



贾先春,周嘉明,智军海,等. 胶体金免疫层析法高通量测定动物肌肉组织中多兽药残留[J]. 南京农业大学学报,2024,47(5):967-978.
JIA Xianchun,ZHOU Jiaming,ZHI Junhai, et al. High-throughput determination of multiple veterinary drug residues in animal muscle tissues by colloidal gold immunochromatographic assay[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2024,47(5):967-978.

胶体金免疫层析法高通量测定动物肌肉组织中多兽药残留

贾先春¹,周嘉明²,智军海²,郝秋艳¹,杨晓芳³,王玮^{1*}

(1.南京农业大学食品科学技术学院/肉品质量控制与新资源创制全国重点实验室/国家肉品质量安全控制工程技术研究中心/农业农村部肉及肉制品质量检验测试中心(南京),江苏南京210095;

2.华测检测认证集团股份有限公司,北京101102;3.新疆维吾尔自治区克孜勒苏柯尔克孜自治州农产品质量安全检验检测中心,新疆维吾尔自治区克孜勒苏柯尔克孜自治州845350)

摘要:[目的]本文旨在建立一种胶体金免疫层析技术高通量测定猪肉、鸡肉组织中8种磺胺类、3种四环素类、2种喹诺酮类和甲氧苄啶药物残留的方法。[方法]动物肌肉组织中磺胺类、四环素类、喹诺酮类和甲氧苄啶经磷酸缓冲液提取,并经含Tween 20的磷酸缓冲液稀释后,与胶体金标记的单克隆抗体结合,抑制抗体与硝酸纤维素膜检测线(T线)上的抗原结合,从而导致T线颜色变化。通过比较T线和质控线(C线)颜色深浅,对试样中多兽药残留进行定性判定。[结果]本试验优化了pH值、抗体添加量、抗原包被量、Tween 20添加量和冻干保护剂种类等关键因素,磺胺类、四环素类、喹诺酮类和甲氧苄啶等药物的检出限分别为50、100、50、35 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$,灵敏度 $\geq 97\%$,假阳性率 $\leq 2\%$,假阴性率 $\leq 3\%$,且与现有标准方法检测结果一致。[结论]该方法操作简便,灵敏度和准确度高,检测时间短且稳定性好,可用于动物肌肉组织中多兽药残留的高通量快速检测。

关键词:多兽药残留;动物肌肉组织;胶体金免疫层析法(GICA);高通量;检测

中图分类号:TS207.3

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)05-0967-12

High-throughput determination of multiple veterinary drug residues in animal muscle tissues by colloidal gold immunochromatographic assay

JIA Xianchun¹,ZHOU Jiaming²,ZHI Junhai²,HAO Qiuyan¹,YANG Xiaofang³,WANG Wei^{1*}

(1.College of Food Science and Technology/State Key Laboratory of Meat Quality Control and Cultured Meat Development/National Center of Meat Quality and Safety Control/Inspection and Testing Center for Quality of Meat-products(Nanjing), Ministry of Agriculture and Rural Affairs,Nanjing Agricultural University,Nanjing 210095,China;

2.Centre Testing International Group Co. Ltd.,Beijing 101102,China;3.Agricultural Products Quality and Safety Inspection and Testing Center,Kizilsu Kirgiz Autonomous Prefecture,Xinjiang Uygur Autonomous Region, Kizilsu Kirgiz Autonomous Prefecture 845350,China)

Abstract:[Objectives]The purpose of this paper was to develop a method for the high-throughput determination of 8 sulfonamides, 3 tetracyclines,2 quinolones and trimethoprim drug residues in pork and chicken tissues by colloidal gold immunochromatographic assay(GICA). [Methods] Sulfonamides, tetracyclines, quinolones and trimethoprim in animal muscle tissues were extracted by phosphate buffer and diluted by phosphate buffer with Tween 20, binding to colloidal gold-labeled monoclonal antibodies and inhibiting the binding of the antibodies to the antigen on the nitrocellulose membrane test line(T-line), which resulted in a change of the color of the T-line. The qualitative determination of poly-veterinary drug residues in the samples was made by comparing the color shades of the T-line and control line(C-line). [Results] This test optimized the key factors such as pH value, antibody addition, antigen encapsulation, Tween 20 addition and type of lyophilized protectant. The limit of detection for sulfonamides, tetracyclines, quinolones and trimethoprim was 50, 100, 50 and 35 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively, and the sensitivity $\geq 97\%$, the false positive rate $\leq 2\%$, the false negative rate $\leq 3\%$, and the method was consistent with the results detected by the existing standard method. [Conclusions] The method was simple with high sensitivity, high precision, short detection time and good stability. It could be used for high-throughput rapid detection of multi-veterinary drug residues in animal muscle tissue.

Keywords: multiple veterinary drug residues; animal muscle tissues; colloidal gold immunochromatography assay(GICA); high-throughput; determination

收稿日期:2023-12-29

基金项目:国家重点研发计划项目(2022YFF1100800)

*通信作者:王玮,副教授,主要从事食品质量安全控制技术研究,E-mail:wangwei821220@njau.edu.cn。

磺胺类、四环素类和喹诺酮类药物作为广谱抗生素,以优良的抗菌能力和低廉的价格成为畜禽养殖中常用的兽药种类^[1]。同时,为增强抗菌效果和减少药物用量,甲氧苄啶常与上述药物联合使用^[2-3]。但部分养殖户在饲养过程中为减少动物死伤而滥用药物,导致动物体内兽药残留严重超标。这些药物会通过食物链蓄积在人体内,对人体健康产生不良影响。例如,磺胺二甲嘧啶被证实具有血液毒性和致癌性^[4];四环素会破坏肝功能,导致胃肠道紊乱^[5];甲氧苄啶会引起骨髓微核抑制反应^[6];恩诺沙星会导致肠道菌群失衡和过敏反应等^[7]。因此,动物性食品中兽药残留问题已成为世界各国关注的焦点和热点。美国、日本、欧盟国家和中国等均对上述药物的残留限量做出了相关规定^[8]。我国《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量:GB 31650—2019》中明确规定磺胺类、四环素类(除多西环素)、恩诺沙星和甲氧苄啶在畜禽肌肉组织中的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)分别为100、200、100、50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ^[9]。当前,我国作为畜禽肉生产和消费大国,肉类总产量约占世界总产量的1/3,且以猪肉和鸡肉消费居多^[10-11],其质量安全问题已影响到我国消费者的身体健康和动物食品的进出口贸易。因此,建立经济高效且能同时检测畜禽肉中多兽药残留的检测方法就显得极为重要和迫切。

动物性食品中磺胺类、四环素类、喹诺酮类及甲氧苄啶残留的检测方法主要分为2大类。一类是仪器检测法,如液相色谱串联质谱法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[12-14]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[15-16]、毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)^[17-19]等。这些方法准确性好,灵敏度高,但均需借助仪器设备在专业实验室中进行,且检测时间较长,不适合快速筛查大批量样品^[20-21]。另一类是利用抗原抗体特异性结合而建立起来的免疫学快速检测方法,此类方法具有检测速度快、操作简便、成本低和效益高等优点。其中,胶体金免疫层析法(colloidal gold immunochromatography assay, GICA)是目前应用最广的快速检测方法,已被普遍用于食品中药物残留的现场监测,但目前检测种类受限,无法满足高通量检测的需求^[22-26]。因此,本试验以猪肉和鸡肉为研究对象,构建一种可同时定性检测动物肌肉组织中磺胺类、四环素类、喹诺酮类及甲氧苄啶残留的GICA法,以期为我国动物性食品中多兽药残留的高通量快速检测及食品安全提供科学支持和技术保障。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

生鲜猪肉、鸡肉购于江苏省南京市农贸市场;阴性猪肉(抽样编号:LXJC032042023020003)和阴性鸡肉(抽样编号:LXJC032042023020006)由农业农村部肉及肉制品质量检验检测中心(南京)提供。

标准品溶液:磺胺二甲嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹恶啉、磺胺索嘧啶;恩诺沙星、环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、盐酸沙拉沙星、洛美沙星、培氟沙星;甲氧苄啶、二甲氧苄氨嘧啶、二甲氧甲基苄胺嘧啶;四环素、金霉素、土霉素、强力霉素。以上标准品溶液质量浓度均为100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,均购于天津阿尔塔科技有限公司。

试剂:磺胺二甲嘧啶抗原、磺胺二甲嘧啶单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)、四环素抗原、四环素 mAb、甲氧苄啶抗原、甲氧苄啶 mAb、恩诺沙星抗原、恩诺沙星 mAb、鸡免疫球蛋白 Y (immunoglobulin Y, IgY)、羊抗鸡 IgY (H+L),均由华测检测认证集团股份有限公司提供;甲醇、乙腈、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠(均为分析纯)购于北京东方事博精细化工有限公司;硼酸、四硼酸钠、柠檬酸三钠(均为分析纯),三羟甲基氨基甲烷(trometamol, Tris)、海藻糖、聚乙二醇、蔗糖、ProClin™ 300 防腐剂,均购于美国 Sigma-Aldrich 公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购于天津康源生物技术有限公司;浓 HCl(质量分数约为37%)、Tween 20(化学纯)、氯金酸(分析纯)购于国药集团化学试剂公司;试验用水均为超纯水。

1.2 仪器与设备

ACQUITY I-X 超高效液相色谱串联质谱仪购于美国 Waters 公司;UV-1800 紫外分光光度计购于日本 Shimadzu 公司;arium® advance EDI 纯水仪购于德国 Sartorius 公司;FEI Tecnai G2 F30 场发射透射电子显微镜购于美国 FEI 公司;HM3035 XYZ 三维划膜喷金仪、ZQ2002 微电脑斩切机、RB45 玻璃纤维膜、SX27 吸水垫购于上海金标生物科技有限公司;聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)底板购于上海捷宁生物科技有限公司;AC-140 硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter membrane, 简称 NC 膜)购于北京艾测星辉生物科技有限公司;LGJ-10 冷冻干燥机购于北京松源华兴科技发展有限公司;DHG-9140A 电热鼓风干燥箱购于上海一恒科学仪器有限公司;TGL-16 高速冷冻离心机购于四川蜀科仪器有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 胶体金溶液制备^[27] 准确移取 0.1 mL $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯金酸溶液于 100 mL 超纯水中, $100 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 5 min 后, 再加入 0.3 mL $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 柠檬酸三钠溶液, 待溶液颜色变为酒红色且保持不变时, 继续加热 15 min, 静置冷却至室温, 然后将胶体金溶液用超纯水定容至 100 mL, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

1.3.2 胶体金质量鉴定^[28] 1) 目视法: 采用目视法观察胶体金溶液是否为清澈无杂质的酒红色, 且存放 2 h 后是否有絮状物的产生, 以此初步判定胶体金的质量。2) 透射电镜法: 准确移取 20 μL 胶体金溶液于附有超薄碳膜的铜网上, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min 后用滤纸吸去残留液, 待室温干燥后将制备好的样品置于透射电镜中, 观察胶体金颗粒大小和均匀度, 有无颗粒的聚集情况, 从而最终判定胶体金的质量。

1.3.3 金标抗体制备与质量鉴定 1) 金标抗体制备^[29]: 分别移取 3 mL 胶体金溶液于 5 个 5 mL 离心管中, 用硼酸缓冲液调节溶液至最适 pH 值, 分别加入羊抗鸡 IgY、磺胺二甲嘧啶 mAb、四环素 mAb、甲氧苄啶 mAb 和恩诺沙星 mAb, 摇匀, 室温静置 30 min; 再加入 150 μL $0.1 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ BSA 封闭 30 min, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min, 弃上清液, 沉淀用金标抗体复溶液 [$1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 聚乙二醇、 $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 海藻糖、 $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ BSA、 $0.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ProClin™ 300 防腐剂和 0.3% (体积分数) Tween 20, 由 $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 值为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液配制] 重悬, 分别制备出 5 种金标抗体溶液。

2) 金标抗体质量鉴定^[20]: 用扫描波长为 450~750 nm 的可见光扫描金标抗体溶液, 观察其光谱曲线是否光滑, 与胶体金相比在最大吸收峰处是否发生位置偏移, 以此判定金标抗体是否制备成功。

1.3.4 胶体金免疫层析法(GICA)检测卡制备 GICA 检测卡的结构如图 1 所示, 具体制备步骤如下:

1) 金标微孔制备^[29]: 将 5 种金标抗体溶液等体积混匀, 准确移取 25 μL 加入金标微孔, 再加入 50 μL 冻干保护剂, 混匀后置于冷冻干燥机中, $-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冻 3 h, $-55 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 24 h 后待用。

2) NC 膜包被: 整个试验过程中喷涂量均设定为 $0.5 \mu\text{L}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。首先将磺胺二甲嘧啶抗原、四环素抗原、甲氧苄啶抗原和恩诺沙星抗原按顺序依次喷涂在 NC 膜上作为检测线(T 线), 再将 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 鸡 IgY 喷涂到 NC 膜上作为质控线(C 线), $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘干待用。

3) GICA 检测卡组装: 将 NC 膜、结合垫、样品垫、吸水纸按照顺序依次粘贴在 PVC 底板上, 每个连接处均重叠 1 mm。将组装好的长板切成 4 mm 宽的试纸条, 装上外壳, 密封干燥保存。

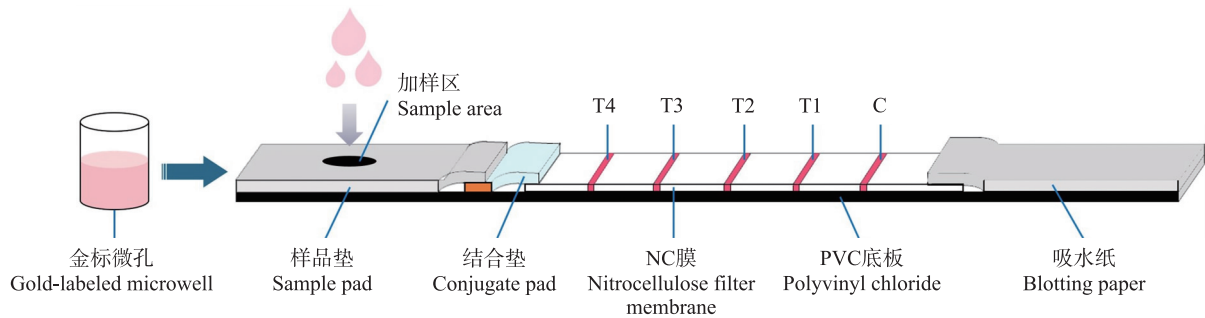


图 1 胶体金免疫层析法(GICA)检测卡结构示意图

Fig. 1 Schematic structure of colloidal gold immunochromatography assay (GICA) test card

C. 质控线 Control line; T1. 磺胺二甲嘧啶检测线 Test line of sulfamethazine; T2. 四环素检测线 Test line of tetracycline; T3. 甲氧苄啶检测线 Test line of trimethoprim; T4. 恩诺沙星检测线 Test line of enrofloxacin. 下同 The same as follows.

1.3.5 样品分析与结果判定 1) 样品前处理: 准确称取 1.00 g 均质样品于 15 mL 离心管中, 加入 4 mL 磷酸缓冲液 ($50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH 8.0), 振荡提取 2 min, $4\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min; 取 100 μL 上清液于 1 mL 含 Tween 20 的磷酸缓冲液中, 涡旋混匀 10 s, 作为待测液。

2) 样品检测与结果判定: 吸取 150 μL 待测液于金标微孔, 抽吸 8~10 次至微孔的试剂完全溶解, 室温孵育 2 min; 从金标微孔中吸取 80 μL 反应液滴加于检测卡加样区, 室温反应 6 min, 通过目视法对结果进行判定(图 2)。若 C 线显色比 T 线强, 则为阳性; 若 C 线显色比 T 线弱或相当, 则为阴性; 若 C 线不显色, 则检测结果无效。

1.3.6 GICA 检测条件优化 1) pH 值的优化: 将硼酸溶液与四硼酸钠溶液按不同的体积比分别配制 pH 值为 7.8~10.0 的硼酸缓冲液, 按照 1.3.3 节和 1.3.5 节分别进行金标抗体制备和分析检测。通过观察 T 线和 C 线的显色情况, 确定金标抗体制备的最佳 pH 值。

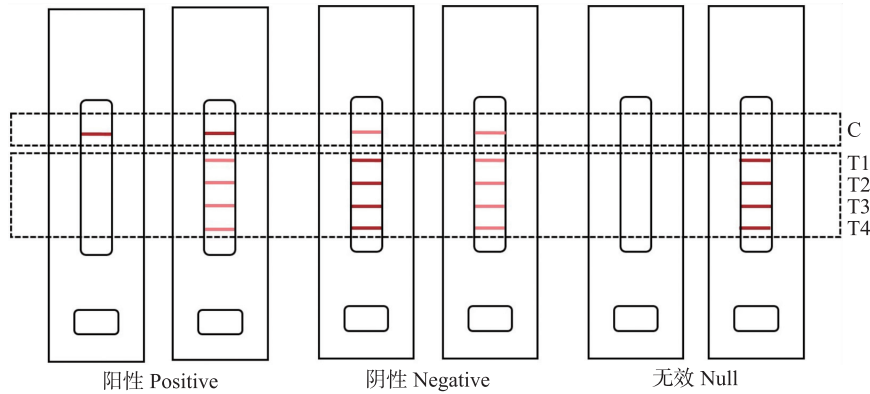


图2 目视判定示意图

Fig. 2 Schematic diagram of visual determination

2) 抗体添加量的优化: 为确保 C 线的显色稳定, 在预试验基础上将羊抗鸡 IgY 添加量设定为 $5.0 \mu\text{g}$, 然后分别添加不同含量的磺胺二甲嘧啶 mAb ($1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 \mu\text{g}$)、四环素 mAb ($2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 \mu\text{g}$)、甲氧苄啶 mAb ($3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 15.0 \mu\text{g}$)、恩诺沙星 mAb ($2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 \mu\text{g}$), 按照 1.3.3 节制备金标抗体。将磺胺二甲嘧啶、四环素、甲氧苄啶和恩诺沙星的标准品溶液用磷酸缓冲液分别稀释至 $1.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 作为阳性对照, 并以磷酸缓冲液作为空白对照, 按照 1.3.5 节进行分析检测。根据 T 线和 C 线显色以及加标抑制情况, 确定金标抗体制备的最佳抗体添加量。

3) 抗原包被量的优化: 将 4 种抗原用磷酸缓冲液分别进行 4 个梯度稀释, 即磺胺二甲嘧啶抗原: $0.01, 0.05, 0.10, 0.20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 四环素抗原: $0.05, 0.10, 0.25, 0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 甲氧苄啶抗原: $0.10, 0.20, 0.40, 0.80 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 恩诺沙星抗原: $0.10, 0.25, 0.50, 1.00 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 并将其分别喷涂到 NC 膜上形成 T 线。将磺胺二甲嘧啶、四环素、甲氧苄啶和恩诺沙星的标准品溶液用磷酸缓冲液分别稀释至 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 作为阳性对照, 并以磷酸缓冲液作为空白对照, 按照 1.3.5 节进行分析检测。根据 T 线和 C 线显色以及加标抑制情况, 确定抗原的最佳包被量。

4) Tween 20 添加量的优化: 分别移取 $0, 10, 30, 50, 70 \mu\text{L}$ Tween 20 于 10 mL 磷酸缓冲液中混匀, 配制不同浓度的样品稀释液。将样品稀释液与金标抗体混匀孵育 2 min , 滴加于检测卡加样区, 并根据反应液的层析情况以及 T 线和 C 线的显色情况, 确定样品稀释液中最佳表面活性剂的含量。

5) 冻干保护剂的优化: 在最佳 pH 值和抗体添加量条件下, 按照 1.3.3 节制备金标抗体, 对蔗糖、BSA 和甘露醇的用量进行优化。选取 4 种冻干保护剂组合, 分别为保护剂 A (1.0 g 蔗糖 + 0.5 g BSA + 0.5 g 甘露醇)、保护剂 B (0.5 g 蔗糖 + 1.0 g BSA + 0.5 g 甘露醇)、保护剂 C (0.5 g 蔗糖 + 0.5 g BSA + 1.0 g 甘露醇) 和保护剂 D (1.0 g 蔗糖 + 1.0 g BSA + 1.0 g 甘露醇)。将上述 4 种冻干保护剂分别用 10 mL 磷酸缓冲液溶解, 吸取 $50 \mu\text{L}$ 与微孔中金标抗体混匀后冻干。采用磷酸缓冲液作为样品待测液, 按照 1.3.5 节进行分析检测, 以不添加保护剂的金标抗体作为对照组, 根据 T 线和 C 线的显色情况, 分析不同冻干保护剂用量的保护效果。

1.3.7 性能评价 1) 检出限: 基于已建立的 GICA 方法, 分别以阴性猪肉和鸡肉为基质, 开展 4 种药物的系列梯度加标试验, 即磺胺二甲嘧啶加标量: $0, 10.0, 20.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 四环素加标量: $0, 20.0, 50.0, 100.0, 150.0, 200.0, 250.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 恩诺沙星加标量: $0, 10.0, 20.0, 50.0, 75.0, 100.0, 150.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 甲氧苄啶加标量: $0, 5.0, 10.0, 20.0, 35.0, 50.0, 100.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。按照 1.3.5 节对样品进行分析与结果判定, 以 T 线颜色明显小于 C 线时的最低浓度作为本方法的检出限。

2) 交叉反应: 基于已建立的 GICA 方法, 分别以阴性猪肉和鸡肉为基质, 开展药物的交叉反应试验。选取磺胺二甲嘧啶的结构类似药物 (磺胺甲基嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺邻二甲基嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺喹恶啉和磺胺索嘧啶), 各药物加标量均为 $20.0, 50.0, 500.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 四环素的结构类似药物 (金霉素、土霉素和强力霉素), 各药物加标量均为 $50.0, 100.0, 1000.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 恩诺沙星的结构类似药物 (环丙沙星、诺氟沙星、氧氟沙星、盐酸沙拉沙星、洛美沙星和培氟沙星), 各药物加标量均为 $20.0, 50.0, 500.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; 甲氧苄啶的结构类似药物 (二甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄氨嘧啶), 各药物加标量均为 $5.0, 35.0, 350.0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 按照 1.3.5 节对样品进行分析与结果判定, 以验证该方法的交叉反应情况。

3) 稳定性:随机选取5个批次的检测卡干燥密封,分别置于4℃、20℃(室温)和37℃储存,30 d后取出备用。选用1倍检出限加标样品(加标量:磺胺二甲嘧啶 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、四环素 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、恩诺沙星 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、甲氧苄啶 35.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和阴性样品各6份,分别按照1.3.5节对样品进行分析与结果判定,以验证该方法的稳定性。

4) 与参比方法一致性分析:随机选取阴性猪肉和鸡肉各4份,每个基质分别设置空白样品和3个加标样品(磺胺二甲嘧啶加标量:50.0、100.0、150.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;四环素加标量:100.0、200.0、300.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;恩诺沙星加标量:50.0、100.0、150.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$;甲氧苄啶加标量:35.0、50.0、75.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。采用本方法和国家现行有效标准^[30-31]对同一样品进行测定,以分析评价该方法与参比方法的一致性。

5) 其他性能指标:选取阴性猪肉和鸡肉各100份。设置空白样品,0.5倍检出限、1倍检出限和1倍MRL 3个浓度,每个基质每个浓度各25份。按照1.3.5节对样品进行分析与结果判定,并根据《市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见》^[32]计算得出该方法的灵敏度、假阳性率和假阴性率。灵敏度是指方法在试验条件下达到实际检出限时,检出阳性结果的阳性样品数占总阳性样品数的百分比;假阳性率是指方法在试验条件下达到检出限时,阴性样品中检出阳性结果的最大概率(以百分比计);假阴性率是指方法在试验条件下达到检出限时,阳性样品中检出阴性结果的最大概率(以百分比计)。

1.3.8 方法的实际应用 选用市售生鲜猪肉和鸡肉各5份,按照1.3.5节对样品进行分析与结果判定,并采用参比方法对其检测结果进行确证,以评价该方法的实际应用效果。

2 结果与分析

2.1 胶体金质量鉴定

通过目视观察,胶体金溶液呈酒红色,溶液清澈透明,无杂质,放置2 h后未出现絮状物,初步判定胶体制备成功(图3-A);从透射电镜扫描结果可知:胶体金颗粒大小均匀,平均粒径为18 nm,未发生聚集现象,无其他杂质,说明胶体金制备成功(图3-B)。

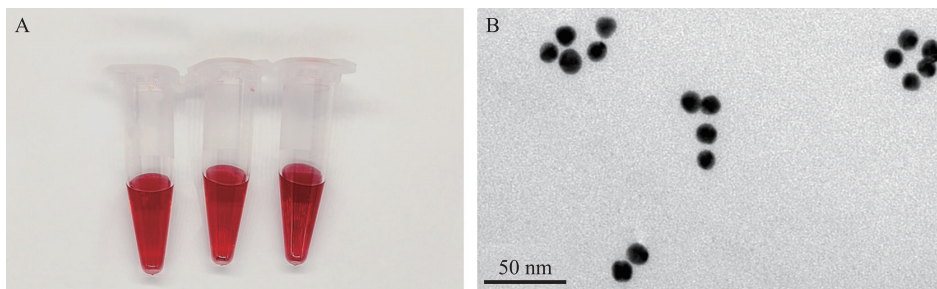


图3 胶体金溶液(A)和胶体金透射电镜扫描图(B)

Fig. 3 Colloidal gold solution(A) and transmission electron microscope scanning image of colloidal gold(B)

2.2 金标抗体质量鉴定

为鉴定金标抗体是否制备成功,采用紫外可见分光光度计对其进行光谱扫描。由图4可见:胶体金和金标抗体溶液的吸收光谱均为光滑曲线,胶体金的最大吸收峰出现在519 nm处,而胶体金标记的羊抗鸡IgY、磺胺二甲嘧啶 mAb、四环素 mAb、甲氧苄啶 mAb 和恩诺沙星 mAb 的最大吸收峰则分别出现在528、527、527、531 和 526 nm处。金标抗体的最大吸收峰发生红移说明其物质内部结构发生改变,证实金标抗体制备成功。

2.3 GICA 检测条件优化

2.3.1 pH 值的优化 由图5可知:当胶体金溶液的pH值为8.1时,胶体金标记磺胺二甲嘧啶 mAb、四环素 mAb 和甲氧苄啶 mAb 的显色强度最高;当胶体金溶液的pH值分别为7.8和8.7时,胶体金标记羊抗鸡IgY 和恩诺沙星 mAb 的显色强度最明显。因此,本试验选用7.8、8.1、8.1、8.1、8.7分别作为羊抗鸡IgY、磺胺二甲嘧啶 mAb、四环素 mAb、甲氧苄啶 mAb 和恩诺沙星 mAb 金标抗体制备时的最适pH值。

2.3.2 抗体添加量的优化 由图6可知:当磺胺二甲嘧啶 mAb、四环素 mAb、甲氧苄啶 mAb 和恩诺沙星 mAb 的添加量分别为2.0、6.0、12.0、6.0 μg 时,空白对照的T线显色清晰,且阳性对照的抑制效果好,未发生非特异性显色,可满足目视法判定。

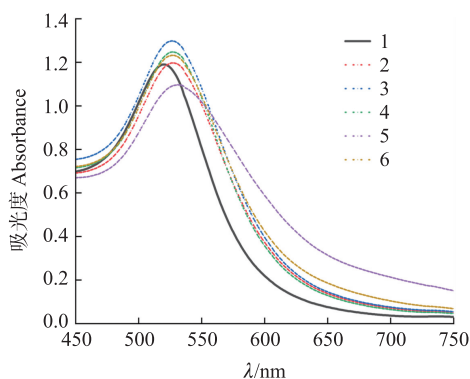


图 4 胶体金与金标抗体的紫外可见吸收光谱

Fig. 4 UV-visible absorption spectra of colloidal gold and gold-labeled antibodies

1. 胶体金 Colloidal gold; 2. 胶体金-羊抗鸡 IgY Colloidal gold-goat anti-chicken IgY; 3. 胶体金-磺胺二甲嘧啶 mAb Colloidal gold-sulfamethazine mAb; 4. 胶体金-四环素 mAb Colloidal gold-tetracycline mAb; 5. 胶体金-甲氧苄啶 mAb Colloidal gold-trimethoprim mAb; 6. 胶体金-恩诺沙星 mAb Colloidal gold-enrofloxacin mAb.

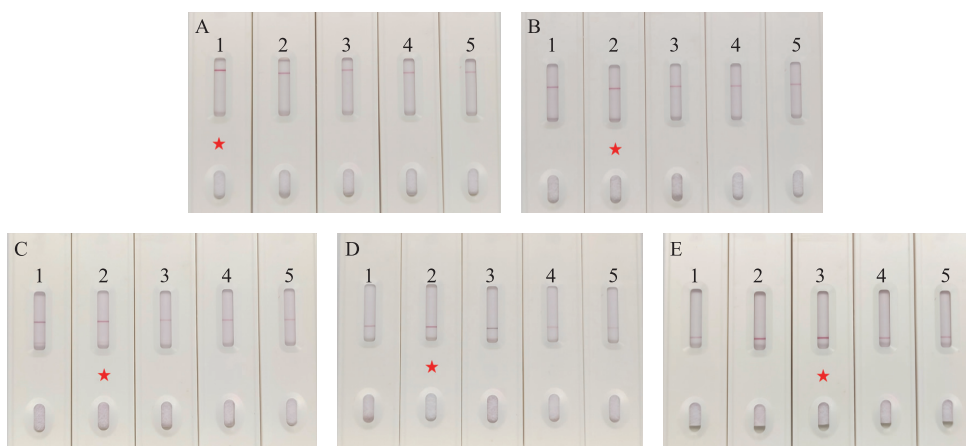


图 5 pH 值优化结果

Fig. 5 Results of pH value optimization

A. 羊抗鸡 IgY Goat anti-chicken IgY; B. 磺胺二甲嘧啶 mAb Sulfamethazine mAb; C. 四环素 mAb Tetracycline mAb; D. 甲氧苄啶 mAb Trimethoprim mAb; E. 恩诺沙星 mAb Enrofloxacin mAb.
1~5 表示 pH 值分别为 7.8、8.1、8.7、9.0、10.0。pH value from 1 to 5 is 7.8, 8.1, 8.7, 9.0, 10.0, respectively.
星号表示最适 pH 值。The asterisk indicates the optimum pH value.

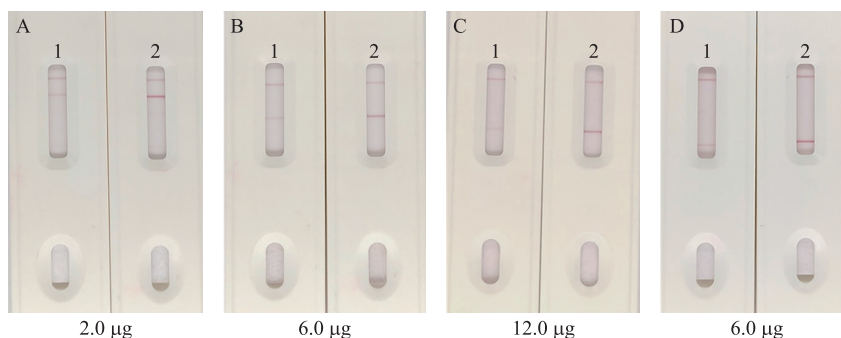


图 6 最适抗体添加量结果

Fig. 6 Results of optimal antibody addition

A. 磺胺二甲嘧啶 mAb Sulfamethazine mAb; B. 四环素 mAb Tetracycline mAb; C. 甲氧苄啶 mAb Trimethoprim mAb; D. 恩诺沙星 mAb Enrofloxacin mAb. 1. 阳性对照 Positive control; 2. 空白对照 Blank control.

2.3.3 抗原包被量的优化 由图 7 可知:当磺胺二甲嘧啶抗原、四环素抗原、甲氧苄啶抗原和恩诺沙星抗原的包被量分别为 0.20、0.25、0.10、0.50 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,空白对照的 T 线显色清晰,且阳性对照的抑制效果好,未出现非特异性显色,可实现目视法判定。

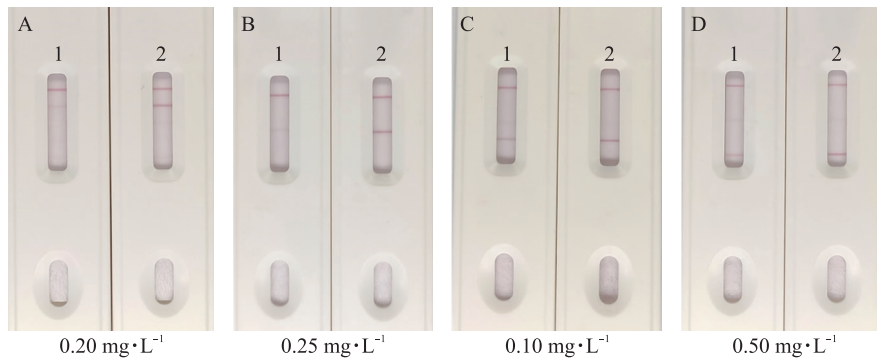


图 7 最适抗原包被量结果

Fig. 7 Results of optimal antigen encapsulation

A. 磺胺二甲嘧啶抗原 Sulfamethazine antigen; B. 四环素抗原 Tetracycline antigen; C. 甲氧苄啶抗原 Trimethoprim antigen; D. 恩诺沙星抗原 Enrofloxacin antigen. 1. 阳性对照 Positive control; 2. 空白对照 Blank control.

2.3.4 Tween 20 添加量的优化 由图 8 可知:当样品稀释液中不加 Tween 20 时,金标抗体在 NC 膜上发生堵塞;而当稀释液中添加 Tween 20 时,堵塞现象消失。但同时也发现随着 Tween 20 添加量的增大,T 线和 C 线的显色均有不同程度减弱,影响其检测结果的准确性。因此,本试验选择堵塞现象消失时的最小添加量作为最适 Tween 20 添加量,即 10 μL 。

2.3.5 冻干保护剂的优化 由图 9 可知:直接冻干的金标抗体在检测时发生显色减弱,直接影响目视判定;添加保护剂的金标抗体虽然显色清晰,但保护剂 B、C、D 却能引起胶体金颗粒聚沉,导致显色变黑,易作出假阴性判定。因此,本试验选择保护剂 A(1.0 g 蔗糖+0.5 g BSA+0.5 g 甘露醇)作为金标抗体的冻干保护剂。

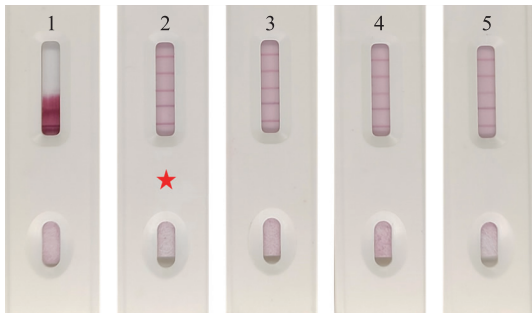


图 8 Tween 20 不同添加量的检测结果

Fig. 8 Results of Tween 20 at different spiked levels

1~5 代表 Tween 20 添加量分别为 0、10、30、50、70 μL 。

The amount of Tween 20 from 1 to 5 is 0, 10, 30, 50, 70 μL , respectively.

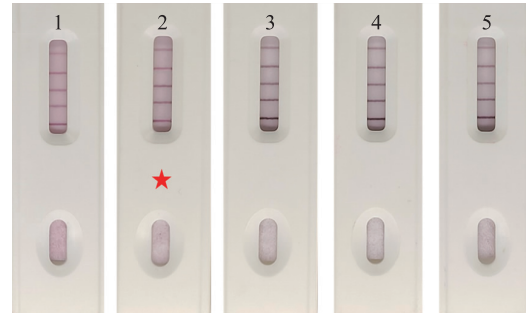


图 9 不同冻干保护剂的检测结果

Fig. 9 Results of different lyophilized protective agents

1~5 分别代表未添加保护剂以及添加保护剂 A(1.0 g 蔗糖+0.5 g BSA+0.5 g 甘露醇)、保护剂 B(0.5 g 蔗糖+1.0 g BSA+0.5 g 甘露醇)、保护剂 C(0.5 g 蔗糖+0.5 g BSA+1.0 g 甘露醇)和保护剂 D(1.0 g 蔗糖+1.0 g BSA+1.0 g 甘露醇)。

Number 1 to 5 represent no protective agent and adding the protective agent A (1.0 g sucrose+0.5 g bovine serum albumin+0.5 g mannitol), protective agent B (0.5 g sucrose+1.0 g bovine serum albumin+0.5 g mannitol), protective agent C (0.5 g sucrose+0.5 g bovine serum albumin+1.0 g mannitol) and protective agent D (1.0 g sucrose+1.0 g bovine serum albumin+1.0 g mannitol).

2.4 性能评价

2.4.1 检出限 由表 1 可知:磺胺二甲嘧啶、四环素、恩诺沙星和甲氧苄啶在猪肉和鸡肉基质中的检出限均分别为 50.0、100.0、50.0、35.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.4.2 交叉反应 由表 2 可知:磺胺二甲嘧啶与其 7 种结构类似药物在加标水平为 50.0~500.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时均存在交叉反应;四环素与其 3 种结构类似药物在加标水平 50.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时均无交叉反应,但在加标水平为 100.0~1 000.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,发现四环素与土霉素和金霉素存在交叉反应;恩诺沙星与其 6 种结构类似药物在加标水平 20.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时均无交叉反应,而在加标水平为 50.0~500.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,发现恩诺沙星与环丙沙星存在交叉反应;甲氧苄啶与其 2 种结构类似药物在加标水平为 5.0~350.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时均无交叉反

应。除目标药物外,本方法还同时适用于7种磺胺类、2种四环素类和1种喹诺酮类药物残留的测定。

表1 4种抗生素药物的检出限($n=3$)

Table 1 Detection limit of 4 antibiotic drugs($n=3$)

基质 Matrix	抗生素药物 Antibiotic drugs	添加水平/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Spiked level	检测结果 Test results	基质 Matrix	抗生素药物 Antibiotic drugs	添加水平/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Spiked levels	检测结果 Test results
猪肉 Pork	磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	0.0	-	鸡肉 Chicken	磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	0.0	-
		10.0	-			10.0	-
		20.0	-			20.0	-
		50.0	+			50.0	+
	四环素 Tetracycline	0.0	-		四环素 Tetracycline	0.0	-
		20.0	-			20.0	-
		50.0	-			50.0	-
	恩诺沙星 Enrofloxacin	100.0	+		恩诺沙星 Enrofloxacin	100.0	+
		0.0	-			0.0	-
		10.0	-			10.0	-
	甲氧苄啶 Trimethoprim	20.0	-		甲氧苄啶 Trimethoprim	20.0	-
		50.0	+			50.0	+
		0.0	-			0.0	-
		5.0	-			5.0	-
		10.0	-			10.0	-
	20.0	-		20.0	-		
	35.0	+		35.0	+		

注:+:阳性 Positive;-:阴性 Negative. 下同 The same as follows.

表2 交叉反应试验结果($n=3$)

Table 2 Cross-reactivity results($n=3$)

目标化合物 Target compounds	结构类似药物 Structural analogs	添加水平/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Spiked levels	检测结果 Test results
磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	磺胺甲基嘧啶 Sulfamerazine, 磺胺嘧啶 Sulfadiazine, 磺胺邻二甲嘧啶 Sulfadoxine, 磺胺二甲氧嘧啶 Sulfadimethoxine, 磺胺间甲氧嘧啶 Sulfadimethoxyipyrimidine, 磺胺喹恶啉 Sulfaquinoxaline, 磺胺索嘧啶 Sulfisomidine	20.0	-
		50.0	+
		500.0	+
四环素 Tetracycline	强力霉素 Doxycycline	50.0	-
		100.0	-
	土霉素 Oxytetracycline, 金霉素 Chlortetracycline	1 000.0	-
恩诺沙星 Enrofloxacin	环丙沙星 Ciprofloxacin	50.0	-
		50.0	+
		500.0	+
甲氧苄啶 Trimethoprim	诺氟沙星 Norfloxacin, 氧氟沙星 Ofloxacin, 盐酸沙拉沙星 Sarafloxacin Hydrochloride, 洛美沙星 Lomefloxacin, 培氟沙星 Pefloxacin	20.0	-
		50.0	-
		500.0	-
甲氧苄啶 Trimethoprim	二甲氧苄氨嘧啶 Diaveridine, 二甲氧甲基苄胺嘧啶 Ormetoprim	5.0	-
		35.0	-
		350.0	-

2.4.3 稳定性 选用加标和阴性样品验证检测卡在不同温度下的储存稳定性。由表3可知:药物的添加水平为1倍检出限时,检测结果呈阳性,且检测同一样品时,不同批次检测卡检测结果相同。根据阿伦尼乌斯经验公式,按照37℃下保存1d等同于室温(20℃)下7d,可推算出该检测卡在室温、密封、干燥环境条件下至少可保存7个月。

2.4.4 GICA方法与参比方法一致性分析 为证实GICA方法的准确性,分析比对本方法与参比方法的检测结果。由表4可知:GICA方法与参比方法的检测结果一致,符合率达到100%。

2.4.5 其他性能指标 本方法按照《市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见》计算各项性能指标。根据表5中数据分别计算得出:灵敏度 $\geq 97\%$ 、假阳性率 $\leq 2\%$ 、假阴性率 $\leq 3\%$ (表6)。

表3 不同温度下检测卡稳定性试验($n=6$)Table 3 Stability test of detection card at different temperatures($n=6$)

抗生素药物 Antibiotic drugs	添加水平/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Spiked level	检测结果 Test results		
		4 °C	20 °C	37 °C
磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	50.0	+	+	+
四环素 Tetracycline	100.0	+	+	+
恩诺沙星 Enrofloxacin	50.0	+	+	+
甲氧苄啶 Trimethoprim	35.0	+	+	+

表4 GICA与参比方法检测样品中4种抗生素药物的含量($n=3$)Table 4 Determination of 4 antibiotic drugs contents in samples by GICA and comparison method($n=3$)

抗生素药物 Antibiotic drugs	基质 Matrix	添加水平/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Spiked level	GICA方法 GICA method	参比方法检测结果/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$ Test results of comparison method
磺胺二甲嘧啶 Sulfamethazine	猪肉 Pork	0.0	-	ND
		50.0	+	53.18±1.60
		100.0	+	92.68±3.21
		150.0	+	143.77±5.14
		0.0	-	ND
		50.0	+	46.67±3.65
四环素 Tetracycline	鸡肉 Chicken	100.0	+	90.80±4.76
		150.0	+	153.75±4.68
		0.0	-	ND
		100.0	+	102.12±5.07
		200.0	+	192.24±4.10
		300.0	+	294.31±15.09
恩诺沙星 Enrofloxacin	猪肉 Pork	0.0	-	ND
		100.0	+	51.83±0.57
		100.0	+	98.89±6.05
		150.0	+	142.46±6.80
		0.0	-	ND
		50.0	+	49.45±1.86
甲氧苄啶 Trimethoprim	鸡肉 Chicken	100.0	+	101.89±2.55
		150.0	+	143.50±11.76
		0.0	-	ND
		35.0	+	30.37±2.95
		50.0	+	52.21±2.20
		75.0	+	70.94±5.16
		0.0	-	ND
		35.0	+	30.12±2.40
		50.0	+	52.93±1.70
		75.0	+	67.18±3.23

注:ND;未检出 Not detected. 下同 The same as follows.

表5 阳性和阴性样品试验结果

Table 5 Test result of positive and negative samples

样品情况 Sample situation	检测结果 Test results								总数 Total
	阳性 Positive				阴性 Negative				
	A	B	C	D	A	B	C	D	
阳性 Positive	99	99	97	99	1	1	3	1	100
阴性 Negative	2	1	1	1	98	99	99	99	100
总数 Total	101	100	98	100	99	100	102	100	200

注:A. 磺胺二甲嘧啶;B. 四环素;C. 恩诺沙星;D. 甲氧苄啶。

Note:A. Sulfamethazine;B. Tetracycline;C. Enrofloxacin;D. Trimethoprim.

表6 快速检测方法性能指标评价结果

Table 6 Performance index evaluation results of rapid detection methods

%

性能指标 Performance index	评价结果 Evaluation results			
	A	B	C	D
灵敏度 Sensitivity	99	99	97	99
假阳性率 False positive rate	2	1	1	1
假阴性率 False negative rate	1	1	3	1

注:A. 磺胺二甲嘧啶;B. 四环素;C. 恩诺沙星;D. 甲氧苄啶。

Note: A. Sulfamethazine; B. Tetracycline; C. Enrofloxacin; D. Trimethoprim.

2.5 方法的实际应用

为验证本方法的实际应用效果,在市场上随机分别选取5份猪肉和鸡肉作为供试材料,采用本试验建立的方法进行检测。由表7可知:参比方法在1份猪肉中检出四环素($33.77 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),但因其残留量低于本方法的检出限($100.0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$),故GICA检测结果为阴性;其余供试样品中均未检出磺胺类、四环素类、甲氧苄啶和喹诺酮类药物残留。

表7 市售生鲜肉中药物残留的检测结果($n=3$)Table 7 Detection results of drug residues for municipal sold fresh meat($n=3$)

基质 Matrix	序号 No.	磺胺类 Sulfonamides		四环素类 Tetracyclines		喹诺酮类 Fluoroquinolones		甲氧苄啶 Trimethoprim	
		GICA	参比方法 Comparison method	GICA	参比方法 Comparison method	GICA	参比方法 Comparison method	GICA	参比方法 Comparison method
猪肉 Pork	1	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	2	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	3	-	ND	-	33.77 ± 1.85	-	ND	-	ND
	4	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	5	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
鸡肉 Chicken	6	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	7	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	8	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	9	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND
	10	-	ND	-	ND	-	ND	-	ND

3 结论

本研究通过优化pH值、免疫试剂用量和表面活性剂用量等因素,建立一种GICA高通量定性检测8种磺胺类药物、3种四环素类药物、2种喹诺酮类药物和甲氧苄啶残留的方法。该方法的检出限满足《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量:GB 31650—2019》的规定和要求,灵敏度 $\geq 97\%$,假阳性率 $\leq 2\%$,假阴性率 $\leq 3\%$,稳定性至少可达7个月。在市售食品检测时发现,该方法的检测结果与参比方法一致。而且,此方法可在15 min内完成样品前处理和分析检测,无需借助设备,即可目视判定结果。因此,本方法的建立有助于解决动物肌肉组织中多种抗生素残留现场快速筛查的技术难题,同时也为其他药物残留检测技术研究提供新的技术思路,对于我国动物性食品进出口贸易和保障消费者健康安全具有重要意义。

参考文献 References:

- [1] Wang C, Li X M, Peng T, et al. Latex bead and colloidal gold applied in a multiplex immunochromatographic assay for high-throughput detection of three classes of antibiotic residues in milk[J]. Food Control, 2017, 77: 1-7.
- [2] 赵振升, 陈直, 吴朝阳, 等. 甲氧苄啶对部分抗菌药的抗菌增效作用[J]. 河南农业科学, 2006, 35(2): 111-112.
Zhao Z S, Chen Z, Wu Z Y, et al. Antibacterial synergistic effect of trimethoprim on some antibacterial drugs[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2006, 35(2): 111-112 (in Chinese).
- [3] 林平, 边保华, 汪旭明, 等. 甲氧苄啶对氟喹诺酮类药物的增效实验观察[J]. 中国热带医学, 2005, 5(9): 1823-1824, 1846.
Lin P, Bian B H, Wang X M, et al. Experimental observation on the synergistic action of trimethoprim to fluoroquinolones[J]. China Tropical Medicine, 2005, 5(9): 1823-1824, 1846 (in Chinese with English abstract).
- [4] He T, Cui P L, Zhang S, et al. Development of a receptor based signal amplified fluorescence polarization assay for multi-detection of 35 sulfonamides in pork[J]. Food Chemistry: X, 2023, 19: 100867.

- [5] Song J Y, Liu X F, Zhang X Y, et al. A smartphone-assisted paper-based ratio fluorescent probe for the rapid and on-site detection of tetracycline in food samples[J]. *Talanta*, 2023, 265: 124874.
- [6] 谢敏, 费丹, 徐俊, 等. 基于量子点微球免疫层析法快速灵敏检测鸡肉中甲氧苄啶[J]. *分析实验室*, 2024, 43(1): 30-35.
Xie M, Fei D, Xu J, et al. Quantum dots-based lateral flow assay for the rapid and sensitive detection of trimethoprim in chicken muscle[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2024, 43(1): 30-35 (in Chinese with English abstract).
- [7] Wu S Z, Mao J, Zhang Y Q, et al. Sensitive electrochemical detection of enrofloxacin in eggs based on carboxylated multi-walled carbon nanotubes-reduced graphene oxide nanocomposites; molecularly imprinted recognition versus direct electrocatalytic oxidation [J]. *Food Chemistry*, 2023, 413: 135579.
- [8] 汤晓艳, 郑铨, 王敏, 等. 畜禽产品兽药残留限量标准现状与发展方向[J]. *食品科学技术学报*, 2017, 35(4): 8-12.
Tang X Y, Zheng X, Wang M, et al. Current situations and development on standards of veterinary drugs maximum residue limits in animal products[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2017, 35(4): 8-12 (in Chinese with English abstract).
- [9] 中华人民共和国农业农村部, 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量: GB 31650—2019[S]. 北京: 中国标准出版社, 2019.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, The National Health Commission of the People's Republic of China, The State Administration for Market Regulation. National food safety standard maximum residue limits for veterinary drugs in foods: GB 31650-2019[S]. Beijing: Standards Press of China, 2019 (in Chinese).
- [10] 郝旺, 石自忠, 杨健卿, 等. 非洲猪瘟疫情对中国居民肉类消费的影响[J]. *农业现代化研究*, 2023, 44(1): 142-152.
Hao W, Shi Z Z, Yang J Q, et al. Impacts of African swine fever on meat consumption of Chinese consumers [J]. *Research of Agricultural Modernization*, 2023, 44(1): 142-152 (in Chinese with English abstract).
- [11] 刘九生. 国际禽肉消费市场需求分析[J]. *中国畜牧业*, 2020(10): 42-44.
Liu J S. Analysis on international demand of poultry meat consumption market [J]. *China Animal Industry*, 2020(10): 42-44 (in Chinese with English abstract).
- [12] Zhao X L, Wang J Y, Wang J P, et al. Development of water-compatible molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of six sulfonamides in animal-derived foods [J]. *Journal of Chromatography A*, 2018, 1574: 9-17.
- [13] Han R W, Zheng N, Yu Z N, et al. Simultaneous determination of 38 veterinary antibiotic residues in raw milk by UPLC-MS/MS [J]. *Food Chemistry*, 2015, 181: 119-126.
- [14] Guidi L R, Santos F A, Ribeiro A C S R, et al. Quinolones and tetracyclines in aquaculture fish by a simple and rapid LC-MS/MS method [J]. *Food Chemistry*, 2018, 245: 1232-1238.
- [15] Yu H, Mu H, Hu Y M. Determination of fluoroquinolones, sulfonamides, and tetracyclines multiresidues simultaneously in porcine tissue by MSPD and HPLC-DAD [J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 2(1): 76-81.
- [16] Saridal K, Ulusoy H İ. A simple methodology based on cloud point extraction prior to HPLC-PDA analysis for tetracycline residues in food samples [J]. *Microchemical Journal*, 2019, 150: 104170.
- [17] Xu X Y, Liu L H, Jia Z M, et al. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in foods of animal origin by capillary electrophoresis with field amplified sample stacking-sweeping technique [J]. *Food Chemistry*, 2015, 176: 219-225.
- [18] Liu L H, Wan Q, Xu X Y, et al. Combination of micelle collapse and field-amplified sample stacking in capillary electrophoresis for determination of trimethoprim and sulfamethoxazole in animal-originated foodstuffs [J]. *Food Chemistry*, 2017, 219: 7-12.
- [19] Yang S X, Ma S Y, Zhu K L, et al. Simultaneous enrichment/determination of six sulfonamides in animal husbandry products and environmental waters by pressure-assisted electrokinetic injection coupled with capillary zone electrophoresis [J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2020, 88: 103462.
- [20] Pang Y M, Zhao S J, Liu Z W, et al. An enhanced immunochromatography assay based on colloidal gold-decorated polydopamine for rapid and sensitive determination of gentamicin in animal-derived food [J]. *Food Chemistry*, 2022, 387: 132916.
- [21] Ding L, Zhao Y Y, Li H H, et al. A highly selective ratiometric fluorescent probe for doxycycline based on the sensitization effect of bovine serum albumin [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 416: 125759.
- [22] Li H P, Wu J Y, Meng F P, et al. Immunochromatographic assay for the detection of antibiotics in animal-derived foods; a review [J]. *Food Control*, 2021, 130: 108356.
- [23] 叶茂, 沈晓玲, 陈青舟, 等. 胶体金免疫层析法同时检测果蔬中四种农药残留 [J]. *食品工业科技*, 2023, 44(6): 300-308.
Ye M, Shen X L, Chen Q Z, et al. Simultaneous determination of four pesticide residues in fruits and vegetables by colloidal gold immunochromatography [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2023, 44(6): 300-308 (in Chinese with English abstract).
- [24] 何晓婷, 陈子键, 黄松, 等. 基于纳米抗体的胶体金免疫层析法快速检测蔬菜中腐霉利 [J]. *食品科学*, 2023, 44(8): 307-316.
He X T, Chen Z J, Huang S, et al. Rapid detection of procymidone in vegetables by nanobody-based colloidal gold immunochromatography assay [J]. *Food Science*, 2023, 44(8): 307-316 (in Chinese with English abstract).
- [25] Zeng Y Y, Liang D M, Zheng P M, et al. A simple and rapid immunochromatography test based on readily available filter paper modified with chitosan to screen for 13 sulfonamides in milk [J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(1): 126-133.

- [26] 樊海新,李寒松,李复辉,等. 伏马菌素 B₁ 胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 南京农业大学学报,2015,38(3):483-490. DOI:10.7685/j.issn.1000-2030.2015.03.020.
Fan H X,Li H S,Li F H,et al. Development of golden immunochromatographic strip for determination of fumonisin B₁[J]. Journal of Nanjing Agricultural University,2015,38(3):483-490(in Chinese with English abstract).
- [27] Wang W,Fan B C,Zhang X H,et al. Development of a colloidal gold immunochromatographic assay strip using monoclonal antibody for rapid detection of porcine deltacoronavirus[J]. Frontiers in Microbiology,2023,13:1074513.
- [28] 栗慧,于苗,刘培,等. 胶体金免疫层析法快速检测动物源性食品中土霉素残留[J]. 食品安全质量检测学报,2022,13(5):1524-1530.
Li H,Yu M,Liu P,et al. Rapid detection of oxytetracycline residues in animal derived foods by colloidal gold immunochromatography[J]. Journal of Food Safety & Quality,2022,13(5):1524-1530(in Chinese with English abstract).
- [29] 周嘉明,封冰,智军海. 三氯杀螨醇胶体金免疫快速检测试纸条研制及在茶叶中的应用[J]. 食品安全质量检测学报,2020,11(15):5337-5342.
Zhou J M,Feng B,Zhi J H. Development of dicofol colloidal gold immune rapid detection test strip and its application in tea[J]. Journal of Food Safety & Quality,2020,11(15):5337-5342(in Chinese with English abstract).
- [30] 中华人民共和国农业农村部,国家卫生健康委员会,国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 动物性食品中四环素类、磺胺类和喹诺酮类药物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法:GB 31658.17-2021[S]. 北京:中国农业出版社,2021.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's republic of China,The National Health Commission of the People's republic of China, The State Administration for Market Regulation. National food safety standard Determination of tetracyclines,sulfonamides and fluoroquinolones residues in animal derived food by liquid chromatography-tandem mass spectrometric method:GB 31658.17-2021[S]. Beijing:Agriculture Press of China,2021(in Chinese).
- [31] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,国家认证认可监督管理委员会. 进出口动物源性食品中二甲氧苄氨嘧啶、三甲氧苄氨嘧啶和二甲氧甲基苄胺嘧啶残留量的检测方法 液相色谱-质谱/质谱法:SN/T 2538-2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
The General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantine of the People's Republic of China,The National Certification and Accreditation Administration. Determination of sulfonamides potentiator residues in animal origin foodstuffs for import and export LC-MS/MS: SN/T 2538-2010[S]. Beijing:Standards Press of China,2010(in Chinese).
- [32] 国家市场监督管理总局. 市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见[EB/OL]. (2023-01-29)[2024-01-08]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxgk/fdzdgknr/spcjs/art/2023/art_f6261b2078ba4f2fb68e028e7bead1f5.html.
The State Administration for Market Regulation. Opinions of the State Administration for Market Regulation on standardizing the use of rapid food detection[EB/OL]. (2023-01-29)[2024-01-08]. https://www.samr.gov.cn/zw/zfxgk/fdzdgknr/spcjs/art/2023/art_f6261b2078ba4f2fb68e028e7bead1f5.html(in Chinese).

责任编辑:范雪梅