

实验技术与方法

用于水产品中硝基呋喃类代谢物检测的
胶体金快速检测试剂板的研制张敏¹, 桑丽雅², 王振国², 王伟萍², 盛慧萍², 柳爱春³

(1. 河南省郑州市农产品质量检测流通中心, 河南 郑州 450000; 2. 杭州南开日新生物技术有限公司, 浙江 杭州 310022; 3. 杭州市农业科学研究院, 浙江 杭州 310024)

摘要:目的 本文采用胶体金免疫层析技术, 研制了一种水产品中硝基呋喃代谢物四合一免疫胶体金快速检测试剂板。方法 将制备的羊抗鼠 IgG、人工结合抗原和金标抗体三者经过反复调试优化, 以适宜浓度和包被量分别包被到硝酸纤维素(NC)膜和微孔中。包被后的 NC 膜和样品垫、胶体金结合垫、吸水垫及其他辅料组装成试纸条。结果 经试验, 该四合一试剂板对水产品中呋喃唑酮代谢物(AOZ)、呋喃西林代谢物(SEM)、呋喃它酮代谢物(AMAZ)和呋喃妥因代谢物(AHD)的检出限分别为 1.0、1.0、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结论 试剂板具有快速、准确、灵敏度高的特点, 适用于大批量水产样品中硝基呋喃代谢物的检测。

关键词:硝基呋喃类代谢物; 胶体金免疫层析; 水产品; 药物残留

中图分类号: R155.5 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2013)01-0032-05

Development and application of colloidal gold rapid test strip for nitrofurans metabolites in aquatic products

Zhang Min, Sang Liya, Wang Zhengguo, Wang Weiping, Sheng Huiping, Liu Aichun
(Zhengzhou Farm Products Quality Inspection Distribution Center, Zhengzhou 450000, China)

Abstract: Objective Based on GICA technology, we developed a four-in-one colloidal gold test strip for rapid detection of nitrofurans metabolites in aquatic products. **Methods** Goat anti-mouse IgG, artificially conjugated antigen and the gold labeled antibody were coated onto nitrocellulose membrane and micropores, the concentration and the amount of coating were optimized, and the sample pad, the colloidal gold conjugate pad, the absorbent pad and other accessories were then assembled into test strip. **Results** The results showed that the detection limits for aquatic AOZ, SEM, AMAZ and AHD were 1.0, 1.0, 1.0 and 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectively. **Conclusion** The test strip is rapid, accurate and high sensitivity, suitable for the detection of nitrofurans metabolites in the large of aquatic samples.

Key words: Nitrofurans metabolites; colloidal gold; aquatic products; drug residues

硝基呋喃类化合物(Nitrofurans)包括呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃它酮等, 是一类广谱性合成抗菌剂, 因有非常好的抗菌作用和药动力学的特性, 曾经被广泛应用作为禽类、水产和猪促生长的添加剂。但在长时间的实验研究过程中发现, 硝基呋喃类药物和代谢物均可以使实验动物发生癌变和基因突变^[1-3]。水产品养殖过程中使用该药物后, 由于其代谢产物会与蛋白组织结合而累积在体内, 人食用后可直接导致人体发病。此类药物残留问题越来越引起人们的关注。

联合国粮农组织、世界卫生组织食品添加剂专家联席委员会、欧盟都已规定了禁止在动物养殖中使用硝基呋喃类药物。呋喃唑酮、呋喃它酮在中国农业部第193号公告^[4]和第235号公告^[5]中被列为动物性食品中不得检出的兽药。目前, 欧盟对硝基呋喃及代谢物的MPRL值为1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。尽管我国从2003年起每年都将水产品中硝基呋喃类代谢物纳入残留监控计划中, 但由于部分企业对此重视不够, 国内水产养殖企业中仍有使用硝基呋喃类药物, 药残超标问题一次次困扰着水产品出口企业。

目前, 硝基呋喃类化合物及其代谢物的检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)法及液-质联用(LC-MS)法等^[6-8]。然而, 这些方法需要较长的检测时间、繁琐的检测步骤及相应昂贵的实验设备, 并被限制在实验室中使用。本文制备了硝基呋喃

收稿日期: 2012-07-23

作者简介: 张敏 女 本科 农艺师 研究方向为农产品质量安全检测 E-mail: jczxzhangmin@126.com

通信作者: 盛慧萍 女 本科 研究方向为食品安全质量安全快速检测 E-mail: huipingsheng@126.com

代谢物四合一胶体金快速检测试剂板,试剂板检测限符合要求,检测时间短,检测过程中无需昂贵的仪器设备,适合现场快速检测。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂

呋喃唑酮代谢物(AOZ)、呋喃西林代谢物(SEM)、呋喃妥因代谢物(AHD)、呋喃它酮代谢物(AMOZ)、牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、氯金酸($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)、羊抗鼠 IgG 均购自美国 Sigma 公司;聚乙二醇 20000 购自华东医药有限公司;硝酸纤维素膜、胶体金结合垫、样品垫均购于 Millipore 公司;抗呋喃唑酮代谢物单抗、抗呋喃西林代谢物单抗、抗呋喃妥因代谢物单抗、抗呋喃它酮代谢物单抗均由杭州南开日新生物技术有限公司提供。

1.1.2 仪器

Avanti J-26XP 高速冷冻离心机、UV-2802 紫外连续扫描分光光度计、78HW-1 恒温磁力搅拌器、恒温鼓风干燥箱、BioJet XYZ3000 型点膜仪、切割机。

1.2 方 法

1.2.1 硝基呋喃类药物特异性结合抗原的制备及鉴定

衍生化:将 0.2 mmol AOZ 盐酸盐溶于 4 ml 0.1 mol/L 盐酸溶液中,加入 19 mg 4-硝基苯甲醛(溶于 200 μl 二甲基亚砜);37 $^{\circ}\text{C}$ 避光水解衍生约 16 h;用 1 mol/L NaOH 或 1 mol/L HCl 调 pH 至 7.0 左右;真空干燥。

重氮化偶联 NPAOZ 和 BSA:0.1 mmol NPAOZ 中加 2 ml 吡啶溶解,再加入 5 ml 1 mol/L HCl,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,磁力搅拌下分批加入 200 mg Zn 粉,继续搅拌 20 min;取上清,旋转蒸发;用 3 ml 0.1 mol/L HCl 重溶(调 pH 1~2 左右),4 $^{\circ}\text{C}$ 冷却;逐滴加入预冷的 0.5 mol/L NaNO_2 溶液 2 ml,搅拌反应至淀粉碘化钾试纸呈灰蓝色,约 20 min(可继续搅拌 30 min);称取 50 mg BSA 溶于 5 ml 0.1 mol/L pH 10.0 碳酸盐缓冲液中;将重氮物逐滴加入到 BSA 中,加适量 0.5 mol/L NaOH 维持 pH 值;磁力搅拌反应 6 h;用 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液透析 3 d。

NPSEM-BSA、NPAMOZ-BSA 和 NPAHD-BSA 的制备方法同 NPAOZ-BSA。

合成的硝基呋喃类药物特异性结合抗原稀释成 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (蛋白浓度),然后做 200~400 nm 波长的紫外扫描。比较硝基呋喃代谢物半抗原、载体蛋白和偶联物的紫外光谱图,判断偶联是否成功。

1.2.2 抗体-胶体金标记物的制备

胶体金溶液的制备:柠檬酸三钠法^[9]。

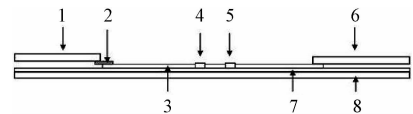
标记前将抗硝基呋喃代谢物单抗溶液以 15 000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min,取上清液;取已制备好的胶体金溶液 100 ml,用 0.1 mol/L K_2CO_3 和 0.1 mol/L HCl 将胶体金溶液的 pH 值调至 8.0。按最适抗体标记量边搅拌边加入 0.5 mg 抗硝基呋喃代谢物单抗,加入蛋白质时应逐滴加入,1 mg 的蛋白质大约 5 min 加完;在搅拌下加入 5% 的 BSA 使其终浓度为 1%,或加入 3% 聚乙二醇(PEG MW20000)使其终浓度为 0.05%;12 000 rpm 离心 25 min,弃上清液;加入 10 ml 0.01 mol/L pH 7.4 的 PBS 缓冲液(含 0.4 mol/L PEG 20000),12 000 rpm 离心 25 min,弃上清液,如此洗涤 2~4 次,以彻底除去未结合的蛋白质;将沉淀用 10 ml 含 2% BSA 的 PBS 缓冲液(pH 7.4,0.01 mol/L)溶解;用 0.22 μm 无菌过滤器过滤后,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 试剂板各组分的优化和组装

NPSEM-BSA、NPAMOZ-BSA、NPAHD-BSA、NPAOZ-BSA(T 线)、羊抗鼠 IgG(C 线)和金标抗体包被量的选择方法如下:

在 T 线粗调范围 0.6~1.0 mg/ml 内和 C 线粗调范围 0.8~2.0 mg/ml 内,选择一组质量浓度,按常规喷量 1.0 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 包被到 NC 膜上,60 $^{\circ}\text{C}$ 干燥箱放置 2 h。将制备好的金标抗体选择不同包被量(8 $\mu\text{l}/\text{孔}$ ~12 $\mu\text{l}/\text{孔}$ 、 $\text{OD}_{525\text{nm}} = 25$)包被到酶标板微孔中,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱干燥 12 h。

将 NC 膜与样品垫、空白胶体金结合垫、吸水垫、底板组装成试纸条,按图 1 所示。4 种硝基呋喃代谢物检测试纸条和上下两块模板组装成四合一试剂板,见图 2。用 0.01 mol/L、pH 7.4 的磷酸盐(PBS)缓冲液和含 1.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 硝基呋喃代谢物的标准品溶液各 100 μl 充分溶解微孔中的金标抗体后分别进行试纸条滴定,观察显色变化和试纸条灵敏度,反复调试,最终选择显色深浅适中、灵敏度最高、梯度最大的一组质量浓度作为最终配比。



1. 样品垫(Sample pad);2. 胶体金结合垫(Colloidal gold conjugate pad);3. 硝酸纤维素膜(NC membrane);
4. 检测线(Test line);5. 控制线(Control line);6. 吸水垫(Absorbent pad);7. 不干胶(Stickers);
8. PVC 底板(PVC soleplate)

图 1 免疫胶体金快速检测试剂板结构示意图

Figure 1 Structure diagram of colloidal gold rapid test device



图2 硝基呋喃代谢物四合一胶体金快速检测试剂板实物照片

Figure 2 The picture of nitrofuran metabolites colloidal gold rapid test device

1.2.4 样品衍生化条件的确定

称取 2 g 水产样品作为供试试样,添加硝基呋喃代谢物标准品,添加浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$,同时做空白对照样。分别用 2-硝基苯甲醛(2-NP)、4-硝基苯甲醛(4-NP)、4-羧基苯甲醛(4-CP)作为衍生化试剂对样本进行相应处理,每种衍生化试剂用量设置 5、10、20、100 mol/L 各 0.1 ml 4 个梯度,处理条件为: 37 $^{\circ}\text{C}$ 处理 16 h^[10],样品处理后,用本研究制备的试剂板进行测定,确定最适衍生化试剂。然后,将衍生化时间设置 37、55、60、65 $^{\circ}\text{C}$ 下各 30、60、90、120 min 和 16 h 5 个梯度,同理,确定最适衍生化温度、时间。

1.2.5 样品前处理

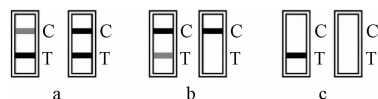
取鱼、虾及鸡肉的可食肌肉部分,用均质机均质;称取 2 g 均质后样本于 50 ml 离心管中,并加入 4 ml 去离子水,0.5 ml 1 mol/L 盐酸溶液,0.1 ml 样本衍生化试剂,充分混合 3 min;60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下孵育 1 h;取出后加入 5 ml 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液,0.4 ml 1 mol/L 氢氧化钠溶液,6 ml 乙酸乙酯,充分混合 1 min,4 000 r/min,离心 5 min;移取上层溶液 3 ml 于 5 ml 离心管中,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴或空气吹干仪中,用氮气或空气吹干;向吹干的试管中加入 1 ml 正己烷,加盖振荡 1 min,然后加入 0.5 ml PBST 缓冲液,充分混匀,4 000 r/min,离心 1 min(或静置至明显分层);吸取 0.4 ml 下层溶液,待检。

1.2.6 检测步骤及结果判断

吸取 400 μl 待检样品溶液分别加入到 4 种包被了不同硝基呋喃代谢物金标抗体的微孔中(4 种金标微孔分别包被 AOZ、SEM、AHD 和 AMOZ 单

抗),每种微孔加入 100 μl ,用滴管吹打均匀,静置反应 5 min,吸取孔内全部混合溶液于对应试剂板加样孔中,加样后开始计时,结果应在 5 ~ 8 min 时间内读取,其他时间判读无效。

肉眼观察样品检测结果,当待检水产样检测线(T线)比控制线(C线)深或一样深为阴性(表明不含此种硝基呋喃代谢物残留或者残留量小于检测限),见图 3a;检测线(T线)比控制线(C线)浅,或检测线(T线)无显色为阳性(表明此种硝基呋喃代谢物残留量大于检测限),见图 3b。未出现 C 线,见图 3c,可能是操作不当或试剂条已失效,应重新进行测定。



C. 控制线(Control line); T. 检测线(Test line)

图3 免疫胶体金快速检测试剂板结果判断图

Figure 3 Result judge of colloidal gold rapid test device

1.2.7 检出限测定

取经 LC-MS/MS 法^[10]确证的阴性水产样品(硝基呋喃代谢物含量小于 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$),分别添加 AOZ、SEM、AHD 和 AMOZ 标准品溶液制成含量为 0、0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的样品各 10 个,样品处理后用本研究制备的四合一试剂板进行测定,确定检出限。

1.2.8 与仪器方法的比对

随机取 10 份水产样品,作为供试试样。每份样品分别用 LC-MS/MS 法和本研究制备的呋喃唑酮代谢物四合一快速检测试剂板进行检测,比较检测结果。

2 结果与分析

2.1 硝基呋喃类药物特异性结合抗原的鉴定

以呋喃唑酮代谢物为例,NPAOZ、BSA 和 NPAOZ-BSA 的紫外扫描图谱见图 4。经分析,

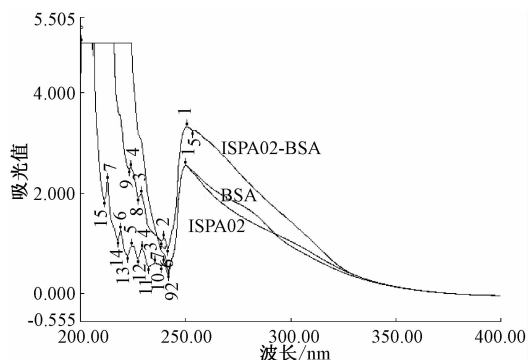


图4 NPAOZ、BSA 和 NPAOZ-BSA 的紫外扫描图谱
Figure 4 UV absorbency spectrum of NPAOZ, BSA and NPAOZ-BSA

NPAOZ 的特征吸收波峰 255 nm, BSA 的特征吸收波峰接近 278 nm, 偶联后 NPAOZ-BSA 的特征吸收波峰发生偏移, 根据吸光度加合性原理, 表明偶联成功。

2.2 样品衍生化条件

样品衍生化条件测试结果见表 1 和表 2, 结果表明, 4-NP 衍生效果最好, 选择 10 mol/L、0.1 ml 即可满足衍生所需。考虑到试剂板作为快速检测试剂, 结合检测效果, 选择 60 °C 60 min 为最佳衍生化温度和时间。

表 1 衍生化试剂和用量测试结果

Table 1 The test result of derivatization reagent and dosage

试剂种类	试剂浓度 (mol/L)			
	5	10	20	100
2-NP	阳性, 梯度 ++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++
4-NP	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++
4-CP	阴性	阳性, 梯度 +	阳性, 梯度 +	阳性, 梯度 +

注: 试剂用量为 0.1 ml; 显色梯度从大到小分别用 + + + +、+ + +、+ +、+ 表示。

表 2 衍生化时间和温度测试结果

Table 2 The test results of time and temperature for derivatization

时间	温度 (°C)			
	37	55	60	65
30 min	阴性	阴性	阳性, 梯度 +	阳性, 梯度 +
60 min	阴性	阳性, 梯度 ++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 ++
90 min	阴性	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 ++
120 min	阳性, 梯度 +	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 ++
16 h	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +++	阳性, 梯度 +

注: 显色梯度从大到小分别用 + + + +、+ + +、+ +、+ 表示。

2.3 样品前处理的优化

样品提取方法分酶解和酸解, 其中酸解常用稀盐酸。提取过程中有机溶剂和 pH 是影响提取的两大因素。向稀盐酸中添加加入甲醇或乙酸乙酯等有机溶剂, 利于提高回收率。本研究选取毒性小的乙酸乙酯作为提取剂, 在用量上设置了梯度, 实验发现, 5 ml 乙酸乙酯即可满足提取需求, 但后续移取 2.5 ml 上层液较困难, 容易将下层溶液吸出来, 而提取剂用量过多又会影响后续吹干步骤所需的时间, 最终选取提取剂用量为 6 ml。

2.4 检出限

硝基咪唑代谢物四合一胶体金快速检测试剂板的检出限试验结果见表 3, 相应试剂板显色结果见图 5。结果表明, 四合一试剂板测定阴性水产样品和 0.5 μg/kg 阳性添加样品均显示阴性, 测定 1.0 μg/kg 阳性添加样品除 AHD 外均显示阳性, 测定 2.0 μg/kg 阳性添加样品均显示阳性, 故此四合一试剂板对水产样品中 AOZ、SEM、AMOZ 和 AHD 的检出限分别为 1.0、1.0、1.0、2.0 μg/kg。

表 3 硝基咪唑代谢物四合一胶体金快速检测试剂板的检出限试验结果

Table 3 The result of detection limit test for colloidal gold rapid test device

添加物质	添加浓度 (μg/kg)	样品总数 (个)	阴性结果数量 (个)	阳性结果数量 (个)	阳性检出率 (%)
AOZ	0	10	10	0	0
	0.5	10	10	0	0
	1.0	10	0	10	100
	2.0	10	0	10	100
SEM	0	10	10	0	0
	0.5	10	10	0	0
	1.0	10	0	10	100
	2.0	10	0	10	100
AMOZ	0	10	10	0	0
	0.5	10	10	0	0
	1.0	10	0	10	100
	2.0	10	0	10	100
AHD	0	10	10	0	0
	0.5	10	10	0	0
	1.0	10	10	0	0
	2.0	10	0	10	100



图 5 试剂板检测显色结果

Figure 5 The chromogenic results of test strip

2.5 与仪器方法的比对

10 份水产盲样经液相色谱-串联质谱法检测, 其中 7 份样品未检出硝基呋喃代谢物残留, 样品 S-4 检出 AOZ 含量 1.81 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、SEM 含量 2.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$,

样品 S-5 检出 AOZ 含量 2.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 样品 S-8 检出 SEM 含量 3.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。这些样品同时用硝基呋喃代谢物四合一胶体金快速检测试剂板检测, 结果与液相色谱-串联质谱法完全符合, 见表 4。

表 4 硝基呋喃代谢物四合一胶体金快速检测试剂板与液相色谱-串联质谱法的盲样检测结果比较

Table 4 The result of blind sample analysis by LC-MS/MS and colloidal gold rapid test device

方法	样品编号									
	S-1	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10
仪器方法 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	未检出	未检出	未检出	AOZ: 1.81 SEM: 2.05	AOZ: 2.53	未检出	未检出	SEM: 3.13	未检出	未检出
四合一试剂板	-	-	-	AOZ: + SEM: + AMOZ: - AHD: -	AOZ: + SEM: - AMOZ: - AHD: -	-	-	AOZ: - SEM: + AMOZ: - AHD: -	-	-

注: “+”表示阳性, “-”表示阴性。

3 讨论

本研究制备的硝基呋喃代谢物四合一胶体金快速检测试剂板, 利用层析式免疫竞争抑制原理, 通过抗原和金标抗体反应显色, 可同时测定水产品中 AOZ、AMOZ、SEM 和 AHD 4 种硝基呋喃代谢物, 其检出限分别为: AOZ 含量 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、SEM 含量 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、AMOZ 含量 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、AHD 含量 2.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。本试剂板具有特异性高、前处理简单、检测周期短、灵敏度高、对操作人员要求低、不需要昂贵的仪器设备等优点, 特别适合广大基层部门对水产样品进行大规模筛选。目前, 该方法只能进行定性检测, 可以用于样本检测的初筛。

参考文献

[1] 倪奕昌, 邵葆若. 硝基呋喃的遗传毒理学性质[J]. 国外医学药学分册, 1981, 3: 148-152.
[2] 苏荣茂. 硝基呋喃类药物残留的危害及管理对策[J]. 福建农业, 2006, 12: 24.
[3] 戴欣, 李改娟. 水产品中硝基呋喃类药物残留的危害、影响以

及控制措施[J]. 吉林水利, 2011, 9: 61-62.
[4] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告 第 193 号 食品动物禁用的兽药及其它化合物清单[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
[5] 中华人民共和国农业部. 中华人民共和国农业部公告 第 235 号 动物食品中兽药最高残留限量[S]. 北京: 中国标准出版社, 2002.
[6] 杨琳, 傅红, 刘强. 水产品及其苗种中硝基呋喃代谢物的高效液相色谱法-串联质谱法测定[J]. 食品科学, 2010, 31(12): 206-211.
[7] 张林田, 黄少玉, 陈建伟, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中硝基呋喃类代谢物[J]. 理化检测(化学分册), 2009, 45(11): 1311-1314.
[8] 孙涛, 胡开峰, 乔昆云, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定水产品中硝基呋喃代谢物残留[J]. 分析仪器, 2010, 5: 27-31.
[9] 檀尊社, 陆恒, 邵伟, 等. 胶体金免疫层析法快速检测水产品中四环素类药物残留[J]. 西北农业学报, 2010, 19(8): 32-37.
[10] 中华人民共和国农业部. 农业部 783 号公告-1-2006. 水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定液相色谱-串联质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.