

胶体金试纸条快速检测食品中磺胺二甲基嘧啶残留

林晓丽¹, 饶辉², 熊勇华¹, 陈媛³, 刘文娟³, 赖卫华^{1,*}

(1.南昌大学 食品科学与技术国家重点实验室, 江西 南昌 330047; 2.江西省兽药饲料监察所, 江西 南昌 330029;
3.江西中德生物工程有限公司, 江西 南昌 330029)

摘要: 目的: 旨在建立一种快速、简便的针对磺胺二甲基嘧啶残留的检测方法。方法: 应用竞争抑制免疫层析原理, 研制磺胺二甲基嘧啶胶体金试纸条。结果: 该试纸条检测限为 10 ng/mL、检测时间 5 min, 与其他磺胺类药物交叉反应小, 可用于多种食品样本的检测, 且样本检测限为 100 μ g/kg。结论: 该方法操作简便、灵敏度高且特异性强, 可实现对食品样品中磺胺二甲基嘧啶残留的快速检测。

关键词: 磺胺二甲基嘧啶; 胶体金; 试纸条; 快速检测

Rapid Detection of Sulfadimidine Residue in Food by Colloidal Gold Strips

LIN Xiao-li¹, RAO Hui², XIONG Yong-hua¹, CHEN Yuan³, LIU Wen-juan³, LAI Wei-hua^{1,*}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047, China;
2. Jiangxi Provincial Institute of Veterinary Drug and Feed Control, Nanchang 330029, China;
3. Jiangxi Zodolabs Biological Engineering Co. Ltd., Nanchang 330029, China)

Abstract: Objective: To establish a rapid and convenient detection method for sulfadimidine residue in food. Methods: The colloidal gold strip for specific sulfadimidine was developed successfully on the basis of competitive inhibition immunochromatography mechanism. Results: The detection limit of the colloidal gold strip was 10 ng/mL for sulfadimidine within less than 5 min, which also had low cross-reactivity with other sulfonamides. The colloidal gold strip could be used in rapid detection of sulfadimidine residue in many kinds of food samples with detection limit of 100 μ g/kg. Conclusion: This method is characteristics of simplicity, high sensitivity and specificity to achieve the rapid detection of sulfadimidine residue in food.

Key words: sulfadimidine; colloidal gold; strip; rapid detection

中图分类号: TS207.7

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)24-0366-04

磺胺二甲基嘧啶作为一种广谱抑菌剂, 具有稳定性好、口服易吸收且价格低廉等优点, 常被用于预防和控制畜禽疾病^[1]。食品中磺胺二甲基嘧啶的残留直接影响甚至威胁到消费者的健康。我国规定了畜禽产品中磺胺二甲基嘧啶的最高残留限量为 100 μ g/kg^[2], 欧盟也对磺胺类药物在畜禽产品中的残留作出了严格的规定^[3]。目前, 磺胺类药物的残留检测方法主要有酶联免疫方法(ELISA)^[4]、高效液相色谱法(HPLC)^[5]、气质联用法(GC-MS)^[6]、液质联用法(HPLC-MS)^[7]等, 但这些方法操作繁琐、费时, 不适于快速、简便地进行大批量样品的检测。本研究基于胶体金免疫层析技术, 拟研制出从组

织样本、蜂蜜、蛋类中快速检测磺胺二甲基嘧啶残留的胶体金试纸条。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

BALB/c 小鼠(6 周龄, 雄性) 扬州大学动物实验中心; 蛋类、蜂蜜、牛肉 江西省南昌市农产品检测中心; 猪肉、鸡肉 江西省兽药饲料监察所; 鱼肉、虾肉 江西省水产品质量安全检测中心。

磺胺二甲基嘧啶(SM₂)、PEG20000、福氏完全佐剂、福氏不完全佐剂 Sigma 公司; 牛血清白蛋白(BSA)

收稿日期: 2010-08-02

基金项目: 教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目(IRT0540); 南昌市重大产业化项目(2009)

作者简介: 林晓丽(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: fub5@163.com

* 通信作者: 赖卫华(1968—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品质量与安全。E-mail: talktolaiwh@163.com

北京新经科生物公司; 氯金酸(HAuCl_4) 天津市福晨化学试剂厂; 柠檬酸三钠 北京化工试剂公司; 硝酸纤维膜(NC膜)、胶金垫、样品垫、滤纸、吸水纸及PVC底板 Millipore 公司。

1.2 仪器与设备

XYZ3000 型三维喷点平台、试纸条切割机 Biodot 公司; 除湿机 日本川井公司; 真空干燥机 上海森信实验仪器有限公司; 电热恒温鼓风干燥箱 上海福玛实验设备有限公司; 包装机 丰兴包装机械材料有限公司; 磁力搅拌加热器 江苏金坛市金城国盛实验仪器厂; 高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器总厂; 紫外-可见分光光度计 上海棱光技术有限公司。

1.3 实验准备

1.3.1 人工抗原的制备

利用重氮法合成 SM_2 与 BSA 的偶联物^[8], 具体方法如下: 用 0.2mol/L NaOH 溶液溶解 5mg SM_2 , 加入 NaNO_2 溶液混匀, 避光搅拌, 将混合液逐滴加入到已预冷的 0.2mol/L HCl 溶液中, 4℃避光反应 3h, 得重氮化 SM_2 ; 称取适量的 BSA 溶于 PBS 中, 预冷后边搅拌边逐滴加入重氮化 SM_2 中, 调 pH8.0, 4℃避光反应过夜; 反应产物用 PBS 透析 3d, 得到纯化的 SM_2 -BSA。

1.3.2 单克隆抗体的制备

将 SM_2 -BSA 偶联物免疫 BALB/c 小鼠, 取小鼠脾脏细胞与 SP2/O 小鼠骨髓细胞融合, 融合细胞在选择性培养液中培养 7~14d, 采用间接竞争 ELISA 方法筛选分泌抗体的杂交细胞株, 杂交细胞株进行三次克隆化, 将克隆细胞株注入小鼠腹腔产生腹水。所得腹水用辛酸硫酸铵法纯化后, 加等体积甘油, 于 -20℃保存备用。

1.3.3 胶体金的制备^[9]

在 1L 圆底烧瓶中加入 500mL 0.01g/100mL HAuCl_4 溶液, 加热煮沸后立即加入 1g/100mL 柠檬酸三钠溶液, 溶液颜色由浅黄变为蓝色, 蓝色逐渐加深, 最后变为红色; 当溶液颜色完全变为透明的红色时, 继续回流 10min 后停止加热, 冷却至室温。

1.3.4 金标抗体的制备

取胶体金至干净烧杯中, 用 0.2mol/L K_2CO_3 溶液将 pH 值调至 7.0, 室温条件下边搅拌边逐滴加入抗 SM_2 -Ab, 继续搅拌反应 1h 后, 按 1/10 体积逐滴加入 10g/100mL BSA, 搅拌反应 30min; 5000r/min 离心 30min, 小心吸去上清液, 加入重悬液, 得到抗 SM_2 金标抗体。

1.3.5 试纸条的组装

用三维喷点平台将 SM_2 -BSA 和驴抗鼠二抗喷在 NC 膜上, 分别作为检测 T 线与质控 C 线, 30℃干燥箱干燥过夜; 同时将抗 SM_2 金标抗体喷在胶金垫上, 30℃真空干燥 1.5h; 将 NC 膜、胶金垫、样品垫、滤纸、

吸水纸及 PVC 底板组装好后, 切成 4mm 宽后装卡, 置于锡箔袋中, 加干燥剂密封, 于 4~30℃保存。

1.3.6 检测方法

将试纸条平放, 往样本池中加入 80 μL 样本, 反应 5min 即可判读结果。当样品中 SM_2 质量浓度大于 10ng/mL 时, 则质控 C 线显色且检测 T 线不出现条带, 结果为阳性; 当样品中 SM_2 质量浓度小于 10ng/mL 时, 质控 C 线显色且检测 T 线出现红色条带, 结果为阴性; 若质控 C 线不显色, 说明操作不当或者试纸条失效。

1.3.7 样本前处理方法^[10-12]

组织样本的处理: 取切碎的组织样本于均质机以 10000r/min 均质 1min; 称取 1.0g 均质物置于离心管中, 加入 4mL 乙腈, 涡旋振荡 5min; 室温条件下 4000r/min 离心 5min, 移取 1.25mL 上清液至另一新离心管中, 55℃条件下氮气吹干; 向残留物中加入 1mL 正己烷, 涡动 30s, 再加入 1mL 磷酸盐缓冲液, 振荡 1min; 室温条件下 4000r/min 离心 10min, 取下层液相, 用磷酸盐缓冲液稀释 4 倍后检测。

蜂蜜样本的处理: 称取 1.0g 均质物置于离心管中, 加入 4mL 乙腈, 涡旋振荡 5min; 室温下 4000r/min 离心 5min, 移取 1.25mL 上清液至另一新离心管中, 55℃条件下氮气吹干; 往残留物中加入 1mL 正己烷, 振荡 30s, 再加入 1mL 磷酸盐缓冲液, 涡动 1min; 室温条件下 4000r/min 离心 10min, 取下层液相, 用磷酸盐缓冲液稀释 4 倍后检测。

蛋类样本的处理: 蛋类样本去壳后, 用均质机 500r/min 匀浆 20s, 使蛋清和蛋黄充分混合; 称取 1.0g 均质物置于离心管中, 加入 5mL 磷酸盐缓冲液, 手动轻摇 20min, 避免乳化; 室温条件下 4000r/min 离心 10min, 取上清液用磷酸盐缓冲液稀释 4 倍后检测。

1.4 评价实验

1.4.1 灵敏度

将 SM_2 标准品稀释成 5、8、10、15、20、50、100ng/mL, 另设阴性对照, 用试纸条进行检测。分别从 3 个不同批次随机抽取试纸条, 每组做两个重复实验, 根据结果判断试纸条灵敏度。

1.4.2 样本检测限

对猪肉、鸡肉、牛肉、鱼肉、虾肉、蜂蜜、鸡蛋共 7 种阴性样本添加 SM_2 标准品, 添加量分别为 25、50、100、200ng/g, 另设阴性对照, 按 1.3.7 节所述方法对样品进行处理, 用试纸条进行多次重复检测, 根据实验结果判定样本检测限。

1.4.3 特异性

将磺胺甲基嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺甲噻二唑、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺吡啶、磺

胺噻唑、磺胺甲噻唑 8 种磺胺类药物分别稀释成 10、100、1000、10000ng/mL 后用试纸条检测。不同样本每个浓度做多次重复, 根据实验结果判定试纸条的特异性。

1.4.4 重复实验

分别从 3 个批次中随机抽取试纸条, 对阴性及 10ng/mL SM₂ 标准品溶液进行多次重复测定, 根据实验结果判定试纸条的重复性。

1.4.5 加速保存实验

将密封好的试纸条置于 60℃ 保存, 每隔 3d 用其对阴性及 10ng/mL SM₂ 标准品溶液进行多次重复测定, 根据实验结果判定试纸条的保质期。

2 结果与分析

2.1 人工抗原的合成

采用重氮法进行半抗原偶联, 所得产物经紫外光谱分析, SM₂-BSA 偶联比为 1:30; 同时采用间接竞争 ELISA 法验证 SM₂ 与 BSA 是否偶联成功, 结果表明随着人工抗原含量的降低, SM₂ 标准品对其的抑制率会升高, 即人工抗原与 SM₂ 标准品能竞争结合 SM₂ 抗体, 证明抗原偶联成功。

2.2 试纸条条件的确定

通过对抗体标金量、抗体标记 pH 值、SM₂-BSA 的浓度、抗 SM₂ 金标抗体的包被量等条件进行反复实验及调整, 最终确定最佳条件为抗体标金量为 1.0μg/mL、抗体标记 pH7.0、抗 SM₂ 金标抗体的包被量为 10μL/cm、SM₂-BSA 使用质量浓度为 0.5mg/mL(喷量为 0.74μL/cm), 质控线驴抗鼠 IgG 使用浓度为 1.0mg/mL(喷量为 0.74μL/cm)。

2.3 灵敏度

实验结果如表 1 所示, 该试纸条检测含量在 10ng/mL 以上的 SM₂ 标准品时, 结果为阳性; 检测含量在 10ng/mL 以下的 SM₂ 标准品时, 结果为阴性。根据实验结果判定该试纸条的灵敏度为 10ng/mL。

2.4 特异性

对选取的 8 种磺胺类似物进行检测, 结果表明该试纸条特异性强。在 0~10000ng/mL 范围内, 与大多数磺胺类似物无交叉反应, 仅与磺胺甲基嘧啶、磺胺嘧啶有一定的交叉反应。

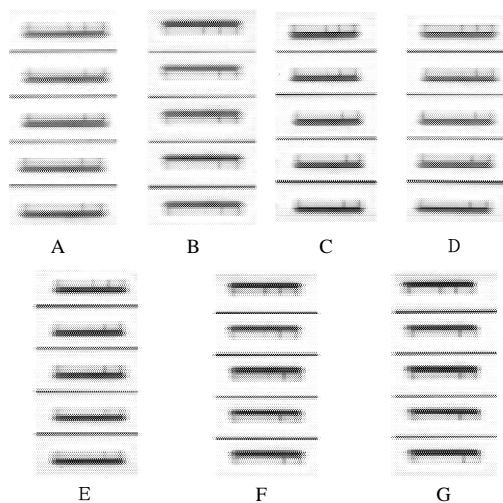
2.5 样本检测限

表 2 磺胺二甲嘧啶快速检测试纸条与其他磺胺类药物的交叉反应
Table 2 Cross-reactivity of sulfadimidine rapid test strip with other sulfonamides

药物名称	磺胺二甲嘧啶添加量/(ng/mL)			
	10	100	1000	10000
磺胺甲基嘧啶	—	—	+	+
磺胺嘧啶	—	—	+	+
磺胺甲噻唑	—	—	—	—
磺胺间二甲氧嘧啶	—	—	—	—
磺胺邻二甲氧嘧啶	—	—	—	—
磺胺吡啶	—	—	—	—
磺胺噻唑	—	—	—	—
磺胺甲噻唑	—	—	—	—

经测定, 猪肉、鸡肉、牛肉、鱼肉、虾肉、蜂蜜、鸡蛋共 7 种阴性样本中 SM₂ 加标量为 100ng/g 时, 检测 T 线不显色, 结果判为阳性。检测结果如图 2 所示, 根据结果判定该试纸条对组织样本、蜂蜜及鸡蛋中 SM₂ 的实际检测限为 100μg/kg。

2.6 重复实验



A.猪肉; B.鸡肉; C.牛肉; D.鱼肉; E.虾肉; F.蜂蜜; G.鸡蛋; 所有 SM₂ 添加量从上至下为 0、25、50、100、200ng/g。

图 1 对 7 种样本的加标回收实验结果

Fig.1 Determination of sulfadimidine in seven spiked samples

多次重复测定结果一致, 表明该试纸条批内、批间测定差异小, 重复性良好。

2.7 加速保存实验

该试纸条于 60℃ 可保质 12d。胶体金免疫层析试纸条 60℃ 稳定 1d 相当于常温保质一个半月, 以此类推,

表 1 磺胺二甲嘧啶快速检测试纸条的灵敏度
Table 1 Sensitivity of rapid test strip for sulfadimidine

批次 SM ₂ /(ng/mL)	第一批次		第二批次		第三批次	
	①	②	①	②	①	②
0	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—
10	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+	+
100	+	+	+	+	+	+

注: +, 阳性; —, 阴性。下同。①、②表示每一批次重复实验组。

SM₂ 试纸条在常温干燥环境下保质期超过 12 个月。

3 讨 论

本研究成功研制出了磺胺二甲基嘧啶快速检测试纸条。该试纸条应用胶体金免疫层析技术^[13]：样本中的磺胺二甲基嘧啶在流动的过程中与胶体金标记的特异性单克隆抗体结合，从而抑制抗体和 NC 膜检测线上 SM₂-BSA 偶联物的结合，原理图详见图 3。

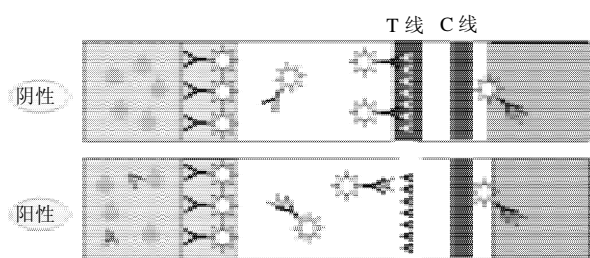


图2 磺胺二甲基嘧啶快速检测试纸条作用原理图

Fig.2 Principle of sulfadimidine rapid test strip

该试纸条可适用于多种食品样品的检测，其灵敏度达 10ng/mL，样本实际检测限为 100 μg/kg，能满足我国及欧盟等国对磺胺二甲基嘧啶最高残留限量的要求。该检测方法整个过程只需一步加样，反应 5min 即可判读结果，而且具有稳定性好、灵敏度高、结果准确、易于判定、经济实用等优点，适合于大批量样品的现场快速检测。

参考文献：

[1] 冯梁, 沈建忠. 磺胺二甲基嘧啶胶体金免疫层析试纸条的研制[D]. 北

京: 中国农业大学, 2005.

- [2] 农业部. 第 235 号公告: 动物性食品中兽药最高残留限量[EB/OL]. (2002-12-24). <http://jckspaqi.gov.cn/dwyxspjyjlgnxbz/200610/t20061027-9809.htm>.
- [3] European Economic Community. Council Regulation No. 2377/90[S]. 1990.
- [4] JIMENEZ V, COMPANYO R, GUITERAS J. Preparation of quality control materials for the determination of sulfonamides in animal feed[J]. Food Addit Contam Part A: Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2009, 26(7): 969-977.
- [5] SUN H W, AI L F, WANG F C. Quantitative analysis of sulfonamide residues in natural animal casings by HPLC[J]. Chromatography, 2007, 66: 333-337.
- [6] KAMAKURA K, HASEGAWA M, KOIGUCHI S, et al. Studies on the identification of sulfadimidine in pork by high performance liquid chromatography with photodiode array detector and gas chromatograph-mass spectrometry[J]. Eisei Shikenjo Hokoku, 1993, 111: 61-65.
- [7] FUH M R, CHAN S A. Quantitative determination of sulfonamide in meat by liquid chromatography- electrospray mass spectrometry[J]. Talanta, 2001, 55(6): 1127-1139.
- [8] LI X, ZHANG G, LIU Q, et al. Development of immunoassays for the detection of sulfamethazine in swine urine[J]. Food Addit Contam Part A: Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2009, 26(3): 314-325.
- [9] 赖卫华, 熊勇华, 陈高明, 等. 应用胶体金试纸条快速检测赭曲霉毒素 A 的研究[J]. 食品科学, 2005, 26(5): 204-207.
- [10] SNT/T 1960—2007 进出口动物源性食品中磺胺类药物残留量的检测方法: 酶联免疫吸附法[S].
- [11] 农业部. 第 1025 号公告: 动物性食品中磺胺类药物残留检测: 酶联免疫吸附法[EB/OL]. (2008-04-29). <http://down.foodmate.net/standard/sort/9/17170.htm>.
- [12] 何方洋, 万宇平, 丁双阳, 等. 检测猪肉中磺胺喹噁啉的快速检测试纸条的研制[J]. 中国兽医杂志, 2009, 45(2): 69-70.
- [13] WANG X, LI K, SHI D, et al. Development and validation of an immunochromatographic assay for rapid detection of sulfadiazine in eggs and chickens[J]. Journal of Chromatography B, 2007, 847(2): 289-295.