

## 监测与评价

## 纳米金磁免疫层析在瘦肉精残留检测中的应用研究

顾娟红<sup>1</sup>, 陈军<sup>1</sup>, 叶剑娜<sup>2</sup>, 钱玉山<sup>2</sup>

(1. 苏州出入境检验检疫局检验检疫综合技术中心, 江苏 苏州 215104;

2. 煤科集团杭州环保研究院有限公司, 浙江 杭州 311201)

**摘要:**为优化动物源性食品中低浓度瘦肉精定量检测,建立了以金磁微粒为反应载体的免疫层析检测系统。应用结果表明,目标物盐酸克伦特罗(CLB)、莱克多巴胺(RAC)试纸条标准曲线范围分别为0.5~50 ng/mL、1.0~100 ng/mL;CLB和RAC试纸条检测下限分别可达0.25 ng/mL和0.5 ng/mL,CLB和RAC与其他同类药物反应均呈阴性,特异性良好;各批添加回收率在82.71~104.12%之间,准确度达到要求;不同CLB、RAC标准添加水平下变异系数(CV)均小于15%,符合精密度标准。样品中假阳性率和假阴性率均为0。该方法将试纸条应用于猪肉制品中CLB和RAC残留的快速检测,具有灵敏度高、稳定性好和特异性强的特点。

**关键词:**纳米金磁;免疫层析法;盐酸克伦特罗。

中图分类号:X836

文献标识码:A

文章编号:1006-8759(2018)06-0058-05

APPLICATION STUDY OF THE RESIDUE DETECTION OF  
CLENBUTEROL BY IMMUNOCHROMATOGRAPHY  
METHOD WITH GOLD MAGNETIC NANOPARTICLESGU Juan-hong<sup>1</sup>, CHEN Jun<sup>1</sup>, YE Jian-na<sup>2</sup>, QIAN Yu-shan<sup>2</sup>(1. *Inspection and Quarantine Integrated Technology Center, Suzhou Entry-exit Inspection & Quarantine Bureau, Suzhou 215104, China;*2. *Hangzhou Environmental Protection Research Institute of China Coal Technology & Engineering Group, Hangzhou 311201, China)*

**Abstract:** In order to optimize the quantitative determination of low concentration clenbuterol from the food of animal origin, a immunochromatography detection system was set up using gold magnetic nanoparticles as supports. The results showed that the standard curves of clenbuterol (CLB) and rctopamine (RAC) test trips were between 0.5~50 ng/mL and 1.0~100 ng/mL, respectively. The lower limits of detection (LLOD) were 0.25 ng/mL and 0.5 ng/mL. CLB and RAC react negatively with drugs of same kind. The recovery rate is between 82.71 and 104.12 %, which means the accuracy meets the requirements. Coefficient of variation (CV) is lower than 15 % with different CLB and RAC adding level, which means the the precision meets the requirements. The false positive rate and false negative rate were both 0. This method shows high sensitivity, stability and specificity for CLB and RAC detection.

**Key words:** Coke oven flue gas; SCR; Low temperature catalyst; Solid acid; Nitrogen oxides.

瘦肉精是一类药物的统称,任何能够抑制动物脂肪生成,促进瘦肉生长的物质都可以称为“瘦肉精”。目前,能够实现这种功能的物质主要是一类叫做 $\beta_2$ -受体激动剂( $\beta_2$ -adrenergicagonist)的药物,如盐酸克伦特罗(Benbuterol hydrochloride, CLB)、莱克多巴胺(Ractopamine, RAC)、沙丁胺醇(Salbutamol, )等。近年来,其他 $\beta_2$ -兴奋剂也开始被用于促进动物生长,如马布特罗、溴布特罗、塞布特罗、塞曼特罗、特布他林等。瘦肉精是一种国家禁令的饲料添加剂,对人体危害极大。

尽管中国和欧盟均严令禁止包括盐酸克伦特罗、莱克多巴胺在内的在动物生产中的应用,但非法滥用瘦肉精的情况依然严重。造成这种屡禁不止现象的原因既有利益驱使,也有动物性食品的安全监督、检测机制不完善,达不到准确、方便、快速、经济的目标。目前,针对多种 $\beta_2$ -受体激动剂的标准化检测方法已经建立起来,最常用检测方法主要有色谱方法、免疫学方法、电化学方法和传感器法等。传统的仪器分析方法由于样品前处理时间长、仪器设备昂贵、检测成本高、对技术人员的要求高等缺点,很难实现对样品中残留物的实时监测。

本研究针对进口肉品生产及加工过程未能消除的瘦肉精残留监控,以GoldMeg<sup>®</sup>-CS金磁复合微粒代替胶体金作为标记材料,利用抗原抗体特异性反应采用已知的方法耦合到目标微粒,形成免疫复合物并用于免疫层析试纸条检测区载体,通过金磁免疫载体的特异性和非特异性反应验证其可行性,由此实现对目标物的定性/定量检测,弥补了胶体金标记免疫层析技术不能定量检测等缺陷。

## 1 试剂与仪器

### 1.1 试剂与耗材

GoldMeg<sup>®</sup>-CS金磁微粒,购自西安金磁纳米生物技术有限公司;KCLB、NaCLB、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、HNO<sub>3</sub>、CLB、NaOH、HAc、NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O等,AR.,购自国药集团化学试剂苏州有限公司;盐酸克伦特罗(CLB)、莱克多巴胺(RAC)、Tween-20、TritonX-100、PEG-20000、十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、聚苯乙烯磺酸钠(PSS)、聚乙烯吡咯酮(PVP)、酪蛋白,购自美国Sigma-Aldrich公司;甘氨酸、四硼酸钠、硼酸,购自北

京陆桥技术股份有限公司;微孔滤膜、硝酸纤维素膜,购自美国Millipore公司;PVC支撑板、SB06玻璃纤维膜,购自上海金标有限公司;Ahlstrom 8964玻璃纤维膜,购自美国Ahlstrom公司;BSA,购自美国Gibco公司;兔IgG、羊抗兔IgG,购自长沙博优生物科技有限公司;甲醇、丙酮、乙腈、三氯甲烷、正己烷,HPLC级,购自美国MERCK公司;6mL NH<sub>2</sub>固相萃取柱、3mL MAX固相萃取柱,购自美国Waters公司;3mL SAX固相萃取柱,购自美国Supelco公司,PSA(一级二级胺),C18,购自月旭材料科技(上海)有限公司;实验用水为Milli-Q Academic A10系统生产的超纯水。

### 1.2 仪器

超纯水仪(美国Millipore公司);移液器(德国Eppendorf公司);磁力搅拌器(广州仪科实验科技有限公司);电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);磁力搅拌器(广州仪科实验科技有限公司);DGHZ-300 A恒温振荡器(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);动态光散射仪(英国Malvern公司);磁性分离器(西安金磁纳米生物技术有限公司);101-1AB电热鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司);GL-3 250磁力搅拌器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司);UV-2 550紫外可见分光光度计(日本岛津公司);振动样品磁强计7 307(美国Lake Shore公司);喷金划膜仪(美国Biodot公司);磁信号分析仪(美国MagnaBioScie硝酸纤维素es公司)。Mettler-Toledo精密电子天平(梅特勒-托利多公司);Milli-Q超纯水系统(美国Millipore公司);Vac Elut 24孔固相萃取装置(美国Angilent公司);KQ-100VDB三频数控超声波机(20/40/80kHz)(昆山超声仪器有限公司);SI Vortex Genie 2涡旋振荡器(德国IKA公司);PHS-3C型酸度计(上海雷磁仪器厂);旋转蒸发器(瑞士Buchi公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 金磁免疫层析法

#### 2.1.1 免疫磁珠的制备与表征

抗体制备:将盐酸克伦特罗抗体和莱克多巴胺抗体(1:1)混合抗体与GoldMeg<sup>®</sup>-CS金磁微粒悬浊液通过聚乙二醇长链分子进行包覆,得到金磁-盐酸克伦特罗抗体和金磁-莱克多巴胺抗体复合物,将制得的复合物于PH=7.4的PBS缓冲溶

液中,4℃保存。

抗体免疫磁珠的制备:用 GoldM<sup>®</sup>-CS 微米金磁微粒偶联 CLB-RAC 混合抗体,1 mg 的 GoldM<sup>®</sup>-CS 微米金磁微粒对应 200 μg 混合抗体,抗体最佳偶联 pH 为 7.4、最佳反应时间为 50 min。

金磁免疫层析法的建立及检测:将检测抗原 CLB-BSA 和 RAC-BSA 混合抗体和羊抗兔 IgG 二抗(1g/L)分别喷涂于硝酸纤维素膜上作为检测线(T线)和质控线(C线),37℃干燥 2 h。在 PVC 底板上依次粘附硝酸纤维素膜、结合垫、样本垫和吸水纸,制成试纸条。

### 2.1.2 金磁免疫层析检测法的建立

分别将 CLB 和 RAC 储备液用 PH=7.4 的 PBS 缓冲溶液稀释浓度为:1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、15 ng/mL、20 ng/mL、40 ng/mL、50 ng/mL 的标准溶液,将其滴加到检测试纸条的样品垫上,20 min 后用磁信号分析仪对 T 线进行定量检测,构建标准曲线。吸取 10 μL 免疫磁珠和 1 mL 含不同浓度混合 BSA 抗原的样液置于离心管中,室温混匀 25 min,磁分离 5 min,100 μL PBS 重悬混合物。重悬液滴入试纸条样本垫,20 min 后读取结果,评价方法的检测灵敏度;检测样液中添加的 CLB 和 RAC,评价方法的特异性。用空白基质标准添加和 LC/MS/MS 进行方法学比对。

### 2.1.3 样品处理

样品绞碎后准确称取 0.5±0.05 g 于 10 mL 塑料离心管中,向管中加入 2 mL 提取液(PH=7.4 的 PBS 缓冲溶液),加入盐酸克伦特罗标准品使样品中的浓度为 4.0 μg/kg,涡旋 1 min,超声 20 min,置于离心机中 8 000 r/min 离心 10 min。取上清液 200 μL 垂直滴在试纸条的加样区,液体通过层析作用向上流动,结合抗体的纳米金磁颗粒复溶后随着液体向试纸条上方流动,等待 5~10 min,如试纸条在 T1、T2 线和 C 线均出现一条棕红色条带,说明结果呈阳性,如 C 线均显示出红棕色,T 区均未显色,且无磁信号,检测结果为阴性。

## 3 结果与分析

### 3.1 金磁微粒偶联单抗

按照前述条件,将 CLB 和 RAC 抗体(1:1)混合抗体与 PSS 修饰的 GoldM<sup>®</sup>-CS 金磁颗粒溶液通过聚乙二醇长链分子进行包覆,得到金磁-盐酸

克伦特罗抗体和金磁-莱克多巴胺抗体复合物,分别对偶联前、后单抗溶液的紫外吸收进行检测,偶联前单抗溶液在 280 nm 处具有明显的特征吸收而偶联反应后的剩余溶液在 280 nm 处的特征吸收值明显降低,由  $D(280)_{pre} = 2.201$ ;  $D(280)_{post} = 0.056$ ,偶联效率=97.46%,说明单抗几乎全部被偶联在金磁微粒表面。

### 3.2 金磁微粒偶联单抗标记条件

参照前述确定的实验条件,当 CLB、RAC 混合抗体的投入量小于 25 μg 时,随着抗体投入量的增加,抗体的偶联量也逐步增加;当抗体的投入量增加至 20 μg 时,偶联饱和,抗体偶联量达到 25 μg,因此用 1mg 的 GoldM<sup>®</sup>-CS 金磁微粒作为固相载体偶联 CLB、RAC 混合抗体时,抗体的最佳用量应为 250 μg。

随着反应时间的增加,混合抗体的偶联效率也逐渐增加,当时间到达 40 min 时,偶联效率达到最高,表明此时抗体在 GoldM<sup>®</sup>-CS 金磁微粒表面的偶联已经达到饱和,考虑到成本和时间因素,选择最佳偶联时间为 50min。

GoldM<sup>®</sup>-CS 金磁微粒在碱性条件时,抗体的偶联量明显比酸性条件高;当 pH 为 8.0 时,偶联量达到最大,因此 GoldM<sup>®</sup>-CS 金磁微粒偶联单抗的最佳 pH 值沿用 Au/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 确定的实验条件。

由于 PSS 修饰前后 GoldM<sup>®</sup>-CS 金磁微粒的单分散性有显著变化,从而改善了纳米金磁微粒的稳定性和分散性;经验证确认,前述研究所筛选的封闭剂较之其它封闭剂封闭效果最好,因为它完全避免了假阳性的发生,而且它不会影响阳性的显色效果,所以后续 GoldM<sup>®</sup>-CS 优化实验均封闭剂 V,对金磁标抗体封闭 2 h,所用亦取最适标记 pH 值 7.4。

### 3.3 金磁标抗体层析试纸的组装

由前述 Au/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 确定的两种标记抗体的最佳配比结论,金磁标羊抗兔 IgG 浓度增高会令金磁标羊抗兔 IgG 更容易与 T 线上的 BSA 混合单抗发生物理性吸附,从而在线处形成堆积并显色;故在其它条件相同的情况下,本研究确定金磁标羊抗兔 IgG 和金磁标 CLB、RAC 混合单抗以 1:10 的比例混合,以保证检测试纸条的检测效果最佳。

如图 2 所示,试纸条硝酸纤维素膜上的背景颜色,随喷涂量的增大而加深,当喷涂量太大时、

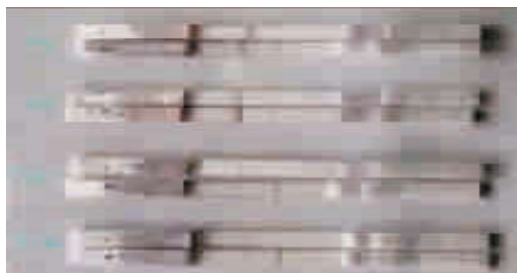


图1 两种金磁标抗体最佳配比的确定

阴性试纸条就会产生假阳性的现象；C线、T线的颜色也随喷涂量的增大而加深，喷涂量太小（1  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 、3  $\mu\text{L}/\text{cm}$ ）时，C线、T线的颜色均太弱；喷涂量为6  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 时阳性试纸条的T线几乎没有颜色，可以判断此时有假阴性发生；当喷涂量为10  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 时，试纸条的检测结果均优于其它喷涂量的检测结果。鉴于此，选择金磁标抗体混合物的喷涂量定为10  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 。样品垫及结合垫的处理方案沿用前述确定的组成，并选用标记物保存液A作为标记物保存液，待处理后将其37  $^{\circ}\text{C}$ 烘干，室温保存。

金磁标羊抗兔IgG和前述处理好的金磁标记复合物按一定的比例混合后，用BioDot划膜喷金仪以9  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的喷涂量均匀喷洒在试纸条结合垫上；用1xPB(pH7.4)将兔IgG和BSA单抗(coating antibody)稀释成2 mg/mL，借助BioDot划膜喷金仪以1  $\mu\text{L}/\text{cm}$ 的划线量用兔IgG划C线，用CLB-BSA单抗划T线，然后组装试纸条，将组装好的试纸条保存在装有干燥剂的密闭钢箱袋内，室温保



图2 金磁标抗体最佳喷涂量的选择

存备用。

### 3.4 金磁免疫层析方法的建立及评价

用特异性扩增条带的磁信号值对免疫磁珠复合物检测CLB、RAC信号值进行定量，以CLB、RAC浓度为横坐标，磁信号值(RMU)为纵坐标绘制标准曲线，CLB标准曲线图见图3，RAC标准曲线图见图4。由图可见，该方法对CLB、RAC进行定量检测时，在目标物浓度范围分别为0.5~50 ng/

mL和1.0~100 ng/mL之间，磁信号强度的变化与CLB、RAC的浓度呈良好的线性关系（ $R^2$ 分别为0.9956、0.9947），故通过此标准曲线可实现对CLB、RAC的定量检测。



图3 CLB定量检测的标准曲线



图4 RAC定量检测的标准曲线

当CLB浓度为0.5 ng/mL、RAC浓度为1.0 ng/mL时，试纸条T1、T2线均不显色；当CLB浓度为5.0 ng/mL、RAC浓度为10.0 ng/mL时，试纸条T线位置开始显色；当CLB浓度大于5.0 ng/mL、RAC浓度大于10.0 ng/mL时，随着目标物浓度的增大，试纸条线的颜色逐渐加深，所以将该试纸条的CLB和RAC的目测检测限定为5.0 ng/mL、10.0 ng/mL。

试纸条检测下限(LOD)可达0.1 ng/mL和0.2 ng/mL。一般分析方法均将检测灵敏度定义为 $\text{XRMU}(0\text{ng/mL}) \pm 2\text{SD}$ ，所以由磁信号分析仪的检测结果可知本试纸条的检测灵敏度对CLB为0.25 ng/mL、对RAC为0.5 ng/mL。

采用空白基质加标的方法对试纸条进行方法可靠性评价检测，结果见表1，各批添加回收率在75.23~120.12%之间，准确度达到要求；不同CLB、RAC浓度下变异系数(CV)均小于15%，符合精密度标准。

以PH=7.4的PBS缓冲溶液配置15 ng/mL的沙丁醇胺、盐酸多巴胺、西马特罗、盐酸多巴胺为待测样品，分别滴加200  $\mu\text{L}$ 垂直滴在试纸条的加样区，等待5~10 min，用磁性阅读仪测试试纸条的检测区磁性信号。测试结果表明，上述几种物质在

表1 金磁免疫层析检测 CLB、RAC 的精密度

目标物	添加水平 (ng/mL)	实测(ng/mL)	回收率 均值(%)	相对标准 偏差(%)	变异系数 (%)
CLB	5.12	5.33	104.12	9.50	9.12
	10.61	10.47	98.75	7.55	7.65
RAC	10.70	8.85	82.71	11.75	14.21
	20.65	19.46	94.24	9.74	10.34

试纸条的C线均显示出红棕色,T区均未显色,且无磁信号,检测结果为阴性。表明上述几种物质对盐酸克伦特罗和莱克多巴胺的检测无干扰。

对20份空白样品进行检测,统计假阳性和假阴性数,按照下列公式计算假阳性率和假阴性率:假阳性率(%)=假阳性数/20×100%;假阴性率(%)=假阴性数/20×100%。在已确认的阴性样品中,试纸条测定结果浓度低于0.1 ng/mL,判定结果为阴性,未出现假阳性。添加5 ng/mL浓度的阳性标准品结果均能检测出阳性,未出现假阴性。

#### 4 结论

本试验从试纸条的检测限、特异性、准确度、添加回收率、精密度和与仪器结果的符合性等方面对试纸条的性能进行了评价。采用与金磁免疫层析试纸条实验对应的样液浓度范围进行方法符合性验证。结果显示,CLB和RAC试纸条标准曲线范围0.5~50 ng/mL、1.0~100 ng/mL;CLB和RAC试纸条检测下限分别可达0.25 ng/mL和0.5 ng/mL,CLB和RAC与其他同类药物反应均呈阴性,特异性良好;各批添加回收率在82.71~104.12%之间,准确度达到要求;不同CLB、RAC标准添加水平下变异系数(CV)均小于15%,符合精密度标准。样品中假阳性率和假阴性率均为0。试纸条使用于猪肉制品中CLB和RAC残留快速检测,具有灵敏度高、稳定性好和特异性强的特点。

研究建立的以金磁微粒为反应载体的免疫层析检测系统实现了对低浓度瘦肉精的检测,比ELISA法检测瘦肉精的灵敏度高,检测的线性范围较宽,目标物CLB、RAC浓度适用范围广,目标物浓度与特异性条带的磁信号强度之间呈良好的正相关。实验表明,金磁微粒为载体的免疫层析检测瘦肉精是一种高灵敏度的检测方法,非常适合动物源性食品的瘦肉精残留检测。

#### 参考文献

[1]Faulk W P, Taylor G M. An immunocolloidal for the electron microscope[J]. *Immunochemistry*, 1971(8): 1081-1083

- [2]Holgate C S, Jackson P, Cowen P N, et al. Immunogold-silver staining new method of immunostaining with enhanced sensitivity[J]. *Histochem Cytochem*, 1983, 31(7): 938-944
- [3]付志锋,魏伟,李翠芳,等.电化学发光免疫传感技术在生物药物分析中的研究进展[J]. *中国科学*, 2011, 41(5): 773-784
- [4]Moongkarndi P, Rodpai E, Kanarat S. Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis[J]. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2011, 23(4): 797-801
- [5]汪慧蓉,朱宏莉,惠文利等.金磁微粒介导的盐酸克伦特罗多克隆抗体的纯化[J]. *西北农林科技大学学报自然科学版*, 2006, 34(5):18-22
- [6]Galvin J P. Rapid methods and automation in microbiology and immunology[M]. Brixia Academic Press Brescia Breseise Italy, 1989: 558
- [7]崔亚丽,张连营,苏婧.组装型金磁微粒的制备及其在免疫学检测中的应用[J]. *中国科学(B 化学)*, 2006, 36(2): 159-165
- [8]Kolossova A Y, Sibanda L, Dumoulin F, et al. Lateral-flow colloidal gold-based immunoassay for the rapid detection of deoxynivalenol with two indicator ranges [J]. *Anal.Chim.Acta.*, 2008, 616(2): 235-244
- [9]Wang Y Y, Xu H, Wei M, et al. Study of superparamagnetic nanoparticles as labels in the quantitative lateral flow immunoassay [J]. *Materials Sciences and Engineering*, 2009, 29(3):714-718
- [10]Xu Q F, Xu H, Gu H C, et al. Development of lateral flow immunoassay system based on superparamagnetic nanobeads as labels for rapid quantitative detection of cardiac troponin I[J]. *Materials Science and Engineering*, 2009, 29(3):702-707
- [11]Chao X, Guo L, Zhao Y, et al. PEG-modified GoldMag nanoparticles (PGMNs) combined with the magnetic field for local drug delivery [J]. *J. Drug Target*, 2010, 5(50): 56-74
- [12]Shi F, Hui W L, Chen C, et al. Facile approach to modification of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Au assembled composite nanoparticles [J]. *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 2011, 13(2): 141-145
- [13]Park S J, Taton T A, Mirkin C A. Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes [J]. *Science*, 2002, 295(5559): 1503-1506
- [14]王松柏,张彦,卫艳丽等.荧光免疫及磁免疫层析法检测莱克多巴胺的研究[J]. *光谱学与光谱分析*, 2015, 35(11): 3100-3104
- [15]李静宇,何小维,刘晓云等.克伦特罗荧光免疫层析试纸条的制备及特性研究[J]. *中国畜牧兽医*, 2015, 42(10): 2606-2611
- [16]Yong Jin, Jin-Wook Jang, Mun-Han Lee, et al. Development of ELISA and immunochromatographic assay for the detection of neomycin[J]. *CLBinnica Chimica Acta*, 2006, 364: 260-266
- [17]刘见.免疫金试纸法快速检测盐酸克伦特罗[J]. *上海交通大学学报: 农业科学版*, 2004, 22(4): 350-354
- [18]王培龙.β-受体激动剂及其检测技术研究[J]. *农产品质量与安全*, 2014, 11(1): 44-52
- [19]Wang Xiao-jie, Zhan Wen-bin, Xing Jing. Development of dot immunogold filtration assay to detect white spot syndrome virus of shrimp[J]. *Journal of Virological Methods*, 2006, 132: 212-215.