DOI:10.12441/spyswjs.20241016001 [文章编号] 1673-1689(2025)06-0115-09

胶体碳免疫层析法快速检测动物性食品中的麻保沙星残留

陈秀金[1,2] 安 彪[1] 陶 健[3,4] 尹心豪[1] 王 耀[1,2] 牛华伟[1,2] 李兆周[1,2*] 张 敏[1,2]

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院,河南 洛阳 471000; 2. 河南省食品绿色加工与质量安全控制国际联合实验室,河南 洛阳 471000; 3. 河南省食品和盐业检验技术研究院,河南 郑州 450003; 4. 国家市场监管重点实验室(食品安全快速检测与智慧监管技术),河南 郑州 450003)

摘要:【目的】建立一种基于胶体碳的竞争抑制免疫层析法,用于检测奶粉和鸡肉中的麻保沙星(marbofloxacin,MBF)残留。**【方法】**用实验室自制的抗MBF多克隆抗体制备了胶体碳免疫探针,考察了反应体系的pH、重悬液、样品垫处理液、标准品稀释液、胶体碳质量浓度、一抗质量浓度、包被原质量浓度和二抗质量浓度对MBF胶体碳免疫层析法的影响,并测定了该方法的灵敏度、特异性、稳定性和准确性。**【结果】**该方法在最优条件下的消线值为4.0 ng/mL,较传统胶体金免疫层析法提高了5倍,半定量检测限为0.4 ng/mL;该方法对MBF检测表现出良好的特异性,可在室温下保存16周,在奶粉和鸡肉样品中的加标回收结果与超高效液相色谱荧光检测法基本一致。**【结论】**该方法操作简单、灵敏度高、特异性强且稳定性好,可用于动物性食品中MBF残留的快速检测。

关键词:奶粉;鸡肉;麻保沙星;免疫层析;胶体碳

Colloidal Carbon-labelled Immunochromatographic Assay for Rapid Detection of Marbofloxacin Residues in Animal-derived Foods

CHEN Xiujin[1,2] *AN Biao*[1] *TAO Jian*[3,4] *YIN Xinhao*[1] *WANG Yao*[1,2] *NIU Huawei*[1,2] *LI Zhaozhou*[1,2*] *ZHANG Min*[1,2]

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China; 2. Henan International Joint Laboratory of Food Green Processing and Quality Safety Control, Luoyang 471000, China; 3. Henan Institute of Food and Salt Industry Inspection Technology, Zhengzhou 450003, China; 4. Key Laboratory of Rapid Detection and Intelligent Supervision Technology for Food Safety (State Administration for Market Regulation), Zhengzhou 450003, China)

Abstract: [**Objective**] A colloidal carbon-labelled immunochromatographic assay with competitive inhibition was developed for the detection of marbofloxacin (MBF) residues in milk powder and chicken. [**Method**] The anti-MBF polyclonal antibody prepared in the author's laboratory was employed to produce the colloidal carbon-labelled immunoprobe. The effects of pH of reaction system, resuspension solution, treatment solution of sample pad, standard dilution buffer, mass concentration of colloidal carbon, mass concentration of primary antibody, mass concentration of coating antigen, and mass concentration of secondary antibody on the MBF colloidal carbon-labelled immunochromatographic assay were investigated. The sensitivity, specificity, stability, and

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(31701694);河南省科技攻关项目(242102321131,242102411001);河南省高校青年骨干教师培养计划项目(2023GGJS046);研究生教学质量工程教育与提升工程项目(HNYJS2020JD06);洛阳市公益性行业科研专项项目(2202021A)。

通信作者:李兆周(1982—),男,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事食品安全检测研究。E-mail:chenxiujin@126.com

收稿日期:2024-10-16 **修回日期:**2024-11-29

accuracy of the method were determined. [**Result**] Under optimal conditions, the cut-off value of the method was 4.0 ng/mL, which was five times higher than the value of traditional colloidal gold-labelled immunochromatographic assay. The semi-quantitative detection limit was 0.4 ng/mL. The method showed good specificity for the detection of MBF and could be stored at room temperature for 16 weeks. The spiked recovery results in milk powder and chicken samples were basically consistent with those of ultra-high performance liquid chromatography coupled with a fluorescence detector. [**Conclusion**] The established method is simple, sensitive, specific, and stable, and thus it can be utilized for rapid detection of MBF residues in animal-derived foods.
Keywords: milk powder; chicken; marbofloxacin; immunochromatographic assay; colloidal carbon

MBF是第三代动物专用的氟喹诺酮类抗菌药物，通过抑制DNA转录酶来抑制革兰氏阴性菌和支原体等微生物的生长[1]，广泛用于动物感染性疾病的预防和治疗[2-3]。MBF的滥用容易造成其在动物性食品中的残留超标，长期食用这种食品可能会造成中枢神经系统损伤[4]、在人体内产生耐药菌株和发生过敏性超敏反应[5]等。因此，许多国家规定了食品中MBF的最大残留限量。欧盟规定原料奶中的MBF最大残留限量为30 μg/kg[6]；我国标准GB 31650.1—2022中规定牛奶和牛肉中的MBF最大残留限量分别为75、150 μg/kg。

目前检测MBF残留的方法有液相色谱法[7-8]、超高效液相色谱-质谱联用法[9-12]、毛细管电泳-质谱法[13]、电化学法[14-15]和酶联免疫法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）[16-17]等。一般而言，仪器法精确度高、重复性好，但对设备要求高，且样品前处理方法十分烦琐。相比之下，免疫分析法具有操作简单和成本低的优势。其中ELISA的应用最广泛，它具有高灵敏度和高通量的优点，但ELISA的检测时间长（4 h），且需要酶标仪等设备，无法满足现场快速检测的需求。免疫层析法是一种将层析技术和免疫反应相结合的即时检测技术[18]，操作简单，仅需几分钟即可读取结果[19-21]；免疫层析法根据标记材料不同分为金标免疫层析法、碳标免疫层析法、量子点免疫层析法等。其中金标免疫层析法应用最多，但金标免疫层析法的光信号往往比较弱，导致其灵敏度不足。与胶体金相比，胶体碳具有成本低廉、稳定性好的优点，且胶体碳在试纸条层析反应中形成的条带为深黑色，具有肉眼可见的明显信号[22-23]。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

MBF、培氟沙星（pefloxacin，PEF）、恩诺沙星（enrofloxacin，ENR）、诺氟沙星（norfloxacin，NOR）、氧氟沙星（ofloxacin，OFLX）、依诺沙星（enoxacin，ENX）、环丙沙星（ciprofloxacin，CIP）标准品：纯度98%，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；MBF抗体和包被原：作者所在实验室自制；碳纳米颗粒：粒径30 nm，上海源叶生物科技有限公司；牛血清蛋白质（bovine serum albumin，BSA）、鸡卵清蛋白质（chicken ovalbumin，OVA）：西格玛奥德里奇（上海）贸易有限公司；羊抗兔二抗：武汉艾美捷科技有限公司；硼酸、硼砂、吐温-20、蔗糖：分析纯，天津德恩化学试剂有限公司；玻璃纤维素膜、硝酸纤维素（nitrocellulose，NC）膜、吸水纸、聚氯乙烯（polyvinyl chloride，PVC）底板：上海金标生物科技有限公司。

1.2 仪器与设备

冷冻离心机：H1650R型，湖南湘仪实验室仪器开发有限公司；紫外分光光度计：UV-2700型，日本岛津公司；自动切条机：ZQ2000型，上海金标生物科技有限公司；Zeta电位分析仪：BeNano 90型，丹东百特仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 胶体碳-MBF抗体免疫探针的制备及表征

利用碱性条件下抗体和碳纳米颗粒之间的静电作用制备胶体碳-MBF抗体免疫探针。用pH 8.8、0.05 mol/L硼酸盐缓冲液（borate buffer solutions，BBS）配制0.5 mg/mL碳纳米颗粒溶液，冰浴超声20 min，得到均匀分散的胶体碳溶液。将MBF抗体溶液加到胶体碳溶液中，使胶体碳溶液中的MBF抗体质量浓度为20 μg/mL，4 ℃下缓慢搅拌过夜。反应完毕后，将溶液于4 ℃、10 000 r/min的条件下离心10 min，弃去上清液，加入1.0 mL重悬液复溶沉淀，4 ℃下保存备用。

用紫外分光光度计法和Zeta电位分析法对免疫探针进行表征：使用紫外分光光度计分别对胶体碳溶液、胶体碳-MBF抗体溶液与MBF抗体溶液在185~300 nm进行扫描，分析各溶液的紫外吸收光谱与最大吸收波长；取1.0 mL胶体碳溶液与1.0 mL胶

体碳-MBF抗体溶液，用Zeta电位仪测定其电位。

1.3.2　胶体碳试纸条的组装与检测原理

1）胶体碳试纸条的组装：试纸条由PVC底板、样品垫、结合垫、NC膜和吸水纸组成。先将NC膜贴在PVC底板上，再用移液枪在NC膜上涂上包被原与羊抗兔二抗，分别形成检测线（test线，T线）和质控线（control线，C线）。在NC膜的两端分别贴上结合垫和吸水纸，重叠部分为1.5~3.0 mm，然后在结合垫的一端贴上样品垫，样品垫与结合垫重叠2.0 mm，组装后的结构见图1。用切条机将其切成宽3.5 mm的条带，37 ℃下烘干，干燥条件下保存备用。

2）MBF测定步骤和检测原理：先在微孔板中加入胶体碳-MBF抗体溶液和样品液，混合均匀后，再将试纸条插入微孔板中，反应8~10 min，用肉眼进行定性分析；再用Image J软件读取试纸条T线与C线的灰度值。将试纸条反应后T线与C线的灰度值的比值定义为*T*/*C*值，当*T*/*C*值≥1时，为阴性；当*T*/*C*值<1时，为阳性。

3）MBF检测原理：试纸条的检测原理见图1。当样品中含有MBF时，胶体碳-MBF抗体将被样品中的MBF捕获形成免疫复合物，当免疫探针达到T线时，由于MBF占据了包被原与抗体的结合位点，所以胶体碳-MBF抗体将无法与T线上的包被原结合，故T线不显色；当免疫探针达到C线时，胶体碳-MBF抗体将被羊抗兔二抗捕获，故C线显色，因此T线不显色，C线显色时，结果为阳性。当样品中不含有MBF时，免疫探针达到T线时，胶体碳-MBF抗体将与T线上的包被原结合，使T线显色；同样，免疫探针达到C线时，使C线显色，因此，T线和C线均显色时，结果为阴性。检测时，若C线不显色，则表示试纸条无效。

1.3.3　胶体碳试纸条的检测条件优化

以*T*/*C*值接近1、试纸条显色程度适中为标准，考察反应体系的pH、重悬液、样品垫处理液、标准品稀释液、胶体碳质量浓度、一抗质量浓度、包被原质量浓度和二抗质量浓度对试纸条性能的影响，每个试验设置3个平行。

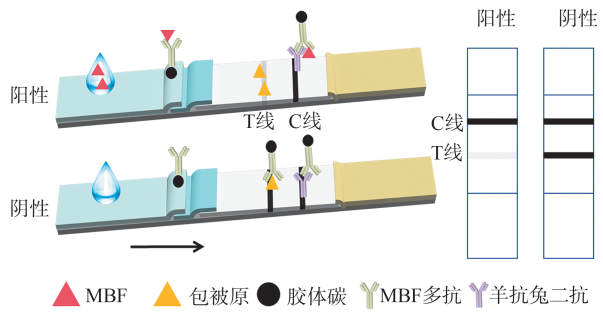


图1　胶体碳试纸条检测原理

Fig. 1　Detection principle of colloidal carbon test strip

1）最佳pH的选择：用pH分别为7.4、8.0、8.8的BBS对胶体碳-MBF抗体溶液进行稀释，用阴性样品进行检测，根据*T*/*C*值和显色结果选择BBS的最佳pH。

2）重悬液的优化：用0.05 mol/L BBS制备4种重悬液（配方一：质量分数1.0%的BSA、体积分数0.25%的吐温-20；配方二：质量分数1.0%的蔗糖、体积分数0.25%的吐温-20；配方三：质量分数1.0%的蔗糖、质量分数0.5%的BSA、体积分数0.25%的吐温-20；配方四：质量分数1.0%的蔗糖、质量分数1.0%的BSA），用重悬液洗涤并重悬胶体碳-MBF抗体溶液，用阴性样品进行检测，根据*T*/*C*值和显色结果选择最适重悬液。

3）样品垫处理液的优化：用0.01 mol/L磷酸盐缓冲溶液（phosphate buffer solution，PBS）制备4种样品垫处理液（配方一：质量分数2.0%的蔗糖、体积分数0.25%的吐温-20；配方二：质量分数2.0%的蔗糖；配方三：质量分数0.1%的BSA、体积分数0.25%的吐温-20；配方四：质量分数2.0%的蔗糖、质量分数0.1%的BSA），用样品垫处理液浸泡样品垫2 h，于37 ℃下烘干，用阴性样品进行检测，根据*T*/*C*值和显色结果选择最适样品垫处理液。

4）标准品稀释液的优化：用0.05 mol/L BBS配制4种标准品稀释液（配方一：质量分数0.2%的蔗糖、体积分数0.25%的吐温-20；配方二：质量分数1.0%的BSA、体积分数0.25%的吐温-20；配方三：质量分数0.2%的蔗糖、质量分数1.0%的BSA、体积分数0.25%的吐温-20；配方四：质量分数0.5%的BSA），用标准品稀释液对MBF标准溶液进行稀释，用阴性样品进行检测，根据*T*/*C*值和显色结果选择最适标准品稀释液。

5）胶体碳质量浓度的优化：用pH 8.8、0.05 mol/L的BBS配制质量浓度分别为0.5、0.8、1.0、1.5 mg/mL的胶体碳溶液，标记抗体后进行检测，根据*T*/*C*值和显色结果选择最适胶体碳质量浓度。

6）一抗质量浓度的优化：在搅拌状态下，将抗体溶液分别滴入1.0 mL胶体碳溶液，使抗体质量浓度分别为40、60、80、100 μg/mL，用阴性样品进行检测，根据*T*/*C*值和显色结果选择最适一抗质量浓度。

7）包被原质量浓度的优化：用pH 7.2、0.01 mol/L的PBS配制质量浓度分别为3.0、1.5、0.6、0.3 mg/mL

的包被原溶液，并喷涂在T线上，用阴性样品进行检测，根据 *T*/*C* 值和显色结果选择最适包被原质量浓度。

8）二抗质量浓度的优化：用 pH 8.8、0.05 mol/L 的 BBS 将羊抗兔二抗质量浓度稀释成 1.50、0.60、0.30、0.15 mg/mL，喷涂在C线上，用阴性样品进行检测，根据 *T*/*C* 值和显色结果选择最适二抗质量浓度。

1.3.4 试纸条检测性能的评价

1）标准曲线的建立与半定量检测限的计算：在最优条件下，分别用 0、1.0、2.0、2.5、3.0、4.0 ng/mL 的 MBF 标准溶液进行检测，先目测结果，再通过 Image J 软件扫描得到T线灰度值，将阳性样品与阴性样品的T线灰度值的比值定义为 T/T_0 值，计算 T/T_0 值。以 MBF 质量浓度为横坐标、T/T_0 值为纵坐标，通过线性回归建立标准曲线。将试纸条T线完全不显色时对应的 MBF 最低质量浓度作为消线值，将抑制率为 10% 时对应的 MBF 质量浓度作为半定量检测限，根据式（1）计算抑制率。

$$I_R=(1-\frac{T}{T_0})\times 100\% \quad (1)$$

式中：

I_R——抑制率，%；

T——阳性样品的T线灰度值；

T_0——阴性样品的T线灰度值。

2）特异性测定：为了评价方法的特异性，用试纸条对 MBF 及其类似物（CIP、OFLX、NOR、ENX、PEF、ENR）进行检测，其中 MBF 质量浓度为 5 ng/mL，其余类似物质量浓度均为 100 ng/mL，观察试纸条显色结果，并用 Image J 软件扫描试纸条的T线灰度值与C线灰度值。

3）稳定性评价：将最优条件组装的试纸条在 4 ℃条件下保存，分别在第 8 周和第 16 周时取出进行检测，观察试纸条显色结果，并用 Image J 软件扫描试纸条的T线灰度值与C线灰度值。

1.3.5 实际样品检测

1）样品前处理方法：称 2.0 g 奶粉，用 10 mL 乙腈溶解，振荡 10 min，5 000 r/min 离心 4 min，收集上清液，于 80 ℃下旋蒸至溶剂蒸出，再加入 2 mL PBS 复溶。称 2.0 g 鸡肉，均质后移至含 20 mL 乙腈的离心管中，振荡 20 min，1 000 r/min 离心 10 min，将上清液移至另一个干净离心管中，加入乙腈饱和正己烷溶液进行萃取以除去脂肪，静置分层，收集下层液体，80 ℃下旋蒸至溶剂蒸出，再加入 2 mL PBS 复溶。

2）加标回收试验：用超高效液相色谱荧光检测法确认奶粉和鸡肉样品中不含 MBF 后，向 3 份 2.0 g 样品中分别加入 2、6、10 μg 的 MBF，然后按照样品前处理方法进行处理，从所制备的样品处理液中取 0.1 mL，用 PBS 定容到 100 mL，再分别用试纸条和超高效液相色谱荧光检测法同时进行检测。

1.4 数据处理

用 Image J 软件扫描试纸条的T线和C线得到灰度值，计算 *T*/*C* 值。通过肉眼观察判断，T线不显色时所对应的 MBF 最低质量浓度即为试纸条的消线值。用 Origin 2019 软件通过线性回归拟合得到试纸条检测 MBF 的标准曲线，根据回归方程计算试纸条的半定量检测限。

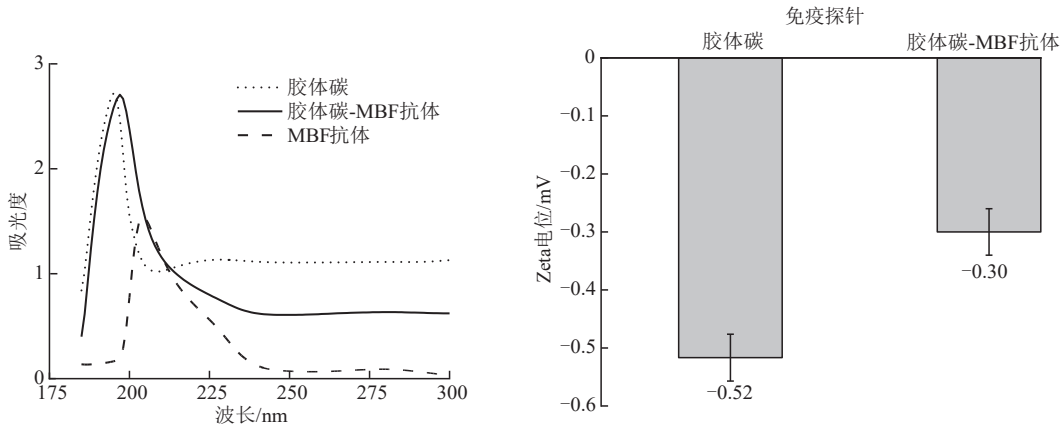
2 结果与讨论

2.1 胶体碳-MBF抗体的表征

紫外吸收光谱的形状与最大吸收波长见图2（a）。胶体碳标记抗体后，吸收峰从 195 nm 偏移到了 198 nm。在波长为 220~300 nm 时，胶体碳-MBF 抗体的紫外吸收光谱位于胶体碳溶液和 MBF 抗体溶液之间。胶体碳-MBF 抗体溶液的 Zeta 电位表征结果见图 2（b），胶体碳的 Zeta 电位值为 −0.52 mV，而胶体碳-MBF 抗体的 Zeta 电位值为 −0.30 mV。上述结果表明胶体碳标记抗体成功。

2.2 胶体碳试纸条的检测条件优化

如图 3（a）所示，当 BBS 的 pH 为 7.4 时，*T*/*C* 值为 1.12，且T线显色较深，不利于提高试纸条灵敏度；当 BBS 的 pH 为 8.0 和 8.8 时，T线显色均适中，但 pH 为 8.8 时的 *T*/*C* 值更接近于 1。因此，选择 BBS 的最优 pH 为 8.8。如图 3（b）所示，用配方一的重悬液进行检测时，*T*/*C* 值远小于 1，且T线和C线的显色过浅，无法用于实际样品检测；用配方二和配方三的重悬液进行检测时，配方二的 *T*/*C* 值更接近于 1；用配方四进行检测时，T线和C线的显色较深且背景不干净。因此，选择配方二的重悬液作为最适重悬液。如图 3（c）所示，用配方一和配方二的样品垫处理液进行检测时，T线和C线的显色太浅，容易造成假阳性结果；用配方四的样品垫处理液进行检测时，*T*/*C* 值太小；使用配方三的样品垫处理液进行检测时，试纸条显色适中且 *T*/*C* 值接近于 1。因此，选择配方三的样品垫处理液作为最适样品垫处理液。如图 3（d）所示，用配方一和配方二的标准品稀释液对 MBF 标准溶液进行稀释时，



(a) 胶体碳-MBF抗体的紫外吸收光谱　　(b) 胶体碳与胶体碳-MBF抗体的Zeta电位

图2　胶体碳-MBF抗体的表征结果

Fig. 2　Characterization results of colloidal carbon-labelled MBF antibody

反应后试纸条的T线几乎不显色；用配方三的标准品稀释液对MBF标准溶液进行稀释时，试纸条的T线和C线显色适中且*T*/*C*值接近1；用配方四的标准品稀释液对MBF标准溶液进行稀释时，*T*/*C*值<1且背景不干净。因此，选择配方三的标准品稀释液作为最适标准品稀释液。

胶体碳质量浓度、一抗质量浓度与包被原质量浓度是影响试纸条性能的关键因素。当这三者的质量浓度过低时，会导致试纸条显色过浅、结果不稳定，进而影响实际样品的检测；当质量浓度过高时，会降低该试纸条的灵敏度，且造成原材料的浪费。如图3(e)所示，当胶体碳质量浓度为0.5 mg/mL时，试纸条显色过浅，容易造成假阳性；当胶体碳质量浓度为0.8、1.0 mg/mL时，T线和C线显色较适中，且胶体碳质量浓度为0.8 mg/mL时，*T*/*C*值更接近于1；当胶体碳质量浓度为1.5 mg/mL时，试纸条几乎不显色，可能是因为胶体碳质量浓度过高，发生了聚集，导致层析受到阻碍。因此，标记抗体时的最适胶体碳质量浓度为0.8 mg/mL。由图3(f)可知，随着一抗质量浓度的增加，*T*/*C*值呈上升趋势。这是因为一抗质量浓度越大，胶体碳吸附的一抗就越多，探针结合T线上的包被原就越多，T线显色就越深；而胶体碳的总量保持不变，所以C线的显色会有点变浅，因此*T*/*C*值逐渐上升。当一抗质量浓度为60、80 μg/mL时，T线和C线显色适中且*T*/*C*值接近于1。为了节约成本，选择最适一抗质量浓度为60 μg/mL。从图3(g)可知，随着包被原质量浓度的降低，*T*/*C*值逐渐降低。这是因为随着包被原质量浓度的下降，T线上包被原的量会越少，其捕获的胶体碳-MBF抗体就会越少，导致T线显色就越浅；而胶体碳的总量不变，所以*T*/*C*值随包被原质量浓度的下降而减小。当包被原质量浓度为0.6 mg/mL与0.3 mg/mL时，T线几乎不显色，无法用于实际检测；当包被原质量浓度为1.5 mg/mL时，T线和C线显色适中且*T*/*C*值接近于1；当包被原质量浓度为3.0 mg/mL时，*T*/*C*值太大。因此，选择最适包被原质量浓度为1.5 mg/mL。从图3(h)可知，随着二抗质量浓度的降低，C线上二抗的量会减少，捕获的胶体碳-MBF抗体也越少，故C线的显色会越来越浅。当二抗质量浓度为1.50、0.60 mg/mL时，两者C线灰度相似，不过二抗质量浓度为0.60 mg/mL时，*T*/*C*值更接近于1；当二抗质量浓度为0.30、0.15 mg/mL时，C线显色过浅。考虑到节约二抗的原则，选择最适二抗质量浓度为0.60 mg/mL。

2.3　试纸条性能评价

2.3.1　标准曲线的建立与半定量检测限的计算

由图4(a)可知，随着MBF质量浓度的增加，T线显色越来越浅。当MBF质量浓度为4.0 ng/mL时，T线不显色，因此得出试纸条的消线值为4.0 ng/mL，比作者所在实验室前期制备的胶体金免疫层析试纸条的消线值提高了5倍。用Image J软件扫描试纸条T线的灰度值，计算出T/T_0值，通过Origin软件进行线性回归拟合，得出的标准曲线见图4(b)。MBF在0~4.0 ng/mL时具有良好的线性关系，线性回归方程为$y=1-0.26x$，相关系数R^2为0.995 0，通过计算得出试纸条的半定量检测限为0.40 ng/mL。

2.3.2　特异性的测定

MBF及其类似物的化学结构式见图5，试纸条特异性的试验结果见图6。用试纸条测定5 ng/mL

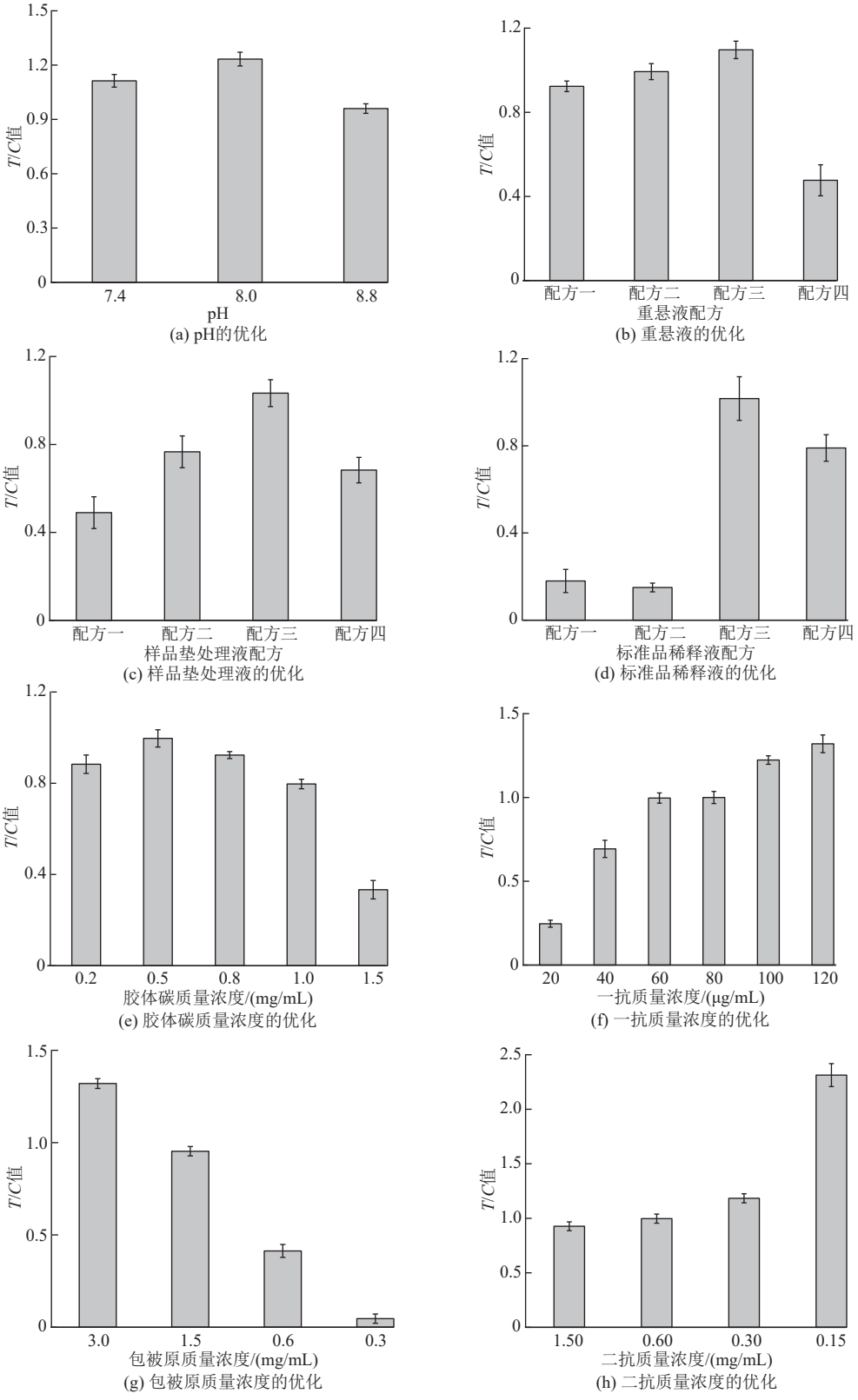
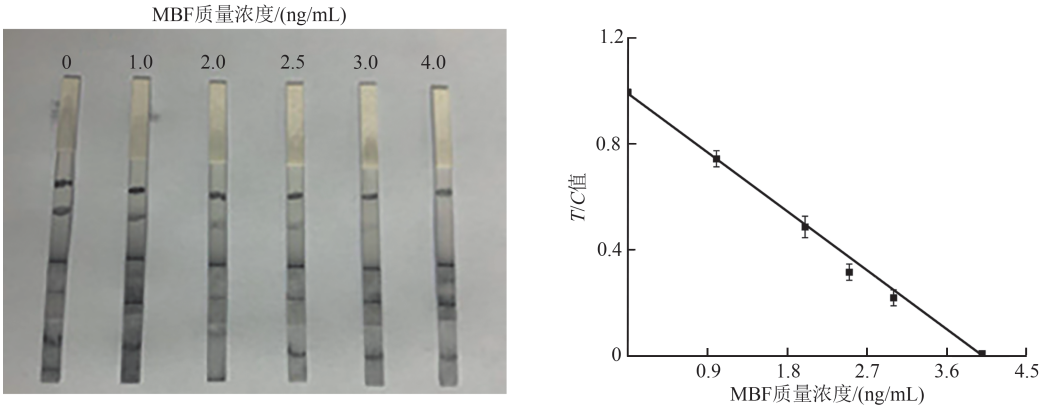


图 3　胶体碳试纸条检测条件的优化结果

Fig. 3　Optimization of detection conditions of carbon-labelled test strips

的 MBF 时，试纸条的 T 线没有显色，表明胶体碳-MBF 抗体与 MBF 发生了特异性结合。用试纸条测定 100 ng/mL 的其他氟喹诺酮类药物时，T 线均为深黑色，表明胶体碳-MBF 抗体没有与其他氟



(a) 试纸条检测MBF的实物图　(b) 试纸条检测MBF的标准曲线

图4　试纸条检测MBF的灵敏度

Fig. 4　Sensitivity of test strips for the detection of MBF

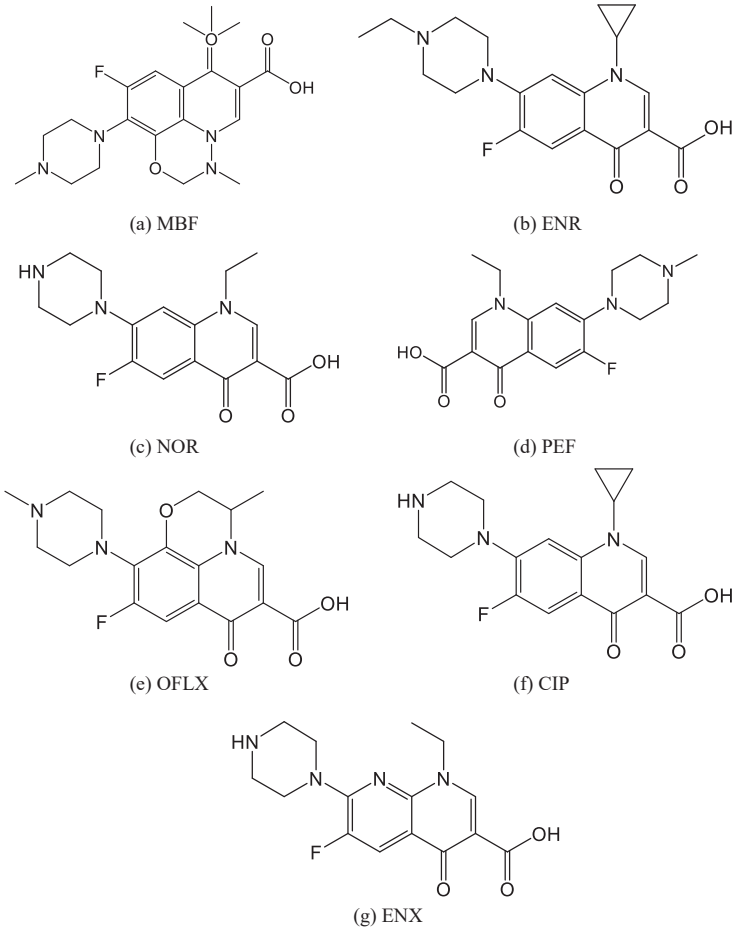


图5　MBF及其类似物的化学结构式

Fig. 5　Chemical structures of MBF and its analogues

喹诺酮类药物结合，而是和T线上包被原发生了结合。因此，试纸条对检测MBF具有良好的特异性，与其他喹诺酮类药物无交叉反应。

2.3.3　稳定性试验

试纸条在室温下储存8周和16周后，对MBF进行检测。如图7所示，试纸条的*T*/*C*值随着MBF质量浓度的增大而减小，且试纸条显色程度适中，梯度较明显，当MBF质量浓度为5 ng/mL时发生消线现象，说明试纸条稳定性良好，常温下可存放16周。

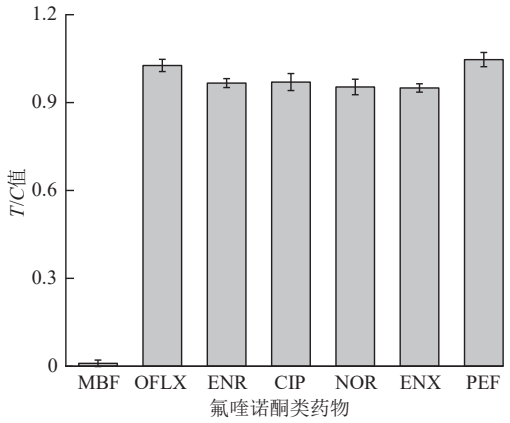


图 6　特异性分析

Fig. 6　Specificity analysis

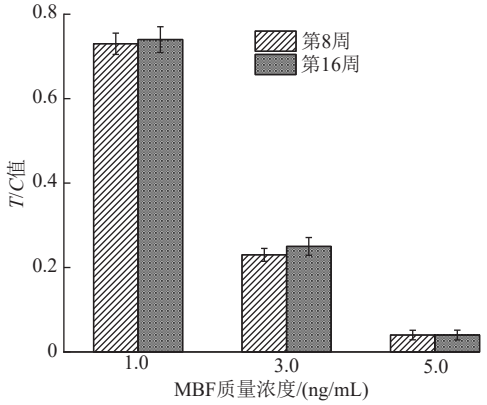


图 7　稳定性试验

Fig. 7　Stability test

2.4　加标回收试验

胶体碳试纸条与超高效液相色谱荧光检测法的加标回收检测结果见表 1。胶体碳试纸条测定奶粉样品的加标回收率为 81.00%~113.70%，测定鸡肉样品的加标回收率为 85.00%~89.30%，2 种样品的相对标准偏差为 9.97%~12.94%。通过超高效液相色谱荧光检测法测定奶粉样品的加标回收率为 94.00%~100.60%，测定鸡肉样品的加标回收率为 98.30%~105.00%，2 种样品的相对标准偏差为 0.80%~7.45%。加标回收试验结果表明，2 种测定方法的结果基本一致，说明胶体碳试纸条准确性良好。

表 1　加标回收试验结果

Table 1　Spiked recovery test results

样品	MBF 加标量/（ng/mL）	胶体碳试纸条			超高效液相色谱荧光检测法		
		测定量/（μg/kg）	加标回收率/%	相对标准偏差/%	测定量/（μg/kg）	加标回收率/%	相对标准偏差/%
奶粉	1	0.81±0.09	81.00	11.11	0.94±0.07	94.00	7.45
	3	3.41±0.34	113.70	9.97	2.94±0.09	98.00	3.11
	5	≥4.00	—	—	5.03±0.04	100.60	0.80
鸡肉	1	0.85±0.11	85.00	12.94	1.05±0.02	105.00	2.03
	3	2.68±0.27	89.30	10.07	2.95±0.06	98.30	2.05
	5	≥4.00	—	—	4.97±0.07	99.40	1.49

注：“—”表示检测过而无结果。

3　结论

试验以胶体碳为标记物，制备了一种检测 MBF 的免疫层析试纸条。在最优条件下，该试纸条检测 MBF 的消线值为 4.0 ng/mL，灵敏度比传统的胶体金免疫层析试纸条提高了 5 倍，半定量检测限为 0.4 ng/mL；加样后 10 min 即可观察检测结果。在奶粉和鸡肉样品中的加标回收结果与超高效液相色谱荧光检测法基本一致，试纸条在室温下可存放 16 周。综上，胶体碳试纸条快捷可靠，具备良好的特异性和稳定性，可应用于食品中 MBF 残留的灵敏、快速检测。

参考文献

[1] RUSCH M，SPIELMEYER A，MEIßNER J，et al. Efficient reduction of antibacterial activity and cytotoxicity of fluoroquinolones by fungal-mediated *N*-oxidation[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry，2017，65(15)：3118-3126.

[2] ALTAN F，SAYIN IPEK D N，CORUM O，et al. The effects of *Mannheimia haemolytica* and albendazole on marbofloxacin pharmacokinetics in lambs[J]. Tropical Animal Health and Production，2019，51(8)：2603-2610.

[3] DOKUZEYLÜL B，ÇELIK B，SIĞIRCI B D，et al. Clinical efficacy of marbofloxacin in dogs and cats diagnosed with lower urinary tract disorders[J]. Medycyna Weterynaryjna，2019，75(9)：549-552.

[4] WANG H X，WANG N，WANG B，et al. Antibiotics detected in urines and adipogenesis in school children[J]. Environment International，2016，89：204-211.

[5] MARTINEZ M，MCDERMOTT P，WALKER R. Pharmacology of the fluoroquinolones：a perspective for

the use in domestic animals[J]. The Veterinary Journal, 2006,172(1):10-28.

[6] CHEN X J, LI Z Z, GUO J Y, et al. Simultaneous screening for marbofloxacin and ofloxacin residues in animal-derived foods using an indirect competitive immunoassay[J]. Food and Agricultural Immunology, 2017,28(3):489-499.

[7] OLIVEIRA K R W, SVERSUT R A, SINGH A K, et al. Development and validation of HPLC assay method for marbofloxacin determination in veterinary chewable tablets [J]. Acta Chromatographica,2019,31(4):291-293.

[8] ARESTA A, COTUGNO P, ZAMBONIN C. Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin, and marbofloxacin in bovine urine, serum, and milk by microextraction by a packed sorbent coupled to ultra-high performance liquid chromatography[J]. Analytical Letters,2019,52(5):790-802.

[9] SONG Z T, XIAO Z M, FAN X, et al. Multiresidue determination of 26 quinolones in poultry feathers using UPLC-MS/MS and their application in residue monitoring [J]. Molecules,2023,28(9):3738.

[10] LEITE M, MARQUES A R, VILA POUCA A S, et al. UHPLC-ToF-MS as a high-resolution mass spectrometry tool for veterinary drug quantification in milk [J]. Separations,2023,10(8):457.

[11] YANG Y, LI X, LIN J, et al. A modified QuEChERS-based UPLC-MS/MS method for rapid determination of multiple antibiotics and sedative residues in freshwater fish [J]. Food Chemistry:X,2024,22:101268.

[12] 余婷婷,梁松,黄文慧,等. 净化柱结合超高效液相色谱-串联质谱检测动物源性食品中16种喹诺酮药物[J]. 食品与机械,2024,40(1):55-62,67.
YU T T,LIANG S,HUANG W H,et al. Establishment and application of clean-up combined with ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the detection of 16 quinolones in animal-derived food[J]. Food & Machinery,2024,40(1):55-62,67.(in Chinese)

[13] MORENO-GONZÁLEZ D, HAMED A M, GILBERT-LÓPEZ B, et al. Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples [J]. Journal of Chromatography A,2017,1510:100-107.

[14] 陈秀金,王雪晴,李兆周,等. 金纳米粒子/氧化石墨烯复合膜电化学免疫传感器的构建及其对鲜肉中马波沙星的检测[J]. 食品与发酵工业,2024,50(20):279-285.
CHEN X J,WANG X Q,LI Z Z,et al. Development of an electrochemical immunosensor based on gold nanoparticle/graphene oxide composite film and its detection of marbofloxacin in fresh meat[J]. Food and Fermentation Industries,2024,50(20):279-285.(in Chinese)

[15] 仇彩霞,陈秀金,付祖耀,等. 基于石墨烯-壳聚糖复合膜修饰电极的麻保沙星电化学免疫传感器的构建[J]. 食品与发酵工业,2022,48(16):50-55.
QIU C X,CHEN X J,FU Z Y,et al. Establishment of an electrochemical immunosensor for marbofloxacin analysis based on graphene oxide-chitosan nanocomposite film modified glass carbon electrode[J]. Food and Fermentation Industries,2022,48(16):50-55.(in Chinese)

[16] LUO M X, XING K Y, GUO Z, et al. Sensitive immunoassays based on a monoclonal antibody for detection of marbofloxacin in milk[J]. Journal of Dairy Science,2020,103(9):7791-7800.

[17] 赵贵山,林梦舟,李辛洁,等. 马波沙星单克隆抗体的制备及ELISA检测方法的初步建立[J]. 畜牧与兽医,2019,51(7):100-106.
ZHAO G S, LIN M Z, LI X H, et al. Preparation of monoclonal antibodies against Marbofloxacin and establishment of an ELISA test method [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine,2019,51(7):100-106.(in Chinese)

[18] 赵赟,蔡伊娜,张存政,等. 基于比色和荧光双信号检测戊唑醇的免疫层析试纸条的构建[J]. 食品与生物技术学报,2022,41(1):36-43.
ZHAO Y, CAI Y N, ZHANG C Z, et al. Fabrication of immunochromatography strip for tebuconazole based on colorimetric and fluorescent dual-signal detection [J]. Journal of Food Science and Biotechnology,2022,41(1):36-43.(in Chinese)

[19] ISHII T, SASAKI M, YAMADA K, et al. Immunochromatography and chemiluminescent enzyme immunoassay for COVID-19 diagnosis[J]. Journal of Infection and Chemotherapy,2021,27(6):915-918.

[20] SHEN B, ZHENG Y F, ZHANG X Y, et al. Clinical evaluation of a rapid colloidal gold immunochromatography assay for SARS-Cov-2 IgM/IgG[J]. American Journal of Translational Research,2020,12(4):1348-1354.

[21] 王冉冉,姚丽,姚帮本,等. 基于胶体金侧向层析原理的大米中痕量镉现场快速检测方法[J]. 食品与机械,2023,39(8):60-65,88.
WANG R R,YAO L,YAO B B,et al. A method for on-site and rapid detection of trace cadmium in rice based on colloidal goldlateral chromatography [J]. Food & Machinery,2023,39(8):60-65,88.(in Chinese)

[22] HOLUBOVÁ-MIČKOVÁ B, BLAŽKOVÁ M, FUKAL L, et al. Development of colloidal carbon-based immunochromatographic strip for rapid detection of carbaryl in fruit juices[J]. European Food Research and Technology,2010,231(3):467-473.

[23] SHI F, ZHAO Y, SUN Y X, et al. Development and application of a colloidal carbon test strip for the detection of antibodies against *Mycoplasma bovis*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology,2020,36(10):157.

（责任编辑：闫林红）