

# 多残留金标检测法在牛奶抗生素残留检测中的应用

王明利 张浩\*

北京农业职业学院畜牧兽医系,北京 102442

**摘要** 本试验选取经过检测不含氨基糖苷类和氟喹诺酮类药物的牛奶样品,选取氨基糖苷类、氟喹诺酮类、头孢类药物等 9 类药物的 26 种标准品,通过加入不同浓度抗生素标准品,用金标检测卡进行检测,验证灵敏度和特异性,以期研究金标快速检测卡在牛奶抗生素残留检测中的应用。试验结果显示,氨基糖苷类药物庆大霉素和卡那霉素的灵敏度均为 0.10  $\mu\text{g/mL}$ 、其他同源药物和非同源药物为阴性,氟喹诺酮类药物的灵敏度为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ ,试验中其他类药物检测均为阴性。由此可知,金标药物残留检测卡具有较高的灵敏度,特异性比较强,与非同源的其他抗生素无交叉反应,检测卡操作简单,方便快捷,结果容易判定,可用于牛奶抗生素残留的现场检测和大量筛查。

**关键词** 金标检测法;牛奶;抗生素残留

在奶牛的饲养过程中,治疗细菌性疾病需要用到抗生素,而为了预防疾病有时也会在饲料中添加抗生素,大剂量使用抗生素会造成牛奶药物残留,给人体健康带来危害<sup>[1]</sup>。另外,随着经济发展和人民生活水平的提高,人们对生活质量和健康日益重视。我国在畜禽生产中禁止和限制使用抗生素有明确规定。基于上述原因检测牛奶中抗生素残留显得格外重要<sup>[2]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1)待检牛奶样品。从北京农业职业学院实训基地采集 10 份新鲜牛奶,每份 100 mL,分装在 100 mL 的蓝盖瓶里,牛奶经过检测无氟喹诺酮类和氨基糖苷类药物残留,冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$  冷藏备用。

2)标准品。选择比较关注的抗生素残留的 9 类药物,分别为氨基糖苷类药物、氟喹诺酮类药物、头孢类药物、磺胺类药物、大环内酯类药物、激素类药

物、青霉素类药物、氯霉素类药物和四环素类药物。每类药物中选择 1~6 种抗生素标准品。标准品溶液均购自北京谱析科技有限公司,其溶液浓度及规格见表 1。

3)多残留金标快速检测卡。批号:MULMI01862053、MULMI01862058 和 MULMI01862137,由北京某生物科技有限公司提供。

4)主要器材。分析天平(AEL-120 型,日本岛津公司生产);微量移液器(大龙,上海汉林实验仪器有限公司生产);微型旋涡混合仪(WH-2 型,上海沪西分析仪器厂生产);海尔冰箱(BCD-629WDEYU1);10、20、100 mL 容量瓶;2 mL EP 管(带管架);移液器吸头和配套吸头盒等。

### 1.2 方法

1)标准溶液的配制。

①检测卡灵敏度标准溶液的配制。配制 9 种标准溶液的贮备液:浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的庆大霉素和卡那霉素;浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  氧氟沙星、诺氟沙星、那氟沙星、恩诺沙星、依诺沙星、沙拉沙星;配制以上 6

收稿日期:2020-07-20

基金项目:北京农业职业学院科技研发推广项目(XY-YF-17-09);北京市特色高水平骨干专业群项目-动物医学专业群项目-技术平台与社会服务建设项目(PXM2020-157102-000060)

\* 通讯作者

王明利,男,1965 年生,讲师。

表 1 抗生素标准品的种类及浓度

药物种类	浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	规格/mL	药物种类	浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	规格/mL		
氨基糖苷类	氨基糖苷类	1 000	1.0	头孢氨苄	100	1.2	
	卡那霉素	100	1.2	头孢类及磺胺类	头孢噻唑	100	1.2
	链霉素	100	1.0		磺胺嘧啶	100	1.2
	新霉素	100	1.0	磺胺二甲嘧啶	100	1.2	
	双氢链霉素	100	0.1	红霉素	100	1.2	
	大观霉素	1 000	1.0	大环内酯类及激素类	泰乐菌素	100	1.2
	氧氟沙星	100	1.0		己烯雌酚	200	1.2
	氟喹诺酮类	依诺沙星	100	1.2	孕酮	100	1.0
恩诺沙星		100	1.2	青霉素类及氯霉素类	青霉素 G	100	1.2
诺氟沙星		100	1.2		氟苯尼考	100	1.2
那氟沙星		100	1.0	四环素类	四环素	100	1.0
沙拉沙星		1 000	1.2		土霉素	100	1.2
					金霉素	100	1.0
			强力霉素		100	1.0	

种氟喹诺酮类药品标准品溶液的混和液,其浓度均为 5  $\mu\text{g/mL}$ ,冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。

配制浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素贮备液:用 1 mL 移液器吸取 1 mL 1 000  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素标准品溶液,沿着内壁缓缓注入 100 mL 容量瓶中,用纯净水冲洗枪头 3 次并将冲洗液注入容量瓶,再用纯净水定量至容量瓶刻度,摇匀,静置备用。

配制浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素贮备液:用 1 mL 移液器吸取 1 mL 100  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素标准品溶液,沿着内壁缓缓注入 10 mL 带底座的容量瓶中,用纯净水冲洗枪头 3 次并将冲洗液注入容量瓶,再用纯净水定量至容量瓶刻度,摇匀,静置备用。

配制浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  氧氟沙星贮备液:用 1 mL 移液器吸取 1 mL 100  $\mu\text{g/mL}$  氧氟沙星标准品溶液,沿着内壁缓缓注入 10 mL 带底座的容量瓶中,用纯净水冲洗枪头 3 次并将冲洗液注入容量瓶,再用纯净水定量至容量瓶刻度,摇匀,静置 2 min,制备成浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  氧氟沙星贮备液;再用 5 mL 移液器吸取 5 mL 10  $\mu\text{g/mL}$  氧氟沙星贮备液,沿着内壁缓缓注入 10 mL 带底座的容量瓶中,用纯净水冲洗枪头 3 次并将冲洗液注入容量瓶,再用纯净水定量至容量瓶刻度,摇匀,静置 2 min,备用。制备成浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  氧氟沙星贮备液。

配制浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  的诺氟沙星、那氟沙星、恩诺沙星、依诺沙星标准品的贮备液:标准品浓度均为 100  $\mu\text{g/mL}$ ,配制方法同氧氟沙星。

配制浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  沙拉沙星贮备液:用

1 mL 移液器吸取 1 mL 100  $\mu\text{g/mL}$  沙拉沙星标准品溶液,沿着内壁缓缓注入 20 mL 带底座的容量瓶中,用纯净水冲洗枪头 3 次并将冲洗液注入容量瓶,再用纯净水定量至容量瓶刻度,摇匀,静置备用。

配制 6 种氟喹诺酮类药品浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  的混和液:用移液器分别取浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的氧氟沙星、诺氟沙星、那氟沙星、恩诺沙星、依诺沙星各 1~20 mL 带底座的容量瓶中,再取 1 mL 浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$ (取配制沙拉沙星 1 000  $\mu\text{g/mL}$  1~100 mL) 沙拉沙星溶液至这个容量瓶,纯净水定容至刻度线,摇匀静置,冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。

②检测卡特异性标准溶液的配制。根据标准品的化学特性配制不同标准品溶液,庆大霉素和卡那霉素标准品贮备液的浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ,氟喹诺酮类贮备液的浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ ,4  $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。

配制 100  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素溶液:用 1 mL 移液器吸取 1 mL 1 000  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素标准品溶液,沿着内壁缓缓注入 10 mL 带底座的容量瓶中,用纯净水冲洗枪头 3 次并将冲洗液注入容量瓶,再用纯净水定量至容量瓶刻度,摇匀,静置备用。

配制 100  $\mu\text{g/mL}$  卡那霉素溶液:采购的标准品浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ ,直接用于试验。

2)检测卡的灵敏度试验。

①检测卡灵敏度试验具体操作方法:将牛奶阴性样品配制成庆大霉素浓度为 0.00、0.05、0.10 和 0.15  $\mu\text{g/mL}$  样品<sup>[9]</sup>,每种浓度样品 10 份,配制 4 个浓度卡那霉素的牛奶样品各 10 份;配制氟喹诺酮

类混合标准品牛奶样品各 10 份,浓度分别为 0.00、0.025、0.050 和 0.100  $\mu\text{g/mL}$ ,每份样品为 10 mL<sup>[3]</sup>。冰箱 4  $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。

②配制 0.05 和 0.10  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素的牛奶样品:用移液器吸取 1 mL 浓度为 10  $\mu\text{g/mL}$  的庆大霉素标准品贮备液,沿颈口内壁缓缓注入 100 mL 容量瓶,吸头用牛奶冲洗 3 次,并将清洗液注入容量瓶中,用牛奶定容,摇匀,静置备用。制备成浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素的牛奶溶液;0.1  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素的牛奶溶液稀释 2 倍,制备成 0.05  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素的牛奶溶液;每种浓度溶液配制 100 mL 分装成 10 份备用。

③配制 0.015  $\mu\text{g/mL}$  庆大霉素的牛奶溶液:用移液器吸取 150  $\mu\text{L}$  至 100 mL 容量瓶,用牛奶定容至刻度,摇匀、静置,4  $^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。

④制备 0.1  $\mu\text{g/mL}$  和 1  $\mu\text{g/mL}$  抗生素牛奶样品:将 2 mL 的 EP 管编号 1~20 放置在 EP 管架上,用 1 mL 移液器分别吸取 1 mL 鲜奶样品放置在 20 支 EP 管里,防止重复和遗漏,移液器吸取 1  $\mu\text{L}$  浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的庆大霉素、卡那霉素溶液等氨基糖苷类、头孢类药物等 20 种标准液依次放入 20 个 EP 管内,反复吹打使牛奶与抗生素混匀。制备成抗生素浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  的牛奶样品。用同样的方法制备抗生素浓度为 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的牛奶样品,编号 1~20 (吸取 10  $\mu\text{L}$  100  $\mu\text{g/mL}$  抗生素至 1 mL 牛奶中)。

⑤制备 0.05  $\mu\text{g/mL}$  和 0.5  $\mu\text{g/mL}$  抗生素牛奶样品(氟喹诺酮类)制备方法同上,用于特异性试验。

3)检测卡灵敏度检测试验方法。选取已经配制的庆大霉素、卡那霉素和氟喹诺酮类药物 4 种浓度的样品奶,按照检测卡的操作步骤进行检测,每份牛奶样品用 3 个批号的检测卡检测,3 个重复,每份牛奶样品检测 9 次<sup>[4]</sup>,观察结果。确定检测卡的灵敏度。

4)检测卡特异性检测试验方法。将上述配制的

不同抗生素浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  和 1  $\mu\text{g/mL}$  的牛奶样品,用 3 个不同批号的检测卡进行检测,确定检测卡的特异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 检测卡灵敏度的测定

由表 2 可知,检测卡进行灵敏度试验,庆大霉素和卡那霉素的灵敏度均为 0.100  $\mu\text{g/mL}$ ,氟喹诺酮类药物混和液灵敏度为 0.05  $\mu\text{g/mL}$ 。

### 2.2 检测卡特异性的测定

由表 3 可知,利用多残留金标检测卡,检测上述人为残留牛奶样品。庆大霉素和卡那霉素浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  和 1  $\mu\text{g/mL}$  的牛奶样品,均显示阳性,链霉素、新霉素、双氢链霉素和大观霉素浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  和 1  $\mu\text{g/mL}$  的牛奶样品均显示阴性,说明检测卡在检测牛奶中氨基糖苷类药物残留时只能检出庆大霉素和卡那霉素,而对其他同源或不同源药物无交叉反应;氧氟沙星、依诺沙星、恩诺沙星、诺氟沙星和那氟沙星这 5 种抗生素浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  和 1  $\mu\text{g/mL}$  的牛奶样品均显示阳性;沙拉沙星浓度在 0.1  $\mu\text{g/mL}$  显阴性,1  $\mu\text{g/mL}$  显阳性,说明检测卡在检测氟喹诺酮类药物残留时可以检出大多数药物,同源的少数药物达到一定浓度(0.5  $\mu\text{g/mL}$ )可以检出,且与其他非同源药物间不存在交叉反应,头孢类、磺胺类、大环内酯类、激素类、青霉素类、氯霉素类和四环素类和几种药浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  和 1  $\mu\text{g/mL}$  的牛奶样品均显示阴性。试验检出结果对照农业农村部 235 公告<sup>[5]</sup>,检测卡检出的残留量低于国家许可的残留限量要求<sup>[6]</sup>。

## 3 结论

本试验所用的多项抗生素药物残留试剂卡基本原理为抗原抗体金标免疫法,此检测卡可以检测庆大霉素、卡那霉素和氧氟沙星等 6 种氟喹诺酮类

表 2 检测卡灵敏度检测试验结果

指标	庆大霉素				卡那霉素				氟喹诺酮			
	0.000	0.050	0.100	0.150	0.000	0.050	0.100	0.150	0.000	0.025	0.050	0.100
浓度/ ( $\mu\text{g/mL}$ )	0.000	0.050	0.100	0.150	0.000	0.050	0.100	0.150	0.000	0.025	0.050	0.100
样品/个	01~10	11~20	21~30	31~40	41~50	51~60	61~70	71~80	81~90	91~100	101~110	111~120
结果	全阴	阴性 7	全阳	全阳	全阴	阴性 8	全阳	全阳	全阴	阴性 8	全阳	全阳

注:所有样品都用 3 种批号不同的检测卡进行检测,每种批号的检测卡对每份牛奶样品做 3 个重复,这样每个样品实测 9 次。表中用“阴性”或“阳性”表示结果,其中“阴性”后面的数字表示阴性的个数。

表 3 多残留金标检测卡检测药残牛奶的结果

药物种类	浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	结果	药物种类	浓度/( $\mu\text{g/mL}$ )	结果		
氨基糖苷类	庆大霉素	0.1	+	头孢类及磺胺类	头孢氨苄	0.1	-
		1.0	+			1.0	-
	卡那霉素	0.1	+			0.1	-
		1.0	+			1.0	-
	链霉素	0.1	-			0.1	-
		1.0	-			1.0	-
	新霉素	0.1	-			0.1	-
		1.0	-			1.0	-
	双氢链霉素	0.1	-			0.1	-
		1.0	-			1.0	-
氟喹诺酮类	大观霉素	0.1	-	大环内酯类及激素类	秦乐菌素	0.1	-
		1.0	-			1.0	-
	氧氟沙星	0.05	+			0.1	-
		0.50	+			1.0	-
	依诺沙星	0.05	+			0.1	-
		0.50	+			1.0	-
	恩诺沙星	0.05	+			0.1	-
		0.50	+			1.0	-
	诺氟沙星	0.05	+			0.1	-
		0.50	+			1.0	-
四环素类	那氟沙星	0.05	+	青霉素类及氯霉素类	青霉素 G	0.1	-
		0.50	+			1.0	-
	沙拉沙星	0.05	-			0.1	-
		0.50	+			1.0	-
		0.05	-			0.1	-
		0.50	+			1.0	-
				0.1	-		
				1.0	-		
				0.1	-		
				1.0	-		

注：“+”表示结果为阳性，“-”表示结果为阴性。

药物，其灵敏度分别为 0.100、0.100、0.050  $\mu\text{g/mL}$ 。强调一点，本试验检测氟喹诺酮类的灵敏度 0.050  $\mu\text{g/mL}$ ，检测的为氟喹诺酮类药物含量的总和。该试剂卡具有较强的特异性，与非同源的其他抗生素没有交叉反应。

试剂卡具有操作步骤简单、方便快捷、稳定性好、特异敏感、结果判断直观，同时不受环境约束等特点，适用于基层、现场大量样品同时筛查及普查工作。在乳品抗生素残留检测中具有广阔的应用前景。

### 参 考 文 献

[1] 夏行昊.牛奶中抗生素残留的危害及检测方法[J].现代畜牧科

技,2019,53(5):139-140.

[2] 赵红丽. 抗生素临床合理应用与人体健康 [J]. 健康之友,2019 (10):33-34.

[3] 马弋,邵翠翠,刘艳,等.多残留金标快速检测法在乳品抗生素残留中的应用[J].公共卫生与预防医学,2015,26(5):95-96.

[4] 李向梅,王战辉,肖希龙,等.同时检测牛奶中喹诺酮类和庆大霉素残留的胶体金免疫层析方法研究 [J]. 中国农业科学,2014 (19):3883-3889.

[5] 张丽茹,黄新红,张东丽,等.鲜牛奶中抗生素残留的原因及常用检测方法[J].现代畜牧科技,2018,37(1):109.

[6] 李运朝,及华,温之雨,等.3种植物生长调节剂在京津冀地区主要瓜果类蔬菜中的残留动态及安全风险评估[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):3011-3017.

【责任编辑：胡 敏】