



背景荧光猝灭免疫层析测定牛奶中林可霉素^{*}

马雪红¹, 吴晓霞², 肖文浚², 李久彤², 李新霞^{2**}, 王玉文³

(1. 新疆医科大学中心实验室, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

3. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的: 采用背景荧光猝灭-免疫层析法现场快速检测牛奶中林可霉素。**方法:** 采用安装有 Simple 1 软件系统的背景荧光猝灭免疫分析仪, 包括检测卡体系和背景荧光猝灭免疫分析仪, 检测卡是其核心部件。基于背景荧光猝灭免疫层析法, 建立牛奶中林可霉素的检测方法, 制备了可用于快速检测的检测卡, 同时进行方法学验证和样品测定。**结果:** 确定检测卡最佳加样量为 100 μL , 最佳反应时间为 10 min; 检测卡的灵敏度为 $0.088 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 线性范围曲线方程 $Y = -5.000 \times 10^{-6} X^3 + 0.000 4 X^2 + 0.001 6 X + 0.489 2$, 林可霉素在 $0.0 \sim 60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间呈良好的相关性 ($r = 0.992 6$)。检测卡批间差 RSD 均小于 2%; 长期重复性试验 RSD 均小于 1%。采用本方法实测牛奶样本, 与国标方法检测结果比较, t 检验结果 $P > 0.05$, 说明采用背景荧光猝灭-免疫层析法和国标法 2 种方法比较没有显著性差异。**结论:** 本法研制的检测卡专属性强, 灵敏度高, 在现场 10 min 内即可快速定量测定牛奶中林可霉素的含量, 可应用于生鲜牛奶的质量控制及现场检测。

关键词: 林可霉素; 背景荧光猝灭; 免疫层析; 牛奶; 检测卡

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2019)12-2178-06

doi: 10.16155/j.0254-1793.2019.12.08

Test of lincomycin in milk based on background fluorescence quenching immune chromatography^{*}

MA Xue-hong¹, WU Xiao-xia², XIAO Wen-jun², LI Jiu-tong², LI Xin-xia^{2**}, WANG Yu-wen³

(1. Central laboratory, Xin Jiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. College of Pharmacy, Xin Jiang Medical University, Urumqi 830011, China; 3. Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830000, China)

Abstract Objective: To establish a method of background fluorescence quenching immune chromatography (bFQIC) to determine lincomycin in milk. **Methods:** The instrument system of background fluorescence quenching immunochromatographic assay (bFQICA) used in this study included the test card system and the background fluorescence quenching immunoassay analyzer (Simple 1), The detection card was the core component. The detection method of lincomycin in milk was established based on background fluorescence quenching and immunochromatography, and a test card was developed for rapid detection, methodology validation and sample

* 国家自然科学基金项目 (81560564); 新疆维吾尔自治区自科技支疆项目 (2016E02036)

** 通信作者 Tel: (0991) 4365034; E-mail: lxx6668@163.com

第一作者 Tel: (0991) 4366429; E-mail: mxh6867@163.com



determination were performed simultaneously. **Results:** The best amount of sample quantity and react timing were 100 μL and 10 min. The sensitivity of the card was $0.088 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, the linear equation was $Y = -5.000 \times 10^{-6} X^3 + 0.0004 X^2 + 0.0016 X + 0.4892$ ($r = 0.9926$), and the linear concentration range was $0.0\text{--}60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, the RSD was lower than 2% and the RSDs of long-term repetitive experiment were lower than 1%. t test of the results obtained from the proposed method and the international test method gave a significance of $P > 0.05$, which illustrated that there was no difference between the methods. **Conclusion:** The test card developed in this study is specific and sensitive, which can be used for the rapid quantitative determination of lincomycin content in fresh milk within 10 minutes in the field, and can be used for the quality control and field detection of fresh milk.

Keywords: lincomycin; background fluorescence quenching; immune chromatography; milk; test card

林可霉素 (lincomycin) 属于林可胺类抗生素^[1], 对革兰氏阳性菌有较强抗菌作用, 对支原体也有抑菌作用, 但对革兰氏阴性菌无效^[2]。林可霉素临床上主要应用于肺炎球菌及厌氧菌所致的呼吸道感染、心内膜炎及厌氧菌所致的腹腔感染等, 还可用于链球菌和葡萄球菌所致的败血症、慢性骨和关节感染的外科辅助治疗等^[3]。林可霉素作为兽药, 常被添加在饲料中或直接乳房注射治疗奶牛的乳房炎, 但残留在乳腺管中的林可霉素, 会经乳汁排出^[4], 导致生鲜乳中抗生素残留, 可引起消费者机体的过敏反应或抗药性^[5]。中华人民共和国农业部公告第 253 号-2002 规定, 牛奶中林可霉素残留限量为 $100 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[6]。

在进出口动物源性食品 SNT2218-2008 林可胺类药物残留量检测方法中林可霉素的检测方法为液相色谱-串联质谱法和质谱法, 文献报道有酶联免疫吸附法 (ELISA)^[6-7]、化学发光法^[7-8]、高效液相色谱法 (HPLC)^[9]、高效液相色谱-质谱联用法 (HPLC-MS)^[10]、气相色谱-质谱法 (GC-MS)^[11] 及胶体金免疫层析法^[12] 等。嗜热链球菌抑制法和嗜热脂肪芽孢杆菌抑制法试验价格低廉, 但样品前处理过程烦琐, 重复性差^[13]; HPLC 及 HPLC-MS 等方法灵敏度高, 特异性好, 但是仪器便携性差, 价格昂贵, 样品前处理复杂; ELISA 方法灵敏度较高、快速、经济, 适用于实验室大量样本初筛, 不适合现场快速检测; 胶体金免疫层析因快速、简便且经济实用, 在食品检测的大量样本筛查中表现出较强的优势, 但只能用于定性检测, 而不能进行定量, 筛选后的阳性样本需送实验室进行进一步定量分析。

本文基于背景荧光猝灭免疫层析技术, 建立检测

牛奶中林可霉素的方法, 并将标准曲线的信息制成二维码, 完善仪器系统, 用于实际样品的测定, 可在现场快速完成检测。

1 仪器与材料

1.1 仪器与材料 背景荧光猝灭-免疫分析仪 (ZC2015-0797, 上海鑫谱生物科技有限公司); 林可霉素标准物质 (Millipore 公司, 批号 20160911, 纯度 98%); 林可霉素试纸条、固定有林可霉素金标抗体的小试杯 (上海鑫谱生物科技有限公司, 批号 20160926), 标准牛奶样品 (经检测没有林可霉素, 上海荣辉生物科技有限公司, 批号 20161011); 市售牛奶样品 (新疆西域春乳业责任有限公司, 批号 20171204); 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer solution, PBS, pH7.4, 天津灏洋华科生物科技有限公司)。

1.2 实验室自制牛奶供试品

市售牛奶样品未检出林可霉素, 为了验证背景荧光猝灭免疫层析法 (background fluorescence quenching immunochromatographic assay, bFQICA) 和国标规定方法的差异, 本实验在市售牛奶样品中人为添加一定量的林可霉素标准物质, 制成含一定浓度林可霉素的牛奶供试品, 分别标记为 004、005、006。

1.3 溶液的配制

林可霉素储备液: 将林可霉素标准物质用 PBS 配成 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的林可霉素浓度标准溶液。

林可霉素系列浓度标准溶液: 将 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 林可霉素标准溶液, 用标准牛奶样品制成 10、20、30、40、60 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的林可霉素系列浓度标准溶液。

2 方法与结果

2.1 测定原理与方法

bFQICA 的仪器系统部分包括检测卡体系和背景

荧光猝灭免疫分析仪 (Simple 1) (见图 1)^[14], 仪器安装有 Simple 1 软件系统。背景荧光猝灭免疫层析分析仪的核心部件是检测卡, 检测卡体系由 5 部分组成 (见图 2): 底部固定有胶体金标记的目标物抗体 (金标抗体) 和胶体金标记的羊抗鼠抗体的小试杯, 供试

品溶液进行层析的样品垫, 固定有荧光试剂的硝酸纤维素膜荧光区 (可产生背景荧光 F_0), 在荧光区包被有“目标物抗原-牛血清白蛋白偶联物”的测试线 (T 线), 包被有“羊抗鼠抗原-牛血清白蛋白偶联物”的控制线 (C 线)。



图 1 背景荧光猝灭-免疫层析分析仪及检测卡

Fig. 1 Background fluorescence quenching immune chromatography and test card

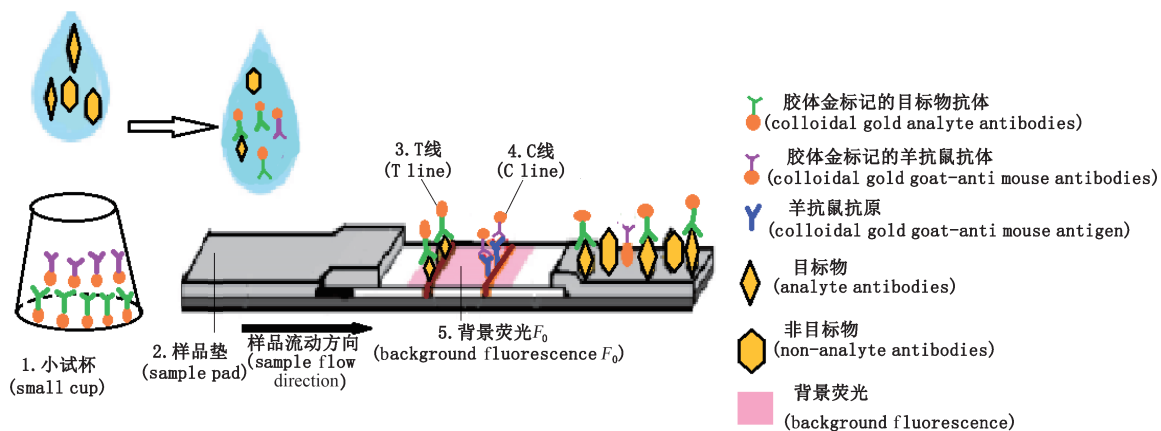


图 2 背景荧光猝灭免疫层析检测示意图

Fig. 2 Background fluorescence quenching immune chromatography assay

检测原理: 将一定量样品溶液, 加入固定有金标抗体小试杯中, 混匀 (样品溶液中的待测目标物-林可霉素抗原与金标抗体特异性结合), 吸取一定量的混合溶液滴加至样品垫上, 通过毛细管作用进行层析。当混合溶液到达 T 线处, 剩余的金标抗体与 T 线处的目标物-林可霉素抗原结合, 形成抗原-金标抗体复合物, 被截留在 T 线上, 使背景荧光猝灭, 以 T 线处荧光强度的测量值记为 F_1 , 荧光猝灭

程度 (F_1/F_0) 与供试品中待测目标物含量有关。当供试品中目标物浓度大时, 结合小试杯中金标抗体的量就多, 小试杯中剩余的金标抗体与 T 线处“目标物抗原-牛血清白蛋白偶联物”结合的少, 猝灭程度减弱, F_1/F_0 的值增大。因此, 零值样本 F_1/F_0 值最小, F_1/F_0 随待测物浓度增大而增加。为对试纸条进行质控, 在具有背景荧光的硝酸纤维素膜上还固定了“羊抗鼠抗原-牛血清白蛋白偶联物” (C 线), 当上述混

合溶液继续前行到达C线处,金标羊抗鼠抗体与C线处的“羊抗鼠抗原-牛血清白蛋白偶联物”结合,使C线处的背景荧光发生一定的猝灭(见图2)。说明试纸条质量合格。

2.1 反应时间与加样量的确定

2.1.1 反应时间的选择 取200 μL 标准牛奶样品,加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀后吸取120 μL 到加样孔中,分别层析8 min和10 min,用背景荧光猝灭-免疫分析仪检测,记录 F_1/F_0 的值,结果见表1,层析时间为10 min时,RSD为4.3%,所以选择反应时间为10 min。

表1 不同反应时间的 F_1/F_0

样本编号 (sample No.)	F_1/F_0	
	8 min	10 min
1	0.473 0	0.448 2
2	0.491 1	0.426 7
3	0.431 6	0.437 1
4	0.434 9	0.401 5
5	0.465 2	0.423 5
6	0.478 1	0.436 4
RSD/%	6.1	4.3

2.1.2 加样量的选择 取200 μL 标准牛奶样品,加到固定有金标抗体的小试杯中,混匀,再各吸取混匀后的标准牛奶样品80、100、120 μL 分别到3个测试卡的加样孔中,层析10 min,用背景荧光猝灭-免疫分析仪检测,记录 F_1/F_0 的值,结果见表2。当加样量为100 μL 时,RSD为1.4%,故选择100 μL 加样量。

表2 不同加样量的 F_1/F_0

样本编号 (sample No.)	F_1/F_0		
	80 μL	100 μL	120 μL
1	0.436 4	0.385 7	0.301 3
2	0.457 9	0.380 6	0.312 8
3	0.409 1	0.371 9	0.343 0
4	0.411 7	0.380 2	0.311 8
5	0.458 3	0.382 6	0.348 5
6	0.425 9	0.376 0	0.327 7
RSD/%	6.4	1.4	3.7

2.2 样品测定

取牛奶供试品200 μL 至固定有金标抗体的小试杯中,充分混匀后吸取100 μL 滴加到检测卡的加样孔,室温下层析10 min后,将检测卡插入仪器的插卡口,点击测定。

2.3 方法学验证

2.3.1 曲线方程与范围 分别吸取“1.3”项林可霉素系列浓度标准溶液,按“2.2”项下方法操作,记录 F_1/F_0 ,结果见表3。以系列林可霉素质量用的为横坐标 X ,对应的 F_1/F_0 为纵坐标 Y ,进行回归,得回归方程:

$$Y = -5.000 \times 10^{-6} X^3 + 0.000 4 X^2 + 0.001 6 X + 0.489 2$$

$$r = 0.992 6$$

表明林可霉素质量浓度在0.0~60 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间呈良好的相关性。标准溶液用PBS逐级稀释,以信噪比 $S/N=3$ 计算检测下限为0.088 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表3 精密度结果

样品编号 (sample No.)	F_1/F_0		
	10/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	30/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	40/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
1	0.578 3	0.885 3	0.741 5
2	0.593 1	0.891 2	0.736 6
3	0.563 4	0.890 5	0.746 3
4	0.579 5	0.885 8	0.751 0
5	0.572 8	0.879 6	0.741 3
6	0.567 1	0.895 1	0.759 0
RSD/%	1.3	0.60	1.1

2.3.2 精密度试验 取“1.3”项下10、30、40 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 3个浓度的林可霉素标准溶液,按“2.2”项下方法操作,记录 F_1/F_0 ,见表3。低、中、高浓度林可霉素的 F_1/F_0 值的RSD($n=6$)依次为1.3%、0.60%、1.1%。

2.3.3 加标回收率 取市售牛奶样品1 mL置EP管中,分别加入1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的林可霉素标准溶液20、30、40 μL ,每个浓度平行3份,按“2.2”项下方法操作,记录各样品中林可霉素的检测浓度。结果显示,3种不同浓度(低、中、高)的牛奶样品中林可霉素平均加标回收率分别为103.4%、99.7%、98.5%,RSD分别为0.71%、0.82%、1.9%。

2.3.4 重复性试验 取市售牛奶样品995 μL 于EP管中,再加入1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的林可霉素标准溶液

5 μL , 混匀, 配成 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 牛奶供试品。按“2.2”项下方法操作, 记录供试品中林可霉素检测值的 F_1/F_0 , 计算测定浓度。结果显示, F_1/F_0 平均值为 0.5139, RSD 为 0.82%, 浓度平均值为 $5.067 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, RSD 为 1.3% ($n=6$)。

2.3.5 稳定性试验 取同一批次林可霉素检测卡和“2.3.1”项下林可霉素系列标准溶液, 按“2.2”项下方法操作。每个月做 1 次标准曲线, 连续做 5 个月。结果显示, 5 个月内, 0、10、20、30、40、60 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 系列标准溶液各点对应的 RSD 为 0.42%、0.35%、0.39%、0.27%、0.24%、0.31%。

2.3.6 二维码的制作 将获得的曲线方程和对应林可霉素名称输入二维码制码器, 制成二维码, 贴于检测卡上。

2.3.7 样品测定 取“1.2”项下制备的 004、005、006 牛奶供试品分别采用背景荧光猝灭-免疫层析法和国标方法检测(表 7)。采用 SPSS 17.0 软件, 对背景荧光猝灭-免疫层析法测定值和国标测定值经 t 检验分析, $P>0.05$, 说明 bFQICA 法和国标方法没有显著性差异。

表 7 牛奶样品测定结果 ($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab. 7 Determination of milk samples

样品编号 (sample No.)	bFQICA	国标方法 (national standard method)
004	318.5 ± 2.1	325.0 ± 2.0
005	232.4 ± 1.6	237.0 ± 2.3
006	45.0 ± 1.3	42.8 ± 1.8

3 讨论

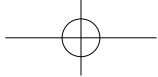
与传统测定林可霉素的方法相比, 本方法是基于抗原、抗体的反应, 所以专属性强。本研究中的硝酸纤维素膜上标记有背景荧光, 胶体金猝灭剂与抗体结合, 硝酸纤维素膜上的 T 线处固定有对应的抗原, 当液体在试纸条上流动, T 线处抗原-抗体-胶体金结合, 引起 T 线处背景荧光猝灭, 猝灭的程度用 F_1/F_0 表示, 进行定量分析, 所以检测灵敏度高。

本研究将检测牛奶中林可霉素标准曲线的信息制成二维码, 不仅完善了检测卡, 而且二维码的引用, 可以使检测人员不用现场做标准曲线, 使检测变得方便、快捷, 本检测卡检测牛奶中林可霉素

的时间为 10 min; 检测仪器内有内置 WIFI, 检测数据可立即发送; 另外将制成的检测卡应用于牛奶样品的测定, 结果与资质单位的检测结果用 t 检验分析, 无明显差异。本方法灵敏度高, 操作简便, 反应时间短, 可实现牛奶中林可霉素的现场快速定量检测, 为本方法广泛地应用于食品安全领域奠定了基础。

参考文献

- [1] 张小辉, 职爱民, 侯玉泽, 等. 林可霉素人工抗原的合成与鉴定[J]. 西北农业学报, 2012, 21(8): 1
ZHANG XH, ZHI AM, HOU YZ, *et al.* Synthesis and identification of lincomycin artificial antigen[J]. Acta Agric Boreali-occident Sin, 2012, 21(8): 1
- [2] 叶兆伟, 吴海港, 刘锦妮, 等. 林可霉素制剂中林可霉素含量测定方法研究进展[J]. 信阳农林学院学报, 2016, 26(2): 102
YE ZW, WU HG, LIU JN, *et al.* Research on the progress of lincomycin concet determination method[J]. J Xinyang Agric Forestry Univ, 2016, 6(2): 102
- [3] 刘友饶, 姜园园. 林可霉素对开放性骨折患者预防感染的作用及其对血清学各指标的影响[J]. 抗感染药学, 2017, 14(1): 194
LIU YR, JIANG YY. The effect of lincomycin on preventing infection in patients with open fracture and its effect on serological indexes[J]. J Anti-Infec Pharm, 2017, 14(1): 194
- [4] 聂雯莹, 罗晓琴, 杜美红, 等. 林可霉素磁免疫化学发光检测方法的建立[J]. 山东畜牧兽医, 2015, 11(36): 6
NIE WY, LUO XQ, DU MH, *et al.* Establishment of magnetimmunochemiluminescence assay for lincomycin[J]. Shandong J Anim Sci Veter Medi, 2015, 11(36): 6
- [5] HE J, WU N, LUO P, *et al.* Development of a heterologous enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of ofclindamycin and lincomycin residues in edible animal tissues[J]. Meat Sci, 2017, 125: 137
- [6] CAO S, SONG S, LIU L, *et al.* Comparison of anenzyme-linkedimmunosorbent assay with an immunochromatographic assay for detection of lincomycinin milk and honey[J]. Immunol Invest, 2015, 44(5): 438
- [7] LI SH, LIU CH, YIN GH, *et al.* Aptamer-molecularly imprinted sensor base on electrogenerated chemiluminescence energy transfer for detection of lincomycin[J]. Biosens Bioelectron, 2017, 91: 687
- [8] YANG C, ZHANG Z, SHI Z. A novel chemiluminescence reaction system for the determination of lincomycin with diperiodatonicke-late (IV) [J]. Microchim Acta, 2010, 168(3): 293
- [9] 李维超, 佟若菲, 张囡, 等. HPLC 法测定复方盐酸林可霉素滴鼻剂中盐酸林可霉素和利巴韦林[J]. 现代药物与临床, 2015, (1): 33
LI WC, TONG RF, ZANG N, *etal.* Determination of lincomycin



- hydrochloride and ribavirin in compound lincomycin hydrochloride nasal drops by HPLC [J]. *Drugs Clin*, 2015, 30(1): 33
- [10] SOLLIEC M, MASSE D, SAUVE S, *et al*. Analysis of trimethoprim, lincomycin, sulfadoxin and tylosin in swine manure using laser diode thermal desorption-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2014, 128: 23
- [11] TAO Y, CHEN D, YU G, *et al*. Simultaneous determination of lincomycin and spectinomycin residues in animal tissues by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection and gase chromatography-mass spectrometry with accelerated solvent extraction [J]. *Food Add Contamin: Part A*, 2001, 28(2): 145
- [12] 赵福民, 熊雅婷, 钱博, 等. 乳品中多种抗生素残留胶体金检测方法研究 [J]. *食品工业*, 2018, 39(9): 135
- ZHAO FM, XIONG YT, QIAN B, *et al*. Simultaneous detection of multiple antibiotic residues in dairy products based on colloidal gold immunochromatography [J]. *Food Ind*, 2018, 39(9): 135
- [13] 俞漪, 胡雪莲, 巢强国, 等. 液体乳中抗生素残留量快速检测方法探究 [J]. *食品研究与开发*, 2010, 31(8): 133
- YU Y, HU XL, CHAO QG, *et al*. Emulsified rapid detection of antibiotic residues method of inquiry [J]. *Food Res Devel*, 2010, 31(8): 133
- [14] WU XX, TIAN XF, XU LH, *et al*. Determination of aflatoxin M1 and chloramphenicol in milk based on background fluorescence quenching immunochromatographic assay [J]. *Biomed Res Int*, 2017(3): 45

(本文于 2019 年 9 月 3 日修改回)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统, 作者稿件一经本刊审核通过, 确定录用, 可优先数字出版, 同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录, 进入因特网提供信息服务, 并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬, 不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件, 所有稿件须登录本刊网站 (<http://www.ywfxzz.cn>) 在线投稿, 并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用, 所有收费按本刊缴费通知办理。