

抗球虫药检测技术研究进展

胡京枝^{1,2,3}, 尚兵^{1,2,3}, 刘进奎^{1,2,3}, 张可可^{1,2,3}, 荆唤芝^{1,2,3}, 王颖^{1,2,3},
匡傲飞^{1,2,3}, 郝学飞^{1,2,3*}

(1. 河南省农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 郑州 450002; 2. 河南省粮食质量安全与检测重点实验室, 郑州 450002; 3. 农业农村部农产品质量安全风险评估实验室, 郑州 450002)

摘要: 球虫病是现代畜牧养殖业中常见的重要寄生虫病之一, 其防治措施主要是在饲料或饮水中加入抗球虫药物。抗球虫药可能在动物组织中残留, 并通过食物链危害消费者健康, 甚至危及生命。为了减少抗球虫药物残留危害, 包括中国在内的世界多国均对动物源性食品中各种抗球虫药物设定了严格的最大残留限量标准。而科研工作者也建立各种抗球虫药物残留的灵敏准确检测技术方法, 对动物源性食品中的抗球虫药残留情况进行有效监控。本文对目前抗球虫药的检测方法包括分光光度法、微生物法、电化学法、色谱法、免疫学法等进行了详细综述, 分析了这些方法的优点及不足; 并对抗球虫药物检测技术的发展前景进行了展望, 为今后分析检测各类样品基质中抗球虫药物的残留提供参考。

关键词: 球虫; 抗球虫药; 药残危害

Advance of the coccidiostat detection methods

HU Jing-Zhi^{1,2,3}, SHANG Bing^{1,2,3}, LIU Jin-Xi^{1,2,3}, ZHANG Ke-Ke^{1,2,3}, JING Huan-Zhi^{1,2,3},
WANG Ying^{1,2,3}, KUANG Ao-Fei^{1,2,3}, HAO Xue-Fei^{1,2,3*}

[1. *Institute of Quality Standard and Testing Technology for Agro-products, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China*; 2. *Henan Key Laboratory of Grain Quality and Safety and Testing, Zhengzhou 450002, China*; 3. *Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-products (Zhengzhou), Ministry of Agriculture, Zhengzhou 450002, China*]

ABSTRACT: Coccidiosis is one of the most important parasitic diseases in modern animal husbandry. The dominant means to prevent and treatment of coccidiosis is adding anticoccidial drugs into animal feed or drinking water. However, coccidiostat may remain in animal edible tissues and subsequently do harm to human health via food chain. In order to reduce the harm to consumers of coccidiostat residues, many countries all over the world, including China, have formulated strict maximum residue limit standards for various coccidiostat residues in animal derived foods. All kinds of sensitive and accurate detection technology and methods have been established by researchers to monitor various anti coccidian drug residues in animal-derived food effectively. This paper reviewed the current detection methods of coccidiostat, including spectrophotometry, microbiological method, electrochemical method, chromatography, immunological method, etc., in detail, and analyzed the advantages and disadvantages of these methods. The development prospect of coccidiostat detection technology was also prospected, which would provide

基金项目: 河南省农业科学院自主创新项目(2018ZC66)

Fund: Supported by the Special Fund for Independent Innovation of Henan Academy of Agricultural Sciences (2018ZC66)

*通信作者: 郝学飞, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。E-mail: a65738297@163.com

*Corresponding author: HAO Xue-Fei, Associate Professor, Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Henan Academy of Agricultural Sciences, No.116, Huayuan Road, Jinshui District, Zhengzhou 450002, China. E-mail: a65738297@163.com

references for the following analysis and detection of coccidiostat from various sample matrixes.

KEY WORDS: coccidiosis; coccidiostat; hazard of drug residues

0 引言

球虫是一类能在动物肠道壁细胞内寄生的顶端复合体门单细胞真核生物^[1], 宿主动物包括家禽、猪、兔、羊、牛及其他动物^[2-7]。球虫病是一种严重影响畜禽健康的寄生虫病之一, 动物感染球虫后, 导致肠道上皮受到破坏, 从而影响饲料养分的消化吸收, 导致动物生长发育迟缓, 并影响其他组织器官的生长发育, 症状严重时会发生腹泻, 甚至死亡^[8-10], 严重影响畜牧养殖效益。球虫病主要以预防为主, 主要是在动物饲料或饮水中加入抗球虫药, 通过抗球虫药的使用基本可以预防和控制动物球虫病的发生发展。本文对目前抗球虫药的检测方法包括分光光度法、微生物法、电化学法、色谱法、免疫学法等进行了详细综述, 分析了这些方法的优点及不足; 并对抗球虫药物检测技术的发展前景进行了展望, 以期为分析抗球虫药物残留的监测提供依据。

1 球虫药种类及潜在危害

目前, 常用的抗球虫药物主要包括: 聚醚类离子载体抗生素莫能菌素、盐霉素、甲基盐霉素、拉沙洛西、马度米星铵、赛杜霉素等; 三嗪类妥曲珠利、地克珠利; 二硝基类化合物二硝托胺、尼卡巴嗪; 其他类如氨丙啉、氯羟吡啶、癸氧喹酯、乙酰酰胺苯甲酯、常山酮、氯苯胍^[11]。但不同的球虫种类对不同的球虫药的敏感性有所差异, 如氨丙啉对鸡柔嫩艾美耳球虫、毒害艾美耳球虫更高效, 但对堆型艾美耳球虫、巨型艾美耳球虫及布氏艾美耳球虫效果不佳, 尽管这些抗球虫药物的效果显著, 研究表明长期在饲料或饮水中添加抗球虫药物除了导致耐药细菌的产生外^[12], 还将导致其在动物组织中的残留^[13], 并通过食物链转移至人体内, 给人类的健康带来潜在的危害作用^[14]。因此, 世界多国对动物性食品中抗球虫药残留作出最高限量, 我国也制定了抗球虫药物在动物性食品中的最高残留限量(见表 1)。为了更好地监控球虫药残留情况, 科研人员建立了各种检测方法。

表 1 我国对常见抗球虫药物的最高残留限量规定

Table 1 China's regulations on the maximum residue limits of common anti coccidia drugs

药物名称	动物种类	靶组织	残留量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
莫能菌素	牛/羊	肌肉	10	
		脂肪	100	
		肾	10	
	羊	肝	20	
		牛	肝	100
			奶	2

表 1(续)

药物名称	动物种类	靶组织	残留量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)	
盐霉素	鸡/火鸡/鹌鹑	肌肉	10	
		脂肪	100	
		肝	10	
		肾	10	
	鸡	肌肉	600	
		皮/脂	1200	
		肝	1800	
		肾	15	
	甲基盐霉素	牛/猪	肌肉	15
			脂肪	50
			肝	50
			肾	15
鸡		肌肉	15	
		皮+脂	50	
		肝	50	
		肾	15	
拉沙洛西	牛	肝	700	
		皮+脂	1200	
	鸡	肝	400	
		皮+脂	400	
	火鸡	肝	400	
		皮+脂	400	
	羊	肝	1000	
		兔	肝	700
马度米星铵	鸡	肌肉	240	
		脂肪	480	
		皮	480	
		肝	720	
赛杜霉素	鸡	肌肉	130	
		肝	400	
		家禽 (产蛋期禁用)	肌肉	100
			皮+脂	200
托曲珠利	家禽 (产蛋期禁用)	肝	600	
		肾	400	
		所有哺乳类 食品动物 (泌乳期禁用)	肌肉	100
			脂肪	150
地克珠利	绵羊/兔	肾	250	
		肌肉	500	
		脂肪	1000	
		肝	3000	
		肾	2000	

表 1(续)

药物名称	动物种类	靶组织	残留量/($\mu\text{g}/\text{kg}$)
二硝托胺	家禽 (产蛋期禁用)	肌肉	500
		皮+脂	1000
		肝	3000
	鸡	肾	2000
		肌肉	3000
		脂肪	2000
火鸡	肝	6000	
	肾	6000	
	肌肉	3000	
尼卡巴嗪	鸡	肝	3000
		肌肉	200
		皮+脂	200
氯丙啉	牛	肝	200
		肌肉	500
		脂肪	2000
	鸡/火鸡	肝	500
		肌肉	2000
		肾	500
氯羟吡啶	牛/羊	肌肉	500
		肝	1000
		肾	1000
	猪	蛋	4000
		可食组织	200
		肌肉	200
鸡/火鸡	肝	5000	
	肾	15000	
	肌肉	15000	
癸氧喹酯	鸡	可食组织	1000
		肌肉	2000
乙氧酰胺苯甲酯	鸡	肝	500
		肾	1500
		肌肉	1500
常山酮	牛(泌乳期禁用)	肌肉	10
		脂肪	25
		肝	30
	鸡/火鸡	肾	30
		肌肉	100
		皮+脂	200
氯苯胍	鸡	肝	130
		皮+脂肪	200
		其他可食组织	100

注: 数据来源于 GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》。

2 抗球虫药的检测方法

目前, 抗球虫药物主要检测方法包括分光光度法、微生物法、电化学法、色谱法、免疫学法以及近几年出现的基于新型纳米标记材料建立的检测法等。

2.1 分光光度法

分光光度法是根据物质对光的选择性吸收及光的吸收定律, 对物质进行定性、定量的分析方法。由于它具有准确度高、操作简便、测定快速、应用范围广、仪器也不太贵重等优点, 因此在抗球虫药物的定性检测中得到了广泛应用。

曾兆国等^[15]采用分光光度法测定了发酵液中盐霉素的含量, 该方法的检测波长为 520 nm, 以无水甲醇为溶剂, 3%香草醛溶液为显色剂, 显色温度 50 °C, 显色时间 15 min, 线性范围为 20~120 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 回收率为 100.1%。

分光光度法虽然具备重现性好和准确度高等优点, 但在实际检测的过程中受到背景干扰的影响较大, 且检测的灵敏度低, 基本用于定性检测, 不做定量残留检测。

2.2 微生物检测法

微生物法检测原理是某些微生物对抗球虫药较为敏感, 在适当条件下, 所产生的抑菌圈的大小与抗球虫药的浓度呈正比。有研究利用枯草芽孢杆菌检测莫能菌素的含量, 对检测样本进行多次重复($n=22$), 回收率为 97.2%^[16]。BOHN 等^[17]采用 4 种细菌(大肠杆菌 ATCC11303、大肠杆菌 ATCC27166、金黄色葡萄球菌 ATCC6538P 和藤黄微球菌 ATCC9341), 对动物饲料中 13 种不同种类的兽药进行检测, 其中包括 6 种抗球虫药, 拉沙里菌素(拉沙洛西)、莫能菌素、马度米星铵、甲基盐霉素、盐霉素、盐酸氯苯胍。其中, 拉沙洛西、莫能菌素、马度米星铵的检出限为 10.35 mg/kg, 盐霉素、甲基盐霉素的检出限为 2.14 mg/kg, 而盐酸氯苯胍检测不到。

微生物检测法具有操作简便、成本低廉、可同时筛选大量样品等优点, 但对特异性菌株的筛选难度较大, 在检测的过程中很容易受到其他抗生素的干扰, 影响检测结果, 且与仪器检测方法相比, 微生物检测的灵敏度也不够高。随着人类对抗球虫药残留限量的要求越来越严格, 抗球虫药的微生物检测法需要进一步探索, 提高检测的灵敏度、准确度和抗干扰能力。

2.3 电化学分析-伏安检测法

电化学分析-伏安检测法的原理, 是在两电极之间施加一恒定电位, 当电活性组分经过电极表面时发生氧化还原反应。对于给定的目标物质, 在检测条件固定的前提下, 每种物质都有特定的溶出电压, 在释放电子的过程

中会形成峰电流,通过与同等检测条件下的标准溶液相比较计算电流峰高或峰面积的值,从而计算出目标物质的浓度。

RADI 等^[18]以吡咯、氯羟吡咯和 NaClO_4 的水溶液为支撑电解质,以抗球虫药物氯羟吡咯为模板分子,采用电化学法在丝网印刷碳糊电极(screen-printed carbon electrodes, SPCEs)上涂覆一层氯羟吡咯印迹聚吡咯涂层,用于选择性地检测氯羟吡咯。除去模板分子后,制备的氯羟吡咯分子印迹聚合物涂层则具备了对氯羟吡咯分子具有特异性和选择性识别的结合位点,能够选择性地识别和吸附氯羟吡咯,从而达到检测的目的。当 pH 为 9.0、缓冲溶液为磷酸盐缓冲液时,氯羟吡咯的阳极信号达到最大值。利用微分脉冲伏安法,得到氯羟吡咯标准曲线的线性范围为 0.3~1.8 mg/kg,检出限为 0.21 mg/kg。HU 等^[19]合成 Zn/Ni-ZIF-8 金属有机骨架材料,并与石墨烯复合修饰玻碳电极,然后在修饰电极的表面电化学沉积金纳米粒子,然后在金纳米颗粒涂层表面修饰上莫能菌素单克隆抗体,构建出一种免标记型的莫能菌素电化学免疫传感器,利用差分脉冲伏安法对牛奶中莫能菌素的残留进行定量检测,检出限达到 0.11 ng/mL,加标回收率在 94.4%~112.0%之间。HU 等^[20]将 AuNPs 修饰玻碳电极,并构建了马度米星铵的竞争型电化学免疫传感器,定量检测鸡蛋中的马度米星铵检出限达到 0.045 ng/mL。

伏安法具有灵敏度高、检出限低的优点,适用于痕量组分分析,但也存在重现性不够好、受样品基质干扰较多的缺陷。故增强方法的重现性、提高方法的抗干扰能力是电化学检测法亟须解决的难题。

2.4 色谱法

大部分化学合成的抗球虫药具有紫外吸收光谱发色团,可以直接通过高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)进行检测。早期有研究采用此法检测了鸡蛋及动物性食品组织中的抗球虫药残留,如 LIU 等^[21]建立 HPLC 检测鸡蛋及鸡肉中氯苯胍残留,方法的线性范围 10~1000 $\mu\text{g/L}$,检出限达 10 $\mu\text{g/L}$ 。HPLC 在抗球虫药的残留检测中起到了重要的作用。但单独使用 HPLC 不能得到物质的结构信息,主要依靠与标准物质进行对比来判断未知物,对无紫外吸收的化合物的检测还需要通过其他途径进行进一步分析。

HPLC-MS/MS 技术在抗球虫药物的检测过程中能更好地达到定性定量检测的目的。WANG 等^[22]为研究新型三嗪类抗球虫药沙咪珠利的毒性,建立了检测小鼠血浆沙咪珠利的超高效液相色谱-串联质谱法(ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, UPLC-MS/MS),该方法检测范围 0.1~100 $\mu\text{g/mL}$,定量限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。MOLONEY 等^[23]建立了可同时检测蛋类和家禽肌肉组织

中的妥曲珠利、氯羟吡啶、拉沙洛西等 20 种抗球虫药物的 UPLC-MS/MS,该方法检测多种抗球虫药的线性范围均为 1~50 $\mu\text{g/kg}$,在相关系数大于 0.98 的条件下,对所有球虫药检测定量限为 1 $\mu\text{g/kg}$ 。对于化学合成的抗球虫药的残留,具有代表性的检测方法是采用正离子或负离子模式的电喷雾电离质谱法(electron spray ionization, ESI)进行检测^[24]。DUBOIS 等^[25]建立了同时检测了鸡蛋和肌肉中的常山酮、地克珠利、尼卡巴嗪、氯苯胍、莫能菌素、拉沙洛西、甲基盐霉素、盐霉素及马度米星铵 9 种抗球虫药的电喷雾 HPLC-MS/MS 检测方法,方法对盐霉素检出限最低为 0.07 $\mu\text{g/kg}$,其次是拉沙洛西为 0.10 $\mu\text{g/kg}$,对常山酮的检出限最高为 0.60 $\mu\text{g/kg}$ 。对于大多数的目标分析物来说,低能量的化学诱导解离实验,即可产生足够数量的产物离子,从而达到高标准的残留检测目的。然而,仍有部分化学合成的抗球虫药在 ESI 模式下不能产生足够数量的产物离子,无法达到检测标准要求。例如托曲珠利在 ESI 作用下不能产生足够数量的离子碎片,在大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)作用下则大大提高了离子化效率^[26]。AI 等^[27]建立了采用凝胶渗透层析提取鸡蛋及鸡肉中的球虫药,然后用 LC 结合电喷雾串联质谱进行检测,该方法检测地克珠利和托曲珠利的检出限为 1.2 $\mu\text{g/kg}$,托曲珠利亚砒和托曲珠利砒的检出限为 1.8 $\mu\text{g/kg}$ 。

近年来,将 HPLC-MS/MS 与其他技术相结合用于抗球虫药物检测的方法也逐渐引起关注。ZHAN 等^[28]对复杂的样品基质进行了简单的萃取,然后分析检测了牛奶中 255 种兽药的残留量,其中包括 6 种抗球虫药氯羟吡啶、马度米星铵、盐霉素、甲基盐霉素、拉沙洛西及一种不常见的尼日利亚菌素,检测方法的定量限在 0.1~1.0 $\mu\text{g/kg}$ 之间。MATUS 等^[29]采用 LC-MS 和飞行时间质谱联用的方法检测了 173 个鸡肉、鸡肝样品中 17 种抗球虫药残留量,该方法检测鸡肝中的抗球虫药,不同的抗球虫药的检出限不相同,对尼卡巴嗪代谢产物 4,4'-二硝基均二苯脲的检出限最高为 91 ng/g,其次是氯羟吡啶的检出限为 74 ng/g,拉沙洛西的检出限最低为 0.2 ng/g。

尽管不断发展的色谱/质谱联用技术具备高通量、多残留检测及高准确度等优点,但由于其样品前处理步骤烦琐、需要专业的操作人员且成本高等缺陷,限制了其大规模的广泛应用。

2.5 免疫检测法

免疫检测法是利用抗体与抗原的特异性反应,结合各种标记技术,如酶标记的敏感性,建立起来的检测方法。在抗球虫药物的免疫检测过程中,最重要的试剂是抗体。抗球虫药是小分子物质,没有免疫原性,不具备天然识别功能,故需将小分子物质与大分子载体偶联,在客体

动物中产生免疫应答, 制备出具有高灵敏度和高特异性的抗体用于免疫检测。以离子型载体抗生素为例, 如盐霉素、莫能菌素、拉沙里菌素和马杜霉素等均含有一个羧基团, 活化后能够与载体偶联制备抗体用于检测相应的抗球虫药^[30-33]。与离子型载体类不同, 化学合成的抗球虫药由于功能基团的缺乏或结构的复杂性, 必需接入连接臂或制备化学衍生物, 进一步制备免疫原, 如常山酮、尼卡巴嗪等^[34-35]。

酶联免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 是最常见的以抗体为基础的检测方法。SHEN 等^[36]建立了肌肉组织 (如肌肉、肝脏和脂肪) 中马杜霉素的 ELISA 检测法, 由于马杜霉素和载体蛋白间由 6 个碳桥接, 大大提高了检测的灵敏度和特异性。另一个检测肌肉组织中马杜霉素残留的 ELISA 方法中, 在原有的基础上进行了优化, 获得了具有高抗干扰能力的单克隆抗体, 与之前的方法相比, 该方法最主要的优势在于简化了样品的制备过程^[37]。BEIER 等^[38]采用 ELISA 和 HPLC 对 473 个样本中的常山酮残留进行了检测, 并对二者的检测结果进行对比, 检测结果表明 ELISA 法具有较高的灵敏度和特异性。FITZGERALD 等^[39]建立的单链抗体基因 (*scFv*) 竞争 ELISA 法对鸡蛋样品中常山酮的残留量进行了检测, 该方法的检出限为 0.08 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。总的来说, ELISA 检测结果的准确度依赖于抗体浓度和酶标二抗及包被抗体, 因此在每一步的实验过程中需对这些条件进行详细地优化。免疫检测法具有较高的特异性、高通量和低成本等优点, 因此在兽药残留检测中发挥了重要的作用。但是 ELISA 方法中, 抗体与抗

球虫药的结合必须达到一个平衡点, 这个过程大约持续数小时, 且需要用酶标仪进行吸光度值读取才能最终确定检测结果, 操作步骤烦琐, 费时费力。

侧流免疫层析法 (lateral flow immunoassay, LFD) 是近年来国内外兴起的一种快速诊断技术, 其原理与 ELISA 大致相同。简单地说, LFD 装置即是将特异性抗体、胶体粒子 (如金、乳胶、碳等) 固定于硝酸纤维膜的某一区域。胶体粒子直接或间接与抗体结合, 作为免疫检测的标记物; 硝酸纤维膜则用于样品的分离和导流。当硝酸纤维膜一端浸入样品后, 由于毛细作用, 样品沿着纤维膜向前流动, 当到达至固定抗体的区域时, 样品中相应的抗原与抗体发生特异性结合, 通过质控线和检测线的显色实现特异性的免疫诊断。WATANABE 等^[40]使用同一抗体, 分别采用 ELISA 和 LFD 进行平行测试, 检测盐霉素的残留量, 结果表明, LFD 的最低检出限比 ELISA 高, 且 LFD 有更好的抗干扰能力。WATANABE 等^[41]采用相似的方法检测了鸡的肝脏和肌肉中赛杜霉素和拉沙洛西的残留量。CAMPBELL 等^[42]则采用了 LFD 的方法检测到家禽饲料中尼卡巴嗪的含量为 2 mg/kg 。

我国农业部 2012 年 10 月 1 日开始实行的《农产品质量安全监测管理办法》明确规定要采用快速检测方法对食品安全进行快速检测筛查。LFD 正是快速检测方法中的一种, 以其耗时短、操作简便且适用于现场检测等无可比拟的众多优势, 因此应用前景广阔。

对以上描述的 5 种抗球虫药检测方法进行了简单的对比, 详见表 2。

表 2 5 种抗球虫药检测方法的对比
Table 2 Comparison of 5 kinds of detection methods of coccidiostat

方法名称	检测原理	检出限	优缺点
分光光度法	物质对光的选择性吸收及光的吸收定律	—	优点: 重现性好和准确度高 缺点: 灵敏度低、背景干扰影响大
微生物检测法	微生物对抗球虫药较为敏感, 在适当条件下, 所产生的抑菌圈的大小与抗球虫药的浓度呈正比	拉沙洛西、马度米星铵、莫能菌素 10.35 mg/kg ; 盐霉素、甲基盐霉素 2.14 mg/kg ; 氯苯胍检不出 ^[17]	优点: 操作简便、成本低廉 缺点: 灵敏度低、受其他抗生素影响大
电化学分析	给定的目标物质, 在检测条件固定的前提下, 每种物质都有特定的溶出电压, 在释放电子的过程中会形成峰电流, 通过与同等检测条件下的标准溶液相比较计算电流峰高或峰面积的值, 从而计算出目标物质的浓度	鸡肉中氯羟吡啶 0.21 mg/kg ^[18] 牛奶中莫能菌素 0.11 ng/mL ^[19] 鸡蛋中马度米星铵 0.045 ng/mL ^[20]	优点: 灵敏度高、检出限低 缺点: 重现性不够好、受样品基质干扰较多

表 2(续)

方法名称	检测原理	检出限	优缺点
色谱法	利用固定相与流动相对待测组分溶解度及吸附性的差异来实现分离	HPLC 检测鸡蛋、鸡肉中氯苯胍 10 $\mu\text{g/L}$ ^[21] ; UPLC-MS/MS 检测小鼠血浆沙咪珠利 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (定量限) ^[22] ; UPLC-MS/MS 同时检测鸡蛋及禽肉妥曲珠利, 氯羟吡啶等 20 种球虫药定量限均为 1 $\mu\text{g/kg}$ ^[23] ; HPLC-电喷雾 MS/MS 检测鸡蛋及鸡肉中常山酮、地克珠利等 9 种球虫药检出限在 0.07~0.60 $\mu\text{g/kg}$ 之间 ^[25] ; APCI 作用下的 LC-MS/MS 检测肉制品中妥曲珠利及妥曲珠利砒 0.5 $\mu\text{g/kg}$, 妥曲珠利亚砒 5 $\mu\text{g/kg}$ ^[26] ; 凝胶渗透层析后 LC-电喷雾 MS/MS 检测鸡蛋及鸡肉中地克珠利及妥曲珠利检出限 1.2 $\mu\text{g/kg}$, 妥曲珠利亚砒及妥曲珠利砒检出限为 1.8 $\mu\text{g/kg}$ ^[27] 。LC-MS 与飞行时间质谱联用检测鸡肉及鸡肝 17 种球虫药检出限在 0.2~91 ng/g 之间 ^[29]	优点: 高通量、多残留检测及高准确度 缺点: 样品前处理烦琐、成本高
		ELISA: 检缓冲液稀释常山酮 80 pg/mL ^[39] , 检血浆、肝脏及鸡肉盐霉素均为 10 ng/g ^[40] ; 检鸡肝及鸡肉拉沙洛西为 10 ng/g , 赛杜霉素为 5 ng/g ^[41] LFD: 检血浆盐霉素为 50 ng/g , 鸡肉为 300 ng/g ^[40] ; 检鸡肉拉沙洛西为 125 ng/g , 赛杜霉素为 100 ng/g ^[41] ; 检鸡饲料为 2 mg/kg ^[42]	优点: 高通量、特异性强、成本低 缺点: ELISA 步骤烦琐, 相对费时费力

注: —表示无此项。

在免疫学检测方法中, 随着标记材料的发展, 特别是纳米材料的出现, 使得免疫学检测技术也得到进一步的发展。纳米材料具有独特的物理性质和化学性质, 如较大的比表面积、较高的催化活性以及较好的生物相容性等, 因此在食品检测领域得到了广泛应用。包括量子点^[43]、金属有机骨架材料^[44]、石墨烯^[45]、碳纳米管^[46]、四氧化三铁磁性材料^[47]、稀土掺杂的上转换荧光纳米材料^[48]、胶体金^[49]等。

2.5.1 胶体金

胶体金一般以柠檬酸钠、硼氢化钠等作为还原剂, 采用还原氯金酸的方法进行制备。氯金酸在还原剂的作用下, 可聚合成粒径大小可控的金颗粒, 由于静电作用在溶液中形成稳定的胶束状态, 通过静电结合作用与带正电荷基团的蛋白质分子牢固结合在一起, 蛋白的生物活性不受影响。

胶体金与抗体结合在一起用作示踪标志物标, 通过抗原抗体的相互作用, 产生肉眼可见的红色或粉红色斑点, 用于药物的定性或半定量的快速免疫检测。由于免疫胶体金具有使用快速简便、成本低、应用范围广、特异敏感、稳定性强、不需加入发色试剂、结果判断直观等优点, 使得胶体金在农兽药残留检测、传染病病原抗体检测、蛋白质的检测和药物测定等多个领域得到了广泛的应用。CHEN 等^[49]采用胶体金标记咪唑苯脲高亲和力单克隆抗体, 研制出金标检测试纸, 目测检出限为 5 ng/mL , 整个检测过程只需 3~5 min。

2.5.2 量子点

另一种在球虫药物的生物检测方面应用较多的纳米材料是量子点。量子点(quantum dots, QDs)是近 20 年发展起来的一种半导体荧光纳米材料, 形状一般为球形或类球形, 粒径介于 1~100 nm 之间, 稳定直径为 2~20 nm, 由于其独特

的发光特性与光物理学性质, 成为近年来研究的热点^[50]。

与生物荧光染料相比, 量子点具有激发谱线范围宽、发射谱线窄、发光效率高、发光颜色可调、光稳定性好等优点, 可作为优异的荧光标记物用于生物检测方面, 如生物传感器^[51]、荧光探针^[52]和抗体偶联技术^[53]等。在抗球虫药的生物检测方面, 量子点应用最为广泛的则是抗体偶联技术。将抗体等生物大分子有效的偶联在量子点表面并保持其生物活性, 是量子点在生物检测应用中至关重要的一步。目前, 将量子点用于抗体标记技术的难点在于将二者偶联后, 偶联物的溶解性及稳定性通常会降低, 从而导致生物分子亲和力的降低而影响检测效率。为了克服这一缺陷, 通常会对量子点表面进行修饰, 使其表面带上一些亲水性基团来增加偶联物的水溶性及生物相容性, 从而提高检测的灵敏度。GORYACHEVA 等^[52]制备出了 CdSe/CdS 及 CdSe/CdS/ZnS 核壳量子点并用不同表面成分的二氧化硅涂层扩展它们, 将这些硅化量子点所含有羧基与霉菌毒素玉米赤霉烯酮及呕吐毒素的单克隆抗体结合, 形成多色荧光探针, 建立了同时检测玉米赤霉烯酮及呕吐毒素免疫层析检测方法, 这种方法检测玉米赤霉烯酮及呕吐毒素的目测灵敏度分别为 40 和 400 $\mu\text{g/kg}$, 灵敏度完全满足欧盟限量要求, 与 LC-MS/MS 同时检测玉米及小麦样品, 二者的检测结果基本一致, 但方法更加快捷、简便。

2.5.3 其他复合物纳米材料

随着纳米材料技术的快速发展, 已有一些新型复合物纳米材料用在了抗球虫药物的检测方面。KAILASA 等^[54]首次利用用 Mn^{2+} 掺杂的 $\text{ZnS}@$ 半胱氨酸纳米粒子($\text{ZnS}@$ cysteine NPs)作为基质, 通过表面辅助激光解析电离飞行时间质谱法(surface-assisted laser desorption

ionization time-of-flight mass spectrometry, SALDI-TOF MS)检测了鸡蛋中的4种抗球虫药(拉沙里菌素、莫能菌素、盐霉素和甲基盐霉素)的含量。 Mn^{2+} 掺杂的 ZnS@cysteine NPs 在水相中合成,且采用扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)、透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)和傅里叶变换红外光谱(Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)进行表征。将 Mn^{2+} 掺杂的 ZnS@cysteine NPs、ZnS@cysteine NPs、ZnS 纳米粒子(ZnS NPs)和 α -氰基-4-羧基肉桂酸几种物质分别作为基质,采用 SALDI-TOF MS 法对基质中的抗球虫药进行检测,并对几种不同方法检测的结果进行对比,检测结果表明,以 Mn^{2+} 掺杂的 ZnS@cysteine NPs 作为基质时,4种抗球虫药物的检出限分别为拉沙里菌素 50 nmol/L、莫能菌素 420 nmol/L、盐霉素 60 nmol/L、甲基盐霉素 40 nmol/L,而以 ZnS NPs 和 CHCA 为基质时,则不能同时检测到4种物质。上述结果表明,以 Mn^{2+} 掺杂的 ZnS@cysteine NPs 作为样品基质用于检测实际样品中抗球虫药的残留量时,能大大提高 SALDI-TOF MS 法的灵敏度,且在复杂的样品基质中具有优异的背景抗干扰能力。

目前,纳米材料在抗球虫药物残留检测中的应用还较少,但随着检测技术的不断发展更新,纳米材料以其优越的性能,在提高检测的灵敏度、准确性、选择性、抗干扰能力等方面表现出巨大的发展潜力。

3 结论与展望

近年来,大多数国家对动物性食品的可食用组织中抗球虫药的残留量提出了限制,促进了实验室水平的很多新型高灵敏度检测技术的发展。建立一种能够同时检测多种抗球虫药物残留、且具有高灵敏度和准确性的检测方法是未来抗球虫药残留检测的重要目标。从早期的分光光度法、微生物检测法、电化学检测法,到应用广泛的免疫检测法和色谱法,再到近年来新出现的纳米材料标记法,抗球虫药物的残留检测在不断发展,检测的便捷性、方法的灵敏度和准确性等都在逐步提高。

然而,由于抗球虫药物具有不同的作用机制、化学结构及药物性质,要达到能够同时检测离子载体和化学合成抗球虫药残留的目标目前还较为困难。迄今为止,抗球虫药物的常规检测仍主要依赖于色谱技术,该技术存在成本高、操作步骤烦琐、需要专业的操作及数据分析人员、分析仪器体积庞大无法实现现场快速检测等缺陷,因此还没有一种方法能够达到理想的检测要求,如快速、简便、高通量、稳定性且样品消耗量低等。

新型纳米材料的研究已成为全球关注的热点,它的应用渗透到各个领域。随着纳米技术的飞速发展,能够作为标记物的纳米材料种类也必然不断增加。近年来一些用作标记物的纳米材料可以通过颜色等的变化来达到检测的

目的,但这给一些荧光标记物带来不便,目前市面上有很多种类的快速检测试纸条和试剂盒,其中有很大一部分必须通过荧光分光光度计读数达到检测的目的。尽管采用荧光纳米材料作为标记物提高了检测的灵敏度,但同时荧光分光光度计的使用也给快速检测技术带来不便。因此,将现有的快速检测方法与新型纳米材料相结合,寻找出一种可以通过阳光、或者手机上自带的手电筒等光(能够从自然界获取而无需特殊仪器设备)的照射即可引起视觉上的颜色变化的纳米材料为标记物,建立起一种对球虫药的高通量、多残留的快速检测方法,制备出能够用于现场精准检测的小型化、便携式检测仪器是未来抗球虫药残留检测的研究目标。

参考文献

- [1] KNIGHT A. Advances in parasitology: The evolutionary biology, ecology and epidemiology of coccidia of passerine birds [J]. 2018. DOI: 10.1016/bs.apar.2018.01.001
- [2] GONG QL, ZHAO WX, WANG YC, et al. Prevalence of coccidia in domestic pigs in China between 1980 and 2019: A systematic review and meta-analysis [J]. Parasit Vectors, 2021, 14(1): 248.
- [3] ORTUZAR-FERREIRA CN, OLIVEIRA MS, GENOVEZ-OLIVEIRA JL, et al. Coccidia of columbiformes: A taxonomic review of its *Eimeriidae* species and *Eimeria columbinae* n. sp. from columbina talpacoti (Temminck, 1809) from Brazil [J]. Parasitol Res, 2020, 119(1): 267–281.
- [4] DALLE ZA, CULLERE M, TASONIERO G, et al. Supplementing growing rabbit diets with chestnut hydrolyzable tannins: Effect on meat quality and oxidative status, nutrient digestibilities, and content of tannin metabolites [J]. Meat Sci, 2018, 146: 1101–1108.
- [5] 王晓星. 羊巴贝斯虫自噬相关基因结构与功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2021.
WANG XX. Study on the structure and function of autophagy-related genes in ovine babesia [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2021.
- [6] 李坤. 牦牛和藏猪常见原虫调查及藏猪肺线虫线粒体基因组分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2019.
LI K. Epidemiological survey of the common protozoans infection in yaks and Tibetan pigs, and analysis of the mitochondrial genome of lungworm derived from Tibetan pig [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.
- [7] DUBEY JP, LINDSAY DS. Coccidiosis in dogs-100 years of progress [J]. Vet Parasitol, 2019, 266: 34–55.
- [8] 唐虹. 鸡球虫病的临床症状、鉴别和防治措施[J]. 现代畜牧科技, 2021, 12: 66–67.
TANG H. The clinical symptoms, identification and control measures of chicken coccidiosis [J]. Technical Advisor Anim Husb, 2021, 12: 66–67.
- [9] 朱玉红. 肉牛球虫病的流行病学、症状和防治措施[J]. 现代畜牧科技, 2021, 12: 100–101.
ZHU YH. The epidemiology, symptoms and control measures of coccidiosis in beef cattle [J]. Technical Advisor Anim Husb, 2021, 12: 100–101.
- [10] 赵娟. 新型三嗪类抗球虫药沙咪珠利的生殖毒性与致畸毒性的研究

- [D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
- ZHAO J. The study of reproductive and teratogenic toxicity for a new anticoccidial triazine drug ethanamizuril [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.
- [11] 李蔚然, 汤晓艳. 我国和CAC动物源性食品中农药最大残留限量标准比对分析[J]. 农产品质量与安全, 2022, (1): 7.
- LI WR, TANG XY. Comparative analysis of maximum residue limits of pesticides in animal derived foods between China and CAC [J]. Qual Saf Agro-prod, 2022, (1): 7.
- [12] 王海霞. 柔嫩艾美耳球虫盐霉素耐药株的诱导及耐药相关基因特性的初步分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- WANG HX. Induction of salinomycin resistant strain of *Eimeria tenella* and preliminary analysis of the characteristics of drug resistance related genes [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.
- [13] 赵晓, 张丽芳, 郭春娜, 等. 新型三嗪类抗球虫药沙咪珠利在鸡体外各组织中的代谢比较[J]. 中国动物传染病学报, 2017, 25(4): 40-44.
- ZHAO X, ZHANG LF, GUO CN, *et al*. Metabolism of the novel triazine anticoccidial drug ethanamizuril in chicken tissues [J]. Chin J Anim Infect Dis, 2017, 25(4): 40-44.
- [14] ROILA R, BRANCIARI R, RANUCCI D, *et al*. Incidence of ionophore and non-ionophore anticoccidials residues in poultry meat and eggs and their risk characterization [J]. Ital J Food Saf, 2021, 10(1): 9332.
- [15] 曾兆国, 李成梅, 陈红梅, 等. 测定盐霉素中间体效价的新方法—分光光度法[J]. 养殖与饲料, 2008, (5): 83-85.
- ZENG ZG, LI CM, CHEN HM, *et al*. A new method for determining the potency of salinomycin intermediates-spectrophotometry [J]. Breed Feed, 2008, (5): 83-85.
- [16] COMMITTEE AM. Microbiological assay of monensin in animal feeds and pre-mixes [J]. Analyst, 1977, 102(1212): 206-210.
- [17] BOHN T, PELLET T, BOSCHER A, *et al*. Developing a microbiological growth inhibition screening assay for the detection of 27 veterinary drugs from 13 different classes in animal feedingstuffs [J]. Food Addit Contam A, 2013, 30(11): 1870-1887.
- [18] RADI AE, EI-NAGGAR AE, NASSEF HM. Determination of coccidiostat clodol on an electro-polymerized-molecularly imprinted polypyrrole polymer modified screen printed carbon electrode [J]. Anal Methods, 2014, 6(19): 7967-7972.
- [19] HU M, HU XF, ZHANG Y, *et al*. Label-free electrochemical immunosensor based on AuNPs/Zn/Ni-ZIF-8800@graphene composites for sensitive detection of monensin in milk [J]. Sens Actuators B, 2019, 288: 571-578.
- [20] HU M, WANG Y, YANG JF, *et al*. Competitive electrochemical immunosensor for maduramicin detection by multiple signal amplification strategy via hemin@Fe-MIL-88NH₂/AuPt [J]. Biosens Bioelectron, 2019, 142: 111554.
- [21] LIU Y, WU Y, JIANG Y. Determination of robenidine residue in chicken tissues and eggs by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr, 2010, 28(9): 905-907.
- [22] WANG X, ZHAO J, WEI S, *et al*. Determination of ethanamizuril, a novel triazine coccidiostat, in rat plasma by ultra-performance liquid chromatography system-tandem mass spectrometry and its application in a toxicological study [J]. Biomed Chromatogr, 2019, 33(11): e4652.
- [23] MOLONEY M, CLARKE L, O'MAHONY J, *et al*. Determination of 20 coccidiostats in egg and avian muscle tissue using ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2012, 1253: 94-104.
- [24] ZHAO X, WANG B, XIE K, *et al*. Development and comparison of HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS methods for determining eight coccidiostats in beef [J]. J Chromatogr B, 2018, 1087-1088: 98-107.
- [25] DUBOIS M, PIERRET G, DELAHAUT P. Efficient and sensitive detection of residues of nine coccidiostats in egg and muscle by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2004, 813(1-2): 181-189.
- [26] MARTINEZ-VILLALBA A, MOYANO E, MARTINS CP, *et al*. Fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry (highly selective selected reaction monitoring) for the determination of toltrazuril and its metabolites in food [J]. Anal Bioanal Chem, 2010, 397(7): 2893-2901.
- [27] AI L, SUN H, WANG F, *et al*. Determination of diclazuril, toltrazuril and its two metabolites in poultry tissues and eggs by gel permeation chromatography-liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2011, 879(20): 1757-1763.
- [28] ZHAN J, YU XJ, ZHONG YY, *et al*. Generic and rapid determination of veterinary drug residues and other contaminants in raw milk by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr B, 2012, 906: 48-57.
- [29] MATUS JL, BOISON JO. A multi-residue method for 17 anticoccidial drugs and ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and time-of-flight mass spectrometry [J]. Drug Test Anal, 2016, 8(5-6): 465-476.
- [30] ELISSALDE MH, BEIER RC, ROWE LD, *et al*. Development of a monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for the coccidiostat salinomycin [J]. J Agric Food Chem, 1993, 41(11): 2167-2171.
- [31] KENNEDY DG, BLANCHFLOWER WJ, O'DORNAN BC. Development of an ELISA for lasalocid and depletion kinetics of lasalocid residues in poultry [J]. Food Addit Contam A, 1995, 12(1): 83-92.
- [32] KENNEDY DG, BLANCHFLOWER WJ, O'DORNAN BC. Development of an ELISA for maduramicin and determination of the depletion kinetics of maduramicin residues in poultry [J]. Food Addit Contam A, 1997, 14(1): 27-33.
- [33] HAGREN OI, TENGHOLM A. Glucose and insulin synergistically activate phosphatidylinositol 3-kinase to trigger oscillations of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in beta-cells [J]. Anal Chim Acta, 2006, 557(1): 164-168.
- [34] ROWE LD, BEIER RC, ELISSALDE MH, *et al*. Production and characterization of monoclonal antibodies against the poultry coccidiostat halofuginone [J]. J Agric Food Chem, 1994, 42(5): 1132-1137.
- [35] HUET AC, MORTIER L, DAESELEIRE E, *et al*. Screening for the coccidiostats halofuginone and nicarbazin in egg and chicken muscle: Development of an ELISA [J]. Food Addit Contam A, 2005, 22(2): 128-134.
- [36] SHEN J, QIAN C, JIANG H, *et al*. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of maduramicin in broiler chicken tissues [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6): 2697-2701.
- [37] CHEN YQ, TANG SS, DING SY, *et al*. Monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of maduramicin in chicken tissues [J]. Anal Lett, 2009, 42(17): 2793-2806.

- [38] BEIER RC, FELDMAN SF, DUTKO TJ, *et al.* Immunoassay and HPLC detection of halofuginone in chicken liver samples obtained from commercial slaughterhouses: A combined study [J]. *Food Agric Immunol*, 2002, 14(1): 29–40.
- [39] FITZGERALD J, LEONARD P, DARCY E, *et al.* Light-chain shuffling from an antigen-biased phage pool allows 185-fold improvement of an anti-halofuginone single-chain variable fragment [J]. *Anal Biochem*, 2011, 410(1): 27–33.
- [40] WATANABE H, SATAKE A, KIDO Y, *et al.* Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic rapid assay for salinomycin [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 437(1): 31–38.
- [41] WATANABE H, SATAKE A, KIDO Y, *et al.* Development of monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for lasalocid and semduramicin [J]. *J Food Hyg Soc Jpn*, 2004, 45(3): 107–112.
- [42] CAMPBELL K, FODEY T, FLINT J, *et al.* Development and validation of a lateral flow device for the detection of nicarbazine contamination in poultry feeds [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(6): 2497–2503.
- [43] SHI K, XU X, LI H, *et al.* Biosynthesized quantum dots as improved biocompatible tools for biomedical applications [J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(3): 496–513.
- [44] LIU M, CAI N, CHAN V, *et al.* Development and applications of MOFs derivative one-dimensional nanofibers via electrospinning: A mini-review [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2019. DOI: 10.3390/nano9091306
- [45] MAKVANDI P, GHOMI M, ASHRAFIZADEH M, *et al.* A review on advances in graphene-derivative/polysaccharide bionanocomposites: Therapeutics, pharmacogenomics and toxicity [J]. *Carbohydr Polym*, 2020, 250: 116952.
- [46] YU W, TANG Y, SANG Y, *et al.* Preparation of a carboxylated single-walled carbon-nanotube-chitosan functional layer and its application to a molecularly imprinted electrochemical sensor to quantify semicarbazide [J]. *Food Chem*, 2020, 333: 127524.
- [47] THAMILSELVAN A, MANIVEL P, RAJAGOPAL V, *et al.* Improved electrocatalytic activity of Au@Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for sensitive dopamine detection [J]. *Colloids Surf B*, 2019, 180: 1–8.
- [48] DUHAN S, SAHOO K, SINGH SK, *et al.* Development of ultrasensitive and As(III)-selective upconverting [NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺] platform [J]. *Analyst*, 2020, 145(19): 6378–6387.
- [49] CHEN LL, HU XF, SUN YN, *et al.* Immunochromatographic assay based on high-affine monoclonal antibody for the detection of imidocarb in milk [J]. *J Food Sci*, 2021, 86(8): 3413–3421.
- [50] KARGOZAR S, HOSEINI SJ, MILAN PB, *et al.* Quantum dots: A review from concept to clinic [J]. *Biotechnol J*, 2020, 15(12): e2000117.
- [51] HAO L, XUE L, HUANG F, *et al.* A microfluidic biosensor based on magnetic nanoparticle separation, quantum dots labeling and MnO₂ nanoflower amplification for rapid and sensitive detection of *Salmonella typhimurium* [J]. *Micromachines (Basel)*, 2020, 11(3): 281.
- [52] GORYACHEVA OA, GUHRENZ C, SCHNEIDER K, *et al.* Silanized luminescent quantum dots for the simultaneous multicolor lateral flow immunoassay of two mycotoxins [J]. *ACS Appl Mater Interf*, 2020, 12(22): 24575–24584.
- [53] 邢仕歌, 熊齐荣, 钟强, 等. 量子点抗体偶联技术研究进展[J]. *分析化学*, 2013, 41(6): 949–955.
XING SG, XIONG QR, ZHONG Q, *et al.* Recent research advances of antibody-conjugated quantum dots [J]. *Chin J Anal Chem*, 2013, 41(6): 949–955.
- [54] KAILASA SK, WU HF. Interference free detection for small molecules: Probing the Mn²⁺-doped effect and cysteine capped effect on the ZnS nanoparticles for coccidiostats and peptide analysis in SALDI-TOF MS [J]. *Analyst*, 2010, 135(5): 1115–1123.

(责任编辑: 于梦娇 张晓寒)

作者简介



胡京枝, 副研究员, 主要研究方向为农产品安全与风险评估工作。
E-mail: hujzh70@sohu.com



郝学飞, 副研究员, 主要研究方向为农产品质量安全。
E-mail: a65738297@163.com