

# 五氯酚钠胶体金快速检测试纸条的研制

罗晓琴<sup>1,2</sup>, 韩深<sup>3</sup>, 吕艳秋<sup>4</sup>, 刘莹<sup>3</sup>, 曹东山<sup>1,2</sup>, 王建霞<sup>1,2</sup>

(1. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206; 2. 北京市食品安全免疫快速检测工程技术研究中心, 北京 102206; 3. 北京出入境检验检疫局, 北京 100026; 4. 北京市昌平区动物疫病预防控制中心, 北京 102200)

**摘要** [目的] 研制五氯酚钠胶体金快速检测试纸条。[方法] 利用胶体金免疫层析技术, 研制一种快速检测猪肉、鸡肉、鱼、虾、水质中五氯酚钠的试纸条。[结果] 经测试, 该试纸条对猪肉、鸡肉、鱼、虾的检测限为 1 μg/kg, 对水质的检测限为 2 μg/kg, 检测时间为 15 min, 假阳性率和假阴性率均为 0。[结论] 该方法准确、可靠, 使用简便, 适合大量样品的现场检测。

**关键词** 五氯酚钠; 胶体金免疫层析试纸条; 快速检测

中图分类号 TS207 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2016)25-055-03

## Study on Gold Immunochromatography Assay for Rapid Detection of Pentachlorophenol - Na

LUO Xiao-qin<sup>1,2</sup>, HAN Shen<sup>3</sup>, LU Yan-qiu<sup>4</sup> et al (1. Beijing Kwinbon Biotechnology Company, Beijing 102206; 2. Beijing Engineering Research Centre of Food Safety Immunodetection, Beijing 102206; 3. Beijing Entry-exit Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026; 4. Beijing Changping District Animal Disease Prevention and Control Center, Beijing 102200)

**Abstract** [Objective] The aim was to study gold immunochromatography assay strip for rapid detection of pentachlorophenol-Na. [Method] By using gold immunochromatography assay, strip for rapid detection of pentachlorophenol-Na in pork, chicken, fish, shrimp and water quality was developed. [Result] The limit of detection was 1 μg/kg in pork, chicken, fish, shrimp flesh, and 2 μg/kg in water. The results could be obtained in 15 minutes. The assay gave no false positive and false negative results. [Conclusion] The method is accurate, simple, reliable and convenient to rapidly detect pentachlorophenol-Na on the spot.

**Key words** Pentachlorophenol-Na; Gold immunochromatography assay strip; Rapid detection

五氯酚钠 (Pentachlorophenol - Na, 简写 PCP - Na) 是五氯酚的钠盐, 属于有机氯农药, 可作为杀虫剂、抗菌剂、防腐剂使用<sup>[1-3]</sup>。五氯酚钠易在动物体内富集, 能够通过食物链进入人体, 严重危害人体健康<sup>[4-5]</sup>。因此, 美国环境保护署 (EPA) 将五氯酚钠列为可疑致癌物质, 并限制其使用<sup>[6]</sup>。我国农业部于 2002 年也将五氯酚钠列入《食品动物禁用的兽药及其化合物清单》, 禁止在水生动物养殖中使用<sup>[7]</sup>。

GB 29708—2013《食品安全国家标准 动物性食品中五氯酚钠残留量的测定》、HJ 591—2010《水质 五氯酚的测定 气相色谱法》分别使用气相色谱-质谱法、气相色谱法测定动物性食品以及水质中的五氯酚钠残留量<sup>[8]</sup>。目前, 国内对于五氯酚钠的分析方法主要有气相色谱法、气相色谱-电子捕获法、气相色谱-氢火焰法等<sup>[9-15]</sup>。该方法具有灵敏度高、结果准确等优点, 但资金和人员等投入成本较高。针对五氯酚钠检测技术上的不足, 笔者设计了一种利用胶体金免疫层析技术检测猪肉、鸡肉、鱼、虾、水质等样本中五氯酚钠的方法, 该方法特异性好、灵敏度高、操作简便、检测成本低, 适合于批量样品的筛选检测, 是理想的快速筛选手段, 能够更好地满足我国猪肉、鸡肉、鱼、虾、水质等样本企业、政府职能部门等开展检测工作。

## 1 材料与方

**1.1 材料与仪器** 五氯酚钠、各种交叉反应药物 (纯度 ≥ 95%) 等标准品购自北京标准物质研究中心; 氯金酸 (HAuCl<sub>4</sub> · 3H<sub>2</sub>O)、卵清蛋白 (OVA) 均购自美国 Sigma 公司; 柠檬酸三钠、碳酸钾购自北京百欣试剂公司; 样本提取剂、样本复溶液由北京勤邦生物技术有限公司提供; 涡旋仪、均质器均购自湖南湘立科学仪器有限公司。

· 3H<sub>2</sub>O)、卵清蛋白 (OVA) 均购自美国 Sigma 公司; 柠檬酸三钠、碳酸钾购自北京百欣试剂公司; 样本提取剂、样本复溶液由北京勤邦生物技术有限公司提供; 涡旋仪、均质器均购自湖南湘立科学仪器有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 五氯酚钠半抗原的制备。** 1.0 g 五氯酚钠与 4 溴丁酸乙酯在 DMF 中, 在无水碳酸钾与碘化钠的催化下, 反应生成五氯酚-4 溴丁酸乙酯产物, 经乙酸乙酯萃取, 水洗, 柱层析纯化分离, 得到中间产物, 中间产物在氢氧化钾的水溶液中加热反应, 水解生成半抗原, 经乙酸乙酯提取, 二氯甲烷重结晶, 得到半抗原产物 (图 1)。

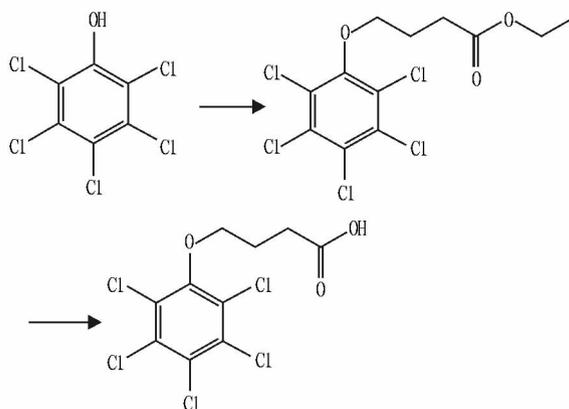


图 1 五氯酚钠半抗原合成

## Fig. 1 Half antigen synthesis of pentachlorophenol - Na

取上述产物经核磁共振氢谱测定, 化学位移在 4.0 ppm 处为邻近酚氧的亚甲基信号峰, 2.0 ppm 处两组为亚甲基信号峰, 11 ppm 处为羧基氢信号峰, 说明半抗原合成成功。

**1.2.2 免疫原的制备——五氯酚钠半抗原与牛血清白蛋白**

**基金项目** 北京市科技计划课题“城市地下水和地表水中 PPCPs 微生物新型检测技术、降解工艺及专项设备的研发” (Z151100002115059)。

**作者简介** 罗晓琴 (1984 - ), 女, 广西南宁人, 高级工程师, 从事食品安全检测技术研究。

**收稿日期** 2016-07-06

(BSA)偶联物合成。取18 mg半抗原,溶解于1 mL DMF中,得到溶液(1),取氯甲酸异丁酯50  $\mu\text{L}$ 加入(1)中,4  $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌30 min,得到反应液A。称取BSA 50 mg,使之充分溶解在4.0 mL PBS(pH 7.2)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24 h,用0.01 mol/L PBS 4  $^{\circ}\text{C}$ 透析3 d,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质。分装,于-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**1.2.3 包被原的制备——五氯酚钠半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联物合成。**取18 mg半抗原,溶解于1 mL DMF中,得到溶液(1),取氯甲酸异丁酯50  $\mu\text{L}$ 加入(1)中,4  $^{\circ}\text{C}$ 下搅拌30 min,得到反应液A。称取OVA 50 mg,使之充分溶解在4.0 mL PBS(pH 7.2)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24 h,用0.01 mol/L PBS 4  $^{\circ}\text{C}$ 透析3 d,每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质。分装,于-20  $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

**1.2.4 五氯酚钠单克隆抗体-胶体金标记物的制备。**在磁力搅拌下,用0.2 mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH至7.2,按1 mL胶体金溶液中加入60  $\mu\text{g}$ 的标准向胶体金溶液中加入五氯酚钠单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置10 min,加入10%牛血清白蛋白(BSA),使其在胶体金溶液中的终浓度为1%(体积百分含量),静置10 min。离心、洗涤、重悬,置于

4  $^{\circ}\text{C}$ 备用。

**1.2.5 五氯酚钠单克隆抗体-胶体金标记物冻干。**将五氯酚钠单克隆抗体-胶体金标记物冻干至微孔试剂上,向微孔试剂微孔板中加入100  $\mu\text{L}$ 五氯酚钠单克隆抗体-胶体金标记物,放入冷冻干燥机中,在冷阱温度为-50  $^{\circ}\text{C}$ 下,预冻3 h后,再真空干燥15 h,即可取出,得到冻干有五氯酚钠单克隆抗体-胶体金标记物的微孔试剂,密封保存。

**1.2.6 样本前处理方法。**猪肉、鸡肉、鱼、虾样本前处理:取已去脂肪的组织样本于均质器中均质;称取2 g匀浆好的组织样本至15 mL聚苯乙烯离心管中,加入1瓶样本提取剂,用涡旋仪涡动3 min,室温(20~25  $^{\circ}\text{C}$ )3 000 r/min下离心5 min;移取3 mL上层有机相至10 mL聚苯乙烯离心管中,于50~60  $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气流或空气流下吹干;加入300 mL样本复溶液,用涡旋仪涡动20 s后待检。水质样本:无需前处理。

**1.2.7 检测方法。**用微量移液器吸取100  $\mu\text{L}$ 待检样本溶液于微孔中,缓慢抽吸且充分与微孔中试剂混匀。室温(20~25  $^{\circ}\text{C}$ )孵育3 min后,吸取混匀液约70  $\mu\text{L}$ 垂直滴于组装好的试纸条。液体流动时开始计时,反应10 min,根据示意图判定结果或通过胶体金分析仪读取检测结果(图2)。其他时间判读无效。

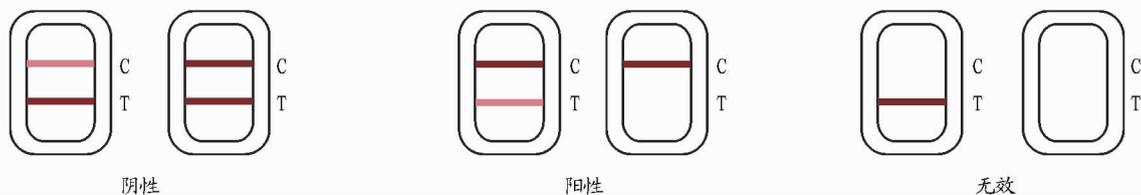


图2 五氯酚钠胶体金试纸条结果判定示意

Fig.2 Judgement of pentachlorophenol-Na gold immunochromatography assay strip

**1.2.8 样本检测限。**在空白猪肉、鸡肉、鱼、虾样本中,分别添加五氯酚钠标准品至质量浓度为0、0.5、1.0、1.5、2.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,在空白水质样本中分别添加五氯酚钠标准品至质量浓度为0、1.0、1.5、2.0、2.5  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,按照“1.2.7”所述方法用3批试纸条进行检测,每个浓度重复5次,根据试验结果确定样本检测限。

**1.2.9 试纸条的特异性。**分别配制1 000  $\mu\text{g}/\text{L}$ 硝基咪唑类药物、氯霉素等药物,用此试纸条检测,重复3次,判断试纸条的特异性。

**1.2.10 准确性。**农业部文件要求胶体金免疫层析法的准确性以假阳性率和假阴性率表示<sup>[9]</sup>。取空白猪肉、鸡肉、鱼、虾样品和添加五氯酚钠质量浓度为1  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的阳性猪肉、鸡肉、鱼、虾样品各50份,取空白水质样品和添加五氯酚钠质量浓度为1  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的阳性水质样品各50份,用试纸条进行检测,计算假阳性率和假阴性率。

**1.2.11 试纸条的重复性。**从3个批次中随机抽取试纸条,对空白猪肉、鸡肉、鱼、虾和添加五氯酚钠质量浓度为1  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的阳性猪肉、鸡肉、鱼、虾样品,以及空白水质和添加五氯酚钠质量浓度为2  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的阳性水质样品进行3次重复测定,

根据试验结果判定试纸条的重复性。

**1.2.12 试纸条的稳定性。**将足量的试纸条保存于2~8  $^{\circ}\text{C}$ 环境中,每隔30 d取出适量,分别检测空白猪肉、鸡肉、鱼、虾样品和添加五氯酚钠质量浓度为1  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的阳性猪肉、鸡肉、鱼、虾样品各10份,以及空白水质样品、添加五氯酚钠质量浓度为2  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的阳性水质样品各10份,重复测定2次,根据试验结果判定试纸条的稳定性。

## 2 结果与分析

**2.1 样本检测限** 用试纸条检测五氯酚钠浓度分别为0、0.5、1.0、1.5、2.0  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的猪肉、鸡肉、鱼、虾样品,0、1.0、1.5、2.0、2.5  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的水质样品,按照“1.2.7”方法进行检测,确定检测限。以仅出现C线时的最低标准品质量浓度作为试纸条的检测限。由表1可知,该试纸条检测限为1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

**2.2 特异性** 该试纸条检测1 000  $\mu\text{g}/\text{L}$ 硝基咪唑类药物、氯霉素等药物,结果均呈阴性,即与其他药物无交叉反应,该试纸条特异性强。

**2.3 准确性** 该试纸条检测的50份空白猪肉、鸡肉、鱼、虾、水质样品,均显示为阴性,假阳性率低于5%;添加五氯酚钠质量浓度为1  $\mu\text{g}/\text{L}$ 的50份阳性猪肉、鸡肉、鱼、虾样品以

及 2  $\mu\text{g/L}$  的 50 份阳性水质样品检测结果均为阳性, 试纸条假阴性率为 0, 符合要求。

表 1 五氯酚钠快速检测试纸条的检测限

Table 1 Detection limit of pentachlorophenol - Na rapid detection strip

五氯酚钠浓度 Pentachlorophenol - Na concentration $\mu\text{g/L}$	猪肉 Pork	鸡肉 Chicken	鱼 Fish	虾 Shrimp	水质 Water quality
0	-	-	-	-	-
0.5	-	-	-	-	-
1.0	+	+	+	+	-
1.5	+	+	+	+	-
2.0	+	+	+	+	+
2.5	+	+	+	+	+

注: - 表示阴性, + 表示阳性。

Note: - stands for negative, + stands for positive.

**2.4 重复性和稳定性** 经验证, 该试纸条的批内和批间重复性良好, 在 2~8  $^{\circ}\text{C}$  下能够保存 12 个月; 从第 13 个月起, 试纸条出现失效、假阴性等现象。

### 3 讨论

(1) 通过查阅文献, 发现目前检测动物组织中五氯酚钠残留量的方法较少, 主要集中在水样、土壤、皮革、纺织品等方面, 尚未发现能够同时检测猪肉、鸡肉、鱼、虾、水质中五氯酚钠的胶体金试纸等的报道。该研究的五氯酚钠胶体金试纸条操作简便, 无需设备, 操作时间仅需 15 min, 能够达到定性检测水平。由于试纸条方便、快捷、成本较低, 非常适用于我国基层检测实验室、政府部门的市场监管检测、临时抽检、排查工作中广泛推广使用, 且能够解决基层单位因设备和经费问题而较难开展食品中残留物检测和监控等工作的问题, 为农业质检、卫生部、工商管理、养殖业等机构的食品安全检测提供检测技术及产品<sup>[16]</sup>。

(2) 五氯酚钠半抗原通过五氯酚钠与 4-溴丁酸乙酯等

反应制备而成, 由此制备的半抗原进而制备成免疫原和包被原, 制备方法均不繁琐, 便于商业化生产。

(3) 该研究制备的试纸条假阴性率为 0, 假阳性率低于 5%, 且在 2~8  $^{\circ}\text{C}$  下能够保存 12 个月, 说明该试纸条稳定性良好, 适于基层实验室使用。

### 参考文献

- [1] 胡滨, 陈一资, 胡惠民. 动物性食品中五氯酚钠残留及对人畜毒害的研究[J]. 研究报告, 2005(2): 27-29.
- [2] 杨淑贞, 韩晓冬, 陈伟. 五氯酚对生物体的毒性研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2005, 22(5): 396-98.
- [3] 张丹晴, 蒋丽娟, 葛家春, 等. 五氯苯酚对渔业环境的危害与对策研究进展[J]. 江苏农业科学, 2007(4): 256-259.
- [4] 杨彩根, 宋学宏, 孙涛, 等. 五氯酚钠在青虾体内的药代动力学研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(3): 265-267.
- [5] 肖宇芳, 刘广民, 董永亮, 等. 土壤中五氯酚的快速测定[J]. 岩矿测试, 2008, 27(2): 117-119.
- [6] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Tox FAQs™ for Pentachlorophenol [EB/OL]. (2011-03-15) [2016-05-09]. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/faq.asp?id=401&tid=70>.
- [7] 中华人民共和国农业部. 食品动物禁用的兽药及其化合物清单: 公告第 193 号[A]. 2002.
- [8] 中华人民共和国农业部, 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 动物性食品中五氯酚钠残留量的测定: GB 29708—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [9] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 1985: 368-370.
- [10] 李荣, 甘金华, 徐进, 等. 气相色谱-电子捕获法直接测定水体中的五氯酚钠[J]. 中国环境监测, 2012, 28(1): 44-46.
- [11] RUDLING L. Deter mination of pentachlorophenol in organic tissues and water [J]. Water research, 1970, 4: 533-537.
- [12] 费志良, 葛家春, 吴军, 等. 气相色谱测定青虾、草鱼肌肉中五氯苯酚及其钠盐残留总量的方法[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2004, 27(3): 70-73.
- [13] 薛粹利, 张晓辉, 杜建明, 等. 虾类中五氯苯酚残留的气相色谱分析[J]. 福建分析测试, 2009, 18(3): 64-65.
- [14] 池锦萍. 固相微萃取气相色谱法测定水产品中五氯苯酚及其钠盐残留量[J]. 分析实验室, 2007(12): 321-323.
- [15] 洪爱华, 尹平河, 梁志红. 高效液相色谱-质谱联用法测定饮用水中的五氯苯酚[J]. 生态环境学报, 2010(1): 69-71.
- [16] 邓省亮, 赖卫华, 许杨. 胶体金免疫层析法快速检测黄曲霉毒素 B1 的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(2): 232-236.

(上接第 23 页)



图 8 高产、优质芋艿新品种‘金华红芽芋’

Fig. 8 New variety of taro Jinhua Hongyayu with high yield and high quality

一步选育出 2~3 个新品种, 特别是选育出具有保健、加工专用等特色功能品种; 提供水生蔬菜优质种苗, 促进种源安全, 为构建我国水生蔬菜产业新品种选育与配套栽培核心技术体系、丰富水生蔬菜市场、打造有市场影响力的品牌发挥强

有力促进作用。

### 参考文献

- [1] 中华人民共和国农业部. 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 茭白: NY/T 2498—2013[S]. 北京: 中国农业出版社, 2014.