

江 羚, 曾 昆, 邵 杰, 等. 四环素类抗生素快速分析方法研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(8): 15–21.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.08.004

四环素类抗生素快速分析方法研究进展

江 羚¹, 曾 昆^{1,2}, 邵 杰¹, 杜道林^{1,2}

(1. 江苏大学环境与安全工程学院, 江苏镇江 212013; 2. 江苏大学环境生态研究所, 江苏镇江 212013)

摘要:四环素类抗生素是一类广谱性抗生素,对大多数革兰氏阳性和阴性菌均有抑制作用,广泛应用于疾病治疗或饲料添加剂以促进动物生长;四环素类抗生素的大量使用,使其广泛残留在水体、土壤、动物性食品中,对人体和环境会造成潜在危害。目前,四环素类抗生素的检测方法主要有微生物法、免疫分析方法、仪器分析方法,其中以抗原抗体特异性结合为基础的免疫分析方法在四环素类抗生素的快速分析中占有重要地位,并随着不同的识别元件和分析方法的引入,不断丰富和发展。主要综述了能够特异性识别四环素类抗生素的生物元件以及各种快速分析方法在四环素类抗生素检测中的应用,以期为该领域的发展趋势和方向提供参考。

关键词:四环素;适配体;分子印迹;快速分析;免疫分析方法;抗生素

中图分类号: X132 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)08-0015-07

四环素类抗生素是由放线菌产生的一类广谱性抗生素,以十二氢化并四苯基结构为基本母核,包括四环素(tetracycline, TC)、土霉素(oxytetracycline, OTC)、金霉素(chlortetracycline, CTC)及半合成衍生物多西环素(doxycycline, DC)等,结构式如图1所示。四环素类抗生素对大多数革兰氏阳性和阴性菌均表现出抑制活性,如葡萄球菌、芽孢杆菌、肺炎杆菌、溶血性链球菌、立克次氏体及沙眼病毒等。有关研究表明,四环素类抗生素在低剂量添加时有促进动物生长和提高饲料利用率的作用,高剂量使用时可用来治疗疾病。此外,为了产品的保鲜,在肉制品加工过程中也会添加一定的抗生素类药物来抑制细菌的滋生。据不完全统计,欧盟国家每年消耗的抗生素总量约5 000 t,其中四环素类抗生素就高达2 300 t^[1];在美国,四环素类抗生素约占整个抗生素市场份额的15.8%^[2];我国是四环素类抗生素生产、销售和使用大国,2014年仅四环素衍生物及其盐出口量就高达 1.55×10^7 kg。

四环素类抗生素的大量使用,使其广泛残留在动物源性食品、环境水样以及土壤中。在一些常见的动物性食品,如鸡肉^[3]、猪肉^[4]、牛奶^[5]和蜂蜜^[6]等中都检测出有不同程度的四环素类药物残留。在美国爱荷华州^[2]、韩国的汉江^[7]以及中国的黄浦江^[8]等均检测出四环素类抗生素,含量高达0.2 g/L。环境中的抗生素残留除了造成化学污染外,还可能诱导抗性基因和抗性微生物的产生。这些抗性微生物可以通过直接或间接接触的方式进入人体,使人体的耐药性增强,从而给人类公共健康带来重大威胁。欧盟制定了四环素类抗

生素最大残留限量标准(maximum residue limit, MRL),其中CTC和4-差向金霉素、DC、OTC、TC在奶和肌肉中为100 μg/kg,肝脏中为300 μg/kg,肾脏中为600 μg/kg;我国动物性食品中兽药最高残留限量(农业部235号公告)规定CTC、DC、OTC和TC在肌肉、肝脏以及肾脏中的残留限量分别为100、300、600 μg/kg,DC、OTC和TC在奶中的残留限量为100 μg/L。

鉴于四环素类抗生素在水体、土壤、动物性食品中的广泛残留,会对人体和环境造成巨大的危害,发展简便、快速、灵敏的检测方法显得尤为必要。四环素类抗生素的检测方法主要有微生物法^[9-11]、ELISA方法^[8,12-14]、HPLC^[15-17]以及LC-MS^[18-20]方法。微生物法能够同时筛查大量样本,但是灵敏度低、耗时长;HPLC/LC-MS具有灵敏度高、准确性好等优点,但是有需要昂贵的设备和专业操作人员、前处理过程复杂等不足,限制了其在快速检测领域的应用。以抗原抗体特异性结合为基础的ELISA方法在快速检测领域中占据主导地位。近年来,在传统的ELISA方法基础上,发展出了多种快速分析方法。比如,用适配体取代抗体,建立了酶联核酸适配体分析(enzyme linked aptamer assay, ELAA),引入了荧光、纳米颗粒等信号报告分子,传感器方法提高了检测的灵敏度,缩短了检测时间。本文主要综述了四环素类抗生素特异性识别元件以及各种快速分析方法在四环素类抗生素检测中的应用,旨在对该领域的发展趋势和方向提供参考。

1 特异性生物识别元件

自20世纪50年代抗体应用于快速检测领域以来,因其特异性、灵敏度以及亲和力等优势,被广泛应用于医学、农业、食品安全以及环境污染物的快速检测中。然而,抗体制备过程周期较长(3~6个月),需要大量的试验动物,并且针对小分子物质的抗体制备较为困难。随着分子生物学技术以及材料科学的发展,一些与抗体具有类似功能的新型识别元件,比如重组抗体、核酸适配体、分子印迹聚合物等,被表达或合成出来,并广泛应用到快速检测领域中。

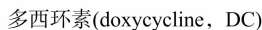
收稿日期:2016-11-29

基金项目:国家自然科学基金(编号:31502118);中国博士后基金(编号:2013M541606);江苏省自然科学基金(编号:BK20130507);江苏大学高层次人才启动基金(编号:13JDC016)。

作者简介:江 羚(1991—)女,安徽无为,人,硕士,主要从事环境污染快速检测方法研究。E-mail:jiangling_46hao@163.com。

通信作者:杜道林,博士,教授,主要从事环境污染生态效应及快速检测方法研究。E-mail:daolindu@163.com。

以抗原与抗体特异性结合特性为基础的免疫分析方法,在快速检测领域中占据着核心地位。抗体自身的特性直接影响检测方法的特异性、灵敏度、准确性和精密度。四环素类抗生素属于半抗原(分子量小于1 000),不具有免疫原性,须与大分子物质(蛋白质、多聚物等)偶联后才能刺激机体产生抗体。半抗原和大分子蛋白偶联方法的设计是抗体制备过程中的关键步骤,直接决定了所得抗体的特异性。四环素类抗生



用 2 种策略合成半抗原: 在 CTC/TC/OTC 结构上衍生出羧基基团, 采用 EDC 法与载体蛋白偶联; 通过 Mannich 反应直接连接 CTC/TC/OTC 与蛋白。不同的抗原与抗体配对发现, 以 KLH - OTC - 3 - III 作免疫原, OVA - TC - 1 为包被抗原, 建立的 ELISA 方法灵敏度最高。并且该抗体能够识别四环素类药物, 对 RTC、OTC、MC、CTC 的交叉反应率分别为 91%、30%、14%、10%^[27]。高峰合成了 2 类完全抗原: DC/CTC 上引入对氨基苯乙酸后通过混合酸酐法与蛋白偶联以及 DC 直接与载体蛋白偶联, 采用 2 种免疫原免疫小鼠, 最终获得 2 株 DC 广谱单克隆抗体 R3M1 (免疫原为 DC - BSA) 和 R8M4 (免疫原为 DC - C - BSA)^[28]。以 CTC - C - OA 为包被原, R8M4 可以识别 7 种四环素类药物, 对 DC、TC、OTC、CTC、MNC、MTC 以及 DMC 的交叉反应率分别为 100%、68%、93%、65%、47%、102%、49%, IC_{50} 在 1.5 ~ 6.9 ng/mL 之间^[28]。

虽然抗原-抗体结合的特异性强、灵敏度高,但是也存在一些缺点,需要大量的试验动物、免疫周期长和不易获得较理想的抗体等。与抗体相比,核酸适配体不仅选择性专一而且具有体外合成周期短、性质稳定、易于修饰和保存、靶分子种类多、无免疫原性和毒性等优势,并且可以对适配体的3'和5'端进行修饰,而不影响目标物的结合位点^[29-31],比如生物素^[32]、巯基^[33]和一些标记分子^[34]。目前,基于核酸适配体的生物传感器分析方法已被广泛应用到检测各种蛋白质、小分子化学物质、代谢物 and 环境污染物中^[35-41]。

Niazi 等采用 SELEX 技术,筛选到 7 个能够特异性识别四环素骨架结构的 DNA 适配体(T7、T15、T19、T20、T22、T23、T24),其解离常数 K_d 在 63 ~ 483 nmol/L 之间。这 7 种适配

体均能同时识别 TC、OTC 和 DC,除 T20 对 TC 的亲合力最高外,其他 6 种适配体对 OTC 的亲合力最高^[42]。Kim 等利用 OTC-BSA 混合物通过 SELEX 技术,筛选得到识别 OTC 的适体 (aptamer) 4 株,分别为 OTC3、OTC6、OTC9 和 OTC16。其中 OTC3 对 OTC 显示出最强的结合能力,其解离常数 K_d 为 4.7 nmol/L ^[43]。Chen 等通过等温滴定量热技术筛选到特异性识别四环素的适配体, K_d 为 $5.18 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ ^[44]。

1.3 分子印迹

分子印迹技术是模拟抗原抗体反应,以目标物为模板,通过化学方法合成一种高分子聚合物——分子印迹聚合物 (molecularly imprinted polymer, MIP),该聚合物能够特异性地与目标物质结合达到检测的目的^[45-46]。与传统抗体相比,分子印迹聚合物具有稳定性好、易制备、周期短、价格低廉、易于保存且能在复杂的环境中得以应用等优点^[47]。

Li 等以 OTC 为模板,邻苯二胺 (o-phenylenediamine, OPD) 为功能单体,合成 MIP,对四环素类化合物的识别能力为 $\text{OTC} > \text{TC} > \text{CTC}$ ^[48]。杨春艳等以 TC 为模板,甲基丙烯酸 (methacrylic acid, MAA) 为功能单体,合成 MIP,以 50 mg MIP 制备的固相萃取柱对 CTC 的动态吸附量为 $2.6 \times 10^{-4} \text{ g/g}$ ^[49]。Lian 等以 CTC 为模板,壳聚糖衍生物 (chitosan derivative, CSDT) 为单体,合成 MIP,对 CTC 有较好的识别能力,对四环素类其他化合物识别能力较弱,具有较好的特异性^[50]。Chen 等以 OTC 为模板,MAA 为功能单体,并结合 Fe_3O_4 合成了具有磁性的四环素分子印迹聚合物。经鉴定,这种磁性 MIPs 能够选择性地识别四环素类化合物,其平均解离常数 K_d 为 $724 \text{ } \mu\text{mol/L}$ ^[51]。

2 分析方法

随着生物检测技术的发展,放射性同位素、酶、量子点、荧光素等报告分子被引入到分析方法中,使得快速分析方法的性能得到了极大的改善。但是报告分子与抗体的偶联过程,可能会导致抗体活性下降或干扰抗原与抗体结合,因此近年来越来越多的学者试图探索出更具性价比的无标记的检测方法,其中以传感器技术应用最为广泛。

2.1 ELISA/ELAA 方法

ELISA 方法是最常见的快速检测方法,许多研究者都建立了 ELISA 方法用于 TC、DC、OTC 以及 CTC 的检测^[21,24,26-27,52],检测限最低可达 $0.19 \text{ } \mu\text{g/L}$ ^[53],均可满足欧盟残留限量的检测标准。而 Jeon 等在 ELISA 方法中引入了生物素-亲和素系统,用于检测牛奶中的四环素残留,其方法的 LOD 为 $1.0 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$,线性范围在 $3.16 \times 10^{-10} \sim 3.16 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ ^[54]。

除 ELISA 法外,以适配体为识别分子代替抗体建立的 ELAA 在四环素快速检测中也有报道。Wang 等建立了基于适配体的间接竞争 ELISA 方法特异性检测蜂蜜中的四环素含量,该方法的最低检测限为 $9.6 \times 10^{-3} \text{ ng/mL}$,线性范围为 $0.01 \sim 100.00 \text{ ng/mL}$ ^[55]。王赛等随后又建立了基于适配体的直接竞争 ELISA 方法,在蜂蜜中四环素的最低检测限为 0.0978 ng/mL ,线性范围可达 $0.1 \sim 1000.0 \text{ ng/mL}$ ^[56]。Jeong 等应用特异性识别四环素的 ssDNA 和 RNA 适配体建立了竞争酶联免疫适配体方法检测牛奶中的四环素残留,其

LOD 为 $2.10 \times 10^{-8} \text{ mol/L}$ ^[57]。张璇等通过 Mannich 法偶联 HRP 和四环素分子制备酶标记物,建立了四环素酶连适配体检测方法,该法的 IC_{50} 为 0.705 g/mL ,LOD 为 2.5 ng/mL ^[58]。

2.2 荧光分析方法

相对于 ELISA 法,荧光分析法具有更高的灵敏度,对某些物质的微量分析能够达到 10^{-10} g 数量级。近年来随着材料科学的发展,量子点 (quantum dots, QDs) 在分析化学等领域已成为重要的生物荧光探针。与传统荧光染料相比,QDs 具有自身特有的光学稳定性、良好的生物相容性和长荧光寿命特性等特点,基于其开发的量子点荧光分析法也成为快速检测技术之一。García - Fernandez 等用 CdSe/ZnS 标记 OTC-BSA,建立了直接筛选牛肉中 4 种四环素的免疫分析方法,检测限为 $0.12 \text{ } \mu\text{g/L}$,线性范围为 $0.26 \sim 3.53 \text{ } \mu\text{g/L}$ ^[59]。王云云采用 EDC/NHS 为活化剂,偶联量子点和 TC 抗体,构建直接竞争荧光免疫分析方法,在酶标板上通过阵列分析实现对牛奶中四环素的残留检测,检测限达到 0.005 ng/mL ,线性范围为 $0.01 \sim 10.00 \text{ ng/mL}$ ^[60]。Hou 等利用简单的微波辅助方法在碳量子点表面合成了能够和四环素分子特异性结合的分子印迹聚合物,建立了基于 CDs@MIPs 的荧光检测牛奶中四环素残留的新方法,检测限为 5.48 nmol/L ^[61]。

2.3 电化学生物传感器

电化学生物传感器是近些年来发展起来的一种新型检测分析方法,其原理是靶物质与电极上的生物识别元件 (抗体、核酸适配体、MIP、细胞等) 相结合,导致生物识别元件分子变构或活性发生改变,以电流、电势或电容为特征检测信号。电化学生物传感器具有上样体积小、响应快、准确度高、无需标记、可以实现连续在线检测等显著优势,在医学、食品工业和环境污染检测等领域展示了十分广阔的应用前景。

2.3.1 以抗体为识别元件的电化学生物传感器 Conzuelo 等将抗 TC 抗体组装在修饰有蛋白 G 的磁珠上,HRP 标记的 TC 和溶解在 PBS 里的 TC 标准品或样品竞争性地与 TC 抗体结合^[62]。通过磁性装置分离并洗涤后,磁珠被移到丝网印刷碳电极上检测电信号。以此建立 1 种可弃式的传感器,用于牛奶中四环素类残留检测,对 TC、CTC、OTC 以及 DC 的检测限分别为 8.9 、 66.8 、 1.2 、 0.7 ng/mL ^[62]。

2.3.2 以适配体为识别元件的电化学生物传感器 Kim 等将疏基修饰的 OTC 适配体固化在金叉指阵列电极芯片上,利用循环伏安法和方波伏安法监测电信号,构建 1 种特异性识别 OTC 的生物传感器,线性范围在 $1 \sim 100 \text{ nmol/L}$ 之间^[63]。Zhou 等在玻碳电极表面组装了 1 层多壁碳纳米管 (multiwalled carbon nanotubes, MWCNTs),通过多壁碳纳米管上的羧基与 TC 适配体偶联,构建 1 种新型的电化学传感器,采用循环伏安法检测电信号,实现对 TC 的快速检测。优化条件后,对 TC 的检测限为 $5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$,线性范围在 $1 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ 之间^[64]。吴艳等将 TC 核酸适配体共价固定于玻碳电极表面构建出可快速现场检测牛奶中四环素的新型生物传感器,检测限为 $1 \text{ } \mu\text{g/L}$,线性检测范围为 $1 \sim 100 \text{ } \mu\text{g/L}$ ^[65]。Hou 等将适配体组装在悬臂上,建立悬臂梁阵列传感器方法,快速、特异性检测 OTC 残留,该方法的最低检测限可达 0.2 nmol/L ^[66]。Liu 等在玻璃电极表面组装了石墨相氮化碳 ($\text{g-C}_3\text{N}_4$) 和 CdS 量子点复合物,并结合 TC 适配

体,构建了能够特异性识别四环素的光电化学传感器,该传感器成功地结合了 $g-C_3N_4$ 和 CdS 量子点的特性于一体,其检测范围在 $10 \sim 250$ nmol/L,检测限为 5.3 nmol/L^[67]。

2.3.3 以 MIP 为识别元件的电化学生物传感器 Li 等采用 OTC 和 HRP-OTC 竞争性与 MIP 结合的策略,建立了基于分子印迹的电化学传感器用于 OTC 的检测,最低检测限为 6.49×10^{-10} mol/L,线性范围为 $0 \sim 1 \times 10^{-7}$ mol/L^[48]。Lian 等在金电极上依次组装 β 环糊精-多壁碳纳米管复合物、纳米金-聚酰胺胺树状分子复合物以及 MIP,构建电化学分子印迹传感器用于检测牛奶和蜂蜜中的 OTC,其最低检测限为 4.958×10^{-8} mol/L,线性范围为 $9 \times 10^{-8} \sim 5 \times 10^{-5}$ mol/L^[50]。康文静利用最优化层数的壳聚糖-多壁碳纳米管复合物多层膜和金纳米粒子构建 1 种灵敏测定土霉素的分子印迹电化学传感器方法。该方法最低检测限为 2.7×10^{-8} mol/L,线性范围为 $3.0 \times 10^{-8} \sim 8.0 \times 10^{-5}$ mol/L^[68]。

2.3.4 其他传感器 还有一些传感器,虽然没有应用抗体、适配体和 MIP 作为生物识别元件,而是利用其他生物活性物质,但建立的方法检测限低、灵敏度高、特异性强,用来检测目标物非常简单、方便。Ghodsi 等利用 OTC 结构中的苯酚基团在 H_2O_2 存在的条件下能够被 HRP 氧化的特性,并结合多壁碳纳米管(MWCNTs)独特的催化特性,建立了一种简单、灵敏的电化学传感器方法检测 OTC,优化条件后,该方法的检测限达 35 nmol/L,线性范围在 $15.0 \mu\text{mol/L} \sim 1.5$ mmol/L^[69]。

2.4 基于金颗粒的检测方法

纳米金颗粒标记抗体结合硝酸纤维素膜建立的测流层析试纸条,具有检测快速、灵敏、操作简便等优点,是快速检测领域,尤其是现场检测的重要组成部分。刘丽等用实验室自制的金标记抗四环素单抗,建立了金标记快速检测试纸条检测食品中四环素的残留方法,灵敏度可达 50 ng/mL^[70]。武玉香利用固相抗原与游离 CTC 竞争性结合胶体金标记 CTC 抗体的原理,Luo 等建立了胶体金免疫层析条法以及斑点金免疫渗滤方法,实现了对食品中 CTC 的快速检测。2 种方法的检测限分别为 $0.7, 0.4 \mu\text{g/mL}$ ^[71]。檀尊社等建立了胶体金免疫层析法用于快速检测水产品中四环素类药物残留,该方法检测水产品样品时,对 TC、CTC、OTC、DC 的检测限分别为 $100, 200, 400, 100$ ng/mL,检测过程仅需 $5 \sim 10$ min^[72]。

除测流层析试纸条外,一些新型的分析方法是基于纳米金颗粒的理化性质建立的。Luo 等将特异性识别 TC 的适配体包被在纳米金颗粒表面,制得具有催化能力的纳米颗粒 (aptamer coated nanogold, ACNG),ACNG 能够催化 Fehling 反应,在 60°C 时产生 Cu_2O 晶体^[73]。当没有 TC 时,稳定的 ACNG 能够催化产生较多的 Cu_2O 晶体,具有较高的共振散射值 (resonance scattering, RS); 当有 TC 存在时,TC 与特异性适配体结合,使纳米金颗粒暴露并沉聚,不能催化产生 Cu_2O 晶体,RS 值降低。基于上述原理,Luo 等建立了一种检测牛奶中四环素含量的共振散射光谱法,该方法的检测限为 11.6 nmol/L,样本添加回收率为 $105\% \sim 109\%$ ^[73]。Luo 等建立了一种四环素比色分析方法,用于牛奶中四环素残留的检测^[74]。当没有 TC 时,纳米金颗粒与适配体因静电引力而沉聚;当有 TC 存在时,TC 特异性地与其适配体结合,诱导适配体构象变化,使得纳米金颗粒释放出来,引发吸光度的改变。该方法的最

低检测限为 $0.039 \mu\text{g/mL}$,线性范围为 $0.2 \sim 2.0 \mu\text{g/mL}$ ^[74]。

2.5 其他

除了以上所列出的比较具有代表性的快速分析方法外,还有一些其他的分析方法,虽然应用不广,但对分析方法的改进和发展来说仍然具有重要意义。Weber 等成功地建立了一种基于原核细胞和哺乳动物细胞的生物传感器的体外检测方法,该方法引用了 ELISA 模式,检测四环素类抗体的最低检测限能够达到 ng/mL 级别^[75]。杨春艳等利用 CTC 在酸性介质中能极大地增敏 Ce(IV) 和 Rh6G 的化学发光特性,建立了分子印迹固相萃取-化学发光测定盐酸金霉素的方法,线性范围为 $2 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$ g/mL,检测限为 4×10^{-9} g/mL^[49]。

3 结语

由于四环素类抗生素的广泛使用,在水体、土壤、动物性食品中都会有抗生素残留。虽然食品和环境中的抗生素残留并不表现出急性毒性作用,但长期摄入和接触可能会产生各种慢性和蓄积性毒性^[76],还可能引起耐药菌株的增加,进而通过环境和食物链间接危害到人类的身体健康和安全。因此,各国也加大了对抗生素非法使用和滥用情况的监管力度。

表 1 中汇总了现有的四环素快速分析方法,发现其具有以下特点:(1) 尽管特异性抗体仍然是重要的生物识别元件,但是新兴的识别分子,如核酸适配体、MIP 等,已经成功地应用于快速分析方法的建立;(2) 电化学传感器方法因其灵敏度高、快速等优势在四环素快速分析中得到长足发展,并且与新型的纳米材料相结合,提高了检测方法的性能;(3) 充分利用核酸的理化性质,结合适当的纳米材料(纳米金等),建立一系列新型的分析方法,可以实现定量/半定量的检测。在未来的检测领域中,结合抗体、适配体、MIP 等识别元件的特性,联合各种新材料(碳纳米管、金属纳米颗粒等)或新技术(传感器技术),开发出新颖的检测方法,依然是四环素类抗生素快速分析的发展方向。

参考文献:

- [1] Hirsch R, Ternes T, Haberer K, et al. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment[J]. Science of the Total Environment, 1995, 225 (1/2): 109-118.
- [2] Sarmaha A K, Meyer M T, Boxall B A. A global perspective on the use, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment[J]. Chemosphere, 2006, 65 (5): 725-759.
- [3] 郭培源, 赵俊华, 刘 硕, 等. 鸡肉中四环素残留量检测及健康风险评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(9): 3614-3620.
- [4] 曹艺耀. 动物性食品中兽药残留检测方法研究及济南市售动物性食品中兽药残留市场调查[D]. 济南: 山东大学, 2013.
- [5] Tan H L, Ma C J, Song Y H, et al. Determination of tetracycline in milk by using nucleotide/lanthanide coordination polymer-based ternary complex[J]. Biosensors & Bioelectronics, 2013, 50 (4): 447-452.
- [6] Tarapoulouzi M, Papachrysostomou C, Constantinou S, et al. Determinative and confirmatory method for residues of tetracyclines in honey by LC-MS/MS[J]. Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment, 2013, 30

表 1 四环素快速分析方法

分析方法	目标物	识别元件	LOD	线性范围	信号分子	参考文献
ELISA	DC	抗体	0.100 μg/L	0.250 ~ 6.700 μg/L	HRP	[24]
	TC	抗体	10.000 μg/L	100.000 ~ 1.000 × 10 ⁵ μg/L	HRP	[26]
	TC	抗体	0.400 μg/L	1.150 ~ 38.900 μg/L	HRP	[27]
	TC	抗体	- ^a	3.900 ~ 2.000 × 10 ³ μg/L	HRP	[52]
	TC	抗体	0.190 μg/L	1.520 ~ 152.000 μg/L	HPR	[53]
	TC	抗体	0.048 μg/L	0.316 ~ 316.000 nmol/L	HRP	[54]
ELAA	TC	适配体	9.600 ng/L	0.010 ~ 100.000 μg/L	HRP	[55]
	TC	适配体	0.098 μg/L	0.100 ~ 1.000 × 10 ³ μg/L	HRP	[56]
	TC	适配体	32.700 nmol/L	199.000 ~ 1.000 × 10 ⁵ nmol/L	HRP	[57]
		适配体	21.000 nmol/L	31.600 ~ 3.160 × 10 ⁵ nmol/L		
	TC	适配体	2.500 μg/L	- ^a	HRP	[58]
荧光分析方法	TCs	抗体	0.120 μg/L	0.260 ~ 3.530 μg/L	QDs	[59]
	TC	抗体	0.005 μg/L	- ^a	QDs	[60]
	TC	MIP	5.480 nmol/L	20.000 ~ 1.200 × 10 ⁴ nmol/L	QDs	[61]
电化学生物传感器	TCs	抗体	3.900 μg/L	12.500 ~ 676.200 μg/L	SPCEs	[62]
	OTC	适配体	- ^a	1.000 ~ 100.000 nmol/L	电信号	[63]
	TC	适配体	5.000 nmol/L	10.000 ~ 5.000 × 10 ⁴ nmol/L	电信号	[64]
	TC	适配体	1.000 μg/L	1.000 ~ 100.000 μg/L	电信号	[65]
	OTC	适配体	0.200 nmol/L	1.000 ~ 100.000 nmol/L	电信号	[66]
	TC	适配体	5.300 nmol/L	10.000 ~ 250.000 nmol/L	光电信号	[67]
	OTC	MIP	0.649 nmol/L	- ^a	电信号	[48]
	CTC	MIP	49.580 nmol/L	9.000 ~ 5.000 × 10 ⁴ nmol/L	电信号	[50]
	OTC	MIP	27.000 nmol/L	30.000 ~ 8.000 × 10 ⁴ nmol/L	电信号	[68]
	CTC		49.580 nmol/L	9.000 ~ 5.000 × 10 ⁴ nmol/L		
	TC		36.500 nmol/L	50.000 ~ 1.000 × 10 ⁵ nmol/L		
	OTC	- ^b	35.000 nmol/L	1.500 × 10 ⁴ ~ 1.500 × 10 ⁶ nmol/L	电信号	[69]
基于金纳米颗粒	TC	抗体	50.000 μg/L	- ^a	比色	[70]
	CTC	抗体	0.400 μg/L	600.000 ~ 1.000 × 10 ³ μg/L	比色	[71]
	TC	抗体	100.000 μg/L	- ^a	比色	[72]
	TC	适配体	11.600 nmol/L	- ^a	RS	[73]
	TC	适配体	39.000 μg/L	200.000 ~ 2.000 × 10 ³ μg/L	比色	[74]
其他	TC	哺乳动物细胞	1.900 μg/L	- ^a	HRP	[75]
	CTC		0.400 μg/L	- ^a		
	OTC		1.900 μg/L	- ^a		
	DC		0.100 μg/L	- ^a		
	CTC	MIP	- ^a	20.000 ~ 1.000 × 10 ³ nmol/L	化学发光	[49]

注：-^a 表示文献中未报道；-^b 表示无识别元件。

(10):1728-1732.

[7] Choi K J, Kim C W, Kim S H. Determination of antibiotic compounds in water by on-line SPE-LC/MSD[J]. Chemosphere, 2007, 66(6):977-984.

[8] 韩敏奇, 蒋增辉, 陆志惠, 等. 酶联免疫法测定上海原水中四环素浓度[J]. 供水技术, 2015, 9(3):57-59.

[9] Virolainen N E, Pikkemaat M G, Elferink J W A, et al. Rapid detection of tetracyclines and their 4-epimer derivatives from poultry meat with bioluminescent biosensor bacteria [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2008, 56(23):11065.

[10] 刘兴泉, 冯震, 姚蕾, 等. 采用高通量微生物法检测四种抗生素在鸡蛋中的残留[J]. 现代食品科学, 2011, 27(4):465-467.

[11] 刘兴泉, 冯震, 姚蕾, 等. 采用高通量微生物法和 HPLC 法检测猪肉中四环素和磺胺类抗生素残留[J]. 食品与发酵工业, 2011, 37(4):194-197.

[12] 国占宝, 武玉香, 田文礼, 等. 食品中四环素类残留的酶联免疫检测试剂盒的研制[J]. 食品科学, 2011, 32(2):333-337.

[13] Chen Y N, Kong D Z, Liu L Q, et al. Development of an ELISA and immunochromatographic assay for tetracycline, oxytetracycline, and chlortetracycline residues in milk and honey based on the class-specific monoclonal antibody[J]. Food Analytical Methods, 2016, 9(4):1-10.

[14] Gao F, Zhao G X, Zhang H C, et al. Production of monoclonal antibody against doxycycline for immunoassay of seven tetracyclines in bovine muscle and milk[J]. Journal of Environmental Science and Health, Part. B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 2013, 48(2):92-100.

[15] 胡冠九, 王冰, 孙成. 高效液相色谱法测定环境水样中 5 种四环素类抗生素残留[J]. 环境化学, 2007, 26(1):106-107.

[16] Castellari M, Gratacós-Cubarsí M, García-Regueiro J A. Detection of tetracycline and oxytetracycline residues in pig and calf

- hair by ultra - high - performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216 (46): 8096 - 8100.
- [17] Tylová T, Olšovská J, Novák P, et al. High - throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection [J]. *Chemosphere*, 2009, 78 (4): 353 - 359.
- [18] 高晓丹. 分子印迹技术与 LC - MS/MS 联用在食品中痕量四环素类检测的应用研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [19] Pamreddy A, Hidalgo M, Havel J, et al. Determination of antibiotics (tetracyclines and sulfonamides) in biosolids by pressurized liquid extraction and liquid chromatography - tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1298 (13): 68 - 75.
- [20] Spisso B F, Monteiro M A, Lima A M B, et al. A liquid chromatography - tandem mass spectrometry confirmatory assay for the simultaneous determination of several tetracyclines in milk considering keto - enol tautomerism and epimerization phenomena [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2009, 656 (1/2): 72 - 84.
- [21] 乐 涛. 多西环素残留免疫学快速检测技术研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [22] Le T, Zhao W Z, Wei W, et al. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody - based enzyme - linked immunosorbent assay for determination of doxycycline in chicken muscle, liver and egg [J]. *Food Chemistry*, 2012, 134 (4): 2442 - 2446.
- [23] 李嘉嘉. 土霉素单克隆抗体的制备 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2012.
- [24] Adrian J, Fernández F, Sánchezbaeza F, et al. Preparation of antibodies and development of an enzyme - linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of doxycycline antibiotic in milk samples [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, 57 (60): 3837 - 3846.
- [25] 李 靛. 盐酸金霉素免疫学快速检测方法研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2012.
- [26] Zhang Y L, Lu S X, Liu W, et al. Preparation of anti - tetracycline antibodies and development of an indirect heterologous competitive enzyme - linked immunosorbent assay to detect residues of tetracycline in milk [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2007, 55 (2): 211 - 218.
- [27] Pastornavarró N, Morais S, Maquieira A, et al. Synthesis of haptens and development of a sensitive immunoassay for tetracycline residues; application to honey samples. [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 594 (2): 211 - 218.
- [28] 高 峰. 强力霉素广谱单克隆抗体的制备及应用 [D]. 保定: 河北农业大学, 2013.
- [29] Huang D W, Niu C G, Qin P Z, et al. Time - resolved fluorescence aptamer - based sandwich assay for thrombin detection [J]. *Talanta*, 2010, 83 (1): 185 - 189.
- [30] Ferreira C S M, Papamichael K, Guilbault G, et al. DNA aptamers against the MUC1 tumour marker; design of aptamer - antibody sandwich ELISA for the early diagnosis of epithelial tumours [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2008, 390 (4): 1039 - 1050.
- [31] Pultar J, Sauer U, Domnanich P, et al. Aptamer - antibody on - chip sandwich immunoassay for detection of CRP in spiked serum [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 24 (5): 1456 - 1461.
- [32] Park H, Paeng I R. Development of direct competitive enzyme - linked aptamer assay for determination of dopamine in serum [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 685 (1): 65 - 73.
- [33] Wang J, Munir A, Li Z, et al. Aptamer - Au NPs conjugates - enhanced SPR sensing for the ultrasensitive sandwich immunoassay [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 25 (1): 124 - 129.
- [34] Shimada J, Maruyama T, Kitaoka M, et al. DNA - enzyme conjugate with a weak inhibitor that can specifically detect thrombin in a homogeneous medium [J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 414 (1): 103 - 108.
- [35] Zheng J, Cheng G F, He P G, et al. An aptamerbased assay for thrombin via structure switch based on gold nanoparticles and magnetic nanoparticles [J]. *Talanta*, 2010, 80 (5): 1868 - 1872.
- [36] Wu Z S, Lu H, Liu X, et al. Inhibitory effect of target binding on hairpin aptamer sticky - end pairing - induced gold nanoparticle assembly for light - up colorimetric protein assay [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (9): 3890 - 3898.
- [37] Edwards K A, Wang Y, Baeumner A J. Aptamer sandwich assays: human α - thrombin detection using liposome enhancement [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 398 (6): 2645 - 2654.
- [38] Surugiu - Warnmark I, Warnmark A, Toresson G, et al. Selection of DNA aptamers against rat liver X receptors [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 332 (2): 512 - 517.
- [39] Shimada J, Maruyama T, Kitaoka M, et al. DNA - enzyme conjugate with a weak inhibitor that can specifically detect thrombin in a homogeneous medium [J]. *Analytical Biochemistry*, 2011, 414 (1): 103 - 108.
- [40] Park H, Paeng I R. Development of direct competitive enzyme - linked aptamer assay for determination of dopamine in serum [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 685 (1): 65 - 73.
- [41] Xu H, Mao X, Zeng Q X, et al. Aptamer - functionalized gold nanoparticles as probes in a dry - reagent strip biosensor for protein analysis [J]. *Analytical Chemistry*, 2008, 81 (2): 669 - 675.
- [42] Niazi J H, Lee S J, Gu M B. Single - stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 16 (15): 7245 - 7253.
- [43] Kim C H, Lee L P, Min J R, et al. An indirect competitive assay - based aptasensor for detection of oxytetracycline in milk [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2014, 51 (1): 426 - 430.
- [44] Chen D, Yao D S, Xie C F, et al. Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline [J]. *Food Control*, 2014, 42: 109 - 115.
- [45] Alexander C, Andersson H S, Andersson L I, et al. Molecular imprinting science and technology: a survey of the literature for the years up to and including 2003 [J]. *Journal of Molecular Recognition*, 2006, 19 (2): 106 - 180.
- [46] 林 影, 叶 茂, 韩双艳, 等. 免疫检测技术的研究进展 [J]. *食品与生物技术学报*, 2007, 26 (4): 117 - 120.
- [47] 李霞霞, 程玉来, 王国来, 等. 免疫检测新技术在食品检测中的应用 [J]. *食品工业科技*, 2006, 27 (3): 170 - 174.
- [48] Li J P, Jiang F Y, Wei X P. Molecularly imprinted sensor based on an enzyme amplifier for ultratrace oxytetracycline determination [J]. *Analytical Chemistry*, 2010, 82 (14): 6074 - 6078.

- [49] 杨春艳,熊 艳,何 超,等. 分子印迹固相萃取 - 化学发光测定盐酸金霉素[J]. 应用化学,2007,24(3):273-277.
- [50] Lian W J, Huang J D, Yu J H, et al. A molecularly imprinted sensor based on β -cyclodextrin incorporated multiwalled carbon nanotube and gold nanoparticles - polyamide amine dendrimer nanocomposites combining with water - soluble chitosan derivative for the detection of chlortetracycline[J]. Food Control, 2012, 26(2):620-627.
- [51] Chen L G, Liu J, Zeng Q L, et al. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the separation of tetracycline antibiotics from egg and tissue samples [J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1216(18):3710-3719.
- [52] 李利东,宓晓黎,袁建兴,等. 酶联免疫检测试剂盒应用于牛奶中四环素残留的测定[J]. 乳业科学与技术, 2004, 27(2):52-54.
- [53] Jeon M, Paeng I R. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 626(2):180-185.
- [54] Jeon M, Kim J, Paeng K J, et al. Biotin - avidin mediated competitive enzyme - linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk[J]. Microchemical Journal, 2008, 88(1):26-31.
- [55] Wang S, Yong W, Liu J H, et al. Development of an indirect competitive assay - based aptasensor for highly sensitive detection of tetracycline residue in honey [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 57(21):192-198.
- [56] Wang S, Liu J H, Yong W, et al. A direct competitive assay - based aptasensor for sensitive determination of tetracycline residue in honey [J]. Talanta, 2015, 131:562-569.
- [57] Jeong S, Rhee P I. Sensitivity and selectivity on aptamer - based assay: the determination of tetracycline residue in bovine milk [J]. The Scientific World Journal, 2012, 2012(4968):357-369.
- [58] 张 璇,刘信嘉,雷红涛,等. 基于酶联适配体的四环素检测方法研究[J]. 现代食品科技, 2014, 30(7):263-267.
- [59] García - Fernandez J, Trapiella - Alfonso L, Costa - Fernandez J M, et al. A quantum dot - based immunoassay for screening of tetracyclines in bovine muscle [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(7):1733-1740.
- [60] 王云云. 多色量子点荧光免疫法同时快速检测牛奶中多抗生素残留的研究[D]. 重庆:西南大学, 2013.
- [61] Hou J, Li H Y, Wang L, et al. Rapid microwave - assisted synthesis of molecularly imprinted polymers on carbon quantum dots for fluorescent sensing of tetracycline in milk [J]. Talanta, 2016, 146:34-40.
- [62] Conzuelo F, Gamella M, Campuzano S, et al. Disposable amperometric magneto - immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk [J]. Analytica Chimica Acta, 2012, 737(15):29-36.
- [63] Kim Y S, Niazi J H, Gu M B. Specific detection of oxytetracycline using DNA aptamer - immobilized interdigitated array electrode chip [J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 634(2):250-254.
- [64] Zhou L, Li D J, Gai L, et al. Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi - walled carbon nanotubes amplification [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2012, 162(1):201-208.
- [65] 吴 艳,张娟琨,范 婷,等. 核酸适体生物传感器快速检测牛奶中抗生素 [J]. 生物加工过程, 2010, 8(3):48-52.
- [66] Hou H, Bai X J, Xing C Y, et al. Aptamer - based cantilever array sensors for oxytetracycline detection [J]. Analytical Chemistry, 2013, 85(4):2010-2014.
- [67] Liu Y, Yan K, Zhang J D. Graphitic carbon nitride sensitized with CdS quantum dots for visible - light - driven photoelectrochemical aptasensing of tetracycline [J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2015, 8(42):28255-28264.
- [68] 廉文静. 分子印迹技术结合壳聚糖检测食品中抗生素的电化学传感器研究[D]. 济南:济南大学, 2013.
- [69] Ghodsi J, Rafati A A, Shoja Y. First report on electrocatalytic oxidation of oxytetracycline by horse radish peroxidase: application in developing a biosensor to oxytetracycline determination [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 224:692-699.
- [70] 刘 丽,胡宜亮,王玉金,等. 食品中四环素残留快速检测方法的初步建立 [J]. 河南科学, 2012, 30(10):1462-1465.
- [71] 武玉香. 食品中金霉素残留的胶体金免疫检测方法研究 [D]. 武汉:武汉工业学院, 2008.
- [72] 檀尊社,陆 恒,邵伟胶,等. 胶体金免疫层析法快速检测水产品中四环素类药物残留 [J]. 西北农业学报, 2010, 19(8):32-37.
- [73] Luo Y F, He L, Zhan S S, et al. Ultrasensitive resonance scattering (RS) spectral detection for trace tetracycline in milk using aptamer - coated nanogold (ACNG) as a catalyst [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(5):1032-1037.
- [74] Luo Y L, Xu J Y, Li Y, et al. A novel colorimetric aptasensor using cysteamine - stabilized gold nanoparticles as probe for rapid and specific detection of tetracycline in raw milk [J]. Food Control, 2015, 54:7-15.
- [75] Weber C C, Link N, Fux C, et al. Broad - spectrum protein biosensors for class - specific detection of antibiotics [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2005, 89(1):9-17.
- [76] 陆 凡. 江苏省生物农药生产现状、存在问题及发展建议 [J]. 江苏农业学报, 2016, 32(1):56-66.