



天津科技大学学报

Journal of Tianjin University of Science & Technology

ISSN 1672-6510, CN 12-1355/N

《天津科技大学学报》网络首发论文

题目: 苯并咪唑类兽药胶体金双模式免疫层析检测方法
作者: 刘亚敏, 范彩旭, 亚婷婷, 金子新, 生威
DOI: 10.13364/j.issn.1672-6510.20250174
收稿日期: 2025-11-18
网络首发日期: 2026-09-02
引用格式: 刘亚敏, 范彩旭, 亚婷婷, 金子新, 生威. 苯并咪唑类兽药胶体金双模式免疫层析检测方法[J/OL]. 天津科技大学学报.
<https://doi.org/10.13364/j.issn.1672-6510.20250174>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。



苯并咪唑类兽药胶体金双模式免疫层析检测方法

刘亚敏, 范彩旭, 亚婷婷, 金子新, 生 威

(天津科技大学食品科学与工程学院, 天津 300457)

摘 要: 本研究采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金溶液(AuNPs), 通过静电吸附作用将苯并咪唑类(benzimidazoles, BZs)兽药广谱性单克隆抗体偶联制备信号探针。通过对检测条件进行优化, 建立兼具肉眼判读和智能手机定量分析的双模式免疫层析检测方法。该方法视觉检测结果为 8 $\mu\text{g/L}$, 进一步利用三原色(RGB)比色技术, 通过智能手机图像采集系统获取试纸条 C 线、T 线的 RGB 色度值, 定量检测限为 0.88 $\mu\text{g/L}$ (以阿苯达唑计), 线性范围为 1.0~16.0 $\mu\text{g/L}$ 。层析检测过程仅需 15 min 即可完成, 方法操作简单、方便快捷。

关键词: 苯并咪唑类兽药; 胶体金; 免疫层析检测方法; RGB

中图分类号: TS201.6

文献标志码: A

文章编号: 1672-6510(0000)00-0000-00

Study on the Detection of Benzimidazole Veterinary Drugs by Colloidal Gold Immunochromatographic Assay

LIU Yamin, FAN Caixu, YA Tingting, JIN Zixin, SHENG Wei

(College of Food Science and Engineering, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: Colloidal gold solution (AuNPs) is prepared by trisodium citrate reduction method, and signal probes are prepared by coupling it with broad-spectrum monoclonal antibodies of benzimidazole veterinary drugs (BZs) through electrostatic adsorption. By optimizing the detection conditions, a dual-mode immunochromatographic assay that combines naked eye reading and smartphone quantitative analysis has been established. The visual result of detection for this method is 8 $\mu\text{g/L}$. Further utilizing RGB colorimetric technology, the RGB chromaticity values of the C and T lines of the test strip are obtained through a smartphone image acquisition system. The limit of detection for this method is 0.88 $\mu\text{g/L}$ (calculated as albendazole), and the linear range is 1.0-16.0 $\mu\text{g/L}$. The chromatography testing process can be completed in just 15 min. The method is easy to operate and convenient and fast.

Key words: benzimidazole veterinary drugs, colloidal gold, immunochromatographic assay, RGB

兽药作为畜禽养殖中的核心投入品, 在预防和治疗畜禽病害、提高饲料利用效率方面发挥着重要作用。然而, 兽药的广泛使用也带来了兽药残留的问题^[1]。兽药残留是指动物在使用兽药后, 其原型药物或代谢产物在动物源性食品中的蓄积或残留

^[2]。人类可能通过食物链的累积, 摄入动物源性食品中的药物残留及降解产物^[3]。近年来, 由于畜禽养殖规模化、畜禽养殖规模的不断扩大, 畜禽产品中的兽药残留问题日趋严重, 已引起世界各国的高度重视^[4]。我国对兽药残留已有较多研究, 对其进

收稿日期: 2025-11-18; 修回日期: 2026-04-03

基金项目: 国家自然科学基金项目(32502335); 中国博士后科学基金第 77 批面上资助(2025M772975)

作者简介: 刘亚敏(2000—), 女, 云南昆明人, 硕士研究生; 通信作者: 生 威, 教授, shengweijunchen@163.com

行严格的监测^[5]。然而, 由于监管体系不完善、养殖户安全用药意识薄弱等原因, 兽药残留超标事件仍时有发生, 严重威胁着食品安全和人类健康。因此, 快速、准确地检测兽药残留对最大限度地减少污染而言是必要的^[6]。

苯并咪唑类 (benzimidazoles, BZs) 兽药因具有抗寄生虫活性、高效、低毒的特点, 在畜牧业中被广泛用于抗蠕虫药物。BZs 兽药是以苯并咪唑为基本骨架的一类抗寄生虫化合物, 其外观呈白色至淡黄色结晶态, 具有中等极性特征, 水溶性较差但可溶于稀释的矿物酸及有机酸溶液 (如甲酸、乙酸等)^[7]。BZs 兽药主要通过抑制寄生虫微管蛋白聚合, 破坏其能量代谢与细胞分裂过程, 从而实现高效驱虫的效果^[8]。此类药物多为弱碱性脂溶性化合物, 在动物体内代谢后, 可能以原形药物或多种代谢物 (如氨基甲酸酯类、亚砷类等) 的形式蓄积于肌肉、肝脏、肾脏及乳制品中^[9-10]。长期摄入含 BZs 残留的动物源性食品, 可能引发消费者基因毒性、胚胎毒性、免疫抑制等健康风险^[11]。此外, BZs 残留通过环境介质 (如畜禽粪便、水体) 的迁移转化, 可能加剧耐药基因的传播, 威胁生态环境安全。因此, 系统研究 BZs 兽药残留的生成机制、检测方法、风险控制策略以及开发广谱抗体和快速检测方法, 对食品样品中 BZs 的检测至关重要, 对完善食品安全监管体系、推动绿色畜牧业发展具有重要的理论和实践意义。

目前, BZs 兽药的检测方法有仪器分析法、免疫分析法及其他检测方法^[12]。仪器分析法^[13]是 BZs 残留检测的金标准, 适用于复杂基质 (如肌肉、肝脏、乳制品) 中的痕量分析, 例如高效液相色谱法 (HPLC)、液相色谱-串联质谱 (HPLC-MS/MS) 等方法。免疫分析法包括酶联免疫分析方法、免疫层析方法等。免疫层析方法^[14]是基于抗原抗体特异性反应的检测方法, 通过层析作用驱动样品在固相载体上的流动, 实现目标物的定性或半定量分析。该方法的使用范围覆盖广泛、成本低, 是以速度和简便性为主要优势, 可用于一些基层检验, 包括 AuNPs 免疫层析法^[15-17]和荧光免疫层析方法等。Yin 等^[18]利用三金属合金 (AgPdCu) 空心纳米球构建比色-光热双响应侧流免疫层析法检测阿苯达唑 (albendazole, ABZ)。该方法的比色检测限和光热检测限分别为 0.071、0.018 $\mu\text{g/L}$, 具有较高的灵敏度。也有研究^[19]通过合成 BZs 的广谱识别性分子印迹聚合物的技术, 以其为

识别元件建立化学发光检测法, 该方法可以同时检测 8 种 BZs, 检测限为 1.5~21 pg/mL 。另外, 表面增强拉曼光谱法、荧光光谱法和电化学分析法等也被报道^[20]。此外, 也有将智能手机应用于免疫分析的研究。Lai 等^[21]开发出与智能手机集成、以金纳米花 (AuNFs) 标记的横向流动测定方法, 可便携收集并区分测试线光信号细微变化, 实现瘦肉精高灵敏度便携式定量检测。Tian 等^[22]建立基于智能手机拍照和侧流免疫层析技术 (LFIA) 快速定性和半定量检测动物源性食品中恩诺沙星的方法。

为了克服了传统方法通常只能针对单一或少数几种目标物进行检测的局限性, 本研究通过系统优化探针制备、 K_2CO_3 的添加量、抗体偶联量、上样缓冲液等反应体系等关键条件, 构建性能稳定、兼具肉眼初筛与智能手机的 Color Picker 应用程序的准确定量功能的双检测平台, 以期实现 10 种 BZs 的广谱检测, 提高检测效率和覆盖范围, 为商业化大规模筛选提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

牛血清白蛋白 (BSA)、三水合四氯金酸 ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)、羊抗鼠二抗 (10 mg/mL), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 柠檬酸三钠 ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$)、碳酸钾 (K_2CO_3)、氯化钠 (NaCl)、甲醇 (色谱纯)、正己烷、乙酸、乙腈、碳酸钠 (Na_2CO_3)、二甲基亚砷 (DMSO)、焦亚硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)、乙酸乙酯, 国药集团化学试剂有限公司; ABZ 包被抗原 (5.06 mg/mL)、BZs 广谱性单克隆抗体 (BZs mAb), 由本课题组制备; 硝酸纤维素 (NC) 膜, 美国 Millipore 公司; 聚氯乙烯吸收垫、样品垫和结合垫, 上海金标生物科技有限公司; 食品样品为超市购买。

1.2 AuNPs 的制备

用移液枪吸取 100 μL 质量分数 10% 的 HAuCl_4 溶液, 用纯水稀释至 100 mL ; 加热至沸腾后迅速加入 4.5 mL 现配的 1% 柠檬酸三钠溶液, 保持沸腾状态直至溶液由淡黄色逐渐转变为酒红色; 颜色稳定后继续加热 5 min 后, 自然冷却。所得胶体金溶液用封口膜密封, 4 $^\circ\text{C}$ 避光保存。

1.3 信号探针 AuNPs@mAb 的制备

用 0.1 mol/L K_2CO_3 溶液将 1 mL AuNPs 溶液调至弱碱性, 将 4 μg 抗体添加到上述反应溶液, 4 $^\circ\text{C}$ 孵

育1 h后,依次加入10% NaCl溶液5 μ L和20% BSA溶液50 μ L,4 $^{\circ}$ C反应1 h,以封闭非特异性位点。反应液4 $^{\circ}$ C、9000 r/min离心50 min后,缓慢吸去上清液,将沉淀重新溶解于金标工作液中,4 $^{\circ}$ C避光保存。

1.4 免疫层析试纸条的组装

将预处理后的NC膜居中粘贴在聚氯乙烯(PVC)背板上,样品垫和吸收垫分别与NC膜重叠2 mm粘贴于两端。使用喷金仪将包被原和羊抗鼠二抗分别喷涂为T线和C线,干燥后将其切割成3.8 mm宽的试纸条,保存备用。

1.5 检测方法的工作条件优化

1.5.1 K_2CO_3 溶液添加量的优化

K_2CO_3 溶液作为pH调节剂,其添加量直接影响偶联反应体系的酸碱环境,进而影响抗体-探针偶联效率和检测灵敏度。考察0.1 mol/L K_2CO_3 溶液不同添加量(0~5 μ L)对偶联效果的影响。依据封闭结束金标抗体溶液颜色变化以及紫外吸收光谱图的最大吸收峰,选择用量最少且能维持金标探针稳定的用量,作为偶联探针的最佳 K_2CO_3 溶液添加量。

1.5.2 抗体偶联量的优化

在反应体系中分别添加2、4、6、8 μ g抗体制备AuNPs@mAb,通过层析试纸条的显色特征优化抗体偶联条件。首先筛选C线和T线显色清晰、条带均匀、无探针堆积的偶联条件;进而采用加标样本检测,以C线显色强度适中且T线完全消线为标准,确定最佳抗体添加量。采用智能手机三原色(RGB)提取软件,对试纸条比色图进行读数,以T线与C线的R值之比(R_T/R_C),表示T线显色强度相对于C线的比例。该比值反映在特定检测条件下,T线与C线对标记探针的相对捕获效率。当 $R_T/R_C=1$ 时,表明T线和C的显色强度完全相等,显色均一度最好;加标试纸条 R_T/R_C 与对照试纸条 R_T/R_C 的差值越大,则证明消线效果越好。

1.5.3 上样缓冲液的优化

反应体系的pH和离子强度是影响检测性能的关键参数。适宜的pH可为抗原-抗体结合提供最佳环境,而适度的离子强度(通过NaCl调节)能优化分子间相互作用。评估不同pH(5.7、7.4、8.5)的磷酸盐缓冲体系(PB和PBS)对检测性能的影响,确定显色效果最好的上样缓冲液。

1.5.4 NC膜的优化

NC膜的孔径和层析速度会影响免疫层析效果。用不同NC膜(95 s、140 s和180 s)组装试纸条,

添加样本检测,以层析速度适中为标准,确定NC膜。

1.5.5 探针上样量的优化

添加6、8、10、12、14 μ L探针进行上样检测,对照不同上样量试纸条的T线显色程度,选择C线和T线显色均一、层析效果最好、 R_T/R_C 越接近1的探针上样量进行后续实验。

1.5.6 羊抗鼠二抗(C线)、包被原(T线)稀释倍数的优化

采用棋盘法系统评估羊抗鼠二抗(C线)3倍(3.33 mg/mL)、5倍(2 mg/mL)、7倍(1.43 mg/mL)稀释梯度与包被原(T线)5倍(1.012 mg/mL)、10倍(0.506 mg/mL)、15倍(0.337 mg/mL)稀释梯度的9种组合,分别进行层析实验。使用智能手机RGB提取软件对试纸条比色图读数,根据 R_T/R_C ,对照试纸条 R_T/R_C ,选择试纸条的显色均一度最好、比值最接近于1的试纸条,即可得到最佳的二抗和包被原的稀释倍数组。

1.6 图像采集的标准化

为确保图像采集过程的一致性和可重复性,所有免疫层析试纸条的图像均在标准化条件下采集。光源由两部分组成:实验室固定位置的顶置LED灯光提供基础照明,同时开启智能手机内置闪光灯作为补充光源,以保证试纸条表面光照强度均匀且稳定。手机通过支架固定于试纸条正上方,镜头与试纸条检测区的垂直距离保持恒定(10 cm),拍摄时垂直于试纸条平面。背景采用统一的白色塑料板,置于试纸条下方。所有图像均使用同一智能手机拍摄及同一应用程序(Color Picker)处理。

1.7 检测原理和步骤

基于AuNPs的BZs双模式免疫层析检测方法的检测原理示意图如图1所示。通过柠檬酸三钠还原法合成AuNPs,利用AuNPs静电吸附直接偶联抗体,形成红色的信号探针(图1(a))。基于竞争免疫层析原理实现ABZ的检测。先将AuNPs@mAb信号探针分散于磷酸盐缓冲液,加入不同浓度的ABZ标准品或待测样品,充分混合孵育10 min,将孵育液滴加至试纸条样品垫,待溶液横向流动15 min完成显色后进行结果判读,其中视觉定性及半定量检测依赖试纸条T线(包被ABZ包被原)和C线(固定羊抗鼠二抗)的显色情况。当待测样品中不含目标物时,T线、C线均显明显红色条带(阴性结果);当样品中存在ABZ时,游离的ABZ会与T线包被原竞争结合信号探针上有限的抗体位点,随着ABZ浓

度的增加, T线颜色呈现浓度依赖性减弱, 直至完全消失(图 1(b)), 而 C线始终显色以作为试纸条有效性质控指标。据此可通过肉眼判读实现 ABZ 定性检测和半定量分析并确定视觉检测结果(图 1(c)), 同时通过智能手机 RGB 提取软件读取 T 线、C 线的 R 值, AuNPs 为酒红色, R 通道信号最强且信噪比高, 可提升定量可靠性。以 R_T/R_C 为纵坐标、ABZ 浓度的常用对数值为横坐标建立标准曲线, 按 3 倍信噪比 (3δ) 计算方法定量检测限。

选择与实际样品基质一致但不包含目标物的样

品为空白样品, 进行多次独立测量(超过 10 次), 记录信号值。多次测量结果的算术平均值即为背景值。背景信号标准偏差和检测限 (LOD) 按照式 (1) 和式 (2) 计算。通过 LOD 值代入标准曲线, 即可计算该方法的检测限。

$$\sigma_y = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_{\text{blank}})^2} \quad (1)$$

$$y_{\text{LOD}} = \bar{y}_{\text{blank}} + 3\sigma_y \quad (2)$$

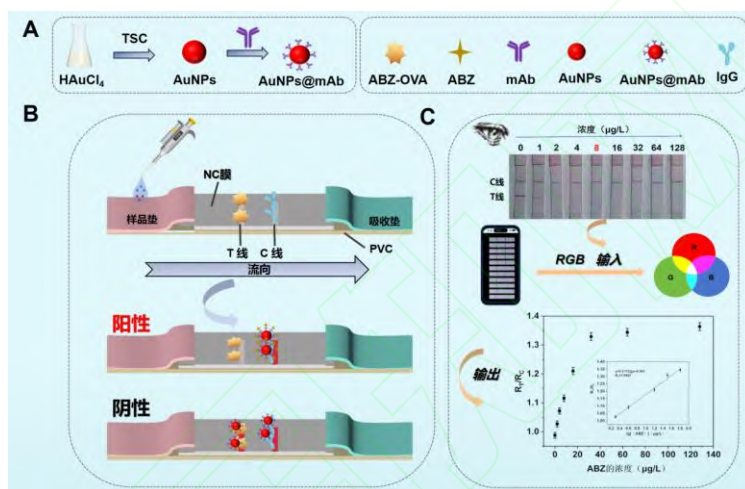


图 1 基于 AuNPs 的 BZs 双模式免疫层析检测方法的检测原理示意图

Fig. 1 Schematic diagram for AuNPs based dual-mode immunochromatographic assay for detection of BZs

1.8 检测方法的特异性评价

评估对甲苯咪唑 (MBZ)、氟苯咪唑 (FLU)、阿苯达唑亚砷 (ABZSO₂)、阿苯达唑砷 (ABZSO)、芬苯达唑 (FBZ)、奥芬达唑 (OFZ)、奥苯达唑 (OXI)、帕苯达唑 (PBZ)、芬苯达唑砷 (FBZSO₂) 这 9 种苯并咪唑类药物的检测性能。将各标准品用 PBS 缓冲液进行梯度稀释, 与 AuNPs 探针及工作液按优化比例混合形成检测体系, 建立常用对数浓度与 R_T/R_C 标准曲线。

1.9 食品样品处理

选取牛奶、猪肉、鸡肉、牛肉和羊肉样品进行加标回收实验。

1.9.1 免疫检测方法的样品处理方法

牛奶样品的处理方法: 取加标牛奶样品 10 mL 置于 50 mL 离心管中, 4 °C、4000 r/min 离心 15 min; 移除上层脂肪层后, 准确吸取中间乳浊层液体, 用 0.01 mol/L PBS 缓冲液 (pH 7.4) 稀释, 消除基质干扰, 随后进行检测。

猪肉、鸡肉、牛肉和羊肉样品的处理方法: 新鲜加标肉组织样品经匀浆后, 称取 (2.00 ± 0.02) g 置于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 甲醇-水 (体积比 7 : 3), 涡旋振荡 5 min, 4000 r/min 离心 10 min。将上清液转移至 50 mL 离心管中, 加入 1 mL 正己烷去脂 (涡旋 1 min, 静置 5 min), 弃去上层有机相; 下层水相经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后, 再用 PBS 稀释, 消除基质干扰, 随后进行检测。

1.9.2 HPLC 的样品前处理方法

牛奶样品的处理方法: 量取 5 mL 加标匀浆样品置于 50 mL 离心管中, 加入 25 mL 含 5% 乙酸的乙腈提取液, 涡旋 1 min, 5 °C、5000 r/min 离心 5 min。上清液过 C₁₈ 固相萃取柱净化, 收集滤液置于玻璃管中, 40 °C 水浴氮气吹至近干, 用 5 mL 0.3% 乙酸水溶液溶解, 过 0.22 μm 滤膜后作为检测溶液。

猪肉、鸡肉、牛肉和羊肉样品的处理方法: 新鲜加标肉组织样品经匀浆后, 称取 (5.00 ± 0.05) g 置于 50 mL 离心管中, 依次加入 1 mL 2% Na₂CO₃ 溶液、2

mL 二甲基亚砷 (DMSO)、1 mL $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (4 mg/mL) 溶液涡旋混合 1 min 后, 加入 8 mL 乙酸乙酯, 振荡提取 5 min。收集上清液置于离心管中, 氮气吹至近干, 用 2 mL 0.3% 乙酸水溶液复溶, 过 0.22 μm 滤膜后作为检测溶液。

1.9.3 HPLC 的检测条件

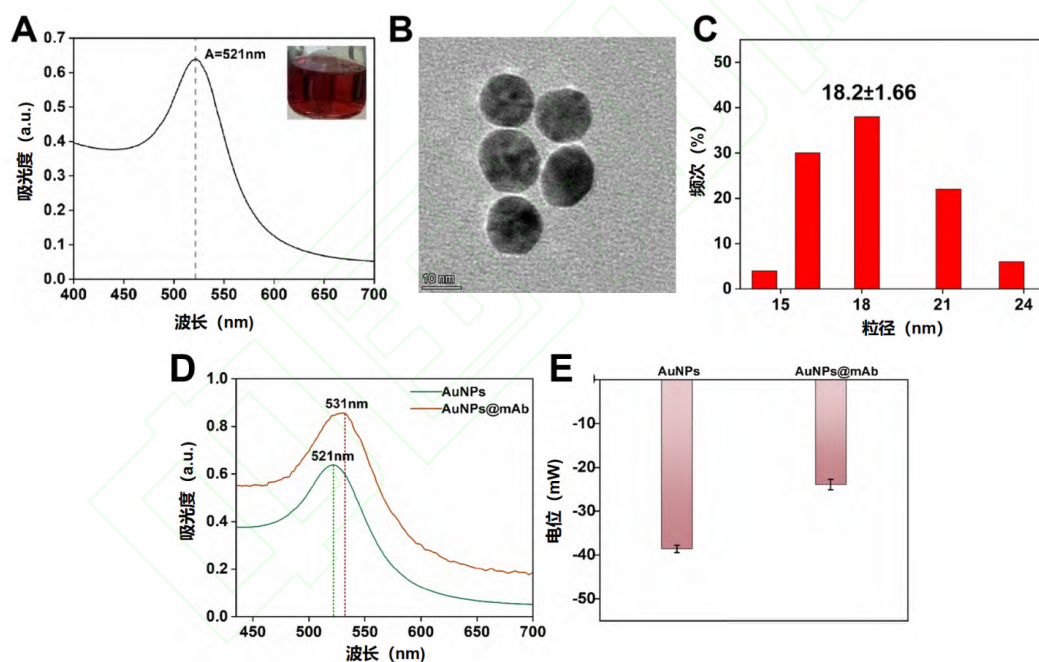
色谱柱为 Waters symmetry C_{18} 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm), 粒径 3.5 μm , 流动相 A 为 0.3% 乙酸水溶液, 流动相 B 为乙腈, 流量 0.3 mL/min, 进样量 20 μL , 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$, 激发波长 290 nm, 发射波长 450 nm。

2 结果与分析

2.1 AuNPs 与信号探针的表征

AuNPs 分散液呈现均一酒红色且光学透明, 初步表明纳米金颗粒已成功合成; 通过紫外可见分光

光度计测得紫外吸收光谱 (图 2 (A)), 胶体金溶液的最大紫外吸收峰为 521 nm, 峰型高又窄, 表明胶体金成功制备。用透射电镜进行观察制备的 AuNPs 粒子, 粒径约为 18.2 nm, 形状为均匀一致的圆形, 分散情况良好且没有明显聚集 (图 2 (B) 和图 2 (C))。通过紫外-可见光谱分析, AuNPs 的特征表面等离子体共振 (SPR) 吸收峰位于 521 nm (图 2 (D))。与 BZs mAb 偶联后, AuNPs@mAb 复合物的 SPR 峰发生 10 nm 红移 (531 nm), 证明抗体-AuNPs 的成功制备。AuNPs 本身是负电位的物质 (-38.61 mV), 通过静电吸附作用, mAb 表面带正点的区域直接中和了 AuNPs 表面大量强负电性的位点, 得到信号探针 AuNPs@mAb, Zeta 电位变为 -23.89 mV (图 2 (E))。根据电位变化, 进一步证明成功制备信号探针 AuNPs@mAb。



(A) AuNPs 的紫外/可见光谱 (B) AuNPs 的 TEM 图像 (C) AuNPs 的粒径分布 (D) AuNPs 和 AuNPs@mAb 的紫外/可见光谱图 (E) Zeta 电位图

图 2 AuNPs 与信号探针的表征

Fig. 2 Characterization of AuNPs and signal probes

2.2 检测方法的工作条件优化结果

检测方法的工作条件优化结果如图 3 所示。由图 3(A)可知: 当 K_2CO_3 溶液添加量为 0、1 μL 时, 测得 pH 在 6.0~7.0 之间, 信号探针出现部分聚沉; 当 K_2CO_3 溶液添加量为 4、5 μL 时, 测得 pH 在 8.0~9.0 之间, 信号探针出现明显聚沉; 当 K_2CO_3 溶液添加量为 2、3 μL 时, 测得 pH 在 7.0~8.0 之间, 溶液颜色呈酒红色且透明均一, 无聚沉现象, 表明此

时正处于抗体等电点附近, 两者可以稳定结合。根据紫外吸收光谱, 3 μL 组的吸光度峰值最高, 表明此时偶联效果最佳。因此, 确定 K_2CO_3 溶液的最佳添加量为 3 μL 。

由图 3 (B) 可知: 加入 2 μg 和 4 μg 抗体时, C 线、T 线显色信号太弱, 无法满足定量实验要求; 当添加 8 μg 抗体时, 对照组条带颜色过深, 影响方法的灵敏度; 当加入 6 μg 抗体时, 可以看到两条均匀

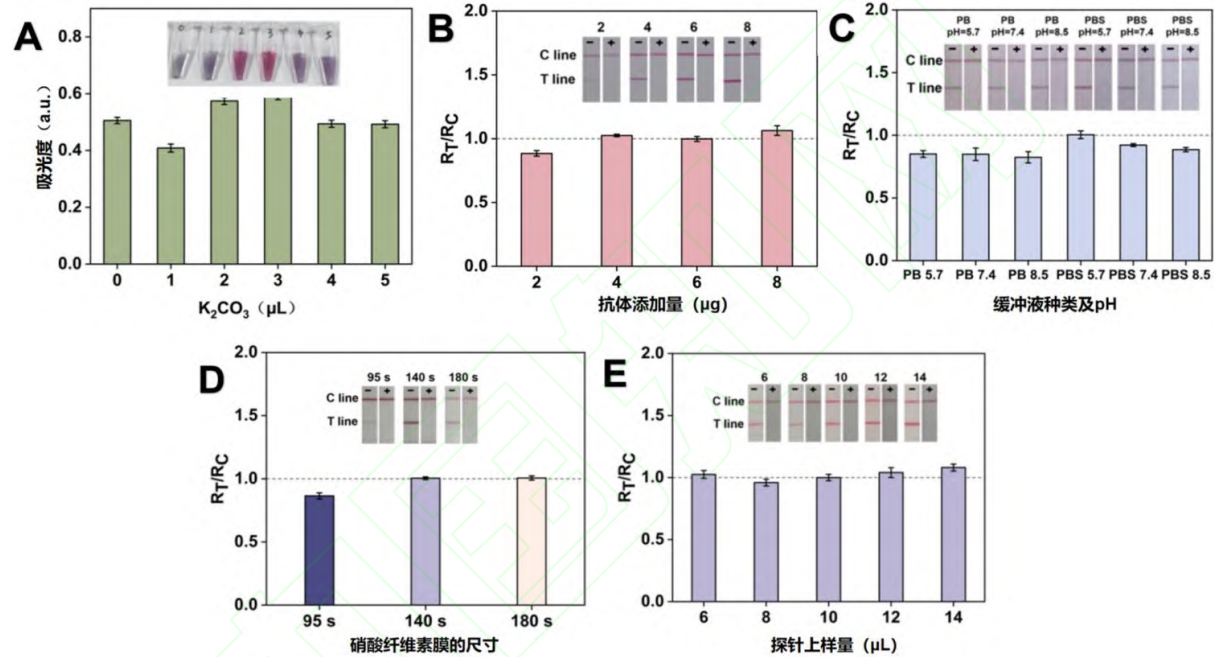
一致的线。当信号探针偶联抗体量为 6 μg 时, R_T/R_C 最接近 1, 因此确定抗体的最佳添加量为 6 μg 。

由图 3 (C) 可知: pH 5.7、7.4、8.5 的 PB 及 pH 8.5 的 PBS 的 T 线显色强度均低于 C 线, 存在显色不均现象; pH 7.4 的 PBS 组双线整体显色偏弱, 影响视觉判读; pH 5.7 的 PBS 组双线显色最佳, 且无探针聚集现象, 该组 R_T/R_C 最接近理论值 1, 表明其层析效果最佳, 故选定 pH 5.7 的 PBS 缓冲液为最优反应体系。

由图 3 (D) 可知, 3 种 NC 膜的层析性能存在显

著差异: NC-95 s 膜的层析速度过快, 导致探针-包被原结合时间不足; NC-180 s 膜层析过慢, 引起探针非特异性沉积; NC-140 s 膜层析速度适中, 能保证充分反应, R_T/R_C 最接近理论值 1, 故选定为最优载体。

由图 3 (E) 可知: 当上样量为 6、8 μL 时, 双线显色强度较浅; 当上样量为 12、14 μL 时, T 线显色过强, 影响检测灵敏度; 当上样量为 10 μL 时, 双线显色均一, 且无探针聚集现象, R_T/R_C 最接近 1, 因此选择 10 μL 探针为最优上样量。



(A) 不同 K_2CO_3 添加量的紫外-可见吸收光谱(插图为探针溶液的照片) (B) 不同抗体添加量下的 R_T/R_C (插图为条带颜色的照片) (C) 不同种类和 pH 的上样缓冲液下 R_T/R_C (插图为条带颜色的照片) (D) 不同硝酸纤维素膜的 R_T/R_C (插图为对应条带颜色的照片) (E) 不同探针上样量的 R_T/R_C (插图为条带颜色的照片)

图 3 检测方法的工作条件优化结果

Fig. 3 Optimization results of working conditions for detection methods

采用棋盘法系统评估不同稀释组合, C 线与 T 线稀释倍数的优化结果见表 1。当 C 线稀释 5 倍、T 线稀释 10 倍时, R_T/R_C 最接近理论值 1。

表 1 C 线与 T 线稀释倍数的优化 (n=3)

Tab. 1 Optimization of dilution factors for C and T lines

T 线-包被原 稀释比例	C 线-羊抗鼠二抗稀释比例		
	1 : 3	1 : 5	1 : 7
1 : 5	1.03±0.013	1.10±0.011	1.15±0.006
1 : 10	0.95±0.008	1.00±0.007	1.03±0.019
1 : 15	1.14±0.014	1.08±0.012	1.02±0.004

2.3 精密度与重现性

在最优实验条件下, 对所建方法的精密度和重现性进行评估。选取低 (2 $\mu\text{g/L}$)、中 (6 $\mu\text{g/L}$)、高 (12 $\mu\text{g/L}$) 3 个质量浓度的标准品, 由两位操作者分别使用两台不同型号智能手机 (手机 A 和手机 B) 进行测定, 计算 R_T/R_C 和 RSD, 结果见表 2。各条件下 RSD 在 0.98%~1.94% 之间, 各质量浓度汇总的 RSD 介于 2.27%~2.92% 之间, 均低于 3%, 表明该方法在不同的操作者和设备间具有良好的精密度和重现性。

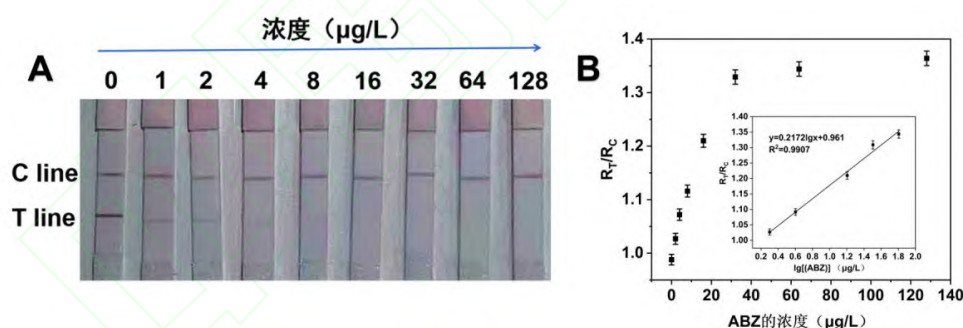
表 2 方法的精密度与重现性验证 (n=3)

Tab. 2 Precision and reproducibility of the proposed method ($n=3$)

标准品质量浓度/ ($\mu\text{g/L}$)	操作者	手机编号	R_T/R_C	RSD/%
2.0	操作者 1	手机 A	0.98 ± 0.011	1.12
2.0	操作者 1	手机 B	0.93 ± 0.018	1.94
2.0	操作者 2	手机 A	0.95 ± 0.013	1.37
2.0	操作者 2	手机 B	0.99 ± 0.018	1.82
2.0 汇总	—	—	0.96 ± 0.028	2.92
6.0	操作者 1	手机 A	1.12 ± 0.015	1.34
6.0	操作者 1	手机 B	1.19 ± 0.013	1.09
6.0	操作者 2	手机 A	1.18 ± 0.017	1.44
6.0	操作者 2	手机 B	1.14 ± 0.012	1.05
6.0 汇总	—	—	1.16 ± 0.031	2.67
12.0	操作者 1	手机 A	1.26 ± 0.019	1.51
12.0	操作者 1	手机 B	1.23 ± 0.012	0.98
12.0	操作者 2	手机 A	1.22 ± 0.015	1.23
12.0	操作者 2	手机 B	1.28 ± 0.017	1.33
12.0 汇总	—	—	1.25 ± 0.028	2.27

2.4 检测方法的建立

应用优化后的最佳条件, 将 ABZ 标准品梯度稀释, 建立基于 AuNPs 的 ABZ 视觉和智能手机 RGB

(A) 视觉检测结果 (B) 不同 ABZ 浓度与 R_T/R_C 的响应关系图 4 基于 AuNPs 的 ABZ 视觉和智能手机 RGB 读取 R_T/R_C 的双模式免疫层析检测方法结果**Fig. 4 Results of the dual-mode immunochromatographic assay based on AuNPs for ABZ visualization and smartphone RGB reading of R_T/R_C**

2.5 特异性评价

本研究利用本方法对除 ABZ 外的其它 BZs 进行特异性分析。如图 5 可知, 通过肉眼观察, MBZ、FLU、ABZSO₂、ABZSO、FBZ、OFZ、OXI、PBZ 和 FBZSO₂ 的 vLOD 分别为 0.4、2、8、8、14、14、

读取 R_T/R_C 的双模式免疫层析检测方法。1 mL 制备好的 AuNPs, 添加 3 μL K₂CO₃ 溶液和 6 μg 抗体的条件下制备信号探针, 使用 NC-140 s, T 线包被原稀释 10 倍、C 线羊抗鼠二抗稀释 5 倍, 以 10 μL 信号探针、pH 5.7 PBS 溶液作为缓冲液进行实验, 结果如图 9 所示。

由图 4 (A) 可知, 对于视觉定性检测模式, T 线的颜色信号与 ABZ 的浓度成反比, 即上样溶液中没有 ABZ 时, C、T 线颜色一致。随着加标溶液中 ABZ 浓度的增加, T 线颜色逐渐变浅。ABZ 浓度从左到右依次为: 0、1、2、4、8、16、32、64 和 128 $\mu\text{g/L}$ 。当 T 线 ABZ 标品浓度为 8 $\mu\text{g/L}$ 时条带完全消失, 定义为视觉检测结果 (vLOD)。因此视觉检测方法的 vLOD 为 8 $\mu\text{g/L}$ 。

将层析结束后的试纸条进行拍照并使用智能手机读取 C、T 线的 RGB 数值。以标准品浓度为横坐标, T、C 线 R 的比值为纵坐标, 建立免疫检测方法的标准曲线。以三倍信噪比 (3δ) 作为检测限, 实现定量检测。如图 4-B 所示, 在 RGB 模式中 ABZ 在 1.0~16.0 $\mu\text{g/L}$ 范围内呈良好的线性关系 ($R^2=0.9907$), 检测限是 0.88 $\mu\text{g/L}$ 。

18、25、40 $\mu\text{g/L}$; 使用智能手机读取 C、T 线 RGB 的数值绘制标曲进行定量检测, 得到的 LOD 分别为 0.06、0.7、2.7、2.4、4.6、4.9、6、8.3、13.4 $\mu\text{g/L}$, 表明该方法可以实现 10 种 BZs 总量的检测。

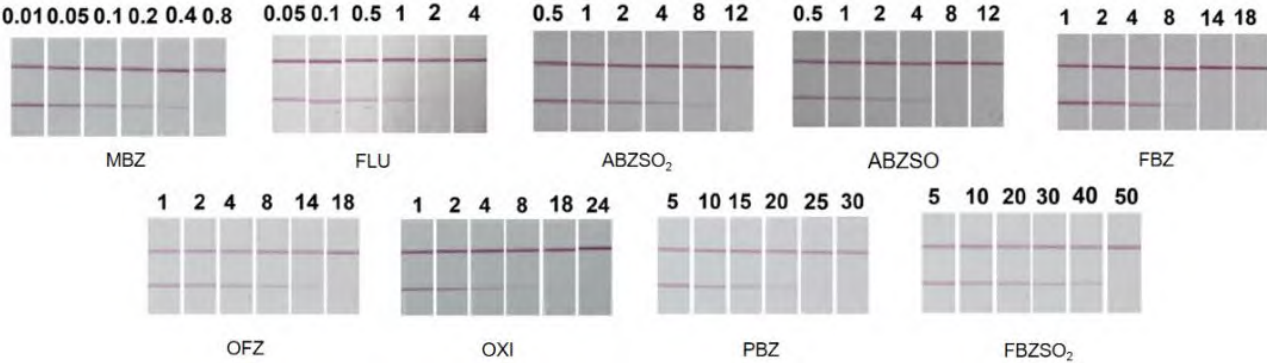


图 5 9 种 BZs 的视觉检测结果

Fig. 5 The vLOD determination for 9 kinds of BZs

表 3 9 种 BZs 的视觉检测结果和定量检测限

Tab. 3 The vLOD and LOD for 9 kinds of BZs

检测限	目标物								
	MBZ	FLU	ABZSO ₂	ABZSO	FBZ	OFZ	OXI	PBZ	FBZSO ₂
视觉检测结果 (μg/L)	0.4	2	8	8	14	14	18	25	40
定量检测限 (μg/L)	0.06	0.7	2.7	2.4	4.6	4.9	6	8.3	13.4

2.6 食品样品分析

为验证本文方法的可靠性,选取 5 种实际样品(牛奶、猪、鸡、牛、羊肉)进行加标回收实验(10、50、100 μg/kg)。牛奶中的蛋白质可能非特异性吸附信号探针,肉类经提取后的样品液仍可能含有脂溶性成分会产生干扰。为了避免样品基质的影响,对实际样品进行稀释,牛奶在稀释 10 倍时对 C 线、T 线的影

响可以消除。按照同样的方法对猪、鸡、牛、羊肉样品进行稀释,当稀释到 8 倍时效果最佳。经基质影响消除校准后(图 6 和表 4),本文方法的平均回收率为 87.19%~101.23%,RSD 为 2.02%~6.80%;HPLC 的平均回收率为 88.31%~104.77%,RSD 为 2.44%~6.88%。两种方法检测结果(图 7)无显著差异($R^2=0.9928$, $p>0.05$),说明本文方法具有良好的准确性,能够应用于实际样品的检测。

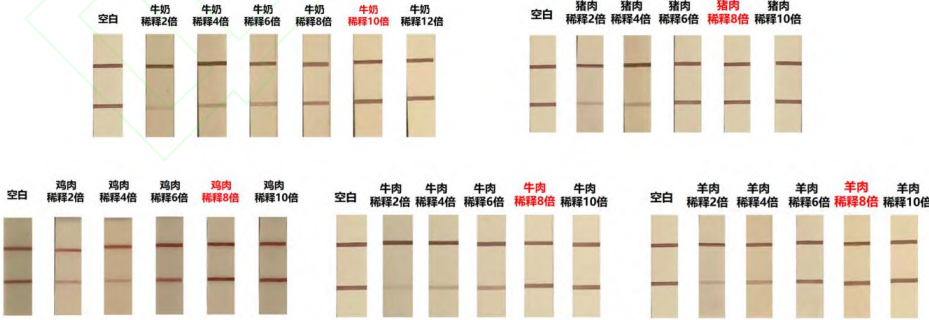


图 6 不同样品基质稀释倍数图

Fig. 6 Dilution ratios of different samples

表 4 加标样品的检测结果 (n=3)

Tab. 4 Detection result of spiked samples (n=3)

样品	质量浓度/ (μg/kg)	AuNPs 免疫层析方法		HPLC	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
牛奶	0	—	—	—	—
	10	88.95±2.14	2.41	98.23±4.14	4.21
	50	92.12±3.43	3.72	99.92±4.56	4.56
	100	99.14±2.93	2.96	101.33±2.35	6.88
猪肉	0	—	—	—	—
	10	87.19±2.63	3.02	102.23±5.34	5.22
	50	97.43±5.22	5.36	101.23±3.32	3.28
	100	101.23±3.44	3.40	91.24±4.90	5.37
鸡肉	0	—	—	—	—
	10	98.73±5.62	5.70	102.30±4.52	4.42
	50	100.47±2.75	2.74	99.53±6.22	6.25
	100	99.64±4.45	4.47	104.77±4.65	4.44
牛肉	0	—	—	—	—
	10	101.09±2.05	6.80	88.31±3.43	3.89
	50	97.43±4.13	2.02	103.43±4.59	4.44
	100	99.56±6.13	6.16	99.43±5.43	5.46
羊肉	0	—	—	—	—
	10	92.95±4.86	5.23	101.31±5.13	5.06
	50	100.01±3.45	3.45	97.82±2.39	2.44
	100	88.97±4.73	5.32	102.97±4.19	4.07

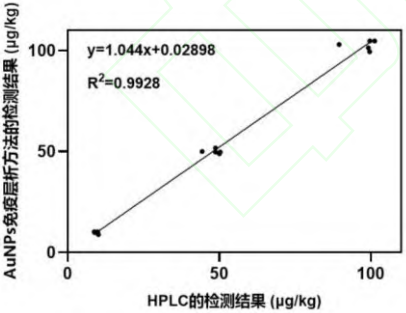


图 7 本文方法与 HPLC 方法的结果验证

Fig. 7 Validation results of this assay and HPLC

3 结 论

本研究聚焦于食品中 BZs 的高效检测需求, 成功构建了一种性能稳定、兼具裸眼初筛与智能手机准确定量功能的双检测平台, 并实现了对 10 种 BZs 的广谱检测。本研究开发双模式免疫层析检测方法

操作简便, 整个层析检测过程仅需 15 min, 大大缩短了检测时间, 能够满足现场快速筛查的需求。利用 10 种 BZs 的广谱性单克隆抗体作为检测识别元件, 能够同时检测食品中多种 BZs, 克服了传统方法通常只能针对单一或少数几种目标物进行检测的局限性, 大大提高了检测效率和覆盖范围, 为食品安全监管提供了更全面的技术手段。

本研究方法具有诸多优势, 但也存在一定的局限性。在定量分析方面, 虽然智能手机 RGB 模式能够提供一定的定量数据, 但与高精度的传统仪器分析方法相比, 其检测限和线性检测范围仍有待进一步提高。此外, 方法对检测环境条件(如温度、湿度等)较为敏感, 在实际应用中需要严格控制检测环境, 以确保检测结果的准确性和可靠性。

综上所述, 本研究方法在快速筛查、多目标物同步检测及现场适用性方面具有显著优势, 为食品中多兽药残留的现场监控提供了可靠的技术支持。

参考文献:

[1] Kim Y R, Park D, Sim J H, et al. National long-term monitoring and risk assessment of various veterinary drug residues in livestock products in the republic of Korea[J]. Food Control, 2025, 167: 110818.

[2] Pratiwi R, Ramadhanti S P, Amatulloh A, et al. Recent advances in the determination of veterinary drug residues in food [J]. Foods, 2023, 12(18): 3422.

[3] Pedersen M, Hakme E, Ninga E, et al. Analysis of veterinary drug- and pesticide residues in pig muscle by LC-QTOF-MS [J]. Food Control, 2023, 148: 109656.

[4] Park H, Choi S Y, Kang H S, et al. Multi residue determination of 96 veterinary drug residues in domestic livestock and fishery products in Korea[J]. Aquaculture, 2022, 553: 738064.

[5] Wu Haoting, Zhao Junfang, Wan Jianqing. A review of veterinary drug residue detection: recent advancements, challenges, and future directions [J]. Sustainability, 2023, 15(13): 10413

[6] Dong Fujia, Ma Zhaoyang, Xu Ying, et al. Monitoring of veterinary drug residues in mutton based on hyperspectral combined with explainable AI: A case study of OFX[J]. Food Chemistry, 2025, 474: 143087.

[7] Tahlan S, Singh S, Kaira M, et al. Benzimidazole-based

- anthelmintic drugs: synthetic strategy, pharmacological insights, and SAR analysis[J]. *Chemistry Select*, 2025, 10(10): e202405873.
- [8] Song B, Park E Y, Kim K J, et al. Repurposing of benzimidazole anthelmintic drugs as cancer therapeutics[J]. *Cancers*, 2022, 14(19): 4601.
- [9] Yuan Houqun, Xia Yifan, Zhong Yufei, et al. Dual-emissive Eu(III)-functionalized metal-organic frameworks for visual, rapid, and intelligent sensing of albendazole and albendazole sulfoxide in animal-origin food[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2024, 1288: 342196.
- [10] Hassan M M, Xu Y, Zareef M, et al. Recent advances of nanomaterial-based optical sensor for the detection of benzimidazole fungicides in food: a review[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(16): 2851–2872.
- [11] Oliveira H C, Rodrigues M L. Repurposing benzimidazoles to fight cryptococcus [J]. *Fungal Biology Reviews*, 2021, 37: 27–40.
- [12] Bai Song, Zhang Miaohe, Tang Shouying, et al. Research progress on benzimidazole fungicides: a review[J]. *Molecules*, 2024, 29(6): 11218.
- [13] Kim G, Son D, Choi S, et al. Monitoring of benzimidazole resistance in botrytis cinerea isolates from strawberry in Korea and development of detection method for benzimidazole resistance[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2023, 39(6): 614–624.
- [14] Guo Lingling, Wu Xiaoling, Liu Liqiang, et al. Gold nanoparticle-based paper sensor for simultaneous detection of 11 benzimidazoles by one monoclonal antibody[J]. *Small*, 2018, 14(6): 170-178.
- [15] 李子哲. 苯并咪唑广谱性及多菌灵高灵敏性单克隆抗体的制备及侧流层析免疫分析方法的建立[D]. 郑州: 河南农业大学, 2024: 53-56.
- [16] Lu Qianqian, Xu Xinxin, Qu Aihua, et al. A multi-colloidal gold immunochromatography assay for rapid and simultaneous detection of 13 herbicides [J]. *Nano Research*, 2024, 17(9): 8368–8376.
- [17] 张彩芹, 张勋, 李洁, 等. 胶体金试纸条同时检测鲤鱼中 7 种苯并咪唑类药物的残留[J]. *现代食品科技*, 2020, 36(6): 291–296.
- [18] Yin Jiaqi, Yu Sha, Mei Xi, et al. Broad-spectrum detection of benzimidazoles with lateral flow immunoassay: a computational chemistry-assisted hapten design strategy and explore of molecular recognition mechanism[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 480: 135986.
- [19] 才艺. 苯并咪唑类药物和菊酯类药物残留检测方法的建立[D]. 保定: 河北农业大学, 2021: 8-14.
- [20] Hajikhani M, Koushen S, Zhang Yi, et al. Design of a novel SERS substrate by electrospinning for the detection of thiabendazole in soy-based foods [J]. *Food Chemistry*, 2024, 436: 137703.
- [21] Lai Weihua, Xiong Zhijuan, Huang Youju, et al. Gold nanoflowers labelled lateral flow assay integrated with smartphone for highly sensitive detection of clenbuterol in swine urine [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2019, 30(1): 1225–1238.
- [22] Tian Run, Ji Jinyu, Zhou Yangyang, et al. Terminal-conjugated non-aggregated constraints of gold nanoparticles on lateral flow strips for mobile phone readouts of enrofloxacin [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2020, 160: 112218.