

呋喃西林代谢物酶联免疫检测方法的建立

吴鹏¹, 万宇平¹, 陶光灿¹, 冯才茂¹, 赵正苗¹, 刘琳¹, 励建荣²

(1. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206; 2. 浙江工商大学食品与生物工程学院, 浙江省食品安全重点实验室, 浙江杭州 310035)

摘要 [目的] 建立动物性食品中呋喃西林代谢物 ELISA 检测方法。[方法] 通过制备特异性强的单克隆抗体, 采用间接竞争 ELISA 法建立动物性食品中呋喃西林代谢物 ELISA 检测方法, 并研制出对动物性食品中呋喃西林代谢物残留检测的试剂盒。[结果] 该试剂盒标准曲线的 IC_{50} 值为 $0.2677 \mu\text{g/L}$, 最低检测限为 $0.1 \mu\text{g/kg}$, 样本加标回收率范围为 79.5% ~ 95.6%, 变异系数为 7.6% ~ 9.7%。在交叉反应试验中, 对呋喃西林的交叉反应率为 25%, 与其他药物的交叉反应率均小于 1%, 表明该方法具有很强的特异性。[结论] 该方法灵敏度、准确度、精密度均较高, 能满足兽药残留的检测要求, 且检测时间短(45 min), 样本前处理简单、检测成本低, 适合于大量样本中呋喃西林代谢物残留检测的快速筛选。

关键词 动物性食品; 呋喃西林代谢物; 酶联免疫试剂盒

中图分类号 S879 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)05-01969-03

Establishment of Detection Method for the Residues of Nitrofurazone Metabolite by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

WU Peng et al (Beijing Kwinbon Biotechnology Co. Ltd., Beijing 102206)

Abstract [Objective] The research aimed to establish an ELISA method for detecting nitrofurazone metabolites in animal food. [Method] Monoclonal antibodies with high specificity were prepared. And an ELISA method for detecting nitrofurazone metabolites in animal food was established by indirect competitive ELISA. The kit for detecting the residues of nitrofurazone metabolites in animal food was developed. [Result] IC_{50} of the standard curve for the kit was $0.2677 \mu\text{g/L}$, the lowest detection limit was $0.1 \mu\text{g/kg}$, the addition recovery was 79.5% - 95.6% and the coefficients of variation ranged from 7.6% to 9.7%. In the cross reactivity test, the cross reactivity rate of nitrofurazone was 25% and its cross reactivity rate with other drugs was less than 1%, which indicated that this method had higher specificity. [Conclusion] This method had higher sensitivity, accuracy and precision and could meet the detection demands of residues in veterinary medicine. This method had the characteristics of short detection time(45 min), simple pre-treatment, low cost and it was suitable for rapid screening for detecting the residues of nitrofurazone metabolites in a large amount of samples.

Key words Animal food; Nitrofurazone metabolite; Enzyme-linked immunosorbent kit

硝基呋喃类抗生素主要包括呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃它酮, 为一类广谱抗生素, 具有非常好的抗菌作用和药动力学特性, 曾被广泛应用于畜牧和水产养殖中。然而, 硝基呋喃类药物及其代谢物具有相当大的毒性和副作用, 因此引起了人们的高度重视。欧盟在 1995 年禁止使用呋喃西林^[1]。欧盟(EU)从 1997 年开始将所有的硝基呋喃类抗生素全部列为违禁药物。1990 年 7 月欧盟颁布 2377/90/EEC 条例, 将硝基呋喃类药物及其代谢产物列为 A 类禁用药物, 规定其在动物源性食品中的残留检测限为 $1.0 \mu\text{g/kg}$ 。自 1995 年起欧盟全面规定禁止使用呋喃类抗菌物质, 在动物源性食品中呋喃类药物不得检出。美国 FDA 公布的禁止在进口动物源性食品中使用的药物名单中包括呋喃西林和呋喃唑酮。

由于硝基呋喃类药物在生物体内代谢迅速, 对原药检测的难度很大, 而其代谢物可以蛋白结合物的形式长期、稳定存在于组织内, 因此可以通过检测代谢产物的手段来检测硝基呋喃类残留, 欧盟对硝基呋喃类代谢物的检测方法灵敏度规定为 $1 \mu\text{g/kg}$ ^[2]。目前, 国内外报道检测硝基呋喃类代谢物残留的方法主要有液相色谱、液相色谱-串联质谱法、酶联免疫法^[3-13]等。仪器方法前处理复杂、繁琐、成本高、操作技术要求高。ELISA 具有灵敏度高、特异性强、操作简便、检测时间短、适合大规模现场检测等特点, 已经广泛应用于农

兽药残留检测中^[14]。笔者从建立酶联免疫检测方法等基础入手, 研制出了检测动物性食品中呋喃西林代谢物的酶联免疫试剂盒。该试剂盒灵敏度、准确性、精密度能够满足呋喃西林代谢物残留检测的要求^[15], 作为 1 种快速检测方法适合于大量样本中呋喃西林代谢物残留检测的快速筛选。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器。8010S 匀浆机, 购自上海斯伯明仪器设备有限公司; KS-II 振荡器, 购自上海跃进医疗器械厂; 90-2 磁力搅拌器, 购自上海振荣科学仪器有限公司; QL-901 漩涡混合器, 购自海门市其林贝尔仪器制造有限公司; Anke TDL-40B 低速离心机, 购自上海安亭科学仪器有限公司; 2000SBL 电子天平, 购自美国 Setra 公司; MK3 酶标仪, 购自美国 Thermo 公司; DSY-III 氨吹仪, 购自北京金科精华苑科技有限公司; 微量移液器(单道 20 ~ 200 μl 、100 ~ 1 000 μl , 多道 50 ~ 300 μl), 购自美国 Thermo 公司。

1.1.2 试剂。呋喃西林代谢物单克隆抗体, 自制; 呋喃西林代谢物标准品, 购自 Sigma 公司; 乙酸乙酯、正己烷、甲醇、三水合磷酸氢二钾、浓盐酸、氢氧化钠、2-硝基苯甲醛, 购自国药集团化学试剂有限公司, 均为分析纯。

包被缓冲液为 pH 9.5 的 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液; 封闭液为 pH 7.4 的 0.05% ~ 0.5% 的牛血清白蛋白(BSA)的磷酸盐缓冲液; 洗涤液为含 0.05% 吐温-20、0.005% 叠氮化钠防腐剂的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液; 复溶工作液 pH 为 7.6, 含有 9% 卵清白蛋白的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液; 衍生化

基金项目 “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD29B06)。

作者简介 吴鹏(1978-), 男, 辽宁沈阳人, 博士, 从事食品安全快速检测技术研究。

收稿日期 2012-12-28

试剂为 15.1 mg 2-硝基苯甲醛溶解于 10 ml 甲醇中;标准品溶液浓度分别为 0、0.05、0.15、0.45、1.35 和 4.05 $\mu\text{g/L}$ 。

1.2 方法

1.2.1 包被抗原和抗体工作浓度的确定。采用方法法进行包被抗原和抗体工作浓度的测定,选择零标准品 $OD_{450\text{nm}}$ 值为 1.5~2.0,以 0.05 $\mu\text{g/L}$ 标准品抑制率为 70%~80% 作为评定标准,选择较好的抗原抗体工作浓度作为 ELISA 反应的理想工作浓度。

1.2.2 抗原最佳包被时间的选择。以筛选的包被抗原最佳工作浓度包被,分别按 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜、37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 1、2、3 和 4 h,以最佳抗体工作浓度进行 ELISA 测定,整板测定零标准品 OD 值,以零标准 OD 值为 1.5~2.0、变异相对较小且节省时间为判定标准,选择最佳包被时间。

1.2.3 封闭时间的选择。用封闭液进行封闭,分别在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温避光反应 2 h 和 4 $^{\circ}\text{C}$ 恒温避光反应 16 h,测定其 OD 值,选择最佳封闭时间。

1.2.4 酶标二抗稀释度和作用时间的选择。选择抗体工作液以 5:1、10:1、20:1 稀释酶标二抗浓缩液,4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下分别作用 5、30、60 min,测定其 OD 值。以零标准品 OD 值均为 1.5~2.0,板内变异系数和板间变异系数相差较小,选择酶标二抗最适稀释度和作用时间。

1.2.5 底物显色时间的选择。加底物显色液后分别在 4 和 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5、15 和 25 min,分别用 2 mol/L 硫酸溶液终止反应,测定其 OD 值,选择最适底物显色时间。

1.2.6 ELISA 标准曲线的制作。按照上述筛选条件制作 ELISA 标准曲线。将包被有偶联抗原的酶标板微孔中分别加入浓度为 0、0.05、0.15、0.45、1.35、4.05 $\mu\text{g/L}$ 的呋喃西林代谢物标准品溶液 50 μl ,然后加入抗体工作液与酶标二抗浓缩液的混合液 50 μl /孔(抗体工作液以 10:1 稀释酶标二抗浓缩液),轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光环境中反应 30 min。将孔内液体甩干,用洗涤液 250 μl /孔,充分洗涤 4~5 次,每次间隔 10 s,用吸水纸拍干。加入底物显色液 100 μl ,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应 15 min。加入 2 mol/L 硫酸溶液 50 μl ,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于波长 450 nm 处,测定每孔 OD 值。

标准品或样品的百分吸光率等于标准品或样品的吸光度值的平均值(双孔)除以第 1 个标准(0 标准)的吸光度值,再乘以 100%,即百分吸光率(%) = $A/A_0 \times 100\%$ 。以标准品百分吸光率为纵坐标(y 轴),以呋喃西林代谢物标准品浓度的对数为横坐标(x 轴),绘制标准曲线。将样品的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样品中呋喃西林代谢物的实际浓度。

1.2.7 交叉反应率的测定。选择与呋喃西林代谢物结构和功能相近的呋喃西林、呋喃它酮、呋喃唑酮、呋喃妥因、呋喃它酮代谢物、呋喃唑酮代谢物、呋喃妥因代谢物,测定各药物的 IC_{50} 值,按照以下公式计算交叉反应率:

$$\text{交叉反应率}(\%) =$$

$$\frac{\text{引起 50\% 抑制的呋喃西林代谢物浓度}}{\text{引起 50\% 抑制的其他类似物浓度}} \times 100\%。$$

1.2.8 样本前处理方法的建立。用均质器均质样本(组织、水产),称取 1.0 g 均质后的样本加入 4 ml 去离子水、0.5 ml 1 mol/L 盐酸溶液和 100 μl 衍生化试剂,振荡器充分振荡 2 min;在 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育(大约 16 h);分别加入 5 ml 0.1 mol/L 磷酸氢二钾溶液、0.4 ml 1 mol/L 氢氧化钠溶液和 5 ml 乙酸乙酯,振荡器剧烈振荡 30 s;4 000 r/min 室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$ /68~77 $^{\circ}\text{F}$)离心 10 min;取 2.5 ml 乙酸乙酯相至 10 ml 干燥玻璃试管中,于 50~60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴氮气流下吹干;加入 1 ml 正己烷涡动 30 s,再加入 1 ml 复溶工作液,用涡旋仪涡动 1 min 充分混匀;4 000 r/min 室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$ /68~77 $^{\circ}\text{F}$)离心 10 min;除去上层有机相,取下层水相 50 μl 用于分析。

1.2.9 检测限的测定。测定 20 份空白鸡肉、猪肉、鱼肉和虾样品,以测定 20 份样品的浓度平均值(\bar{X})加 3 倍标准差(S)作为呋喃西林代谢物药物在该样品中的检测限(MDL),即 $MDL = \bar{X} + 3S$ 。

1.2.10 精密度和准确度的测定。取空白鸡肉、猪肉、鱼肉、虾均质物,分别添加呋喃西林代谢物至终浓度为 0.2、0.4、0.8 $\mu\text{g/kg}$ 。每个浓度重复 5 次,每个样品 2 个平行,测定呋喃西林代谢物的残留量。最后,计算添加回收率和变异系数。

2 结果与分析

2.1 检测方法的确定 当包被抗原 1:3 000 稀释、抗体 1:30 000 稀释时,零标准品 OD 值为 1.5~2.0,0.05 $\mu\text{g/L}$ 标准品抑制率为 70%~80%。37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h 后,洗涤液洗涤 2 次后,用封闭液封闭,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h 后,测得 $OD_{450\text{nm}}$ 均为 1.5~2.0,变异较小,故选择 37 $^{\circ}\text{C}$ 包被 2 h 作为抗原最佳包被时间,37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 2 h 作为最佳封闭时间。选择抗体工作液以 10:1 稀释酶标二抗浓缩液,4 $^{\circ}\text{C}$ 作用 30 min。25 $^{\circ}\text{C}$ 底物显色时间 15 min,加入终止液 2 mol/L H_2SO_4 ,最大吸光度值为 1.5~2.0,0.05 $\mu\text{g/L}$ 标准品抑制率为 70%~80%,板内变异系数和板间变异系数均较小,因此选择以上参数作为试剂盒的检测条件。

2.2 标准曲线的建立 分别测定浓度为 0、50、150、450、1 350、4 050 ng/L 呋喃西林代谢物标准品的吸光度,并采用 RIDASOFT WIN 数据分析软件建立标准曲线。从图 1 可以看出, IC_{50} 值为 267.7 ng/L。

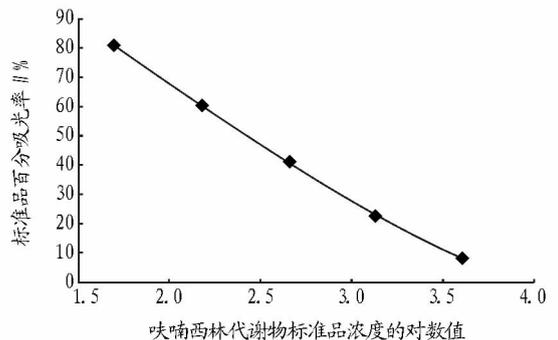


图 1 呋喃西林代谢物的标准曲线

2.3 特异性 交叉反应试验表明,该试剂盒与呋喃西林有一定的交叉反应为 25%。这可能是因为呋喃西林代谢物与其原药有类似的结构,而对其他呋喃类药物及代谢物的交叉反应率均较低,表明该试剂盒具有良好的特异性。

2.4 试剂盒的检测限 同时测定 20 份空白鸡肉、猪肉、鱼肉和虾样品的吸光度值,从标准曲线上查出对应于吸光度的各浓度。计算试剂盒的检测限,在动物组织中呋喃西林代谢物检测限可达到 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.5 精密度和准确度 ELISA 测定的精密度以变异系数表示,准确度以回收率表示。取空白鸡肉、猪肉、鱼肉、虾均质物,分别添加呋喃西林代谢物至终浓度为 0.2、0.4、0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。计算平均回收率和变异系数。由表 1 可知,以 0.2、0.4、0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的呋喃西林代谢物对空白鸡肉、猪肉、鱼肉、虾进行添加,其加标平均回收率范围为 79.5%~95.6%,变异系数为 7.6%~9.7%,说明该试剂盒重复性较好。

表 1 ELISA 测定试剂盒的精密度和准确度

样品	添加浓度	平均回	变异系
	$\mu\text{g}/\text{kg}$	收率//%	数 CV//%
鸡肉	0.2	91.5	9.7
	0.4	93.5	8.9
	0.8	95.6	8.3
鱼肉	0.2	86.1	9.1
	0.4	93.0	9.5
	0.8	94.0	9.2
猪肉	0.2	86.9	9.6
	0.4	88.6	7.6
	0.8	85.6	8.7
虾	0.2	79.5	9.6
	0.4	88.8	8.2
	0.8	90.2	9.7

2.6 试剂盒的稳定性 考虑在运输和使用过程中会有非正常保存条件出现,将试剂盒在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置 15 d;考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻 15 d,进行加速老化试验,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50% 抑制浓度、呋喃西林代谢物添加实际测定值均在正常范围之内。结果表明,该试剂盒各项指标完全符合要求。在实际应用中,试剂盒一般存放在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。因此,对整体试剂盒的稳定性评判,还需要进行 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 放置保存试验,从而

进一步验证试剂盒的稳定性。

3 小结

采用间接竞争 ELISA 法建立了呋喃西林代谢物酶联免疫试剂盒的检测方法。该方法最低检测限为 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$,低于目前常规方法的检测限,样本加标回收率范围为 79.5%~95.6%,变异系数为 7.6%~9.7%。这表明该试验建立的呋喃西林代谢物残留检测酶联免疫方法的灵敏度、准确度、精密度均较高,能够满足兽药残留检测要求,并且检测时间短(45 min),样本前处理简单、仪器设备投资少、检测成本低,适合于大量样本中呋喃西林代谢物残留检测的快速筛选。

参考文献

- [1] 郭植,连瑾,吴淑君. 动物源性食品中呋喃唑酮及其代谢物的检测[J]. 广东农业科学,2005(5):57-59.
- [2] Amending decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin[S]. Official Journal of the European Union Commission,2003:17-18.
- [3] ALEXANDER L,PETER Z,WOLFGANG L. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A,2001,939:49-58.
- [4] 祝伟霞,刘亚风,梁炜. 动物性食品中硝基呋喃类药物残留检测研究进展[J]. 动物医学进展,2010,31(2):99-102.
- [5] 王媛,蔡友琼,贾东芬. 高效液相色谱法检测水产品中硝基呋喃类代谢物残留量[J]. 分析试验室,2009,28(12):86-90.
- [6] 徐一平,胥传来. 动物源食品中硝基呋喃类物质及其代谢物残留的检测技术研究[J]. 食品科学,2007,28(10):590-593.
- [7] 林黎明,林回春,高彦惠,等. 液相色谱/串联质谱线性组合法测定动物组织中硝基呋喃代谢产物[J]. 分析化学,2005,33(8):1081-1086.
- [8] 陈威风,陈敬鑫. 肉制品中硝基呋喃类药物残留的研究进展[J]. 肉类研究,2011,25(12):53-57.
- [9] 彭涛,储晓刚,杨强,等. 高效液相色谱/串联质谱法测定奶粉中的硝基呋喃代谢物[J]. 分析化学,2005,33(8):1073-1076.
- [10] 贾涛. 高效液相色谱法检测饲料中的硝基呋喃类药物[J]. 饲料广角,2011(16):33-37.
- [11] 张平安,张建成,乔明武,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中硝基呋喃代谢物的研究[J]. 浙江农业科学,2010(3):611-614.
- [12] 曹鹏,耿金培,尹大路,等. 高效液相色谱法同时测定饲料中的呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃酮类药物残留量[J]. 山东农业大学学报:自然科学版,2010,41(3):424-427.
- [13] 梁剑,朱品玲,钟茂生. 一种改进的水产品中硝基呋喃代谢物测定方法研究[J]. 安徽农业科学,2009,37(33):16198-16199,16212.
- [14] 宋琍琍,张晓辉,张海琪,等. 酶联免疫法快速测定水产品中呋喃唑酮、呋喃酮代谢物[J]. 浙江农业学报,2008,20(4):296-299.
- [15] 农医发[2005]17号农业部文件. 关于发布“兽药残留酶联免疫试剂(盒)备案审查技术资料要求”和“兽药残留酶联免疫试剂(盒)备案参考评判标准”的通知[Z]. 2005.
- [20] 李广庆,马国辉. 固相萃取技术在食品痕量残留和污染分析中的应用[J]. 色谱,2011,29(7):606-612.
- [21] 周昱,徐敦明,陈达捷,等. 固相微萃取-气相色谱法和气相色谱-质谱法测定茶叶中氟虫腈及其代谢物残留[J]. 色谱,2011,29(7):656-661.
- [22] 袁宁,余彬彬,张茂升,等. 微波辅助萃取-固相微萃取-气相色谱法同时测定茶叶中的有机氯和拟除虫菊酯农药残留[J]. 色谱,2006,24(6):636-640.
- [23] 王耀,刘少彬,谢翠美,等. 加速溶剂萃取凝胶渗透色谱/固相萃取净化气相色谱质谱法测定咸鱼中有机磷农药残留[J]. 分析化学,2011,39(1):67-71.
- [24] 徐敦明,陈安良,余向阳,等. 超临界流体萃取气相色谱法测定鱼肉中的毒死蜱残留[J]. 分析化学,2005,33(4):451-454.
- [25] 彭金云,韦良兴,农克良,等. 基质固相分散-高效液相色谱法测定甘蔗中痕量甲拌磷和特丁硫磷[J]. 广东农业科学,2009(11):169-171.
- [26] 彭金云,韦良兴,农克良,等. 基质固相分散气相色谱法测定甘蔗中三嗪类除草剂[J]. 分析试验室,2010,29(6):49-51.
- [27] 彭金云,赵汉民,韦良兴,等. 超声波萃取-气相色谱法对甘蔗中有机磷残留量的测定[J]. 安徽农业科学,2010,38(3):1129-1130.
- [28] 王天顺,范业赓,杨玉霞,等. 气相色谱-质谱法同时测定蔗汁中的莠去津与莠灭净残留量[J]. 分析测试学报,2011,30(10):1153-1156.
- [29] 杨玉霞,莫仁甫,王天顺,等. 毛细管气相色谱法测定唑草酮在甘蔗及其土壤中的残留量[J]. 西南农业学报,2011,24(6):2230-2233.

(上接第 1936 页)