

磺胺喹噁啉酶联免疫分析方法的建立

刘超, 刘一兵, 韩世泉, 许文革, 张莉玲

(中国原子能科学研究院 同位素研究所, 北京 102413)

摘要: 利用抗磺胺喹噁啉(SQ)多抗建立酶联免疫分析方法, 以测定 SQ 在动物源食品中的残留。方法学鉴定结果表明: 灵敏度为 0.2 ng/mL, 批内、批间变异分别为 7.8%~10.0%、10.5%~12.0%; 牛奶、蜂蜜、鸡肉、鸡蛋样品的添加回收率分别在 93.1%~107.0%、69.0%~104.0%、40.0%~73.6%、50.0%~84.0%之间。牛奶稀释实验表明, 测定值与稀释度呈线性相关, 相关系数 $R=0.997$ 。

关键词: 磺胺喹噁啉; 酶联免疫分析; 兽药残留

中图分类号: S859.7; S852.43

文献标识码: A

文章编号: 1000-6931(2007)02-0142-06

Establishment of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Sulfaquinoxaline

LIU Chao, LIU Yi-bing, HAN Shi-quan, XU Wen-ge, ZHANG Li-ling

(*Department of Isotope, China Institute of Atomic Energy, Beijing 102413, China*)

Abstract: An indirect competitive enzyme-linked immunoassay (ELISA) was developed using polyclonal antibody to measure the residues of sulfaquinoxaline (SQ) in food. The range of standard curve is 0.3-100 ng/mL. The sensitivity of the assay is 0.2 ng/mL. The intra-assay and inter-assay CVs are 7.8%-10.0%, 10.5%-12.0%, respectively. The recovery of SQ in milk, honey, chicken and eggs is 93.1%-107.0%, 69.0%-104.0%, 40.0%-73.6%, 50.0%-84.0%, respectively. The correlation coefficient between measured and expected value is 0.997 after serial dilutions of the samples with high concentration of SQ.

Key words: sulfaquinoxaline; enzyme-linked immunoassay; drug residues

磺胺喹噁啉(sulfaquinoxaline, 简称 SQ, 相对分子质量为 300.4)是一种在国内需求量极大的磺胺类高效抗球虫和抗菌药。由于养殖场在饲养动物过程中向饲料或动物饮用水中添加 SQ, 导致 SQ 在动物源食品中大量残留。人食用这些动物源食品后, 可能造成 SQ 在人体内

富集, 从而使人发生变态、过敏等反应, 严重的还会产生致畸、致癌作用^[1]。为此, 世界各国均制定了相对严格的兽药残留标准。目前, 中国磺胺类药物在动物源性食品中的残留标准是 300 ng/g, 欧盟、日本、美国等西方发达国家制定的残留标准是 100 ng/g^[2]。常规的检测方

法,如微生物法、吸收分光光度法、荧光分光光度法、气相色谱法等已无法满足检测需要。目前,各国法定的检测标准方法是 HPLC(高压液相色谱),其灵敏度高,但预处理过程复杂,仪器设备要求高,不便于养殖场用于大规模筛查自检。酶联免疫分析方法具有样品预处理简单、灵敏度高、特异性好等特点,适用于养殖场的大规模筛查自检,具有广阔的市场应用前景。

1 实验材料与方法

1.1 实验仪器

酶联免疫分析仪(SPECTRAIII),奥地利 SLT 公司;紫外分光光度计(Varian)。

1.2 实验材料和试剂

辣根过氧化物酶(HRP)、四甲基联苯胺、尿素过氧化氢、牛血清白蛋白、人血清白蛋白、卵清蛋白、明胶,均为 Sigma 产品;蛋白 G 亲和层析柱,Pharmacia 公司产品;磺胺喹噁啉,由中国药检所提供;抗磺胺喹噁啉抗体、酶联抗兔二抗,由中国原子能科学研究所原子高科医学二部提供;96 孔酶标板,美国 COSTAR 公司产品。

包被缓冲液,0.1 mol/L、pH=9.5 碳酸盐缓冲液(C. B.);封闭液,含 0.2% 明胶的 0.05 mol/L、pH=7.4 磷酸盐缓冲液(P. B.);洗涤液,含 0.05% Tween-20 的 0.025 mol/L、pH=7.4 P. B.;抗体稀释液,含 0.2% 明胶的 0.02 mol/L、pH=7.4 P. B.。

1.3 实验方法

1) 包被用抗原的制备

碳二亚胺法连接包被用抗原 SQ-OVA。称取卵清蛋白(OVA)10.4 mg,加入 3 mL H₂O 溶解。称取 7.0 mg SQ,加入 2 mL 20% 的 pH=5.5 的 DMF 水溶液溶解。将 OVA 溶液与溶解的 SQ 充分混合,搅拌,使之完全溶解。向上述混合溶液中加入 0.4 mL(40 mg)新鲜 EDC 溶液,避光搅拌。1 h 后再加入 0.4 mL(40 mg)新鲜的 EDC 溶液,继续避光搅拌 0.5 h,于 4 °C 过夜放置。在 4 °C 条件下,用 0.02 mol/L、pH=7.4 的磷酸缓冲液透析 2 d,换液 5~6 次^[3]。

2) 酶联免疫分析步骤

96 孔酶标板每孔加 0.1 mol/L、pH=9.5

C. B. 稀释的 0.5 μg/mL SQ-OVA 100 μL 包被,于 4 °C 过夜放置。弃液后用生理盐水洗涤 1 次,每孔加 150 μL 封闭液,37 °C 下 1 h 后弃液。之后,每孔加 50 μL 标准品或样品、50 μL 抗体溶液,37 °C 反应 1 h。弃液,洗涤 3 次后,每孔加驴抗兔 IgG 二抗 100 μL,37 °C 下反应 0.5 h。弃液后洗涤 4 次,每孔加入 100 μL TMB 和 H₂O₂ (1 : 1) 显色液,37 °C 下显色 15 min。最后加入 50 μL 2 mol/L 硫酸溶液终止反应。在酶标仪上读取吸光值(450 nm 处)。

3) 样品预处理过程

(1) 牛奶样品的预处理。量取若干份牛奶样品,每份 2 mL,往每份样品中加入一定的 SQ 标准溶液,配成不同浓度 SQ 的牛奶样品。之后,每管中加入 150 μL Carrez I 及 150 μL Carrez II 完全混合(旋涡振荡),于 4~12 °C、3 000 r/min 条件下离心 10 min。若无冷冻离心机,预先将样品冷却到 8 °C。移出 1 mL 上层液至一新离心管中,用提取液稀释 4 倍(1 份上层液+3 份稀释液)。取 50 μL 进行分析。

(2) 蜂蜜样品的预处理。称取若干份蜂蜜样品,每份样品 2.0 g,每份分别添加不同浓度的 SQ 标准溶液。往每份蜂蜜样品中加入 4 mL 蒸馏水稀释溶解。再加入 4 mL 乙酸乙酯,振荡 10 min,室温(20~25 °C)、3 000 r/min 条件下离心 10 min。移取 1 mL 上层的乙酸乙酯至另一新试管中,60 °C 下氮气吹干。残留物用 0.5 mL 提取液溶解。取 50 μL 进行分析。

(3) 鸡肉样品的预处理。称取若干份鸡肉样品,每份 3.0 g。每份样品分别添加不同浓度的 SQ 标准溶液。往每份鸡肉样品中加入 3 mL 水,用均质器充分均质样品。往每份均质过的样品中加入 6 mL 乙酸乙酯。上下剧烈振荡 10 min,室温(20~25 °C)、3 000 r/min 条件下离心 10 min。移取 4 mL 上层的乙酸乙酯至另一新试管中,60 °C 下氮气吹干。用 1 mL 异辛烷溶解干燥的残留物。加入 2 mL 提取液,剧烈振荡 1 min。室温(20~25 °C)、3 000 r/min 条件下离心 10 min。取 50 μL 下层水相进行分析。

(4) 鸡蛋样品的预处理。称取若干份搅匀的鸡蛋样品,每份 2.0 g,每份分别添加不同浓度的 SQ 标准溶液。每份鸡蛋样品中,加入

12 mL 乙酸乙酯。上下来回剧烈振荡 10 min, 室温 (20~25 °C)、3 000 r/min 条件下离心 10 min。移取 6 mL 上层的乙酸乙酯至另一新试管中, 60 °C 下氮气吹干。用 1 mL 异辛烷溶解干燥的残留物。加入 1 mL 提取液, 剧烈振荡 1 min。室温 (20~25 °C)、3 000 r/min 条件下离心 10 min。取 50 μ L 下层水相进行分析。

4) 阳性样品的获得

从养鸡场购买 10 只产蛋期母鸡, 用产蛋期饲料喂养 15 d, 然后将磺胺喹噁啉-二甲氧苄啶预混剂以 5 倍于标准投药量的剂量投药 (标准投药量为 0.05%, 连续投药不超过 5 d, 休药期 10 d, 产蛋期禁用), 1#、2# 鸡一直用正常饲料喂养, 3#、4# 投药喂养 5 d 后取血, 5#、6# 投药喂养 10 d 后取血, 7#、8#、9#、10# 投药喂养 15 d 后取血。

通过喂养 10 只产蛋期母鸡, 获得了阳性的血清样品。

2 实验结果

2.1 方法学的建立

用含 0.2% 明胶的 0.02 mol/L、pH=7.4 的 P.B. 溶液配置一系列 SQ 标准品, 浓度分别为 0.3、1、3、10、30、100 ng/mL。

1) 包被浓度的选择

将提纯后的抗磺胺喹噁啉 1405 号兔 IgG 抗血清稀释 600 倍, 即抗体浓度为 2.88 μ g/mL。包被用抗原浓度分别选为 0.2、0.35、0.5、1 μ g/mL。不同包被浓度下的标准曲线示于图 1。最终选择最优包被用抗原浓度为 0.5 μ g/mL。

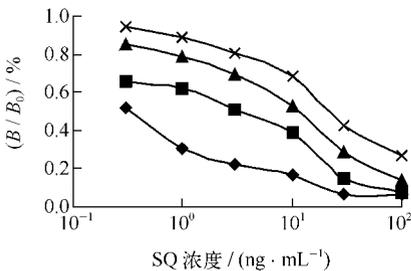


图 1 不同包被浓度下的标准曲线

Fig. 1 Selecting concentration of antigen used for coating

◆—0.2 μ g/mL; ■—0.3 μ g/mL;
▲—0.5 μ g/mL; ×—1 μ g/mL

2) 抗体稀释浓度的选择

包被浓度选为 0.5 μ g/mL, 提纯后的 1405 号兔 IgG 抗血清分别稀释 600、900、1 200、1 500 倍, 浓度分别为 2.88、1.92、1.44、1.15 μ g/mL。不同包被浓度下的标准曲线示于图 2。最终选择最优抗体稀释浓度为 1.92 μ g/mL。

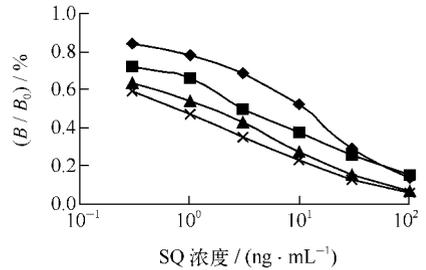


图 2 不同抗体浓度下的标准曲线

Fig. 2 Selecting concentration of antibody

◆—1/600; ■—1/900; ▲—1/1 200; ×—1/1 500

3) 反应时间的选择

在最优的包被浓度和抗体稀释浓度下, 分别反应 0.5、1、1.5、2、3、4 h, 标准品浓度分别为 0、0.3、1、3、10、30、100 ng/mL, 绘制反应动力学曲线 (图 3), 选择合适的反应时间。

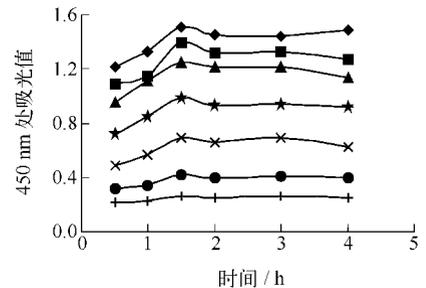


图 3 反应动力学曲线

Fig. 3 Kinetics curves of SQ ELISA

◆—0 ng/mL; ■—0.3 ng/mL;
▲—1 ng/mL; ★—3 ng/mL;
×—10 ng/mL; ●—30 ng/mL; +—100 ng/mL

从图 3 可看出, 反应 90 min 后反应基本达到平衡, 而 60 min 已可满足实验测定需要。

2.2 方法学鉴定

1) 标准曲线及灵敏度

用 1405 号兔抗 SQ 抗体建立的标准曲线

示于图4。经 logit-log 回归,得到回归方程为 $y = -1.416x + 0.778, R = 0.998$ 。

同时测定了 10 个 S_0 值,平均值 x 为 1.870, $SD = 0.069, x - 2SD = 1.732$,代入拟合直线,查得浓度值为 0.2 ng/mL,即该方法学的灵敏度为 0.2 ng/mL。标准曲线示于图 4。

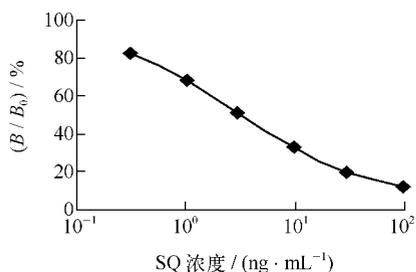


图4 SQ ELISA 标准曲线

Fig.4 SQ ELISA calibration curve

2) 精密度实验

精密度实验结果列于表 1 和 2。

表 1 批内变异实验 ($n = 10$)

Table 1 Intra-assay variation coefficient ($n = 10$)

浓度值/ (ng · mL ⁻¹)	测得平均值/ (ng · mL ⁻¹)	标准差/ (ng · mL ⁻¹)	变异系数 CV/%
0.5	0.5	0.05	10.0
2	2.0	0.2	10.0
20	20.3	1.7	8.4
50	52.9	4.1	7.8

表 2 批间变异实验 ($n = 10$)

Table 2 Inter-assay variation coefficient ($n = 10$)

浓度值/ (ng · mL ⁻¹)	测得平均值/ (ng · mL ⁻¹)	标准差/ (ng · mL ⁻¹)	变异系数 CV/%
0.5	0.5	0.06	12.0
2	1.9	0.2	10.5
20	19.3	2.2	11.4
50	48.9	5.8	11.9

从表 1 和 2 可知,批内变异小于 10%,批间变异小于 15%,满足方法学的要求。

3) 健全性实验

向牛奶中添加已知浓度的标准品,经预处理后,用标准品稀释液倍比稀释样品。计算出的测定值列于表 3,稀释度与测定值之间的线

性关系示于图 5。

表 3 健全性实验

Table 3 Sanity experiment

稀释倍数	测定值/(ng · mL ⁻¹)	理论值/(ng · mL ⁻¹)
4	50.7	44.6
8	28.4	22.3
16	12.7	11.1
32	4.1	5.6
64	2.5	2.8
128	1.2	1.4
256	0.7	0.7
512	0.4	0.35

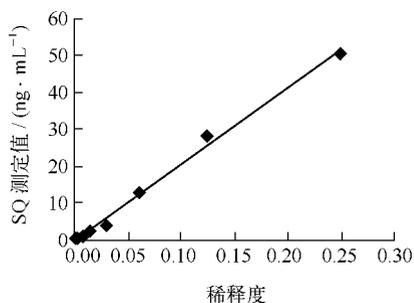


图 5 牛奶稀释实验

Fig.5 Correlation coefficient of dilution experiment

表 3 和图 5 结果表明,稀释度与测定值呈线性相关,相关性方程为 $y = 208.86x - 0.4345, R = 0.997$ 。

4) 回收实验

参照国家标准和相关文献^[4,5]报道,对牛奶、蜂蜜、鸡肉、鸡蛋等几种动物源性食品进行样品的预处理,并测定其回收率,结果列于表 4~7。

表 4 牛奶添加回收实验

Table 4 Recovery of SQ in milk

样品号	测定值/ (ng · g ⁻¹)	理论值/ (ng · g ⁻¹)	回收率/%
1	1.9	1.8	105.0
2	2.9	3.1	94.0
3	4.2	4.0	105.0
4	6.4	6.0	107.0
5	13.7	13.6	101.0
6	32.6	35.0	93.1
7	48.1	50.0	96.2

表 5 蜂蜜添加回收实验

Table 5 Recovery of SQ in honey

样品号	测定值/ (ng · g ⁻¹)	理论值/ (ng · g ⁻¹)	回收率/%
1	4.8	5.0	96.0
2	6.9	10.0	69.0
3	16.4	20.0	82.0
4	17.4	20.0	87.0
5	20.7	20.0	104.0
6	41.0	50.0	82.0

表 6 鸡肉添加回收实验

Table 6 Recovery of SQ in chicken

样品号	测定值/ (ng · g ⁻¹)	理论值/ (ng · g ⁻¹)	回收率/%
1	0.4	1.0	40.0
2	1.7	3.0	57.0
3	3.2	5.0	64.0
4	6.9	9.8	70.0
5	14.5	19.7	73.6
6	21.0	29.8	70.5
7	33.4	48.9	68.3

表 7 鸡蛋添加回收实验

Table 7 Recovery of SQ in egg

样品号	测定值/ (ng · g ⁻¹)	理论值/ (ng · g ⁻¹)	回收率/%
1	0.5	1.0	50.0
2	2.1	3.0	70.0
3	4.2	5.0	84.0
4	7.7	10.0	77.0
5	15.7	20.0	78.5
6	23.6	30.0	78.7
7	35.8	50.0	71.6

从表 4~7 可以看出,鸡肉、蜂蜜、牛奶、鸡蛋样品的添加回收率分别为 40.0%~73.6%、69.0%~104.0%、93.1%~107.0%、50.0%~84.0%。

5) 稳定性实验

不同温度条件下药盒的稳定性示于图 6。

由图 6 可看出,常温状态下试剂盒放置 6 d 左右、37 °C 条件下放置 6 d 以上,将不影响试剂盒的检测效果。

2.3 真实性样品的测定

用自制药盒与国家规定的 HPLC 方法分别对阳性血样进行测定,结果列于表 8。

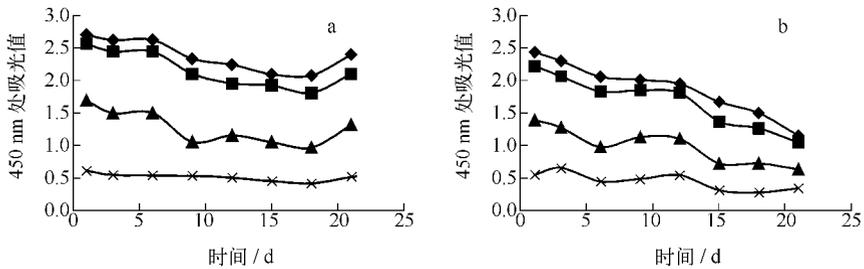


图 6 常温(a)和 37 °C(b)条件下药盒的稳定性

Fig. 6 Stabilities of EIA at room temperature(a) and 37 °C(b)

◆——0 ng/mL; ■——0.3 ng/mL; ▲——3 ng/mL; ×——30 ng/mL

表 8 阳性血样测定实验

Table 8 Measurement of positive serum

样品号	自制药盒测定值	HPLC 测定值	样品号	自制药盒测定值	HPLC 测定值
1	18.4	27.2	6	45.2	
2	6.4	4.3	7	38.5	49.4
3	25.3	27.2	8	94.6	
4	103.8		9	25.4	
5	24.3		10	57.6	66.6

通过自制试剂盒测定值与 HPLC 方法的测定值相比较,其相关方程为 $y = 1.195x - 0.0025$, 相关系数 $R = 0.986$ 。

3 讨论

3.1 SQ 紫外吸收峰的漂移

纯 SQ 标准溶液在 360 nm 处有最大吸收峰,戊二醛法连接的 BSA-SQ、HAS-SQ 在 355 nm 处有最大吸收峰,碳二亚胺法连接的 BSA-SQ 在 358 nm 处有最大吸收峰,这是因为联接上载体蛋白后吸收峰向紫外漂移所致。

3.2 包被板的稳定性

SQ-OVA 采用的是碳二亚胺法联结,4 °C 条件下于冰箱中液体存放。在进行方法学调试的几个月过程中观察到,同样不变的包被用抗原、不变的包被浓度、同样的标准品溶液,实验所得的 S_0 值一直在下降,标准曲线各点 B/B_0 值也均呈下降趋势。若从 -20 °C 条件下取出新的同一批包被用抗原,则曲线 S_0 及其余各点抑制率均不变。在 4 °C 条件下存放时间最好不要超过 6 个月。

3.3 药盒测定范围的调整

由图 1 可见,不同的抗原包被浓度对标准抑制曲线有较大影响。随着包被浓度降低,分析灵敏度升高;包被浓度增加,分析灵敏度降低。因此,可根据用户需求,在允许范围内通过一定程度上改变包被量,适当调整试剂盒的测试范围。

本方法可用于制备酶联免疫分析药盒,以测定动物源食品中磺胺喹噁啉的残留,亦适用于各种大型养殖场大批量动物源样品的筛查。

诚挚感谢中国原子能科学研究院同位素研究所的官国英、李子颖、贾娟娟对本工作的支持和帮助。

参考文献:

- [1] 朱蓓蕾. 动物性食品药物残留[M]. 上海:上海科学技术出版社,1993.
- [2] 庄无忌. 各国食品和饲料中农药兽药残留限量大全[M]. 北京:中国对外经济贸易出版社,1995.
- [3] 李俊锁,李喜旺,王明安. 磺胺类药物半抗原的合成及结构表征[J]. 中国农业大学学报,1999,4(1):109-113.
LI Junsuo, LI Xiwang, WANG Ming'an. Synthesis and structure elucidation of sulfonamide haptens[J]. Journal of China Agricultural University, 1999, 4(1):109-113(in Chinese).
- [4] FURUSAWA N, HANABUSA R. Cooking effects on sulfonamide residues in chicken thigh muscle[J]. Food Research International, 2002, 35: 37-42.
- [5] FURUSAWA N. Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 481: 255-259.