

呋喃妥因代谢物 CLIA 试剂盒对畜禽及水产品的验证研究

谢体波¹, 党娟^{1*}, 易重任¹, 李平¹, 何方洋^{1,2}, 冯才伟¹

(1. 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司, 贵阳 550009; 2. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 100012)

摘要: **目的** 验证呋喃妥因代谢物 CLIA 检测试剂盒的检测效果。**方法** 用化学发光微粒子免疫法和高效液相色谱-串联质谱法分别对市售猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉 4 种样品中呋喃妥因代谢物残留量进行检测, 比对两种方法试验结果间的差异。**结果** 该试剂盒对 4 种样品的最低检测限分别为 69.37、67.86、67.52、69.09 ng/kg, 试剂盒板内板间变异系数均小于 10%; 对 4 种样品做加标回收试验, 其回收率均在 90%~105%之间, 变异系数均小于 10%; 该方法与高效液相色谱法检测实际样品的阴、阳性判断结果一致。**结论** 该方法稳定、可靠, 可满足食品中呋喃妥因代谢物残留快速检测的需要。

关键词: 呋喃妥因代谢物; 化学发光微粒子免疫法; 高效液相色谱-串联质谱法

Verification of furantoin metabolites CLIA kits in meat, poultry and seafood

XIE Ti-Bo¹, DANG Juan^{1*}, YI Zhong-Ren¹, LI Ping¹, HE Fang-Yang^{1,2}, FENG Cai-Wei¹

(1. Guizhou Kwinbon Food Safety Science-Technology Co., Ltd., Guiyang 550009, China;
2. Beijing Kwinbon Biotechnology Co., Ltd., Beijing 100012, China)

ABSTRACT: Objective To verify the test effect of chemiluminescence immune (CLIA) kit. **Methods** The method of CLIA was used to detect the residues of furantoin metabolites in 4 kinds of samples including market sold pork, chicken, fish and shrimp, and the results were compared with that of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Results** The minimum detection limitation of the kit of the 4 kinds of samples were 69.37, 67.86, 67.52, and 69.09 ng/kg, respectively, and the coefficient of variation was less than 10%. The recovery of the method was in the range of 90%~105%, and the coefficient of variation was less than 10%. The CLIA's judgments of positive and negative were the same as the HPLC's. **Conclusion** This method is efficient, reliable and sensitive, and can meet the fast-tested need for the determination of furantoin metabolites residues in food.

KEY WORDS: furantoin metabolites; chemiluminescence immune method; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

基金项目: 2014 贵阳技术创新项目(筑科合同[2014]20 号)

Fund: Supported by 2014 Guiyang Technology Innovation ([2014]20)

*通讯作者: 党娟, 中级工程师, 研究方向为食品安全快速检测技术开发。E-mail: 853625823@qq.com

*Corresponding author: DANG Juan, Intermediate Engineer, Guizhou Kwinbon Food Safety Science-Technology Co., Ltd., Guiyang Economic and Technological Development Zone Technology Road, Guizhou 550009, China. E-mail: 853625823@qq.com

1 引言

呋喃妥因是一种人工合成的广谱抗菌药,能杀灭多种革兰氏阳性和阴性细菌,在畜牧业和水产养殖业中得到了广泛的应用^[1]。呋喃妥因在生物体内代谢为呋喃妥因代谢物(1-氨基乙内酰胺,简称 AHD),AHD 能以膜蛋白结合态,使呋喃妥因易残留在生物体内数周^[2,3],所以长期使用易使呋喃妥因及其代谢物残留在动物组织中,并通过食物链传递给人类^[4],引起类似药物过敏、血压升高等症状,能诱导机体基因突变,有致癌、致畸胎的诱导作用及其他毒副作用^[5-7]。1995 年起欧盟禁止硝基呋喃类药物在畜禽及水产动物食品中使用,并严格执行对水产中硝基呋喃的残留检测,2002 年美国亦随之制定相应法规^[8]。我国在 2002 年 3 月由农业部发布的《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中将呋喃妥因列为禁用药^[9]。为了利于动物性食品的出口贸易,增加畜禽产品的出口创汇,同时增强食品安全与安全消费,保障人民身体健康,必须对畜禽及水产品中呋喃妥因代谢物进行检测^[10,11]。

目前呋喃妥因代谢物残留的检测方法主要有液相色谱、液相色谱质谱联用、免疫法等^[12],现阶段,我公司已研制出酶联免疫试剂盒^[13]和胶体金免疫层析法试纸条^[14]快速检测残留的呋喃妥因代谢物。采用化学发光微粒子免疫法检测呋喃妥因代谢物的报道较少,前期已建立间接竞争化学发光微粒子免疫法,本研究以公司自主研发的呋喃妥因代谢物单克隆抗体为基础建立直接竞争化学发光免疫测定(chemiluminescence immune method, CLIA)方法,对相关技术指标优化,研制出了呋喃妥因代谢物化学发光微粒子免疫试剂盒,并对市售猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉等采用高效液相色谱-质谱法(high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)和本试剂盒进行验证试验。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 样品与试剂

猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉均购自贵阳农贸市场;呋喃妥因代谢物 CLIA 检测试剂盒(北京勤邦生物技术有限公司);呋喃妥因代谢物标准品(美国 Sigma 公司);乙腈、甲酸、甲醇、丙酮(分析纯,天津市富宇

精细化工有限公司)。

2.1.2 仪器与设备

高速电动匀浆机(FSH-II 型,江苏中大仪器厂);恒温振荡器(CHZ-82A,上海百典仪器设备有限公司);高速离心机(GT16-3A,北京时代北利离心机有限公司);微量移液器(单道 20~200 μL 、100~1000 μL ,多道 250 μL ,美国 Thermo 公司);高效液相色谱仪(Anglent1200,美国安捷伦公司);全自动化学发光免疫分析仪(北京勤邦生物技术有限公司)。

2.2 方法

2.2.1 样品前处理方法

用均质器均质样本;称取(1.0±0.05) 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 mL 衍生化试剂,用涡旋仪涡动 2 min;在 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 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,用涡旋仪涡动 30 s;3000 g 以上,室温(20~25 $^{\circ}\text{C}$)离心 5 min;取 2.5 mL 上清液至 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,用涡旋仪涡动 1 min,再加入 1 mL 复溶工作液,用涡旋仪涡动 30 s 充分混匀;3000 g 以上,室温离心 5 min;除去上层有机相,取下层水相用于分析。

2.2.2 样品检测方法

所有试剂与反应杯放在实验台上放置室温,摇匀。取出反应杯,将标准品和样品对应反应杯编号,每个标准品和样品做 3 孔平行,记录样品和反应杯位置。向反应杯中加入标准品溶液 50 μL ,用常规抗原稀释液(pH 9.6, 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲液)稀释的酶标抗原 50 μL ,用常规抗体稀释液(pH 7.2, 6%山羊血清, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液)稀释的磁标抗体 50 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应 20 min,用 PBST 洗液洗板 3 次,将底物 A 液和底物 B 液按 1:1 混合,摇匀后每孔加入 100 μL ,室温放置 3.5 min,用光子计数仪测定,并记录。

2.2.3 试剂盒的工作参数

酶标抗原 1:5×10³ 稀释,磁标抗体 1:5×10² 稀释;加样方式:50 μL 标准品 + 50 μL 酶标抗原 + 50 μL 磁标抗体;反应温度及时间:25 $^{\circ}\text{C}$ 下避光反应 10 min;底物显色时间 3.5 min;抗原稀释液、抗体稀释液:零标准 OD 值在 1.5~2.0 之间,标准品抑制率在 70%~80%之间。

2.2.4 试剂盒相关指标检测方法

分别对试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、准

确度进行试验, 并将其中灵敏度、精密度和准确度与 HPLC-质谱法检测的灵敏度、精密度和准确度进行对比。

(1) 试剂盒特异性的测定

特异性用交叉反应率来表示, 交叉反应率是指抗体与结构不同的抗原决定簇发生结合的能力。选择与呋喃妥因代谢物类似结构和类似功能的药物, 将不同浓度的呋喃妥因代谢物类似物, 替代呋喃妥因代谢物标准溶液, 测定其标准曲线, 并计算 IC₅₀ 抑制浓度, 计算交叉反应率。

交叉反应率(%)=

$$\frac{\text{引起 50\%抑制的呋喃妥因代谢物浓度}}{\text{引起 50\%抑制的呋喃妥因代谢物类似物浓度}} \times 100\%$$

(2) 试剂盒检测限的确定

分别对空白猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉样品进行 20 次检测, 计算呋喃妥因代谢物的浓度, 检测限 LOD=S+3SD(S 为呋喃妥因代谢物的浓度平均值, SD 为标准差), 即为试剂盒检测实际样品的最低检测限。

(3) 试剂盒精密度和准确度的测定

准确度是指测定值与真实值间的符合程度, 试剂盒的准确度常用回收率表示。本实验分别取空白猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉样本以 70、140 和 280 ng/kg 呋喃妥因代谢物进行添加, 每种样品、每个浓度各 6 个平行, 用试剂盒提供的操作方法提取测定。抽取三批试剂盒, 每批试剂盒测定同一份样品 2 次, 分别计算测定样品的回收率及批内、批间变异系数。

2.2.5 CLIA 试剂盒与 HPLC-质谱法检测结果比较

随机抽取市售的猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉样本各 20 份, 分别用试剂盒方法和 HPLC-质谱法进行检测。HPLC 法参考《GB/T 21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法 高效液相色谱/串联质谱法》(检测限为 0.5 μg/kg)。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

以试剂盒中选定参数的样品浓度、加样方式、反应温度、反应时间为分析条件, 采用 CLIA 检测分别测定 0、35、105、315、945、2835 ng/L 6 个浓度的标准液的 RLU 值。以呋喃妥因代谢物浓度对数值(Log)为横坐标, 各对应浓度的抑制率(RLU/RLU0%)

为纵坐标, 制作标准曲线, 以呋喃妥因代谢物标准品浓度的对数(Log)为横坐标, 抑制率 $\ln[B/(B_0-B)]$ 为纵坐标建立双对数直线拟合曲线, 数学模型为 $\ln[B/(B_0-B)]=a+b\log C$ 。从图 1 和图 2 中可知, 标准曲线回归方程为: $Y=-1.86X+7.33$, 相关系数 $r^2=0.993$, 说明该试剂盒线性关系良好。

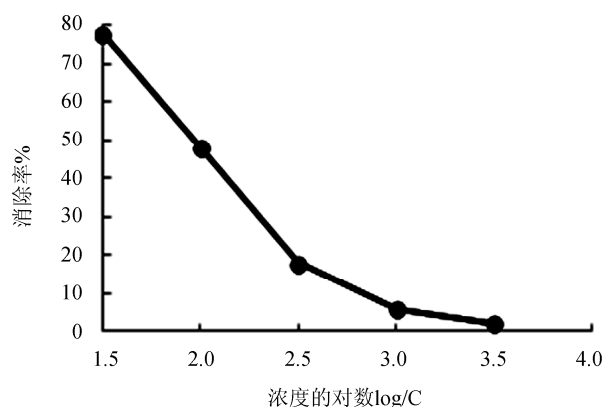


图 1 标准曲线

Fig. 1 The standard curve

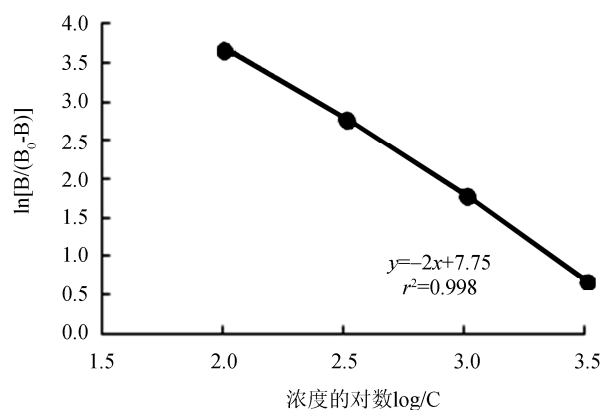


图 2 标准曲线方程

Fig. 2 Standard curve equation

3.2 试剂盒特异性测定结果

交叉反应率小, 可证明抗体的特异性高。由表 1 可知, 该抗体对其它几种类似代谢物的交叉反应率均较低, 对呋喃妥因代谢物具有较好的特异性。

3.3 试剂盒最低检测限

根据 2.2.2 检测方法, 对 20 份不含呋喃妥因代谢物的猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉 4 种样品进行测定, 检

测结果平均值加上 3 倍标准差, 即为试剂盒检测实际样品的最低检测限。

$$LOD = X + 3\sqrt{\frac{n\sum X^2 - (\sum X)^2}{n(n-1)}}$$

其中 X 为重复测定空白样品的平均值, n 为样品数量。

CLIA 检测试剂盒测定结果如表, 由表 2 可知, 该试剂盒对猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉 4 种样品的最低检测限分别为 69.37、67.86、67.52、69.09 ng/kg, 远远低于目前欧盟对硝基咪唑类代谢物的检测方法灵敏度规定为 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[15], 说明该试剂盒灵敏度较高。

3.4 试剂盒精密度和准确度测定结果

向猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉 4 种空白样品中分别添加不同浓度的呋喃妥因代谢物, 3 个浓度各 3 个平行, 按 2.2.2 操作方法测定, 再计算 4 个样品的标准偏差及回收率, 由表 3 可知, 4 种样品回收率均在 90%~105%之间, 变异系数 CV 均小于 10%, 符合《农

业部文件》农医发[2005]17 号规定, 说明该呋喃妥因代谢物 CLIA 试剂盒精密度和准确度良好。

表 1 交叉反应率
Table 1 Cross reactivity

药物名称	交叉反应率(%)
呋喃妥因代谢物	100
呋喃唑酮代谢物	< 0.1
呋喃它酮代谢物	< 0.1
呋喃西林代谢物	< 0.1
呋喃唑酮	< 1
呋喃它酮	< 1
呋喃妥因	13
呋喃西林	< 1

表 2 空白猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉中呋喃妥因代谢物含量测定结果

Table 2 Determination of the content of furantoin metabolites in the blank pork, chicken, fish and shrimp meat

	样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
猪肉	测定值	55.68	35.87	52.37	46.85	35.85	40.64	51.96	50.54	46.34	51.63	最低 检测限 69.37
	样本号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	测定值	52.24	39.86	37.56	43.85	56.64	50.24	57.63	33.27	35.86	39.64	
	样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
鸡肉	测定值	51.24	38.26	51.96	55.76	46.36	40.79	55.17	53.64	38.75	36.79	最低 检测限 67.86
	样本号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	测定值	46.39	38.76	31.57	50.97	51.87	36.45	51.01	38.96	37.63	33.85	
	样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
鱼肉	测定值	46.56	52.64	50.33	56.39	38.92	33.58	46.33	40.85	36.75	51.97	最低 检测限 67.52
	样本号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	测定值	50.64	55.24	43.56	37.56	33.60	51.36	37.88	50.63	51.32	38.56	
	样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
虾肉	测定值	52.37	46.96	55.23	38.67	40.63	55.88	35.64	36.79	40.63	50.24	最低 检测限 69.09
	样本号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
	测定值	55.13	50.24	46.34	52.36	51.63	35.61	30.76	51.63	46.90	36.76	
	样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

3.5 CLIA 试剂盒与 HPLC-质谱法检测结果比较

CLIA 试剂盒与 HPLC-质谱法检测结果见表 4, 以仪器方法检测限(0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$)为阳性判定线, 低于阳性判定线的值, 检测结果以“-”表示, 高于或等于阳性判定线的值以实际检测结果表示。对市售猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉 4 种样品结果可知, 市场销售的畜禽类及水产品基本低于国家最高残留量, 表明工商局有效监管, 控制农药残留情况。由表可知, CLIA 试剂盒检测结果与 HPLC-质谱法检测结果相吻合, 表明 CLIA 试剂盒法的准确度达到国家标准检测水平。

4 结 论

本研究采用化学发光微粒子免疫法(CLIA)测定市售猪肉、鸡肉、鱼肉、虾肉 4 种样品中呋喃妥因代谢物, 以此验证本公司生产的呋喃妥因代谢物 CLIA 试剂盒检测效果, 并将其检测效果与 HPLC-质谱法作对照。结果表明, 呋喃妥因代谢物 CLIA 试剂盒检测灵敏度高, 对畜禽类及水产品的最低检测限远远低于国家规定最高残留。与 HPLC-质谱法相比, 检测结果相吻合, 检测时间短(10 min), 前处理简单, 操作方便, 与间接竞争化学发光微粒子免疫法相比, 灵敏度、精密度和准确度更高, 可快速准确的检测畜禽类及水产品中残留的呋喃妥因代谢物, 适用于大批量呋喃妥因代谢物的检测, 可达到目前国际上检测呋喃妥因代谢物残留的先进水平。

参考文献

- [1] 宋宁宁, 刘迎春, 陈永军, 等. 呋喃妥因残留代谢物人工抗原的合成与鉴定[J]. 中国动物传染病学报, 2012, 03: 55-61.
Song NN, Liu YC, Chen YJ, *et al.* Preparation and characterization of nitrofurantoin metabolite antigen coupled to bovine serum albumin [J]. *Chin J Anim Infec Disea*, 2012, 03: 55-61.
- [2] Robert J, McCracken D, Kennedy G. Determination of furazolidone in animal feeds using liquid chromatography with UV and thermospray mass spectrometric detection [J]. *J Chromatogr A*, 1997, 771(1/2): 349-354.
- [3] Gottschall DW, Wang R. Depletion and Bioavailability of Furazolidone Residues in Swine Tissues [J]. *J Agric Food Chem*, 1995, 43(9): 2520-2525.
- [4] 陈勇, 施杏芬, 鲁马媚. 食品中呋喃妥因代谢物酶联免疫检测试剂盒的研制[J]. 畜牧兽医科技信息, 2012, 07: 26-29.
Chen Y, Shi XF, Lu MM. Development of the detection kit for the detection of the enzyme linked immunosorbent assay in food [J]. *Chin J Anim Husb Vet Med*, 2012, 07: 26-29.
- [5] Sharafadinzadeh N, Moghtaderi A, Alavi-Naini R. Nitrofurantoin induced peripheral neuropathy: a lesson to be re-learned [J]. *Neurol India*, 2008, 56(1): 94-96.
- [6] Volbeda F, Jonker AM, Vecht J, *et al.* Liver cirrhosis due to chronic use of nitrofurantoin [J]. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2004, 148(5): 235.
- [7] Edoute Y, Karmon Y, Roguin A, *et al.* Fatal liver necrosis associated with the use of nitrofurantoin [J]. *Isr Med Assoc J*, 2001, 3(5): 382.
- [8] 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, 10: 590-593.
Xu YP, Xu CL. Determination Overview on Nitrofurantoin Antibiotics and Their Metabolites Residues in Animal Foods Type [J]. *Food Sci*, 2007, 10: 590-593.
- [9] 农业部文件农牧发(2002)1 号 关于发布《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》的通知[J]. 饲料研究, 2002, 06: 18.
Ministry of agriculture, agricultural and animal husbandry (2002) 1 Circular on Issuing the Detailed List of Banning to Use Veterinary Medicine and Other Chemical Compound on Animal for Food Commodity [J]. *Feed Res*, 2002, 06: 18.
- [10] 冯才伟, 冯月君, 崔海峰, 等. 呋喃它酮代谢物化学发光试剂盒的建立[J]. 江苏农业科学, 2013, 09: 277-279.
Feng CW, Feng YJ, Cui HF, *et al.* Establishment of a chemical luminescent reagent kit for the chemical luminescence of the ketone [J]. *Jiangsu Agric Sci*, 2013, 09: 277-279.
- [11] 杨恒东. 畜禽产品中的兽药残留及其控制对策[J]. 畜禽业, 2003, 12: 50-51.
Yang HD. Veterinary drug residues in livestock and poultry products and its control strategy [J]. *Lives Poul Ind*, 2003, 12: 50-51.
- [12] 刘辉, 梁德沛, 花铁果, 等. 食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 02:383-388.
Liu H, Liang DP, Hua TG, *et al.* Progress in analytical methods of nitrofurantoin antibiotics and their metabolites in food a review [J]. *J Food Safe Qual*, 2013, 02: 383-388.
- [13] 罗晓琴, 方华林, 张德红, 等. 动物组织中呋喃妥因代谢物残留酶联免疫试剂盒的研制[J]. 食品工业科技, 2013, 04: 59-62.
Luo XQ, Fang HL, Zhang DH, *et al.* Development of an enzyme linked immunosorbent assay kit for furantoin metabolite residues determination in animal tissue [J]. *Sci Tech Food Ind*, 2013, 04: 59-62.
- [14] 吴茂生, 何方洋, 赵正苗, 等. 胶体金免疫层析法快速检测水

产品中呋喃妥因代谢物残留[J]. 福建水产, 2012, 04: 290-295.

Wu MS, He FY, Zhao ZM, *et al.* Rapid detection of the residues of metabolites in aquatic products by colloidal gold immunoassay chromatography [J]. J Fujian Fish, 2012, 04: 290-295.

- [15] 余永新, 李宝海, 曹维强, 等. 动物性食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测技术的研究进展[J]. 现代科学仪器, 2010, 06: 149-153.

She FX, Li BH, Cao WQ, *et al.* Progress on the determination methods for nitrofurant antibiotics and their metabolites residues in animal foods [J]. Mod Sci Instrum, 2010, 06: 149-153.

(责任编辑: 金廷秋)

作者简介



谢体波, 中级工程师, 硕士, 主要研究方向为食品安全快速检测技术的研究与开发。

E-mail: 394736614@qq.com



党娟, 中级工程师, 硕士, 主要研究方向为食品安全快速检测技术的研究与开发。

E-mail: 853625823@qq.com

补充说明

本刊 2015 年第 6 卷第 10 期(2015, 6(10): 4003-4010)赵玉庭等作者“盐渍海蜇脱铝研究及安全食用建议”一文中做如下更改:

基金项目: 农业部海蜇铝产品铝安全性应急调查项目

Fund: Supported by Ministry of Agriculture about Jellyfish Aluminum Safety Emergency Investigation
更改为

基金项目: 农业部物种资源保护(渔业)项目、农业部海蜇铝产品铝安全性应急调查项目

Fund: Supported by Ministry of Agriculture about Species Resource Conservation (Fishery) Project and Ministry of Agriculture about Jellyfish Aluminum Safety Emergency Investigation

《食品安全质量检测学报》编辑部