

间接竞争化学发光酶免疫法检测动物源食品中的 呋喃西林代谢物

黄登宇^{1,2}, 高丽霞¹, 李亚楠¹, 冯敏¹, 高文静¹, 杨秀松^{3*}

(1. 山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2. 山西大学食品药品快检技术中心, 太原 030006;
3. 国家食品药品监督管理总局高级研修学院, 北京 100073)

摘要: **目的** 建立动物源食品中呋喃西林代谢物间接竞争化学发光酶免疫检测方法。**方法** 采用活化酯法将衍生后的呋喃西林代谢物半抗原与卵清蛋白(ovalbumin, OVA)偶联成为包被原; 其次, 对化学发光液体系、包被原和单克隆抗体的最优稀释倍数及其他反应条件进行优化; 最后对该法的灵敏度、特异性、精密度及准确度进行评价。**结果** 化学发光液 A 液为 8 mmol/L 对碘苯酚溶液和 10 mmol/L 鲁米诺溶液(1:1, V:V)混合, B 液为每 10 mL 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)-盐酸缓冲液加 5 μ L 30% H₂O₂ 溶液, A 液与 B 液临用前体积比 1:1 混匀; 最优反应条件是包被原和单抗稀释倍数均为 800, 封闭液为 1% 脱脂乳, 竞争时间 30 min, 酶标二抗孵育 60 min; 该法的线性方程为 $Y = -0.4654X + 0.3768$ ($r^2 = 0.993$), 线性范围为 0.123~2.398 ng/mL, IC₅₀ 为 0.544 ng/mL, 批内和批间变异系数分别为 1.9%~4.1% 和 2.8%~5.3%, 空白鸡肉样品添加回收率为 89.6%~98.0%。**结论** 该检测方法简单快速, 可用于实验室或现场动物源食品中呋喃西林代谢物的筛查。

关键词: 呋喃西林; 氨基脒; 化学发光酶免疫; 硝基呋喃类药物

Determination of nitrofurazone metabolite in animal-derived food by indirect competitive chemiluminescence enzyme immunoassay

HUANG Deng-Yu^{1,2}, GAO Li-Xia¹, LI Ya-Nan¹, FENG Min¹, GAO Wen-Jing¹, YANG Xiu-Song^{3*}

(1. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. China Food and Drug Safety Rapid Detection Center, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. China Food and Drug Administration Institute of Executive Development, Beijing 100073, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of nitrofurazone metabolite semicarbazide (SEM) in animal-derived food by indirect competitive chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA). **Methods** Firstly, derived 3-(4-carboxyl benzyl)-semicarbazone (CPSEM) hapten was conjugated with ovalbumin (OVA) by using N-hydroxysuccinimide ester method to synthesize coating antigen. Secondly, chemiluminescence solution system, the best concentration of coating antigen and monoclonal antibody, and other reaction conditions were optimized. Finally, the sensitivity, specificity, precision and accuracy of the CLEIA method were evaluated. **Results** Chemiluminescence solution A was mixed by the same volume of 8 mmol/L iodine phenol solution and 10 mmol/L luminol solution, solution B was 10 mL Tris-HCl buffer solution including 5 μ L 30% H₂O₂ solution, and solution A

*通讯作者: 杨秀松, 副教授, 主要研究方向为食品科学与食品安全。E-mail: yxs@cfdaiied.org

*Corresponding author: YANG Xiu-Song, Associate Professor, China Food and Drug Administration Institute of Executive Development, No.16, West Railway Station South Road, Beijing 100073, China. E-mail: yxs@cfdaiied.org

and solution B were mixed with the same volume before using. The optimized reaction conditions were as follows: fold dilution of monoclonal antibody and CPSEM-OVA were both 800, blocking solution was 1% skimmed milk, competitive reaction time was 30 min, and HRP-IgG incubation time was 60 min. The linear equation of CLEIA was $Y = -0.4654X + 0.3768 (r^2 = 0.993)$ with a linear detection range of 0.123~2.398 ng/mL, the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) was 0.544 ng/mL, the intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were respectively 1.9%~4.1% and 2.8%~5.3%, and the recoveries in negative chicken were 89.6%~98.0%. **Conclusion** The established detection method is simple and rapid, which can be applied in screening SEM from animal-derived food in laboratory or on-site.

KEY WORDS: nitrofurazone; semicarbazide; chemiluminescence enzyme immunoassay; nitrofurans

1 前言

当前各种抗生素类兽药在食品动物养殖过程中的使用仍具有广泛性和必要性,但在兽药使用过程中,应做到严格依法依规用药,且用药范围与剂量应合理规范,从而解决兽药残留及耐药性等问题。呋喃西林作为一种常见硝基呋喃类禁用兽药,可用于治疗动物胃肠道疾病,曾经在畜禽和水产养殖业有广泛应用^[1,2]。硝基呋喃类药物被食品动物摄取后,能迅速代谢并长期稳定地以其代谢物形式存在于动物体内^[2,3],进而被人体摄食吸收并产生蓄积,可引起慢性中毒,具有“三致”作用^[4,5]。

早在 1995 年,欧盟规定呋喃类抗菌药残留物在动物源性食品中不得检出^[6]。2002 年,我国农业部第 235 号公告^[7]要求硝基呋喃类药物在动物性食品中不得检出,且养殖过程中也不得使用。2011 年国家卫生和计划生育委员会发布了食品中可能违法添加的非食用物质名单^[8]中也包括硝基呋喃类药物。目前对于呋喃西林代谢物氨基脲(semicarbazide, SEM)残留的检测方法中,仪器法主要包括高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)及其与质谱联用等技术,免疫学方法主要包括酶联免疫法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、化学发光酶免疫法(chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA)、生物素-亲和素放大酶免疫法(biotin-avidin enzyme linked immunosorbent assay, BA-ELISA)及胶体金免疫层析(colloidal gold immunochromatographic assay, GICA)等^[9-13]。由于食品安全日常检测工作中样品检测数量大,时效性要求高,因此对样品前处理要求复杂,检测周期长且需专业化操作的仪器分析法有其局限性,而操作简单快速、可大批量检测的酶免疫分析法等快速检测方法在农兽药残留检测方面已广泛应用。在酶免疫分析法中, CLEIA 法与传统 ELISA 法相比通常具有更高灵敏度与准确度^[14,15],在实验室定性与定量检测兽药残留方面可进一步发展应用。本研究对间接竞争 CLEIA 法检测 SEM 的反应条件予以优化并作方法学评价。

2 材料与方 法

2.1 材料与试剂

鸡肉,市购。

盐酸氨基脲(semicarbazide-hydrochloride, SEM-HCl)、N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、N,N'-二环己基碳二亚胺(N,N-dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、2-硝基苯亚甲基-氨基脲(2-nitrobenzaldehyde-semicarbazone, NPSEM)、对甲苯酚、鲁米诺、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)、邻硝基苯甲醛(2-nitrobenzaldehyde, 2-NPA)、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP),均购自美国 Sigma 公司;对醛基苯甲酸(carboxybenzaldehyde, 4-CBA)、对碘苯酚(国药集团化学试剂有限公司);SEM 单克隆抗体(深圳易瑞生物技术有限公司);辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗(peroxidase from horseradish-immunoglobulin G, HRP-IgG, 北京艾旗斯德科技有限公司);其他试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司)。

磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4);碳酸盐缓冲液(carbonate buffered saline, CBS, 0.05 mol/L, pH 9.6);洗涤液(phosphate buffered saline tween, PBST, PBS 中加 0.05% Tween-20);对碘苯酚储备液(100 mmol/L): 110.0 mg 对碘苯酚溶于 5 mL 乙醇;鲁米诺储备液(100 mmol/L): 89.0 mg 鲁米诺溶于 5 mL 0.1 mol/L NaOH;发光底物缓冲液(三羟甲基氨基甲烷-盐酸, Tris-HCl, 0.1 mol/L, pH 8.8): Tris 12.114 g 加水定容至 1 L, 1 mol/L 盐酸调 pH。

2.2 仪器与设备

AVANCE 600MHz 核磁共振仪(德国 Bruker 公司);UV-1600 紫外/可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);96 孔可拆卸化学发光板(深圳金灿华实业有限公司);Infinite M200 PRD 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);DFCZW-15L 氮吹仪(杭州德克尔实验设备有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 制备半抗原 3-(4-羧基苯甲基)-氨基脒(3-(4-carboxyl benzyl)-semicarbazone, CPSEM)

称取 56.0 mg(0.5 mmol)SEM·HCl 溶于 1 mL 水中, 为 A 液; 称取 75.0 mg(0.5 mmol)4-CBA 溶于 1 mL DMF 中, 为 B 液。把 B 液逐滴加于 A 液, 室温搅拌反应 48 h, 所得混合液 4500 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 水洗得白色沉淀, 烘干且避光保存^[16]。

2.3.2 制备包被原(CPSEM-OVA)

采用活性酯法制备: 称取 4.2 mg(20 μmol)CPSEM、4.1 mg(20 μmol)DCC、2.3 mg(20 μmol)NHS 溶于 1 mL DMF, 搅拌反应 18 h, 为 A 液; 称取 9.0 mg(0.2 μmol)OVA 溶于 1 mL PBS, 为 B 液。把 B 液逐滴加入 A 液, 搅拌反应 3 h。将所得混合液用 PBS 透析 3 d, 4500 r/min 离心 10 min, 取上清液, 即得包被原 CPSEM-OVA^[17]。

2.3.3 化学发光液的配制与优化

(1) 化学发光液的配制

将鲁米诺溶液和增强剂(对碘苯酚或对甲苯酚)按体积比 1:1 配制化学发光 A 液, 化学发光 B 液为 H₂O₂ 溶液, 临用前将 A 液和 B 液按体积比 1:1 混合。用 Tris-HCl 缓冲溶液将 HRP 稀释为 5×10⁻⁶ mg/mL, 50 μL/孔加到白板中, 再加入 100 μL/孔化学发光液, 反应 2 min 后测定相对发光单位(relative light unit, RLU), 隔 3 min 测一次。选取 RLU 值较高且发光稳定的孔对应的条件为最优条件。

(2) 增强剂的选择

将对碘苯酚和对甲苯酚用乙醇溶解后, 用 Tris-HCl 缓冲溶液稀释成浓度分别为 10 和 1 mmol/L。鲁米诺溶液浓度为 5 mmol/L, 化学发光 B 液为每 10 mL Tris-HCl 缓冲溶液中加入 5 μL 30% H₂O₂ 溶液。按照 2.3.3 (1) 步骤配制化学发光液测定。

(3) 对碘苯酚浓度的选择

将对碘苯酚溶液稀释成浓度为 10、8、6、4、2、1、0.5、0.1 mmol/L 梯度溶液进行测定。

(4) 鲁米诺浓度的选择

将鲁米诺稀释成浓度为 10、8、6、4、2、1、0.5、0.1 mmol/L 梯度溶液, 对碘苯酚浓度为 8 mmol/L 进行测定。

(5) H₂O₂ 浓度的选择

向每 10 mL Tris-HCl 缓冲溶液中分别加入 0.5、1、5、10、15、20、30、50 μL 30% H₂O₂ 溶液在上述优化条件下测定。

2.3.4 SEM 间接竞争 CLEIA 法操作步骤

将用 CBS 缓冲液稀释后的包被原 CPSEM-OVA 按 100 μL/well 包被; 洗板, 加入 200 μL/well 封闭液, 37 °C 封闭 2 h, 洗板; 加入 50 μL/well NPSEM 溶液或样品溶液和 50 μL/well 单克隆抗体, 37 °C 反应, 洗板; 加入 100 μL/well HRP-IgG, 37 °C 孵育, 洗板; 加入 100 μL/well 化学发光液, 避光反应 5 min, 测 RLU 值。

2.3.5 优化间接竞争 CLEIA 法反应条件

(1) 包被原和单克隆抗体最优稀释倍数

采用棋盘法设置包被原稀释倍数设置为从 100 起始, 以 2 倍梯度稀释共 6 个梯度, 单抗稀释倍数设置为从 100 起始, 2 倍梯度稀释共 8 个梯度。按照 2.3.4 步骤测定, 2% 脱脂乳封闭, NPSEM 浓度为 100 ng/mL, 竞争反应 30 min, HRP-IgG 孵育 30 min。同时做阴性对照。由 B/B₀(B 为加 NPSEM 时 RLU 值, B₀ 为不加 NPSEM 时 RLU 值)值确定最优组合^[18]。

(2) 封闭液脱脂乳浓度

在 2.3.5 (1) 优化条件下, 将脱脂乳粉配制成 2%、1% 和 0.5%(m:V) 的溶液作为封闭液测定。NPSEM 浓度从 80 ng/mL 起, 4 倍梯度稀释共 7 个浓度, 其余同 2.3.5 (1) 步骤。绘制标准曲线, 求 IC₅₀(IC₅₀: B/B₀ 为 0.5 时相应的 NPSEM 浓度)和 RLU_{max}/IC₅₀(RLU_{max}: 最大 RLU)。以 IC₅₀ 和 RLU_{max}/IC₅₀ 作为确定最佳条件的依据^[19]。

(3) 竞争时间

在上述 2.3.5 (1) 和 (2) 确定的优化条件下, 设置标品与单克隆抗体的竞争时间为 30、60、90 min 测定。其余条件和计算指标同 2.3.5 (2)。

(4) HRP-IgG 孵育时间

在上述优化条件下, 设置 HRP-IgG 孵育时间为 30、60、90 min 测定。其余条件和计算指标同 2.3.5 (2)。

2.3.6 间接竞争 CLEIA 方法学评价

(1) 灵敏度

按照优化后的 CLEIA 法测定, NPSEM 浓度同 2.3.5 (2)。以 NPSEM 溶液浓度常用对数值为横坐标, B/B₀ 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 求灵敏度 IC₅₀ 和线性范围(IC₂₀~IC₈₀)。

(2) 特异性

将 NPSEM 结构类似物 SEM、AMAZ、AOZ、AHD 及其相应衍生物 NPAMAZ、NPAZ、NPAHD(具体名称见表 2 备注)和衍生试剂 4-CBA、2-NPA 分别配制成同 2.3.6 (1) 中 NPSEM 浓度梯度相同的浓度测定, 求交叉反应率(cross reactivity, CR)。

$$CR/\% = \frac{IC_{50}(NPSEM)}{IC_{50}(\text{结构类似物})} \times 100 \quad (1)$$

(3) 精密度

配制 0.7、1.0、1.3、1.6、1.9 ng/mL 5 个浓度 NPSEM 溶液测定, 从其线性方程中求出测定值, 计算批内和批间 CV^[20]。

$$CV/\% = \frac{\text{测定值标准偏差}}{\text{测定值平均值}} \times 100 \quad (2)$$

(4) 准确度

对空白鸡胸肉进行添加回收试验: 取 1.0 g 空白鸡肉样品进行均质, 并加入 3 mL 超纯水, 加入 1 mL SEM 标品溶液, 使其终浓度为 0.5、1.0 和 1.5 ng/g, 其余样品前处理

步骤参照我国出入境检验检疫行业标准^[21]。

3 结果与分析

3.1 鉴定半抗原 CPSEM

对半抗原 CPSEM 的核磁共振 ¹H-NMR 图谱分析如下:

¹H NMR (600 Hz, DMSO-*d*₆) δ 13.02 (s, 1H), 10.44 (s, 1H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.89 (s, 1H), 7.85 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 6.59 (s, 2H); 其中, 7.89 (s, 1H) 表明半抗原 CPSEM 合成。

3.2 鉴定包被原 CPSEM-OVA

参考文献^[22,23]对 CPSEM、OVA 及 CPSEM-OVA 紫外扫描如图 1。CPSEM、OVA、CPSEM-OVA 的特征吸收波长分别为 295、279 和 293 nm, CPSEM-OVA 的特征吸收峰与 CPSEM、OVA 比较发生明显偏移, 初步说明包被原 CPSEM-OVA 合成。

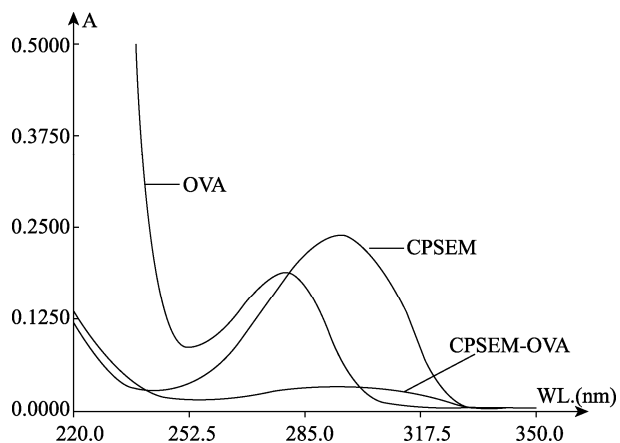


图 1 CPSEM、OVA 和 CPSEM-OVA 的紫外扫描图
Fig. 1 UV spectrum of CPSEM, OVA and CPSEM-OVA

3.3 化学发光液的优化

3.3.1 增强剂的确定

由图 2 可知当对碘苯酚和对甲苯酚浓度均为 10 mmol/L 或均为 1 mmol/L 时, 对碘苯酚的 RLU 值 (纵坐标值为双轴图主坐标轴一侧, 即左侧) 均显著高于对甲苯酚和无增强剂 (纵坐标值为双轴图次坐标轴一侧, 即右侧), 且前者的发光值较为稳定, 故选增强剂为对碘苯酚。

3.3.2 对碘苯酚浓度的确定

由图 3 可知, 当对碘苯酚浓度为 10 mmol/L 和 8 mmol/L 时 RLU 值随时间推移先增大后减小, 且二者下降的趋势较平缓, 同时 8 mmol/L 时的 RLU 值总是高于 10 mmol/L。在其他浓度下 RLU 值都随时间的延长呈下降趋势, 且随对碘苯酚浓度的减小, 降低趋势更明显, 当 0.5 mmol/L 和 0.1 mmol/L 时, RLU 值的降低趋势减慢。故选择发光稳定且发光值较大的 8 mmol/L 浓度作为最优对碘苯酚浓度。

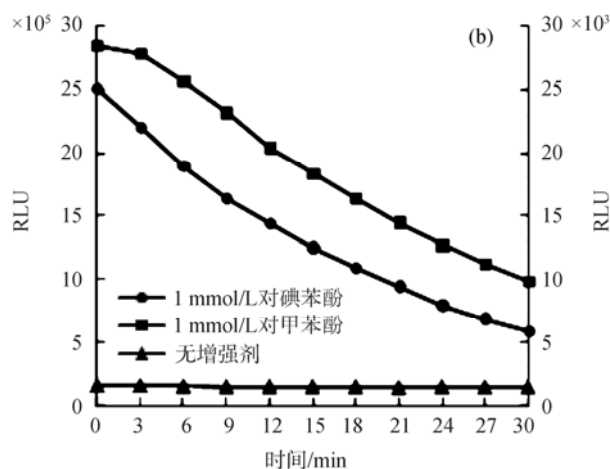
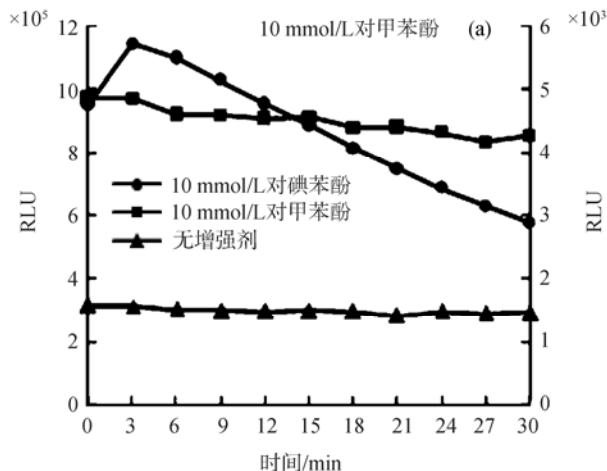


图 2 增强剂对 RLU 值的影响

Fig. 2 Effects of enhancer on RLU
(a: 10 mmol/L 对碘苯酚和对甲苯酚, b: 1 mmol/L 对碘苯酚和对甲苯酚)

3.3.3 鲁米诺浓度的确定

由图 4 可知, 不同鲁米诺浓度下 RLU 值都随时间推移呈下降趋势; 鲁米诺浓度为 10、8 和 6 mmol/L 时, RLU 值都较高且为 10 mmol/L 时 RLU 值随时间下降的趋势最为平缓, 说明在满足 RLU 值尽可能高的同时发光也较为稳定, 故选鲁米诺浓度为 10 mmol/L。

3.3.4 H₂O₂ 浓度的确定

由图 5 可知, 每 10 mL Tris-HCl 缓冲溶液中分别加入 5、1、0.5 μL 30% H₂O₂ 溶液作为化学发光 B 液配制化学发光液进行测定, RLU 值随时间推移出现小幅度上升后下降的趋势, 加入其他体积 H₂O₂ 溶液测得的 RLU 值均随时间而下降。当选择 5 μL 这一体积的 30% H₂O₂ 溶液时, 在各时间点测得的 RLU 值均是最大且发光值稳定, 故选择化学发光 B 液为每 10 mL Tris-HCl 缓冲溶液中加 5 μL 30% H₂O₂ 溶液。同时观察图中 5 μL 30% H₂O₂ 这一发光值曲线可知, 在第一次间隔 3 min 时测得的 RLU 值最高, 加

上 2.3.3 (1)中说明的发光液加入体系后的反应时间 2 min, 即确定加入化学发光液后反应时间为 5 min 时, RLU 值最大, 故选择化学发光液反应时间为 5 min。

3.4 CLEIA 最优反应条件的确定

3.4.1 包被原和单克隆抗体最佳稀释倍数

包被原和单克隆抗体不同稀释倍数下 B/B_0 值结果见

表 1。考虑单克隆抗体成本高, 选择包被原和单克隆抗体稀释倍数均为 800, 此时 B/B_0 值为最小, 即 0.0140。 B/B_0 值的差异也表明成功合成包被原 CPSEM-OVA。

3.4.2 封闭液

由图 6 知, 当脱脂乳浓度为 1% 时, IC_{50} 最小且 RLU_{max}/IC_{50} 最大, 故选封闭液浓度为 1%。

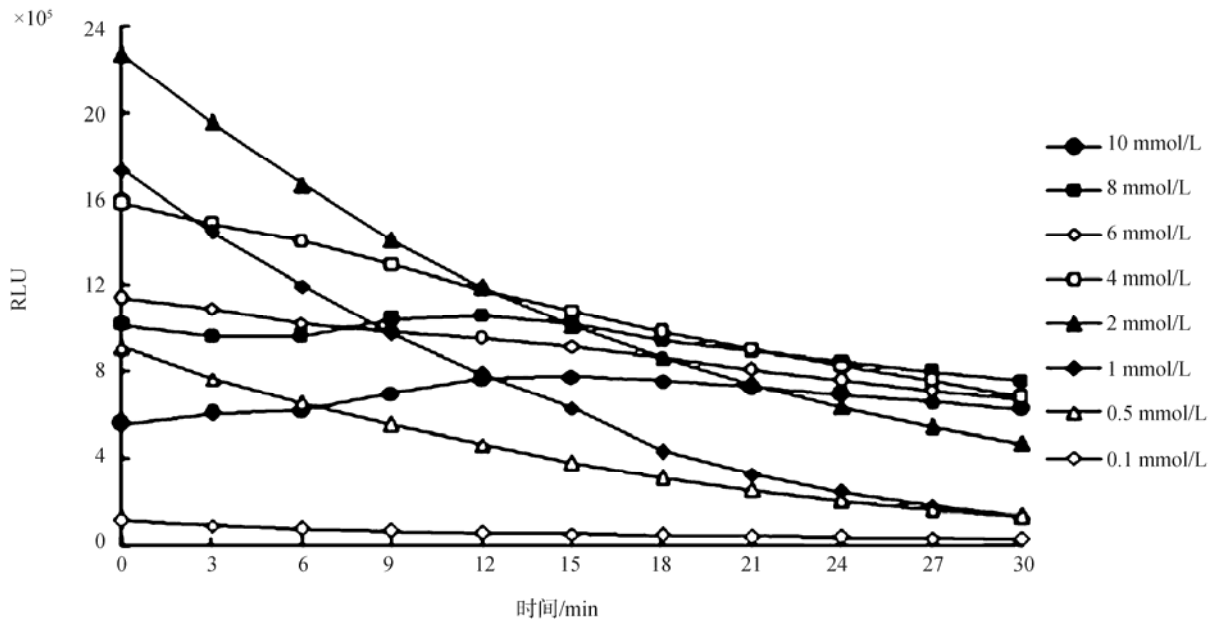


图 3 对碘苯酚浓度对 RLU 值的影响

Fig. 3 The effect of 4-iodophenol concentration on RLU

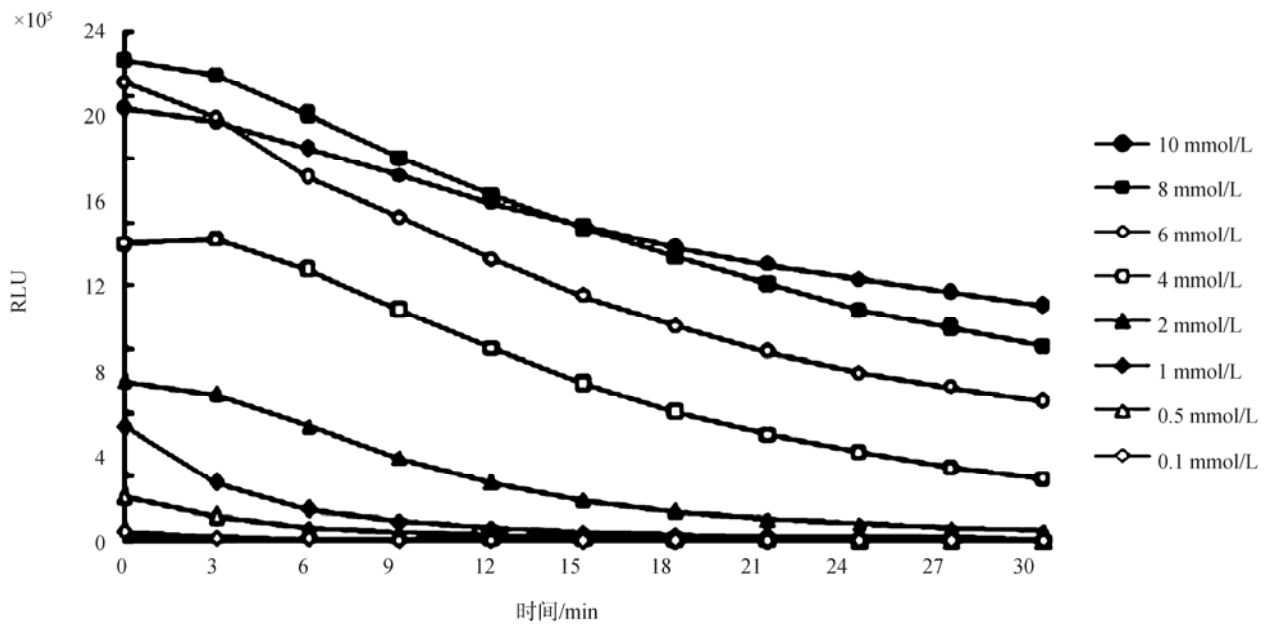


图 4 鲁米诺浓度对 RLU 值的影响

Fig. 4 The effect of luminol concentration on RLU

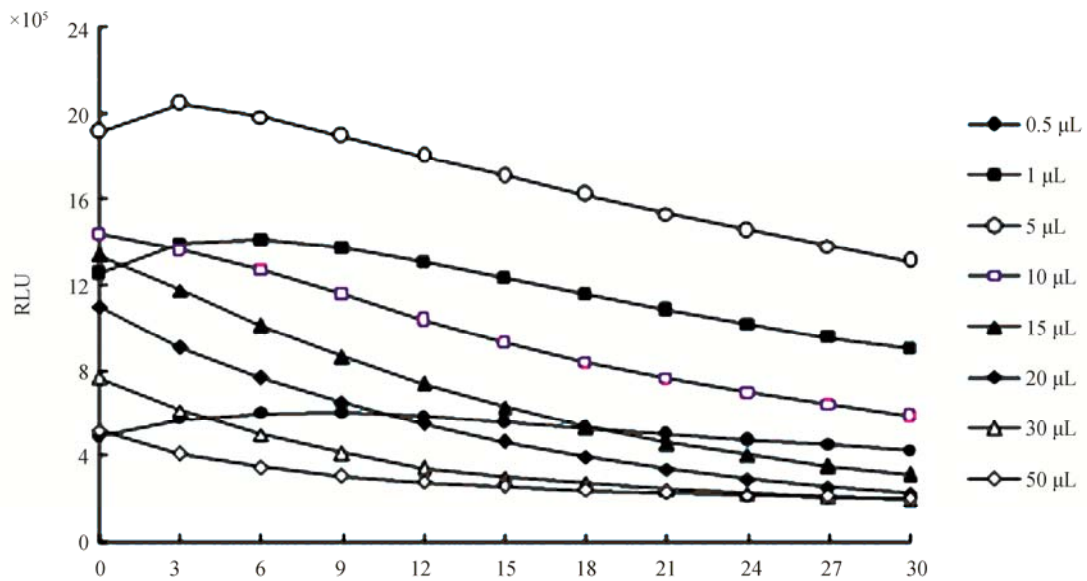


图 5 H₂O₂ 浓度对 RLU 值的影响
Fig. 5 The effect of H₂O₂ concentration on RLU

表 1 不同包被原和单抗稀释倍数下 B/B₀ 值
Table 1 B/B₀ values of different dilution of coating antigen and monoclonal antibody

单抗稀释倍数	包被原稀释倍数					
	100	200	400	800	1600	3200
100	0.4303±0.0670	0.2476±0.0222	0.1306±0.0420	0.0493±0.0046	0.0274±0.0006	0.0213±0.0041
200	0.1441±0.0339	0.0628±0.0058	0.0324±0.0075	0.0192±0.0016	0.0158±0.0010	0.0188±0.0046
400	0.0652±0.0072	0.0306±0.0049	0.0196±0.0035	0.0179±0.0054	0.0140±0.0003	0.0207±0.0018
800	0.0366±0.0085	0.0212±0.0038	0.0158±0.0040	0.0140±0.0031	0.0174±0.0023	0.0295±0.0035
1600	0.0311±0.0057	0.0211±0.0028	0.0188±0.0016	0.0190±0.0073	0.0302±0.0065	0.0536±0.0006
3200	0.0387±0.0031	0.0295±0.0056	0.0275±0.0011	0.0324±0.0063	0.0649±0.0046	0.1077±0.0301
6400	0.0697±0.0104	0.0534±0.0085	0.0584±0.0043	0.0749±0.0250	0.1203±0.0027	0.2001±0.0091
12800	0.1793±0.0032	0.1531±0.0014	0.1298±0.0140	0.1582±0.0335	0.2813±0.0501	0.3372±0.0204

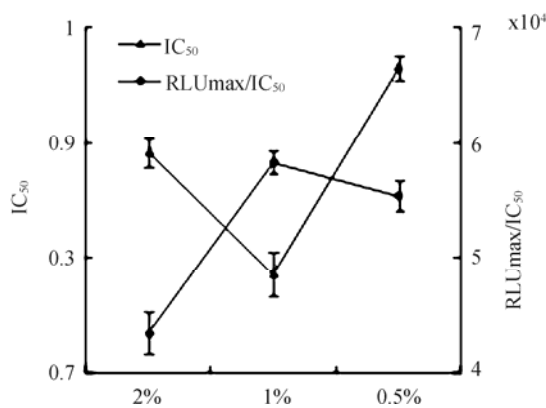


图 6 CLEIA 法封闭液优化
Fig. 6 Optimization of blocking solution for CLEIA

3.4.3 竞争时间

由图 7 知, 当竞争时间为 30 min 时, IC₅₀ 最小且 RLU_{max}/IC₅₀ 最大, 选选竞争时间为 30 min。

3.4.4 HRP-IgG 孵育时间

由图 8 知, 当孵育时间为 60 min 时, IC₅₀ 最小且 RLU_{max}/IC₅₀ 最大。故选 HRP-IgG 孵育时间为 60 min。

3.5 间接竞争 CLEIA 方法评价

3.5.1 灵敏度

本研究建立的间接竞争 CLEIA 法的标准曲线见图 9。CLEIA 法线性方程为 $Y = -0.4654X + 0.3768 (r^2 = 0.993)$, IC₅₀ 为 0.544 ng/mL, 线性范围为 0.123~2.398 ng/mL; 与我国农业部 781 号公告^[24]和国家标准^[25,26]中的液相色谱-串联质谱法检测硝基呋喃类代谢物残留的检出限 0.5 μg/kg 相当, 可

见间接竞争 CLEIA 法的灵敏度可满足快速筛查的要求。

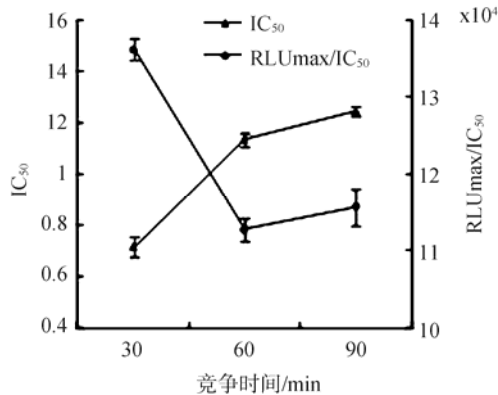


图 7 CLEIA 法竞争时间优化

Fig. 7 Optimization of competitive reaction time for CLEIA

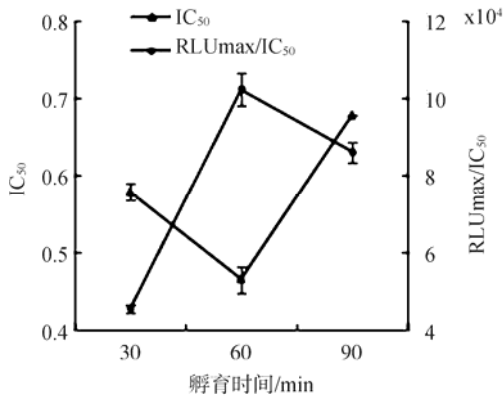


图 8 CLEIA 法 HRP-IgG 孵育时间优化

Fig. 8 Optimization of incubating time of HRP-IgG for CLEIA

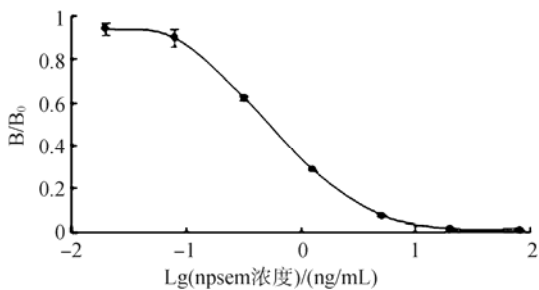


图 9 SEM CLEIA 法标准曲线

Fig. 9 Standard curve of SEM by CLEIA

3.5.2 特异性

NPSEM 的其他结构类似物及衍生试剂各自不同浓度下对应的 B/B_0 基本相同, 即各自标准曲线的纵坐标值随浓度变化幅度小。由表 2 知, 建立的 CLEIA 法与其他结构类似物及衍生试剂的 CR 都小于 0.1%, 说明 SEM 单克隆抗体的特异性好, 检测中不易出现交叉反应。

表 2 特异性测定结果($n=3$)

Table 2 Determination results of specificity ($n=3$)

竞争物	CLEIA	
	IC ₅₀ /(ng/mL)	CR/(%)
NPSEM	0.620±0.027	100
SEM	>1000	<0.1
AOZ	>1000	<0.1
AMOZ	>1000	<0.1
AHD	>1000	<0.1
NPAOZ	>1000	<0.1
NPAMOZ	>1000	<0.1
NPAHD	>1000	<0.1
4-CBA	>1000	<0.1
2-NPA	>1000	<0.1

注: (1) AOZ (3-氨基-2-恶唑烷酮, 3-amino-2-oxazolidinone); (2) AMOZ (5-甲基吗啉-3-氨基-2-恶唑烷酮, 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone); (3) AHD (1-氨基-乙内酰胺, 1-amino-hydantoin); (4) NPAOZ (3-(2-硝基苯亚甲基)-氨基-2-恶唑烷酮, 3-[(2-nitro-benzylidene)-amino]-2-oxazolidone); (5) NPAMOZ (5-(4-吗啉基)-3-(2-硝基苯亚甲基)-氨基-2-恶唑烷酮, 5-(4-morpholinomethyl)-3-[(2-nitrophenyl)-methylene]amino-2-oxazolidinone); (6) NPAHD (1-(2-硝基苯亚甲基)-氨基乙内酰胺, 1-[(2-nitro-benzylidene)-amino]-imidazolidin-2,4-dione)

3.5.3 精密度

由表 3 知, CLEIA 批内和批间 CV 分别为 1.9%~4.1% 和 2.8%~5.3%, 一般酶免疫法的批内 CV 小于 10%, 批间 CV 小于 15% 时可认为精密度较好^[20], 因此该法具有较好的精密度。

表 3 精密度测定结果($n=5$)

Table 3 Results for precision ($n=5$)

NPSEM/(ng/mL)	CLEIA	
	批内 CV/%	批间 CV/%
0.7	3.1	4.2
1.0	1.9	2.8
1.3	4.1	5.3
1.6	3.5	4.3
1.9	2.9	4.5

3.5.4 准确度

由表 4 知, 间接竞争 CLEIA 回收率为 89.6%~98.0%, 满足一般酶免疫试验的回收率需在 90%~105% 范围内的要求^[20], 表明该 CLEIA 法有较高的准确度。

表 4 准确度测定结果($n=3$)
Table 4 Results of accuracy ($n=3$)

添加浓度/(ng/g)	CLEIA	
	平均回收率/%	CV/%
0.5	94.6	5.9
1.0	98.0	9.5
1.5	89.6	3.0

4 讨论

本研究建立的 CLEIA 法检测 SEM 的灵敏度为 0.544 ng/mL, 和国家标准^[25,26]中的液相色谱-串联质谱法的检出限相当, 同时与闫叶娜^[27]和李军平^[17]分别建立的间接竞争 ELISA 法检测呋喃西林代谢物的灵敏度 2.19 ng/mL 和 62.5 ng/mL 相比表现出更高的灵敏度; 同时对鸡肉的加标回收率也符合常规检测要求的 90%~105%区间^[20], 说明该法具有较高的准确度。因此本研究建立的基于实验室快速定量检测的化学发光酶免疫法检测 SEM 能满足大批量动物源食品中 SEM 的快速筛查, 同时为目前市场上针对不同硝基呋喃类代谢物检测的单一酶免疫试剂盒的标准化和准确化研制奠定了一定的实验基础。但对于实现同时检测不同硝基呋喃类药物的酶免疫试剂盒及相关检测卡或试纸条产品, 仍需在已有理论与实验基础上进一步研究与开发。

参考文献

- [1] Ni YN, Wang PP, Kokot S. Voltammetric investigation of DNA damage induced by nitrofurazone and short-lived nitro-radicals with the use of an electrochemical DNA biosensor [J]. *Biosens Bioelect*, 2012, 38: 245–251.
- [2] Samsonova JV, Douglas AJ, Cooper KM, *et al.* The identification of potential alternative biomarkers of nitrofurazone abuse in animal derived food products [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46: 1548–1554.
- [3] McCracken RJ, Spence DE, Floyd SD, *et al.* Evaluation of the residues of furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolinone(AOZ) in egg [J]. *Food Addit Contam*, 2001, 18(11): 954–959.
- [4] 王群, 马兵, 吕海燕, 等. 食品中硝基呋喃类及其代谢物对人体健康的安全性评价[J]. *中国渔业质量与标准*, 2013, 3(2): 4–10.
Wang Q, Ma B, Lv HY, *et al.* Safety evaluation of nitrofurans and its metabolites for human health [J]. *Chin Fish Qual Stand*, 2013, 3(2): 4–10.
- [5] 戴欣, 李改娟. 水产品中硝基呋喃类药物残留的危害、影响以及控制措施[J]. *吉林水利*, 2011, (9): 61–62.
Dai X, Li GJ. The hazards, affects and control measures for nitrofurans residues in aquatic products [J]. *Jilin Water Resour*, 2011, (9): 61–62.
- [6] 生威, 李季, 许艇. 动物性产品中硝基呋喃类抗生素残留检测方法研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(Z1): 429–434.
Sheng W, Li J, Xu T. Advances of detection for residues of nitrofurans and analogues in foods derived from animals [J]. *J Agro-Environ Sci*, 2006, 25: 429–434.

- [7] 农业部第 235 号公告-12-2002 动物性食品中兽药最高残留限量[S].
The Ministry of Agriculture Announcement No.235-12-2002 The maximum residue limit of veterinary drugs in animal foods [S].
- [8] 食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第 1-5 批汇总)[EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7892/201406/38e5c8a53615486888d93ed05ac9731a.shtml>. 2011-4-22.
The list of possible illegally added unedible substance and abusive food additives in food (first-fifth batches summary)[EB/OL]. <http://www.nhfpc.gov.cn/sps/s7892/201406/38e5c8a53615486888d93ed05ac9731a.shtml>. 2011-4-22.
- [9] 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, (6): 149–153.
She YX, Li BH, Cao WQ, *et al.* Progress on the determination methods for nitrofurans antibiotics and their metabolites residues in animal foods [J]. *Mod Sci Instrum*, 2010, (6): 149–153.
- [10] 李芳, 陈莹, 李献刚, 等. 动物源性食品中硝基呋喃及其代谢物检测研究方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(6): 2320–2327.
Li F, Chen Y, Li XG, *et al.* Progress on determination of nitrofurans and their metabolites in animal-derived food [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(6): 2320–2327.
- [11] 魏法山, 盖圣美, 谢文佳, 等. 动物源性食品中硝基呋喃类兽药残留检测方法的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(6): 2289–2295.
Wei FS, Gai SM, Xie WJ, *et al.* Research progress on nitrofurans residues detection methods in animal derived foods [J]. *J Food Saf Qual*, 2016, 7(6): 2289–2295.
- [12] Verdon E, Couedor P, Sanders P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaldone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry—In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 586: 336–347.
- [13] 赵正苗, 罗晓琴, 汪善良, 等. 应用胶体金免疫层析法检测动物组织中呋喃西林代谢物的残留[J]. *上海畜牧兽医通讯*, 2012, (5): 4–5.
Zhao ZM, Luo XQ, Wang SL, *et al.* Detection of nitrofurazone metabolite residues in animal tissue by colloidal gold immunochromatographic assay [J]. *Shanghai J Anim Husband Vet Med*, 2012, (5): 4–5.
- [14] 萨仁托雅, 张峰, 郑有虎, 等. 化学发光免疫分析与酶联免疫分析法检测水产品药物残留的比较研究[J]. *大连海洋大学学报*, 2014, 29(5): 486–490.
Sa RTN, Zhang F, Zheng YH, *et al.* Comparison research of CLEIA and ELISA in the detection of aquatic products' medicine residue [J]. *J Dalian Ocean Univ*, 2014, 29(5): 486–490.
- [15] 戴尽波, 徐振林, 刘凤银, 等. 化学发光酶免疫分析测定鱼肉中呋喃它酮代谢物方法研究[J]. *分析化学*, 2015, 43(6): 871–875.
Dai JB, Xu ZL, Liu FY, *et al.* Method research of the detection of furaldone metabolite in fish by chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. *Chin J Anal Chem*, 2015, 43(6): 871–875.
- [16] 郑丽丽. 呋喃它酮和呋喃妥因酶联免疫检测方法的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2013.
Zheng LL. Study of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection

- of furaltadone and furantoin [D]. Tianjin: Tianjin University of Science and Technology, 2013.
- [17] 李敏. 动物性食品中呋喃唑酮代谢物残留酶联免疫检测方法研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2012.
- Li M. Research on enzyme linked immunosorbent assay for rapid analysis of furazolidone metabolite residues in animal food [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2012.
- [18] 杨武英, 董洁娟, 沈玉栋, 等. 虾肉中呋喃唑酮代谢物化学发光酶免疫分析方法的建立[J]. 分析化学, 2012, 40(12): 1816-1821.
- Yang WY, Dong JX, Shen YD, *et al.* The establishment of chemiluminescence enzyme immunoassay of furaltadone metabolite in lobster [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(12): 1816-1821.
- [19] 孙文佳, 沈玉栋, 孙远明, 等. 化学发光酶免疫法检测猪肉中氯丙嗪残留[J]. 分析化学, 2012, 40(9): 1397-1402.
- Sun WJ, Shen YD, Sun YM, *et al.* The detection of chlorpromazine residues in pork by chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(9): 1397-1402.
- [20] 王硕, 张鸿雁, 王俊平. 酶联免疫吸附分析方法-基本原理及其在食品中化学污染物检测应用[M]. 北京: 科学出版社, 2011.
- Wang S, Zhang HY, Wang JP. Enzyme linked immunosorbent assay-basic principles and its application in the detection of chemical contaminants in foods [M]. Beijing: Science Press, 2011.
- [21] SN/T 3380 - 2012 出口动物源食品中硝基呋喃代谢物残留量的测定酶联免疫吸附法[S].
- SN/T 3380 - 2012 Determination of residues of nitrofurans metabolites foodstuffs of animal origin for export-ELISA method [S]
- [22] 李军平. 抗呋喃西林代谢物衍生物单克隆抗体的研制及其 ELISA 检测方法的建立[D]. 扬州: 扬州大学, 2008.
- Li JP. Development of monoclonal antibody against derivant of nitrofurans' metabolite and establishment of its ELISA detection [D]. Yangzhou: Yangzhou University, 2008.
- [23] 贾慧勤, 丁焕中. 呋喃唑酮代谢物人工抗原的合成及抗体的制备[J]. 中国兽药杂志, 2013, 47(6): 20-23.
- Jia HQ, Ding HZ. Synthesis of artificial antigens and preparation of specific antisera against 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of furazolidone [J]. Chin J Vet Med, 2013, 47(6): 20-23.
- [24] 农业部第 781 号公告-4-2006 动物源食品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定 高效液相色谱-串联质谱法[S].
- The Ministry of Agriculture Announcement No.781-4-2006 Determination of nitrofurans metabolites in animal derived food by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [S].
- [25] GB/T20752-2006 猪肉、牛肉、鸡肉、猪肝和水产品中硝基呋喃类代谢物残留量的测定: 液相色谱-串联质谱法[S].
- GB/T20752-2006 Method for the determination residues of the metabolites of nitrofurans in pork, beef, chicken, porcine liver and aquatic products-LC-MS-MS method [S].
- [26] 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[S].
- GB/T 21311-2007 Determination of residues of nitrofurans metabolites in foodstuffs of animal origin-HPLC-MS/MS method [S].
- [27] 闫叶娜. 呋喃西林代谢物单克隆抗体的制备及其免疫分析方法的建立 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- Yan YN. Preparation of monoclonal antibody for nitrofurazone and development of its immunity analysis [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010.

(责任编辑: 姚 菲)

作者简介



黄登宇, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为食品卫生检测。
E-mail: Huanggy1110@126.com



杨秀松, 硕士, 副教授, 主要研究方向为食品科学与食品安全。
E-mail: yxs@cfdaied.org