

测定食品中呋喃它酮代谢物 3-氨基-5-吗啉 甲基-2-恶唑烷酮的酶联免疫吸附法

宋娟^{1,2}, 王玉珍¹, 邓安平^{1,*}

(1. 苏州大学材料与化学化工学部, 苏州 215123;

2. 成都市食品药品检验中心, 成都 610045)

摘要: **目的** 建立以多克隆抗体为基础的测定食品中呋喃它酮代谢物 3-氨基-5-吗啉甲基-2-恶唑烷酮 (AMOZ) 的间接竞争酶联免疫吸附分析法 (ELISA)。 **方法** 以 4-甲酰基苯氧基乙酸 (4-FPA) 为修饰剂, 合成 AMOZ 半抗原衍生物, 并使其分别与牛血清蛋白 (BSA) 和卵清蛋白 (OVA) 交联制备得到免疫原和包被抗原, 经免疫动物 (兔), 获得抗 NPAMOZ (AMOZ 与衍生化试剂 2-硝基苯甲醛所形成的结合物) 的多克隆抗体。用酶联免疫分析法测定 AMOZ (以 NPAMOZ 形式)。 **结果** 在包被抗原为 2.5 ng/mL, 抗体为 1 : 300 000 稀释, 酶标二抗为 1 : 10000 稀释的优化条件下, ELISA 测定 AMOZ (以 NPAMOZ 形式) 的 IC_{50} 值 (标准曲线中吸光度抑制至最大吸光度值 50% 时所对应的待测物浓度) 为 1.86 ng/mL。抗体与呋喃它酮的交叉反应率较高 (70.7%), 与 AMOZ 的交叉反应率仅为 0.32%, 与其余三种硝基呋喃抗生素及它们的代谢物以及其它八种药物的交叉反应率很小 (<0.01%), 表明抗体的特异性高。四种市售的肉样 (鱼肉、虾肉、鸡肉、猪肝) 用作加标实验, 加标浓度分别为 0.5、1.0 和 5.0 ng/g, 加标样品经衍生化处理后用 ELISA 测定, 回收率为 75.6%~112.2%, 批间相对标准偏差 (RSD) 为 8.3%~17.5%。 **结论** 本法具有高灵敏性和高特异性, 能用于动物产品中 AMOZ 的检测。 **关键词:** 硝基呋喃; 呋喃它酮; 5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷酮; 多克隆抗体; 酶联免疫吸附分析法

Detection of furaltadone metabolite in food samples by an enzyme-linked immunosorbent assay

SONG Juan^{1,2}, WANG Yu-Zhen¹, DENG An-Ping^{1,*}

(1. College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Soochow University, Suzhou 215123, China; 2. Chengdu Center for Food and Drug Control, Chengdu, 610045)

ABSTRACT: Objective To establish a polyclonal antibody based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of furaltadone metabolite (3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, AMOZ) in food samples. **Methods** With 4-formylphenoxy acetic acid (4-FPA) as a derivative reagent, carboxyphenyl AMOZ derivative (CPAMOZ) containing a carboxylic group at the end of the spacer was synthesized, which was then coupled to carrier proteins (bovine serum albumin or ovalbumin) for the production of immunogen and coating antigen. After immunizing animal (rabbit), polyclonal antibody against NPAMOZ (AMOZ nitrophenyl derivative) was produced. AMOZ (in the form of NPAMOZ) was detected by ELISA. **Results** Under optimal experimental conditions, e.g. coating antigen at 2.5 ng/mL, antibody diluted

基金项目: 国家自然科学基金项目 (2115097)

*通讯作者: 邓安平, 男, 博士、教授、博士生导师, 研究方向为食品和环境免疫分析。Email: danganping@suda.edu.cn, danganping6119@yahoo.com.cn

at 1 : 300,000, enzyme labeled second antibody diluted at 1 : 10,000, the sensitivity of the ELISA expressed by IC_{50} value (e.g. the analyte concentration at 50% inhibition of maximum signal) was found to be 1.86 ng/mL. The cross-reactivity (CR) of the antibody with furaltadone was 70.7%, while CR with AMOZ was only 0.32% and there was almost no CR with other three nitrofurans and their metabolites, as well as other eight tested drugs, indicating a high selectivity of the antibody. Four food samples, e.g. fish (carp), shrimp, chicken muscle and swine liver were spiked with AMOZ at the concentration of 0.5, 1.0 and 5.0 ng/g. After derivatization, the formed NPAMOZ was analyzed by the proposed ELISA. The recovery and the relative standard deviation of the ELISA for spiked samples were found within 75.6%~112.2% and 8.3%~17.5%, respectively. **Conclusion** The method is sensitive and specific, and can be used for AMOZ detection in animal foods.

KEY WORDS: nitrofurans; furaltadone; 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone; polyclonal antibody; immunosorbent assay

1 引言

呋喃它酮属于硝基呋喃类的一种,为广谱抗生素,曾被广泛应用于家畜、家禽的痢疾、肠炎、球虫病的预防和治疗^[1]。但研究表明^[2],该药物及其代谢物(5-吗啉甲基-3-氨基-2-恶唑烷酮,AMOZ)具有严重的致癌等毒副作用。近十多年来世界各国陆续禁用该药物并限定了残留标准。呋喃它酮对光敏感,具有代谢快速的特点,在动物体内的半衰期不过数小时,通常不太可能检出原药残留^[3,4],然而其代谢产物AMOZ由于与蛋白结合可在体内稳定存在。因此,目前国内外报道多见于检测呋喃它酮的代谢物AMOZ,并通过检测AMOZ的含量判断是否存在违规使用呋喃它酮。

AMOZ通常用高效液相色谱(HPLC)^[5-7]、液相色谱-质谱(LC-MS)^[4]、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)^[8-10]等分析方法进行检测。样品在酸性条件下水解,释放出AMOZ,然后用衍生化试剂(如2-硝基苯甲醛)进行衍生化,所形成的NPAMOZ经提取和进一步净化后用紫外或质谱检测器检测。但色谱法仪器昂贵,样品预处理复杂、检测成本高。为了加强食品监督,保护消费者的健康,迫切需要建立快速、简便、价廉的分析方法,以便及早检测出食品中存在的AMOZ。

酶联免疫吸附分析方法(ELISA)是在抗原与抗体之间特异性反应基础上建立的分析方法,具有灵敏度高、特异性强、样品处理简便、分析快速、高通量等特点,已广泛用于食品和环境中有毒有害物的检测^[11-14]。然而目前ELISA用于AMOZ检测的报道较少。Palaga等^[15]以3-羧基苯甲醛修饰AMOZ制备免

疫原,建立了以单抗为基础的测定AMOZ(以NPAMOZ形式)的ELISA,Wang等^[16]以通过直接修饰呋喃它酮制备免疫原,建立直接检测AMOZ的ELISA。本文以4-甲酰基苯氧基乙酸(4-FPA)修饰AMOZ制备免疫原,经动物免疫,制得抗NPAMOZ的多克隆抗体,建立了测定AMOZ(以NPAMOZ形式)的酶联免疫分析法,并用于动物食品中的AMOZ的测定。

2 材料与方法

2.1 实验试剂及仪器

AMOZ,呋喃它酮(Witega);4-甲酰基苯氧基乙酸(ABCR GmbH & Co. KG);牛血清白蛋白(BSA),卵清蛋白(OVA),二环己基碳二亚胺(DCC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),辣根过氧化物酶-山羊抗兔IgG偶合物(HRP-GaRIgG)为Sigma产品。其他试剂为分析纯。

电子天平及pH计(北京赛多利斯系统有限公司);洗板机及酶标仪(澳大利亚Tecan公司);恒温磁力搅拌器(江苏康健医疗用品有限公司);微量振荡器(上海司乐仪器厂);电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);超声波清洗器(昆山市超声波仪器有限公司);离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2.2 AMOZ衍生物及免疫原的合成

AMOZ衍生物的合成如图1所示。称取4-甲酰基苯氧基乙酸(4-FPA) 0.075 mmol加入反应瓶,用无水甲醇溶解,再加入AMOZ 0.05 mmol,溶解完全后,65℃氮气保护下反应12 h。取出,将反应液离心(5000 r/min),弃去上层清液,沉淀用冰无水乙醇洗涤三次后,得白色沉淀即为AMOZ衍生物(CPAMOZ)。

AMOZ 衍生物上的羧基用 DCC/NHS 活化酯法活化^[12], 与载体蛋白(牛血清白蛋白 BSA 或卵清蛋白

OVA)交联生成 CPAMOZ-载体蛋白结合物, 其中 CPAMOZ-BSA 为免疫原, CPAMOZ-OVA 为包被抗原。

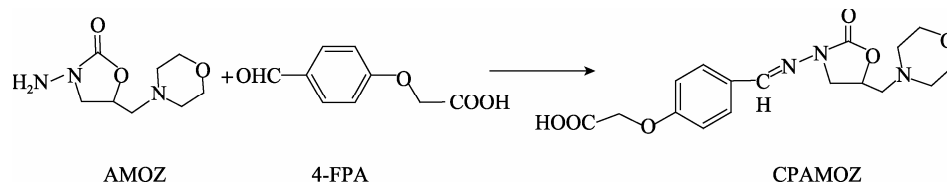


图 1 AMOZ 衍生物(CPAMOZ)的合成

Fig. 1 Synthesis of AMOZ derivative (CPAMOZ)

2.3 多克隆抗体的制备

免疫动物为体重 1.5 kg 左右, 4 个月大的雄性新西兰大白兔(苏州大学动物中心提供)。饲养观察一周, 确定兔子无异样后, 以 CPAMOZ-BSA 为免疫原, 背部多点皮下注射免疫。以 CPAMOZ-BSA : 福氏完全佐剂(体积比 1 : 1)混合液进行第 1 次免疫, 剂量为每只动物 1.0 mg CPAMOZ-BSA。首次免疫 21 天后, 以 CPAMOZ-BSA : 福氏不完全佐剂(1 : 1)混合液进行第二次免疫注射。第 3~5 次免疫注射液与第 2 次相同, 免疫注射间隔 2~3 周。第 5 次免疫 10 天后, 进行动脉取血。血液于 4 °C 冰箱过夜, 离心(5000 r/min), 取上清液, 即为兔抗 NPAMOZ 多克隆抗体。

2.4 间接酶联免疫分析方法的建立

加入一定浓度的包被抗原(CPAMOZ-OVA)于 96 孔酶标板中, 200 μ L/孔, 4 °C 过夜; 用含吐温-20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗板三次; 加入用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释的 1% 酪蛋白, 280 μ L/孔, 室温孵育 1 h; 用 PBST 洗板三次; 依次加入 NPAMOZ 标准溶液(浓度范围为 0~100 ng/mL)或样品和一定浓度的抗体各 100 μ L/孔, 室温孵育 1 h; 用 PBST 洗板三次; 加入 PBS 稀释的酶标二抗(HRP-GaRIgG), 200 μ L/孔, 室温孵育 1 h; 用 PBST 洗板三次; 加入底物溶液即四甲基联苯胺(TMB)/H₂O₂ 混合液(临用新配), 200 μ L/孔, 室温避光反应, 在微量振荡器上振摇约 15 分钟; 显色后, 加入 5% H₂SO₄(V/V)终止液, 80 μ L/孔, 终止酶反应; 用酶标仪测定吸光度(A), 以 B/B₀-logC 作图得到测定 NPAMOZ 的标准曲线(B 和 B₀ 分别为标准浓度及 0 浓度所对应的吸光度)。

2.5 加标回收实验

市售四种肉样(鱼肉、虾肉、鸡肉、猪肝)用于加标实验。具体步骤如下^[12]: 取 20 g 左右样品, 经均质

匀浆后, 精确称取 1.00 g 样品, 加入不同量的 AMOZ(最终加标浓度分别为 0.5、1、5 ng/g), 然后分别加入 4.0 mL H₂O、0.5 mL 1.0 mol/L 盐酸溶液和 100 μ L 10 mmol/L 2-硝基苯甲醛, 旋涡混合 1~2 分钟, 37 °C 振荡孵育 16 h 后, 分别加入 5.0 mL 0.1 mol/L K₂HPO₄、0.4 mL 1.0 mol/L NaOH 和 5.0 mL 乙酸乙酯, 剧烈振荡 30 s, 室温下 5000 r/min 离心 10 min, 再用乙酸乙酯提取 2 次, 合并乙酸乙酯层, 氮气吹干, 用 1.0 mL 正己烷溶解干燥物, 加入 1.0 mL 磷酸缓冲液(pH=7.2), 室温下 3000 r/min 离心 10 min, 取 50 μ L 下层液体, 用 PBS 缓冲液稀释后直接用于 ELISA 测定。

3 结果与讨论

3.1 AMOZ 衍生物及免疫原的合成

本研究以 4-甲酰苯氧基乙酸(4-FPA)为衍生化试剂与 AMOZ 反应, 使生成的 AMOZ 衍生物(CPAMOZ)带有含 2 个原子的连接臂, 且在连接臂末端带有羧基。CPAMOZ 的结构由 ¹HNMR 谱图得到确认。¹HNMR 谱图数据为: (DMSO, δ vs TMS): 12.934 (s, 1H); 6.999-7.666 (t, 4H); 7.796 (s, 1H); 4.914 (s, 2H); 4.735 (s, 2H)。以上数据表明 CPAMOZ 的制备是成功的。

将 CPAMOZ 末端的羧基活化, 使 CPAMOZ 与载体蛋白交联, 制备免疫原和包被抗原。与文献报道的免疫原相比^[15], 本研究的免疫原, 由于在 CPAMOZ 和载体蛋白之间有含 2 个原子的连接臂, 使 CPAMOZ 能充分暴露于动物的免疫系统, 刺激动物产生更灵敏、更特异的抗体。

3.2 实验条件的优化

为了提高检测的灵敏度, 实验条件如包被抗原的浓度、抗体的浓度(或稀释度)、酶标二抗的浓度(或稀释度)、封闭液的种类和浓度、免疫反应时间和温度等都应优化。根据棋盘实验, 本研究筛选出的最佳

条件是:包被抗原浓度为 2.5 ng/mL; 抗体稀释度为 1 : 300,000; 酶标二抗(HRP-GaRIgG)为 1 : 10,000; 封闭液为 1% 酪蛋白; 孵育条件为室温 1 h; 显色时间为 15 min。

3.3 ELISA方法灵敏度

ELISA 的灵敏度可用 IC_{50} 值表示, IC_{50} 值越小, 灵敏度越高。在最佳优化实验条件下, 以 NPAMOZ 为目标物, 考察了 ELISA 的灵敏度。NPAMOZ 标准溶液的浓度范围为 0.1~100 ng/mL。标准曲线如图 2 所示, 从图中可得到 ELISA 的灵敏度(IC_{50} 值)为 1.86 ng/mL, 与文献报道的灵敏度相近 ($IC_{50}=1.59$ ng/mL^[15]; $IC_{50}=2.3$ ng/mL^[16])。

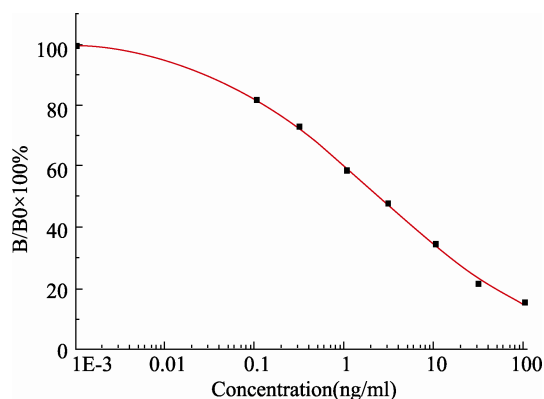


图2 ELISA测定AMOZ(以NPAMOZ形式)的标准曲线

Fig. 2 ELISA standard curve for the detection of AMOZ (in form of NPAMOZ)

3.4 ELISA方法的特异性

ELISA 特异性可用交叉反应率来表示。交叉反应率越小, 特异性越强。交叉反应率(%)=(NPAMOZ 的 IC_{50} /交叉反应物的 IC_{50}) \times 100%。

除 NPAMOZ 外, 本研究的交叉反应物为: AMOZ、呋喃它酮、呋喃唑酮、呋喃妥因、呋喃西林、NPAOZ、NPAHD、NPSEM、氯霉素、林可霉素、莫能霉素、土霉素、甲泼尼龙、甲硝唑、盐酸克伦特罗和 18-甲基炔诺酮。将交叉反应物配成 0~10000 ng/mL 的标准溶液, 在最佳实验条件下进行 ELISA 实验。每种交叉反应物的 IC_{50} 值都可从其对应的 ELISA 标准曲线中求出。结果表明, 抗体与 AMOZ、呋喃它酮的交叉反应率分别为 0.32% 和 70.7%, 与其它物质的交叉反应率均小于 0.01%。由于 AMOZ 为呋喃它酮的代谢物, 两者的结构很相近, 故抗体与呋喃它酮的交叉反应率较大。然而呋喃它酮在体内极不稳定, 极易分解, 并不能干扰检测。因此, 所建立的测定 AMOZ(以 NPAMOZ)的 ELISA 具有极高的特异性。

3.5 ELISA方法的准确度和精密度

选用的四种未加标肉物均未检测出 AMOZ。在加标实验中, 四种肉样 AMOZ 的加标浓度分别为 0.5、1、5 ng/g。加标样品经衍生化步骤处理后, 所生成的 NPAMOZ 用 ELISA 测定, 结果如表 1 所示。回

表1 ELISA检测加标样品的回收率及相对标准偏差

Table 1 Recovery and relative standard deviation of the ELISA for spiked food samples

样品	加标浓度 (ng/g)	测定浓度 \pm SD (ng/g)	回收率 (%)	相对标准偏差 RSD (%)
鱼肉	0	未检出		
	0.5	0.482 \pm 0.042	96.4	8.7
	1.0	0.954 \pm 0.106	95.4	11.1
	5.0	4.396 \pm 0.473	87.9	10.8
	0	未检出		
虾肉	0	未检出		
	0.5	0.422 \pm 0.035	84.4	8.3
	1	0.918 \pm 0.122	91.8	13.3
	5	5.411 \pm 0.843	108.2	15.6
	0	未检出		
鸡肉	0	未检出		
	0.5	0.378 \pm 0.047	75.6	12.4
	1	0.912 \pm 0.089	91.2	9.8
	5	4.317 \pm 0.721	86.3	16.7
	0	未检出		
猪肝	0	未检出		
	0.5	0.561 \pm 0.067	112.2	11.9
	1	0.853 \pm 0.149	85.3	17.5
	5	3.921 \pm 0.536	78.4	13.7
	0	未检出		

收率在 75.6%~112.2%之间, 相对标准偏差 RSD 为 8.3 %~17.5% ($n=4$), 表明 ELISA 的准确度和精密度均较好。

4 结 论

本研究成功制备了 AMOZ 的衍生物, 并以这种衍生物进一步制得免疫抗原, 经免疫动物(兔), 获得高灵敏性和高特异性的抗 NPAMOZ 多克隆抗体, 在优化的实验条件下, 建立了测定 AMOZ(以 NPAMOZ 形式)的 ELISA 方法, 并用于动物食品的检测。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Nouws JFM, Laurensen J. Postmortal degradation of furazolidone and furaltadone in edible tissues of calves [J]. Vet Q, 1990, 12: 56-59.
- [3] Gottschall DW, Wang R. Depletion and Bioavailability of [^{14}C] Furazolidone Residues in Swine Tissues [J]. J Agric Food Chem, 1995, 43: 2520-2525.
- [4] McCracken RJ, Kennedy DG. Determination of the furazolidone in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland [J]. J Chromatogr B, 1997, 691: 87-94.
- [5] Saowapa C, Somyote S, Pakawadef S. New Reagent for Trace Determination of Protein-Bound Metabolites of Nitrofurans in Shrimp Using Liquid Chromatography with Diode Array Detector [J]. J Agric Food Chem, 2009, 57: 1752-1759.
- [6] Hu XZ, Xu Y, Yediler A. Determinations of Residual Furazolidone and Its Metabolite, 3-Amino-2-oxazolidinone (AOZ), in Fish Feeds by HPLC-UV and LC-MS/MS, Respectively [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 1144-1149.
- [7] Barbosa J, Moura S, Barbosa R, *et al.* Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ionspray tandem mass spectrometry [J]. Anal Chim Acta, 2007, 586: 359-365.
- [8] Bock C, Gowik P, Stachel C. Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurans metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS [J]. J Chromatogr B, 2007, 856:

178-189.

- [9] Chu PS, Lopez MI. Determination of Nitrofurans Residues in Milk of Dairy Cows Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 2129-2135.
- [10] Xia X, Li XW, Zhang SX, *et al.* Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2008, 1208: 101-108.
- [11] 陈福生, 高志贤, 王建华. 食品安全检测与现代生物技术[M]. 北京: 化学工业出版社. 2004.
- [12] Deng AP, Markus H, Zhu QZ, *et al.* Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS [J]. Environ Sci Technol, 2003, 37: 3422-3429.
- [13] Han D, Yu M, Knopp D, *et al.* Development of a highly sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Sudan I in food samples [J]. J Agric Food Chem, 2007, 55: 6424-6430.
- [14] Wang YZ, Wei DP, Yang H, *et al.* Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of sudan I in food samples [J]. Talanta, 2009, 77: 1783-1790.
- [15] Umaporn P, Songchan P, Kittinan K, *et al.* Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaltadone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples [J]. Food Chem, 2009, 116: 785-791.
- [16] Yan XD, Hu XZ, Zheng CH, *et al.* Direct determination of furaltadone metabolite, 3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone, in meats by a simple immunoassay [J]. Food Agric Immunol, Available online: 29 Sep 2011.

(责任编辑: 张宏梁)

作者简介



宋娟, 女, 硕士, 主要从事食品安全检测, 包括兽药、抗生素残留、食品添加剂及重金属检测等。

E-mail: songjuan_as@163.com



邓安平, 男, 博士、教授、博士生导师, 研究方向为食品和环境免疫分析。

E-mail: denganping@suda.edu.cn; denganping6119@yahoo.com.cn