放射免疫法快速检测牛血清中四环素类药物

苏明明[1], 王 僑[2], 王晓薇[2], 王 琦[2], 曹际娟[1*]
(1. 辽宁出入境检验检疫局, 大连 116001; 2. 大连出入境检验检疫局, 大连 116000)

摘 要: 目的 采用 Charm II 放射免疫分析方法检测牛血清中四环素类药物残留。**方法** 采集 6 个牛血清样品进行添加检测, 设定控制点, 样品结果与控制点比较。评价免疫反应体系的特异性和灵敏度。测得控制点后与样品结果比较, 大于控制点则为阴性, 小于控制点则为阳性。**结果** 采用此方法短时间可出检测结果, 四环素类检测限为 20 μg/kg。该方法特异性强, 操作方法简单便捷。**结论** 此方法作为初筛方法, 测得阳性结果时则需采用其他检测方式进一步确证。该方法保持了家畜鲜活状态, 减少了商家的损失, 既能快速得到检测结果, 又能达到检测牛血清中四环素类药物残留的要求。

关键词: 放射免疫分析方法; 四环素类; 牛血清

Detection of tetracycline in bovine serum with radioimmunoassay method

SU Ming-Ming[1], WANG Xiao[2], WANG Xiao-Wei[2], WANG Qi[2], CAO Ji-Juan[1*]
(1. *Liaoning Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian* 116001, *China*; 2. *Dalian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Dalian* 116001, *China*)

ABSTRACT: Objective To detect the sulfonamide residues in bovine serum by Charm II radioimmunoassay method. **Methods** Six serum samples were collected for the addition test. The control point was set. The results from the sample test were compared with the control point. The sensitivity and specificity of the immune reaction system was evaluated. The measured value was compared with the control point. The sample was determined to be negative if the measured value was greater than the control point, whereas, the sample was positive if the measured value was less than the control point. **Results** Test results can be obtained in short time and the limit of tetracycline detection was 20 μg/kg. The method was highly specific, easy and convenient to operate. **Conclusion** Other test methods are still needed to further confirm the positive results as the method proposed in this paper is only a preliminary method. This method can keep livestock alive and reduce losses of merchants. It can quickly give out test results and meet detection requirements of tetracycline residues in bovine serum.

KEY WORDS: radioimmunoassay method; tetracycline; bovine serum

1 引 言

进入 WTO 以来, 食品安全问题越来越引起人们的关注。尤其近几年食品和农副产品进出口量加大, 农兽药残留污染已成为国内外更加关心的问题。其中供港食品农副产品量大, 要求高, 需要检测时间短,

*通讯作者: 曹际娟, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: caojijuanlnciq@163.com
***Corresponding author:** CAO Ji-Juan, Professor, Technical Center of Liaoning Entry-Exit Inspection & Quarantine Bureau, No.60, Changjiang East Road, Zhongshan District, Dalian 116000, China. E-mail: caojijuanlnciq@163.com

体现了建立快速检测技术的必要性。四环素类抗生素(tetracyclines)是由放线菌产生的一类广谱抗生素，包括金霉素(chlotetracycline)、土霉素(oxytetracycline)、四环素(tetracycline)及半合成衍生物甲烯土霉素、强力霉素、二甲胺基四环素等，其结构均含并四苯基本骨架。四环素类抗生素应用于动物饲养过程中，可预防和治疗动物疾病、促进动物生长、提高饲料转化率。由于疗效较为显著，作为饲料添加剂在食源性动物的饲养中，四环素类药物在畜牧生产中广泛应用[1,2]。但在动物屠宰之前，动物体内的四环素，不能完全代谢掉，而是有相当大一部分残留下来(其中以肾脏、肝脏残留最集中)。人们在食用了有四环素类抗生素残留的动物性食品，会对身体造成严重的伤害，如果母亲在孕期服用四环素族抗生素，四环素类药物可以造成婴儿的先天性耳聋，对男性的生殖系统会造成很大的伤害，如长期食用，也会产生过敏反应，降低人类对病菌的免疫能力，对人类的身体健康产生很大的危害。当今，我国农业部发布的《动物性食品中兽药最高残留限量》和香港特别行政区发布的《药物、化学物及其最高残余限量》中，均规定牛奶中四环素类的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)：土霉素、四环素、金霉素均小于 100 μg/L[3,4]。但在实际的动物饲养过程中，仍存在滥用抗生素的情况，日常生活对家畜类的需求量越来越大，使得在家畜养殖过程中的用药情况成为了国内外关注的焦点。加强对四环素类药物的残留监控对强化食品安全有着重要意义。如何在节约成本避免造成出口商不必要的浪费的前提下，快速高效地检测四环素类药物残留有十分重要的意义。四环素类药物检测方法有许多种，有酶联免疫法(ELISA)、高效液相色谱紫外检测法[5-10]和高效液相色谱串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)[11-15]，但是 HPLC 法前处理提取方法繁琐，操作时间长，不能完全排除杂质干扰；而 ELISA 主要针对某种特定四环素类及其主要代谢物，无法解决同时检测四环素类药物多残留的问题。基于细菌受体分析的 Charm Ⅱ放射免疫法的样品前处理方法简便，特异性强，灵敏度高，并且可以检测四环素类残留总量，已经为欧盟国家和美国 FDA 认可并且应用于初筛分析[16]。本研究建立牛血清样中四环素类残留 Charm Ⅱ放射免疫分析方法[17,18]。

2 材料与方法

2.1 仪器与设备

Charm II6600/7600分析仪(美国Charm公司)；离心机(美国 Sigma 公司)；涡旋混合器(德国 IKA 公司)；恒温孵育器(65±1) ℃；闪烁液加液器; 50 mL 离心管; 硼硅玻璃试管及试管塞；药片压杆(美国 Charm 公司)；液体闪烁计数仪(美国 Charm 公司)。

2.2 样品与试剂

2.2.1 检测基质

牛血清：用采血注射器在牛尾处采集血液，将其收集到容器内，控制温度在 18~25 ℃, 8~12 h 等待自然析出足够的血清。

2.2.2 检测试剂

四环素类 Charm Ⅱ检测试剂盒、闪烁液(Optifluor)、阴性对照液、多抗标准品(美国 Charm 公司)。四环素、金霉素、土霉素、和强力霉素、新霉素、庆大霉素、链霉素、螺旋霉素、红霉素、青霉素G、林可霉素、螺旋霉素等标准品(美国 Sigma 公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 测试原理

微生物细胞表面存在着能与各种四环素类药物共有功能基团相结合的特异性位点，能与各种四环素类药物发生相应的微生物受体反应。检测四环素类药物残留时，同时加入微生物受体结合物和[3H]标记过的金霉素。如果样品中残留有四环素类药物，就会同[3H]标记过的金霉素竞争结合微生物受体结合物的相关位点。用液体闪烁计数仪测定样品反应后的[3H]含量的 cpm 值(count per minute, 即每分钟脉冲数), cpm 值与样品中的四环素类药物残留量成反比。

2.3.2 样品制备

称取 1 g(精确到 0.1 g)均质好的试样于 50 mL 离心管，加入 30 mL MSU 萃取缓冲溶液，涡旋振荡 5 min。将离心管置于(80±2) ℃孵育器内孵育 45 min，再将离心管置于冰水中 10 min 后，1750 *g* 离心 10 min。吸出上清液，注意不要将漂浮的脂肪颗粒混入上清液内。恢复室温后，用 pH 试条检查 pH 是否是 7.5。如不准确，用试剂盒自带 M2 缓冲液或 1 mol/L 盐酸调整至 pH7.5，即为样品测试液。

2.3.3 测定步骤

用药片压杆的平端，将白色药片压入洁净的玻璃试管内，加 300 μL 蒸馏水，到试管内用涡旋混合

器振荡 10 s 直至药片破碎, 用移液器加 4 mL 稀释后的血清样到试管内, 压入橙色药片, 用振荡器振荡大约 15 s, 使样品上下 15 次, 置(65±1) ℃孵育器内, 孵育 3 min, 1750 *g* 离心机离心 5 min, 离心停止后立即取出试管, 倒掉上层液, 用棉签清除试管壁内的残渍, 不要接触沉淀物, 加 300 μL 蒸馏水到试管内, 振荡使沉淀物完全破碎, 加 3 mL 闪烁液到试管内涡旋混匀至试管内没有不均一的云状物, 试管放入 Charm Ⅱ6600/7600 分析仪内, 读[3H]项的 cpm 值。

2.3.4　阳性结果的确定

样品的 cpm 值小于控制点时, 需要重新检测样品及同时测定一个阴性质控和一个阳性质控, 以确定试剂和设备是否工作正常。通常情况下:

(1)测试的阴性质控应该是阴性质控平均值±20%(每一试剂盒都会给出阴性质控平均值, 平均值一般为运行 3 份阴性质控液的 cpm 值的平均数)。

(2)测试的阳性质控应该小于控制点。如果重测样品的 cpm 小于控制点, 且(1)、(2)两条件符合, 则判定样品阳性。

2.3.5　控制点的建立

在 6 份已知无四环素类残留的牛血清样品中加入测试所要求的抗生素浓度(参照试剂盒说明书)。按照分析程序运行(见 2.3.3 方法)。得出 6 个 cpm 值, 计算其平均值。在平均值上加上平均值的 20%即为此类样品的控制点。

3　结果与分析

3.1　抗原抗体竞争性反应标准曲线

确定本方法对药物的灵敏度。使用 MSU 萃取缓冲溶液作为零标准, 将 MSU 多种抗生素标准品分别配制成 5.0、10.0、20.0、30.0、50.0、100.0、200.0、300.0 μg/kg 标准溶液, 并测定 cpm 值, 结果见表 1。

由表 1 可知, 测定的 cpm 值随药物浓度增大而减少, 当药物浓度增加到 20 μg/kg, 所得 cpm 值与阴性空白值相比可以满足检测的灵敏度需求, 因此本方法的检出限为 20 μg/kg。

将浓度为 100000 μg/L 的金霉素标准品添加入阴性牛血清样品中, 使样品的添加浓度分别为 0、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0 μg/kg, 按 2.3.3 步骤检测其 cpm 值, 横坐标为质量浓度对数, 纵坐标为相应质量浓度的 cpm 数值的相对值(即其 cpm 读数与阴性样品 cpm 读数的比值, B/B_0), 得到半对数曲线 Y=-0.0301X+0.92, 如图 1 所示。从图 1 可以看出在添加浓度为 10~50 μg/kg 的范围内, 相关系数达到 0.9915, 分析体系比较灵敏。根据实际情况确定检测限时, 一般要求空白加标样品与空白样品的 cpm 值相对值小于 0.6, 据此初步判定血中金霉素检测浓度须大于 20 μg/kg。

3.2　检测限的验证

依据 3.1 抗原抗体竞争性反应标准曲线实验推定的牛血清四环素类残留检测限为 20 μg/kg, 本研究对此做了验证实验, 据 2.3.5 确定 20 μg/kg 检测限的控制点 cpm 值为 1919, 共做了 6 份空白样与 6 份空白样加标实验, 添加水平为 20 μg/kg 金霉素, 空白样品结果全为阴性, 加标样品结果全为阳性。验证结果确定本方法检测限为 20 μg/kg。结果见表 2。

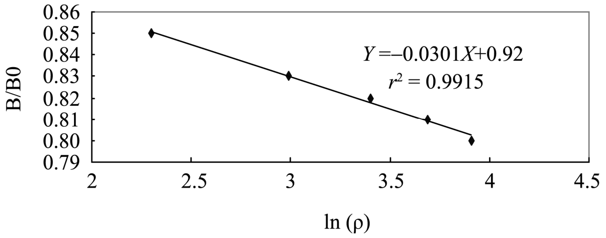


图 1　金霉素的竞争性 RRA 半对数曲线

Fig. 1　The competitive RRA semilogarithmic curve of chlortetracycline

表 1　不同药物浓度四环素测定结果

Table 1　The results of different concentrations tetracycline

浓度(μg /kg)	0	5.0	10.0	20.0	30.0	50.0	100.0	200.0	300.0
cpm	2743	2188	1982	1715	1669	1641	1639	1600	1592

表 2　牛血清中四环素类抗生素残留量测定(控制点: 1919)

Table 2　The determination of chlortetracycline antibiotic residues in bovine serum(control point: 1919)

	6 次测定 cpm 值					
	1	2	3	4	5	6
牛血清(空白样)	2333	2435	2501	2309	2299	2478
牛血清(添加 20 μg/kg)	1793	1533	1482	1464	1453	1449

3.3 特异性验证实验

本研究选取阴性牛血清样品作为实验基质，分别添加 4 种四环素类药物标准品，分别为四环素、土霉素、金霉素和强力霉素，添加水平为 20 μg/kg，与控制点 cpm 值 1919 相比较，结果添加 4 种四环素类标准品的样品测定结果阳性率为 100%。另添加新霉素、庆大霉素、恩诺沙星、链霉素、螺旋霉素、林可霉素、青霉素 G、氯霉素、红霉素等标准品，添加水平为 100 μg/kg，测定加标后 cpm 值，与控制点 cpm 值 1919 相比较，样品测定结果全部为阴性。上述实验验证了 Charm II 放射免疫分析法测定牛血清中四环素类药物残留的特异性能满足检测要求。

4 结 论

采用 Charm II 放射免疫分析法测定活体牛血清中的四环素类药物残留，方法检测限为 20 μg/kg，该检测特异性强、灵敏度高、方法可靠，符合磺胺类最大残留限量的检测要求；在短时间内可出初筛结果，假阴性率为 0%，提高了检测效率，使大批量快速检测得以实现，但是此方法是初筛方法，初筛阳性的样品必须用其他方法确证。快速高通量的检测技术已经成为食品安全，尤其是食品中的农兽药残留问题中关注的焦点，势必要顺应潮流。快速高效地检测农兽药的残留，可以避免造成出口商不必要的损失，减少成本，加强对食品中的药物残留的监测，本方法为动物养殖过程中的用药监控提供了一种快速检测方法。

参考文献

[1] Jacobsen AM, Halling-Sørensen B. Multi-component analysis of tetracyclines, sulfonamides and tylosin in swine manure by liquid chromatography–tandem mass spectrometry [J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 66(8): 51–56.

[2] Himmelsbach M, Buchberger W. Residue analysis of oxytetracycline in water and sediment samples by high-performance liquid chromatography and immunochemical techniques [J]. Microchim Acta, 2005 38(7): 1–2.

[3] Aga DS, O'Connor S, Ensley S, *et al.* Determination of the persistence of tetracycline antibiotics and their degradates in manure-amended soil using enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 2005, 25(9): 111–116.

[4] Arikan OA. Degradation and metabolization of chlortetracycline during the anaerobic digestion of manure from medicated calves [J]. J Hazard Mater, 2008, 16(3): 251–256.

[5] Carlson JC, Mabury SA. Dissipation kinetics and mobility of chlortetracycline,tylosin,and monensin in an agricultural soil in Northumberland County, Ontario, Canada [J]. Environ Toxicol, 2006, 20(5): 301–306.

[6] Yan DD, He LM, Zhang GJ, *et al.* Simultaneous determination of cyadox and its metabolites in chicken tissues by LC-MS/MS [J]. Food Anal Methods, 2012, 60(2): 6–9.

[7] Liubavina IA, Valiakina TI, Grishin EV. Monoclonal antibodies labeled with colloidal gold for immunochromatographic express analysis of diphtheria toxin [J]. Bioorganicheskaia Khimiia, 2011, 42(3): 132–136.

[8] Salter, Robert, Douglas, *et al.* Intel-laboratory study of the charm ROSA safe level aflatoxin M_1 quantitative lateral flow test for raw bovine milk [J]. J AOAC Int, 2006, 17(10): 255–259.

[9] Li H, Sun ZY, Zhong WY, *et al.* Ultrasensitive electrochemical detection for dna arrays based on silver nanoparticle aggregates [J]. Anal Biochem, 2010, 25(3): 300–304.

[10] Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment [J]. Chemosphere, 2006, 39(4): 211–214.

[11] Cliquet P, Cox E, Haasnoot W, *et al.* Generation of group-specific antibodies against sulfonamides [J]. J Agric Food Chem, 2003,14(9): 47–56.

[12] Pastor-navarro N, Garcia-rover C, Maquieira A, *et al.* Specific polyclonal-based immunoassays for sulphathiazole [J]. Anal Bioanal Chem, 2004, 15(3): 90–97.

[13] Jeon M, Kim J, Paeng KJ, *et al.* Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect residues of tetracyclines in milk [J]. Microchem J, 2008, 57(5): 151–156.

[14] Lamar J, Petz M. Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices [J]. Anal Chim Acta, 2007, 43(12): 271–274.

[15] Korpimaki T, Hagren V, Brockmann EC, *et al.* Generic lanthanide fluoroimmunoassay for the simultaneous screening of 18 sulfonamides using an engineered antibody [J]. Anal Biochem, 2004, 36(7): 287–289.

[16] Franek M, Diblikova I, Cernoch I, *et al.* Broad-specificity immunoaseay for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors [J]. Anal

Biochem, 2006, 30(5): 217–223.

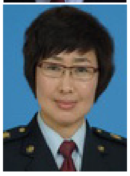
[17] Spinks CA, Wyatt GM, Everest S, *et al*. Atypi-cal antibody specificity: advancing the development of a generic assay for sulfonamides using heterolo- gous ELISA [J]. J Sci Food Agric, 2002, 15(10): 137–144.

[18] Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, *et al*. Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents [J]. Anal Biochem, 2004, 30(3): 156–163.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介

苏明明, 工程师, 硕士, 主要研究方向为农残兽残分析。
E-mail: meng8135@163.com



曹际娟, 研究员, 硕士, 主要研究方向为农残兽残分析。
E-mail: caojijuanlnciq@163.com