

放射免疫法快速检测牛血清中磺胺类药物

苏明明¹, 代弟¹, 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** 应用 Charm II 放射免疫分析方法检测牛血清中磺胺类药物残留, 以便能大大提高检测速度, 快速高效地完成磺胺类药物检测。**方法** 在活体家畜上采集血清样品进行检测。确定控制点设定的方法, 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灵敏度和特异性。测得数值与控制点比较, 测的数值大于控制点即为阴性, 反之测得数值小于控制点即为阳性样品。**结果** 磺胺类检测限可达 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 短时间可出检测结果, 此方法特异性强, 与除磺胺类药物外的其他药物无交叉反应。**结论** 此方法快速, 简便。虽然此方法只是初筛方法, 测得阳性结果时则需采用其他检测方式进一步确证。但已经大大提高了检测效率, 既保持了家畜的鲜活状态, 又能快速得到检测结果, 大大加快通关速度, 促进了我国的活畜出口量。

关键词: 放射免疫分析方法; 磺胺类; 牛血清

Detection of sulfonamides in bovine serum by radioimmunoassay method

SU Ming-Ming¹, DAI Di¹, WANG Xiao-Wei², WANG Qi², 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, so as to improve the detection rate greatly and complete the sulfa drug testing quickly and efficiently. **Methods** Serum samples which collected from the live livestock were detected. The determination method of control point was made. 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** The limit of sulfonamide detection was 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The whole detection process could be finished within short time. This method had strong specificity and showed no cross reactions with drugs other than sulfonamides. **Conclusion** This method is rapid and convenient. Although other test methods are still needed to further confirm the positive results as the method proposed in this paper is only a preliminary method, the method improves test efficiency and can both keep livestock alive and quickly provide the test results, thus greatly speeding up customs clearance and increasing livestock export volume of our country.

KEY WORDS: radioimmunoassay method; sulfonamides; bovine serum

*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

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, 农兽药残留污染就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, 体现了建立快速检测技术的必要性。磺胺类药物(sulfonamides, SAs) 是具有对氨基苯磺酰胺结构, 能预防和治疗细菌感染的一类药物的总称。由于疗效显著, 作为饲料添加剂在食源性动物的饲养中, SAs 在畜牧生产中大量使用^[1,2]。但是摄入 SAs 会在人体内蓄积, 不会很快被代谢掉, 其残留会破坏人的造血系统, 导致溶血性贫血症、血小板减少症等, 还能引起过敏病症, 轻者引起皮肤瘙痒, 严重的过敏病人甚至死亡, 长期使用能产生抗药性, 对人健康危害很大^[3,4]。近年来国际社会对动物源食品的兽药残留要求越来越高, 国际食品法典委员会(CAC)规定磺胺类药物总量及磺胺二甲基嘧啶等单个磺胺类药物的含量不得超过 0.1 mg/kg, 日本规定食品中不得检出磺胺类药物。因此, 加强对磺胺类药物的残留监控, 开发快速高通量的检测磺胺类药物残留的方法对于食品安全而言有着重要意义。磺胺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)^[11-16], 但是 HPLC 法前处理提取方法操作时间长, 繁琐, 不能完全排除杂质干扰; 而 ELISA 主要针对某种特定 SAs 及其代谢物, 无法同时检测磺胺类药物多残留。基于细菌受体分析的 Charm II 放射免疫法, 样品前处理方法简便, 特异性强, 灵敏度高, 并且可以检测磺胺类残留总量, 已经为欧盟国家和美国 FDA 认可并且应用于初筛分析, 此方法应用到牛血清中磺胺类药物残留的检测, 既能节约成本, 又能降低出口商的损失, 快速高效地保证家畜类的出口量。本研究建立牛血清样中磺胺类残留 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) °C; 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 °C, 8~12 h 等待自然析出足够的血清。

2.2.2 检测试剂

磺胺类 Charm II 检测试剂盒、多抗标准品(美国 Charm 公司); 闪烁液 (Optifluor) (美国 Charm 公司)、阴性对照液(美国 Charm 公司)。磺胺甲基嘧啶(SM1)、磺胺二甲基嘧啶(SM2)、磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺喹噁啉(SQX)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺噻唑(ST)、磺胺吡啶(SPD)、磺胺异噁唑(SIZ)、磺胺甲噻二唑(STZ)、磺胺甲基异噁唑(SMZ)、磺胺甲氧哒嗪(SMP)、磺胺氯哒嗪(SCP)庆大霉素、链霉素四环素、恩诺沙星、新霉素、氯霉素、螺旋霉素、林可霉素、红霉素、青霉素 G 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磺胺类药物共有功能基团相结合的特异性位点, 能与各种磺胺类药物发生相应的微生物受体反应。检测磺胺类药物残留时, 同时加入微生物受体结合物和^[3H]标记过的磺胺二甲嘧啶。如果样品中残留有磺胺类药物, 就会同^[3H]标记过的磺胺二甲嘧啶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 值与样品中的磺胺类药物残留量成反比。

2.3.2 样品稀释

采集新鲜牛血清样品进行测定, 如有浑浊应于 1750 g 离心 10 min 取上清液备用。取玻璃试管, 加入 0.1 mL 尿样和 0.3 mL MSU 提取缓冲液, 强力振荡混匀。然后吸取 0.1 mL 混合液加入 50 mL 离心管, 再加入 10 mL MSU 提取缓冲液, 强力振荡混匀备用。

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 蒸馏水于试管内用涡旋混合器振荡 10 s 直至药片粉碎均匀, 用移液器加 4 mL 稀释后的血清样品到试管内。压入粉红色药片, 振荡器振荡大约 15 s, 置(65±1) °C 孵育器内, 孵育 5 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 II 6600/7600 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 $\pm 20\%$ (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 份已知无磺胺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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 所得 cpm 值与阴性空白 cpm 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

将浓度为 100000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的磺胺二甲嘧啶标准品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 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 按 2.3.3 测定步骤检测其 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, 如图 1。基于以细菌细胞壁受体作为抗原的结合位点, 其亲和性不均一, 抗原抗体反应的复杂性, 得不到相关系数很高的线形拟合, 从图 1 可以看出在添加浓度为 10~50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的范围内, 相关系数达到 0.966 以上, 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与空白样的 cpm 值相对值小于 0.6, 据此初步判定血中磺胺二甲嘧啶检测浓度须大于 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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, 推定得出牛血清磺胺类残留检测限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 本研究对此做了验证实验, 据 2.3.5 确定 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 检测限的控制点 cpm 值为 2132, 共做了 6 份空白样与 6 份空白样加标实验, 添加水平为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 磺胺二甲嘧啶, 空白样品结果全是阴性, 加标样结果全是阳性。验证结果确定本方法检测限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。结果见表 2。

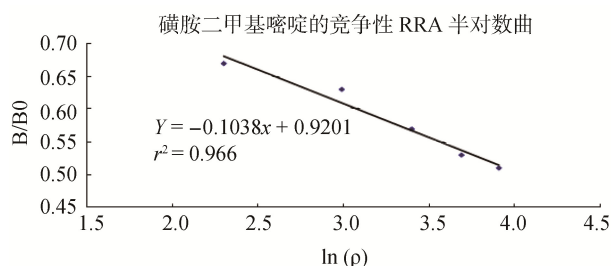


图 1 磺胺二甲嘧啶的竞争性 RRA 半对数曲线
Fig. 1 The competitive RRA semilogarithmic curve of sulfamethazine

表 1 不同药物浓度磺胺二甲嘧啶测定结果

Table 1 The results of different concentrations sulfamethazine

浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	0	5.0	10.0	20.0	30.0	50.0	100.0	200.0	300.0
cpm	1692	1125	953	713	712	703	689	587	537

表 2 牛血清中磺胺类抗生素残留量测定(控制点: 2132)

Table 2 The determination of sulfa antibiotic residues in bovine serum(control point: 2132)

	6 次测定 cpm 值					
	1	2	3	4	5	6
空白样	2695	2590	2981	3103	2393	2714
磺胺二甲嘧啶	1776	1732	1547	1635	1565	1589

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 13 种磺胺类药物标准品, 分别为: 磺胺甲基嘧啶(SM1)、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺二甲嘧啶(SM2)、磺胺间二甲氧嘧啶(SDM)、磺胺甲噻二唑(STZ)、磺胺喹噁啉(SQX)、磺胺吡啶(SPD)、磺胺甲基异噁唑(SMZ)、磺胺异噁唑(SIZ)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺甲氧哒嗪(SMP)、磺胺噻唑(ST)、磺胺氯哒嗪(SCP), 添加水平为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 与控制点 cpm 值比较, 结果添加 13 种磺胺类标准品的样品测得结果阳性率为 100%。另添加恩诺沙星、链霉素、庆大霉素、新霉素、四环霉素、林可霉素、氯霉素、螺旋霉素等标准品, 添加水平为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 测定加标后 cpm 值, 与控制点 cpm 值比较, 样品测得结果全部为阴性。上述实验验证了 Charm II 放射免疫分析法测定牛血清中磺胺类残留的特异性能满足检测要求。

4 结 论

采用 Charm II 放射免疫分析方法测定血清的磺胺类残留, 方法检测限为 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 该检测方法可靠, 灵敏度高, 特异性强, 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势必要顺应的主流。快速高通量的检测技术不仅大大提高了通关效率, 节约了出口商的成本, 还简化了操作人员的工作流程, 保证家畜活程度的同时, 更有效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] Beloglazova NV, Shmelin PS, Yu Goryacheva I, *et al.* Liposomes loaded with quantum dots for ultrasensitive on-site determination of aflatoxin M_1 in milk products [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 25(1): 24–30.
- [2] Van Coillie Els, De Block Jan, Reybroeck Wim. Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies [J]. *J Agric*, 2004, 36(4): 55–59.
- [3] Franek Milan, Diblikova Iva, Cernoch Ivo, *et al.* Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors [J]. *Anal Biochem*, 2006, 28(3): 101–107.
- [4] Aless, Ra Gentili, Daniela Perret, *et al.* Accelerated solvent extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry [J]. *J Agric*, 2004, 55(8): 12–17.
- [5] Annette Kupstat, Michael U Kumke, Niko Hildebrandt. Toward sensitive, quantitative point-of-care testing (POCT) of protein markers: miniaturization of a homogeneous time-resolved fluoroimmunoassay for prostate-specific antigen detection [J]. *Analyst*. 2011, 19(3): 61–64.
- [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, 21(2): 63–66.
- [7] Liubavina IA, Valiakina TI, Grishin EV. Monoclonal antibodies labeled with colloidal gold for immunochromatographic express analysis of diphtheria toxin [J]. *Bioorganicheskaia Khimiia*, 2011, 20(4): 51–63.
- [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]. *JAOAC Int*, 2006, 33(8): 111–114.
- [9] Li H, Sun ZY, Zhong WY, *et al.* Ultrasensitive electrochemical detection for dna arrays based on silver nanoparticle aggregates [J]. *Anal Biochem*, 2010, 43(9): 79–82.
- [10] Ye B, Li S, Zuo P, *et al.* Simultaneous detection of sulfamethazine, streptomycin, and tylosin in milk by microplate-array based SMM-FIA [J]. *Food Chem*, 2008, 55(8): 61–64.
- [11] Cliquet P, Cox E, Haasnoot W, *et al.* Generation of group-specific antibodies against sulfonamides [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 77(10): 11–13.
- [12] Pastor-navarro N, Garcia-rover C, Maquieira A, *et al.* Specific polyclonal-based immunoassays for sulphathiazole [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2004, 9(6): 96–100.
- [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, 25(8): 136–140.
- [14] Janine Lamar, Michael Petz. Development of a receptor-based microplate assay for the detection of beta-lactam antibiotics in different food matrices [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 38(9): 44–52.
- [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, 40(10): 269–273.
- [16] Franek M, Diblikova I, Cernoch I, *et al.* Broad-specificity immunoassay for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors [J]. *Anal Biochem*, 2006, 44(5): 211–216.
- [17] Spinks CA, Wyatt GM, Everest S, *et al.* Atypical antibody specificity: advancing the development of a generic assay for sulfonamides using heterologous ELISA [J]. *J Sci Food Agric*, 2002, 56(1): 298–303.
- [18] Goldman ER, Clapp AR, Anderson GP, *et al.* Multiplexed toxin analysis using four colors of quantum dot fluororeagents [J]. *Anal Biochem*, 2004, 25(18): 193–197.

(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