

免疫分析多残留同步法测定饲料中 硝基呋喃类药物

袁利鹏¹, 刘波^{1*}, 马莹², 尹凯丹¹

(1. 广东农工商职业技术学院热带农林学院, 广州 510507; 2. 解放军空军勤务学院北京训练大队, 北京 100195)

摘要: **目的** 建立酶联免疫吸附多残留同步法测定饲料中硝基呋喃类违禁药物残留的分析方法。**方法** 采用 5-硝基糠醛和对羧基苯肼反应合成含有硝基呋喃类共有结构的半抗原 4-硝基呋喃甲醛-(4-羧基-苯基)-腙 (4-nitrofur formaldehyde-(4-carboxyl phenyl) hydrazon, NFHBA)。通过偶联载体蛋白牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA)后的免疫原 NFHBA-BSA 免疫新西兰大白兔, 成功制备了特异性识别呋喃环位点硝基的多克隆抗体。**结果** 该抗体对 4 种目前主要使用的硝基呋喃类抗生素药物: 呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因的检测半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)分别达 5.2、6.4、26.6、4.2 ng/mL, 饲料样品平均添加回收率均在 80%~90%之间。**结论** 该方法能达到产品检测要求, 可用于饲料中硝基呋喃类药物多残留同步快速检测。

关键词: 硝基呋喃; 半抗原; 多克隆抗体; 多残留

Determination of nitrofur drugs in feed by multi-residue immunoassay method

YUAN Li-Peng¹, LIU Bo^{1*}, MA Ying², YIN Kai-Dan¹

(1. Tropical Institute of Agriculture and Forestry, Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510507, China;

2. Beijing Training Group, Chinese PLA Air Force Institute of Service, Beijing 100195, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of multiple residues of nitrofurans in feed by multi-residue enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method. **Methods** The hapten 4-nitrofur formaldehyde-(4-carboxyl phenyl) hydrazon (NFHBA) with a hydrazone type structure was synthesized by 5-nitro furfural and carboxyl phenylhydrazine. The New Zealand white rabbits were immunized with the immunogen NFHBA-BSA conjugated with the carrier protein bovine serum albumin (BSA), and a polyclonal antibody that specifically recognized the nitro-ring nitro group was successfully achieved. **Result** The half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) values of furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, and nitrofurantoin were 5.2, 6.4, 26.6, 4.2 ng/mL, respectively, which were used as main nitrofur antibiotic drugs. The average recoveries for feed were all

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2015A030313793)、国家级星火计划项目(2015GA780082)、广东省教育厅高职领军人才项目(食品加工技术专业)、广州市增城高层次人才项目

Fund: Supported by Natural Science Foundation of Guangdong in 2015 (2015A030313793), National Spark Program Foundation of China (2015GA780082), Guangdong Provincial Department of Education Higher Vocational Leading Talents Project (Food Processing Technology), and Guangzhou Zengcheng High-level Talents Project

***通讯作者:** 刘波, 硕士, 副教授, 主要研究方向为食品营养、安全检测。E-mail: rainbow719518@126.com

***Corresponding author:** LIU Bo, Master, Associate Professor, Tropical Institute of Agriculture and Forestry, Guangdong AIB Polytechnic College, No.198, Yueken Road, Tianhe District, Guangzhou 510507, China. E-mail: rainbow719518@126.com

80%–90%。 **Conclusion** This method can meet the requirements of product testing, and can be used for rapid simultaneous detection of multi-residue of nitrofurans drugs in feed.

KEY WORDS: nitrofurans; hapten; polyclonal antibody; multiple residues

1 引言

硝基呋喃类药物主要是指呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因、硝呋索尔等引入硝基的一类人工合成抗生素。因其杀菌和抗菌能力强且广谱、耐药性低、廉价等特点,临床中应用广泛。硝基呋喃类药物是目前国际上最受关注的兽药残留药物之一,该类药物曾经作为动物生长促进剂在畜牧业生产中起到积极的作用,它们在饲料中的有效添加量较高,一般为 10~2500 mg/kg 左右^[1]。但后来由于其“硝基”被认为有“三致”危害,美国、日本、加拿大、欧盟等国家已经禁止该类药物在食品源性动物中使用^[2,3]。由于硝基呋喃类药物对治疗肠炎、痢疾等疾病效果非常明显,而且价格便宜,所以有些养殖企业把硝基呋喃类药物作为预防动物腹泻、霍乱等疾病的目的长期添加于饲料中使用。长期使用会使此类药物残留在被饲喂动物的肌肉组织与内脏组织中,人在食用这些动物性食品后也会出现类似于药物过敏的症状,重者会出现心动过速、血压升高、胸闷、烦躁等症状。孕妇在长时间食用这些肉食品后还可能造成新生儿畸形的风险^[4]。因此,对饲料中硝基呋喃类药物进行监测是保障人类食品安全和人类身体健康与生命安全的重要措施。

国内外已有大量有关用于检测硝基呋喃类抗生素代谢物残留的方法报道,如液质联用法^[5-7]、分光光度法^[8,9]、免疫分析法^[10]等。但是针对硝基呋喃类原型药的检测比较少,我国目前对该类药物检测主要是仪器方法,远远不能满足我国对饲料中该类物质实际监控的需要。更未见硝基呋喃类药物多残留同步检测相关报道。因此,研究建立饲料中多种硝基呋喃类药物的快速、准确、灵敏的检测方法十分迫切,本研究采用基于抗原抗体反应的免疫分析方法,试图制备可同时检测多种硝基呋喃原型药的多克隆抗体,用于建立饲料中多种硝基呋喃类药物的快速、准确、灵敏的检测方法,弥补理论研究和产品市场的空白。

2 材料与方法

2.1 实验材料

2.1.1 主要试剂

呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃西林、呋喃妥因、硝呋索尔标准品(纯度 99.0%, 德国 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司); 5-硝基糠醛、对羧基苯肼(纯度 98%, 安耐吉试剂有限公司); N,N'-二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide, DCC)、N-羧基琥珀酰亚胺(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine solution liquid membrane substrate, NHS, 纯度 99.0%, 阿拉丁生化科技股份有限公司); 牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA, 65 kD)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA, 45 kD)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司); 辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG(武汉博士德生物工程有限公司); 新西兰大白兔(广东省医学动物实验中心); 包被液、稀释液、洗涤液、封闭液、3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液(3,3',5,5'-tetramethyl benzidine solution liquid membrane substrate, TMB)及终止液均按文献^[11]方法配制; 饲料(色谱检测阴性饲料样品, 广州市食品检验所)。

2.1.2 实验动物

新西兰大白兔, 2 只, 购于广东省实验动物中心。

2.1.3 仪器

UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津仪器); Mili-Q A10 纯水处理系统(美国 MILIPORE 公司); 5427 R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 薄膜透析袋(规格分子质量 12000~14000 D, 美国 Sigma 公司); MK3 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司); Wellwash MK2 酶标洗板机(美国 Thermo 公司); Sciex QTRAP® 4500 液质联用设备(美国 AB 公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 半抗原合成路线

按图 1 路线合成衍生药物, 在 50 mL 圆底烧瓶中加入对羧基苯肼 5 mmol, 缓慢加入甲醇直至溶解, 搅拌中加入 6 mmol 5-硝基糠醛, 室温搅拌过夜。反应结束, 过滤沉淀物, 水洗 2 遍, 甲醇洗 2 遍, 得到棕黄色固体。

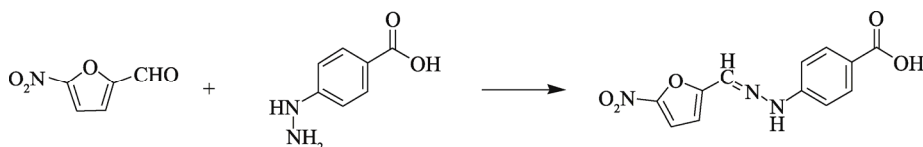


图 1 硝基呋喃半抗原合成路径

Fig.1 The synthesis routing of hapten NFHBA

2.2.2 免疫原和包被原的制备

免疫抗原和包被抗原制备(活泼酯法): 称取 18 mg 半抗原 4-硝基呋喃甲醛-(4-羧基-苯基)-胺(4-nitrofur formaldehyde-(4-carboxyl phenyl) hydrazon, NFHBA)、7 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于 0.5 mL N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)中, 磁力搅拌下缓慢加入 125 mg N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)固体粉末, 室温搅拌 5 h, 转速 4000 r/min, 离心 7 min, 取上清液。在磁力搅拌下将上清液逐滴滴入到 5 mL pH 7.4 磷酸盐缓冲液中(含 50 mg BSA 或 40 mg OVA), 置 4 °C 冰箱中搅拌过夜。4 °C 温度下采用 0.9% 生理盐水透析 48 h, 每 7 h 更换透析液。透析液通过紫外扫描监测, 至无小分子吸收峰时, 将产物在无菌环境下通过 0.2 μm 滤膜分装, -20 °C 保存即得到免疫原(NFHBA-BSA)和包被原(NFHBA-OVA)。

2.2.3 实验动物免疫和多克隆抗体制备

取 2~2.5 kg 雌性新西兰大白兔 2 只饲养 1 周, 静脉耳缘采血 1 mL, 收集兔血清作为阴性对照用于测定基础效价^[12]。后用免疫原 NFHBA-BSA 进行免疫。免疫剂量为 0.5 mg/只, 在兔背部皮下多点免疫, 每 4 周加强免疫 1 次。初次免疫选用完全佐剂与免疫原等体积混合乳化后免疫, 加强免疫则选用不完全佐剂。第 3 次免疫后第 7 d 开始采兔血检测效价, 直至兔抗血清效价不再升高, 后心脏动脉取兔血, 室温下自然凝固后分离抗血清, 4 °C 环境下放置过夜, 4000 r/min 离心 30 min, 分离取上层血清, 加等量甘油分装, -20 °C 冻存。

2.2.4 多克隆抗体间接竞争 ELISA 方法建立

棋盘滴定确定 ELISA 方法最佳包被浓度、抗体稀释

倍数, 确保建立稳定、灵敏的 ELISA 间接竞争方法。具体方法是将包被液加到酶标板孔中, 100 μL/孔, 4 °C 冰箱过夜。用洗液洗涤 2 次, 甩干, 每孔加入封闭液 120 μL, 37 °C 温箱中孵育 3 h。甩干孔中液体, 置 37 °C 烘箱中 3 h 烘干备用; 抗体稀释适当倍数, 每孔分别加入不同浓度标准液和抗体各 25 μL, 轻摇混合, 37 °C 温箱中孵育 40 min。洗液洗涤 6 次, 甩干, 加入 1:5000 倍(V/V)稀释的酶标记羊抗兔抗体, 37 °C 温箱中孵育 30 min, 洗液洗涤 6 次, 甩干, 加显色液, 37 °C 温箱中孵育 10 min, 加入 50 μL/孔的终止液, 测 $A_{450\text{ nm}}$ 值。再通过四参数 Logistic 拟合曲线计算 IC_{50} , 确定本方法检测范围, 最终确定本方法最低检测限。

2.2.5 添加回收实验方法

称取 5 g 磨碎后的饲料样品于 50 mL 离心管中, 加入 10 mL 50% 的甲醇:水溶液(1:1, V/V), 震荡 5 min, 4000 r/min 离心 5 min, 检测时吸取上清液进行试验。

3 结果与分析

3.1 半抗原的结构鉴定

目标产物相对分子质量 275.05, 图 2 中反应物中可见存在 m/z 为 273.8 和 274.8 的关键物质质谱峰, 该物质相对分子质量与目标产物高度吻合, 可基本推断目标半抗原合成成功, 也可证明该合成路线可用于硝基呋喃类原型药半抗原的合成。图中 273.8 分子离子峰为最强峰, 说明该产物是反应体系中最主要成分, 产物纯度高。

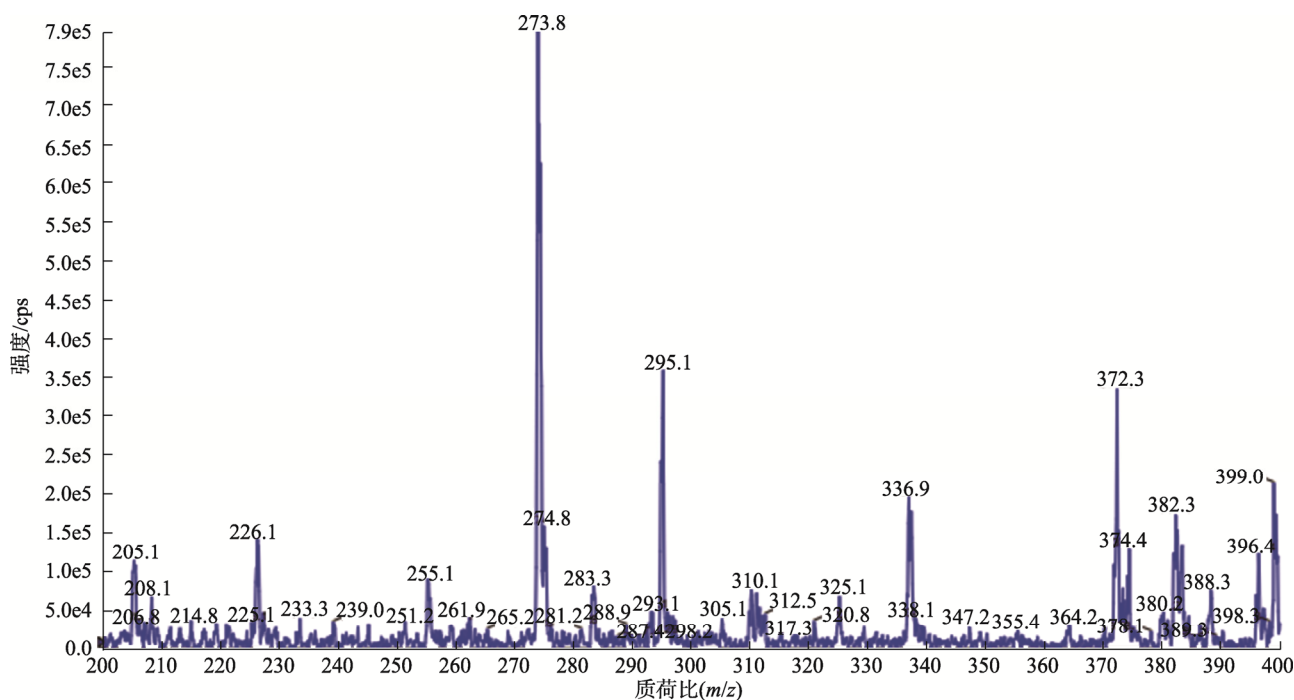


图 2 硝基呋喃半抗原负离子质谱图

Fig.2 The negative MS of NFHBA

3.2 免疫原和包被原的鉴定

抗原偶联是抗体制备的关键环节,载体蛋白和半抗原在紫外-可见光区会出现各自吸收峰,偶联物同时具有载体蛋白和半抗原的特征吸收峰可以说明偶联成功^[13]。取 NFHBA、BSA、OVA、NFHBA-BSA、NFHBA-OVA 分别进行紫外(200~600 nm)扫描鉴定,并比较偶联前后各物质的最高吸光值(见图 3)。结果表明免疫原 NFHBA-BSA 的吸收曲线与 NFHBA、BSA 明显不同,是一种 BSA 和 NFHBA 的累加吸收特征。因为透析后不存在游离的 NFHBA,所以这种累加的吸收特征为免疫原 NFHBA-BSA 的偶合物贡献,而非游离 NFHBA 和 BSA 累加贡献,说明免疫原 NFHBA-BSA 合成成功。同理,免疫原 NFHBA-OVA 合成成功。

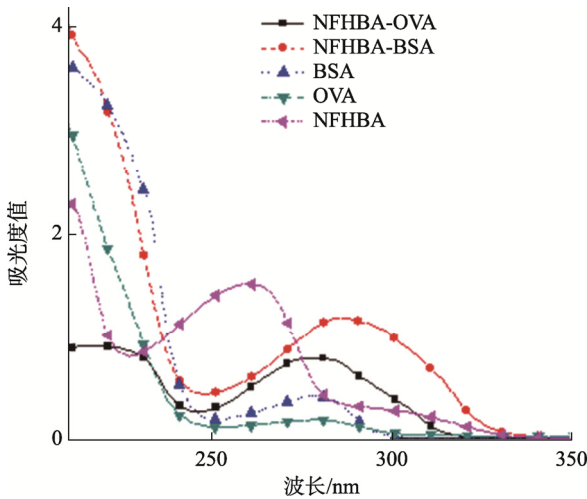


图 3 NFHBA-BSA/OVA 紫外吸收曲线
Fig.3 UV spectrum of NFHBA-BSA/OVA

3.3 单抗的灵敏度的测定

所制备抗体可采用间接 ELISA 鉴定法^[14],利用 Originlab 7.5 4 参数拟合模块对间接竞争 ELISA 反应曲线完成 S 拟合,可计算曲线 IC₅₀ 值,以 NFHBA-OVA 为包被原,建立呋喃西林间接 ELISA 缓冲液标准曲线(见图 4),其 IC₅₀ 结果为 26.6 ng/mL,检出限(limit of detection, LOD)为 1.75 ng/mL,定量检测线性范围为 4.8~189.8 ng/mL。

3.4 抗体特异性测定

抗体特异性可以通过结构类似物的交叉反应(cross-reactivity, CR)来判断。交叉反应率则可通过测定该抗体对反应药物的半抑制浓度(IC₅₀)来确定,以一个检测药物作为对照交叉反应率其 CR 设为 100%,本研究以抗体对呋喃西林的 IC₅₀ 值作为对照,抗体对其他药物的交叉反应计算如公式所示:

交叉反应率(%) = $\frac{IC_{50}(\text{呋喃西林})}{IC_{50}(\text{竞争物})} \times 100\%$

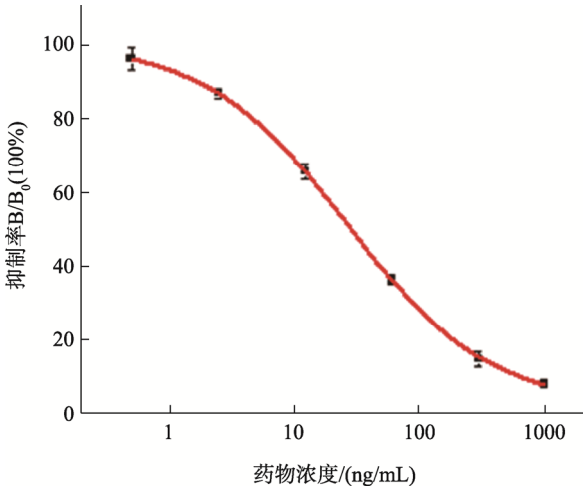


图 4 呋喃西林间接 ELISA 缓冲液标准曲线(n=3)
Fig.4 The icELISA standard curve of nitrofurazone (n=3)

表 1 多克隆抗体与呋喃类药物的交叉反应率
Table 1 Cross reactivity of polyclonal antibody with analogous compound of nitrofurans

化合物	分子结构	IC ₅₀ /(μg/L)	CR/%
呋喃西林 (nitrofurazone)		26.6	100
呋喃唑酮 (furazolidone)		5.2	511.5
呋喃它酮 (furaltadone)		6.4	415.6
呋喃妥因 (nitrofurantoin)		4.2	633.3
硝呋索尔 (nifursol)		132.8	20

本研究所获得的多克隆抗体与硝基呋喃类典型的几种药物均有不同程度的交叉反应,其中与呋喃妥因、呋喃唑酮、呋喃它酮、呋喃西林交叉反应率超过 100%(见表 1),说明该抗体可特异性结合 5-硝基糠醛与胍形成的脲式结构的类型化合物。因交叉反应高可用于此类型药物的多残留检测。

3.5 添加回收实验

对饲料样品采用 ELISA 方法进行检测,每个添加浓度做 3 次平行,表 2 结果显示,平均回收率为 72.8%~92.4%,变异系数(coefficient of variation, CV)均小于 20%。

表 2 添加回收实验(n=3)				
Table 2 Recovery test results with feed as samples (n=3)				
添加药物	添加量 (ng/g)	平均回收量± 标准偏差 (ng/g)	平均回收率 /%	CV/%
呋喃西林	25.0	22.1±4.1	88.4	18.5
	10.0	8.42±1.45	84.2	17.2
呋喃唑酮	10.0	8.82±1.45	88.2	16.4
	5.0	4.45±0.75	89.0	16.9
呋喃它酮	10.0	8.63±1.25	86.3	14.5
	5.0	4.51±0.58	90.2	12.9
呋喃妥因	10.0	8.69±1.41	86.9	16.2
	5.0	4.25±0.65	83.0	15.3

4 结 论

本研究通过独特的半抗原合成方法制备了人工抗原, 通过动物免疫制备了多克隆兔抗体, 通过交叉反应鉴定, 该抗体均可识别 5-硝基糠醛与胍形成的脲式结构的类型化合物, 实现了硝基呋喃类多种主要药物的同时检测, 弥补了该类药物多残留快速检测的空白, 对此类药物多残留同步快速免疫检测试剂盒的开发与研制提供关键技术参考。

参考文献

[1] 贾涛. 饲料中硝基呋喃类药物的检测研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2011, 7: 37-40.
Jia T. Progress in the detection of nitrofurans in feed [J]. Feed Anim Husbandry, 2011, 7: 37-40.

[2] Leitner P, Zollner P, Lindner W. Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissues by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2001, 939: 49-58.

[3] Laurentius AP, Hoogen B, Gerard D, et al. Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2002, 11: 273-287.

[4] 杨宝学, 孙凯. 硝基呋喃对大鼠脾淋巴细胞非程序 DNA 合成的诱导作用[J]. 卫生毒理学杂志, 1990, (2): 12-13.
Yang BX, Sun K. Induction of non-programmed DNA synthesis in spleen lymphocytes of rats [J]. J Toxicol, 1990, (2): 12-13.

[5] 王金荣, 李德发, 张丽英, 等. 饲料中 5 种硝基呋喃类药物的反相高效液相色谱同步测定方法[J]. 分析测试方法, 2005, 30(1): 292-294.
Wang JR, Li DF, Zhang LY, et al. Simultaneous determination of five nitrofurantoin drugs in feed by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Anal Test Method, 2005, 30(1): 292-294.

[6] Cooper KM, Mulder PPJ, van Rhijn JA, et al. Depletion of four nitrofurantoin

antibiotics and their tissue-bound metabolites in porcine tissues and determination using LC-MS/MS and HPLC-UV [J]. Food Addit Contam, 2005, 22(5): 406-414.

[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(1-2): 359-365.

[8] Chang C, Peng DP, Wu J, et al. Development of an indirect competitive ELISA for the detection of furazolidone marker residue in animal edible tissues [J]. J Agric Food Chem, 2008, 56: 1525-1531.

[9] 肖桂英, 郭海霞, 娄喜山. 高效液相色谱法同时测定饲料及兽药中四种硝基呋喃类药物[J]. 分析仪器, 2010, (3): 30-33.
Xiao GY, Guo HX, Lou XS. Simultaneous determination of four nitrofurans in feed and veterinary drugs by high performance liquid chromatography [J]. Anal Instrum, 2010, (3): 30-33.

[10] 罗杰, 李健. 呋喃唑酮间接竞争 ELISA(cELISA)检测法的建立[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(2): 213-218.
Luo J, Li J. Establishment of indirect competitive ELISA (ciELISA) for furazolidone [J]. J China Ocean Univ, 2005, 35(2): 213-218.

[11] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
Zhu LP, Chen XQ. Common experimental methods of immunology [M]. Beijing: People's Military Medical Publishing House, 2000.

[12] Lei HT, Shen YD, Song LJ, et al. Hapten synthesis and antibody production for the development of a melamine immunoassay [J]. Anal Chim Acta, 2010, 665(1): 84-90.

[13] Oplatowska M, Connolly L, Stevenson P, et al. Development and validation of a fast monoclonal based disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of triphenylmethane dyes and their metabolites in fish [J]. Anal Chim Acta, 2011, 698(1-2): 51-60.

[14] 徐瑞霞, 时那, 宋莉, 等. ELISA 方法在基础医学研究中的应用及注意事项[J]. 标记免疫分析与临床, 2011, (6): 429-432.
Xu RX, Shi N, Song L, et al. Application and precautions of ELISA in basic medical research [J]. Label Immunoass Clin Pract, 2011, (6): 429-432.

(责任编辑: 苏笑芳)

作者简介

袁利鹏, 硕士, 副教授, 主要研究方向为农兽药残留免疫分析检测。
E-mail: 543753927@qq.com

刘 波, 硕士, 副教授, 主要研究方向为食品营养、安全检测。
E-mail: rainbow719518@126.com