

鳗鱼中恩诺沙星残留量的酶联免疫检测方法

郑 晶, 黄晓蓉, 李耀平, 李小晶, 林 杰
(福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350003)

摘 要: 运用酶联免疫分析方法测定鳗鱼中恩诺沙星残留。测试曲线线性范围为 $0.3 \sim 10 \mu\text{g/kg}$, 最低检测限为 $3 \mu\text{g/kg}$ 。向样品中分别添加 25、50、 $100 \mu\text{g/kg}$ 3 个浓度水平的恩诺沙星, 平均回收率分别为 74.5%、76.6% 和 66.5%, 批内变异系数为 7.62%~14.31%, 批间变异系数为 6.03%~7.00%, 灵敏度达到 $0.3 \mu\text{g/kg}$ 。特异性试验结果表明与喹诺酮类中的其它药物以及其它类抗生素均无交叉反应。

关键词: 鳗鱼; 恩诺沙星残留; 酶联免疫方法

Determination of Remained Enrofloxacin in Eel by ELISA

ZHENG Jing, HUANG Xiao-rong, LI Yao-ping, LI Xiao-jing, LIN Jie
(Fujian Province Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Remained Enrofloxacin in eel were determined by ELISA. The calibration curve should be virtually linear in the range of $0.3 \sim 10 \mu\text{g/kg}$. The limit of detection (LOD) is $3 \mu\text{g/kg}$. Adding Enrofloxacin to eel samples, the concentration is 25, 50 and $100 \mu\text{g/kg}$ separately. Average recovery rate is 74.5%, 76.6%, and 66.5% separately. Coefficient of variation in same batch is 7.62%~14.31%. Coefficient of variation in different batch is 6.03%~7.00%. Sensitivity is $0.3 \mu\text{g/kg}$. The result of special test is as following: No cross-reactivities happened to other drugs.

Key words: eel; remained Enrofloxacin; ELISA

中图分类号 TS207

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2004)10-0247-04

恩诺沙星(Enrofloxacin, ENR)是于20世纪80年代以来出现的抗菌谱更广、抗菌作用更强的第三代氟喹诺酮类药物之一, 化学结构为($\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3$), 分子量为 359.1646。因其能抑制细菌 DNA 螺旋酶、抗菌谱广、高效、低毒、组织穿透力强, 抗菌作用是磺胺类药的近千倍, 加之系化学合成药物, 价格低廉, 故在医学和兽医学

中很快取得广泛应用, 尤其在水产养殖中成为最重要的抗感染药物之一。由于致病菌产生耐药性和某些潜在的致癌性质, 其残留问题已引起广泛关注^[1]。2003 年初, 日本在我国出口烤鳗中检出恩诺沙星, 并利用其食品卫生法中“动物源性食品中不得含有合成抗生素”的规定, 使我国出口烤鳗受阻。因此, 我国及日本从 2003 年起加强了出口日本鳗鱼及其制品恩诺沙星残留检测。目前测定组织恩诺沙星残留的检测方法包括: 作为过筛方法的微生物抑制实验(MIA)和免疫方法, 薄层色谱

收稿日期: 2004-07-09

作者简介: 郑晶(1973-), 女, 工程师, 从事食品微生物和抗生素残留检测。

在溶样杯中直接消解时可能导致消解不完全, 这时, 势必要增加预处理过程, 带来不必要的麻烦。

参考文献:

- [1] 于炎湖. 警惕饲料中镉的污染与危害[J]. 中国饲料, 2001, (5): 21-23.
- [2] 司文会. 镉的污染与人体健康[J]. 世界元素医学, 2000, (9): 102-104.

- [3] 林克惠. 微量元素对作物和人的危害[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 94-96.
- [4] Petter Barrett, Leon J, Davidowski Jr, et al. Microwave oven based wet digestion technique[J]. Anal Chem, 1978, 50 (7): 1021-1023.
- [5] 王大宁. 微波辅助湿法消解植物样品的研究[J]. 分析化学, 1990, 18(5): 482-484.
- [6] 但德忠. 微波溶样技术[J]. 化学通报, 1989, (10): 46-49.

(TLC)、高效液相色谱法(HPLC)、气质联用法(GC/MS)^[2]。近年更多使用了高灵敏和较新的分析技术,如LC/FLD、LC/MS或LC/MS/MS等。基于酶联免疫分析方法不需要配备昂贵的仪器设备,不需要复杂的样品前处理提取步骤,具有快速、灵敏、大量样品残留检测,易于在基层推广等许多优点,本研究选用荷兰EURO-DIAGNOSTICA公司生产的恩诺沙星试剂盒,应用于鳊鱼恩诺沙星残留检测分析,并评价了该方法。

1 实验部分

1.1 试剂和材料

标准品恩诺沙星(enrofloxacin, ENR),纯度为99.0%;环丙沙星(ciprofloxacin, CIF),纯度为93.0%;诺氟沙星(norfloxacin, NOR),纯度为99.0%;氧氟沙星(Ofloxacin, OFL),纯度为99.0%;单诺沙星(danofloxacin, DAN),纯度为98.4%;洛美沙星(lomefloxacin, LOM),纯度≥98.0%;噁喹酸(Oxolinic acid, OXO),纯度99.0%;依诺沙星(enoxacin, ENO),纯度98.0%;托舒沙星(tosufloxacin, TOS),纯度99.0%;以及其它抗生素标准均购自德国Dr. Ehrenstorfer。

甲醇试剂为分析纯,所用水为重蒸馏水。恩诺沙星酶联免疫测定试剂盒购自荷兰EURO-DIAGNOSTICA公司(包括96个微孔板,冻干恩诺沙星标准品;冻干过氧化物酶恩诺沙星结合物;冻干恩诺沙星抗体;底物;中性稀释液;终止液;洗涤缓冲液)。

1.2 主要仪器

450nm波长酶标仪;均质器;涡旋振荡器;冷冻离心机;37℃恒温箱;微量移液器。

1.3 原理

恩诺沙星96微孔均用羊抗兔抗体IgG包被。特异性抗体(兔抗恩诺沙星),恩诺沙星标记的酶(酶结合物)和恩诺沙星标准品或样品被加入到微孔后,特异性抗体被牢固地结合在板条上的羊抗兔抗体IgG上,与此同时,游离的恩诺沙星(在标准溶液或样品中)和酶结合物与特异性抗体竞争性结合。经过1h孵育,在洗涤步骤中除去未结合(酶标记物)试剂,加入色原底物,结合的酶结合物可将无色的色原转化成为有色的产物。加入硫酸,终止底物反应,在450nm波长检测吸光度就能定量检测样品中恩诺沙星的含量。吸光度值或光密度与样品中的恩诺沙星浓度呈反比。

1.4 检测部分

1.4.1 检样制备

剖杀鳊鱼,除去内脏后洗净,用刀把割下的鱼皮置于微波炉中高火微波30s,取出后与鱼肉一起切碎,用均质器均质。取1g均质样品到玻璃试管,加入3ml

80%的甲醇,室温下涡旋混合5min后,10℃,2000g离心10min,取50μl清亮的上清液加入到150μl稀释缓冲液中,混匀,即是检样溶液。

1.4.2 检测步骤

按试剂盒说明书稀释恩诺沙星酶结合物、恩诺沙星抗体、恩诺沙星标准液和洗涤缓冲液。准备好实验所需数量的微孔条(加入的空白、零标准、标准液和样液均设复份)。滴加100μl稀释缓冲液/20%甲醇的混合溶液作为空白对照,滴加50μl稀释缓冲液/20%甲醇的混合溶液作为零标准对照,滴加50μl各恩诺沙星标准稀释液(0.313、0.625、1.25、2.5、5、10μg/kg)和检样溶液于其余各孔。滴加25μl稀释的酶结合物和25μl稀释的恩诺沙星抗体溶液于除空白对照外的全部各孔,封板,摇板1min,37℃下在暗处温育1h。弃去微孔中的溶液,用洗涤缓冲液洗3次,将微孔板倒置在吸水纸上平稳叩击,除去微孔中残余洗涤液。将100μl底物溶液加入全部各孔,室温25℃下温育30min,加入100μl终止液于各孔中,立即读取450nm吸光度值。

1.4.3 定量计算

按公式(1)计算标准液和样液的百分比吸光度值:

$$A = \frac{OD_s - OD_{空白}}{OD_{零标准} - OD_{空白}} \times 100\% \quad (1)$$

OD_s—标准液或样液平均吸光度值;

OD_{空白}—空白对照平均吸光度值;

OD_{零标准}—零标准平均吸光度值。

用半对数坐标系处理数据,以百分比吸光度值为纵坐标,以恩诺沙星浓度(对数)为横坐标,通过线性回归绘制标准液的标准线性曲线,通过标准曲线得出各样品恩诺沙星浓度,或用数据分析软件计算其浓度,如样品浓度超出标准范围,需调整样品的稀释倍数。从标准曲线得出的浓度需乘以稀释度才为样品恩诺沙星的含量。

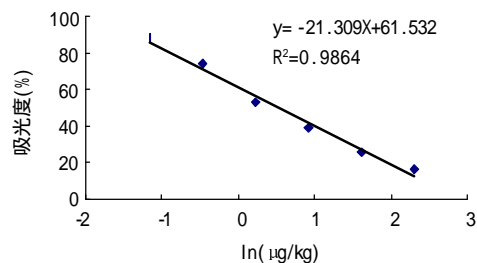


图1 标准曲线图

2 结果与讨论

2.1 鳊鱼回收率和精密度试验

表1 回收率、批内变异系数试验数据(n=12)

样品添加水平(μg/kg)	25		50		100	
添加样品测得值(μg/kg)	16.141	18.007	45.602	44.882	62.323	71.069
	19.421	24.955	40.150	35.774	60.974	61.952
	20.412	16.432	30.147	39.831	64.853	65.241
	19.001	19.115	40.875	40.632	72.353	71.352
	15.145	17.478	37.598	40.632	57.213	69.117
	20.905	16.630	34.310	28.971	70.086	71.494
平均值(μg/kg)	18.637		38.284		66.502	
回收率(%)	74.5		76.6		66.5	
变异系数(%)	14.31		12.98		7.62	
鳗鱼本底测得值(μg/kg)	1.849 2.562 3.034 2.614 平均值 2.515					
添加用标准溶液	溶液稀释至5μg/kg					
测得值(μg/kg)	5.209	5.091	4.929	4.524	4.922	平均值 4.935
排除本底和标准溶液的误差后回收率(%)	65.3		72.5		64.8	

2.1.1 鳗鱼试验材料筛选 选择恩诺沙星残留阴性的鳗鱼作为添加试验材料,因鳗鱼难免残留少量的恩诺沙星本底,所以用酶联免疫方法对鳗鱼进行检测时,对阴性试材重复测定4次,确定试材的本底,以排除本底干扰。

2.1.2 在确定本底的鳗鱼中分别添加25μg/kg, 50μg/kg和100μg/kg三个浓度水平的恩诺沙星标准,用同一批号试剂盒测定,每一浓度测定12次,计算回收率和批内变异系数,结果如表1所示。

2.1.3 分别用3个不同批号试剂盒测定添加水平为25μg/kg, 50μg/kg和100μg/kg的鳗鱼样品各3次,计算批间变异系数,结果如表2所示。

表2 批间变异系数试验数据

样品添加水平	25	50	100
试剂盒1测得平均值(μg/kg)	18.217	44.682	70.069
试剂盒2测得平均值(μg/kg)	17.633	42.375	74.321
试剂盒3测得平均值(μg/kg)	16.010	38.842	65.864
平均值(μg/kg)	17.287	41.966	70.085
批间变异系数(%)	6.61	7.00	6.03

该试剂盒用于鳗鱼添加回收试验,其回收率平均为72.5%,排除添加用标准、样品本底的干扰,其平均回收率为67.5%。添加试验回收率不高,推测其原因,可能是恩诺沙星对组织的渗透力较强,可通过氢键、亲脂力和范德华力与机体蛋白产生较为紧密的结合,不能够完全被提取液溶出所致。添加样品测定的批内变异系数为7.62%~14.31%,批间变异系数为6.03%~7.00%,批间变异系数明显小于批内变异系数,我们分析可能是由于表1中的12次测定,是对同一样品中进行12次的重复取样、制样,由于样品均匀性,操作误差等因素的影响,其变异系数范围要大一些,而表2中的3次测

表3 灵敏度测定结果

“0”标准吸光度值	1.502 1.453 1.652 1.409 1.526 1.498 1.622 1.442 1.596 1.500
平均值	1.52
标准差	0.08
标准曲线	$Y = -21.309x + 61.532$ $R^2 = 0.9864$
灵敏度(μg/kg)	0.23

定则是对同一取、制备的样品进行3次测试,虽然是用不同批号的试剂盒进行测定,但样品的均一性好,所以变异系数波动范围相对较小,因此,我们认为不同的试剂盒对检测结果影响不大,重复性较好。

2.2 灵敏度试验

按照2.4.2步骤同时测定10个“0”标准溶液的吸光度值,求出其平均值,再减去两倍标准差,从标准曲线上计算出这个吸光度值对应的浓度,即为灵敏度,结果如表3所示。

本试验灵敏度为0.23μg/kg,达到试剂盒中所示的0.3μg/kg,乘以样品稀释倍数12,则样品的检测下限可达到3μg/kg,表明该方法有较高的灵敏度。

2.3 标准曲线的重复性

进行标准曲线的重复性试验,6个月内测定同一批号试剂盒的恩诺沙星标准曲线8次,批内变异系数为5.36%~8.49%,测定3个不同批号试剂盒的恩诺沙星标准曲线6次,批间变异系数为5.78%~9.13%,标准曲线的批内变异系数和批间变异系数无明显差别,这也证明样品的均匀性、操作误差是变异系数较大的原因。

2.4 特异性试验

根据试剂盒检测范围喹诺酮类药物浓度选择5μg/kg和50μg/kg,其它类抗生素药物浓度选择100μg/kg进行特异性试验,重复测定3次取平均值,结果见表4。

表4 特异性试验结果

药物名称	浓度($\mu\text{g/kg}$)	450nm 吸光度值
零标准对照(试剂盒提供)	0	1.419
恩诺沙星(试剂盒提供)	2.5	0.501
恩诺沙星(Dr.Ehrenstorfer)	2.5	0.598
恩诺沙星(试剂盒提供)	5	0.310
恩诺沙星(Dr.Ehrenstorfer)	5	0.327
恶喹酸	5	1.551
氧氟沙星	5	1.618
依诺沙星	5	1.567
托舒沙星	5	1.640
洛美沙星	5	1.689
环丙沙星	5	1.695
诺氟沙星	5	1.908
单诺沙星	5	1.622
恶喹酸	50	1.623
氧氟沙星	50	1.475
依诺沙星	50	1.554
托舒沙星	50	1.643
洛美沙星	50	1.626
环丙沙星	50	1.649
诺氟沙星	50	1.724
单诺沙星	50	1.606
新生霉素	100	1.596
庆大霉素	100	1.568
螺旋霉素	100	1.514
红霉素	100	1.521
林可霉素	100	1.480
卡那霉素	100	1.848
氨基苄西林	100	0.344
土霉素	100	0.151
四环素	100	0.129

吸光度值与恩诺沙星浓度成反比,表4中零标准吸光度值为1.419,除氨基苄西林、土霉素、四环素外,其余各种抗生素的吸光度值均大于零标准,可以认为这些抗生素药物与恩诺沙星无交叉反应。而造成氨基苄西林、土霉素、四环素标准液吸光度值低的原因,我们分析是由于标准配制所使用的缓冲溶液pH值不同引起的,喹诺酮类药物和除氨基苄西林、土霉素、四环素外的抗生素标准溶液配制均使用为pH值为8.0的缓冲液,试剂盒中稀释缓冲液pH为7.5,而氨基苄西林配制使用pH值为6.0缓冲液,四环素类配制使用pH值为4.5缓冲液,pH值差别越大,则对检测结果影响越大。我们用试剂盒中稀释缓冲液重新配制氨基苄西林、土霉素、四环素后进行测定,吸光度值均大于零标准吸光度值。因此可以认为以上抗生素与恩诺沙星均无交叉反应。

2.5 方法实际检测

应用本方法对97份鳊鱼和20份烤鳊样品进行了日常测定,同时用高效液相色谱-荧光检测法分析,高效液相色谱-荧光检测法的检测低限为 $10\mu\text{g/kg}$,结果如表5。

表5

测定结果	酶联免疫 分析法	高效液相色谱 —荧光检测法	符合率
$<10\mu\text{g/kg}$ 样品数	94	94	100%
$>10\mu\text{g/kg}$ 样品数	23	22	95.7%

以 $10\mu\text{g/kg}$ 作为酶联免疫检测方法样品检出限,从上表中可认为假阴性率为0,假阳性率为4.3%。酶联免疫方法应用于烤鳊样品的检测中与鳊鱼无显著区别,只需注意在烤鳊样品的制备中去除干净酱油等其它物质。

3 小 结

本文采用酶联免疫分析方法对鳊鱼中恩诺沙星残留进行检测,证明该方法的最低检测限可达到 $3\mu\text{g/kg}$ 。向样品中分别添加25、50、 $100\mu\text{g/kg}$ 3个浓度水平的恩诺沙星,平均回收率分别为74.5%、76.6%和66.5%,批内变异系数为7.62%~14.31%,批间变异系数为6.03%~7.00%。灵敏度试验结果为 $0.23\mu\text{g/kg}$,达到试剂盒所示的 $0.3\mu\text{g/kg}$ 。特异性试验显示与喹诺酮类中的其它药物以及其它类抗生素均无交叉反应,结果表明该方法灵敏度高,重复性好。运用酶联免疫分析方法对鳊鱼和烤鳊中恩诺沙星残留量进行筛选,能在几个小时内检测几十到上百个样品,样品预处理简单,仪器设备投资少,具有快速、简单、特异性高、灵敏性高的优点,是药物残留检测发展的趋势。在目前筛选法少,检测限不统一,检测结果判定较为困难的前提下,酶联免疫方法作为一种快速筛选手段,可在基层实验室中推广使用。

参考文献:

- [1] 李俊锁,邱月明,王超. 兽药残留分析(第1版)[M]. 2002. 257-258.
- [2] Sherri B. Turnipseed Austin R Long. 动物源性食品中药物残留分析方法[M]. 1998. 484-497.
- [3] Suhren G, Hammer P, Heesch W. Residues of veter drugs in food proceedings of the euroResidue III conf [J]. Veldhoven The Netherlands, 1996, (5): 917-921.