

酶联免疫和气质联用检测动物不同组织中 残留甲羟孕酮

刘剑波¹, 彭池方², 胥传来^{2,*}, 金征宇²

(1. 湖南岳阳市质量技术监督局, 湖南 岳阳 414000 2. 江南大学食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 本文应用酶联免疫分析(ELISA)测定了MPA在动物源可食性组织中的残留量, 并采用气相色谱-质谱联用(GC-MS)方法加以确证。以0.8mg/kg剂量连续喂服5d, 停药7d后, 白兔的腿肌肉、肝脏和肾脏中MPA残留量分别为白兔腿肌肉残留量为7、6、23 μ g/kg水平。分析GC-MS确证方法与ELISA方法所得结果, 两者检测结果相关性良好。

关键词: 甲羟孕酮; 残留; 酶联免疫分析; 气相色谱-质谱联用

Analysis of Medroxyprogesterone Acetate in Animal Tissues by ELISA and GC-MS

LIU Jian-bo¹, PENG Chi-fang², XU Chuan-lai^{2,*}, JIN Zheng-yu²

(1. Yueyang Bureau of Quality and Technical Supervision, Yueyang 414000, China

2. School of Food Science and Technology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The MPA residue was determined by ELISA in the edible tissues derived from animal. After 5 days oral administration at 0.8mg/kg, the MPA residue in muscle, liver and kidney were 7, 6 and 23 μ g/kg, respectively. The above results are confirmed by GC-MS. And a good correlation is observed between the GC-MS and ELISA methods.

Key words: MPA (medroxyprogesterone acetate); residue; ELISA; GC-MS

中图分类号: R392-23 0657.63

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2007)03-0257-04

甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate, MPA)为一种合成孕激素, 属于同化激素, 具有蛋白质同化作用, 在畜牧养殖中主要用于动物繁殖、生育疾病治疗等, 同时它在促生长应用中也有很长的历史。长期摄入过量残留MPA等同化激素的动物食品会给人体带来许多危害, 目前许多国家都禁止同化激素用于动物催肥^[1-2]。我国农业部也制定有关激素使用的法规^[3], 开始逐步规范这些兽药的使用。

研究兽药在不同靶组织的残留分布情况, 不仅可以为MRL(最大残留限量)的制定提供科学的参考, 同时对实际情况中选择何种靶组织和监测方法也具有重要意义。目前, 许多国家对MPA都规定了残留限量, 或禁止检出, 而我国对MPA在可食性动物组织的残留尚未作出明确规定。有关MPA在动物饲养中的研究主要是针对其同期发情的应用, 对其残留检测的研究也主要是仪器分析方法^[1-4], 而ELISA方法较少, 且主要是ELISA药物代谢研究中的应用^[5-6]。

因此, 有必要采用ELISA方法分析MPA在动物不同可食性组织中的残留量, 开展该方法对靶组织的应用研究。对于兽药残留的监测和分析, 目前常采用的检测流程是先采用ELISA方法筛选, 再采用仪器分析, 如GC-MS、LC-MS2等方法加以确证。本文采用先采用ELISA方法检测阳性白兔的肌肉、肝脏、肾脏中MPA的残留量, 然后采用GC-MS方法加以确证, 初步得到MPA在动物可食性组织中的残留分布情况, 并探讨两种方法检测动物可食性组织的可行性。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

醋酸甲羟孕酮检测试剂盒 荷兰Euro-diagnostica公司; C₁₈固相萃取小柱(500mg/6ml)、色谱纯乙腈 江苏汉邦科技公司; 醋酸甲羟孕酮、N-甲基-N-三甲基硅烷-三氟乙酰胺(MSTFA)和三甲基氯硅烷(TMCS) Sigma公司; 其它未经说明试剂均为分析纯。

收稿日期 2006-04-11

*通讯作者

基金项目: 国家自然科学基金项目(20475022)

作者简介: 刘剑波(1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向为食品安全。

2月龄雌性新西兰白兔和饲料为无锡山禾药业公司 SPF 动物实验室提供。

1.2 仪器

MuLtika Mks 酶标仪; Wellwash Plus 洗板机; 可调试移液器 Thermo electron 公司; 气相色谱-质谱仪: Agilent 6890N 气相色谱-Agilent 5973N 型质谱检测器; 色谱柱: Agilent 122-1032 毛细管柱 DB-1, 0.25mm × 30m × 0.25 μm; FA25 匀质器 Fluka 公司; TDL80-2B 离心机 上海安亭仪器公司。

1.3 方法

1.3.1 动物饲养与样品制备

3只白兔, 将MPA水悬浊液(0.8mg)经14号导尿管灌入每只兔胃中, 一日一次, 连续5d, 定期定量喂养饲料, 宰杀前休药7d。分离肝脏、肾脏和腿部肌肉, 分别剪碎, 匀质。

1.3.2 ELISA 分析

取1.0g匀质样品于玻璃管中, 按照ED公司试剂盒说明书(版本: 5131MPA1p[2]09.02)进行样品的提取、净化及ELISA操作。

1.3.3 GC-MS 分析

参考上述说明书, 如下提取、净化样品。加入10.0ml 环己烷, 涡旋30s, 2000r/min 离心5min, 取上清。上清转移至未活化的C₁₈柱中(流速约为0.5ml/min), 以3ml 环己烷洗涤柱子, 真空干柱10min, 用3.5ml 80% 甲醇洗脱, 加2ml 蒸馏水到洗脱液中。再转移到另一C₁₈柱(分别用5ml 100%和5ml 50%甲醇预先洗涤), 用7.0ml 50% 甲醇洗涤柱子, 真空干柱; 用5.5ml 80% 甲醇洗涤柱子(流速1.0ml/min)。

提取净化液的碱解^[7]50 氮气蒸发洗脱液, 残余物溶于0.2ml 1.0mol/L KOH 甲醇碱解液, 37℃下保温30min, 加入1.0ml 酸性缓冲液(取1.7ml 盐酸与98.3ml 2mol/L, pH5.2 醋酸盐缓冲液混合)中止水解。此混合液用3.0ml 叔丁基甲醚提取两次, 合并提取液, 40℃用氮气蒸发浓缩, 转移至衍生化小瓶中, 40℃继续氮气蒸发至干。

制备MPA的三甲基硅衍生物^[3]: 衍生化溶液为含有5%TMCS的MSTFA 乙腈溶液(40/60, V/V), 新鲜配制。加100 μl 衍生化溶液至衍生化小瓶中, 60℃烘箱中加热反应10min, 将反应液50℃氮气蒸发至干, 残余衍生物溶于25 μl 异辛烷。

色谱条件如下: 进样2 μl 不分流; 载气为高纯氮, 2.5ml/min; 升温程序为160℃(1min)→20℃/min→300℃; 接口温度 280℃; 质谱条件: 溶剂延迟10min; 电离模式 电子轰击, 70eV; 离子源温度 230℃; 四级杆温度 150℃; 电子倍增器电压 自动调谐值加200V; 选择离子 373、283、265、145。

2 结果与分析

2.1 ELISA 分析

ELISA 分析标准曲线见图1。从图1看出, 作为痕量分析方法, ELISA 标准曲线, 从0.2ng/ml 到40ng/ml, 仍有较好的线性关系。因此, 具备了较好的定量作用。分析结果见表1。由于游离的和乙酰化的甲羟孕酮有可能同时残留于各组织中, 因此, ELISA 分析所得的结果综合了两种形式的甲羟孕酮。因此, 有必要采用GC-MS 等物理方法加以确证。

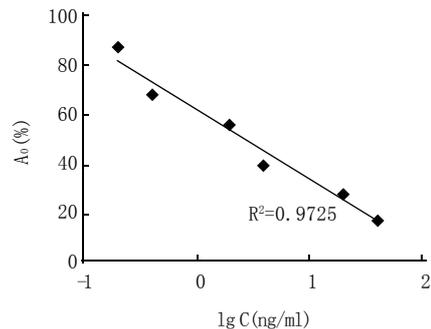


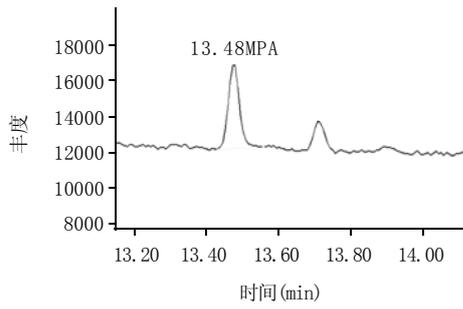
图1 ELISA 标准曲线

Fig.1 ELISA standard curve

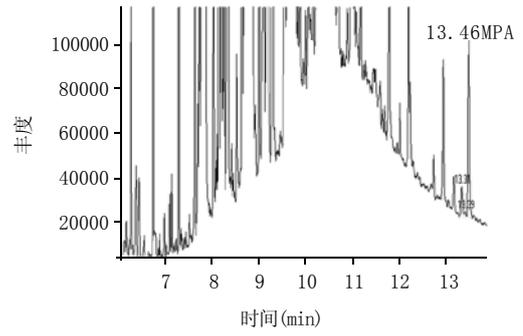
2.2 GC-MS 分析

所采用的GC-MS 方法为文献中所述的欧盟残留检测确证方法。图2 为标准溶液和三种组织样品的总离子色谱图, 采用选择离子为373、283、265 和145 四种离子, 根据欧盟兽药残留质谱确证方法要求^[8], GC-MS 选择四种离子扫描监测, 得到四分, 从而使待测物结构得以确定。分析所得到的色谱峰的质谱图, 将图(d)、(f)和(h)与(b)相比较, 仅有肾脏样品的265 质谱峰相对丰度比其它的高, 这是由于265 峰的相对峰度仅略大于10%, 在电子轰击离子源下, 相对偏差可达到50%, 再加上基质干扰的影响, 使得其偏离较大。通过ELISA 分析得到该肾脏样品中含有MPA, 同时, 采用GC-MS 分析未经过水解处理的此样品时, 肾脏样品在13~14min 区域没有MPA 峰, 而经水解处理后, 该区域找到MPA 峰, 因此, 推测在肾脏中MPA 主要以乙酰化的酯分子形式存在。酯分子无游离的羟基于与所采用的衍生试剂形成三甲基硅烷化醚, 而经过水解, 有了游离的羟基, 可衍生试剂形成三甲基硅烷化醚, 在相对应的保留找到对应的峰, 故而断定其为MPA。

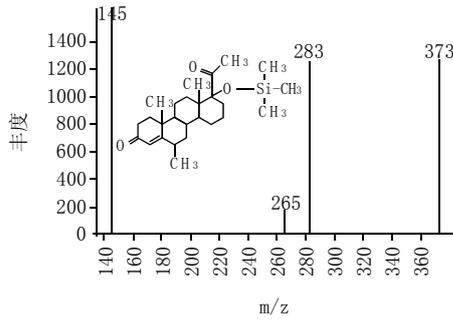
GC-MS 分析所得结果见表1。分析表1 结果, 考虑到动物个体的差异, 分析平均残留量, 白兔腿肌肉残留量为7 μg/kg, 肝脏中残留量为5~6 μg/kg, 肾脏中残留量为23 μg/kg。总体看来, 肌肉和肝脏处于同一数量级, 低于10ng/ml, 而肾脏中残留量则比肌肉和肝



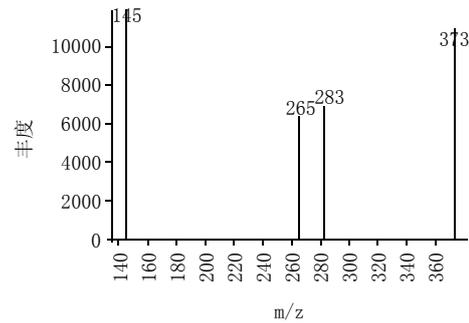
(a) 4.75ng/ml MPA标准总离子色谱图



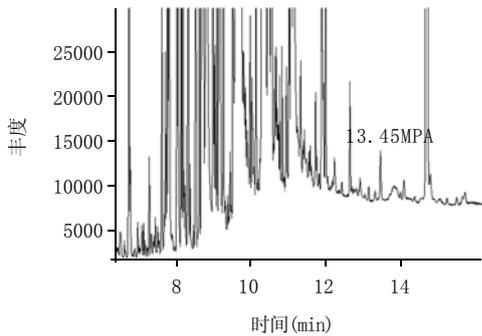
(e) 肾脏总离子色谱图



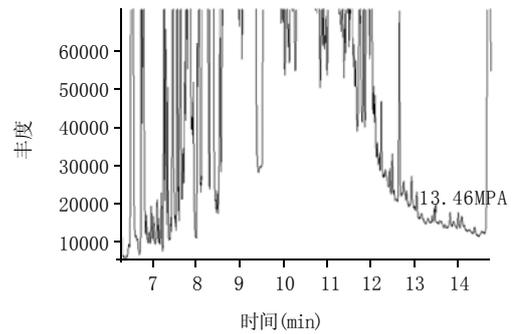
(b) (a)图中保留时间(R_t)对应质谱图



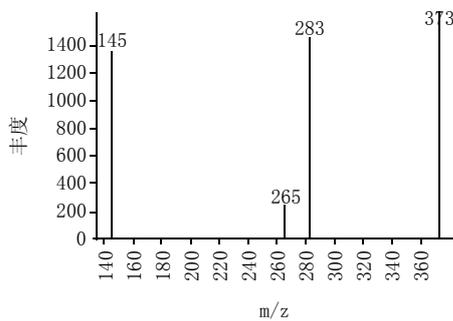
(f) (e)图中R_t 13.31min对应质谱图



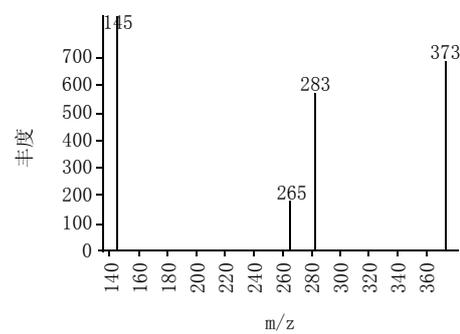
(c) 腿肌肉总离子色谱图



(g) 肝脏总离子色谱图



(d) (c)图中R_t 13.45min对应质谱图



(h) (g)图中R_t 13.46min对应质谱图

图2 各样品 GC-MS 总离子色谱图和质谱图

Fig.2 GC-MS total ion chromatograph of samples and mass spectrums

脏显著高, 大于 20 μg/kg。此外, 由于动物个体的差异, 不同动物间的残留量差异可达到 16%~24%。

2.3 ELISA 和 GC-MS 分析 MPA 在组织中残留的相关性

两种方法结果相关性见图 2, 可见两种方法相关性很高, 从而说明, 在开展 MPA 在兔组织中残留行为的研究时, 采用 ELISA 方法与 GC-MS 方法一样, 均可以

表1 组织中MPA残留ELISA和GC-MS测定结果($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Table 1 Results of residues in tissues ($\mu\text{g}/\text{kg}$)

	腿肌肉		肾脏		肝脏	
	ELISA	GC-MS	ELISA	GC-MS	ELISA	GC-MS
1#	8.1	8.5	20.5	18.3	3.7	5.0
2#	5.2	5.8	29.1	26.8	5.9	6.6
3#	6.8	7.3	20.6	23.5	4.5	5.2
平均	6.7	7.2	23.4	22.9	4.7	5.6
标准偏差	1.5	1.4	4.9	4.3	1.1	0.9
变异系数(%)	22	19	21	19	24	16

得到较准确的数据。

ELISA 作为免疫分析方法, 具有灵敏度高、特异性好, 以及快速方便等优点, 但同时也有一些弱点, 主要是交叉反应和基质干扰带来的假阴性或假阳性。所采用的ELISA 试剂盒除了对MPA(两种甲羟孕酮, 游离的和乙酰化的) 有特异性的识别, 它的系统也能识别其它少数与抗体有交叉反应的分子, 如甲地孕酮等结构类似物。但是, 由于所用的动物为自己饲养, 不会含有除MPA 外的其它外源激素, 故而不会有其它未知的物质影响其测定结果。另外, ELISA 方法易受到样品的基质的干扰, 产生假阴性或假阳性结果。为了得到更“干净”(基质干扰小) 的分析样品, 在样品处理中采用了液液萃取和 C_{18} 柱净化相结合样品处理技术, 可以得到对ELISA 分析基本无干扰的样品, 从而将假阴性或

假阳性结果基本可以消除。

GC-MS 与ELISA 方法比较, 方法精确度更高, 通过物质的质谱图对物质加以确证, 测试结果更直观可靠, 但同时也具有仪器昂贵、费用高、繁琐耗时以及对测试专业技术要求高等缺点。

3 结论

以 $0.8\text{mg}/\text{kg}$ 剂量连续喂服5d, 停药7d后, 白兔的腿肌肉、肝脏和肾脏中MPA 残留量分别为白兔腿肌肉残留量为7、6、 $23\mu\text{g}/\text{kg}$ 水平。分析GC-MS 确证方法与ELISA 方法所得结果, 两者检测结果相关性良好。

参考文献:

- [1] HOOIJERINK H, BENNEKON E O V, NIELEN M W F. Screening for gestagens in kidney fat using accelerated solvent extraction and liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 51-59.
- [2] Council Directive 96/22/EC. Concerning the prohibition on the use in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of β -agonists, and repealing directives 81/602/EEC, 88/146/EEC and 88/299/EEC[J]. Official J Eurn Commun, 1996, L125: 3-9.
- [3] 农业部畜牧兽医局. 农业部发布动物性食品中兽药最高残留限量(续)[J]. 中国兽药杂志, 2003, 37(4): 15-20.
- [4] IMPENS S, DE WASCH K, CORNELIS M, et al. Analysis on residues of estrogens, gestagens and androgens in kidney fat and meat with gas chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 955: 281-293.
- [5] LEWIS L K, ELDER P A, BARRELL G K. An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma medroxyprogesterone acetate (MPA) [J]. J Steroid Biochem Molec Biol, 1992, 42: 179-183.
- [6] KIM J K, ADAM A, LOO J C, et al. A chemiluminescence enzyme immunoassay (CLEIA) for the determination of medroxyprogesterone acetate in human serum[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 1995, 13: 885-891.
- [7] 庄无忌. 动物和动物源食品中兽药残留分析方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2003: 127-151.
- [8] The European Commission. Commission decision of 12 August 2002 implementing council directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results(2002/657/EC) [J]. Official Journal of the European Communities, 2002, 239: 66.

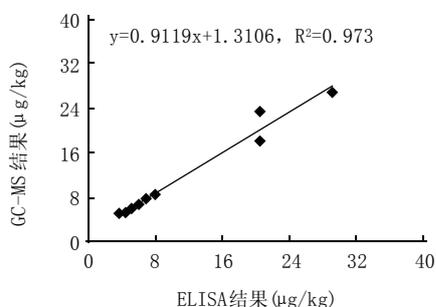


图3 ELISA 和GC-MS 分析各组织中MPA 结果的相关性

Fig.3 Correlation between ELISA and GC-MS value obtained for MPA in the tissues



氧化压力透过讯息传递压制肿瘤生长

根据2007年2月发表于《Cancer Cell》期刊中的一项新研究显示, 细胞内讯息传导机制中MAPK 路径的p38- α , 能够侦测胞内的氧化压力随之变化, 进一步能够压制肿瘤的生长。

p38 为讯息传递路径MAPK 中的一个激酶, 先前研究已知其参与在细胞内压力内的调控, 包括氧自由基的一种一活性氧(reactive oxygen species, ROS)。西班牙国家癌症中心的Angel R. Nebreda博士与其研究团队利用缺乏p38- α 的突变实验鼠, 证实了p38- α 在肿瘤生理学上扮演了压制癌细胞的重要角色。

研究者表示, 致癌基因(oncogene)活化造成ROS 上升, 细胞随即透过p38- α 启动细胞凋亡(apoptosis) 来阻止癌化; 但他们亦发现, 致癌基因似乎能够反制调控ROS 的量来躲避这项保护机制。

专家表示, 这项结果不仅有助于控管癌细胞的发展, 也为新式抗癌治疗法的研发提供许多有力的参考。