保健酒中萘普生免疫学检测方法的建立

郭杰标，郝卿辰，李杏娉，肖仔君，何颖娟，刘艳珊
（韶关学院，广东韶关 512005）

摘要：萘普生是疗效显著但有一定副作用的非甾体抗炎药物，近期频繁发现不法生产者在抗风湿保健酒中添加萘普生增加治疗效果，这种现象对消费者健康构成威胁。为了究建立快速检测萘普生的免疫学方法，本文以活泼酯法将萘普生分别连接到 BSA 制备免疫抗原，连接到 OVA 上制备检测抗原。用免疫抗原免疫家兔制备多克隆抗体，配合检测抗原经条件优化建立竞争抑制酶联免疫吸附检测方法。实验结果表明，检测体系 IC_{50} 值为 23.0 ng/mL，最低检测限为 3.1 ng/mL，检测保健酒中萘普生加标回收率在 87.3~102.1%，变异系数小于 8.9%，与 8 种相关药物交叉反应率都小于 0.05%。且与用 ELISA 方法与 HPLC 检测市售保健酒，1 例阳性和 19 例阴性结果全部吻合。因此，本文所建立的免疫学检测萘普生的实验方法，具有高灵敏度和特异性，能够满足保健酒萘普生快速筛选的需要。

关键词：功能食品；萘普生；违法添加；人工抗原；免疫检测

文章篇号：1673-9078(2013)8-2011-2014

Development of an Immunoassay for Detection of Naproxen in Health Liquor

GUO Jie-biao, HAO Qing-chen, LI Xing-ping, XIAO Zi-jun, HE Ying-juan, LIU Yan-shan
(Shaoguan College, Shaoguan 512005, China)

Abstract: Naproxen,a nonsteroidal anti-inflammatory drug, was frequently reported being adulterated onto antirheumatic health liquors to promote therapeutic effect. This phenomenon poses a serious threat to public health. In order to develop an immunoassay for detection of naproxen, providing an analytical method for rapid screening of illegal products, naproxen was conjugated to BSA and OVA to synthesize artificial antigens using active ester method for preparation of immunogen and testing antigen, respectively. Immunogen was employed to immunize rabbits for raising polyclonal antibodies. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established based on the antibodies and testing antigen. The IC_{50} value and LOD of the optimal ELISA were 23.0 ng/mL and 3.1 ng/mL, respectively. The recoveries were 87.3 ~102.1% and the coefficients of variation (CV%) were less than 8.9% when detecting Naproxen in health liquors. All cross-reactivities against 8 associate drugs were less than 0.05%. The ELISA method was in good agreement with LC-UV when detecting Naproxen in 1 positive and 19 negative health liquors from market. The method was suitable for screening Naproxen as illegal additives in health liquors due to its sensitivity and specificity.

Key words: functional foods; naproxen; illegal adulterant; artificial antigen; immunoassay

风湿性疾病是以关节、肌肉、软组织、神经等疼痛为主要症状，病程多呈慢性和反复发作。临床治疗风湿性疾病主要使用的抗炎镇痛药物存在诸多副作用，而我国又有通过“食疗”调理慢性疾病的传统，针对风湿性疾病的天然功能食品（以保健酒为主）近年来广受市场青睐。非甾体抗炎药物治疗风湿性疾病起效迅速且价格低廉，近期不断发现有不法厂家在保健酒中违法添加这类药物，以增强疗效牟取不正当利益[1~2]。违法产品对消费者的健康造成危害，患者在不知情前提下服用含非甾体抗炎药物的保健食品后，可能产生恶心、头痛、肝功能损伤或过敏性皮疹等不良反应[3~4]，严重的甚至导致过敏性休克和急性肾功能衰竭[5~6]。萘普生是常用的非甾体抗炎药物，曾经被发现违法添加在抗风湿保健酒中[3]，必须加强对这类违法现象的监督抽查。

目前，检测违法添加非甾体抗炎药物的主要方法是高效液相色谱检测[2~3]、液相-质谱联用检测[4]。但是这些方法设备投入大、运行费用高、样品预处理复杂，需要受过专门训练的技术人员进行操作，难以展开大规模筛查。而已经报道的针对违法添加药物的快

收稿日期：2013-04-05

基金项目：香港铭源基金科研项目(2010/188)；广东省营养膳食与健康重点实验室开放基金项目（2011K004）；广东省自然科学基金项目（S2011040001362）；

作者简介：郭杰标(1971-)，博士，讲师，研究食品安全检测

通讯作者：肖仔君(1973-)，博士，副教授，研究食品安全检测

速检测方法，如化学检测方法[5]和薄层色谱法[6]的灵敏度和抗干扰能力都有待提高。免疫学检测方法具有灵敏、特异、快速和价廉的特点，已经在农药残留[7~8]、兽药残留[9~10]和真菌毒素残留[11~13]等食品安全检测工作中推广，快速筛查食品中违法添加药品[14]也有成功应用的报道。本研究开发筛查保健酒中萘普生的酶联免疫吸附检测（ELISA）方法，为大规模的专项打假工作提供有效的筛查工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

新西兰大白兔购自南方医科大学实验动物中心（机构许可证号 SYXK（粤）2005-0056）。

1.1.2 主要药品及试剂

萘普生标准品购自中国药品生物制品检定所；弗氏完全(不完全)佐剂、牛血清白蛋白(BSA)、卵清白蛋白（OVA）、二环己基碳二亚胺（DCC）、N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）购自上海生工；山羊抗兔 IgG 二抗酶结合物购自 Jackson；其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 主要仪器

96 孔酶标板购自 Nunc 公司；紫外/可见光扫描仪购自美国 Thermo 公司；酶标仪购自 Labsystems 公司。高效液相色谱为 Agilent 1100 型（Kromasil C18 柱 4.6 mm×250 mm，P/N 07251967）。

1.2 方法

1.2.1 人工抗原的合成

称取 0.8 mg 萘普生溶解于 1.0 mL 四氢呋喃中，再加入 2.0 mg NHS 和 3.0 mg DCC，室温反应 24 h，10000 r/min 离心 15 min 去除沉淀，取上清液经旋转蒸发得到活化产物。

活化产物溶解于 0.5 mL 二甲基亚砜中，缓慢滴入 BSA 溶液中（10 mg 溶于 2 mL 0.15mol/L $NaHCO_3$）。25 ℃振荡反应 4 h，得到萘普生免疫抗原。同样方法，与 OVA 反应得到萘普生检测抗原。反应完全后，蛋白溶液用 0.01 mol/L PBS（pH 7）溶液充分透析，用紫外扫描判断偶联结果。

1.2.2 萘普生人工抗原偶联比的计算

萘普生在 280 nm 处有特征吸收，测定萘普生浓度消光系数 K_{280}，则人工抗原中萘普生的浓度：Con.萘普生=(A_{280}人工抗原-A_{280}载体蛋白)/K_{280}；用双缩脲法检测载体蛋白质量浓度，计算萘普生的人工抗原偶联比 R。

其中，M 萘普生是萘普生的摩尔质量，M 载体蛋白是载体蛋白的摩尔质量。

$$R=\frac{Con._{萘普生}/M_{萘普生}}{Con._{载体蛋白}/M_{载体蛋白}} \quad (1)$$

1.2.3 动物免疫

将与 BSA 偶联成功的免疫原免疫新西兰雄性大白兔。首次免疫，取 200 μg 免疫抗原与弗氏完全佐剂乳化，采用背部多点免疫健康大白兔。首次免疫后 4 周，然后每间隔 3 周，取免疫抗原 100 μg 与弗氏不完全佐剂乳化加强免疫 4 次。最后一次免疫 8 d 后心脏取血，血液在 4 ℃条件下放置过夜，5000 r/min 离心 10 min，保留血清，并加入等体积的甘油存放于-20 ℃的冰箱中。

1.2.4 血清效价测定

参照 Li 等[11]报道的方法，采用间接 ELISA 测定免疫兔血清的抗体的效价。

1.2.5 最佳检测条件的确定

参照 Wang 等[8]报道的方法，通过棋盘滴摸索最佳抗原包被浓度和抗体稀释倍数：检测抗原按 2.0、5.0、8.0、10 μg/mL 的浓度包被酶标板，抗血清分别按 1.0×10^5、2.0×10^5、3.0×10^5、4.0×10^5 倍稀释，每种抗原/抗体工作组合形成的检测体系，分别检测萘普生浓度为 0 和 20 ng/mL 的两种溶液，按公式（2）计算抑制率（I%）。I%最大而且 A_0 值在 1.3~1.6 之间的孔，所采用的抗原/抗体工作组合就是最佳检测条件。

$$抑制率(I\%)=\frac{A_0-A_i}{A_0-A_B}\times100\% \quad (2)$$

注：A_i 是加入萘普生的检测值，A_0 未加入萘普生的检测值，A_B 是未加入抗体的空白检测值。

1.2.6 ELISA 标准曲线的建立

按照 1.2.4 摸索的最佳检测条件，用萘普生系列浓度 90、30、10、3.0、1.0 ng/mL 进行竞争抑制 ELISA 检测。以萘普生标准品系列浓度为横坐标、A_{450} 值为纵坐标，用 RIDAWIN 软件拟合标准曲线方程。

1.2.7 交叉反应率的测定

以 ELISA 方法检测 8 种相关的抗炎药品（吲哚美辛、舒林酸、布洛芬、萘普生、双氯芬酸、阿司匹林、美洛昔康、酮布芬），计算各相关药物的 50%抑制浓度（IC_{50} 值）。按公式（3）计算的检测系统对各种药品的交叉反应率（Cross-reactivity，CR）：

$$交叉反应率(CR\%)=\frac{IC_{50\ 萘普生}}{IC_{50\ 相关药物}}\times100\% \quad (3)$$

1.2.8 样品检测

取 0.2 mL 样品溶解在 20 mL PBS 溶液中，然后取 0.2 mL 样品制备液溶解在 20 mL 样品缓冲液（0.01

M PBS，pH 7.4，0.05% Tween-20，0.2% BSA）中，样品被稀释了 10,000 倍。按照 1.2.5 的步骤进行 ELISA 检测，将检测数值内插到标准曲线获得样品溶液萘普生的浓度，在乘以稀释倍数就是样品中萘普生的含量。

1.2.9 加标回收率和变异系数实验

在空白保健酒样品中添加 0.10、0.20、0.30 mg mL^{-1} 的萘普生，各取 0.2 mL 样品按 1.2.7 步骤进行萘普生含量检测；每个加标浓度的样品平行检测 3 次，按公式（4）计算各个加标水平的加标回收率，并用统计软件分析各个加标水平的检测变异系数（n=3）。

$$\text{加标回收率}(R\%)=\frac{\text{萘普生检测值}}{\text{萘普生加标值}}\times 100\% \quad (4)$$

1.2.10 HPLC 比对验证

按照李存金[2]等报道的方法，以甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾溶液（pH 3.3）（66:34）为流动相，在流速 1.0 mL/min、检测波长 280 nm 的条件下，检测 1.2.7 步骤检测过的保健酒中萘普生的含量，与 ELISA 检测结果进行比对验证。

2 结果与分析

2.1 人工抗原的鉴定

如图 1 所示，萘普生-BSA 偶联物的紫外扫描图谱，与 BSA 载体蛋白明显不同，在萘普生吸收峰 260 nm、300 nm 处吸光光度值明显增强，证明萘普生与 BSA 偶联成功。同样方法检测萘普生-OVA 偶联物的紫外扫描图谱，证明萘普生与 OVA 偶联成功。

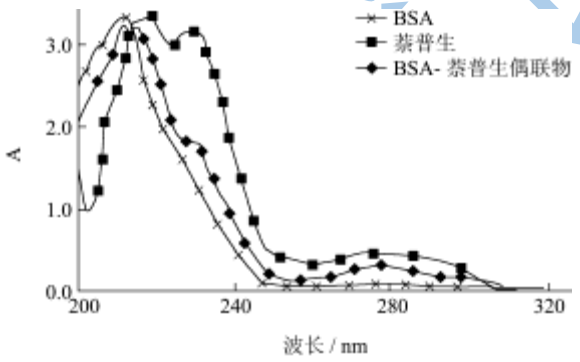


图 1 人工免疫抗原、载体蛋白和萘普生紫外扫描图谱

Fig.1 UV absorption spectra of artificial immunogen、carrier protein and Naproxen

根据 1.2.2 中的公式（1），计算得到免疫抗原的萘普生/载体蛋白偶联比为 6.8，检测抗原的萘普生/载体蛋白偶联比为 2.6。

2.2 血清效价测定

检测两只家兔稀释 1.6×10^6 倍血清的 A_{450} 值大于 0.280，远高于阴性血清的检测值 0.060。萘普生特异性抗体的滴度符合要求。

2.3 最佳检测条件的确定

按 1.2.5 步骤以棋盘实验，摸索最优抗原/抗体工作浓度，结果显示当检测抗原包被浓度为 8.0 μg/mL，抗血清稀释 3.0×10^5 倍条件下，检测 20 ng/mL 萘普生样品溶液，产生的抑制率达到最高，以此条件构建 ELISA 检测体系。

2.4 ELISA 标准曲线的建立

按照 1.2.5 方案进行竞争抑制 ELISA 检测，使用 RIDAWIN 软件拟合的萘普生浓度对结合率 ELISA 曲线如图 3 所示，回归方程 Y=88.3-29.151 log(X) (R^2=0.9964)，IC_{50} 值为 23.0 ng/mL。

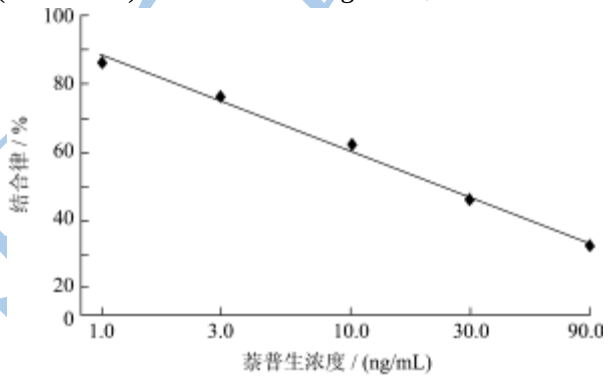


图 2 萘普生 ELISA 标准曲线

Fig.2 ELISA standard curve of Naproxen

设定检测阈值为 I%=25%，内插到标准曲线，萘普生最低检出浓度为 3.1 ng/mL。

2.5 交叉反应率的测定

如表 1 所示，检测 8 种相关药物与抗体的交叉反应率结果都小于 0.05%，证明检测所有抗体的特异性良好。

表 1 抗体对不同药物的交叉反应

Table 1 Cross-reactivities of the antibodies against 8 associate drugs

检测药品	IC_{50} 值/(ng/mL)	CR/%
吲哚美辛	>5000	<0.05%
奥沙普嗪	>5000	<0.05%
布洛芬	>5000	<0.05%
舒林酸	>5000	<0.05%
双氯芬酸	>5000	<0.05%
阿司匹林	>5000	<0.05%
美洛昔康	>5000	<0.05%
酮布芬	>5000	<0.05%

2.6 加标回收率和变异系数实验

表 2 萘普生加标保健酒样品 ELISA 检测回收率和变异系数结果

Table 2 Recoveries and coeffecients of variation for the determination of naproxen by ELISA. obtained in health liquors

萘普生加标量/(mg/g)	100	200	300
萘普生检测量/(mg/g)	88.3~96.5	174.6~187.2	282.3~306.3
回收率/%	88.3~96.5	87.3~93.6	94.1~102.1
变异系数/%	7.7	8.9	8.6

如表 2 所示，使用 ELISA 方法检测添加 0.10、0.20、0.30 mg/mL 萘普生的保健酒，加标回收率在 87.3~102.1%之间，变异系数小于 8.9%。检测准确性和精密度满足违法添加样品快速筛查的要求。

2.7 样品检测与验证

分别使用 ELISA 和 HPLC 对 20 个市售保健酒样品进行检测，结果如表 3 所示，证实两种方法的检测结果有很高的吻合度。

表 3 20 个保健酒样品的 ELISA 和 HPLC 检测结果

Table 3 Determination results of 20 health liquors using ELISA and HPLC

样品编号	ELISA 检测结果 /(μg/ mL)	HPLC 检测结果 /(μg/mL)
NO.5	>100	132.5
其余样品	0	0

3 结论

本研究使用活泼酯法制备了萘普生人工抗原，通过动物免疫获得了抗萘普生抗体，所建立竞争抑制酶联免疫吸附（ELISA）检测方法，IC_{50} 值为 23.0 ng/mL，最低检测限为 3.1 ng/mL。检测添加 0.10、0.20、0.30 mg/mL 萘普生的保健酒，加标回收率在 87.3~102.1%之间，变异系数小于 8.9%。与 8 种相关药物交叉反应率都小于 0.05%，检测 20 市售保健酒样品的结果与 HPLC 完全吻合。本免疫检测方法灵敏度和特异性满足于检测保健酒中的非法添加的萘普生，能够为食品药品安全专项检查提供方便的筛查工具。

参考文献

[1] 刘福艳,李军,谢元超,等.中成药中非法添加化学物质的现状与分析检测对策[J].中国药事,2008,22(12): 1067-1069
Liu F Y, Li J, Xie Y C, et al. Recent Advances and Analytic Technique on Determination of Chemical Drug Mixed Illegally in TCPM [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2008, 22(12): 1067-1069

[2] 李存金,郭飞宇.HPLC 检测抗风湿类中成药中非法添加非甾体类化学物质[J].中成药,2010,32(12):2191-2194
Li C J, Guo F Y. Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in antirheumatic chinese traditional tatent medicines using HPLC [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2010, 32(12): 2191-2194

[3] 宁素云,郭兴杰,张虹,等.HPLC 法同时检测清热解毒类中成药中非法添加的 9 种化学药品[J].中国药事,2009, 23(9):907-910
Ning S Y, Guo X J, Zhang H, et al. Detection of 9 Illegal Components in Traditional Chinese Medicine for detoxification by HPLC [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2009, 23(9): 907-910

[4] 赵凤菊,来国防,孙刚,等.UPLC/MS/MS 法检测抗风湿类制剂中添加醋酸泼尼松、醋酸地塞米松、双氯芬酸钠和布洛芬[J].药物分析杂志,2010,30(6):1035-1037
Zhao F J, Lai G F, Sun G., et al. Determination of prednisone acetate, dexamethasone acetate, diclofenac sodium and ibuprofen mixed in antirheumatic traditional Chinese medicine by UPLC/MS/MS [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 30(6): 1035-1037

[5] 王仕平,黄炳泉,刘卿,等.中成药中非法添加双氯芬酸钠与尼美舒利的快速检测[J].中国药品标准,2011,12(3): 211-214
Wang S P, Huang B Q, Liu Q, et al. Rapid Detection of Diclofenac Sodium and Nimesulide illegally mixed into Traditional Chinese medicine [J]. Drug Standards of China, 2011, 12(3): 211-214

[6] 邓树勇,马启龙,丁燕,等.TLC 法快速筛选抗风湿类中成药中的化学药品[J].药物分析杂志,2009,29(10):1719-21
Deng S Y, Ma Q L, Ding Y, et al. Rapid screening of TLC antirheumatic traditional Chinese medicines of add chemicals [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2009, 29(10): 1719-21

[7] Liang Y, Liu X J, Liu Y, et al. Synthesis of three haptens for the class-specific immunoassay of O,O-dimethyl organophosphorus pesticides and effect of hapten heterology on immunoassay sensitivity [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 615: 174-183

[8] Wang C M, Liu Y H, Guo Y R, et al. Development of a McAb-based immunoassay for parathion and influence of the competitor structure [J]. Food Chemistry, 2009, 115: 365-370

[9] Jeon M S, Paeng I R. Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay [J].

analytica chimica acta, 2008, 626: 180-185

[10] Chen J, Xu F, Jiang H, et al. A novel quantum dot-based fluoroimmunoassay method for detection of Enrofloxacin residue in chicken muscle tissue [J]. Food Chemistry, 2009, 113: 1197-1201

[11] Li P W, Zhang Q, Zhang W, et al. Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut [J]. Food Chemistry, 2009, 115: 313-317

[12] D Acharya, T K Dhar. A novel broad-specific noncompetitive immunoassay and its application in the determination of total aflatoxins [J]. Analytica Chimica Acta, 2008, 630: 82-90

[13] Pei S C, Zhang Y Y, S A. Eremin, et al. Detection of aflatoxin M1 in milk products from China by ELISA using monoclonal antibodies [J]. Food Control, 2009, 20: 1080-1085

[14] Guo J B, Xu Y, He Q H, et al. Development of an immunoassay for rapid screening of vardenafil and its potential analogues in herbal products based on a group specific monoclonal antibody. Analytica Chimica Acta, 2010, 658: 197-203

现代食品科技