

# 间接竞争 ELISA 法检测呋喃唑酮代谢物

李敏, 何小维

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

**摘要:** 以人工抗原和特异性抗体为基础, 建立了以 2-硝基苯甲醛为衍生试剂检测呋喃唑酮代谢物 3-氨基-2-恶唑烷酮 (AOZ) 间接竞争 ELISA 方法。通过方阵滴定和间接竞争法确定 ELISA 方法的抗原抗体的最佳工作浓度; 得到标准曲线的线性范围为 0.25~10 ng/mL, 线性关系良好; 根据标准曲线计算  $IC_{50}$  为 0.5881~1.1333 ng/mL。此外, 检测了与其他类似物的交叉反应率, 显示了很好的特异性; 并且通过对虾样品添加回收率的测定, 证明了该方法的准确性。高温短时间衍生化处理可达到与 37 °C 孵育过夜同样的衍生效果。

**关键词:** 呋喃唑酮; 3-氨基-2-恶唑烷酮; 间接竞争酶联免疫; 衍生化

文章编号: 1673-9078(2012)4-476-479

## Development of an Indirect Competitive ELISA for Rapid Analysis of Furazolidone Metabolite Residues in Animal Food

LI Min, HE Xiao-wei

(College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Based on artificial antigen and specific polyclonal antibody, an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was developed to detect 3-amino-2-oxazolidone (AOZ), followed by derivatization with 2-nitrobenzaldehyde. The selection of the optimum concentrations of the coating antigen, the polyclonal antibody and HRP-conjugated antibody was performed by ic-ELISA and square titration. Calibration curve was prepared for NPAOZ (3-(2-Nitrobenzylideneamino)-2-oxazolidinone), a 2-nitrobenzaldehyde derivative of AOZ, and good linearity was achieved over the concentration (0.25-10 ng/mL), the obtained  $IC_{50}$  was between 0.5881 ng/mL and 1.1333 ng/mL. In addition, the antibody was high specific for NPAOZ and no cross-reactivity with analog. The accuracy of the assay was validated by determining the recovery in shrimp tissue. High temperature and short time derivative process can be in line with incubating at 37 °C overnight.

**Key words:** furazolidone; 3-amino-2-oxazolidone (AOZ); ic-ELISA; derivatization

呋喃唑酮属于硝基呋喃类抗菌药, 它对革兰阳性及阴性菌均有一定抗菌作用。因其效高价廉, 广泛应用于在家畜、家禽、水产类的痢疾、肠炎、球虫病和火鸡黑头病的预防和治疗<sup>[1]</sup>。近年来毒理学研究发现, 呋喃唑酮具有较强的致癌、致畸、致突变作用<sup>[2,3]</sup>。

呋喃唑酮原药在体代谢迅速, 残留的时间较短, 研究证明呋喃唑酮在动物体内可代谢为 3-氨基-2-恶唑烷酮 (AOZ)<sup>[4-5]</sup>。其代谢物可与组织蛋白结合形成稳定的化合物, 从而在体内残留。普通的食品加工加热方法都难以使其大量降解, 蛋白结合态残留物会对人体造成一定毒副作用<sup>[6]</sup>。由于它严重的危害性, 导致世界各国普遍禁止使用。WHO 和欧盟规定其在动物源性食品中的残留检测限为 1.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[7,8]</sup>。我国农业部 2002 年第 193 号公告已经将其列入《食品动物禁用的兽药及其它化合物清单》中。

正是由于其原药的不稳定性, 故对于呋喃唑酮代谢物的研究和检测更为重要。目前检测 AOZ 的方法主要是高效液相色谱法 (HPLC)、液相色谱-质谱 (LC-MS)、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS) 和酶联免疫吸附法 (ELISA)。HPLC 法检测限达不到欧盟规定的要求, LC-MS 只能对呋喃唑酮代谢物进行筛选实验, 对检出的阳性结果必须再用 LC-MS/MS 进行确证<sup>[9-14]</sup>。HPLC、LC-MS 及 LC-MS/MS 是用来检测呋喃唑酮代谢物的常用方法, 但在实际操作中需要高档仪器, 且前处理复杂、时间长, 成本高, 操作技术要求高。而酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定的基础是抗原抗体反应, 具有快速, 灵敏度高和检测成本低廉等优点。因此本实验建立了呋喃唑酮代谢物 (AOZ) 的间接 ELISA 方法 (Indirect competitive ELISA, ic-ELISA), 并对其进行了评估。

### 1 材料与方法

收稿日期: 2012-01-11

作者简介: 李敏 (1987-), 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测

## 1.1 材料与仪器

3-氨基-2-恶唑烷酮 (3-amino-2-oxazolidinone, AOZ), SIGMA-ALDRICH; 2-硝基苯甲醛衍生物 (NPAOZ), SIGMA-ALDRICH; 2-硝基苯甲酸 (NBA), 上海达瑞精细化学品有限公司; 4-羧基苯甲醛, 上海点耀精细化工有限公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (HRP-GAR-IgG), 广州捷倍斯生物科技有限公司; 四甲基联苯胺 (TMB), 广州捷倍斯生物科技有限公司; 其他试剂均为分析纯试剂, 购于广州化学试剂厂。

Thermo Scientific Heraeus Biofuge Primo 台式离心机, 赛默飞世尔科技公司; Thermo Scientific Well wash 4Mk2 洗板机, 赛默飞世尔科技公司; Thermo Scientific Multiskan FC 酶标仪, 赛默飞世尔科技公司; 涡旋混合器, 上海沪西仪器分析; 固相氮吹仪, 青岛海科仪器有限公司。

## 1.2 溶液系统

包被缓冲液 (0.05 mol/L, pH 9.6 碳酸盐缓冲液); PBS (0.01 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液); 洗涤缓冲液 (PBST); 抗体及二抗稀释液; 底物缓冲液; TMB; 终止液 (2 mol/L 的  $H_2SO_4$  溶液); 标准溶液: 用甲醇配制 1 mg/mL 的标准品储备液。用 PBS 溶液进行系列浓度稀释, 配制成浓度为 0、0.25、0.5、1、2、10 ng/mL 的标准溶液; 衍生化试剂: 向装有 2-硝基苯甲醛的试剂瓶中加甲醇溶解定容至 10 mL (浓度为 10 mM); 0.5 M 磷酸氢二钾溶液; 0.36 M 亚硝基铁氰化钠 [ $Na_2Fe(CN)_5 \cdot NO_2 \cdot H_2O$ ] 溶液; 1 M 硫酸锌 ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) 溶液; 1 M 盐酸溶液; 1 M 氢氧化钠溶液。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 AOZ 间接 ELISA 方法建立及抗原抗体工作浓度确定

将合成好的包被原, 用包被缓冲液作系列稀释, 稀释后包被 96 孔酶标板, 100  $\mu$ L/孔, 于 4  $^{\circ}C$  冰箱过夜。洗板机洗涤 3 次后, 以下洗涤方法相同; 充分洗涤后, 用封闭缓冲液封闭酶标板, 120  $\mu$ L/孔, 于 37  $^{\circ}C$  温育箱内温育 1 h 后洗涤, 拍干; 每孔注入 50  $\mu$ L 系列浓度的标准品和 50  $\mu$ L 工作浓度纯化抗体, 37  $^{\circ}C$  孵育 30 min 后洗涤、拍干; 每孔加入 100  $\mu$ L HRP-GAR-IgG, 37  $^{\circ}C$  孵育 30 min 后洗涤、拍干; 每孔加入 100  $\mu$ L 显色液, 暗处 37  $^{\circ}C$  反应 15 min, 取出后每孔加入 50  $\mu$ L 终止液 (2 mol/L 的硫酸), 用酶标仪测定光密度值  $A_{450}$ 。

### 1.3.2 ic-ELISA 方法评估

#### 1.3.2.1 灵敏度的测定

将标准品 NPAOZ 配成浓度为 0、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、10 ng/mL 系列浓度, 按间接竞争 ELISA 方法测定。以无检测物 0  $\mu$ g/kg 标准品时的 OD 值为  $B_0$  值, 相应浓度 NPAOZ 抑制时的 OD 值为 B 值, 以抑制率  $B/B_0$  为纵坐标, 以 NPAOZ 浓度的对数为横坐标, 绘制标准曲线, 得出 NPAOZ 标准曲线的线性方程。

#### 1.3.2.2 特异性的测定 (交叉反应率, Cross-reactivity, CR)

NPAOZ 的几种结构类似物和衍生试剂 (AOZ、AMOZ、AHD、SEM、CPAOZ、CPAHD、对醛基苯甲酸、2-硝基苯甲醛) 分别配成不同的浓度, 作为抗体的竞争物, 按 ic-ELISA 操作步骤测定, 求出各自  $IC_{50}$  值。

$$CR(\%) = \frac{IC_{50} \text{ 的 NPAOZ}}{IC_{50} \text{ 的结构类似物}} \times 100\%$$

#### 1.3.2.3 准确性的测定 (添加回收率)

准确度是指测定值与真实值间的符合程度。ELISA 方法的准确度即检测值与真实值之间的符合程度。本实验采用样品添加回收实验, 来反映方法的准确度。样品添加回收实验为在样品中添加一定量的待测物, 然后通过样品处理, 用 ELISA 方法检测其中待测物的含量的方法。本实验通过对虾肉进行添加回收实验, 根据检测线性范围及检测要求添加浓度分别 1  $\mu$ g/kg、2  $\mu$ g/kg、4  $\mu$ g/kg。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{\text{加标样品测定值} - \text{空白样品测定值}}{\text{加样量}} \times 100\%$$

肌肉、肝脏、鱼虾等组织样本处理方法: 称取  $1.0 \pm 0.05$  g 均质后的组织样本 (肝样/肉样/水产品), 分别加入 4 mL 的去离子水、0.5 mL 1 M 盐酸溶液和 100 mL 衍生化试剂, 用振荡器充分振荡 2 min; 在 37  $^{\circ}C$  过夜孵育 (大约 16 h); 分别加入 1 mL 0.5 M 磷酸氢二钾溶液、0.4 mL 1 M 氢氧化钠溶液和 4 mL 乙酸乙酯, 用振荡器剧烈振荡 30 s; 5000 r/min 离心 5 min; 取 2 mL 上清液至 10 mL 干燥的玻璃试管中, 于 50~60  $^{\circ}C$  氮气流下吹干; 加入 1 mL 复溶工作液, 用涡旋仪涡动 30 s, 再加入 0.5 mL 正己烷, 用涡旋仪涡动 1 min 充分混匀; 5000 r/min 离心 5 min; 除去上层有机相 (若出现乳化现象, 请在 60  $^{\circ}C$  水浴直到分层为止), 取下层水相 50  $\mu$ L 用于分析。

#### 1.3.2.4 精密度的测定

精密度也叫可重复性, 反应测定方法对某一特定样本多次测定所得结果的重复程度。ELISA 常用的是变异系数法, 变异系数 (coefficient of variation, CV) 又称为相对标准偏差 (RSD), 常用批内 (Intra-assay) 和批间变异系数 (Inter-assay) 表示。批内变异系数即每批平行样之间的变异系数小于或等于 25%, 对于禁

用药物小于或等于 30%。批间变异系数即所有样品之间的变异系数值小于或等于 30%，对于禁用药物小于或等于 40%。

## 2 结果与讨论

### 2.1 棋盘法确定最佳工作浓度

通过间接竞争法评价抗原抗体及酶标二抗的最佳工作浓度结果见表 1，由表可以看出 0 μg/kg 标准品 OD 值和抑制浓度的 OD 值符合农业部备案要求的有包被原 500 倍稀释、抗体 4K 倍稀释、酶标二抗 2K 倍稀释和包被原 500 倍稀释、抗体 1K 倍稀释、酶标二抗 8K 倍稀释。由于酶标二抗获得途径稳定，效果较一致，而抗体的制备复杂，不能保证获得的均一性，因此选用包被原 500 倍稀释、抗体 4K 倍稀释、酶标二抗 2K 倍稀释的工作浓度。

表 1 最佳工作浓度的确定

Table 1 The optimization of concentration

	Ag	500		2K		8K		2W	
		HRP	2K	8K	2K	8K	2K	8K	2K
Ab 1K	0μg/kg	3	2.11	2.22	0.88	0.56	0.19	0.28	0.1
	10μg/kg	0.86	0.25	0.33	0.12	0.19	0.08	0.17	0.07
Ab 2K	0μg/kg	2.91	1.55	1.46	0.53	0.37	0.15	0.19	0.08
	10μg/kg	0.46	0.15	0.16	0.08	0.11	0.06	0.10	0.05
Ab 4K	0μg/kg	2.39	0.98	0.94	0.31	0.23	0.10	0.13	0.06
	10μg/kg	0.23	0.11	0.11	0.06	0.10	0.05	0.09	0.05
Ab 8K	0μg/kg	1.92	0.57	0.59	0.19	0.14	0.07	0.07	0.05
	10μg/kg	0.15	0.07	0.07	0.04	0.05	0.04	0.05	0.04

### 2.2 ic-ELISA 方法评估

#### 2.2.1 灵敏度的测定

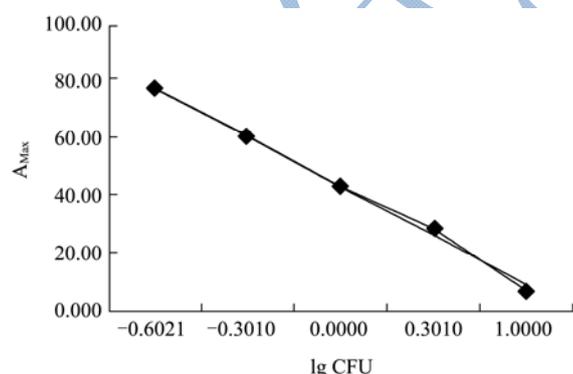


图 1 ic-ELISA 标准曲线

Fig.1 Calibration curve for NPAOZ using ELISA

由图 1 可得，标准曲线的线性回归方程为  $y = -42.6341x + 46.2387$ ， $R^2 = 0.9880$ ，其线性范围为 0.25~10 ng/mL；根据标准曲线计算  $IC_{50}$  为 0.5881~1.1333 ng/mL。

#### 2.2.2 特异性的测定（交叉反应率，Cross-reactivity，

CR)

间接竞争 ELISA 测定抗体特异性结果见表 2，列出了 NPAOZ 的结构类似物和衍生物，抗体对同样具有 C=N 键和 AOZ 特征结构的 CPAOZ 有较强的交叉（1819.88%），并对具有 C=N 结构的 CPAHD 具有一定的交叉（35.86%），不与其他药物有交叉。说明抗体对同时具有 C=N 键和 AOZ 特征结构 AOZ 衍生物有特异性。

表 2 交叉反应率的测定

Table 2 Determination of the cross-reactivity

竞争药物	$IC_{50}$	交叉反应率/%
NPAOZ	0.9297	100.00%
AOZ	>5000	<0.1%
AMOZ	>5000	<0.1%
SEM	>5000	<0.1%
AHD	>5000	<0.1%
CPAHD	2.5930	35.86%
CPAOZ	0.0511	1819.88%
2-NBA	No Competition	<0.1%
4-CBA	No Competition	<0.1%

#### 2.2.3 回收率的测定

表 3 回收率的测定 (%)

Table 3 Determination of recoveries

添加浓度	回收率	平均回收率	批内变异系数	批间变异系数
1 μg/kg	96.72±6.91	96.85±5.37	9.83	7.04
	103.73±4.2			
	81.24±2.87			
	109.46±7.21			
	90.14±10.3			
2 μg/kg	85.16±6.92	89.55±7.29	10.27	15.82
	70.6±12.01			
	103.53±2.14			
	98.3±5.09			
	108.62±6.85			
4 μg/kg	96.6±5.98	105.76±6.31	7.3	3.67
	112.39±3.16			
	108.21±8.37			
	103.01±7.18			

AOZ 分子量仅为 102，空间结构简单，对于抗体来说几乎不识别。在 AOZ 合成半抗原 CPAOZ 时 AOZ 的氨基与衍生试剂的醛基发生亲核加成反应，引入共轭体系后导致 AOZ 的电子云重新排布，改变了其空间结构，从而导致抗体不能识别游离的 AOZ。本实验将 AOZ 利用 2-硝基苯甲醛进行衍生化，作为目标识

别物,对样品同样采用2-硝基苯甲醛衍生。本实验将标准品AOZ分别在虾肉组织中添加浓度为1、2、4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ,利用2-硝基苯甲醛将其衍生化,通过检测其回收率和变异系数,结果如表3。三组的回收率均达到要求,它们的变异系数都小于25%,说明该样品处理方法准确、可靠,完全符合农业部兽药残留检测的要求。

### 2.3 样本处理的优化

目前所有的研究均采用常规的衍生化方法,即在37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜至少需要16 h,导致衍生化过程是整个样本处理的限速环节,本实验对其他样本的处理尝试高温短时间水浴的方法,缩短样本处理时间。

表4 高温衍生处理样本

Table 4 Derivatization of samples at high temperature

衍生试剂	样本	添加		高温衍生化		常规衍生化	
		浓度	反求浓度	回收率/%	反求浓度	回收率/%	反求浓度
NBA 衍生试剂	鱼	0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.0257		0.0182		
		2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.1852	109.26	2.3564	117.82	
		4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4.2724	106.81	4.6072	115.18	
	虾	0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.03		0.0271		
		2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.3552	117.76	1.7967	89.835	
		4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4.6124	115.31	4.6385	115.96	
鸡肝	猪肝	0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.0164		0.0494		
		2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1.8927	94.64	2.2708	113.54	
		4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	3.4685	86.71	3.7696	94.24	
	鸡肝	0 $\mu\text{g}/\text{kg}$	0.0241		0.0164		
		2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	1.6484	82.42	1.8341	91.705	
		4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	4.7334	118.34	4.4672	111.68	

由表4可得,50  $^{\circ}\text{C}$  3 h衍生处理样本与37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜效果相当。高温加速衍生化对阴性本底无影响,添加回收实验结果也符合要求,因此高温衍生处理样本方法可行。

### 3 结论

我国仍有大量养殖户使用呋喃唑酮,导致出口欧盟的畜产品和水产品由于呋喃唑酮代谢物检出而被就地销毁的事件屡有发生。本文建立了呋喃唑酮代谢物AOZ的间接竞争ELISA方法,并且从灵敏度、特异性、准确性等几个方面评估了本方法;对虾样本进行添加测定,得到回收率和变异系数也符合检测要求。以2-硝基苯甲醛作为衍生试剂时,衍生化处理过程可以采用高温短时间处理达到与37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜同样的效果,提高了呋喃唑酮代谢物衍生化效率,为呋喃唑酮代谢物的检测提供了更便捷的方法。

### 参考文献:

- [1] 陈笑梅,鲍晓霞.HPLC法测定鳗鱼、猪肉和对虾中的痢特灵残留[J].分析测试学报,1994,13(3):78-80
- [2] Hoogenboom L A, van Kammen M, Berghmans M C, et al. The use of pig hepatocytes to study the nature of protein bound metabolites of furazolidone, a new analytical method for their detection [J]. Food and Chemical Toxicology, 1991, 29(5): 321-328
- [3] McCracken R J, Kennedy D G. Determination of furazolidone in animals feeds using liquid chromatography with UV and thermo spray mass spectrometric detection [J]. J Chromatogr A, 1997, 771:349-354
- [4] 郭桢,连瑾,吴淑君.动物源性食品中呋喃唑酮及代谢物的检测[J].广东农业科学,2005,5:57-59
- [5] 侯为道,傅小鲁,张立实.动物性食品中兽药残留的监测与控制[J].中国公共卫生,2003,19(2):241-244
- [6] McCracken R J, Kennedy D G. The bioavailability of residues of the furazolidone metabolite 3- amino-2-oxazolidinone in porcine tissues and the effects of cooking upon residue concentrations [J]. Food Additives & Contaminants, 1997, 4(5): 507-513
- [7] Stehly G R, Plakas S M, el Said K R. Liquid Chromatographic Determination of Furazolidone in Shrimp [J]. J AOAC Int, 1994, 77(4): 901 - 904
- [8] 唐雪莲,王群,李健.渔用抗菌药物代谢动力学和残留的研究现状[J].海洋湖沼通报,2002,2:62-70
- [9] CONNEEY A, NUGENT A, KEEFE M O. Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatives furazolidone metabolite from animal tissues[J]. Analyst, 2002, 127: 705-709
- [10] 葛宝坤,王云凤,贺信,等.高效液相色谱法测定鸡肉、水产品中呋喃西林和呋喃唑酮残留量的研究[J].中国卫生检验杂志,2002,12(6):661-662
- [11] 林黎明,林回春,刘心同,等.固相萃取高效液相色谱-质谱法测定动物组织中硝基呋喃代谢产物[J].分析化学,2005, 33(5):707-710
- [12] 彭涛,邱月明,李淑娟,等.高效液相色谱-串联质谱法测定动物肌肉中硝基呋喃类抗生素代谢物[J].检验检疫科学, 2003,13(6):23-25
- [13] 王太全,于伯华.ELISA法检测禽肉中呋喃唑酮及其代谢物残留量[J].中国禽业导刊,2004,21(24):40
- [14] 朱坚.高效液相色谱-质谱法检测肉和水产品中硝基呋喃类药物的代谢物残留量[J].质谱学报,2003,24:121-122