

动物肌肉中四环素类药物多残留的 固相萃取—酶联免疫分析*

秦燕, 陈毓芳, 朱柳明

(广州出入境检验检疫局食检中心, 广东 广州 510623)

摘要: 研究确立了动物肌肉中四环素类药物多残留分析的基质固相萃取净化—酶联免疫分析方法, 交叉反应分析表明其对每千克动物肌肉中四环素、土霉素和金霉素的检出限分别为 8、8.5 和 70 μg , 回收率为 80% ~ 110%, 是监控动物源性食品中四环素族多抗生素残留的优选方法。与常用的液相色谱法相比, 此方法更简便、高效, 能实现自动化和高通量分析。

关键词: 四环素族; 多残留; 固相萃取; 酶联免疫法

中图分类号: S69; S851.34*7

文献标识码: A

文章编号: 0529-6579 (2004) 01-0084-03

天然四环素类药物(tetracyclines, TCs)主要有四环素(teracycline, TC)、土霉素(Oxytetracycline, OTC)和金霉素(chlotetracycline, CTC)等, 主要通过可逆性地结合核糖体 30S 亚单位和阻止 rRNA 与核糖体 mRNA 复合体结合来抑制蛋白质的合成而发挥抑菌作用。用药动物的残留主要分析方法有微生物法和高效液相色谱法, 免疫法报道尚不多见^[1]。本文研究了四环素族多残留的固相萃取(solid phase extraction, SPE)净化方法和酶联免疫分析体系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 **主要试剂** 标准品盐酸四环素($w = 97.1\%$)、盐酸土霉素($w = 96.2\%$)和盐酸金霉素($w = 84.4\%$)均购自 Riedel-de haen 公司; 四环素酶联免疫试剂盒(r-Biopharm 公司), PBS-tween 洗涤缓冲液。

1.1.2 **主要仪器** 自动洗板机和酶标仪(Biosystem 公司); 岛津高效液相色谱仪系统。

1.2 试验方法

1.2.1 **样品前处理方法** 称取匀质后的肌肉组织 5 g, 用 25 mL 含 0.1 mol/L Na_2EDTA 的 McIlvaine 提取缓冲液(pH 4.0)振荡提取 30 min, 15 $^{\circ}\text{C}$ 下 4 000 g 离心 10 min, 取上清液, 残渣用 25 mL 提取缓冲液重复提取, 合并上清液, 0.45 μm 水相滤膜过滤后取 5 mL 注入已预先用甲醇、水和提取液活化的

Oasis[®] HLB 固相萃取柱, $\varphi = 30\%$ 甲醇淋洗后用 2 mL 甲醇洗脱, 用 B1 缓冲液 10 倍稀释后进行酶联免疫分析。

1.2.2 **竞争性酶联免疫分析** 参看试剂盒说明。

1.2.3 **标准曲线绘制** 以零质量浓度标准对应的 A_{450} 为 100, 计算其它各质量浓度的相对 A_{450} 值(即相对结合率 B/B_0)。以四环素质量浓度对数为横坐标, $B/B_0(\%)$ 为纵坐标绘制半对数曲线。

1.2.4 **特异性测定** 以交叉反应率来表示。测定不同抗原的竞争结合曲线, 求出各自 B/B_0 为 50% 和 80% 时对应的抗原浓度 I_{50} 和 I_{80} , 交叉反应率为基准抗原与近似抗原 I_{50} 的比值。

1.2.5 **液相色谱条件** 色谱柱: Discovery C_{18} 柱, 250 mm $\times$ 4.6 mm (i.d.); 流动相: 乙腈 - pH2.5 的 0.01 mol/L NaH_2PO_4 溶液(体积比为 23:77); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测器: $\lambda = 355 \text{ nm}$; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

2 结果与讨论

2.1 提取、净化条件的确定

2.1.1 **提取溶剂的选择** 强酸虽较易提取与蛋白质结合的 TCs, 但实验表明 TC、OTC 和 CTC 的 pH 稳定性有差异, 采用 pH < 2 的强酸提取时, TC 在溶液中尤易发生差向异构化, 因此采用 pH 4.0 的 McIlvaine 缓冲液来提取。并向提取液中加入 EDTA 使其与无机离子螯合从而释放出四环素类药物。5

* 收稿日期: 2003-10-20

基金项目: 供港澳动物源性食品中多种药物残留的初筛免疫法测定和高效液相色谱法方法研究资助项目(GDJ17-2003)

作者简介: 秦燕(1975年生), 女, 博士; E-mail: zizimaomao@163.com

g 空白肉样添加 TC、OTC 和 CTC 质量分数各为 10^{-6} 时, 0.1 mol/L 的 Na_2EDTA -Mellvaine 缓冲液 20、20、10 mL 分 3 次提取和 25、25 mL 分 2 次提取效果相当, 回收率在 90% 以上。

2.1.2 固相萃取柱的选择和条件优化 TCs 属高极性的两性化合物, 仅靠液液萃取难以去除生物组织中其它成分对免疫分析的干扰。选择不同的键合硅胶 C_{18} 固相萃取柱^[2]和 Oasis[®] HLB 固相萃取柱进行试验, 见表 1。

表 1 不同固相萃取柱的回收率比较¹⁾

Tab.1 The recovery of various SPE columns on TCs

SPE 柱类型	回 收 率 (%)		
	OTC	TC	CTC
WAT020515 C_{18} plus	74	73	58
RIDA C_{18}	84	77	72
Baker 10 C_{18}	81	75	69
Oasis [®] HLB	94	89	86

1) 空白样品加标水平: TC, OTC 和 CTC 各 1, 1 和 2 mg/kg, 上柱浓度 0.1 g/mL, 上柱体积 5 mL。柱预先用提取溶液活化。

洗脱溶液: 对 C_{18} 柱, 20 mmol/L 的草酸甲醇溶液 2 mL; 对 HLB 柱, $\varphi = 100\%$ 甲醇溶液 2 mL。

表 1 可知, 不同 C_{18} 小柱的回收率不同, 这可能与柱的碳含量差异有关。但与 HLB 柱相比, 其回收率都明显偏低, 且 HPLC 色谱图显示其杂质峰也较多。这可能是未键合的硅醇基团与提取液中的残留蛋白相互作用影响了 TCs 的吸附和洗脱。有报道指出采用不同比例的丙酮—水体系来进行淋洗和洗脱可以改善 C_{18} 小柱的萃取效果。但丙酮的使用将破坏后续的抗原抗体结合反应, 而免疫反应对低浓度的甲醇有一定耐受力。因此, 选择主要成分是二乙烯基苯—N—乙基吡咯烷酮共聚物的反相类型 Oasis[®] HLB 柱进行净化。从洗脱分布图可知, $\varphi = 40\%$ 的甲醇水溶液最早开始将 OTC 洗脱下来, 然后依次是四环素和金霉素。因此采用 $\varphi = 30\%$ 的甲醇水溶液作为洗涤溶剂, $\varphi = 100\%$ 甲醇溶液作为洗脱溶液。

2.2 酶联免疫分析

2.2.1 竞争免疫曲线线性范围和检测限 在 TC 质量浓度 $0.5 \sim 40.5 \mu\text{g/L}$ 的范围内, 半对数曲线性方程为 $Y = -19.343X + 169.91$, $r = 0.9912$, 相关性显著。采用样品试剂空白的 3 倍标准偏差和 10 倍标准偏差对应的质量浓度值分别作为分析检测限 (LOD) 和定量检测限 (LOQ); 求得 LOD 和 LOQ 分别为 0.07 和 $0.20 \mu\text{g/L}$, 样品前处理稀释了 40 倍, 因此对 TC 的 LOQ 约为 8×10^{-9} 。

2.2.2 交叉反应 半抗原的设计一定程度上决定了其诱导产生的抗体对不同的四环素族药物结合力差异, 以四环素为基准抗原, 由 1.2.5 求得的交叉反应系数 (CR) 如表 2。可看出此分析体系对 TC 最灵敏, CTC 稍次之, 但对 OTC 其交叉反应率只有 11.7% 左右。即分析体系对 TC、CTC 和 OTC 的定量检测限分别约为 8×10^{-9} , 8.5×10^{-9} 和 70×10^{-9} , 远小于最大残留限量 (MRL) 300×10^{-9} 的限量要求, 可用于对这 3 种药物的同时筛选分析。

表 2 四环素族 ELISA 分析的交叉反应

Tab.2 Cross-reactivity of TCs ELISA

化合物	IC_{50} ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	IC_{80} ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	CR %
TC	0.492	0.104	100
OTC	4.207	2.38	11.7
CTC	0.521	0.181	94.4

这是因为半抗原的设计是发生在 C-4 位, 先形成了 4-脲-脱甲基四环素, 然后通过氨基和羧基的缩合反应合成半抗原, 金霉素和四环素的惟一结构差异是前者用氯原子取代了母核远端 C-7 位上的氢, 因此其对由此半抗原诱导产生的抗体的亲和力大小与四环素相似, 可以预见, 此抗体对以二甲胺取代了 C-7 位上氢的二甲胺四环素 (Minocycline, MINO) 应也有很高的交叉反应率。而土霉素与四环素相比, 是在母核的 C-5 位用羟基替代了氢原子, 可能正是由于这个羟基的空间位阻和电荷效应使其与抗体的结合力大为下降, 这也部分解释了此分析体系对强力霉素 (即脱氧土霉素 DC) 抗原抗体反应相对更低灵敏度的原因^[3]。

2.2.3 回收率实验 在空白猪肉样品中分别添加一定量 TCs 标准, 测定平均回收率在 80% ~ 110% 之间, $\text{RSD} < 12\%$, 满足分析要求。

2.2.4 方法比对实验 空白猪肉样品在四环素加标水平 $0.1 \times 10^{-6} \sim 4.0 \times 10^{-6}$ 的范围内, ELISA 方法与 HPLC 方法测定结果的线性回归方程为 $Y = 0.94X + 0.013$ (X 、 Y 分别为 ELISA 和 HPLC 测定结果), 相关性较好, $r = 0.87$ 。表 3 列出了一些样品的 ELISA 法和 HPLC 法检测结果, 相对误差 CE 小于 15%。

3 结 语

固相萃取 HLB 柱可以实现样品的高通量净化, 消除杂质对免疫分析的干扰。与 HPLC 法相比, 酶联免疫法的检测限更低, 方法精密度和回收率等都能满足多残留分析的要求。

表 3 肌肉组织中四环素族药物的酶联免疫和
液相色谱结果比较¹⁾

Tab.3 Comparison of TCs concentrations in
muscle samples detected by ELISA and HPLC

样品	ELISA/ 10^{-6}			HPLC-UV/ 10^{-6}			相对误差/%		
	OTC	TC	CTC	OTC	TC	CTC	OTC	TC	CTC
1	ND	0.19	ND	ND	0.22	ND	-	-13.6	-
2	ND	ND	ND	-	-	-			
3	ND	0.56	ND	ND	0.49	ND	-	14.3	-
4	ND	ND	1.04	ND	ND	0.96	-	-	8.3
5	2.14	ND	ND	2.27	ND	ND	-5.7	-	-

1) ND 为未检出

参考文献:

- [1] HISAO O, YOKO I, HIROSHI M. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods[J]. J Chromatography A, 2000, 882:109-133.
- [2] MARIA T, PANTELIS R, PANAYIOTIS P, et al. Determination of oxytetracycline in the live fish feed Artemia using high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. J Chromatography B, 1995, 663:167-171.
- [3] DIANA S A, RANDALL G, PANKAJ K. Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes[J]. Analyst, 2003, 128:658-662.

A SPE-ELISA Determination for Tetracyclines Multi-residues in Animal Muscles

QIN Yan, CHEN Yu-fang, ZHU Liu-ming

(The Food Inspection Center of Guangzhou Entry-Exit CIQ, Guangzhou 510623, China)

Abstract: An effective solid phase extraction (SPE) clean-up and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed for the multi-residues screening of tetracyclines in animal muscles. The cross reactivity showed the limits of quantification were about 8, 8.5 and 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, the recoveries were 80% ~ 110%, this indicates the method can be alternative to determine total TCs in muscle samples. Compared with liquid chromatography method, it offered the advantage of being suitable for automation and increasing throughput of samples.

Key words: tetracyclines; multi-residues; solid phase extraction (SPE); ELISA