

文章编号 :1000 - 0615( 2006 )04 - 0520 - 05

## 酶联免疫法测定水产品中呋喃唑酮代谢物 AOZ 的残留

沈美芳, 宋红波, 耿雪冰, 吴光红

(农业部渔业产品质量监督检验测试中心, 江苏省水产质量检测中心, 江苏 南京 210017)

**摘要** 运用酶联免疫法对水产品中呋喃唑酮代谢物残留测定的方法进行研究。结果表明 稀释倍数对回收率影响显著, 而乙酸乙酯提取次数、光照条件和放置时间对测定结果无显著影响。向样品中分别添加 0.60、2.00、6.00  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  3 个浓度水平的呋喃唑酮代谢物时, 平均回收率分别为 99.2%、96.0% 和 100.0% ; 批内变异系数为 1.76% ~ 12.57% , 批间变异系数为 5.43% ~ 8.58% , 最低检测限为 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。该方法灵敏度高, 重复性较好, 适用于水产品中呋喃唑酮代谢物残留的筛选。

**关键词** 水产品, 呋喃唑酮代谢物, 酶联免疫法

中图分类号 S 941 文献标识码 A

## Enzyme linked immunosorbent assay( ELISA ) for the quantitative analysis of furazolidone residues in aquatic products

SHEN Mei-fang , SONG Hong-bo , GENG Xue-bing , WU Guang-hong

( Fishery Products Quality Supervision and Testing Center , Ministry of Agriculture ,  
Aquatic Products Analysis and Testing Center of Jiangsu Province , Nanjing 210017 , China )

**Abstract** : A method of ELISA for the determination of furazolidone metabolites residues in aquatic products is established in this paper. There were no literatures about determination of AOZ residues in aquatic products by Enzyme linked Immunosorbent assay ( ELISA ) at home. Samples were derivatived with 2-nitrobenzaldehyde and extracted with ethyl acetate. Then they were purified with n-hexane and determined by ELISA. In the paper , effects of different disposal conditions including dilution factors , extraction times , illumination conditions and shelf time to recovery were researched. By determination on *Eriocheir sinensis* , *Micropterus salmoides* and *Procambarus clarkii* spiked with AOZ , recovery , precision and detection limit of the method were researched by single laboratory validation approach as well as between laboratory comparisons. Results show that there is a remarkable effect of dilution factors on the recovery while no such effect is displayed for extraction times by ethyl acetate , illumination conditions and shelf time. So the best disposal condition is that dilution factor and extraction time are both one. The average recoveries are 99.2% , 96.0% and 100.0% respectively when the samples are spiked with 0.60  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  , 2.00  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and 6.00  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  of AOZ. The detection limit is 0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The relative standard deviations( n = 3 ) for intra-assay are 1.76% - 12.57% and coefficients of variation for inter-assay are 5.43% - 8.58% . Three positive samples analyzed by ELISA are confirmed by LC-MS and no false positive samples are found. The method is sensitive with a fairly good reproducibility and suitable for the determination of furazolidone metabolite( AOZ ) in aquatic products.

**Key words** : aquatic products ; furazolidone metabolites ; enzyme linked immunosorbent assay( ELISA )

收稿日期 2006-01-09

资助项目 江苏省自然科学基金( BK2005103 ) ; 江苏省水产三项工程项目( PJ2005 - 51 )

作者简介 沈美芳( 1968 - ) , 女, 江苏昆山人, 副研究员, 硕士, 主要从事水产动物营养需求与检测技术研究。Tel 025 - 86581579 , E-mail :mfshen2005@yahoo.com.cn

通讯作者 吴光红, Tel 025 - 86581558 , E-mail :wuguangh@sina.com

呋喃唑酮(furazolidone)属硝基呋喃类药物,是一种人工合成的广谱抗生素,它有非常好的抗菌作用,曾经被广泛应用,作为猪、禽类和水产促生长的添加剂。但在长时间的实验室研究过程中发现,硝基呋喃类的药物和代谢物均可以使实验动物发生癌变和基因突变<sup>[1]</sup>,正因为如此才导致此类药物禁止在治疗和饲料中使用,呋喃唑酮在1995年在欧洲(EU)被禁用<sup>[2]</sup>。由于硝基呋喃类药物在体内很快就能被代谢,而在组织中蛋白结合态的代谢产物则能存留较长的一段时间,所以在分析此类药物的残留时经常要分析其代谢后的产物,管理部门就以检测代谢产物为手段达到检测硝基呋喃类残留的目的<sup>[3]</sup>。

目前,动物组织中呋喃唑酮及其代谢物 AOZ 残留分析主要采用 HPLC 法<sup>[4-6]</sup>、LC-MS/MS 法<sup>[7,8]</sup>和 LC-MS 法<sup>[9]</sup>。这些方法虽然准确度和灵敏度较高,但样品前处理过程复杂,分析速度慢,仪器价格昂贵,不适合在基层推广使用。基于抗原抗体特异性反应建立起来的免疫学测定方法,具有简单、快速、处理样品量大、灵敏度较高、特异性强等诸多优点,现已有试剂盒供应市场,可以直接用于生产实践。目前国内尚未有文献报道采用酶联免疫法检测水产品中的呋喃唑酮代谢物残留的检测方法。本文对该前处理方法进行了比较研究,并对方法的回收率、精密性、准确度、灵敏度及检测限进行了评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**样品及其制备** 实验选取中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)及克氏螯虾(*Procambarus clarkii*)。中华绒螯蟹取可食部分用高速试样粉碎机匀浆制成均质物,备前处理用。大口黑鲈经洗净、去头、去皮后,取背部肌肉,制成均质物,备前处理用。克氏螯虾经洗净、去头去壳后取肌肉制成均质物,备前处理用。

**仪器与设备** JA-5002 电子天平(上海精天电子仪器厂);HH-1 恒温水浴锅(常州国华电器有限公司);恒温培养箱、漩涡混合器(太仓市科教仪器厂);AllegraTM21R 台式高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司);NEVAP-11155 氮吹仪(Supleco 公司);BIO-RAD550 酶标仪(美国 BIO

-RAD 公司);单道 50,100,1 000,5 000  $\mu\text{L}$  微量进样器;多道 250  $\mu\text{L}$  微量进样器。

**试剂** 呋喃唑酮代谢物(AOZ)标准物质(Sigma 公司,纯度 99%);乙酸乙酯(色谱纯);正己烷(色谱纯);10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 2-硝基苯甲醛(溶剂为二甲亚砜);0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾;1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  氢氧化钠;1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸;RIDASCREEN Nitrofurantoin 试剂盒(德国 R-Biopharm 公司),其中包括 96 微孔、6 种浓度的 AOZ 标准溶液、酶标记物、抗体、基质、发色剂、反应停止液、样品稀释液(用试剂盒内粉剂配制)。

### 1.2 方法

**样品前处理方法** 称取 1 g 制备好的均质物,加入 4 mL 的蒸馏水,0.5 mL 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 HCl 和 100  $\mu\text{L}$  10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 2-硝基苯甲醛,充分振荡,在 37  $^{\circ}\text{C}$  过夜孵育(约 16 h)。加入 5 mL 0.1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,0.4 mL 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 和 5 mL 乙酸乙酯,在漩涡混合器上剧烈振荡 30 s,在室温下以 4 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ (可视离心效果适当增加离心速度)离心 10 min,吸取 2.5 mL 乙酸乙酯上层液(或全部吸取 5 mL)到 10 mL 玻璃离心管中(或用乙酸乙酯再提取一次并合并提取液),用氮吹仪吹干。用 1 mL 的正己烷溶解干燥物,然后加入 1 mL 样品稀释液适当的混合,在室温下以 3 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取下层澄清液体待用。

**稀释倍数对 AOZ 回收率的影响** 向 1 g 样品中加入 2.00  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 AOZ 标准溶液 1.00 mL,按上述方法进行前处理,对照组乙酸乙酯吸取量为 2.5 mL(稀释倍数为 2)吹干;另一组将乙酸乙酯全部吸出吹干(稀释倍数为 1),其他处理同对照组,比较两种前处理方法回收率的差异。

**乙酸乙酯提取次数对 AOZ 回收率的影响** 在 1 g 样品中加入 2.00  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  AOZ 标准溶液 1.00 mL,按样品前处理方法处理,稀释倍数均为 1,对照组用乙酸乙酯提取 1 次,另外一组提取 2 次,每组做 3 个平行,比较两者回收率差异。

**前处理后样品稳定性试验** 在 1 g 样品中加入 2.00  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  AOZ 标准溶液 1.00 mL,做 3 个平行,按样品前处理方法进行前处理,乙酸乙酯提取 1 次,稀释 1 倍。经前处理后的样品保存在冰箱内,分别测定放置 0、2、4、10 d 后溶液中 AOZ 的含量,计算回收率。

**光照对 AOZ 回收率的影响** 为研究光照

条件对 AOZ 衍生物(NPAOZ)稳定性的影响,在 1 g 样品中加入  $2.00 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  AOZ 标准溶液 1.00 mL,按样品前处理方法分别在正常光照和避光(或光线昏暗)的条件下对样品进行前处理,乙酸乙酯提取 1 次,稀释倍数为 1。前处理后样液分别装入无色和棕色进样瓶保存。每个组做 3 个平行,比较两者回收率的差异。

**精密度和准确度** 试剂盒的准确度常以回收率表示,而精密度常以变异系数来表示。向样品中分别添加 3 个浓度水平的 AOZ 标样:0.60、2.00、6.00  $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,每个浓度做 3 个平行,同时做 3 个空白样。按样品前处理方法同时进行前处理(乙酸乙酯提取 1 次,稀释倍数为 1),测定呋喃唑酮代谢物含量,计算回收率和批内变异系数,在不同时间(间隔 1 周左右)按上述方法分别进行了 3 个批次样品的处理并分别测定,计算回收率和批内变异系数。

**酶联免疫分析程序** 将标准品和样品所用的微孔条插入微孔架,记录标准品和样品的位置。加入 50  $\mu\text{L}$  标准品或处理好的样品到各自的微孔中,再加入 50  $\mu\text{L}$  酶标记物及 50  $\mu\text{L}$  抗体溶液于每一个微孔底部充分混合,覆盖上薄膜,在室温(20~25  $^{\circ}\text{C}$ )孵育 1 h。倒出孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打 3 次以保证完全除去孔中的液体,用 250  $\mu\text{L}$  蒸馏水充入孔中,再次倒掉微孔中的液体,重复操作 3 次。洗板后加入 100  $\mu\text{L}$  基质/发色剂到每个微孔中,充分混合并在室温暗处孵育 15 min。加入 100  $\mu\text{L}$  反应停止液到微孔中,混合后,以空气为空白,用酶标仪在 450 nm 处测量吸光度值。(必须在加入停止液后 60 min 内读取吸光度值)。

**标准曲线的制作及样品浓度的计算** 将所获得的标准品和样品的吸光度值按下式折算成百分比吸光度值(%吸光度值):

$$\text{吸光度值}(\%) = \frac{\text{标准品或样品的吸光度值}}{\text{空白标准品的吸光度值}} \times 100$$

利用试剂盒公司提供的 RIDASCREEN 数据分析软件绘制出标准曲线,并计算出各个样品中呋喃唑酮代谢物的浓度。

## 2 结果

### 2.1 标准曲线

按照酶联免疫分析步骤,分别测定浓度为 0、

0.05、0.15、0.45、1.35 和 4.05  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  呋喃唑酮代谢物标准液的吸光度值,采用 RIDASCREEN 数据分析软件建立标准曲线如图 1。

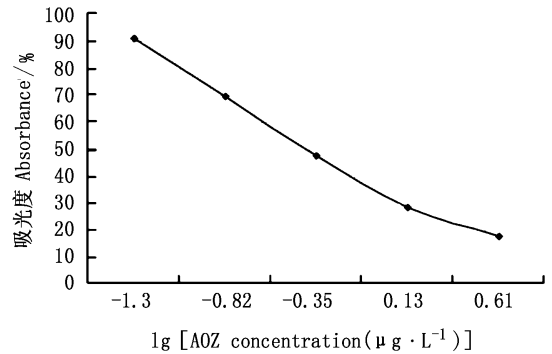


图 1 RIDASCREEN 数据分析软件建立的呋喃唑酮代谢物标准曲线

Fig.1 The standard curve of AOZ by RIDASCREEN

### 2.2 稀释倍数对回收率的影响

研究了不同稀释倍数对 AOZ 回收率的影响,当加标浓度为  $2.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,稀释倍数为 1(提取液吸取 5 mL)和 2(提取液吸取 2.5 mL)的组回收率差异见表 1。从表 1 中看出,稀释倍数为 2 的试验组回收率明显高于稀释倍数为 1 的组(95%置信度,  $n=3$ )。原因是乙酸乙酯的挥发导致提取液中 AOZ 浓度升高(气温较高挥发更明显),进而导致回收率偏高。因此在下面的试验中采用稀释倍数为 1 的前处理方法。

### 2.3 乙酸乙酯提取次数对回收率的影响

加标浓度为  $2.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,稀释倍数为 1 时,用乙酸乙酯提取 1 次和提取 2 次回收率的差异见表 2。从表 2 看出,用乙酸乙酯提取 1 次和 2 次的组回收率没有明显差异(95%置信度,  $n=3$ )。

### 2.4 前处理后样品的稳定性

AOZ 在生物体内以稳定的蛋白结合态存在<sup>[9]</sup>,而 AOZ 衍生物的稳定性尚未可知,试验研究了该 AOZ 衍生物的稳定性。加标浓度为  $2.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,稀释倍数为 1,乙酸乙酯提取 1 次时,经前处理后的样品放置不同的时间所得 AOZ 回收率见表 3。

通过测定经不同时间的放置后 AOZ 回收率的变化,研究了 AOZ 衍生物的稳定性。从表 3 中看出,样品在前处理后放置 0~10 d 回收率没有发生明显的变化(95%置信度,  $n=3$ ),说明较短时间的放置对测定结果没有影响。

表 1 不同稀释倍数对回收率的影响

Tab.1 Influence of different factor on the recoveries of AOZ

稀释倍数 times of dilution	1( 5 mL)	2( 2.5mL)	
回收率( % ) recovery	1 2 3	90.6 92.6 93.8	105.3 111.1 102.9
平均回收率( % ) average recovery		92.3 ± 1.62	106.4 ± 4.22

表 2 乙酸乙酯提取次数对回收率的影响

Tab.2 Influence of different extraction times of ethyl acetate on the recoveries of AOZ

乙酸乙酯提取次数 extraction times	1	2	
回收率 % recovery %	1 2 3	92.0 102.9 96.9	107.1 103.2 107.6
平均回收率 % average recovery		97.3 ± 5.46	105.9 ± 2.41

表 3 放置不同天数后的回收率

Tab.3 Recoveries of AOZ by conservation for different days

放置天数( d ) conservation time	0	2	4	10	
回收率( % ) recovery	1 2 3	92.0 102.9 96.9	87.0 104.0 111.8	101.1 108.0 101.4	92.6 107.6 101.1
平均回收率( % ) average recovery		97.3 ± 5.46	100.9 ± 12.68	103.5 ± 3.9	100.4 ± 7.52

## 2.5 光照对 AOZ 回收率的影响

加标浓度为  $2.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  时,按样品前处理方法进行前处理,稀释倍数为 1,乙酸乙酯提取 1 次。避光前处理和正常光照前处理时检测结果的差异见表 4。从表 4 看出,避光前处理与不避光前处理的回收率没有明显差异(置信度 95%,  $n = 3$ ),表明正常光照条件(非强光直射)对前处理过程的影响可以忽略。

## 2.6 精密度和准确度

ELISA 中试剂盒的准确度以回收率表示,精密度以变异系数来表示,测定结果见表 5。结果表明,向样品中分别添加  $0.60$ 、 $2.00$ 、 $6.00 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  3 个浓度水平的 AOZ 标准品时,平均回收率分别为 99.2%、96.0% 和 100.0%;批内变异系数为 1.76% ~ 12.57%,批间变异系数为 5.43% ~ 8.58%,方法重复性较好。

表 4 光照条件对回收率的影响

Tab.4 Recoveries of AOZ in different illumination conditions

	取样次数 sampling	避光	不避光
回收率( % ) recovery	1 2 3	94.0 96.2 98.7	92.0 102.9 96.9
平均回收率( % ) average recovery		96.3 ± 2.35	97.3 ± 5.46

## 2.7 检测限

按照酶联免疫分析步骤同时测定 10 个“0”标准溶液的吸光度值,从标准曲线上查出对应于吸光度值的各浓度,求出其标准偏差( $s$ )。

当空白测定次数  $n < 20$ , 检测限 =  $2\sqrt{2}t_{f,s}$ 。本实验中  $s = 0.042$ ,  $f = m(n - 1) = 9$ ,  $t_f = 2.26$  (95% 置信度), 则该方法检测限为  $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

表 5 准确度和精密度测定结果

Tab.5 Results of accuracy and precision

	$\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$								
添加浓度 spiked concentration	0.60			2.00			6.00		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
回收率( % ) recovery	106.2 90.5 98.0	94.0 98.7 96.2	101.8 109.2 98.0	101.8 102.6 90.5	92.0 102.9 96.9	90.6 92.6 93.8	92.0 94.4 111.1	105.3 98.1 96.2	87.0 104.0 111.8
平均回收率( % ) average recovery	99.2 ± 5.81			96.0 ± 5.21			100.0 ± 8.58		
变异系数( % ) CV	批内 intra-assay			批内 intra-assay			批内 intra-assay		
	7.99	2.44	5.53	6.89	5.61	1.76	10.48	4.80	12.57
	批间 inter-assay			批间 inter-assay			批间 inter-assay		
	5.86			5.43			8.58		

### 3 讨论

#### 3.1 不同前处理条件对检测结果的影响

对不同前处理方法的研究表明,稀释倍数为 $\alpha$ (提取液吸取 2.5 mL)的组回收率明显高于稀释倍数为 1(提取液吸取 5 mL)的组,原因是在前处理时,用乙酸乙酯提取并经高速离心后,由于溶剂的易挥发性使提取液的体积变小(小于 5 mL),提取液中 AOZ 浓度升高,稀释倍数为 2 时(吸取 2.5 mL 提取液)进行浓缩,则使测定值偏高,进而导致回收率偏高。特别是环境温度较高时,乙酸乙酯挥发更快,这种影响更加不可忽略。因此试验采用稀释倍数为 1 的前处理方法;乙酸乙酯提取 1 次和 2 次的检测结果没有明显差异,考虑到方法的简便性,可以采用提取 1 次的方法进行前处理;AOZ 衍生物经 0~10 d 放置不影响检测结果,长时间放置对回收率的影响还有待进一步研究;正常光照条件对检测结果没有明显的影响;另外还比较了孵育条件对检测结果的影响,结果表明 37℃水浴孵育和培养箱孵育结果无显著差异,在实际操作时都可以选择。

#### 3.2 检测限及方法的准确度与精密度

采用稀释倍数为 1,乙酸乙酯提取 1 次的方法进行前处理,该方法的最低检测限由公式  $2\sqrt{2}t_s$  计算,为  $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。本文同时进行了低浓度  $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  加标试验,测定结果与空白样品有显著差异,平均回收率为 85.3%。加标浓度分别为 0.60、2.00、6.00  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  时,平均回收率分别为 99.2%、94.3% 和 100.0%;批内变异系数为 2.44%~12.57%,批间变异系数为 5.86%~8.58%。运用该方法对 150 个鱼、虾、蟹样品进行检测,筛选出 5 个疑似阳性样品(阳性判出标准为浓度大于或等于  $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),其中 2 个样品经酶联免疫法再次测定为阴性,另外 3 个样品经酶联免疫法再次测定仍为阳性,用 LC-MS 确证为阳性,未发现假阳性样品。结果表明该方法灵敏度高,重复性较好,适用于水产品中呋喃唑酮代谢物残留的筛选。

#### 3.3 方法应用前景

运用酶联免疫法对水产品中呋喃唑酮代谢物残留进行筛选,能在几小时内检测几十到上百个样品,且不需要复杂的仪器设备,样品预处理简

单,检测成本低,是药物残留检测发展的趋势,但目前筛选法的检测标准极少,检测限(即阳性浓度标准)不统一,给检测结果判定带来一定困难,对筛选可疑结果需用确证方法进行确证。酶联免疫法作为一种快速筛选手段,在现场监控和基层检测中有着广阔的推广应用前景。

### 4 小结

研究表明,运用酶联免疫法测定水产品中呋喃唑酮代谢物残留时,稀释倍数对回收率影响显著,乙酸乙酯提取次数、光照条件和放置时间对测定结果无显著影响。用该方法对鱼、虾、蟹进行加标回收率试验,0.60~6.00  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  加标水平的回收率为 87%~111.8%,变异系数为 1.76%~12.57%,适用于水产品中呋喃唑酮代谢物残留的筛选。

#### 参考文献:

- [1] Kelly B D, Heneghan M A, Connolly C E, *et al.* Nitrofurantoin-induced hepatotoxicity mediated by CD8 + T cells [J]. *American Journal of Gastroenterology*, 1998, 93(5): 819-821.
- [2] Off J Eur Commur [S]. L224, 1, 1990.
- [3] 郭 桢, 连 瑾, 吴淑君. 动物源性食品中呋喃唑酮及其代谢物的检测 [J]. *广东农业科学*, 2005 (5): 57-59.
- [4] 无公害食品水产品中呋喃唑酮残留量的测定液相色谱法 [S]. SC/T 3022-2004.
- [5] 葛宝坤, 王云凤, 贺 信. 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, 14(6): 661-662.
- [6] Angelini N M, Rampini O D, Mugica H. Liquid chromatographic determination of nitrofur residues in bovine muscle tissues [J]. *Journal of AOAC International*, 1997, 80(3): 481-485.
- [7] Draisci R, Giannetti L, Lucentini L, *et al.* Determination of nitrofur residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry [J]. *J Chromatogra*, 1997, 777(1): 201-211.
- [8] Diaz T G, Cabanillas A G, Valenzuela MIA, *et al.* Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaladone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *J Chromatogra*, 1997, 764(2): 243-248.
- [9] 徐维海, 林黎明, 朱校斌, 等. HPLC/MS 法对呋喃唑酮及其代谢物 AOZ 在罗非鱼体内残留研究 [J]. *上海水产大学学报*, 2005, 14(1): 35-39.