

化学发光免疫试剂盒检测牛肝、牛肉中阿维菌素类药物的残留

党娟¹, 谢体波¹, 刘红¹, 何进¹, 吴紫洁¹, 何方洋²

(1. 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司, 贵阳 550009; 2. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 100012)

[收稿日期] 2016-01-04 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2016) 03-0039-06 [中图分类号] S859.84

[摘要] 为验证自主研发的阿维菌素类药物化学发光免疫试剂盒的检测效果,采用化学发光微粒子免疫法和液相色谱-质谱法对牛肝、牛肉样品中阿维菌素类药物残留量进行检测,并比对2种方法试验结果的差异。结果表明:这种试剂盒标准曲线 IC_{50} 值的波动范围为14.805~26.235 ng/L,对牛肝、牛肉样品在2、4、8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3个水平做加标回收试验,其回收率均在95.25%~104.55%之间,变异系数 CV 均小于15%,对牛肝、牛肉样品的最低检测限分别为1.463、1.392 ng/kg。这种方法与液相色谱-质谱法检测实际样品的阴、阳性判断结果一致。该方法高效、可靠,可满足现场快速检测动物组织中阿维菌素类药物残留的需要。

[关键词] 阿维菌素类药物;化学发光微粒子免疫法;液相色谱-质谱法

Detection of Avermectins Residues in Beef Liver and Beef Muscle by Using Chemiluminescence Immune Kit

DANG Juan¹, XIE Ti-Bo¹, LIU Hong¹, HE Jin¹, WU Zi-Jie¹, HE Fang-Yang²

(1. Guizhou Kwinbon Food Safety Science - Technology Co Ltd., Guiyang 550009, China; 2. Beijing Kwinbon Biotechnology Co Ltd., Beijing 100012, China)

Abstract: To verify the independence R & D of avermectins chemiluminescence immunoassay kit, the method of chemiluminescent microparticle immunoassay and liquid chromatography - mass spectrometry method were used to detect the residues of avermectins in beef livers and beef muscles, and compared the difference between the results of two methods. The results showed that IC_{50} value of the kits standard curve was 14.805 ~ 26.235 ng/L, the recovery of the method was in the range of 95.25% ~ 104.55%, and the coefficient of variation CV was less than 15%, the limits of detection of the kit for the beef liver and beef muscle were 1.463 ng/kg and 1.392 ng/kg; The results of kit method was well consistent with as the results of LC - MS method. This kit method was efficient, reliable and could meet the on - site rapid detection of animal tissue avermectins residues needs.

Key words: avermectins (AVMs); chemiluminescence micro immunoassay; liquid chromatography - mass spectrometry (LC - MS)

基金项目: 2015 贵州省科技技术项目(黔科合 NY[2015]3016-1 号); 2014 贵州省科技成果转化引导基金计划(黔科合成转字[2014]5104 号)

作者简介: 党娟, 硕士, 从事食品安全快速检测技术的研究与开发。E-mail: 853625823@qq.com

阿维菌素类药物(Avermectins, AVMs)是由放线菌产生的一组大环内酯类抗生素,包括阿维菌素(AVM)、伊维菌素(IVM)、多拉菌素(DOR)等^[1]。商品化的阿维菌素为8个化学结构相近的化合物中活性最强的两个同体系的混合物,是一种优良的新型农畜两用抗生素^[2-3]。阿维菌素对绝大多数有重要经济价值动物中的寄生虫和节肢动物均有很强的抑杀作用,其作用机制独特,使用方便,被誉为近几十年来抗寄生虫药物研究的重大突破^[4-6]。阿维菌素作为脂溶性药物,生物体均能很好地吸收,其广泛分布于全身组织,且残留时间较长,消除缓慢。阿维菌素对中枢神经系统损害最为多见,严重者因频繁抽搐窒息或出现室颤而死亡^[7-8],因而WHO将其列为高毒化合物,其动物源食品中的残留检测工作引起各国的极大关注^[9]。2002年12月我国农业部公告第235号文件规定在所食用牛的脂肪、肝中的最高残留量为100 μg/kg,肾的最高残留量为50 μg/kg,将检测阿维菌素类药物的残留量列为残留监控重点^[10]。

目前,国外阿维菌素化学发光微粒子免疫试剂盒研发处于成熟期,原装进口的产品价格昂贵,导致检测成本过高。由于阿维菌素类药物本身有很多种,开发出可以同时检测阿维菌素类的多种药物的试剂盒,这种试剂盒在检测单一药物残留的同时也可以对一类药物的总残留检测,可实现兽药残留检测的集成化,大大降低检测成本等。常见的检测阿维菌素类药物残留量的方法主要是以荧光衍生化检测为基础的高效液相色谱法(HPLC)^[11-12]、气相色谱-质谱法(GC-MS)、液相色谱-质谱法(LC-MS)和酶联免疫吸附法(ELISA)等^[13-15]。本研究采用快速筛选方法对样品筛查后,检测为阳性的样本,再用液质联用的方法确证,可对大量样本实现快速检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品与试剂 牛肝、牛肉购买于农贸市场、菜市场、街边摊贩;阿维菌素类药物试剂盒(自主研发);阿维菌素、埃普菌素标准品:美国Sigma公司;

乙腈(色谱纯);冰乙酸、三乙胺、中性氧化铝分析纯,天津市富宇精细化工有限公司。

1.1.2 仪器与设备 磁免疫全自动化学发光检测仪(自主研发),高速电动匀浆机(FSH-II型,江苏中大仪器厂),恒温振荡器(CHZ-82A,上海百典仪器设备有限公司),高速离心机(GT16-3A,北京时代北利离心机有限公司),涡旋仪(QL-901,海门市其林贝尔仪器制造有限公司),分析天平(ESJ200-4,沈阳龙腾电子有限公司),微量移液器(单道20~200 μL、100~1000 μL、多道250 μL,美国Thermo公司),LC-MS液质联用仪(TSQ Quantum Ultra,美国Thermo)。

1.2 方法

1.2.1 样品前处理 用均质器均质样本,称取5.0±0.05 g均质物至50 mL聚苯乙烯离心管中,加入10 mL甲醇,用涡旋仪涡动1 min,再用振荡器振荡10 min;3000 g以上,15℃离心10 min;移取上清液20 μL至2 mL聚苯乙烯离心管中,加入复溶工作液按1:9体积比进行稀释(20 μL样本+180 μL复溶工作液),取20 μL用于分析。

1.2.2 样品检测方法 分别吸取20 μL标准品或样本,然后加入20 μL发光标记物,再加20 μL荧光素标记物,充分混匀后,37℃温育15 min;加入包被有羊抗FITC单克隆抗体的顺磁性纳米微珠80 μL,混匀后在37℃温育5 min;用磁分离架分离5 min,弃上清后用清洗液300 μL冲洗复合物沉淀;上述清洗步骤重复2~4次;所得分离好的复合物直接放入测量暗箱,加入激发底物1和激发底物2,延迟3 s后检测发出的发光值。

1.2.3 阿维菌素类药物浓度的计算 百分吸光率的计算^[16],标准品或样品百分吸光率等于标准品或样品的吸光度值的平均值除以空白溶液的吸光度值的平均值,再乘以100%,即百分吸光率(%) = $B/B_0 \times 100\%$, B - 标准品或样品溶液的平均吸光度值, B_0 - 空白溶液的平均吸光度值。将样品的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样品所对应浓度,乘以其对应稀释倍数即为样品中阿维菌素类药物实际浓度。

1.2.4 试剂盒相关指标检测方法 分别对试剂盒的特异性、灵敏度、精密度、准确度进行试验^[17],并将其中灵敏度、精密度和准确度与 LC-MS 检测的灵敏度、精密度和准确度进行对比。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起 50\% 抑制的阿维菌素浓度}}{\text{引起 50\% 抑制的阿维菌素类似物浓度}} \times 100\%$$

试剂盒检测限的确定:分别对空白牛肝、牛肉样品进行 20 次检测,计算阿维菌素类药物的浓度,检测限 $LOD = S + 3SD$ (S 为阿维菌素类药物的浓度平均值, SD 为标准差),即为试剂盒检测实际样品的最低检测限。

试剂盒精密度和准确度的测定:在检测为阴性的牛肝、牛肉样本以 2.0、4.0、8.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 阿维菌素类药物进行添加,每种样品、每个浓度各 6 个平行,用试剂盒提供的操作方法提取测定,计算测定样品的回收率。抽取三批试剂盒,每批试剂盒测定同一份样品 6 次,分别计算测定样品的回收率及批内、批间变异系数。

1.2.5 试剂盒与 GC-MS 检测结果比较 随机抽取市场上售卖的牛肝、牛肉样本各 20 份,分别用试剂盒方法和 LC-MS 法进行检测。LC-MS 参考《GB/T 20748-2006 牛肝和牛肉中阿维菌素类药物残留量的测定液相色谱-串联质谱法》,其中对动物源性食品样品中阿维菌素类药物的检出限为 4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2 结果与分析

2.1 标准曲线 分别测定 0、0.02、0.05、0.1、0.2、0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 6 个浓度的标准液的吸光度值(A)。以阿维菌素浓度对数值(Log)为横坐标,各对应浓度的百分吸光率%为纵坐标,制作标准曲线,以阿维菌素标准品浓度的对数(Log)为横坐标,抑制率 $\ln[B/(B_0 - B)]$ 为纵坐标建立双对数直线拟合曲线,数学模型为 $\ln[B/(B_0 - B)] = a + b\text{log}C$ 。从图 1 和图 2 中可知,标准曲线回归方程为: $Y = -2.4134X + 4.4618$,相关系数 $R^2 = 0.9949$,说明试

剂盒特异性的测定采用特异性用交叉反应率来表示,选择与阿维菌素类似结构和类似功能的药物,将不同浓度的阿维菌素类似物,替代阿维菌素标准溶液,测定其标准曲线,并计算交叉反应率。

剂盒线性关系良好。

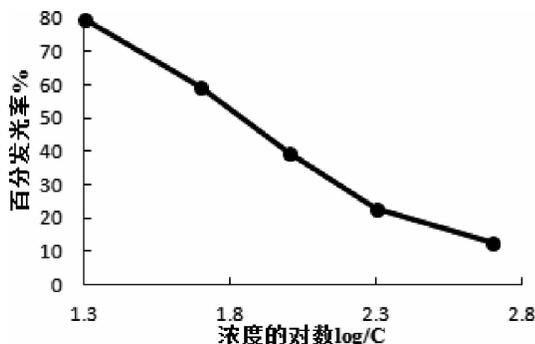


图 1 标准曲线

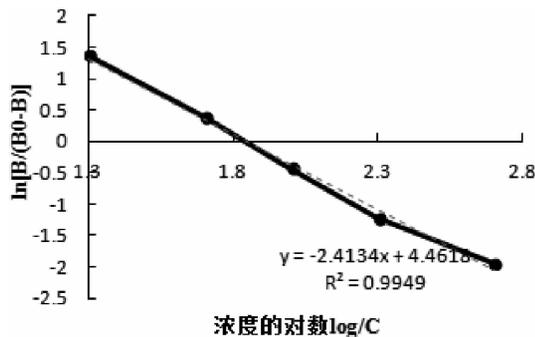


图 2 标准曲线方程

2.2 试剂盒灵敏度的确定 由表 1 可知,阿维菌素类药物化学发光快速检测试剂盒标准曲线 IC_{50} 值的波动范围为 14.805 ~ 26.235 ng/L 。对空白牛肝、牛肉样品进行 20 次检测,测定结果的平均值加上 3 倍标准差即为试剂盒检测实际样品的最低检测限,结果见表 2、表 3。由表 2、表 3 可知,本试剂盒对空白牛肝、牛肉的最低检测限为分别为 1.463、1.392 ng/kg 。

表 1 阿维菌素类药物化学发光试剂盒 IC_{50} 统计表 (ng/L)

批号	IC_{50}						IC_{50} 的平均值	标准曲线 IC_{50} 范围
1	14.805	17.620	16.289	20.736	25.463	20.172		
2	20.198	19.909	21.236	19.629	17.492	22.589	14.805 ~ 26.235	
3	17.869	16.896	26.235	19.352	20.861	23.567		

表2 空白牛肝测定结果统计表 (ng/kg)

样本	空白牛肉 ng/kg										平均值	标准差	最低检测限
样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	0.539	0.308	1.463
测定值	0.691	1.125	0.564	0.637	0.179	0.285	0.758	0.542	0.218	0.691			
样本号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	0.539	0.308	1.463
测定值	0.258	0.753	0.233	0.397	0.357	0.451	1.234	0.326	0.567	0.258			

表3 空白牛肉测定结果统计表 (ng/kg)

样本	空白牛肉 ng/kg										平均值	标准差	最低检测限
样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	0.522	0.290	1.392
测定值	0.512	1.069	0.367	0.156	0.652	1.112	0.523	0.247	0.116	0.623			
样本号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	0.522	0.290	1.392
测定值	0.869	0.561	0.768	0.129	0.569	0.369	0.413	0.159	0.639	0.591			

2.3 试剂盒特异性的测定 试剂盒特异性测定结果如表4,由表4可知,该抗体对阿维菌素类似药物的交叉反应率均较高,对阿维菌素、埃普菌素具有较好的特异性。

表4 交叉反应率

药物名称	交叉反应率/%
阿维菌素	100
埃普菌素	130
依维菌素	33
多拉菌素	<10

2.4 试剂盒精密度和准确度的测定 对空白牛肝、牛肉以2、4、8 ng/kg 3个浓度分别阿维菌素、埃普菌素进行添加,各6个平行,按2.2.2项操作方法测定,计算平均回收率,由表5、表6可知,牛肝、牛肉样品中阿维菌素类药物3个浓度添加的平均回收率范围在95.25%~104.55%之间,批内、批间变异系数均小于15%。符合《农业部文件》农医发[2005]17号附件2中试剂盒备案参考标准。

表5 牛肝样品准确度与精密度测定结果表

分类	批号	加标量/(ng·kg ⁻¹)	测定均值/(ng·kg ⁻¹)	标准差	回收率/%	批内 CV/%	批间 CV/%
阿维菌素	1	2	1.987	0.177	99.35	11.3	
	2	2	1.965	0.160	98.25	10.8	13.1
	3	2	2.033	0.169	101.65	11.6	
	1	4	4.182	0.358	104.55	9.7	
	2	4	4.042	0.152	101.05	10.5	12.9
	3	4	3.957	0.169	98.92	10.2	
	1	8	7.664	0.328	95.80	10.2	
	2	8	8.050	0.134	100.62	11.5	13.3
	3	8	7.993	0.199	99.91	10.7	
埃普菌素	1	2	1.906	0.182	95.25	10.8	
	2	2	1.916	0.053	95.81	9.8	12.6
	3	2	1.971	0.100	98.55	10.5	
	1	4	3.907	0.190	97.67	11.5	
	2	4	3.897	0.202	97.42	10.9	14.0
	3	4	3.940	0.082	98.50	11.8	
	1	8	7.842	0.139	98.02	9.9	
	2	8	7.896	0.116	98.70	10.0	12.8
	3	8	7.969	0.157	99.61	10.3	

表6 牛肉样品准确度与精密度测定结果表

分类	批号	加标量/(ng·kg ⁻¹)	测定均值/(ng·kg ⁻¹)	标准差	回收率/%	批内 CV/%	批间 CV/%
阿维菌素	1	2	1.905	0.122	95.25	10.9	
	2	2	1.946	0.074	97.30	10.3	13.3
	3	2	1.989	0.118	99.45	9.9	
	1	4	4.088	0.181	102.20	9.8	
	2	4	3.898	0.113	97.45	10.1	12.5
	3	4	4.021	0.099	100.52	9.6	
	1	8	8.101	0.167	101.26	10.7	
	2	8	7.998	0.115	99.97	11.3	14.2
	3	8	8.055	0.159	100.68	10.4	
埃普菌素	1	2	1.900	0.121	95.00	10.2	
	2	2	2.008	0.110	100.40	10.8	12.9
	3	2	1.984	0.028	99.20	9.7	
	1	4	3.861	0.248	96.52	10.5	
	2	4	3.956	0.061	98.90	10.3	13.6
	3	4	3.987	0.085	99.67	11.1	
	1	8	7.875	0.176	98.43	12.1	
	2	8	7.852	0.037	98.15	11.6	14.4
	3	8	7.927	0.077	99.08	10.8	

2.5 试剂盒与仪器方法检测结果比较 试剂盒与仪器方法检测结果见表7,仪器方法中牛肝、牛肉的检测限(0.5 μg/kg)为阳性判定线,低于阳性判定线的值,检测结果以“-”表示,高于或等于阳性判定线的值以实际检测结果表示。对农贸市场和菜

市场的牛肝、牛肉2种样品结果可知,检测结果基本低于国家最高残留量。由表7可知,化学发光微粒子试剂盒检测结果与仪器方法检测结果相吻合,表明这种试剂盒方法的准确度达到国家标准检测水平。

表7 试剂盒与仪器方法检测结果的比较(μg/kg)

样品	方法	检测值									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
牛肝 μg/kg	样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	试剂盒	-	-	-	-	-	5.89	-	-	-	-
	仪器方法	-	-	-	-	-	5.31	-	-	-	-
牛肉 μg/kg	样本号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	试剂盒	-	6.03	-	-	-	-	-	-	-	-
	仪器方法	-	5.87	-	-	-	-	-	-	-	-
牛肝 μg/kg	样本号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	试剂盒	-	-	-	-	3.69	-	-	-	-	-
	仪器方法	-	-	-	-	3.22	-	-	-	-	-
牛肉 μg/kg	样本号	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	试剂盒	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.43
	仪器方法	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.12

注:仪器检测结果包含阿维菌素和埃普菌素

3 讨论与小结

目前市场上有多家国内外厂家生产销售阿维菌素试剂盒,商品化的试剂盒多采用酶联免疫法,国内阿维菌素 ELISA 产品处于成熟期^[18]。自主研发生产的阿维菌素类药物试剂盒采用直接竞争化学发光微粒子免疫法,用包被有羊抗 FITC 单克隆抗体的顺磁性纳米微珠磁分离复合物,检测的灵敏度与可测范围远远高于酶联免疫法,兼具 ELISA 法的简便操作及短时反应等性能,且可检测单一药物或一类药物的总残留,实现农兽药残留检测的集成化;与传统色谱质谱类仪器分析方法相比,检测结果一致,但样品前处理方法简单,后续检测实现大量样本的同步检测,分析周期短、检测设备投入少^[19]。现阶段国内化学发光产品处于导入期或成长期,基本依赖进口。

本研究采用化学发光微粒子免疫法对牛肝、牛肉样品中阿维菌素类药物残留量进行检测,验证自主研发生产的阿维菌素类药物化学发光微粒子免疫试剂盒检测效果,并将其检测效果与仪器检测方法做对照。结果表明,阿维菌素类药物化学发光微粒子免疫试剂盒检测灵敏度高,牛肝、牛肉样品回收率均在 95.25%~104.55% 之间,变异系数 CV 均小于 15%,对牛肝、牛肉样品的最低检测限分别为 1.463、1.392ng/kg,低于国家规定最高残留量。

参考文献:

- [1] 何方洋,裴道国,万宇平,等. 阿维菌素类药物单克隆抗体的制备和鉴定[J]. 现代畜牧兽医,2010,7:48-51.
- [2] 徐汉虹,梁明龙,胡林. 阿维菌素类药物的研究进展[J]. 华南农业大学学报,2005,1:1-6.
- [3] 冯瑜,盛旋,郑屏,等. 阿维菌素类药物残留检测方法研究进展[J]. 安徽化工,2008,1:1-4.
- [4] 廉慧锋,宋洁,张文娟,等. 食品中阿维菌素类药物残留检测方法研究进展[J]. 山西农业科学,2011,8:918-921.
- [5] Tsukamoto Y, Cole L M, Casida J E. Avermectin chemistry and action: ester- and ether-type candidate photoaffinityprobes [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 2000, 8(1):19-26.

- [6] Danaher M, Glennon J D, Glennon J D. Extraction and isolation of avermectins and milbemycins from liver samples using unmodified supercritical CO₂ with in-line trapping on basic alumina. [J]. Journal of Chromatography B Biomedical Sciences & Applications, 2001, 761(1):115-123.
- [7] 李力,徐颖,杨卫超,等. 阿维菌素类近期毒理学研究进展[J]. 医学动物防制,2010,7:608-610.
- [8] 扈洪波,朱蓓蕾. 阿维菌素类药物的毒理学研究进展[J]. 动物科学与动物医学,2000,3:51-52.
- [9] 张卫. 农药阿维菌素在环境中降解和代谢研究[D]. 杭州:浙江大学,2004.
- [10] 赵卫东,郑文杰,贺艳,等. 酶联免疫法检测动物源性产品中阿维菌素残留[J]. 食品研究与开发,2009,4:127-130.
- [11] Sanderson H, Laird B, Pope L, et al. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosms. [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 85(4):229-240.
- [12] Payne L D, Hicks M B, Wehner T A. Determination of abamectin and/or ivermectin in cattle feces at low parts per billion levels using HPLC with fluorescence detection[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1995, 43(5):1233-1237.
- [13] 宫小明,董静,孙军,等. 动物源性食品中阿维菌素类药物残留的 QuEChERS-液质联用法测定[J]. 分析测试学报, 2010,9:933-937.
- [14] 赵东豪,贺利民,聂建荣,等. 猪肉组织中阿维菌素类药物残留的高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008,8:862-865.
- [15] 郑卫东,胡江涛,阴文娅,等. 高效液相色谱-串联质谱测定猪肝中阿维菌素、伊维菌素残留[J]. 食品科学,2011,4:185-188.
- [16] 赵卫东,郑文杰,贺艳,等. 酶联免疫法检测动物源性产品中阿维菌素残留[J]. 食品研究与开发,2009,4:127-130.
- [17] 谢体波,党娟,易重任,等. 呋喃妥因代谢物 CLIA 试剂盒对畜禽及水产品的验证研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2015,11:4645-4651.
- [18] 蔡姗姗. 商品化食品安全检测试剂盒评价制度研究[D]. 福州:福建农林大学,2013.
- [19] 侯晓林,何继红,杜向党,等. 牛肝中阿维菌素类药物残留的高效液相色谱荧光检测方法的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2006,5:500-503.

(编辑:侯向辉)