

用酶联免疫法测定水产品中氯霉素的残留量

沈美芳¹, 赵文亚², 费志良¹, 吴光红¹, 耿雪冰¹

(1. 江苏省水产质量检测中心, 210017, 南京) (2. 南京农业大学食品科技学院, 210095, 南京)

[摘要] 运用酶联免疫法测定水产品中的氯霉素残留. 氯霉素浓度在 0.05~4.05 μg/kg 范围内呈线性, 线性方程为 $Y = 0.31211 - 0.34014X$, $r = 0.994$. 向样品中分别添加 0.45、1.35、4.05 μg/kg 3 个浓度水平的氯霉素, 平均回收率分别为 84.5%、88.4% 和 79.9%, 最低检测限为 90 ng/kg, 批内变异系数为 6.0%~8.5%, 批间变异系数为 5.8%~14.3%. 结果表明该方法灵敏度高, 重复性好, 适合水产品中氯霉素残留筛选检测.

[关键词] 水产品, 氯霉素, 酶联免疫法

[中图分类号] R978.1⁺3; TQ460.7⁺2, [文献标识码] B, [文章编号] 1672-1292-(2003)02-0001-04

氯霉素(chloramphenicol, CAP)是一种广谱抗生素,对多种病原菌有较强的抑制作用,曾是我国水产养殖中常用的抗菌药之一.氯霉素存在着严重的毒副作用,能引起人的再生障碍性贫血、粒状白细胞缺乏症以及新生儿、早产儿灰色综合症等^[1],对人类健康构成巨大的潜在威胁.因此,氯霉素残留问题已引起国际组织和许多国家及地区有关部门的高度重视.美国严禁氯霉素用于食用动物^[2,3].欧共体各国也严格控制氯霉素用于食用动物.因此,探讨快速、便捷的氯霉素残留的检测方法也引起了世界各国的广泛关注.

目前,氯霉素残留分析主要采用高效液相色谱法^[4~8]和气相色谱法^[9~11].高效液相色谱法虽操作简单,但检出限较高,无法满足当前对氯霉素低残留限量的要求.气相色谱法灵敏度较高,但也存在一些不足,如样品前处理过程复杂、分析速度慢、仪器化程度高且价格昂贵,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.本文采用酶联免疫法检测水产品中的氯霉素残留,该方法简单、快速、灵敏度高、重复性较好,适用于大规模氯霉素的残留筛选检测.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品及其制备

实验所采用的样品为南美白对虾.虾经洗净、去头、去皮后,取肌肉,用高速万能试样粉碎机匀浆,备前处理用.

1.1.2 仪器与设备

JA-5002 电子天平,上海精天电子仪器厂;KS 调速多用振荡器,常州国华电器有限公司;Allegra™21R 台式高速冷冻离心机,美国 Beckman 公司;BIO-RAD550 酶标仪, BIO-RAD1575 洗板机,美国 BIO-RAD 公司.

1.1.3 试剂

乙酸乙酯、异辛烷、三氯甲烷,分析纯,上海化学试剂有限公司;RIDASCREEN Chloramphenicol 试剂

收稿日期: 2003-03-13.

资助项目:江苏省“十五”科技攻关项目(BE2001385)和江苏省科技厅社会公益项目(BM2001704)资助.

作者简介:沈美芳,女,1968-,江苏省水产质量检测中心副研究员,主要从事水产动物营养需要与检测技术的研究.

盒,德国 R-Biopharm 公司,其中包括 0、0.5、1.5、4.5、13.5、40.5 $\mu\text{g/L}$ 6 种浓度的氯霉素标准浓缩液、酶标记物、抗体、基质、发色剂、反应停止液和缓冲液。

1.2 方法

1.2.1 标准溶液的配制

分别取 0、0.5、1.5、4.5、13.5、40.5 $\mu\text{g/L}$ 的氯霉素标准浓缩液各 50 μL , 分别用 450 μL 缓冲液(试剂盒提供)稀释并混合均匀,制成 0、0.05、0.15、0.45、1.35 和 4.05 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液。

1.2.2 样品前处理

称取 1.1.1 制备的样品 3 g, 加入 6 mL 乙酸乙酯,用振荡器强烈混合 10 min, 4000 r/min 室温离心 10 min, 取 2 mL 上清液在氮气流下干燥,用 1 mL 异辛烷/氯仿(2:3)溶解干燥后的残留物,加入 1 mL 缓冲液强烈振荡 1 min, 5000 r/min 室温离心 10 min. 取 50 μL 上层水相进行测定。

1.2.3 酶联免疫分析程序

将足够的标准品和样品所用的孔条插入微孔架,每个标准品和样品做 2 个平行,记录标准品和样品的位置. 加入 50 μL 标准品或处理好的样品到各自的微孔中,再加入 50 μL 稀释了的酶标记物(10 份缓冲液+1 份酶标记物浓缩液)于微孔底部. 加入 50 μL 稀释了的抗体溶液(10 份缓冲液+1 份抗体浓缩液)于每一个微孔底部充分混合,覆盖上薄膜,在室温孵育 2 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,用洗板机洗板 3 次或用 250 μL 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 50 μL 基质和 50 μL 发色剂到每个微孔中,充分混合并在室温暗处孵育 30 min. 加入 100 μL 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.(注意:必须在加入停止液后 60 min 内读取吸光度值)。

1.2.4 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):

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

以标准样品浓度的对数值为横坐标,标准样品的%吸光度值为纵坐标,绘制对应氯霉素浓度的半对数校正曲线,样品浓度根据测得的吸光度值从校正曲线上读出,或利用试剂盒公司提供的 RIDASCREEN 数据分析软件直接读出浓度。

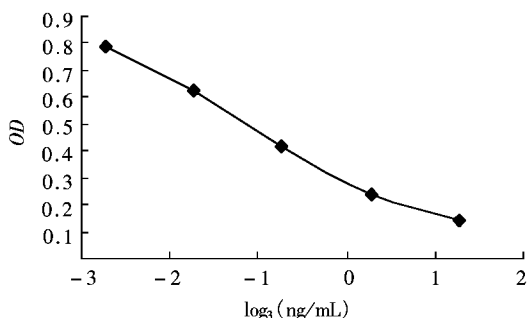


图1 RIDASCREEN 数据分析软件建立的氯霉素标准曲线

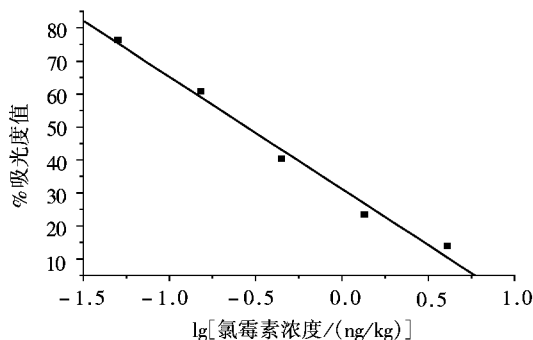


图2 ORIGIN 数据处理软件建立的氯霉素标准曲线

2 结果

2.1 标准曲线

按照 1.2.2 步骤,分别测定浓度为 0、0.05、0.15、0.45、1.35 和 4.05 $\mu\text{g/L}$ 氯霉素标准液的吸光度值,采用 RIDASCREEN 数据分析软件建立标准曲线如图 1,采用 ORIGIN 软件绘制氯霉素曲线如图 2. 由图 2 曲线可知氯霉素浓度在 50~4050 ng/kg 范围内呈线性,线性方程为 $Y = 0.31211 - 0.34014X$,相关系数

$r = 0.994$.

2.2 精密度

采用变异系数表示法, 在同一次测定中对 3 个浓度水平的样品分别重复测定 3 次, 计算批内变异系数. 分别测定 3 个浓度水平的样品在 3 个不同批次测定之间的变异系数, 即为批间变异系数. 结果如表 1 所示.

2.3 回收率

向样品中分别添加 3 个浓度水平的氯霉素标样: 0.45、1.35、4.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 每个浓度做 3 个平行, 同时做 3 个空白样. 按 1.2.2 处理后测定氯霉素含量, 计算回收率, 结果如表 2 所示.

2.4 灵敏度

按照 1.2.3 步骤同时测定 10 个“0”标准溶液的吸光度值, 求出其平均值(X), 再减去两倍标准差(SD), 从标准曲线上查出对应于吸光度值为 $X - 2SD$ 的浓度, 即为灵敏度. 本实验中 $X = 0.847$, $SD = 0.073$, 该方法的平均灵敏度为 90 ng/kg .

3 讨论

目前文献报道的氯霉素的酶联免疫法大都是针对动物性食品和畜禽组织的^[12, 13], 专门针对水产品的检测尚未见报道. 本文采用酶联免疫法对水产品中氯霉素残留进行检测, 该方法的最低检测限为 90 ng/kg , 批内变异系数为 6.0% ~ 8.5%, 批间变异系数为 5.8% ~ 14.3%, 当向样品中分别添加 0.45、1.35、4.05 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 3 个浓度水平的氯霉素时, 平均回收率分别为 84.5%、88.4% 和 79.9%. 结果表明该方法灵敏度高, 重复性较好, 适用于水产品中氯霉素残留的筛选.

运用酶联免疫法对水产品中氯霉素残留进行筛选, 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.

表1 精密度测定结果($n = 3$)

测试样品	批内变异系数($n = 3$)		批间变异系数($n = 3$)	
	$\bar{X} \pm SD$	$CV(\%)$	$\bar{X} \pm SD$	$CV(\%)$
1	0.39 ± 0.030	7.6	0.37 ± 0.053	14.3
2	0.67 ± 0.057	8.5	0.67 ± 0.072	10.7
3	1.20 ± 0.072	6.0	1.34 ± 0.078	5.8

表2 回收率测定结果($n = 3$)

添加浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	实测浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率/ %	平均回收率/ %	CV / %
0.45	0.40	89.2	84.5 ± 4.70	5.6
	0.38	84.4		
	0.36	79.8		
1.35	1.13	83.5	88.4 ± 4.36	4.9
	1.21	89.7		
	1.24	91.9		
4.05	3.15	77.8	79.9 ± 1.91	2.4
	3.30	81.5		
	3.27	80.7		

[参考文献]

[1] Allen E H. Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, egg, and tissues from food-producing animal [J]. J Assoc Off Anal Chem, 1985, 68: 990~ 999.

[2] Munns R K, Holland D C, Roybal J E, *et al.* Gas chromatographic determination of chloramphenicol residues in shrimp: interlaboratory study[J]. J AOAC Int, 1994, 77(3): 596~ 601.

[3] Ginkel L A, Rossum H J, Zoontjes P W, *et al.* Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric procedure for the identification and quantification of residues of chloramphenicol[J]. Analytica Chimica Acta, 1990, 237: 61~ 69.

[4] 于国胜. 肉类中氯霉素(CAP)的高效液相色谱测定法[J]. 分析测试通报, 1991, 10(4): 75~ 76.

[5] 陈家华. 高效液相色谱快速测定家禽组织中氯霉素残留研究[J]. 中国抗生素杂志, 1992, 17(5): 351~ 355.

[6] 李兰生, 王勇强. 对虾体内氯霉素含量测定方法的研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1995, 25(3): 400~ 405.

[7] Austin R, Long L C, Hsieh A C, *et al.* Method for the isolation and liquid chromatographic determination of chloramphenicol in

- milks[J]. J Agric Chem, 1990, 38: 427~ 429.
- [8] Pascal Sanders, Philippe Guillot, Michele Dagorn, *et al.* Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in calf tissues: studies of stability in muscles, kidney, and liver[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1991, 74(3): 483~ 486.
- [9] 王建华, 陈世山. 同时测定鱼肉中氯霉素和甲砒霉素残留量的毛细管气相色谱法[J]. 分析测试学报, 2001, 20(3): 89~ 91.
- [10] Weber L. Trace analysis of chloramphenicol residues in egg powders by capillary gas chromatography-electron capture detection [J]. Chromatographic Science, 1990, 28: 501~ 504.
- [11] Robert L E. International validation study for the determination of chloramphenicol in bovine muscle[J]. J AOAC Int, 1994, 77(3): 570~ 576.
- [12] 关嵘. 应用酶联免疫技术检测动物源性食品中氯霉素残留的研究[J]. 检验检疫科学, 2002, 12(4): 5~ 10.
- [13] 王菊芳, 李志勇. 广州鸡肉中氯霉素含量的快速检测与分析[J]. 四川畜牧兽医, 2002, 29(137): 35~ 36.

Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) for Quantitative Analysis of Chloramphenicol Residues in Aquatic Products

Shen Meifang¹, Zhao Wenya², Fei Zhiliang¹, Wu Guanghong¹, Geng Xuebing¹

(1. Aquatic Products Analysis and Testing Center of Jiangsu Province, 210017, Nanjing, PRC)

(2. Department of Food Science and Technology, Nanjing Agricultural University, 210095, Nanjing, PRC)

Abstract: Chloramphenicol residues in aquatic products were analyzed by ELISA. The calibration curve was linear in the range of 0.05~ 4.05 μ g/kg. The average recoveries were 84.5%、88.4% and 79.9% respectively when samples were spiked with 0.45, 1.35 and 4.05 μ g/kg. The detection limit was 90ng/kg. The intra-assay coefficients of variation were 6.0%~ 8.5% and inter-assay coefficients of variation were 5.8%~ 14.3%. The method is sensitive and suitable for the determination of trace chloramphenicol in aquatic products.

Key words: aquatic products, chloramphenicol, ELISA

[责任编辑: 严海琳]