

文章编号: 1004-7271(2002)03-0199-04

酶联免疫法检测中华鳖肌肉中己烯雌酚

胡 鲲, 杨先乐, 张 菊

(农业部渔业动植物病原库, 上海水产大学, 上海 200090)

摘 要: 根据酶标免疫法原理, 用含有针对兔 IgG(己烯雌酚抗体)的羊抗体与待测中华鳖肌肉中的己烯雌酚发生特异性的结合反应。洗涤后, 加入的酶标底物连接未结合的己烯雌酚抗体, 在酶基质的作用下与无色发色剂生成有色产物。反应后于 450nm 处测量吸光度, 吸光强度与样品中的己烯雌酚浓度成反比。该检测方法平均最低检测下限为 0.0125 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 平均回收率 74.8%, 变异系数为 1.763~3.084%。表明本方法快速、灵敏、可靠, 适合对己烯雌酚残留限量检测的要求。

关键词: 中华鳖; 己烯雌酚; 酶联免疫法

中图分类号: S917 文献标识码: A

Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the quantitative analysis of diethylstilbestrol (DES) residues in the muscle of *Trionyx sinensis*

HU Kun, YANG Xian-le, ZHANG Ju

(Fishery Pathogen Collection of the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Based on the antigen-antibody reaction, diethylstilbestrol (DES) in the muscle of *Trionyx sinensis* is bound by the sheep antibodies that are directed against rabbit IgG (anti DES antibody) in the reagent box. After a washing step the DES enzyme conjugate is added, which is bound by the remaining free antibody binding sites. With the enzyme substrate, the colorless chromogen converts into a blue product. The measurement is made photometrically at 450 nm. The absorption is inversely proportional to the DES concentration in the sample. The mean lower detection limit of this method is about 0.0125 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The mean recovery rate is 74.8% and the coefficients of variation is 1.763~3.084%. This method is rapid, sensitive and reliable. It is available for sensitive detection of DES residues.

Key words: *Trionyx sinensis*; Diethylstilbestrol; enzyme linked immunosorbent assay

己烯雌酚 (Diethylstilbestrol, 以下简称 DES) 是一种人工合成的芪类 (Stilbenes) 雌激素。常当作性激素来调节动物的生理机能, 但 DES 具有致癌作用^[1]。从六十年代初开始许多国家已经制定法律禁止己烯雌酚在饲料中添加。目前, 世界上许多国家已规定己烯雌酚在家畜禽与水产养殖中禁用。我国于 1999 年制定了《中华人民共和国动物及动物源食品残留监控计划》, 规定该药物最大残留检测量 (Maximum Residues Limits, 以下简称 MRL) 为不得检出。

目前, 用于测定 DES 的方法有重量法 (小鼠子宫称重法)、紫外分光光度法、放射免疫法、荧光测定

法、纸层析法、高效液相色谱法(HPLC)和气相-质谱联用法(GC-MS)等^[2-6]。这些方法各有优劣。水产品与其它畜禽产品相比,有着自身的特殊性。我国目前尚无针对水产品药物残留检测专业的、统一的方法。现使用的 DES 残留检测标准是借鉴畜禽类的检测标准,这些检测标准在实验条件、精密度、重现性及操作可行性上均不能满足现阶段水产品药物残留检测的需要。本文采用酶联免疫法(ELISA)检测水产品中的 DES 残留,该方法灵敏度高、可靠性强,符合国内外对 DES 残留检测限量的要求,适用于大规模、精确地检测水产养殖品中 DES 残留。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

BIO-TEK(EL808IU)型酶标仪;KC4(v3.0)数据分析软件;RIDASCREEN 己烯雌酚试剂盒(德国 R-Biopharm 公司制造)其中包括 DES 标准溶液、DES 酶标物、DES 抗体酶基质、发色剂、反应停止液和缓冲液;RIDA C18 固相萃取柱;

叔丁基甲基醚(分析纯);石油醚(分析纯);二氯甲烷(分析纯);6mol/L 磷酸;甲醇(分析纯);67mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.2)。

1.2 测定方法

1.2.1 样品来源与预处理

中华鳖(*Trionyx sinensis*):由浙江湖州东林湖州金翔特种水产公司提供,雌性,体重 0.6~0.7kg/只。

由用 10mL 67mmol/L 磷酸缓冲液研磨 5.0g(± 0.1 g)肌肉(必需是去除了脂肪和连接组织的研磨样品),精确称取 3.0g(± 0.1 g)研磨物,加入 8mL 叔丁基甲基醚,强烈振荡 20min,3000r/min 离心 10min,取上清液,用 8mL 叔丁基甲基醚重复提取沉淀物,合并上清液并蒸发至干。用 1mL 70% 甲醇溶解干燥的残留物,加入 3mL 石油醚洗涤甲醇溶液,除去石油醚,蒸发甲醇溶液。加入 1mL 二氯甲烷溶解,用 3mL 1mol/L 氢氧化钠溶液提取。吸取上层氢氧化钠溶液,加入 300 μ L 6mol/L 磷酸溶液中和提取。

1.2.2 样品纯化

用 3mL 甲醇洗涤 RIDA C18 固相萃取柱(流速为 1 滴/s),加入 2mL 20% 甲醇平衡柱子。样品进柱,分别用 2mL 20% 甲醇和 3mL 40% 甲醇洗涤柱子,通入氮气干燥固相萃取柱。用 1mL 80% 甲醇洗涤样品,加入 3mL 80% 甲醇和 4mL 蒸馏水稀释洗脱液,取 20 μ L 进行分析。

1.2.3 测定步骤

控制室温在 20~24 $^{\circ}$ C,分别用试剂盒中的缓冲液稀释抗体和酶标记物(10 份缓冲液+1 份抗体或酶标记物),备用。在微孔板中加入 20 μ L 标准品或处理好的样品,标准品和样品作 2 个平行。加入 50 μ L 稀释过后的抗体,充分混合,用薄膜覆盖,2~8 $^{\circ}$ C 孵育过度。

第 2 天,将微孔板恢复至室温。甩去孔中的液体,将微孔架倒置在吸水纸上拍打,至无明显水迹,重复 3 次,以保证完全出去孔中的液体。用 250 μ L 蒸馏水充入孔中,再次甩掉孔中液体,再重复一次操作。加入 50 μ L 稀释后的酶标记物,室温孵育 1h。再次洗板,迅速加入 50 μ L 酶基质及 50 μ L 发色剂到每一孔中。充分混合,在室温暗处孵育 30min,加入 100 μ L 反应停止液,混匀。用酶标仪在 450nm 处检测吸光度。

1.2.4 计算

将所测样品的浓度乘以稀释倍数,本方法的稀释系数为 8。

(1) 标准曲线的制作

按照以上步骤测定浓度为 0、12.5、25.0、50.0、100.0、200.0ng/L 的 DES 标准浓液的吸光光度值,建立标准曲线。

将样品和标品的吸光度值按照如下公式折算成:

标准的吸光光度值(或样品) $\times 100$ /空白标准的吸光值 = % 吸光度值

绘制对应 DES 浓度的半对数曲线,相对应的样品浓度从校正曲线上读出,或利用 KC4(v3.0)数据分析软件直接读出浓度。

(2) 精密度和回收率的测定

对待测样品重复测定,计算测定平均值和相对标准偏差(即为精密度)。

取 200ng/L 的己烯雌酚标准液 4mL、6mL 分别加入到 5.0g(± 0.1 g)空白肌肉样品中,按照上述方法测定己烯雌酚含量。计算回收率。

(3) 样品的测定

取待测样品,按照以上方法测定其中 DES 残留量。

2 结果

2.1 检测灵敏度

本方法的平均灵敏度为 $0.0125\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

2.2 己烯雌酚标准曲线

己烯雌酚标准曲线如图 1。

2.3 精密度

精密度测定结果如表 1,两组测定结果变异系数分别为 1.763% 和 3.084%。

2.4 回收率

利用外标法测定回收率结果如表 2,本方法平均回收率为 74.8%。

2.5 样品测定结果

测定的三份中华鳖肌肉中 DES 残留量平均值分别为 $0.725\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.996\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.459\mu\text{g}/\text{kg}$,如表 3 所示。

3 讨论

目前常见的 DES 检测方法大都用于检测动物性食品和畜禽体内的 DES 残留,专门针对水产品中 DES 残留检测尚未见报道。其中,液相色谱法测定猪肉及畜禽肉中 DES 残留量(国家标准 GB/T 14931.2-1994)最低检测限为 $250\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[7];气相—质谱联最低检测限为 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[8]。这些方法均低于我国水产行业标准 NY/T-5070-2001 规定对 DES 允许的残留限量为 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 的技术要求。利用放射性免疫法可以达到 $0.05-0.0005\mu\text{g}/\text{kg}$ 的灵敏度,但该方法对仪器硬件和操作技能要求较高,不适合作为常规检测方法推广使用。与上述方法相比,本文采用酶联免疫检测水产品中 DES 残留量的方法灵敏度高(平均最低检测下限为 $0.0125\mu\text{g}/\text{kg}$)、可靠性强、重现性好、测定迅速,适于大批量检测水产品中

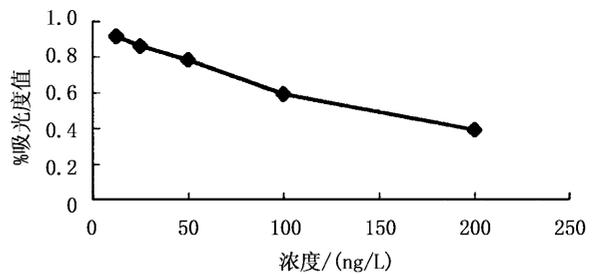


图 1 己烯雌酚标准曲线

Fig.1 Standard curve of DES

表 1 精密度测定结果

Tab.1 Precision of DES assaying

测试样品	实测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	变异系数 (%)
1	0.696	0.683	1.763
	0.672		
	0.681		
2	0.952	0.937	3.084
	0.946		
	0.914		
	0.914		

表 2 回收率测定结果

Tab.2 Recovery rate of DES assaying

样品理论浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	样品实测浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
0.160	0.120	75.0	74.8 \pm 0.024
	0.122	76.2	
	0.119	74.4	
0.240	0.174	72.5	
	0.184	76.7	
	0.178	74.2	

DES残留含量,并能够符合欧盟委员会对DES允许的MRI($2\mu\text{g}/\text{kg}$)和我国水产行业标准($1\mu\text{g}/\text{kg}$)的技术要求。

我们在实验过程中发现:由于本方法实验精度要求较高、样品前处理步骤较多,因而某些前处理步骤非常关键(如样品纯化时过柱的速度、实验温度控制的均一性及洗板的彻底与否等)。这些因素都会对实验结果产生较大的影响。这一方面要求我们规范实验操作、尽量增加同批测定样品数量、减少由于偶然误差造成的影响,另一方面也要求我们尽快建立一套符合水产行业特点的、统一规范的DES标准检测标准(包括实验方法的标准化和操作人员的专业化培训等)。

由于水产品不同组织中成份各异(特别是肝肾中成份较为复杂)利用酶联免疫方法检测水产品中DES残留检测时样品前处理非常重要。前处理可以有效地去除样品中杂质对DES检测的干扰、富集待测DES、提高检测灵敏度^[2,5,8];同时前处理步骤的增加也意味着整个检测方法回收率的降低和偶然误差对结果影响的增大。我们认为利用酶联免疫检测水产品中DES的方法能较好地解决两方面的矛盾。

参考文献:

- [1] 黄世乐,陈祖义,成冰.放射免疫法测定畜产品中的己烯雌酚[J].核农学报,1997,43(6):701-705.
- [2] 陈慕杰,胡家焱.己烯雌酚注射液的高效液相色谱测定法[J].中国医药工业杂志,1991,22(9):499-411.
- [3] 潘祖亭,姚礼峰,马红燕.己烯雌酚荧光性质的研究及其分析应用[J].武汉大学学报(自然科学版),1997,43(6):701-705.
- [4] 林黎明,管恩平,王建华,等.液相色谱/酶标免疫分析法测定动物组织中己烯雌酚[J].中国动物检疫,2001,18(3):26.
- [5] 刘军.高效液相色谱法测定化妆品中的己烯雌酚[J].甘肃科技,1996(3):45.
- [6] 李薇,张娟.高效液相色谱法测定儿童保健品中己烯雌酚的方法[J].江苏预防医学,2001,12(1):65.
- [7] 中华人民共和国国家标准.畜禽肉中己烯雌酚的测定方法[S].GB/T 14931.2-1994.
- [8] 郭志峰,安秋荣,刘鹏岩.鸡蛋中己烯雌酚的GC/MS法分析测定[J].质谱学报,1997,18(3):36-40.

欢迎订阅 2003 年《海洋与湖沼》

《海洋与湖沼》是由中国海洋湖沼学会主办、中国科学院海洋研究所承办的海洋湖沼科技领域的综合性学术刊物,于1957年创刊。现任主编为中国科学院院士、中国海洋湖沼学会理事长秦蕴珊研究员。《海洋与湖沼》主要刊载国家自然科学基金资助项目、国家重大攻关项目、各部委基金资助项目的研究成果,论文内容涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、研究简报、高新技术、学术争鸣等栏目。

本刊为双月刊,16开,国内外公开发售。每期定价:22.00元。国内统一刊号:CN 37-1149;国际标准刊号:ISSN 0029-814X。国内邮发代号:2-421;国外发行代号:BM69。读者可在当地邮局订阅,也可直接汇款到编辑部订阅。

编辑部地址:青岛市南海路7号,邮编266071。

联系电话:0532-2898753;E-mail:bsun@ms.qdio.ac.cn。