

文章编号: 1674 - 5566(2010)06 - 0805 - 05

## 基于单克隆抗体的酶联免疫法与高效液相色谱法 检测水产品中环丙沙星残留的比较

胡 鲲<sup>1</sup>, 黄宣运<sup>1</sup>, 姜有声<sup>1</sup>, 方 伟<sup>2</sup>, 朱泽闻<sup>3</sup>, 杨先乐<sup>1</sup>

(1. 上海海洋大学农业部渔业动植物病原库, 上海 201306;

2. 广东省水生动物疫病预防控制中心, 广东 广州 510222;

3. 全国水产技术推广总站, 北京 100026)

**摘 要:** 为了快速、灵敏地检测禁用药物环丙沙星在水产品中的残留,建立了基于单克隆抗体的间接竞争酶联免疫法(competitive indirect ELISA, ci-ELISA),并比较了其与高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)在灵敏度、准确性和重现性等方法学参数上的差异。实验结果显示,经过浓缩、净化等前处理过程,ci-ELISA与HPLC的检测灵敏度分别可以达到10 μg/kg和1 μg/kg,回收率分别为79.28%~92.92%和86.27%~97.32%,相对标准偏差分别在3.21%~8.88%和2.66%~5.52%。前者经济、高效,适合作为初筛方法大批量筛选样品;后者灵敏度、重现性更好,适于在实验室条件下作为验证方法。

**关键词:** 环丙沙星; 水产品; 残留; 间接酶联免疫法; 高效液相色谱法

中图分类号: S 948

文献标识码: A

## Comparing the competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay based on monoclonal antibody and High Performance Liquid Chromatography methods to determinate the ciprofloxacin residues in fishery products

HU Kun<sup>1</sup>, HUAN Xuan-yun<sup>1</sup>, JIANG You-sheng<sup>1</sup>, FANG Wei<sup>2</sup>, ZHU Ze-wen<sup>3</sup>, YANG Xian-le<sup>1</sup>

(1. Aquatic Pathogen Collection Center of Ministry of Agriculture, Research Centre for Aquatic Drug Analysis and Measurements in Shanghai Ocean University, SOU Key Laboratory of Aquatic Genetic Resource Excavation and Utilization Certificated by Ministry of Education, Shanghai 201306, China;

2. Guangdong Provincial Aquatic Animal Epidemic Disease Prevention and Control Center, Guanzhou 510222, China;

3. The National Fishery Technical Extension Center, Beijing 100026, China)

**Abstract:** For sensitive and specifically detection of ciprofloxacin (CIP) residues in fishery products, this study is aimed at generating and developing a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ci-ELISA) based on CIP-specific monoclonal antibodies (McAb). The sensibility, accuracy and repeatability of ci-ELISA method was compared to those of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) method. By

收稿日期: 2010-01-21

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(6660106477); 公益性行业(农业)科研专项(200803013); 公益性行业(农业)科研专项(nyhyzx07-042)和现代农业产业技术体系建设专项资金(NYCYTX-49-17)

作者简介: 胡 鲲(1976-),男,副教授,主要从事微生物、水产品安全等方面的研究。E-mail: khu@shou.edu.cn

通讯作者: 杨先乐, E-mail: xlyang@shou.edu.cn

concentration and purification process, the limit of detection (LOD) of ci-ELISA and HPLC method could reach to 10  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  respectively. we detected the recovery rates were 79.28% – 92.92% and 86.27% – 97.32% while relative standard deviation (RSD) varying from 3.21% – 8.88% and 2.66% – 5.52% for these methods. Between the two methods, ci-ELISA method was cheaper and more efficient while HPLC method was more sensitive and stable.

**Key words:** ciprofloxacin; fishery products; residues; competitive indirect ELISA; High Performance Liquid Chromatography

环丙沙星(ciprofloxacin, CIP)在水产品中的残留对公共卫生安全产生严重的安全隐患,并在国际贸易中引起广泛关注。我国将CIP列为“禁用渔药”<sup>[1]</sup>,美国、欧盟也将其列为“严格监控的对象”。快速、准确地检测CIP残留是保障水产品安全的技术保障。目前报道的CIP在水产品中残留的检测方法包括微生物法<sup>[2]</sup>、毛细管电泳法<sup>[3]</sup>、酶联免疫法<sup>[4]</sup>(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)和高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)<sup>[5-8]</sup>等。其中,ELISA和HPLC法具有快速、灵敏、准确而被广泛应用。目前,关于水产品中CIP残留的检测方法中以HPLC法报道最多,国内关于ELISA检测方法大都是建立在多克隆抗体(PcAb)的基础上<sup>[4]</sup>,或者处于单克隆抗体(McAb)的摸索阶段<sup>[9]</sup>。以McAb为基础的免疫学检测方法特异性更强,是小分子药物残留检测的未来发展方向。本文建立了针对水产品中CIP残留的单依赖于McAb的间接竞争ELISA(competitive indirect ELISA, ci-ELISA)检测方法,并比较其与HPLC检测方法在准确性、灵敏度、重现性等方法学参数的差异,为建立科学、合理的禁用药物检测技术程序提供技术依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器和试剂

试验仪器包括Agilent 1100高效液相色谱仪, Bio-Tek EL311型酶标仪, FORMA-3111二氧化碳培养箱; MICROSON超声波破碎仪, SANYO烘箱, HitachiCR21G型高速离心机, Thermo Forma3111型培养箱, FORMA-3111二氧化碳培养箱, Forma Scientific 725型超低温冰箱。

CIP含量 $\geq 98.5\%$ ,购自浙江国邦药业有限公司。针对CIP的McAb及CIP-Ovalbumin偶联物(CIP-OVA)由本实验室制备。柠檬酸、醋酸

铵、四丁基溴化铵均为国产化学纯试剂;乙腈、甲醇、为国产色谱纯试剂。Tetramethylbenzidine (TMB)、Peroxidase (HRP)购于鼎国生物技术公司。异育银鲫(*Carassius auratus*)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)、南美白对虾(*Penaeus vannamei*)、罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)购自上海市农贸市场。

CIP标准溶液的配制:准确称取0.001 g干燥恒重的CIP,置于50 mL烧杯中,先加0.5 mol/L盐酸5 mL溶解,转移至100 mL容量瓶中,用磷酸盐缓冲液稀释至刻度,即成100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的CIP母液,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

### 1.2 ci-ELISA检测水产品中CIP残留

称取5.0 g切碎的样品(异育银鲫、草鱼、南美白对虾、罗氏沼虾肌肉),加入30 mL酸化乙腈(乙腈+50%盐酸=2500+20),高速组织匀浆器匀浆,充分振荡5 min, 4 500 r/min离心15 min,取上清液。往残渣中加入酸化乙腈30 mL,重复上述操作一次,合并上清液。收集的上清液移入分液漏斗,加入25 mL正己烷,震荡5 min后静置。取下层有机层 $65\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴蒸干,取1.0 mL酸化乙腈洗涤残渣,过0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜,备用。同时设置未添加CIP标准溶液的样品作为空白对照(CK)。

利用CIP-OVA(150 ng/mL)包被酶标板,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育1 h;倒去包被液,拍干后加入含有5%牛奶的磷酸缓冲液,200  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育1 h;倒去多余液体,用PBST洗板;拍干,加入50  $\mu\text{L}$ 梯度浓度的CIP标准溶液或前处理后的样品提取液,同时加入50  $\mu\text{L}$ 抗体(1:65 000),设阴性对照和空白对照。 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育1 h;洗板,拍干后每孔加入100  $\mu\text{L}$ 过氧化物酶标羊抗鼠IgG(1:6 000),  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育0.5 h;洗板,拍干后每孔加入100  $\mu\text{L}$  TMB显色液(1.5 mg/mL TMB:0.03%  $\text{H}_2\text{O}_2$ :0.2 mol/L NaAC = 1:5:4, V/V/V),  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 孵

育 10 min; 每孔加入 2 mol/L 的硫酸 50  $\mu$ L 终止反应。利用酶标仪测定吸光度值。以竞争浓度 (ng/mL) 为横坐标, 抑制率 ( $B/B_0\%$ ) 为纵坐标, 绘制竞争抑制曲线, 计算  $IC_{50}$  (50% 抑制浓度)。最低检测限 (LOD) 为 ( $B_0-3SD$ )/ $B_0$  所对应的浓度值。

### 1.3 高效液相色谱法检测 CIP 在水产品中残留

前处理方法参见胡鲲等<sup>[10]</sup>。色谱条件: 反相色谱柱 C18 柱 (150 mm  $\times$  4.6 mm); 流动相: 乙腈: 四丁基溴化铵溶液 = 5: 95 (V/V); 流速: 1.5 mL/min; 激发波长: 280 nm, 发射波长 450 nm; 柱温: 40  $^{\circ}$ C; 进样量 20  $\mu$ L。不同浓度梯度的 CIP 标准溶液上 HPLC, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标制作 HPLC 测定方法的标准曲线。

### 1.4 两种检测方法的比较

样品添加适当浓度 CIP 标准溶液至样品中, 分别按照 1.2 和 1.3 的方法检测 CIP 残留, 比较方法的最低检测限 (Limit of Detection, LOD)、回收率 (Recovery rate) 和相对标准偏差 (Relative Standard Deviation, RSD) 等指标。

## 2 结果

### 2.1 ci-ELISA 方法测定 CIP 在水产品中残留

在 450 nm 波长下, 测定系列稀释浓度的 CIP

标准溶液的吸光度, 竞争抑制曲线见图 1, 曲线方程为  $y = -54.896x + 181.24$ ,  $R^2 = 0.9676$ ,  $IC_{50}$  值为 245.86 ng/mL。以 ( $B_0-3SD$ )/ $B_0$  所对应的浓度值确定的最低检测限为 45.25 ng/mL。结合样品前处理浓缩倍数, 以 10  $\mu$ g/kg 作为最低检测限, 且方法在 10 ~ 200  $\mu$ g/kg 间线性关系较好。

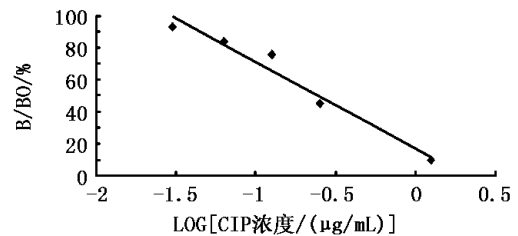


图 1 ELISA 方法下的恩诺沙星标准曲线

Fig.1 The standard curve of ENR by ELISA method

### 2.2 HPLC 方法测定 CIP 残留

CIP 标准品 (5  $\mu$ g/mL) 色谱图如图 2a, CIP 的保留时间约为 5.5 min。空白鲫鱼肌肉组织样品色谱图如图 2b; 添加 CIP 标准品 (2  $\mu$ g/kg) 的异育银鲫肌肉组织色谱图如图 2c。图 2a、b、c 色谱图均基线平稳, CIP 药物峰分离效果良好。HPLC 方法测定 CIP 的标准曲线如图 3, 在 0.05  $\mu$ g/mL ~ 4  $\mu$ g/mL 的线性范围内, 标准曲线线性关系良好, 曲线方程为  $y = 73.377x + 0.7064$ ,  $R^2 = 0.9992$ 。根据 2 倍噪音确定最低检测限, CIP 的最低检测限为 1.0  $\mu$ g/kg。

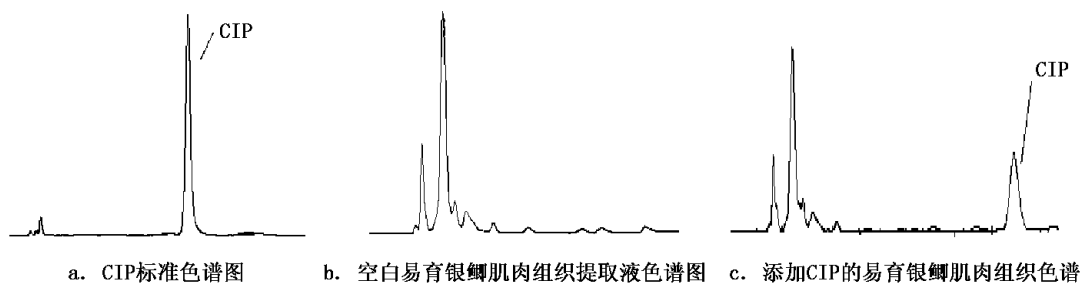


图 2 水产品组织中 CIP 残留色谱图

Fig.2 Chromatogram of the fishery products samples

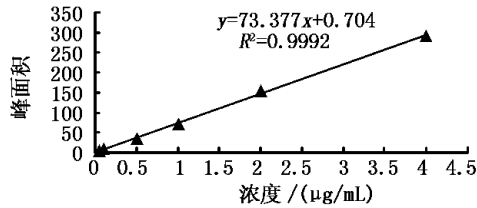


图3 HPLC法测定CIP标准曲线

Fig.3 The standard curve of CIP by HPLC

表1 ci-ELISA和HPLC法测定水产品中CIP残留(n=6)

Tab.1 Assaying CIP residues in fishery products by ci-ELISA and HPLC respectively (n=6)

检测方法	添加浓度 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	异育银鲫		草鱼		南美白对虾		罗氏沼虾	
		回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)	回收率(%)	RSD(%)
ci-ELISA	阴性对照	ND		ND		ND		ND	
	10	82.36 $\pm$ 4.56	5.54	80.87 $\pm$ 5.43	6.71	79.28 $\pm$ 4.54	5.73	86.98 $\pm$ 3.21	3.69
	20	86.29 $\pm$ 3.20	3.71	89.98 $\pm$ 6.49	7.21	87.39 $\pm$ 4.53	5.18	87.38 $\pm$ 4.32	4.94
	50	92.92 $\pm$ 2.98	3.21	83.87 $\pm$ 7.45	8.88	86.90 $\pm$ 3.49	4.02	90.93 $\pm$ 5.43	5.97
HPLC	阴性对照	ND		ND		ND		ND	
	1	87.28 $\pm$ 2.32	2.66	87.93 $\pm$ 4.58	5.20	92.23 $\pm$ 3.48	3.77	89.02 $\pm$ 2.38	2.67
	5	89.03 $\pm$ 2.59	2.91	90.23 $\pm$ 3.98	4.41	89.45 $\pm$ 2.34	2.61	95.98 $\pm$ 3.48	3.63
	50	97.32 $\pm$ 2.34	2.41	90.32 $\pm$ 3.45	3.82	86.27 $\pm$ 2.34	2.71	90.27 $\pm$ 4.98	5.52

### 3 讨论

CIP在美国、欧盟和澳洲等国家和地区均被列为“严格监控的对象”，而禁止在水产养殖中使用。其中，美国联邦法规关于鲶鱼等水产品中氟喹诺酮的残留限量标准为 $5\mu\text{g}/\text{kg}$ ，但部分州(美国鲶鱼加工的主要地区，如亚拉巴马州和密西西比州)规定鲶鱼中不得检出包括CIP在内的氟喹诺酮残留，即“零限量”标准。日本的“肯定列表(Positive List System)”制度中规定水产品CIP的最高残留限量(Maximum Residue Limits, MRLs)为 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ 。我国规定CIP在水产品中不得检出，国家标准(农业部783号公告-2-2006)利用HPLC法测定水产品中CIP残留方法检测限可达 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ”<sup>[11]</sup>。

ELISA和HPLC方法是检测水产品中CIP残留的常见方法。在目前报道的ELISA方法中，大都以基于McAb的ELISA检测方法为主<sup>[4]</sup>。其中，Duan等建立的多克隆抗体检测CIP最低检测限为 $0.32\mu\text{g}/\text{kg}$ ，回收率在75.58%~84.30%之间，变异系数(CV)在5.81~11.23之间<sup>[4]</sup>；Snitkoff等建立的针对CIP的McAb的回收率在15%~48%之间<sup>[12]</sup>。本文建立的ci-ELISA方法

### 2.3 方法学参数的比对

利用ci-ELISA和HPLC法测定异育银鲫等水产品样品中CIP残留的准确性和重现性结果见表1。其中，ci-ELISA法的回收率在79.28%~92.92%，RSD在3.21%~8.88%之间。HPLC法的回收率在86.27%~97.32%之间，RSD在2.66%~5.52%。T测验表明，两种方法的回收率和RSD均表现出极显著的差异。

建立在McAb基础上，抗体特异性更强，重现性好以及易于扩大化生产，符合目前小分子药物的免疫学检测发展的主流发展方向；其回收率在79.28%~92.92%，RSD在3.21%~8.88%之间，均优于以上报道的结果。此外，本方法可在2h内完成对于水产动物组织内CIP残留的检测，是目前效率最高的检测方法。

检测水产品中CIP残留的HPLC方法包括紫外检测法<sup>[7]</sup>、二极管阵列检测法<sup>[13]</sup>、荧光检测法<sup>[10]</sup>和质谱检测法<sup>[14-15]</sup>。基于原理的差异，荧光检测方法的检测灵敏度往往高于紫外检测法和二极管阵列检测法，而质谱检测法优势在于多组分残留的检测，程序相对较为繁琐，成本较高。综合灵敏度和适用性等因素，本文中的HPLC方法采用荧光检测法，结合对组织样品的净化、浓缩等前处理步骤，可以使水产品CIP残留的检测回收率与报道的其它HPLC方法相近，而最低检测限达到 $1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ ，完全适用于我国水产品对外出口贸易的检测技术要求。

对于本文建立的ci-ELISA和HPLC两种方法，前者准确、高效、成本低，非常适合在非实验室或半实验室条件下，对大批量样品进行初筛检测；后者灵敏度、重现性更好，适于在实验室条件下对初筛可疑样品进行复检的验证方法。更为

重要的是,两种方法的准确性、灵敏度和重现性等指标分别适用于行业标准和国际贸易的技术要求;二者相得益彰,分为补充,可以构建有效的针对 CIP 残留的检测技术体系。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业行业标准. 无公害食品渔用药物使用准则[S]. 2002, NY5071-2002.
- [2] Montero A, Althaus R L, Molina A, *et al.* Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse100®) for ewe milk [J]. *Small Ruminant Res.* 2005, 57: 229-237.
- [3] Hernandez M, Aguilar C, Borrull F, *et al.* Determination of ciprofloxacin, enrofloxacin and flumequine in pig plasma samples by capillary isotachopheresis-capillary zone electrophoresis [J]. *J Chromatogr B*, 2002, 772: 163-172.
- [4] Duan J H, Yuan Z H. Development of an Indirect Competitive ELISA for Ciprofloxacin Residues in Food Animal Edible Tissues [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1087-1089.
- [5] Garcia Ovando H, Gorla N, Luders C, *et al.* Comparative pharmacokinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in chickens [J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 1999, 22: 209-212.
- [6] Tang J, Yang X L, Zheng Z L, *et al.* Pharmacokinetics and the active metabolite of enrofloxacin in Chinese mitten-handed crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. *Aquaculture*, 2006, 260: 69-76.
- [7] 陈辉华,戴军,王洪新,等. HPLC 法对鱼肉中 3 种四环素类和 5 种喹诺酮类兽药残留的同时测定 [J]. *分析测试学报*, 2009, 27(9): 951-955.
- [8] 孟勇,吴光红,朱晓华,等. RP-HPLC 同时测定中华绒螯蟹肝脏中诺氟沙星、环丙沙星和恩诺沙星残留 [J]. *中国水产科学*, 2005, 12(6): 772-778.
- [9] Zhou Y, Li, Y S, Wang Z, *et al.* Synthesis and Identification of the Antigens for Ciprofloxacin [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2006, 26: 200-203.
- [10] 胡鲲,杨先乐,唐俊,等. 绒螯蟹中 3 种氟喹诺酮类药物残留检测的前处理方法研究 [J]. *华中农业大学学报*, 2007, 26(5): 670-675.
- [11] 中华人民共和国国家标准. 水产品中诺氟沙星、盐酸环丙沙星、恩诺沙星残留量的测定 液相色谱法[S]. 2006, 农业部 783 号公告-2-2006.
- [12] Snitkoff G G, Grabe D W, Holt R, *et al.* Development of an immunoassay for monitoring the levels of enrofloxacin in patient samples [J]. *J Immunoassay*, 1998, 19(4): 227-238.
- [13] 郑宗林,唐俊,喻文娟,等. RP-HPLC 法测定中华绒螯蟹主要组织中的恩诺沙星及其代谢产物 [J], *上海水产大学学报*, 2006, 15(2): 156-162.
- [14] 杨方,庞国芳,刘正才,等. 液相色谱-串联质谱法检测水产品中 15 种喹诺酮类药物残留量 [J]. *分析试验室*, 2008, 27(12): 27-33.
- [15] 施冰,张志刚,吴抒怀,等. LC/MS/MS 测定水产品中 7 种氟喹诺酮类抗菌素残留量的方法研究 [J]. *检验检疫科学*, 2004, 14(S): 25-30.