

免疫分析方法在磺胺类药物残留检测中的应用

宋予震^{1,2},董青^{1,2},邢广旭³,胡晓飞³,吕全建²,柳巨雄^{1*}

(1. 吉林大学 动物医学学院,吉林 长春 130062; 2. 河南牧业经济学院 动物医学院,河南 郑州 450046;

3. 河南省农业科学院 动物免疫学重点实验室,河南 郑州 450002)

摘要: 磺胺类药物是一类常用的广谱型抗菌药,主要用于预防和治疗细菌感染性疾病,并可作为添加剂在动物饲料中长期添加。但磺胺类药物的不规范使用会导致不同程度的药物残留,从而引起生态环境污染,威胁人类健康。磺胺类药物在人体内蓄积会引起过敏反应、造血功能紊乱、肾脏损伤等。因此,研究简单快速、灵敏度高、特异性强的磺胺类药物残留检测方法十分必要。免疫分析方法利用高亲和力抗体对抗原进行特异性识别,是近几年磺胺类药物残留快速检测的研究热点。综述了放射性免疫、化学发光免疫、酶联免疫、免疫层析、免疫传感器等免疫分析方法在磺胺类药物残留快速检测中的应用,并对免疫分析方法今后的发展进行展望。

关键词: 磺胺类药物; 免疫分析; 残留检测

中图分类号: S859.84 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2017)10-0008-05

Application of Immunoassay in the Sulfonamides Residues Detection

SONG Yuzhen^{1,2}, DONG Qing^{1,2}, XING Guangxu³, HU Xiaofei³, LÜ Quanjian², LIU Juxiong^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, Jilin University, Changchun 130062, China; 2. College of Veterinary Medicine, Henan

University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China; 3. Key Laboratory of Animal Immunology,

Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Sulfonamides is a type of commonly used broad-spectrum antimicrobials which are used primarily for the prevention and treatment of bacterial infectious diseases and are used as feed supplements in animal feeding for a long time. However, the use of non-standard use of sulfa drugs will lead to different levels of residues, causing ecological pollution and human health hazards. The accumulation of the drug in the human body can cause allergic reactions, hematopoietic disorders and damage the kidneys. Therefore, the study of simple and rapid, high sensitivity, specificity of the detection method for the protection of human health is of great significance. Immunoassay is one of the hotspots in the rapid detection of sulfa drug residues in recent years by using high affinity antibodies to specifically recognize antigens. In this paper, the application of radio immunoassay, chemiluminescence immunoassay, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography and immunosensor in rapid detection of sulfonamides residues is reviewed, and its future development is prospected.

Key words: sulfonamides; immunoassay; residue detection

磺胺类药物(sulfonamides, SAs)是指具有对氨基苯磺酰胺结构的一类药物的总称,常用于预防和治疗细菌引起的感染性疾病,因其性质稳定、廉价易

得、广谱抑菌,在兽医临床和饲料添加剂中应用广泛。但是,随着其广泛应用,副作用也逐渐凸显出来。磺胺类药物的不规范使用会导致其在动物体内

收稿日期:2017-04-22

基金项目:河南牧业经济学院科技创新团队支持计划项目(HUAHE2015008);河南牧业经济学院重点学科建设项目(MXK2016102)

作者简介:宋予震(1979-),男,河南新乡人,副教授,在读博士研究生,研究方向:动物免疫与食品安全检测。

E-mail:zzmzs@163.com

*通讯作者:柳巨雄(1963-),男,山西河曲人,教授,博士,主要从事动物免疫调节方面研究。E-mail:juxiongliu@sina.com

残留超标,进而通过食物链传递给人类。磺胺类药物在人体内蓄积会造成过敏反应、细菌耐药、造血系统障碍、致畸和致癌等危害^[1-2],所以应严格规范其使用,并在动物屠宰前注意休药期。国际上很多组织和地区都对磺胺类药物残留限量做出了严格的规定,国际食品法典委员会(CAC)、世界卫生组织(WHO)、美国食品药品管理局(FDA)、欧盟以及我国规定食品和饲料中磺胺类药物最大残留限量均为100 μg/kg^[3]。日本要求最为严格,规定动物性食品中不得检出磺胺类药物。然而,在现实生产中,许多企业为追求利益最大化,超量使用磺胺类药物,或在动物屠宰前为掩盖病情使用磺胺类药物,这就要求有关部门需加大对这类药物残留的监测力度。目前,常用的检测动物性食品中磺胺类药物残留的方法主要包括高效液相色谱(HPLC)法^[4-6]、高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)法^[7-9]和免疫分析方法^[10]。HPLC和HPLC-MS的灵敏度高,能够满足食品监督管理、出入境检验检疫机构的检测需求,但前处理过程均较复杂,需要大型仪器设备和专业人员操作,不易进行大批量样品的筛查,限制了其在实际检测中的推广应用。免疫分析方法主要是利用特异性抗体对抗原进行高灵敏和高亲和的识别,不需要大型仪器,能够实现快速、灵敏、特异的高通量检测,适合进行初步筛查,满足了监督部门对食品中磺胺类药物快速、准确检测的需要。综述了磺胺类药物残留免疫分析方法的应用,以期为食品中磺胺类药物痕量残留检测方法的发展提供参考。

1 磺胺类药物理化性质

磺胺类药物具有共同的对氨基苯磺酰胺母核结构,其基本结构上的氢能够被不同取代基取代,形成不同的衍生物(图1)。常用的磺胺类药物有20多种,与母核相比,衍生物具有毒性小、效价高、广谱抗菌、易吸收等优点,规范使用磺胺类药物可提高饲料利用率,促进禽畜生长。磺胺类药物的基本结构与对氨基苯甲酸(PABA)相似,可竞争PABA作用于细菌的二氢叶酸合成酶,影响细菌的叶酸代谢从而抑制细菌的生长繁殖。根据吸收难易程度,可将其分为易吸收型和难吸收型,前者常被用于治疗全身感染,而后者多用于治疗肠道感染。磺胺类药物一般为白色或类白色结晶,粉末状,味微苦,遇光易变质,色渐变深。大多数磺胺类药物在水中溶解度极低,形成钠盐后则易溶于水,水溶液呈强碱性^[3]。

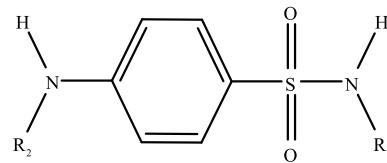


图1 磺胺类药物的基本结构

2 磺胺类药物毒性作用

合理规范地使用磺胺类药物可预防和治疗动物的细菌感染性疾病,但不当使用会造成其在动物组织中富集,最终通过食物链传递对人体产生一定的毒副作用,主要表现为泌尿系统损伤与过敏反应、细菌耐药性、致畸、致癌、致突变作用等。磺胺类药物的代谢产物乙酰化磺胺的溶解度低,经肾脏排出时,若尿液偏酸性,可在肾盂、输尿管析出结晶,造成泌尿系统阻塞损伤,引起泌尿系统毒性作用。磺胺类药物常见过敏反应有皮疹、药热,一般用药1周左右出现,药停即逐渐恢复,但重者将会休克甚至死亡。除此之外,磺胺类药物可引起急性溶血性贫血、再生障碍性贫血、粒细胞缺乏症;还可引起消化系统障碍,表现为腹泻、呕吐、食欲不振等症状^[11]。

3 磺胺类药物残留检测免疫分析方法

免疫分析方法主要包括放射性免疫(RIA)法、化学发光免疫分析(CLIA)法、酶联免疫(ELISA)法、化学发光酶联免疫法(CLEIA)、免疫层析法(ICA)、免疫传感器法等。

3.1 RIA 法

RIA法是建立较早的标记免疫检测方法^[11],该方法将放射性同位素作为标记物标记抗原,标记的抗原与待测样品中的抗原竞争与抗体反应,根据放射性强度,可以间接反映出样品中的抗原含量。

目前,在磺胺类药物残留检测中应用最为广泛的RIA法是美国开发的基于细菌受体分析的Charm II放射免疫试剂盒检测方法,该方法已被美国FDA和欧盟认可。Su等^[12]利用Charm II放射免疫试剂盒完成了牛血清中磺胺类药物残留的快速检测,检测限达20 μg/kg;李佐卿等^[13]利用RIA法分别检测鱼肉和鸡肉中磺胺类药物残留,检测限为10 μg/kg,达到国家限量要求。RIA法操作简单、灵敏度高、特异性强,大大提高了检测效率,可在短时间得到初筛结果。但RIA法会产生放射性污染且难以处理,制约了RIA法的普及应用。

3.2 CLIA 法

CLIA 法是用化学发光相关的酶等物质标记抗原或者抗体,当抗原抗体特异性结合时,往体系中加入其他化学发光相关的物质,使其发出辐射光,根据发光强度确定抗原或抗体含量的分析方法。

刘俊伟^[14]通过制备抗磺胺类药物的多克隆抗体建立 CLIA 法,对 16 种磺胺类药物进行竞争检测,与传统 ELISA 方法相比,灵敏度较高,检测限范围在 0.1~31.0 μg/L;通过对 HPLC 和 CLIA 法的检测结果进行线性回归分析,证明 CLIA 法准确度较高。CLIA 法具有操作简单快速、灵敏度高、特异性强、没有辐射、标记物不易丢失等优点,但化学反应的稳定性会影响其准确性,从而限制了 CLIA 法的应用。

3.3 ELISA 法

ELISA 法是将酶分子作为标记物与抗体或二抗共价结合,此结合不改变抗体的免疫活性和酶的活性。ELISA 法应用较多的是竞争模式,待测样品中的抗原与固相载体上的抗原竞争结合抗体,再加入酶标记的二抗(酶主要为辣根过氧化物酶),与结合在固相载体抗原上的抗体结合,加入酶底物后,发生显色或发光反应,反应的强弱与样品中抗原的含量成反比。酶的高催化性放大了反应结果,大大提高了其灵敏度。

杜玉玲等^[15]合成了磺胺类药物的母核结构,通过偶联载体蛋白制备人工抗原,经过免疫小鼠和细胞融合,筛选得到了针对母核结构且免疫学特性良好的单克隆抗体,对磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶等药物均有良好的交叉反应性,并在此基础上开发了 ELISA 试剂盒,实现了磺胺类药物的多残留快速检测^[16]。ELISA 法的结果可通过酶标仪快速分析,且使用设备简单、成本低,且具有较高的灵敏度和良好的特异性,已广泛应用于磺胺类药物残留的筛选检测^[17]。目前,该法已用于多种磺胺类药物的单残留检测,如磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲恶唑等^[18-19],但 ELISA 法也易受基质效应影响。

3.4 CLEIA 法

近几年,ELISA 法在应用中也得到了进一步的发展,由传统的显色底物变为发光底物,形成了 CLEIA 法,该方法通过检测发光信号提高了 ELISA 法的灵敏度^[20],在磺胺类药物残留的快速检测中应用较广泛。CLEIA 法主要使用竞争模式。马玲等^[21]在制备磺胺二甲基嘧啶单克隆抗体的基础上,

运用竞争模式建立了检测动物食品中磺胺二甲基嘧啶的间接竞争化学发光酶联免疫法,具有较低的检测限(0.174 μg/L)。万宇平等^[22]采用 CLEIA 法检测猪肉中磺胺类药物的含量,检测范围是 1.0~81.0 ng/mL,检测半数抑制量(IC_{50})达 3.047 ng/mL,检测限为 0.74 ng/g。目前,已开发出商业化的 CLEIA 试剂盒用于磺胺类药物的快速检测^[23]。

3.5 ICA 法

ICA 法是相对于 RIA 法、ELISA 法和 CLEIA 法更为快速的一种检测方法,可在 5~10 min 得到检测结果。最经典的 ICA 法是胶体金免疫层析(GICA)法,GICA 法利用胶体金纳米材料作为抗体标记物,可在反应膜的特定区域(检测线和质控线)与抗原(或抗体)形成裸眼可见的紫红色,具有简便、直观、省时的特点,在磺胺类药物的定性检测或者半定量检测中发挥着重要的作用。

国内外许多研究人员和检测公司都相继研发出了基于 ICA 的商业化磺胺类药物快速检测试纸条^[24-25],包括单残留检测和多残留检测 2 种类型。Zhang 等^[26]制备了具有良好特异性的磺胺间甲氧嘧啶单克隆抗体,并利用胶体金标记该抗体,采用竞争模式,组装了用于检测猪尿中磺胺间甲氧嘧啶单残留的试纸,检测限为 15 ng/mL;韩静等^[27]利用对磺胺类药物具有广谱特异性的多克隆抗体,通过胶体金标记,研制了能够检测猪肉、鸡肉、鲫鱼中 5 种磺胺类药物的多残留层析检测试纸,目测检测限为 0.01 mg/kg。

除了胶体金作为标记材料,一些新型纳米标记材料也开始应用于磺胺类药物的 ICA 检测方法中,王娟^[28]制备了 CdTe/ZnS 核壳型量子点,并将其作为标记材料研制了快速检测猪肉中残留的磺胺对甲氧嘧啶免疫层析试纸条,检测限为 50 ng/mL,为动物源性食品中磺胺对甲氧嘧啶残留的 ICA 法检测提供了新方法。

3.6 免疫传感器法

免疫传感器是生物传感器中重要的一种,其原理是将抗原或抗体作为敏感识别元件制备传感器的生物敏感层,然后与样品中的目标检测物发生免疫反应,随即产生一些物理化学变化,这些变化通过不同原理的传感器转换成光信号、电信号或其他形式的信号输出,具有高通量、选择性强、响应快、灵敏度高等特点^[29]。

目前,在磺胺类药物残留检测中应用较多的免疫传感器是表面等离子体共振(SPR)传感器^[30-32],

抗原抗体间的相互作用可以通过 SPR 信号反映出来,可进行实时检测。周宏敏等^[33]将磺胺甲恶唑共价偶联到表面等离子共振芯片表面,优化了抗体结合浓度和芯片再生条件,利用免疫竞争原理建立检测方法,检测限为 3.2 ng/mL,实现了牛奶中磺胺甲恶唑的高通量检测。符运良等^[34]同样利用竞争模式建立了牛奶中磺胺二甲基嘧啶的 SPR 传感器检测方法,添加回收率为 102.8%,相对标准偏差为 6.3%,具有较高的精确度和稳定性。免疫传感器法亲和力高、广谱性好,是具有潜力的新型检测方法。

4 小总结及展望

在众多的检测方法中,RIA 法操作简单、灵敏度高,几乎可以测定生物体内任何物质,包括生物本身分泌的各种激素、病人口服或注射的各种药物、一些病毒抗原等,但该方法会产生放射性污染且难以处理;CLIA 法既具有发光检测的高度敏感性,又具有高度特异性,是公认的快速、精确、重复性好且安全无毒的方法,但化学反应不稳定会增大其结果的变异系数;ELISA 法特异性强、灵敏度高、成本低、操作简单快速且试剂使用寿命长,可用于现场检测,但其易受多方面因素干扰,稳定性、重复性差;ICA 法操作简单、特异性强、灵敏度高,可利用该技术对目标物进行纯化、富集,再与其他检测技术联用进行检测;免疫传感器法是基于抗原抗体特异性识别功能而研制的传感器,灵敏度高、特异性强,可将输出的结果数字化,以达到定量检测的效果,但其制作比较复杂,测定次数有限。因此,构建操作简单、灵敏度高、特异性强的新型检测方法已成为目前研究的热点。

除了上述几种主要的免疫分析方法之外,时间分辨荧光免疫法(TRFIA)^[35-36]、荧光偏振免疫法(FPIA)^[37-39]等方法在磺胺类药物残留检测中也有应用。这些免疫检测方法虽各具优势,但仍有待于进一步完善。免疫检测不仅需要稳定的抗体,同时也需要稳定快速的样品前处理方法,以缩短整体检测时间,真正实现快速检测,确保检测稳定;免疫检测中抗体的特异性至关重要,但目前能够检测多种磺胺类药物、具有良好特异性的抗体仍较为缺乏,这在一定程度上制约了多残留快速检测产品的开发。提高检测稳定性和灵敏度,简化样品前处理及操作步骤,实现高通量和多残留筛查将是未来磺胺类药物残留快速检测的主要发展方向。随着与纳米、传感、光谱等技术的不断融合,免疫分析方法在磺胺类

药物的残留检测中必将发挥更为重要的作用。

参考文献:

- [1] Dixon-Holland D E, Katz S E. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue [J]. Journal-Association of Official Analytical Chemists, 1987, 71(6):1137-1140.
- [2] Ko E, Song H, Park J H. Direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for sulfamethazine [J]. Journal of Veterinary Medical Science, 2001, 62(10):1121-1123.
- [3] 陈枝榴. 兽医药理学 [M]. 北京:中国农业出版社, 2002:227-234.
- [4] 宋洁,赵笑天,潘亚利,等. 免疫亲和净化 - 超高效液相色谱法同时测定猪肉和牛奶中的 12 种磺胺类药物 [J]. 食品科技, 2013, 34(3):319-323.
- [5] 袁中珍,张雷,唐柏彬,等. 免疫亲和柱净化/高效液相色谱法同时测定动物源性食品中 16 种磺胺类药物残留 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(4):478-482.
- [6] 彭英,何欢,孙成,等. 新型固相微萃取 - 高效液相色谱测定牛奶中 4 种磺胺类药物残留 [J]. 分析化学, 2013, 41(4):529-533.
- [7] 李一凡,王凤玲,肖瑶,等. 超高效液相色谱 - 串联质谱法同时测定牛乳中 3 类 15 种抗生素残留 [J]. 食品科学, 2015, 36(18):204-208.
- [8] 王硕,张晶,邵兵. 超高效液相色谱 - 串联质谱测定污泥中氯霉素、磺胺类、喹诺酮类、四环素类与大环内酯类抗生素 [J]. 分析测试学报, 2013, 32(2):179-185.
- [9] 王晓利,郭涛,王珊珊,等. 高效液相色谱 - 串联质谱法测定兽药粉剂中 18 种磺胺类违禁添加药物 [J]. 分析测试学报, 2015, 34(1):115-119.
- [10] Santos L, Ramos F. Analytical strategies for the detection and quantification of antibiotic residues in aquaculture fishes: A review [J]. Trends in Food Science and Technology, 2016, 52:16-30.
- [11] 赵旭壮,李明元. 动物性食品中磺胺类药物残留检测研究进展 [J]. 中国食品卫生杂志, 2012, 24(3):292-296.
- [12] Su M, Dai D, Wang X, et al. Detection of sulfonamides in bovine serum by radioimmunoassay method [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2016, 7(2):634-638.
- [13] 李佐卿,倪梅林,章再婷. 鱼肉和鸡肉中磺胺类药物残留的放射免疫测定 [J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(6):85-86.
- [14] 刘俊伟. 磺胺氯吡嗪钠化学发光免疫分析方法的建立 [D]. 上海:中国农业科学院上海兽医研究所, 2015.
- [15] 杜玉玲,常迪,吴国英,等. 磺胺母核单克隆抗体的制备及其免疫学特性研究 [J]. 中国食品学报, 2013, 13

- (12):139-145.
- [16] 杜玉玲. 磺胺类药物多残留 ELISA 快速检测试剂盒与胶体金免疫层析试纸条的初探 [D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2013.
- [17] Nesterenko I S, Nokel M A, Eremin S A. Immunochemical methods for the detection of sulfonamide drugs [J]. Journal of Analytical Chemistry, 2009, 64(5):435-444.
- [18] Zhang H, Wang L, Zhang Y, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for seven sulfonamide residues and investigation of matrix effects from different food samples [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(6):2079-2084.
- [19] Zhang H, Wang S. Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products [J]. Journal of Immunological Methods, 2009, 350(1):1-13.
- [20] 楚金申, 许杨, 何庆华, 等. 直接竞争化学发光酶免疫法检测猪肉中磺胺嘧啶 [J]. 食品科学, 2011, 32(10):124-129.
- [21] 马玲, 韦建兴, 陆忠础, 等. 磺胺二甲嘧啶间接竞争化学发光酶免疫分析法的建立及应用 [J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(5):455-460.
- [22] 万宇平, 吴鹏, 冯月君, 等. 食品中磺胺类药物化学发光酶联免疫检测试剂盒的初步研究 [J]. 北京工商大学学报(自然科学版), 2012, 30(2):8-27.
- [23] Liu N, Nie D, Han Z, et al. Rabbit monoclonal antibody-based lateral flow immunoassay platform for sensitive quantitation of four sulfonamide residues in milk and swine urine [J]. Analytical Letters, 2013, 46(2):286-298.
- [24] 陈繁华, 曾玉梅, 刘佳, 等. 胶体金免疫层析法快速检测非法添加磺胺甲恶唑的研究 [J]. 解放军药学学报, 2014, 30(2):145-147.
- [25] 杜连启, 朱凤妹, 李楠. 胶体金免疫层析法检测猪肉中 3 种磺胺类物质残留 [J]. 中国食品学报, 2014, 14(3):151-160.
- [26] Zhang G, Wang X, Zhi A, et al. Development of a lateral flow immunoassay strip for screening of sulfamonomethoxine residues [J]. Food Additives and Contaminants (Part A), 2008, 25(4):413-423.
- [27] 韩静, 刘恩梅, 王帅, 等. 胶体金免疫层析法检测食品中的磺胺类药物残留 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(5):603-606.
- [28] 王娟. 磺胺对甲氧嘧啶 - 量子点免疫层析试纸条的研制 [D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2015.
- [29] 蔡文金, 张航俊, 陈晓林, 等. 动物源性食品中磺胺类药物残留检测技术研究进展 [J]. 畜禽业, 2015, 25(5):64-67.
- [30] 李辉, 崔大付, 王于杰, 等. 利用表面等离子谐振生物传感器检测磺胺二甲嘧啶的方法研究 [J]. 食品科学, 2007, 28(6):288-292.
- [31] McGrath T, Baxter A, Ferguson J, et al. Multi sulfonamide screening in porcine muscle using a surface plasmon resonance biosensor [J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 529(1):123-127.
- [32] Pastor-Navarro N, Gallego-Iglesias E, Maquieira A, et al. Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides: Application to bee honey analysis [J]. Talanta, 2007, 71(2):923-933.
- [33] 周宏敏, 欧惠超, 姜浩, 等. 利用表面等离子共振技术快速检测牛奶中的磺胺甲恶唑 [J]. 食品科学, 2010, 31(6):168-171.
- [34] 符运良, 郑艺华, 刘汉军. 表面等离子谐振传感器检测磺胺二甲嘧啶残留 [J]. 广西大学学报(自然科学版), 2012, 37(5):1051-1056.
- [35] Le T, Yan P, Liu J, et al. Simultaneous detection of sulfamethazine and sulfaquinoxaline using a dual-label time-resolved fluorescence immunoassay [J]. Food Additives and Contaminants (Part A), 2013, 30(7):1264-1269.
- [36] Zhang Z, Liu J, Shao B, et al. Time-resolved fluoroimmunoassay as an advantageous approach for highly efficient determination of sulfonamides in environmental waters [J]. Environmental Science and Technology, 2009, 44(3):1030-1035.
- [37] 王战辉, 张素霞, 沈建忠, 等. 荧光偏振免疫分析方法分析磺胺二甲基嘧啶 [J]. 分析化学, 2007, 35(6):819-824.
- [38] 王战辉, 张素霞, 沈建忠. 荧光偏振免疫分析测定磺胺甲基嘧啶研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7):1621-1625.
- [39] 王小勇, 龚福春, 唐连飞, 等. 基于长春西汀酸的荧光偏振免疫方法测定磺胺二甲氧基嘧啶 [J]. 分析化学, 2010, 38(10):1457-1461.