

ELISA 试剂盒用于检测猪尿中赛庚啶残留的考察

张鑫,吴剑平,顾欣*,李丹妮,严凤

(上海市兽药饲料检测所,上海 201103)

[收稿日期] 2012-08-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2013)04-0035-03 [中图分类号] S859.84

[摘要] 对市场销售的四种未明确标识可用于猪尿样品的赛庚啶 ELISA 试剂盒进行考察,使用空白猪尿和不同浓度的空白添加猪尿对其反应原理、可操作性、灵敏度、检测限、回收率等进行研究,发现其中三种赛庚啶 ELISA 试剂盒可用于猪尿中赛庚啶残留检测,但需要根据试剂盒的特点按需选择。结果表明使用市售的 ELISA 试剂盒监测猪尿中赛庚啶残留简便可靠,可作为初筛方法,检测限为 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

[关键词] 赛庚啶;残留;猪尿;酶联免疫试剂盒

Study for the Detection of Cyproheptadine Residue in Swine Urine by ELISA Kit

ZHANG Xin, WU Jian-ping, GU Xin*, LI Da-ni, YAN Feng

(Shanghai Municipal Supervisory Institute Veterinary Drugs and Feedstuff, Shanghai 201103, China)

Abstract: In this paper, four kinds of ELISA kits for cyproheptadine detection (signs for urine) were respectively studied by evaluating and testing some properties including reaction principle, operability, sensitivity, limit of detection and recovery, by blank swine urine and adding with different concentration of cyproheptadine. The results showed that three of the kits had high sensitivity and reliability, however, the kits would be chosen according to the properties. We demonstrate that cyproheptadine ELISA kits could be used as screening method to detect cyproheptadine residue in swine urine for their operability and applicability, the LOD of cyproheptadine ELISA kits were suggested to estimate as 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$.

Key words: cyproheptadine; residue; swine urine; ELISA Kits

赛庚啶 (Cyproheptadine, CYP) 是一种人用药,在临床上用于治疗过敏反应导致的皮炎等疾病,由于该药具有可抑制下丘脑的饱觉中枢而刺激食欲的作用^[1-2],可以促进动物生长。2010年,上海市兽药饲料检测所首次发现 CYP 被一些不法畜牧养殖企业作为新型养殖促进剂非法使用,而 CYP 在畜产品中的残留对消费者的健康极有危害。2010

年底,中国农业部第 1519 号公告《禁止在饲料和动物饮水中使用的物质》明确禁止使用该类药物作为家畜的生产促进剂,2012年,上海市和江苏省率先开展了地产生猪出栏前 CYP 监测。

动物口服 CYP 后 40% 以上由尿液排泄,主要为原形药物及葡萄糖醛酸结合的季铵盐型 CYP,不同动物的尿液中代谢物成分含量有所不同。可通

基金项目:上海市地方标准制修订项目(沪质技监标[2012]309号)

作者简介:张鑫,畜牧师,从事兽药残留检测和研究所。

通讯作者:顾欣。E-mail: guxun@sh163.net

过检测猪尿中的 CYP 残留以监控其在养殖业的非法使用。当前用作 CYP 残留检测的仪器方法为 HPLC 或 LC/MS/MS 法^[3-5], 检测对象为接受 CPY 治疗的人或动物的血、尿或奶, 最低检测限为 0.1 $\mu\text{g/L}$ 。但其前处理步骤复杂, 成本较高, 不适用于日常监测及大规模筛查。

ELISA 试剂盒可经济、快速地检测尿中的药物残留, 但目前市场上可采购的 CYP 检测 ELISA 试剂盒均未标明适合检测猪尿样品。进口试剂盒(代号分别为 A、B、C)在国外用于检测人或马用药后的 CYP 含量情况, 国产试剂盒(D)是由进口抗体在国内分装生产, 未明确说明适用于猪尿检测, 因此, 四种试剂盒用于猪尿的检测限与标示可能不符。试验通过考察四种试剂盒的反应原理、可操作性、灵敏度、检测限、回收率等, 了解国内市场上 CYP 试剂盒的质量现状, 探讨使用 ELISA 试剂盒监测猪尿中 CYP 残留的可行性, 给出参考的检测限。由于国内猪尿中 CYP 残留检测工作刚刚起步, 检测标准尚未出台, 因此, 本试验为 CYP 监测工作提供一定的试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器及试剂 高速离心机, 型号 Sigma 1-14; 酶标仪, 型号 BioTek ELX808。CYP 试剂盒 A、B、C、D, 市售购得。CYP 标准品, 纯度 98%, 购自美国 sigma 公司。

1.1.2 试料 猪尿 20 份, 采自上海市青浦区三家猪场。

1.2 试验方法

1.2.1 试样的制备 空白样品 20 份猪尿阴性样品经 LC/MS/MS 法确证为 CYP 阴性样品。

空白添加样品 取阴性猪尿样品, 添加 CYP 标准品储备液制成浓度为 0.1、0.5、1.0 和 5.0 $\mu\text{g/L}$ 的阳性样品各 6 份。

将空白及空白添加的猪尿液 8000 r/min 离心 5 min, 并根据各试剂盒对样品的要求进行稀释或直接测试。

1.2.2 试剂盒反应原理 吸附在孔内的抗原和标准品或样品中赛庚啶与特异性抗体竞争结合, 与标准品或样品中赛庚啶相结合的抗体被洗涤去除后, 孔内抗原结合的抗体与酶标记的第二抗体相结合,

酶底物在酶作用下显色, 在 450 nm 下吸光度的高低与样品中赛庚啶的含量成反比。

1.2.3 试剂盒操作步骤 四种试剂盒的反应原理基本一致, 操作步骤及反应时间有细微差异, 仅把有区别的步骤列表如下。试剂盒的反应时间通常在 75 ~ 100 min 之间。

表 1 四种试剂盒的操作步骤及反应时间差异比较

序号	步骤	A	B	C	D
1	样品稀释	10 倍	/	5 倍	/
2	标准品配置	/	/	需配置	/
3	一抗反应时间	60 min	30 min	30 min	30 min
4	酶标二抗稀释	2500 倍	100 倍	100 倍	/
5	酶标二抗反应时间	30 min	30 min	30 min	30 min
6	显色反应时间	10 min	15 min	30 min	15 min
7	终止液配置	自配盐酸	/	/	/
总计	步骤总数	14	12	14	11
	操作时间	>100 min	>75 min	>90 min	>75 min

注: / 表示不需要此步骤

1.2.4 灵敏度、检测限、准确度 试剂盒的灵敏度由 50% 抑制浓度(IC_{50})体现。测定 5 次标准曲线, 计算出每条标准曲线的 IC_{50} 。测定 20 份阴性尿液样品, 根据标准曲线求出 CYP 的测定值, 计算平均值和标准差。检测限为平均值加 3 倍标准差, 计算出猪尿中 CYP 的检测限。准确度以回收率表示。取 CYP 空白添加猪尿样本, 每个浓度做 6 次平行检测, 计算猪尿中 CYP 的平均回收率。

1.2.5 与不同分析方法的比较 参照文献[4]提供的 HPLC/MS/MS 法对空白及阳性添加猪尿进行检测, 与试剂盒检测结果做比较。

2 结果

2.1 50% 抑制浓度(IC_{50}) 四种试剂盒 IC_{50} 的差异较大, 范围为 0.119 ~ 0.965 $\mu\text{g/L}$, 结果见表 2:

表 2 四种试剂盒的 IC_{50} $\mu\text{g/L}$

试剂盒代号	A	B	C	D
IC_{50} 平均值 (n=5)	0.119	0.341	0.855	0.965

2.2 检测限 20 份空白猪尿中 CYP 的测定均值及试剂盒的检测限见表 3, 试剂盒 C 与标示不符。

表 3 猪尿中 CYP 检测限与定量限 $\mu\text{g/L}$

试剂盒代号	A	B	C	D
测定均值	0.019	0.058	0.399	0.103
标准差	0.024	0.105	0.304	0.124
检测限	0.091	0.373	1.311	0.475
试剂盒标示检测限	0.1	0.3	0.25	0.5

2.3 准确度 猪尿中 CYP 的四个添加浓度(0.1、0.5、1.0 和 5.0 $\mu\text{g/L}$)的检测准确度见表 4。

表 4 CYP 阳性质控猪尿样品检测准确度 ($n=6$)

添加浓度 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	平均回收率/%			
	A	B	C	D
0.1	126.9	146.0	636.0	445.3
0.5	97.6	212.0	178.4	106.7
1.0	67.8	135.2	134.2	76.5
5	139.5	105.7	111.4	143.3
回收率范围	108.0 \pm 35.8	149.7 \pm 53.2	265.0 \pm 262.3	193.0 \pm 184.4

2.4 与仪器方法的比较 LC/MS/MS 法检测 CYP 浓度为 0.1、0.5 和 1.0 $\mu\text{g/L}$ 的阳性添加猪尿样品的结果与试剂盒测试值的比较见表 5。

表 5 阳性添加猪尿样品中 CYP 的测试值

CYP 浓度 $/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	LC/MS/MS	测试值/ $(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$			
		A	B	C	D
0	0	0.042	0.028	0.299	0.031
0.1	0.175	0.061	0.551	0.991	0.126
0.5	0.457	0.465	1.432	1.356	0.281
1.0	0.855	1.691	1.981	3.715	1.263

3 讨论

3.1 由于是 ELISA 半定量试剂盒,定量通常不够准确,在 CYP 添加浓度较低时,其回收率更多反映的是试剂盒本身的抗干扰能力及灵敏度。试剂盒 A、B 的灵敏度较高, $IC_{50} < 0.5 \mu\text{g/L}$, 抗体特异性较好。数据显示,试剂盒 A、B、D 的检测限均低于 0.5 $\mu\text{g/L}$, 可考虑该法的检测限定为 0.5 $\mu\text{g/L}$, 同时为排除假阳性,含量在检测限以上的样品应由 LC/MS/MS 定性及定量。

试剂盒 A、D 在检测 CYP 添加浓度 $\geq 0.5 \mu\text{g/L}$ 的样品时有较稳定的回收率。试剂盒 B 检测限 $< 0.5 \mu\text{g/L}$, 但回收率偏高。试剂盒 C 检测限及回收率均不能达到要求,不适于猪尿中赛庚啶的检测。

3.2 研究数据显示,在日常监测中使用的大部分市售的 ELISA 试剂盒可以满足 CYP 筛查需要,但仍有以下问题需要注意:

选用试剂盒之前应对其性能参数进行全面的考察。例如,实验得到的检测限与商品标示的检测限可能并不相符。进口试剂盒在国外用于马、狗、

人等用药后尿液及血液的检测,其检测限很可能不适合 CYP 非法添加饲喂监测的需要,需注意甄别。

通过考察了解试剂盒的特点,在批量检测样品时为结果判断提供依据。例如,试剂盒 A 的 IC_{50} 和检测限都很低,回收率稳定,在较低浓度范围内有较好的线性,试剂盒 B 检测限较低,回收率却偏高,这对定量不利,却对定性有帮助,试剂盒 D 的 IC_{50} 和检测限都较高,但在较高浓度范围内有较好的线性,因此不同试剂盒之间可以互补,在实际监测工作中应至少配备两个品牌以上的试剂盒交替使用。

由于不同物种尿液中 CYP 及其代谢物的含量不同,本文使用标准品添加实验对试剂盒进行评价有一定局限性,动物实验得出的结论可能不同。由于 ELISA 方法的局限性,仍存在基质干扰或假阳性的可能,所以对 CYP 含量大于 0.5 $\mu\text{g/L}$ 的样品需进行 LC/MS/MS 法确证实验。

参考文献:

- [1] Maria Konstandi, Anastasia Dellia - Sfikaki, Denis Varonos. Effect of cyproheptadine hydrochloride on ingestive behaviors[J]. Pharmacological Research, 1996, 33:1.
- [2] Masahiro Iwaki, Taro Ogiso, Yoshiaki Fujii. Pharmacokinetics of cyproheptadine and its metabolites in rats[J]. Bioi. Pharm. Bull. 1993, 16:12.
- [3] Gustavo Duarte Mendes, André Arruda, Lu Shi Chen. Quantification of cyproheptadine in human plasma by high - performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry in a bioequivalence study [J]. Biomed. Chromatogr. 2012, 26:129 - 136.
- [4] Cristina A. Fente, Patricia Regal, Beatriz I, et al. Development and validation of an LC - MS/MS confirmatory method for residue analysis of cyproheptadine in urine of food - producing animals [J]. J. Agric. Food Chem. 2009, 57:2595 - 2598.
- [5] John E. Koundourellis, Kenneth O. Ebete, Eleftheria T, et al. Liq. isocratic high performance liquid chromatographic method for the quantitation of cyproheptadine in human milk and plasma using solvent and solid phase extraction techniques[J]. Chrom. & Rel. Technol. 1999, 22(4):603 - 614.

(责任编辑:陈希)