

荧光偏振免疫分析在农药和兽药残留检测中的研究进展

王战辉¹, 张素霞¹, 沈建忠^{1*}, Sergei A Eremin²

1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094

2. 莫斯科大学化学学院, 莫斯科 119992

摘要 荧光偏振免疫分析技术是以免疫竞争原理和荧光偏振原理为基础的一种以快速筛选为目的的分析技术, 主要用于测定小分子量物质(抗原), 就是检测荧光标记抗原在结合特异性的抗体前后, 荧光偏振值的变化, 是均相的竞争免疫分析方法, 反应系统完全在溶液中, 不需要分离结合的和未结合的抗体, 不受溶液颜色、仪器灵敏度变化的影响, 该技术最显著的特点是操作简单和检测时间短, 适用于大量样本的快速筛选检测。目前该技术在农药和兽药残留分析中已经得到了应用, 但是国内的相关研究尚未见报道。文章综述了荧光偏振免疫分析的历史背景, 发展历程和主要原理, 概括了荧光偏振免疫分析方法在农药和兽药残留分析中的研究进展。

关键词 荧光偏振免疫分析; 测定; 农药和兽药

中图分类号: O657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-0593(2007)11-2299-08

引言

农药和兽药在环境和食品中的残留, 不仅对人类健康造成了长期的潜在危害, 而且对我国农产品的出口产生了巨大的冲击。目前, 检测农药和兽药的残留分析技术主要是各种色谱方法及光谱方法^[1], 色谱分析法对于大多数的农药和兽药残留分析有足够的灵敏度, 但是需要昂贵的仪器, 且检测过程中一般要对被检药物衍生化, 前处理过程耗时, 效率低下, 不适用于大量样本的筛选检测^[2, 3], 因此迫切需要一种简单的药物残留分析方法, 快速、高效的检测大批量样本。最近 15 年来, 免疫分析方法, 尤其是酶联免疫分析(enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)广泛应用于农药和兽药的快速筛选残留检测^[4, 5]。大多数免疫检测方法的标记物是酶, 但是也有应用其他标记物建立的方法, 如化学发光法和电化学法^[6]。最近关于兽药和农药残留检测的 ELISA 方法的综述见之于报道^[6-9]。相对于色谱方法而言, 免疫方法在残留检测中有着非常突出的优势, 免疫方法可以适用于大量样本的快速分析、灵敏度高、成本低, 不需要昂贵复杂的仪器, 除了常用的 96 孔酶标板, 现在一些实验室已经开始使用 384 或 1536 孔的酶标板, 可以显著提高工作效率^[10]。目前 ELISA 方法在农药残留检测的免疫方法中占到了 90% 以上^[11]。

但是 ELISA 方法是固相的免疫分析法, 抗原抗体完全反应需要 1~2 h, 操作过程中, 需要分离结合的和未结合的抗体, 而且还有几步洗涤步骤, 这些操作延长了实验时间, 且操作过程也难以完全自动化。简化操作步骤和缩短操作时间是发展快速筛选方法的主要指标。实现上述优点的途径就是把非均相的反应系统转换为均相的反应系统。在所有免疫分析方法中, 荧光偏振免疫分析方法(fluorescence polarization immunoassay, FPIA)几乎具备上述的所有优点, 是一种简单、可靠、快速和高效的免疫分析方法^[12]。

关于荧光偏振免疫分析的原理已经在有关书籍^[13, 14]和论文^[15, 16]中有过详细的介绍, 最近又有几篇关于荧光偏振免疫分析方法的英文综述发表^[12, 17-19], 但是关于荧光偏振免疫分析的中文书籍和资料比较少^[20], 尤其是在农药和兽药残留检测方面的介绍几乎是空白。因此本文简要综述了荧光偏振免疫分析的历史、原理、最新进展及其在农药和兽药残留检测中的应用进展。

1 FPIA 的历史和原理

1.1 FPIA 的发展历史

荧光偏振原理最初是由 Perrin 在 20 世纪 20 年代建立的^[21], 抗原抗体竞争免疫分析技术则是 Yalow 和 Berson 于 1954 年提出的, 同时发展了放射标记免疫分析技术。20 世

收稿日期: 2006-06-28, 修订日期: 2006-10-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471305)和中俄合作基金项目(RFBR-GFEN03-03-39004)资助

作者简介: 王战辉, 1979 年生, 中国农业大学动物医学院在读博士生 *通讯联系人 e-mail: sjz@cau.edu.cn

纪 60 年代, Dandliker 第一次将荧光偏振应用到抗原抗体反应上^[22], 并命名了荧光偏振免疫分析这个名词。1976 年, 英国伦敦 Bartholomew 医院的 Landon 研究小组第一次用 FPIA 作为一种分析方法检测血清中的治疗药物^[23, 24]。1980 年以前, 由于受荧光偏振测量仪器发展的制约, FPIA 并不是一种常见的分析方法。80 年代, Abbott 公司开发出一种 Abbott TDx 自动荧光偏振测量系统, 并实现了商品化, 用于血液中治疗性药物的检测^[25], 目前为止, 这种仪器可以检测大概 100 种分析物^[26]。Jolley 等第一次应用 FPIA 方法检测人血清中的氨基糖甙类抗生素可以认为是 FPIA 方法在兽药检测中应用的开端^[27]。Lukens 等在 1977 年检测了农药苯菌灵 (Benomyl) 的主要代谢物 2-氨基苯并咪唑 (2-aminobenzimidazol)^[28]。Colbert 第一次用 FPIA 进行农药残留检测, 他们建立了一种在血液中检测百草枯 (Paraquat) 的方法^[29], 而用该方法对食品中的兽药残留进行检测则是在 20 世纪 90 年代, 由 Eremin 等建立了猪肉中磺胺二甲嘧啶的残留检测方法^[30]。

1.2 FPIA 的原理

1.2.1 荧光偏振的原理

当物质被一定波长的光激发后, 其电子从基态被激发到能量较高的轨道, 经过一定时间 τ (τ 代表分子的荧光寿命, 即荧光强度衰减到起始荧光强度 $1/e$ 时所需要的时间), 电子释放出多余能量, 发射出波长比激发波长长的光, 这就是荧光。荧光过程相对较快, 其荧光寿命通常是纳秒级, 如荧光素异硫氰酸钠 (FITC) 的激发波长和发射波长分别是 492 和 517 nm, 它的荧光寿命大约是 5 ns。

荧光分子被平面偏振光激发时, 如果荧光分子保持静止不动, 发射出来的光也是偏振光, 发射光与激发光具有相同的偏振方向, 称为完全偏振; 如果荧光分子不是静止不动, 而是因 Brownian 运动处于不断运动旋转状态, 则发射偏振光与激发偏振光具有不同的方向, 这一现象称之为消偏振, FPIA 正是利用消偏振现象建立起来的。实验过程中, 一般是应用起偏器获得偏振光, 偏振光经样品后产生偏振荧光, 然后经检偏器获得发射偏振荧光的强度, 测量原理如图 1 所示。

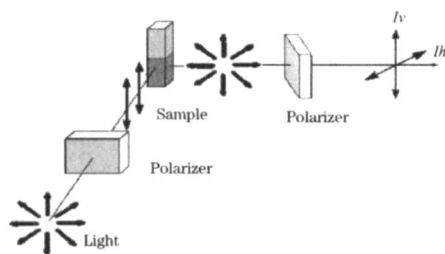


Fig 1 The principle of fluorescence polarization immunoassay instrument

荧光偏振 (fluorescence polarization, FP) 一般定义为: 用垂直方向 () 的偏振光激发荧光分子, 然后测量发射偏振光在垂直方向 () 和水平方向 () 的荧光强度 (I), 则有

$$FP = (I_v - I_h) / (I_v + I_h)$$

实际上, FP 是当起偏器分别处于垂直 (v) 和水平 (h) 方向上时, 用垂直方向 () 的偏振光激发荧光分子, 通过测量所对应的发射偏振光在垂直和水平方向上的荧光强度值计算出来的, 即有 4 个荧光强度值 I_{vv} , I_{vh} , I_{hv} 和 I_{hh} , 下标 h 和 v 分别代表起偏器和检偏器的方向。通常 I_{hv} 和 I_{hh} 作为一个因子 G ($G = I_{hv} / I_{hh}$), 来校正仪器引入的误差, 仪器的工作原理如图 1 所示。FP 也可以写成:

$$FP = (I_{vv} - G \times I_{vh}) / (I_{vv} + G \times I_{vh})$$

FP 的值是一个比值, 一般写作 mP ($1 \text{ P} = 1000 \text{ mP}$), 分子固定不动完全偏振时, FP 值是 $P_0 = 1000 \text{ mP}$ 。在一个分子可以自由运动的系统中, 根据分子运动速度的快慢, 荧光偏振值大约在 0 ~ 500 mP 之间, 如果分子比较小, 则运动快, FP 值就小; 大分子运动速度较慢, FP 值就比较大。FP 值与分子的运动和荧光寿命有关, 可以用 Perrin 方程表示:

$$(1/P - 1/P_0) = (1/P_0 - 1/P_0) (1 + 3\tau/\rho)$$

P 是观测到的荧光偏振值, P_0 是理论上的最大值, τ 代表分子的荧光寿命, ρ 代表荧光分子的弛豫时间, 即一个分子旋转 θ 度时所用的时间, $\cos\theta = 1/e$, 这个角度大约是 68.5° 。对于给定的荧光分子, 荧光寿命是常数, FP 值只与分子的弛豫时间 ρ 有关, 而 ρ 又由分子体积 (V)、气体常数 (R)、溶液粘度 (η) 和绝对温度 (T) 决定, 即 $\rho = 3\eta V / RT$, 所以分子的大小, 溶液的温度和粘度都会影响 ρ , 即影响分子的运动, 从而影响 FP 值。在实验过程中, 溶液的温度和粘度一般保持不变, 所以 FP 值仅与荧光分子的大小有关。荧光分子大小的改变, 如荧光分子与大分子 (抗体) 结合, 会引起体积的改变从而使 FP 值发生改变。尽管其原理相当复杂, 荧光偏振技术却是一项比较简单, 易于操作的技术。

1.2.2 荧光偏振免疫分析 (FPIA) 的原理

FPIA 与其他的针对小分子免疫分析方法相似, 都是竞争性的免疫分析方法, 就是检测荧光标记抗原 (Tracer) 在结合特异性的抗体前后 FP 值的变化。Tracer 的体积较小, 运动速度较快, FP 值较小, 一般在 30 ~ 50 mP。当样本不含竞争抗原时, Tracer 与抗体结合, 形成大的抗原抗体复合物, 运动速度变慢, 荧光偏振值相应变大, 一般是在 150 ~ 300 mP。如果样本中竞争抗原的浓度增加时, 抗原将与 Tracer 竞争有限的抗体结合位点, 抑制 Tracer 与抗体的结合, Tracer 以游离的形式存在于样本中, FP 值便会下降, 一般在 30 ~ 60 mP 即为完全抑制^[18], 利用这一原理可进行定量分析, FPIA 的原理如图 2 所示。

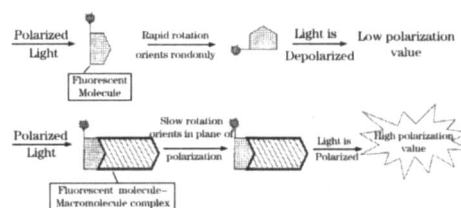


Fig 2 The principle of fluorescence polarization immunoassay^[31]

FPIA 是均相的竞争免疫分析方法, 反应系统完全在溶液中, 不需要分离结合的和未结合的抗体。实验过程非常简

单, 仅仅是将抗体、Tracer 和抗原(即被测药物)加入到反应杯中, 经过几分钟甚至是几秒钟的温育便可直接测量, 很快得到被测药物的浓度。这是 FPIA 区别于其他免疫分析方法的**最大优势, 实验的时间仅仅决定于加样的时间。FPIA 反应过程的动力学过程如图 3 所示。

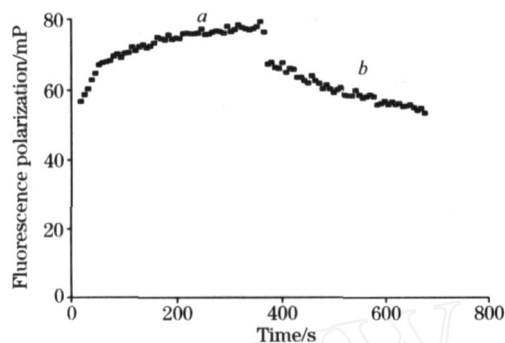


Fig 3 Kinetics of (a) binding of tracer SMZ-FITC by monoclonal antibody and (b) displacement tracer SMZ-FITC from the immunocomplex by excess of sulphamethazine (SMZ)^[32]

磺胺二甲嘧啶荧光标记物与磺胺二甲基嘧啶(SMZ)抗体结合, 2 min 可以达到平衡, 加入竞争物以后可以发现 FPIA 的竞争过程可以在很短的时间内完成。

2 FPIA 方法的优点和缺点

FPIA 和其他免疫方法的共有特点:

(1) 只要制备了农药和兽药的特异性抗体, 可以应用到几乎所有的农药和兽药检测中。

(2) 可以检测一种药物, 也可以检测一类药物, 主要取决于抗体的性质和 tracer 的选择。

FPIA 特有的优点:

(1) 均相系统, 不需要分离步骤, 易于自动化, 适于快速的筛选实验。

(2) FP 值是一个比值, 不受溶液颜色的影响, 也不受仪器灵敏度变化的影响, 如激发光强度的变化, 使实验测定更加稳定, 重现性更好。

(3) 可以使用多种仪器进行荧光偏振值的测量。可以利用自动的荧光偏振仪如使用比色杯的 Abbott TDx 和 BEA-CON 2000(PanVera Corp., USA), 使用微孔板的 Tecan Polarion (Tecan UK Ltd., UK), Victor (LKB-Pharmacia, Sweden) 或者是 Polarstar(BM Lab Technologies GmbH, Germany)。同时对于普通的荧光分光光度计, 也可以通过增加一个偏振片附件测量偏振值。

(4) 在所有的农药和兽药的荧光偏振免疫分析中, 最常用的荧光素是 FITC, 另外还有 DTAF、荧光胺和 GAF 等, 荧光素一般都比较稳定, 用于 FPIA 的 Tracer 一般可以稳定保存数年。

FPIA 的缺点:

(1) FPIA 不如 ELISA 方法灵敏^[33, 34]。一般来说 FPIA

的检测限为 $0.1 \sim 10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 左右, 检测范围从 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 到 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 级。

(2) FPIA 易于受样本基质(如样本本身的荧光性)和光散射的影响。

(3) 在 FPIA 过程中, Tracer 可能会与样本中的基质发生特异性的结合, 使荧光偏振值增加。获得合适的 Tracer 是所有 FPIA 方法的关键。

各种农药和兽药 Tracer 的合成方法见表 1。

Table 1 Working range for FPIA of pesticides and veterinary drugs and related compounds^[12]

药物	最低检测量 / ng	检测范围 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	参考资料
阿特拉津	0.1	0.001 ~ 1	[35]
西玛津	0.15	0.001 ~ 1	[36]
三嗪	0.25	0.001 ~ 1	[37, 38]
2,4-二氯苯氧乙酸	5	0.001 ~ 10	[39, 40]
2,4,5-三氯苯氧乙酸	4	0.02 ~ 10	[41]
敌稗	0.025	0.001 ~ 0.1	[42]
2-甲基-4-氯苯氧乙酸	500	2 ~ 200	[43]
2-甲基-4-氯苯氧丁酸	50	1 ~ 100	[44]
氯磺隆	0.5	0.01 ~ 1	[45]
百草枯	1.5	0.025 ~ 2	[29]
三氯乙醛	0.45	0.05 ~ 5.5	[46]
异丙隆	4	0.5 ~ 10	[47]
甲磺隆	0.25	0.03 ~ 1	[48]
DDT specific	12	0.02 ~ 1	[49]
DDT class	3	0.006 ~ 1	[49]
甲基对硫磷	1.5	0.025 ~ 10	[50]
2-氨基苯并咪唑	0.3	0.001 ~ 0.1	[28]
绿草定	2.1	0.86 ~ 100	[51]
西维因	11.4		[52]
2,4-滴丙酸		0.01 ~ 100	[53]
本菌灵	1.2		[52]
直链烷基磺酸盐	250	3 ~ 85	[54, 55]
壬基苯酚	400	18 ~ 250	[56]
腐马霉素		0.002 ~ 20	[57]
赭曲霉毒素 A	3	0.015 ~ 0.2	[58]
安灭达	0.046	-	[33]
磺胺嘧啶		0.0001 ~ 54 ~ 0.032	[59]
磺胺二甲基嘧啶	1	0.004 ~ 0.081	[32]

3 FPIA 的最新进展

3.1 单试剂(Single reagent) FPIA

单试剂 FPIA 预先将抗体和 Tracer 混合, 作为一种混合试剂与竞争抗原反应, 将 FPIA 过程简化为一步反应, 经过很短时间的温育, 测定偏振值, 由于简化了操作步骤和试剂种类, 便于操作和运输, 商品化的 FPIA 试剂盒多采用单试剂 FPIA。单试剂 FPIA 首先被 Colbert 应用于违禁药物的检测^[60]。对于半定量的 FPIA, 单试剂 FPIA 2 ~ 3 min 便可以得到结果, 而对于定量 FPIA, 则需要 15 ~ 30 min 的温育时

间。有时候, 因为结合的 Tracer 对抗体的保护, 单试剂 FPIA 甚至比普通的 FPIA 更加稳定, 而且标准曲线至少一周时间内不会有太大的变化^[35]。如图 4, 阿特拉津的单试剂 FPIA, 在一周时间内, 标准曲线几乎没有发生变化。

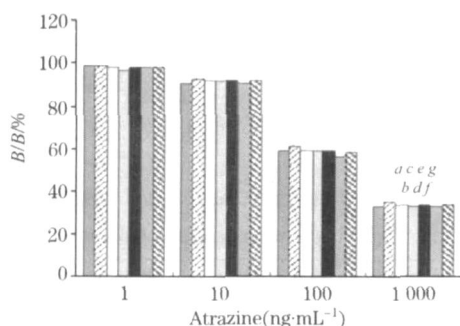


Fig 4 Weekly stability of SR FPIA for atrazine determination using SR stored at room temperature^[35]

a: 0; b: 1; c: 2; d: 3; e: 4; f: 5; g: 6 day

3.2 停流(Stop flow) FPIA

由于散射光和基质荧光产生的样本本底的干扰, 导致 FPIA 方法灵敏度降低, 是阻碍 FPIA 应用于实际样本检测的最大障碍。如果被测药物的浓度很低, 竞争免疫系统达到平衡状态时, 分析信号和本底信号就难以区分。但是本底信号不随着时间变化而发生变化, 所以通过测量 Tracer 与抗体反应的起始速度, 而不是测量免疫反应完成后的荧光偏振的信号, 就可以减小本底信号的负面作用。尽管起始速度非常高, 但是现在通过自动的停流仪器也可以比较容易的进行测量, 反应测量只要 4~5 s。这种技术已经被应用到血液和尿的治疗和违禁药物的测定中^[61-63], 获得的检测限明显好于传统的 FPIA。最近, 停流 FPIA 也被应用于农药 2,4-二氯苯氧乙酸^[63]和阿特拉津^[64]在水环境、橙汁和白葡萄酒的检测中。

3.3 有机溶剂中的 FPIA

在非极性的有机溶剂中, 表面活性剂形成的反相胶束系统是均相的有机介质, 它可以溶解类似于抗体的生物活性物质, 形成透明的溶液。传统的 FPIA 系统一般是在极性的水溶液中, 如果分析物不能溶解于极性溶剂, 则对 FPIA 的建立造成困难, 反相胶束系统的优势就是可以耐受分析物溶解于非极性有机溶剂。阿特拉津、2,4-二氯苯氧乙酸和扑灭津(Propazine)的反相胶束系统 FPIA 已经建立, 获得的灵敏度与在水溶液中基本一致^[12]。

在分析农药和兽药在动植物组织中的残留时, 一般要用可与水混溶的有机溶剂如甲醇、乙腈和二甲基亚砩等直接提取药物, 用于 FPIA 检测。在用 FPIA 检测的药物如三氯乙醛^[46]、2,4,5-三氯苯氧乙酸和甲基对硫磷^[50]中发现, FPIA 反应可以耐受至少 10% 的乙腈和 25% 的甲醇, 而在检测赭曲霉毒素 A 时即使是含 100% 的甲醇, 灵敏度也不会有很大的变化^[58](见图 5)。所以药物可以用有机溶剂与水直接提取, 不需要进一步处理就可以直接测量, 节省了操作时间。

3.4 分子印迹(Molecularly imprinted polymers) FPIA

分子印迹(molecularly imprinted polymers)技术是模板

分子(如兽药或农药)和功能单体在合适分散介质中依靠相互作用力, 形成可逆的复合物, 然后去除模板分子, 获得与模板分子互补特异性的孔穴物质, 可以取代生物抗体用于兽药和农药的检测, 由于其有适用范围广, 比生物抗体稳定等优点在药物检测领域得到了应用, 其检测终端一般为电化学检测器^[65]。2006 年, Hunt 将分子印记聚合物代替生物抗体用于心得安和 2,4-二氯苯氧乙酸的 FPIA 检测, 获得的 2,4-二氯苯氧乙酸的 IC₅₀ 为 10 μmol · L⁻¹^[66, 67]。心得安本身具有荧光性, 所以没有标记任何荧光素。免疫印迹聚合物对心得安的荧光性在不同的溶剂中有不同的影响, 如在以甲苯为溶剂的系统中 80% 的心得安可以与免疫印迹聚合物结合, 而在柠檬酸钠缓冲盐中只有 40% 的心得安与之结合。但是以免疫印迹聚合物为药物识别物质的 FPIA 尚待进一步的发展。Chen 等以有机物葱为模板, 分别利用常规的 FPIA 和时间分辨 FPIA 证明葱与分子印记聚合物结合紧密^[68]。

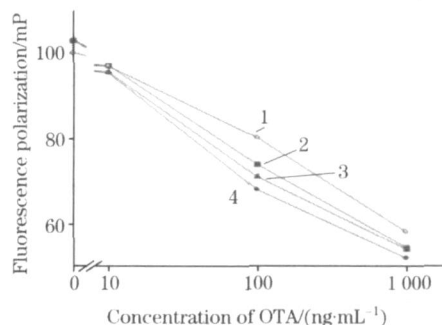


Fig 5 Effect of organic solvents on OTA FPIA performance influence of the methanol content^[58]

1: Borate buffer; 2: 25% methanol;
3: 50% methanol; 4: 100% methanol

4 荧光偏振免疫分析在农药和兽药残留检测中的应用

从 20 世纪 90 年代起, FPIA 方法就被广泛应用于农药和兽药的残留分析, 尤其是农药残留检测中。

4.1 农药 FPIA

Colbert 等使用美国 Abbott 公司的 TDx 荧光偏振分析仪, 首先通过 FPIA 检测血液中农药百草枯的残留, 方法的检测限为 1.5 ng, 线性范围为 0.025~2 mg · L⁻¹^[29]。但在上个世纪 80 年代, FPIA 方法并未受到足够重视, 直到 90 年代, FPIA 方法才被大量应用于农药残留检测。Eremin 在俄文杂志上发表了关于 2,4-二氯乙酸的 FPIA 的研究报道^[69], 后来又有几篇关于 2,4-二氯乙酸和 2,4,5-三氯乙酸 FPIA 方法的报道^[40, 41, 70-72]。大部分的荧光偏振免疫分析都是在专门的荧光偏振仪上进行的, Sanchez 等利用普通的荧光分光光度计配备一个偏振片建立了除草剂 2,4-滴丙酸在苹果中的 FPIA 方法残留分析, 检测范围为 0.01~100 μg · mL⁻¹^[53]。Samsonova 建立了在农业生产中大量应用的除草剂 σ -三嗪和 2-氯- σ -三嗪的 FPIA 检测方法^[37, 73], 同年该研究小组也研究了阿特拉津 FPIA 方法中 tracer 结构对 FPIA 分析参数的影

响^[74]。抗体是 FPIA 方法中的关键试剂,前期的 FPIA 一般都是用多克隆抗体,Polak 等首次把单克隆抗体应用于农药 2-methyl-4-chlorobutyric acid 的 FPIA 检测^[44]。Eremin 等建立了除草剂甲基苯噻隆和 2-甲基-4-氯苯氧乙酸的 FPIA 残留检测方法^[43,75],在随后的文章中也发展了甲基苯噻隆的单试剂 FPIA^[76]。1998 年之前,农药的 FPIA 方法主要由莫斯科大学的 Eremin 及其合作者发展建立,其研究成果也主要发表在俄文杂志上。Onnerfjord 等以三嗪为分析物,合成了两种 tracer 和 5 种免疫原,详细研究了 Tracer 和免疫原的结构对 FPIA 特异性、免疫动力学和灵敏度的影响,获得的阿特拉津在水中检测的最灵敏的范围为 $0.08 \sim 0.4 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[64,77],同年停流 FPIA 技术在 2,4-二氯苯甲酸的残留检测中得到了应用^[39]。Sanchez 等利用两种不同型号的荧光分光光度计配备不同的偏振片建立了西维因和本菌灵 FPIA 残留检测方法,两种偏振片获得的结果基本相似,检测限分别为 11.4 和 $1.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[52],Sanchez 等制备了农药绿草定的特异性多克隆抗体并用同样的方法建立了水中绿草定的 FPIA 残留检测方法,检测限为 $0.7 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,在自来水中的回收率为 $97.9\% \sim 130\%$ ^[51]。FPIA 方法的灵敏度虽然主要依赖于抗体的质量,但是 Tracer 的结构对灵敏度也有一定的影响,Krasnova 等在建立敌婢的 FPIA 方法时合成了 3 种不同的 Tracer,其不同之处在于药物分子与荧光素之间的间隔臂长度不一样,结果发现间隔臂最短的 Tracer 获得的灵敏度最高,检测限为 $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,同时将该方法与 GC-MS 方法进行了比对,相关性较高,相关系数为 0.99 ^[42],在其他的类似研究中,也发现与荧光素间隔臂较短的 tracer 获得的灵敏度较高^[18,50]。最近 Matveeva 和 Eremin 等及其合作者分别建立了有机氯农药氯代二苯并二噁英和 DDT 的残留检测方法^[49,55,78],Choi 等发展了阿特拉津的单试剂 FPIA^[35],发现 FPIA 方法的标准曲线在一周时间内基本没有变化。大多数农药分子一般使用荧光素 FITC 作为标记,2002 年 Hatzidakis 等发展了一种以 L-赖氨酸为标记物的 FPIA,以 2,4-D 为研究物,获得了满意的效果^[79]。Franek 等建立了甲基对硫磷的 FPIA 方法,研究了有机溶剂丙酮、DMSO 和甲醇对免疫反应的影响,发现该实验可以耐受 10% 的甲醇,而丙酮对免疫反应的影响最大,当丙酮含量为 10% 时, IC_{50} 几乎为缓冲液中的 2 倍^[48]。FPIA 的研究一般晚于 ELISA,所以专门为 FPIA 制备抗体的研究比较少,Eremin, Yakovleva 和 Kolosova 分别制备了氯磺隆、三氯乙醛和甲基对硫磷的多克隆抗体和单克隆抗体并首先应用于 FPIA 方法的研究,获得的检测限分别为 $10, 9$ 和 $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[45,46,50]。Kolosova 等以甲基对硫磷为例比较了 FPIA 与直接 ELISA 和间接 ELISA 的优势和劣势,结果显示,3 种不同的免疫方法各有优缺点,FPIA 方法速度最快,测定 10 个样本只需要 10 min ,但是灵敏度最低,最低检测限为 $15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,间接 ELISA 方法速度最慢,每测一个 96 孔的酶标板需要大概 3.5 h ,但是灵敏度最高,最低检测限为 $0.08 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[34]。

4.2 兽药 FPIA

尽管早在 1981 年就已经建立氨基糖甙类药物的 FPIA

方法^[27],但是 1994 年 Eremin 等对猪肉组织中的磺胺二甲嘧啶进行残留检测,才真正地将 FPIA 方法应用于食品中兽药残留检测,该实验利用琥珀酸酐作为 Tracer 和免疫原的间隔臂,将半抗原磺胺二甲嘧啶琥珀酸酐以活性酯法偶联到白蛋白上免疫绵羊获得羊多克隆抗体,Tracer 以两种方法合成,分别是磺胺二甲嘧啶直接和 FITC 偶联及以琥珀酸酐为间隔臂和乙二胺 FITC 偶联。结果表明直接偶联到 FITC 上的 Tracer 获得的灵敏度较高,在 $20 \mu\text{L}$ 的样本中,检测限为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,分析 1 个和 20 个样本的时间分别是 14 和 22 min 。Zhang 等利用磺胺二甲嘧啶的单克隆抗体和多克隆抗体测定了鸡肉中磺胺二甲嘧啶的残留,以单克隆抗体获得的检测限为 $1 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{50} 为 $16 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测范围是 $4 \sim 80 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,在鸡肉中的回收率为 $79\% \sim 89\%$,以多克隆抗体获得 IC_{50} 为 $122 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,对磺胺甲基嘧啶的交叉反应率为 45% ^[32]。Murtazina 等建立了磺胺嘧啶的 FPIA 方法,在 $50 \mu\text{L}$ 的样本中获得的检测限为 $0.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[59]。2005 年 Eremin 利用磺胺类药物的半抗原获得了抗磺胺类药物的多克隆抗体,同时利用该半抗原与 FITC 合成 Tracer,建立针对磺胺类的 FPIA 方法,对常用磺胺类药物的 IC_{50} 分别为磺胺甲氧吡嗪 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,磺胺氯吡嗪 $2.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,磺胺噻唑 $10.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,磺胺甲噻二唑 $12.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,磺胺嘧啶 $16.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,磺胺二甲嘧啶 $17 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。除了磺胺类药物,近年来已经建立 FPIA 方法的其他兽药还有洋地黄毒苷、卡巴咪嗪和美沙酮^[80-82]。

4.3 其他小分子物质

FPIA 同样也应用在其他毒素类 and 环境污染物等小分子药物的残留检测中,如黄曲霉毒素^[83]、腐马霉毒素^[57]、赭曲霉毒素 A^[58]、脱氧雪腐镰刀菌烯醇^[84,85]和安灭达^[33]。其他环境污染物如壬基苯酚^[56,86]、LAS^[55]和 BETX^[87]等的 FPIA 研究也有报道。壬基苯酚是直链烷基化合物,分子结构比较简单,难以制备高亲和力的特异性抗体,Franek 等合成了四种免疫原,和三种 Tracers,获得的最灵敏的检测限为 $7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,半数抑制量为 $53 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,未能达到环境中壬基苯酚的最低有害残留量($0.18 \sim 5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),而用同样的抗体,利用 ELISA 方法可以将灵敏度提高 $1 \sim 2$ 个数量级^[88]。Bicamumpaka 等报道了人血清、紫杉的粗提物和 Erwinia 紫杉培养介质中抗癌药物紫杉醇的 FPIA 检测,检测限为 $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[89]。

5 结 论

FPIA 方法是一种简单、快速、高效和可靠的分析技术,尤其是在以筛选为目的的农药和兽药残留检测中,完全在均相溶液系统内完成反应,易于自动化,具有广阔的商业开发价值。它相对于 ELISA 的主要劣势是灵敏度较低,但是随着技术的不断进步,在不久的将来 FPIA 可能会成为农药和兽药检测的主要技术之一。

参 考 文 献

- [1] LI Wen-xiu, XU Ke-xin, WANG Yan, et al(李文秀, 徐可欣, 汪燕, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(10): 1202.
- [2] Santos F J, Galceran M T. Trends Anal. Chem., 2002, 21(9-10): 672.
- [3] Ahmed F E. Trends Anal. Chem., 2001, 20(11): 649.
- [4] Kim S H, Huang T S, Seymour T A, et al. J. Food Prot., 2005, 68(9): 1860.
- [5] Wang S, Yu C, Wang J. Food Addit. Contam., 2005, 22(8): 735.
- [6] Nunes G S, Toscano I A, Barcelo D. Trends Anal. Chem., 1998, 17(2): 79.
- [7] Hennion M C, Barcelo D. Anal. Chim. Acta, 1998, 362: 3.
- [8] Morozova V S, Levashova A I, Eremin S A. Journal of Anal. Chem., 2005, 60(3): 202.
- [9] Bonwick G A, Smith C J. Food Sci. Technol. Int., 2004, 39(8): 817.
- [10] Marco M P, Gee S J, Hammock B D. Trends Anal. Chem., 1995, 14: 415.
- [11] Gabaldon J A, Maquieira A, Puchades R. Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 1999, 39(6): 519.
- [12] Eremin S A. Comb. Chem. High Throughput Screen, 2003, 6: 79.
- [13] Rhys-Williams A T, Smith D S. Fluorescence Polarisation Immunoassay. Methods of Immunological Analysis, eds. Albert W H W, Staines N A. Vol. 1. Weinheim: Fundamentals. 1993. 466.
- [14] Rhys-Williams A T. Fluorescence Polarization Immunoassay. Complementary Immunoassay, ed. Collins W P. New York: John Wiley & Sons, 1988. 135.
- [15] Weber G, Adv. Protein Chem., 1953, 8: 415.
- [16] Gutierrez M C, Gomez-Henz A, Perez-Bendito D. Talanta, 1989, 36: 1187.
- [17] Nasir M S, Jolley M E. Comb. Chem. High Throughput Screen, 1999, 2(4): 177.
- [18] Eremin S A. Food Technol. Biotechnol., 1998, 36(3): 235.
- [19] Checovich W J, Bolger R E, Burke T. Nature, 1995, 375: 254.
- [20] ZHU Guang-hua, ZHENG Hong, JU Huang-xian(朱广华, 郑洪, 鞠煊先). Chinese J. Anal. Chem.(分析化学), 2004, 32: 102.
- [21] Perrin M F. Phys. Radium, 1926, 7: 390.
- [22] Dandliker W B, Halbert S P, Schapiro H C. Exp Med., 1965, 122: 1029.
- [23] Watson R A A, Landon J, Shaw J E, et al. Clin. Chim. Acta, 1976, 73: 51.
- [24] McGregor A R, Crookall-Greening J O, Landon J, et al. Clin. Chim. Acta, 1978, 83: 162.
- [25] Popelka S R, Miller D M, Holen J T, et al. Clin. Chem., 1981, 27(7): 1198.
- [26] Jolley M E. J. Anal. Toxicol., 1981, 5(5): 236.
- [27] Jolley M E, Stroupe S D, Wang C H, et al. Clin. Chem., 1981, 27(7): 1190.
- [28] Lukens H R, Williams C B, Levison S A, et al. Environ. Sci. Technol., 1977, 11(3): 292.
- [29] Colbert D L, Coxon R E. Clin. Chem., 1988, 34: 1948.
- [30] Eremin S A, Landon J, Smith D S. Analyst, 1994, 119: 2723.
- [31] Seethala R. Methods, 2000, 22(1): 61.
- [32] Zhang S X, Wang Z H, Nesterenko I S, et al. Food Sci. Technol. Int., 2006, 41: 36.
- [33] Furzer G S, Veldhuis L, Hall J C. J. Agric. Food Chem., 2006, 54(3): 688.
- [34] Kolosova A Y, Park J H, Eremin S A, et al. Anal. Chim. Acta, 2004, 511: 323.
- [35] Choi M J, Lee J R, Eremin S A. Food Agric. Immunol., 2002, 14: 107.
- [36] Eremin S A, samsonova J V. Anal. Lett., 1994, 27: 3031.
- [37] Samsonova J V, Eremin S A, Egorov A M. Voprosy Meditsinskoi Khimii(in Russian), 1994, 40(4): 53.
- [38] Samsonova L V, Egorov A M, Eremin S A. Russian Journal of Agrochemistry, 1994, 10: 97.
- [39] Eremin S A, Matveeva E G, Gomez Hens A, et al. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 1998, 71(2): 137.
- [40] Lukin Y V, Dokuchaev I M, Polyka I M, et al. Anal. Lett., 1994, 27: 2973.
- [41] Eremin S A, Melnichenko O A, Tumanov A A, et al. Voprosy Meditsinskoi Khimii(in Russian), 1994, 40(4): 57.
- [42] Krasnova A I, Eremin S A, Natangelo M, et al. Anal. Lett., 2001, 34(13): 2285.
- [43] Polak I M, Eremin S A, Egorov A M, et al. Immunology (in Russian), 1995, 1: 17.
- [44] Polak I M, Eremin S A, et al. Russian Journal of Agrochemistry, 1994, 10: 131.
- [45] Eremin S A, Ryabova I A, Yakovleva J N, et al. Anal. Chim. Acta, 2002, 468: 229.
- [46] Yakovleva J N, Lobanova A I, Panchenko O A, et al. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 2002, 82: 851.
- [47] Melnichenko O A, Eremin S A. Russian Journal of Agrochemistry, 1994, 10: 126.
- [48] Yakovleva J, Knopp D, Niessner R, et al. Food Agric. Immunol., 2002, 14(4): 217.
- [49] Eremin S A, Bochkareva A E, Popova V A, et al. Anal. Lett., 2002, 35(11): 1835.

- [50] Kolosova A Y, Park J H, Eremin S A, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51(5): 1107.
- [51] Sanchez F G, Navas-Diaz A, Gonzalez-Diaz A F, et al. *Anal. Chim. Acta*, 2001, 439: 131.
- [52] Sanchez F G, Navas-Diaz A, Torijas M C. *Anal. Chim. Acta*, 2000, 414: 25.
- [53] Sanchez F G, Navas A, Alonso F, et al. *J Agric Food Chem*, 1993, 41: 2215.
- [54] Franek M, Zeravik J, Eremin S A, et al. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 371: 456.
- [55] Yakovleva J N, Lobanova A, Michura I, et al. *Anal. Lett.*, 2002, 35(14): 2279.
- [56] Yakovleva J N, Lobanova A Y, Shutaleva E A, et al. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378(3): 634.
- [57] Maragos C M, Jolley M E, Plattner R D, et al. *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49: 596.
- [58] Shim W B, Kolosova A Y, Kim Y J, et al. *Food Sci. Technol. Int.*, 2004, 39: 829.
- [59] Murtazina N R, Eremin S A, Mozoleva O V, et al. *Food Sci. Technol. Int.*, 2004, 39: 879.
- [60] Colbert D L, Smith D S, Landon J, et al. *Clin. Chem.*, 1984, 30: 1765.
- [61] Perez-Bendito D, Gomez-Hens A, Gaikwad A. *Clin. Chem.*, 1994, 40(8): 1489.
- [62] Gaikwad A, Gomez-Hens A, Perez B. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 280: 129.
- [63] Matveeva E G, Aguilar-Caballeros M P, Eremin S A, et al. *Analyst*, 1997, 122: 863.
- [64] Sendra B, Panadero S, Eremin S A, et al. *Talanta*, 1998, 47(1): 153.
- [65] Marx S, Zaltsman A, Turyan I, et al. *Anal. Chem.*, 2004, 76(1): 120.
- [66] Hunt C E, Ansell R J. *Analyst*, 2006, 131(5): 678.
- [67] Hunt C E, Pasetto P, Ansell R J, et al. *Chem. Commun. (Camb)*, 2006, (16): 1754.
- [68] Chen Y C, Wang Z, Yan M, et al. *Luminescence*, 2006, 21(1): 7.
- [69] Eremin S A, Moreva I Y, Dzantiev B B, et al. *Voprosy Meditsinskoi Khimii (in Russian)*, 1991, 37: 93.
- [70] Rogers K R, Kohl S D, Riddick L A, et al. *Analyst*, 1997, 122: 1107.
- [71] Garcia F S, Navas F A, Lovillo J. *J. Agric Food Chem.*, 1993, 41: 2215.
- [72] Lunskey I M, Eremin S A, Egorov A M, et al. *Agrokhimiya (in Russian)*, 1993, 2: 113.
- [73] Samsonova J V, Egorov A M, Eremin S A. *Russian Journal of Agrochemistry*, 1994, 10: 97.
- [74] Samsonova J V, Eremin S A, Egorov A M, et al. *Bioorg. Chem.*, 1994, 20(12): 773.
- [75] Eremin S A, Mel'nichenko O A, Kreissing S, et al. *Russ. J. Anal. Chem.*, 1995, 50(9): 888.
- [76] Mel'nichenko O A, Eremin S A, Egorov A M, *Russ. J. Anal. Chem.*, 1996, 51(5): 512.
- [77] Onnerfjord P, Eremin S A, Emneus J, et al. *J. Immunol. Methods*, 1998, 213: 31.
- [78] Matveeva E G, Gribkova E V, Sanborn J R, et al. *Anal. Lett.*, 2001, 34(13): 2311.
- [79] Hatzidakis G I, Tsatsakis A M, Krambovitis E K, et al. *Anal. Chem.*, 2002, 74: 2513.
- [80] Dasgupta A, Lopez A E, Wells A, et al. *Clin. Chim. Acta*, 2001, 309(1): 91.
- [81] Wilimowska J, Gomollka E, Pasich A, et al. *Przegląd Lekarski*, 2005, 62(6): 595.
- [82] KuKanich B, BD X L, Papich M G. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2005, 27(3): 389.
- [83] Nasir M S, Jolley M E. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50(11): 3116.
- [84] Maragos C M, Plattner R D. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, 50(7): 1827.
- [85] Maragos C M, Jolley M E, Nasir M S. *Food Addit. Contam.*, 2002, 19(4): 400.
- [86] Yakovleva J N, Zeravik J, Michura I V, et al. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 2003, 83: 597.
- [87] Eremin S A, Knopp D, Niessner R, et al. *Environ. Chem. Lett.*, 2005, 2: 227.
- [88] Franek M, Zeravik J, Eremin S A, et al. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 2001, 371: 456.
- [89] Bicaumpaka C, Page M. *J. Immunol. Methods*, 1998, 212(1): 1.

Development of Fluorescence Polarization Immunoassay for Determination of Pesticides and Veterinary Drugs

WANG Zhan-hui¹, ZHANG Su-xia¹, SHEN Jian-zhong^{1*}, Sergei A Eremin²

1. Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology, College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China
2. Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119992, Russia

Abstract Fluorescence polarization immunoassay (FPIA) is a fast screening technique based on immune competition and fluorescence polarization principle and is most used in the determination of small molecular substance (antigen). FPIA is based on the

increase in polarization of the fluorescence of small fluorescent-labeled antigen when bound by specific antibody. FPIA is a homogeneous technique and not affected by solution color and the sensitivity of instrument. No separation step is required for FPIA. Simplifying the assay and minimizing the analysis time are the most notable advantages of FPIA over other immunoassays and FPIA is suitable to screening a large number of samples. The technique has been applied to the determination of pesticides and veterinary drugs in environment and food samples, while no studies have been reported in the correlative field in China. The present paper presents the principle and history of FPIA and its application in the screening determination of pesticides and veterinary drugs.

Keywords Development fluorescence polarization immunoassay; Determination; Pesticides and veterinary drugs

* Corresponding author

(Received Jun. 28, 2006; accepted Oct. 6, 2006)

第 15 届国际生物发光和化学发光会议(15th ISBC) 通知

<http://www.sino-meetings.com/isbc/>

2008 年 5 月 13 日 ~ 16 日, 中国上海

由国际生物发光和化学发光学会(International Society for Bioluminescence & Chemiluminescence [ISBC]) 主办, 中国生物物理学会光生物学专业委员会承办, 中国化学学会发光及动力分析专业委员会和中国物理学会发光学会分会协办的第 15 届国际生物发光和化学发光会议(15th ISBC) 定于 2008 年 5 月 13 ~ 16 日在上海举行。会议将重点围绕着生物发光、化学发光的基础和应用研究, 生物医学研究中的发光成像, 发光相关的医学仪器和高通量药物筛选, 生物发光、化学发光与生物进化、环境变化、生态系统变迁的关系, 荧光、磷光的形成与应用, 生物发光、化学发光、荧光、磷光相关的新技术和新方法等主题, 讨论和交流在生物发光和化学发光研究领域的最新研究和重要进展, 并为本领域的国内外与会学者提供互相交流的学术平台。现将会议具体事宜通知如下:

一、会议时间: 2008 年 5 月 13 日报到, 5 月 14 ~ 16 日开会。

二、会议地点: 上海银河宾馆(****)

三、大会(中国)组织委员会:

主 席: 沈 恂

副 主 席: 崔宗杰 张新荣

秘 书 长: 杨晓林

副秘书长: 刘亚宁 林金明

委 员: 陈国男 崔 华 崔宗杰 晋卫军 孔祥贵 林金明 刘亚宁 沈 恂

邢 达 杨国强 杨晓林 张新荣 章竹君 庄惠生

四、国际顾问委员会

Masuo Aizawa (Japan)

Hashem Akhavan-Tafti (USA)

Anslem Berthold (Germany)

Fritz Berthold (Germany)

Luba Brovko (Canada)

Stefano Girotti (Italy)

Steve Haddock (USA)

Russell Hart (USA)

Erika Hawkins (USA)

Hideo Hiruma (Japan)

Phil Hill (UK)

Valentina Kratasyuk (Russia)

Larry Kricka (USA)

John Lee (USA)

Osamu Nozaki (Japan)

Yoshihiro Ohmiya (Japan)

Patrizia Pasini (Italy)

Terry Quickenden (Australia)

Aldo Roda (Italy)

Dinesh Shah (USA)

Pasquale De Sole (Italy)

Philip Stanley (UK)

Aladar Szalay (Germany)

Akio Tsuji (Japan)

Vadim Viviani (Brazil)

Edie Widder (USA)

Keith Wood (USA)

Bert Zomer (Netherlands)

五、会议主题

1. Basic and applied bioluminescence: luciferase (firefly, bacteria, cypridina and renilla), aequorin, etc.

2. Basic and applied chemiluminescence: reaction mechanisms, biosensor, chemical assays, molecular labeling, and detection of reactive oxygen and nitric species.

(下转 2340 页)