

荧光偏振免疫分析方法快速检测沙拉沙星残留

宋佩¹ 孟萌¹ Sergei A Eremin² 张太昌¹ 田溪¹
薛虎寅¹ 张昱¹ 尹永梅^{*1} 郝日沫^{*1}

¹(南开大学药学院,南开大学药物化学生物学国家重点实验室,天津市分子药物研究重点实验室,天津 300071)

²(Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia)

摘要 以异硫氰酸荧光素(FITC)标记沙拉沙星合成荧光标记物,采用薄层色谱法提纯,优化了反应时间、标记物和抗体的工作浓度,建立了沙拉沙星的快速荧光偏振免疫分析法(FPIA)。本方法测定沙拉沙星在缓冲液中的半数抑制浓度(IC₅₀)为43.2 μg/L;检测范围为5.7~327 μg/L,可以达到国家规定的动物性食品中兽药最高残留限量(80 μg/kg)的要求。本研究考察了FPIA测定沙拉沙星的动力学过程及对其它4种喹诺酮类药物的交叉反应。结果表明,环丙沙星、恩诺沙星、加替沙星及氧氟沙星的交叉反应率分别为3.3%、1.8%、1.7%和0.7%。在牛奶和猪尿中沙拉沙星的回收率分别在71%~94%和74%~102%之间。本方法操作简单快捷,整个检测过程只需5 min,而且灵敏度较高、特异性强,适用于动物性食品中沙拉沙星残留的快速筛选检测。

关键词 荧光偏振免疫分析; 沙拉沙星; 喹诺酮类药物; 荧光标记

1 引言

沙拉沙星(Sarafloxacin, SAR, 图1)属于动物专用的氟喹诺酮类药物,其盐酸盐主要用于治疗鸡与猪的细菌及支原体感染所致的疾病^[1]。盐酸沙拉沙星的半衰期较长,过量的药物残留会直接危害动物乃至人体健康。我国规定动物性食品中兽药沙拉沙星的最高残留限量不得超过80 μg/kg。

目前,氟喹诺酮类药物的检测方法主要有微生物法^[2]、仪器分析法、化学发光分析法^[3]及免疫分析法。微生物法主要用于大量样品的快速筛选;常用的仪器分析法有高效液相色谱法^[4]、液相色谱-质谱联用分析法^[5]和毛细管电泳法^[6]等,此类方法的缺

点是所用仪器昂贵且样品前处理较繁琐,不适合大量样品的快速检测;免疫分析法灵敏度高、特异性强、快速准确,现已广泛应用于小分子农药以及兽药的筛选检测,但是大部分属于固相免疫分析,操作中需要分离结合的和未结合的抗原(抗体)或酶标记物,耗时较长,所以迫切需要发展更加简便快速的分析方法。

荧光偏振免疫分析法(FPIA)^[7]是一种快速简便高效的均相免疫分析方法,无需昂贵复杂的仪器,测定时间短。应用FPIA检测沙拉沙星的技术尚未开展。基于此,本研究合成并提纯了沙拉沙星荧光标记物,建立利用荧光标记物和沙拉沙星多克隆抗体检测沙拉沙星的荧光偏振免疫分析方法。

2 实验原理

20世纪20年代,Perrin发现垂直方向的偏振光激发荧光分子之后,偏振光在垂直(I_⊥)和水平(I_∥)方向都会有荧光强度,因此可以得到荧光偏振强度值(P): $P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$ ^[8]。当溶液的温度和粘度固定不变时,P值主要取决于荧光分子的体积大小。小分子物质在溶液中旋转速度快,P值较小;大分子物质在溶液中旋转速度较慢,P值较大。

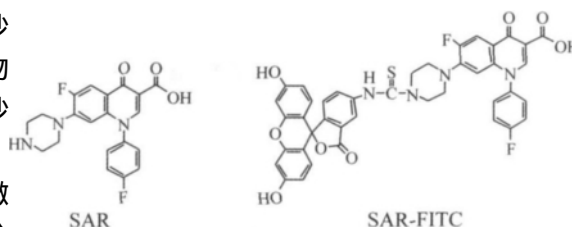


图1 沙拉沙星和沙拉沙星荧光标记物的分子结构
Fig. 1 Molecular structure of Sarafloxacin (SAR) and Sarafloxacin-FITC

2012-01-05 收稿; 2012-03-22 接受

本文系国家自然科学基金项目(Nos.81173017, 31101277), 中央高校基本科研业务费项目(No.65011751) 资助

* E-mail: xirimo2000@yahoo.com; yinyongmei@nankai.edu.cn

FPIA 是基于荧光标记抗原结合抗体后荧光偏振强度增强的检测方法^[9]。利用药物的标准浓度与荧光偏振强度的线性关系作定量分析^[10,11]。另外, FPIA 也可以进行抗体的检测^[12]。FPIA 是一种均相标记免疫分析技术, 它避免了大量的分离和洗涤步骤, 加样数分钟后即可检测, 适于大量样品分析。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

荧光偏振分析仪(DIACHEMIX SENTRY 100); 液相色谱-质谱联用仪(Agilent G6520 QTOF)。盐酸沙拉沙星(Dr. Ehrensorfer GmbH); 加替沙星、恩诺沙星、氧氟沙星、盐酸环丙沙星对照品(中国兽医药品监察所); 5(6)-异硫氰酸荧光素(FITC, Sigma-Aldrich 公司); 其它试剂均为分析纯(天津光复精细化工研究所); 硅胶薄层色谱板(5 cm×10 cm, 天津思立达科技有限公司); SAR 多克隆抗体(实验室自制); 牛奶(市场购买); 猪尿(某养殖场); 2.5 mmol/L 硼砂缓冲液(BB, pH=8.0): 0.95 g 硼砂和 0.1 g 叠氮化钠溶于 1 L 二次蒸馏水。

3.2 荧光标记物(Tracer) 的合成及鉴定

参照文献[13, 14]的 FITC 荧光标记物合成方法, 称取 3.8 mg SAR, 溶于由 100 μL 二次蒸馏水、500 μL 甲醇、50 μL 三乙胺组成的混合溶剂中, 得到 A 液; 称取 6 mg FITC, 溶于 600 μL 甲醇中, 形成 B 液; 将 200 μL B 液逐滴加入 A 液中, 振荡, 室温避光保存过夜。以氯仿-甲醇(2:1, V/V) 为展开剂, 室温下进行薄层层析^[15], 分离纯化沙拉沙星荧光标记物。在紫外投射仪下观察, 选择 $R_f=0.05$, $R_f=0.1$ 两条带, 分别用 100 和 120 μL 甲醇萃取。

3.3 荧光标记物工作浓度(TWS) 和抗体工作浓度(AbWS) 的确定

用 BB 溶液倍比稀释, 配制不同浓度的沙拉沙星标记物, 检测荧光偏振光强度。以 5 倍于空白溶液的偏振光强度作为其工作浓度, 确定选取 1/12800 稀释的浓度作为工作浓度(TWS), 空白溶液选用 BB。

在每个试管中依次加入 500 μL 不同浓度的沙拉沙星多抗溶液, 并依次加入 500 μL 工作浓度的沙拉沙星荧光标记物($R_f=0.1$), 室温孵育 5 min, 检测荧光偏振光强度, 选取 1/1600 稀释浓度作为抗体的工作浓度(AbWS)。

3.4 FPIA 方法的建立

取适量盐酸沙拉沙星溶于二次蒸馏水, 配制成 1000, 100, 10, 2.5, 1, 0.25, 0.1 和 0.01 mg/L 系列浓度的标准溶液, 分别加入 8 个试管中, 另设一个二次蒸馏水空白对照, 40 μL/管; 每个试管中加入 480 μL (1:12800) 的沙拉沙星标记物($R_f=0.1$), 再分别加入 480 μL (1:1600) 的沙拉沙星多抗, 室温孵育 5 min, 检测其荧光偏振光强度。

用甲醇溶解恩诺沙星和加替沙星; 稀醋酸(pH 5~6) 溶解氧氟沙星; 二次蒸馏水溶解盐酸沙拉沙星和盐酸环丙沙星。以上氟喹诺酮溶液初始浓度均为 1 g/L, 以二次蒸馏水稀释至 100, 10, 1, 0.1, 0.01 和 0.001 mg/L, 检测步骤同上。

3.5 沙拉沙星回收率的 FPIA 法检测

在 4 °C 将牛奶或猪尿以 10000 r/min 离心 15 min, 牛奶脱去脂肪层, 猪尿除去沉淀, 将脱脂的牛奶和澄清的猪尿分别用 BB 稀释 20 倍, 得到待测样品。

在样品中添加沙拉沙星, 使其最终浓度为 4, 10, 40, 100 和 200 μg/L, 然后加样 40 μL/管; 加工作浓度的荧光标记物和沙拉沙星抗体各 480 μL, 混匀后, 室温孵育 5 min, 检测。

采用 Origin 6.0 软件对实验数据进行分析处理。

4 结果与讨论

4.1 荧光标记物的合成与鉴定

荧光标记物的合成在 FPIA 中起关键作用^[16]。可利用加入抗体前后偏振值 mP 的变化判断荧光标记物的合成是否成功。本研究利用 FITC 标记沙拉沙星合成荧光标记物, 并采用薄层色谱法提纯, 以氯仿-甲醇(2:1, V/V) 为展开剂, 得到 $R_f=0.05$ (A 带), $R_f=0.1$ (B 带) 两条带, 均用甲醇提取。对于 A

带,游离的荧光标记物的 m_p 值为 51.1;加入抗体后 m_p 值为 124.4, Δm_p 为 73.3。而 B 带的 Δm_p 为 160.9。对比两带,说明沙拉沙星抗体与 B 带萃取物具有明显的特异性结合,而且该萃取物完好地保留了沙拉沙星半抗原与抗体特异性识别的特征结构;同时,肉眼可见该条带处具有 FITC 的黄绿色荧光,故可初步判定本实验成功合成了沙拉沙星的荧光标记物 SAR-FITC,即为 $R_f=0.1$ 条带(B 带)的萃取物。

为了进一步确定沙拉沙星荧光标记物是否合成成功,本研究对 $R_f=0.1$ 条带(B 带)的萃取物进行了 LC/MS 鉴定,由其质谱图(图 2)可见 SAR-FITC 的分子离子峰(m/z 775)。由以上两方面的鉴定可断定本研究成功合成了 SAR-FITC。

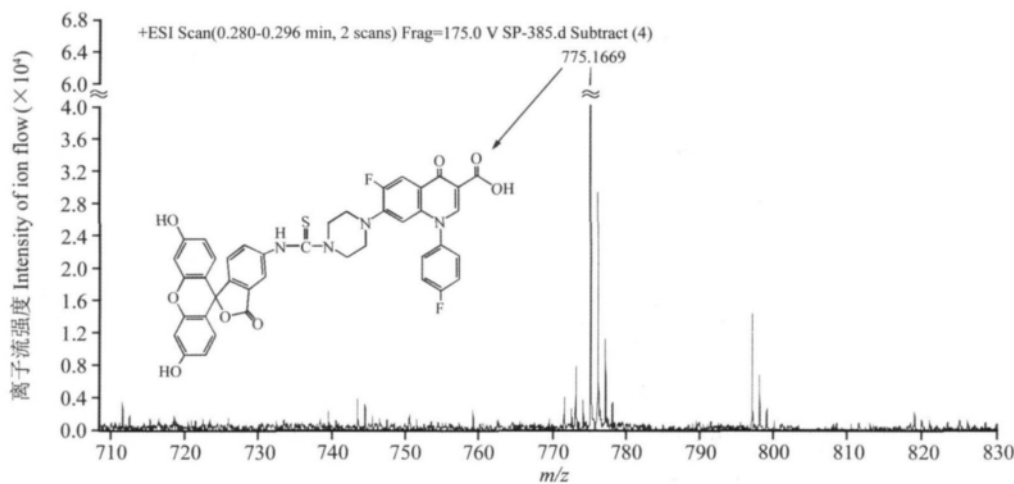


图 2 沙拉沙星荧光标记物($R_f=0.1$)的 LC/MS 鉴定图

Fig. 2 Mass spectrum of Sarafloxacin-FITC ($R_f=0.1$)

4.2 反应时间的优化和选择

FPIA 检测前孵育时间的选择非常重要。孵育时间过短,抗原和抗体结合不完全,造成结果偏差。本实验研究了 6 个浓度的沙拉沙星标准品参与竞争时的动力学曲线。结果表明,前 2 min 内,偏振值逐渐增大而且变化比较明显;5 min 后偏振值基本趋于稳定,体系达到竞争平衡,产生完全抑制。因此,本研究选择孵育 5 min 后检测其偏振值,以获得准确稳定的检测结果。

4.3 荧光标记物工作浓度和抗体工作浓度的确定

在不影响荧光信号测量的前提下,较低的荧光标记物浓度容易获得较灵敏的荧光响应。荧光标记物的总荧光信号约是空白溶液荧光强度 5~10 倍时,既不会影响荧光信号的测量,又能获得准确的荧光标记物响应值^[17]。以此为基础,本研究筛选了荧光标记物和抗体的工作浓度。

按照 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200, 1/6400, 1/12800, 1/25600 稀释荧光标记物; 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200 的倍数稀释沙拉沙星抗体,检测偏振光强度。以 5 倍于空白溶液的偏振光强度作为荧光标记物的工作浓度,确定选取 1/12800 稀释的浓度作为荧光标记物的工作浓度,空白溶液选用 BB。为了准确确定抗体的工作浓度,本研究对 1/800, 1/1600, 1/3200 稀释的抗体分别作了竞争抑制率曲线(图 3)。稀释比为 1/1600 时的灵敏度高于 1/800;而稀释比为 1/3200 时所得的线性范围较窄。本研究选择 1/1600 的稀释比作为抗体的工作浓度。

4.4 FPIA 方法的灵敏度和线性范围

在最佳荧光标记物工作浓度和抗体浓度下进行竞争法检测抗体的灵敏度。在缓冲液 BB 中,分别绘制抗体抑制率曲线(沙拉沙星最终浓度为 1000, 100, 10, 2.5, 1.0, 0.25, 0.1 和 0.01 mg/L)和标准曲线(沙拉沙星最终浓度为 100.0, 10.0, 2.5, 1.0 和 0.25 mg/L)。图 4 为优化后的沙拉沙星抗体的竞争抑制率曲线及其标准曲线,纵坐标均为 m_p/m_{p0} ,其中 m_{p0} 是未加沙拉沙星的偏振值, m_p 是加有沙拉沙星的偏振值,横坐标为沙拉沙星浓度的对数值。根据抑制率曲线可知半数抑制浓度(IC_{50})为 43.2 $\mu\text{g/L}$,检测范围($IC_{20} \sim IC_{80}$)为 5.7~327 $\mu\text{g/L}$,标准曲线线性良好。

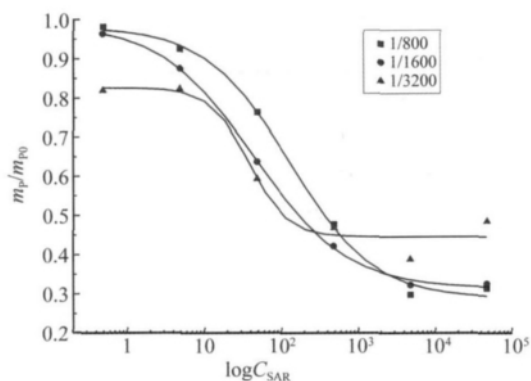


图 3 不同稀释倍数的沙拉沙星抗体的抑制率曲线
Fig. 3 Optimum dilution of polyclonal antibody

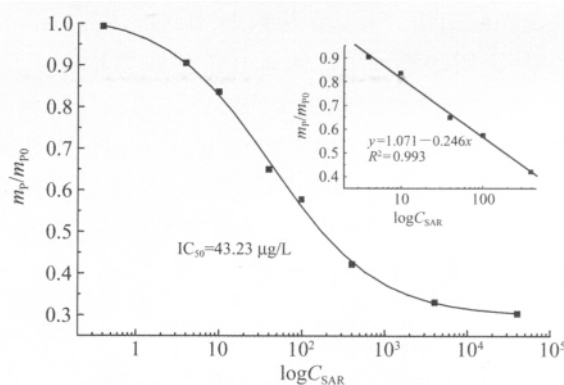


图 4 沙拉沙星抗体的抑制率曲线和标准曲线
Fig. 4 Fluorescence polarization immunoassay (FPIA) representative inhibition curve and linear calibration curve for anti-Sarafloxacin antibody using tracer of $R_f=0.1$

4.4 FPIA 方法的特异性

利用 FPIA 在同样条件下测定其他喹诺酮类药物, 计算各自的 IC_{50} , 利用下列公式得到沙拉沙星和另外 4 种沙星类药物的交叉反应率 (CR):

$$CR (\%) = [IC_{50}(\text{SAR}) / IC_{50}(\text{喹诺酮类药物})] \times 100\%$$

结果表明, 以 SAR-FITC 为荧光标记物 4 种沙星类药物用于 FPIA 方法的特异性评价, 发现只有环丙沙星有明显的交叉反应, 交叉反应率为 3.3%, 其它 3 种药物的交叉反应率均低于 2% (见表 1)。

4.5 FPIA 方法的精密度和准确度

在优化后的 FPIA 分析条件下, 按照本方法在牛奶及猪尿样品中进行添加回收实验。

选择 5 种添加浓度, 每个浓度的样品一天内平行测定 6 次, 计算批内精密度, 而批间精密度则由 6 d 平行测定 6 次的结果统计得出, 并计算添加回收率和精密度 (表 2)。

结果表明, FPIA 用于检测牛奶和猪尿中沙拉沙星含量时, 其平均回收率均大于 84%, 而且相对标准偏差均低于 17%, 表明本方法具有较好的精密度和准确度。

表 2 牛奶和猪尿中沙拉沙星的回收率和方法精密度结果

Table 2 Mean recoveries and precision for FPIA determination of sarafloxacin (SAR) spiked in milk and pig urine

样品 Sample	添加量 Spiked level (mg/L)	批间 Inter-assay			批内 Intra-assay		
		测量值 Found (mg/L)	回收率 Recovery (%, n=6)	相对标准偏差 RSD (%, n=6)	测量值 Found (mg/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%, n=6)
牛奶 Milk	4	3.33±0.34	83.3	10.2	3.79±0.54	94.9	14.3
	10	7.32±1.14	73.1	15.6	7.12±0.82	71.2	11.5
	40	30.66±3.34	76.6	10.8	31.00±3.90	77.5	12.5
	100	88.55±7.95	88.5	8.9	91.60±9.30	91.6	10.1
	200	189.77±14.0	94.8	7.4	188.90±13.20	94.5	6.9
猪尿 Pig urine	4	3.32±0.54	82.9	16.5	3.38±0.49	84.5	14.5
	10	7.10±0.83	70.9	11.8	7.35±0.54	73.5	7.4
	40	30.60±4.0	76.4	13.0	31.90±2.2	79.8	6.8
	100	95.60±11.70	95.6	12.2	97.90±7.20	97.9	7.3
	200	197.80±22.30	98.9	11.2	205.90±13.90	102.9	6.7

总之, FPIA 对沙拉沙星的检测具有较高的灵敏性和重现性, 而且方法简单快速, 5 min 即可完成对样品检测, 可以作为快速检测沙拉沙星兽药残留的方法。

References

- 1 GONG Xue-Yun, ZHANG Lei, MIU Juan, LI Hua-Cen. *J. Henan Agric. Sci.*, **2011**, 40(9): 157 ~ 106
龚雪云, 张磊, 缪娟, 李华岑. 河南农业科学, **2011**, 40(9): 157 ~ 106
- 2 Da Lisiane S E, Elfrides E S S. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 27: 91 ~ 96
- 3 Fatna A A, Salma A A, Abduhahman A A. *Talanta*, **2001**, 53(4): 885 ~ 893
- 4 LIU Yuan, XIE Meng-Xia, DING Lan, SHAN Ji-Hao, YANG Qing-Feng, LIU Su-Ying. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2004**, 32(3): 352 ~ 355
刘媛, 谢孟峡, 丁岚, 单吉浩, 杨清峰, 刘素英. 分析化学, **2004**, 32(3): 352 ~ 355
- 5 PENG Tao, YONG Wei, AN Juan, CHU Xiao-Gang, TANG Ying-Zhang, LI Chong-Jiu. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2006**, 34: S10 ~ S14
彭涛, 雍炜, 安娟, 储晓刚, 唐英章, 李重九. 分析化学, **2006**, 34: S10 ~ S14
- 6 Schmitt-Kopplin P, Burhenne J, Freitag D, Spiteller M, Kettrup A. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 837(1-2): 253 ~ 263
- 7 Wang Z H, Cheng L L, Shi W M, Zhang S X, Shen J Z. *Sci. China Chem.*, **2010**, 53(3): 612 ~ 618
- 8 ZHANG Zhen-Ya, MEI Xing-Guo. *Chinese J. Letters in Biotechnology*, **2006**, 17: 677 ~ 680
张振亚, 梅兴国. 生物技术通讯, **2006**, 17: 677 ~ 680
- 9 Smith D S, Eremin S A. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, 391(5): 1499 ~ 1507
- 10 Baksu A, Taskin M, Goker N, Baksu B, Uluocak A. *Am. J. Perinatol.*, **2006**, 23(1): 31 ~ 35
- 11 Rodriguez E, Delucchi M A, Cano F, Castillo M C, Villegas R. *Transplant Proc.*, **2005**, 37(8): 3354 ~ 3357
- 12 Ostaopenko Y N, Lisovik Z A, Belova M V, Luzhnikov E A, Livanov A S. *Przegl. Lek.*, **2005**, 62(6): 591 ~ 594
- 13 Zhang S X, Wang Z H, Nesterenko I S, Eremin S A, Shen J Z. *Int. J. Food Sci. Tech.*, **2007**, 42: 36 ~ 44
- 14 Wang Q, Simon A, Haughey, Sun Y M, Eremin S A, Li Z F, Liu H, Xu Z L, Shen Y D, Lei H T. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, 399(6): 2275 ~ 2284
- 15 WANG Xiao-Yong, GONG Fu-Chun, TANG Lian-Fei, LI Zhi-Zhang, ZHENG Xing-Liang, ZHAN Xue-Hui. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(10): 1457 ~ 1461
王小勇, 龚福春, 唐连飞, 李志章, 郑兴良, 湛雪辉. 分析化学, **2010**, 38(10): 1457 ~ 1461
- 16 Wu X L, Wang L B, Ma W, Zhu Y Y, Xu L G, Kuang H, Xu C L. *Immunol. Invest.*, **2011**, 41(1): 38 ~ 50
- 17 Eremin S A, Landon J, Smith D S. *Analyst*, **1994**, 119(12): 2723 ~ 2726

Development of a Fluorescence Polarization Immunoassay for Rapid Determination of Sarafloxacin in Milk and Pig Urine

SONG Pei¹, MENG Meng¹, Sergei A Eremin², ZHANG Tai-Chang, TIAN Xi¹, XUE Hu-Yin¹,
ZHANG Yu¹, YIN Yong-Mei^{*1}, XI Ri-Mo^{*1}

¹(College of Pharmacy, State Key Laboratory of Medicinal Chemical Biology and Tianjin Key Laboratory of Molecular Drug Research, Nankai University, Tianjin 300071, China)

²(Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow 119991, Russia)

Abstract To develop a rapid and sensitive fluorescence polarization immunoassay (FPIA) for the determination of sarafloxacin (SAR), fluorescein-labelled tracer (SAR-FITC) was synthesized and purified by TLC. The reaction time, tracer and polyclonal antibody concentration were optimized, and the FPIA method showed a dynamic range from 5.7 to 327.6 $\mu\text{g/L}$ with IC_{50} value of 43.23 $\mu\text{g/L}$ to SAR in buffer. The specificity of the FPIA for SAR was investigated using other 4 quinolones and the cross-reactivity for ciprofloxacin, enrofloxacin, gatifloxacin, ofloxacin were 3.3%, 1.8%, 1.7%, 0.7%, respectively. The recoveries in milk samples ranged from 71%–94%, and those of pig urine samples were in the range of 74%–102%. The FPIA developed in this study is a rapid and convenient method, which is suitable to be used as a screening method to detect residues of sarafloxacin.

Keywords Fluorescence polarization immunoassay; Sarafloxacin; Quinolones; Fluorescent-labeling

(Received 5 January 2012; accepted 22 March 2012)