

# Rapid Detection of Tetracycline Residues in Animal Serum Radioimmunoassay

Nan Wang Mingming Su Xiaosheng Zhang Weijian Shen Jing Chen

Dalian Customs Technology Center, Dalian, Liaoning, 116000, China

## Abstract

This method mainly takes sheep serum and chicken serum as the research object, adopts the radioimmunoassay Charm II, and establishes a rapid, simple and efficient detection method to determine the residues of tetracyclines in animals by optimizing the reaction conditions. As a positive preliminary screening method, this method can provide technical support for the detection of tetracycline residues in Chinese farms and import and export food animals, and reduce the cost loss of enterprises in previous tests. When a positive result is detected, other testing methods should be used for confirmation.

## Keywords

radioimmunoassay; primary screening; tetracycline drugs

## 动物血清中四环素类残留的快速检测 – 放射免疫法

王楠 苏明明 张晓声 沈伟健 陈静

大连海关技术中心, 中国·辽宁 大连 116000

## 摘要

本方法主要以羊血清和鸡血清为研究对象, 采用放射免疫分析法Charm II, 通过优化反应条件, 建立起一种快速、简便、高效的检测方法对动物体内四环素类药物残留进行测定。此方法作为阳性初筛方法, 可以为中国养殖场及进出口食用动物四环素类残留的检测提供技术支持, 降低企业在以往检测中的成本损失。当其检出阳性结果时, 应采用其他检测方法进行确证。

## 关键词

放射免疫分析法; 初筛; 四环素类药物

## 1 引言

四环素属于一种有机化合物, 分子式为  $C_{22}H_{24}N_2O_8$ , 四环素及其盐类均为一种呈黄色或淡黄色的晶体, 在干燥状态下稳定性极高, 其四环素族的水溶液都稳定性高, 但金霉素除外。四环素族除了能溶于浓度不高的酸碱等溶液, 同时也可略溶于水和甲醇乙醇等溶液, 但不溶于醚类溶液, 如石油醚等<sup>[1]</sup>。四环素族抗生素主要包括有金霉素、土霉素、四环素。四环素类抗生素是20世纪40年代发现的一类具有菲烷母核的广谱抗生素, 该类抗生素广泛应用于革兰阳性和阴性细菌、细胞内支原体和立克次氏体引起的感染<sup>[2-4]</sup>。

目前, 四环素主要作为生长促进剂以及药物添加剂投喂给动物, 不仅可以促进动物生长提高产量, 并且可以预防和治疗动物养殖过程中产生的多种感染性疾病。但是, 在动物被宰杀之前, 动物体内的四环素并不能完全被动物自身代谢所排出体外, 而是有很大一部分残留在动物体内

并主要集中在肝脏和肾脏部位<sup>[5-6]</sup>。人们在食用了有四环素类抗生素残留的动物性食品, 会引起很多较为严重的疾病, 影响人的身体健康安全。例如, 肝肾中毒, 影响人的中枢神经系统以及血液方面疾病等。并且如长期食用, 还会使人体对此类的抗生素产生耐药性, 产生耐药菌株, 从而使在以后生病时使用抗生素无效, 也会产生过敏反应, 降低人类对病菌的免疫能力<sup>[7]</sup>。

中国2020年4月实施的GB 31650—2019《食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量》以及包括欧盟、美国等国家, 均规定食品中四环素类药物残留的MRL, 即土霉素、四环素、金霉素最低值均小于  $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ ; ADI 则为  $0\sim 30 \mu\text{g}/\text{kg bw}$ 。

目前, 四环素类残留的检测方法主要有微生物检测法、高效液相色谱法 (HPLC) 和酶联免疫吸附法 (ELISA) 等。其中, 微生物检测法检测耗时较长, 且容易被其他抗生素类干扰, 检测准确度不足。高效液相色谱法是目前常用的可以对大批量样品进行检测的方法, 检测灵敏度和准确度较高, 但是其前处理方法复杂费时, 且使用成本较高, 不

【作者简介】王楠 (1990-), 男, 中国辽宁大连人, 硕士, 工程师, 从事兽药残留检测和重金属检测等研究。

适合快速检测。酶联免疫吸附法容易产生交互反应，且需要对每一种抗体进行分别标记，导致检测费用较高，不适合对四环素类药物多残留就行检测<sup>[8-10]</sup>。Charm II 放射免疫分析法具有样品前处理简单快速，特异性强，检测时间短等优点，可以对样品中四环素类药物残留总量进行检测，并且具有高效液相色谱法检测的准确性和免疫吸附法检测的高效性，适用于对大量样品的初筛检测，该检测方法也已经得到了美国FDA和欧盟等国家的认可和应用，具有广阔的应用前景。

## 2 材料和方法

### 2.1 设备和材料

Charm II 7600 分析仪（美国 Charm 公司）；3k15 离心机（德国 Sigma 公司）；涡旋混合器（德国 IKA 公司）；恒温孵育器（65±1℃，80±2℃）；闪烁液加液器；离心管（50mL）；硼硅玻璃试管及试管塞；液体闪烁计数器（美国 Charm 公司）；药片压杆

### 2.2 样品和试剂

检测基质为羊血清和鸡血清：分别采集两种动物血液，将采集好的血液置于容器内，室温下静置 10h，析出足够血清备用。

检测试剂为四环素类 Charm II 检测试剂盒；闪烁液；阴性对照液；多抗标准品等。

### 2.3 方法

#### 2.3.1 实验原理

放射免疫分析法检测的基本原理是微生物细胞表面存在着不同的特异性点位，并能够与各种四环素类药物上的共有功能基团相结合发生相应的微生物受体反应。检测四环素类药物残留时，同时加入微生物受体结合物和 [<sup>3</sup>H] 标记过的金霉素。当样品中残留四环素类药物时，就会同 [<sup>3</sup>H] 标记过的金霉素形成竞争关系，共同竞争微生物受体结合物上的点位，当残留物与微生物受体结合上的点位越多，就代表四环素类药物残留越多。用液体闪烁计数器测定样品反应后的 [<sup>3</sup>H] 含量的 cpm（即每分钟脉冲数）值，cpm 值越低，代表了样品中的四环素类药物残留量越高，二者成反比关系。

#### 2.3.2 样品制备

取 50mL 离心管，并向其中加入 1mL 血液样品和 30mLMSU 萃取缓冲溶液，之后涡旋 5min。将离心管放置于 80±2℃ 的恒温孵育器 45min，取出后冷水浴 10min，并在 1750g 的离心力下离心 10min，取上清液备用。恢复室温后，测定其 pH，pH 值应为 7.5。否则，则使用试剂盒配置的 M2 缓冲液或者是 1mol/L 的盐酸调节 pH，得到样品测试液。

#### 2.3.3 测定步骤

将白色药片通过药片压杆的平端放入洁净的玻璃试管内，加入 300μL 的蒸馏水，涡旋 10s 直至药片破碎。吸取 4mL 处理好的血液试样于试管中，压入橙色药片，放于振

荡器上使其震荡 15s，使样品上下不少于 15 次。之后，将试管置于 65±1℃ 的恒温孵育器中 3min，取出后放入 1750g 的离心力下离心 5min，离心后立即取出试管并将上清液弃去（此时不宜太过用力，防止将有四环素标记的药物甩出，造成结果不准确），并用棉签清理试管壁内侧的残渣，不要接触沉淀物。向试管中加入 300μL 蒸馏水并振荡，使试管内的沉淀物完全破碎，之后向其中加入 3mL 的闪烁液，涡旋混匀至其中不存在不均一的云状物呈现均匀状，放置 1min 后，将试管放入 Charm II 6600/7600 分析仪中，读取 [<sup>3</sup>H] 项的 cpm 值。

#### 2.3.4 控制点的确定

采用阳性对照添加样品，即选取六份已知不含四环素类药物残留的血清样品，按照试剂盒使用说明书的要求加入不同浓度的抗生素，按照上述测定步骤进行测定，得到 6 次计数值，计算其平均值，则可计算出控制点为：平均值 ×（1+20%）。

#### 2.3.5 结果判定

当样品计数值大于控制点时，则判断为阴性样品。当样品计数值小于等于控制点时，则判断为初筛疑似阳性，此时应进行重复检测样品，并同时加测一个阴性对照和阳性对照，从而确定试剂和仪器是否正常工作。其阳性判定标准有两点：一是阴性对照必须在阴性对照平均值的（1±20%）范围内波动；二是阳性对照的计数值必须要小于控制点。如果可以同时满足以上两点，并且重新测试的样品计数值也小于控制点，则可以判断其为阳性样品。

## 3 结果与分析

### 3.1 抗原抗体的竞争性

在 Charm II 放射免疫分析中的受体和 [<sup>3</sup>H] 标记的金霉素抗原的量是固定的，因此对不同药物浓度进行测试，以确定方法灵敏度。将 MSU 萃取缓冲溶液作为含量零的标准溶液，分别取一定量的 MSU 多种抗生素标准品，并依次配制成 10.0μg/kg、20.0μg/kg、50.0μg/kg、100.0μg/kg、200.0μg/kg、500.0μg/kg、1000.0μg/kg 标准溶液，并分别测定其 cpm 值，得到结果见表 1。由此表可以得到，测定的 cpm 值与添加的药物浓度成反比，当到达一定浓度后 cpm 值将不再变化。

表 1 不同药物浓度测定结果

| 浓度 (μg/kg) | 0    | 10   | 20.0 | 50.0 | 100.0 | 200.0 | 500.0 | 1000 |
|------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|------|
| cpm        | 2512 | 2033 | 1753 | 1655 | 1622  | 1611  | 1594  | 1573 |

### 3.2 检出限以及线性范围的确定

选择已知阴性的基质中添加不同浓度的 MSU 多种抗生素标准品进行测试，以确定基质的检测限。分别向羊血清和鸡血清中添加浓度水平为 0μg/kg、10.0μg/kg、20.0μg/kg、30.0μg/kg、40.0μg/kg、50.0μg/kg 的四环素测试，得到结果见表 2。

表 2 不同基质中不同添加水平的测定结果

| 添加水平(μg/kg) | 0    | 10.0 | 20.0 | 30.0 | 40.0 | 50.0 |
|-------------|------|------|------|------|------|------|
| 羊血清         | 1943 | 1458 | 1218 | 1119 | 1013 | 920  |
| 鸡血清         | 1796 | 1399 | 1210 | 1135 | 1020 | 910  |

以添加水平的自然对数  $\ln(\rho)$  为自变量, 分别对羊血清和鸡血清相应质量浓度的 cpm 数值相对值(即相应浓度 cpm 值与阴性控制 cpm 值的比值, B/B0) 进行线性拟合, 得到图 1、图 2 所示结果。

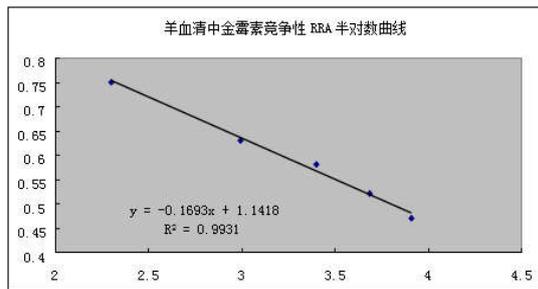


图 1 羊血清  $\ln(\rho)$  与 B/B0 值拟合曲线

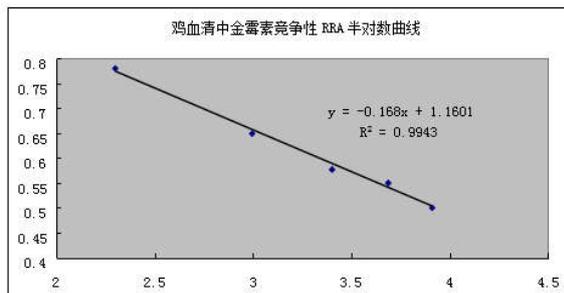


图 2 鸡血清  $\ln(\rho)$  与 B/B0 值拟合曲线

各数据点都较好地分布在拟合曲线两侧, 拟合情况良好, 各种基质中  $\ln(\rho)$  均与 cpm 值存在着良好的线性关系。当结合实际情况来确定其检测限时, 考虑到分析相对标准偏差, 一般要求对样品空白加标与空白样品二者进行测定, 其测定的 cpm 值相对值 (B/B0) 小于 0.6, 据此确定动物血清中金霉素检测最低浓度应大于等于  $20 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

## 4 结论

Charm II 检测方法, 不仅符合中国四环素快速检测要求, 同时也是其他国家采用的快速检测手段, 符合国际标准。使用 Charm II 放射免疫分析法对动物血清中四环素类药物残留进行检测, 可以提高检测效率, 降低了检测成本, 适用于对大量活体动物体内四环素检测的阳性初筛, 具有检测灵敏度高, 稳定性良好, 特异性强, 准确度高等优点, 是一种快速有效的检测动物体内四环素类药物残留的筛选方法。

## 参考文献

- [1] 卢运战, 祁克宗. 四环素类药物残留检测方法研究进展 [J]. 家禽科学, 2006(10):36-39.
- [2] 曹丁丁, 陆利霞, 熊晓辉. 食品中四环素残留检测方法比较分析 [J]. 生物加工过程, 2020, 18(5):636-641.
- [3] 苏明明, 王楠. 放射免疫法快速检测牛血清中四环素类药物 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7(2):629-632.
- [4] 林杰, 黄晓蓉, 郑晶, 等. 放射免疫法快速检测猪尿样中的四环素类药物残留 [J]. 饲料工业, 2009, 30(15):45-47.
- [5] 杜红鸽, 郭芙蓉. 四环素类药物残留分析方法研究进展 [J]. 河南畜牧兽医综合版, 2008, 29(6):13.
- [6] 江羚, 曾昆. 四环素类抗生素快速分析方法研究进展 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(8):15-21.
- [7] 孙广龙, 胡立宏. 四环素类抗生素的研究进展 [J]. 药学研究, 2017, 36(1):1-5.
- [8] 国占宝, 武玉香. 食品中四环素类残留的酶联免疫检测试剂盒的研制 [J]. 食品科学, 2011, 32(2):333-337.
- [9] 刘妮, 叶能胜, 谷学新, 等. 动物源性食品中四环素类残留分析研究进展 [J]. 分析科学学报, 2009, 25(3):351-356.
- [10] 陈妙瑞. 动物性食品中四环素类抗生素残留的 ELISA 检测 [J]. 企业技术开发, 2017, 36(5):47-48.