

猪肝和猪尿中沙丁胺醇和克伦特罗残留的酶联免疫吸附检测法研究

王建平, 沈建忠*

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

摘要: 采用混合酸酐法将沙丁胺醇与牛血清白蛋白偶联, 并免疫家兔制备抗沙丁胺醇抗血清。以间接 ELISA 法测定血清效价, 测得抗血清最佳工作浓度为 1: 6 400, 该抗沙丁胺醇抗血清对克伦特罗有 110% 的交叉反应性。建立了能够同时检测 SAL 和 CL 的间接竞争 ELISA 方法, 该方法对沙丁胺醇的检测范围为 0.48 ng/mL~ 8.0 μ g/mL, 对克伦特罗的检测范围为 0.43 ng/mL~ 7.3 μ g/mL, 对沙丁胺醇的检测灵敏度为 0.48 ng/mL, 对克伦特罗的检测灵敏度为 0.43 ng/mL。在猪肝和猪尿中添加 1~ 50 ng/g (ng/mL) 的沙丁胺醇, 添加回收率为 72.2%~ 84.8%, 变异系数为 4.2%~ 28.3%, 在猪肝和猪尿中添加 1~ 50 ng/g (ng/mL) 的克伦特罗, 添加回收率为 84.3%~ 103.4%, 变异系数为 0.3%~ 35.5%。

关键词: β_2 -兴奋剂; 沙丁胺醇; 克伦特罗; 酶联免疫吸附法; 猪肝; 猪尿

中图分类号: S859.84

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2005)04-0397-05

沙丁胺醇(Salbutamol, SAL)属于 β_2 -兴奋剂的一种, 化学名称为 1-(4-羟基-3-羟甲基苯基)-2-(叔丁氨基)乙醇, 是一种能与 β_2 -肾上腺素能受体结合的药物, 临床上主要用于治疗哮喘、支气管痉挛等。将 SAL 作为饲料添加剂使用, 能显著促进动物生长, 增加饲料转化率和瘦肉率^[1], 长期超量使用, 则会在动物组织中蓄积, 人食用了这种动物产品后会引发中毒。20 世纪 90 年代初欧洲发生了多起 β_2 -兴奋剂中毒事件^[2], 我国从 1998 年至今也有多起中毒事件发生^[3], 因此欧盟各国及我国均做出相应规定禁止其作为饲料添加剂使用。但受经济利益驱使, 仍存在大量非法使用的现象。因此监督、检测动物产品中与饲料中的 β_2 -兴奋剂就成为关系消费者健康的亟待解决的问题。

β_2 -兴奋剂中最常作为促生长剂使用的是克伦特罗(Clenbuterol, CL), 但随着对 CL 检测力度的加大, 非法使用者开始转向其他替代品。由于 SAL 与 CL 的促生长作用相差不大, 其在动物体内的消除时间比克伦特罗短, 毒性较弱, 因此, SAL 就成为 CL 之后最主要的替代品^[4]。但国内对于 SAL 的免疫检测方法研究还处于起步阶段, 因此, 本研究拟制

备 SAL 抗血清, 建立一种简便、可靠、快速、灵敏, 能同时检测 SAL 和 CL 残留的检测方法, 以便对动物组织中的 SAL 和 CL 残留进行监控。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

沙丁胺醇标准品、克伦特罗标准品, 购自中国药品与生物制品检定所; 牛血清白蛋白、卵清蛋白, 购自北京华美生物工程公司; 乙酸乙酯、异丁醇均为分析纯, 购自北京化学试剂公司。

1.2 主要仪器

318MC 型酶标仪。

1.3 试验动物

德国大白兔, 体重 1.5 kg, 共 5 只, 编号为 SAL1 SAL2 SAL3 SAL4 SAL5。

1.4 沙丁胺醇完全抗原的合成

沙丁胺醇属小分子物质, 无免疫原性, 需要连接大分子载体蛋白才具有免疫原性。以琥珀酸酐为交联剂, 采用混合酸酐法将 SAL 与牛血清白蛋白(BSA)偶联, 制备成完全抗原: SAL-BSA^[5,6]。用紫外扫描法进行鉴定并计算偶联比^[7]。

1.5 抗血清制备

制备每只家兔的阴性血清。首次免疫用弗氏完全佐剂(中国兽药监察所)与完全抗原进行乳化, 第 2 次以后用弗氏不完全佐剂(中国兽药监察所)乳化, 共免疫 6 次, 每次间隔 4 周, 免疫剂量均为 1

收稿日期: 2004-02-18

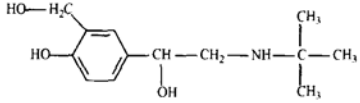
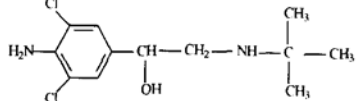
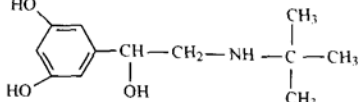
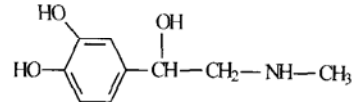
基金项目: 北京市自然科学基金项目(6022011)

作者简介: 王建平(1977-), 男, 河北人, 博士生, 主要研究方向为兽医药理与毒理学

* 通讯作者: 沈建忠, TEL: 010-62732803; E-mail: sjz@cau.edu.cn

mg/kg bw。最后1次免疫7d后心脏采血,分离血清,-20℃保存备用。

表1 几种 α - β -兴奋剂的化学结构式
Table 1 Structure of the several α , β -agonists

名称	化学结构式	受体
沙丁胺醇		β_2 -受体
克伦特罗		β_2 -受体
特布他林		β_2 -受体
肾上腺素		α, β -受体

1.6 抗血清效价与抗原、抗体工作浓度的测定

采用方阵滴定法确定抗血清最佳工作浓度与包被抗原最佳包被浓度。包被抗原为SAL-OA(制备方法同SAL-BSA),倍比稀释后纵向包被酶标板,置4℃过夜,用2%明胶封闭,然后横向加入用含0.05%吐温-20的PBS倍比稀释的SAL抗血清,再加入HRP-羊抗兔IgG,最后加底物邻苯二胺显色,测定492nm处的OD值,确定抗血清效价和抗原、抗体最佳工作浓度。

1.7 间接竞争ELISA方法的建立

1.7.1 抗血清间接竞争ELISA检测 以包被抗原最佳浓度包被酶标板,SAL抗血清以二分之一工作浓度先与等体积倍比稀释的SAL标准液或CL标准液37℃作用1h,再到酶标板上反应,同时以抗血清与同体积PBS混合物为零标准,以PBS溶液为空白对照。再加入HRP-羊抗兔IgG,最后加底物邻苯二胺显色,测定492nm处的OD值。

1.7.2 标准曲线的制作 以1.7.1中所测OD值计算SAL(CL)各浓度的抑制率(I),以其为纵坐标,以SAL(CL)各标准浓度的负对数值(-Log C)为横坐标,绘制出标准回归曲线,计算标准回归曲线的回归方程和相关系数。

1.8 交叉反应率测定

方法同1.7.1,但抗SAL抗血清抑制物分别为

倍比稀释的CL、莱克多巴胺、肾上腺素、去甲肾上腺素、异丙肾上腺素,根据抑制曲线计算抑制抗原抗体结合50%时的各竞争物浓度,以SAL抑制率为50%的浓度与各竞争物浓度之比计算交叉反应率。公式如下:

$$\text{交叉反应性}(\%) = \frac{I_{50}(\text{SAL})}{I_{50}(\text{竞争物})} \times 100$$

1.9 添加回收率测定

1.9.1 猪肝组织中SAL的添加回收率测定 样品来自本动物室饲养的未使用过 β_2 -兴奋剂的试验猪。取猪肝5g,匀浆后添加SAL,加入20mL 0.1mol/L HCl溶液,振荡30min或用超声波提取15min,每5min轻微振荡1次,然后4000r/min离心10min,取上清液用1mol/L NaOH调节pH值至10,加入20mL异丁醇萃取,分出有机相,水浴减压蒸干,用5mL PBS溶解,按1.7.1的方法检测。

1.9.2 猪尿中SAL的添加回收率测定 尿液中添加样品后可直接进行检测,无需提取过程。如尿液混浊,可离心或过滤后再检测。

1.9.3 猪肝组织中CL的添加回收率测定 取猪肝5g,匀浆后添加CL,加入20mL 0.1mol/L HCl溶液,振荡30min或用超声波提取15min,每5min轻微振荡1次,然后4000r/min离心10min,取上清液用1mol/L NaOH调节pH值至12,加入20mL乙酸乙酯萃取,分出有机相,水浴减压蒸干,用5mL PBS溶解,按1.7.1的方法检测。

1.9.4 猪尿中CL的添加回收率测定 尿液中添加样品后可直接进行检测,无需提取过程。

1.9.5 各种样品经前处理后,按1.7.1中的方法进行的操作,检测OD_{492nm}的吸收值,计算抑制率,代入标准回归方程,计算SAL的量,根据交叉反应率计算CL的量,并根据以下公式计算添加回收率:

$$\text{添加回收率}(\%) = \frac{\text{测定值}(\text{ng/g})}{\text{添加值}(\text{ng/g})} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 完全抗原的鉴定

SAL与琥珀酸酐反应所得产物经核磁检测,初步确定已合成半抗原。半抗原与BSA之偶联物经紫外分光光度计全波长扫描,根据吸收峰相加性原理确定已成功偶联,SAL与BSA的偶联比为9:1,SAL与OA的偶联比为6:1。

2.2 抗血清效价测定

选择血清OD值大于阴性血清OD值2倍(即

P/N > 2) 的血清最大稀释倍数为抗血清效价。方阵滴定法所测结果显示 SAL 抗血清的效价为 1:25 600; 选择 OD 值 1.0 左右时的抗原抗体浓度为最佳工作浓度, 则抗血清最佳工作浓度为 1:6 400, SAL-OA 最佳包被浓度为 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 结果见表 2。

表 2 抗沙丁胺醇血清效价检测
Table 2 The titer of anti-SAL serum

SAL-OA /($\mu\text{g}/\text{mL}$)	血清稀释度(1: x)									
	100	200	400	800	1 600	3 200	6 400	12 800	25 600	51 200
14.0	1.285	1.283	1.316	1.276	1.278	1.211	1.075	0.721	0.515	0.326
7.0	1.276	1.271	1.285	1.272	1.28	1.193	1.043	0.807	0.534	0.367
3.5	1.121	1.119	1.125	1.076	1.021	0.823	0.606	0.412	0.238	0.17
1.75	1.103	0.997	0.906	0.826	0.661	0.493	0.355	0.253	0.147	0.133

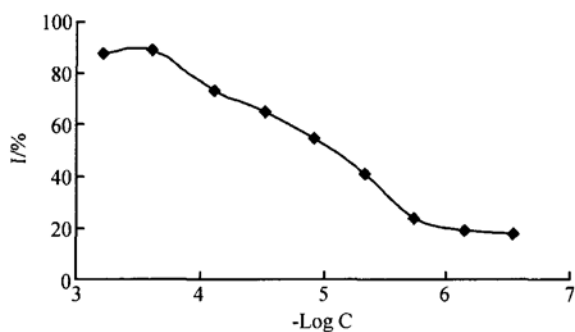


图 1 沙丁胺醇(SAL)间接竞争抑制曲线

Fig. 1 Indirect competitive inhibitory curve of SAL

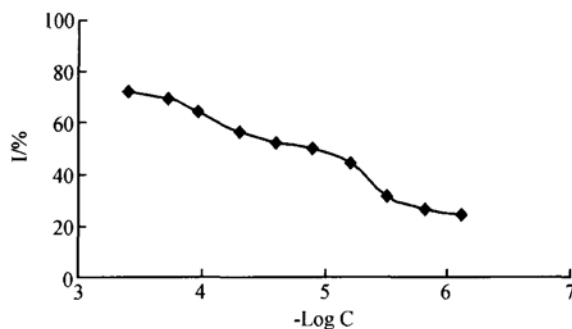


图 2 克伦特罗(CL)间接竞争抑制曲线

Fig. 2 Indirect competitive inhibitory curve of CL

2.3.2 交叉反应性检测 SAL 抗血清对 CL 有 110% 的交叉反应性, 对其他 1 种 β_2 -兴奋剂和 2 种 α , β -兴奋剂均无交叉反应, 结果见表 3。

表 3 抗 SAL 抗血清与各抑制物的交叉反应率
Table 3 Across reactivity with competitors of the anti-SAL serum

竞争物	I_{50} /(ng/mL)	交叉反应率		兴奋剂类型
		交叉反应率 / %	交叉反应率 / % ^[5]	
沙丁胺醇(SAL)	13.2	100	100	β_2
克伦特罗(CL)	11.8	110	115	β_2
莱克多巴胺	> 130 000	-	< 0.01	β_2
肾上腺素	> 130 000	-	< 0.01	α, β
异丙肾上腺素	> 130 000	-	< 0.01	β_1

2.3 间接竞争 ELISA 方法的建立

2.3.1 抗血清间接竞争 ELISA 检测 结果表明, 随着 SAL 浓度的逐渐降低, 抑制率递减, 说明抗血清对 SAL 有较好的选择性, 结果见图 1。同时制作了 CL 对抗 SAL 抗血清的间接竞争抑制曲线, 结果见图 2。

2.3.3 标准曲线的制作 对 I 与 -Log C 进行回归分析, 得到检测 SAL 的线性回归方程为: $y = -13.87x + 117.68$, 相关系数 $r = 0.9987$ 。该方法对 SAL 的检测范围为 0.48 $\text{ng}/\text{mL} \sim 8.0 \mu\text{g}/\text{mL}$, 对 SAL 的检测灵敏度为 0.48 ng/mL , 对 CL 的检测范围为 0.43 $\text{ng}/\text{mL} \sim 7.3 \mu\text{g}/\text{mL}$, 对 CL 的检测灵敏度为 0.43 ng/mL 。

2.4 添加回收率测定

在猪肝和猪尿中按 1, 2, 10, 50 ng/g (ng/mL) 的剂量添加 SAL, 样品经提取后进行检测, 添加回收率为 72.2% ~ 84.8%, 变异系数为 4.2% ~ 28.3%, 说明用异丁醇提取 SAL 完全能够满足残留检测的要求, 结果见表 4。

表4 样品中沙丁胺醇(SAL)添加回收率

Table 4 Recovery of Salbutamol added to samples

样品 Sample	添加值 Added level	检测值 Recovery level	回收率 Recovery / %	变异系 数 CV / %
肝脏 Liver				
1	1 ng/g	0.80 ± 0.2 ng/g	80.0 ± 23.8	28.3
2	2 ng/g	1.54 ± 0.1 ng/g	76.9 ± 7.1	13.7
3	10 ng/g	8.07 ± 0.8 ng/g	80.7 ± 8.0	13.5
4	50 ng/g	42.4 ± 4.1 ng/g	84.8 ± 8.0	13.7
尿液 Urine				
1	1 ng/mL	0.72 ± 0.1 ng/mL	72.2 ± 6.4	7.1
2	2 ng/mL	1.57 ± 0.1 ng/mL	78.6 ± 4.2	4.2
3	10 ng/mL	8.24 ± 0.5 ng/mL	82.4 ± 4.9	5.1
4	50 ng/mL	39.5 ± 2.1 ng/mL	78.9 ± 4.2	4.2

在猪肝和猪尿中按 1、2、10、50 ng/g (ng/mL) 的剂量添加 CL, 样品经提取后用抗 SAL 抗血清进行检测, 添加回收率为 84.3% ~ 103.4%, 变异系数为 0.3% ~ 35.5%, 说明用乙酸乙酯提取 CL 完全能够满足残留检测的要求, 结果见表 5。

表5 样品中克伦特罗(CL)添加回收率检测

Table 5 Recovery of Clenbuterol added to samples

样品 Sample	添加值 Added level	检测值 Recovery level	回收率 Recovery / %	变异系 数 CV / %
肝脏 Liver				
1	1 ng/g	0.88 ± 0.1 ng/g	88.2 ± 5.6	8.3
2	2 ng/g	2.06 ± 0.1 ng/g	103.4 ± 2.8	4.0
3	10 ng/g	9.31 ± 0.02 ng/g	93.1 ± 0.2	0.3
4	50 ng/g	42.2 ± 14.4 ng/g	84.3 ± 28.8	35.5
尿液 Urine				
1	1 ng/mL	0.95 ± 0.03 ng/mL	95.1 ± 3.0	2.5
2	2 ng/mL	1.85 ± 0.04 ng/mL	92.6 ± 2.2	1.9
3	10 ng/mL	9.18 ± 0.4 ng/mL	91.8 ± 3.7	3.1
4	50 ng/mL	46.3 ± 1.8 ng/mL	92.6 ± 3.5	3.1

3 讨论

用本实验室制备的 SAL 抗血清建立的 ELISA 检测法特异性强, 灵敏度高, 可快速检测猪肝、猪尿中的 SAL, 避免了用仪器分析时逐个进行检测的繁

琐过程, 在同一酶标板上可同时检测多个样品, 为实际应用提供了很大的便利。本试验用间接竞争 ELISA 方法检测猪肝、猪尿中 SAL 的含量, 检测灵敏度为 0.48 ng/g (ng/mL), Degand 等^[5]用直接竞争 ELISA 方法检测羊尿中 SAL 的含量, 其灵敏度为 0.14 ng/mL, 与之相比, 本法的灵敏度偏低。尽管本法对猪肝、猪尿中 CL 含量检测的灵敏度为 0.43 ng/g (ng/mL), 与 Elliott 等^[8]报道的用 CL 抗血清检测猪组织中 CL 的灵敏度(0.15 ng/g) 相比偏高, 但本方法用 SAL 抗血清能够同时检测 SAL 和 CL, 为发展 β_2 -兴奋剂的多残留 ELISA 检测法奠定了一定的基础。

由于 SAL 与 CL 结构极为相似, 据 Degand 报道^[5], 抗 SAL 抗血清对克伦特罗有很高的交叉反应率(115%), 可以同时检测 SAL 和 CL。通过交叉反应性检测发现, 本试验所得抗 SAL 抗血清对克伦特罗同样具有较高交叉反应性(110%), 通过猪肝、猪尿中 SAL 和 CL 的添加回收率检测, 证明本试验所得抗 SAL 抗血清可以同时检测 SAL 和 CL, 属于多残留检测, 说明本试验建立的 ELISA 法具有很高的实用价值。如果将本试验进一步深入开展, 研究抗 SAL 抗血清与其他更多种 β_2 -兴奋剂的交叉反应性, 将会为国内研制开发此类药物的多残留 ELISA 试剂盒奠定基础。

Courthyn 等^[9]曾以 CL、SAL 和特布他林为代表详细研究了几种常用溶剂的萃取效率, 选用的有机溶剂有乙酸乙酯、异丁醇、正己烷、2,4-戊二酮、叔丁基甲基醚。其结果显示, 对于 CL, 叔丁基甲基醚、乙酸乙酯的萃取率都在 99% 以上。对于含苯酚结构的药物如 SAL、特布他林, 各参试溶剂的萃取率均低于对克伦特罗的萃取率, 在 pH 9~10 范围内异丁醇萃取率最高(80%), 其次为乙酸乙酯(25%~40%)。本试验采用异丁醇萃取 SAL, 乙酸乙酯萃取 CL, 然后将有机溶剂蒸干再用 PBS 溶解残留物, 进行 ELISA 检测。用异丁醇对猪肝、猪尿液中的 SAL 进行萃取, 回收率为 72.2%~84.8%, 用乙酸乙酯对猪肝、猪尿液中的 CL 进行萃取, 回收率为 84.3%~103.4%, 与文献报道相符, 完全能够满足残留检测的需要。

参考文献:

- [1] Warriss P D, Kestin S C, Rolph T P, et al. The effects of the β_2 -adrenergic agonist salbutamol on

- meat quality in pigs[J]. *Journal of Animal Science*, 1990, 68 (1): 128~ 136.
- [2] Kuiper H A, Noordam M Y, Van Dooren-Flipsen M M, et al. Illegal use of β -adrenergic agonist: european community [J]. *J Anim Sci*, 1998, 76(1): 195~ 207.
- [3] 尹靖东. 饲料中使用 β 兴奋剂的安全性评述[J]. *中国饲料*, 1998, 20: 6~ 8.
- [4] Cater W J, Lynch M E. Comparison of the effects of salbutamol and clenbuterol on skeletal muscle mass and carcass composition in senescent rats [J]. *Metabolism*, 1994, 43(9): 1 119~ 1 125.
- [5] Degand G, Bernes-Duyckaerts A. Determination of β -agonists in urine by an enzyme immunoassay based on the use of an anti-salbutamol antiserum[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1993, 275 : 241~ 247.
- [6] Tijssen P. Practice and theory of enzyme immunoassays [M]. New York: Elsevier Amsterdam, 1985. 27.
- [7] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京大学出版社, 1998.
- [8] Elliott C Y, McCaughy W J, Shortt H D. Residues of the β -agonist clenbuterol in tissues of medicated farm animals [J]. *Food Additives and Contaminants*, 1993, 10(2): 231~ 244.
- [9] Courthyn D, Baakeroot V, de Volder F, et al. Multi-residue enzyme immunoassay for screening for β -agonists in faeces and feeds [J]. *Food Agric Immunol*, 1994, 6: 131~ 139.

Detection of Salbutamol and Clenbuterol in Swine Liver and Swine Urine by Enzyme Linked Immunosorbent Assays

WANG Jian-ping, SHEN Jian-zhong*

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: The β_2 -agonist, salbutamol (SAL) was linked to bovine serum albumin(BSA) using the mixed anhydride method and the anti-SAL serum was acquired in rabbits against the conjugate. The optional dilution of the anti-SAL serum was 1: 6 400 by the indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and the anti-SAL serum has the cross-reactivity of 110% with Clenbuterol (CL). Then an indirect competitive ELISA, which can detect SAL and CL simultaneously, was developed. The limit of detection for SAL was 0.48 ng/mL with the range of detection 0.48 ng/mL~ 8.0 μ g/mL and the limit of detection for CL was 0.43 ng/mL with the range of detection 0.43 ng/mL~ 7.3 μ g/mL. The recovery rates ranged from 72.2% to 84.8% for detecting SAL fortified level of 1~ 50 ng/g (ng/mL) in swine liver and swine urine, the coefficients of variation was 4.2%~ 28.3%; the recovery rates ranged from 84.3% to 103.4% for detecting CL fortified level of 1~ 50 ng/g (ng/mL) in swine liver and swine urine, the coefficients of variation was 0.3%~ 35.5%.

Key words: β_2 -agonist; salbutamol; clenbuterol; enzyme linked immunosorbent assay; swine liver; swine urine

* Corresponding author