

基于特异性调控的氟苯尼考与氟苯尼考胺宽谱免疫分析方法研究

周文玥¹ 杨金易¹ 张咏仪¹ 李然¹ 王弘¹ 徐振林¹
田元新^{*2} 沈玉栋^{*1}

¹(华南农业大学食品学院, 广东省食品质量安全重点实验室, 广州 510642)

²(南方医科大学药学院, 广东省新药筛选重点实验室, 广州 510515)

摘 要 畜禽养殖过程中长期存在氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺共残留问题,目前缺乏同时识别这两种小分子的高特异性免疫分析方法。本研究基于“包被原-抗体-靶标药物分子”三元竞争分子识别机制,通过设计不同包被原调控抗体-抗原亲和力,从而筛选抗体,实现抗体对氟苯尼考及其代谢物的特异性竞争识别。基于此,通过成功筛选的抗体-抗原组合对,开发了可同时特异性识别氟苯尼考及氟苯尼考胺的免疫分析方法。本方法对氟苯尼考及氟苯尼考胺的 IC₅₀ 分别为 10.96 和 8.94 ng/mL,线性检测范围分别为 3.05~39.45 ng/mL 和 2.32~34.46 ng/mL,检出限分别为 1.45 和 1.06 ng/mL。猪肉样本中氟苯尼考及氟苯尼考胺的加标回收率均在 72.1%~96.4%之间, RSD < 3%,与 HPLC-MS/MS 方法检测结果相关性良好(R² = 0.99)。本方法适用于氟苯尼考及其代谢物的快速筛查检测。

关键词 氟苯尼考; 氟苯尼考胺; 包被原; 特异性调控; 免疫分析

氟苯尼考(Florfenicol, FF)是继氯霉素(第一代)和甲砒霉素(第二代)之后的第三代氯霉素类广谱抗菌药,在畜禽养殖过程中常用于治疗和预防细菌感染^[1]。氟苯尼考抗菌谱广,对革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌均有抑制作用。氟苯尼考是由甲砒霉素(Thiamphenicol, TAP)α-甲基位上的羟基被氟原子取代而成(图 1),潜在的致再生障碍性贫血性较低,对许多氯霉素和甲砒霉素的耐药菌株有很好的抑制作用^[2-6]。虽然氟苯尼考安全性和临床效果优于氯霉素和甲砒霉素,但仍具有一定血液毒性、胚胎毒性以及免疫毒性^[7-10]。欧盟及我国都对氟苯尼考在食品中的残留限量进行了严格限定^[11-12],其中,氟苯尼考在不同动物组织中残留限量在 100~3000 μg/kg 之间,并且禁止在产蛋和泌乳期使用,是食品安全日常监测项目,但氟苯尼考在养殖过程中违规使用或者滥用现象仍然广泛存在^[13-14]。氟苯尼考在动物体内的标志残留物为氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺(Florfenicol amine, FFA),其最大限量(Maximum residue limit, MRL)标准以二者总量计^[12]。因此,开发定量检测食品中的氟苯尼考残留具有重要意义。

氟苯尼考和氟苯尼考胺的检测方法主要包括高效液相色谱(HPLC)和色谱-质谱联用(HPLC-MS/MS)等大型仪器分析方法^[15-18],虽然这些方法比较灵敏、准确,但所需仪器昂贵、操作繁琐且对操作的专业要求高,不适于现场高通量筛查。免疫分析方法具有低成本和高通量等优点,与大型仪器确证方法优势互补。近年来,研究者开发了食品中氟苯尼考和氟苯尼考胺残留的免疫分析方法^[19-22],显著提高了畜禽产品兽药残留的检测效率。然而,目前使用的抗体普遍存在与甲砒霉素交叉反应显著或不能同时有效识别氟苯尼考胺等不足^[23-27],难以满足国家标准对氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺总量检测的要求^[12];特别是氟苯尼考与甲砒霉素的最大残留限量不同(氟苯尼考 ≥ 100 μg/kg,甲砒霉素为 50 μg/kg)^[12]。抗体与甲砒霉素显著的交叉反应,必然导致测定结果假阴性与假阳性判断的混淆。因此,探究可特异性同时识别氟苯尼考及其代谢物的免疫分析方法至关重要。

2023-03-17 收稿; 2023-09-23 接受

国家自然科学基金项目(No. 32272400)、广东省基础与应用基础研究项目(Nos. 2019B1515210025, 2018B030314005)和广州市科技计划项目(No. 202206010146)资助。

* E-mail: tyx523@163.com; shenyudong@scau.edu.cn

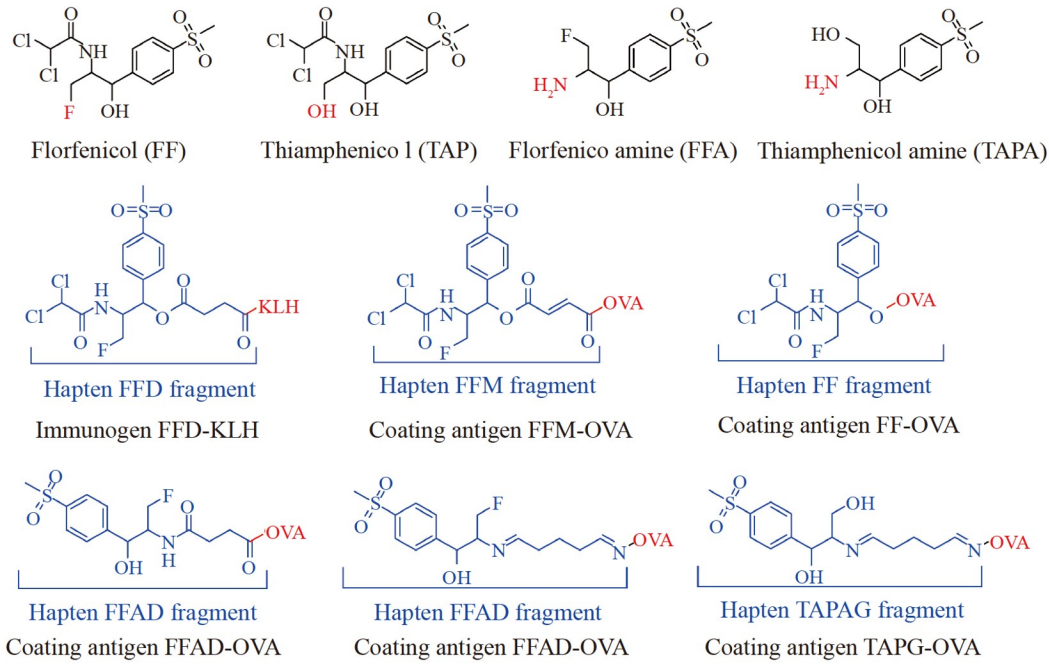


图1 氟苯尼考、甲砒霉素、氟苯尼考胺、甲砒霉素胺与人工抗原结构示意图
KLH, 血蓝蛋白; OVA, 卵清蛋白; FF, 氟苯尼考; FFA, 氟苯尼考胺; TAP, 甲砒霉素; TAPA, 甲砒霉素胺; FFD, 氟苯尼考-丁二酸酐; FFM, 氟苯尼考-马来酸酐; FFAD, 氟苯尼考胺-丁二酸酐; FFAG, 氟苯尼考胺-戊二醛; TAPAG, 甲砒霉素胺-戊二醛; FFD-KLH, 氟苯尼考-丁二酸酐-血蓝蛋白; FFM-OVA, 氟苯尼考-马来酸酐-卵清蛋白; FF-OVA, 氟苯尼考-卵清蛋白; FFAD-OVA, 氟苯尼考胺-丁二酸酐-卵清蛋白; FFAG-OVA, 氟苯尼考胺-戊二醛-卵清蛋白; TAPAG-OVA, 甲砒霉素胺-戊二醛-卵清蛋白

Fig.1 Structures of florfenicol, thiamphenicol, florfenicol amine, thiamphenicol amine and artificial antigens
KLH, keyhole limpet; OVA, ovalbumin; FF, florfenicol; FFA, florfenicol amine; TAP, thiamphenicol; TAPA, thiamphenicol amine; FFD, florfenicol succinic; FFM, florfenicol maleic anhydride; FFAD, florfenicol amine succinic; FFAG, florfenicol amine glutaraldehyde; TAPAG, thiamphenicol amine glutaraldehyde; FFD-KLH, florfenicol succinic-keyhole limpet; FFM-OVA, florfenicol maleic anhydride-ovalbumin; FF-OVA, florfenicol-ovalbumin; FFAD-OVA, florfenicol amine succinic-ovalbumin; FFAG-OVA, florfenicol amine glutaraldehyde-ovalbumin; TAPAG-OVA, thiamphenicol amine glutaraldehyde-ovalbumin

小分子免疫检测基本采用“包被抗原-抗体-靶标药物分子”三元竞争模式(图2)。因此,包被抗原与抗体亲和识别的强弱和方式决定着靶标药物分子竞争结合抗体的难易。包被抗原主要取决于半抗原结构设计的合理性,可通过化学合成方式进行半抗原结构的合理设计和调控。因此,如何利用包被原与抗体的亲和力差异调控抗体对不同小分子靶标的竞争识别特异性和灵敏度值得探索。基于此,考虑到半

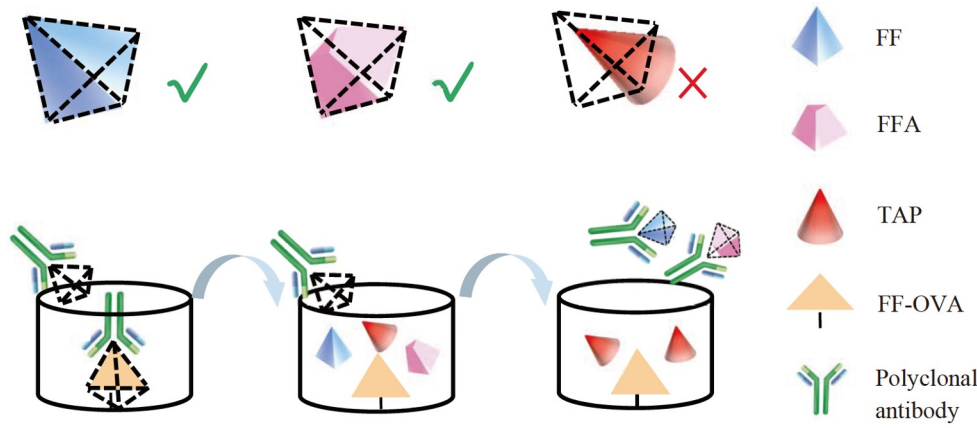


图2 包被抗原-抗体-靶标药物分子三元竞争模式
Fig.2 The ternary competitive system of antigen, antibody and target molecule

抗原不同手臂和偶联位点对抗体结合的影响^[28],本研究通过设计系列不同结构的包被抗原(图 1),考察靶标药物分子被抗体竞争识别的灵敏度与特异性,筛选可同时检测氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的抗体-包被原组合,建立了同时检测氟苯尼考和氟苯尼考胺的间接竞争酶联免疫分析方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Multiskan MK3 酶标仪和 Evolution 300 紫外-可见分光光度计(美国 Thermo 公司); EYELA 旋转蒸发器(东京理化器械株式会社); 氮吹仪(康宁科技有限公司); Water XevoTQ-XS 三重四极杆质谱仪(美国 Waters 公司); AVANCE NEO 600 超导核磁共振谱仪(瑞士 Bruker Biospin AG 公司); AB SCIEX QTRAP4500 高效液相色谱-串联质谱联用仪(美国 AB SCIEX 公司)。

氟苯尼考、氟苯尼考胺、甲矾霉素、氯霉素、四环素、磺胺二甲嘧啶、沙星类和呋喃类等标准品及其它常用化学试剂均购自上海阿拉丁试剂公司; *N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS, 99%)、1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC, 99%)、卵清蛋白(OVA)、血蓝蛋白(KLH)、Freund 佐剂、辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体和 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)底物显色液等购自美国 Sigma 公司; 酶标板(深圳金灿华有限公司); 半抗原 FFD 和 FFM(图 1)为实验室前期自制^[26]。T 缓冲液: Tris-HCl 缓冲液(0.05 mol/L, pH=8.0); 磷酸盐缓冲液 PBS(0.01 mol/L, pH=7.4; 0.025 mol/L, pH=7.5); 洗涤液: 含 0.05% Tween-20 的 PBS 缓冲液(0.01 mol/L, pH=7.4)。

1.2 实验方法

1.2.1 半抗原合成

将 247 mg 氟苯尼考胺与 200 mg 丁二酸酐加入到 4 mL 二氯甲烷中,室温反应 3 h, 反应结束后蒸干并过硅胶柱纯化,蒸干后得到粉末,即为半抗原 FFAD。将 712 mg 甲矾霉素与 130 mg NaOH 加入到 3 mL 水中, 50 °C 水浴加热反应 2 h, 产物混合液用乙酸乙酯萃取 3 次,将萃取液蒸干并过硅胶柱纯化得到淡黄色粉末,即为 TAPA^[29]。

1.2.2 人工抗原合成

根据半抗原活性偶联官能团的特点,采用不同的方法进行人工抗原偶联。通过活泼酯法^[30]将半抗原 FFD 分别与载体蛋白 KLH 和 OVA 偶联,获得免疫原 FFD-KLH; 将半抗原 FFM 和 FFAD 分别与载体蛋白 OVA 偶联获得包被原 FFM-OVA 和 FFAD-OVA; 采用 *N,N*-羰基二咪唑法^[31]将 FF 与载体蛋白 OVA 偶联制备包被原 FF-OVA; 采用戊二醛法^[32]将氟苯尼考和甲矾霉素胺分别与载体蛋白 OVA 偶联获得包被原 FFAG-OVA 和 TAPAG-OVA; 采用紫外扫描法^[33]进行人工抗原鉴定。

1.2.3 抗体的制备与纯化

按照文献^[34]的免疫方案,将免疫原 FFD-KLH 免疫新西兰大白兔,第 3 次免疫 7 d 后,取 1 mL 兔抗血清进行检测,第 4 次免疫后采集兔抗血清,并采用辛酸-硫酸铵沉淀法^[35]纯化,得到多克隆抗体,分装,于 -20 °C 保存备用。

1.2.4 包被原-抗体组合的筛选

将包被原(1 mg/mL)用 PBS 稀释,并加入到 96 孔酶标板中(1 μg/mL, 100 μL/孔),在 37 °C 下孵育过夜。洗板 2 次后,加入 3%脱脂奶粉(120 μL)于 37 °C 下封闭 3 h, 倒去孔内液体,将板倒扣在烘箱中, 37 °C 干燥 1 h, 于 4 °C 保存。将 50 μL 多克隆抗体(一抗)稀释液分别加入 PBS 和 50 μL 系列浓度标准品或其它竞争药物中,混匀后加入到 96 孔酶标板中,于 37 °C 孵育 40 min。洗板 5 次,加入 100 μL HRP-羊抗兔 IgG(二抗), 37 °C 孵育 30 min 后洗板 5 次。随后加入 100 μL 底物显色液, 10 min 后加入 50 μL 2 mol/L H₂SO₄ 以淬灭反应,采用酶标仪在 450 nm 波长处读取孔内吸光值($A_{\max}$),按公式(1)计算抑制率(Inhibition rate, IR),采用 Origin 9.0 软件中的四参数 S 函数拟合并绘制标准曲线。

$$IR(\%) = (1 - B/B_0) \times 100 \quad (1)$$

其中, B_0 为靶标药物浓度为空白时的 $A_{\max}$, B 为加入一定浓度靶标药物时的 $A_{\max}$ 。以 B/B_0 为 90%抑制时四参数 S 函数拟合曲线对应的药物浓度表示检出限(IC₁₀),以 B/B_0 为 50%抑制时对应的药物浓度表示灵

敏度(IC_{50}),以 B/B_0 为 20%~80%抑制时对应的药物浓度为线性范围(IC_{20} ~ IC_{80})。

1.2.5 抗体的特异性

以氟苯尼考为参照,通过考察其结构与功能类似物的交叉反应,评价抗体特异性,具体采用四参数 S 函数拟合并绘制标准曲线,并按公式(2)计算交叉反应率(Cross reactivities, CRs):

$$CRs(\%)=[IC_{50}(\text{Florfenicol})/IC_{50}(\text{Analyte})] \times 100 \quad (2)$$

1.2.6 间接竞争酶联免疫分析(icELISA)方法的建立

按照 1.2.4 节方法确定包被原-抗体组合,通过单因素实验分别对药物和抗体的浓度和稀释缓冲溶液类型、一抗竞争反应时间、酶标二抗稀释液及二抗反应时间进行优化。最适 icELISA 反应条件以 $A_{\max}$ 、 IC_{50} 和 $A_{\max}/IC_{50}$ 3 个因素作为评价标准,当 $A_{\max}$ 在 1.0~1.5 之间、 $A_{\max}/IC_{50}$ 较高、 IC_{50} 较低时为 icELISA 的最适工作条件^[27]。以靶标药物质量浓度为横坐标、 B/B_0 为纵坐标,采用四参数 S 函数拟合并绘制检测氟苯尼考及氟苯尼考胺的 icELISA 标准曲线。

1.2.7 精密度和稳定性

取不同批次包被的酶标板和置于 37 °C 下保存 0、2、4、6 d 的同一批次包被的酶标板,在相同条件下进行氟苯尼考的 icELISA 实验,采用四参数 S 函数拟合并绘制曲线,通过 IC_{50} 、 $A_{\max}$ 和 IC_{20} ~ IC_{80} 进行精密度和稳定性评判。

1.2.8 样品前处理及加标回收实验

猪肉样品购于当地市场,用搅碎机充分均质,经仪器检测验证为阴性样品。称取均质阴性猪肉 5 g,置于 50 mL 离心管中,加入 1 mL 氨水和 9 mL 乙酸乙酯,再加入 5 g NaCl 以沉淀蛋白,涡旋 5 min 后离心 5 min,上清液于 65 °C 氮吹至干后加入 5 mL PBS 复溶,加入 2 mL 正己烷去脂后弃去有机层,下层水溶液过 0.22 μm 滤膜后作为样品测试液备用。将样品测试液用 PBS 稀释 6 倍后用于检测,此时猪肉的基质效应可忽略不计。

在所建 icELISA 方法的检测范围内,向均质阴性猪肉样品中添加低、中、高 3 个浓度水平的靶标药物标准品,经前处理后分别采用所建 icELISA 方法和 HPLC-MS/MS 方法^[40]测定(HPLC-MS/MS 的检测条件见电子版文后支持信息表 S1)。

1.2.9 分子模拟

采用软件 Chem Draw 绘制出氟苯尼考、氟苯尼考胺及甲砒霉素与包被抗原 FF-OVA 表位模拟物 FF-Lys(即半抗原偶联卵清白蛋白赖氨酸残基的表位结构)分子结构,分子几何结构优化采用 Gaussian 16 软件包的密度泛函(DFT)方法在 B3LYP 水平、重原子 Cl 和 S 原子采用赝势函数 LANL2DZ、轻原子(C、H、O、N 和 F)采用 6-31G(d, p)基组进行计算;基于量化优化的几何结构,采用薛定谔(Schrodinger)软件包进行共轭模式分子叠合。

2 结果与讨论

2.1 半抗原设计合成

半抗原结构对小分子化合物抗体的特异性具有决定作用^[28]。氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺、甲砒霉素均由苯环及复杂侧链结构形成分子骨架,因此,涵盖分子整体骨架的半抗原在偶联蛋白载体后会更容易诱导产生特异性免疫应答。此外,不同于免疫半抗原结构的异源包被半抗原,因结构差异可能导致与抗体结合力弱于免疫半抗原(同源半抗原),从而提高了靶标药物分子竞争结合抗体的能力,改变特异性和改善灵敏度^[33,36-37]。本研究基于特征碎片结构、偶联位点及手臂等多种考虑,设计了系列包被半抗原及抗原(图 1),用于考察其对抗体识别靶标药物分子特异性与灵敏度的影响。半抗原经波谱鉴定合成成功。FFAD:ESI-MS analysis (negative) m/z 346 $[M-H]^-$; 1H -NMR (600 MHz, d_4 -Methanol) δ 7.93 (m, 2H), 7.67 (dd, $J = 16.2, 8.4$ Hz, 2H), 5.05 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H), 4.59 (m, 1H), 4.37 (m, 2H), 3.12 (s, 3H), 2.54 (m, 2H), 2.43 (m, 2H). TAPA: ESI-MS analysis (positive) m/z :246.59 $[M+H]^+$; 1H -NMR (600 MHz, d_6 -DMSO) δ 7.90 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 7.62 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H), 4.73 (d, $J = 6.5$ Hz, 1H), 3.40 (d, $J = 6.6$ Hz, 1H), 3.23 (dd, $J = 10.7, 4.9$ Hz, 1H), 3.20 (s, 3H), 2.97 (dd, $J = 11.1, 5.8$ Hz, 1H).

2.2 人工抗原制备

包被抗原间隔臂可以有效调控抗体对包被原和靶标药物分子的亲和力,调节竞争性免疫分析的效价和灵敏度,改善免疫分析性能^[28]。半抗原、人工抗原和载体蛋白均具有各自的特征紫外吸收峰($A_{\max}$),人工抗原制备成功后,由于分子间的共价键共轭及电子的转移,导致原载体蛋白的特征吸收峰的位置和峰形均会发生变化^[38]。UV-Vis 光谱扫描结果如图 3 所示,相比于载体蛋白 OVA 和 KLH,人工抗原 FFAG-OVA、FF-OVA、TAPAG-OVA、FFAD-OVA、FFM-OVA 和 FFD-KLH 吸收峰形均发生改变或偏移,说明人工抗原制备成功。此外,血清具有特异性抑制,说明动物体内产生了特异性抗体,也证明人工抗原合成成功。

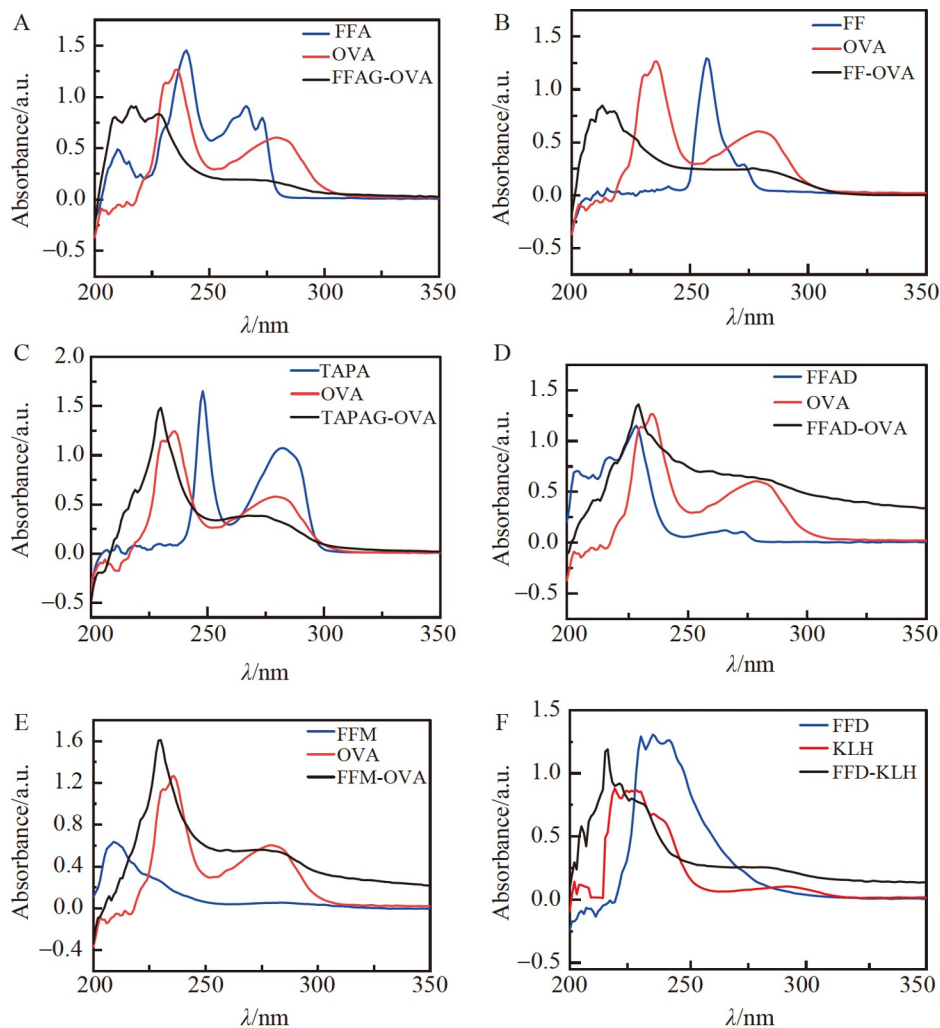


图3 抗原、半抗原及载体蛋白的紫外吸收光谱: (A)FFAG-OVA、FFA 和 OVA; (B)FF-OVA、FF 和 OVA; (C)TAPAG-OVA、TAPA 和 OVA; (D)FFAD-OVA、FFAD 和 OVA; (E)FFM-OVA、FFM 和 OVA; (F)FFD-KLH、FFD 和 KLH

Fig.3 Ultraviolet (UV) absorption spectra: (A) FFAG-OVA, FFA and OVA; (B) FF-OVA, FF and OVA; (C) TAPAG-OVA, TAPA and OVA; (D) FFAD-OVA, FFAD and OVA; (E) FFM-OVA, FFM and OVA; (F) FFD-KLH, FFD and KLH

2.3 抗体特异性与灵敏度调控

以交叉反应率为指标,采用不同结构异源包被原对抗体特异性与灵敏度进行调控,结果见表 1 和图 4。当分别采用包被原 FFAG-OVA 和 FFAD-OVA 时,抗体与甲砒霉素存在显著交叉反应且灵敏度不佳(IC_{50} 分别为 76 和 60 ng/mL); 虽然 FFM-OVA 为包被原时对氟苯尼考具备高灵敏度(IC_{50} 为 1 ng/mL),但对甲砒霉素交叉反应率达到了 40%,对氟苯尼考及氟苯尼考胺的类识别不具备特异性; 当采用

表1 包被原介导的抗体性能
Table 1 The performance of antibody mediated by different coating antigens

包被原 Coating antigen	效价 Titer (×10 ³)	灵敏度	交叉反应率	
		IC ₅₀ /(ng/mL)	Cross reactivities (CRs)/%	
		氟苯尼考 FF	氟苯尼考胺 FFA	甲砒霉素 TAPA
FFAG-OVA	32	76	61	27
FFAD-OVA	64	60	75	10
TAPAG-OVA	32	50	70	1
FF-OVA	2	15	80	2
FFM-OVA	4	1	4	40

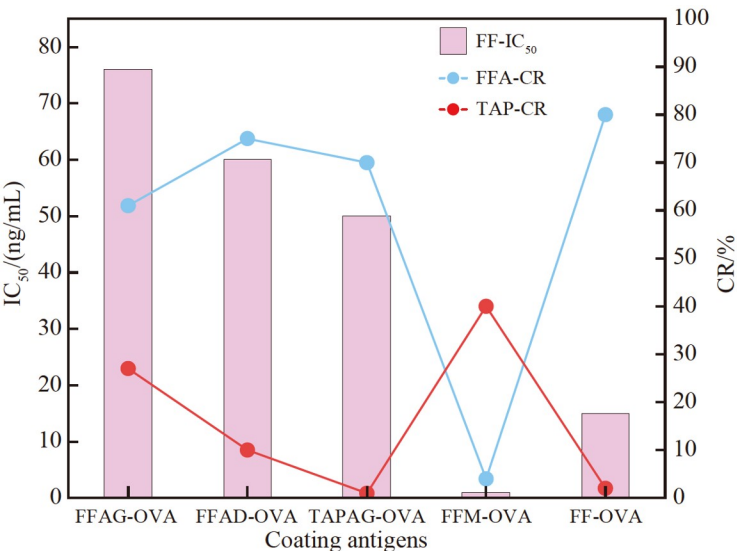


图4 包被原介导的抗体性能分析对比
Fig.4 Performance analysis and comparison of antibody mediated by different coating antigens

TAPAG-OVA 为包被原时,虽然实现了氟苯尼考及氟苯尼考胺的同时特异性识别,但灵敏度欠佳(IC₅₀ 为 76 ng/mL); 当采用 FF-OVA 作为包被原时,对氟苯尼考及氟苯尼考胺识别具有良好的类特异性,并且灵敏度较好(IC₅₀ 为 15 ng/mL)。将氟苯尼考、氟苯尼考胺及甲磺霉素同时与包被抗原 FF-OVA 表位模拟物 FF-Lys 进行叠合分子模拟,发现甲磺霉素叠合度较差(图 5),可能导致无法有效从抗体-抗原复合物中竞争置换 FF-Lys 表位,从而不具备识别甲磺霉素的能力,因此显示出对氟苯尼考和氟苯尼考胺的良好类特异性。因此,选定包被原 FF-OVA 建立氟苯尼考和氟苯尼考胺的 icELISA 检测方法。

2.4 标准曲线的建立

通过 2.3 节的方法确定包被原-抗体组合工作的最佳条件为: 0.33 μg/mL 包被原-抗体; 一抗竞争稀释溶液为 PBS 溶液(0.025 mol/L, pH=7.5); 靶标药物稀释溶液为 PBS; 酶标二抗浓度为 0.20 μg/mL, 稀释液为 T 缓冲液,反应时间 30 min。根据确定的最佳条件,绘制氟苯尼考和氟苯尼考胺的 icELISA 标准曲线(图 6),氟苯尼考的 IC₅₀ 为 10.96 ng/mL, 线性检测范围为 3.05~39.45 ng/mL, 检出限为 1.45 ng/mL; 氟苯尼考胺的 IC₅₀ 为 8.94 ng/mL, 线性范围为 2.32~36.46 ng/mL, 检出限为 1.06 ng/mL。与文献报道的检测氟苯尼考、氟苯尼考胺和甲磺霉素的方法相比(表 2),本方法线性范围较宽、灵敏度较好,并且在标准曲线工作浓度范围内,氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺标准曲线均高度吻合(图 6),这更有利于实现氟苯尼考及氟苯尼考胺准确的同时定量分析。

2.5 特异性

以氟苯尼考的 CRs = 100%作为参照,测定所选包被原-抗体组合下的功能结构类似物的 CRs,典型抗

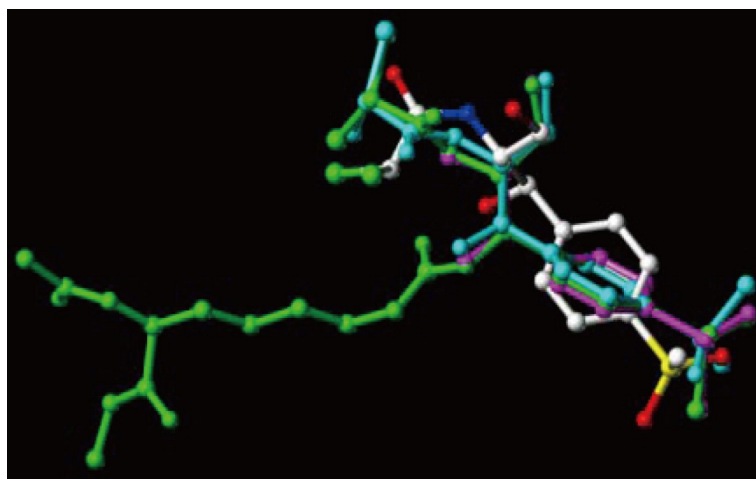


图5 甲砒霉素(灰色)、氟苯尼考(青色)、氟苯尼考胺(紫色)与 FF-OVA 模拟半抗原 FF-Lys(绿色)叠合图

Fig.5 Superposition diagram of TAP (Gray), FF (Cyan), FFA (Purple) and hapten mimic FF-Lys (Green)

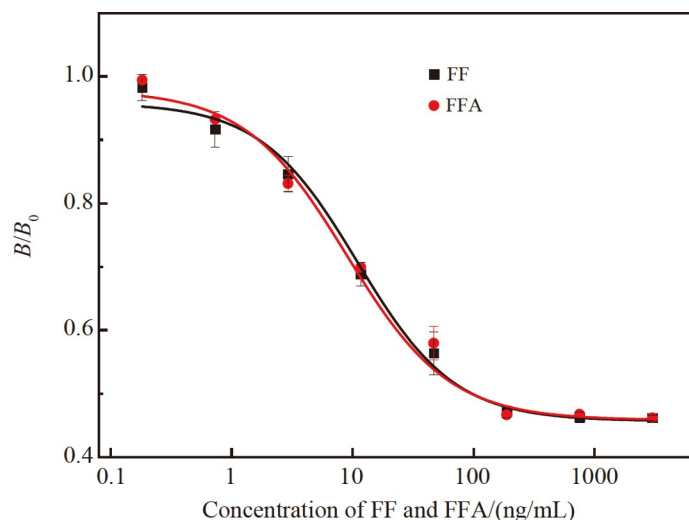


图6 氟苯尼考及氟苯尼考胺间接竞争酶联免疫吸附分析(icELISA)标准曲线

Fig.6 Dose-response curve for FF and FFA in indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) ($n=3$)

生素如氯霉素、甲砒雷素、沙星类、呋喃类、四环素和磺胺二甲嘧啶等均无明显交叉反应(见电子版文后支持信息表 S2),说明所开发的 icELISA 对氟苯尼考及氟苯尼考胺的类特异性良好。

2.6 精密度与稳定性

根据 1.2.7 节的方法考察方法的精密度和稳定性,结果见电子版文后支持信息表 S3 和表 S4。批间 IC_{50} 的平均值为 9.85 ng/mL, A_{max} 平均值为 1.61, $RSD < 10\%$; 置于 37 °C 下存放不同时间的包被酶标板的 IC_{50} 平均值为 9.54 ng/mL, A_{max} 平均值为 1.16, $RSD < 9\%$,说明所建立的 icELISA 方法稳定、可靠。

2.7 加标回收实验

采用建立的 icELISA 方法检测猪肉中氟苯尼考和氟苯尼考胺的浓度,以验证本方法的实用性,结果见表 3。采用 icELISA 方法,氟苯尼考的加标回收率为 78.0%~96.4%, $RSD < 2\%$,氟苯尼考胺的加标回收率为 72.1%~75.9%, $RSD < 3\%$,与 HPLC-MS/MS 确证方法^[40]检测结果一致。将两种方法的检测结果进行线性回归分析,回归方程为 $y = 0.99x - 1.68$, $R^2 = 0.99$ (见电子版文后支持信息图 S1),说明此 icELISA 方法具有良好的实用性,准确度能达到检测要求,可用于实际样本检测。

表2 氟苯尼考、氟苯尼考胺与甲砒霉素的免疫分析方法比较

Table 2 Comparison of immunoassay methods for FF, FFA and TAPA

方法 Method	样品 Sample	靶标物 Target	交叉反应率 CRs/%		线性范围 Linear range/ (ng/mL)	参考文献 Ref.
			甲砒霉素 TAP	氟苯尼考胺 FFA		
icELISA	牛奶, 蜂蜜 Milk, Honey	氟苯尼考, 甲砒霉素 FF, TAP	641	1	0.11~1.36	[23]
icELISA	鸡蛋 Egg	氟苯尼考, 甲砒霉素 FF, TAP	74	1	0.05~1.42	[24]
FMs-LFA	牛奶 Milk	氟苯尼考, 甲砒霉素 FF, TAP	237	1	不适用 Not applicable	[25]
icELISA	畜禽肉, 尿液 Meat, Urine	氟苯尼考, 甲砒霉素 FF, TAP	62	不适用 Not applicable	0.31~11.20	[26]
GICA	鸡肉 Chicken	氟苯尼考, 氟苯尼考胺 FF, FFA	20	0.3	不适用 Not applicable	[39]
icELISA	猪肉 Pork	氟苯尼考, 氟苯尼考胺 FF, FFA	5.5	82	2.32~39.45	本工作 This work

表3 实际猪肉样本加标回收实验结果

Table 3 Spiking recoveries of FF and FFA in blank pork samples

检测目标 Tested object	添加值 Spiked/ (ng/mL(g))	icELISA			HPLC-MS/MS		
		检测值 Found/ (ng/mL(g))	回收率 Recovery/ %	相对标准偏差 RSD/ (%, n=3)	检测值 Found/ (ng/mL(g))	回收率 Recovery/ %	相对标准偏差 RSD/ (%, n=3)
氟苯尼考 FF	18	17.4	96.4	1.3	15.6	86.7	2.1
	54	42.1	78.0	1.8	43.2	79.9	2.0
	108	94.9	87.9	1.2	86.6	80.1	10.0
氟苯尼考胺 FFA	30	21.6	72.1	1.3	138.8	77.0	1.2
	90	68.4	75.9	2.5	64.8	71.9	0.1
	180	133.8	74.3	2.3	134.2	74.5	1.3

3 结论

基于“包被原-抗体-靶标药物分子”三元竞争分子识别体系,通过包被原介导调控抗体对靶标药物分子竞争识别的灵敏度及特异性,开发了可同时特异性识别氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的 icELISA 方法,二者的检出限分别低至 1.45 和 1.06 ng/mL,与甲砒霉素和氯霉素等多种类似物均无明显交叉反应,与 HPLC-MS/MS 方法检测结果的相关性良好($R^2 = 0.99$),适用于实际样品中氟苯尼考及其代谢物氟苯尼考胺的快速筛查检测。包被原对特异性的调控策略可为方法的优化与分析性能的调控提供参考。

References

[1] LI Xian-Qiang, Chin. J. Vet. Drug, 2016, 50(11): 5-8.
李先强. 中国兽药杂志, 2016, 50(11): 5-8.

[2] ZHAO Xia, WANG Bo, XIE Kai-Zhou, WANG Ya-Juan, GUO Ya-Wen, BU Xiao-Na, LIU Chu-Jun. Chin. J. Anal. Lab. , 2018, 37(8): 978-985.
赵霞, 王波, 谢恺舟, 王雅娟, 郭亚文, 卜晓娜, 刘楚君. 分析试验室, 2018, 37(8): 978-985.

[3] SAMS R A. J. Tieraerzt. Umsch. , 1995, 50: 703-711.

[4] SCHWARZ S, KEHRENBURG C, DOUBLET B, CLOECKAERT A. FEMS Microbiol. Rev. , 2004, 28(5): 519-542.

[5] WEI C F, CHANG S K, SHIEN J H, KUO H C, CHEN W Y, CHOU C C. Vet. Rec. , 2016, 178(13): 319.

- [6] FODEY T L, GEORGE S E, TRAYNOR I M, DELAHAUT P, KENNEDY D G, ELLIOTT C T, CROOKS S R H. *J. Immunol. Methods*, 2013, 393(1-2): 30-37.
- [7] HASSANIN O, ABDALLAH F, AWAD A. *Vet. Res. Commun.*, 2013, 38(1): 51-58.
- [8] HU D, HAN Z, LI C, LV L, CHENG Z, LIU S. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 2016, 38(6): 472-485.
- [9] HU D, ZHANG T, ZHANG Z, WANG G, WANG F, QU Y, NIU Y, LIU S. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2014, 162(3-4): 122-131.
- [10] AN L, WANG Y, PAN Y, TAO Y, CHEN D, LIU Z, YANG W, PENG D, YUAN Z. *Food Anal. Methods*, 2016, 9(9): 2434-2443.
- [11] Commission Regulation (EU) No. 37/2010. on Pharmacologically Active Substances and Their Classification Regarding Maximum Residue Limits in Foodstuffs of Animal Origin. Official Journal of the European Union, 2010. (L15), 1-72.
- [12] GB 31650-2019. National Food Safety Standard-Maximum Residue Limits of Veterinary Drugs in Food. National Standards of the People's Republic of China.
食品安全国家标准 食品中兽药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准. GB 31650-2019.
- [13] ZHANG Zhen-Zhen, YANG Wei-Jun, HAN Chun-Zheng, YANG Hai-Juan. *Chin. J. Vet. Med.*, 2022, 58(12): 124-127.
张珍珍, 杨卫军, 韩春政, 杨海娟. 中国兽医杂志, 2022, 58(12): 124-127.
- [14] SUN Chun-Biao. *Zhejiang J. Anim. Sci. Vet. Med.*, 2022, 47(3): 18-30.
孙春标. 浙江畜牧兽医, 2022, 47(3): 18-30.
- [15] SHIROMA L S, QUEIROZ S C N, JONSSON C M, BOTTOLI C B G. *Food Anal. Methods*, 2020, 13(1): 291-302.
- [16] WANG T, ZHANG D, ZHANG Z, HAN J, WANG Y, TANG X. *J. Iran Chem. Soc.*, 2016, 13(10): 1759-1765.
- [17] QIAN M R, ZHOU D N, WANG Q Y, GAO J D, LI D, LI Y C, YANG B. *Food Addit. Contam. Part A*, 2019, 36(8): 1218-1227.
- [18] WANG Z, BEIER R C, SHEN J. *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2017, 92: 42-61.
- [19] WANG Z F, LUO J Q, ZHAO Y F, LUO P J. *Food Agric. Immunol.*, 2020, 31(1): 864-875.
- [20] DU J, MA B, LI J, WANG Y, DOU T, XU S, ZHANG M. *Front. Chem.*, 2022, 9: 815189.
- [21] CHEN B, SHEN X, LI Z, WANG J, LI X, XU Z, SHEN Y, LEI Y, HUANG X, WANG X, LEI H. *Foods*, 2022, 11(3): 324.
- [22] ZHANG Y Y, LI L H, WANG Y, WANG H, XU Z L, TIAN Y X, SUN Y M, YANG J Y, SHEN Y D. *Biosens. Bioelectron.*, 2022, 205: 114089.
- [23] GUO L, SONG S, LIU L, PENG J, KUANG H, XU C. *Biomed. Chromatogr.*, 2015, 29(9): 1432-1439.
- [24] LEI X, XU L, SONG S, LIU L, KUANG H. *Food Agric. Immunol.*, 2018, 29(1): 254-266.
- [25] WANG J Y, WANG Q, ZHENG Y J, PENG T, YAO K, XIE S L, ZHANG X Y, XIA X, LI J C, JIANG H Y. *Food Agric. Immunol.*, 2017, 29(1): 56-66.
- [26] LI Ran, LIN Ze-Jia, YANG Jin-Yi, XU Zhen-Lin, WANG Hong, LEI Hong-Tao, SUN Yuan-Ming, SHEN Yu-Dong. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2018, 46(8): 1321-1328.
李然, 林泽佳, 杨金易, 徐振林, 王弘, 雷红涛, 孙远明, 沈玉栋. 分析化学, 2018, 46(8): 1321-1328.
- [27] XIE Mei-Chan, YANG Jin-Yi, LI Ran, XIAO Zhi-Li, WANG Hong, XU Zhen-Lin, SUN Yuan-Ming, SHEN Yu-Dong. *J. Instrum. Anal.*, 2021, 40(9): 1380-1385.
谢美婵, 杨金易, 李然, 肖治理, 王弘, 徐振林, 孙远明, 沈玉栋. 分析测试学报, 2021, 40(9): 1380-1385.
- [28] BAI Y, LIU R, DOU L, WU W, YU W, WEN K, YU X, SHEN J, WANG Z. *Anal. Chim. Acta*, 2023, 1239: 340699.
- [29] MAGOULAS G E, KOSTOPOULOU O N, GARNELIS T, ATHANASSOPOULOS C M, KOURNOUTOU G G, LEOTSINIDIS M, DINOS G P, PAPAIOANNOU D, KALPAXIS D L. *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, 23(13): 3163-3174.
- [30] XIAO Zhi-Li, WANG Hong, SHEN Yu-Dong, LEI Hong-Tao, WU Qing, YANG Jin-Yi, SUN Yuan-Ming. *Mod. Food Sci. Technol.*, 2012, 28(8): 975-978.
肖治理, 王弘, 沈玉栋, 雷红涛, 吴青, 杨金易, 孙远明. 现代食品科技, 2012, 28(8): 975-978.
- [31] ZHAO D, HE L, PU C, DENG A. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391(7): 2653-2661.
- [32] SHEU S Y, WANG Y K, TAI Y T, LEI Y C, CHANG T H, YAO C H, KUO T F. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2013, 34(4): 438-452.
- [33] CHEN Z J, LIU X X, XIAO Z L, FU H J, HUANG Y P, HUANG S Y, SHEN Y D, HE F, YANG X X, HAMMOCK B, XU Z L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2020, 196: 110533.
- [34] CHEN H Y, ZHANG Y Y, HUA Y T, TIAN Y X, WANG H, XIAO Z L, TAN X C, SHEN Y D, YANG J Y. *Food Addit. Contam. Part A*, 2021, 38(6): 892-903.
- [35] WANG W B, LIU L Q, SONG S S, XU L G, KUANG H, ZHU J P, XU C L. *Microchim. Acta*, 2017, 184(3): 715-724.
- [36] CHEN Z J, WU H L, XIAO Z L, FU H J, SHEN Y D, LUO L, WANG H, LEI H T, HONGSIBSONG S, XU Z L. *J. Hazard. Mater.*, 2021, 412: 125241.
- [37] LU N, LING L, GUAN T, WANG L, WANG D, ZHOU J, RUAN T, SHEN X, LI X, SUN Y, LEI H. *Toxicol.*, 2020, 175: 44-48.

- [38] ZHANG Y, WANG L, SHEN X, WEI X, HUANG X, LIU Y, SUN X, WANG Z, SUN Y, XU Z, EREMIN S A, LEI H. *J. Agric. Food Chem.*, 2017, 65(23): 4830-4838.
- [39] PI Jiang-Yi, HU Jia-Yong, WANG Wei, LIU Guo-Jiao, LIN Jin, ZHOU Tao-Hong. *Food Sci.*, 2021, 42(12): 255-260.
皮江一, 胡家勇, 汪薇, 刘国娇, 林津, 周陶鸿. *食品科学*, 2021, 42(12): 255-260.
- [40] SN/T 1865-2016. Determination of Thiamphenicol, Florfenicol and Florfenicol Amine Residues in Animal-derived Food for Export—LC-MS/MS Method. The State Administration for Entry-Exit Inspection and Quarantine of the People's Republic of China.
出口动物源食品中甲砒霉素、氟甲砒霉素和氟苯尼考胺残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法. 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准. SN/T 1865-2016.

Development of Competitive Regulation-based Immunoassay Method for Detecting Florfenicol and Florfenicol Amine in Group-Specific Manner

ZHOU Wen-Yue¹, YANG Jin-Yi¹, ZHANG Yong-Yi¹, LI Ran¹, WANG Hong¹, XU Zhen-Lin¹,
TIAN Yuan-Xin^{*2}, SHEN Yu-Dong^{*1}

¹(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

²(Guangdong Provincial Key Laboratory of New Drug Screening, School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract The residue of florfenicol (FF) and its metabolite, florfenicol amide (FFA), in livestock farming is a serious issue, and it is important to establish a simultaneous detection method for the two drugs. Series coating antigens were designed to regulate the antibody-antigen affinity and specific recognition to FF and FFA in this study. Then, an immunoassay was developed for simultaneous detection of FF and FFA based on the ternary competitive molecular recognition system of “coating-antibody-target molecule”. This method showed an IC₅₀ value of 10.96 ng/mL for FF and 8.94 ng/mL for FFA, and the linear detection ranges were 3.05–39.45 ng/mL with a limit of detection (LOD, IC₁₀) of 1.45 ng/mL for FF and 2.32–34.46 ng/mL with a LOD of 1.06 ng/mL for FFA, respectively. The recoveries of FF and FFA in pork samples were 72.1%–96.4% with relative standard deviation (RSD) less than 3%, which were well correlated with the detection results of the high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry ($R^2=0.99$). This method was suitable for rapid screening of FF and FFA in actual samples.

Keywords Florfenicol; Florfenicol amine; Coating antigen; Specific regulation; Immunoassay

(Received 2023-03-17; accepted 2023-09-23)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32272400), the Guangdong Basic and Applied Basic Research Foundation (Nos. 2019B1515210025, 2018B030314005) and the Science and Technology Planning Project of Guangzhou City (No. 202206010146).