

# 动物性食品中氨苯砒 dcELISA 的检测\*

郑小娇, 张晶, 张亚卓, 史晨杉, 王向红

(河北农业大学 食品科技学院, 河北 保定, 071001)

**摘要** 建立了动物性食品中氨苯砒残留快速检测技术。将氨苯砒重氮化后连接到牛血清蛋白(BSA)上制得免疫原 BSA-DDS, 免疫新西兰大耳白兔获得多克隆抗体, 经 ProteinA-Sepharose 4B 对抗体进行纯化, 在此基础上建立直接竞争 ELISA 方法。结果显示:该方法可制备目标抗原 BSA-DDS 和抗体, 氨苯砒与载体蛋白偶联比可达到 1:10; 建立的直接竞争 ELISA 方法的  $IC_{50}$  为 4.78 ng/mL, 最低检测限达 0.03 ng/mL, 加标回收率为 75.45% ~ 91.75%。

**关键词** 氨苯砒; 多克隆抗体; ELISA

氨苯砒(dapsone, DDS) 俗称二氨基二苯砒, 双氨基双苯砒, 分子式为  $C_{12}H_{12}N_2O_2S$ , 相对分子质量为 248.30, 为砒类抑菌剂, 多用于麻风病<sup>[1]</sup>和某些皮肤病的治疗<sup>[2]</sup>, 对麻风杆菌有较强的抑菌作用, 大剂量使用时显示杀菌作用。由于其作用机制与磺胺类药物相似, 两者具有协同增效作用, 在动物和水产养殖中常作为磺胺增效剂使用<sup>[3]</sup>。然而氨苯砒毒性较大, 可将血红蛋白氧化成没有携氧能力的高铁血红蛋白, 引起血液系统反应, 如高铁血红蛋白血症和溶血性贫血<sup>[1-2, 4]</sup>, 还可能造成粒细胞缺乏症、周围神经炎、肝肾功能损害和精神障碍, 严重者可致死亡<sup>[3]</sup>, 因此我国农业部 193 号、235 号公告明确规定禁止以任何形式在所有食品动物中使用, 且在动物性食品中不得检出<sup>[5]</sup>; 欧盟 2377/90、37/2010 也明确规定氨苯砒为禁用药物<sup>[6-7]</sup>。

目前, 国内外关于食品中氨苯砒残留检测的报道较少, 且多与磺胺类药物同时检测, 研究方法主要有高效液相色谱法<sup>[8-9]</sup>和液质联用法<sup>[4, 10-13]</sup>。仪器方法可以精确地进行定量分析, 但设备昂贵、操作复杂、对样品纯度要求较高、检测成本高、周期长, 只能用于小批量样本抽检, 无法满足食品安全检测中对大批量样本现场快速筛查的需要。而酶联免疫吸附技术(ELISA)具有敏感度高、特异性强、快速简便等优点<sup>[14]</sup>, 适合于大批量动物源食品中氨苯砒残留的筛选和定量检测。因此, 本研究采用重氮化法制备 BSA-DDS 人工抗原, 免疫动物后获得的多克隆抗体,

建立了直接竞争酶联免疫吸附(ELISA)的方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试剂与仪器

新西兰大耳白兔(雄性), 河北全友实验动物养殖场; 氨苯砒(DDS), 德国 Dr. Ehrenstorfer 公司, 含量 98.5%; 牛血清白蛋白(BSA), Sigma 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂, Sigma 公司; 辣根过氧化物酶羊抗兔, 北京索莱宝科技有限公司;  $NaNO_2$ 、 $Na_2CO_3$ 、 $NaHCO_3$ 、 $NaH_2PO_4$ 、 $Na_2HPO_4$ 、 $NaCl$ (分析纯), 天津市科密欧试剂有限公司;

电子感量分析天平, 北京赛多利斯仪器有限公司; UV-2802H 型紫外可见分光光度计, 上海尤尼克仪器有限公司; 96 孔酶标板(Costar); 酶标仪(Thermo); 洗板机(Thermo); 8 道微量移液器(BIOHIT); SK-1 型涡旋混匀器, 麒麟医仪; SK5200H 超声仪, 上海科导。

### 1.2 DDS 完全抗原的制备

采用重氮化法将半抗原 DDS 与载体蛋白 BSA 相偶联, 制备氨苯砒人工免疫抗原, 合成路线见图 1。

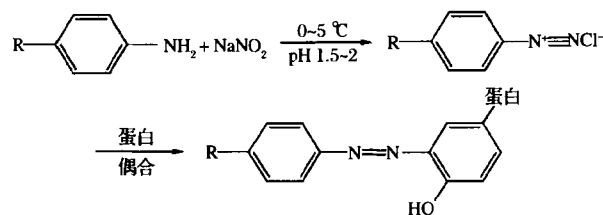


图 1 免疫原 BSA-DDS 的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of immunogen BSA-DDS

#### 1.2.1 DDS 重氮化

称取 6.4 mg 氨苯砒, 溶解于 2 mL 已预冷的 0.1

第一作者: 硕士研究生(王向红教授为通讯作者)。

\* 河北省科技支撑项目(No. 152776120D)

收稿日期: 2014-12-02, 改回日期: 2015-05-30

mol/L HCl 中,用 1 mol/L HCl 调 pH 值至 1.5。4 ℃ 冰浴搅拌,慢慢滴加 360  $\mu$ L 10 mg/mL 的 NaNO<sub>2</sub> 溶液。用 KI 淀粉试纸检验,直至试纸变为深紫色停止,4 ℃ 避光搅拌反应 30 min 后,即得到重氮化的 DDS 溶液。

### 1.2.2 BSA-DDS 合成

称取 10.4 mg BSA,溶于 2 mL CBS(0.1 mol/L, pH=9.5)溶液中,将重氮化的 DDS 溶液慢慢滴加到 BSA 溶液中,随时监测 pH 值变化(保持 pH 为 9.0~9.5),搅拌反应 2 h 后将反应液置于 4 ℃,避光反应 18 h。反应结束后,用 PBS(0.01 mol/L, pH 值 7.2~7.4)在 4 ℃ 冰箱中连续透析 3 d,每天换液 2~3 次,分装, -20 ℃ 保存待用。

### 1.3 酶标抗原的制备

采用过碘酸钠法将 DDS 与 HRP 相连制备了酶标抗原 DDS-HRP。

### 1.4 免疫血清制备

以 BSA-DDS 为免疫抗原,首先将免疫抗原与弗氏完全佐剂等量充分乳化,以后加强免疫则用弗氏不完全佐剂,采用以 1 mg/只的药量背部皮下脊柱两侧多点(6~8 点)注射,免疫健康新西兰大耳白兔,获得含有多克隆抗体的免疫血清。经 Protein A-Sepharose 4B 过柱纯化,得到免源抗 DDS 的抗体,加入 0.01% 叠氮化钠分装, -20 ℃ 保存待用。

### 1.5 直接竞争 ELISA 方法的建立

参考文献<sup>[15]</sup>中的直接竞争 ELISA 操作方法,将抗体浓度稀释为 10  $\mu$ g/mL,包被酶标板 12~14 h;将酶标抗原(DDS-HRP)作一定倍数稀释,将 DDS 标准品配成 0.01、0.1、1、10、100、1 000 ng/mL 系列浓度做直接竞争 ELISA,以 DDS 溶液浓度为横坐标( $x$ ),抑制率为纵坐标( $y$ ),绘制标准曲线。

### 1.6 动物性食品中 DDS 的测定

#### 1.6.1 样品的前处理

牛奶。取全奶 10~15 mL 置于聚苯乙烯离心管中,4 ℃, 2 000 g 离心 15 min,弃掉上层脂肪层,用缓冲液稀释 10 倍,混匀。

蜂蜜。称取均质试样(1.0  $\pm$  0.001) g 样本至 15 mL 聚苯乙烯离心管中,先加 1% 氨水的乙腈溶液 5 mL,漩涡混合 2 min,超声提取 5 min,4 000 r/min 室温(20~25 ℃)离心 5 min,弃去上层有机相(正己烷),用缓冲液稀释 5 倍,混匀。

猪肉。称取均质试样(1.0  $\pm$  0.001) g 样本至 15 mL 聚苯乙烯离心管中,先加 1% 氨水的乙腈溶液 5

mL,然后加入 2.5 mL 正己烷,漩涡混合 2 min,超声提取 5 min,4 000 r/min 室温(20~25 ℃)离心 5 min,弃去上层有机相(正己烷),将提取液氮气吹干,用缓冲液复溶,混匀。

鸡蛋。称取均质试样(1.0  $\pm$  0.001) g 样本至 15 mL 聚苯乙烯离心管中,先加 1% 氨水的乙腈溶液 5 mL,漩涡混合 2 min,超声提取 5 min,4 000 r/min 室温(20~25 ℃)离心 5 min,弃去上层有机相(正己烷),将提取液氮气吹干,用缓冲液复溶,混匀。

#### 1.6.2 样品回收率

向空白牛奶、蜂蜜、猪肉和鸡蛋样品中添加一定浓度的 DDS 标准品,按照 1.6.1 的方法进行样品预处理,直接竞争 ELISA 测定样品中 DDS 浓度,每个样品设 5 个重复,计算回收率和变异系数。

## 2 结果与分析

### 2.1 DDS-BSA 完全抗原的鉴定

以重氮化法制备了免疫原 BSA-DDS,反应过程中,偶氮后的 DDS 滴入 BSA 中时,颜色立刻变黄,最后成为橘红色,透析和冷冻时颜色均未见褪减,初步推断 DDS 与 BSA 结合成功。分别对 BSA 和 BSA-DDS 进行 SDS-PAGE 电泳分析,根据电泳条带的位置判断 BSA 是否与 DDS 发生结合形成 BSA-DDS(见图 2)。分别做 BSA、DDS 和偶联物在 200~500 nm 的紫外吸收光谱图,根据其紫外吸收光谱图判定 BSA 是否与 DDS 发生结合形成 BSA-DDS(见图 3)。由图 2 可知,人工抗原 BSA-DDS 的迁移率比 BSA 电泳条带的迁移率小。由于 SDS-PAGE 消除了样品电荷对迁移率的影响,使得样品的迁移率只与其分子量有关。分子质量大的样品迁移率小,分子质量小的样品迁移率大,则说明人工抗原 BSA-DDS 的分子质量大于 BSA,BSA-DDS 人工抗原成功合成。由图 3 可知,载体蛋白最高峰在 280 nm 左右处,DDS 最高峰在 290 nm 左右,偶联物最高峰在 370 nm 左右,DDS 与载体 BSA 偶联反应后,其产物 DDS-BSA 的紫外吸收图谱与载体蛋白 BSA 和 DDS 相比,最大吸收峰位置发生了位移且吸光值有所增加,这说明载体分子上已经成功的连接了一定数量的半抗原,并根据文献<sup>[16]</sup>推算出 BSA-DDS 偶联比为 1:10。

### 2.2 直接竞争 ELISA 检测方法的建立

将 DDS 标准品配成 0.01、0.1、1、10、100、1 000 ng/mL 系列浓度做直接竞争 ELISA,绘制标准曲线(见图 5)拟合方程为:  $y = 6.963 \ln(x) + 39.112$

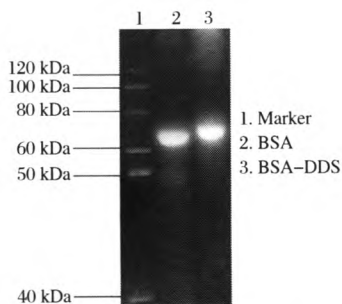


图2 BSA 和 BSA-DDS 偶联物的 SDS-PAGE 鉴定图  
Fig.2 SDS-PAGE electrophoresis analysis of BSA and BSA-DDS

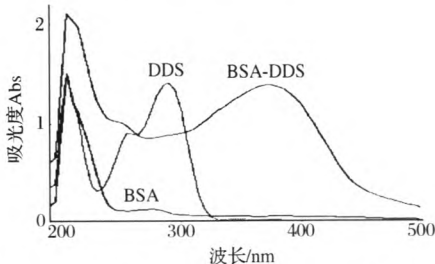


图3 BSA, DDS, BSA-DDS 紫外扫描光谱图  
Fig.3 UV scanning spectrum of BSA, DDS and BSA-DDS

( $R^2 = 0.9817$ ),  $IC_{50}$  为  $4.78 \text{ ng/mL}$ ,  $IC_{15}$  可达  $0.03 \text{ ng/mL}$ , 灵敏度较高。

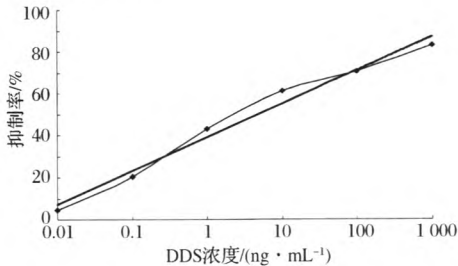


图4 氨苯砒标准曲线  
Fig.4 Standard curve of dapsone

2.3 加标回收率

添加回收试验结果见表1。在牛奶中添加25、50、100  $\mu\text{g/kg}$  的 DDS, 蜂蜜、猪肉和鸡蛋中添加75、150、300  $\mu\text{g/kg}$  的 DDS, 回收率在75.45% ~ 91.75%, 变异系数1.79% ~ 13.03%。

3 讨论

从氨苯砒 (DDS) 的结构式可以看出来, DDS 分子上携带2个氨基。其分子质量小, 结构简单, 只有反应原性而无免疫原性, 因此必须与大分子物质联结, 制备成完全抗原, 才能刺激动物机体产生免疫反应。本实验采用重氮化法进行 DDS 与载体蛋白偶

表1 动物性食品中氨苯砒添加回收率和变异系数 ( $n=5$ )  
Table 1 The recovery and RSD of DDS in spiked animal foods ( $n=5$ )

样品	添加浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$	回收率/%	变异系数
牛奶	25	80.14	2.51
	50	86.97	6.49
	100	90.48	4.08
蜂蜜	75	75.45	4.26
	150	85.67	6.93
	300	81.61	1.79
猪肉	75	87.65	10.47
	150	91.75	13.03
	300	91.10	5.81
鸡蛋	75	86.63	5.60
	150	83.02	7.06
	300	80.87	3.64

联, 通过反应过程中颜色变化初步判断偶联成功, 又经过 SDS-PAGE 电泳分析载体 BSA 电泳条带和人工抗原 BSA-DDS 的条带迁移率大小, 表明 BSA-DDS 人工抗原成功合成, 最后进行紫外图谱分析在370 nm左右明显可见偶联物的最高峰形, 载体蛋白最高峰在280 nm左右处, DDS 在290 nm左右, 偶联物紫外扫描最高峰位置发生偏移, 由此证明偶联反应成功。经计算 DDS 与 BSA 的结合比为10:1。一般认为, 半抗原与载体蛋白的结合比以8~25为宜。本试验的免疫原结合比为10:1, 将制得的免疫原 BSA-DDS 免疫新西兰大耳白得到多抗血清, 纯化后得到抗体, 并建立了直接竞争 ELISA 方法。通过试验表明, 该检测方法对牛奶、蜂蜜、猪肉和鸡蛋的最低检测限分别可达到0.05、0.07、0.06和0.07  $\text{ng/mL}$ , 通过多次试验数据表明, 该方法灵敏度高、稳定性好并且具有 ELISA 检测法微量、高效、经济 and 方便的特点, 可用于动物源性食品中氨苯砒残留的大批量、快速检测。

参 考 文 献

[1] 毛翀, 熊俊浩. 麻风病化学治疗药物的研究进展[J]. 实用医院临床杂志, 2010, 7(6): 136-138.  
[2] 廉佳, 张峻岭, 卢桂玲. 羟氯喹, 氨苯砒, 沙利度胺在皮肤科的应用[J]. 中国皮肤性病杂志, 2007, 21(10): 632-633.  
[3] 田云, 岳振峰, 叶卫翔, 等. 动物组织中氨苯砒及其代谢产物残留量的液相色谱串联质谱法测定[J]. 分析测试学报, 2009, 28(1): 88-92.  
[4] Coleman M D. Dapsone toxicity: some current perspectives [J]. General Pharmacology: The Vascular System, 1995, 26(7): 1461-1467.

- [5] 农业部. 中华人民共和国农业部第 235 号公告. 动物性食品中兽药最高残留限量[Z]. 2002.
- [6] Regulation C. No 2377/90 of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin[Z]. Off J Eur Commun L, 1990, 224(1): 1-8.
- [7] Regulation C. No. 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin[D]. Off J Eur Union L, 2010, 15(1): 1-72.
- [8] Hela W, Brandtner M, Widek R, et al. Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection[J]. Food Chemistry, 2003, 83(4): 601-608.
- [9] Suhren G, Heeschen W. Detection of eight sulphonamides and dapsone in milk by a liquid chromatographic method[J]. Analytica Chimica Acta, 1993, 275(1): 329-333.
- [10] Hadjigeorgiou M, Papachrysostomou C, Theodorou Z, et al. Determination of dapsone in meat and milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Analytica chimica acta, 2009, 637(1): 220-224.
- [11] Vanrhijn J A, Lasaroms J J P, Berendsen B J A, et al. Liquid chromatographic -tandem mass spectrometric determination of selected sulphonamides in milk[J]. Journal of Chromatography A, 2002, 960(1/2): 121-133.
- [12] McDonald M, Mannion C, Rafter P. A confirmatory method for the simultaneous extraction, separation, identification and quantification of Tetracycline, Sulphonamide, Trimethoprim and Dapsone residues in muscle by ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry according to Commission Decision 2002/657/EC[J]. Journal of Chromatography A, 2009, 1 216(46): 8 110-8 116.
- [13] Economou A, Petraki O, Tsipi D, et al. Determination of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in honey and validation according to Commission Decision 2002/657/EC for banned compounds[J]. Talanta, 2012, 97: 32-41.
- [14] 陶光灿, 李勇, 崔廷婷, 等. 酶联免疫吸附法检测动物源性食品中氨苯砒残留[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7): 778-783.
- [15] 李晓云, 石德时, 王喜亮, 等. 直接竞争 ELISA 检测氯霉素残留的方法建立及初步应用[J]. 中国兽医学报, 2007, 27(5): 723-727.
- [16] 蔡勤仁, 曾振灵, 杨桂香, 等. 恩诺沙星单克隆抗体的制备及鉴定[J]. 中国农业科学, 2004, 37(7): 1 060-1 064.

## Development of a direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of dapsone in animal foods

ZHENG Xiao-jiao, ZHANG Jing, ZHANG Ya-zhuo,  
SHI Chen-shan, WANG Xiang-hong

(College of Food Science & Technical, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**ABSTRACT** A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect Dapsone in animal foods. Hapten dapsone was conjugated with Bovine Sera Albumin (BSA) by diazotization to produce immunogen BSA-DDS used for immunizing rabbit. The rabbit antiserum was purified with ProteinA-Sepharose 4B to prepare polyclonal antibody against dapsone. A direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to detect and quantitate dapsone. The best synthesis of BSA-DDS and the conjugated-ratio was 1:10. The  $IC_{50}$  was 4.78 ng/mL, visual detection limit was 0.03 ng/mL, and recoveries of dapsone in spiked samples ranged from 75.45% ~ 91.75%. The artificial antigens can be used for preparing specificity anti-dapsone antibody. The method is sensitive and the procedure of sample pretreatment is simple and quick. It is suitable to use in the detection of DDS residues in animal foods on site.

**Key words** dapsone; polyclonal antibody; direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay