

联苯四氮唑沙坦类药物广谱性抗体的制备及其在降压类保健食品中多残留检测ic-ELISA法的应用

刘凤银^{1,2}, 苏珮韵¹, 林浩标¹, 刘 汇¹, 陈嘉仪³, 卢梓程², 穆洪涛¹, 李攻科^{2,*}

(1.广东第二师范学院生物与食品工程学院, 广东 广州 510303; 2.中山大学化学学院, 广东 广州 510006;

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

摘要: 建立联苯四氮唑沙坦类药物的间接竞争酶联免疫吸附检测(indirect competitive-enzyme linked immunosorbent assay, ic-ELISA)法, 并用于其在降压类保健食品中的多残留检测。将坎地沙坦与牛血清白蛋白偶联制备免疫原; 免疫动物获得广谱性抗体; 对坎地沙坦、氯沙坦羧酸、洛沙坦钾、奥美沙坦、奥美沙坦酯、厄贝沙坦、缬沙坦和缬沙坦甲酯的半抑制浓度分别为0.2、0.2、0.7、0.04、0.6、0.3、0.9、2.4 ng/mL。降压类保健食品经甲醇超声提取、标准稀释液稀释法消除基质效应, 8种待测物的添加回收率为80.6%~120.0%, 变异系数不高于14.0%, 与液相色谱-串联质谱法的测定结果一致性良好($r > 0.97$), 表明建立的ic-ELISA法具有良好的准确度和可靠性。

关键词: 联苯四氮唑沙坦类药物; 广谱性抗体; 保健食品; 多残留检测; 间接竞争酶联免疫吸附

Preparation of Broad-Spectrum Polyclonal Antibody and Development of an Indirect Competitive-Enzyme Linked Immunosorbent Assay for Multi-Residue Detection of Biphenyl Tetrazolium Sartans in Antihypertensive Health Foods

LIU Fengyin^{1,2}, SU Peiyun¹, LIN Haobiao¹, LIU Hui¹, CHEN Jiayi³, LU Zicheng², MU Hongtao¹, LI Gongke^{2,*}

(1. College of Biology and Food Engineering, Guangdong University of Education, Guangzhou 510303, China;

2. School of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: An indirect competitive-enzyme linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was established to detect the multi-residue of biphenyl tetrazolium sartans in antihypertensive health foods. Candesartan was coupled with bovine serum albumin to obtain immunogen. New Zealand white rabbits were immunized and a broad-spectrum antibody was obtained by an antibody screening assay. The half maximal inhibitory concentrations (IC_{50}) for candesartan, losartan carboxylic acid, losartan potassium, olmesartan, olmesartan medoxomil, irbesartan, valsartan and valsartan methyl ester were 0.2, 0.2, 0.7, 0.04, 0.6, 0.3, 0.9 and 2.4 ng/mL, respectively. The samples were extracted with methanol and the matrix effect was eliminated by diluting the extract with standard solutions. The average recoveries of the eight target compounds were in the range from 80.6% to 120.0% with coefficients of variation equal to or below 14.0%. The results of ic-ELISA were highly correlated with those of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) ($r > 0.97$), indicating high accuracy and good reliability of ic-ELISA.

Keywords: biphenyl tetrazolium sartans; broad-spectrum antibody; health food; multi-residue detection; indirect competitive-enzyme linked immunosorbent assay

DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220731-346

中图分类号: R155.1

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2023)16-0331-09

收稿日期: 2022-07-31

基金项目: 广东省食品安全重点领域研发计划项目(2019B020211001); 国家自然科学基金面上项目(21976213);

国家自然科学基金重点项目(22134007); 广州市科技计划项目(202102080339);

广东省科技创新战略专项资金项目(pdjh2021b0369); 广东第二师范学院食品科学技术校级重点学科项目;

广东省高等学校中青年教师国内访问学者计划项目

第一作者简介: 刘凤银(1990—)(ORCID: 0000-0002-8664-7897), 女, 实验师, 硕士, 研究方向为食品安全检测新技术。

E-mail: liufengyin@gdei.edu.cn

*通信作者简介: 李攻科(1963—)(ORCID: 0000-0003-3750-6358), 女, 教授, 博士, 研究方向为复杂样品分离分析、色谱/光谱分析及样品前处理。E-mail: cesgkl@mail.sysu.edu.cn

引文格式:

刘凤银, 苏珮韵, 林浩标, 等. 联苯四氮唑沙坦类药物广谱性抗体的制备及其在降压类保健食品中多残留检测ic-ELISA法的应用[J]. 食品科学, 2023, 44(16): 331-339. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220731-346. <http://www.spkx.net.cn>
LIU Fengyin, SU Peiyun, LIN Haobiao, et al. Preparation of broad-spectrum polyclonal antibody and development of an indirect competitive-enzyme linked immunosorbent assay for multi-residue detection of biphenyl tetrazolium sartans in antihypertensive health foods[J]. Food Science, 2023, 44(16): 331-339. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-20220731-346. <http://www.spkx.net.cn>

沙坦类药物为一类抗高血压药物, 临床上主要用于治疗高血压、心衰和冠心病等^[1-2]。依据其结构可分为联苯四氮唑类和非联苯四氮唑类^[3], 前者的结构式中均含有联苯四氮唑环, 主要包括坎地沙坦、氯沙坦羧酸、洛沙坦钾、奥美沙坦、奥美沙坦酯、厄贝沙坦、缬沙坦和缬沙坦甲酯等, 结构见图1; 后者主要包括阿奇沙坦、甲磺酸依普罗沙坦和替米沙坦等。保健食品中的联苯四氮唑沙坦类药物主要来源于非法添加。我国《食品安全法》明确规定, 保健食品不得添加药品。一些不法分子为使其效果显著, 向降压类保健食品中非法添加降压类药物, 而尚未在原国家食品药品监督管理局发布《保健食品中75种非法添加化学药物的检测》(BJS 201710)名单中的联苯四氮唑沙坦类药物, 成为不法分子为规避处罚, 非法添加的降压类备选药物。而非法添加的药物存在来源不明确、兼容性不明确和添加量不明确等问题, 对消费者的健康带来很大的安全隐患。

针对联苯四氮唑沙坦类药物, 国外研究者主要关注于其对环境生态的危害问题, 开展其在环境水资源中的残留检测及生态风险评估研究^[4-6]; 国内研究者主要关注于降压类保健食品和中成药中的非法添加现象^[7-8]。采用的检测方法主要有液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) 法^[7,9]、高效液相色谱法^[8,10]等, 该类仪器检测方法准确性

好、灵敏度高, 但仪器设备昂贵、专业化要求较高, 方法普及受限。因此, 建立一种准确灵敏、快速简便的分析方法用于降压类保健食品中联苯四氮唑沙坦类药物非法添加的检测十分必要。基于抗原-抗体特异性反应的免疫分析技术具有准确、灵敏、快速的特点, 尤其适用于现场筛查和大批量样品的快速分析, 为食品安全提供了重要保障^[11-12]。基于广谱性抗体建立的免疫检测方法, 可通过一次实验同时筛查多种待测物, 在分析通量、实用性、成本方面具有突出优势^[13-14]。目前, 国内外鲜见有关于联苯四氮唑沙坦类药物免疫检测方法的报道。

本研究基于免疫分析技术, 针对联苯四氮唑沙坦类药物的共性结构, 通过人工抗原的制备和动物免疫, 制备其广谱特异性抗体, 建立其间接竞争酶联免疫吸附检测 (indirect competitive-enzyme linked immunosorbent assay, ic-ELISA) 法, 并用于降压类保健食品中联苯四氮唑沙坦类药物的多残留检测, 检测结果采用LC-MS/MS法确证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

保健食品购于国内互联网商店; SPF级雌性纯种新西兰大白兔购于广东省医学实验动物中心。

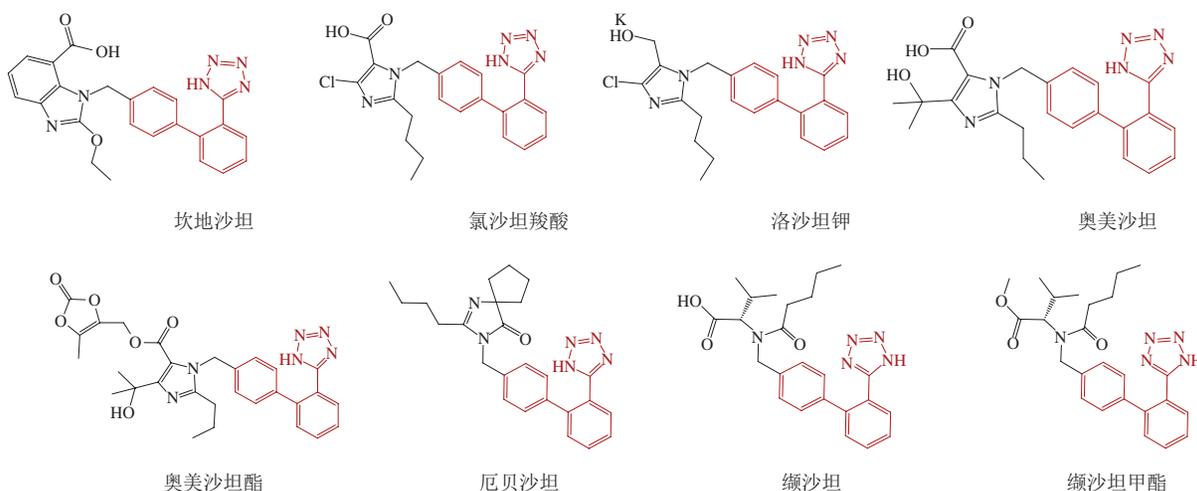


图1 8种联苯四氮唑沙坦类药物的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of eight biphenyl tetrazolium sartans

坎地沙坦(纯度98%) 天津希恩思生化科技有限公司; 氯沙坦羧酸(纯度98%) 上海抚生实业有限公司; 洛沙坦钾(纯度99%) 上海安耐吉化学有限公司; 奥美沙坦酯(纯度≥98%)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(纯度99%) 上海源叶生物科技有限公司; 缬沙坦(纯度95%) 上海麦克林生化科技有限公司; 奥美沙坦(纯度≥98%)、缬沙坦甲酯(纯度95%)、阿奇沙坦(纯度≥99%)、甲磺酸依普罗沙坦(纯度≥99%)、替米沙坦(纯度≥98%)、厄贝沙坦(纯度≥98%)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(纯度99%)、1,3-二环己基碳二亚胺(纯度99%)、甲醇(色谱纯)、甲酸(色谱纯)、*N,N*-二甲基甲酰胺(无水级99.8%) 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; HRP标记的羊抗兔IgG抗体 美国Earthox公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 纯度高于98%)、卵清白蛋白(ovalbumin, OVA, 纯度高于98%) 上海昂一生物科技有限公司; 弗氏完全和不完全佐剂 美国Sigma公司; 96孔微孔板 厦门怡佳美实验器材有限公司; 针筒式有机过滤器(0.22 μm) 天津市津腾实验设备有限公司; 其他试剂均为分析纯; 实验用水为超纯水。

1.2 仪器与设备

SP-Max 2300A2光吸收型全波长酶标仪 上海闪谱生物科技有限公司; TOM-3PW自动洗板机 上海托莫斯科学仪器有限公司; PHS-3C精密酸度计 上海雷磁仪器股份有限公司; Neofuge 13R高速冷冻离心机 上海力申科学仪器有限公司; UNIQUE-R20实验室多功能纯水系统 锐思捷科学仪器有限公司; LCMS-8050超高效液相色谱-串联三重四极杆质谱仪 日本岛津公司; Amicon Ultra-0.5 10 kDa超滤离心管 美国Millipore公司。

1.3 方法

1.3.1 人工抗原合成与结构鉴定

采用活泼酯法, 将坎地沙坦与BSA偶联制备免疫原坎地沙坦-BSA, 将坎地沙坦、氯沙坦羧酸、奥美沙坦和缬沙坦分别与OVA偶联, 制备包被原坎地沙坦-OVA、氯沙坦羧酸-OVA、奥美沙坦-OVA和缬沙坦-OVA。人工抗原合成路线图如图2所示。具体偶联方法: 将0.05 mmol

半抗原溶于500 μL *N,N*-二甲基甲酰胺中, 搅拌中加入0.1 mmol 1,3-二环己基碳二亚胺和0.1 mmol *N*-羟基琥珀酰亚胺, 4 °C磁力搅拌反应过夜, 离心后取上清液; 搅拌中, 将上清液逐滴滴加到溶解有适量载体蛋白的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS, 0.01 mol/L, pH 7.4)溶液中, 4 °C磁力搅拌反应12 h; 4 °C、12 000 r/min离心10 min, 取上清液。4 °C用PBS透析3 d得人工抗原, -20 °C分装贮存。上述半抗原与BSA、OVA的物质的量比分别为100:1、60:1。

在220~320 nm波长间分别对载体蛋白、人工抗原和半抗原进行紫外扫描, 比较三者的紫外吸收光谱曲线, 判定人工抗原是否制备成功。免疫原用超滤管脱盐, 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MADLI-TOF MS)法测定其分子质量, 计算偶联比。

1.3.2 动物免疫与抗体特性评价

将上述制备的免疫原免疫2只2.5 kg雌性新西兰大白兔, 采集抗血清。免疫方法: 将免疫原(500 μg/只)与等剂量的弗氏佐剂混合乳化, 采用皮内、皮下、肌肉多点注射免疫; 首次免疫后, 于第31、52、73天以同样方式进行加强免疫。首次免疫采用弗氏完全佐剂, 加强免疫采用弗氏不完全佐剂。于第80天心脏采血, 将室温静置0.5~1 h, 4 °C、12 000 r/min离心15 min, 收集上清液获得抗血清, 分装后于-20 °C保存备用。

采用ic-ELISA法, 在包被原和目标分析物的质量浓度均为1 μg/mL时, 测定同源和异源不同包被模式下抗血清的效价和抑制率。抑制率按照式(1)计算:

$$\text{抑制率}/\% = \frac{A_{450 \text{ nm效价孔}} - A_{450 \text{ nm抑制孔}}}{A_{450 \text{ nm效价孔}}} \times 100 \quad (1)$$

式中: $A_{450 \text{ nm效价孔}}$ 为在一定包被浓度和抗体稀释倍数下, 不含目标分析物的测试孔的吸光度; $A_{450 \text{ nm抑制孔}}$ 为在特定包被浓度和抗体稀释倍数下, 含有一定浓度目标分析物测试孔的吸光度。

1.3.3 ic-ELISA建立

参照杨武英等^[15]的ic-ELISA实验步骤, 采用棋盘滴定法确定最佳包被原浓度和抗血清稀释倍数; 通过单

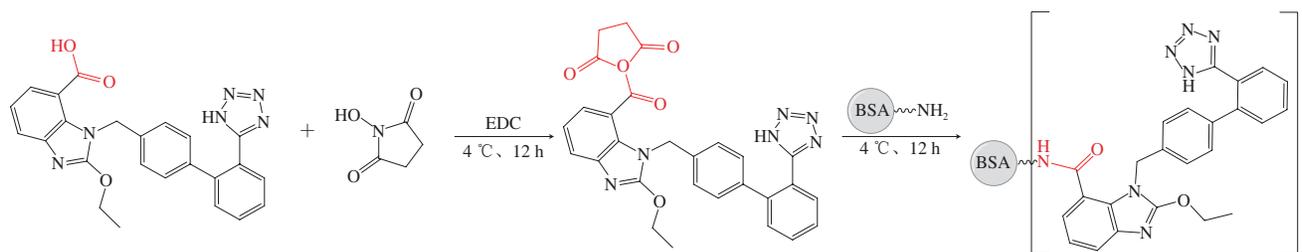


图2 人工抗原合成技术路线图(以坎地沙坦-BSA为例)

Fig. 2 Scheme for preparation of artificial antigen (taking candesartan-BSA for example)

因素试验,考察理化因素缓冲液pH值(5.4、6.4、7.4、8.4)、缓冲液离子浓度(5、10、20、40 mmol/L)、竞争反应时间(20、30、40、50、60 min)对ic-ELISA检测性能的影响。以目标分析物浓度的对数值为横坐标,吸光度 $A_{450\text{ nm}}$ 为纵坐标,绘制抑制曲线,计算最大吸光度 A_{max} 、半抑制浓度 IC_{50} 及 A_{max}/IC_{50} 。选取 A_{max} 较大、 IC_{50} 较小、 A_{max}/IC_{50} 较大且曲线拟合度好的反应条件作为最佳工作条件。

1.3.4 交叉反应率评价

选取7种联苯四氮唑沙坦类药物和3种非联苯四氮唑沙坦类药物进行交叉反应实验。分别绘制每种药物的抑制曲线,计算其对应的 IC_{50} 、检出限 IC_{10} 。交叉反应率按式(2)计算:

$$\text{交叉反应率}/\% = \frac{IC_{50\text{坎地沙坦}}}{IC_{50\text{交叉反应物}}} \times 100 \quad (2)$$

1.3.5 样品前处理

参照王超等^[16]的方法并适当调整。具体如下:固体样品(片剂、硬胶囊和茶叶)取10次服用剂量用磨粉机磨粉后,过30目筛;液体样品(软胶囊)取10次服用剂量的内容物混匀。准确称取1次服用剂量的样品于50 mL容量瓶中,加入40 mL甲醇超声提取15 min,冷却后甲醇定容,过0.22 μm 有机相滤膜,得提取液。用PBS或甲醇适当稀释后分别采用ic-ELISA法和LC-MS/MS法测定。

1.3.6 基质效应评价

选取4种剂型的空白样品(经LC-MS/MS法测定不含有8种目标分析物),按照1.3.5节样品前处理步骤,制备空白基质溶液。将空白基质溶液用PBS稀释100、500、1000倍后作为稀释液,分别配制一系列浓度梯度的坎地沙坦标准溶液,进行ic-ELISA实验,绘制基质标准曲线,与以PBS作为稀释液绘制的溶剂标准曲线进行比对。

1.3.7 LC-MS/MS法确证

色谱条件:色谱柱Endeavorsil C₁₈(150 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm);流动相:A为甲醇,B为0.1%甲酸溶液;柱温40 $^{\circ}\text{C}$;进样体积5 μL ;流速0.25 mL/min。梯度洗脱程序:0~1 min, 15% A、85% B; 1~3 min, 15%~40% A、85%~60% B; 3~6 min, 40%~60% A、60%~40% B; 6~8 min, 60%~85% A、40%~15% B; 8~12 min, 85% A、15% B; 12~15 min, 85%~50% A、15%~50% B; 15~19 min, 50%~15% A、50%~85% B; 19~20 min, 15% A、85% B。

质谱条件:电喷雾离子源正离子模式;雾化气流量3 L/min;加热气流量10 L/min;干燥气流量10 L/min;

加热块温度400 $^{\circ}\text{C}$;接口电压4.0 kV;接口温度300 $^{\circ}\text{C}$;脱溶剂管温度250 $^{\circ}\text{C}$;多反应选择监测模式(multiple reaction monitoring, MRM),采用分段采集(利用软件的自带功能,根据每个目标分析物的保留时间自动设置MRM事件时间)。主要质谱参数见表1。

表1 主要质谱参数
Table 1 MS/MS parameters

| 分析物 | CAS号 | 时间/min | m/z | | 碰撞电压/V |
|-------|-------------|--------|-------|-----------------------|----------|
| | | | 母离子 | 子离子 | |
| 坎地沙坦 | 139481-59-7 | 10.85 | 441.1 | 263.2*/423.2/192.15 | 13/13/27 |
| 氯沙坦羧酸 | 124750-92-1 | 11.08 | 437 | 235.05*/206.95/180.1 | 27/23/33 |
| 洛沙坦钾 | 124750-99-8 | 10.557 | 423 | 207.05*/405.05/377.1 | 23/12/15 |
| 奥美沙坦 | 144689-24-7 | 8.786 | 447 | 207.05*/429.15/189.95 | 25/14/54 |
| 奥美沙坦酯 | 144689-63-4 | 9.945 | 559.1 | 207*/429.15/541.15 | 31/19/13 |
| 厄贝沙坦 | 138402-11-6 | 10.648 | 429.1 | 207.05*/195.05/180.05 | 26/23/40 |
| 缬沙坦 | 137862-53-4 | 11.066 | 436 | 235.1*/291.05/207.05 | 18/18/28 |
| 缬沙坦甲酯 | 137863-17-3 | 11.314 | 450.1 | 235.15*/207.15/418.25 | 16/26/10 |

注:*.定量离子。

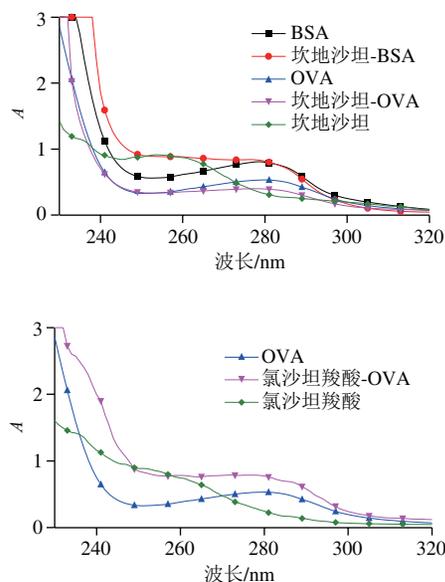
1.4 数据处理

采用ChemDraw pro 18绘制化学结构式;采用Origin pro 2018绘制抑制曲线;采用Excel 2010绘制表格。

2 结果与分析

2.1 人工抗原合成与结构鉴定

采用紫外扫描判定人工抗原是否偶联成功。由于结构不同,载体蛋白和半抗原在紫外下有各自不同的特征吸收峰,偶联后两者的共轭结构相互作用,若人工抗原相较于载体蛋白的紫外吸收光谱发生明显偏移,则说明人工抗原合成成功^[17]。半抗原、载体蛋白和人工抗原的紫外吸收光谱见图3。可以看出,人工抗原的光谱曲线明显区别于相应的载体蛋白,说明人工抗原合成成功。



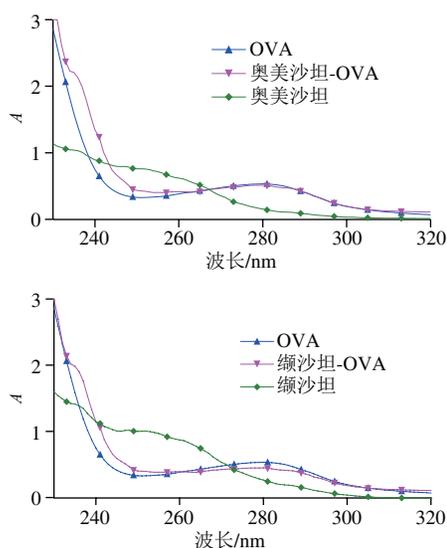


图3 人工抗原的紫外吸收光谱图
Fig. 3 UV spectra of artificial antigens

采用MADLI-TOF MS测定BSA和免疫原坎地沙坦-BSA的分子质量, 计算偶联比。从图4可知, BSA相对分子质量为66 433, 坎地沙坦-BSA相对分子质量为68 672。坎地沙坦与BSA通过酰胺键偶联, BSA分子上偶联1个坎地沙坦分子, 相对分子质量增加422.5, 计算得到坎地沙坦-BSA的偶联比为5.3。

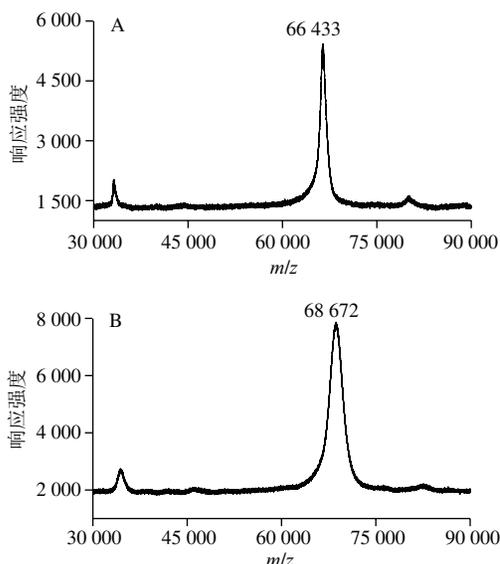


图4 BSA (A) 及坎地沙坦-BSA (B) 质谱图
Fig. 4 Mass spectra of BSA (A) and candesartan-BSA (B)

2.2 抗体特性评价

不同包被模式下, 抗血清记作PAb-坎地沙坦的效价和抑制率测定结果见表2, 其中包被原质量浓度和待测物质量浓度均为1 μg/mL。同源包被模式下, PAb-坎地沙坦的效价为243 000, 对坎地沙坦的抑制率为65%, 对其他3种待测物无抑制; 以缬沙坦-OVA作为包被原的异源包

被模式下, PAb-坎地沙坦的效价为9 000, 对坎地沙坦、氯沙坦羧酸、奥美沙坦和缬沙坦4种待测物均呈现了很高的抑制率, 分别为92%、93%、92%和91%; 以氯沙坦羧酸-OVA和奥美沙坦-OVA作为包被原时, PAb-坎地沙坦的效价为9 000, 但抑制率很低或抑制率为0%。可能原因是缬沙坦分子结构中不含苯并咪唑或咪唑结构, 这种结构上的差异使得缬沙坦-OVA作为包被原时, 对抗体的亲和力较小, 提高了抗体对游离药物的检测灵敏度^[8]。实验以抗血清PAb-坎地沙坦、包被原缬沙坦-OVA建立ic-ELISA法。

表2 不同包被模式下抗血清PAb-坎地沙坦的效价及抑制率
Table 2 Titers and inhibition rates of antiserum PAb-candesartan under heterologous and homologous coating modes

| 抗血清 | 包被原 | 效价 ($\times 10^3$) | 抑制率/% | | | |
|----------|-----------|-------------------------|-------|-------|------|-----|
| | | | 坎地沙坦 | 氯沙坦羧酸 | 奥美沙坦 | 缬沙坦 |
| PAb-坎地沙坦 | 坎地沙坦-OVA | 243 | 65 | 0 | 0 | 0 |
| | 氯沙坦羧酸-OVA | 9 | 29 | 26 | 0 | 0 |
| | 奥美沙坦-OVA | 9 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 缬沙坦-OVA | 9 | 92 | 93 | 92 | 91 |

2.3 ic-ELISA法建立

最佳工作条件: 包被原质量浓度为4 μg/mL, 抗血清稀释倍数为1:15 000, 反应体系为PBS (pH 7.4, 10 mmol/L), 竞争反应时间为30 min。在最佳工作条件下建立坎地沙坦标准曲线, 如图5所示。缓冲溶液体系中, 方法对坎地沙坦的检出限 IC_{10} 为0.012 ng/mL, IC_{50} 为0.18 ng/mL, 线性范围 $IC_{20} \sim IC_{80}$ 为0.032~1.02 ng/mL。

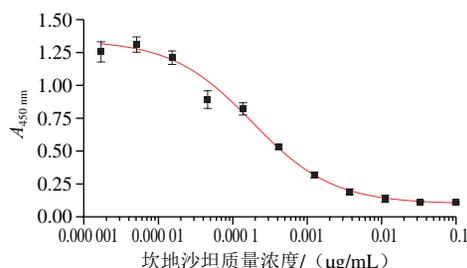


图5 ic-ELISA法检测坎地沙坦的标准曲线 (n=3)
Fig. 5 Standard curve for the detection of candesartan by ic-ELISA (n=3)

2.4 交叉反应率评价

在以缬沙坦-OVA作为包被原的异源包被模式下, 抗血清PAb-坎地沙坦对10种沙坦类药物的交叉反应率见表3。免疫半抗原坎地沙坦为联苯四氮唑沙坦类药物, 含有联苯四氮唑沙坦类药物含有的共性结构联苯四氮唑结构, 故以其作为免疫半抗原制备的抗血清PAb-坎地沙坦对其他7种联苯四氮唑沙坦类药物均呈现了较好的异源亲和能力, 对氯沙坦羧酸、洛沙坦钾、奥美沙坦、奥美沙坦酯、厄贝沙坦、缬沙坦和缬沙坦甲酯的交叉反应率分别为109%、27%、495%、32%、55%、21%、7%; 非联苯四氮唑沙坦类药物的分子结构中不含有联苯四氮唑沙坦类药物, 抗血清PAb-坎地沙坦对阿奇沙坦、甲磺

酸依普罗沙坦和替米沙坦的交叉反应率低于0.1%，说明该抗血清对联苯四氮唑结构具有特异性识别能力。抗血清PAb-坎地沙坦对8种联苯四氮唑沙坦类药物的 IC_{50} 在0.04~2.4 ng/mL之间，具有良好的广谱特异性。

表3 ic-ELISA法对沙坦类药物的检出限、 IC_{50} 、线性范围及交叉反应率检测结果 ($n=3$)

| Table 3 Detection limit, IC_{50} , linear range and cross-reactivity of ic-ELISA for sartans ($n=3$) | | | | | |
|--|----------|-------------|--------------------|----------|------|
| 种类 | 沙坦类药物 | 检出限/(ng/mL) | IC_{50} /(ng/mL) | 交叉反应率/% | |
| 联苯四氮唑沙坦类药物 | 坎地沙坦 | 0.01 | 0.2 | 0.03~1.2 | 100 |
| | 氯沙坦羧酸 | 0.01 | 0.2 | 0.03~1.1 | 109 |
| | 洛沙坦钾 | 0.10 | 0.7 | 0.2~2.2 | 27 |
| | 奥美沙坦 | 0.003 | 0.04 | 0.01~0.2 | 495 |
| | 奥美沙坦酯 | 0.04 | 0.6 | 0.1~3.0 | 32 |
| | 厄贝沙坦 | 0.03 | 0.3 | 0.07~1.5 | 55 |
| | 缬沙坦 | 0.05 | 0.9 | 0.2~5.1 | 21 |
| | 缬沙坦甲酯 | 0.2 | 2.4 | 0.5~12.5 | 7 |
| 非联苯四氮唑沙坦类药物 | 阿奇沙坦 | — | >200 | — | <0.1 |
| | 甲磺酸依普罗沙坦 | — | >200 | — | <0.1 |
| | 替米沙坦 | — | >200 | — | <0.1 |

注：—未检出。

2.5 基质效应评价

基质成分引起的基质效应（待测物响应增强或响应抑制）会严重影响定量分析结果的准确性^[19-20]。ELISA实验中常用的基质效应消除方法有标准稀释液稀释法^[21-22]、基质匹配标准溶液法^[23-24]、基质多重净化法^[25-27]等。基质匹配标准溶液法是利用空白基质提取液作为待测物的稀释液，建立校正曲线，可同等程度地补偿目标分析物在样品提取液和标准溶液中的响应强度差异，是一种常用的基质效应消除方法。但由于不同样品的基质性质差异较大，在实际检测中为保证检测的准确性，需要针对每种待测样品基质制备其空白提取液及基质匹配标准曲线，工作量大，不适用大批量不同类型样品的检测。基质多重净化法是采用多种净化方法，如固相萃取^[28]、磁富集^[29]和液相色谱分离法^[30]等，尽可能地将除目标分析物之外的其他基质成分去除，以消除其可能带来的基质干扰。该方法往往对实验设备要求较高，操作较为繁琐，耗时长，适用于对灵敏度要求较高的样品检测。标准稀释液稀释法是通过用标准稀释液对样品提取液进行一定程度的稀释，将样品中的基质成分降低到较低水平，进而减弱或消除其带来的基质效应。该方法操作简便，不需要复杂的样品前处理方法，也不需要每次检测时针对每种样品基质制备空白提取液，在实际检测应用中可操作性强。

鉴于建立的ic-ELISA法对8种目标分析物的灵敏度 IC_{50} 在0.04~2.4 ng/mL之间，灵敏度远高于其在保健食品中的实际含量水平，为提高实验的简便性，本实验探究采用标准稀释液稀释法消除基质效应的可行性。鉴于不

同剂型的降压类保健食品的辅料差别较大，故实验考察片剂、硬胶囊、软胶囊和茶叶4种不同剂型样品的基质效应，结果见图6。4种样品基质采用简单的甲醇提取法对样品进行前处理后，提取液经PBS稀释1000倍后的标准曲线与溶剂标准曲线趋势一致，两者基本重合，基质效应均可忽略。因此，样品提取液用PBS稀释至少1000倍后用于ic-ELISA测定。

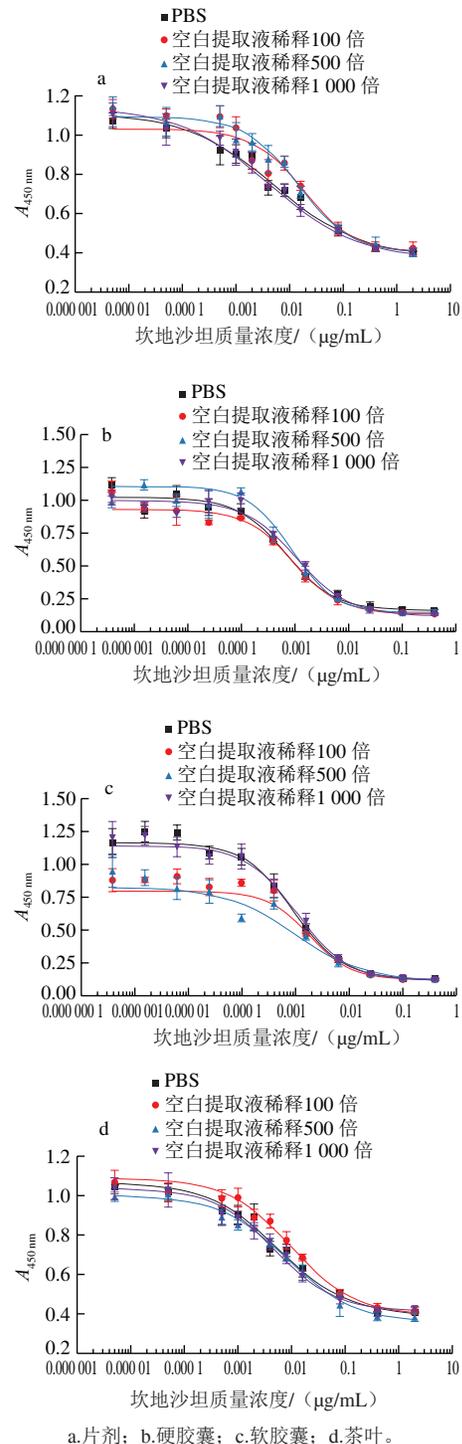
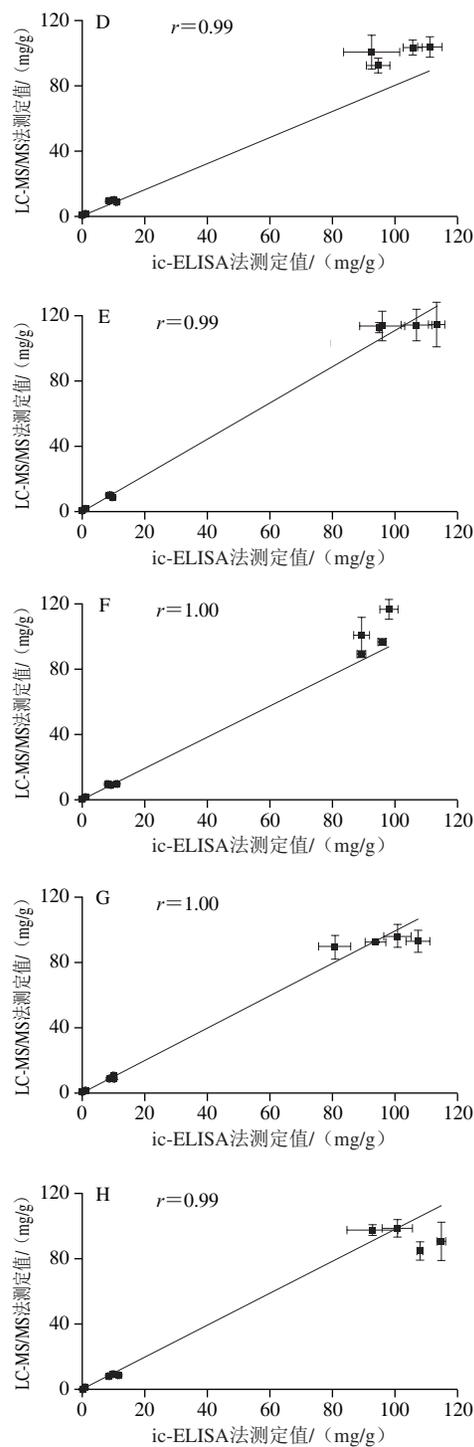
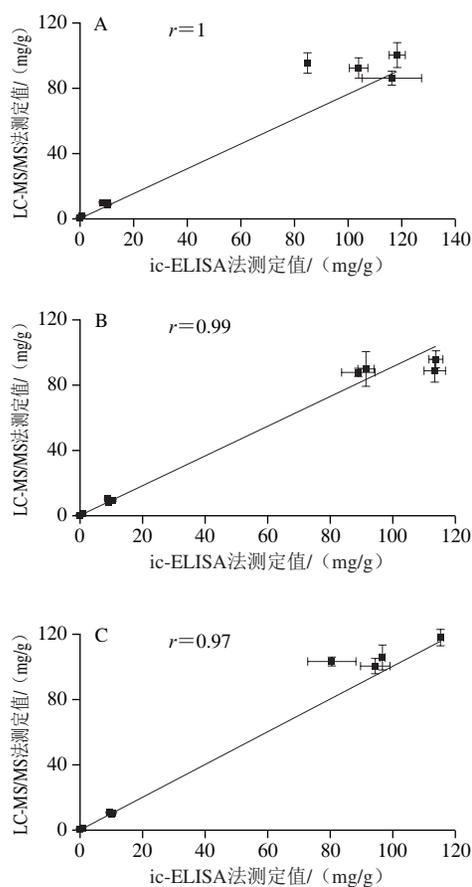


图6 4种不同样品基质对ic-ELISA性能的影响

Fig. 6 Effects of four different sample matrices on ic-ELISA performance

2.6 添加回收率测定

将8种联苯四氮唑沙坦类药物的混合标准溶液逐级稀释,进行LC-MS/MS法测定,当信噪比为3时,计算得到LC-MS/MS法对坎地沙坦、氯沙坦羧酸、洛沙坦钾、奥美沙坦、奥美沙坦酯、厄贝沙坦、缬沙坦和缬沙坦甲酯的检出限分别为0.2、0.6、0.1、0.2、0.5、0.3、0.3 ng/mL和0.03 ng/mL。8种目标分析物在5~100 ng/mL范围内,均呈线性关系。保健食品中添加的药物需达到一定剂量后,才能发挥有效的药物作用;如果剂量过小,其被人体吸收后不能达到有效浓度,便无法发挥药效^[16]。目前已报道的联苯四氮唑沙坦类药物在保健食品中的检出量为1.8~88.2 mg/g^[10]。鉴于此,为适应可能非法添加有联苯四氮唑沙坦类药物的保健食品其实际含量水平,实验选取0.1、1、10、100 mg/g四个添加水平,测定8种目标分析物在片剂、硬胶囊、软胶囊和茶叶4种剂型的降压类保健食品中的添加回收率。结果显示,8种目标分析物ic-ELISA法的平均回收率为80.6%~120.0%之间变异系数在0.3%~14.0%之间,具有良好的回收率和重复性;LC-MS/MS法的平均回收率在81.0%~118.4%之间,变异系数在0.1%~8.4%之间。两者检测结果的相关性见图7,8种目标分析物的相关系数 r 均不低于0.97。ic-ELISA法和LC-MS/MS法测定结果一致性良好,说明实验所建立的ic-ELISA法准确性良好。



A~H.分别为坎地沙坦、氯沙坦羧酸、洛沙坦钾、奥美沙坦、奥美沙坦酯、厄贝沙坦、缬沙坦和缬沙坦甲酯。

图7 ic-ELISA法和LC-MS/MS法测定结果相关性曲线

Fig. 7 Correlation of LC-MS/MS results with ic-ELISA results

2.7 盲样检测

选取14份不同剂型的降压类保健食品,其中片剂2份、硬胶囊3份、软胶囊4份和茶叶5份,同时采用ic-ELISA法和LC-MS/MS法进行检测,均未检出目标分析物。从每种样品基质中随机选取一份样品,进行加标回

收测试,加标量为0.10 mg/g,结果见表4,两种方法的添加回收率均较好,一定程度说明了本次盲样检测实验的数据可信度高。

表4 ic-ELISA法和LC-MS/MS法盲样检测结果比较 ($n=3$)
Table 4 Comparison of blind analysis results by ic-ELISA and those by LC-MS/MS ($n=3$)

| 分析物 | ic-ELISA法 | | LC-MS/MS法 | |
|-------|-----------|--------|-----------|--------|
| | 回收率/% | 变异系数/% | 回收率/% | 变异系数/% |
| 坎地沙坦 | 97.3 | 4.8 | 85.7 | 6.3 |
| 氯沙坦羧酸 | 88.8 | 4.9 | 87.0 | 4.7 |
| 洛沙坦钾 | 91.1 | 1.1 | 101.2 | 1.0 |
| 奥美沙坦 | 104.7 | 6.4 | 94.2 | 5.7 |
| 奥美沙坦酯 | 92.6 | 3.0 | 100.8 | 3.4 |
| 厄贝沙坦 | 106.4 | 2.9 | 95.2 | 1.2 |
| 缬沙坦 | 87.1 | 10.4 | 93.2 | 3.2 |
| 缬沙坦甲酯 | 91.3 | 8.4 | 86.7 | 1.0 |

3 结论

本实验采用免疫分析技术,针对联苯四氮唑沙坦类药物的结构特点,选取坎地沙坦作为通用半抗原,制备免疫原免疫动物并进行抗体特性评价,以缬沙坦-OVA作为包被原时,抗血清PAb-坎地沙坦取得了较好的效价和广谱特异性,通过工作条件优化,建立了针对联苯四氮唑沙坦类药物多残留检测的ic-ELISA法,对坎地沙坦、氯沙坦羧酸、洛沙坦钾、奥美沙坦、奥美沙坦酯、厄贝沙坦、缬沙坦和缬沙坦甲酯8种联苯四氮唑沙坦类药物的 IC_{50} 分别为0.2、0.2、0.7、0.04、0.6、0.3、0.9、2.4 ng/mL,对3种非联苯四氮唑沙坦类药物的交叉反应率小于0.1%。

对片剂、硬胶囊、软胶囊和茶叶4种不同剂型降压类保健食品,采用甲醇超声提取,标准稀释液稀释法消除基质效应,标准添加量为0.1、1、10、100 mg/g时,8种目标分析物的添加回收率为80.6%~120.0%,变异系数为0.3%~14.0%;采用LC-MS/MS法对添加回收检测结果进行确证,两者测定结果相关系数 r 不低于0.97,一致性良好。本研究所建立的ic-ELISA法具有准确、快速、样品前处理简单、可多残留检测的优点,可用于降压类保健食品中联苯四氮唑沙坦类药物的快速筛查。

参考文献:

- [1] 谢立强,胡信群.阿利沙坦酯片与厄贝沙坦片治疗高血压合并冠心病患者的临床研究[J].中国临床药理学杂志,2021,37(19):2562-2564;2568. DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2021.19.004.
- [2] JANA A, RAVICHANDIRAN V, SWAIN S P. Application of organometallic catalysts for the synthesis of *o*-tolyl benzonitrile, a key starting material for sartans[J]. New Journal of Chemistry, 2021, 45(38): 17753-17771. DOI:10.1039/D1NJ03380H.
- [3] 万仁贵,徐佳彬,王永珍,等.新型联苯四氮唑沙坦类化合物的合成[J].合成化学,2015,23(2):172-175. DOI:10.15952/j.cnki.cjcs.1005-1511.2015.02.0172.
- [4] ROVERI V, GUIMARÃES L L, TOMA W, et al. Occurrence and risk assessment of pharmaceuticals and cocaine around the coastal submarine sewage outfall in Guarujá, São Paulo State, Brazil[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(9): 11384-11400. DOI:10.1007/s11356-020-11320-y.
- [5] MUTER O, PÊERKONS I, ŠVINKA V, et al. Distinguishing the roles of carrier and biofilm in filtering media for the removal of pharmaceutical compounds from wastewater[J]. Process Safety and Environmental Protection, 2017, 111: 462-474. DOI:10.1016/j.psep.2017.08.010.
- [6] FONSECA V F, DUARTE I A, DUARTE B, et al. Environmental risk assessment and bioaccumulation of pharmaceuticals in a large urbanized estuary[J]. Science of the Total Environment, 2021, 783: 1-9. DOI:10.1016/j.scitotenv.2021.147021.
- [7] 龙凌云,王伟姣,姜成君,等. UPLC-MS/MS法测定保健食品中非法添加37种降压类化学药的研究[J]. 中南药学, 2019, 17(10): 1690-1695. DOI:CNKI:SUN:ZNYX.0.2019-10-021.
- [8] 陈国权,黄文静,蔡霞,等. 高效液相色谱法测定降压类健康产品中非法添加的4种化学成分[J]. 中南药学, 2018, 16(1): 107-110. DOI: CNKI:SUN:ZNYX.0.2018-01-023.
- [9] ROVERI V, GUIMARÃES L L, TOMA W, et al. Occurrence and ecological risk assessment of pharmaceuticals and cocaine in the urban drainage channels of Santos beaches (São Paulo, Brazil): a neglected, but sensitive issue[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28: 65595-65609. DOI:10.1007/s11356-021-15249-8.
- [10] 陈林,温家欣,齐春艳,等. 降压类中成药及保健食品中21种非法添加化学药物的快速检测与确证方法研究[J]. 分析测试学报, 2016, 35(8): 937-942. DOI:10.3969/j.issn.1004-4957.2016.08.002.
- [11] CIVERA A, GALAN-MALO P, SEGURA-GIL I, et al. Development of sandwich ELISA and lateral flow immunoassay to detect almond in processed food[J]. Food Chemistry, 2022, 371: 131338. DOI:10.1016/j.foodchem.2021.131338.
- [12] ORTEGA J, INFANTES-LORENZO J A, ROY A, et al. Factors affecting the performance of P22 ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in milk samples[J]. Research in Veterinary Science, 2022, 145: 40-45. DOI:10.1016/j.rvsc.2022.02.008.
- [13] VALOUZI H, GOLNARAGHI A, HASHEMI S S, et al. Detection of potyviruses infecting Iranian common beans using broad-spectrum antibodies and universal primer pairs[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2019, 41(4): 535-543. DOI:10.1080/07060661.2019.1579756.
- [14] HAN X Y, SHENG F, KONG D X, et al. Broad-spectrum monoclonal antibody and a sensitive multi-residue indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the antibacterial synergists in samples of animal origin[J]. Food Chemistry, 2019, 280: 20-26. DOI:10.1016/j.foodchem.2018.12.040.
- [15] 杨武英,王弘,洪艳平,等. 咪喃它酮代谢物单链抗体制备和酶联免疫分析方法[J]. 食品科学, 2020, 41(24): 251-258. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20190817-191.
- [16] 王超,祝波,杨钊. RRLC-MS/MS法同时测定保健食品中31种降糖、降压、降血脂类非法添加化学药物[J]. 中国药师, 2019, 22(10): 1946-1950. DOI:CNKI:SUN:ZYSG.0.2019-10-048.
- [17] HU Y M Q, FENG H W, LIU S, et al. The preparation of polyclonal antibody against chlordimeform and establishment of detection by indirect competitive ELISA[J]. Journal of Environmental Science and Health Part B, 2022, 57(2): 114-124. DOI:10.1080/03601234.2022.2029274.

- [18] 罗林. 几种超小分子有害物特异性抗体制备及免疫检测技术研究与应用[D]. 广州: 华南农业大学, 2017: 36-51.
- [19] 舒晓, 褚能明, 张雪梅, 等. 脂质去除分散固相萃取-气相色谱-串联质谱测定鸡蛋中62种农药残留[J]. 食品科学, 2021, 42(14): 320-327. DOI:10.7506/spkx1002-6630-20191211-121.
- [20] KUMAR D, GAUTAM N, ALNOUTI Y. Analyte recovery in LC-MS/MS bioanalysis: an old issue revisited[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2022, 1198: 339512. DOI:10.1016/j.aca.2022.339512.
- [21] LUO L, XU Z L, YANG J Y, et al. Synthesis of novel haptens and development of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of histamine in foods[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(51): 12299-12308. DOI:10.1021/jf504689x.
- [22] 朱琳, 陈子键, 罗林, 等. 基于高特异性单克隆抗体的间接竞争ELISA检测食品中胭脂红的研究[J]. 分析测试学报, 2022, 41(1): 128-135. DOI:10.19969/j.fxcsxb.21040903.
- [23] 蒋佳伊, 张磊, 秦露, 等. 高灵敏度黄曲霉毒素B₁单克隆抗体的制备及其在中药材酸枣仁污染快速检测中的应用[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(16): 3900-3907. DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20200522.201.
- [24] GROSS M S, WOODWARD E E, HLADIK M L. Evaluation of ELISA for the analysis of imidacloprid in biological matrices: cross-reactivities, matrix interferences, and comparison to LC-MS/MS[J]. *Chemosphere*, 2022, 286(Pt 3). DOI:10.1016/j.chemosphere.2021.131746.
- [25] 徐飞. 混合模式磁性吸附剂的制备及其对食品中有毒和有害物质的富集性能研究[D]. 西安: 西北大学, 2019: 35-144.
- [26] WANG B, XIE K Z, LEE K. Veterinary drug residues in animal-derived foods: sample preparation and analytical methods[J]. *Foods*, 2021, 10(3): 555. DOI:10.3390/foods10030555.
- [27] ZHANG Z, LIN H, SUI J X, et al. The effect of chlorophyll on the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of procymidone in vegetables and the way to overcome the matrix interference[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2022, 102(8): 3393-3399. DOI:10.1002/jsfa.11686.
- [28] HASEGAWA T, KOMAGATA M, HAMASAKI A, et al. Solid-phase extraction treatment is required for measurement of active glucagon-like peptide-1 by enzyme-linked immunosorbent assay kit affected by heterophilic antibodies[J]. *Journal of Diabetes Investigation*, 2019, 10(2): 302-308. DOI:10.1111/jdi.12896.
- [29] 刘坤. 饲料中玉米赤霉烯酮的高效富集及免疫层析定量检测方法的建立[D]. 南昌: 南昌大学, 2015: 22-33.
- [30] HOFFMANN H, KNIZIA C, KUHNE M, et al. LC-ELISA as a contribution to the assessment of matrix effects with environmental water samples in an immunoassay for estrone (E1)[J]. *Accreditation and Quality Assurance*, 2018, 23: 349-364. DOI:10.1007/s00769-018-1351-7.