

[2] 苏小川, 黄梅, 甘宾宾, 等. 调味品辣椒粉和腌料中苏丹染料的 GC-MS 分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1073-1074.

[3] 谷岩, 崔松林, 周宇, 等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中碱性橙玫瑰精含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2006, 12(4): 202-204.

[4] 卢彩霞, 陈艳, 李永波. 高效液相色谱法测定豆制品中酸性橙 II 和酸性金黄[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(15): 2594-2595.

[5] 赵莹, 赵海燕, 李兵, 等. 建立同时测定调味品中非法添加的 4 种工业染料 SPE-UPLC-MS/MS 法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(5): 410-414.

[6] 谭莹, 吴平谷, 张晶, 等. HPLC 法测定辣椒中碱性橙的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(3): 522-524.

[7] 杨琳, 陈青俊, 丁献荣, 等. 高效液相色谱法测定食品中 3 种碱性橙含量[J]. 理化检验(化学分册), 2011, 23(7): 768-770.

[8] 曹鹏, 乔旭光, 娄喜山, 等. 固相萃取结合超高效液相色谱-串联质谱法同时检测食品中的 6 种工业染料[J]. 分析化学, 2011, 25(11): 1670-1675.

[9] 赵海燕, 赵榕, 李兵, 等. HPLC 同时测定调味料中非法添加多组分工业染料的方法研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(6): 527-531.

[10] 王竹天, 杨大进. 调味品中碱性橙、碱性玫瑰精、酸性橙 II 及酸性金黄四种工业染料测定的标准操作程序[M]. 食品中化学污染物及有害因素监测技术手册, 北京: 中国标准出版社, 2011.

实验技术与方法

磺胺二甲嘧啶间接竞争化学发光酶免疫分析法的建立及应用

马玲¹, 韦建兴¹, 陆忠础², 唐承明³, 李辉², 李智红², 张怡轩¹, 甘浪帆², 吴健敏¹

(1. 广西壮族自治区兽医研究所, 广西南宁 530001; 2. 南宁市动物卫生监督所, 广西南宁 530001; 3. 广西壮族自治区兽药监察所, 广西南宁 530001)

摘要:目的 建立一种更加灵敏的磺胺二甲嘧啶(SM₂)免疫学检测方法。方法 本研究制备抗 SM₂ 单克隆抗体(SM₂-mAb), 用于建立 SM₂ 间接竞争化学发光酶免疫分析法(SM₂-CLEIA), 并检测主要动物食品中 SM₂ 残留。结果 本研究制备的 SM₂-mAb 为 IgG_{2b} 亚类, 亲和常数为 0. 12 × 10⁷ L/mol; SM₂-CLEIA 曲线在 0. 1 ~ 1 000 μg/L 之间呈现良好的线性关系, 相关系数 $r^2 = 0. 990\ 4$, 半数抑制浓度(IC₅₀) 为 4. 006 μg/L, 检测限为 0. 174 μg/L, 添加回收率为 94. 41% ~ 104. 40%, 批内和批间变异系数分别为 3. 07% 和 8. 22%, 与磺胺脒等药物无交叉反应, 与 SM₂-ELISA 试剂盒的阴阳性符合率为 100%。结论 建立了灵敏、特异、准确、检测范围宽的 SM₂-CLEIA 检测方法。**关键词:**磺胺二甲嘧啶; 间接竞争化学发光酶免疫分析法; 兽药残留; 检测

中图分类号: R155; S859. 79⁺6 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)05-0455-06
DOI: 10. 13590/j. cjfh. 2014. 05. 012

Development and application of indirect competitive chemiluminescence immunoassay for detecting sulfadimidine residue

MA Ling, WEI Jian-xing, LU Zhong-chu, TANG Cheng-ming, LI Hui, LI Zhi-hong, ZHANG Yi-xuan, GAN Lang-fan, WU Jian-min
(Guangxi Veterinary Research Institute, Guangxi Nanning 530001, China)

Abstract: **Objective** To develop a more sensitive immunologic method for SM₂ detection. **Methods** An indirect competitive chemiluminescence immunoassay was established with SM₂ monoclonal antibody, and was used to detect the SM₂ residue in animal derived foods. **Results** The results indicated that the SM₂-mAb belongs to subclass of IgG_{2b}, and its affinity constant was 0. 12 × 10⁷ L/mol. The detection limit of SM₂-CLEIA was 0. 174 μg/L with the linear range of 0. 1 to 1 000 μg/L ($r^2 = 0. 990\ 4$), and IC₅₀ was 4. 006 μg/L. The recoveries were from 94. 41% to 104. 40%. The variability within and between batches were 3. 07% and 8. 22%, respectively. There was no significant cross reaction between SM₂-

收稿日期: 2014-07-02
基金项目: 广西壮族自治区科技厅基本科研业务专项(桂科专项 12-4); 南宁市科学研究与技术开发计划-科技创新能力与条件建设项目(201102047B)
作者简介: 马玲 女 助理研究员 研究方向为分子免疫学与传染病学 E-mail: maling0120@sohu.com
通讯作者: 吴健敏 女 研究员 研究方向为分子病毒学与动物传染病 E-mail: wu-jm20@163.com

mAb and SG or other drugs, and the results were 100% in accordance with those of the SM₂-ELISA kit. **Conclusion** SM₂-CLEIA was established, which was sensitive, specific, precise and with wide linear range.

Key words: Sulfadimidine; indirect competitive chemiluminescence immunoassay; veterinary drug residue; detection

磺胺二甲嘧啶(sulfadimidine, SM₂) 又称磺胺二甲甲基嘧啶、磺胺间二甲嘧啶, 是畜牧养殖业中应用最广的磺胺类药物之一, 其添加或滥用可导致动物性食品中的药物残留, 威胁人类健康。因此, 联合国食品法典委员会和欧盟等规定, 食品和饲料中磺胺类药物(sulfonamides, SAs) 总量以及 SM₂ 等单个 SAs 的量均不得超过 100 μg/kg; 日本规定的最高残留限量为 10 μg/kg; 2002 年 12 月我国农业部公告第 235 号文件规定^[1], 在所有食用动物的肌肉、脂肪、肝和肾中, 磺胺类最高残留限量为 100 μg/kg, 并将其列为兽药残留监控重点。

目前, 检测磺胺二甲嘧啶的方法有微生物法、理化方法(如高效液相色谱法、薄层层析等)和免疫分析法(如放射免疫分析法、酶联免疫吸附法、化学发光酶免疫分析法等)。其中, 化学发光酶免疫分析法(chemiluminescence enzyme immunoassay, CLEIA)以其灵敏度高、特异性好、简便快速、无辐射、标记物有效期长并可实现全自动化检测等优点, 越来越多地用于临床样品的高通量筛选, 该法将免疫反应的特异性与化学发光分析的灵敏性相结合, 为食品中残留药物分析检测和科学研究提供了一种痕量或超痕量的非放射免疫分析技术, 在注重灵敏度的方法中有逐步取代放射免疫和普通酶联免疫(ELISA)的趋势, 是免疫分析的重要发展方向, 近年来已被应用于多种药物残留的检测^[2-5], 但有关检测磺胺二甲嘧啶残留的化学发光酶免疫分析法尚未见报道。

为此, 本研究制备了磺胺二甲嘧啶单克隆抗体(SM₂-mAb), 旨在为建立灵敏度高、特性强、快速、准确、可用于动物食品中磺胺二甲嘧啶残留检测的间接竞争化学发光酶免疫分析法(SM₂-CLEIA), 并用于样品的检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物和细胞系

BALB/c 小鼠购自广西医科大学实验动物中心(实验动物生产许可证: SCXK 2009-0002); Sp2/0 骨髓瘤细胞由成都军区昆明疾病预防控制中心李作生博士提供。

1.1.2 主要仪器与试剂

OptiPlate™ 化学发光板(美国 PerkinElmer)、CentroLB960 微孔板式发光仪(德国 Berthold)、

Wellwash4Mk2 洗板机(美国 ThermoFisher)。

聚乙二醇 4000、HAT、HT、弗氏完全佐剂及不完全佐剂均购自美国 Sigma, 磺胺二甲嘧啶-牛血清白蛋白(SM₂-BSA)、磺胺二甲嘧啶-卵清蛋白(SM₂-OVA)、磺胺二甲嘧啶(SM₂)均购自上海生工生物技术有限公司, HRP-羊抗鼠 IgG(美国 SantaCruz), 超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物技术研究所以)。

1.2 方法

1.2.1 SM₂-mAb 的制备及纯化

分别以 SM₂-BSA、SM₂-OVA 做为免疫抗原和筛选抗原, 按照常规方法^[6]进行动物免疫、细胞融合、克隆筛选、鉴定及腹水制备; 对获得的腹水先后采用硫酸铵盐析法和亲和层析法进行纯化, 并通过聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)分析纯化后单抗的纯度, 同时利用 BCA 蛋白检测试剂盒测定抗体浓度。

1.2.2 SM₂-mAb 特性鉴定

亚类鉴定: 按照洛阳佰奥通实验材料中心的小鼠单抗 Ig 类/亚类鉴定用 ELISA 试剂盒鉴定 SM₂-mAb 的亚类。

相对亲和常数测定: 分别用 0.6、0.3、0.15、0.075 μg/ml 的 SM₂-OVA 包被酶标板, 再先后加入倍比稀释的 SM₂-mAb、酶标二抗分别反应, 最后测定 OD₄₅₀ 值; 以 SM₂-mAb 浓度为横坐标, OD₄₅₀ 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算不同抗原稀释度下, 曲线上 1/2 OD_{max} 对应的抗体浓度, 按照公式: $Ka = (n - 1) / (2(n[Ab']_i - [Ab]_i))$ 计算 Ka 值。

1.2.3 SM₂-CLEIA 反应条件的确定^[2,4,7]

采用间接竞争化学发光酶免疫分析法, 在不同反应条件下, 对 SM₂-OVA 稀释度(1:25 000、1:50 000、1:75 000、1:100 000 和 1:125 000)、包被条件(37℃ 10 h、24℃ 10 h、4℃ 10 h 和 37℃ 3 h、24℃ 3 h 和 4℃ 3 h)、封闭液(20 mM 的 PBS、5% 的脱脂奶粉、1% 的 BSA、5% 的胎牛血清)、封闭条件(37℃ 1 h、37℃ 2 h 和 4℃ 过夜)、SM₂-mAb 稀释度(1:1 000、1:1 500、1:2 000 和 1:2 500)和 HRP-羊抗鼠 IgG 稀释度(1:1 000、1:2 000、1:4 000 和 1:8 000)以及竞争反应时间进行 CLEIA 反应, 计算各条件下半数抑制浓度(IC₅₀), 以 IC₅₀ 值最低的条件为最佳反应条件^[7-8]。

1.2.4 SM₂-CLEIA 的评价

1.2.4.1 标准曲线的建立、半数抑制浓度和检测限
在最佳条件下, 将 SM₂ 配成 0.1 ~ 1 000 μg/L

系列浓度,每个浓度设3个平行样,进行检测。以标准样品溶液浓度的对数值为横坐标,以各浓度 SM₂ 标准品的发光值与“0”浓度孔发光值的百分比 (rlu/rlu 0%) 为纵坐标,绘制标准曲线,计算 IC₅₀,即发光强度达到零标准品发光强度一半时所对应的 SM₂ 浓度。

测定 20 份不同批次的空白标准品,计算空白标准品平均值($\bar{x}$)和标准差(s),取 $\bar{x} - 2s$ 值所对应的浓度值作为方法的检测限^[9-11],即灵敏度。

1.2.4.2 方法的特异性

方法的特异性由 SM₂-mAb 的特异性决定,以交叉反应率表示,交叉反应率越小,说明方法的特异性越高。运用建立的 SM₂-CLEIA 测定 SM₂ 结构类似物和常见抗生素(磺胺脒、磺胺嘧啶、磺胺五甲嘧啶、磺胺二甲氧嘧啶、磺胺甲恶唑、青霉素、氧氟沙星、氯霉素、己烯雌酚)的 IC₅₀,根据公式:交叉反应率 = IC₅₀(SM₂)/IC₅₀(其他药物) × 100%,分别计算各药物与 SM₂-mAb 的交叉反应率。

1.2.4.3 添加回收率、准确性和精密性

准确性是指测定值与真实值的符合程度,以添加回收率和变异系数(CV%)表示。将低、中、高 3 个浓度(1、10、100 μg/L)的 SM₂ 标准品分别添加到空白样品中进行回收试验,每个样品设定 3 孔重复,确定方法的准确性。

精密性反映测定方法测定结果的可重复性,以批内和批间 CV% 表示。运用建立的 SM₂-CLEIA 用同一批次和不同批次配制试剂分别对 5 份样品进行 3 次批内和 3 次批间重复性试验,以确定 SM₂-CLEIA 批内和批间试验的 CV%。

1.2.5 样品的检测

采集虾、鱼、猪肉和牛奶样品共 686 份,参照国家农业部 1025 公告—24—2008 标准^[12]进行样品的前处理,然后用本研究的 SM₂-CLEIA 进行检测。按照农业部规定,当残留量超过 100 和 25 μg/kg(牛奶)判为不合格。

1.2.6 与 ELISA 检测试剂盒的比较

对包括阳性样品的 36 份样品分别使用北京勤邦生物技术有限公司的 SM₂-ELISA 试剂盒(编号:CA096)和本研究建立的 SM₂-CLEIA 同时检测 SM₂ 的残留量,并对两种方法的阴阳性符合率和检测数据进行比对及统计学分析。

2 结果与分析

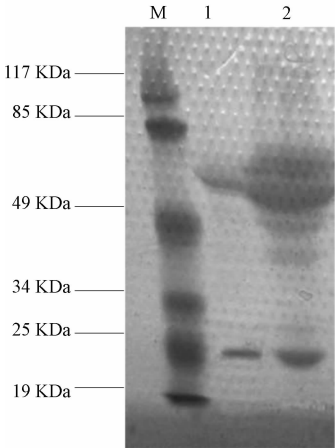
2.1 SM₂-mAb 杂交瘤细胞株的建立

通过间接 ELISA 筛选获得了 1 株分泌抗 SM₂ 的强阳性杂交瘤细胞株,命名为 1E7。

2.2 SM₂-mAb 特性鉴定

2.2.1 纯化结果

SDS-PAGE 结果如图 1 所示,与腹水相比,SM₂-mAb 仅见 2 条清晰条带,分别为约 50 和 25 kDa 的重链和轻链,说明纯化后的 SM₂-mAb 已达到电泳纯。BCA 蛋白含量测定结果为 4.536 mg/ml。



注:M:蛋白质 Marker;1. 纯化后抗体 1E7;2. 腹水

图 1 SM₂-mAb 的聚丙烯酰胺电泳鉴定

Figure 1 SDS-PAGE of SM₂-mAb

2.2.2 亚类鉴定结果

按照试剂盒说明测定 1E7 抗体亚类为 IgG_{2b}。

2.2.3 相对亲和常数测定

相对亲和常数的测定结果见图 2,如图所示,计算不同抗原稀释度相应曲线上 1/2 OD_{max} 时对应的抗体浓度,计算 SM₂-mAb 的相对亲和常数为 0.12 × 10⁷ L/mol,为中等强度亲和力^[13]。

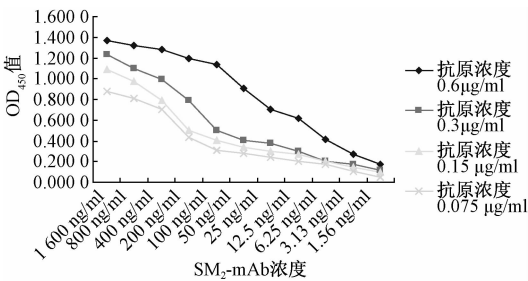


图 2 SM₂-mAb 相对亲和常数的测定

Figure 2 Determination of relative affinity index for SM₂-mAb

2.3 SM₂-CLEIA 反应条件的优化结果

根据 IC₅₀ 值大小,确定 1:100 000 稀释 4 ℃ 作用 10 h 可以达到最佳包被效果,见表 1;封闭条件以 5% 脱脂奶粉 37 ℃ 封闭 1 h 为最佳,见表 2;如表 3 所示,SM₂-mAb 以 1:1 500 为最佳稀释倍数,竞争时间 60 和 30 min 对反应影响不大,但竞争时间为 60 min 时,曲线在 0.1 ~ 1 μg/L 结果不易判断,所以选择 30 min 作为最佳竞争反应时间。根据上述结果确定 SM₂-CLEIA 操作程序为:将 100 μl

1:100 000 稀释的 SM₂-OVA 在 4 ℃ 包被化学发光板 10 h 后,恢复至室温,加 350 μl 5% 脱脂奶粉 37 ℃ 封闭 1 h,另外预先将梯度稀释的 SM₂ 标准品及待检样品与 50 μl 1:1 500 稀释的 SM₂-mAb 按 1:1 (V/V)混合,37 ℃ 预反应 45 min 后,再分别添加到化学发光板相应孔中竞争反应 30 min,使固定的 SM₂-BSA 与游离的 SM₂ 竞争 SM₂-mAb 的结合位点,随后加入 1:2 500 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG 反应 45 min,最后加入化学发光液并读取数值。

表 1 抗原包被条件的优化结果

Table 1 Optimization of coating condition			
抗原稀释倍数	IC ₅₀ /(μg/L)	包被条件	IC ₅₀ /(μg/L)
1:25 000	18.80	37 ℃ 10 h	394.20
1:50 000	14.01	25 ℃ 10 h	18.74
1:75 000	10.66	4 ℃ 10 h	4.01
1:100 000	8.65	37 ℃ 3 h	82.13
1:125 000	13.00	25 ℃ 3 h	309.36
—	—	4 ℃ 3 h	116.65

注:—表示无

表 2 封闭条件的优化结果

Table 2 Optimization of blocking condition			
封闭材料	IC ₅₀ /(μg/L)	封闭时间/min	IC ₅₀ /(μg/L)
20 mM PBS	—	45	37.96
5% 脱脂奶粉	9.61	60	19.84
1% BSA	13.62	90	75.88
5% 胎牛血清	13.84	120	99.13

注:—表示无法测定

表 3 抗体稀释倍数、竞争反应时间的优化结果

Table 3 Determination of SM ₂ -mAb dilution ratio and competitive reaction time			
抗体稀释倍数	IC ₅₀ /(μg/L)	竞争反应时间/min	IC ₅₀ /(μg/L)
1:500	13.43	15	24.37
1:1 000	7.84	30	8.29
1:1 500	6.69	60	5.24
1:2 000	7.30	—	—

注:—表示无

2.4 SM₂-CLEIA 的评价

2.4.1 标准曲线的建立、半数抑制浓度和检测限

按照上述反应条件,所绘制的标准曲线符合 4 参数 Logit 曲线拟合,回归方程为 $y = -22.13x + 63.338$, $r^2 = 0.990 4$, IC₅₀ 为 4.006 μg/L,曲线在 0.1 ~ 1 000 μg/L 之间呈现良好的线性关系。测定 20 份不同批次的空白样品,计算 SM₂-CLEIA 检测限为 0.174 μg/L。

2.4.2 特异性

选取 SM₂ 结构类似物和常见抗生素进行检测,测定 IC₅₀,计算各药物的交叉反应率,由表 4 可知,SM₂-CLEIA 与上述药物的交叉反应率均 <0.01%,表明本方法具有较高的特异性。

表 4 特异性测定结果

Table 4 Results of specificity	
药物	交叉反应率/%
磺胺二甲嘧啶	100
磺胺脒	<0.01
磺胺嘧啶	<0.01
磺胺五甲嘧啶	<0.01
磺胺二甲氧嘧啶	<0.01
磺胺甲恶唑	<0.01
青霉素	<0.01
氧氟沙星	<0.01
氯霉素	<0.01
己烯雌酚	<0.01

2.4.3 添加回收率、准确性和精密性

试验结果如表 5 所示,SM₂-CLEIA 的添加回收率在 94.41% ~ 104.40% 之间,变异系数在 2.17% ~ 8.71%,均远低于 15%,表明本法具有较高的准确性^[14]。

表 5 添加回收率试验

Table 5 Results of recovery test			
添加量/(μg/L)	测定值/(μg/L)	回收率/%	CV/%
1	0.96 ± 0.04	95.58 ± 2.07	2.17
10	9.44 ± 0.57	94.41 ± 2.87	3.04
100	104.40 ± 18.18	104.40 ± 9.09	8.71

试验结果如表 6 所示,各浓度平均批内变异系数为 3.07%,批间变异系数为 8.22%,批内变异系数小于批间变异系数,且均远低于 15%,表明本方法具有较高的精密性和较好的重复性。

表 6 精密性试验

Table 6 Results of precision test				
SM ₂ 浓度/(μg/L)	批内重复试验		批间重复试验	
	CV/%	平均值/%	CV/%	平均值/%
0.1	0.19		3.26	
1	4.06		5.06	
10	2.04	3.07	6.97	8.22
100	6.18		14.10	
1000	2.89		11.70	

2.5 样品的检测

用本方法检测样品 686 份,在 63 份虾样品、86 份鱼样品、189 份猪肉样品和 348 份牛奶样品中 SM₂ 阳性分别为 2、2、8 和 0 份。

2.6 与 ELISA 检测试剂盒检测结果的比较

比较分析 SM₂-CLEIA 与 SM₂-ELISA 检测试剂盒的检测结果(见表 7),发现这两种方法阴阳性符合率为 100%;对两种方法检测数值进行 t 检验可知, $t = 0.410$, $P = 0.648 > 0.05$,提示两种方法的检测结果之间无显著差异,说明对相同样品,两种方法可获得一致的检测结果。而在检测限、检测范围等方面,SM₂-

CLEIA 具有优势,因此具有较好的应用前景。

表 7 SM₂-CLEIA 与 SM₂-ELISA 试剂盒检测结果比对
Table 7 Comparison of SM₂-CLEIA and SM₂-ELISA kit

样品 编号	SM ₂ -CLEIA /(μg/kg)	SM ₂ -ELISA /(μg/kg)	样品 编号	SM ₂ -CLEIA /(μg/kg)	SM ₂ -ELISA /(μg/kg)
虾 1	317.34	248.08	猪 4	407.82	443.02
虾 2	335.67	266.10	猪 5	353.73	385.93
虾 15	1.00	2.31	猪 10	8.56	18.17
虾 17	1.52	2.36	猪 11	1.35	1.36
虾 19	1.30	2.96	猪 15	353.73	340.27
虾 20	1.45	2.60	猪 17	1.40	1.45
鱼 1	335.67	378.32	猪 19	5.15	4.40
鱼 2	364.49	334.21	猪 24	1.08	1.14
鱼 11	2.19	1.89	猪 25	1.38	2.18
鱼 12	1.67	1.81	猪 44	323.34	271.30
鱼 14	2.90	3.53	猪 61	360.42	348.44
鱼 15	2.06	3.19	猪 83	296.66	347.66
鱼 17	1.74	1.22	猪 64	357.73	334.21
鱼 18	1.41	1.80	猪 65	318.53	241.62
鱼 20	1.15	2.92	猪 88	3.97	14.07
猪 1	158.16	172.24	猪 86	28.36	32.23
猪 2	410.88	445.00	猪 111	4.08	18.17
猪 3	397.27	420.57	猪 125	4.08	1.80

3 讨论

CLEIA 是世界范围内发展非常迅速的非放射性免疫分析技术,是继酶免、放免和荧光免疫技术之后发展起来的一种超高灵敏度的微量检测技术,具有检测范围宽、灵敏度高、准确率高、重复性好等特点,是目前免疫定量分析最理想的方法。

其中,单克隆抗体是影响 CLEIA 的关键因素,与方法的灵敏度、特异性、准确性和精确性等都有直接关系。本研究制备的 SM₂-mAb 亲和力中等,因此在 SM₂-CLEIA 中,增加 SM₂ 标准品及待检样品与 SM₂-mAb 预反应的操作步骤,这样可使方法的检测限降低 10 倍,是提高方法评价指标的有效手段。

在方法灵敏度的确定上,目前王爱萍等^[15]使用的 $LOD\% = (\bar{x} - 2s) / \bar{x}$ 、龚云飞和高彬文等^[8,16]使用的 IC_{90} 以及 TAO 等^[4]使用的 IC_{50} 来表示。按照以上方法计算 SM₂-CLEIA 的灵敏度分别为 0.177、0.062 和 4.006 μg/L,其中 $LOD\% = (\bar{x} - 2s) / \bar{x}$ 方法与本研究使用的 $(\bar{x} - 2s)$ 方法的计算值基本一致,另外 $(\bar{x} - 2s)$ 方法应用更广泛,所以本研究使用 $(\bar{x} - 2s)$ 计算本方法的检测限。

本研究建立了磺胺二甲嘧啶间接竞争化学发光酶免疫分析法,该法比高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用方法检测限低近 17、57 倍^[17],比间接竞争 ELISA^[18] 和胶体金^[19] 的检测限低 10 倍,比直接竞争 ELISA^[16] 阻断 ELISA^[14] 和毛细管电泳-电导法^[20] 的检测范围宽 2 个数量级,比蛋白芯片法的

精确性好^[21],比双标记时间分辨荧光分析法^[22] 的准确性和精确性更高、且可检测样品种类多,因此具有较好的应用前景。

参考文献

[1] 中华人民共和国农业部公告 第 235 号. 动物性食品中兽药最高残留限量[S]. 北京:中国标准出版社,2002.

[2] 马玲,关忠谊,吴健敏,等. 氯霉素残留一步式化学发光酶免疫法的建立[J]. 南方农业学报,2011,42(2):205-208.

[3] WU Y, YU S, YU F, et al. Chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of sulfamethoxydiazine[J]. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011, 81(1):544-547.

[4] TAO X Q, YU X Z, SHI W M, et al. Development of a rapid chemiluminescent ciELISA for simultaneous determination of florfenicol and its metabolite florfenicol amine in animal meat products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(2):301-307.

[5] LIN S, HAN S Q, LIU Y B, et al. Chemiluminescence immunoassay for chloramphenicol[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(5):1250-1255.

[6] 张启模,杨姝,马玲,等. 抗氯霉素单克隆抗体的制备及其化学发光酶免疫法的建立[J]. 动物医学进展,2011,32(8):12-16.

[7] Maiolini E, Knopp D, Niessner R, et al. Chemiluminescent ELISA for the BTEX determination in water and soil[J]. Analytical Sciences, 2010, 26(7):773-777.

[8] 高彬文,张素霞,沈建忠,等. 化学发光酶联免疫法检测鱼虾中氯霉素残留[J]. 中国兽医杂志,2007,43(5):68-69.

[9] WANG X, CHEN H, LIN J M, et al. Development of a highly sensitive and selective microplate chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of free thyroxine in human serum[J]. International Journal of Biological Sciences, 2007, 3(5):274-280.

[10] 罗杰,李健. 呋喃唑酮间接竞争 ELISA (ciELISA) 检测法的建立[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2005,35(2):213-218.

[11] 沈建忠,何方洋,何继红,等. 动物组织中磺胺二甲嘧啶残留检测 ELISA 试剂盒的研制[J]. 中国兽药杂志,2003,39(6):6-8.

[12] 中华人民共和国农业部. 第 1025 号公告—24—2008 动物源食品中磺胺二甲嘧啶残留检测酶联免疫吸附法[S]. 北京:中国标准出版社,2008:1-4.

[13] Goding J W. Monoclonal antibodies: principles and practice[M]. Access Online via Elsevier, 1996.

[14] 张改平,刘庆堂,邓瑞广,等. 磺胺二甲基嘧啶残留快速检测阻断 ELISA 试剂盒的研制及其性能测定[J]. 中国预防兽医学报,2009,31(1):51-55.

[15] 王爱萍,李发弟,胡晓飞,等. 新霉素阻断 ELISA 试剂盒的研制与应用[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(6):857-864.

[16] 龚云飞,王唯芬,张明洲,等. 磺胺二甲嘧啶快速直接竞争 ELISA 试剂盒的研制及应用[J]. 畜牧兽医学报,2011,42(7):1007-1014.

[17] YU H, TAO Y, CHEN D, et al. Development of a high performance liquid chromatography method and a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method with the pressurized liquid extraction for

the quantification and confirmation of sulfonamides in the foods of animalorigin[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879 (25) : 2653-2662.

[18] 英瑜,李健. 水产品中磺胺二甲嘧啶间接竞争 ELISA 检测法的建立[J]. 海洋水产研究,2005,26(4) :45.

[19] Shim W B, Kim J S, Kim M G, et al. Rapid and sensitive immunochromatographic strip for on-site detection of sulfamethazine in meats and eggs[J]. Journal of Food Science,2013,78 (10) :1575-1581.

[20] 谢玉璇,谢天尧,刘秋英,等. 毛细管电泳-电导法分离检测磺胺嘧啶,磺胺甲嘧啶和磺胺二甲嘧啶[J]. 分析测试学报,2006,25(3) :100-102.

[21] 左鹏,叶邦策. 蛋白芯片法快速测定食品中氯霉素和磺胺二甲嘧啶残留[J]. 食品科学,2007,28(2) :254-258.

[22] LE T,YAN P,LIU J,et al. Simultaneous detection of sulfamethazine and sulfaquinoxaline using a dual-label time-resolved fluorescence immunoassay [J]. Food Additives & Contaminants: Part A,2013 (just-accepted).

实验技术与方法

固相萃取-高效液相色谱-荧光检测法同时测定动物源性食品中 8 种氟喹诺酮类药物残留

宫小明¹,于金玲¹,孙军¹,万进²,崔晓娜³,高彦¹

(1. 潍坊出入境检验检疫局,山东 潍坊 261041; 2. 青岛技师学院,山东 青岛 266229; 3. 山东畜牧兽医职业学院,山东 潍坊 261061)

摘要:目的 建立动物源性食品中 8 种氟喹诺酮类药物(麻保沙星,诺氟沙星、环丙沙星、达氟沙星、恩诺沙星,二氟沙星,噁喹酸,氟甲喹)残留的高效液相色谱检测法。方法 样品用 EDTA-Mcllvaine 缓冲溶液提取,PEP-2 固相萃取柱净化,ZORBAX C₁₈(4.6 mm×250 mm,5 μm)分离,荧光检测器检测,外标法定量。结果 麻保沙星,噁喹酸,氟甲喹配制标准品浓度在 30~360 μg/L,其余 5 种在 15~180 μg/L 范围内线性关系良好,相关系数均>0.99,诺氟沙星,环丙沙星,恩诺沙星,二氟沙星的检出限为 2 μg/kg,达氟沙星的检出限为 0.5 μg/kg,麻保沙星,噁喹酸,氟甲喹的检出限为 8 μg/kg,各种组分回收率在 77.6%~98.3% 之间,相对标准偏差为 2.8%~9.4%。结论 该方法操作简单,准确度和精密度高,对人体危害较小,能够满足不同基质检测的需要。

关键词:氟喹诺酮; 高效液相色谱法; 荧光检测器; 动物源性食品; 兽药残留; 食品安全

中图分类号:R155;S859.84 文献标志码:A 文章编号:1004-8456(2014)05-0460-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2014.05.013

Simultaneous determination of 8 fluoroquinolones residues in animal derived food by SPE-HPLC-FLD

GONG Xiao-ming, YU Jin-ling, SUN Jun, WAN Jin, CUI Xiao-na, GAO Yan

(Weifang Entry Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shandong Weifang 261041, China)

Abstract: Objective A high performance liquid chromatographic method was developed for determination of 8 fluoroquinolones residues in animal derived food (including marbofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, norfloxacin, enrofloxacin, difloxacin, oxolinic acid, and flumequine). **Methods** The sample residues were extracted by EDTA-Mcllvaine buffer, purified with PEP-2 solid-phase extraction column, separated by ZORBAX C₁₈ (5 μm, 4.6 mm×250 mm) and quantified by external standard calibration curves. **Results** Marbofloxacin, oxolinic acid, and flumequine in 30-360 μg/L, and the remaining five drugs in 15-180 μg/L linear relationship is good, the correlation coefficient is greater than 0.99. The detection limit (including norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, difloxacin) is 2 μg/kg, the detection limit of danofloxacin is 0.5 μg/kg, the detection limit of marbofloxacin, oxolinic acid and flumequine is 8 μg/kg, the recoveries are between 77.6%-98.3%, the relative standard deviations are between 2.77%-9.35%.

Conclusion The method was simple, high accuracy and precision, less harmful to human body and could be satisfied with

收稿日期:2014-05-11

基金项目:国家自然科学基金项目(SK201216(LC/MS/MS))

作者简介:宫小明 男 高级工程师 研究方向为毒素农兽药残留 E-mail:Gongxiaoming@yahoo.com

通讯作者:于金玲 女 工程师 研究方向为食品检测 E-mail:wftxhappy@163.com