

# 生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法测定呋喃西林代谢物

黄登宇<sup>1,2</sup>, 冯敏<sup>1</sup>, 李亚楠<sup>1</sup>, 高丽霞<sup>1</sup>, 高文静<sup>1</sup>, 杨秀松<sup>3\*</sup>

(1. 山西大学生命科学学院, 太原 030006; 2. 山西大学食品药品快检技术中心, 太原 030006;  
3. 国家食品药品监督管理总局高级研修学院, 北京 100073)

**摘要:** **目的** 建立竞争生物素-亲和素放大酶联免疫吸附测定法(biotin-avidin enzyme linked immunosorbent assay, BA-ELISA)检测呋喃西林代谢物。**方法** 采用棋盘法确定单克隆抗体和包被原的最佳稀释倍数, 通过单因素试验优化辣根过氧化物酶标记的链霉亲和素(streptavidin-horseradish peroxidase, SA-HRP)稀释倍数、封闭液浓度、竞争反应时间、生物素标记羊抗鼠二抗(biotinylated goat anti-mouse ImmunoglobulinG, Biotin-IgG)孵育时间、SA-HRP 孵育时间和显色时间, 建立标准曲线, 并对方法的灵敏度、特异性、准确度和精密度进行方法学评价。**结果** 最佳实验条件为: 包被原稀释倍数为 1:800, 单克隆抗体稀释倍数为 1:12800, SA-HRP 稀释倍数为 1:8000, 封闭液为 1%的脱脂乳, 竞争反应时间为 30 min, Biotin-IgG 孵育时间为 30 min, SA-HRP 孵育时间为 60 min, 显色时间为 15 min; 在优化条件下, 线性方程为  $Y=-0.3299X+0.4272$  ( $r^2=0.990$ ),  $IC_{50}$  为 0.601 ng/mL, 线性范围为 0.074~4.883 ng/mL; 加标回收率为 88.8%~98.5%, 批内变异系数(coefficient of variation, CV)和批间 CV 分别为 1.2%~3.6%和 2.5%~5.1%, 建立的方法与其他结构类似物及衍生化试剂的交叉反应率(cross reactivity, CR)均小于 0.1%。BA-ELISA 与高效液相色谱-串联质谱法的回收率均在 85%~115%范围内。**结论** BA-ELISA 法灵敏度高、特异性好、重现性好, 可适用于动物组织中呋喃西林代谢物的快速筛查。**关键词:** 兽药; 呋喃西林; 氨基脲; 生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法

## Determination of nitrofurazone metabolite by biotin-avidin enzyme-linked immunosorbent assay

HUANG Deng-Yu<sup>1,2</sup>, FENG Min<sup>1</sup>, LI Ya-Nan<sup>1</sup>, GAO Li-Xia<sup>1</sup>, GAO Wen-Jing<sup>1</sup>, YANG Xiu-Song<sup>3\*</sup>

(1. College of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Food and Drug Rapid Inspection Technology Center, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 3. China Food and Drug Administration Institute of Executive Development, Beijing 100073, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for determination of nitrofurazone metabolite by biotin-avidin enzyme-linked immunosorbent assay (BA-ELISA). **Methods** The optimal dilutions of monoclonal antibody and coating antigen were determined by chequerboard titration. The effects of the dilution ratio of streptavidin-horseradish peroxidase (SA-HRP), the concentration of sealing fluid, the competitive reaction time, the incubation time of biotinylated goat anti-mouse IgG(Biotin-IgG), SA-HRP incubation time and chromogenic reaction time were optimized by single-factor experiments. The standard curve was set up. The degree of sensitivity,

\*通讯作者: 杨秀松, 硕士, 主要研究方向为食品科学与食品安全。E-mail: 787898353@qq.com

\*Corresponding author: YANG Xiu-Song, Master, China Food and Drug Administration Institute of Executive Development, No.16, Xizhan Avenue, Fengtai District, Beijing 100073, China. E-mail: 787898353@qq.com

specificity, precision and accuracy about the method were evaluated. **Results** The result of optimized reaction conditions were as follows: fold dilution of coating antigen was 1:800, fold dilution of monoclonal antibody was 1:12800, fold dilution of SA-HRP was 1:8000, sealing fluid was 1% dried skim milk, competitive time was 30 min, Biotin-IgG reaction time was 30 min, SA-HRP reaction time was 60 min and chromogenic reaction time was 15 min. The linear detection range was  $Y=-0.3299X+0.4272$  ( $r^2=0.990$ ),  $IC_{50}$  was 0.601 ng/mL, the linear range of the presented method was 0.074~4.883 ng/mL, the recoveries in negative samples were 88.8%~98.5% and the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 1.2%~3.6% and 2.5%~5.1%, respectively. The cross-reactivity values were lower than 0.1% with other structural analogues and derivatives. The recoveries of high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) and BA-ELISA were all in the range of 85%~115%.

**Conclusion** This method has high sensitivity, high specificity and good reproducibility, which can be used for rapidly screening nitrofurazone metabolites in animal tissues.

**KEY WORDS:** veterinary medicine; nitrofurazone; semicarbazide; biotin-avidin enzyme linked immunosorbent assay

## 1 引言

呋喃西林(nitrofurazone, NFZ)属于硝基呋喃类药物,是一种广谱抗菌药,具有非常好的抗菌作用<sup>[1]</sup>。硝基呋喃类药物及其代谢物对人体具有潜在的致癌、致突变作用。硝基杂环类化合物能够直接诱发细胞发生突变,属于直接致变剂<sup>[2,3]</sup>,结合态的硝基呋喃代谢物被人体食用后可在胃液的酸性条件下解离,进而危害人体健康,很多国家禁止用于食品动物的使用此类药物<sup>[4]</sup>。但是,此类抗生素成本低、预防和治疗细菌感染效果明显,因此仍然被非法使用<sup>[5,6]</sup>。呋喃西林被机体摄取后会很快代谢,半衰期不过几小时<sup>[7]</sup>,代谢物为氨基脒(semicarbazide, SEM),而 SEM 会与蛋白质结合在体内残留数周<sup>[8,9]</sup>。因此,通常将 SEM 作为监测食品中是否非法使用呋喃西林药物的标志物<sup>[10]</sup>。

目前,检测动物源食品中 SEM 的方法有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)<sup>[11-13]</sup>、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)<sup>[14,15]</sup>、酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)<sup>[16,17]</sup>。ELISA 相比于 HPLC 与 LC-MS/MS,不需要昂贵的仪器,操作简便,检测成本低,可以实现大批量的检测。生物素-亲和素系统(biotin-avidin system, BAS)是以生物素和亲和素特有的结合特性为基础的新型反应放大系统。BAS 与 ELISA 偶联主要是用于放大 ELISA 的终反应,即用生物素化的抗体代替 ELISA 中常规的酶标记抗体,之后再与亲和素-酶结合物(BA-ELISA)结合,从而放大反应信号,提高检测的灵敏度<sup>[18,19]</sup>。张雯迪等<sup>[20]</sup>建立了检测氯胺酮的生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法,与间接竞争 ELISA 相比,BA-ELISA 法线性范围向低浓度扩展一个数量级,检测限更低。魏孔吉等<sup>[19]</sup>建立了检测双酚 A 的生物素-亲和素放大酶联免疫

吸附方法,与间接竞争 ELISA 法相比,BA-ELISA 法测定双酚 A 的线性范围向低浓度推进了约一个数量级,检测限降低为原来的 1/2。因此 BA-ELISA 法在高灵敏快速筛查食品样品方面有较好的应用前景。本研究建立了检测呋喃西林代谢物的 BA-ELISA 法,并对主要条件进行了优化以及方法评价。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料与试剂

SEM 单克隆抗体(深圳易瑞生物技术有限公司);生物素标记羊抗鼠二抗(Biotin-IgG, 北京博奥森生物技术有限公司);辣根过氧化物酶标记链霉亲和素(SA-HRP, 北京博奥森生物技术有限公司);3-(4-羧基苯甲基)-氨基脒(CPSEM)和 CPSEM-OVA 为实验室制备<sup>[21]</sup>,其他化学试剂均为国产分析纯。

### 2.2 仪器与设备

96 孔可拆卸酶标板(深圳金灿华实业有限公司);INFINITE200PRO 酶标仪(瑞士 Tecan 公司);Acquity TQ Detector 液质联用仪(美国 Waters 公司);DFCZW-15L 氮吹仪(杭州德克尔实验设备有限公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 BA-ELISA 法

##### (1) BA-ELISA 法操作步骤

用碳酸盐缓冲液将包被原 CPSEM-OVA 稀释后,每孔 100  $\mu$ L 加入到 96 孔透明酶标板中进行包被;甩干孔内液体,用 PBST 溶液洗板 3 次,吸水纸上拍干,每孔加入 200  $\mu$ L 封闭液,37  $^{\circ}$ C 封闭 2 h,洗板拍干;每孔加入 50  $\mu$ L NPSEM 溶液或样品溶液和 50  $\mu$ L 单克隆抗体,37  $^{\circ}$ C 反应,洗板拍干;每孔加入 100  $\mu$ L Biotin-IgG,37  $^{\circ}$ C 孵育,洗板拍干;每孔加入 100  $\mu$ L SA-HRP,37  $^{\circ}$ C 孵育,洗板拍干;每孔

加入 100  $\mu\text{L}$  显色底物液(A 液和 B 液按体积比 1:1 混合), 室温避光反应; 每孔加入 50  $\mu\text{L}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  终止液终止反应, 用酶标仪测定 450 nm 下的吸光度(optical density,  $OD$ )值。

### (2) BA-ELISA 法条件优化

采用棋盘法确定包被原和单克隆抗体的最佳工作浓度, 设置包被原稀释倍数为 100、200、400、800、1600 和 3200, 单克隆抗体稀释倍数为 100、200、400、800、1600、3200、6400、12800。测定  $OD$  值, 封闭液为 2% 脱脂乳, 37  $^{\circ}\text{C}$  封闭 2 h, NPSEM 浓度为 0 ng/mL, 竞争反应 30 min, Biotin-IgG 孵育 30 min, SA-HRP 孵育 30 min, 显色反应 20 min。每个实验 3 次重复, 计算平均值。根据  $A/A_0$  ( $A$  为 NPSEM 浓度不为 0 时  $OD$  值,  $A_0$  为 NPSEM 浓度为 0 时  $OD$  值)选择  $OD$  值在 1 左右的组合为最佳工作浓度。

通过单因素试验确定 SA-HRP 稀释倍数、封闭液浓度、竞争反应时间、Biotin-IgG 孵育时间、SA-HRP 孵育时间、显色时间。SA-HRP 设置 5000、8000 和 10000 倍 3 个稀释倍数; 封闭液脱脂乳粉配制为 0.5%、1%、2% ( $m:V$ ) 3 种浓度; 竞争时间、Biotin-IgG 孵育时间、SA-HRP 孵育时间均设置成 30、60 和 90 min; 显色时间设置成 10、15 和 20 min。测定吸光度  $OD$  值, 每个条件 3 次重复。绘制各条件下的标准曲线, 计算  $IC_{50}$  ( $IC_{50}$ :  $A/A_0$  为 0.5 时相应的 NPSEM 浓度)和  $OD_{\text{max}}/IC_{50}$  ( $OD_{\text{max}}$ : 最大吸光值)。以  $IC_{50}$  和  $OD_{\text{max}}/IC_{50}$  作为确定最佳条件的依据。

### (3) 评价 SEM 的 BA-ELISA 法

#### a. 灵敏度

NPSEM 浓度为 80、20、5、1.25、0.3123、0.0781 和 0.0195 ng/mL 7 个浓度, 按照 2.3.1 步骤及优化后最佳反应条件进行操作, 测定  $IC_{50}$ , 每个浓度进行 3 次重复。

#### b. 特异性

将 NPSEM 结构类似物氨基脒(semicarbazide, SEM)、5-甲基吗啉-3-氨基-恶唑烷酮(3-amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidone, AMOZ)、3-氨基-2-恶唑烷酮(3-amino-2-oxazolidinone, AOZ)和 1-氨基-乙内酰脲(1-amino-hydantoin, AHD)及其相应衍生物 NPAOZ、NPAMOZ、NPAHD 和衍生试剂 4-CBA、2-NPA<sup>[21]</sup>分别配制为 80、20、5、1.25、0.3123、0.0781 和 0.0195 ng/mL 7 个浓度 NPSEM 溶液, 按照优化后的方法进行测定, 计算交叉反应率(cross reactivity, CR)。

#### c. 精密度

精密度指该检测方法的重现性, 可用批内变异系数(coefficient of variation, CV)和批间 CV 衡量。在建立的分析法的线性范围内, 配制 0.7、1.0、1.3、1.6、1.9 ng/mL 5 个浓度 NPSEM 溶液, 按照优化后的方法进行测定, 从线性方程中求得测定值, 计算批内 CV。

每个浓度同一天内进行 5 次重复, 计算 CV。平行测定 5 d, 计算批间 CV。

#### d. 准确度

准确度指检测值与真实值的符合程度, 可用加标回收率衡量。采用本实验建立的 BA-ELISA 法对空白鸡胸肉进行添加回收测定, 并与参照国标 GB/T 21311-2007 采用 HPLC-MS/MS 法<sup>[23]</sup>对同批空白鸡胸肉测得的回收率进行比较。

### 2.3.2 酶免疫分析法和 HPLC-MS/MS 法

#### (1) 酶免疫分析法样品前处理

取 1.0 g 样品, 加入 3 mL 超纯水均质, 加入 1 mL SEM 标品溶液, 使其最终添加浓度为 0.5、1.0、1.5 ng/g, 混匀; 加入 0.5 mL HCl 溶液(1 mol/L)和 100  $\mu\text{L}$  2-NPA 溶液(0.01 mol/L), 混匀, 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡反应 16 h; 加入 5 mL  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  溶液(0.1 mol/L)、0.4 mL NaOH 溶液(1 mol/L)和 5 mL 乙酸乙酯, 室温振荡 5 min; 4500 r/min 离心 10 min, 取 2.5 mL 上清液至洁净容器中, 氮气吹干; 加入 1.0 mL 正己烷重新溶解, 再加入 1.0 mL PBS 混匀; 4500 r/min 离心 10 min, 取下层水相用于测定<sup>[22]</sup>。

#### (2) HPLC-MS/MS 法

##### a. 前处理

取 2.0 g 样品, 加入 10 mL 甲醇-水混合液(甲醇与水体积比为 1:1), 振荡 10 min, 4000 r/min 离心 5 min, 弃上清液; 加入 10 mL HCl 溶液(0.2 mol/L), 10000 r/min 均质 1 min 后, 按照最终添加浓度为 0.5、1.0、1.5 ng/g 加入 SEM 标品溶液, 再加入 100  $\mu\text{L}$  内标溶液(0.5 ng/mL), 100  $\mu\text{L}$  2-NPA 溶液(0.1 mol/L), 涡动 30 s 后, 振荡 30 min, 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 16 h; 加入 2 mL  $\text{K}_3\text{PO}_4$  溶液(0.3 mol/L), 用 NaOH 溶液(2.0 mol/L)调 pH 至 7.4( $\pm 0.2$ ); 加入 10 mL 乙酸乙酯振荡 10 min, 10000 r/min 离心 10 min 后, 收集乙酸乙酯层, 如此提取 2 次, 合并乙酸乙酯层;  $\text{N}_2$  吹干, 加入 1 mL 甲酸水溶液(0.1%)溶解; 用 3 mL 乙腈饱和正己烷分 2 次液液分配, 去除脂肪; 取下层水相进行测定<sup>[23]</sup>。

##### b. 标准曲线的建立

标准曲线建立所用样品为同批空白鸡肉, 按最终浓度为 0.5、1.0、2.5、5、10 ng/g (即 1、2、5、10 和 20 ng/mL) 加入 SEM 标品溶液, 以 SEM 浓度为横坐标, 响应值(SEM 峰面积/SEM-D 峰面积)为纵坐标, 绘制标准曲线。

## 3 结果与分析

### 3.1 BA-ELISA 条件优化

#### 3.1.1 包被原和单克隆抗体最佳稀释倍数

包被原和单克隆抗体不同稀释倍数下  $OD$  值结果见表 1, 随着包被原和单克隆抗体稀释倍数的增大,  $OD$  值均出现降低的趋势。研究表明,  $OD$  值在 1 左右时酶联免疫反应灵敏度高。在包被原稀释倍数为 800, 单克隆抗体稀释倍数为 12800 时,  $OD$  值为 1.0208, 与 1 最为接近。因此选择包被原稀释倍数为 800, 单克隆抗体稀释倍数为 12800。

表 1 不同包被原和单克隆抗体稀释倍数下 OD 值  
Table 1 The OD values of different dilution of coating antigen and monoclonal antibody

单克隆抗体 稀释倍数	包被原稀释倍数					
	100	200	400	800	1600	3200
200	1.8903±0.0085	1.8467±0.0283	1.7568±0.0375	1.7481±0.0064	1.7216±0.0099	1.6170±0.0064
400	1.8376±0.0035	1.7654±0.0162	1.7517±0.0099	1.6442±0.0059	1.6199±0.0375	1.5004±0.0085
800	1.7499±0.0035	1.7479±0.0148	1.6375±0.0078	1.5283±0.0024	1.5063±0.0389	1.4834±0.0003
1600	1.7376±0.0070	1.6362±0.0057	1.5288±0.0057	1.4103±0.0148	1.3821±0.0205	1.2664±0.0072
3200	1.6070±0.0071	1.5054±0.0036	1.4698±0.0014	1.3797±0.0078	1.2618±0.0057	0.9505±0.0049
6400	1.5716±0.0198	1.3742±0.0042	1.3407±0.0057	1.1475±0.0071	1.1009±0.0064	0.8374±0.0106
12800	1.3469±0.0007	1.2159±0.0010	1.1564±0.0021	1.0208±0.0014	0.8341±0.0215	0.7305±0.0104
25600	1.2372±0.0014	0.9764±0.0028	0.8348±0.0042	0.7619±0.0021	0.6293±0.0026	0.5274±0.0007

3.1.2 SA-HRP 稀释倍数

不同 SA-HRP 稀释倍数对应的 IC<sub>50</sub> 和 OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 结果见图 1, 随着稀释倍数增大, IC<sub>50</sub> 先减小后增大, OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 先增大后减小; 稀释倍数为 8000 时, IC<sub>50</sub> 最小, 且 OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 最大。因此选择 SA-HRP 最佳稀释倍数为 8000。

3.1.3 封闭液

不同浓度脱脂乳对应的 IC<sub>50</sub> 和 OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 结果见图 2, IC<sub>50</sub> 先减小后增大, OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 先增大后减小; 脱脂乳浓度为 1% 时, IC<sub>50</sub> 最小, 且 OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 最大。因此选择 1% 脱脂乳浓度为最佳封闭液浓度。

3.1.4 竞争时间

不同竞争时间对应的 IC<sub>50</sub> 和 OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 结果见图 3, IC<sub>50</sub> 逐渐增大, OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 逐渐减小; 竞争时间为 30min 时, IC<sub>50</sub> 最小, 且 OD<sub>max</sub>/IC<sub>50</sub> 最大。因此选择 30 min 为最佳竞争时间。

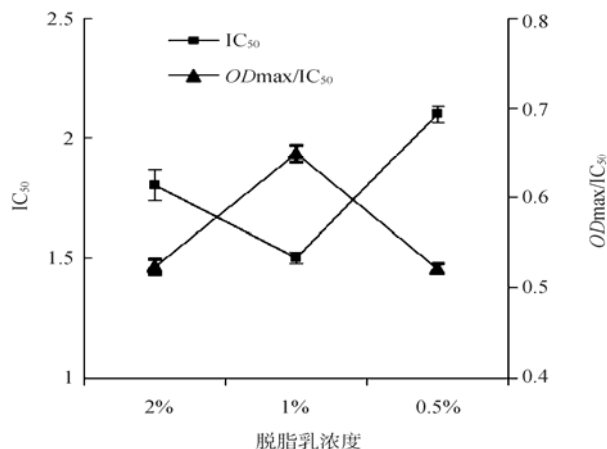


图 2 BA-ELISA 法封闭液优化  
Fig. 2 Optimization of blocking liquid for BA-ELISA

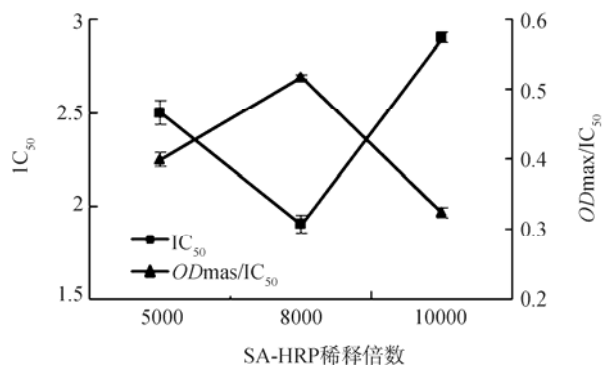


图 1 BA-ELISA 法 SA-HRP 稀释倍数优化  
Fig. 1 Optimization of SA-HRP dilution for BA-ELISA

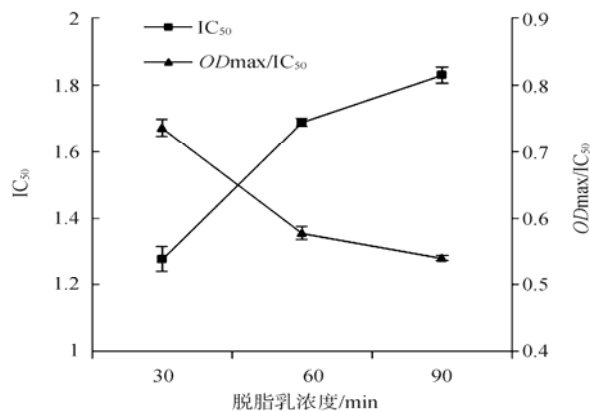


图 3 BA-ELISA 法竞争时间优化  
Fig. 3 Optimization of competitive reaction time for BA-ELISA

### 3.1.5 Biotin-IgG 孵育时间

不同 Biotin-IgG 孵育时间对应的  $IC_{50}$  和  $OD_{max}/IC_{50}$  结果见图 4,  $IC_{50}$  先增大后减小,  $OD_{max}/IC_{50}$  先减小后增大; 30min 时,  $IC_{50}$  最小, 且  $OD_{max}/IC_{50}$  最大。因此选择 30 min 为最佳 Biotin-IgG 孵育时间。

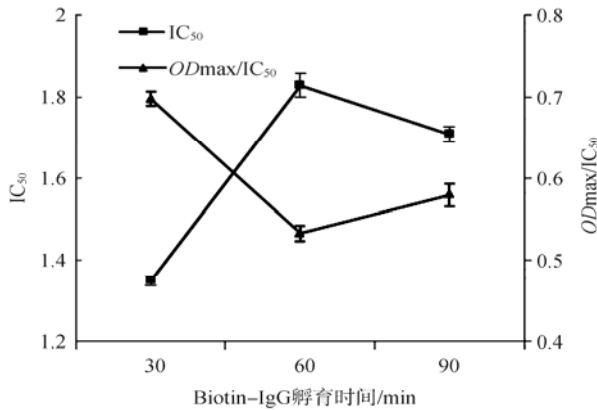


图 4 BA-ELISA 法 Biotin-IgG 孵育时间优化

Fig. 4 Optimization of Biotin-IgG incubating time for BA-ELISA

### 3.1.6 SA-HRP 孵育时间

不同 SA-HRP 孵育时间对应的  $IC_{50}$  和  $OD_{max}/IC_{50}$  结果见图 5,  $IC_{50}$  先减小后增大,  $OD_{max}/IC_{50}$  先增大后减小; 60 min 时,  $IC_{50}$  最小, 且  $OD_{max}/IC_{50}$  最大。因此选择 60 min 为最佳 SA-HRP 孵育时间。

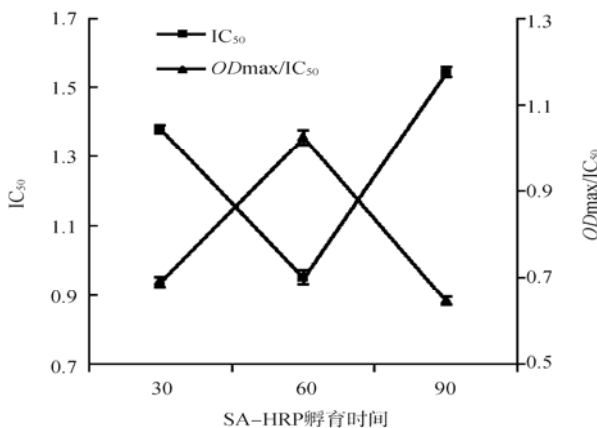


图 5 BA-ELISA 法 SA-HRP 孵育时间优化

Fig. 5 Optimization of SA-HRP incubating time for BA-ELISA

### 3.1.7 显色时间

不同显色时间对应的  $IC_{50}$  和  $OD_{max}/IC_{50}$  结果见图 6,  $IC_{50}$  先减小后增大,  $OD_{max}/IC_{50}$  先增大后减小; 15 min 时,  $IC_{50}$  最小, 且  $OD_{max}/IC_{50}$  最大。因此选择 15 min 为最佳显色时间。

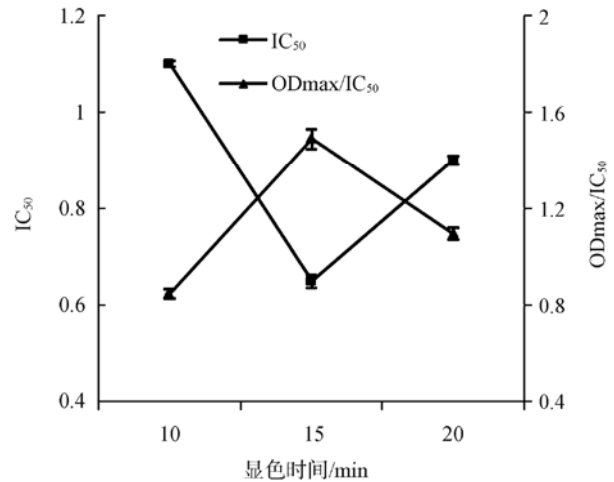


图 6 BA-ELISA 法显色时间优化

Fig. 6 Optimization of colouration time for BA-ELISA

## 3.2 评价 SEM 的 BA-ELISA 法

### 3.2.1 灵敏度

SEM 标准曲线见图 7, BA-ELISA 线性方程为  $Y = -0.3299X + 0.4272$  ( $r^2 = 0.990$ ),  $IC_{50}$  为 0.601 ng/mL, 线性范围为 0.074~4.883 ng/mL。

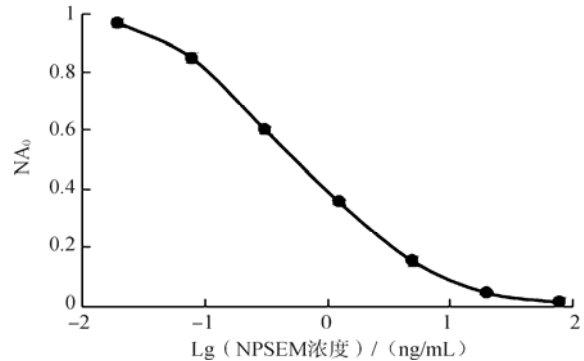


图 7 SEM 标准曲线

Fig. 7 Standard curve of SEM

### 3.2.2 特异性

竞争物为 NPSEM 时标准曲线呈现典型的 S 形, 其他结构类似物及衍生试剂不同浓度下各自对应的  $A/A_0$  基本相同, 即各自标准曲线纵坐标值基本相同, 随浓度变化趋势不明显。特异性测定结果见表 2, 建立的 BA-ELISA 与其他结构类似物及衍生试剂的 CR 均小于 0.1%, 表明所用 SEM 单克隆抗体特异性好。

### 3.2.3 精密度

BA-ELISA 批内和批间 CV 分别为 1.2%~3.6% 和 2.5%~5.1%, 表明该方法的精密度较好, 在实际检测中重现性好。

表 2 特异性测定结果(n=3)  
Table 2 Results of specificity (n=3)

竞争物	BA-ELISA	
	IC <sub>50</sub> /(ng/mL)	CR/(%)
NPSEM	0.635±0.009	100
SEM	>1000	<0.1
AOZ	>1000	<0.1
AMAZ	>1000	<0.1
AHD	>1000	<0.1
NPAOZ	>1000	<0.1
NPAMAZ	>1000	<0.1
NPAHD	>1000	<0.1
4-CBA	>1000	<0.1
2-NPA	>1000	<0.1

3.2.4 准确度

鸡肉基质中建立的 HPLC-MS/MS 法标准曲线见图 8, 曲线方程为  $Y=12.1833X-0.452357$  ( $r^2=0.995$ )。其中浓度为

0.5 ng/g (即 1 ng/mL)时的质谱图见图 9。

准确度测定结果见表 4, BA-ELISA 平均回收率为 88.8%~98.5%, CV 为 3.7%~5.6%; HPLC-MS/MS 回收率为 99.5%~102.0%, CV 为 1.4%~2.6%。建立的 BA-ELISA 分析法回收率虽低于 HPLC-MS/MS, 但均在 85%~115%范围内, 表明该方法的准确度较高, 在实际检测中误差较小。

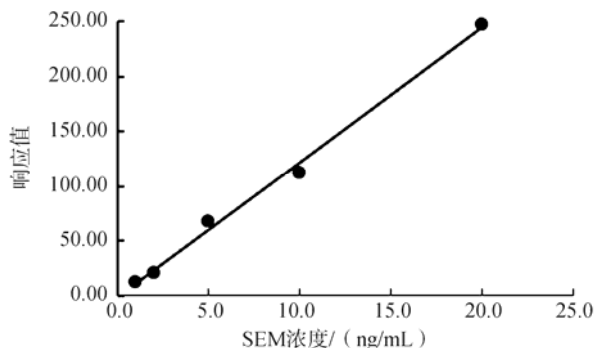


图 8 HPLC-MS/MS 标准曲线

Fig. 8 Standard curve of HPLC-MS/MS

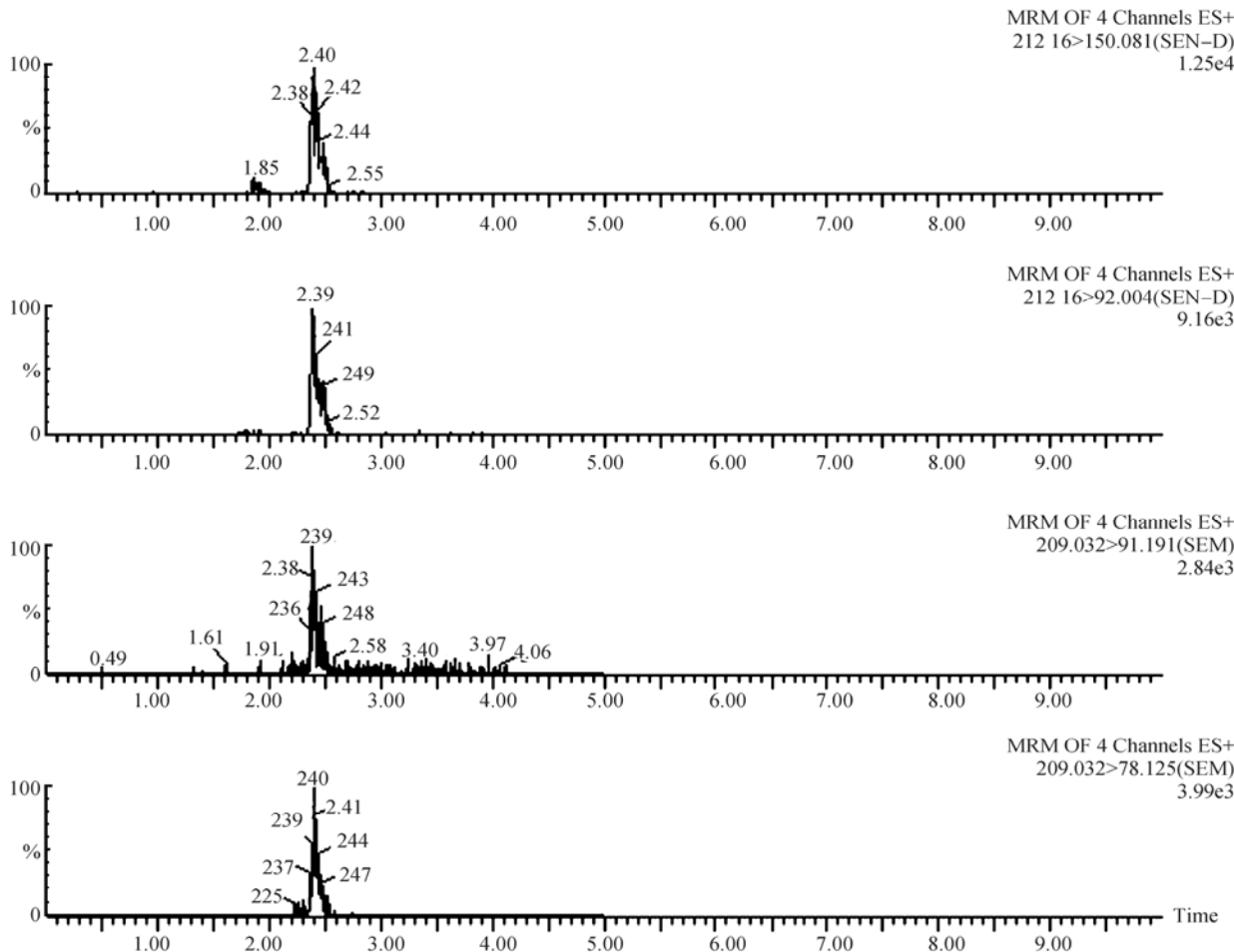


图 9 SEM 和 SEM-D 的质谱图

Fig. 9 The mass spectrum of SEM and SEM-D

表 3 精密度测定结果( $n=5$ )  
Table 3 Results of precision ( $n=5$ )

NPSEM/ (ng/mL)	BA-ELISA	
	批内 CV/%	批间 CV/%
0.7	2.7	3.6
1.0	1.2	3.0
1.3	3.6	5.1
1.6	1.7	2.5
1.9	3.4	4.9

表 4 准确度测定结果( $n=3$ )  
Table 4 Results of accuracy ( $n=3$ )

添加浓度 (ng/g)	BA-ELISA		HPLC-MS/MS	
	回收率/%	CV/%	回收率/%	CV/%
0.5	98.5±3.7	3.7	101.3±1.4	1.4
1.0	95.9±3.8	4.0	99.5±2.1	2.1
1.5	88.8±5.0	5.6	102.0±2.7	2.6

## 4 结 论

与任海涛等<sup>[24]</sup>建立呋喃西林代谢物酶免疫吸附法( $IC_{50}$ 为 1.19  $\mu\text{g/L}$ , 线性范围为 0.14~23.6  $\mu\text{g/L}$ )相比, 本研究建立 BA-ELISA 法测定 SEM 的线性范围向低浓度推进了约一个数量级, 灵敏度更高, 该方法的特异性好, 在实际检测中不易出现误检的情况, 在实际检测中重现性好, BA-ELISA 法的添加回收率与 LC-MS/MS 的回收率存在一定差距, 分析原因一方面可能是样品衍生不完全, 有待改进样品前处理方法, 提高衍生率; 另一方面在依据国标法采用 HPLC-MS/MS 法建立标准曲线时, 是在空白鸡肉样品中添加系列浓度 SEM 后衍生进行测定, 由此建立的标准曲线与待测回收率选用的样品基质相同, 故准确度高, 而本研究标准曲线的建立是基于 PBS 溶液, 可能会造成在鸡肉中的添加回收率低。另外本研究采用的前处理方法中衍生条件为 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡反应 16 h, 衍生时间较长, 有待研究衍生时间较短的方法。研究建立的检测 SEM 残留的 BA-ELISA 法准确度虽略逊于 HPLC-MS/MS 法, 但是均能满足实际样品检测的需求, 可用于食品中 SEM 的快速筛查。

## 参考文献

- [1] 刘书贵, 吴仕辉, 郑光明, 等. 呋喃西林代谢物在杂交鳢(斑鳢♀×乌鳢♂)体内的残留消除规律研究[J]. 华南农业大学学报, 2013, 34(2): 248-253.  
Liu SG, Wu SH, Zheng GM, *et al.* Studies on the residue and degradation rules of nitrofurazone metabolites in hybrid snakehead (*channa maculata* (♀) × *channa argus* (♂)) [J]. J South Chin Agric Univ, 2013, 34(2):

248-253.

- [2] 徐一平, 金征宇, 胥传来. ELISA 方法检测呋喃妥因代谢物 1-氨基乙内酰胺[J]. 食品工业科技, 2008, 29(8): 272-275  
Xu YP, Jin ZY, Xu CL. Development of a sensitive ELISA method for detection of 1-aminohydantoin, a tissue-bound metabolite of the nitrofurantoin [J]. Sci Technol Food Ind, 2008, 29(8): 272-275.
- [3] 杨成对, 宋莉晖, 刘志涛, 等. 电子束辐照下呋喃西林代谢产物降解的质谱检测[J]. 分析检测学报, 2005, 24(6): 96-98.  
Yang CD, Song LH, Liu ZT, *et al.* Mass spectrum detection of nitrofurazone metabolite's degraded by electronic beam irradiation [J]. J Instrum Anal, 2005, 24(6): 96-98.
- [4] Vass M, Hruska K, Franek M. Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis [J]. Vet Med, 2008, 53(9): 469-500.
- [5] Kim D, Kim B, Hyung Sw, *et al.* An optimized method for the accurate determination of nitrofurans in chicken meat using isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry [J]. J Food Comp Anal, 2015, 40: 24-31.
- [6] 陈丽惠, 洪超, 贾玉珠. 市售动物源食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量的调查研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(24): 3602-3604.  
Chen LH, Hong C, Jia YZ. Survey of nitrofurantoin metabolite residues in animal-origin foods in the city retailer [J]. Chin J Health Lab Technol, 2014, 24(24): 3602-3604.
- [7] Wickrananayake PU, Tran TC, Hughes JG, *et al.* Simultaneous separation of nitrofurantoin antibiotics and their metabolites by using micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. Electrophoresis, 2006, 27(20): 4069-4077.
- [8] 于慧娟, 李冰, 蔡友琼, 等. 液相色谱-串联质谱法测定甲壳类产品中氨基脒的含量[J]. 分析化学, 2012, 40(10): 1530-1535  
Yu HJ, Li B, Cai YQ, *et al.* Determination of semicarbazide content in crustaceans by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Chem, 2012, 40(10): 1530-1535.
- [9] 赵东豪, 黎智广, 王旭峰. 高效液相色谱-串联质谱法检测水产品中硝基呋喃类代谢物的优化研究[J]. 南方水产科学, 2015, 11(6): 58-64.  
Zhao DH, Li ZG, Wang XF. Optimization of determination of nitrofurantoin metabolites in aquatic products by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. South Chin Fish Sci, 2015, 11(6): 58-64.
- [10] McCracken RJ, Kennedy DG. Detection, accumulation and distribution of nitrofurantoin residues in egg yolk, albumen and shell [J]. Food Addit Contam, 2007, 24(1): 26-33.
- [11] 曹鹏, 耿金培, 尹大路, 等. 高效液相色谱法同时测定饲料中的呋喃唑酮、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃它酮药物残留量[J]. 山东农业大学学报, 2010, 41(3): 424-427.  
Cao P, Geng JP, Yin DL, *et al.* Determination of the pesticide residues of furazolidonum, furacilin nitrofurantoin by HPLC [J]. J Shandong Agric Univ, 2010, 41(3): 424-427.
- [12] 魏涯, 岑剑伟, 郝淑英, 等. 高效液相色谱法测定池塘底泥中呋喃西林的研究[J]. 南方水产科学, 2014, 10(1): 71-77.  
Wei Y, Zeng JW, Hao SX, *et al.* HPLC determination of nitrofurazone in sediment of aquaculture pond [J]. South Chin Fish Sci, 2014, 10(1): 71-77.
- [13] 宋凯, 肖桂英, 姜桥, 等. 高效液相色谱法同步测定饲料及兽药中 4 种硝基呋喃类药物[J]. 粮食与饲料工业, 2010, 3: 49-51.

- Song K, Xiao GY, Jiang Q, *et al.* Simultaneous determination of four nitrofurans in feedstuff and veterinary drugs by high performance liquid chromatography [J]. *Cereal Feed Ind*, 2010, 3: 49–51.
- [14] 孙良娟, 李红权, 梁锋, 等. 高效液相色谱串联质谱法同时测定饲料中 4 种硝基呋喃类抗生素[J]. *分析测试学报*, 2013, 32(8): 978–982.
- Sun LJ, Li HQ, Liang F, *et al.* Simultaneous determination of four nitrofurans antibiotics residues in feedstuff by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2013, 32(8): 978–982.
- [15] 常晨阳, 王碧生, 方成俊, 等. LC-MS/MS 法测定动物源食品中呋喃西林代谢物不确定度的评定[J]. *现代农业科技*, 2014, (12): 274–276.
- Chang CY, Wang BS, Fang CJ, *et al.* Uncertainty evaluation of determining furacilin metabolites in animal origin food by LC-MS/MS [J]. *Mod Agric Sci Technol*, 2014, (12): 274–276.
- [16] Cooper KM, Samsonova JV, Plumpton L, *et al.* Enzyme immunoassay for semicarbazide-the nitrofurans metabolite and food contaminant [J]. *Anal Chim Acta*, 2007, 592(1): 64–71.
- [17] M Vass, I Diblikova, I Cernoch, *et al.* ELISA for semicarbazide and its application for screening in food contamination [J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 608(1): 86–94.
- [18] 高翔, 张燕, 樊明涛. 利用生物素链霉亲和素放大酶联免疫方法检测猪肉中莱克多巴胺残留[J]. *食品研究与开发*, 2009, 30(3): 108–111.
- Gao X, Zhang Y, Fan MT. Rapid determination of ractopamine residue in pig muscular tissue using competitive biotin-streptavidin amplified ELISA [J]. *Food Res Dev*, 2009, 30(3): 108–111.
- [19] 魏孔吉, 赵美萍, 李元宗, 等. 生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法测定双酚 A [J]. *分析化学*, 2005, 33(8): 1122–1124.
- Wei KJ, Zhao MP, Li YZ, *et al.* Determination of bisphenol A based on biotin-avidin enzyme linked immunosorbent assay [J]. *Chin J Anal Chem*, 2005, 33(8): 1122–1124.
- [20] 张雯迪, 苏萍, 杨屹, 等. 生物素-亲和素放大酶联免疫吸附法测定氯胺酮[J]. *分析化学*, 2010, 38(1): 117–120.
- Zhang WD, Su P, Yang Y, *et al.* Biotin-avidin mediated competitive enzyme-linked immunosorbent assay for determination of ketamine [J]. *Chin J Anal Chem*, 2010, 38(1): 117–120.
- [21] 闫叶娜. 呋喃西林代谢物单克隆抗体的制备及其免疫分析方法的建立 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010.
- Yan YN. Preparation of monoclonal antibody for nitrofurazone and development of its immunity analysis [D]. Nanjing: Nanjing Agriculture University, 2010.
- [22] SN/T 3380-2012 出口动物源食品中硝基呋喃代谢物残留量的测定 酶联免疫吸附法[S].
- SN/T 3380-2012 Determination of residues of nitrofurans metabolites foodstuffs of animal origin for export-ELISA method [S].
- [23] GB/T 21311-2007 动物源性食品中硝基呋喃类药物代谢物残留量检测方法 高效液相色谱/串联质谱法[S].
- GB/T 21311-2007 Determination of residues of nitrofurans metabolites in foodstuffs of animal origin-HPLC-MS/MS method [S].
- [24] 任海涛, 沈玉栋, 徐振林, 等. 呋喃西林代谢物多克隆抗体制备及酶联免疫吸附分析方法[J]. *分析化学*, 2012, 5(40): 745–751.
- Ren HT, Sheng YD, Xu ZL, *et al.* Production and identification of polyclonal antibody detect nitrofurazone metabolite and development of enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Chin J Anal Chem*, 2012, 5(40): 745–751.

(责任编辑: 姚 菲)

## 作者简介



黄登宇, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为食品卫生检测。  
E-mail: Huanggy1110@126.com



杨秀松, 硕士, 主要研究方向为食品科学与食品安全。  
E-mail: 787898353@qq.com