

免疫亲和层析结合高效液相色谱法检测 氟喹诺酮类药物

章雪明^{1*}, 方强¹, 苑华宁¹, 原茵², 吴康³

(1. 苏州市农产品质量安全监测中心, 苏州 215128; 2. 苏州大学材料与化学化工学部, 苏州 215123;
3. 苏州大学基础医学与生物科学学院, 苏州 215123)

摘要: **目的** 建立检测氟喹诺酮类药物的免疫亲和层析样品前处理方法结合高效液相色谱法的分析方法。**方法** 通过将抗恩诺沙星单抗与溴化氰活化的琼脂糖 4B 偶联作为免疫吸附剂来提取胎牛血清中的 5 种氟喹诺酮类药物, 并用高效液相色谱仪配备荧光检测器检测。**结果** 在本研究中, 诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星和达氟沙星在胎牛血清中的萃取回收率分别为 82.97%、70.50%、70.16%、31.83%和 6.37%, 检出限均为 0.5 ng/mL。**结论** 建立的氟喹诺酮类免疫亲和层析色谱胶具有高的吸附容量、选择性、萃取效率和稳定性。免疫亲和色谱法是一种可以从复杂基质样品中萃取多种氟喹诺酮类抗生素的可行方法。**关键词:** 免疫亲和色谱; 氟喹诺酮类; 高效液相色谱法

Determination of fluoroquinolones by immunoaffinity chromatography with high performance liquid chromatography

ZHANG Xue-Ming^{1*}, FANG Qiang¹, YUAN Hua-Ning¹, YUAN Yin², WU Kang³

(1. Suzhou Agricultural Products Quality and Safety Monitoring Center, Suzhou 215128, China; 2. College of Chemistry, Chemical Engineering and Materials Science, Soochow University, Suzhou 215123, China;
3. School of Biology and Basic Medical Science, Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of fluoroquinolones by immunoaffinity chromatography with high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The anti-enrofloxacin monoclonal antibody was covalently cross-linked to CNBr-Sepharose 4B as an immunosorbent agent which was used for the extraction of 5 kinds of fluoroquinolones including norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, sarafloxacin and danofloxacin from bovine serum. A liquid chromatography equipped with a fluorescence detector was used for the detection of the extracted fluoroquinolones. **Results** The recovery values of norfloxacin, enrofloxacin, ciprofloxacin, sarafloxacin and danofloxacin in bovine serum were 82.97%, 70.50%, 70.16%, 31.83% and 6.37%, respectively. The limits of quantitation of fluoroquinolones were all 0.5 ng/mL. **Conclusion** The established fluoroquinolone immunoaffinity chromatography displays high binding capacity, selectivity, extraction efficiency and stability. The immunoaffinity chromatography is a feasible method for the extraction of multiple fluoroquinolone antibiotics from complex matrix samples.

KEY WORDS: immunoaffinity chromatography; fluoroquinolones; high performance liquid chromatography

*通讯作者: 章雪明, 高级兽医师, 主要研究方向为动物疫病防治及药物残留。E-mail: zxmy@foxmail.com

*Corresponding author: ZHANG Xue-Ming, Senior Veterinarian, Suzhou Agricultural Products Quality and Safety Monitoring Center, Suzhou 215128, China. E-mail: zxmy@foxmail.com

1 引言

氟喹诺酮类药物作为人工合成抗生素类药物,以抗菌能力强、机体利用率高、与其他种类抗生素对细菌无交叉耐药性等优点广泛应用于医学、农副水产品生产中^[1,2]。但如果用药过量会造成中枢神经系统、消化系统和肝肾等器官发生病变,因此氟喹诺酮类药物必须严格控制用量以确保畜禽产品等的食用安全。目前,各领域氟喹诺酮类药物的残留检测对象以恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星、氧氟沙星、沙拉沙星、双氟沙星为主。

目前用来检测氟喹诺酮类药物残留的主要有色谱分析法和免疫分析法。在这些方法中,高效液相色谱法被认为是具有权威的分离和检测方法,而所需的样品前处理手段纷繁复杂,其中的净化方法种类繁多,如固相萃取^[3]、液液萃取^[4]、基质固相萃取^[5]、搅拌棒吸附萃取^[6,7]、磁固相萃取^[8]和固相微萃取^[9]等。2007年颁布的检测氟喹诺酮类药物的国标中,采用了固相萃取联合液相色谱串联质谱法(solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, SPE-LC-MS/MS)同时检测14种氟喹诺酮类药物的残留,检测范围均在0.5~100 ng/g之间^[10]。而在此之前,欧盟早已规定恩诺沙星和环丙沙星在牛奶中的最大残留量分别为100 μg/kg和75 μg/kg^[11]。刘媛等^[12]利用固相萃取作为样品前处理技术,高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)作为检测手段,对鸡蛋中4种氟喹诺酮类药物残留进行了同时检测,其回收率在78.1%~95.7%之间;Shim等^[13]采用了超临界流体萃取技术从鸡胸肉中萃取恩氟沙星进入高效液相色谱配荧光检测器(high performance liquid chromatography-fluorescence detector, HPLC-FLD)中检测,回收率达到104%。

免疫亲和色谱法(immunoaffinity chromatography, IAC)是利用抗原与抗体之间特异性结合的特点,可建立从复杂样品基质中高效分离和浓缩目标物的样品前处理方法^[14]。它相比于固相萃取和液液萃取技术,具有基质干扰小、选择性高、稳定性好、可再生利用等优势^[15]。免疫亲和色谱法如今已十分成熟。Hou等^[16]采用IAC-LC-MS/MS方法,同时检测牛肉中阿维菌素类杀虫剂残留,样品回收率在62.9%~84.0%之间。2008年, Li等^[17]制备了氟喹诺酮类和磺胺类多组分混合免疫亲和柱,通过LC-MS/MS对猪肉中13种氟喹诺酮类药物和6种磺胺类药物进行同时检测,19种目标物的样品回收率在72.6%~107.6%之间,结果较好。这种新的免疫亲和方法实现了2个不同类别的药物进行同时检测的可能。

本文将免疫亲和层析高选择性与液相色谱分离技术完美结合在一起,研制了新型的抗恩诺沙星单抗免疫亲和层析色谱胶,同时捕获胎牛血清中5种氟喹诺酮类药物并利用高效液相色谱获得上述5种药物的确证与精确定量。

2 材料与方法

2.1 样品与试剂

CNBr-Sepharose-4B(瑞典 GE healthcare 公司); 碳酸氢钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); Tris(色谱纯, 美国 Amresco 公司); 醋酸钠(色谱纯, 美国 Alfa Aesar 公司); 环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星、培氟沙星、依诺沙星(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司); 胎牛血清(德国 Gibco 公司); 恩诺沙星单克隆抗体[来源于杂交瘤细胞株(中国典型培养保藏中心 NO.C2015221)]; 乙腈(色谱纯, 美国 Honeywell 公司)。

2.2 仪器与设备

Waters e2695 高效液相色谱仪(配备 Waters 2475 荧光检测器, 美国 Waters 公司); BSA 2202S-CW 电子天平(德国赛多利斯公司); Multi 720 pH 计(德国 WTW 公司); 5804R 高速冷冻离心机(艾本德中国有限公司); DIRECT-Q3 超纯水机(密理博中国有限公司); MS3 涡旋振荡混合器(广州仪科实验室技术有限公司)。

2.3 实验方法

2.3.1 色谱条件

色谱柱: Waters XBridge[®] C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流速: 0.8 mL/min; 柱温: 25 °C; 试样温度: 室温; 进样量: 20 μL; 流动相: A 相为 0.05 mol/L 磷酸溶液/三乙胺(pH 2.4), B 相为乙腈, 等度洗脱, A:B=86:14(V/V); 荧光检测器: 激发波长 280 nm, 发射波长 450 nm。

2.3.2 标准溶液配制

恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、达氟沙星标准储备液: 分别称量 10 mg 固态标准品于 10 mL 容量瓶中, 加入 0.03 mol/L NaOH 溶液溶解定容, 分别得到浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。

2.3.3 制备免疫亲和层析胶

称取 3 g CNBr 活化的 Sepharose 4B 冻干粉于 50 mL 离心管, 加入 30 mL 1 mmol/L HCl 室温于摇床中轻轻摆动溶胀 1 h, 室温 2000 r/min 10 min 弃上清, 重复同法离心洗涤重复 8~10 次充分去除 Sepharose 4B 中其他小分子化学试剂后, 再加 30 mL 0.1 mol/L NaHCO₃ 和 0.5 mol/L NaCl(pH 8.3)离心洗涤一次, 取沉淀胶备用。

将纯化好的单抗蛋白液加入上述沉淀胶中, 置于摇床中室温摇动孵育 1 h, 室温 2000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 从该上清中取少许以 Bradford 法分析单抗蛋白与 Sepharose 4B 交联效果。每支离心管加 30 mL 0.1 mol/L NaHCO₃/0.5 mol/L NaCl(pH 8.3)缓冲溶液, 置于摇床中室温摇动孵育 10 min, 室温 2000 r/min 离心 10 min 弃上清, 再用该交联缓冲液重复上述步骤离心洗涤 5~6 次以充分去除未交联的蛋白, 获得抗体蛋白交联胶。

在离心管加入 30 mL 0.1 mol/L Tris-HCl(pH 8.0)置于摇床中室温摇动孵育 2 h 以充分封闭 Sepharose 4B 胶中未与蛋白交联的活化基团,室温 2000 r/min 离心 10 min,弃上清,再分别用 30 mL 0.1 mol/L HAC-NaAC 和 0.5 mol/L NaCl(pH 4.0)和 30 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 和 0.5 mol/L NaCl(pH 8.0)2 种缓冲液交替离心洗涤 3 个循环后,将胶重悬于 30 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 和 0.5 mol/L NaCl(pH 8.0)液补加 0.02%NaN₃,即制备好免疫亲和层析胶,于 4 °C 保存备用。

2.3.4 免疫亲和过程

(1)免疫亲和和层析胶亲和过程

取若干 1.5 mL 离心管,每管均加入 500 μ L 免疫亲和层析胶悬液(层析胶实际体积约为 50 μ L),用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)离心洗涤 2 次,再将样品溶液——对应移入含免疫层析胶的离心管中,混合后于摇床室温摆动孵育 1 h,1000 r/min 离心 10 min 弃上清,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.2)离心洗涤 5~6 次,再用 0.9%NaCl 离心洗涤 2 次,每支离心管中分别加 1 mL 0.1 mol/L HAC-HCl(pH 2.3)开始洗脱,置于摇床室温摇动孵育 15 min,1000 r/min 离心 10 min,将离心洗脱上清液各取 850 μ L——对应移入新的离心管中,每管再补加 150 μ L 色谱级乙腈充分混匀后,作待测样本直接上 HPLC-FLD 定量测定。

(2)萃取回收率的测定

将上样浓度分别为 25、50、100 ng/mL 的恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星混合标准溶液 1 mL 加入到免疫层析胶中,交联反应、洗涤、洗脱,收集 850 μ L 洗脱液,再补加 150 μ L 色谱级乙腈,充分混合后作待测样本直接上 HPLC-FLD 定量测定各浓度点目标物的含量并根据该含量换算成回收率。

(3)免疫亲和和层析胶抗基质干扰能力的测定

为了进一步验证免疫亲和和层析胶抗基质干扰能力,在胎牛血清基质下做了对比实验。方法是将 5 种氟喹诺酮类药物的混合标准溶液分别等体积加入到 5%胎牛血清和 0.01 mol/L PBS 中,另外再以等体积的 5%胎牛血清和 0.01 mol/L PBS 混合液作为空白对照试液,将这 3 种溶液作为上样溶液,洗脱后用 HPLC-FLD 定量分析,测定各自的回收率。

2.3.5 免疫亲和和层析柱亲和过程

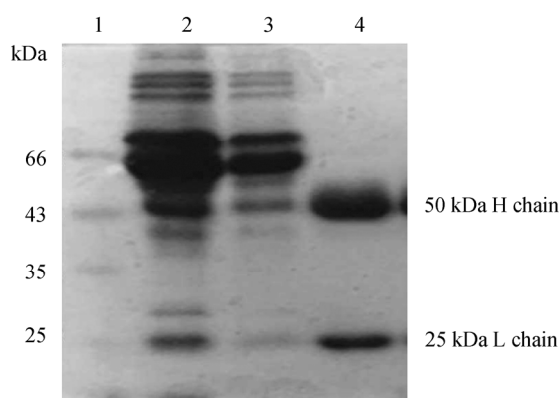
取一支 5 mL 亲和层析专用柱床,用 Tdwater 充分洗涤后,将 3 mL IAC 胶悬液装柱于柱床中,100 mL 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)平衡柱后备用,用 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)将恩诺沙星、诺氟沙星、环丙沙星、沙拉沙星、达氟沙星等 5 种药物标准储备液稀释成浓度均为 50 μ g/mL 的 100 mL 混合液作试液,将该液于层析柱中过滤 5 次(自然流速),分别用 100 mL 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)和 0.9% NaCl 洗涤该柱,最后加 1.5 mL 0.1 mol/L HAC-HCl(pH 2.3)过滤

柱子,流速不大于 1.0 mL/min,收集洗脱液,取 850 μ L 洗脱液于一支 1.5 mL 离心管中,补加 150 μ L 色谱级乙腈充分混匀,过 0.22 μ m 滤膜进样作 HPLC-FLD 定量分析。

3 结果与分析

3.1 单抗纯化电泳鉴定

单抗纯度是决定免疫亲和和层析胶性能的关键因素。本研究采用 protein G resin 一步法纯化抗体蛋白,纯化样本经 SDS-PAGE 电泳鉴定,结果见图 1。该图中纯化蛋白样本仅显示 2 条蛋白条带(重链和轻链),无其他杂蛋白条带,结果表明已获得极高纯度单克隆抗体蛋白,满足免疫亲和和层析胶研制的要求。



注:泳道 1 为蛋白分子量 Marker;泳道 2 为腹水样本;泳道 3 为 3 倍稀释腹水样本;泳道 4 为纯化单抗蛋白。

图 1 单抗诱生腹水样本经 Protein G 纯化后的电泳鉴定图
Fig. 1 Detection of McAb protein derived from ascites filtered with protein G resin by SDS-PAGE

3.2 氟喹诺酮类药物 HPLC-FLD 方法的建立

为了更好地分离这 5 种物质,比较了不同种类和不同比例的流动相。最后选择的流动相是 0.05 mol/L 磷酸溶液/三乙胺-乙腈(86:14, V:V),等度洗脱,流速为 0.8 mL/min,进样量 20 μ L;激发波长 280 nm,发射波长 450 nm。以此作为条件,5 种物质的峰型和出峰时间都比较好。在优化好的条件下,测定了 5 种物质的标准曲线,如表 1 所示。

3.3 萃取回收率测定

25、50、100 ng/mL 的诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星 3 种药物样本回收率均大于等于 65%,其中诺氟沙星的回收率最高分别为 82.17%、77.69%、75.79%;而沙拉沙星回收率较低,分别为 54.15%、47.98%、45.58%;结果见图 2,图中 4 种药物的回收率为 3 次独立重复试验而获得。该结果与间接竞争 ELISA 测定的该单克隆抗体对 4 种药物的亲和力和呈强相关性。

3.4 免疫亲和层析胶抗基质干扰能力的测定

为了进一步验证本文的免疫亲和层析胶对氟喹诺酮类药物多组分混标物结合力以及该层析胶抗基质干扰能力,以单组分均为 50 ng/mL 的恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星、达氟沙星 5 组分混标物作目标物,加入到 5%胎牛血清基质中,测其萃取回收率;并与药物在 0.01 mol/L PBS(pH 7.4)溶液中回收率作对比。2 组试样洗脱物的各组分的 HPLC 如图 3 所示。从图 3 可以看出,各组分均能被高效液相色谱柱有效分离,各组分信号响应良好,目标峰明确清晰、无其他非相关分子杂峰,而空白对照组无任何的目标药物信号峰。结果表明免疫亲和层析胶对上述 5 种药物混标物的单组分均有选择性捕捉能力。

各组分在 0.01 mol/L PBS 和 5%胎牛血清中的萃取回收率如图 4 所示,可以看出与 0.01 mol/L PBS 组相比,5%胎牛血清组的 5 种药物回收率均有显著地提高,诺氟沙星、恩诺沙星、环丙沙星、沙拉沙星和达氟沙星在胎牛血清中的萃取回收率分别为 82.97%、70.50%、70.16%、31.83% 和 6.37%。该结果表明 5%胎牛血清作模式基质不仅没有干扰免疫亲和层析胶对氟喹诺酮类目标物识别与捕捉,反而显著提高了该层析胶对目标物识别与捕捉能力,推测牛血清对免疫亲和层析胶有良好封闭作用,大大降低了固相抗体分子空间排阻效应,从而提高了抗体对目标抗原的识别与结合力。更为重要的是,通过牛血清对免疫亲

和层析胶预封闭处理,将恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星等 3 种食品样本重要残留目标物的回收率提高到 70%以上,考虑到样本洗涤时部分结合胶损失,实际回收率接近甚至超过 80%,为该免疫亲和层析胶由试验型转化为实际应用型提供了良好的优化方法。

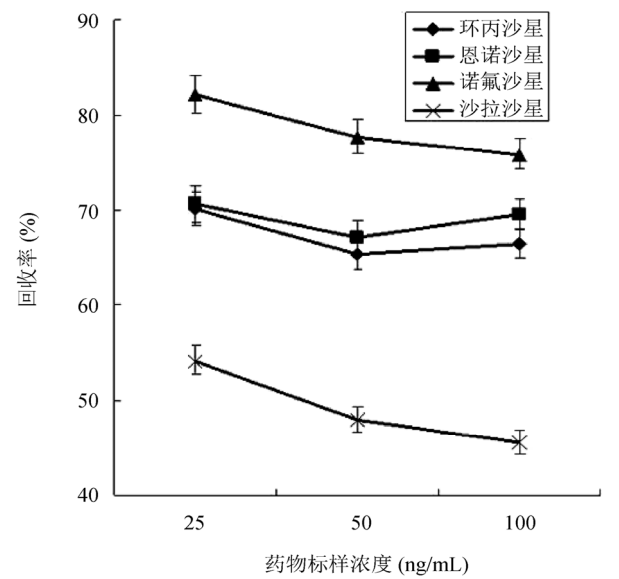


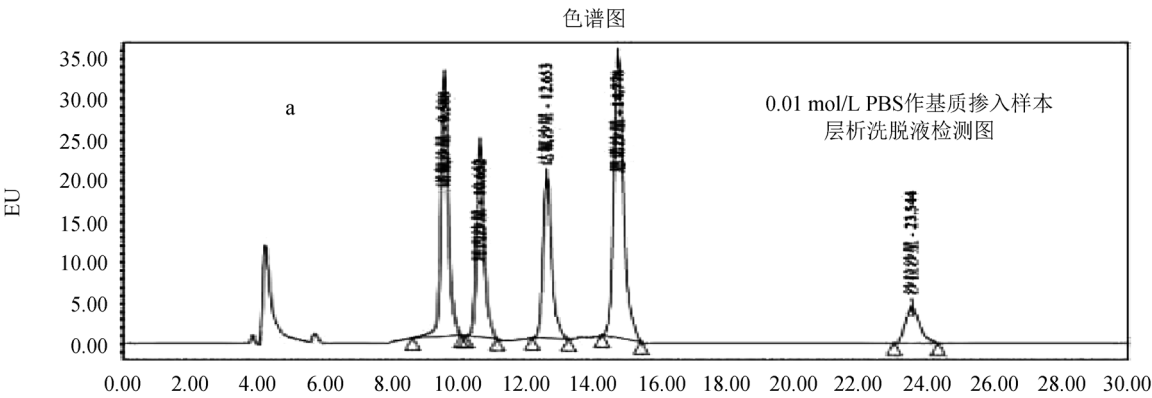
Fig. 2 环丙沙星、恩诺沙星、诺氟沙星和沙拉沙星的免疫亲和层析色谱回收率折线图(n=3)

Fig. 2 Immunoaffinity chromatography recovery line chart of ciprofloxacin, enrofloxacin, norfloxacin and sarafloxacin (n=3)

表 1 氟喹诺酮类药物的回归曲线方程、相关系数、线性范围、检出限

Table 1 Regression equations, correlation coefficients, linear ranges and limits of detection of fluoroquinolones.

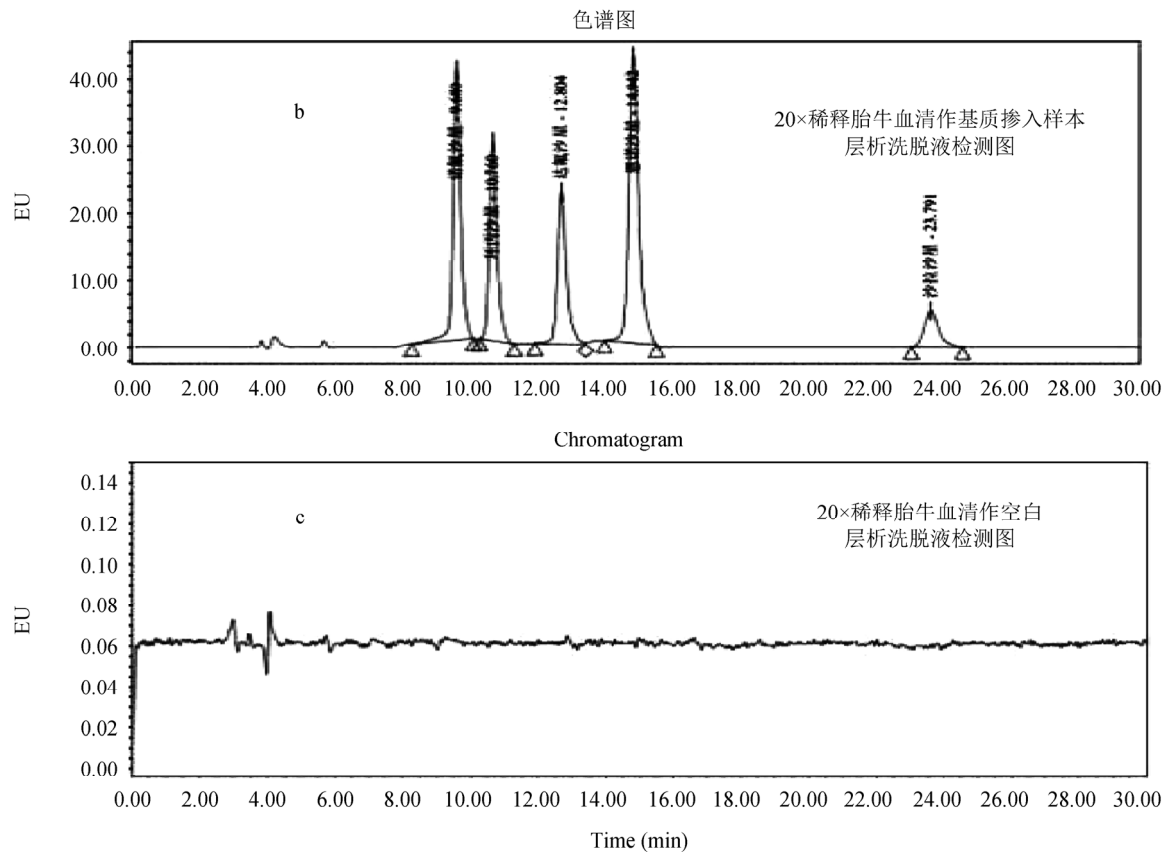
分析物	回归方程	相关系数	线性范围(ng/mL)	检出限(ng/mL)
诺氟沙星	$Y=202056X+94349$	0.9997	2~100	0.5
环丙沙星	$Y=152157X+197397$	0.9993	2~100	0.5
达氟沙星	$Y=2E+06X+172987$	0.9996	0.5~20	0.5
恩诺沙星	$Y=310119X+199493$	0.9996	2~100	0.5
沙拉沙星	$Y=112368X+80088$	0.9993	2~100	0.5



注: a: 0.01 mol/L PBS 溶剂; b: 5%胎牛血清溶剂; c: 5%胎牛血清空白。

图 3 恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星和达氟沙星标准溶液色谱图

Fig. 3 Chromatograms of the enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, sarafloxacin and danofloxacin standard solution



注: a: 0.01 mol/L PBS 溶剂; b: 5%胎牛血清溶剂; c: 5%胎牛血清空白。

图 3 恩诺沙星、环丙沙星、诺氟沙星、沙拉沙星和达氟沙星标准溶液色谱图

Fig. 3 Chromatograms of the enrofloxacin, ciprofloxacin, norfloxacin, sarafloxacin and danofloxacin standard solution

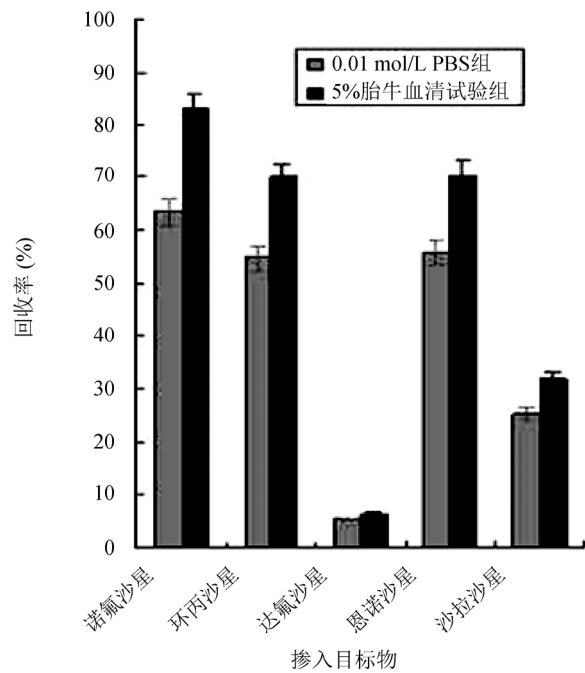


图 4 氟喹诺酮类药物掺入胎牛血清及 PBS 的回收率对比图($n=6$)
Fig.4 Comparison of recoveries of fluoroquinolones into fetal bovine serum and PBS ($n=6$)

3.5 免疫亲和层析柱对目标物富集能力的测定

氟喹诺酮类药物在地表水和土壤中的残留是极微量的, 而对其残留限目目前没有统一的标准, 但瑞典等发达国家对氟喹诺酮类药物的检测限规定为 500 pg/mL。因此本文在证实上述免疫亲和层析胶能同时捕捉几种氟喹诺酮类药物的基础上, 以浓度分别为 0.5 ng/mL 的 5 种氟喹诺酮类药物的 100 mL 混合标准溶液作为样本, 经上述免疫亲和层析柱凝胶免疫结合-洗脱获取 5 种药物的洗脱样本, 经 HPLC-FLD 检测, 结果如图 5 所示。5 种药物均达到 HPLC-FLD 仪器信号响应水平, 目标峰明确清晰, 无其他非相关分子杂峰。

4 结 论

本文成功制备了抗恩诺沙星单克隆抗体和 CNBr 活化的 Sepharose 4B 偶联的氟喹诺酮类免疫亲和层析胶。依据抗体的特异性, 可同时捕获胎牛血清中 5 种氟喹诺酮类药物供高效液相色谱检测, 回收率在 6.37%~83.0%。免疫亲和层析胶具有高的柱容量、选择性、萃取效率和稳定性, 在实际样品分析中具有广阔的应用前景和价值。

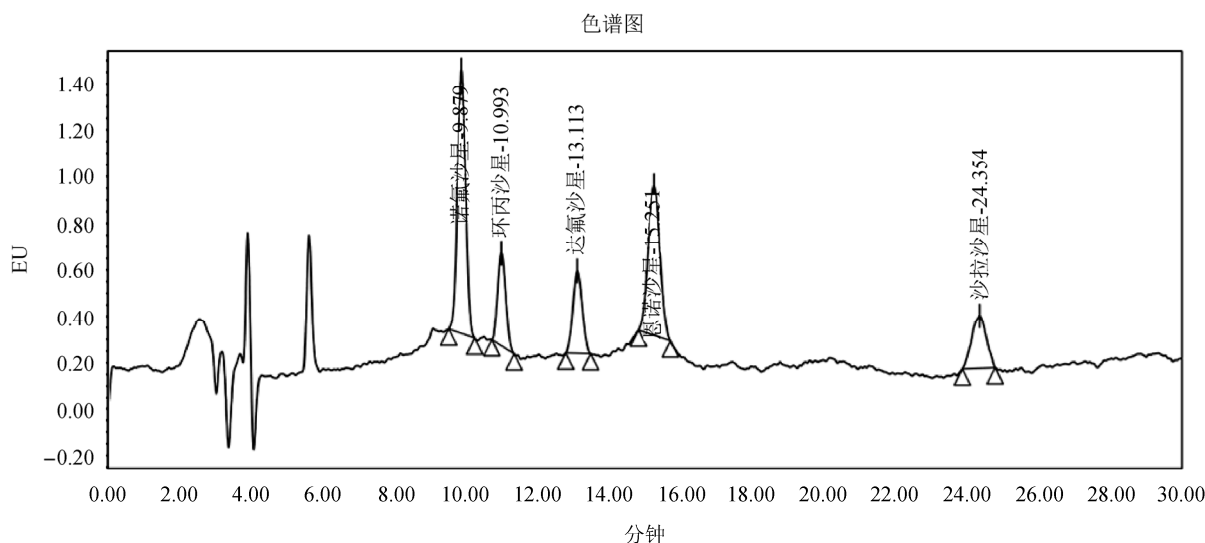


图5 氟喹诺酮类药物混合液经免疫亲和和检测图(50 pg/mL)
Fig. 5 Chromatogram of fluoroquinolones by immunoaffinity chromatography (50 pg/mL)

参考文献

- [1] Roca M, Castillo M, Marti P, *et al.* Effect of heating on the stability of quinolones in milk [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(9): 5427–5431.
- [2] Batt AL, Bruce IB, Aga DS. Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges [J]. *Environ pollut*, 2006, 142(2): 295–302.
- [3] Li YL, Hao XL, Ji BQ, *et al.* Rapid determination of 19 quinolone residues in spiked fish and pig muscle by high-performance liquid chromatography (HPLC) tandem mass spectrometry [J]. *Food Addit Contam*, 2009, 26(3): 306–313.
- [4] Huet AC, Charlier C, Tittlemier SA, *et al.* Simultaneous determination of (fluoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(8): 2822–2827.
- [5] Wang S, Mu H, Bai Y, *et al.* Multiresidue determination of fluoroquinolones, organophosphorus and N-methyl carbamates simultaneously in porcine tissue using MSPD and HPLC–DAD [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(27): 2961–2966.
- [6] Fan W, He M, Wu X, *et al.* Graphene oxide/polyethyleneglycol composite coated stir bar for sorptive extraction of fluoroquinolones from chicken muscle and liver [J]. *J Chromatogr A*, 2015, 1418: 36–44.
- [7] Huang X, Qiu N, Yuan D, *et al.* Preparation of a mixed stir bar for sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of quinolones from wastewater [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(16): 2667–2673.
- [8] Gao Q, Zheng HB, Luo D, *et al.* Facile synthesis of magnetic one-dimensional polyaniline and its application in magnetic solid phase extraction for fluoroquinolones in honey samples [J]. *Anal Chim Acta*, 2012, 720: 57–62.
- [9] He XM, Zhu GT, Zheng HB, *et al.* Facile synthesis of polyaniline-coated SiO₂ nanofiber and its application in enrichment of fluoroquinolones from honey samples [J]. *Talanta*, 2015, 140: 29–35.
- [10] GB/T 21312-2007 动物源性食品中14种喹诺酮类药物残留检测方法-液相色谱-质谱/质谱法[S].
GB/T 21312-2007 Determination of 14 quinolone drug residues in animal foods by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [S].
- [11] EU Commission Regulation No.2377/90. Laying down a community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin [S].
- [12] 刘媛, 谢孟峡, 丁岚, 等. 高效液相色谱同时测定鸡蛋中4种氟喹诺酮类药物残留[J]. *分析化学*, 2004, 32(3): 352–355.
Liu Y, Xie FX, Ding L, *et al.* Simultaneous determination of four fluoroquinolones residues in eggs by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Anal Chem*, 2004, 32(3): 352–355.
- [13] Shim JH, Shen JY, Kim R, *et al.* Determination of the fluoroquinolone enrofloxacin in edible chicken muscle by supercritical fluid extraction and liquid chromatography with fluorescence detection [J]. *J Agric Food Chem*, 2003, 51(26): 7528–7532.
- [14] Yang Y, Wang Y, Niu R, *et al.* Preparation and characterization of chitosan microparticles for immunoaffinity extraction and determination of enrofloxacin [J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93: 783–788.
- [15] Zhao S, Li X, Ra Y, *et al.* Developing and optimizing an immunoaffinity cleanup technique for determination of quinolones from chicken muscle [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(2): 365–371.
- [16] Hou X, Li X, Ding S, *et al.* Simultaneous analysis of avermectins in bovine tissues by LC-MS-MS with immunoaffinity chromatography cleanup [J]. *Chromatographia*, 2006, 63(11): 543–550.
- [17] Li C, Wang Z, Cao X, *et al.* Development of an immunoaffinity column method using broad-specificity monoclonal antibodies for simultaneous extraction and cleanup of quinolone and sulfonamide antibiotics in animal muscle tissues [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1209(1): 1–9.

(责任编辑: 姜 珊)

作者简介



章雪明, 硕士, 高级兽医师, 主要研究方向为动物疫病防治及药物残留。
E-mail: zxmy@foxmail.com