

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240731005

间接竞争酶联免疫吸附测定法快速筛查 药酒中双氯芬酸

杨兴东^{1*}, 曲 扬¹, 王趁趁¹, 毋丽华¹, 何贝贝¹, 王小慧¹, 胡晓飞²

(1. 周口师范学院生命科学与农学院, 周口 466001;
2. 河南省农业科学院动物免疫学重点实验室, 郑州 450002)

摘 要: **目的** 建立间接竞争酶联免疫吸附测定法快速筛查药酒中双氯芬酸(diclofenac, DCF)。**方法** 采用活性酯法和混合酸酐法分别将 DCF 与载体蛋白耦合, 得到 DCF 的免疫原和检测抗原。采用 DCF-牛血清白蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 随后用杂交瘤等技术制备抗 DCF 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 基于 DCF mAb 建立了间接竞争酶联免疫吸附测定法, 对该检测方法的性能(准确度、精密度和特异性)进行鉴定。**结果** 紫外扫描结果表明 DCF 已成功与载体蛋白偶联; 获得最优株抗 DCF 的杂交瘤细胞株(4B9), 其 IC₅₀ 值为 0.61 ng/mL; 该检测方法在药酒中的 DCF 平均添加回收率为 85.9%, 其批间变异系数(coefficient of variation, CV) (5.3%~9.7%)均大于批内 CV (4.9%~9.1%), 与类似物(酮洛芬、阿司匹林、吲哚美辛、布洛芬、舒林酸、萘普生、罗非昔布)没有交叉反应。**结论** 本研究建立的间接竞争 ELISA 法为 DCF 在药酒中的残留提供了一种新的筛查手段。

关键词: 双氯芬酸; 合成抗原; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附测定法; 药酒

Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of diclofenac in medicinal liquor

YANG Xing-Dong^{1*}, QU Yang¹, WANG Chen-Chen¹, WU Li-Hua¹, HE Bei-Bei¹,
WANG Xiao-Hui¹, HU Xiao-Fei²

(1. College of Life Science and Agriculture, Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China;
2. Key Laboratory of Animal Immunology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)

ABSTRACT: Objective To establish an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening diclofenac (DCF) in medicinal liquor. **Methods** DCF was coupled to carrier protein using the active ester method and the mixed anhydride method to obtain DCF immunogen and detection antigen. BALB/c mice were immunized with DCF-bovine serum albumin, and then anti-DCF monoclonal antibody (mAb) was prepared by hybridoma technology. An indirect competitive ELISA method was established based on DCF mAb, and the performance (accuracy, precision and specificity) of the detection method was evaluated. **Results** Ultraviolet

基金项目: 河南省科技攻关项目(212102110094)、周口师范学院中青年骨干教师资助项目

Fund: Supported by the Henan Province Science and Technology Agency (212102110094), and the Young and Middle-aged Backbone Teachers from Zhoukou Normal University

*通信作者: 杨兴东, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全免疫学快速检测技术。E-mail: zkskyyxd@163.com

*Corresponding author: YANG Xing-Dong, Ph.D, Associate Professor, Zhoukou Normal University, No.6, Wenchang Road, Chuanhui District, Zhoukou 466001, China. E-mail: zkskyyxd@163.com

scanning results showed that DCF was successfully coupled to the carrier protein; the optimal hybridoma cell line (4B9) against DCF was obtained, with an IC_{50} value of 0.61 ng/mL; the average recovery rate of DCF added in medicinal liquor by this detection method was 85.9%, and the coefficient of variation (CV) for intra-assay (5.3%-9.7%) was greater than the CV for inter-assay (4.9%-9.1%), and there was no cross-reaction with analogues (ketoprofen, aspirin, indomethacin, ibuprofen, sulindac, naproxen, and rofecoxib). **Conclusion** The indirect competitive ELISA method established in this study provides a new screening method for DCF residues in medicinal liquor.

KEY WORDS: diclofenac; synthetic antigen; monoclonal antibody; enzyme linked immunosorbent assay; medicinal liquor

0 引言

双氯芬酸(diclofenac, DCF), 又名 1-(2,6-二氯苯基)-2-吡啶酮, 是一种非甾体抗炎药, 用于缓解关节炎、类风湿性关节炎、急性痛风和痛经引起的疼痛、发热和炎症^[1-4], 因其起效快、成本低廉而被广泛用于抗风湿性疾病的解热镇痛药。国内一些不良厂商瞄准商机, 在药酒中违规添加 DCF 或其衍生物, 以提高功效, 获取非法利益。DCF 主要在胃肠道吸收, 长期饮用含有 DCF 的药酒会对人体产生不良健康影响, 如胃肠道溃疡、肾毒性和血小板机能失调^[5-7]。另一方面, 由于 DCF 的极性, 废水处理无法有效去除 DCF, 因此会持续危害鱼类和鸟类的健康^[8-11]。我国规定食品中 DCF 的每日允许摄入量(acceptable daily intake, ADI)为 0~0.5 $\mu\text{g}/(\text{kg bw}\cdot\text{d})$, 最高残留限量(maximum residue limit, MRL)为 1~10 ng/mL, 牛奶的 MRL 为 0.5 ng/mL。我国没有明确规定 DCF 在药酒中的添加限量标准和 MRL, 但我国《食品安全法》明确规定, 在食品或保健食品中添加药物属违法行为。建立保健食品中快速筛查 DCF 的残留方法非常必要。

用于测定生物样品中 DCF 的分析方法有很多, 例如高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[12-14]、HPLC-紫外检测法^[15-18]、反相高效液相色谱法(reversed phase-HPLC, RP-HPLC)^[19-21]、电化学检测^[22]、液相色谱质谱法(HPLC-mass spectrometry, HPLC-MS)^[23-24]和气相色谱质谱法(gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS)^[25-26]。虽然这些方法对于检测 DCF 相当敏感且具有特异性, 但它们耗时、费力, 并且由于它们依赖于样品预处理(分离、提取和衍生化)、昂贵的仪器和熟练的专业人员, 因此仅限于实验室使用。相反, 基于抗原和抗体之间特异性反应的免疫测定可以克服其中的一些缺点。因此, 酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[27-28]、竞争性上转换关联免疫吸附测定法^[29]已被开发用于检测废水、牲畜尸体和其他生物样品中的 DCF^[30]。ELISA 简化了复杂的样品预处理, 并且可以容忍某些基质干扰, 是一种更简单、快速的免疫测定方法, 可

分别进行定性和定量测定。

本研究通过活性酯(activated ester, AE)法和混合酸酐(mixed anhydride, MA)法将 DCF 与牛血清白蛋白(bull serum albumin, BSA)和卵白蛋白(ovalbumin, OVA)结合, 制备抗 DCF 单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb), 然后建立了间接竞争 ELISA, 并在加标回收实验中验证了其灵敏度、准确度和精密度、特异性, 为药酒中 DCF 的残留监测提供一种快速筛查的工具。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DCF、N-羧基琥珀酰亚胺、N,N-二甲基甲酰胺、 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 、四亚甲基氧化物、1-(3-(二甲基氨基)丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐、三正丁胺、氯甲酸异丁酯(分析纯, 美国 Sigma 公司); 二甲基亚砷(dimethylsulfoxide, DMSO)(分析纯, 上海麦克林生化科技股份有限公司); BSA、OVA(分析纯, 上海源叶生物科技有限公司)。HRP-羊抗鼠 IgG(中美生物技术有限公司); 6~8 周龄 SPF 级 BALB/c 小鼠(实验动物许可证号: 016BJ18Q32528R2M, 北京维通利华实验动物技术有限公司)。

1.2 仪器与设备

Multiskan 酶标仪、NanoDrop 2000c 紫外分光光度计[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; CP214 电子天平[精度 0.0001 g, 奥豪斯国际贸易(上海)有限公司]; SW-CJ-LFD 超净工作台(苏州净化设备有限公司); MYP19-2 磁力搅拌器(上海梅颖浦仪器仪表制造有限公司); 倒置显微镜[徕卡显微系统(上海)贸易有限公司]。

1.3 实验方法

1.3.1 免疫原和包被抗原的制备

采用两种方法合成 DCF-BSA 和 DCF-OVA 结合物: AE 法和 MA 法。AE 法^[31]: 将 15 mg DCF 溶解在 3.0 mL N,N-二甲基甲酰胺中, 并与 6.0 mg N-羧基琥珀酰亚胺、10.0 mg 1-(3-(二甲基氨基)丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐在室温(room temperature, RT)下混合 12 h。将混合物离心后留取

上清液。通过旋转蒸发收获活性最终产物并溶解在 1 mL DMSO 中, 然后逐滴加入 2.0 mL BSA 溶液 (42 mg 溶解在 0.01 mol/L PBS 中) 或 OVA 溶液 (28 mg 溶解在 0.01 mol/L PBS 中) (图 1a)。MA 法^[32]: 将 15.0 mg DCF 加入 2.0 mL 四氢呋喃中, 随后添加 27.0 μ L 三正丁胺, 在冰浴条件下, 混合液充分反应 20 min, 然后向混合物中加入 16.0 μ L 氯甲酸异丁酯, 室温条件下作用 3 h。最后, 将 3 mL 预冷的 BSA 溶液 (42 mg 溶于 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 或 OVA 溶液 (28 mg 溶于 0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 逐滴加入混合物中, 并在室温下搅拌 24 h (图 1b)。

在这两种方法中, 最终混合物均用 PBS 透析, 并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下以 3000 r/min 的速度离心 20 min。收集上清液并在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存。使用紫外扫描分别判断 DCF 与 BSA 或 OVA 是否偶联, 并计算两者的结合率^[33]。分别以两种方法制备的 DCF-AE-BSA 和 DCF-MA-BSA 作为免疫原免疫 BALB/c 小鼠。

1.3.2 抗 DCF mAb 的制备

BALB/c 小鼠皮下注射 65 μ g 免疫原 5 次, 间隔 3 周。收集多抗血清并测定。选择在间接竞争 ELISA (indirect competitive ELISA, ic-ELISA) 中给出最佳半数最大抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 的小鼠, 在细胞融合前腹腔注射 100 μ g 免疫原。通过 ic-ELISA 筛选出分泌抗 DCF mAbs 的杂交瘤, 有限稀释法亚克隆, 并培养制备石蜡引流小鼠腹水 (DCF mAb)^[34-35]。使用 ELISA 和小鼠 mAb 同型试

剂盒 (美国 Sigma 公司) 鉴定 mAb 的亲力和同源性。

1.3.3 间接竞争 ELISA 检测方法的建立

反应步骤如下。(1) 将 DCF-OVA 用 CBS 溶液稀释至 3.0 $\mu\text{g/mL}$, 50.0 $\mu\text{L/孔}$ 加入酶标板, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 2 h, PBST 洗板后以 220.0 $\mu\text{L/孔}$ 用量加入 5.0% 猪血清, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h, 洗板后自然晾干, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待检; (2) 以 50 mL/孔的用量将 PBS 溶液加入上述酶标板, 随后每孔加入倍比稀释的 DCF 标准品, 并立即加入的 DCF mAb ($\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值为 1.0 左右) 50 μL , 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育 15 min, 用 PBST 洗涤酶标板 4 次; (3) 以 50 $\mu\text{L/孔}$ 的用量将 1:1000 稀释的 HRP-羊抗鼠 IgG 加入酶标板, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中温育 30 min, PBST 洗涤 6 次; (4) 添加显色液 5 min 后, 快速加入终止液终止反应, 测定 $\text{OD}_{450 \text{ nm}}$ 值。

1.3.4 ic-ELISA 的性能测试

(1) 加标回收实验

样品前处理: 药酒 (含酒精 38%) 购自周口市川汇区当地市场, 经 HPLC 检测为阴性。将 2.0 mL 药酒稀释在 8.0 mL PBS 中, 配制成储备液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。在加标回收实验前, 应用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过原液, 设 2.0、5.0、15.0 ng/mL 3 个 DCF 的加标量。

(2) 精密度测试

DCF 标准品的质量浓度分设为 4、8、32 ng/mL, 在同一批内作 6 次重复, 重复操作 6 个批次。测试结束后, 计算批内及批间误差。

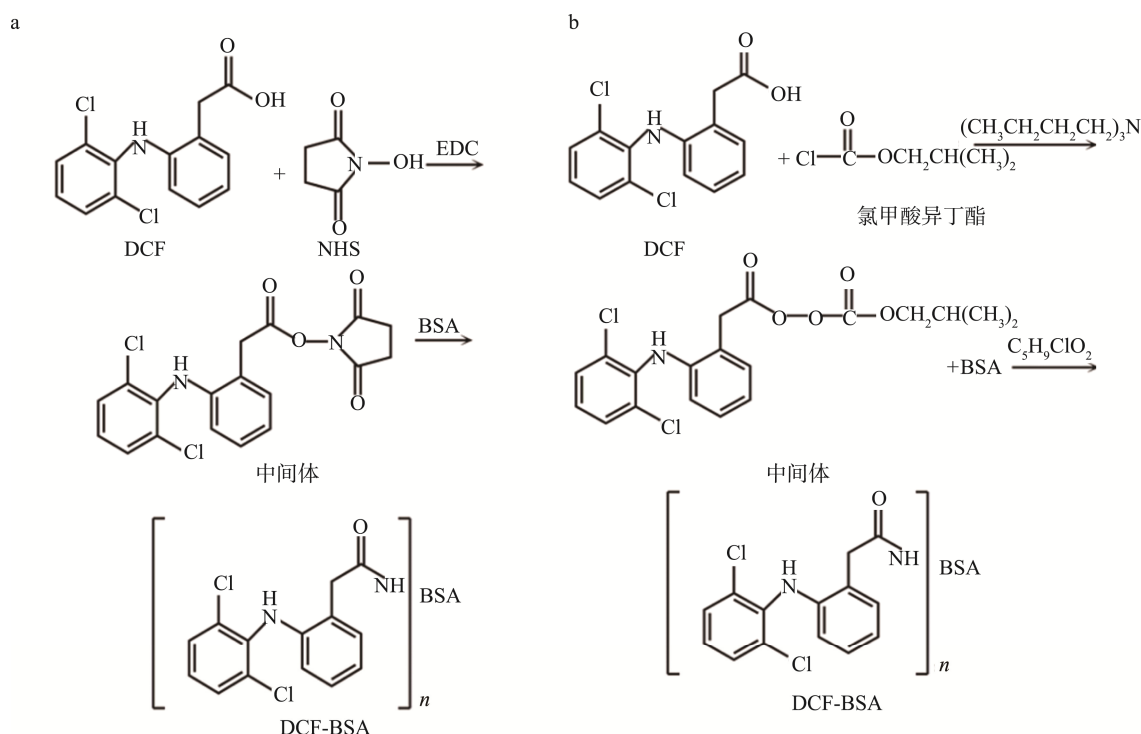


图1 活化酯法合成DCF-BSA (a)和混合酸酐法合成DCF-BSA (b)

Fig.1 Synthesis of DCF-BSA using activated ester method (a) and synthesis of DCF-BSA using mixed anhydride method (b)

(3) DCF mAb 特异性测试

应用 ic-ELISA 分别测试其类似物(酮洛芬、阿司匹林、吲哚美辛、布洛芬、舒林酸、萘普生、罗非昔布)的 IC₅₀ 值,运用交叉反应(cross reaction, CR)来表示其特异性,计算公式: CR/%=(DCF IC₅₀ 值/类似物 IC₅₀ 值)×100%。

1.4 数据处理

本实验中的所有未标明数据均设置 3 个平行,实验结果以平均值±标准偏差进行表示,运用 Excel 2021 统计实验数据,GraphPad Prism 8.0 软件进行绘图。

2 结果与分析

2.1 完全抗原的制备

采用 AE 法合成免疫原(DCF-AE-BSA)、包被抗原(DCF-AE-OVA), MA 法合成免疫原(DCF-MA-BSA)、包被抗原(DCF-MA-OVA)。DCF、BSA、OVA 的最大吸收波峰分别位于 276、280、281 nm 处,紫外扫描显示 DCF-BSA、DCF-OVA 与 BSA、OVA 相比,两者的最大吸收波峰均发生了变化(图 2); 计算得出 AE 法[1-(3-(二甲基氨基)丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐/N-羧基琥珀酰亚胺]DCF 与 BSA、OVA 的偶联率分别为 21.6:1 和 16.5:1。MA 法 DCF 与 BSA、OVA 的偶联率分别为 17.2:1、15.9:1。通过比较血清抗体滴度和 IC₅₀ 值(表 1),选择抗体滴度为 1:5.12×10⁴ 和 IC₅₀ 值为 7.89 ng/mL 的小鼠进行后续的细胞融合,细胞融合前 3 d 用 AE 法制备的 DCF-AE-BSA 进行加强免疫。

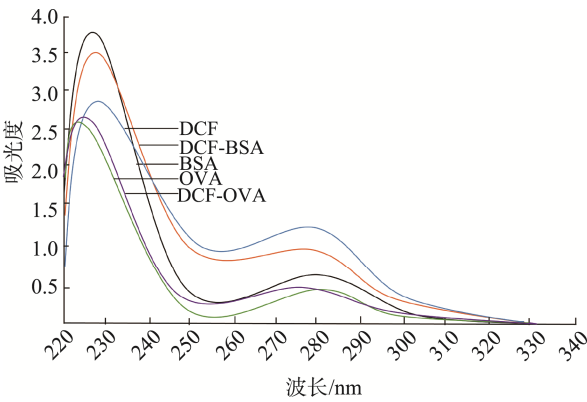


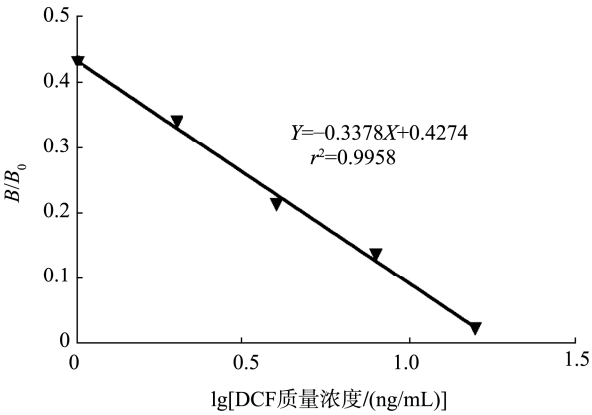
图2 DCF、BSA、OVA、DCF-BSA和DCF-OVA紫外扫描图
Fig.2 Ultraviolet-visible scanning spectra of DCF, BSA, OVA, DCF-BSA and DCF-OVA

表 1 MA 法和 AE 法产生的抗 DCF 多抗血清的最佳特征
Table 1 Optimal characteristics of anti-DCF polyclonal antisera generated by MA and AE methods

包被抗原	多抗血清(MA)		多抗血清(AE)	
	效价 (×10 ³)	IC ₅₀ /(ng/mL)	效价 (×10 ³)	IC ₅₀ /(ng/mL)
DCF-AE -OVA	6.4	51.13	51.2	7.89
DCF-MA-OVA	12.8	25.41	6.4	43.76

2.2 DCF mAb 的特征

经过细胞融合、间接 ELISA 和 ic-ELISA 筛选,选出了 4 株杂交瘤细胞系,分别命名为 2F4、3A7、3D4 和 4B9。其中 mAb 4B9 的抗体滴度为 1:1.024 × 10⁶, IC₅₀ 值为 0.61 ng/mL(图 3, 表 2)。经测定,4B9 的亲合力常数(Ka)和亚型分别为 1.5×10¹¹ L/mol(表 2)和 Ig G1,表明制得的抗 DCF mAb 对 DCF 具有较好的亲和力,且该 DCF mAb 的抗体类型适合于食品中免疫分析检测。



注: B/B₀表示加标样品的 OD_{450 nm} 值除以空白样品的 OD_{450 nm} 值。
图 3 DCF mAb 对 DCF 的 ic-ELISA 的校准曲线
Fig.3 Calibration curve of ic-ELISA of DCF mAb against DCF

2.3 间接竞争 ELISA 方法的测试结果

2.3.1 添加回收实验测试结果

阴性药酒的回收率在 83.3%~88.6%,平均为 85.9%,变异系数(coefficient of variation, CV)为 7.2%~9.2%,平均为 8.5%(表 3),根据我国 GB/T 27404—2008《食品理化检测标准》:添加回收实验的回收率为 60%~120%(被测组分 <100.0 ng/mL),该法具有较好的准确度。另外,我国药酒的酒精度大多在 38%~50%之间,在此范围内,对该法的添加回收实验检测结果没有明显差异。

表 2 ELISA 鉴定抗 DCF mAbs
Table 2 Characterization of anti-DCF mAbs by ELISA

mAb	mAb 效价	Ka/(L/mol)	线性回归方程	r ²	IC ₅₀ /(ng/mL)
2F4	1:1.024×10 ⁶	9.0×10 ¹⁰	Y=−0.3823X+0.5091	0.9935	1.10
3A7	1:5.12×10 ⁵	7.5×10 ¹⁰	Y=−0.4842X+0.6562	0.9921	2.10
3D4	1:5.12×10 ⁵	7.5×10 ¹⁰	Y=−0.4617X+0.6177	0.9927	1.80
4B9	1:1.024×10 ⁶	1.5×10 ¹¹	Y=−0.3263X+0.3986	0.9958	0.61

表 3 DCF 在药酒中的回收率

Table 3 Recovery of DCF in medicinal liquor

DCF 添加量 /(ng/mL)	测定值 /(ng/mL)	回收率/%	CV/%
2.0	1.67±0.15	83.3±7.5	9.2
5.0	3.43±0.31	85.7±6.2	9.0
15.0	12.29±0.96	88.6±6.4	7.2

2.3.2 方法精密度测试结果

表 4 显示阴性药酒的批内 CV 在 4.9%~9.1%之间, 平均批内 CV 为 6.9%; 批间 CV 在 5.3%~9.7%之间, 平均 CV 系数为 7.6%, 平均批间 CV 大于平均批内 CV, 且在被测组分含量小于 100.0 ng/mL 条件下, 批内和批间 CV 均小于 10%, 说明该检测方法的精密度较好。

表 4 ic-ELISA 检测药酒的精密度

Table 4 ic-ELISA for the precision of testing medicinal liquor

DCF /(ng/mL)	批次	平均值 /(ng/mL)	批内 CV/%	平均值 /(ng/mL)	批间 CV/%
4	3	3.35	9.1	3.28	9.7
8	3	6.78	6.8	6.70	7.8
32	3	28.94	4.9	28.73	5.3

2.3.3 方法特异性测试结果

表 5 显示该法与酮洛芬、阿司匹林、吲哚美辛、布洛芬、舒林酸、萘普生、罗非昔布等类似物的交叉反应率均小于 0.1%, 说明 DCF 与这 7 种结构类似物没有 CR, 进一步说明该检测方法的特异性较好。

表 5 DCF mAb 与其类似物的 CR%

Table 5 CR% of DCF mAb with its analogs

化合物	IC ₅₀ /(ng/mL)	CR/%
DCF	0.61	100
酮洛芬	> 700	< 0.1
阿司匹林	> 700	< 0.1
吲哚美辛	> 700	< 0.1
布洛芬	> 700	< 0.1
舒林酸	> 700	< 0.1
萘普生	> 700	< 0.1
罗非昔布	> 700	< 0.1

3 讨论与结论

DCF 的分子量为 296.15 Da, 是一种半抗原, 其本身不具备免疫原性。本研究运用活性酯法和混合酸酐法将 DCF 分别与 BSA、OVA 耦合制得免疫原和包被原, 采用 DCF-BSA 对 BALB/c 小鼠进行免疫。通过杂交瘤技术将敏感性最优的小鼠脾细胞和 NS₀ 骨髓瘤细胞融合, 经过对细胞株筛选、亚克隆及诱生腹水法等步骤, 最后获得高亲和力、特异性的抗 DCF mAb。基于抗 DCF mAb 建立了用于

检测 DCF 残留的间接竞争 ELISA 检测方法, 对于 DCF 的 IC₅₀ 为 0.61 ng/mL。药酒样品中批内、批间 CV 分别为 4.9%~9.1%、5.3%~9.7%。与色谱分析法相比, 间接竞争 ELISA 方法具有检测快速, 成本低, 专业人员易于操作等优点, 因此, 该法是一种方便的筛选工具, 可用于检测药酒样品中 DCF 的残留, 也为下一步研制食品中 DCF 快速检测免疫层析试纸提供了实验依据。另一方面, 为避免外界环境的干扰, 可探寻合适的抗体替代品, 为食品中有害物质的残留提供更加精确的检测手段。

参考文献

[1] SAVASER A, OZKAN Y, ISIMER A. Preparation and *in vitro* evaluation of sustained release tablet formulations of diclofenac sodium [J]. *IL Farmaco*, 2005, 60: 171–177.

[2] 周志洁, 张兰云, 李凤国, 等. 复方双氯芬酸钠对骨关节炎大鼠软骨形态及氧化应激的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(26): 4154–4160.

ZHOU ZJ, ZHANG LY, LI FG, *et al*. Effects of compound diclofenac sodium on cartilage morphology and oxidative stress in osteoarthritis rats [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2023, 27(26): 4154–4160.

[3] 钟伟兴, 湛祖江, 李俊桦, 等. 消炎止痛膏对脂多糖诱导的 C2C12 分化肌管影响[J]. *中国临床解剖学杂志*, 2023, 41(6): 716–720.

ZHONG WX, CHEN ZJ, LI JH, *et al*. Effect of xiaoyanzhitong ointment on C2C12 myofibers induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Clin Anat*, 2023, 41(6): 716–720.

[4] SANTHOSH A, SHARMA A, BAKHSHI S, *et al*. Topical diclofenac for prevention of capecitabine-associated hand-foot syndrome: A double-blind randomized controlled trial [J]. *J Clin Oncol*, 2024, 42(15): 1821–1829.

[5] AYGUN D, KAPLAN S, ODACI E, *et al*. Toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: A review of melatonin and diclofenac sodium association [J]. *Histol Histopathol*, 2012, 27(4): 417–436.

[6] BHANJA DB, SIL A, CHAKRABORTY S. Intramuscular diclofenac-induced iatrogenic cutaneous necrosis [J]. *Postgrad Med J*, 2020, 96(1135): 298–299.

[7] CHEN ES, LEE CL, TSUI KC, *et al*. Diclofenac-induced adverse drug reactions and hyperbilirubinemia caused by a variant gene [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2022, 38(3): 286–287.

[8] ZIYLAN A, KOLTYPIN Y, GEDANKEN A, *et al*. More on sonolytic and sonocatalytic decomposition of diclofenac using zero-valent iron [J]. *Ultrason Sonochem*, 2013, 20(1): 580–586.

[9] SATHISHKUMAR P, MOHAN K, MEENA RAA, *et al*. Hazardous impact of diclofenac on mammalian system: Mitigation strategy through green remediation approach [J]. *J Hazard Mater*, 2021, 419: 126135.

[10] MORENO-OPPO R, CARAPETO R, CASIMIRO R, *et al*. The veterinary use of diclofenac and vulture conservation in Spain: Updated evidence and socio-ecological implications [J]. *Sci Total Environ*, 2021, 796: 148851.

[11] RUSSO C, NUGNES R, ORLO E, *et al*. Diclofenac eco-geno-toxicity in freshwater algae, rotifers and crustaceans [J]. *Environ Pollut*, 2023, 335: 122251.

[12] ELKACEMI M, ELORCHE A, ELHAMDAOUI O, *et al*. Validation of an HPLC method for the determination of diclofenac diethylamine and three of its impurities in a gel pharmaceutical form [J]. *J AOAC Int*, 2023, 106(6): 1443–1454.

- [13] THAKUR S, MOHIUDDIN I, SINGH R, *et al.* Selective quantification of diclofenac from groundwater and pharmaceutical samples by magnetic molecularly imprinted polymer-based sorbent coupled with the HPLC-PDA detection [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(27): 70871–70883.
- [14] ANDRAWS G, TREFI S. Ionisable substances chromatography: A new approach for the determination of ketoprofen, etoricoxib, and diclofenac sodium in pharmaceuticals using ion-pair HPLC [J]. *Heliyon*, 2020, 6(8): e04613.
- [15] RAMOS PM, BELLO LMA, FERNANDEZ-TORRES R, *et al.* HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME) [J]. *Anal Chim Acta*, 2009, 653(2): 184–190.
- [16] RODRIGUEZ-BASSO ÁG, BONAFEDE SL, PRADO HJ. Concurrent determination of pridinol, diclofenac and impurity a by HPLC-UV [J]. *J Chromatogr Sci*, 2023, 62(1): 92–99.
- [17] NENNI M, DOGAN A, ÇELEBIER M, *et al.* Itrafiltration-based sample preparation and HPLC-UV determination of diclofenac in human plasma samples [J]. *Turk J Chem*, 2022, 46(3): 777–785.
- [18] 赵悦, 秦晓鹏, 刘菲. 水体中主要阴离子及 pH 值对双氯芬酸液相色谱定量的影响[J]. *岩矿测试*, 2018, 37(1): 79–86.
- ZHAO Y, QIN XP, LIU F. Effects of anions and pH on the determination of diclofenac in water solutions by high performance liquid chromatography [J]. *Rock Min Anal*, 2018, 37(1): 79–86.
- [19] SHAHZAD A, ARSHAD S, ZUBAIR F, *et al.* Development and validation of facile RP-HPLC method for simultaneous determination of timolol maleate, moxifloxacin hydrochloride, diclofenac sodium and dexamethasone in plasma, aqueous humor and pharmaceutical products [J]. *J Chromatogr Sci*, 2023, 61(7): 678–687.
- [20] ALNAHWA LHM, ALI HM, HASANIN THA, *et al.* Development of an RP-HPLC method for quantifying diclofenac diethylamine, methyl salicylate, and capsaicin in pharmaceutical formulation and skin samples [J]. *Molecules*, 2024, 29(12): 2732.
- [21] KHATTABI L, BOUDIAR T, BOUHENNA MM, *et al.* RP-HPLC-ESI-QTOF-MS qualitative profiling, antioxidant, anti-enzymatic, anti-inflammatory, and non-cytotoxic properties of ephedra alata monjaueana [J]. *Foods*, 2022, 11(2): 145.
- [22] CHMIELEWSKA A, KONIECZNA L, PLENIS A, *et al.* Determination of diclofenac in plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2006, 20: 119–124.
- [23] AISSAOUI S, FAGNANI E, PEREZ S, *et al.* Removal of diclofenac by a local bacterial consortium: UHPLC-ESI-MS/MS analysis of metabolites and ecotoxicity assessment [J]. *Braz J Microbiol*, 2021, 52(2): 749–759.
- [24] 倪香艳, 孙念霞, 孙志文. 高效液相色谱-串联质谱法检测牛组织中双氯芬酸钠残留的研究[J]. *畜牧与兽医*, 2023, 55(3): 48–54.
- NI XY, SUN NX, SUN ZW. detection of diclofenac sodium residue in bovine tissue using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anim Hus Vet Med*, 2023, 55(3): 48–54.
- [25] CABAN M, STEPNOWSKI P. The application of isotopically labeled analogues for the determination of small organic compounds by GC/MS with selected ion monitoring [J]. *Anal Methods*, 2020, 12(30): 3854–3864.
- [26] HUANG JL, HE JJ, XU KN, *et al.* Diclofenac degradation by activating peroxydisulfate via well-dispersed GO/Cu₂O nano-composite [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(27): 41776–41787.
- [27] HUEBNER M, WEBER E, NIESSNER R, *et al.* Rapid analysis of diclofenac in freshwater and wastewater by a monoclonal antibody-based highly sensitive ELISA [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(29): 8873–8882.
- [28] SCHMIDT S, HOFFMANN H, GARBE LA, *et al.* Re-assessment of monoclonal antibodies against diclofenac for their application in the analysis of environmental waters [J]. *Anal Methods*, 2024, 16(21): 3349–3363.
- [29] HLAVACEK A, FARKA Z, HUBNER M, *et al.* Competitive upconversion-linked immunosorbent assay for the sensitive detection of diclofenac [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(11): 6011–6017.
- [30] SAINI M, TAGGART MA, KNOPP D, *et al.* Detecting diclofenac in livestock carcasses in India with an ELISA: A tool to prevent widespread culture poisoning [J]. *Environ Pollut*, 2012, 160(1): 11–16.
- [31] PINACHO DG, SANCHEZ-BAEZA F, MARCO MP, *et al.* Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics [J]. *Anal Chem*, 2012, 84(10): 4527–4534.
- [32] WAINER BH, FITCH FW, ROTHBERG RM, *et al.* Mor-phine-3-succinyl-bovine serum albumin: An immunogenic hapten-protein conjugate [J]. *Science*, 1972, 176: 1143–1145.
- [33] 刘岑, 王金荣, 段二珍, 等. 重金属属人工抗原的制备与鉴定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(21): 6915–6922.
- LIU C, WANG JR, DUAN ERZ, *et al.* Preparation and identification of artificial antigen for heavy metal cadmium [J]. *J Food Saf Qual*, 2022, 13(21): 6915–6922.
- [34] 杜斌, 岳绪辉, 罗建芝, 等. 草甘膦单克隆抗体的制备及酶联免疫分析方法的建立[J]. *食品安全质量检测学报*, 2023, 14(16): 205–212.
- DU B, YUE XH, LUO JZ, *et al.* Preparation of glyphosate monoclonal antibody and establishment of an enzyme linked immunosorbent assay [J]. *J Food Saf Qual*, 2023, 14(16): 205–212.
- [35] 谭攀, 吴鑫, 唐霏, 等. 米醇菌酸单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(3): 141–147.
- TAN P, WU X, TANG F, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibodies of bongkreik acid [J]. *J Food Saf Qual*, 2024, 15(3): 141–147.

(责任编辑: 蔡世佳 于梦娇)

作者简介



杨兴东, 博士, 副教授, 主要研究方向为食品安全免疫学快速检测技术。
E-mail: zkskyyxd@163.com