

# 酶联免疫法检测猪肉中的司帕沙星

邢广旭, 赵东, 孙雪峰, 温留丁, 张颖硕, 张改平\*

(河南省农业科学院, 动物免疫学重点实验室, 河南郑州 450003)

**摘要:** 为了建立一种检测猪肉中司帕沙星(SPFX)残留的方法,并且在检测时具有特异性高,背景低和无需样品预处理的特点。本研究制备了间接竞争性酶联免疫吸附剂和特异性抗司帕沙星单克隆抗体。结果表明,该抗体与氟甲喹(11.99%)、氟罗沙星(11.14%)、恩诺沙星(4.60%)、环丙沙星(0.31%)几乎没有交叉反应。该方法测定了添加SPFX的猪肉中的药物残留,检测内变异系数小于5.68%,检测间变异系数小于5.51%。检测间和检测内的平均回收率分别为102%~106%和101%~104%。该抗体对SPFX的 $IC_{50}$ 为31  $\mu$ g/L,没有抗体具有四种结构相关化合物和其他化合物。高效液相色谱(HPLC)和酶联免疫吸附试验(ELISA)的结果进一步证实了icELISA快速检测猪肉中SPFX的可靠性和准确性。该研究表明icELISA法检测猪肉中SPFX残留分析是一种可靠、简便、低成本的方法。

**关键词:** 司帕沙星; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附试验; 猪肉

文章编号: 1673-9078(2022)02-266-271

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.2.0527

## Detection of Sparfloxacin in Pork by Enzyme Linked Immunosorbent Assay

XING Guangxu, ZHAO Dong, SUN Xuefeng, WEN Liuding, ZHANG Yingshuo, ZHANG Gaiping\*

(Henan Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Animal Immunization, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract:** To establish a method for detecting sparfloxacin (SPFX) residues in pork, which has the characteristics of high specificity, low background, and no need for sample pretreatment, an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent and a specific anti-sparfloxacin monoclonal antibody were prepared in this paper. The results showed that the antibody had almost no cross-reactivity with flumequine (11.99%), fleroxacin (11.14%), enrofloxacin (4.60%), and ciprofloxacin (0.31%). This method measured drug residues in pork with SPFX, and the intra-detection coefficient of variation was less than 5.68%, and the inter-detection coefficient of variation was less than 5.51%. The average recovery rates between and within the test were 102%~106% and 101%~104%, respectively. The  $IC_{50}$  of this antibody against SPFX is 31  $\mu$ g/L, and almost no antibody has four structurally related compounds and other compounds. The results of high-performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) further confirmed the reliability and accuracy of the rapid detection of SPFX in pork by icELISA. This study shows that the icELISA method to detect SPFX residues in pork is a reliable, simple, and low-cost method.

**Key words:** sparfloxacin; monoclonal antibody; ELISA; pork meats

引文格式:

邢广旭,赵东,孙雪峰,等.酶联免疫法检测猪肉中的司帕沙星[J].现代食品科技,2022,38(2):266-271

XING Guangxu, ZHAO Dong, SUN Xuefeng, et al. Detection of sparfloxacin in pork by enzyme linked immunosorbent assay [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(2): 266-271

司帕沙星(SPFX)是第三代氟喹诺酮类抗菌剂,因其对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、支原体、衣原体、分枝杆菌等具有良好的抗菌活性,被广泛应用于

收稿日期: 2021-05-19

基金项目: 国家研发计划重点专项(2019YFC1605700)

作者简介: 邢广旭(1978-),男,博士,副研究员,研究方向:免疫学快速检测技术, E-mail: sprinkle.w@126.com

通讯作者: 张改平(1960-),男,博士,研究员,中国工程院院士,研究方向:动物病毒致病机制、动物重大疫病快速检测技术和食品安全快速检测技术, E-mail: zhanggaip@126.com

兽医传染病的治疗和预防。它能抑制拓扑异构酶 IV 和 DNA 旋转酶的功能,导致微生物 DNA 复制和蛋白质合成的失败,具有强烈而广泛的杀菌作用。

近年来,司帕沙星(SPFX)不仅用于细菌感染的预防和治疗,而且作为一种促进生长的工具。由于SPFX的滥用,其残留和对该抗生素产生耐药性的细菌的出现已成为主要的公共卫生问题<sup>[1-3]</sup>。根据已发表的文献,氟喹诺酮类药物的毒副作用包括食欲减退、呕吐、光毒性、遗传毒性等。

尽管SPFX的急性毒性在食品安全领域尚未见报

道,但考虑到未知的潜在生态风险,低水平 SPFX 的食品监测是必不可少的。越来越多的国家正在制定最大残留量 (MRL) 和氟喹诺酮类原料药的停药时间。根据食品和药品的不同来源,氟喹诺酮类原料药的最大残留限量设定在 30~1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ <sup>[4]</sup>。我国农业部已制定了氟喹诺酮类原料药的动物种类、剂量、用法和停药期限 (No.278, 2003.5.22)。为了监测动物性食品中 SPFX 的残留量,有必要建立简便、快速的分析方法。

目前,动物性食品中氟喹诺酮类药物的分析方法有生物测定法、高效液相色谱法、荧光分析法、分光光度法、液相色谱-串联质谱法和毛细管电泳法。但是当涉及到多类生物样品时,这些方法已经显示出检测 SPFX 的一些缺点,例如耗时、昂贵、低吞吐量、高背景或需要昂贵的设备。因此,有必要建立一种简便、灵敏、低成本的 SPFX 分析方法。

在以往的研究中,酶联免疫吸附法 (ELISA) 已广泛应用于食品和动物组织 (肌肉、血清、肝、肾、蛋和乳) 中包括氟喹诺酮类药物在内的兽药残留的筛选<sup>[5-8]</sup>。一些氟喹诺酮类药物,如诺氟沙星、培氟沙星、恩诺沙星、马波沙星、环丙沙星和达诺氟沙星,已被研究用于发展免疫分析<sup>[8-12]</sup>。根据目前报道,ELISA 法测定动物性食品和食品中 SPFX 的报道还很少。

本研究的主要目的是建立一种免疫单克隆抗体 ELISA 检测限度。在检测猪肉中 SPFX 残留时,具有特异性高,背景低和无需样品预处理的特点。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

司帕沙星、氟罗沙星、恩诺沙星、环丙沙星、氟甲喹、莱克多巴胺、特布他林、庆大霉素、沙布他莫和克伦特罗由国家药品生物制品检定所 (中国北京) 提供。N,N'-二环己基碳二亚胺、弗氏完全佐剂和不完全佐剂购自 Sigma-Aldrich (美国密苏里州圣路易斯)。卵清蛋白和牛血清白蛋白购自上海上宝生物科技有限公司 (中国上海)。吐温-20 和 N,N-二甲基甲酰胺购自中国广东省广州市东宏化工公司。3,3',5,5'-四甲基联苯胺购自 Amresco (Solon, OH)。山羊抗兔 IgG 辣根过氧化物酶结合物购自军事医学研究所 (中国北京)。

### 1.2 仪器

ELISA 在聚苯乙烯 96 孔微量滴定板 (Bio-Basic 公司) 中完成。紫外数据是从日立公司的 U-4100 分光光度计收集。微孔板阅读器 450/550 来自 Bio-Rad (加利福尼亚州里士满)。超纯水由 milipore (Bedford,

MA) 获得。

### 1.3 缓冲液和溶液

在免疫分析过程中,所有试剂和缓冲液的制备均采用超纯去离子水。磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 由 147 mmol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、136.9 mmol/L NaCl、268.3 mmol/L KCl 和 809.7 mmol/L  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  组成。洗涤缓冲液 (PBST) 为含有 0.05% 吐温-20 的 PBS 缓冲液 (0.01 mmol/L, pH 7.4)。使用 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液 (由 17.5 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$  和 7.5 mmol/L  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  组成, pH 9.6) 制备包衣缓冲液。底物缓冲液为 0.1 mol/L 醋酸钠/柠檬酸盐缓冲液 (pH 5.0)。含有 0.05% 猪血清的洗涤缓冲液为阻断缓冲液。为制备基质溶液,将 1.27 mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶解于 0.5 mL 甲醇中并添加 0.5 mL 甘油。

### 1.4 免疫原和包被抗原的制备

免疫原通过使用 NHS 酯法<sup>[11]</sup> (图 1) 将 SPFX 与 BSA 结合来合成。首先,将半抗原 (1.5 mg) 溶解于 DMF (1 mL) 中。向溶液中加入 NHS (1.80 mg) 和 DCC (3.20 mg),在无光和室温下混合 12 h。然后,将 BSA (5.10 mg, 溶于 2 mL PBS) 缓慢地添加到剧烈搅拌的活性 NHS 溶液中,然后在室温下搅拌 4 h。最后,将半抗原-BSA 结合物在 4  $^{\circ}\text{C}$  透析 72 h。将获得的 SPFX-BSA 免疫原冻干并在 -20  $^{\circ}\text{C}$  储存。包被抗原 SPFX-OVA 的设计方法相同。用紫外吸收光谱对偶联物进行了表征。

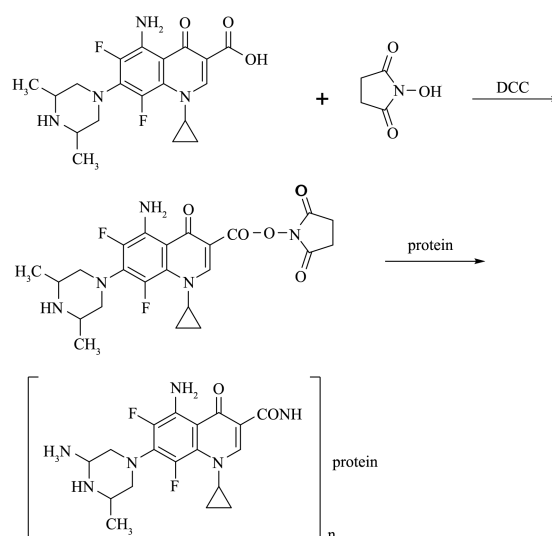


图 1 BSA-SPFX 偶联物的合成

Fig.1 Synthesis of BSA-SPFX conjugate

### 1.5 单克隆抗体产生

3 只雌性 BALB/C 小鼠购自河南省实验动物中心

(实验动物许可证号为SYXK(E)2021-0003)。小鼠在光暗循环 12 h, 室温  $24\pm 2$  °C 和有饮用水条件下饲养。用免疫原 BSA-SPFX 多部位皮下免疫小鼠。初始接种为皮下注射 0.15 mg 结合物, 加入 0.5 mL PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 和 0.5 mL 不完全佐剂。其余 3 次强化免疫均以 0.5 mL PBS (0.01 mol/L, pH 7.4) 和 0.5 mL iFA 注射 0.25 mg SPFX-BSA, 间隔 20 d。从第三次免疫开始, 使用 ELISA 法测定血清滴度。用抗血清分离材料中的颗粒, 将血液凝块放在 4 °C 过夜。

通过 ELISA 法测定血清效价, 让血液凝块在 4 °C 过夜分离带有抗血清的颗粒物。部分细胞融合程序和亚克隆条件在此仅作简要描述。

NS0 骨髓瘤细胞在添加有 100 单位/mL、10% FBS、青霉素链霉素 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 RPMI-1640 中维持在指数生长阶段。取对 SPFX 竞争最强、效价最高的小鼠脾脏, 与骨髓瘤细胞以 10:1 的比例与 PEG 1500 融合。融合细胞分布于 96 孔培养板中, 小鼠腹腔巨噬细胞制备与选择性 HAT 培养基结合前一天。扩展孔培养显示 SPFX 识别活性, 以有限稀释进行亚克隆 3 次。菌落在含有冷冻液氮和 10% 二甲基亚砜 (DMSO) 的培养基中冷冻, 然后解冻 3 次以选择产生的克隆抗体的稳定性。成熟雌性 BALB/c 小鼠腹腔注射 (ip) 0.5 mL 石蜡 10 d 前接受 IP 进入阳性杂交瘤细胞, 注射后 10 d 收集腹水。小鼠用 10% 水合氯醛 1~2 mL 腹内注射, 然后根据改变的辛酸硫酸铵沉淀 (CAASP) 测定确定 mAb 的纯化。mAb 在这项工作中表现出最高的滴度和灵敏度。所有实验程序均按照郑州大学动物护理意向标准和实验动物使用委员会的指导方针进行。

## 1.6 间接竞争 ELISA

将 50  $\mu\text{L}$  SPFX-OVA 溶液 (在包被缓冲液中为 5000  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) 包被在每个孔中。37 °C 孵育 2 h, 用洗涤缓冲液洗涤 5 次。然后, 将封闭缓冲液 (250  $\mu\text{L}$ ) 加入到每个板中, 4 °C 孵化过夜。再次用洗涤缓冲液洗涤 4 次后, 每孔加入 50  $\mu\text{L}$  适当稀释的抗 SPFX 抗体和 50  $\mu\text{L}$  样品, 37 °C 孵育 30 min。再次洗板四次, 羊抗鼠 IgG-HRP (50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ , 1:1000) 37 °C 孵育 30 min。2.5 mL 缓冲液和 2.5 mL 底物溶液缓慢混合至显色。将混合物 (50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ) 加入样品中, 并将板在室温下温育 10 min。每孔 50  $\mu\text{L}$  终止液终止反应。通过酶标仪在 450 nm 处测定与板结合的酶活性。免疫前提取的血清作为阴性对照。

## 1.7 检测的灵敏度和特异性

测定 B/B0 比值为 0.5 时的抑制剂浓度 ( $\text{IC}_{50}$  值)

和交叉反应性 (CR), 以评价该方法的特异性和敏感性。用四种相关化合物进行竞争性免疫测定, 包括氟甲喹、恩诺沙星、环丙沙星、氟罗沙星和其他几种化合物。这四个化合物的选择基本上是因为它们在结构上与 SPFX 有关。测试氟喹诺酮 API 部署到 icELISA 程序中, 如上所述用于 SPFX。CR 值计算如下:

$$\text{CR} / \% = \frac{\text{IC}_{50} \text{司帕沙星}}{\text{IC}_{50} \text{受试化合物}} \times 100\%$$

## 1.8 猪肉提取物的制备及 HPLC 分析

猪肉样品在郑州市场购买并由郑州农业部监督检验中心采用高效液相色谱法 (HPLC) 检测。将不含 SPFX 的猪肉末样品 (5 g) 用 5 mL 均质提取溶剂 1:5 (V/V) 甲醇和 PBS 均质化, 以调节 pH 值为 7.4 和 6N 盐酸。匀浆在 1 min 涡旋混合器中混合, 剧烈振荡 35 min, 然后以 12000 r/min 离心 1.5 h。将上清液用测定缓冲液稀释十倍, 然后将其应用于微量滴定板。ELISA 和 HPLC 分析方法对同一样品进行定量比较两种方法的一致性。高效液相色谱分析在安捷伦 1200 系统上进行。安捷伦 Zorbax Eclipse XDB-C18 色谱柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5.0  $\mu\text{m}$  粒径), 25 °C 下流速为 1 mL/min; 保持以下条件: 洗脱液: 乙腈 30.05 mol 磷酸盐缓冲液 (pH 2.4) (15:85, V/V); 进样量: 20 mL。在这种情况下, SPFX 保留时间为 13 min。猪肉样品的含量分别为 50、225、622  $\mu\text{g}/\text{L}$ , 分别代表低、中和高水平的残留。

## 1.9 统计分析

实验数据被表示为几个实验的  $\bar{x}\pm S$ 。使用 SPSS 15.0 软件对方差进行单向 ANOVA 分析, 评估了统计学意义  $\alpha$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 半抗原结合

为了制备高质量的抗体, 发展高灵敏度、特异性的免疫分析方法是很有必要的。SPFX (分子量: 392.41) 作为一个小分子, 必须对目标分析物的分子结构进行适当的修饰。由于 SPFX 分子羧基的第 3 位为阳性, 使最常用的蛋白质 (BSA 和 OVA) 直接与其结合。

### 2.2 抗体特性

间接 ELISA 法测定的单克隆抗体效价是以一个吸光度值相互稀释两次的结果, 对抗体与 SPFX 和其

他氟喹诺酮类药物的结合能力进行了评价。恩诺沙星、氟罗沙星、氟甲喹、环丙沙星、莱克多巴胺、庆大霉素、沙丁胺醇、特布他林和克伦特罗的代表性 ELISA 曲线如表 1 所示,从该试验获得的 IC<sub>50</sub> 值如图 2 所示。它显示出与 IC<sub>50</sub> 值几乎相等的相对亲和力。

表 1 SPFX 单抗与竞争化合物的 CR

Table 1 The CR of SPFX mAb with compete compounds

Compound	IC <sub>50</sub> /(μg/L)	CR/%
Sparfloxacin	31.00	100
Flumequine	258.47	11.99
Fleroxacin	278.21	11.14
Enrofloxacin	674.36	4.60
Ciprofloxacin	1.0×10 <sup>4</sup>	0.31
Ractopamine	>1.0×10 <sup>4</sup>	<0.31
Gentamicin	>1.0×10 <sup>4</sup>	<0.31
Terbutaline	>1.0×10 <sup>4</sup>	<0.31
Clenbuterol	>1.0×10 <sup>4</sup>	<0.31
Sabutamol	>1.0×10 <sup>4</sup>	<0.31

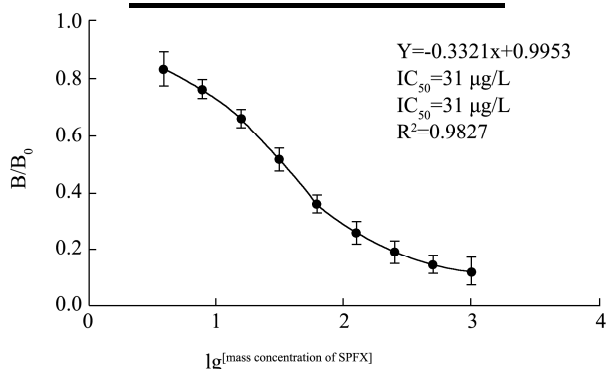


图 2 ELISA 法测定小鼠 SPFX 单克隆抗体抑制曲线的一半

Fig.2 Half of the inhibitive curve of mice SPFX monoclonal antibody by ELISA

### 2.3 ICESIA 的优化

使用棋盘法测试包衣抗原 SPFX-OVA、抗体和 GaRIgG HRP 的浓度<sup>[13]</sup>。包被抗原的 SPFX-OVA 浓度

表 2 用 SPFX 掺加的猪肉的批间和批内差异掺加的 SPFX (μg/L) 批内批间

Table 2 Inter-assay and intra-assay variations of pork spiked with SPFX spiked SPFX (μg/L) intra-assay inter-assay measured

Spiked SPFX (μg/L)	Intra-assay			Inter-assay		
	Measured/%	Recovery/%	CV/%	Measured/%	Recovery/%	CV/%
35	36.24±2.06	104±1.37	5.68	37.18±2.05	106±2.03	5.51
105	107.24±1.06	102±0.35	0.99	109.21±2.04	104±0.68	1.87
315	318.17±3.08	101±0.68	0.97	322.13±1.03	102±0.45	4.6

注:猪肉样品中掺有 35、105 和 315 μg/L 的 SPFX 样品,使用一批测试样品 (n=6) 评估批内精度,对于批间精度,使用三批测试样品以检测给定的样本。在所有情况下,通过三次重复测定计算回收率和变异系数 (CV, %)。

为 2000 μg/L; 单克隆抗体效价为 1:1.6×10<sup>5</sup>; GaRIgG-HRP 的稀释度为 1:1000。

在不同孵育条件下(4 °C 过夜、60 min 过夜、37 °C 过夜 120 min) 检测包被抗原。在 4 °C 下涂覆过夜或在 37 °C 下涂覆 120 min, 孵育效果无显著差异。结果表明,在 37 °C 保温 60 min 时,其 IC<sub>50</sub> 值较高 (>20 μg/L), 最终在 37 °C 保温 120 min。免疫反应时间分别为 30 min、60 min 和 120 min。结果表明,免疫反应 60 min 效果最好, IC<sub>50</sub> 最低。

还应仔细选择封闭缓冲液,因为它用于防止非特定吸光度<sup>[14]</sup>。用 2000 μg/L OVA-SPFX 在 37 °C 下包覆 2 h, 洗净后用 5%猪血清、5%脱脂奶粉或 0.5% BSA 每孔 200 μL 分别在 37 °C 下封闭 30 min、1 h 和 2 h。以 1/1.6×10<sup>5</sup> 稀释 SPFX mAb 作为阳性对照。以产生最大 P/N 值的阻断液和阻断时间为最优。三种阻断剂阻断 1 h 和 2 h 的 P/N 值无显著性差异。所有这些条件都表明培养板完全被封闭,因此在 37 °C 下与 5%猪血清孵育 1 h, 所以在本研究中被选为阻断缓冲液。室温下孵育 10 min, P/N 值最大, 孵育时间越长, P/N 值越低; 因此,以 10 min 为最佳。

### 2.4 方法性能

IC<sub>50</sub> 值是评价 ELISA 敏感性的重要指标, IC<sub>50</sub> 值越低, 检测灵敏度越高。在本研究中, IC<sub>20</sub>~IC<sub>80</sub> 值范围为 3.87 至 248.12 μg/L, R<sup>2</sup>=0.9827 (图 3)。IC<sub>50</sub> 平均值为 31 μg/L, 表明已建立的 icELISA 具有高度灵敏。

从表 1 可以看出, 含有四种结构相关化合物的抗体的 CR 值为 0.31%~11.99%; 抗体与其它化合物的识别率很低 (CR<0.31%)。CR 值可以清楚地表明本研究获得的单克隆抗体对目标分析物 SPFX 表现出非常高的特异性。对所开发的测定方法在猪肉中 SPFX 残留量测定中的适用性进行了测试,结果如表 2 所示。在本研究中,回收率研究的样品是通过在 PBS 中稀释提取物制备的, 无需进一步处理。

## 2.5 猪肉样品分析

应用 icELISA 法测定了郑州市猪肉中 SPFX 的含量。样品 1、样品 2 和样品 3 的检出浓度分别为 48.77、219.32 和 614.63  $\mu\text{g/L}$  (表 3)。

表 3 通过 ELISA 和 HPLC 样品测定的猪肉样品中 SPFX 的浓度

Table 3 Concentrations of SPFX in pork samples determined

by ELISA and HPLC Sample		
Sample/ $(\mu\text{g/L})$	ELISA/ $(\mu\text{g/L})$	HPLC(n=4)/ $(\mu\text{g/L})$
Sample 1	48.77 $\pm$ 0.39	50.10 $\pm$ 0.46
Sample 2	219.32 $\pm$ 2.65	224.74 $\pm$ 3.58
Sample 3	614.63 $\pm$ 3.24	620.89 $\pm$ 2.85

注: 由农业部监督检验中心提供的三份猪肉样品来自中国郑州, 通过 HPLC 鉴定为具有 3 种 SPFX 含量。使用 ELISA 和 HPLC 方法一式三份地分析样品。计算了 ELISA 和 HPLC 与 LC-MS 的差异, 并比较了 ELISA 和 HPLC 分析之间的差异。使用 ELISA 进行的统计分析未显示它们之间的显著差异。

## 2.6 讨论

如上所述, 通过 DCC 方法将载体蛋白上的羧基转化为伯胺基。采用紫外吸收法分别测定 BSA、SPFX 和 SPFX-BSA。在紫外光谱法中, SPFX-BSA 的喹诺酮类部分的吸收峰已移到 224 nm 和 292 nm (图 3), 这意味着 SPFX 与 BSA 的结合成功。包被抗原 SPFX-OVA 与 SPFX-BSA 具有相似的 UV 图谱。

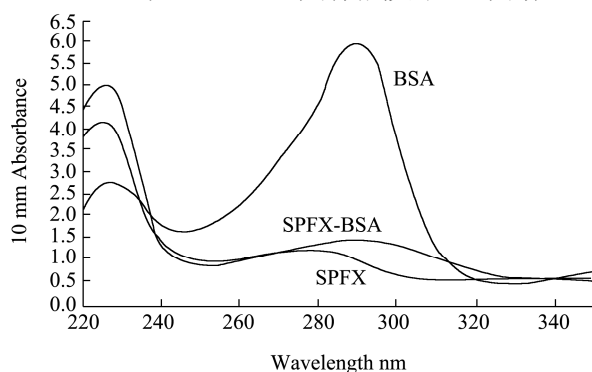


图 3 紫外扫描 BSA、SPFX-BSA、SPFX

Fig.3 UV scanning of BSA, SPFX-BSA, SPFX

注: 425\*191 mm (80\*80 DPI)。

如其他研究所述, 当将氟喹诺酮的羧基连接到载体蛋白合成的免疫原制备抗体时, 发现这些氟喹诺酮之间具有高交叉反应性<sup>[8,15]</sup>。用 SPFX 抗体的 CR 值、恩诺沙星、氟罗沙星、氟甲喹、环丙沙星等 4 种氟喹诺酮类药物的 CR 值评价该方法的特异性。

将已知量的 SPFX 添加到猪肉中, 并使用缓冲液中制作的校准曲线进行分析。添加 35、105 和 315  $\mu\text{g/L}$  的猪肉样品的平均回收率分别为 104、102 和 101 (批

内回收率) 和 106、104 和 102 (批间) 回收率。CV (变异系数) 的范围分别为测定内的 0.97%~5.68%和测定间的 1.07%~5.51%。由于 35  $\mu\text{g/L}$  接近 31  $\mu\text{g/L}$  的检测限, 因此需要更大的变异性和更低的准确度。用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 对猪抽提液进行了一系列稀释, 并比较了 PBS 缓冲液中的结果。提取液稀释 1:10, 抑制曲线与 PBS 缓冲液基本一致。缓冲溶液中的测试极限为 31 Cg/L。采用 SPFX 的浓度检测限吸光度值降至无竞争吸光度值的 90%。HPLC 与 icELISA 的结果具有良好的一致性, 进一步证实了 icELISA 的可靠性。

越来越多的国家已经制订了喹诺酮类药物的最大残留量 (MRLs) 和停药期, 所以必须对样品进行常规监测以确保 SPFX 的正确使用。沈翠香等人<sup>[16]</sup>采用微生物抑制法来检测恩诺沙星药物残留, 其处理方法简便, 成本低的优点已经被许多企业所应用, 但每组测试只能筛检一类药物, 在初筛期间还会出现假阳性的结果, 所以不能准确地进行兽药残留分析。万雄等人<sup>[17]</sup>采用 HPLC 法检测水产品中的司帕沙星残留, 该方法检测结果精确、假阳性率低, 但需对待测样品进行复杂的预处理, 而且设备昂贵, 在面对大量待测样品时就略显不足。

## 3 结论

本研究制备了一种特异性单克隆抗体, 采用高灵敏度间接竞争酶联免疫吸附法测定动物性食品中的 SPFX, IC<sub>50</sub> 最低达到 31  $\mu\text{g/L}$ , 目前没有抗体具有四种结构相关化合物和其他化合物。试验表明本研究中所建立的 ELISA 方法具备灵敏度高, 特异性高, 准确度高, 易操作, 相对于 HPLC 法更加快速、便捷, 可用于动物性食品中 SPFX 残留的快速检测。

## 参考文献

- [1] Minnick M F, Wilson Z R, Smitherman L S, et al. gyrA mutations in ciprofloxacin-resistant *Bartonella bacilliformis* strains obtained *in vitro* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(1): 383-386
- [2] Weigel L M, Anderson G J, Tenover F C. DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis* [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002, 46(8): 2582-2587
- [3] Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, et al. *In-vitro* activity and killing effect of polycationic peptides on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and interactions with clinically used antibiotics [J]. Diagnostic Microbiology

- and Infectious Disease, 2000, 38(2): 115-118
- [4] Brown S A. Fluoroquinolones in animal health [J]. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1996, 19(1): 1-14
- [5] Fan G, Yang R, Jiang J, et al. Development of a class-specific polyclonal antibody-based indirect competitive ELISA for detecting fluoroquinolone residues in milk [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2012, 13(7): 545-554
- [6] Huet A C, Charlier C, Tittlemier S A, et al. Simultaneous determination of (fluoro) quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(8): 2822-2827
- [7] Liu Y Z, Zhao G X, Wang P, et al. Production of the broad specific monoclonal antibody against sarafloxacin for rapid immunoscreening of 12 fluoroquinolones in meat [J]. Journal of Environmental Science & Health Part B, 2013, 48(2): 139-146
- [8] Wang Z, Zhu Y, Ding S, et al. Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(12): 4471-4483
- [9] Jiang W, Zhang H, Li X, et al. Monoclonal antibody production and the development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening spiramycin in milk [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2013, 61(46): 10925-10931
- [10] Lorenzo F, Navaratnam S, Edge R, et al. Primary photoprocesses in a fluoroquinolone antibiotic sarafloxacin [J]. Photochemistry and Photobiology, 2009, 85(4): 886-894
- [11] Sheng W, Xia X, Wei K, et al. Determination of marbofloxacin residues in beef and pork with an enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(13): 5971-5975
- [12] Zhang H, Jiang J, Wang Z, et al. Development of an indirect competitive ELISA for simultaneous detection of enrofloxacin and ciprofloxacin [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2011, 12(11): 884-891
- [13] Buchberger W. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 593: 129-139
- [14] Deng A, Himmelsbach M, Zhu Q Z, et al. Residue analysis of the pharmaceutical diclofenac in different water types using ELISA and GC-MS [J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(15): 3422-3429
- [15] Hu G, Sheng W, Zhang Y, et al. A novel and sensitive fluorescence immunoassay for the detection of fluoroquinolones in animal-derived foods using upconversion nanoparticles as labels [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015, 407(28): 8487-8496
- [16] 沈翠香,斯坎达尔·买合木提,黄晓蓉,等.增敏微生物抑制法检测恩诺沙星药物残留[J].福建畜牧兽医,2010,32(2):16-18  
SHEN Cuixiang, Sikandaer Maihemuti, HUANG Xiaorong, et al. Detection of enrofloxacin residue by sensitization microbe inhibition method [J]. Fujian Animal Husbandry and Veterinary, 2010, 32(2): 16-18
- [17] 万雄,郁迪,董洁莹,等.离子液体萃取/HPLC 测定水产品中司帕沙星残留研究[J].食品科技,2012,37(5):303-306  
WAN Xiong, YU Di, DONG Jieying, et al. Ionic liquid extraction/HPLC determination of sparfloxacin residues in aquatic products [J]. Food Science and Technology, 2012, 37(5): 303-306

(上接第 223 页)

- [23] 彭常梅,方锐琳,赖敏,等.不同提取方法对牡丹籽油品质的影响[J].食品科学,2021,42(3):104-111  
PENG Changmei, FANG Ruilin, LAI Min, et al. The effect of different extraction methods on the quality of peony seed oil [J]. Food Science, 2021, 42(3): 104-111
- [24] 钟政昌,阚金涛,袁雷.不同提取方法对西藏野桃仁油品质的影响[J].中国油脂,2021,46(4):20-25  
ZHONG Zhengchang, KAN Jintao, YUAN Lei. The effect of different extraction methods on the quality of Tibetan wild peach kernel oil [J]. China Oils and Fats, 2021, 46(4): 20-25
- [25] 白章振,张延龙,于蕊,等.不同方法提取‘凤丹’牡丹籽油品质比较[J].食品科学,2017,38(1):136-141  
BAI Zhangzhen, ZHANG Yanlong, YU Rui, et al. Comparison of the quality of ‘Fengdan’ peony seed oil extracted by different methods [J]. Food Science, 2017, 38(1): 136-141