

# 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检测方法研究

张冬昊<sup>1</sup>, 赵桐桐<sup>1</sup>, 魏东<sup>1</sup>, 邢彦枝<sup>2</sup>, 何扩<sup>1</sup>

(1. 河北北方学院河北省农产品食品质量安全分析检测重点实验室, 河北张家口 075000)

(2. 张家口市农产品质量安全监督检验中心, 河北张家口 075000)

**摘要:** 为了建立氯唑西林(Cloxacillin, CLOX)可视化免疫亲和凝胶柱检测方法。实验采用活化酯法, 将辣根过氧化物酶(HRP)与氯唑西林偶联, 制得氯唑西林酶标抗原, 并通过紫外光谱扫描鉴定表明 CLOX 酶标抗原合成成功。实验采用恒温振荡法, 将溴化氰活化的琼脂糖凝胶分别与氯唑西林抗体、HRP 抗体偶联制得氯唑西林抗体胶和 HRP 抗体胶, 作为亲和凝胶柱的检测层与质控层。建立氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱分析方法, 确定了该方法在酶标抗原的稀释倍数为 4000、抗体胶稀释倍数为 10、HRP 胶稀释倍数为 20、样品稀释液 pH 值为 5.7、加样时间为 60 s 条件下, 达到最佳工作状态。该方法检测限为 25  $\mu\text{g/L}$ , 特异性强, 与哌拉西林、阿莫西林、氨苄青霉素、四环素、呋喃它酮、甲砒霉素、链霉素均无交叉反应, 动物源食品实际样品中氯唑西林检出限为 25  $\mu\text{g/kg}$ 。该方法便捷、快速、可视化, 适合作为高通量筛选氯唑西林的有效检测手段。

**关键词:** 氯唑西林 (cloxacillin, CLOX); 多克隆抗体; 半抗原; 检测方法

文章编号: 1673-9078(2019)04-273-278

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.4.037

## Study on the Detection Method of Cloxacillin Visualized Immunoaffinity Gel Column

ZHANG Dong-hao<sup>1</sup>, ZHAO Tong-tong<sup>1</sup>, WEI Dong<sup>1</sup>, XING Yan-zhi<sup>2</sup>, HE Kuo<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Analysis and Testing of Agricultural Products Food Quality and Safety in Hebei Province, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

(2. Zhangjiakou Agricultural Product Quality Safety Supervision and Inspection Center, Zhangjiakou 075000, China)

**Abstract:** In order to establish a method for the detection of cloxacillin visualized immunoaffinity gel column, the activated ester method was used to combine horseradish peroxidase (HRP) with cloxacillin to obtain the cloxacillin enzyme standard antigen. Results of the UV spectrum scanning showed that the CLOX enzyme standard antigen was successfully synthesized. The agarose gel activated by hydrogen bromide was combined with cloxacillin antibody and HRP antibody, respectively, which was used as the detection layer and the quality control layer of the affinity gel column, respectively. A visual immunoaffinity gel column analysis method for cloxacillin was established. The optimum condition of this method was the dilution ratio of enzyme-labeled antigen of 4000, dilution ratio of antibody gel of 10, dilution ratio of HRP gel of 20, sample dilution pH of 5.7 and sample addition time of 60 s. The detection limit of this method was 25  $\mu\text{g/L}$ . Its specificity was strong. There was no cross-reaction with piperacillin, amoxicillin, ampicillin, tetracycline, furantalone, thiamphenicol and streptomycin. The detection limit of cloxacillin in animal-derived foods was 25  $\mu\text{g/kg}$ . This method is convenient, rapid and visual. It is suitable for high-throughput screening of cloxacillin.

**Key words:** cloxacillin (CLOX); polyclonal antibodies; hapten; detection method

氯唑西林 (cloxacillin), 属于半合成类青霉素类

收稿日期: 2018-12-04

基金项目: 河北省科技攻关重点研发项目 (16236802D-5); 河北省教育厅科技研发项目 (QN206242); 张家口科学技术与发展项目 (18110366); 河北北方学院科学技术与发展项目 (22036, 12995583)

作者简介: 张冬昊(1996-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品污染物免疫检测

通讯作者: 何扩(1977-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 食品污染物免疫检测

抗生素, 主要用于治疗动物的败血症、呼吸道感染、以及皮肤和软组织感染, 是治疗牛乳腺炎的最佳用药。一度成为牲畜疾病预防和治疗使用最多的抗生素类药物之一<sup>[1-5]</sup>。随着氯唑西林在畜禽养殖中的广泛滥用造成环境和食品中残留的氯唑西林超标, 严重影响食品的安全、人体的健康及动物源食品贸易, 因此残留问题成为热门研究方向并得到了重点关注。2008 年我国农业部 235 号公告规定氯唑西林在动物源组织中的限量值为 300  $\mu\text{g/L}$ , 牛奶中氯唑西林规定为不得超过 30

$\mu\text{g/L}$ 。然而在监测研究中分析方法多为分析仪器法, 这些方法昂贵、前处理复杂且费时, 因而不符合基层现场检测工作的需要。因此, 开发在食品的流通过程中能快速、可视化和高通量筛选的氯唑西林检测技术成为必然趋势。

可视化凝胶柱免疫检测技术是近年兴起的一种免疫快速检测新技术, 将抗体固定在溴化氰活化的琼脂糖凝胶上, 利用抗原、抗体的特异性结合, 当样品溶液通过柱子时, 待检测物会被结合到柱子上, 与样品中的杂质分离, 然后加入适量底物液通过显色进行测定。与传统的可视化技术相比, 具有性能稳定、成本低和保存期长等优点。该技术在兽药残留检测当中应用最广, 国内外已开始对可视化凝胶柱免疫检测技术进行开发并实际应用, 具有良好的市场需求和远大的发展前景。目前关于氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检测方法还未有报道。本实验以氯唑西林为研究物, 建立一种用于检测动物源性食品中氯唑西林的可视化免疫亲和凝胶柱检测方法<sup>[6-12]</sup>。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要药品及试剂

氯唑西林购自商城北纳创联生物科技有限公司; 辣根过氧化氢酶 (HRP)、HRP 抗体、溴化氰活化的琼脂糖凝胶、抑菌素 (Proclin 300) 购自北京索莱宝科技有限公司;  $\beta$ -环糊精、过氧化氢脲、二甲基亚砜 (DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、氢氧化钠 (分析纯)、碳酸氢钠 (分析纯)、乙酸 (分析纯)、戊二醛、甘氨酸 (Glycine)、盐酸 (分析纯)、无水乙酸钠 (分析纯)、磷酸二氢钠 (分析纯)、磷酸氢二钠 (分析纯) 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 氯唑西林抗体、氯唑西林酶标抗原、抗体胶和 HRP 抗体胶为本实验室自制。

### 1.2 主要仪器

磁力搅拌器 (型号为 RH-2) 购自德国 IKA 公司; 无填料 SPE 小柱 (1 mL)、具砂板层析柱、聚乙烯垫片、转接口购自商城北纳创联生物科技有限公司; 恒温振荡器购自苏州市培英设备有限公司; 紫外可见分光光度计 (型号为 U-3900) 购自日立高新技术公司; 双杰电子天平 (型号为 JJ100) 购自常熟市双杰测试仪器厂; 仪都离心机 (型号为 TGL-16A) 购自金坛市岸头仪都仪器厂。

### 1.3 主要溶液的配制

偶联缓冲液: 称取氯化钠 29.2 g, 碳酸氢钠 8.4 g, 加入 1000 mL 超纯水溶解, 使用氢氧化钠将溶液 pH 调至 8.3。

清洗缓冲液: 称取氯化钠 7.3 g, 乙酸钠 1.125 g 加入 250 mL 超纯水溶解, 使用乙酸将溶液 pH 调至 4.0。

封闭缓冲液: 称取甘氨酸 0.6 g, 加入 20 mL 偶联缓冲液溶解。

磷酸盐缓冲液 (pH 为 7.4): 氯化钠 16 g, 磷酸氢二钠 29 g, 磷酸二氢钠 0.54 g, 加入 2000 mL 超纯水溶解, 将溶液 pH 调至 7.4。

磷酸盐缓冲液 (pH 为 8.5): 氯化钠 16 g, 磷酸氢二钠 33.9 g, 磷酸二氢钠 0.54 g, 加入 2000 mL 超纯水溶解, 将溶液 pH 调至 8.5。

底物液: 底物液 A 溶液: 无水乙酸钠 2.05 g, 过氧化氢脲 0.1 g,  $\beta$ -糊精 0.65 g, 加入 250 mL 超纯水溶解, 将溶液 pH 调至 5.0, 在 4 °C 下保存。底物液 B 溶液: 将 50 mg TMB 溶解于 5 mL DMSO 中, 避光保存。使用提前将底物 A 溶液和底物 B 溶液恢复室温然后按一定比例混合。

### 1.4 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱分析方法的建立

#### 1.4.1 酶标抗原稀释倍数和检测层的优化

(1) 酶标抗原最低稀释倍数的确定。在 SPE 小柱最底部放入垫片, 加入 600  $\mu\text{L}$  封闭胶, 使用转接口连接注射器加压将柱内液体打出后再放入一个垫片, 即为封闭胶测定柱。使用磷酸盐缓冲液按照酶标抗原: 磷酸盐缓冲液 (体积比) 为 1:999、1:1999、1:2999、1:3999、1:4999 的比例进行稀释。在封闭胶测定柱中加入 1 mL 酶标抗原稀释液, 使用转接口连接注射器加压将柱内液体匀速打出, 最终加入 500  $\mu\text{L}$  底物液显色 30 s 后加压打出柱内溶液, 记录 3 min 内凝胶层颜色变化。检测结果为无色时酶标抗原的稀释比例为酶标抗原最低稀释倍数。

(2) 酶标抗原和抗体胶的稀释倍数的优化。采用棋盘滴定法优化酶标抗原和抗体胶的稀释倍数。横行: 使用上述超过酶标抗原最低稀释倍数的比例, 纵行: 使用封闭胶对抗体胶进行稀释, 稀释倍数依次为 5、10、15、20。在 SPE 小柱中固定稀释抗体胶, 加入 1 mL 酶标抗原稀释液, 将柱内液体匀速打出, 最终加入 500  $\mu\text{L}$  底物液显色 30 s 后加压打出柱内溶液, 记录 3 min 内凝胶层颜色变化。

(3) 最佳工作浓度酶标抗原和抗体胶的确定。选

择凝胶层颜色最佳且保留时间最长的组合。

#### 1.4.2 质控层的优化

使用封闭胶对 HRP 抗体胶进行稀释, 稀释倍数依次为 10、20、30、40、50。在 SPE 小柱中固定最佳工作浓度抗体胶, 加入 1 mL 最优工作浓度酶标抗原稀释液, 将柱内液体匀速打出, 最终加入 500  $\mu$ L 底物液显色 30 s 后加压打出柱内溶液, 记录 3 min 内凝胶层颜色变化。

#### 1.4.3 样品稀释液 pH 值的确定

将 pH 值为 5.7, 7.4, 8.5 的磷酸盐缓冲液分别按相同比例稀释氯唑西林标品, 使用氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱对其进行检测, 然后对结果进行分析, 从而确定样品稀释液的最佳 pH 值。

#### 1.4.4 加样时间的优化

使用上述优化基础上的氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检测氯唑西林标品与酶标抗原的混合液, 在检测过程中控制混合液在柱子中的反应时间, 然后对结果进行分析, 从而选择最适加样时间。

### 1.5 免疫亲和凝胶检测柱的组装及检测步骤

检测柱的下层为质控层, 中间留有间隔, 上层为检测层。质控层的制备: 在 SPE 小柱最底部放入垫片, 加入 600  $\mu$ L 封闭胶与 HRP 抗体胶的混合液, 使用转接口连接注射器加压将柱内液体打出后再放入一个垫片。检测层的制备: 将第三个垫片固定在质控层上方约 5 mm 处, 然后加入 600  $\mu$ L 抗体胶和封闭胶混合液, 加压排空柱内液体, 最后盖上第四个垫片。

检测步骤如下:

(1) 加样: 在检测柱的进样口加入 1 mL 待测液 (最佳工作浓度酶标抗原稀释液与氯唑西林标品的混合液), 使用转接口连接注射器加压将柱内液体匀速打出 (按上述最适加样时间)。

(2) 洗柱: 使用 PBST 液与磷酸盐缓冲液交替冲洗柱子 2 次。

(3) 显色: 加入 500  $\mu$ L 底物液显色 30 s 后加压打出柱内溶液, 记录 3 min 内凝胶层颜色变化。

### 1.6 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检出限的确定

在检测柱的进样口加入 1 mL 待测液 (最佳工作浓度酶标抗原稀释液与氯唑西林标品的混合液), 使用转接口连接注射器加压将柱内液体匀速打出 (按上述最适加样时间)。洗柱后加入 500  $\mu$ L 底物液显色 30 s 后加压打出柱内溶液, 记录 3 min 内凝胶层颜色变化。

当检测后检测层显无色 (蓝色消失) 且质控层显蓝色时, 氯唑西林标准品的最小浓度为凝胶检测柱的检出限。

### 1.7 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱的特异性

实验使用与氯唑西林用 4 种同种类抗生素: 阿莫西林、哌拉西林、氨苄青霉素、甲砒霉素和 3 种其他常用兽药: 四环素、链霉素、呋喃它酮。用氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱按上述检测步骤对这些标准品进行检测, 然后对结果进行分析, 从而确定氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱的特异性。

### 1.8 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱实际样品的检测

实验选择猪肉、鸡肉、牛肉、牛奶、发酵乳和奶粉作为实际样品进行检测。猪肉、鸡肉和牛肉的前处理: 称取适量均质试样, 加入乙腈溶液后充分混匀, 6000 r/min, 离心 15 min, 取上清液稀释后进行检测。牛奶的前处理: 将牛奶稀释 5 倍后即可进行检测。发酵乳及奶粉的前处理: 取少量发酵乳, 加适量样品稀释液充分混匀, 6000 r/min, 离心 15 min, 取上清液稀释后进行检测<sup>[13,14]</sup>。

### 1.9 数据统计分析

所有数据以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 spass 软件统计。

## 2 结果与讨论

### 2.1 酶标抗原最低稀释倍数的确定

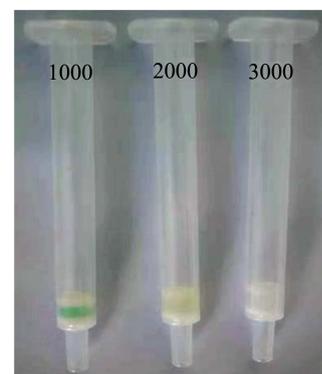


图 1 酶标抗原稀释检测结果

Fig.1 Enzyme standard antigen dilution test results

由图 1 可知, 当酶标抗原:磷酸盐缓冲液的比例为 1:999 时, 凝胶层呈青黄色; 当酶标抗原:磷酸盐缓冲

液的比例为 1:1999 时, 凝胶层呈橙黄色, 当酶标抗原: 磷酸盐缓冲液的比例为 1:2999 时, 凝胶层无色。故氯唑西林酶标抗原的最低稀释倍数为 3000。

## 2.2 酶标抗原和抗体胶的稀释倍数的优化结果

由 2.1 可得, 在酶标抗原和抗体胶的稀释倍数的优化过程中酶标抗原的稀释倍数为 3000、4000、5000, 按照颜色、灵敏度及颜色保留时间对实验结果进行分析, 得到最佳工作浓度酶标抗原和抗体胶的组合。如图 2, 在酶标抗原的稀释倍数为 4000、抗体胶稀释倍数为 10 时, 其检测结果呈蓝色, 灵敏度高且颜色保留时间久。

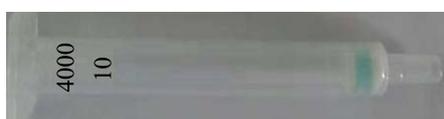


图 2 酶标抗原和抗体胶的稀释倍数的优化结果

Fig.2 Optimization results of dilution ratios of enzyme-labeled antigen and antibody gel

## 2.3 质控层的优化结果

在以上优化条件为基础上, 对不同比例稀释的 HRP 抗体胶进行检测, 按照空白对照、质控层及检测层显色结果一致的原则对检测结果进行分析, 从而得到最佳工作浓度 HRP 抗体胶。如图 3, 当使用封闭胶对 HRP 胶稀释 20 倍时, 空白对照、质控层及检测层显色结果基本一致。



图 3 质控层优化结果

Fig.3 Quality control layer optimization results

## 2.4 样品稀释液 pH 值的确定

用最佳条件组装免疫亲和凝胶检测柱, 将 pH 值为 5.7, 7.4, 8.5 的磷酸盐缓冲液分别按相同比例稀释氯唑西林标品 (标品浓度分别为 10  $\mu\text{g/L}$ 、20  $\mu\text{g/L}$ 、30  $\mu\text{g/L}$ ), 依次标记为 A、B、C 三组, 使用氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱对其进行检测, 如图 4, 当标

品浓度为 30  $\mu\text{g/L}$  时, A 组显无色 (蓝色消失), B、C 组仍显蓝色。



图 4 样品稀释液 pH 值的确定结果

Fig.4 Determination of the pH of the sample diluent

## 2.5 加样时间的确定

本实验加样时间分别控制为 30 s、60 s、90 s、120 s, 结果表明当加样时间为 30 s 时, 显色较浅, 其余加样时间显色结果基本一致。选取 60 s 为免疫亲和凝胶检测柱的加样时间。

## 2.6 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检出限的确定

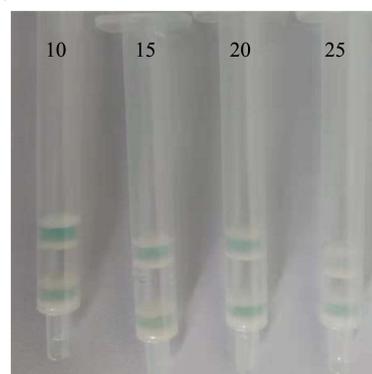


图 5 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检出限的确定

Fig.5 Determination of the detection limit of cloxacillin visualized immunoaffinity gel column

用最佳条件组装氯唑西林免疫亲和凝胶检测柱, 根据在样品稀释液 pH 值的确定时的结果可得, 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检出限在 30  $\mu\text{g/L}$  以内。故实验选择氯唑西林标品浓度分别为: 10  $\mu\text{g/L}$ 、15  $\mu\text{g/L}$ 、20  $\mu\text{g/L}$ 、25  $\mu\text{g/L}$ 、30  $\mu\text{g/L}$ 。如图 5 可以看出, 当加入氯唑西林标品浓度为 25  $\mu\text{g/L}$  时, 检测结果中检测层显无色且质控层显蓝色。经多次检测得到氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检出限为 25  $\mu\text{g/L}$ 。

## 2.7 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱的特异

性

实验使用4种与氯唑西林同种类抗生素：阿莫西林、哌拉西林、氨苄青霉素、甲砒霉素和3种其他常用兽药：四环素、链霉素、呋喃它酮进行交叉实验。加入上述标品浓度为10 mg/L，用氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱进行检测，检测结果如图6（从左至右依次为阿莫西林、哌拉西林、氨苄青霉素、甲砒霉素、四环素、链霉素、呋喃它酮）可以看出氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱与上述药品均无交叉反应，同时说明氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱的特异性良好。

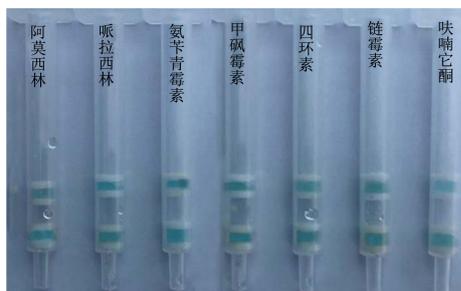


图6 特异性测定结果

Fig.6 Specificity determination results

## 2.8 氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱实际样品的检测

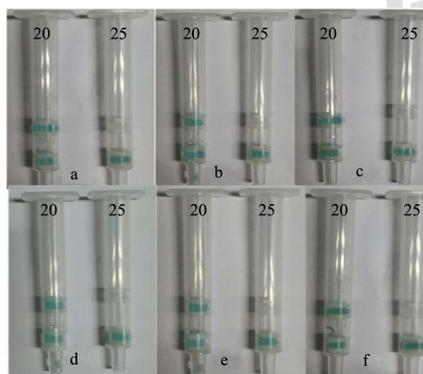


图7 实际样品的检测

Fig.7 Detection of actual samples

本实验选择猪肉、鸡肉、牛肉、牛奶、发酵乳和奶粉进行实际样品检测。实验选择加入氯唑西林标品浓度分别为：10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、30  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。对实际样品完成前处理后进行检测。结果表明（如图7从a~f分别为猪肉、鸡肉、牛肉、牛奶、发酵乳和奶粉），当加入氯唑西林标品浓度为25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时，检测层显无色且质控层显蓝色。经多次测定得到氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱方法检测动物源是食品的检测限为25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。由文献可知得，章敏等人建立了高效液相色谱法测定牛奶中氯唑西林残留的方

法，其方法检出限为5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为15  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。董文婷等人采用乙腈-磷酸盐缓冲液提取，超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中氯唑西林残留量，其方法检出限为20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。综上本实验所建立的氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检测方法与高效液相色谱法测定牛奶中氯唑西林残留的方法、超高效液相色谱-串联质谱法测定饲料中氯唑西林残留量法处于同一灵敏水平，并在操作、费用和检测时间上具有明显优势<sup>[15,16]</sup>。

## 3 结论

3.1 我国在2008年的农业部235号公告规定氯唑西林在动物源组织中的限量值为300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，牛奶中氯唑西林规定为不得超过30  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。故实验制作的氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱的检测水平符合国家对动物源性食品中常见氯唑西林生素的最高残留限量标准。

3.2 本实验建立了一种用于检测动物源性食品中氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检测方法，并对氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检测方法进行了优化，确定了该方法在酶标抗原的稀释倍数为4000、抗体胶稀释倍数为10、HRP胶稀释倍数为20、样品稀释液pH值为5.7、加样时间为60 s条件下，氯唑西林可视化免疫亲和凝胶柱检测方法达到最佳工作状态。该检测方法特异性强，灵敏度高，方法检测限为25  $\mu\text{g}/\text{L}$ ，动物源食品实际样品中氯唑西林的检出限为25  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。该方法能快速、可视化和高通量筛选食品中的氯唑西林，符合当前食品安全检测的需求。

## 参考文献

- [1] SU M L, RONG Z, WANG X S, et al. Rapid detection of fumonisin B1 using a colloidal gold immunoassay strip test in corn samples [J]. *Toxicon*, 2015, 108
- [2] CHEN X X, GAN M, HONG X F, et al. Development of a rapid and sensitive quantum dot-based immunochromatographic strip by double labeling PCR products for detection of *Staphylococcus aureus* in food [J]. *Food Control*, 2014, 46(12): 225-232
- [3] LUO J P, JIANG W X, Beier Ross C, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for determination of the furaltadone etabolite, 3-Amino-5-Morpholinomethyl-2-Oxazolidinone (AMOZ) in animal tissues [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2012, 25(4): 449-457
- [4] HE J, WU N, LUO P J, et al. Development of a heterologous enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of clindamycin and lincomycin residues in edible animal tissues

- [J]. Meat Science, 2017, 125(3): 137-142
- [5] FENG B, DAI Y Z, WANG L, et al. A novel affinity ligand for polystyrene surface from a phage display random library and its application in anti-HIV-1 ELISA system [J]. Biologicals, 2008, 37(1): 48-54
- [6] 田园.展青霉素特异性抗体的制备及其免疫学检测方法的研究[D].泰安:山东农业大学,2012  
TIAN Yuan. Preparation of patulin specific antibodies and their application in development of immunoassay for patulin [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012
- [7] 刘宣兵,张改平,侯玉泽,等.庆大霉素人工抗原的合成与鉴定[J].黑龙江畜牧兽医,2008,12:64-65  
LIU Xuan-bing, ZHANG Gai-ping, HOU Yu-ze, et al. Synthesis and identification of the antigen for gentamicin [J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2008, 12: 64-65
- [8] 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 Ye-na. Preparation of monoclonal antibody for nitrofurazone and development of its immunity analysis [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2010
- [9] 周克楠,唐勇,蓝彩凤,等.呋喃唑酮代谢物单克隆抗体及其新型免疫层析检测试纸条的制备[J].中国生物制品学杂志, 2014,27(7):927-931  
ZHOU Ke-nan, TANG Yong, LAN Cai-feng, et al. Preparation of monoclonal antibody against furazolidone metabolite and novel immunochromatographic strips [J]. Chinese Journal of Biologicals, 2014, 27(7): 927-931
- [10] 柳爱春,刘超,赵芸,等.免疫胶体金法快速检测水产品中硝基呋喃类代谢物的研究[J].浙江农业学报,2013,25(1):95-102  
LIU Ai-chun, LIU Chao, ZHAO Yun, et al. Rapid determination of nitrofurans metabolites in aquatic products by colloidal gold method [J]. Acta Agriculture Zhejiangensis, 2013, 25(1): 95-102
- [11] 吴巧丽,叶春生.胶体金免疫层析技术快速检测沙丁胺醇残留[J].现代食品科技,2012,11:1595-1599  
WU Qiao-li, YE Chun-sheng. Colloidal gold immunochromatographic assay for residual salbutamol [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 11: 1595-1599
- [12] 吕月霞,王瑞,黄登宇,等.呋喃它酮代谢物直接竞争化学发光酶免疫分析法的建立[J].食品工业科技,2015,36(22):71-75,86  
LYU Yue-xia, WANG Rui, HUANG Deng-yu, et al. Development of a direct competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of furaltadone metabolite [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(22): 71-75, 86
- [13] TIAN Xi, DONG Yang-qing, WANG Yun-feng, et al. Quantification of diethyl phthalate by a rapid and homogenous fluorescence polarization immunoassay [J]. Analytical Letters, 2015, 48(18): 2843-2855
- [14] Mc Cracken R J, Van Rhijn J A, Kennedy D G. Transfer of nitrofurans residues from parent broiler breeder chickens to broiler progeny [J]. British Poultry Science, 2005, 46(3): 287-292
- [15] 杨典原,吕月霞,李亚楠,等.化学发光酶免疫法检测呋喃它酮代谢物残留[J].畜牧与兽医 2016,48(4):112-115  
YANG Dian-yuan, LYU Yue-xia, LI Ya-nan, et al. Competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of furaltadone metabolite [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2016, 48(4): 112-115
- [16] 章敏,黄显会,杨刚,等.牛奶中氯唑西林残留量的高效液相色谱法测定[J].动物医学进展,2012,33(6):56-60  
ZHANG Min, HUANG Xian-hui, YANG Gang, et al. Determination of cloxacillin in residues in milk by high-performance liquid chromatography [J]. Progress in Veterinary Medicine, 2012, 33(6): 56-60
- 
- (上接第 43 页)
- [27] Li D, Zhang Y, Liu Y, et al. Purified anthocyanin supplementation reduces dyslipidemia, enhances antioxidant capacity, and prevents insulin resistance in diabetic patients [J]. Journal of Nutrition, 2015, 145(4): 742-8
- [28] Shi M, Loftus H, McAinch A J, et al. Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation [J]. Journal of Functional Foods, 2017, 30: 16-29