

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

任海涛,沈玉栋,徐振林,杨金易,雷红涛,肖治理,王 弘,孙远明*

(广东省食品质量安全重点实验室,华南农业大学食品学院,广东广州 510642)

摘要:为了建立检测呋喃西林代谢物(SEM)的酶联免疫吸附分析方法(ELISA),将所设计合成的系列半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联制备免疫原并免疫新西兰大白兔,筛选获得源于新颖半抗原H₃的具有高亲和力、高特异性抗SEM多克隆抗体。同时,基于设计合成的系列同/异源包被抗原,考察了不同结构包被原对ELISA灵敏度的影响,发现H₄-OVA作为异源包被原建立SEM的ELISA检测方法可获得最佳的检测效果,结果显示:ELISA方法的半抑制浓度(IC₅₀)为12.37ng/mL;定量检测线性范围(IC₂₀~IC₈₀)为0.439~110.78ng/mL;检测限(IC₁₀)达0.07ng/mL,达到了国内外相关检测限量要求,可应用于实际食品样品检测。

关键词:硝基西林,半抗原设计,多克隆抗体,异源包被,ELISA(酶联免疫吸附分析)

Production and identification of polyclonal antibody detect nitrofurazone metabolite and development of enzyme-linked immunosorbent assay

REN Hai-tao, SHEN Yu-dong, XU Zhen-lin, YANG Jin-yi, LEI Hong-tao, XIAO Zhi-li,
WANG Hong, SUN Yuan-ming*

(Key Laboratory of Food Quality and Safety of Guangdong Province, College of Food Science,
South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: In order that a method of Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) method was established to detect nitrofurazone metabolite (SEM), series haptens were synthesized and coupled to bovine serum albumin (BSA) as immunogen which was used to immunize New Zealand white rabbit. An anti-SEM PcAb original from new hapten-H₃ was obtained and was highly specific to SEM. Effect of ELISA method sensitivity on the different structure coating antigen (homology/heterologous) was inspected. ELISA detection method against SEM could achieve the best result on account of heterologous feature structure H₄-OVA. Results showed: half inhibiting concentration (IC₅₀) was 12.37ng/mL, the quantitative detection linear range (IC₂₀~IC₈₀) was 0.439~110.78ng/mL, and the limit of detection limit (IC₁₀) was 0.07ng/mL for ELISA method, which made it met requirement of relevant detection limit at home and abroad and could be applied in the actual demand of food samples detection.

Key words: nitrofurazone; Hapten design; polyclonal antibody; heterogenous package; ELISA

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)05-0330-05

呋喃西林是一种硝基呋喃类药物,代谢快速,代谢物为1-氨基脒(SEM)。近些年来广泛应用于水产类和禽类养殖^[1]。但因其代谢物具有三致作用(致癌、致畸性、致突变),对人体健康与生态平衡造成潜在威胁^[2]。欧美和我国先后都明文规定动物源性食品中呋喃西林不得检出^[3]。由于呋喃西林在动物体内分解

迅速,其原位稳定性只有数小时,因此检测呋喃西林母体就显得没有意义,然而其代谢物与组织蛋白结合可以形成稳定的化合物,故有必要检测呋喃西林代谢物^[4]。目前国内外报道的对食品中硝基呋喃类药物检测主要是通过对SEM进行衍生化处理后(NPSEM),采用液/质联用分析法(LC-MS)、液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)和免疫学方法等进行检测^[5-7]。但因为仪器法操作复杂、检测成本高、且难以满足现场大批量样品的快速检测要求。酶联免疫吸附分析方法(ELISA)因其灵敏、简便且可以高通量筛选样品,目前已经发展成一种普遍的快速检测筛选方法。Cooper等人建立了基于多克隆抗体的酶联免疫方法检测呋

收稿日期: 2011-05-03 * 通讯联系人

作者简介: 任海涛(1984-),男,硕士,研究方向:食品质量与安全。

基金项目: 国家自然科学基金(30901005);广东省科技计划项目(2009B011300005, 2010A090200084, 2009B090300409);华南农业大学校长基金(5100-K08198)。

喃西林残留,其ELISA最低检测限为0.25ng/mL^[8]。Gao等人制备的单克隆抗体,建立的ELISA方法IC₅₀为1.3ng/mL^[9]。但以上报道没有针对呋喃西林半抗原设计进行深入研究,没有对同/异源包被进行比较和优化。因此,本工作拟通过设计及合成的系列半抗原,通过半抗原偶联蛋白制备抗SEM多克隆抗体,同时考察不同结构包被原对ELISA方法灵敏度的影响,旨在建立SEM的灵敏、快速的ELISA检测方法,为开发相应ELISA试剂盒提供理论基础和科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

雌性新西兰大白兔 广东省医学实验动物中心;呋喃西林衍生物 本实验室自制;牛血清蛋白(BSA)、卵清白蛋白(OVA)、二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、PEG4000 美国Sigma公司;HRP标记的羊抗兔IgG抗体 武汉博士德生物公司;其它化学试剂 均为国产分析纯。

MK3多功能酶标仪 美国Thermo公司;HP1100液质联用仪 美国Agilent公司;DRX-600核磁共振仪 德国Burker公司;UV-1640A紫外-可见光扫描仪 日本Kyoto公司;6K-15高速冷冻离心机 德国Eppendorf公司。

1.2 实验方法

1.2.1 半抗原合成 半抗原H₁和H₄:1mmol乙醛酸(H₁)、醛基苯甲酸(H₄)分别与SEM于10mL甲醇中室温反应2h后,过滤溶液中沉淀。水、甲醇洗涤沉淀,烘干得H₁和H₄。

H₁: MS (ESI negative) m/z: 131[M-H]⁻, ¹H-NMR (600MHz, d₆-DMSO, TMS): δ5.41 (s, 1H); 4.66 (t, J=6.8Hz, 2H); 2.62 (t, J=8.0Hz, 2H)。

H₄: MS (ESI negative) m/z: 206[M-H]⁻, ¹H-NMR (600MHz, d₆-DMSO, TMS): δ10.42 (s, 1H); 7.92 (d, J=8.4Hz, 1H); 7.88 (s, 1H); 7.83 (d, J=8.4Hz, 1H)。

半抗原H₂: 氯乙酸钠1.1mmol、对羟基苯甲醛1mmol于10mL的0.1mol/L NaOH溶液中90~95℃下反应5h。冷却后用0.5mol/L稀盐酸调pH。过滤出现的沉淀用乙酸乙酯洗涤并转至分液漏斗,水洗后分离乙酸乙酯相,乙酸乙酯-石油醚(8:1)重结晶。水洗、烘干得FPAA^[10]。FPAA与SEM合成H₂方法同H₁。

H₂: MS (ESI negative) m/z: 236[M-H]⁻, ¹H-NMR (600MHz, d₆-DMSO, TMS): δ10.09 (s, 1H); 7.78 (s, 1H); 7.64 (d, J=9.0Hz, 2H); 6.91 (d, J=9.0Hz, 2H); 4.71 (s, 2H)。

半抗原H₃: DMF 10mL(除水)、对羟基苯甲醛1mmol于-5℃下加入NaH 2mmol。混匀后滴加溴丁酸乙酯1mL,室温反应过夜。加0.5g NaOH和20mL甲醇,60℃下反应2h后蒸发甲醇。饱和NaHCO₃溶液、乙酸乙酯洗涤后分离水相,0.5mol/L稀盐酸调pH至析出沉淀并过滤,水洗,烘干得FPBA,FPBA与SEM合成H₃方法同H₁。

H₃: MS (ESI negative) m/z: 265[M-H]⁻, ¹H-NMR (600MHz, d₆-DMSO, TMS): δ12.16 (s, 1H); 10.10 (s, 1H); 7.79 (s, 1H); 7.64 (d, 1H, J=8.8Hz); 6.94 (d, 1H,

J=8.8Hz); 6.43 (s, 1H); 4.02 (t, 1H, J=6.4Hz); 2.40 (t, 1H, J=7.3Hz); 1.95 (t, 1H, J=6.9Hz)。

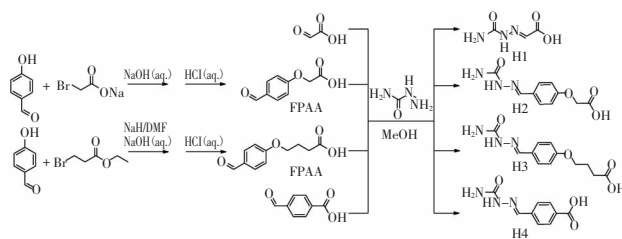


图1 半抗原合成图

Fig.1 Hapten synthesis map

1.2.2 抗原制备及鉴定 SEM半抗原均采用活泼脂法制备免疫原H₂-BSA、H₃-BSA和包被原H₁-OVA、H₂-OVA、H₃-OVA、H₄-OVA。同时采用戊二醛法制备包被原H₅-OVA。制备及鉴定方法参考文献[11-12]进行。

1.2.3 免疫程序 采用免疫原H₂-BSA、H₃-BSA免疫雌性新西兰大白兔,100μg/只,首次免疫后间隔1个月加强免疫,以后每隔14d加强免疫。每次免疫后第7d取血并采用棋盘滴定法测定抗血清的效价及灵敏度。操作方法参考文献[13]进行。最后一次免疫后心脏采血获得抗血清,于4℃下放置过夜并高速离心分离血细胞,将获得的抗血清分装,加0.1%的叠氮钠于-76℃环境下保存。

1.2.4 ELISA方法的建立 筛选出免疫后制备的最优抗血清,依次进行不同包被原-抗血清组合并找出最优的包被原-抗血清组合,基于最优的组合进一步完善ELISA工作各条件,通过比较Abs_{450nm}/IC₅₀的值大小获得最优条件^[14],进行包被原浓度、抗体反应时间、缓冲溶液体系及浓度、pH等条件的优化。最终采用最佳ELISA工作条件,以SEM衍生物(NPSEM)浓度的对数值为横坐标,以B/B₀(B为添加药物时的吸光值,B₀为不添加药物时的吸光值)为纵坐标,按照B/B₀-logC四参数对数拟合绘制最优包被原条件下的ELISA标准曲线^[15]并计算ELISA的半抑制浓度(IC₅₀)、线性检测范围(IC₂₀~IC₈₀)、最低检测限(IC₁₀)。

1.2.5 抗体特异性 以SEM衍生物(NPSEM)及其结构类似物进行间接竞争ELISA,以下式计算交叉反应率:

$$CR(\%) = \frac{IC_{50}(NPSEM)}{IC_{50}(\text{结构类似物})} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 半抗原/抗原设计、合成及鉴定

设计合成了2个用于免疫的半抗原,5个用于包被的半抗原。设计的免疫原选择在能充分暴露SEM特征结构的苯环对位分别引入2个、4个碳原子长度手臂,可以最大限度暴露待测母体结构,增强免疫原性。同时苯环的存在使手臂增加了其刚性结构,使得特征结构不至于被蛋白包埋从而起到增强免疫的效果。为了探讨抗原抗体识别机制,设计了5个不同结构的包被原用于免疫分析,其中H₂-OVA、H₃-OVA为其对应免疫原的同源包被,H₁-OVA、H₄-OVA、H₅-OVA为异源包被。异源包被中H₁-OVA、H₅-OVA因为

没有连接苯环间隔臂而呈现出与免疫半抗原更大的差异。符合异源包被的设计思路^[6]。

合成的所有半抗原质谱、核磁共振波谱数据经分析均能正确归属并与目标物结构一致,表明半抗原合成成功。抗原紫外扫描的结果也明显可以看出,相应半抗原和载体蛋白比较,偶联后的全抗原的最大紫外吸收峰在210~230nm和270~285nm波长范围内变化明显,证明抗原合成成功。

2.2 抗体特性的鉴定

固定包被原浓度为1 μ g/mL,ELISA测定抗血清效价,结果显示H₃-BSA免疫后产生的抗血清效价高于H₂-BSA免疫后产生的抗血清(如图2,图3)。制备的4个碳原子手臂长度半抗原H₃-BSA免疫应答优于2个碳原子手臂长度的半抗原H₂-BSA,说明蛋白与半抗原偶联间隔臂为4个碳原子的长度适宜,与蛋白偶联后并没有被蛋白的三维结构掩盖,单羧酸手臂与苯环组合形成了刚性的手臂结构,从而可以支撑起半抗原的决定簇^[7]。同时设计的手臂位于重要特征官能团的远端,利于诱导动物产生较强的免疫应答效应。

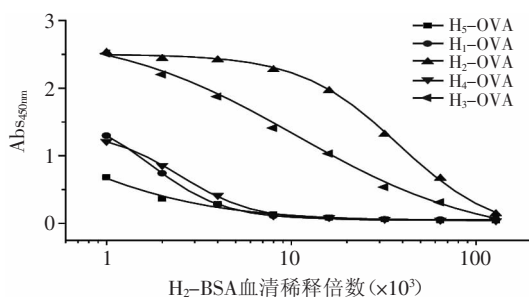


图2 H₂-BSA血清效价图

Fig.2 Serum titer of H₂-BSA

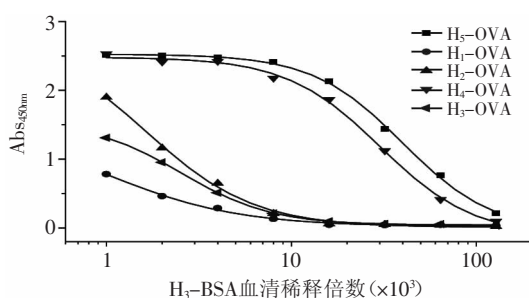


图3 H₃-BSA血清效价图

Fig.3 Serum titer of H₃-BSA

确定最优抗血清后,ELISA测定不同包被原对ELISA灵敏度的影响并选用最优的抗体-包被原组合

表1 不同包被原ELISA检测灵敏度的比较

Table 1 Comparison of ELISA detection sensitivity on different package antigen

包被抗原	H ₂ -BSA				H ₃ -BSA			
	效价	Abs _{450nm}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀	效价	Abs _{450nm}	IC ₅₀ (ng/mL)	A _{max} /IC ₅₀
H ₁ -OVA	1600	1.05	36.5	0.0287	2000	1.08	28.2	0.0383
H ₂ -OVA	36000	0.89	32.4	0.0274	25600	1.29	30.4	0.0424
H ₃ -OVA	12800	0.81	27.4	0.0296	40000	0.96	48.5	0.0197
H ₄ -OVA	2000	0.95	23.3	0.0407	2500	1.15	17.4	0.0661
H ₅ -OVA	500	1.12	28.4	0.0394	800	0.86	25.5	0.0337

注:效价值为Abs_{450nm}≈1.0抗血清的稀释倍数。

(如表1)。结果显示异源包被H₄-OVA与免疫原H₃-OVA的组合测得的Abs_{450nm}/IC₅₀最高,故在进一步的优化当中选用异源包被H₄-OVA。

2.3 ELISA方法的建立

对包被原浓度、抗体反应时间、缓冲溶液体系及浓度、pH等工作条件进行优化。通过比较Abs_{450nm}/IC₅₀的大小获得最优条件(如图4)。包被浓度和缓冲溶液对ELISA影响明显,说明高或低的包被原浓度都是不适合的,浓度低时包被原量不足,板孔内可供抗体结合的抗原决定簇少;浓度高时易产生空间位阻导致供抗体结合的有效抗原决定簇少,都会降低灵敏度。再次,PBS缓冲溶液为最优,说明此缓冲溶液的离子强度有利于改善ELISA的工作条件。pH则主要影响抗体和酶的等电点,从而影响抗原抗体的相互作用^[8]。最终确立的最佳ELISA工作条件为:包被抗原浓度为50ng/mL、抗体反应时间为40min、酶标抗体反应时间为30min、最优缓冲溶液体系为0.05mol/L pH为7.1的PBS缓冲溶液。

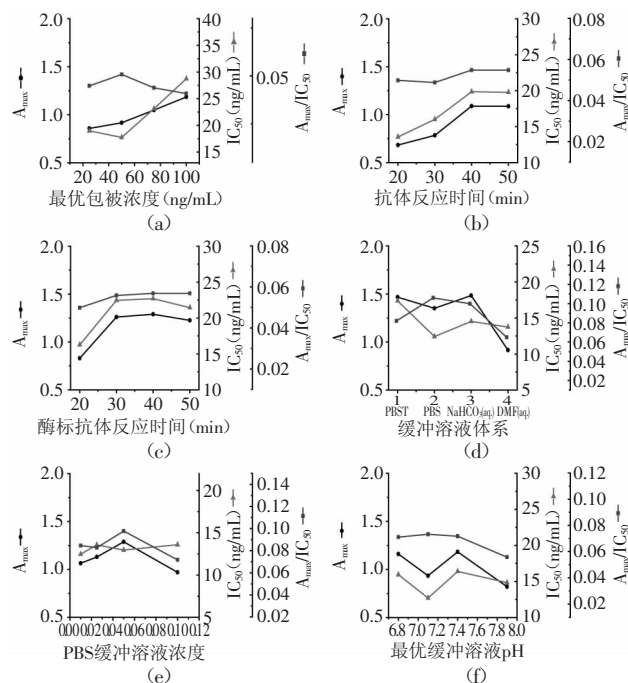


图4 不同工作条件对ELISA方法灵敏度的影响

Fig.4 Effect of different conditions on ELISA sensitivity

2.4 ELISA标准曲线的建立

基于上述最佳ELISA工作条件,以50ng/mL H₄-OVA为异源包被原,建立了检测SEM衍生物的ELISA标准曲线。结果显示(如图5):IC₅₀为12.37ng/mL(SEM

相对应量4.46ng/mL),定量检测线性范围为(IC₂₀~IC₈₀) 0.439~110.78ng/mL(SEM相对应量0.158~39.94ng/mL),检测限为0.07ng/mL(SEM相对应量0.025ng/mL)。

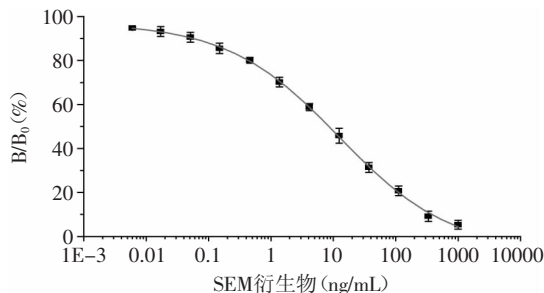


图5 ELISA标准曲线

Fig.5 ELISA standard curve

2.5 包被原对ELISA灵敏度的影响

基于上述最佳ELISA工作条件,考察了不同包被原包被,ELISA测定了抑制情况(如表2),结果显示:只含待测物质对象SEM特征结构片段的异源包被H₁-OVA和H₅-OVA因为剔除了苯环仅保留了SEM特征结构,造成了抗体识别困难。说明虽然合理的异源包被能在不降低特异性的基础上大幅度提高方法灵敏度,但是在设计异源包被时也要保证与抗体间的亲和力,不能过高更不宜过低。同时,结果显示未剔除苯环的异源包被H₄-OVA灵敏度更优,进一步验证了异源包被与抗体的亲和力适中才能提高ELISA检测的灵敏度。而同源包被H₃-OVA上的半抗原结构和抗体识别的主体骨架结构相同,从而造成ELISA检测的灵敏度不高^[9]。因此,最终本文选择H₄-OVA作为最佳ELISA方法的包被原。

表2 不同包被原对ELISA检测灵敏度的影响(ng/mL)

Table 2 Effect of different package antigen on ELISA sensitivity (ng/mL)

包被抗原	ELISA		
	IC ₁₀	IC ₅₀	IC ₂₀ ~IC ₈₀
H ₁ -OVA	0.182	26.91	0.862~626.07
H ₂ -OVA	0.24	27.22	1.03~737.83
H ₃ -OVA	0.73	33.96	3.22~959.35
H ₄ -OVA	0.07	12.37	0.439~110.78
H ₅ -OVA	0.254	23.02	1.15~230.92

2.6 方法特异性

选用最优包被原H₄-OVA,最优ELISA工作条件下测定各药物的IC₅₀并进一步计算交叉反应率(CR)。结果显示抗体对其它硝基呋喃药物及结构类似物均

表3 多克隆抗体ELISA方法特异性测定

Table 3 ELISA specificity determination on polyclonal antibody

化合物	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
NPSEM	12.37±1.08	100
SEM	4561±233	<0.1
呋喃西林	103.8±16.55	11.85
NPAHD	>50000	<0.01
NPAOZ	>50000	<0.01
NPAMOZ	>50000	<0.01
硝基苯甲醛	>50000	<0.01
孔雀石绿	>50000	<0.01

无交叉反应,特异性良好(如表3)。唯一出现交叉反应的是呋喃西林原药,但作为检测呋喃西林代谢物的方法,检测其代谢物最终也是为了说明呋喃西林原药的使用与否,因此与原药的交叉并不会影响到对监测结果的判定。

3 结论

针对呋喃西林代谢物(SEM),通过设计合成的新颖免疫半抗原H₃,成功制备了具有高特异性、高亲和力的抗SEM多克隆抗体。其次,通过不同的抗体-包被原组合,从5种包被原中筛选出最优的异源包被原H₄-OVA。基于此优化ELISA工作条件并建立了标准工作曲线。同时,讨论了包被原对ELISA灵敏度的影响。最终,测定了ELISA方法的特异性并成功建立了灵敏度高的SEM异源ELISA检测方法,此方法检测灵敏度和定量线性范围均达到国内外相关检测限量要求,为食品中非法添加呋喃西林造成的食品安全问题提供了技术保障,为进一步开发、研制其快速检测试剂盒提供了理论基础。

参考文献

- [1] M Vass, K Hruska, M Franek. Nitrofurantoin antibiotics: A review on the application, prohibition and residual analysis[J]. Veterinarni Medicina, 2008, 53(9): 469-500.
- [2] 徐一平, 胥传来. 动物源食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留的检测技术研究[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 590-593.
- [3] 王习达, 陈辉, 左健忠, 等. 水产品中硝基呋喃类药物残留的检测与控制[J]. 现代农业科技, 2007, 18(3): 152-155.
- [4] 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: 86-94.
- [5] 张平安, 张建威, 乔明武, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定蜂蜜中硝基呋喃代谢物的研究[J]. 浙江农业科学, 2010(3): 611-613.
- [6] Pereira A S, Pampana L C, Donato J L. Analysis of nitrofurantoin metabolic residues in salt by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Anal Chim Acta, 2004, 514: 9-13.
- [7] Mottier P, Khong S P, Gremat E. Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography - electrospray ionization - tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2005, 1067: 85-91.
- [8] K M Cooper, Jeanne V Samsonova, et al. Enzyme immunoassay for semicarbazide-the nitrofurantoin metabolite and food contaminant[J]. Anal Chim Acta, 2007, 592: 64-71.
- [9] Aizhong Gao, Qiaolin Chen, Yu Cheng, et al. Preparation of monoclonal antibodies against a derivative of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurantoin[J]. Anal Chim Acta, 2007, 592: 58-63.
- [10] 沈玉栋, 张世伟, 蔡肇婷, 等. 呋喃西林代谢物荧光偏振免疫检测方法研究[J]. 分析测试学报, 2009, 28(1): 27-31.
- [11] Kim Y J, Cho Y A, Lee H S, et al. Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity

(下转第379页)

- [16] Zheng BL, He K, et al. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats[J]. Urology, 2000, 55: 598-602.
- [17] Markus Ganzera, et al. Chemical profiling and Standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by Reversed phase High Performance Liquid Chromatography[J]. Chem Pharm Bull, 2002, 50(7): 988-991.
- [18] Tellez MR, Khan IA, et al. Composition of the essential oil of *Lepidium meyenii* (Walp)[J]. Phytochemistry, 2002, 61(2): 149-155.
- [19] Sandoval M, Okuhama NM. Antioxidant activity of the cruciferous vegetable Maca (*Lepidoum meyenii*)[J]. Food Chem, 2002, 79: 207-213.
- [20] Gonzales G F, Rubio J, Gasco M, et al. *Lepidium meyenii*, Maca, A Plant from the Highlands of Peru: Pharmacological Properties and Impact on Production and Exportation[J]. Proceeding of the International Congress on Ethnopharmacology, 2006, 12-33.
- [21] Valerio L, Gonzales GF. Toxicological Aspects of South American Herbs: *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw) and the *Lepidium meyenii* (Maca)[J]. A Critical Synopsis. Toxicological Reviews, 2005, 24: 11-35.
- [22] 田辉, 樊柏林, 孙凡中, 等. 玛咖细粉毒理安全性实验研究[J]. 实验动物科学, 2007, 24(3): 6-11.
- [23] <http://www.fao.org/docrep/t0646e/t0646e0h.htm>.
- [24] 冯颖, 何钊, 徐琬峰. 云南栽培玛咖的营养成分分析与评价[J]. 林业科学研究, 2009, 22(5): 696-700.
- [25] 余龙江, 金文闻. 玛咖有效成分提取方法[P]. 中国, 01138330. 2002-07-10.
- [26] 余龙江, 金文闻, 程华, 等. 玛咖根提取物[P]. 中国, 03128262 [P]. 2004-02-11.
- [27] 薛润光, 杨少华, 和寿星, 等. 一种玛咖保健酒[P]. 中国, 200810233797. 2009-06-17.
- [28] 杨勇武, 刘佑贤, 马玉祥, 等. 一种发酵玛咖葡萄酒及其制备方法[P]. 中国, 200910009345. 2009-08-19.
- [29] 杨勇武, 刘佑贤, 马玉祥, 等. 一种玛咖葡萄酒及其制备方法[P]. 中国, 200910009344. 2010-02-24.
- [30] 陈亿中, 谢卫红, 姜中兴. 玛咖酒[P]. 中国, 201010249156. 2010-12-01.
- [31] 陈亿中, 谢卫红, 姜中兴. 玛咖牛初乳片剂[P]. 中国, 201010249160. 2010-12-08.
- [32] 金文闻. 药食两用植物玛咖 (*Lepidium meyenii*) 的增效物质研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2007.
- [33] 肖伟, 彭勇, 许利嘉, 等. 秘鲁特产药用植物玛卡研究的新进展[J]. 世界科学技术——中医药现代化, 2007, 9(3): 102-106.
- [34] 余龙江, 金文闻, 吴元喜, 等. 玛咖的植物学及其药理作用研究概况[J]. 天然产物研究与开发, 2002, 14(5): 71-74.
- [35] 甘瑾, 冯颖, 何钊, 等. 云南栽培3种颜色玛咖中总生物碱含量分析[J]. 食品科学, 2010(24): 415-419.
- [36] 金文闻, 王晴芳, 李硕, 等. 新疆产玛咖的挥发油成分研究[J]. 食品科学, 2009(12): 241-245.
- [37] 何钊, 冯颖, 徐琬峰, 等. 云南种植玛咖乙醇提取物的体外抗氧化活性分析[J]. 食品科学, 2010(15): 39-43.

(上接第333页)

- [J]. Anal Chim Acta, 2003, 475(2): 85-96.
- [12] Singh K V, Kaur J, Varshney G C, et al. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules[J]. Bioconjugate Chemistry, 2004, 15(1): 168-173.
- [13] Liu Y, Peng D P, Wang YL, et al. Application of a modified enzyme-linked immunosorbent assay for 3-amino-2-oxazolidinone residue in aquatic animals[J]. Anal Chim Acta, 2010, 664: 151-157.
- [14] 王保玲, 袁利鹏, 雷红涛, 等. 沙丁胺醇直接竞争ELISA法快速测定[J]. 食品科学, 2010, 20(31): 270-274.
- [15] Gosling J P. Immunoassays a practical approach[M]. America: Oxford University Press, 2000: 41.
- [16] 李永祥, 徐振林, 王弘, 等. 二甲氧基硫代磷酸酯类农药多残留免疫分析方法研究[J]. 分析化学, 2010, 38(11): 1550-1555.
- [17] 谢桂勉, 孙远明, 徐振林, 等. 硫代磷酸二乙酯类农药半抗原设计及抗体识别特性[J]. 高等学校化学学报, 2009, 30(11): 2193-2198.
- [18] 杨利国, 胡少昶, 魏平华, 等. 酶免疫测定技术[M]. 南京: 南京大学出版社, 1998: 70-71.
- [19] Xu Z L, Xie G M, Li Y X, et al. Production and characterization of a broad-specificity polyclonal antibody for O, O-diethyl organophosphorus pesticides and a quantitative structure-activity relationship study of antibody recognition[J]. Anal Chim Acta, 2009, 647: 90-96.

全国中文核心期刊

轻工行业优秀期刊