

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.01.014

一种多菌灵酶联免疫快速检测方法的建立

Establishment of a rapid detection method for carbendazim enzyme-linked immunosorbent

蒋文慧¹ 吴小胜^{2,3} 崔娜^{2,3} 张瑜^{2,3}JIANG Wen-hui¹ WU Xiao-sheng^{2,3} CUI Na^{2,3} ZHANG Yu^{2,3}彭正学⁴ 崔海峰^{2,3} 万宇平^{2,3}PENG Zheng-xue⁴ CUI Hai-feng^{2,3} WAN Yu-ping^{2,3}

(1. 浙江省杭州市人民检察院, 浙江 杭州 310012; 2. 北京勤邦生物技术有限公司, 北京 102206;
3. 北京市食品安全免疫快速检测工程技术研究中心, 北京 102206; 4. 北京望尔生物技术有限公司, 北京 102206)

(1. Hangzhou People's Procuratorate of Zhejiang Province, Hangzhou, Zhejiang 310012, China;

2. Beijing Kwinbon Biotechnology Company, Beijing 102206, China;

3. Beijing Engineering Research Centre of Food Safety Immunodetection, Beijing 102206, China;

4. Beijing Wanger Biotechnology Company, Beijing 102206, China)

摘要:利用酶联免疫吸附法原理建立了一种能够定量测定果蔬、茶叶、烟叶中多菌灵残留量的方法。通过酸碱中和化学反应,制备多菌灵半抗原,再通过免疫小鼠筛选出抗多菌灵单克隆抗体,制得酶标羊抗鼠抗抗体,并将制备出的抗多菌灵单克隆抗体和酶标羊抗鼠抗抗体用于酶联免疫试剂盒的研制。结果表明,在 0.1~8.1 $\mu\text{g/L}$ 的线性范围内,目标物多菌灵线性关系良好,相关系数(R^2)可达到 0.995。在 300, 600, 1 200 $\mu\text{g/kg}$ 3 个添加水平下试剂盒的回收率为 76.0%~102.2%,相对标准偏差均小于 10%。试剂盒检测烟叶、苹果、白菜、茶叶样本中的多菌灵,检测限依次为 266.3, 421.0, 349.1, 484.4 $\mu\text{g/kg}$ ($n=20$)。该方法属于快速检测方法,适用于果蔬、茶叶、烟叶中多菌灵残留量的测定。

关键词:多菌灵;单克隆抗体;ELISA 试剂盒

Abstract: Using the principle of enzyme-linked immunosorbent assay, a method for quantitative determination of carbendazim residues in fruits, vegetables, tea, and tobacco was established. First, the carbendazim hapten was prepared through acid-base neutralization chemical reaction, and then the anti-carbendazim monoclonal antibody was screened out by immunizing mice to

prepare the enzyme-labeled goat anti-mouse anti-antibody, and finally the prepared anti-carbendazim Monoclonal antibodies and enzyme-labeled goat anti-mouse anti-antibodies were used in the development of enzyme-linked ELISA kits. The results showed that within the linear range of 0.1~8.1 $\mu\text{g/L}$, the target carbendazim had a good linear relationship, and the correlation coefficient (R^2) could reach 0.995. The recoveries of the kits at the addition levels of 300, 600, and 1 200 $\mu\text{g/kg}$ were 76.0%~102.2%, and the relative standard deviations were all less than 10%. The kit detected carbendazim in tobacco leaves, apples, cabbage, and tea samples, and the detection limits were 266.3, 421.0, 349.1, and 484.4 $\mu\text{g/kg}$ ($n=20$). This method was a rapid detection method and suitable for the determination of carbendazim residues in fruits, vegetables, tea, and tobacco leaves.

Keywords: carbendazim; monoclonal antibodies; enzyme linked immunosorbent assay kit

多菌灵(carbendazim)即 N-(2-苯并吡唑基)氨基甲酸甲酯,属于苯并吡唑类,是一种病害防治杀菌剂,被广泛应用于农作物。然而施用多菌灵的目标物会长期残留该药物,人、畜食用后,会引起头晕、恶心、呕吐、抽搐等一系列中毒症状^[1-2]。

GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》规定了果蔬、茶叶中多菌灵的最大残留限量(Maximum Residue Limit, MRL)范围为: 0.02~5.00 mg/kg。目前中国的检测标准有:GB/T 5009.188—2003《蔬菜、水果中甲基托布津、多菌灵的测定》、GB/T

基金项目:北京市科技计划课题(编号:Z181100009318006)

作者简介:蒋文慧,女,浙江省杭州市人民检察院副主任法医师,学士。

通信作者:万宇平(1982—),男,北京勤邦生物技术有限公司高级工程师,硕士。E-mail: zhen0803zhen@sina.com

收稿日期:2020-06-04

23380—2009《水果、蔬菜中多菌灵残留的测定 高效液相色谱法》、SN/T 3650—2013《药用植物中多菌灵、噻菌灵和甲基硫菌灵残留量的测定 液相色谱—质谱/质谱法》、SN/T 0162—2011《出口水果中甲基硫菌灵、硫菌灵、多菌灵、苯菌灵、噻菌灵残留量的检测方法 高效液相色谱法》、SN/T 1753—2016《出口浓缩果汁中甲基硫菌灵、噻菌灵、多菌灵和2-氨基苯并咪唑残留量的测定 液相色谱—质谱/质谱法》、SN/T 0220—2016《出口水果中多菌灵残留量的检测方法》、NY/T 1680—2009《蔬菜水果中多菌灵等4种苯并咪唑类农药残留量的测定 高效液相色谱法》、NY/T 1453—2007《蔬菜及水果中多菌灵等16种农药残留测定 液相色谱—质谱—质谱联用法》。上述标准均为仪器分析法,同时,通过查阅文献发现,前人研究多菌灵检测方法较多地偏重仪器方法,已报道的仪器方法有:超高效液相色谱法^[3]、QuEChERS—高效液相色谱法^[4-5]、液相色谱—质谱/质谱法^[6]、紫外分光光度法^[7]、液相色谱法^[8-9]、高效液相色谱法^[10-11]、SERS法^[12]等,分析对象主要为蔬菜、水果。此外,也有报道^[13-14]利用酶联免疫法快速检测多菌灵的残留量,但分析对象为土壤和水,目前尚未检索到农产品中检测多菌灵残留量的快速检测方法。而且仪器分析法成本高、步骤复杂,对检测人员有较高的技术要求,不便于基层实验室和中小型生产企业实施检测。因此,研究拟采用酶联免疫吸附法对烟叶、苹果、白菜、茶叶中多菌灵残留量进行检测,以期提供一种成本低、效果好的方法,为农药残留监管提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

多菌灵、噻苯达唑、甲基托布津、托布津、2-氨基苯并咪唑标准品:纯度 $\geq 95\%$,北京标准物质研究中心;

牛血清白蛋白:纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma 公司;

卵清蛋白:纯度 $\geq 98\%$,美国 Sigma 公司;

三氟乙酸、三氟乙酸酐、硝酸铵、氢氧化钠、二氯甲烷、乙酸乙酯、氯化锡、碳二亚胺、石油醚、硫化铵、二甲基甲酰胺、碳酸钾:分析纯,北京百欣试剂公司;

果蔬、茶叶、烟叶:市售;

Balb/c 小鼠:斯贝福(北京)生物技术有限公司;

单克隆杂交瘤细胞株:实验室自制;

酶标仪:MK3 型,上海雷勃分析仪器有限公司。

1.2 抗原制备

1.2.1 半抗原制备 取三氟乙酸 20 mL,加三氟乙酸酐 2 mL,冰水浴至 0 °C,加硝酸铵 0.5 g,搅拌 1 h,加入含多菌灵 1.0 g 的三氟乙酸溶液,继续搅拌反应 2 h。停止搅拌,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.0,加 200 mL 二氯甲烷萃取,加水 300 mL,充分搅拌,转入分液漏斗中,静置 30 min,分层,分去上层水相,所得二氯甲烷溶液,旋蒸(40 °C),50 mL 乙醚打浆,得到化合物 a 0.76 g,收率 67%^[15]。在上述三氟乙酸和三氟乙酸酐体系下,用硝酸铵对多菌灵进行硝化反应,在苯环上引入硝基,萃取前进行中和,便于萃取。¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ : 8.31(1H, dd, $J = 1.616, J = 1.239$), 7.69(1H, dd, $J = 8.716, J = 1.616$), 7.64(1H, dd, $J = 8.716, J = 1.239$), 3.85(3H, s)。

取化合物 a 0.7 g 用乙醇溶解,加含 0.43 g 氯化锡的水溶液 10 mL,通入氮气,加热回流反应 3 h;旋蒸(60 °C)、除去乙醇,加水 200 mL,加乙酸乙酯 100 mL,充分搅拌,静置,分去水相,有机相旋蒸(55 °C)以除去大部分乙酸乙酯,利用石油醚—乙酸乙酯($V_{\text{石油醚}} : V_{\text{乙酸乙酯}} = 1 : 1$)对其进行洗脱分离,得到 b 产物(半抗原化合物) 0.54 g,收率为 83%。¹H NMR(CDCl₃, 300 MHz) δ : 3.79(3H, s), 6.27(2H, s), 6.90(1H, dd, $J = 2.225, J = 1.850$), 6.46(1H, dd, $J = 8.422, J = 2.225$), 7.34(1H, dd, $J = 8.422, J = 1.850$), 5.00(1H, s), 9.15(1H, s)。上述产物经核磁共振氢谱测定,在化学位移 $\delta = 6.27$ 处存在苯环上芳香胺的共振吸收峰,说明半抗原合成成功。多菌灵半抗原合成路线见图 1。

1.2.2 免疫原制备 称取牛血清白蛋白 50 mg,使之充分溶解在 3.8 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中,得到溶液 A;用 0.2 mL H₂O 溶解 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 *N*-羟基琥珀酰亚胺各 30 mg,加入至溶液 A 中,搅拌 30 min;取 15 mg 半抗原,溶解于 1 mL 二甲基甲酰胺溶液中,然后缓慢加入到溶液 A 中溶解,搅拌 24 h。透析后分装, -20 °C 保存。

1.2.3 包被原制备 称取卵清蛋白 50 mg,使之充分溶解在 3.8 mL 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.2)中,得到溶液 B;用 0.2 mL H₂O 溶解 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和 *N*-羟基琥珀酰亚胺各 30 mg,加入至溶液 B 中,搅拌 30 min;取 13 mg 半抗原,溶解于 1 mL 二



图 1 多菌灵半抗原合成

Figure 1 Synthesis of carbendazim hapten

甲基甲酰胺中,然后缓慢加入到溶液 B 中溶解,搅拌 24 h。透析后分装, -20 °C 保存。

1.3 酶标记抗体制备

利用 1.2 得到的免疫原免疫 Balb/c,制备杂交瘤细胞株,纯化出多菌灵单克隆抗体^[16],免疫无病原体羊,得到羊抗鼠抗体^[17],再用辣根过氧化物酶进行标记^[18],得到酶标记抗体。

1.4 抗原包被浓度、单克隆抗体浓度选择及酶标板制备

(1) 对制备的抗原依次进行 1:2 000, 1:4 000, 1:8 000 的梯度稀释,对制备的单克隆抗体依次进行 1:10 000, 1:20 000, 1:40 000, 1:80 000 的梯度稀释,测定波长为 450 nm,按式(1)计算百分吸光率。

$$K = \frac{B}{B_0} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

K ——百分吸光率, %;

B ——标准品或样本溶液的平均吸光度值;

B_0 ——0 $\mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值。

(2) 包被酶标板的抗原包被液体积为 100 μL ,需在 37 °C 下孵育 2 h,再加入 150 μL 0.02 mol/L PBS 缓冲液,其中牛血清白蛋白的质量分数为 0.05%, 37 °C 下孵育 2 h^[19],即完成酶标板制备。

1.5 烟叶中多菌灵残留量测定

利用 RIDAWIN 数据分析软件建立标准曲线,分别以待测药物的标准品浓度、 $\text{Logit}(B/B_0)$ 为标准曲线的横、纵坐标,将待测样本的吸光度值代入该曲线,即可测定出多菌灵残留量。

1.6 关键指标检测

1.6.1 检测限 取 20 份经过确证的空白样本,利用 1.5 的方法检测样本浓度,并计算 20 份样本浓度的标准差,所测样本浓度的平均值与其 3 倍标准差之和即为检测限^[20]。

1.6.2 精密度和准确度 将多菌灵标准品添加至烟叶样本,添加浓度分别为 300, 600, 1 200 $\mu\text{g/kg}$,检测 3 个浓度的烟叶样本回收率。烟叶样本做 4 个平行,计算相对标准偏差(RSD)。

1.6.3 稳定性 将试验制备的试剂盒于 4 °C 下存放,每月固定日期测定最大吸光度值(0 $\mu\text{g/L}$)、试剂盒 IC_{50} 以及烟叶样本的回收率,连续测定 12 个月。

1.6.4 抗体特异性 噻苯达唑、甲基托布津、托布津、2-氨基苯并咪唑与多菌灵的结构类似,测定上述药物的 IC_{50} ,根据式(2)计算噻苯达唑、甲基托布津、托布津、2-氨基苯并咪唑的交叉反应率。引起 50% 抑制的多菌灵浓度与引起 50% 抑制的多菌灵类似物浓度的百分比,即为交叉反应率。

$$R = \frac{C_1}{C_2} \times 100\%, \quad (2)$$

式中:

R ——交叉反应率, %;

C_1 ——引起 50% 抑制的多菌灵浓度, $\mu\text{g/L}$;

C_2 ——引起 50% 抑制的多菌灵类似物浓度, $\mu\text{g/L}$ 。

2 结果与分析

2.1 抗原包被浓度、单克隆抗体浓度选择

测定浓度为 0.0, 0.1 $\mu\text{g/L}$ 的多菌灵标准品的吸光度值(见表 1),根据式(1)计算 $B(0.1 \mu\text{g/L})/B_0(0.0 \mu\text{g/L})$ 的百分吸光率。理论上在抗原数量一定的情况下,抗体只有达到一定数量才能有效结合,然而实际应用中,抗原和单克隆抗体作为制备酶联免疫试剂盒的最关键原料,理想情况是在能够保证有效反应的情况下,抗体量最小;稀释倍数越大,同样产量的原料能够制备的试剂盒就越多。根据已有的研究^[21],如果能够达到 $B(0.1 \mu\text{g/L})/B_0(0.0 \mu\text{g/L})$ 的百分吸光率在 70%~85% 的要求,那么稀释倍数越大,原料就能节省得越多。因此,选择抗原稀释倍数为 8 000,单克隆抗体稀释倍数为 80 000。

2.2 标准曲线

利用 RIDAWIN 数据分析软件建立标准曲线(见图 2),标准曲线的范围为 0.0~8.1 $\mu\text{g/L}$,试剂盒的半数抑制浓度(IC_{50})为 0.851 $\mu\text{g/L}$;得到的线性方程为: $y = -1.686x + 1.117$,决定系数 R^2 为 0.995。

2.3 检测限

由表 2 可知,该方法对烟叶、苹果、白菜及茶叶样本的检测限分别为 266.3, 421.0, 349.1, 484.4 $\mu\text{g/kg}$ 。优于吴燕等^[12]针对茶叶建立的基于表面增强拉曼光谱测定方法(定量限为 2 000 $\mu\text{g/L}$)。GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》规定了多菌灵对苹果、白菜、茶叶的最大残留限量均为 5 mg/kg(暂未对烟叶进行规定)。因此,该方法能够满足对多菌灵的检测要求。

表 1 抗原、抗体的浓度选择($OD_{450 \text{ nm}}$)

Table 1 Optimal concentration of antigen and antibody ($OD_{450 \text{ nm}}$)

单抗稀 释倍数	测定浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	抗原稀释倍数		
		1:2 000	1:4 000	1:8 000
1:10 000	0.0	3.164	3.104	3.052
	0.1	3.086	3.099	2.994
1:20 000	0.0	2.768	3.185	2.878
	0.1	2.677	3.191	2.980
1:40 000	0.0	2.271	2.249	1.934
	0.1	1.966	1.886	1.843
1:80 000	0.0	1.201	1.591	1.793
	0.1	1.294	1.545	1.451

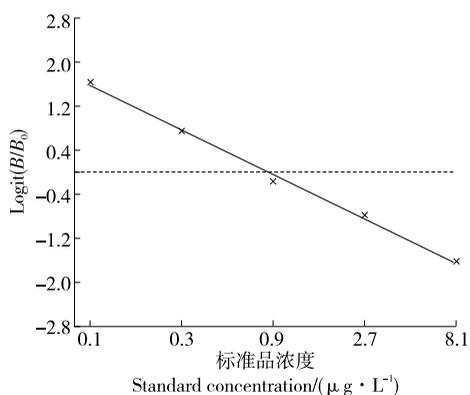


图2 多菌灵标准曲线

Figure 2 Standard curve of carbendazim

2.4 精密度和准确度

由表3可知,不同添加水平多菌灵的烟叶样本的回收率为76.0%~102.2%,批内相对标准偏差为4.8%~9.7%,批间相对标准偏差为8.0%~8.6%。酶联免疫试

表3 精密度及准确度试验

Table 3 Precision and accuracy test

添加水平/ ($\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	批次	回收率/%					RSD/%	
		1	2	3	4	平均值	批内($n=4$)	批间($n=3$)
300	1	86.1	78.3	86.9	78.2	86.1	5.6	
	2	91.4	102.2	94.9	86.3	91.4	7.3	8.2
	3	83.0	78.7	87.7	87.2	83.0	5.1	
600	1	90.6	96.4	92.7	85.9	90.6	4.8	
	2	76.0	92.5	79.9	86.9	76.0	9.6	8.6
	3	100.8	83.9	77.8	86.5	100.8	9.7	
1 200	1	83.4	82.3	93.6	92.0	83.4	6.9	
	2	98.5	101.1	98.9	83.6	98.5	8.1	8.0
	3	85.5	92.3	102.0	86.3	85.5	8.9	

表4 稳定性试验

Table 4 Stability of the kit at 4 °C

保存时间/月	最大吸光度值	$IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$	回收率/%
1	1.68	0.772	76.9
2	1.59	0.367	81.6
3	1.80	0.613	76.3
4	1.86	0.532	95.3
5	1.66	0.446	72.6
6	1.72	0.655	86.0
7	1.62	0.572	76.8
8	1.87	0.702	86.7
9	1.84	0.623	87.2
10	1.77	0.369	76.1
11	1.91	0.369	74.7
12	1.81	0.662	73.9

表2 样本的检测限测定

Table 2 Determination of detection limit of samples ($n=20$) $\mu\text{g}/\text{kg}$

样本	平均值	标准差	检测限
烟叶	96.1	56.8	266.3
苹果	146.1	91.7	421.0
白菜	137.9	70.4	349.1
茶叶	212.2	90.7	484.4

剂盒的准确性与精密度有关,批内与批间的相对标准偏差均在10%以内,能保证测试的准确性。

2.5 稳定性

由表4可知,试剂盒于4 °C保存能够正常检测12个月,试验期间其最大吸光度值(0 $\mu\text{g}/\text{L}$)范围为1.59~1.91, IC_{50} 范围为0.367~0.772 $\mu\text{g}/\text{L}$,烟叶样本的回收率范围为72.6%~95.3%,均未显示异常。说明该酶联免疫试剂盒的稳定性良好,在4 °C下能够保存12个月。

2.6 抗体特异性

噻苯达唑、甲基托布津、托布津、2-氨基苯并咪唑为应用广泛的杀菌剂。通过测定多菌灵抗体与噻苯达唑、甲基托布津、托布津、2-氨基苯并咪唑的交叉反应率,发现多菌灵抗体与噻苯达唑、甲基托布津、托布津、2-氨基苯并咪唑的交叉反应率<1%,说明多菌灵抗体的特异性良好。

3 结论

试验建立了一种烟叶、苹果、白菜、茶叶中多菌灵残留的酶联免疫吸附方法,通过制备出特异性良好的多菌灵单克隆抗体,将其应用于酶联免疫试剂盒的制备。结果表明,该方法稳定性好,检测时间仅为45~60 min,并且不需要昂贵的仪器,适用于基层实验室对烟叶、苹果、白菜、茶叶中多菌灵残留量进行批量检测。GB 2763—2019《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》规

定了多菌灵对 6 种谷物、4 种油料油脂、16 种蔬菜、28 种水果等食品类别的最大残留限量,而试验研究样本仅限于苹果、白菜等果蔬,今后可根据市场需求,结合该标准对样本进行拓展。

参考文献

- [1] 华孝成,柯建赛,黄兆册.分光光度法检测果蔬中多菌灵残留量的改进[J].浙江农业科学,2013(8):1 016-1 018.
- [2] 高兴,于基成,郭乃菲,等.食品中多菌灵残留检测方法研究进展[J].食品与机械,2010,26(6):153-155.
- [3] 石慧,黄安香,李洙锐,等.超高效液相色谱法检测甘薯中多菌灵的残留方法研究[J].农药科学与管理,2014,35(3):24-27.
- [4] 周晓洁,赵良忠,夏湘,等.改良 QuEChERS—高效液相色谱法检测柑橘中的多菌灵[J].邵阳学院学报,2014,11(2):74-78.
- [5] 车继英.蔬菜、水果中多菌灵的测定方法研究[J].黑龙江科技信息,2009(8):34.
- [6] 崔丽丽,闫梅霞,王春伟,等.液相色谱—质谱/质谱法检测人参和土壤中多菌灵的残留动态[J].分析科学学报,2015,31(2):223-227.
- [7] 张奇泓.紫外分光光度法检测蔬菜、水果中多菌灵残留[J].福建热作科技,2013,38(1):13-15.
- [8] 高国文,朱红霞.液相色谱法测定香菇中多菌灵农药残留方法研究[J].农药科学与管理,2010,31(9):36-38.
- [9] 高国文,刘育清,朱家香.液相色谱法检测柑橘中多菌灵残留的方法研究[J].农药科学与管理,2006,27(5):10-11.
- [10] 张雪波,上官良敏.茶叶中多菌灵和甲萘威农药残留量的测定[J].质量技术监督研究,2009(2):19-21.

(上接第 93 页)

好并且覆盖了大部分基质,可在大多数分析实验室推广应用。但是,由于该方法研究的化合物较多,不同的化合物灵敏度也不一致,因此前处理方法无法保证每一个化合物的回收率都能达到 100% 满意的结果,但均在 70%~120%,满足日常检测的定量要求。今后可扩大检测基质体量、研究不同基质的前处理方式的优化以及如何更加有效去除基质的干扰,以期达到更全面、严格管理监测这类中药材或药物的使用。

参考文献

- [1] 夏新斌,杨勇,吴玉冰,等.中医药膳食认证管理现状探讨[J].食品与机械,2018,34(8):207-210.
- [2] 蔺红伟,江春霞,陆文铨,等.仙灵骨葆同方提取物的肝细胞毒性研究[J].药学服务与研究,2020,20(2):98-101.
- [3] 宋蕾,毕亚男,袁晓美,等.异补骨脂素腹腔注射 9 d 所致 C57 小鼠肝损害[J].毒理学杂志,2018,32(1):21-24.
- [4] 艾国,黄正明,王德文,等.金丝桃苷的大鼠胚胎—胎仔发育毒性研究[J].中国中药杂志,2012,37(16):2 452-2 455.
- [5] 王丹,贾德贤,李真真,等.淫羊藿的安全性评价与风险控制措施探讨[J].中国中药杂志,2019,44(8):1 715-1 723.

- [11] 房超,董雷玲,宋阳威.高效液相色谱法同步检测橙汁饮料中多菌灵、吡虫啉残留量[J].江苏农业科学,2012,40(9):295-297.
- [12] 吴燕,吴瑞梅,黄双根,等.茶叶中多菌灵残留的 SERS 快速检测[J].江苏农业科学,2015,43(9):338-340.
- [13] 王国霞.多菌灵酶联免疫分析技术研究[D].北京:中国农业科学院,2006:36.
- [14] 王金花,奇日迈励图,张蓉,等.抗多菌灵单克隆抗体的制备、纯化及初步鉴定[J].细胞与分子免疫学杂志,2012,28(1):53-54.
- [15] 中国烟草总公司郑州烟草研究院,国家烟草质量监督检验中心,北京勤邦生物技术有限公司.检测多菌灵的酶联免疫试剂盒及其应用:CN201510973048.5[P].2015-12-23.
- [16] 刘小军,冯才伟,冯静,等.一种叶酸的酶联免疫快速检测试剂盒的研制[J].食品工业科技,2013,34(23):303-310.
- [17] 杨利国,胡少昶,魏平华,等.酶联免疫技术[M].南京:南京大学出版社,1998:114-157.
- [18] 郭春祥,郭锡琼.介绍一种简单、快速、高效的辣根过氧化物酶标记抗体的过碘酸钠法[J].免疫学杂志,1983(33):97-100.
- [19] 郑百芹,罗晓琴,冯才伟,等.一种喹诺酮类药物的酶联免疫快速检测试剂盒的研制[J].中国酿造,2014,33(2):130-133.
- [20] 冯仁丰.分析灵敏度(检测限)[J].上海医学检验杂志,2002,17(3):133-136.
- [21] 董李学,冯才伟,冯静,等.抗氧氟沙星单克隆抗体的制备及 ELISA 快速试剂盒的初步研制[J].中国畜牧兽医,2014,41(8):90-94.

- [6] 康宁,高媛惠,高利珍.高效液相色谱—串联飞行时间质谱法检测安神类保健食品中非法添加物[J].食品与机械,2018,34(10):49-54.
- [7] 刘云,杨玉忠.超高效液相色谱—串联质谱法定性定量检测中成药及保健食品中非法添加的 17 种化学药物[J].安徽医药,2020(1):82-86.
- [8] 王雨晴,王雨辰,陈亮,等.超高效液相色谱—四极杆—飞行时间质谱快速筛查中成药、保健品中 26 种非法添加化合物[J].食品与发酵工业,2020,46(5):263-269.
- [9] 勇艳华,李鹏,边海涛,等.超高效液相色谱—串联质谱法测定痛风类中成药中 17 种非法添加物[J].中国卫生检验杂志,2019,29(22):2 711-2 714.
- [10] 马俊美,王敬,孙文毅,等.超高效液相色谱—串联质谱法测定保健食品中 90 种那非类药物[J].食品科学,2020,41(14):307-313.
- [11] 易必新,龙凌云,姜成君,等.UPLC-MS/MS 法测定保健食品中非法添加 14 种化学降糖药的研究[J].中南药学,2019,17(10):1 685-1 689.
- [12] 王超,祝波,杨钊.RRLC-MS/MS 法同时测定保健食品中 31 种降糖、降压、降血脂类非法添加化学药物[J].中国药师,2019,22(10):1 946-1 950.