

间接竞争酶联免疫分析方法检测动物性食品中恩诺沙星残留

黄佳翔^{1,2} 李燕飞^{1,2} 王凯乐^{1,2} 张 敏^{1,2} 王 耀^{1,2} 康怀彬^{1,2}

(1. 河南科技大学食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471000;

2. 河南省食品绿色加工与质量安全控制国际联合实验室, 河南 洛阳 471000)

摘要: [目的] 建立动物性食品中恩诺沙星(ENR)残留的高灵敏间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)。**[方法]** 采用碳二亚胺法将 ENR 与钥孔血蓝蛋白(KLH)偶联合成免疫抗原, 免疫新西兰大白兔制备高敏感性抗体, 在此基础上优化检测体系建立 ic-ELISA, 对其检测性能进行鉴定并在动物性食品中进行加标回收试验。**[结果]** 在包被抗原质量浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、抗体稀释 40 000 倍、二抗稀释 5 000 倍、一抗孵育 15 min、二抗孵育 30 min、显色时间 5 min 的条件下, 该方法的 IC_{50} 为 27.76 pg/mL , 检测范围为 0.49~1 577.29 pg/mL , 最低检测限为 0.33 pg/mL , 批内批间变异系数均小于 15%, 且在 ENR 痕量检测中表现出良好的特异性, 检测鸡肉、鱼肉样品的加标回收率分别为 93.37%~97.06% 和 87.15%~97.59%。**[结论]** 该方法灵敏度、精密度、特异性和准确度等检测性能优异, 能够为动物性食品中 ENR 痕量残留检测提供技术支持。

关键词: 恩诺沙星; 抗体; 竞争酶联免疫分析方法; 痕量检测; 兽药残留

Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of enrofloxacin residues in animal-derived food

HUANG Jiexiang^{1,2} LI Yanfei^{1,2} WANG Kaile^{1,2} ZHANG Min^{1,2} WANG Yao^{1,2} KANG Huaibin^{1,2}

(1. College of Food and Bioengineering, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471000, China;

2. Henan International Joint Laboratory of Food Green Processing and Quality Safety Control, Luoyang, Henan 471000, China)

Abstract: [Objective] To establish a highly sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) for detecting enrofloxacin (ENR) residues in animal-derived food. [Methods] ENR was conjugated with keyhole limpet hemocyanin (KLH) using the carbodiimide method to prepare an immunogen, and New Zealand white rabbits were immunized to produce high-sensitivity antibodies. Based on this, the detection system was optimized to establish ic-ELISA, the detection performance was evaluated, and spiked recovery tests were conducted in animal-derived food. [Results] Under the optimized conditions of coating antigen concentration at 0.25 $\mu\text{g/mL}$, antibody dilution of 1:40 000, secondary antibody dilution of 1:5 000, primary antibody incubation for 15 min, secondary antibody incubation for 30 min, and color development for 5 min, the IC_{50} of the method was 27.76 pg/mL . The detection range was 0.49~1 577.29 pg/mL , and the limit of detection was 0.33 pg/mL . The intra- and inter-assay coefficients of variation were both less than 15%. The method showed good specificity in trace detection of ENR, with recovery rates of 93.37%~97.06% in chicken and 87.15%~97.59% in fish. [Conclusion] This method demonstrates excellent sensitivity, precision, specificity, and accuracy, and provides an effective tool for detecting trace residues of ENR in animal-derived food.

基金项目: 国家级大学生创新训练计划项目(编号:202410464052); 河南省高校青年骨干教师培养计划(编号:2023GGJS046); 河南省科技攻关项目(编号:252102320246)

通信作者: 王耀(1986—), 男, 河南科技大学教授, 博士。E-mail: wangyao@haust.edu.cn

康怀彬(1963—), 男, 河南科技大学教授, 硕士。E-mail: khbin001@163.com

收稿日期: 2025-02-12 **改回日期:** 2025-09-25

引用格式: 黄佳翔, 李燕飞, 王凯乐, 等. 间接竞争酶联免疫分析方法检测动物性食品中恩诺沙星残留[J]. 食品与机械, 2026, 42(3): 37-44.

Citation: HUANG Jiexiang, LI Yanfei, WANG Kaile, et al. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of enrofloxacin in animal-derived food[J]. Food & Machinery, 2026, 42(3): 37-44.

Keywords: enrofloxacin; antibody; competitive enzyme-linked immunosorbent assay; trace detection; veterinary drug residue

恩诺沙星(enrofloxacin, ENR)又名乙基环丙沙星,属于喹诺酮类广谱抗生素,对革兰氏阴性菌和阳性菌均有良好的抗菌作用,在降低畜禽动物的发病率和死亡率等方面起到十分显著的效果^[1-3]。该药物可通过结合回旋酶亚基阻断细菌 DNA 解链、切割与连接过程,从而实现抑菌和杀菌目的^[4]。作为畜牧业中广泛使用的抗生素,该药物具有高效低毒、抗菌谱广、耐药交叉性小、价格低廉等优点^[5-6],但长期、不规律或过量使用药物可导致 ENR 及其代谢产物在动物性食品和环境中的残留量增加,严重损害了人体健康和生态环境^[7-8]。长时间摄入含有过量 ENR 的动物性食品,也可能会引起轻度胃肠道刺激或不适,如头痛、头晕、睡眠不良等,并且大剂量的摄入还可能导致肝功能损伤^[9]。因此,中国《食品安全国家标准食品中兽药最大残留限量》(GB 31650—2019)规定了 ENR 在动物肌肉、脂肪及奶中的最大残留限量(maximum residue limit, MRL)为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,牛、羊肝脏和家禽肾脏中的 MRL 为 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$,在水产品中的 MRL 为 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。国际上,欧盟法规(EU No 37/2010)将牛奶中 ENR 的 MRL 设定为 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,以降低 ENR 残留物对人体的健康风险。在近几年各地喹诺酮类抗生素残留的监测分析调查中,ENR 在水产品、禽肉禽蛋类产品中均有检出,且检出率较高^[10-11]。

目前,ENR 残留的检测方法主要有高效液相色谱法^[12]、液相色谱—串联质谱法^[13]和毛细管电泳法^[14],但这些检测方法需要昂贵的仪器和专业的操作培训,检测周期较长,不利于现场大规模样品的快速检测。免疫分析技术具有灵敏度高、操作简单等优势,其中酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)具有检测速度快、灵敏度高、简便易操作且易于标准化等特点,近年来得到快速的发展和广泛应用^[15-16]。在 ELISA 方法中抗体的制备尤为重要,而要获得性能良好的抗体首先需要合成免疫原性优良的人工抗原。目前,人工抗原制备所使用的载体蛋白多为牛血清白蛋白(bovine albumin, BSA)和鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)。钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)是一种来源于海洋软体动物的高相对分子质量蛋白,具有复杂的结构和独特的免疫原性^[17]。现有相关研究中尚未有采用 KLH 偶联 ENR 制备人工抗原获得高性能抗体的报道。研究拟采用 KLH 通过碳二亚胺法合成人工抗原免疫新西兰大白兔制备出高敏感性抗体,在此基础上,优化检测体系建立间接竞争酶联免疫吸附法(indirect competitive enzyme-linked immunoassay assay, ic-ELISA)并对其检测性能进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

ENR、KLH、BSA、四甲基联苯胺(TMB)、碳酰二亚胺

(EDC)、*N*-羟基丁二酰亚胺(NHS)、诺氟沙星(NOR)、氧氟沙星(OFL):分析纯,上海麦克林生化科技有限公司;

二甲基亚砷(DMSO):分析纯,天津市德恩化学试剂有限公司;

弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA):美国 Sigma 公司;

Goat Anti-Rabbit IgG HRP (GaRIgG-HRP, 以下简称二抗):美国 Jackson ImmunoResearch 公司;

96 孔聚苯乙烯酶标板(ELISA 板):上海科兴生化仪器有限公司;

新西兰大白兔(2 kg):河南斯克贝斯生物科技股份有限公司;

酶标仪:Multiskan FC 型,美国 Thermo 公司;

紫外可见分光光度计:UV-2600 型,日本岛津公司;

台式高速冷冻离心机:H1650R 型,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司;

涡旋混合机:Vortex 1 型,德国 IKA 公司;

电子分析天平:JJ224BF 型,德国 Sartorius 公司;

磁力搅拌器:MSE-HD 型,大龙兴创实验仪器(北京)股份公司。

1.2 方法

1.2.1 人工抗原的制备与鉴定 采用碳二亚胺法^[18]制备 ENR 免疫抗原(ENR-KLH)和包被抗原(ENR-BSA)。取 10 mg ENR 溶解于 0.5 mL 的 DMSO(若不能完全溶解,加 0.1 mL 水)中,10 mg EDC 和 6.5 mg NHS 溶于 0.2 mL DMSO 水中,加入其中,室温避光反应 4 h。反应结束后,将 7.8 mg KLH 和 9.2 mg BSA 分别溶解于 4 mL 碳酸盐缓冲液(CBS)中。将上述活化液分成两份,搅拌滴加其中,室温 4 h,4 $^{\circ}\text{C}$ 静置过夜,用 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)透析 3 d。3 000 r/min 离心 10 min,取上清保存。用 PBS 将 ENR-KLH、ENR-BSA、ENR 标准品、KLH、BSA 配制成浓度相同的溶液,进行紫外扫描并根据特征吸收峰的位置变化判断人工抗原是否偶联成功。

1.2.2 动物免疫 将 ENR-KLH 人工抗原作为雌性新西兰大白兔的免疫抗原,采用背部皮下注射的免疫方法。首次免疫为基础免疫,每只免疫 2 mL 抗原,剂量为 200 μg 。将免疫抗原用无菌 PBS 溶液稀释后与等体积 FCA 混合,充分乳化后进行免疫。每隔 14 d 进行一次加强免疫,将 FCA 替换为 FIA,免疫剂量与首次免疫相同。进行 3 次加强免疫 15 d 后采集心脏血,采用硫酸铵—辛酸联合法纯化血清制备多抗^[19]。

1.2.3 兔多抗的鉴定 采用间接酶联免疫吸附法(indirect enzyme-linked immunoassay method, iELISA)测定 ENR 兔多抗效价^[20]。将 ENR-BSA 作为包被原包被 ELISA 板,通过加入不同稀释倍数的抗体(设立空白孔)

进行检测,在酶标仪中读取 OD_{450} 值。当待测孔 OD_{450} 值大于空白孔 OD_{450} 值的2.1倍,则判定为阳性孔,以阳性孔最小 OD_{450} 值所对应的抗体稀释倍数作为抗体效价。采用ic-ELISA测定ENR兔多抗的敏感性^[21],通过梯度加入不同稀释倍数的ENR标准品,再加入一定稀释浓度的抗体(效价测定时 OD_{450} 值为1.2左右),并设阳性孔和空白孔。以 B/B_0 为纵坐标(B 为不同质量浓度ENR所对应的 OD_{450} 值, B_0 为ENR质量浓度为0时的 OD_{450} 值),以ENR质量浓度的对数值为横坐标,绘制抑制曲线。根据线性回归方程计算半数抑制浓度(IC_{50})鉴定抗体的敏感性。

1.2.4 检测体系优化

(1) 包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数:采用方阵棋盘法^[22]优化包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数。具体步骤:用CBS将包被抗原ENR-BSA分别稀释至4.000, 2.000, 1.000, 0.500, 0.250, 0.125 $\mu\text{g/mL}$ 包板。采用iELISA测定不同质量浓度包被抗原下的抗体效价,选取 OD_{450} 值在1.2左右的抗体稀释倍数进行ic-ELISA法,测定不同质量浓度包被抗原下的 IC_{50} 值。以 IC_{50} 值最低的包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数作为最优组合,参考文献[23]检测体系其他条件的优化试验。

(2) 一抗孵育时间:在最佳包被抗原质量浓度和抗体工作浓度的条件下设置一抗孵育10, 15, 20 min,计算不同时间下的 IC_{50} 值,确定 IC_{50} 值最低时的孵育时间为最优时间。

(3) 二抗稀释倍数:在确定一抗孵育时间的条件下,设置脱脂奶对二抗进行3 000倍、5 000倍、8 000倍、10 000倍、12 000倍稀释,计算不同稀释倍数下的 IC_{50} 值,确定 IC_{50} 值最低时的倍数为最优稀释倍数。

(4) 二抗孵育时间:在确定一抗孵育时间和二抗稀释倍数的条件下,将二抗分别在酶标板中孵育15, 30, 45 min,计算不同时间下的 IC_{50} 值,以最低 IC_{50} 值所对应的孵育时间为最优时间。

(5) 显色时间优化:在确定一抗孵育时间、二抗稀释倍数和孵育时间的条件下,优化显色时间,将TMB显色液加入酶标孔中,分别反应5, 10, 15 min,计算不同时间下的 IC_{50} 值,确定 IC_{50} 值最低时的反应时间为最优时间。

1.2.5 ic-ELISA检测性能鉴定

(1) 标准曲线及灵敏度:在最优条件下,将ENR标准品倍比稀释,进行ic-ELISA测定。纵坐标为抑制率 B/B_0 ,横坐标为ENR质量浓度的对数值,绘制标准抑制曲线。通过标准曲线线性回归方程计算得到 IC_{50} 和检测范围($IC_{10} \sim IC_{90}$)。对不含ENR的空白样品重复测定10次,计算空白样品的平均 OD_{450} ($\bar{X}$)和标准偏差(S),以 $\bar{X}-2S$ 求得最低检测限(limit of detection, LOD),用于评价方法灵敏度。

(2) 精密度:取同一批次包被的ELISA板(批内)和不

同批次包被的ELISA板(批间)分别进行ic-ELISA检测。按文献[24]的方法计算变异系数(coefficient of variation, CV)评价方法精密度,通常认为批内和批间的 IC_{50} 值和ENR质量浓度为0时的 OD_{450} 值的CV值越小,建立的方法稳定性越高。

(3) 特异性:参照文献[25],通过测定诺氟沙星、氧氟沙星、洛美沙星、培氟沙星、盐酸沙拉沙星、甲磺酸培氟沙星、麻保沙星、马波沙星、依诺沙星等其他喹诺酮类药物的交叉反应率(cross reactivity, CR)评价方法特异性。CR值越小,特异性越强。

(4) 加标回收试验:取阴性鸡肉和鱼肉样品进行加标回收试验。将5 g鸡肉研磨成匀浆,转移到50 mL离心管中,加入5 mL甲醇作为样品提取液,振荡15 min。8 000 r/min离心10 min分离上清液和沉淀物,收集上清液再次离心备用^[26]。鸡肉样品的处理使用了甲醇溶液,所以在保持高灵敏检测的前提下,在检测时应先消除有机溶液基质干扰。用PBS稀释4倍、8倍、16倍、32倍和64倍的样品溶液对比PBS溶液的抑制曲线和 IC_{50} 值,判断样品溶液不同稀释倍数的基质效应。鱼肉样品的蛋白质含量丰富,脂肪含量较少,基质效应影响较小,在样品处理时可直接使用PBS缓冲溶液作为样品提取液。将5 g鱼肉样品转移到50 mL离心管中,加入5 mL PBS缓冲溶液提取,涡旋振荡充分混匀2 min,20 $^{\circ}\text{C}$ 、8 000 r/min离心2 min,取上清备用^[27]。在鸡肉、鱼肉阴性样品中分别添加ENR至50.0, 25.0, 12.5 pg/mL ,用ic-ELISA方法对样品进行检测,通过计算各添加浓度的回收率及变异系数评价方法准确度。

1.2.6 数据处理 在试验数据中所有未标明数据均为2次平行试验结果。采用Microsoft Office 2021软件进行数据处理,使用Origin 2022软件绘图。

2 结果与分析

2.1 人工抗原的鉴定

如图1所示,ENR的吸收峰为267, 222 nm,载体蛋白的特征吸收峰为280 nm,人工抗原ENR-KLH、ENR-BSA的吸收峰在272, 276 nm处均向左偏移,当ENR的羧基基团活化后与载体蛋白的氨基发生反应后,形成稳定的酰胺键,相对分子质量增大,特征吸收峰发生偏移,所以初步表明抗原合成成功。

2.2 兔多抗的鉴定结果

采用iELISA方法检测兔多抗的效价,兔多抗在4次免疫后的效价在 $1:3.2 \times 10^5$ 以上,采用ic-ELISA鉴定兔多抗的敏感性,标准抑制曲线如图2所示,线性回归方程为 $y=1.10249-0.22257x$, IC_{50} 为509.29 pg/mL ,显著优于已有研究所制备的ENR抗体,如穆洪涛等^[28]制备兔多抗的 IC_{50} 值为4.539 $\mu\text{g/mL}$,丁丽军等^[29]制备鼠多抗的 IC_{50} 值为54.60 ng/mL ,张家禾等^[30]制备鼠单抗的 IC_{50} 值为14.21 ng/mL 。结果表明,试验合成了高质量的ENR人工

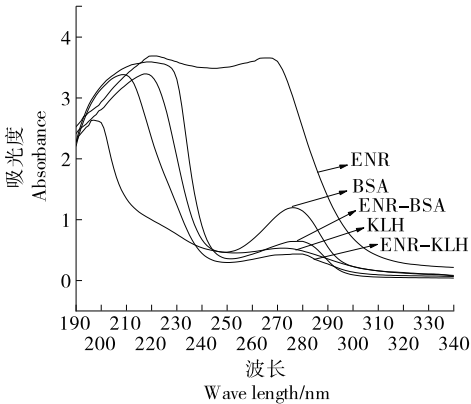


图1 ENR人工抗原紫外鉴定

Figure 1 Ultraviolet identification of ENR artificial antigen

抗原并通过动物免疫成功制备出了敏感性优异的多抗。

2.3 检测体系优化

2.3.1 包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数优化 通过方阵棋盘法优化包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数,结果如表1、图3所示,IC₅₀值随着包被抗原质量浓度的降低呈先降低后升高趋势,包被抗原质量浓度过高会导致ENR与ENR-BSA竞争不充分,浓度过低会导致结合量过少,灵敏度下降。当包被抗原质量浓度为0.25 μg/mL时,IC₅₀

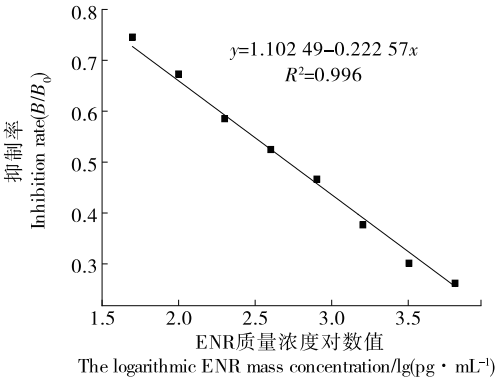


图2 标准抑制曲线

Figure 2 Standard suppression curve

值达到最低。因此,确定包被抗原质量浓度0.25 μg/mL,抗体稀释倍数40 000倍为最佳反应条件。

2.3.2 一抗孵育时间优化 如图4所示,一抗孵育15 min时的IC₅₀值相对较低。一抗孵育时间过短会导致兔多抗与包被抗原竞争不充分,时间过长会使兔多抗非特异性结合增加,灵敏度降低。因此,选择15 min作为一抗孵育时间。

2.3.3 二抗稀释倍数优化 如图5所示,IC₅₀值在二抗稀释倍数为5 000倍时达到最低,而后逐渐升高并趋于平

表1 包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数优化

Table 1 Optimization of concentration and antibody dilution of coated antibody

包被抗原质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	抗体稀释倍数						空白
	2 500	5 000	10 000	20 000	40 000	80 000	
4.000	5.036±0.485	4.898±0.117	4.819±0.064	4.205±0.251	2.998±0.137	1.948±0.145	0.066±0.004
2.000	4.888±0.139	4.835±0.180	4.405±0.038	3.305±0.273	2.214±0.066	1.299±0.245	0.062±0.006
1.000	4.973±0.298	4.814±0.239	4.380±0.034	3.219±0.202	2.191±0.307	1.344±0.183	0.060±0.013
0.500	4.901±0.026	4.503±0.296	3.796±0.011	2.786±0.021	1.803±0.074	1.093±0.154	0.056±0.011
0.250	3.527±0.388	2.640±0.330	2.342±0.692	1.493±0.092	1.009±0.063	0.482±0.177	0.060±0.003
0.125	2.656±1.109	1.755±0.440	1.197±0.190	0.736±0.020	0.525±0.082	0.331±0.040	0.068±0.011

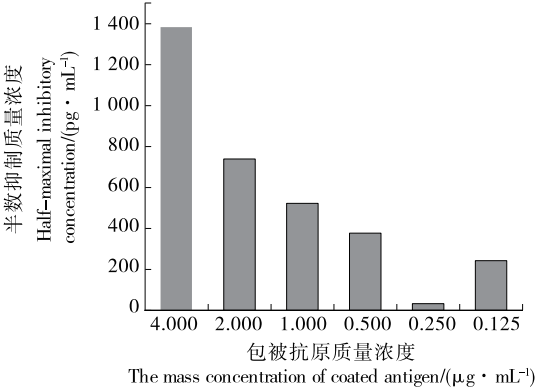


图3 不同包被抗原质量浓度下测得的IC₅₀值

Figure 3 IC₅₀ values measured at different mass concentrations of coated antigen

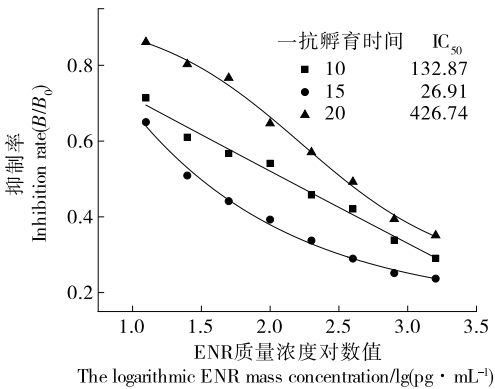


图4 一抗孵育时间优化

Figure 4 Optimization of incubation time of primary antibody

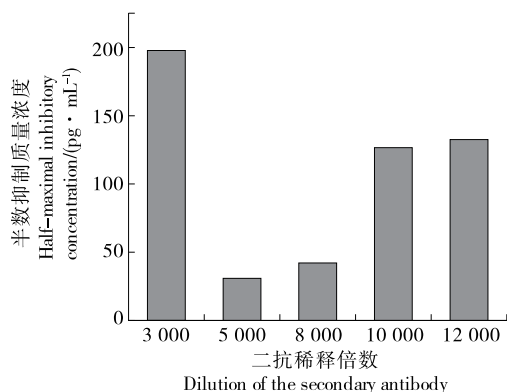


图5 二抗稀释倍数优化

Figure 5 Optimization of dilution ratio of secondary antibody

稳。二抗可以催化大量底物转化,二抗稀释倍数过低会导致非特异性结合增加,稀释倍数过高会导致难以检测到ENR,灵敏度降低。因此,选择二抗稀释5 000倍作为最佳稀释倍数。

2.3.4 二抗孵育时间优化 如图6所示,随着二抗时间的增加,IC₅₀值先降低后升高,在30 min时达到最低。二抗孵育时间过短会导致其与一抗的结合不充分,时间过长会导致非特异性结合增加,灵敏度降低。因此,选择30 min作为二抗孵育时间。

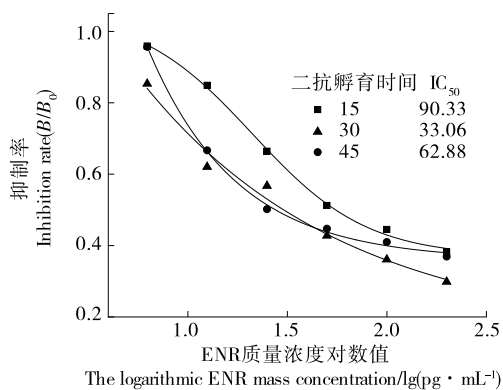


图6 二抗孵育时间优化

Figure 6 Optimization of incubation time of secondary antibody

2.3.5 显色时间优化 不同显色时间会导致底物催化程度不同,时间过短会导致底物催化不完全,而时间过长会导致底物过度催化显色异常,影响检测准确度和灵敏度。ic-ELISA在不同显色时间测定的IC₅₀值结果如图7所示,其中5 min时的IC₅₀值相对较低,而后逐渐增大。因此,选择5 min作为显色时间。

2.4 ic-ELISA 方法的性能鉴定

2.4.1 灵敏度鉴定 通过优化检测体系建立ic-ELISA方法,绘制标准抑制曲线结果如图8所示,线性回归方程为 $y=0.829\ 06-0.227\ 98x$,IC₅₀值为27.76 pg/mL,检测范围(IC₁₀~IC₉₀)为0.49~1 577.29 pg/mL。检测空白样品得到

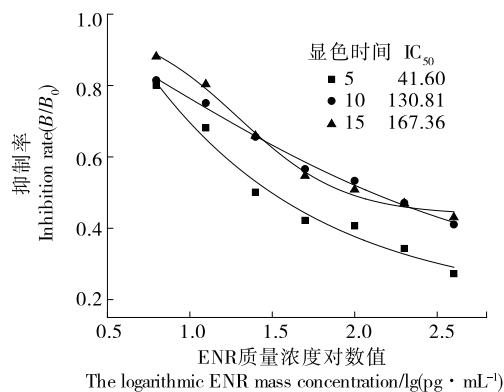


图7 显色时间优化

Figure 7 Optimization of color development time

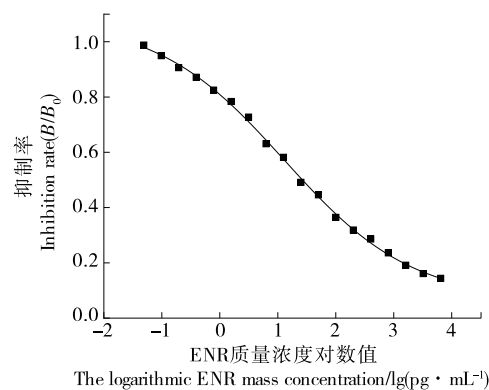


图8 ic-ELISA 标准抑制曲线

Figure 8 Standard inhibition curve of ic-ELISA

LOD为0.33 pg/mL,表明ic-ELISA方法灵敏度高。该方法与已有文献报道的同类及其他检测方法相比(见表2),在方法灵敏度上具有显著优势,且与同类免疫分析方法相比,ENR-KLH作为免疫抗原具有较强的免疫原性,更易刺激动物产生高质量抗体。

2.4.2 精密度鉴定 采用ic-ELISA法对同一批次和不同批次包被的ELISA板分别测定IC₅₀值结果如表3所示,批内IC₅₀值和阳性孔OD₄₅₀值的CV<10%,批间IC₅₀值和阳性孔OD₄₅₀值的CV<15%。对照《酶联免疫吸附试剂盒》(YY/T 1183—2024)行业标准对于精密度的要求,试验所建立的ic-ELISA方法具有良好的精密度,在同批次与不同批次的检测中具有较好的稳定性。

2.4.3 特异性鉴定 ic-ELISA与其他喹诺酮类药物的交叉反应率结果如表4所示,培氟沙星的交叉反应率为1.31%,与洛美沙星、麻保沙星、氧氟沙星、诺氟沙星、马波沙星、甲磺酸培氟沙星、依诺沙星交叉反应率均小于0.2%。在实际样品检测中,为避免复杂样品基质效应和其他类似药物的干扰,通常采用多倍稀释的方法进行样品处理。试验方法具有高灵敏度适宜进行ENR痕量检测,能够在样品高度稀释后消除其他类似药物的干扰,表现出良好的特异性。

表 2 文献报道方法与试验方法对比[†]

方法	单位	检测范围	检测限	实际样品	免疫抗原	参考文献
表面增强拉曼检测法	nmol/mL	5~1 000	0.12	鸡肉、鱼肉	/	[31]
荧光传感检测法	nmol/mL	1~400	14.72	鱼肉	/	[32]
分子印迹传感器检测法	ng/mL	25~1 000	61.1	鸡肉	/	[33]
胶体金免疫层析法	mg/kg	/	3	鸡肉	ENR-BSA	[34]
化学发光酶免疫法	ng/mL	0.35~1.00	0.03	牛奶、鸡蛋、蜂蜜	ENR-BSA	[35]
异源包被 ic-ELISA	ng/mL	4.16~24.08	2.11	鸡蛋、鱼肉	ENR-BSA	[36]
ic-ELISA	μg/mL	/	0.59	牛蛙	ENR-BSA	[37]
基于金纳米颗粒 ELISA	ng/mL	0.16~500.00	0.24	牛奶	ENR-BSA	[38]
试验方法	pg/mL	0.49~1 577.29	0.33	鸡肉、鱼肉	ENR-KLH	

[†] “/”表示参考文献中未提及。

表 3 ic-ELISA 精密度鉴定

平行	批内精密度		批间精密度	
	IC ₅₀ /	OD ₄₅₀	IC ₅₀ /	OD ₄₅₀
	(pg·mL ⁻¹)		(pg·mL ⁻¹)	
1	31.40±0.26	1.227±0.003	28.18±0.87	0.986±0.006
2	33.33±0.52	1.264±0.018	36.52±0.46	1.101±0.009
3	35.95±0.40	1.149±0.006	28.56±0.43	1.061±0.023
4	35.22±0.59	1.479±0.007	34.60±0.61	1.152±0.001
平均值	33.98±2.04	1.280±0.141	31.97±4.23	1.075±0.070
CV/%	6.00	11.016	13.23	6.511

表 4 与其他喹诺酮类药物的交叉反应率

其他喹诺酮类药物	IC ₅₀ /(pg·mL ⁻¹)	交叉反应率/%
培氟沙星	2 113.40	1.31
洛美沙星	>20 000	<0.2
麻保沙星	>20 000	<0.2
氧氟沙星	>20 000	<0.2
诺氟沙星	>20 000	<0.2
马波沙星	>20 000	<0.2
甲磺酸培氟沙星	>20 000	<0.2
依诺沙星	>20 000	<0.2

2.4.4 加标回收试验 阴性鸡肉样品处理后稀释不同倍数,经 ic-ELISA 检测绘制抑制曲线。如图 9 所示,随着甲醇稀释倍数的增大,IC₅₀ 值也逐渐降低,甲醇浓度过高会抑制酶活性导致灵敏度降低,其中 64 倍稀释与 PBS 溶液条件下 IC₅₀ 最为接近,且抑制曲线基本吻合,表明此时已不存在基质效应。因此,确定鸡肉样品处理后采用 PBS 稀释 64 倍以消除其基质干扰。

以回收率和变异系数表示检测值与其实际样品添加量之间的差异,加标回收试验结果如表 5 所示,鸡肉和鱼肉样品的加标回收率分别为 93.37%~97.06% 和 87.15%~

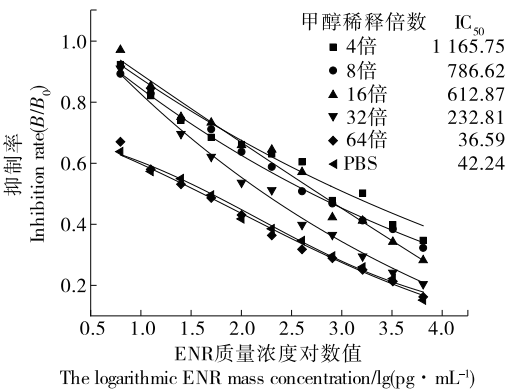


图 9 鸡肉样品基质效应消除
Figure 9 Elimination of matrix effect in chicken samples

表 5 实际样品添加回收试验

样品	添加值/ (pg·mL ⁻¹)	检测值/ (pg·mL ⁻¹)	回收率/%	变异系 数/%
鸡肉	50.0	48.43±4.06	96.87±8.11	8.38
	25.0	24.26±2.13	97.06±0.09	8.78
	12.5	11.67±0.91	93.37±0.07	7.80
鱼肉	50.0	48.80±1.62	97.59±0.03	3.32
	25.0	21.79±1.80	87.15±0.07	8.26
	12.5	11.65±0.65	93.21±0.05	5.58

97.59%,变异系数小于 10%,均在实际样品检测可接受的范围内,说明试验方法的准确度较高。

3 结论

该研究采用碳二亚胺法合成了恩诺沙星-钥孔血蓝蛋白免疫抗原,通过免疫新西兰大白兔成功制备了高敏感性的恩诺沙星多抗,在此基础上优化检测体系建立间接竞争酶免疫吸附法。该方法的检测范围为 0.49~1 577.29 pg/mL,最低检测限为 0.33 pg/mL,具有较好的灵敏度,批内批间的半数抑制浓度和 OD₄₅₀ 值的变异系数均

小于15%,具有良好的精密度和稳定性,在痕量检测中具有良好的特异性。鸡肉和鱼肉中的加标回收率范围分别为93.37%~97.06%和87.15%~97.59%,变异系数均小于10%。该方法对于动物性食品等复杂样品消除基质效应需要高度稀释的情况下,仍可实现准确痕量检测,能够为食品安全抽检中恩诺沙星的快速、灵敏、特异、准确筛查提供技术支撑。该研究在恩诺沙星高灵敏免疫分析方法中具有一定优势,但在人工抗原的制备研究中仍需在半抗原与载体蛋白的偶联方法、效率、结构等方面进一步探索。

参考文献

- [1] PAUDEL S, CERBU C, ASTETE C E, et al. Enrofloxacin-impregnated PLGA nanocarriers for efficient therapeutics and diminished generation of reactive oxygen species[J]. ACS Applied Nano Materials, 2019, 2(8): 5 035-5 043.
- [2] SEBASTIAN S, HOLLIE A, KE H, et al. Direct photolysis of fluoroquinolone antibiotics at 253.7 nm: specific reaction kinetics and formation of equally potent fluoroquinolone antibiotics[J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50(17): 9 533-9 542.
- [3] RIAZ L, MAHMOOD T, COYNE M S, et al. Physiological and antioxidant response of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings to fluoroquinolone antibiotics[J]. Chemosphere, 2017, 177: 250-257.
- [4] CUI F J, LI H D, CHEN C, et al. Cattail fibers as source of cellulose to prepare a novel type of composite aerogel adsorbent for the removal of enrofloxacin in wastewater[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 191: 171-181.
- [5] MERCAN U Y, VOLKAN K, MIKAIL K, et al. Adverse effects of oxytetracycline and enrofloxacin on the fertility of Saanen bucks[J]. Tropical Animal Health and Production, 2021, 53(5): 466.
- [6] COSTA R P, CAVALCANTE M M G, BORBA C T R, et al. Multilocus sequence analysis reveals genetic diversity in *Staphylococcus aureus* isolate of goat with mastitis persistent after treatment with enrofloxacin[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 17252.
- [7] LUCIANA B C, NOVA V M R, REYES G F R. Effect of food processing (fish burger preparation and frying) on residual levels of enrofloxacin and ciprofloxacin[J]. Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2021, 38(10): 1 689-1 700.
- [8] ESMORÍS C, CID M, SANJURJO M J, et al. Environmental relevance of adsorption of doxycycline, enrofloxacin, and sulfamethoxypyridazine before and after the removal of organic matter from soils[J]. Journal of Environmental Management, 2021, 287: 112354.
- [9] LI D C, GAO J F, DAI H H, et al. Long-term responses of antibiotic resistance genes under high concentration of enrofloxacin, sulfadiazine and triclosan in aerobic granular sludge system[J]. Bioresource Technology, 2020, 312: 123567.
- [10] 卫瑾瑾, 鹿尘, 张正尧, 等. 河南省2019年—2020年动物源性食品中喹诺酮类抗生素残留的监测分析及健康风险评估[J]. 中国卫生检验杂志, 2022, 32(9): 1 138-1 141, 1 145.
WEI J J, LU C, ZHANG Z Y, et al. Analysis of monitoring results and health risk assessment of quinolone antibiotic residues in animal-derived food from 2019 to 2020 in Henan Province[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2022, 32(9): 1 138-1 141, 1 145.
- [11] 朱颖, 庄睿, 胡婧, 等. 山东省市售淡水鱼虾中喹诺酮类抗生素残留量分析及暴露风险评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, 36(11): 1 240-1 245.
ZHU Y, ZHUANG R, HU J, et al. Analysis of quinolone antibiotics residues and exposure risk assessment in commonly marketed freshwater fish and shrimp from Shandong Province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2024, 36(11): 1 240-1 245.
- [12] VERMA M K, AHMAD A H, PANT D, et al. Screening of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in chicken meat by high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Pharmaceutical Research International, 2020, 32(21): 64-69.
- [13] 施元旭, 张水锋, 潘项捷, 等. 超高效液相色谱串联质谱法测定豆芽中恩诺沙星、环丙沙星残留量的不确定度评定[J]. 食品与机械, 2020, 36(10): 37-42.
SHI Y X, ZHANG S F, PAN X J, et al. Evaluation of uncertainty in determination of enrofloxacin and ciprofloxacin residues in bean sprouts by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Food & Machinery, 2020, 36(10): 37-42.
- [14] 陈宗保, 王星, 尹月春, 等. 改性纳米金富集-毛细管电泳电化学发光法测定水产品中4种氟喹诺酮类药物残留[J]. 分析测试学报, 2019, 38(2): 176-181.
CHEN Z B, WANG X, YIN Y C, et al. Determination of four fluoroquinolones drug residues in aquatic products by capillary electrophoresis-electrochemiluminescence with modified gold nanoparticles enrichment[J]. Journal of Instrumental Analysis, 2019, 38(2): 176-181.
- [15] TANG W Z, QI Y C, LI Z H. A portable, cost effective and user-friendly instrument for colorimetric enzyme-linked immunosorbent assay and rapid detection of aflatoxin B₁[J]. Foods, 2021, 10(10): 2 483.
- [16] WANG Y D, QIN J A, WU L, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic strip for rapid detection of atrazine in three medicinal herbal roots[J]. World Journal of Traditional Chinese Medicine, 2021, 7(1): 97-103.
- [17] JI R Y, GUAN L Y, HU Z Y, et al. A comprehensive review on hemocyanin from marine products: structure, functions, its implications for the food industry and beyond[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 269(1): 132041.
- [18] HAN L, LI Y T, JIANG J Q, et al. Comparison of synthetic methods and identification of several artificial antigens of deoxynivalenol[J]. Molecules, 2023, 28(6): 2 789.

- [19] AHSAN N. Comparative efficiency of ammonium sulfate alone and ammonium sulfate-octanoic acid combined methods in the purification potential of antibodies[J]. *Pure and Applied Biology*, 2019, 8(2): 1 698-1 706.
- [20] 曹金博, 王耀, 胡晓飞, 等. 免疫分析技术在四环素类抗生素残留检测中的应用[J]. *饲料工业*, 2019, 40(12): 53-59.
CAO J B, WANG Y, HU X F, et al. The application of immunoassay technique in the detection of tetracycline antibiotics residue[J]. *Feed Industry*, 2019, 40(12): 53-59.
- [21] 杨兴东, 魏慧雅, 曲扬. 间接竞争 ELISA 检测蜂蜜中氧氟沙星残留[J]. *食品工业科技*, 2024, 45(23): 240-247.
YANG X D, WEI H Y, QU Y. Determination of ofloxacin residues in honey by indirect competition ELISA[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2024, 45(23): 240-247.
- [22] 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 X H, LUO J Z, et al. Preparation of glyphosate monoclonal antibody and establishment of an enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Journal of Food Safety & Quality Detection*, 2023, 14(16): 205-212.
- [23] 李然, 林泽佳, 杨金易, 等. 酶联免疫法检测动物组织及尿液中氟苯尼考与甲砒霉素的残留[J]. *分析化学*, 2018, 46(8): 1 321-1 328.
LI R, LIN Z J, YANG J Y, et al. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for simultaneous determination of florfenicol and thiamphenicol in animal meat and urine[J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2018, 46(8): 1 321-1 328.
- [24] 潘明飞, 李诗洁, 郭丹丹, 等. 间接竞争酶联免疫分析方法检测花生中黄曲霉毒素 B₁[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(9): 255-261.
PAN M F, LI S J, GUO D D, et al. Determination of aflatoxin B₁ in peanut by indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(9): 255-261.
- [25] 杨金易, 张燕, 曾道平, 等. 基于 QuEChERS 前处理技术的水产品中喹诺酮类药物多残留 ELISA 检测方法的建立[J]. *食品工业科技*, 2015, 36(1): 292-298.
YANG J Y, ZHANG Y, ZENG D P, et al. Simultaneous determination of fluoroquinolones in seafood by modified QuEChERS and enzyme-linked immunosorbent assay[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2015, 36(1): 292-298.
- [26] HU G S, LIU Z Y, ZHANG Y Q, et al. Quantum dot-based biomimetic fluorescence immunoassays for enrofloxacin detection in animal-derived foods[J]. *Analytical Methods: Advancing Methods and Applications*, 2024, 16(48): 8 390-8 398.
- [27] 杨伟. 虾和贝中恩诺沙星免疫层析法的建立[D]. 南昌: 南昌大学, 2022: 30.
YANG W. Establishment of immunochromatographic assay for the detection of enrofloxacin in shrimp and shellfish[D]. Nanchang: Nanchang University, 2022: 30.
- [28] 穆洪涛, 李嘉慧, 刘凤银, 等. 恩诺沙星残留酶联免疫分析法的建立[J]. *广东第二师范学院学报*, 2020, 40(5): 61-67.
MU H T, LI J H, LIU F Y, et al. Establishment of enrofloxacin residual enzyme immunoassay[J]. *Journal of Guangdong University of Education*, 2020, 40(5): 61-67.
- [29] 丁丽军, 张家禾, 周作红, 等. 恩诺沙星完全抗原的制备与鉴定及其多克隆抗体的制备[J]. *江西农业大学学报*, 2014, 36(3): 661-664.
DING L J, ZHANG J H, ZHOU Z H, et al. Preparation and identification of the complete antigen with enrofloxacin and production of polyclonal antibodies against enrofloxacin[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2014, 36(3): 661-664.
- [30] 张家禾, 周作红, 洪伟鸣, 等. 抗恩诺沙星单克隆抗体的制备与鉴定[J]. *江西农业大学学报*, 2013, 35(5): 1 070-1 073.
ZHANG J H, ZHOU Z H, HONG W M, et al. Preparation and identification of monoclonal antibodies against enrofloxacin[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2013, 35(5): 1 070-1 073.
- [31] WANG P X, WANG L, LI C, et al. Reliable and rapid detection and quantification of enrofloxacin using a ratiometric SERS aptasensor[J]. *Molecules*, 2022, 27(24): 8 764.
- [32] BAO X L, WANG S Y, HAO Q F, et al. Enrofloxacin rapid detection in aquatic foods: based on DNA aptamer sensor[J]. *Foods*, 2024, 13(6): 941.
- [33] WANG W Q, WANG R H, LIAO M, et al. Rapid detection of enrofloxacin using a localized surface plasmon resonance sensor based on polydopamine molecular imprinted recognition polymer[J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2021, 15(4): 1-11.
- [34] CHEN X L, XU H Y, LAI W H, et al. A sensitive chromatographic strip test for the rapid detection of enrofloxacin in chicken muscle[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 2012, 29(3): 383-391.
- [35] YU F, YU S C, YU L L, et al. Determination of residual enrofloxacin in food samples by a sensitive method of chemiluminescence enzyme immunoassay[J]. *Food Chemistry*, 2014, 149: 71-75.
- [36] LU N, BU M C, ZHANG C, et al. Development of a rapid detection method for enrofloxacin in food[J]. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 2024, 40(4): 3 931-3 949.
- [37] ZHANG B, LANG Y H, GUO B W, et al. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on broad-spectrum antibody for simultaneous determination of thirteen fluoroquinolone antibiotics in rana catesbeianus[J]. *Foods*, 2023, 12(13): 2 530.
- [38] 李坚, 张富源, 刘敏轩, 等. 基于金纳米颗粒信号放大 ELISA 检测食品中恩诺沙星[J]. *食品科学*, 2021, 42(24): 311-317.
LI J, ZHANG F Y, LIU M X, et al. Development and application of a gold nanoparticle-based signal amplification enzyme linked immunosorbent assay for the detection of enrofloxacin in food samples[J]. *Food Science*, 2021, 42(24): 311-317.