

DOI: 10.13652/j.spjx.1003.5788.2025.80598

磺胺二甲氧嘧啶的间接竞争酶联免疫检测方法建立

韩 露^{1,2} 黄明月^{1,2} 于 翔^{1,2} 李思佳^{1,2} 曹金博³ 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; 3. 华南师范大学化学学院, 广东 广州 510000)

摘要: [目的] 建立动物性食品中磺胺二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine, SDM)的间接竞争酶联免疫检测方法(indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA)。**[方法]** 采用重氮化法将 SDM 与载体蛋白偶联合成人工抗原, 通过动物免疫制备 SDM 的高敏感性抗体, 在此基础上建立 ic-ELISA, 优化检测体系, 对其检测性能进行鉴定并进行添加回收试验。**[结果]** 当包被抗原质量浓度为 0.500 $\mu\text{g/mL}$ 、羊抗兔酶标二抗稀释倍数为 1:5 000、一抗反应时间为 15 min、二抗反应时间为 30 min、显色时间为 10 min 时, 建立的 ic-ELISA 方法半数抑制质量浓度(IC_{50} 值)为 9.33 ng/mL, 检测范围为 0.76~114.82 ng/mL, 检测限为 0.74 ng/mL, 且具有良好的精密度和特异性, 在牛奶、鸡肉和猪肉样品中有较高的添加回收率。**[结论]** 该方法可用于牛奶、鸡肉、猪肉实际样品中 SDM 残留的灵敏、精密、特异、准确检测, 可为现场高效筛查提供有效的检测手段。

关键词: 磺胺二甲氧嘧啶; 动物性食品; 间接竞争; 酶联免疫吸附法

Establishment of an indirect competitive ELISA for sulfadimethoxine

Han Lu^{1,2} Huang Mingyue^{1,2} Yu Xiang^{1,2} Li Sijia^{1,2} Cao Jinbo³ 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; 3. School of Chemistry, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: [Objective] To establish an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) for the detection of sulfadimethoxine (SDM) in animal-derived foods. [Methods] An artificial antigen is synthesized by conjugating SDM with carrier proteins by the diazotization method. A highly sensitive antibody against SDM is prepared by immunizing animals. Based on this, an ic-ELISA is established and the detection system is optimized. Its detection performance is characterized, and spiked recovery tests are carried out. [Results] When the concentration of the coating antigen is 0.500 $\mu\text{g/mL}$, the dilution ratio of the horseradish peroxidase-labeled goat anti-rabbit secondary antibody is 1:5000, the reaction time of the primary antibody is 15 min, the reaction time of the secondary antibody is 30 min, and the chromogenic reaction time is 10 min, the established ic-ELISA exhibits an IC_{50} of 9.33 ng/mL, a detection range of 0.76~114.82 ng/mL, and a limit of detection of 0.74 ng/mL, with good precision and specificity, and satisfactory spiked recovery rates in milk, chicken, and pork samples. [Conclusion] This method can be applied to the sensitive, precise, specific and accurate detection of SDM residues in real samples of milk, chicken, and pork, providing an effective means for efficient on-site screening.

Keywords: sulfadimethoxine; food of animal origin; indirect competitive; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

基金项目: 河南省高校青年骨干教师培养计划(编号:2023GGJS046); 国家级大学生创新训练计划项目(编号:202410464052); 河南省科技攻关项目(编号:252102320246, 242102321131); 河南省研究生教育改革与质量提升工程项目(编号:HNYS2020JD06)

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: 2025-06-29 **改回日期:** 2026-04-27

引用格式: 韩露, 黄明月, 于翔, 等. 磺胺二甲氧嘧啶的间接竞争酶联免疫检测方法建立[J]. 食品与机械, 2026, 42(7): 52-59.

Citation: Han Lu, Huang Mingyue, Yu Xiang, et al. Establishment of an indirect competitive ELISA for sulfadimethoxine[J]. Food & Machinery, 2026, 42(7): 52-59.

磺胺类药物(sulfonamides, SAs)能够抑制细菌的生长与繁殖,其抗菌作用主要源于对细菌叶酸代谢过程的干扰,是一类具有广谱抗菌特性的药物。SAs被广泛应用于畜禽养殖中细菌性疾病和原虫病的防治,该类药物易在动物源性食品(肉、蛋、奶)中残留^[1-2],过量的SAs积累会对人体健康产生危害,具体症状表现为皮疹和过敏反应^[3],严重时会导致神经系统、免疫系统和泌尿系统疾病,甚至还会引发致畸、致癌等作用^[4-5]。GB 31650.1—2022《食品安全国家标准 食品中41种兽药最大残留限量》规定SAs在牛奶、鸡肉和猪肉中最大残留量为100 $\mu\text{g}/\text{kg}$,因此,为满足食品安全标准要求并提高监管效率,开展动物源性食品中SAs残留的快速检测尤为重要。

目前免疫学快速检测方法是SAs残留检测的常用方法,其中酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)是该类方法的典型代表^[6-8],被广泛应用于磺胺二甲基嘧啶、磺胺嘧啶等SAs残留检测。磺胺二甲氧嘧啶(sulfadimethoxine, SDM)是一种常用的磺胺类药物,具有广谱抗菌性、有效性和经济性^[9-10],SDM经常与甲氧苄啶联用治疗猪链球菌病^[11],与二甲氧苄啶联用治疗鸡球虫病^[12],虽然ELISA在SDM残留检测中已有相关研究与应用,但相对于其他SAs残留检测方法研究仍然偏少,且相关研究对于实际样品的应用范围有限,对于样品基质效应的消除缺乏深入探讨。

研究拟合成SDM人工抗原,免疫新西兰大白兔以制备多克隆抗体,基于该抗体建立间接竞争酶联免疫检测方法(indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay, ic-ELISA),并选取食品安全抽检中SAs残留的高风险样品(牛奶、鸡肉、猪肉)进行基质效应研究和添加回收试验,旨在为SDM的快速筛查提供简便有效的工具。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新西兰大白兔:河南斯克贝斯生物科技股份有限公司;

SDM、磺胺间甲氧嘧啶(SMM)、磺胺二甲基嘧啶(SM2)、磺胺甲噁唑(SMZ)、磺胺嘧啶(SD)、磺胺氯吡嗪钠(SPZ)、磺胺喹噁啉钠(SQ-Na)、牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂(FCA)、弗氏不完全佐剂(FIA):美国Sigma公司;

辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(GaRIgG-HRP,以下简称二抗):美国Jackson ImmunoResearch公司;

二甲亚砜(DMSO):天津市德恩化学试剂有限公司;

96孔聚苯乙烯酶标板:海门施海英实验分析仪器经营部;

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:MS-H280-pro型,大龙兴创实验仪器(北

京)股份公司。

1.2 试验方法

1.2.1 人工抗原合成与鉴定 采用重氮化法^[13-14]合成SDM-BSA、SDM-OVA人工抗原。称取适量SDM溶解于稀盐酸溶液,后续步骤根据文献[13]中的方法进行人工抗原合成,SDM-OVA人工抗原用相同方法制备。在200~320 nm波长区间内,利用UV-2100紫外可见分光光度计对质量浓度相同的SDM、BSA、OVA、SDM-BSA和SDM-OVA溶液进行扫描鉴定。通过分析各物质特征吸收峰的波长位移,对偶联效果进行初步验证。

1.2.2 抗体的制备与鉴定 采用背部皮下注射的方法免疫2只新西兰大白兔,首次免疫剂量为每只2 mL免疫原,SDM-BSA质量浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$;共进行3次加强免疫,每次间隔14 d,将FCA替换为FIA,每次免疫剂量为每只2 mL免疫原,SDM-BSA质量浓度为75 $\mu\text{g}/\text{mL}$;最后一次加强免疫10 d后采集兔子心脏血,获得多抗血清,采用硫酸铵—辛酸联合法^[15]对血清进行纯化。

根据文献[16]中间接ELISA(indirect enzyme-linked immunosorbent assay, i-ELISA)方法进行试验,将包被原换为SDM-OVA测定抗体效价^[17],根据文献[18]中的方法建立标准抑制曲线,计算其半数抑制浓度(IC_{50})进行敏感性鉴定。

1.2.3 检测体系优化

(1) 包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数:根据文献[19]的方法进行优化。将SDM-OVA用CBS溶液分别稀释为0.125, 0.250, 0.500, 1.00, 2.00, 4.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 进行包板,一抗孵育时间为15 min、二抗稀释倍数为5 000倍、二抗孵育时间为30 min,选取 IC_{50} 值最低的组合为最佳工作条件。

(2) 一抗孵育时间:在最佳包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数的条件下,将一抗分别孵育10, 15, 20, 25 min,二抗稀释倍数为5 000倍、二抗孵育时间为30 min,选取 IC_{50} 值最低的孵育时间为最佳时间。

(3) 二抗稀释倍数:在确定最佳包被抗原质量浓度、抗体稀释倍数和一抗孵育时间的条件下,二抗稀释倍数以3 000倍, 5 000倍, 8 000倍, 10 000倍, 12 000倍稀释,二抗孵育时间为30 min,选取 IC_{50} 值最低的稀释倍数为最佳倍数。

(4) 二抗孵育时间:在确定最佳包被抗原质量浓度、抗体稀释倍数、一抗孵育时间和二抗稀释倍数的条件下,将二抗分别孵育20, 30, 40, 50 min,选取 IC_{50} 值最低的孵育时间为最佳时间。

1.2.4 ic-ELISA检测性能评价

(1) 灵敏度:在最优试验条件下,根据文献[18]中的操作步骤建立标准抑制曲线,并求出其 IC_{50} 和检测范围($\text{IC}_{90}\sim\text{IC}_{10}$),根据文献[20]的方法计算得出检测限(limit of detection, LOD)。

(2) 精密度:为鉴定 ic-ELISA 方法的精密度,通过绘制标准曲线计算批间和批内 IC_{50} 值和阳性孔 OD_{450} 值的变异系数(coefficient of variation, CV)进行鉴定^[21],对照《酶联免疫吸附法检测试剂盒》(YY/T 1183—2024), CV 越低,精密度越高。

(3) 特异性:利用已建立的 ic-ELISA 方法,通过测定 SMM、SM2、SMZ、SD、SPZ、SQ-Na 的交叉反应率进行方法特异性的鉴定。根据文献[22]的方法计算 CR 值。CR 值越小,特异性越好。

(4) 准确度:选择食品安全抽检中 SAs 不合格情况较多的高风险样品,利用添加回收试验鉴定方法的准确度。根据文献[23]的方法处理牛奶样品;鸡肉和猪肉样品各取 5 g 研磨成匀浆,转移至 2 个 50 mL 离心管中,每管加 5 mL 甲醇作为样品提取液,振荡 15 min, 8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液^[24-25]。为了消除基质效应的干扰,将 PBS 作为稀释液对 3 类样品分别稀释 5 倍, 10 倍, 15 倍, 20 倍, 25 倍, 30 倍, 根据建立的 ic-ELISA 方法绘制基质曲线并与标准曲线进行对比,选出最优稀释倍数用于后续试验^[26]。选取 3 类经处理的阴性样品,分别添加 5, 10, 15, 20 ng/mL 4 个浓度水平的 SDM 标准溶液,用 ic-ELISA 方法进行检测,计算平均回收率及相对标准偏差^[27] (relative standard deviation, RSD)从而对方法准确度进行评价。

1.3 数据处理

试验结果取 3 次平行试验的平均值,相关数据处理及绘图分别使用 Microsoft Office 2019 与 Origin 2021 软件进行。

2 结果与分析

2.1 人工抗原的紫外鉴定

选择 BSA 和 OVA 作为偶联载体蛋白,合成免疫原 SDM-BSA 和包被原 SDM-OVA,采用紫外分光光度法对其进行鉴定,结果如图 1 所示,SDM 在 271, 220 nm 处有吸收峰,载体蛋白 BSA 的吸收峰为 279, 221 nm, OVA 的吸

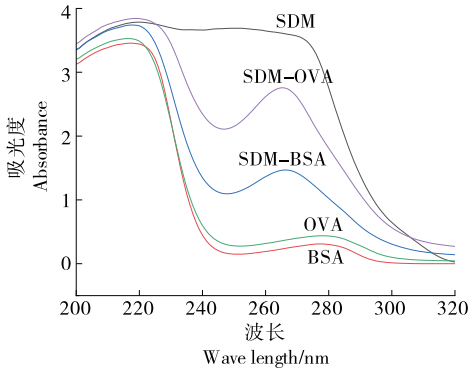


图 1 SDM 人工抗原的紫外—可见吸收光谱图
Figure 1 UV-visible absorption spectra of SDM artificial antigen

收峰为 267, 221 nm。人工抗原 SDM-BSA、SDM-OVA 的吸收峰在 267 nm 处均向左偏移,在 221, 223 nm 处出现明显的峰值向右偏移,初步判定人工抗原合成成功。

2.2 抗体的制备与鉴定

SDM 抗体的效价采用 i-ELISA 法测定,结果见表 1。经 4 次加强免疫后,2 只试验兔子的多抗血清效价均达到 1:128 000 以上,表明所合成的 SDM 人工抗原具有良好的免疫原性,能够有效诱导体产生。其中 2 号兔子的抑制效果显著,标准抑制曲线如图 2 所示,线性回归方程为 $y = -0.274x + 0.780$, $R^2 = 0.981$, IC_{50} 为 10.47 ng/mL,与张玉超等^[28]所制备的 IC_{50} 为 8.39 ng/mL 鼠单抗相当。

表 1 抗体效价测定结果
Table 1 Determination of antibody titer

血清稀 释倍数	兔子 1	兔子 2	血清稀 释倍数	兔子 1	兔子 2
2 000	4.809	4.800	128 000	0.289	0.292
4 000	3.829	4.265	256 000	0.188	0.219
8 000	2.829	3.245	512 000	0.117	0.115
16 000	1.758	1.765	1 024 000	0.112	0.098
32 000	0.932	1.108	2 048 000	0.091	0.109
64 000	0.529	0.474	空白	0.061	0.066

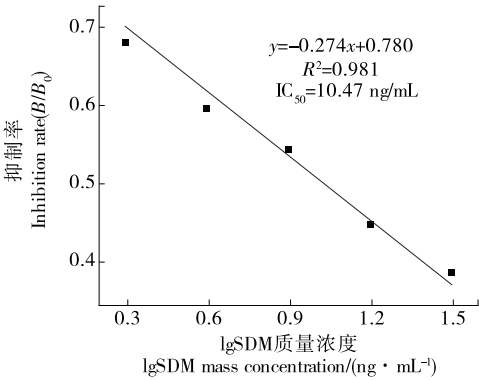


图 2 标准抑制曲线
Figure 2 Standard suppression curve

2.3 检测体系优化

2.3.1 最佳包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数的确定

采用棋盘试验确定包被抗原质量浓度及抗体稀释倍数。由表 2 和图 3 可知, IC_{50} 随着包被抗原质量浓度的降低,呈现出先降低后升高的趋势,包被抗原质量浓度过高会导致 SDM 与 SDM-OVA 竞争不充分,质量浓度过低会导致结合量过少,灵敏度下降。最终选择包被抗原质量浓度为 0.500 μ g/mL,抗体稀释倍数为 1:32 000 时作为最佳试验条件。

2.3.2 一抗孵育时间的确定 如图 4 所示, IC_{50} 值最低时,一抗孵育时间为 15 min。随着—抗时间的增加, IC_{50} 值先降低后升高,在 15 min 时达到最低。—抗孵育时间过短,

表2 工作浓度的优化

抗体稀释倍数	包被抗原质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)					
	0.125	0.250	0.500	1.00	2.00	4.00
16 000	0.994	1.322	2.085	2.255	2.631	2.755
32 000	0.574	0.719	1.122	1.238	1.568	1.700
64 000	0.327	0.384	0.659	0.685	0.790	0.905
128 000	0.203	0.233	0.293	0.342	0.442	0.483
256 000	0.127	0.154	0.197	0.182	0.253	0.247
512 000	0.090	0.118	0.126	0.127	0.153	0.164
1 024 000	0.083	0.093	0.098	0.094	0.112	0.126
2 048 000	0.071	0.077	0.091	0.077	0.091	0.108
空白	0.053	0.052	0.051	0.047	0.046	0.050

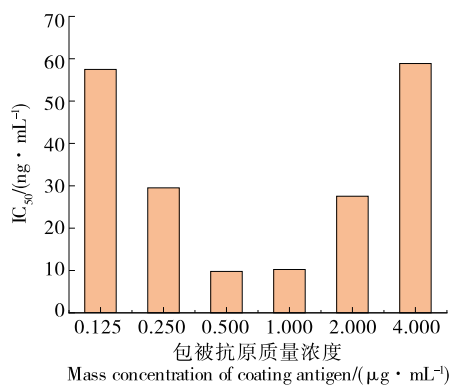


图3 包被抗原质量浓度的优化

Figure 3 Optimization of coating antigen concentration

抗体与包被抗原的结合反应不充分,无法实现有效竞争;孵育时间过长,则会导致抗体的非特异性结合现象显著增加,从而降低检测的灵敏度。因此,选择15 min作为一抗的最佳孵育时间。

2.3.3 二抗稀释倍数的确定 如图5所示, IC_{50} 值最低时,二抗稀释倍数为5 000倍。随着二抗稀释倍数的增加, IC_{50} 值先降低后升高,在5 000倍时达到最低。二抗可以

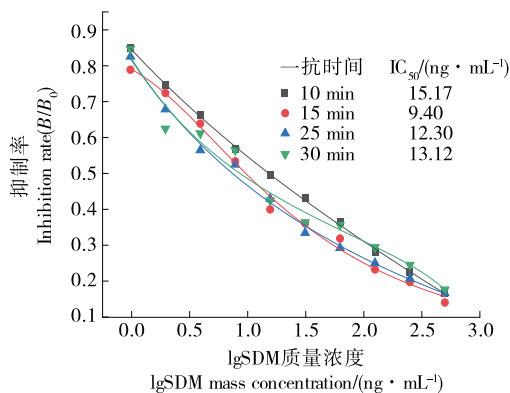


图4 一抗孵育时间的优化

Figure 4 Optimization of incubation time of primary antibody

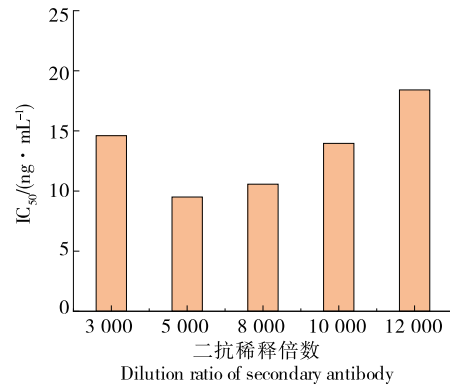


图5 二抗稀释倍数的优化

Figure 5 Optimization of dilution factor of secondary antibody

高效催化底物转化,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SDM检测困难,从而降低检测灵敏度。因此,选择5 000倍作为二抗的最佳稀释倍数。

2.3.4 二抗孵育时间的确定 如图6所示, IC_{50} 值最低时,二抗孵育时间为30 min。随着二抗孵育时间的增加, IC_{50} 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一抗和二抗结合反应不完全;孵育时间过长则会引起非特异性结合,降低检测灵敏度。因此,选择30 min作为二抗的最佳孵育时间。

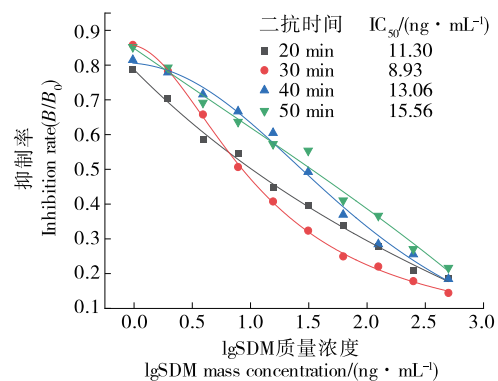


图6 二抗孵育时间的优化

Figure 6 Optimization of incubation time of secondary antibody

2.4 方法检测性能鉴定

2.4.1 灵敏度 通过检测体系优化,建立了ic-ELISA方法,如图7所示,该方法线性方程为 $y = -0.368x + 0.857$, $R^2 = 0.998$, IC_{50} 为9.33 ng/mL,检测范围为0.76~114.82 ng/mL。对不含SDM的空白样品重复检测10次,根据公式计算得出LOD为0.74 ng/mL,该方法灵敏度较好。如表3所示,将试验方法与现有文献方法进行对比,试验方法的灵敏度优于其他检测方法,在同类免疫分析技术中,其灵敏度达到了与基于单克隆抗体的免疫学检测方法相当的水平^[28]。

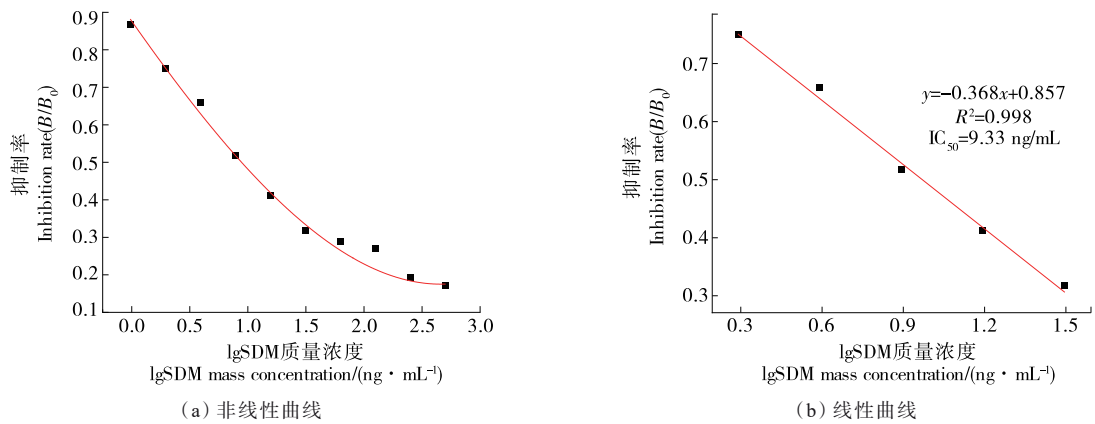


图 7 ic-ELISA 标准抑制曲线
Figure 7 Standard suppression curves of ic-ELISA

表 3 ic-ELISA 方法与文献报道方法的比较[†]
Table 3 Comparison between the methods reported in the literature and ic-ELISA method

检测方法	检测范围/ (ng·mL ⁻¹)	检测限	实际样品	文献
生物传感器检测法	/	0.9 μg/L	鸡蛋	[29]
荧光传感检测法	10~250	1.54 ng/mL	水、鱼肉	[30]
超灵敏纳米ELISA	/	0.2 μg/kg	鸡肝	[31]
ELISA 方法	/	0.27 ng/mL	水、牛乳	[28]
ELISA 方法	/	16.64 ng/mL	/	[32]
ic-ELISA 方法	0.76~114.82	0.74 ng/mL	牛奶、鸡肉、猪肉	

[†] “/”表示文献中未提及。

表 4 精密度鉴定结果
Table 4 Precision identification of ic-ELISA method (n=3)

批号/ 平行	批间精密度		批内精密度	
	IC ₅₀ / (ng·mL ⁻¹)	OD ₄₅₀ 值	IC ₅₀ / (ng·mL ⁻¹)	OD ₄₅₀ 值
1	9.77±0.33	1.05±0.05	9.55±0.14	1.08±0.01
2	8.71±0.47	1.02±0.01	9.12±0.28	0.97±0.01
3	9.12±0.67	0.96±0.01	9.33±0.14	0.98±0.02
4	8.91±0.53	0.94±0.01	8.91±0.18	1.05±0.06
平均值	9.13±0.46	0.99±0.02	9.23±0.27	1.03±0.03
CV/%	5.03	2.02	2.92	2.91

2.4.2 精密度 通过对不同批次和同批次包被的酶标板进行 ic-ELISA 方法检测,其 IC₅₀值和 OD₄₅₀值如表 4 所示,批间和批内的 CV 均小于 15%,表明所建立的方法精密度良好。

2.4.3 特异性 在实际样品检测中,为避免和其他磺胺类药物的干扰,通常采用 ic-ELISA 方法分析 SDM 类似物的交叉反应率。如表 5 所示,与 SM2、SMZ、SD、SPZ、SQ-

表 5 ic-ELISA 方法特异性鉴定结果
Table 5 Specificity identification of ic-ELISA method

其他磺胺类药物	IC ₅₀ /(ng·mL ⁻¹)	交叉反应率 CR/%
磺胺间甲氧嘧啶(SMM)	202.77	4.6
磺胺二甲基嘧啶(SM2)	>1.00×10 ⁴	<0.1
磺胺甲噁唑(SMZ)	>1.00×10 ⁴	<0.1
磺胺嘧啶(SD)	>1.00×10 ⁴	<0.1
磺胺氯吡嗪钠(SPZ)	>1.00×10 ⁴	<0.1
磺胺喹噁啉钠(SQ-Na)	>1.00×10 ⁴	<0.1

Na 无交叉反应,仅与 SMM 有 4.6% 的交叉反应,说明所建立的方法特异性较好。

2.4.4 准确度 将 3 种样品稀释 5 倍,10 倍,15 倍,20 倍,25 倍,30 倍后,利用建立的 ic-ELISA 方法绘制其标准曲线。牛奶样品在各稀释倍数下及 PBS 对照中的 IC₅₀ 值如图 8 所示,分别为 21.88,11.22,19.95,31.62,39.81,26.92,9.55 ng/mL;鸡肉样品在 5 倍,10 倍,15 倍,20 倍,25 倍,30 倍稀释下和 PBS 条件下的 IC₅₀ 分别为 331.13,102.33,67.61,43.65,9.77,69.18,9.55 ng/mL;猪肉样品在 5 倍,10 倍,15 倍,20 倍,25 倍,30 倍稀释下和 PBS 条件下的 IC₅₀ 分别为 97.72,72.44,45.71,13.80,54.95,77.62,9.77 ng/mL。随着甲醇稀释倍数的增大,IC₅₀ 逐渐降低,甲醇浓度过高会抑制酶活性导致灵敏度降低,结果表明,牛奶、鸡肉、猪肉样品经前处理后,分别稀释 10 倍,25 倍,20 倍时的 IC₅₀ 值与 PBS 溶液条件下的 IC₅₀ 最为接近,可有效消除基质干扰。因此,最终确定采用上述稀释倍数进行处理。

牛奶、鸡肉、猪肉样品标准抑制曲线如图 9 所示,牛奶样品线性方程为 $y = -0.273x + 0.808$, $R^2 = 0.993$, IC₅₀ 为 13.49 ng/mL,检测范围为 0.46~389.05 ng/mL,LOD 为 0.40 ng/mL;鸡肉样品线性方程为 $y = -0.329x + 0.866$, $R^2 = 0.994$, IC₅₀ 为 12.88 ng/mL,检测范围为 0.79~228.03 ng/mL,LOD 为 0.69 ng/g;猪肉样品线性方程为 $y =$

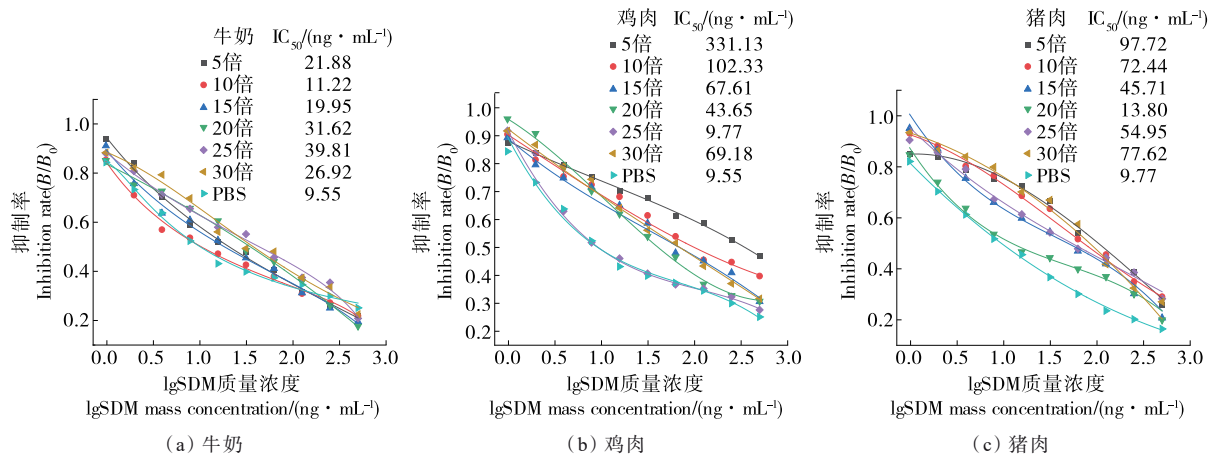


图8 3种样品的基质效应消除试验结果

Figure 8 Matrix effect elimination experiment for three samples

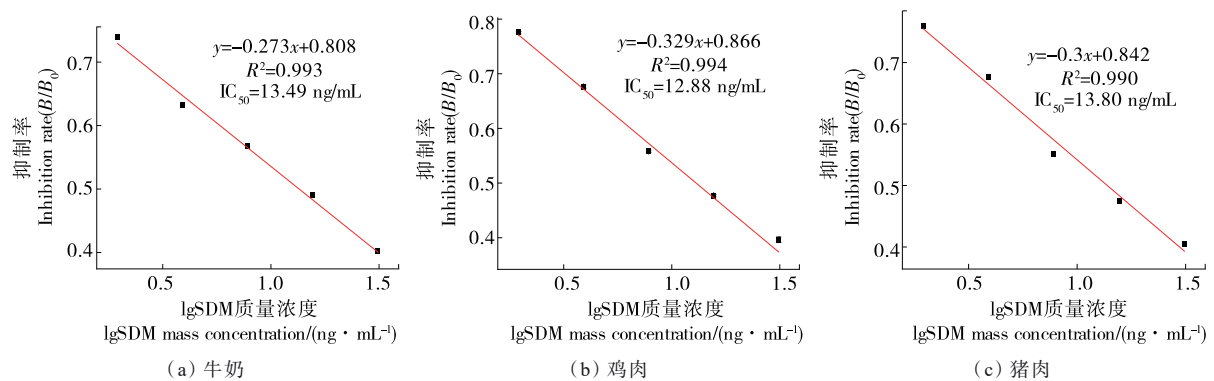


图9 3种样品的ic-ELISA方法标准抑制曲线

Figure 9 ic-ELISA standard inhibition curves of three samples

$-0.3x + 0.842$, $R^2 = 0.990$, IC_{50} 为 13.80 ng/mL , 检测范围为 $0.65 \sim 295.12 \text{ ng/mL}$, LOD 为 0.61 ng/g , 3种样品均具有较好的灵敏度。

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。由表6可知,牛奶、鸡肉和猪肉样品中SDM的回收率范围分别为 $92.34\% \sim 97.40\%$, $94.80\% \sim 96.74\%$, $94.05\% \sim 98.14\%$, CV 分别为 $1.95\% \sim 4.79\%$, $2.74\% \sim 4.82\%$, $2.02\% \sim 6.16\%$,建立的ic-ELISA方法准确度高。

2.5 方法验证

将ic-ELISA方法与GB 31658.17—2021《食品安全国家标准 动物性食品中四环素、磺胺类和喹诺酮类药物多残留的测定 液相色谱—串联质谱法》进行对比验证。液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS)的标准曲线如图10所示,其线性方程 $y = 1493.584x + 129.280$, $R^2 = 0.994$ 。如表7所示,ic-ELISA方法与LC-MS/MS法具有良好的一致性。因此,研究建立的ic-ELISA方法可以实现对样品中磺胺二甲氧嘧啶的定量检测。

表6 添加回收试验[†]

Table 6 Spiked recovery experiments

样品	添加值	检测值	回收率/%	CV/%
牛奶	5	4.62 ± 0.09	92.34 ± 1.83	1.95
	10	9.64 ± 0.44	96.38 ± 4.39	4.56
	15	14.61 ± 0.70	97.40 ± 4.69	4.79
	20	18.78 ± 0.68	93.88 ± 3.42	3.62
鸡肉	5	4.77 ± 0.23	95.36 ± 4.68	4.82
	10	9.53 ± 0.35	95.25 ± 3.48	3.67
	15	14.22 ± 0.39	94.80 ± 2.62	2.74
	20	19.35 ± 0.80	96.74 ± 4.00	4.13
猪肉	5	4.80 ± 0.11	96.03 ± 2.26	2.29
	10	9.41 ± 0.58	94.05 ± 5.78	6.16
	15	14.36 ± 0.29	95.72 ± 1.94	2.02
	20	19.63 ± 0.85	98.14 ± 4.26	4.33

[†] 牛奶添加值和检测值单位为 ng/mL , 鸡肉和猪肉添加值和检测值单位为 ng/g 。

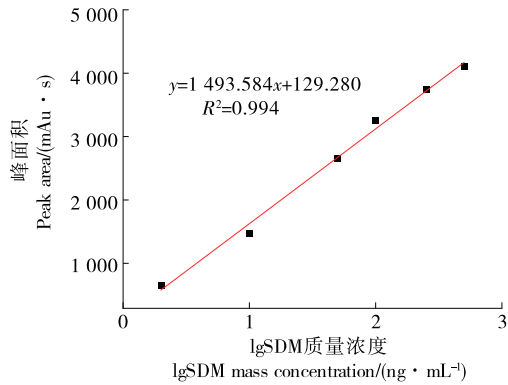


图 10 LC-MS/MS 法标准曲线
Figure 10 Standard curve for LC-MS/MS

表 7 LC-MS/MS 法和 ic-ELISA 方法样品的检测结果[†]
Table 7 Detection of samples by LC-MS/MS and ic-ELISA

样品	添加值	检测值	
		LC-MS/MS 法	ic-ELISA 方法
牛奶	10	10.86±0.88	11.10±0.54
鸡肉	10	11.63±0.95	12.45±0.61
猪肉	10	12.04±0.78	11.09±0.20

[†] 牛奶添加值和检测值单位为 ng/mL, 鸡肉和猪肉添加值和检测值单位为 ng/g。

3 结论

研究利用获得的磺胺二甲氧嘧啶高敏感性抗体, 基于抗原抗体特异性结合与酶催化反应的原理, 建立了对动物性食品中磺胺二甲氧嘧啶的快速检测方法, 并对检测体系进行优化, 最后对方法性能进行评价。该方法 IC₅₀ 为 9.33 ng/mL, 灵敏度为 0.74 ng/mL, 检测范围为 0.76~114.82 ng/mL, 批内批间的 IC₅₀ 和 OD₄₅₀ 值的标准偏差均小于 15%, 与磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噁唑、磺胺嘧啶、磺胺氯吡嗪钠、磺胺喹噁啉钠无交叉反应, 仅与磺胺间甲氧嘧啶有 4.6% 的交叉反应, 牛奶、鸡肉和猪肉样品中磺胺二甲氧嘧啶的回收率均高于 90%, 变异系数均小于 10%。建立的间接竞争酶联免疫吸附方法具有灵敏度高、特异性强、准确度高、方便快捷、分析成本低、安全可靠等优点, 能够应用于市场抽检中牛奶、鸡肉和猪肉 3 种高风险典型样品的检测, 可为现场高效筛查提供有效的检测手段。

参考文献

[1] Qiu J R, Zhao T, Liu Q Y, et al. Residual veterinary antibiotics in pig excreta after oral administration of sulfonamides[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2016, 38(2): 549-556.
[2] Chen Y N, Liu L Q, Xu L G, et al. Gold immunochromatographic sensor for the rapid detection of twenty-six sulfonamides in

foods[J]. Nano Research, 2017, 10(8): 2 833-2 844.
[3] Kliangsuwan A, Phonchai A, Bunkoed O. A magnetic molecularly imprinted polymer hierarchical composite adsorbent embedded with a zinc oxide carbon foam nanocomposite for the extraction of sulfonamides[J]. Microchemical Journal, 2022, 179: 107443.
[4] Liu X W, Lv K, Deng C X, et al. Persistence and migration of tetracycline, sulfonamide, fluoroquinolone, and macrolide antibiotics in streams using a simulated hydrodynamic system [J]. Environmental Pollution, 2019, 252: 1 532-1 538.
[5] Chatzimitakos T, Stalikas C. Zinc ferrite as a magnetic sorbent for the dispersive micro solid-phase extraction of sulfonamides and their determination by HPLC[J]. Microchemical Journal, 2020, 155: 104670.
[6] González-Martínez M Á, Puchades R, Maquieira Á. Modern techniques for food authentication[M]. 2nd ed. Amsterdam: Academic Press, 2018: 617-657.
[7] Liang X, Li J Y, Zhong L J, et al. Highly broad-specific and sensitive direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening multi-antibacterial synergists: assay optimization and application to animal-derived food[J]. Food and Agricultural Immunology, 2020, 31(1): 150-164.
[8] Liu B, Qin Y, Cao M R, et al. A stable and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of metsulfuron-methyl residues in foods[J]. Journal of Food Science, 2021, 86(7): 3 176-3 187.
[9] Liu Q, Shi T Y, Cheng Y, et al. Amplified photocurrent signal for fabricating photoelectrochemical sulfadimethoxine aptasensor based on carbon nitride photosensitization with visible/near-infrared light responsive zinc phthalocyanine[J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 406: 124749.
[10] Chen L, Su J Y, Zhang X Z, et al. Immunogenicity of novel sulfadimethoxide conjugates[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(48): 9 939-9 950.
[11] 李文辉, 孙志文. 超高效液相色谱—串联质谱法同时检测鸡蛋中 5 种磺胺类药物和甲氧苄啶残留量[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(8): 34-40.
Li W H, Sun Z W. Simultaneous determination of five sulfonamide and trimethoprim residues in eggs by ultrahigh-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(8): 34-40.
[12] 王峰, 王国永, 郝雪琴, 等. 二甲氧苄啶对磺胺类药物的抗球虫增效作用研究[J]. 河南农业科学, 2013, 42(2): 142-144.
Wang F, Wang G Y, Hao X Q, et al. Synergistic effect of ditrimethoprim (diaveridine) combinnd with several sulfa drugs on chicken coccidiosis[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2013, 42(2): 142-144.
[13] 王耀, 曹金博, 曹夕丹, 等. 盐酸可乐定人工抗原及其鼠源多抗的制备[J]. 西北农业学报, 2021, 30(11): 1 595-1 602.
Wang Y, Cao J B, Cao X D, et al. Preparation of clonidine

- hydrochloride artificial antigen and its mouse polyclonal antibody[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2021, 30(11): 1 595-1 602.
- [14] Bocharé M D, Degani M S. Polyethylene glycol nitrite (PEG-ONO) as a novel diazotizing agent[J]. *ACS Sustainable Chemistry Engineering*, 2017, 5(5): 3 716-3 720.
- [15] Duan Y P, Luo J Y, Liu C M, et al. Rapid identification of triptolide in *Tripterygium wilfordii* products by gold immunochromatographic assay[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2019, 168: 102-112.
- [16] 王耀, 曹金博, 李铁梅, 等. 盐酸可乐定人工抗原的合成及鼠源多抗血清 ELISA 鉴定[J]. *食品与机械*, 2021, 37(7): 76-80, 111.
- Wang Y, Cao J B, Li T M, et al. Synthesis of artificial antigen and ELISA identification of mouse polyclonal antiserum against clonidine hydrochloride[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(7): 76-80, 111.
- [17] Qi Y H, Sun G P, Zhang G P, et al. Preparation of tiamulin artificial complete antigen and development of its monoclonal antibody[J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2019, 35(2): 174-179.
- [18] Hu G S, Yu Q X, Zhang Y Q, et al. Development of two novel ELISAs based on prussian blue nanoparticles for ultrasensitive detection of norfloxacin in milk[J]. *Food Chemistry*, 2025, 463: 141206.
- [19] Zhou L L, Chen G F, Chen M, et al. Development of a highly sensitive monoclonal antibody-based indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of avilamycin in feed[J]. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 2022, 39(3): 488-498.
- [20] Zhu W X, Zhang J, Zhang Y Y, et al. Establishment of a rapid and sensitive ic-ELISA for the detection of thiacloprid residues in honey and medicinal herbs using a novel highly specific monoclonal antibody[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2024, 284: 116911.
- [21] 谭庶, 杨金易, 许吉华, 等. 鸡肉中金刚烷胺间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J]. *食品科学*, 2020, 41(10): 304-310.
- Tan S, Yang J Y, Xu J H, et al. Development of an indirect competitive enzyme linked immunoassay for the analysis of amantadine in chicken muscle[J]. *Food Science*, 2020, 41(10): 304-310.
- [22] Li J, Ding Y, Chen H, et al. Development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for propiconazole based on monoclonal antibody[J]. *Food Control*, 2022, 134: 108751.
- [23] 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.
- [24] Nhari R M H R, Hanish I, Khairil Mokhtar N F, et al. Authentication approach using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of porcine substances[J]. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, 2019, 11(5): 449-457.
- [25] 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 G X, Zhao D, Sun X F, et al. Detection of sparfloxacin in pork by enzyme linked immunosorbent assay[J]. *Modern Food Science and Technology*, 2022, 38(2): 266-271.
- [26] Liu X, Xie B, Cheng Y, et al. A sensitive monoclonal-antibody-based ELISA for forchlorfenuron residue analysis in food samples[J]. *Biosensors*, 2022, 12(2): 78.
- [27] 蒋文慧, 吴小胜, 崔娜, 等. 一种多菌灵酶联免疫快速检测方法的建立[J]. *食品与机械*, 2021, 37(1): 94-98.
- Jiang W H, Wu X S, Cui N, et al. Establishment of arapid detection method for carbendazim enzyme-linked immunosorbent[J]. *Food & Machinery*, 2021, 37(1): 94-98.
- [28] 张玉超, 周洪波, 刘良禹, 等. 半抗原直接包被的磺胺二甲氧嘧啶酶联免疫吸附分析法的建立[J]. *食品科技*, 2023, 48(3): 303-309.
- Zhang Y C, Zhou H B, Liu L Y, et al. Establishment of hapten coated enzyme-linked immunosorbent assay for sulfadimethoxine [J]. *Food Science and Technology*, 2023, 48(3): 303-309.
- [29] 杜佳音. 用于检测磺胺二甲氧嘧啶的液晶型适配体生物传感器[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2019: 40-42.
- Du J Y. Aptamer biosensors based on liquid crystals for the detection of sulfadimethoxine[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2019: 40-42.
- [30] 陈香秀. 基于核酸适配体荧光传感检测水产品中磺胺二甲氧嘧啶[D]. 厦门: 集美大学, 2019: 61-62.
- Chen X X. Detection of sulfadimethoxine in aquatic products based on aptamer fluorescence sensors[D]. Xiamen: Jimei University, 2019: 61-62.
- [31] Peng C F, Duan X H, Pan Q L, et al. Ultrasensitive nano-ELISA for detecting sulfadimethoxine in chicken tissue[J]. *Journal of Chemistry*, 2013, 2 013(1): 234178.
- [32] 刘宣兵, 鲁晓翠, 张改平, 等. 磺胺二甲氧嘧啶单克隆抗体的制备及其免疫学特性鉴定[J]. *核农学报*, 2008, 22(5): 739-744.
- Liu X B, Lu X C, Zhang G P, et al. Preparation and immunological trait of monoclonal antibody for sulfadimethoxine[J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2008, 22(5): 739-744.