

朱暖飞,董帅兵,张 祯. 环境中氨基脲的高通量酶联免疫法检测[J]. 江苏农业科学,2018,46(20):313-315,324.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.20.078

环境中氨基脲的高通量酶联免疫法检测

朱暖飞,董帅兵,张 祯

(江苏大学环境与安全工程学院,江苏镇江 212013)

摘要:以实验室所制备的硝基呋喃类代谢物——氨基脲(SEM)的单克隆抗体,建立一种高通量快速检测环境中氨基脲的间接竞争酶联免疫分析方法(IC-ELISA)。为了提高该方法的检测灵敏度,对反应体系中缓冲液的 pH 值、甲醇含量、离子强度等进行优化。在最优条件下,本方法的检测限可达 $0.059 \mu\text{g/L}$ 。本方法具有较高的准确性(空白加标回收率为 $87.8 \sim 111.2\%$,样品加标回收率为 $96.9 \sim 120.6\%$)、较宽的检测范围($0.179 \sim 8.627 \mu\text{g/L}$)。利用该方法对镇江地区中水体与土壤中的 SEM 进行调查研究,发现 SEM 被普遍检出,其中水样中 SEM 的浓度为 $0.431 \sim 1.325 \mu\text{g/L}$,土壤中浓度为 0.205 ng/g 。

关键词:氨基脲;高通量;酶联免疫法;单克隆抗体;镇江;试验条件优化;加标回收试验

中图分类号: X592 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)20-0313-03

硝基呋喃类药物是一类广谱抗生素,由于其对大多数革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌、真菌、原虫等病原体都有强烈的杀灭作用^[1-4],被广泛应用于畜禽及水产养殖业^[2,5-9]。常见的硝基呋喃类药物有呋喃西林、呋喃唑酮等,其结构式如图 1 所示。然而,研究表明,这种药物及其代谢物是一类具有潜在的致癌、致畸和致突变的物质^[4,10-13]。目前我国已将呋喃西林等列为禁用药物,禁止在食品工业中使用该类物质,并将其列入首批《兽药地方标准废止目录》中。但由于此类药物价格低廉、治疗效果佳,非法使用仍然存在。

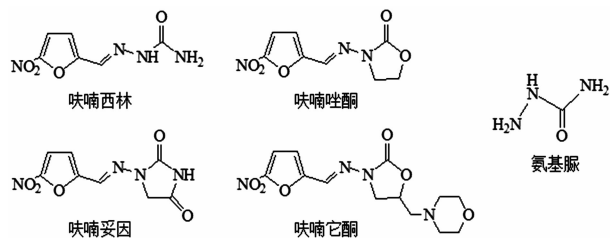


图1 硝基呋喃类药物及其典型代谢物氨基脲(SEM)的结构

硝基呋喃类药物在动物体内的代谢非常迅速,半衰期短,因此这类药物不易被检测,但由于此类物质的代谢产物容易和生物体内的蛋白质结合,形成稳定的化合物残留在动物体或人体当中^[10,14-17],因此,通常通过对硝基呋喃类抗生素的代谢物的研究来推断硝基呋喃类物质的残留情况。氨基脲(SEM)是呋喃西林的特征性代谢产物,以 SEM 作为标示物可以检测呋喃西林的残留^[18-19]。考虑到呋喃西林大量使用,可能导致 SEM 在环境中的广泛存在。所以,建立简单、灵敏、可靠的分析方法,不但可以调查环境中 SEM 的残留现状,进而

评估其生态风险,而且有助于推断畜禽及水产养殖业中呋喃西林的使用状况。目前对于 SEM 的检测方法主要集中于仪器分析方法,如气相色谱-质谱法、LC-MS/MS 等^[2-4,20-26],虽然这些方法灵敏度高、准确性好,但是由于存在测试成本高、分析时间长、检测所需样品量大(通常 $>500 \text{ mL}$)及前处理步骤繁琐等不足,并不能实现在较大范围内系统、全面、快速分析样品中 SEM 的含量。与此相比,酶联免疫法(ELISA)具有操作简便、检测成本低、高通量的特点^[26-28],可用于环境中此种痕量污染物的分析。

因此,本研究利用实验室所制备的可特异性识别 SEM 的单克隆抗体,建立了一种高灵敏度、高通量的间接竞争酶联免疫分析方法(IC-ELISA),并以此对江苏省镇江地区水体与土壤中 SEM 的污染状况进行了调查研究。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氨基脲 SEM 抗原、抗体由笔者所在课题组制备;氨基脲标准品、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG、3,3',5,5'-四甲基联苯胺均购自美国 Sigma 公司;吐温-20(Tween-20)、十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、二水磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、碳酸钠(Na_2CO_3)、碳酸氢钠(NaHCO_3)、浓硫酸(H_2SO_4)明胶等购自阿拉丁化学试剂有限公司,且均为分析纯;96 孔酶标板购自丹麦 NUNC 公司。

碳酸盐包被缓冲液(CBS)为 0.05 mol/L 碳酸氢钠和碳酸钠溶液,pH 值为 9.6;封闭液为含 1% 明胶的 CBS 缓冲液;洗涤液为含体积分数 0.05% Tween-20 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH 值为 7.4;抗体稀释液为含 0.01% Tween-20、0.1% 明胶的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液,pH 值为 7.4;显色液为 $500 \mu\text{L}$ 3,3',5,5'-四甲基联苯胺溶液、10 mL 柠檬酸钠缓冲液、32 μL 0.75% 过氧化氢,用时混合;终止液为 2 mol/L 硫酸溶液。

1.2 仪器设备

电子分析天平、恒温培养箱、多功能酶标仪分别购自重庆

收稿日期:2017-05-21

基金项目:国家自然科学基金(编号:1721370100)。

作者简介:朱暖飞(1991—),男,河北沧州人,硕士,从事环境科学研究。E-mail:zhuananfei@163.com。

通信作者:张 祯,博士,副教授,从事环境科学研究。E-mail:zhzhenok@163.com。

CoiC 公司、上海精密试验设备有限公司和瑞士 Tecan 公司。

1.3 间接酶联免疫分析法试验条件的优化

根据棋盘滴定法测定原则,选取吸光度 D 值为 1 且斜率最大的抗原、抗体浓度组合为本试验中抗原最佳包被浓度、抗体最佳稀释浓度,同时,为了使该方法的检测效果达到最佳,对反应体系甲醇含量、离子强度、pH 值 3 个影响因素进行筛选优化。

1.4 间接酶联免疫分析法的建立

在最优试验条件下建立方法,具体操作步骤如下:

(1)包被:用包被液稀释 SEM 包被原加至 96 孔酶标板中,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 ~ 16 h 或 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 孵育。(2)洗涤:倾去孔内多余液体,用新配制的洗涤液洗涤 5 遍,200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,在吸水纸上将板拍干。(3)封闭:150 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入封闭液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 45 min。(4)洗涤:倾去孔内液体,用新配制的洗涤液洗涤 3 遍,200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,在吸水纸上拍干。(5)竞争:加入不同浓度的标准品或样品和抗体,各 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。(6)洗涤:倾去孔内液体,用新配制的洗涤液洗涤 5 遍,200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,在吸水纸上拍干。(7)加入酶标二抗:加入辣根过氧化物酶-羊抗鼠 IgG 100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。(8)洗涤:倾去孔内液体,用新配制的洗涤液洗涤,200 $\mu\text{L}/\text{孔}$,共洗 5 遍,在吸水纸上拍干。(9)显色:加入新鲜配制的 TMB 底物溶液,100 $\mu\text{L}/\text{孔}$,避光显色 5 min。(10)终止:加入终止液,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。(11)测定:使用多功能酶标仪读取各孔 450 nm 下的吸光度。

1.5 空白加标和样品加标试验

1.5.1 样品前处理 水样处理:取 10 mL 水样,抽滤,向其中加入 8 mL 正己烷,恒温振荡 6 h,离心 2 min,取上清,氮吹至近干,用 2 mL 甲醇复溶。

土壤样品处理:取 5 g 土壤样品,烘干至恒质量,向其中加入 10 mL 正己烷,恒温振荡 12 h,高速离心 5 min,取上清,氮吹至近干,用 2 mL 甲醇复溶。

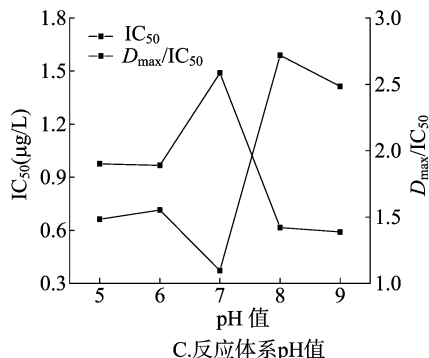
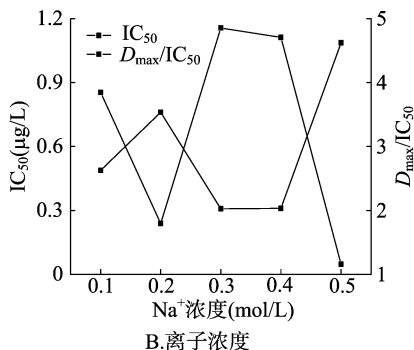
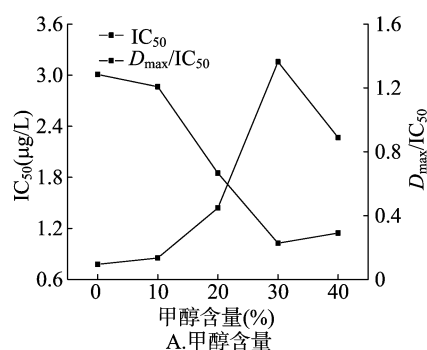


图2 ELISA 的条件优化

2.2 加标回收试验

为了验证方法的准确性,本研究进行了加标回收试验(表1、表2),空白加标回收率在 81.9% ~ 105.6% 之间,变异系数均小于 5%;样品加标回收率在 83.0% ~ 104.0%,变异系数均小于 5%,证明该方法具有良好的重现性和准确度,符合检测要求,可用于实际样品的分析。

2.3 镇江地区水体及土壤样本的测定

硝基呋喃类药物经生物体代谢后,一部分与生物体中的蛋白质结合,稳定存在于动物机体内,另一部分则被排泄到体

1.5.2 加标试验 空白加标试验:取一定量的蒸馏水或自来水或空白土壤,向其中添加线性范围内低、中、高 3 个浓度的 SEM 标准品,每个水平设置 3 个平行重复孔,根据“1.4”节中建立的间接竞争 ELISA 法进行测定。将测定结果代入标准曲线,计算浓度,并根据公式(1)计算添加回收率。

空白回收率 = 测定量($\mu\text{g}/\text{L}$)/加标量($\mu\text{g}/\text{L}$) \times 100%。

(1)

样品加标试验:取相同的样品 2 份,其中 1 份加入定量的标准物质;将 2 份样品按相同的分析步骤进行分析。将测定结果代入标准曲线,计算浓度,并根据公式(2)计算添加回收率。

样品回收率 = [测定量($\mu\text{g}/\text{L}$) - 样品量($\mu\text{g}/\text{L}$)]/加标量($\mu\text{g}/\text{L}$) \times 100%。

(2)

1.6 样品测定

根据“1.5.1”节进行样品前处理,根据“1.4”节中建立的间接竞争 ELISA 法进行样品测定,最后将测定结果代入标准曲线,计算样品浓度。

2 结果与分析

2.1 试验条件的优化

ELISA 是一种经典的分析方法,其灵敏度由多种因素决定。优化反应条件和体系各种参数对于灵敏度的提高极其必要。本研究对体系甲醇含量、pH 值和离子浓度 3 个方面进行了优化,并以 IC_{50} 值和 $D_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 作为优化结果的评判标准。

从图 2-A 可以看出,反应体系加入甲醇后,该方法的 IC_{50} 值迅速上升,这意味着甲醇的加入损坏了方法的灵敏度,因此本检测体系剔除了甲醇。同样,当体系中缓冲液的 pH 值为 7、 Na^+ 浓度为 0.3 mol/L 时,该方法的 IC_{50} 值和 $D_{\text{max}}/\text{IC}_{50}$ 达到最佳值(图 2-B、图 2-C)。基于此,建立该方法的标准曲线(图 3),其线性范围为 0.179 ~ 8.627 $\mu\text{g}/\text{L}$, IC_{50} 值为 0.967 $\mu\text{g}/\text{L}$,检测限可达到 0.059 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

外,进入环境中^[29-30],SEM 结构稳定,进入到环境中不易降解且有较强的生物富集性,其蓄积效应会对水生生态系统高营养级生物产生毒性和危害^[29]。

表 2 的分析结果可以看出,在镇江地区的 2 条主要支流——玉带河与团结河均检出了 SEM 的残留,浓度分别为 0.431 $\mu\text{g}/\text{L}$ 和 1.325 $\mu\text{g}/\text{L}$,团结河附近土壤的含量为 0.205 ng/g。2 处河流周围均无畜禽及水产养殖场,其来源可能是该物质通过食物链进入人体,随着生活污水等方式释放到环境中。浓度为 $\mu\text{g}/\text{L}$ 级的 SEM 持续暴露可严重损害水生

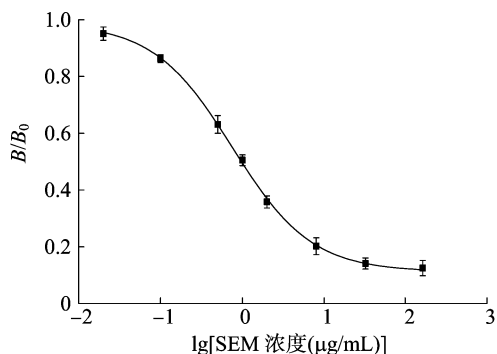


图3 氨基脒 SEM 的标准曲线

表1 IC-ELISA 空白加标回收试验

样品	空白值	加标量	测定量	回收率 (%)	变异系数 (%) , n = 3)
蒸馏水	ND	0.5 μg/L	0.481 μg/L	96.2	2.05
		2 μg/L	2.111 μg/L	105.6	3.25
		6 μg/L	4.912 μg/L	81.9	2.77
自来水	ND	0.5 μg/L	0.501 μg/L	100.2	3.01
		2 μg/L	1.993 μg/L	99.7	1.18
		6 μg/L	6.022 μg/L	100.4	1.43
空白土壤	ND	0.5 ng/g	0.478 ng/g	95.6	3.45
		2 ng/g	1.919 ng/g	96.0	3.21
		6 ng/g	5.763 ng/g	96.1	2.66

注:ND 表示未检出。下同。

表2 IC-ELISA 样品测定和样品加标回收试验

样品	空白值	样品含量	加标量	测定量	回收率 (%)	变异系数 (%) , n = 3)
玉带河水	ND	0.431 μg/L	0.1 μg/L	0.514 μg/L	83.0	4.37
团结河水	ND	1.325 μg/L	0.6 μg/L	1.911 μg/L	97.7	3.91
玉带河土壤	ND	ND	—	—	—	—
团结河土壤	ND	0.205 ng/g	0.1 ng/g	0.309 ng/g	104.0	4.92

系统中的敏感菌,严重影响水生系统的平衡。SEM 对环境的负作用是慢性、长期和累积性的,它们可以通过生物累积和食物链的传递而最终导致对高等动植物和人类的危害。同时,从环境水体与土壤中残留量的结果可以看出,目前仍有一定量的硝基呋喃类抗生素的非法使用。

3 结论

本研究建立了一种高灵敏、高通量快速检测环境中 SEM 的间接竞争酶联免疫分析方法(IC-ELISA),方法的线性检测范围为 0.179 ~ 8.627 μg/L,检测限可达 0.059 μg/L。该方法具有良好的重现性和准确性。利用此方法对镇江地区环境水体与土壤中 SEM 的残留状况进行调查研究,在部分河流与土壤中检出了此种污染物。相关结果将为研究环境中 SEM 的污染状况和生态风险评估提供技术支撑。

参考文献:

- [1] 刘 辉,梁德沛,花铁果,等. 食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测技术的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2013,4(2):383-388.
- [2] 唐红梅,曾 芳,李成洪. 食品中硝基呋喃类药物及其代谢物残留检测的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(10):3952-3959.
- [3] 王传现,黄 帆,王 敏,等. 液相色谱-串联质谱法检测水产品中残留的硝基呋喃类药物的代谢物[J]. 色谱,2013,31(3):206-210.
- [4] 祝伟霞,刘亚风,梁 炜. 动物性食品中硝基呋喃类药物残留检测研究进展[J]. 动物医学进展,2010,31(2):99-102.
- [5] 陈永平,张素青,李春青,等. 液质质串联质谱法测定淡水及沉积物中硝基呋喃类代谢物[J]. 河北渔业,2015(9):50-57.
- [6] 高均超. HPLC-MS/MS 测定水产品中硝基呋喃类代谢物残留试验研究[J]. 科技与创新,2017(6):29-30.
- [7] 郭丽娜,刘成文,符元春. 液相色谱串联质谱法测定水产品中硝基呋喃类代谢物的不确定度评定[J]. 现代食品,2017(2):101-105.

- [8] 柳 毅. 动物源性食品硝基呋喃类代谢物残留量的测定与分析[J]. 现代畜牧科技,2017(3):159.
- [9] 马青青,许文清. 鱼肉中硝基呋喃的检测分析[J]. 食品安全导刊,2017(1/2):77.
- [10] Gajewska J, Szczypka M, Tudek B, et al. Studies on the effect of ascorbic acid and selenium on the genotoxicity of nitrofurans; nitrofurazone and furazolidone[J]. Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis,1990,232(2):191-197.
- [11] Hoenicke K, Gatermann R, Hartig L, et al. Formation of semicarbazide (SEM) in food by hypochlorite treatment; is SEM a specific marker for nitrofurazone abuse? [J]. Food Additives and Contaminants,2004,21(6):526-537.
- [12] Li J, Ju X L, Jian P W. Multidetermination of four nitrofurans in animal feeds by a sensitive and simple enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2009,57(6):2181-2185.
- [13] Li J, Liu J, Zhang H C, et al. Broad specificity indirect competitive immunoassay for determination of nitrofurans in animal feeds[J]. Analytica Chimica Acta,2010,678(1):1-6.
- [14] Barbosa J, Moura S, Barbosa R, et al. Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta,2007,586(1/2):359-365.
- [15] Bock C, Stachel C, Gowik P. Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurans in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the software InterVal. [J]. Analytica Chimica Acta,2007,586(1/2):348-358.
- [16] 赵东豪,黎智广,王旭峰,等. 高效液相色谱-串联质谱法检测水产品中硝基呋喃类代谢物的优化研究[J]. 南方水产科学,2015,11(6):58-64.
- [17] 赵东豪,王旭峰,王 强,等. 液相色谱串联电喷雾质谱检测中溶剂对硝基呋喃类代谢物响应的影响[J]. 南方水产科学,2016,12(6):108-114.
- [18] 李 嘉. 食品添加剂副产物氨基脒的毒理学研究[D]. 长春:吉林

(下转第 324 页)

- International Journal of Environmental Science and Technology, 2010, 7(3): 435–446.
- [2] Zahra A, Hashmi M Z, Malik R N, et al. Enrichment and geo-accumulation of heavy metals and risk assessment of sediments of the Kurang Nallah – feeding tributary of the Rawal Lake Reservoir, Pakistan[J]. Science of the Total Environment, 2014, 470–471: 925–933.
 - [3] Superville P J, Prygiel E, Magnier A, et al. Daily variations of Zn and Pb concentrations in the Deûle River in relation to the resuspension of heavily polluted sediments[J]. Science of the Total Environment, 2014, 470: 600–607.
 - [4] Yang Y Q, Chen F R, Zhang L, et al. Comprehensive assessment of heavy metal contamination in sediment of the Pearl River Estuary and adjacent shelf[J]. Marine Pollution Bulletin, 2012, 64(9): 1947–1955.
 - [5] 王立硕, 毕见霖, 王馨慧, 等. 非常规水源补给城市河流表层沉积物重金属污染及风险评价[J]. 环境科学学报, 2015, 35(3): 903–910.
 - [6] 杨 陈, 王沛芳, 刘佳佳, 等. 太湖沉积物中重金属的垂向分布特征及迁移转化[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(3): 548–557.
 - [7] 王 海, 王春霞, 王子健. 太湖表层沉积物中重金属的形态分析[J]. 环境化学, 2002, 21(5): 430–435.
 - [8] 俞 慎, 历红波. 沉积物再悬浮-重金属释放机制研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(7): 1724–1731.
 - [9] 孔 明, 董增林, 晁建颖, 等. 巢湖表层沉积物重金属生物有效性与其生态风险评价[J]. 中国环境科学, 2015, 35(4): 1223–1229.
 - [10] 汤雨霖, 姜 霞, 陈春宵. 蓝藻水华对沉积物汞迁移释放的影响[J]. 河南科技, 2015(22): 73–74.
 - [11] 沈 青. 地表水中藻类代谢对 pH 和含氧量影响分析[J]. 环境科学与技术, 2011(增刊 2): 261–262.
 - [12] Ni L, Li D, Su L, et al. Effects of algae growth on cadmium remobilization and ecological risk in sediments of Taihu Lake[J]. Chemosphere, 2016, 151: 37–44.
 - [13] 李 旻, 陆 平, 曹宇欣, 等. 长荡湖底泥重金属污染分布特征[J]. 污染防治技术, 2015, 28(5): 10–12.
 - [14] 蒋 豫, 刘 新, 高俊峰, 等. 江苏省浅水湖泊表层沉积物中重金属污染特征及其风险评价[J]. 长江流域资源与环境, 2015, 24(7): 1157–1159.
 - [15] 李莹杰, 张列宇, 吴易雯, 等. 江苏省浅水湖泊表层沉积物重金属 GIS 空间分布及生态风险评价[J]. 环境科学, 2016, 37(4): 1321–1323.
 - [16] Yin H, Cai Y, Duan H, et al. Use of DGT and conventional methods to predict sediment metal bioavailability to a field inhabitant freshwater snail (*Bellamya aeruginosa*) from Chinese eutrophic lakes[J]. Journal of Hazardous Materials, 2014, 264(2): 184–194.
 - [17] 张 红, 吕 富, 吕林兰, 等. 浮游植物叶绿素 a 含量测定方法的比较及优化[J]. 海洋科学, 2012, 36(10): 1–4.
 - [18] Chen M, Li X M, Yang Q, et al. Total concentrations and speciation of heavy metals in municipal sludge from Changsha, Zhuzhou and Xiangtan in Middle–South Region of China[J]. Journal of Hazardous Materials, 2008, 160(2): 324–329.
 - [19] Zhang H, Davison W, Knight B, et al. *In situ* measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT[J]. Environment Science & Technology, 1998, 32(5): 704–710.
 - [20] Hsieh Y P, Yang C H. Diffusion methods for the determination of reduced inorganic sulfur species in sediments[J]. Limnology & Oceanography, 1989, 34(6): 1126–1130.
 - [21] Hong Y S, Kinney K A, Reible D D. Acid volatile sulfides oxidation and metals (Mn, Zn) release upon sediment resuspension; laboratory experiment and model development[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2011, 30(3): 564–575.
 - [22] Rickard D, Morse J W. Acid volatile sulfide (AVS)[J]. Marine Chemistry, 2005, 97(3): 141–197.
 - [23] 秦延文, 张 雷, 郑丙辉, 等. 太湖表层沉积物重金属赋存形态分析及污染特征[J]. 环境科学, 2012, 33(12): 4291–4299.
 - [24] Middelboe A L, Hansen P J. High pH in shallow-water macroalgal habitats[J]. Marine Ecology Progress, 2007, 338(9): 107–113.
 - [25] 倪利晓, 叶 祥, 马艳艳, 等. 室内模拟水华蓝藻对沉积物中 Cd 迁移释放的影响[J]. 广东农业科学, 2013, 40(3): 147–150.
-
- (上接第 315 页)
- 林农业大学, 2008.
- [19] 高 素, 汝少国. 氨基胍的毒性效应研究进展[J]. 环境科学研究, 2013, 26(6): 637–644.
 - [20] Chu P S, Lopez M I. Liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the determination of protein – bound residues in shrimp dosed with nitrofurans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(23): 8934–8939.
 - [21] Ong T, de Serres F J. Genetic analysis of ad-3 mutants induced by AF-2 and two other nitrofurans in *Neurospora crassa* [J]. Environmental Mutagenesis, 1981, 3(2): 151–158.
 - [22] Pereira A S, Donato J L, De Nucci G. Implications of the use of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone contamination in coated products[J]. Food Additives and Contaminants, 2004, 21(1): 63–69.
 - [23] Takegawa K, Mitsumori K, Yasuhara K, et al. A mechanistic study of ovarian carcinogenesis induced by nitrofurazone using *rash2* mice[J]. Toxicologic Pathology, 2000, 28(5): 649–655.
 - [24] Verdon E, Couedor P, Sanders P. Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furalidone, furaldone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nitrofurantoin) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH)[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1/2): 336–347.
 - [25] 闻 胜, 熊 碧, 黄常刚, 等. 2013—2015 年湖北地区虾中硝基呋喃代谢物残留的监测分析[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 336–340.
 - [26] Barclay W S, Al – Nakib W. An ELISA for the detection of rhinovirus specific antibody in serum and nasal secretion[J]. Journal of Virological Methods, 1987, 15(1): 53–64.
 - [27] Reen D J. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)[M]. Clifton: Humana Press, 1994: 461–466.
 - [28] Rennard S I, Berg R, Martin G R, et al. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) for connective tissue components. [J]. Analytical Biochemistry, 1980, 104(1): 205–214.
 - [29] 贾 涛. 饲料中硝基呋喃类药物的检测研究进展[J]. 饲料与畜牧, 2011(7): 37–40.
 - [30] 张 敏, 桑丽雅, 王振国, 等. 用于水产品中硝基呋喃类代谢物检测的胶体金快速检测试剂板的研制[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(1): 32–36.