



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107915774 B

(45) 授权公告日 2021.02.05

(21) 申请号 201710615989.0

(22) 申请日 2017.07.26

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107915774 A

(43) 申请公布日 2018.04.17

(83) 生物保藏信息
CCTCC NO:C201781 2017.05.22

(73) 专利权人 华中农业大学
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山
街1号

(72) 发明人 彭大鹏 袁宗辉 董国良 王玉莲
潘源虎 陈冬梅 陶燕飞 刘振利

(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104

代理人 徐绍新

(51) Int.Cl.

G07K 16/14 (2006.01)

G12N 5/20 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

审查员 王雪

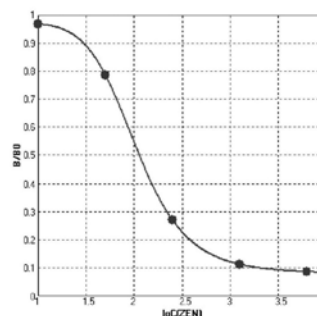
权利要求书1页 说明书21页 附图2页

(54) 发明名称

用于检测玉米赤霉烯酮及其代谢产物的单
抗及酶联免疫方法与试剂盒

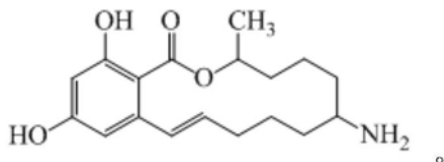
(57) 摘要

本发明公开了一种能识别玉米赤霉烯酮及其代谢产物的特异性单克隆抗体,它是由杂交瘤细胞株ZEN/6C2所分泌的,所述的杂交瘤细胞株ZEN/6C2,保藏在中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO:C201781。本发明还公开了检测玉米、猪饲料、动物可食性组织和牛奶中玉米赤霉烯酮及其代谢产物的酶联免疫方法及其试剂盒。本发明制备的单克隆抗体灵敏度较高,广谱,检测的准确度高,精密度好,具有简便、快速、易操作等有点。



1. 一种能识别玉米赤霉烯酮及其代谢产物的单克隆抗体,它是由保藏号为CCTCC NO: C201781的杂交瘤细胞株ZEN/6C2所分泌的,所述代谢产物为 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉酮。

2. 如权利要求1所述的单克隆抗体,其特征在于:所述杂交瘤细胞株ZEN/6C2,它是将半抗原与载体蛋白偶联后作为免疫原制备得到的,所述半抗原的结构式如下:



3. 权利要求1所述的单克隆抗体在制备检测玉米赤霉烯酮及其代谢产物的酶联免疫试剂盒中的应用。

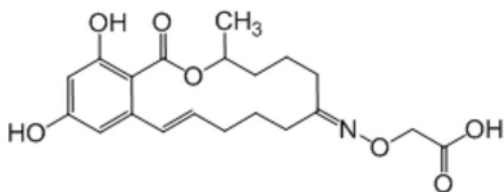
4. 包含权利要求1所述单克隆抗体的试剂盒。

5. 根据权利要求4所述的试剂盒,该试剂盒是检测玉米赤霉烯酮及其代谢产物的酶联免疫试剂盒。

6. 权利要求4所述的试剂盒在玉米赤霉烯酮及其代谢产物非诊断目的检测中的应用。

7. 一种玉米赤霉烯酮及其代谢产物非诊断目的检测的酶联免疫方法,其特征在于包括以下步骤:

(1) 将结构式如下的半抗原与鸡卵清白蛋白偶联得到包被原;



(2) 用保藏号为CCTCC NO: C201781的杂交瘤细胞株ZEN/6C2制备单克隆抗体;

(3) 用步骤(1)的包被原包被固相载体;

(4) 玉米、猪饲料、动物可食性组织如猪肉、肝、肾、牛奶样品的处理和检测,

所述代谢产物为 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇、玉米赤霉酮。

用于检测玉米赤霉烯酮及其代谢产物的单抗及酶联免疫方法与试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于兽药残留分析和免疫学技术领域,具体涉及一种能识别玉米赤霉烯酮及其代谢产物的单克隆抗体以及酶联免疫方法(ELISA)与试剂盒。

背景技术

[0002] 玉米赤霉烯酮(ZEN)是黄色镰刀菌和禾谷镰刀菌等镰刀菌属真菌的次级代谢产物,主要污染玉米、小麦、大米、大麦、及燕麦等谷物。玉米赤霉烯酮具有雌激素作用,主要作用于雌性动物生殖系统,引起繁殖机能异常甚至死亡,具有基因毒性和致癌性,免疫毒性及生殖毒性。欧盟规定未加工谷物(不包括玉米)、面包以及婴儿食品中ZEN的最大残留限量分别为100、50.0、20.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 。中国则规定小麦及玉米中ZEN最大残留限量为60.0 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 。动物摄入玉米赤霉烯酮后,可将其代谢为 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇以及玉米赤霉酮,而玉米赤霉烯醇同样存在于谷物中。由于这些代谢物均具有较强的雌激素活性,故 α -玉米赤霉醇曾被广泛用作牛羊促生长剂,但因其能影响人体生殖系统发育,欧盟禁止将其用于动物源食品,我国也禁止将其用于食品动物促生长作用。

[0003] 残留检测方法是准确判断残留是否超标的重要手段,要求具有较高的精确度和准确度。目前用于玉米赤霉烯酮类霉菌毒素检测的方法主要有仪器分析法和免疫学检测方法。仪器分析法具有检测灵敏度高、选择性好、分离效率高和应用范围广等优点,能够满足大多数霉菌毒素的检测要求。但该方法通常需要昂贵的仪器设备,对操作人员的技术要求较高,需要进行复杂的分析,更适用于对药物的确认检测而不适用于样品的大量筛选。免疫学检测方法,尤其是ELISA方法,具有灵敏、特异、简单、快速、稳定及易于自动化操作等特点,能够克服仪器分析的缺陷,是一种有效的大批量残留筛选方法,有着巨大的发展前景。虽然目前基于单抗的玉米赤霉烯酮类霉菌毒素ELISA方法已有报道,但抗体灵敏度低、广谱性差、检测样品种类单一,使得该类方法的应用受到一定局限。

发明内容

[0004] 本发明的目的为:

[0005] (1)提供一种特异性识别玉米赤霉烯酮及其代谢产物的单克隆抗体;

[0006] (2)提供所述单克隆抗体在制备检测玉米赤霉烯酮及其代谢产物的酶联免疫试剂盒中的应用;

[0007] (3)利用该单克隆抗体,建立一种能检测玉米赤霉烯酮及其代谢产物的ELISA方法;

[0008] (4)提供所述酶联免疫检测试剂盒在玉米赤霉烯酮及其代谢产物检测中的应用。

[0009] 上述目的是通过以下技术方案实现的:

[0010] 一种单克隆抗体,能识别玉米赤霉烯酮及其代谢产物,它是由保藏号为CCTCC NO: C201781的杂交瘤细胞株ZEN/6C2所分泌的。

- [0028] 图2为 α -玉米赤霉烯醇(α -ZEL)的间接竞争ELISA标准曲线。
 [0029] 图3为 β -玉米赤霉烯醇(β -ZEL)的间接竞争ELISA标准曲线。
 [0030] 图4为 α -玉米赤霉醇(α -ZAL)的间接竞争ELISA标准曲线。
 [0031] 图5为 β -玉米赤霉醇(β -ZAL)的间接竞争ELISA标准曲线。
 [0032] 图6为玉米赤霉酮(ZAN)的间接竞争ELISA标准曲线。

具体实施方式

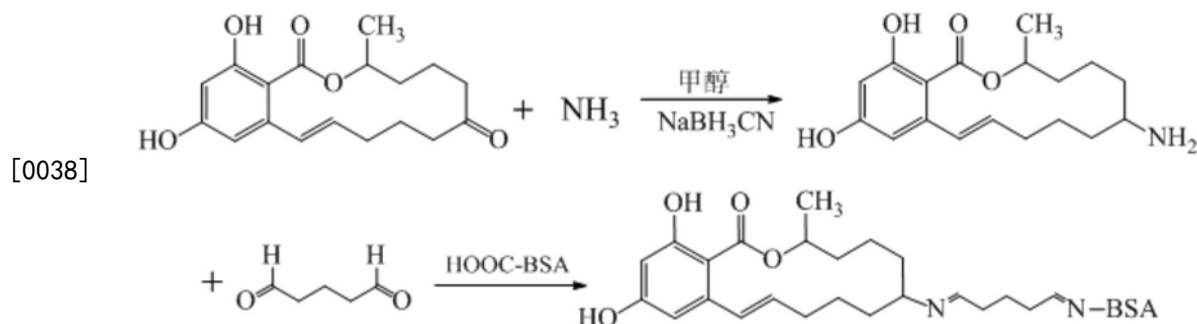
[0033] 下面通过实施例对本发明作进一步说明,但不限制本发明。

[0034] 实施例1免疫原和包被原的制备

[0035] 1.1免疫原7-NH₂-ZEN-GA-BSA的制备

[0036] 准确称取2mg ZEN溶于1mL甲醇,冰浴条件下通入氨气,室温搅拌反应1h,加入3mg 氰基硼氢化钠,继续搅拌反应3h。室温下氮气吹干即得半抗原7-NH₂-ZEN。

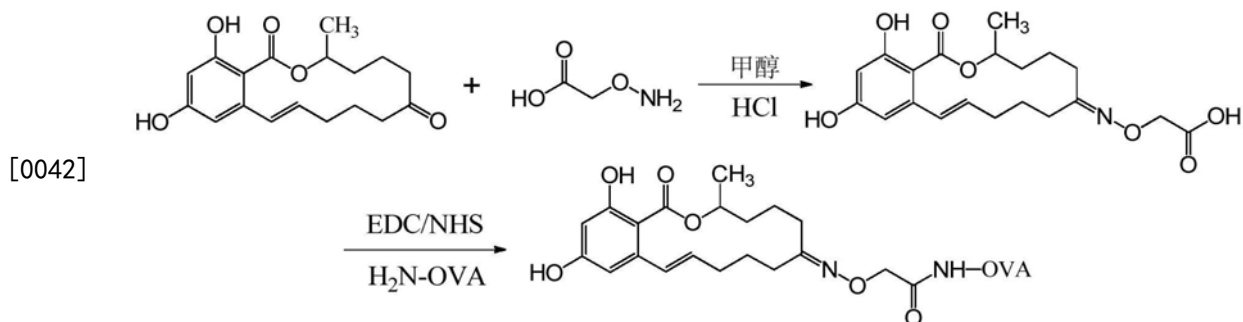
[0037] 将半抗原溶于100 μ L DMF,称取16.0mg BSA溶于4mL PBS,将两者缓慢混匀得A液。取40 μ L 25%戊二醛溶液,以PBS稀释至400 μ L,此为B液。避光条件下将B液逐滴加入到A液,室温搅拌反应9h。将反应液在4 $^{\circ}$ C条件下用pH=7.4的PBS透析5d,5000 r min⁻¹离心10min,保留上清,即得7-NH₂-ZEN-GA-BSA,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。反应如下:



[0039] 1.2包被原ZEN-CMO-OVA的制备

[0040] 准确称取2mg ZEN,溶于1mL甲醇,加入3mg羧甲基羟胺半盐酸盐和5mg无水碳酸钠,室温条件下搅拌反应24h,将所得溶液用氮吹仪进行氮吹,吹干后加入0.05mol L⁻¹的盐酸2mL复溶,用等体积的乙酸乙酯萃取3次,弃去水相,合并有机相,进行氮吹,吹干后得淡黄色油状残留物,即半抗原ZEN-CMO。

[0041] 称取1mg半抗原(ZEN-CMO),溶于400 μ L DMF中,加入1mg NHS和2mg EDC,室温条件下搅拌反应过夜得A液。称取16.0mg OVA缓慢溶于4mL磷酸盐缓冲液(pH=7.4)中,此为B液。冰浴条件下,将A液逐滴缓慢加入B液,搅拌反应过夜。将反应液在4 $^{\circ}$ C条件下用pH=7.4的PBS透析3d,5000r min⁻¹离心10min,保留上清,即得ZEN-CMO-OVA,于-20 $^{\circ}$ C保存备用。反应如下:



[0043] 实施例2单克隆抗体的制备

[0044] 2.1动物免疫

[0045] 利用制备的免疫原(7-NH₂-ZEN-GA-BSA)免疫雌性Balb/C小鼠(购自湖北省疾病预防控制中心实验动物中心)。免疫程序是取免疫原7-NH₂-ZEN-GA-BSA以蛋白含量分别为100μg和50μg与佐剂等量混合后注入小鼠体内,使其产生特异性血清。

[0046] 2.2细胞融合和克隆化

[0047] 参照杨汉春《动物免疫学》,利用免疫原免疫雌性Balb/C小鼠,免疫程序为:基础免疫将免疫原与等体积的弗氏完全佐剂乳化后,于小鼠背部皮下多点注射,以后每间隔2周加强免疫一次,换用不完全佐剂乳化。最后于融合前三天(最好于免疫结束后休整1月)腹腔注射,强化免疫,抗原量加倍,不加佐剂。

[0048] 融合时,取经最后强化免疫的Balb/C鼠一只,眼眶放血处死(收集血清,即为阳性血清),在75%酒精中浸泡5min消毒。无菌取出小鼠脾脏,分离出脾细胞,与新鲜制备的SP2/0骨髓瘤细胞(SP2/0骨髓瘤细胞来自本实验室)按1~2×10⁷个和10⁸个免疫脾细胞,其比例在1:5~1:10之间,将其都置于50mL离心管中,用15mL的RPMI-1640基础液重悬细胞,1500r min⁻¹离心5min,洗细胞1次。离心的间隙将温浴的培养基,温浴的水,温浴的50%聚乙二醇(PEG)等放入超净台。然后取出灭菌的吸水纸,将装有骨髓瘤细胞和免疫脾细胞的离心管上清倒尽后,倒扣在吸水纸上控干水滴,轻敲管底使细胞松动。打开计时器,吸取0.8mL的PEG,手持装有混合细胞的离心管,将其放置在水浴中片刻,将PEG缓慢的滴加到混合细胞上,边加边轻轻搅拌,1min内加完,持续搅拌10s。然后加入10mL基础培养液,沿管壁缓慢加到融合细胞上,边加边轻轻摇动(不能吹打),在3min内加完5mL,在5min内加完10mL,最后补加基础培养液到40mL,加盖后,反复颠倒几次,使细胞混匀。800r min⁻¹ 5min离心,弃上清。吸取含有饲养细胞的HAT培养基5mL,缓慢加入,并轻轻搅动,忌吹打;然后将该细胞缓慢滴入到含饲养细胞的血清瓶中,混合均匀后将细胞接种在细胞培养板上,每孔两滴,置于培养箱中培养。一次融合可接种5~7块96孔板。根据需要也可少种,一般按SP2/0的细胞数计算,每孔接种量约含10⁴左右个SP2/0细胞。于37℃,5%CO₂培养箱中培养。

[0049] 融合的当天计为0d,前3d尽量不要动细胞板,保持培养箱内环境稳定。第3d每孔补加1滴HAT完全培养基;第5d每孔吸出1/2培养上清(100μL),再加入1滴HT完全培养基;以后每隔2d同上吸去1/2-3/4培养上清,在7d后换入HT完全培养基。

[0050] 待融合细胞集落长至培养孔的1/4左右,用建立的间接ELISA方法进行筛选。与零药物孔相比,药物孔OD值能被抑制的判为阳性。根据抑制率和细胞集落生长状况,选择2~4个强阳性的仅有1~2个单集落的细胞孔,采用有限稀释方法进行克隆化。

[0051] 经过3~4次克隆,最终筛选出分泌抗玉米赤霉烯酮及其代谢产物的单克隆抗体的

杂交瘤细胞株, 申请人将其命名为ZEN/6C2, 并于2017年5月22日送交位于湖北省武汉市武汉大学内的中国典型培养物保藏中心(CCTCC)保藏, 保藏编号为CCTCC NO: C201781。对该细胞系进行了染色体计数, 结果显示, 杂交瘤细胞的染色体数目平均值为100.7条, 满足SP2/0的染色体数为62~68条, 脾细胞染色体为40条, 说明融合细胞的确是SP2/0细胞与脾细胞的杂交产物。将该细胞株经腹腔注射Balb/C小鼠, 生产单克隆抗体。采用购自Thermo Sxientific公司的鼠单克隆抗体快速ELISA同型试剂盒对本发明所得到的单克隆抗体的亚型和轻链进行鉴定, 结果为小鼠IgG₁亚型。

[0052] 实施例3ZEN间接竞争ELISA检测方法的建立

[0053] 3.1试剂的配制(本实施例使用的试剂除另注明外均采用以下方法配制)

[0054] 磷酸盐缓冲液: NaCl 8.0g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, KCl 0.2g, 加三蒸水至1000mL, 调节pH至7.4;

[0055] 包被液: 取Na₂CO₃ 1.59g, NaHCO₃ 2.93g, 加三蒸水至1000mL, 调节pH值至9.6;

[0056] 洗涤液: NaCl 8.0g, KH₂PO₄ 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, KCl 0.2g, Tween 20 0.5mL, 加三蒸水至1000mL, 调节pH至7.4;

[0057] 封闭液: 卵清蛋白10.00g溶于1000mL磷酸盐缓冲液中;

[0058] 底物液A: 3, 3', 5', 5'-四甲基联苯二胺(TMB) 160mg, 四丁基硼氢化氨21mg, 加入10mL 二甲基乙酰胺溶解混匀;

[0059] 底物液B: 柠檬酸13.70g, 柠檬酸三钠10.14g, 过氧化氢脲282.00mg, 加三蒸水至1000mL;

[0060] 底物混合液: 将A液和B液按体积比1:100混合即得, 现配现用;

[0061] 终止液: 2mol L⁻¹硫酸溶液。

[0062] 3.2包被原浓度和抗体工作浓度的初步确定

[0063] 根据方阵滴定法初步确定包被原浓度和抗体工作浓度。选择上述合成的 ZEN-CMO-OVA作为包被原, 用包被液稀释成4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625μg mL⁻¹ 7个浓度, 在96孔酶标板, 从第1至第7行依次加入, 4℃过夜; 洗涤3次, 拍干, 加入封闭液250μL, 37℃封闭60min; 洗涤3次, 拍干, 在酶标板的第1列至第8列依次加入100μL用磷酸盐缓冲液稀释的稀释倍数为4000、8000、16000、32000、64000、128000、256000、512000的单克隆抗体, 37℃孵育30min, 洗涤3次, 拍干; 各孔加入1:5000 倍磷酸盐缓冲液稀释的HRP标记的羊抗鼠IgG抗体(简称二抗, 以下所指二抗均为HRP标记的羊抗鼠IgG抗体, 购自武汉飞远科技有限公司) 100μL, 37℃孵育30min, 洗涤5次, 拍干; 各孔加入100μL底物混合液, 避光显色15min, 加入50μL终止液, 用自动酶标仪在450nm波长处测定光密度值(OD值), 选择OD值接近2.0, 与相邻孔OD值差异较显著的孔对应的抗原包被浓度和抗体稀释度组合, 结果见表1。

[0064] 结果表明, 初步确定包被原ZEN-CMO-OVA的包被浓度为1μg mL⁻¹或0.5μg mL⁻¹, 抗体工作浓度为1:64000或1:32000。

[0065] 表1单克隆抗体方阵滴定

抗体稀释度 (1:X)	包被浓度($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625
4000	2.532	2.655	2.646	2.685	1.944	1.242	0.814
8000	2.663	2.861	2.922	2.576	1.542	0.832	0.482
16000	2.679	2.752	2.672	2.402	1.076	0.668	0.37
32000	2.682	2.816	2.541	1.994	0.885	0.578	0.572
64000	2.737	2.714	2.148	1.307	0.83	0.502	0.445
128000	2.714	2.472	1.536	0.846	0.627	0.47	0.275
256000	2.262	1.514	1.041	0.689	0.531	0.471	0.437
512000	1.434	0.98	0.718	0.552	0.438	0.43	0.396

[0067] 3.3最佳包被原浓度和抗体工作浓度的确定

[0068] 以方阵滴定初步确定的包被原ZEN-CMO-OVA的包被浓度,即 $1, 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ 2个浓度包被酶标板。将ZEN标准溶液用磷酸盐缓冲液稀释成 $0, 50, 100, 200, 400, 800 \text{ ng L}^{-1}$ 的 6个浓度,将单克隆抗体用磷酸盐缓冲液分别稀释为 $1:64000$ 和 $1:32000$,向加入 $50 \mu\text{L}$ PBS 的零孔和 $50 \mu\text{L}$ ZEN标准溶液的复孔中各加 $50 \mu\text{L}$ 单克隆抗体进行间接竞争ELISA测定。以ZEN标准溶液浓度的对数值作横坐标,以复孔的OD值与“零”孔OD值的比值(B/B_0) 作为纵坐标绘制抑制曲线,选择“0”孔OD值接近2.0、产生50%抑制时ZEN浓度(IC_{50}) 较低者作为包被浓度。以最佳包被原浓度包被酶标板,将ZEN标准溶液稀释成 $0, 50, 100, 200, 400, 800 \text{ ng L}^{-1}$ 6个浓度,将抗体以选择浓度 $1:64000$ 等差设置稀释度,分别加入到零孔和系列浓度的ZEN标准溶液的复孔中进行间接竞争ELISA,绘制抑制曲线并计算 IC_{50} 值。选择“0”孔OD值接近2.0、 IC_{50} 较低者作为最佳抗体工作浓度。结果见表2、3。

[0069] 表2最佳包被原浓度优化

包被原浓度($\mu\text{g mL}^{-1}$)	抗体稀释度(1:X)	0 孔 OD 值	IC_{50} 值(ng L^{-1})
1	64000	1.967	107.03
0.5	32000	2.381	173.12

[0072] 表3最佳抗体稀释度优化

抗体稀释度 (1:X)	0孔OD值	IC_{50} 值 (ng L^{-1})
56000	2.181	174.55
60000	2.06	149.13
64000	1.998	139.38
68000	1.893	124.89
72000	1.869	116.89

[0074] 结果表明,最佳包被浓度为 $1 \mu\text{g mL}^{-1}$,最佳抗体稀释度为 $1:64000$ 。

[0075] 3.4标准曲线的建立

[0076] 将ZEN标准溶液用磷酸盐缓冲液配制成 $0, 10, 50, 250, 1250, 6250 \text{ ng L}^{-1}$ 的6个浓度,

每个浓度重复5孔,按照间接竞争ELISA方法测定,重复测定5次。以ZEN溶液浓度的对数值为横坐标,B/B₀为纵坐标绘制标准曲线并计算IC₅₀。采用ELISA Calc软件进行拟合,结果如图1-6所示。标准曲线的回归方程为 $y = (A-D) / [1 + (x/C)^B] + D$, $A=0.97351$, $B=7.47822$, $C=2.03041$, $D=0.07020$, $R^2=0.99977$, IC₅₀值为 $114.0 \pm 5.0 \text{ ng L}^{-1}$ ($n=5$),线性范围为 $10 \sim 6250 \text{ ng L}^{-1}$ 。

[0077] 3.5交叉反应试验

[0078] 将 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇和玉米赤霉酮用磷酸盐缓冲液配制成适当浓度,用建立的ELISA方法测定各药物的IC₅₀值,每个药物3个复孔,以单克隆抗体对玉米赤霉烯酮的交叉反应率为100%,根据公式1计算单克隆抗体对玉米赤霉烯酮及其5种代谢物的交叉反应率,结果见表4。

$$[0079] \quad \text{交叉反应率} = \frac{50\% \text{抑制 (ZEN)}}{50\% \text{抑制 (竞争物)}} \times 100\% \quad (\text{公式 1})$$

[0080] 表4单克隆抗体对玉米赤霉烯酮及其5种代谢物交叉反应率

[0081]	化合物名称	IC ₅₀ (ng L ⁻¹)	交叉反应率(%)
	玉米赤霉烯酮	114.0	100.0
	α -玉米赤霉烯醇	127.4	89.5
[0082]	β -玉米赤霉烯醇	290.4	39.3
	α -玉米赤霉醇	114.9	99.2
	β -玉米赤霉醇	205.6	55.5
	玉米赤霉酮	257.1	44.3

[0083] 结果表明,单克隆抗体对玉米赤霉烯酮、 α -玉米赤霉烯醇、 β -玉米赤霉烯醇、 α -玉米赤霉醇、 β -玉米赤霉醇和玉米赤霉酮有较高的交叉反应,能同时检测6种霉菌毒素。

[0084] 实施例4ELISA试剂盒的组装

[0085] 4.1本发明ELISA试剂盒由下述部分组成:

[0086] 1) 包被有包被原ZEN-CMO-OVA的固相载体(酶标板);

[0087] 2) ZEN标准溶液6瓶,浓度分别为0、10、50、250、1250、6250 ng L⁻¹;

[0088] 3) 杂交瘤细胞ZEN/6C2分泌的单克隆抗体;

[0089] 4) 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG抗体工作液;

[0090] 5) 浓缩磷酸盐缓冲液:NaCl 80.0g, KH₂PO₄ 2.0g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 29.0g, KCl 2.0g, 加双蒸水至1000mL;

[0091] 6) 浓缩洗涤液:NaCl 80.0g, KH₂PO₄ 2.0g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 29.0g, KCl 2.0g, Tween 20 5mL, 加三蒸水至1000mL;

[0092] 7) 底物液A:3,3',5',5'-四甲基联苯二胺(TMB) 160mg, 四丁基硼氢化氨21mg, 加入10mL二甲基乙酰胺溶解混匀;

[0093] 8) 底物液B:柠檬酸13.70g, 柠檬酸三钠10.14g, 过氧化氢脲282.00mg, 加三蒸水至

1000mL;

[0094] 9) 终止液: 2mol L^{-1} 硫酸溶液。

[0095] 4.2 酶标板的制备

[0096] 用包被液将ZEN-CMO-OVA稀释成 $1\mu\text{g mL}^{-1}$, 每孔加入 $100\mu\text{L}$, 4°C 过夜, 倾去包被液, 每孔加入 $250\mu\text{L}$ 洗涤液洗涤3次, 拍干, 然后每孔加入封闭液 $250\mu\text{L}$, 37°C 孵育 120min, 倾去孔内液体, 洗涤液洗涤3次, 拍干, 用锡箔纸真空密封保存。

[0097] 实施例5酶联免疫试剂盒的测定程序

[0098] 5.1 试剂的配制

[0099] 1) 样品稀释液: 将试剂盒中提供的浓缩磷酸盐缓冲液用三蒸水稀释10倍后使用。

[0100] 2) 洗涤液: 将试剂盒中提供的洗涤液用三蒸水稀释10倍后使用。

[0101] 3) 底物混合液: 根据每次所需用量, 将配制的底物液A和底物液B按体积1:100 混匀, 现配现用。

[0102] 5.2 样品前处理

[0103] 1) 饲料和玉米的样品前处理: 猪混合饲料与玉米研磨成粉, 并用40-目网筛筛选。取 $2.00 \pm 0.02\text{g}$ 筛选后的样品于 50mL 离心管中, 加入 10mL 甲醇-水 (7:3, v/v), 涡旋震荡5min, 采用Whatman NO.1滤纸过滤。取 1mL 滤液于 10mL EP管中, 以PBS (0.01mol L^{-1} , pH 7.4) 将滤液稀释至 4mL , 若液体依然浑浊, 则用滤纸重新过滤, 澄清滤液用于ELISA 检测。

[0104] 2) 动物可食性组织的样品前处理: 对新鲜猪肉 (肝、肾) 组织细细匀浆。取 $2.00 \pm 0.02\text{g}$ 处理后的样品于 50mL 离心管中, 加入 10mL 甲醇-水 (7:3, v/v), 涡旋震荡5min, 经 4000r min^{-1} 离心10min。取 1mL 上清液于 10mL EP管中, 以PBS (0.01mol L^{-1} , pH 7.4) 将滤液稀释至 3mL , 加入 1mL 正己烷涡旋振荡去脂, 静置5min, 吸去上层脂肪层, 取下层澄清液体用于ELISA检测。

[0105] 3) 牛奶样品的前处理: 取 2mL 生鲜牛乳于 10mL EP管中, 4°C 条件下经 4000r min^{-1} 离心15min, 吸去上层脂肪层, 取中间层乳浊液用PBS (0.01mol L^{-1} , pH 7.4) 稀释10倍后用于ELISA分析。

[0106] 5.3 测定步骤

[0107] 1) 加样: 向酶标板微孔中加入玉米赤霉烯酮系列浓度标准溶液或样品提取液 $50\mu\text{L}$, 然后加入单克隆抗体工作液 $50\mu\text{L}$, 置于湿盒中, 37°C 恒温孵育30min;

[0108] 2) 洗涤: 倒出孔中的液体, 每孔中加入洗涤液 $250\mu\text{L}$ 洗涤3次并拍干;

[0109] 3) 加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠IgG抗体工作液: 每孔中加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗鼠IgG抗体工作液 $100\mu\text{L}$, 置于湿盒中, 37°C 恒温孵育30min;

[0110] 4) 洗涤: 倒出孔中的液体, 每孔中加入洗涤液 $250\mu\text{L}$, 洗涤3次并拍干;

[0111] 5) 加底物: 每孔中加入底物混合液 $100\mu\text{L}$, 置于湿盒中, 37°C 恒温孵育15min;

[0112] 6) 加终止液: 每孔中加入终止液 $50\mu\text{L}$;

[0113] 7) 测定: 用酶标仪在 450nm 处测定每孔的光密度值 (OD值)。

[0114] 5.4 结果判断

[0115] 标准曲线:

[0116] 以所测定的标准品OD值除以“零”孔OD值 (B/B_0) 为纵坐标, 玉米赤霉烯酮 (ZEN) 浓度的对数值为横坐标作标准曲线, 并进行线性回归, 给出回归方程。

[0117] 玉米、猪饲料、动物可食性组织和牛奶中ZEN的浓度计算：

[0118] 计算样品的抑制率(所获得的样品的OD值除以“零”孔OD值)，代入标准曲线的回归方程计算毒素浓度。

[0119] 玉米、猪饲料、动物可食性组织和牛奶中玉米赤霉烯酮代谢物浓度计算：

[0120] 计算样品的抑制率(所获得的样品的OD值除以“零”孔OD值)，代入标准曲线的回归方程中，按照公式2折算成玉米赤霉烯酮代谢物浓度。

$$[0121] \quad C_{\text{竞争物}} = \frac{C_{\text{ZEN}}}{\text{交叉反应率}} \times \text{稀释倍数} \quad (\text{公式 2})$$

[0122] 实施例6本发明ELISA方法的灵敏度、精密度、准确度试验

[0123] 6.1本发明试剂盒的灵敏度试验

[0124] 将20份 $0\mu\text{g L}^{-1}$ 标准溶液的检测OD值代入标准曲线，计算20份空白测定浓度，求出平均值和标准差，根据公式 $Z=C+3SD$ 计算Z值(见表5)。该ELISA方法的灵敏度为 11.3 ng L^{-1} 。最低检测限(LOD)通过以下步骤决定：测定20份空白组织样品的OD值，根据标准曲线的回归方程计算出相应的ZEN浓度，然后计算出ZEN浓度的平均值($\bar{X}$)和标准差(SD)，根据公式 $\text{LOD}=\bar{X}+3SD$ 计算出样品中的LOD；定量限(LOQ)= $\bar{X}+10SD$ 。ZEN及其5种代谢物在不同样品中的LOD和LOQ详见表6。

[0125] 表5试剂盒的灵敏度

ZEN (ng L^{-1})	标准曲线(OD)					20份 $0\mu\text{g L}^{-1}$ 标准溶液测定值				平均值	标准差	LOD
	1	2	3	4	5	(ng L ⁻¹)				(ng L ⁻¹)	(SD)	(ng L ⁻¹)
0	1.973	2.059	1.983	1.95	1.982	6.220	7.330	5.999	8.331	7.1	1.4	11.3
10	1.917	1.985	1.901	1.910	1.919	5.278	6.864	5.749	7.853			
50	1.557	1.594	1.582	1.512	1.576	5.243	10.80	6.887	8.331			
250	0.537	0.611	0.533	0.484	0.515	6.098	7.827	7.234	7.574			
1250	0.221	0.273	0.217	0.227	0.223	6.954	8.867	6.932	5.599			
6250	0.144	0.165	0.125	0.131	0.143							

[0127] 表6不同样品中玉米赤霉烯酮及其5种代谢物的检测限和定量限

药物	基质	20份空白样品 平均测定值(ng L^{-1})	标准差 SD	LOD(ng L^{-1})	LOQ(ng L^{-1})
ZEN	玉米	136.2	36.1	244.6	497.3
	猪饲料	164.8	46.8	305.0	632.3
	猪肉	118.5	30.9	211.0	427.0
	猪肝	117.5	30.1	207.9	418.9
	猪肾	97.6	25.8	174.9	355.4

[0129]

	牛奶	81.0	31.4	175.3	395.2
α -ZEL	玉米	213.7	53.0	372.6	743.3
	猪饲料	255.2	67.5	457.8	930.4
	猪肉	184.1	44.7	318.1	630.7
	猪肝	182.7	43.8	314.1	620.7
	猪肾	153.5	37.9	267.3	532.8
	牛奶	125.4	45.7	262.4	582.2
β -ZEL	玉米	375.6	94.1	658.3	1317.8
	猪饲料	449.5	120.4	810.9	1653.9
	猪肉	318.2	86.7	578.8	1184.7
	猪肝	321.6	78.1	555.7	1102.0
	猪肾	269.7	67.4	472.0	944.1
	牛奶	220.9	81.4	465.0	1034.7
α -ZAL	玉米	86.3	24.7	160.3	333.0
	猪饲料	106.0	32.6	203.7	431.6
	猪肉	75.9	21.4	140.2	290.2
	猪肝	75.2	20.8	137.7	283.5
	猪肾	61.5	17.6	114.2	237.1
	牛奶	52.2	21.7	117.4	269.3
β -ZAL	玉米	119.3	34.3	222.2	462.2
	猪饲料	146.7	45.3	282.7	599.9
	猪肉	105.0	29.8	194.5	403.2
	猪肝	104.1	29.0	191.0	393.8
	猪肾	85.1	24.4	158.3	329.1
	牛奶	162.9	30.2	162.9	374.3
ZAN	玉米	387.2	92.9	665.8	1315.9
	猪饲料	459.6	117.6	812.3	1635.2
	猪肉	332.0	77.8	565.5	1110.4
	猪肝	329.2	76.4	558.4	1093.2
	猪肾	278.5	66.6	478.3	944.5
	牛奶	225.7	79.8	465.1	1023.6

[0130] 6.2本发明试剂盒的精密度试验

[0131] 将ZEN标准品稀释成0、10、50、250、1250、6250ng L⁻¹ 6个浓度,每浓度5个重复,按照间接竞争ELISA方法重复测定5次,应用标准曲线的回归方程计算出各浓度 ZEN标准溶液的测定值,计算板内和板间变异系数,结果见表7。

[0132] 表7标准曲线的板内与板间变异系数

[0133]

ZEN (ng L ⁻¹)	测定值 ($\bar{x} \pm SD$, $\mu\text{g L}^{-1}$)	板内变异系 (CV %, n=5)	平均测定值 ($\bar{x} \pm SD$, ng L ⁻¹)	板间变异系 (CV %, n=25)
10	9.8 ± 1.2	12.7	9.8 ± 1.2	12.2
	10.8 ± 1.2	11.4		
	8.2 ± 0.8	10.0		
	11.1 ± 0.9	7.7		
	9.1 ± 1.1	12.5		
50	50.5 ± 5.8	11.4	49.8 ± 2.9	5.7
	48.2 ± 4.3	9.0		
	47.2 ± 2.1	4.5		
	54.5 ± 4.7	8.5		
	48.7 ± 1.9	3.8		
250	254.7 ± 22.6	8.9	255.8 ± 28.0	10.9
	250.2 ± 26.0	10.4		
	214.7 ± 4.5	2.1		
	291.4 ± 26.3	9.0		
	267.9 ± 20.0	7.5		
1250	1129.8 ± 73.3	6.5	1115.8 ± 109.0	9.8
	1286.3 ± 110.9	8.6		
	994.0 ± 85.6	8.6		
	1057.3 ± 124.2	11.8		
	1111.5 ± 78.2	7.0		
6250	6460.1 ± 673.3	10.4	6285.7 ± 346.3	5.5
	6469.0 ± 781.2	12.1		
	5674.5 ± 340.4	6.0		
	6483.3 ± 838.5	12.9		
	6341.6 ± 577.2	9.1		

[0134] 6.3本发明试剂盒的准确度、重复性试验

[0135] 分别将三个浓度的玉米赤霉烯酮及其5种代谢物标准品添加到6种样品中,其添加回收率在62.9%~113.6%之间,批内与批间变异系数<15%;具体测定结果见表8~13。

[0136] 回收率 (%) = $\frac{\text{实测浓度}}{\text{添加浓度}} \times 100\%$ (公式 2)

[0137] 表8玉米中添加回收率

[0138]

药物	添加浓度 (ng L ⁻¹)	回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	批间变异系数 (CV %)
ZEN	500	109.7 $\pm$ 12.9	11.7	109.3 $\pm$ 8.4	7.6
		100.7 $\pm$ 13.5	13.4		
		117.4 $\pm$ 6.3	5.4		
	1000	105.8 $\pm$ 11.7	11.1	101.0 $\pm$ 4.6	4.5
		96.7 $\pm$ 12.4	12.8		
		100.4 $\pm$ 11.0	11.0		
	2000	88.7 $\pm$ 7.8	8.8	84.2 $\pm$ 4.3	5.1
		80.1 $\pm$ 5.8	7.2		
		83.6 $\pm$ 5.4	6.4		
α -ZEL	750	97.4 $\pm$ 7.7	7.9	105.0 $\pm$ 10.5	10.0
		100.7 $\pm$ 12.0	11.9		
		117.0 $\pm$ 11.1	9.5		
	1500	100.6 $\pm$ 7.7	7.7	100.7 $\pm$ 5.0	4.9
		95.8 $\pm$ 4.1	4.3		
		105.8 $\pm$ 7.8	7.4		
	3000	80.2 $\pm$ 9.4	11.7	77.4 $\pm$ 7.9	10.2
		68.5 $\pm$ 4.5	6.6		
		83.5 $\pm$ 10.2	12.2		
β -ZEL	1350	85.0 $\pm$ 5.7	6.7	90.7 $\pm$ 5.6	6.17
		91.0 $\pm$ 6.3	6.9		
		96.2 $\pm$ 9.5	9.9		
	2700	102.9 $\pm$ 4.9	4.8	104.8 $\pm$ 5.6	5.3
		111.1 $\pm$ 6.3	5.6		
		100.4 $\pm$ 9.4	9.3		
	5400	87.4 $\pm$ 7.9	9.1	81.6 $\pm$ 7.9	9.6
		84.8 $\pm$ 6.2	7.4		
		72.7 $\pm$ 5.1	7.0		
α -ZAL	350	69.1 $\pm$ 7.8	11.2	66.9 $\pm$ 2.3	3.4
		64.6 $\pm$ 6.0	9.3		
		67.0 $\pm$ 6.8	10.1		
	700	103.1 $\pm$ 13.6	13.2	98.1 $\pm$ 4.5	4.5
		96.3 $\pm$ 13.1	13.6		

[0139]

β -ZAL	1400	94.8 $\pm$ 13.1	13.8	95.8 $\pm$ 3.3	3.5
		99.5 $\pm$ 7.2	7.3		
		94.6 $\pm$ 9.0	9.5		
		93.2 $\pm$ 5.7	6.2		
	500	77.5 $\pm$ 7.3	9.5	71.3 $\pm$ 9.4	13.1
		75.9 $\pm$ 8.8	11.6		
		60.5 $\pm$ 7.7	12.7		
	1000	98.6 $\pm$ 7.7	7.8	88.2 $\pm$ 9.1	10.3
		84.1 $\pm$ 11.0	13.0		
		82.0 $\pm$ 10.7	13.1		
	2000	105.2 $\pm$ 4.5	4.3	99.5 $\pm$ 5.7	5.7
		99.4 $\pm$ 11.1	11.2		
		93.9 $\pm$ 7.6	8.0		

[0140]

表9猪饲料中添加回收率

[0141]

药物	添加浓度 (ng L ⁻¹)	回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	批间变异系数 (CV %)
ZEN	650	88.6 $\pm$ 9.3	10.5	100.9 $\pm$ 10.7	10.6
		107.5 $\pm$ 13.6	12.6		
		106.8 $\pm$ 12.7	11.9		
	1300	100.2 $\pm$ 2.7	2.6	97.4 $\pm$ 8.1	8.3
		103.6 $\pm$ 14.2	13.8		
		88.3 $\pm$ 11.1	12.6		
	2600	74.8 $\pm$ 9.5	12.7	77.7 $\pm$ 3.4	4.4
		81.5 $\pm$ 10.9	13.4		
		76.7 $\pm$ 9.5	12.4		

[0142]

α -ZEL	950	92.9 ± 4.7	5.1	104.2 ± 10.5	10.1
		112.6 ± 8.3	7.3		
		107.6 ± 4.5	4.2		
	1900	89.2 ± 8.3	9.3	91.9 ± 5.6	6.1
		88.1 ± 5.9	6.7		
		98.3 ± 12.0	12.2		
	3800	70.9 ± 8.7	12.3	69.9 ± 5.0	7.1
		64.5 ± 7.5	11.6		
		74.3 ± 7.3	9.9		
β -ZEL	1700	115.9 ± 5.2	4.5	108.9 ± 11.4	10.4
		115.1 ± 6.4	5.5		
		95.8 ± 12.1	12.6		
	3400	95.9 ± 5.6	5.8	89.9 ± 5.8	6.5
		89.3 ± 5.2	5.8		
		84.3 ± 3.3	3.9		
	6800	85.6 ± 11.9	13.9	80.7 ± 4.4	5.4
		79.6 ± 15.9	7.4		
		77.0 ± 5.0	6.5		
α -ZAL	450	81.6 ± 8.1	9.9	76.8 ± 10.0	13.0
		65.3 ± 8.3	12.7		
		83.5 ± 9.8	11.7		
	900	98.6 ± 12.2	12.4	92.6 ± 5.4	5.8
		90.7 ± 8.1	9.0		
		88.3 ± 7.0	8.0		
	1800	106.4 ± 11.4	10.7	105.4 ± 3.0	2.8
		102.1 ± 9.6	9.4		
		107.8 ± 11.5	10.7		
β -ZAL	600	73.5 ± 10.4	14.1	71.0 ± 2.3	3.2
		70.5 ± 8.8	12.5		
		69.1 ± 7.4	10.7		
	1200	101.9 ± 9.2	9.0	93.5 ± 7.3	7.8
		89.1 ± 10.3	11.6		
		89.4 ± 12.5	14.0		
	2400	107.8 ± 15.5	14.4	103.4 ± 4.1	4.0
		99.7 ± 10.1	10.2		

[0143]

		102.6 ± 11.7	11.4		
ZAN	1700	122.4 ± 10.1	8.3	111.3 ± 10.5	9.4
		109.9 ± 5.0	4.5		
		101.6 ± 7.1	7.0		
		94.8 ± 3.4	3.6		
	3400	92.7 ± 4.1	4.5	91.4 ± 4.2	4.6
		86.7 ± 4.7	5.5		
		72.1 ± 5.7	7.9		
	6800	82.1 ± 8.1	9.9	73.9 ± 7.5	10.1
		67.5 ± 3.4	5.0		

[0144] 表10猪肉中添加回收率

[0145]

药物	添加浓度 (ng L ⁻¹)	回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	批间变异系数 (CV %)
ZEN	450	106.4 ± 13.9	13.1	101.2 ± 5.9	5.8
		102.4 ± 11.9	11.7		
		94.8 ± 8.9	9.4		
	900	84.9 ± 7.1	8.3	84.2 ± 1.8	2.1
		82.1 ± 9.8	12.0		
		85.5 ± 6.7	7.9		
	1800	68.3 ± 6.4	9.3	75.9 ± 6.8	9.0
		81.4 ± 9.5	11.7		
		78.1 ± 10.2	13.1		
α -ZEL	650	103.0 ± 3.0	2.9	100.3 ± 10.4	10.3
		109.0 ± 7.2	6.6		
		88.8 ± 3.9	4.4		
	1300	85.5 ± 2.4	2.8	87.7 ± 3.5	4.0
		85.7 ± 3.9	4.6		
		91.7 ± 5.8	6.4		
	2600	73.1 ± 8.5	11.7	69.9 ± 3.4	4.9
		70.3 ± 4.6	6.5		
		66.3 ± 9.3	14.0		
β -ZEL	1200	96.3 ± 3.9	4.0	87.9 ± 10.0	11.3
		76.9 ± 11.1	14.5		
		90.6 ± 5.2	5.8		

[0146]

	2400	91.7 ± 2.3	2.5	89.6 ± 7.5	8.3
		81.3 ± 6.78	8.3		
		95.9 ± 5.6	5.8		
	4800	76.7 ± 10.1	13.2	74.1 ± 2.6	3.6
		71.4 ± 7.8	10.9		
		74.2 ± 7.5	10.1		
	α-ZAL	76.5 ± 10.0	13.1	75.1 ± 3.6	4.8
		77.9 ± 4.8	6.2		
		71.0 ± 10.0	14.1		
		86.6 ± 10.1	11.7	85.5 ± 2.6	3.0
		82.5 ± 11.8	14.2		
		87.3 ± 11.1	12.7		
		85.3 ± 11.0	12.9	97.5 ± 11.6	11.9
		108.3 ± 14.8	13.6		
		98.9 ± 12.1	12.2		
	450	68.4 ± 9.6	14.1	66.1 ± 2.1	3.1
		64.6 ± 6.0	9.2		
		65.1 ± 5.4	8.2		
	900	93.1 ± 10.7	11.5	92.9 ± 2.2	2.4
		95.1 ± 9.2	9.6		
		90.7 ± 2.4	2.7		
	1800	85.0 ± 3.6	4.3	86.6 ± 1.7	2.0
		88.4 ± 1.7	1.9		
		86.3 ± 3.3	3.8		
	1200	110.2 ± 6.6	6.0	105.3 ± 6.7	6.3
		97.7 ± 11.2	11.5		
		108.1 ± 5.8	5.4		
	2400	89.9 ± 4.1	4.5	93.2 ± 3.1	3.3
		93.6 ± 2.7	2.9		
		96.0 ± 2.7	2.8		
	4800	70.1 ± 5.6	7.9	71.5 ± 3.1	4.3
		69.3 ± 2.8	4.0		
		75.0 ± 7.9	10.5		

[0147] 表11猪肝脏中添加回收率

[0148]

药物	添加浓度 (ng L ⁻¹)	回收率(%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率(%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批间变异系数 (CV %)
ZEN	450	101.1 $\pm$ 11.0	10.9	99.9 $\pm$ 10.1	10.1
		109.3 $\pm$ 10.4	9.5		
		89.2 $\pm$ 9.6	10.7		
	900	86.6 $\pm$ 7.6	8.8	85.8 $\pm$ 5.8	6.7
		91.1 $\pm$ 8.7	9.5		
		79.6 $\pm$ 4.7	5.9		
	1800	72.1 $\pm$ 5.6	7.8	74.2 $\pm$ 5.5	7.5
		80.5 $\pm$ 8.5	10.5		
		70.05 $\pm$ 2.5	3.6		
α -ZEL	650	100.5 $\pm$ 5.3	5.2	105.1 $\pm$ 4.4	4.2
		109.4 $\pm$ 3.2	3.0		
		105.2 $\pm$ 4.5	4.2		
	1300	85.7 $\pm$ 4.0	4.7	82.0 $\pm$ 8.3	10.2
		87.9 $\pm$ 4.7	5.4		
		72.5 $\pm$ 2.7	3.7		
	2600	67.2 $\pm$ 6.1	9.1	69.8 $\pm$ 4.5	6.9
		75.3 $\pm$ 9.0	11.9		
		66.9 $\pm$ 2.7	4.0		
β -ZEL	1200	91.2 $\pm$ 9.7	10.6	90.8 $\pm$ 5.6	6.2
		96.2 $\pm$ 7.7	8.0		
		84.9 $\pm$ 9.1	10.7		
	2400	80.1 $\pm$ 6.2	7.7	80.2 $\pm$ 5.3	6.6
		85.6 $\pm$ 8.1	9.4		
		75.0 $\pm$ 2.9	3.9		
	4800	64.0 $\pm$ 3.7	5.7	69.7 $\pm$ 7.5	10.7
		78.2 $\pm$ 10.6	13.5		
		67.1 $\pm$ 3.5	5.2		
α -ZAL	300	63.7 $\pm$ 8.9	13.9	68.9 $\pm$ 6.6	9.6
		76.3 $\pm$ 10.7	14.1		
		66.8 $\pm$ 8.6	12.9		
	600	89.8 $\pm$ 10.5	11.7	89.0 $\pm$ 9.4	10.6
		97.9 $\pm$ 9.0	9.2		

[0149]

	1200	79.2 ± 6.6	8.3	96.6 ± 9.1	9.4
		92.5 ± 10.5	11.4		
		107.1 ± 15.8	14.7		
		90.3 ± 6.2	6.9		
β-ZAL	400	90.3 ± 5.1	5.6	87.8 ± 6.1	7.0
		92.21 ± 6.6	7.2		
		80.8 ± 11.6	14.3		
	800	107.4 ± 13.5	12.6	102.2 ± 10.5	10.3
		109.0 ± 13.40	12.3		
		90.0 ± 4.8	5.3		
	1600	104.1 ± 14.0	13.5	104.2 ± 6.9	6.6
		111.1 ± 9.9	8.9		
		97.3 ± 5.1	5.3		
ZAN	1100	99.5 ± 3.1	3.1	107.4 ± 11.0	10.2
		120.0 ± 6.6	5.5		
		102.9 ± 7.5	7.3		
	2200	94.5 ± 5.6	5.9	93.0 ± 4.4	4.7
		96.4 ± 5.7	5.9		
		88.1 ± 1.9	2.2		
	4400	67.2 ± 3.2	4.7	70.3 ± 3.2	4.5
		73.6 ± 4.1	5.6		
		70.1 ± 2.7	3.9		

[0150] 表12猪肾脏中添加回收率

[0151]

药物	添加浓度 (ng L ⁻¹)	回收率(%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率(%) ($\bar{X} \pm \text{SD}$)	批间变异系数 (CV %)
ZEN	400	107.6 ± 11.1	10.3	109.2 ± 8.0	7.3
		102.2 ± 8.3	8.1		
		117.8 ± 4.7	4.0		
	800	106.1 ± 4.7	4.5	106.1 ± 4.6	4.4
		101.5 ± 4.9	4.8		
		110.8 ± 6.8	6.2		
	1600	79.7 ± 8.2	10.3	80.5 ± 4.0	4.9
		77.0 ± 5.5	7.1		
		84.8 ± 7.0	8.3		

[0152]

α -ZEL	550	99.4 ± 3.9	3.9	104.7 ± 5.3	5.1
		109.9 ± 9.3	8.4		
		104.8 ± 7.5	7.1		
	1100	87.4 ± 4.7	5.3	88.7 ± 4.2	4.7
		93.4 ± 6.4	6.8		
		85.4 ± 3.9	4.5		
	2200	75.1 ± 4.5	6.0	70.5 ± 4.3	6.1
		66.6 ± 3.2	4.8		
		69.9 ± 4.2	5.9		
β -ZEL	1000	104.8 ± 5.5	5.2	96.1 ± 8.0	8.4
		88.9 ± 4.2	4.8		
		94.5 ± 5.4	5.7		
	2000	88.1 ± 6.0	6.8	84.1 ± 4.6	5.5
		79.0 ± 10.4	13.1		
		85.3 ± 4.8	5.7		
	4000	84.4 ± 10.4	12.3	77.9 ± 5.7	7.3
		73.9 ± 3.7	5.0		
		75.3 ± 3.2	4.3		
α -ZAL	250	74.1 ± 9.9	13.4	77.8 ± 8.4	10.8
		71.9 ± 9.5	13.2		
		87.4 ± 12.0	13.8		
	500	107.6 ± 10.6	9.8	109.3 ± 5.6	5.2
		104.8 ± 9.7	9.2		
		115.6 ± 10.5	9.1		
	1000	112.2 ± 6.5	5.8	106.8 ± 5.3	5.0
		106.5 ± 4.5	4.2		
		101.6 ± 4.8	4.7		
β -ZAL	350	74.9 ± 9.3	12.4	69.2 ± 7.9	11.4
		60.2 ± 9.0	14.9		
		72.5 ± 8.7	11.9		
	700	105.3 ± 9.2	8.7	100.1 ± 10.5	10.4
		88.1 ± 12.9	14.7		
		107.0 ± 6.7	6.3		
	1400	114.2 ± 6.2	5.4	110.5 ± 4.5	4.1
		105.5 ± 9.6	9.1		

[0153]

		111.8 ± 6.3	5.7		
ZAN	1000	112.2 ± 5.9	5.2	113.6 ± 5.3	4.7
		119.5 ± 7.0	5.8		
		109.1 ± 6.75	6.2		
	2000	96.2 ± 3.8	3.9	95.5 ± 8.1	8.5
		103.1 ± 5.9	5.7		
		87.2 ± 6.1	7.0		
	4000	74.0 ± 1.9	2.6	74.6 ± 3.4	4.5
		78.2 ± 5.9	7.5		
		71.5 ± 2.0	2.8		

[0154] 表13牛奶中添加回收率

[0155]

药物	添加浓度 (ng L ⁻¹)	回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	批内变异系数 (CV %, n=5)	平均回收率(%) ($\bar{X} \pm SD$)	批间变异系数 (CV %)
ZEN	400	81.3 ± 10.2	12.6	84.6 ± 3.5	4.1
		84.2 ± 11.4	13.5		
		88.3 ± 11.8	13.4		
	800	98.6 ± 5.1	5.1	96.2 ± 4.5	4.7
		90.9 ± 11.8	13.0		
		98.9 ± 9.4	9.5		
	1600	69.4 ± 6.4	9.2	73.8 ± 4.2	5.7
		77.7 ± 10.3	13.2		
		74.3 ± 9.7	13.0		
α -ZEL	600	99.2 ± 14.1	14.2	94.7 ± 9.5	10.1
		101.1 ± 13.4	13.3		
		83.7 ± 4.9	5.9		
	1200	83.2 ± 8.7	10.5	76.9 ± 5.6	7.3
		75.2 ± 6.5	8.7		
		72.4 ± 5.1	7.0		
	2400	63.2 ± 8.0	12.7	62.9 ± 2.9	4.5
		65.6 ± 8.9	13.5		
		59.9 ± 6.8	11.4		
β -ZEL	1100	85.5 ± 2.9	3.4	94.1 ± 8.4	8.9
		102.3 ± 10.0	9.8		
		94.3 ± 7.2	7.7		

[0156]

	2200	90.6 ± 11.5	12.6	87.0 ± 3.2	4.1
		86.9 ± 8.9	10.3		
		83.6 ± 7.5	9.0		
	4400	65.0 ± 6.2	9.6	65.0 ± 8.0	12.4
		73.1 ± 5.9	8.1		
		57.0 ± 7.2	12.7		
	α-ZAL	300	67.8 ± 8.6	67.5 ± 2.9	4.3
			70.2 ± 2.9		
			64.5 ± 86		
		600	93.7 ± 8.0	92.6 ± 2.6	2.8
			89.6 ± 9.9		
			94.4 ± 9.4		
		1200	78.4 ± 9.7	81.5 ± 3.2	3.9
			84.8 ± 7.4		
			81.3 ± 9.4		
	β-ZAL	400	75.8 ± 10.2	73.6 ± 5.8	7.9
			78.0 ± 9.5		
			67.0 ± 4.8		
		800	91.1 ± 8.4	92.0 ± 2.0	2.2
			94.3 ± 5.9		
			90.7 ± 3.4		
		1600	95.2 ± 11.9	96.7 ± 6.0	6.2
			103.2 ± 10.0		
			91.5 ± 7.4		
	ZAN	1100	87.4 ± 6.7	99.2 ± 11.2	11.3
			109.7 ± 7.9		
			100.4 ± 9.4		
		2200	80.2 ± 6.8	81.9 ± 4.1	5.0
			86.6 ± 4.9		
			78.91 ± 3.6		
		4400	61.2 ± 7.4	63.9 ± 2.8	4.3
			66.8 ± 7.2		
			63.8 ± 6.4		

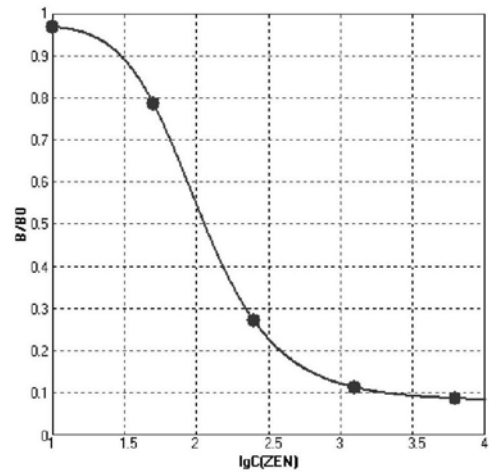


图1

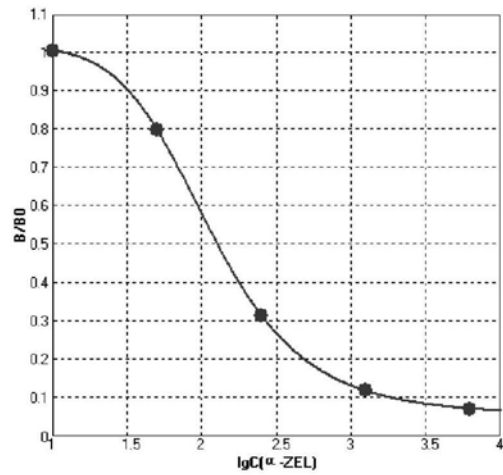


图2

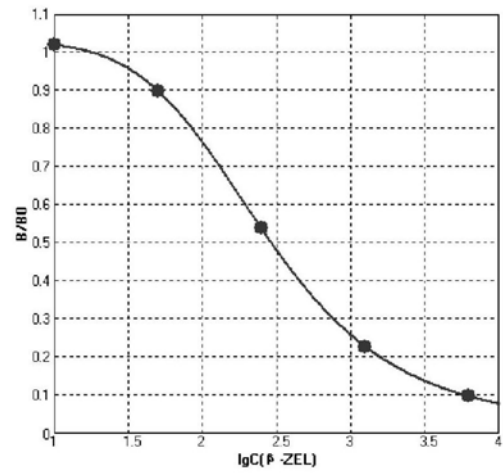


图3

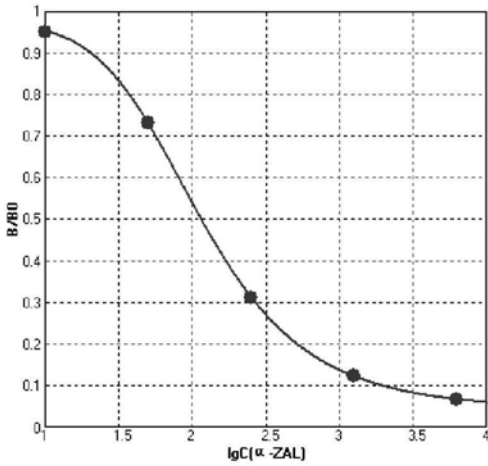


图4

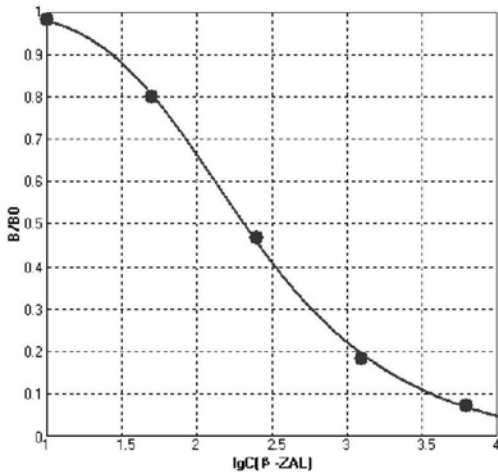


图5

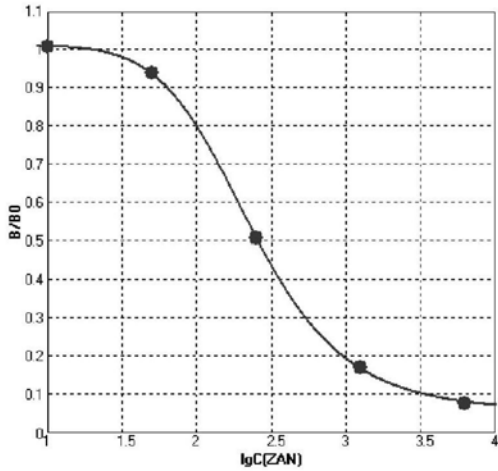


图6