

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001898

AlphaLISA法同时测定动物组织中克伦特罗和莱克多巴胺

向 露¹, 龚 倩², 王 智², 郝存显³, 聂福平³, 曹淑瑞³, 王国民³, 唐柏彬³, 母昭德²

(1. 重庆大学附属肿瘤医院药学部, 重庆 400030; 2. 重庆医科大学药学院药物分析教研室, 重庆 400016;

3. 重庆出入境检验检疫局重庆市进出口食品安全工程技术研究中心, 重庆 400020)

【摘要】目的:建立同时测定动物组织中克伦特罗(clenbuterol, CLB)和莱克多巴胺(ractopamine, RAC)的纳米均相时间分辨荧光免疫(amplified luminescent proximity homogeneous assay linked immunosorbent assay, AlphaLISA)分析方法。**方法:**样品经 β -葡萄糖醛酸苷酶/芳基硫酸酯酶和乙酸铵酶解提取, 正己烷脱脂, 滤膜过滤, 滤液与生物素化抗原、抗体、供体微珠和受体微珠进行酶联免疫, AlphaLISA 进行检测。**结果:**CLB 和 RAC 在 0.1~50 ng/mL 范围内呈良好的线性关系($R^2>0.98$), 检测限为 0.02 ng/mL; 在 5、10、20 $\mu\text{g/kg}$ 3 个添加水平下 CLB + RAC(1:1)、CLB 和 RAC 的回收率分别为 88.8%~102.8%、86.6%~98.3%和 84.2%~103.2%; 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)均小于 12%。**结论:**该方法快速简单、结果准确可靠, 适用于检测和筛选动物组织中的 RAC 和 CLB。

【关键词】AlphaLISA; 克伦特罗; 莱克多巴胺; 动物组织**【中图分类号】**O657.99**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-11-12Simultaneous determination of clenbuterol and ractopamine
in animal tissues by AlphaLISAXiang Lu¹, Gong Qian², Wang Zhi², Xi Cunxian³, Nie Fuping³, Cao Shurui³,
Wang Guomin³, Tang Bobin³, Mu Zhaode²(1. Department of Pharmacy, Chongqing University Cancer Hospital; 2. Teaching and Research Section of
Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University; 3. Chongqing Entry-Exit
Inspection and Quarantine Bureau, Chongqing Engineering Technology Research Center of Import
and Export Food Safety)

【Abstract】Objective: To develop an amplified luminescent proximity homogeneous assay linked immunosorbent assay (AlphaLISA) method for simultaneous determination of clenbuterol (CLB) and ractopamine (RAC) in animal tissues. **Methods:** The samples were subjected to enzymatic extraction with β -glucuronidase/sulfatase and ammonium acetate, degreased with n-hexane, and filtrated with a filter membrane. Then the filtrate underwent reactions with biotinylated antigen, antibody, donor beads, and acceptor beads; subsequently AlphaLISA was used for determination. **Results:** CLB and RAC showed a good linear relationship in the range of 0.1 to 50 ng/mL ($R^2>0.98$), with a limit of detection of 0.02 ng/mL. The recovery rates of CLB + RAC(1:1), CLB, and RAC at spiking levels of 5, 10, and 20 $\mu\text{g/kg}$ were 88.8%~102.8%, 86.6%~98.3%, and 84.2%~103.2%, respectively; the relative standard deviations were all less than 12%. **Conclusion:** The method developed is simple, rapid, accurate, and reliable, thus making it applicable for the determination and screening of CLB and RAC in animal tissues.

【Key words】AlphaLISA; clenbuterol; ractopamine; animal tissue

作者介绍: 向 露, Email: xianglu51@163.com,

研究方向: 药物分析。

通信作者: 母昭德, Email: 1281618155@qq.com。

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划资助项目(编号:
2015IK333); 质检公益性行业科研专项资助项目(编号:
201210086)。优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181122.0911.006.html>

(2018-11-22)

克伦特罗(Clenbuterol, CLB)和莱克多巴胺(Rac-topamine, RAC)是具有相似化学结构和功能的 β -受体激动剂,由于这一类药物能够加强心肌收缩,扩张支气管平滑肌,在临床上常用于治疗休克和支气管痉挛等疾病^[1-2]。在畜牧业中,CLB 和 RAC 作为饲料添加剂在动物体内能够起到营养再分配作用,可明显促进生长,减少脂肪含量,增加肌肉蛋白质的合成,提高动物的瘦肉率^[3-4],被俗称为“瘦肉精”。研究表明,人若长期大量食用含有此类药物蓄积的肉制品,会出现心悸、头痛、呕吐等中毒症状,严重威胁人类健康^[5]。因此,欧盟、中国和美国先后在法律上禁止使用 β -受体激动剂作为动物的饲料添加剂^[6]。但在经济利益的驱使下, β -受体激动剂的非法添加屡禁不止。为了确保食品安全,建立一种快速有效的方法来检测和筛选 CLB 和 RAC 等 β -受体激动剂是非常有必要的。

国内外报道的 β -受体激动剂检测方法主要有:酶联免疫法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[7-8]、电化学检测法^[9-10]、荧光探针^[11-12]、高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[13]、液相色谱-串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)^[14] 和气相色谱-质谱法(gas chromatography mass spectrometry, GC-MS)^[15]。尽管这些方法成功地用于 β -受体激动剂的检测,但所需要的仪器往往十分昂贵,且分析过程中样品预处理复杂耗时,比如 HPLC^[13]和 LC-MS/MS 法^[16],而 ELISA 法则易出现假阳性结果。纳米均相时间分辨荧光免疫(amplified luminescent proximity homogeneous assay linked immunosorbent assay, AlphaLISA)作为一种新的检测技术,因其操作简单、无须清洗步骤、样品用量少且稳定性好等优点被广泛用于分子生物学和医学等领域^[17-18]。而食品中兽药残留的监测方面,2012 年,Zhang 等^[19]首次报道了用 AlphaLISA 法测定牛奶、蜂蜜和鸡蛋中的氯霉素。AlphaLISA 技术的原理是基于 2 种类型的微珠:供体微珠和受体微珠。供体珠中包含的光敏剂,在 680 nm 光照下将空气中的氧转换为单体氧,当供体微珠和受体微珠非常接近(距离小于 200 nm)时单体氧扩散到受体微珠,受体微珠就会发射 520~620 nm 的光^[20-21]。因待测物与生物素化抗原竞争抗体时,供体微珠和受体微珠无法相互靠近,使得单体氧无法扩散到受体微珠,导致光信号

下降^[17]。通过检测光信号的强度,来判断样品中有无待测物。

目前,用 AlphaLISA 法同时检测 CLB 和 RAC 残留鲜有报道。本文建立了 AlphaLISA 法同时检测动物组织样品中的 CLB 和 RAC。与其他检测方法相比,该方法更简单,更快,更灵敏,可用于肉类食品中 CLB 和 RAC 的残留检测和快速筛查,在实际样品分析具有较好的应用前景。

1 材料与方法

1.1 研究材料

猪肉和牛肉组织均购于重庆地区超市。

1.2 主要试剂与仪器

克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇、特布他林、妥布特罗、西马特罗、齐帕特罗、喷布特罗、苯乙醇胺 A(纯度均 $\geq 97.0\%$);氯霉素(纯度 $\geq 99.24\%$)和庆大霉素(纯度 $\geq 92.7\%$),以上试剂均购自 Dr.Ehrenstorfer GmbH 公司(Augsburg, Germany)。抗体(CLB, RAC)、偶联 BSA 的抗原(CLB, RAC)购自深圳生物安提科技公司。生物素(b-1001-105)购自美国 Solulink 公司。正己烷和醋酸铵(均为色谱纯)购自美国 TEDIA 公司。 β -葡萄糖醛酸苷酶/芳基硫酸酯酶(helix pomatia, $\geq 100\ 000$ U/mL)购自美国 Sigma 公司。偶联有鼠抗 IgG 的受体微珠、包裹有链霉素和素的供体微珠、Buffer 缓冲液和 384 微孔板购自美国 PerkinElmer 公司。Oasis MCX 6cc 购自美国 Waters 公司。其他化学试剂均为分析纯,购于美国 Sigma Aldrich 和德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司。

主要仪器有多标记微孔板检测仪(AlphaLISA 仪, EnSpire 2300, 美国 PerkinElmer 公司), Sartorius BS224S 天平(Sartorius 公司), N-EVAP 116 氮吹仪(美国 Organomation 公司), SR-2DS 型强力震荡器(日本 TAITEC 公司), 涡旋震荡器(江苏康健医疗用品有限公司), 3-30K 离心机(德国 Sigma 公司), IPP500 烘箱(美墨尔特公司), 超纯水仪(Milford, MA, USA)。

1.3 研究方法

1.3.1 标准溶液的配制 分别准确称取折算成目标化合物为 10 mg(精确至 0.000 01 g)的各标准品,溶解在 10 mL 甲醇溶液中制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液并储存在 $-20\ ^\circ\text{C}$ 。将上述标准储备溶液逐级稀释成 1 mg/L 的标准溶液,储存在 $4\ ^\circ\text{C}$ 供日常使用。

1.3.2 生物素化抗原的制备 分别取抗原(CLB 和 RAC) 32 μL 添加到 2 只 250 μL EP 管中,加入生物素 2 μL ,通过涡旋震荡混匀后,室温下避光孵育 90 min,得到生物素化抗原, $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。

1.3.3 样品的制备 猪肉和牛肉组织样品均购自超市。准确称取 5 g 样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 50 μL β -葡萄糖醛酸苷酶/芳基硫酸酯酶和 20 mL 醋酸铵(2 mol/L,

pH=5.2)溶液,涡旋混匀后在 37 ℃下酶解提取 16 h。然后 8 000 r/min 离心 5 min,上层溶液转移到新的 50 mL 离心管,加入 20 mL 正己烷,振摇 20 min,然后 8 000 r/min 离心 5 min,弃去正己烷层,水相经滤纸过滤,并用 2 mL 醋酸铵溶液洗涤。滤液供检测。

1.3.4 AlphaLISA 检测 取白色微孔板,将 5 μL 样品(或标准品),5 μL 混合抗原(v/v, 1:1)和 5 μL 混合抗体(v/v, 1:1)添加到微孔板中。离心 1 min,37 ℃条件下避光孵育 30 min。无须洗涤步骤,依次加入 5 μL 受体微珠(0.18 mg/mL)和 5 μL 供体微珠(0.18 mg/mL)于微孔板中,离心 1 min,37 ℃条件下避光孵育 60 min。用 AlphaLISA 检测仪测定每个待测孔的光信号强度,绘制标准曲线,根据标准曲线计算样品中待测物的含量。

2 结果

2.1 方法学评价

2.1.1 线性关系和检测限 取 1 mg/mL 的标准储备溶液 (CLB、RAC 和混合标准溶液 (CLB:RAC, 1:1)) 配制成一系列浓度为 0.1、1、5、10、20、50 ng/mL 的标准工作溶液,在最佳优化条件下进行测定,对结果进行线性拟合。结果表明,混合标准溶液、CLB 和 RAC 的线性回归方程分别为 $y=-0.327\ 19x+0.762\ 77$, $y=-0.239\ 98x+0.889\ 08$, $y=-0.222\ 66x+0.815\ 29$; R 值均大于 0.98,说明该方法具有良好的线性。检测限(limit of detection, LOD)为 0.02 ng/mL。

2.1.2 特异性 本实验考察了在优化条件下 9 种结构相似化合物对 CLB 和 RAC 检测的影响。在浓度为 0.1~50 ng/mL 进行 AlphaLISA 测定,通过 IC_{50} 值的测定来计算交叉反应率。交叉反应率计算公式为:

交叉反应率(100%)= $\frac{(\text{CLA}+\text{RAC})\text{的 } IC_{50}\text{ 值}}{\text{其他相似化合物的 } IC_{50}\text{ 值}}\times 100\%$

交叉反应率见表 1。结果表明 CLB 和 RAC 与其他 9 种化合物的交叉反应率低,该方法测定 CLB 和 RAC 特异性良好。

2.1.3 方法回收率和样品的测定 采用 1.3 项下方法,对市售的猪肉和牛肉样品用建立的 AlphaLISA 方法进行检测。结果显示猪肉和牛肉样品中均未检出 CLB 和 RAC。为了进一步评价所建立的 AlphaLISA 方法,空白猪肉和牛肉进行加标回收试验,3 个添加水平分别为 5、10、20 μg/kg ($n=5$)。并将已建立的方法与 GB SN/T 1924-2011^[22]中 LC-MS/MS 法进行比较(表 2),AlphaLISA 法和 LC-MS/MS 法测定结果无明显差别。AlphaLISA 测定 CLB、RAC 和混合体系 CLB+RAC (1:1) 回收率分别为 86.6%~98.3%、84.2%~103.2%、88.8%~102.8%, RSD 均小于 11.2%。结果表明,本文建立的 AlphaLISA 法可用于猪肉和牛肉样品中 CLB 和 RAC 的残留检测。

表 1 与类似结构物的交叉反应率

化合物	结构式	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率 (%)
CLB+RAC		3.58	100
特布他林		40.63	8.81
苯乙醇胺 A		92.53	3.87
喷布特罗		626.51	0.57
西马特罗		>1 000	<0.1
齐帕特罗		>1 000	<0.1
沙丁胺醇		>1 000	<0.1
妥布特罗		>1 000	<0.1
氯霉素		>1 000	<0.1
庆大霉素		>1 000	<0.1

表 2 猪肉和牛肉加标回收率实验结果 ($n=5$)

样品	化合物	添加 水平 (μg/kg)	AlphaLISA		LC-MS/MS	
			回收率 (%)	RSD (%)	回收率 (%)	RSD (%)
牛肉	CLB+RAC (1:1)	5	101.6	11.2	98.2	5.3
		10	95.1	6.1	93.8	4.8
		20	88.8	5.1	85.3	7.5
	CLB	5	95.5	6.8	95.1	6.3
		10	98.3	7.5	90.8	8.4
		20	87.1	8.3	96.0	10.5
	RAC	5	84.2	6.2	111.2	9.8
		10	93.2	8.7	96.7	10.3
		20	85.2	4.5	79.6	9.3
猪肉	CLB+RAC (1:1)	5	91.2	8.6	90.1	10.8
		10	102.8	5.3	93.4	8.7
		20	92.4	5.8	92.1	7.1
	CLB	5	86.6	6.9	88.5	10.5
		10	95.5	9.9	81.6	8.4
		20	95.6	7.1	93.0	6.9
	RAC	5	89.6	10.4	84.6	8.9
		10	103.2	5.8	93.7	9.2
		20	92.8	4.7	87.1	7.5

2.2 净化过程的考察

本研究将待测样品分为 2 组,一组样品溶液不经 MCX 柱净化直接测定,另一组样品溶液通过 MCX 柱净化。净化过程为:MCX 柱用 3 mL 甲醇、3 mL 水和 3 mL 盐酸(0.1 mol/L)活化,样品上清液转移至柱中,用 3 mL 水、5 mL 甲醇(v/v, 50%)和 3 mL 正己烷淋洗,洗脱液(V 醋酸乙酯:V 甲醇:V 氨, 10:9:1)洗脱。氮气吹干后,用 1 mL Buffer 溶解残渣,0.22 μ m 滤膜过滤。结果表明,无净化过程的回收率与净化后的结果无明显区别,如图 1 所示。因此,本实验样品前处理无须净化步骤,与其他方法相比,本实验的操作程序更简单^[14-15]。

2.3 抗原-抗体浓度的优化

用 Buffer 缓冲液进行稀释,生物素化抗原浓度的变化从 1:100 到 1:19 200,最后 1 个孔只加 Buffer 作空白对照,采用

1.3.4 项目下方法进行测定。结果表明荧光强度随抗原稀释倍数的增加逐渐增强,当抗原浓度达 1:9 600 时,荧光强度最大,如图 2A 所示。在抗原浓度为 1:9 600 时,对 2 种抗体浓度进行优化,结果显示随稀释倍数的增加荧光强度先增强后降低,当抗体浓度为 1:300~1:1 200,荧光强度有一个最高平台值,如图 2B 所示。通过测定 CLB 和 RAC(1:1)的 IC_{50} 值,最终确定混合抗体的最佳稀释浓度。图 3A 显示当混合抗体浓度稀释为 1:300 时,CLB 和 RAC 灵敏度和 IC_{50} 值差异较大,当混合抗体浓度稀释到 1:600 时 IC_{50} 值较为接近(图 3B),进一步将混合抗体稀释至 1:1 200,CLB 和 RAC 的 IC_{50} 值分别提高同时 IC_{50} 值之间的差异增加(图 3C)。综上,将抗原浓度为 1:9 600,抗体浓度为 1:600 作为工作浓度。

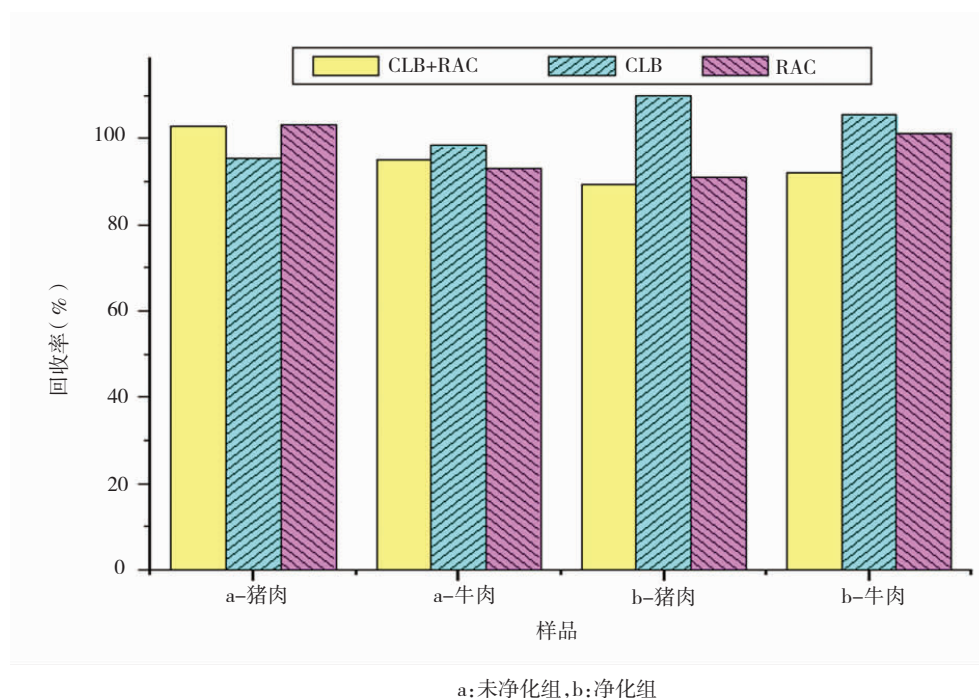
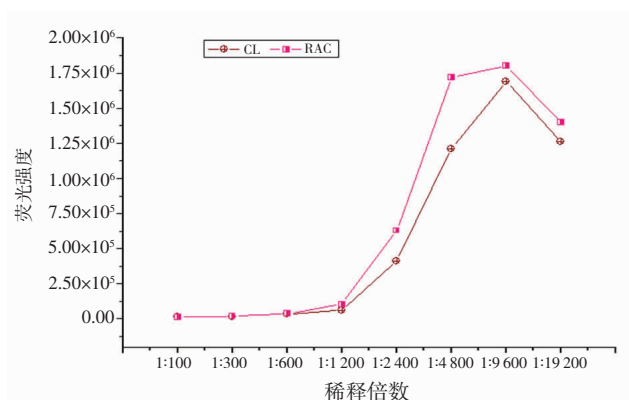
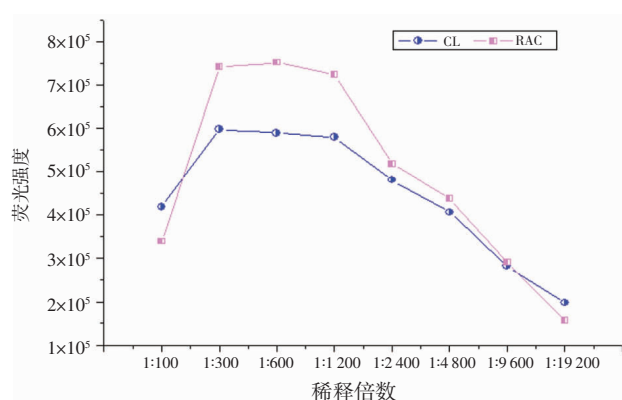


图 1 净化与未净化对结果的影响

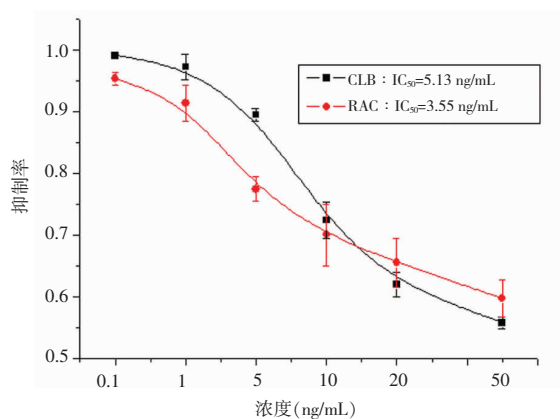


A. 抗原

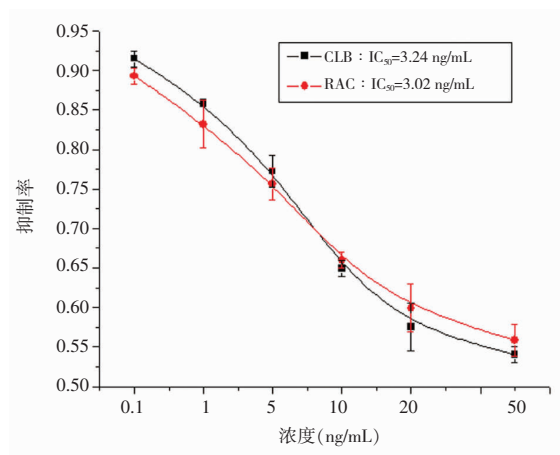


B. 抗体

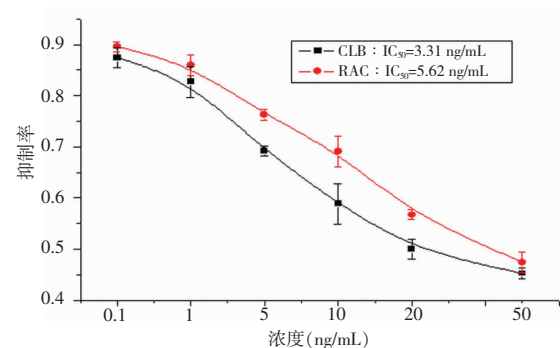
图 2 不同稀释倍数浓度对荧光强度的影响



A. 稀释倍数为 1:300



B. 稀释倍数为 1:600



C. 稀释倍数为 1:1200

图3 混合抗体浓度优化

2.4 供体微珠和受体微珠浓度优化

将 2 种微珠用 Buffer 缓冲液稀释至 0.01、0.03、0.06、0.09、0.12、0.15、0.18 和 0.21 mg/mL, 结果如图 4 所示。当供体微珠浓度在 0.18 mg/mL 时荧光强度最大。在供体微珠浓度为 0.18 mg/mL, 受体微珠浓度 0.18 mg/mL 和 0.21 mg/mL 条件下测定 IC_{50} 值。当受体微珠浓度为 0.18 mg/mL 时, CLB 和 RAC 的 IC_{50} 值分别为 2.89、2.69 ng/mL, 当受体微珠浓度为 0.21 mg/mL 时, CLB 和 RAC 的 IC_{50} 值分别为 2.75、4.15 ng/mL。因受体微珠和供体微珠浓度均为 0.18 mg/mL 时, 这 2 种化合物的

IC_{50} 较为接近。故将浓度为 0.18 mg/mL 的供体和受体微珠的选为最佳条件。

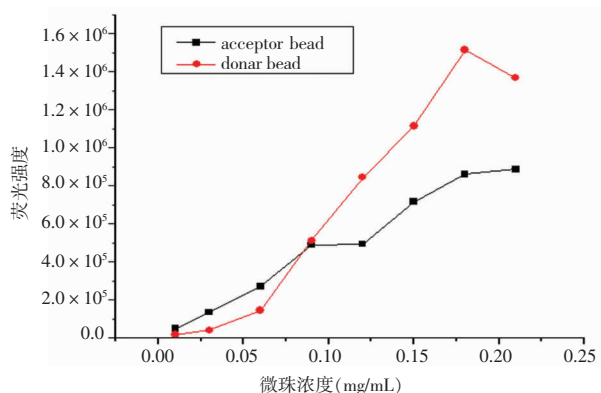


图4 供体和受体微珠浓度的优化

2.5 时间和温度的优化

在反应温度为 25 °C 和 37 °C 时, 分别考察了不同的反应时间 (30、45、60、90 min) 对结果的影响。结果表明, 在同一反应时间下, 温度为 37 °C 的反应值明显高于在 25 °C 时; 且同一温度下, 时间越长, 反应值越高, 如图 5 所示。本实验在 37 °C 条件下, 反应时间为 60 min 和 90 min, 测定 CLB 和 RAC 的 IC_{50} 值。反应时间 60 min 时, CLB 和 RAC 的 IC_{50} 分别为 2.79、3.09 ng/mL, 反应时间 90 min 时, IC_{50} 分别为 3.24、3.75 ng/mL。综合检测灵敏度和检测时间, 本实验选择反应温度为 37 °C 和反应时间为 60 min 作为实验条件, 以此节省时间和提高检测灵敏度。

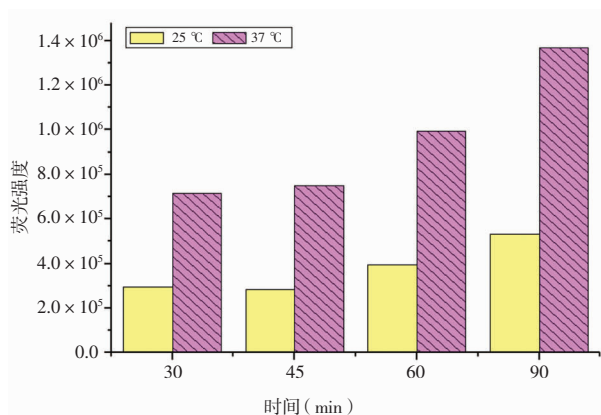


图5 反应时间和温度的选择

3 讨论

随着近年来食品安全事件的频频发生, 食品中 β -受体激动剂的残留检测和监控引起了世界各国的广泛关注。现有的分析方法中, LC-MS/MS 和 GC-MS 是应用最广泛、可靠性较高的方法^[14-15, 23]。但这 2 种方法的缺点是样品前处理步骤繁琐、耗时长, 且仪

器设备昂贵,不能满足快速检测的需要。ELISA法较前 2 种方法虽快速简单,无须大型仪器,但容易出现假阳性结果^[7-8]。

AlphaLISA 技术是超微量检测领域中出现的新的检测技术,被誉为免洗的 ELISA。该方法具有分析操作简单、高通量、稳定性强、样品消耗少、灵敏度高、特异性强等特点,在生物医学检测及新药研究等领域得到了较为广泛的应用,而在食品安全检测方面鲜有报道^[23]。本研究建立了同时测定动物组织中 CLB 和 RAC 的 AlphaLISA 法,该方法快速简单、省时省力且样品用量少,检测限达到 0.02 ng/mL,可用于猪肉和牛肉中 CLB 和 RAC 的筛选与检测,为今后动物组织中 CLB 和 RAC 监测研究工作的深入开展提供了有力的技术支持,具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Shelper WL, Smith DJ. Development of an Immunoassay for the β -adrenergic agonist ractopamine[J]. *Journal of Immunoassay*, 2000, 21(1): 1-23.
- [2] Yan PP, Tang QH, Deng AP, et al. Ultrasensitive detection of clenbuterol by quantum dots based electrochemiluminescent immunosensor using gold nanoparticles as substrate and electron transport accelerator [J]. *Sensors & Actuators B Chemical*, 2014, 191(1): 508-515.
- [3] Wang H, Zhang Y, Li H, et al. A silver-palladium alloy nanoparticle-based electrochemical biosensor for simultaneous detection of ractopamine, clenbuterol and salbutamol[J]. *Biosens Bioelectron*, 2013, 49: 14-19.
- [4] Cao XL, Li H, Lian L, et al. A dual-responsive fluorescence method for the detection of clenbuterol based on BSA-protected gold nanoclusters[J]. *Anal Chim Acta*, 2015, 871: 43-50.
- [5] 徐丽君, 卢艳芬, 唐 巍, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法同时测定牛肉和牛肝中 5 种 β_2 -受体激动剂[J]. *分析测试技术与仪器*, 2012, 18(3): 140-148.
- [6] Shishani E, Chai SC, Jamokha S, et al. Determination of ractopamine in animal tissues by liquid chromatography-fluorescence and liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 483(1-2): 137-145.
- [7] 王建平, 沈建忠. 猪肝和猪尿中沙丁胺醇和克伦特罗残留的酶联免疫吸附检测法研究[J]. *畜牧兽医学报*, 2005, 36(4): 397-401.
- [8] Pleadin J, Peršić N, Vulić A, et al. Determination of residual ractopamine concentrations by enzyme immunoassay in treated pig's tissues on days after withdrawal[J]. *Meat Sci*, 2012, 90(3): 755-758.
- [9] Shen L, He PL. An electrochemical immunosensor based on agarose hydrogel films for rapid determination of ractopamine[J]. *Electrochemistry Communications*, 2007, 9(4): 657-662.
- [10] Regiart M, Escudero LA, Aranda P, et al. Copper nanoparticles applied to the preconcentration and electrochemical determination of β -adrenergic agonist: an efficient tool for the control of meat production[J]. *Talanta*, 2015, 135: 138-144.
- [11] Tang Y, Gao Z, Wang S, et al. Upconversion particles coated with molecularly imprinted polymers as fluorescence probe for detection of clenbuterol[J]. *Biosens Bioelectron*, 2015, 71: 44-50.
- [12] Jing X, Bai B, Zhang C, et al. Rapid and sensitive determination of clenbuterol in porcine muscle and swine urine using a fluorescent probe[J]. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2015, 136(PtB): 714-718.
- [13] Geng Y, Zhang M, Yuan W, et al. Modified dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of clenbuterol in swine urine[J]. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 2011, 28(8): 1006-1012.
- [14] Duvivier WF, Van Beek TA, Meijer T, et al. Ultratrace LC-MS/MS analysis of segmented calf hair for retrospective assessment of time of clenbuterol administration in agriforensics[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(2): 493-499.
- [15] He LM, Su YJ, Zeng ZL, et al. Determination of ractopamine and clenbuterol in feeds by gas chromatography-mass spectrometry[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 132(4): 316-323.
- [16] Gressler V, Franzen ARL, de Lima GJMM, et al. Development of a readily applied method to quantify ractopamine residue in meat and bone meal by QuEChERS-LC-MS/MS[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2016, 1015-1016: 192-200.
- [17] 洪小柳, 吕敬章, 张 恒, 等. AlphaLISA 技术在食品安全检测中的研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(1): 198-202.
- [18] Huang B, Yu H, Bao J, et al. A homogeneous time-resolved fluorescence immunoassay method for the measurement of compound W [J]. *Biomark Insights*, 2018, 13: 1177271918757484.
- [19] Zhang Y, Huang B, Zhang J, et al. Development of a homogeneous immunoassay based on the AlphaLISA method for the detection of chloramphenicol in milk, honey and eggs[J]. *J Sci Food Agric*, 2012, 92(9): 1944-1947.
- [20] Waller H, Chatterji U, Galloway P, et al. The use of AlphaLISA technology to detect interaction between hepatitis C virus-encoded NS5A and cyclophilin A[J]. *J Virol Methods*, 2010, 165(2): 202-210.
- [21] Gong Q, Xi CX, Nie FP, et al. Determination of zearalanol and its analog zearalanone in muscle tissues by amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaLISA)[J]. *Food Analytical Methods*, 2017, 10(2): 339-346.
- [22] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB SN/T1924-2011 进出口动物源食品中克伦特罗、莱克多巴胺、沙丁胺醇和特布他林残留量的测定 液相色谱-质谱/质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [23] 颜 露, 赵晓航, 许 杨. 均相光激化学发光免疫分析技术研究进展[J]. *生命科学*, 2016, 28(9): 1083-1088.

(责任编辑: 冉明会)