

糖皮质激素 ELISA 检测方法的建立及 群选性抗体的筛选

胡拥明, 王利兵, 袁媛, 陈伟, 边爱, 马伟, 胥传来*

(江南大学食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 设计间接竞争 ELISA 方法, 并优化二抗稀释比、竞争时间、PBS 溶液的 pH 值 3 个条件参数。优化后的地塞米松、倍他米松、双氟米松 3 种抗体的间接竞争 ELISA 曲线的 IC_{50} 分别为 2.66、7.36、6.12 ng/ml。通过 3 种抗体的交叉反应来评估其群选特性。结果表明, 地塞米松抗体的群选性最强, 对双氟米松的交叉反应率高达 120%、倍他米松 73%、曲安奈德 37%、泼尼松龙 21%, 而对其他 3 种内源性类糖皮质激素交叉反应率均小于 0.1%, 然后地塞米松以 0.375、0.75、1.5、3.0 ng/g 分别添加到鸡肉样本中测定回收率, 所得回收率在 61.3%~80.3% 之间, 变异系数小于 15%。在实际样本检测中, 将 ELISA 方法的测定结果与 LC-MS 的结果进行比较, 两者具有很好的相关性。

关键词: 糖皮质激素; 酶联免疫吸附测定法; 检测; 群选性抗体; 选择性

Development of an ELISA for Detection of Dexamethasone and Screening of Polyclonal Antibody

HU Yong-ming, WANG Li-bing, YUAN Yuan, CHEN Wei, BIAN Ai, MA Wei, XU Chuan-lai*

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Indirect competitive ELISA methods were developed based on the high-titer antibody and the dilution ratio of goat anti-rabbit-HRP, competition time and the pH of PBS solution were optimized. The IC_{50} of optimized indirect competitive ELISA for dexamethasone, betamethasone and flumethasone were 2.66, 7.36, 6.12 ng/ml, respectively. The group selection of three antibodies was accessed by detecting their cross-reactivities. The results showed that the anti-dexamethasone antibody was the best suitable for group selection and the cross-reactivity toward flumethasone, betamethasone, triamcinolone and prednisolone was up to 120%, 73%, 37%, prednisolone 21% while the cross activity towards several natural glucocorticoids was lower than 0.1%. The recoveries were detected by spiking four concentrations (0.375, 0.75, 1.5 ng/ml and 3.0 ng/ml) of DEX in chicken muscle tissue and the results indicated that the recoveries were between 61.3% and 80.3% and the coefficients of variation were lower than 15%. The ELISA method and LC-MS method were applied to analyze the real samples, and high correlation was observed between the two methods.

Key words: corticosteroids; ELISA; detection; class specific antibody; group-selection

中图分类号: R977.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2009)24-0331-06

为了限制糖皮质激素类药物的非法生产与使用, 保障消费者的安全与健康, 有必要建立高效、灵敏的检测方法。当今国际上常用的糖皮质激素类残留的检测方法有免疫分析法、薄层色谱、液相色谱、气相色谱、分光光度计、荧光计、电子捕获、质谱或串联质谱技术等^[1-9]。本研究建立检测糖皮质激素残留的间接竞争 ELISA(indirect competitive ELISA, ic-ELISA)方法, 优化间接 ELISA 检测系统, 确定 3 种抗体的间接 ELISA 的

最低检测限和线性范围。此外, 考察方法的特异性, 从而筛选出最佳群选性抗体, 然后从准确性、重复性方面评估 ELISA 检测系统。最后, 用 LC-MS 方法对实际样品检测结果进行确证。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

收稿日期: 2009-07-08

作者简介: 胡拥明(1979—), 男, 助教, 本科, 研究方向为残留物检测。E-mail: hymnody@yeah.net

* 通讯作者: 胥传来(1965—), 男, 教授, 博士, 研究方向为食品安全。E-mail: xcl@jiangnan.edu.cn

地塞米松(dexamethasone, DEX)、倍他米松(betamethasone, BET)、双氟米松(flumethasone, FLM) 陕西晶美生物科技有限公司; 曲安息龙、泼尼松龙、氢化可的松、甲基泼尼松龙、可的松 Sigma 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(HRP-IgG) 上海生物工程公司; 四甲基联苯胺(TMB) 华美生物工程公司。

1.2 仪器与设备

TGL-40B 台式低速离心机 上海安亭科学仪器厂; 石英自动双重纯水蒸馏器 金坛市荣华仪器制造有限公司; ZD-9556 水平摇床 太仓科教器材厂; Costar 96 孔可拆酶标板 上海吉泰生物科技有限公司; MuLtika Mks 酶标仪、可调移液器 Thermo Labsystems 公司; Agilent 6890N 气相色谱 -Agilent 5973N 型质谱检测器 美国 Finigon 质谱公司; 涡旋混合器 上海沪西仪器分析厂。

1.3 方法及步骤

1.3.1 间接竞争 ELISA 法

利用间接竞争 ELISA 流程进行测定, 具体步骤见文献^[10-14]。作图时求出各浓度的 B 校正值(B 校正值 = A 实测值), 求出各浓度的 B/B_0 值: $B/B_0 = B \text{校正值} / B_0 \text{校正值}$, B 为标准品或样品的校正值; B_0 为标准溶液 0 ng/ml 时, 即阴性对照孔的校正值。以 B/B_0 为纵坐标, 以标准溶液浓度的对数值为横坐标作图, 即得 DEX 的竞争标准曲线。

1.3.2 ic-ELISA 方法各参数的优化

影响 ELISA 的条件很多, 每一参数的改变都有可能产生不同的结果, 而且重复性差。每一个 ELISA 的检测条件都不尽相同, 因此, 对重要的参数需要进行多次的实验进行优化, 使得整个过程在比较适合的环境下进行。一般认为下列参数影响比较大, 如竞争反应时间、二抗稀释比、PBS 的 pH 值^[15], 本实验对这些参数也进行了研究。

1.3.3 ic-ELISA 方法特异性检测

抗原抗体的结合有高度的特异性, 本实验将分别检测地塞米松、倍他米松、双氟米松 3 种抗体与结构功能相似的药物(地塞米松、倍他米松、双氟米松、曲安西龙、泼尼松龙、氢化可的松、可的松、孕酮、睾酮)的交叉反应率, 从而从中筛选出较好的群选性抗体。用各结构相似药物标准溶液的标样分别配成不同的浓度, 作为抗体的竞争物, 按 ELISA 的操作步骤测定。用下面的公式计算交叉反应率(cross-reactivity, CR), 以 ELISA 方法筛选群选性抗体。

$$\text{CR}(\%) = \frac{\text{药物的IC}_{50}}{\text{结构类似物的IC}_{50}} \times 100$$

1.3.4 LC-MS 确证方法

1.3.4.1 ic-ELISA 方法的样品制备

10~50g 搅碎的鸡肌肉样本糜待用, 取 1g 组织样本糜, 加入 3ml 的蒸馏水, 涡旋混合 1min, 加入 4ml 的乙酸乙酯, 摇动(从一头到另一头)样本 30min, 4°C 、2000r/min 离心 10min, 吸取 1ml 的上清液于玻璃试管中, 50°C 时在适当的氮气流下进行挥发干燥, 将残渣溶解于 0.5ml 10% 甲醇的 PBST。

1.3.4.2 LC-MS 样品前处理

样品提取: 准确称取 2g 匀浆后的鸡肉样本于 50ml 塑料离心管中。涡旋混合 15s, 加入 6ml, 0.2mol/L 乙酸钠缓冲液(pH5.5), 旋转 20min。4000r/min 离心 10min, 上层收集于一个新的 50ml 塑料离心管中, 加入 0.6ml, 20% TCA 溶液和 120 μl , 37% 的 HCl(V/V), 将管内溶液混匀(涡旋混合), 二次离心(4000r/min, 10min), 上层用滤纸过滤, 滤液继续进行固相萃取净化。

样品净化: C_{18} 柱(500mg/10ml); 预处理: 分别用 5ml 甲醇和水处理。鸡肉组织提取液缓慢过柱(流速为 0.5ml/min 左右), 用 5ml 水和 5ml 正己烷洗柱(1ml/min 左右), 挤干后, 分析物用 2ml 甲醇洗提, 收集洗提液。洗提液在 40°C , 缓和的氮气流下吹干, 干燥的残余物, 溶解于 200 μl 的甲醇中, 涡旋混合 15s。处理好的样本提取液转移至自动进样系统的小瓶中, 10 μl 注入 LC 柱^[16]。

1.3.4.3 标准溶液的配制及标准曲线的绘制

精确配制 DEX 标准溶液: 0、0.375、0.75、1.5、5、10、20、50、100ng/g。以 DEX 的质量浓度为横坐标 X , 其相对应的峰面积 Y 为纵坐标作图, 求出 DEX 的线性回归方程。

1.3.4.4 样品添加回收率测定

取空白鸡肉样本 9 份, 3 份为一平行组, 分别添加 5、10、20ng/g 的 DEX 标准品, 样本处理过程同 1.3.4.1 节, 检测添加回收率。

2 结果与分析

2.1 ic-ELISA 方法的标准曲线测定

2.1.1 最佳工作浓度的确定

表 1 方阵法确定 DEX 包被抗原和抗体的工作浓度

Table 1 Determination of work concentrations of DEX coating antigen and antibody by phalanx method

抗体稀释度	包被抗原稀释度			
	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
1:250	2.998	2.671	2.462	1.85
1:500	2.719	2.553	2.247	1.341
1:1000	2.744	2.293	1.503	0.839
1:2000	2.392	1.619	1.039	0.637
1:4000	1.531	0.918	0.648	0.367
1:8000	0.901	0.488	0.340	0.253
1:16000	0.454	0.228	0.142	0.125
1:32000	0.169	0.138	0.115	0.106

将 DEX-OVA 作为包被抗原,并用包被缓冲液系列稀释成 1:800、1:1600、1:3200、1:6400,纯化的 DEX 抗体作 1:250、1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16000 和 1:32000 稀释。用方阵滴定法确定包被抗原和地塞米松抗体的工作浓度,结果见表 1。

根据 ELISA 检测的要求,选择吸光度在 1.5 左右时的抗原抗体浓度为最适工作浓度,由表 1 选择包被抗原稀释度为 1:3200,抗体稀释度为 1:1000。同样地,用方阵法测定倍他米松和双氟米松抗体的最佳工作浓度,结果表明,倍他米松的包被抗原稀释度为 1:3200,抗体稀释度为 1:4000;双氟米松的包被抗原稀释度为 1:3200,抗体稀释度为 1:800。

2.1.2 ELISA 方法的各影响因素的优化

2.1.2.1 竞争时间的选择

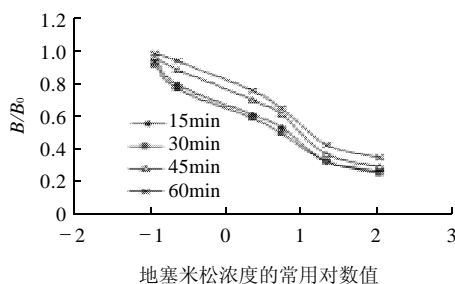


图 1 竞争时间对 ELISA 的影响

Fig.1 Determination of competition time

由图 1 可见,竞争时间为 30min 时, IC_{50} 值较低,故竞争时间选择 30min。

2.1.2.2 二抗稀释比的确定

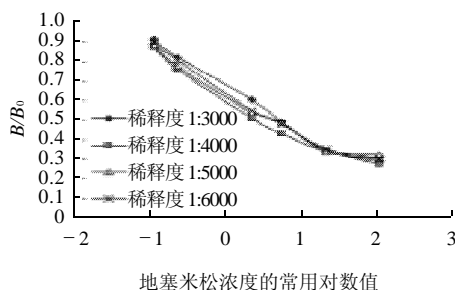


图 2 二抗稀释比对 ELISA 的影响

Fig.2 Effect of dilution ratio of secondary antibody on ELISA

将酶标二抗分别稀释 3000、4000、5000、6000 倍,考察其对 IC_{50} 的影响,结果见图 2。由图 2 可见,二抗稀释比对 ELISA 的影响不是非常显著,1:4000 时 IC_{50} 值最小,即最灵敏。因此选择将酶标二抗稀释 4000 倍使用。

2.1.2.3 PBS 溶液 pH 值的选择

pH 值对非共价结合的抗原抗体反应和 ELISA 测定灵敏度均有影响。为研究 pH 值对本实验的影响, PBS 溶液和 DEX 标准溶液 pH 值调整为 6.5~10.2。图 3 为不同 pH 值对 IC_{50} 值的影响。从图中可以看到, pH 值过低 (pH6.5) 或过高 (pH10.2) 均会导致抗体抑制能力的下降。pH7.4 时, IC_{50} 值最低且抑制率曲线具较宽的线性范围, PBS 和标准溶液的最佳 pH 值为 7.4。

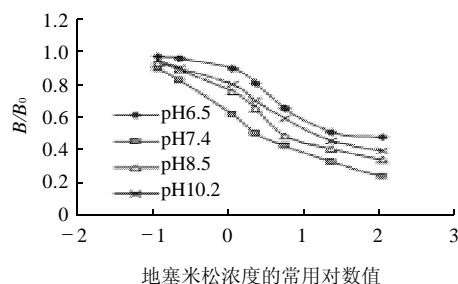


图 3 PBS 溶液 pH 值对 ELISA 的影响

Fig.3 Optimization of pH of PBS solution

2.1.3 优化后的 ic-ELISA

用 pH9.5、0.01mol/L 的碳酸盐缓冲液将 DEX-OVA 稀释 3200 倍,抗血清稀释度为包被酶标板,置于 4℃ 过夜,洗涤后使用封闭液 (含 0.01% 明胶的包被缓冲液) 4℃ 封闭过夜,用抗体稀释缓冲液 (含 0.01% 明胶的 PBST) 1:1000 稀释地塞米松抗体,标准品和抗体按体积比为 40:60 加入酶标板中, 37℃ 孵育 0.5h; 洗净拍干后每孔加入稀释 4000 倍的酶标二抗, 37℃ 孵育 0.5h, 加入 100 μ l 显色液 (底物液与 TMB 配比为 6:1) 37℃ 显色 20min 后加终止液后读数, PBS 溶液的 pH 值均为 7.4, 依据以上的条件实验得出的地塞米松 ic-ELISA 标准曲线见图 4, 地塞米松的 IC_{50} 为 2.66ng/ml, 最低检测限 (limit of detection, LOD) 为 0.139ng/ml, 线性方程为 $y = -0.3126x + 0.6327$ ($R^2 = 0.9939$), 说明检测线性方程是可靠有效的。

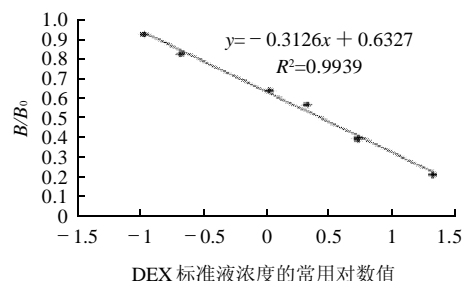


图 4 DEX 的 ic-ELISA 标准曲线

Fig.4 Calibration curve of ic-ELISA for DEX

用 pH9.5、0.01mol/L 的碳酸盐缓冲液将 BET-OVA 稀释 3200 倍,抗血清稀释度为包被酶标板,置于 4℃ 过夜,洗涤后使用封闭液 (含 0.01% 明胶的包被缓冲液) 4℃

封闭过夜, 用抗体稀释缓冲液(含 0.01% 明胶的 PBST) 1:4000 稀释倍他米松抗体, 标准品和抗体按体积比为 40:60 加入酶标板中, 37℃ 孵育 0.5h; 洗净拍干后每孔加入稀释 4000 倍的酶标二抗, 37℃ 孵育 0.5h, 加入 100 μ l 显色液(底物液与 TMB 配比为 6:1)37℃ 显色 20min 后加终止液后读数, PBS 溶液的 pH 值均为 7.4, 依据以上的条件得出倍他米松 ic-ELISA 标准曲线见图 5, IC_{50} 为 7.36ng/ml, LOD 为 0.56ng/ml, 线性方程为 $y = -0.354x + 0.5771 (R^2 = 0.9941)$ 。

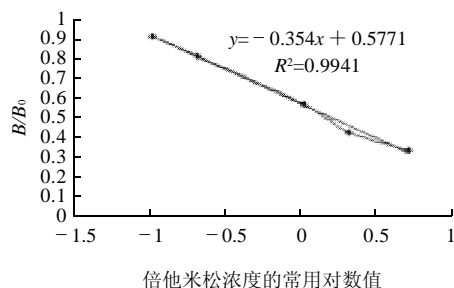


图5 BET 的 ic-ELISA 标准曲线

Fig.5 Calibration curve of ic-ELISA for BET

用 pH9.5、0.01mol/L 的碳酸盐缓冲液将 FLM-OVA 稀释 3200 倍, 抗血清稀释度为包被酶标板, 置于 4℃ 过夜, 洗涤后使用封闭液(含 0.01% 明胶的包被缓冲液)4℃ 封闭过夜, 用抗体稀释缓冲液(含 0.01% 明胶的 PBST) 1:800 稀释双氟米松抗体, 标准品和抗体按体积比为 40:60 加入酶标板中, 37℃ 孵育 0.5h; 洗净拍干后每孔加入稀释 4000 倍的酶标二抗, 37℃ 孵育 0.5h, 加入 100 μ l 显色液(底物液与 TMB 配比为 6:1)37℃ 显色 20min 后加终止液后读数, PBS 溶液的 pH 值均为 7.4, 依据以上的条件实验得出的双氟米松 ic-ELISA 标准曲线见图 6, IC_{50} 为 6.12ng/ml, LOD 为 0.21ng/ml, 线性方程为 $y = -0.276x + 0.7171 (R^2 = 0.9934)$ 。

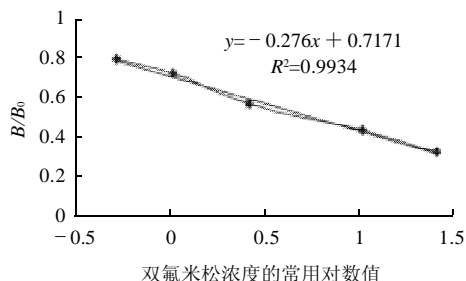


图6 FLM 的 ic-ELISA 标准曲线

Fig.6 Calibration curve of ic-ELISA for FLM

2.2 抗体交叉反应测定结果

从表 2 可以看出, 3 种抗体均对人工合成类糖皮质激素有群选性, 而对非人工合成类糖皮质激素交叉反应

率均小于 0.1%; 从交叉反应可以看出, 地塞米松产生的抗体与倍他米松、双氟米松、曲安息龙、泼尼松龙的群选性优于倍他米松和双氟米松, 所以认为地塞米松抗体的群选性优于倍他米松和双氟米松, 后续的回收率测定及仪器确证均使用地塞米松抗体。

表2 交叉反应率的测定

Table 2 Determination of cross-reactivity among dexamethasone, betamethasone and flumethasone %

糖皮质激素类似物	地塞米松	倍他米松	双氟米松
地塞米松	100	67	72
倍他米松	73	100	45
双氟米松	120	31	100
曲安息龙	37	5.8	19
泼尼松龙	21	3.2	5.3
氢化可的松	< 0.1	< 0.1	< 0.1
甲基泼尼松龙	< 0.1	< 0.1	< 0.1
可的松	< 0.1	< 0.1	< 0.1

2.3 ELISA 法回收率测定结果

表3 添加回收率的测定

Table 3 Determination of DEX in spiked chicken muscle samples by ic-ELISA

添加浓度(ng/g)	回收量(ng/g)	回收率(%)	变异系数(%)
0.375	0.23 \pm 0.03	61.3	13.1
0.75	0.52 \pm 0.06	69.2	11.5
1.5	1.12 \pm 0.15	4.7	13.4
3	2.41 \pm 0.23	80.3	9.6

从表 3 可以看出, 地塞米松在鸡肉样本中的回收率在 61.3%~80.3% 之间。该分析方法重复性较好, 变异系数低于 15%。

2.4 液质谱联用法(LC-MS)对实际样品的确证

2.4.1 标准曲线的绘制

在 1~100ng/g 范围内, 色谱峰面积与药物的质量浓度呈线性关系, 其线性回归方程为 $y = 565.29x + 804.24$, $R^2 = 0.9994$, 其线性相应范围满足兽药检测要求, 证实了该方法定量测定的可靠性。

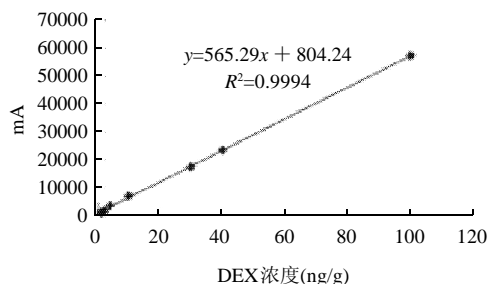


图7 DEX 的 LC-MS 标准曲线

Fig.7 Calibration curve of LC-MS for DEX

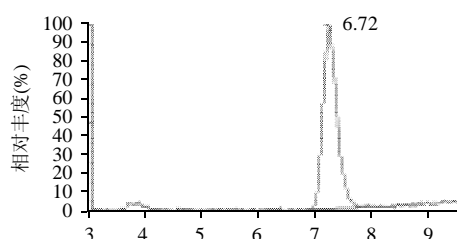
2.4.2 样品添加回收率实验

表4 鸡肌肉组织中 DEX 的添加回收实验 (LC-MS)

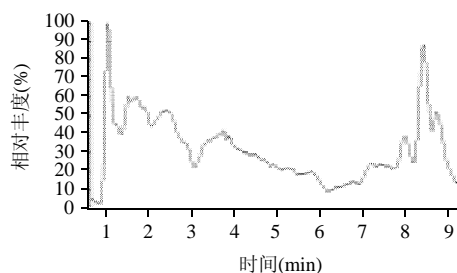
Table 4 Recovery of DEX in chicken muscle tissue (LC-MS)

添加浓度(ng/g)	回收率(%)	变异系数(%)
5	61.7	10.0
10	73.6	8.6
20	79.1	9.3

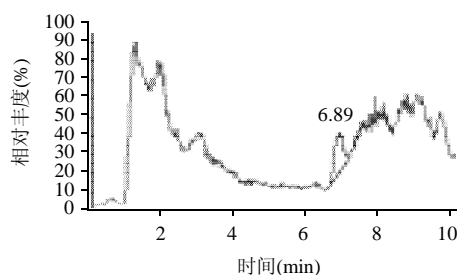
由表4可知,在鸡肉样本中3个水平添加DEX,用LC-MS检测其回收率在61.7%~79.1%之间,变异系数低于10%。标准品、空白鸡肉组织与添加水平的鸡肌肉组织的液相色谱图见图8。



a. DEX 标准品



b. 蛋白鸡肉组织



c. 添加水平的鸡肉组织

图8 25 μg/L DEX 标准图、空白组织样品图、阳性样品的液相色谱图
Fig.8 LC-MS spectrum of 25 μg/L DEX, LC-MS spectrum of blank chicken muscle, LC-MS spectrum of positive sample

2.5 实际样品检测

采用ELISA方法和LC-MS方法同时测定鸡肌肉组织中DEX的残留,以此来验证ELISA方法的准确性,测定结果见表5。由结果可知,在停药0、1、2d时两种方法均可检测出有DEX残留,但停药3d时,只有ELISA能检测出有DEX残留,LC-MS法则检测不出。

图9为ELISA法与LC-MS法的相关性计算结果,线性方程为 $y = 0.9116x + 0.4221$, $R^2 = 0.9981$,表明两者具有很高的相关性。

表5 鸡肉组织中 DEX 的残留浓度 ($\bar{x} \pm s$)Table 5 Determination of DEX in chicken muscle tissue ($\bar{x} \pm s$)

宰杀时间(d)	样品编号	DEX 的残留质量分数(ng/g)	
		ELISA 法	LC-MS 法
0	0-1	82.1 ± 3.7	78.5 ± 5.3
	0-2	75.8 ± 2.3	63.2 ± 3.6
	0-3	79.6 ± 4.8	75.3 ± 5.7
1	1-1	11.0 ± 1.1	12.6 ± 1.9
	1-2	14.6 ± 0.8	15.1 ± 1.2
	1-3	13.5 ± 1.2	12.1 ± 2.2
2	2-1	2.1 ± 0.6	1.5 ± 0.7
	2-2	1.9 ± 0.5	ND
	2-3	2.8 ± 0.5	1.7 ± 0.8
3	3-1	0.6 ± 0.1	ND
	3-2	1.0 ± 0.2	ND
	3-3	0.8 ± 0.1	ND

注: ND. 未检出。

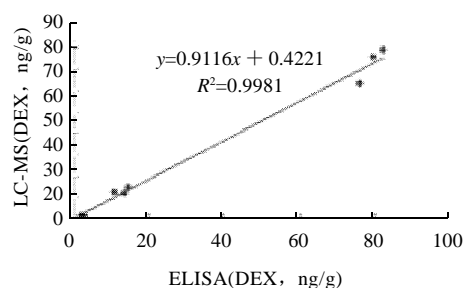


图9 ELISA法与LC-MS法检测实际样品中DEX含量的比较

Fig.9 Comparison of results of ELISA and LC-MS for real sample determination

3 结论

本实验确定了实验所需要的酶标二抗稀释比、竞争时间及PBS的pH值3个参数,初步建立了间接竞争ELISA方法。通过优化实验确定竞争反应时间选择30min;酶标二抗稀释度为1:4000;PBS溶液的pH值均为7.4。所建立的ic-ELISA针对地塞米松、倍他米松、双氟米松抗体的 IC_{50} 分别为2.66、7.36、6.12ng/ml,最低检测限分别为0.14、0.56、0.21ng/ml。再从特异性、准确度、灵敏度3个方面评估了ELISA系统,分别考察了3种抗体对人工合成类糖皮质激素及内源性糖皮质激素的交叉反应率。结果表明,3种抗体对几种人工合成类糖皮质激素均有较高的交叉反应,而对内源性糖皮质激素的交叉反应率均小于0.1%,说明了3种抗体均对人工合成类糖皮质激素有群选性及特异性;其中地塞米松抗体与几种人工合成类糖皮质激素的交叉反应率与其余两种抗体相比较,因此更适合做群选性抗体。

此外,本研究基于地塞米松抗体的 ELISA 系统,在 0.375、0.75、1.5、3.0ng/g 4 个添加水平下,地塞米松在肌肉样本中的回收率在 61.3%~80.3% 之间,变异系数低于 15%,具有较好的准确性及稳定性。

本研究又将 ELISA 方法与 LC-MS 法做了对比,LC-MS 的线性方程为 $y = 565.29x + 804.24 (R^2 = 0.9994)$,线性范围为 1~100ng/g,在 5、10、20ng/g 3 个添加水平下的回收率在 61.7%~79.2%,变异系数小于 10%,利用 ELISA 法及 LC-MS 法进行了实际样品的检测。在停药 0、1、2d 两种方法均可检测出有 DEX 残留,但停药 3d 时,只有 ELISA 法能检测出有 DEX 残留,LC-MS 法则检测不出,说明 ELISA 法较 LC-MS 法灵敏。通过 ELISA 法与 LC-MS 法的相关线性方程: $y = 0.9116x + 0.4221 (R^2 = 0.9981)$,表明两者具有很高的相关性,说明 ELISA 方法完全适于实际样品的检测。

参考文献:

- [1] CRISTINA B, CARMEN M T, YOLANDA P. Progress in analysis of residual antibacterials in food[J]. Trends in Analytical Chemistry, 2007, 26(9): 895-913.
- [2] ELLEN R G, IGOR L M, HEDI M. Luminescent quantum dots in immunoassays[J]. Anal Bioanal Chem, 2006, 384(3): 560-563.
- [3] IGLESIAS Y, FENTE C, VAZQUEZ B I, et al. Application of the luminol chemiluminescence reaction for the determination of nine corticosteroids[J]. Analytica Chimica Acta, 2002, 468(1): 43-52.
- [4] ANTIGNAC J, BIZEC B L, MONTEAU F, et al. Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the "2002/657/EC" European decision: guideline and application[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483(1/2): 325-334.
- [5] TOUBER M E, van ENGELN M C, GEORGAKOPOULUS C, et al. Multi-detection of corticosteroids in sports doping and veterinary control using high-resolution liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry[J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 586(1/2): 137-146.
- [6] ANTIGNAC J P, LE BIZEC B, MONTEAU F, et al. Multi-residue extraction-purification procedure for corticosteroids in biological samples for efficient control of their misuse in livestock production[J]. J Chromatogr, 2001, 757(1): 11-19.
- [7] DRAISCI R, MARCHIAFAVA C, PALLESECHI L, et al. Accelerated solvent extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry quantitation of corticosteroids residues in bovine liver[J]. J Chromatogr, 2001, 753(2): 217.
- [8] SHARRON G P, LIN H, MICHAEL J N. Nanoparticles for bioanalysis[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2003, 7(5): 609-615.
- [9] WILLIAM W Y, EMMANUEL C, REBEKAH D. Water-soluble quantum dots for biomedical applications[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 348(3): 781-786.
- [10] ROCKE D M, JONES G. Optimal design for ELISA and other forms of immunoassay[J]. Technometrics, 1997, 39(2): 162-170.
- [11] KARPINSKI K F. Optimality assessment in the Enzyme-Linked immunosorbent assay (ELISA)[J]. Biometrics, 1990, 46(2): 381-390.
- [12] HASHIDA S, NAKAGAWA K, IMAGAWA M, et al. Use of inorganic salts to minimize serum interference in a sandwich enzyme assay for growth hormone using Fab horse radish peroxidase conjugate[J]. Clin Chim Acta, 1983, 135(3): 263-273.
- [13] JONES G, WORTBERG M, KREISSIG S B, et al. Sources of experimental variation in calibration curves for enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Analytica Chimica Acta, 1995, 313(3): 197-207.
- [14] SELBY C. Interference in immunoassay[J]. Ann Clin Biochem, 1999, 36(Pt6): 704-721.
- [15] CHEN Y Q, SHANG Y H, LI X M, et al. Development of an enzyme-linked immunoassay for the detection of gentamicin in swine tissues[J]. Food Chemistry, 2008, 108: 304-309.
- [16] CHERLET M, de BAERE S, CROUBELS S, et al. Quantitative determination of dexamethasone in bovin plasma and tissues by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-tandem mass spectrometry to monitor residue depletion kinetics[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 529(1/2): 361-369.