



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109633147 A

(43)申请公布日 2019. 04. 16

(21)申请号 201811496858.6

(22)申请日 2018.12.07

(71)申请人 杭州康力食品有限公司

地址 311401 浙江省杭州市富阳区东洲街  
道东洲工业园区

(72)发明人 张暘

(74)专利代理机构 北京维正专利代理有限公司  
11508

代理人 俞涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书2页 说明书5页

(54)发明名称

一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法

(57)摘要

本发明涉及蜂王浆检测技术领域的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,包括样品前处理:提取-净化-上清液处理;样品检测:利用氟喹诺酮类药物的检测试剂盒检测。本申请旨在提供一种前处理操作简单的氟喹诺酮类成分的检测方法。

1. 一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,其特征在于,包括如下的检测步骤,

(1) 样品前处理:

步骤1:提取,称取2g鲜蜂王浆样品至50ml离心管中,在离心管中加入5.0ml乙酸锌溶液震荡5min溶解样品,向样品溶液中加入10ml乙酸乙酯,震荡提取10min后,加入1.0g氯化钠和4.0g无水硫酸锌,涡动1min后,震荡5min,8000-10000rpm条件下离心5min;

步骤2:净化,准确移取上清液5.0ml于装有500mg PSA 的15 mL 离心管中,振荡5min,6000rpm 离心5min,取上清液1.0 mL 于2 mL 离心管中30℃下氮气吹干;

步骤3:上清液氮气吹干后,向离心管中加入500μL 碳酸钠溶液涡旋复溶,再加入500μL 丹磺酰氯-丙酮溶液立刻涡旋混匀;于60℃加热15min;衍生化结束后,置于4℃冰箱冷藏10min;最后样品溶液过0.2μm 滤膜;

(2) 样品检测:利用氟喹诺酮类药物的检测试剂盒检测。

2. 根据权利要求1所述的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,其特征在于,所述氟喹诺酮类药物的检测试剂盒的检测方法包括如下步骤,

S1. 氟喹诺酮类试剂盒回升至室温;

S2. 取出需要数量的微孔板备齐并插入微孔架上,记录样品和标准品对应微孔并按顺序编号,每个样品和标准孔做2孔平行试验;

S3. 加标准品/样品,吸取50μL诺氟沙星标准溶液至对应的微孔中,吸取50μL样品溶液于其余微孔中,吸取75μL诺氟沙星单克隆抗体和甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗体的混合液于每个微孔中轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min;

S4. 洗板、揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250μL/孔,充分洗涤三次,每次间隔10s,用吸水纸拍干;

S5. 显色:加入底物显色A液50μl/孔,底物显色B液50μl/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15min;

S6. 测定,加入终止液50μL/孔,轻轻震荡混匀,设定酶标仪于450nm处,测定每孔OD值。

3. 根据权利要求1所述的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,其特征在于,所述终止液选择2mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

4. 根据权利要求1所述的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,其特征在于,所述底物显色液A液为含0.4~0.6mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲溶液,底物显色B液为四甲基联苯胺溶液。

5. 根据权利要求1所述的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,其特征在于,所述洗涤工作液包括含0.05%吐温-20的PBS溶液。

6. 根据权利要求1所述的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,其特征在于,所述诺氟沙星标准溶液为选用乙酸乙酯作为溶剂配置成100ng/mL的储存液,于-20℃条件下保存。

7. 根据权利要求1所述的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,其特征在于,所述氟喹诺酮类药物单克隆抗体的制备:

动物免疫:氟喹诺酮类药物半抗原与载体蛋白偶联物免疫8~10周龄Balb/c小鼠;

细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇4000的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

经筛选得到氟喹诺酮类药物的单克隆杂交瘤细胞株；

细胞冻存和复苏：将杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \times 10^9$ 个/ml的细胞悬液，在液氮中长期保存；

复苏时取出冻存管，立即放入37℃水浴中速融，离心去除冻存液后，移入培养瓶内培养。

8. 根据权利要求1所述的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法，其特征在于，所述甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体的制备过程包括：将标记酶甲状腺过氧化物酶与羊抗鼠抗抗体采用戊二醛交联法进行偶联得到甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体。

## 一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及蜂王浆检测技术领域,尤其涉及一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法。

### 背景技术

[0002] 蜂蜜是由蜜蜂采集花蜜而来,富含人体必须的各类营养物质,如葡萄糖、果糖、氨基酸、酶类、矿物和抗氧化物质等,是重要的天然食品。蜂王浆是由工蜂的舌腺和上颚腺分泌的混合物,具有非常好的保健和药用价值。然而,实际生产中蜜蜂容易受到细菌、真菌、病毒和外来寄生螨类的侵染而引起病害。控制和治理这些疾病通常的方法是直接饲喂兽药或者在蜂巢中喷洒兽药,因此可能导致蜂蜜和蜂王浆等蜂产品中的兽药残留问题,对消费者造成潜在威胁。

[0003] 喹诺酮类药物作为一种常用抗生素类兽药,在养蜂生产中通常用来防治和治疗各类细菌疾病,尤其是可以有效地防治美洲幼虫腐臭病引起的蜜蜂数量减少和蜂蜜产量降低。

[0004] 目前,一些文献中报道了蜂蜜或蜂王浆中喹诺酮类药物残留的检测方法,主要有液相色谱法和液相色谱-串联质谱法,因液相色谱-串联质谱法检出限低、灵敏度和精确度高而广泛使用,它也是我国蜂蜜和蜂王浆中的规定方法。前处理方法多采用固相萃取技术,因其都需要分别经过净化、浓缩等一些列过程,操作复杂、费时费力,灵敏度和重复性差。目前,很少有能够简单、快速的样品前处理方法用于检测蜂王浆中喹诺酮类药物残留。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,具有样品前处理简单、快速的优点。

[0006] 本发明的上述目的是通过以下技术方案得以实现的:

一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法,包括如下的检测步骤,

(1) 样品前处理:

步骤1:提取,称取2g鲜蜂王浆样品至50ml离心管中,在离心管中加入5.0ml乙酸锌溶液震荡5min溶解样品,向样品溶液中加入10ml乙酸乙酯,震荡提取10min后,加入1.0g氯化钠和4.0g无水硫酸锌,涡动1min后,震荡5min,8000-10000rpm条件下离心5min;

步骤2:净化,准确移取上清液5.0ml于装有500 mg PSA 的15 mL 离心管中,振荡5 min,6000rpm 离心5 min,取上清液1.0 mL 于2 mL 离心管中30℃下氮气吹干;

步骤3:上清液氮气吹干后,向离心管中加入500  $\mu$ L 碳酸钠溶液(0.1 mM,pH=10.5)涡旋复溶,再加入500 $\mu$ L丹磺酰氯-丙酮溶液(1.0 mg/mL)立刻涡旋混匀;于60℃加热15 min;衍生化结束后,置于4℃冰箱冷藏10 min;最后样品溶液过0.2  $\mu$ m 滤膜;

样品检测:利用氟喹诺酮类药物的检测试剂盒检测。

[0007] 实施上述技术方案,蜂王浆样品中基质复杂,含有蛋白质、脂肪、乳糖、有机酸和氨

基酸等干扰物,有效的脱脂、去蛋白作用直接决定提取的效率。而在溶解蜂王浆样品的过程中,对比纯水和乙酸锌溶液溶解基质的效果,仪器分析结果显示纯水作为溶解剂时出现更多的杂质干扰峰,影响目标化合物的准确定量;而使用乙酸锌溶液作为溶解剂时,因为其提供的高浓度酸根离子可以夺去蛋白质表面的水花层,蛋白质胶粒“失水”,进而凝结并沉淀析出,另一方面,蛋白质在等电点的溶解度最小,而乙酸锌缓冲溶液所提供的酸性pH接近蜂王浆中大部分蛋白质的等电点,从而也加速了蛋白质析出沉淀,起到净化基质的效果。

[0008] 此外,向溶液中加入氯化钠和无水硫酸锌能够起到盐析作用,提高离子强度,加深沉淀物与上清液分离,并增大对目标化合物的提取效率。

[0009] 加入的PSA能除去样品中萃取物中的有机酸、脂肪酸、某些色素和糖类等极性基质成分,选用PSA作为净化材料,操作简便,且对于有机酸、脂肪酸、某些色素和糖类等极性基质的处理更为彻底。

[0010] 而丹磺酰氯的磺酰基能够与喹诺酮类激素的酚羟基反应生成易发生电离的结合物,增加了检测的灵敏度。

[0011] 最后选用氟喹诺酮类药物的检测试剂盒检测鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测,操作简单方便。

[0012] 整个操作过程中直接通过提取-净化-上清液处理就得到检测样品,较之传统的利用固相萃取柱的操作方法更加简单。

[0013] 进一步,所述氟喹诺酮类药物的检测试剂盒的检测方法包括如下步骤,

S1. 氟喹诺酮类试剂盒回升至室温;

S2. 取出需要数量的微孔板备齐并插入微孔架上,记录样品和标准品对应微孔并按顺序编号,每个样品和标准孔做2孔平行试验;

S3. 加标准品/样品,吸取50 $\mu$ L诺氟沙星标准溶液至对应的微孔中,吸取50 $\mu$ L样品溶液于其余微孔中,吸取75 $\mu$ L诺氟沙星单克隆抗体和甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体的混合液于每个微孔中轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境中反应30min;

S4. 洗板、揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤工作液250 $\mu$ L/孔,充分洗涤三次,每次间隔10s,用吸水纸拍干;

S5. 显色:加入底物显色A液50 $\mu$ L/孔,底物显色B液50 $\mu$ L/孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}$ C避光环境中反应15min;

S6. 测定,加入终止液50 $\mu$ L/孔,轻轻震荡混匀,设定酶标仪于450nm处,测定每孔OD值。

[0014] 实施上述技术方案,使用氟喹诺酮类药物的检测试剂盒的检测方法进行检测,最终测定出OD值,最终通过换算得出蜂王浆中氟喹诺酮的含量。

[0015] 进一步,所述终止液选择2mol/L的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>。

[0016] 实施上述技术方案,终止液选择硫酸能够有效抑制酶的活性,避免存活的生物酶对检测结果造成的影响。

[0017] 进一步,所述底物显色液A液为含0.4~0.6mmol/L的过氧化氢脲的柠檬酸-磷酸二氢钠缓冲溶液,底物显色B液为四甲基联苯胺溶液。

[0018] 实施上述技术方案,选用的底物显色液A和底物显色液B能够相互配合增加反应的灵敏度。

[0019] 进一步,所述洗涤工作液包括含0.05%吐温-20的PBS溶液。

[0020] 实施上述技术方案,吐温-20作为表面活性剂,既有亲水的部分,又有亲油的部分,能够提升洁净程度。

[0021] 进一步,所述诺氟沙星标准溶液为选用乙酸乙酯作为溶剂配置成100ng/mL的储存液,于-20℃条件下保存。

[0022] 进一步,所述氟喹诺酮类药物单克隆抗体的制备:

动物免疫:氟喹诺酮类药物半抗原与载体蛋白偶联物免疫8~10周龄Balb/c小鼠;

细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇4000的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

经筛选得到氟喹诺酮类药物的单克隆杂交瘤细胞株;氟喹诺酮类药物的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量的产生氟喹诺酮类药物特异性抗体,该抗体特异性是针对氟喹诺酮类药物的,灵敏度达到0.1μg/L;

细胞冻存和复苏:将杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \times 10^9$ 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存;

复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0023] 实施上述技术方案,氟喹诺酮类药物的单克隆杂交瘤细胞株可以无限量的产生氟喹诺酮类药物特异性抗体,该抗体特异性是针对氟喹诺酮类药物的,灵敏度达到0.1μg/L。整个制备可实施性强。

[0024] 进一步,所述甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体的制备过程包括:将标记酶甲状腺过氧化物酶与羊抗鼠抗抗体采用戊二醛交联法进行偶联得到甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体。

[0025] 实施上述技术方案,戊二醛交联法是一种常用的同型双功能交联剂,通过它的两个醛基分别与HRP和抗体蛋白的氨基结合,形成HRP-戊二醛-Ab蛋白结合物。制备甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体的制备过程简单。

[0026] 综上所述,本发明具有以下有益效果:

- 一、选择乙酸锌作为缓冲液,能够加速蛋白质的洗出沉淀,净化基质作用明显;
- 二、利用本申请的操作方法,前处理的过程操作简单。

## 具体实施方式

[0027] 1、氟喹诺酮类药物单克隆抗体的制备:

动物免疫:氟喹诺酮类药物半抗原与载体蛋白偶联物免疫8~10周龄Balb/c小鼠;

细胞融合与克隆化:取免疫后的鼠脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞在融合剂聚乙二醇4000的作用下融合,筛选获得能稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

经筛选得到氟喹诺酮类药物的单克隆杂交瘤细胞株;

细胞冻存和复苏:将杂交瘤细胞用冻存液制成 $1 \times 10^9$ 个/ml的细胞悬液,在液氮中长期保存;

复苏时取出冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养。

[0028] 2、甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体的制备过程包括:将标记酶甲状腺过氧化物

物酶与羊抗鼠抗抗体采用戊二醛交联法进行偶联得到甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体。

[0029] 3、诺氟沙星标准溶液的浓度分别设置为0ng/mL、0.125ng/mL、0.5 ng/mL、2.5ng/mL、5ng/mL、12.5ng/mL。

#### [0030] 实施例一

(1) 鲜蜂王浆样品前处理：

步骤1：提取，称取2g鲜蜂王浆样品至50ml离心管中，在离心管中加入5.0ml乙酸锌溶液震荡5min溶解样品，向样品溶液中加入10ml乙酸乙酯，震荡提取10min后，加入1.0g氯化钠和4.0g无水硫酸锌，涡动1min后，震荡5min，8000rpm条件下离心5min；

步骤2：净化，准确移取上清液5.0ml于装有500mg PSA 的15mL 离心管中，振荡5min，6000rpm 离心5min，取上清液1.0mL 于2mL 离心管中30℃下氮气吹干；

步骤3：上清液氮气吹干后，向离心管中加入500μL 碳酸钠溶液(0.1 mM, pH=10.5)涡旋复溶，再加入500μL 丹磺酰氯-丙酮溶液(1.0 mg/mL)立刻涡旋混匀；于60℃加热15min；衍生化结束后，置于4℃冰箱冷藏10min；最后样品溶液过0.2μm滤膜；

(2) 样品检测：利用氟喹诺酮类药物的检测试剂盒检测；

S1. 氟喹诺酮类试剂盒回升至室温；

S2. 取出需要数量的微孔板备齐并插入微孔架上，记录样品和标准品对应微孔并按顺序编号，每个样品和标准孔做2孔平行试验；

S3. 加标准品/样品，吸取50μL诺氟沙星标准溶液至对应的微孔中，吸取50μL样品溶液于其余微孔中，吸取75μL诺氟沙星单克隆抗体和甲状腺过氧化物酶标记羊抗鼠抗抗体的混合液于每个微孔中轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应30min；

S4. 洗板、揭开盖板膜，将孔内液体甩干，用洗涤工作液250μL/孔，充分洗涤三次，每次间隔10s，用吸水纸拍干；

S5. 显色：加入底物显色A液50μl/孔，底物显色B液50μl/孔，轻轻振荡混匀，用盖板膜盖板后置25℃避光环境中反应15min；

S6. 测定，加入终止液50μL/孔，轻轻震荡混匀，设定酶标仪于450nm处，测定每孔OD值。

[0031] 检测结果分析：标准品或样品的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值除以第一个标准品的吸光度值的平均值，在乘以100%，得到标准品或样本的百分吸光度值。以标准品百分吸光率为纵坐标，以氟喹诺酮类药物标准品浓度(μg/L)的对数为横坐标，绘制标准曲线图。将样本的百分吸光率代入标准曲线中，从标准曲线上读出样本所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样本中氟喹诺酮类药物的实际浓度。

#### [0032] 实施例2

实施例2与实施例1的区别在于样品前处理的步骤1中提取过程中离心速度为9000rpm/min。

#### [0033] 实施例3

实施例2与实施例1的区别在于样品前处理的步骤1中提取过程中离心速度为10000rpm/min。

#### [0034] 实验数据记录

实施例1中得到的标准曲线为 $y = -0.341x + 0.998$

氟喹诺酮的残留量的计算公式

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000}$$

X-样品中氟喹诺酮的残留量,单位为微克每千克( $\mu\text{g}/\text{kg}$ );

c-从标准工作曲线上得到的样品中诺氟沙星浓度,单位为纳克每毫升( $\text{ng}/\text{ml}$ );

V-样品溶液的最终定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );

m-样品溶液所代表的最终试样质量,单位为克( $\text{g}$ )。

[0035] 表1 实施例1-3氟喹诺酮的残留量的检测结果。

项目	实施例1	实施例2	实施例3
测定低限 $\mu\text{g}/\text{kg}$	2.5	2.5	2.5

[0036] 添加水平为 $2.5\mu\text{g}/\text{kg}$ ,氟喹诺酮回收率范围为70%~93%;

添加水平为 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ ,氟喹诺酮回收率范围为75%~97%;

添加水平为 $10.0\mu\text{g}/\text{kg}$ ,氟喹诺酮回收率范围为74%~90%;

在 $2.5\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $5.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 和  $10.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加水平上,相对标准偏差(RSD)为4.0%~6.0%。



专利名称(译)	一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN109633147A</a>	公开(公告)日	2019-04-16
申请号	CN201811496858.6	申请日	2018-12-07
[标]发明人	张暘		
发明人	张暘		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/54306 G01N21/31 G01N33/535		
代理人(译)	俞涛		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及蜂王浆检测技术领域的一种鲜蜂王浆中氟喹诺酮类成分的检测方法，包括样品前处理：提取-净化-上清液处理；样品检测：利用氟喹诺酮类药物的检测试剂盒检测。本申请旨在提供一种前处理操作简单的氟喹诺酮类成分的检测方法。

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000}$$