

同时检测动物样品中四种磺胺药物残留的膜基质免疫分析法

曹喜春, 许杨*, 何庆华, 刘星

(南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 中德联合研究院, 江西南昌 330047)

摘要:建立了一种简便、快速、可靠的膜免疫芯片检测牛奶和猪肝样品中磺胺类药物总量的方法。以PVDF膜作为固相基质,通过优化包被抗原浓度和抗体的工作浓度,研究出了检测磺胺药物膜免疫分析法。结果表明,该法检测牛奶和猪肝样品中四种磺胺药物(磺胺嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺二甲嘧啶和磺胺对甲氧嘧啶)总量的检测阈值为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,可以用于磺胺药物总量的筛查。此外,分别采用本方法、Ic-ELISA和HPLC测定了市场上随机购买的20份牛奶和8份猪肝样品,三者结果基本一致。本法结果可靠、简便直观、无需特殊的检测仪器,适合于在线监测和收购现场的快速检测。

关键词:聚偏氟乙烯膜,磺胺类药物,膜免疫检测,动物样品,间接竞争酶联免疫检测

Simultaneous determination of four sulfonamide in animal derived food samples by polyvinylidene fluoride membrane-based dot immunoassay

CAO Xi-chun, XU Yang*, HE Qing-hua, LIU Xing

(State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-Germany Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

Abstract: The development of polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane-based dot-immunoassay for convenience and rapid detection of sulfonamides in milk and pork liver samples was described. Based on the PVDF membrane, a membrane-based dot immunoassay was to detect sulphonamides, and the influence of envelope antigen concentration and antibody concentration factors on the immunoassay was studied. Using this method, the cut-off level of the sum of sulfadiazine (SDZ), sulfamerazine (SMR), sulfadimidine (SM2), and sulfametoxydiazine (SMDZ) were 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ in milk and pork liver. The total concentration of SDZ, SMR, SM2 and SMDZ were determined in 20 milk and in 8 pork livers samples by both the PVDF membrane-based immunoassay and Ic-ELISA, and the results showed no significant difference with the HPLC. These results suggested that this method could be a useful on-site screening tool for the rapid detection of sulphonamides (SDZ, SMR, SM2 and SMD) in milk and pork liver samples without special instrumentation.

Key words: polyvinylidene fluoride membrane; sulfonamides; membrane-based dot immunoassay; animal derived food; indirect competition enzyme-linked immune sorbent assay (Ic-ELISA)

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2015)18-0065-06

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2015.18.004

磺胺类药物(Sulfonamides, SAs)是含有对氨基苯磺酰胺结构的一类物质,具有预防和治疗细菌感染的作用^[1]。因它使用方便、价格低廉及抑菌效果较好,被广泛应用于动物养殖中。目前,SAs的滥用不仅导致其不断通过多种途径造成环境的污染,而且还会通过其在家禽家畜组织和土壤等中的富集进入食物链,影响消费者的健康,造成细菌对其产生耐药性。欧盟、美国和中国已经对SAs总含量残留设定了

最高限量标准,所有动物可食肌肉组织、牛奶中不得超过100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ^[2-3]。

近几年磺胺类物质的检测方法发展迅速,主要包括免疫检测法如酶联免疫法(ELISA)、荧光偏振免疫分析法^[4]和化学发光酶联免疫法^[5-6]、分光光度法^[7]、表面等离子共振技术(SPR)^[8]、高效液相色谱法(HPLC)^[9]、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)^[10]以及超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)^[11]和适体传感器检

收稿日期: 2014-12-16

作者简介: 曹喜春(1987-),女,硕士研究生,研究方向:食品科学,E-mail: qiangxuelian@126.com。

* 通讯作者: 许杨(1951-),女,博士,教授,研究方向:食品生物技术,E-mail: xuyang1951@163.com。

基金项目: 国家自然科学基金项目(31471648);江西省科技厅重大专项项目(2007BS12501)。

测方法^[12]等。上述方法目前大量应用在监测食品中SAs的含量,检测方法灵敏、结果稳定,可信度高,但多数存在需要使用仪器、样品处理复杂的缺点,不便对实际样品进行高通量快速检测。此外,有文献报道胶体金免疫分析法可以快速检测动物源性食品中五种磺胺类药物,其检测限为0.01 mg/mL,操作简单、稳定性好^[13],但是需要金标记抗体及专业化的喷金和点膜设备。

膜免疫芯片是近年来发展起来用于检测小分子物质的一种酶免疫检测法,具有快速、灵敏,操作简单,无需特殊的检测设备等特点,适合高通量现场快速检测。目前已有将这种方法用于检测谷物中的真菌毒素的文献报道^[14-15]。另外,也有以硝酸纤维素膜为基质建立的斑点酶联免疫法(Dot-ELISA)检测牛奶中的庆大霉素残留量的报道^[16]。

本文以聚偏氟乙烯(PVDF)膜为载体,建立了一种简便、快速、可靠的膜免疫芯片方法,应用于检测牛奶和猪肝样品中SAs总量。此外,膜免疫芯片较一般的蛋白质芯片而言,还具有成本低廉,制作过程中无需特殊仪器辅助的特点。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

磺胺二甲嘧啶(sulfadimidine, SM2)、磺胺甲基嘧啶(sulfamerazine, SMR) 阿拉丁;磺胺对甲氧嘧啶(sulfametoxydiazine, SMDZ)、恩诺沙星(enrofloxacin, ENLX)、环丙沙星(ciprofloxacin, CFPX) 中国兽医药品监察所;庆大霉素(gentamicin, GM)、磺胺嘧啶(sulfadiazine, SDZ) 生工生物;抗磺胺类单克隆抗体(本研究以抗SDZ单克隆抗体作为磺胺总量的检测抗体,原始浓度5.0 mg/mL)、磺胺类人工检测抗原(本研究以SDZ-BSA作为磺胺总量的检测抗原,6.0 mg/mL) 北京诚德文科技有限公司;羊抗鼠IgG-HRP酶标二抗 Sigma公司;单组份沉淀型TMB显色液 湖州英创生物科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS) 0.01 mol/L pH7.4;洗涤液(PBST) 含0.05%吐温-20的PBS, pH7.4;标准品稀释液 10%甲醇-PBS, pH7.4;Φ 11 cm定性滤纸 杭州特种纸业有限公司;PVDF膜(26.5 cm×3.75 m, 0.45 μm) Millipore公司;96孔可拆酶标板 深圳金灿华公司;其他试剂 均为国产分析纯级。

膜免疫芯片反应盒、芯片洗涤盒 北京博奥生物有限公司;酶联免疫检测仪(MULTISKAN MK3) Thermo公司;单管可调微量移液器(0.5~10 μL) Eppendorf公司;Milli-Q超纯水系统(Synthesis) Millipore公司;酶联免疫检测仪(MK3) Thermo公司;台式高速冷冻离心机(SORVALL Blofuge stratos) Heraeus公司;E-620照相机 Olympus公司;WD-9405B水平摇床 沃德生物医学仪器公司。

1.2 SDZ间接竞争酶联免疫法(Ic-ELISA)的建立

1.2.1 Ic-ELISA棋盘滴定优化抗原抗体浓度 将SDZ-BSA全抗原用PBS(pH7.4)分别稀释为2、4、6、8 μg/mL,加入96孔酶标板(100 μL/孔),37 °C包被2 h, PBST洗板3次;每孔加300 μL脱脂牛奶(5%,溶

于PBS),37 °C封闭1 h, PBST洗板3次,拍干。然后,将抗SDZ单克隆抗体进行500~16000倍比稀释,每孔加入100 μL不同稀释度的抗体,37 °C孵育30 min, PBST洗涤4次,拍干。接下来,每孔加入50 μL的HRP标记羊抗鼠二抗37 °C反应30 min, PBST洗板4次。最后,加入100 μL/孔TMB显色液,避光显色5 min后,加入50 μL终止液(2 mol/L H₂SO₄),酶标仪检测450 nm处吸光值。取OD₄₅₀值为1.0左右的全抗原浓度为最佳包被抗原浓度,此时所对应的酶标抗体稀释倍数的一半为抗体最佳工作稀释度。

1.2.2 Ic-ELISA标准抑制曲线的建立 根据确定的抗原抗体工作浓度,测定SDZ与抗SAs单克隆抗体的亲和性。取标准品稀释液将100 μg/mL标准品储备液稀释为0~100 μg/L。将标准品与抗SDZ单克隆抗体各取50 μL同时加入,其他步骤同1.2.1。以药物对抗原抗体结合反应的抑制率为纵坐标,药物浓度的对数为横坐标,绘制标准曲线。

1.2.3 Ic-ELISA反应介质对抗原抗体结合的影响

1.2.3.1 反应介质pH的影响 用1 mol/L HCl或NaOH溶液将0.01 mol/L pH7.4的PBS分别配制成pH为6.0、7.4、8.0的反应溶液,以10%甲醇浓度的PBS稀释成不同浓度的SDZ作为竞争物,分析不同pH对抗原抗体结合的影响。

1.2.3.2 反应介质中有机溶剂的影响 以含5%、10%、20%甲醇、pH7.4的PBS为标准品稀释液,以不同浓度的SDZ作为竞争物,分析甲醇溶剂对抗原抗体结合的影响。

1.2.3.3 反应介质中盐离子浓度的影响 以0.005、0.010、0.025 mol/L PBS(pH=7.4)为反应介质,以10%甲醇浓度的PBS稀释成不同浓度的SDZ作为竞争物,分析盐离子浓度对抗原抗体结合的影响。

1.3 膜基质免疫分析磺胺类药物方法的建立

1.3.1 PVDF膜的前处理 将膜切剪成适当大小,将PVDF膜置于纯甲醇中浸泡15 s后取出,再于双蒸水中浸泡2 min。将用蒸馏水润湿的双层滤纸平铺在洁净的操作台上,然后把预处理过的PVDF膜平放在滤纸上,用光滑外表干净的玻璃试管在膜和滤纸上轻轻滚动,除去其中多余的水分保证膜与滤纸之间无气泡,然后滴加3 μL SDZ-BSA抗原于膜的表面,静置1 min,待液体渗入膜后,将膜用镊子取下,置于湿盒中37 °C孵育2 h。之后,将膜移入加有5%的脱脂牛奶-PBS的反应盒中,37 °C封闭1 h后将膜取出,于超净台内风干备用。

1.3.2 抗原点阵及抗体工作浓度的优化及检测阈值的确定 取经预处理过的膜一张(3.5 cm×3.5 cm),膜前处理方法同1.3.1,按照5×5的阵式点样,SDZ-BSA抗原分别稀释为15、30、60、120和240 μg/mL,点样于膜的每列(每点样量3 μL)。将抗SDZ抗体用PBS分别稀释为20、10、5、2.5和1.25 μg/mL,各2 mL,分别放入反应盒1~5号反应槽中。将预处理好的膜沿行线剪开,编号为1~5,分别放入1~5号反应槽中,水平摇床中速振荡反应10 min,反应结束后将膜放入洗盒中, PBST漂洗3 min。将漂洗后的膜分别放入已

加入浓度为1/1000(用PBS稀释)的羊抗鼠IgG-HRP二抗反应盒1~5号反应槽中,水平摇床中速振荡反应10 min,反应结束后将膜放入洗盒中,PBST漂洗5 min。将漂洗后的膜取出,沥去表面液体,按顺序放在洁净的滤纸上,滴加沉淀型TMB底物液,每张膜150 μ L,显色40 s,自来水终止。膜上斑点被完全阻断而不显色时的标准品浓度定义为该方法的检测阈值。

1.3.3 膜基质免疫芯片的酸碱耐性分析

1.3.3.1 耐酸性分析 分别配制不同浓度(0.01、0.02、0.04和0.05 mol/L)的HCl-PBS溶液,与抗SDZ抗体混合后,置入已点阵SDZ-BSA抗原的膜中反应10 min,再加入1/500的羊抗鼠IgG-HRP二抗,反应10 min。加入沉淀型TMB显色液反应40 s后,用照相机采集膜斑点的光密度值,具体步骤同方法1.3.2。

1.3.3.2 耐碱性分析 分别配制不同浓度(0.002、0.004、0.006和0.008 mol/L)NaOH-PBS配制的溶液,按上述1.3.3.1方法,分析其碱性耐受度。

1.4 膜基质免疫分析法检测动物样品中的磺胺药残留

1.4.1 动物样品中磺胺药物的提取

1.4.1.1 牛奶样品的提取方法 将牛奶样品用PBS稀释5倍剧烈混合5 min,5000 r/min离心15 min。去掉下层沉淀和上层的脂肪层,取出中间溶液待测。

1.4.1.2 猪肝样品提取方法^[7] 取组织样本于均质机中均质1 min后,称取1.0 g置于聚丙烯离心管中,加入4 mL乙腈,涡旋振荡5 min,4000 \times g离心10 min,取上清液至另一干净离心管中,40 $^{\circ}$ C条件下氮气吹干后得到残留物,向残留物中加入4 mL正己烷,涡旋混合30 s,再加入1 mL磷酸盐缓冲液,超声5 min。后于25 $^{\circ}$ C条件下5000 r/min离心10 min,取下层液相,加入4倍下层液体体积的磷酸盐缓冲液,稀释后检测。

1.4.2 膜基质免疫分析磺胺类药物残留 取经预处理及抗原点阵后的PVDF膜,将膜沿行线剪开,分别放入0和1号反应槽中。将样品提取液与抗SDZ抗体等体积混合后,取2 mL体积置于1号反应槽中,0号反应槽中加入PBS溶液作为空白对照,置于水平摇床中档速度振荡反应10 min。用PBST漂洗反应膜3 min后,0和1号反应槽中均加入浓度为1/500的羊抗鼠IgG-HRP二抗,水平摇床中档速度振荡反应10 min后将膜放入洗盒中,PBST漂洗5 min。取出膜置于洁净的滤纸上吸干膜表层水,每条膜均匀滴加150 μ L沉淀型TMB底物液反应40 s,自来水终止。膜上斑点的颜色越深,则表示样品中磺胺类药物的浓度越低,当样品中磺胺类药物的浓度等于或超过膜芯片的检测阈值时,该样品对应的膜上斑点则不显色。

1.4.3 方法学确证 选取经HPLC验证未被SAs污染猪肝和牛奶样品,分别添加10、25、50和100 μ g/kg的SDZ(或者SMR、SM2、SMDZ)标准品。按上述1.4.1方法提取样品,按1.4.2方法进行样品中SDZ(或者SMR、SM2、SMDZ)含量的检测,分析其加标回收率。

2 结果与分析

2.1 SDZ间接竞争酶联免疫法的建立

2.1.1 SDZ全抗原的包被浓度和抗SDZ单抗工作浓

度的确定 根据1.2.1方法,对包被抗原浓度和抗体浓度进行了棋盘滴定实验,结果见表1。Ic-ELISA由表1可知,当SDZ全抗原的最佳包被浓度为6 μ g/mL,抗SDZ抗体的工作浓度为0.3125 μ g/mL(稀释倍数为16000)时,OD₄₅₀值为1.016,接近1.0,且为包被原用量较少的抗原抗体组合,可作为间接竞争ELISA工作浓度。

表1 棋盘滴定确定ELISA检测SDZ体系中抗原抗体的最佳工作浓度

Table 1 The check-board assay for optimizing the concentration of antibody and antigen in Ic-ELISA for SDZ

抗SDZ抗体的 稀释倍数	SDZ-BSA全抗原的包被浓度(μ g/mL)			
	8	6	4	2
500	3.668	3.324	2.649	1.701
1000	3.292	2.996	2.348	1.512
2000	2.919	2.691	2.047	1.310
4000	2.347	2.034	1.595	0.991
8000	1.781	1.57	1.206	0.589
16000	1.198	1.016	0.576	0.169
32000	0.916	0.604	0.319	0.099
空白	0.042	0.031	0.032	0.032

2.1.2 Ic-ELISA反应介质对抗原抗体结合的影响结果 根据1.2.2方法,对Ic-ELISA的反应条件(pH、甲醇浓度和盐离子浓度)进行了优化,并建立了抗SDZ单克隆抗体Ic-ELISA检测方法。

2.1.2.1 pH的优化结果 由图1可知,在pH为6.0、7.4、8.0的条件下SDZ的IC₅₀分别为0.211、0.191、1.933 μ g/L,标准曲线R²为0.985~0.999。因此,Ic-ELISA反应介质最优的pH为7.4。

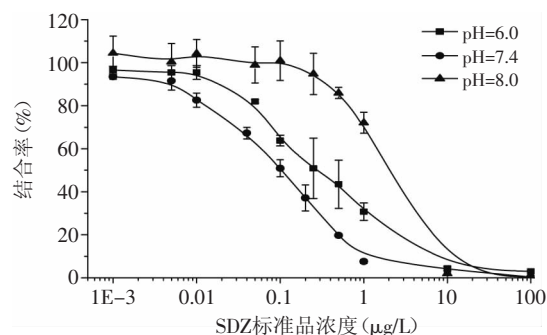


图1 pH对间接竞争ELISA检测SDZ的影响

Fig.1 The effects of pH value on the indirect competitive ELISA for SDZ

2.1.2.2 反应介质中甲醇浓度的优化结果 由图2可知,甲醇浓度在5%~20%对Ic-ELISA的影响不是很明显,甲醇浓度在5%、10%、20%其IC₅₀值分别为0.212、0.063、0.187 μ g/L,标准曲线R²为0.981~0.987。所以,选择甲醇浓度为10%-PBS作为标准品稀释液。

2.1.2.3 反应介质中盐离子浓度的优化结果 由图3可知,盐离子浓度为0.005、0.010、0.025 mol/L的PBS缓冲液作为反应介质时,Ic-ELISA的IC₅₀值分别为

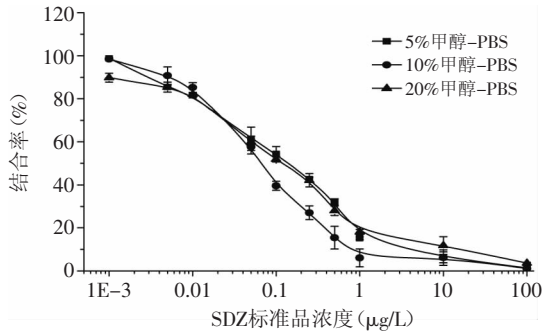


图2 甲醇浓度对间接竞争ELISA检测SDZ的影响

Fig.2 The effects of methanol buffer on the indirect competitive ELISA for SDZ

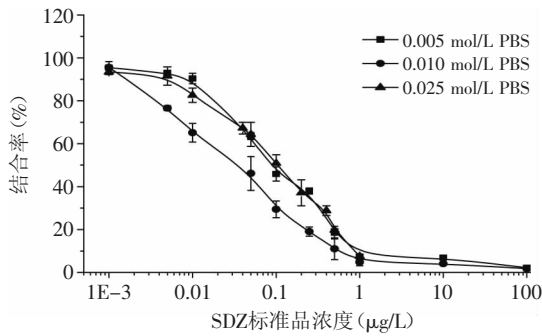


图3 离子强度对间接竞争ELISA检测SDZ的影响

Fig.3 The effects of ionic strength on the indirect competitive ELISA for SDZ

0.149、0.063、0.174 $\mu\text{g/L}$ ，标准曲线 R^2 为0.983~0.988。Ic-ELISA的最优反应条件为：反应缓冲液中盐离子浓度为0.010 mol/L的PBS缓冲液。

2.1.3 抗SDZ单克隆抗体与常见抗生素的交叉反应情况 由表2可知，抗SAs单克隆抗体建立的Ic-ELISA检测方法，该法分别能检测SDZ、SMR、SM2和SMDZ四种物质，它们的 IC_{50} 分别为0.063、0.112、0.126和0.121 $\mu\text{g/L}$ ，交叉反应率范围为50%~100%，SDZ的检测范围为0.016~0.202 $\mu\text{g/L}$ 。此外，抗SAs单克隆抗体与CPFX、SDM和GM等抗生素基本不产生结合反应，所以抗SAs单克隆抗体对磺胺类的SDZ、SMR、SM2和SMDZ这四种物质有较好的特异性。

表2 抗SDZ单克隆抗体与其它常见抗生素的交叉反应率
Table 2 The cross-reactivity of anti-SDZ McAb with other common antibiotics

药物名称	线性范围($\mu\text{g/L}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	CR (%)
SDZ	0.016~0.202	0.063	100
SMR	0.022~0.49	0.112	56.3
SM2	0.010~0.292	0.126	50.0
SMDZ	0.085~0.181	0.121	52.1
SDM	-	>100	<1
ENLX	-	>100	<1
CPFX	-	>100	<1
SALX	-	>100	<1
GM	-	>100	<1

2.2 膜免疫芯片的最佳检测条件

根据图4可知，随着抗原点阵浓度及抗体浓度的增加，膜上斑点的颜色逐渐增加。根据文献报道，抗原及抗体的浓度越低，其所建立免疫分析体系的灵敏度越高，结合肉眼辨别能力及体系的稳定性，本研究中选择膜免疫芯片的最优检测条件为：SDZ-BSA抗原的包被浓度为120 $\mu\text{g/mL}$ ，抗SDZ单克隆抗体的工作浓度为5 $\mu\text{g/mL}$ ，羊抗鼠二抗最佳稀释倍数为1/500；一抗、二抗最佳反应时间均为10 min，TMB显色液室温反应40 s。由图5可知，在最优检测条件下，当SDZ的浓度为10 $\mu\text{g/L}$ 时，此列膜上班点的颜色和空白的颜色相同，即为完全阻断，其检测阈值确定为10 $\mu\text{g/L}$ 。

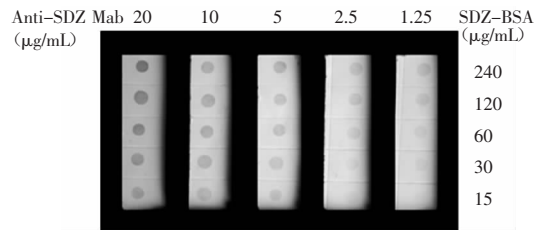


图4 棋盘滴定实验确定膜基质免疫分析SDZ体系中抗原及抗体的最佳浓度

Fig.4 The check-board assay for optimizing the concentration of antibody and antigen in PVDF membrane-based dot immunoassay for SDZ

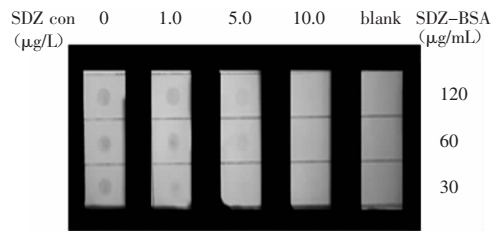


图5 膜基质免疫分析SDZ的检测阈值

Fig.5 The cut-off level of PVDF membrane-based dot immunoassay for SDZ

2.3 酸和碱的浓度对磺胺类膜免疫芯片的影响结果

由图6可知，当HCl的浓度>0.02 mol/L或NaOH的浓度>0.004 mol/L时，膜的反应区无信号值，所以反应体系中对HCl和NaOH的耐受度分别为0.02、0.004 mol/L。

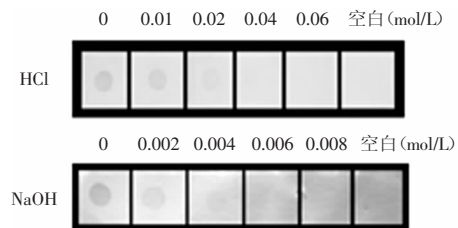


图6 HCl和NaOH浓度对膜基质免疫分析体系的影响

Fig.6 The effects of the HCl and NaOH concentration on membrane based dot immunoassay

2.4 膜免疫芯片检测动物样品的灵敏度

由图7可知,随着牛奶中的SAs药物(SDZ、SMR、SM2和SMDZ)浓度的增加,其所对应的膜上斑点颜色逐渐下降,当浓度为25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,膜上斑点颜色下降明显;当浓度为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,四种磺胺类药物所对应膜上的斑点均未显色,因此可知膜免疫芯片对于牛奶中四种磺胺药物的检测灵敏度均可达到50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。对于猪肝样品的检测结果显示,膜免疫芯片对四种磺胺药物的检测灵敏度也均为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (因为图型与牛奶样品中的相似,故省略)。

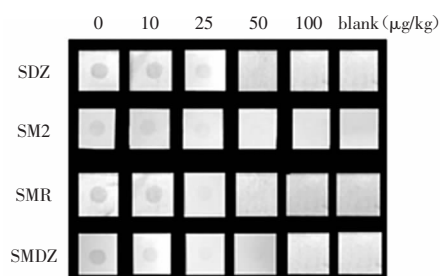


图7 膜基质免疫分析牛奶中四种磺胺类药物的检测灵敏度
Fig.7 The sensitivity of membrane-based dot immunoassay for SAs in milk samples

2.5 膜免疫芯片、Ic-ELISA与HPLC三种方法检测牛奶(M)和猪肝样品(PL)中SAs药物的结果比较

分别采用本研究建立的膜基质免疫分析法、Ic-ELISA、HPLC测定了市场上随机购买的20份牛奶和8份猪肝样品,由表3可知,其中20份牛奶样品中只有M5和M17检测含有SAs, M5和M17样品的Ic-ELISA,检测结果分别为6.3和2.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$; 8份猪肝样品中,除PL6和PL8样品外,其余均检测出磺胺药物残留。三种检测方法的结果显示,三者之间无显著性差异,表明膜基质免疫分析方法可应用于牛奶及猪肝等动物样品中的快速、定性检测。

3 结论

本研究建立了一种快速检测牛奶和猪肝中四种SAs的膜免疫分析法,该法检测牛奶和猪肝样品中四种磺胺药物总量的检测阈值为50 $\mu\text{g}/\text{kg}$,一抗、二抗

最佳反应时间均为10 min,可以用于磺胺药物总量的筛查。此外,分别采用本方法、Ic-ELISA和HPLC测定了市场上随机购买的20份牛奶和8份猪肝样品,三者结果基本一致。本法结果可靠、简便直观、无需特殊的检测仪器,适合于在线监测和收购现场的快速检测。

参考文献

- [1] Baran W, Adamek E, Ziemianska J, et al. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health[J]. Journal of hazardous materials, 2011, 196: 1-15.
- [2] Galarini R, Diana F, Moretti S, et al. Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed[J]. Food Control, 2014, 35(1):300-310.
- [3] Liu N, Han Z, Lu L, et al. Development of a new rabbit monoclonal antibody and its based competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of sulfonamides[J]. Journal of the science of food and agriculture, 2013, 93(3): 667-673.
- [4] 王战辉,张素霞,沈建忠,等. 荧光偏振免疫分析方法分析磺胺二甲嘧啶[J]. 分析化学, 2007(6):819-824.
- [5] Zhou Q, Peng D, Wang Y, et al. A novel hapten and monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay for sulfonamides in edible animal tissues[J]. Food chemistry, 2014, 154:52-62.
- [6] 楚金申,许杨,何庆华,等. 直接竞争化学发光酶免疫法检测猪肉中磺胺嘧啶[J]. 食品科学, 2011(10):124-129.
- [7] Hajian R, Mousavi E, Shams N. Net analyte signal standard addition method for simultaneous determination of sulphadiazine and trimethoprim in bovine milk and veterinary medicines[J]. Food chemistry, 2013, 138(2-3):745-749.
- [8] 周宏敏,欧惠超,姜浩,等. 利用表面等离子共振技术快速检测牛奶中的磺胺甲噁唑[J]. 食品科学, 2010(6):168-171.
- [9] 查玉兵,陈美,王晓芳,等. 高效液相色谱法测定猪肉中五种磺胺类药物残留量[J]. 分析仪器, 2008(4):42-45.
- [10] Won SY, Lee CH, Chang HS, et al. Monitoring of 14

表3 猪肝(PL)和牛奶(M)样品中磺胺类(SAs)药物的膜基质免疫分析法、Ic-ELISA、HPLC检测结果

Table 3 Detection results of SAs in pork liver and milk samples by membrane-based immunoassay, Ic-ELISA and HPLC

样品	HPLC ($\mu\text{g}/\text{kg}$)				SAs	Ic-ELISA ($\mu\text{g}/\text{kg}$) (n=3)	膜基质免疫分析法 (n=3)
	SMR	SM2	SMDZ	SDZ			
PL1	ND	ND	106.2	ND	106.2	208.1 \pm 3.5	-, -, - ^a
PL2	ND	50.7	54.8	55.1	160.6	352.1 \pm 2.9	-, -, -
PL3	ND	ND	38.2	22.6	60.8	97.8 \pm 4.1	-, -, -
PL4	ND	ND	117.7	ND	117.7	196.4 \pm 2.3	-, -, -
PL5	ND	ND	ND	90.4	90.4	126.6 \pm 1.2	-, -, -
PL7	ND	ND	62.6	ND	62.6	56.1 \pm 2.1	-, -, \pm ^c
M5	ND	ND	ND	ND	ND	6.3 \pm 0.8	+, +, + ^b
M17	ND	ND	ND	ND	ND	2.1 \pm 0.2	+, +, +

注:a:“-”未显色,阳性;b:“+”显色,阴性;c:“ \pm ”无法判断;d:“ND”不能检出,低于最低检测限;SAs的Ic-ELISA、HPLC的最低检测限分别为0.1、100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

(下转第81页)

因此该产品可以稳定贮藏。但当添加油脂后,由于产品的持水能力下降,产品的水分活度均大于0.70,产品的贮藏稳定性受到了影响。同样由表5可知,当 $a_w=0.75$ 时,添加油脂能够降低产品的干基含水量;当油脂添加量为6%时,产品的干基水分含量为0.175,即产品的湿基含水量已达到国标小于20%的要求,但此产品并没有表现出利于贮藏的状况(a_w 小于0.65)。由此可见,增加油脂虽然可以降低肉干制品的硬度,但在加工过程中不能仅采用终产品的水分含量以及干燥时间为衡量指标,建议在产品开发中增加产品的水分活度值作为衡量指标,这样更为科学。

3 结论

本文以含油重组碎肉产品为原料,研究了油脂添加对重组肉干产品硬度和持水性的影响,为开发硬度适中的重组肉干产品提供理论依据。本文通过对不同产品的干燥曲线和硬度分析表明,当干燥至相同的时间,随着油脂添加量的增加,终产品水分含量增加,产品硬度显著降低($p < 0.05$),且油脂添加量大于6%时,干燥12 h后产品的硬度增加不明显。同时对解析等温线模型拟合分析表明:GAB模型更适合于重组肉干等温线的拟合;并对拟合模型分析表明,当油脂添加量为0%~6%时,持水能力逐渐降低,而油脂添加量为9%~12%时,持水能力逐渐增加,6%添加量的产品持水能力最差。综上所述,建议在实际生产加工过程中不仅以干燥时间和干基含水量为指标评价干燥效果和产品质量,应在此基础上添加水分活度更为准确和全面。

参考文献

- [1] Dondero M, Figueroa V, Morales X, et al. Transglutaminase effects on gelation capacity of thermally induced beef protein gels[J]. Food Chemistry, 2006, 99(3): 546-554.
- [2] Dimitrakopoulou M A, Ambrosiadis J A, Zetou F K, et al. Effect of salt and transglutaminase(TG) level and processing conditions on quality characteristics of phosphate-free, cooked, restructured pork shoulder[J]. Meat Science, 2005, 70(4): 743-749.
- [3] 刘永安, 赵改名, 黄现青, 等. 脂肪添加量对熏煮香肠质构的影响[J]. 食品与发酵工业, 2012(6): 203-208.
- [4] 刘迪迪, 孔保华. 不同肥瘦肉质量比对乳化肠品质的影响[J]. 食品与发酵工业, 2009(12): 173-177.

- [5] Lorenzo J M, Franco D. Fat effect on physico-chemical, microbial and textural changes through the manufactured of dry-cured foal sausage Lipolysis, proteolysis and sensory properties[J]. Meat Science, 2012, 92(4): 704-714.
- [6] 闫晓蕾. 山梨糖醇在香肠制品中的持水作用研究[D]. 无锡: 江南大学, 2012.
- [7] 吴焕领, 魏赛男, 崔淑玲. 吸附等温线的介绍及应用[J]. 染整技术, 2006(10): 12-14.
- [8] 王云阳, 张丽, 王绍金, 等. 澳洲坚果果壳解吸等温线与吸附等温线拟合模型[J]. 农业机械学报, 2012(5): 103-107.
- [9] Sinija V R, Mishra H N. Moisture sorption isotherms and heat of sorption of instant(soluble) green tea powder and green tea granules[J]. Journal of Food Engineering, 2008, 86(4): 494-500.
- [10] 回瑞华, 侯冬岩, 李学成, 等. 玉米油的制备及脂肪酸的分析[J]. 食品科学, 2006(11): 418-420.
- [11] 张海臣, 吕春艳, 姜义东. 关于玉米油营养价值及制备的探讨[J]. 粮油加工, 2009(4): 41-44.
- [12] GB/T 23490-2009食品水分活度的测定[S]. 中国: 2009.
- [13] Basunia M A, Abe T. Moisture desorption isotherms of medium-grain rough rice[J]. J Stored Prod Res, 2001, 37(3): 205-219.
- [14] Moreira R, Chenlo F, Torres M D, et al. Water adsorption and desorption isotherms of chestnut and wheat flours[J]. Industrial Crops and Products, 2010, 32(3): 252-257.
- [15] 彭桂兰, 陈晓光, 吴文福, 等. 玉米淀粉水分吸附等温线的研究及模型建立[J]. 农业工程学报, 2006, 22(5): 176-179.
- [16] Yıldız-Turp G, Serdaroğlu M. Effect of replacing beef fat with hazelnut oil on quality characteristics of sucuk-A Turkish fermented sausage[J]. Meat Science, 2008, 78(4): 447-454.
- [17] Mugerza E, Fista G, Ansorena D, et al. Effect of fat level and partial replacement of pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages[J]. Meat Science, 2002, 61(4): 397-404.
- [18] Utrilla M C, García Ruiz A, Soriano A. Effect of partial replacement of pork meat with an olive oil organogel on the physicochemical and sensory quality of dry-ripened venison sausages[J]. Meat Science, 2014, 97(4): 575-582.
- [19] Hugo A, Roodt E. Significance of porcine fat quality in meat technology: A review[J]. Food Reviews International, 23(2): 175-198.
- [20] GB 2726-2005熟肉制品卫生标准[S]. 中国: 2005.

(上接第69页)

- sulfonamide antibiotic residues in marine products using HPLC-PDA and LC-MS/MS[J]. Food Control, 2011, 22(7): 1101-1107.
- [11] 高洋洋, 张朝晖, 刘鑫, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物源性食品中的磺胺增效剂[J]. 色谱, 2014(5): 524-528.
 - [12] Chen A, Jiang X, Zhang W, et al. High sensitive rapid visual detection of sulfadimethoxine by label-free aptasensor[J]. Biosensors & bioelectronics, 2013, 42: 419-425.
 - [13] 韩静, 刘恩梅, 王帅, 等. 胶体金免疫层析法检测食品中的磺胺类药物残留[J]. 现代食品科技, 2011, 27(5): 603-606.
 - [14] He Q-h, Xu Y, Zhang C-z, et al. Phage-borne peptidomimetics

- as immunochemical reagent in dot-immunoassay for mycotoxin zearalenone[J]. Food Control, 2014, 39(0): 56-61.
- [15] He Q-H, Xu Y, Wang D, et al. Simultaneous multiresidue determination of mycotoxins in cereal samples by polyvinylidene fluoride membrane based dot immunoassay[J]. Food chemistry, 2012, 134(1): 507-512.
 - [16] 陈艳, 梁赤周, 吴斌, 等. 庆大霉素快速Dot-ELISA检测方法的建立及初步应用[J]. 中国畜牧兽医, 2010(9): 237-240.
 - [17] 林晓丽, 饶辉, 熊勇华, 等. 胶体金试纸条快速检测食品中磺胺二甲基嘧啶残留[J]. 食品科学, 2010(24): 366-369.