

# 喹诺酮类药物抗体制备研究进展及策略分析

王战辉, 沈建忠, 张素霞

(中国农业大学动物医学院/国家兽药残留基准实验室, 北京 100193)

**摘要:** 氟喹诺酮类 (Fluoroquinolones, FQs) 各单体药物之间的化学结构极其类似, 通常针对某一个药物制备的抗体对多种氟喹诺酮具有广谱识别性, 是易于建立多残留免疫分析的代表性药物。本文综述了氟喹诺酮抗体制备和食品中的免疫分析研究进展, 分析了已发表文章中以不同氟喹诺酮为半抗原所获得抗体对其它氟喹诺酮的交叉反应, 并应用 SYBYL 7.0 程序包以 MMFF94 力场优化了 8 种批准用于动物的氟喹诺酮最低能量构象, 从二维和三维构象角度对制备广谱氟喹诺酮抗体的策略进行了探讨, 理论上提出了制备广谱氟喹诺酮抗体的途径。

**关键词:** 氟喹诺酮; 广谱抗体; 免疫分析; 分子模拟

## Recent Advances and New Strategy in Antibody Preparation for Fluoroquinolones

WANG Zhan-hui, SHEN Jian-zhong, ZHANG Su-xia

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University/National Reference Laboratory for Test of Veterinary Drug Residues, Beijing 100193)

**Abstract:** The antibody against one of the fluoroquinolones (FQs) always possesses broad-spectrum binding characteristics to FQs due to the similarity between individual drugs of FQs, which are easy to be detected by multi-residue immunoassay. This paper reviewed advances in the development of immunoassay for FQs in food samples and analyzed the cross-reaction results from papers published, optimized the minimum energy conformations of 8 FQs approved to be used in animals. A theoretic strategy for obtaining broad-spectrum antibody was put forward based on the evidence of two-dimensional and three-dimensional view.

**Key words:** Fluoroquinolone; Broad-spectrum antibody; Immunoassay; Molecular modeling

### 0 引言

氟喹诺酮 (fluoroquinolones, FQs) 类药物是第三代喹诺酮类药物 (图 1), 抗菌作用是磺胺类药物的近千倍<sup>[1]</sup>。经由氟喹诺酮治疗的动物, 其产品中可能存在氟喹诺酮的残留, 对消费者的健康造成危害。而且长期使用会诱导细菌产生对 FQs 的耐药性, 因此, FQs 残留问题越来越引起人们的重视<sup>[2,3]</sup>。欧盟<sup>[4]</sup>和中国农业部 (No. 278, 2003.5.22) 分别对 6 种 FQs 规定了最高残留限量 (MRL)。目前国内外已批准用于动物的 FQs 包括诺氟沙星 (norfloxacin, NOR)、恩诺沙星 (enrofloxacin, ENR)、沙拉沙星 (sarafloxacin, SAR)、达诺沙星 (danofloxacin, DAN)、环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP)、二氟沙星 (difloxacin, DIF)、

氧氟沙星 (ofloxacin, OFL) 和马保沙星 (marbofloxacin, MAR)<sup>[5,6]</sup> (图 2)。

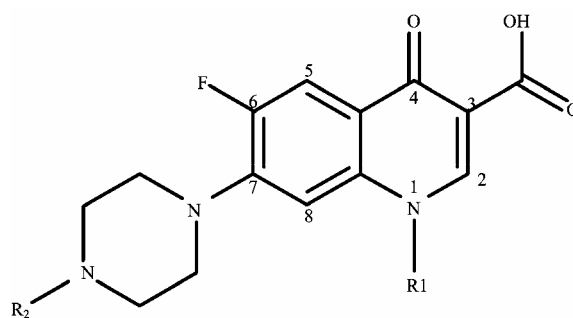


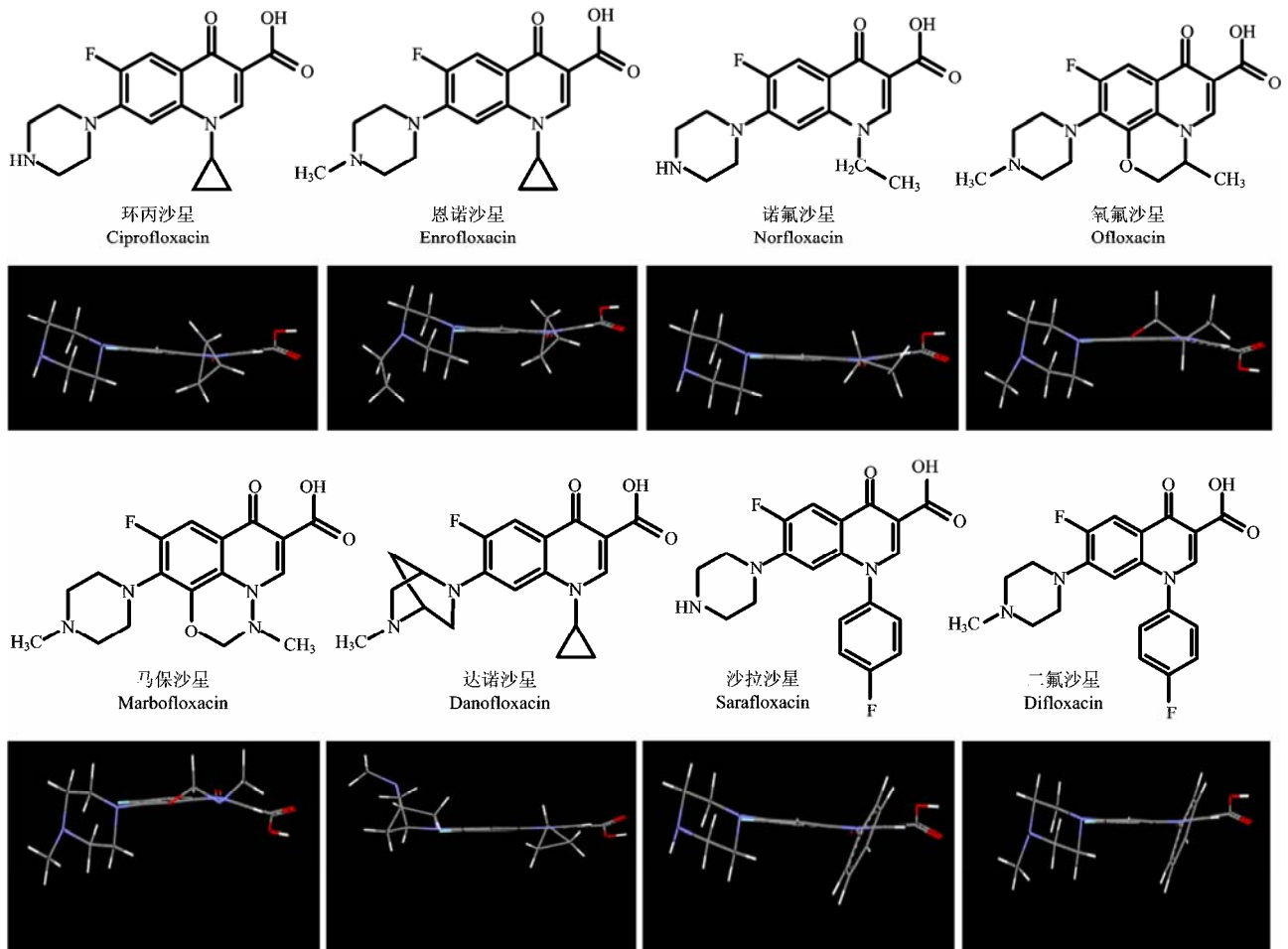
图 1 氟喹诺酮类药物母环结构

Fig. 1 The common chemical structure of fluoroquinolones

收稿日期: 2007-08-14; 接受日期: 2008-06-24

基金项目: 国家自然科学基金重点基金 (30830082)、北京市优秀博士论文基金 (YB20081001902) 和中国农业大学科研启动基金 (2007024)

作者简介: 王战辉 (1979-), 男, 山东昌邑人, 讲师, 博士, 研究方向为兽药残留检测。Tel: 010-62733289; E-mail: wangzhanhui@cau.edu.cn。通讯作者沈建忠 (1963-), 男, 浙江桐乡人, 教授, 研究方向为兽医药理与毒理学。Tel: 010-62732803; E-mail: sjz@cau.edu.cn



不同的元素以不同的颜色表示：灰色，碳原子；白色，氢原子；红色，氧原子；深蓝色，氮原子；黄色，氟原子  
The elements are represented in the following manner: carbon, off white; hydrogen, white; oxygen, red; nitrogen, blue; and fluorine, yellow

图2 批准用于动物的氟喹诺酮类药物化学结构式及其最低能量构象

Fig. 2 The chemical structures and models of the minimum energy conformations of fluoroquinolones that are approved to be used in animal

目前检测 FQs 的方法大多为高效液相色谱法—荧光检测<sup>[7]</sup>，液质联用<sup>[8,9]</sup>，毛细电泳<sup>[10]</sup>等。但是这些仪器方法，需要昂贵的设备，熟练的操作人员，前处理过程复杂，耗时费力，不适合大量样本的快速分析。免疫分析方法，尤其是酶联免疫吸附分析(enzyme-link immunosorbent assay, ELISA)，逐渐成为一种成熟的兽药残留分析方法<sup>[11]</sup>，其特点是：不需要昂贵复杂的仪器，费用低、速度快和效率高，可以适用于大量样本的快速分析，灵敏度高，成本低<sup>[12]</sup>。要充分发挥 ELISA 的优势，发展兽药多残留检测，即一次上机可以检测多种药物的有效途径。抗体是免疫分析的关键试剂，它决定着免疫分析的灵敏度和特异性。目前，获得理想的广谱性抗体是制约多残留 ELISA 发展的

主要瓶颈问题，兽药如磺胺类药物的采用复杂的半抗原制备方法<sup>[13,14]</sup>获得了广谱性抗体，新的抗体制备技术如重组抗体<sup>[15]</sup>和抗特异型抗体<sup>[16]</sup>也层出不穷，为广谱性抗体的制备，发展兽药多残留免疫分析提供了多种途径。其中分子模拟是近年来开始应用于广谱性抗体制备中的新技术。其主要优势在于指导半抗原的合成。分子模拟技术可以从三维角度提供分析物的物理化学性质，如三维构象、疏水特性和电子特性等能影响氢键、疏水键、范德华力和静电作用形成的因素。基于对这些因素的分析，可以更好的理解抗原抗体之间的结合作用，合成更为理想的半抗原<sup>[17]</sup>。目前成功地利用分子模拟技术制备出理想抗体的药物有三氯苯酚<sup>[18]</sup>和抗球虫药物尼卡巴嗪<sup>[19]</sup>。现在有些免疫分析，

尤其是 ELISA, 应用分子模拟技术解释抗体的交叉反应, 如沙拉沙星<sup>[20]</sup>、磺胺类药物<sup>[21,22]</sup>和伏马菌素类<sup>[23]</sup>等。同样利用分子模拟的分析结果, 可以观察到各个药物之间理化性质的不同, 为选择理想的半抗原结构提供理论基础。利用分子模拟技术, 从三维角度探讨药物与抗体的结合, 国外研究的不多, 国内尚未开展相应研究。

免疫分析检测 FQs 起步较晚, 目前检测方法主要是传统的 ELISA 检测方法。本文综述了国内外 FQs 免疫分析的最新研究进展, 并利用分子模拟技术结合已经发表的有关 FQs 的数据结果, 从理论上提出了理想的广谱 FQs 抗体制备策略。

## 1 分子模拟试验

全分子在 SGI 图形工作站上用 SYBYL 7.0 三维模拟软件包完成构建<sup>[24]</sup>。采用 MMFF94 力场, 加载 MMFF4 电荷对分子进行能量优化。由最陡下降法优化 100 轮后, 用 BFGS 计算方法收敛, 直到梯度均方根小于  $0.005 \text{ kcal} \cdot (\text{mol} \cdot \text{\AA})^{-1}$ 。

## 2 影响抗原抗体特异性结合的因素

无论是多克隆抗体还是单克隆抗体都是免疫球蛋白, 它们能与对应的抗原进行特异性结合, 这取决于抗体的抗原结合位点与抗原决定簇之间在空间上的互补程度及分子表面基团的分布和性质。只有当两者的空间构象互补程度较大, 相互之间才能产生较高的亲和力。抗体可以对一种化合物表现出特异的亲和力, 也可以识别一类结构相似的化合物。抗体与抗原(如抗生素)的特异性结合依赖于在抗体上抗原结合位点处发生的结构上或化学上的反应, 是可逆的, 不形成新的共价键反应。它们之间的特异性结合受抗原(化学组成和空间构型、光学构型及立体构象)<sup>[25]</sup>和位于抗体分子高变区内单个氨基酸残基的精确调控, 这些反应包括离子键(盐键)、范德华力和氢键、疏水力和短程电荷反应<sup>[26, 27]</sup>。

## 3 喹诺酮类抗体制备的研究进展

### 3.1 单个药物的残留免疫分析

3.1.1 恩诺沙星 蔡勤仁等<sup>[28]</sup>以 ENR 为半抗原通过碳化二亚胺法合成了牛血清蛋白和卵清蛋白的人工抗原, 筛选出针对 ENR 的两株单克隆抗体, 对 ENR 的半数抑制量 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $21.67 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 检测限 (limit of detection, LOD) 为  $0.13 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。单抗对其它几种 FQs

有较高的选择性, 与 CIP、MAR、SAR、DAN 的交叉反应率分别为 110.84%、27.40%、71.05% 和 37.41%, 而与头孢氨苄、氯霉素、磺胺间甲氧嘧啶等无交叉反应。Watanabe 等<sup>[29]</sup>以相同的方法同样筛选出一株针对 ENR 的单抗, 并制备了免疫亲和色谱, 以 ELISA 方法检测了 ENR 在鸡肝、鸡肉和牛奶中的残留分析, 回收率为 72.4%~99.0%, 并与 HPLC 方法进行比对, 相关系数均在 0.98 以上。不同的是单抗对 CIP 的交叉反应率较低, 所建立的方法在实际应用中受到限制。Bucknall 等<sup>[30]</sup>报道了 ENR 多克隆抗体的制备, 同样以碳化二亚胺法获得免疫原, 得到的抗体对其它沙星类药物的交叉反应率均小于 1%。Mellgren 等<sup>[31]</sup>利用制备的 ENR 抗体<sup>[32]</sup>建立了牛奶中 ENR 和 CIP 的免疫传感器分析方法, 对 ENR 和 CIP 的检测限都在  $1.5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。作者没有给出与其它 FQs 的交叉反应率。

3.1.2 环丙沙星 CIP 是继 NOR 之后获美国 FDA 批准上市的第二个喹诺酮类药物<sup>[1]</sup>。目前只有一篇文献报道了检测 CIP 的 ELISA 方法。Duan 等<sup>[33]</sup>以 CIP 为半抗原通过活性酯法偶联到载体牛血清蛋白和人血清蛋白, 获得了针对 CIP 的多克隆抗体, 对 ENR 和 NOR 的交叉反应率分别为 69.8% 和 44.6%。建立的 ELISA 方法, LOD 为  $0.32 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。在猪肉、鸡肉和牛奶中的添加回收率分别为 75.58%、81.29% 和 84.30%, 检测范围  $1.6 \sim 1\,000 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。尽管作者没有检测交叉反应率较高的 ENR 和 NOR, 但从灵敏度上分析, 该方法至少可以同时检测 3 种 FQs 的残留。

3.1.3 氟甲喹 氟甲喹 (flumequin, FLU) 是 20 世纪 70 年代开发出来的第二代 FQs, 目前仍然在广泛应用。Van Coillie 等<sup>[34]</sup>建立了牛奶中 FLU 的 ELISA 检测方法, 缓冲液和牛奶中的  $\text{IC}_{50}$  分别为  $500 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $90 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 牛奶中的  $\text{IC}_{50}$  低于缓冲液的 5 倍。与其它 FQs 的交叉反应小于 0.1%。与其它 FQs 的免疫分析不同的是, 制备 FLU 时的动物不是传统的哺乳动物, 而是鸡, 获得的抗体方式不是采集鸡的血清, 而是收集经过免疫的鸡的卵黄抗体, 同样取得了较好的效果。

3.1.4 沙拉沙星 SAR 是美国 FDA 第一个批准上市的专门用于动物的沙星类药物<sup>[20]</sup>。Holtzapfel 等<sup>[20]</sup>于 1997 年首次报道了 SAR 单克隆抗体的制备, 获得的 6 株抗体对其它沙星类的交叉反应率基本类似, 对 DIF 的交叉反应率高于 100%, 而对缺失哌嗪环的爪哇沙星的交叉反应率高于 50%。同时对 ENR、NOR 和奈啶酸也有较高的交叉反应率。

3.1.5 培氟沙星 Lu 等<sup>[35]</sup>同样没有经过抗原改造直

接以 PEF 经偶联牛血清蛋白免疫,获得的抗培氟沙星 (pefloxacin, PEF) 血清的  $IC_{50}$  为  $6.7 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。对其 它 FQs 的交叉反应率为氟罗沙星 (116%), ENR (88%), 和 OFL (10%)。以该抗体建立的间接竞争 ELISA 方法应用于鸡肝中 PEF 的残留检测,平均回收率为 86%~106%。

### 3.2 多个药物残留的同时免疫分析

免疫分析趋向于同时检测多种药物,目前为止,两篇文章报道了旨在建立 FQs 的多残留免疫分析方法。Bucknall 等<sup>[30]</sup>以 NOR 为母体化合物,在哌嗪基团的第二个氨基上引入己六酸,再以碳化亚胺法与卵清蛋白偶联制备免疫原,获得了广谱的 FQs 多克隆抗体。在直接竞争的 ELISA 体系中,至少可以识别 9 种 FQs,分别是 NOR (100%)、奈啶酸 (15%)、ENR (6%)、FLU (6%)、CIP (9%)、OFL (17%)、奥林酸 (40%)、吡哌酸 (18%) 和依诺沙星 (143%)。可以发现,尽管作者成功的制备了针对 FQs 的多残留抗体,但是对几种重要的沙星类药物如 ENR 和 CIP 交叉反应率偏低,作者也没有研究用于动物的 SAR 和 DIF 的交叉反应,所以在实际应用中受到局限。

Huet 等<sup>[5]</sup>真正实现了可以用于实测样本的 ELISA 多残留分析。作者指出,免疫原的制备是以 SAR 和 NOR 为母体化合物,在哌嗪基团的第二个氨基 ( $R_2$ ) 引入羧基,连接载体蛋白,但是作者没有详细描述免疫原的合成过程。无论是 NOR 还是 SAR 都获得广谱的多克隆抗体。酶标竞争原的种类对交叉反应性有很大的影响。异源性的酶标竞争原都获得了满意的交叉反应率,而同源性的酶标竞争原交叉反应性显著降低。优化之后,以 SAR 为免疫原以 NOR 为酶标竞争原的直接竞争 ELISA 的交叉反应为 SAR (100%)、NOR (105%)、DIF (64%)、CIP (17%)、PEF (30%)、OFL (55%)、FLU (4%)、西诺沙星 (1%)、奥林酸 (3%)、DAN (88%)、ENR (66%)、MAR (45%)、洛美沙星 (24%) 依诺沙星 (27%) 和奈啶酸 (14%)。对 SAR 的 LOD 为  $0.21 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。尽管对 FLU (4%)、西诺沙星 (1%) 和奥林酸 (3%) 的交叉反应率小于 10%,但是对其的 LOD 分别为 5.09、25.00 和  $6.26 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ,完全可以满足这 3 类药物在食品中的检测要求,作者认为所建立的 ELISA 方法至少可以同时检测 15 种 FQs。

## 4 现存的问题分析及展望

到目前为止,制备 FQs 抗体的研究较少,但是可

以发现不管制备的抗体是用于多残留检测<sup>[5,30]</sup>还是单残留检测<sup>[20,28-30,33,35]</sup>,不管是单克隆抗体<sup>[20]</sup>还是多克隆抗体<sup>[5,30,33]</sup>,得到的抗体大多都具有广谱的性质(表)。在已经发表的多残留检测文章中<sup>[5,30]</sup>,半抗原制备都采用了在哌嗪基的第二个氨基上引入羧基,以完全暴露 FQs 的母环结构,但是利用该方法获得的抗体并不都具有明显的广谱性,如 Bucknall<sup>[30]</sup>制备的抗体对几种重要的 FQs (ENR、CIP 和 FLU) 的交叉反应率都低于 10%。相反直接以 CIP、NOR 和 SAR 为半抗原获得抗体,对一些结构极为相似的药物交叉反应率都在 50%以上<sup>[20,28,33]</sup>。所以,既然 FQs 自身含有活性羧基,又有直接以某种 FQs 为半抗原成功制备广谱抗体的先例,笔者认为可以不经复杂的半抗原改造就可以获得广谱性质抗体在理论上是可行的。

从交叉反应率的结果来看,NOR、CIP 和 SAR 得到的抗体对其他 FQs 的交叉反应率较大。可能的原因是:

(1) 这 3 种 FQs 单体在哌嗪基上没有取代基,可以避免产生针对哌嗪取代基的抗体结合位点。尽管哌嗪基上的取代基团大多为烷烃基,具有较弱的免疫原性,但是免疫学中有一个广为接受的原理,就是抗体倾向于结合距离偶联位点最远的基团,如果以 FQs 的母化合物为半抗原,哌嗪基团的烷烃取代基是距离偶联位点最远的基团。这已经被一些实验证明,如 Bucknall 等<sup>[30]</sup>制备的 ENR 多克隆抗体和 Watanabe 等<sup>[29]</sup>制备的 ENR 单克隆抗体具有高度的选择性,只能识别 ENR 而对其它 FQs 结合力很低。Lu 等<sup>[35]</sup>制备的 PEF 多克隆抗体也证明了这一点。PEF 的哌嗪基团上含有一个甲基,获得的抗体只识别哌嗪基团上含有甲基的 FQs 如氟罗沙星 (116%)、OFL (10%) 或含有乙基的 FQs 如 ENR (88%),而对于不含有甲基的 FQs 的交叉反应率均低于 1%如吡哌酸、加替沙星、SAR、CIP、洛美沙星和依诺沙星,即使是和 PEF 极为相似的 NOR 的交叉反应率也仅为 1%。所以哌嗪基团上的取代基在制备抗体过程中的作用是极为重要的。相反,从发表文章的数据来看,哌嗪基上的烷烃取代基对抗体与药物的结合影响力却有限,如以 NOR、CIP 和 SAR 等均在哌嗪基上不含取代基的药物为半抗原获得的抗体,除了对哌嗪基上不含取代基的 FQs 有高亲和力外对哌嗪基上含取代基的 FQs 如 ENR 和 OFL 等也有很高的亲和力,所以选择半抗原时应该选择哌嗪基上不含取代基的 FQs。

(2) NOR 和 CIP 在 1 位的取代基均为烷烃基,

表 已发表文献喹诺酮类抗体交叉反应总结 (%)

Table Review of cross-reaction of antibody against fluoroquinolones from published papers

药物 Compounds	文献 References						
	[33]	[29]	[5]	[30]	[20]*	[34]	[28]
恩诺沙星 Enrofloxacin	70	100	66	6	83	-	100
环丙沙星 Ciprofloxacin	100	-	17	9	ND	-	111
诺氟沙星 Norfloxacin	45	-	105	100	27	-	ND
二氟沙星 Difloxacin	ND	-	64	ND	215	-	ND
达诺沙星 Danofloxacin	ND	-	88	ND	ND	-	37
氧氟沙星 Ofloxacin	ND	-	55	17	N	-	ND
沙拉沙星 Sarafloxacin	ND	-	100	ND	100	-	71
培氟沙星 Pefloxacin	ND	-	30	ND	ND	-	ND
氟甲喹 Flumequine	ND	-	4	6	ND	100	ND
奥林酸 Oxolinic Acid	ND	-	3	40	ND	-	ND
依诺沙星 Enofloxacin	ND	-	27	143	ND	-	ND
洛美沙星 Lomefloxacin	ND	-	24	ND	ND	-	ND
马保沙星 Marbofloxacin	ND	-	45	ND	ND	-	27
奈啶酸 Nalidixic Acid	ND	-	14	15	15	-	ND
西诺沙星 Cinoxacin	ND	-	1	1	ND	-	ND
爪哇沙星 Trovafloxacin	ND	-	ND	ND	92	-	ND
吡哌酸 Pipemidic Acid	ND	-	ND	18	ND	-	ND

\*单抗 Sara-5; ND: 没有检测; -: 无交叉反应

\* Signal clone Sara-5; ND: No measure; -: No cross-reactivity

结构简单且不易产生免疫原性,而且由于靠近羧基与载体蛋白的结合部位(3位),载体蛋白可以阻挡1位取代基暴露给免疫系统,屏蔽其免疫原性。但是从NOR为半抗原得到抗体交叉反应率来看,对SAR和DIF的交叉反应率较低<sup>[5]</sup>,这可能是由于SAR和DIF在1位有较大的氟苯环取代基,在此部位引入了空间位阻,阻碍药物与抗体之间形成非共价键反应,即针对NOR上乙基的抗体的抗原结合罅隙(pocket)不能完全包裹体积较大的氟苯环,造成了抗体识别能力的下降。

(3)从理论分析来看SAR是最适合的半抗原,除了在哌嗪环没有取代基外,另外针对1位较大的氟苯环抗体结合位点完全可以包容其它FQs在此位点上的较小的取代基。虽然体积较大的氟苯环可能会刺激产生抗体分子上针对氟原子的正电氨基酸残基序列,但是抗原与抗体之间的非共价结合力中,疏水作用力在大多数情况下发挥主导作用,烷烃取代基和氟苯环都为疏水取代基,这样可以削弱氟原子在抗原抗体结合时发挥作用<sup>[25]</sup>。

为了更好地理解抗原与抗体之间的特异性结合,利用SYBYL 7.0程序包,以MMFF94力场优化了目前已经批准用于动物的8种FQs的最低能量构象(图3),从这些三维结构中可以比较FQs分子之间三维构象的异同。因为空间结构的相似性是抗体与抗原结合的先决条件,只有抗原的分子体积符合抗原结合位点的要求,才会发生如氢键、离子键和疏水作用等各种非共价键。可以发现,8种FQs的空间构象极为相似。FQs的共同结构喹啉结构的两个环基本上处于同一个平面(垂直于纸平面)。构成哌嗪环的6个原子以椅式构象与喹啉环平面形成夹角。哌嗪基团的烷烃取代基因其结构简单,并没有明显改变FQs的空间构象,这是抗体结合药物的重要因素,这样空间构象相似的FQs可互补的契入抗体分子的抗原结合位点,这是广谱抗体识别多种FQs的结合机理。其中:

①DAN明显不同于其它的FQs。DAN在7位没有哌嗪环结构(图2),而是一个含有两个氮原子的二环结构。从其二维结构来看发生了很大的变化,但是从分子的最低能量构象来看,这个二元环的空间排

列与哌嗪基团基本类似,即没有影响 FQs 的基本构象。所以,制备的抗体只要能够识别其中的一种药物,对其它的药物或多或少都能够有识别作用。

②SAR 和 DIF 的 1 位空间构象不同于其它 FQs。较大的氟苯环构成另一个平面与喹啉环构成的平面几乎垂直。FQs 的分子量大概在 350 左右,氟苯环的分子量为 97,氟苯环的引入大概改变了 FQs 分子量的 28%,尽管不改变其它部位的立体构象,但是会引起分子体积的明显改变,对抗体结合造成伤害。

另外,在抗体的制备过程中,几乎所有的人都注意到即使是同一种免疫原免疫同种类型的动物,获得抗体的特性都存在差异,这是由于免疫动物的个体差异引起的。构思严密的半抗原设计可以通过大规模的动物免疫获得理想抗体,但是不同动物个体和不同脾细胞产生的抗体之间的差异是不可避免的。从统计学的角度来说,同一种免疫原所获得的抗体的性质服从正态分布,所以如果获得抗体亲和力的结果不符合理论分析<sup>[28]</sup>,是可以理解的。从另一方面来讲,如果理论分析的结论正确,经过大规模的抗体筛选总能得到理想的抗体。

## References

- [1] 李俊锁,邱月明,王超.兽药残留分析.上海:上海科技出版社,2002.  
Li J S, Qiu Y M, Wang C. *Veterinary Drug Residue Analysis*. Shanghai: Shanghai Scientific Technology Press, 2002. (in Chinese)
- [2] Espinosa-Mansilla A, Munoz de la Pena A, Gonzalez Gomez D, Salinas Lopez F. Determination of fluoroquinolones in urine and serum by using high performance liquid chromatography and multiemission scan fluorimetric detection. *Talanta*, 2006, 68: 1215-1221.
- [3] Linder J A, Huang E S, Steinman M A, Gonzales R, Stafford R S. Fluoroquinolone prescribing in the United States: 1995 to 2002. *The American Journal of Medicine*, 2005, 118: 259-268.
- [4] EEC Council Regulation, 1990, No.2377/90.
- [5] Huet A C, Charlier C, Tittlemier S A, Singh G, Benrejeb S, Delahaut P. Simultaneous determination of (fluoro)quinolone antibiotics in kidney, marine products, eggs, and muscle by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 2822-2827.
- [6] 汪雪雁,祁克宗,朱良强.氟喹诺酮类药物残留分析研究进展.安徽农业科学,2004,32:1021-1023.  
Wang X Y, Qi K Z, Zhu L Q. Progress on the detection methods of fluoroquinolones residue. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2004, 32: 1021-1023. (in Chinese)
- [7] Zeng Z, Dong A, Yang G, Chen Z, Huang X. Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatograph B*, 2005, 821: 202-209.
- [8] Heller D N, Nochetto C B, Rummel N G, Thomas M H. Development of multiclass methods for drug residues in eggs: hydrophilic solid-phase extraction cleanup and liquid chromatography/tandem mass spectrometry analysis of tetracycline, fluoroquinolone, sulfonamide, and beta-lactam residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 5267-5278.
- [9] Lolo M, Pedreira S, Fente C, Vazquez B I, Franco C M, Cepeda A. Study of enrofloxacin depletion in the eggs of laying hens using diphasic dialysis extraction/purification and determinative HPLC-MS analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53: 2849-2852.
- [10] Wang L, Wu X, Xie Z. Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin by high performance capillary electrophoresis with end-column amperometric detection. *Journal of Separation Science*, 2005, 28: 1143-1148.
- [11] Amine A, Mohammadi H, Bourais I, Palleschi G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21: 1405-1423.
- [12] Wheeler M J. Immunoassay techniques. *Methods in Molecular Biology*, 2006, 324: 1-23.
- [13] Zhang H, Duan Z, Wang L, Zhang Y, Wang S. Hapten synthesis and development of polyclonal antibody-based multi-sulfonamide immunoassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 4499-4505.
- [14] Franek M, Diblikova I, Cernoch I, Vass M, Hruska K. Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors. *Analytical Chemistry*, 2006, 78: 1559-1567.
- [15] Korpimaki T, Brockmann E C, Kuronen O, Saraste M, Lamminmaki U, Tuomola M. Engineering of a broad specificity antibody for simultaneous detection of 13 sulfonamides at the maximum residue level. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 40-47.
- [16] Kohen F, Gayer B, Anir-Zaltsman Y, O'Keefe M. Generation of an anti-idiotypic antibody as a surrogate ligand for sulfamethazine in immunoassay procedures. *Food and Agricultural Immunology*, 2000, 12: 193-201.
- [17] Spinks C A. Broad-specificity immunoassay of low molecular weight

- food contaminants: new paths to utopia. *Trend in Food Science and Technology*, 2000, 11: 210-217.
- [18] Galve R, Camps F, Sanchez-Baeza F, Marco M P. Development of an immunochemical technique for the analysis of trichlorophenols using theoretical models. *Analytical Chemistry*, 2000, 72: 2237-2246.
- [19] Beier R C, Ripley L H, Young C R, Kaiser C M. Production, characterization, and cross-reactivity studies of monoclonal antibodies against the coccidiostat nicarbazin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, 49: 4542-4552.
- [20] Holtzapple C K, Buckley S A, Stanker L H. Production and characterization of monoclonal antibodies against sarafloxacin and cross-reactivity studies of related fluoroquinolones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45: 1984-1990.
- [21] Spinks C A, Wyatt G M, Lee H A, Morgan M R. Molecular modeling of hapten structure and relevance to broad specificity immunoassay of sulfonamide antibiotics. *Bioconjugate Chemistry*, 1999, 10: 583-588.
- [22] Muldoon M T, Font I A, Beier R C, Holtzapple C K, Young C R, Stanker L H. Development of a cross-reactive monoclonal antibody to sulfonamide antibiotics: evidence for structural conformation-selective hapten recognition. *Food and Agricultural Immunology*, 1999, 11: 117-134.
- [23] Beier R C, Elissalde M H, Stanker L H. Calculated three dimensional structures of the fumonisin B1-4 mycotoxins. *Bulletin of Environment Contamination and Toxicology*, 1995, 54: 479-487.
- [24] 韩晓峰, 刘莹, 高莹, 来鲁华. 非肽类凝血酶抑制剂的比较分子力场分析. *化学进展*, 2003, 61(7): 1136-1139.
- Han X F, Liu Y, Gao Y, Lai L H. Comparative molecular field analysis of non-peptidic inhibition of thrombin. *Progress in Chemistry*, 2003, 61(7): 1136-1139. (in Chinese)
- [25] 江世益, 张鲁雁. 免疫化学. 上海:上海医科大学出版社, 1995.
- Jiang S Y, Zhang L Y. *Immunology Chemistry*. Shanghai: Shanghai Medicine University Press, 1995. (in Chinese)
- [26] Galve R, Nichkova M, Camps F, Sanchez-Baeza F, Marco M P. Development and evaluation of an immunoassay for biological monitoring chlorophenols in urine as potential indicators of occupational exposure. *Analytical Chemistry*, 2002, 74: 468-478.
- [27] Beier R C, Stanker L H. Application of immunoassay for detection of antibiotics in foods and feed: A review. *Recent Research Development Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 4: 59-93.
- [28] 蔡勤仁, 曾振灵, 杨桂香, 陈杖榴, 方炳虎. 恩诺沙星单克隆抗体的制备及鉴定. *中国农业科学*, 2004, 37: 1060-1064.
- Cai Q R, Zeng Z L, Yang G X, Chen Z L, Fang B H. Studies on preparation and characterization of monoclonal antibodies against enrofloxacin and cross-reactivity of related fluoroquinolones. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 1060-1064. (in Chinese)
- [29] Watanabe H, Satake A, Kido Y, Tsuji A. Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. *Analyst*, 2002, 127: 98-103.
- [30] Bucknall S, Silverlight J, Coldham N, Thorne L, Jackman R. Antibodies to the quinolones and fluoroquinolones for the development of generic and specific immunoassays for detection of these residues in animal products. *Food Additives and Contaminants*, 2003, 20: 221-228.
- [31] Mellgren C, Sternesjo A. Optical immunobiosensor assay for determining enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk. *Journal of AOAC International*, 1998, 81: 394-397.
- [32] Hammer P, Heeschen W. Antibody-capture immunoassay for the detection of enrofloxacin. *Milchwissenschaft*, 1995, 50: 513-514.
- [33] Duan J, Yuan Z. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 2001, 49: 1087-1089.
- [34] Van Coillie E, De Block J, Reybroeck W. Development of an indirect competitive ELISA for flumequine residues in raw milk using chicken egg yolk antibodies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52: 4975-4978.
- [35] Lu S X, Zhang Y L, Liu J T, Zhao C B, Liu W, Xi R M. Preparation of anti-pefloxacin antibody and development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of pefloxacin residue in chicken liver. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54: 6995-7000.

(责任编辑 林鉴非)