

# 叶蛋白提取分离及应用研究进展

柳青海<sup>1,2</sup> 张唐伟<sup>1,2</sup> 李天才<sup>1</sup>

(1.中国科学院西北高原生物研究所,青海西宁 810008;

2.中国科学院研究生院,北京 100049)

**摘要:**叶蛋白因具有资源丰富、营养价值高、不含动物性胆固醇等特点而备受关注,是一种具有良好开发价值的新型蛋白资源。细胞破碎的方法主要有研磨、组织捣碎等方法;提取的方法主要有酸(碱)加热提法、发酵法、有机溶剂沉淀等方法;分离纯化的方法主要有电泳、色谱等方法。叶蛋白在医药、食品、饲料等方面都有广泛的应用。

**关键词:**叶蛋白 提取分离 细胞破碎 应用

## Review on extraction, purification and application of leaf protein

LIU Qing-hai<sup>1,2</sup> ZHANG Tang-wei<sup>1,2</sup> LI Tian-cai<sup>1</sup>

(1.Northwest Institute of Plateau Biology Chinese Academy of Science, Xining 810008, China;

2.Graduate University, Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

**Abstract:** Leaf protein has been paid much attention for its plenty of sources, high nutrition and nocholesterol, it was a new type of protein resources. Methods to crash cell included grinding, crushing and other methods. Crude leaf protein extraction methods were acid heating, the direct fermentation, organic solvent precipitation and other methods. Protein separation and purification methods included electrophoresis, chromatography and so on. Leaf protein widely used in medicine, food, feed and so on.

**Key words:** leaf protein; extraction and purification; cell breakage; application

中图分类号: TS201.2<sup>+</sup>1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)09-0468-04

叶蛋白(Leaf protein concentration, LPC)是从新鲜植物茎叶,经压榨取汁、液中蛋白质分离和浓缩干燥而制备的高质量浓缩物<sup>[1]</sup>。研究表明,叶蛋白制品含蛋白质50%~70%<sup>[2]</sup>。据文献报道,苜蓿叶蛋白食用效果好,可消化率为62%~72%,能量代谢率为69%~90%,每千克叶蛋白中代谢能为2800~3200kcal<sup>[3]</sup>。叶蛋白中含有18种氨基酸,其中含8种人体必需氨基酸,钱爱萍等<sup>[4]</sup>研究表明,乌饭树叶蛋白质中总氨基酸含量为71.82%,必需氨基酸(EAA)占总氨基酸量的40.30%,第一限制性氨基酸为赖氨酸,氨基酸比值系数为77.05,必需氨基酸与非必需氨基酸含量的比值为0.674,分别高于WHO/FAO标准规定的40%和0.6。迟桂荣<sup>[5]</sup>对苜蓿和浮萍研究表明,这两种植物中叶蛋白中粗蛋白含量为51.6%和42.3%。国内外对叶蛋白应用研究,主要集中在药用(抗氧化、心血管病、抗菌等)、食品、饲料等方面。我国植物资源丰富,而在叶蛋白开发方面相对滞后,积极寻求开发新的蛋白资源具有十分重要的意义。

## 1 叶蛋白的提取

### 1.1 样品的预处理

1.1.1 研磨 刘建华等<sup>[6]</sup>采用干打浆的方法,将鲁梅克斯嫩叶茎剪切成长0.5~1cm的小段,分数次用研钵研磨成糊状,医用纱布两层叠放在一起,每次取少许研磨后的糊状物放在纱布上,充分挤压,挤出绿色汁液,从而分离出叶蛋白。该方法简单,经常与其他方法结合使用。

1.1.2 组织捣碎法 这是一种较剧烈的破碎细胞的方法,通常可先用家用食品加工机将组织打碎,然后再用10000~20000r/min的内刀式组织捣碎机(即高速分散器)将组织的细胞打碎。宋葆华等<sup>[7]</sup>在ZK高速自控组织捣碎机中,加蒸馏水300mL,捣碎3min,比较107种植物中叶蛋白含量。

1.1.3 溶胀法 细胞膜为天然的半透膜,在低渗溶液和低浓度的稀盐溶液中,由于存在渗透压差,溶剂分子大量进入细胞,将细胞膜胀破释放出细胞内物质。阚欢等<sup>[8]</sup>用100:1的液料比,浸泡60min,从辣木叶中分离叶蛋白。李雪枫等<sup>[9]</sup>用此方法破碎柱花草叶细胞,从中提取叶蛋白。

### 1.2 提取方法

1.2.1 酸(碱)加热提法 酸(碱)加热提法是酸(碱)法和加热法相结合的一种复合型叶蛋白提取方法。叶蛋白经等电点沉淀和热变性双重因素共同作用,增加了蛋白质凝聚机会,使叶蛋白凝聚快、凝聚物结构紧密易分离,保证了叶蛋白的高提取率。吴

收稿日期:2010-09-09

作者简介:柳青海(1985-),男,硕士研究生,研究方向:药用植物化学。

峰华等<sup>[10]</sup>利用碱提酸沉法,考察了提取温度、提取时间、pH 和料液比对豆腐柴叶蛋白提取率的影响,表明温度为 50℃,时间为 80min, pH 为 11,料液比为 1:30,豆腐柴叶蛋白提取率可达到 82.04%。赵希艳等<sup>[11]</sup>采用紫花苜蓿叶为原料,酸(碱)加热法提取紫花苜蓿叶蛋白,确定获得叶蛋白高产率的最优条件为:pH4.5、温度 80℃,加热时间 5min。酸(碱)加热法的主要优点是流程短操作方便、沉淀快、易于过滤收集等。但该工艺的缺点是酸(碱)等条件造成蛋白水解、影响蛋白活性。

1.2.2 发酵法 利用乳酸菌产生的乳酸等改变浆液的 pH 到蛋白质的等电点,使蛋白沉淀,再通过离心得到叶蛋白。曾凡枝等<sup>[12]</sup>用该法从苜蓿中提取叶蛋白,实验结果表明,各因素对苜蓿叶蛋白提取率的影响顺序为:发酵温度 > 乳酸菌数 > 发酵时间,实验发酵时间 10h 左右,发酵温度 34℃。刘鹏等<sup>[13]</sup>将乳酸的发酵酸与植物叶榨汁液按体积比 3:1 混合,搅拌静置后,离心得到叶蛋白沉淀,实验发现发酵酸新鲜程度、乳酸菌数量多少、生物活性高低等因素,对叶蛋白聚凝和提取效率都有影响。发酵法提取叶蛋白的优点是使植物叶中对动物机体有害的物质失去活性,提高了蛋白质品质,能耗少,提取效率高,是生产叶蛋白的一种节能环保的优良工艺。

1.2.3 有机溶剂沉淀 Walter J. Bray 等<sup>[14]</sup>用聚丙烯酰胺 A150 可高效的提取紫花苜蓿和黑麦草汁液中的白色叶蛋白。韦吉等<sup>[15]</sup>研究不同提取条件对热研号柱花草叶蛋白凝集的影响,表明其溶剂的选择及质量分数、pH、加热时间和温度对蛋白提取均有影响。有机溶剂提取法是目前较为常见的提取叶蛋白的方法,其优点是沉淀快、絮凝物结构紧密,易过滤收集。且经有机溶剂脱色生产的脱色叶蛋白具有含糖量低、蛋白成分较为单一等高营养价值,可用于抗癌、营养保健食品的开发。

1.2.4 直接加热法 刘建华等<sup>[6]</sup>用鲁梅克斯做原料比较了直接加热法、凝絮法和加酸法 3 种提取方法,结果直接加热法提取叶蛋白的产率相对较高。施正香等<sup>[7]</sup>研究表明,直接加热法能较好地促使叶蛋白絮凝,加热温度对叶蛋白提取效果有明显影响,50℃和 90℃是提取率最高的两个点;植株叶的幼嫩程度对叶蛋白提取率有影响,在处理温度相同时,同种植物越幼嫩,叶蛋白絮凝沉淀越容易,叶蛋白提取率越高。李雪枫等<sup>[9]</sup>用此方法提取柱花草叶蛋白,提取温度为 80℃。邹文辉等<sup>[16]</sup>对草坪草屑叶蛋白提取方法进行比较,直接加热法和酸化加热法之间无显著差异,但直接加热法具有较好的絮凝沉淀效果,且容易过滤,因此,直接加热法是提取草坪草屑叶蛋白的一种较好的方法。

1.2.5 其他方法 叶蛋白的提取方法还有超滤法、等电点沉淀法、结晶和重结晶法、酸碱法等,也有将不同的提取方法综合在一起使用的。Werner Koschuh 等<sup>[17]</sup>用超滤法从黑麦汁液中提取叶蛋白的得率为 59%,而用加热法的得率为 45%。阎欢等<sup>[8]</sup>用浸提及等电点法从辣木中提取分离叶蛋白,等电点分离 pH 为 4.0~5.0 时,产品的蛋白质含量达

68.86%,蛋白质提取率达 70%。Aruna RPGA 等<sup>[18]</sup>用酸提法从废茶叶渣中提取叶蛋白, pH4.4 时,叶蛋白提取率达 69%。刘晓颖<sup>[19]</sup>以黑麦草为原料采用酸加热和有机溶剂相结合的方法对其叶蛋白进行抽提,测得叶蛋白中粗蛋白质含量高达 32%~58%。可以看出,将有机溶剂提取和酸化加热法结合在一起可以获得较高的蛋白提取率。如果能在方法上得到进一步的改变,使得叶蛋白提取的成本降低,将为我们寻求新的蛋白资源提供更多的选择。

## 2 叶蛋白分离纯化

叶蛋白中含有多种蛋白,通过一系列物理、化学、生物等技术将其分开,得到相对较纯的蛋白,有利于叶蛋白的进一步研究,寻找新的活性蛋白,对开发叶蛋白有着重要意义。目前纯化蛋白的方法主要有电泳法、色谱等方法。

### 2.1 电泳法

带电荷的供试品(蛋白质粗提液)在惰性支持介质(如纸、醋酸纤维素、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等)中,于电场的作用下,向其对应的电极方向按各自的速度进行泳动,使组分分离成狭窄的区带,达到对不同物质的分离。谢正军等<sup>[20]</sup>用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将苜蓿叶提取的粗蛋白分成不同的组分,确定其分子量大小。Gomez-Vidal S 等<sup>[21]</sup>用二维电泳的方法(2-DE)从枣椰树叶中分离出五种纯蛋白。Silas Pessini Rodrigues 等<sup>[22]</sup>用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-PAGE)从番木瓜叶中提取出 15 种蛋白。

### 2.2 色谱法

2.2.1 凝胶过滤 根据分子量大小不同在色谱柱中的分配速度不同,分子量大的流出较分子量小的快,进而将其分离。马丽等<sup>[23]</sup>用葡聚糖凝胶 G-200 凝胶色谱及 Sephadex A.50,从元宝枫叶片中提取并纯化了叶蛋白,其中蛋白酶的比活性为 1408.04U·mg<sup>-1</sup>,纯化倍数 50.77。Mylarappa Bantaganahalli Ningappa 等<sup>[24]</sup>用 Sephadex G-75 和 Sephadex G-25 从麻绞叶中分离纯化出一种蛋白,该蛋白分子量为 35kDa。Pereira CA 等<sup>[25]</sup>用 Q-琼脂糖凝胶(Q-Sepharose)从木薯叶中分离蛋白。

2.2.2 离子交换层析 根据蛋白带电性质的不同,与交换剂发生交换,改变洗脱液 pH 或离子强度,将其洗脱而达到分离的目的。Dhira j. Vyas 等<sup>[26]</sup>用 DEAE-cellulose 从茶叶蛋白提取物中分离出具有抗氧化作用的蛋白。Sharma P 等<sup>[27]</sup>用 DEAE 从水稻叶中分离出具有活性的两种蛋白,其分子量 28.5kDa 和 34kDa。

## 3 叶蛋白应用研究

### 3.1 药用价值

国内外在叶蛋白药用方面研究的较多,如叶蛋白在抗氧化、预防心血管病、抗肿瘤、治疗关节炎、肺气肿、老年性白内障等方面的作用有研究报道。

3.1.1 抗氧化 谢正军等<sup>[20]</sup>对苜蓿叶蛋白及其水解产物抗氧化实验研究表明,苜蓿叶蛋白水解产物具

有明显的抗氧化功能。傅晓<sup>[28]</sup>用苜蓿叶蛋白对大鼠饲养结果证实,叶蛋白可提高谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)的活力,降低氧化产物丙二醛(MDA)的浓度,增强机体抗氧化酶系统的功能。Mylarappa Bantaganahalli Ningappa等<sup>[24]</sup>从麻绞叶中分离出蛋白,该蛋白具有抗氧化和清除自由基的作用。Dhira j.Vyas等<sup>[26]</sup>从茶叶蛋白提取物中分离出具有抗氧化作用的蛋白。Sharma P等<sup>[27]</sup>从水稻叶中分离出两种具有活性的蛋白,有显著的抗氧化作用。

3.1.2 预防心血管病 活泼等<sup>[29]</sup>从茶叶中提取蛋白,通过实验证明其具有明显的降血脂效果,对动脉粥样硬化及冠心病可能有一定的预防作用。邓勇等<sup>[30]</sup>通过苜蓿叶蛋白强化膳食营养学实验证明:进食苜蓿叶蛋白能明显提高大学生血红蛋白的含量,改善贫血状况。EWA D.Marczak等<sup>[31]</sup>研究结果表明,从菠菜中提取叶蛋白对高血压小鼠的血管紧张素转移酶活性有显著的抑制作用,能够起到降血压作用。

3.1.3 抗菌作用 Kyoko Hayashi等<sup>[32]</sup>研究表明,从丝兰属植物叶中提取的叶蛋白,能阻止单纯疱疹病毒感染细胞后蛋白合成系统,从而阻止其在宿主细胞内繁殖,该发现对开发植物的叶蛋白具有重要意义。

### 3.2 保健食品

粗叶蛋白富含维生素和叶黄素,不含动物蛋白所含的胆固醇,可作为儿童和成人的食用蛋白源和食品添加剂,被联合国粮食及农业组织认为是一种高质量食品。郑建仙<sup>[33]</sup>将苜蓿叶蛋白应用到面条中,在添加量不超过4%时,不改变面团流变学特性和口感;即使苜蓿叶蛋白的加入量达5%,也不会影响面条的加工性能。Devadas等<sup>[34]</sup>将苜蓿叶蛋白作为食物实验研究表明:其容易消化,还可促进生长,同动物蛋白相比,其成本低廉,在经济欠发达地区是一种理想的食品。Prevot-Dalvise等<sup>[35]</sup>用酶膜反应器水解苜蓿叶蛋白分离制备的叶蛋白肽,其溶解性、乳化性能、发泡性能均有较大改善,可用于食品工业。叶蛋白对人体具有多种功能,它进入人们的膳食结构后,将会降低高胆固醇对健康的危害。

### 3.3 饲料方面

叶蛋白含有动物必需氨基酸,粗蛋白质含量高,是猪、鸡、牛、羊良好的蛋白质补充饲料。对家畜适口性好、营养价值高、明显增加体重、改善禽畜鱼蛋等产品品质、具有良好的饲养效果,可作为家畜饲料添加剂,也可直接制成叶蛋白饲料直接进行饲喂。Delic<sup>[36]</sup>用含50%粗蛋白的苜蓿叶蛋白浓缩物代替蛋鸡日粮中3%的大豆饼,产蛋率增加3%,平均蛋重由55.8g提高到57.7g,饲养成本降低,蛋黄中 $\beta$ -胡萝卜素含量增加14%,且蛋黄中叶黄素积累增多,色泽提高。李玉清等<sup>[37]</sup>实验表明,在蛋鸡生产中用5%、10%菠菜叶蛋白替代相应比例的豆粕饲喂“种禽褐”商品代蛋鸡,生产性能不受影响;同时还可提高蛋黄颜色和经济效益。潘行正等<sup>[38]</sup>在饲料中添加西兰花叶蛋白对仔猪生产性能的实验表明,适量添加叶蛋白对断奶仔猪的采食量影响不显著,但添加量提高

到6%时可显著影响仔猪的采食量,在饲料转化率方面3%叶蛋白组效率最高,表明西兰花叶可用于代替等量日食的饲料。

### 3.4 其他方面用途

叶蛋白除了用于医药、保健食品、饲料外,还可用于化妆品、洗涤用品等日用化工用品和植物生长营养调节剂等方面,也可将叶蛋白作为原料进一步分离制得叶绿素、胡萝卜素、纯蛋白质、维生素E等许多功能性物质,而且叶蛋白的应用领域正在不断拓宽。叶蛋白纯化后活性蛋白研究,以及多肽等的研究越来越多。

## 4 前景与展望

叶蛋白资源丰富,加工过程简单,成本低,有利于规模化生产,而国内在叶蛋白的深加工方面相对滞后,目前国内对叶蛋白的研究主要集中于提取,而对于其进一步深加工研究较少,需要在叶蛋白应用方面进行更多的研究,使其生产加工能形成产业化、规模化,深加工产品能广泛的应用于医药、食品等方面,获得更大的经济价值。国内对蛋白需求大,尤其是畜牧养殖业,而国内蛋白资源相对缺乏,所以叶蛋白具有良好的开发前景。

### 参考文献

- [1] Pirie N W. Leaf protein in human and animal nutrition [M]. Cambridge University Press. 1987(2):32-36.
- [2] 邱业先, 黄长干, 蒋伦伟, 等. 植物叶蛋白提取率研究[J]. 中国饲料, 1995, 14:19-20.
- [3] 陈光耀, 毛新安. 紫花苜蓿的营养保健功能[J]. 中国动物保健, 2002(7):40-41.
- [4] 钱爱萍, 林虬, 颜孙安, 等. 乌饭树叶蛋白质中氨基酸含量及营养价值评价[J]. 福建农业学报, 2008, 23(3):306-309.
- [5] 迟桂荣. 苜蓿和浮萍中叶蛋白的提取及营养物质分析[J]. 安徽农业通报, 2007, 13(14):39-40.
- [6] 刘建华, 董顺福, 韩丽琴. 鲁梅克斯叶蛋白提取的研究[J]. 吉林医药学院学报, 2007, 28:19-21.
- [7] 宋葆华, 李法曾, 贺新强, 等. 107种植物叶蛋白产量及其蛋白质含量比较[J]. 植物资源与环境, 1998(4):52-54.
- [8] 阚欢, 李贤忠, 陆斌. 辣木叶蛋白质提取工艺研究[J]. 西部林业科学, 2007, 36(1):106-108.
- [9] 李雪枫, 王坚, 罗瑛, 等. 桂花草叶蛋白提取工艺研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26):11282-11284.
- [10] 吴峰华, 杨虎清, 何志平. 豆腐柴叶蛋白提取工艺研究[J]. 食品工业科技, 2010, 31(2):240-243.
- [11] 赵希艳, 张泽生. 酸碱加热法提取紫花苜蓿叶蛋白的最佳工艺参数[J]. 河北科技师范学院学报, 2006, 20(2):15-18.
- [12] 曾凡枝, 田丽萍, 薛琳, 等. 直接发酵法提取苜蓿叶蛋白[J]. 新疆农业科学, 2008, 45(5):890-893.
- [13] 刘鹏, 黄虎, 罗翠兰, 等. 乳酸发酵聚沉叶蛋白的反应过程与机理[J]. 湖南农业大学学报, 1999, 25(2):127-132.
- [14] Walter J Bray, Catherine Humphries. Preparation of White Protein Concentrate using a Polyanionic Flocculant [J]. J Sci Food Agric, 1979(30):171-176.
- [15] 韦吉, 古艳. 不同提取条件对热研2号桂花草叶蛋白凝集

的影响[J].科技信息, 2008, 18:30.

[16] 邹文辉, 惠文森, 王康英. 草坪草屑叶蛋白质提取方法比较实验[J]. 草业与畜牧, 2009(2):20-22.

[17] Werner Koschuh. Production of leaf protein concentrate from ryegrass and alfalfa: Comparison between heat coagulation/centrifugation and ultrafiltration [J]. *Esalination*, 2004, 163: 253-259.

[18] Aruna RPGA, Abeysinghe ISB, Jayaweera CD. Optimization of conditions for preparing leaf protein concentrate from refuse tea [J]. *Journal of Food Science and Technology (Mysore)*, 2007, 44(4):413-416.

[19] 刘晓颖. 黑麦草叶蛋白等营养成分的提取及性质分析[J]. *安徽大学学报*, 2007, 31(4):81-84.

[20] 谢正军, 金征宇, 徐学明. 苜蓿叶蛋白及其酶解物抗氧化活性的比较[J]. *食品与生物技术学报*, 2009, 28(5):627-632.

[21] Gomez-Vidal S, Tena M, Lopez-Llorca LV, et al. Protein extraction from Phoenix dactylifera L. leaves, a recalcitrant material, for two-dimensional electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2007, 29(2):448-456.

[22] Silas Pessini Rodrigues, José Aires Ventura, R.B. Zingali, et al. Evaluation of Sample Preparation Methods for the Analysis of Papaya Leaf Proteins through Two-dimensional Gel Electrophoresis [J]. *Phytochemical Analysis*, 2009, 20:456-464.

[23] 马丽, 邱业先, 杨进军, 等. 元宝枫蛋白酶的分离纯化及其生化性质[J]. *植物资源与环境学报*, 2005, 14(1):6-9.

[24] Mylarappa Bantaganahalli Ningappa, Leela Srinivas. Purification and characterization of 35 kDa antioxidant protein from curry leaves (*Murraya koenigii* L.) [J]. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22(3):699-709.

[25] Pereira CA, Correa AD, dos Santos CD, et al. Hemagglutinin of cassava leaves (*Manihot esculenta* Crantz): partial purification and toxicity [J]. *Cienciae Agrotecnologia*, 2008, 32(3):900-907.

[26] Dhira j Vyas, Sanjay Kumar. Purification and partial characterization of a low temperature Responsive Mn-SOD From

tea (*Camellia sinensis* L. O.Kuntze) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 329:831-838.

[27] Sharma P, Dubey RS. Ascorbate peroxidase from rice seedlings: properties of enzyme isoforms, effects of stresses and protective roles of osmolytes [J]. *Plant Science*, 2004, 167(3):541-550.

[28] 傅晓. 植物叶蛋白对抗脂质过氧化作用酶系统的影响[J]. *中国兽医科技*, 2003, 33(11):49-50.

[29] 活泼, 黄光荣, 张晓辉, 等. 非水溶性茶叶蛋白降血脂作用研究[J]. *茶叶科学*, 2005, 25(2):95-99.

[30] 邓勇, 李立人. 叶蛋白的研究及开发[J]. *生命的化学*, 1992, 12(2):11-13.

[31] EWA D Marczak. Antihypertensive properties of spinach leaf protein digests [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52:223-225.

[32] Kyoko Hayashi, Hiroko Nishino, Seiichiro Niwayama, et al. Yucca leaf protein (YLP) stops the protein synthesis in HSV-infected cells and inhibits virus replication [J]. *Antiviral Research*, 1992, 17(4):323-333.

[33] 郑建仙. 苜蓿叶蛋白在面条中的应用研究[J]. *食品工业*, 1996(5):2-3.

[34] Devadas R P. 将叶蛋白用作人的食物[A]. 丁广文译. 十五届国际草地会议论文集(下册) [C]. 北京: 北京农业大学出版社, 1988(12):21-23.

[35] Prevot-Dalvise. Development of a pilot process for the production of alfalfa peptide isolate [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2003, 78(5):518-528.

[36] Delic I. Protein Carotenoid Concentrate from Lucerne Juice as the Source of Xanthophyll and Protein for Layers [J]. *Biotechnology Atocarsva*, 1994(10):65-70.

[37] 李玉清, 杨久仙, 张洁, 等. 菠菜叶蛋白替代豆粕饲喂蛋鸡效果的影响研究[J]. *北京农业职业学院学报*, 2010, 24(1):27-32.

[38] 潘行正, 黄正明, 刘国华. 饲料中添加西兰花叶蛋白对仔猪生产性能的影响[J]. *现代农业科技*, 2010(12):287.

(上接第467页)

muscle and shrimp by LC-MS/MS [J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 856:178-189.

[25] Rodziewicz L. Determination of nitrofurans metabolites in milk by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 864:156-160.

[26] 焦奎, 张书圣, 张敏, 等. 电化学免疫分析法研究进展[J]. *分析化学*, 1995, 23(10):1211-1217.

[27] 黎其万, 潘灿平. 农药残留分析免疫方法及其应用研究进展 [J]. *西南农业学报*, 2004, 17(2):248-252.

[28] Vass M, Kotkova L, Diblikova I, et al. Production and characterisation of monoclonal antibodies for the detection of AOZ a tissues bound metabolite of furazolidone [J]. *Veterinarni Medicina*, 2005, 50(7):300-310.

[29] Diblikova I, Cooper KM, Kennedy DG, et al. Monoclonal antibody-based ELISA for the quantification of nitrofurans metabolite 3-amino-2-oxazolidinone in tissues using a simplified sample preparation [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 540:285-

292.

[30] 徐蓓, 徐志祥, 王凤侠, 等. 动物性食品中呋喃唑酮代谢产物酶联免疫检测方法的研究[J]. *食品研究与开发*, 2007, 28(12):145-148.

[31] Gao AH, Chen QL. Preparation of monoclonal antibodies against a derivative of semicarbazide as a metabolic target of nitrofurazone [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 529(1):58-63.

[32] Pimpitak U, Putong S, et al. Development of a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for detection of the furaldone metabolite, AMOZ, in fortified shrimp samples [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116:785-791.

[33] 朱广华, 郝洪, 鞠焯先. 荧光偏振免疫分析技术的研究进展[J]. *分析化学*, 2004, 32(1):102-106.

[34] 沈玉栋, 张世伟, 蔡肇婷, 等. 呋喃西林代谢物荧光偏振免疫检测方法研究[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(1):27-31.

[35] Zhang SW, Shen YD, Zhong AQ. Monoclonal antibody-based fluorescence polarization immunoassay for nifursol in feed [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2010, 21(2):131-141.