动物制品中磺胺类药物残留便捷式检测技术研究

谢体波[1],张 凯[1*],何方洋[2],冯才伟[2]

(1. 贵州勤邦食品安全科学技术有限公司,贵州贵阳 550009;2. 北京勤邦生物技术有限公司,北京 100012)

摘要 [目的]研究动物制品中磺胺类药物残留的便捷式检测技术。[方法]比较 ELISA 法、毛细管电泳法、高效液相色谱法检测动物制品中磺胺类药物的残留。[结果]利用 ELISA 法检测磺胺类药物残留具有操作简便、成本低廉、检测速率快、检测时间短等优点。[结论]ELISA 法能更符合快速检测的要求,满足对肉制品中磺胺类药物快速检测。

关键词 动物制品;磺胺类药物残留;便捷式检测;ELISA

中图分类号 S851.34+7 **文献标识码** A **文章编号** 0517 – 6611(2018)08 – 0161 – 03

Convenient Detection Technology of Sulfonamides Residues in the Foods of Animal Products

XIE Ti-bo[1],ZHANG Kai[1],HE Fang-yang[2] et al (1. Guizhou Kwinbon Food Safety Science-Technology Co.,Ltd.,Guiyang,Guizhou 550009;2. Beijing Qinbang Biotechnology Co.,Ltd.,Beijing 100012)

Abstract [Objective]To study the convenient detection technology of sulfonamides residues in the foods of animal products. [Method]To compare the technology of ELISA,capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for detecting the sulfonamides residues in the foods of animal products. [Result]Using ELISA method to detect sulfonamides residues has advantages of easy operating, low cost, fast rate and short time. [Conclusion]ELISA can better meet the requirements of rapid detection and meet the rapid detection of sulfonamides in meat products.

Key words Animal products;Sulfonamides residues;Convenient detection;ELISA

磺胺类药物(Sulfonamides,SAs)是一种化学合成的两性化合物,能抑制干扰大多数革兰氏阳性菌和某些阴性菌[1],在医学和多种动物的感染性疾病防治中应用较为广泛,有数十种具有很好的疗效[2-4]。但其可残留于动物机体之中,人体摄入后,当其浓度超过峰值时,将对人体泌尿系统造成破坏,导致耐药菌株产生或菌失调等症状,严重时还会产生过敏及致癌性作用[5-9]。因此,如何合理又快速地检测畜禽肉质品种的磺胺类药物,保证食品安全变得尤为重要。在国际规定的畜禽类食品中总磺胺以及单个磺胺的最高残留限量为 0.100 mg/kg,其中磺胺二甲基嘧啶的最高残留限量为 0.025 mg/kg[10-11]。

目前检测磺胺类兽药残留的方法有很多,如高效液相色谱(high performance liquid chromatography,HPLC)、气相色谱(gas chromatography,GC)、毛细管电泳(capillary electrophoresis,CE)、Barham 法等[12-17],但上述方法由于试验前处理繁琐,试验设备操作复杂,因而不适应大规模的检查和现场监控,从而影响食品安全检测速率。该研究中相关检测产品与上述仪器相比具有简便、快速、灵敏度高、准确等特点,能最大限度地减少工作时间和操作误差,可检测动物性食品中磺胺类药物残留量。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试剂。乙腈、乙酸乙酯、正己烷、十二水合磷酸氢二钠、二水合磷酸氢二钠、去离子水。

1.1.2 主要仪器。微孔板酶标仪 450 nm/630 nm,旋转蒸发仪,均质器,振荡器,涡旋仪,离心机,天平(感量 0.01 g),刻度移液管,洗耳球,500 mL 容量瓶,10 mL 玻璃试管,2、50 mL 聚苯乙烯离心管,微量移液器。

1.1.3 试剂盒提供材料与试剂。96 孔酶标板 1 块(包被有偶联抗原),0、1、3、9、27、81 μg/L 标准品 6 瓶(1 mL/瓶),1 μg/mL高浓度标准液 1 瓶(1 mL/瓶),7 mL 抗体工作液,7 mL 底物液 A 液,7 mL 底物液 B 液,12 mL 酶标二抗,2 倍浓缩复溶液 20 mL,20 倍浓缩洗涤液 40 mL,终止液 7 mL。

1.1.4 配制溶液。配液 1:乙腈 – 乙酸乙酯溶液,量取 25 mL 乙腈和 25 mL 乙酸乙酯加至 50 mL 容量瓶中,混匀;配液 2:0.18 mol/L 磷酸盐缓冲溶液,称取 23.22 g 十二水合磷酸氢二钠和 3.91 g 二水合磷酸二氢钠,加入500 mL 去离子水溶解混匀;配液 3:0.2 mol/L 磷酸盐缓冲溶液,称取 25.80 g 十二水合磷酸氢二钠和 4.35 g 二水合磷酸二氢钠,加入500 mL 去离子水溶解混匀;配液 4:复溶工作液,用去离子水将浓缩复溶液按 1∶1体积稀释,用于样本复溶;配液 5: 洗涤液,用去离子水将 20 倍浓缩洗涤液稀释(1 mL 20 倍浓缩洗涤液 +19 mL去离子水),用于酶标板的洗涤。

1.2 检测方法

1.2.1 原理。该研究采用间接竞争 ELISA 方法,在酶标板微孔条上预包被偶联抗原,让原有样本中所残留的磺胺类药物与酶标板微孔条上预包装偶联抗原竞争抗磺胺类药物的抗体,加入酶标二抗后,用 TMB 底物使其显色,样本吸光度值与其所含残留物磺胺类药物的含量呈负相关,与标准曲线相比,再乘以其对应的稀释倍数,就可以得出磺胺类药物的残留量。

1.2.2 组织样本前处理。①称取 1 g 均质后的鸡肉或猪肉组织样本到 50 mL 聚苯乙烯离心管中,加入 0.5 mL 0.2 mol/L磷酸盐缓冲溶液,用涡旋仪涡动样本成糊状,加入

基金项目 磺胺类、阿维菌素类药物快速检测技术开发及产业化项目;技术中心创新能力建设项目(20170002);慢抗快速检测试剂盒产业化。

作者简介 谢体波(1985—),男,贵州遵义人,工程师,硕士,从事食品安全快速检测研究。*通讯作者,从事食品安全生物技术研究。

收稿日期 2017 – 12 – 11

7 mL 乙腈-乙酸乙酯溶液,振荡均匀。当样本组织溶液超过 3 kg 时,应保持 20~25 ℃离心 5 min。②移取 2 mL 上层有机液至 10 mL 洁净干燥玻璃试管中,于 50~60 ℃ 水浴氮气流下吹干。③加入 0.5 mL 正己烷,用涡旋仪涡动 30 s 溶解干燥的残留物,再加入 0.5 mL 复溶工作液,用涡旋仪涡动 30 s,混匀,转入 2 mL 聚苯乙烯离心管中。④除去上层有机相,取下层水相 25 μL 用于分析。

1.2.3 操作步骤。①将所需试剂从冷藏环境中取出,使其回温至室温(20~25 ℃),每种试剂在使用之前都要摇匀。②取出微孔板,将猪肉或鸡肉样本和标准品按对应微孔序列排序,并记录标准孔和样本孔所在的位置。③加标准品和样本 25 μL 到编号所相对的微孔中,然后加入 25 μL/孔抗体工作液,轻轻摇晃混合,盖上膜盖板后置 25 ℃,在避光环境中反应 30 min。④将孔内的液体甩干,加入洗涤工作液 200 μL/孔,反复洗涤 3~4 次,每次间隔 8 s,用吸水纸拍干。⑤加入酶标二抗 50 μL/孔,轻轻振荡混合,在 25 ℃避光环境中反应 30 min,然后重复步骤④。⑥加入底物液 A 液 25 μL/孔,再加入底物液 B 液 25 μL/孔,轻轻振荡混合,盖膜盖板后置 25 ℃避光环境反应 15 min,最终使其有显色反应。⑦加入终止液 25 μL/孔,轻轻混匀,设定酶标仪于 630 nm 处,测定每孔 OD 值。

1.2.4 试剂盒其余指标检测方法。依次对试剂盒的标准性、特异性、灵敏度、精密度进行研究,并将其中的灵敏度、准确度和精密度与高效液相色谱检测的相关数据标准性进行对比。

1.2.5 磺胺类药物残留定量分析。样本或标准品吸光率百分比等于样本或标准品吸光度值的平均值除以第 1 个标准品吸光度值的平均值,再乘以 100%,即

$$百分吸光率 = B/B_0 \times 100\%$$

式中,B 为标准品或样本溶液的平均吸光度值;B_0 为 0 μg/L 标准溶液的平均吸光度值。

由于标准品吸光率的变化,以标准品的吸光度值为纵坐标,磺胺类药物标准品对数为横坐标,绘制标准曲线图,带入百分比吸光率,从标准曲线上得出样本对应的浓度值,再乘以样本稀释的倍数,即为磺胺类药物的真实浓度。其中组织样本稀释 1 倍,畜禽肉样本稀释倍数为 4 倍。

1.2.6 试剂准确度和精密度的测定。准确度是指测定值与实际值间的符合程度,通常用回收率表示。精密度是反映检测方法对某一固定样品多次测定所得的重复程度,又称为重复性,这也是评定化学发光试剂盒质量的基本参数。在此次测定范围中,就通过测定样品中的相应参数来判断该试剂盒与其他检测手段的区别。

1.2.7 研究其他药物的交叉反应率。交叉反应率是指不同结构的抗原定性簇与抗体结合的能力。选择磺胺甲基异噁唑作为相应标准,按上述操作步骤,加入不同类的磺胺类竞争物,以试验所得化学发光强度值,计算抑制百分比,制作相应的百分曲线,通过抑制浓度,计算竞争物的交叉反应率。

1.3 注意事项 ①当室温低于 20 ℃或试剂及样本未回到室温,可能导致所有标准品的吸光度值偏低。②此次使用的终止液为 2 mol/L 硫酸,操作时禁止与皮肤接触。③在洗板过程中如果出现板孔干燥的情况,则会导致标准曲线不呈线性、重复性不好,所以将洗板抖干后应立即进行下一步操作。④当加入底物液 A 液和 B 液时,显色时间通常为 12~15 min。⑤每加 1 种试剂前需要将其摇匀。⑥该试剂应储存在 2~8 ℃ 环境中,禁止冷冻并避免直接暴露在光线下。⑦发色试剂有任何颜色变化表示其已变质,应当弃之。

2 结果与分析

2.1 反应时间优化 使用上述方法加入与之对应的标准品和抗体,室温下反应 4、8、12、16 min 后加入发光溶液,最终结果表明反应时间为 12 min 时,发光值最大(图 1)。

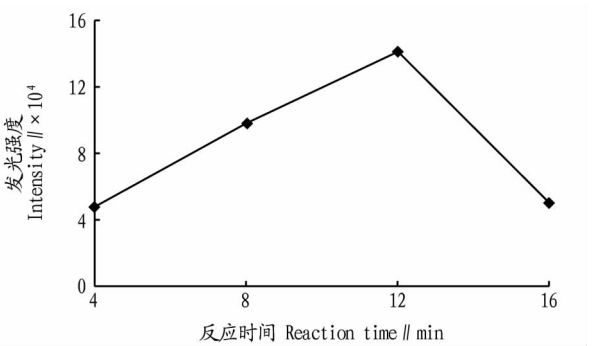

图 1 发光强度与反应时间

Fig. 1 Intensity and reaction time

对各种试验方法[18-19]的反应时间进行比较,结果见表 1。从表 1 可以看出,使用 ELISA 法试剂盒在样品前处理和试剂反应稳定过程中分别节约了 15~25 min,总体节约了 30~48 min。

表 1 各种试验方法反应时间比较

Tab. 1 Comparison of reaction time of various experimental methods

序号 No.	操作步骤 Operating steps	ELISA 法 ELISA method	毛细管电泳法 Capillary electrophoresis method	高效液相色谱法 High performace liquid chromatography
1	标准品/样品检测前处理	35	50	60
2	试剂反应与出峰稳定	27	42	50
3	总反应	62	92	110

2.2 标准曲线 以磺胺甲基异噁唑标准品浓度对数为横坐标,百分发光率为纵坐标,绘制抑制标准曲线(图 2)。

从图 2 得到曲线线性方程 $y = -16.748x + 85.442$,$R^2 = 0.9856$,其中 y 为百分发光率,x 为标准品浓度(C)对数。运用专业分析软件替换相应横坐标,所得标准工作曲线见图 3,根据图 3 相应数据得出试剂盒在 1.0~81.0 ng/mL 线性范围内关系良好。

对空白猪肉做 20 次试验,采用试验结果平均值加上 3 倍标准差的方法检测出最低检出限,根据公式计算出该试剂盒猪肉最低检出限为 0.93 μg/kg。

2.3 试剂特异性的确定 选择 5 种磺胺类药物(磺胺甲基异噁唑、磺胺噻唑、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噻二

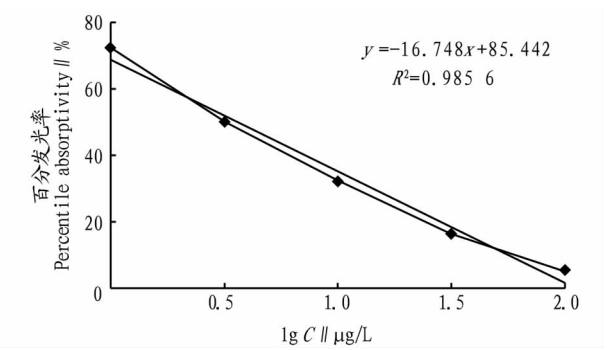

图 2　标准曲线

Fig. 2　Standard curve

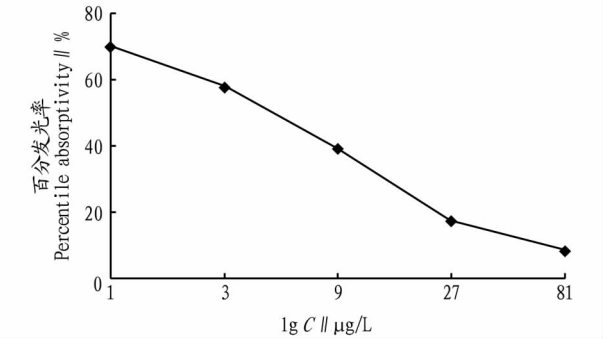

图 3　试剂盒标准工作曲线

Fig. 3　Standard working curve of reagent

唑),计算出交叉反应率,结果表明交叉反应率都较高,所以该试剂盒适用于检测以上 5 种药物,并能更好地表示所检测数据的特异性。

2.4　准确度与精密度的测定　ELISA 法、毛细管电泳法、高效液相色谱法[20]通常以回收率表示准确度,以变异系数表示精密度。从表 2 ~4 可以看出,取空白猪肉样本,分别添加磺胺甲基异噁唑标准品磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺甲噻二唑至 1、2 μg/kg,比较各个方法之间的差别。

表 2　ELISA 法准确度与精密度测定结果

Table 2　Determination of accuracy and precision by ELISA method

序号 No.	磺胺药物 Sulfonamides	加样标 Adding sample μg/kg	平均回收率 Average recovery rate // %	RSD %
1	磺胺甲基异噁唑	1	100.3	0.5
		2	101.0	0.4
2	磺胺噻唑	1	96.7	1.9
		2	97.8	3.6
3	磺胺嘧啶	1	95.7	2.4
		2	96.3	3.4
4	磺胺二甲基嘧啶	1	94.5	4.2
		2	95.0	1.4
5	磺胺甲噻二唑	1	90.7	1.0
		2	94.7	5.9

3　结论

我国对磺胺类药物在动物制品中的残留限量有着明确规定,然而在检测中大部分操作方法都面临耗时长、成本高等问题。该研究对快速检测磺胺类药物残留的 3 种方法进行对比,验证ELISA法、毛细管电泳法、高效液相色谱法对检测磺胺类药物准确度与灵敏度之间的差异。在研究中发现 ELISA 法对磺胺类药物抑制标准曲线线性良好,在试验过程中 5 种磺胺类药物交叉反应率高,且试剂标准曲线范围广,最低检测限为 0.93 μg/kg,ELISA 试剂盒法添加回收率为 90.7% ~101.0%,变异系数为 0.4% ~5.9%;毛细管电泳法添加回收率为 84.2% ~102.0%,变异系数为 0.8% ~7.2%;高效液相色谱法添加回收率为 83.0% ~97.3%,变异系数为 3.4% ~10.8%。由此可以看出,ELISA 试剂盒法的准确度与精密度均高于毛细管电泳法和高效液相色谱法。该方法不仅满足国家规定的各项检测指标,而且与毛细管电泳法、高效液相色谱法相比时间缩短,符合分析周期短,样品前处理简单、迅速、灵敏的检测要求。可见用 ELISA 法以及提供的试剂更符合快速检测的要求,能满足对肉制品中磺胺类药物快速检测。

表 3　毛细管电泳法准确度与精密度测定结果

Table 3　Determination of accuracy and precision by capillary electrophoresis

序号 No.	磺胺药物 Sulfonamides	加样标 Adding sample μg/kg	平均回收率 Average recovery rate // %	RSD %
1	磺胺甲基异噁唑	1	99.5	1.1
		2	102.0	1.8
2	磺胺噻唑	1	84.2	0.8
		2	88.0	4.3
3	磺胺嘧啶	1	91.3	7.2
		2	96.0	3.9
4	磺胺二甲基嘧啶	1	89.8	7.1
		2	92.7	5.1
5	磺胺甲噻二唑	1	87.7	4.8
		2	95.2	5.2

表 4　高效液相色谱法准确度与精密度测定结果

Table 4　Determination of accuracy and precision of high performance liquid chromatography

序号 No.	磺胺药物 Sulfonamides	加样标 Adding sample μg/kg	平均回收率 Average recovery rate // %	RSD %
1	磺胺甲基异噁唑	1	97.3	4.8
		2	96.2	3.7
2	磺胺噻唑	1	83.0	3.4
		2	89.0	6.4
3	磺胺嘧啶	1	92.2	9.4
		2	95.7	7.4
4	磺胺二甲基嘧啶	1	87.3	10.8
		2	95.3	4.9
5	磺胺甲噻二唑	1	91.7	6.6
		2	94.3	4.5

参考文献

[1] 陈炳卿,孙长颢. 食品污染与健康[M]. 北京:化学工业出版社,2002.
[2] 关舒函. 黑龙江省猪肉中五种磺胺类药物残留的检测与风险评估[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2016.
[3] 姜大富. 磺胺类药物的临床应用及使用心得[J]. 畜牧兽医科技信息,2006(6):85.

(下转第 167 页)

品的摄入情况,尤其是还处在成长发育阶段的少年儿童以及面临怀孕生子的成年女性。

由于只是初步的暴露评估,因此在评估过程中存在很多的不确定性。例如膳食摄入量的数据来自小范围的调查问卷,则其数据不能完全代表全国的实际消费状况。该研究采用的二氧化硫含量的数据来源是根据抽检的 143 份样品统计出来的,其样本量有限,抽检食品的代表性也有待提高。体质量方面,由于选取的人是同一个年龄阶段的平均体重,因此也会因人而异,存在一定的风险偏差。此外,在评估梅干和杏干二氧化硫残留对人体暴露风险时,存在许多差异性,如不同人群(常人及敏感人群,主要为老人、孕妇、儿童以及病人等)、消费量、体质量、消费频率和最低检出限等。

在对膳食二氧化硫评估下一步研究中,一方面应该尽可能地考虑上述的这些因素,加大样品含量;另一方面,应该增加对居民消费量较高的其他食物中硫化物含量的测定和暴露评估,采用更为精细的评估方法,提高评估的准确度和精确度,更好地对硫化物的使用安全风险进行评估和监测,为监管部门提供参考作用。消费者在购买蜜饯食品时需要谨慎,注意食品的鲜艳程度、标签等,最好是通过正规的渠道,产品带有 QS 标志。当然,建议有关部门应加强风险监测和评估机制;作为执法监管部门,应加大抽查监测力度,对违法使用、滥用添加剂的企业加强处罚,确保食品添加剂的使用安全,确保人类饮食安全。

参考文献

[1] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 蜜饯通则: GB/T 10782—2007[S]. 北京:中国标准出标社,2007.

[2] 周德庆,张双灵,辛胜昌. 亚硫酸盐在食品加工中的作用及其应用[J]. 食品科学,2004,25(12): 198 –201.

[3] 李东云,任白雪,陈金哲. 蜜饯类食品中二氧化硫残留量与其色泽相关性的探讨[J]. 实用医技杂志,2012,19(4): 383 –384.

[4] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. 食品添加剂使用标准: GB 2760—2014 [S]. 北京:中国标准出版社,2014.

[5] 方志飞. 笋制品中二氧化硫的风险评估[D]. 海口:海南大学,2010.

[6] 黄镁. 食品中二氧化硫残留量的控制及检测[J]. 中国高新技术企业,2010(17): 38 –39.

[7] 陈飞东,戴志远. 食品中亚硫酸盐测定方法的研究进展[J]. 食品研究与开发,2006,27(8): 139 –142.

[8] 李文生,杨军军,王宝刚,等. 北京市场果脯蜜饯二氧化硫残留分析[J]. 中国食品添加剂,2014(8): 187 –189.

[9] 江朝华. 蜜饯中二氧化硫残留量检测及超标问题分析[J]. 农业研究与应用,2011(2): 29 –31.

[10] 顾娉婷. 蜜饯果脯类食品中二氧化硫测定方法研究分析[J]. 安徽农业科学,2016,44(14): 107 –108.

[11] 曾秀珊,曾石峭,成莲,等. 蒸馏法测定果脯中二氧化硫的不确定度评定[J]. 现代食品,2017(6): 91 –94.

[12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品中二氧化硫的测定:GB 5009.34—2016 [S]. 北京:中国标准出版社,2016.

[13] 王艳红,安宇,张敏,等. 人参中二氧化硫残留分析与健康风险评估[J]. 食品科学,2015,36(24): 214 –219.

[14] 陈天全,魏益民,潘家荣. 食品中铅对人体危害的风险评估[J]. 中国食物与营养,2007(2): 15 –18.

[15] 徐为霞,郭智广,王毅红,等. 蔬菜中二氧化硫残留结果的调查与风险评估[J]. 安徽农业科学,2013,41(15): 6892 –6893.

[16] 王明月,赵亚南,杨春亮,等. 桂圆肉中二氧化硫残留的风险评估[J]. 热带作物学报,2014,35(2): 396 –399.

[17] 吴燕明,吕高明,周航,等. 湘南某矿区蔬菜中 Pb、Cd 污染状况及健康风险评估[J]. 生态学报,2014,34(8): 2146 –2154.

[18] SUNYER J, BALLESTER F, TERTRE A L, et al. The association of daily sulfur dioxide air pollution levels with hospital adinissions for cardiovascular diseases in Europe (the Aphea –Ⅱ study) [J]. European heart journal, 2003, 24(8): 752 –760.

[19] 尹洁, 朱军莉, 励建荣. 食品中二氧化硫的来源与检测方法[J]. 食品科技, 2009, 34(11): 292 –296.

[20] LESTER M R. Sulfite sensitivity:Significance in human health[J]. Journal of the American college of nutrition, 1995, 14(3): 229 –232.

(上接第 163 页)

[4] 胡园园,陈一资. 胺类药物磺胺二甲嘧啶对人和动物的危害机理及其残留的检测方法[C]/中国畜牧兽医学会兽医食品卫生学分会第五次会员代表大会暨第九次学术交流会论文集. 北京:中国畜牧兽医学会,2006.

[5] 张闻娟. 鸡肉中磺胺药物残留风险评估[D]. 武汉:华中农业大学,2013.

[6] 廖理克,屈裕华,吴孔兴. 几种兽药残留对人体的危害[J]. 广东畜牧兽医科技,2004,29(2):50 –51.

[7] 王瑞深. 肉品中残留磺胺类药的危害及其监控[J]. 兽医导刊,2010(2): 50 –51.

[8] 赵超英. 食品中农药和兽药残留对人体的危害[J]. 中国全科医学,2006,9(13):1086 –1087.

[9] 张海玲. 分泌抗磺胺类药物单克隆抗体杂交瘤株的建立[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2009.

[10] 赵书景,贺绍君,罗国琦,等. 动物性食品中磺胺类药物残留检测方法的研究进展[J]. 中国畜牧兽医,2009,36(8):60 –63.

[11] 关舒函. 黑龙江省猪肉中五种磺胺类药物残留的检测与风险评估[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2016.

[12] 代婷婷,林华萍,段婕,等. 毛细管区带电泳化学发光法测定食品中残留的磺胺类药物[J]. 分析化学,2016,44(5):747 –753.

[13] 杨瑞芬,施治国,冯钰锜,等. 磺胺类药物的毛细管高效液相色谱与电色谱研究[J]. 药学学报,2003,38(2): 129 –132.

[14] 谢玉璇,谢天尧,刘秋英,等. 毛细管电泳 –电导法分离检测磺胺嘧啶、磺胺甲嘧啶和磺胺二甲嘧啶[J]. 分析测试学报,2006,25(3): 100 –102.

[15] 马丽娜,陈大伟,陆俊贤,等. 鸡蛋中磺胺类药物残留检测方法研究[J]. 中国家禽,2016,38(10):37 –40.

[16] 刘冬虹,吴玉銮,王斌,等. 分散固相萃取 –超高效液相色谱 –串联质谱测定肉制品中 5 类药物残留[J]. 现代食品科技,2016,32(10):290 –296,258.

[17] BARHAM R,BLACK W D,CLAXTON J,et al. A rapid assay for detecting sulfonamides in tissues of slaughtered animals[J]. J Food Protection, 2001,64(10):1565 –1573.

[18] 邓樱花,李林,张洪权,等. 高效液相色谱 –荧光检测法测定鸡肉中 5 种磺胺类药物残留[J]. 华中师范大学学报(自然科学版),2014,48(1):53 –57,65.

[19] 郝晓丽,谷学新,叶能胜,等. 毛细管电泳法检测肉类中 5 种磺胺类药物残留研究[J]. 药物分析杂志,2009,29(4):579 –581.

[20] 乔坤云,王成,刘圣红,等. 猪肉中 10 种磺胺类药物残留的高效液相色谱检测[J]. 现代科学仪器,2013(3):101 –103.

科技论文写作规范——工作单位

在圆括号内书写作者的工作单位(用全称)、城市名及邮政编码。若为外国的工作单位,则加国名。多个作者不同工作单位时,在名字的右上角分别加注“1”“2”,和地址前注“1.”“2.”。