

• 专栏 •

直接竞争酶联免疫吸附分析法 测定甘蔗中的克百威残留

刘腾飞^a, 刘曙照^{* b}

(扬州大学 a 园艺与植物保护学院, b 环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 采用包被抗体直接竞争酶联免疫吸附分析(ELISA)法测定了甘蔗中的克百威残留量。在优化条件下, 对克百威标样检测的线性范围为 0.000 1~1 mg/L, 抑制中浓度(IC_{50}) = 3.09 μ g/L, 5次重复测定的相对标准偏差(RSD)为 9.3%, IC_{20} 值为 0.085 μ g/L。甘蔗中分别添加克百威标样 1, 0.1, 0.01 mg/kg 直接竞争 ELISA 法测定的回收率分别为 86.3%~99.1%, 89.0%~101% 和 70.7%~90.6%, RSD (n=5)分别为 5.4%, 5.2% 和 10.7%。ELISA 法对甘蔗中克百威残留的最小检出量为 6.3×10^{-11} g 定量限可达 1.26 μ g/kg, 而同样前处理条件下高效液相色谱-紫外检测器(HPLC-UV)法对克百威的最小检出量为 5×10^{-8} g 检测甘蔗中克百威残留的定量限仅为 2.5 mg/kg。

关键词: 直接竞争酶联免疫吸附分析; 甘蔗; 克百威; 残留量; 高效液相色谱

DOI 10.3969/j.issn.1008-7303.2010.03.09

中图分类号: S482.34 TQ450.263

文献标志码: A

文章编号: 1008-7303(2010)03-0289-05

Determination of carbofuran residue in sugarcane by direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay

LU Teng-fei^a, LU Shu-zhao^{* b}

(a. School of Horticulture and Plant Protection,

b. School of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China)

Abstract The method of antibody-immobilized direct competitive ELISA was employed to determine carbofuran residue in sugarcane. Under the optimized conditions, the linear concentrations ranged from 0.000 1 mg/L to 1 mg/L, the IC_{50} value was 3.09 μ g/L with relative standard deviation (RSD) of 9.3%, IC_{20} value was 0.085 μ g/L. The recoveries were 86.3%–99.1%, 89.0%–101% and 70.7%–90.6% with the RSD of 5.4%, 5.2% and 10.7% at the spiked level of 1, 0.1 and 0.01 mg/kg in sugarcane. The limit of detection of ELISA was 6.30×10^{-11} g and the limit of quantification (LOQ) was 1.26 μ g/kg for carbofuran residue in sugarcane. With the above similar sample preparation procedure, the limit of detection of HPLC-UV was 5.00×10^{-8} g and the limit of quantification for carbofuran residue in sugarcane was only 2.5 mg/kg.

Key words direct competitive ELISA; sugarcane; carbofuran; residue; high-performance liquid chromatography

收稿日期: 2010-07-07; 修回日期: 2010-08-29

作者简介: 刘腾飞(1985-), 男, 江苏淮阴人, 硕士研究生; * 通讯作者(Author for correspondence): 刘曙照(1952-), 男, 江苏镇江人, 理学博士, 教授, 主要从事农药残留分析技术研究, 电话: 0514-87979247, E-mail: szli@yzu.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(3077064); 国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2009AA03Z331)。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

克百威 (carbofuran), 化学名称 2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃-N-甲基氨基甲酸酯, 是一种高效广谱的氨基甲酸酯类内吸性杀虫、杀线虫剂, 广泛用于棉花、水稻、甘蔗、花生、大豆、烟草等作物害虫的防治^[1]。克百威在土壤中不易降解, 易通过径流和渗透造成地表和地下水污染。虽然我国农药残留标准中规定克百威在蔬菜和水果中为不得检出^[12], 但违规使用克百威的现象仍较为普遍, 因误食被克百威污染的蔬菜等食物而引起中毒的事件时有发生。

目前克百威的残留检测主要有气相色谱法 (GC)^[3-4]、高效液相色谱法 (HPLC)^[5-7]、气-质联用 (GC-MS)^[8-9] 和液-质联用法 (HPLC-MS)^[10-11]。采用这些分析方法需要昂贵的仪器和专门技术人员, 样品前处理过程复杂且花费高、费时长, 难以满足大量样品和现场样品快速检测的需要。酶联免疫吸附分析法 (ELISA) 具有简便快速、特异灵敏、样品容量大、分析成本低的特点, 可以简化甚至省去样品净化步骤, 在大量样本和现场样本快速筛选监测中显示出独特优势。本文在现有克百威免疫分析技术的基础上^[12-14], 采用包被抗体、酶标半抗原-克百威直接竞争模式, 优化相关条件, 在减少抗体及酶标半抗原用量的同时, 提高检测灵敏度, 缩短分析时间, 首次建立了甘蔗中残留克百威的高灵敏度、高特异性快速检测 ELISA 法, 同时采用高效液相色谱带紫外检测器 (HPLC-UV) 法进行对比分析。

1 材料和方法

1.1 药剂与试剂

克百威 (carbofuran), 有效成分质量分数 > 98%, 江苏太合金龙集团产品; 对克百威具特异性亲和力的抗体、辣根过氧化物酶标记克百威半抗原, 为本实验室自制^[12]; 包被液、反应稀释液为 0.02 mol/L、pH 7.2 的磷酸盐缓冲液 (PB); 封闭液: 抗体稳定剂, 本实验室自制; 洗涤液为灭菌蒸馏水; 显色液为 0.1 mol/L 的柠檬酸溶液 24.3 mL、0.2 mol/L 的 NaH₂PO₄ 溶液 25.7 mL 和蒸馏水 50 mL 混匀, 临用前加入 40 mg 邻苯二胺 (OPD), 溶解后加入 100 μ L 30% 的双氧水, 混匀; 终止液为 2 mol/L 的硫酸; 甲醇、二氯甲烷为分析纯。

1.2 主要仪器设备

Primo R 高速冷冻离心机 (德国 Heres 公司); 680 酶标仪 (美国 BIO-RAD 公司); R-200 旋转蒸发器 (瑞士 BÜCHI 公司); DK-S28 电热恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司); JYL-510 匀浆机

(山东九阳小家电有限公司); 取液器: 芬兰产 5~40 μ L、20~200 μ L、200~1 000 μ L 单道可调, 德国产 20~200 μ L 8 道可调; 40 孔酶标板 (浙江黄岩); XW-80A 漩涡混合器 (上海青浦沪西仪器厂); YXQ-SG 41 280 手提式压力蒸汽灭菌器 (上海华线医用核子仪器有限公司); 高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司, 490UVD)。

1.3 试验方法

1.3.1 克百威直接竞争 ELISA 法的条件优化 分别用 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mg/L 的抗体包被聚苯乙烯微孔板, 酶标半抗原分别稀释 2.5 $\times 10^4$, 3.0 $\times 10^4$, 3.5 $\times 10^4$ 和 4.0 $\times 10^4$ 倍, 采用直接 ELISA 模式、方阵实验法对包被抗体和酶标半抗原的工作浓度进行仔细筛选, 选择克百威和酶标半抗原用量少、酶促显色反应的 OD₄₉₀ $\approx$ 1.0 时的实验组合作为直接竞争 ELISA 中最佳酶标半抗原-抗体浓度组合。

分别用不同浓度和不同 pH 值的磷酸盐缓冲液作为抗体的包被介质和 ELISA 的反应介质, 以包被抗体用量少、抗原抗体亲和力高 (最终酶促显色反应测定的 OD₄₉₀ 值大) 的磷酸盐缓冲液作为抗体包被介质和 ELISA 反应介质。

在最佳工作条件下, 测定不同浓度克百威对抗原抗体结合反应的抑制率 I%。将克百威标样用甲醇溶解成 1 mg/mL 的储备液, 用 pH 7.2 的 PB 稀释成质量浓度分别为 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.000 1 μ g/mL 的系列标准溶液, 分别与酶标半抗原溶液按体积比 1:1 的比例混合后, 加入到用抗克百威抗体包被过的酶标板内, 100 μ L/孔, 以 pH 7.2 的 PB 为对照, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 洗涤去除游离物, 加显色液 100 μ L/孔, 37 $^{\circ}$ C 避光显色 15 min, 加 2 mol/L 的硫酸 (50 μ L/孔) 终止反应, 于酶标仪上测定 OD₄₉₀ 值。计算不同质量浓度的克百威对酶标半抗原与抗体结合反应的抑制率 I, I% = 100[(OD_{对照} - OD_{克百威})/OD_{对照}], 绘制 I 对克百威质量浓度 (ρ) 的标准曲线, 建立回归方程 I = B ρ + A, 并进行相关分析, 分别计算抑制率达 50% 和 20% 时克百威的质量浓度 (IC₅₀, IC₂₀), 在实际样品测定时以 IC₂₀ 为定量限。

1.3.2 甘蔗中克百威残留的提取与净化 将鲜甘蔗去皮, 切成小块后于组织捣碎机中捣碎, 称取 20 g 于 100 mL 具塞刻度三角瓶中, 加 40 mL 甲醇, 超声振荡提取 10 min 用甲醇定容至 60 mL, 混匀, 静置或离心后取上清液 30 mL, 加等体积质量分数为 5% 的氯化钠溶液混匀, 减压旋转蒸发去除甲醇后依

次用二氯甲烷 25, 12.5, 12.5 mL 萃取, 弃水相。合并有机相, 旋转蒸发浓缩至 1~2 mL, 残余物用 N_2 吹干, 加 1 mL 甲醇溶解后用 pH 7.2 的 PB 定容至 10 mL (每 mL 样品提取液对应于 1 g 甘蔗样品), 再稀释 10 倍后用于 ELISA 测定。或将用 N_2 吹干后的残留物用甲醇定容至 2 mL, 用于 HPLC 测定。

1.3.3 甘蔗中克百威标准添加回收率的测定 在经预处理的甘蔗样本中分别按 1, 0.1, 0.01 mg/kg 的水平添加克百威标样 (以未添加的为空白对照), 按 1.3.2 节步骤进行提取和分离, 分别用于 ELISA 测定和 HPLC 测定, 计算回收率。

1.3.4 HPLC 分析条件 化学键合 C_{18} 色谱柱; 流动相为质量分数 65% 的甲醇水溶液; 流速 1 mL/min; 紫外检测波长 254 nm; 定量进样体积 20 μ L; 峰面积定量。

2 结果和分析

2.1 直接竞争 ELISA 最适工作条件

经方阵实验筛选, 在包被抗体直接竞争 ELISA 法中, 当用 0.02 mol/L pH 7.2 的 PB 将抗体稀释至 3.5 mg/L, 包被酶标板, 酶标半抗原用 0.02 mol/L pH 7.2 的 PB 稀释 3×10^4 倍时, 抗原抗体亲和力高, 克百威对抗体-酶标半抗原竞争结合的抑制率高, 梯度明显。

2.2 克百威标样 ELISA 抑制曲线与回归分析

在最佳工作条件下, 采用包被抗体直接竞争 ELISA 法测定克百威标样对抗体与酶标半抗原结合的抑制率, 以 5 次测定的平均值为纵坐标, 克百威的质量浓度为横坐标绘制标准曲线 (见图 1)。经回归分析得回归方程 $I = 19.27\rho + 98.36$ 相关系数 $R = 0.9955$, 对克百威标样的线性检测范围为 0.0001~1 mg/L, 抑制中浓度 $IC_{50} = 3.09 \mu$ g/L, 5 次重复测定的相对标准偏差 (RSD) = 9.3%, $IC_{20} = 85.8$ ng/L。

2.3 甘蔗中克百威 ELISA 抑制曲线与回归分析

按 1.3.2 节方法提取空白样品和待测样品, 定容至 10 mL (每 mL 提取液对应 1 g 甘蔗)。用稀释 10 倍的空白样品提取液代替 pH 7.2 的 PB, 稀释克百威标样, 建立工作曲线 (见图 2)。包被抗体直接竞争 ELISA 法对克百威的线性检测范围为 0.0001~1 mg/L。经回归分析, 克百威抑制抗体-酶标半抗原结合的百分率 (I) 对克百威浓度 (ρ) 的回归方程为 $I = 20.36\rho + 99.32$ $R = 0.9962$ $IC_{50} = 3.78 \mu$ g/L, 5 次重复测定的 $RSD = 10.1\%$, $IC_{20} =$

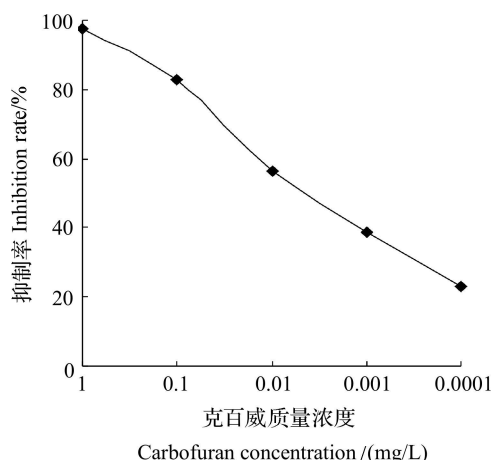


图 1 克百威标样直接竞争 ELISA 标准抑制曲线

Fig 1 Inhibition curve of carbofuran standard by direct competitive ELISA

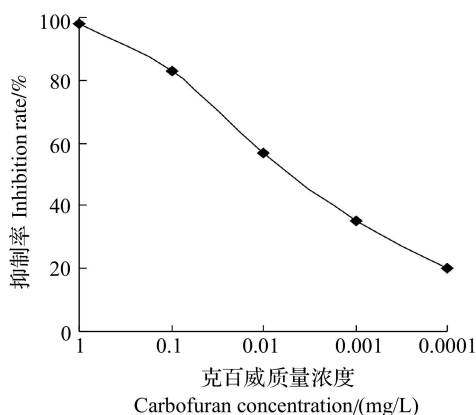


图 2 甘蔗提取液中克百威直接竞争 ELISA 抑制曲线

Fig 2 Inhibition curve of carbofuran in extract of sugarcane by direct competitive ELISA

0.126 μ g/L。将待测样品提取液用 PB 稀释 10 倍后用于 ELISA 检测, 按工作曲线和测定时的稀释倍数计算, 对甘蔗中残留克百威的定量限为 1.26 μ g/kg, 最小可检出量为 6.30×10^{-11} g。

2.4 甘蔗中克百威残留 ELISA 测定结果

由甘蔗中克百威标准添加回收率 ELISA 法的测定结果 (见表 1) 可以看出, 当甘蔗中添加克百威 1, 0.1, 0.01 mg/kg 时, ELISA 法测定的回收率结果符合克百威残留检测的要求。

2.5 甘蔗中克百威残留的 HPLC 测定结果

克百威标样的 HPLC-UV 检测限为 2×10^{-8} g, 见图 3。甘蔗中克百威残留提取液未经柱层析净化, 直接进行 HPLC-UV 测定, 存在多个杂质峰, 对克百威的最小检出量为 5.00×10^{-8} g, 定量限为 2.50 mg/kg, 见图 4。

表 1 甘蔗中克百威标准添加回收率直接竞争 ELISA 法测定结果

Table 1 Recovery of carbofuran in sugarcane determined by direct competitive ELISA

添加水平	测定值	回收率	平均回收率	RSD /%
Spiked level/(mg/kg)	Found/(mg/kg)	Recovery /%	Average recovery /%	(n= 5)
1	0.981	98.1	94.8	5.4
	0.969	96.9		
	0.940	94.0		
	0.991	99.1		
	0.863	86.3		
0.1	0.0952	95.2	95.7	5.2
	0.100	100		
	0.0890	89.0		
	0.0934	93.4		
	0.101	101		
0.01	0.00894	89.4	81.5	10.7
	0.00707	70.7		
	0.00819	81.9		
	0.00075	75.0		
	0.00906	90.6		

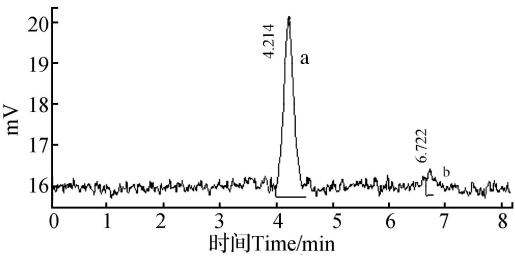


图 3 克百威标样 (2×10⁻⁸g)液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of carbofuran standard

a 溶剂 solvent b 克百威标样 carbofuran standard

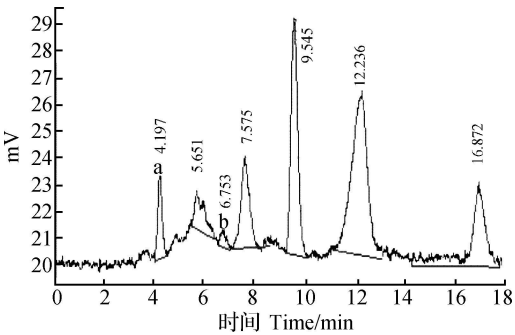


图 4 克百威残留 (2.50mg/kg)高效液相色谱图

Fig 4 HPLC chromatogram of carbofuran residue

a 溶剂 solvent b 克百威 carbofuran

3 结论与讨论

从实验结果可以看出: 将甘蔗样品提取液 (1mL样品提取液对应 1g 甘蔗)稀释 10倍后, 采用包被抗体直接竞争 ELISA 法测定残留的克百威,

可以检测出甘蔗中 1.26 μg/kg残留的克百威; 而未经柱层析净化的样品提取浓缩液用 HPLC-UV D 检测, 存在多个杂质峰, 影响检测灵敏度 (见图 4), 在同样前处理条件下, HPLC-UV D 法的定量限只能达到 2.50 mg/kg。我国对甘蔗中克百威的最大残留限量的推荐性国家标准是 0.1 mg/kg^[15], 根据回收率的试验结果, 确定甘蔗中残留克百威的 ELISA 法最低检测浓度为 10 μg/kg 满足残留分析的要求。同样前处理条件下, HPLC-UV D 法的检测灵敏度达不到克百威最大残留限量的检测要求。尽管采用 HPLC-荧光检测器可提高对克百威的检测灵敏度, 但需要对克百威标样和样品进行衍生化处理, 增加了样品前处理的步骤和难度, 延长了分析时间, 也提高了检测成本。

谨以此文敬贺钱传范教授八十华诞!

参考文献:

[1] TOM LIN C D S The Pesticide Manual a World Compendium [M]. 11th Ed Crop Protection Publications Surrey, UK, 1997

[2] YE J+ming (叶纪明), HE Y+ibing (何艺兵), TAO Chuan-jiang (陶传江). 中国农药残留量国家标准情况介绍 [J]. Pesticide Science and Administration (农药科学与管理), 2000, 214: 20-23

[3] BALLESTEROS E, GALLEGO M, VALCARCEL M. Automatic gas chromatographic determination of N-methylcarbamates in milk with electron capture detection [J]. Anal Chem, 1993, 65: 1773-1778

- [4] RICHTER P, SEPÚLVEDA B, OLIVA R, et al. Screening and determination of pesticides in soil using continuous subcritical water extraction and gas chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2003, 994: 169–177.
- [5] LANÇAS F M, RISSATO S R, GALHIANE M S. Analysis of carbaryl and carbofuran in tobacco samples by HRGC, HPLC, and CZE[J]. J High Resolut Chromatogr, 2005, 19 (4): 200–206.
- [6] FYTIANOS K, PITRAKIS K, BOBOLA E. Monitoring of N-methylcarbamate pesticides in the Pinios River (central Greece) by HPLC[J]. Int J Environ Anal Chem, 2006, 86 (1 2): 131–145.
- [7] KOC F, YIGIT Y, DAS Y K, et al. Determination of aldicarb, propoxur, carbofuran, carbaryl and methidathion residues in honey by HPLC with post-column derivatization and fluorescence detection after elution from a Florisil column[J]. J Food Drug Anal, 2008, 16 (3): 39–45.
- [8] KAWAMOTO T, MAKIHATA N. Development of a simultaneous analysis method for carbofuran and its three derivative pesticides in water by GC/MS with temperature programmable inlet on-column injection[J]. Anal Sci, 2003, 19 (12): 1605–1610.
- [9] SILVA M G D, AQUINO A, DÓREA H S, et al. Simultaneous determination of eight pesticide residues in coconut using MSPD and GC/MS[J]. Talanta, 2008, 76: 680–684.
- [10] BARREK S, PAISSE O, GRENIER-LOUSTALOT M F. Analysis of pesticide residues in essential oils of citrus fruit by GC-MS and HPLC-MS after solid-phase extraction[J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 376: 157–161.
- [11] MICKOVA B, ZROSTLIKOVA J, HAJSLOVA J, et al. Correlation study of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of N-methylcarbamate insecticides in baby food[J]. Anal Chim Acta, 2003, 495: 123–132.
- [12] LIU Shu-zhao (刘曙照), FENG Da-he (冯大和), CHEN Mei-juan (陈美娟), et al. 对克百威具高度特异性的免疫分析技术研究[J]. J Anal Sci (分析科学学报), 2000, 16 (5): 373–378.
- [13] ABAD A, MORENO M J, MONTOLYA A. Development of monoclonal antibody-based immunoassay to the N-methylcarbamate pesticide carbofuran[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47: 2475–2485.
- [14] ABAD A, MORENO M J, PELEGRI R, et al. Determination of carbaryl, carbofuran and methidathion in cucumbers and strawberries by monoclonal enzyme immunoassays and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. An analytical comparison[J]. J Chromatogr A, 1999, 833 (1): 3–12.
- [15] Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture (中华人民共和国农业部农药检定所). 农产品农药残留限量标准汇编[M]. Beijing (北京): China Agriculture Press (中国农业出版社), 2001.

(责任编辑: 金淑惠)