

酶联免疫法测定蔬菜中 2,4-二氯苯氧乙酸的改进

陆欢^{1,2}, 杨东顺², 林涛², 王继良^{1*}, 刘宏程²

(1. 昆明医科大学药学院暨重点实验室, 昆明 650500; 2. 云南省农业科学院质量标准与检测技术研究所
农业部农产品质量安全风险评估实验室(昆明), 昆明 650223)

摘要: **目的** 研究酶联免疫吸附法快速测定茄果类蔬菜中 2,4-二氯苯氧乙酸残留量(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)的分析方法。**方法** 对蔬菜的提取分离方法进行优化, 捣碎后经萃取溶剂萃取后, 离心去上清液吹干后经酶标仪测定茄果类蔬菜中 2,4-D 残留量。以水体 2,4-D 试剂盒, 通过运用 8 种不同萃取溶剂对样品前处理条件进行优化, 分别考察本方法的灵敏度、回收率、重复性。**结果** 本方法的检测灵敏度为 1.782 μg/kg, 添加浓度分别为 5.9、10.0、20.0 μg/kg 时的回收率在 74%~118%, 番茄和青椒样品的重复性试验的标准偏差分别为 3.5%和 4.16%, 使用乙酸乙酯为溶剂时, 对青椒的残留 2,4-D 萃取效果最佳。**结论** 本方法稳定性和重现性好, 且最大检出限量均比已有研究结果大 10 倍以上, 可广泛用于番茄及青椒等茄果类蔬菜中 2,4-D 残留量的检测。

关键词: 茄果类蔬菜; 酶联免疫法; 2,4-二氯苯氧乙酸

Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid residue in vegetables by enzyme linked immunosorbent assay

LU Huan^{1,2}, YANG Dong-Shun², LIN Tao², WANG Ji-Liang^{1*}, LIU Hong-Cheng²

(1. Department of Pharmaceutical Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China; 2. Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Agro-Product, Ministry of Agriculture(Kunming), Agri-Food Quality Standard & Testing Technology Institute, Kunming 650223, China)

ABSTRACT: Objective To study the method of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for rapid determination of 2,4-dichlorobenzene in solanaceous fruit vegetable. **Methods** The extraction and separation methods were optimized for vegetables after extraction by solvent extraction and centrifugation to make clear liquid and were blown dried followed by enzyme instrument determination of 2,4-D in solanaceous fruit vegetable residues. With 2,4-D kits, by using 8 different extraction solvents on sample preparation condition was optimized to investigate sensitivity, recovery, and repeatability of this method respectively. **Results** The detection sensitivity of this method was 1.782 μg/kg, and the recovery at the adding concentrations of 5.9, 10.0, and 20.0 μg/kg was 74% ~ 118%, the sample standard deviation of the repeatability test of tomato and green pepper were 3.5% and 4.16%, respectively. Using ethyl acetate as solvent, the extraction effect of 2,4-D residue in green pepper was the best. **Conclusion** This method has a good stability and reproducibility, its maximum detection limit is 10 times more than the existing research results, which can be widely used in the solanaceous

基金项目: 云南省社会发展科技计划(2012CA005)

Fund: Supported by Social Development in Yunnan Province Science and Technology Plan (2012CA005)

*通讯作者: 王继良, 教授, 主要研究方向为药物合成。E-mail: wangjiliangkm@163.com

*Corresponding author: WANG Ji-Liang, Professor, College of Pharmacy, Kunming Medical University, Yunnan 650500, China. E-mail: wangjiliangkm@163.com

fruit vegetables such as tomato and green pepper for 2, 4-D residue detection.

KEY WORDS: *Solanaceous* fruit vegetables; enzyme-linked immunosorbent assay; 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

1 引言

2,4-二氯苯氧乙酸(2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D)是一种具有代表性的合成植物生长素。应用 2,4-D 调节作物生长发育、提高产量和改良品质,已成为现代农业的重要措施之一,特别在番茄的保花保果,柑橘的保鲜中应用广泛。为降低外源植物激素带来的食用安全风险,欧盟、美国、澳大利亚、日本等发达国家对多种蔬菜、水果中 2,4-D 等生长调节剂均制定了严格的安全限量控制标准。如美国和欧盟^[1]均制定了辣椒中 2,4-D 的最大残留限量为 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。中国在 GB 2763-2012 中规定果菜类蔬菜中 2,4-D 的最大残留限量为 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 比欧美的限量要求宽。特别是在番茄使用过程中,2,4-D 蘸花使用不当,就会出现药害,造成果实质量下降,形成畸形果,严重影响商品价值^[2]。因此,需要对茄果类蔬菜中 2,4-D 残留量进行风险评估。

现在国内外对 2,4-D 的检测方法主要有高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)、气相色谱法(gas chromatography, GC)、液相色谱质谱联用技术(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)和免疫学检测方法(immunologic technology, IT)等^[3]。此类方法都有较好的准确度和精密度。但是样品前处理步骤一般比较繁琐,耗时长,且耗材和试剂成本高。

免疫学检测法是基于抗原抗体特异性结合反应来检测各类靶标的分析方法。此种检测方法能够克服理化检测的缺点,且具有特异性和敏感性高和快速的特点,是目前农药残留快速检测研究的热点之一^[3,4]。但学者多聚焦于 2,4-D 抗体制备工艺的研究^[5,6],很少用于实际样品的检测,特别是对青椒等复杂基质的测定。目前市场上只有针对水体中 2,4-D 的检测试剂盒,由于蔬菜中的糖分、油脂、色素等都可能干扰检测的结果,此试剂盒的前处理方法不适用于蔬菜样品的检测,本研究改进了试剂盒的前处理方法并用于蔬菜中 2,4-D 的残留检测。本研究以新鲜辣椒和番茄为本底材料,对商品化 2,4-D 残留量的试剂盒

进行改进,旨在建立一种简便快速低成本的茄果类蔬菜中 2,4-D 残留量的测定方法。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

番茄和青椒:昆明农贸市场随机抽取;

专用于水样检测的 2,4-D 试剂盒(Abraxis, USA, NO.54003A):美国博奥通科技有限公司;甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、丙酮 乙腈等(分析纯,北京百林康源生物技术有限责任公司);2,4-D: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,农业部农业环境监测总站研制。

2.2 仪器

回旋式振荡器(HY-5 型,江苏省金坛市友联仪器研究所);金诺分析天平(JF1004 型,余姚市金诺天平仪器有限公司);酶标仪(Bio-Rad680 型,美国伯乐公司);电热恒温水浴锅(HW.SY11-K2 型,北京市长风仪器仪表公司);隔水式电热恒温培养箱(恒字 PYX-DHS 型,上海跃进医疗器械厂)。

2.3 2,4-D 标准溶液的配制

取 2,4-D 标准溶液储备液 0.1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用去离子水定容至刻度,即配成浓度 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 2,4-D 标准中间液。然后稀释为 0.0、2.0、10.0、20.0、40.0、80.0 ng/mL 的系列标准溶液,待测定。

2.4 方法

2.4.1 样品前处理

用捣碎机捣碎样品,充分混匀后准确称取 10.00 g 样品于离心管中,用 20.0 mL 乙腈,室温震荡提取 10 min,4000 r/min 离心 10 min。取上清液 1 mL,50 $^{\circ}\text{C}$ 氮气吹干。用 0.5 mL 试剂盒中样品稀释液溶解并彻底冲洗玻璃管,移至小试管加盖振荡后待测。

2.4.2 ELISA 检测步骤

试剂盒室温放置 30 min 至常温。启封酶标板,按编号加入标准品,空白对照液及样品反应液到相应的孔位中,50 $\mu\text{L}/\text{孔}$,做 2 个平行。在各个微孔中相继加入 50 μL 酶结合物溶液(enzyme conjugate)。加入

50 μL 抗体溶液, 用覆盖膜盖板。握住测试条, 以圆周运动的方式混匀, 时间为 30 s, 小心溶液溅出。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。用 400 mL 蒸馏水稀释 Abraxis 酶联免疫试剂盒中 PBS-T 洗液。倒掉反应液, 用 PBS-T 洗液充分洗板 3 次, 用吸水纸拍干。每孔加入 150 μL 显色液, 用覆盖膜盖板, 充分混匀 30 s, 恒温箱避光孵育 20 min, 加入终止液 100 μL /孔, 与添加显色剂顺序一致。添加终止液 15 min 内读取波长为 450 nm 时的吸收值 OD, 根据标曲, 计算出样品中 2,4-D 含量。

3 结果与分析

3.1 萃取溶剂的选择

本研究应用的 2,4-D 试剂盒专用于水样检测, 该试剂盒中并没有用于去除蔬菜中的糖分、油脂、色素等干扰测定的杂质前处理方法, 直接应用会使测定数据可靠性下降。本课题组前期研究表明, 使用 HPLC 法测定水果中外源植物激素时, 在快速前处理方法中使用乙腈能完全萃取 2,4-D^[7]。因此, 选择乙腈作为萃取溶剂。通过测定青椒和番茄空白的 OD 值可知, 番茄的 OD 值为 0.709, 青椒的 OD 值为 0.39, 青椒的 OD 值接近 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液, 所以乙腈不适合用于青椒的萃取。需要对青椒的萃取溶剂进行选择, 结果见表 1。由表 1 可知, 二氯甲烷和乙酸乙酯萃取青椒的 OD 值高, 通过添加 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的回收率实验结果表明, 二氯甲烷回收率只有 48%, 乙酸乙酯的回收率有 112%, 与原溶剂甲醇 PBS 8:2 相比, 更加精确。因此, 选择乙酸乙酯作为萃取溶剂。

表 1 不同溶剂萃取青椒的 OD 值
Table 1 OD value of pepper in different solvent

试剂	OD _{450 nm} 值		
	1	2	平均值
乙酸乙酯	0.440	0.438	0.439
丙酮	0.371	0.409	0.390
二氯甲烷	0.420	0.470	0.445
乙腈	0.401	0.423	0.412
甲醇:水=8:2	0.322	0.365	0.343
甲醇:水=5:5	0.340	0.358	0.349
甲醇:水=4:6	0.391	0.415	0.403

3.2 标准曲线

按 2.4 测定标准溶剂相对应的 A 值, 以标准液浓度的对数为横坐标, 以标准液 B 值与 0 ng/mL 的 B₀ 值的比值为纵坐标绘制标准曲线(见图 1), 进行回归曲线计算, 得线性方程为 $Y=-36.606X+83.200$, 表明在 0~80 ng/mL 浓度范围内线性关系良好。

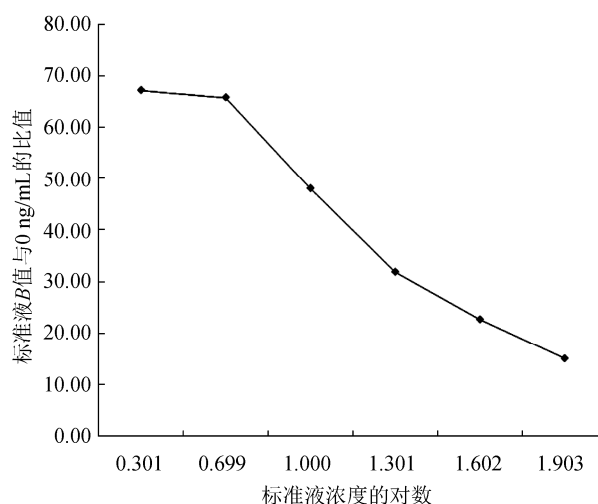


图 1 2,4-D 标准曲线

Fig. 1 Standard curve of 2,4-D solution

3.3 方法灵敏度的测定

方法灵敏度是以测得最低浓度的 OD 值与标准溶液 0 ng/mL 的 OD 值读数之差大于 0.1 来计算的^[8]。以实验室自来水为样本, 按 2.4 的方法, 依次降低 2,4-D 标准溶液在 450 nm 的吸光度, 实验所得结果以及与现有方法灵敏度对比, 如表 2、3 所示:

表 2 2,4-D 最低检测浓度
Table 2 The detection limit of 2,4-D

2,4-D 浓度/ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	OD _{450 nm} 值		
	1	2	平均值
0.000	0.466	0.525	0.500
0.506	0.465	0.474	0.470
1.120	0.416	0.442	0.429
1.782	0.404	0.335	0.370
2.564	0.304	0.402	0.353

表3 不同方法检测不同样品中 2,4-D 的检出限
Table 3 The 2, 4-D detection limit of different samples using different methods

检测方法	检测对象	检出限	参考文献
ELISA(本方法)	番茄、青椒	1.782 µg/L	-
HPLC	土壤	0.02 mg/L	[1]
GC	柑桔	7.5 µg/L	[9]
GC	水果	5 µg/kg	[10]
HPLC-MS	尿样	0.5 mg/L	[11]
HPLC-MS	葡萄干	8.0~11.6 µg/kg	[12]
GC-MS	韭菜	0.02 µg/kg	[13]
GC(GB/T5009.175)	粮食、蔬菜	8~13 µg/kg	[14]

表4 回收率试验
Table 4 Test of recovery

样品	添加浓度/(µg/kg)	OD 平均值	2,4-D 检出浓度(µg/kg)	平均回收率/%
番茄	0.0	0.709	0.776	—
	5.0	0.469	4.898	82.3
	10.0	0.375	10.233	94.5
	20.0	0.261	24.547	118.0
青椒	0.0	0.383	9.770	—
	5.0	0.339	13.490	74.4
	10.0	0.304	17.783	79.3
	20.0	0.241	28.840	95.4

结果表明, 2,4-D 浓度在 1.782 ng/mL 时与 0 ng/mL 时 OD 值的差值大于 0.1, 因此, 本法对 2,4-D 最低检出浓度为 1.782 ng/mL。

3.4 回收率验证试验

取番茄或青椒 10 份, 每份 10 g, 试验组每组 3 份, 对照组 2 份。每组分别添加 2,4-D 标准溶液 1 µg/mL 的 0.05、0.10、0.20 mL, 使其添加浓度分别为 5、10、20 µg/kg, 混匀后按 2.4 进行检测。结果(表 4)表明, 番茄的平均回收率为 82.3%~118.0%, 青椒的平均回收率为 74.4%~95.4%, 说明 ELISA 法测定茄果类蔬菜中 2,4-D 含量稳定性好, 完全能满足日常监测需求。

3.5 重复性试验

按 2.4 检测流程测定添加浓度为 10 µg/kg 番茄和

青椒的 OD 值, 计算标准偏差(s)和相对标准偏差(RSD%)值。结果表明, 番茄和青椒样品测定结果的相对标准偏差分别为 3.42%、4.32%, 说明酶联免疫法测定茄果类蔬菜中 2,4-D 残留量方法重现性较好。

4 结论

本研究基于 ELISA 法, 比较 8 种溶剂的萃取样品的 OD 值, 筛选基质干扰最小的溶剂, 最后确定乙酸乙酯为萃取溶剂, 本试验建立的检测方法的灵敏度为 1.782 ng/mL, 添加浓度在 5~20 µg/kg, 回收率在 74%以上。该法具有准确度和灵敏度高、操作简单、快速等优点, 尤其适合批量样品的测定。

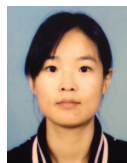
参考文献

- [1] De-Amarante OP, Jr NM. Brito, Dos-Santos TCR, *et al.* Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis [J]. *Talanta*, 2003, 60(1): 115-121.
- [2] 潘雅文. 番茄 2,4-D 药害的产生及预防[J]. *现代农业*, 2013, (3): 45.
- [3] Pan YW. 2, 4-d phytotoxicity and prevention of tomato [J]. *Mod Agr*, 2013, (3): 45.
- [4] 龚芳, 席俊, 职爱民, 等. 2,4-D 的毒性与残留检测方法研究进展[J]. *河南农业科学*, 2011, 40(8): 40-43.
- [5] Gong F, Xi J, Zhi AM, *et al.* A review on the toxicity and residues determination of 2,4-Dichlorophenoxy [J]. *J Henan Agr Sci*, 2011, 40(8): 40-43.
- [6] 朱赫, 纪明山. 农药残留快速检测技术的最新进展[J]. *中国农学通报*, 2014, 30(4): 242-250.
- [7] Zhu H, Ji MS. Recent advances in rapid detection technology of pesticide residue [J]. *Chin Agr Sci Bulletin*, 2014, 30(4): 242-250.
- [8] 余若祯, 施汉昌, 何苗, 等. 2,4-二氯苯氧乙酸完全抗原和抗体的制备[J]. *中国环境科学*, 2005, 25(3): 288-292.
- [9] Yu RZ, Shi HC, He M, *et al.* Preparation of complete anigen and antibody for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. *China Environ Sci*, 2005, 25(3): 288-292.
- [10] 李会娜, 曹远银, 孙艳秋, 等. 兔抗 2,4-D 多克隆抗体的制备[J]. *河北农业大学学报*, 2006, 9(3): 39-42.
- [11] Li HN, Cao YY, Sun YQ, *et al.* The preparation of polyclone antibody for 2,4-D residue [J]. *J Agr Univ Hebei*, 2006, 9(3): 39-42.
- [12] 刘宏程, 林涛, 邵金良, 等. 高效液相色谱测定水果中外源植

- 物激素的快速前处理方法研究[J]. 分析科学学报, 2014, 30(4): 497-500.
- Liu HC, Lin T, Shao JL, *et al.* Determination of plant growth regulator residues in fruits by quick extraction and high performance liquid chromatography [J]. *J Anal Sci*, 2014, 30(4): 497-500.
- [8] 齐惠萍, 吕建明, 李常青. ELISA 法检测食醋中黄曲霉素 B₁ 方法的改进[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(4): 313-315.
- Qi HP, Lu JM, Li CQ. Improvement on pretreatment method of aflatoxin B₁ in vinegar enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Chin J Food Hyg*, 2008, 20(4): 313-315.
- [9] 陈友清, 冯先桔. 衍生化气相色谱法测定柑橘果实中的 2,4-二氯苯氧乙酸[J]. 浙江柑橘, 2003, 20(1): 43-45.
- Chen YQ, Feng XJ. Derivative gas chromatography for determination of 2,4-D in citrus fruit acid [J]. *Zhejiang Ganju*, 2003, 20(1): 43-45.
- [10] 周艳明, 李冬焯, 胡睿. 气相色谱法测定 2,4-滴丁酯在水果中的残留[J]. 农药, 2010, 49(1): 39-40.
- Zhou YM, Li DY, Hu R. Determination of the residues of 2,4-D butylate in fruits by GC [J]. *Agrochem*, 2010, 49(1): 39-40.
- [11] Beeson MD, Driskell WJ, Barr DB. Isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for quantifying urinary metabolites of atrazine, malathion, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid [J]. *Anal Chem*, 1999, 71(16): 3526-3530.
- [12] 李海艳, 尚德军, 巩志国, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测葡萄干中五种植物生长调节剂的残留[J]. 保鲜与加工, 2014, 14(1): 27-32, 36.
- Li HY, Shang DJ, Gong ZG, *et al.* Determination of the residues of the 5 kinds of plant growth regulators in raisins using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Stor Proc*, 2014, 14(1): 27-32, 36.
- [13] 曹艳平, 解力, 杨剑影. 气相色谱-质谱法测定韭菜中 2,4-D 丁酯[J]. 质谱学报, 2006, 27(1): 33-35.
- Cao YP, Xie L, Yang JY. Determination of 2,4-D-butyl ester in Chinese leek by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectr Soc*, 2006, 27(1): 33-35.
- [14] GB/T 5009.175-2003 粮食和蔬菜中 2,4-滴残留量的测定[S]. GB/T 5009.175-2003 Determination of 2,4-D in grains and vegetables [S].
- [15] 陈君, 安东各, 许莉, 等. 豆芽中甲硝唑、多菌灵、赤霉素、6-苄基腺嘌呤、2,4-二氯苯氧乙酸的定量检测[J]. 化学通报, 2014, 77(9): 916-918.
- Chen J, An DG, Xu L, *et al.* Simultaneous quantitative detection of metronidazole carbendazim, gibberellic acid, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and 6-benzyladenine in bean sprout [J]. *Chem*, 2014, 77(9): 916-918.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



陆 欢, 研究生, 主要研究方向药物化学。

E-mail: lh599202641@163.com



王继良, 教授, 硕士生导师, 主要研究方向为药物合成。

E-mail: wangjiliangkm163.com