

双甲脒胶体金免疫快速检测试纸条研制及其在蜂蜜中的应用

智军海¹, 孟 超², 周嘉明^{2*}

(1. 天津华测检测认证有限公司, 天津 300000; 2. 青岛市华测检测技术有限公司, 青岛 266000)

摘 要: **目的** 基于胶体金免疫层析原理研制双甲脒快速检测试纸条, 评价其在蜂蜜检测中的应用效果。**方法** 使用双甲脒-牛血清白蛋白偶联物作为人工抗原免疫小鼠获得单克隆抗体, 制备胶体金微孔试剂, 使用双甲脒-卵清蛋白(ovalbumin, OVA)偶联物和羊抗鼠 IgG 抗体分别作为试纸条的检测线和控制线, 并对蜂蜜样品进行添加检测。**结果** 研制的试纸条可以定性检测蜂蜜中双甲脒的残留, 对蜂蜜中双甲脒的检出限为 0.2 mg/kg, 检测用时约 25 min, 检测与双甲脒功能和结构相似的其他药物时无交叉反应, 特异性较好。**结论** 本研究研制的试纸条适用于蜂场现场快速检测以及基层实验室中大量样本的筛查, 为蜂蜜中抗生素残留控制提供有效监管手段。

关键词: 双甲脒; 胶体金试纸条; 蜂蜜; 快速检测

Development of amitraz colloidal gold rapid immunoassay strip and its application in honey

ZHI Jun-Hai¹, MENG Chao², ZHOU Jia-Ming^{2*}

(1. Tianjin Huadian Testing and Certification Co., Ltd., Tianjin 300000, China; 2. Qingdao Huadian Testing Technology Co., Ltd., Qingdao 266000, China)

ABSTRACT: Objective To develop a rapid test strip for amitraz by colloidal gold immunochromatography and evaluate its application effect in honey detection. **Method** A mouse was immunized by using the amitraz-bovine serum albumin conjugate as an artificial antigen to obtain a monoclonal antibody, a colloidal gold microporous reagent was prepared, the amitraz-ovalbumin (OVA) conjugate and the goat anti-mouse IgG antibody were respectively used as a detection line and a control line of a test strip, and addition detection is performed on a honey sample. **Result** The developed test strip could be used for qualitative detection of amitraz residue in honey, the limit of detection for amitraz in honey was 0.2 mg/kg, and the detection time was about 25 min, there was no cross-reaction for the detection of other drugs similar to amitraz in function and structure, with good specificity. **Conclusion** The test strip developed in this study is suitable for rapid detection in bee farms and screening of a large number of samples in grass-roots laboratories, and provides effective supervision means for controlling antibiotic residues in honey.

KEY WORDS: amitraz; colloidal gold test strip; honey; rapid detection

*通信作者: 周嘉明, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: zhoujiaming@cti-cert.com

*Corresponding author: ZHOU Jia-Ming, Professor, Qingdao Huadian Testing Technology Co., Ltd., No.7, Gaochang Road, Laoshan District, Qingdao 266000, China. E-mail: zhoujiaming@cti-cert.com

0 引言

蜂蜜是由蜜蜂采集花蜜酿造而成, 主要成分为果糖和葡萄糖, 是一种纯天然的甜味物质, 因富含维生素、氨基酸等营养元素, 其保健功效受到了越来越多消费者的认可^[1]。我国作为养蜂大国, 在 2013 年时蜂蜜年产量已占世界蜂蜜总产量的 25% 以上^[2], 2020 年受疫情影响, 国际市场对保健食品的需求显著增加, 我国蜂蜜出口量同比增长 8%, 出口金额达到了 25404.5 万美元^[3]。然而蜂产品的出口量和质量密切相关, 为了保证蜂产品的质量, 必须严格检测蜂蜜中的农药残留^[4]。

双甲脒是一种常见的广谱有机氮类杀虫、杀螨剂^[5], 又称 N,N-双甲胺, 自 1974 年起被广泛用于果树、蔬菜、茶叶、棉花等作物的害虫防治^[6], 同时对蜜蜂常见的体外寄生虫——狄斯瓦螨的幼、若、成螨均有良好的防治效果^[7-8]。但双甲脒易发生代谢, 生成单甲脒[N-(2,4-dimethylphenyl)-N'-methylimidoformamide, DMPF]、2,4-二甲基苯基甲酰胺(2,4-dimethylphenyl formamide, DMF)和 2,4-二甲基苯胺(2,4-dimethylaniline, DMA), 其中 DMA 对肝脏具有较大的毒副作用, 并且具有致突变性和潜在的致癌性^[9]。蜂蜜中的双甲脒残留超标, 不仅严重影响了蜂蜜出口贸易的发展, 也对人体健康造成难以逆转的伤害。因此, 我国在 2019 年规定了蜂蜜中双甲脒最大残留限量为 0.2 mg/kg, 同欧盟、日本和美国规定的残留限量一致, 意大利和德国规定的限量为 0.01 mg/kg, 同时对其代谢物进行检测^[10]。

蜂蜜中双甲脒及其代谢物常用仪器法进行检测, 包括气相色谱-质谱法^[11]、液相色谱法^[12]、超高效液相色谱法^[13]。这些方法虽然可以准确定量检测出药物的残留量, 但检测成本较高、周期长, 对实验人员还有一定的技术要求, 并且只能在特定的实验室进行检测, 无法实现现场检测及基层实验人员对大批样本的初筛。随着政策的要求和市场需求, 亟需一种适用于在蜂场即可对蜂蜜进行初步检测的低成本快速检测方法。胶体金免疫层析技术是近年来较为普及的一种快检技术, 具有方便在现场检测、时效性高、灵敏度高且特异性强等优点。目前对于应用胶体金试纸条检测蜂蜜中的双甲脒鲜有报道, 为了提供一种免疫层析胶体金快速检测方法和弥补仪器法的不足之处, 本研究研制了一种可以用于快速检测蜂蜜中双甲脒的胶体金试纸条, 旨在监控蜂蜜品质和减少受污染的蜂蜜进入市场流通的机会, 在保障食品安全方面具有较高的实际使用价值。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

6~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠(江苏集萃药康生物科技股份有限公司)。

双甲脒、杀虫脒、哒螨灵、丁氟螨酯、噻螨酮标准品(纯度 $\geq 99\%$, 德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 纯度 $\geq 98\%$)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国 Sigma 公司); 羊抗鼠 IgG(无锡迪腾敏生物科技有限公司); 碳酸钾、氢氧化钠、正己烷、异丙醇、蔗糖、吐温-20(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 硝酸纤维素膜(CN140, 德国 Sartorius 公司); 吸水垫、样品垫、聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)底板(上海金标生物科技有限公司); 双甲脒-BSA 偶联物、双甲脒-卵清蛋白(ovalbumin, OVA)偶联物、胶体金重悬液、样本复溶液由华测检测认证集团北京实验室提供。

1260 液相色谱仪(美国安捷伦科技有限公司); CTS300 数控裁条机、HM3035 XYZ 三维划膜喷仪、ZQ2002 微电脑斩切机(上海金标生物科技有限公司); TGL-16 高速冷冻离心机(四川蜀科仪器有限公司); TD4K-Z 离心机(长沙东旺实验仪器有限公司); LGJ-10 真空冷冻干燥机(北京松源华兴科技发展有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 双甲脒单克隆抗体的制备

取 6~8 周龄 BALB/c 雌性小鼠, 以双甲脒-BSA 偶联物作为免疫原与等体积弗氏完全佐剂混合乳化后, 于小鼠背部皮下多点注射, 首次免疫时每只小鼠注射 0.1 mL 混合液, 每隔 2 周进行一次加强免疫, 共加强免疫 3 次, 后两次免疫用弗氏不完全佐剂进行乳化^[14-15]。间隔 3 周后, 将 0.1 mL 不添加佐剂的免疫原通过腹腔注射免疫小鼠^[16-17], 3 d 后脱颈处死小鼠^[18], 将其浸入 75% 的乙醇中消毒, 5 min 后于无菌环境下解剖并取出脾脏, 参考文献[19-20]中的方法制备杂交瘤细胞并筛选出能够稳定分泌抗体的阳性细胞株。

1.2.2 双甲脒单克隆抗体-胶体金标记物微孔试剂的制备

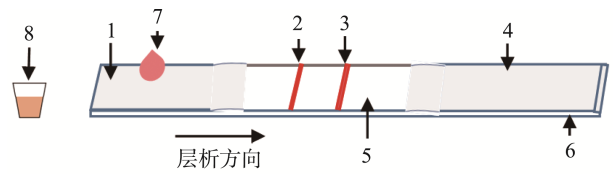
取 100 mL 制备好的 0.01% 胶体金溶液^[21], 搅拌加入 0.1 mol/L 碳酸钾调节胶体金溶液 pH 至 8.5 左右^[22], 将双甲脒单克隆抗体按质量浓度 30~40 $\mu\text{g/mL}$ 加入胶体金溶液中, 搅拌均匀后于室温 25 $^{\circ}\text{C}$ 下静置 20 min, 加入 1 mL 10% BSA^[23], 使用磁力搅拌器搅拌(转速 150 r/min, 30 min), 再静置 20 min 后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 12000 $\times g$ 离心 20 min, 弃上清, 余下沉淀使用 20 mL 胶体金重悬液(2% 蔗糖、1% BSA、0.3% Tween-20, 由 0.01 mol/L pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲溶液配制)重悬后放于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用^[16,24]。

在微孔中加入 100 μL 双甲脒单克隆抗体-胶体金标记物, 设置冷冻干燥机冷阱温度为 -70 $^{\circ}\text{C}$, 将微孔预冻 3 h, 再真空干燥 24 h^[25], 得到冻干双甲脒单克隆抗体-胶体金标记物微孔试剂。

1.2.3 试纸条制备与组装

将适当浓度的双甲脒-OVA 偶联物和羊抗鼠 IgG 抗体分别包被在硝酸纤维素膜的 T 线-检测线和 C 线-质控线上,

根据层析方向依次将样品垫、硝酸纤维素膜、吸水垫粘在 PVC 底板上, 每个部位间重叠约 0.5 mm^[26], 将组装好的试纸使用可编程切条机切割成 4 mm 宽的试纸条, 密封于干燥条件下, 于室温中保存备用^[27-28], 试纸条结构见图 1。



注: 1: 样品垫; 2: 质控线; 3: 检测线; 4: 吸水垫; 5: 硝酸纤维素膜; 6: PVC 底板; 7: 与金标记抗体预先反应后的待测液; 8: 金标微孔。
图 1 试纸条结构图
Fig.1 Structure diagram of strip

1.2.4 蜂蜜样品的处理

取 1 g 实验室保存的蜂蜜样品, 加入 1 mL 0.1 mol/L 氢氧化钠, 涡旋混匀 1 min, 再加入 3 mL(正己烷:异丙醇=2:1, V/V)的混合液, 涡旋混匀 2 min, 室温 25 °C 下 3000×g 离心 5 min。取离心后全部上清液于 10 mL 离心管中, 于 40 °C 水浴中旋转蒸发至干。加入 1 mL 样本复溶液(12.90 g 十二水合磷酸氢二钠和 2.18 g 二水合磷酸二氢钠, 用水溶解并定容至 1 L, 调节 pH 至 8)溶解残渣, 充分振荡混匀后, 4000×g 离心 1 min, 即得到待检液^[29-30]。参照 GB/T 21169—2007《蜂蜜中双甲脒及其代谢物残留量测定 液相色谱法》进行。

1.2.5 样品的检测及判定标准

吸取 120 μL 待检液于金标微孔中, 轻柔吹打至微孔底部红色物质完全溶解, 静置反应 2 min 后, 吸取微孔内全部液体直接滴加到试纸条样品垫上, 水平静置 5 min 后即可读取结果, 结果应在 5~8 min 内读取, 其余时间判读无效, 根据示意图(图 2)判定结果, 方法如下:

阴性(-): 检测线(T 线)显色比质控线(C 线)深或两者颜色相同, 表示样本中双甲脒的含量低于检出限或不含双甲脒。

阳性(+): 检测线(T 线)显色比质控线(C 线)浅或 T 线不显色, 表示样本中双甲脒含量大于检出限, T 线显色比 C 线显色越浅, 表示样品中双甲脒的含量越高。

无效: 质控线(C 线)不显色, 表明试纸条失效或操作不规范, 应使用新的试纸条重新检测。

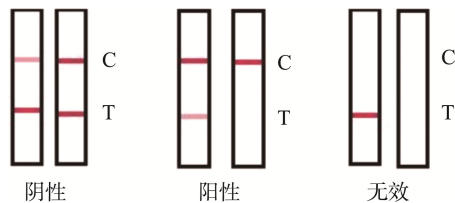


图 2 结果判定示意图
Fig.2 Schematic diagram of result determination

1.2.6 试纸条质量评估

(1)检出限的确定

在空白蜂蜜样品中分别添加浓度为 0、0.05、0.10、0.20、0.40 mg/kg 的双甲脒标准品, 使用 3 个不同批次的试纸条进行检测, 每个浓度设立 3 个平行实验, 根据实验结果确定试纸条的检出限。

(2)特异性实验

选择与双甲脒化学结构、功能相似的药物进行检测。分别配制 0、5、10、15、20 mg/L 的双甲脒、杀虫脒、哒螨灵、丁氟螨酯、噻螨酮, 使用 3 批不同的试纸条检测, 并重复检测 3 次, 根据结果判断试纸条的特异性。

(3)稳定性实验

将试纸条密封于铝箔袋中, 于室温环境下保存, 每个月随机选取一定数量的试纸条对添加双甲脒 0.2 mg/kg 的蜂蜜样品进行检测并重复检测 3 次, 连续测定 18 个月。

(4)准确性实验

取实验保存空白蜂蜜样品和添加双甲脒 0.1、0.2、0.4 mg/kg 的蜂蜜样品各 50 份, 使用 3 批不同批次的试纸条对上述样品重复检测 3 次, 分别计算假阳性率和假阴性率。

另取 20 份蜂蜜样品, 使用本试纸条检测的同时, 根据 GB/T 21169—2007 中方法, 使用液相色谱仪对样品进行检测, 对比两种方法的检测结果。

2 结果与分析

2.1 检出限

由表 1、图 3 可以看出, 当蜂蜜中双甲脒含量为 0、0.05、0.10 mg/kg 时, T 线显色比 C 线深, 表明检测结果为阴性, 当双甲脒含量为 0.2、0.4 mg/kg 时, C 线显色深于 T 线, 检测结果为阳性, 且平行实验间重复性良好。故根据实验结果, 可以确定本试纸条检出限为 0.2 mg/kg。可以满足我国对蜂蜜中双甲脒最大残留限量的需求。

表 1 双甲脒快速检测试纸条检出限结果(n=3)

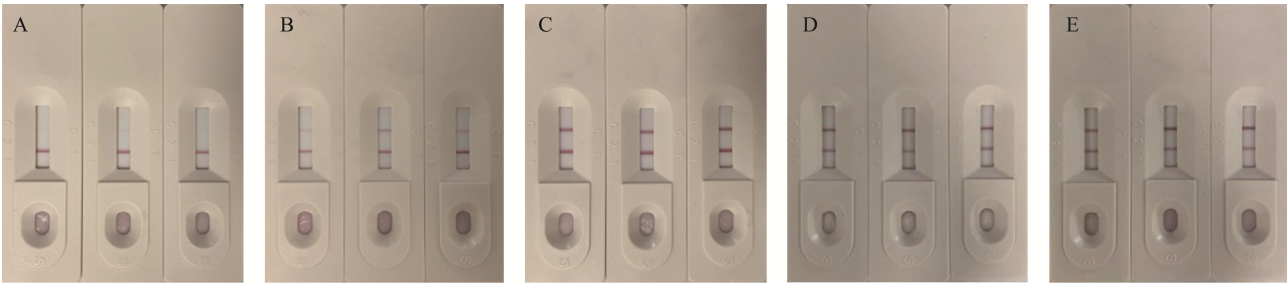
Table 1 Results of detection limit of test strip for rapid detection of amitraz (n=3)

平行实验	蜂蜜中双甲脒含量/(mg/kg)				
	0	0.05	0.10	0.20	0.40
A	-	-	-	+	+
B	-	-	-	+	+
C	-	-	-	+	+

注: -表示阴性, +表示阳性, 下同。

2.2 特异性

由表 2 可以看出, 使用双甲脒快速检测试纸条检测与双甲脒化学结构、功能相似的不同浓度的药物时, 结果均为阴性, 而对超出检出限的双甲脒进行检测时, 结果呈阳性, 表明本试纸条可以特异性检测双甲脒的残留而与其他药物无交叉反应, 特异性较好。



注: A: 双甲脒浓度 0 mg/kg; B: 双甲脒浓度 0.05 mg/kg; C: 双甲脒浓度 0.10 mg/kg; D: 双甲脒浓度 0.20 mg/kg; E: 双甲脒浓度 0.40 mg/kg。

图 3 双甲脒快速检测试纸条检出限结果

Fig.3 Results of detection limit of test strip for rapid detection of amitraz

表 2 双甲脒快速检测试纸条特异性结果

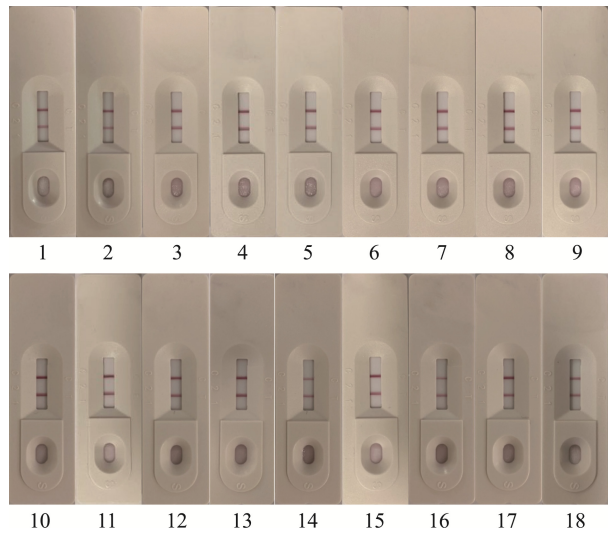
Table 2 Specific results of test strip for rapid detection of amitraz

药物名称	药物质量浓度/(mg/L)														
	0			5			10			15			20		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
双甲脒	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
杀虫脒	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
哒螨灵	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
丁氟螨酯	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
噻螨酮	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: A、B、C 为 3 次重复实验。

2.3 稳定性

将试纸条常温密封保存, 连续 18 个月对其进行检测, 根据图 4 可以看出, 前 13 个月内试纸条检测结果无异常, 均为阳性, 在第 14 个月至第 18 个月的检测中发现, 试纸条偶有出现假阴性, 结果不稳定。从整体上看试纸条的稳定性可以满足现场使用的要求。



注: 1~18 为贮藏月份。

图 4 双甲脒快速检测试纸条稳定性结果

Fig.4 Stability results of test strip for rapid detection of amitraz

2.4 准确性

根据检测结果可以看出, 空白蜂蜜样品中未检测出阳性结果, 双甲脒添加量为 0.1 mg/kg 的蜂蜜样品检测结果中, 出现 3 例阳性结果, 故假阳性率为 1.00%; 双甲脒添加量为 0.2 mg/kg 的蜂蜜样品检测结果中, 出现 1 例阴性结果, 双甲脒添加量为 0.4 mg/kg 的检测结果全部为阳性, 故假阴性率为 0.33%, 具体见表 3。

使用试纸条检测和液相色谱检测的结果见表 4, 从中可以看出, 两种方法的检测结果相符, 具有较好的一致性。单个样品的检测时间可以控制在 25 min 之内完成, 说明该试纸条可以用于蜂蜜中双甲脒残留量的快速检测。

表 3 双甲脒快速检测试纸条检测结果

Table 3 Detection result of amitraz rapid detection test strip

样品情况	检测结果	
	阳性	阴性
阳性样品	299	1
阴性样品	3	297
假阴性率	0.33%	
假阳性率	1.00%	

表 4 双甲脒快速检测试纸条与色谱仪检测对比结果
Table 4 Comparison results of amitraz rapid detection test strip and chromatograph detection

编号	试纸条检测结果	色谱仪检测结果/(mg/kg)	编号	试纸条检测结果	色谱仪检测结果/(mg/kg)
1	—	0.128	11	+	0.302
2	—	未检出	12	+	0.241
3	—	未检出	13	—	未检出
4	+	0.344	14	—	0.158
5	—	未检出	15	—	未检出
6	—	0.152	16	—	未检出
7	+	0.287	17	+	0.338
8	+	0.277	18	—	未检出
9	—	未检出	19	—	0.155
10	—	0.103	20	—	0.126

注: -表示阴性含量低于检出限 0.2 mg/kg, +表示阳性。

3 结 论

双甲脒是一种广谱性杀螨剂,对蜂螨有很强的触杀作用,导致许多国家已经禁止应用双甲脒防治蜂螨,但由于其价格便宜同时防治效果好,国内蜂农仍未停止使用双甲脒,这对我国人民的身体健康和蜂蜜出口贸易造成了极大影响。目前,常用的仪器检测法由于受检测场地限制,检测成本高且周期长,无法满足现场快速检测的要求,本研究使用双甲脒-BSA 偶联物作为免疫原制备出双甲脒单克隆抗体,成功研制出快速检测蜂蜜样品中双甲脒残留量的胶体金试纸,可应用于现场及基层实验室筛选出疑似阳性的样品,检测用时大大缩短。

试纸条的检出限为 0.2 mg/kg,满足 GB 31650—2019 中对双甲脒的限量要求。根据特异性实验结果可以看出,本实验研制的双甲脒试纸条与杀虫脒、哒螨灵、丁氟螨酯及噻螨酮之间无交叉反应,具有良好的特异性。在使用不同批次的试纸条分别检测阳性和阴性蜂蜜样品时,虽然假阳性率为 1.00%和假阴性率为 0.33%,但假阳性率和假阴性率均很低,满足国家市场监督管理总局发布的快速检测方法规定的假阳性率和假阴性率的要求。出现这种情况的原因推测是由于双甲脒随着时间的推移和环境温、湿度、pH 的变化会发生一定的降解。结合液相色谱的检测结果,两者一致性较好,说明试纸条检测结果准确可信。常温下,试纸条的保质期在一年以上,在此期间,检测结果准确、稳定,符合商品化要求。本试纸条由于其携带方便、前处理过程简单、准确度高等优点,可以广泛应用于蜂蜜样品现场快速检测,从蜂蜜源头上控制双甲脒的超标,进一步保障蜂蜜产品的安全,具有较强的使用价值。

参考文献

[1] 田洪芸,王冠群,任雪梅.我国蜂蜜产品及其品质检测指标[J].中国蜂业,2020,71(10):47-49.

TIAN HY, WANG GQ, REN XM. China's honey products and their quality testing indicator [J]. Apicul China, 2020, 71(10): 47-49.

[2] 郑国富. 中国蜂蜜进出口贸易发展的新动态, 问题与建议[J]. 中国蜂业, 2021, (2): 53-56.

ZHENG GF. New trend, problem, and suggestions on the import and export trade development of China's honey [J]. Apicul China, 2021, (2): 53-56.

[3] 刁青云, 代平礼, 周军. 2020 年国际蜂蜜的进出口情况[J]. 中国蜂业, 2021, 72(12): 55.

DIAO QY, DAI PL, ZHOU J. International honey import and export in 2020 [J]. Apicul China, 2021, 72(12): 55.

[4] 王英, 张永贵, 吴忠高, 等. 蜂蜜中农药残留概况[J]. 中国蜂业, 2019, 70(4): 53-55.

WANG Y, ZHANG YG, WU ZG, *et al.* Pesticide residues in honey [J]. Apicul China, 2019, 70(4): 53-55.

[5] DHOORIA S, AGARWAL R. Amitraz, an underrecognized poison: A systematic review [J]. Med Res, 2020, 144(3): 348-358.

[6] VUCINIC S, JOVANOVIC D, VUCINIC Z, *et al.* A near-fatal case of acute poisoning by amitraz/xylene showing atrial fibrillation [J]. Forensic Toxicol, 2021, (25): 41-49.

[7] RINKEVICH FD. Detection of amitraz resistance and reduced treatment efficacy in the varroa mite, varroa destructor, within commercial beekeeping operations [J]. PLoS One, 2020, 15(1): 227258-227264.

[8] 沈德胜, 林瑞平. 花椒对狄斯瓦螨作用的实验室试验研究初探[J]. 浙江畜牧兽医, 2020, 45(4): 4-5, 12.

SHEN DS, LIN RP. Preliminary study on the effect of zanthoxyum bungeanm on the varroa destructor in laboratory [J]. Zhejiang J Anim Sci Vet Med, 2020, 45(4): 4-5, 12.

[9] OSANNO O, ADMIRAAL W, KLAMER HJ, *et al.* Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamides and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius* [J]. Environ Pollut, 2020, 119(2): 195-202.

[10] RIAL-OTERO R, GASPAR EM, MOURA I, *et al.* Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview [J]. Talanta, 2007, 71(2): 503-514.

[11] 韩瑞烜, 陈其玲, 吴辰雪, 等. GC-MS 检测蜂蜜中双甲脒残留量的方法研究[J]. 食品工业, 2018, 39(4): 299-301.

- HAN JX, CHEN QL, WU CX, *et al.* The methods of detection of amitraz and its metabolite (2,4-xyldine) residues in honey based on gas chromatography-mass spectrometry [J]. Food Ind, 2018, 39(4): 299–301.
- [12] 赵增运, 吴斌, 沈崇钰, 等. 高效液相色谱法测定蜂蜜中的双甲脒残留[J]. 中国养蜂, 2005, (5): 4–6.
- ZHAO ZY, WU B, SHEN CY, *et al.* Determination of amitraz residue in honey by HPLC with UV detector [J]. Apicul China, 2005, (5): 4–6.
- [13] 谭璟慧, 谢宏斌, 李贵荣, 等. 超高效液相色谱法同时测定蜂蜜中双甲脒及其代谢物残留量[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(12): 4091–4096.
- TAN JH, XIE HB, LI RG, *et al.* Simultaneous determination of amitraz and its metabolite (2,4-dimethylaniline) residues in honey by ultra-performance liquid chromatography [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(12): 4091–4096.
- [14] 周嘉明, 封冰, 智军海. 三氯杀螨醇胶体金免疫快速检测试纸条研制及在茶叶中的应用[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 8(15): 5337–5342.
- ZHOU JM, FENG B, ZHI JH. Development of dicofol colloidal gold immune rapid detection test strip and its application in tea [J]. J Food Saf Qual, 2020, 8(15): 5337–5342.
- [15] 封青, 李研, 孙晶莹, 等. 三聚氰胺单克隆抗体制备与鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 5303–5308.
- FENG Q, LI Y, SUN JY, *et al.* Preparation and identification of monoclonal antibody against melamine [J]. J Food Saf Qual, 2020, 11(15): 5303–5308.
- [16] 王姝婷. 农药多簇人工抗原的免疫特异性及多残留免疫金技术[D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- WANG ST. Immuno-specificity of multi-determinant artificial antigen and gold immuno-chromatography assay for multi-residue of pesticide [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2008.
- [17] NARDO FD, BAGGIANI C, GIOVANNOLI C, *et al.* Multicolor immunochromatographic strip test based on gold nanoparticles for the determination of aflatoxin B₁ and fumonisins [J]. Microchim Acta, 2017, 184(5): 1295–1304.
- [18] 李春生, 刘静静, 杜顺丰, 等. 呋喃唑酮代谢物单克隆抗体和胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 现代食品科技, 2017, 33(6): 326–331.
- LI CS, LIU JJ, DU SF, *et al.* Preparation of monoclonal antibody and colloidal gold immunochromatographic test strip against furazolidone metabolites [J]. Mod Food Sci Technol, 2017, 33(6): 326–331.
- [19] WANATABE S, ITO S, KAMATA Y, *et al.* Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid insecticides imidacloprid and acetamiprid [J]. Anal Chim Acta, 2021, 427(2): 211–219.
- [20] YOKOYAMA WM. Production of monoclonal antibody supernatant and ascites fluid production. 2th ed [M]. New York: Cur Protoc Mol Biology, 2020.
- [21] XU P, LI J, HUANG X, *et al.* Effect of the tip length of multibranched AuNFs on the detection performance of immunochromatographic assay [J]. Anal Methods, 2016, 8(16): 3316–3324.
- [22] 张晓丽, 颜露, 向军俭, 等. 呋喃唑酮代谢物 5-甲基吗啉-3-氨基-2-噁唑酮单克隆抗体的制备、鉴定与胶体金免疫层析试纸条的研制[J]. 生物工程, 2013, (13): 161–165.
- ZHANG XL, YAN L, XIANG JJ, *et al.* Production and characterization of monoclonal antibody against the metabolite of furaltadone, 5-morpholino-3-amino-2-oxazolidone (AMOZ), and establishment of colloidal gold immunochromatography for detecting [J]. Biotechnol J, 2013, (13): 161–165.
- [23] 曲晓芳. 毒死蜱 ELISA 快速检测试剂盒与胶体金试纸条的研制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.
- QU XF. Study on ELISA rapid detection kit and on colloidal gold strip for chlorpyrifos [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2012.
- [24] 吴雨豪, 刘文娟, 武燕华, 等. 多枝状胶体金免疫层析试纸条定量检测猪尿中沙丁胺醇[J]. 生物加工过程, 2018, (2): 74–79.
- WU YH, LIU WJ, WU YH, *et al.* Multi-branched gold nanoparticles based immunochromatographic strip for quantitative detection of salbutamol in swine urine [J]. Chin J Biop Eng, 2018, (2): 74–79.
- [25] LI J, DUAN H, XU P, *et al.* Effect of different-sized spherical gold nanoparticles grown layer by layer on the sensitivity of an immunochromatographic assay [J]. RSC Adv, 2016, 6(31): 26178–26185.
- [26] 李莎, 白瑞樱, 曾道平, 等. 胶体金免疫层析试纸条在猪尿 β -兴奋剂多残留检测中的应用[J]. 食品工业科技, 2016, 37(20): 53–58.
- LI S, BAI RY, ZENG DP, *et al.* Investigation of colloidal gold immunochromatographic strip for quantitative detection of variety of β -agonists in swine urine [J]. Sci Technol Food Ind, 2016, 37(20): 53–58.
- [27] 王艳芳, 姜宝芹, 那福彬, 等. 快速检测西尼罗病毒胶体金免疫层析试纸条方法的建立[J]. 检验检疫学刊, 2010, 20(2): 10–13.
- WANG YF, JIANG BQ, NA FB, *et al.* Establishment of rapid detection of west Nile virus with gold-immunochromatography [J]. J Inspect Quar, 2010, 20(2): 10–13.
- [28] 邱凌, 王佳妮, 廖旭, 等. 胶体金免疫试纸条快速测定雌三醇[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2015, 54(1): 47–51.
- QIU L, WANG JN, LIAO X, *et al.* Study of colloidal gold immuno-chromatographic assay stick for detection of estriol [J]. J Xiamen Univ (Nat Sci), 2015, 54(1): 47–51.
- [29] 郭璟琦, 许江萍, 郭浩. 气相色谱-质谱联用检测稻田水中的双甲脒农药残留[J]. 化学通报, 2014, 77(1): 90–92.
- GUO JQ, XU JP, GUO H. Determination of amitraz and its metabolite pesticide residues in paddy water by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Chem Bull, 2014, 77(1): 90–92.
- [30] 董榕贵, 周红, 陈朝欢, 等. QuEChERS 结合 GC-MS/MS 法测定果蔬汁中 21 种农药残留[J]. 中国制造, 2020, 39(2): 200–205.
- DONG RG, ZHOU H, CHEN CH, *et al.* Determination of 21 pesticides residue in fruit and vegetable juices by QuEChERS coupled with GC-MS/MS [J]. China Brew, 2020, 39(2): 200–205.

(责任编辑: 张晓寒 韩晓红)

作者简介



智军海, 硕士, 中级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: zhijunhai@cti-cert.com



周嘉明, 正高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。
E-mail: zhoujiaming@cti-cert.com