

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241115003

引用格式: 丰东升, 徐燕, 陈柔含, 等. 胶体金免疫层析法快速检测蔬菜中的啶虫脒含量[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(5): 179-186.

FENG DS, XU Y, CHEN RH, *et al.* Rapid detection of acetamiprid in vegetables using colloidal gold immunochromatography assay [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(5): 179-186. (in Chinese with English abstract).

胶体金免疫层析法快速检测蔬菜中的啶虫脒含量

丰东升^{1#}, 徐燕^{2#}, 陈柔含¹, 马颖清¹, 高猛峰¹, 杨晓君¹,
吴蔚³, 邓波^{1*}, 刘娜^{2*}

(1. 上海市农产品质量安全中心, 上海 201708; 2. 中国科学院上海营养与健康研究所, 上海 200031;
3. 上海佑隆生物科技有限公司, 上海 201114)

摘要: **目的** 制备胶体金免疫层析法试纸条, 实现蔬菜中啶虫脒残留量的快速检测。**方法** 通过半抗原合成获得免疫抗原, 通过动物免疫和杂交瘤技术获得啶虫脒高灵敏特异性单克隆抗体, 基于该抗体优化划膜条件等参数确定, 制备了免疫胶体金试纸条, 该试纸条联合呈色分析应用于多种蔬菜的定量检测。**结果** 在最适工作条件下, 所建立的方法对啶虫脒的检出限为 0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 线性范围为 0.42~18.38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。实际样品检测回收率为 70.0%~88.3%, 测定批内和批间实验的变异系数(coefficient of variation, CV)分别低于 12.00%和 11.03%。**结论** 该快速检测试纸条可直接应用于蔬菜中啶虫脒的现场高通量快速筛查, 借助呈色分析仪亦可实现对啶虫脒的定量检测。

关键词: 啶虫脒; 单克隆抗体; 胶体金试纸条; 呈色分析仪; 定量检测

Rapid detection of acetamiprid in vegetables using colloidal gold immunochromatography assay

FENG Dong-Sheng^{1#}, XU Yan^{2#}, CHEN Rou-Han¹, MA Ying-Qing¹, GAO Meng-Feng¹,
YANG Xiao-Jun¹, WU Wei³, DENG Bo^{1*}, LIU Na^{2*}

(1. Shanghai Agricultural Products Quality and Safety Center, Shanghai 201708, China; 2. Shanghai Institute of Nutrition and Health, University of Chinese Academy of Science, Shanghai 200031, China; 3. Shanghai Youlong Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201114, China)

ABSTRACT: Objective To prepare colloidal gold immunochromatographic test strips for the rapid detection of acetamiprid residues in vegetables. **Methods** The immunogen was obtained through hapten synthesis, and a highly sensitive and specific monoclonal antibody against acetamiprid was developed using animal immunization and hybridoma technology. Based on this antibody, parameters such as membrane-coating conditions were optimized to

收稿日期: 2024-11-15

基金项目: 上海市科技兴农项目(上海地产蔬菜中高风险农药残留多组分现场快速检测技术研发与应用, 2022-02-08-00-12-F01172)

#丰东升和徐燕为共同第一作者

第一作者: 丰东升(1966—), 男, 硕士, 高级农艺师, 主要研究方向为农产品质量安全监管。E-mail: dosfeng@qq.com

徐燕(1994—), 女, 硕士, 助理工程师, 主要研究方向为食品加工与安全。E-mail: yxu@sinh.ac.cn

*通信作者: 邓波(1982—), 男, 硕士, 高级兽医师, 主要研究方向为农产品质量安全与品质分析。E-mail: dengbo.25@163.com

刘娜(1981—), 女, 博士, 副研究员, 主要研究方向为真菌毒素与食品安全。E-mail: liuna@sinh.ac.cn

prepare immunocolloidal gold test strips. These test strips, combined with colorimetric analysis, were applied for the quantitative detection of acetamiprid residues in various vegetables. **Results** Under optimal working conditions, the established method achieved a limit of detection of 0.23 $\mu\text{g}/\text{kg}$ for acetamiprid, with a linear range of 0.42–18.38 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The recovery rates for actual sample detection ranged from 70.0% to 88.3%, and the coefficients of variation (CV) for intra-batch and inter-batch experiments were below 12.00% and 11.03%, respectively. **Conclusion** The rapid test strips can be directly applied for high-throughput on-site screening of acetamiprid residues in vegetables. Additionally, with the assistance of a colorimetric analyzer, quantitative acetamiprid detection can also be achieved.

KEY WORDS: acetamiprid; monoclonal antibody; gold immunochromatography assay; colorimetric analyzer; quantitative determination

0 引言

啉虫脒是一种新型广谱且具有一定杀螨活性的新烟碱类杀虫剂,广泛用于水稻、蔬菜、果树、茶叶的蚜虫、飞虱等虫害防治,目前被广泛使用^[1-6]。它能通过与害虫体内尼古丁乙酰胆碱受体结合而将其杀死,但与人和动物体内相关受体也会结合而造成危害^[7-11]。短期内接触啉虫脒有可能破坏内分泌系统,而长期接触啉虫脒可能增加患癌症的风险,并对生殖健康造成不利影响^[12]。啉虫脒为 GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》蔬菜产品中有限量规定的农药品种,花菜、青皮瓜、丝瓜皮、豇豆和秋葵对啉虫脒的限量标准分别为 0.5、0.2、0.2、0.4 和 1.0 mg/kg 。随着农药的使用越来越广泛,用量越来越大,农药残留的环境安全问题以及对土壤非靶标生物的毒害效应开始引起人们的关注。虽然啉虫脒属低毒农药,但在国家食品安全风险监控中检出率较高,如果过量使用或使用不当,残留在蔬菜中将会对人体健康带来隐患,因此其在蔬菜中的残留水平值得关注^[13-14]。

由于蔬菜中啉虫脒的残留较为痕量,针对其的检测方法必须高精度、高稳定性和高特异性。常见检测蔬菜中啉虫脒的分析方法主要有液相色谱法^[15-18]、液相色谱-质谱法等^[19-24]。然而,这些复杂的方法并不适合实时检测大量样品。近年来,多种新型的分析技术得到了快速发展,并被广泛应用于啉虫脒的检测,包括酶联免疫吸附法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)^[25-26]、电化学发光法(electrochemiluminescence, ECL)^[27]、表面增强拉曼光谱法(surface enhanced Raman spectroscopy, SERS)^[24,26,28]、比色法^[29]等。然而,这些方法的使用仪器成本相对较高、程序复杂、分析时间相对较长。因此,这些方法并不适用于食品安全的现场检测。相比之下,金标免疫试纸条操作简单,检测速度快,在较宽的温度和湿度范围内都能保持较高的检测精度而被广泛应用。目前针对啉虫脒的快速定量检测方法鲜少报道。赵颖等^[30]建立了啉虫脒金标速测试纸条的研制方法,对啉虫脒在茶叶中残留的情况进行了快速检测

定量分析,但是其检测方法检出限高,灵敏度较低。王彧婕等^[31]考察了市场上流通的 5 种不同品牌的胶体金免疫层析法试纸条在蔬菜、水果的农药残留检测中的检出限、灵敏度、特异性等性能指标,但仅对快速检测试纸条进行了效果初探,并没有深入研究其方法的性能指标。总体来说,已有的检测方法均存在检出限高、灵敏度低、回收率低等不足,因此,提高胶体金免疫层析法检测的上述指标十分有必要。

本研究基于制备啉虫脒单克隆抗体构建了一种啉虫脒定量快速检测方法。通过对金标试纸条的划膜浓度和胶体金标记等制备工艺和工作条件优化,生产制备啉虫脒胶体金试纸条,对该试纸条的检测性能进行了评价,旨在获得可用于蔬菜样品的快速检测产品,满足高通量快速检测的需要。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

蔬菜分别来自无锡市朝阳农贸市场。

啉虫脒(纯度 98.0%, 坛墨质检科技股份有限公司); 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、鸡血清白蛋白(chicken blood innocent protein, OVA)[西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐[1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride, EDC]、N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS)、十二水合磷酸二氢钠、碳酸钾、柠檬酸、氯金酸、柠檬酸三钠、蔗糖、海藻糖(纯度 $\geq 99.0\%$)(索莱宝生物科技有限公司); N,N-二甲基甲酰胺(N,N-dimethylformamide, DMF)、碳酸氢钠、氯化钾、磷酸二氢钾、吐温-20、甲醇(纯度 $\geq 99.5\%$)、无水碳酸钠、氯化钠(纯度 $\geq 99.8\%$)、氢氧化钠(纯度 $\geq 96.0\%$)、PEG 4000(分析纯)(国药集团化学试剂有限公司); 硝酸纤维素(nitrocellulose, NC)(美国颇尔公司); 玻璃纤维纸、吸水纸、聚酯膜[通晟(福州)纸业有限公司]。

1.2 仪器与设备

XPR204S/AC 精密电子天平(精度 0.1 mg)、EL20K pH

计[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]; HY-2 涡旋振荡器、88-I 恒温磁力搅拌器(上海司乐仪器有限公司); SL1R Plus 高速冷冻离心机、SL16R 高速离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司); HiPette 可调微量加样器[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]; HN-36BS 恒温鼓风干燥箱(上海力辰仪器科技有限公司); Direct-Pure UP 纯水仪(乐枫生物科技有限公司); ZD-9556 水平摇床(太仓市华利达实验设备有限公司); HGS510 划膜喷金划膜机、HGS201 切条机、HGS803 平板压卡机(杭州封航科技有限公司); FR-900 型封口机(上海申越包装机械制造有限公司); GIC-H1 呈色分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司); Rapiflex 基质辅助激光解吸飞行时间质谱仪(matrix assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometer, MALDI-TOF-MS, 德国布鲁克公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 抗原制备

将啶虫脒(2.2 g), 巯基丙酸(2.12 g), Cs_2CO_3 (32.6 g) 混悬于己二酸二甲酯(40 mL)中, 120 °C下反应 16 h, 冷至室温, 加入四氢呋喃(50 mL)后过滤, 所得固体粗品(35 g)加至少量水中, 高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)纯化, 得到啶虫脒半抗原(acetamiprid half antigen, ATPA)(如图 1 所示)。采用 EDC 法合成。称取 ATPA 5 mg, EDC 12 mg, NHS 7 mg, 用 300 μL DMF 溶解(称为 A 液), 室温搅拌反应 4~6 h。称取 10 mg BSA, 溶解于 2 mL 硼酸缓冲溶液中(称为 B 液), 在室温条件, 逐滴将 A 液加入到 B 液中, 室温反应过夜, 即得偶联物 ATPA-EDC-BSA 混合液, 半抗原与蛋白摩尔为 100:1, 透析并用 MALDI-TOF-MS 进行鉴定。包被抗原 ATPA-EDC-OVA 合成与 ATPA-EDC-BSA 方法一致, 半抗原与蛋白摩尔为 60:1。

1.3.2 单克隆抗体获得

(1) 动物免疫

取 4 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠进行免疫, 前 3 次免疫采取皮下多点注射, 每次间隔 28 d。每次每只小鼠抗原免疫用量为 25 μg , 初次免疫用等量弗氏完全佐剂乳化, 第

2 次和第 3 次免疫用等量弗氏不完全佐剂乳化, 第 4 次免疫用等量生理盐水混合, 腹腔注射。第 2 次免疫后 10 d 尾静脉采血, 通过间接法测抗体效价, 以此确定是否有针对小分子的抗体生成, 最后选择抗体效价较高的小鼠用于细胞融合。融合前 3 d 用抗原直接加强免疫 1 次。

(2) 啶虫脒单克隆抗体的制备

从液氮中取出冻存细胞骨髓瘤细胞进行复苏, 制备免疫脾细胞, 用 PEG 将分离得到的脾细胞与提前复苏备用的骨髓瘤细胞进行细胞融合, 用 HAT 的细胞培养液吹打成单细胞悬液, 铺入 96 孔细胞培养板。细胞融合后第 7 d, 培养板孔底长出肉眼可见的克隆, 首先通过 ELISA 间接法对所有细胞孔进行初次筛选, 记录呈现强阳性的细胞孔; 对初筛呈阳性的各细胞孔应及时在 24 孔细胞培养板中进行扩大培养, 采用有限稀释法进行杂交瘤细胞克隆化。取 6 周龄健康雌性小鼠, 腹腔注射 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个杂交瘤细胞, 7~10 d 收集腹水, 腹水离心上清, 硫酸铵沉淀法后继续采用 Protein G 小柱进行纯化。

1.3.3 胶体金试纸条制备与优化

胶体金的制备: 量取超纯水于烧杯中, 加入 1% 的氯金酸溶液, 置于恒温磁力搅拌器上搅拌混匀, 开启加热至溶液沸腾, 迅速加入新制备的 1% 柠檬酸三钠溶液, 继续搅拌加热, 溶液逐渐变为蓝黑色, 然后紫黑, 再加热出现红色, 继续煮沸出现透明的橙红色, 继续煮沸 7~10 min, 自然冷却至室温, 加超纯水定容。倒入棕色瓶, 4 °C 避光保存。

取 1.5 mL 制取的胶体金溶液, 用 0.1 mol/L 的碳酸钾调节 pH, 加入相应量抗体, 混合均匀, 室温反应 40 min。加入 1% PEG, 反应 30 min, 加入 10% 的 BSA 终止, 静置 30 min。先用 1500 r/min 低速离心, 弃去由凝聚的金胶粒形成的沉淀。然后用 8500 r/min 高速离心 30 min。仔细吸去上清, 沉淀物用胶体金溶液复溶, 4 °C 保存。将包被抗原稀释至适当浓度划于 T 线烘干, 羊抗鼠二抗划于 C 线烘干, 标记好的胶体金喷于预处理过的金标垫烘干。为实现最佳的检测灵敏度、稳定性与显色效果, 优化标记体系 pH、抗体添加量、金标抗体用量、T 线抗原包被浓度、样品垫处理液中离子浓度、BSA 浓度、吐温-20 浓度、蔗糖浓度。

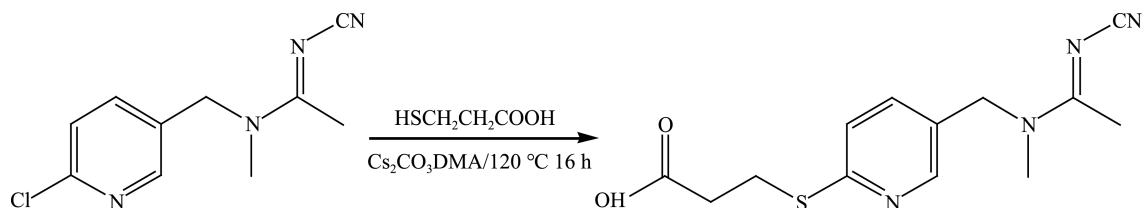


图 1 啶虫脒半抗原合成路线

Fig.1 Synthesis route of acetamiprid hapten

将一定浓度的包被抗原作为 T 线(测试线)和羊抗鼠二抗(C 线, 质控线)分别包被在金标结合垫上和 NC 膜上, 根据层析方向由下至上, 将样品垫、金标结合垫、NC 膜、吸水垫依次黏于聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)衬板上(如图 2 所示)。将组装好的试纸条切成 3 mm 宽的试纸条, 室温干燥条件保存。

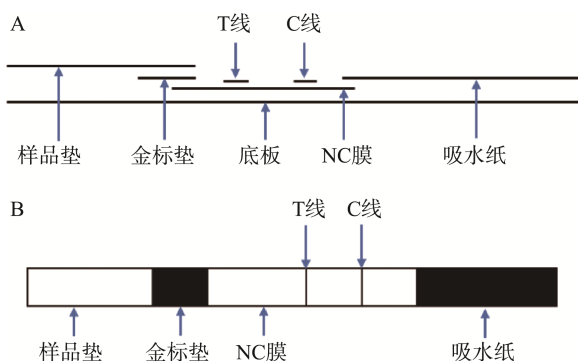


图 2 试纸条侧面(A)和正面(B)示意图

Fig. 2 Side sketch (A) and front sketch (B) of strip

1.3.4 检测步骤及定量定性检测

取待测溶液加至试纸条的加样孔中, 室温反应 5 min, 对于无待测物的阴性样本, 检测线 T 上的检测抗原会捕获金标抗体, 形成一条红色的检测线 T, C 线的羊抗鼠免疫球蛋白(immune globulin, IgG)会捕获剩余的金标抗体, 形成红色的 C 线。对于含有待测物的阳性样本, 金标抗体会优先与待测物结合, 导致 T 线的显色强度随着待测物浓度的增加而变浅。当试纸条的 C 线无色, 结果无效。采用金标读数仪读取试纸条 T 线和 C 线的信号值并进行计算, 对比试纸条的 T/C 值以及抑制率进行优化选择。抑制率(Y , %)按公式(1)计算:

$$Y/\% = \frac{B_0 - B_X}{B_0} \times 100\% \quad (1)$$

式中: B_0 为阴性样品 T 线和 C 线信号强度比值; B_X 为阳性样品 T 线和 C 线信号强度比值。

1.3.5 试纸条性质测定

准确性: 通过空白样本加标回收实验评价所建立方法的精密度和准确度。具体操作如下: 对空白样本按质量浓度为 10 ng/mL 和 25 ng/mL 进行加标, 采用最佳工艺制备完成的胶体金免疫试纸条方法检测上述加标样品, 重复 5 次。

特异性: 配制质量浓度为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 多菌灵、噻虫嗪、烯酰吗啉、腐霉利、霜霉威标准溶液, 阴性样本为不加标的缓冲液, 均用建立的噻虫脒胶体金免疫试纸条进行测定。

稳定性: 为了评价试纸条的稳定性和重复性, 将同一批制备完成试纸条, 对加标样品的质量浓度分别为 50、100 和 200 ng/mL 的阳性和阴性样品进行检测, 重复 5 次, 并分析 T/C 值。

1.3.6 实际样品测定

5 种蔬菜(花菜、青瓜皮、丝瓜皮、豇豆、秋葵)样品购自农贸市场, 分别添加噻虫脒标准品溶液(5、20、100 $\mu\text{g/kg}$), 称 1 g 碎叶(蔬菜、瓜果皮), 加 5 mL 的甲醇, 振荡提取后, 50 μL 的样品处理上清与 450 μL 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)混合检测, 吸取 200 μL 用胶体金免疫试纸条进行检测, 通过加标回收率以及变异系数对该法的准确性进行评价。

1.4 数据处理

通过 Excel 2024 对相关数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 ATPA 衍生物的合成及全抗原的鉴定

为了验证噻虫脒免疫抗原是否制备成功, 对其进行了 MOLDI-TOF 鉴定, 如图 3(a)和(b)所示。色谱图中有一处强

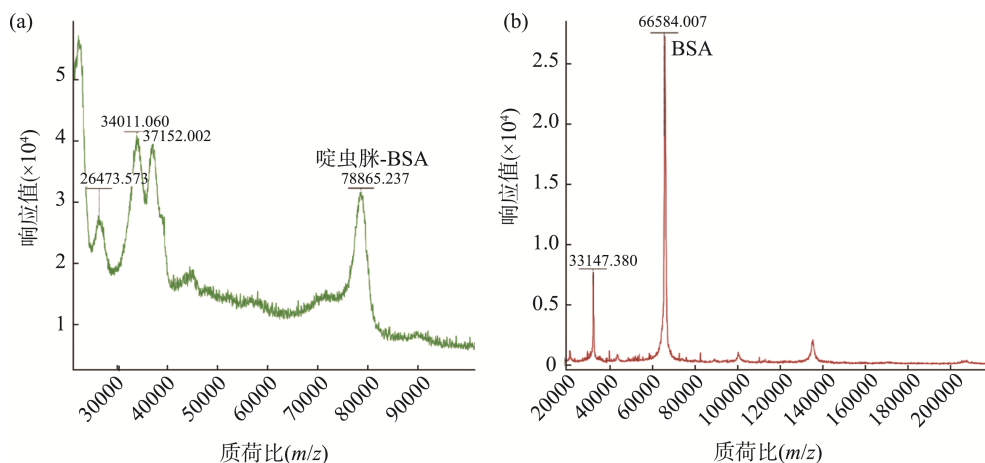


图 3 噻虫脒免疫抗原的 MALDI-TOF 鉴定

Fig.3 MALDI-TOF identification of acetamidine immune antigen

信号峰, 根据偶联物与 BSA 的质荷比(m/z)的差值以及对应组分(啮虫脘)的相对分子质量, 计算出偶联值约为 1:55。

2.2 抗体的生产与金标抗体的选择

2.2.1 啮虫脘杂交瘤细胞的筛选与抗体的获得

采用啮虫脘单抗竞争抑制检测, 啮虫脘竞争质量浓度分别为 0.000、0.001、0.010、0.100、0.500、1.000、10.000 $\mu\text{g/mL}$, 分别进行单克隆杂交瘤细胞株的建立, 共融合 M220061、M220243、M230043 3 只血清效价达到 81K 并有明显抑制的小鼠, 二次融合筛选稳定的阳性细胞株, 并建立阳性单克隆杂交瘤细胞株 10 株。制备并收集 9 株小鼠腹水, 经离心、过滤、亲和层析、透析、冻干后, 纯化单克隆抗体, 以啮虫脘-BSA (1 $\mu\text{g/mL}$)为包被抗原, 采用 ELISA 间接法测定抗体效价, 间接竞争法测定其抗体性质。共建立 5 株效价达至少为 81K 稳定产抗的单克隆细胞

株(见表 1), 9 株抗体来源及亚型鉴定, 抗体的重链免疫球蛋白 G1 (IgG1), 免疫球蛋白 G2a (IgG2a)和轻链(λ), 其中 8 株为 IgG1 类抗体, 1 株为 IgG2a 类抗体。选择竞争效果较好的 2#和 6#杂交瘤细胞株制备单克隆抗体。其中 2#, 4#, 6#, 8# 的竞争抑制效果较好, 灵敏度低于 0.5 $\mu\text{g/mL}$, 且效价较高。

2.2.2 试纸条制备

选取配对效果好的抗体抗原, 对划膜浓度、胶体金标记等条件进行优化, 最终选择颗粒大的胶体金波长 523~524 nm, 每 1.5 mL 的胶体金加 0.1 mol/L 碳酸钾溶液 20 μL , 抗体标金浓度按照最终标记质量浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 进行标记, 反应 30 min, 加 10% BSA 100 μL 封闭, 反应 30 min 后, 5000 r/min 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 min, 弃上清后复容, 喷金 1.0 $\mu\text{L/cm}$ 37 $^{\circ}\text{C}$ 干燥 12 h。二抗 C 线羊抗鼠质量浓度均为 0.5 mg/mL, 划膜抗原 FY079-BSA, T 线划膜质量浓度为 0.25 mg/mL,

表 1 单抗竞争抑制检测
Table 1 Competitive inhibition assay of monoclonal antibody

抗体号	抗体稀释度(1000)	啮虫脘质量浓度/ $(\mu\text{g/mL})$								效价	细胞株号	亚型
		0.000	0.001	0.010	0.100	0.200	0.500	1.000	10.000			
1#	27K	0.3873	0.3272	0.339	0.3107	0.2398	0.2862	0.2918	0.2515	<27K	1 C4 A2 H7	IgG1, λ
	81K	0.2927	0.2717	0.2866	0.2693	0.2760	0.2355	0.2536	0.2689			
	243K	0.2413	0.2224	0.2423	0.2414	0.2300	0.1952	0.2039	0.2726			
2#	27K	2.3539	2.3106	2.3358	2.0668	1.8919	1.3895	1.0519	0.4361	243K	2 D5 B8 F9	IgG1, λ
	81K	1.5242	1.7730	1.7589	1.2870	1.0490	0.7117	0.5025	0.3174			
	243K	0.8237	1.0397	0.9848	0.6503	0.5519	0.4149	0.3352	0.2972			
4#	27K	1.7172	1.6521	1.6889	0.9847	0.8894	0.5343	0.4211	0.2728	243K	2 G12 E2 F12	IgG1, λ
	81K	1.0803	1.1177	0.9674	0.4804	0.3282	0.2313	0.1873	0.1915			
	243K	0.4833	0.4879	0.4304	0.2323	0.1661	0.1317	0.1178	0.1625			
5#	27K	0.5087	0.5754	0.6533	0.5074	0.3790	0.3030	0.2622	0.1962	27K	3 A2 G6 F2	IgG2a, λ
	81K	0.2674	0.2555	0.2844	0.2815	0.1869	0.1548	0.1683	0.1688			
	243K	0.1624	0.1489	0.1554	0.1519	0.1164	0.1171	0.1507	0.1537			
6#	27K	1.3854	1.3302	1.4804	1.2108	1.1215	0.7902	0.5995	0.3452	81K	8 D12 H9 C5	IgG1, λ
	81K	0.6204	0.6624	0.7741	0.5232	0.4498	0.3155	0.2600	0.2008			
7#	243K	0.2616	0.2956	0.3315	0.2303	0.1970	0.1618	0.1575	0.1468	27K	6 C11 H9 B12	IgG1, λ
	27K	0.4197	0.4399	0.4298	0.2948	0.2387	0.1994	0.1923	0.1703			
	81K	0.1947	0.2167	0.2336	0.2114	0.1576	0.1379	0.1455	0.1245			
8#	243K	0.1407	0.1367	0.1335	0.1431	0.1153	0.1234	0.1087	0.1398	81K	6 H9 H1 F1	IgG1, λ
	27K	1.3698	1.5304	1.3812	0.7620	0.5327	0.3155	0.2789	0.2356			
	81K	0.6559	0.7739	0.666	0.3054	0.2361	0.1614	0.1632	0.1509			
9#	243K	0.3021	0.3348	0.2750	0.1769	0.1322	0.1159	0.1230	0.1410	27K	6 A3 B4 B6	IgG1, λ
	27K	0.5155	0.5062	0.5573	0.3613	0.3079	0.2366	0.2285	0.1885			
	81K	0.2395	0.2234	0.2506	0.2186	0.1690	0.1449	0.1340	0.1547			
10#	243K	0.1507	0.1544	0.1520	0.1403	0.1227	0.1213	0.1006	0.1282	243K	2 G5 H11 A5	IgG1, λ
	27K	1.6849	1.7138	1.7465	1.7522	1.6931	1.5364	1.3956	0.6653			
	81K	1.0456	1.0905	1.3439	1.1950	1.1489	0.8223	0.6651	0.2883			
	243K	0.5027	0.5177	0.6722	0.6008	0.5333	0.3690	0.2870	0.1737			

取 1 μL 湿金划膜。在进行测试时, 阴性对照使用的是含有 10% 甲醇的 PBST 缓冲液, 而阳性对照则分别使用 0.2、0.5 mg/kg 的啶虫脒进行测试。如图 4 所示, 单抗与划膜 BSA 结合的效果比较好, 其中阴阳性显色最好的是 2# 抗体最佳, 200 mg/kg 基本抑制, 其次 6# 单抗, 200 mg/kg 明显有线, 500 mg/kg 基本抑制。最终选择 2# 抗体作为后续抗体制备胶体金试纸条。

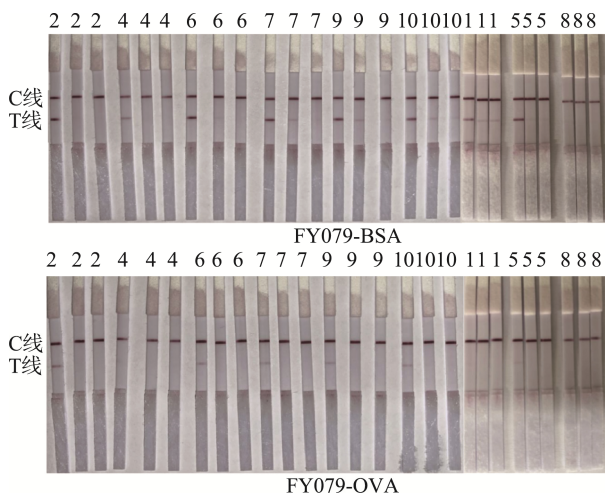


图 4 FY079-BSA 和 FY079-OVA 划膜抗体对比
Fig.4 Comparison of FY079-BSA and FY079-OVA membrane scratching antibodies

2.3 试纸条性能评价

2.3.1 灵敏度

配制一系列不同浓度啶虫脒标准品稀释液(0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、20.0、35.0、50.0 μg/kg), 用于试纸条检测。检测的 T/C 值分别为 0.55、0.43、0.39、0.30、0.20、0.16、0.09、0.06、0.04。如图 5 所示, 随着啶虫脒浓度的增加, 肉眼观察到 T 线显色逐渐变浅。在最佳实验条件下, 根据浓度及 T/C 值绘制标准曲线, 其线性范围为 0.42~18.38 μg/kg, 最低检出限为 0.23 μg/kg。该试纸条配合呈色分析仪检测灵敏度较高, 满足啶虫脒检测要求。

2.3.2 特异性

采用不同浓度(0.5、1.0 μg/kg)的多菌灵、噻虫嗪、烯酰吗啉、腐霉利、霜霉威标准溶液, 评价胶体金免疫试纸条检测啶虫脒的特异性。结果如表 2 所示, 测定值与阴性值一致, 说明无交叉反应率, 啶虫脒试纸条具有良好的特异性。

2.3.3 准确性

采用建立的胶体金免疫试纸条方法检测蔬菜中的啶虫脒的质量浓度, 以验证本方法的实用性。采用胶体金免疫试纸条的方法, 啶虫脒的加标回收率为 78%~98%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于等于 6.74%, 结果见表 3, 说明此方法具有良好的实用性, 准确度能达到检测要求, 可用于实际样本检测。



图 5 啶虫脒的标准曲线的测定
Fig.5 Determination of the standard curve of acetamiprid

表 2 啶虫脒胶体金试纸条特异性和交叉反应性结果(n=3)
Table 2 Results of specificity and cross reactivity of acetamiprid colloidal gold test strips (n=3)

T/C 值	阴性	多菌灵		噻虫嗪		烯酰吗啉		腐霉利		霜霉威	
		0.5 μg/kg	1.0 μg/kg	0.5 μg/kg	1.0 μg/kg	0.5 μg/kg	1.0 μg/kg	0.5 μg/kg	1.0 μg/kg	0.5 μg/kg	1.0 μg/kg
卡 1	0.387	0.386	0.442	0.407	0.416	0.402	0.394	0.398	0.398	0.416	0.415
卡 2	0.382	0.409	0.392	0.398	0.419	0.410	0.402	0.409	0.420	0.418	0.411
卡 3	0.408	0.401	0.394	0.380	0.373	0.414	0.407	0.395	0.418	0.385	0.393
平均值	0.392	0.399	0.410	0.395	0.403	0.409	0.401	0.401	0.412	0.406	0.406
检测值/阴性值	1.000	1.018	1.040	1.007	1.028	1.043	1.023	1.023	1.051	1.036	1.036

表 3 空白样本加标回收实验结果(n=5)
Table 3 Results of spiked recovery experiments on blank samples (n=5)

检测目标	批内	添加值/(ng/mL)	检测值/(ng/mL)	回收率/%	RSDs/%
啶虫脒	卡 1	10	8.90	89	6.48
	卡 2	10	8.53	85	
	卡 3	10	7.81	78	
	卡 4	10	9.33	93	
	卡 5	10	8.56	86	
	卡 1	25	20.76	83	6.74
	卡 2	25	24.41	98	
	卡 3	25	21.84	87	
	卡 4	25	22.38	90	
	卡 5	25	20.85	83	

表 4 啶虫脒的稳定性实验(n=3)
Table 4 Stability experiment of acetamiprid (n=3)

批内	浓度	卡 1	卡 2	卡 3	卡 4	卡 5	平均值	标准差	CVs/%≤15%	批间 CVs/%
第一批次(T/C)	阴性	0.4392	0.4237	0.3852	0.3981	0.3995	0.4091	0.0218	5.33	7.21
第二批次(T ₀ /C ₀)	阴性	0.5402	0.4249	0.4994	0.4728	0.4125	0.4700	0.0528	11.20	
第三批次(T ₁ /C ₁)	阴性	0.5520	0.5862	0.5767	0.5434	0.6178	0.5752	0.0295	5.10	
第一批次(T/C)	50 ng/mL	0.1427	0.1750	0.1944	0.1588	0.1560	0.1654	0.0199	12.00	9.90
第二批次(T ₀ /C ₀)	50 ng/mL	0.1682	0.1867	0.2242	0.1881	0.1820	0.1898	0.0208	10.90	
第三批次(T ₁ /C ₁)	50 ng/mL	0.1498	0.1662	0.1766	0.1686	0.1532	0.1629	0.0111	6.80	
第一批次(T/C)	100 ng/mL	0.0738	0.0616	0.0626	0.0614	0.0768	0.0672	0.0074	11.10	11.03
第二批次(T ₀ /C ₀)	100 ng/mL	0.0654	0.0703	0.0843	0.0669	0.0792	0.0732	0.0082	11.20	
第三批次(T ₁ /C ₁)	100 ng/mL	0.0785	0.0887	0.0753	0.0906	0.0703	0.0807	0.0087	10.80	
第一批次(T/C)	200 ng/mL	0.0217	0.0240	0.0272	0.0291	0.0256	0.0255	0.0029	11.20	9.80
第二批次(T ₀ /C ₀)	200 ng/mL	0.0231	0.0205	0.0191	0.0212	0.0189	0.0205	0.0017	8.30	
第三批次(T ₁ /C ₁)	200 ng/mL	0.0280	0.0275	0.0297	0.0228	0.0254	0.0267	0.0026	9.90	

注: T/C 值(第一批次); T₀/C₀ 值(第二批次); T₁/C₁ 值(第三批次)。

表 5 不同蔬菜样品的加标回收率实验(n=3)
Table 5 Recovery rates of different vegetables with addition experiment (n=3)

样品	标准品浓度/(μg/kg)	胶体金试纸条		
		均值/(μg/kg)	回收率/%	RSDs/%
花菜	0.15	0.12	80.0	2.5
	0.30	0.21	70.0	9.3
	0.60	0.46	76.7	7.8
青皮瓜	0.15	0.12	80.0	7.2
	0.30	0.22	73.3	2.8
	0.60	0.49	81.7	4.2
丝瓜皮	0.15	0.12	80.0	4.8
	0.30	0.21	70.0	8.0
	0.60	0.48	80.0	3.5
豇豆	0.15	0.13	86.7	5.8
	0.30	0.24	80.0	6.1
	0.60	0.53	88.3	2.4
秋葵	0.15	0.13	86.7	4.7
	0.30	0.23	76.7	6.3
	0.60	0.48	80.0	6.4

2.3.4 稳定性

为了评价试纸条的稳定性和重复性, 将同一批制备完成试纸条, 对加标样品的质量浓度分别为 50、100 和 200 ng/mL 的阳性和阴性样品进行检测, 重复 5 次, 并分析 T/C 值。此外, 还选择了不同批次(n=3)的试纸进行测定间实验, 以确保结果的重现性。通过分析 T/C、T₀/C₀、T₁/C₁ 的测定结果进行实验间实验, 以确保结果的稳定性。测定批内和批间实验的变异系数(coefficient of variation, CV)分别低于 12.00%和 11.03%, 如表 4 所示, 表明使用该方法定量啶虫脒具有可重复性和良好的稳定性。

2.3.5 实际样品检测

将啶虫脒的标准品加入到 5 种蔬菜基质中, 对加标回收率进行分析。如表 5 所示, 结果表明, 检测的回收率 70.0%~88.3%, RSDs 为 2.4%~9.3%。结果证实了胶体金试纸条检测的可靠性。表明该胶体金试纸条可用于果蔬的快速检测。

3 结论

本研究开发了一种可用于果蔬快速定量检测试纸条。借助呈色分析仪, 建立了 T/C 值与啶虫脒浓度检测线性关系。并且应用于多种样品基质进行了实际应用测试, 结果表明该方法具有良好的精密度, 验证了其在不同样品中的适用性。该方法具有成本效益高、灵敏度和特异性高、操作简单、回收率高, 检测时间短等优点。尤其在大量样品检测中, 能快速准确定量分析, 提高检测的效率。该试纸具有广泛的市场应用潜力, 适合日常快速检测的需要。

参考文献

[1] SHARMA KK, TRIPATHY V, SHARMA K, et al. Long-term monitoring of 155 multi-class pesticide residues in Indian vegetables and their risk

- assessment for consumer safety [J]. *Food Chemistry*, 2022, 373: 131518.
- [2] RAMADAN MFA, ABDEL-HAMID MMA, ALTORGOMAN MMF, *et al.* Evaluation of pesticide residues in vegetables from the Asir Region [J]. *Molecules*, 2020, 25(1): 205.
- [3] FAN JC, JUN AN. Occurrence and exposure risk assessment of pesticide residues in green tea samples cultivated in Hangzhou area [J]. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 2023, 16(1): 8–13.
- [4] SANTOS DMD, LANAS FM, VIEIRA EM, *et al.* Neonicotinoids exposure assessment in Africanized honey bees (*Apis mellifera* L.) by using an environmentally-friendly sample preparation technique followed by UPLC-MS/MS [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2022, 57(4): 252–262.
- [5] ZHANG Z, CHEN Q, HUANG H, *et al.* Ultrasensitive immunoassay for the determination of imidacloprid in medicinal herbs [J]. *Analytical Letters*, 2023, 56(11): 1843–1855.
- [6] LIAO GH, JIN X, CHEN WL, *et al.* Application of high performance liquid chromatography in detection of imidacloprid and acetamiprid residue in tea [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2011, 4: 130–133.
- [7] 石绪根. 棉蚜对吡虫啉抗性机理的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2012.
- SHI XG. Study on the mechanisms of imidacloprid resistance in cotton aphid, *Aphis gossypii* (Glover) [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2012.
- [8] CHEN S, DENG J, DENG Y, *et al.* Influencing factors and kinetic studies of imidacloprid degradation by ozonation [J]. *Environmental Technology*, 2019, 40(16): 2127–2134.
- [9] PANG S, LIN Z, ZHANG Y, *et al.* Insights into the toxicity and degradation mechanisms of imidacloprid via physicochemical and microbial approaches [J]. *Toxics*, 2020, 8(3): 65.
- [10] TAO Y, PHUNG D, DONG F, *et al.* Urinary monitoring of neonicotinoid imidacloprid exposure to pesticide applicators [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 669: 721–728.
- [11] JESCHKE P, NAUEN R, SCHINDLER M, *et al.* Overview of the status and global strategy for neonicotinoids [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(7): 2897–2908.
- [12] VAN-DIJK TC, VAN-STAALDUINEN MA, VANDER-SLUIJS JP. Macro-invertebrate decline in surface water polluted with imidacloprid [J]. *PLoS One*, 2013, 85: e62374.
- [13] SHENG W, SUN M, BAI D, *et al.* Colorimetric and photothermal double-model immunochromatographic assay based on MoS₂@Au nanocomposite for high sensitive detection of imidacloprid in food [J]. *Microchemical Journal*, 2024, 201: 110637.
- [14] LI D, DONG H, LI Z, *et al.* Novel cross-linkable fluorescent probe with oriented antibody to enhance lateral immunoassay strip for the detection of acetamiprid [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2024, 476: 134935.
- [15] ZHANG B, PAN X, VENNE L, *et al.* Development of a method for the determination of 9 currently used cotton pesticides by gas chromatography with electron capture detection [J]. *Talanta*, 2008, 75(4): 1055–1060.
- [16] BALAYIANNIS GP, KARASALI H. Determination of azoxystrobin, topramezone, acetamiprid, fluometuron and folpet in their commercially available pesticide formulations by liquid chromatography [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2021, 56(5): 503–511.
- [17] 戴华, 李拥军, 张莹, 等. 稻谷中吡虫啉农药残留量的固相萃取高效液相色谱测定[J]. *分析测试学报*, 2002, 21(1): 3.
- DAI H, LI YJ, ZHANG Y, *et al.* Determination of imidacloprid in rice by solid phase extraction-HPLC [J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2002, 21(1): 3.
- [18] 吴俐勤, 吴声敢, 刘宇, 等. 高效液相色谱测定吡虫啉的残留研究[J]. *现代科学仪器*, 2003(1): 4.
- WU LQ, WU SG, LIU Y, *et al.* Residue study of imidacloprid by HPLC [J]. *Modern Scientific Instruments*, 2003(1): 4.
- [19] LEE HS, KIM SW, ABDEI-ATY AM, *et al.* Liquid chromatography–tandem mass spectrometry quantification of acetamiprid and thiacloprid residues in butterbur grown under regulated conditions [J]. *Journal of Chromatography B*, 2017, 1055: 172–177.
- [20] FU D, ZHANG Y, ZHANG S, *et al.* Validation and application of a QuEChERS-based method for estimation of the half-lives of cyromazine and acetamiprid in cowpeas and soil by LC-ESI-MS/MS [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2022, 102(3): 650–666.
- [21] LIU Q, HE Q, ZHANG S, *et al.* Toxic effects of detected pyrethroid pesticides on honeybee (*Apis mellifera ligustica* Spin and *Apis cerana cerana* Fabricius) [J]. *Scientific Reports*, 2022, 12(1): 16695.
- [22] LIU G, RONG L, GUO B, *et al.* Development of an improved method to extract pesticide residues in foods using acetone with magnesium sulfate and chloroform [J]. *Journal of Chromatography A*, 2011, 1218(11): 1429–1436.
- [23] AMBRUS Á, DOAN VVN, SZENCZI-CSEH J, *et al.* Quality control of pesticide residue measurements and evaluation of their results [J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 954.
- [24] ELSHABRAWY MS, KHORSHID MA, HAMDY-ABDELWAHEED M, *et al.* Optimization and evaluation of four multi-residue methods for the determination of pesticide residues in orange oil using LC-MS/MS and GC-MS/MS: A comparative study [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2023, 103(16): 4061–4078.
- [25] FANG Q, ZU Q, HUA X, *et al.* Quantitative determination of acetamiprid in pollen based on a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1265.
- [26] 毛金竹, 肖淑玲, 杨智淳, 等. 合成生物学在农残检测领域的应用[J]. *化工学报*, 2021, 72(5): 13.
- MAO JZ, XIAO SL, YANG ZC, *et al.* Application of synthetic biology in pesticides residues detection [J]. *CIESC Journal*, 2021, 72(5): 13.
- [27] SUN J, LIU W, HE Z, *et al.* Novel electrochemiluminescence aptasensor based on AuNPs-ABEI encapsulated TiO₂ nanorod for the detection of acetamiprid residues in vegetables [J]. *Talanta*, 2024, 269: 125471.
- [28] DONG S, HE K, YANG J, *et al.* A simple mesoporous silica Nanoparticle-based aptamers SERS sensor for the detection of acetamiprid [J]. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2022, 283: 121725.
- [29] XU C, LIN M, SONG C, *et al.* A gold nanoparticle-based visual aptasensor for rapid detection of acetamiprid residues in agricultural products using a smartphone [J]. *RSC Advances*, 2022, 12(9): 5540–5545.
- [30] 赵颖, 杨斌, 柳颖, 等. 吡虫啉金标免疫速测试纸条研制及其在茶叶中的应用[J]. *农药学报*, 2016, 18(3): 7.
- ZHAO Y, YANG B, LIU Y, *et al.* Development and application of gold immunostrip for the detection of acetamiprid residue in tea samples [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2016, 18(3): 7.
- [31] 王彘婕, 冯德建, 冯双, 等. 吡虫啉和啉虫脒胶体金免疫层析法试纸条性能评估及应用效果探究[J]. *食品安全质量检测学报*, 2024, 15(3): 133–140.
- WANG YJ, FENG DJ, FENG S, *et al.* Performance evaluation and application effect study of colloidal gold immunochromatographic test strips for imidacloprid and acetamiprid [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2024, 15(3): 133–140.

(责任编辑: 韩晓红 蔡世佳)