

## 固相抗体直接竞争 ELISA 法测定 小白菜和苹果中的甲萘威残留

刘曙照<sup>1\*</sup> 冯大和<sup>2</sup> 钱传范<sup>3</sup> Sergei A. Erem in<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>扬州大学植物保护系, <sup>2</sup>扬州大学理化测试中心, 扬州 225009)

(<sup>3</sup>中国农业大学应用化学学院, 北京 100094)

(<sup>4</sup>Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, 119899 Moscow, Russia)

**摘 要** 采用固相抗体直接竞争 ELISA 法测定小白菜和苹果中的甲萘威残留量, 并以高效液相色谱法进行验证。结果表明: ELISA 法测定小白菜和苹果中甲萘威残留的检测限为 0.4 ng/kg; 样本中添加 0.1 mg/kg 和 10.0 mg/kg 甲萘威标样, 以该法测定的回收率分别为 80.9%~116% 和 86.7%~96.3%, 变异系数分别为 9.62%~16.9% 和 7.34%~11.4%; 实际样本中甲萘威残留 ELISA 测定的变异系数为 6.89%~10.3%, 符合残留分析的要求。方法简便快速, 测定结果与高效液相色谱法测定结果基本一致。

**关键词** 甲萘威; 小白菜; 苹果; 残留; 酶联免疫吸附测定(ELISA)

甲萘威(carbaryl)是广谱、高效、低毒氨基甲酸酯类杀虫剂, 用于防治稻、麦、棉、蔬菜、果树的多种害虫和畜禽外寄生虫, 与有机磷农药混用对多种农业害虫有明显的增效作用<sup>[1]</sup>。80年代以来通过对甲萘威毒副作用的研究发现, 甲萘威能引起哺乳动物肝脏微粒体酶的变化<sup>[2]</sup>; 抑制 HL-2 依赖型 T 细胞的增值<sup>[3]</sup>; 离体培养下引起大型粒状淋巴细胞免疫功能的改变<sup>[4]</sup>; 长期接触甲萘威可引起亚慢性神经毒性<sup>[5]</sup>。甲萘威及其复配制剂的广泛应用, 使环境和食品, 特别是新鲜蔬菜、水果中残留频率不断增加<sup>[6]</sup>。现有甲萘威残留分析方法主要有光谱分析法<sup>[7]</sup>和色谱分析法<sup>[8,9]</sup>。由于氨基甲酸酯类农药热稳定性差, 难以直接用气相色谱分析。光谱和高效液相色谱(HPLC)分析对样品前处理要求高且灵敏度有限。本研究采用固相抗体直接竞争 ELISA 法测定小白菜和苹果中的甲萘威残留, 方法简便快捷、特异性强、灵敏度高, 样品容量大, 分析成本低廉。

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂与材料

99% 甲萘威(carbaryl)标样(成都化学试剂厂); 98% 克百威(carbofuran)(江苏太仓金龙集团); 90% 混灭威(dimethacarb)原油(常州农药厂); 95% 灭多威(methomyl)原粉(无锡惠山农药厂); 对甲萘威具特异性亲和力的抗体、辣根过氧化物酶标记甲萘威半抗原(自制)<sup>[10]</sup>; 磷酸盐缓冲液(PB): 0.02 mol/L, pH 6.8 和 pH 7.6; 封闭液、底物液、终止液(参见文献[10]); 40 孔酶标板(浙江黄岩); 8 孔酶标条(NUNC 公司); 丙酮、二氯甲烷、氯仿、正己烷为分析纯, 重蒸; 乙腈为色谱纯。Sep-pak 硅胶柱(Millipore 公司)。

\* 通讯联系人

国家自然科学基金(29977028)国际合作项目(中国-俄罗斯)

## 1.2 主要仪器设备

484 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);低温冰箱, - 30 (日本三洋);DG-1 酶标仪(华东电子管厂);HH-8 恒温水浴(常州国华仪器厂);TGLL-18B 高速冷冻离心机(江苏太仓医疗器械厂);ZQF85A 旋转蒸发仪(上海医械专机厂);DY89-1 型高速匀浆器(宁波新芝科器研究所);加液器:丹麦产 0~ 50  $\mu\text{L}$  单道可调,芬兰产 20~ 200  $\mu\text{L}$ 、50~ 1000  $\mu\text{L}$  单道可调,德国产 20~ 200  $\mu\text{L}$  八道可调。

## 1.3 试验方法

1.3.1 甲萘威固相抗体直接竞争 ELISA 法的建立与方法特异性的考察 抗体用 pH7.6 磷酸盐缓冲液(PB)稀释成 6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被酶标板,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,以阴性血清作对照,4 吸附过夜。吸干,洗板 3 次,加封闭液 150  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,37 保温 1.5 h。吸干,洗板 3 次,吸干,4 保存备用。将甲萘威用乙腈溶解成 1 mg/mL 储备液,然后用 pH6.8 PB 稀释成  $10^5 \sim 10^{-3}$  ng/mL 的标样系列,酶标半抗原稀释 3 000 倍。将不同浓度的甲萘威标样(或样本)溶液分别与酶标半抗原溶液 1:1 混合后加入用抗体包被好的酶标板,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,以 pH6.8 PB 为对照,37 反应 1.5 h。吸干,洗板 3 次,加底物液 100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,37 反应 10 min。加终止液 50  $\mu\text{L}/\text{孔}$ ,在酶标仪上测定光密度 OD<sub>490</sub>。计算不同浓度甲萘威对抗体与酶标半抗原结合的抑制率( $I\%$ ), $I = 100[\text{OD}_{490(\text{ck})} - \text{OD}_{490(\text{样})}] / \text{OD}_{490(\text{ck})}$ 。以抑制率为纵坐标,甲萘威标样浓度为横坐标绘制标准曲线。以抑制率( $I$ )对甲萘威浓度( $\log C$ )进行回归分析,计算抑制中浓度( $\text{IC}_{50}$ )和检测限( $\text{IC}_{20}$ )。在相同条件下测定常用氨基甲酸酯类杀虫剂和甲萘威主要代谢产物  $\alpha$ -萘酚的  $\text{IC}_{50}$ ,甲萘威的  $\text{IC}_{50}$  与被测物  $\text{IC}_{50}$  的百分比为该被测物与抗体的交叉反应率。交叉反应率越低,对甲萘威分析的干扰越小。在实际样本测定时,用空白样本提取液代替 pH6.8 PB 稀释甲萘威标样,建立标准工作曲线,同时测定样本提取液对抗体与酶标半抗原结合的抑制率,根据标准工作曲线计算样本中甲萘威的含量。

1.3.2 样本处理 在小白菜 *B. brassica chinensis* 4 叶期用含 19% 甲萘威和 1% 氰戊菊酯的复配剂稀释 150 倍均匀喷雾;在苹果收获前一个月用相同复配剂稀释 200 倍喷雾,分别设清水对照,用药后 7 d 取样,分别测定小白菜和苹果中的甲萘威残留。

1.3.3 小白菜和苹果中甲萘威残留的提取与净化 程序:50 g 样品加 95 mL 丙酮和 5 mL 水,于匀浆器中高速匀浆 2 min,振荡 5 min。匀浆液经铺有双层滤纸和助滤剂 Celite 的布氏漏斗抽滤,用丙酮洗涤容器和滤渣 3 次,每次 20 mL。合并滤液于分液漏斗中,加 4% 硫酸钠 400 mL,用二氯甲烷萃取 3 次,每次 50 mL,弃水相。合并萃取液,无水硫酸钠脱水后在旋转蒸发器上于 30 浓缩至约 2 mL,残余二氯甲烷用氮气吹干,用 5 mL 正己烷溶解残渣,过 Sep-pak 硅胶柱,30 mL 正己烷淋洗,7 mL 氯仿洗脱。氮气吹除氯仿,用 1 mL 乙腈溶解后 HPLC 分析,或将该乙腈溶液用 pH6.8 PB 稀释 10 倍用于 ELISA 测定。程序:10 g 样品加 18 mL 乙腈和 2 mL 水,于小型匀浆器中匀浆,浆液经铺有双层滤纸和助滤剂 Celite 的小型布氏漏斗抽滤,用乙腈洗容器和滤渣 3 次,每次 5 mL。合并滤液于分液漏斗中,加 4% 硫酸钠 80 mL,用二氯甲烷萃取 3 次,每次 10 mL,弃去水相。合并萃取液,经无水硫酸钠脱水后在旋转蒸发器上于 30 浓缩至约 2 mL,残余二氯甲烷用氮气吹干,用 1 mL 乙腈溶解,再用 pH6.8 的 PB 稀释 10 倍用于 ELISA 测定。

1.3.4 样本基质干扰的考察 分别按程序 和程序 提取空白样本,所得提取液用 pH6.8 PB 稀释不同倍数后用于配制甲萘威标样系列,建立甲萘威分析工作曲线,比较其与甲萘威

EL ISA 标准曲线的吻合程度。

1.3.5 标准添加回收率测定和方法验证 分别在未使用过甲萘威的小白菜和苹果样本中添加甲萘威 0 100 mg/kg、10 0 mg/kg, 然后按程序 处理, 用于 HPLC 和 EL ISA 分析, 按程序 处理用于 EL ISA 测定, 计算回收率。HPLC 分析采用化学键合 C18 柱, 流动相为乙腈 水= 4 1, 流速 1 mL/m in, 紫外检测波长 282 nm。比较 EL ISA 和 HPLC 分析结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 甲萘威 EL ISA 分析标准曲线及方法的特异性

甲萘威分析标准曲线见图 1。固相抗体直接竞争 EL ISA 法测定甲萘威的线性浓度范围是  $10^{-5}$ ~ $10^{-3}$   $\mu\text{g/mL}$ 。经回归分析, 甲萘威抑制抗体-酶标半抗原结合的百分率( $I$ )对甲萘威浓度( $\log C$ )的回归方程为  $I = 9.46 \log C + 73.6$ , 相关系数 0.9951, 抑制中浓度( $IC_{50}$ )为 3.06 ng/mL, 检测限( $IC_{20}$ )为 0.02 ng/mL。经测定, 常用氨基甲酸酯类杀虫剂克百威、混灭威、灭多威和  $\alpha$ -萘酚与抗体的交叉反应率分别为 0.022%、0.004%、 $< 0.001\%$  和 0.476%, 不干扰甲萘威的测定。甲萘威半抗原与抗体的交叉反应率为 245%, 但甲萘威半抗原属实验室合成物, 不可能存在于实际样本中。

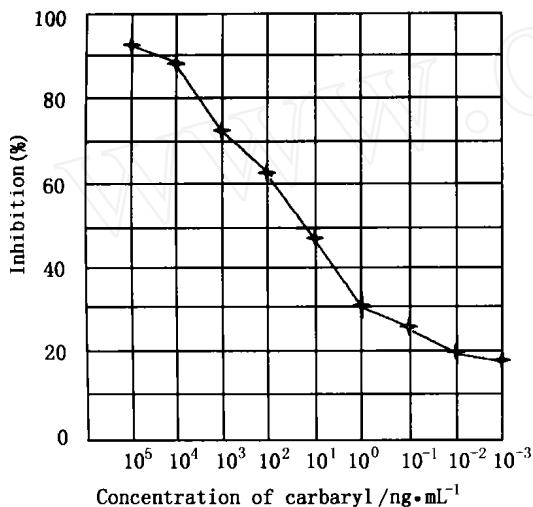


Fig. 1 EL ISA standard curves of carbaryl

### 2.2 小白菜和苹果基质对 EL ISA 和 HPLC 分析的影响

按程序 1、程序 2 提取的空白样本溶液对 EL ISA 的干扰情况见图 2。从图 2 可以看出: 程序 1

空白样本提取液经过 Sep-pak 柱层析净化, 稀释适当倍数(乙腈含量低于 10%)后对 EL ISA 基本无影响, 程序 2 省去了层析净化步骤, 空白样本提取液稀释 10 倍对 EL ISA 分析亦基本无影响。程序 1 提取净化后的标准添加样本浓缩液可用于 HPLC 分析, 但程序 2 提取浓缩液对 HPLC 分析的干扰严重, 不能直接进样分析。

### 2.3 小白菜、苹果中甲萘威残留 EL ISA 与 HPLC 分析结果的比较

程序 1 提取的标准添加小白菜、苹果样本, 按 1.3.5 HPLC 条件进行测定, 同时按 1.3.1

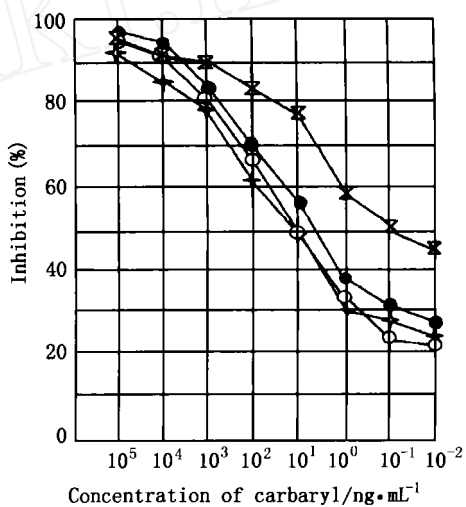


Fig. 2 Influence of sample substrate on EL ISA of carbaryl

- × Procedure ① no dilution
- Procedure ② 10 times dilution
- ↑ Procedure ① 10 times dilution
- Standard curve

试验样本 EL ISA 条件测定。程序 提取的样本只用于 EL ISA 分析。实际样本的前处理和分析与标准添加样本相同, 以空白样本为对照, 结果见表 1。

Table 1 The comparison of carbaryl content in *B. rassaica chinensis* and apple determined by EL ISA and HPLC

| Type of sample               | Procedure of sample preparation | Spiked /mg · kg <sup>-1</sup> | Results (n= 4)              |       |              |       |        |       |
|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------|--------------|-------|--------|-------|
|                              |                                 |                               | Found/mg · kg <sup>-1</sup> |       | Recovery (%) |       | CV (%) |       |
|                              |                                 |                               | EL ISA                      | HPLC  | EL ISA       | HPLC  | EL ISA | HPLC  |
| <i>B. rassaica chinensis</i> | CK                              | 0 100                         | 0 107                       | 0 114 | 107          | 114   | 11. 2  | 16. 2 |
|                              |                                 | 10 0                          | 8 96                        | 8 25  | 89. 6        | 82. 5 | 9. 06  | 12. 1 |
|                              |                                 | 0 100                         | 0 081                       | /     | 80. 9        | /     | 10. 5  | /     |
|                              |                                 | 10 0                          | 8 67                        | /     | 86. 7        | /     | 8. 47  | /     |
|                              | Sample                          | /                             | 0 78                        | 0 67  | /            | /     | 10. 3  | 9. 76 |
|                              |                                 | /                             | 0 75                        | /     | /            | /     | 6. 89  | /     |
| Apple                        | CK                              | 0 100                         | 0 116                       | 0 106 | 116          | 106   | 16. 9  | 14. 2 |
|                              |                                 | 10 0                          | 9 63                        | 9 05  | 96. 3        | 90. 5 | 11. 4  | 9. 39 |
|                              |                                 | 0 100                         | 0 100                       | /     | 99. 6        | /     | 9. 62  | /     |
|                              |                                 | 10 0                          | 8 85                        | /     | 88. 5        | /     | 7. 34  | /     |
|                              | Sample                          | /                             | 0 45                        | 0 42  | /            | /     | 9. 26  | 12. 4 |
|                              |                                 | /                             | 0 41                        | /     | /            | /     | 8. 45  | /     |

从表 1 可以看出: 小白菜、苹果中分别添加甲萘威 0.100 mg/kg、10.0 mg/kg, 按程序 提取净化, EL ISA 法测定的回收率为 89.6% ~ 116%, 变异系数为 9.06% ~ 16.9%。HPLC 法测定的回收率为 82.5% ~ 114%, 变异系数为 9.39% ~ 16.2%。EL ISA 与 HPLC 测定结果基本吻合。按程序 进行样本处理供 EL ISA 分析, 不需要层析净化, 降低了分析成本, 加快了分析速度, 其标准添加回收率为 80.9% ~ 99.6%, 变异系数为 7.34% ~ 10.5%。实际样本和标准添加样本分析结果趋势一致, 方法的灵敏度、准确度和精密度符合残留分析的要求。此外, EL ISA 法对甲萘威的最低检测浓度为 0.4 ng/mL, 样品容量大, 可多个样本同时分析。HPLC 法的最低检测浓度为 50 ng/mL, 一次进样只能分析一个样品。表明 EL ISA 法具有特异性强, 灵敏度高, 简便快捷, 分析成本低, 不需要贵重仪器等优点, 进一步开发成试剂盒, 可用于大量样品的快速检测。

## 参 考 文 献

- 1 王振荣, 李布青主编 商品农药大全, 北京, 中国商业出版社, 1996: 231~ 233
- 2 Lechner D. W., Abdelz-Rahman M. S. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1985, 14: 451~ 457
- 3 Casale G. P., Vennerstrom J. L., Bavari S. *et al. Immunopharmacol Immunotoxicol.*, 1993, 15: 199 ~ 215
- 4 Bavari S., Casale G. P., Gold Q. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1991, 17(1): 61~ 74
- 5 Branch R. A., Jacqz E. *Am. J. Med.*, 1986, 80: 741~ 745

- 6 Schattenberg H. J., Hsu J. P. *J. AOAC Int*, 1992, 75: 925~ 933
- 7 Yanez-Sedeno P., Nova N. C., Polodiez L. M. *Microchem. J.*, 1988, 38: 370~ 375
- 8 Wallbank B. E. *J. Chromatogr.*, 1981, 208: 301~ 311
- 9 McGarvey B. D. *J. Chromatogr.*, 1993, 642: 89~ 105
- 10 刘曙照, 冯大和, 钱传范 *农药学学报*, 1999, 1(1): 62~ 68

## The Residue of Carbaryl in *B. brassica chinensis* and Apple Determined by Method of Antibody-Immobilized Direct Competitive ELISA

Liu Shuzhao<sup>1\*</sup> Feng Dahe<sup>2</sup> Qian Chuanfan<sup>3</sup> Sergei A. Erem in<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Department of Plant Protection, <sup>2</sup>Testing Center, Yangzhou University, Yangzhou 225009)

(<sup>3</sup>College of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094)

(<sup>4</sup>Faculty of Chemistry, M. V. Lomonosov Moscow State University, 119899 Moscow, Russia)

**Abstract** The method of antibody-immobilized direct competitive ELISA was developed to monitor the residue of carbaryl in *B. brassica chinensis* and apple. The results showed that the limit of detection was 0.4 ng/kg, the recoveries were 80.9%~116% and 86.7%~96.3%, the CVs were 9.62%~16.9% and 7.34%~11.4% at 0.100 mg/kg and 10.0 mg/kg spiking levels respectively. For the ELISA of carbaryl residue in real samples, the CVs were 6.89%~10.3%. The ELISA method is simple and rapid, the results from ELISA were well correspondent with those from HPLC.

**Key words** Carbaryl; Residue; *B. brassica chinensis*; Apple; ELISA

## 本 刊 声 明

为适应我国信息化建设的需要,实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,本刊已加入“CNKI期刊全文数据库”(《中国学术期刊(光盘版)》和《中国期刊网》全文数据库)及“万方数据——数字化期刊群”,因此,凡本刊录用的稿件,将一律编入数据库,提供网络信息服务,其作者著作权使用费包含在本刊所付稿酬中,不再另付。

如有不同意者,请在来稿中注明。

中国期刊网 <http://www.chinajournal.net.cn>

万方数据——数字化期刊群

<http://www.chinaInfo.gov.cn/periodical>

《农药学学报》编辑部