

蔬菜水果中百菌清镧系高敏荧光检测卡的制备和应用

蔡雨芯¹, 童兰艳^{1*}, 肖昭竞¹, 李根容¹, 龚迎昆¹, 章健², 李明伟²

(1. 重庆市计量质量检测研究院, 国家农副加工及调味品质量检验检测中心, 重庆 401123)

(2. 成都微瑞生物科技有限公司, 四川成都 611731)

摘要: 百菌清单抗与稀土镧系荧光纳米微球通过竞争法供价偶联, 合成荧光标记免疫探针, 开发了一种现场定量检测百菌清的高敏荧光检测卡, 建立了蔬菜水果中百菌清快速定量检测的荧光免疫分析方法。实验筛选了具有高灵敏度和特异性的百菌清抗原抗体, 优化了纳米荧光微球与百菌清单抗的标记条件、百菌清抗原在硝酸纤维膜上包被浓度、稀释复溶液配方等条件。研制的荧光免疫层析试纸条, 与荧光检测仪配套使用, 样品前处理有机溶剂用量少。该研究确定最优实验条件为: 抗体 0.05 mg/mL, NC 膜上百菌清抗原包被质量浓度 0.8 mg/mL、pH 值 7.2 的 PBS 缓冲液 (甲醇体积分数 8%), 并建立标准曲线, 方法线性范围为 2~100 ng/mL, 检出限为 0.2 mg/kg, 与常用类型农药交叉反应率 <1%。在基质限量加标水平下, 百菌清的加标回收率为 85%~98%, 产品批内相对标准偏差为 8%~12%, 批间精密度 11%~17%, 加标样品的检测结果与气相色谱法无显著性差异。结果表明该研究建立的高敏荧光分析方法具有速度快、准确性好、特异性强、灵敏度高、绿色环保的特点, 适用于蔬菜水果中百菌清的现场快速定量筛查。

关键词: 百菌清; 镧系纳米荧光微球; 免疫层析; 快速定量检测; 蔬菜水果

文章编号: 1673-9078(2025)01-310-319

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.1.1515

Preparation and Application of A Highly Sensitive and Rapid Lanthanide Fluorescent Quantitative Detection Card for the Determination of Chlorothalonil in Fruits and Vegetables

CAI Yuxin¹, TONG Lanyan^{1*}, XIAO Zhaojing¹, LI Genrong¹, GONG Yingkun¹, ZHANG Jian², LI Mingwei²

(1.Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, National Center of Quality Supervision & Inspection Agricultural Processed Products and Condiments, Chongqing 401123, China)

(2.Chengdu Weirui Bio Technology Co. Ltd., Chengdu 611731, China)

Abstract: The competition method was used to couple a monoclonal antibody against chlorothalonil with the rare lanthanide fluorescent nanobeads through competitive coupling, and a fluorescently labeled immunoprobe was synthesized. A highly sensitive and rapid lanthanide fluorescent quantitative detection card for chlorothalonil was developed. The experimental conditions were screened to select a monoclonal antibody with high sensitivity and specificity, and optimize the labeling conditions of the nanobeads and the monoclonal antibody, the coating concentration of the antigen on the nitrocellulose membrane, the dilution and reagent solution formula, etc. The self-developed fluorescent immunochromatographic test strip, when used in conjunction with a fluorescence detector, can reduce the amount of organic solvent used in sample pretreatment. The optimal experimental conditions were determined to be: antibody 0.05 mg/mL, NC membrane chlorothalonil antigen coating mass concentration 0.8 mg/mL, pH 7.2 PBS buffer solution (8% methanol volume fraction), and a standard curve was established. The method linear range was 2~100 ng/mL, the detection limit was 0.2 mg/kg, and the cross-reactivity with commonly used pesticides was <1%.

引文格式:
蔡雨芯,童兰艳,肖昭竞,等.蔬菜水果中百菌清镧系高敏荧光检测卡的制备和应用[J].现代食品科技,2025,41(1): 310-319.

CAI Yuxin, TONG Lanyan, XIAO Zhaojing, et al. Preparation and application of a highly sensitive and rapid lanthanide fluorescent quantitative detection card for the determination of chlorothalonil in fruits and vegetables [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(1): 310-319.

收稿日期: 2023-12-19

基金项目: 重庆市市场监督管理局科研计划项目 (CQSKJ2022032); 重庆市技术创新与应用发展专项重点项目 (CSTB2023TIAD-KPX0066)

作者简介: 蔡雨芯 (1995-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 食品安全技术研究, E-mail: laurelcc0717@sina.com

通讯作者: 童兰艳 (1988-), 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 食品安全技术研究, E-mail: 2297245296@qq.com

earth europium fluorescent nanospheres to synthesize a fluorescent labeled immune probe. This probe was used with a highly sensitive and rapid lanthanide fluorescent immunochromatography card for the rapid quantification of chlorothalonil in vegetables and fruits through an immunoassay. In this study, a high sensitivity and specificity chlorothalonil antigen was selected, and the labelling conditions of fluorescent nanospheres and chlorothalonil, coating concentration of flufenicomumab antigen on NC membrane, and proportion of diluted complex solution were optimized. The fluorescence test strip developed in this study was used in conjunction with a fluorescence detector and pre-treatment with low-dosage organic solvent. Herein, the optimum experimental condition were the concentration of antigen was 0.05 mg/mL, and the concentration of antibody was 0.8 mg/mL, the pH of PBS working buffer was 7.2 (8% methanol). A standard curve was established, and the linear range of the method was 2~100 ng/mL with a detection limit of 0.2 mg/kg. The strip detection of chlorothalonil had strong specificity without any cross reaction observed in certain pesticides. The recovery rate of thiamethoxam was 85~98%, the intra-batch precision was 8%~12%, and the inter-batch precision was 11%~17%. There was no significant difference between the results of actual samples and the national standard method. The rapid time-resolved fluorescence assay developed in this study is fast, accurate, highly sensitive, and green and environmentally friendly, making it suitable for rapid and quantitative screening of chlorothalonil in food of plant origin.

Key words: chlorothalonil; lanthanide based fluorescent nanospheres; fluorescence immuno-chromatography; rapid quantitative detection; fruits and vegetables

百菌清, 四氯间苯二甲腈, 是一种高效、低毒的非内吸性广谱有机氯杀菌剂, 对多种作物的真菌病害有良好的预防作用, 被广泛应用于蔬菜、果树、经济作物和豆类、水稻、小麦等作物及森林等多种作物病害的防治^[1-4]。其作用机理是与真菌细胞中的三磷酸甘油醛脱氢酶发生作用, 破坏酶活性, 使真菌细胞的新陈代谢受破坏而失去生命力。工业上百菌清作为防霉涂料、添加剂, 涂在船舶上防治水藻等^[5]。百菌清对植物体具有良好的黏着性, 使得百菌清及其代谢产物在果蔬、土壤及水中均有较大的残留^[6,7], 直接对生态环境和人类健康造成严重危害, 甚至在北极地区也能检测到百菌清残留^[8,9]。百菌清在土壤中经光、酶或微生物等作用后转化为羟基百菌清, 其毒性和稳定性增加, 能溶于水, 这将对环境和食品安全造成更严重的威胁。因此, 很多国家都高度重视百菌清残留污染问题, 国家标准 GB 5749-2022《生活饮用水卫生标准》将百菌清规定为水源水、饮用水的必检项目^[10], 且在国家 GB 2763-2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》规定不同蔬菜、水果中百菌清的最大残留限量^[11], 限量在 0.2~20 mg/kg 范围内。

百菌清的检测方法主要有气相色谱法^[12,13]、高效液相色谱法^[14]、质谱联用分析法等^[15-17]。色谱法、质谱法需配备大型仪器、专业技术人员, 仅适用于实验室检测, 检测周期长、成本高、操作复杂, 不适用于保质期短、市场流通速度快的蔬菜水果等农产品质量安全保障。因此简单快速、低成本、易于

操作的快速现场检测方法逐渐受到大家关注, 百菌清的快速检测方法主要有酶联免疫法、胶体金免疫层析法、放射免疫分析等^[18-20]。镧系高敏荧光免疫层析是结合时间分辨荧光免疫分辨技术和层析技术建立起来的超微量快速免疫检测技术^[21,22], 搭配荧光分析仪可实现自动化检测, 具有灵敏度高、特异性强、稳定性好、检测成本低、操作简单和无放射性等优点^[23-26], 适合大规模样品的快速筛查与现场检测。目前, 镧系高敏荧光免疫技术应用于蔬菜水果中百菌清的分析研究尚未见报道。

本文基于镧系纳米荧光微球与百菌清单抗偶联技术开发高敏荧光检测卡, 建立用于快速定量检测蔬菜水果中百菌清的荧光免疫分析法。该方法即具有胶体金免疫层析法简单、方便、快捷等优点, 又具有酶联免疫吸附法敏感、特异、微量的优点, 不需要专业技术人员, 设备小巧便于携带, 具有良好的实用性和应用前景。

1 材料与方法

1.1 原料

1.1.1 试剂与材料

镧系纳米荧光微球 (110 nm), 成都微瑞生物科技有限公司自制; 硝酸纤维膜 (NC 膜), 赛多利斯公司; 玻璃纤维, 美国 Pall 公司; 百菌清单克隆抗体、山羊抗鸡抗体, 杭州启泰生物技术有限公司; 牛血清白蛋白 (Bovine Albumin, BSA)、Tween-20、

磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、2-(N- 吗啡啉) 乙磺酸 (MES)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (分析纯), 国药集团化学试剂有限公司;N- 羟基琥珀酰亚胺、1-(3-二甲氨基丙基)-3- 乙基碳二亚胺盐酸盐 (分析纯), 南京都莱生物技术有限公司; 甲醇 (色谱纯), 北京百灵威科技有限公司; 百菌清 [(100.1±3.0) mg/L], 上海安谱实验科技股份有限公司。

1.1.2 主要仪器设备

WR-1608D 荧光分析仪 (激发波长 415 nm, 发射波长 615 nm), 成都微瑞生物科技有限公司; GC2030 气相色谱仪 (配有电子捕获检测器 ECD), 岛津公司; DCY08-1 样品浓缩仪, 金坛区白塔金昌实验仪器厂; DH100 恒温孵育器, 武汉钟瑞生物科技有限公司; SCADC-180 高速冷冻离心机, 赛默飞世尔科技公司; JY 92-IIN 超声波细胞粉碎机, 宁波新芝生物科技股份有限公司; TST101A-1 恒温鼓风干燥箱, 成都特斯特仪器有限公司。

1.2 高敏荧光快速检测卡的制备

本研究制备的荧光快速检测卡包括利用包埋三价镧- 镧系螯合物的纳米荧光微球作为标记物制备荧光探针、包被膜的制备、标记物的结合及检测卡组装过程, 具体流程如图 1 所示。筛选抗原抗体原

料, 优化包被抗体量、荧光微球使用量比、抗体标记反应条件等制备工艺, 制备出荧光微球偶联抗体复合物 (FM_s-Ab)。优化样品缓冲液、二抗、包被半抗原的稀释倍数以及 FM_s-Ab 的添加量等实验条件, 制备出蔬菜水果中百菌清检测用荧光快速检测卡。

1.3 荧光定量快速检测卡检测原理

组装的百菌清荧光检测试剂卡结构、免疫层析原理、荧光检测仪如图 2 所示。其中标记垫上有纳米荧光微球标记的百菌清单克隆抗体, 纳米荧光微球上的羧基与百菌清单克隆抗体上的氨基通过酰胺键偶联。硝酸纤维素膜上检测线包被有百菌清 -BSA 抗原, 质控线包被有山羊抗鸡抗体, 当处理后的试样加入到样品垫后, 样液会随试纸条侧向层析, 依次流经标记物垫、检测线、质控线, 最终流至吸水纸。若样液中有百菌清, 则会跟标记垫上的百菌清单抗反应, 百菌清越多, 检测线捕获百菌清单抗和纳米荧光微球偶联物越少, 在检测线处形成的荧光信号越弱。若样液中没有百菌清, 则标记垫上百菌清单抗与纳米荧光微球偶联物会随样液流至检测线, 百菌清单抗与荧光微球偶联物会被包被在检测线的百菌清 -BSA 抗原捕获, 此种情况下在检测线 (T 线) 处形成最强的荧光信号。

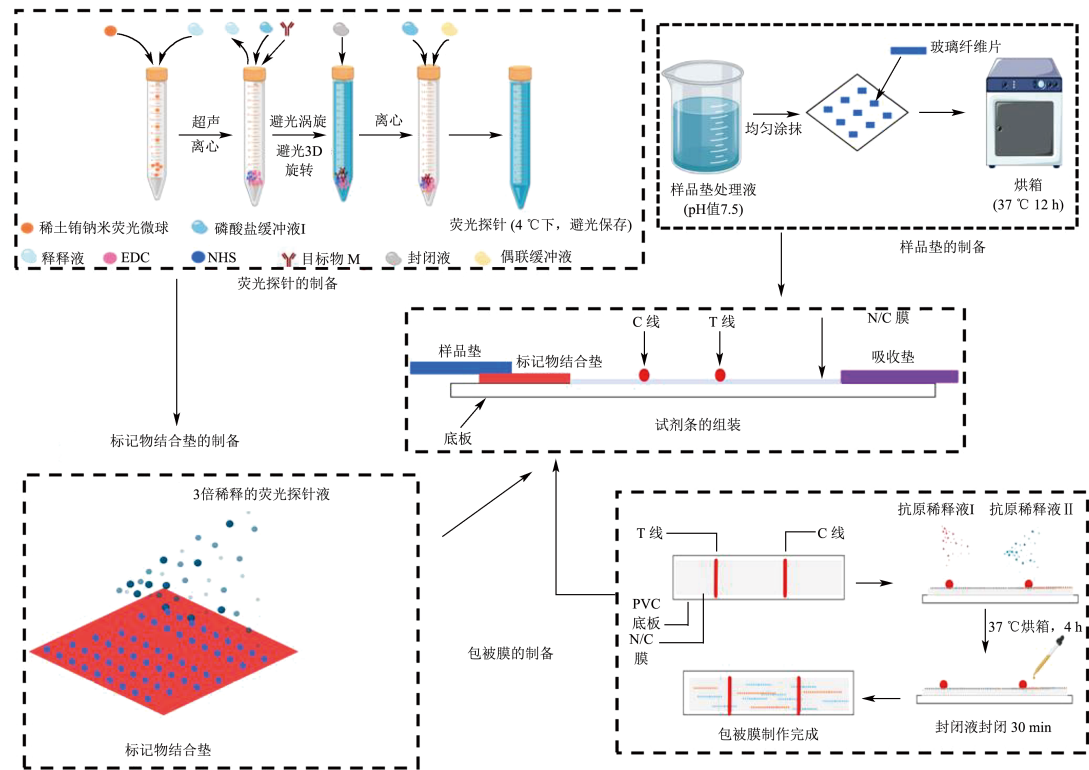


图 1 荧光免疫层析卡制备流程

Fig.1 Preparation process of fluorescence immunoassay cards

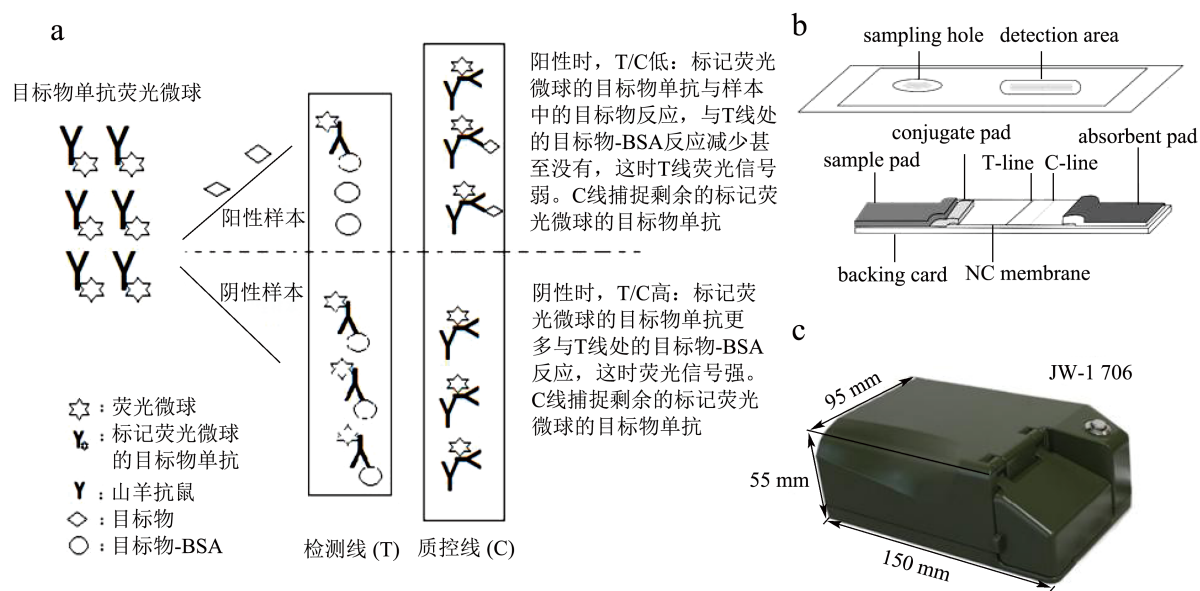


图 2 实验原理图

Fig.2 Schematic diagram of fluorescent immunochromatographic strip

注: (a) 结构示意图, (b) 检测原理图, (c) 小型化的荧光分析仪。

1.4 荧光定量快速检测卡的单因素试验

1.4.1 抗体和抗原筛选

免疫分析法是基于抗体抗原的特异性结合，因此选择合适的抗原抗体十分重要。分别从市场和机构收集 4 家百菌清单抗和 4 家百菌清抗原，4 个厂家抗体代号分别为 AB1、AB2、AB3、AB4，4 个厂家抗原代号分别为 AT1、AT2、AT3、AT4。检测卡的制备按照 1.2 步骤进行，分别将上述抗原抗体交叉配对进行实验，取制备好的检测卡，用样本复溶液配制质量浓度为 10 μg/L 百菌清溶液，取 80 μL 滴卡检测，层析反应 10 min 后将检测卡插入高敏荧光分析仪读数，记录荧光响应强度和 T/C 比值，通过 T/C 比值计算抑制率，抑制率 I 计算见 (1) 式。

$$I = \frac{1-B}{B_0} \times 100\% \tag{1}$$

式中:

I ——抑制率, %;

B ——百菌清标准溶液的 T/C;

B_0 ——溶剂的 T/C。

1.4.2 抗体与荧光微球偶联比优化

检测卡的制备按照 1.2 步骤进行，将百菌清抗体和微球的 (1 mg/mL) 质量浓度比设定为 1:10, 1:20 和 1:40 和 1:80，制备最终相同微球浓度的抗体微球偶联物，分别与包被量为 4 μg/L 的百菌清 -BSA 抗原组合。取制备好的检测卡，用样本复溶液配制

质量浓度为 4 μg/L 的百菌清溶液，取 80 μL 滴卡检测，层析反应 10 min 后将试纸条插入高敏荧光分析仪读数，记录荧光响应强度和 T/C 比值，通过 T/C 比值计算抑制率。

1.4.3 NC膜包被抗原量的优化

检测卡的制备按照 1.2 步骤进行，用百菌清 -BSA 抗原包被 NC 膜，抗原包被量分别为 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mg/mL，与荧光微球抗体偶联物组合，取制备好的检测卡，用样本复溶液配制 4 μg/L 的百菌清溶液，取 80 μL 滴卡检测，层析反应 10 min 后将试纸条插入高敏荧光分析仪读数，记录荧光响应强度和 T/C 比值，通过 T/C 比值计算抑制率。

1.4.4 层析时间的优化

取制备好的检测卡，分别用样本复溶液配制质量浓度为 2.00、4.00、10.00、20.00、50.00、100.00 μg/L 的百菌清溶液，取 80 μL 滴卡检测，设定层析时间分别为 4、6、10、15、20 min，层析反应后将试纸条插入高敏荧光分析仪读数，记录 T/C 比值和 T 线的荧光响应强度 (FI)，并计算抑制率和 T 线变化率，T 线变化率按 (2) 式计算。

$$R = \frac{FI_{T_2} - FI_{T_1}}{T_2 - T_1} \times 100 \tag{2}$$

式中:

FI_{T_1} ——时间为 T_1 时 T 线荧光强度;

FI_{T_2} ——时间为 T_2 时 T 线荧光强度。

1.5 样品前处理

称取剪碎样品 2 g 置于 10 mL 离心管中, 加入 4 mL 稀释液, 涡旋摇匀 2 min, 静置 1 min, 转移上清液, 准确移取 50 μ L 上清液与 950 μ L 复溶缓冲液混合均匀, 即为待测液, 取 80 μ L 待测液滴入试剂卡检测孔, 层析反应 10 min, 立即放入荧光分析仪检测。

1.6 样本复溶液优化

取制备好的检测卡, 将阴性蔬菜、水果基质混匀, 添加 0.2 mg/kg 的百菌清标准溶液作为供试品, 按照 1.5 步骤进行前处理并进行检测。在 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 值为 7.2) 中添加水、PBS, 以及体积分数为 5%、8%、15% 的甲醇作为样本复溶液, 考察不同的样本复溶液结果的差异。

1.7 方法有效性评价

1.7.1 检出限和线性范围评价

用样本复溶液配制质量浓度分别为 2.00、4.00、10.00、20.00、50.00、100.00 μ g/L 的百菌清标准系列溶液。用检测试剂卡对每个浓度点进行两次检测, 取两次检测 T/C 的平均值的 log 值为 x, 浓度的 log 值为 y, 制作标准曲线。取阴性蔬菜水果按照 1.5 处理并检测, 20 份阴性样本测定结果的平均值加上 3 倍标准偏差即为检出限。

1.7.2 一致性、准确度和精密度评价

分别采用本研究建立的方法与, 在阴性蔬菜水果样本 (马铃薯、辣椒、樱桃、苹果、菜用大豆、抱子甘蓝、樱桃番茄、葡萄、番木瓜) 中添加标准曲线范围内低、中、高 3 个浓度 (0、0.5 倍限量浓度和 1 倍限量浓度) 进行精密度和准确度评价。按照 1.5 处理后检测三个添加浓度的 T/C, 按照标准曲线公式计算结果, 根据结果计算回收率和相对标准偏差。一致性分析是同时用荧光免疫法和参比方法 NY/T 761-2008《蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留的测定》对同一样品进行分析, 比较结果的差异性。

1.7.3 特异性评价

用交叉反应率 (CR) 来评价抗体的特异性。将竞争物乙草胺、吡虫啉、毒死蜱、百草枯、甲基对硫磷、克百威、涕灭威、阿维菌素和叶菌唑添加到空白阴性样品中, 按照 1.5 处理后上机测定各竞争物

的半抑制浓度 (IC_{50}), 半抑制浓度计算见 (3) 式。

$$CR = \frac{IC_{50}A}{IC_{50}B} \times 100\% \quad (3)$$

式中:

A——研究对象;

B——竞争物。

1.8 数据分析

流程图采用 Medpeer 绘制, 数据处理采用 Excel 处理, 图标绘制采用 Origin 2018。

2 结果与讨论

2.1 材料荧光光谱扫描分析

用酶标仪对 NC 膜及包被了铜系微球抗体的 NC 膜进行荧光光谱扫描, 结果如图 3 所示, 由图可知该配基的激发光峰值较大, 最佳激发光点图就在 372 nm, 此点的检测信号的信噪比较大, 因此检测最佳激发波长最好远离该点。

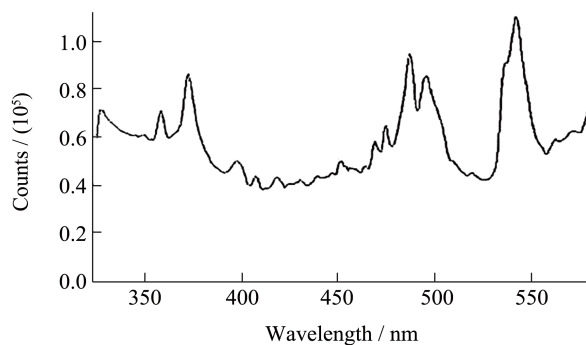


图 3 NC 膜荧光光谱扫描

Fig.3 NC film fluorescence spectrum scanning

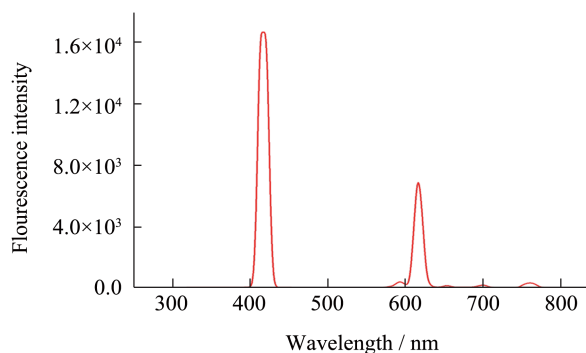


图 4 微球的荧光光谱扫描图

Fig.4 Fluorescence spectrum scan of microspheres

将铜系纳米微球进行全波长荧光光谱扫描, 结果如图 4 所示。由图 4 可知所制微球最佳激发波长

在 412 nm 左右,较市面所售微球的 360 nm 高,而最佳发射波长与市面常规微球一致,均在 616 nm 左右。微球的激发波长在可见光范围内,为检测设备使用 LED 灯管激发提供了技术支持,降低设备使用成本,同时也远离 NC 膜的最佳激发光 372 nm,成功避开 NC 膜带来的荧光干扰。

2.2 纳米荧光微球的形貌分析

通过透射电镜和微球经纳米粒度仪对荧光纳米微球的形貌特征进行表征,结果如图 5 所示。结果表明,微球形态呈圆球形,粒径均一,分散性好。圆球形具有较大表面积,能偶联更多检测抗体,提高免疫反应效率;微球均匀性好,可保证不同批次微球粒径造成的误差减小,批间产品更加稳定;从纳米粒度仪分析结果发现,粒径在 80~140 nm 范围的微球占比超过 85%,可知微球具备良好分散性,使得微球在层析过程中释放完全,信号损失更小,满足对试纸条检测速度和灵敏度的要求。微球经纳米粒度仪检测结果显示微球粒径分布在 100 nm 左右,分布较均衡,近似正态分布,与透射电镜结果一致。

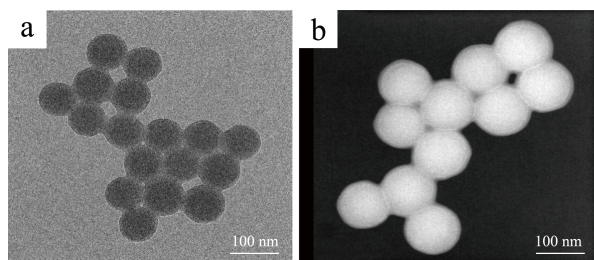


图 5 纳米荧光微球形貌图

Fig.5 Morphology of nanospheres

2.3 百菌清单克隆抗体和百菌清-BSA 抗原筛选

不同厂家抗体和抗原生物效价差异较大,主要表现为抗原抗体亲和力、抗体与百菌清结合灵敏度差异。抗原抗体亲和力越高,产生相同荧光强度所需荧光微球越少,背景干扰越小,制备的检测卡稳定性更好,选择与百菌清结合灵敏高且特异性好的抗体,有助于提高检测灵敏度和准确性。抗原抗体组合筛选结果见图 6,4 号的抗原与 1 号抗体、3 号抗体、4 号抗体结合荧光强度明显高于其余组合,荧光响应值为 $6.7 \times 10^7 \sim 2.3 \times 10^8$,其他组合荧光响应均在 2×10^7 以下,即厂家 4 抗原效价高。用 10 $\mu\text{g/L}$ 百菌清标准溶液对抗体抗原结合进行灵敏度测试试验,实验结果发现 4 号抗体与 4 号抗原结合对百菌清抑制率为 95%,远远大于其他三家产品。抑制率越高,

灵敏度越高,因此选择厂家 4 的抗原抗体原料。

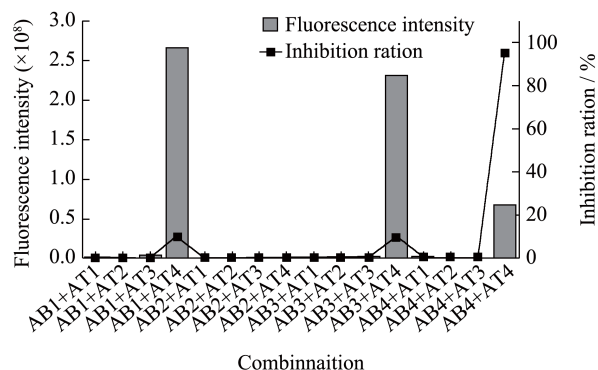


图 6 抗体与抗原筛选结果

Fig.6 Antibody and antigen screening results

2.4 百菌清单克隆抗体与荧光微球偶联比优化

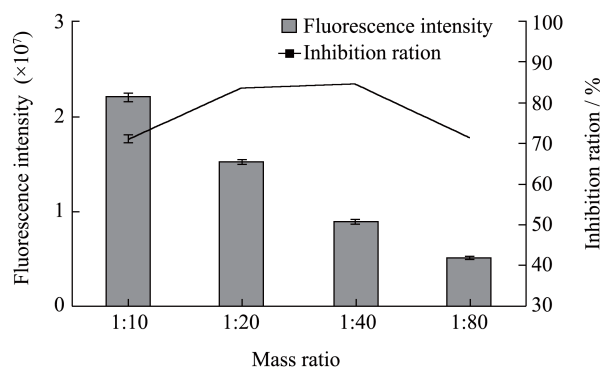


图 7 抗体与荧光微球偶联比对结果的影响

Fig.7 Effect of conjugation ratio between antibody and fluorescent microspheres

百菌清抗体与荧光微球的标记用量比例对试剂卡的灵敏度、信号强度和特异性均有影响。微球表面基团量一定时,抗体过多,荧光强度弱,灵敏度低;抗体过少,偶联效率低;微球过多,标记后单位微球抗体越少,与百菌清-BSA 结合的 FI 越低;如果提高 FI,需要使用更多的单位数量微球,会导致试剂卡背景提高,微球比例过少则会导致假阳性和灵敏度降低。检测结果见图 7,抗体微球偶联比为 1:10 时,FI 最高为 2.2×10^7 ,但抑制率明显低于 1:20 和 1:40。抗体微球偶联比为 1:20 和 1:40 时,抑制率分别为 84% 和 85%,变化不明显,但是 1:20 时的 FI 强度 1.5×10^7 明显高于 1:40 时的 FI 强度 8.8×10^6 ,继续增大微球比例抑制率变化较小,因此选择抗体微球偶联比为 1:20 为最佳偶联比。

2.5 百菌清-BSA 包被 NC 膜量的优化

不同浓度的百菌清-BSA 包被优化结果如图 8

所示。随着百菌清抗原包被浓度的不断增加, FI 不断增强, 当百菌清抗原包被浓度增加到一定量时, FI 增速减慢, FI 不再成比例增加。实验中发现包被质量浓度增强到 0.8 mg/mL 时, FI 信号为 4.3×10^7 , 抑制率达 82%。继续增加抗原包被浓度, FI 增强趋势明显变缓, 且灵敏度提高趋势不明显, 可能是由于过量的包被抗原, 会导致在层析过程中, 样本百菌清竞争优势变弱导致。包被浓度过低, 检测到 FI 的信号较弱, 较弱的 FI 会导致标准曲线线性范围变窄, 同时较弱的 FI 检测时会引进更大的变异系数。考虑经济效益和 C, T 线信号, 最终选择质量浓度为 0.8 mg/mL 作为百菌清 -BSA 抗原的最佳包被浓度。

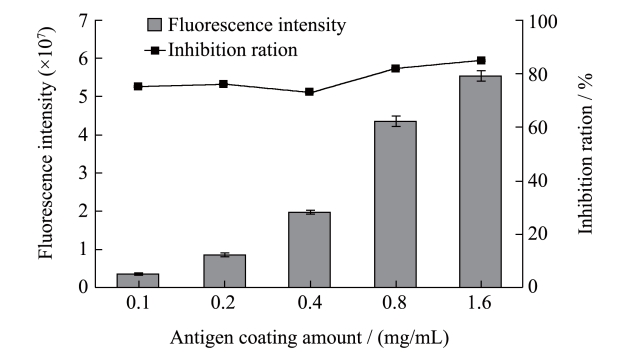


图 8 不同包被抗原质量浓度对结果的影响
Fig.8 Effect of different concentration of coated antigen on the results

表 1 不同层析时间对实验结果的影响

Table 1 Influence of different chromatography time on experimental results				
质量浓度/ (μg/L)	T 线变化率 ×10 ⁷ /(RUF/min)			
	4~6 min	6~10 min	10~15 min	15~20 min
100.00	5	1	0.5	0.3
50.00	5	1	0.5	0.3
20.00	5	1	0.5	0.3
10.00	5	1	0.5	0.3
6.00	5	1	0.5	0.3
4.00	5	1	0.5	0.3
2.00	5	1	0.5	0.3

2.6 层析时间优化

试剂卡从滴液到用荧光仪检测试剂卡的时间段为层析反应时间, 在整个层析过程中, T 线荧光信号和 T/C 比值不断变化, 在层析相对稳定的时间段检测可有效减少误差, 提高检测的准确性。由表 1 和表 2 可知, 检测卡在 4~6 min 的各浓度梯度 T 线变化率较大为 5×10^7 /min 和 1×10^7 /min, 低浓度的抑

制率不稳定; 10~15 min 时间段, 各浓度 T 线变化率为 0.5×10^7 /min, 抑制率均相对稳定, 相对偏差 (CV) 变化不明显。因此在选择层析时间 10 min, 既可以节省快检时间, 又不影响检测准确性。

表 2 不同层析时间对抑制率的影响
Table 2 Effect of different chromatography time on inhibition ratio (n=6)

质量浓度 (μg/L)	抑制率 (CV) /%				
	4 min	6 min	10 min	15 min	20 min
100.00	0.99 (3)	0.99 (2)	0.99 (2)	0.99 (4)	0.99 (2)
50.00	0.98 (4)	0.98 (3)	0.99 (5)	0.99 (3)	0.99 (2)
20.00	0.97 (3)	0.97 (3)	0.97 (3)	0.97 (2)	0.97 (3)
10.00	0.93 (2)	0.94 (4)	0.95 (5)	0.95 (4)	0.95 (2)
6.00	0.94 (4)	0.95 (1)	0.95 (3)	0.95 (3)	0.95 (2)
4.00	0.87 (3)	0.89 (1)	0.90 (2)	0.90 (3)	0.90 (1)
2.00	0.78 (4)	0.82 (3)	0.83 (5)	0.83 (4)	0.84 (3)

2.7 样本复溶液优化

硼酸、磷酸、碳酸、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 等均可作为复溶样本的缓冲溶液, 目的在于使免疫反应处于合适的 pH 值环境和离子强度下, 保持层析过程稳定。由于百菌清微溶于水, 添加一定量的有机溶剂可以提高百菌清在复溶液中的溶解度, 考察了添加水、PBS、[PBS+ 甲醇 +2% tween (质量分数)] 三种不同成分稀释液配制百菌清标准品后滴入试剂卡与空白进行实验对比。结果如表 3 所示, 直接用水作复溶液, 滴入试剂卡后 T 线荧光信号弱, 阳性试样 T/C 与空白试验 T/C 差异不明显, 相对偏差为 30% 以上, 即免疫反应不稳定; PBS (pH 值 7.2) 作为复溶液, 滴入试剂卡后, T/C 比区分相对较好, 试剂卡背景较好, 但检测过程中 C 线跳动较大, 影响结果稳定性; PBS (pH 值 7.2)、甲醇和 tween 作为复溶液, 滴入试剂卡后, T 线荧光信号增强, 背景很好且 TC 比明显。实验还对比复溶液中添加体积分数为 5%、8%、15% 的甲醇对实验结果的影响, 当甲醇体积分数为 15% 时, 会出现层析困难, 导致 NC 膜残留大量荧光微球, 检测结果极不稳定; 甲醇体积分数 5% 和 8% 时检测结果均很稳定, 且重现性良好, 但体积分数为 8% 甲醇含量的复溶液 C 线和 T 线荧光信号强度更高, 因此选择体积分数为 8% 甲醇含量作为样本复溶液的有机溶剂添加剂。

因此, 实验选择 PBS (pH 值 7.2) +8% 甲醇 (体积分数) +0.2% tween (质量分数) 为最佳稀释液样本缓冲液。

表 3 不同复溶液对检测过程T/C比值影响

Table 3 The effect of different compound solutions on the T/C ratio in the detection process (n=10)							
成分	质量浓度/ (μg/L)	C(×10 ⁷) 线 均值	C 线 CV/%	T(×10 ⁷) 线均值	T 线 CV/%	T/C 均值	T/C 的 CV/%
水	4	0.332	18.6	0.032 5	17.5	0.245 8	30
	0	0.175	15.9	0.162	14.6	0.924 5	35
PBS	4	1.00	16.7	0.237	13.5	0.235 1	12
	0	1.61	12.2	1.65	10.2	1.025 4	10
PBS+8% 甲醇 +0.2% tween	4	1.12	8.7	0.228	7.5	0.203 6	10
	0	1.25	6.4	1.78	6.7	1.420 6	9

2.8 方法有效性评价

2.8.1 检出限和线性范围评价

采用建立的方法在最优条件下进行检测，得出标曲线方程为 $y=-0.744\ 5x-0.200\ 9$ ， $R^2=0.994\ 8$ ，相关性良好，见图 9。因此百菌清的线性范围为 2.00~100.00 ng/mL。20 份阴性样本测定结果的平均值加上 3 倍标准偏差即为检出限，得出试剂卡检测百菌清检出限为 0.2 mg/kg。满足国家标准 GB 2763-2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》中蔬菜水果百菌清限量 0.2~20 mg/kg 限量要求。

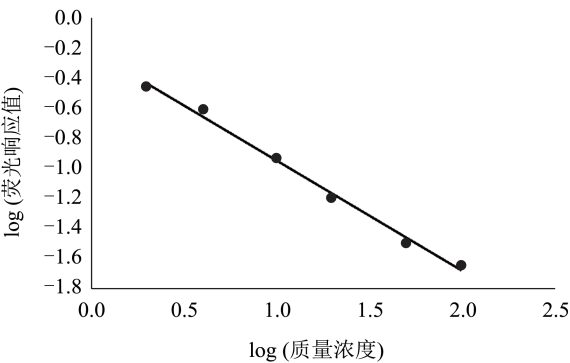


图 9 百菌清线性方程拟合图

Fig.9 Linear equation fitting diagram of chlorothalonil

2.8.2 回收率和精密度评价

选用经参比方法确认的阴性蔬菜、水果基质，百菌清标准溶液加标制成 1 倍限量样品，按照 1.5 进行处理和参比方法同时进行处理，同时进行 10 平行试验，用同批次和不同批次检测卡对同一样品检测。结果见表 4，可知百菌清回收率为 90%~110%，批内精密度 6%~12%，批间精密度 8%~16%，说明实验结果稳定性好。

表 4 方法的回收率和精密度

Table 4 The recovery rate and precision of the method					
样品	添加质量 浓度 (mg/kg)	快检结果 (mg/kg)	回收 率/%	n=10	
				批内偏 差/%	批间差 异/%
马铃薯	0.20	0.18	90	6	8
辣椒	0.30	0.31	103	9	11
樱桃	0.50	0.51	102	5	7
苹果	1.00	1.10	110	8	8
菜用大豆	2.00	2.20	110	10	13
抱子甘蓝	6.00	6.30	105	10	15
樱桃番茄	7.00	7.5	104	11	15
葡萄	10.00	10.5	105	10	10
番木瓜	20.00	20.8	104	9	13

2.8.3 与参比方法一致性分析

选用经参比方法确认的蔬菜水果样品，采用百菌清标准溶液加标的方式制备阳性样品，加标样品设置 1 倍限量加标水平，每个浓度水平各 10 份平行样品，分别用荧光免疫法和参比方法 NY/T 761 进行检测，进行比对，开展两种方法的一致性分析。结果见表 5。国家市场监督管理总局发布的《市场监管总局关于规范食品快速检测使用的意见》（国市监食检规[2023]1 号）中《附件 3 食品快速检测结果验证规范》“第十一条食品快检结果实验室验证的判定要求如下：（1）当快检结果呈阳性，其对应项目的实验室验证结果大于或等于快检检出限（最低检出水平）的最大负偏离（一般情况不超过 20%，对于痕量物质检测时可达 30%）时，则判定为验证通过。（2）当快检结果呈阴性时，实验室验证结果小于快检检出限水平，则判定为验证通过，反之为不通过。”根据该规定，由上述结果可知，本快检

方法与参比方法检测结果一致性完全符合。

表 5 荧光免疫检测与参比方法结果一致性分析
Table 5 Consistency analysis between fluorescence immunoassay and reference methods (n=10)

样品	添加质量浓度/(mg/kg)	NY/T 761-2006 测定平均值/(mg/kg)	快检结果测定平均值/(mg/kg)
马铃薯	0.20	0.22	0.18
辣椒	0.30	0.31	0.31
樱桃	0.50	0.49	0.51
苹果	1.00	0.90	1.10
菜用大豆	2.00	2.10	2.20
抱子甘蓝	6.00	6.25	6.30
樱桃番茄	7.00	7.42	7.5
葡萄	10.00	10.2	10.5
番木瓜	20.00	21.1	20.8

表 6 阴性蔬菜水果不同稀释倍数T/C与复溶缓冲液 T/C比值变化情况
Table 6 T/C ratio of negative vegetables and fruits with different dilution ratios and sample diluents

种类	T/C 比			
	5 倍	10 倍	20 倍	40 倍
马铃薯	0.196 3	0.286 2	0.482 4	1.265 0
辣椒	0.201 8	0.312 5	0.423 1	1.241 6
樱桃	0.064	0.142 6	0.289 3	1.249 0
苹果	0.116 2	0.201 9	0.347 2	1.251 3
菜用大豆	0.203	0.259 3	0.282	1.261 9
抱子甘蓝	0.072 4	0.123 9	0.193 1	1.246 7
樱桃番茄	0.062 7	0.153 6	0.302	1.256 2
葡萄	0.135	0.154 8	0.173 4	1.260 2
番木瓜	0.103 8	0.254 3	0.318 6	1.249 3
样品复溶液	1.301 5			

2.8.4 基质效应评价

样品前处理技术在分析检测中扮演着重要角色，样品经过前处理实现目标物净化、富集或转化为仪器更易识别、检测的化合物，同时也是导致目标物损失的重要因素，决定检测分析的正确性和准确度。蔬菜水果中脂肪酸、有机酸和一些极性色素及糖类色素、油脂、蛋白质、以及其他干扰物，如糖类、有机酸类、酚类等一并被提取出来，检测时干扰荧光检测，产生基质增强或减弱效应。本实验中提取液经复溶缓冲液稀释直接测定，未进行氮吹浓缩、溶剂置换，通过测定阴性样本不同稀释倍数

的 T/C 比值与复溶缓冲液 T/C 比值评价基质效应。选择经参比方法确证阴性蔬菜水果，切碎制样后称取 1 g 样本于 50 mL 的离心管中，分别加入 5、10、20、40 mL 复溶缓冲液，涡旋 2 min，4 000 r/min 离心 3 min，取上清液按 1.5 进行检测，记录 T/C 比值变化。结果见表 6，当稀释倍数达到 40 倍时，不同基质 T/C 比值在 1.241 6~1.265 0 与复溶缓冲液 T/C 比值 1.301 5 接近，基本消除基质影响。

同时，根据每种植物源性食品限量不同，前处理时采用不同的稀释倍数，以满足 GB 2763-2021 中不同基质的不同限量值要求。

2.8.5 特异性评价

抗体的特异性是指与相应抗原或近似抗原物质的识别能力，抗体的特异性高，它的识别能力就强，一般用交叉反应率（CR）来表示。交叉反应性为信号减少至空白样品获得的荧光信号 50% 的点（B/B0 为 50%）对应的交叉反应物的浓度，以此作为能够引起相同程度信号下降的分析浓度的百分比。交叉反应性（%）=（50% B/B0 处分析物浓度）/（50% B/B0 处交叉反应物浓度）×100%。经试验测试，达到空白样品荧光信号 50% 的百菌清浓度为：1 μg/kg，各交叉反应物先按 100 倍百菌清浓度（即质量浓度为 100 μg/kg）添加，测试荧光信号降低至 50% 的情况。本研究选取了噻虫嗪的几种常见类似物进行特异性评价。结果见表 7，本方法与质量浓度为 100 μg/kg 时的乙草胺、吡虫啉、毒死蜱、多菌灵、百草枯、甲基对硫磷、克百威、涕灭威、阿维菌素、叶菌唑等均小于 1%，表明本方法对百菌清有较好的特异性。

表 7 方法的交叉反应实验结果

Table 7 Results of cross-reaction experiments of the method

干扰物	添加质量浓度/(μg/kg)	荧光信号降低情况	交叉反应率/%
乙草胺	100	无	<1
吡虫啉	100	无	<1
毒死蜱	100	无	<1
多菌灵	100	无	<1
百草枯	100	无	<1
甲基对硫磷	100	无	<1
克百威	100	无	<1
涕灭威	100	无	<1
阿维菌素	100	无	<1
叶菌唑	100	无	<1

3 结论

本研究制备了定量检测百菌清的高敏荧光检测卡,优化了检测卡的组份工艺和检测试剂卡的前处理工艺。建立蔬菜水果中百菌清残留的时间分辨荧光免疫法。方法线性范围为2~100 ng/mL,检出限为0.2 mg/kg,与常用类型农药交叉反应率<1%。在基质限量加标水平下,百菌清的加标回收率为85%~98%,产品批内相对标准偏差为8%~12%,批间精密度11%~17%,加标样品的检测结果与气相色谱法无显著性差异。本研究建立现场快速检测方法有机试剂用量少,操作简单、准确可靠、绿色高效。因此本方法可应用于大量样本的筛查和初步定量检测,具有较大的使用价值,为现场执法及重大活动应急提供了技术支撑。

参考文献

- [1] KEINATH A P, HOLMES G J, EVERTS K L, et al. Evaluation of combinations of chlorothalonil with azoxystrobin, harpin and disease forecasting for control of downy mildew and gummy stem blight on melon [J]. Crop Prot, 2007, 26(2): 83-88.
- [2] ALNASIR F M, JIRIES A G, ALRABADI G J, et al. Determination of pesticide residues in selected citrus fruits and vegetables cultivated in the Jordan Valley [J]. LWT, 2020, 123: 109005.
- [3] WANG Z L, YANG L, CHENG P, et al. Adsorption, degradation and leaching migration characteristics of chlorothalonil in different soils [J]. Eur J Remote Sens, 2021, 54 (Suppl.2): 238-247
- [4] ZHEN X M, LIU L, WANG X M, et al. Fates and ecological effects of current-use pesticides (CUPs) in a typical river-estuarine system of Laizhou Bay, North China [J]. Environ Pollut, 2019, 252: 573-579.
- [5] ONDUKA T, KAKUNO A, KONO K, et al. Toxicity of chlorothalonil to marine organisms [J]. Fish Sci, 2012, 78(6): 1301-1308.
- [6] 罗海威,林敏,白欣欣,等.船舶防污杀生剂的水生生物毒性和近海海域分布特征研究进展[J].环境化学,2022, 41(11):3493-3513.
- [7] 张栋.百菌清吡虫啉在甘蓝和小白菜上的沉积消解代谢规律与施用限量研究[D].合肥:安徽农业大学,2021.
- [8] JUNG S M, BAE J S, KANG S G, et al. Acute toxicity of organic antifouling biocides to phytoplankton *Nitzschia pungens* and zooplankton *Artemia* larvae [J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 124(2): 811-818.
- [9] 纪淑娟,郭乃菲,齐小辉,等.高效液相色谱法检测蔬菜中百菌清及其代谢产物的方法研究[J].食品工业科技, 2011,32(7):397-402
- [10] DALY G L, LEI Y D, TEIXEIRA C, et al. Pesticides in western Canadian mountain air and soil [J]. Environ Sci Technol, 2007, 41(17): 6020-6025.
- [11] GB 5749-2022,生活饮用水卫生标准[S].
- [12] GB 2763-2021,食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
- [13] 欧蕾.气相色谱法测定水中百菌清和溴氰菊酯的含量[J].江西化工,2023,39(1):16-19.
- [14] 曹叶中,蔡文.气相色谱法测定果蔬中百菌清残留的方法优化[J].食品安全质量检测学报,2020,11(21):7935-7941.
- [15] CHAVES A, SHEA D, DANEHOWER D. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS [J]. Chemosphere, 2008, 71(4): 629-638.
- [16] 梁建英,谢瑞龙,胡雪,等.气相色谱-串联质谱法测定原料类果酱中百菌清残留量[J].食品安全质量检测学报, 2021,12(21):8620-8624.
- [17] 毕瑞锋,邓锁成,付萌,等.改进的QuEChERS-高效液相色谱-串联质谱法同时测定蔬菜水果中百菌清及其代谢物残留[J].农药学报,2022,24(2):429-434.
- [18] 马琳,赵颖,陈建波,等.基于胶体金免疫层析法快速检测蓝莓中的百菌清残留[J].农药学报,2023,25(2):435-443.
- [19] WATANABE E, MIYAKE S, ITO S, et al. Reliable enzyme immunoassay detection for chlorothalonil: fundamental evaluation for residue analysis and validation with gas chromatography [J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1129(2): 273-282.
- [20] LI X, ZHANG G, LIU Q, et al. Development of immunoassays for the detection of sulfamethazine in swine urine [J]. Food Addit Contam: Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess, 2009, 26(3): 314-325.
- [21] 李媛,毛翔,胡军,等.时间分辨荧光在免疫分析中的应用进展[J].公共卫生与预防医学,2021,32(3):111-116.
- [22] 辛甜甜,郭松林,王艺磊,等.时间分辨荧光免疫分析的新进展[J].理化检验(化学分册),2017,53(1):112-118.
- [23] XU C, LIU X, ZHANG C, et al. Establishment of a sensitive time-resolved fluoroimmunoassay for detection of *Bacillus thuringiensis* cryII toxin based nanobody from a phage display library [J]. Analytical Biochemistry, 2017, 518: 53-59.
- [24] 赵天睿,雷镒妃,许灏钧,等.时间分辨荧光免疫分析的研究进展[J].中国兽医科学,2023,53(4):520-525.
- [25] 杜戎,虞睿宁,袁好,等.基于荧光免疫分析技术的食品中污染物检测方法研究进展 [J].食品工业科技,2021, 42(16):388-396.
- [26] 梁荣良.基于时间分辨荧光微球的免疫分析技术平台的建立及临床应用[D].广州:南方医科大学,2018.