

免疫分析技术在杀菌剂残留检测中的应用*

周映霞^{1,2}, 焦必宁^{1,2}, 潘家荣³

1(西南大学食品科学学院, 重庆, 400716) 2(中国农业科学院柑橘研究所/西南大学柑橘研究所, 重庆, 400712)

3(中国农业科学院农产品加工研究所, 北京, 100193)

摘要 免疫分析技术具有灵敏度高、特异性强、简单快速等优点, 已成为检测食品中杀菌剂残留的一种重要手段。文中简要介绍了免疫分析技术原理, 综述了近年来在杀菌剂残留检测中的应用研究进展, 并对该技术的发展前景作了展望。

关键词 免疫分析, 杀菌剂残留, 检测

杀菌剂是一类用于防治果蔬等农副产品生产中由病原菌引起的植物病害以及用于采后防腐保鲜的农药^[1]。研究发现, 杀菌剂虽对人体的直接毒性不大, 但如果长期摄入, 在体内积累会导致慢性或急性毒性而影响人们的健康^[2]。为保障消费者的健康, 发达国家和国际组织制定了许多杀菌剂在食品中的最大残留限量标准, 并加强对食品农产品中杀菌剂残留的监测^[3]。目前杀菌剂残留的检测主要是采用 GC、HPLC 等仪器分析法, 这些方法存在前处理繁琐、分析周期长、成本高等缺点, 且需要熟练的技术人员, 难以满足简单、快速的现场检测要求。

免疫分析法是将待分析物制备成抗原后免疫动物使之产生抗血清, 利用抗原与抗体的特异性反应, 结合现代测试手段来对待测组分进行定性以及超微量定量分析。与仪器分析法相比, 具有简单、快速、灵敏和特异性强等特点, 近年来备受人们重视, 如美国化学会已将免疫分析与气相、液相色谱同列为农药残留的三大支柱技术^[4], 并已广泛用于杀虫剂、除草剂、植物生长调节剂等农药残留的检测。根据标记物不同, 免疫分析可分为放射免疫技术(RIA)、荧光免疫技术(FIA)、酶免疫技术(EIA)、发光免疫技术(LIA)和金免疫技术(IG)。本文对近年来国内外检测杀菌剂残留常用的免疫分析技术及其应用进展进行了综述, 重点介绍了 EIA 的应用情况, 并对免疫分析技术今后的发展方向进行了讨论。

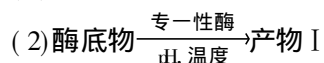
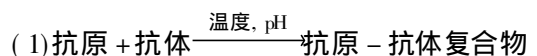
1 放射免疫技术(RIA)

RIA 是 Yalow 和 Berson 于 1956 年首次提出的, 它是一种根据竞争免疫原理把放射性同位素的高度灵敏性与抗原抗体反应的特异性相结合的微量物质分析方法。Centeno 等于 1968 年就将 RIA 应用于 DDT 和马拉硫磷的检测, 这标志着免疫学检测技术正式应用于农药残留检测中。因具有灵敏度高(高达 ng 甚至 pg 水平)、特异性强、精密度好(ng 量物质的回收率接近 100%)、适用范围广等优点, RIA 现已广泛应用于众多分析研究领域^[5]。李佐卿等^[6]用放射免疫方法检测鱼肉和鸡肉中磺胺类抗菌剂残留量, 对样品加标 10 μg/kg 分别进行 18 次和 16 次测定, 其精密度分别为 51.4% 和 61.9%, 最低检出限为 10 μg/kg

该方法简便、快捷, 而且具有较高的灵敏度和特异度, 但有时会出现交叉反应、假阳性反应, 且样品处理不够迅速。最重要的是 RIA 所使用的同位素会给人类及环境带来危害, 这限制了其进一步的应用和发展, 目前许多国家已开始对 RIA 的使用加以限制。

2 酶免疫技术(EIA)

EIA 是于 20 世纪 70 年代继放射免疫技术(RIA)后发展起来的一种非放射性免疫标记技术。针对 RIA 的缺点, EIA 用生物酶代替放射性同位素作为指示剂, 是一种将抗原抗体反应的特异性和酶催化底物反应的高效性和专一性结合起来的免疫检测技术, 其基本原理可用以下 3 个反应式表示:



第一作者: 硕士研究生(焦必宁教授为通讯作者)。

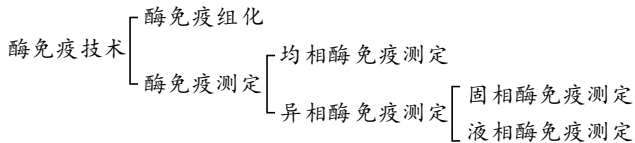
* 国家“十一五”科技支撑计划项目(2007BAD47B07), 科技部科研院所公益基金项目(2004DIB4J147)和现代农业(柑橘)产业技术体系项目资助

收稿日期: 2009-07-28

(3) 生色原或供氢体 $\xrightarrow[\text{pH, 温度}]{\text{产物 I}}$ 产物 II (颜色反应

或紫外吸光值变化)

酶免疫技术按照抗原抗体系统是定位于组织细胞上还是存在于液体样品中分为酶免疫组化技术和酶免疫测定, 酶免疫测定又可分为均相酶免疫测定和异相酶免疫测定, 因分离游离和结合的标记物的方法不同, 异相酶免疫测定又分成液相酶免疫测定和固相酶免疫测定 2 类:



目前, 酶免疫技术中最常用的是固相酶免疫测定中的酶联免疫吸附法 (ELISA), 因为 ELISA 除了具备其他酶免疫分析技术的优点外, 还具有样品前处理简洁、快速的优点。该技术可在几十分钟至几个小时内完成多批样品的检验, 且检验成本低。目前, 国内外已有大量根据 ELISA 的技术关键点 (抗原合成、载体选择和抗体制备等方面) 建立不同的 ELISA 法检测食品中杀菌剂残留的文献报道。

杀菌剂是小分子物质本身不具免疫原性, 须先合成可直接与载体偶联的半抗原后才能刺激机体产生特异性抗体。因此, 制备人工抗原的前提是先设计合适的半抗原。Newsome 等^[7]建立了间接 ELISA 检测草莓、桃、苹果和葡萄等果品中的克菌丹残留, 最低检测限为 1 ng/mL, 线性范围为 1-200 μg/mL。在半抗原设计时, 先在克百威分子苯环上反应产生 1 个氯原子, 然后将其代谢物 tetrahydrophthalimide (THPI) 通过连接不同的烷基间隔臂合成 3 种不同的半抗原, 发现间隔臂为 5 个碳原子的半抗原合成的抗原能产生最佳的多克隆抗体。这是因为 5 个碳原子的间隔臂避免了间隔臂太短导致载体空间位阻影响免疫系统对半抗原特征基团的识别, 间隔臂太长易受氢键、疏水作用等作用力的影响。Lee 等^[8]将半抗原苯环上的羧基偶联匙孔血蓝蛋白合成人工抗原, 建立了间接竞争 ELISA 检测马铃薯、洋葱、黄瓜和西红柿中异丙菌胺残留, 最低检测限仅为 0.065 ng/mL, IC₅₀ 为 3.51 ng/mL。在半抗原设计时, 尝试将异丙菌胺上的异丙氧基除去, 结果合成的人工抗原未能产生免疫原性, 实验表明保留待测物的特征基团是提高检测特异性的关键, 半抗原的设计应在尽可能保留待测物的特征结构的基础上于适当位置引入合适的连接臂和官能

团。同年, Lee 等^[9]又通过保持氯苯嘧啶醇的立体结构合成了两种不同的半抗原, 建立了间接竞争 ELISA 检测苹果和梨中氯苯嘧啶醇残留, 该方法的最低检测限均为 0.3 ng/mL, 其 IC₅₀ 分别为 5.4 和 9.4 ng/mL。

效价高、特异性强的抗体获得在免疫分析方法中最为关键, 因为抗体质量的优劣直接影响测定的性能和操作性。目前, 农药小分子免疫中抗体制备主要有多克隆抗体技术和单克隆抗体技术。Carsten 等^[10]建立了苹果和西红柿中百菌清多克隆抗体 ELISA 检测方法, 检测限分别为 0.068 mg/g 和 0.030 mg/g, Bushway^[11]利用 ELISA 和 HPLC 法比较检测了 134 个葡萄酒样品中多菌灵, 发现虽然其中 98 个样品经两种方法检测均呈阳性, 而剩余 36 个样品中, ELISA 法最低检测限为 0.005 ng/mL, 低于 HPLC (0.01 ng/mL), 且 ELISA 法从样品前处理到检测仅需 30 min, 回收率为 81% - 105%; 随后, Bushway 等^[12]通过制备多克隆抗体建立了果汁中多菌灵的 ELISA 测定方法, 结果表明, 检测未经前处理的样品需 18 min, 而经前处理的样品也仅需 35 min。多克隆抗体技术方法简单、成本低、来源广, 较早应用于免疫分析。与多克隆抗体相比, 单克隆抗体对设备要求相对较高, 技术相对复杂, 成本也高, 但特异性强, 交叉反应少, 产量大且稳定、易于处理和等特点。Manels 等^[13]用单克隆抗体的 ELISA 方法检测果汁中的氟醚唑、戊菌唑、环唑醇和腈菌唑等三唑类杀菌剂, 检测限为 0.1-0.7 μg/L, 回收率为 62% - 135%, 该法操作简单, 除样品稀释外, 无需任何前处理, 符合农药残留检测技术要求。

检测杀菌剂残留的 ELISA 法根据包被原的不同通常可分为直接 ELISA (包被抗体测抗原) 和间接 ELISA (包被抗原测抗体)。Paik 等^[19]将 1 个氨基酸与克利菌的硫代磷酸酯基团连接作间隔臂, 简化半抗原合成步骤 (从普遍的 7 步简化到 2 步), 新合成了 2 种半抗原, 并建立了特异性强和灵敏度高的测定果蔬中立枯磷残留的间接 ELISA 方法, 最低检测限为 20 ng/mL, IC₅₀ 为 160 ng/mL。该方法的灵敏度和特异性均比常规的直接竞争 ELISA 方法高 (最低检测限为 130 ng/mL, IC₅₀ 为 410 ng/mL)。Brandon 等^[15]报道了检测马铃薯和苹果中噻菌灵残留的间接竞争 ELISA 方法, 最低检测限为 200 μg/kg, Abad 等^[16]优化了半抗原合成的方法, 建立了 1 种灵敏度高、选择性好的检测果汁中噻菌灵的间接竞争 ELISA 方法。研究表明, 该法可直接测定未经任何提取或净

化处理的样品,对于橙汁和葡萄柚汁、香蕉汁、苹果和桃子汁,其最低检测限分别为 1 ng/mL、5 ng/mL 和 20 ng/mL,其中苹果和桃子汁中的噻菌灵经乙酸乙酯提取后用 ELISA 检测,其最低检测限可降至 5 ng/mL,说明去除样品基质干扰可提高检测的灵敏度; Anne-Laurence^[17]通过选用不同的吸附载体(微孔板和聚乙烯管)对比建立竞争 ELISA 检测福美双,最低检测限为 5 ng/mL,回收率为 89%,该法的检测速度

比酶标仅结合于孔壁上快且灵敏度高。Mercader^[18]通过比较不同孵育方法(一步和二步孵育)建立 ELISA 检测果蔬中脲菌酯残留,最低检测限分别为 0.17 ng/mL 和 0.21 ng/mL。这些方法都不仅优化实验步骤还提高了检测的灵敏度和特异性。

表 1 归纳了国内外应用 ELISA 检测食品中杀菌剂残留的部分实例。

表 1 ELISA 在食品杀菌剂残留中的应用

杀菌剂名称	抗体类型	测定样本	检测限	回收率 /%	报道文献
苯菌灵	多抗	红葡萄酒	0.5 ng/mL	-	[19]
多菌灵	多抗	果汁	300 ng/mL	81-105	[20]
氟醚唑	多抗	水果、果汁	2 ng/mL	-	[21]
三唑酮	多抗	黄瓜、梨等	40 ng/mL	92.44-98.18	[22]
噻菌灵	多抗	肉类	9-20 ng/g	-	[23]
多菌灵	多抗	牛肉、猪油	5 ng/g	-	[24]
抑霉唑	单抗	柑橘属水果	0.1 ng/mL	81.0	[25]
抑霉唑	单抗	苹果、马铃薯、果汁	0.06 ng/mL	>97	[26]
硝基唑	单抗	肝脏	20 ng/g	-	[27]
苯并咪唑类	单抗	肝脏	1-8 ng/g	-	[28-29]

3 金免疫技术 (ICG)

金免疫技术 (ICG) 又称免疫金标记技术,是以胶体金作为示踪标志物或显色剂,利用特异性抗原抗体反应,在光镜、电镜下对抗原(或抗体)物质进行定位、定性乃至定量研究的 1 种新型免疫标记技术。1962 年 Feldherr 首次介绍了胶体金可作为一种电子显微镜水平的示踪标记物,1971 年, Taylor 又将胶体金引入电镜免疫标记技术中。氯金酸在还原剂如白磷、抗坏血酸、枸橼酸钠、鞣酸等作用下,可聚合成一定大小的金颗粒,形成带负电的疏水胶溶液。它在静电作用下而形成稳定的胶体状态,故称胶体金。胶体金标记,实质上是蛋白质等高分子被吸附到胶体金颗粒表面的包被过程。在实际应用时一般是将胶体金与抗体结合形成金标抗体,用于检测抗原。

胶体金不存在内源酶干扰及放射性同位素污染等问题,且还可利用不同颗粒大小的胶体金作双重甚至多重标记,使定位更加精确,因此它已成为继荧光素、酶和同位素等标记技术之后的一种新型标记技术。张明等^[30]应用胶体金免疫层析技术检测动物食品中的磺胺甲噁唑 (SMZ) 抗菌剂残留,制备了抗磺胺甲噁唑多克隆抗体,并采用柠檬酸三钠法制备胶体金

颗粒,胶体金标记多抗后喷涂到玻璃纤维膜上,特异性抗原以线状包被在硝酸纤维素膜上,制成快速检测试纸条检测待测液,该方法对 SMZ 标准溶液的灵敏度达到 50 ng/mL,试纸条显色结果清晰,反应灵敏,整个检测反应在 5-10 min 内完成,稳定性及重复性良好。但是,由于胶体金颗粒本身的性质决定了该技术还存在一些问题,如胶体金颗粒大,渗透能力相对较差;在操作过程中要求清洁程度高;胶体金溶液存放时间相对较短等,这些问题导致免疫胶体金技术的应用受到一定限制。

表 2 列出了放射免疫技术 (RIA)、ELISA 法和金免疫技术 (ICG) 的优缺点的比较。

4 存在问题与发展前景

免疫技术较之其他检测方法显示了极大的优势,在杀菌剂残留的检测中取得了一定的进展,但由于杀菌剂品种繁多、结构复杂、检测样本各异等,仍存在以下局限:(1)人工抗原合成困难。制备稳定、免疫性好的人工抗原需要一定的相关知识和经验,且工作量大、周期长、成本高;目前尚未对半抗原结构、免疫原结构与结合比以及免疫活性作深入研究,难以合成高活性的免疫抗原;(2)易出现假阳性。由于难于制备

高特异性抗体,且待测农药与其结构类似物有一定程度的交叉反应,导致检测的准确性和灵敏度降低,易出现假阳性;(3)难于同时分析多种成分。免疫技术

分析对试剂的选择性高,很难同时分析多种成分;(4)方法难于标准化。影响免疫分析技术的因素较多且不稳定,使方法难于标准化。

表 2 三种免疫技术优缺点的比较

比较指标	RIA	ELISA	ICG
特异性	取决于抗体制备	取决于抗体制备	取决于抗体制备
敏感性	高	高	高
重演性	较满意	较满意	较满意
结果判断	客观	客观	客观
抗原制备	较容易或复杂	较容易或复杂	较容易或复杂
结合物制备	已标准化	正在标准化	正在标准化
在野外条件下用于大量人群标本的普查	困难	可以	可以
主要设备	粒子计数器	酶标比色计	光镜、电镜
试验成本	高	低	低
试剂半衰期	短	长	较长
对人的危害性	有	无或很少	很少
主要检测对象	抗原	抗体或抗原	抗原

但是,近年来出现了不少免疫新技术,有力地推动了农药残留免疫分析技术的发展。(1)免疫分析技术与其他技术相结合,如免疫分析与流动注射系统相结合形成流动注射免疫技术,免疫分析与传感器相结合形成免疫传感技术,免疫分析与气相、液相色谱联用等,都充分利用了两种以上技术的优势,既可提高检测灵敏度又可降低交叉反应;(2)多农药残留免疫分析,该技术的应用为多残留检测、残留暴露评估以及混配农药分析创造了条件;(3)免疫-PCR技术,利用将抗原-抗体的特异性反应与PCR强大的扩增能力结合在一起,使免疫分析的灵敏度进一步提高;(4)分子印迹技术,利用化学手段合成的分子印迹聚合物(MIP),能特异性吸附作为印迹分子的待测物。

随着分子生物学、基因工程及信息技术的发展,免疫分析技术也将朝着检测限更低、检测范围更广、灵敏度和特异性更高、适合多组分快速检测和易于商品化的方向不断完善发展,免疫技术也必将在检测食品中的杀菌剂残留领域发挥更重要的作用。

参 考 文 献

- [1] Ryley R, Bhuiyan S, Herde D, et al. Efficacy, timing and method of application of fungicides for management of sorghum ergot caused by *Claviceps Africana*[J]. *Australasian Plant Pathol* 2003, 32: 329-338.
- [2] Wills R, Gasson BM, Graham D, et al. An introduction to the physiology and handling of fruit vegetables and ornamentals[J]. University of New South Wales Press Ltd 1998: 144-158.

- [3] <http://www.nzfsa.govt.nz/plant/subject/horticulture/residues/usav eb.pdf>
- [4] 王振国, 宋广义, 王君双. 食品农药残留免疫学检测技术[J]. *吉林科技大学学报*, 1997, 19(3): 113-120.
- [5] Ercegovich C D, Vallejo R P, Getting RR, et al. Development of a radioimmunoassay for parathion[J]. *J Agric Food Chem*, 1981, 29(3): 559-563.
- [6] 李佐卿, 倪梅林, 章再婷. 鱼肉和鸡肉中磺胺类药物残留的放射免疫测定[J]. *中国卫生检验杂志*, 2005, 15(6): 709-710.
- [7] Newsome W H, Yeung JM, Collins P G. Development of enzyme immunoassay for captan and its degradation product tetrahydrothalamide in foods[J]. *J AOAC Int* 1993, 76(2): 381-386.
- [8] Lee JK, Park SH, Lee E Y, et al. Development of an ELISA for the detection of the residues of the fungicide prothioconazole[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(22): 6680-6686.
- [9] Lee JK, Park SH, Lee E Y, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the fungicide fenarimol[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(24): 7206-7213.
- [10] Caioli S, Amoldi A, Pagan S. Enzyme-Linked Immunosorbent assay for the quantitation of the fungicide tetraconazole in fruits and fruit juices[J]. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(12): 3849-3854.
- [11] Bushway R J, Paradis LR, Perkins LB, et al. Determination of methyl 2-benzimidazolecarbamate in wine by competitive inhibition enzyme immunoassay[J]. *Assoc Off Anal Chem*, 1993, 76(4): 851-856.

- [12] Bushway R J, Young B E, Paradis L R, et al. Determination of methylenedibenzimidazole carbamate in bulk fruit juice concentrates by competitive inhibition enzyme immunoassay [J]. *J AOAC Int*, 1994, 77 (5): 1 237 - 1 243.
- [13] Mancl s J, Moreno M J, Plana E, et al. Development of monoclonal immunoassays for the determination of triazole fungicides in fruit juices [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(19): 8 793 - 8 800.
- [14] Park K Y, Park W C, Kim Y J, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus fungicide tolclofos-methyl [J]. *Bull Korean Chem Soc*, 2003, 24(3): 334 - 338.
- [15] Brandon D L, Binder R G, Wilson R E. Analysis of thiabendazole in potatoes and apples by ELISA using monoclonal antibodies [J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41 (6): 996 - 999.
- [16] Abad A, Mancl s J, Moreno M J, et al. Determination of thiabendazole in fruit juices by a new monoclonal enzyme immunoassay [J]. *JAOAC Int*, 2001, 84(1): 156 - 161.
- [17] Queffelec A L, Boisdé F, Laine J P, et al. Development of an immunoassay (ELISA) for the quantification of thiram in lettuce [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49(4): 1 675 - 1 680.
- [18] Mercader J V, Suarez-Pantaleón C, Agulló C, et al. Hapten synthesis and monoclonal antibody-based immunoassay development for detection of the fungicide trifloxystrobin [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(8), 2 581 - 2 588.
- [19] Rosso I, Giraudi G, Gamberini R, et al. Application of an ELISA to the determination of benalaxyl in red wines [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48, 33 - 36.
- [20] Itak J A, Selisker M Y, Jourd' an S W, et al. Determination of benomyl and carbendazim in water, soil and fruit juice by an antigenic particle-based immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 1993, 41(12): 2 329 - 2 332.
- [21] Jahn C, Schwack W. Determination of cutin-bound residues of chlorothalonil by immunoassay [J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49 (3): 1 233 - 1 238.
- [22] 王勇, 李治祥, 朱海英, 等. 食品中三唑酮的酶联免疫吸附分析 [J]. *分析化学*, 1993, 21(9): 1 055 - 1 057.
- [23] 武中平, 徐春祥, 高魏, 等. 酶联免疫分析法及其在食品农药残留检测中的应用 [J]. *江苏农业科学*, 2007(1): 198 - 201.
- [24] Nan K S, King J W. Supercritical fluid extraction and immunoassay for pesticide detection in meat products [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42, 1469.
- [25] Watanabe E, Watanabe S, Ito S, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the fungicide imazalil in citrus fruit [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48 (11): 5 124 - 5 130.
- [26] Moreno M J, Plana E, Monbaya A, et al. Application of a monoclonal antibody-based immunoassay for the determination of imazalil in fruit juices [J]. *Food Additives and Contaminants*, 2007, 24(7): 704 - 712.
- [27] 郭玉莲. 农药残留的酶联免疫分析技术及研究进展 [J]. *农机化研究*, 2006 (2): 201 - 203.
- [28] Brandon D L, Binder R G, Bates A H, et al. Monoclonal antibody for multiresidue ELISA of benzimidazole anilines in liver [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42(7): 1 588 - 1 594.
- [29] Brandon D L, Holland K P, Dreas J S, et al. Rapid screening for benzimidazole residues in bovine liver [J]. *J Agric Food Chem*, 1998, 46(9): 3 653 - 3 656.
- [30] 张明, 吴国娟, 沈红, 等. 免疫胶体金法检测磺胺甲噁唑残留的研究 [J]. *中国兽药杂志*, 2006, 40(4): 17 - 19, 24.

Immunoassay Technology and Its Applications on Detection of Fungicide Residues in Agricultural Products

Zhou Yingxia^{1, 2}, Jiao Bin^{1, 2}, Pan Jiarong³

1(Food College, Southwest University, Chongqing 400716, China)

2(Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China)

3(Agro-food processing Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

ABSTRACT With the advantages of high sensitivity, high specificity, easy handling and rapid response, immunoassay has been playing an important role in fungicide residue detection. In this paper, not only the principle of immunoassay technique, but also the applications and development prospects in fungicide residues detection are reviewed.

Key words waxy corn, OSA modified starch, paste properties, immunoassay, fungicide residues, determination