

# 胶体金免疫层析试纸法检测农产品中戊唑醇残留

许俊丽<sup>1,2</sup> 刘贝贝<sup>2</sup> 王玉龙<sup>2</sup> 李盼<sup>2</sup> 杨康<sup>2</sup> 吴勤<sup>2</sup>  
蒋岚<sup>2</sup> 张皓然<sup>2</sup> 杨立飞<sup>\*1</sup> 张存政<sup>\*2,3</sup>

<sup>1</sup>(南京农业大学园艺学院, 南京 210095) <sup>2</sup>(江苏省农业科学院-农产品质量安全与营养研究所, 南京 210014)  
<sup>3</sup>(江苏大学食品与生物工程学院, 镇江 212013)

**摘要** 利用纳米金标记高亲和、高特异性戊唑醇单克隆抗体,建立了戊唑醇免疫层析快速检测方法,通过肉眼观察可快速定性判断是否超过最大限量值(MRL),实现了样品现场快速筛查与精准定量分析,具有快速、精准、低成本的优点。以 20 nm 的胶体金颗粒标记抗戊唑醇单克隆抗体作为检测探针,分别将包被原 Teb-OVA(0.3 mg/mL)和羊抗小鼠 IgG 抗体(1 mg/mL)包被于硝酸纤维膜(NC 膜),形成检测线(T 线)和质控线(C 线),组装成的胶体金免疫层析检测试纸条肉眼观察的检出限为 6.25 ng/mL(T 线完全消线),可在 15 min 内实现小麦、黄瓜和甘蓝中戊唑醇的定性与半定量分析,分析结果与高效液相色谱质谱联用(LC-MS/MS)方法的检测结果一致。胶体金免疫检测方法特异性和准确性好,操作方便,重复性好,可满足现场快速筛查大量样品的需求。

**关键词** 戊唑醇残留; 胶体金免疫层析; 液相色谱串联质谱

## 1 引言

戊唑醇(Tebuconazole, 1-(4-氯苯基)-3-(1H-1,2,4-三唑-1-基甲基)-4,4-二甲基戊-3-醇)是一种三唑类杀菌剂,能有效防治由白粉菌属、柄锈菌属、喙孢属、核腔菌属和壳针孢属引起的病害,广泛用于小麦、蔬菜、香蕉、苹果等作物的种子处理和叶面防治<sup>[1~5]</sup>,是三唑类杀菌剂中使用量与销售最高的品种之一<sup>[6]</sup>,防治谱广,使用广泛。但戊唑醇对哺乳动物具有毒性,且在肝脏和血液中有毒性蓄积作用,具有潜在的非遗传致癌毒性作用及环境激素内分泌干扰效应<sup>[7~9]</sup>。美国环保署(EPA)已将三唑类杀菌剂中的戊唑醇、烯效唑、己唑醇、丙环唑和氟环唑列入潜在的人类致癌物名单<sup>[10]</sup>,欧盟委员会和我国规定了部分农作物和蔬菜中戊唑醇的最大残留限量(0.05 mg/kg)<sup>[11,12]</sup>。因此,研发快速、精准的戊唑醇残留分析方法,是进行有效监管的重要环节。

戊唑醇残留的仪器检测方法包括气相色谱法(氮磷检测器,GC-NPD)、高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、高效液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)和毛细管气相色谱法等。Dong 等<sup>[13]</sup>采用 LC-MS/MS 测定戊唑醇及其代谢产物在土壤、葡萄中的残留动态与风险评估,方法的检出限为 0.1 mg/kg。Zhang 等<sup>[14]</sup>建立了 HPLC 方法对土壤沉积物中的戊唑醇等 3 种手性三唑类杀菌剂的同分异构体的降解情况进行研究,手性化合物的消长分布符合一级动力学方程,且与沉积物的性质相关联。Wang 等<sup>[15]</sup>建立了固相萃取-超高效液相/串联质谱法检测水中戊唑醇残留,不同基质检出限为 0.001 ~ 41.27 ng/L,回收率为 76% ~ 97%。刘军等<sup>[16]</sup>采用分散固相萃取-液相色谱-质谱法测定水稻及土壤中戊唑醇残留量,检测范围为 5 ~ 200 μg/L,检出限为 2.5 × 10<sup>-11</sup> g。

免疫分析技术广泛用于现场检测和高通量筛选,具有简单、便携、快速、低成本等优点,是仪器分析方法的补充<sup>[17]</sup>,包括酶联免疫吸附分析(ELISA)、免疫层析试纸条和免疫传感器等<sup>[18~21]</sup>。其中以纳米金作为信号输出的胶体金试纸条实用性强,操作简单,肉眼即可判定结果,应用广泛。目前,对戊唑醇的免疫分析报道不多,主要是由于不易获得高质量抗体,其中基于胶体金试纸条的残留检测方法未见报道。Danks 等<sup>[22]</sup>报道了基于多克隆抗体的 ELISA 方法,对戊唑醇的检测范围为 0.02 ~ 20 mg/L;

Qi 等<sup>[23]</sup>利用分子印迹电化学传感器等方法(ECA),通过信号的放大作用实现对戊唑醇的检测,灵敏度达到 3.85 ng/mL; Chen 等<sup>[24]</sup>通过设计半抗原获得特异性抗体,建立的免疫分析方法对水样中的戊唑醇的检测灵敏度为 0.197 ~ 0.297 ng/mL。本研究以前期设计的新型半抗原制备的抗戊唑醇的高特异性、高亲和力单克隆抗体为材料,建立了半定量胶体金免疫层析试纸条分析方法,实现肉眼观察确定戊唑醇残留,经 ELISA 鉴定此抗体对戊唑醇的检测灵敏度为 0.07 ng/mL( $IC_{20}$ ),  $IC_{50}$  为 0.19 ng/mL<sup>[25]</sup>; 同时,建立了基于 LC/MS-MS 的检测方法,以小麦、黄瓜和甘蓝等样品为对象,进行了方法的验证,表明两种检测方法配合使用可以实现对戊唑醇的精准、快速检测,优势互补。其中,免疫层析试纸条快速、方便,能用于现场检测,LC-MS/MS 方法准确、灵敏,可用于大量样品的高通量定量检测。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

XYZ3050<sup>TM</sup> 试纸条喷膜仪(Bio-Dot 公司); ZQ2000 微电脑试纸条自动切割仪(上海金标生物科技有限公司); Lambda25 UV-vis Spectrometer 双光束紫外-可见分光光度计(美国 Perkin Elmer 公司); Agilent Technologies 1260 Infinity 高效液相色谱-质谱联用仪(美国 Agilent 公司); Multiscan ascent 酶标仪(美国 Thermo 公司); H-7650 透射电子显微镜(日本日立公司); 硝酸纤维素膜(NC 膜)、金标结合垫、吸水垫(美国 Millipore 公司); 聚氯乙烯(PVC)底板、样品垫(上海金标科技生物有限公司); 超纯水净化仪(美国 Labconco 公司)。

戊唑醇标准品(农业部环境质量监督检验测试中心(天津)); 戊唑醇单克隆抗体(Teb McAb)及半抗原、包被原(Teb-OVA)由本实验室制备。羊抗小鼠 IgG(武汉博士德生物工程有限公司); 牛血清蛋白(BSA)、氯金酸( $H AuCl_4 \cdot 3H_2O$ )、二水合柠檬酸三钠( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ )(美国 Sigma 公司); 其它试剂均为分析纯(西陇化工股份有限公司)。小麦粉产于江苏省农业科学院试验田,甘蓝、黄瓜购于南京某超市。

### 2.2 抗原的制备

**2.2.1 半抗原的合成** 戊唑醇半抗原的合成如图 1 所示,以  $-C_5H_{10}COOH$  基团取代戊唑醇苯环上的 *p*-Cl,引入偶联臂和活性  $-COOH$  基团,合成半抗原。

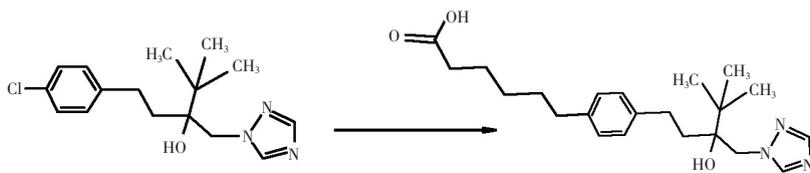


图 1 戊唑醇半抗原的制备示意图

Fig. 1 Schematic of synthesis pathway of haptent

**2.2.2 包被原的制备** 采用混合酸酐法将合成的戊唑醇半抗原与卵清蛋白 OVA(BSA)偶联制备包被原。将 0.05 mmol(19.4 mg)半抗原溶于 1 mL 二甲基甲酰胺(DMF)中,再依次加入 20  $\mu$ L 三正丁胺和 10  $\mu$ L 氯甲酸异丁酯,4 $^{\circ}C$  条件下搅拌反应 1 h,得到反应混合物;将 0.5  $\mu$ mol(30 mg)OVA 溶于 5 mL 碳酸盐缓冲溶液中,再逐滴缓慢加入上述混合物,搅拌反应 2 h;将得到的反应物透析,分装后于  $-20^{\circ}C$  保存,备用。

### 2.3 胶体金的制备与鉴定

采用柠檬酸三钠还原法制备胶体金<sup>[26]</sup>: 500 mL 三角瓶中加入 200 mL 二次蒸馏水,再加入 1 mL 1%  $H AuCl_4$  混合均匀,置于微波炉中加热 5 min 至沸腾;取出三角瓶,迅速顺时针轻轻晃动,快速加入经滤膜过滤的 1% 柠檬酸三钠水溶液 5 mL,快速混匀,放入微波炉中加热 4 ~ 5 min 至沸腾,制备的酒红色液体即为胶体金溶液。室温避光冷却后,用超纯水定容至 200 mL,4 $^{\circ}C$  避光保存。紫外分光光度计扫描测定波长 400 ~ 600 nm 的最大吸收峰( $\lambda_{max} = 519$  nm)。透射电子显微镜(TEM)观察鉴定胶体金颗粒的粒径及分散性,结果显示,胶体金颗粒分散均匀、无聚集,粒径约为 20 nm。

## 2.4 胶体金标记抗体探针的制备

**2.4.1 最佳标记 pH 值条件优化** 取 10 个 1.5 mL 离心管, 分别加入 1 mL 胶体金溶液, 依次编号为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9; 向各离心管中加入与编号数相同体积 ( $\mu\text{L}$ ) 的 0.1 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液, 迅速充分混匀, 调节溶液 pH 值; 向各离心管中加入 20  $\mu\text{L}$  0.62 mg/mL 戊唑醇单克隆抗体, 轻轻摇匀, 室温下静置反应 2 h; 测定未出现沉淀的溶液在 400 ~ 600 nm 的吸收光谱, 并以  $\text{K}_2\text{CO}_3$  溶液加入量为横坐标、各溶液最大吸收值为纵坐标, 选取吸收值最大时对应的  $\text{K}_2\text{CO}_3$  加入量, 确定最佳标记 pH 值条件。

**2.4.2 抗体最佳标记量的优化** 取 12 个 1.5 mL 的离心管, 分别加入 1 mL 胶体金溶液, 再以 7  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调至溶液 pH 值(如 2.3.1 节); 依次加入戊唑醇单克隆抗体, 使溶液终浓度为 0、0.62、1.24、1.86、2.48、3.1、3.72、4.34、4.96、5.58、6.20 和 6.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 混匀后, 室温静置 5 min; 每管分别加入 10% ( $m/V$ ) NaCl 溶液 100  $\mu\text{L}$ , 静置 5 min, 观察记录溶液的颜色变化, 判断抗体的最适标记量。

**2.4.3 胶体金标记抗体探针** 取 5 mL 胶体金溶液, 加入 35  $\mu\text{L}$  0.1 mol/L  $\text{K}_2\text{CO}_3$  调节溶液 pH 值, 加入 8  $\mu\text{L}$  抗体(0.62 mg/mL), 室温下搅拌反应 30 min; 加入 10% ( $m/V$ ) BSA 溶液至 BSA 终浓度为 0.01 g/mL, 室温下继续搅拌反应 30 min, 12000 r/min 离心 35 min, 弃上清液, 加入 0.5 mL 重悬液(0.01% 硼酸, 0.2% PEG 20000, 0.02%  $\text{NaN}_3$ ) 重悬沉淀, 即得到胶体金标记戊唑醇单克隆抗体探针溶液, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存, 备用。

## 2.5 胶体金免疫试层析纸条的组装与结果判定

**2.5.1 试纸条的组装** 完整的试纸条包括聚氯乙烯(PVC)底板、吸水垫、NC 膜、金标垫和样品垫(图 2)。将 NC 膜贴在 PVC 底板的中间, 用喷膜仪在 NC 膜上分别喷涂戊唑醇包被原(Teb-OVA)和羊抗鼠抗体(IgG), 作为检测线(T)和质控线(C), T 线和 C 线间隔 4 mm; 金标结合垫和吸水垫于 NC 膜两端重合 1 ~ 2 mm 贴在 PVC 底板上, 金标结合垫贴在近检测线(T)端, 吸水垫近质控线(C)端; 样品垫与金标结合垫重合 1 ~ 2 mm 贴在 PVC 底板上, 组装完毕的 PVC 底板用切条仪切割成 3.5 mm $\times$ 60.0 mm 试纸条。37 $^{\circ}\text{C}$  干燥箱干燥 2 h, 密封保存。

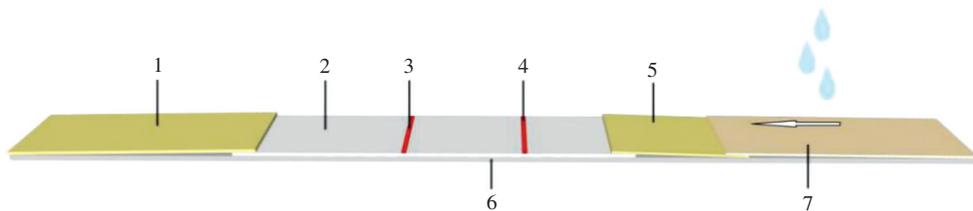


图 2 胶体金免疫层析试纸条构成截面图(1. 吸水垫; 2. NC 膜; 3. 质控线(C 线); 4. 检测线(T 线); 5. 金标结合垫; 6. PVC 底板和 7. 样品垫)

Fig. 2 Assembly and cross-section illustration of lateral flow test strip (1. Absorbent pad; 2. Nitrocellulose (NC) membrane; 3. Control line; 4. Test line; 5. Conjugate pad; 6. Polyvinyl chloride (PVC) backing and 7. Sample pad)

**2.5.2 试纸条检测结果的判定** 将 1  $\mu\text{L}$  胶体金免疫探针固定于胶体金垫, 干燥保存, 待用, 使用时, 向样品垫中滴加 75  $\mu\text{L}$  待测样品液或不同浓度的戊唑醇标准品溶液(5% 甲醇-PBS 缓冲液稀释配制), 15 min 后肉眼观察判定检测结果, 结果如图 3 所示。(1) 当待测液中不含戊唑醇或浓度极低, 不足以检出时, 金标抗体与固定于 T 线上的包被原结合, 形成肉眼可见的红色条带, 同时, 过量的金标抗体与 C 线上固定的羊抗鼠 IgG 抗体结合, 形成肉眼可见的红色条带, 此时 T 线与 C 线均为红色条带, 当 T 线显色等同或深于 C 线时, 结果判定为阴性; (2) 当待测液中存在戊唑醇(可检出, 浓度 < 6.25 ng/mL), 或浓度高于 6.25 ng/mL 时, 戊唑醇与金标抗体结合, T 线颜色变浅或不显色, 免疫复合物或者多余的金标抗体与 C 线二抗结合显红色, 此时 T 线颜色变淡(浅于 C 线颜色)或无色(戊唑醇浓度  $\geq$  6.25 ng/mL), 结果判断为阳性; (3) 当 C 线不显色时, 无论 T 线是否显色, 均判为试纸条失效。

## 2.6 戊唑醇 LC-MS/MS 检测方法的建立

**2.6.1 仪器检测条件** (1) 液相色谱条件 ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(150 mm  $\times$  2.1 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ); 流

动相为乙腈-0.1%甲酸溶液(9:1, V/V);流速:0.4 mL/min;进样体积为5  $\mu$ L;柱温40 $^{\circ}$ C。(2)质谱条件 多反应监测(MRM)模式扫描;电喷雾正离子源(ESI+);离子化电压:4000 V;雾化气温度为350 $^{\circ}$ C;喷雾气压力为25 psi,流速为10 L/min。详细质谱检测参数见表1。

**2.6.2 标准品溶液配制及标准曲线** 称取标准品,用乙腈溶液配制成浓度为100 mg/mL的标准储备溶液。使用时用乙腈逐级稀释成浓度为0、2.5、5、10、20、50、100和200 ng/mL的标准溶液。以定量离子峰面积为纵坐标( $y$ ),浓度为横坐标( $x$ ),建立LC-MS/MS检测标准曲线。

## 2.7 样品处理

**2.7.1 样品提取溶剂的选择** 将小麦研磨成粉,黄瓜、甘蓝用食品粉碎机打碎至泥浆状,然后取5 g样品于50 mL离心管中,添加戊唑醇农药标准品溶液,添加浓度分别为0、0.02、0.05和0.10 mg/kg。分别加入10 mL 5%甲醇-PBS、甲醇、乙腈和丙酮,除5%甲醇-PBS提取液,其它提取溶液中加入3 g NaCl,振荡提取30 min,5000 r/min离心5 min。

表1 戊唑醇质谱检测参数

Table 1 Parameters for mass spectrometric detection of TEB

化合物 Compound	保留时间 Retention time (min)	定量离子 Quantitative ion ( $m/z$ )	定性离子 Qualitative ion ( $m/z$ )	去簇电压 Decluster voltage (V)	碰撞电压 Collision voltage (V)	驻留时间 Dwell time (ms)
戊唑醇 Tebuconazole	1.63	308.2/70	308.2/70	130	35	200
			308.2/125	130	20	200

**2.7.2 样品提取液净化** 准确吸取5 mL上层提取液于10 mL离心管中,氮气吹干。准确加入2 mL乙腈复溶,小麦样品再加入1.0 mg  $C_{18}$ ,涡旋振荡3 min,用0.22  $\mu$ m滤膜过滤,通过仪器(LC-MS/MS)检测戊唑醇,比较各提取溶剂的提取效率。

**2.7.3 样品基质影响** 选择提取效率最高的溶剂进行添加回收实验。在小麦、黄瓜、甘蓝样品中添加戊唑醇,浓度分别为0、0.02、0.05和0.10 mg/kg,每组重复3次,提取后,以氮气吹干,用5%甲醇-PBS复溶,进行试纸条测试,并与LC-MS/MS结果进行对比。

## 3 结果与分析

### 3.1 戊唑醇半抗原的鉴定

戊唑醇半抗原分子式:  $C_{22}H_{33}N_3O_3$ ,相对分子质量为387.25,质谱检测得到  $m/z$  388.3 [ $M+H$ ],符合预期分子量, $^1H$  NMR (DMSO)结果表明羧基偶联改造成功:  $\delta$  11.98 (s, 1H, —COOH), 8.51 (s, 1H, Ar-H), 8.01 (s, 1H, Ar-H), 6.99~7.06 (m, 4H, pH-H), 4.52 (s, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.25~4.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.47~2.54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.17~2.20 (t, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.89~1.90 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.73~1.76 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.62~1.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>), 1.51~1.60 (s, 4H, 2CH<sub>2</sub>), 1.31~1.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.29 (s, 9H, 3CH<sub>3</sub>)。

### 3.2 免疫原和包被原的鉴定

采用紫外分光光度法(240~400 nm)扫描戊唑醇半抗原、载体蛋白BSA、OVA及偶联物免疫原、包被原,结果表明,免疫原(半抗原-BSA)和包被原(半抗原-OVA)有明显的吸收峰偏移,表明偶联成功。计算免疫原和包被原的摩尔比分别为24和33。

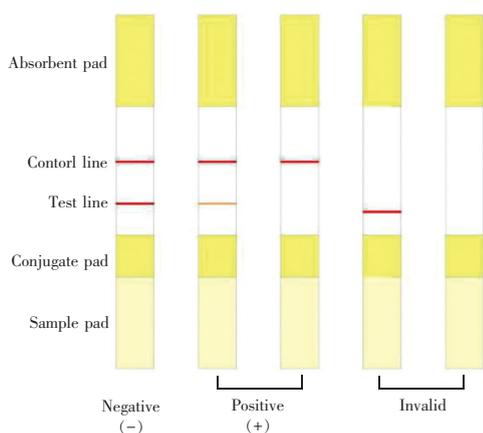


图3 免疫层析试纸条检测结果判定示意图

Fig. 3 Schematic diagram of lateral flow test strip for detection of tebuconazole (TEB)

### 3.3 金标抗体制备条件的优化

**3.3.1 最佳标记 pH 值** 将戊唑醇单克隆抗体加入到以 0.1 mol/L  $K_2CO_3$  溶液调节的不同 pH 值的胶体金溶液中,测定其吸收值。结果表明,当 1 mL 胶体金溶液加入 7  $\mu$ L 0.1 mol/L  $K_2CO_3$ ,溶液的吸收值最大,最大吸收峰为 521 nm,最大吸收值为 0.644,此时胶体金颗粒表面结合的抗体最多,为胶体金颗粒与抗体结合的最佳标记 pH 条件。

**3.3.2 抗体最适标记浓度** 柠檬酸根保护的胶体金颗粒外层带有负电荷,在静电作用下,胶体金溶液为稳定的胶体状,在加入 10% (m/V) NaCl 时,由于盐离子的作用,胶体金溶液发生聚沉,由均一的酒红色变为蓝色。抗体蛋白可通过物理吸附(静电作用、疏水力及 Au—S 键)与柠檬酸根包裹的胶体金结合,增加分子间距,在较高浓度盐离子下,使胶体金颗粒仍能保持良好的分散性。盐析诱导沉聚实验表明,当抗体标记浓度  $\geq 4.96 \mu$ g/mL 时,在盐析作用下,胶体金标记的抗体仍保持稳定,溶液颜色与原胶体金溶液颜色一致,即戊唑醇单克隆抗体最小标记浓度为 4.96  $\mu$ g/mL。

### 3.4 试纸条检测线与质控线的优化

优化了硝酸纤维素膜上 C 线(羊抗小鼠 IgG 抗体)和 T 线(戊唑醇包被原)的喷涂浓度。当 C 线喷涂 1 mg/mL 羊抗小鼠 IgG,喷涂量为 0.6  $\mu$ L/cm 时,C 线显示清晰的红色条带。采用棋盘法优化 T 线戊唑醇包被原浓度,得最优 C 线羊抗小鼠 IgG 浓度为 1 mg/mL,喷涂量为 0.6  $\mu$ L/cm; 最优 T 线戊唑醇包被原(Teb-OVA)浓度为 0.3 mg/mL,喷涂量为 0.6  $\mu$ L/cm。

### 3.5 试纸条的灵敏度和特异性

以 5% 甲醇-PBS 溶液配制系列浓度的戊唑醇标准品溶液,使最终浓度为 0、1.50、3.15、6.25、12.5、25.0 和 50.0 ng/mL。分别取 75  $\mu$ L 样液用于试纸条检测,T 线完全消失时的戊唑醇浓度即为试纸条的检出限。如图 4 所示,随着戊唑醇浓度升高,T 线颜色逐渐变浅,当戊唑醇浓度为 6.25 ng/mL 时,T 线颜色基本完全消失,即为胶体金试纸条的检出限(6.25 ng/mL,参照前述样品前处理稀释 10  $\times$ ,换算后浓度为 0.05 mg/kg),满足国家标准中对小麦、蔬菜中农药最大残留限量检测的要求(0.05 ~ 1.0 mg/kg, GB2763-2016)<sup>[11]</sup>。

以 5% 甲醇-PBS 溶液分别稀释多效唑、腈菌唑、丙环唑和己唑醇标准品至终浓度为 1.0  $\mu$ g/mL,用试纸条检测,观察试纸条的交叉反应情况。结果表明,只有戊唑醇出现明显的抑制,T 线消失(图 5),表明此试纸条对戊唑醇有较好的特异性。

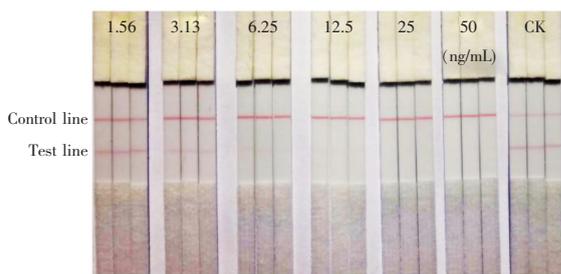


图 4 试纸条的戊唑醇标准品最低检出限判定

Fig. 4 Limit of detection (LOD) of TEB by lateral flow test strip

### 3.6 样品提取条件的优化

**3.6.1 提取溶剂的选择** 样品添加浓度分别为 0、0.02、0.05 和 0.10 mg/kg,考察乙腈、丙酮、甲醇和 5% 甲醇-PBS 4 种溶剂对戊唑醇的提取效率。如表 2 所示,提取效果为乙腈 > 丙酮 > 甲醇 > 5% 甲醇-PBS,因此,选取乙腈为添加回收实验的提取溶剂,效率为 79.0% ~ 95.5%。

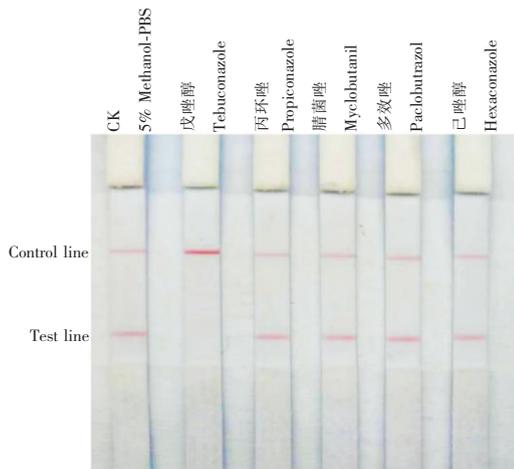


图 5 丙环唑、腈菌唑、多效唑、己唑醇的交叉反应 (1  $\mu$ g/mL)

Fig. 5 Cross reactivity of lateral flow test strip in detection of propiconazole, myclobutamil, paclobutrazol and hexaconazole. The sample concentrations are 1  $\mu$ g/mL respectively

表 2 不同提取溶剂的提取效果比较

Table 2 Extraction efficiency of different solvents for spiked samples ( $n=3$ )

试剂 Solvent	添加浓度 Spiked level (mg/kg)					
	0.02		0.05		0.1	
	测得值 Found (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	测得值 Found (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	测得值 Found (mg/kg)	回收率 Recovery (%)
甲醇 Methanol	ND	0.00	0.011±0.001	21.4	0.037±0.002	37.0
乙腈 Acetonitrile	0.0191±0.002	95.50	0.043±0.003	86.0	0.079±0.001	79.0
丙酮 Acetone	0.0167±0.003	83.5	0.041±0.002	82.0	0.071±0.003	71.0
5% 甲醇-PBS 5% Methanol-PBS	ND	0.00	ND	0	ND	0

ND: 未检出 (Not detectable)

**3.6.2 样品提取液的净化** 以乙腈为提取溶剂进行样品前处理及净化,由图 6 可见,本研究的净化方法对小麦、黄瓜和甘蓝 3 种基质的净化效果均较好,样品峰不受到其它杂质因素的影响,满足戊唑醇在农作物样品中的残留分析要求。

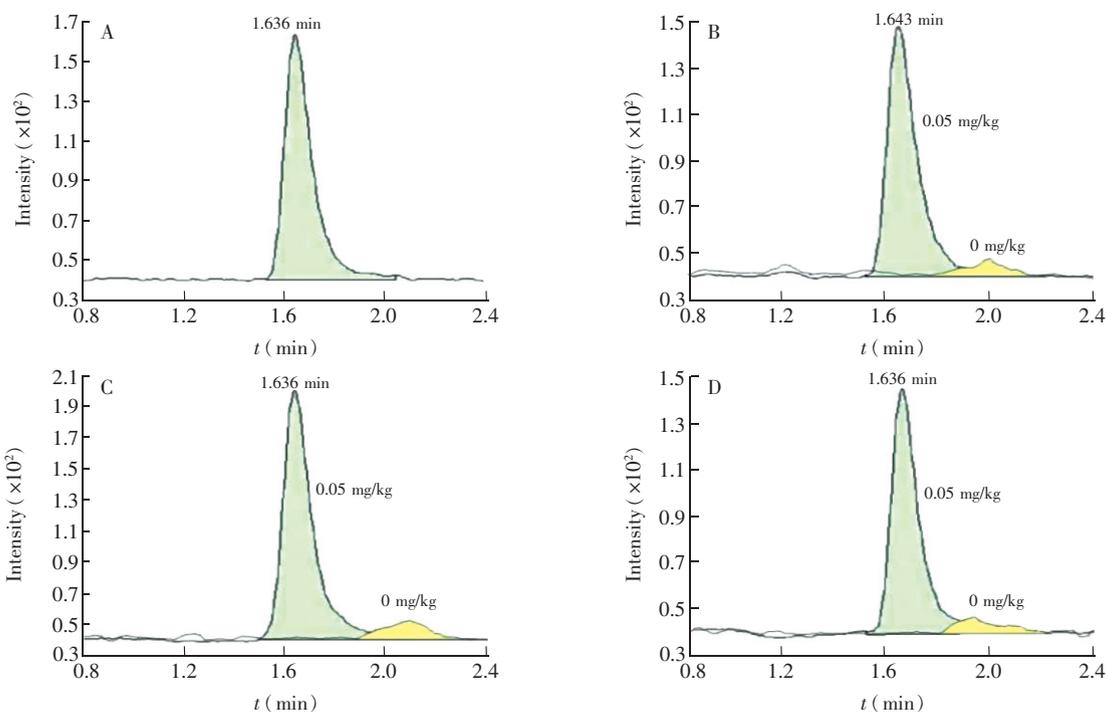


图 6 标准溶液(A)、小麦(B)、黄瓜(C)、甘蓝(D)添加样品(0.05 mg/kg)和空白样品(0 mg/kg)色谱图

Fig. 6 Chromatogram of standard (A), spiked and control samples of wheat (B), cucumber (C) and cabbage (D)

**3.6.3 样品基质对胶体金试纸条的影响** 取 5 g 小麦、黄瓜、甘蓝样品,加入 10 mL 乙腈,按 2.8 节方法操作,取 5 mL 上清液,经氮气吹干后,加入 2.0 mL 5% 甲醇-PBS 复溶,过滤,得到小麦、黄瓜、甘蓝的基质混合溶液。将其分别稀释 2、5、10、20 倍,得到相应稀释液,用稀释液配制成浓度为 0、3.13 和 6.25 ng/mL 的戊唑醇基质标准溶液,并与 5% 甲醇-PBS 配制的空白溶液比较。由表 3 可知,小麦样品稀释倍数 < 5 时,试纸条出现假阴性;当稀释倍数 > 5 时,与空白结果一致。黄瓜和甘蓝样品则在稀释 10 倍之后与空白结果一致,表明可通过稀释样品提取液消除基质干扰作用。本实验中 3 种样品均选择稀释 10 倍液检测,以消除基质对胶体金免疫层析试纸的影响。

### 3.7 方法验证

**3.7.1 戊唑醇 LC-MS/MS 方法验证** 选取小麦、黄瓜和甘蓝样品进行添加回收实验,TEB 添加浓度为 0.02、0.05 和 0.10 mg/kg。样品经乙腈提取、净化后,用于 LC-MS/MS 检测。如表 4 所示,平均回收率为 75.0% ~ 100.0%,方法的检出限(LOD)为 1.5 ng/mL,相对标准偏差(RSD)小于 6.9%,表明建立的

表 3 基质对胶体金试纸条的影响

Table 3 Matrix interference on lateral flow test strip practice

样品 Sample	戊唑醇浓度 Concentration of TEB (ng/mL)	5% 甲醇-PBS 5% Methanol-PBS	稀释倍数 Material dilution times			
			2X	5X	10X	20X
小麦 Wheat	0	-	-	-	-	-
	3.125	±	-	±	±	±
	6.25	+	-	+	+	+
黄瓜 Cucumber	0	-	-	-	-	-
	3.125	±	-	±	±	±
	6.25	+	-	±	+	+
甘蓝 Cabbage	0	-	-	-	-	-
	3.125	±	-	-	±	±
	6.25	+	-	±	+	+

“-”: 阴性, “+”: 阳性, “±”: 弱阳性。

“-”negative, “+”positive, “±”weakly positive.

表 4 戊唑醇标品不同添加浓度下高效液相色谱质谱法的添加回收率

Table 4 Average recoveries of LC-MS/MS at different spiked concentrations of TEB

样品 Samples	戊唑醇添加浓度 Spiked concentration (mg/kg)	高效液相色谱质谱联用法 LC-MS/MS		
		测得值 Found (mg/kg)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (% , n=3)
小麦 Wheat	0.02	0.015	75.0	5.0
	0.05	0.044	88.0	3.1
	0.1	0.096	96.0	2.7
黄瓜 Cucumber	0.02	0.018	90.0	5.3
	0.05	0.045	90.0	5.2
	0.1	0.079	79.0	5.6
甘蓝 Cabbage	0.02	0.020	100.0	6.9
	0.05	0.049	98.1	5.3
	0.1	0.091	91.0	6.6

戊唑醇 LC-MS/MS 检测方法准确, 可用于黄瓜、甘蓝样品中戊唑醇的测定, 与文献[27]报道结果一致。

### 3.7.2 免疫层析方法验证

小麦、黄瓜、甘蓝样品中戊唑醇添加浓度分别为 0、0.02、0.05 和 0.10 mg/kg, 静置 2 h。样品提取过程如前述, 基于抗体及 NC 膜对有机试剂的耐受程度及简化前处理方法、基质干扰(假阳性、假阴性)的考虑, 以 5% 甲醇-PBS 稀释 10 倍直接用于试纸条检测。检测结果如图 7 所示, 小麦、黄瓜、甘蓝的基质在稀释 10 倍后对试纸条均无影响, 肉眼检测灵敏度为 6.25 ng/mL (结合前述样品前处理过程, 换算结果为 0.05 mg/kg), 表明添加浓度  $\geq 0.05$  mg/kg 时, 样品经乙腈提取, 5% 甲醇-PBS 复溶并稀释 10 倍后, 检测结果为阳性。

## 4 结论

建立了快速准确检测小麦、蔬菜样品中戊唑醇残留的胶体金免疫层析试纸条检测方法, 并采用高效液相色谱-质谱联用法(LC-MS/MS)对戊唑醇进行定量分析。所建立的试纸条对戊唑醇的肉眼观察检测灵敏度为 6.25 ng/mL (结合样品前处理过程, 换算后为 0.05 mg/kg), 满足国家标准中对小麦、蔬菜中农药最大残留限量检测的要求(0.05 ~ 1.00 mg/kg, GB2763-2016)。此试纸条特异性高, 对其它

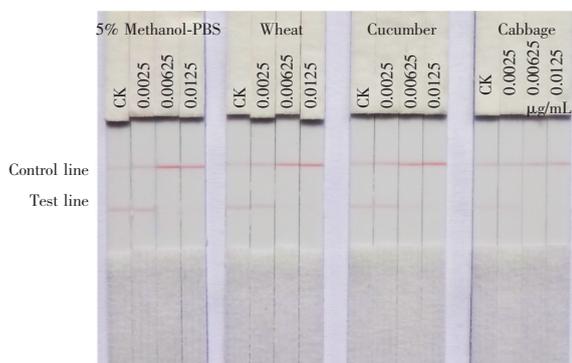


图 7 添加样品中戊唑醇的试纸条检测结果

Fig. 7 Results of strip test for TEB in spiked samples

三唑类杀菌剂丙环唑、腈菌唑、多效唑、己唑醇无交叉反应, LC-MS/MS 方法的检出限为 1.0 ng/mL。两种方法配合使用, 可实现对小麦、黄瓜和甘蓝样品中戊唑醇的残留的快速、准确、定量分析。

## References

- 1 Narayanan C R, Venkatasubramanian N K. *Tetrahedron Lett.*, **1965**, 6(41): 3639–3646
- 2 HUA Nai-Zhen. *Agrochemicals*, **2013**, 52(11): 781–786, 809  
华乃震. *农药*, **2013**, 52(11): 781–786, 809
- 3 Cavariani C, Velini E D, Bicudo S J, Nakagawa J. *Pesqui. Agropecu. Bras.*, **1994**, 29(7): 1035–1039
- 4 Zhu W, Qiu J, Dang Z, Lv C, Jia G, Li L. *Chirality*, **2010**, 19(2): 141–147
- 5 Munoz-Leoz B, Ruiz-Romera E, Antigüedad I, Garbisu C. *Soil Biol. Biochem.*, **2011**, 43(10): 2176–2183
- 6 China Pesticide Information Network, [2018-12-28] <http://www.chinapesticide.gov.cn/hysj/index.jhtml>  
中国农药信息网登记公告, [2018-12-28] <http://www.chinapesticide.gov.cn/hysj/index.jhtml>
- 7 YANG Xiu-Hong, AN Fei-Yun, LU Dan. *Practical Preventive Medicine*, **2010**, 17(10): 2084–2087  
杨秀鸿, 安飞云, 陆丹. *实用预防医学*, **2010**, 17(10): 2084–2087
- 8 Li S Y, Wu Q, Sun Q Q, Coffin S, Cui W J, Zhu G N. *Aquat. Toxicol.*, **2019**, 211: 116–123
- 9 Li S Y, Sun Q Q, Wu Q, Gui W J, Zhu G N, Schlenk D. *Environ. Pollut.*, **2019**, 249: 1049–1059
- 10 Tebuconazole (ELITE 45 DF). Registration for Use on Cherry, Peach and Nectarine and Tolerance Petition for Residues in or on Cherry and Peach. Tox Review 011857, Mar, 29, 1996 [https://iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=CHEMICALSEARCH:7:::NO:1,3,31,7,12,25:P3\\_XCHEMICAL\\_ID:3984](https://iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=CHEMICALSEARCH:7:::NO:1,3,31,7,12,25:P3_XCHEMICAL_ID:3984)
- 11 GB 2763-2016, *National Food Safety Standard Maximum Residue Limits for Pesticides in Food*. National Standards of the People's Republic of China  
食品安全国家标准食品中农药最大残留限量. 中华人民共和国国家标准. GB 2763-2016
- 12 EU Pesticide Database. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX:32010R0750>
- 13 Dong B Z, Yang Y P, Pang N N, Hu J Y. *Food Chem.*, **2018**, 260: 66–72
- 14 Zhang Q, Zhou L L, Yang Y, Hua X D, Shi H Y, Wang M H. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **2016**, 117: 1–6
- 15 Wang X, Jia R B, Song Y, Wang M Q, Zhao Q H, Sun S H. *Microchem. J.*, **2019**, 149: 104013
- 16 LIU Jun, LIU Qian, CHENG Yun-Bin, SHEN Jing, CHEN Xin. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, **2018**, 46(35): 171–173  
刘军, 刘骞, 程运斌, 沈菁, 陈鑫. *安徽农业科学*, **2018**, 46(35): 171–173
- 17 Ackermann Y, Curtui V, Dietrich R, Gross M., Latif H, Märtilbauer E, Usleber E. *J. Agric. Food Chem.*, **2011**, 59: 6360–6368
- 18 JIN Ren-Yao, ZHU Guo-Nian. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, **2013**, (04): 515–522  
金仁耀, 朱国念. *核农学报*, **2013**, (04): 515–522
- 19 HUANG Jun-Ran, GAI Ling, YE Zun-Zhong, WANG Jian-Ping. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2010**, 38(10): 1483–1486  
黄君冉, 盖玲, 叶尊忠, 王剑平. *分析化学*, **2010**, 38(10): 1483–1486
- 20 GONG Hang, LIU Bei-Bei, LI Pan, HE Dan, GUO Yi-Rong, WANG Li-Min, HUA Xiu-De, WANG Ming-Hua, LIU Feng-Quan, XU Zheng-Lin, ZHANG Cun-Zheng, WANG Li. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2018**, 46(6): 938–946  
龚航, 刘贝贝, 李盼, 何丹, 郭逸蓉, 王利民, 华修德, 王鸣华, 刘凤权, 徐振林, 张存政, 王丽. *分析化学*, **2018**, 46(6): 938–946
- 21 WHANG Qian, LI Kang, CHEN Shu-Fen, LU Jian. *Journal of Instrumental Analysis*, **2009**, 28(4): 458–460  
王钱, 李康, 陈树芬, 陆健. *分析测试学报*, **2009**, 28(4): 458–460
- 22 Danks C, Chaudhry M Q, Parker L, Barker I, Banks J N. *Food Agr. Immunol.*, **2001**, 13(3): 151–159
- 23 Qi P P, Wang J, Wang Z W, Wang X, Wang X Y, Xu X H, Xu H, Di S S, Zhang H, Wang Q, Wang X Q. *Electrochim. Acta*, **2018**, 274, 406–414
- 24 Chen X J, Li Z Z, Sun F X, Cao X T, Wang Y, Cao L, Gao H L, Gao D, Wang Y W. *Food Agr. Immunol.*, **2019**, 30(1): 677–691

- 25 WANG Y L, Xu J L, Qiu Y L, Li P, Liu B B, Yang L F, Bogdan Barnych, Bruce D, Hammock, Zhang C Z. *J. Agric. Food Chem.*, **2019**, 67(32): 9096–9103
- 26 HU Jing, GUO Yi-Rong, LIANG Xiao, LIU Xian-Jin, ZHU Guo-Nian, LIU Feng-Quan, WANG Ming-Hua, WANG Li-Min, HUA Xiu-De, ZHANG Cun-Zheng. *Chinese J. Anal. Chem.*, **2016**, 44(12): 1900–1906  
胡静, 郭逸蓉, 梁晓, 刘贤金, 朱国念, 刘凤权, 王鸣华, 王利民, 华修德, 张存政. *分析化学*, **2016**, 44(12): 1900–1906
- 27 WANG Su-Ru, GE Hui-Lin, HAN Bing-Jun, ZHAO Fang-Fang. *Journal of Jilin Agricultural*, **2017**, 23(18): 70–74  
王素茹, 葛会林, 韩丙军, 赵方方. *吉林农业*, **2017**, 23(18): 70–74

## Lateral Flow Assay for Determination of Tebuconazole in Agricultural Products

XU Jun-Li<sup>1,2</sup>, LIU Bei-Bei<sup>2</sup>, WANG Yu-Long<sup>2</sup>, LI Pan<sup>2</sup>, YANG Kang<sup>2</sup>, WU Qin<sup>2</sup>,  
JIANG Lan<sup>2</sup>, ZHANG Hao-Ran<sup>2</sup>, YANG Li-Fei<sup>\*1</sup>, ZHANG Cun-Zheng<sup>\*2,3</sup>

<sup>1</sup>(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

<sup>2</sup>(Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

<sup>3</sup>(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract** A Lateral flow assay was developed for the rapid determination of Tebuconazole residues in wheat and vegetables based on the high affinity and specific anti-Tebuconazole monoclonal antibody. For the lateral flow assay development, firstly, 20 nm size colloidal gold nanoparticle was synthesized to label anti-Tebuconazole monoclonal antibody (Mab) as a detection agent. Teb-OVA (0.3 mg/mL) conjugate and goat anti-mouse IgG antibody (1 mg/mL) were coated on nitric acid fiber membrane (NC) to form the test line (T) and quality control line (C), respectively. Under the optimized conditions, the assembled immunochromatographic strip could accomplish the detection of Tebuconazole within 15 min. The Limit of detection observed by naked eyes was 6.25 ng/mL, with negligible cross-reactivity to the analogs of Tebuconazole. Meanwhile, for comparison, a high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was established to determine Tebuconazole accurately and quantitatively. The results released that these two developed methods matched each other very well. These two methods could be successfully employed for the detection of Tebuconazole in wheat, cucumber, and cabbage, high-throughput, specific and precise. Immunochromatographic strip could contribute to on-site determination, and LC-MS/MS based method provided accurate quantification.

**Keywords** Tebuconazole residue; Immunochromatographic strip; High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

(Received 26 June 2019; accepted 15 August 2019)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0200803-3) and the Independent Innovation Project of Jiangsu Province (No. CX (17) 1003).