

王春琼, 陈丹, 罗旭轲, 等. 胶体金免疫层析法定量检测烟叶中霜霉威残留[J]. 中国烟草学报, 2023, 29(3). WANG Chunqiong, CHEN Dan, LUO Xuke, et al. Quantitative detection of propamocarb residues in tobacco leaf by colloidal gold immunochromatography[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2023, 29(3). doi:10.16472/j.chinatobacco. 2022.170

胶体金免疫层析法定量检测烟叶中霜霉威残留

王春琼¹, 陈丹¹, 罗旭轲^{2,3}, 郭建⁴, 杨飞⁵, 孙浩巍¹, 张轲¹, 蔡洁云¹,
张晓伟¹, 李晓芳^{2,3}, 王兆芹^{2,3*}

1 云南省烟草质量监督检测站, 云南昆明高新开发区科医路 41 号 650106;

2 北京勤邦科技股份有限公司, 北京昌平国际信息产业基地高新四街 8 号 102206;

3 北京市食品安全免疫快速检测工程技术研究中心, 北京昌平国际信息产业基地高新四街 8 号 102206;

4 云南省烟草公司红河州公司, 云南弥勒温泉路 652300;

5 国家烟草质量监督检验中心, 河南郑州高新技术产业开发区翠竹街 6 号 450001

摘要:【背景和目的】利用胶体金免疫层析技术研制霜霉威定量检测试纸条, 并探究其在烟叶样品中的应用。【方法】将霜霉威单克隆抗体标记在胶体金颗粒上制备金标抗体, 优化试纸条反应材料, 构建霜霉威免疫层析定量试纸条, 验证该试纸条的检出限、定量限、准确性和特异性。【结果】(1)所研制的霜霉威定量试纸条的检测范围为 1.25~20 mg/kg, 检出限和定量限分别为 1.187 mg/kg 和 3.147 mg/kg; 加标回收率 84.7%~116.7%, 相对标准偏差 5.3%~10.9%。(2)可特异性识别霜霉威, 对烟草中常用杀菌剂无交叉反应。(3)试纸条检测结果与高效液相色谱-串联质谱法检测结果的相对误差在 4.3%~20.1%, $R^2=0.9898$ 。【结论】该试纸条具有操作方便、检测时间短、准确性高、特异性强的优点, 可作为霜霉威残留现场检测的有效手段。

关键词: 霜霉威; 烟叶; 胶体金免疫层析技术; 定量检测

霜霉威 (Propamocarb) 是一种内吸性的高效、广谱、低毒性氨基甲酸酯类杀菌剂, 可用于烟草、花卉及果蔬的霜霉病、猝倒病等真菌病害的预防和治疗^[1], 已成为全球应用较广泛的杀菌剂之一^[2]。霜霉威在农作物中的残留风险较高^[3-6], 我国规定霜霉威的最大残留限量 (MRLs) 为: 蔬菜、水果 0.2~100 mg/kg^[7], 烟叶 10 mg/kg^[8]。因此, 开发敏感、准确、高效的农产品和农业环境中霜霉威的检测方法是十分必要的。

目前, 气相色谱 (GC)、液相色谱-串联质谱 (LC-MS/MS) 等仪器分析方法已广泛用于霜霉威的检测^[9-11], 这些方法对霜霉威残留监测的定量限为 0.01~0.05 mg/kg, 具有良好的准确性和灵敏度, 但需要昂贵的仪器设备、专业的技术人员, 且样品前处理

繁琐、检测耗时长、不适用于现场检测和高通量检测。免疫分析技术是一种用户友好、经济高效、高通量的分析方法, 能很好地弥补仪器检测方法的不足, 为仪器分析提供补充方法, 以满足不同的分析需求^[12]。其中胶体金免疫层析技术作为近年最快速的新型检测技术之一, 已在食品^[13]、环境^[14]和农业^[15]等农药残留检测领域广泛应用, 并逐渐由定性判定向定量检测方向发展^[16-18]。但目前霜霉威快速检测方法尚少见报道, 且主要集中于果蔬等基质^[19-20], 未见烟叶中霜霉威快速检测方法相关报道。为此, 本研究提供了一种胶体金免疫层析试纸条, 可快速检测烟叶中霜霉威的残留, 以期从源头减少污染烟叶进入生产和流通环节, 具有一定的实际应用价值。

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技项目“烟叶农残及病害快速检测技术的研发与应用”(2021530000241021)

作者简介: 王春琼 (1990—), 硕士研究生, 工程师, 主要从事烟草化学研究工作, Tel: 0871-68319270, Email: wangchunqiong.ytqs@outlook.com

通讯作者: 王兆芹 (1976—), Tel: 010-80700520, Email: beijingqinbang@kwinbon.com

收稿日期: 2022-09-28; **网络出版日期:** 2023-02-17

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

烟叶样品, 产自云南, 其中 20 份为经 HPLC-MS/MS^[21]检测霜霉威含量 <0.014 mg/kg 的阴性样品; 6 份为经 HPLC-MS/MS 检测霜霉威含量 ≥ 1.187 mg/kg 的阳性样品。

霜霉威、多菌灵、噁霜灵、甲霜灵、稻瘟灵、甲基硫菌灵标准品, 纯度均 $\geq 98\%$, 购自 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司; 1,4-环己烷二异氰酸酯、二甲基亚砜(DMSO)、卵清白蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA)、羊抗鼠 IgG, 购自 Sigma 公司; 柠檬酸三钠、氯金酸, 购自国药集团化学试剂北京有限公司; 霜霉威单克隆抗体, 北京勤邦科技股份有限公司制备; 硝酸纤维素

膜(NC膜)、玻璃纤维膜、样品垫、吸水垫、PVC底板, 购自上海捷宁生物科技有限公司。

XYZ3050 胶体金点样系统, 美国 BioDot 公司; CT 300 数控切条机, 上海金标生物科技有限公司; GT-810 胶体金分析仪, 北京勤邦科技股份有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 霜霉威半抗原的合成

霜霉威半抗原的合成如图 1 所示。称取 1.88 g 霜霉威溶于 20 mL 吡啶中, 加入 2.49 g 1,4-环己烷二异氰酸酯和 1.3 mL 三乙胺, 加热至 80℃ 反应 3 h; 停止反应, 旋蒸除去吡啶和三乙胺, 得到红色油状物, 用 35 mL 体积比为 1:15 的乙醚-正己烷混合溶液重结晶, 得到霜霉威半抗原。

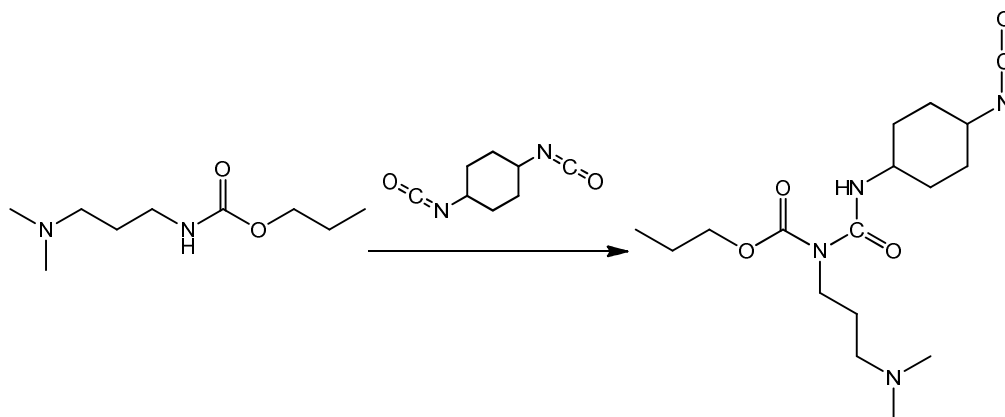


图 1 霜霉威半抗原合成路线图

Fig.1 Synthesis route of propamocarb hapten

1.2.2 包被原的制备

取 7.8 mg 霜霉威半抗原溶于 1 mL DMSO 中; 取 50 mg OVA 溶于 6 mL 碳酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 9.5)中; 将半抗原溶液逐滴加到 OVA 溶液中, 室温反应 4 h, 停止反应, 用 0.02 mol/L 的磷酸盐缓冲液透析纯化 3 d, 每天换液 3 次, 得到霜霉威半抗原-OVA 偶联物, 即为包被原, 分装, -20℃ 保存。

1.2.3 金标抗体的制备

参考柠檬酸三钠还原法制备胶体金颗粒^[22], 采用肉眼观察和透射电镜对胶体金进行鉴定; 然后将霜霉威单克隆抗体标记到金颗粒表面。取 1 mL 胶体金溶液, 加入 3 μ L pH 为 7.4 的 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液, 摇匀, 再加入 80 μ L 的 0.1 mg/mL 霜霉威单克隆抗体溶液, 至霜霉威抗体终浓度为 8 μ g/mL, 搅拌混匀后室温反应 10 min; 加入 10% BSA 溶液至其终质量分

数为 1%, 搅拌混合后室温反应 10 min; 然后 12000 r/min、4℃ 离心 5 min, 弃去上清液, 沉淀用含 0.5% BSA、0.05% Triton X-100 的 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次后复溶, 4℃ 保存。

1.2.4 试纸条的制备

以包被原和羊抗鼠 IgG 分别作为 NC 膜的检测线(T线)和质控线(C线), 按 1 μ L/cm 的速度进行划线, 两线相隔 5 mm, 包被完毕后置于 37℃ 干燥 16 h 备用; 将金标抗体按 0.01 mL/cm 的量均匀喷涂在玻璃纤维膜上制备金标垫, 37℃ 干燥 30 min 备用; 将样品垫浸泡在活化复溶液中 2 h, 完毕后 37℃ 干燥 2 h 备用; 将制备好的 NC 膜粘贴到 PVC 底板的中心, 将金标垫、样品垫和吸水垫叠加粘贴到底板上(图 2), 最后将板切割成 4 mm 宽的条带, 装在特制的塑料制卡中。

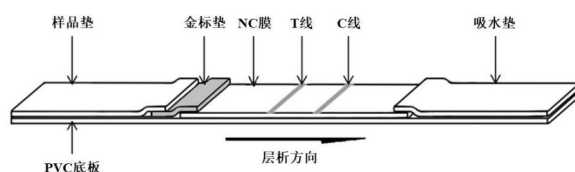


图2 试纸条结构示意图

Fig.2 Structure diagram of the test strip

1.2.5 样品处理及检测方法

烟叶抽去主脉后剪成片或切成丝，40℃下烘干，利用磨粉机将其粉碎；称取 (1.00 ± 0.05) g粉碎的样品，加入5 mL甲醇，振荡1 min；移取100 μ L上清液，加入900 μ L 0.1 mol/L磷酸缓冲液，混匀即为待检液。吸取100 μ L待检液，垂直滴加于样品垫处，反应10 min后，用胶体金读数仪读取T线和C线的显色强度值，并计算T/C值。

1.2.6 试纸条的优化

① NC膜的筛选：选择不同型号的NC膜（CN 140、PALL 90、YN 100），经干燥、组装试纸条后，检测添加不同浓度（0、2.5、10、20 mg/kg）霜霉威的烟叶样本，读取T线的显色强度值，比较抑制率。

② 样品垫活化复溶液的筛选：将样品垫活化复溶液的常用成分0.02 mol/L PB（pH 7.4）、表面活性剂（Triton X-100、蔗糖）、BSA等组成5种配方浸泡样品垫，组装成试纸条，检测霜霉威阴性样本，重复测定15次，比较T/C值的相对标准偏差（RSD）。

③ 样品垫的筛选：用筛选出的最佳活化复溶液处理不同型号的样品垫（BX-SB06、WFB、BX-6613），经干燥、组装试纸条后，检测添加不同浓度（0、2.5、10、20 mg/kg）霜霉威的烟叶样本，读取T线的显色强度值，比较抑制率。

1.2.7 试纸条性能指标的确定

① 标准曲线的建立：按样品处理及检测方法测定霜霉威浓度分别为0、1.25、2.5、5、10、15、20 mg/kg的烟叶样品的T/C值，每个浓度平行测定6次，计算

平均值，根据各霜霉威浓度对应的T/C值绘制标准曲线。

② 检出限和定量限：对1.1中20份阴性烟叶样品进行分析，通过标准曲线计算各样品T/C值对应的浓度，检出限（Limit of detection, LOD） $=\bar{X}+3S$ ，定量限（Limit of quantitation, LOQ） $=\bar{X}+10S$ ，其中 $\bar{X}$ 为20份样品的平均浓度值， S 为标准偏差。

③ 准确性：从1.1中20份阴性烟叶样品中随机抽取1份，用霜霉威标准品配制成质量浓度为5、10、20 mg/kg的加标样品，用试纸条检测，每个浓度重复测定6次，计算添加回收率和相对标准偏差，以评价该方法的准确性。

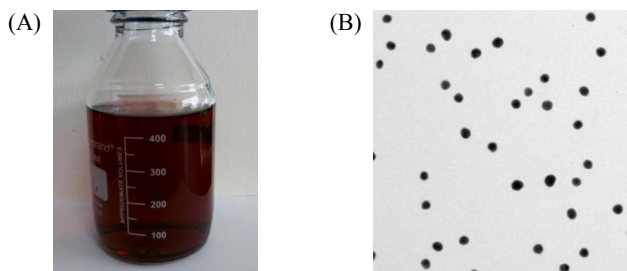
④ 特异性：从1.1中20份阴性烟叶样品中随机抽取1份，向其中添加烟草常用杀菌剂（多菌灵、噁霜灵、甲霜灵、稻瘟灵、甲基硫菌灵）至浓度分别为100、1000 mg/kg，用试纸条进行检测，考察该方法的特异性。

⑤ 与仪器方法检测结果比对：用本研究试纸条对1.1中6份阳性烟叶样品进行检测，比较其与仪器方法的一致性。

2 结果与分析

2.1 胶体金的质量鉴定

通过肉眼观察，制备好的胶体金溶液呈酒红色，颜色清澈、无杂质（图3A），存放一段时间未出现絮状物；通过透射电镜观察，胶体金颗粒大小均一，未出现聚集现象，经计算，粒径为20 nm左右（图3B）。



注：(A)制备好的胶体金溶液；(B)胶体金透射电镜图（ $\times 100000$ ）。

图3 胶体金质量鉴定结果

Fig.3 Quality identification results of colloidal gold

2.2 试纸条的优化

2.2.1 NC 膜的筛选

由表 1 可知,低浓度 (2.5 mg/kg) 时不同型号 NC 膜的抑制率差异不显著;高浓度 (10、20 mg/kg) 时 CN 140 的抑制率显著高于其他两种型号,这可能是由于 CN 140 膜的层析速度较慢,金标抗体和样本中的霜霉威可以充分结合,致使被 T 线上的包被原 (霜霉威半抗原-OVA 偶联物) 拦截的金标抗体减少, T 线颜色更浅,抑制率更高,因此选择 CN 140 为最优 NC 膜。

2.2.2 样品垫活化复溶液的筛选

样品垫活化复溶液的筛选结果见表 2。复溶液中添加糖类,可改善界面亲水状态,提高液体层析的润湿效率,使层析过程更稳定;而非离子表面活性剂 Triton X-100 的加入,起到增溶、润湿的作用^[23]。综合考虑,选择 5# (PB+0.5% BSA+0.05% Triton X-100+5.0%蔗糖) 作为最佳样品垫活化复溶液。

2.2.3 样品垫的筛选

由表 3 可知,WFB 的抑制率显著优于其他两种型号 (表 3),选择 WFB 为最优样品垫。

2.3 标准曲线的建立

以霜霉威浓度为横坐标, T/C 值为纵坐标绘制标准曲线;并以 T/C 值为纵坐标,霜霉威浓度的对数值为横坐标,对标准曲线进行拟合 (图 4),发现在 1.25~

20 mg/kg 浓度范围内, T/C 值与霜霉威浓度对数呈现良好的线性关系,回归方程 $Y = -2.7410 \lg X + 4.1206$, $R^2 = 0.9628$ 。

2.4 检出限和定量限分析

20 份阴性烟叶样品检测结果见表 4,由此可知,烟叶样品中霜霉威的检出限为 1.187 mg/kg,定量限为 3.147 mg/kg。

2.5 准确性分析

准确性分析结果如表 5 所示,霜霉威定量检测试纸条的加标回收率为 84.7%~116.7%,相对标准偏差为 5.3%~10.9%,表明试纸条准确性和精密度良好。

2.6 特异性分析

由表 6 可知,利用霜霉威试纸条检测烟草中常用杀菌剂,如多菌灵、噁霜灵、甲霜灵、稻瘟灵、甲基硫菌灵等,结果均为阴性,表明该试纸条对烟草中常用杀菌剂无交叉反应,特异性良好。

2.7 与仪器方法检测结果比对

由表 7 可知,试纸条检测结果相对误差在 4.3%~20.1%。对两种检测结果的相关性分析如图 5 所示,试纸条检测结果与 HPLC-MS/MS 检测结果的线性方程为 $Y = 1.1721X - 0.3862$, $R^2 = 0.9898$,具有良好线性相关,表明本研究试纸条可应用于烟叶中霜霉威残留的检测筛选。

表 1 NC 膜筛选结果

Tab.1 The screening results of NC membrane

霜霉威浓度 (Concentration of propamocarb) / (mg/kg)	抑制率 (Inhibition rate) / %		
	CN 140	PALL 90	YN 100
0	0	0	0
2.5	51.6±3.6 ^a	44.3±2.5 ^{ab}	37.6±3.7 ^b
10	70.4±0.9 ^a	61.6±1.4 ^b	67.5±1.1 ^c
20	88.8±0.2 ^a	80.7±0.2 ^b	79.3±0.2 ^c

注: ① 抑制率=(0 mg/kg 样品 T 值 - 加标样品 T 值)/(0 mg/kg 样品 T 值)×100%;

② 同行中不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平上差异显著,下同。

Note: ① Inhibition rate=(T value of 0 mg/kg sample - T value of spiked sample)/(T value of 0 mg/kg sample)×100%.

② Different lowercase letters in the same line indicate significant difference at the level of $P < 0.05$, the same below.

表 2 样品垫活化复溶液筛选结果

Tab.2 The screening results of working buffers for the sample pad

复溶液编号 (Number of working buffers)	组分 (Component)	T/C 平均值 (Average T/C value, $n = 15$)	相对标准偏差 (RSD, $n = 15$) / %
1#	PB+0.5% BSA	4.235	11.6
2#	PB+0.5% BSA+2.5%蔗糖	3.967	9.3
3#	PB+0.5% BSA+0.05% Triton X-100	4.152	12.7
4#	PB+0.5% BSA+0.1% Triton X-100+2.5%蔗糖	4.083	13.2
5#	PB+0.5% BSA+0.05% Triton X-100+5.0%蔗糖	4.326	4.5

表 3 样品垫筛选结果
Tab.3 The screening results of sample pad

霜霉威浓度 (Concentration of propamocarb) /(mg/kg)	抑制率 (Inhibition rate) /%		
	BX-SB06	WFB	BX-6613
0	0	0	0
2.5	37.7±3.9 ^a	57.5±1.1 ^b	39.7±2.7 ^a
10	51.3±3.0 ^a	73.3±0.8 ^b	66.5±1.3 ^c
20	74.3±0.9 ^a	85.7±0.8 ^b	71.6±1.0 ^c

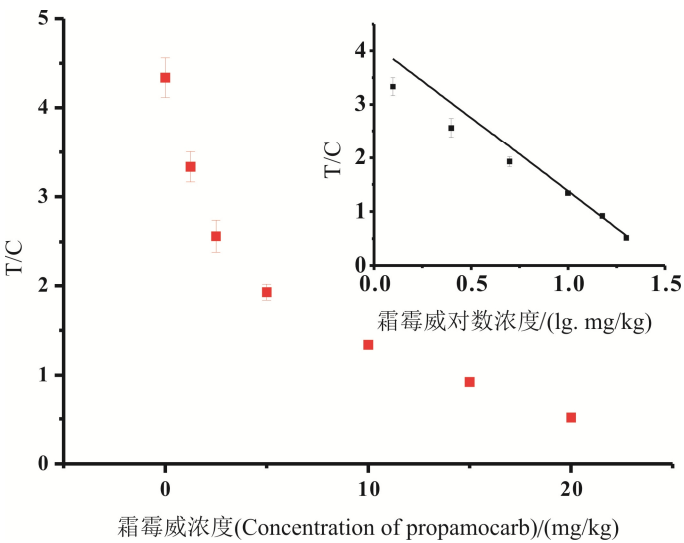


图 4 试纸条标准曲线
Fig.4 Standard curve of the test strip

表 4 试纸条检测烟叶样本的检出限和定量限
Tab.4 LOD and LOQ of the test strip for tobacco samples

样品编号 (Sample number)	测定值 (Measured value) /(mg/kg)	样品编号 (Sample number)	测定值 (Measured value) /(mg/kg)
1	0.225	11	0.084
2	0.656	12	0.097
3	0.093	13	0.144
4	0.666	14	0.110
5	0.563	15	0.281
6	0.725	16	0.898
7	0.086	17	0.153
8	0.751	18	0.088
9	0.146	19	0.625
10	0.390	20	0.156
平均值 (Average value)/(mg/kg)	0.347	标准偏差 (Standard deviation)	0.280
检出限 (LOD) /(mg/kg)	1.187	定量限 (LOQ) /(mg/kg)	3.147

表 5 试纸条的准确性和精密度结果
Tab.5 Accuracy and precision of the test strip

添加浓度 (Add concentration) / (mg/kg)	测定值 (Measured value) /(mg/kg)						平均值 (Average value)/(mg/kg)	回收率 (Recovery rate) /%	相对标准偏 差 (RSD) / %
5	4.976	5.540	4.565	4.998	5.093	5.679	5.142	102.8	7.9
10	10.630	10.772	11.667	10.575	9.895	10.883	10.737	107.4	5.3
20	19.920	19.496	16.947	21.398	17.209	22.156	19.521	97.6	10.9

表 6 试纸条的特异性结果
Tab.6 Specificity of the test strip

常用杀菌剂 (Common fungicides)	检测结果 (Detection results)		交叉反应率 (Cross-reaction rate)
	100 mg/kg	1000 mg/kg	
多菌灵	阴性	阴性	无
噁霜灵	阴性	阴性	无
甲霜灵	阴性	阴性	无
稻瘟灵	阴性	阴性	无
甲基硫菌灵	阴性	阴性	无

表 7 试纸条与高效液相色谱-串联质谱法检测烟叶中的霜霉威结果
Tab.7 Detection of propamocarb in tobacco leaves by test strip and HPLC-MS/MS method

样本号 (Sample)	高效液相色谱-串联质谱法测定值 (Detection of value by HPLC-MS/MS) / (mg/kg)	试纸条测定值 (Test strip determination value) / (mg/kg)	相对误差 (Absolute relative deviation) / %
1	3.90	3.73	4.3
2	23.53	18.80	20.1
3	24.13	22.68	6.0
4	11.78	10.57	10.3
5	38.08	33.34	12.4
6	37.35	31.25	16.3

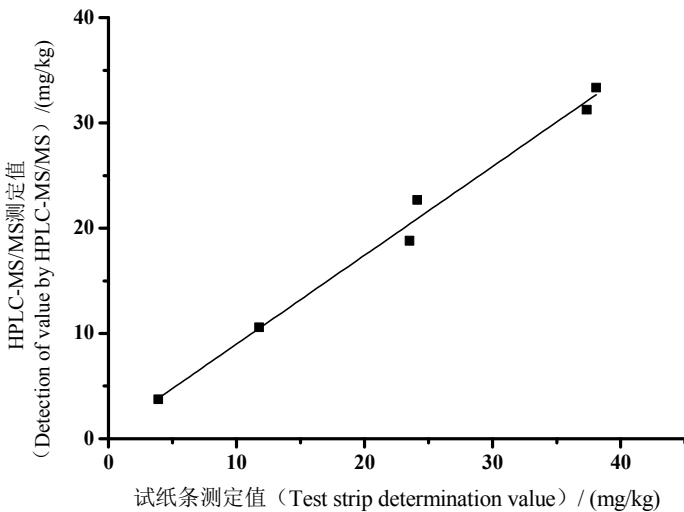


图 5 试纸条与 HPLC-MS/MS 法检测烟叶中霜霉威的相关性结果
Fig.5 Correlation of test results of propamocarb in tobacco By test strip and HPLC-MS/MS

3 讨论

NC 膜又叫硝酸纤维素膜,是胶体金试纸中必不可少的材料,固定着 T 线抗原和 C 线二抗,抗原抗体的免疫反应也在此进行^[24]。研究表明,NC 膜表面孔径的大小决定了金标液在膜表面层析的速度、发生免疫反应的效率及灵敏度,但是非特异性结合会使假阴性率提高^[25-26]。所以,为了提高灵敏度和检测效率,选择合适的 NC 膜非常重要。本研究比较了 3 种型号 NC 膜的显色情况,考察层析速度和膜面金颗粒背景残留的状态后,选择了孔径较小的慢速 NC 膜作为层析介质,这样金标抗体和样本中的霜霉威可以充分结合,提高了检测灵敏度。

样品垫的功能主要是使样品液能够自由进入金标垫中。选择扩散性好、分散性均匀的样品垫,不仅能使样品很好地扩散进入 NC 膜上,还能阻挡非特异性的结合物^[27]。不同的样品垫对缓冲液层析的速度及 T 线、C 线的显色程度有较大影响,为了使试纸条有较好的层析效果,本研究对 3 种不同型号的样品垫进行了比较优化。

用于胶体金试纸条定量模式的主要方法是 T 值法和 T/C 比值法。有研究发现,T 线显色会随时间延长而加深,容易受工艺条件变动或样本差异等因素的影响,造成结果偏差较大,不利于稳定的定量分析;而 T/C 比值定量符合免疫动力学曲线的一般变化规律,能够避免环境差异或试纸条显色差异的影响^[28-29]。因此,本研究通过系列浓度霜霉威标准溶液的 T/C 值来建立标准曲线;同时为了避免样本基质的干扰,以样本溶液来配置霜霉威标准溶液,较大地提高了检测灵敏度。

目前,关于霜霉威胶体金免疫层析分析方法的报道并不多,仅有胥传来等^[30]筛选了一株分泌霜霉威单克隆抗体的杂交瘤细胞株,其分泌产生对霜霉威具有较好亲和力和较高灵敏度的单克隆抗体,对霜霉威的 50%抑制浓度(IC₅₀)为 3.24 ng/mL,但未对其进行进一步的胶体金免疫层析方法研究;唐晓宾等^[19]比较了

胶体金法与 LC-MS/MS 在霜霉威检测中的应用,证实了胶体金试纸检测蔬菜中霜霉威残留的可靠性,但所用胶体金试纸条为定性产品。与已有方法相比,本研究建立的胶体金免疫层析法可实现霜霉威的定量检测,且灵敏度较高。

4 结论

本试验所研制的霜霉威胶体金免疫层析试纸条为定量产品,能有效检测烟叶中残留的霜霉威药物。①所研制的霜霉威定量试纸条的检测范围为 1.25~20 mg/kg,检出限和定量限分别为 1.187 mg/kg 和 3.147 mg/kg;加标回收率 84.7%~116.7%,相对标准偏差 5.3%~10.9%。②对于烟草中常用的杀菌剂,试纸条与其无交叉反应,可特异性地定量检测烟叶中的霜霉威残留。③试纸条检测结果与高效液相色谱-串联质谱法检测结果的相对误差在 4.3%~20.1%, $R^2=0.9898$,但操作简单,10~15 min 即可显示出结果,极大地缩短了检测时间,加快了现场检查的效率,适用于相关部门在对霜霉威残留的现场检测中使用。

参考文献

- [1] 王迪轩. 霜霉威[J]. 农业知识, 2018(28): 62-63.
WANG Dixuan. Propamocarb[J]. Agriculture Knowledge, 2018(28): 62-63.
- [2] LIU Chunhong, QIN Zhiwei, ZHOU Xiuyan, et al. Expression and functional analysis of the Propamocarb-related gene *CsDIR16* in cucumbers[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 1-12.
- [3] ZHANG Rui, PAN Zihong, WANG Xiaoyu, et al. Short-term propamocarb exposure induces hepatic metabolism disorder associated with gut microbiota dysbiosis in adult male zebrafish[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2019, 51(1): 88-96.
- [4] 司晓喜, 刘志华, 李中昌, 等. 5 种农药在采收前和初烤后的烟叶及土壤中的残留量变化[J]. 烟草科技, 2016, 49(7): 44-50.
SI Xiaoxi, LIU Zhihua, LI Zhongchang, et al. Residues of five pesticides in tobacco leaves before harvesting and after flue-curing and soils[J]. Tobacco Science & Technology, 2016, 49(7): 44-50.
- [5] 史晓琼. 气相色谱质谱法同时监测地表水中 4 种氨基甲酸酯类农药[J]. 化学工程师, 2022, 36(7): 27-29.
SHI Xiaoqiong. Simultaneous monitoring of four carbamate pesticides in surface water by GC-MS[J]. Chemical Engineer, 2022, 36(7): 27-29.
- [6] 李敏, 安文佳, 张海燕, 等. 蔬菜中农药残留数据的合规分析[J].

- 中国口岸科学技术, 2022, 4(3): 66-70.
- LI Min, AN Wenjia, ZHANG Haiyan, et al. Compliance analysis of pesticide residue in vegetables[J]. China Port Science and Technology, 2022, 4(3): 66-70.
- [7] GB 2763—2021 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量[S].
GB 2763—2021 National food safety standard—Maximum residue limits for pesticides in food[S].
- [8] YQ 50—2014 烟叶农药最大残留限量[S].
YQ 50—2014 Maximum residue limits for pesticides in tobacco[S].
- [9] 卢静宜, 杨仁斌, 傅强, 等. 气相色谱-氮磷检测器测定辣椒及其土壤中的霜霉威残留[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(2): 149-151.
LU Jingyi, YANG Renbin, FU Qiang, et al. Residue analysis of propamocarb in peppers and soil by GC-NPD[J]. Journal of Anhui Agri. Sci., 2015, 43(2): 149-151.
- [10] 冯达, 马月, 侯新港, 等. QuEChERS-HPLC-MS/MS 法测定西葫芦中霜霉威[J]. 农药, 2020, 59(4): 288-291+305.
FENG Da, MA Yue, HOU Xingang, et al. Determination of propamocarb residue in summer squash by QuEChERS-HPLC-MS/MS[J]. Agrochemicals, 2020, 59(4): 288-291+305.
- [11] CHEN Kaiying, LI Shasha, HU Mingfeng, et al. Dissipation dynamics of fenamidone and propamocarb hydrochloride in pepper, soil and residue analysis in vegetables by ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry[J]. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 2017, 97(2): 134-144.
- [12] ESTEVE-TURRILLAS Francesc A, MERCADER Josep V, AGULLO Consuelo, et al. Highly sensitive monoclonal antibody-based immunoassays for boscalid analysis in strawberries[J]. Food Chemistry, 2018, 267(30): 2-9.
- [13] 杨琳芬, 万宇平, 崔廷婷, 等. 胶体金免疫层析法快速检测水果中三氯杀螨醇残留[J]. 农药, 2021, 60(2): 131-134.
YANG Linfen, WAN Yuping, CUI Tingting, et al. Rapid determination of dicofol residues in fruits by colloidal gold immunochromatography[J]. Agrochemicals, 2021, 60(2): 131-134.
- [14] 孙蔚名. 农产品与水体中的克百威及其代谢物残留的免疫检测技术研究[D]. 海南大学, 2021.
SUN Weiming. Research on immunoassay techniques for carbofuran and the metabolite residues in agricultural products and water[D]. Hainan University, 2021.
- [15] 许俊丽, 刘贝贝, 王玉龙, 等. 胶体金免疫层析试纸法检测农产品中戊唑醇残留[J]. 分析化学, 2019, 47(11): 1823-1831.
XU Junli, LIU Beibei, WANG Yulong, et al. Lateral flow assay for determination of tebuconazole in agricultural products[J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2019, 47(11): 1823-1831.
- [16] 吉美奇, 王维力, 石三俊, 等. 胶体金免疫层析法快速检测果蔬中的三唑酮及其代谢物残留[J]. 食品安全质量检测学报, 2022, 13(14): 4519-4526.
JI Meiqi, WANG Weili, SHI Sanjun, et al. Rapid determination of triadimefon and its metabolite residues in fruits and vegetables by colloidal gold immunochromatographic assay[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2022, 13(14): 4519-4526.
- [17] 何晓婷, 陈子键, 黄松, 等. 基于纳米抗体的胶体金免疫层析法快速检测蔬菜中的腐霉利[J/OL]. 食品科学: 1-14[2022-11-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220425.1439.014.htm> l.
HE Xiaoting, CHEN Zijian, HUANG Song, et al. Rapid detection of procymidone in foods by nanobody-based colloidal gold immunochromatography[J/OL]. Food Science: 1-14[2022-11-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20220425.1439.014.htm> l.
- [18] 李晓芳, 周润鑫, 王春琼, 等. 烟叶中多菌灵胶体金定量试纸条的研制及应用[J]. 烟草科技, 2022, 55(7): 33-39.
LI Xiaofang, ZHOU Runxin, WANG Chunqiong, et al. Colloidal gold test strip to quantify carbendazim residues in tobacco leaves: development and application[J]. Tobacco Science & Technology, 2022, 55(7): 33-39.
- [19] 唐晓宾, 许泓, 万志全, 等. 检测霜霉威的两种方法的比较[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(1): 36-38.
TANG Xiaobin, XU Hong, WAN Zhiqian, et al. Comparison on two methods for detection of propamocarb[J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2009, 21(1): 36-38.
- [20] LIU Jie, XU Xinxin, WU Aihong, et al. Preparing monoclonal antibodies and developing immunochromatographic assay strips for the determination of propamocarb levels[J]. Food Chemistry, 2022, 370: 131284.1-131284.8.
- [21] YC/T 405.1—2011 烟草及烟草制品 多种农药残留量的测定 第1部分: 高效液相色谱-串联质谱法[S].
YC/T 405.1—2011 Tobacco and tobacco products—Determination of multi-pesticide residues—Part 1: High performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method[S].
- [22] 曹涤非, 薛佳莹, 崔向红, 等. 柠檬酸三钠法制备胶体金及其应用[J]. 化学工程师, 2019, 33(12): 12-14+24.
CAO Difei, XUE Jiaying, CUI Xianghong, et al. Preparation and application of colloidal gold by trisodium citrate[J]. Chemical Engineer, 2019, 33(12): 12-14+24.
- [23] 李奕亭. 脱氧雪腐镰刀菌烯醇胶体金检测试纸条的研制[D]. 集美大学, 2016.
LI Yiting. Development of the colloidal gold test paper strip for the detection of deoxynivalenol[D]. Jimei University, 2016.
- [24] 徐田丽. 诺氟沙星单克隆抗体的制备和胶体金试纸条的研制[D]. 集美大学, 2016.
XU Tianli. Production of monoclonal antibody and colloidal gold immunochromatographic test strip against norfloxacin[D]. Jimei University, 2016.
- [25] 高海岗. 孔雀石绿纳米抗体的制备及其免疫层析检测方法的建立与应用[D]. 扬州大学, 2021.
GAO Haigang. Preparation of malachite green nanobody and establishment and application of immune-chromatography detection method[D]. Yangzhou University, 2021.
- [26] 赵粉粉. 动物性食品中酰胺醇类药物残留的免疫分析方法研究[D]. 西北农林科技大学, 2021.
ZHAO Fenfen. Immunoassay for determination of amphenicols

- residue in animal-origin food[D]. Northwest A & F University, 2021.
- [27] 杨英. 基于胶体金免疫层析技术制备快速检测中药中黄曲霉毒素 B₁ 试纸条的研究[D]. 成都中医药大学, 2015.
- YANG Ying. Preparation based on colloidal gold immune chromatography technology rapid detection of aflatoxin B₁ strip in traditional Chinese medicine research[D]. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, 2015.
- [28] 刘坤. 饲料中玉米赤霉烯酮的高效富集及免疫层析定量检测方法的建立[D]. 南昌大学, 2015.
- LIU Kun. Development of efficient enrichment and immunochromatographic assays for quantitative detection of zearalenone in feedstuffs[D]. Nanchang University, 2015.
- [29] ZHI Aimin, LI Binbin, LIU Qingtang, et al. Development of a lateral-flow immunochromatographic test device for the rapid detection of difloxacin residues[J]. Food and Agricultural Immunology, 2010, 21(4): 335-345.
- [30] 胥传来, 刘杰, 匡华, 等. 一株分泌霜霉威单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用: 中国, CN112574956A[P]. 2021-03-30.
- XU Chuanlai, LIU Jie, KUANG Hua, et al. A hybridoma cell line secreting monoclonal antibody against propamocarb and its application: China, CN112574956A[P]. 2021-03-30.

Quantitative detection of propamocarb residues in tobacco leaf by colloidal gold immunochromatography

WANG Chunqiong¹, CHEN Dan¹, LUO Xuke^{2,3}, GUO Jian⁴, YANG Fei⁵, SUN Haowei¹, ZHANG Ke¹, CAI Jieyun¹,
ZHANG Xiaowei¹, LI Xiaofang^{2,3}, WANG Zhaoqin^{2,3*}

1 Yunnan Tobacco Quality Supervision and Test Station, Kunming 650106, China;

2 Beijing Kwinbon Technology Co., Ltd., Beijing 102206, China;

3 Beijing Engineering Research Centre of Food Safety Immunodetection, Beijing 102206, China;

4 Honghe Prefecture Branch of Yunnan Tobacco Company, Mile 652300, China;

5 China National Tobacco Quality Supervision & Test Center, Zhengzhou 450001, China

Abstract: [Objective] This study aims to develop the strip for quantitative detection of propamocarb using colloidal gold immunochromatographic technique, and explore its application in tobacco samples. [Methods] The anti-propamocarb monoclonal antibody were labeled on colloidal gold to prepare gold labeled antibody. Reactive materials were optimized to develop immuno-colloidal gold chromatographic strip for quantitative detection of propamocarb. The limit of detection (LOD), quantitation (LOQ), the accuracy and specificity of the test strip were verified. [Results] 1) The detection range of the developed immune-colloidal gold chromatographic test strip was 1.25-20 mg/kg, and the LOD and LOQ for propamocarb were 1.187 mg/kg and 3.147 mg/kg, respectively. The recoveries were 84.7%-116.7% with the relative standard deviation ranging from 5.3% to 10.9%. 2) The developed test strip was able to identify the propamocarb specifically without cross-reacting with the fungicides commonly used in tobacco. 3) The relative error of the results between the test strip and the high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was 4.3%-20.1%, and the linear correlation coefficient $R^2=0.9898$. [Conclusion] The developed test strip has the advantages of convenient operation, short detection time, high accuracy and strong specificity, which can be used as an effective method for on-site detection of propamocarb residues.

Keywords: propamocarb; tobacco leaf; colloidal gold immunochromatography; quantitative detection

*Corresponding author. Email: beijingqinbang@kwinbon.com