

免疫分析法在农药残留分析中的应用

杨依军, 王 勇, 杨秀荣, 郭永泽, 张玉婷

(天津市植物保护研究所, 天津 300112)

摘要: 简述了近年来免疫分析技术在检测农产品及环境中的除草剂、杀虫剂和杀菌剂残留分析上的研究及应用, 阐明了农药残留免疫分析技术的发展前景。

关键词: 免疫分析; 农药; 残留分析

中图分类号: S481⁺.8 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2001)04- 0119- 06

1 免疫分析法的概念

免疫分析法(Immunoassay IA)是一种以抗体作为生物化学检测器对化合物、酶或蛋白质等物质进行定性和定量分析的分析技术。20世纪90年代以来它在检测粮食、水果、蔬菜、肉、奶、水和土壤中农药的残留分析上得到迅速发展, 成为优先研究、开发和应用的一项分析技术。世界粮农组织(FAO)已向许多国家推荐此项技术, 美国化学学会将免疫分析技术、色谱分析技术(气相和液相)共同列为农药残留分析的主要技术, 其检测的结果具有法律效应^[1]。

免疫分析法具有特异性强、灵敏度高(检测极限可达1~ 1 000 ng/mL)、方便快捷、分析容量大、检测成本低、安全可靠等优点。一般不需要贵重仪器, 可大大简化甚至省去前处理过程, 对使用人员的专门技术要求不高, 容易普及和推广。该技术开发的产品——检测试剂盒, 可广泛应用于现场样品和大量样品的快速检测。因此, 人们称免疫分析技术是21世纪最具竞争性和挑战性的检测分析技术。

2 农药残留免疫分析技术的方法

2.1 免疫分析标记抗体的类型

农药残留的免疫分析方法是在已有免疫学实验的基础上建立起来的, 因此它的免疫学反应原理及操作过程都与其他免疫检测方法相类似。用于农药残留免疫分析上的抗体标记方法主要有4种类型, 即放射性标记、酶标记、生物素标记和荧光抗体标记。早期的农药残留免疫分析标记抗体主要是以碘标记为主, 但由于这种标记方法半衰期短, 而且对环境和人有潜在的危險性, 因而逐步被酶标记所替代, 由此建立的方法称为酶免疫分析法(EIA)。酶标记的抗体保存期长, 具高敏感性, 显示结果直观并可进行光谱分析, 这为农药残留定性、定量分析带来很大的方便。标记在抗体上的酶主要是辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 β -半乳糖苷酶。在

检测过程中,当加入适当的底物时产生特殊的颜色反应,用于检测。此外,生物素标记和荧光抗体标记检测农药残留的应用也有不少报道。

2.2 农药残留免疫分析检测方法

用于农药残留免疫分析反应的类型绝大多数是抗体或抗原竞争型反应,其检测方法有两种:一种是抗原捕获法,将已知量的标记抗原与含有未知量的待测抗原混合在一起,然后将该混合液与吸附在固相上的亚饱和量抗体孵育,检测液中含有量的抗原将减少标记抗原的结合,这样通过已知标准曲线定量出不同目标检测物的浓度;另一种是“三明治”分析法,是先把抗原吸附在固相上,然后将混有待测抗原的一抗抗体混合液与吸附在固相上的抗原孵育,冲洗掉已结合的抗体,再加入酶标记的二抗抗体与其共同孵育,最后测定标记抗体上酶催化底物产生的光吸收值的大小来确定农药残留的量,也可将一抗抗体直接用酶标记,然后测定结合抗体上的酶所催化底物产生的颜色反应。

酶标记反应的固相支持物有聚苯乙烯、塑料管、膜和微球。目前大多数采用96孔酶标板(MTP)作为固相支持物,这种板的检测容量大,样本数量多,其检测反应结果只需有酶标仪的配合就可得出准确的检测数据,与其他检测手段相比,此种方法更易被使用者接受。不过美国 Milipore 公司在中国市场销售的克百威(呋喃丹)和涕灭威残留检测试剂盒是采用聚苯乙烯塑料管,每个包装含60个检测管,可检测50个未知样品。

2.3 利用生物传感器进行免疫分析

生物传感器通常是指由一种生物敏感部件与转换器紧密结合,对特定种类化合物或生物活性物质具有选择和可逆响应的分析装置。免疫反应传感器是利用目标化合物与抗体的特异性接合,产生一系列的物化反应,利用转移器使其将完成特定形式的反应信号,再通过监视器把这些特殊信号变成可视数据用于检测。Ngeh-Ngwainbi 等人^[2]最早研制成功了对硫磷的生物传感器,以后又有人制成了光导纤维免疫传感器,利用荧光标记抗体产生的反应,对对硫磷在溶液中含量进行了分析测定^[3]。微型化的免疫传感器对分析样品的用量少、响应速度快,可进行快速跟踪分析。目前生物传感器主要存在的问题是分析结果的稳定性、可重复性及使用寿命和使用成本。

3 免疫分析法在农药残留分析中的应用

到目前为止已有60多种农药可用于酶免疫法分析,这其中最多是除草剂和杀虫剂,少部分为杀菌剂。他们检测的灵敏度不尽相同,检测样品从水、土壤浸出液到食品或果实抽提物。

3.1 除草剂的残留免疫分析

除草剂的残留分析是农残分析中的重要内容之一,一方面由于除草剂累积在农作物产品中对人畜危害巨大;另一方面由于除草剂在土壤和水中的残留对下茬作物生长有很大的影响。20世纪90年代以来,国外对除草剂残留的免疫分析研究取得了很多成果,其产品也较早地应用于市场。目前已商品化的试剂盒有:百草枯、扑灭津、甲草胺、扑草净、莠去津、阿特拉津等几十种。

2,4-D的检测分析一直是常规分析中的难点,而利用制备的2,4-D多克隆抗体或单克隆抗体则很容易从水、食品和土壤中检测2,4-D的存在,检测极限达 1 ng/mL ^[4]。百草枯是一种

对人畜高毒的除草剂, 利用放射性标记免疫分析技术检测血浆和尿液中的百草枯, 检测极限达 1 ng/mL , 采用酶标记免疫检测可达 0.3 ng/mL 。该检测方法与气相色谱法(GC)检测相关性达到 0.998。利用荧光标记的抗体间接法检测水中的百草枯达 2.0 ng/mL 。以上 3 种检测方法的重复率均在 80% 以上^[5]。

均三氮苯类除草剂的免疫分析方法的研究开展的较早, 1985 年 Huber 建立了莠去津酶免疫定性定量分析方法并开发莠去津免疫分析试剂盒^[6]。目前制备的莠去津多克隆抗体检测土壤和水中的莠去津极限达 0.01 ng/mL 。用酶免疫分析方法检测食品中莠去津的含量, 在以食品提取液作为标准曲线条件下, 酶免疫分析法检测的结果与气相色谱法之间的相关系数为 0.988, 变异系数仅为 2.4% ~ 13.7%^[7]。Goodrow 研究小组^[8]利用不同的半抗原载体结合物制备出两种三氮苯类抗体: 一种与莠去津、西玛津、阿特拉津等有特异性反应, 另一种是与甲基均三氮苯类化合物有特异性反应, 如扑草净、西草净、莠灭净等。

酰胺类除草剂残留的免疫分析以甲草胺和吡草胺为代表, Schlaeppi 等^[9]制备的吡草胺单克隆抗体直接法检测极限可达 0.05 ng/mL , 间接法 0.1 ng/mL 。但有报道, 甲草胺的抗体可与丁草胺、吡草胺和毒草胺产生轻微的交叉反应。

此外, 其他除草剂如特草定、禾草特、灭草隆、灭草松、冬播隆、异恶草酮、达草灭、三氟羧草醚和氟乐灵等的残留免疫分析方法亦有报道。

3.2 杀虫剂的残留免疫分析

几乎所有的化学合成杀虫剂在产品或环境中残留时间较长, 且残留成分复杂。世界各国也都把杀虫剂在农产品或食品中的残留量作为一项重要的进出口检验质量指标, 特别是发达国家有着严格的标准。传统的色谱分析方法从提取到上机测定需要相当长的时间, 而且费用惊人。近年来开发的免疫分析法则较好地解决了这一难题。

3.2.1 有机磷杀虫剂 有机磷杀虫剂是通过抑制昆虫体内乙酰胆碱酯酶的活性来杀死害虫的, 它是目前世界上使用量最大的一类杀虫剂。1981 年 Ercegovich 等^[10]首先建立了对硫磷的放射免疫分析方法(RIA), 在人的血液和莴苣叶片上它的检测极限为 $10 \sim 20 \text{ ng/mL}$, 检测水中的残留量可达 4 ng/mL 。随后建立的酶免疫分析方法检测血浆中的对硫磷残留水平可达 280 pg/mL , 在缓冲液中检测水平能够提高 10 倍^[11]。McAdem 和 Hill^[12]制备的杀虫螟单克隆抗体检测谷物中的残留量时, 其线性检测范围是 $100 \sim 20\,000 \text{ ng/mL}$ 。同时 Skerit 等人^[13]发现杀虫螟的抗体除与本抗原反应外, 还可与甲基毒死蜱和 methylprimiphos 反应。

3.2.2 有机氯杀虫剂 尽管有机氯杀虫剂使用时间最长, 应用范围也最广, 但有机氯的残留免疫分析研究却较少。Centeno 和 Johnson^[14]以二氯二苯醋酸衍生物作为半抗原, 制备的抗体仅对 DDT 有较低的效价。曾有人利用捕获型免疫分析法测定土壤浸出液和水中的硫丹的含量, 其线性检测范围为 $3 \sim 400 \text{ ng/mL}$, 且硫丹、狄氏剂和异狄氏剂之间仅存较弱的交叉反应^[15]。

3.2.3 氨基甲酸酯杀虫剂 目前已商品化的氨基甲酸酯类杀虫剂免疫分析检测试剂盒主要有呋喃丹、涕灭威和西维因。Lehotay 和 Argauer^[16]利用 Millipore 公司生产的呋喃丹和涕灭威检测试剂盒检测肉、肝脏、牛奶、血液和尿中的农药残留量, 其检测水平达 10 ng/mL 。同时他们发现涕灭威在混合样品分析时不够稳定, 但其检测合理域值仍能达到允许残留量的 5%。以钼孔碱血蓝素(KLH)为连接载体制备的西维因抗体, 检测水中的西维因水平可达

0.22 ng/mL~0.25 ng/mL, 并与液相色谱分析有极好的相关性^[17]。Ohmicro 公司开发的西维因快速检测试剂盒只需 1 h 即可完成样品中农药的定量分析, 它的市场应用前景十分看好。

3.2.4 拟除虫菊酯杀虫剂 Stanker 等^[18]利用自行制备的合成苄氯菊酯单克隆抗体对肉类的合成苄氯菊酯进行了检测分析, 在检测样本中含有 5% 乙腈状态下, 检测范围达 50 ng/mL~500 ng/mL, 检出率为 62%。但由于这种抗体可与氯氰菊酯和溴氰菊酯产生较强烈的交叉反应, 因此国外只用它作为拟除虫菊酯类农药中相关化合物的总量检测。此外, 有关苯醚菊酯、生物苄味喃酯的酶免疫检测分析也有相应的报道。

3.3 杀菌剂的残留免疫分析

杀菌剂的种类和使用范围几乎与除草剂、杀虫剂并驾齐驱, 但有关它的免疫分析的研究甚少, 这可能与杀菌剂的毒性相对较低、品种使用轮换快有关。Itak^[19]等利用酶免疫分析技术检测了水、果汁和土壤中的多菌灵含量, 其检测水平分别为 0.1 ng/mL, 300 ng/mL 和 37.5 ng/mL。Newsome^[20]报道 ELISA 方法检测甲霜灵在作物中的最小检测量为 63 ng/mL, 变异率小于 5%。三唑类杀菌剂的免疫检测主要集中在三唑酮类在食品中的残留分析。以丁菌唑和戊菌唑制备的多克隆抗体除本身的特异性反应外, 对丙环唑、三唑酮类杀菌剂也有交叉反应。由于它的特异性太低, 以至不适于实际应用分析。New Sane 等人^[21]用克菌丹的降解物 THPI (tetrahydrophthalimide) 作为半抗原而制备了克菌丹的抗体, 他们对草莓、桃、苹果和葡萄等果品中的农药残留进行了分析, 检测的下限为 1 ng/mL, 标准曲线的线性范围在 1~200 $\mu\text{g/mL}$ 之间。另外, 特克多 (TBZ) 是一种采后使用的广谱性杀菌剂, 利用 ELISA 方法检测以水溶液提取的马铃薯和苹果样品时, 检测极限可达 0.2 ng/mL^[22]。

4 问题与展望

已有的研究表明, 农药残留免疫分析方法尚处在研究和开发阶段。由于农药的种类繁多, 结构复杂, 因此农药免疫检测分析系统的建立也不尽相同。目前农药的残留免疫分析主要存在以下问题:

(1) 免疫原的制备 化学合成农药一般都为小分子有机化合物(分子量<1 000 Da), 不具备免疫原性, 因此需要与一大分子(如 BSA、KLH、葡聚糖等)共价结合后才能使动物免疫系统识别, 产生相应的抗体。这就要求每一种农药半抗原制备要经过仔细设计, 既要保留农药分子的基本结构特征, 又要使其很好地与大分子结合, 这往往给检测目标农药增加了难度。

(2) 免疫反应的特异性 在农药的合成和开发过程中, 往往通过修饰一种母体结构上的特定基团(官能团)来衍生出多种具生物活性的农药。在免疫分析过程中这些结构类似的化合物之间不可避免地产生交叉反应, 这对农药结构分析带来不便。但同时它对农药的现场分析又十分有利, 因为大多数情况下检测人员只需确定某种类型农药的残留。因此美国、欧洲等发达国家在农产品的初检时普遍采用免疫分析技术。

(3) 检测样品的复杂性 农药残留分析的样品来源广泛, 有的是新鲜的植物组织材料, 有的是加工后的产品, 有的还来自于水和土壤等。因此, 制备用于免疫分析的样品方法多种

多样, 提取出的样品既有水溶性的, 也有溶剂性的。这样在检测分析过程中就有可能产生不同的分析结果, 其标准化制订有很大难度。

(4) 抗体选择性强 一种农药的抗体一般只检测这种农药或结构相类似的少数农药。如果同一样品中的多种农药残留分析(多残留分析)就需要逐一采用不同的农药抗体进行多次检测分析, 这就需要更多的样品, 同时也增加了分析成本和工作量。

综上所述, 尽管农药残留免疫分析技术尚有待进一步研究和完善, 但对于极性、难挥发、热不稳定、易分解的农药分析有着得天独厚的优势。另外在环境监测、田间或市场快速检测分析方面, 免疫分析法都是其他分析方法所不可比拟的。因此, 人们有理由相信免疫分析技术一定会在农药残留分析上发挥越来越大的作用。

参考文献:

- [1] Krotzky A J, Zeeh B. Immunoassays for residue analysis of agrochemicals proposed guidelines for precision, standardization and quality control[J]. Pure and Appl Chem, 1995, 67: 2065– 2088.
- [2] Ngele Ngwainbi J, Foley D H, Kuan S S, *et al.* Parathion antibodies on piezoelectric crystals[J]. J Am Chem Soc, 1995, 108: 5444– 5447.
- [3] Anis N A. A fiber-optic immunosensor for detecting parathion[J]. Anal Lett, 1992, 25: 627– 635.
- [4] Fleeker J. Two enzyme immunoassays to screen for 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid in water[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1987, 70: 847– 878.
- [5] Fatori D. Radioimmunoassay for serum paraquat[J]. Clin Chim Acta, 1980, 100: 81– 90.
- [6] Huber S J. Improved solid-phase immunoassay systems in the ppt range for atrazine in fresh water[J]. Chemosphere, 1985, 14: 1795– 1803.
- [7] Amin Md R, Malek M A, Rahman M, *et al.* Enzyme immunoassay for atrazine analysis in water and soil[J]. Pestic Sci, 1998, 52: 152– 158.
- [8] Goodrow M H, Harrison R O, Hammock B O. Hapten synthesis, antibody development, and competitive inhibition enzyme immunoassay for S-triazine herbicides[J]. J Agric Food Chem, 1990, 38: 990– 996.
- [9] Schlaeppli J M, Fory W L, Ramsteiner K. Determination of metolachlor by competitive enzyme[J]. J Agric Food Chem, 1991, 39: 1533– 1536.
- [10] Ercegovich C D, Vallejo R P, Getting R R, *et al.* Development of a radioimmunoassay for parathion[J]. J Agric Food Chem, 1981, 29: 559– 563.
- [11] Hunter K W, Lenz D E. Detection of a radioimmunoassay for parathion[J]. Life Sci, 1982, 30: 355– 361.
- [12] McAdam D P, Hill A S, Beasley H L, *et al.* Mono and polyclonal antibodies to the organophosphate fenitrothion 1. Approach to hapten-protein conjugation[J]. J Agric Food Chem, 1992, 40: 1466– 1474.
- [13] Skeritt J H, Hill A S, Beasley H L, *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of organophosphate pesticides[J]. J AOAC Int, 1992, 75: 519– 528.
- [14] Centeno E R. Antibodies to two common pesticides, DDT and malathion[J]. Int Arch Allergy, 1970, 37: 1– 13.
- [15] Wigfield Y Y, Grant R. Evaluation of an immunoassay kit for the detection of certain organochlorine(cyclodienes) pesticide residue in apple, tomato, and lettuce[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1992, 49: 342– 347.
- [16] Lehotay S J, Argauer R J. Detection of aldicarb sulfone and carbofuran in fortified meat and liver with com-

- mercial ELISA kits after rapid extraction[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 2006– 2010.
- [17] Itak J A. Validation of a paramagnetic particle-based ELISA for the quantitative determination of carbaryl in water[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1993, 51: 260– 267.
- [18] Stanker L H, Bigbee C, Van Emon J, *et al.* An immunoassay for pyrethroids: Detection of permethrin in meat [J]. J Agric Food Chem, 1989, 37: 834– 839.
- [19] Itak J A, Selisker M Y, Jourdan S W, *et al.* Determination of benomyl(as carbendazim) and carbendazim in water, soil, and fruit juice by a magnetic particle-based immunoassay[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 2329 – 2332.
- [20] Newsome W H. An enzyme-linked immunosorbent assay for metalaxyl in foods[J]. J Agric Food Chem, 1985, 33: 528– 530.
- [21] Newsome, W H, Yeung J M, Collins P G. Development of enzyme immunoassay for captan and its degradation product tetrahydrothalamide in foods[J]. J AOAC Int, 1993, 76: 381– 386.
- [22] Marco M P, Gee S J, Cheng H M, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay for metalaxyl in foods[J]. J Agric Food Chem, 1993, 41: 423– 430.

Approach to Immunoassay as Analytical Technique of Pesticide Residues

YANG Yijun, WANG Yong, YANG Xirong, GUO Yongze, ZHANG Yuting
(Tianjin Institute of Plant Protection, Tianjin 300112, China)

Abstract: This report reviewed previous immunoassay techniques in the residue analysis of herbicide, insecticide, and fungicide and discussed some new perspective using the immunoassay.

Key words: Immunoassay; Pesticide; Residue analysis