

# 灭蝇胺抗原抗体在豇豆、韭菜、芹菜快速检测中的应用研究

赵颖<sup>1</sup> 梁赤周<sup>2</sup> 虞森<sup>2</sup> 寿林飞<sup>2</sup>

(1. 杭州佰盛汇星生物科技有限公司, 杭州 311112; 2. 浙江省植保检疫与农药管理总站, 杭州 310009)

**摘要:** 本研究设计并合成了灭蝇胺半抗原, 制备得到灭蝇胺完全抗原, 并通过动物免疫与细胞融合单克隆筛选技术, 成功获得灭蝇胺单克隆抗体,  $IC_{50}$  达到  $5.3 \mu\text{g/L}$ 。将完全抗原和单克隆抗体应用于金标免疫层析试纸制备, 经优化相关参数, 获得一种高灵敏度、高特异性、简便快速的检测方法。将方法应用于豇豆、韭菜、芹菜 (以下简称“三棵菜”) 样品检测, 检测结果与仪器参比方法检测结果的符合率达 93.3%。结果表明, 建立的“三棵菜”中灭蝇胺金标试纸快检方法具有良好的准确度, 可实现定性、半定量检测分析, 能在 15 min 内完成样品检测, 并具备小型化、操作方便的特性, 可为农药残留现场快速筛查提供技术支持。

**关键词:** 灭蝇胺; 抗原; 单克隆抗体; 快速检测; 豇豆; 韭菜; 芹菜

灭蝇胺是一种昆虫生长调节类低毒杀虫剂<sup>[1]</sup>, 对双翅目昆虫 (蝇类害虫) 有良好的杀虫活性。灭蝇胺在瓜果蔬菜等农作物生产中被广泛使用, 导致蔬菜<sup>[2~3]</sup>和水果<sup>[4]</sup>中的灭蝇胺残留存在潜在膳食暴露风险, 其还被广泛应用于家畜养殖, 在鸡肉<sup>[5]</sup>、牛奶<sup>[6]</sup>中存在一定的暴露水平。因此, 人们对灭蝇胺膳食风险评估作了很多相关研究<sup>[3,7~8]</sup>。

2021 年 6 月, 农业农村部等 7 部委联合实施食用农产品“治违禁 控药残 促提升”三年行动, 治理的重点品种“三棵菜”为豇豆、韭菜、芹菜, 鼓励食用农产品批发市场开办者对“三棵菜”中腐霉利、灭蝇胺等易超标的常规农药残留开展针对性速测。2022 年, 浙江省农业农村厅征集的检测农产品及目标项目中包括了豇豆中的灭蝇胺。GB 2763—2021《食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量》<sup>[9]</sup>规定了灭蝇胺在豇豆、芹菜、韭菜上的最大残留限量 (MRL) 分别为 0.5、4、3 mg/kg (参考葱)。以上文件内容提到了“三棵菜”中灭蝇胺残留易超标的问题, 也反映出对灭蝇胺快速检测产品的需求。因此, 制备灭蝇胺抗原抗体并建立灭蝇胺金标试纸快检方法, 对“三棵菜”中的

灭蝇胺残留快速检测具有重要意义。

目前, 食品中灭蝇胺或其代谢产物三聚氰胺的检测分析方法主要有液相色谱法<sup>[10~12]</sup>、液相色谱—质谱联用法<sup>[13~15]</sup>、气相色谱—质谱联用法<sup>[16~18]</sup>、表面增强拉曼光谱法<sup>[19~20]</sup>、毛细管电泳非接触式电导检测法<sup>[21]</sup>、金纳米探针法<sup>[22~24]</sup>、时间分辨荧光试纸法<sup>[25]</sup>、分子印迹聚合物膜法<sup>[26~27]</sup>。另外, 三聚氰胺抗原抗体制备及其在动物源食品中灭蝇胺和三聚氰胺的检测分析应用已有报道<sup>[28~29]</sup>。然而灭蝇胺抗原抗体制备及其免疫快检方法在“三棵菜”上的应用鲜有报道, 因此, 本文开展灭蝇胺抗原抗体研究, 从半抗原设计到完全抗原制备再到获得单克隆抗体, 后将抗原抗体应用于金标试纸制备, 从而建立一套“三棵菜”中灭蝇胺的快检技术方法。

## 一、材料与方法

(一) 材料与试剂 豇豆、韭菜、芹菜样品, 采集自浙江省各地区市场; Blab/c 小鼠 (雌性, 6 周龄), F1 代小鼠 (雌性, 6 周龄), 浙江省实验动物中心; 小鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0), 上海细胞库;

基金项目: 浙江省“三农九方”科技协作计划项目 (2022SNJF015)。

作者简介: 赵颖 (1988—), 高级工程师, 从事农药残留分析、免疫抗体研发与应用工作。E-mail: 644647105@qq.com。寿林飞 (1979—), 高级农艺师, 从事植保检疫与农药管理、农产品质量安全检测工作。E-mail: lfshou@163.com (通讯作者)。

Nunc™ 96孔酶标可拆板/整板、Nunc™ 6孔/24孔/96孔细胞培养板、Nunc™ 25 cm<sup>2</sup>/75 cm<sup>2</sup>细胞培养瓶、15 mL/50 mL离心管、2 mL细胞冻存管、10 μL/200 μL/300 μL/1 000 μL移液器吸头、250 μL/500 μL低吸附离心管，美国 Thermo 公司；SDS-PAGE凝胶试剂盒，南京金斯瑞公司；2 mL进样瓶，美国 Waters 公司；0.22 μm针式滤膜（有机相），上海安谱实验科技股份有限公司。

钥孔血蓝蛋白 (KLH)、鸡卵清白蛋白 (OVA)、兔抗鼠酶标二抗 (IgG-HRP)、次黄嘌呤-胸腺嘧啶脱氧核苷添加剂 (HT)、黄嘌呤-氨基蝶呤-胸腺嘧啶脱氧核苷添加剂 (HAT)、聚乙二醇 (PEG1450)、三水合氯金酸 (分析纯)、柠檬酸三钠 (分析纯)，美国 Sigma 公司；醋酸纤维素膜 CN140、玻璃纤维膜 8964，美国 Sartorius 公司；N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)、N,N-二环己基碳二亚胺 (DCC)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)，上海 Aladdin 公司；灭蝇胺标准品 (纯度 99.24%)、三聚氰胺标准品 (纯度 99%)、敌菌灵标准品 (纯度 99.3%)、均三嗪标准品 (纯度 99%)，德国 Dr. Ehrenstorfer 公司；乙腈 (色谱纯)，德国 Merck 公司；盐酸、氢氧化钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、碳酸钾、乙酸铵、二氯甲烷 (均为分析纯)，国药集团上海有限公司；单组分 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)、弗式佐剂、羊抗鼠 IgG，苏州博奥龙科技有限公司；低内毒素胎牛血清，浙江四季青公司；高糖培养基 DMEM，杭州吉诺公司；氨基净化柱 (500 mg/6 mL)，美国 Waters 公司。

(二) 仪器与设备 超纯水系统 Milli-Q，美国 Millipore 公司；旋涡混合器 SCI LoGex MX-S，美国 Scilogex 公司；磁力搅拌器 85-1，上海志威公司；多功能酶标仪 SpectraMax@ i3，美国 Molecular Devices 公司；微量分光光度计 Nano-100，杭州奥盛仪器公司；超声波清洗器，苏州昆山超声公司；二氧化碳培养箱 MCO-18AIC，日本松下公司；倒置显微镜 DMI1，德国 Leica 公司；低温高速离心机 Fresco21、单通道移液器、多通道可调移液器，美国 Thermo 公司；洗板机 HW2096，深圳华科瑞公司；超净工作台 SW-CJ-1FD，苏州苏净安泰公司；低速离心机 DL-5-B，上海安亭公司；蛋白电泳仪，美国 Bio-Rad 公司。

### (三) 实验方法

1. 半抗原设计与合成。本研究的关键技术是获得高亲和力和高灵敏度的灭蝇胺抗体，重点在于半抗原的设计与合成。灭蝇胺半抗原与目标待测物相

似度高 (见图 1)，对灭蝇胺的特征结构保留完整，为灭蝇胺抗体制备奠定了基础。

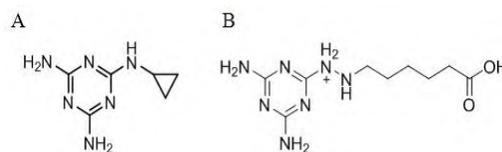


图 1 灭蝇胺结构 (A) 和灭蝇胺半抗原结构 (B)

称取 2 g 2-氨基三聚氰胺溶于 KOH 碱性无水 DMF 溶液中，进行 N-烃化反应，加入 1.5 倍摩尔当量的溴代己酸甲酯，搅拌条件下升温至 80℃，反应得到三聚氰胺氨基己酸甲酯 (由于反应是在无水条件下进行，不涉及 pH 控制，因此不会对侧链甲酯发生水解)。加入 2 倍摩尔当量的 NaOH 水溶液，pH 约 14，在碱性条件下，三聚氰胺氨基己酸甲酯水解成三聚氰胺氨基己酸，冷却至 10℃，抽滤得到的固体样品用 1,4-二氧六环重结晶，干燥后得到灭蝇胺半抗原 (见图 2)。

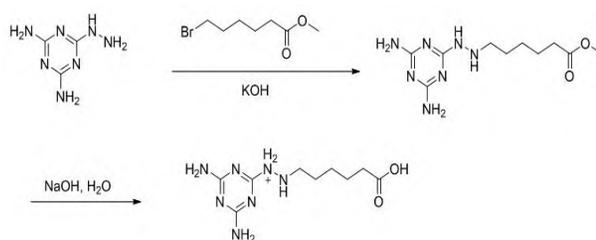


图 2 灭蝇胺半抗原合成路线

2. 完全抗原制备。由于灭蝇胺分子本身不具备免疫原性，需要将分子连接于蛋白载体，从而获得免疫原性。经改造后的灭蝇胺半抗原分子引入了氨基己酸，可与蛋白分子上的氨基缩合形成稳定的酰胺键，一个蛋白分子能连接 20~300 个半抗原分子。

采用碳二亚胺法制备灭蝇胺免疫抗原，称 0.005 mmol 灭蝇胺半抗原溶于 0.2 mL DMF 中，加入 0.01 mmol EDC 和 0.01 mmol NHS，室温搅拌反应 4 h，得到灭蝇胺半抗原活化液。用 0.01 mol/L 碳酸缓冲液 (pH 9.0) 配置 5 mg/mL 的 KLH 溶液，室温搅拌条件下逐滴加入上述半抗原活化液，再改为缓慢磁力搅拌反应 3 h。将反应溶液进行透析处理，得到免疫抗原灭蝇胺-KLH。

采用混合酸酐法制备灭蝇胺竞争抗原，称 0.01 mmol 灭蝇胺半抗原溶于 0.2 mL DMF 中，搅拌下加入 0.02 mmol 三正丁胺和 0.02 mmol 氯甲酸异丁酯，室温搅拌反应 1 h，得到灭蝇胺半抗原活化

液。用 0.01 mol/L 碳酸缓冲液 (pH 9.0) 配置 10 mg/mL 的 OVA 溶液, 室温搅拌条件下逐滴加入上述半抗原活化液, 继续搅拌反应 3 h, 将反应溶液进行透析处理, 得到竞争抗原灭蝇胺-OVA。

3. 免疫与血清监测。采用皮下多点免疫方式, 将灭蝇胺-KLH 免疫于 Blab/c 小鼠, 初次免疫剂量 200 μg/只, 2 次至末次免疫剂量 100 μg/只, 免疫间隔时间 14 d。初次免疫将灭蝇胺-KLH 与完全弗氏佐剂 1:1 乳化混合, 2 次至末次免疫前 1 次免疫将灭蝇胺-KLH 与不完全弗氏佐剂 1:1 乳化混合, 末次免疫不加佐剂。

3 次和 4 次免疫后 1 周, 采用同源间接竞争 ELISA 法测定小鼠血清效价以及对灭蝇胺的抑制率, 以吸光度值  $OD_{450nm} \geq 1$  为效价标准, 若效价达到 10 000 以上, 且对 1 mg/L 浓度的灭蝇胺抑制率 >50%, 可对小鼠进行末次免疫。

4. 单克隆细胞筛选与抗体制备。小鼠末次免疫 3 d 后, 取小鼠脾脏细胞与 SP2/0 细胞杂交融合, 细胞培养加入 HAT 与 HT 筛选试剂, 筛选单克隆杂交瘤细胞。采用同源间接竞争 ELISA 法, 包被 10 μg/mL 灭蝇胺-OVA, 以灭蝇胺标准溶液 100 ng/mL 作为竞争药物, 筛选出细胞上清液阳性  $OD_{450nm} \geq 0.5$  且抑制率  $\geq 50\%$  的细胞株, 连续亚克隆 2 次, 筛选单克隆细胞孔并进行阳性和抑制率测试, 获得稳定的灭蝇胺单克隆杂交瘤细胞株。

将灭蝇胺单克隆杂交瘤细胞株 (细胞密度约  $2 \times 10^5$  个/mL) 以 500 μL/只的剂量接种于 F1 代小鼠腹腔, 1 周后小鼠腹腔开始膨胀, 收集小鼠腹水, 并采用辛酸-硫酸铵沉淀法纯化腹水, 得到灭蝇胺单克隆抗体。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 鉴定抗体轻重链与纯化效果。通过 ELISA 法检测抗体对灭蝇胺、三聚氰胺、敌菌灵和均三嗪的抑制率 (%), 按公式 (1) 计算。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{空白对照的吸光度} - \text{标准溶液的吸光度}}{\text{空白对照的吸光度}} \times 100\% \quad (1)$$

5. 金标试纸制备。采用胶体金免疫层析方法制备灭蝇胺金标试纸。将竞争抗原灭蝇胺-OVA 和羊抗鼠 IgG 划膜于醋酸纤维膜 (NC 膜) 分别用于检测线 (T 线) 和质控线 (C 线), 优化划膜浓度。胶体金标记灭蝇胺抗体用于检测探针, 优化标记 pH 和抗体稳定量。优化准则<sup>[30]</sup>: 检测空白样品时 T 线显色最深, 检测灭蝇胺 0.1 mg/L 标准溶液样品时 T 线不显色。

金标试纸的组装见图 3。如图 3 所示, T 线 (5) 和 C 线 (6) 分别包被于 NC 膜 (2) 上, 并根据先

后顺序, 将 NC 膜、吸水垫 (7)、金标杯 (4)、样品垫 (3) 依次粘于衬板 (1) 上。将组装好的试纸切成 3 mm 宽的试纸条, 于干燥柜中保存并控制湿度 30% 以内。

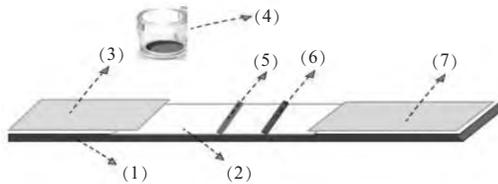


图 3 金标试纸的构成示意

6. 金标试纸性能评价方法。配置灭蝇胺标准母液 100 mg/L (甲醇), 稀释成 0.006、0.012、0.025、0.05、0.1、0.2 mg/L 标准工作液 (含 20% 甲醇的 0.01 mol/L PBS)。取标准工作溶液 100 μL 滴加于金标试纸样品孔, 反应 10 min 时判断 T 线显色情况。T 线显色等于、深于或略浅于 C 线表示样品中灭蝇胺的浓度低于检出限 (阴性); T 线不显色表示样品中灭蝇胺的浓度等于或高于检出限 (阳性), 从而确定检出限浓度。

7. “三棵菜”中灭蝇胺金标试纸快检方法。实际样品检测选取豇豆、芹菜、韭菜, 分别设置空白样本和灭蝇胺阳性添加样本, 灭蝇胺标准溶液添加浓度为 0.1、0.5、2.5 mg/kg。准确称取 1.0 g 匀浆样品至 15 mL 离心管, 加入 10 mL 提取试剂 (含 20% 甲醇的 0.01 mol/L 磷酸缓冲液), 涡旋振荡 30 s, 于离心机中以 4 000 r/min 离心 3 min, 取上清液 100 μL 用于金标试纸快速检测, 检测流程见图 4。此提取方法通过样品稀释去除基质干扰, 样品稀释倍数为 10 倍条件下, 用于试纸检测时无基质干扰现象。

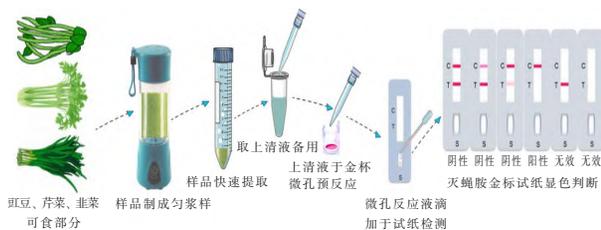


图 4 “三棵菜”中灭蝇胺快速检测流程

8. 仪器参比方法。样品制备、提取与净化: 准确称取 20 g 匀浆样品于 250 mL 烧杯中, 加入 40 mL 乙腈, 用高速匀浆机匀浆提取 1 min, 匀浆液过滤到装有 5 g 氯化钠的 100 mL 具塞量筒中, 剧烈振荡 1 min, 室温下静置 30 min。吸取 10 mL 乙

腈相至 50 mL 烧杯中, 于 80℃ 水浴加热并氮吹, 待乙腈蒸发至干, 加入 2.0 mL 甲醇-二氯甲烷 (1:9, 体积比) 溶解, 盖上铝箔, 待净化。将氨基净化柱用 4.0 mL 甲醇-二氯甲烷 (1:9, 体积比) 预洗柱, 当溶剂液面到达柱吸附层表面时, 立即加入上述待净化溶液, 收集洗脱液, 用 4.0 mL 甲醇-二氯甲烷 (1:9, 体积比) 洗烧杯后过柱, 合并洗脱液。将洗脱液氮吹至近干, 用甲醇准确定容至 2.0 mL, 超声溶解后加入约 2.0 mL 超纯水, 并用超纯水准确定容至 5.0 mL。在混合器上混匀后, 经 0.22 μm 滤膜过滤后供液相色谱串联质谱测定。

液相色谱串联质谱测定条件: Waters C<sub>18</sub> 色谱柱 (2.6 μm, 2.1 mm×100 mm); 流动相 A 为 5 mmol/L 乙酸铵水溶液, B 为甲醇; 流速 0.3 mL/min。流动相梯度洗脱条件: 0~2 min, 80% A~20% A; 2~4 min, 20% A~5% A; 4~6 min, 5% A; 6~6.1 min, 5% A~80% A; 6.1~8 min, 80% A。柱温 40℃; 进样量 1 μL。电喷雾离子源 (ESI), ESI 正离子电压 5 000V; 离子源温度 500℃; 辅助加热气 379 kPa; 气帘气压力 241 kPa; 定量离子对 (*m/z*) 167.0/125.0, 定性离子对 (*m/z*) 167.0/125.0、167.0/108.0, 去簇电压 46 V, 碰撞电压 25、29 V, 碰撞室出口电压 6、6 V。

(四) 数据计算 采用 Spectrophotometer V2.1、Masshunter, 以及 Microsoft Excel 2019、Origin 2021 软件对检测结果进行统计和数据分析。

## 二、结果与分析

(一) 灭蝇胺半抗原鉴定 质谱鉴定采用 ESI 正离子模式 {HRMS (ESI-TOF) *m/z*: [M+H]<sup>+</sup>}, 质荷比扫描得到相对分子质量为 256.15 的化合物, 推算得到分子式为 C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 通过归一法计算得到纯度为 97.0%, 详见图 5。核磁氢谱鉴定采用 400 M 核磁共振仪 [<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)], 化学位移值显示结构中含己酸侧链上的 10 个氢, 分别表述为 δ1.39~1.43 (m,2H), 1.55~1.59 (m,2H), 1.61~1.67 (m,2H), 2.32 (t, J=7.2 Hz, 2H), 2.75~2.86 (m, 2H), 详见图 6。上述结果表明灭蝇胺半抗原连接了己酸侧链, 与设计合成的结构一致。

(二) 灭蝇胺完全抗原评价 灭蝇胺-KLH、灭蝇胺-OVA、载体蛋白 KLH 和 OVA、半抗原分别通过紫外光谱扫描鉴定。紫外吸收光谱显示, 半抗原、完全抗原与载体蛋白之间存在明显的吸收峰偏移 (见图 7), 证明完全抗原偶联成功。

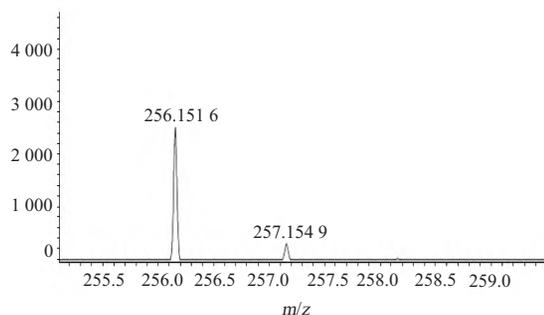


图 5 灭蝇胺半抗原的质谱图

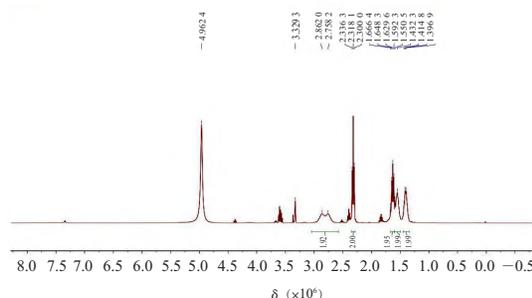
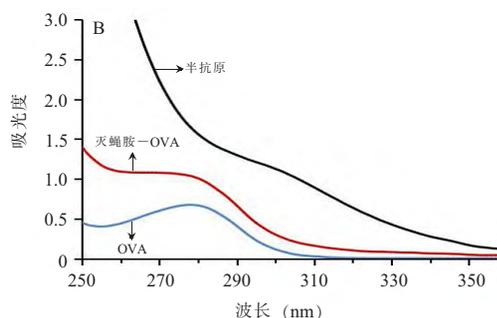
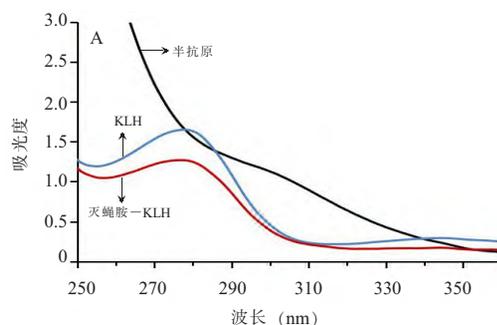


图 6 灭蝇胺半抗原的核磁氢谱图

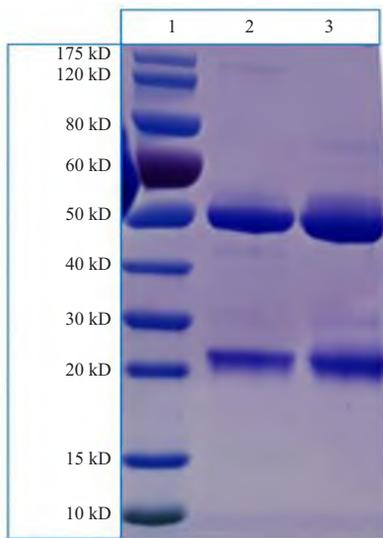


A-半抗原、KLH、灭蝇胺-KLH; B-半抗原、OVA、灭蝇胺-OVA

图 7 紫外光谱图

(三) 抗体纯化与鉴定 灭蝇胺腹水抗体进行辛酸-硫酸铵沉淀法纯化后, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定分析, 出现显著的轻链 (25 kD) 和重链 (50 kD) 条带, 且无其他杂条带 (见图 8), 由此判断抗体纯化效果良好。纯化得到的抗体经微量分光光度计测定浓度为 5.3 mg/mL。

(四) 灭蝇胺抗体性能检测 通过细胞融合筛选出 1 株稳定分泌灭蝇胺抗体的单克隆杂交瘤细胞



泳道 1—Marker；泳道 2—低浓度纯化抗体；泳道 3—高浓度纯化抗体

图 8 SDS-PAGE 凝胶电泳图

株，使用同源间接竞争 ELISA 法测定抗体亲和力以及和灭蝇胺类似结构化合物三聚氰胺、敌菌灵、均三嗪的交叉反应情况，结果见图 9。如图 9 所示，抗体对灭蝇胺和三聚氰胺显示为双特异性，对敌菌灵和均三嗪无显著特异性。灭蝇胺抑制曲线的线性方程为  $y=15.612 \ln(x)+24.104$ ， $R^2=0.996$ ， $IC_{50}=5.3 \mu\text{g/L}$ ；三聚氰胺抑制曲线的线性方程为  $y=14.542 \ln(x)+24.367$ ， $R^2=0.991$ ， $IC_{50}=5.8 \mu\text{g/L}$ 。

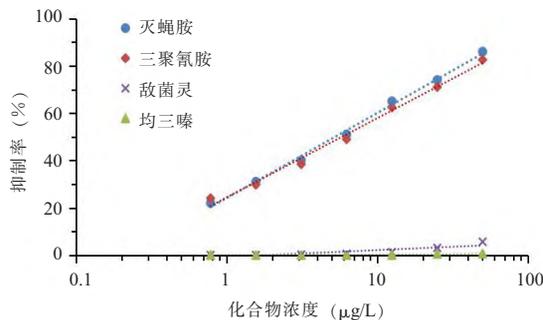


图 9 灭蝇胺抗体亲和力和交叉反应曲线

(五) 金标试纸制备关键性参数 制备灭蝇胺金标免疫识别探针，优化得到最适标记 pH 和最适抗体稳定量，得到的金标抗体具有最优探针显色效果并可有效识别灭蝇胺，同时，优化得到最适 T 线和 C 线组合，优化结果见表 1。

(六) 金标试纸性能评价结果 灭蝇胺标准工作液的金标试纸检测结果见图 10。如图 10 所示，随着灭蝇胺浓度的提高，T 线显色逐渐减弱，当灭蝇胺浓度为 0.05 mg/L 时 T 线完全消失。显色结果

表 1 灭蝇胺金标试纸关键参数优化值

关键参数	优化值
金标最适 pH	7.0
金标最适抗体稳定量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	8
T 线浓度 (mg/mL)	0.2
C 线浓度 (mg/mL)	0.1
标准溶液检出限 (mg/L)	0.05

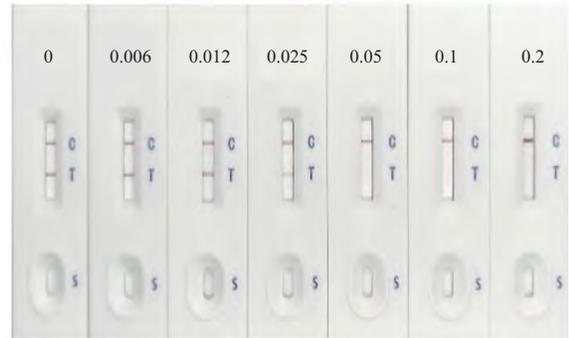


图 10 灭蝇胺标准溶液 (浓度单位: mg/L) 的金标试纸显色结果

表明 T/C 与灭蝇胺浓度之间具有良好的相关性，灭蝇胺的检出限为 0.05 mg/L，可通过显色直接判读灭蝇胺的检出情况。

(七) 方法准确度 为评价金标试纸快检方法的准确度，本研究对豇豆、芹菜、韭菜样品进行了加标实验 (加标浓度分别为 0.1、0.5、2.5 mg/kg)，分别对加标样品进行金标试纸方法检测和仪器参比方法检测，设置 3 个平行，5 次重复 ( $n=5$ )，实验结果见表 2。如表 2 所示，灭蝇胺添加浓度小于 0.5 mg/kg 的样本，仪器参比方法实测浓度符合添加浓度水平，其试纸检测结果均显示阴性；灭蝇胺添加浓度大于或等于 0.5 mg/kg 的样本，仪器参比方法实测浓度符合添加浓度水平，其试纸检测结果均显示阳性。结果表明，金标试纸方法与仪器参比方法结果一致，具有良好的准确度，样品中的检出限为 0.5 mg/kg，可用于灭蝇胺的定性和半定量分析。

(八) 实际样品测定 从浙江省各地区市场随机抽检豇豆、芹菜、韭菜样品各 5 份，用仪器参比方法定量检测样品中灭蝇胺残留量，并用本研究建立的金标试纸快检方法检测得出半定量结果 (见表 3)。快检方法结果与定量检测方法结果比对，符合率为 93.3%，其中豇豆-4 样品存在灭蝇胺超标，其他样品均未超标，表明快检方法在实际样品分析中准确性较高。

表 2 金标试纸对豇豆、芹菜、韭菜加标样品的检测结果与仪器实测结果比对 (n=5)

样品	添加浓度 (mg/kg)	金标试纸显色	仪器实测浓度 (mg/kg)
豇豆	0.1	均为阴性	0.091±0.002
	0.5	均为阳性	0.448±0.012
	2.5	均为阳性	2.300±0.046
芹菜	0.1	均为阴性	0.094±0.003
	0.5	均为阳性	0.482±0.005
	2.5	均为阳性	2.297±0.028
韭菜	0.1	均为阴性	0.091±0.002
	0.5	均为阳性	0.435±0.009
	2.5	均为阳性	2.053±0.021

表 3 豇豆、芹菜、韭菜实际样品定量检测和快速检测比对结果

样品	仪器参比方法 (mg/kg)	金标试纸快检法
豇豆-1	—	阴性
豇豆-2	0.066	阴性
豇豆-3	—	阴性
豇豆-4	0.530	阳性
豇豆-5	0.170	阴性
芹菜-1	—	阴性
芹菜-2	0.076	阴性
芹菜-3	0.269	阳性
芹菜-4	—	阴性
芹菜-5	—	阴性
韭菜-1	0.046	阴性
韭菜-2	—	阴性
韭菜-3	—	阴性
韭菜-4	0.214	阴性
韭菜-5	—	阴性

注：“—”表示未检出。

### 三、结论

本研究成功合成了灭蝇胺半抗原，制备了灭蝇胺完全抗原，获得了灭蝇胺单克隆抗体，并以此建立了灭蝇胺金标试纸快速检测方法。抗体对灭蝇胺、三聚氰胺显示为双特异性，IC<sub>50</sub>分别为 5.3、5.8 μg/L，对其他结构类似化合物无交叉反应。灭蝇胺标准溶液的试纸检测结果显示，显色结果与标准溶液浓度之间呈负相关，即浓度越高，T 线显色越浅。豇豆、芹菜、韭菜的加标实验结果表明方法具有良好的准确度，样品中的检出限为 0.5 mg/kg。快检方法应用于实际样品检测，与仪器参比方法结果符合率达 93.3%。综上所述，本研究建立的灭蝇

胺快检方法可实现“三棵菜”中灭蝇胺残留的快速、准确、定性、半定量分析。此外，样品的前处理过程简易、快速、环保，有较强的现场检测实用性，可为“三棵菜”中灭蝇胺快速检测提供技术保障，并为我国建立灭蝇胺金标试纸快速检测标准提供重要参考数据。

本文引用格式：赵颖，梁赤周，虞森，等. 灭蝇胺抗原抗体在豇豆、韭菜、芹菜快速检测中的应用研究 [J]. 农产品质量与安全, 2024 (1): 36-42.

ZHAO Ying, LIANG Chizhou, YU Miao, et al. Application research of cyromazine antigen and anti-cyromazine antibody for rapid detection of cowpeas, chives, celery[J]. *Quality and Safety of Agro-products*, 2024 (1): 36-42.

### 参考文献

- [1] 金岩, 祝国栋, 张国福, 等. 10 种杀虫剂防治韭菜迟眼蕈蚊综合药效试验评价 [J]. 农药科学与管理, 2019, 40 (7): 50-59.
- [2] 孙玲, 黄健祥, 邓义才, 等. 广东省主要叶菜农药残留膳食暴露风险评估研究 [J]. 食品科学, 2017, 38 (17): 223-227.
- [3] 张群, 段云, 马晨, 等. 豇豆中 5 种农药及其代谢物残留检测与膳食风险评估 [J]. 中国蔬菜, 2022 (10): 86-96.
- [4] 田培, 赵慧宇, 刘之炜, 等. 杨梅中灭蝇胺及其代谢物检测方法 with 风险评估 [J]. 浙江农业学报, 2021, 33 (3): 534-540.
- [5] JI X, YANG H, LYU W, et al. Evaluation of cyromazine transferred from feed to chicken products and subsequent assessment of dietary risks to Chinese consumers [J]. *Journal of Food Science*, 2020, 85 (12): 4 396-4 406.
- [6] ESCOBAR A, FAURE R, SOSA D, et al. Melamine. A potential problem for animal and human health as adulterant in food especially in milk [J]. *Revista de Salud Animal*, 2010, 32 (1): 22-31.
- [7] FU D, ZHANG S, WANG M, et al. Dissipation behavior, residue distribution and dietary risk assessment of cyromazine, acetamiprid and their mixture in cowpea and cowpea field soil [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2020, 100 (12): 4 540-4 548.
- [8] 梁晓涵, 林敏, 万娜, 等. 基于食品安全指数法和危害物风险系数法评估海南芹菜的农药残留风险 [J]. 食品

- 安全质量检测学报, 2023, 14 (1): 112-121.
- [9] 中华人民共和国国家卫生健康委员会, 中华人民共和国农业农村部, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量: GB 2763-2021 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- [10] 刘兰, 周培华, 汤春甫, 等. 分散固相萃取高效液相色谱法测定蔬菜中灭蝇胺残留 [J]. 湖南农业科学, 2022 (11): 78-83.
- [11] 杨飞帆, 赵舒景. 液相色谱法测定植物源性食品中灭蝇胺 [J]. 食品安全导刊, 2022 (22): 69-71.
- [12] GE X, WU X, LIANG S, *et al.* A sensitive and validated HPLC method for the determination of cyromazine and melamine in herbal and edible plants using accelerated solvent extraction and cleanup with SPE [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2014, 52 (7): 751-757.
- [13] 汪春明, 乐粉鹏, 赵鑫, 等. QuEChERS-同位素内标-高效液相色谱-串联质谱法测定果蔬中灭蝇胺残留 [J]. 食品科技, 2022, 47 (5): 309-316.
- [14] 李莉, 刘苗苗, 丁宗博, 等. 液相色谱-串联质谱法测定蔬菜中的灭蝇胺 [J]. 食品安全导刊, 2021 (20): 84-85.
- [15] 李建勋, 范蓓, 周杰, 等. QuEChERS-超高效液相色谱-飞行时间质谱法快速筛查蔬菜中 154 种农药残留 [J]. 食品与发酵工业, 2019, 45 (19): 239-250.
- [16] 王培龙, 赵根龙, 苏晓鸥. 气相色谱-质谱法测定饲料样品中三聚氰胺的研究 [J]. 农产品质量与安全, 2010 (4): 36-38.
- [17] 李锋格, 姚伟琴, 田延河, 等. 固相萃取净化-微波辅助衍生-气相色谱-质谱法测定番茄酱中灭蝇胺及其代谢物三聚氰胺 [J]. 检验检疫学刊, 2010, 20 (2): 1-4, 7.
- [18] 李燕妹, 连增维. QuEChERS 结合气相色谱-负化学源质谱法测定蔬菜水果中 37 种农药残留 [J]. 安全质量检测学报, 2020, 11 (15): 5 074-5 079.
- [19] 陈漾, 李攻科, 胡玉玲. 表面增强拉曼光谱法快速定量分析食品中福美双、二氰蒽醌和灭蝇胺的残留 [J]. 分析科学学报, 2015, 31 (3): 307-312.
- [20] XING H, ZHENG B, LI X, *et al.* Sensitive SERS detection of melamine and cyromazine in raw milk using aptamer-based in situ silver nanoparticles synthesis [J]. *Results in Chemistry*, 2022, 4: 100 266.
- [21] GUO M, LIU S, WANG M, *et al.* Double surfactants-assisted electromembrane extraction of cyromazine and melamine in surface water, soil and cucumber samples followed by capillary electrophoresis with contactless conductivity detection [J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100 (1): 301-307.
- [22] HUIHUI L, ZEYU G, CHAO S, *et al.* Use of a smart-phone for intelligent detection of cyromazine based on tween 20 modified gold nanoparticles [J]. *Analytical Methods*, 2020, 12 (11): 1 469-1 477.
- [23] TAO L, PEIFENG Y, JIAN X, *et al.* A novel colloidal gold-based lateral flow immunoassay for rapid simultaneous detection of cyromazine and melamine in foods of animal origin [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138 (2-3): 1 610-1 615.
- [24] BAI W H, ZHU C, ZHANG G L, *et al.* Visual colorimetric detection of cyromazine in river water using citrate-stabilized gold nanoparticles [J]. *Analytical Methods*, 2016, 8 (29): 5 869-5 873.
- [25] 万宇平, 富成研, 崔廷婷, 等. 6 种农药多残留快速检测芯片的研制 [J]. 安全质量检测学报, 2021, 12 (7): 2 841-2 848.
- [26] DIKICI E, ÖNAL A B, ACETÖ, *et al.* "Lab-on-pol" colorimetric sensor platforms: Melamine detection with color change on melamine imprinted membranes [J]. *Microchemical Journal*, 2023, 188: 108 468.
- [27] CHEN J, WANG J, TAN L. Highly selective separation and detection of cyromazine from seawater using graphene oxide based molecularly imprinted solid-phase extraction [J]. *Journal of Separation Science*, 2019, 42 (12): 2 100-2 106.
- [28] LE T, YAN P, XU J, *et al.* A novel colloidal gold-based lateral flow immunoassay for rapid simultaneous detection of cyromazine and melamine in foods of animal origin [J]. *Food Chemistry*, 2013, 138 (2): 1 610-1 615.
- [29] LIU J, ZHONG Y, LIU J, *et al.* An enzyme linked immunosorbent assay for the determination of cyromazine and melamine residues in animal muscle tissues [J]. *Food Control*, 2010, 21 (11): 1 482-1 487.
- [30] EUN-HYE L, YOUNG A K, YONG T L, *et al.* Competitive immunochromatographic assay for the detection of the organophosphorus pesticide EPN [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2013, 24 (2): 129-138.