

除草剂异丙甲草胺特异性抗体制备及 免疫检测方法的建立

许晶晶, 王兰腾, 赖玉健, 李向梅, 雷红涛, 沈兴
(华南农业大学食品学院, 广东广州 510642)

摘要: 为检测食品中的异丙甲草胺农药残留, 降低其对人体可能造成的危害, 本文建立了基于抗体的酶联免疫分析方法。首先以除草剂异丙甲草胺、3-巯基丙酸为原料合成半抗原, 经由氢核磁共振和质谱方法鉴定后, 通过碳二亚胺(EDC)法将半抗原与载体蛋白偶联制备异丙甲草胺人工抗原, 免疫新西兰大白兔获取抗体, 通过棋盘滴定确定抗原抗体最佳稀释倍数, ELISA反应的抗体稀释液为PBS(1%PEG 6000), 药物稀释液为PBS(10%甲醇), 在此基础上建立间接竞争ELISA标曲, 其 IC_{50} 为14.64 ng/mL, 检测限(limit of detection, LOD)为0.8 ng/mL, 线性检测范围 IC_{20} ~ IC_{80} 为1.51~141.92 ng/mL。与14种结构类似物进行交叉反应, 交叉反应率低于3%。向环境水样中添加异丙甲草胺, 回收率为86.60%~102.16%, 变异系数(RSD)为7.05%~13.30%。此抗体灵敏度高特异性好, 可用于食品和环境中的异丙甲草胺的监测。

关键词: 异丙甲草胺; 多克隆抗体; 间接竞争酶联免疫吸附(ic-ELISA)

文章编号: 1673-9078(2019)010-246-252

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.10.033

An Immunoassay Based on the Antibody Specific for Herbicide Metolachlor

XU Jing-jing, WANG Lan-teng, LAI Yu-jian, LI Xiang-mei, LEI Hong-tao, SHEN Xing
(College of Food Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: An antibody-based ic-ELISA was established to detect the pesticide residue of metolachlor in food and reduce its potential harm to human. Metolachlor hapten was synthesized from herbicide metolachlor and 3-mercaptopropionic acid, and identified by 1H -NMR and mass spectrometry. The artificial antigen of metolachlor was prepared by coupling the hapten with carrier protein using EDC method. Antibody against metolachlor was raised by rabbit. The optimal dilution times of antigen and antibody were determined by chessboard titration. The antibody dilution solution for ELISA reaction was PBS (1% PEG6000), and the drug dilution solution was PBS (10% methanol). On this basis, the established ic-ELISA calibration curve for metolachlor was conducted by antibody, which exhibited IC_{50} value of 14.64ng/mL, detection limit (LOD) of 0.8 ng/mL and linear detection range (IC_{20} ~ IC_{80}) of 1.51~141.92 ng/mL. The cross-reactivity with 14 structural analogues was less than 3%. The recoveries of spiked samples were in the range of 86.60%~102.16% with RSD ranging from 7.05%~13.30%. This antibody with high sensitivity and specificity can be used to detect metolachlor in the food or environment.

Key words: metolachlor; polyclonal antibody; indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA)

异丙甲草胺(Metolachlor, MET), 属于乙酰胺类芽前选择性除草剂, 是我国生产和使用量最大的酰胺类除草剂品种之一, 也是世界销售额前十位的农药品种之一^[1-4]。异丙甲草胺因其广谱除草活性, 价格低廉易得, 被广泛应用于各种作物。但有研究显示异丙甲草胺是潜在致癌性物质, 当其被施用于花生、大豆和玉米等作物时, 会产生一定农药残留, 从而导致严重

食品安全问题。我国多个地区的土壤中都能检测出异丙甲草胺的存在^[5], 并且它可通过降雨和渗透作用等途径污染地表水体系, 使各类果蔬、粮食作物以及低等动物长期暴露在异丙甲草胺的环境中, 这不仅对鱼类和作物造成危害, 而且它还可能通过食物链进入人体^[6], 对人体造成危害。国家标准 GB/T 5009.174-2003《花生、大豆中异丙甲草胺残留量的测定》规定异丙甲草胺在花生和大豆中的最高残留限量为 0.5 mg/kg, 农业行业标准 NY 775-2004 则规定异丙甲草胺在玉米籽粒中的最高残留限量为 0.1 mg/kg, 在大豆中的残留量为 0.5 mg/kg。在国外, 美国环境保护局要求在饮用

收稿日期: 2019-05-09

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(31601555)

作者简介: 许晶晶(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 沈兴(1987-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 食品安全检测

水中的异丙甲草胺残留量限制在 100 ng/mL (US EPA, 1989); 加拿大健康和福利中心临时设立在饮用水中的异丙甲草胺最高容许浓度为 50 ng/mL。

目前国内外异丙甲草胺的检测方法主要集中在 GC-MS^[7-9], HPLC-MS^[10,11]等方法, 这些方法虽然准确度和灵敏度高, 但仪器设备价格相对高昂, 分析时间长、成本高, 样品前处理步骤复杂, 对实验人员专业技能要求也较高, 因此很难满足大批量样品的快速检测, 而基于抗体的免疫分析方法简单、快速, 能实现大量样品的高通量筛选^[12,13]。本实验在氯乙酰基侧链引入取代基团, 即 3-巯基丙酸作为衍生手臂, 经此半抗原获取灵敏度高、特异性强的多克隆抗体, 建立了异丙甲草胺酶联免疫分析方法。本研究提供了一种快速检测农药残留的方法, 为食品安全检测领域提供方便快速的检测技术, 也为后续开发异丙甲草胺残留快速检测试剂盒提供基础。

1 材料与方 法

1.1 主要药品与试剂

异丙甲草胺、2-乙基-6-甲基-2-氯乙酰苯胺, 德国 Dr.Ehrenstorfer 公司; 交叉反应药物, 美国 AccuStandard 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 抗体, 全式金生物技术有限公司; 碳二亚胺 (EDC)、3-巯基丙酸 (3-MPA)、牛血清白蛋白 (BSA)、卵清白蛋白 (OVA)、聚乙二醇 (PEG) 6000, 弗氏完全佐剂与弗氏不完全佐剂, 美国 Sigma 公司; 其余试剂均为市售分析纯。

1.2 主要仪器设备

NanoDrop 2000 c 微量分光光度计, 美国 Thermo; Multiskan FC 型酶标仪, 美国 Thermo 公司; MettlerToledo 电子天平, 梅特勒-托利多电子仪器(上海)有限公司; RT-3900 全自动洗板机, 上海艾研生物科技有限公司; 96 孔酶标板, 厦门怡佳美实验器材有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 半抗原合成与鉴定

半抗原合成路线见图 1, 将 0.4 g 3-巯基丙酸 (3-MPA)、1 g 异丙甲草胺和 0.66 g 的 KOH 溶于 50 mL 乙醇中。在恒温油浴锅 (80 °C) 中回流搅拌反应 6 h。反应完全后, 用饱和食盐水萃取两次, 水相用 HCl 中和到 pH 为 2~3 后, 用乙酸乙酯萃取两次, 用 Na₂SO₄ 干燥过夜。之后进行柱层析, 将收集的洗脱液

分管收集, 真空旋干, 最终获取无色油状物质。采用核磁与质谱对半抗原进行结构鉴定。

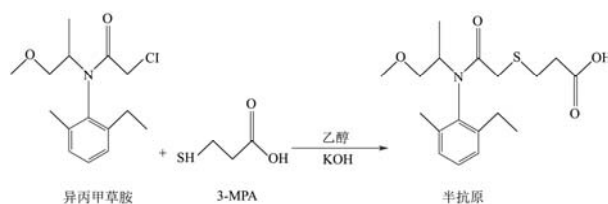


图 1 异丙甲草胺半抗原合成路线

Fig.1 Synthetic route for MMPA

1.3.2 人工抗原合成与鉴定

准确称取 3.5 mg 异丙甲草胺半抗原 (MMPA), 溶于 200 μL 二甲基甲酰胺 (DMF); 将 10 mg 牛血清白蛋白 (BSA) 溶于 1.7 mL PBS 中; 然后将半抗原溶液加到载体蛋白溶液中, 最后将 4.22 mg 碳二亚胺 (EDC) 加入到上述溶液中, 边加边搅拌, -4 °C 反应 9 h, 用磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 透析两天, 透析结束后得到异丙甲草胺人工抗原, 半抗原偶联 OVA 也依据此法。异丙甲草胺半抗原 (MMPA)、BSA/OVA 和相应人工抗原分别进行紫外 (200~400 nm) 扫描鉴定^[14]。

1.3.3 抗体制备

用异丙甲草胺羧基衍生物 (MMPA) 偶联牛血清白蛋白 (BSA) 所获得的人工抗原免疫新西兰大白兔, 抗体制备的具体流程参见文献^[15]。在免疫期间, 采用间接竞争 ELISA 方法监测血清活性^[16], 免疫结束后, 将获得的抗体离心, 和甘油 1:1 混合, 分装, -20 °C 冻存。

1.3.4 ELISA 优化

本实验采取棋盘滴定法^[17,18]确定最适的包被原与抗体稀释倍数。在此基础上优化药物稀释液和抗体稀释液。先是稀释液种类优化, 再是稀释液中相应成分、含量的优化。药物稀释液包括: PBS、PBST (10%甲醇)、PBST, 抗体稀释液包括: PBS、PBST、PBS (0.5% BSA)、PBS (0.5% PEG 6000)。

1.3.5 标曲建立

ELISA 的标准曲线是以 B/B₀ 值为纵坐标, 标准品浓度对数值为横坐标, 应用 OriginPro 8.5 软件的四参数对数函数进行曲线拟合^[19]。

$$\text{四参数函数为: } y=(A-D)/[1+(x/C)^B]+D \quad (1)$$

式 1 中, A 和 D 分别代表药物浓度最小和最大时的 A₄₅₀ 值, B 表示曲线的陡峭程度, 称斜率因子, C 为中点浓度, 当药物浓度等于 C 时的值为 (A+D)/2, 正处于曲线的拐点处, 浓度为 IC₅₀; 以 IC₁₀ 为检测限 (LOD), 以 IC₂₀ 为定量限 (LOQ), 以 IC₂₀~IC₈₀ 为检测范围。

1.3.6 特异性评价

根据上述方法, 将异丙甲草胺标准溶液替换成其他结构类似物(图 2)的标准溶液, 在相同条件下绘制药物对抗体的抑制曲线, 并计算出相应的 IC₅₀ 值,

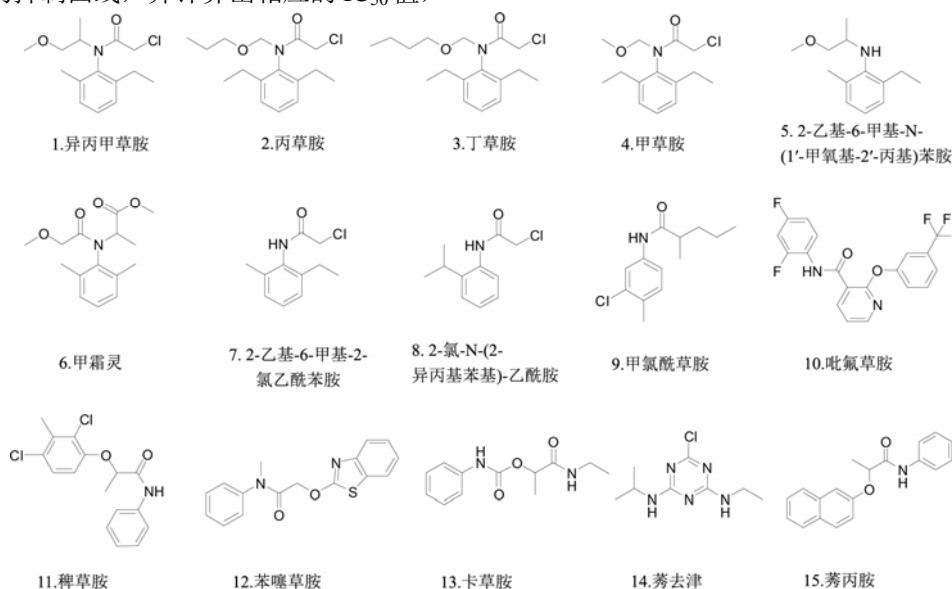


图 2 异丙甲草胺及其结构类似物

Fig.2 Metolachlor and its structural analogues

1.3.7 水样添加回收实验

水样来自 XX 大学宁荫湖。采回足量宁荫湖水样, 添加 30 ng/mL、50 ng/mL、80 ng/mL 的异丙甲草胺到水样中, 离心、滤纸过滤, 去除杂质, 用建立的 ic-ELISA 方法进行测定, 计算回收率。

1.3.8 数据统计分析

每个数据做三组平行, 取三组数据平均值用 OriginPro 8.5 软件作图并进行数据分析。

2 结果和讨论

2.1 半抗原合成

高灵敏度、高特异性抗体对建立优良免疫检测方法至关重要。而其中半抗原的设计对获取优质抗体至关重要。异丙甲草胺分子质量只有 283.8, 属于半抗原物质, 无免疫原性, 需连上大分子蛋白质, 才能成为完全抗原用于动物免疫^[20]。然而异丙甲草胺分子中不存在可以与蛋白分子连接的基团, 因此药物需要构建手臂基团连接蛋白。国外, Schlaeppli 等^[21]采用从头合成的方法, 经过六步反应在苯环对位引入羧酸基团, 最后获得的单抗虽然特异性较强, 但此半抗原合成方法太过复杂, 获取抗体难度较大。而本文采用 3-巯基丙酸作为衍生化试剂, 仅需一步便能获取带羧基的半抗原分子。核磁结果如下所示: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ_H 7.17~7.25 (2H, m, H-4', 5'), 7.10(1H, d, J=7.2

根据公式 2 计算结构类似物的交叉反应率 CR (%)。

$$\text{交叉反应率}(\%) = [\text{IC}_{50}(\text{异丙甲草胺}) / \text{IC}_{50}(\text{结构类似物})] \times 100\% \quad (2)$$

Hz, H-3'), 4.16~4.20 (1H, m, H-6), 3.66~3.75 (1H, m, H-7a), 3.45~3.49 (1H, m, H-7b), 3.26(3H, d, J=9.6 Hz, H-8), 2.87~2.90 (4H, m, H-3, 4), 2.65 (2H, t, J=7.2 Hz, H-2), 2.53~2.61 (2H, m, C₂-CH₂-), 2.25 (3H, d, J=9.6 Hz, C₆-CH₃), 1.24(3H, t, J=7.6 Hz, C₆-CH₃), 1.14(3H, t, J=6.4 Hz, C₂-CH₃), 衍生物相对于原药而言, 增加的是 3-巯基丙酸基团, 从氢归属情况, 大致确定了物质的化学结构, MS m/z(-ESI):352.157[M-H]⁻, 核磁与质谱结果均表明异丙甲草胺半抗原合成成功。

2.2 人工抗原鉴定

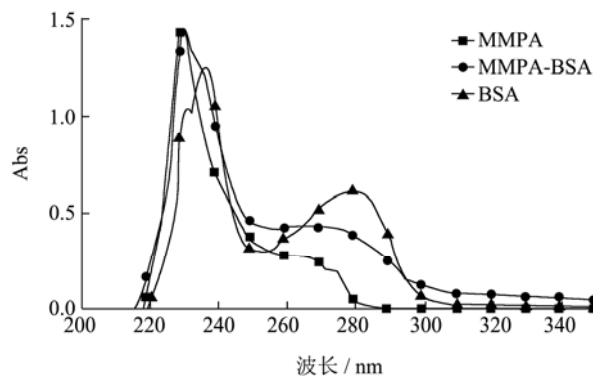


图 3 异丙甲草胺半抗原、异丙甲草胺人工抗原和 BSA 的紫外吸收曲线

Fig.3 UV-vis spectrum of metolachlor hapten, artificial antigen and BSA

半抗原与载体蛋白是否能成功偶联, 对免疫动物

后特异性抗体的产生具有重要影响。人工抗原的吸收曲线与载体蛋白和异丙甲草胺半抗原明显不同 (图3), BSA 仅在 280 nm 处有特征峰, 对比三者曲线可看出发生明显位移, 说明反应产物是载体蛋白 BSA 与 MMPA 的复合物, 证明偶联成功^[22]。同理也证明 MMPA-OVA 偶联成功 (图4)。

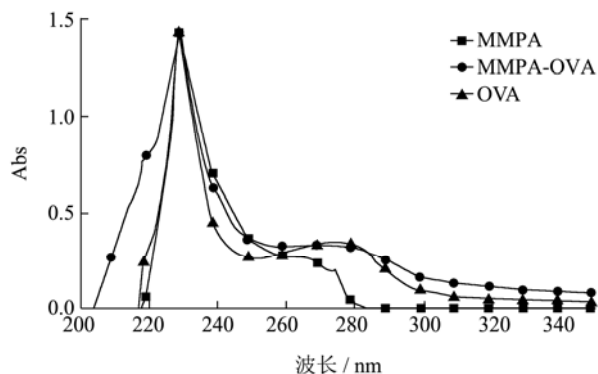


图4 异丙甲草胺半抗原、异丙甲草胺人工抗原和 OVA 的紫外吸收曲线

Fig.4 UV-vis spectrum of metolachlor haptent, artificial antigen and OVA

2.3 ELISA 优化

2.3.1 抗原抗体工作浓度优化

包被原浓度是影响标准曲线灵敏度的重要因素, 降低包被原浓度有利于游离抗原竞争结合抗体, 从而提高检测灵敏度。但包被原浓度过低, 也会导致反应吸光度降低, 使包被板条保质期缩短, 标准曲线结果不稳定。包被浓度和抗体稀释倍数共同决定着所绘制曲线的灵敏度及稳定性。本研究选取包被原浓度和抗体稀释倍数的标准在于: 尽可能降低包被原浓度, 同时保证效价 OD 值在 1.0 左右以及具有较高的抑制率, 依据上述原则最终选择包被原稀释 4000 倍 (0.25 μg/mL), 抗体稀释 16000 倍进行后续实验。

2.3.2 ELISA 体系优化

抗原与抗体之间的作用力主要是疏水相互作用、范德华力、氢键等, 因此可通过对 ELISA 反应体系进行优化提高灵敏度 (表 1)。甲醇可以促进药物溶解, 有利于药物与包被原竞争性结合抗体, 另外 PEG 6000 可以与抗体争夺水分子, 提高抗体的相对浓度, 可促进抗原抗体反应。本研究同时参考 IC₅₀ 与 R² 值, 最终选取 PBS (10%甲醇) 作为药物稀释液, PBS (1% PEG 6000) 作为抗体稀释液。相对于优化前的 45.37 ng/mL 提高了 3 倍左右。

表 1 缓冲液种类及相应成分含量对 ic-ELISA 的影响

Table 1 Effects of the buffer types and related component contents on ic-ELISA

优化类别	优化条件	IC ₅₀ /(ng/mL)	B ₀	R ²
药物稀释液种类	PBST	45.37	1.214	0.991
	PBST (10%甲醇)	25.74	1.207	0.998
	PBS	34.61	1.022	0.998
甲醇含量	PBS (0%)	32.38	1.1	0.998
	PBS (10%)	24.76	0.994	0.999
	PBS (20%)	55.5	1.01	0.993
	PBS (30%)	77.96	1.025	0.992
	PBS (吐温)	24.76	0.994	0.999
抗体稀释液种类	PBS	24.12	1.146	0.999
	PBS (0.5%BSA)	39.96	1.112	0.991
	PBS (0.5%PEG 6000)	13.56	1.359	0.98
PEG 6000 含量	0%	24.12	1.146	0.999
	0.50%	14.26	1.479	0.971
	1%	14.64	1.373	0.997
	4%	44.94	1.483	0.935

2.4 标曲建立

根据上述最优包被原及抗体稀释组合、抗体及药物稀释液的优化, 绘制抗异丙甲草胺多克隆抗体的标准曲线(图5)。异丙甲草胺抗体的 IC₅₀ 为 14.64 ng/mL, 检测范围为 1.51~141.92 ng/mL, LOD 为 0.8 ng/mL,

相比于张^[23]文献报道中的抗体, 本研究制备的抗体灵敏度要高 2.3 倍, LOD 低 7.9 倍。并且该检测限能达到 GB/T 5009.174-2003 及 NY 775-2004 对异丙甲草胺最高残留限量的检测要求, 也能满足国外饮用水的检测需求, 因此可应用于实际检测。

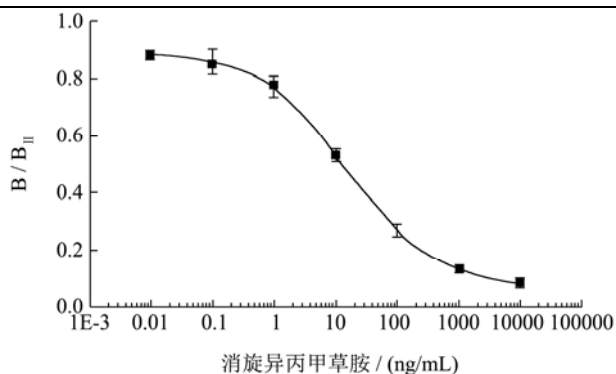


图5 异丙甲草胺标准曲线

Fig.5 icELISA calibration curves for metolachlor

2.5 交叉反应结果分析

表2 异丙甲草胺抗体与其结构类似物交叉反应

Table 2 Cross-reactivity of metolachlor antibody towards structural analogues

药物名称	IC ₅₀ /(ng/mL)	CR/100%
异丙甲草胺	12.99	100.00%
丙草胺	480.17	2.71%
丁草胺	482.75	2.69%
甲草胺	793.35	1.64%
甲霜灵	927.86	1.40%
2-乙基-6-甲基-2-氯乙酰苯胺	ND	ND
2-氯-N-(2-异丙基苯基)-乙酰苯胺	ND	ND
2-乙基-6-甲基-N-(1'-甲氧基-2'-丙基)苯胺	ND	ND
甲氯酰草胺	ND	ND
吡氟草胺	ND	ND
卡草胺	ND	ND
莠去津	ND	ND
萘丙胺	ND	ND
稗草胺	ND	ND
苯噻草胺	ND	ND

注: ND表示不识别。

交叉反应数据见表2, 根据文献报道^[24-26]及异丙甲草胺自身结构特征, 抗体的识别位点可能为: (1) 氯乙酰基侧链; (2) 烷氧基侧链; (3) 苯环上烷基。因此本研究据此选取14种交叉反应药物来研究此抗体特异性。从选取的交叉反应结构对比来看(见图2), 相比于异丙甲草胺, 2-乙基-6-甲基-2-氯乙酰苯胺(CR,ND)和2-乙基-6-甲基-N-(1'-甲氧基-2'-丙基)苯胺(CR,ND)分别少了烷氧基侧链和氯乙酰基基团, 但抗体却对它们完全不识别, 说明此抗体对抗原的识别不在于某一个位点, 而是具有多个识别位点。甲草胺(CR=1.64%)、丙草胺(CR=2.71%)、丁草胺

(CR=2.69%)与异丙甲草胺结构相比, 主要是烷氧基侧链的差别, 说明烷氧基侧链在抗原识别中的重要性; 但甲草胺, 丙草胺, 丁草胺三者差别不大, 表明烷氧基侧链的长短对抗体识别的影响不显著。在以往研究中, 张等^[23]仅选取了部分酰胺类除草剂评价抗体特异性, 结果显示交叉反应率低于0.5%, Hall等^[27]将甲霜灵羧酸衍生物作为半抗原制备异丙甲草胺兔多抗, 但该抗体与甲草胺(CR=23%)、甲霜灵(CR=5%)有较高的交叉反应, 其特异性较差; Lawruk通过混合酸酐法将异丙甲草胺的巯基丁酸衍生物与BSA进行偶联, 免疫兔子得到兔多抗, 建立免疫磁珠ELISA方法, 但对乙草胺(CR=13.0%)和甲霜灵(CR=15.2%)存在较高的交叉反应率^[24]。Feng等^[28]制备的兔多抗对硫醚代谢物存在交叉反应, 也未进行实际样品的检测。而本文制备的多克隆抗体与异丙甲草胺结构类似物的交叉反应率均低于3%, 抗体特异性更好。

2.6 添加回收

检测结果如表3所示。在水样中的添加异丙甲草胺的量分别为30 ng/mL、50 ng/mL、80 ng/mL时, 从表中可以看出, 此方法的平均回收率为86.60%~102.16%, 变异系数7.05%~13.30%, 表明其准确度和精确度都比较高, 能满足对实际样品检测的要求。

表3 异丙甲草胺在水样中的添加回收实验

Table 3 Recovery of metolachlor in water samples (n=8)

添加浓度/(ng/mL)	测定值/(ng/mL)	平均回收率/%	变异系数 CV/%
30	25.98±3.45	86.60±11.50	13.30
50	48.06±3.97	96.12±7.94	8.26
80	81.73±5.76	102.16±7.20	7.05

3 结论

本研究成功制备出异丙甲草胺半抗原并获取相应抗体, 该抗体灵敏度高, IC₅₀为14.64 ng/mL, LOD能达到0.8 ng/mL; 其特异性强, 与14种异丙甲草胺结构类似物的交叉反应率低于3%。同时建立了异丙甲草胺的酶联免疫分析方法, 根据添加回收结果表明该方法可用于实际样品检测, 具有较高准确度和稳定性, 可用于环境水样和食品中异丙甲草胺的检测。

参考文献

[1] 陈燕玲. 氯乙酰胺类除草剂-精异丙甲草胺[J]. 现代农药, 2016, 15(3): 40-43
CHEN Yan-ling. S-metolachlor, A chloroacetamide herbicide [J]. Modern Agrochemicals, 2016, 15(3): 40-43

- [2] 张璇,杨瑞丽,柳春红,等.手性除草剂异丙甲草胺毒理研究进展[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2015,43(1): 152-158
ZHANG Xuan, YANG Rui-li, LIU Chun-hong, et al. Progress in toxicity of chiral herbicide metolachlor [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2015, 43(1): 152-158
- [3] 张大同,徐秀珠,蔡小军,等.异丙甲草胺立体异构体在高效液相色谱手性固定相上的分离[J].分析化学,2004,2:191-194
ZHANG Da-tong, XU Xiu-zhu, CAI Xiao-jun, et al. Stereoisomeric separation of metolachlor by high performance liquid chromatography chiral stationary [J]. Analytical Chemistry, 2004, 2: 191-194
- [4] Rose C E, Coupe R H, Capel P D, et al. Holistic assessment of occurrence and fate of metolachlor within environmental compartments of agricultural watersheds [J]. Science of the Total Environment, 2018, 612: 708-719
- [5] 冯玉洁,谢圣华,田海,等.异丙甲草胺在不同类型土壤中的吸附和淋溶特性研究[J].西南农业学报,2017,30(12):2751-2755
FENG Yu-jie, XIE Sheng-hua, TIAN Hai, et al. Adsorption and leaching behavior of metolachlor in different soils [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(12): 2751-2755
- [6] 梅梅,杜振霞,陈芸.QuEChERS-超高效液相色谱串联质谱法同时测定土壤中5种常用除草剂[J].分析化学,2011, 39(11):1659-1664
MEI Mei, DU Zhen-xia, CHEN Yun. QuEChERS-Ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of 5 currently used herbicides [J]. Analytical Chemistry, 2011, 39(11): 1659-1664
- [7] Williams D B G, George M J, Marjanovic L. Rapid detection of atrazine and metolachlor in farm soils: gas chromatography-mass spectrometry-based analysis using the bubble-in-drop single drop microextraction enrichment method [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014, 62(31): 7676-7681
- [8] 黄武,梁锋,庞晓林,等.在线凝胶渗透色谱-气相色谱-质谱联用法检测大豆中异丙甲草胺残留量[J].食品安全导刊, 2016,3:126-128
HUANG Wu, LIANG feng, PANG Xiao-lin, et al. Determination of metolachlor residues in Soybeans by online gel permeation chromatography and gas chromatography-mass spectrometry [J]. China Food Safety Magazine, 2016, 3: 126-128
- [9] Vryzas Z, Tsaboula A, Papadopoulou-Mourkidou E. Determination of alachlor, metolachlor, and their acidic metabolites in soils by microwave-assisted extraction (MAE) combined with solid phase extraction (SPE) coupled with GC-MS and HPLC-UV analysis [J]. Journal of Separation Science, 2007, 30(15): 2529-2538
- [10] Curwin B D, Hein M J, Barr D B, et al. Comparison of immunoassay and HPLC-MS MS used to measure urinary metabolites of atrazine, metolachlor, and chlorpyrifos from farmers and non-farmers in Iowa [J]. Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology, 2010, 20(2): 205-212
- [11] 李菊颖,郭欣妍,何健,等.玉米粉中吡虫啉、三唑酮、乙草胺与异丙甲草胺的QuEChERS/高效液相色谱-串联质谱快速检测[J].分析测试学报,2017,36(6):783-787
LI Ju-ying, GUO Xin-yan, HE Jian, et al. Rapid Determination of imidacloprid, triadimefon, acetochlor and metolachlor in corn flour by QuEChERS/Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2017, 36(6): 783-787
- [12] Wang Z H, Zhu Y, Ding S Y, et al. Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds [J]. Analytical Chemistry, 2007, 79(12): 4471-4483
- [13] Chen J H, Wang L T, Lu L L, et al. Four specific hapten conformations dominating antibody specificity: quantitative structure-activity relationship analysis for quinolone immunoassay [J]. Analytical Chemistry, 2017, 89(12): 6740-6748
- [14] Zeng H P, Chen J H, Zhang C J, et al. Broad-specificity chemiluminescence enzyme immunoassay for (fluoro) quinolones: hapten design and molecular modeling study of antibody recognition [J]. Analytical Chemistry, 2016, 88(7): 3909-3916
- [15] Shen S J, Zhang F, Zeng S, et al. Development of enantioselective polyclonal antibodies to detect styrene oxide protein adducts [J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(7): 2668-2677
- [16] Liu Y, Wang L T, Zhou K, et al. Rapid and homologous immunoassay for the detection of herbicide propisochlor in water [J]. Food and Agricultural Immunology, 2018, 29(1): 67-83
- [17] Casino P, Morais S, Puchades R, et al. Evaluation of

- enzyme-linked immunoassays for the determination of chloroacetanilides in water and soils [J]. *Environmental Science & Technology*, 2001, 35(20): 4111-4119
- [18] Zeng D Y, Shi H Y, Li B, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for quantitative determination of quinalofop-p-ethyl [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(23): 8682-8687
- [19] Wang L T, Jiang W M, Shen X, et al. Four hapten spacer sites modulating class specificity: nondirectional multianalyte immunoassay for 31 β -agonists and analogues [J]. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(4): 2716-2724
- [20] Feng P C C, Wratten S J, Horton S R, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for alachlor and its application to the analysis of environmental water samples [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38(1): 159-163
- [21] Schlaeppi J M, Moser H, Ramsteiner K. Determination of metolachlor by competitive enzyme immunoassay using a specific monoclonal antibody [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, 39(8): 1533-1536
- [22] Liu Z J, Yu P M, Fang S, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for determination of pretilachlor in water and soil [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2011, 74(6): 1595-1599
- [23] 张炽坚,王强,唐秋实,等.酶联免疫吸附法检测除草剂异丙甲草胺[J].*食品科学*,2013,34(10):126-129
- ZHANG Chi-jian, WANG Qiang, TANG Qiu-shi, et al. Determination of the herbicide metolachlor by enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Food Science*, 2013, 34(10): 126-129
- [24] Lawruk T S, Lachman C E, Jourdan S W, et al. Determination of metolachlor in water and soil by a rapid magnetic particle-based ELISA [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1993, 41(9): 1426-1431
- [25] Hegedűs G, Krikunova V, Bélai I, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for the detection of acetochlor [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2002, 82(11-12): 879-891
- [26] Yakovleva J, Zherdev A V, Popova V A, et al. Production of antibodies and development of enzyme-linked immunosorbent assays for the herbicide butachlor [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 491(1): 1-13
- [27] Hall J C, Wilson L K, Chapman R A. An immunoassay for metolachlor detection in river water and soil [J]. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 1992, 27(5): 523-544
- [28] Feng P C C, Horton S R, Sharp C R. A general method for developing immunoassays to chloroacetanilide herbicides [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1992, 40(2): 211-214

(上接第 278 页)

- [11] Anastassiades M, Lehotay S J, Stajnbaher D, et al. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce [J]. *Journal of Aoac International*, 2003, 86(2): 412-431
- [12] 刘红,曾建勇,梁雪琪,等.QuEChERS EMR-Lipid 结合 LC-MS/MS 测定鸡蛋中磺胺类和喹诺酮类药物残留[J].*现代食品科技*,2018,34(9):235-243
- LIU Hong, ZENG Jian-yong, LIANG Xue-qi, et al. determination of sulfonamides and quinolones in eggs by QuEChERS EMR-lipid and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2018, 34(9): 235-243
- [13] 姚瑞雄.QuEChERS 净化结合超高效液相色谱串联质谱法测定奶粉中的季铵盐[J].*现代食品科技*,2017,33(10):275-280
- YAO Rui-xiong. Determination of quaternary ammonium compounds in milk powder by QuEChERS Purification coupled with UPLC-MS/MS [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2017, 33(10): 275-280
- [14] 农业部 1031 号公告-2-2008.动物源性食品中糖皮质激素类药物多残留检测液相色谱-串联质谱法[S]
- Announcement No.1031-2 (2008) of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China, Determination of glucocorticoids residues in animal products LC-MS/MS method [S]
- [15] Matuszewski B K. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis [J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 830(2): 293-300