

文章编号:1673-1689(2010)06-0883-06

食品中百草枯 3 种检测方法的比较

孙秀兰¹, 张银志¹, 杨婷婷², 邵景东³

(1. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江苏省苏微微生物研究所, 江苏 无锡 214122; 3. 张家港出入境检验检疫局, 江苏 张家港 215500)

摘要:通过对粮食作物中的百草枯残留检测方法进行比较研究,得到各种方法的优劣。结果: HPLC 的最低检测限为 12 mg/L,加标回收率为 42%~52%,相对标准偏差(RSD)为 4.43%; ELISA 的最低检测限为 0.005 mg/L,加标回收率为 70%~80%,相对标准偏差(RSD)为 8.15%; GICA 的最低检测限为 50 mg/L,通过一个标准的颜色反应系列,可以非常简便、快速的对样品进行现场检测,是快速检测发展的一个方向。

关键词: 百草枯; HPLC, 酶联免疫法(ELISA); 胶体金免疫层析法(GICA)

中图分类号: Q 33

文献标识码: A

Comparasion of Three Detection Dethods for Paraquat Residues in Food

SUN Xiu-lan^{1,2}, ZHANG Yin-zhi¹, YANG Ting-ting², SHAO Jing-dong³

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu suwei Institute of Microbiology Co. Ltd, Wuxi 214036, China; 3. Zhangjiagang Entry-Exit inspection And Quarantine, Zhangjiagang 215500, China)

Abstract: This study investigated the detection methods and the corresponding detection parameters of paraquat(PQ). A serials of results were achieved: (1) The minimum limitation of HPLC was 12 mg/L, the recovery ration was 42~52%, the RSD was 4.43%, the precision was very high. (2) the parameters of ELISA were: minimum limitation 0.005 μg /L, the recovery ratio 70~80%, RSD 8.15%; (3) The detection results of GICA is very good, minimum limitation 50 mg/L, through a standard color reflected series. Among these detection protocols, GICA method has been proven to be a simple, efficient, quick method to determine the content of PQ in food.

Key words: PQ; HPLC; ELISA; GICA

百草枯(paraquat, PQ)俗称克无踪、对草快,化学名为 1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶阳离子盐^[1],是一种广谱、灭生性有机杂环类除草剂。百草枯可经胃肠道、皮肤和呼吸道吸收,易导致肺纤维化^[2]。对

人类健康存在潜在的危害,许多国家严格限制使用百草枯^[3]。中国 2005 年发布并实施的国家标准——食品中农药最大农药残留限量中规定蔬菜、柑橘、小麦粉中百草枯的最大残留限量分别为

收稿日期:2009-10-28

基金项目:国家 863 计划项目(2007AA10Z428)。

作者简介:孙秀兰(1976—),女,山东聊城人,工学博士,副教授,主要从事食品安全检测方面研究。

Email: sxlzzz@yahoo.com.cn

0.05、0.2、0.5 r/min。

目前,有关百草枯的检测方法报道最多的也是关于血液、尿液等生物检样中百草枯的检测,但是其在粮食、果蔬中残留的检测也不可忽视。百草枯的传统检测方法气质联用法^[4]、毛细管电泳法^[5-7]、高效液相色谱法^[8-10]和毛细管电泳质谱联用法^[9]等,然而这些方法的前处理比较复杂、费时,不适用于大量样品的快速检测。有关 ELISA 法检测国外有过相关报道,不过大多是关于生物样品中的百草枯检测或者人体暴露的评价^[11-12]。本课题组在前期研究的基础上^[13],采用免疫学方法对食品中百草枯残留进行检测,并将建立的 ELISA 法、GICA 检测法与 HPLC 法进行分析和比较。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器

百草枯标准品:质量分数 $\geq 98.5\%$ 安谱科学仪器有限公司生产;盐酸、三氯甲烷、氢氧化钠、铁氰化钾、甲醇、乙腈(国药集团化学试剂有限公司);大豆样品由张家港出入境检验检疫局提供。胶体金试纸条(本研究室自制)。

Agilent1100 液相色谱仪:美国 Agilent 公司产品;旋转蒸发仪:上海贝凯生物化工设备有限公司生产;DL-5 低速大容量离心机:上海安亭科学仪器厂生产;可调式移液器:Thermo Labsystems 公司生产;waters Sep-Pak Plus, ENV C18 固相萃取小柱:美国 Waters 公司生产;Varian, Bond Elut Straight Barrel, PRS 固相萃取小柱:美国 Varian 公司生态产品;其他均为实验室常用仪器。

1.2 试验方法

1.2.1 免疫学检测方法的应用

1) 样品的前处理 将大豆样品用粉碎机粉碎,分别称取 5.0 g 粉碎试样,置于 15 mL 离心管中,分别加入 50、500、2 000 ng/mL 百草枯标准品及标准品稀释液各 5.0 mL,每个质量浓度平行做 3 次。使样品中百草枯质量分数分别为 0.05、0.5、2 和 0 mg/kg。混合均匀,超声波提取 20 min,然后于离心 15 min,取上清液,用于 ELISA 和 GICA 法的检测。

2) ELISA 法检测大豆样品中的百草枯 采用间接 ELISA 法测定。酶标板微孔包被有已知抗原,加入一定量的单克隆抗体与标准溶液或样品提取液,竞争孵育后,形成抗原抗体复合物,洗去多余抗体,然后加入酶标记的抗免疫球蛋白的第 2 抗体的结合物,孵育后,洗去多余酶结合物。加入底物进行酶的催化显色反应,结合的酶标记物使无色的底

物产生蓝色,加入停止液后颜色由蓝色转变为黄色,颜色的梯度可以反映样品中 PQ 的质量分数。

同时制作 1~50 ng/mL 范围的标准曲线。根据回收试验建立的标准曲线计算每个样品的 PQ 质量分数,扣去原样品中 PQ 的质量分数即为检测质量分数。检测到的质量分数与加标质量分数之间的比率为对应的回收率。计算方法如下:

回收率(%)=

$$\frac{\text{总 PQ 质量分数} - \text{原样品中 PQ 质量分数}}{\text{加标质量分数}} \times 100$$

3) GICA 法检测大豆样品中的百草枯 取待测样品 75 μ L 滴于试纸条的加样孔中,进行检测,在 10 min 内观察试纸条上 C、T 线的显色情况。若 T 线消失,则将样液进行适当稀释后再测,直至 T 线出现红色带,再对比标准色带进行 PQ 含量估算;若 T 线为红色带,直接比对标准色带以判断样液中 PQ 的大体质量分数;若 C、T 线均无色带出现则该试纸条失效。

1.2.2 HPLC 检测法的建立

1) 样品的前处理 用粉碎机将样品粉碎,室温保存。称取 5.0 g 粉碎试样,置于 50 mL 离心管中,分别加入 50、500、2 000 ng/mL 百草枯标准品及标准品稀释液各 5.0 mL,每个质量分数平行做 3 次。使样品中百草枯质量分数分别为 0.05、0.5、2 和 0 mg/kg。加入 10 mL 2 mol/L HCl,超声波提取 1 min,然后加入 5 mL 超纯水,混匀,4 200 r/min,离心 15 min,将上清液放入 25 mL 棕色容量瓶中,定容至 25 mL。

用 Waters, Sep-Pak Plus, ENV C18 固相萃取小柱进行纯化,条件为:用 5 mL 甲醇+5 mL 超纯水活化,然后上样 5 mL,收集流出液,最后用 5 mL 5 mol/L HCl 洗脱,收集滤液,并与上面的收集的流出液合并,总共约 10 mL。再用 varian, Bond Elut Straight Barrel, PRS 固相萃取小柱进一步纯化,条件为:用 10 mL 超纯水活化,然后上样 10 mL,先用 5 mL 超纯水淋洗,再用 10 mL 5 mg/mL 的氯化铵溶液淋洗,最后用 27 mg/mL 的氯化铵溶液/25 mg/mL 铵溶液(100:5)30 mL 洗脱,并收集洗脱液。

2) 荧光衍生化 将上面得到的洗脱液用 27 mg/mL 的氯化铵溶液/25%铵溶液(100:5)补到总体积为 40 mL,取 10 mL 放入 250 mL 分液漏斗中,先加入 12 mol/L 的 NaOH 20 mL 震荡均匀,后加入 10 mg/mL 铁氰化钾 5 mL,震荡均匀反应 10 min 后静置,加入 20 mL 三氯甲烷后混匀,静置分层,将下层有机层放入 50 mL 圆底烧瓶中,重复一次,最后于 40 $^{\circ}$ C 左右旋转蒸发至干,然后用乙腈:

甲醇:超纯水(15 : 15H170)定容至 1 mL,用于液相色谱检测。

3) HPLC 检测条件 流动相:甲醇/水(15/85),10 min 后改为甲醇/水(40/60);体积流量:1 mL/min,柱温:30 ℃,进样量:10 μL;检测时间:10 min;荧光检测器:Ex=335 Em=436。

4) 标准曲线的制作 称取 0.010 2 g 百草枯标准品于 10 mL 棕色容量瓶中,用超纯水定容至刻度,配制成 1 000 μg/mL 的标准溶液,将其稀释为 7 种不同浓度,经过荧光衍生化后用于 HPLC 检测。

1.2.3 加标回收率的计算

1) HPLC 检测法的回收率计算方法:

$$W = \frac{A \times C_b}{A_s \times C} \times 100\%$$

其中,W 为回收率;A 为加标样品峰面积;A_s 为标准品峰面积;C 为加入样品中标准品 PQ 的质量分数;C_b 为标准品 PQ 的质量分数。

2) ELISA 的加标回收率的计算

回收率(%)=

$$\frac{(\text{总的 PQ 质量分数} - \text{原样品中 PQ 质量分数})}{\text{添加入 PQ 的质量分数}} \times 100$$

1.2.4 灵敏度的确定

1) HPLC 法最低检测限的确定 在标准曲线中最低检测浓度的图谱上,找到 PQ 所在峰。在此峰附近找一个较大的噪音,用该噪音峰面积乘以 3,除以 PQ 的峰高,再乘以最低检测浓度。即得 HPLC 法检测百草枯的最低检测限^[14]。

2) ELISA 检测法的灵敏度 该方法的灵敏度是指测得 PQ 标准溶液最低浓度的 A 值与 0 μg/L 测得的 A 值之差>0.1 读数,这个浓度就是最低检测浓度^[15]。

3) GICA 法的灵敏度 随着 PQ 的质量分数不断增加,金标试纸条中 T 线的颜色逐渐变浅,T 线颜色刚刚消失时 PQ 的质量分数即为该方法的检测灵敏度。

2 结果与分析

2.1 酶联免疫检测方法的建立

2.1.1 ELISA 法标准曲线的建立 以 A/A₀ 为纵坐标,以 100 倍的标准溶液浓度的对数值为横坐标作图,得到 PQ 的竞争标准曲线,其线性回归方程为:y=-0.131 5x+0.856 4,R=0.995 6。

2.1.2 ELISA 法检测样品的回收率 在大豆样品中添加不同浓度的 PQ,按上述方法处理后利用 ELISA 法进行检测,加标回收结果见表 1,可以看

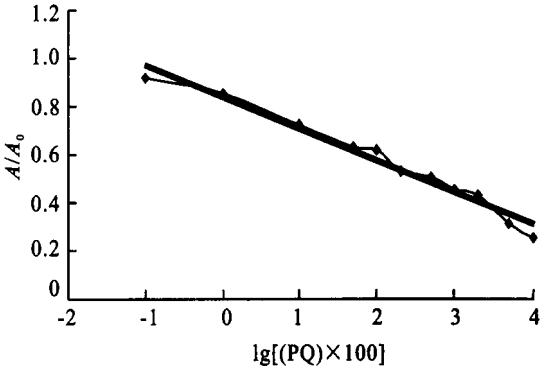


图 1 PQ 抑制率曲线

Fig. 1 Inhibition curve of PQ

出 3 个水平的加标回收率在 70%~80% 之间。该方法重复性较好,相对标准偏差(RSD)低于 10%。

表 1 样品加标回收试验结果

Tab. 1 Recovery Rate Experiment of samples

样品	实测质量浓度(ng/mL)			回收率(%)
空白样品	0.097	0.040	0.067	—
加标 50 ng/mL	37.08	35.31	39.71	74.4±5.91
加标 500 ng/mL (稀释 20 倍)	19.12	21.91	20.45	80.3±9.46
加标 2000 ng/mL (稀释 100 倍)	15.73	14.09	16.91	74.2±9.08

2.1.3 ELISA 检测 PQ 的最低检测限 从图 1 可知,PQ 含量在 0.01~20 ng/mL 范围内时,ELISA 实验具有较好的线性关系,最低检测限(LOD,10% 抑制率对应的浓度)为 0.005 ng/mL。

2.2 GICA 检测方法

2.2.1 标准色带的制作 用制作的试纸条检测浓度为 0、1、5、10、50、100、500 ng/mL 的系列百草枯标准溶液。从图 2 可以看出,随着 PQ 质量分数的增加,T 线颜色越来越浅,在 10 ng/mL 时,肉眼刚刚能够分辨出颜色。

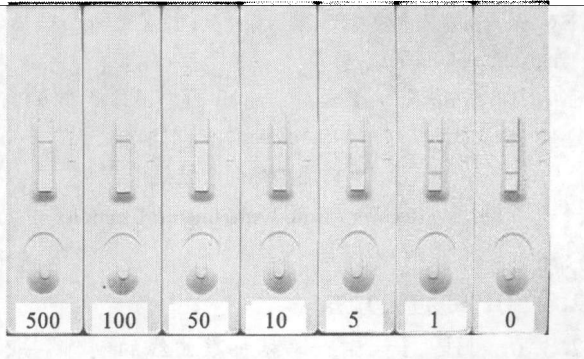


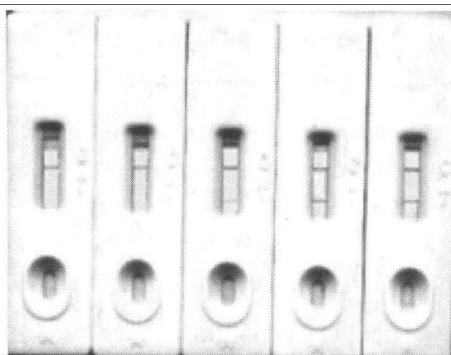
图 2 PQ 标准溶液的金标免疫层析试剂条

Fig. 2 Typical Immunochromatograms of PQ testing strips

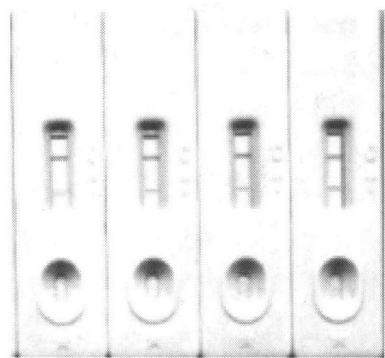
2.2.2 GICA 法的加标回收 将样品检测的结果(图 3(a))与标准色带进行比对,3 个加标 50 ng/mL 的样品,T 线刚好肉眼分辨出,可判断其 PQ 含

量在 10~50 ng/mL 之间。加标 500 ng/mL 和 2 000 ng/mL 的样品,其 T 线通过肉眼观察不出颜色,说明其含量超过 50 ng/mL,需进行适当稀释后再测定。

将加标 2 000 ng/mL 的样品分别稀释 2 000 倍、400 倍,加标 500 ng/mL 的样品分别稀释 50 倍、500 倍后进行测定,由图 3 中的(b)图与标准色带比对,加标 2 000 ng/mL 的样品稀释 2 000 倍后可判断其含量在 0~1 ng/mL 之间,稀释 400 倍后可判断其含量在 1~5 ng/mL 之间。加标 500 ng/mL 的样品稀释 50 倍后,对照图 2,可判断其含量在 5~10 ng/mL 之间,稀释 500 倍后可判断其含量在 0~1 ng/mL 之间。由此可以看出,用试纸条检测样品,回收率较好。



(a)



(b)

(a)从右至左依次为:PBS、未加标样品、加标 50 ng/mL、500 ng/mL、2000 ng/mL。

(b)从右至左依次为:加标 2000 ng/mL 的样品稀释 2000 倍、400 倍;加标 500 ng/mL 的样品稀释 500 倍、50 倍。

图3 样品加标回收结果

Fig.3 Recovery Rate Experiment of samples

2.3 HPLC 检测方法

2.3.1 HPLC 检测百草枯标准曲线的制作 取浓度为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 的百草枯标准溶液分别稀释至 20、50、100、200、500、1 000、2 000 ng/mL 各个标准浓度梯度,经过荧光衍生化后进行高效液相色谱的检测分析。其 HPLC 图谱如图 4 所示,保留时间为 7.178 min。以 PQ 的质量浓度为横坐标,以峰面

积值为纵坐标,制作标准曲线,如图 5。

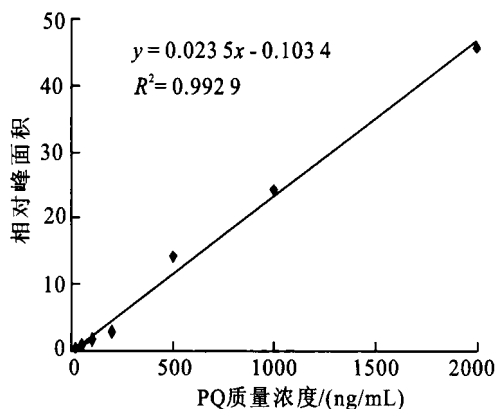


图4 PQ标准溶液的HPLC图谱

Fig.4 HPLC chromatogram of PQ

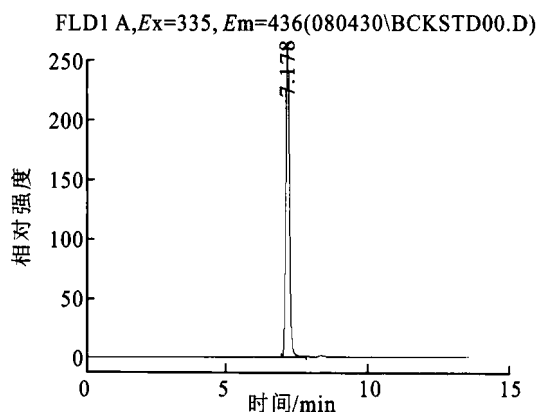


图5 高效液相色谱分析标准曲线

Fig.5 Standard curve of HPLC

从图 5 可以看出,百草枯质量浓度从 20 ng/mL 递增到 2 000 ng/mL 时,百草枯浓度和液相色谱的峰面积之间存在线性关系。

2.3.2 HPLC 检测法最低检测限的确定 图 6 中出峰时间为 7.732 min 的峰即为百草枯浓度为 20 ng/mL 时的峰,在该峰值附近找一个较大的噪音,该噪音峰面积为 0.021 9,峰高为 0.547。根据该数据计算为: $(0.021\ 9 \times 3 \times 100) / 0.547 = 11.95\ \text{ng/mL}$,即高效液相色谱对 PQ 的最低检测限为 12 ng/mL。

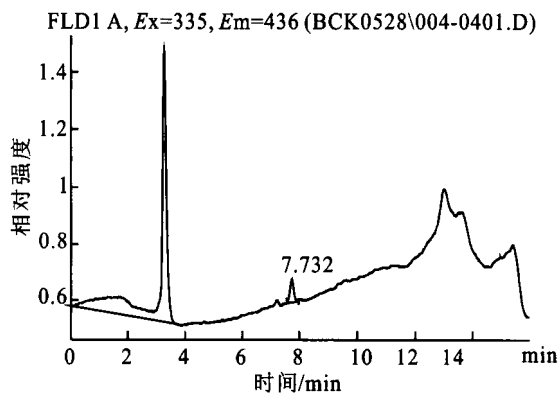


图6 最低检测质量浓度(20 mg/L)色谱图

Fig.6 HPLC chromatogram of the minimum detectable concentration (20 mg/L)

2.3.3 HPLC 加标回收率的计算 将加标样品荧

光衍生化处理后进行 HPLC 检测,检测结果见表 2。作为对照的标准品百草枯浓度为 500 mg/L,在 HPLC 测定中标准品峰面积值为:14.327。

从表 2 可以看出,3 个水平的加标回收率均较低,在 40%~55%之间。推测其原因可能是样品的

前处理过程比较复杂,要经过两次固相萃取,从而使待测物损失较大。对同一样品进行多次重复测定,其相对标准偏差(RSD)的平均值在 2.5%~6.5%之间,表明 HPLC 检测法对 PQ 的检测精密度较高。

表 2 HPLC 法检测百草枯回收率数据
Tab. 2 Recovery of HPLC on PQ anlysis

	检测次数	峰面积	回收率	平均值	RSD/%
加标 50mg/L	1	3.734	52.13%	3.532	6.54
	2	3.280	49.95%	50.70%	—
	3	3.582	50.02%	—	—
	检测次数	峰面积	回收率	平均值	RSD/%
加标 500 mg/L	1	6.297	43.95%	6.286	4.18
	2	6.543	45.67%	43.87%	—
	3	6.017	42.00%	—	—
	检测次数	峰面积	回收率	平均值	RSD/%
加标 2 000 mg/L	1	25.40	44.32%	25.33	2.58
	2	24.64	46.48%	45.27%	—
	3	25.94	45.27%	—	—

表 3 PQ 3 种检测方法结果比较
Tab.3 Comparton of the three test methods

检测 方法	加标 回收率/%	精密度 (RSD)/%	最低检出限/ (mg/L)
HPLC	42~52	4.43	12
ELISA	70~80	8.15	0.005
GICA	较好	较好	10

3 结 语

目前,有关食品中百草枯的检测方法未见相关国家标准,我国进出口商品检验行业标准(SN 0340-95)中有关粮谷、蔬菜种百草枯的检测采用紫外分光光度法,最低检出限为 0.02 mg/kg;SN 0293-93 中采用气相色谱法检测出口粮谷中百草枯

残留,最低检出限为 0.05 mg/kg。本文研究的 ELISA 法最低检出限可达 0.005 mg/L,GICA 法的目测检出限为 10 mg/L。因此,免疫学检测方法的建立对国家标准的制定具有一定的参考价值。本论文将 ELISA、GICA 和 HPLC 3 种检测方法应用于食品中百草枯的检测,分别确定了它们的检测参数,并对此 3 种检测方法进行了客观的比较。HPLC 方法的精密度较好,但是其样品的前处理较为繁琐耗时,且回收率比较低。ELISA 检测法的灵敏度比较高,但其精密度不如 HPLC 法好。GICA 检测方法虽然只能进行半定量,但该方法样品前处理比较简单,且在 30 min 之内即可观察检测结果,适用于大量样品的现场快速筛选,是未来检测方法发展的必然趋势。

参考文献(References):

[1] 曾铭. 共振光散射光谱法机理研究及其在农药分析中的应用[D]. 四川师范大学,2006:29.
[2] 夏敏,刘建华. 百草枯中毒研究现状[J]. 四川医学,1995,16(4):237—239.
Xia min,Liu jian hua. The study situation of paraquat intoxication[J]. **Sichuan medical Journal**, 1995,16(4):237—239. (in Chinese)
[3] 吴厚斌,宋俊华,马进,等. 百草枯在欧盟批准继续使用[J]. 农药科学与管理,2004,25(1),36—37.

- WU Hou-bin, SONG Jun-hua, Ma jin. Paraquat in eu obtains the approval of continued use[J]. **Pesticide science and administration**, 2004, 25(1), 36—37. (in Chinese)
- [4] 麦剑平, 许启荣. 血液中百草枯的 GC-MSD 快速检测法[J]. 职业与健康, 2004, 20(4): 40.
MIAN Jian-ping, XU Qi-rong. The rapid detection of paraquat in the blood by GC-MSD[J]. **Occupation and health**, 2004, 20(4): 40. (in Chinese)
- [5] NúÑEZ O, Moyano E, Galceran MT. Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water[J]. **Journal of Chromatography A**, 2002, 946: 275—285.
- [6] Nunez O, Kim JB, Moyano E, et al. Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection[J]. **Journal of Chromatography A**, 2002, 961: 65—75.
- [7] Mallat E, Barzen C, Abuknesha R, et al. Fast determination of paraquat residues in water by an optical immunosensor and validation using capillary electrophoresis-ultraviolet detection[J]. **Analytica Chimica Acta**, 2001, 427: 165—171.
- [8] 王朝虹, 李玉安, 邢俊波等. 高效液相色谱法测定人血液中的百草枯[J]. 中国法医学杂志, 2004, 19(3): 160—161.
WANG Chao-hong, LI Yu-an, XING Jun-bo. The detection of Paraquat in the blood by HPLC[J]. **Chinese Journal of Forensic Medicine**, 2004, 19(3): 160—161. (in Chinese)
- [9] Young MS, Jenkins KM. 河水中百草枯和敌草快的分析方法[J]. 环境化学, 2004, 23(6): 722—723.
Young MS, Jenkins KM. The analytical method of paraquat and diquat in river water[J]. **Environmental chemistry**, 2004, 23(6): 722—723. (in Chinese)
- [10] Paixao P, Costa P, Bugalho T, et al. Simple method for detection of paraquat in plasma and serum of human by high-performance liquid chromatography[J]. **Journal of Chromatography B**, 2002, 775: 109—113.
- [11] Jeanette Van Emon, Bruce Hammock, James N. Seiber. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Paraquat and Its Application to Exposure Analysis[J]. **Anal. Chem**, 1986, 58: 1866—1873.
- [12] M. E. Koivunen, S. J. Gee, E. -K. Park, et al. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of paraquat in human-exposure samples[J]. **Arch. Environ. Contam. Toxicol**, 2005, 48: 184—190.
- [13] 杨婷婷, 孙秀兰, 邵景东等. 百草枯人工抗原的合成及抗体的制备[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2008, 24(9): 924—927.
- [14] Svlcia VL, Phillips TD, Clement BA, et al. Determination of deoxynivalenol (vomitoxin) by high performance liquid chromatography with electrochemical detection[J]. **J Chromatogr**, 2000, 362(1): 79—80. (in Chinese)
- [15] Bondy G, Pestka J. Immunomodulation by fungal toxins[J]. **J Toxicol Environmental Health Part B: Critical Reviews**, 2000; 3: 109—143.

(责任编辑: 杨萌)