



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105181949 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510609069. 9

(22) 申请日 2015. 09. 22

(71) 申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路
866 号

(72) 发明人 朱国念 赵颖 柳颖 杨斌
郭逸蓉 方一画 司芳芳 程敬丽

(74) 专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公
司 33212

代理人 金祺

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

适用茶叶中吡虫啉等 3 种农药多残留速测法
及所用试纸条

(57) 摘要

本发明公开了一种适用于茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条, 该试纸条包括衬板、样品垫、金标一抗结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫, 金标一抗结合垫上包被有胶体金标记的吡虫啉类特异性小鼠单抗, 硝酸纤维素膜上包被有用于异源竞争的氯噻啉或噻虫胺人工抗原的检测线和包被有兔抗鼠 IgG 的质控线。本发明还提供了相应的速测法: 取茶汤滴加 2 ~ 3 滴到样品垫的点样区中进行层析反应, 5 ~ 10 分钟后根据检测线和质控线的显色情况直接判断样品中农药的阴阳性结果。



1. 适用于茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条, 该试纸条包括衬板 (7)、样品垫 (1)、金标一抗结合垫 (2)、硝酸纤维素膜 (3)、吸水垫 (4), 其特征是: 所述金标一抗结合垫 (2) 上包被有胶体金标记的吡虫啉类特异性小鼠单抗, 硝酸纤维素膜 (3) 上包被有用于异源竞争的氯噻啉或噻虫胺人工抗原的检测线 (5) 和包被有兔抗鼠 IgG 的质控线 (6)。

2. 根据权利要求 1 所述的适用于茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条, 其特征是:

胶体金标记的吡虫啉类特异性小鼠单抗是由 20 ~ 40nm 的纳米金颗粒与吡虫啉类特异性小鼠单抗相结合的复合物, 吡虫啉类特异性小鼠单抗与胶体金的结合浓度为 3 ~ 10mg/L。

3. 根据权利要求 2 所述的适用于茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条, 其特征是:

检测线 (5) 包被的用于异源竞争的氯噻啉或噻虫胺人工抗原是指将氯噻啉半抗原或噻虫胺半抗原偶联到鸡卵清蛋白 (OVA) 上的人工抗原, 浓度为 100 ~ 500mg/L; 氯噻啉半抗原或噻虫胺半抗原与 OVA 的偶联比为 8:1 ~ 15:1;

兔抗鼠 IgG 的质控线 (6) 的浓度为 50 ~ 200mg/L。

4. 根据权利要求 3 所述的适用于茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条, 其特征是:

所述检测线 (5) 和质控线 (6) 所用的稀释液是质量浓度 1 ~ 5% 蔗糖的 0.01M PBS 溶液。

5. 利用权利要求 1 ~ 4 任一所述的试纸条进行的茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留速测法, 其特征是:

以茶叶鲜叶、成品茶作为待测样品;

直接用开水冲泡待测样品 30 ~ 60 分钟, 得茶汤; 或者, 先将待测样品研磨成粉状后, 加入开水冲泡 30 ~ 60 分钟, 得茶汤;

取茶汤滴加 2 ~ 3 滴到样品垫 (1) 的点样区中进行层析反应, 5 ~ 10 分钟后根据检测线 (5) 和质控线 (6) 的显色情况直接判断样品中农药的阴阳性结果;

质控线 ---C 线 (6) 显红色表示试纸条有效, 未显色则失效;

检测线 ---T 线 (5) 显红色则判断为阴性, 表示茶汤中表示茶汤中未检测到吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉中的任何一种, 或茶汤中这 3 种农药总浓度低于 0.005mg/L;

检测线 ---T 线 (5) 未显色则判断为阳性, 表示茶汤中吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉总浓度高于 0.005mg/L。

6. 根据权利要求 5 所述的茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留速测法, 其特征是:

所述成品茶包括: 绿茶、红茶、乌龙茶、白茶、黄茶、黑茶。

适用茶叶中吡虫啉等 3 种农药多残留速测法及所用试纸条

技术领域

[0001] 本发明属于小分子化合物的金标免疫分析检测领域,具体涉及一种基于直接竞争免疫层析法的农药残留金标速测试纸条,该试纸条适用于茶叶样品中氯代烟碱类农药吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉的多残留快速检测。

背景技术

[0002] 自美国、欧盟、日本加强对进口食品、农产品检疫检验力度后,我国茶叶出口呈现大幅下降的趋势,其主要原因是农药超标困扰我国茶叶出口。近几年来,由于吡虫啉等氯代烟碱类农药在茶叶上使用频率高,导致吡虫啉等农药在茶叶上检出率高。2014 年 8 月青岛出入境检验检疫局对一批进口乌龙茶实施抽样检验时检出吡虫啉超标 2 倍,进口茶叶也存在氯代烟碱农药超标问题。欧盟食品安全局(EFSA)发布的报告指出,新烟碱类农药对授粉昆虫构成“严重风险”,这类农药与蜜蜂死亡有关。鉴于蜜蜂大量死亡,可能影响农作物的授粉,2013 年 5 月欧盟的 15 个成员国举行投票,同意实行临时禁令,在未来两年将禁用吡虫啉、噻虫胺以及噻虫嗪 3 种新烟碱类农药。

[0003] 鉴于常规的农药残留检测仪器分析方法(如气相、液相色谱及质谱联用)满足不了茶叶样品在较短时间内完成快速检测的需求,因此,人们迫切希望有一种简便、快速、价廉及信息量大的农残检测技术能在野外现场和实验室内进行大批量的快速筛查试验。迄今,常见的农药残留现场快速筛查方法为酶抑制显色纸片法,但其检测假阳性比率偏高,受基质干扰大,检测对象局限于有机磷类和氨基甲酸酯类农药,且特异性不高。近些年来,基于抗原-抗体特异性反应的免疫化学分析法是农残快速检测技术的研究热点之一,其中研究报道最多的是酶联免疫吸附法(ELISA),已研制出多类农药 ELISA 试剂盒,确实有潜在的市场应用前景,但检测需要多步反应,仍不能真正实现现场快速筛查。

[0004] 胶体金标记技术是继同位素、酶、荧光素及乳胶标记技术之后的一种新型实用的标记技术。基于胶体金免疫层析技术的试纸条以其使用便捷、价格低廉、筛查结果可视化、环境友好性等独特优势更受大众欢迎。近些年来,适用于检测小分子化合物的竞争型金标试纸条研发也越来越多,有关农药方面的公开报道集中在三嗪类、有机磷类、氨基甲酸酯类,而针对新烟碱类农药金标试纸条的仅涉及吡虫啉、噻虫嗪和噻虫胺单残留或双残留的测定。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种操作简单、灵敏度高、结果可视化、适用于现场速测等优点的适用于茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留现场速测试纸条(基于间接竞争免疫层析法的农药多残留金标速测试纸条)及其具体使用方法。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种适用于茶叶中吡虫啉等 3 种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条(基于直接竞争免疫层析法的氯代烟碱类农药金标速测试纸条),该试纸条包括衬板(例如为 PVC 衬板)、样品垫(例如为玻璃纤

维样品垫)、金标一抗结合垫、硝酸纤维素膜---NC膜、吸水垫,所述金标一抗结合垫上包被有胶体金标记的吡虫啉类特异性小鼠单抗(一抗),硝酸纤维素膜---NC膜上包被有用于异源竞争的氯噻啉或噻虫胺人工抗原的检测线---T线和包被有兔抗鼠IgG(二抗)的质控线---C线。

[0007] 备注说明:在本发明中,吡虫啉等3种氯代烟碱类农药就是指吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉。

[0008] 作为本发明的适用于茶叶中吡虫啉等3种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条的改进:胶体金标记的吡虫啉类特异性小鼠单抗(一抗)是由20~40nm(例如为30nm)的纳米金颗粒与吡虫啉类特异性小鼠单抗相结合的复合物,吡虫啉类特异性小鼠单抗与胶体金的结合浓度为3~10mg/L(较佳为4mg/L),即,每1L的胶体金溶液中配用3~10mg(较佳为4mg)的吡虫啉类特异性小鼠单抗。

[0009] 备注说明:该吡虫啉类特异性小鼠单抗(一抗)对吡虫啉、氯噻啉和噻虫胺的识别能力接近。胶体金溶液中胶体金的质量浓度为0.01%;包被量为0.4~0.6 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$ (较佳为0.5 $\mu\text{L}/\text{mm}^2$)。

[0010] 作为本发明的适用于茶叶中吡虫啉等3种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条的进一步改进:检测线---T线包被的用于异源竞争的氯噻啉或噻虫胺人工抗原是指将氯噻啉半抗原或噻虫胺半抗原偶联到鸡卵清蛋白(OVA)上的人工抗原,浓度为100~500mg/L;氯噻啉半抗原或噻虫胺半抗原与OVA的偶联比为8:1~15:1(例如为10:1)。

[0011] 兔抗鼠IgG(二抗)的质控线---C线的浓度为50~200mg/L。

[0012] T线和C线的包被量均为0.04~0.06 $\mu\text{L}/\text{mm}$ (较佳为0.05 $\mu\text{L}/\text{mm}$)。

[0013] 作为本发明的适用于茶叶中吡虫啉等3种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条的进一步改进:所述检测线和质控线所用的稀释液是质量浓度1~5%蔗糖的0.01M PBS溶液(PH7.4磷酸缓冲溶液,PH7.4磷酸盐PBS缓冲液)。

[0014] 本发明还同时提供了利用上述试纸条进行的茶叶中吡虫啉等3种氯代烟碱类农药多残留速测法:以茶叶鲜叶、成品茶作为待测样品;

[0015] 直接用开水冲泡待测样品30~60分钟,得茶汤;或者,先将待测样品研磨成粉状后,加入开水冲泡30~60分钟,得茶汤;

[0016] 取茶汤滴加2~3滴到样品垫的点样区(该点样区位于样品垫的中间位置)中进行层析反应,5~10分钟后根据检测线和质控线的显色情况直接判断样品中农药的阴阳性结果;

[0017] 质控线---C线显红色表示试纸条有效,未显色则试纸条失效;

[0018] 检测线---T线显红色则判断为阴性,表示茶汤中表示茶汤中未检测到吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉中的任何一种,或茶汤中这3种农药总浓度低于0.005mg/L;

[0019] 检测线---T线未显色则判断为阳性,表示茶汤中吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉总浓度高于(\geq)0.005mg/L。

[0020] 备注说明:粉红色即显色不完全,表示偏阳性,且“检测线---T线未显色”比“T线显示浅红色”代表茶汤中吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉残留的浓度高。

[0021] 作为本发明的茶叶中吡虫啉等3种氯代烟碱类农药多残留速测法的改进:

[0022] 所述成品茶包括：绿茶、红茶、乌龙茶、白茶、黄茶、黑茶。

[0023] 在本发明中，采用质量浓度 1-5% 蔗糖的 0.01M PBS 溶液 (PH7.4 磷酸盐 PBS 缓冲液) 作为稀释液可以保护包被抗原和包被二抗，从而延长抗原和二抗的活性。

[0024] 本发明采用的是一种间接封闭模式，即样品垫中完全吸附封闭液并作干燥处理，在样品检测过程中待测样品带动样品垫上的封闭液到 NC 膜上，从而达到间接封闭的效果。异源竞争的氯噻啉或噻虫胺抗原是指将氯噻啉或噻虫胺半抗原偶联到鸡卵清蛋白 (OVA) 上的复合物。本发明的速测试纸条可检测茶叶中的 3 种氯代烟碱类农药，分别是吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉。所述的茶叶种类包括中国六大茶类：绿茶、红茶、乌龙茶、白茶、黄茶、黑茶。

[0025] 本发明的有益效果：本试纸条采用胶体金标记吡虫啉一抗（胶体金标记的吡虫啉类特异性小鼠单抗）作为免疫金标探针，可以同时监测茶叶中吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉这 3 种氯代烟碱类农药的残留，是一种快速简便的多残留筛查手段。本发明根据之前已公开报道的吡虫啉抗原制备得到了吡虫啉类特异性单抗，能同时识别吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉这 3 种氯代烟碱类农药，同时选用氯噻啉或噻虫胺人工抗原来建立异源竞争免疫层析技术，这有利于提高竞争式免疫层析法的灵敏度。所制备的多残留检测试纸条对茶汤样品中 3 种氯代烟碱类农药的肉眼判断灵敏度均可达到 0.005mg/L。本发明的试纸条具有灵敏度高、特异性好、使用便捷、结果可视化等优点，将来有望在其他农产品上得到应用拓展。

[0026] 吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉 3 种农药同时检测的金标试纸条还未见公开报道，本发明首次制备了该测试纸条。

[0027] 与现有的速测试纸条方法原理相比，本发明利用了吡虫啉类特异性抗体与抗原的异源反应原理，实现了吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉 3 种农药的多残留检测，具有检测谱宽、灵敏度高、特异性好、使用便捷、结果准确等优点。本发明具备良好的实用性，试纸条可应用于现场筛查茶叶鲜叶和成品茶样品中 3 种氯代烟碱类农药残留量及超标检测与诊断，检出限均为 0.005mg/L，符合我国现行食品安全标准要求，检测时间 5~10 分钟。该产品技术具有灵敏度高、使用便捷、结果准确、成本低的优点，对于加强茶叶生产的质量安全监督管理具有良好的应用前景。

[0028] 综上所述，本发明采用吡虫啉类特异性单抗和氯噻啉或噻虫胺抗原建立了异源竞争免疫层析技术，所制备的金标试纸条能同时检测吡虫啉、氯噻啉和噻虫胺 3 种氯代烟碱类农药，且重点应用于茶叶样品中上述 3 种农残的速测。同时本产品能够实现茶叶现场采摘时对吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉进行快速筛查，若发现茶叶中该类农药超标可通过延缓采摘时间等方式来降低茶叶中的农药残留。即，通过此判定方法直接判断样品中吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉的阴阳性结果，检测灵敏度高、使用快捷、结果直观。

附图说明

[0029] 下面结合附图对本发明的具体实施方式作进一步详细说明。

[0030] 图 1 为吡虫啉等多残留速测试纸条的示意图；

[0031] 图 2 是图 1 的俯视示意图；

[0032] 图 3 是吡虫啉等多残留速测试纸条检测过程示意图；

[0033] 图 4 是检测结果判定方法；

[0034] 图 4 中，从左至右分别为：

- [0035] C 线和 T 线均显示红色→阴性；
- [0036] C 线显示红色, T 线显示浅红色→偏阳性；
- [0037] C 线显示红色, T 线不显色→阳性；
- [0038] C 线不显色, T 线显示红色→失效；
- [0039] C 线和 T 线均不显色→失效。
- [0040] 图 5 标准溶液检测结果；
- [0041] 图 5 中, 从左至右依次为: 茶汤空白样品 (两个重复) → 阴性, 茶汤添加吡虫啉 0.005mg/L 样品 (两个重复) → 阳性, 茶汤添加噻虫胺 0.005mg/L 样品 (两个重复) → 阳性, 茶汤添加氯噻啉 0.005mg/L 样品 (两个重复) → 阳性。
- [0042] 图 6 是茶叶实际样品检测结果。

具体实施方式

[0043] 实施例 1: 试纸条制备

[0044] 1. 胶体金的制备

[0045] 采用柠檬酸三钠 (柠檬酸钠) 还原法制备胶体金颗粒。将 150mL 0.01% (质量%) 氯金酸溶液在油浴条件下加热至沸腾 (约 120℃), 在磁力搅拌下迅速加入 2.5mL 1% (质量%) 柠檬酸三钠水溶液, 当溶液的颜色完全变为亮红色时, 继续回流 5~10min 后停止加热, 冷却后将溶液装入试剂瓶并放置于 4℃ 冰箱中保存。得质量浓度为 0.01% 的胶体金溶液。

[0046] 通过紫外-可见分光光度计对胶体金颗粒在可见光范围内进行扫描, 测得最大吸收波长 λ_{\max} 为 520nm, 吸光值是 0.80; 在透射电镜下观察胶体金颗粒, 大小均一性较好, 采用马尔文激光粒度分析仪测量颗粒的水合粒径平均为 30nm。

[0047] 2. 金标一抗的制备

[0048] 取 10mL 质量浓度为 0.01% 的胶体金溶液, 逐滴加入 1mL 40mg/L 的吡虫啉类特异性小鼠单抗 (一抗) 溶液, 边加边混匀, 混合均匀后静置 1h。再加入 2.5mL 含 5% BSA (牛血清蛋白) 和 0.1% PEG (聚乙二醇) 的 20mM 硼酸缓冲溶液, 混合均匀后静置 1h。4℃ 条件下 10000r/min 离心 30min, 弃上清, 红色沉淀再用 10mL 含 1% BSA 和 0.02% PEG 的 20mM 硼酸缓冲溶液复溶 (洗涤作用), 然后 4℃ 条件下 10000r/min 离心 30min, 弃上清, 再重复上述复溶离心弃上清一次。最后用 1% BSA 和 5% 蔗糖的 20mM 硼酸缓冲溶液溶解红色沉淀并定容至 1mL, 即获得纯化的吡虫啉金标一抗, 放置于 4℃ 冰箱中备用。

[0049] 备注说明: 该吡虫啉类特异性小鼠单抗 (一抗) 对吡虫啉、氯噻啉和噻虫胺的识别能力接近。可根据 Wanatabe 等人 (Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid insecticides imidacloprid and acetamiprid. Anal Chim Acta, 2001, 427 (2): 211-219) 报道的方法, 合成了吡虫啉人工抗原并进行单抗制备。由于吡虫啉、氯噻啉和噻虫胺都是属于 N-硝基胍基团类的新烟碱农药, 结构非常相似, 所以通过吡虫啉免疫原制备得到的抗体对其它两种农药的识别能力也比较高。由于单抗的丰富多样性, 因此挑选对这 3 种农药识别能力接近的单抗细胞株用于多残留检测。

[0050] 上述 % 均为重量 %。例如, 上述含 5% BSA (牛血清蛋白) 和 0.1% PEG (聚乙二

醇)的20mM硼酸缓冲溶液的制备方法为:在100ml的20mM硼酸缓冲溶液(pH 8.5)中加入5g的BSA(牛血清蛋白)和0.1g的PEG(聚乙二醇)。

[0051] 3. 样品垫1的处理

[0052] 配制20mL封闭液,称取50mg BSA、50mg PVP(聚乙烯吡咯烷酮)、1000mg蔗糖,将其加入20mL 0.01M PBST(含0.05%吐温的磷酸缓冲溶液)中。

[0053] 备注说明:上述0.01M PBST(含0.05%吐温的磷酸缓冲溶液)是指在100mL的0.01M PBS缓冲溶液(pH 7.4磷酸缓冲溶液)中加入0.05mL的吐温。

[0054] 将上述试剂和溶液充分混合溶解即封闭液配制完成,将样品垫原料浸入封闭液中,待样品垫原料完全吸附封闭液时取出样品垫,并在37℃烘箱中干燥(约1~3小时),得样品垫1;放入封口袋中并保存于玻璃干燥器中备用(也作为“金标一抗结合垫”2的原始材料)。

[0055] 备注说明:上述“完全吸附封闭液”即,样品垫原料浸泡至封闭液中,直至封闭液的余量不再改变;上述浸泡时间一般为20~30秒分钟。

[0056] 4. 金标一抗结合垫2的制备

[0057] 将步骤2)所得的混合均匀的吡虫啉金标一抗均匀包被在上述封闭液处理的样品垫上,包被量为 $0.5\mu\text{L}/\text{mm}^2$,37℃烘箱中干燥30min,得金标一抗结合垫2;放入封口袋中并保存于玻璃干燥器中备用。

[0058] 5. 检测线、质控线的包被

[0059] 首先配制检测线(T线)和质控线(C线)的保护剂,其成分为质量浓度1%蔗糖的0.01M PBS溶液。再用保护剂作为稀释液,分别配制100mg/L的氯噻啉-OVA偶联物(检测线T线)和50mg/L的兔抗鼠IgG(质控线C线)。

[0060] 备注说明:上述氯噻啉-OVA偶联物(即,氯噻啉-OVA卵白蛋白偶联物)可依据以下参考文献制备而得:Fang S.,Zhang B.,Ren K.,et al.,2011.Development of a Sensitive Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ic-ELISA) Based on the Monoclonal Antibody for the Detection of the Imidacloprid Residue. J Agr Food Chem 59(5):1594-1597。氯噻啉-OVA偶联物,即,氯噻啉半抗原偶联到鸡卵清蛋白(OVA)上所得的人工抗原,半抗原与OVA的偶联比为10:1。

[0061] 上述兔抗鼠IgG购于北京博枫科生物科技有限公司(北京博奥龙免疫技术有限公司),原始浓度为5mg/mL。

[0062] 采用自动划线仪将T线和C线包被在硝酸纤维素膜3上(划线位置见图1和图2),T线和C线的包被量均为 $0.05\mu\text{L}/\text{mm}$ 。划线完成后将衬板放于37℃烘箱中干燥10min备用;得包被氯噻啉抗原(氯噻啉-OVA偶联物)的检测线---T线5和包被二抗(兔抗鼠IgG)的质控线---C线6的NC膜3。

[0063] 6. 试纸条的组装

[0064] 先在衬板7的中间段贴上上述包被有T线6和C线5的NC膜3,然后在NC膜3粘贴金标一抗结合垫2,金标一抗结合垫2的纵向长度为2mm,粘贴位置为靠近T线5端的NC膜3末端,从而使约一半的金标一抗结合垫2位于在NC膜3的上方。然后,将封闭液处理过的样品垫1粘贴在金标一抗结合垫2的上方,从而盖住约一半的金标一抗结合垫2。最后粘贴吸水垫4,吸水垫4的粘贴位置为靠近C线6端的NC膜3末端,吸水垫4盖住NC膜

约 3mm。衬板组装完成后水平放入自动切条机中,将其切割成 3mm 宽的试纸条。

[0065] 实施例 2 :应用

[0066] 1. 试纸条灵敏度实验

[0067] (1) 标准溶液配制

[0068] 分别用甲醇配制吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉 3 种农药的标准储备液,标准储备液浓度均为 1mg/L。再用 0.01M PBS 缓冲液分别稀释吡虫啉、噻虫胺、氯噻啉至系列浓度的标准工作液 :0.1mg/L、0.01mg/L、0.005mg/L、0.002mg/L、0.001mg/L。

[0069] (2) 标准溶液检测

[0070] 设置 13 个处理组,分别为空白对照 (0.01M PBS 缓冲液),吡虫啉 0.01mg/L、0.005mg/L、0.002mg/L、0.001mg/L,噻虫胺 0.01mg/L、0.005mg/L、0.002mg/L、0.001mg/L,氯噻啉 0.01mg/L、0.005mg/L、0.002mg/L、0.001mg/L。分别使用同一批次的残留速测试纸条进行检测,每个处理组重复 2 次,检测方法为 :取茶汤样品滴加 2 滴到点样区中进行层析反应,5 ~ 10 分钟后根据检测线 5 和质控线 6 的显色情况直接判断样品中农药的阴阳性结果。以检测线 5 不显色作为试纸条的检测灵敏度。

[0071] 13 个处理组的检测结果见表 1。结果表明,标准工作液检测条件下,吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉的检测灵敏度均为 0.002mg/L,即肉眼判断最低检测限为 0.002mg/L。

[0072] 表 1、吡虫啉等多残留速测试纸条对 3 种农药标准工作液的检测结果

[0073]

农药名称 \ 标样浓度	检测结果 (检测线显色情况)				
	空白对照	0.001 mg/L	0.002 mg/L	0.005 mg/L	0.01mg/L
吡虫啉	+++	+	-	-	-
噻虫胺		+	-	-	-
氯噻啉		+	-	-	-

[0074] 注 :+++ 表示完全显色判断为阴性 ;++ 或 + 表示显色不明显或不完全,判断为偏阳性 (未达到设定的最低检出限) ;- 表示不显色判断为阳性。13 组处理每组 2 个重复。

[0075] 粉红色 (浅红色) 即显色不完全,表示偏阳性,显示粉红色 (浅红色) 代表检测到吡虫啉等农药的浓度低于不显色的情况。

[0076] (3) 茶汤中单一农药标准溶液添加试验

[0077] 称取绿茶干茶样品 1g 加入 50mL 开水冲泡,得到的茶汤作为样品基质,分别添加 (1) 中所述的 1mg/L 的吡虫啉、噻虫胺、氯噻啉标准工作液。

[0078] 设置 13 个处理组,分别为空白对照 (茶汤基质),1mL 茶汤中添加 1 μ L、2 μ L、5 μ L、10 μ L 吡虫啉标准溶液,1mL 茶汤中添加 1 μ L、2 μ L、5 μ L、10 μ L 噻虫胺标准溶液,1mL 茶汤中添加 1 μ L、2 μ L、5 μ L、10 μ L 氯噻啉标准溶液。分别使用同一批次的残留速测试纸条进行检测,每个处理组重复 2 次,检测方法同上。以检测线不显色作为试纸条的检测灵敏度。

[0079] 13 个处理组的检测结果见表 2。结果表明,茶汤基质加标条件下,吡虫啉、噻虫胺

和氯噻啉的检测灵敏度均为 0.005mg/L,即肉眼判断最低检测限为 0.005mg/L。

[0080] 表 2、吡虫啉等多残留速测试纸条对茶汤中 3 种农药添加样品的检测结果

[0081]

样品浓度 农药名称	茶汤中农药添加样品检测结果 (检测线显色情况)				
	空白对照	0.001 mg/L	0.002 mg/L	0.005 mg/L	0.01mg/L
吡虫啉	+++	++	+	-	-
噻虫胺		++	+	-	-
氯噻啉		++	+	-	-

[0082] 注 :+++ 表示完全显色判断为阴性 ;++ 或 + 表示显色不完全,判断为偏阳性 (未达到设定的最低检出限) ; - 表示不显色判断为阳性。

[0083] (4) 茶汤中混合农药标准溶液添加试验 :

[0084] 称取绿茶干茶样品 1g 加入 50mL 开水冲泡,得到的茶汤作为样品基质,分别添加(1)中所述的 1mg/L 的吡虫啉、噻虫胺、氯噻啉标准工作液。

[0085] 设置 8 个处理组,按照表 3 中所设置的各档浓度,在茶汤基质中分别添加适量对应农药的标准工作液。使用同一批次的残留速测试纸条进行检测,每个处理组重复 2 次,检测方法同上。以检测线不显色作为试纸条的检测灵敏度。

[0086] 表 3、吡虫啉等多残留速测试纸条对茶汤中 3 种农药混合添加样品的检测结果

[0087]

农药 处理	茶汤中农药添加样品检测结果							
	吡虫啉+	吡虫啉+	吡虫啉+	吡虫啉+	吡虫啉+	吡虫啉+	吡虫啉+	吡虫啉+
	氯噻啉↓	氯噻啉↓	氯噻啉↓	氯噻啉↓	氯噻啉↓	氯噻啉↓	氯噻啉↓	氯噻啉↓
	噻虫胺	噻虫胺	噻虫胺	噻虫胺	噻虫胺	噻虫胺	噻虫胺	噻虫胺
添加浓	0.5+0.5+0	0.5+0+0.5	0+1+1	1+0.5+0.5	1+1+1	2+2+1	2+2+2	3+3+3

[0088]

度(μg/L)								
显色情况	+++	++	+	+	+	-	-	-

[0089] 注 :+++ 表示完全显色判断为阴性 ;++ 或 + 表示显色不完全,判断为偏阳性 (未达到设定的最低检出限) ; - 表示不显色判断为阳性。

[0090] 检测结果表明,茶汤基质加标条件下,吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉这 3 种农药总量的检测灵敏度为 0.005mg/L,即肉眼判断最低检测限为 0.005mg/L (1 μg/L = 0.001mg/L)。

[0091] 2. 茶叶样品快速检测

[0092] (1) 茶汤样品制备

[0093] 准备 3 份茶叶样品,分别为绿茶 (代号 1261)、红茶 (代号 1264)、乌龙茶。实验室

已用液质联用仪检测得到 3 份茶叶中吡虫啉的含量：绿茶中未检出；红茶中 0.526mg/kg；乌龙茶中 0.259mg/kg；3 份茶叶中噻虫胺和氯噻啉均未检出。以上茶叶样品各称取 1g 加入 50mL 开水冲泡，30min 后取茶汤进行检测。

[0094] (2) 茶汤样品检测及结果判定

[0095] 茶汤样品用同一批次的残留速测试纸条进行检测，检测方法同上。

[0096] 检测结果见图 6，结果显示：绿茶（代号 1261）阴性，红茶（代号 1264）阳性，乌龙茶阳性，表明绿茶茶汤中未检测到吡虫啉，红茶和乌龙茶的茶汤中吡虫啉含量 $\geq 0.005\text{mg/L}$ ，折算到茶叶中吡虫啉的含量 $\geq 0.25\text{mg/kg}$ 。此试纸条测定结果和仪器检测结果完全相符合，从而验证了试纸条检测结果的准确性和实用性。

[0097] 对比例：改变实施例 1 的步骤 5) 的包被抗原“氯噻啉-OVA”，将包被抗原改为“吡虫啉-OVA”，即，由异源竞争模式改成同源竞争模式。将上述对比例所述的试纸条，按照实施例 2 的“试纸条灵敏度实验”进行检测，所得结果的对比如下：

[0098] 表 4、两种吡虫啉等多残留速测试纸条对对茶汤中 3 种农药添加样品的检测结果对比

[0099]

样品浓度 试纸条/农药		检测结果（检测线显色情况）				
		空白对照	0.002 mg/L	0.005 mg/L	0.01 mg/L	0.02 mg/L
实施例 2	吡虫啉	+++	+	-	-	-
	噻虫胺		+	-	-	-
	氯噻啉		+	-	-	-
对比例	吡虫啉	+++	+++	++	+	-
	噻虫胺		+++	++	+	-

[0100]

	氯噻啉		+++	++	+	-
--	-----	--	-----	----	---	---

[0101] 注：+++ 表示完全显色判断为阴性；++ 或 + 表示显色不完全，判断为偏阳性（未达到设定的最低检出限）；- 表示不显色判断为阳性。

[0102] 结果表明，对比例条件下，试纸条对茶汤中 3 种农药添加样品的检测灵敏度为 0.02mg/L，明显高于实施例 2 所达到的检测灵敏度 0.005mg/L。通过和对比例的比较，实施例中采用的试纸条灵敏度更高，因此异源竞争模式有利于提高金标试纸条的检测灵敏度。

[0103] 实施例 3：将实施例 1 步骤 5) 中的“氯噻啉-OVA 偶联物”改成“噻虫胺-OVA 偶联物”，噻虫胺-OVA 偶联物可依据以下参考文献制备而得：Li M., Sheng E., Cong L., et al., 2013. Development of Immunoassays for Detecting Clothianidin Residue in Agricultural Products. J Agr Food Chem 61(15):3619-3623. 噻虫胺半抗原与 OVA 的偶联比为 10:1。试纸条制作过程的其余内容等同于实施例 1。样品检测过程等同于实施例 2 中应用实验 1) 的步骤 (3)。

[0104] 所得结果如下：

[0105] 茶汤基质加标条件下,吡虫啉、噻虫胺和氯噻啉的检测灵敏度均为 0.005mg/L,即最低检测限为 0.005mg/L。结果表明,检测线包被采用异源竞争的噻虫胺-OVA 偶联物或氯噻啉-OVA 偶联物的效果一致。

[0106] 表 5 吡虫啉等多残留速测试纸条对茶汤中 3 种农药添加样品的检测结果

[0107]

样品浓度 农药名称	茶汤中农药添加样品检测结果 (检测线显色情况)			
	空白对照	0.002 mg/L	0.005 mg/L	0.01mg/L
吡虫啉	+++	+	-	-
噻虫胺		+	-	-
氯噻啉		+	-	-

[0108] 注:+++ 表示完全显色判断为阴性; ++ 或 + 表示显色不完全,判断为偏阳性(未达到设定的最低检出限);- 表示不显色判断为阳性。

[0109] 最后,还需要注意的是,以上列举的仅是本发明的若干个具体实施例。显然,本发明不限于以上实施例,还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形,均应认为是本发明的保护范围。

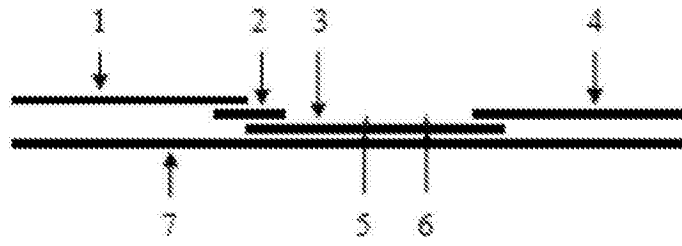


图 1

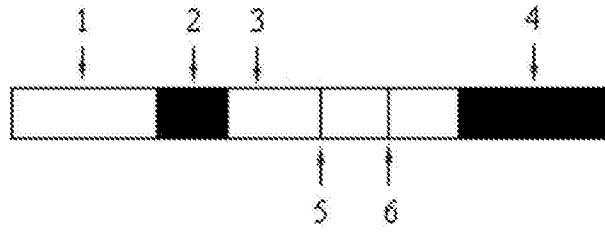


图 2

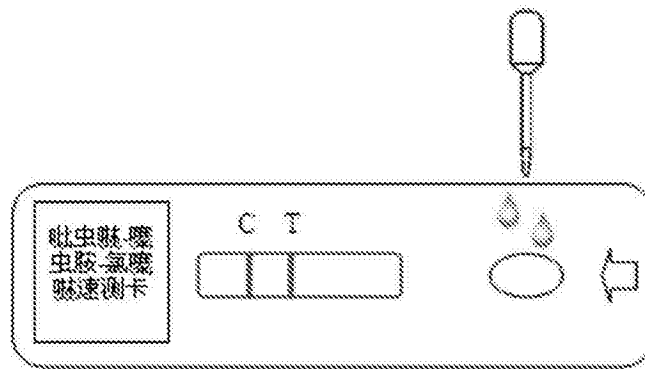


图 3

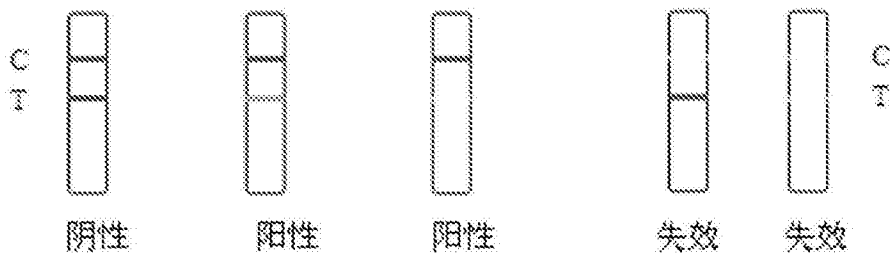


图 4

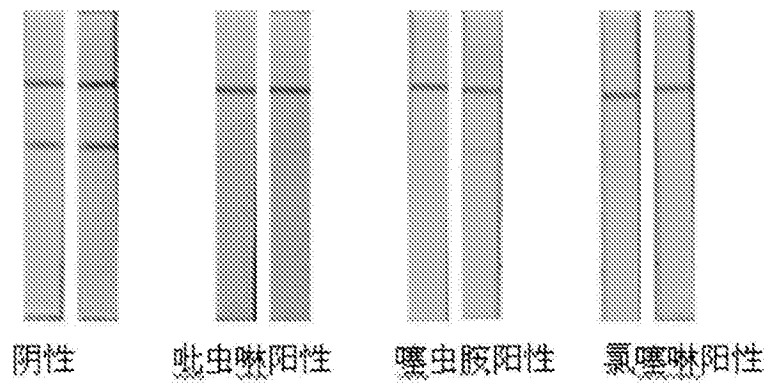


图 5

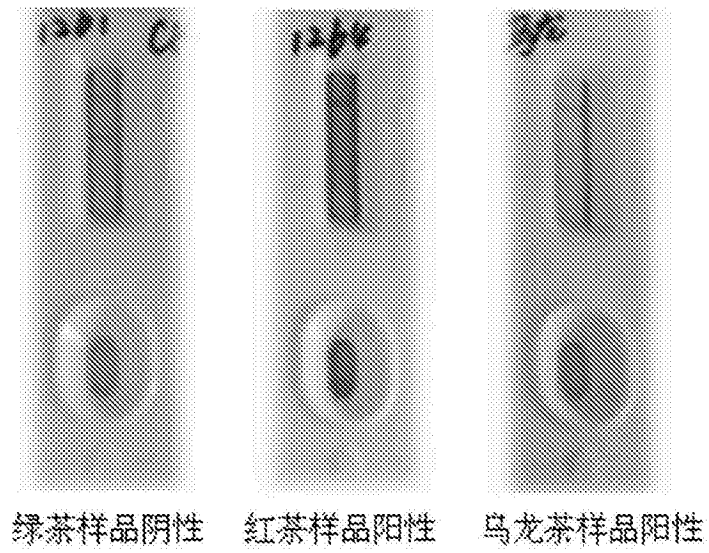


图 6

专利名称(译)	适用茶叶中吡虫啉等3种农药多残留速测法及所用试纸条		
公开(公告)号	CN105181949A	公开(公告)日	2015-12-23
申请号	CN201510609069.9	申请日	2015-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	朱国念 赵颖 柳颖 杨斌 郭逸蓉 方一画 司芳芳 程敬丽		
发明人	朱国念 赵颖 柳颖 杨斌 郭逸蓉 方一画 司芳芳 程敬丽		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
代理人(译)	金祺		
其他公开文献	CN105181949B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种适用于茶叶中吡虫啉等3种氯代烟碱类农药多残留速测的异源竞争免疫层析金标试纸条，该试纸条包括衬板、样品垫、金标一抗结合垫、硝酸纤维素膜、吸水垫，金标一抗结合垫上包被有胶体金标记的吡虫啉类特异性小鼠单抗，硝酸纤维素膜上包被有用于异源竞争的氯噻啉或噻虫胺人工抗原的检测线和包被有兔抗鼠IgG的质控线。本发明还提供了相应的速测法：取茶汤滴加2~3滴到样品垫的点样区中进行层析反应，5~10分钟后根据检测线和质控线的显色情况直接判断样品中农药的阴阳性结果。

