



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110987892 A

(43)申请公布日 2020.04.10

(21)申请号 201911349441.1

(22)申请日 2019.12.24

(71)申请人 福建省烟草公司三明市公司

地址 365000 福建省三明市梅列区崇桂新村100幢

(72)发明人 林建麒 黄一兰 林智慧 梁颂捷
姜占省 叶建如 方松 杨林潇
孔凡玉

(74)专利代理机构 福州元创专利商标代理有限公司 35100

代理人 修斯文 蔡学俊

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 1/34(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

一种测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法

(57)摘要

本发明公开了一种时间分辨荧光免疫分析法测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其以二氯喹啉酸包被抗原、二氯喹啉酸单克隆抗体、Eu³⁺标记抗体为检测体系,经时间分辨荧光测定建立荧光强度与二氯喹啉酸浓度对应的标准曲线,然后利用所得标准曲线计算获得土壤样品中二氯喹啉酸的含量。本发明方法具有灵敏度高、重现性好、回收率高、有机溶剂用量少、成本低等特点,能够满足烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的快速、灵敏检测。

1. 一种测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 将二氯喹啉酸标准品用磷酸盐缓冲液溶解,得到具有系列浓度的二氯喹啉酸标准溶液;

2) 将二氯喹啉酸溶解在N,N-二甲基甲酰胺中,然后加入N-羟基琥珀酰亚胺,室温下搅拌反应15min,再加入二环己基碳二亚胺,室温下反应过夜,离心后取上清液,缓慢加入到卵清蛋白中,磁力搅拌下反应4h,待反应完成后,装入透析袋,先用蒸馏水透析2次,然后用磷酸盐缓冲液溶液透析3天,得到二氯喹啉酸包被抗原,于-20℃保存;

3) 将山羊抗鼠抗体和异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸铜分别用碳酸盐缓冲液溶解后,将两者混合,4℃下搅拌24小时后装入透析袋,使用含0.01%氯化钠的Tris-HCl缓冲液透析72h后获得Eu³⁺标记抗体,向其中加入等体积的甘油和0.1wt%的牛血清蛋白,-20℃保存;

4) 将步骤2)制得的二氯喹啉酸包被抗原溶解在碳酸盐缓冲液中,加入微孔板中,孵育2小时;用含0.05vol%Tween-20的磷酸盐缓冲液清洗去除未结合的包被抗原,然后加入溶解有1wt%卵清蛋白的Tris-HCl缓冲液,孵育0.5小时以封闭微孔,再用含0.05vol%Tween-20的磷酸盐缓冲液清洗去除过量的卵清蛋白;

5) 在步骤4)所得体系中分别加入系列浓度的二氯喹啉酸标准溶液后,再加入经含甲醇的磷酸盐缓冲液稀释的二氯喹啉酸单克隆抗体,孵育0.5小时,用含0.05 vol%Tween-20的磷酸盐缓冲液清洗微孔板后加入步骤3)制备好的Eu³⁺标记抗体,孵育1小时,再用含0.05 vol%Tween-20的磷酸盐缓冲液清洗微孔板,加入荧光增强液,机械振荡10分钟;

6) 使用时间分辨荧光测定仪分别测定不含二氯喹啉酸标准溶液的空白反应体系及步骤5)含二氯喹啉酸标准溶液的反应体系,得到其相应荧光强度F₀、F,然后以二氯喹啉酸浓度为横坐标,F与F₀的百分比F/F₀作为纵坐标绘制标准曲线;

7) 将来源于烟稻轮作田的土壤按料液比1:5 g/mL加入甲醇/磷酸盐缓冲液混合溶液中,超声提取10min,得到样品溶液;

8) 将所得样品溶液按步骤5)所述步骤进行处理后,使用时间分辨荧光测定仪测定其荧光强度,再利用所得标准曲线计算获得样品中二氯喹啉酸的含量。

2. 根据权利要求1所述的测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其特征在于:步骤1)-4)中所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L,pH=7.4;

所述碳酸盐缓冲液的浓度为0.05mol/L,pH=9.6;

所述Tris-HCl缓冲液的浓度为0.05mol/L,pH=7.8。

3. 根据权利要求1所述的测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其特征在于:步骤2)中所用二氯喹啉酸、N-羟基琥珀酰亚胺与二环己基碳二亚胺的摩尔比为1:3:1.5。

4. 根据权利要求1所述的测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其特征在于:步骤3)中所用山羊抗鼠抗体与异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸铜的质量比5:2。

5. 根据权利要求1所述的测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其特征在于:步骤5)中以所加入二氯喹啉酸标准溶液的体积为基准,二氯喹啉酸单克隆抗体的加入量为0.2 mg/L,Eu³⁺标记抗体的加入量为1.0mg/L;

所用含甲醇的磷酸盐缓冲液的pH=7,其中磷酸盐浓度为0.01mol/L、甲醇含量为10 vol%、Na⁺浓度为0.2mol/L。

6. 根据权利要求1所述的测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其特征在于:步

骤5)所述荧光增强液为含 $15\mu\text{mol/L}$ β -萘三氟丙酮和 $0.1\text{ vol}\%$ Triton X-100的 0.1mol/L 双邻苯二甲酸钾缓冲液,其 $\text{pH}=3.2$ 。

7.根据权利要求1所述的测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其特征在于:步骤7)所述甲醇/磷酸盐缓冲液混合溶液中甲醇与磷酸盐缓冲液的体积比为1:1;

所用磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01mol/L , $\text{pH}=7.4$ 。

8.根据权利要求1所述的测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其特征在于:检测时,时间分辨荧光测定仪的参数设置为激发波长 340nm 、发射波长 615nm 、延迟时间 $100\mu\text{s}$ 、窗口时间 $400\mu\text{s}$ 。

一种测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学测定技术领域,具体涉及一种时间分辨荧光免疫分析法测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法。

背景技术

[0002] 二氯喹啉酸(Quinclorac),化学名称3,7-二氯喹啉-8-羧酸,俗名快杀稗、稗草净、杀稗灵、神锄等,是一种针对稗草、马唐等单子叶杂草和部分阔叶杂草的选择性除草剂,因其具有成本低、用量少、对稗草等杂草防除效果优异等特点在我国水稻种植过程中广泛使用。

[0003] 然而,随着二氯喹啉酸在稻田的广泛使用及其不合理使用也带来了一定环境安全问题,这主要是由于一方面,二氯喹啉酸半衰期较长,导致它在土壤中的残留较大;另一方面,烟草、马铃薯、辣椒等一些茄科作物对二氯喹啉酸特别敏感,土壤中较低浓度的二氯喹啉酸就会引起药害,如土壤中的二氯喹啉酸残留会导致后茬烟草出现植株畸形生长,新叶向叶背面内卷皱缩,并逐渐发展成为线型鼠尾状叶形。特别是在我国南方福建、江西、贵州等烟稻轮作区,因二氯喹啉酸使用对烟草产生药害,甚至严重影响烟叶产量和质量的现象时有发生,给农民造成巨大的经济损失。因此,亟需建立一种快速、特异、灵敏的检测方法来实现烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的检测。

[0004] 目前,国内外针对二氯喹啉酸的分析方法主要为仪器分析法,包括液相色谱法、气相色谱法、液质联用法等等。仪器分析方法稳定、可靠,但仪器成本及运行成本较高,需要专业技术人员操作,且有机试剂消耗量大、耗时长,不适合分析大量样品。近年来,免疫分析法因其特异性强、灵敏度高、操作简便等特点,在农药残留领域得到广泛应用。其中,时间分辨荧光免疫分析法(TRFIA)以镧系离子及其螯合剂为示踪剂,具有独特的荧光特性,并具有灵敏度高、检测范围广、样品干扰少、多标记检测等优点,被认为是最有前途的免疫检测方法之一。许多研究表明,与常规免疫分析相比,时间分辨荧光免疫分析方法显著提高了兽药和农药残留的检测灵敏度。因此,利用免疫分析灵敏度高、特异性强的优点,建立二氯喹啉酸的时间分辨荧光免疫分析方法,可满足烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸快速、灵敏检测的现实需求,对保障烟叶安全生产和农民经济利益具有重要意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种时间分辨荧光免疫分析法检测烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其具有灵敏度高、重现性好、回收率高、有机溶剂用量少、成本低等特点,可满足二氯喹啉酸残留分析的要求。

[0006] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法,其包括以下步骤:

1) 将二氯喹啉酸标准品用0.01mol/L、pH=7.4的磷酸盐缓冲液(PBS)溶解,得到具有系列浓度的二氯喹啉酸标准溶液;

2) 将48.4 mg (0.2mmol) 二氯喹啉酸溶解在1mL的N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 然后加入69.1mg (0.6mmol) 的N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 室温下搅拌反应15min, 再加入61.9mg (0.3mmol) 的二环己基碳二亚胺 (DCC), 室温下反应过夜, 离心后取上清液0.5mL, 缓慢加入到12mL含10mg/mL卵清蛋白 (OVA) 的0.05 mol/L、pH 9.6的碳酸盐缓冲液 (CBS) 中(半个小时加完), 磁力搅拌下反应4h, 待反应完成后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析2次, 然后用0.01mol/L、pH=7.4的PBS透析3天, 得到二氯喹啉酸包被抗原, 保存于-20℃的冰箱中;

3) 将山羊抗鼠抗体和异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸铈 (DTTA-Eu³⁺) 分别用0.05mol/L、pH=9.6的CBS溶解后, 按山羊抗鼠抗体和DTTA-Eu³⁺的质量比为5:2将两者混合, 4℃下搅拌24小时后装入透析袋, 使用含0.01%氯化钠的0.05mol/L、pH=7.8的Tris-HCl缓冲液 (TBS) 透析72h后获得Eu³⁺标记抗体, 向其中加入等体积的甘油和0.1wt%的BSA, 保存于-20℃的冰箱中;

4) 将步骤2) 制得的二氯喹啉酸包被抗原溶解在0.05mol/L、pH=9.6的CBS中, 得到包被抗原含量为1.0mg/L的溶液, 将该溶液加入微孔板中, 孵育2小时; 用含0.05vol% Tween-20的0.01mol/L、pH=7.4的PBS (PBST) 清洗去除未结合的包被抗原, 然后加入溶解有1wt%卵清蛋白 (OVA) 的0.05mol/L、pH=7.8的TBS, 孵育0.5小时以封闭微孔, 再用PBST清洗去除过量的OVA;

5) 在步骤4) 所得体系中分别加入系列浓度的二氯喹啉酸标准溶液后, 再加入经含甲醇的磷酸盐缓冲液 (所述磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L、pH=7, 其中甲醇含量为10 vol%、Na⁺浓度为0.2mol/L) 稀释的二氯喹啉酸单克隆抗体, 孵育0.5小时, 用PBST清洗微孔板后加入制备好的Eu³⁺标记抗体, 孵育1小时, 再用PBST清洗微孔板, 加入荧光增强液, 机械振荡10分钟; 所述荧光增强液为含15μmol/L β-萘三氟丙酮和0.1 vol% Triton X-100的0.1mol/L双邻苯二甲酸钾缓冲液, 其pH=3.2;

6) 使用时间分辨荧光测定仪分别测定不含二氯喹啉酸标准溶液的空白反应体系及步骤5) 含二氯喹啉酸标准溶液的反应体系, 得到其相应荧光强度F₀、F, 然后以二氯喹啉酸浓度为横坐标, F与F₀的百分比F/F₀作为纵坐标绘制标准曲线; 检测时, 时间分辨荧光测定仪参数设置为激发波长340nm、发射波长615nm、延迟时间100μs、窗口时间400μs;

7) 将来源于烟稻轮作田的土壤按料液比1:5 g/mL加入甲醇/磷酸盐缓冲液混合溶液 (混合溶液中甲醇与磷酸盐缓冲液的体积比为1:1, 所用磷酸盐缓冲液的浓度为0.01mol/L, pH=7.4) 中, 超声提取10min, 得到样品溶液;

8) 将所得样品溶液按步骤5) 所述步骤进行处理后, 使用时间分辨荧光测定仪测定体系的荧光强度, 再利用所得标准曲线计算获得样品中二氯喹啉酸的含量。

[0007] 步骤5) 中以所加入二氯喹啉酸标准溶液的体积为基准, 二氯喹啉酸单克隆抗体的加入量为0.2 mg/L, Eu³⁺标记抗体的加入量为1.0mg/L。

[0008] 本发明的显著优点在于:

与目前最广泛应用的液相色谱或液-质联用色谱相比, 本发明不需要使用大量的甲醇、乙腈等有机试剂作为流动相, 减少了有机试剂对环境的污染, 具有较好的环境效益; 且该方法较传统免疫分析方法的半抑制浓度 (IC₅₀) 提高了近20倍, 最低检测限提高了近7倍, 具有很高的灵敏度和检测限; 同时, 该方法操作较为简便, 不需要昂贵的检测仪器和专业的操作人员, 抗体制备成本较低, 极大降低了检测成本, 并可同时对多个样品进行检测, 克服了仪

器检测需每个样品单独检测的缺点,缩短了检测时间,极大的提高了检测效率。

具体实施方式

[0009] 为了使本发明所述的内容更加便于理解,下面结合具体实施方式对本发明所述的技术方案做进一步的说明,但是本发明不仅限于此。

[0010] 1. 试剂与仪器

试剂:二氯喹啉酸标准品(纯度>98%),牛血清蛋白(BSA),卵清蛋白(OVA),亲和纯化山羊抗兔抗体,聚氧乙烯山梨糖醇单月桂酸酯(Tween-20),异硫氰酸苄基二亚乙基三胺四乙酸铈(DTTA-Eu³⁺)。

[0011] 缓冲溶液:0.01mol/L、pH=7.4的磷酸盐缓冲液(PBS);0.05mol/L、pH=9.6的碳酸盐缓冲液(CBS);0.05mol/L、pH=7.8的Tris-HCl缓冲液(TBS);含0.05%Tween-20的0.01mol/L、pH=7.4的PBS缓冲液(PBST);荧光增强液为含15μmol/L β-萘三氟丙酮和0.1vol% Triton X-100的0.1mol/L双邻苯二甲酸钾缓冲液,pH=3.2;

仪器:免疫微孔洗板机(96孔道,Thermo,美国);时间分辨荧光测定仪(M200,Tecan,瑞士);超声波清洗机(SB25-12D,宁波新芝,中国);离心机(Allegra TM 64R,贝克曼,美国);液相色谱质谱仪(ACQUITY UPLC-Orbitrap MS,AB Sciex,美国)。

[0012] 2. 二氯喹啉酸标准溶液的制备

将二氯喹啉酸标准品用PBS溶解,得到具有系列浓度的二氯喹啉酸标准溶液。

[0013] 3. 土壤样品提取液的制备

将来源于烟稻轮作田的土壤按料液比1:5 g/mL加入体积比1:1的甲醇/PBS混合溶液中,超声提取10min,制得土壤样品提取液。

[0014] 4. 包被抗原的制备

将48.4 mg(0.2mmol)二氯喹啉酸溶解在1mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,然后加入69.1mg(0.6mmol)的N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温下搅拌反应15min,再加入61.9mg(0.3mmol)的二环己基碳二亚胺(DCC),室温下反应过夜,离心后取上清液0.5mL,缓慢加入到12mL含10mg/mL OVA的CBS(pH=9.6)中(半个小时加完),磁力搅拌下反应4h,待反应完成后,装入透析袋,先用蒸馏水透析2次,然后用PBS透析3天,得到二氯喹啉酸包被抗原,保存于-20℃的冰箱中。

[0015] 5. 二氯喹啉酸单克隆抗体的制备

将1210 mg二氯喹啉酸加入三颈烧瓶,随后加入25mL二氯甲烷和7mL草酰氯,磁力搅拌条件下加入4滴DMF,在90-100℃条件下回流1.5h。对回流产物进行减压蒸馏,得到3,7-二氯-8-喹啉甲酰氯。冰浴搅拌条件下向三颈烧瓶中加入585mg的5-氨基戊酸,随后加入5mL氢氧化钠(4mol/L)。将上述步骤得到的3,7-二氯-8-喹啉甲酰氯溶解于25mL的1,4-二氧六环中,分3次加入5-氨基戊酸的氢氧化钠溶液中,反应1.5h。使用乙酸乙酯对反应液萃取3次,收集有机相。用稀盐酸(0.1mol/L)洗涤3次,收集上层乙酸乙酯。用碳酸氢钠溶液(1mol/L)反萃取3次,收集下层溶液。抽滤得白色固体,即为二氯喹啉酸半抗原。采用碳二亚胺法(DCC/NHS体系)将半抗原与BSA偶联制得免疫原。再按免疫原免疫注射BALB/c小鼠--Sp2/0骨髓瘤细胞的复苏--免疫脾细胞的制备--细胞融合--阳性杂交瘤细胞的筛选--阳性杂交瘤细胞的克隆--阳性杂交瘤细胞的体外培养--小鼠腹水的制备--单克隆抗体的纯化等步

骤,制得二氯喹啉酸单克隆抗体(具体操作参见Zeng DY, Shi HY, Li B, Wang MH, Song BA (2006) J Agric Food Chem 54:8682)。

[0016] 6. 标记抗体的制备

分别使用0.1 mL CBS (pH=9.6)充分溶解0.25 mg山羊抗鼠抗体和0.1 mg DTTA-Eu³⁺,之后将二者充分混合;混合液在4℃下搅拌24小时后装入透析袋,使用含0.01%氯化钠的TBS透析72h;透析完成后获得Eu³⁺标记抗体,向其中加入等体积的甘油和0.1wt%的BSA,保存在-20℃条件下。

[0017] 7. 时间分辨荧光免疫分析方法构建

将制备的包被抗原溶解在CBS (pH=9.6)中,配成1.0mg/L的溶液,然后将该溶液加入微孔中(100μL/孔),孵育2小时;用PBST充分清洗微孔板除去未结合的包被抗原,然后加入溶解有1wt% OVA的PBS (200μL/孔),孵育0.5小时来封闭微孔;用PBST清洗微孔板除去过量的OVA,加入二氯喹啉酸标准溶液或土壤样品提取液(50μL/孔),之后加入经含甲醇的PBS(所用PBS具有不同的甲醇含量、Na⁺浓度和pH)稀释的二氯喹啉酸单克隆抗体(50μL/孔,10ng/μL),孵育0.5小时;用PBST清洗微孔板后,加入Eu³⁺标记抗体(100μL/孔,100ng/μL),孵育1小时;再次用PBST清洗微孔板后,加入荧光增强液(200μL/孔),机械振荡10分钟。使用时间分辨荧光测定仪测定荧光强度,仪器测定参数为激发波长340nm、发射波长615nm、延迟时间100μs、窗口时间400μs。

[0018] 8. 检测方法的优化与确定

通过相对较低的IC₅₀值和较高的F_{max}/IC₅₀比值(F_{max}:无SAL的荧光信号)对部分试剂参数进行筛选,确定分析体系中包被抗原的含量为1.0mg/L、单克隆抗体的含量为0.2mg/L、Eu³⁺标记抗体的含量为1.0mg/L、用于稀释单克隆抗体的PBS的pH=7,其中甲醇含量10%、Na⁺浓度0.2mol/L。

[0019] 确定了最佳实验参数后,用二氯喹啉酸浓度和F/F₀(%)值绘制标准曲线。F和F₀分别是测定二氯喹啉酸和无二氯喹啉酸反应体系的荧光值。采用四参数逻辑方程计算时间分辨荧光免疫分析方法对二氯喹啉酸的检测性能。得出该检测方法的半抑制浓度(IC₅₀)和检出限(LOD, IC₁₀)分别为20.56μg/L,0.89μg/L,线性范围(IC₁₀₋₈₀)为0.89-605.41μg/L。相比之下,现有传统免疫分析方法的IC₅₀为400μg/L;最低检测限为6μg/L。因此,建立的时间分辨荧光免疫分析法较传统免疫分析方法的IC₅₀提高了近20倍,最低检测限提高了近7倍,具有很高的灵敏度和检测限,可满足烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸,特别是痕量二氯喹啉酸的残留检测。

[0020] 9. 检测方法的验证与应用

采集福建、江西、贵州三个地区24个烟稻轮作田土壤样品,其中12个土壤样品未有二氯喹啉酸用药历史,进行添加回收率试验,12个土壤样品有二氯喹啉酸用药历史,进行真实样品检测。称取1g土壤,按料液比1:5 g/mL加入体积比1:1的甲醇/PBS混合溶液后,超声10分钟,5000rpm离心5分钟;吸取上清液100μL,用PBS稀释液稀释5倍后进行检测时间分辨荧光免疫分析方法检测,同时吸取上清液1mL进行UPLC-MS/MS检测(仪器检测试验条件详见表1和表2)。

[0021] 表1 二氯喹啉酸的UPLC检测参数

色谱柱	柱温	时间 (min)	流速(mL·min ⁻¹)	%A (乙腈) (V)	%B (水) (V)
ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1×50mm×1.7μm)	25℃	0-4	0.35	80	20

表2 二氯喹啉酸的MS/MS检测参数

参数	数值
监测模式	ESI+
气帘气 (psi)	35
离子喷雾电压 (v)	5500
离子源温度 (℃)	500
离子源气压 1 (psi)	55
离子源气压 2 (psi)	55
定量离子对	411.2/149.2
定量离子对碰撞能量及锥孔电压(v)	90/26
定性离子对	411.2/182
定性离子对碰撞能量及锥孔电压(v)	90/24

表3 未有二氯喹啉酸用药历史的土壤样品中二氯喹啉酸添加回收率测定结果

样品编号	添加浓度(mg/kg)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)	标准偏差 (%)
1	0.1	100.0	9.2	9.2
	1	88.1	12.6	11.1
2	0.1	84.3	5.7	4.8
	1	98.6	9.0	8.9
3	0.1	88.0	11.3	9.9
	1	102.6	6.1	6.3
4	0.1	99.5	9.1	9.0
	1	83.4	10.6	8.9
5	0.1	95.3	9.9	9.4
	1	108.0	7.0	7.6
6	0.1	92.3	13.9	12.9
	1	84.4	10.1	8.5
7	0.1	102.7	5.8	6.0
	1	85.0	8.7	7.4
8	0.1	108.1	5.6	6.1
	1	108.7	7.1	7.7
9	0.1	100.4	10.1	10.1
	1	94.6	12.1	11.4
10	0.1	94.6	15.3	14.4
	1	92.5	14.4	13.4
11	0.1	87.1	7.2	6.3
	1	103.0	3.0	3.1
12	0.1	105.4	13.2	13.9
	1	103.3	11.9	12.3

表4 真实土壤样品中二氯喹啉酸时间分辨荧光免疫分析与UPLC-MSMS测定结果

样品编号	时间分辨荧光免疫分析 测定结果(mg/kg)	UPLC-MS/MS 测定结果(mg/kg)	线性回归方程
1	0.1243	0.1352	
2	0.1154	0.1351	
3	0.0251	0.0254	
4	0.0214	0.0170	
5	0.0354	0.0301	
6	0.0780	0.0692	Y=0.8711x+0.0053
7	0.1211	0.1158	R ² =0.9887
8	0.1548	0.1323	
9	0.4711	0.4210	
10	0.3340	0.2850	
11	0.0689	0.0558	
12	0.0741	0.0658	

结果显示,12个未有二氯喹啉酸用药历史的土壤样品在1mg/kg和0.1mg/kg添加水平下,采用时间分辨荧光免疫分析法测定的回收率为83.4-111.6%,标准差(RSD)为3.0-15.3%(见表3)。12个真实样品采用时间分辨荧光免疫分析方法与UPLC-MS/MS的检测结果具有很好的相关性,其线性回归方程为 $Y=0.8711x+0.0053$ ($R^2=0.9887$) (见表4)。添加回收率与仪器检测的比对结果表明,该方法完全符合农药残留检测要求。

[0022] 与目前最广泛应用的液相色谱或液-质联用色谱相比,本发明不需要使用大量的甲醇、乙腈等有机试剂作为流动相,减少了有机试剂对环境的污染,具有较好的环境效益;且该方法较传统免疫分析方法的半抑制浓度(IC_{50})提高了近20倍,最低检测限提高了近7倍,具有很高的灵敏度和检测限;同时,该方法操作较为简便,不需要昂贵的检测仪器和专业的操作人员,抗体制备成本较低,极大降低了检测成本,并可同时对多个样品进行检测,克服了仪器检测需每个样品单独检测的缺点,缩短了检测时间,极大的提高了检测效率。

[0023] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

专利名称(译)	一种测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法		
公开(公告)号	CN110987892A	公开(公告)日	2020-04-10
申请号	CN201911349441.1	申请日	2019-12-24
[标]申请(专利权)人(译)	福建省烟草公司三明市公司		
申请(专利权)人(译)	福建省烟草公司三明市公司		
当前申请(专利权)人(译)	福建省烟草公司三明市公司		
[标]发明人	林建麒 黄一兰 林智慧 梁颁捷 姜占省 叶建如 方松 杨林潇 孔凡玉		
发明人	林建麒 黄一兰 林智慧 梁颁捷 姜占省 叶建如 方松 杨林潇 孔凡玉		
IPC分类号	G01N21/64 G01N1/34 G01N33/532		
CPC分类号	G01N1/34 G01N21/6402 G01N33/532		
代理人(译)	蔡学俊		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种时间分辨荧光免疫分析法测定烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的方法，其以二氯喹啉酸包被抗原、二氯喹啉酸单克隆抗体、Eu³⁺标记抗体为检测体系，经时间分辨荧光测定建立荧光强度与二氯喹啉酸浓度对应的标准曲线，然后利用所得标准曲线计算获得土壤样品中二氯喹啉酸的含量。本发明方法具有灵敏度高、重现性好、回收率高、有机溶剂用量少、成本低等特点，能够满足烟稻轮作田土壤中二氯喹啉酸的快速、灵敏检测。

色谱柱	柱温	时间 (min)	流速(ml/min)	%A(乙醇)	(V)%B(水)	(V)
ACQUITY UPLC BEH	25°C	0.4	0.35	80		20
C18 (2.1×50mm×1.7µm)						