

免疫亲和色谱及在农药残留分析中的应用

邵秀金¹, 刘曙照^{1*}, 冯大和², 钱传范³

(1. 扬州大学 植物保护系, 江苏 扬州 225009; 2. 扬州大学 理化测试中心, 江苏 扬州 225009;
3. 中国农业大学 应用化学系, 北京 100094)

摘要: 免疫亲和色谱可用于复杂样本中微量目标分析物的选择性分离富集。综述了免疫亲和色谱的基本原理、方法的建立过程(包括抗体的制备、固相基质的筛选、抗体与基质的偶联、免疫亲和色谱条件的优化)、免疫亲和色谱在农药残留分析中的应用现状及发展趋势。

关键词: 免疫亲和色谱; 农药残留

中图分类号: O 657. 7; R 392-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-7303(2003)04-0009-06

化学农药在农业有害生物防治中发挥了非常重要的作用, 但大量使用农药造成的环境和农产品污染问题也引起了人们的高度重视。加强农药残留监测对于农业的可持续发展和保障人类健康具有重要意义。

传统的农药残留分析主要依靠波谱、色谱等理化分析手段^[1, 2], 但理化分析需要经过繁杂的提取、净化、衍生化等前处理过程。特别是对于那些超高效农药如绿磺隆等, 田间用量仅 7. 5 ~ 30 g/hm², 复杂的前处理不仅耗时耗力, 而且样本中极微量的农药容易丢失。此外, 传统的样品前处理方法选择性差, 样品基质中一些理化性质相近的化合物难以被有效去除, 影响残留分析结果的准确性和可靠性。这就迫切需要开发具有选择性分离富集功能的纯化技术。本文对免疫亲和色谱技术及其在农药残留分析中的应用进行综述。

1 农药残留免疫亲和色谱基本原理

免疫亲和色谱(Immunoaffinity Chromatography, IAC)是利用抗原与抗体的高亲和力、高专一性和可逆结合的特性而建立的一种色谱方法。将针对目标农药的特异性抗体固定到适当的固相基质上, 制备成免疫亲和色谱固定相。利用农药小分子的反应原性、抗原抗体结合的特异性以及抗原抗体复合物在一定条件下能可逆解离的性质进行色谱分离。当含有目标分析农药的样本粗提液经过免疫亲和色谱柱时, 提取液中对抗体有亲和力的目标农药就被结合到抗体上, 淋洗去掉非目标分析物后采用适当条件将结合在抗体上的农药洗脱下来, 从而使超微量的目标农药被选择性地提取与浓缩。所得提取物可直接采用GC、HPLC、ELISA等方法进行检测, 有效地简化了样品前处理过程, 减少了有机溶剂的用量和提取过程中样品的损失。IAC通常只需“加样-洗涤-洗脱”一步层析就可使复杂样本中痕量的特定组分得到高度纯化和浓缩, 具有特异性强、结合容量大、洗脱条件温和、色谱柱可以方便地再生并重复使用等特点, 所以非常适用于复杂样本中痕量农药残留的分离、分析。

IAC的雏形出现在20世纪50年代, 但直到20世纪80年代末, 人们才真正认识到该方法

作者简介: 刘曙照(1952-), 男, 江苏镇江人, 理学博士, 教授, 主要从事农药残留与环境毒理研究
基金项目: 国家自然科学基金 29977028; 国家自然科学基金 20177019 资助项目

的重要应用价值。小分子化合物免疫分析技术的研究与发展,扩展了 IAC 技术的应用领域。目前, IAC 的应用已从医学扩展到环境分析和食品安全检验等领域,从单纯的样本纯化深入到在线定性定量分析之中。

2 IAC 的建立程序

2.1 抗体的制备

抗体是 IAC 固定相的配体,制备对目标分析物具特异性亲合力的抗体最为关键。当抗原注入动物体内时,动物机体免疫系统被激活产生相应的抗体,并能与该抗原发生专一性的结合。完全抗原应当具备较大的相对分子质量,而一般化学合成的农药其相对分子质量小,不具备免疫原性,需要将其衍生化,使其含有末端羧基、氨基、羟基等活性基团,再通过这些活性基团与载体蛋白质共价偶联制备人工抗原,免疫动物获得多克隆抗体,或应用杂交瘤技术制备单克隆抗体^[3]。从上世纪 90 年代开始,利用基因工程生产抗体的研究工作逐渐开展起来,这将为规模化生产抗体和 IAC 提供有力的技术支持,展现出良好的应用前景。

2.2 IAC 固相基质的选择

近年来,商品化的 IAC 基质越来越多,但选择基质的标准未变,理想的 IAC 基质应该具备如下特性:高度亲水,使亲合色谱固定相易与水溶液中的生物高分子接近;基质惰性,非专一性吸附尽可能小;具有相当量的化学基团可供活化或修饰;有较好的物理、化学稳定性和良好的机械性能,能承受配基固定化和亲合层析时所可能采用的各种条件(如温度、压力、pH 值、离子强度、去污剂等)的影响;具有多孔的网状结构,能使被亲合吸附的分子自由地通过从而增加配基的有效浓度;最好是均一的珠状颗粒,以保证亲合色谱柱有较好的流速。

早期,人们使用纤维素作为 IAC 的基质,但因其流动性较差未被继续使用。现在常用的基质材料的特性如下:

- (1)多聚糖类^[4]: pH 适用范围广(2~ 14),亲合容量高,价格比较便宜。但质软,不耐高压。
- (2)硅胶:机械强度高,有很好的流体动力学性质和化学稳定性,不溶于有机溶剂,无生物降解,孔径和形状易人为控制。但非特异性吸附强,只适用于低 pH (< 8)范围。
- (3)葡聚糖包敷的硅胶^[5]:结合了多聚糖凝胶亲合容量高和硅胶机械强度好的优点,较大程度地克服了硅胶非特异性强的缺陷。
- (4)纤维素: pH 适用范围广(1~ 14),但流动性差。
- (5)多孔玻璃:不溶解,几乎不受洗脱液、压力、流速、pH 和离子强度变化的影响,但非特异性吸附较强,适合在低 pH (< 8)范围内使用。
- (6)聚丙烯酰胺:有良好的化学稳定性,与生物大分子有良好的生物相容性,pH 适用范围较广(3~ 10)。

2.3 基质的活化与偶联

大部分基质在与抗体偶联之前,均需要进行化学活化。通常在基质骨架上引入亲电基团使之活化,再与间隔分子或抗体上的亲核基团(如- NH₂、- OH、- COOH 等)共价结合。

在小配体的亲合色谱中,常在基质和配体之间插一个间隔臂,以减少空间位阻的影响。对于农药残留 IAC,配体是对农药具特异性亲合力的抗体,相对分子质量大,抗体与抗原间的相互作用一般不受空间位阻的影响,如果引入间隔臂,特别是引入疏水性间隔臂,反而增加了非特异性吸附的机会。因此,制备农药残留 IAC 固定相时一般不引入间隔臂。目前常用的有代表

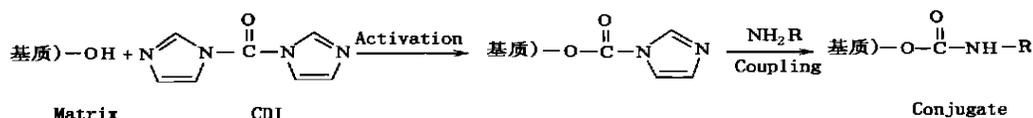
性的活化试剂包括溴化氰(CNB_r)、羰酰二咪唑(CDI)、环氧氯丙烷(ECD)和高碘酸盐(NaIO₄)等,见表1。

Table 1 The compounds most in use for the activation of matrices of immunoaffinity chromatography

Active compounds	Activated group	References
Cyanogen bromide	NH ₂	[6]
Dioxirane	NH ₂ , OH, SH	[7]
Benzoquinone	NH ₂	[8]
Carbonyl dimidazole	NH ₂	[9]
Periodate	NH ₂	[10]
Divinyl sulfone	NH ₂ , OH, SH	[11]
Epichlorohydrin	NH ₂	[12]
Hydrazine	NH ₂	[12]
N-Hydroxysuccinimide	NH ₂ , OH	[12]
Trifluoroethylsulfonyl chloride	NH ₂ , SH	[13]

CNB_r法最早由Axen等^[14]提出,属经典的活化方法,具有活化效果好、方法简单等优点。CNB_r法的缺点有:CNB_r毒性高,使用时要注意安全;活化时引入了阴离子交换基团异脲衍生物(pK_a=10.4),可能使活化基质产生非特异性吸附;该法制备的IAC固定相在使用过程中可能发生固定抗体的流失问题。

Bethell等^[15]建立了目前被认为最优良的CDI活化法,该法活化效率较CNB_r法高数十倍。活化基质与配体(以NH₂R表示)的偶联反应专一性强,产物单纯,即N-取代氨基甲酸酯衍生物。整个反应过程较CNB_r法简单,与配体的偶联率可与CNB_r法相媲美^[16]。CDI法反应过程如下:



抗体与活化基质的偶联方式有随机偶联与定向偶联两种。随机偶联时,基质与抗体的结合位点不固定,存在如下问题:抗体与基质偶联时,抗体的抗原结合位点可能被占。抗体与基质多点结合改变了抗体上抗原结合位点的空间结构,降低或失去与抗原的亲合力。当基质上偶联的抗体过多时,抗体分子间挨得较近,在空间上阻碍了抗原接近其结合位点。因此,随机偶联后抗体的免疫学活性一般仅为游离抗体的1%~30%^[16]。

定向偶联是先将蛋白A(Protein A)或蛋白G(Protein G)固定在基质上,Protein A或Protein G只与IgG的Fc区相结合,然后用二甲基庚二酸酯等化学交联剂使抗体(多抗或单抗)与Protein A或Protein G定向偶联,抗体上的抗原结合位点则处于游离状态。定向偶联还可采用在抗体与基质偶联之前先改造抗体的方法来进行。第一种方案也是最常用的方案是将抗体Fc区碳水化合物中的羟基在温和条件下用高碘酸钠氧化,或使末端半乳糖残基与半乳糖氧化酶反应,形成醛基后与含酰肼的基质偶联。第二种方案是将抗体或抗体的F(ab')₂片段

用 β -巯基乙醇还原, 在它们的绞链(Hinge)区生成—SH, 然后与含碘乙酰基团的基质反应, 形成稳定的硫醚键而偶联于基质上。定向偶联的优点是: 留出正确定向的抗原结合位点, 能够提高 IAC 固定相的结合容量。

2.4 IAC 固定相性能的考察与 IAC 条件的选择

2.4.1 IAC 固定相的柱容量 IAC 固定相的柱容量是 IAC 中具有重要实用价值的参数, 分为动态柱容量(每 mL 柱床对靶标物质的最大吸附量, ng/mL)和绝对柱容量(每 mg 固定化抗体对靶标物质的最大结合量, ng/mg), 可用前沿分析法或 Scatchard 分析法进行测定^[17]。若洗脱条件已经确定, 测定柱容量最方便的方法是将一定浓度、待测组分超过理论容量的溶液通过 IAC 柱, 免疫反应平衡后洗涤去除未被结合的游离部分, 在适当条件下洗脱被结合的部分进行定量测定。IAC 柱在使用和储存过程中应定期监测柱容量变化。

2.4.2 反应与洗涤介质 采用一系列不同 pH 值、离子强度及化学组成的缓冲液作为免疫反应与洗涤柱子的介质, 测定不同条件下的柱容量, 选择柱容量最大时所用缓冲液作为反应、平衡和洗涤介质。

2.4.3 洗脱条件 农药残留 IAC 中多采用非特异性洗脱方式, 如改变介质的 pH 值、离子强度、使用极性有机溶剂(如甲醇等), 或使用变性剂(脲、胍等)、去垢剂或离子序列高的离子。对于农药残留 IAC, 采用有机溶剂洗脱后, 多数可直接采用 HPLC、GC 进行分析。为了更好地排除复杂样本中非特异性组份的干扰, 必要时应在 IAC 之前增加适当的净化步骤。

2.4.4 IAC 柱的再生与储存 通常先用一定体积的极性有机溶剂洗柱除去非特异性吸附的杂质, 然后用 10~15 倍柱体积的平衡缓冲液冲洗 IAC 柱, 即可再生使用。一根柱子一般可再生使用数十次, 暂时不用时可用含 0.02% 叠氮钠或 0.01% 硫柳汞的缓冲液平衡, 于 4℃ 冰箱中保存。

3 IAC 技术在农药残留分析中的应用

目前 IAC 技术在农药残留分析中主要用于样本的净化与浓缩, 其最大的优点是大大简化了样品前处理过程, 提高了分析的灵敏度。例如对萝卜、芹菜、玉米、葡萄、洋葱、土豆、草莓等样本中苯基脲类除草剂的残留检测, 采用 IAC-反相高效液相色谱法, 检测水平可达 2~5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 远低于常规样品前处理-HPLC 的检测限 0.1 mg/L ^[18]。水中多菌灵经 IAC 柱净化浓缩后, 采用高效液相色谱检测, 最低检测限可达 0.1 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[19]。猪肝中残留的阿维菌素^[16], 小麦、玉米、羊尿等样本中残留的咪唑啉酮类除草剂和花生中残留的 Thifluzamide^[20], 土壤和水中残留的百草枯^[21]等, 样本提取液采用 IAC 柱净化浓缩后, 均取得了很好的检测效果。

目前笔者成功地采用羰酰二咪唑(CDI)活化法制备了绿磺隆 IAC 柱, 柱容量高达 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 柱床体积。配制 500 mL 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的绿磺隆溶液, 经 IAC 吸附浓缩后, 用 2 mL 80% 甲醇就能洗脱下来, 可直接用于 HPLC、GC 分析。农田土壤中绿磺隆残留量一般在 ng/g 以下, 样本提取后不经 IAC 柱分离富集难以达到色谱分析的最低检出浓度。笔者采用 IAC 对土壤提取液中的绿磺隆残留进行了净化浓缩, ELISA 检测, HPLC 法验证, 回收率 > 90%。

4 IAC 技术的发展趋势

IAC 在农药残留分析样本前处理中所显示出来的高选择性、高灵敏度及高效能, 使其在残留分析领域中处于越来越重要的地位。IAC 正从离线分析向在线分析、从单残留分析向多残

留分析发展。多残留免疫亲和色谱(M IAC)是将多种抗体或簇特异性抗体固定到一根柱子上,或将固定有不同抗体的不同柱子串联起来,同时对多种目标组份进行净化浓缩。M IAC 使免疫分析技术实际具备了处理复杂样品中多组份残留的能力。同时 IAC 作为理化检测方法的分离纯化手段,使残留分析集免疫反应的高选择性、快速与理化检测方法的准确性于一体,避免了单纯免疫分析或理化分析的不足^[22]。但应当注意到: IAC 在实际应用中有时存在着基质的非特异性吸附等问题,而且抗体的大量制备和供应也存在一定的局限性,有待于在今后的研究工作中不断改进、发展与完善。

参考文献:

- [1] Valverde A. Chromatographic pesticide residue analysis [J]. *J A O A C Int*, 2000, 83(3): 679
- [2] 段文仲, 郝冬生. 高效液相色谱法同时测定水果中多种农药残留量的研究方法[J]. *农药*, 2000, 37(8): 20-22
- [3] 金涌. 单克隆抗体在食品卫生检验中的应用[J]. *农牧产品开发*, 2001, (5): 9-12
- [4] Rees D A. Shapely polysaccharide[J]. *The B iochem J*, 1972, 126(2): 257-275
- [5] L akhiari H, M uller D, Jozefonvicz J. Interaction mechanisms between insulin and N -acetylneuram inic acid in affinity chromatography[J]. *J Chrom atogr A*, 1995, 711(1): 93-103
- [6] Kennedy J F, Barnes J A. Immunochemical studies of the non-specific interactions of cyanogen bromide-activated macroporous agarose-based immunoabsorbents [J]. *J Chrom atogr A*, 1983, 281: 83-93
- [7] Porath J, Fornstedts N. Group fractionation of plasma proteins on dipolar ion exchanger [J]. *J Chrom atogr*, 1970, 51: 479-489
- [8] Stubbings D, Bubb M O, Conradie J D. Two methods for the introduction of amino groups into agarose-based matrices: Their use immunoaffinity chromatography [J]. *Analytical B iochem istry*, 1993, 210(1): 159-162
- [9] Bethell G S, Ayers J S, Hearn J W, et al. Investigation of the activation of various insoluble polysaccharides with 1, 1 -carbonyldim idazole and the properties of the activated matrices [J]. *J Chrom atogr A*, 1987, 219(3): 361-371
- [10] Ferrua B, Maiolin R, Masseyeff R. Coupling of gamma-globulin to microcrystalline cellulose by periodate oxidation [J]. *J ImmunolM ethods*, 1979, 25(1): 49-53
- [11] Porath J, Sundberg L. High capacity chemisorbents for protein immobilization [J]. *N ature N ew B iol*, 1972, 238(87): 261-262
- [12] 黄昕, 邱宗荫. 免疫亲和色谱定向偶联方法的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 1999, 24(2): 132-134
- [13] Nilsson K, Mosbach K. Immobilization of enzymes and affinity ligands to various hydroxyl group carrying supports using highly reactive sulfonyl chlorides [J]. *B iochem B iophys Res Comm un*, 1981, 102(1): 449-457
- [14] Axen R, Porath J, Ernback S. Chemical coupling of pesticides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides [J]. *N ature*, 1967, 214(5095): 1302-1304
- [15] Bethell G S, Ayers J S, Hancock W S. A novel method of activation of cross-linked agarose with 1, 1 -carbonyldim idazole which gives a matrix for affinity chromatography devoid of additional charged groups [J]. *J B iol Chem*, 1979, 254(8): 2572-2574
- [16] Li J S, Li X W, Hu H B. Immunoaffinity column cleanup procedure for analysis of ivermectin in swine

- liver [J]. *J Chrom atography B*, 1997, 696(1): 166-171
- [17] Li J S, Li X W, Yuan J X, *et al* Detem ination of sulfonam ides in swine meat by immunoaffinity chromatography [J]. *J A O A C Int*, 2000, 83(4): 830-836
- [18] Lawrence J F, Menard C, Hennion M C, *et al* Use of immunoaffinity chromatography as a simplified cleanup technique for the liquid chromatographic detem ination of phenylurea herbicides in plant material [J]. *J Chrom atography A*, 1996, 732(2): 277-281
- [19] Thomas D H, Lopez-Avila V, Betowski L D, *et al* Detem ination of carbendazim in water by high-performance immunoaffinity chromatography on-line with high performance liquid chromatography with diode-array or mass spectrometric [J]. *J Chrom atography A*, 1996, 724(1-2): 207-217
- [20] Rejeb S B, Cleroux C, Lawrence J F, *et al* Development and characterization of immunoaffinity columns for selective extraction of a new developmental pesticide: Thifluzamide from peanuts [J]. *Anal Chim Acta*, 2001, 432(2): 193-200
- [21] Spinks C A, Wang B, Mills E N, *et al* Development of an ELISA for paraquat: Improvement of antibody characteristics by reversed affinity chromatography [J]. *Analyst*, 1999, 124(6): 847-850
- [22] Newkirk D K, Benson R W, Howard P C, *et al* On-line immunoaffinity capture, coupled with HPLC and electrospray ionization mass spectrometry, for automated detem ination of fumonisins [J]. *J Agric and Food Chemistry*, 1998, 46(4): 1677-1688

Immunoaffinity Chromatography and its Application in Pesticide Residue Analysis

SHAO Xiu-jin¹, LIU Shu-zhao^{1*}, FENG Da-he², QIAN Chuan-fan³

(1 Department of Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2 Center of Physical and Chemical Analysis, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

3 Department of Applied Chemistry, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract Immunoaffinity chromatography (IAC) could be used for the separation and enrichment of trace target small molecular compounds such as pesticides in complicated samples with high specificity. The review is on the principle of IAC, the developmental procedure of IAC (including the preparation of antibody, the selection of matrix, the coupling of antibody to matrix, and the optimization of IAC condition), the application of IAC in pesticide residue analysis and the trend of this technology.

Key words immunoaffinity chromatography; pesticide residue