

绿磺隆克百威三唑磷多抗体免疫亲和色谱技术研究

韦林洪¹, 刘曙照², 邵秀金³, 张 军¹

(1.扬州环境资源职业技术学院, 江苏 扬州 225127; 2.扬州大学环境科学与工程学院, 江苏 扬州 225009; 3.扬州环境保护局, 江苏 扬州 225009)

摘要:采用碳酰二咪唑(CDI)将 Sepharose CL-4B 活化并分别与纯化的抗绿磺隆、抗克百威、抗三唑磷的多克隆抗体共价偶联,合成相应的免疫亲和吸附剂,并制备了对绿磺隆、克百威和三唑磷具有特异性亲和力的多抗体免疫亲和色谱(MIAC)柱。对 MIAC 的条件进行优化,选择 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.2 磷酸盐缓冲液作吸附与平衡介质,80%(体积分数)甲醇水溶液作洗脱剂。结果表明,在上述试验条件下,MIAC 柱对绿磺隆、克百威和三唑磷的动态柱容量分别达 1.81 、 2.29 和 $1.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 床体积。用 MIAC 柱对添加有绿磺隆、克百威、三唑磷的河水与土壤提取液进行分离富集,洗脱液分别采用包被抗体直接竞争酶联免疫吸附(ELISA)法和高效液相色谱(HPLC)法测定,重复 5 次,平均回收率是 $89.98\% \sim 106.2\%$,相对标准偏差(RSD)为 $3.21\% \sim 14.81\%$,ELISA 法和 HPLC 法的测定结果基本一致。成功建立了绿磺隆、克百威和三唑磷的多抗体免疫亲和色谱分析技术并用于河水和土壤中绿磺隆、克百威、三唑磷残留的测定。

关键词:绿磺隆;克百威;三唑磷;多抗体免疫亲和色谱(MIAC)

中图分类号:X830.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)10-2211-06

Studies on Multi-class Immunoaffinity Chromatography (MIAC) for Chlorsulfuron, Carbofuran and Triazophos

WEI Lin-hong¹, LIU Shu-zhao², SHAO Xiu-jin³, ZHANG Jun¹

(1.Yangzhou Vocational College of Environment and Resource, Yangzhou 225127, China; 2.College of Environmental Science and Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 3.Yangzhou Environmental Protection Bureau, Yangzhou 225009, China)

Abstract: The purified anti-chlorsulfuron antibody, anti-carbofuran antibody and anti-triazophos antibody were conjugated to the CDI-activated sepharose CL-4B respectively to synthesize the immunosorbent. The mixed immunosorbent of chlorsulfuron, carbofuran and triazophos were used to prepare multi-class immunoaffinity chromatography(MIAC) column which are specific to chlorsulfuron, carbofuran and triazophos. The conditions of MIAC were optimized, $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.2 phosphate buffer was used as equilibrium and absorbent medium, and 80% methanol-water(V/V) as eluent. Under the experimental conditions, the dynamic column capacity of chlorsulfuron, carbofuran and triazophos were up to 1.81 , 2.29 and $1.89 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ bed volume respectively. The spiked river water and the extracts of spiked soil were clean up and enriched by MIAC, the target compounds in eluates were determined by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) and verified by high performance liquid chromatography(HPLC). The average recoveries were $89.98\% \sim 106.2\%$ and the RSD were $3.21\% \sim 14.81\%$ ($n=5$). The results from ELISA were well corresponded with those from HPLC. MIAC technology was developed successfully for analysis of chlorsulfuron, carbofuran and triazophos residues in water river and soil.

Keywords: chlorsulfuron; carbofuran; triazophos; multi-class immunoaffinity chromatography (MIAC)

近年来,由于大量使用农药而导致的农药残留问题已引起全世界的高度关注,农药残留分析新技术一直是各国研究的热点。农药残留分析包括单残留分析和多残留分析。农药多残留检测方法主要有

气相色谱法(GC)^[1-3]和高效液相色谱法(HPLC)^[4-9]。应用这些方法需要对被测样品中的目标分析物进行提取、净化、浓缩等复杂的前处理。常规的样品前处理方法不仅费时费力,消耗大量的有机溶剂,还容易导致极微量的目标分析物丢失,影响分析结果的准确性和可靠性^[10-11],因此,需要开发简便高效快速的样品前处理新技术。免疫亲和色谱(immunoaffinity chromatography, IAC)利用抗原与抗体结合的专一性来实

收稿日期:2009-04-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(20177019)

作者简介:韦林洪(1970—),女,江苏扬州人,硕士,讲师,研究方向为环境和农产品安全检测。E-mail:yzweilh@yahoo.com.cn

现样本提取液中的目标组分的分离与富集,具有选择性强、结合容量大、富集效率高、可重复应用等特点,大大地简化了样品的前处理过程,提高了分析方法的灵敏度和可靠性,在残留分析领域中处于越来越重要的地位^[12-20]。

Ginkel^[21]将 IAC 分为三种类型:(1)一种抗体针对一种靶物质,即常规 IAC,可用于单残留分析。(2)一种抗体针对多种靶物质(multi-analyte),即群选择性 IAC,它将针对一组化合物共有结构的簇特异性抗体固定到一根柱子上,可用于样本中一类化合物的分离与富集。(3)多种抗体针对多种靶物质(multi-antibody, multi-analyte),即 MIAC,它将多种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,可用于样本中不同种类化合物的分离与富集,从而使 MIAC 具备分离与富集同一样本中多种目标分析物的能力。

本研究制备了对绿磺隆、克百威和三唑磷具有特异性亲和力的 MIAC 柱,并将其用于河水和土壤提取液中的这 3 种农药的选择性分离与富集,建立了农药多类多残留分析的 MIAC 技术,该项研究国内迄今尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

台式高速冷冻离心机, Biofuge primo R, 德国 Heraeus; 紫外可见分光光度计, UV-1700, 日本 Shimadzu; 旋转蒸发仪, 200S, 瑞士 Büchi; 恒温磁力搅拌器, 852 型, 上海司乐仪器有限公司; 玻璃色谱柱, 100 mm×8 mm I.D., 底部带 G₃ 滤板, 定制; 高效液相色谱仪, 带 490 型 UV 检测器, Nova-Pak C₁₈ 柱(3.9 mm×150 mm), 美国 Waters。

1.2 主要试剂

氯磺隆原粉, 含量 98%, 江苏省激素研究所; 克百威原粉, 含量>98%, 江苏太仓金龙集团; 三唑磷, 含量>98%(75% 原油经柱层析净化), 江苏江都农药厂; 兔抗氯磺隆纯化抗体, 兔抗克百威纯化抗体, 兔抗三唑磷纯化抗体(均为本实验室制备); Sepharose CL-4B, 瑞典 Pharmacia; 碳酰二咪唑(CDI), 含量>97%, 瑞士 Fluka; 甲醇、乙腈(色谱纯); 双蒸水; 0.02 mol·L⁻¹ 不同 pH 值磷酸盐缓冲液(PB); 1.0 mol·L⁻¹ 乙醇胺溶液, pH8.0; 0.1 mol·L⁻¹ 硼酸盐缓冲液; 丙酮, 分析纯; 50%、60%、70%、80%、90%(体积分数) 甲醇水溶液。

1.3 免疫亲和色谱柱的制备

1.3.1 固相基质 Sepharose CL-4B 的活化^[18-20]

取充分溶胀的 Sepharose CL-4B 2 mL, 依次用 10 mL 蒸馏水、20 mL 丙酮-水(体积比为 1:1)、4×10 mL 无水丙酮抽洗后悬浮于 6 mL 无水丙酮中, 于 4℃ 下缓慢搅拌成混悬液, 加入 0.2 g CDI, 室温下缓慢搅拌反应 45 min, 反应物依次用 5×10 mL 丙酮、4×10 mL 硼酸盐缓冲液冲洗。

1.3.2 免疫亲和吸附剂的制备

准确称取纯化的抗绿磺隆抗体、抗克百威抗体、抗三唑磷抗体各 20~25 mg, 分别溶于 5 mL 硼酸盐缓冲液, 用紫外分光光度计在 280 nm 处测定各自的吸光值(A₂₈₀)后加入已活化的 Sepharose CL-4B 中, 于 4℃ 下缓慢搅拌反应 24 h。然后分别于 2 500 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min, 取上清液分别测定 A₂₈₀, 计算偶联效率。偶联效率=(偶联前抗体总量-偶联后游离的抗体量)/(Sepharose CL-4B 用量)。将偶联后的凝胶分别与适量乙醇胺溶液混合, 室温下慢慢搅拌反应 4 h, 封闭未偶联的活化位点, 得到绿磺隆、克百威和三唑磷免疫亲和吸附剂。

1.3.3 多抗体免疫亲和色谱柱(MIAC)的制备

取 1.3.2 制备的 3 种免疫亲和吸附剂各 1 mL(床体积), 在 pH7.2 的 PB 中混合均匀, 减压除去气泡后装入已关闭出口的玻璃柱中, 使其自然沉降。打开柱的出口, 随着 PB 缓缓地流出, 免疫吸附剂慢慢沉降直至平衡。

1.4 免疫吸附剂性能测定及 MIAC 条件选择

1.4.1 MIAC 柱吸附容量的测定

用 pH7.2 的 PB 平衡 1.3.3 制备的 MIAC 柱, 将每 1 mL 分别含有 0.1 μg 的氯磺隆、克百威和三唑磷的 PB 50 mL 在自然重力下过 MIAC 柱(流速 4~5 mL·min⁻¹), 分管收集流出液(1.0 mL·管⁻¹), 包被抗体直接竞争 ELISA 法^[22-24]分别检测流出液中绿磺隆、克百威和三唑磷浓度。当柱结合饱和后(流出液中氯磺隆、克百威和三唑磷浓度与加样浓度相同), 用 30 mL PB 洗去柱中游离的氯磺隆、克百威和三唑磷, 然后用 10 mL 80% 甲醇水溶液预淋洗, 4 mL 80% 甲醇水溶液洗脱(预淋洗和洗脱的流速 0.5 mL·min⁻¹)。HPLC 法(色谱条件: 流动相为 70% 甲醇水溶液, 流速 0.8 mL·min⁻¹; 灵敏度 0.2 AUFS; 紫外检测波长 270 nm; 进样量 25 μL, 按色谱峰面积采用外标法定量)检测洗脱液中绿磺隆、克百威和三唑磷的含量, 按 Davis 等^[25]的方法计算动态柱容量。

1.4.2 MIAC 吸附与平衡介质的选择

用不同 pH 值(6.4、6.8、7.2、7.6)的 PB 作 MIAC 的吸附与平衡介质,按 1.4.1 步骤分别测定不同 pH 值下的柱容量,然后选择柱容量最大时所用的 PB 作为 MIAC 柱的吸附与平衡介质。

1.4.3 MIAC 洗脱介质的选择

在最佳吸附条件下,将约 1/2 柱容量的绿磺隆、克百威、三唑磷吸附到 MIAC 柱上,用 PB 洗去柱中非目标分析物,采用不同体积分数(60%、80%)的甲醇水溶液作洗脱剂,分管收集(1.0 mL·管⁻¹),ELISA 法测定洗脱液中绿磺隆、克百威和三唑磷的含量,计算回收率。选择回收率高、洗脱剂用量少、对免疫吸附剂影响小,能够同时洗脱 3 种农药的甲醇水溶液作洗脱介质。

1.4.4 考察重复使用柱容量的变化

在选定的 MIAC 条件下,按 1.4.1 步骤测定柱容量。重复上述步骤,考察柱容量的变化(每次重复使用前用 10 mL 80% 甲醇水溶液再生柱,暂不使用时,用含 0.02% NaN₃ 的 PB 平衡,4℃ 保存)。

1.5 标准添加回收率试验

1.5.1 河水中绿磺隆、克百威、三唑磷残留标准添加回收率试验

取扬州古运河的河水 100 mL,调节 pH 值为 7.2,每 1 mL 河水添加绿磺隆 5 ng、克百威 10 ng、三唑磷 10 ng(各组分总量均低于各自的柱容量),过 MIAC 柱,流速为 4~5 mL·min⁻¹,MIAC 柱依次用 20 mL 含 0.5% 吐温-20 的 pH7.2 的 PB、30 mL pH7.2 的 PB 洗柱,10 mL 80% 甲醇水溶液预淋,4 mL 80% 甲醇水溶液洗脱,洗脱液用 N₂ 吹至近干,用甲醇定容到 1.0 mL。取部分洗脱液稀释 10 倍后用包被抗体直接竞争 ELISA 法测定绿磺隆、克百威、三唑磷的含量,其余的洗脱液直接用 HPLC 法测定其含量(色谱条件同 1.4.1),计算标准添加回收率。同样条件下,以未添加绿磺隆、克百威、三唑磷的河水平行处理作空白对照。

1.5.2 土壤中绿磺隆、克百威、三唑磷残留标准添加回收率试验

将风干粉碎的农田土壤过 40 目筛,称取土壤 40 g,每 1 g 土壤添加绿磺隆 5 ng、克百威 25 ng、三唑磷 10 ng(各组分总量均低于各自的柱容量),混匀,装入滤纸筒中,将滤纸筒放入索氏提取器中,加入丙酮,加热回流提取至少 6 h。将提取液旋转蒸发除去丙酮至约 4 mL 时,用含有 0.5% 吐温-20 的 pH7.2 的 PB 定容到 40 mL,过 MIAC 柱,流速为 4~5 mL·min⁻¹,MIAC

柱依次用 20 mL 含 0.5% 吐温-20 和 20% 甲醇的 pH 7.2 的 PB、30 mL 含 20% 甲醇的 pH7.2 的 PB 洗柱,其余同 1.5.1。同样条件下,以未添加绿磺隆、克百威、三唑磷的土壤平行处理作空白对照。

2 结果与分析

2.1 抗体与基质的偶联效率

3 次重复偶联试验,每毫升柱床体积的 Sepharose CL-4B 上偶联的绿磺隆、克百威和三唑磷的抗体量见表 1。

表 1 抗体与基质偶联效率

偶联次数	1	2	3
绿磺隆抗体偶联效率/mg·mL ⁻¹	8.92	7.70	7.56
克百威抗体偶联效率/mg·mL ⁻¹	11.09	10.44	11.89
三唑磷抗体偶联效率/mg·mL ⁻¹	10.33	10.27	11.06

2.2 吸附与平衡介质同柱容量的关系

不同 pH 值的 PB 作为吸附与平衡介质与 MIAC 柱容量的关系见图 1。图 1 表明,用 pH7.2 的 PB 做 MIAC 柱的吸附与平衡介质时,绿磺隆、克百威、三唑磷的吸附容量最大,这可能是因为 pH7.2 接近正常生理条件,有利于提高农药与相应抗体之间的亲和力。

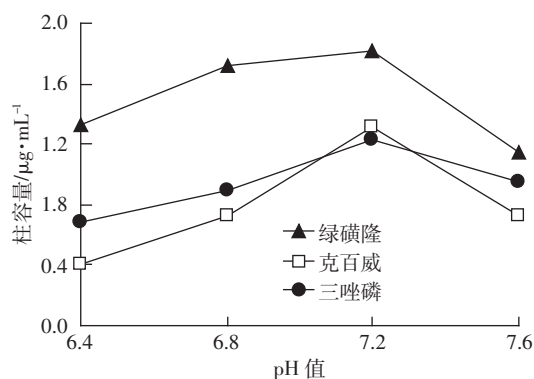


图 1 pH 值对柱容量的影响

Figure 1 Effect of pH on column capacity

2.3 洗脱介质的选择

60% 甲醇水溶液作洗脱介质时,在第 11、12 管大约有 85% 的克百威被洗脱,而绿磺隆和三唑磷直到第 16 管仍未被洗脱;用 80% 甲醇水溶液作洗脱介质时,克百威在第 11、12 管基本洗脱完全,三唑磷和绿磺隆从第 11 管开始被洗脱,到第 14 管基本洗脱完全。因此,MIAC 柱选用 10 mL 80% 甲醇水溶液预淋洗,4 mL 80% 甲醇水溶液作为洗脱介质。

2.4 重复使用柱容量的变化情况

绿磺隆起始柱容量为 $1.81 \mu\text{g}$ 、克百威起始柱容量为 $2.29 \mu\text{g}$ 、三唑磷起始柱容量为 $1.89 \mu\text{g}$ 的 MIAC 柱在 2 个月内重复使用多次,柱容量的变化情况见图 2。可以看出,MIAC 柱重复使用 10 次后,绿磺隆的柱容量下降为起始柱容量 50%左右,克百威的柱容量下降为起始柱容量 45%左右,三唑磷的柱容量下降为起始柱容量 70%左右,但上述变化不影响 MIAC 柱的使用,只要加样量不超过柱容量,同一根 MIAC 柱可再生重复使用 15 次以上。MIAC 柱用含 0.02% NaN_3 的 PB 平衡,4℃保存一段时间,柱容量有一定程度的回升,说明在适当条件下抗体的免疫学活性有一定的自行恢复能力。

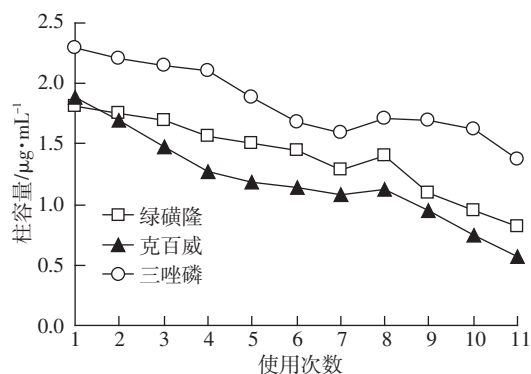


图 2 重复使用柱容量的变化

Figure 2 Changes of MIAC column capacity after reuse

2.5 标准添加回收率

河水中添加绿磺隆 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、克百威 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、三唑磷 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,按 1.5.1 步骤操作,重复 5 次,测定结果见表 2。土壤中添加绿磺隆 $5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、克百威 $25 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 、三唑磷 $10 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$,按 1.5.2 步骤操作,重复 5 次,测定结果见表 3。HPLC 法测定的图谱见图 3。

从表 2、表 3 可以看出:两种方法检测结果基本吻合,符合残留分析的要求。

3 讨论

采用 CDI 法将基质 Sepharose CL-4B 活化后与抗体相偶联,反应过程简单,操作安全,抗体与基质

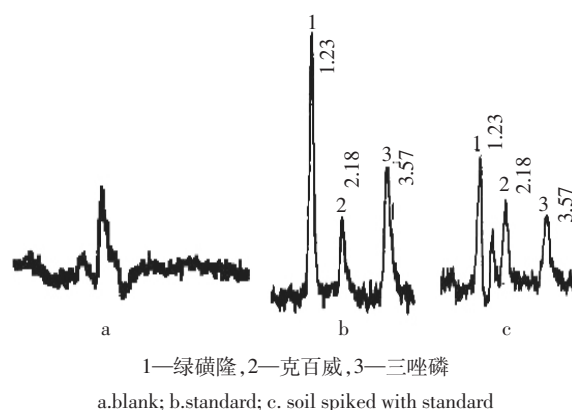


图 3 绿磺隆、克百威、三唑磷高效液相色谱图

Figure 3 HPLC chromatograms of chlorsulfuron, carbofuran and triazophos

表 2 河水中绿磺隆、克百威、三唑磷标准添加回收率(经 MIAC 纯化)

Table 2 Recoveries of chlorsulfuron, carbofuran and triazophos from the spiked river water (enriched and purified by MIAC)

农药品种	添加浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	实测浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		回收率/%		平均回收率/%		相对标准偏差 RSD/%	
		ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC
绿磺隆	5	4.918	5.152	98.36	103.0	104.5	106.2	8.26	14.81
		5.092	5.866	101.8	117.3				
		5.572	4.227	111.4	84.54				
		4.764	5.542	95.28	110.8				
		5.772	5.974	115.4	119.5				
克百威	10	9.372	9.952	93.72	99.52	89.98	97.62	6.01	12.48
		9.624	11.44	96.24	114.4				
		8.348	8.419	83.48	84.19				
		8.546	8.742	85.46	87.42				
		9.099	10.26	90.99	102.6				
三唑磷	10	8.873	8.206	88.73	82.06	92.59	102.5	6.13	12.03
		10.08	11.24	100.8	112.4				
		9.588	11.21	95.88	112.1				
		8.711	10.30	87.11	103.0				
		9.040	10.31	90.40	103.1				

表 3 土壤中绿磺隆、克百威、三唑磷标准添加回收率(经 MIAC 纯化)

Table 3 Recoveries of chlorsulfuron, carbofuran and triazophos from the spiked soil (enriched and purified by MIAC)

农药品种	添加浓度/ ng·g ⁻¹	实测浓度/ng·g ⁻¹		回收率/%		平均回收率/%		相对标准偏差 RSD/%	
		ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC	ELISA	HPLC
绿磺隆	5	4.840	4.168	96.80	83.36	102.0	94.80	6.13	8.41
		4.718	4.975	94.36	99.50				
		5.370	4.480	107.4	89.60				
		5.145	5.100	102.9	102.0				
		5.420	4.978	108.4	99.56				
克百威	25	26.10	25.72	104.4	102.9	95.09	101.9	8.44	3.21
		22.86	25.89	91.44	103.6				
		25.78	26.36	103.1	105.4				
		21.97	24.22	87.88	96.88				
		22.16	25.22	88.64	100.9				
三唑磷	10	9.285	9.182	92.85	91.82	95.34	105.7	5.46	8.86
		9.231	10.03	92.31	100.3				
		10.32	11.11	103.2	111.1				
		9.040	11.30	90.40	113.0				
		9.795	11.32	97.95	113.2				

的偶联效率高,可保持较高的免疫学活性,重复性好。MIAC 柱在 2 个月内可重复使用多次,MIAC 柱重复使用后用含有 0.02% NaN₃ 的 pH7.2 的 PB 平衡,4 ℃ 存放一段时间后,柱容量有一定程度的回升,说明在适当条件下抗体的免疫学活性有一定的自行恢复能力。

MIAC 是利用抗原与抗体的高亲和力、高专一性和在一定条件下能可逆解离的特性而建立的一种新的色谱方法。MIAC 的高度选择性使样本提取液通过 MIAC 柱后相应的目标分析物均能被选择性地吸附,非目标分析物被有效分离而去除,从而减少了有机溶剂的用量和目标分析物的损失,避免了复杂繁琐的样品前处理过程,可进一步开发应用于环境中多种目标污染物的选择性分离富集与测定。

河水和土壤提取液过 MIAC 柱后,加入 0.5% 吐温-20 和 20% 甲醇是为了减少非特异性吸附,去除样品基质中的干扰物质,同时实现目标分析物的分离提纯与富集,从而有效避免了提取液中干扰物质对 HPLC 测定的影响。

4 结论

成功地建立了对绿磺隆、克百威和三唑磷具有特异亲和力、高容量的 MIAC 技术,为测定河水和土壤提取液中痕量的绿磺隆、克百威和三唑磷残留提供了一种特异性强、灵敏度高、简便可靠的样品前处理新

技术。

参考文献:

- [1] 陈守忠. 有机磷农药多残留气相色谱分析研究[J]. 福建分析测试, 2008, 17(1): 36-39.
CHEN Shou-zhong. Organophosphorus pesticides residues detected by GC[J]. *Fujian Analysis & Testing*, 2008, 17(1): 36-39.
- [2] 李嘉静, 张卫峰, 洪振涛. 固相萃取—气相色谱法测定蔬菜中多种有机磷农药的残留量[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(13): 54-55.
LI Jia-jing, ZHANG Wei-feng, HONG Zhen-tao. Determination of organophosphorous pesticide residues in vegetable by SPE-GC[J]. *Anhui Agri Sci Bull*, 2007, 13(13): 54-55.
- [3] 郝丽丽, 薛 健. 菊花中 18 种有机氯农药的多残留分析[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(12): 1838-1841.
HAO Li-li, XUE Jian. Determination of 18 organochlorin multiresidua pesticides in traditional chinese medicine flos chrysanthemi[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2006, 26(12): 1838-1841.
- [4] 祁 彦, 张新忠, 占春瑞, 等. 高效液相色谱法测定大豆中磺酰脲类除草剂的残留[J]. 农药, 2005, 44(2): 76-78.
QI Yan, ZHANG Xin-zhong, ZHAN Chun-rui, et al. HPLC determination of sulfonylurea herbicide residues in soybeans[J]. *Pesticides*, 2005, 44(2): 76-78.
- [5] 金 雁, 姜 莉, 赵 颖, 等. 高效液相色谱法同时测定蔬菜中多种磺酰脲类除草剂的残留量[J]. 现代仪器, 2008, 14(4): 61-63.
JIN Yan, JIANG Li, ZHAO Ying, et al. Simultaneous determination of suifonylurea herbicide residues in vegetables by HPLC[J]. *Modern Instruments*, 2008, 14(4): 61-63.
- [6] 李 英, 周艳明, 牛 森. 蔬菜、水果中氨基甲酸酯类农药多残留分析方法的比较[J]. 现代科学仪器, 2005, 6: 68-70.

- LI Ying, ZHOU Yan-ming, NIU Sen. Analysis of residues of carbamate pesticides in vegetables and fruits[J]. *Modern Scientific Instruments*, 2005, 6: 68-70.
- [7] 李 娟, 赵永刚, 丁曦宁. 固相萃取/高效液相色谱法测定地表水中氨基甲酸酯类农药[J]. 环境监测管理与技术, 2006, 18(1): 27-28.
- LI Juan, ZHAO Yong-gang, DING Xi-ning. Determination of carbamate pesticides in surface water using solid phase extraction and HPLC[J]. *The Administration and Technique of Environmental Monitoring*, 2006, 18(1): 27-28.
- [8] 张 静, 闫 实, 王 蕾, 等. HPLC 测定蔬菜、水果中氨基甲酸酯类农药残留量[J]. 沈阳化工学院学报, 2007, 21(2): 156-160.
- ZHANG Jing, YAN Shi, WANG Lei, et al. Measurements of carbamate pesticides residual quantity in vegetable and fruit by using HPLC[J]. *Journal of Shenyang of Chemical Technology*, 2007, 21(2): 156-160.
- [9] 张卓旻, 陈金泉, 张 兰. 固相萃取-高效液相色谱联用分析蔬菜中5种有机磷[J]. 分析测试技术与仪器, 2008, 14(2): 87-91.
- ZHANG Zhuo-min, CHEN Jin-quan, ZHANG Lan. Determination of five organophosphorous pesticides in vegetables by SPE-HPLC[J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2008, 14(2): 87-91.
- [10] 岳永德. 农药残留分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2004, 8: 18.
- YUE Yong-de. Analysis of pesticide residues[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2004, 8: 18.
- [11] 王 静, 金 芬, 邵 华, 等. 农药多残留检测样品前处理技术研究进展[J]. 农业质量标准, 2007, 1: 28-31.
- WANG Jing, JIN Feng, SHAO Hua, et al. Development of pre-treatment technology of multiresidue pesticides testing[J]. *Agricultural Quality and Standards*, 2007, 1: 28-31.
- [12] 张国华, 赖卫华, 金 晶, 等. 免疫亲和色谱的原理及其在食品安全检测中的应用[J]. 食品科学, 2007, 28(10): 577-581.
- ZHANG Guo-hua, LAI Wei-hua, JIN Jing, et al. Principles of immunoaffinity chromatography and its application in food safety monitoring[J]. *Food Science*, 2007, 28(10): 577-581.
- [13] 邵秀金, 刘曙照, 冯大和, 等. 免疫亲和色谱及在农药残留分析中的应用[J]. 农药学报, 2003, 5(4): 9-14.
- SHAO Xiu-jin, LIU Shu-zhao, FENG Da-he, et al. Immunoaffinity chromatography and its application in pesticide residue analysis[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2003, 5(4): 9-14.
- [14] 庄海宁. 免疫亲和色谱的原理及其在食品安全检测中的应用[J]. 中国食品添加剂, 2006(5): 154-158.
- ZHUANG Hai-ning. Principles of IAC and its application in food safety monitoring[J]. *China Food Additives*, 2006(5): 154-158.
- [15] Chuang J C, Vanemonb J M, et al. Development and application of immunoaffinity column chromatography for atrazine in complex sample media[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 583: 32-39.
- [16] Sánchez-Martínez M L, Aguilar-Caballeros M P, Eremin S A, et al. Determination of linear alkylbenzenesulfonates in water samples by immunoaffinity chromatography with fluorescence detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 553: 93-98.
- [17] Sanchez F G, Herrero A D, et al. Development and characterisation of an immunoaffinity chromatographic column for the on-line determination of pesticide triclopyr[J]. *Talanta*, 2007, 71: 1411-1416.
- [18] 刘曙照, 韦林洪, 徐维娜. 克百威的免疫亲和色谱分析研究[J]. 色谱, 2005, 23(2): 134-137.
- LIU Shu-zhao, WEI Lin-hong, XU Wei-na. Studies on immunoaffinity chromatography for carbofuran [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2005, 23(2): 134-137.
- [19] 韦林洪, 王 莲, 刘曙照. 稻米中三唑磷残留免疫亲和色谱-高效液相色谱分析[J]. 中国农业科学, 2006, 39(5): 941-946.
- WEI Lin-hong, WANG Lian, LIU Shu-zhao. Analysis of triazophos residue in rice by immunoaffinity chromatography-high performance liquid chromatography[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(5): 941-946.
- [20] 冯大和, 邵秀金, 韦林洪, 等. 免疫亲和色谱-高效液相色谱法测定土壤中氯磺隆残留[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1663-1666.
- FENG Da-he, SHAO Xiu-jin, WEI Lin-hong, et al. Determination of chlorsulfuron in soil by immunoaffinity chromatography-high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6): 1663-1666.
- [21] Ginkel L V. Immunoaffinity chromatography, its applicability and limitations in multi-residue analysis of anabolizing and doping agents[J]. *Chromatogr*, 1991, 564(2): 363-384.
- [22] 刘曙照, 冯大和, 邵秀金. 氯磺隆酶联免疫吸附分析技术研究[J]. 分析科学学报, 2000, 16(6): 461-465.
- LIU Shu-zhao, FENG Da-he, SHAO Xiu-jin. Studies on enzyme-linked immunosorbent assay of chlorsulfuron [J]. *Journal of Analytical Science*, 2000, 16(6): 461-465.
- [23] 刘曙照, 冯大和, 陈美娟, 等. 对克百威具高度特异性的免疫分析技术研究[J]. 分析科学学报, 2000, 16(5): 373-378.
- LIU Shu-zhao, FENG Da-he, CHEN Mei-juan, et al. Study on a highly specific enzyme linked immunosorbent assay for carbofuran [J]. *Journal of Analytical Science*, 2000, 16(5): 373-378.
- [24] 刘曙照, 王 莲, 韦林洪. 三唑磷的免疫分析技术研究[J]. 中国农业科学, 2005, 33(12): 1697-1700.
- LIU Shu-zhao, WANG Lian, WEI Lin-hong. Studies on the immunoassay for triazophos[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 33(12): 1697-1700.
- [25] Davis G C, Hein M B, Chapmar D A. Evaluation of immunosorbents for the analysis of small molecules, isolation and purification of cytokinins[J]. *Journal of Chromatography*, 1986, 366: 171-189.