

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20241111008

引用格式: 张耀海, 崔永亮, 彭怡霖, 等. 杂环类杀螨剂的免疫检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(5): 167-178.

ZHANG YH, CUI YL, PENG YL, *et al.* Research progress in immunoassay techniques of heterocyclic acaricides [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(5): 167-178. (in Chinese with English abstract).

杂环类杀螨剂的免疫检测技术研究进展

张耀海^{1,2,3*}, 崔永亮^{1,2,3}, 彭怡霖^{1,2,3}, 王成秋^{1,2,3}, 赵其阳^{1,2,3}, 陈爱华^{1,2,3},
何悦^{1,2,3}, 李晶^{1,2,3}

(1. 西南大学/中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 农业农村部柑橘类果品质量安全控制重点实验室, 重庆 400712; 3. 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712)

摘要: 目前, 在我国农业生产中杀螨剂的需求仅次于杀虫剂, 位列第二位。杀螨剂作为影响农产品安全的重要化学污染物, 其中以含杂环为代表的一类杀螨剂结构相对稳定、半衰期长、不易降解, 更易残留在食品表面或内部造成严重的食品安全问题, 开发经济有效的杂环类杀螨剂检测方法已成为目前的研究趋势, 对保障群众菜篮子安全、助力绿色生态农业、推进农业高质量发展具有重要意义。免疫分析方法以其快速简便、高效灵敏等特点被广泛应用于农药残留检测领域。本文从半抗原的合成、抗体的制备及其在农产品基质中的检测应用等方面综述了杂环类杀螨剂农药免疫分析方法的研究进展, 分析了免疫分析方法所面临的挑战和未来发展前景, 对杂环类杀螨剂残留检测研究具有一定的参考价值。

关键词: 农药残留; 质量安全; 半抗原; 免疫检测; 杂环类杀螨剂

Research progress in immunoassay techniques of heterocyclic acaricides

ZHANG Yao-Hai^{1,2,3*}, CUI Yong-Liang^{1,2,3}, PENG Yi-Lin^{1,2,3}, WANG Cheng-Qiu^{1,2,3},
ZHAO Qi-Yang^{1,2,3}, CHEN Ai-Hua^{1,2,3}, HE Yue^{1,2,3}, LI Jing^{1,2,3}

(1. Southwest University/Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China;
2. Key Laboratory of Quality and Safety Control of Citrus Fruits, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chongqing 400712, China; 3. National Citrus Engineering Technology Research Center, Chongqing 400712, China)

ABSTRACT: At present, the demand for acaricides in agricultural production in China ranks second only to insecticides. As an important chemical pollutant affecting the safety of agricultural products, acaricides, represented by heterocyclic compounds, have relatively stable structures, long half lives, are not easily degraded, and are more likely to remain on the surface or inside of food, causing serious food safety problems. The development of economically effective detection methods for heterocyclic acaricides has become a current research trend, which is of great significance for ensuring the safety of public vegetable baskets, promoting green ecological agriculture, and advancing high-quality agricultural development. Immunoassay methods are widely used in the field of pesticide residue detection due to their fast, simple, efficient, and sensitive characteristics. This paper reviewed the research

收稿日期: 2024-11-11

基金项目: 农业农村部现代农业(柑橘)产业技术体系建设专项(CARS-26)

第一作者/*通信作者: 张耀海(1977—), 男, 博士, 副研究员, 主要研究方向为农产品监测和产地溯源。E-mail: zyh26824@sina.com

progress of immunological analysis methods for heterocyclic acaricides pesticides from the aspects of synthesis of haptens, preparation of antibodies, and their detection applications in agricultural product matrices, analyzed the challenges and future development prospects of immunoassay methods, which have certain reference value for the detection of heterocyclic acaricides residues.

KEY WORDS: pesticide residue; quality safety; haptens; immunoassay; heterocyclic acaricide

0 引言

在农产品从生产到销售的过程当中,农药的施用无可避免,而农药的乱用或滥用是食品生产源头环节中容易出现安全问题的突出因素。植食性螨虫因具有形体微小、活动范围广、繁殖快、世代周期短、耐药性强等特点,是水果、蔬菜、花卉、茶叶等农业种植中的主要虫害。自1944年合成第一种农用杀螨剂以来,杀螨剂在农业种植中的应用变得普遍起来,成为现代农业防治害螨的主要手段。近几年,随着我国经作面积的逐渐增多,尤其是柑橘种植的快速扩张,导致螨类危害大规模爆发,使得杀螨剂的市场需求进一步扩大^[1]。根据中国农药信息网杀螨剂登记信息显示,我国已登记的现有杀螨剂可分为人工合成和天然产物两大类,而人工合成的杀螨剂中含杂环类占据绝大多数^[2]。杂环类杀螨剂是指结构中成环的原子除了碳原子外,还至少含有一个杂原子,最常见的杂原子是氮原子、硫原子、氧原子。杂环类杀螨剂因具有选择性高、活性高、作用机制独特、无交互抗性等特点被广泛应用于蔬菜、水果、谷物、茶叶中。

然而,以含杂环类为代表的杀螨剂基本结构稳定,半衰期长,不易降解,导致施用后易残留在食品表面或内部,所带来的食品安全问题一直备受关注。例如,杂环类杀螨剂中应用最广泛的啉虫脒可通过兴奋烟碱乙酰胆碱受体产生神经毒性,对哺乳动物具有较大威胁^[3];果皮中乙螨唑的残留对于人体的慢性风险值较大^[4];螺虫乙酯可抑制鱼类生长发育,主要效应器官是肝脏和睾丸^[5],对人体有潜在风险;唑螨酯作为线粒体活性的一种有效抑制剂可导致神经毒性,还可能与帕金森综合症有关^[6]。因此,创新发展科学、有效的农药残留检测技术势在必行,要通过研发出更高效更便利的农药杀螨剂检测技术助力农产品安全监督控制,防止农药杀螨剂滥用和乱用,实现农产品高质量发展。

农药残留检测方法多样,其中基于抗体与抗原特异性结合的免疫分析方法具有快速、高效、检测灵敏度高、特异性强、价格低廉以及高通量等优点,已被广泛应用于农药、兽药、重金属等物质的检测。免疫分析方法主要包括:酶联免疫分析法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)、化学发光酶联免疫分析法(chemiluminescent enzyme immunoassay, CLEIA)、免疫层析试纸条(immunochromatographic test strip, ITS)、荧光免疫分析法(fluoroimmunoassay, FIA)、免疫传

感器等。近年来,国内外科研人员在杂环类杀螨剂半抗原的合成、抗体的制备及应用这一领域做了大量的探索和研究,并取得了一定的进展。本文从半抗原的合成、抗体的制备及其在农产品基质中的检测应用等方面综述了杂环类杀螨剂农药免疫分析方法的研究进展,分析了免疫分析方法所面临的挑战和未来发展前景,以期对杂环类杀螨剂残留检测研究提供参考。

1 杂环类杀螨剂人工抗原和抗体的制备

杂环类杀螨剂属于小分子化合物,只有反应原性,缺乏免疫原性,无法直接诱导动物机体产生抗体,因此需要与牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)或钥孔血蓝蛋白(keyhole limpet hemocyanin, KLH)等大分子蛋白质偶联构成人工抗原,以此作为免疫原免疫动物使其产生特异性的抗体。其中BSA因其溶解性好容易与半抗原偶联、性质稳定不易变性、价格便宜等特点被广泛应用于免疫抗原制备。然而,并不是所有的小分子都可以与蛋白等大分子直接偶联获得人工抗原,这就需要先在分子上引入能够与蛋白偶联的活性基团制备出半抗原。人工抗原制备的关键在于半抗原的设计,在尽量保留目标小分子特征结构的原则上对不同分子结构进行化学改造,使其获得活性基团后可与载体蛋白进行偶联。抗体则主要包括多克隆抗体(polyclonal antibody, pAb)、单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)和基因工程抗体等。基因工程抗体中的纳米抗体(nanobody, Nb)是羊驼外周血液中存在的一种天然缺失轻链的单链抗体,是自然存在的能够与抗原结合的最小片段,直径和分子量均小于一般抗体,具有表达效率高、便于纯化等优势。

目前,已制备出抗体的杂环类杀螨剂包括氟啉胺、啉虫脒、乙螨唑、虫螨腈、哒螨灵、啶螨醚、螺虫乙酯、螺螨酯、噻螨酮、噻虫胺、噻嗪酮、三唑锡、二嗪农、四螨嗪、啶硫磷、伏杀硫磷以及三唑磷等。而唑螨酯、螺甲螨酯、腈吡螨酯、乙唑螨腈等杂环类杀螨剂尚未有半抗原、抗体制备的报道,表1列出了杂环类杀螨剂半抗原设计现状。

杂环结构多是杀螨剂的特征结构,在半抗原设计时应最大程度的保留。LIU等^[7]设计的乙螨唑半抗原在远离特征结构处有较长的连接臂,能避免特征结构被蛋白覆盖,免疫小鼠后筛选出一株分泌抗乙螨唑单克隆抗体杂交瘤细胞株,已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生

物中心。付辉等^[8]在乙螨唑的苯醚结构上衍生出带有羧基连接臂, 合成的乙螨唑半抗原既能最大程度保留乙螨唑的特征结构, 增强了乙螨唑半抗原的免疫原性, 但未制备出抗体。虫螨腈的芳基吡咯是其特征结构, 若将虫螨腈吡咯环上的腈基还原成氨基, 进而与载体蛋白偶联, 修饰位点与虫螨腈分子的特征结构距离较近, 不利于虫螨腈分子特征结构的暴露, 何方洋等^[9]、ITO 等^[10]为最大程度保留虫螨腈特征结构的半抗原, 在虫螨腈吡咯环上的乙氧基甲基引入羧基活性基团, 再通过活性酯法与载体蛋白偶联后, 可突出虫螨腈本身独有的芳基吡咯结构, 最后制得鼠源单克隆抗体。王弘等^[38]构建了一种噬菌体展示纳米抗体文库, 并从噬菌体展示纳米抗体文库中筛选得到一种针对啶硫磷

农药的纳米抗体 VHH 8F, 该抗体热稳定性强, 抗原结合活性高。徐振林等^[39]通过构建双峰驼免疫抗体文库, 结合噬菌体展示技术, 对抗体文库进行亲和淘筛, 获得一种抗二嗪农特异性结合的纳米抗体。

综上, 杂环类杀螨剂合成半抗原的路径主要有: 通过设计水解、取代、氧化和其他反应在目标农药分子自身结构、代谢降解产物或带有目标农药分子特征结构的中间产物上衍生出适当的活性基团; 直接在由原料合成农药的过程中引入适合反应条件并带有活性基团的分子。同时, 要想制备出高特异性识别目标农药分子的抗体则在半抗原设计时要注意合理选择连接臂的长度及其衍生位置以保障农药特征结构最大限度地被免疫细胞识别。

表 1 杂环类杀螨剂半抗原设计现状
Table 1 Design status of haptens of heterocyclic acaricides

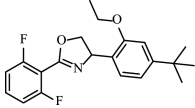
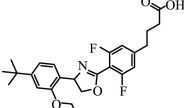
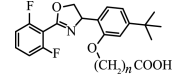
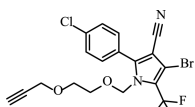
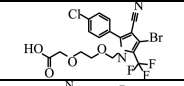
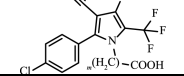
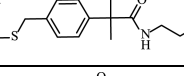
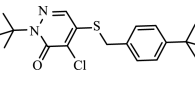
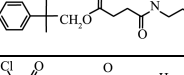
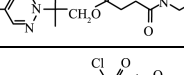
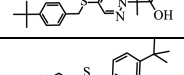
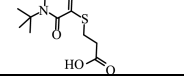
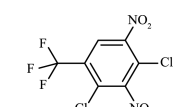
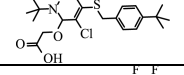
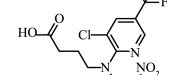
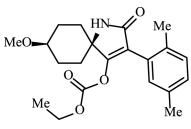
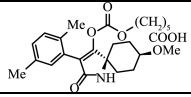
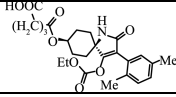
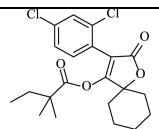
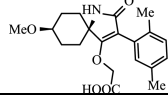
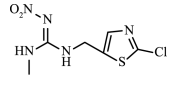
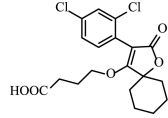
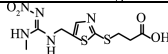
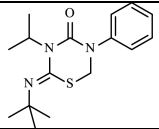
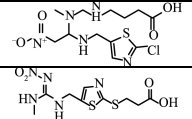
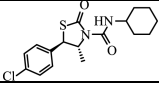
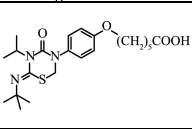
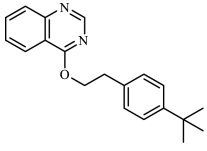
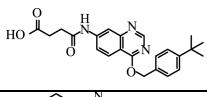
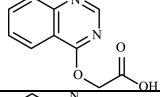
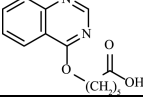
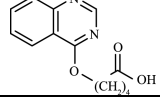
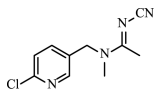
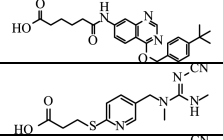
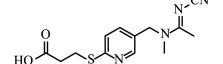
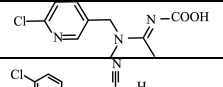
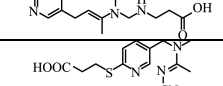
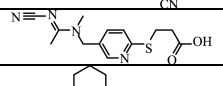
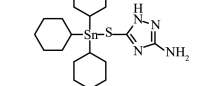
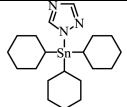
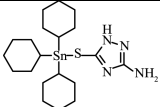
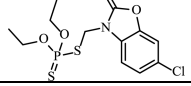
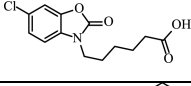
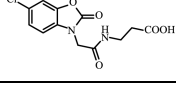
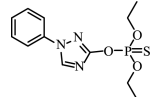
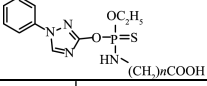
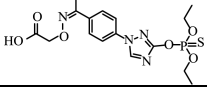
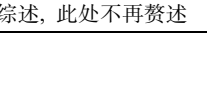


农药	结构	半抗原设计	参考文献
乙螨唑			[7]
			[8]
虫螨腈			[9]
			[10]
			[11]
哒螨灵			[11]
			[11]
			[12]
			[13]
氟啶胺			[14]
			[15]

表1(续)

农药	结构	半抗原设计	参考文献
螺虫乙酯		 	[16-17]
螺螨酯			[18]
噻虫胺		 	[19]
噻嗪酮			[20]
噻螨酮			[21-23]
啞螨醚		   	[24]
啞虫脒		     	[25]
三唑锡			[26]
伏杀硫磷		 	[27]
三唑磷		 	[28]
二嗪农			[29]
			[30]
			[31]
			[32]
			[33]
			[34]
			[35]
			[36]
			[37]

2 杂环类杀螨剂的免疫分析方法

免疫分析基于特异性抗原-抗体结合, 将抗体或抗原标记酶、发光物或其他物质, 达到检测样品中被测物的目的。免疫分析可以是非竞争性的, 也可以是竞争性的。竞争性免疫测定法通常用于检测只有一个抗原决定

簇的小分子化合物, 多用于小分子农药领域, 而非竞争性免疫测定法通常用于检测具有多个抗原表位的蛋白质或多糖等大分子化合物。目前, 杂环类杀螨剂的免疫分析方法主要包括 ELISA、CLEIA、ITS、FIA、免疫传感器等, 见表 2。表 3 为杂环类杀螨剂不同免疫检测方法的优缺点。

表 2 杂环类杀螨剂的免疫分析方法
Table 2 Immunoassays of heterocyclic acaricide

农药	免疫分析方法	抗体类型	样品基质	检测能力	参考
乙螨唑	ITS	mAb	柑橘、葡萄	icELISA 的 IC ₅₀ 为 4.04 ng/mL, ITS 的定性检出限为 10 ng/g	[7]
虫螨腈	ITS	mAb	茄子、结球甘蓝	检出限 1 mg/kg	[40]
	ELISA	-	苹果、桃子	IC ₅₀ 为 2.3 ng/g, IC ₂₀ ~IC ₈₀ 为 1~10 ng/g	[41]
哒螨灵	icELISA	mAb	水	IC ₅₀ 为 0.21 ng/mL	[13]
	ITS	mAb	-	-	[42]
	ITS	mAb	黄瓜、苹果	IC ₅₀ 为 2.36 ng/mL, 对黄瓜和苹果的检出限分别为 25 ng/g 和 50 ng/g	[12]
氟啶胺	icELISA	mAb	-	IC ₅₀ 为 0.1 μg/L	[14]
	icELISA	mAb	-	IC ₅₀ 为 2.68 ng/mL	[15]
螺虫乙酯	dcELISA、ITS	mAb、pAb	葡萄、葡萄酒	检出限为 1000 μg/L	[17,43]
	icELISA	mAb	河水、土壤、番茄和柑橘	IC ₅₀ 为 2.1 μg/L	[18]
噻虫胺	TRFIA	mAb	-	-	[44]
	ELISA、TIS	mAb	大白菜、水稻	ELISA 检出限为 1 μg/kg	[20,45]
	icELISA、ITS	重组完整抗体	-	icELISA 的 IC ₅₀ 为 4.62 ng/mL; ITS 的检出限为 2.5 ng/mL	[16]
	ELISA	mAb	稻田水、土壤、小麦、糙米、竞争性 ELISA 的 IC ₅₀ 为 3.83 ± 0.23 ng/mL, 非竞争性卷心菜、土豆、梨、柑橘	ELISA 的 IC ₅₀ 为 (0.45±0.02) ng/mL,	[46]
	dcELISA	mAb	黄瓜、番茄、苹果	IC ₅₀ 为 4.4 ng/mL	[21]
	ITS	mAb	河水、土壤、卷心菜、番茄、青菜	检出限为 8 ng/mL	[47]
	icELISA	pAb、mAb、scfv	河水、土壤、甘蓝、番茄、大米	pAb、mAb、scfv 建立方法的 IC ₅₀ 分别为 46.0、25.6 和 62.3 ng/mL	
	CLEIA	pAb	河水、土壤、大米、甘蓝、番茄	IC ₅₀ 为 14.8 ng/mL	[22]
	TRFIA、FLISA、FPIA	mAb	河水、土壤、大米、甘蓝、番茄	TRFIA、FLISA、FPIA 的 IC ₅₀ 分别为 2.07、12.5 和 87.3 ng/mL	
	噻嗪酮	ITS	mAb	-	-
噻螨酮	ITS	mAb	-	检出限为 0.1 mg/L	[25]
四螨嗪	ITS	mAb	-	-	[49]
啶螨醚	icELISA	pAb	苹果、梨	IC ₅₀ 为 96.97 ng/mL, 检出限为 8 ng/mL	[26]
	ITS	mAb	黄瓜、苹果	黄瓜和苹果样品中截止限值分别为 5 ng/mL 和 30 ng/mL	[50]
啶虫脒	dcELISA	mAb	黄瓜、青椒、番茄、苹果	IC ₅₀ 为 1 ng/mL	[27]
	ELISA	-	桃子、苹果、草莓、黄瓜、茄子、番茄	IC ₅₀ 为 0.6 ng/g, 检出限为 0.053 ng/g	[51]
	免疫传感器	mAb	草莓、卷心菜	检出限为 3.2 ng/L	[32]
	ITS	mAb	大米、白菜、烟草	对大米的检出限为 0.5 mg/kg, 对白菜、烟草的检出限为 1 mg/kg	[30]

表 2(续)

农药	免疫分析方法	抗体类型	样品基质	检测能力	参考
	TRFIA	mAb	烟草	灵敏度为 2 $\mu\text{g/L}$, 对烟草的检出限为 0.1 mg/kg	[52]
	ITS	mAb	大米、苹果、卷心菜、茶	肉眼定性阈值为 1 ng/mL, 定量检测的 IC_{50} 为 1.12 ng/mL	[53]
	icELISA	mAb	山茶花粉、荷花花粉、油菜花粉	IC_{50} 为 0.17 ng/mL	[54]
	免疫传感器	mAb	梨、苹果、番茄和黄瓜	检出限为 4.68 pg/mL	[55]
	IFEIA	mAb	土壤、梨、小麦、黄瓜	IC_{50} 为 0.04 $\mu\text{g/L}$	[56]
	icELISA	mAb	茶	IC_{50} 为 4.5 ng/mL	[57]
	CLEIA	mAb	中药	检出限为 4.77 pg/mL	[58]
	CLEIA	mAb	-	-	[59]
	免疫传感器	mAb	水	检出限为 6.51 ng/L	[60]
	CLEIA	mAb	大白菜、黄瓜	IC_{50} 为 10.24 ng/mL	[61]
	免疫传感器	mAb	苹果、番茄	检出限为 8.780 pg/mL	[62]
	免疫芯片	mAb	蜂蜜	检出限为 2.47 ng/mL	[63]
	ITS	mAb	蔬菜	线性范围为 50~1800 $\mu\text{g/kg}$	[64]
	ITS	mAb	茶	检出限为 0.05 mg/kg	[65]
	ITS	mAb	茶	检出限为 10 ng/mL	[66]
	icELISA、ITS	mAb	黄瓜、苹果	icELISA 的 IC_{50} 为 0.396 ng/mL; ITS 对黄瓜和苹果的检出限分别为 5 ng/g 和 10 ng/g	[67]
三唑锡	免疫传感器	mAb	-	-	[33]
啶硫磷	icELISA	Nb	-	IC_{50} 为 22.72 ng/mL	[38]
伏杀硫磷	icELISA	pAb	-	IC_{50} 为 2 mg/L	[34]
	icELISA	pAb	水	检出限为 0.40 $\mu\text{g/L}$	[68]
二嗪农	icELISA	mAb	生菜、米	icELISA 的 IC_{50} 为 4.0 ng/mL, dcELISA 的 IC_{50} 为 6.0 ng/mL	[69]
	icELISA	mAb	黄瓜、生菜、卷心菜	IC_{50} 为 0.58 ng/mL	[37]
三唑磷	三唑磷已有免疫分析相关综述, 此处不再赘述				[70-71]

注: mAb 表示单克隆抗体; pAb 表示多克隆抗体; scFv 表示单链抗体; 半抑制率(half maximal inhibitory concentration, IC_{50}); 间接竞争酶联免疫分析方法(indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay, icELISA); 直接竞争酶联免疫分析方法(direct competitive enzyme linked immunosorbent assay, dcELISA); 时间分辨荧光免疫分析方法(time resolved fluorescence immunoassay, TRFIA); 荧光偏振免疫分析方法(fluorescence polarization immunoassay, FPIA); 荧光酶免疫分析方法(fluorescent enzyme immunosorbent assay, FLISA); -表示未报道。

表 3 杂环类杀螨剂不同免疫检测方法的优缺点
Table 3 Advantages and disadvantages of different immunoassays for heterocyclic acaricide

免疫检测方法	优点	缺点
ELISA	特异性强、灵敏度高、检测结果准确、适合大批量样品的检测	操作烦琐耗时, 自动化程度低
化学发光法	特异性强、灵敏度高、线性范围宽	化学发光标记物和配套试剂成本相对较高
ITS	简单快捷、结果直观、适合现场大批量初筛	灵敏度和精确度普遍较低, 多用于定性检测
FIA	线性范围宽、重复性和稳定性好	极易受到环境因素的影响
免疫传感器	灵敏度高、无需复杂的检测设备、可实现便携化、结果呈现方式多样	稳定性和可靠性可能受到环境因素的影响

2.1 ELISA

ELISA 是将抗原抗体的特异反应与酶的高效催化作用结合在一起的免疫分析方法。农药小分子和偶联上农药小分子的包被原竞争性结合酶标记的抗体, 形成抗原抗体复合物后, 复合物上的酶催化底物, 产生有色产物, 再通过眼睛或仪器进行定量或定性检测, 该方法特异性强、灵敏度高。ELISA 分析常作为筛选新型抗体、鉴定抗体抑制率的通用方法。杂环类杀螨剂属于小分子, 主要采用的是 icELISA 和 dcELISA。

YOU 等^[46]开发了基于噬菌体展示肽的竞争性 ELISA 和非竞争性 ELISA 检测噻虫胺, 竞争性 ELISA 的方法 IC_{50} 为(3.83 \pm 0.23) ng/mL, 非竞争性 ELISA 的 IC_{50} 为(0.45 \pm 0.02) ng/mL, 分别对稻田水、土壤、小麦、糙米、卷心菜、土豆、梨、柑橘进行加标回收, 平均回收率分别为 73.8%~104.1%, 与高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)具有良好的相关性。FANG 等^[54]建立

了一种生物素化 icELISA 检测花粉中啮虫脒的方法,检出限为 0.17 ng/mL,平均回收率为 81.1%~108.0%,日内相对标准偏差为 4.8%~10.9%,检测结果与高效液相色谱-串联质谱法(high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, HPLC-MS/MS)具有一致性。魏新林等^[57]对 6 种茶叶(黑茶、黄茶、白茶、红茶、乌龙茶、绿茶)中的啮虫脒建立高通量 icELISA 检测体系,用铂包金纳米粒子(Au@Pt NPs)标记二抗实现信号放大,铂包金纳米粒子能催化氧化四甲基联苯胺(etramethylbenzidine, TMB)产生蓝色氧化产物,并在滴加终止液后于 450 nm 处产生紫外吸收峰实现定量检测,方法的 IC₅₀ 为 4.5 ng/mL,检出限为 0.17 ng/mL,加标回收率为 81.4%~120.5%,变异系数为 0.14%~15.58%。LEE 等^[69]基于抗二嗪农单克隆抗体,建立了间 icELISA, IC₅₀ 为 4.0 ng/mL,检出限为 0.7 ng/mL,利用酶示踪剂建立了 dcELISA, IC₅₀ 为 6.0 ng/mL,检出限为 0.9 ng/mL。

基于杂环类杀螨剂抗体制备的 ELISA 检测试剂盒被广泛使用,例如虫螨脒^[41]、噻虫胺^[20]、啮虫脒^[51,72-73]、二嗪农^[39,74]等,对其检出限、特异性进行了验证,灵敏度和准确度大多都能够满足国家农药残留限量标准要求,但有一定的适用范围,不能适用于复杂基质的样品检测。

2.2 CLEIA

CLEIA 是将化学发光信号与特异性的免疫分析法相结合,在抗体或抗原上标记化学发光剂,通过获取标记物进行化学发光反应时的化学发光强度实现定量检测。具有特异性强、灵敏度高、线性范围宽、易于实现自动化等优点,在检测灵敏度上优于 ELISA,现已成为农药检测的一种常用工具。

ZHANG 等^[58]利用十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide, CTAB)的疏水保护作用,通过表面活性剂辅助合成策略,合成了水稳定性显著提高的金属有机框架(metal organic frameworks, MOFs),合成的 CTAB-Co-MOFs 具有良好的催化活性,可显著增强鲁米诺体系的化学发光信号,将其作为化学发光探针建立了一种高灵敏度、高选择性的 CLEIA 法用于检测中药中啮虫脒,该方法检测的线性范围为 0.01~25 ng/mL,检出限为 4.77 pg/mL,中药中的加标回收率为 90.40%~113.33%。纳米酶是一类具有类似于天然酶催化活性的纳米材料,相比于天然酶其稳定性更好且易于储存和大批量生产,徐东辉等^[59]采用纳米酶 Au 作为天然酶的替代物,制备纳米酶 Au 的啮虫脒 CLEIA 试剂盒,该试剂盒的发光强度可达 7×10^4 RLU,发光时间持续可达 60 min,化学发光稳定平台期持续时间可达 35 min,可惜未进行实际样品的测定。ZHU 等^[61]建立了间接竞争 CLEIA,优化了影响 CLEIA 敏感性的条件,在最优条件下该方法的 IC₅₀ 为 10.24 ng/mL,在大白菜和黄瓜中的平均加标回收率为 82.7%~112.2%,变异系数<9.19%,与

HPLC 检测结果一致。

CLEIA 分析法在含杂环类杀螨剂抗体的应用中相对较少,但现有研究已将其与高分子材料、纳米材料等结合以改善催化反应条件提高检测性能,充分利用了化学发光技术优势为杂环类杀螨剂残留检测开辟新的途径。

2.3 ITS

ITS 以膜为固相,基于吸水垫的毛细管虹吸效应将抗原抗体特异性识别应用于试纸条上的免疫技术,也称为横向流动免疫分析(lateral flow immunoassays, LFIA)。ITS 是杂环类杀螨剂免疫分析方法中应用最广泛的,与 ELISA 相比,ITS 检测简单、快速、灵敏、廉价,可在 5~10 min 内得到结果,是现场即时筛查的一种理想手段。

CEVALLOS-CEDENO 等^[17]基于抗螺虫乙酯单克隆抗体建立了 dcELISA,对葡萄、葡萄汁和葡萄酒基质进行加标回收实验,并且该课题组还以此建立了螺虫乙酯胶体金免疫层析法^[43],对葡萄酒样品中螺虫乙酯及其代谢物残留进行半定量测定,其可视化检出限为 1000 μg/L,满足欧洲对葡萄酒中螺虫乙酯残留的半定量快速分析的要求。LI 等^[47]基于制备的抗噻虫胺单克隆抗体建立了 TIS,在最佳条件下,该抗体 ELISA 的 IC₅₀ 和检出限分别为 25.6 ng/mL 和 3.8 ng/mL,胶体金单抗探针的可视化检出限为 8 ng/mL,肉眼可在 10 min 内判断结果,对河水、土壤、卷心菜、番茄、青菜的 ELISA 加标回收率为 78.0%~114.5%。LIU 等^[50]基于抗啮虫脒单克隆抗体研发了 ITS,对啮虫脒的检出限为 1 ng/mL,黄瓜和苹果样品中的检出限分别为 5 ng/mL 和 30 ng/mL,检测时间只需 5 min。LIU 等^[53]建立了一种基于量子点(quantum dots, QDs)的 ITS 检测方法,用于农业样品中啮虫脒的定性和定量检测,采用 QDs-mAb 偶联探针建立竞争,对啮虫脒的肉眼定性阈值为 1 ng/mL,定量检测的 IC₅₀ 为 1.12 ng/mL,对大米、苹果、卷心菜、茶的平均加标回收率为 78.38%~126.97%,在盲茶样品的检测中, QDs-ITS 与超高效液相色谱-串联质谱法的检测结果具有较高的相关性。WU 等^[64]通过对比不同抗原抗体组合并采用最佳组合开发了 8 min 的 QDs-ITS,对蔬菜加标的平均回收率为 75%~117%,假阳性率<5%,假阴性率为 0%,该方法的线性范围为 50~1800 μg/kg,符合中国、欧盟和美国的啮虫脒检测标准。姚蕾璐^[67]建立了检测果蔬中啮虫脒的 ITS,黄瓜和苹果中啮虫脒的检出限分别为 5 ng/g 和 10 ng/g。

免疫试纸条作为杂环类杀螨剂抗体应用最广泛的方法,在水果、蔬菜、茶叶等农产品的现场检测中发挥了极大的作用。为提高免疫试纸条的灵敏度和稳定性,近几年的研究方法常将免疫试纸条与新型材料,如量子点、纳米颗粒、荧光微球、高分子材料等相结合,或与传感器、化学发光、荧光免疫检测等不同检测体系相组合进行应用。

2.4 FIA

FIA 是将荧光的敏感可测性与抗原抗体免疫反应的高特异性有机结合的方法。FIA 可以分为 TRFIA、FPIA、FLISA。

王秀国等^[44]开发了一种测试噻虫胺的 TRFIA 并制成试纸条,样品扩散速度快,可大大提高检测灵敏度和检测效率。李明^[22]建立了检测噻虫胺的 TRFIA,噻虫胺和噻虫啉同时检测的量子点 FLISA 和噻虫胺 FPIA,3 种方法的 IC₅₀ 分别为 2.07、12.5 和 87.3 ng/mL,结果表明:TRFIA 法在灵敏度方面得到了显著提高,属于高灵敏检测方法;FLISA 法可同时检测噻虫胺和噻虫啉进行残留定性定量检测;FPIA 法无需分离洗涤步骤,在检测时间、操作步骤、示踪物稳定性方面显示出明显的优势。陈黎等^[52]基于此前制备的抗噻虫胺单克隆抗体建立了检测噻虫胺的 TRFIA,并制成试纸条,检测灵敏度为 2 μg/L,对烟草中噻虫胺的检出限为 0.1 mg/kg。

FIA 还可以根据抗原抗体反应是否需要分离分为均相荧光免疫分析、非均相荧光免疫分析。LI 等^[56]以上转化纳米颗粒(UCNPs)偶联的单克隆抗体为荧光源,金纳米颗粒(AuNPs)偶联的抗原为荧光开关试剂,噻虫胺为荧光开启试剂,建立了检测噻虫胺的非辐射能量转换的内过滤效应均相免疫测定方法(IFEIA),该单抗在 icELISA 中 IC₅₀ 为 0.15 μg/L,该方法的灵敏度在此基础上提高 3.75 倍为 0.04 μg/L,检测范围为 0.002~0.58 μg/L,对土壤、梨、小麦、黄瓜加标得平均回收率为 75.1%~104.7%。

FIA 作为一类高灵敏度的检测方法可实现精准检测,通过在标记物、标记方法及应用上不断优化,如应用发光寿命长的上转化纳米颗粒、强发光的量子点以及免疫磁分离荧光检测法,以应对多样化的检测需求。

2.5 免疫传感器

免疫传感器是一种将免疫检测技术和传感技术相结合的免疫分析技术,免疫传感器基于抗体的敏感和特异性作为传感元件,再通过合适的转导机制将识别作用转换为可读的信号,从而达到识别和捕获目标农药的目的。借助传感器信号放大的作用,免疫分析的灵敏度和特异性也随之提高。免疫传感器正向着便携化、自动化、省时化、可重复使用以及实时在线检测的方向发展。

XU 等^[32]开发了一种基于半抗原接枝程序探针(half antigen grafting program probe, HGPP)作为共识别元件的高效竞争性电化学免疫传感器方法,样品中的噻虫胺与 HGPP 通过特异性识别与电极上捕获的抗体相结合实现间接检测,方法检出限为 3.2 ng/L,在草莓、卷心菜中的平均回收率为 93.7%~104.3%,相对标准偏差为 1.89%~4.66%。提高灵敏度一直是免疫传感器研究的热点,BAI 等^[55]研究开发了一种基于 Bi 半金属/沸石咪唑酸骨架混合材料的免

疫层析条带(Bi semimetal/zeolitic imidazolate frameworks hybrid material-immunochromatographic test strip, Bi/ZIF HM-ITS)传感器,用于噻虫胺的敏感检测。Bi/ZIF HM 不仅具有优越的色强、与单克隆抗体的强亲和力和良好的生物相容性,而且作为信号标记,在噻虫胺的残留检测中表现突出。Bi/ZIF HM-ITS 传感器的检出限为 4.68 pg/mL,线性范围为 0.01~6 ng/mL,比传统金纳米颗粒型 ITS (0.457 ng/mL)低 98 倍,在梨、苹果、番茄和黄瓜样品中的加样回收率为 80.3%~118.5%,相对标准偏差小于 3.67%。BAI 等^[62]又开发 Bi₂Se₃ 微粒子免疫层析条带 (Bi₂Se₃ microparticles-immunochromatographic test strip, BS MPs-ITS)传感器,方法检出限为 8.78 pg/mL,比传统金纳米颗粒型 ITS (0.54 ng/mL)低约 62 倍,在苹果和番茄样品中平均回收率为 83.823%~99.223%,相对标准偏差和小于 1.7%。SONG 等^[60]基于时间分辨效应和 icELISA 原理,研制了一种用于对噻虫胺和氟虫腈现场快速同时检测的双荧光光纤生物传感器,用两种半抗原蛋白偶联物修饰的光纤可作为一种双功能生物探针,靶标存在时,相应抗体的结合位点被占据,连接探针表面的抗体减少,导致荧光信号减弱,最后通过分别测量 568 nm 和 702 nm(发射波长)的荧光信号来确定噻虫胺和氟虫腈的浓度;噻虫胺和氟虫腈的线性反应范围分别为 14.2~225.4 ng/L 和 25.1~162.8 ng/L,检出限分别为 6.51 ng/L 和 17.8 ng/L,可对 3 种环境样品中噻虫胺和氟虫腈同时检测,加样回收率为 90%~128%。孟东等^[63]建立了可视化微阵列蛋白芯片法,可同时检测蜂蜜中多菌灵、噻虫胺和蝇毒磷 3 种农药残留,该方法对噻虫胺的定量检测范围为 0.3~4.8 ng/mL,检出限为 2.47 ng/mL。

近年来,在免疫传感技术的基础上,研究者进行了拓展延伸,各种免疫芯片法(immunochip)发展迅速。可视化免疫芯片可同时检测多种药物及有害物残留,具有可视化、快速、高灵敏度、无需复杂的检测设备、性价比高等优点,在农药残留的现场快速检测方面有较好发展前景。

3 结束语

免疫分析方法在杂环类杀螨剂残留检测领域发挥着重要的作用,且正朝着更高效、灵敏、便捷的方向发展,但在发展过程中仍存在诸多挑战。目前,已经报道了部分杂环类杀螨剂的免疫检测方法,但是还有一些杂环类杀螨剂半抗原难以合成,无法制备出抗体。已制备出的抗体主要以单克隆抗体和多克隆抗体为主,仅有部分单链抗体以及重组抗体。单克隆抗体和多克隆抗体制备方法存在对动物不友好,抗体稳定性差,灵敏度欠佳,批次之间差异大等问题。而基因工程抗体具有分子量小、稳定性强、批次间差异小、免疫原性低、可塑性强、成本低等优点,是当前的研究热点,必将在农药小分子的抗体制备和免疫分析方面获得广泛应用和深入研究。

在杂环类杀螨剂的免疫分析方法中 ELISA 与 ITS 被广泛应用。ELISA 作为免疫分析方法中基础通用的方法,存在灵敏度不够高、过程耗时、易受基质干扰、检测目标单一等缺点;ITS 是现场检测的一种常用手段,但检测灵敏度有限、无法精确界定和量化、仅适用于对样品的初筛,在复杂的基质中易受干扰;此外,ELISA 法与 ITS 法在实际操作中还易出现假阳性。未来的研究方向应着重于:设计更贴近目标结构的半抗原,优化抗体筛选方法;开发更灵敏、更稳定的酶标记;设计多残留免疫层析检测系统,助力实现 ITS 免疫定量分析;创新多信号的识别体系,解决单信号偶然误差所导致假阳性/阴性结果的问题;结合智能设备和 5G 网络进一步提高试纸条的识别和数据分析性能。

近年来, CLEIA、FIA 和免疫传感器发展迅速,较好地弥补了传统免疫分析方法存在的灵敏度差和定量困难等问题,但是也存在一些不足,如化学发光法稳定性差、易受外界环境因素干扰等,未来的研究方向应着重于:开发新型化学增强剂、发光剂和催化剂、优化化学发光液的稳定性;探索开发多通道检测化学发光试剂盒;开发便携式设备,联合其他技术实现现场多残留分析或自动化检测等。

FIA 的标记材料信号强度不足、稳定性差、易受样品自带颜色的干扰、少数荧光染液具有毒性等,未来的研究方向应着重于:开发新型成本低廉、无污染的标记材料;改进标记技术,促进 FIA 多组分检测发展;实现荧光检测仪器智能化便携化发展等。

免疫传感器稳定性和重现性较差,背景干扰大,程序复杂,读取数据时需借助大型仪器等,未来研究方向应着重于:简化分析程序和时间;结合适配体等新技术取代传统抗原抗体特异性结合的模式;结合纳米材料、量子点等提高传感器灵敏度和准确度;开发新型经济环保、吸附能力强、可重复利用的纳米材料应用于传感器中;将智能手机、3D 打印技术、“云”计算、数据储存等技术集成到免疫传感器中等。

相信在不久的将来,更为准确、快速、高效、操作简便且价格低廉的杂环类杀螨剂免疫检测方法会被开发出来。

参考文献

- [1] 滚烫的杀螨剂市场:下一个百亿增量新蓝海?[Z]. 2020. Hot mite killing agent market: The next billion dollar increment new blue ocean? [Z]. 2020.
- [2] 杨旭,孙洪扬,高一星,等.杀螨剂的现状及研究进展[J].现代农药,2020,19(3):7-15. YANG X, SUN HY, GAO YX, *et al.* Status and research progress of acaricides [J]. *Modern Agrochemicals*, 2020, 19(3): 7-15.
- [3] KIMURA-KURODA J, KOMUTA Y, KURODA Y, *et al.* Nicotine-like effects of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and imidacloprid on cerebellar neurons from neonatal rats [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e32432.
- [4] SUN DL, PANG JX, FANG Q, *et al.* Stereoselective toxicity of etoxazole to MCF-7 cells and its dissipation behavior in citrus and soil [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016, 23(24): 24731-24738.
- [5] ZHANG J, QIAN L, WANG C, *et al.* Dysregulation of endocrine disruption, apoptosis and the transgenerational toxicity induced by spirotetramat [J]. *Chemosphere*, 2020, 240: 124900.
- [6] SHERER TB, RICHARDSON JR, TESTA CM, *et al.* Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: Relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease [J]. *Journal of Neurochemistry*, 2007, 100(6): 1469-1479.
- [7] LIU J, XU XX, WU AH, *et al.* Immunochromatographic assay for the rapid and sensitive detection of etoxazole in orange and grape samples [J]. *LWT-Food Science and Technology*, 2022, 163: 113519.
- [8] 付辉,杨星星,李细清,等.一种乙螨唑半抗原及其合成方法和应用:中国,CN109970674A[P].2019-07-05. FU H, YANG XX, LI XQ, *et al.* A semi antigen of etoxazole and its synthesis method and application: China, CN109970674A [P]. 2019-07-05.
- [9] 何方洋,万宇平,崔廷婷,等.溴虫腈半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用:中国,CN111943881A[P].2020-11-17. HE FY, WAN YP, CUI YT, *et al.* Chlorfenapyr hapten, artificial antigen, and antibody, as well as their preparation methods and applications: China, CN111943881A [P]. 2020-11-17.
- [10] ITO S, HAYASHI M, OMOTA N, *et al.* Antibody specific to chlorfenapyr hapten for immunoassay: Japan, JP2000281645A [P]. 2000-10-10.
- [11] MIYAMOTO T, KUWAHARA T, YAMAMOTO I. A rational approach to hapten selection for immunoassay of the miticide pyridaben by computational chemistry [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2001, 69(3): 174-182.
- [12] LIU J, XU XX, WU AH, *et al.* Development of a gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay for the detection of pyridaben [J]. *Microchemical Journal*, 2021, 170: 106762.
- [13] 盛相国.一种哒螨灵单克隆抗体及其应用:中国,CN112778420A[P].2021-05-11. SHENG XG. A monoclonal antibody against pyridaben and its application: China, CN112778420A [P]. 2021-05-11.
- [14] 崔廷婷,冯才伟,何方洋,等.氟啶脲半抗原、人工抗原和抗体及其制备方法和应用:中国,CN110498766A[P].2019-11-26. CUI YT, FENG CW, HE FY, *et al.* Fluazinam hapten, artificial antigen, antibody and their preparation methods and applications: China, CN110498766A [P]. 2019-11-26.
- [15] 胥传来,刘杰,匡华,等.一株分泌氟啶脲单克隆抗体的杂交瘤细胞株及其应用:中国,CN113502273A[P].2021-10-15. XU CL, LIU J, KUANG H, *et al.* A hybridoma cell line secreting monoclonal antibodies against fluazinam and its application: China, CN113502273A [P]. 2021-10-15.
- [16] GUO YR, CHANG YY, ZHAO Y, *et al.* Preparation of anti-clothianidin antibody for monitoring contamination in environment and agricultural or

- food product: WO2021218053A1 [P]. 2021-11-04.
- [17] CEVALLOS-CEDENO RE, AGULLO C, ABAD-SOMOVILLA A, *et al.* Hapten design and antibody generation for immunoanalysis of spirotetramat and spirotetramatenol [J]. ACS Omega, 2018, 3(9): 11950–11957.
- [18] 赵静, 赵其阳, 张耀海, 等. 螺虫乙酯单克隆抗体的制备及酶联免疫分析方法的建立[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(10): 247–254.
ZHAO, ZHAO QY, ZHANG YH, *et al.* Preparation of monoclonal antibody-based immunoassay for the detection of spirotetramat [J]. Food and Fermentation Industries, 2022, 48(10): 247–254.
- [19] 崔永亮, 金雅琪, 彭怡霖, 等. 螺螨酯半抗原、抗原和抗体及其制备方法与应用: 中国, CN114560834A[P]. 2022-05-31.
CUI YL, JIN YQ, PENG YL, *et al.* Spirodicofen hapten, antigen, antibody and their preparation methods and applications: China, CN112595850A [P]. 2021-04-02.
- [20] 万宇平, 何方洋, 吴小胜, 等. 一种噻虫胺人工抗原在酶联免疫试剂盒中的应用: 中国, CN112595850A[P]. 2021-04-02.
WAN YP, HE FY, WU XS, *et al.* Application of clothianidin artificial antigen in enzyme linked immunoassay kit: China, CN112595850A [P]. 2021-04-02.
- [21] UCHIGASHIMA M, WATANABE E, ITO S, *et al.* Development of immunoassay based on monoclonal antibody reacted with the neonicotinoid insecticides clothianidin and dinotefuran [J]. Sensors, 2012, 12: 15858–15872.
- [22] 李明. 噻虫胺抗体制备及免疫分析方法研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
LI M. The preparation of Antibodies and development of immunoassays for clothianidin [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [23] 匡华, 叶丽雅, 胥传来, 等. 一株分泌噻虫胺单克隆抗体的杂交瘤细胞株 J6 及其应用: 中国, CN108948188A[P]. 2018-12-07.
KUNAG H, YE LY, XU CL, *et al.* A hybridoma cell line J6 secreting monoclonal antibodies against clothianidin and its application: China, CN108948188A [P]. 2018-12-07.
- [24] ITO S, Hotta Y, NAGASAKI H, *et al.* Hapten containing buprofezin conjugate, antibody and immunoassay: Japan, JP2001039959A [P]. 2001-02-13.
- [25] 李雪, 许晶冰, 杨星星, 等. 噻嗪酮半抗原及其制备方法、噻嗪酮抗原、抗体及其应用: 中国, CN111978271A[P]. 2020-11-24.
LI X, XU JB, YANG XX, *et al.* Hexythiazox hapten and its preparation method, hexythiazox antigen, antibody and its application: China, CN111978271A [P]. 2020-11-24.
- [26] LEE JK, KIM YJ, LEE EY, *et al.* Development of an ELISA for the detection of fenazaquin residues in fruits [J]. Agricultural Chemistry and Biotechnology, 2005, 48(1): 16–25.
- [27] WANATABE S, ITO S, KAMATA Y, *et al.* Development of competitive enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) based on monoclonal antibodies for chloronicotinoid insecticides imidacloprid and acetamiprid [J]. Analytica Chimica Acta, 2001, 427(2): 211–219.
- [28] 李广领, 陈锡岭, 王自良, 等. 杀虫剂噻虫脒人工抗原的合成与表征[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2010, 38(4): 18–22.
LI GL, CHEN XL, WANG ZL, *et al.* Synthesis and characterization of artificial antigen of acetamiprid [J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology, 2010, 38(4): 18–22.
- [29] 胥传来, 姚蕾琚, 匡华, 等. 一株噻虫啉、啉虫脒单克隆抗体杂交瘤细胞株 GW 及其应用: 中国, CN105754955A[P]. 2016-07-13.
XU CL, YAO LJ, KUANG H, *et al.* A hybridoma cell line GW with monoclonal antibodies against thiacloprid and acetamiprid and its application: China, CN105754955A [P]. 2016-07-13.
- [30] 扶胜, 杨梅, 袁学伟, 等. 一种啉虫脒半抗原、抗原及其胶体金检测试纸条: 中国, CN110045114A[P]. 2019-07-23.
FU S, YANG M, YUAN XW, *et al.* A test strip for detecting acetamiprid hapten, antigen, and colloidal gold: China, CN110045114A [P]. 2019-07-23.
- [31] 陈黎, 范子彦, 刘惠民, 等. 一种啉虫脒半抗原与抗原的制备方法及应用: 中国, CN109111394A[P]. 2019-01-01.
CHEN L, FAN ZY, LIU HM, *et al.* A preparation method and application of acetamiprid hapten and antigen: China, CN109111394A [P]. 2019-01-01.
- [32] XU XH, GUO YN, WANG L, *et al.* Hapten-grafted programmed probe as a corecognition element for a competitive immunosensor to detect acetamiprid residue in agricultural products [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(29): 7815–7821.
- [33] 王伟华, 韩占江, 梁鹏举, 等. 一种检测农药三唑锡的电化学免疫传感器及其制备方法: 中国, CN105116149A[P]. 2015-12-02.
WANG WH, HAN ZJ, LIANG PJ, *et al.* An electrochemical immunosensor for detecting pesticide azocyclotin and its preparation method: China, CN105116149A [P]. 2015-12-02.
- [34] ISSERT V, LAZARO R, LAMATY F, *et al.* Production of polyclonal antibodies towards the immunodetection of insecticide phosalone [J]. Amino Acids, 1999, 17(4): 377–389.
- [35] GUI WJ, JIN RY, CHEN ZL, *et al.* Hapten synthesis for enzyme-linked immunoassay of the insecticide triazophos [J]. Analytical Biochemistry, 2006, 357(1): 9–14.
- [36] 冯才伟, 何方洋, 黄健, 等. 三唑磷单克隆抗体制备以及酶联免疫试剂盒的研究[J]. 中国酿造, 2016, 35(6): 165–169.
FENG CW, HE FY, HUANG J, *et al.* Preparation of triazophos monoclonal antibodies and its ELISA kit research [J]. China Brewing, 2016, 35(6): 165–169.
- [37] WU HL, WANG BZ, WANG Y, *et al.* Monoclonal antibody-based icELISA for the screening of diazinon in vegetable samples [J]. Analytical Methods, 2021, 13(16): 1911–1918.
- [38] 王弘, 李家冬, 吴广培, 等. 一种识别啉硫磷农药的纳米抗体及酶联免疫分析方法: 中国, CN114702592A[P]. 2022-07-05.
WANG H, LI JD, WU GP, *et al.* A nano-antibody and enzyme-linked immunosorbent assay method for identifying quinalphos pesticides: China, CN114702592A [P]. 2022-07-05.
- [39] 徐振林, 黄丹彤, 何晓婷, 等. 一种检测二嗪农的纳米抗体及其应用:

- 中国, CN114409795A[P]. 2022-04-29.
- XU ZL, HUANG DT, HE XT, *et al.* A nano-antibody for detecting diazinon and its application: China, CN114409795A [P]. 2022-04-29.
- [40] 王兆芹, 万宇平, 贾芳芳, 等. 一种检测溴虫腈的试纸条及方法: 中国, CN111965359A[P]. 2020-11-20.
- WANG ZQ, WAN YP, JIA FF, *et al.* A colloidal gold detection device for detecting chlorfenapyr and its preparation method: China, CN111965359A [P]. 2020-11-20.
- [41] WATANABE E, BABA K, EUN H, *et al.* Evaluation of a commercial immunoassay for the detection of chlorfenapyr in agricultural samples by comparison with gas chromatography and mass spectrometric detection [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1074(1-2): 145–153.
- [42] 智军海, 封冰, 李丰勇. 一种用于检测哒螨灵的胶体金检测装置及其制备方法: 中国, CN115356478A[P]. 2022-11-18.
- ZHI JH, FENG B, LI FY. A colloidal gold detection device for detecting pyridaben and its preparation method: China, CN115356478A [P]. 2022-11-18.
- [43] CEVALLOS-CEDENO RE, AGULLO C, ABAD-FUENTES A, *et al.* Enzyme and lateral flow monoclonal antibody-based immunoassays to simultaneously determine spirotetramat and spirotetramat-enol in foodstuffs [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 1809.
- [44] 王秀国, 张晓, 郭庆. 一种测试噻虫胺的时间分辨荧光免疫层析试纸条: 中国, CN111308069A[P]. 2020-06-19.
- WANG XG, ZHANG X, GUO Q. A time-resolved fluorescent immunochromatographic test strip for testing clothianidin: China, CN111308069A [P]. 2020-06-19.
- [45] 王兆芹, 万宇平, 马玉华, 等. 一种检测噻虫胺的试纸条及其应用: 中国, CN112698026A[P]. 2021-04-23.
- WANG ZQ, WAN YP, MA YH, *et al.* A test strip for detecting clothianidin and its application: China, CN112698026A [P]. 2021-04-23.
- [46] YOU TY, DING Y, CHEN H, *et al.* Development of competitive and noncompetitive immunoassays for clothianidin with high sensitivity and specificity using phage-displayed peptides [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 425: 128011.
- [47] LI M, HUA XD, MA M, *et al.* Detecting clothianidin residues in environmental and agricultural samples using rapid, sensitive enzyme-linked immunosorbent assay and gold immunochromatographic assay [J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 499: 1–6.
- [48] 智军海, 封冰, 申屠献忠. 一种用于检测噻嗪酮的胶体金检测装置及其制备方法: 中国, CN115343470A[P]. 2022-11-15.
- ZHI JH, FENG B, SHEN TXZ. A colloidal gold detection device for detecting buprofezin and its preparation method: China, CN115343470A [P]. 2022-11-15.
- [49] 洪霞, 吴明慧. 一种快速检测水果中四螨嗪含量的方法: 中国, CN105572310A[P]. 2016-05-11.
- HONG X, WU MH. A rapid method for detecting the content of clofentezine in fruits: China, CN105572310A [P]. 2016-05-11.
- [50] LIU LQ, SURYOPRABOWO S, ZHENG QK, *et al.* Development of an immunochromatographic strip for detection of acetamiprid in cucumber and apple samples [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2017, 28(5): 767–778.
- [51] WATANABE E, MIYAKE S, BABA K, *et al.* Immunoassay for acetamiprid detection: Application to residue analysis and comparison with liquid chromatography [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386(5): 1441–1448.
- [52] 陈黎, 范子彦, 刘惠民, 等. 一种检测啶虫脒的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用: 中国, CN109061158A[P]. 2018-12-21.
- CHEN L, FAN ZY, LIU HM, *et al.* A time-resolved fluorescent immunochromatographic test strip for detecting acetamiprid and its preparation method and application: China, CN109061158A [P]. 2018-12-21.
- [53] LIU Y, ZHAO Y, ZHANG TY, *et al.* Quantum dots-based immunochromatographic strip for rapid and sensitive detection of acetamiprid in agricultural products [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2019, 7: 76.
- [54] FANG QK, ZU Q, HUA XD, *et al.* Quantitative determination of acetamiprid in pollen based on a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay [J]. *Molecules*, 2019, 24(7): 1265.
- [55] BAI F, BU T, LI RX, *et al.* Rose petals-like Bi semimetal embedded on the zeolitic imidazolate frameworks based-immunochromatographic strip to sensitively detect acetamiprid [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 423(Part B): 127202.
- [56] LI J, SUN WL, QIN YL, *et al.* Inner filter effect-based immunoassay for the detection of acetamiprid using upconversion nanoparticles and gold nanoparticles [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2021, 32(1): 740–753.
- [57] 魏新林, 丁然, 彭澜兰, 等. 一种适用于茶叶中啶虫脒残留高通量检测方法: 中国, CN113176405A[P]. 2021-07-27.
- WEI XL, DING R, PENG LL, *et al.* A high-throughput detection method for acetamiprid residues in tea leaves: China, CN113176405A [P]. 2021-07-27.
- [58] ZHANG LX, XIAN JX, XIANG XX, *et al.* Surfactant-assisted synthesis of water-stable cobalt-imidazole metal organic frameworks as signal probes for chemiluminescent immunoassay [J]. *Sensors Actuators, B*, 2022, 373: 132774.
- [59] 徐东辉, 陈鸽, 刘广洋, 等. 一种啶虫脒化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法和应用: 中国, CN114397441A[P]. 2022-04-26.
- XU DH, CHEN G, LIU GY, *et al.* A chemiluminescence immunoassay kit for acetamiprid and its preparation method and application: China, CN114397441A [P]. 2022-04-26.
- [60] SONG D, LIU JY, XU WJ, *et al.* On-site rapid and simultaneous detection of acetamiprid and fipronil using a dual-fluorescence lab-on-fiber biosensor [J]. *Microchimica Acta*, 2022, 189(6): 234.
- [61] ZHU ZX, SHI QY, WU JW, *et al.* Determination of acetamiprid residues in vegetables by indirect competitive chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. *Foods*, 2022, 11(16): 2507.

- [62] BAI F, BU T, ZHAO S, *et al.* Golf-shaped Bi₂Se₃ microparticles based-immunochromatographic strip for ultra sensitive detection of acetamiprid [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 433: 128810.
- [63] 孟东, 王波, 陈蕾, 等. 可视化微阵列蛋白芯片法同时检测蜂蜜中3种农药残留[J]. *食品安全质量检测学报*, 2021, 12(5): 1928–1935.
- MENG D, WANG B, CHEN L, *et al.* Simultaneous determination of 3 kinds of pesticide residues in honey by visual microarray protein chip method [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2021, 12(5): 1928–1935.
- [64] WU YX, GUO YM, YANG QQ, *et al.* The effects of different antigen-antibody pairs on the results of 20 min ELISA and 8 min chromatographic paper test for quantitative detection of acetamiprid in vegetables [J]. *Biosensors*, 2022, 12(9): 730.
- [65] 杨梅, 罗逢建, 陈宗懋, 等. 茶叶中吡虫啉与啶虫脒农药残留速测技术研究[J]. *中国茶叶*, 2018, 40(2): 31–35.
- YANG M, LUO FJ, CHEN ZM, *et al.* Study on rapid detection technology of imidacloprid and imidacloprid pesticide residues in tea [J]. *China Tea*, 2018, 40(2): 31–35.
- [66] 赵颖, 杨斌, 柳颖, 等. 啶虫脒金标免疫速测试纸条研制及其在茶叶中的应用[J]. *农药学报*, 2016, 18(3): 337–343.
- ZHAO Y, YANG B, LIU Y, *et al.* Development and application of gold immunostrip for the detection of acetamiprid residue in tea samples [J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 2016, 18(3): 337–343.
- [67] 姚蕾珺. 吡虫啉、啶虫脒、克百威及涕灭威的免疫快速检测[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
- YAO LJ. Immune rapid detection of imidacloprid, acetamiprid, carbofuran and aldicarb [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017.
- [68] BRUN EM, GARCES-GARCIA M, ESCUIN E, *et al.* Assessment of novel diazinon immunoassays for water analysis [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(4): 1115–1123.
- [69] LEE EK, KIM YJ, PARK WC, *et al.* Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assays for the detection of the organophosphorus insecticide diazinon [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 530(1): 143–153.
- [70] YANG FW, LI YX, REN FZ, *et al.* Toxicity, residue, degradation and detection methods of the insecticide triazophos [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2019, 17(4): 1769–1785.
- [71] 龚航. 基于单克隆抗体农药吡虫啉、三唑磷免疫层析方法研究[D]. 滁州: 安徽科技学院, 2018.
- GONG H. Monoclonal antibody based on lateral flow assay for imidacloprid and triazophos detection [D]. Chuzhou: Anhui Science and Technology University, 2018.
- [72] 范子彦, 陈黎, 鲁亚辉, 等. 一种检测啶虫脒的酶联免疫试剂盒及其应用: 中国, CN109061169A[P]. 2018-12-21.
- FAN ZY, CHEN L, LU YH, *et al.* An enzyme-linked immunosorbent assay kit for detecting acetamiprid and its application: China, CN109061169A [P]. 2018-12-21.
- [73] 吴民富, 李莎, 谢群, 等. 一种检测啶虫脒的双抗夹心 ELISA 试剂盒及其应用: 中国, CN113176403A[P]. 2021-07-27.
- WU MF, LI S, XIE Q, *et al.* A dual antibody sandwich ELISA kit for detecting acetamiprid and its application: China, CN113176403A [P]. 2021-07-27.
- [74] SULLIVAN JJ, GOH KS. Evaluation and validation of a commercial ELISA for diazinon in surface waters [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, 48(9): 4071–4078.

(责任编辑: 于梦娇 韩晓红)