

农药吡虫啉酶联免疫检测方法研究进展

谭桂玉¹, 陈俊玉^{2*}, 刘伟华¹, 何佳¹, 李燕¹, 胡志鑫¹

(1. 福建安欣睿捷生物科技有限公司, 福建福州 350003; 2. 东山出入境检验检疫局, 福建东山 363401)

摘要 对目前国内外应用于吡虫啉检测的酶联免疫检测方法进行综述, 论述了该方法建立过程中主要技术环节及其主要进展, 以及目前市场上吡虫啉农残酶联免疫检测试剂盒, 并展望该技术的应用前景。

关键词 吡虫啉; 酶联免疫检测; 抗原抗体

中图分类号 S482.3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)12-0017-03

Study Progress on Determination of Pesticide Imidacloprid Residue by Enzyme-linked Immunoassay

TAN Gui-yu¹, CHEN Jun-yu², LIU Wei-hua¹ et al (1. Fujian Antiorigin Biotechnology Co., Ltd., Fuzhou, Fujian 350003; 2. Dongshan Entry & Exit Inspection and Quarantine Bureau of P. R. C., Dongshan, Fujian 363401)

Abstract The researchs on detection of imidacloprid with enzyme-linked immune-sorbent assays (ELISA) used in China or foreign country were reviewed. The main technological steps in the process of the method establishment were introduced and their main progress was discussed. The current market of ELISA detection kits for imidacloprid pesticide residues was also mentioned. At the end of the present paper, the application of ELISA for the imidacloprid pesticide residues was prospected.

Key words Imidacloprid; ELISA; Antigen and antibody

吡虫啉(Imidacloprid)是一种含吡啶环的超高效内吸性杀虫剂, 1991年由德国Bayer公司在英国布莱顿作物保护会议上首次报道其功效。此后多年的应用表明, 吡虫啉能选择性抑制昆虫神经系统中的乙酰胆碱受体, 破坏昆虫中枢神经的正常转导, 造成害虫出现麻痹进而死亡^[1], 具有高效、低毒、广谱、残效期长、内吸性强的特点, 广泛应用于小麦、蔬菜、水稻、棉花等农作物。

虽然吡虫啉具有良好的杀虫效果, 但残留期较长。研究表明, 吡虫啉在酸性介质中非常稳定, 几乎不水解; 中性条件下水解速度类似于酸性条件, 90 d后样品仅降解了1.5%; 碱性条件下吡虫啉稳定性较酸性、中性条件差, 但仍相当稳定, pH 8时样品90 d降解了5.3%, pH 9时样品降解了20.0%^[2]。

吡虫啉的稳定性势必会引起农产品中的残留, 并对后续市场行为产生一系列不利影响, 因此, 吡虫啉的检测十分重要。目前, 吡虫啉的检测包括生物分析法^[3-4]、气相-质谱联用法^[5-6]、液相色谱法^[7-8]、液相-质谱联用法^[9-10]、酶联免疫检测法(ELISA)^[11-12]、免疫层析检测法^[13-14]等。其中, 酶联免疫检测法因其快速、高通量、灵敏度高、前处理较简便、成本低廉、对操作人员仪器要求较低等优点, 被广大检测工作者所接受。目前, 国内外都陆续设计研发了针对吡虫啉农药残留的酶联免疫检测方法。笔者就目前应用于吡虫啉的酶联免疫检测法研究进展进行综述。

1 半抗原设计

小分子酶联免疫检测方法研究的前提是设计合理的半抗原, 再利用半抗原与载体蛋白连接制备完全抗原。吡虫啉分子量为255.7, 为一种小分子, 其化学结构是通过碳链连接的咪唑环和吡啶环, 咪唑环上有一个—NO₂, 吡啶环上有一个—Cl。这些基团与载体蛋白的连接较困难, 需要对吡虫啉

分子先进行衍生。在前人的报道中, 有6种衍生方法(图1), 分别给吡虫啉分子衍生了易于与载体蛋白连接的一COOH(I^[15]、II^[15]、III^[16]、IV^[17]、V^[16])或是一NH₂(VI^[18])。其中, 半抗原I和II最早被设计并制备抗体, 因为利用半抗原II制备的抗体非常灵敏, 在后续研究中半抗原II被广泛应用。比较6个半抗原, 半抗原II从—Cl衍生简单碳链, 对吡虫啉的结构改动最小。这种衍生将咪唑环及其上的—NO₂展露在外, 更易激发免疫动物的应激反应, 产生灵敏度高的抗体。

2 抗体制备及酶免疫检测方法的建立

半抗原设计制备后, 即可进行完全抗原的合成, 并制备抗体。最初为吡虫啉制备的是多克隆抗体(pAb)。pAb制备较简单, 多为免疫动物的血清, 但其不同批次间差异较大。随着时间推移, 吡虫啉单克隆抗体(mAb)的报道逐渐增多, mAb性质单一稳定, 且具有无限使用的优势。利用这2种抗体, 直接竞争免疫测定(dc-ELISA)和间接竞争免疫测定(ic-ELISA)均有建立。从已有报道看, pAb和mAb之间、dc-ELISA和ic-ELISA之间在灵敏度方面并无明显差别。方法灵敏度的高低最终取决于半抗原设计及其所筛选到的抗体, 半抗原II所制备的抗体, 其灵敏度明显高于其他半抗原。Kim等^[19]利用半抗原II制备得到mAb, 分别建立了dc-ELISA和ic-ELISA, dc-ELISA的IC₅₀为0.3 μg/L, 检测限(LOD)达0.03 μg/L, 为所有报道中最灵敏的方法。Wang等^[20]、Zhang等^[21]也利用半抗原II制备抗体, 但制备的是pAb, 仅建立了ic-ELISA, 在LOD上与Kim等^[19]研究结果一致, 也为0.03 ng/mL, IC₅₀为1.2~3.0 ng/mL。在LOD一致的情况下, Wang等^[20]、Zhang等^[21]利用pAb所建立的ELISA, 比Kim等^[19]建立的方法检测范围更大。Lee等^[16]利用半抗原III和V制备抗体建立ic-ELISA, IC₅₀为17.3 ng/mL; Li等^[17]利用半抗原II、III和IV制备抗体建立ic-ELISA, IC₅₀为995.4 ng/mL; 马寅生等^[18]利用半抗原VI制备抗体建立ic-ELISA, IC₅₀为12.9 μg/kg, 在灵敏度上均没有半抗原II所建立

的方法理想。

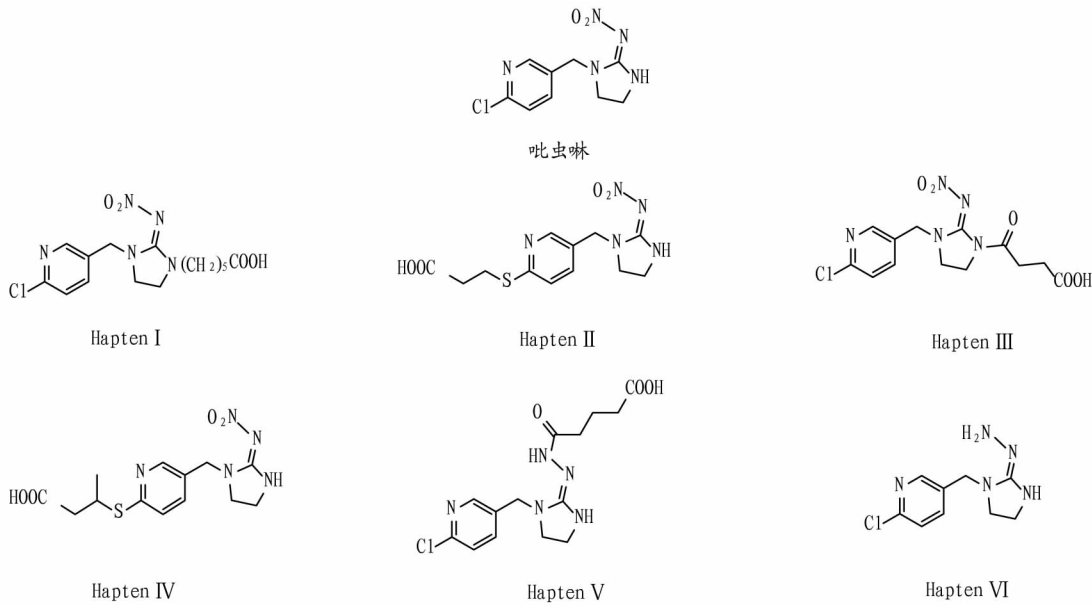


图1 吡虫啉及其半抗原
Fig.1 Imidacloprid and its haptens

3 ELISA 在吡虫啉农残检测中的应用

ELISA 方法建立后,将其应用于实际样品的检测。由于不同样品的基质干扰不同,针对不同样品,还需要进行提取方法的优化。目前已报道中,针对环境污染而进行的检测集中在水样和土样,针对食品残留,研发的是水果和蔬菜的检测,包括苹果、葡萄、黄瓜、青椒和番茄等。相比较于气相色谱检测、液相色谱检测的样品前处理方法,ELISA 的样品前处理方法较为简单。在流体样品(水、果汁、蜂蜜、葡萄藤汁液)的处理中,大都仅需要将样品进行稀释,即可进行吡虫啉

含量的测定^[19, 22-25]。固体样品的前处理则由于基质不同而比较多样:通常先将样品研浆,用甲醇或乙腈等有机溶剂对样品中的吡虫啉进行提取,通过离心或过滤去除样品残渣。而后,Wanatabe 等^[26]、Kim 等^[19]直接用 PBS 稀释提取液进行 ELISA 测定, Li 等^[15]、Lee 等^[16]、Watanabe 等^[27-28]、Xu 等^[29-30]、Wang 等^[20]、李广领等^[31]、刘剑锋等^[32]则将上清液通过液氮吹干、真空抽干的方式进行浓缩,最后以适量的水性溶液(PBS、水:甲醇)复溶进行 ELISA 测定。国内外吡虫啉酶联免疫检测方法见表 1。

表 1 国内外吡虫啉酶联免疫检测方法
Table 1 Enzyme-uniked immunoassay detormiation method in China and foreign country

编号 No.	半抗原 Hapten	Ab	ELISA	IC ₅₀	LOD	样品 Samples	公司 Company	参考文献 Reference
1	I 和 II	pAb	ic-ELISA	73~88 μg/L 35 μg/L	—	水、咖啡、樱桃和豌豆		[15]
2	Ⅲ和 V	pAb	ic-ELISA	17.3 ng/mL	—	水和苹果		[16]
3	Ⅱ	mAb	dc-ELISA	3.3 ng/mL	1.3 ng/mL	黄瓜、青椒、番茄和苹果		[26]
4	—	mAb	dc-ELISA	8 ng/mL	0.5 ng/g	苹果	Horiba Biotechnology Co., Ltd. Japan	[27]
5	—	mAb	dc-ELISA	8 ng/mL	0.5 ng/g	黄瓜、茄子、生菜、菠菜、青椒	Horiba Biotechnology Co., Ltd. Japan	[28]
6	Ⅱ	mAb	ic-ELISA	0.8 μg/L	0.10 μg/L	水和黄瓜		[19]
			dc-ELISA	0.3 μg/L	0.03 μg/L			
7	—	—	dc-ELISA	—	0.20 μg/L	葡萄藤汁液		[22]
8	Ⅱ	mAb	ic-ELISA	6.82 μg/L	—	夏威夷刺桐树		[29]
9	Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ	pAb	ic-ELISA	995.4 ng/mL	30 ng/mL	—		[17]
10	—	mAb	dc-ELISA	3.9 μg/L	0.22 μg/L	苹果汁、葡萄汁和橙汁		[23]
11	Ⅱ	mAb	ic-ELISA	6.5 ng/mL	20 ng/g	蜂蜜		[24]
12	Ⅱ	mAb	ic-ELISA	6.5 ng/mL	20 ng/g	苹果汁、葡萄汁、橙汁和桃汁		[32]
13	Ⅱ	pAb	ic-ELISA	1.2~3.0 ng/mL	0.03 ng/mL	水、土壤、包菜、黄瓜和苹果		[20]
14	Ⅱ	pAb	ic-ELISA	2.41 mg/L	0.025 mg/L	自来水		[21]
15	—	mAb	ic-ELISA	15.12 ng/mL	1.76 ng/mL	饮用水、地下水和地表水		[25]
16	Ⅱ	mAb	ic-ELISA	4.92 ng/mL	8 ng/mL	小麦籽粒		[30]
17	Ⅵ	mAb	dc-ELISA	12.9 μg/kg	4 μg/kg	蔬菜和水果		[18]
18	Ⅱ	mAb	ic-ELISA	5.1 ng/mL	0.2 ng/mL	稻谷		[31]

4 吡虫啉商业 ELISA 试剂盒

目前,市场上已经出现针对吡虫啉农残检测的 ELISA 试剂盒,Watanabe 等^[23, 27],采用的是 Horiba Biotechnology Co., Ltd. Japan 公司生产的 SmartAssay series 吡虫啉检测试剂盒。Byrne 等^[22]采用 EnviroLogix Inc., Portland 公司生产的 ELISA 试剂盒。马寅生等^[18]采用的是北京勤邦生物技术有限公司的试剂盒。这些试剂盒均采用 dc-ELISA 的形式,操作步骤少,因而操作人员的失误率减少,更易得到准确结果。此外,这些试剂盒对其应用的样品及其处理方法具有严格规定,如不在其规定范围内,则还需要根据样品先进行前处理方法的研发。

5 展望

2012 年,24 t 进口秘鲁冷冻草莓在山东蓬莱口岸进境检验时被发现吡虫啉残留严重超标,口岸部门依法对货物实施退运处理。2014 年,一批进口乌龙茶在青岛出入境检验检疫局抽样检验时被检出吡虫啉超标。近年来我国进出口农产品中吡虫啉残留超标事件,都说明吡虫啉农残问题的严重性与迫切性。随之,其农残检测方法也越来越受到重视。

酶联免疫检测方法是以前抗原和抗体的特异性结合为基础,利用光学检测系统建立起来的分析技术。其在样品前处理的简便性方面具有仪器检测所不具备的巨大优势,且其检测时间短,检测成本低,对操作人员要求较低,特别适用于大批量样品的检测,必将成为吡虫啉残留检测的一种趋势。

参考文献

- [1] CLAUDE A T, RAINBOW P, MICHÈLE R. Tolerance to environmental contaminants [M]. Boca Raton, FL: CRC Press, 2011.
- [2] 郑巍, 宣日成, 刘维屏. 新农吡虫啉水解动力学和机理研究 [J]. 环境科学学报, 1999, 19(1): 101-104.
- [3] RODRÍGUEZ Y A, CHRISTOFOLETTI C A, PEDRO J, et al. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid [J]. Chemosphere, 2015, 120: 438-442.
- [4] RUST M K, VETTER R, DENHOLM I, et al. Susceptibility of cat fleas (Siphonaptera: Pulicidae) to fipronil and imidacloprid using adult and larval bioassays [J]. J Med Entomol, 2014, 51(3): 638-643.
- [5] NAVALÓN A, GONZÁLEZ-CASADO A, EL-KHATTABI R, et al. Determination of imidacloprid in vegetable samples by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Analyst, 1997, 122 (6): 579-581.
- [6] MACDONALD L M, MEYER T R. Determination of imidacloprid and triadimefon in white pine by gas chromatography/mass spectrometry [J]. J Agric Food Chem, 1998, 46(8): 3133-3138.
- [7] BASKARAN S, KOOKANA R S, NAIDU R. Determination of the insecticide imidacloprid in water and soil using high-performance liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 1997, 787(1/2): 271-275.
- [8] FERNANDEZ-ALBA A R, VALVERDE A, AGÜERA A, et al. Determination of imidacloprid in vegetables by high-performance liquid chromatography with diode-array detection [J]. J Chromatogr A, 1996, 721(1): 97-105.
- [9] TIMOFEEVA I, SHISHOV A, KANASHINA D, et al. On-line in-syringe sugaring-out liquid-liquid extraction coupled with HPLC-MS/MS for the determination of pesticides in fruit and berry juices [J]. Talanta, 2017, 167: 761-767.
- [10] BONMATIN J M, MOINEAU I, CHARVET R, et al. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens [J]. Anal Chem, 2003, 75(9): 2027-2033.
- [11] GIROTTI S, MAIOLINI E, GHINI S, et al. Quantification of imidacloprid in honeybees: Development of a chemiluminescent ELISA [J]. Anal Lett,

2010, 43(3): 466-475.

- [12] EISENBACK B M, MULLINS D E, SALOM S M, et al. Evaluation of ELISA for imidacloprid detection in eastern hemlock (*Tsuga canadensis*) wood and needle tissues [J]. Pest Manag Sci, 2009, 65(2): 122-128.
- [13] 袁宝凤, 亢欢虎, 王丽, 等. 甲霜灵、吡虫啉胶体金免疫层析试纸与色谱仪检测蔬菜农药残留对比试验分析 [J]. 陕西农业科学, 2013, 59(5): 69-72.
- [14] 万积成, 林源, 王金花, 等. 液相色谱-串联质谱与胶体金法检测蔬菜中吡虫啉残留比较 [J]. 中国卫生检验杂志, 2009(10): 2258-2259.
- [15] LI K, LI Q X. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(8): 3378-3382.
- [16] LEE J K, AHN K C, PARK O S, et al. Development of an ELISA for the detection of the residues of the insecticide imidacloprid in agricultural and environmental samples [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(5): 2159-2167.
- [17] LI Z X, LIU Y L, SUN Y M, et al. Development of polyclonal antibody based enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of the agricultural insecticide imidacloprid: Food quality and safety [J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2007, 16(S1): 102-105.
- [18] 马寅生, 冯才伟, 贾芳芳, 等. 一种吡虫啉的酶联免疫快速检测试剂盒的研制 [J]. 山东畜牧兽医, 2013, 34(5): 6-8.
- [19] KIM H J, SHELVER W L, LI Q X. Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for the insecticide imidacloprid [J]. Anal Chim Acta, 2004, 509(1): 111-118.
- [20] WANG R M, WANG Z H, YANG H, et al. Highly sensitive and specific detection of neonicotinoid insecticide imidacloprid in environmental and food samples by a polyclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay [J]. J Sci Food Agric, 2012, 92(6): 1253-1260.
- [21] ZHANG L N, WANG Z F, WEN Y B, et al. Simultaneous detection of parathion and imidacloprid using broad-specificity polyclonal antibody in enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Anal Methods, 2014, 7(1): 205-210.
- [22] BYRNE F J, CASTLE S J, BI J L, et al. Application of competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of imidacloprid titers in xylem fluid extracted from grapevines [J]. J Econ Entomol, 2005, 98(1): 182-187.
- [23] WATANABE E, BABA K, EUN H, et al. Application of a commercial immunoassay to the direct determination of insecticide imidacloprid in fruit juices [J]. Food chemistry, 2007, 102(3): 745-750.
- [24] MA H X, XU Y J, LI Q X, et al. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for quantification of the insecticides imidacloprid and thiamethoxam in honey samples [J]. Food Addit Contam: Part A, 2009, 26(5): 713-718.
- [25] 彭方毅, 姜海蓉, 陈远翔, 等. 吡虫啉的酶联免疫吸附分析方法研究 [J]. 分析化学, 2010, 38(12): 1737-1741.
- [26] 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.
- [27] WATANABE E, EUN H, BABA K, et al. Evaluation and validation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the neonicotinoid insecticide imidacloprid in agricultural samples [J]. J Agric Food Chem, 2004, 52(10): 2756-2762.
- [28] WATANABE E, EUN H, BABA K, et al. Rapid and simple screening analysis for residual imidacloprid in agricultural products with commercially available ELISA [J]. Analytica chimica acta, 2004, 521(1): 45-51.
- [29] XU T, JACOBSEN C M, CHO I K, et al. Application of an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of imidacloprid in wiliwili tree, *Erythrina sandwicensis* O. Deg, for control of the wasp *Quadrastichus erythrinae* [J]. J Agric Food Chem, 2006, 54(22): 8444-8449.
- [30] XU T, WEI K Y, WANG J, et al. Quantitative analysis of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam in fruit juices by enzyme-linked immunosorbent assays [J]. J AOAC Int, 2010, 93(1): 12-18.
- [31] 李广领, 姜金庆, 陈锡岭, 等. 吡虫啉残留酶联免疫吸附检测方法的建立 [J]. 食品科学, 2011, 32(12): 228-233.
- [32] 刘剑锋, 刘志平, 王楷, 等. 稻谷中吡虫啉残留的免疫分析技术研究 [J]. 粮食科技与经济, 2015, 40(2): 36-40.