

吡虫啉人工半抗原合成方法的优化

钟艺煊^{1,3} 王彦红^{1,3} 杨成根^{1,2} 邹辉^{1,3} 顾建红^{1,3}
袁燕^{1,3} 卞建春^{1,3} 刘学忠^{1,3*}

(1. 扬州大学 兽医学院/教育部农业与农产品安全国际合作联合实验室,江苏 扬州 225009;
2. 扬州大学 化学化工学院,江苏 扬州 225009;
3. 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心,江苏 扬州 225009)

摘要 为获得纯度更高的吡虫啉人工半抗原,通过对常规半抗原合成的反应顺序、试剂等进行调整和优化,筛选出最适 3-巯基丙酸反应比例,采用薄层层析色谱法、质谱法和核磁共振法对合成的吡虫啉半抗原分子结构进行确证,进一步用合成的吡虫啉半抗原与载体蛋白偶联得到吡虫啉完全抗原并免疫小鼠,于三免和五免 7 天后断尾采血,采用间接 ELISA 法测定小鼠血清抗体效价。结果表明:1)吡虫啉、反应体系、有机相和水相的比移值分别为 0.55、0.23、0.50 和 0;2)质荷比为 326 的峰是吡虫啉半抗原的分子离子峰,且其余杂质离子峰的数量明显下降;3)核磁共振结果与吡虫啉半抗原相符,3-巯基丙酸氧化副产物峰下降;4)三免后,小鼠血清效价达到 1:12 800,五免后,小鼠血清效价可达 1:51 200。综上,此优化方法不仅保证 3-巯基丙酸完全反应,还减少 3-巯基丙酸氧化副产物和不必要杂质的产生,提供了一种操作简单、安全,同时可减少半抗原合成过程杂质产生的吡虫啉半抗原合成优化方法,为后续吡虫啉单克隆抗体的制备提供便利。

关键词 吡虫啉; 半抗原; 合成; 优化

中图分类号 S856 文章编号 1007-4333(2022)05-0249-08 文献标志码 A

Optimization of artificial hapten synthesis of imidacloprid

ZHONG Yixuan^{1,3}, WANG Yanhong^{1,3}, YANG Chenggen^{1,2}, ZOU Hui^{1,3}, GU Jianhong^{1,3},
YUAN Yan^{1,3}, BIAN Jianchun^{1,3}, LIU Xuezhong^{1,3*}

(1. College of Veterinary Medicine/Joint Laboratory for International Cooperation on Agricultural and Agricultural Product Safety, Ministry of Education, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
3. Collaborative Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal and Human-Veterinary Diseases in Jiangsu Universities, Yangzhou 225009, China)

Abstract In order to obtain imidacloprid artificial semi-antigen with higher purity, the reaction sequence and reagents of conventional semi-antigen synthesis were adjusted and optimized, and the most suitable reaction ratio of 3-mercaptopropionic acid was selected. The molecular structure of imidacloprid hapten was confirmed by thin layer chromatography, mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (NMR). Mice were immunized with imidacloprid complete antigen by coupling the synthesized imidacloprid semi-antigen with carrier protein. The serum antibody titer of mice was determined by indirect ELISA after the third and the fifth immunization. The results showed that: 1) The specific shift values of imidacloprid, reaction system, organic phase and aqueous phase were 0.55, 0.23, 0.50 and 0, respectively; 2) The peak of mass-to-charge ratio 326 was the molecular ion peak of imidacloprid half-antigen, and

收稿日期: 2021-07-11

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(18)3022);江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD)

第一作者: 钟艺煊, 硕士研究生, E-mail:626458607@qq.com

通讯作者: 刘学忠, 主要从事动物营养代谢病与中毒病研究, E-mail:liuxuezhong68@163.com

the number of the remaining impurity ion peaks decreased significantly; 3) The results of NMR analysis were consistent with imidacloprid half-antigen, and the oxidation by-product peak of 3-mercaptopropionic acid decreased; 4) After the third immunization, the serum titer of mice reached 1 : 12 800, and the serum titer of mice reached 1 : 51 200 after the fifth immunization. In conclusion, the improved method can not only ensure the complete reaction of 3-mercaptopropionic acid, but also reduce the generation of 3-mercaptopropionic acid oxidation by-products and unnecessary impurities. It provides a simple and safe method for the synthesis of imidacloprid semi-antigen, which can also reduce the impurities in the synthesis of semi-antigens. The approach could eventually facilitate the preparation of subsequent monoclonal antibodies to imidacloprid.

Keywords imidacloprid; semi-antigen; synthesis; optimization

农药是一类多相化学物质,可以通过控制病菌的危害来减少生物毒素的产生和食源性疾病微生物的污染,保障农产品质量安全^[1]。20世纪90年代以来,新烟碱类杀虫剂已成为世界上使用最频繁的杀虫剂之一^[2]。根据中国农药信息网数据显示,截止到2017年7月,新烟碱类杀虫剂已占据我国杀虫剂市场份额的1/4以上。其中,作为第一代新烟碱类杀虫剂代表的吡虫啉(IMI),使用最为广泛。IMI是一种尼古丁类神经毒性杀虫剂,通过烟碱型乙酰胆碱受体(NAChR)阻断神经传递^[3],导致昆虫麻痹死亡。通常用于农作物、水果和蔬菜中,以防治刺吸式口器害虫^[4]。IMI对昆虫具有急性毒性^[3],因其可在哺乳动物体内蓄积^[5],IMI对哺乳动物的亚致死性损伤作用也日益凸显^[6],长期暴露会影响人和动物的免疫系统、生殖系统和神经系统等。目前有研究表明,IMI对非靶标生物体的不利影响^[7],包括对人体的不利影响,取决于暴露量^[8]。因此,对于IMI残留的检测显得尤为重要。

目前,新烟碱类农药残留常规检测方法有气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)、气相色谱串联质谱(GC-MS)和高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS),这些常规检测方法费时耗力,过度依赖仪器和专业检测人员,不适合进行现场检测。因此,人们迫切希望有一种简单、快速、灵敏及价廉的ELISA检测技术能在室外和实验室内进行大批量的筛选试验。

IMI分子量为255.66,是一种小分子物质。只具备反应原性而不具备免疫原性,只有与载体蛋白偶联以后,才具备免疫原性^[9]。一般来说,具有活性基团的小分子,可以与载体蛋白直接进行偶联。因为IMI不具备与载体蛋白直接进行偶联的活性基团,与载体蛋白的连接较困难,所以需要先对IMI分子进行衍生^[10]。这主要依赖其分子结构中的3个活性位点,分别是:吡啶环上 α -Cl、咪唑环上亚胺

基H原子和-NO₂。目前,朱国念等^[11]和姚蕾璐^[12]主要是通过亲和取代反应替换吡啶环上 α -Cl;马寅生等^[13]和Lee等^[14]主要是通过将-NO₂还原成-NH₂,使其与载体蛋白直接偶联;通过吸电子效应取代咪唑环上亚胺基H原子这一方法理论可行,实际操作则会大大降低该化合物与乙酰胆碱受体的结合能力。其中,亲和取代反应法最早被用于IMI人工半抗原的合成,且应用最为广泛^[15]。半抗原从-Cl衍生简单碳链,对吡虫啉的结构改动小^[16],且Cl原子位于分子识别的远端,能使IMI的抗原决定簇充分暴露^[11],合成半抗原的抗体非常灵敏。

通过亲和取代反应取代IMI吡啶环上 α -Cl这一半抗原合成方法以朱国念等^[11]发表的最为成熟。虽然此方法为目前最为常用的IMI人工半抗原合成方法,但也存在很多缺点,如:试验过程中使用高危化学试剂,易造成火灾、半抗原合成过程容易产生较多杂质、免疫后小鼠血清抗体效价低等。本研究旨在减少常规IMI半抗原合成方法中杂质的产生,提高免疫后小鼠血清抗体效价,最终提高IMI单克隆抗体制备过程中融合细胞的阳性率,获得高质量、高产量的IMI单克隆抗体细胞株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 实验动物

健康状况良好的7周龄雌性SPF级BALB/c小鼠(编号为202103799),购自常州卡文斯实验动物有限公司。

1.1.2 主要试剂及仪器

95%的吡虫啉原药(江苏红太阳集团有限公司),N,N'-二环己基碳二亚胺、98% 3-巯基丙酸、N-羟基琥珀酰亚胺(Sigma-Aldrich),4-二甲基吡啶(上海源叶生物科技有限公司),二甲亚砜、薄层层析硅胶版GF254型(扬州必帮生物技术有限公司),氢

氧化钾、二氯甲烷、乙酸乙酯等其他试剂为国产分析纯或优级纯。

maXis 超高分辨飞行时间质谱仪、AVANCE 600 核磁共振波谱仪 NMR (Bruker Daltonics), 通风厨(扬州天辉钢木制品公司), 电热套、化学用升降台(扬州必帮生物技术有限公司), 旋转蒸发仪(上海

申生科技有限公司)等。

1.2 试验方法

1.2.1 试验原理

如图 1 所示:以 IMI 原药和 3-巯基丙酸为原料,在热碱的作用下,通过亲和和取代反应,合成 IMI 人工半抗原。

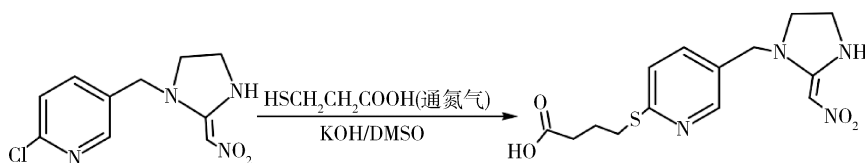


图 1 IMI 人工半抗原合成路线图

Fig. 1 Roadmap of IMI artificial semi-antigen synthesis

1.2.2 IMI 半抗原合成方法的优化

IMI 半抗原常规合成方法参照朱国念等^[11]报道的方法如下:称取 IMI 5.15 g,用 20 mL DMSO 溶解,再加入 KOH 2.25 g;另称取 3-巯基丙酸 2.10 g,用 10 mL DMSO 溶解;在搅拌下将 3-巯基丙酸溶液缓慢滴加到三口烧瓶中,于油浴上使之缓慢升温至 100 °C,保温 2 h 后;撤去油浴,待产物自然冷却至室温。取反应体系 5 mL,加入 8 mL 双蒸水,以 6 mol/L HCL 溶液调节 pH 为 3;用 4 mL 二氯甲烷在分液漏斗中萃取,收集下层。用 3 mL NaHCO₃ 水溶液萃取,收集上层;用少量乙醚洗涤水相,弃去乙醚层;用 6 mol/L HCL 溶液调节水相 pH 为 3,然后用 3 mL 乙酸乙酯分萃取,合并乙酸乙酯提取液。用少量蒸馏水洗涤乙酸乙酯,弃水层。提取液经无水硫酸钠干燥后,减压浓缩。加入少量丙酮溶液溶解,静置过夜,有黄色晶体析出,即为 IMI 半抗原。

IMI 半抗原合成方法的优化(下文称为优化方法)如下:称取 IMI 1.3 g 于三口烧瓶中,用 15 mL DMSO 溶解,得到 A 液;称取筛选出的最适比例的 KOH 和 3-巯基丙酸(专利申请号:CN202110772955.0),用 5 mL DMSO 溶解,得到 B 液;打开电热套,将 A 液缓慢升温至 100 °C;通入氮气;缓慢向其中滴加 B 液,边加边搅拌;100 °C 保温 3 h;撤去电热套,待反应体系冷却至室温。取反应体系 5 mL,用 8 mL 双蒸水溶解,6 mol/L 稀盐酸调 pH 至 3.0;用 4 mL 二氯甲烷在分液漏斗中萃取,收集下层;下层用 3 mL NaHCO₃ 水溶液萃取,收集上层;上层用 3 mL 乙酸乙酯萃取,收集下层;下层用 6 mol/L 稀盐酸调 pH

至 3.0,用 3 mL 乙酸乙酯萃取,收集上层,产品在 上层中。取 30 mL 产品用 DDW 萃取后加入 1.2 g 无水硫酸钠干燥,用旋转蒸发仪蒸发得到 IMI 半抗原。

1.2.3 IMI 半抗原结构鉴定

IMI 半抗原的分子结构采用薄层层析色谱(TLC)法、质谱(MS-ESI)法和核磁共振(¹H-NMR)法进行确证。

1.2.3.1 薄层层析色谱(TLC)法

采用微量毛细管进行点样。点样前,先用铅笔在薄层板上距末端 1 cm 处轻轻画一横线,然后用毛细管吸取样液在横线上轻轻点样。将点样的薄层板放在展开剂中展开,待位移至 2/3 处,取出薄层板。展开后的薄层板干燥后,用紫外光灯照射,检出斑点。展开分离后,化合物在薄层板上的位置用比移值 R_f(溶质移动的距离/溶液移动的距离)来表示。

1.2.3.2 质谱(MS-ESI)法

采用电喷雾串联三重四极杆质谱对 IMI 人工合成半抗原进行分析,负离子模式,电喷雾电压 3 000 V,毛细管电压为 60 V,离子源温度 105 °C,辅助气温度 350 °C,进行一级质谱扫描,获取母离子质荷比,对 IMI 半抗原进行结构鉴定。

1.2.3.3 核磁共振(¹H-NMR)法

将合成的 IMI 人工半抗原用 C₂D₆SO 溶解后扫描其¹H-NMR 谱,根据不同 H 原子的化学位移和不同位移处 NMR 谱峰的积分比例,分析合成的 IMI 人工半抗原中 H 原子的数目及分布,以确定 IMI 人工半抗原合成情况。

1.2.4 完全抗原偶联鉴定

将常规方法合成获得的 IMI 半抗原和优化方法合成获得的 IMI 半抗原通过亲和取代反应分别与相同载体蛋白(BSA)进行偶联得到完全抗原。偶联得到的完全抗原(IMI-BSA)进行 3 d 的透析纯化。采用薄层析色谱法(方法同 1.2.3.1),鉴定 IMI-BSA 是否偶联成功。

1.2.5 吡虫啉完全抗原免疫小鼠及血清抗体效价的测定

用鉴定后的完全抗原按照表 1 的免疫程序对 7 周龄雌性 SPF 级 BALB/c 小鼠进行免疫,并于三免和五免 7 d 之后断尾采血,按照李刚等^[18]方法,对小鼠血清采用间接 ELISA 法测定其抗体效价。

表 1 吡虫啉完全抗原免疫小鼠的免疫程序

Table 1 Immunization program in mice immunized with imidacloprid complete antigen

免疫时间 Immune time	免疫原 Immunogen		免疫剂量 Immune dose	免疫途径 Immune route
	常规方法 Conventional method	优化方法 Optimization method		
首免 First immunization	IMI-BSA+弗氏完全佐剂	优化 IMI-BSA+弗氏完全佐剂	50 $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}/\text{只}$	腹腔注射
二免 (间隔三周) Second immunization (Three-week interval)	IMI-BSA+弗氏不完全佐剂	优化 IMI-BSA+弗氏不完全佐剂	50 $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}/\text{只}$	腹腔+皮下三点注射
三免 (间隔两周) Third immunization (Two-week interval)	IMI-BSA+弗氏不完全佐剂	优化 IMI-BSA+弗氏不完全佐剂	50 $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}/\text{只}$	腹腔+皮下三点注射
四免 (间隔两周) Fourth immunization (Two-week interval)	IMI-BSA+弗氏不完全佐剂	优化 IMI-BSA+弗氏不完全佐剂	50 $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}/\text{只}$	腹腔+皮下三点注射
五免 (间隔两周) Fifth immunization (Two-week interval)	IMI-BSA+弗氏不完全佐剂	优化 MI-BSA+弗氏不完全佐剂	50 $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}/\text{只}$	腹腔+皮下三点注射
冲击免疫 (融合前 3 d) Shock immunity (Three days before integration)	IMI-BSA+生理盐水	优化 IMI-BSA+生理盐水	50 $\mu\text{g}/0.1\text{ mL}/\text{只}$	腹腔注射

2 结果与分析

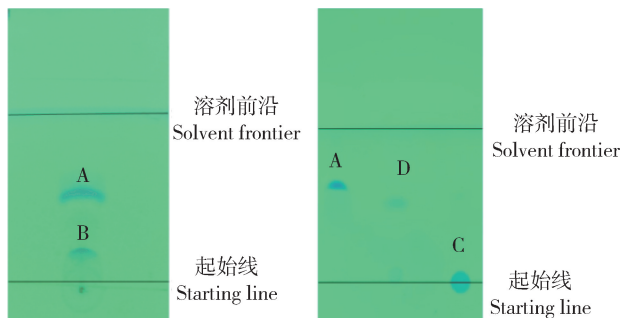
2.1 半抗原的鉴定

2.1.1 薄层层析色谱法检测分析

根据图 2 薄层层析色谱图计算各物质的比移值

R_f (溶质移动的距离/溶液移动的距离),结果显示:IMI、反应体系、有机相和水相的 R_f 值分别为 0.55、0.23、0.50 和 0。产品萃取后保留在有机相中,在相同展开剂中,产品的 R_f 值与 IMI、反应体系、和水相均不相同,且紫外下可见荧光反应,判定 IMI 半抗

原合成成功。



A: IMI; B: 反应体系; C: 有机相; D: 水相

A: Imidacloprid; B: Reaction system; C: Organic phase;

D: Aqueous phase

图 2 TLC 法检测半抗原偶联反应

Fig. 2 TLC method for detection of semi-antigenic coupling reactions

2.1.2 质谱法分析结果

图 3 IMI 半抗原质谱法分析结果显示： M^+ ， m/z , 326，且其余分子离子峰的解释也较为合理，因此可以判断，该碎片离子峰为 IMI 人工半抗原的分子离子峰 $[M^+]$ 。

2.1.3 核磁共振法分析结果

图 4 IMI 半抗原核磁共振法分析结果显示，该化合物¹H-NMR 谱（400 MHz, DMSO- D_6 ）为： δ 12.36（1H, s, COOH），8.89（1H, s, NH），8.38~8.39（1H, d, P_{ry}:H），7.52~7.81（1H, q, P_{ry}:H），8.37~8.98（1H, t, P_{ry}:H），4.47（2H, s, CH₂），4.02（2H, q, CH₂），2.50~2.90（2H, q, CH₂），1.24（2H, m, CH₂），与文献^[11]报道的 IMI 半抗原核磁结果相符。

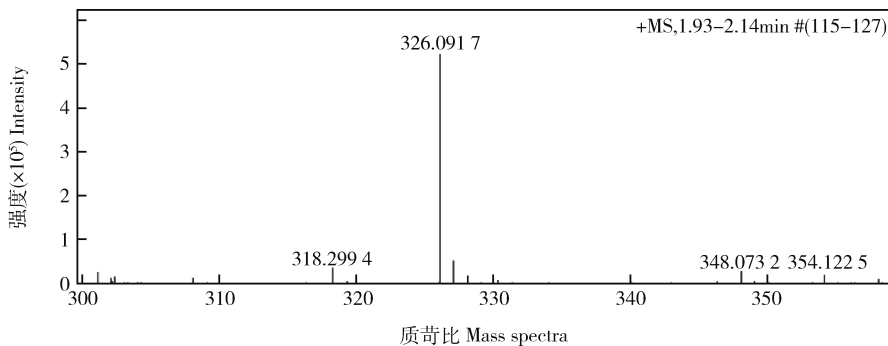


图 3 IMI 半抗原质谱图

Fig. 3 Mass spectrum of imidacloprid hapten

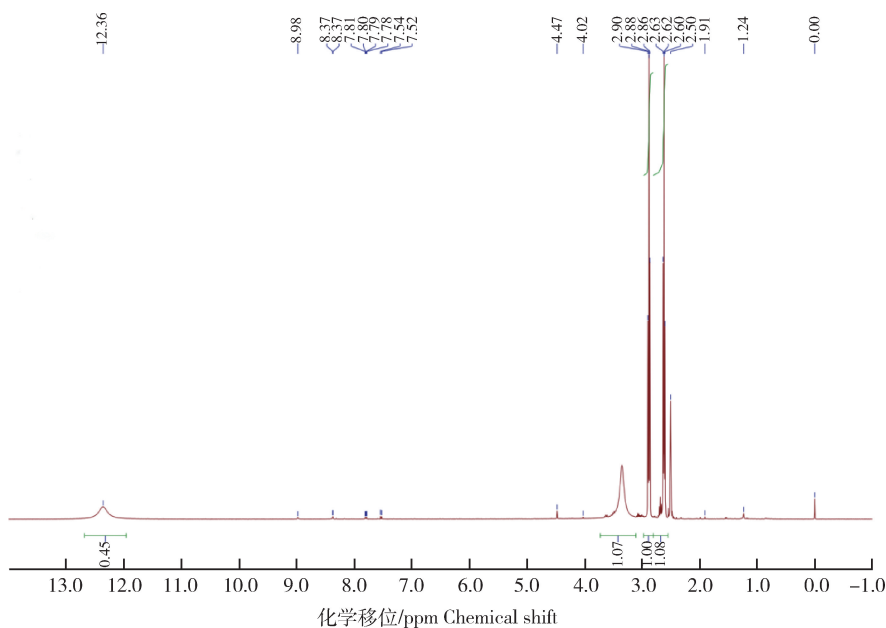


图 4 IMI 半抗原核磁图

Fig. 4 Nuclear magnetic resonance (NMR) of imidacloprid hapten

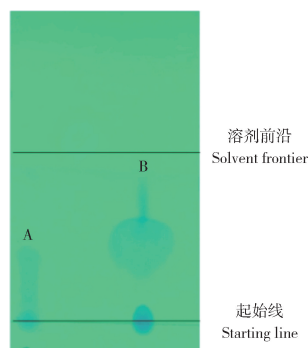
2.2 完全抗原的偶联鉴定

采用薄层层析色谱法对完全抗原偶联过程进行监测。根据图5薄层层析色谱图计算各物质的比移值 R_f (溶质移动的距离/溶液移动的距离),结果显示:IMI-BSA和BSA的 R_f 值分别为0.43和0.85。在相同的展开剂下,具有不同的 R_f ,判断有新物质生成,而当加入BSA后,经过一段时间样点消失,判断物质偶联完全,可初步验证IMI和BSA反应良好,初步判定IMI-BSA免疫原偶联成功。

2.3 小鼠血清抗体效价测定结果

三免和五免7d之后断尾采血,测定小鼠血清抗体效价,如图6所示:使用常规方法合成的IMI半抗原进行免疫的小鼠,血清抗体效价在三免后仅达到1:800,五免后勉强达到1:12800;而使用优化方法合成的IMI半抗原进行免疫的小鼠,血清抗

体效价在三免后均可达到1:12800,五免后可达到1:51200。



A: IMI-BSA; B: 反应体系

A: Imidacloprid; B: Reaction system

图5 TLC法检测完全抗原偶联反应

Fig. 5 TLC method for detection of complete antigenic coupling reactions

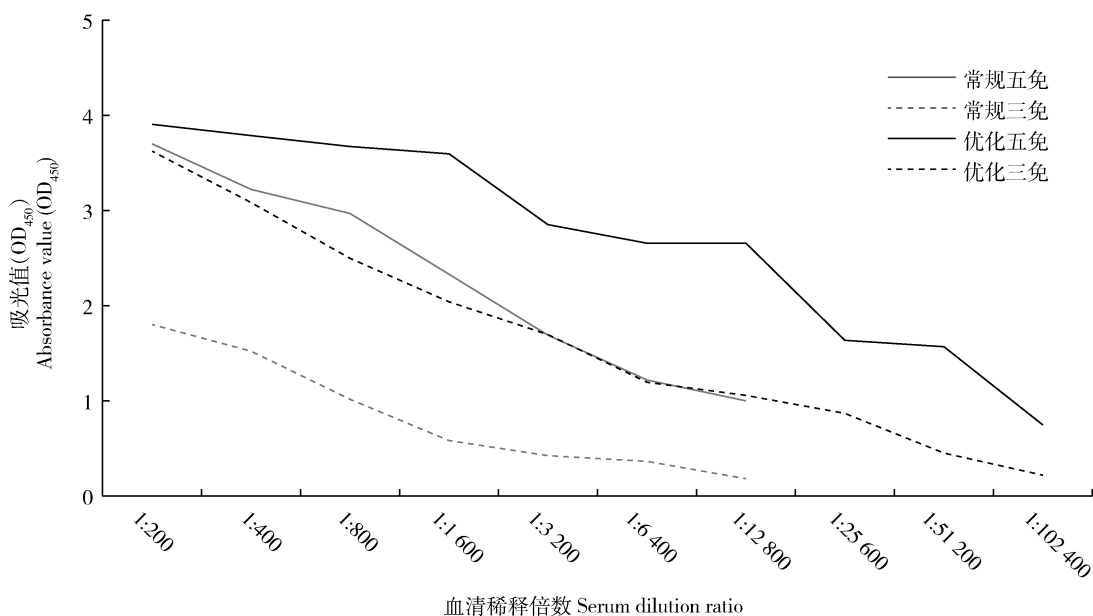


图6 小鼠血清抗体效价测定

Fig. 6 Detection of antibody titers of mouse serum

3 讨论

3.1 调整使用试剂对试验安全性的影响

IMI半抗原合成过程,反应需持续加热。常规方法使用油浴加热,导热效果好,能使物质均匀受热且保持恒温,但操作过程需十分谨慎,以防因油外溢而烫伤或因升温过高而引起火灾。优化方法选用恒温电热套代替油浴,升温更快、可控性更好,且可以很好地避免烫伤和失火。

常规方法使用的乙醚等高危化学试剂,操作人员长期低浓度接触会透皮吸收,因毒性蓄积而出现一系列不适症状。优化方法使用乙酸乙酯替换乙醚,降低了化学试剂对试验人员的毒性,提高了试验操作的安全性。

3.2 调整反应顺序和试剂比例对半抗原合成过程杂质产生的影响

常规IMI半抗原合成方法,虽然能够得到最终产品,但合成的半抗原含杂质较多,会产生较多3-

巯基丙酸的氧化副产物和其他碎片离子。并且,在普通实验室,每次合成的半抗原数量有限,往往需要进行多次重复试验才可获得足够量的半抗原进行下一步试验。

优化方法在 3-巯基丙酸加入反应之前预先通入氮气,并维持到整个反应结束,以此排出氧气,一定程度减少了氧气与 3-巯基丙酸发生反应而产生氧化副产物。同时,筛选出最适 3-巯基丙酸反应比例,一方面保证 3-巯基丙酸能够完全反应,保证 IMI 人工半抗原的产量,另一方面防止 3-巯基丙酸过剩而与其他物质反应生成氧化副产物或者有大量 3-巯基丙酸残留而产生过多的杂质。优化方法质谱结果显示质荷比为 326 的峰是 IMI 半抗原的分子离子峰,符合质谱分析中有机物的含氮规则。相较于李广领^[17]的方法,其余碎片离子峰数量有了很大程度的减少。一方面,说明优化方法合成的半抗原杂质减少,另一方面,溶剂峰的减少和下降,也说明了 IMI 半抗原合成反应更为彻底。优化方法核磁结果与文献报道相符,相较于朱国念等^[11]的方法,12.36 处的 3-巯基丙酸的氧化副产物峰明显下降,说明 3-巯基丙酸的氧化副产物减少,进一步说明优化方法合成的人工半抗原杂质减少。但是,由于专业纯度检测仪器的限制,尚未准确测出半抗原纯度,具体提升值尚不明确,后续可作进一步检测。

3.3 优化方法对免疫后小鼠血清抗体效价的影响

单抗制备过程中动物的免疫效价,会影响其产生特异性抗体的能力,同时也影响单抗的大量生产^[19]。若半抗原偶联数量过多,会因抗原过量而产生免疫耐受;若半抗原偶联数量过少,则会因抗原不足而不产生抗体^[20]。所以,小分子抗原偶联到载体的数量要适中,才能使免疫后的小鼠产生高效价的抗体。

使用优化方法合成获得的半抗原与载体蛋白偶联得到完全抗原,用偶联的完全抗原免疫小鼠,三免后,小鼠血清抗体效价均可达到 1:12 800;五免后,小鼠血清抗体效价达到 1:51 200。使用常规合成方法偶联获得的完全抗原免疫小鼠,五免后,小鼠血清抗体效价仅达到 1:12 800。李刚等^[18]使用常规合成方法偶联获得的完全抗原免疫小鼠,小鼠血清抗体效价最高达到 1:12 800。说明优化方法可以刺激小鼠更稳定地产生更高滴度的抗体。小鼠血清抗体效价越高,其针对抗原的特异性抗体浓度则越高,细胞融合后筛选出阳性的概率也越大,所以单抗

制备过程中,提高小鼠抗体效价十分重要。不仅免疫的抗原能影响免疫就小鼠血清抗体效价,不同的免疫途径和免疫剂量也会使免疫后小鼠效价发生改变。后续可改变免疫的途径和免疫的剂量,进一步筛选出一套可以刺激小鼠更稳定地产生更高效价的免疫程序,使整个免疫流程更为高效、便利。

4 展望

本研究通过调整半抗原合成过程反应顺序和筛选最适 3-巯基丙酸反应比例,在相对安全的试验环境下,减少了 IMI 人工半抗原合成过程中杂质的产生,一定程度上提高了 IMI 人工半抗原纯度。免疫后,小鼠能产生更高滴度的抗体。后续可继续进行 IMI 单克隆抗体的制备,研究更高滴度的抗体是否能够刺激小鼠产生更多的 B 淋巴细胞用于后续细胞融合,从而提升细胞融合后的阳性率,获得更高质量的 IMI 单克隆抗体细胞株。最终,建立起能在室外和室内进行大批量筛选试验的简单、快速、灵敏及性价比高的 ELISA 检测技术。

参考文献 References

- [1] Chawla P, Kaushik R, Shiva Swaraj V J, Kumar N. Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection [J]. *Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management*, 2018, 10: 292-307
- [2] Simon-Delso N, Amaral-Rogers V, Belzunces L P, Bonmatin J M, Chagnon M, Downs C, Furlan L, Gibbons D W, Giorio C, Girolami V, Goulson D, Kreutzweiser D P, Krupke C H, Liess M, Long E, McField M, Mineau P, Mitchell E A D, Morrissey C A, Noome D A, Pisa L, Settele J, Stark J D, Tapparo A, Van Dyck H, Van Praagh J, Van der Sluijs J P, Whitehorn P R, Wiemers M. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22: 5-34
- [3] Crosby E B, Bailey J M, Oliveri A N, Levin E D. Neurobehavioral impairments caused by developmental imidacloprid exposure in zebrafish [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2015, 49: 81-90
- [4] Sabarwal A, Kumar K, Singh R P. Hazardous effects of chemical pesticides on human health-cancer and other associated disorders [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2018, 63: 103-114
- [5] Perkins R, Whitehead M, Civil W, Goulson D. Potential role of veterinary flea products in widespread pesticide contamination of English rivers [J]. *Science of the Total Environment*, 2021,

- 755: 143560
- [6] Chen D, Liu Z, Barrett H, Han J, Lv B, Li Y, Li J, Zhao Y, Wu Y. Nationwide biomonitoring of neonicotinoid insecticides in breast milk and health risk assessment to nursing infants in the chinese population[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(47): 13906-13915
- [7] Wang X, Anadón A, Qinghua W, Fang Q, Irma A, Maria-Rosa M, Zonghui Y, María-Aránzazu M. Mechanism of neonicotinoid toxicity: impact on oxidative stress and metabolism [J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2018, 58: 471-507
- [8] Vinod K V, Srikant S, Dutta T K. A fatal case of thiacloprid poisoning[J]. *American Journal of Emergency Medicine*, 2015, 33: 310-316
- [9] 杨松鑫, 冯建远, 郭旋, 韦柳源, 梁翼莹, 严昊, 张子仪, 陈海兰. 小分子化合物单克隆抗体的制备及其在动物医学领域的应用[J]. *中国畜牧兽医*, 2021, 48(3): 1121-1131.
Yang S X, Feng J Y, Guo X, Wei L Y, Liang Y Y, Yan H, Zhang Z Y, Chen H L. Preparation of monoclonal antibodies to small molecule compounds and their application in animal medicine [J]. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2021, 48(3): 1121-1131 (in Chinese)
- [10] Hermonson G T. *Bioconjugate Echniques* [M]. Academic Press, 1996
- [11] 朱国念, 桂文君, 郑尊涛, 程敬丽, 吴刚. 吡虫啉人工抗原的合成与鉴定[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(3): 511-515
Zhu G N, Gui W J, Zheng Z T, Cheng J L, Wu G. Synthesis and identification of artificial antigens of imidacloprid [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38 (3): 511-515 (in Chinese)
- [12] 姚蕾璐. 吡虫啉、啉虫脒、克百威及涕灭威的免疫快速检测[D]. 无锡: 江南大学, 2017
Yao L J. Rapid immunoassay for imidacloprid, acetamiprid, carbofuran and aldicarb[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2017 (in Chinese)
- [13] 马寅生, 冯才伟, 贾芳芳, 冯静, 杨烁. 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
Ma Y S, Feng C W, Jia F F, Feng J, Yang S. Development of a rapid enzyme immunoassay kit for imidacloprid[J]. *Shandong Journal of Animal Science and Veterinary Medicine*, 2013, 34(5): 6-8 (in Chinese)
- [14] Lee J K, Kim Y J, Lee E Y, Kim D K, Kyung K S. Development of an ELISA for the detection of fenazaquin residues in fruits[J]. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 2005, 48(2): 16-25
- [15] Du P F, Jin M J, Chen G, Zhang C, Jiang Z J, Zhang Y X, Zou P, She Y X, Jin F, Shao H, Wang S S, Zheng L F, Wang J. A competitive bio-barcode amplification immunoassay for small molecules based on nanoparticles [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 38114
- [16] Esteve-Turrillas F A, Agulló C, Mercader J V, Abad-Somovilla A, Abad-Fuentes A. Rationally designed haptens for highly sensitive monoclonal antibody based immuneanalysis of fenhexamid[J]. *Analyst*, 2018, 143(17): 4057-4066
- [17] 李广领. 吡虫啉残留免疫学快速检测技术研究[D]. 新乡: 河南科技学院, 2010
Li G L. Study on the immunological rapid detection technique of imidacloprid residues in food[D]. Xinxiang: Henan Institute of Science and Technology, 2010 (in Chinese)
- [18] 李刚, 纪宪勇, 钱国良, 华修德, 秦娜, 王杰, 刘凤权. 抗吡虫啉单克隆抗体的制备及鉴定[J]. *生物工程学报*, 2011, 27(6): 943-951
Li G, Ji X Y, Qian G L, Hua X D, Qin N, Wang J, Liu F Q. Production and identification of monoclonal antibodies against pesticide imidacloprid[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2011, 27(6): 943-951 (in Chinese)
- [19] 包光妍. 几种免疫血清制备方法的比较[J]. *数理医药学杂志*, 2001(2): 177-178
Bao G Y. Comparison of several immune serum preparation methods[J]. *Journal of Mathematical Medicine*, 2001(2): 177-178 (in Chinese)
- [20] Mari G M, Li H F, Dong B, Yang H J, Talpur A, Mi J F, Guo L C, Yu X Z, Ke Y B, Han D G, Wang Z H. Hapten synthesis, monoclonal antibody production and immunoassay development for direct detection of 4-hydroxybenzohydrazide in chicken, the metabolite of nifuroxazide[J]. *Food Chemistry*, 2021, 355Z: 129598

责任编辑: 秦梅