

苯基脲类和磺酰脲类除草剂半抗原设计策略

李方实, 夏金云, 李 壹

(南京工业大学理学院应用化学系, 江苏 南京 210009)

摘 要:本文综述了苯基脲类和磺酰脲类除草剂半抗原的设计原则、合成方法及影响因素等方面的研究进展。合成苯基脲类除草剂半抗原,在苯基脲类分子中引入可供结合用活性基团的位点主要有 3 种,即外部脲桥上的氮、内部脲桥上的氮以及直接在苯环上。研究表明,在外部脲桥上的氮连接亚甲基基团是最理想的半抗原。合成磺酰脲类除草剂半抗原有保留苯环部分、保留杂环部分和保留磺酰脲分子全部特征部分 3 种方法。经比较研究,保留苯环特征部分的半抗原要比保留磺酰脲全部特征部分的半抗原产生的抗体有更高的亲和力。间隔臂长度是半抗原设计的一个重要因素。间隔臂长(5 个亚甲基)的半抗原一般要比间隔臂短的半抗原更能产生理想的免疫结果。在建立酶联免疫法中选择包被/示踪半抗原时,选用比免疫用半抗原更不被抗体识别的半抗原做包被/示踪半抗原。示踪半抗原亲和力的适度减少,被分析物所需的量可以减少,可以进一步提高分析的灵敏度,降低检测限。

关键词:苯基脲类除草剂;磺酰脲类除草剂;半抗原;合成;进展

中图分类号:X839.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)05-1697-08

Design Strategies of the Hapten for Phenylurea and Sulfonylurea Herbicides

LI Fang-shi, XIA Jin-yun, LI Yi

(College of Science, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract: Immune assay is one of the recently developed analytical methods of pesticide residue. The synthesis of hapten is a key factor in establishing an immunoassay. This article summarized the study progress of the hapten for phenylurea and sulfonylurea herbicides including the idea of synthesis and the influencing factors. To maximize selective target molecule recognition, the immunizing hapten was designed to represent a near-perfect mimic of the target molecule in structure, electronic, and hydrophobic properties. From the three potential locations for handle attachment(the terminal urea nitrogen, the internal urea nitrogen, and directly on the aromatic ring system) the compounds with an extension of the terminal N-methyl group with innocuous methylene groups, provide the most perfect mimic of the phenylurea herbicide structure. The antibodies with much higher affinity for sulfonylurea herbicides were generated using the haptens that had only a phenyl moiety of the corresponding sulfonylurea herbicides, compared to those obtained with a hapten consisting of the complete molecule. In general, longer (five methylene) handle provided better test results than the shorter handle, suggesting that handle length and/or flexibility are important factors in assay utility. Compared to the hapten used for immunization, the hapten for enzyme label or for coating antigen should be less recognized by the antibodies. This moderately decreased affinity relative to the analyte could lower the amounts of analyte required for the equilibrium under working conditions. In this way the assay sensitivity and determination limit could be improved.

Keywords: phenylurea herbicide; sulfonylurea herbicide; hapten; synthesis; progress

苯基脲类除草剂主要用来防治一年生浅根杂草,具有药效高、用量少、杀草谱广、水溶性小、残效期长的特点^[1]。这类除草剂有近 20 种,结构如图 1 所示。

磺酰脲类除草剂是目前世界上最大的一类除草

剂^[2],自从杜邦公司 1982 年首次开发出麦田除草剂氯磺隆,从而使杂草的防除进入高效时代以来,目前国内外登记用于农业的磺酰脲类除草剂有 29 种^[3,4]。

磺酰脲类化合物从结构上可分为 3 部分,即疏水部分、磺酰脲桥部分和杂环部分。其基本结构如图 2 所示(以苯环表示其疏水部分)。在决定其总体的除草活性上,每个部分都起着重要作用。

苯基脲类和磺酰脲类除草剂的大量使用所造成

收稿日期:2007-08-14

基金项目:国家自然科学基金项目(20447003)

作者简介:李方实(1956—),男,山西芮城人,博士,教授,研究方向为环境分析化学。E-mail: fangshi.li@njut.edu.cn

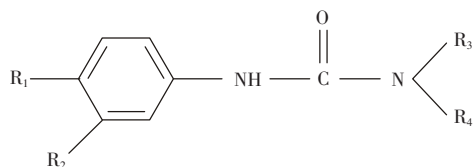
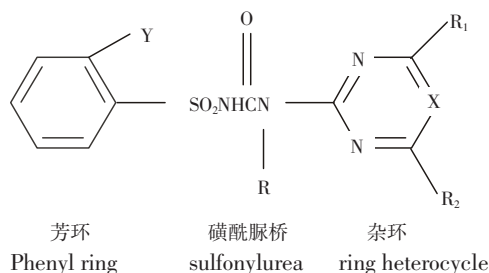


图1 苯基脲类除草剂的分子结构

Figure 1 The structure of phenylurea herbicides



其中, $R = \text{CH}_3$, 烷基; $R_1 = \text{CH}_3, \text{OCH}_3, \text{Cl}, \text{NHCH}_3$; $R_2 = \text{CH}_2, \text{OCH}_3, \text{Cl}, \text{CH}_2\text{OF}_2, \text{OCH}_2\text{CH}_3, \text{CH}_2\text{SePH}$; $X = \text{N}, \text{CH}$; $Y = \text{Cl}, \text{CH}_3, \text{CF}_3, \text{SCH}_3, \text{OCH}_3, \text{CH}_2\text{Cl}, \text{SO}_2\text{CH}_3, \text{COOCH}_3, \text{COOC}_2\text{H}_5, \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}, \text{OCH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_3, \text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2, \text{SO}_2\text{NHOCH}_3$ 。

图2 磺酰脲类除草剂的分子结构

Figure 2 The structure of sulfonylurea herbicides

的环境污染问题,已引起人们的高度重视。随着环保意识的加强和经济的发展,我国对环境、食品中苯基脲类和磺酰脲类除草剂残留的监测也日益重视。加强对苯基脲类和磺酰脲类除草剂残留监测研究,对于合理使用苯基脲类和磺酰脲类除草剂、保护环境和保障人类健康,具有重要的理论和现实意义。随着待检样品逐步增多和对农药残留检测灵敏度、效率要求的提高,对高灵敏度、快速检测分析新技术的开发需求也日益迫切。

传统的苯基脲类和磺酰脲类除草剂残留分析方法有液相色谱法、气相色谱法、质谱等多种理化分析手段^[9],但存在样品前处理复杂,仪器设备昂贵,要求熟练的技术人员,完成一次分析费时长等问题。特别是这些方法不能满足样品现场快速检测的要求,迫使人们运用新的原理和方法去开发特异性强、灵敏度高、方便快捷、安全廉价的分析新技术。免疫化学分析技术灵敏、简便快速,正可以满足这些需求,受到农药残留检测工作者的重视,正逐渐成为农药残留快速检测的一个热点,并显示出独特的优势。

为了建立苯基脲类和磺酰脲类除草剂免疫分析方法,首先必须制备出效价高、特异性强的抗体。而苯基脲类和磺酰脲类除草剂是小分子物质(分子量小于1 000),本身不具有诱导产生抗体的能力。因此,人工抗原的制备是苯基脲类和磺酰脲类除草剂免疫分析技术的关键所在。首先必须设法先得到半抗原,再将半抗原与载体蛋白质偶联制备出人工抗原。

半抗原按其作用分为免疫半抗原(immunogenic hapten)、包被半抗原(coating hapten)和示踪半抗原(tracer hapten)。免疫半抗原与载体蛋白偶联后形成免疫抗原(immune antigen),用于免疫制备抗体。包被半抗原和示踪半抗原分别与载体蛋白偶联后形成包被抗原(coating antigen)和示踪抗原(enzyme tracer),分别用于间接竞争和直接竞争免疫反应。如图3所示。

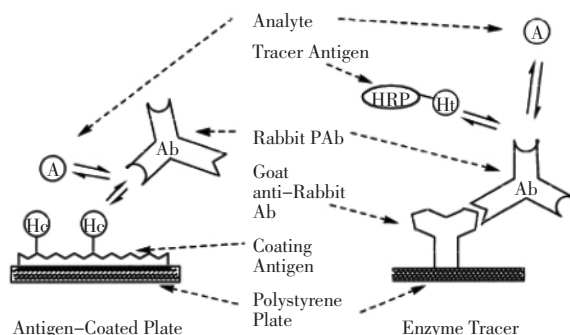


图3 农药残留分析的两种酶联免疫分析模式

Figure 3 Two models of ELISA in pesticide residues

酶联免疫可以分为同源和异源分析两种。同源分析是指用同一种半抗原制备的人工抗原与相应的抗体进行免疫分析。异源分析是指用同一种分析物的不同半抗原所得的抗体分别与不同半抗原所制备的包被抗原或标记抗原进行的免疫分析。不同半抗原指半抗原分子的结构、间隔臂长度、活性基团的引入位点或载体蛋白不同等。

目前已经建立了10多种苯基脲类和磺酰脲类除草剂的免疫分析方法,如表1所示。但仍然有相当一部分苯基脲类和磺酰脲类除草剂的免疫分析技术尚未建立。

本文试对苯基脲类和磺酰脲类除草剂免疫分析技术中涉及的半抗原设计策略和制备的研究进展做一综述,以期致力于这方面研究的工作者提供一整体的思路和系统的理论体系,促进农药免疫分析的研究。

1 苯基脲类除草剂半抗原合成

合成苯基脲类除草剂半抗原,在苯基脲类分子中引入可供结合用活性基团的位点主要有3种,即外部脲桥上的氮(1-位取代),内部脲桥上的氮(2-位取代),以及直接在苯环上(3-位取代),如图4所示。

1.1 连接臂接在苯基脲类除草剂外部脲桥上的氮上(1-位取代)

在异丙隆分子外部脲桥上的氮上接上一个连接臂,包括3步反应,即合成N-甲基己酸、合成对异丙

表 1 已有合成半抗原的苯基脲类和磺酰脲类除草剂
Table 1 The phenylurea and sulfonylurea herbicides with haptens

除草剂	CAS	结构式
异丙隆	34123-59-6	
敌草隆	330-54-1	
绿麦隆	15545-48-9	
利谷隆	330-55-2	
甲基苯噻隆	18691-97-9	
苄嘧磺隆	83055-99-6	
氯嘧磺隆	90982-32-4	
甲磺隆	74223-64-6	
绿磺隆	64902-72-3	
吡嘧磺隆	93699-74-6	
醚苯磺隆	82097-50-5	

基苯异氰酸酯和合成异丙隆半抗原^[6]。反应路线如图 5 所示。

对所合成的半抗原进行比较的结果表明,用 n=5 的半抗原比 n=3 的半抗原制备的免疫抗原的免疫效果好,制备的多克隆抗体对 6 种与异丙隆结构相似的取代脲类除草剂的交叉反应小于 0.6%, 表明了间隔

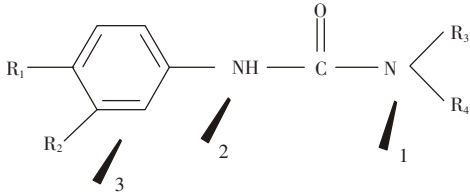


图 4 苯基脲类除草剂半抗原中引入可供结合用基团的位点位置

Figure 4 The potential locations of phenylurea herbicide haptens for group attachment

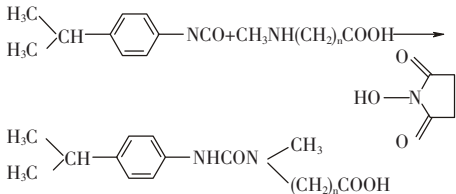


图 5 异丙隆半抗原合成路线

Figure 5 Haptens for isoproturon synthesis pathways

臂的长度或者弹性是分析效用的一个重要因素。用 n=3 的半抗原制备包被原, 建立了间接竞争酶联免疫吸附分析法测定土壤和面粉中的异丙隆^[7]。

Karu^[8]和 Schneider^[9]合成了敌草隆、灭草隆和利谷隆等多种半抗原, 经过比较, 1-位取代的 n = 5 的敌草隆半抗原比 n = 3 的半抗原和 2-位取代的半抗原所建立的 ELISA 法要灵敏 100~2 000 倍。

Bacigalupo^[10]用 n=3 的敌草隆半抗原建立了时间分辨荧光免疫分析法, 灵敏度为 20 ng·L⁻¹。

Katmeh^[11]合成的 n = 1 的异丙隆半抗原, 与绿麦隆和其他不相关的杀虫剂几乎没有交叉反应, 建立的竞争 ELISA 灵敏度达到 0.03 μg·L⁻¹。用同样的方法合成的绿麦隆半抗原^[12], 仅与绿秀隆和异丙隆分别有 71%和 47%的交叉反应率。

Rejeb^[13]用 n = 1 的异丙隆半抗原制备的抗体, 经过提纯后与其他结构相似的化合物没有交叉反应, 异丙隆的 IC₅₀ 小于 0.29 ng·mL⁻¹。

Pichon 等^[14]合成了 n = 1 的异丙隆免疫半抗原, 得到的抗体用于制备免疫柱。

Vessieres^[15]将 n = 1 的绿麦隆半抗原用于建立非同位素免疫分析。

Schneider 等^[9]合成了 28 种敌草隆, 灭草隆, 利谷隆半抗原并以此来建立酶联免疫法。除了合成 1-位取代引入羧基[-(CH₂)_nCOOH]的半抗原外, 还合成了 1-位引入酯基[-(CH₂)_nCOOR₁]的半抗原, 其中 R₁ = -CH₃ 或 -CH₂CH₃。他们提出一种假设, 以羧酸的酯为取代途径的半抗原要比羧酸为取代途径的半抗原更

适合做半抗原,并对其进行验证。结果表明,用以酯为取代途径合成的半抗原作为示踪半抗原,增强了抗体的识别能力,有较低的交叉反应率。

Sellrie 等^[16]合成了 1-位取代的荧光-灭草隆结合物(图 6),建立了间接荧光免疫法测定敌草隆/灭草隆。

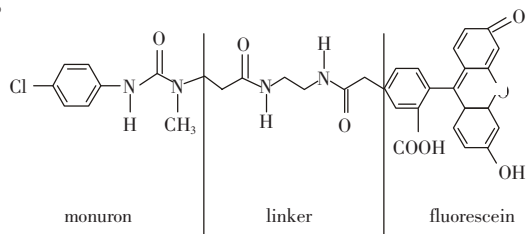


图 6 1-位取代的荧光-灭草隆结合物

Figure 6 1-substituted fluorescein-monuron dihapten conjugate

1.2 连接臂接在苯基脲类除草剂内部脲桥上的氮上(2-位取代)

图 7 为 2-位取代的苯基脲类除草剂半抗原的合成路线^[8,9]。2-位取代的苯基脲类除草剂半抗原产生的抗体亲和力比 1-位取代的半抗原所产生的抗体特异性低,用 2-位取代的苯基脲类除草剂半抗原作为包被/示踪抗原可以提高灵敏度。

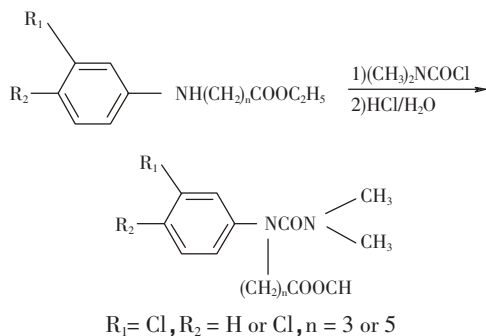


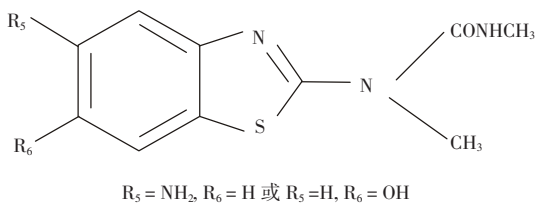
图 7 2-位取代的苯基脲类除草剂半抗原的合成路线

Figure 7 synthesis pathways of 2-substituted haptens for phenylurea herbicides

1.3 连接臂直接接在苯基脲类除草剂苯环上(3-位取代)

Kreibig^[17]采用的甲基苯噻隆半抗原是甲基苯噻隆的衍生物,即 5'-氨基-甲基苯噻隆和 6'-羟基-甲基苯噻隆(图 8)。以此建立的免疫分析方法 IC₅₀ 为 1.0 μg·L⁻¹,测定水中的甲基苯噻隆检测限为 0.05 μg·L⁻¹。

Mallat 等^[18]合成的异丙隆半抗原,在异丙苯上直接连接氨基丙酸,没有保留脲桥部分(图 9)。获得的抗体对敌草隆、绿麦隆和利谷隆的交叉反应率分别为 93%、53%和 46%。



R₅ = NH₂, R₆ = H 或 R₅ = H, R₆ = OH

图 8 甲基苯噻隆半抗原

Figure 8 Hapten for methabenzthiazuron

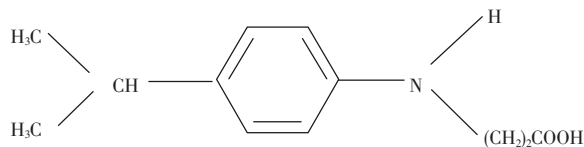


图 9 异丙隆半抗原

Figure 9 Hapten for Isoproturon

2 磺酰脲半抗原的合成

合成磺酰脲类除草剂半抗原的主要有 3 种方法,分别为保留苯环部分、保留杂环部分和保留磺酰脲分子全部特征部分。

2.1 保留苯环部分

近年来在考虑磺酰脲类除草剂半抗原在设计途径时大都选择保留苯环部分。图 10 为半抗原合成路线^[19-29]。制备的抗体的 IC₅₀ 达到 ng·mL⁻¹ 水平。

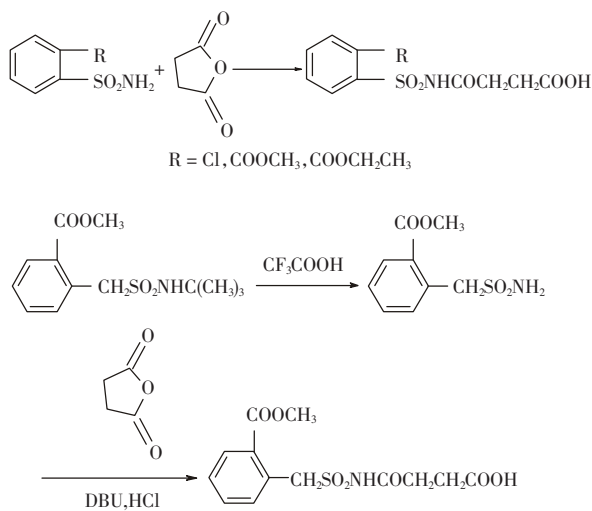


图 10 保留磺酰脲类除草剂的苯环部分的半抗原合成路线

Figure 10 Synthesis pathway for the haptens that has only the phenyl moiety of the sulfonylurea herbicide

Schlaeppli^[30]合成了如图 11 所示的半抗原,并建立了基于磁性粒子的自动化学发光免疫法测定醚苯磺隆,与其他磺酰脲类除草剂的交叉反应率很低。

2.2 保留杂环部分

Kolar^[23]和 Degelmann^[26]保留甲磺隆杂环特征部分

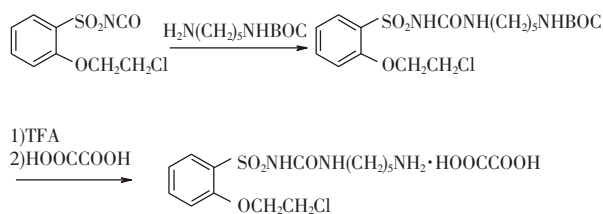


图 11 醚苯磺隆半抗原合成路线

Figure 11 Synthesis pathway for triasulfuron hapten

合成的半抗原(图 12),与醚磺隆、醚苯磺隆和氟嘧磺隆的交叉反应率分别为 142%、95%和 60%。

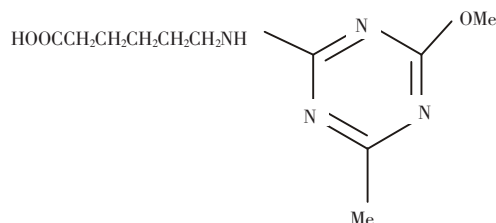


图 12 甲磺隆半抗原

Figure 12 Hapten for metsulfuron-methyl

2.3 保留磺酰脲分子全部特征部分

Kelly^[31]用比绿磺隆苯环上多一个氨基的结构相似物的为半抗原(图 13),经重氮化与蛋白质偶联制得抗原。建立 ELISA 法,分析土壤中的绿磺隆。与绿磺隆结构相似的磺酰脲类除草剂如甲磺隆有一定的交叉反应,但是与其他磺酰脲类除草剂及其降解产物无交叉反应。

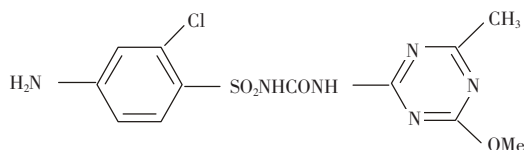


图 13 氯磺隆半抗原

Figure 13 Hapten for chlorsulfuron

Kawada^[32]和 Lee^[25]合成了多种苄嘧磺隆半抗原(图 14),保留了苄嘧磺隆的特征部分,将苄嘧磺隆的酯基改变为不同长度碳链的酸。

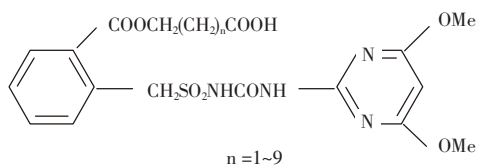


图 14 苄嘧磺隆半抗原

Figure 14 Hapten for bensulfuron-methyl

Hironaka^[33]用吡嘧磺隆的衍生物及其盐作免疫分析中的半抗原,并选择图 15 中 $n=2$ 的半抗原与 BSA 偶联作为抗原,产生的单抗对吡嘧磺隆有较高的特异性。

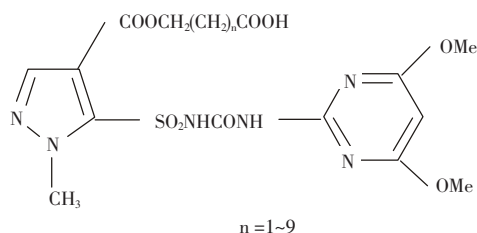


图 15 吡嘧磺隆半抗原

Figure 15 Hapten for pyrazosulfuron

Hirai^[34]同样合成了一系列吡嘧磺隆半抗原(图 16),在 R_1 和 R_2 两个不同的位置上进行了取代。半抗原与生物高分子如血蓝蛋白,血清白蛋白,卵清蛋白, Ig 等偶联,免疫动物获得抗体用于免疫分析。

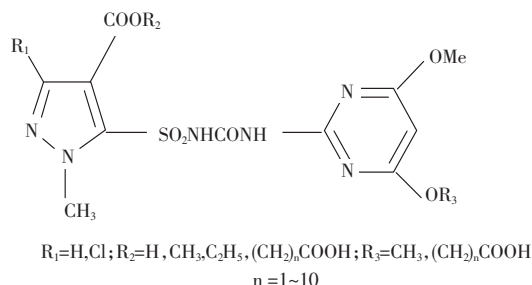


图 16 吡嘧磺隆半抗原

Figure 16 Hapten for pyrazosulfuron

Finkelstein 等^[35]合成如表 2 所示的 12 种半抗原,用其中半抗原 8 与 KLH 偶联获得的抗体,用于检测湖水中的绿磺隆,检测限为 $10 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Schlaeppli^[36]保留了醚苯磺隆特征部分,用氨基- n -丙氧基基团取代三嗪环上的甲氧基进行修饰,合成醚苯磺隆半抗原,用于制备醚苯磺隆的特异性抗体(图 17)。

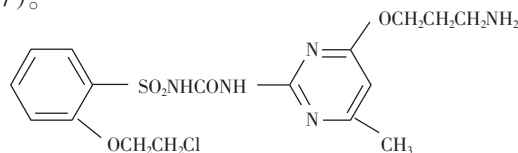


图 17 醚苯磺隆半抗原

Figure 17 Hapten for triasulfuron

Degelmann 等^[26]合成了保留磺酰脲类除草剂全部特征部分的半抗原(图 18),制备的抗体可以同时检测 16 种磺酰脲类除草剂。

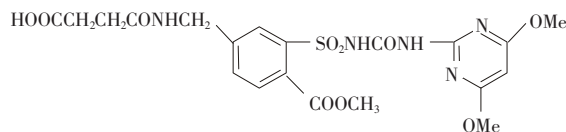


图 18 同时检测 16 种磺酰脲类除草剂的半抗原

Figure 18 Hapten for 16 sulfonylurea herbicides

表 2 绿磺隆半抗原
Table 2 Hapten for Chlorsulfuron

半抗原	X	Y	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	N	N	H	H	CON(CH ₃) ₂	OCH ₃	OCH(CH ₃)COOH
2	N	H	H	H	CON(CH ₃) ₂	CH ₃	OCH ₂ COOH
3	H	N	COOH	H	COOCH ₃	CH ₃	OCH ₃
4	H	H	COOH	H	COOC ₂ H ₅	Cl	OCH ₃
5	H	N	H	COOH	Cl	OCH(CH ₃) ₂	OCH(CH ₃) ₂
6	H	H	H	COOH	Cl	H	H
7	H	H	H	COOH	H	Cl	OCH ₃
8	H	N	H	COOH	Cl	CH ₃	OCH ₃
9	H	N	COOH	H	COOCH ₃	NHCH ₃	OCH ₂ CH ₃
10	H	N	COOH	H	COOCH ₃	CH ₃	CH ₃
11	H	H	H	H	COOCH ₃	OCH ₃	OCH ₂ COOH
12	H	N	H	H	COOCH ₃	OCH ₃	OCH(CH ₃)COOH

有些磺酰脲类除草剂中,如氯嘧磺隆,有酸(图 19)和酯两种形式。有研究者用其酸来做包被半抗原^[37]。



图 19 氯嘧磺隆(酸性)
Figure 19 Chlorimuron-ethyl (acid)

用硫原子替换脲上的氧原子所制备的半抗原作为示踪半抗原(图 20)建立的 ELISA 方法可以降低免疫分析的检测限^[38]。

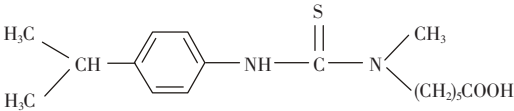


图 20 异丙隆示踪半抗原
Figure 20 Tracer hapten for isoproturon

Lee 等^[25]改变了苄嘧磺隆的磺酰脲桥合成半抗原(图 21)。尽管用此半抗原免疫新西兰白兔未能产生高效价的抗血清,但是用其来做包被原建立酶联免疫法,结果令人满意,检测限有很大的提高。

Knopp^[39]在建立酶联免疫法测定水中甲磺隆时,

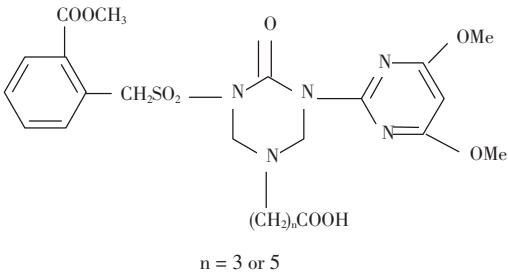


图 21 苄嘧磺隆包被半抗原
Figure 21 Coating antigen for bensulfuron-methyl

试用下图所示两种醚苯磺隆半抗原(图 22)来作为甲磺隆包被用半抗原,结果是醚苯磺隆与蛋白质偶联的结合物不能识别甲磺隆抗体。

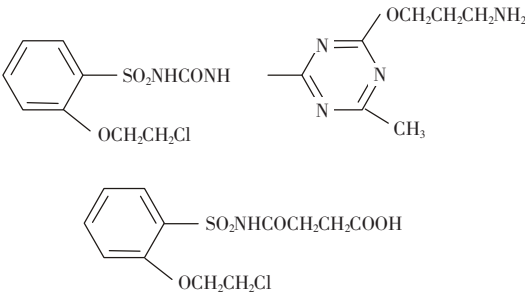


图 22 醚苯磺隆半抗原
Figure 22 Hapten for metsulfuron-methyl

3 讨论与展望

半抗原是指与目标分析物结构相同或相似、并具有反应活性基团的低分子量有机物。半抗原的结构是否合理,并以此能否制备稳定并有良好免疫原性的人工免疫原是免疫分析法建立的重要环节。脲类除草剂属于小分子物质,不具备免疫原性,必须与大分子物质结合后才能刺激动物机体产生抗体。因此需要制备能最大程度模拟脲类除草剂分子结构,且可直接与载体(一般为蛋白质)偶联的半抗原。理想的半抗原,与载体蛋白连接后可保证该结构特征能最大程度为免疫活性细胞识别,产生具有预期选择性和亲合性的抗体。半抗原的立体化学决定免疫分析的特异性,因此在半抗原的设计上应该使半抗原与目标分子在大小、形状(立体结构)和电子性能上尽量相似。为达到这一目的,要求设计合成的半抗原,一是应具备适当末端活性基团,如 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{SH}$ 等;二是活性基团与载体之间应具备 3~6 个碳链长度的间隔臂,且不能含较强的决定簇(如芳香环、共轭双键等);三是半抗原主体结构中尽量含有芳香环,这样形成的抗原具较强免疫原性。苯基脲类和磺酰脲除草剂分子结构类型复杂,每一种除草剂半抗原制备需仔细设计,往往要设计多个目标分子供筛选。

在免疫分析中应尽量选择异源分析,这样可以提高分析的灵敏度。在苯基脲类除草剂分子外部脲桥上的氮上引入不同长度碳链长度亚甲基的羧酸是最理想的半抗原。间隔臂的长度是分析效用的一个重要因素。通常是间隔臂长的比间隔臂短的半抗原经偶联免疫后更能得到特异性的抗体。而在选择包被/示踪半抗原时,通常会选用比免疫用半抗原更不被抗体识别的半抗原做包被/示踪半抗原^[9,25,40]。包被/示踪半抗原亲和力的适度减少,被分析物所需的量可以减少,可以进一步提高分析的灵敏度,降低检测限^[38,41]。

3 种合成磺酰脲类除草剂半抗原的方法各有优缺点。仅保留磺酰脲类除草剂苯环特征部分的方法是近些年来绝大多数研究者采用的方法。优点是合成比较容易,可以获得高效价的抗体。其缺点是抗体特异性不高,同类除草剂有交叉反应,形成干扰;仅保留磺酰脲类除草剂杂环特征部分得到的半抗原,因为半抗原结构与其他农药如三嗪类相似,特异性不高,所以采取这种方法的很少;保留磺酰脲全部特征部分的半抗原产生的抗体能识别磺酰脲类除草剂,是免疫分析的新动向。但在 Schlaeppi 等^[36]的研究中,产生的单克

隆抗体不能检测低 ppb 水平的醚苯磺隆。而且并不是所有免疫这种半抗原的老鼠都产生了特异性的单克隆抗体,其原因可能是半抗原与蛋白质偶联时空间群重组导致的非特异性结合。

半抗原结构、免疫抗原结构、半抗原与载体蛋白形成的偶联物结合比对免疫活性均有影响,但这些影响尚不十分清楚,即使是同样的半抗原产生的抗体也会有很大的差别。在半抗原的合成研究中,应尽可能地多合成多种不同的半抗原,以便可以选择合适的匹配,建立更完善的免疫分析方法。

参考文献:

- [1] 朱良天. 精细化学品大全农药卷 [M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 2000. 494.
ZHU Liang-tian. A Complete Collection of Fine Chemicals • Pesticide [M]. Zhejiang Science & Technology Press, Hangzhou, 2000. 494.
- [2] 邓金保. 磺酰脲类除草剂综述 [J]. 世界农药, 2003, 25(3): 24–29, 32.
DENG Jin-bao. Review of sulfonylurea herbicides [J]. *World Pesticide*, 2003, 25(3): 24–29, 32.
- [3] Powley C R. Sulfonylurea herbicides [M]. In *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*; Lee P W, Aizawa H, Barefoot A C, Murphy J J, Eds; John Wiley & Sons Ltd, New York, 2003. 400–411.
- [4] Russell M H, Saladini J L, Lichtner F. Sulfonylurea herbicides[J]. *Pestic Outlook*, 2002, 4: 166–173.
- [5] 李方实, Martens D, Kettrup A. 固相萃取 2 高效液相色谱法同时测定水中的 16 种苯基脲除草剂 [J]. 色谱, 2001, 19(6): 534–537.
LI Fang-shi, Martens D, Kettrup A. Simultaneous determination of sixteen phenylurea herbicides in water by high performance liquid chromatography and solid phase extraction [J]. *Chinese Journal of Chromatography*, 2001, 19(6): 534–537.
- [6] LI Fang-shi, SUN Feng, LIU Xian-jin, et al. Development of anti-Iso-proturon polyclonal antibody[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(8): 964–969.
- [7] 吴春菊, 李方实. 间接竞争酶联免疫吸附分析方法测定土壤和面粉中的异丙隆 [J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(3): 1080–1084.
WU Chun-ju, LI Fang-shi. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of isoproturon in soil and flour [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(3): 1080–1084.
- [8] Karu A E, Goodrow M H, Schmidt J D, et al. Synthesis of haptens and derivation of monoclonal antibodies for immunoassay of the phenylurea herbicide diuron[J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42: 301–309.
- [9] Schneider P, Goodrow M H, Gee S J, et al. A highly sensitive and rapid ELISA for the arylurea herbicides diuron, monuron, and linuron[J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42: 413–422.
- [10] Bacigalupo M A, Meroni G. Quantitative determination of diuron in ground and surface water by time-resolved fluoroimmunoassay: seasonal variations of diuron, carbofuran, and paraquat in an agricultural area[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55: 3823–3828.
- [11] Katmeh M F, Frost G, Aherne W, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for isoproturon in water[J]. *Analyst*, 1994, 119:431–435.
- [12] Katmeh M F, Aherne G W, Stevenson D. Competitive enzyme-linked

- immunosorbent assay for the determination of the phenylurea herbicide chlortoluron in water and biological fluids[J]. *Analyst*, 1996, 121: 1699–1703.
- [13] Rejeb S B, Fischer–durand N, Martel A, et al. Development and validation of indirect enzyme immunoassay for the detection of the herbicide isoproturon in water matrices[J]. *Intern J Environ Anal Chem*, 1997, 69: 13–30.
- [14] Pichon V, Chen L, Hennion M C. Preparation and evaluation of immunosorbents for selective trace enrichment of phenylurea and triazine herbicides in environmental waters[J]. *Anal Chem*, 1995, 67: 2451–2460.
- [15] Vessieres A, Fischer–durand N, Bideau F L, et al. First carbonyl metal–lo immunoassay in the environmental area: application to the herbicide chlortoluron [J]. *Appl Organometal Chem*, 2002, 16: 669–674.
- [16] Sellrie F, Warsinke A, Micheel B. Homogeneous indirect fluorescence quenching immunoassay for the determination of low molecular weight substances [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386: 206–210.
- [17] Kreibitz S, Hock B, Stöcker R. An enzyme immunoassay for the determination of Methabenzthiazuron[J]. *Analytical Letters*, 1991, 24(10): 1729–1739.
- [18] Mallat E, Barzen C, Abuknesha R, et al. Part per trillion level determination of isoproturon in certified and estuarine water samples with a direct optical immunosensor[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 426: 209–216.
- [19] Simon E, Knopp D, Carrasco P B, et al. Development of an enzyme immunoassay for metsulfuron–methyl[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 1998, 10: 105–120.
- [20] 赵 静, 王庆华, 王保民, 等. 氯嘧磺隆抗体制备的研究[J]. 农药学报, 2005, 7(2): 150–155.
- ZHAO Jing, WANG Qing–hua, WANG Bao–min, et al. Preparation of polyclonal antibodies for detection chlorimuron–ethyl[J]. *Chinese Journal of Pesticide Science*, 7(2): 150–155.
- [21] Zhao J, Yi G X, He S P, et al. Development of a monoclonal antibody–based enzyme–linked immunosorbent assay for the herbicide chlorimuron–ethyl [J]. *J Agric Food Chem*, 2006, 54: 4948–4953.
- [22] 戴 烨, 李方实, 孙 峰. 甲磺隆人工抗原的合成及多克隆抗体的制备[J]. 南京工业大学学报, 2007, 29(3): 39–43.
- DAI Ye, LI Fang–shi, SUN Feng. Synthesis of artificial antigen for metsulfuron–methyl and preparation of polyclonal antibody[J]. *Journal of Nanjing University of Technology*, 2007, 29(3): 39–43.
- [23] Kolar V, Deng A P, Franek M. Production and characterization of generic antibodies against s–Triazine and sulfonylurea herbicides[J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2002, 14: 91–105.
- [24] 刘曙照, 冯大和, 邵秀金. 氯黄隆酶联免疫吸附分析技术分析[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.
- [25] Lee J K, Ahn K C, Park O S, et al. Development of an immunoassay for the residues of the herbicide bensulfuron–methyl[J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50: 1791–1803.
- [26] Degelmann P, Wenger J, Niessner R, et al. Development of a class–specific ELISA for sulfonylurea herbicides (sulfuron screen) [J]. *Environ Sci Technol*, 2004, 38: 6795–6802.
- [27] Eremin S A, Ryabova L A, Yakovleva J N, et al. Development of a rapid, specific fluorescence polarization immunoassay for the herbicide chlorsulfuron[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2002, 468: 229–236.
- [28] Yazynina E V, Zherdev A V, Eremin S A, et al. Development of enzyme immunoassays for the herbicide chlorsulfuron[J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2002, 38(1): 9–14.
- [29] Dztantiev B B, Yazynina E V, Zherdev A V, et al. Determination of the herbicide chlorsulfuron by amperometric sensor based on separation–free bienzyme immunoassay[J]. *Sensors and Actuators B*, 2004, 98: 254–261.
- [30] Schlaeppli J M A, Kessler A, Fory W. Development of a magnetic particle–based automated chemiluminescent immunoassay for triasulfuron [J]. *J Agric Food Chem*, 1994, 42: 1914–1919.
- [31] Kelly M M, Zahnow E W, Petersen W C, et al. Chlorsulfuron determination in soil extracts by enzyme immunoassay[J]. *J Agric Food Chem*, 1985, 33: 962–965.
- [32] Kawada M, Motoki M, Miyake S, et al. Bensulfuron derivatives, their conjugates, antibodies to bensulfuron–methyl, hybridomas producing the antibodies, and immunoassay using the antibodies[P]. JP 10330368 A2 15 Dec 1998.
- [33] Hironaka T, Miyake S, Motoki M, et al. Pyrazosulfuron derivatives as haptens, antibodies to pyrazosulfuron–ethyl, hybridoma secreting the antibodies, and immunochemical analysis of pyrazosulfuron–ethyl[P]. JP 11035580 A2 9 Feb 1999.
- [34] Hirai Y, Nakajima A. Polyclonal antibodies and immunoassay of pyrazos–ulfonylureas [P]. JP 11240879 A2 7 Sep 1999.
- [35] Finkelstein B L, Sharp J K. Compounds useful for measuring low levels of sulfonylureas by immunoassay [P]. CA 2027022 AA 7 Apr 1991.
- [36] Schlaeppli J M A, Meyer W, Ramsteiner K A. Determination of triasulfuron in soil by monoclonal antibody–based enzyme immunoassay[J]. *J Agric Food Chem*, 1992, 40: 1093–1098.
- [37] Sheedy C, Hall J C. Immunoaffinity purification of chlorimuron–ethyl from soil extracts prior to quantitation by enzyme–linked immunosorbent assay[J]. *J Agric Food Chem*, 2001, 49: 1151–1157.
- [38] 李方实, Kraemer P, Kettrup A. 酶联免疫吸附法测定水中异丙隆[J]. 环境科学学报, 2003, 23(3): 382–385.
- LI Fang–shi, Kraemer P M, Kettrup A. Determination of isoproturon in water by enzyme–linked immunosorbent assay[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2003, 23(3): 382–385.
- [39] Knopp A, Knopp D, Niessner R, et al. ELISA determination of the sulfonylurea herbicide metsulfuron–methyl in different water types[J]. *Environ Sci Technol*, 1999, 33: 358–361.
- [40] Kramer P M, Goodrow M H, Kremmer E. Enzyme–linked immunosorbent assays based on rabbit polyclonal and rat monoclonal antibodies against isoproturon[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 2462–2471.
- [41] Goodrow M H, Hammock. Hapten design for compound–selective antibodies: ELISAs for environmentally deleterious small molecules[J]. *Analytica Chimica Acta*, 1998, 376: 83–91.