

# 有机磷杀虫剂毒死蜱人工抗原的合成与鉴定

朱国念, 吴刚, 吴慧明

(浙江大学农药与环境毒理研究所 杭州 310029)

**摘要:**以杀虫剂毒死蜱为起始原料,在碱性条件下与3-巯基丙酸反应,合成了半抗原O,O-二乙基-O-[3,5-二氯-6-(2-羧乙基)硫代-2-吡啶基]硫逐磷酸酯(简称AR),然后分别与牛血清白蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA),经过碳二亚胺法和混合酸酐法偶联反应得到了免疫抗原和包被抗原,其结合比分别为39:1和13:1。用所得的免疫抗原免疫兔子获得了效价较高的多克隆抗体。

**关键词:**毒死蜱;半抗原;人工抗原;合成;鉴定

## Synthesis and Identification of the Antigens for the Organophosphorus Insecticide Chlorpyrifos

ZHU Guo-nian, WU Gang, WU Hui-ming

(Institute of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

**Abstract:** This study reported that the hapten of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos, O,O-diethyl-O-[3,5-dichloro-6-(2-carboxyethyl)thio-2-pyridyl]phosphorothioate (named AR) was synthesized by using technical grade chlorpyrifos reacted with 3-mercaptopropanoic acid in the hot alkazid solution. The hapten was conjugated to bovine serum albumin (BSA) with the modified active ester method to form artificial immune antigen. The ratio of AR:BSA was 39:1. The artificial coating antigen for chlorpyrifos was synthesized by conjugating AR to ovalbumin (OVA) with the mixed-anhydride method, and the ratio was 13:1. The anti-chlorpyrifos polyclonal antibodies were obtained by using the artificial immune antigen (AR-OVA) to immune in the rabbits.

**Key words:** Chlorpyrifos; Hapten; Antigen; Synthesis; Identification

毒死蜱[chlorpyrifos, O,O-二乙基-O-(3,5,6-三氯-2-吡啶基)硫逐磷酸酯],商品名为毒死蜱,乐斯本等,1965年由Dow Chemical Company推广使用的一种高效杀虫剂,在世界范围内应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物的害虫防治<sup>[1]</sup>。它对哺乳动物毒性中等,但对非靶标水生生物毒性较高<sup>[2~4]</sup>。由于毒死蜱广泛地应用于农业生产上,在粮食等作物上引起的残留问题已有所报道。而且,环境样品中发现毒死蜱残留的情况也日趋严重<sup>[5]</sup>,对人们的健康构成了潜在的威胁<sup>[6~8]</sup>。因此,随着人们对毒死蜱残留的毒性与环境风险的日益关注,亟需更科学、快捷和高效的检测手段。

酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测毒死蜱残留的研究,国外已有报道<sup>[9~11]</sup>,国内尚未见相关报道。本文研究了毒死蜱半抗原的合成与鉴定以及半抗原与载体蛋白质的偶联与鉴定,并制备出了高效价的抗毒死蜱多克隆抗体。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

**1.1.1 试验材料** 毒死蜱原药(96.78%,浙江新农化工有限公司提供)、毒死蜱标准品(99.5%)、甲基毒死蜱标准品(99.3%)、马拉硫磷标准品(98.5%)、对硫磷标准品(99.7%)、三氯吡啶酚标准品

收稿日期 2002-08-22

基金项目 浙江省自然科学基金资助项目(301283)

作者简介 朱国念(1957-),男,浙江诸暨人,教授,博士,主要从事农药环境毒理学与农药污染治理研究。Tel:0571-86971220; Fax:0571-86971902; E-mail: zhugn@zju.edu.cn

(98.25%) 杀螟硫磷标准品(99.5%) 3-巯基丙酸(Fluka Chemika) 牛血清蛋白(BSA, MW67000, 华美生物工程公司) 卵清蛋白(OVA, MW45000, 华美生物工程公司) 弗氏完全佐剂(Sigma 公司) 弗氏不完全佐剂(Sigma 公司)。

N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 二环己基碳二亚胺(DCC) N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 正三丁胺、氯甲酸乙酯、乙醇、氢氧化钠、碳酸氢钠、氯化钠、浓盐酸、硼酸、硼砂、洒石酸锑钾、钼酸铵、抗坏血酸、磷酸二氢钾(均为 A.R. 级)。

**1.1.2 试验仪器** Esquire-LC00075 液质联用仪(Bruker 公司) AVANCE DMX500 型核磁共振仪(Bruker 公司) Lambda 40 UV/VIS 分光光度计(PerkinElmer 公司) Nexus 670 型傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet 公司) 旋转蒸发器(上海申科医械专机厂) ML-902 型定时电磁搅拌机(上海浦江分析仪器厂) X-4 数字显示显微熔点测定仪(北京泰克仪器有限公司) 721 型分光光度计(上海第三分析仪器厂) 酶联仪(Bio-Rad550 型) 冷冻干燥机(ALPHA1-4) 低温离心机(HITACHI SCR20BC) 96 孔聚苯乙烯酶标板(浙江临海分析仪器厂) 及常规玻璃器皿。

## 1.2 试验方法

**1.2.1 毒死蜱半抗原的合成** 毒死蜱的结构式如图 1, 它的吡啶环上第 6 位 Cl 原子易通过亲核取代反应被取代<sup>[11]</sup>, 从而引入新的基团; 另外, 硫代磷酸酯上的乙氧基部位可以在起始合成过程中引入新的基团。据此, 可在毒死蜱结构的两个不同位点上引入连接臂(即位点 I 和 II 处), 作为 2 种不同结构的半抗原, 进一步与蛋白质偶联制备成人工抗原。本试验以毒死蜱原药和 3-巯基丙酸为起始原料, 通过亲核取代反应等步骤, 合成了 O,O-二乙基-O[3,5-二氯-6-(2-羧乙基)硫代-2-吡啶基]硫逐磷酸酯(简称 AR), 用于制备毒死蜱的人工抗原。其合成路线见图 2。

在 500 ml 的三口平底烧瓶中加入溶于 100 ml 无水乙醇的 3.75 g (31.3 mmol) 3-巯基丙酸, 然后加

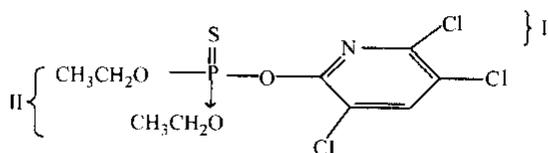


图 1 毒死蜱分子结构式

Fig. 1 The molecular structure of chlorpyrifos

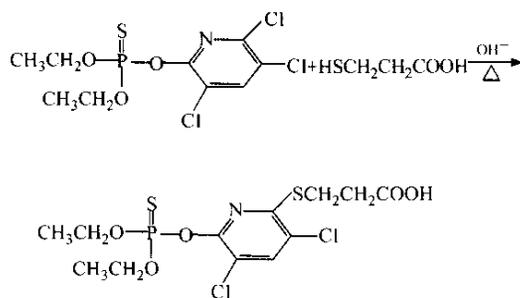


图 2 毒死蜱半抗原 AR 的合成路线

Fig. 2 Reaction scheme of the synthesis for chlorpyrifos haptens AR

入 1.82 g NaOH, 放在有加热功能的磁力搅拌器上加热搅拌反应, 直至溶解, 再加入溶于 100 ml 无水乙醇的 8.15 g 含量为 96.78% 的 (22.5 mmol·L<sup>-1</sup>) 毒死蜱原药, 回流反应 2 h, 过滤反应混合物, 减压浓缩近干。然后用 100 ml 5% NaHCO<sub>3</sub> 溶液转移到分液漏斗中, 用正己烷 (50 ml × 2) 萃取 2 次, 弃去有机相。然后用浓盐酸调水相 pH 至 3 左右, 用二氯甲烷 (50 ml × 3) 萃取 3 次, 有机相过无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 减压浓缩近干, 得棕红色油状物, 过硅胶柱, 收集洗脱液 (正己烷/乙酸乙酯, 1:2) 的流相, 减压浓缩近干。加入少量无水乙醇溶解产物, 重结晶后得到浅黄色晶体, 该晶体用熔点仪测得 m. p. 为 124 ~ 125 °C, 经计算该反应产率为 35.1%。

**1.2.2 毒死蜱半抗原分子结构的鉴定** 所得的毒死蜱半抗原产物采用 Esquire-LC00075 液质联用仪 (ESI) AVANCE DMX500 型核磁共振仪 (<sup>1</sup>H-NMR) 和 Nexus 670 型傅立叶变换红外光谱仪 (IR) 鉴定其分子结构, 并将毒死蜱与毒死蜱半抗原产物的红外吸收光谱进行了比较。

### 1.2.3 毒死蜱半抗原与蛋白质的偶联

① 碳二亚胺法合成毒死蜱免疫抗原<sup>[9, 12]</sup>: 取 80 μmol 半抗原 AR 溶于 1 ml N,N-二甲基甲酰胺中, 然后加入等当量的二环己基碳二亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺, 室温下磁力搅拌反应过夜。离心后, 取上清液 500 μl 加入到 8 ml 溶于 0.2 mol·L<sup>-1</sup> pH 9.0 的硼酸盐缓冲溶液溶解的 10 mg·ml<sup>-1</sup> 的 BSA 溶液中, 磁力搅拌下反应 4 h。待反应完成后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析 2 次, 然后用 0.9% 生理盐水溶液透析 3 d, 每天换液 3 ~ 4 次。按照 Chen<sup>[14]</sup> 的方法测定偶联物中磷的含量, 从而求出其结合比, 并分装保存于 -20 °C 冰箱中。

② 混合酸酐法合成毒死蜱包被抗原<sup>[9, 13]</sup>: 取 80

$\mu\text{mol}$  半抗原 AR 溶于 1 ml N,N-二甲基甲酰胺中, 然后加入等当量的正三丁胺和氯甲酸乙酯, 室温下搅拌反应 1 h, 取反应液 400  $\mu\text{l}$  加入 8 ml 溶于 0.2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH9.0 的硼酸盐缓冲溶液溶解的 15  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  的 OVA 溶液中, 磁力搅拌下反应 2 h。待反应完成后, 装入透析袋, 先用蒸馏水透析 2 次, 然后用 0.9% 生理盐水溶液透析 3 d, 每天换液 3~4 次。按照 Chen<sup>[14]</sup> 的方法测定偶联物中磷的含量, 从而求出其结合比, 并分装保存于  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱中。

**1.2.4 抗体的制备** 以结合物 AR-BSA 作免疫抗原免疫 3 只兔子, 先进行基础免疫, 免疫剂量为每千克兔子体重 0.5 mg 免疫抗原。免疫抗原用生理盐水稀释, 加等体积弗氏完全佐剂充分乳化, 注射时采

用背部皮下和大腿腹股沟肌肉注射相结合的方法, 4 周后加强免疫, 免疫剂量为基础免疫的 2 倍, 改用弗氏不完全佐剂, 每 2 周加强免疫 1 次。从第 3 次加强免疫开始, 免疫后第 8~10 天耳静脉取血, 采用间接竞争 ELISA 法测定抗血清的效价。效价合格后, 心脏采取全血, 分离抗血清, 并采用辛酸-硫酸铵二步沉淀法纯化抗体, 制成冻干粉, 于  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 2 结果与分析

### 2.1 毒死蜱半抗原分子的结构鉴定

取上述合成的产物分别经 ESI、 $^1\text{H-NMR}$  和 IR 测定其分子结构得图 3、图 4 和图 5。

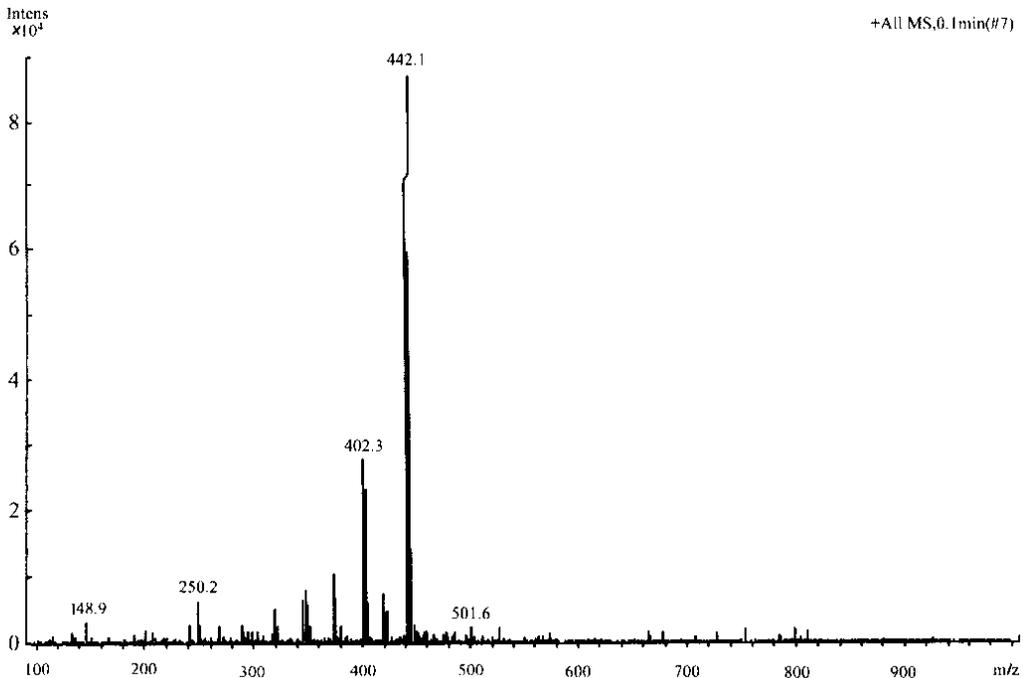


图 3 毒死蜱半抗原 AR 的 ESI 图谱

Fig. 3 The ESI spectrum of chlorpyrifos haptan AR

由图 3 可知, 合成产物的 ESI 分子离子标准峰为  $44\chi(\text{M}^+ + 23)$ , 且该峰旁有一同位素峰, 其峰高为 442 峰的  $2/3$  强, 由此可知该物质有 2 个 Cl 原子。靠近 442 峰的 402 峰, 应为该物质去掉羟基 ( $-\text{OH}$ ) 后的离子峰。由此可以初步确定合成物质为目标产物。

由图 4 可知, 该物质的  $^1\text{H-NMR}$  ( $500\text{MHz}$ ,  $\text{CD-Cl}_3$ ):  $\delta$  7.65 (s, H, ArH), 4.29~4.35 (q + q, 4H,  $2\text{CH}_2\text{O}$ ), 3.39~3.43 (t, 2H,  $\text{SCH}_2$ ), 2.91~2.94 (t, 2H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 1.27~1.42 (t, 6H,  $2\text{CH}_3$ ), 与文献值相符<sup>[11]</sup>。

由图 5 可知, 该物质的 IR (KBr 压片)  $\text{cm}^{-1}$  为: 298 $\chi$  (s~m, C- $\text{CH}_3$ ), 1711 (s, C=O, 饱和脂肪酸), 1541 (m, C=N, 吡啶), 1402 $\chi$  (s, C-C, 芳香族), 1246 (s~m, P-O-C, 芳香族), 1068 (s~m, C-S, 芳香族), 1019 (s, P-O-C, 脂肪族), 862 $\chi$  (s~m, P=S) 及 828 $\chi$  (s~m, C-Cl, 芳香族)。

由图 6 可知, 毒死蜱的 IR (KBr 压片)  $\text{cm}^{-1}$  为: 298 $\chi$  (s~m, C- $\text{CH}_3$ ), 1550 (m, C=N, 吡啶), 1412s, C-C, 芳香族), 1274 (s~m, P-O-C, 芳香族), 1072 $\chi$  (s~m, C-S, 芳香族), 1022 $\chi$  (s, P-O-C, 脂肪族), 837 $\chi$  (s~m, P=S) 及 745 $\chi$  (s~m, C-Cl, 芳香族)。



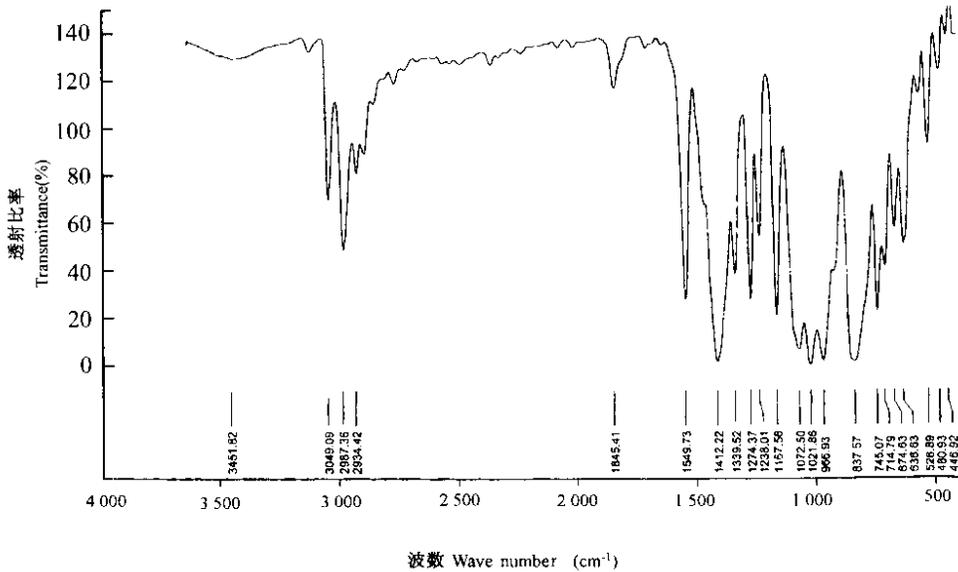


图 6 毒死蜱的 FTIR 图谱

Fig.6 The FTIR spectrum of chlorpyrifos

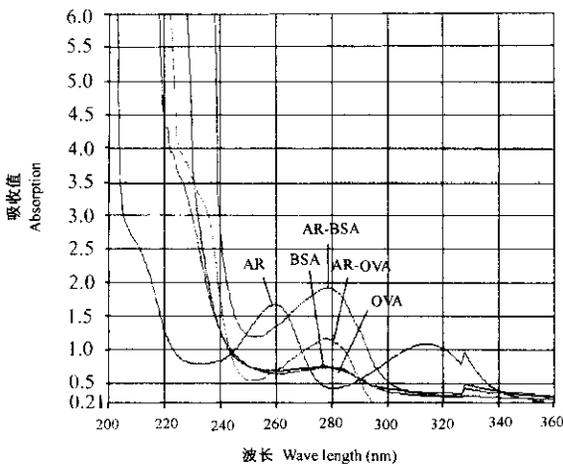


图 7 毒死蜱半抗原 AR 与蛋白质偶联物的紫外扫描图谱

Fig.7 The UV spectra of the chlorpyrifos hapten AR conjugated to the protein

定抗毒死蜱抗体的效价。当包被抗原 AR-OVA 的浓度为  $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  时, 抗血清的效价分别为  $2.56 \times 10^4$ 、 $1.28 \times 10^4$ 、 $1.28 \times 10^4$ , 而抗体混匀后纯化的冻干粉的效价为  $5.12 \times 10^6$ 。并进一步确定间接竞争 ELISA 分析方法抗原与抗体的最适工作浓度为: 包被抗原 AR-OVA 的浓度为  $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 抗体的浓度为  $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

### 2.5 抗体的特异性

用间接竞争 ELISA 法检测毒死蜱、毒死蜱结构类似的化合物及毒死蜱的代谢产物对获得的多克隆

抗体的抑制情况的结果显示, 当对 AR-BSA 抗体的抑制率为 50% 时, 毒死蜱的浓度为  $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 抗体对各类似物的交叉反应率均小于 2.0% (甲基毒死蜱除外), 可知该抗体的特异性较好。该抗体对三氯吡啶酚交叉反应率为 1.5%; 对硫代磷酸酯类有机磷农药交叉反应率分别为: 甲基毒死蜱为 119%, 马拉硫磷  $< 0.15\%$ , 对硫磷为 0.16%, 杀螟硫磷为 0.34%。

### 3 讨论

在农药残留的免疫化学分析中, 人工抗原的合成是制备抗体和建立免疫分析方法最关键的步骤, 半抗原的设计又是合成人工抗原的前提。半抗原的设计应考虑两方面的因素: 第一, 能否刺激机体产生免疫应答; 第二, 产生的抗体能否具有预期的活性。另外, 还应注意以下问题: 半抗原结构中是否含有芳香结构。据文献统计<sup>[16]</sup>, 如果结构中有芳香结构, 其平均成功率约为  $1/3$  相比之下, 不含芳香结构的半抗原, 成功率仅占  $1/11$ , 其原因是前者形成的抗原具有较强的免疫原性, 可使机体产生较强的免疫应答, 因而增加了筛选概率。

毒死蜱的吡啶环上第 6 位 Cl 原子很容易通过亲核取代反应被取代<sup>[11]</sup>。据此, 本文选择毒死蜱为原料, 在碱性条件下与 3-巯基丙酸加热回流反应, 合成了半抗原 O, O-二乙基-O[3, 5-二氯-6-(2-羧乙基) 硫代-2-吡啶基] 硫逐磷酸酯, 从而将毒死蜱的分子结构做了微小的改变, 得到了目标产物。并利用

ESI、<sup>1</sup>H-NMR 和 IR 对其结构进行了鉴定,与文献报道相符。从毒死蜱与合成的产物的 IR 数据比较进一步可以看出,毒死蜱不含有羧基,而所合成的产物含有特征基团羧基,应为所需的目标产物。

在本研究中,用所得的结合比为 39:1 的免疫抗原(AR-BSA)免疫新西兰白兔,制得了效价较高的抗毒死蜱抗体。虽然甲基毒死蜱与毒死蜱的结构极为相似,对所制备的抗体交叉反应率也较高,但由于甲基毒死蜱一般作为卫生杀虫剂使用,另外,即使甲基毒死蜱用于防治农作物上的病虫害,也几乎不可能与毒死蜱同时使用。所以这并不影响对样品中有机磷杀虫剂毒死蜱残留的测定。以上结果表明,本研究所合成的毒死蜱半抗原(AR)及其人工抗原技术路线是可行的,所得产物与预期相符。

致谢:本文得到了浙江工业大学徐振元教授、许旦倩研究员和章初龙老师的热心帮助与指导,特此谢忱。

## References

- [ 1 ] 刘乾开,朱国念. 新编农药使用手册. 上海:上海科学技术出版社,1999:60-62.  
Liu Q K, Zhu G N. *New Manual of Pesticides*. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 1999:60-62. (in Chinese)
- [ 2 ] Tafuri J, Roberts J. Organophosphate poisoning. *Annals of Emergency Medicine*, 1987, 6:193-202.
- [ 3 ] Raven P J, George J J. Recovery by riffle macroinvertebrates in a river after a major accidental spillage of chlorpyrifos. *Environmental Pollution*, 1989, 59:55-70.
- [ 4 ] Ward S, Arthington A H, Pusey B J. The effects of a chronic application of chlorpyrifos on the macroinvertebrate fauna in an outdoor artificial stream systems: species responses. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, 30:2-23.
- [ 5 ] Hallberg G R. Pesticide pollution of groundwater in the humid United States. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 1989, 26:299-367.
- [ 6 ] Neidert E, Trotman R B, Saschenbrecker P W. Levels and incidences of pesticide residues in selected agricultural food commodities available in Canada. *The Journal of AOAC International*, 1994, 77:18-33.
- [ 7 ] KAN-DO (Office and Pesticide Team). Accumulated pesticide and industrial chemical findings from a ten-year study of ready-to-eat foods. *The Journal of AOAC International*, 1995, 78:614-631.
- [ 8 ] Cochran R C, Kishiyama J, Aldous C, Carr W C, Pfeifer K F. Chlorpyrifos-hazard assessment based on a review of the effects of short-term and long-term exposure in animals and humans. *Food and Chemical Toxicology*, 1995, 33:165-172.
- [ 9 ] Manclus J J, Primo J, Montoya A. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide Chlorpyrifos. 1. monoclonal antibody production and immunoassay design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44:4052-4062.
- [ 10 ] Manclus J J, Primo J, Montoya A. Development of enzyme-linked immunosorbent assays for the insecticide chlorpyrifos. 2. assay optimization and application to environmental waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44:4063-4070.
- [ 11 ] Manclus J J, Primo J, Montoya A. development of a chlorpyrifos immunoassay using antibodies obtained from a simple hapten design. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42:1257-1260.
- [ 12 ] Langone J J, Van Vunakis H. Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 1975, 10:163-171.
- [ 13 ] Riggle B. Determination of enzyme immuno-assay for the detection of the Herbicide Norflurazon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1990, 38:1922-1925.
- [ 14 ] Chen P S, Thonbara T Y, Wamer H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical Chemistry*, 1956, 28(11):1756-1758.
- [ 15 ] 孙远明,赵肃清,张春艳,黄晓钰,雷红涛. 甲胺磷人工抗原的合成与鉴定. *免疫学杂志*, 2002, 18(3):163-166.  
Sun Y M, Zhao S Q, Zhang C Y, Huang X Y, Lei H T. Synthesis and identification of methamidophos artificial antigen. *Immunological Journal*, 2002, 18(3):163-166. (in Chinese)
- [ 16 ] Thomas N R. Hapten design for the generation of catalytic antigens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1994, 47(2-3):345-372.

(责任编辑 王红艳)