

西维因人工抗原的合成新方法

杨耀军^{1,2}, 渠桂荣², 孟凡涛¹, 马光辉¹

(1. 中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080; 2. 河南师范大学化学与环境科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 用对硝基苯氯甲酸酯活化萘酚并与 6-氨基己酸反应, 合成了完全保留氨基甲酸酯结构的半抗原 6-(1-萘氧基甲酰胺基)己酸(CNH), 并采用活化酯法与载体蛋白共价连接制备了突出西维因结构特征的抗原. 用正交实验选择活化酯法的最佳实验条件, 并进一步详细考察了半抗原与载体蛋白结合率随外界条件的改变, 从而制得不同结合比的抗原. 用紫外和红外对制得的抗原进行了鉴定.

关键词: 西维因; 对硝基苯氯甲酸酯; 半抗原; 抗原; 活化酯法

中图分类号: S481 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2005)02-0201-04

1 前言

西维因(Carbaryl, 1-萘基-N-甲基氨基甲酸酯)是世界上第一个商品化并大量使用的高效低毒氨基甲酸酯类杀虫剂, 广泛应用于粮食、蔬菜、水果及经济作物等的害虫防治^[1]. 虽然西维因对除蜜蜂^[2]外的非防治对象的动物(如家禽、鸟类、鱼及其他野生动物)危害很小, 但近期研究发现作物和蔬菜上农药残留仍会对人体健康造成较大的危害, 这已引起人们的广泛关注. 因此开发一种简单、快速, 适用农药残留现场监测的痕量分析方法—免疫分析方法具有重要的现实意义^[3].

在免疫分析中, 要获得对农药分子具高特异性和亲和力的抗体, 首先必须制备出具有高免疫原性和特异性的人工抗原. 人工抗原的制备包括两步: (1) 合成保留农药分子结构且带活性基团的半抗原; (2) 使半抗原的活性基团与白蛋白、卵清蛋白等载体蛋白反应, 得到抗原. 其中制备带活性基团的半抗原是关键. 国外报道的氨基甲酸酯类的半抗原采用的合成方法^[4-6]是: 用光气活化酚盐, 制得氯甲酸酯结构, 再与氨基己酸反应形成氨基甲酸酯结构的半抗原. 由于光气毒性很大, 反应过程中一定要避免泄露, 这增大了反应操作的难度和生产的危险性. 本研究提出采用对硝基苯氯甲酸酯对萘酚活化制备半抗原, 避免了与光气的直接接触, 并系统研究了抗原中蛋白质和半抗原结合比受外界条件的影响. 这

是国内外西维因免疫检测实验^[6-8]中未曾报道的. 该实验的前期工作为下一步免疫实验提供了可靠的免疫原, 也为进一步进行其他农药的免疫分析奠定了基础.

2 材料和方法

2.1 材料和仪器

2.1.1 实验材料

对硝基苯氯甲酸酯、 α -萘酚、6-氨基己酸(Fluka 公司); 牛血清蛋白(BSA)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS, Sigma 公司); N, N'-二环己基炭二亚胺(DCC, 上海余山化工厂); 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液, pH 9.4, 0.05 mol/L 硼酸盐缓冲液, pH 8.0 或 8.7, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液, pH 7.4; 柱层析硅胶(青岛海洋化工厂); 实验所用有机试剂均为国产分析纯.

2.1.2 实验仪器

紫外可见分光光度计(瑞典 Pharmacia 公司), 红外光谱仪(FT/IR, 日本 JASCO 公司), 核磁共振仪(dm3000, 德国 Bruker), 质谱仪(BIFLEXIII, Bruker), 旋转蒸发仪(河南巩峪仪器厂), 磁力搅拌器(上海市南汇器材厂), 透析袋(8000~14000), 以及其他常用玻璃器皿.

2.2 实验方法

2.2.1 半抗原的合成

合成目标化合物 6-(1-萘氧基甲酰胺基)己酸(CNH)需经过两步反应, 合成路线见图 1.

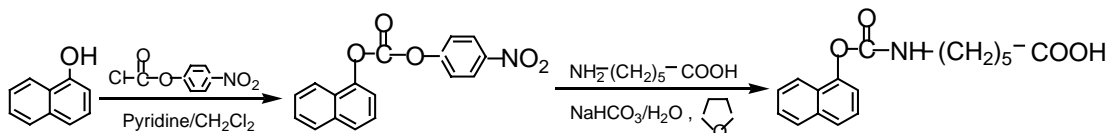


图 1 西维因半抗原合成路线图

Fig.1 Reaction of the synthesis of carbaryl hapten

收稿日期: 2004-04-28, 修回日期: 2004-05-25

基金项目: 863 高技术项目基金资助(编号: 2004AA2Z 3401)

作者简介: 杨耀军(1970-), 女, 河南省方城县人, 硕士研究生, 有机化学专业; 马光辉, 通讯联系人.

(1) 1-萘氧基-4-硝基苯碳酸酯的制备

0.8 g (5.5 mmol) 萘酚溶于 15 mL 二氯甲烷后, 加入 0.58 mL (10 mmol) 吡啶形成混合溶液, 向其中滴加 1 g (5 mmol) 对硝基苯氯甲酸酯溶液(溶于 10 mL 二氯甲烷), 整个体系保持 4 °C 以下冰盐浴. 用薄板层析(TLC)跟踪反应(展开剂为二氯甲烷:石油醚=3:2), 确定 3 h 结束反应. 反应液先用 3% 的盐酸于分液漏斗中振荡洗涤, 后用二氯甲烷和乙醚重结晶. 得到淡黄色的 1-萘氧基-4-硝基苯碳酸酯晶体, 以对硝基苯氯甲酸酯为基准的收率为 70%.

(2) CNH 的制备

取 0.4 g (1.2 mmol) 上步制得的 1-萘氧基-4-硝基苯碳酸酯溶于 12 mL 四氢呋喃中, 0.16 g (2.4 mmol) 6-氨基己酸溶于 pH 为 8.2 的 12 mL 碳酸氢钠溶液, 把四氢呋喃溶液(溶有 1-萘氧基-4-硝基苯碳酸酯)逐滴加入碳酸氢钠溶液(溶有 6-氨基己酸)中, 滴加过程保持冰浴, TLC 跟踪反应(展开剂同上), 确定室温反应 4.5 h. 反应结束后, 在冰浴下加 4 mol/L 的 HCl 调节反应液的 pH 为 4, 用乙酸乙酯提取 3 次, 提取液加无水 Na₂SO₄ 脱水, 浓缩至约 5 mL, 所得溶液用硅胶 H 柱常压层析, 洗脱剂为丙酮:石油醚(1:3). 收集目标组分, 减压蒸馏除去溶剂得到白色晶体. 以 1-萘氧基-4-硝基苯碳酸酯为基准, 收率为 90%. 用红外、核磁和质谱鉴定其化学结构.

2.2.2 半抗原与蛋白质的偶联

(1) CNH 活化

称取 0.43 g (1.4 mmol) CNH 和 0.25 g (2.8 mmol) NHS 置于反应瓶中, 加入 10 mL 无水四氢呋喃溶解, 另取 0.59 g (2.8 mmol) DCC 溶于 10 mL 无水四氢呋喃, 将此溶液加入反应瓶中, 室温搅拌反应, TLC 跟踪反应(展开剂为丙酮:石油醚=1:1), 确定 5 h 结束. 反应液在 4 °C 条件下密闭静置, 过滤, 得活化酯液. 将此溶液浓缩至约 5 mL, 用硅胶 H 柱常压层析, 洗脱剂为丙酮:石油醚(1:4). 收集目标组分, 减压蒸馏除去溶剂得白色晶体.

(2) CNH 偶联

称取一定量的活化酯溶于 DMSO 中(活化酯的量按表 1), 浓度为 12 mg/mL, 称取 10 mg BSA 溶于 1 mL 不同 pH 值的 0.05 mol/L 的缓冲液中, 在磁力搅拌下等量分次将活化酯溶液滴加到 BSA 溶液中, 约 30 min 滴加完毕(滴加时间不计入反应时间内). 按正交表 L₉(3⁴) 的设计进行反应. 反应产物于 0.01 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中透析, 直至透析外液中测不出半抗原的 OD₂₈₀ 为止. 精确计量透析后偶联物溶液的体积, 计算蛋白质浓度. 以最后 1 次的透析外液作空白, 分别对偶联物溶液、半抗原溶液、载体蛋白溶液进行紫外扫描,

根据扫描图谱确定是否发生了偶联. 根据各自的 OD₂₈₀ 和浓度分别计算摩尔吸光系数 ϵ_{280} , 按下式估算半抗原与载体蛋白结合的分子数之比(结合比): 结合比 = $(\epsilon_{280}^{\text{偶联物}} - \epsilon_{280}^{\text{载体蛋白}}) / \epsilon_{280}^{\text{半抗原}}$. 对透析结束后的样品冷冻干燥, 用红外光谱仪测定, 进一步鉴定偶联反应的产物.

表 1 正交实验表 L₉(3⁴) 设计^[9]

Table 1 Orthogonal L₉(3⁴) design of the test

Level	CNH:BSA (mol/mol)	pH	Temperature (°C)	Time (h)
1	20:1	8.0	4	1
2	35:1	8.7	20	2
3	50:1	9.4	40	3

3 结果和讨论

3.1 半抗原 CNH 的鉴定及讨论

红外光谱(IR, KBr 压片): 3288 cm⁻¹ (s, $\nu_{\text{N-H}}$), 2931 cm⁻¹ (s, $\nu_{\text{C-H}}$), 3000~2540 cm⁻¹ (w, -COOH 缔合), 1720 cm⁻¹ (s, $\nu_{\text{C=O}}$ 氨基甲酸酯结构), 1706 cm⁻¹ (s, $\nu_{\text{C=O}}$ 羧酸), 1225 cm⁻¹ (s, $\nu_{\text{C-O-C}}$).

核磁共振谱(¹H NMR, TMS 为内标), 共振频率为 400 MHz, 溶剂 aceton-d₆, δ (ppm): 1.47~1.53 (m, 2H, CH₂), 1.64~1.70 (m, 4H, 2CH₂), 2.33~2.37 (t, 2H, CH₂COOH), 3.28~3.33 (q, 2H, CH₂NH), 7.32~8.02 (m, 7H, aromatic C₁₀H₇).

质谱(EIMS): 溶剂为乙腈, 在 301.03 cm⁻¹ 处有 1 个最高的分子离子峰, 与该产物的分子量相符.

红外、核磁和质谱分析结果与文献^[6]结果相符合, 所合成的半抗原为 CNH 结构.

对于西维因半抗原的合成, 国外采用的合成方法^[6]是: 在酚盐的水溶液中通入过量的光气, 得到中间产物氯甲酸酯, 再用氯甲酸酯和氨基己酸在氢氧化钠溶液中反应生成半抗原. 实际上用光气合成氨基甲酸酯类农药属于一种传统的方法^[10,11]. 这类方法难免要使用大量的光气, 极易造成环境污染. 本研究采用对硝基苯氯甲酸酯制成了碳酸酯的结构, 避免了直接使用光气, 并获得了较高的收率(70%). 接下来与氨基己酸的反应中, 文献^[6]用强碱 NaOH 溶液作为反应体系, 结果造成半抗原中萘氧基的大量水解, 因此与氨基己酸的反应收率较低(68%). 本研究过程中曾按其碱性条件进行重复实验, 收率仅为 10%, 所以采用 NaHCO₃ 稀水溶液这样的弱碱性环境, 有效地避免了萘氧基的水解, 收率提高到 90%.

3.2 人工抗原 BSA-CNH 的鉴定

合成抗原的紫外和红外光谱图如图 2, 3 所示. 从图 2 紫外光谱可以看出, BSA 和 CNH 在 280 nm 处均有吸收, 但 CNH 在 280 nm 处的吸收比较特殊, 存在明显的肩峰. 合成抗原在该位置的紫外吸收不是简单的蛋白和

半抗原紫外谱图的叠加, 其紫外吸收的位置及峰形都发生了改变; 如果是二者简单的混合, 该处的最高峰均在 280 nm 处, 而发生偶联后的产物最高峰飘移至 282 nm. 计算表明, 偶联反应后抗原的摩尔吸光系数明显增加.

从图 3 可以看出 BSA 的红外光谱呈现了蛋白质类共有的吸收, 如 3306 cm^{-1} 的胺基 N-H 吸收峰、 1653 cm^{-1} 的酰胺谱带 I 和 1538 cm^{-1} 的酰胺谱带 II 等. 将偶联产物 BSA-CN H 和 BSA 的红外光谱对比可知: (1) BSA-CN H 显示出了蛋白 BSA 在 $3306, 1653$ 和 1538 cm^{-1} 的特征吸收. (2) 在 1720 和 1225 cm^{-1} 出现吸收峰. 1720 cm^{-1} 处的峰与半抗原 CNH 中氨基甲酸酯的羰基吸收位置相吻合^[12], 而 1225 cm^{-1} 处的强吸收峰正是半抗原中 C-O-C 的特征吸收峰. 所以 BSA-CN H 兼有 BSA 和 CNH 的吸收峰.

红外和紫外光谱均确证了偶联反应的发生.

3.3 合成抗原的正交实验结果

正交实验反映出偶联反应受外界条件的影响情况: 投料摩尔比对结合比的影响最大, 其次是反应体系的 pH 值, 而温度和时间的影响较小.

为了防止抗原中羰基的断裂和简化实验操作, 在恒定室温和 pH 9.4 的条件下, 进一步研究了投料摩尔比和反应时间对结合比的影响, 实验结果如图 4, 5 所示.

3.3.1 投料摩尔比(CNH/BSA)对结合比的影响

从图 4 可以看出, 当 CNH 与 BSA 的摩尔比低于 70:1 时, 随着投料比的增加, 蛋白的结合比也在明显增加, 而摩尔比在 70:1 以上时对蛋白的结合比没有太大的影响, 这是由于载体蛋白 BSA 中可与 CNH 反应的氨基是有限的, 摩尔比增大到一定程度后, 并不会由于 CNH 的增多而提高利用率. 因此从节约原料的角度考虑, CNH 与 BSA 最大投料摩尔比不超过 70:1 为宜.

3.3.2 反应时间对结合比的影响

从图 5 可以看出, 反应开始时 CNH 和 BSA 的结合比迅速增加, 并且在 1 h 达到最大值. 随反应时间的延长, 合成抗原的结合比反而降低. 这是由于活化酯的活性较大, 反应初始阶段可以与蛋白发生较快的偶联反应, 但是生成抗原中的羰基不稳定, 易发生水解, 随着羰基水解离去, 产物在 280 nm 处吸收峰的高度降低, 从而计算得出的结合比减小.

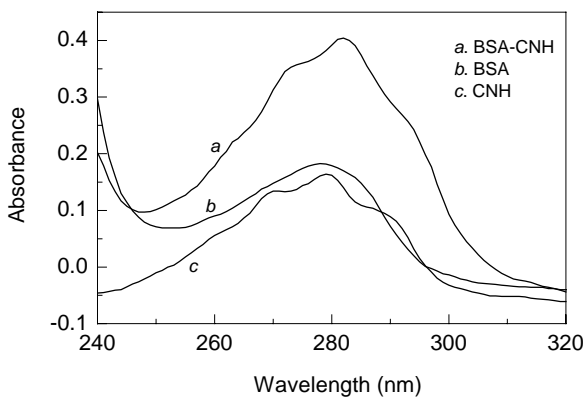


图 2 合成抗原的紫外扫描光谱
Fig.2 UV scanning spectra of the antigen

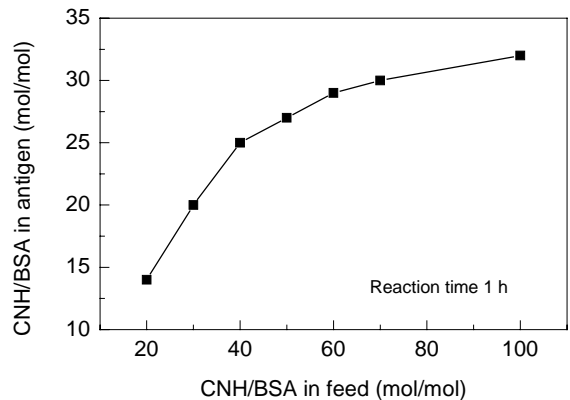


图 4 投料摩尔比(CNH/BSA)对结合比的影响
Fig.4 Influence of CNH/BSA in feed on CNH/BSA in antigen

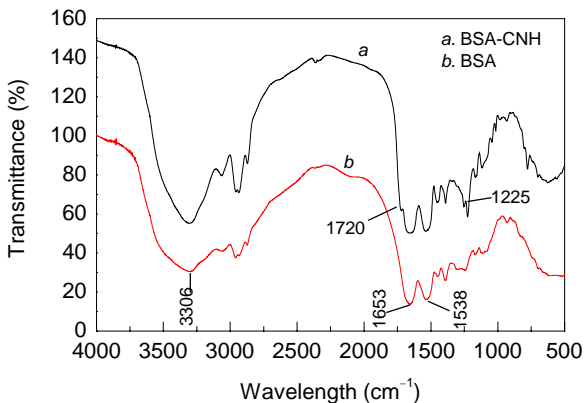


图 3 合成抗原的红外光谱
Fig.3 IR spectra of the antigen

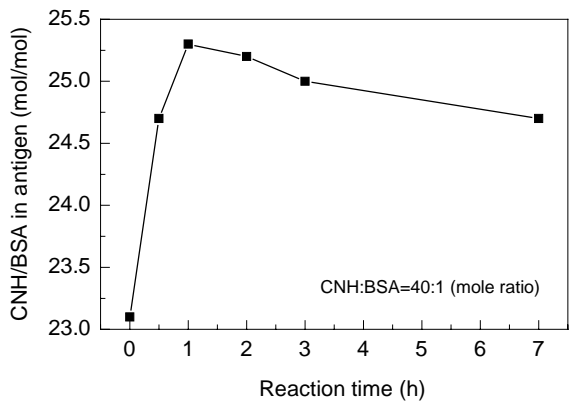


图 5 反应时间对结合比的影响
Fig.5 Influence of reaction time on CNH/BSA in antigen

4 结论

在半抗原的合成中用对硝基苯氯甲酸酯对萘酚活化, 可避免传统方法中使用毒性较大的光气. 碳酸酯与氨基己酸反应, 使用弱碱 NaHCO_3 的稀溶液取代 NaOH , 有效避免了萘氧基的水解, 大大提高了反应的收率.

通过活化酯法将半抗原 CNH 与载体蛋白 BSA 共价偶联, 成功地获得了人工抗原 BSA-CN. 偶联反应的正交实验表明, CNH 与 BSA 的投料摩尔比是决定抗原 BSA-CN 结合比的关键, 反应体系的 pH 对结合比有重要影响, 偶联时间不宜过长, 反应温度对结合比的影响较小. 通过对偶联反应的进一步研究, 确定在 pH 9.4、室温、反应 1 h 情况下, 改变 CNH 和 BSA 投料摩尔比, 可得到不同结合比的抗原. 今后将用得到的不同结合比的抗原对动物进行免疫, 以确定免疫效果最好的结合比.

参考文献:

- [1] Hodgson E. Pesticides — Past, Present and Future Review [J]. *Pestic. Toxicol.*, 1991, 1(1): 3–12.
- [2] Westlake G E. Effects of Storage and Pesticide Treatment on Honey Bee Brain Acetylcholinesterase Activities [J]. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1985, 34: 668–675.
- [3] Meulenberg E P, Mulder W H, Stokes P G. Immunoassay for Pesticides [J]. *Environ. Sci. Technol.*, 1995, 29: 553–561.
- [4] Abad A, Moreno M J, Montoya A. Development of Monoclonal Antibody-based Immunoassays to the N-methylcarbamate Pesticide Carbofuran [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47(6): 2475–2485.
- [5] Abad A, Moreno M J, Montoya A. Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to the N-methylcarbamate Pesticide Methiocarb [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46(6): 2417–2426.
- [6] Abad A, Montoya A. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1994, 42(8): 1818–1823.
- [7] 刘曙照, 冯大和, 钱传范. 甲萘威酶联免疫吸附分析技术研究 [J]. *农药学报*, 1999, 1(1): 62–68.
- [8] Maria P M. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Carbaryl [J]. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, 41(3): 423–430.
- [9] Cendloff E H, Casale L W, Ram P B, et al. Hapten-protein Conjugates Prepared by the Mixed Anhydride Method [J]. *J. Immunol. Methods*, 1986, 92: 15–20.
- [10] Lambrecht J A. α -Naphthol Bicyclic Aryl Esters of N-substituted Carbamic Acids [P]. US Patent: 2903478, 1959–09–08.
- [11] Kuhr R J, Dorough H W. 氨基甲酸酯杀虫剂的化学、生物学、及毒理学 [M]. 张立言, 译. 北京: 化学工业出版社, 1984. 18.
- [12] 谢晶曦. 红外光谱在有机化学和药物化学中的应用 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1987. 276.

Novel Synthesis of the Antigen for Carbaryl

YANG Yao-jun^{1,2}, QU Gui-rong², MENG Fan-tao¹, MA Guang-hui¹

(1. State Key Lab. Biochem. Eng., Institute of Process Engineering, CAS, Beijing 100080, China;

2. College of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007, China)

Abstract: A hapten 6-[(1-naphthyloxy) carbonyl] amino hexanoic acid (CNH) completely preserving the carbamate group was synthesized with aminohexanoic acid and 1-naphthol, which was activated with 4-nitrophenyl chloroformate. Then the CNH hapten was covalently attached to carrier protein by utilizing the modified active ester method to synthesize antigen. Some factors influencing synthesis of CNH antigen were studied, and the conditions were optimized through orthogonal design experiments. A series of CNH-BSA antigens of different CNH/BSA mole ratios were synthesized by altering the experimental conditions. The antigens were identified with the UV-VIS and IR analysis.

Key words: carbaryl; 4-nitrophenyl chloroformate; hapten; antigen; active ester method