

甲胺磷人工抗原的合成及光谱表征

王向红^{1,2}, 段振娟¹, 宋诗莹¹, 王 硕^{1*}

1. 天津市食品营养与安全重点实验室, 天津科技大学生物技术与食品工程学院, 天津 300457
2. 河北农业大学食品科技学院, 河北 保定 071001

摘要 通过化学方法合成了一种甲胺磷的半抗原 6-(O,O-二甲基硫代磷酰基)氨基己酸(MC), MC与N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)反应得到 6-(O,O-二甲基硫代磷酰基)氨基己酸活化酯(MCE), 活化酯(MCE)与匙孔血蓝蛋白(KLH)偶联得到第一种人工抗原(MC-KLH); 直接用甲胺磷作为半抗原用重氮化法与牛血清蛋白(BSA)偶联得到第二种人工抗原(M-BSA)。通过质谱、红外和核磁表征, 证明所合成的半抗原是设计的目标产物; 并且对两种人工抗原进行了红外光谱分析, 结果表明, 人工抗原 1 的红外光谱中既有酰胺结构单元又有半抗原中的甲氧结构单元; 半抗原 2 中不但具有酰胺结构单元又有甲胺磷的甲氧基和硫氧基结构单元, 以此判断半抗原和蛋白偶合成功, 为红外光谱法用于人工抗原合成与否的鉴定研究提供了依据。

关键词 甲胺磷; 半抗原; 人工抗原; 红外光谱法

中图分类号: TS207.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-0593(2007)05-0881-05

引言

甲胺磷是一种广谱杀虫剂, 前些年在我国使用非常广泛, 但是它对哺乳动物的毒性很大, 我国已经严令禁止使用。自从 20 世纪 90 年代以来, 农药残留的酶联免疫吸附测定技术(ELISA)得到了全面迅速的发展, 免疫法操作便捷, 具有很高的灵敏度, 适合大批食品样品的检测。甲胺磷酶联免疫分析方法的开发, 首先要制备出针对甲胺磷的抗体, 而甲胺磷的相对分子质量仅为 141, 不具有免疫原性, 必须与大分子载体蛋白交联才能刺激动物产生免疫应答。为了探讨简便、快速、特异性的免疫分析方法, 需要合成甲胺磷的半抗原并连接蛋白制备出具有免疫原性的人工抗原, 为其免疫分析方法的建立提供必要条件。

本实验拟合成了两种人工抗原, 第一种人工抗原(MC-KLH)是利用 O,O-二甲基硫代磷酰氯与 6-氨基己酸反应得到与甲胺磷结构类似具有一个六个碳间隔臂结构的半抗原, 再将此半抗原衍生为活化酯, 之后与匙孔血蓝蛋白(KLH)连接得到; 第二种人工抗原(M-BSA)是直接利用甲胺磷作为半

抗原, 通过重氮化反应连接牛血清蛋白(BSA)得到。并且通过红外光谱法鉴定两种人工抗原, 判断半抗原和载体蛋白偶联是否成功。

1 试剂、仪器与方法

1.1 试剂

甲胺磷 99%, 农业部药检所。O,O-二甲基硫代磷酰氯 99%, Aldrich 公司。N-羧基琥珀酰亚胺(NHS); N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC); 匙孔血蓝蛋白(KLH); 牛血清蛋白(BSA) (均购自 Sigma 公司)。6-氨基己酸及其他化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

布鲁克 VECTOR 22 傅里叶变换红外光谱仪; 布鲁克 AV-300 和布鲁克 AV-400 核磁共振仪; 热电 LCQ Advantage 液相色谱-质谱联用仪; EPPENDORF 台式冷冻干燥机。

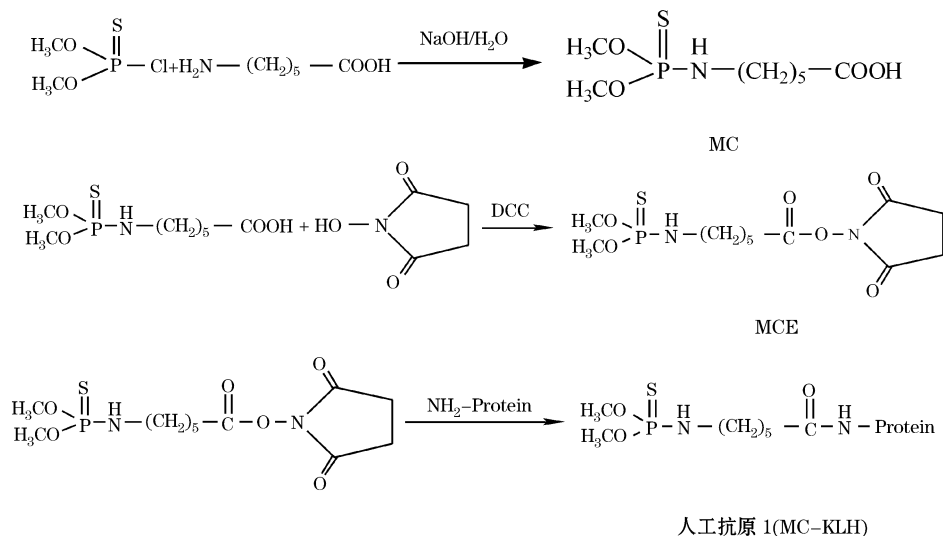
1.3 方法

1.3.1 人工抗原 1 的合成

收稿日期: 2005-12-10, 修订日期: 2006-04-20

基金项目: 国家“863”计划项目(2006AA10Z448), 人事部高层次留学回国人才资助计划和天津科技大学科学研究基金项目(20050204)资助

作者简介: 王向红, 女, 1973 年生, 天津科技大学生物技术与食品工程学院副教授 * 通讯联系人 e-mail: s. wang@tust. edu. cn



人工抗原 1(MC-KLH)

(1) 半抗原 6-(O,O-二甲基硫代磷酰基)氨基己酸(MC)的合成

称取 1.31 g 6-氨基己酸置于三颈瓶中, 加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 冰浴搅拌 30 min, N_2 保护下, 逐滴加入溶有 1.215 mL O,O-二甲基硫代磷酰氯的 THF 溶液, 冰浴下搅拌 1~2 h, 反应完全后旋除 THF, 水层调至酸性, 乙酸乙酯萃取, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 真空干燥得白色针状固体 1.93 g, 产率 75.8%, TLC(二氯甲烷: 甲醇=50:1+1 滴冰醋酸) $R_f=0.51$ 。

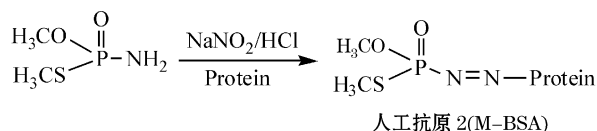
(2) 6-(O,O-二甲基硫代磷酰基)氨基己酸活化酯(MCE)的合成

称取 510 mg MC, 254 mg N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)溶于无水二氯甲烷中, N_2 保护下, 滴加溶有 454 mg DCC 的无水四氢呋喃溶液, 搅拌过夜。过滤除去白色沉淀, 旋除有机溶剂, 加入 20 mL CH_2Cl_2 , 用饱和 NaCl 洗涤 3 次, 无水硫酸钠干燥, 硅胶柱纯化(二氯甲烷: 甲醇=80:1+1 滴冰醋酸洗脱) $R_f=0.51$, 得无色透明油状物 0.16 g, 产率 23%。

(3) 用活化酯法合成人工抗原 1(MC-KLH)

精确称取 10 mg MCE, 溶解于 1 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 另取 10 mg KLH 溶于 2 mL pH 值为 8.3 的 KH_2PO_4 溶液中, 冰浴下, MCE(13 倍过量)滴加入蛋白溶液中, 4°C 放置过夜后将反应液装入透析袋, 4°C 下, 用 PBS 透析 3 天, 透析液冷冻干燥得到白色粉末, 贮于 -20°C 下备用。

1.3.2 用重氮化法合成人工抗原 2(M-BSA)



称取 100 mg 甲胺磷溶于 10 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl 中, 冰浴搅拌下加入预冷的 1% NaNO_2 至淀粉碘化钾试纸变蓝后继续搅拌 30 min; 另称取 10 mg BSA 溶解于 2 mL pH 8.7 的硼酸盐缓冲液中, 取上述重氮化产物 2 mL 滴加到蛋白溶液中, 冰浴下搅拌 2 h, 4°C 放置过夜后将反应液装入透析

袋, 4°C 下, 用 PBS 透析 3 天, 透析液冷冻干燥得到白色粉末, 贮于 -20°C 下备用。

2 结果

2.1 半抗原 6-(O,O-二甲基硫代磷酰基)氨基己酸(MC)的表征

半抗原 MC 的 MS, IR, ^1H NMR 图分别见图 1, 图 2 和图 3。MS(ESI): [Found: m/z 278.17 [M+Na] $^+$, 532.82 [2M+Na] $^+$, calcd for $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}_4\text{NPS}$ Mr=255]; IR(KBr, cm^{-1}): 3323(s), 3100~2500(br), 2982(w), 2946(m), 2877(w), 1703(s), 1438(w), 1408(m), 1319(m), 1092(s), 1051(s), 1026(s), 926(w), 816(s), 796(s), 735(w), 647(m); ^1H NMR(300 MHz, DMSO- d_6 , ppm): δ 11.969(s, 1H, COOH), 3.535(s, 3H, CH_3O), 3.489(s, 3H, CH_3O), 2.759(2H, NHCH_2 , $J=9$ Hz, 6 Hz), 2.473(m, 1H, NH), 2.158(t, 2H, CH_2COOH , $J=9$ Hz), 1.494~1.168(m, 6H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$)。数据与化合物的结构相符, 由此确定该化合物为 6-(O,O-二甲基硫代磷酰基)氨基己酸。

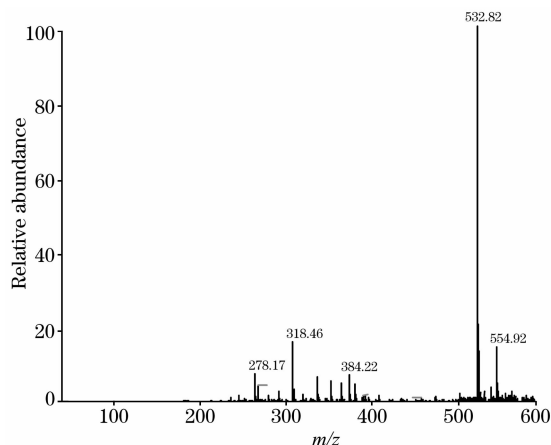


Fig. 1 ESI-MS spectrum of MC

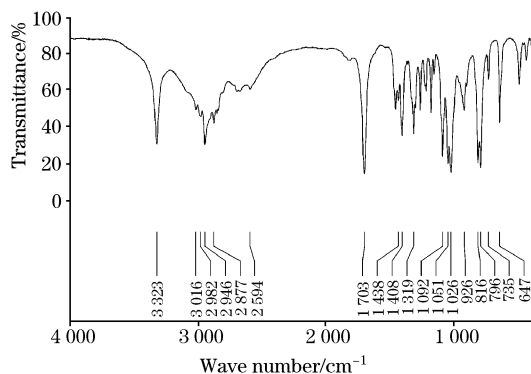


Fig. 2 IR spectrum of MC(KBr)

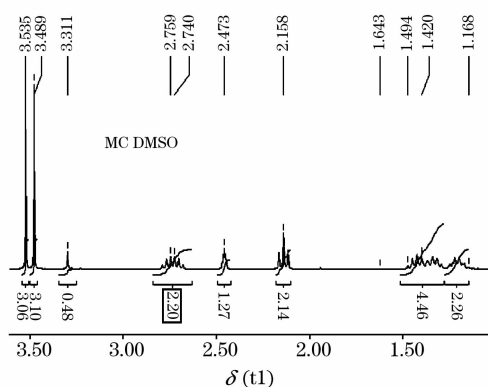
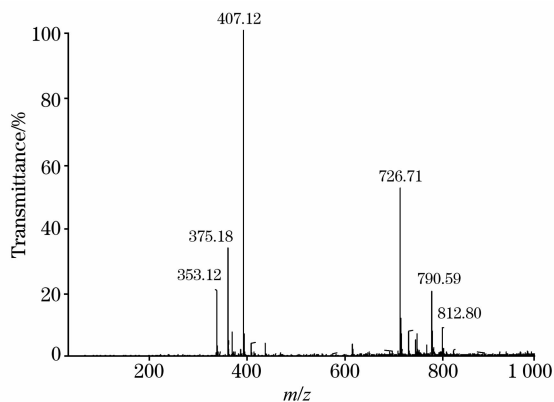
Fig. 3 ¹H NMR spectrum of MC(in DMSO-d₆)

Fig. 4 ESI-MS spectrum of MCE

2.2 半抗原 6-(O,O-二甲基硫代磷酰基)氨基己酸活化酯 (MCE) 的表征

半抗原 MCE 的 MS, IR, ¹H NMR 图分别见图 4, 图 5 和图 6。MS(ESI): [Found: m/z 353.12 [M+H]⁺, 375.16 [M+Na]⁺, 726.71 [2M+Na]⁺, calcd for C₁₂H₂₁O₆N₂PS Mr=352]; IR(KBr, cm⁻¹): 3 367(m), 2 946(s), 2 867(w), 1 813(s), 1 783(s), 1 737(s), 1 459(w), 1 412(m), 1 367(m), 1 209(s), 1 066(s), 1 027(s), 812(s), 758(w), 647(m); ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, ppm(1 ppm=1 μg · mL⁻¹)): δ 3.708(s, 3H, CH₃O), 3.674(s, 3H, CH₃O),

3.083(¹H, NH), 2.961(2H, NHCH₂), 2.867(4H, OC-CH₂CH₂CO), 2.626(t, 2H, J=8 Hz, CH₂COO), 1.805~1.253(m, 6H, CH₂CH₂CH₂)。数据与化合物的结构相符, 由此确定该化合物为 6-(O,O-二甲基硫代磷酰基)氨基己酸活化酯。

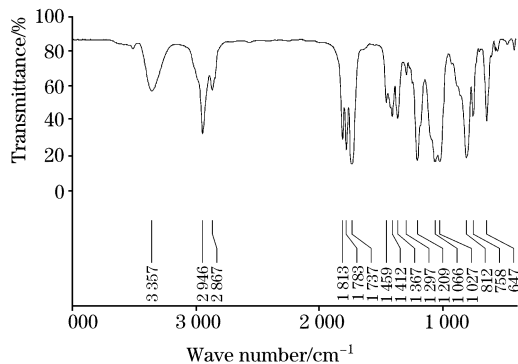


Fig. 5 IR spectrum of MCE(KBr)

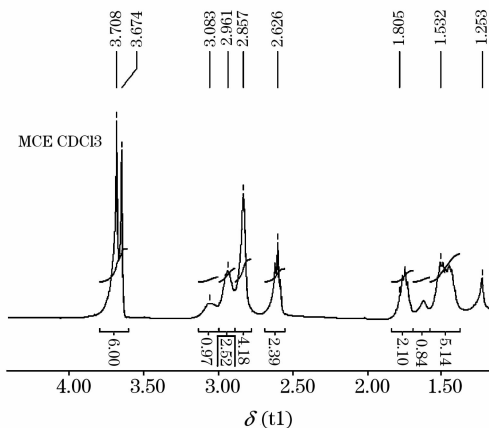
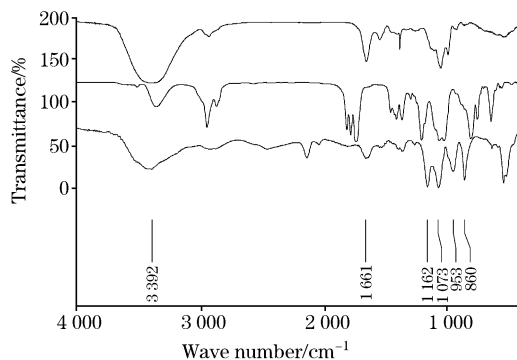
Fig. 6 ¹H NMR spectrum of MCE(in CDCl₃-d₆)

Fig. 7 IR spectra of KLH, MC-KLH and MCE(KBr)

2.3 红外光谱法鉴定人工抗原 1(MC-KLH)

半抗原与载体蛋白偶联是否成功是人工抗原是否具有免疫原性的关键。在人工抗原 1(MC-KLH)的红外光谱图中, 3 392, 1 661 cm⁻¹ 分别是酰胺结构单元的特征吸收带, —CONH—的 N—H 伸缩振动位于 3 392 cm⁻¹ 处, 1 661

cm^{-1} 处是 $-\text{CONH}-$ 的 $\text{C}=\text{O}$ 伸缩振动特征吸收带;1 162, 1 073, 953, 860 cm^{-1} 处的谱带分别为两个 $\text{CH}_3\text{O}-$ 的反对称伸缩振动和对称伸缩振动;并且半抗原活化酯(MCE)中的酯羰基和五元环结构单元琥珀酰亚胺基的两个羰基在 1 813 (s), 1 783(s), 1 737(s) cm^{-1} 处的强吸收带消失。综上判断载体蛋白取代了半抗原活化酯(MCE)的 N -琥珀酰亚胺氧基,得到的人工抗原 1(MC-KLH)不但具有 KLH 的酰胺结构单元还具有半抗原(MC)的甲氧基结构单元,说明半抗原活化酯成功地与载体蛋白偶联为人工抗原 1(MC-KLH)。人工抗原 1, KLH 和氨基己酸活化酯(MCE)红外光谱图见图 7(由上到下依次为 KLH, MCE 和 MC-KLH)。

2.4 红外光谱法鉴定人工抗原 2(M-BSA)

人工抗原 2(M-BSA)是直接通过甲胺磷氨基的重氮化制备的。人工抗原 2(M-BSA)红外光谱图中, 3 412, 1 660, 1 533 cm^{-1} 分别是酰胺结构单元的特征吸收带, $-\text{CONH}-$ 的 $\text{N}-\text{H}$ 伸缩振动位于 3 400 cm^{-1} 处, 1 660, 1 533 cm^{-1} 处是 $-\text{CONH}-$ 的酰胺 I 带和酰胺 II 带;1 161, 1 074 cm^{-1} 的谱带分别为 $\text{CH}_3\text{O}-$ 的反对称伸缩振动和对称伸缩振动, 950, 860 cm^{-1} 分别为 $\text{CH}_3\text{S}-$ 的反对称伸缩振动和对称伸缩振动。综上判断人工抗原 2(M-BSA)不但具有 BSA 的酰胺结构单元还具有甲胺磷的甲氧基和硫氧基结构单元,说明重氮化反应成功将蛋白连接在甲胺磷上,人工抗原 2(M-BSA)合成获得成功。人工抗原 2, BSA 和甲胺磷的红外光谱图见图 8(由上到下依次为 BSA, Met 和 M-BSA)。

3 讨论

通过上述结果可知。

(1)制备了甲胺磷的半抗原 MC 和 MCE,用质谱、红外和核磁进行了表征;

(2)将甲胺磷的半抗原 MCE 与匙孔血蓝蛋白偶联,得到

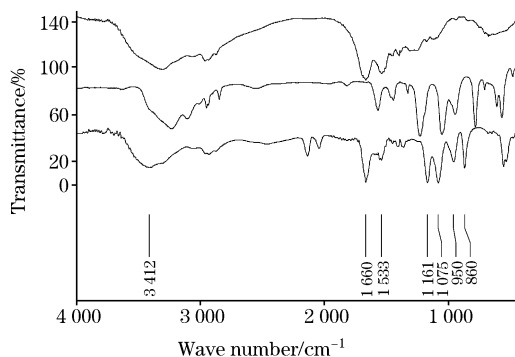


Fig. 8 IR spectra of BSA, M-BSA, and Met(KBr)

第一种人工抗原(MC-KLH);直接把甲胺磷重氮化后与牛血清蛋白偶联,得到第二种人工抗原(M-BSA);

(3)半抗原合成后与蛋白质连接是否成功是人工抗原是否具有免疫原性的关键,在以往的报道中,多用在特定波长下紫外吸收的变化来确定半抗原是否与蛋白偶联成功。但是紫外光谱主要反映分子中不饱和基团的性质并不能反映整个分子的结构,具有相同紫外吸收光谱带的物质其结构并不一定相同,所以对化合物结构的确定缺乏准确性;对于甲胺磷,其分子不具有共轭结构,在紫外光区没有强吸收带,因此不能用紫外光谱法对它的人工抗原进行定性鉴定。

红外光谱与分子结构密切相关,谱图中谱带的频率、强度和形状与分子中特定基团的振动相对应,根据红外光谱图,能够确认某些功能团的存在,判断化合物的类型。在两种甲胺磷人工抗原的红外光谱图上,除了具有蛋白的特征基团吸收带外还具有甲胺磷半抗原的特征基团吸收带,由此推测载体蛋白分子上已经连接了一定数量的甲胺磷半抗原分子,即人工抗原偶联成功。为红外光谱法用于人工抗原的合成鉴定提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] TANG Chu-chi, LI Yu-chang, CHEN Bin, et al(唐除痴, 李煜昶, 陈彬, 等). Pesticide Chemistry(农药化学). Tianjin: Nankai University Publishing House(天津: 南开大学出版社), 1998. 3.
- [2] DONG Guo-wei, LIU Xian-jin, et al(董国伟, 刘贤进, 等). Journal of Huazhong Agricultural University(华中农业大学学报), 2001, 20(4): 340.
- [3] DONG Guo-wei, LIU Xian-jin, et al(董国伟, 刘贤进, 等). Journal of Huazhong Agricultural University(华中农业大学学报), 2001, 20(5): 434.
- [4] SUN Yuan-ming, ZHANG Chun-yan, et al(孙远明, 张春艳, 等). Immunological Journal(免疫学杂志), 2002, 18(3): 163.
- [5] ZHAO Su-qing, SUN Yuan-ming, et al(赵肃清, 孙远明, 等). Immunological Journal(免疫学杂志), 2003, 19(2): 142.
- [6] ZHAO Su-qing, CAI Yan-fei, et al(赵肃清, 蔡燕飞, 等). Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析), 2004, 24(2): 207.
- [7] Lee J K, Ahn K C, Stoutamire D W. et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2003, 51(13): 3695.
- [8] LIU Feng-quan, XU Zhi-gang, et al(刘凤权, 许志刚, 等). Journal of Agricultural Biotechnology(农业生物技术学报), 1998, 6(2): 141.
- [9] LI Jun-suo, LI Xi-wang, et al(李俊锁, 李喜旺, 等). Journal of China Agricultural University(中国农业大学学报), 1999, 4(1): 109.
- [10] ZHOU Xiang-yang, LIN Chun-zhong, et al(周向阳, 林纯忠, 等). Food Science(食品科学), 2004, 25(1): 151.
- [11] ZHOU Pei, LU Yi-tong(周培, 陆贻通). Chinese Journal of Pesticides(农药), 2002, 41(5): 12.
- [12] Wang S, Allan R D, Skerritt J H, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46: 3330.
- [13] Wang S, Allan R D, Skerritt J H, et al. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47: 3416.
- [14] ZHU Guo-nian, WU Yin-liang, et al(朱国念, 吴银良, 等). Journal of Zhejiang University(Agric. & Life Sci.)(浙江大学学报·农业与生命科学版), 2002, 28(1): 47.
- [15] ZHOU Si-xiang, LIU Fu-cheng(周思祥, 刘福成). Chinese Journal of Pesticides(农药), 2005, 44(8): 337.

Spectral Analysis and Synthesis of Artificial Antigen of the Organophosphors Pesticide Methamidophos

WANG Xiang-hong^{1, 2}, DUAN Zhen-juan¹, SONG Shi-ying¹, WANG Shuo^{1*}

1. Tianjin Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Tianjin University of Science and Technology, Food Science and Biologic Technology College, Tianjin 300457, China

2. Agricultural University of Hebei, Food Science and Technology College, Baoding 071001, China

Abstract In the present paper, a hapten of methamidophos was synthesized and conjugated with KLH by active ester method, thus the first artificial antigen was obtained. By diazotization method methamidophos conjugated with BSA, and the second artificial antigen was obtained. The synthesized haptens were characterized by MS, IR and ¹H NMR, and the two artificial antigens were determined by the method of IR spectrum. The result implied that both the artificial antigens have absorbance peaks of hapten and protein, indicating that they were prepared successfully. This could provide evidence that the method of IR spectrum can be used to determine whether the artificial antigens are synthesized successfully.

Keywords Methamidophos; Hapten; Artificial antigen; IR spectrum

(Received Dec. 10, 2005; accepted Apr. 20, 2006)

* Corresponding author