

魏松红,王娟,李兴海,等. 二氯喹啉酸人工抗原的合成[J]. 江苏农业科学,2013,41(7):302-304.

# 二氯喹啉酸人工抗原的合成

魏松红,王娟,李兴海,东琴,王振

(沈阳农业大学植物保护学院,辽宁沈阳 110866)

**摘要:**以 3,7-二氯-8-喹啉羧酸、草酰氯、5-氨基戊酸(Q-5)为原料合成二氯喹啉酸半抗原,再采用碳二亚胺法将半抗原与载体蛋白[牛血清蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)]偶联合成相应的人工抗原。将半抗原用红外(IR)和核磁共振( $^1\text{H}$ -NMR)进行结构表征,通过紫外扫描证明二氯喹啉酸人工抗原(Q-5-BSA、Q-5-OVA)合成成功,且 Q-5-BSA、Q-5-OVA 的结合比分别为 21:1、17:1。人工抗原的合成成为研制二氯喹啉酸多克隆抗体及免疫试剂盒奠定了基础。

**关键词:**二氯喹啉酸;半抗原;人工抗原

**中图分类号:**S481.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)07-0302-03

二氯喹啉酸(quinclorac,3,7-二氯-8-喹啉羧酸,商品名快杀稗),是 80 年代德国巴斯夫公司研发的激素型喹啉酸类除草剂,主要用于稻田防治单子叶杂草,对稗草防治效果突出。但二氯喹啉酸是长残效除草剂,在水田中的降解方式主要是光解,微生物降解作用非常弱,几乎无水解也不挥发,导致它在土壤中的残留较大,对后茬蔬菜及早田作物产生药害<sup>[1]</sup>。

目前,二氯喹啉酸残留检测的常用方法为仪器分析法,包括气相色谱法(GC)和高效液相色谱法(HPLC)<sup>[2-3]</sup>。近年来,免疫分析法以其特异性强、灵敏度高、准确性好、快速方便等特点在农药残留检测中得到了快速发展<sup>[4]</sup>。我们拟通过二氯喹啉酸与氨基戊酸反应增加 4 个碳链长度的间隔臂合成半抗原,与载体蛋白偶联获得人工抗原,为进一步建立二氯喹啉酸免疫分析提供基础。

收稿日期:2012-12-28

基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:201203098);辽宁省自然科学基金(编号:201202195)。

作者简介:魏松红(1974—),女,博士,副教授,主要从事农药学研究。

E-mail:songhongw125@163.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂 二氯喹啉酸(Q)原药(95%,新沂中凯农用化工有限公司产品)、二氯甲烷、草酰氯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、1,4-二氧六环(A.R.级,国药集团化学试剂有限公司产品)、5-氨基戊酸、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,B.R.级,国药集团化学试剂有限公司产品)、二环己基碳二亚胺(DCC,B.R.级,国药集团化学试剂有限公司产品)、牛血清蛋白(BSA,SIGMA 公司产品)、鸡卵清蛋白(OVA,华美生物工程公司产品)。

1.1.2 仪器设备 旋转蒸发仪(R210,BUCHI)、红外光谱分析仪(Spectrum 65,PerkinElmer)、高效液相色谱-质谱联用仪(HPLC1100/MSD Trap S L,布鲁克光谱仪器公司产品)、 $^1\text{H}$ 核磁共振(Bruker AM500,安捷伦公司产品)等。

### 1.2 方法

1.2.1 半抗原的合成 合成路线如图 1 所示。

在 100 mL 三颈烧瓶中,加入 1 210 mg 二氯喹啉酸,并加入 25 mL 无水二氯甲烷和 7 mL 草酰氯,在磁力搅拌下缓慢滴

[2]Prato M,Kostarelos K,Bianco A. Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery[J]. Acc Chem Res,2008,41(1):60-68.

[3]Nakashima N. Solubilization of single walled carbon nanotubes with condensed aromatic compounds[J]. Science and Technology of Advanced Materials,2006,7(7):609-616.

[4]Bianco A. Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules[J]. Expert Opin Drug Deliv,2004,1(1):57-65.

[5]于金刚,黄可龙,杨巧勤,等. 碳纳米管作为药物载体的研究进展[J]. 药学学报,2008,43(10):985-991.

[6]张晓科,孟令杰,路庆华,等. 壳聚糖或海藻酸钠改性碳纳米管靶向缓释载体的制备方法:中国,200910054316[P]. 2009-12-02.

[7]万洪善. 阿德福韦酯-海藻酸钠多壁碳纳米管复合物的体外缓释行为[J]. 中国生化药物杂志,2012,33(4):358-360,364.

[8]丁赞立,王庚超,王贵友,等. 水性聚氨酯/聚邻氨基苯磺酸修饰碳纳米管复合材料的制备与性能[J]. 高分子材料科学与工程,

2010,26(8):128-130,133.

[9]刘辉,潘卫三,聂淑芳,等. 布地奈德结肠定位片的体外释放度实验方法及其释药机制研究[J]. 药学学报,2008,43(11):1147-1151.

[10]谢建峰. 奥沙利铂几种新型脂质体的制备及对大肠癌靶向性与药动学研究[D]. 长沙:中南大学,2008.

[11]崔园园,陈红,周丰,等. 海藻酸钠-胰蛋白酶微球的制备及药物释放性能[J]. 复合材料学报,2011,28(2):117-122.

[12]李含. 水溶性碳纳米管的合成、性质及生物效应研究[D]. 南京:南京大学,2011.

[13]李英. 水溶性壳聚糖功能化碳纳米管的研究[D]. 北京:北京化工大学,2010.

[14]吕春祥,凌立成,袁淑霞,等. 硝苯地平在球状活性炭中的吸附及缓释行为[J]. 新型炭材料,2007,22(1):17-22.

[15]慕春海,李超鹏,韩博,等. 异甘草素-多壁碳纳米管复合物的体外缓释行为[J]. 中国药学杂志,2010,45(1):36-40.

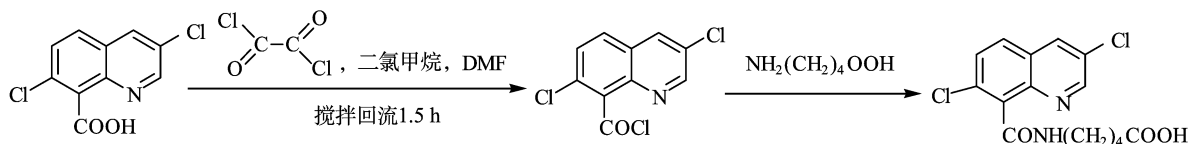


图1 半抗原的合成路线

入 3~4 滴 DMF, 85~100 °C 回流 1.5 h。反应后减压蒸馏, 得淡黄色固体 3,7-二氯-8-喹啉甲酰氯。

称取 585 mg 5-氨基戊酸于 100 mL 三颈烧瓶中, 加入 5 mL 氢氧化钠(4 mol/L)冰浴搅拌。用 25 mL 1,4-二氧六环溶解 3,7-二氯-8-喹啉甲酰氯, 分批次加入 5-氨基戊酸的氢氧化钠溶液中, 磁力搅拌下反应 1.5 h。反应完毕, 将反应液用乙酸乙酯萃取 3 次, 收集有机相。用稀盐酸(0.1 mol/L)洗涤 3 次, 收集乙酸乙酯层。用碳酸氢钠溶液(1 mol/L)反萃取 3 次, 收集下层溶液。抽滤得白色固体, 即为半抗原 Q-5。

采用柱层析纯化, 用石油醚拌适量硅胶湿法装柱, 洗脱剂比例为乙酸乙酯: 石油醚: 甲醇 = 4: 2: 1, 收集所需组分, 减压蒸馏浓缩, 得淡黄色粘稠液体, 静置过夜, 有淡黄色晶体析出。纯化后的半抗原用傅里叶红外光谱仪(IR)和<sup>1</sup>H 核磁共振(<sup>1</sup>H-NMR)鉴定。

**1.2.2 人工抗原的合成** 将半抗原 Q-5 与牛血清蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联合成相应的人工抗原 Q-5-BSA、Q-5-OVA(碳二亚胺法)<sup>[5-6]</sup>。

称取 Q-5(69.95 mg)加入到 25 mL 三角瓶中, 加入等摩尔量 DCC(51.5 mg)和 NHS(28.75 mg), 磁力搅拌过夜。4 °C 下 4 000 r/min 离心 10 min, 取上层清液 2 000 μL, 缓慢加入到 20 mL 20 mg/mL 牛血清蛋白(BSA)的碳酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 值 9.6)中, 磁力搅拌反应 4 h。反应完成后用磷酸缓冲液(0.01 mol/L, pH 值 7.4, PBS)透析 3 d。透析结束后, 冻干成粉, 即制得免疫抗原 Q-5-BSA。采用同样方法将半抗原 Q-5 与卵清蛋白偶联制得免疫抗原 Q-5-OVA。

**1.2.3 二氯喹啉酸人工抗原的紫外光谱鉴定** 称取 1 mg 半抗原 Q-5 溶于 10 mL 甲醇中, 配成 0.1 mg/mL 溶液。再称取相应的人工抗原 Q-5-BSA/OVA 和载体蛋白 BSA、OVA 各 1 mg 溶于 10 mL PBS 缓冲液中, 配成 0.1 mg/mL 溶液。将配好的溶液在 200~400 nm 波长下进行紫外扫描, 得到相应

的谱图并进行分析。

**1.2.4 人工抗原结合比的测定** 称取 1 mg 半抗原 Q-5 用甲醇稀释为 50 μg/mL, 然后经过倍比稀释得 25.000、12.500、6.250、3.125 μg/mL 系列浓度, 分别进行紫外图谱扫描。从紫外图谱上读出 Q-5 的 λ<sub>max</sub> 及最大吸收峰处的吸光度值 D<sub>max</sub>, 作 Q-5 浓度与吸光度的标准吸收曲线 D<sub>max</sub>-C<sub>Q-5</sub>。

称取 160 mg BSA/OVA 用 PBS 缓冲液稀释成 100 mL, 再倍比稀释得 0.8、0.4、0.2、0.1 mg/mL 系列浓度溶液, 分别作 UV 谱图。从 BSA/OVA 的紫外光谱图上读出最大吸收峰处的吸光度值 D<sub>max</sub>, 作 BSA/OVA 浓度与吸光度的标准吸收曲线 D<sub>max</sub>-C<sub>BSA/OVA</sub>。

取透析液 0.5 mL, 用 PBS 缓冲液稀释为 10 mL, 测定 UV 谱图, 得其最大吸收波长处的吸光度值 D<sub>0</sub>(D<sub>0</sub>')。根据体积比计算出稀释后的透析液中 BSA/OVA 的浓度。

按照吸光度值加和性, 偶联物中的 Q-5 对总吸光度值 D<sub>0</sub> 的贡献应为偶联物的吸光度值减去 BSA/OVA 对 D<sub>0</sub>(D<sub>0</sub>')的贡献, 即为 D<sub>1</sub> = D<sub>0</sub> - D<sub>2</sub>(D<sub>1</sub>' = D<sub>0</sub>' - D<sub>2</sub>'), 可以通过吸光度值对应标准曲线 D<sub>max</sub>-C<sub>Q-5</sub> 计算出 Q-5 在偶联物中的浓度从而计算出结合比。

## 2 结果与分析

### 2.1 半抗原分子的结构鉴定

半抗原 5-(3,7-二氯-8-喹啉甲酰基)氨基戊酸(Q-5)的结构表征: 红外谱图见图 2, IR(KBr, cm<sup>-1</sup>): 3 201.7(NH), 1 713.0(COOH), 1 636.5(CONH)。核磁谱图见图 3, <sup>1</sup>H-NMR, δ(ppm): 8.96(d, 1H, -NH=, J = 2.40 Hz), 8.67(d, 1H, -C=C-Cl, J = 2.40 Hz), 8.50(t, 1H, -CONH), 8.03(d, 1H, ArH, J = 9.00 Hz), 7.65(d, 1H, ArH, J = 9.00 Hz), 3.31(d, d, 2H, -NCH<sub>2</sub>-, J = 6.60, 6.00 Hz), 2.27(t, 2H, -CH<sub>2</sub>-COO-), 1.64~1.66(m, 2H), 1.54~1.57(m, 2H)。

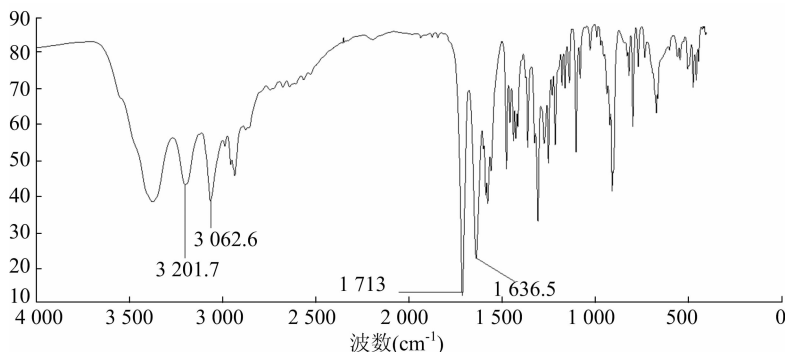


图2 半抗原Q-5的红外吸收光谱图

### 2.2 人工抗原的鉴定

将半抗原与载体蛋白偶联后, 所得产物的紫外吸收光谱

与相应的载体蛋白以及半抗原相比较, 吸光度值发生了明显变化(图 4)。由此可判断, 半抗原偶联成功。

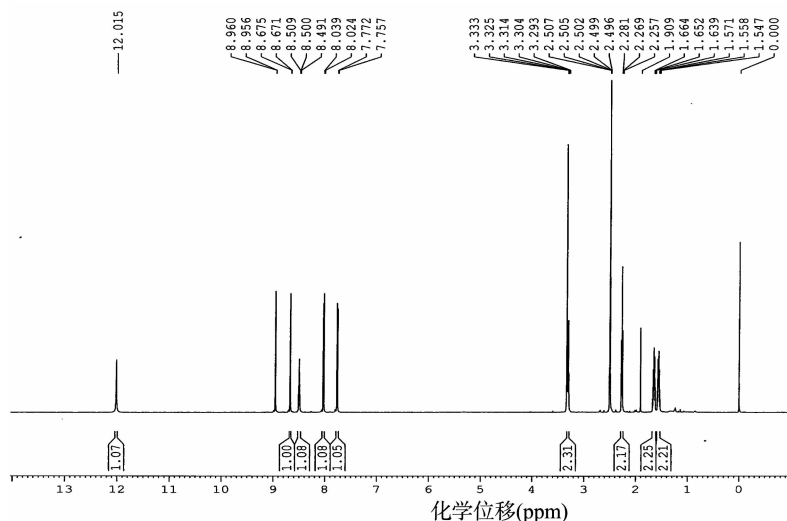
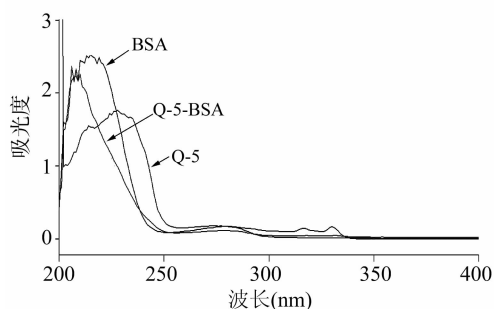
图3 半抗原Q-5的<sup>1</sup>H-NMR谱图

图4 Q-5、载体蛋白及其偶联物的紫外吸收图

### 2.3 人工抗原结合比

通过紫外扫描可知,Q-5的最大吸收波长为227.9 nm,根据不同浓度下吸光度值绘制标准曲线,得线性方程:

$$y = 0.1010x + 0.1547 (r^2 = 0.9959) \quad (1)$$

式中: $y$ 为Q-5浓度, $x$ 为吸光度。

紫外扫描BSA的最大吸收波长为215.0 nm,根据相应浓度下吸光度值绘制标准曲线,可得方程:

$$y = 0.6148x + 0.0227 (r^2 = 0.9997) \quad (2)$$

式中: $y$ 为BSA浓度, $x$ 为吸光度。

同理得到OVA的线性方程为:

$$y = 0.7703x + 0.0166 (r^2 = 0.9972) \quad (3)$$

式中: $y$ 为OVA浓度, $x$ 为吸光度。

结果显示,人工抗原Q-5-BSA结合比为21:1,人工抗原Q-5-OVA的结合比为17:1。

### 3 讨论

为了使二氯喹啉酸与蛋白质进行偶联,活性基团与载体之间需要有间隔臂,适当长度的间隔臂可以使半抗原的特征结构最大限度的被免疫活性细胞识别,刺激机体产生特异性免疫应答,从而获得高亲和力、高特异性的抗体<sup>[7]</sup>。Vallejo等<sup>[8]</sup>研究发现间隔臂长的半抗原可以将农药分子的特征结构暴露出来,从而增强了抗体的效价和特异性。Karu等<sup>[9]</sup>和Schneider等<sup>[10]</sup>合成了多种半抗原,通过比较,发现间隔臂长度为5的半抗原所建立的ELISA法比油间隔臂长度为3的半抗

原所建立的ELISA法要灵敏100~2000倍。

试验采用草酰氯与二氯喹啉酸反应应用较短的时间和较少的原料,获得3,7-二氯-8-喹啉甲酰氯中间体,再与5-氨基戊酸反应,增加4个碳原子长度的间隔臂,获得半抗原,通过红外光谱、核磁氢谱检测与分析,说明半抗原合成成功。将半抗原与载体蛋白偶联生成免疫抗原和包被抗原,通过紫外光谱检测说明偶联成功,测定其结合比也在最适的结合比范围之内。这为二氯喹啉酸多克隆抗体制备及残留检测试剂盒研制奠定了基础。

### 参考文献:

- [1]徐子晶,逯州,向殿福.二氯喹啉酸药害的生物测定[J].安徽农业科学,2010,38(23):12712-12763,12772.
- [2]王一茹,刘长武,牛成玉,等.二氯喹啉酸及其代谢物在稻田水土作物中的气谱和液谱残留分析方法研究[J].农业环境保护,1996,15(3):102-106.
- [3]王一茹,刘长武,牛成玉,等.二氯喹啉酸在稻田水、土壤和作物中的残留动态研究[J].农业环境保护,1996,17(1):27-30.
- [4]朱国念,毛黎娟,施海燕,等.二氯喹啉酸人工抗原的合成与鉴定[J].中国农业科学,2005,38(1):86-90.
- [5]桑光明.残杀威和氯氟氰菊酯的半抗原分子设计、合成及人工抗原制备[D].无锡:江南大学,2009.
- [6]孔晔,李培武,张奇,等.一种新型溴氰菊酯农药半抗原的合成及应用效果[J].化学试剂,2009,31(4):245-249.
- [7]施海燕,王鸣华.半抗原的间隔臂长度对免疫识别的影响[J].农药学报,2008,10(2):172-177.
- [8]Vallejo R P, Bogus E R, Mumma R O. Effects of hapten structure and bridging groups on antisera specificity in parathion immunoassay development[J]. Journal of Agricultural and Food Chemical, 1982, 30(3):572-580.
- [9]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.
- [10]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.