

三种常用氨基甲酸酯类农药人工抗原合成方法的设计与优选

瞿巧钰, 陈珊珊, 刘潇威*

(农业部环境保护科研监测所, 天津 300191)

摘要: 农药人工抗原的合成直接影响制备抗体的质量, 是建立农药分子特异性强、灵敏度高的免疫分析方法的关键。本文综述了国内外对于氨基甲酸酯类广泛使用的3种农药甲萘威、克百威、涕灭威人工抗原合成过程中的农药分子半抗原的设计原则、合成方法, 人工抗原的设计、优选及影响因素等方面的研究进展。

关键词: 氨基甲酸酯类农药; 甲萘威; 克百威; 涕灭威; 半抗原; 人工抗原; 合成方法

中图分类号: X592

文献标志码: A

文章编号: 2095-6819(2013)06-0101-08

Design and Selection of Synthesis Methods of Artificial Antigens for Three Frequently-used N-methylcarbamate Pesticides

QU Qiao-yu, CHEN Shan-shan, LIU Xiao-wei*

(Agro-Environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture, Tianjin 300191, China)

Abstract: Synthesis of artificial antigens of pesticides directly influences the quality of the antibodies, and is critical in the format of particular and sensitive immunology assay. The progress of the design principle and synthesis methods of haptens of three kinds of N-methylcarbamate pesticides including carbaryl, carbofuran, aldicarb were introduced in this paper. Furthermore, the design and selection of synthesis methods for artificial antigens and the influencing factors of the synthesis were also presented.

Keywords: N-methylcarbamate pesticides; carbaryl; carbofuran; aldicarb; hapten; artificial antigen; synthesis methods

氨基甲酸酯类农药是我国当前广泛使用的农药种类之一。该类农药具有分解快、残留期短、高效、选择性强等特点, 代表品种有甲萘威、克百威、涕灭威等。20世纪70年代以来, 氨基甲酸酯类农药的使用量逐年增加, 随之带来的农产品中农药残留量超标问题也日益突出, 直接影响着消费者的身体健康和对外经贸的发展。所以建立快速、高效、经济的检测方法成为亟待解决的问题^[1-2]。

目前氨基甲酸酯类农药残留检测常采用高效液相色谱(HPLC)法^[3], 另外LC-MS/MS是快速发展的一种分析技术, 具很高的灵敏度和分离能力, 近年来在

水果、蔬菜等农残分析上已有了一些应用^[4]。但这些方法需要较昂贵的仪器并且样品前处理过程复杂, 因而难以满足样品快速检测的需要。免疫分析方法具有快速、特异性强、灵敏度高等优点, 近年已被广泛应用于农药残留检测^[5]。农药免疫分析是利用抗原、抗体的特异性反应来检测农药含量, 此方法的关键是制备高特异性的抗体, 以提高检测特异性和灵敏度。根据标记物的不同, 主要农药免疫分析技术分为: 放射免疫分析(RIA)、酶免疫分析(EIA)、荧光免疫分析(FIA)、化学发光免疫分析(CLIA)等。1993年Marco等^[6]最先开始甲萘威免疫技术的研究, 设计并合成总共8种半抗原, 分别进行多克隆抗体的制备, 通过效价评定, 筛选出较高免疫性的人工抗原, 为后续甲萘威抗体的制备以及免疫技术的发展提供了重要的参考。1994年Antonio等^[7]就进行了甲萘威单克隆抗体的制备。1994

收稿日期: 2013-10-10

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201203094-2)

作者简介: 瞿巧钰(1988—), 女, 重庆涪陵人, 硕士研究生, 主要从事农药残留与环境毒理学研究。E-mail: hsquqiaoyu@163.com

*通信作者: 刘潇威 E-mail: xwliu2006@163.com

年后,科研人员对甲萘威的研究逐渐增多,根据需要开发了免疫技术需求,设计合成了不同的人工抗原,得到相应的高特异性抗体。克百威免疫技术的研究略晚于甲萘威,1999年 Antonio 等^[8]设计合成了4种克百威的半抗原,通过单克隆抗体的制备,筛选出较高免疫性的人工抗原。之后人们不断开发克百威残留的检测免疫技术。关于涕灭威半抗原的合成及其免疫技术的研究相对较少。最早的研究是1988年 Brady 等^[9]设计合成了一种半抗原,建立的酶联免疫法对涕灭威的检测具有较高特异性,但是其最低检出限为 $0.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。我国对其的研究始于2006年,张彦峰等^[10]设计并合成了一种新的涕灭威半抗原,但是此半抗原还未在免疫技术上进一步应用。

高质量的抗体是免疫分析方法建立的关键,而合成高质量的人工抗原又是制备特异性抗体的必备条件。本文对国内外关于氨基甲酸酯类广泛使用的3种农药甲萘威、克百威、涕灭威人工抗原合成过程中的农药分子半抗原的设计原则、合成方法,人工抗原的设计、优选及影响因素等方面的研究进展作一综述,并从中总结一些规律,为促进国内氨基甲酸酯类农药免疫分析技术的发展提供参考。

1 半抗原的设计与合成

农药小分子半抗原分子的设计及合成是免疫动物制备单克隆抗体(McAb)或多克隆抗体(PcAb)以及进一步建立免疫分析法快速检测农药残留的前提、基础及关键^[11]。

选定农药待测物后,应根据其结构选择合适的半抗原合成方法,如果农药分子含有活性基团,可直接与连接剂或载体蛋白连接,但大多数农药小分子没有现成的活性基团,需要作适当的衍生化改造,使农药原药分子内产生活性基团,即在农药分子末端引入 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{NH}_n$ ($n=1$ 或 2)、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{CHO}$ 等活性基团后再与连接剂连接^[12]。合成半抗原的路径一般有以下几种方式:直接对农药分子的原药进行衍生化,利用待测物现有结构,通过氧化、还原、取代、水解等反应产生相应的功能基团;利用农药分子降解产物或中间产物合成半抗原;由原料重新合成半抗原,在合成过程中选择适当步骤用一个有反应功能团的分子参与反应,从而合成出有反应功能团的半抗原分子;簇半抗原的制备;半抗原中特征基团的保护等。半抗原设计需要遵循总体原则:第一,半抗原中要含有目标物的完整或部分结构特征;第二,半抗原中需要有

一个可以与载体蛋白质发生共价结合反应的活性基团;第三,半抗原上的空间连接臂长度要适中(通常为3~6个碳原子的链长)^[13]。

氨基甲酸酯类农药是指在甲酸酯类化合物中,连于碳原子上的氢原子被氨基取代的化合物,通式见图1;其中甲萘威、克百威、涕灭威的结构式分别见图1。

根据图1中3种农药的结构,我们可以看出甲萘威和克百威的分子结构式相似,都属于取代苯基-N-甲基氨基甲酸酯类,具有稠环结构和一个较强的吸电子基团氨基甲酸酯基团,推测稠环和氨基甲酸酯基团可能为其免疫决定区。而涕灭威属于脲基氨基甲酸酯类农药,推断其脲基可能为其免疫决定区域。

1.1 甲萘威半抗原的设计与合成

甲萘威(carbaryl),化学名称为1-萘基甲基氨基甲酸酯(1-naphthyl methylcarbamate),分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_2$,相对分子质量为201,水解主要产物为1-萘酚^[14]。

对于甲萘威半抗原的合成与筛选,最早见1993年 Marco 等^[6]的研究,在稠环上的不同位置引入不同的连接臂,合成8种不同的半抗原。也有许多学者^[15-17]相继根据所要研究和开发的免疫技术,尝试合成并筛选不同的半抗原,以达到最好的免疫性和特异性。借鉴前期学者的经验,近年来人们主要选择的半抗原有3-(1-萘氧基甲酰胺)-丙酸($3-[(1\text{-naphthyloxy})\text{carbonyl}]\text{amino}]\text{propionic acid}$,CNA)、6-(1-萘氧基甲酰胺)-己酸($6-[(1\text{-naphthyloxy})\text{carbonyl}]\text{amino}]\text{hexanoic acid}$,CNH)、4-(1-萘氧基甲酰胺)-丁酸($4-[(1\text{-naphthyloxy})\text{carbonyl}]\text{amino}]\text{butanoic acid}$,CNB)、1-(1-萘基)-3-(5-羧基戊烷基)尿素($1-(1\text{-naphthyl})-3-(5\text{-carboxypentyl})\text{urea}$,CPNU),制备出

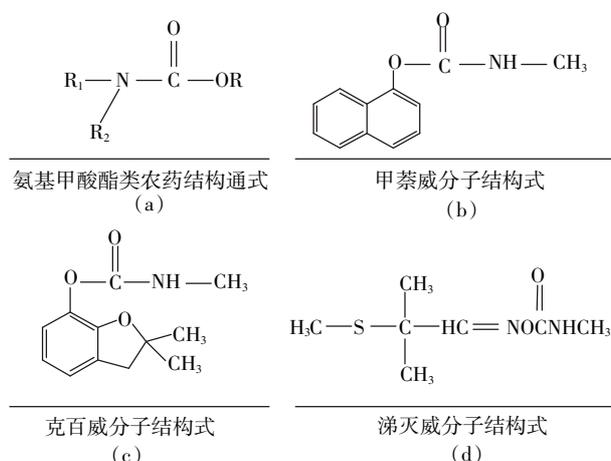


图1 氨基甲酸酯类农药通式及甲萘威、克百威和涕灭威分子结构式

的抗体,均得到较高的效价以及特异性^[18-20]。

对于甲萘威半抗原的合成方法,国外采用的合成方法^[7,21]是(合成途径见图2(a)):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,这类方法需要使用大量的光气以及甲苯,极易造成环境污染,危害人体健康。近几年来,有研究者不断探究新的合成方法并成功合成了甲萘威半抗原^[22-23](合成途径见图2(b)),研究采用了对硝基苯氯甲酸酯制成了萘羧酸酯的结构,避免了直接使用光气,并获得了较高吸收率(70%),避免了光气和甲苯的引入所带来的危害作用。

为了能够产生适合目标物的抗原,采用目标化合物的衍生物作为半抗原也是制备抗体的一种有效方法。如甲萘威的衍生物1-萘基-N-氨基甲酸酯,N-(2-萘甲酰基)-6-氨基己酸等也可以作为半抗原^[22,24]。另外,CPNU的合成可以参照文献[25]中的合成路线(见图3)。

1.2 克百威半抗原的设计与合成

克百威(carbofuran),化学名称为2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基-N-甲基氨基甲酸酯(2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofurany-N-lmethyl carbamate),分子式为 $C_{12}H_{15}NO_3$,相对分子质量为221,水解的主要产物为呋喃酚。

对于克百威人工抗原的合成,研究略晚于甲萘威半抗原的研究,研究者根据克百威与甲萘威水解后断裂部位相同,参照了甲萘威半抗原合成方法,从克百威水解产物呋喃酚入手制备半抗原。1999年Antonio Abad等^[8]选择不同的连接臂,合成了4种克百威的半抗原分别为3-[[[(2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基]氨基]丙酸(3-[[[(2,3-Dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyloxy)carbonyl]-amino]-propanoic acid, BFNP)、4-[[[(2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基]氨基]丁酸(4-[[[(2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyloxy)carbonyl]-amino]butanoic acid, BFNB)、6-[[[(2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基氧)羰基]氨基]己酸(6-[[[(2,3-dihydro-

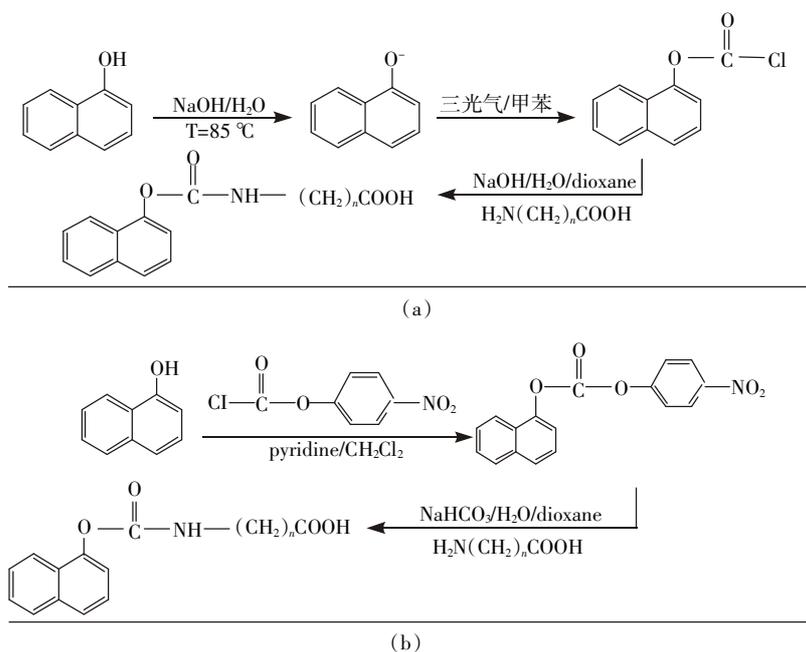


图2 (a) 甲萘威半抗原传统合成路线;(b)甲萘威半抗原新合成路线

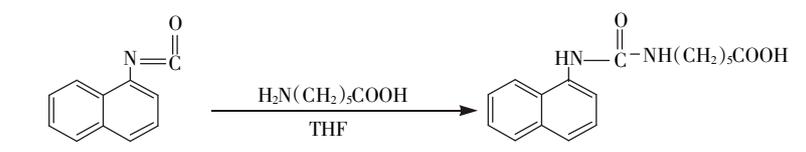


图3 甲萘威半抗原 CPNU 合成路径

2,2-dimethyl-7-benzofuranyl-oxy)carbonyl]-amino hexanoic acid, BFNH)、6-[[[(2,2-二甲基-1,3-苯丙二烷基-4-氧)羰基]氨基]己酸(6-[[[(2,2-dimethyl-1,3-benzodi oxol-4-oxy)carbonyl]-amino] hexanoic acid, BONH)。根据单克隆抗体的制备,以及酶联免疫方法的建立,高特异性和亲和性的杂交瘤来自 BFNP、BFNB。之后关于克百威免疫技术的研究中,半抗原的合成主要都是参考前3种半抗原,例如 Zhu 等^[26]在建立直接酶联免疫吸附技术(Direct competitive enzyme-linked immunoassay, CD-ELISA)测定蔬菜中克百威残留的方法中,合成 BFNP 作为半抗原,Gui 等^[27]在建立时间分辨荧光免疫技术时,合成 BFNB 作为半抗原。也有研究者以克百威、对硝基苯氯甲酸酯和 6-氨基己酸为反应原料,避免传统的三光气化学合成工艺,合成克百威半抗原 BFNH。将半抗原与载体蛋白(BSA、OVA)偶联制备了克百威人工免疫抗原 BFNH-BSA 和包被抗原 BFNH-OVA。利用 BFNH-BSA 免疫家兔获得抗克百威多克隆抗体,并通过间接 ELISA 法测定抗体效价。结果表明家兔抗血清效价高达 1.28×10^6 ^[28]。

1.3 涕灭威半抗原的设计与合成

涕灭威(Aldicarb),化学名称为 2-甲基-2-(甲硫基)丙醛-氧-[(甲胺基)羰基]肟(2-Methyl-2-(Methylthio)propanal-O-[(Methylamino)carbonyl]oxime),分子式为 $C_7H_{14}N_2O_2S$,相对分子质量为 190。它是一种高效、剧毒、广谱,内吸性的杀虫、杀螨、杀线虫剂。涕灭威是目前毒性最大的农药之一,它在环境或生物体内发生氧化反应生成涕灭威亚砷(Aldicarb sulfoxide)和涕灭威砷(Aldicarb sulfone),都具有较高的水溶性和毒性,主要水解产物为涕灭威脒。

由于涕灭威的毒性以及在环境中的不稳定性,关于涕灭威半抗原的研究相对较少。涕灭威的结构不同于甲萘威、克百威,因此半抗原的合成方法不同于前者。1988年 Brady 等^[9]最早开始进行涕灭威半抗原的制备并开发了酶联免疫技术,建立的方法对涕灭威具有高度选择性。此半抗原在涕灭威脒分子中引入了反式-(氨基甲基)-环己烷羧酸,而甲萘威、克百威的半抗原引入的是直链羧酸。我国学者张彦峰等^[10,29]设计并合成了一种新的涕灭威半抗原:涕灭威脒琥珀酸单酯(Aldicarb oxime succinic ester, AOSE),并偶联 BSA 制备了多抗。关于涕灭威半抗原,国外最新的研究是 Lai Khai Siew 等^[30]制备单抗所合成的半抗原:涕灭威脒乙酸乙酯(Aldicarb oxime ethyl acetate),并分别偶

联载体蛋白 BSA、KLH 形成 2 种免疫原,分别得到不同的单抗,为发展不同的免疫技术提供借鉴。

2 人工抗原的合成与筛选

分子量小于 300 的半抗原较难获得高亲和力的抗体^[12],必须设法先将农药小分子与载体蛋白质偶联制备出农药人工完全抗原,这是农药免疫分析的关键。人工抗原的合成需要考虑载体蛋白、偶联方法、偶联结合比等因素的选择与优化。

2.1 载体蛋白的选择

常用来作为合成农药人工抗原的载体蛋白质有牛血清蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清蛋白(HSA)及人工合成的多聚赖氨酸(PLL)。此外,阳离子牛血清白蛋白(cBSA)也逐渐在人工抗原的制备中作为即用型和具有高度免疫原性的载体蛋白。cBSA 通过过量的乙二醇修饰天然 BSA 制备而成,基本上用带正电的伯胺封闭了所有带负电的羧基基团,其效果是获得了免疫性明显增强、高度带正电的蛋白质($pI > 11$)。此外,伯胺数量的增加为使用典型交联法提供了更大量的可被交联的抗原分子。当相对于 BSA 需要更强的免疫原性,而条件不适合使用钥孔血蓝蛋白(KLH)时,cBSA 是用于免疫原制备的优良选择。

一般采用比较多的制备免疫原用的载体蛋白为 BSA,制备包被原用的载体蛋白为 OVA。BSA 具有物化性质稳定、不易变性、价廉易得,而且其赖氨酸含量高、自由氨基多,在不同的 pH 值和离子强度下均有较大的溶解度等优点。而将 OVA 作为包被原的载体蛋白是因为其免疫原性较 BSA、KLH 等其他蛋白弱,可以作为无关的载体蛋白用于抗体的筛选和免疫测定。KLH 因为其与脊椎动物免疫系统具有很好的异源性而被认为是很好的载体,但是 KLH 价格昂贵,虽然免疫原性强,但它激发的 B 淋巴细胞克隆中针对自身的抗原决定簇较多,相对减少了针对半抗原的 B 淋巴细胞克隆,增加了阳性克隆筛选的难度和工作量。因此一般采用 BSA、KLH 作为免疫原的载体蛋白,而 OVA 则作为包被原载体蛋白的首选,当然也有学者采用其他种类的蛋白作为包被原的载体蛋白,如刘曙照^[6]在“甲萘威酶联免疫吸附分析技术研究”中则采用了 HSA、OVA 作为包被原的载体蛋白。阳离子化的载体蛋白可以增强半抗原分子和蛋白的偶联,减小蛋白间的交联反应,提高免疫效应等优点,现在主要应用于药物的酶联免疫技术中人工抗原的合成^[31],用此

免疫原制备了高质量的单抗并建立了高灵敏性的酶联免疫技术。表1列举了部分研究者对3种农药免疫原所选取的载体蛋白。

表1 免疫原载体蛋白的选择

农药	半抗原	免疫原载体蛋白	相关文献
甲萘威	CNA、CNB、CNH	BSA	[7] [17] [23] [32]
	CPNU	KLH	[9] [18] [19] [25]
克百威	BFNB、BFNP、BFBH	BSA	[33] [34]
涕灭威	涕灭威脲琥珀酸单酯	BSA	[10] [29]
	涕灭威脲乙酸乙酯	BSA、KLH	[30]

2.2 半抗原与载体的偶联

在设计好的半抗原的基础上,半抗原与载体蛋白的偶联,主要考虑偶联方法和偶联结合比2个重要因素。

2.2.1 偶联方法的选择

药物或其衍生物分子上的羧基可以通过活化酯法、碳二亚胺法、混合酸酐法、偶氮苯甲酸法等与蛋白上的氨基形成酰胺键,其中碳二亚胺法在这类化合物的偶联反应中的应用最为广泛。但是,碳二亚胺的缩合反应存在没有选择性、易形成蛋白分子间的自身聚合、产生非均一性产物等缺点。为了减少蛋白分子间的自身聚合,可以先将药物分子上的羧基转化为N-羟基琥珀酰亚胺的活泼酯,然后再与抗体交联,即在碳二亚胺法基础上改进活化酯法^[35]。混合酸酐法是指半抗原或药物及其衍生物分子中的羧基可以在三乙胺存在下与氯甲酸异丁酯反应,生成活泼中间体混合酸酐,然后与蛋白载体上的伯氨基反应,形成酰胺交

联键。本反应过程简单,毋需制备和分离中间产物。偶氮苯甲酸法是对氨基苯甲酸重氮化后,与带苯环的半抗原偶联引入羧基,再利用羧基的反应连接于蛋白上。目前,还没有采用此种方法合成氨基酸酯类农药的人工抗原。其原因可能是采用此方法引入的苯环本身就具有免疫性,再者引入部分的位置在苯环上,改变了农药本身的结构,影响针对农药分子抗体的特异性。

对于载体偶联方法的选择,免疫原及包被原的合成路线最好不同,另外,用作免疫原的半抗原化学结构、连接位置、连接臂长及构型应尽量与包被原的半抗原不同^[33],因此免疫原的制备常采用活化酯法,而包被原的制备常采用混合酸酐法。4种偶联方法的反应原理见表2。

2.2.2 偶联结合比的选择

人工抗原中半抗原与载体蛋白的摩尔分子比称为偶联结合比。除半抗原结构特征外,偶联率也是影响人工抗原免疫效果的重要因素。适宜的偶联结合比有助于提高抗体的亲和力和选择性。不同待测物,不同载体其最佳结合比可能不同。现在一般通过调节半抗原与载体的摩尔比、反应的pH值、温度、离子强度等来控制结合比。半抗原结合比过高或过低均会影响抗体的生成。低偶联结合比的人工抗原引起的免疫反应较慢,过高结合比抗原易导致动物免疫麻痹。刘成梅等^[34]认为,完全抗原的偶联结合比在10:1~25:1之间为宜。Rinehart等^[36]认为最佳偶联结合比为10:1~20:1。不同人工抗原的最佳结合比可能是

表2 羧基活性基团偶联方法及原理

偶联方法	活性基团	反应原理
活化酯法	COOH	$\text{RCOOH} + \text{HO} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \text{O} \\ \diagup \end{array} \longrightarrow \text{RCOO} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \diagdown \text{O} \\ \diagup \end{array} \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\bullet} \text{RCONH}-\bullet$
混合酸酐法	COOH	$\text{RCOOH} + \text{Cl}-\overset{\text{O}}{\parallel}-\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \xrightarrow{(\text{n}-\text{C}_4\text{H}_9)_3\text{N}} \text{RC}-\overset{\text{O}}{\parallel}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}-\text{COCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2 \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\bullet} \text{RCONH}-\bullet$
碳二亚胺法	COOH	$\text{RCOOH} + \text{R}-\text{N}=\text{C}=\text{N}-\text{R} \longrightarrow \text{R}-\overset{\text{H}}{\text{N}}-\overset{\text{OCOR}}{\text{C}}=\text{N}-\text{R} \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\bullet} \text{RCONH}-\bullet$
偶氮苯甲酸法	COOH	$\text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2 \xrightarrow{\text{NaNO}_2/\text{HCl}} \text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}_2\text{ClH} \xrightarrow{\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}} \text{HOOC}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R} \xrightarrow{\text{H}_2\text{N}-\bullet} \bullet-\text{HN}-\overset{\text{O}}{\parallel}-\text{C}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N}=\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{R}$

不一致的,最好且直接的获取方法是通过免疫实验,进行最优人工抗原的筛选。

综合以上人工抗原合成的因素,3种氨基甲酸酯类农药的部分人工抗原分子的设计、合成与优选归纳见表3。

表3 3种农药部分人工抗原合成与优选归纳

农药	偶联蛋白	偶联方法	连接臂	偶联比	相关文献
甲萘威	BSA	活化酯法	6个碳原子	26:1	[23][37]
克百威	BSA	活化酯法	4个碳原子	13:1	[8][26][32][33][38]
涕灭威	BSA	活化酯法	—	—	[10]

2.3 人工抗原的筛选、纯化和鉴定

不同种类人工抗原的免疫性,最终需要进行免疫实验,才能筛选出适宜的人工抗原,为后期特异性抗体的制备打好坚实的基础。

半抗原修饰物与载体偶联后所得的人工抗原必须进行纯化,以除去未反应的半抗原小分子、盐类及其他小分子杂质。最常用的方法是透析和层析法。透析一般耗时较长(通常需2d以上),纯化较为彻底、操作相对简单。层析法中,常用的有凝胶层析、亲和层析和离子交换层析,具体采用哪种形式,需要根据偶联的种类和性质以及对纯化程度的要求来决定。但凝胶层析耗时较短,但操作相对复杂,需要对流出组分进行跟踪分析,以确定目标组分。

对纯化后人工抗原进行鉴定,一方面是定性判断半抗原与载体是否偶联成功;另一方面是定量测定偶联结合比和蛋白质含量。人工抗原的检测方法主要有紫外分光光度法、红外吸收光谱法、考马斯亮蓝法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法、标记抗原示踪法、SDS-PAGE法、ESI-MS法^[32]、MALDI-TOF-MS法等^[37]。

鉴定农药人工抗原最常用的方法是紫外光谱扫描法,如果人工抗原的紫外吸收图谱不同于原载体蛋白和半抗原的紫外扫描图谱,则证明人工抗原合成成功^[39]。

以最后一次的透析外液作空白,分别将载体蛋白、半抗原及偶联在波长200~400nm进行紫外扫描,得到各物质最大的吸收波长,如若是在280nm处均有较大吸收,则选择280nm处波长的OD₂₈₀值以及浓度分别计算摩尔吸光系数,按下式估算半抗原与载体蛋白结合的分子数之比(结合比):

$$\text{结合比} = (e_{280 \text{ 偶联物}} - e_{280 \text{ 载体蛋白}}) / e_{280 \text{ 半抗原}}^{[23]}$$

若是得到的3种物质的最大吸收波长相差较远,可以分别以半抗原、载体蛋白的最大吸收波长扫描得

到的OD,进行结合比的计算^[40-41]。

$$\text{偶联结合比}(n) = (A_{Cam.KBbm} - A_{Cbm.KBam}) / (A_{Cbm.KAam} - A_{Cam.KAam})$$

式中:A、B、C分别为半抗原、载体蛋白、偶联物;KAam、KAbm、KBam、KBbm、ACam、ACbm分别为3种物质在A、B物质最大吸收波长处的吸光值;分子消光系数K=A/C。但是,对于最大吸收波长相差不大的偶联比计算,也可以采用上述方法^[42-43]。

紫外分光光度法只能对偶联的结果进行初步判断,计算中涉及到的偶联物浓度是根据初始加入蛋白质的浓度进行计算的,且对人工抗原纯化程度以及偶联物体积不十分精确,因此计算出的结合比也不是精确的;且紫外分光光度法需要一系列浓度的配制、烦琐的计算等。质谱法具有灵敏度高、样品用量少、可以提供样品的精确分子量和结构信息,能与色谱联用、用于复杂体系的分析等优点,是近年来广泛应用于偶联物鉴定的新型鉴定方法之一。基质辅助激光解吸-电离飞行时间质谱法(MALDI-TOF/MS),也被称为生物质谱,可以直接测定偶联物的相对分子质量,可作为一种直观的检测方法判定小分子是否与载体蛋白结合,并可精确计算偶联物结合比。

半抗原与载体蛋白的结合比 = (MC-MB)/MA
式中:A、B分别为半抗原和蛋白质,其比值为偶联结合比;MA、MB和MC分别表示半抗原、蛋白、偶联物的摩尔质量。

若是实验室具备仪器条件,生物质谱法无疑是一种快捷、准确的方法。王莹等^[44]用质谱法测定了4种真菌毒素与载体蛋白偶联物的结合比。

3 问题与展望

稳定并具有免疫原性的半抗原是农药人工抗原分子合成的前提和关键。氨基甲酸酯类农药的结构相对比较简单,都具有氨基甲酸酯的结构,半抗原的合成具有一定的规律。(1)从农药分子的共性结构(氨基甲酸酯末端)设计引入连接臂或活性基团,为一大类农药分子人工抗原的合成提供了可行性,如上述3种农药均是在氨基甲酸酯末端水解引入连接臂;(2)借鉴已合成的半抗原的方法,在结构类似的农药分子上引入活性基团,合成新的半抗原。例如,克百威与甲萘威水解后断裂部位相同,参照甲萘威半抗原合成方法从克百威水解产物咪喃酚入手制备半抗原。异丙威、仲丁威等半抗原也可以用此种合成方法。

虽然氨基甲酸酯农药的人工抗原合成有可参考

的合成路径,但是方法中也存在一些问题:(1)活化酯法合成免疫原时,水容易被引入而影响实验的成败;(2)传统蛋白的纯化,透析需要经过较长的时间,凝胶层析所需时间较短,但操作相对复杂;(3)偶联物的定性方法较为简单,但不能准确判断偶联情况以及结合比的计算。针对以上问题,需要我们严格控制实验的操作条件和方法,避免引入其他物质而对目标物质的形成和保存产生影响;农药人工抗原的合成过程中涉及有机化学知识,全面系统地掌握化学知识有利于从根本上掌握人工抗原设计与合成的原理;对于人工抗原的定性,可以采用ESI-MS, MALDI-TOF-MS等方法进行更加快捷、精确的确证。

成功合成高质量的人工抗原是制备特异性抗体的关键。氨基甲酸酯类农药人工抗原的合成已初见成效并有一定规律可循,因此,此类农药人工抗原的合成以及免疫技术的开发与建立将有一个较大的发展。

参考文献:

- [1] 武中平,高巍,杨红,等.氨基甲酸酯类农药残留测定方法的研究进展[J].江苏化工,2004(5):24-27,53.
- [2] 胡芹芹.蔬菜中氨基甲酸酯类农药残留快速检测技术研究[D].武汉:华中师范大学,2009.
- [3] Caballo-Lopez A, M D L D. Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to on line filtration-solid-phase extraction-column liquid chromatography-post column derivatisation-fluorescence detection for the determination of N-methyl carbamates in soil and food[J]. *Journal of Chromatography A*, 2003, 998: 51-59.
- [4] 郝学飞,董小海,钟红舰,等.氨基甲酸酯类农药残留检测方法对比研究[J].食品科学,2010(2):183-186.
- [5] Barbora Mickova, Jitka Zrostlikova, Jana Hajslova, et al. Correlation study of enzyme-linked immunosorbent assay and high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the determination of N-methyl carbamate insecticides in baby food [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2003, 495: 123-132.
- [6] Marco Maria-Pilar, Gee J Shirley, Cheng Hong M, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for carbaryl[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1993, 41: 423-430.
- [7] Antonio Abad, Angel Montoya. Production of monoclonal antibodies for carbaryl from a hapten preserving the carbamate group [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1994, 42(8): 1818-1823.
- [8] Antonio Abad, Marai' Jose' Moreno, Angel Montoya. Development of monoclonal antibody-based immunoassays to the N-methyl carbamate pesticide carbofuran[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1999, 47(6): 2475-2485.
- [9] Brady F James, Fleeker R James, Wilson A Richard, et al. Enzyme immunoassay for aldicarb[J]. *American Chemical Society*, 1988, doi:10.1021:262-284.
- [10] 张彦峰,戴树桂,高志贤,等.杀虫剂涕灭威的半抗原、抗原和抗体及其制备方法与应用[P].中国:200610013124.9,2007-08-08.
- [11] 贲亚翔,朱德锐,刘德立,等.农药人工抗原合成方法的设计与优选[J].农药,2008(1):10-14.
- [12] 张文元,杨亚冬.农药小分子半抗原合成的研究与应用[J].农药研究与应用,2007(6):7-10.
- [13] 张奇.倍硫磷和速灭威半抗原分子设计及其免疫效果研究[D].南京:南京农业大学,2007.
- [14] 罗永宏,宋超,陈家长,等.氨基甲酸酯类农药甲萘威的毒理学及环境归趋研究进展[J].江苏农业科学,2012(1):316-318,321.
- [15] Abad A, Primo J A. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay to carbaryl antibody production from several haptens and characterization in different immunoassay formats[J]. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 1997, 45: 1486-1494.
- [16] 刘曙照,冯大,钱传范,等.甲萘威酶联免疫吸附分析技术研究[J].农药学学报,1999(1):62-68.
- [17] 许艇.杀虫剂西维因单克隆抗体的研制及鉴定[J].免疫学杂志,2004(1):61-64.
- [18] Wang Shuo, Yu Chun-di, Wang Jun-ping, et al. Enzyme immunoassay for the determination of carbaryl residues in agricultural products[J]. *Food Additives and Contaminants*, 2005, 22(8): 735-742.
- [19] Wang Shuo, Robin D Allan, Amanda S, et al. Rapid enzyme immunoassays for the detection of carbaryl and methoprene in grains[J]. *Journal of Environmental Science and Health part B: -Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 2002, 37(6): 521-532.
- [20] Wang Shuo, Yu Chun-di, Zhang Yan, et al. Tube-immunoassay for rapid detection of carbaryl residues in agricultural products [J]. *Journal of Environmental Science*, 2007, 41(5): 693-704.
- [21] Miguel A, Gonzales-Martinez, Sergi Morais, et al. Monoclonal antibody-based flow-through immunosensor for analysis of carbaryl [J]. *Analytical Chemistry*, 1997, 69(14): 2812-2818.
- [22] 王硕.西维因抗体库的构建及特异性克隆的筛选[J].食品研究与开发,2012(7):127-131.
- [23] 杨耀军.西维因人工抗原的合成新方法[J].过程工程学报,2005(2):201-204.
- [24] 张灿.农药西维因快速检测试纸条的研究开发[D].天津:天津科技大学,2006.
- [25] Dong Ting-ting, Sun Jing-wei, Liu Bing, et al. Development of a sensitivity-improved immunoassay for the determination of carbaryl in food

- samples [J]. *Society of Chemical Industry*, 2010, 90: 1106–1112.
- [26] Zhu Guo-nian, Jin Mao-jun, Gui Wen-jun, et al. Development of a direct competitive enzyme-linked immunoassay for carbofuran in vegetables [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107(4): 1737–1742.
- [27] Gui Wen-jun, Jin Mao-jun, Sun Li-feng, et al. Residues determination of carbofuran in vegetables based on sensitive time-resolved fluorescence immunoassay [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2009, 20(1): 49–56.
- [28] 朱德锐. 呋喃丹半抗原合成与多克隆抗体制备及其检测应用[D]. 武汉: 华中师范大学, 2011.
- [29] Zhang Yan-feng, Gao Zhi-xian, Zhang Qing-min, et al. A new hapten for immunoassay of aldicarb [J]. *Chinese Chemical Letters*, 2006(8): 1021–1024.
- [30] Lai Khai Siew, Larry A Winger, Julia A Spoors, et al. Monoclonal antibodies useful in sensitive immunoassays for aldicarb in either laboratory or the field [J]. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2003, 83(5): 417–426.
- [31] Chen Jun-Jie, Jiang Jin-Qing. Monoclonal antibody-based solvent tolerable indirect competitive ELISA for monitoring ciprofloxacin residue in poultry samples [J]. *Food and Agricultural Immunology*, 2013, 24(3): 331–344.
- [32] Yang Jin-yi, Wu Qing, Wang Hong, et al. Production and identification of high affinity monoclonal antibodies against pesticide carbofuran [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2007(9): 1082–1088.
- [33] Yang Jin-yi, Wang Hong, Jiang Yue-ming, et al. Development of an enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) method for carbofuran residues [J]. *Molecules*, 2008, 13(4): 871–881.
- [34] 刘成梅, 黄丽, 罗舜菁, 等. 氨基青霉素人工抗原的制备及鉴定 [J]. *生物工程·食品科学*, 2007, 28(9): 384–388.
- [35] 龚雄麒, 仲伯华. 蛋白质交联方法及其应用 [J]. *国外医学·药学分册*, 1988(2): 65–73.
- [36] Rinehart K L, Namikoshi M, Cho B W. Structure and bio-synthesis of toxins from blue-green alga (cyanobacteria) [J]. *Appl Phycol*, 1994(6): 159–176.
- [37] 王悦秋, 宋娟, 王榕妹, 等. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备 [J]. *分析化学评述与进展*, 2010, 38(8): 1211–1218.
- [38] 杨金易, 吴青, 王弘, 等. 高亲和力的农药克百威单克隆抗体的制备及鉴定 [J]. *中国农业科学*, 2007(3): 518–523.
- [39] 张丽芳, 李伟岭, 薛飞群. 人工抗原的鉴定 [J]. *畜牧与饲料科学*, 2009, 30(10): 116–117.
- [40] 陈建波, 王云飞, 奚道珍, 等. 克百威及其代谢产物残留分析方法研究进展 [J]. *农药科学与管理*, 2011(3): 30–33.
- [41] 王静, 魏朝俊, 赵建庄, 等. 溴氰菊酯人工抗原的合成及偶联比的测定 [J]. *北京农学院学报*, 2006(4): 71–74.
- [42] 朱国念, 吴银良, 程敬丽, 等. 克百威人工抗原的合成与鉴定 [J]. *浙江大学学报: 农业与生命科学版*, 2002(1): 49–55.
- [43] 许艇, 李季, 李兴海, 等. 杀虫剂西维因特异性多克隆抗体的制备及鉴定 [J]. *农业环境科学学报*, 2003(6): 758–761.
- [44] 王莹, 王希春, 金福源, 等. 质谱法测定 4 种真菌毒素与载体蛋白偶联物的结合比 [J]. *分析检测*, 2012, 33(2): 219–223.