

食品中残留喹乙醇人工抗原的制备与鉴定

张景艳, 杨志强, 李建喜*, 王学智, 孟家仁², 张凯, 张艳

(1. 甘肃农业大学动物医学院, 甘肃兰州730070; 2. 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所, 甘肃兰州730050)

摘要 [目的] 合成喹乙醇人工抗原。[方法] 通过化学合成方法, 将喹乙醇与琥珀酸酐反应, 合成半抗原喹乙醇半琥珀酸酯(OLA HS), 通过活泼酯化法将半抗原与载体蛋白偶联制备喹乙醇全抗原。[结果] TLC、紫外光谱法的鉴定结果表明, 目标半抗原合成成功; 紫外光谱法鉴定结果表明, 全抗原合成成功。[结论] 建立了一种喹乙醇半抗原及全抗原的合成方法, 为进一步制备喹乙醇抗体奠定基础。

关键词 喹乙醇; 半抗原; 全抗原; 鉴定

中图分类号 TS207.5+3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)05-01876-02

Preparation and Identification of the Artificial Antigen of Residual Olaquinox in Foods

ZHANG Jingyan et al (College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070)

Abstract [Objective] The research aimed to synthesize the artificial antigen of olaquinox. [Method] Olaquinox reacted with succinic anhydride by chemosynthesis method to synthesize the hapten(OLA HS). And the hapten was coupled with carrier protein by using active esterification method to prepare the complete antigen of olaquinox. [Result] The identification results by TLC and ultraviolet spectroscopy showed that the hapten was successfully synthesized. The identification results by ultraviolet spectroscopy showed that the complete antigen was successfully synthesized. [Conclusion] A synthesis method of the hapten and complete antigen of olaquinox was established, which laid the foundation for further preparation of olaquinox antibody.

Key words Olaquinox; Hapten; Complete antigen; Identification

动物性食品安全与人们身体健康和经济贸易密切相关, 药物残留是威胁动物性食品安全的重要因素。乙醇(olaquinox, OLA) 又称酰胺醇, 是一个纯化学合成物质, 它的化学名称叫作2-羟乙基氨基甲酰3-甲基喹啉1,4-二氧化物。残留于动物组织中的乙醇是一种基因毒剂和生殖腺诱变剂, 不但能使动物发生中毒或死亡, 且其可能残留在畜产品中, 对人体也有较大的危害。因此, 中国兽药典规定, 乙醇禁用于禽、鱼及体重超过35 kg的猪。近年来, 我国动物源食品中乙醇残留仍很严重, 为了确保人类安全与健康, 开展饲料及饲料添加剂中乙醇含量检测工作非常重要。

乙醇残留的检测目前主要依靠薄层色谱法^[1-2]、高效液相色谱法^[3-7]、质谱法^[8]、高效液相-质谱联用法^[9]等, 这些方法往往需要复杂昂贵的仪器, 而且需要经过繁琐的前处理, 很难达到快速、简便的现场检测要求。免疫检测分析方法由于具有特异性强、灵敏度高、简便、快速等优点, 在兽药残留分析领域应用越来越多。因此, 笔者建立了一种鲜见文献报道的乙醇半抗原及全抗原合成方法, 以期为进一步制备乙醇抗体和快速检测免疫试剂盒奠定基础。

1 材料与方

1.1 试剂 乙醇原料药, 纯度98%, 购于山西亚宝兽药有

限公司; 乙醇标准品, 纯度99.6%, 批号HD71101, 购于中国兽药监察所; 牛血清白蛋白(BSA) 为生化试剂, N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、二环己基碳二亚胺(DCC) 为分析纯, 均购于Sigma公司; 其他试剂皆为市售分析纯。

1.2 仪器 UV-2501 紫外-可见分光光度计, 由岛津公司生产; MS-5704, 由美国应用生物系统公司生产; CCA-111 旋转蒸发仪; LGJ-10 冷冻干燥机, 透析袋(最大截留相对分子质量6 000), 进口分装。

1.3 方法

1.3.1 半抗原的合成。称取2.209 0 g 乙醇和0.916 g 琥珀酸酐置于圆底烧瓶中, 加入吡啶 200 ml, 加热回流反应8 h后, 减压蒸除吡啶, 加入50 ml 蒸馏水和6 ml 浓盐酸, 放入4℃冰箱过夜, 次日用乙酸乙酯萃取3次, 用2 ml/L 碳酸氢钠水溶液提取有机相, 重复3次, 收集水相, 再用浓盐酸调pH值约为2, 析出黄褐色糖浆状物。撇去酸层, 用蒸馏水洗5次后, 经真空干燥得黄褐色固体, 即半抗原乙醇半琥珀酸酯(OLA HS), 直接用于鉴定或偶联。反应路线见图1。

1.3.2 全抗原合成。准确称取30.4 ng OLA HS 溶于0.5 ml DMF, 加入42.0 ng DDC, 搅拌10 min 后再加入27.6 ng NHS, 室温避光搅拌反应24 h, 离心除去沉淀物(N,N-二环己基脲),

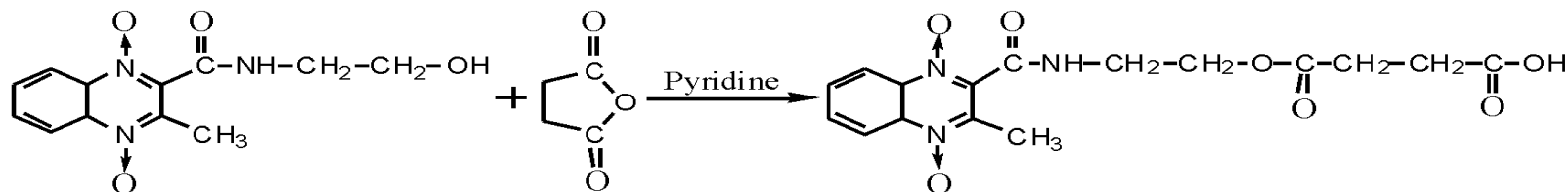


图1 半抗原合成路线

Fig.1 The synthetic route of hapten

上清液为反应A液。另称取20 ng BSA 溶于8 ml 浓度为0.1 ml/L pH值为7.4的磷酸缓冲液中, 此为反应液B。将反应液A逐滴加到反应液B中, 4℃搅拌过夜。次日将反应

液置于处理过的透析袋内。用浓度为0.1 ml/L pH值为7.4的磷酸缓冲液透析3 d, 每天换液3次, 即得乙醇全抗原(OLA BSA)。冷冻干燥, 分装, 保存于-20℃冰箱中备用。

2 结果与分析

2.1 OLA HS 的合成与鉴定

2.1.1 TLC 监测结果。溶剂选择95%乙醇溶液, 展开剂为乙酸乙酯-丙酮-乙醇(5:4:1)。在254 nm紫外灯下观察。结果

作者简介 张景艳(1980-), 女, 甘肃武威人, 硕士研究生, 研究方向: 动物中毒与营养代谢病。* 通讯作者, 博士, 副研究员, E-mail: lalda200011@163.com.

收稿日期 2008-11-27

表明, 乙醇标准品的 R_f 值与 乙醇原料药的 R_f 值相同 ($R_f = 0.39$), 产物 OLA HS 的斑点单一, R_f 值 ($R_f = 0.69$) 不同于 乙醇原料药, 因此可以得出在反应后生成了不同于 乙醇的一种新产物。

2.1.2 紫外光谱法的鉴定结果。由图2可知, 乙醇原料药在373.0、356.0、258.8、239.4 nm 时有最大吸收, 乙醇半琥珀酸酐 (OLA HS) 除具有与 乙醇相同的特征吸收峰以外, 在343.40、242.20 nm 也有吸收。而经试验证明琥珀酸酐无紫外吸收, 因此试验表明有新物质生成。

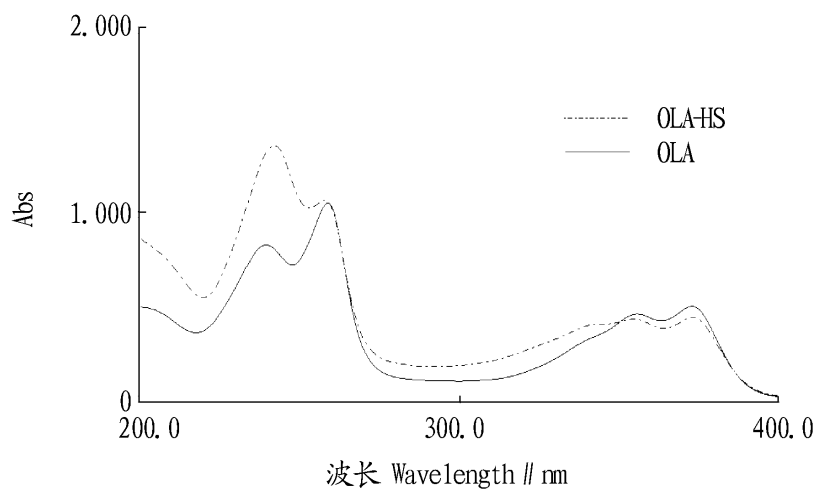


图2 OLA 和 OLA HS 的紫外吸收光谱

Fig 2 The ultraviolet absorption spectrum of OLA and OLA HS

2.1.3 OLA HS 的质谱鉴定结果。由图3可知, 对 OLA HS 进行+ESI-MS 鉴定时出现 OLA HS 分子离子峰 $m/z = 364$ ($[363 + H]^+$), 与目标产物的理论分子量一致。通过以上鉴定分析, 表明半抗原 乙醇半琥珀酸酐合成成功。

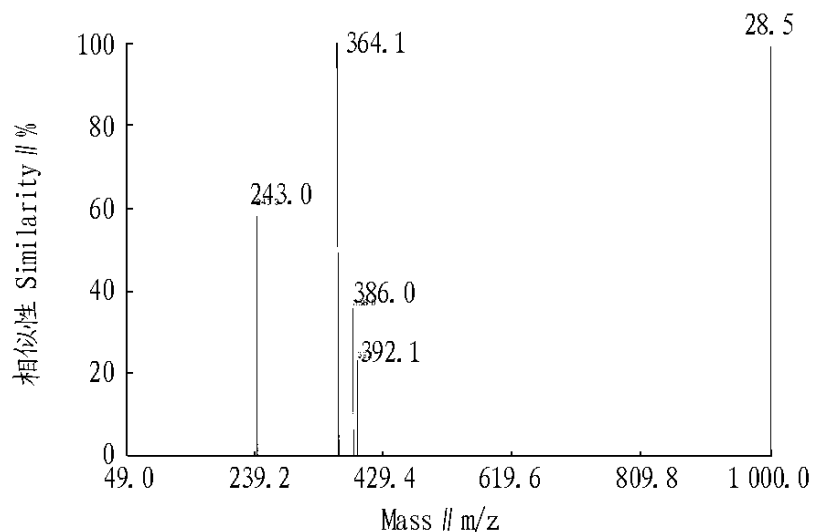


图3 OLA HS 的电喷雾离子化质谱图

Fig 3 The electrospray ionization mass spectrometry of OLA HS

2.2 OLA BSA 全抗原的鉴定 由图4可知, 乙醇全抗原的紫外吸收光谱, 与载体蛋白及半抗原的吸收曲线有明显的

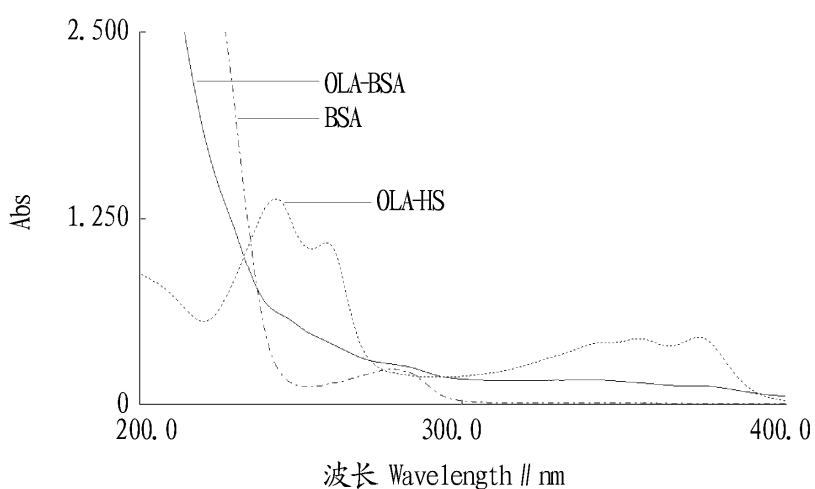


图4 OLA-BSA 的紫外吸收光谱

Fig 4 The ultraviolet absorption spectrum of OLA-BSA

变化。280 nm 为载体蛋白 BSA 的特征吸收峰, 而 OLA BSA 在这一波长处吸收有增加; 在341.1 nm 处, OLA BSA 表现出与 OLA 类似的特征吸收峰, 结果表明全抗原合成成功。

3 讨论

(1) 在药物残留检测领域, 酶联免疫检测方法 (ELISA) 具有灵敏、快速、简便、特异等优点, 适用于现场监控和大量样本筛选。而大部分药物都属于半抗原, 不具有免疫原性, 因此合成小分子药物的人工抗原并制备出相应的抗体是制备酶联免疫试剂盒的关键。目前, 国内文献鲜见有关 乙醇酶联免疫分析方法的报道, 仅 Stu 等报道过使用直接竞争 ELISA 的方法对饲料中 乙醇原型药物的含量进行检测, 使用该方法检测饲料中 乙醇的最低检测限为 1.02 ng/kg, 最低定量限为 1.5 ng/kg, 在 4 ~ 8 ng/kg 的添加浓度范围内回收率在 91% ~ 102%, 并且交叉反应率试验表明针对 乙醇的多克隆抗体对结构类似的同类药物卡巴氧具有 15.2% 交叉反应率^[10]。仅从检测灵敏度上看, 该方法不能满足残留检测的要求。因此, 在 乙醇残留检测方法中, 进一步开展、完善免疫分析方法的研究是有必要的。

(2) 由于 乙醇的分子质量只有 263, 不具有免疫原性, 必须具有或衍生出能与载体进行交联反应的功能基团(氨基、羧基、重氮盐等), 才能与载体交联。对于含羟基的半抗原, 需要将其羟基衍生为羧基后才能再与载体交联合成人工抗原。分子结构中支链末端为羟基, 该试验以琥珀酸酐为衍生剂, 吡啶作反应溶剂, 经简单洗涤、脱溶, 即可得到纯度很高的产物, 产物纯度得到了波谱鉴定确证, 该法操作简便, 能够满足实验室合成少量半抗原的需要。

(3) 对于含羧基的半抗原, 其人工抗原的合成常采用混合酸酐法、活泼酯化法或碳二亚胺法^[11], 其中活泼酯化法是对碳二亚胺法的改进, 由于避免了碳二亚胺对蛋白的直接作用和蛋白分子间的交联, 在小分子的酶联免疫分析方法的研究中应用广泛。该研究采用活泼酯化法成功制备出 乙醇的全抗原, 为进一步制备 乙醇抗体和快速检测免疫试剂盒奠定坚实的基础。

参考文献

- [1] 莫宗正. 中药复方制剂中 乙醇和痢菌净的薄层色谱测定[J]. 广西农业学, 1997(3): 146.
- [2] 刘安南. 薄层色谱法鉴别中西复方制剂中 乙醇成分[J]. 饲料检测, 2001(1): 23.
- [3] 徐晓云, 胡劲松, 赫庚. 高效液相色谱法测定 乙醇含量[J]. 吉林畜牧兽医, 2005(12): 53.
- [5] ROYBAL J E, MUNN R K, SHIMODA W. Liquid chromatographic determination of carbadox residues in animal feed[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1985, 68(4): 653-657.
- [6] LUCHTEFELD R G. Detection of low level carbadox residues in animal feeds by high pressure liquid chromatography[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1977, 60(2): 279-283.
- [7] THORPE V A. Rapid colorimetric method for carbadox in animal feeds[J]. J Assoc Off Anal Chem, 1976, 59(6): 1290-1293.
- [8] MAO X S, RAYMOND E M, CHRIS D M A tandem mass spectrometric study of the N oxides, carbadox, and laquindox, carried out at high mass accuracy using electrospray ionization[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2003, 230: 123-133.
- [9] VAN POUCKE C, DE KEYSER K, BALTUSNIKIENE A, et al. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric detection of banned antibiobiotic growth promoters in animal feed[J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 99-109.
- [10] STU C, ELLIOTT C T. Simultaneous and rapid detection of five banned antibiotic growth promoters by immunoassay[J]. Analytica Chimica Acta, 2005, 529: 89-96.
- [11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 73, 77-101.