

杀菌剂抑霉唑人工抗原的合成和鉴定

周映霞^{1,2,3}, 张丽杰², 潘家荣², 焦必宁^{1,3,*}, 王磊²

(1.西南大学食品科学学院, 重庆 400716; 2.中国农业科学院农产品加工研究所, 北京 100193;
3.中国农业科学院柑桔研究所/西南大学柑桔研究所, 重庆 400712)

摘要: 以咪唑乙醇为原料, 与6-溴己酸乙酯发生取代反应后再经水解反应合成抑霉唑半抗原(6-[1-(2,4-二氯苯基)-2-(1-咪唑基)乙氧基]己酸)。产物经薄层层析和¹H-NMR鉴定后, 采用活化酯法分别与牛血清蛋白(BSA)和卵清白蛋白(OVA)偶联得到免疫原(HIA-BSA)和包被原(HIA-OVA), 紫外光谱分析法计算得其偶联比分别为13:1和7:1, 初步说明人工抗原合成成功。通过免疫动物获得效价为1:64000的抗体, 采用间接竞争ELISA法测定抗体的IC₅₀值为1.76 μg/mL, 从而进一步证明人工抗原合成成功, 所得的抗体可用于ELISA检测试剂盒的研制。

关键词: 抑霉唑; 半抗原; 人工抗原; 合成; 鉴定

Synthesis and Identification of Imazalil Antigen

ZHOU Ying-xia^{1,2,3}, ZHANG Li-jie², PAN Jia-rong², JIAO Bi-ning^{1,3,*}, WANG Lei²

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400716, China; 2. Institute of Agro-Food Sciences and Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Citrus Research Institute, Southwest University, Chongqing 400712, China)

Abstract: In this study, imazalil (6-[1-(2,4-dichloro-phenyl)-2-(1-imidazolyl) ethoxy] hexanoic acid) was synthesized via substitution reaction between imidazole ethanol and 6-bromo-ethyl followed by hydrolysis reaction to provide a hapten. The synthesized product was identified by thin-layer chromatography (TLC) and ¹H-NMR. The hapten was conjugated with bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) to obtain artificial immune antigen and artificial coating antigen, respectively. The coupling molar ratios were calculated to be 13:1 and 7:1 according to UV spectroscopy analysis, which suggests that artificial antigens are both synthesized successfully. The titer of the antibodies secreted by immunized animals was 1:64000 and the IC₅₀ value was 1.76 μg/L determined by indirect ELISA, which further confirms successful synthesis of artificial antigens. The obtained antibodies can be used for the development of ELISA test kit.

Key words: imazalil; hapten; antigen; synthesis; identification

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2010)13-0184-05

抑霉唑, 化学名称为1-[2-(2,4-二氯苯基)-2-(烯丙氧基)乙基]-1H-咪唑, 相对分子质量为297.2, 是一种内吸性咪唑类杀菌剂, 可用于谷物、水果、蔬菜等防治真菌病害, 尤其对控制柑橘、苹果和瓜类的采后腐烂有效, 已广泛用于果蔬的防腐保鲜。但由于不合理应用, 谷物、水果和蔬菜中存在一定的残留。研究发现, 抑霉唑虽对人体的直接毒性不大, 但如果长期摄入, 在体内积累会导致慢性毒性而影响人们的健康^[1]。为保障消费者的健康, 发达国家和国际组织均制定了抑霉唑在

食品中的最大残留限量标准(maximum residue limits, MRLs)^[2-3], 如欧盟和美国对柑橘的MRLs分别为0.02mg/kg和1mg/kg, 日本规定蒜苔MRLs为0.01mg/kg, 我国规定了抑霉唑在柑橘类水果中的MRLs为5mg/kg, 从而加强对食品和农产品中抑霉唑残留的监测。

目前对抑霉唑残留的检测主要采用气相色谱法(GC)^[4-5]和高效液相色谱法(HPLC)^[6-7]等, 这些方法检测结果准确, 但存在前处理繁琐、分析周期长、成本高等缺点, 且需要熟练的技术人员, 难以满足简便和快速的现场检

收稿日期: 2009-11-13

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD47B07); 国家“863”计划项目(2006AA10Z449);

国家现代农业(柑橘)技术创新体系项目

作者简介: 周映霞(1984—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品安全与质量控制。E-mail: zyx899@163.com

* 通信作者: 焦必宁(1964—), 男, 研究员, 本科, 研究方向为食品安全与检测技术。E-mail: bljiao@tom.com

测需要。酶联免疫分析方法(ELISA)具有简便、快速、灵敏、特异且对仪器要求低等优点,目前已广泛地应用于农药残留检测中。但目前对抑霉唑残留的ELISA检测研究较少^[8-9],国内尚未见报道。人工抗原的制备是建立ELISA法的关键,本研究参考Ito等^[10]的方法并加以改进和优化,以咪唑乙醇为原料,设计和合成具有抑霉唑特异结构的人工抗原,并利用紫外光谱和核磁共振等手段进行鉴定,以期为抑霉唑免疫检测方法的建立提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器

咪唑乙醇(纯度98%) 浙江市三门县盼达技术研究所;6-溴己酸乙酯(纯度95%) 滨海泰丰医药化工有限公司;氢化钠(NaH,纯度60%) 上海朗瑞精细化学品有限公司;N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 汕头市西陇化工厂;牛血清蛋白(BSA)、鸡卵清蛋白(OVA)、弗氏完全、弗氏不完全佐剂、二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 美国Sigma公司;HRP标记的羊抗小鼠IgG抗体 北京索莱宝生物科技有限公司;以上及其他试剂均为分析纯。

X24数字显示显微熔点测定仪 北京泰克仪器有限公司;UV3010紫外-可见分光光度计 日本日立株式会社;BLUKER-STECTROSTIN.300Hz.ULTRASHIED核磁共振波谱仪;Multiskan MK3酶标仪 美国Thermo公司。

1.2 实验动物

Balb/c小鼠(4~6周龄,雌性) 北京兴隆实验动物养殖场。

1.3 方法

1.3.1 抑霉唑半抗原(imazalil hapten, HIA)的合成

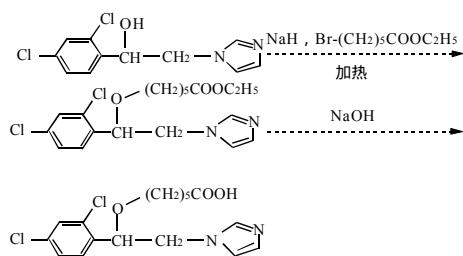


图1 抑霉唑半抗原的合成路线

Fig.1 Synthesis route of imazalil hapten

抑霉唑降解物咪唑乙醇的分子结构外部有一羟基活性基团,该基团易于通过亲核取代反应被取代而引进一羧基。因此选择咪唑乙醇为原料通过取代反应合成6-[1-

(2,4-二氯苯基)-2-(1-咪唑基)乙氧基]己酸,作为抑霉唑的半抗原。其合成路线如下:咪唑乙醇与6-溴己酸乙酯发生取代反应生成6-[1-(2,4-二氯苯基)-2-(1-咪唑基)乙氧基]正己酸乙酯(产物),然后将产物水解得到6-[1-(2,4-二氯苯基)-2-(1-咪唑基)乙氧基]己酸(产物),见图1。具体步骤参考文献[10]并从反应条件、产物纯化方法等方面略作改进。

1.3.2 6-[1-(2,4-二氯苯基)-2-(1-咪唑基)乙氧基]正己酸乙酯的制备

2.1g咪唑乙醇溶解于3mL DMF中,0.37g60%的NaH悬浮于10mL的四氢呋喃后加到咪唑乙醇溶液中,52恒温回流搅拌1.5h后于15水浴加入2.5g6-Br-(CH₂)₅COOC₂H₅,回流搅拌反应过夜。次日将产物过滤、浓缩后用硅胶层析提纯(洗脱剂、己烷、乙酸乙酯体积比为3:1)收集得到产物。产物用薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)初步检测,经硅胶进一步纯化并用核磁共振鉴定。

1.3.3 6-[1-(2,4-二氯苯基)-2-(1-咪唑基)乙氧基]己酸的制备

称取1.4g的产物用体积分数50%的乙醇溶液稀释成40mL,然后加入4mmol/mL的NaOH溶液5mL,室温搅拌反应1.5h,将反应混合液浓缩后加30mL蒸馏水到浓缩液中,用乙酸乙酯萃取,水相用稀盐酸调pH6.5后用氯仿萃取。氯仿层用水润洗后经无水硫酸镁干燥,过滤后将滤液浓缩结晶得到产物。产物经核磁共振波谱鉴定。

1.4 抑霉唑人工抗原(HIA-BSA、HIA-OVA)的合成

称取74.2mg产物溶于1mL的DMF中,加入23mgNHS和41.3mgDCC,室温搅拌反应4h后10000r/min离心15min,取0.5mL的上清液分别逐滴加入溶有100mgBSA和100mgOVA的10mL硼酸缓冲液(pH9.0)中,室温搅拌反应1h后于4搅拌过夜。次日取出,在4条件下用pH7.4磷酸盐缓冲液透析3d,每天换液3次。透析液于10000r/min离心5min,取上清液冷冻干燥成粉末-20保存备用。产物经紫外-分光光度法鉴定并根据下式^[11]计算偶联比,其中为克分子消光系数。

$$\text{偶联比} = \frac{\text{偶联物} - \text{载体蛋白}}{\text{半抗原}}$$

1.5 抗体的制备及鉴定

购买Balb/c小鼠6只,观察一周无异样后取尾血保存作阴性对照。用HIA-BSA对6只小鼠于腹部皮下多点免疫,设高低剂量两种处理免疫(A 0.5 μg/mL和B 5 μg/mL),各免疫3只,每只注射0.2mL,初次免疫为免疫原和弗氏完全佐剂等体积混合,以后每次加强免疫均为免疫原与不完全弗氏佐剂等体积混合。每次免疫间隔3周,第3次加强免疫一周后取尾血测其效价。若

效价达到要求($1:10^4$)则于尾静脉进行冲击免疫，一周后取血。取效价最高的血清用间接非竞争 ELISA 法确定抗原抗体最佳工作浓度，并用间接竞争 ELISA 法测定抗体的特异性。

2 结果与分析

2.1 半抗原的合成与鉴定

用氯化钠将咪唑乙醇中羟基活化后与 6- 溴己酸乙酯反应 4h 后，用 TLC 法(展开剂为甲醇、正己烷、乙酸乙酯，体积比 1:3:6)检测发现有新的产物生成，但此时反应未完全且有较多的杂质。随着反应时间的延长，产物中的原药点逐渐消失，而出现了两个与咪唑乙醇($R_f = 0.63$)不同的较明显的目标产物点($R_f = 0.78$ 和 $R_f = 0.42$)。粗产物浓缩后经硅胶柱层析提纯，用 TLC 法检测发现 $R_f = 0.42$ 的几乎消失，因此可初步说明 $R_f = 0.78$ 的点为目标产物。收集产物浓缩得到棕黄色油状物(产物) 约 1.68g，得率为 52.5%。

产物 经核磁进一步验证，核磁结构为 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO)：1.15(3H,m)、1.23(2H,m)、1.44(4H,m)、2.17(2H,m)、3.25(2H,m)、4.28(2H,m)、4.20(2H,m)、4.87(1H,m)、6.85(1H,s)、7.05(1H,s)、7.34(1H,d)、7.46(2H,m)、7.64(1H,d)。结果表明，其结构与预期目的物的理论结构一致。相对于咪唑乙醇的核磁结构，产物 多了 6 个特征峰，分别为 1.15(3H,m)、1.23(2H,m)、1.44(4H,m)、2.17(2H,m)、3.25(2H,m)、4.28(2H,m)，由此可见，咪唑乙醇上的羟基经反应后转变成了酯，说明产物 是咪唑乙醇和 6- 溴己酸乙酯的酯化物，从而可确定此物质为目标产物。

产物 溶液经浓缩结晶后得到约 0.3g 的微黄色粉末，产物得率较低，仅为 23.3%。这可能是由于产物

纯度不高，残留的部分杂质与产物 极性相近难于分离，且经多次萃取过程造成产物的损失。对产物 进行显微熔点仪测定和核磁鉴定，其熔点为 103~106 $^{\circ}\text{C}$ ，由核磁鉴定结果可知，产物 相对产物 少了两个特征峰：1.15(3H,m)、4.28(2H,m)，由此可知产物 发生了水解反应得到水解产物 。产物 的结构通过核磁鉴定为 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO)：1.23(2H,m)、1.44(4H,m)、2.17(2H,m)、3.25(2H,m)、4.20(2H,m)、4.87(1H,m)、6.85(1H,s)、7.05(1H,s)、7.34(1H,d)、7.46(2H,m)、7.64(1H,d)，从而可确定此物质为目标产物 。这与 Ito 等^[10] 报道基本相符，但没有出现 12.0(1H,br) 这一特征峰，据分析该特征峰是羧基上的氢。可能是因为氢氧化钠未被盐酸完全中和，过量的氢氧化钠与羧基发生反应取代了羧基上的氢。但若 pH 值过低会使肽键受到影响而发生断裂，因此必须保持接近中性的环境，才有较高的得率。因此，还需对反应和分离纯化条件进一步优化。

2.2 人工抗原的鉴定

将 HIA-BSA、HIA-OVA、HIA 和载体蛋白用 PBS 稀释为 1mg/mL，以 PBS 为空白对照，测定三者在 280nm 处的吸光度，结果见图 2、3。

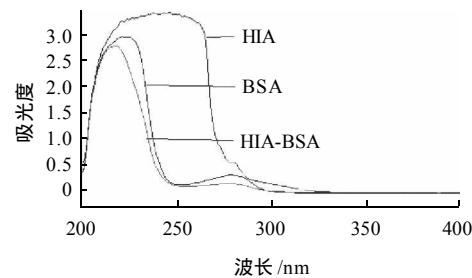


图 2 HIA-BSA 的紫外吸收光谱
Fig.2 Ultraviolet absorption spectrum of HIA-BSA

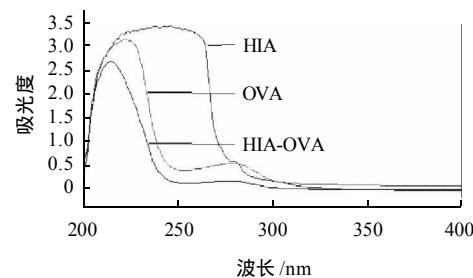


图 3 HIA-OVA 的紫外吸收光谱
Fig.3 Ultraviolet absorption spectrum of HIA-OVA

从图 2、3 可以看出，合成的两种人工抗原的紫外吸收图谱与载体和半抗原相比，吸收曲线均发生了变化，且人工抗原同时具备了半抗原和载体的吸收峰特征。根据人工抗原、载体及半抗原的吸光系数，估算半抗原与载体蛋白结合的分子数之比即偶联比。HIA-BSA 和 HIA-OVA 载体蛋白的偶联比分别为 13:1 和 7:1。根据紫外吸收的加合性原理，可知抑霉唑人工抗原已发生偶联，但由于结合比不大，曲线变化不明显，因此需通过抗体的制备和特异性检测进一步加以证明。

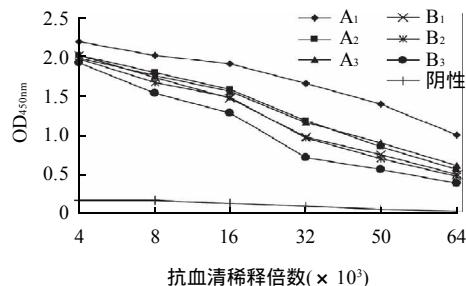
2.3 抗体的鉴定

2.3.1 效价的测定

以阴性血清为空白对照，用间接 ELISA 法测定制备的抗体效价，大于空白对照两倍以上且 $OD_{450\text{nm}}$ 值接近 1 的抗体稀释倍数为阳性抗体的效价，测定结果见图 4。

由图 4 可知，合成的免疫原 HIA-BSA 经 3 次免疫后 6 只小鼠均能产生较高效价的阳性抗体，其中 A₁ 小鼠效价最高可达 $1:64000$ ，高剂量刺激小鼠产生的效价均高于低剂量的，说明免疫剂量在小鼠的最高耐受量范围

内，高剂量比低剂量更能刺激小鼠产生免疫应答，从而产生高效价的抗体；但由于动物个体的差异，相同剂量的各只小鼠产生的效价也略有不同。



A₁、A₂、A₃为高剂量；B₁、B₂、B₃为低剂量。

图4 抗体效价的测定

Fig.4 Indirect ELISA curve of antiserum

2.3.2 抗体特异性的测定

选择效价较高的A₁抗体用间接非竞争ELISA法确定抗原抗体最佳工作浓度为：包被原质量浓度5 μg/mL，血清稀释倍数为32000倍。用所确定的抗原抗体最佳工作浓度进行间接竞争ELISA法测定抗体的特异性，结果见图5。

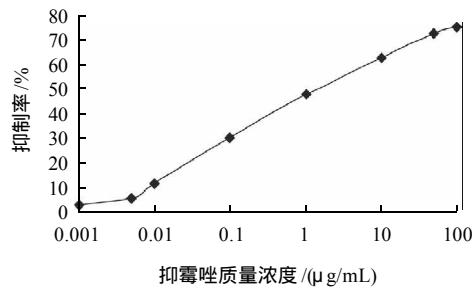


图5 抑霉唑抗体的抑制率曲线

Fig.5 Inhibition curve of anti-imazalil antibody

由图5可知，抑制率与抑霉唑的质量浓度呈明显的正相关，表明抑霉唑作为竞争物在0.001~100 μg/mL的质量浓度范围内能与包被原竞争性地结合血清中的抗体，抑制了抗体与包被原的结合。该曲线在0.01~50 μg/mL质量浓度范围内有较好的线性关系，因此抑制率为10%~70%是理想检测区域。对于抑霉唑抗体的IC₅₀值为1.76 μg/mL，当抑霉唑质量浓度为100 μg/mL时，抑制率达到75%，表明所制备的抗体对抑霉唑农药具有较强的结合能力。从而说明合成的人工抗原具有良好的免疫原性，可激发动物产生特异性免疫反应。

3 讨 论

抑霉唑是小分子物质(相对分子质量为297.2)，本身不具免疫活性，需先与蛋白质等大分子物质偶联制备人工抗原才能刺激机体产生抗体，但抑霉唑分子结构中并不具备能与载体进行交联反应的功能基团(氨基、羧基、重氮盐等)，因此需对抑霉唑或其降解物进行化学修饰。本实验选择抑霉唑的降解物咪唑乙醇为原料，与6-溴己酸乙酯通过取代反应后于碱性条件下水解成功制备了含羧基的半抗原，与直接利用农药本身进行化学修饰的方法相比，本实验的合成方法较为简单，而且实验条件温和易于实现。合成的抑霉唑半抗原在保留了抑霉唑的特征立体结构的基础上连接了一个具6个碳原子的连接臂，该结构避免了间隔臂太短导致载体空间位阻影响免疫系统对半抗原特征基团的识别，间隔臂太长易受氢键、疏水作用等作用力的影响，因而能与载体蛋白很好的连接制备人工抗原，而且能更好被免疫活性细胞识别和结合，制备出具有预期选择性和亲和性的抗体。但产物中的部分杂质经纯化后仍难于除去，分析原因可能有：纯化后残存的杂质与产物结构相似，选取的洗脱剂难于区分；洗脱剂设置的梯度范围使有些杂质没能被硅胶柱吸附就被洗脱下来；洗脱剂梯度设置使产物收集范围过大而残留杂质；产物的得率不高，表明实验仍需进一步探索合适的反应和纯化方法从而提高产物的得率。

研究表明，活化酯法避免了碳二亚胺对蛋白的直接作用和蛋白分子间的交联，因而广泛地应用于含羧基半抗原的人工抗原合成^[12]；同时，采用不同载体蛋白可减少抗体对包被原的特异性结合，提高分析的特异性和灵敏度^[13-14]。因此，本实验采用活化酯法，选择抵抗力强、溶解性好、价廉易得且亲源关系较远、交叉反应程度较低的BSA和OVA作为载体蛋白偶联合成抑霉唑的免疫原和包被原。与已有的方法^[15]相比，本实验用一种方法同时合成了免疫原和包被原，简化了实验步骤。合成的人工抗原用常用的紫外分光光度法^[16-19]鉴定，初步证明其合成成功。

人工抗原能否刺激动物产生针对半抗原的特异性抗体，是判断人工抗原合成成败的核心^[20]。本实验利用合成的免疫原(HIA-BSA)对动物进行免疫，结果所合成的人工抗原能有效刺激小鼠机体发生特异性免疫应答，产生了效价较高的特异性多克隆抗体，为抑霉唑单克隆抗体的制备及其ELISA法检测试剂盒的研制提供了参考。

参 考 文 献：

- [1] WILLS R, MCGLASSON B, GRAHAM D, et al. Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals[M]. 4th ed. Wallingford Oxon, UK: CAB International,

- 1998: 144-158.
- [2] 赵其阳, 焦必宁, 王成秋, 等. 气相色谱法同时测定柑桔中抑霉唑、噻菌灵和嘧霉胺残留[J]. 现代科学仪器, 2007(1): 77-79.
- [3] 杨玉柱. 柑橘采后新型杀菌剂的防腐效果及其残留降解动态[D]. 重庆: 西南大学, 2007: 7.
- [4] TORRES C M, PICÓ Y, MANS J. Comparison of octadecylsilica and graphitized carbon black as materials for solid-phase extraction of fungicide and insecticide residues from fruit and vegetables[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 778(1/2): 127-137.
- [5] GARRIDO J, de ALBA M, JIMENEZ I, et al. Chromatographic analysis of imazalil and carbendazim in fruits method validation and residue monitoring program 1995[J]. *J Chromatogr A*, 1997, 765(1): 91-97.
- [6] ZAMORA T, POZO O J, LÓPEZ F J, et al. Determination of tridemorph and other fungicide residues in fruit samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1045(1/2): 137-143.
- [7] MOTOHASHI N, NAGASHIMA H, MEYER R. High-performance liquid chromatography of fungicides in citrus fruits[J]. *J Liq Chromatogr R T*, 1991, 14(19): 3591-3602.
- [8] WATANABE E, WATANABE S, ITO S, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the fungicide imazalil in citrus fruit[J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48(11): 5124-5130.
- [9] MORENO M J, PLANAS E, MONTOYA A, et al. Application of a monoclonal-based immunoassay for the determination of imazalil in fruit juices[J]. *Food Addit Contam*, 2007, 24(7): 704-712.
- [10] ITO S, HAYASHI M, WATANABE S, et al. Hapten compound and antibody of imazalil and measurement: JP, 10257886[P]. 1998-10-25.
- [11] ZHANG Qi, SUN Qin, HU Baishi, et al. Development of a sensitive ELISA for the analysis of the organophosphorous insecticide fenithion in fruit samples[J]. *Food Chem*, 2008, 106(3): 1278-1284.
- [12] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 73; 77-101.
- [13] LEE J K, PARK S H, LEE E Y, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the fungicide fenarimol[J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(24): 7206-7213.
- [14] 陈继明, 韩正康, 龚晓明, 等. 两种 α -受体激动剂快速免疫检测方法[J]. 中国兽医科技, 1998, 28(9): 5-8.
- [15] 朱学加, 陈金兰, 何计国. 噻乙醇人工抗原的合成及鉴定[J]. 食品科学, 2008, 29(5): 129-133.
- [16] LIU Wei, ZHAO Chengbiao, ZHANG Yulan, et al. Preparation of polyclonal antibodies to a derivative of 1-aminohydantoin (AHD) and development of an indirect competitive ELISA for the detection of nitrofurantoin residue in water[J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(17): 6829-6834.
- [17] SIGHN K V, KAUR J, VARSHNEY G C, et al. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugation for antibody production against small molecules[J]. *Bioconjugate Chem*, 2004, 15(1): 168-173.
- [18] LOMMEN A, HASSNOOT W, WESMAN J M. Nuclear magnetic resonance controlled method for coupling of fenoterol to carrier and enzyme[J]. *Food and Agriculture Immunology*, 1995, 7(2): 123-129.
- [19] SHELVER W L, SMITH D J. Development of an immunoassay for the α -agonist ractopamine[J]. *J Immunoassay*, 2000, 21(1): 21-23.
- [20] 沈关心, 周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉: 湖北科技出版社, 1998: 23.