研究论文

百草枯半抗原分子设计合成及表征

管 露[1]， 张银志[*1]， 杨婷婷[1]， 尤继明[3]， 李红梅[3]， 孙秀兰[1]
（1. 食品科学与技术国家重点实验室 江南大学，江苏 无锡 214122；2. 江苏苏微微生物研究有限公司，江苏 无锡 214068；3. 国家有机食品质量监督检验中心，江苏 宝应 225800）

摘要：以4,4′-联吡啶和碘甲烷为起始原料，通氮气保护下于暗处经3步反应成功合成了百草枯半抗原N-甲基-N′-戊酸基-二吡啶二溴化物（简称PQ-h），产物通过LC/MS、1HNMR和IR鉴定。

关键词：百草枯；半抗原；合成；鉴定
中图分类号：S 482.4　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2013)05—0524—05

Synthesis and Characterization of the Hapten for Paraquat

GUAN LU[1]， *ZHANG Yin-zhi*[*1]， *YANG Ting-ting*[1]， *YOU Ji-ming*[3]， *LI Hong-mei*[3]， *SUN Xiu-lan*[1]
(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Jiangsu Suwei Institute of Microbiology Co.LTD, Wuxi 214063, China; 3. National Center of Supervision and Inspection for Organic Food Quality, Baoying 225800, China)

Abstract: In this manuscript, the hapten for paraquat N-(4-carboxybutyl)-N′-methylbipyridilium (named PQ-h) was synthesized by using 4,4′-Bipyridine and iodomethane as substrate through three steps.The products was further identified through LC/MS, 1HNMR and IR. This study lays the groundwork for further research of immunoassay to paraquat.

Keywords: paraquat, hapten, synthesis, identification

百草枯(paraquat, PQ)又名克无踪、对草快，化学名为1,1′-二甲基-4,4′-联吡啶阳离子盐，它是一种广谱、灭生性有机杂环类除草剂，主要防治玉米、大豆、蔬菜、水稻、果园等地的杂草，也用作谷类、棉花、甘蔗等收割前的脱叶剂，它对植物绿色组织具有较强的破坏作用[1]。百草枯可经胃肠道、皮肤和呼吸道吸收。有研究显示，使用百草枯除草的农民长期吸入小剂量百草枯易导致肺纤维化[2]。由于百草枯的广泛应用，有可能会存在于粮油作物和一些食品原料中，即使在非致害水平下，也会对人体健康产生潜在危害。

农药免疫分析法不但具有与常规分析法相当或更高的灵敏度，而且无须使用昂贵仪器设备，方法简便快速，在农药残留的快速筛选和定量检测以及现场和快速检测方面已显示出独特的优点，受到环境监测工作者的重视。酶联免疫吸附测定法检测

收稿日期：2012-03-14
基金项目：国家质检总局资助项目(2010QK172)。
* 通信作者：张银志(1975—)，男，陕西汉中人，高级工程师，主要从事食品安全检测。Email:yinzhizhang@yahoo.com.cn

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

百草枯残留的研究,国外已有报道[3-8],国内相关报道极少[9-10]。百草枯的分子量仅为 257 Da,属于半抗原,只具有反应原性,而无免疫原性。由于百草枯自身没有可供偶联的活性官能团(如氨基、羧基等),因此,必须对百草枯分子结构进行修饰,使其具有活性基团——羧基,然后与大分子载体蛋白质交联,才能刺激动物产生特异性免疫应答。由于百草枯分子结构中,联吡啶环上两氮原子均连有甲基,不易直接连入带有一段碳连的羧基。为此,作者选取百草枯的结构类似物—4,4'-联吡啶,通过控制反应先在其一侧氮原子上加入甲基,然后再在另一氮原子上连入带有一段碳连的羧基,即为百草枯半抗原,从而为百草枯完全抗原的合成奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 实验材料 4,4'-联吡啶、碘甲烷、N,N 二甲基甲酰胺(DMF)、浓 HCl、丙酮、体积分数 95%乙醇等均为分析纯,氮气,3A 分子筛。

1.1.2 实验仪器 Spectronic 1.70 紫外可见光分光光度计,意大利 GBC 产品;WBG 1-4002 型旋转蒸发仪,德国产品;79-1 型磁力加热搅拌器,常州市国立试验设备研究所提供;DF-101S 型集热式磁力搅拌器,江苏省金坛市正基仪器有限公司制造;SHB-III型循环水真空泵,巩义市站街光亚仪器厂制造;DZF-6020 型真空干燥箱,巩义市英峪予华仪器厂制造;SX_2 箱式电阻炉,上海实验仪器厂有限公司制造;Waters Platform ZMD 4000 型液相色谱质谱联用仪,美国 Waters 公司产品;BC-W201 型恒温浴锅,上海贝凯生物化工设备有限公司制造;ALPHA1-4 型冷冻干燥机。

1.2 实验方法

百草枯的分子结构式如图 1,本实验以 4,4'-联吡啶和碘甲烷为起始原料[4,9],合成了 N-甲基-N'-戊酸基-二吡啶二溴化物(简称 PQ-h),用于制备百草枯的人工抗原。其合成路线如图 2,反应分 3 步完成。

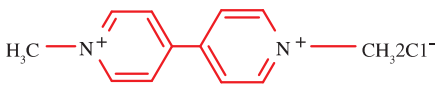


图 1 百草枯的分子结构式

Fig. 1 Molecular structural formula of paraquat

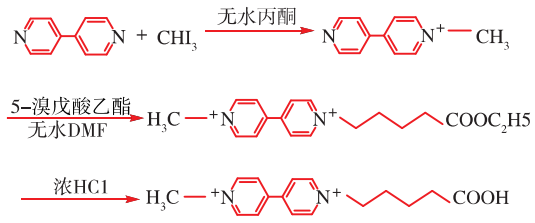


图 2 百草枯人工半抗原的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of artificial hapten for paraquat

1.2.1 N-甲基-二吡啶阳离子化合物——Monoquat(MQ)的合成 事先将 50 mL 的三颈圆底烧瓶通氮气排除其中的空气,称取 3 g 4,4'-联吡啶于圆底烧瓶中,加入 30 mL 无水丙酮溶解后冷却至 4 ℃,在磁力搅拌下慢慢加入 1.14 mL 碘甲烷(CH_3I),于暗处反应。反应混合物完全加入后,低温(4 ℃左右)搅拌过夜。用无水丙酮洗涤,抽干,得产品 MQ,真空干燥,得黄色针状结晶,然后存放于真空干燥器中,取少量进行鉴定。

1.2.2 N-甲基-N'-戊酸乙酯基-二吡啶阳离子化合物的合成 称取 1.56 g 第一步反应得到的 MQ 于圆底烧瓶中,加入 30 mL 新鲜蒸馏的无水二甲基甲酰胺(DMF)溶解,然后加入 1.6 mL 5-溴戊酸乙酯在 120 ℃油浴磁力搅拌下反应,回流 5 h,然后室温放置过夜。抽滤,用无水 DMF 洗涤,真空干燥,得黄色片状结晶,存放于真空干燥器中,取少量进行鉴定。

1.2.3 N-甲基-N'-戊酸基-二吡啶阳离子化合物(PQ-h)的合成 称取 0.3 g 第二步得到的 N-甲基-N'-戊酸乙酯基-二吡啶阳离子化合物与 23 mL 浓 HCl 混合,水浴加热回流 3 h 左右。在旋转蒸发器上蒸去过量的酸和水,保持水浴温度不超过 60 ℃,蒸干,得固体残留物。冷却后,加入少量丙酮结晶(析出白色晶体),过滤,抽干,真空干燥,得粗品,再经体积分数 95%乙醇重结晶,真空干燥,存放于真空干燥器中,取少量进行鉴定。

2 结果与分析

取上述每一步合成的百草枯衍生物进行 LC-MS 鉴定和 1HNMR 鉴定,并将百草枯半抗原进行 IR 鉴定,结果见图 3—9。

2.1 N-甲基-二吡啶阳离子化合物——Monoquat(MQ)的 LC-MS、1HNMR 鉴定

由图 3 知,第一步反应合成的产物纯度较高,

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

达 95%以上,说明反应比较彻底,基本无副产物生成。经计算产物得率约为 86%。由质谱图可看出产物的相对分子质量为 171,这与目标产物——N-甲基-二吡啶阳离子化合物(MQ)的相对分子质量一致。

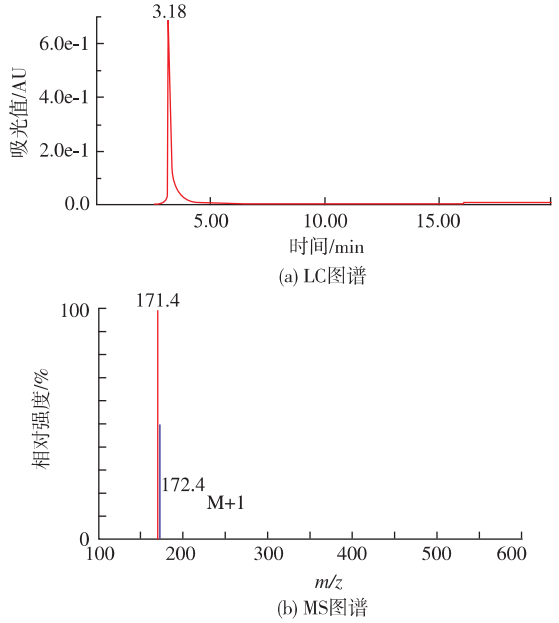


图 3 N-甲基-二吡啶阳离子化合物(MQ)的LC 图谱和 MS 图谱

Fig. 3 LC spectrum (A) and MS spectrum (B) of N-methyl-4-(pyridine-4-pyridyl) pyridinium (MQ)

由图 4 可知,该物质的 ^{1}HNMR (500 MHz, D_2O):δ 为 8.92(d,2H,ArH),8.76(d,2H,ArH),8.39(d,2H,ArH),7.9 (d,2H,ArH),4.5 (s,3H,CH_3),所得结构信息与目标物——N-甲基-二吡啶阳离子化合物(MQ)的结构信息相同,从而推断其为目标产物[9]。

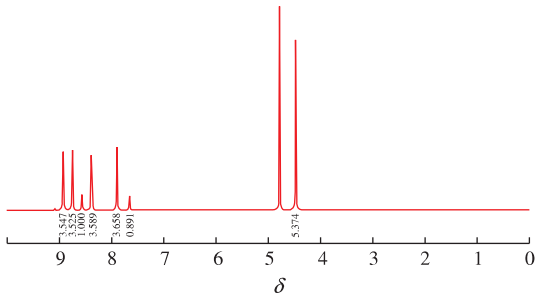


图 4 N-甲基-二吡啶阳离子化合物(MQ)的^{1}HNMR 图谱

Fig. 4 ^{1}HNMR spectrum of N-methyl-4-(pyridine-4-pyridyl) pyridinium (MQ)

2.2 N-甲基-N′-戊酸乙酯基-二吡啶阳离子化合物的 LC-MS、^{1}HNMR 鉴定

图 5 的 LC 图出现两个峰,N-甲基-N′-戊酸乙酯基-二吡啶阳离子化合物在液相色谱上的保留时间为 1.62 min,其余为杂质峰,通过积分计算其纯度为 70%。由质谱图可以看出,300.5 为 N-甲基-N′-戊酸乙酯基-二吡啶阳离子化合物的阳离子峰,计算得其相对分子质量为 300,与实际相对分子质量相符。

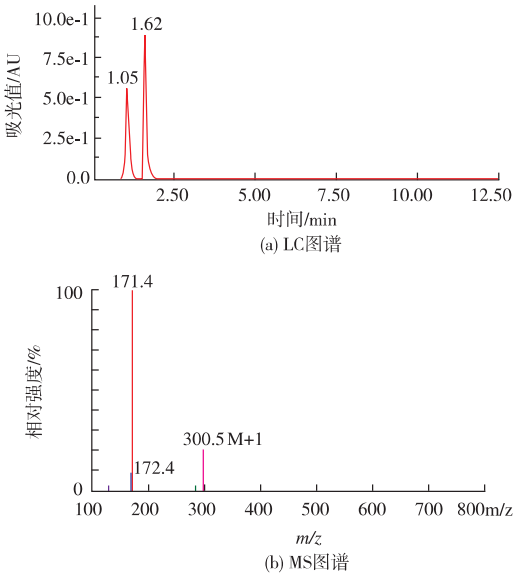


图 5 N-甲基-N′-戊酸乙酯基-二吡啶阳离子化合物的 LC 图谱和 MS 图谱

Fig. 5 LC spectrum (A) and MS spectrum (B) of N-(5-ethoxy-5-oxopentyl)-N′-methylbipyridilium

由图 6 可知,该物质的 ^{1}HNMR (500 MHz, D_2O):δ (ppm)9.18 (d,2H,ArH),9.11 (d,2H,ArH),8.61(d,2H,ArH),8.58(d,2H,ArH),4.56(s,3H,N-CH_3),2.54 (t,2H,CH_2),2.18 (t,2H,CH_2),1.76(m,2H,CH_2),1.29 (t,3H,CH_3),所得结构信息与目标物——N-甲基-N′-戊酸乙酯基-二吡啶阳离子化合物的结构信息相同,从而推断其为目标产物[9]。

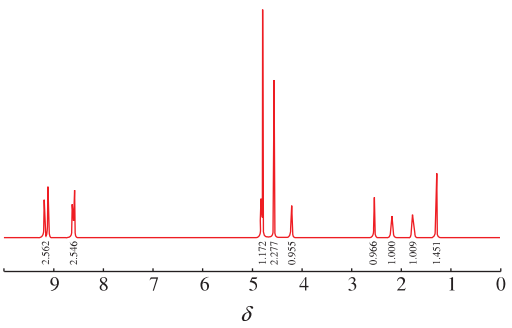


图 6 N-甲基-N′-戊酸乙酯基-二吡啶阳离子化合物的 ^{1}HNMR 图谱

Fig. 6 ^{1}HNMR spectrum of N-(5-ethoxy-5-oxopentyl)-N′-methylbipyridilium

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3 N–甲基–N′–戊酸基–二吡啶阳离子化合物(PQ–h)的 LC–MS、^{1}HNMR 鉴定

由图 7 可知,酸水解后的产物相对较纯,纯度达 96%。由质谱图可看出 272.5 为 PQ–h 的阳离子峰,计算得其相对分子质量为 272,与实际的相对分子质量相符,经计算得率为 69%。

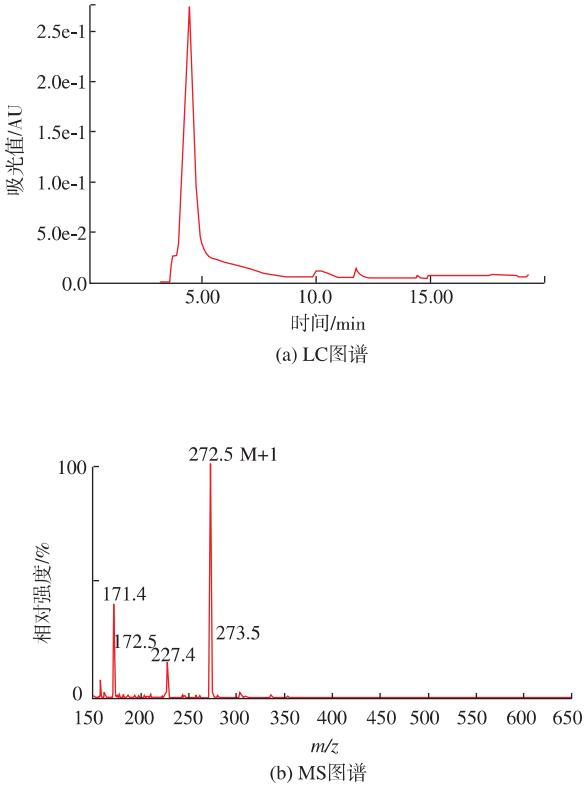


图 7 N–甲基–N′–戊酸基–二吡啶阳离子化合物(PQ–h)的 LC 图谱和 MS 图谱

Fig. 7 LC spectrum (A) and MS spectrum (B) of N–(5–ethoxy–5–oxopentyl)–N′–methylbipyridilium (PQ–h)

由图 8 可知,该物质的 ^{1}HNMR (500 MHz, D^2O):δ 为 9.18(d,2H,ArH),9.11(d,2H,ArH),8.61(d,2H,ArH),8.57 (d,2H,ArH),4.81 (t,2H,CH_2),4.56 (s,3H,CH_3),2.54 (t,2H,CH_2),2.19 (m,2H,CH_2),1.75 (m,2H,CH_2),羧基上的活泼氢被溶剂 DO_2 中的 D 替换。该所得结构信息与目标物——N–甲基–N′–戊酸基–二吡啶阳离子化合物(PQ–h)的结构信息相同,从而推断其为目标产物[9]。

2.4 IR 鉴定结果及分析

取合成的百草枯半抗原进行 IR (KBr 压片)鉴定,结果见图 9。

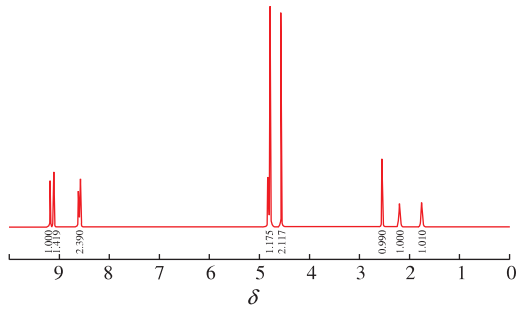


图 8 N–甲基–N′–戊酸基–二吡啶阳离子化合物 (PQ–h) 的 ^{1}HNMR 图谱

Fig. 8 ^{1}HNMR spectrum of N–(5–ethoxy–5–oxopentyl)–N′–methylbipyridilium (PQ–h)

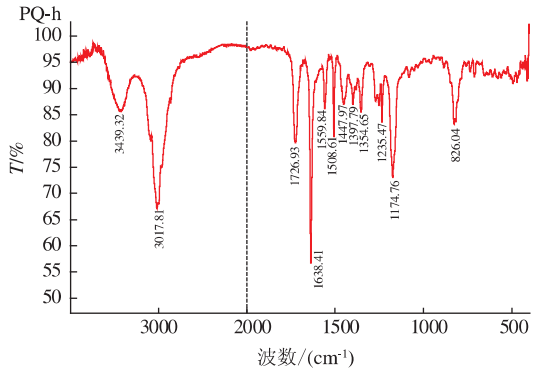


图 9 百草枯半抗原的 IR 图谱

Fig. 9 IR spectrum of paraquat hapten

由图 9 知,3 439.32 cm^{-1} 对应的宽的峰为羧酸上的 O—H 伸缩吸收,3 017.81 cm^{-1} 对应的为芳环上 C—H 的伸缩振动,1 726.93 cm^{-1} 为 C═O 的吸收,1 638.41 cm^{-1} 为 C═N 的吸收(即吡啶环结构),1 397.79、1 447.97、1 508.61、1 559.84 cm^{-1} 均为 C═C 骨架的振动,826.04 cm^{-1} 为芳环上 C—H 面外弯曲振动吸收。通过以上分析,初步确定为目标产物—PQ–h。

3 结 语

在农药残留的免疫学分析中,人工抗原的合成是制备抗体和建立免疫分析方法最关键的步骤,而半抗原的设计又是合成人工抗原的前提。半抗原的设计要求应尽量使合成的半抗原能刺激机体产生特异性免疫应答,并且产生的抗体应具有预期的活性[11]。因此,应尽量保证半抗原分子具有与待测物分子类似的立体化学特征。一般将半抗原设计成包含一个间隔臂和偶联基团,并仍具有原农药分子基本

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

结构的分子。通常认为连接臂的最适长度在3~6个碳原子，连接臂太短不利于半抗原的充分暴露，而连接臂太长又会因疏水作用而造成烷基链的折叠，导致半抗原分子仍然被载体蛋白质所掩盖，不利于抗原递呈细胞(APC)的识别[12]。

在本研究中，采用百草枯的结构类似物—4,4'-联吡啶通氮气保护下经3步化学反应合成了目标产物，并用ESI、^{1}HNMR、IR对其结构进行了鉴定。经分析证明，合成的百草枯中间体纯度较高，可以将其与载体蛋白质偶联制备百草枯人工抗原。

参考文献:

[1] 曾铭. 共振光散射光谱法机理研究及其在农药分析中的应用[D]. 成都:四川师范大学,2006:29.

[2] 夏敏,刘建华. 百草枯中毒研究现状[J]. 四川医学,1995,16(4):237-239.
XIA Min,LIU Jian-hua. Research status quo of paraquat poisoning [J]. **Sichuan Medical Journal**,1995,16 (4):237-239. (in Chinese)

[3] Niewola Z,Walsh S T,Davies G E. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for paraquat [J]. **International Journal of Immunopharmacology**,1983,5(3):211-218.

[4] Jeanette Van Emon,Bruce Hammock,James N Seiber. Enzyme-Linked immunosorbent assay for paraquat and its application to exposure analysis[J]. **Anal Chem**,1986,58:1866-1873.

[5] Coxon R E,Rae C,Gallacher G,et al. Development of a simple,fluoroimmunoassay for paraquat [J]. **Clin Chim Acta**,1988,175 (3):297-305.

[6] Michele Y Selisker,David P Herzog,Roger D Erber,et al. Determination of paraquat in fruits and vegetables by a magnetic particle based enzyme-linked immunosorbent assay[J]. **J Agric Food Chem**,1995,43:544-547.

[7] Koivunen M E,Gee S J,Park E K,et al. Application of an Enzyme-Linked immunosorbent assay for the analysis of paraquat in Human-Exposure samples[J]. **Arch Environ Contam Toxicol**,2005,48:184-190.

[8] Caroline A Spinks,Wang Bo,Clare Mills E N,et al. Development of an ELISA for paraquat;improvement of antibody characteristics by reversed affinity chromatography[J]. **Analyst**,1999,124:847-850.

[9] 马兆扬,黄金祥. 半抗原:N-甲基-N′-戊酸基-二吡啶-二溴化物的合成[J].卫生研究,2004,33(2):220-221.
MA Zhao-yang,HUANG Jin-xiang. The synthesis of the hapten:N-(5-ethoxy-5-oxopentyl)-N′-methylbipyridilium[J]. **Journal of Hygiene Research**,2004,33(2):220-221. (in Chinese)

[10] Takatori T,Nagao M,Wu B 等. 单克隆抗体与百草枯反应的特性与进展[J]. 中国法医学杂志,1988,3(3):171
Takatori T,Nagao M,Wu B,et al. The characteristics and progress of the reaction to monoclonal antibody and paraquat[J]. **Chinese Journal of Forensic Medicine**,1988,3(3):171. (in Chinese)

[11] 朱国念,吴刚,吴慧明. 有机磷杀虫剂毒死蜱人工抗原的合成与鉴定[J].中国农业科学,2003,36(6):657-662.
ZHU Guo-nian,WU Gang,WU Hui-ming. Synthesis and identification of the antigens for the organophosphorus insecticide chlorpyrifos[J]. **Scientia Agricultura Sinca**,2003,36(6):657-662. (in Chinese)

[12] Jung F,Gee S J,Harrison R O,et al. Use of immunochemical techniques for the analysis of pesticides [J]. **Pestic Sci**,1989,26:303-317.

© 1994-2013 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net