

甲基苯丙胺与蛋白偶联物的合成

陈燕忠¹, 刘安华¹, 刘晓云², 王继华²

(1. 华南理工大学材料科学与工程学院, 广东 广州 510640)(2. 广州万孚生物技术有限公司, 广东 广州 510640)

摘要: 研究合成甲基苯丙胺抗原。在甲基苯丙胺分子上引入偶联官能团, 以牛血清白蛋白(BSA)为载体蛋白, 用戊二醛法偶联合成了甲基苯丙胺抗原, 并用红外光谱、紫外扫描、蛋白电泳以及胶体金免疫层析等方法进行检测。结果表明, 每分子 BSA 连接甲基苯丙胺分子数为 25; 胶体金免疫层析检测结果显示合成抗原与抗体有特异性反应, 具有活性。可在免疫检测中用作抗原的甲基苯丙胺与蛋白偶联物。

关键词: 冰毒; 甲基苯丙胺; 人工抗原; 免疫检测法

中图分类号: O621.3; 文献标识码: A; 文章篇号: 1673-9078(2008)05-0405-04

Synthesis of Methamphetamine-Bovine Serum Albumin Conjugates

CHEN Yan-zhong¹, LIU An-hua¹, LIU Xiao-yun², WANG Ji-hua²

(1. College of Material Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Wandfo Biotech Co., Ltd, Guangzhou 510640, China)

Abstract: To synthesize the methamphetamine antigen for immunoassay. Functional group was introduced into methamphetamine and then methamphetamine antigen was synthesized by anhydride method using BSA as carrier protein. The reaction was monitored by FTIR, UV scanning, protein electrophoresis and GICA methods. Results: 25 molecules of methamphetamine were conjugated to one molecule of BSA. And the formed conjugate showed confirmed antigenic Activity. Methamphetamine antigen was successfully synthesized and could be used in immunoassay.

Key words: ice; methamphetamine; antigen; immunoassay

药物滥用正构成 21 世纪的全局性公害, 给当今世界带来了严重的灾害。在药物滥用中, 合成药物的滥用趋势增长明显, 尤以苯丙胺类物质为首。“冰毒”, 即甲基苯丙胺 (METH), 是苯丙胺类物质的一种, 在苯丙胺的化学结构基础上改造而来的, 属于国家规定管制的人工合成精神药品, 属于苯丙胺类兴奋剂, 其滥用程度日趋严重, 数量日益增加^[1-2]。在西方某些国家, 冰毒及其掺合物已经成为主要的滥用毒品, 而且有非常明显的增加趋势。在中国, 自 1994 年国内首次报道苯丙胺类物质以来, 冰毒吸食者的数量有明显的逐年增多之势^[3]。1996 年联合国禁毒署在上海召开的国际兴奋剂专家会议上, 一致认为苯丙胺类物质将逐步取代流行的鸦片、海洛因、大麻、可卡因等常用毒品, 成为 21 世纪全球范围滥用最为广泛的毒品。因此, 加强对苯丙胺类物质的滥用的控制和检测防治变得愈加迫切。

检测甲基苯丙胺有多种方法, 包括薄层色谱法

收稿日期: 2007-12-13

基金项目: 商务部高新技术出口项目和广州市外经贸局科技兴贸项目

通讯作者: 刘安华

(TLC)、高效液相色谱法^[4-5] (HPLC)、气相色谱法 (GC)^[6-7]、气相色谱/质谱法 (GC/MS)^[6-7], 免疫分析法等^[8]。前两种方法需要大量检测样品, 检测灵敏度及精密度均不高, 后两者虽有较高的灵敏度和精密度, 但对检测样品的前处理要求高, 步骤较多, 另外, 仪器和设备本身的昂贵, 使其难以推广使用。而且这四种方法均难以开展现场检测, 应用范围有限, 不适合于现场快速便捷检查。

免疫分析法操作简便, 需样量少, 灵敏度高, 特异性强^[9], 其中一种应用是胶体金试纸条的毒品检测, 能够提供方便快捷的现场检测, 是近年来国际检测毒品通用的初筛方法。

免疫检测法建立的基础是要有相应的抗原, 再利用抗原制备出单克隆抗体, 从而建立胶体金免疫法、酶联免疫法、放射免疫法等免疫检测技术。

目前, 免疫检测中所用的抗原大部分来自进口, 国内仍未有规模化的研究。因此, 系统性地研究抗原合成具有现实的意义。

在毒品的免疫检测中, 抗原的合成是抗体制备和建立免疫检测方法中最关键和最基本的步骤。近年来,

我国在毒品和药物滥用检测方面相继有些报道,但在这方面仍处于缓慢发展阶段,而在对某类抗原的合成进行有系统的研究,这方面的报道甚至更少,反观国外,则已有相关的研究报道和专利。本文以甲基苯丙胺为研究对象,进行有系统的抗原合成研究。所合成的抗原经检测具有抗原性,可以以此抗原为基础,进行单克隆抗体筛选,从而进行各类冰毒免疫检测方法的研究。

1 实验

1.1 试剂

甲基苯丙胺盐酸盐,省公安厅提供,牛血清白蛋白(BSA, sigma),无水乙醇(光谱纯),戊二醛, N-(4 溴丁基)邻苯二甲酰亚胺,三乙胺,三氯甲烷,水合肼皆为分析纯,盐酸, NaOH 溶液,磷酸盐缓冲溶剂(PBS, pH 7.2),电泳试剂,甲基苯丙胺抗体(美国 Biological 公司)。

1.2 仪器

磁力搅拌器(85-1型,江苏金坛市医疗仪器厂),紫外分光光度计(Hitachi, U-3010 spectrophotometer),高速冷冻离心机(GL20-C型,中科院武汉科学仪器厂),垂直电泳槽(DYY-型,北京六一仪器厂),红外光谱仪(MAGNA-IR760, Nicolt)。

1.3 合成操作

1.3.1 甲基苯丙胺半抗原合成

称取 150 mg 甲基苯丙胺盐酸盐溶于蒸馏水中,滴加 1 mol/L 的 NaOH 溶液,析出游离态的甲基苯丙胺,三氯甲烷萃取, Na₂SO₄ 干燥,过滤,蒸发溶剂,得到甲基苯丙胺。产物有强烈的胺臭味。

将甲基苯丙胺溶于无水乙醇,加入 N-(4 溴丁基)邻苯二甲酰亚胺-无水乙醇溶液,可适当加入三乙胺,加热回流,薄层色谱法确认反应完全后,继续加入 80% 水合肼,混合,加热回流。反应结束后,用盐酸酸化,过滤,滤液用三氯甲烷萃取三次,真空抽滤,烘干,得到半抗原 N-(4 胺丁基)甲基苯丙胺。

1.3.2 甲基苯丙胺抗原合成

称取 50 mg 半抗原和 BSA 分别溶于 PBS 中,低温搅拌下混合,加入 1%~2% 的戊二醛试剂,室温搅拌至少 10 h,反应液清晰透明。反应结束后,以 4000 r/min 离心分离 10 min,上清液装入透析袋, pH 7.0 的 PBS 透析至少 24 h, 8000 r/min 离心分离 10 min,取上层清液得到甲基苯丙胺抗原溶液。

1.4 结构测试

1.4.1 红外光谱测试

半抗原 N-(4 胺丁基)甲基苯丙胺以 KBr 压片,测试用 Nicolt 的 MAGNA-IR760 型傅立叶变换红外光谱仪作红外分析,扫描波数范围 4000~400 cm⁻¹。

1.4.2 紫外光谱测试

BSA 和甲基苯丙胺以及甲基苯丙胺抗原配成溶液后,用紫外可见分光光度计(Hitachi, U-3010)在 190~400 nm 测量最大吸收波长。

1.4.3 电泳测试

蛋白质电泳用聚丙烯酰胺凝胶电泳^[10],下胶用 10% 聚丙烯酰胺,上胶用 5% 聚丙烯酰胺,上样量 20 μg。

1.5 活性检测

利用胶体金免疫层析法对合成抗原进行检测。用喷膜机以 2 mm 宽度将合成的甲基苯丙胺抗原喷到 NC 膜上,以甲基苯丙胺单克隆抗体标记胶体金,结合玻璃纤维纸及吸水纸,组装成试纸条^[11],对试纸条进行检测。

2 结果与讨论

2.1 合成原理

甲基苯丙胺分子量为 149,通常分子量低于 1000 的物质属于半抗原不具备免疫原性,不具有诱导机体产生抗体的能力,须引入官能团与蛋白质进行偶联,才能成为抗原,只有将它与蛋白质或其它高聚物结合后才能刺激机体产生抗体。通过化学合成法,利用官能团把甲基苯丙胺连接到载体上,这样才带有免疫原性。

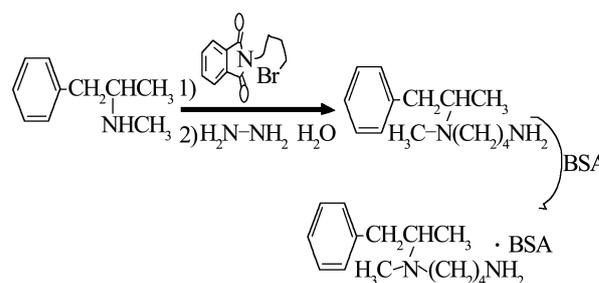


图 1 合成路线

Fig.1 Synthesis route of methamphetamine-bovine serum albumin conjugates

从甲基苯丙胺分子结构得知,它不带氨基或羧基,必须使用化学法引入官能团,然后再与蛋白质连接,才能得到甲基苯丙胺抗原。

在甲基苯丙胺的结构上,有两个位点可以作为偶联部位,仲氮位和苯环对位。仲氮带有一个氢原子,氮原子有一对未用电子对,具有亲核性,以此为引入点,通过与亲电官能团的结合,偶联蛋白。由于-CH₃

为推电子基团, 单取代后活化苯环, 使其容易发生二次取代, 取代位置为邻对位, 以对位为主。

不同位点与蛋白质偶联合成的抗原产生的抗体效价及活性都有差别, 这是因为不同位点偶联导致半抗原分子暴露不同的空间结构。因而, 在位点选择时应以能突出半抗原的特征结构为佳, 即分子簇。选择苯环对位的位点, 能够更充分的显现其特征结构。

因此, 本实验的合成路线如图 1^[12]:

2.2 结构分析

2.2.1 甲基苯丙胺半抗原的结构分析

合成得到的半抗原 N-(4 胺丁基)甲基苯丙胺经纯化后的红外光谱图如图 2 所示。

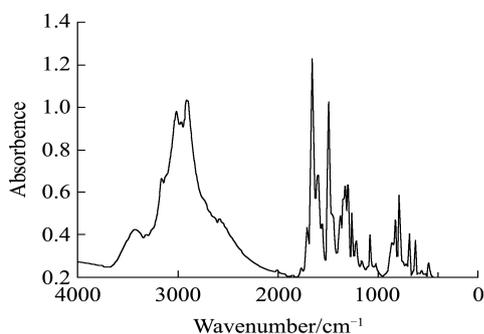


图 2 半抗原红外吸收谱图

Fig.2 Infrared absorption spectrogram of hapten

由图 2 可见, 在 3400 cm^{-1} 附近有一宽的峰, 是 NH_2 伸缩振动的吸收峰, 在 3000 cm^{-1} 左右有强烈的吸收峰, 由引入的 CH_2 链伸缩振动引起的。结果说明甲基苯丙胺结构中成功接入 $-\text{NH}_2$ 基团。

2.2.2 甲基苯丙胺抗原的结构分析

将 BSA 和甲基苯丙胺以及甲基苯丙胺抗原分别用紫外可见分光光度计在 $190\sim 400\text{ nm}$ 波长下进行紫外光谱扫描, 结果如图 3 所示。

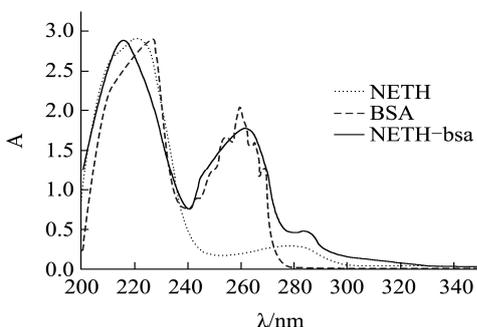


图 3 BSA, METH, METH-BSA 紫外吸收光谱

Fig.3 Ultraviolet absorption spectrogram of BSA, METH and METH-BSA

从图中可以看出甲基苯丙胺在波长 260 nm 和 220 nm 处各有一个最大吸收峰, BSA 在波长 215 nm 和 285 nm 处各有一个最大吸收峰; 而甲基苯丙胺抗原与

甲基苯丙胺及 BSA 有明显不同, 抗原的吸收峰在 BSA 的基础上有增加, 稍高于甲基苯丙胺, 在 260 nm 处抗原的吸收值高于 BSA 相应位置的吸收。根据紫外吸收的加合性可初步认为成功合成了抗原^[13]。根据紫外吸收光谱的可加性, 推算其结合比约为 25:1。

将 BSA、甲基苯丙胺偶联蛋白质用聚丙烯酰胺电泳检测, 结果如图 4。

BSA 抗原

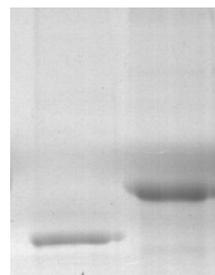


图 4 BSA、甲基苯丙胺抗原电泳图

Fig.4 Electrophoretogram of methamphetamine and BSA

由图中的电泳图可以看出, 甲基苯丙胺抗原的分子量比原来 BSA 大, 也就是说, BSA 偶联甲基苯丙胺以后, 分子量增加, 进一步证实了蛋白质与甲基苯丙胺偶联成功。

2.3 活性分析

利用胶体金免疫层析法对本实验合成的抗原进行检测的结果如图 5。



图 5 胶体金试纸条图

Fig.5 Colloidal gold test strip

检测区出现红色反应线, 证明合成的甲基苯丙胺抗原能被抗体所识别并发生结合, 由此可证明所合成的冰毒人工抗原具有抗原活性。

在建立免疫检测方法如 ELISA 及胶体金检测方法时, 一般使用的蛋白载体蛋白有 BSA, 卵清蛋白 (OVA) 与人血清蛋白 (HAS) 等, 最常用的是 BSA。原因是它的物理化学性质稳定, 不易变性, 还具有大量的反应基团, 如氨基、羧基等, 并且在不同的 pH 值和不同离子强度下都能保持较大的溶解度; 在含有有机溶剂状态下 (吡啶、二甲基甲酰胺) 都可以和半抗原进行偶联, 并且在偶联后仍可保持可溶状态。除此以外, 它的价格低廉, 易为大多数实验室购用。近年来, 也有报导用人工合成多聚肽 (常用多聚赖氨酸 PLL) 为载体, 其优点是可增加半抗原的免疫原性

[14,15]。

本研究将继续研究不同偶联位点对抗原活性的影响,以及选用其它蛋白作偶联用以作活性比较。关于这方面的工作,我们另文叙述。

参考文献

- [1] Karch SB, Stephens BG, Ho CH. Methamphetamine-related deaths in San Francisco: demographic, pathologic, and toxicologic profiles [J]. *J Forensic. Sci.*,1999,44:359-368
- [2] Arielle Baskin-Sommers, Ira Sommers. Methamphetamine use and violence among young adults [J]. *J Criminal Justice*, 2006,34(6):661-674
- [3] 蒋庆明. 新型毒品问题形势与分析对策探讨[J]. *公安学刊*, 2004(3):44-46
- [4] Kim Mc Fadden, John Gillespie, Brian Carney, et al. Development and application of a high-performance liquid chromatography method using monolithic columns for the analysis of ecstasy tablets [J]. *J chromatogr. A*, 2006, 1120 (1-2): 54-60.
- [5] Hajime Miyaguchia, Masaya Kakutab, Yuko T. Iwataa, et al. Development of a micropulverized extraction method for rapid toxicological analysis of methamphetamine in hair [J]. *J chromatogr A*,2007, 1161(1-2):43-48.
- [6] Marta Concheiroa, Susana Maria dos Santos Sadler Simõesb, Óscar Quintela, et al. Fast LC-MS/MS method for the determination of amphetamine, methamphetamine, MDA, MDMA, MDEA, MBDB and PMA in urine [J]. *Forensic Sci. Int.*,2007, 171(1):44-51.
- [7] Takeshi Kumazawa, Chika Hasegawa, Xiao-Pen Lee, et al. Simultaneous determination of methamphetamine and amphetamine in human urine using pipette tip solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J. Pharm. Biomed. Anal.*,2007,44(2):602-607
- [8] 李金. 苯丙胺类物质及其检测 [J]. *中国药物依赖性杂* 2003, 12(1):10-13
- [9] 黄卫平. 免疫学分析在检测滥用药物中的应用[J]. *中国滥用药物分析*, 2005,11(3):164-168.
- [10] 沈关心,周汝麟. 现代免疫学实验技术[M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 1998. 398-400
- [11] 王培之,徐克沂,皮国华. 胶体金免疫结合试验在检验医学中的应用[J], *中华检验医学杂志*,2000(5):308-309.
- [12] Gheng LT, Kim ST, Chung A, et al. Amphetamine: new radioimmunoassay [J]. *Febe. lett.*,1973, 36(3):339-342.
- [13] Chen XJ, Zhao HJ. Application of immunological technic in plant science [M]. Beijing: Agriculture Press, 1998. 30-38
- [14] James PT, Fidel ZJ. Multiple antigen peptide.[J]. *J Immunol. Meth.*, 1989, 124: 53-56
- [15] Tam J P. Recent advances in multiple antigen peptides [J]. *J Immunol. Meth.*, 1996, 196: 17-32

(上接第304页)

参考文献

- [1] Anderson R A. Trace elements in human and nutrition [M]. New York : Aademi Press,1987
- [2] Mertz W. Chromium in human nutrition[J]. *J. Nutv*,1993,123: 626
- [3] Nielsen F H. Modern nutrition in heath and disease (8thEd.) [M]. Philadelphia :Lea&Febrger,1994
- [4] Anderson RA, Cheng N, Bryden NA ,et al. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type diabetes[J]. *Diabetes*,1997,46:1786-1791
- [5] Cheng N, Zhu X, Shi H, et al. Follow-up survey of people in China with type 2 diabetes mellitus consuming supplemental chromium[J]. *Trace Elem Exp Med*,1999,12:55-60
- [6] Ravina A , Slezak L , Rubal A , et al. Clinical use of the trace element chromium (III) in the treatment of diabetes mellitus[J]. *Trace Elem Exp Med* ,1995,8:183-190
- [7] Fox GN, Sabovic Z. Chromium picolinate supplementation for diabetes mellitus[J]. *Fam Pract*,1998,46: 83-86
- [8] Anderson RA. Chromium, glucose intolerance and diabetes [J]. *Am Coll Nutr* ,1998,17:548-555
- [9] 任俊莉,付丽红,邱化玉. 胶原蛋白的应用及其发展前景(续)[J]. *中国皮革*,2003,(1):36-38
- [10] 胡国华. 功能性食品胶[M]. 北京:中国轻工业出版社,1997: 197-206
- [11] 徐叔云. 药理方法学(第 2 版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1991:1230
- [12] Garza H, Bennett N,P Rodriguez Jr Gladys. Improved Rapid Method for the Isolation, Purification and Identification of Collagen Glycosides[J]. *Chromatogr A*,1996,732:385-389
- [13] 王秀丽,刘安军,李琨,等,刘景彬. 胶原蛋白多肽-铬(III)螯合物的降血糖机理探讨[J]. *食品研究与开发*,2006,27(5):125-130