

氟西汀快速免疫检测用人工抗原的合成与鉴定

刘波¹, 袁利鹏¹, 聂燕华¹, 尹凯丹¹, 熊波²

(1. 广东农工商职业技术学院热作系, 广东广州 510507) (2. 广东产品质量监督检验研究院, 广东顺德 528300)

摘要: 本文针对药物、减肥类保健食品中氟西汀成分及残留问题现状, 主要研究了氟西汀人工抗原的合成方法, 并对所合成的半抗原、人工抗原进行了结构和特异性鉴定。研究中先将氟西汀与丙烯酸甲酯反应后再经过水解制备出半抗原(H-FXT), 再用活泼酯法将半抗原分别与牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联制备了氟西汀人工免疫原(H-FXT-BSA)和氟西汀包被原(H-FXT-OVA), 通过免疫原免疫 Balb/c 小鼠, 利用间接 ELISA 方法对抗血清进行了鉴定评价。研究制备的人工抗原 H-FXT-BSA、H-FXT-OVA 经紫外光谱扫描计算后偶联比分别达到 14.5:1 和 11.3:1。免疫小鼠后所获得抗血清的效价均达到 30000 以上, 半抑制量浓度 IC₅₀ 值为 100 ng/mL。本研究首次合成了鉴定氟西汀人工抗原, 并成功获得了氟西汀抗体, 本研究可为后期在药物、减肥类保健食品中氟西汀成分的免疫快速检测方法的建立和酶联免疫检测试剂盒等相关产品开发奠定了关键技术研究基础。

关键词: 氟西汀; 半抗原; 完全抗原; 鉴定

文章编号: 1673-9078(2016)8-290-294

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.8.044

Synthesis and Identification of Artificial Antigen for the Rapid Immunological Detection of Fluoxetine

LIU Bo¹, YUAN Li-peng¹, NIE Yan-hua¹, YIN Kai-dan¹, XIONG Bo²

(1. Tropical Crops Department, Guangdong AIB Polytechnic College, Guangzhou 510507, China)

(2. Guangdong Provincial Product Quality Supervision and Inspection Institute, Shunde 528300, China)

Abstract: Currently, fluoxetine residues in drugs and slimming health foods pose a health problem. Therefore, the synthesis of artificial antigens for fluoxetine was explored, and the structures and specificities of the synthesized hapten and artificial antigen were identified. Fluoxetine reacted with methyl acrylate and underwent hydrolysis to produce the hapten (H-FXT). Subsequently, the active ester method was used to conjugate H-FXT with bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) separately, to obtain the fluoxetine immunogen (H-FXT-BSA) and coated fluoxetine antigen (H-FXT-OVA), respectively. The H-FXT-BSA immunogen was used to immunize Balb/c mice and the generated anti-serum was analyzed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The artificial antigens, H-FXT-BSA and H-FXT-OVA, were analyzed by ultraviolet (UV) spectroscopy, and calculations showed that the coupling ratios were 14.5:1 and 11.3:1, respectively. The antiserum titers after the immunization of Balb/c mice were all above 30 000, and the half maximal inhibitory concentration was approximately 100 ng / mL. The artificial fluoxetine antigens were successfully synthesized for the first time and anti-fluoxetine antibodies were obtained. This study can provide a key technical basis for further studies involving the establishment of a method for the rapid immunological detection of fluoxetine, including the development of an ELISA kit and other related products.

Key words: fluoxetine; hapten; complete antigen; identification

盐酸氟西汀 (Fluoxetine Hydrochloride) 是目前临床广泛使用的一种第二代抗抑郁药物, 为选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂 (SSRI), 可选择性作用于神经递质受体^[1], 它不仅对各型抑郁障碍患者均有明显抗抑

收稿日期: 2016-03-20

基金项目: 广东省自然科学基金项目 (2015A030313793); 广东省教育厅高等学校优秀青年教师培养计划项目 (2014145); 国家级星火计划面上引导项目 (S2015E000181)

作者简介: 刘波 (1980-), 女, 讲师, 研究方向: 食品安全检测

通讯作者: 袁利鹏 (1979-), 男, 副教授, 研究方向: 食品加工与检测

郁、抗焦虑作用, 在临床上还具有治疗偏头痛、肥胖、早泄、进食障碍、惊恐障碍、儿童孤独症等多种疾病的作用^[2-4], 但由于精神类药品的安全范围比较窄, 且抑郁症患者对于治疗的顺应性较差^[5], 对氟西汀进行血药浓度的快速监测, 寻找疗效最佳、副反应最轻的适宜血药浓度, 具有重要的临床意义。

此外, 近年来研究同时发现, 接受氟西汀治疗的抑郁症病人体会明显减轻, 故氟西汀已被试用作减肥药。研究对照试验结果证明, 氟西汀每日 40~80 mg, 8 周后体重下降 2~6 kg, 其效果明显超过比普通安慰

剂。在对包括 600 多例肥胖的剂量一效应研究中发现,使用氟西汀每日 0、10、20、40 和 60 mg 引起的体重下降幅度主要取决于该药物剂量^[6], 因其减肥效果明显, 在利益的驱动下, 不法商贩随意加大减肥药中该成分剂量甚至在各类减肥保健食品中滥用极有可能^[7]。故此, 对减肥药及减肥保健食品中开展氟西汀的检测研究, 可有效的控制该药物的违法滥用, 对维护人民的健康安全非常必要。

关于氟西汀的血药浓度检测、减肥保健食品中残留检测方法已有报道^[8-12], 主要是采用气相色谱法和高效液相色谱法, 设备昂贵, 操作繁琐, 不便于普及。近年来, 免疫分析技术已经越来越广泛的应用于兽药残留分析、掺伪食品鉴定、血药浓度测定等领域, 以其简单、廉价、快捷、灵敏度高、适用于大批量样品检测等优点而成为主要的初步筛选分析方法^[13]。目前国内外尚未见关于氟西汀的免疫化学检验方法及产品的相关报道。本研究在首次设计合成了氟西汀半抗原、全抗原, 旨在为后期氟西汀单克隆抗体的制备、免疫检验试剂盒的研发提供关键性的研究基础, 也为医药和减肥食品中氟西汀免疫快速检测、监测工作的开展奠定全新的技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

6 周龄雌性 Balb/c 小鼠 8 只, 20 g/只, SPF 级, 购于广东省医学实验动物中心, scxk(粤)2008-002。

氟西汀盐酸盐(百灵威科技有限公司); 丙烯酸甲酯、N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)(阿拉丁试剂公司); 牛血清白蛋白(BSA, 65 kD)、卵清蛋白(OVA, 45 kD)、2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)、考马斯亮蓝 G-250、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(Sigma 公司); 其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器与设备

Mettler Toledo 电子天秤(梅特勒-托利多电子仪器(上海)有限公司); UV-2450 紫外-可见分光光度计(日本岛津分析仪器公司); 纯水系统(美国 MILIPORE 公司); Centrifuge 5471R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 透析袋(分子质量 12000~14000 D)(Sigma 公司); JB-3 型定时恒温磁力搅拌器(上海雷磁仪器厂); DRX-400/600NMR 核磁共振仪(德国 Bruker 公司); LCQEDCA 液质联用仪(美国 Finnigan 公司); MULTSKANGO 酶标仪(美国 Thermo 公司); ZSB-120011A2 生物安全柜(苏州长留净化科技有限

公司)。

1.3 氟西汀半抗原的合成

如图 1 所示, 将 1.7 g 氟西汀盐酸盐溶于 25 mL 蒸馏水中, 用 1 M 的 NaOH 将溶液 pH 值调成微碱性, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 将有机相合并减压蒸干; 之后依次加入 50 mL 无水甲醇, 0.8 g 丙烯酸甲酯, 回流过夜, 待反应结束后直接蒸干溶剂, 用硅胶柱分离纯化得到 1.2 g 中间体 M-FXT。

称取 1.0 g 中间体 M-FXT, 然后加入 25 mL 10% 的 NaOH 溶液, 回流反应 2 h 后用 6 M 的稀盐酸将溶液 pH 值调至酸性, 用乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相并将其减压蒸干即得到 0.8 g 纯的终产物 H-FXT。

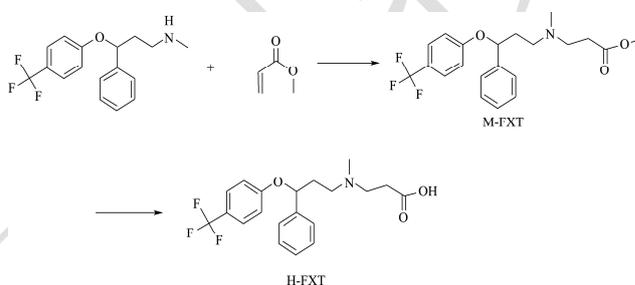


图 1 氟西汀半抗原合成路线

Fig.1 Synthetic route of fluoxetine hapten

1.4 氟西汀抗原的合成

采用活泼酯法制备免疫原 H-FXT-BSA、包被原 H-FXT-OVA: 称取 19 mg 半抗原 H-FXT 和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 7 mg 溶于 0.5 mL N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中, 磁力搅拌下, 将 125 mg N,N-二环己基碳二亚胺(DCC)固体缓慢加入, 室温下搅拌 5 h, 4000 r/min 离心 5 min, 取上层清液即活泼酯。然后在搅拌状态下将活泼酯逐滴加入到 5 mL 含 50 mg BSA (或 40 mg OVA) pH 7.4 磷酸盐缓冲液中, 4 °C 冰箱搅拌反应过夜。4 °C 下用 0.9% 的生理盐水透析 2 d, 每 8 h 换一次透析液。紫外扫描透析液无小分子吸收峰时将产物在无菌条件下通 0.2 μm 的滤膜, 分装后, -20 °C 保存。

1.5 动物免疫

选取 8 只 6 周龄的 Balb/c 雌性小鼠, 两只用作阴性对照, 其余 6 只用免疫原 H-FXT-BSA 进行免疫。免疫剂量为 50 μg/只, 首次免疫采用等量弗氏完全佐剂乳化后皮下多点注射, 以后每两周免疫一次, 采用等量弗氏不完全佐剂乳化后注射。第 3 次免疫后 7 d 对小鼠进行尾部采血约 100 μL/只, 室温静置 2 h 后 4000 r/min 低温离心 10 min, 收集上层血清, 用 1.0

μg/mL 浓度的 H-FXT-OVA 作为包被原, 采用间接 ELISA 方法^[10]测定免疫小鼠的抗血清效价及抑制率。

2 结果与分析

2.1 半抗原的结构鉴定

通过核磁共振 (NMR) 与液质谱 (LC-MS) 两种方法对合成的半抗原 H-FXT 进行结构鉴定。

2.1.1 核磁共振 (NMR) 氢谱分析

其波谱数据及结构归属如下: ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, TMS), δ 2.02(m, 2H, CO-CH₂), 2.15(s, 3H, N-CH₃), 2.31(m, 2H, CH₂-COOH), 2.46(m, 2H, N-CH₂), 2.65(m, 2H, N-CH₂), 5.25 (m, 1H, O-CH), 6.78~7.35(m, 9H, Ar-H), 结构归属合理。

2.1.2 液质谱 (LC-MS) 分析

由图 2 可见, 反应物质谱图中确实存在 *m/z* 为 382.3 的质谱峰, 由于本次质谱为加氢的分子离子峰 [M+H]⁺, 该产物相对分子质量与目标产物的相对分子质量 381.4 一致, 结合反应路线, 可以推断合成产物即为所需目标半抗原, 说明该合成路线可以用于氟西汀半抗原的合成。同时可见, 382.3 的分子离子峰是最强峰, 表明其为反应体系中的主要物质, 说明反应产物具备相对较高的纯度。

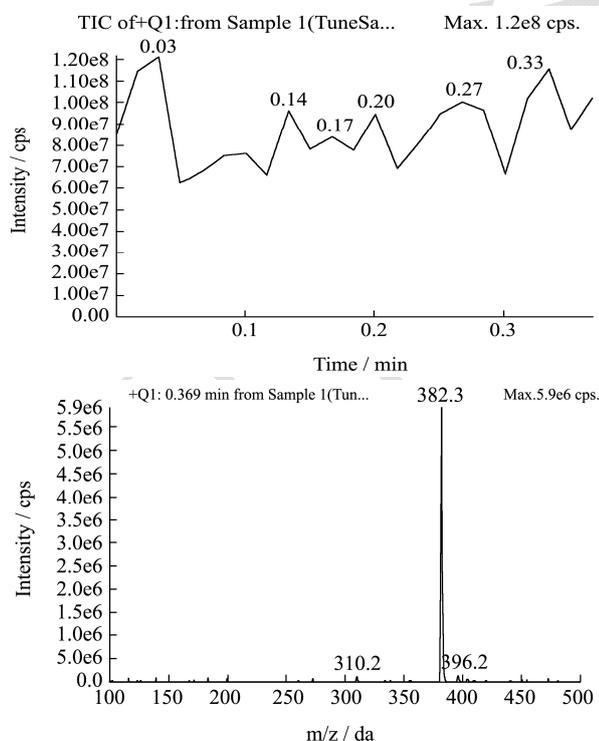


图 2 氟西汀半抗原质谱图

Fig.2 MS spectra of the fluoxetine hapten

2.2 完全抗原的制备

通过活泼酯法将半抗原的羧基与载体蛋白的氨基偶联, 分别制备免疫原和包被原, 产物采用考马斯亮蓝 G-250 法测定蛋白质含量^[14], 采用紫外扫描鉴定抗原是否偶联成功^[15]。

2.2.1 完全抗原的蛋白质浓度测定

将标准蛋白 BSA 用生理盐水配制成浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.5 mg/mL 的溶液, 取 0.1 mL 加入到 1.0 mL 考马其亮蓝溶液中, 混匀, 静止 10 min, 于 595 nm 波长下测定吸光值, 并根据吸光值与蛋白质浓度绘制标准曲线, 如图 3 所示。根据工作曲线计算免疫原 H-FXT-BSA、包被原 H-FXT-OVA 的蛋白质质量浓度分别为 8.3 mg/mL 和 6.4 mg/mL。

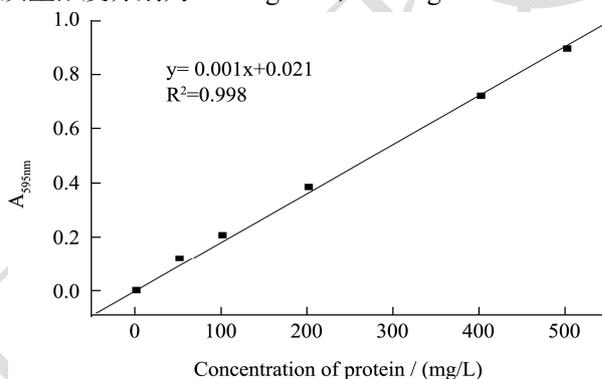


图 3 蛋白质浓度标准曲线

Fig.3 Standard curve of BSA

2.2.2 完全抗原的鉴定

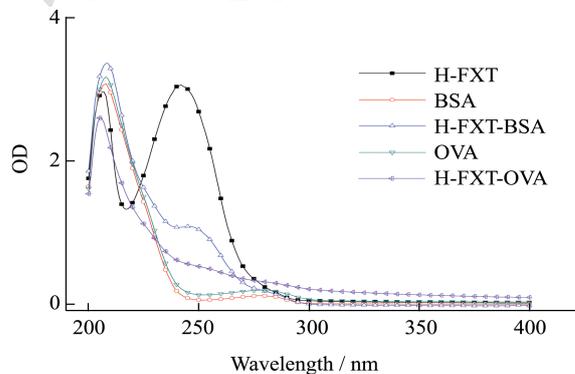


图 4 H-FXT-BSA/OVA 紫外吸收曲线

Fig.4 UV absorption curves of H-FXT-BSA/OVA

将载体蛋白、偶联物及半抗原均配制成 0.5 mg/mL, 并将上述溶液在 200~400 nm 进行全波长扫描其紫外吸收, 根据扫描图谱判断载体蛋白是否与半抗原偶联成功。由图 4 可知, 偶联物与载体蛋白在相同的蛋白质质量浓度下, 吸收曲线发生了改变, 在半抗原 H-FXT 的最大吸收范围内, 吸光度发生了增加, 表明偶联物的紫外吸收峰为蛋白质和半抗原吸收峰的叠加, 说明载体蛋白成功偶联上了一定数目的小分子半抗原。采用 2,4,6-三硝基苯磺酸 (TNBS) 法测定人工抗原的分子偶联比^[16], 计算结果为免疫原

H-FXT-BSA 和包被原 H-FXT-OVA 的偶联比分别是 14.5:1 和 11.3:1。

2.3 免疫效果的测定结果

用 H-FXT-OVA 作为包被原,用间接 ELISA 法测定免疫原 H-FXT-BSA 免疫小鼠 3 次后获得的小鼠尾部抗血清,效价均达到 30000 以上,用 100 ppb 浓度的药物做竞争其抑制率可达 40%以上,说明合成的免疫原能够刺激小鼠产生抗体,该抗体和氟西汀小分子具有一定的亲和力,氟西汀小分子可以和包被原竞争该抗体,能够制备间接竞争法测定氟西汀的检测试剂盒,可以通过细胞融合制备单克隆抗体。

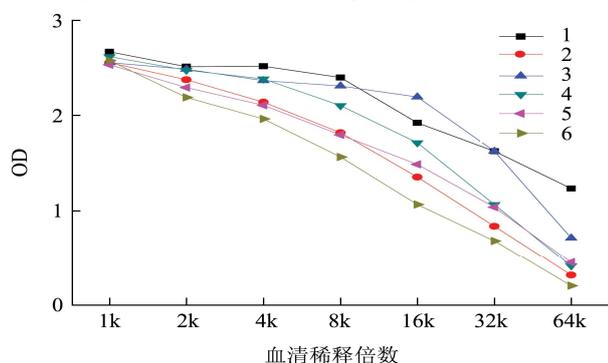


图 5 氟西汀抗血清效价测定曲线

Fig.5 Antiserum titer curves of fluoxetine

表 1 氟西汀抗血清抑制率的测定

Table 1 Determination of antiserum inhibition rate of fluoxetine

编号	1	2	3	4	5	6
0 ppb	1.21	1.09	0.98	1.13	1.06	0.96
100 ppb	0.47	0.61	0.56	0.32	0.38	0.43
抑制率	61.2%	44.1%	42.9%	71.7%	64.2%	55.2%

3 讨论

免疫分析方法研究中制备高质量抗体是关键,而抗体质量的优劣在很大程度上取决于半抗原设计是否合理^[17]。因此,设计合理的半抗原结构及选择合适的蛋白偶联方式非常关键。本研究首先发现氟西汀相对分子质量为 309.3,属小分子物质,该药物只有反应原性而无免疫原性,不能直接诱导机体产生抗体,因而必需与大分子的载体蛋白偶联,形成既有反应原性又有免疫原性的人工全抗原后被使用,才能诱导机体产生对应抗体^[18]。其次,由于氟西汀的分子结构本身没有可以偶联载体蛋白的活性基团(如-COOH 或-NH₂),经过结构分析发现氟西汀分子上有个亚氨基位点可与丙烯酸酯很容易反应,可以给氟西汀分子接上一个丙酸作为间隔臂,同时也提供了可接蛋白的活性基团-COOH,这个结构设计可以非常完整的保留氟西

汀分子中可能的抗原决定簇结构部分,故此设计合成了本研究所用半抗原 H-FXT。有机合成通常存在副反应、反应不充分等问题,所以对合成的半抗原 H-FXT 进行严格的结构鉴定,是本研究的关键点。通过核磁共振(NMR)氢谱分析半抗原 H-FXT 归属合理,再通过液质谱(LC-MS)分析也能直观判断半抗原的离子峰对应且合成杂质少,纯度较高,结合以上两种仪器分析手段,可确认半抗原 H-FXT 合成效果理想,可为后期抗原的制备以及后期酶标半抗原的研究提供保障。

后期,本研究采用了活泼酯法将半抗原与载体蛋白相偶联合成氟西汀抗原,用 DCC 和 NHS 作为一种脱缩合剂,使半抗原和载体蛋白的反应效率高,且缩合效果好。免疫原的免疫效果不仅与偶联物的分子及结构性质相关,还与每个蛋白分子上偶联的小分子的数目密切相关,因此在免疫前,测定人工抗原中载体上连接的小分子数目至关重要。通常认为每分子载体蛋白上含有 8~25 个半抗原时能得到效价较高的抗体^[19]。本研究用 TNBS 法测得免疫原 H-FXT-BSA 和包被原 H-FXT-OVA 偶联比分别为 14.5:1 和 11.3:1,有效控制在了 8:1~25:1 比值区间范围内。最终免疫小鼠的实验结果显示,三次免疫后小鼠尾部血清效价均可达到 30000 以上,且抗血清与药物的直接竞争效果较好,也直观的说明了人工抗原合成成功。

4 结论

本研究首次合成、鉴定了氟西汀人工抗原,也成功获得了氟西汀抗体,抗血清的效价均达到 30000 以上,半抑制量浓度 IC₅₀ 值为 100 ng/mL。研究可为后期在药物、减肥类保健食品中氟西汀成分的免疫快速检测方法的建立和酶联免疫检测试剂盒等相关产品开发奠定了关键技术研究基础。

参考文献

- [1] Frazer A. Serotonergic and noradrenergic reuptake inhibitors: prediction of clinical effects from in vitro potencies [J]. J. Clin. Psychiatry, 2001, 62 (Suppl. 12): 16-23
- [2] Wong D T, Fuller R W, Robertson D W. Fluoxetine and its two enantiomers as selective serotonin uptake inhibitors [J]. Acta Pharm. Nord., 1990, 2(3): 171-180
- [3] Robertson D W, Krushinski J H, Fuller R W, et al. Absolute configurations and pharmacological activities of the optical isomers of fluoxetine, a selective serotonin-uptake inhibitor [J]. J. Med. Chem., 1988, 31(7): 1412-1417
- [4] Robertson D W, Jones N D, Swarzendruber J K, et al.

- Molecular-structure of fluoxetine hydrochloride, a highly selective serotonin-uptake inhibitor [J]. *J. Med. Chem.*, 1988, 31(1): 185-189
- [5] D Charlotte, DLG Geoffroy Lorin, D M Philippe. A high-performance liquid chromatography method with photodiode-array UV detection for the therapeutic drug monitoring of the nontricyclic antidepressant drugs [J]. *Therapeutic Drug Monitoring*, 2003, 25(5): 565-573
- [6] 胡琛. 5-羟色胺再吸收抑制剂氟西汀[J]. 国外医药-合成药、生化药、制剂分册, 2006, 17(1): 32-34
HU Chen. Serotonin reuptake inhibitors fluoxetine [J]. *Foreign Medical Synthetic Medicine Biochemical Medicine Preparation Section* 2006, 17(1): 32-34
- [7] 赖天兵, 胡小红, 刘晓革, 等. 减肥类保健食品违禁添加药物现状及特点[J]. 中国食品卫生杂志, 2007, 19(4): 336-337
LAI Tian-bin, HU Xiao-hong, LIU Xiao-ge, et al. Antiobesities current situation and characteristics of prohibited drugs health food [J] *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2007, 19(4): 336-337
- [8] Maya M T, Domingos C R, Guerreiro M T, et al. Determination of the antidepressant fluoxetine in human plasma by LC with UV detection [J]. *Pharma. & Biomed. Anal.*, 2000, 23(6): 989
- [9] 何娟, 周志凌, 李焕德. HPLC-MS 同时测定 4 种新型抗抑郁药物的血药浓度[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(12): 1428-1432
HE Juan, ZHOU Zhi-ling, LI Huan-de. Simultaneous determination of four new antidepressants plasma by HPLC-MS, *Chin. J. Pharm. Anal.*, 2005, 25(12): 1428-1432
- [10] 闫小华, 陈本美, 张毕奎, 等. LC-MS 联用法测定人血浆中氟西汀的浓度[J]. 中国药房, 2007, 18(26): 2024-2025
YAN Xiao-hua, CHEN Ben-mei, ZHANG Bi-kui, et al. Determination of fluoxetine in human plasma by LC/MS [J]. *Clinic Pharmacy*, 2007, 18(26): 2024-2025
- [11] 刘文宪, 陈清霞, 刘伟忠, 等. 高效液相色谱法测定人血浆中氟西汀浓度[J]. 海峡药学, 2011, 23(10): 207-209
LIU Wen-xian, CHEN Qing-xia, LIU Wei-zhong, et al. Determination of the concentration of fluoxetine in human plasma by HPLC [J]. *Strait Pharmaceutical Journal*, 2011, 23(10): 207-209
- [12] 车宝泉, 张喆, 黄晓君, 等. 液质联用检查中药制剂及保健食品中减肥类药物[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(4): 633-635
CHE Bao-quan, ZHANG Zhe, HUANG Xiao-jun, et al. HPLC-MS/MS identification of antiobesities in traditional Chinese medicine and health foods [J]. *Chin. J. Pharm. Anal.*, 2009, 29(4): 633-635
- [13] 管华, 石茂健, 崔亚男, 等. 免疫分析技术研究进展[J]. 亚太传统医药, 2007, 10(3): 33-36
GUAN Hua, SHI Mao-jian, CUI Ya-nan, et al. Development of immune analysis technology [J]. *Asia-Pacific Traditional Medicine*, 2007, 10(3): 33-36
- [14] 贾亚琰, 朱德锐, 胡芹芹, 等. 呋喃丹多克隆抗体的制备与初步应用[J]. 环境科学研究, 2008, 21(3): 175-179
BEN Ya-li, ZHU De-ruì, HU Qin-qin, et al. Production and initial application of carbifuran polyclonal antibody [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2008, 21(3): 175-179
- [15] 汪家, 政范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000
WANG Jia, ZHEN Fan-min. Handbook of protein technology [M]. Beijing: Science Press, 2000
- [16] Singh K V, Kaur J, Varshney G C, et al. Synthesis and characterization of hapten-protein conjugates for antibody production against small molecules [J]. *Bioconjugate Chemistry*, 2004, 15(1): 168-173
- [17] Sashidhar R B, Capoor A K, Ramana D. Quantitation of epsilon-amino group using amino-acids as reference-standards by trinitrobenzene sulfonic-acid-a simple spectrophotometric method for the estimation of hapten to carrier protein ratio [J]. *Journal of Immunological Methods*, 1994, 167(1-2): 121-127
- [18] 张梅, 张继瑜, 李剑勇. 兽药人工抗原合成的研究进展[J]. 中兽医医药杂志, 2006, 25(1): 63-65
ZHANG Mei, ZHANG Ji-yu, LI Jian-yong. Research progress on the synthesis of artificial antigen on veterinary medicine [J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2006, 25(1): 63-65
- [19] Li Q X, Zhao M S, Gee S J, et al. Development of enzyme linked immunosorbent assays for 4-nitrophenol and substituted 4-nitrophenols [J]. *Agric. Food Chem.*, 1991, 39(9): 1685-1692