

呋喃唑酮代谢物人工抗原的制备及鉴定

李静宇¹, 何小维¹, 李敏¹, 刘晓云², 李文美^{1,2}

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广州万孚生物技术股份有限公司, 广东广州 510663)

摘要: 在催化剂条件下, 以碳酸二甲酯和乙醇肼为原料, 四氢呋喃为溶剂, 合成了高收率的呋喃唑酮代谢物 3-氨基-2-恶唑烷酮 (AOZ)。实验结果表明, 得到的 AOZ 收率可达到 82.7%, 此时的最佳反应条件如下: 催化剂用量 12%, 反应温度 75 °C, 反应时间 3 h。随后对 AOZ 进行结构改造, 得到 AOZ 半抗原衍生物, 同时采用戊二醛法将 AOZ 及其半抗原衍生物与活化的卵血清蛋白 (cOVA) 和牛血清白蛋白 (cBSA) 交联, 成功制备了免疫原和包被原; 通过气相质谱联用仪 (GC-MS)、元素分析、紫外分光光度计等手段对半抗原和完全抗原进行鉴定。GC-MS 结果证明了 AOZ 的成功合成; 元素分析数据表明, 半抗原顺利合成; 紫外扫描数据显示, 半抗原与 cOVA、cBSA 偶联成功, 免疫原 I、免疫原 II 的偶联比分别为 16.74 和 24.05。

关键词: 呋喃唑酮; 呋喃唑酮代谢物; 半抗原; 人工抗原

文章编号: 1673-9078(2014)10-182-186

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.10.031

Preparation and Identification of Artificial Antigen of Furazolidone Metabolite

LI Jing-yu¹, HE Xiao-wei¹, LI Min¹, LIU Xiao-yun², LI Wen-mei^{1,2}

(1. College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Wondfo Biotech Co., Ltd, Guangzhou 510663, China)

Abstract: The furazolidone metabolite 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ) was synthesized at a high yield from the raw materials dimethyl carbonate and ethanol hydrazine hydrate using a catalyst and tetrahydrofuran as a solvent. The results showed that the optimum reaction conditions for maximum AOZ yield (82.7%) were as follows: catalyst dosage, 12%; reaction temperature, 75 °C; and reaction time, 3 h. Subsequently, a hapten derivative was obtained from the structural transformation of AOZ. Then, immunogens and coating antigens were successfully prepared using a method involving glutaraldehyde to conjugate AOZ and its hapten derivative with activated ovalbumin (cOVA) and bovine serum albumin (cBSA). The hapten and immunogen were identified by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), elemental analysis, and UV spectrophotometry. The GC-MS data demonstrated the successful preparation of AOZ. The elemental analysis indicated successful formation of the hapten. UV spectrophotometry results showed that conjugation of the hapten with cOVA and cBSA was successful, and the conjugation ratios of immunogen I and immunogen II were 16.74 and 24.05, respectively.

Key words: furazolidone; furazolidone metabolite; hapten; artificial antigen

呋喃唑酮是一种硝基呋喃类抗生素, 是一种光谱抗菌药, 它对常见的革兰氏阴性菌和阳性菌有抑制作用, 可以用于治疗细菌和原虫引起的痢疾、肠炎、胃溃疡等肠道疾病^[1]。然而, 呋喃唑酮具有很强的副作用, 而且在动物体内很快就代谢为 3-氨基-2-恶唑烷酮 (AOZ), AOZ 在胃酸条件下直接代谢成为具有强烈致突变性和致癌性的 β -羟乙基肼^[2-4]。

多年来研究也表明, 呋喃唑酮代谢物具有较强的致

癌、致畸、致突变作用^[5-6]。由于毒副作用明显, 对人类健康具有潜在危害, 呋喃唑酮代谢物已在药物研发及动源性食品、饲料生产领域禁止被使用^[7-8]。因此, 关于呋喃唑酮代谢物残留的快速有效检测也显得尤为重要。

目前关于呋喃唑酮代谢物残留的检测方法较多, 常用方法包括: 高效液相色谱 (HPLC)^[9]、液相色谱-质谱法 (HPLC-MS)^[10]、液相色谱-串联质谱法 (LC-MS/MS)^[11]等。然而, 在实际过程中, 实验检测存在前处理复杂、时间长、成本高, 需要专业人员操作、不易普及等缺陷。目前研究报道中, 酶联免疫吸附法 (ELISA) 具有快速、灵敏、操作简便、检测成本低廉等优点, 有着广阔的应用前景

收稿日期: 2014-04-28

基金项目: 广州市科技局珠江新星项目 (2013J2200049)

作者简介: 李静宇 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全检测
通讯作者: 何小维 (1959-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能碳水化合物材料理论与技术

[12-13]。然而,建立酶联免疫吸附法的前提是获得针对呋喃唑酮代谢物的特异性抗体,而得到抗体的前提条件是要制备待测物的免疫原。目前,关于AOZ的衍生化过程相对繁琐和耗时,若要实现其直接现场快速检测,有必要对AOZ及其衍生物的制备过程进一步优化来得到高收率AOZ和有效的人工抗原,以实现高特异性单克隆抗体的制备。

本实验以碳酸二甲酯和乙醇肼为原料、四氢呋喃为溶剂、甲醇钠为催化剂,制备了高纯度的呋喃唑酮代谢物3-氨基-2-恶唑烷酮(AOZ)。研究了反应时间、反应温度、催化剂用量对AOZ收率的影响,通过气相色谱和质谱对其结构进行了鉴定。然后在AOZ基础上进行结构改造,得到了AOZ半抗原衍生物,同时采用戊二醛法将半抗原衍生物和活化的卵血清蛋白(cOVA)和牛血清白蛋白(cBSA)交联,成功制备了免疫原和包被原;最后,通过GC-MS、元素分析、紫外分光光度计等手段对半抗原、免疫原及包被原进行鉴定。本研究重点在于人工抗原的制备和鉴定,从而为获得呋喃唑酮代谢物特异性抗体和建立酶联免疫吸附快速检测法打下基础。

1 材料与方法

1.1 原料

乙醇肼、碳酸二甲酯,购于上海达瑞精细化学品有限公司;四氢呋喃、N-4-溴丁基邻苯二甲酰亚胺、甲苯、相转移催化剂、乙二胺、N,N-二环己基碳二亚胺(EDC),来自广州化学试剂厂;戊二醛,购于天津市科密欧化学试剂有限公司;卵清白蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA),购自美国Sigma公司;其余试剂均为分析纯。

1.2 主要仪器设备

CP224S 分析天平,德国Satorious公司;RE-205 旋转蒸发器,上海予华仪器设备有限公司;Agilent 5975 气质联用仪,美国Agilent公司;Vario EL III 元素分析仪,德国Elementar公司;UV-1700 紫外分光光度计,日本岛津公司;MD34-7 透析袋,捷倍斯生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 半抗原制备

1.3.1.1 3-氨基-2-恶唑烷酮(3-amino-2-oxazolidinone, AOZ)的制备

以碳酸二甲酯和乙醇肼为原料、甲醇钠为催化剂,

在四氢呋喃反应溶剂中合成AOZ。具体操作方法如下:在有蒸馏装置的圆底烧瓶中加入四氢呋喃7 mL、乙醇肼1 g和一定量的甲醇钠,以3 s/滴的速度逐滴加入碳酸二甲酯1.65 mL,调整反应温度,恒温搅拌反应一定时间后将得到的AOZ合成液冷却至室温,加入二氯甲烷溶解产物后减压抽滤,滤液旋转蒸干后,加入适量无水乙醇和少量无水乙醚,于4 °C冰箱静置,得到白色固体AOZ,即半抗原I(合成路线见图1)。

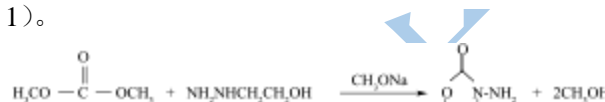


图1 3-氨基-2-恶唑烷酮的合成

Fig.1 Synthesis of 3-amino-2-oxazolidinone

1.3.1.2 半抗原II的制备

准确称量AOZ 100 mg (0.98 mmol), N-4-溴丁基邻苯二甲酰亚胺 552.9 mg (1.96 mmol), 碳酸钾 405.9 mg (2.94 mmol) 以及相转移催化剂 30 mg 于圆底烧瓶中,加入10 mL 甲苯,溶解搅拌,于100 °C回流反应约6 h。反应时间结束后将溶液旋转蒸干,并用乙酸乙酯和水萃取,取乙酸乙酯层,再次旋转蒸干后得到白色固体。加入300 μL 水合肼和5 mL 乙醇,100 °C反应1 h,反应结束后,再用乙醇溶解过滤取滤液,旋转蒸干后即得黄色产物(合成路线见图2)。

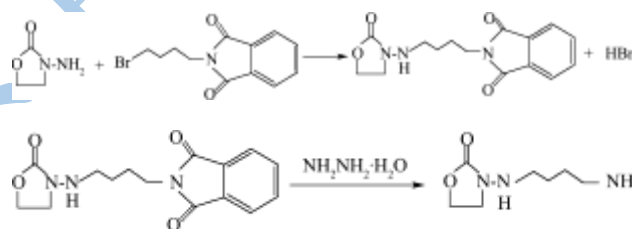


图2 半抗原II的合成

Fig.2 Synthesis of hapten II

1.3.2 完全抗原的制备

1.3.2.1 活化卵清蛋白(cOVA)的制备

将18 mg (300 μmol) 乙二胺(EDA)逐滴加入至冰冷的20 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)中,0~4 °C条件下搅拌,向该溶液中逐滴加入浓盐酸,调pH至7.4;向上述EDA的溶液中加入1 g OVA(15 μmol)和56 mg EDC (300 μmol),室温下反应2 h。反应完毕后,取上清液于0~4 °C条件下透析。先后用PBS缓冲液和蒸馏水中透析5 d,每6 h更换一次透析液。将透析后的溶液冻干,得白色絮状固体,-20 °C保存备用。

1.3.2.2 免疫原的制备

在半抗原的基础上,采用戊二醛法^[14]制备免疫原。具体过程如下:取5 mg 半抗原溶于1 mL PBS 溶液中,此为A液;取10 mg cOVA溶于3 mL PBS 溶

液中, 此为 B 液; 将 A 液逐滴滴入 B 液中, 在搅拌条件下, 向混合液中加入 30 μ L 5% 戊二醛, 继续搅拌 5 h; 随后, 将反应液转移到透析袋中, 用 PBS 溶液透析 3 d, 每天换水六次; 透析完后, 离心取上清液, 4 $^{\circ}$ C 冷藏待用。免疫原 I 合成路线见图 3, 免疫原 II 合成路线见图 4。

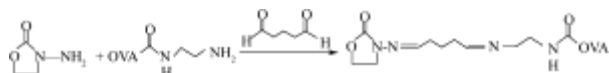


图 3 免疫原 I 的合成

Fig.3 Synthesis of immunogen I

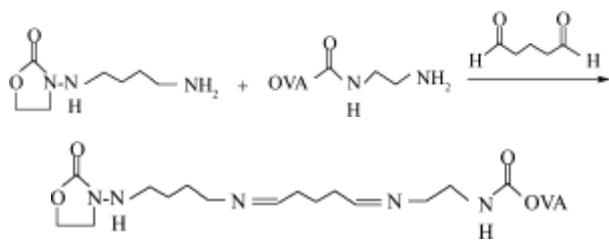


图 4 免疫原 II 的合成

Fig.4 Synthesis of immunogen II

1.3.3 包被原的制备

以 cBSA 为载体蛋白质, 在半抗原 I、II 的基础上合成了包被原, 合成方法同 1.3.2。

1.3.4 半抗原和完全抗原的鉴定

采用 GC-MS 分析 AOZ 的纯度; 半抗原 II 进行元素分析; 此外, 采用紫外分光光度法^[15]对免疫原 I 和 II 和包被原 A 和 B 进行鉴定。

1.3.5 数据分析

各实验组数据均为 3 次重复测定后的平均值, 数据采用 Excel 进行处理, 以平均数 \pm 标准差表示, 用 Origin 7.5 绘图。

2 结果与讨论

2.1 反应条件对 AOZ 收率的影响

反应温度 70 $^{\circ}$ C, 反应时间 2 h 条件下, AOZ 收率随催化剂用量变化的曲线如图 5a 所示。由图可知, 催化剂用量在某一范围内增加时, AOZ 收率逐渐增加; 当催化剂用量过高, AOZ 收率出现下降趋势。出现这一现象的原因可能是, 催化剂甲醇钠的过量使用导致体系 pH 值发生改变, 从而影响 AOZ 的收率。数据显示, 催化剂最适用量为 12%。

催化剂用量 12%, 反应时间 2 h 条件下, AOZ 收率随反应温度变化的曲线如图 5b 所示。由图可知, 随着反应温度的升高, AOZ 收率先增加后降低。这一现象的原因是, 反应温度的升高使得逆反应增强, 从而导致产物收率的降低。数据显示, 最适反应温度为

75 $^{\circ}$ C。

催化剂用量 12%, 反应温度 75 $^{\circ}$ C 条件下, AOZ 收率随反应时间变化的曲线如图 5c 所示。由图可知, 随着反应时间的增加, AOZ 收率先增加后降低。造成这一现象的原因可能是, 反应时间的持续延长使得碳酸二甲酯与 β -羟乙基胍反应后再与催化剂结合形成副反应, 从而导致产物收率的降低。数据显示, 最适反应时间为 3 h。

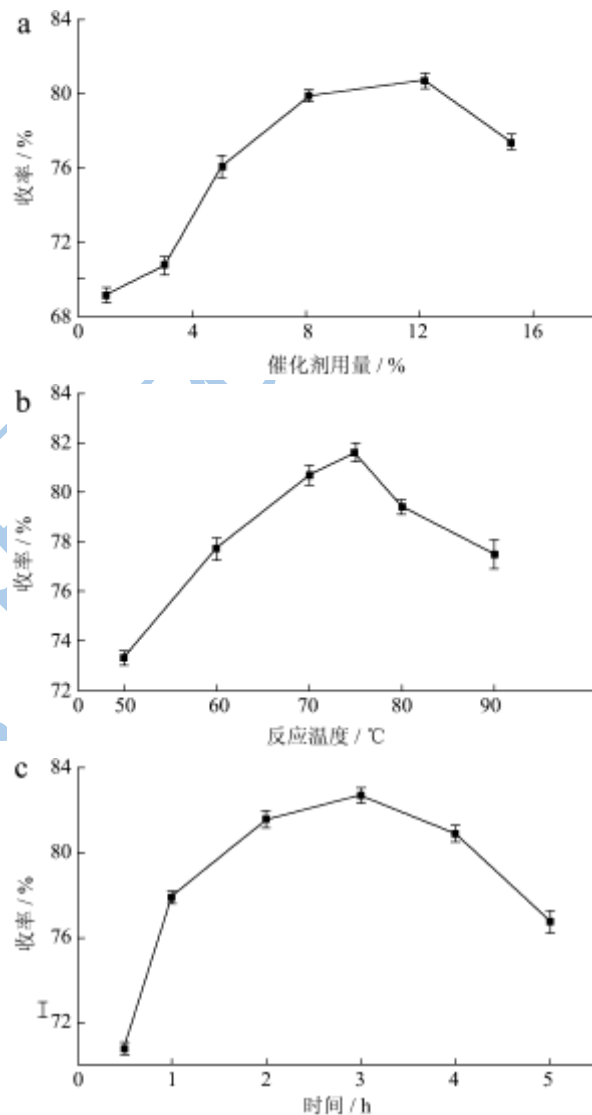


图 5 反应条件对 AOZ 收率的影响

Fig.5 Influence of reaction conditions on the yield of AOZ

2.2 半抗原的鉴定

2.2.1 AOZ 的鉴定

在催化剂用量为 12%、反应温度 75 $^{\circ}$ C、反应时间 3 h 最佳反应条件下合成的 AOZ 的气相分析和质谱分析如图 6 和图 7 所示。由图 6 可知, 在 5.44 min 时出现较强的吸收峰。AOZ 的分子量为 102, 而图 7 显示在分子量 102 处存在吸收峰, 实验结果表明 AOZ

合成成功。

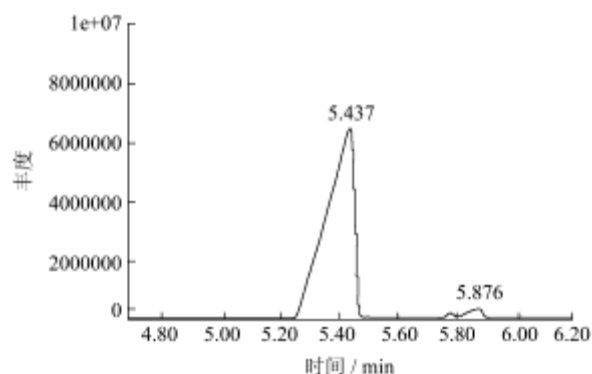


图 6 AOZ 气相图谱

Fig.6 GC spectrum of AOZ

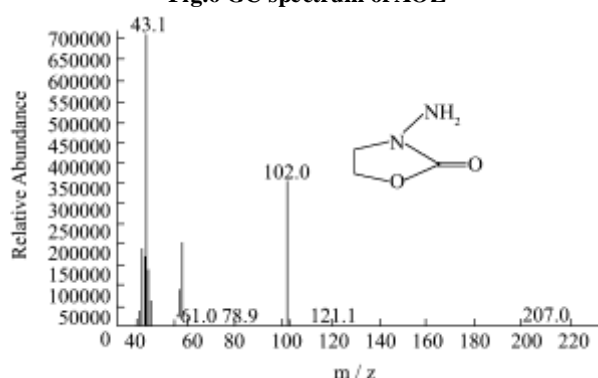


图 7 AOZ 质谱图谱

Fig.7 MS spectrum of AOZ

2.2.2 半抗原 II 的鉴定

实验对半抗原 II 进行元素分析,由表 1 结果可知,所得产物经元素分析仪得到的结果与理论值一致,说明反应进行顺利。

表 1 半抗原 II 的元素分析表

Table 1 The elemental analysis of hapten II

结果	C	H	N	O
理论值/%	48.54	8.73	24.26	18.47
实测值%	48.37	8.81	24.13	18.69

2.3 完全抗原的鉴定

2.3.1 免疫原 I 的鉴定

实验采用紫外分光光度计法鉴定免疫原,并估测偶联比。由图 8 可知,半抗原 I 最大吸收波长为 207 nm, cOVA 最大吸收波长为 279.5 nm,而免疫原 I 最大吸收波长为 266 nm,不同于半抗原 I 和 cOVA。免疫原 I 偶联了一定数量的半抗原 I,在最大吸收波长发生明显的偏移,从而初步判定偶联成功。经紫外分光光度法^[13]估测偶联比为 16.74。

2.3.2 免疫原 II 的鉴定

由图 9 可知,半抗原 II 最大吸收波长为 267 nm, cOVA 最大吸收波长为 279.5 nm,而免疫原 II 的最大

吸收波长在 260 nm,较 cOVA 的吸收峰有明显偏移。从整体曲线上看,免疫原 II 曲线兼具了 cOVA 和半抗原 II 的特征,并且具有相应的曲线叠加的情况。由此分析,可以认为半抗原 II 与 cOVA 偶联成功。经估算,偶联比为 24.05。

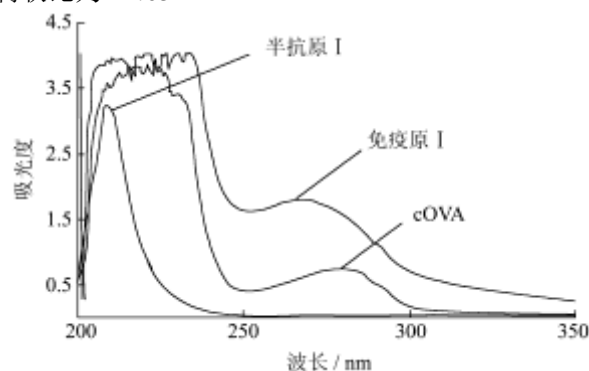


图 8 半抗原 I、免疫原 I 和 cOVA 的紫外图谱

Fig.8 UV spectra of hapten I, immunogen I, and cOVA

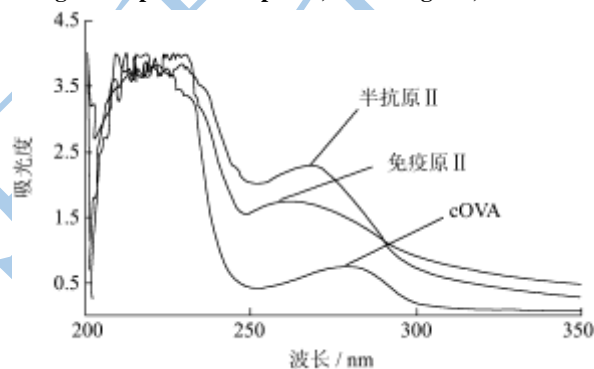


图 9 半抗原 II、免疫原 II 和 cOVA 的紫外图谱

Fig.9 UV spectra of hapten II, immunogen II, and cOVA

2.3.3 包被原 A 的鉴定

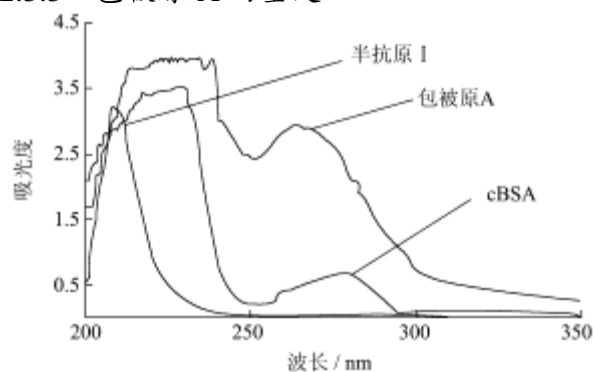


图 10 半抗原 I、包被原 A 和 cBSA 的紫外图谱

Fig.10 UV spectra of hapten I, coating antigen A, and cBSA

图 10 表示半抗原 I、cBSA 和两者偶联产物包被原 A 的紫外扫描图谱。由图可知,包被原 A 与反应前 cBSA、半抗原 I 相比,紫外吸收曲线发生了改变,偶联物在紫外区域的吸光值高于相应蛋白的吸光值。这说明载体蛋白分子上已经成功的连接了一定数量的半抗原。

2.3.4 包被原 B 的鉴定

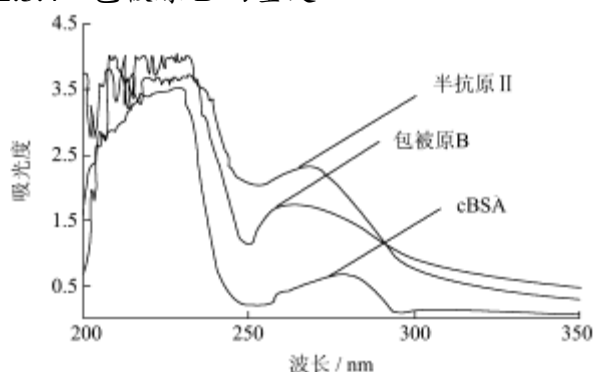


图 11 半抗原 II、包被原 B 和 cBSA 的紫外图谱

Fig.11 UV spectra of haptent II, coating antigen B, and cBSA

图 11 表示半抗原 II、cBSA 和两者偶联产物包被原 B 的紫外扫描图谱。由图可知，包被原 B 在紫外区域的吸光值高于相应蛋白的吸光值，吸收峰较 cBSA 有明显偏移，半抗原 II 这一紫外吸收带与 cBSA 的紫外吸收叠加效果明显。这说明半抗原 II 与 cBSA 偶联成功。

3 结论

AOZ不具有免疫原性，需与载体蛋白偶联以合成人工抗原，因而AOZ的合成是制备有效人工抗原及特异性抗体的关键。有关AOZ合成的研究中，大多以甲苯或甲醇作为溶剂，在该溶剂条件下得到产物纯度较低，这将不利于有效人工抗原的合成。本研究过程中，以四氢呋喃为溶剂、碳酸二甲酯和乙醇胺为原料，在催化剂条件下通过实验条件优化大量合成了收率高达82.7%的AOZ，且数据显示以四氢呋喃为溶剂合成的AOZ其纯度明显高于以甲苯或甲醇作溶剂时产物的纯度。随后，在AOZ基础上成功合成了人工抗原，通过GC-MS、元素分析、紫外扫描等手段对其进行了鉴定。GC-MS数据证实了AOZ的生成。元素分析显示，半抗原II成功合成。紫外扫描数据表明，半抗原与cOVA、cBSA偶联成功，免疫原 I、免疫原 II 的偶联比分别为16.74和24.05，且相关研究表明，该偶联比条件下有利于产生较好的特异性抗体。本实验对AOZ的有效合成进行了深入研究，并成功合成了有效人工抗原，为抗AOZ特异性抗体的制备提供了基础。

参考文献

- [1] 陈杖榴. 兽医药理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007
CHEN Zhang-liu. Veterinary pharmacology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2007
- [2] Hoogenboom L A, Bruchem G D, Sonne K, et al. Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound

residues of furazolidone [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2002, 11(3): 273-287

- [3] 杨悦熙, 李敏, 李文美, 等. 呋喃唑酮代谢物抗体的制备与筛选 [J]. 现代食品科技, 2013, 29(2): 362-364
YANG Yue-xi, LI Min, LI Wen-mei, et al. The preparation and screening of antibody of furazolidone metabolite [J]. Modern Food Science and Technology, 2013, 29(2): 362-364
- [4] 李敏, 何小维. 间接竞争ELISA法检测呋喃唑酮代谢物 [J]. 现代食品科技, 2012, 28(4): 476-478
LI Min, HE Xiao-wei. Development of an indirect competitive elisa for rapid analysis of furazolidone metabolite residues in animal food [J]. Modern Food Science and Technology, 2012, 28(4): 476-478
- [5] Draisci R, Giannetti L, Lucentini L, et al. Determination of nitrofurantoin residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry [J]. Journal of Chromatography, 1997, 777(1): 201-203
- [6] Kelly B D, Heneghan M A, Connolly C E, et al. Nitrofurantoin-induced hepatotoxicity mediated by CD8+ T cells [J]. American Journal of Gastroenterology, 1998, 93(5): 819-821
- [7] Council Regulation (EEC) No2377/90 [S]. Off J Eur Commun, 1990, NoL224/1-8
- [8] Stehly G R, Plakas S M, Said K R. Liquid chromatographic determination of furazolidone in shrimp [J]. J AOAC Int, 1994, 77(4): 901-904
- [9] Yu J X, Hu X Z, Lin Y F, et al. High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in honey and shrimp [J]. Journal of Analytical Science, 2004, 20(4): 382-385
- [10] Lin L M, Lin H C, Gao Y H, et al. Determination of nitrofurantoin metabolites in animal tissues by isotope dilution linear combination high performance liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2005, 33(8): 1081-1086
- [11] Diaz T G, Cabanillas A G, Valenzuela M, et al. Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection [J]. J Chromatography, 1997, 764(2): 243-248
- [12] Cooper K M, Caddell A, Elliott C T, et al. Production and characterisation of polyclonal antibodies to a derivative of 3-amino-2-oxazolidinone, a metabolite of the nitrofurantoin

- furazolidone [J]. *Analytica Chemical Acta*, 2004, 520(1-2): 79-86
- [13] 沈美芳,宋红波,耿雪冰,等.酶联免疫法测定水产品中呋喃唑酮代谢物AOZ的残留[J].*水产学报*,2006,30(4):520-524
SHEN Mei-fang, SONG Hong-bo, GENG Xue-bing, et al. Residual status of a metabolite of furazolidone in aquatic products by ELISA [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2006, 30(4): 520-524
- [14] Su Y L. A strategy for immunoassay signal amplification using clusters of immune gold nanoparticles [J]. *Applied Surface Science*, 2006, 253(3): 1101-1106
- [15] 杨利国,胡少涎.酶免疫测定技术[M].南京:南京大学出版社,1998
YANG Li-guo, HU Shao-xian. *Enzyme Immunoassay* [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1998
- [14] Su Y L. A strategy for immunoassay signal amplification using

现代食品科技