

环丙沙星衍生物的制备及其抗体特异性研究

张明柱, 冯亭亭, 魏东

(河北北方学院食品安全研究中心, 河北张家口 075000)

摘要: 本文研究了环丙沙星(CPLX)羧基衍生物及其抗体的制备, 并对该衍生物抗体的特异性进行了测定。将环丙沙星与3-溴丙酸反应, 生成环丙沙星的羧基衍生物(CPLX-COOH), 通过制备液相进行纯化, 用红外光谱(IR)、电喷雾电离质谱(ESI-MS)与核磁共振法(NMR)进行鉴定; 将环丙沙星衍生物分别与牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)进行偶联, 分别制备免疫抗原(CPLX-COOH-BSA)和包被抗原(CPLX-COOH-OVA), 并用紫外光谱法进行鉴定。用免疫抗原免疫BALB/c小鼠, 制备环丙沙星衍生物多克隆抗体。通过ELISA方阵滴定法, 确定包被抗原的最佳包被浓度和抗体最佳稀释度, 建立了CPLX-COOH间接竞争ELISA检测方法, 其半抑制浓度 IC_{50} 为228.56 ng/mL, 最低检出限(LOD)为25.527 ng/mL, 该抗体具有广谱特异性, 可与多种氟喹诺酮类药物发生交叉反应, 可进行氟喹诺酮类药物残留的多元检测。

关键词: 环丙沙星; 间隔臂; 衍生物; 抗体; 检测; ELISA

文章编号: 1673-9078(2017)3-191-195

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.029

Preparation of Ciprofloxacin Derivative and its Antibody Specificity

ZHANG Ming-zhu, FENG Ting-ting, WEI Dong

(Food Safety Research Center, Hebei North University, Zhangjiakou, 075000, China)

Abstract: The preparations of the ciprofloxacin (CPLX) carboxyl derivative and its antibody were studied in this paper, and the antibody specificity of this derivative was determined. CPLX derivatives (CPLX-COOH) were synthesized with CPLX and 3-bromopropionic acid, and purified by preparation of liquid phase. Infrared spectroscopy (IR), electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS), and nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy were used to identify the CPLX derivative. CPLX-COOH was conjugated to bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) to prepare the immune antigen CPLX-COOH-BSA and coating antigen CPLX-COOH-OVA, which were identified using ultraviolet spectroscopy. The BALB/c mice were immunized with CPLX-COOH-BSA to obtain a polyclonal antibody directed against the CPLX derivative with high titer. The optimum concentration of the coating antigen and the optimum dilution of the antibody were determined using the chessboard method, and the indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was established. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) and the limit of detection (LOD) of CPLX-COOH were 228.56 ng/mL and 25.527 ng/mL, respectively. This antibody had a broad specificity and cross reactivity with multiple fluoroquinolones, and could be used to detect several fluoroquinolone residues.

Key words: ciprofloxacin; spacer arm; derivatives; antibody; detection; enzyme-linked immunosorbent assay

环丙沙星(环丙氟哌酸, Ciprofloxacin, CPLX 或 CIP)是氟喹诺酮类(Fluoroquinolones, FQNS 或 FQS)药物, 属第三代喹诺酮类广谱高效抗菌药, 是预防和治疗畜禽细菌性感染及支原体病的有效药物。但随着其大量的使用, 由环丙沙星在动物源性食品中的残留而引起的不良反应也屡见不鲜, 欧盟、美国、日本和中国等国家和组织均对动物源性食品中环丙沙星残留作了禁用或限量的规定^[1-3], 并建立了多种检测标准, 其中免疫学检测方法因具有快速、经济、灵敏度高和

收稿日期: 2016-04-29

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(13227110D); 河北北方学院重大项目(ZD201403); 河北北方学院创新人才基金项目(CXRC1303)

作者简介: 张明柱(1964-), 男, 教授, 研究方向: 药物化学

高通量检测等优点, 成为环丙沙星残留快速检测技术的研究热点。

抗体是免疫学检测方法的核心, 而抗原是制备抗体的关键因素。环丙沙星分子量331.35, 是小分子半抗原, 不具备免疫原性, 不能刺激机体产生针对抗原决定簇的特异性抗体, 而且不能被固相载体吸附, 所以在制备抗体时必须将其与载体蛋白偶联, 人工合成完全抗原。常见的完全抗原人工合成方法有三种: ①抗原直接与载体蛋白偶联; ②先修饰载体蛋白, 后与抗原偶联; ③先修饰抗原, 后与载体蛋白偶联。一般情况下, 免疫系统对位于载体远端的半抗原部分识别能力最强, 因此, 在小分子药物与载体蛋白之间连接1个有间隔臂, 有利于针对半抗原的特异性抗体的产

生^[4]。间隔臂一般为 3~6 个碳链长度,间隔臂太短,半抗原分子的特征结构就会被大分子载体蛋白掩盖;间隔臂过长,易引起半抗原分子构型发生折叠,使半抗原分子靠近蛋白表面而被屏蔽。

本研究采用最后一种方式进行完全抗原的人工合成,首先对抗原进行修饰,将环丙沙星与 3-溴丙酸($C_3H_5BrO_2$)相结合,得到环丙沙星羧基衍生物 CPLX-COOH,然后利用 N-羟基琥珀酰亚胺活性酯(NHS)法将 CPLX-COOH 分别与牛血清白蛋白第五组份(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联制备免疫抗原(CPLX-COOH-BSA)和包被抗原(CPLX-COOH-OVA),用免疫抗原免疫小鼠获得鼠抗 CPLX-COOH 多克隆抗体,并对其特异性进行测定。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、耗材及实验动物

盐酸环丙沙星对照品(100.0%)、诺氟沙星对照品(99.8%)、甲磺酸达氟沙星对照品(99.7%)、沙拉沙星对照品(99.6%)、盐酸洛美沙星对照品(99.8%)、甲磺酸培氟沙星(99.9%)、恩诺沙星(100.1%)和氧氟沙星(99.0%)购自中国兽医药品监察所;3-溴丙酸(98.0%)、三乙胺和氯甲酸(异)乙丁酯购自上海晶纯生化科技股份有限公司;牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、二甲基甲酰胺(DMF)、乙基[3-(二甲氨基)丙基]碳二亚胺盐酸(EDC·HCL)、邻苯二氨(OPD)和 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),购自 Sigma 公司;辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;注射用青霉素钠购自华北制药股份有限公司;注射用硫酸链霉素购自大连美罗大药厂;注射用氨苄西林钠购自上海公谊兽药厂,羊血清为本实验室自制;其他试剂均为分析纯。

RE-2000E 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂);IR solution 红外光谱仪(日本岛津公司);AVANCE-500 核磁共振仪(瑞士 Bruker 公司);高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);电喷雾电离质谱(美国安捷伦公司);Hitachi(日立)U-3900 紫外可见分光光度计(日立高新技术公司);MULTISKAN MK3 酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

5 周龄 SPF 级 BALB/c 雌性小鼠[SCXK(京)2014-0004]5 只,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 环丙沙星衍生物的制备

称取 167.17 mg 3-溴丙酸溶解于 2.00 mL DMF 中,制得 A 液;将 331.35 mg 环丙沙星溶解于 10.00 mL DMF 中,制得 B 液;将 A 液缓慢滴加到 B 液中,80 °C 搅拌反应 2 h,反应过程中反应液保持 pH 为 8(NaOH 调)。反应完成后,滴加 1.00 mol/L 的盐酸溶液至 pH 为 6,放置析晶,抽滤,干燥,得到环丙沙星衍生物-CPLX-COOH,合成方式见图 1。通过制备液相制得 CPLX-COOH 纯品,用红外光谱扫描仪、ESI-MS 与核磁共振法进行鉴定。液相采用 3.50 μ m, 150.00 mm \times 4.60 mm 的 Sunfire 色谱柱;H₂O 和乙腈为流动相,起始 1~9 min 内乙腈的含量由 5%变到 95%,然后 95% 乙腈分析 5 min,之后 1 min 内乙腈所占比例减少至 5%,流速为 1.00 mL/min,柱温 40 °C。

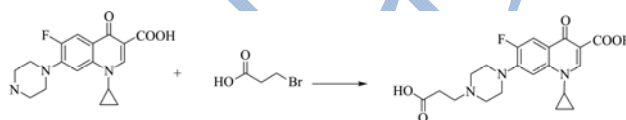


图 1 CPLX-COOH 合成方式

Fig.1 Synthetic route for CPLX-COOH

1.2.2 完全抗原的制备

采用混合酸酐法制备免疫抗原^[5],取 30.00 mg CPLX-COOH 半抗原,溶于 3.00 mL DMF 中,加入三乙胺 30.00 μ L,氯甲酸(异)乙丁酯 60.00 μ L,搅拌,室温反应 24 h,得到 CPLX-COOH 反应液;110.00 mg BSA 溶于 8.00 mL PBS(pH 7.2)液中,得 BSA 液;将 CPLX-COOH 反应液滴加到 BSA 液中,4 °C 反应 24 h,生理盐水 4 °C 透析 72 h,每 6 h 换液一次,离心,收集上清,分装,得到免疫抗原 CPLX-COOH-BSA, -20 °C 冻存。

采用改进的活性酯法制备包被抗原^[6],将 20.00 mg CPLX-COOH, 10.00 mg NHS 和 12.50 mg EDC·HCL 充分溶解于 1.00 mL DMF 中,室温避光搅拌 24 h,得到 CPLX-COOH 反应液;50.00 mg OVA 充分溶解在 3.00 mL PBS(pH 7.4)中得到 OVA 溶液,将 CPLX-COOH 反应液缓慢滴加到 OVA 溶液中,并于室温下搅拌 3 h, PBS 透析 3 d,以除去未反应的小分子物质。离心,收集上清,分装,得到包被抗原 CPLX-COOH-OVA, -20 °C 冻存。

1.2.3 完全抗原的鉴定

将 CPLX-COOH、BSA、OVA 和 2 种偶联物分别用 PBS 按一定比例稀释(偶联产物按蛋白计),以 PBS 为空白对照,参照文献^[5]在 200~400 nm 紫外光区进行扫描,对扫描图谱进行组合,定性证明是否偶联成功。

1.2.4 动物免疫

实验动物饲养于河北北方学院实验动物中心[SYXK(冀)2014-0062],自由饮水和进食。适应性

喂养一周后, 选取 5 只 BALB/c 雌性小鼠分别进行腹腔多点注射免疫, 1.00 mg/kg/次 (以载体蛋白含量计算), 每 14 d 免疫 1 次, 共免疫 5 次。首次免疫使用等量弗氏完全佐剂乳化免疫抗原, 第 2、3 和 4 次均使用等量弗氏不完全佐剂乳化免疫抗原, 第 5 次加强免疫直接注射免疫抗原。从第 3 次免疫开始, 于免疫后 7 d, 取任意 1 只小鼠尾静脉采血, 间接 ELISA 法检测抗体效价。第 5 次免疫后 7 d, 小鼠眼眶采血, 室温静置 1 h, 4 °C 过夜, 离心, 收集上清, 分装, 一部分用于后面试验, 另一部分 -20 °C 冻存备用。

1.2.5 抗体效价的测定

方阵滴定法^[7]分别测定抗体效价, 包被抗原按 8.00、4.00、2.00、1.00、0.50、0.25、0.125 和 0.0625 μg/mL 横向包被酶标板; 抗体从 2000 倍开始依次倍比稀释至 64000 倍, 纵向加入酶标板, 其余同间接 ELISA 方法。根据 OD_{490nm} 值及具体情况确定抗体效价, 并选择 OD 值为 1.00 左右的抗体和包被抗原浓度为最佳工作浓度。

1.2.6 标准曲线的制作

参照文献的方法^[8]并略作改进, 进行间接竞争 ELISA (Ci-ELISA) 测定, 以不同浓度(包括 0 ng/mL) 的抑制率 I 倒数值为纵坐标 (抑制率 $I=B_0/B$, B 为各相应浓度样品抑制时的 OD 值, B₀ 为无抗原抑制时的 OD 值, 即空白对照 OD 值), 以系列稀释的 CPLX-COOH 标准液浓度的对数值为横坐标, 制备标准曲线, 计算回归曲线方程和相关系数^[9]。

1.2.7 抗体特异性鉴定

采用 Ci-ELISA 法测定 CPLX-COOH 抗体与竞争物-CPLX-COOH、环丙沙星、达氟沙星、沙拉沙星、恩诺沙星、二氟沙星、硫酸链霉素、氨苄西林钠及青霉素钠的交叉反应率。以系列稀释的竞争物溶液作为被检抗原, 绘制出各自的标准曲线, 得到每种竞争物的 IC₅₀ 值, 按照下面公式计算出抗体对各种竞争物的交叉反应率。

$$\text{交叉反应率} = \frac{IC_{50} \text{时抗原浓度}}{IC_{50} \text{近似抗原物质的浓度}} \times 100\%$$

1.2.8 数据统计分析

每个数据做三组平行, 取三组数据的平均值用 Excel 2003 作图并进行数据统计分析。

2 结果与讨论

2.1 CPLX-COOH 的鉴定

2.1.1 红外光谱鉴定

图 2 是 CPLX-COOH 的红外光谱, 其中波数 3441

cm⁻¹ 处宽大吸收峰为半抗原中羧基吸收峰; 3082 cm⁻¹ 环丙烷亚甲基伸缩振动吸收峰; 2926 cm⁻¹ 为丙烷基-CH₂ 伸缩震动引起的吸收峰; 1724 cm⁻¹ 强吸收峰为羰基特征峰; 1628 cm⁻¹ 芳香环 C=C 吸收峰; 1269 cm⁻¹ 和 942 cm⁻¹ 为羧基 C-O 和 -OH 面内摇摆引起的吸收峰, 991 cm⁻¹ 为 C-F 吸收峰。其中 3441 cm⁻¹、3082 cm⁻¹、1724 cm⁻¹、1269 cm⁻¹ 和 942 cm⁻¹ 为丙酸相关基团引起的特征吸收, 因此可推断 3-溴丙酸与环丙沙星连接成功。

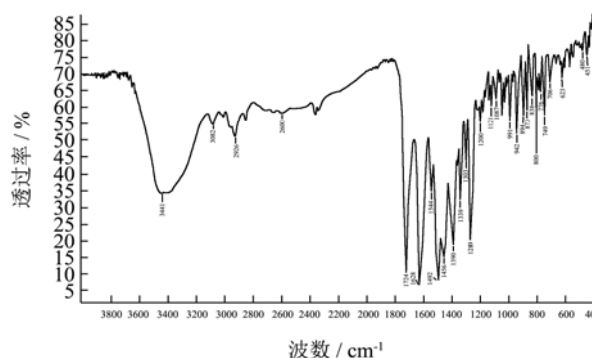


图 2 CPLX-COOH 的红外光谱图

Fig.2 IR spectrum of CPLX-COOH

2.1.2 质谱鉴定

环丙沙星衍生物的 (+) ESI-MS 全扫描质谱 (图 3), 出现 m/z 404 的 [M+1]⁺ 准分子离子峰, 与半抗原分子质量相对应。

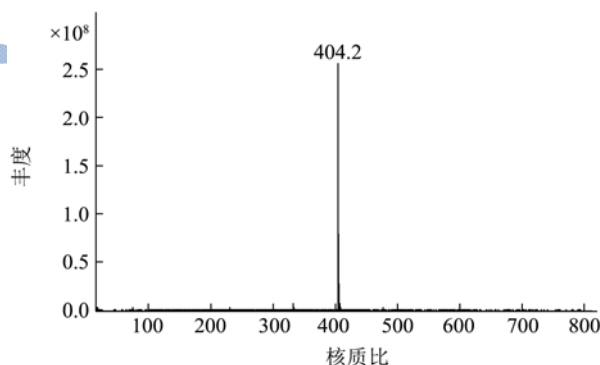


图 3 CPLX-COOH 的 ESI-MS 质谱图

Fig.3 ESI-MS mass spectrum of CPLX-COOH

2.1.3 核磁共振鉴定

图 4 是 CPLX-COOH 的 ¹H-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ 15.19(s, 2H, -OH), 8.63(s, 1H, 2-H), 7.84(d, 1H, J=13.5, 5-H), 7.54(d, 1H, J=7.5 Hz, 8-H), 3.82(m, 1H, 11-H), 3.45(q, 2H, 20-H), 2.66(m, 8H, piperazine), 2.44(q, 2H, 19-H), 1.32(m, 2H, 13-H), 1.18(m, 2H, 12-H)。图 5 是环丙沙星半抗原 ¹³C-NMR: (500 MHz, DMSO-d₆) δ 176.3(C-4), 173.4(C-21), 166.0(C-14), 153.9(C-6), 151.9(C-2), 147.9(C-7), 145.1(C-10), 139.0(C-9), 111.0(C-5),

106.7(C-3), 106.3(C-8), 56.0(C-16, 17), 53.1(C-15, 18), 49.3(C-19), 31.6(C-20), 18.5(C-11) 7.52(C-12, 13)。由氢谱 15.19、3.45 和 2.44 峰与碳谱 173.4、49.3 和 31.6 峰归属与情况可推断环丙沙星成功连接了 3-丙羧基。

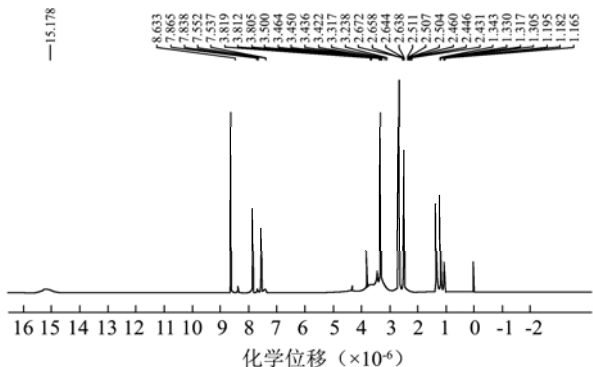


图 4 CPLX-COOH 的¹H-NMR

Fig.4¹H-NMR of CPLX-COOH

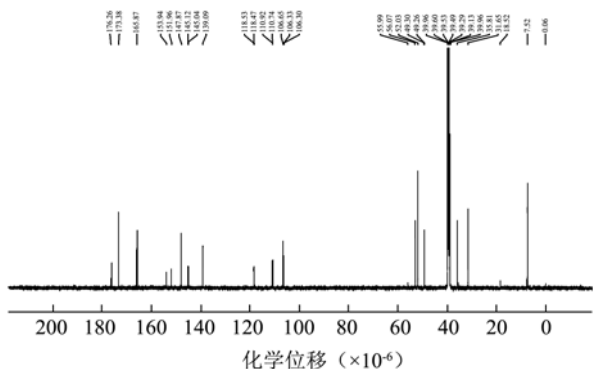


图 5 CPLX-COOH 的¹³C-NMR

Fig.5¹³C-NMR of CPLX-COOH

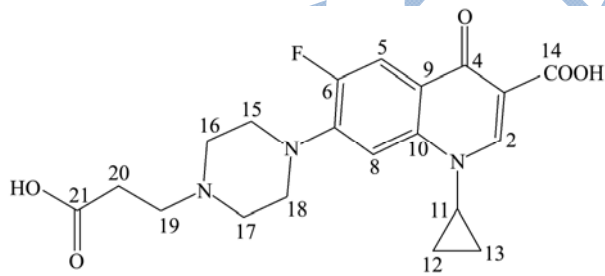


图 6 CPLX-COOH 结构图

Fig.6 Chemical structure of CPLX-COOH

2.2 CPLX-COOH 完全抗原的紫外光谱扫描鉴定结果

由图 7 可知，CPLX-COOH 的最大吸收峰在 271.20 nm 处，BSA 的最大吸收峰在 278.40 nm 处，而免疫抗原 CPLX-COOH-BSA 与它们中任何一方的光谱都不同，其最大吸收峰在 273.80 nm 处。这说明在 BSA 载体蛋白上连接上了目的物小分子 NFLX，证明

偶联成功，可用作动物免疫。

由图 8 可知，CPLX-COOH 的最大吸收峰在 271.20 nm 处，OVA 的最大吸收峰在 279.20 nm 处，而包被抗原 CPLX-COOH-OVA 与它们中任何一方的光谱都不同，其最大吸收峰在 276.40 nm 处。同理可证明偶联成功，可用做包被抗原进行包被。

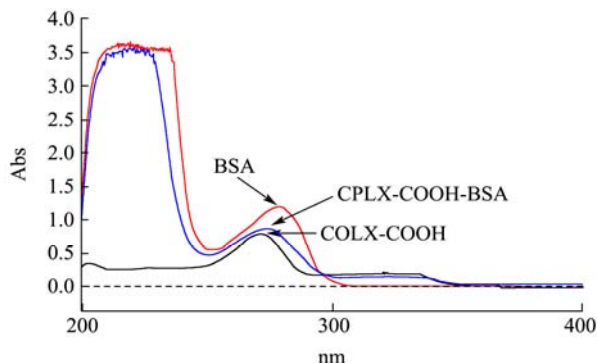


图 7 CPLX-COOH-BSA 的紫外光谱图

Fig.7 Ultraviolet spectrum of CPLX-COOH-BSA

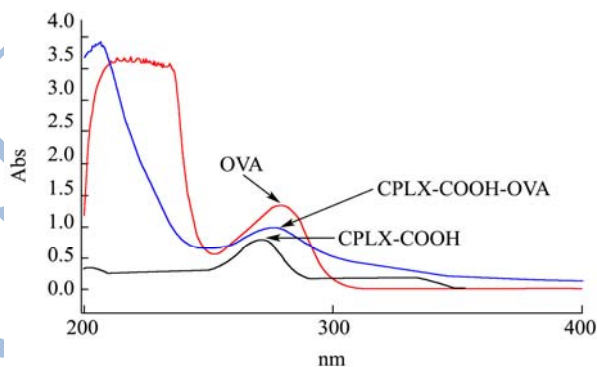


图 8 CPLX-COOH-OVA 的紫外光谱扫描

Fig.8 Ultraviolet spectrum of CPLX-COOH-OVA

2.3 抗体效价的测定结果

第 3 次免疫后 7 d，间接 ELISA 法测定血清中 CPLX-COOH 抗体效价可达 1:32000。第 5 次免疫后 7 d，眼眶采血后测定血清中 CPLX-COOH 抗体效价最高可达 1:64000，抗体最佳工作浓度是 1:16000，包被抗原最佳包被浓度是 0.50 μg/mL。通过间接 ELISA 法测定血清中抗体效价，说明产生了针对抗原的抗体，可继续进行免疫，同样也证明了药物偶联成功。

2.4 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立

酶联免疫测定法的最低检测限为 $I \geq 1.5 \sim 2^{[10]}$ ，本方法的最低检测限取 $I=1.5$ 。CPLX-COOH 间接竞争 ELISA 检测结果见图 9，拟和的线性回归直线方程为 $y = -17.515x + 91.321$ ($R^2=0.9958$)，符合线性关系的判断标准，其中 y 为 %B/B₀ (抑制率 I 倒数)，x 为 CPLX-COOH 浓度对数 $Lg[CPLX-COOH]$ ，半抑制浓度 IC₅₀

为 228.56 ng/mL。由图 9 可见 I=1.5 时对应 Log[CPLX-COOH] 为 1.407, [CPLX-COOH] 为 25.527 ng/mL, 即最低检测限。

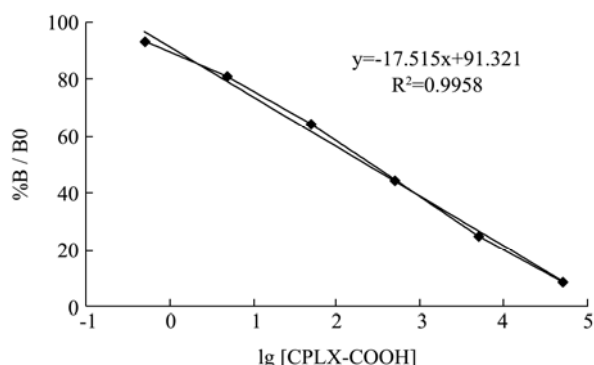


图 9 CPLX-COOH ci-ELISA 测定法的标准曲线

Fig.9 Standard curve for the detection of CPLX-COOH by ci-ELISA

2.5 交叉反应率测定结果

表 1 抗体与 FQNs 的交叉反应率

Table 1 Cross-reactivity of antibody with FQNs

竞争药物	交叉反应率/%
CPLX-COOH	100.00
环丙沙星	97.05
达氟沙星	71.28
恩诺沙星	62.31
沙拉沙星	13.26
二氟沙星	11.14
硫酸链霉素	<0.1
氨苄西林钠	<0.1
青霉素钠	<0.1

以抗体对自身药物的交叉反应率为 100%，该抗体与其它 FQNs 的交叉反应率见表 1，其中 CPLX-COOH 抗体能与多种 FQNs 发生交叉反应，而与硫酸链霉素、氨苄西林钠及青霉素钠没有交叉反应，表明该抗体对同族类药物具有广谱性，对异族药物具有特异性，即具有广谱特异性，为确保该方法的实用性和保证检测效果，可运用该抗体对环丙沙星、达氟沙星和恩诺沙星的残留进行检测。

3 结论

本研究利用环丙沙星与 3-溴丙酸合成环丙沙星的羧基衍生物，制备了一种新的环丙沙星人工抗原，经与载体蛋白偶联，并免疫动物制备抗体，其效价达到 1:64000，建立的检测方法的半抑制浓度 IC₅₀ 为 228.56 ng/mL，理论最低检测限达 25.527 ng/mL，与课题组曾经做过的用环丙沙星直接与载体蛋白偶联^[11]制备

抗体的相关研究比较，效价更高，检测限更低，同时可与多种 FQNs 药物发生交叉反应。根据文献报道，目前国内外均有利用环丙沙星抗体进行多元检测技术的研究^[12-14]，本研究的结果显示，经过改造的人工抗原所制备的 CPLX-COOH 抗体，具有广谱特异性，可对多种氟喹诺酮类药物残留进行检测，这也为多元检测技术的研究提供了一个新的思路。

参考文献

- [1] Regulation (EC) No 470/2009, The european parliament and of the council [S]
- [2] CAC/MRL 02-2008, Maximum residue limits for veterinary drugs in foods. The 31st session of the codex alimentarius commission [S]
- [3] 中华人民共和国农业部公告第 235 号,动物性食品中兽药最高残留限量[S] Bulletin of Ministry of Agriculture, P.R. China. No.235. Veterinary drug maximum residue limits in the food of animal origin [S]
- [4] Jeanette M Van Emon, Ralph O Mumma. Immunochemical methods for environmental analysis [M]. Washington, D C: American Chemical Society, 1990
- [5] Zhan-hui Wang, Yan Zhu, Shuang-yang Ding, et al. Development of a monoclonal antibody-based broad-specificity ELISA for fluoroquinolone antibiotics in foods and molecular modeling studies of cross-reactive compounds [J]. Anal. Chem., 2007, 79(12): 4471-4483
- [6] Jiu-hua Duan, Zong-hui Yuan. Development of an indirect competitive ELISA for ciprofloxacin residues in food animal edible tissues [J]. J. Agric. Food Chem., 2001, 49(3): 1087-1089
- [7] WANG Lei, ZHANG Li-jie, LV Wei, et al. Determination of organophosphorus pesticides based on biotin-avidin enzyme-linked immunosorbent assay [J]. Chin. J. Anal. Chem., 2011, 39(3): 346-350
- [8] Xiao Liang, Heng-jia Ni, Ross C, et al. Highly broad-specific and sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening sulfonamides: assay optimization and application to milk samples [J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(10): 1992-2002
- [9] Yan-ling Li, Feng-chun Zhao, Long-yu Zhao, et al. Development of a broad-specificity immunoassay for determination of organophosphorus pesticides using dual-generic hapten antigens [J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(2): 420-427

- [10] 刘智宏,陈慧珠,赵轶先,等.鸡血清中磺胺二甲嘧啶残留的酶免疫法测定[J].中国兽医学报,1998,18(4):375-377
LIU Zhi-hong, CHEN Hui-zhu, ZHAO Yi-xian, et al. Enzyme immunoassay for measuring sulfamethazine in chicken serum [J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 1998, 18(4): 375-377
- [11] 魏东,李颖,郭昌明,等.氟喹诺酮类药物间接竞争 ELISA 检测方法的建立[J].吉林农业大学学报,2009,31(1):97-101
WEI Dong, LI Ying, GUO Chang-ming, et al. Development of ci-ELISA for detecting fluoroquinolones [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2009, 31(1): 97-101
- [12] Pinacho D G, Sanchez-Baeza F, Marco M P. Molecular modeling assisted hapten design to produce broad selectivity antibodies for fluoroquinolone antibiotics [J]. Anal. Chem., 2012, 84(10): 4527-4534
- [13] Steven Suryoprabowo, Li-qiang Liu, Juan Peng, et al. Development of a broad specific monoclonal antibody for fluoroquinolone analysis [J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(10): 2163-2168
- [14] Lei Zhang, Jin-qing Jiang, Guang-ling Li, et al. Development and optimization of a monoclonal Antibody-based indirect competitive ELISA for detecting fluoroquinolone residue in milk [J]. Journal of Food, Agriculture & Environment, 2011, 9(2): 113-120