

去甲氯胺酮半抗原及其全抗原的合成与鉴定

杨婷婷¹ 赵春城¹ 沈笑平² 谈伯昌² 邹盘坤² 王怀明³ 刘凌云⁴
韦超⁵ 魏万里² 何金海² 吴杰¹ 张东升¹ 赵晓联^{*1}

¹(江苏省苏微微生物研究有限公司, 无锡 214063) ²(无锡市公安局, 无锡 214002)

³(镇江市公安局, 镇江 212001) ⁴(江阴市公安局, 江阴 214400)

⁵(盐城市公安局, 盐城 224001)

摘要 在低温条件下, 去甲氯胺酮与琥珀醛酸反应, 合成了半抗原羧基-去甲氯胺酮, 电喷雾质谱鉴定结果表明, 目标半抗原合成成功; 通过碳二亚胺法将半抗原与载体蛋白偶联制备人工抗原, 红外光谱法鉴定结果表明, 人工抗原合成成功, 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱鉴定表明去甲氯胺酮半抗原与牛血清白蛋白的偶联比为 11:1。经动物免疫, 获得高效价特异性多克隆抗体, 抗血清效价可达 5.12×10^4 。

关键词 去甲氯胺酮; 半抗原; 人工抗原; 合成; 鉴定

1 引言

氯胺酮(Ketamine, KET)是一种通过静脉给药的短效麻醉剂, 其进入血循环后大部分进入脑组织, 然后再分布于全身组织中, 肝、肺和脂肪内的药物浓度也较高。由于KET是毒品“K粉”的主要成分, 近年来, 其非法滥用现象严重。由于KET代谢的半衰期较短, 摄入体内后, 代谢生成去甲基氯胺酮(Norketamine, NKET)、去氢去甲基氯胺酮(Dehydronorketamine, DHNK), 因此在生物检材(如血液、尿液、毛发等)中代谢物的含量比较高^[1, 2], 作为检测指标, KET代谢物(主要是NKET)的检测比KET的检测更加重要, 而且对嫌疑人是否吸食KET的确认更加有效。目前, 检测KET及其代谢物的分析方法主要有: 气相色谱法(GC)、气-质联用法(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)、液-质联用法(LC-MS)、高效毛细管电泳法(HPCE)酶联免疫吸附法(ELISA)等^[3~11]。由于常规仪器分析不适于批量样品的筛选检测, 关于NKET的免疫分析技术国内迄今尚未见相关报道。本文设计合成了NKET的半抗原, 并与牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联得到人工抗原, 经免疫新西兰大白兔后, 获得高效价的特异性多克隆抗体, 为建立NKET的免疫学检测方法提供了强有力的技术支持。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

Spectronic 1.70 紫外可见光分光光度计(意大利 GBC 公司); Nexus 670 型傅立叶变换红外光谱仪(Nicolet 公司); Voyager DE STR 基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(美国应用生物系统公司); MK3 酶标仪(雷勃公司)。去甲氯胺酮标准品(英国 Tocris 公司); 牛血清白蛋白(BSA, Sigma 公司)、卵清蛋白(OVA, Sigma 公司); 弗氏完全、不完全佐剂(北京生物制品研究所); 四甲基联苯胺(TMB)、羊抗兔 IgG(北京博奥森有限公司); 其他试剂均为分析纯。

2.2 实验方法

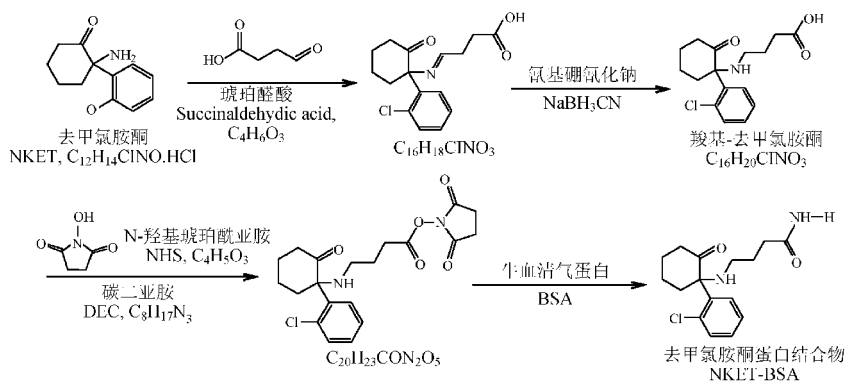
2.2.1 半抗原合成 取 10 mg NKET、3 mg 氰基硼氢化钠(NaBH_3CN)或 40 μL 15% 琥珀醛酸溶液, 分别加入 6, 1 和 1 mL 混合溶剂(四氢呋喃-吡啶为 5:1, V/V)至完全溶解, 于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱放置备用; 将琥珀醛酸溶液逐滴加入到 NKET 溶液中, 4 $^\circ\text{C}$ 下磁力搅拌, 反应 5 min; 再逐滴加入 NaBH_3CN 溶液, 将反应混合物在 4 $^\circ\text{C}$ 下磁力搅拌 2~3 h, 直至反应完全后, 将反应物低温(40 $^\circ\text{C}$)旋转蒸发至干, 所得产物即为 NKET 半抗原(羧基-NKET)。

2009-07-02 收稿; 2009-09-08 接受

本文系江苏省社会发展项目(No. BS2007022)资助

* E-mail: zhaoXLI18@263.net

2.2.2 人工抗原的合成 取上述 NKET 半抗原 13.8 mg 溶于 1 mL *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF) 溶液中, 滴加 50 mg 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC 溶于 0.5 mL H₂O) 搅拌反应 20 min 后 将该反应液滴加至 20 mg BSA(溶于 10 mL H₂O 中) 立即加入 52 mg *N*-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS) 室温下搅拌过夜。PBS 透析 48 h 冷冻干燥。包被抗原(NKET-OVA) 的合成方法同上。合成路线见图解 1。



图解 1 去甲氯胺酮人工抗原合成路线

Scheme 1 Reaction scheme of synthesis for norketamine (NKET) antigen

2.2.3 半抗原和人工抗原的结构鉴定 所得的 NKET 半抗原和免疫抗原(NKET-BSA) 的分子结构鉴定分别采用质谱法(MS-ESI)和红外光谱法(IR) 确证。

2.2.4 抗体制备及效价测定 以偶联物 NKET-BSA 为免疫抗原免疫雄性新西兰大白兔, 1 mg/kg 体重。基础免疫采用背部皮下多点注射, 加强免疫采用四肢内部肌肉注射, 间接酶联免疫吸附法(iELISA) 测定效价合格后, 颈动脉放血, 分离抗血清, 采用饱和硫酸铵沉淀法^[7] 纯化抗体, 制成冻干粉, 于 -20℃ 保存。采用 ELISA 法测定纯化抗体的效价。

3 结果与讨论

3.1 半抗原分子结构的鉴定

经 LC-MS 法(如图 1) 分析得出, LC 图谱中 8.71 min 对应的峰是过剩的反应物, 而 9.45 min 对应的峰经 MS 法分析结果可知, 分子离子峰 m/z 312 ($[310 + 2H]^+$), 分子离子峰 m/z 308 ($[310 - 2H]^-$), 因此, 质谱分析结果初步说明反应产物为目标化合物, 即 NKET 半抗原。

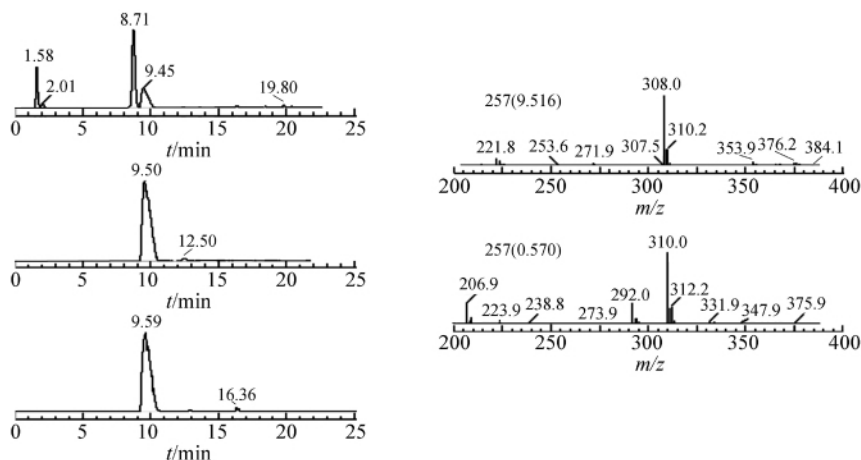


图 1 NKET 半抗原的 HPLC-MS 图谱

Fig. 1 HPLC-MS spectrum of NKET hapten

3.2 人工抗原 NKET-BSA 结构鉴定

采用固体 KBr 压片, 对 NKET-BSA 冻干粉、BSA 和 NKET 进行 IR 测定。如图 2 所示。通过比较 BSA 和 NKET-BSA 的红外吸收光谱发现, 在 2800 ~ 3400 cm⁻¹ 区域以及 1500 ~ 1700 cm⁻¹ 区域具有相似

的吸收,此为蛋白质中氨基酸的特征吸收,说明合成的 NKET-BSA 化合物具有 BSA 的特征官能团。将 NKET-BSA 与 NKET 的红外光谱进行比较,在 $600 \sim 1200 \text{ cm}^{-1}$ 之间,出现了明显的 NKET 半抗原特征峰,而 BSA 在此处无明显吸收,说明 NKET-BSA 具有 NKET 的特征官能团,基本判断 NKET-BSA 人工免疫原已经合成成功。

3.3 人工抗原偶联比的测定

将所得免疫抗原(NKET-BSA)通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行偶联比的测定得测定偶联物分子量约为 68685 Da,计算得 1 分子 BSA 约与 11 分子 NKET 半抗原偶联,即 NKET 半抗原与 BSA 的偶联比为 11:1。

3.4 抗体效价

根据方阵滴定原理,采用间接 ELISA 法测定抗 NKET 抗体的效价。当包被抗原浓度为 2.0 mg/L 时,抗血清效价可达 5.12×10^4 。

本研究选择从氨基部位进行衍生化,以琥珀醛酸作为衍生剂,以混合溶剂(四氢呋喃-吡啶, 5:1, V/V)作为反应溶剂,低温反应得到产物。研究表明,本方法是一种新的 NKET 半抗原合成方法,能够满足实验室少量合成半抗原的需要。人工抗原 NKET-BSA 的合成,采用碳二亚胺法,经两步反应得到偶联物,并通过 IR 和 MALDI-TOF-MS 进行了鉴定。经动物免疫获得抗 NKET 的多克隆抗体,当包被抗原浓度为 2.0 mg/L 时,抗血清效价可达 5.12×10^4 。

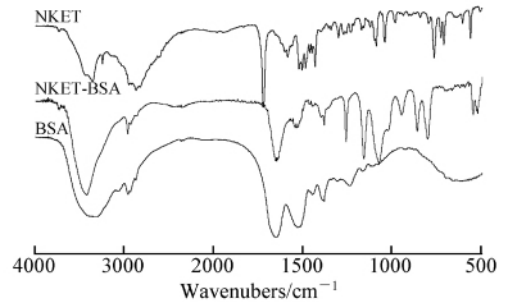


图2 NKET, NKET-BSA 及 BSA 的 IR 图谱

Fig.2 IR spectra of NKET, NKET-BSA and BSA

References

- LIU Xiao-Xing(刘小兴), XIONG Yong-Hua(熊勇华). *China Public Health(中国公共卫生)*, **2007**, 23(5): 629 ~ 631
- White P F, Way W L, Trevor A J. *Anesthesiology.*, **1982**, 56(2): 119 ~ 136
- JIANG Zhao-Lin(姜兆林), PAN Jun-Chang(潘俊昌), YAO Li-Juan(姚丽娟), ZHAO Yan-Jun(赵彦军). *Journal of Jiangxi Public Security College(江西公安专科学校学报)*, **2003**, (2): 74 ~ 75
- LUO Fang(罗芳), LIU Ying(刘颖). *Forensic Science and Technology(刑事技术)*, **2007**, (1): 19 ~ 21
- CHEN Li-Li(陈礼莉), LIAO Lin-Chuan(廖林川), LI Wen-Jia(李雯佳), HUANG Lu-Yao(黄璐瑶), YAN You-Yi(颜有仪), YANG Lin(杨林), MA Xiao-Na(马晓娜), HE Rong(何荣). *Journal of Forensic Medicine(法医学杂志)*, **2008**, 24(1): 38 ~ 42
- SHEN Xiao-Ping(沈笑平), HE Jin-Mei(何金梅), DOU Li(窦莉). *Chin. J. Pharm. Anal. (药物分析杂志)*, **2006**, 26(8): 1074 ~ 1076
- Seay S S, Aucoin D P, Tyczkowska K L. *J. Chromatogr. B*, **1993**, 620(3): 281 ~ 287
- YAO Li-Juan(姚丽娟), WANG Lang(王郎), MENG Pin-Jia(孟品佳), WANG Jing-Han(王景翰). *Journal of the People's Public Security University(Natural Science Edition)(中国人民公安大学学报:自然科学版)*, **2005**, 11(1): 1 ~ 3
- WANG Ting-Hua(王廷华), LI Guan-Cheng(李官成), ZHOU Xin-Fu. *Antibody Theory and Technology(抗体理论与技术)*. Beijing(北京): Science Press(科学出版社), **2005**: 315 ~ 316
- Svensson J O, Gustafsson L L. *J. Chromatogr. B*, **1996**, 678(4): 373 ~ 376
- Feng N, Vollenweider F X, Minder E I, Rentsch K, Grampp T, Vonderschmitt D J. *Ther Drug Monit.*, **1995**, 17(1): 95 ~ 100

Synthesis and Identification of Hapten and Complete Antigen of Norketa mine

YANG Ting-Ting¹, ZHAO Chun-Cheng¹, SHEN Xiao-Ping², TAN Bo-Chang², ZOU Pan-Kun², WANG Huai-Ming³,
LIU Ling-Yun⁴, WEI Chao⁵, WEI Wan-Li², HE Jin-Hai², WU Jie¹, ZHANG Dong-Sheng¹, ZHAO Xiao-Lian^{*1}

¹ (Jiangsu SUWEI Microbiology Research Co., LTD., Wuxi 214063)

² (Wuxi Municipal Public Security Bureau, Wuxi 214002)

³ (Zhenjiang Municipal public Security Bureau, Zhenjiang 212001)

⁴ (Jiangyin Municipal public Security Bureau, Jiangyin 214405)

⁵ (Yancheng Municipal public Security Bureau, Yancheng 224001)

Abstract Under low temperature conditions, the hapten carboxyl-norketamine was synthesized by reacting norketamine and succinaldehyde acid. Identification result using electrospray ionization mass showed the hapten was successfully synthesized. The artificial antigen confirmed by infrared spectroscopy was developed by conjugating hapten to carrier proteins with carbodiimide (EDC) method. Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) showed that the ratio of hapten to BSA was 11:1. The antibody with high titer (5.12×10^4) was produced after immunizing to rabbits.

Keywords Norketamine; Hapten; Artificial antigen; Identification

(Received 20 July 2009; accepted 8 September 2009)

《分析化学》(2010年)

邮发代号 12-6 本刊承办广告业务

《分析化学》(ISSN 0253-3820, CODEN FHHHDT, CN 22-1125/O6) 是中国科学院和中国化学会共同主办的专业学术期刊, 主要报道我国分析化学创新性研究成果, 反映国内外分析化学学科前沿和进展。刊物设有研究快报、特约来稿、研究报告、研究简报、评述与进展、仪器装置与实验技术、来稿摘登等栏目。读者对象为从事分析化学研究和测试的科技人员及大专院校师生。本刊也是有关图书、情报等部门必不可少的信息来源。

《分析化学》目前是我国自然科学核心期刊及全国优秀科技期刊, 1999年荣获首届国家期刊奖, 2000年获中国科学院优秀期刊特别奖, 2001年入选“中国期刊方阵”高知名度、高学术水平的“双高”期刊, 2002年又荣获第二届全国期刊奖和第三届中国科协优秀科技期刊奖。论文已被包括美、英、日、俄的国内外30余种刊物和检索系统收录。根据中国科技信息研究所2009年发布的“中国科技期刊引证报告”获悉, 本刊影响因子居中国科技期刊化学类第二, 本刊连续多年被选入美国权威文摘《化学文摘》(CA) 摘引量最大的1000种期刊(简称“CA千种表”)中, 并居我国入选“CA千种表”期刊的前列。从1999年第27卷第1期开始被美国科学信息研究所(Institute for Scientific Information)正式收入《科学引文索引扩大版》(Science Citation Index Expanded, SCIE, also known as SciSearch), 同时还被收入《Research Alert》和《Chemistry Citation Index》等ISI系列。2008年SCI影响因子为0.633。

本刊为月刊, 160页(大16开), 由科学出版社出版。国内单价15.00元, 全年180.00元。邮发代号12-6, 全国各地邮局订阅, 国外代号M336, 中国国际书店订购, 漏订读者, 可与编辑部联系。

编辑部地址: 长春市人民大街5625号 邮政编码: 130022

电话: (0431) 85262017/85262018 传真: (0431) 85262018

E-mail: fxhx@ciac.jl.cn 网址: http://www.analchem.cn

广告代理: 北京行胜言广告有限公司 电话: 010-51289220 52086537 广告经营许可证号: 第2200004000094号