

氯氰菊酯手性拆分及其抗体立体选择性研究

陈秀金^{1,2}, 匡华¹, 刘丽强¹, 胥传来^{*1}

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 河南科技大学 食品与生物工程学院, 河南 洛阳 471023)

摘要: 以 HP-silica 柱和 Sino-Chiral OD 手性柱为固定相, 通过紫外检测器检测, 采用 Waters 484 型液相色谱仪对氯氰菊酯进行手性拆分和单体制备; 并根据 Sino-Chiral OD 手性柱的分离结果和文献, 对氯氰菊酯异构体进行构型鉴定; 最后, 研究了抗氯氰菊酯单克隆抗体对其 8 个异构体的抑制效果。研究表明: 抗氯氰菊酯单克隆抗体仅对氯氰菊酯的 2 个异构体 (CP₁, 1R-cis-αR 和 CP₂, 1R-cis-αS) 有抑制作用; 抗体对 CP₁ 的灵敏度比对 CP₂ 要高得多, 对高杀虫活性 CP₂ 异构体的半数抑制浓度为 23.62 ng/mL, 为将来高活性氯氰菊酯异构体的免疫检测提供了依据。

关键词: 氯氰菊酯; 手性拆分; 单克隆抗体; 立体选择性

中图分类号: TQ 453.299 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2013)12—1287—06

Separation of Cypermethrin and Stereoselectivity of Antibodies to Cypermethrin Isomers

CHEN Xiu-jin^{1,2}, KUANG Hua¹, LIU Li-qiang¹, XU Chuan-lai^{*1}

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Food and Biological Engineering Institute, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471023, China)

Abstract: With the developing of chromatographic separation, it is inevitable that cypermethrin isomers with high insecticidal activities would be prepared. In this work, HP-silica column and Sino-Chiral OD column were chosen as the stationary phase and examined using the ultraviolet detector to separation and isomer's preparation of cypermethrin by the liquid performance spectrometer of Waters 484. Then, the configurations of cypermethrin isomers were identified according to the separation results by Sino-Chiral OD column and the reported studies. Finally, the inhibition effect of monoclonal antibodies to cypermethrin isomers was performed. The results demonstrated that only two of eight cypermethrin isomers, CP₁ (1R-cis-R) and CP₂ (1R-cis-S), were recognized by the antibodies, and CP₁ was more sensitivity than CP₂. Fifty percent inhibition concentration of CP₂ with high insecticidal activities was 23.62 ng/mL. This results indicated that immunological technology for the determination of CP₂ isomer could be established in the future.

Keywords: cypermethrin, chiral separation, monoclonal antibody, stereoselectivity

收稿日期: 2013-07-05

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目(2012BAC01B07, 2012BAD29B04); 国家 863 计划项目(2012AA06A303)。

作者简介: 陈秀金(1977—), 女, 河南洛阳人, 工学博士, 讲师, 主要从事手性农药分离及免疫检测方面研究。

E-mail: chenxiujin9610@126.com

* 通信作者: 胥传来(1965—), 男, 江苏盐城人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事食品安全检测研究。E-mail: xcl688@163.com

手性(chirality)是三维物体的基本属性,指一个物体不能和其镜中的影像相重合,彼此互为实物和镜像的关系。一对互成镜像的化合物被称为对映体^[1],它们具有基本相同的物理、化学性质和相反的光学活性。氯氰菊酯(结构见图1)含有3个手性中心,存在8个对映异构体,不同异构体表现出的生物活性和毒性差异显著,如氯氰菊酯构型(1R-cis- α S)表现出杀虫活性最高;氯氰菊酯构型(1R-tran- α S)也有一定活性,而其它6个立体异构体则几乎无活性^[2]。研究表明,使用氯氰菊酯单体作为杀虫剂,不仅可以大大地提高其杀虫活性,而且能够减少对非目标生物的毒害和对环境的不利影响。因此,研制高活性氯氰菊酯异构体具有重要的理论和实际应用价值。

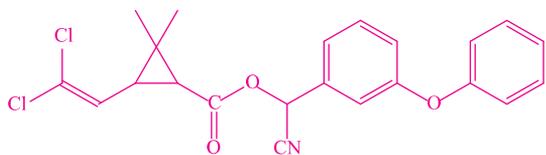


图1 氯氰菊酯的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of cypermethrin

目前,已有不少关于氯氰菊酯和高效氯氰菊酯手性拆分和制备的报道,单体拆分方法包括高效液相色谱法^[3-7]、气相色谱法^[2,8-10]、毛细管电泳萃取法^[11]和超临界流体萃取法^[12-13]。其中高效液相色谱法(HPLC)和超临界流体萃取法不仅可以用于除虫菊酯高活性异构体的分析,而且可以用于异构体的制备。然而,对于含有8个异构体的氯氰菊酯,超临界流体萃取法往往需要3次甚至3次以上的拆分,操作更繁琐。此外,关于氯氰菊酯8个异构体完全分离的报道并不多。因此,作者采用HP硅胶柱和Sino-Chiral OD柱的HPLC对氯氰菊酯进行手性拆分和单体制备;根据参考文献[14]并结合Sino-Chiral OD手性柱的拆分结果,对每个异构体的构型进行鉴定;在此基础上,研究了氯氰菊酯单克隆抗体对其异构体的立体选择性,对于建立高活性氯氰菊酯异构体的免疫检测技术具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与材料

氯氰菊酯标准品(纯度>97%),衡水鼎尚商贸有限公司提供;正己烷、异丙醇、甲醇,美国Fisher公

司色谱纯产品;氯氰菊酯单克隆抗体(IC₅₀:3.86 ng/mL),由作者所在实验室制备;辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠Ig(HRP-Ig G),康成生物工程公司产品;碳酸钠、碳酸氢钠、明胶、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾、Tween20、双氧水、四甲基联苯胺(TMB),阿拉丁试剂有限公司分析纯试剂。

HP-silica柱(5 μ m, 10.0 mm \times 250 mm), Sino-Chiral OD柱(5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm),购自赛分科技有限公司。

1.2 主要仪器

Waters 484型液相色谱仪,美国Waters公司制造;真空冷冻干燥机,美国Virtis公司制造;RE-52AA旋转蒸发器,上海亚荣生化仪器厂制造;梅特勒-托利多分析电子天平,上海仪器有限公司制造;Milli-Q Integral Cabinet 3型超纯水制备仪,美国Millipore公司制造;MKs型酶标仪,美国Bio Tek公司制造;SP-250A生化培养箱,南京实验仪器厂制造;XW-80A旋涡混合器,上海精科实业有限公司制造;八道可调移液器,美国Eppendorf公司制造。

1.3 试验方法

1.3.1 氯氰菊酯异构体的拆分 称取氯氰菊酯标准品100.0 mg,溶解于10 mL流动相(正己烷/氯仿/乙醚体积比=200:1:6)中,质量浓度为10 mg/mL,经0.45 μ m滤膜过滤后即得到样品溶液。样品上样量为50 μ L;以正己烷/氯仿/乙醚(体积比200:1:6)为流动相,通过HP-silica柱进行分离;体积流量4.7 mL/min;柱温26 $^{\circ}$ C;柱压570 psi (Pounds per square inch,磅/平方英寸);紫外检测仪波长280 nm。经HP-silica柱分离和每个组分脱溶剂浓缩后,上样量50 μ L,以正己烷/异丙醇(体积比99.7:0.3)为流动相,通过Sino-Chiral OD半制备柱进行再次拆分和制备。在柱温26 $^{\circ}$ C下,体积流量0.5 mL/min;柱压300 psi;紫外检测器波长230 nm。

1.3.2 氯氰菊酯异构体的鉴定 手性化合物单体构型的鉴定方法主要有2种:一是在相同的色谱条件下标准品和样品异构体的色谱图,对异构体构型进行鉴定;二是根据参考文献中的色谱条件和色谱图,鉴定异构体的构型。本试验选择了第二种方法进行氯氰菊酯单体构型鉴定。按照1.3.1的色谱条件,样品溶液质量浓度10.0 mg/mL;上样量5 μ L,通过Sino-Chiral OD柱分离得到相应的色谱图,结合参考文献[14],则可判断氯氰菊酯异构体构型。

1.3.3 单克隆抗体立体选择性

1) 氯氰菊酯异构体标准品贮备液的配制: 每个异构体称取 5.0 mg 左右, 加入 5.0 mL 正己烷, 振荡, 充分溶解后得到质量浓度为 1 mg/mL 的标准品溶液; 然后用正己烷将其质量浓度稀释到 100 $\mu\text{g/mL}$; 因为光学异构体对光和温度不稳定, 要求样品密封, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 避光保存, 备用。

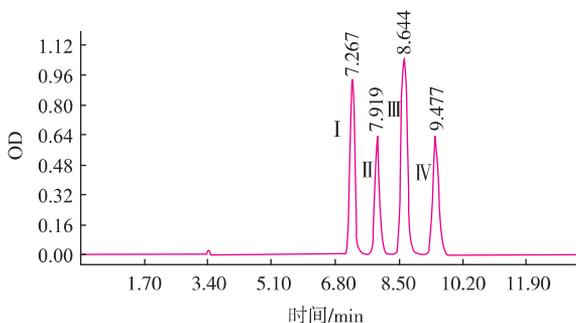
2) 氯氰菊酯异构体标准溶液的配制: 从 100 $\mu\text{g/mL}$ 的氯氰菊酯异构体贮备液中量取 30 μL , 用氮气吹干后, 加入 0.6 mL 的甲醇, 振荡, 充分溶解后, 再加入 2.4 mL 的 pH 7.2 浓度 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲溶液, 配制成 1 $\mu\text{g/mL}$ 的氯氰菊酯异构体标准溶液; 为了减少溶剂异构化的影响, 要求该溶液现用现配。

3) 试验采用的 ic-ELISA 方法: 测定抗氯氰菊酯单克隆抗体对其 8 个异构体的抑制作用, ELISA 法的具体操作过程见参考文献[15]。

2 结果与分析

2.1 氯氰菊酯非对映体的分离结果

氯氰菊酯标准品溶液按照 1.3.1 的色谱条件, 以 HP-silica 柱为固定相的分离结果见图 2。



注: OD 指流出液通过 280 nm 紫外检测器时的吸光值。

图 2 氯氰菊酯非对映体在 HP-silica 柱上的分离结果

Fig. 2 Separation of the diastereomers of cypermethrin by a HP-Silica column

由图 2 可见, 氯氰菊酯溶液通过 HP-silica 柱后被完全分成了 4 对对映体, 按照流出顺序分别被定义为组分 I、组分 II、组分 III、组分 IV; 经计算, 各组分的峰面积分数分别为 25.05%、17.28%、35.52% 和 22.14%。由此可见, 组分 III 占氯氰菊酯总量的比例最高。每个组分减压旋蒸脱溶后, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 密封保存。

2.2 氯氰菊酯对映体的分离结果

氯氰菊酯的每个组分 (每对对映体) 在 Sino-Chiral OD 手性色谱柱中的分离结果见图 3。

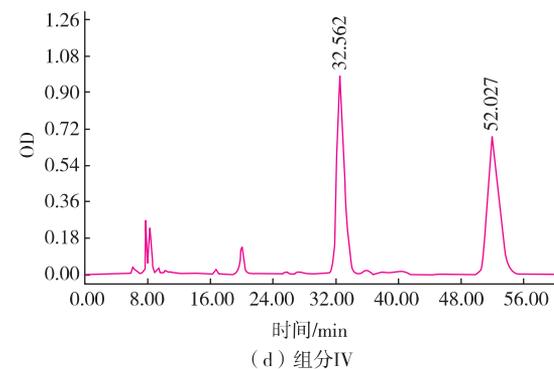
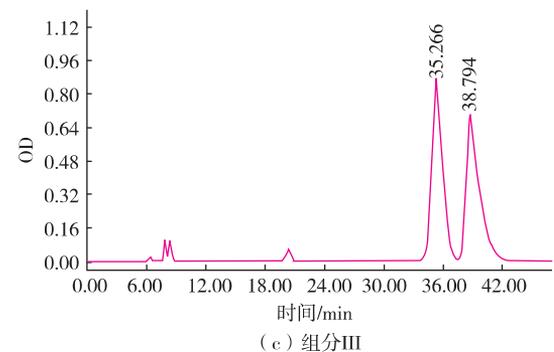
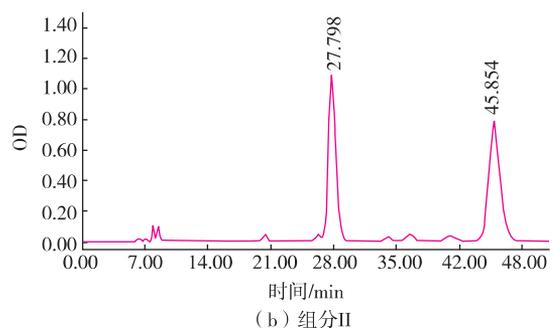
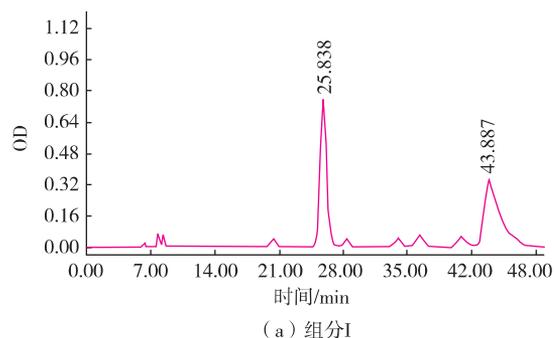


图 3 氯氰菊酯对映体在 Sino-Chiral OD 手性柱上的拆分
Fig. 3 Separation of the enantiomers of cypermethrin using Sino-Chiral OD

由图 3 可得, 在优化后的色谱条件下, 氯氰菊

酯对映体通过 Sino-Chiral OD 手性柱达到了基线分离,得到了高光学纯的 8 个异构体。组分 I 经 Sino-Chiral OD 柱分离后,得到 2 个异构体的峰面积分数分别为 48.38%和 51.62%;组分 分离后得到 2 个异构体的峰面积分数分别为 47.91%和 52.09%;组分 分离后得到 2 个异构体的峰面积分数分别为 49.32%和 50.68%;组分 分离后得到 2 个异构体的峰面积分数分别为 32.56%和 52.03%。由此可见,组分 中杂质含量较高(大于 10%),并且 2 个异构体的比例差异较大;其他 3 个组分中的纯度均达到了 99%以上,并且 2 个异构体所占比例非常接近。此外,在制备氯氰菊酯异构体的过程中,组分 III 不容易完全分离,不过降低流动相流速,也达到了完全分离。分别收集 Sino-Chiral OD 半制备柱中流出的 8 个流分,低温浓缩干燥至恒重,置于棕色瓶中,做好标记,密封,-20 °C 保存。

2.3 氯氰菊酯异构体构型的鉴定

2.3.1 氯氰菊酯在 Sino-Chiral OD 手性色谱柱中的分离结果 试验中氯氰菊酯(cypermethrin, CP)溶液配制方法和色谱条件见 1.3.1,氯氰菊酯的上样量为 5 μL,通过 Sino-Chiral OD 手性色谱柱的分离结果见图 4。由图 4 可得,氯氰菊酯溶液通过 Sino-Chiral OD 手性柱被分成了 8 个峰,对应 CP 的 8 个异构体,每个异构体对应一个保留时间,所以根据图 4 进行氯氰菊酯异构体的构型鉴定。按照异构体的流出顺序被分别命名为 CP₁、CP₂、CP₃、CP₄、CP₅、CP₆、CP₇、CP₈。不过图 4 中只有 4 个峰达到了基线分离,而 CP₃、CP₄、CP₆、CP₇ 仅得到了部分分离。因此认为,仅采用 Sino-Chiral OD 手性柱为固定相很难实现氯氰菊酯 8 个异构体的完全分离。

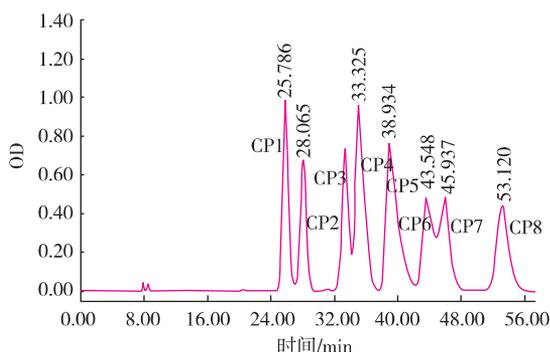


图 4 氯氰菊酯的对映体在 Sino-Chiral OD 手性柱上的拆分结果

Fig. 4 Separation of the enantiomers from cypermethrin using Sino-Chiral OD

2.3.2 氯氰菊酯异构体的构型鉴定和纯度测定 将图 4 和图 3 中每个异构体的保留时间进行对比,结合参考文献[14],得出每个异构体的构型,结果见表 1。

表 1 CP 单体构型的鉴定

Table 1 Configuration identification of CP isomers

CP 对映体	峰数	保留时间/min	构型	出峰顺序 Sino-Chiral OD
I	1	25.84	1R 3R αR	1
	2	43.87	1S 3S αS	6
II	1	27.8	1R 3R αS	2
	2	45.86	1S 3S αR	7
III	1	35.28	1R 3S αR	4
	2	38.79	1S 3R αS	5
IV	1	32.56	1S 3R αR	3
	2	52.03	1R 3S αS	8

此外,采用 Sino-Chiral OD 手性柱对每个单体纯度进行分析,均达到了 97% 以上,可以用做标准品。

2.4 单克隆抗体(mAb)的立体选择性

Ic-ELISA 方法中,包被原质量浓度 0.05 μg/mL, mAb 的质量浓度 0.06 μg/mL,测定 mAb 对氯氰菊酯 8 个异构体的抑制,结果见表 2。

表 2 mAb 对氯氰菊酯异构体的抑制测定结果

Table 2 Inhibition results of a monoclonal antibody to cypermethrin isomers

菊酯名称	单体	构型	IC ₅₀ /(ng/mL)
氯氰菊酯(CP)	CP ₁	1R, 3R, αR	1.05
	CP ₂	1R, 3R, αS	23.26
	CP ₃	1S, 3R, αR	-
	CP ₄	1R, 3S, αR	-
	CP ₅	1S, 3R, αS	-
	CP ₆	1S, 3S, αS	-
	CP ₇	1S, 3S, αR	-
	CP ₈	1R, 3S, αS	-

注“-”代表 IC₅₀ 值大于 1 000 ng/mL。

由表 2 可以看出, mAb 仅识别氯氰菊酯的 8 种单体中的 2 种, 单体 1 (CP₁ 1R-cis-αR) 和单体 2 (CP₂ 1R-cis-αS)。而且抗体对 CP₁ 灵敏度远高于对 CP₂, 这和文献中结果相吻合^[6]。根据单克隆抗体识别的 2 种异构体构型, 可以推断, 环丙烷的顺式构型可能更容易被制备的 mAb 所识别, 而 α 碳原子构型主要影响抗体的灵敏度, R 型的灵敏度更好。由

于氯氰菊酯异构体遇碱、见光和遇有机溶剂时会不稳定,易发生构型转化和降解。因此,免疫原免疫小鼠后,半抗原中不同单体在体内的转化和降解速度不同,导致了抗体识别异构体种类差异。

3 结 语

先采用 HP-silica 柱将氯氰菊酯分成 4 对对映体,经脱溶剂浓缩后,再通过以 Sino-Chiral OD 手性柱为固定相的高效液相色谱仪被分成了 8 个异构体,实现了氯氰菊酯异构体的完全分离和制备,为将来制备高活性氯氰菊酯异构体提供了很好的思路。

试验将氯氰菊酯通过以 Sino-Chiral OD 手性柱

为固定相的高效液相色谱仪进行分离,得到了 8 个峰,通过对比两种方法中每个异构体的保留时间并结合文献,确定了每个异构体的构型,以便进行抗体立体选择性的研究。

最后,采用间接竞争酶联免疫法,通过测定单克隆抗体对氯氰菊酯 8 个异构体的抑制曲线,来研究抗体的立体选择性。结果表明,mAb 仅识别氯氰菊酯的 8 种单体中的 2 种,单体 1(CP₁ 1R-cis- α R)和单体 2(CP₂ 1R-cis- α S),而且 CP₂ 是氯氰菊酯中杀虫活性最高的异构体,IC₅₀ 为 23.62 ng/mL, 这为将来商品化高活性氯氰菊酯异构体的免疫检测提供了有力的工具。

参考文献:

- [1] Drăghici C, Chirila E, Sica M. Enantioselectivity of chiral pesticides in the environment [M]. Springer: Environmental Security Assessment and Management of Obsolete Pesticides in Southeast Europe, 2013: 91-102.
- [2] Nillos M G, Qin S, Larive C, et al. Epimerization of cypermethrin stereoisomers in alcohols[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2009, 57(15): 6938-6943.
- [3] Albaseer Saeed S. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatographic method for efficient diastereomeric separation and quantification of cypermethrin, resmethrin and permethrin [J]. **Research Journal of Chemical Sciences**, 2013, 2231: 606.
- [4] Kuang H, Miao H, Wu Y, et al. Enantioselective determination of cypermethrin in pig muscle tissue by immunoaffinity extraction and high performance liquid chromatography[J]. **International Journal of Food Science & Technology**, 2010, 45(4): 656-660.
- [5] Li Z, Zhang Z, Zhang L, et al. Stereo and enantioselective degradation of β -Cypermethrin and β -Cyfluthrin in soil[J]. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2008, 80(4): 335-339.
- [6] Pérez-Fernández V, Domínguez-Vega E, Chankvetadze B, et al. Evaluation of new cellulose-based chiral stationary phases Sepapak-2 and Sepapak-4 for the enantiomeric separation of pesticides by nano liquid chromatography and capillary electrochromatography[J]. **Journal of Chromatography A**, 2012, 1234: 22-31.
- [7] Xu C, Tu W, Lou C, et al. Enantioselective separation and zebrafish embryo toxicity of insecticide beta-cypermethrin [J]. **Journal of Environmental Sciences**, 2010, 22(5): 738-743.
- [8] Qin S, Gan J. Abiotic enantiomerization of permethrin and cypermethrin: Effects of organic solvents [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2007, 55(14): 5734-5739.
- [9] You J, Lydy M J. A solution for isomerization of pyrethroid insecticides in gas chromatography [J]. **Journal of Chromatography A**, 2007, 1166(1): 181-190.
- [10] Kuang H, Miao H, Hou X, et al. Determination of enantiomeric fractions of cypermethrin and cis-bifenthrin in Chinese teas by GC/ECD[J]. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2010, 90(8): 1374-1379.
- [11] Karcher A, El Rassi Z. Electrically driven microseparation methods for pesticides and metabolites: IV Effects of the nature of fluorescent labels on the enantioseparation of pesticides and their degradation products by capillary zone electrophoresis with UV and laser-induced fluorescence detection[J]. **Electrophoresis**, 2000, 21(10): 2043-2050.
- [12] 徐明仙, 高伟亮, 金丽霞, 等. 拟除虫菊酯类农药在超临界流体色谱中的对映体分离[J]. **农药**, 2011, 50(7): 492-497.
XU Ming-xian, GAO Wei-liang, JIN Li-xia, et al. Enantiomer separation of synthetic pyrethroids by supercritical fluid chromatography[J]. **Agrochemicals**, 2011, 50(7): 492-497. (in Chinese)
- [13] 高伟亮, 金丽霞, 傅贤伟, 等. 四种拟除虫菊酯的超临界色谱手性分离[J]. **浙江工业大学学报**, 2012, 40(3): 295-298.
GAO Wei-liang, JIN Li-xia, FU Xian-wei et al. Chiral separation of four pyrethroids by supercritical fluid chromatography[J].

- Journal of Zhejiang University of Technology**, 2012, 40(3):295-298. (in Chinese)
- [14] Edwards D P, Ford M G. Separation and analysis of the diastereomers and enantiomers of cypermethrin and related compounds[J]. **Journal of Chromatography A**, 1997, 777(2):363-369.
- [15] CHEN Xiu-jin, XU Li-guang, MA Wei, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for cyhalothrin. Immunological Investigations. DOI: 10.3109/08820139.2013.797909[P]. 2013-01-01.
- [16] Lee N, Mcadam D P, Skerritt J H. Development of immunoassays for type II synthetic pyrethroids: 1 Hapten design and application to heterologous and homologous assays[J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1998, 46(2):520-534.

科技信息

<http://news.foodmate.net/2013/11/247788.html>

美科学家研发纤维素生产直链淀粉技术

来自美国弗吉尼亚理工大学的一个研究小组日前宣布已成功地将纤维素转化成淀粉,这为从植物中摄取新的营养物质提供了新思路。该研究成果发表于《美国国家科学院院刊》。

纤维素和淀粉具有相同的化学式,仅化学键存在差异。研究人员希望利用级联酶打破纤维素的骨架,重新构型转变成淀粉。新的方法将从非食品植物材料的纤维素,如玉米秸秆,转化为约30%的直链淀粉,剩余部分水解生成葡萄糖,进而生产乙醇。这种生物过程被称为“酶解生物转化和微生物发酵同时进行法”,很容易被扩大规模实现商业化生产。该方法环境友好,因为它不需要昂贵的设备,额外补充热能或添加化学试剂,也不会产生任何废物。且关键的酶被固定在磁性纳米粒子中,可以很方便的回收利用,节约了成本。

淀粉是人类饮食的最重要组成部分之一。研究小组新开发的方法生产的是直链淀粉,在消化过程中难以降解,是膳食纤维的良好来源。此类淀粉已被证明可以有效减少肥胖症和糖尿病的发病风险。除了作为食物来源,该直链淀粉还能用于生产可生物降解的食品包装薄膜;甚至可以作为一种高密度的氢存储载体,解决氢能源的储存问题。

[信息来源]中国食品饮料网. 美科学家研发纤维素生产直链淀粉技术 [EB/OL]. (2013-11-6). http://news.40777.cn/info_1391809.html.

欧盟制定人饮用水中放射性物质的公众健康保护规定

2013年11月7日,欧盟发布2013/51/Euratom号理事会指令,就人饮用水中的放射性物质制定了公众健康保护要求,规定了监测放射性物质的参数值、频率及方法。该指令适用于人饮用水,不适用于天然矿物质水、医学用水。

新指令规定,对于以下情况可豁免该指令:主管当局认为水体质量不会直接或间接影响公众健康;特别供应的人类消费用水,提供每天少于10立方米或者少于50人,该消费用水用于商业或公共活动的情况除外。该指令自发布之日起第20天生效。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟制定人饮用水中放射性物质的公众健康保护规定 [EB/OL]. (2013-11-13). <http://news.foodmate.net/2013/11/248420.html>.