

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910085648.2

[51] Int. Cl.

C07D 307/71 (2006.01)

C07K 16/44 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

G01N 33/566 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 2 月 10 日

[11] 公开号 CN 101643462A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/531 (2006.01)

[22] 申请日 2009.5.27

[21] 申请号 200910085648.2

[71] 申请人 北京维德维康生物技术有限公司

地址 100085 北京市海淀区上地十街 1 号院 4 号楼

[72] 发明人 吴小平 江海洋 王战辉 阮永磊
王 进 王亚辉 徐 飞

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅 任凤华

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 2 页

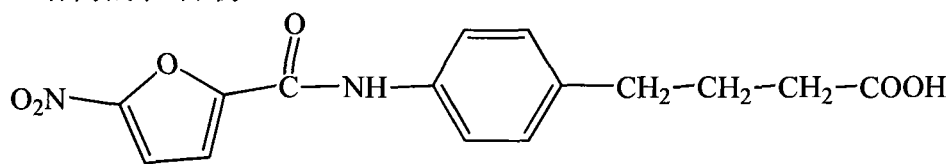
[54] 发明名称

硝基呋喃类物质的一种半抗原、抗原及其制备方法与应用

[57] 摘要

本发明公开了硝基呋喃类物质的一种半抗原、抗原及其制备方法与应用。该抗原是一种硝基呋喃化合物，该硝基呋喃化合物是将式 I 结构的化合物与载体蛋白偶联得到的偶联物。由于本发明的抗原共有 5 - 硝基呋喃环结构，因此以该抗原作为免疫原免疫动物，可以获得硝基呋喃类物质的抗体，该抗体可以同时识别四种硝基呋喃类物质（呋喃西林、呋喃唑酮、呋喃它酮和呋喃妥因）。因此，本发明制备的抗原可以用于硝基呋喃类物质的免疫分析和筛选，提高检测效率，缩短检测时间，降低检测成本。

1、式 I 结构的化合物，



式 I。

2、权利要求 1 所述式 I 结构化合物的制备方法，包括以下步骤：

将 5-硝基呋喃-2-甲醛的乙醇溶液和对氨基苯丁酸的乙醇溶液混合，离心取沉淀，得到式 I 结构的化合物。

3、根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于：所述 5-硝基呋喃-2-甲醛和所述对氨基苯丁酸的摩尔比为 1：（1-2），优选为 1：1；

所述 5-硝基呋喃-2-甲醛的乙醇溶液是将所述 5-硝基呋喃-2-甲醛溶于乙醇的水溶液中得到的；所述乙醇的水溶液中，所述乙醇和水的体积比为 1：（1-2），优选为 1：1；

所述对氨基苯丁酸的乙醇溶液是将所述对氨基苯丁酸溶于无水乙醇中得到的。

4、权利要求 1 所述式 I 结构的化合物在制备硝基呋喃类物质抗体中的应用。

5、一种硝基呋喃化合物，是将权利要求 1 所述式 I 结构的化合物与载体蛋白偶联得到的偶联物；

所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

6、权利要求 5 所述硝基呋喃化合物的制备方法，包括以下步骤：

1) 将 N,N'-二环己基碳化二亚胺（DCC）、N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）和式 I 结构化合物混合，将混合物溶于 N,N-二甲基甲酰胺中，得到溶液 A；

将载体蛋白溶解于碳酸钠溶液中，得到溶液 B；

2) 将溶液 B 滴加到溶液 A 中，得到硝基呋喃化合物。

7、根据权利要求 6 所述的方法，其特征在于：所述步骤 1) 中，所述式 I 结构的化合物、所述 N,N'-二环己基碳化二亚胺和所述 N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为 1：（0.6-1）：（0.4-1），优选为 1：1：1；

所述载体蛋白为卵清蛋白或牛血清白蛋白；

所述式 I 结构的化合物与所述载体蛋白的摩尔比为（5-15）：1，优选为 13：1。

8、根据权利要求6或7所述的方法，其特征在于：所述方法还包括将所述硝基呋喃化合物进行透析的步骤，所述透析的条件为：4-20°C用生理盐水溶液透析48-84小时，优选为4°C用生理盐水溶液透析72小时；

所述方法还包括将透析后的硝基呋喃化合物进行过滤的步骤，所述过滤过程中，滤膜的滤径为0.05-0.2 μm ，优选为0.2 μm 。

9、权利要求5所述硝基呋喃化合物在制备硝基呋喃类物质抗体和检测硝基呋喃类物质中的应用。

10、以权利要求5所述硝基呋喃化合物为免疫原制备的抗体。

硝基呋喃类物质的一种半抗原、抗原及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及硝基呋喃类物质的一种半抗原、抗原及其制备方法与应用。

背景技术

硝基呋喃类物质(Nitrofurans)是一类人工合成的具有5-硝基呋喃环基本结构的广谱抗菌药物,主要包括呋喃西林(Nitrofurazone)、呋喃妥因(Nitrofurantion)、呋喃唑酮(Furazolidone)和呋喃它酮(Furaltadone)。硝基呋喃类物质对大多数革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌和原虫等病原体均有杀灭作用,在畜禽养殖、水产养殖上应用非常广泛。但硝基呋喃类物质对畜禽有一定的毒性,动物大剂量或长期连续服用硝基呋喃类物质易引起中毒性反应,表现为厌食、腹泻、胃肠出血、周围神经炎、兴奋、惊厥或瘫痪等,中毒严重时甚至可以引起动物死亡。同时硝基呋喃类物质也是一类具有潜在致癌性和诱导有机体产生突变的物质。1990年7月欧盟颁布2377/90/EEC条例,将硝基呋喃类物质及其代谢产物列为A类禁用药物,规定其在动物源性食品中的残留检测限为1.0 $\mu\text{g/kg}$ 。由于对呋喃唑酮蛋白结合态残留物的安全性产生怀疑,自1995年起,欧盟全面规定禁止使用呋喃类抗菌物质,在动物源性食品中呋喃类残留物的检出限为不得检出。欧盟从1997年开始将所有的硝基呋喃类抗生素全部列为违禁药物。2004年美国FDA公布了禁止在进口动物源性食品中使用的11种药物名单,其中包括呋喃西林和呋喃唑酮。我国农业部文件农牧发[2002]1号也规定动物源性食品中呋喃唑酮的检出限为不得检出。目前,国内外都对呋喃类物质的控制相当严格,各国对于呋喃类物质测定的标准都有明确的规定。

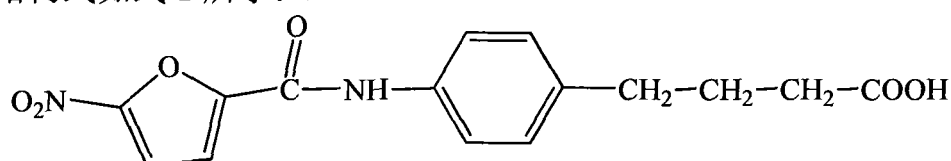
国内外已发表的有关硝基呋喃类抗生素残留检测方法的文献中,早期的文献报道多数是检测原药化合物。但研究表明,硝基呋喃类物质原药的半衰期通常只有几小时,而其代谢产物则可以长达数周仍能在动物组织中残留。目前,国内外报道多见于检测硝基呋喃类物质的代谢物,仪器检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱-质谱法(LC-MS)、液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)。其中,LC-UV、LC-MS及LC-MS/MS是目前用来检测硝基呋喃类物质代谢物最常用的方法,但在实际操作中需要有LC-UV、LC-MS及LC-MS/MS等高档仪器,且前处理复杂、繁琐、操作时间长、操作技术要求高。而免疫分析方法采用针对硝基呋喃类物质代谢物的

特异性抗体，可以有很高的精确度、灵敏性和特异性，且对技术要求不高，具有检测时间短，适用于大批量测定等优点。免疫分析检测技术是近年来在环境、食品安全监测领域逐渐广泛应用的一种快速、高通量、低成本的检测技术，已逐渐成为世界各国对有毒有害残留物快速筛选监测的主要方法之一，这为硝基呋喃类物质代谢物的检测提供了一种新的途径。

发明内容

本发明的目的是提供一种化合物及其制备方法与应用。

本发明所提供的化合物，其化学名称为 4-(4-(5-硝基呋喃-2-甲酰胺基)苯基)丁酸，其结构式如式 I 所示：



式 I。

上述式 I 结构的化合物的制备方法包括以下步骤：

将 5-硝基呋喃-2-甲醛的乙醇溶液和对氨基苯丁酸的乙醇溶液混合，离心，取沉淀得到式 I 结构的化合物。

上述方法中，所述 5-硝基呋喃-2-甲醛和所述对氨基苯丁酸的摩尔比为 1：

(1-2)，具体可为 1：1；

所述 5-硝基呋喃-2-甲醛的乙醇溶液是将所述 5-硝基呋喃-2-甲醛溶于乙醇的水溶液中得到的，所述乙醇的水溶液中，所述乙醇和水的体积比为 1：(1-2)，具体可为 1：1；

所述对氨基苯丁酸的乙醇溶液是将所述对氨基苯丁酸溶于无水乙醇中得到的。

上述方法还包括将所述式 I 结构的化合物进行干燥的步骤，所述干燥的温度为 50-60°C，具体可为 60°C。

上述式 I 结构的化合物可用于制备硝基呋喃类物质的抗体。

上述式 I 结构的化合物还可用于检测硝基呋喃类物质。

本发明的另一个目的是提供一种硝基呋喃化合物及其制备方法与应用。

本发明所提供的硝基呋喃化合物，是将上述式 I 结构的化合物与载体蛋白偶联得到的偶联物。

上述硝基呋喃化合物中，所述载体蛋白为卵清蛋白(OVA)或牛血清白蛋白

(BSA)。

上述硝基呋喃化合物的制备方法包括以下步骤：

1) 将 N,N'-二环己基碳化二亚胺 (DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 和式 I 结构的化合物混合，将混合物溶于 N,N-二甲基甲酰胺中，得到溶液 A；

将载体蛋白溶解于碳酸钠溶液中，得到溶液 B；

2) 将溶液 B 滴加到溶液 A 中，得到硝基呋喃化合物。

上述方法中，所述步骤 1) 中，所述式 I 结构的化合物、所述 N,N'-二环己基碳化二亚胺和所述 N-羟基琥珀酰亚胺的质量比为 1: (0.6-1): (0.4-1)，具体可为 1: 1: 1。

所述载体蛋白为卵清蛋白 (OVA) 或牛血清白蛋白 (BSA)；

所述碳酸钠溶液为 pH 9.6 的 0.1mol/L 的碳酸钠的水溶液；

所述式 I 结构的化合物与所述载体蛋白的摩尔比为 (5-15): 1，具体可为 13: 1。

上述方法还包括将所述硝基呋喃化合物进行透析的步骤，所述透析的条件为：4-20℃ 用生理盐水溶液透析 48-84 小时，具体可为 4℃ 用生理盐水溶液透析 72 小时。

上述方法还包括将透析后的硝基呋喃化合物进行过滤的步骤，所述过滤过程中，滤膜的滤径为 0.05-0.2μm，具体可为 0.2 μm。

将制备好的硝基呋喃化合物分装于安培瓶中，-20℃ 保存。

上述硝基呋喃化合物可用于制备硝基呋喃类物质的抗体。

上述硝基呋喃化合物还可用于检测硝基呋喃类物质。

用上述硝基呋喃化合物制备的抗体也属于本发明的保护范围。

所述抗体为单克隆抗体。

由于上述硝基呋喃化合物含有硝基呋喃类物质共有的 5-硝基呋喃环结构，因此以该硝基呋喃化合物作为免疫原免疫动物，可以获得硝基呋喃类物质的抗体，该抗体可以同时识别四种硝基呋喃类物质(呋喃西林、呋喃唑酮、呋喃它酮和呋喃妥因)。因此，本发明的硝基呋喃化合物可以用于硝基呋喃类物质的免疫分析和筛选，提高检测效率，缩短检测时间，降低检测成本。

附图说明

图 1 为硝基呋喃化合物的制备流程图。

图2为式I结构化合物的质谱图。

图3为硝基呋喃化合物的紫外鉴定图谱。

具体实施方式

下述实施例中所述实验方法，如无特殊说明，均为常规方法；所述试剂和生物材料，如无特殊说明，均可从商业途径获得。

硝基呋喃化合物的制备过程如图1所示。下面结合具体的实施例阐述硝基呋喃化合物的制备过程。

实施例1、式I结构化合物的合成与鉴定

1、式I结构化合物的合成

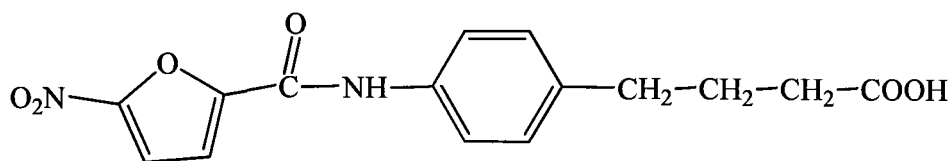
1) 将 139mg (1mmol) 5-硝基呋喃-2-甲醛溶于由 1mL 纯水和 1mL 无水乙醇组成的乙醇的水溶液中，磁力搅拌使其完全溶解；

2) 将 179mg (1mmol) 对氨基苯丁酸溶于 1mL 无水乙醇中；

3) 将上述步骤1)和步骤2)的溶液混合，混合液颜色逐渐变为黄色，搅拌1分钟之后，出现黄色沉淀，继续室温搅拌、过夜、离心，获得黄色沉淀；将该沉淀60°C干燥，称量获得223mg产物，产率为71%。

2、式I结构化合物的鉴定

上述步骤1获得的化合物经ESI测定其分子结构。结果如图2所示。结果表明，该化合物的ESI分子离子标准峰为317(M+1)；元素分析结果表明，该化合物中，C元素的百分含量为60.75，H元素的百分含量为5.10，N元素的百分含量为8.86，O元素的百分含量为25.29。表明该化合物的分子式为C₁₆H₁₆N₂O₅，其结构式如式I所示：



式 I,

该化合物的化学名称为 4-(4-(5-硝基呋喃-2-甲酰胺基)苯基)丁酸。

实施例2、硝基呋喃化合物的合成与鉴定

1、硝基呋喃化合物的合成

1) 将 15mg 上述实施例1制备的式I结构的化合物溶解于 1mL N,N-二甲基甲酰胺中，磁力搅拌使其完全溶解；

2) 将 15mg DCC 和 15mg NHS 分别加入到上述步骤 1) 的溶液中, 室温反应过夜, 离心去除沉淀;

3) 将 50 mg 牛血清白蛋白 (BSA) 溶解于 5mL pH 9.6 的 0.1mol/L 的碳酸钠溶液中;

4) 将上述步骤 3) 的溶液逐滴加入到上述步骤 2) 的溶液中, 搅拌反应 4 小时;

5) 将上述步骤 4) 的反应液装入透析袋中, 4℃ 条件下用生理盐水溶液透析 72 小时, 期间更换透析液 6 次; 倒掉透析液, 将透析袋中的溶液在无菌条件下用滤径为 0.2 μ m 的滤膜过滤, 得到硝基呋喃化合物, 将硝基呋喃化合物分装于安培瓶中, -20℃ 保存。

2、硝基呋喃化合物的鉴定

采用紫外光谱法对上述步骤1获得的硝基呋喃化合物进行鉴定, 只要上述步骤1制备的硝基呋喃化合物的紫外图谱与载体蛋白和式I结构化合物的紫外图谱相比发生了变化, 则可以判断式I结构的化合物与载体蛋白偶联成功。上述步骤1制备的硝基呋喃化合物的紫外鉴定图谱如图3所示。通过比较三者260nm和280nm的吸收值计算式I结构化合物和BSA的结合比。

实施例 3、抗体的制备

1、免疫动物制备抗血清

采用5只新西兰大白兔作为免疫动物, 以上述实施例2制备的硝基呋喃化合物作为免疫原, 免疫剂量为 1 mg/kg。免疫方法如下: 首免时将免疫原用等体积的弗氏完全佐剂充分乳化, 颈背部皮下多点注射, 间隔3-4周, 将免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂混合制成乳化剂, 加强免疫一次, 共免疫8次 (包括加强免疫共8次), 最后一次不加佐剂。

最后一次免疫后7-10 d将兔子处死, 采用心脏采血法采血, 每只兔子可采血80 mL左右, 将采集的血液样本在4℃冰箱中放置5-6小时, 然后5000 rpm离心10 min, 分离血清, 血清经适当稀释后用间接ELISA方法测定效价。第五次免疫时, 兔子获得了高效价的抗体, 抗血清的滴度为1: 51200。

2、抗体的纯化

采用辛酸-硫酸铵盐析法对上述步骤1获得的抗血清进行纯化。辛酸在偏酸性的条件下能将血清中除IgG以外的蛋白质都沉淀下来, 上清中只有IgG。辛酸加入因抗体来源的不同而不同, 人血清为70 μ l/mL, 兔血清为75 μ l/mL, 小鼠血清为40 μ l/mL。

实验设三次重复, 结果表明, 采用上述方法IgG的回收率达90%以上。

3、抗血清最低检测限 (LOD值) 和半数抑制量 (IC₅₀) 的检测

用方阵滴定法确定上述实施例2制备的硝基呋喃化合物和上述步骤1制备的抗血清的工作浓度, 上述实施例2制备的硝基呋喃化合物的工作浓度为500 ng/ml, 抗血清的工作浓度为1/8000。

用不同浓度的5-硝基呋喃-2-甲醛的标准品溶液做实验溶液, 其浓度如下(单位: mg/L): 0、0.5、1、2、4、8、16、32、64、128、256 (请指明标准品溶液的浓度)。采用8组平行试验 (n=8)。

间接竞争性ELISA方法: 用上述工作浓度的上述实施例2制备的硝基呋喃化合物包被酶标板, 将实验溶液与抗体溶液同时加入酶标板小孔中, 同时设置空白孔 (将添加的抗体溶液换成高纯水, 其它一致) 和阴性对照孔 (将添加的实验溶液用高纯水代替, 其它一致), 37℃温育0.5h, 倒出孔内液体, 用洗涤液 (10×PBST) 洗涤2-5次, 将酶标板倒置在吸水纸上拍打; 加入酶标二抗溶液于酶标板小孔中, 37℃温育0.5h, 用洗涤液重复洗3-5次, 吸干; 加入底物显色溶液到酶标板小孔中, 室温下反应10-15min, 用酶标仪在波长450nm处测定吸光度值A。以吸光度值A为纵坐标, 以标准品实验溶液浓度的log₁₀值为横坐标, 绘制半对数标准曲线图。标准曲线具有完整的反S形状, 并具有上平台和下平台, 标准曲线的平行测定次数8次, 实验重复性良好, 相对标准偏差 (变异系数) 均在15%以内。

根据标准曲线得出10%抑制量和半数抑制量 (IC₅₀), 比较检测灵敏度。

抑制率用以下式计算:

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min}) - (\text{OD}_x - \text{OD}_{\min})}{(\text{OD}_{\max} - \text{OD}_{\min})} \times 100\%$$

式中: OD_{max}为不加标准品时的吸光值 (即阴性对照), OD_x为标准品浓度为x时的吸光值, OD_{min}为空白对照孔的吸光值。

结果表明, 半数抑制量 (IC₅₀) 为1.0~1.5 ng/mL, 最低检测限 (LOD) 为0.18~0.24ng/mL, 在0.18 ng/mL~10.9 ng/mL范围内, 抑制率与药物浓度的对数值呈显著的线性关系, 相关系数为r=0.9865。

4、抗体的特异性检测

抗血清的特异性就是指它同特异性抗原结合的能力与同该抗原类似物结合能力的比较。常用交叉反应率作为评价的重要标准。交叉反应越小, 抗血清的特异性

越好。

将标准品5-硝基呋喃-2-甲醛及其类似物（5-硝基呋喃-2-丙烯酸、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃唑酮和呋喃它酮）进行系列稀释，然后分别与上述步骤1制备的抗血清反应，制作标准曲线，在曲线上分别找出上述实施例2制备的硝基呋喃化合物抑制率50%的剂量和其类似物（5-硝基呋喃-2-丙烯酸、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃唑酮和呋喃它酮）抑制率50%时的剂量，计算出硝基呋喃化合物及其类似物（5-硝基呋喃-2-丙烯酸、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃唑酮、呋喃它酮）的交叉反应率。

交叉反应率（%）=（引起50%抑制的5-硝基呋喃-2-甲醛的浓度/引起50%抑制的其它物质的浓度）×100%。

实验设三次重复，取三次重复的平均值作为实验结果。由ELISA方法建立的标准曲线可以看出，上述实施例2制备的硝基呋喃化合物的特异性较好，上述实施例2制备的硝基呋喃化合物的特异性抗体对呋喃西林、5-硝基呋喃-2-丙烯酸、呋喃妥因、呋喃唑酮和呋喃它酮的交叉反应率为：89%、85%、82%、78%和64%，由此可知，上述实施例2制备的硝基呋喃化合物的特异性抗体可以作为同时识别这四类药物的通用抗体，满足硝基呋喃类药物的广泛、高效筛选。

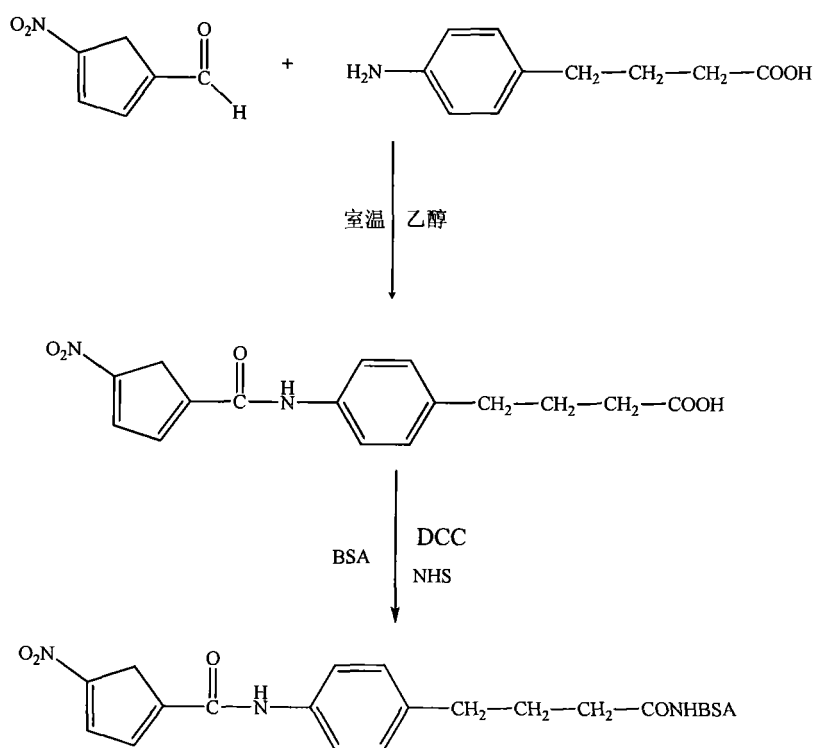


图 1

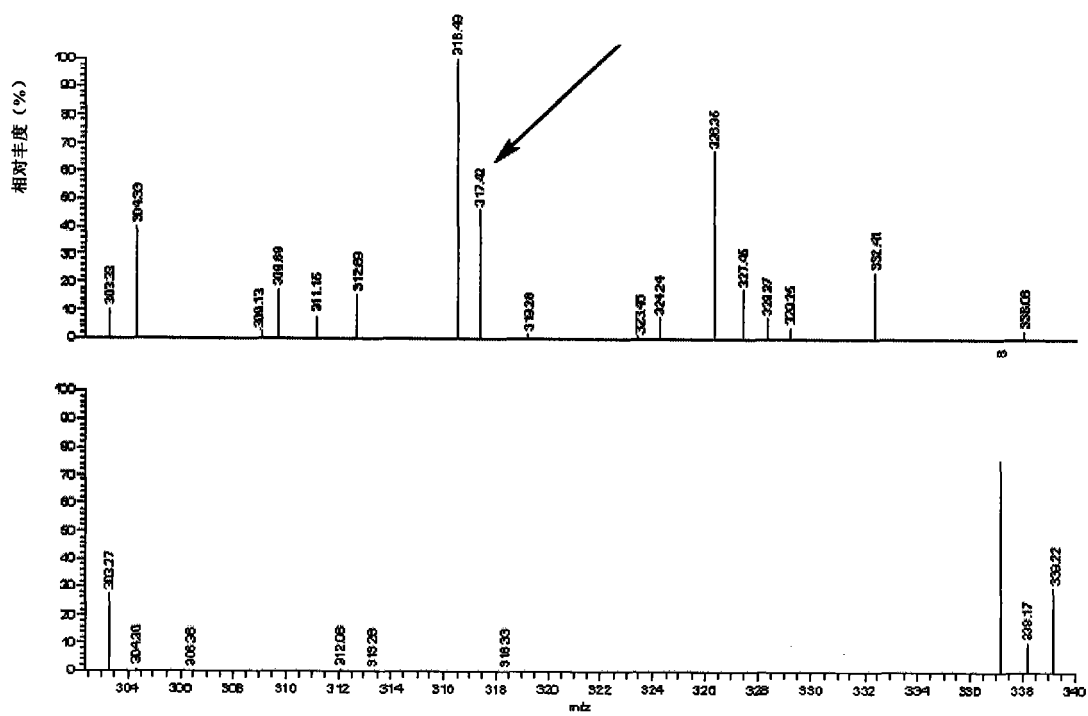


图 2

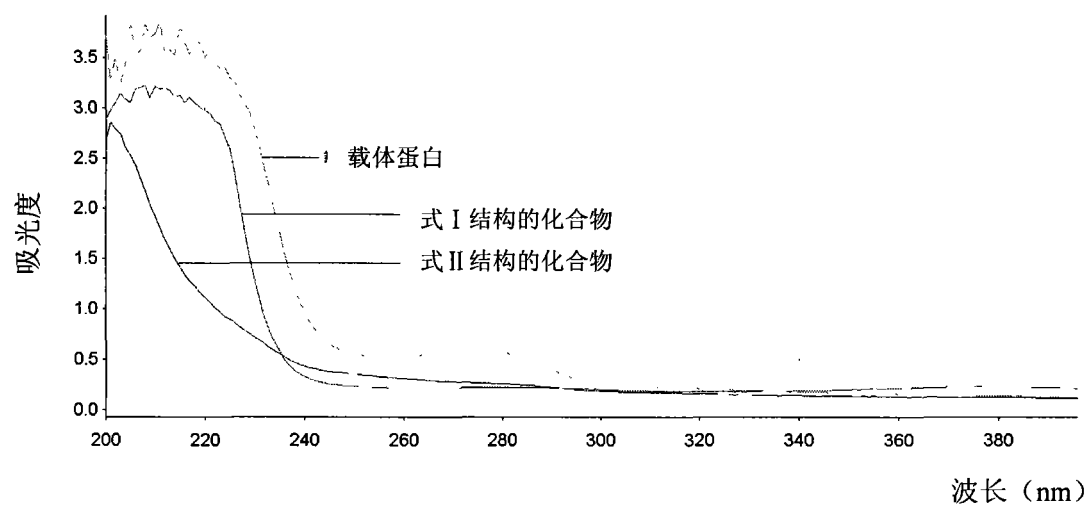


图 3

专利名称(译)	硝基呋喃类物质的一种半抗原、抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101643462A	公开(公告)日	2010-02-10
申请号	CN200910085648.2	申请日	2009-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京维德维康生物技术有限公司		
[标]发明人	吴小平 江海洋 王战辉 阮永磊 王进 王亚辉 徐飞		
发明人	吴小平 江海洋 王战辉 阮永磊 王进 王亚辉 徐飞		
IPC分类号	C07D307/71 C07K16/44 C07K14/765 C07K14/77 C07K11/113 G01N33/566 G01N33/531		
代理人(译)	关畅		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了硝基呋喃类物质的一种半抗原、抗原及其制备方法与应用。该抗原是一种硝基呋喃化合物，该硝基呋喃化合物是将式I结构的化合物与载体蛋白偶联得到的偶联物。由于本发明的抗原共有5 - 硝基呋喃环结构，因此以该抗原作为免疫原免疫动物，可以获得硝基呋喃类物质的抗体，该抗体可以同时识别四种硝基呋喃类物质(呋喃西林、呋喃唑酮、呋喃它酮和呋喃妥因)。因此，本发明制备的抗原可以用于硝基呋喃类物质的免疫分析和筛选，提高检测效率，缩短检测时间，降低检测成本。

