



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109824604 B

(45)授权公告日 2020.06.23

(21)申请号 201910138537.7

(22)申请日 2019.02.25

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109824604 A

(43)申请公布日 2019.05.31

(73)专利权人 中国农业大学

地址 100193 北京市海淀区圆明园西路2号

(72)发明人 王战辉 沈建忠 温凯 李成龙

柯跃斌 张素霞 史为民

(74)专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司 11002

代理人 王文君 陈征

(51)Int.Cl.

G07D 239/42(2006.01) (续)

(56)对比文件

WO 2014028669 A1,2014.02.20,说明书第00344、00347段.

CN 106543049 A,2017.03.29,说明书全文.

CN 102516199 A,2012.06.27,说明书全文.

CN 101565405 A,2009.10.28,说明书全文.

CN 103288723 A,2013.09.11,说明书全文.

CN 106565615 A,2017.04.19,说明书全文.

陈燕妮.四类重要抗生素残留的免疫快速检测方法的研究.《江南大学博士学位论文》.2018,22-63.

陈燕妮.四类重要抗生素残留的免疫快速检

测方法的研究.《江南大学博士学位论文》.2018,22-63.

HONGYUAN ZHANG等.Hapten Synthesis and Development of Polyclonal Antibody-Based Multi-Sulfonamide Immunoassays.《Journal of Agricultural and Food Chemistry》.2006,第54卷(第13期),4499-4505.

Yanni Chen等.Ultrasensitive Immunochromatographic Strip for Fast Screening of 27 Sulfonamides in Honey and Pork Liver Samples Based on a Monoclonal Antibody.《Journal of Agricultural and Food Chemistry》.2017,第65卷(第37期),8248-8255.

Yanni Chen等.Ultrasensitive Immunochromatographic Strip for Fast Screening of 27 Sulfonamides in Honey and Pork Liver Samples Based on a Monoclonal Antibody.《Journal of Agricultural and Food Chemistry》.2017,第65卷(第37期),8248-8255.

王佳等.动物源食品中磺胺类药物残留的免疫分析方法研究进展.《食品与发酵工业》.2018,第44卷(第10期),260-267. (续)

审查员 解晓妮

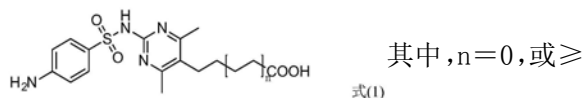
权利要求书2页 说明书9页 附图4页

(54)发明名称

磺胺类药物半抗原和人工抗原及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明涉及磺胺类药物半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述磺胺类药物半抗原的结构如式(1)所示:



其中,n=0,或≥

式(1)

1的整数。所述磺胺类药物人工抗原是由式(1)所示半抗原与载体蛋白偶联得到。利用所述磺胺类药物人工抗原免疫动物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的磺胺类药物半抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的磺胺类药物检测方法提供了新手段。

CN 109824604 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

*C07K 14/765*(2006.01)

*C07K 14/77*(2006.01)

*C07K 14/795*(2006.01)

*C07K 16/44*(2006.01)

*G01N 33/68*(2006.01)

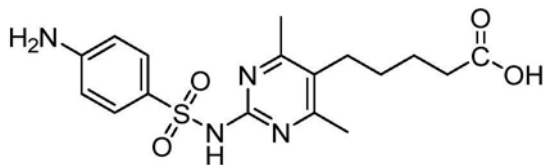
*G01N 33/577*(2006.01)

*G01N 33/53*(2006.01)

(56)对比文件

JAVIER ADRIAN等.Generation of broad specificity antibodies for sulfonamide antibiotics and development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the analysis of milk samples.《Journal of Agricultural and Food Chemistry》.2009,第57卷(第2期),385-394.

1. 磺胺类药物半抗原, 其特征在于, 其结构如式 (I) 所示:

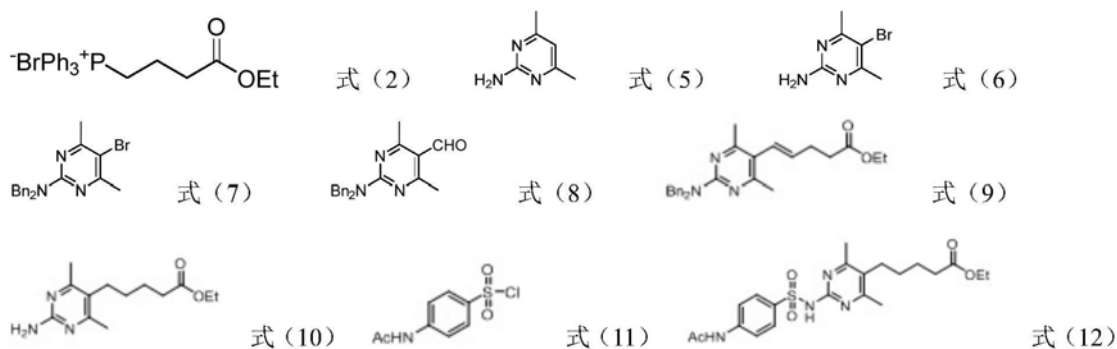


式(I)。

2. 权利要求1所述半抗原的制备方法, 其特征在于, 式 (I) 化合物的制备方法包括如下步骤:

- 1) 4-溴丁酸乙酯与三苯基膦反应得到式 (2) 化合物;
- 2) 2,4-戊二酮与盐酸胍反应得到式 (5) 化合物;
- 3) 式 (5) 化合物与N-溴代丁二酰亚胺反应得到式 (6) 化合物;
- 4) 式 (6) 化合物与苄基氯反应得到式 (7) 化合物;
- 5) 式 (7) 化合物与正丁基锂反应得到式 (8) 化合物;
- 6) 式 (8) 化合物与式 (2) 化合物反应得到式 (9) 化合物;
- 7) 式 (9) 化合物发生氢化反应得到式 (10) 化合物;
- 8) 式 (10) 化合物与式 (11) 化合物反应得到式 (12) 化合物;
- 9) 式 (12) 化合物发生水解反应得到式 (I) 化合物;

其中, 步骤1)-9) 中所述化合物的结构如下:



式 (I) 化合物的制备方法包括如下步骤:

1') 将4-溴丁酸乙酯与三苯基膦混合, 在甲苯中回流反应; 沉淀过滤, 回收, 用石油醚洗涤后干燥, 得到式 (2) 化合物;

2') 将2,4-戊二酮和盐酸胍溶于水中, 加入碳酸钾, 反应混合物在36-44℃下搅拌21.6-26.4h; 沉淀经过滤, 用水洗涤后真空干燥, 得到式 (5) 化合物;

3') 将式 (5) 化合物、N-溴代丁二酰亚胺加入乙腈中, 72-88℃条件下加热5.4-6.6h; 沉淀经过滤, 用乙腈洗涤后真空干燥, 得到式 (6) 化合物;

4') 将式 (6) 化合物溶解于DMF中, 然后在-1~1℃下分批加入含氢化钠的矿物油, 在低温条件下搅拌0.9-1.1h, 然后加入苄基氯; 混合物在室温搅拌21.6-26.4h, 加入水, 用乙酸乙酯萃取; 合并乙酸乙酯相, 依次用水、饱和盐水清洗后干燥并浓缩, 残渣经硅胶柱纯化, 得到式 (7) 化合物;

5') 将式 (7) 化合物溶解于四氢呋喃中, 降温至-70.2~-85.8℃, 在氮气保护下, 加入正丁基锂, 搅拌0.9-1.1h, 加入DMF, 恢复至室温, 搅拌0.9-1.1h; 加入饱和氯化铵溶液, 用二氯甲烷进行萃取, 收集二氯甲烷相, 干燥并浓缩, 残渣经硅胶柱纯化, 得到式 (8) 化合物;

6') 将式(2)化合物溶于四氢呋喃中,冷却至-1~1℃,加入含氢化钠的矿物油,室温搅拌0.9-1.1h;加入溶解于四氢呋喃的式(8)化合物,在45-55℃条件下搅拌10.8-13.2h;加入饱和氯化铵溶液,用乙酸乙酯萃取,重复3次,合并有机相,干燥并浓缩;残渣经硅胶柱纯化,得到式(9)化合物;

7') 将式(9)化合物、钨碳催化剂溶于乙醇中,在氢气保护下,45-55℃加热10.8-13.2h,过滤,除去催化剂,真空下移除有机相;残渣经硅胶柱纯化,得到式(10)化合物;

8') 将式(10)化合物、式(11)化合物和吡啶溶于乙腈中,54-66℃下搅拌21.6-26.4h;真空下移除有机相,残渣中加水,用二氯甲烷提取,合并有机相,干燥并浓缩;残渣经硅胶柱纯化,得到式(12)化合物;

9') 将式(12)化合物、NaOH加入水和乙醇中,回流21.6-26.4h,直至式(12)化合物完全反应;真空下移除乙醇,加水,用酸调pH值为2.7-3.3;将沉淀过滤,干燥,即得式(I)化合物。

3. 磺胺类药物人工抗原,其特征在于,由权利要求1所述磺胺类药物半抗原与载体蛋白偶联后得到;

其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

4. 根据权利要求3所述的人工抗原,其特征在于,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

5. 权利要求3或4所述人工抗原的制备方法,其特征在于,通过碳二亚胺或混合酸酐法使所述磺胺类药物半抗原与载体蛋白偶联制得人工抗原。

6. 由权利要求3或4所述人工抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体。

7. 权利要求1所述半抗原或权利要求3或4所述人工抗原的以下任一应用:

①在制备抗磺胺类药物特异性抗体中的应用;

②在检测抗磺胺类药物特异性抗体中的应用。

8. 抗磺胺类药物多克隆抗体,其特征在于,由权利要求3或4所述人工抗原免疫实验动物获得。

9. 根据权利要求8所述的多克隆抗体,其特征在于,所述人工抗原由所述磺胺类药物半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联得到。

10. 由权利要求6所述特异性抗体或权利要求8或9所述多克隆抗体制备的磺胺类药物检测试剂或试剂盒。

11. 权利要求6所述特异性抗体或权利要求8或9所述多克隆抗体的以下任一应用:

(1) 在检测磺胺类药物中的应用;

(2) 在制备磺胺类药物的免疫层析试纸条中的应用;

(3) 在制备磺胺类药物的胶体金检测试纸条中的应用。

12. 根据权利要求11所述的应用,其特征在于,所述磺胺类药物包括氨苯磺胺、磺胺醋酰、磺胺胍、磺胺苯吡唑、酞磺胺噻唑、磺胺二甲异噻唑、磺胺噻唑、磺胺甲基异噻唑、磺胺二甲噻唑、磺胺甲二唑、磺胺硝苯、柳氮磺胺吡啶、磺胺吡啶、磺胺氯吡啶、磺胺甲氧吡啶、磺胺乙氧吡啶、磺胺喹噻啉、磺胺氯吡啶、磺胺多辛、磺胺苯酰、磺胺林、磺胺二甲基异噻唑、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺溴二甲嘧啶。

## 磺胺类药物半抗原和人工抗原及其制备方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域,具体地说,涉及磺胺类药物半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

### 背景技术

[0002] 磺胺类药物(sulfonamides, SAs)具有抗菌谱广、价格低廉、化学性质稳定及使用方便等优点,目前仍被广泛用于兽医临床、畜牧和水产养殖中,来预防和治疗细菌感染性疾病。但不合理使用甚至滥用,易造成SAs在动物组织中残留,继而通过食物链等途径在人体内蓄积,危害人类健康。目前,中国、欧盟、美国、日本等国家或地区均规定了动物性食品中磺胺类药物的最高残留限量(MRLs)。除了从源头上控制SAs的不合理使用外,对动物源食品中药物的残留进行检测及监控,也是保障食品安全的重要措施。因此有必要建立简便、快速、灵敏、广谱的残留检测方法。

[0003] 目前,磺胺类药物残留的检测方法主要是液相色谱(HPLC)或色谱-质谱联用(LC-MS)等理化分析方法。而这些方法均需要昂贵的仪器、复杂的样品前处理和专业人员操作,繁琐费时、检测成本较高,且不能现场操作,不适于大批量样本的快速筛查。

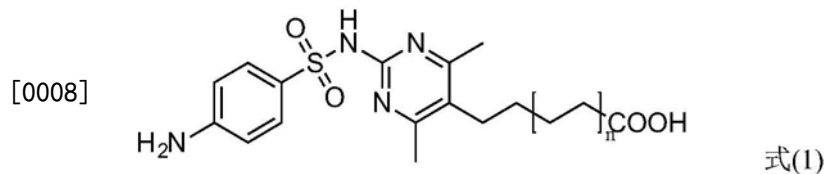
[0004] 以抗原和抗体的特异性、可逆性结合反应为基础的免疫分析技术,以其速度快、成本低、灵敏度高等优点,目前被广泛用于食源性样本中SAs的快速筛选。但单一磺胺药物的检测方法在实际应用中存在很大的局限性,SAs多残留检测方法是目前的研究趋势,而作为核心试剂的广谱性SAs的抗体又制约着多残留免疫分析方法的发展。

[0005] 已知制备广谱性抗体的关键在于半抗原。迄今为止,已有TS、SS、NS、SSS、HS、SA、BS、SA3、SA10、PS、SMX、SG和H1等10余种磺胺半抗原被合成,并制备了相应的广谱性SAs多克隆和单克隆抗体,但这些抗体存在识别SAs种类少、灵敏度差、交叉反应率不平均等问题,不能很好地用于实际样品检测。

### 发明内容

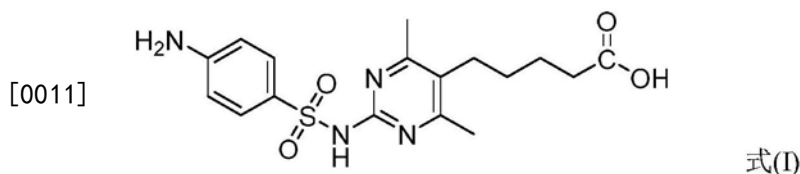
[0006] 本发明的目的是提供磺胺类药物半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。

[0007] 为了实现本发明目的,第一方面,本发明提供磺胺类药物半抗原,其为磺胺二甲嘧啶戊酸,结构如式(1)所示:



[0009] 其中, $n=0$ ,或 $\geq 1$ 的整数。

[0010] 优选地, $n=1$ ,所述半抗原为式(I)所示的化合物:



[0012] 第二方面,本发明提供所述半抗原的制备方法,当n=1时,式(I)化合物的制备方法包括如下步骤:

[0013] 1) 4-溴丁酸乙酯与三苯基膦反应得到式(2)化合物;

[0014] 2) 2,4-戊二酮与盐酸胍反应得到式(5)化合物;

[0015] 3) 式(5)化合物与N-溴代丁二酰亚胺反应得到式(6)化合物;

[0016] 4) 式(6)化合物与苄基氯反应得到式(7)化合物;

[0017] 5) 式(7)化合物与正丁基锂反应得到式(8)化合物;

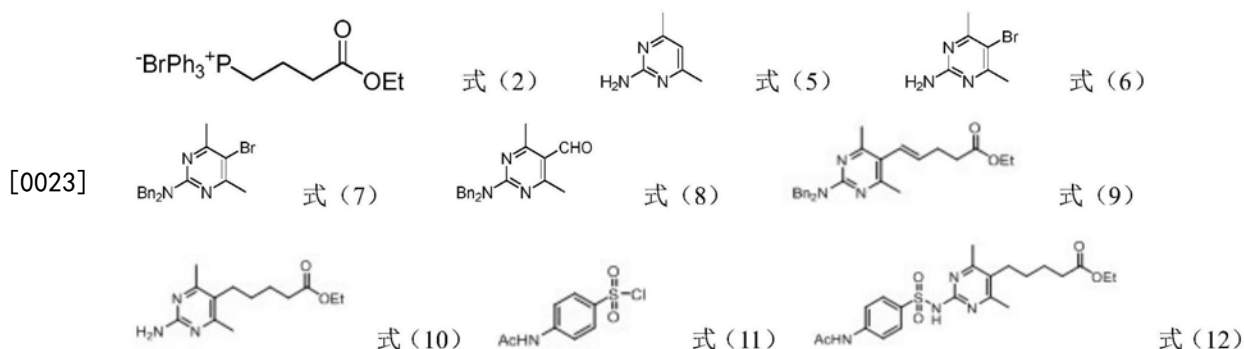
[0018] 6) 式(8)化合物与式(2)化合物反应得到式(9)化合物;

[0019] 7) 式(9)化合物发生氢化反应得到式(10)化合物;

[0020] 8) 式(10)化合物与式(11)化合物反应得到式(12)化合物;

[0021] 9) 式(12)化合物发生水解反应得到式(I)化合物。

[0022] 其中,步骤1)-9)中所述化合物的结构如下:



[0024] 优选地,式(I)化合物的制备方法包括如下步骤:

[0025] 1') 将4-溴丁酸乙酯与三苯基膦混合,在甲苯中回流反应;沉淀过滤,回收,用石油醚洗涤后干燥,得到式(2)化合物;

[0026] 2') 将2,4-戊二酮和盐酸胍溶于水中,加入碳酸钾,反应混合物在36-44℃下搅拌21.6-26.4h(优选40℃下搅拌24h);沉淀经过滤,用水洗涤后真空干燥,得到式(5)化合物;

[0027] 3') 将式(5)化合物、N-溴代丁二酰亚胺加入乙腈中,72-88℃条件下加热5.4-6.6h(优选80℃条件下加热6h);沉淀经过滤,用乙腈洗涤后真空干燥,得到式(6)化合物;

[0028] 4') 将式(6)化合物溶解于DMF中,然后在0℃下分批加入含氢化钠的矿物油,在低温条件下搅拌0.9-1.1h(优选1h),然后加入苄基氯;混合物在室温搅拌21.6-26.4h(优选24h),加入水,用乙酸乙酯萃取;合并乙酸乙酯相,依次用水、饱和盐水清洗后干燥并浓缩,残渣经硅胶柱纯化,得到式(7)化合物;

[0029] 5') 将式(7)化合物溶解于四氢呋喃中,降温至-70.2~-85.8℃(优选-78℃),在氮气保护下,加入正丁基锂,搅拌1h,加入DMF,恢复至室温,搅拌0.9-1.1h(优选1h);加入饱和氯化铵溶液,用二氯甲烷进行萃取,收集二氯甲烷相,干燥并浓缩,残渣经硅胶柱纯化,得到式(8)化合物;

[0030] 6') 将式(2)化合物溶于四氢呋喃中,冷却至0℃,加入含氢化钠的矿物油,室温搅拌0.9-1.1h(优选1h);加入溶解于四氢呋喃的式(8)化合物,在45-55℃条件下搅拌10.8-13.2h(优选50℃搅拌12h);加入饱和氯化铵溶液,用乙酸乙酯萃取,重复3次,合并有机相,干燥并浓缩;残渣经硅胶柱纯化,得到式(9)化合物;

[0031] 7') 将式(9)化合物、钨碳催化剂溶于乙醇中,在氢气保护下,45-55℃加热10.8-13.2h(优选50℃加热12h),过滤,除去催化剂,真空下移除有机相;残渣经硅胶柱纯化,得到式(10)化合物;

[0032] 8') 将式(10)化合物、式(11)化合物和吡啶溶于乙腈中,54-66℃下搅拌21.6-26.4h(优选60℃搅拌24h);真空下移除有机相,残渣中加水,用二氯甲烷提取,合并有机相,干燥并浓缩。残渣经硅胶柱纯化,得到式(12)化合物;

[0033] 9') 将式(12)化合物、NaOH加入水和乙醇中,回流21.6-26.4h(优选24h),直至式(12)化合物完全反应;真空下移除乙醇,加水,用酸调pH值为2.7-3.3(优选pH值3);将沉淀过滤,干燥,即得式(I)所示的磺胺类药物半抗原。

[0034] 在本发明的一个具体实施方式中,所述半抗原按以下方法制得(合成路线见图1):

[0035] 1、将100g的4-溴丁酸乙酯(化合物1),150g的三苯基膦混合,在1L甲苯中回流反应24h。沉淀过滤,回收,并用石油醚洗涤,重复操作3次。真空干燥,得到白色固体产物(化合物2)。

[0036] 2、将200g的2,4-戊二酮(化合物3),200g的盐酸胍(化合物4)溶于2L的水中,逐步加入550g碳酸钾。反应混合物在40℃下搅拌24h。沉淀经过滤,用水洗涤,重复3次。真空下干燥,得到灰白色固体(化合物5)。

[0037] 3、将150g化合物5,200g的N-溴代丁二酰亚胺加入1L乙腈中,80℃条件下加热6h。沉淀经过滤,用冷的乙腈洗涤,真空条件下干燥,得白色固体(化合物6)。

[0038] 4、将100g化合物6溶解于1L的DMF中。将50g溶解于60%矿物油中的NaH在0℃下分批加入,在低温条件下,继续搅拌1h,逐渐加入150g苄基氯。混合物在室温搅拌24h。后加入4L水,使用乙酸乙酯萃取,重复3次。合并乙酸乙酯相,用水清洗,重复3次;饱和盐水清洗,重复3次;用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残渣经硅胶柱纯化,得到无色油状物(化合物7)。

[0039] 5、将50g化合物7溶解于500mL的四氢呋喃中,降温至-78℃。在氮气保护下,逐滴加入200mL的1M的正丁基锂,继续搅拌1h。加入50mL DMF,逐步恢复至室温,并搅拌1h。加入饱和氯化铵溶液,使用二氯甲烷进行萃取,收集二氯甲烷相,Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残渣经硅胶柱纯化,得到白色固体(化合物8)。

[0040] 6、将50g化合物2溶于500mL四氢呋喃中,冷却至0℃,加入含5g氢化钠的60%矿物油。室温搅拌1h。加入20g溶解于50mL四氢呋喃的化合物8,在50℃条件下搅拌12h。加入饱和NH<sub>4</sub>Cl溶液,使用乙酸乙酯萃取,重复3次,合并有机相,使用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残渣经硅胶柱纯化,得到白色固体(化合物9)。

[0041] 7、将10g化合物9,5g钨碳催化剂溶于50mL乙醇中,在氢气保护下,50℃加热12h。过滤,除去催化剂。真空下,移除有机相。残渣经硅胶柱纯化,得到白色粉末(化合物10)。

[0042] 8、将2.5g化合物10,2.5g化合物11,1g吡啶溶于100mL的乙腈中,60℃下搅拌24h。真空下移除有机相,残渣中加水,用二氯甲烷提取,重复3次。合并有机相,使用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残渣经硅胶柱纯化,得到白色粉末(化合物12)。

[0043] 9、将1g化合物12,1g的NaOH加入水和乙醇中,回流24h,并使用薄层色谱进行监控,直至化合物12被完全反应。真空下移除乙醇,加水,用1M HCl调整pH值为3。将沉淀过滤,干燥,得白色粉末,即为终产物磺胺二甲嘧啶戊酸。取合成的磺胺类药物半抗原经核磁共振氢谱( $^1\text{H-NMR}$ )测定,结构如图2所示。

[0044] 第三方面,本发明提供磺胺类药物人工抗原,是由所述磺胺类药物半抗原与载体蛋白偶联后得到。所述磺胺类药物人工抗原可以作为免疫原也可以作为包被原。

[0045] 其中,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、甲状腺蛋白、人血清白蛋白(HSA);优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

[0046] 第四方面,本发明提供所述人工抗原的制备方法,通过碳二亚胺或混合酸酐法使所述磺胺类药物半抗原与载体蛋白偶联制得人工抗原。具体地,采用活化酯法将载体蛋白偶联于所述半抗原的羧基碳上。具体地,采用活化酯法将半抗原的羧基与载体蛋白上的赖氨酸偶联,生成酰胺键。

[0047] 优选地,式(1)所示化合物与载体蛋白的偶联摩尔比为7-13:1。优选地,式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联摩尔比为12.3:1。

[0048] 第五方面,本发明提供由所述磺胺类药物人工抗原制备的特异性抗体,包括多克隆抗体和单克隆抗体。

[0049] 第六方面,本发明提供所述磺胺类药物半抗原或所述磺胺类药物人工抗原的以下任一应用:

[0050] ①在制备抗磺胺类药物特异性抗体中的应用;

[0051] ②在检测抗磺胺类药物特异性抗体中的应用。

[0052] 第七方面,本发明提供抗磺胺类药物多克隆抗体,由所述人工抗原免疫实验动物获得。

[0053] 优选地,所述人工抗原由所述磺胺类药物半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联得到。

[0054] 本发明提供的多克隆抗体为广谱抗体,可以同时检测单环类磺胺(氨苯磺胺、磺胺醋酰、磺胺胍),五元杂环双环类磺胺(磺胺苯吡唑、酞磺胺噻唑、磺胺二甲异噻唑、磺胺噻唑、磺胺甲基异噻唑、磺胺二甲噻唑、磺胺甲二唑)和六元杂环双环类磺胺(磺胺硝苯、柳氮磺胺吡啶、磺胺吡啶、磺胺氯吡啶、磺胺甲氧吡啶、磺胺乙氧吡啶、磺胺喹噁啉、磺胺氯吡啶、磺胺多辛、磺胺苯酰、磺胺林、磺胺二甲基异嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺溴二甲嘧啶)等。

[0055] 第八方面,本发明提供由所述特异性抗体或所述多克隆抗体制备的磺胺类药物检测试剂或试剂盒。

[0056] 第九方面,本发明提供所述特异性抗体或所述多克隆抗体的以下任一应用:

[0057] (1)在检测磺胺类药物中的应用;

[0058] (2)在制备磺胺类药物的免疫层析试纸条中的应用;

[0059] (3)在制备磺胺类药物的胶体金检测试纸条中的应用。

[0060] 本发明中,所述磺胺类药物包括但不限于单环类磺胺(氨苯磺胺、磺胺醋酰、磺胺胍),五元杂环双环类磺胺(磺胺苯吡唑、酞磺胺噻唑、磺胺二甲异噻唑、磺胺噻唑、磺胺甲基异噻唑、磺胺二甲噻唑、磺胺甲二唑)和六元杂环双环类磺胺(磺胺硝苯、柳氮磺胺吡啶、磺胺吡啶、磺胺氯吡啶、磺胺甲氧吡啶、磺胺乙氧吡啶、磺胺喹噁啉、磺胺氯吡啶、磺胺多辛、磺

胺苯酰、磺胺林、磺胺二甲基异嘧啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺溴二甲嘧啶)。

[0061] 第十方面,本发明提供基于所述多克隆抗体和包被原建立的快速、灵敏、广谱的磺胺类药物的酶联免疫分析方法。

[0062] 优选地,所述包被原由所述磺胺类药物半抗原与牛血清白蛋白偶联得到。

[0063] 借由上述技术方案,本发明至少具有下列优点及有益效果:

[0064] 本发明首次公开了新的磺胺类药物半抗原、人工抗原及其制备方法,用所述磺胺类药物人工抗原免疫动物,可得到效价高,灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的磺胺类药物半抗原及其制备的抗体,为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的磺胺类药物检测方法提供了新手段。

[0065] 利用本发明提供的半抗原与载体蛋白的偶联物制备磺胺类药物抗体,制备过程简单、经济,抗体的检测灵敏度高、实用价值高。本发明在兽药残留检测中具有良好的应用前景。

## 附图说明

[0066] 图1为本发明实施例1中磺胺类药物半抗原合成路线。

[0067] 图2为本发明实施例1中制备的磺胺类药物半抗原核磁共振氢谱。

[0068] 图3为本发明实施例3中磺胺类药物包被原MALDI-TOF谱图。

[0069] 图4为本发明实施例5中磺胺类药物酶联免疫分析标准曲线。

## 具体实施方式

[0070] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

[0071] 实施例1磺胺类药物半抗原的制备和鉴定

[0072] 1、将100g的4-溴丁酸乙酯(化合物1),150g的三苯基膦混合,在1L甲苯中回流反应24h。沉淀过滤,回收,并用石油醚洗涤,重复操作3次。真空干燥,得到白色固体产物(化合物2)。

[0073] 2、将200g的2,4-戊二酮(化合物3),200g的盐酸胍(化合物4)溶于2L的水中,逐步加入550g碳酸钾。反应混合物在40℃下搅拌24h。沉淀经过滤,用水洗涤,重复3次。真空下干燥,得到灰白色固体(化合物5)。

[0074] 3、将150g化合物5,200g的N-溴代丁二酰亚胺加入1L乙腈中,80℃条件下加热6h。沉淀经过滤,用冷的乙腈洗涤,真空条件下干燥,得白色固体(化合物6)。

[0075] 4、将100g化合物6溶解于1L的DMF中。将50g溶解于60%矿物油中的NaH在0℃下分批加入,在低温条件下,继续搅拌1h,逐渐加入150g苄基氯。混合物在室温搅拌24h。后加入4L水,使用乙酸乙酯萃取,重复3次。合并乙酸乙酯相,用水清洗,重复3次;饱和盐水清洗,重复3次;用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残渣经硅胶柱纯化,得到无色油状物(化合物7)。

[0076] 5、将50g化合物7溶解于500mL的四氢呋喃中,降温至-78℃。在氮气保护下,逐滴加入200mL的1M的正丁基锂,继续搅拌1h。加入50mL DMF,逐步恢复至室温,并搅拌1h。加入饱和氯化铵溶液,使用二氯甲烷进行萃取,收集二氯甲烷相,Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残渣经硅胶柱

纯化,得到白色固体(化合物8)。

[0077] 6、将50g化合物2溶于500mL四氢呋喃中,冷却至0℃,加入含5g氢氧化钠的60%矿物油。室温搅拌1h。加入20g溶解于50mL四氢呋喃的化合物8,在50℃条件下搅拌12h。加入饱和NH<sub>4</sub>Cl溶液,使用乙酸乙酯萃取,重复3次,合并有机相,使用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残渣经硅胶柱纯化,得到白色固体(化合物9)。

[0078] 7、将10g化合物9,5g钨碳催化剂溶于50mL乙醇中,在氢气保护下,50℃加热12h。过滤,除去催化剂。真空下,移除有机相。残渣经硅胶柱纯化,得到白色粉末(化合物10)。

[0079] 8、将2.5g化合物10,2.5g化合物11,1g吡啶溶于100mL的乙腈中,60℃下搅拌24h。真空下移除有机相,残渣中加水,用二氯甲烷提取,重复3次。合并有机相,使用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残渣经硅胶柱纯化,得到白色粉末(化合物12)。

[0080] 9、将1g化合物12,1g的NaOH加入水和乙醇中,回流24h,并使用薄层色谱进行监控,直至化合物12被完全反应。真空下移除乙醇,加水,用1M HCl调整pH值为3。将沉淀过滤,干燥,得白色粉末,即为终产物磺胺二甲嘧啶戊酸。取合成的磺胺类药物半抗原经核磁共振氢谱(<sup>1</sup>H-NMR)测定,结构如图2所示。

[0081] 实施例2磺胺类药物免疫抗原磺胺二甲嘧啶戊酸-血蓝蛋白的制备

[0082] 1、取0.1mmol磺胺二甲嘧啶戊酸,40mg N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 25mg N-hydroxysuccinimide (NHS) 加入1mL DMF中,室温过夜搅拌,对半抗原羧基进行酯化(活化)。

[0083] 2、将活化产物取出,4000rpm离心10min。

[0084] 3、称取100mg的KLH,溶于20mL预冷的PBS中。

[0085] 4、取活化产物离心后的上清液,逐滴缓慢加入KLH溶液中,4℃条件下过夜搅拌。

[0086] 5、将上述反应产物置于透析袋中,在5L透析液中透析过夜。

[0087] 6、取出产物,分装后冻存于-70℃冰柜,即为免疫原磺胺二甲嘧啶戊酸-KLH。实施例3磺胺类药物检测用包被原磺胺二甲嘧啶戊酸-牛血清白蛋白的制备

[0088] 1、取0.5mmol磺胺二甲嘧啶戊酸,200mg N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 100mg N-hydroxysuccinimide (NHS) 加入1mL DMF中,室温过夜搅拌,对半抗原羧基进行酯化(活化)。

[0089] 2、将活化产物取出,4000rpm离心10min。

[0090] 3、称取500mg的BSA,溶于20mL预冷的PBS中。

[0091] 4、取活化产物中离心后的上清液,逐滴缓慢加入BSA溶液中,4℃条件下过夜搅拌。

[0092] 5、将上述反应产物置于透析袋中,透析三天,每8小时更换一次透析液。

[0093] 6、取出产物,分装后冻存于-20℃冰柜,即为包被原磺胺二甲嘧啶戊酸-BSA。

[0094] 7、取合成的磺胺类药物包被原磺胺二甲嘧啶戊酸-BSA经MALDI-TOF测定,如图3所示,其主峰的m/z为71759.7,表明半抗原磺胺二甲嘧啶戊酸与载体蛋白BSA偶联成功,其偶联摩尔比为12.3:1。

[0095] 实施例4磺胺类药物检测用多克隆抗体的制备

[0096] 以实施例2制备的偶联物磺胺二甲嘧啶戊酸-KLH为免疫原,免疫50只6-8周龄雌性BALB/c小鼠(SPF级别),免疫程序为一次基础免疫及数次加强免疫。

[0097] 首次免疫时将100μg免疫原与等体积的弗氏完全佐剂混合,进行乳化。蛋白乳液多

点注射于小鼠的颈背部皮下,200 $\mu$ L每只进行基础免疫。

[0098] 将50 $\mu$ g免疫原与等体积的弗氏不完全佐剂混合,进行乳化。在首次免疫后4周进行第一次加强免疫,后3周进行第二次加强免疫,后3周进行第三次加强免疫,体积均为200 $\mu$ L每只。

[0099] 从免疫二次起,每次免疫后第8天眼眶采血,分离血清,间接竞争ELISA检测血清抗体的效价,识别磺胺药物的种类,以及半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

[0100] 选择效价高、识别谱广、IC<sub>50</sub>值低的小鼠,摘除眼球,收集血液,离心获得抗血清,即为磺胺类药物多克隆抗体。

[0101] 实施例5磺胺类药物酶联免疫分析方法的建立

[0102] 1、试剂配制

[0103] 包被缓冲液:Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.59g,NaHCO<sub>3</sub> 2.93g,加蒸馏水至1L,混匀。

[0104] 封闭缓冲液:小牛血清50mL,蔗糖50g,酪蛋白2.5g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 5.8g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.593g,NaCl 8g,proclin 300 300 $\mu$ L,加蒸馏水定容至1L,混匀,置4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

[0105] 抗体稀释液:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.6g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.072g,NaCl 16g,KCl 0.4g,proclin300 200 $\mu$ L,triton X-100 500 $\mu$ L,加蒸馏水至1L,混匀,置4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

[0106] 标准品稀释液:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 2.9g,NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.59g,NaCl 8.5g,KCl 0.2g,加蒸馏水定容至1L,混匀。

[0107] 酶标抗体稀释液:NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.6g,Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.072g,NaCl 16g,KCl 0.4g,proclin 300 200 $\mu$ L,蒸馏水950mL,溶解后加入50mL已灭活小牛血清,混匀,置4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

[0108] 洗涤缓冲液(20 $\times$ ):Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 23.2g,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g,NaCl 64g,KCl 0.036g,Tween-20 20mL,proclin 300 300 $\mu$ L,加水980mL定容至1L。稀释20倍使用。

[0109] 底物缓冲液:Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 3.68g,柠檬酸0.933g,加蒸馏水至100mL。

[0110] TMB储存液:取10mg TMB溶于4mL乙二醇,避光保存。

[0111] 底物液:取TMB储存液0.4mL,底物缓冲液10mL,30%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 $\mu$ L,避光保存。

[0112] 终止缓冲液:取98%浓硫酸22.2mL,加蒸馏水177.8mL,混匀。

[0113] 2、方阵滴定

[0114] 采用方阵滴定法筛选最佳的包被原浓度和抗体稀释度。使用包被缓冲液将包被原倍比稀释成1:5 000,1:10 000,1:20 000,1:40 000,1:80 000和1:160 000,从第1至第12列依次纵向加入96孔酶标板中,包被,每个稀释度设置1个重复。使用抗体稀释液将多克隆抗体倍比稀释成1:2 000,1:4 000,1:8 000,1:16 000,1:32 000,1:64 000,1:128 000和1:256 000,从第1至第8行依次横向加入96孔酶标板,做间接ELISA。同时,每一个包被原、抗体浓度组合,加入1ng/mL(1ppb)的磺胺二甲基嘧啶,进行竞争反应。方阵滴定结果见表1,初步选择OD值接近2.0,相邻两孔OD值有较大变化,且竞争较好的包被浓度及对应的抗体稀释度组合。从表1中选择包被原1:80000的浓度和抗体1:64000的稀释度组合。

[0115] 表1方阵滴定法

		包被原												
		1:5 000		1:10 000		1:20 000		1:40 000		1:80 000		1:160 000		
		PBS	1 ppb	PBS	1 ppb	PBS	1 ppb	PBS	1 ppb	PBS	1 ppb	PBS	1 ppb	
[0116]	多	1:2 000	2.576	2.524	2.773	2.737	2.673	2.51	2.726	2.592	2.798	2.748	2.785	2.673
	克	1:4 000	2.657	2.481	2.733	2.688	2.688	2.648	2.568	2.561	2.769	2.769	2.71	2.553
	隆	1:8 000	2.666	2.658	2.864	2.803	2.683	2.55	2.65	2.65	2.71	2.683	2.626	2.396
	抗	1:16 000	2.67	2.67	2.795	2.774	2.615	2.587	2.654	2.574	2.83	2.382	2.517	2.077
	体	1:32 000	2.677	2.617	2.747	2.617	2.719	2.345	2.564	1.989	2.47	1.638	2.126	1.418
		1:64 000	2.49	2.23	2.486	2.061	2.416	1.744	2.159	1.293	1.965	1.014	1.558	0.822
		1:128 000	1.983	1.494	1.824	1.266	1.688	1.066	1.466	0.816	1.212	0.567	0.988	0.469
		1:256 000	1.419	1	1.265	0.862	1.192	0.709	1.001	0.529	0.857	0.386	0.673	0.337

[0117] 3、标准曲线建立

[0118] 将单环类磺胺(氨苯磺胺、磺胺醋酰、磺胺胍),五元杂环双环类磺胺(磺胺苯吡唑、酞磺胺噻唑、磺胺二甲异噁唑、磺胺噻唑、磺胺甲基异噁唑、磺胺二甲噁唑、磺胺甲二唑)和六元杂环双环类磺胺(磺胺硝苯、柳氮磺胺吡啶、磺胺吡啶、磺胺氯吡嗪、磺胺甲氧吡嗪、磺胺乙氧吡嗪、磺胺喹噁啉、磺胺氯吡嗪、磺胺多辛、磺胺苯酰、磺胺林、磺胺二甲基异噻啶、磺胺间甲氧嘧啶、磺胺对甲氧嘧啶、磺胺嘧啶、磺胺二甲基嘧啶、磺胺间二甲氧嘧啶、磺胺甲基嘧啶、磺胺溴二甲嘧啶)等标准品配制8个浓度梯度,每个浓度3个平行孔,做间接竞争ELISA,绘制标准曲线,计算 $IC_{50}$ 值,其中磺胺甲基嘧啶的标准曲线如图4所示。

[0119] 4、交叉反应率测定

[0120] 将上述 $IC_{50}$ 值与磺胺喹噁啉的 $IC_{50}$ 值对比,得到交叉反应率,结果如表2所示。本研究建立的间接竞争ELISA方法对所测定的32种磺胺类药物均存在一定程度的交叉反应率。

[0121] 表2 ELISA方法 $IC_{50}$ 值及抗体交叉反应率

SAs	多克隆抗体	
	IC <sub>50</sub> (ng/mL)	CR (%)
氨苯磺胺	19.65	7.8%
磺胺醋酰	9.63	15.9%
磺胺胍	20.43	7.5%
磺胺苯吡唑	10.29	14.9%
酞磺胺噻唑	19.72	7.8%
磺胺二甲异噁唑	2.52	60.7%
磺胺噻唑	2.77	55.2%
磺胺甲基异噁唑	2.01	76.1%
磺胺二甲噁唑	0.61	250.8%
磺胺甲二唑	0.64	239.1%
磺胺硝苯	14.22	10.8%
柳氮磺胺吡啶	17.35	8.8%
磺胺吡啶	7.9	19.4%
磺胺氯哒嗪	6.64	23.0%
磺胺甲氧哒嗪	5.01	30.5%
磺胺乙氧哒嗪	8.47	18.1%
磺胺喹噁啉	<b>1.53</b>	<b>100.0%</b>
磺胺氯吡嗪	2.98	51.3%
磺胺多辛	3.72	41.1%
磺胺苯酰	0.78	196.2%
磺胺林	1.42	107.7%
磺胺二甲基异噻啶	1.62	94.4%
磺胺间甲氧噻啶	1.35	113.3%
磺胺对甲氧噻啶	0.31	493.5%
磺胺噻啶	0.31	493.5%
磺胺二甲基噻啶	0.94	162.8%
磺胺间二甲氧噻啶	0.56	273.2%
磺胺甲基噻啶	0.23	665.2%
磺胺溴二甲噻啶	0.56	273.2%

[0123] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之做一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

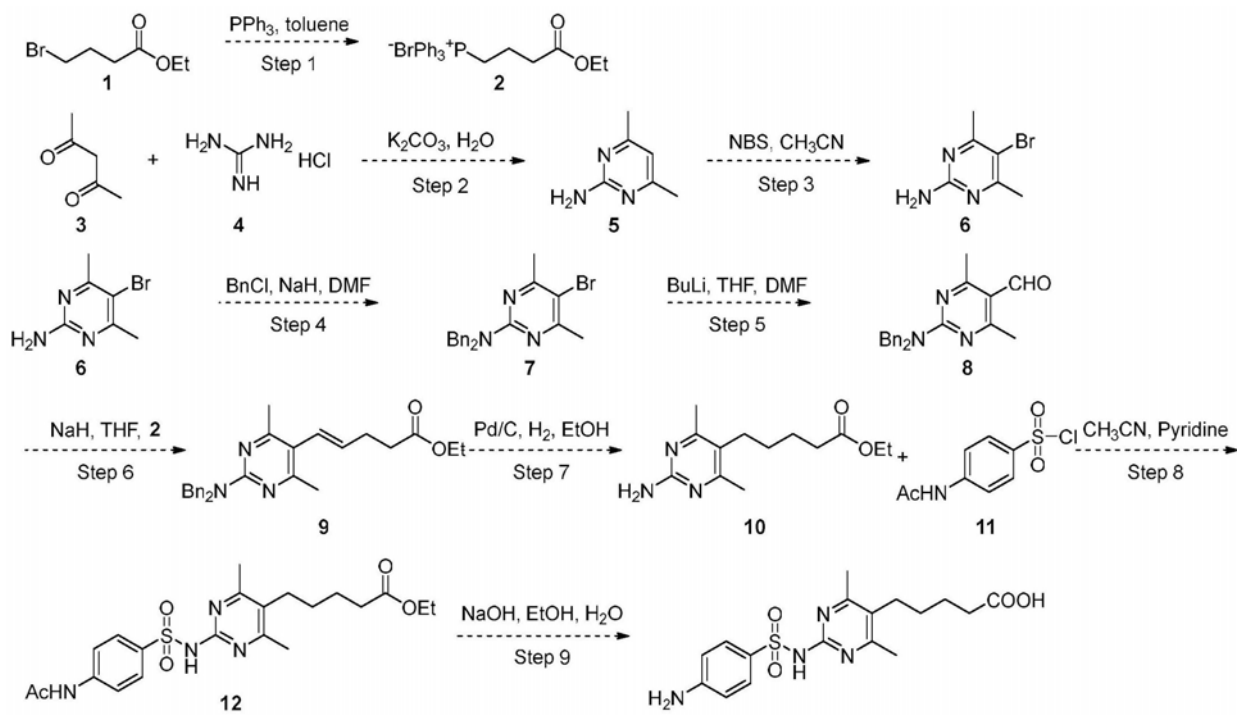


图1

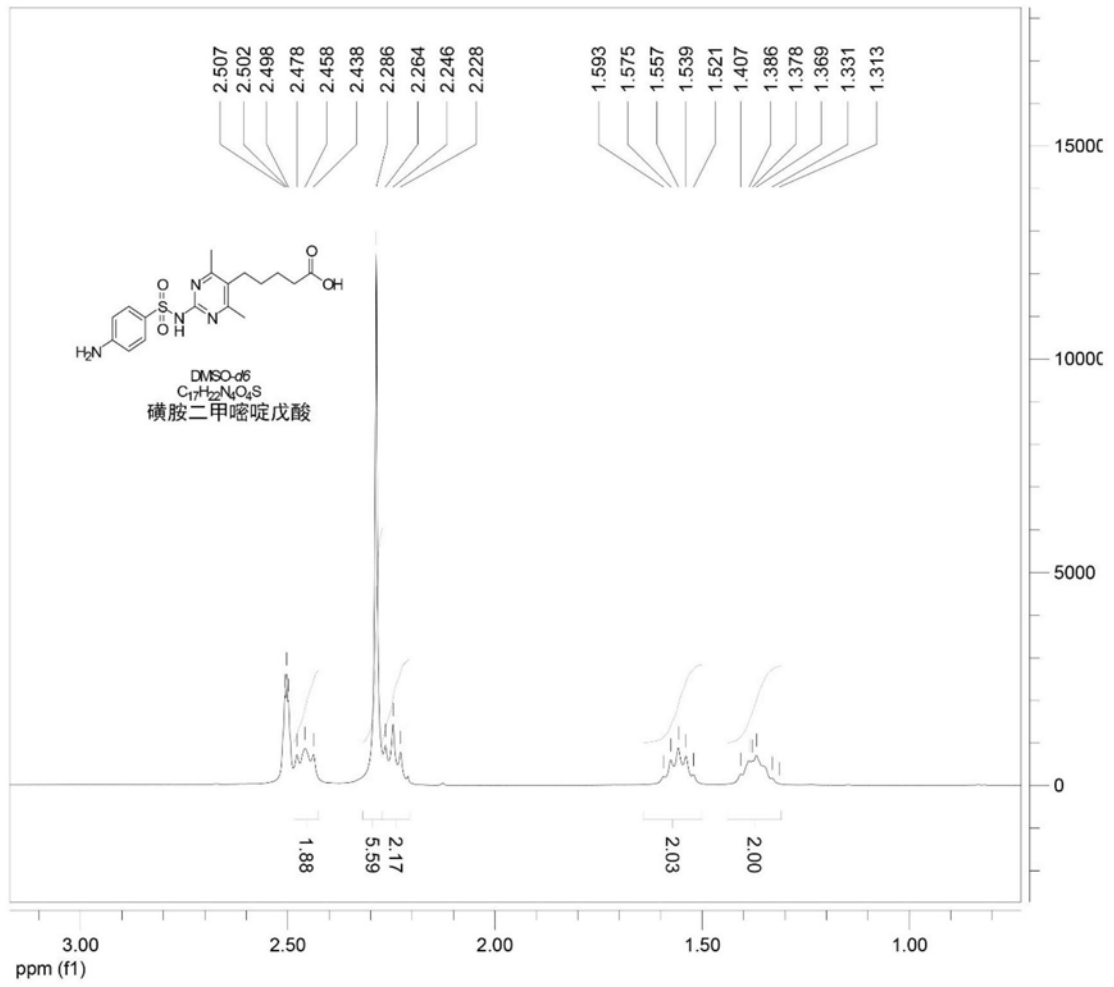


图2

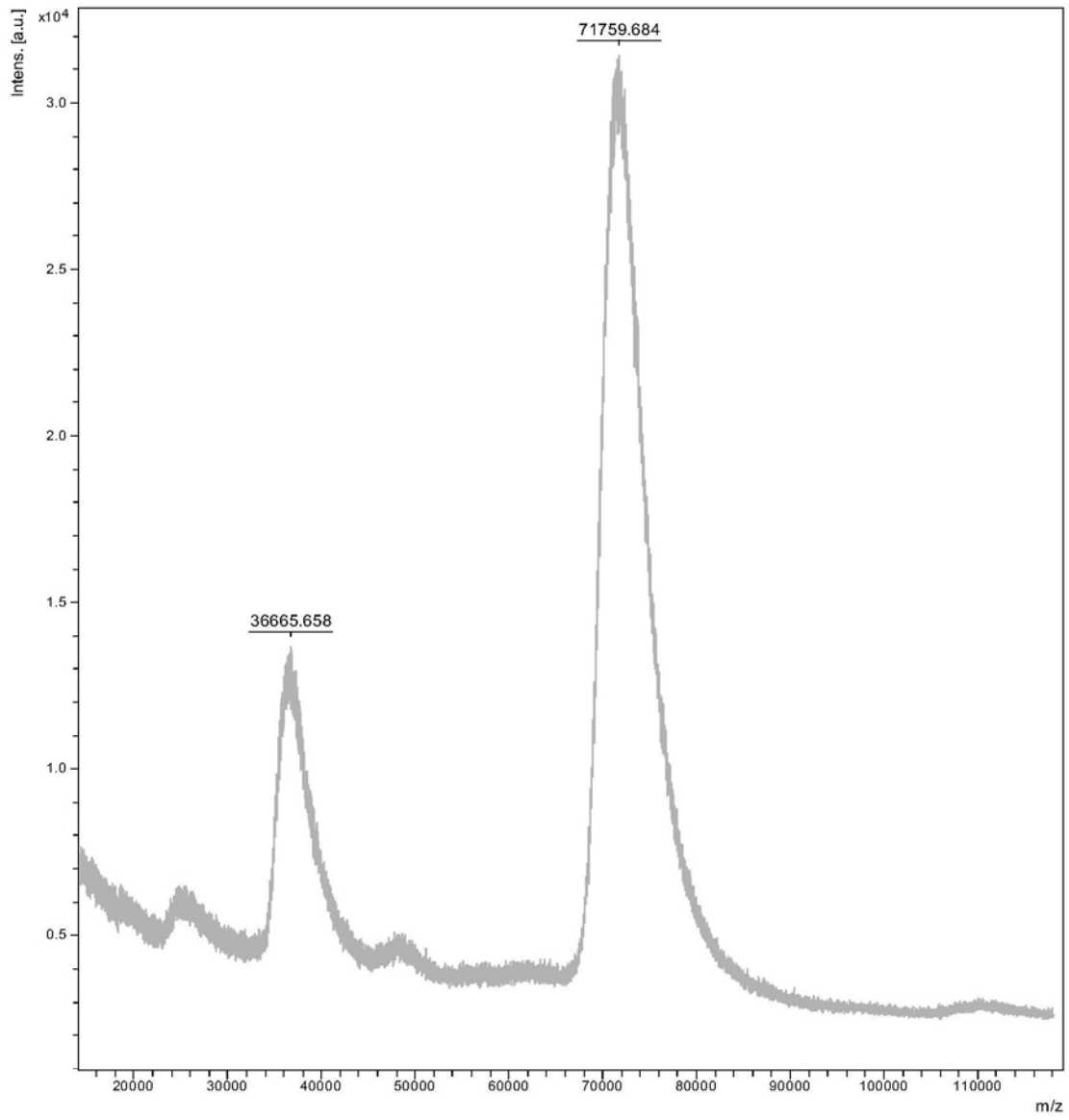


图3

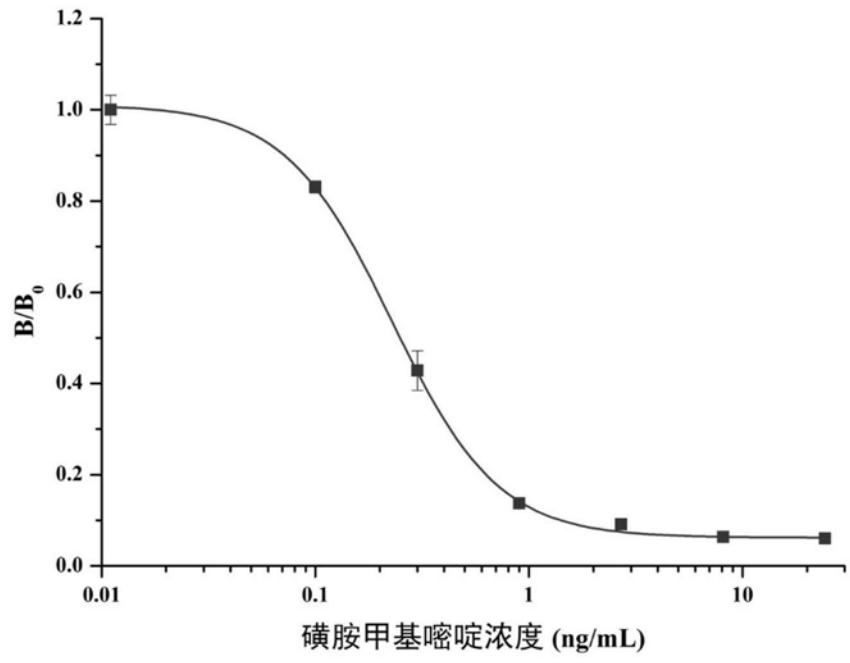
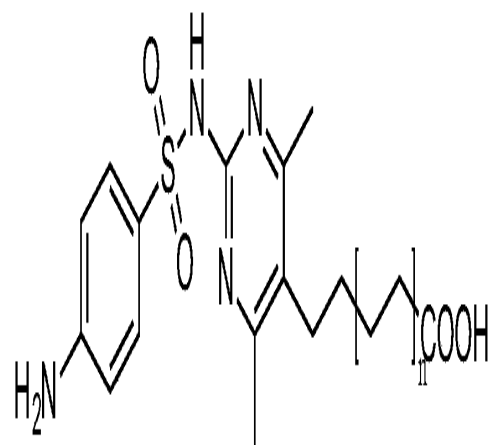


图4

专利名称(译)	磺胺类药物半抗原和人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109824604B</a>	公开(公告)日	2020-06-23
申请号	CN201910138537.7	申请日	2019-02-25
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	王战辉 沈建忠 温凯 李成龙 柯跃斌 张素霞 史为民		
发明人	王战辉 沈建忠 温凯 李成龙 柯跃斌 张素霞 史为民		
IPC分类号	C07D239/42 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/68 G01N33/577 G01N33/53		
代理人(译)	王文君 陈征		
其他公开文献	CN109824604A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及磺胺类药物半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述磺胺类药物半抗原的结构如式(1)所示：其中， $n = 0$ ，或 $\geq 1$ 的整数。所述磺胺类药物人工抗原是由式(1)所示半抗原与载体蛋白偶联得到。利用所述磺胺类药物人工抗原免疫动物，可得到效价高，灵敏度高的特异性抗体。本发明提供的磺胺类药物半抗原及其制备的抗体，为建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的磺胺类药物检测方法提供了新手段。



式(1)