



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110713457 A

(43)申请公布日 2020.01.21

(21)申请号 201910953596.X

C07K 16/44(2006.01)

(22)申请日 2019.10.09

G01N 33/53(2006.01)

(71)申请人 中国农业大学

地址 100191 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
于雪芝 张素霞 史为民 余文博

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 吴爱琴

(51)Int.Cl.

C07D 213/76(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

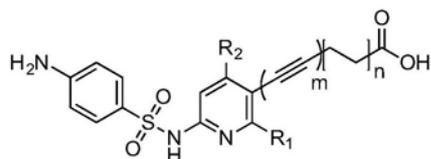
权利要求书3页 说明书11页 附图4页

(54)发明名称

磺胺吡啶类半抗原和人工抗原及其制备方法与应用

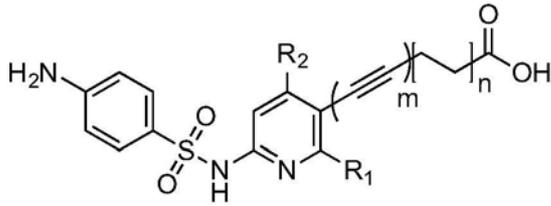
(57)摘要

本发明涉及磺胺吡啶类半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述磺胺吡啶类半抗原的结构如式(1)所示。其中,R₁、R₂为氢、甲基或甲氧基;m为单键、双键或三键;n=0,或≥1的整数。所述磺胺吡啶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。利用所述磺胺吡啶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。本发明提供的磺胺吡啶类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 110713457 A

1. 一种磺胺吡啶类半抗原,其结构如式(1)所示:

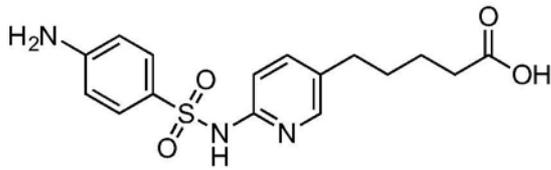


式(1)

其中,R₁、R₂独立地为氢、甲基或甲氧基;m为单键、双键或三键;n=0,或≥1的整数。

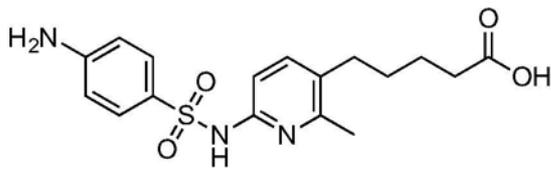
2. 根据权利要求1所述的磺胺吡啶类半抗原,其特征在于:

所述式(1)所示磺胺吡啶类半抗原为式(I)所示化合物:



式(I),

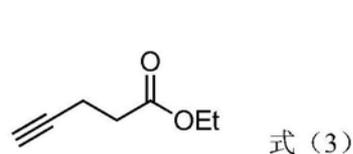
或,式(II)所示化合物:



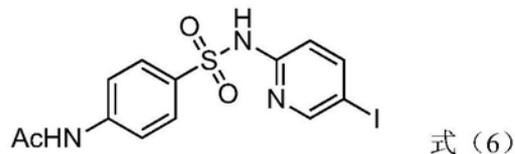
式(II)。

3. 制备权利要求2中式(I)所示磺胺吡啶类半抗原的方法,包括如下步骤:

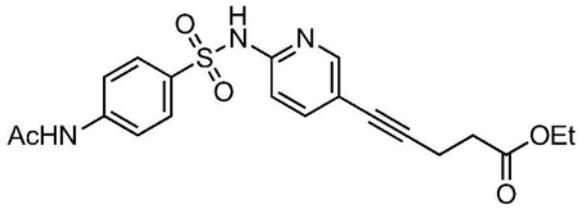
- 1) 4-戊炔酸与乙醇反应得到式(3)所示化合物;
 - 2) 对乙酰胺基苯磺酰氯与2-氨基-5-碘吡啶反应得到式(6)所示化合物;
 - 3) 式(6)所示化合物与式(3)所示化合物反应得到式(7)所示化合物;
 - 4) 式(7)所示化合物发生还原反应得到式(8)所示化合物;
 - 5) 式(8)所示化合物发生水解反应得到式(I)所示化合物;
- 其中,步骤1)-5)中所述化合物的结构如下:



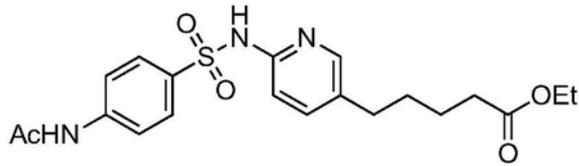
式(3)



式(6)



式 (7)

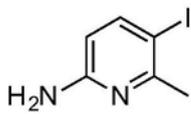


式 (8)。

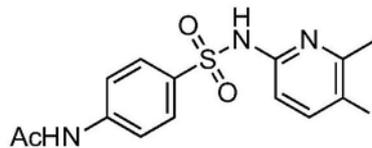
4. 制备权利要求2中式 (II) 所示磺胺吡啶类半抗原的方法, 包括如下步骤:

- 1) 4-戊炔酸与乙醇反应得到式 (3) 所示化合物;
- 2) 2-氨基-6-甲基吡啶与N-碘代丁二酰亚胺反应得到式 (10) 所示化合物;
- 3) 对乙酰胺基苯磺酰氯与式 (10) 所示化合物反应得到式 (11) 所示化合物;
- 4) 式 (11) 所示化合物与式 (3) 所示化合物反应得到式 (12) 所示化合物;
- 5) 式 (12) 所示化合物发生还原反应得到式 (13) 所示化合物;
- 6) 式 (13) 所示化合物发生水解反应得到式 (II) 所示化合物;

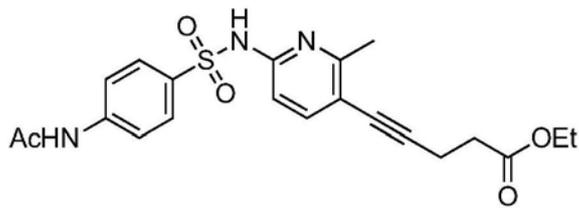
其中, 步骤1)-6) 中所述化合物的结构如下:



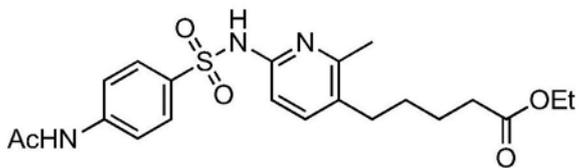
式 (10)



式 (11)



式 (12)



式 (13)。

5. 磺胺吡啶类药物人工抗原, 由权利要求1中所述磺胺吡啶类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。

6. 权利要求5所述磺胺吡啶类药物人工抗原的制备方法, 为: 通过碳二亚胺或混合酸酐法使所述磺胺吡啶类半抗原与载体蛋白偶联制得人工抗原。

7. 由权利要求5所述人工抗原制备的特异性抗体, 包括多克隆抗体、单克隆抗体、重链抗体和重组抗体。

8. 权利要求1所述半抗原或权利要求5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。

9. 抗磺胺类药物多克隆抗体,由权利要求5所述人工抗原免疫实验动物获得;具体地,所述人工抗原由所述磺胺吡啶类半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联得到。

10. 由权利要求7所述特异性抗体或权利要求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7所述特异性抗体或权利要求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ELISA检测试剂盒中的应用;

(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、磺胺醋酸、磺胺胍、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、磺胺甲噻二唑、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、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺苯酰、磺胺甲氧吡嗪、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。

磺胺吡啶类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,具体涉及磺胺吡啶类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)具有抗菌谱较广、价格低廉、种类较多等优点,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源食品中SAs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,SAs残留的检测主要是色谱-串联质谱联用(LC-MS/MS)的理化分析方法。而该方法需要昂贵的仪器、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。

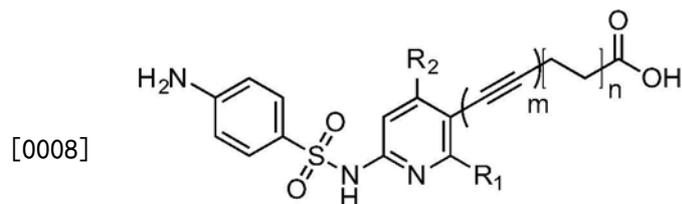
[0004] 以抗原和抗体的特异性、可逆性结合反应为基础的免疫分析技术,以其速度快、成本低、灵敏度高等优点,目前被新修订的《食品安全法》认可,并广泛用于动物源样本中SAs的快速筛选。单一磺胺药物的检测方法在实际应用中存在很大的局限性,SAs多残留检测方法是目前的研究趋势,而作为核心试剂的广谱性SAs的抗体又制约着多残留免疫分析方法的发展。

[0005] 制备广谱性抗体的关键在于半抗原。迄今为止,已有SA1-CH₂-、BS、HS、SA2、CS、S9、SA10、S4、SA1、S5、H1、TS、SA10-X、SA8、SA9、PS、H2、Acet-SA1-CH₂-、S7、S8、SA3、SA4、SA5和SA6等20余种磺胺半抗原被合成,并制备了相应的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] 本发明的目的之一是提供一种磺胺吡啶类半抗原及其制备。

[0007] 本发明所提供的磺胺吡啶类半抗原,其为磺胺(甲基/甲氧基)吡啶(烯/炔)戊酸,结构如式(1)所示:

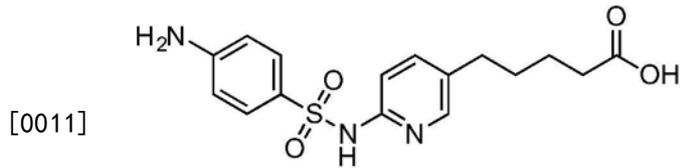


式(1)

[0009] 其中,R₁、R₂可独立地为氢、甲基或甲氧基;m为单键、双键或三键;n=0,或≥1的整

数。

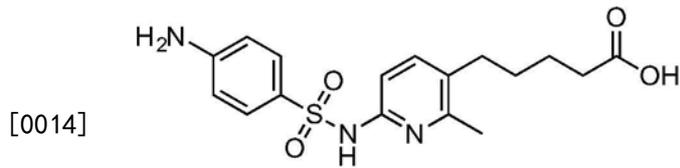
[0010] 具体地,式(1)所示磺胺吡啶类半抗原为式(I)所示化合物:



式(I)

[0012] 即,式(1)中, R_1 、 R_2 同为氢, m 为单键, $n=1$;

[0013] 或,式(1)所示磺胺吡啶类半抗原为式(II)所示化合物:



式(II)

[0015] 即,式(1)中, R_1 为甲基、 R_2 为氢, m 为单键, $n=1$ 。

[0016] 本发明还提供上述半抗原的制备方法,当 R_1 、 R_2 为氢, m 为单键, $n=1$ 时,式(I)所示化合物的制备方法包括如下步骤:

[0017] 1) 4-戊炔酸与乙醇反应得到式(3)所示化合物;

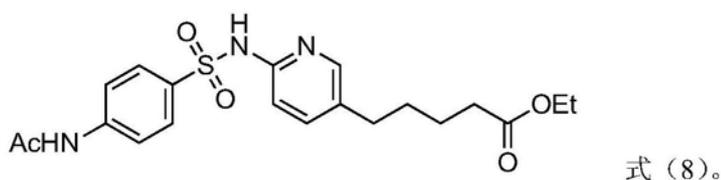
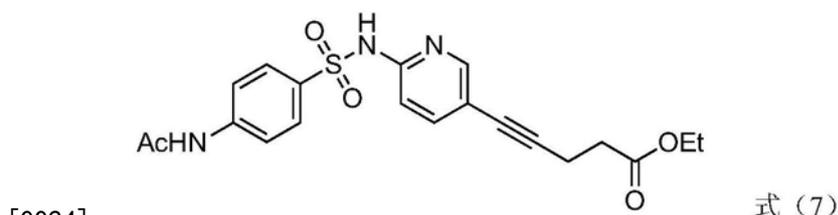
[0018] 2) 对乙酰胺基苯磺酰氯与2-氨基-5-碘吡啶反应得到式(6)所示化合物;

[0019] 3) 式(6)所示化合物与式(3)所示化合物反应得到式(7)所示化合物;

[0020] 4) 式(7)所示化合物发生还原反应得到式(8)所示化合物;

[0021] 5) 式(8)所示化合物发生水解反应得到式(I)所示化合物(R_1 、 R_2 为氢, m 为单键, $n=1$);

[0022] 其中,步骤1)-5)中所述化合物的结构如下:



[0025] 具体地,式(I)所示化合物的制备方法包括如下步骤:

[0026] 1') 将4-戊炔酸,浓硫酸和乙醇混合,80℃的条件下加热16h,室温冷却后,加入适量碳酸氢钠至中性,在真空条件下,移除有机试剂,加入水,萃取生成的酯,加入硫酸钠干燥,并浓缩至无色的油状,得到式(3)所示化合物;

[0027] 2') 将对乙酰胺基苯磺酰氯,2-氨基-5-碘吡啶和吡啶加入乙腈中,70℃下反应16h,真空条件下移除有机溶剂,得到固体,残渣经薄层色谱分离,得到式(6)所示化合物;

[0028] 3') 在氮气保护下,将式(6)所示化合物,CuI,二(三苯基膦)二氯化钯,三乙胺和式(3)所示化合物,加入四氢呋喃中,65℃下反应16h,真空条件下移除有机相。残渣中加入水,使用CH₂Cl₂萃取,并重复操作2次,提取液经Na₂SO₄干燥并浓缩,残渣经薄层色谱纯化,得到式(7)所示化合物;

[0029] 4') 取式(7)所示化合物和钯碳催化剂,加入乙醇中,在氢气保护下反应,薄层色谱监控反应至完全,过滤,除去催化剂,真空下,移除有机相,残渣经薄层色谱纯化,得到式(8)所示化合物;

[0030] 5') 将式(8)所示化合物、NaOH溶于水和乙醇中,80℃加热16h,移除有机相后,残渣中加入HCl,至pH为3,将生成的沉淀过滤,在乙醇中结晶,得到式(I)所示化合物(R₁、R₂为氢,m为单键,n=1)。

[0031] 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

[0032] 1):

[0033] 1) 将25g的4-戊炔酸(化合物2),1mL的浓硫酸和200mL的乙醇混合,80℃的条件下加热16h,室温冷却后,加入适量碳酸氢钠至中性,在真空条件下,移除有机试剂,加入200mL水,萃取生成的酯,并重复操作一次,合并有机相,加入硫酸钠干燥,并浓缩至无色的油状(化合物3) 21.05g,产率约为66%,

[0034] 2) 将23.20g对乙酰胺基苯磺酰氯(化合物4),20.00g的2-氨基-5-碘吡啶(化合物5)和14.20g吡啶加入500mL乙腈中,70℃下反应16h,真空条件下移除有机溶剂,得到固体25g,残渣经薄层色谱分离,得到白色固体6.2g(化合物6),其展开剂为CH₂Cl₂/CH₃OH(50:1,v/v),产率约为33%;

[0035] 3) 在氮气保护下,将6.0g化合物6,274mg的CuI,1.01g的二(三苯基膦)二氯化钯,14.50g的三乙胺,2.35g的化合物3,加入200mL的四氢呋喃中,65℃下反应16h,真空条件下移除有机相,残渣中加入200mL的水,使用200mL的CH₂Cl₂萃取,并重复操作2次,提取液经Na₂SO₄干燥并浓缩,残渣经薄层色谱纯化,展开剂为CH₂Cl₂/CH₃OH(30:1,v/v),得到白色固体3.10g(化合物7),产率约为50%;

[0036] 4) 取3.00g化合物7,3.00g钯碳催化剂,加入50mL乙醇中,在氢气保护下(1atm)反应,薄层色谱监控反应至完全。过滤,除去催化剂。真空下,移除有机相,残渣经薄层色谱纯化,流动相为CH₂Cl₂/CH₃OH(60:1,v/v),得到白色粉末2.1g(化合物8),产率约为70%;

[0037] 5) 将2.05g化合物8,1.92g的NaOH加入到5mL水和25mL的乙醇中,80℃下反应16h,真空中移除乙醇。用1M的HCl调整pH值为3,将沉淀过滤,在乙醇中结晶,得式(I)化合物白色粉末1.05g,产率约为62%,取合成的磺胺吡啶类半抗原(I)经核磁共振氢谱(¹H-NMR)和碳谱(¹³C-NMR)测定,结构如图2所示。

[0038] 本发明还提供所述半抗原的制备方法,当R₁为甲基、R₂为氢,m为单键,n=1时,式(II)化合物的制备方法包括如下步骤:

[0055] 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3):

[0056] 1) 将25g的4-戊炔酸(化合物2),1mL的浓硫酸和200mL的乙醇混合,80°C的条件下加热16h,室温冷却后,加入适量碳酸氢钠至中性,在真空条件下,移除有机试剂。加入200mL水,萃取生成的酯,并重复操作一次,合并有机相,加入硫酸钠干燥,并浓缩至无色的油状(化合物3) 21.05g,产率约为66%;

[0057] 2) 将10.80g的2-氨基-6-甲基吡啶(化合物9)溶于500mL乙腈中,再加入33.7 g的N-碘代丁二酰亚胺,室温反应3h,沉淀经过滤,200mL冷乙腈洗涤,真空条件下干燥,得到灰白色固体12.2g(化合物10),产率约为52%;

[0058] 3) 取12.20g的化合物10,14.60g的对乙酰胺基苯磺酰氯(化合物4),加入200 mL吡啶中,室温搅拌24h,真空下,移除有机试剂至体积为50mL,加入200mL水,有沉淀生成。沉淀过滤,用200mL水洗涤,真空下干燥,得到白色粉末9.40g(化合物 11),产率约为42%;

[0059] 4) 在氮气保护下,将6.50g化合物11,2.50g的4-戊炔酸乙酯(化合物3),300 mg的CuI,600mg的二(三苯基膦)二氯化钯,4mL的三乙胺,加入50mL的四氢呋喃中,回流16h,真空下移除有机相,残留物中加入100mL的水,用100mL的CH₂Cl₂萃取,并重复操作2次,合并有机相,使用Na₂SO₄干燥并浓缩,经薄层色谱纯化,展开剂为石油醚/EtOAc(30:1,v/v),得到灰白色粉末4.80g(化合物12),产率约为75%;

[0060] 5) 取4.80g化合物12,3g的钯碳催化剂,加入30mL乙醇中,在氢气保护下(1 atm)反应1h,过滤,除去催化剂,真空下,移除有机相,残渣经薄层色谱纯化,流动相为CH₂Cl₂/CH₃OH(60:1,v/v),得到无色油状物2.8g(化合物13),产率约为58%;

[0061] 6) 将2.80g化合物13,2.60g的NaOH加入到15mL水和100mL的乙醇中,80°C下反应16h,真空中移除乙醇,残渣中加入30mL的水,使用CH₂Cl₂洗涤,水相中用2M的HCl调整pH值为4,将沉淀过滤,干燥,得式(II)白色粉末1.6g,产率约为67%,取合成的磺胺吡啶类半抗原(II)经核磁共振氢谱(¹H-NMR)和碳谱(¹³C-NMR)测定,结构分别如图4和5所示。

[0062] 本发明的另一目的是提供磺胺吡啶类药物人工抗原,是由所述磺胺吡啶类半抗原与载体蛋白偶联后得到。

[0063] 所述磺胺吡啶类药物人工抗原可以作为免疫原也可以作为包被原。

[0064] 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)、甲状腺球蛋白(TG)、人血清白蛋白(HSA);优选牛血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白。

[0065] 本发明还提供所述人工抗原的制备方法,即,通过碳二亚胺或混合酸酐法使所述磺胺吡啶类半抗原与载体蛋白偶联制得人工抗原。

[0066] 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上。

[0067] 更具体地,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。

[0068] 优选地,式(1)所示化合物与载体蛋白的偶联摩尔比为5:1-25:1,具体地,式(I)所示化合物与载体蛋白的偶联摩尔比为11.8:1,式(II)所示化合物与载体蛋白的偶联摩尔比为12.2:1。

[0069] 本发明的再一目的是提供由上述磺胺吡啶类药物人工抗原制备的特异性抗体。

[0070] 所述特异性抗体包括多克隆抗体、单克隆抗体、重链抗体和重组抗体。

[0071] 本发明提供所述磺胺吡啶类半抗原或所述磺胺吡啶类药物人工抗原的以下任一应用：

[0072] ①在制备抗磺胺类药物特异性抗体中的应用；

[0073] ②在检测抗磺胺类药物特异性抗体中的应用。

[0074] 本发明的又一目的是提供抗磺胺类药物多克隆抗体，所述抗磺胺类药物多克隆抗体由上述人工抗原免疫实验动物获得。

[0075] 具体地，所述人工抗原由所述磺胺吡啶类半抗原与钥孔血蓝蛋白偶联得到。

[0076] 本发明提供多克隆抗体为灵敏、广谱识别性抗体，可以同时检测多种SAs。

[0077] 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。

[0078] 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：

[0079] (1) 在检测磺胺类药物中的应用；

[0080] (2) 在制备磺胺类药物的ELISA检测用试纸盒中的应用；

[0081] (3) 在制备磺胺类药物的胶体金检测试纸条中的应用。

[0082] 在上述应用中，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、磺胺甲噻二唑）和六元杂环双环类磺胺（磺胺硝苯、柳氮磺胺吡啶、磺胺吡啶、磺胺氯哒嗪、磺胺甲氧哒嗪、磺胺乙氧哒嗪、磺胺喹噁啉、磺胺氯吡嗪、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺苯酰、磺胺甲氧吡嗪、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）。

[0083] 本发明还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。

[0084] 优选地，所述包被原由所述磺胺吡啶类半抗原与牛血清白蛋白偶联得到。

[0085] 借由上述技术方案，本发明至少具有下列优点及有益效果：

[0086] 本发明首次公开了新的磺胺吡啶类半抗原、人工抗原及其制备方法，用所述磺胺吡啶类药物人工抗原免疫动物，可得到效价高，灵敏度高、识别谱广的特异性抗体。本发明提供的磺胺吡啶类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。

[0087] 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、识别谱广、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

[0088] 图1为本发明实施例1中磺胺吡啶类半抗原(I)合成路线。

[0089] 图2为本发明实施例1中制备的磺胺吡啶类半抗原(I)核磁共振氢谱和碳谱。

[0090] 图3为本发明实施例2中磺胺吡啶类半抗原(II)合成路线。

[0091] 图4为本发明实施例2中制备的磺胺吡啶类半抗原(II)核磁共振氢谱。

[0092] 图5为本发明实施例2中制备的磺胺吡啶类半抗原(II)核磁共振碳谱。

[0093] 图6为本发明实施例4中磺胺类药物包被原MALDI-TOF谱图。

[0094] 图7为本发明实施例6中磺胺类药物酶联免疫分析标准曲线。

具体实施方式

[0095] 下面通过具体实施例对本发明进行说明,但本发明并不局限于此。

[0096] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法;下述实施例中所用的试剂、生物材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0097] 实施例1磺胺吡啶类半抗原I(磺胺吡啶戊酸)的制备和鉴定

[0098] 1、将25g的4-戊炔酸(化合物2),1mL的浓硫酸和200mL的乙醇混合,80°C的条件下加热16h。室温冷却后,加入适量碳酸氢钠至中性。在真空条件下,移除有机试剂。加入200mL水,萃取生成的酯,并重复操作一次,合并有机相。加入硫酸钠干燥,并浓缩至无色的油状(化合物3) 21.05g,产率约为66%。

[0099] 2、将23.20g对乙酰胺基苯磺酰氯(化合物4),20.00g的2-氨基-5-碘吡啶(化合物5)和14.20g吡啶加入500mL乙腈中,70°C下反应16h。真空条件下移除有机溶剂,得到固体25g,残渣经薄层色谱分离,得到白色固体6.2g(化合物6),其展开剂为CH₂Cl₂/CH₃OH(50:1, v/v),产率约为33%。

[0100] 3、在氮气保护下,将6.0g化合物6,274mg的CuI,1.01g的二(三苯基膦) 二氯化钯,14.50g的三乙胺,2.35g的化合物3,加入200mL的四氢呋喃中,65°C下反应16h。真空条件下移除有机相。残渣中加入200mL的水,使用200mL的CH₂Cl₂萃取,并重复操作2次。提取液经Na₂SO₄干燥并浓缩。残渣经薄层色谱纯化,展开剂为CH₂Cl₂/CH₃OH(30:1, v/v),得到白色固体3.10g(化合物7),产率约为50%。

[0101] 4、取3.00g化合物7,3.00g钯碳催化剂,加入50mL乙醇中,在氢气保护下(1atm)反应,薄层色谱监控反应至完全。过滤,除去催化剂。真空下,移除有机相。残渣经薄层色谱纯化,流动相为CH₂Cl₂/CH₃OH(60:1, v/v),得到白色粉末2.1g(化合物8),产率约为70%。

[0102] 5、将2.05g化合物8,1.92g的NaOH加入到5mL水和25mL的乙醇中,80°C下反应16h。真空中移除乙醇。用1M的HCl调整pH值为3。将沉淀过滤,在乙醇中结晶,得式(I,磺胺吡啶戊酸)化合物白色粉末1.05g,产率约为62%。取合成的磺胺吡啶类半抗原(I)经核磁共振氢谱(¹H-NMR)和碳谱(¹³C-NMR)测定,结构如图2所示。

[0103] 实施例2磺胺吡啶类半抗原II(磺胺甲基吡啶戊酸)的制备和鉴定

[0104] 1、将25g的4-戊炔酸(化合物2),1mL的浓硫酸和200mL的乙醇混合,80°C的条件下加热16h。室温冷却后,加入适量碳酸氢钠至中性。在真空条件下,移除有机试剂。加入200mL水,萃取生成的酯,并重复操作一次,合并有机相。加入硫酸钠干燥,并浓缩至无色的油状(化合物3) 21.05g,产率约为66%。

[0105] 2、将10.80g的2-氨基-6-甲基吡啶(化合物9)溶于500mL乙腈中,再加入33.7 g的N-碘代丁二酰亚胺,室温反应3h。沉淀经过滤,200mL冷乙腈洗涤,真空条件下干燥,得到灰白色固体12.2g(化合物10),产率约为52%。

[0106] 3、取12.20g的化合物10,14.60g的对乙酰胺基苯磺酰氯(化合物4),加入200 mL吡啶中,室温搅拌24h。真空下,移除有机试剂至体积为50mL。加入200mL水,有沉淀生成。沉淀过滤,用200mL水洗涤,真空下干燥,得到白色粉末9.40g(化合物11),产率约为42%。

[0107] 4、在氮气保护下,将6.50g化合物11,2.50g的4-戊炔酸乙酯(化合物3),300 mg的

CuI, 600mg的二(三苯基膦)二氯化钯, 4mL的三乙胺, 加入50mL的四氢呋喃中, 回流16h。真空下移除有机相, 残留物中加入100mL的水, 用100mL的CH₂Cl₂萃取, 并重复操作2次。合并有机相, 使用Na₂SO₄干燥并浓缩。经薄层色谱纯化, 展开剂为石油醚/EtOAc (30:1, v/v), 得到灰白色粉末4.80g (化合物12), 产率约为75%。

[0108] 5、取4.80g化合物12, 3g的钯碳催化剂, 加入30mL乙醇中, 在氢气保护下(1 atm)反应1h。过滤, 除去催化剂。真空下, 移除有机相。残渣经薄层色谱纯化, 流动相为CH₂Cl₂/CH₃OH (60:1, v/v), 得到无色油状物2.8g (化合物13), 产率约为58%。

[0109] 6、将2.80g化合物13, 2.60g的NaOH加入到15mL水和100mL的乙醇中, 80℃下反应16h。真空中移除乙醇。残渣中加入30mL的水, 使用CH₂Cl₂洗涤。水相中用2M的HCl调整pH值为4。将沉淀过滤, 干燥, 得式(II)白色粉末1.6g, 产率约为67%。取合成的磺胺吡啶类半抗原(II, 磺胺甲基吡啶戊酸)经核磁共振氢谱(¹H-NMR)和碳谱(¹³C-NMR)测定, 结构分别如图4和5所示。

[0110] 实施例3磺胺吡啶类药物免疫抗原I-血蓝蛋白(磺胺吡啶戊酸-血蓝蛋白)或II-血蓝蛋白(磺胺甲基吡啶戊酸-血蓝蛋白)的制备

[0111] 1、取0.1mmol的磺胺吡啶半抗原I或II, 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)。

[0112] 2、将活化产物取出, 4000rpm离心10min。

[0113] 3、称取100mg的KLH, 溶于20mL预冷的PBS中。

[0114] 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。

[0115] 5、将上述反应产物置于透析袋中, 在5L透析液中透析过夜。

[0116] 6、取出产物, 分装后冻存于-70℃冰柜, 即为免疫原I-KLH(磺胺吡啶戊酸-血蓝蛋白)或II-KLH(磺胺甲基吡啶戊酸-血蓝蛋白)。

[0117] 实施例4磺胺吡啶类药物检测用包被原I-牛血清白蛋白(磺胺吡啶戊酸-牛血清白蛋白)或II-牛血清白蛋白(磺胺甲基吡啶戊酸-牛血清白蛋白)的制备

[0118] 1、取0.5mmol的磺胺吡啶半抗原I或II, 200mg N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), 125mg 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)。

[0119] 2、将活化产物取出, 4000rpm离心10min。

[0120] 3、称取500mg的BSA, 溶于20mL预冷的PBS中。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 6、取出产物, 分装后冻存于-20℃冰柜, 即为包被原I-BSA(磺胺吡啶戊酸-牛血清白蛋白)或II-BSA(磺胺甲基吡啶戊酸-牛血清白蛋白)。

[0124] 7、取合成的磺胺类药物包被原经MALDI-TOF测定, 如图6所示, I-BSA主峰的m/z为68878.1, II-BSA主峰的m/z为69192.4, 而BSA为64763.1, 表明半抗原与载体蛋白BSA偶联成功, 其偶联摩尔比分别为11.8:1和12.2:1。

[0125] 实施例5磺胺类药物检测用多克隆抗体的制备

[0126] 以实施例3制备的偶联物I-KLH或II-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。

[0127] 首次免疫时将100 μ g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 μ L每只进行基础免疫。

[0128] 将50 μ 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 μ L每只。

[0129] 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 (IC₅₀)。

[0130] 选择效价高、识别谱广、IC₅₀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。

[0131] 实施例6磺胺类药物酶联免疫分析方法的建立

[0132] 1、试剂配制

[0133] 包被缓冲液: Na₂CO₃ 1.59g, NaHCO₃ 2.93g, 加蒸馏水至1L, 混匀。

[0134] 封闭缓冲液: 小牛血清50mL, 蔗糖50g, 酪蛋白2.5g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 5.8g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.593g, proclin 300 300 μ L, 加蒸馏水定容至1L, 混匀, 置4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

[0135] 抗体稀释液: NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.6g, Na₂HPO₄ 1.072g, NaCl 16g, KCl 0.4g, proclin 300 200 μ L, triton X-100 500 μ L, 加蒸馏水至1L, 混匀, 置4 $^{\circ}$ C冰箱保存。

[0136] 标准品稀释液: Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.59g, NaCl 8.5g, KCl 0.2g, 加蒸馏水定容至1L, 混匀。

[0137] 酶标抗体稀释液: NaH₂PO₄ · 2H₂O 0.6g, Na₂HPO₄ 1.072g, NaCl 16g, KCl 0.4g, proclin 300 200 μ 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。

[0138] 洗涤缓冲液 (20 \times): Na₂HPO₄ · 12H₂O 23.2g, KH₂PO₄ 2g, NaCl 64g, KCl 0.036g, Tween-20 20mL, proclin 300 300 μ L, 加水980mL定容至1L。稀释20倍使用。

[0139] 底物缓冲液: Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.68g, 柠檬酸0.933g, 加蒸馏水至100mL。

[0140] TMB储存液: 取10mg TMB溶于4mL乙二醇, 避光保存。

[0141] 底物液: 取TMB储存液0.4mL, 底物缓冲液10mL, 30% H₂O₂ 10 μ L, 避光保存。

[0142] 终止缓冲液: 取98%浓硫酸22.2mL, 加蒸馏水177.8mL, 混匀。

[0143] 2、方阵滴定

[0144] 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1:4 000, 1:8 000, 1:16 000, 1:32 000, 1:64 000, 1:128 000, 1:256 000和1:512 000, 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10ng/mL (10ppb) 的磺胺吡啶, 进行竞争反应。I-KLH制备所得多克隆抗体与I-BSA的方阵滴定结果见表1, II-KLH制备所得多克隆抗体与II-BSA的方阵滴定结果见表2, 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1:40 000的浓度和抗体1:32 000的稀释度组合, 从表2中选择包被原1:20 000的浓度和抗体1:64 000的稀释度组合。

[0145] 表1 I-KLH多克隆抗体与I-BSA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	10ppb	PBS	10ppb	PBS	10ppb	PBS	10ppb	PBS	10ppb	PBS	10ppb	
[0146]	多克隆抗体	1:4 000	2.543	2.654	2.651	2.589	2.576	2.677	2.543	2.354	2.432	2.276	2.246	1.698
		1:8 000	2.671	2.542	2.782	2.763	2.734	2.786	2.476	2.219	2.145	1.287	1.765	0.854
		1:16 000	2.761	2.612	2.771	2.612	2.812	2.11	2.412	1.382	1.834	0.976	1.334	0.567
		1:32 000	2.643	2.589	2.632	2.034	2.621	1.165	1.978	0.754	1.267	0.454	0.965	0.312
		1:64 000	2.698	2.425	2.421	1.376	1.867	0.823	1.301	0.51	0.823	0.278	0.534	0.186
		1:128 000	2.314	1.421	1.598	0.682	1.154	0.391	0.602	0.245	0.379	0.156	0.276	0.121
		1:256 000	1.321	0.675	0.824	0.332	0.511	0.187	0.361	0.134	0.301	0.087	0.123	0.076
		1:512 000	0.702	0.395	0.487	0.246	0.387	0.174	0.254	0.161	0.187	0.023	0.119	0.109

[0147] 表2 II-KLH多克隆抗体与II-BSA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	10ppb	PBS	10ppb	PBS	10ppb	PBS	10ppb	PBS	10ppb	PBS	10ppb	
[0148]	多克隆抗体	1:4 000	2.519	2.432	2.459	2.512	2.592	2.699	2.521	2.286	2.434	2.372	2.245	1.75
		1:8 000	2.649	2.765	2.782	2.645	2.754	2.768	2.554	2.177	2.265	1.77	1.756	1.389
		1:16 000	2.495	2.501	2.737	2.878	2.634	2.032	2.512	1.723	1.834	1.415	1.356	0.852
		1:32 000	2.986	2.687	2.485	2.045	2.554	1.56	1.876	1.224	1.267	0.792	0.945	0.659
		1:64 000	2.811	2.376	2.513	1.686	1.993	1.206	1.234	0.76	0.832	0.587	0.587	0.498
		1:128 000	2.19	1.882	1.423	0.973	1.321	0.823	0.601	0.423	0.376	0.29	0.342	0.217
		1:256 000	1.302	0.965	0.918	0.654	0.498	0.504	0.365	0.123	0.212	0.192	0.165	0.092
		1:512 000	0.708	0.665	0.507	0.432	0.365	0.275	0.232	0.176	0.145	0.084	0.126	0.109

[0149] 3、标准曲线建立

[0150] 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、磺胺甲噻二唑)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、磺胺邻二甲氧嘧啶、磺胺苯酰、磺胺甲氧吡嗪、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IC₅₀值,其中磺胺吡啶(SPY)的标准曲线如图7所示。

[0151] 4、交叉反应率测定

[0152] 将上述IC₅₀值与磺胺喹噁啉的IC₅₀值对比,得到交叉反应率,结果如表3所示。本研究建立的间接竞争ELISA方法对所测定的29种磺胺类药物均存在一定程度的交叉反应率。

[0153] 表3 ELISA方法IC₅₀值及抗体交叉反应率

SAs	I-KLH 多克隆抗体		II-KLH 多克隆抗体	
	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
氨苯磺胺	>10000	<0.91	>4000	<0.99
磺胺胍	>10000	<0.91	440.4	8.96
磺胺醋酰	>10000	<0.91	2000	1.97
酞磺胺噻唑	203.1	44.71	1500	2.63
磺胺噻唑	125.2	72.52	10.09	391.08
磺胺甲基异噁唑	272.5	33.32	14.57	270.83
磺胺甲噻二唑	2922.1	3.11	6.95	567.77
磺胺二甲异噁唑	1593.9	5.70	318.6	12.39
磺胺苯吡唑	395.5	22.96	13.95	282.87
磺胺二甲噁唑	49.9	181.96	125.5	31.44
磺胺硝苯	273.9	33.15	900	4.38
柳氮磺胺吡啶	373.0	24.34	1000	3.95
磺胺吡啶	10.1	899.01	24.55	160.73
磺胺氯哒嗪	130.2	69.74	3.28	1203.05
磺胺甲氧哒嗪	20.0	454.00	8.88	444.37
磺胺乙氧哒嗪	18.1	501.66	9.61	410.61
磺胺喹噁啉	90.8	100.00	39.46	100.00
磺胺氯吡嗪	401.5	22.62	88.47	44.60
磺胺甲氧吡嗪	209.6	43.32	105.5	37.40
磺胺邻二甲氧嘧啶	217.3	41.79	217.3	18.16
磺胺间甲氧嘧啶	77.5	117.16	10.19	387.24
磺胺二甲基异嘧啶	110.5	82.17	9.03	436.99
磺胺间二甲氧嘧啶	110.5	82.17	8.10	487.16
磺胺嘧啶	330.8	27.45	69.63	56.67
磺胺对甲氧嘧啶	238.0	38.15	222.6	17.73
磺胺甲基嘧啶	84.8	107.08	44.47	88.73
磺胺二甲基嘧啶	97.9	92.75	495.4	7.97
磺胺溴二甲嘧啶	136.3	66.62	60.44	65.29
磺胺苯酰	1643.7	5.52	>4000	<0.99

[0154] 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。

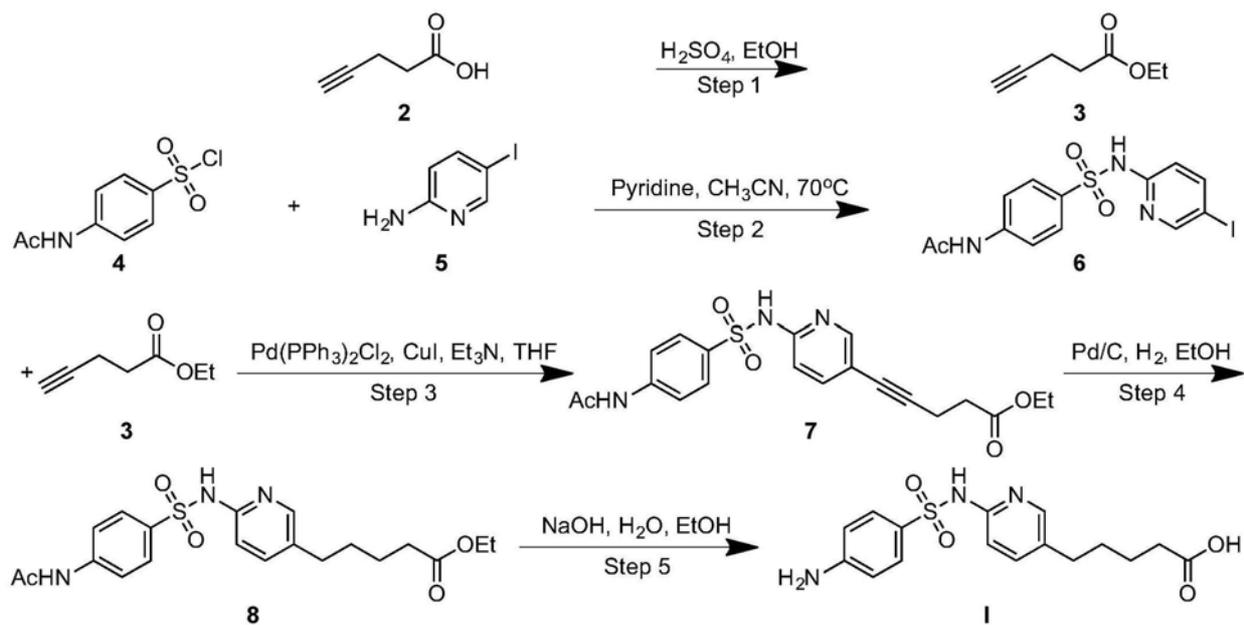


图1

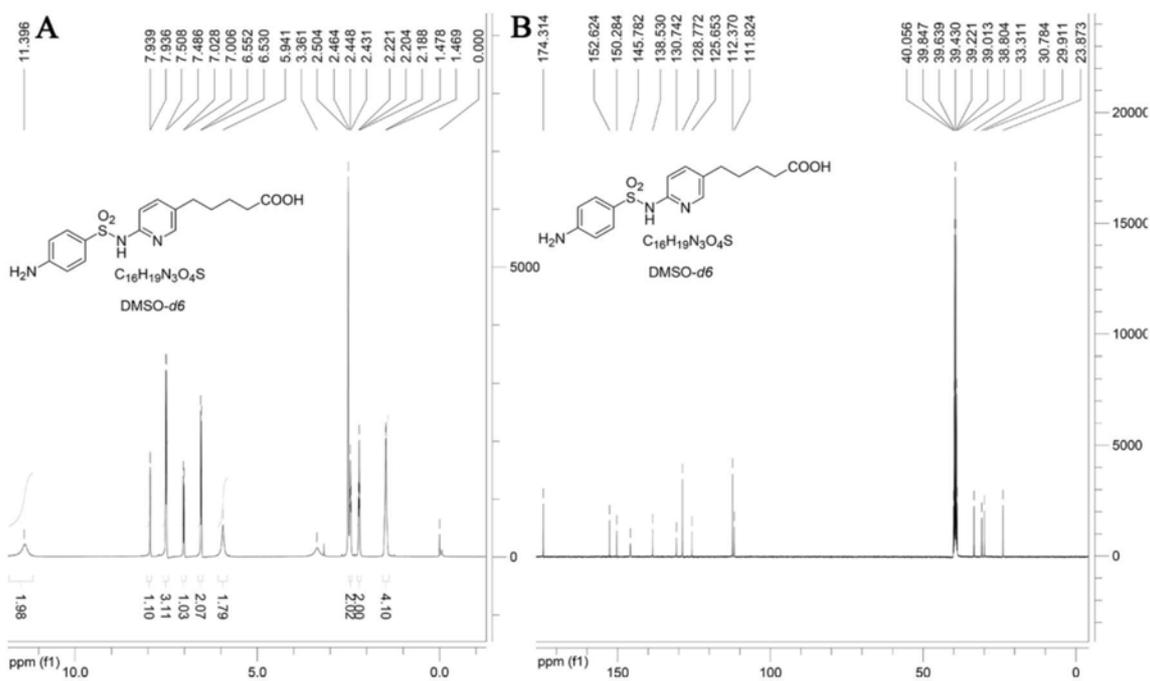


图2

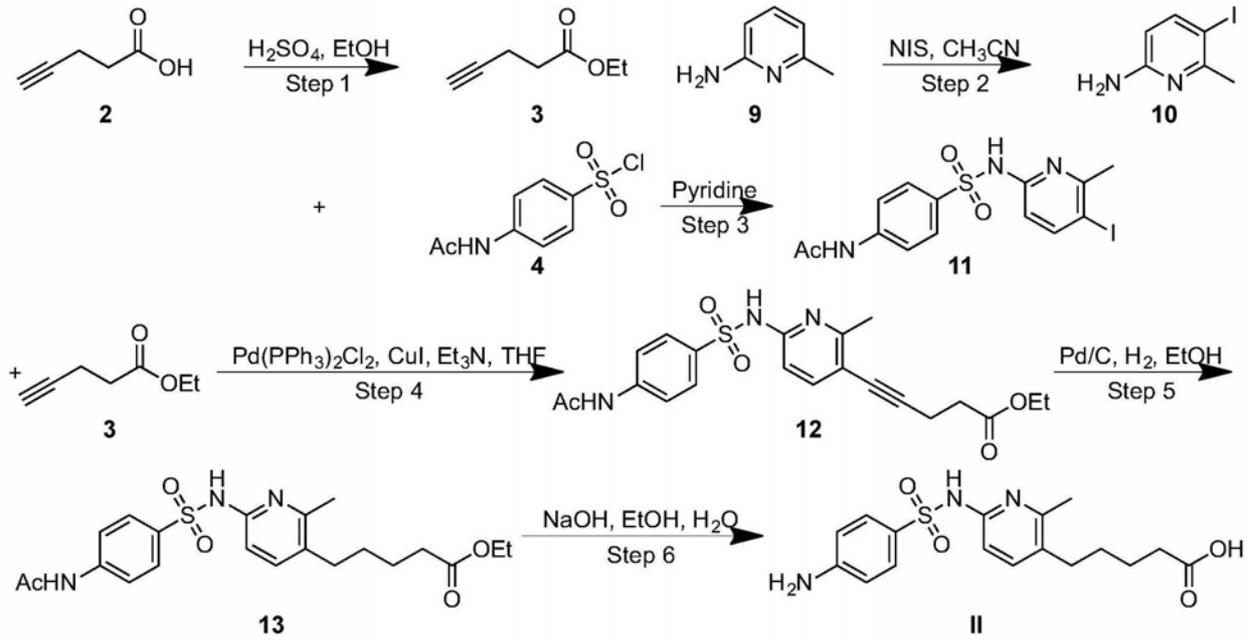


图3

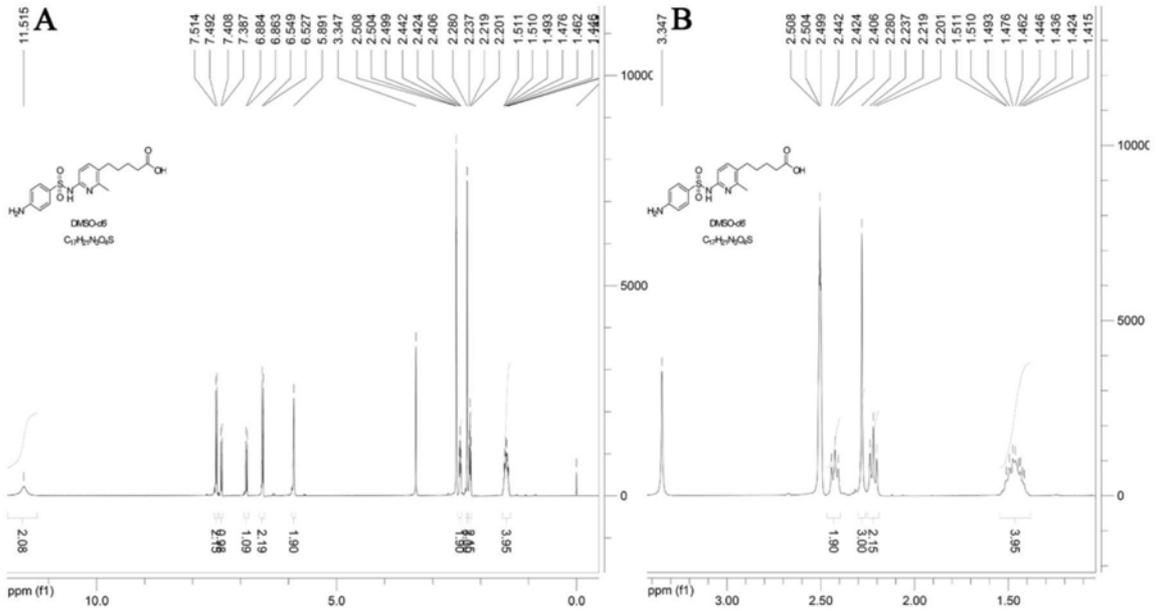


图4

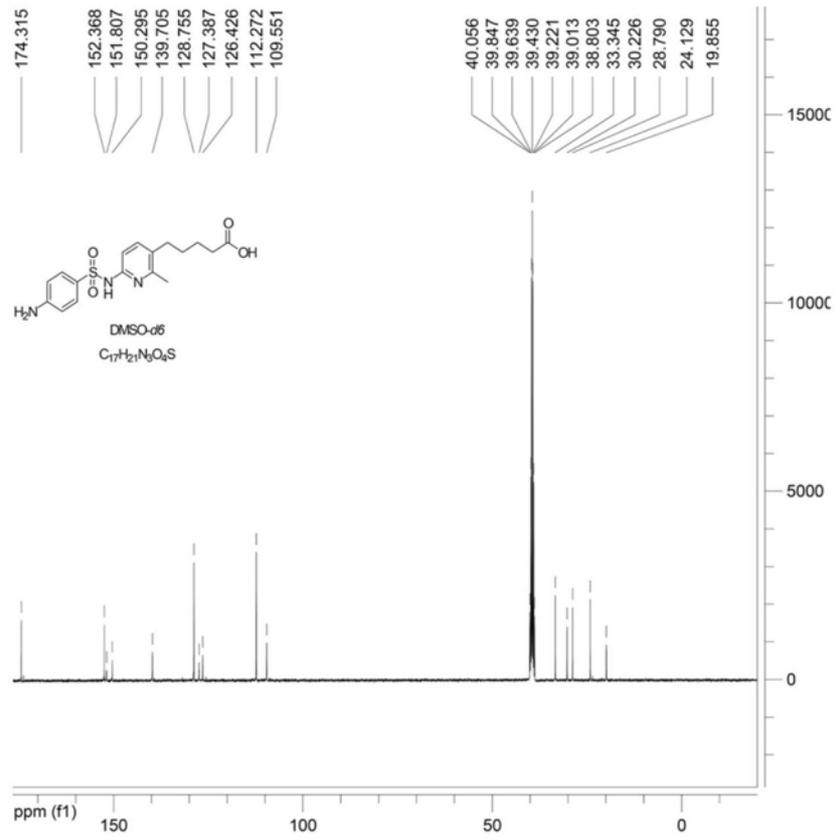


图5

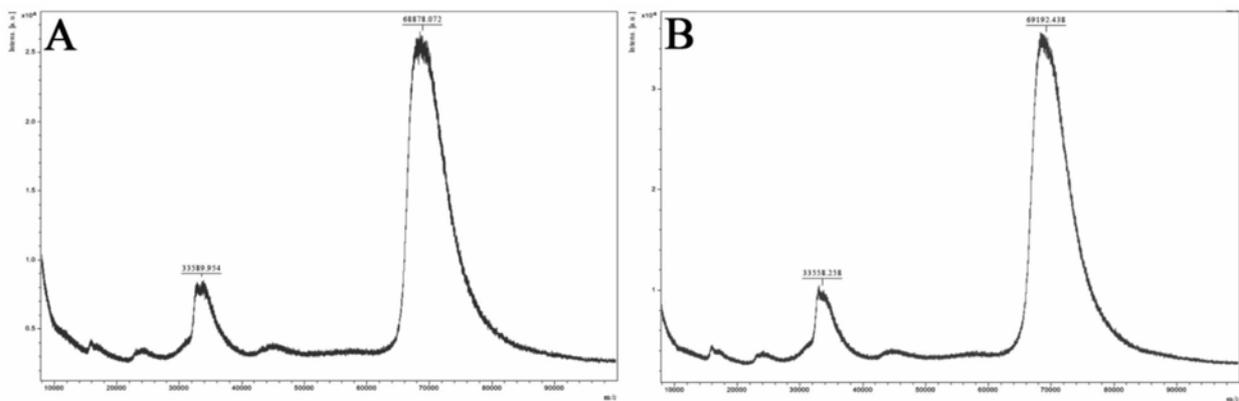


图6

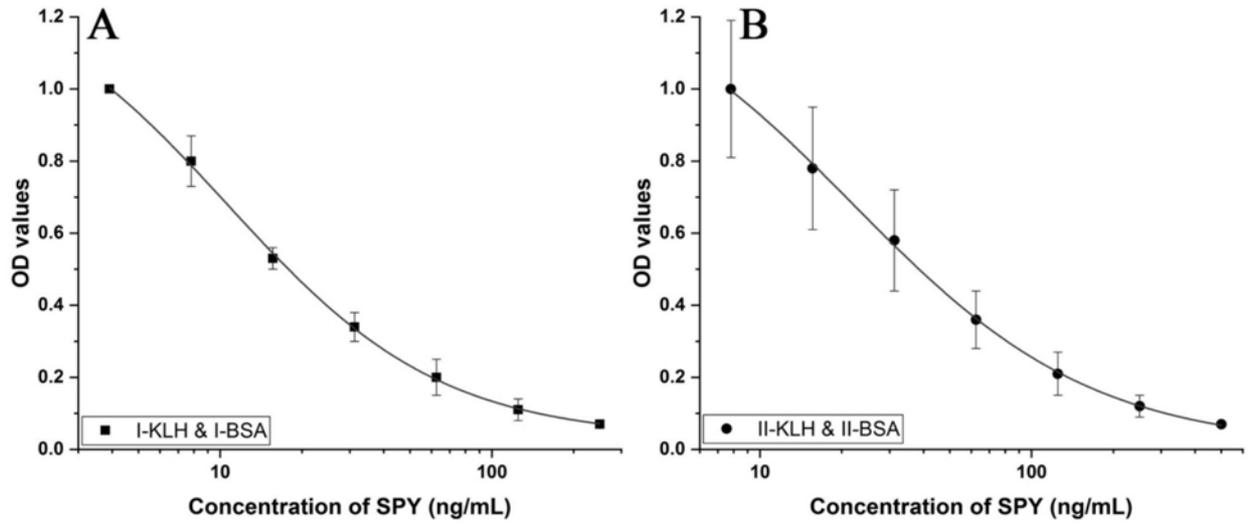
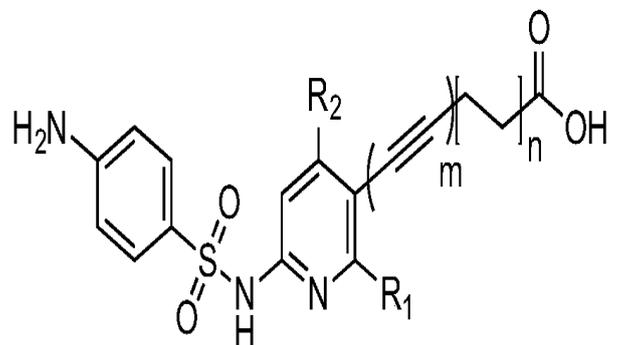


图7

专利名称(译)	磺胺吡啶类半抗原和人工抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN110713457A	公开(公告)日	2020-01-21
申请号	CN201910953596.X	申请日	2019-10-09
[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 于雪芝 张素霞 史为民 余文博		
发明人	王战辉 沈建忠 温凯 李成龙 于雪芝 张素霞 史为民 余文博		
IPC分类号	C07D213/76 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
CPC分类号	C07D213/76 C07K14/47 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	吴爱琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及磺胺吡啶类半抗原和人工抗原及其制备方法与应用。所述磺胺吡啶类半抗原的结构如式(1)所示。其中，R₁、R₂为氢、甲基或甲氧基；m为单键、双键或三键；n=0，或≥1的整数。所述磺胺吡啶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。利用所述磺胺吡啶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。本发明提供的磺胺吡啶类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)