



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107805241 B

(45)授权公告日 2020.05.26

(21)申请号 201711044873.2

(22)申请日 2017.10.31

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107805241 A

(43)申请公布日 2018.03.16

(73)专利权人 福建安欣睿捷生物科技有限公司

地址 350000 福建省福州市仓山区盖山镇  
浦下村后门里122号080室(自贸试验  
区内)

(72)发明人 王保民 陈俊玉 王冕 谭桂玉

刘伟华

(74)专利代理机构 福州君诚知识产权代理有限

公司 35211

代理人 戴雨君

(51)Int.Cl.

C07D 401/06(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

审查员 陆悠玲

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

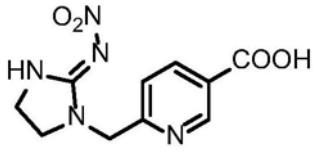
一种吡虫啉半抗原、完全抗原及制备方法和应用

(57)摘要

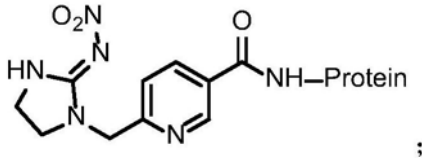
本发明公开了一种吡虫啉半抗原、完全抗原及制备方法和应用,所述吡虫啉半抗原以6-甲基烟酸为原料,先与甲醇反应生成6-甲基烟酸甲酯,6-甲基烟酸甲酯与N-溴代琥珀酰亚胺反应得到6-(溴甲基)烟酸甲酯,再与N-(咪唑烷-2-亚基)硝酰胺反应生成6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯,最后用NaOH水溶液将酯反应成6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸,即为吡虫啉半抗原。将吡虫啉半抗原与载体蛋白偶联,制备得到吡虫啉完全抗原。免疫动物实验表明本发明制备的人工抗原具有良好免疫原性,本发明的吡虫啉半抗原和吡虫啉抗原可用于吡虫啉免疫分析检测,应用前景十分广阔。

1. 一种吡虫啉完全抗原的制备方法,其特征在于:所述吡虫啉完全抗原由吡虫啉半抗原制备而成,包括以下步骤:

所述吡虫啉半抗原的分子结构为:



所述吡虫啉完全抗原的分子结构为:



所述吡虫啉半抗原的制备方法,包括以下步骤:

1) 将1份6-甲基烟酸溶解在3-4份甲醇中,加入0.1-0.2份浓硫酸,反应体系65-70℃加热回流3~4小时,减压蒸馏除去甲醇,得到6-甲基烟酸甲酯;

2) 将1份上述6-甲基烟酸甲酯溶于3-4份四氯化碳中,接着加入1.2-1.5份N-溴代琥珀酰亚胺,待反应体系升温到80℃,加入0.1-0.2份的偶氮二异丁腈或过氧苯甲酰,反应体系70-80℃反应3~4小时,减压蒸馏除去四氯化碳得到液体,该液体用柱色谱纯化得到固体,该固体为6-(溴甲基)烟酸甲酯;

3) 将1份上述6-(溴甲基)烟酸甲酯溶于3.5-4份乙腈中,加入1-1.2份N-(咪唑烷-2-亚基)硝酰胺和3-3.5份碳酸钾,反应体系70-80℃反应5-6小时后冷却并抽滤,滤液浓缩后用柱色谱分离纯化得到中间产物,该中间产物为6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯;

4) 将1份上述6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯溶于3.5-4份甲醇中,加入2份NaOH水溶液,反应体系反应2-2.5小时,接着调节反应体系pH到中性,抽滤收集固体,该固体为所述吡虫啉半抗原;

所述吡虫啉完全抗原的制备方法,包括以下步骤:

1) 将吡虫啉半抗原溶于二甲基甲酰胺中,加入二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,室温搅拌18-24小时得到A液;

其中,吡虫啉半抗原、二甲基甲酰胺、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的用量比为20 $\mu$ mol:1mL:60 $\mu$ mol:60 $\mu$ mol;

2) 将载体蛋白溶于碳酸盐缓冲液中,得到B液;其中,载体蛋白和碳酸盐缓冲液的用量比为0.4 $\mu$ mol:3mL;

3) 将上述A液滴加到B液中并于4℃搅拌10-12小时,得到C液;

4) 将C液置于透析袋并于磷酸缓冲液中透析,每3小时换液一次,共透析6次,收集透析袋中的溶液,即为吡虫啉完全抗原。

2. 根据权利要求1所述的一种吡虫啉完全抗原的制备方法,其特征在于:所述吡虫啉半抗原的制备方法的步骤4)采用浓盐酸调节pH。

3. 根据权利要求1所述的一种吡虫啉完全抗原的制备方法,其特征在于:所述载体蛋白

为牛血清蛋白。

4. 根据权利要求1所述的制备方法得到的吡虫啉完全抗原的应用,其特征在於:所述吡虫啉完全抗原应用于食品中吡虫啉的检测。

## 一种吡虫啉半抗原、完全抗原及制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种吡虫啉半抗原、完全抗原及制备方法和应用。

### 技术背景

[0002] 吡虫啉是一种含吡啶环的超高效内吸性杀虫剂,对缨翅目、鞘翅目、同翅目、鳞翅目及双翅目等,尤其是对刺吸式口器害虫如中国梨木虱、桃蚜、小绿叶蝉、苹果瘤蚜、蓟马、黑尾叶蝉、梨黄粉蚜、白粉虱、梨象甲等具有高残效和内吸性,能广泛用于小麦、蔬菜、水稻、棉花等大多数农作物,具有高效、低毒、广谱强的特点。虽然吡虫啉效果显著,使用后虫害能够得到有效控制,但该农药的残留长,会对人、畜构成威胁,给农产品、食品的销售及安全出口带来影响。我国食品安全国家标准GB2763-2016《食品中农药最大残留限量》中规定蔬菜大白菜中吡虫啉的最大残留限量为0.2mg/kg,水果苹果、梨中吡虫啉的最大残留量为0.5mg/kg。

[0003] 现有的吡虫啉检测主要是液质联用及酶联免疫吸附分析方法(ELISA)。ELISA方法简单、有效、适合现场快速、高能量测定,越来越多地被相关检验检疫单位所应用。建立小分子的ELISA检测方法,其首要条件是进行半抗原和抗原的制备。优秀的半抗原、抗原可以激发被免疫动物产生灵敏度高、特异性好的抗体。

### 发明内容

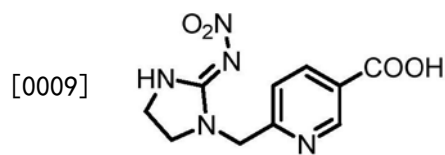
[0004] 本发明的一个目的在于提供一种吡虫啉半抗原以及吡虫啉完全抗原,可有效地刺激被免疫动物产生灵敏度高、特异性强的抗体。

[0005] 本发明的另一个目的在于提供上述吡虫啉半抗原以及吡虫啉完全抗原的制备方法,该方法简单易行。

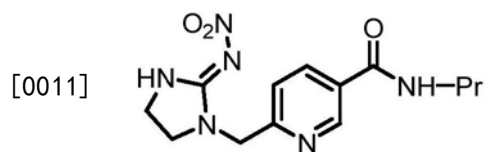
[0006] 本发明制备得到的吡虫啉半抗原和吡虫啉完全抗原可用于后续吡虫啉的免疫分析方法建立,应用于食品中吡虫啉的检测。

[0007] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0008] 一种吡虫啉半抗原,其分子结构为:



[0010] 一种吡虫啉完全抗原,其分子结构为:



[0012] 所述吡虫啉半抗原的制备方法,包括以下步骤为:

[0013] 1) 将1份6-甲基烟酸溶解在3-4份甲醇中,加入0.1-0.2份浓硫酸,反应体系65-70℃加热回流3~4小时,减压蒸馏除去甲醇,得白色固体粉末,该粉末为6-甲基烟酸甲酯;

[0014] 2) 将1份上述6-甲基烟酸甲酯溶于3-4份四氯化碳中,接着加入1.2-1.5份N-溴代琥珀酰亚胺,待反应体系升温到80℃,加入0.1-0.2份偶氮二异丁腈或过氧苯甲酰,反应体系70-80℃反应3~4小时,减压蒸馏除去四氯化碳得褐色液体,该褐色液体用柱色谱纯化得白色固体,该白色固体为6-(溴甲基)烟酸甲酯;

[0015] 3) 将1份上述6-(溴甲基)烟酸甲酯溶于3.5-4份乙腈中,加入1-1.2份N-(咪唑烷-2-亚基)硝酰胺和3-3.5份碳酸钾,反应体系70-80℃反应5-6小时后冷却并抽滤,滤液浓缩后用柱色谱分离纯化得白色固体,该白色固体为6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯;

[0016] 4) 将1份上述6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯溶于3.5-4份甲醇中,加入2份NaOH水溶液,反应体系反应2-2.5小时,接着调节反应体系pH到中性,抽滤收集白色固体,该白色固体为吡虫啉半抗原,其化学名为6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸。

[0017] 进一步,所述步骤4)采用浓盐酸调节pH。

[0018] 所述吡虫啉完全抗原由吡虫啉半抗原制备而成,包括以下步骤:

[0019] 1) 将吡虫啉半抗原溶于二甲基甲酰胺(DMF)中,加入二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌18-24小时得到A液;

[0020] 其中,吡虫啉半抗原、DMF、DCC和NHS的用量比为20 $\mu$ mol:1mL:60 $\mu$ mol:60 $\mu$ mol;

[0021] 2) 将载体蛋白溶于碳酸盐缓冲液中,得到B液;其中,载体蛋白和碳酸盐缓冲液的用量比为0.4 $\mu$ mol:3mL;

[0022] 3) 将上述A液滴加到B液中并于4℃搅拌10-12小时,得到C液;

[0023] 4) 将C液置于透析袋并于磷酸缓冲液中透析,每3小时换液一次,共透析6次,收集透析袋中的溶液,即为免疫原溶液,即所述吡虫啉完全抗原。

[0024] 所述载体蛋白为牛血清蛋白(BSA)。

[0025] 本发明采用以上技术方案,以6-甲基烟酸为原料,先与甲醇反应生成6-甲基烟酸甲酯,6-甲基烟酸甲酯与N-溴代琥珀酰亚胺反应得到6-(溴甲基)烟酸甲酯,再与N-(咪唑烷-2-亚基)硝酰胺反应生成6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯,最后用NaOH水溶液将酯反应成6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸,即为吡虫啉半抗原。将吡虫啉半抗原与载体蛋白偶联,制备得到吡虫啉完全抗原。本发明的制备方法简单易行,制备得到的吡虫啉半抗原、吡虫啉完全抗原,可有效地刺激被免疫动物产生灵敏度高、特异性强的抗体,可用于免疫分析中,满足国内对吡虫啉残留的检测。

## 具体实施方式

[0026] 以下结合具体实施例进一步详细说明本发明。实施例的试剂除特别说明外,都是常规市购实验室用试剂。

[0027] 实施例1

[0028] 一种吡虫啉半抗原的制备方法,包括以下步骤:

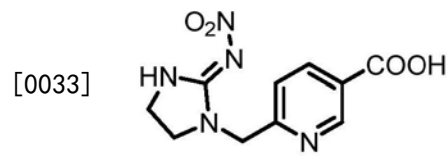
[0029] 1) 将1份6-甲基烟酸溶解在4份甲醇中,加入0.2份浓硫酸,反应体系65℃加热回流

3小时,减压蒸馏除去甲醇,得白色固体粉末,该粉末为6-甲基烟酸甲酯;

[0030] 2) 将1份上述6-甲基烟酸甲酯溶于4份四氯化碳中,接着加入1.5份N-溴代琥珀酰亚胺,待反应体系升温到80℃,加入0.2份偶氮二异丁腈,反应体系80℃反应3小时,减压蒸馏除去四氯化碳得褐色液体,该褐色液体用柱色谱纯化得白色固体,该白色固体为6-(溴甲基)烟酸甲酯;

[0031] 3) 将1份上述6-(溴甲基)烟酸甲酯溶于4份乙腈中,加入1份N-(咪唑烷-2-亚基)硝酰胺和3份碳酸钾,反应体系80℃反应5小时后冷却并抽滤,滤液浓缩后用柱色谱分离纯化得白色固体,该白色固体为6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯;

[0032] 4) 将1份上述6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯溶于4份甲醇中,加入2份NaOH水溶液,反应体系反应2小时,接着用浓盐酸调节反应体系pH到中性,抽滤收集白色固体,该白色固体为吡虫啉半抗原,其化学名为6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸,其分子结构为



[0034] 实施例2

[0035] 一种吡虫啉半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0036] 1) 将1份6-甲基烟酸溶解在3份甲醇中,加入0.1份的浓硫酸,反应体系70℃加热回流3小时,减压蒸馏除去甲醇,得白色固体粉末,该粉末为6-甲基烟酸甲酯;

[0037] 2) 将1份上述6-甲基烟酸甲酯溶于3份四氯化碳中,接着加入1.2份N-溴代琥珀酰亚胺,待反应体系升温到80℃,加入0.1份过氧苯甲酰,反应体系70℃反应4小时,减压蒸馏除去四氯化碳得褐色液体,该褐色液体用柱色谱纯化得白色固体,该白色固体为6-(溴甲基)烟酸甲酯;

[0038] 3) 将1份上述6-(溴甲基)烟酸甲酯溶于3.5份乙腈中,加入1.2份N-(咪唑烷-2-亚基)硝酰胺和3.5份碳酸钾,反应体系70℃反应6小时后冷却并抽滤,滤液浓缩后用柱色谱分离纯化得白色固体,该白色固体为6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯;

[0039] 4) 将1份上述6-((2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯溶于3.5份甲醇中,加入2份NaOH水溶液,反应体系反应2.5小时,接着用浓盐酸调节反应体系pH到中性,抽滤收集白色固体,该白色固体为吡虫啉半抗原。

[0040] 实施例3

[0041] 以实施例1的吡虫啉半抗原制备吡虫啉完全抗原,包括以下步骤:

[0042] 1) 将20μmol吡虫啉半抗原溶于1mL DMF中,加入60μmol DCC和60μmol NHS,室温搅拌24小时得到A液;

[0043] 2) 将0.4μmol BSA溶于3mL碳酸盐缓冲液中,得到B液;

[0044] 3) 将上述A液滴加到B液中并于4℃搅拌12小时,得到C液;

[0045] 4) 将C液置于透析袋并于磷酸缓冲液中透析,每3小时换液一次,共透析6次,收集透析袋中的溶液,即为免疫原溶液,即所述吡虫啉完全抗原,-20℃保存。

[0046] 实施例4

[0047] 以实施例2的吡虫啉半抗原制备吡虫啉完全抗原,包括以下步骤:

[0048] 1) 将20 $\mu\text{mol}$ 吡虫啉半抗原溶于1mL DMF中,加入60 $\mu\text{mol}$  DCC和60 $\mu\text{mol}$  NHS,室温搅拌24小时得到A液;

[0049] 2) 将0.4 $\mu\text{mol}$  BSA溶于3mL碳酸盐缓冲液中,得到B液;

[0050] 3) 将上述A液滴加到B液中并于4 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌10小时,得到C液;

[0051] 4) 将C液置于透析袋并于磷酸缓冲液中透析,每3小时换液一次,共透析6次,收集透析袋中的溶液,即为免疫原溶液,即所述吡虫啉完全抗原,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

[0052] 实施例5

[0053] 吡虫啉完全抗原的鉴定。

[0054] 用实施例3制备的吡虫啉完全抗原免疫Ba1 b/c小鼠,四免后第5天采眼眶静脉血清进行检测,判断所制备的吡虫啉抗原是否具有免疫活性。

[0055] 1) 将实施例3制备的吡虫啉完全抗原稀释为2、1、0.5、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后加入酶标板,每孔100 $\mu\text{L}$ ,每个浓度包被6个孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育3h后取出,用PBST洗净;

[0056] 2) 取采集的小鼠血清,稀释500、1000、2000、4000、8000、16000倍,每个抗原浓度孔加一个孔,每孔100 $\mu\text{L}$ ,随后将酶标板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温育0.5h后取出,用PBST洗净;;

[0057] 3) 向酶标孔中加入0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的羊抗小鼠抗体,每孔100 $\mu\text{L}$ ,随后将酶标板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温育0.5h后取出,用PBST洗净;

[0058] 4) 向酶标孔中加入100 $\mu\text{L}$ 的OPD显色液,室温显色15min,读取492nm吸光值;

[0059] 5) 实验结果显示,吸光值随抗原、血清的稀释倍数加大,呈现逐渐下降的规律,小鼠血清效价在8000-16000倍之间。

[0060] 实施例6

[0061] 食品中吡虫啉的检测,包括以下步骤:

[0062] 1) 称取食物(韭菜、马铃薯、红薯等)2g,匀浆,用乙酸乙酯5mL震荡提取30min后,离心取2mL上清,用氮气吹干,加入2mL PBS溶解残渣,即为待测液;

[0063] 2) 将实施例3制备的吡虫啉完全抗原稀释为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后加入酶标板后,每孔100 $\mu\text{L}$ ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育3h后取出,用PBST洗净;

[0064] 3) 向酶标孔中分别加入50 $\mu\text{L}$ 待测液,随后,取实施例5制备的小鼠血清,稀释4000倍,每孔加入50 $\mu\text{L}$ 。随后将酶标板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温育0.5h后取出,用PBST洗净;

[0065] 4) 向酶标孔中加入0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的羊抗小鼠抗体,每孔100 $\mu\text{L}$ ,随后将酶标板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 温育0.5h后取出,用PBST洗净;

[0066] 5) 向酶标孔中加入100 $\mu\text{L}$ 的OPD显色液,室温显色15min,读取492nm吸光值;

[0067] 6) 比较不同样品测定吸光值,样品中吡虫啉残留量越高,吸光值越低;残留量越低,吸光值越高。

专利名称(译)	一种吡虫啉半抗原、完全抗原及制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN107805241B</a>	公开(公告)日	2020-05-26
申请号	CN2017111044873.2	申请日	2017-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
[标]发明人	王保民 陈俊玉 王冕 谭桂玉 刘伟华		
发明人	王保民 陈俊玉 王冕 谭桂玉 刘伟华		
IPC分类号	C07D401/06 C07K14/765 C07K1/107 G01N33/535		
CPC分类号	C07K14/765 C07K19/00 G01N33/535 G01N2430/10		
代理人(译)	戴雨君		
其他公开文献	CN107805241A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种吡虫啉半抗原、完全抗原及制备方法和应用，所述吡虫啉半抗原以6-甲基烟酸为原料，先与甲醇反应生成6-甲基烟酸甲酯，6-甲基烟酸甲酯与N-溴代琥珀酰亚胺反应得到6-(溴甲基)烟酸甲酯，再与N-(咪唑烷-2-亚基)硝酰胺反应生成6-(2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸甲酯，最后用NaOH水溶液将酯反应成6-(2-(硝基亚氨基)咪唑烷-1-基)甲基)烟酸，即为吡虫啉半抗原。将吡虫啉半抗原与载体蛋白偶联，制备得到吡虫啉完全抗原。免疫动物实验表明本发明制备的人工抗原具有良好免疫原性，本发明的吡虫啉半抗原和吡虫啉抗原可用于吡虫啉免疫分析检测，应用前景十分广阔。

