



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101158680 B

(45) 授权公告日 2011. 03. 30

(21) 申请号 200710134500. 4

CN 1731167 A, 2006. 02. 08, 全文.

(22) 申请日 2007. 10. 31

于海峰等. 诺氟沙星人工抗原的合成. 《吉林农业大学学报》. 2007, 第 29 卷 (第 4 期), 443 - 446.

(73) 专利权人 江南大学

地址 214028 江苏省无锡市新区新华路 94 号江南大学国家大学科技园

王莹等. 诺氟沙星间接 EL ISA 检测方法的建立及初步应用. 《中国兽医杂志》. 2007, 第 43 卷 (第 3 期), 52 - 53.

(72) 发明人 胥传来 李雅丽 王灿辉 唐剑峰 陈伟 刘丽强 陶冠军 秦昉

审查员 滕文静

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 1/10(2006. 01)

C07D 215/233(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1861632 A, 2006. 11. 15, 全文.

US 4191738 A, 1980. 03. 04, 全文.

JP 57109724 A, 1982. 07. 08, 全文.

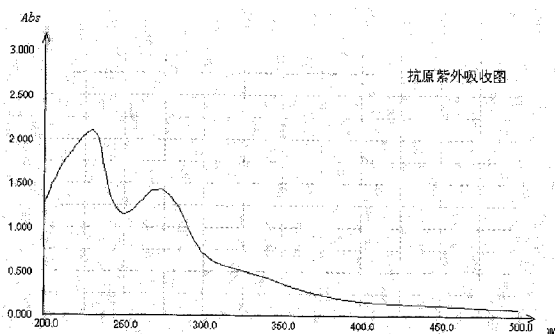
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法

(57) 摘要

一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法, 属于生物化工技术领域。本发明以诺氟沙星为原料, 经过诺氟沙星的衍生化和羧基保护制备半抗原 N-2- 乙胺 - 诺氟沙星, 再偶联蛋白合成喹诺酮类抗生素多簇抗原 N-2- 乙胺 - 诺氟沙星 - 牛血清蛋白。本发明成功合成了喹诺酮类抗生素多簇抗原, 合成步骤简洁, 经过提纯后处理, 纯度可达到 99% 以上, 完全可以用作喹诺酮类多簇酶联免疫试剂盒的应用, 为今后人们的研究提供了方便的途径, 可以满足国内对其研究的需要。

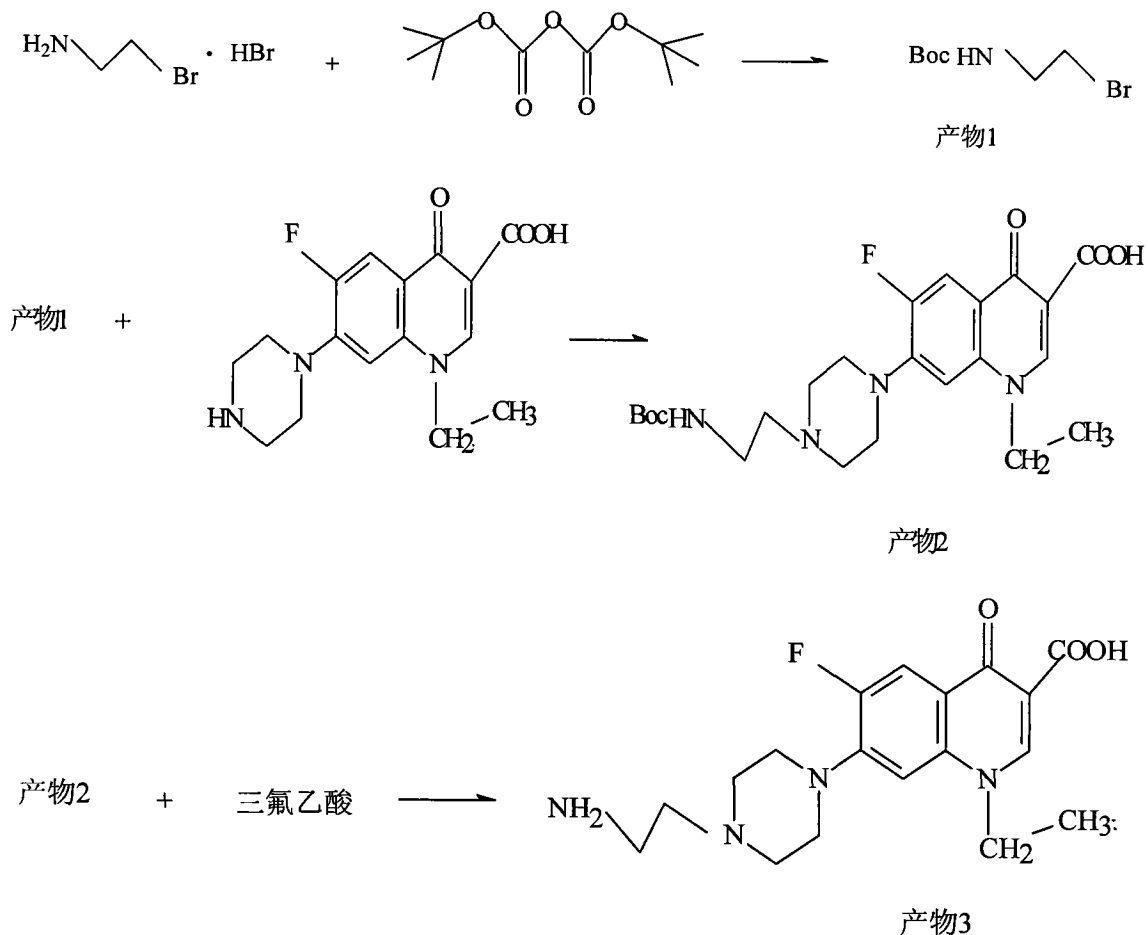


1. 一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法,其特征是以诺氟沙星为原料将其衍生化制备半抗原,进而再与牛血清蛋白采用戊二醛法偶联合成抗原;

工艺步骤为:

(1) 人工半抗原的合成

合成路线:



产物 1 的合成:

2-溴乙胺氢溴酸盐和碳酸二叔丁酯  $\text{Boc}_2\text{O}$  反应, 配比控制为碳酸二叔丁酯摩尔比过量 20%, 以甲醇为反应介质, 三乙胺为催化剂, 搅拌、加热升温到  $60^\circ\text{C}$ , 反应 1h, 然后室温反应过夜; 反应液真空浓缩, 残液溶于二氯甲烷, 依次用 0.5N 的盐酸、饱和食盐水和饱和的  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 得淡黄色液体产物 1, 直接用于下一步反应;

产物 2 的合成:

产物 1 和诺氟沙星反应, 控制配比为产物 1 摩尔比过量 20%, 以二甲基甲酰胺为反应介质, 三乙胺为催化剂, 搅拌、加热升温到  $80^\circ\text{C}$ , 反应过夜, 冷至室温, 滴加 0.5N 的盐酸控制 pH6, 搅拌使体系重新冷却到室温, 过滤, 依次用蒸馏水、无水乙醇洗涤滤饼, 干燥, 得粗产品产物 2, 用乙醇重结晶;

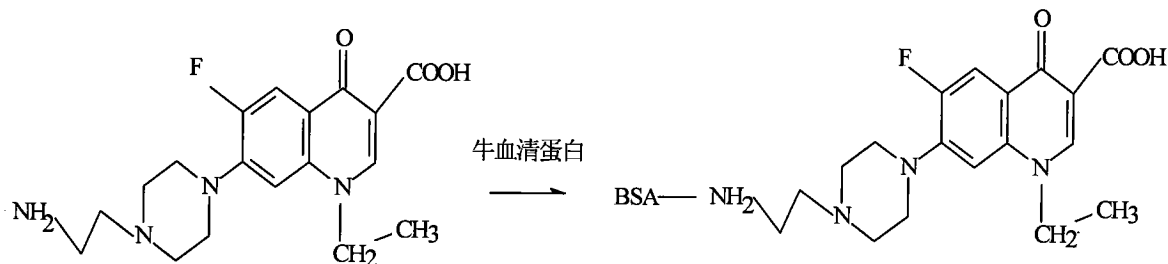
产物 3 的合成:

产物 2 和三氟乙酸反应, 脱碳酸二叔丁酯基: 室温搅拌反应 3 小时, 真空浓缩, 将残留物溶于乙醇, 加入三乙胺, 静止, 过滤得到的粗品用乙醇和氯仿重结晶提纯, 得产物 3 半抗原,

命名为 N-2-乙胺-诺氟沙星；

(2) 人工抗原的合成

合成路线：



透析袋的前处理：取 5-10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用；

磷酸盐缓冲溶液的配制：0.2mol/L 磷酸二氢钠 19mL 和 0.2mol/L 磷酸氢二钠 81mL 加水至 2000mL 混合即为 pH7.4 的磷酸盐缓冲液；

偶联蛋白：

取 0.1mmol 的产物 3 溶于 2mL 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液中，搅拌下缓慢滴加戊二醛溶液，滴加至溶液的戊二醛最终质量浓度为 1.25%，成 A 液；

取 0.002mmol 的牛血清蛋白溶于 10mL 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中成 B 液；

搅拌条件下将 A 液缓慢滴加到 B 液中，搅拌过夜，磷酸盐缓冲液中透析 5 天，得人工抗原 N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白；

(3) 抗原鉴定：N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白采用紫外扫描测定其偶联比，分别在 262nm、278nm 处测吸光值，并计算其偶联比。

## 一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法

### 技术领域

[0001] 一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

### 背景技术

[0002] 喹诺酮是一类合成抗生素类药物,英文名称:quinolones(QNS)。在化学上与萘啶酮酸相关,其作用机理是直接作用于细菌的核、抑制细菌的 DNA 旋转酶,使酶不能在 DNA 双链上引入切口,破坏细菌的代谢和繁殖,迅速杀灭细菌。最初这类药物用于治疗尿道感染,现在已发展到治疗系统感染疾病,并且在动物饲养中作为预防和治疗药物普遍使用。近年来,这些药物在动物组织中的残留已引起广泛的注意,我国规定牛、鸡、猪、羊、兔等动物的肌肉、脂肪、肝、肾食品中达氟沙星、二氟沙星、恩诺沙星(环丙沙星与恩诺沙星量之和)、沙拉沙星等喹诺酮类兽药最高残留限量 0.01 ~ 1.9mg/kg,欧盟规定在动物肌肉、肝脏和肾脏中达氟沙星、二氟沙星、恩诺沙星(环丙沙星与恩诺沙星量之和)、麻保沙星、沙拉沙星等喹诺酮类兽药最高残留限量 0.01 ~ 1.9mg/kg,日本在 2002 年 7 月 1 日对我国产蒲烧鳗鱼实施磺胺类抗生素检测后,又于 2003 年 7 月 1 日起对进口生鳗鱼及其制品进行氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星残留检测,并且将限量控制在方法检测限的 0.05mg/kg。因此,氟喹诺酮类药物残留问题越来越引起人们的重视。为了建立快速检测方法有必要合成一种喹诺酮类抗生素多簇抗原,到目前为止,喹诺酮类抗生素多簇抗原合成方法还未见国内报道。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种喹诺酮类抗生素多簇抗原合成方法,所合成抗原所制备的抗体可对多种喹诺酮类抗生素产生识别,为今后人们的快速检测的研究提供了方便的途径。

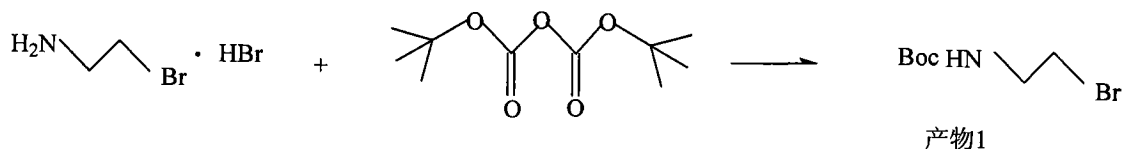
[0004] 本发明的技术方案:一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法,以诺氟沙星为原料将其衍生化制备半抗原,进而再与牛血清蛋白采用戊二醛法偶联合成抗原;

[0005] 工艺步骤为:

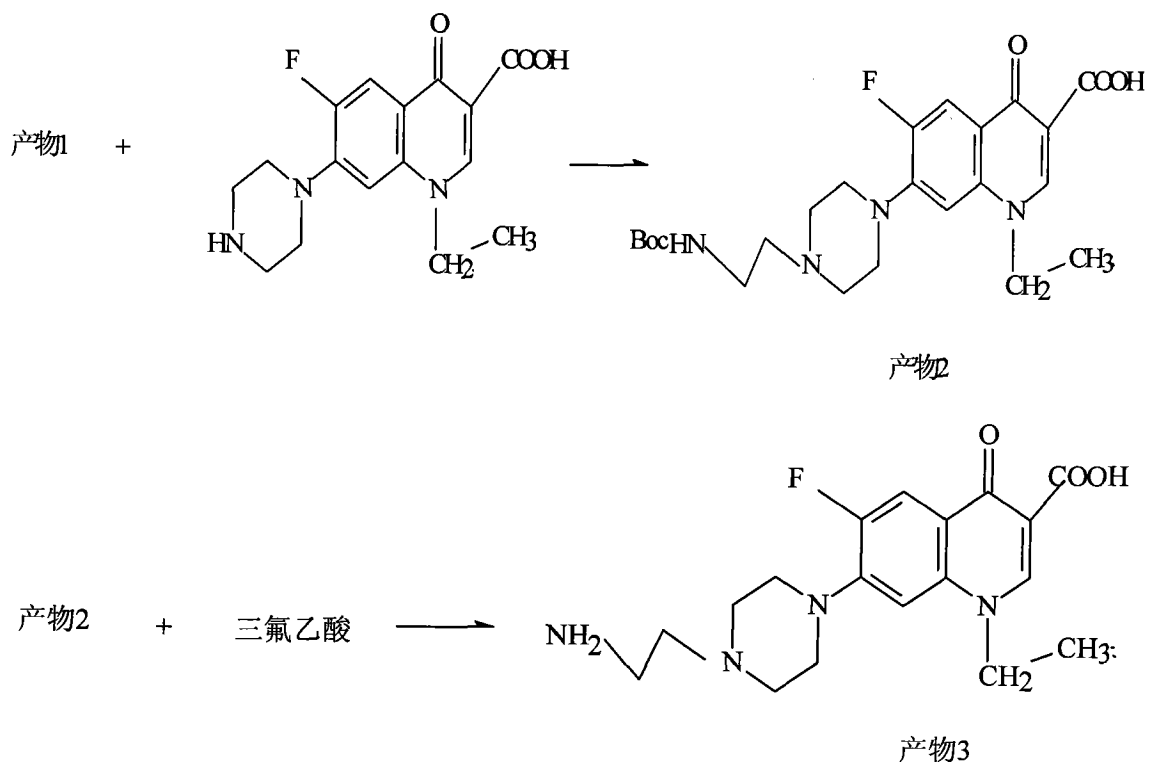
[0006] (1) 人工半抗原的合成

[0007] 合成路线:

[0008]



[0009]



[0010] 产物1的合成：

[0011] 2-溴乙胺氢溴酸盐和碳酸二叔丁酯 Boc<sub>2</sub>O 反应，配比控制为碳酸二叔丁酯摩尔比过量 20%，以甲醇为反应介质，三乙胺为催化剂，搅拌、加热升温到 60℃，反应 1h，然后室温反应过夜；反应液真空浓缩，残液溶于二氯甲烷，依次用 0.5N 的盐酸、饱和食盐水和饱和的 NaHCO<sub>3</sub> 溶液洗涤，无水硫酸镁干燥，过滤，浓缩，得淡黄色液体产物 1，直接用于下一步反应；

[0012] 产物2的合成：

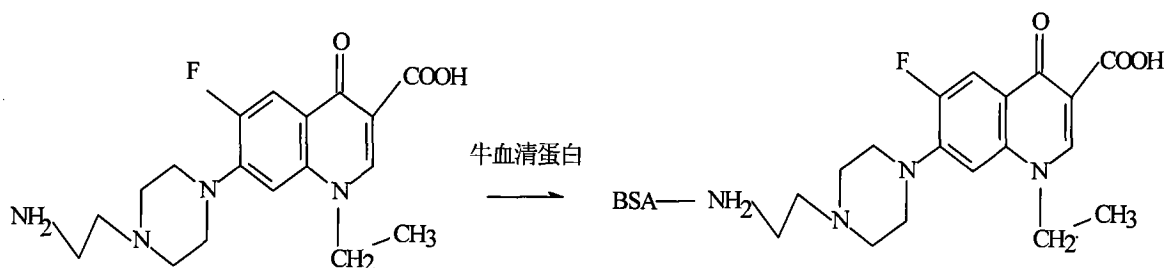
[0013] 产物1和诺氟沙星反应，配比控制为产物1摩尔比过量 20%，以二甲基甲酰胺为反应介质，三乙胺为催化剂，搅拌、加热升温到 80℃，反应过夜，冷至室温，滴加 0.5N 的盐酸控制 pH 至 6，搅拌使体系重新冷却到室温，过滤，依次用蒸馏水、无水乙醇洗涤滤饼，干燥，得粗产品产物 2，用乙醇重结晶；

[0014] 产物3的合成：

[0015] 产物2和三氟乙酸反应，脱碳酸二叔丁酯基：室温搅拌反应 3 小时，真空浓缩，将残留物溶于乙醇，加入三乙胺，静止，过滤得到的粗品用乙醇和氯仿重结晶提纯，得产品 3 半抗原，命名为 N-2-乙胺-诺氟沙星；

[0016] (2) 人工抗原的合成：合成路线：

[0017]



[0018] 透析袋的前处理：取 5-10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60℃ 的去离子水

冲洗 3min, 保存在 4℃ 去离子水中备用。

[0019] 磷酸盐缓冲溶液的配制: 0.2mol/L 磷酸二氢钠 19mL, 0.2mol/L 磷酸氢二钠 81mL 加水至 2000mL 混合即为 pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0020] 偶联蛋白:

[0021] 取 0.1mmol 的产物 3 溶于 2mL 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中, 搅拌下缓慢滴加戊二醛溶液, 滴加至使戊二醛的最终质量浓度为 1.25%, 成 A 液;

[0022] 取 0.002mmol 的牛血清蛋白溶于 10mL 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中成 B 液;

[0023] 搅拌条件下将 A 液缓慢滴加到 B 液中, 搅拌过夜, PBS 透析 5 天, 得人工抗原 N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白;

[0024] (3) 抗原鉴定: 2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白采用紫外扫描测定其偶联比, 分别在 262nm、278nm 处测吸光值, 并计算其偶联比。

[0025] 本发明的有益效果: 本发明合成了喹诺酮类抗生素的多簇人工抗原, 合成步骤简洁, 有效, 经过后处理, 纯度可达 99% 以上, 完全可用于免疫分析中, 为今后人们的研究提供了方便的途径, 可以满足国内对其研究的需要。

#### 附图说明

[0026] 图 1 半抗原的液相色谱图

[0027] 图 2 半抗原的质谱正离子图

[0028] 图 3 半抗原的紫外吸收图

[0029] 图 4 抗原的紫外吸收图

#### 具体实施方式

[0030] (1) 人工半抗原的合成

[0031] 合成过程:

[0032] 产物 1 的合成:

[0033] 在一个 1L 的圆底烧瓶中加入 500mL 的甲醇, 2-溴乙胺氢溴酸盐 (10g, 49mmol), 三乙胺 (30mL), 碳酸二叔丁酯  $\text{Boc}_2\text{O}$  (13g, 60mmol), 搅拌、加热升温到 60℃, 反应 1h, 然后室温反应过夜。反应液真空浓缩, 残液溶于 500mL 二氯甲烷, 依次用 0.5N 的盐酸 (250mL×2)、饱和食盐水 (250mL)、饱和的  $\text{NaHCO}_3$  (250mL) 洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 得淡黄色液体产物 1 (收率 63%), 直接用于下一步反应。

[0034] 产物 2 的合成:

[0035] 在一个 250mL 的圆底烧瓶中加入诺氟沙星 (5.499g, 17.2mmol), DMF (70mL), 搅拌均匀, 加入三乙胺 (4.8mL, 35mmol), 然后加入产物 1 (4.631g, 20.6mmol), 升温至 80℃, 反应过夜。反应液冷至室温, 滴加 0.5N 的盐酸调 pH 至 6 左右, 搅拌使体系重新冷却到室温, 过滤, 依次用蒸馏水、无水乙醇洗涤滤饼, 干燥, 得粗产品产物 2, 用乙醇重结晶后, 用  $^1\text{H-NMR}$  检测, 结构正确为目标产物。

[0036] 产物 3 的合成:

[0037] 在一个 250mL 的圆底烧瓶中加入 50mL 二氯甲烷, 3.763g 产物 3, 然后加入 35mL 三氟乙酸, 室温搅拌反应 3 小时, 真空浓缩, 将残留物溶于乙醇, 加入 1.4mL 的三乙胺, 静止, 过

滤的粗品用乙醇和氯仿重结晶提纯,纯度为 97.61%。

[0038] (2) 人工抗原的合成。合成过程为:

[0039] 透析袋的前处理:

[0040] 取 5-10cm 的透析袋,于沸水中煮沸 5min,再用 60℃的去离子水冲洗 3min,保存在 4℃去离子水中备用。

[0041] 磷酸盐缓冲溶液的配制:

[0042] 磷酸盐缓冲液 (Borate saline buffer):0.2Mol/L 磷酸二氢钠 19ml 和 0.2Mol/L 磷酸氢二钠 81mL 加水至 2000mL 混合即为 pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0043] 偶联蛋白

[0044] 取 0.1mmol 的产物 3 溶于 2mL 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中,搅拌下缓慢滴加戊二醛溶液,滴加至溶液的戊二醛终浓度为 1.25%,成 A 液。

[0045] 取 0.002mmol 的牛血清蛋白 (BSA) 溶于 10mL 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液中成 B 液。

[0046] 搅拌条件下将 A 液缓慢滴加到 B 液中。搅拌过夜, PBS 透析 5 天。得人工抗原 N-2- 乙胺 - 诺氟沙星 - 牛血清蛋白;

[0047] (3) 抗原鉴定

[0048] 摩尔吸收系数  $\epsilon$ :配制人工半抗原浓度为 0, 10, 20, 30  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的 20%乙醇溶液,通过紫外扫描可知人工半抗原的最大吸收波长为 278nm,在 278nm 处测吸光值,每个浓度做平行样。摩尔吸光系数计算为: $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

[0049] 偶联物蛋白浓度测定:配制牛血清蛋白浓度为 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液 1.5mL,加入 5mL 考马斯亮蓝染色液,立即混匀,30℃水浴温热 5 分钟,每个浓度做平行样。、在 595nm 处测吸光值,绘制牛血清蛋白曲线。估算偶联物的蛋白质浓度:蛋白质量 / 偶联产物的体积,以此来确定稀释比例,让稀释后的浓度在牛血清蛋白曲线以内,稀释过的样品要同牛血清蛋白曲线的测定进行同样测定,经过数据处理可得到偶联产物蛋白浓度。

[0050] 偶联比测定:配制 150  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA 的 20%乙醇溶液,将偶联产物用 20%乙醇稀释到 150  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,在 242nm 处测吸光值,以 20%乙醇为空白,测出的吸光值为  $A_1, A_2$ ,则偶联比率 r 为: $r = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (150 \times 10^{-3} / 65000)$

[0051] 其中  $\epsilon$  为摩尔吸光系数 ( $\text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$ ),65000 为 BSA 分子量,150  $\times 10^{-3}$  为 BSA 浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

071024-1

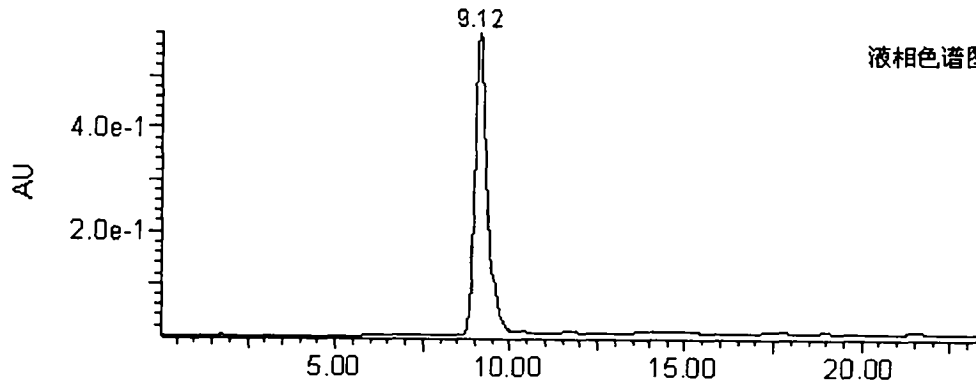


图 1

071024-1 122 (9.216)

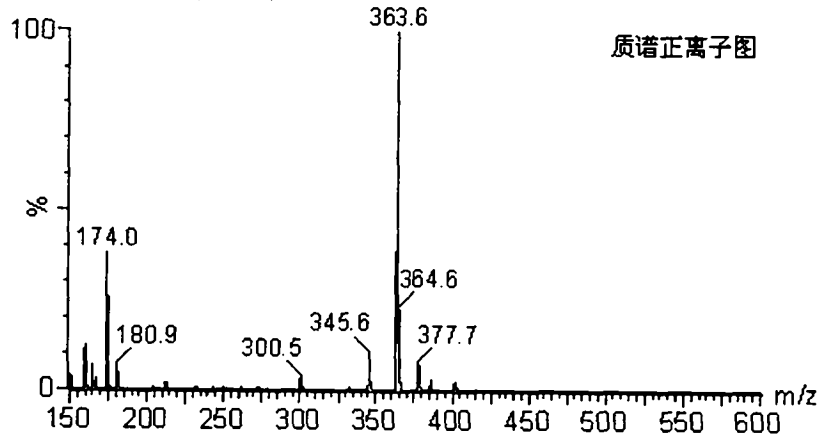


图 2

071024-1 542 (9.137)

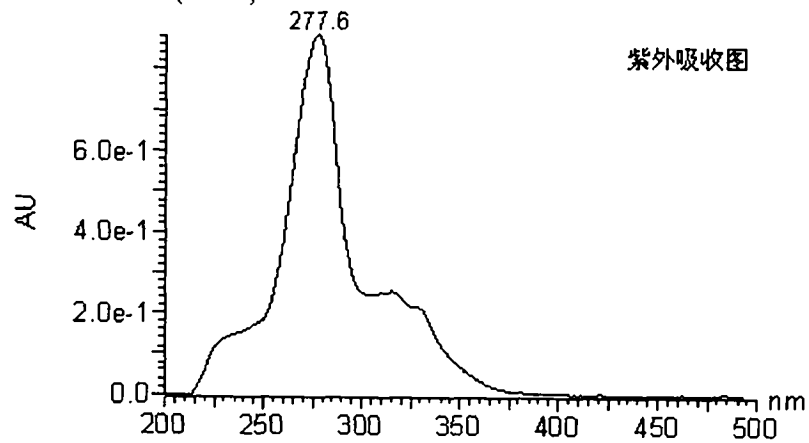


图 3

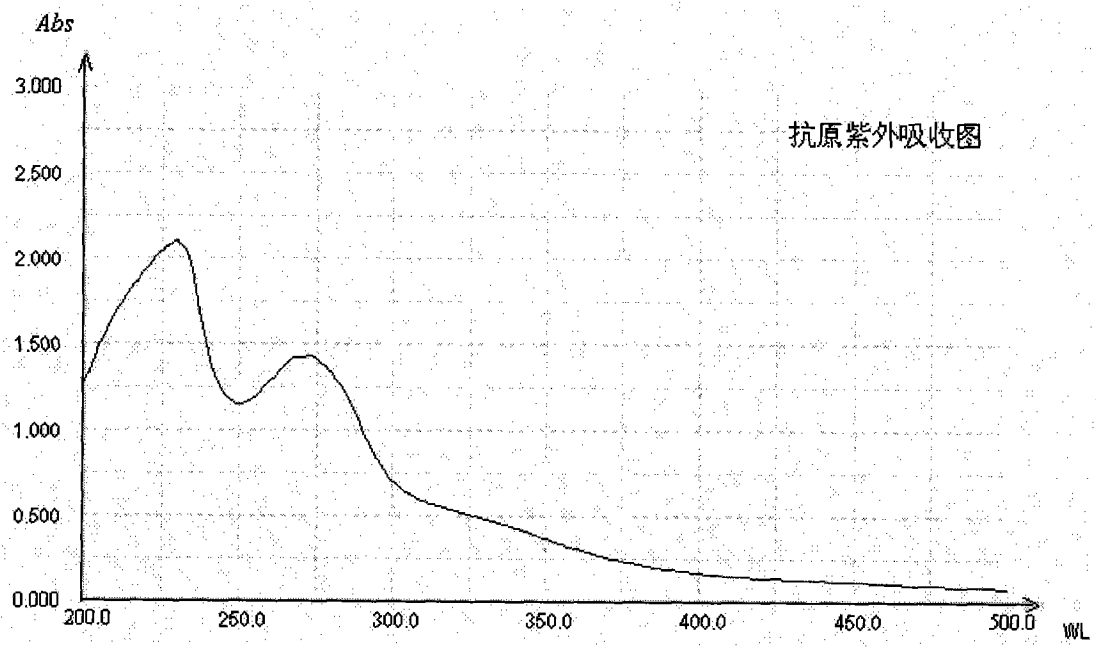


图 4

专利名称(译)	一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101158680B</a>	公开(公告)日	2011-03-30
申请号	CN200710134500.4	申请日	2007-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 李雅丽 王灿辉 唐剑峰 陈伟 刘丽强 陶冠军 秦昉		
发明人	胥传来 李雅丽 王灿辉 唐剑峰 陈伟 刘丽强 陶冠军 秦昉		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/765 C07K11/10 C07D215/233		
审查员(译)	滕文静		
其他公开文献	CN101158680A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以诺氟沙星为原料，经过诺氟沙星的衍生化和羧基保护制备半抗原N-2-乙胺-诺氟沙星，再偶联蛋白合成喹诺酮类抗生素多簇抗原N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白。本发明成功合成了喹诺酮类抗生素多簇抗原，合成步骤简洁，经过提纯后处理，纯度可达到99%以上，完全可以用作喹诺酮类多簇酶联免疫试剂盒的应用，为今后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

