



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104130195 B

(45) 授权公告日 2016.06.22

(21) 申请号 201410291510.9

(22) 申请日 2014.06.26

(73) 专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号江南大学食品学院

(72) 发明人 徐丽广 胥传来 严会娟 匡华
马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲

(74) 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所
(普通合伙) 32104

代理人 时旭丹 刘品超

(51) Int. Cl.

C07D 235/30(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102675463 A, 2012.09.19,

WO 0206755 A2, 2002.08.15,

CN 101706386 A, 2010.05.12,

王国霞. 多菌灵酶联免疫分析技术研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库(硕士) 农业科技辑》.2006,(第10期),第3页第1.3节,第9页第2.1.2.2.1节,第10-12页,第19页第

2.3.1节,第34-36页.

张淑平,等. 氨基甲酸酯类农药的快速检测.《现代食品科技》.2006,第22卷(第2期),第229-232页.

张璐珊. 苯并咪唑类兽药残留分析研究进展.《中国畜牧兽医》.2009,第36卷(第3期),第84-88页.

王金花,等. 抗多菌灵单克隆抗体的制备、纯化及初步鉴定.《细胞与分子免疫学杂志》.2012,第28卷(第1期),第53-54页.

DAVID BRANDON 等. Monoclonal Antibody to Fenbendazole: Utility in Residue Studies.《Food and Agricultural Immunology》.2010,(第14期),第275-283页.

审查员 李小宏

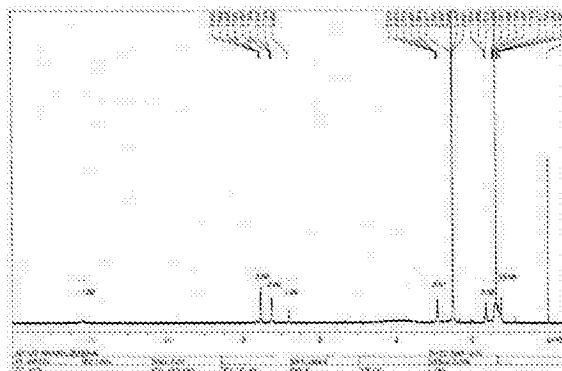
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

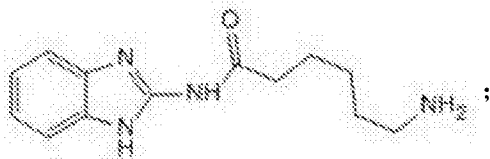
一种多菌灵半抗原的合成方法

(57) 摘要

一种多菌灵半抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。本发明以2-氨基苯并咪唑为原料,经过3步化学反应得到多菌灵半抗原,采用液质联用技术和核磁共振技术对重要的中间产物和终产物进行鉴定和分析。本方法成功地合成了多菌灵半抗原,合成步骤安全有效,为建立多菌灵的酶联免疫分析方法提供了有利的条件,满足了国内对该研究的需要。



1. 一种多菌灵半抗原的合成方法,所述多菌灵半抗原,其结构简式如下所示:



其合成方法特征在于:步骤如下:

(1)活性酯348的合成:将叔丁基氧羰基保护的氨基己酸5mmol,溶在20mL二氯甲烷-四氢呋喃混合溶剂中,混合体积比为1:1,依次加入与叔丁基氧羰基保护的氨基己酸等摩尔量的缩合剂1-羟基苯并三氮唑一水物和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺,室温搅拌2h,待用;

活性酯348的结构式为:



(2)前体346的合成:将用少量DMF溶解的2-氨基苯并咪唑0.665g加入步骤(1)制备的活性酯348溶液中,室温搅拌过夜;将反应液旋转蒸发除去二氯甲烷-四氢呋喃,残渣用20mL二氯甲烷溶解,水洗三次,每次20mL;再用饱和盐水洗三次,每次20mL;以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去二氯甲烷,所得粗品经色谱纯化得产物25mg;

前体346的结构式为:



(3)多菌灵半抗原的合成:将步骤(2)制备的前体346溶于3mL二氯甲烷中,冰浴下加入三氟醋酸3mL,搅拌2h,旋转蒸发至干,产物经0.5mol/L氢氧化钠溶液调节至pH 14,用二氯甲烷萃取,旋转蒸发得到多菌灵半抗原。

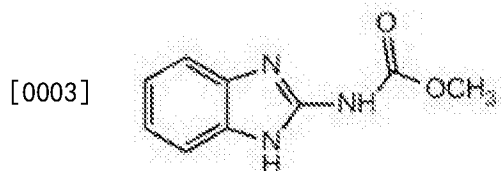
一种多菌灵半抗原的合成方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种多菌灵半抗原的合成方法,属于生物化工技术领域。

背景技术

[0002] 多菌灵是一种广谱、高效、低毒内吸性苯并咪唑类杀菌剂。其化学结构式如下:



[0004] 其作用机理是,通过干扰细胞纺锤体的形成从而干扰细胞分裂,对植物具有良好的保护和治疗作用。广泛应用于各类农产品中,对多种作物由真菌(如半知菌、多子囊菌)引起的病害有防治效果。可用于叶面喷雾、种子处理和土壤处理等。多菌灵对动物肝、肾和生殖系统具有潜在的破坏作用。

[0005] 目前检测多菌灵的方法主要是气相色谱法(GC),液相色谱法(HPLC),分光光度法、导数同步荧光法、薄层层析-分光光度法、气质联用法等紫外仪器方法,但是这些方法存在操作繁琐,耗时,费用比较贵等缺点,不能实现大量样品的快速检测,因此建立一种快速简便的多菌灵检测方法具有重要意义。

[0006] 酶联免疫法(ELISA)是一种极为高效、敏感、快速的检测方法,检测时对样本的纯度要求不高而且操作简便,适用于大量样本的现场快速检测。然而得到高亲和力和高特异性的单克隆单体是免疫学检测的前提,其中人工抗原的合成是其中重要的一步。

[0007] 由于多菌灵是小分子物质(分子量 $M_w < 1000 \text{ Da}$),本身不具有诱导机体产生抗体的能力,需要和蛋白载体偶联后,才能具有免疫原性。但是多菌灵结构中没有可以直接利用的活性基团如 $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-OH$ 或 $-SH$ 等,因此,要实现多菌灵和载体蛋白的偶联,首先要进行多菌灵半抗原的设计和合成。

[0008] 根据相关报道,为了保证半抗原和大分子载体蛋白偶联后能够最大限度的被识别,需要在目标分子和载体之间有一定的连接臂;同时要求连接臂应尽量远离半抗原分子的特征性基团,目的是突出半抗原的特征性结构,突出其抗原决定簇。一般选择4-6个碳链长度的手臂。根据上述原则,本发明设计了多菌灵半抗原合成方法,为建立多菌灵的酶联免疫分析方法提供了有利条件。

[0009] 影响免疫分析方法的关键因素在于特异性的抗原和抗体。本发明中合成了由多菌灵的类似物2-氨基苯并咪唑为原料,经过3步化学反应得到多菌灵的半抗原,这种半抗原目前尚无文献报道。

发明内容

[0010] 本发明的目的是克服现有技术的不足之处,提供一种多菌灵半抗原的合成方法。

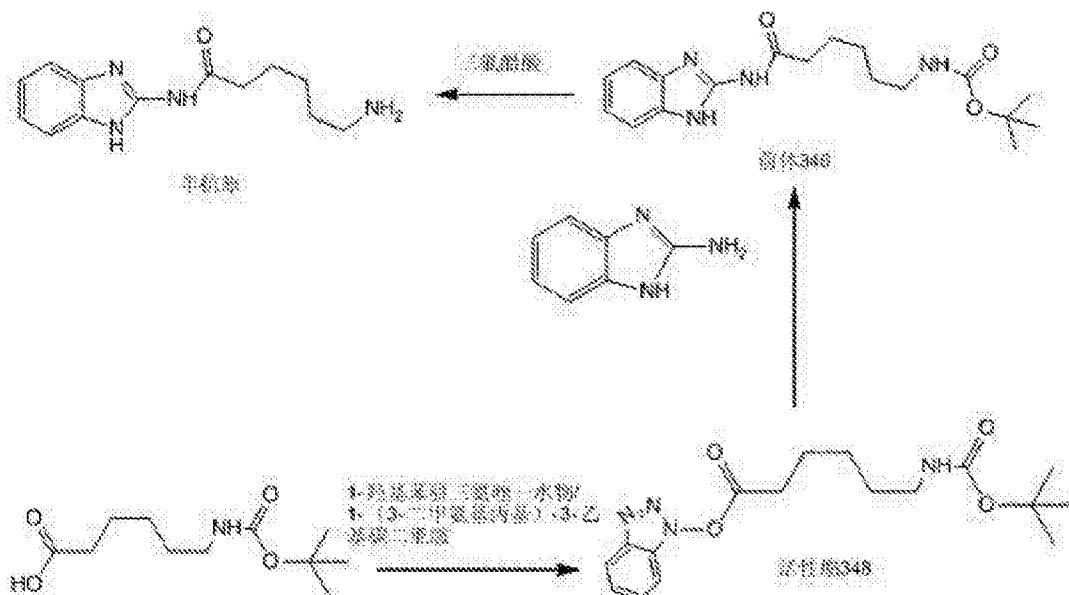
[0011] 本发明的技术方案:一种多菌灵半抗原,其结构简式如下所示:

[0012]



[0013] 所述多菌灵半抗原的合成方法,以2-氨基苯并咪唑为原料,通过 3 步化学反应,得到多菌灵农药的半抗原。其反应过程的方程式为:

[0014]



[0015] 步骤如下:

[0016] (1)活性酯348的合成:将叔丁基氧羰基Boc保护的氨基己酸5mmol(1.155g),溶在20mL二氯甲烷-四氢呋喃混合溶剂中,混合体积比为1:1,依次加入与叔丁基氧羰基保护的氨基己酸等摩尔量的缩合剂1-羟基苯并三氮唑一水物HOBt和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺EDC1,室温搅拌2h,待用;

[0017] (2)前体346的合成:将用少量DMF溶解的2-氨基苯并咪唑0.665g加入步骤(1)制备的活性酯348溶液中,室温搅拌过夜;将反应液旋转蒸发除去二氯甲烷-四氢呋喃,残渣用20mL二氯甲烷溶解,水洗三次,每次20mL;再用饱和盐水洗三次,每次20mL;以无水硫酸钠干燥过滤,旋转蒸发除去二氯甲烷,所得粗品经色谱纯化得产物25mg,收率2.2%;核磁图和液相色谱图分别见图1和图2;H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.2 (br, 1H), 7.54 (dd, J = 6.0 Hz, 3.2 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 6.0 Hz, 3.2 Hz, 2H), 6.80 (br, 1H), 2.91 (m, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.42~1.20 (m, 15H);

[0018] (3)多菌灵半抗原的合成:将步骤(2)制备的前体346溶于3mL二氯甲烷中,冰浴下加入三氟醋酸3mL,搅拌2h,旋转蒸发至干,产物经0.5mol/L氢氧化钠溶液调节至pH 14,用二氯甲烷萃取,旋转蒸发得到多菌灵半抗原。

[0019] 所述的多菌灵半抗原的应用,多菌灵半抗原在制备多菌灵完全抗原化合物或多菌灵抗体中的应用;

[0020] 所述多菌灵半抗原或完全抗原化合物或多菌灵抗体在检测多菌灵中的应用。

[0021] 上述多菌灵半抗原在制备多菌灵抗体中的应用也属于本发明的保护范围。

[0022] 上述多菌灵半抗原或完全抗原化合物或抗体在检测多菌灵中的应用也属于本发

明保护的范围。

[0023] 本发明的有益效果：本发明是新型的多菌灵半抗原的合成方法，为多菌灵完全抗原的合成以及筛选出高特异性的多菌灵单克隆抗体成为可能。

附图说明

[0024] 图1 多菌灵前体346的核磁图。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.2 (br, 1H), 7.54 (dd, J = 6.0 Hz, 3.2 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 6.0 Hz, 3.2 Hz, 2H), 6.80 (br, 1H), 2.91 (m, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.42~1.20 (m, 15H)。

[0025] 图2多菌灵半抗原的液相色谱图。

具体实施方式

[0026] 实施例1多菌灵半抗原的制备

[0027] (1)活性酯348的合成：将叔丁基氧羰基(Boc)保护的氨基己酸, 1.155g, 5mmol, 溶在20mL二氯甲烷-四氢呋喃混合溶剂中, 混合体积比为1:1, 依次加入与叔丁基氧羰基保护的氨基己酸等摩尔量的缩合剂1-羟基苯并三氮唑-水合物(HOBT)和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDCI), 室温搅拌2h, 待用；

[0028] (2)前体346的合成：将用少量DMF溶解的2-氨基苯并咪唑(0.665g)加入步骤(1)制备的活性酯348溶液中, 室温搅拌过夜；将反应液旋转蒸发除去二氯甲烷-四氢呋喃, 残渣用20mL二氯甲烷溶解, 水洗三次, 每次20mL；再用饱和盐水洗三次, 每次20mL；以无水硫酸钠干燥过滤, 旋转蒸发除去二氯甲烷, 所得粗品经色谱纯化得产物25mg, 收率2.2%。核磁图和液相色谱图分别见图1和图2。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 12.2 (br, 1H), 7.54 (dd, J = 6.0 Hz, 3.2 Hz, 2H), 7.24 (dd, J = 6.0 Hz, 3.2 Hz, 2H), 6.80 (br, 1H), 2.91 (m, 2H), 1.64 (m, 1H), 1.42~1.20 (m, 15H)。

[0029] (3)多菌灵半抗原的合成：将步骤(2)制备的前体346溶于3mL二氯甲烷中, 冰浴下加入三氟醋酸3mL, 搅拌2h, 旋转蒸发至干, 产物经0.5mol/L氢氧化钠溶液调节至pH为14, 用二氯甲烷萃取, 旋转蒸发得到多菌灵半抗原。

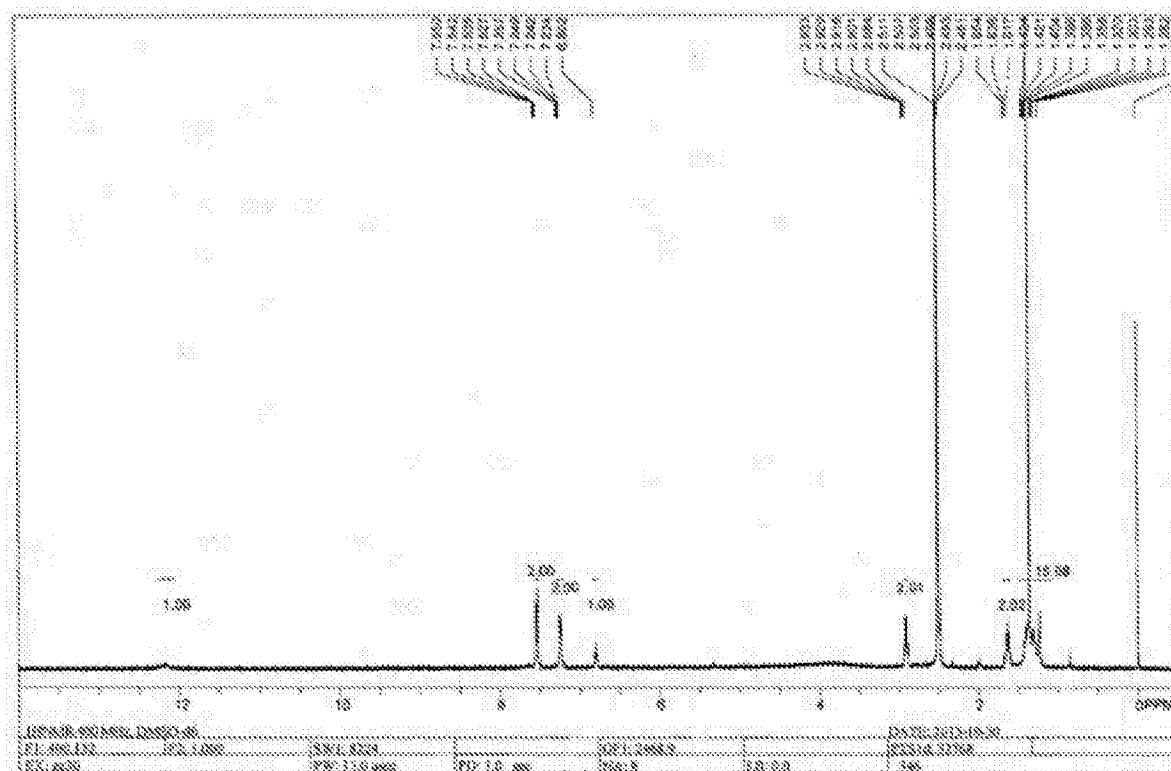


图1

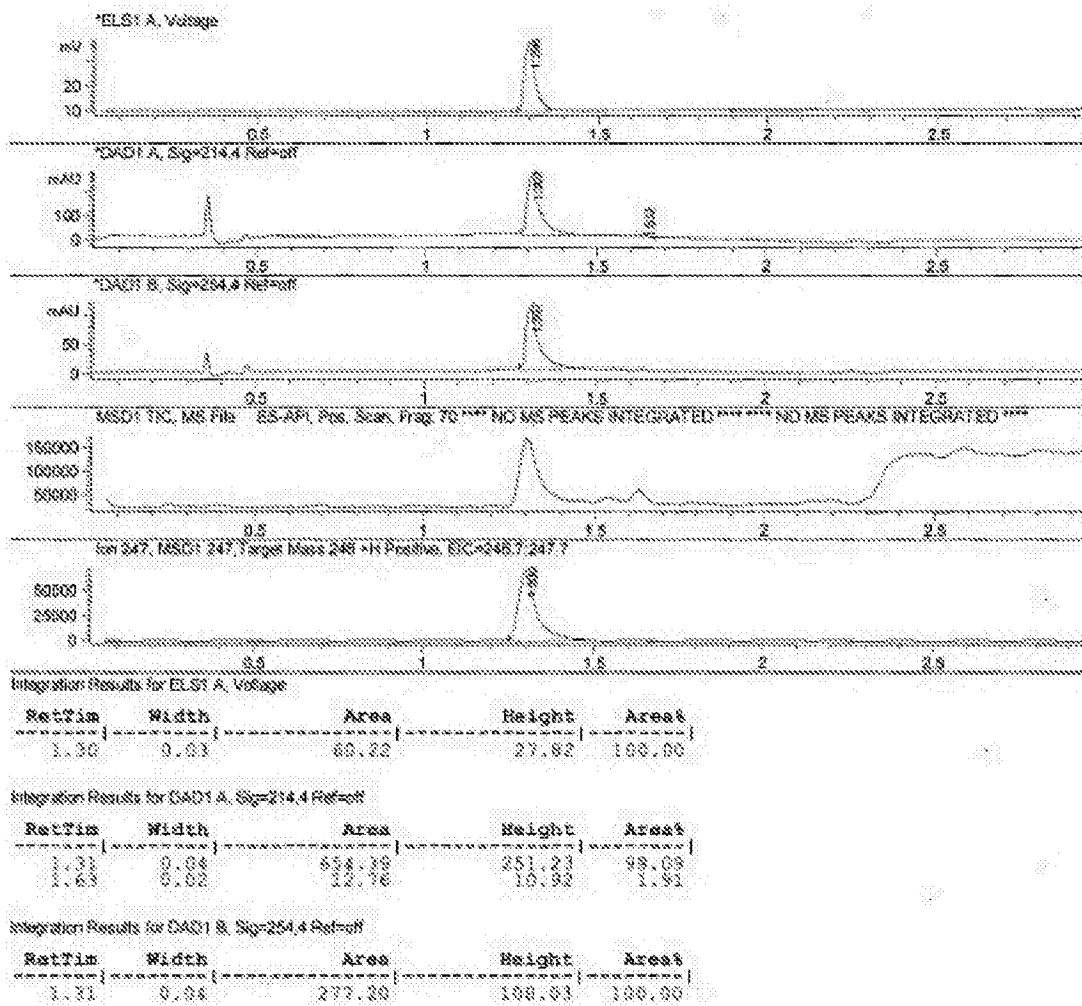


图2

专利名称(译)	一种多菌灵半抗原的合成方法		
公开(公告)号	CN104130195B	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201410291510.9	申请日	2014-06-26
[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	徐丽广 胥传来 严会娟 匡华 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
发明人	徐丽广 胥传来 严会娟 匡华 马伟 刘丽强 宋珊珊 吴晓玲		
IPC分类号	C07D235/30 C07K16/44 G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	C07D235/30 C07K16/44 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/577 G01N2430/00		
其他公开文献	CN104130195A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种多菌灵半抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以2-氨基苯并咪唑为原料，经过3步化学反应得到多菌灵半抗原，采用液质联用技术和核磁共振技术对重要的中间产物和终产物进行鉴定和分析。本方法成功地合成了多菌灵半抗原，合成步骤安全有效，为建立多菌灵的酶联免疫分析方法提供了有利的条件，满足了国内对该研究的需要。

