

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C07C309/40

[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/497 G01N 33/00

G01N 33/563 C12Q 1/68

[21] 申请号 01145441.5

[43] 公开日 2002 年 8 月 7 日

[11] 公开号 CN 1362405A

[22] 申请日 2001.12.12 [21] 申请号 01145441.5

[30] 优先权

[32]2000.12.12 [33]GB [31]00302786.6

[32]2001.10.15 [33]GB [31]0124714.7

[71] 申请人 兰道克斯实验有限公司

地址 英国安特里姆

[72] 发明人 L·汉密尔顿

P·G·温亚德

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事
务所

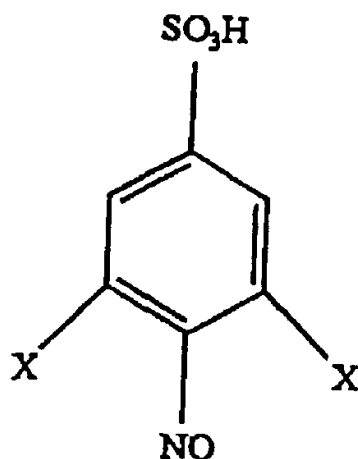
代理人 李华英

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图页数 2 页

[54] 发明名称 亚硝基化合物及其作为自旋捕集剂的用途

[57] 摘要

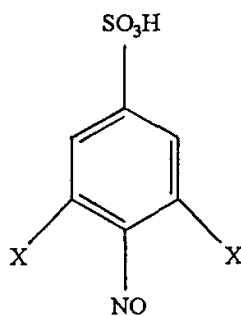
一种右式的化合物或者其盐,其中 X 是 Cl 或 CH₃。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种下式的化合物或者其盐，
其中 X 是 Cl 或 CH₃。
2. 3,5-二氯-4-亚硝基苯磺酸酯或者其盐。
3. 根据权利要求 2 的化合物，所述化合物为 3,5-二氯-4-亚硝基苯磺酸酯的钠盐。
4. 3,5-二甲基-4-亚硝基苯磺酸酯或者其盐。
5. 根据前述权利要求任何一项的化合物，所述化合物被同位素标记。
6. 根据权利要求 5 的化合物，其中同位素是 ²H 或者 ¹⁵N。
7. 根据前述权利要求任何一项的化合物作为自旋捕集剂的用途。
8. 根据权利要求 7 的用途，用于分析亚硫酸根阴离子、尿毒症患者渗析液中的氧化剂、一氧化氮、烷基自由基或过氧化物。
9. 根据权利要求 7 的用途，用于分析酶联免疫吸附试验中抗体-过氧化物酶配合物的存在。
10. 根据权利要求 7-9 任何一项的用途，在分析中，其中通过电子自旋共振光谱学来检测基团。



亚硝基化合物及其作为自旋捕集剂的用途

发明领域

本发明涉及新的亚硝基化合物及其作为自旋捕集剂的用途。

发明背景

现在已经广泛认同了活性氧(RO)和活性氮(RN)片段(包括自由基)涉及了几种疾病情况的发病。能直接检测到低浓度基团的唯一技术是电子自旋共振(ESR)光谱学。虽然该技术高度灵敏(阈值为 10^{-7} - 10^{-6} M自旋),但是其不能直接应用于生物氧化的研究。一种更有用的方法是将寿命短的活性自由基转变成更加持久的片段对其进行ESR研究,即,所谓的“自旋捕集”方法。该自旋捕集技术利用了抗磁性化合物,该化合物中所有电子都是成对的。作为自旋捕集剂已知的抗磁性化合物可同含有自旋未成对电子的自由基(R)反应。自旋捕集剂同活性自由基的反应导致了相对稳定的、可ESR观测的自旋加合物的形成。有利的情形是从自旋加合物的ESR参数(例如超精细合常数, g 因子)能鉴别自由基R。

Jansen 等人, JACS (1968) 90: 5909 - 10 创建了该技术。此后,已经有许多关于适合的自旋捕集剂的合成研究。最常使用的自旋捕集剂是在与自由基的反应中形成氮氧化物(nitroxide)的那些。

可商购的自旋捕集剂是3,5-二溴-4-亚硝基苯磺酸酯的钠盐(DBNBS)。参见 Kaur 等人, JCS Chem. Comm. (1981) 142 - 3。DBNBS 是水溶性芳香族C-亚硝基自旋捕集剂,已经报道了其捕获了亚硫酸根阴离子(SO_3^-)、超氧化物、烷基、一氧化氮和亚硒酸阴离子基团。还报道了当将DBNBS氧化成能通过ESR光谱学检测的基团阳离子DBNBS⁺时, DBNBS 就能在尿毒症病人的血浆中检测到氧化类物质。参见 Roselaar 等人, 国际肾学杂志(Kidney International) (1995) 48: 199 - 206, 和 WO-A-92/18874。

Reist 等人, FEBS Lett. (1998. 423: 231 - 4), 公开了亚硫酸盐对肺是有毒的, 并且能引起变态反应如哮喘症中的支气管缩窄。Reist 等人, 肾病学杂志(J. Nephrology) (1998) 71: 2431 - 8 报道了亚硫酸盐同过硝酸盐结合

对神经元细胞的毒性作用。因此，对于亚硫酸盐来说，有效的自旋捕集剂具有很大潜在的价值。

Matsuo 等人，游离基生物与医学 (Free Radical Biology and Medicine) (1998) 25: 929-35, 报道了对于乙型肝炎表面 (HBs) 抗原检测非常灵敏的 'ELISA-ESR' 方法，该方法使用 4-亚肼基甲基-1-羟基-2, 2, 5, 5-四甲基-3-咪唑啉-3-氧化物 (HHTIO) 作为自旋捕集剂。在该方法中，用第一 HBs 抗体包被玻璃珠，并且用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记第二 HBs 抗体。在 HBs 抗原的存在下，HRP 标记的抗体将同抗原连接，抗原同玻璃珠连接。在洗涤之后，将抗原-抗体复合物加入到含有对乙酰氨基苯酚 (p-AP)、过氧化氢和 HHTIO 的溶液中。在过氧化氢的存在下，通过 HRP 作用将 p-AP 转化为苯氧基，用 HHTIO 捕集苯氧基以形成稳定的能通过 ESR 光谱学检测的氮氧基 (nitroxide radical)。

发明概述

根据本发明，新的化合物是 3, 5-二氯-4-亚硝基苯磺酸酯 (DCNBS) 和 3, 5-二甲基-4-亚硝基苯磺酸酯 (DMNBS) 及其盐。

DCNBS 至少有几个优于 DBNBS 的优点。这些优点包括改进了自旋捕集剂在含水系统中的溶解性和较狭窄的 ESR 信号 (其将导致较大的信/噪比)。

已经使用 DCNBS 成功地检测了肾衰竭患者的渗析液中的氧化剂 (氧化剂将 DCNBS 氧化为其基团阳离子 DCNBS^+ ，接着通过 ESR 光谱学进行检测)。

DCNBS 将捕获一氧化氮。并且其还是对烷基自由基、过氧化物和亚硒酸根阴离子 (SeO_3^-) 来说的潜在的自旋捕集剂。

就亚硫酸根阴离子 (SO_3^-) 来说，发现 DCNBS 是比 DBNBS 具有更大灵敏度的自旋捕集剂。同样 DMNBS 优于 DBNBS 或其同位素类似物 (^{15}N 和 d_2) 或 DCNBS。对 SO_3^- 加合物来说，用 DMNBS 获得的 ESR 信号比用 DBNBS 获得的多 20 倍。

因此，DMNBS 作为亚硫酸根阴离子的自旋捕集剂具有巨大的潜能。此外，DMNBS 可用作通过 ESR 检测 ELISAs 中抗体-过氧化物酶复合物存在的检测器分子。

优选实施方案的描述

本发明优选的化合物是 DCNBS 钠盐和 DMNBS 钠盐。然而，可以考虑其它盐的形式，且保留了本发明的本质特点。

DCNBS 和 DMNBS 可以如 DBNBS 一样以相同的方式配制和使用。下面描述它们的合成和应用。

例如，可以用本发明的化合物分析任何适合的存在亚硫酸盐阴离子、一氧化氮、烷基自由基或过氧化物的样品。还可用本发明的化合物分析尿毒症患者渗析液中的氧化剂。并且参见英国专利申请 No. 0024938. 3。

在本发明的分析中，可以通过 ESR 光谱学检测基团。

在本发明特别的实施方案中，在上述的 ELISA-ESR 分析中，可以用 DMNBS 代替 HHTIO。基于同样的原理，通过 HRP 的作用（图 2），由亚硫酸盐、过氧化氢和 DMNBS 的反应混合物可形成 $\text{DMNBS} - \text{SO}_3^-$ 加合物。许多 HRP 标记的抗体是普遍有效的。初步的结果暗示了 DMNBS 分析优于 HHTIO 分析，这表明本发明的化合物可用作通过 ESR 检测 ELISAs 中抗体-过氧化物酶复合物存在的检测器分子。

下面的实施例阐明了本发明化合物的制备。接下来的测试阐明了其应用。

实施例 1

下面描述分两步由 2, 6-二氯苯胺（Aldrich 化学公司）合成 DCNBS。参考通过 Kaur 等人，supar 的方法由 3, 5-二溴对氨基苯磺酸（3,5-dibromosulphanilic acid）的钠盐（Aldrich 化学公司）合成 DBNBS。辣根过氧化物酶（Type VI）、磷酸盐缓冲的盐片、过氧化氢和亚硫酸二钾都可从 Sigma 化学公司，Poole, Dorset, U.K. 购买。

3, 5-二氯对氨基苯磺酸

在氮气、伴随冷却和搅拌条件下，将 2, 6-二氯苯胺（22.0 克；0.136 摩尔）小心加入到浓硫酸（50 毫升）中。当加入完成时，在氮气条件下在 170℃ 将反应混合物加热 5 小时，然后在灌入冷水（4℃）之前将其冷却到 50℃。过滤沉淀，然后与脱色炭（2g）一起在沸水（500 毫升）中加热 15 分钟。过滤之后，除去溶剂，用水重结晶粗产品得到结晶固体，用硅胶干燥过夜，得到 3, 5-二氯对氨基苯磺酸白色粉末。产率 13.7 克（42%）。

I. R. 1153cm^{-1} (s) (SO_3^-)

3, 5-二氯-4-亚硝基苯磺酸酯的钠盐（DCNBS）

将 3, 5-二氯对氨基苯磺酸（2.0 克；8.26 毫摩尔）和 30% 的过氧化氢（5.9 毫升；0.058 摩尔）加入到乙酸钠（0.68 克；8.26 毫摩尔）的冰乙酸（14

毫升) 溶液中, 搅拌直到固体完全溶解。将得到的溶液在室温下放置 14 天, 此后, 将部分溶剂在旋转蒸发器上除去 (水浴温度 40-50℃), 直到恰好观察到固体产品。然后在 4℃ 下将反应混合物放置过夜。过滤产品, 用冰乙酸 (5 毫升)、无水乙醇 (10 毫升)、二噁烷/乙醚 (1: 1) (10 毫升) 和无水乙醇 (10 毫升) 洗涤。产品用硅胶干燥过夜, 得到 3, 5-二氯-4-亚硝基苯磺酸酯的钠盐霜形粉末。产率 0.92 克 (40%)

I. R. 1297 cm^{-1} (s) (芳族 C-亚硝基反式二聚体)

FAB-MS (负离子形式, 使用 3-NBA 作为基体)

在 254、256、258a. m. u. 观测到峰值 (14%, 10%, 4%), 其与 DCNBS 的 M^+ -Na 一致。

实施例 2

3, 5-二甲基对氨基苯磺酸 (Dimethylsulphanilic acid)

在冷却和搅拌条件下, 将新鲜蒸馏的 2, 6-二甲基苯胺 (25 毫升; 0.20 摩尔) 小心加入到浓硫酸 (37.5 毫升) 中。当加入完成时, 在 170℃ 将反应混合物加热 5 小时, 然后在灌入冷水 (4℃) 之前将其冷却到 70℃。在放置 15 分钟后过滤沉淀。然后将其溶于 2M 的氢氧化钠 (600 毫升) 中, 与脱色炭一起加热 15 分钟。过滤混合物, 将其冷却。然后使用 2M 的盐酸小心将其酸化到 pH 为 3。冷却到 4℃, 产品结晶成白色固体。过滤该固体, 真空下用硅胶干燥。产率 18.4 克 (45%)。

I. R. 1155 cm^{-1} (s) (SO_3^-)。

M. S. (-E. l.) 在 200 (M^+ -1.56%) 观测到峰值。

3, 5-二甲基对氨基苯磺酸的钠盐

将含水氢氧化钠 (2M) 逐滴加入到 3, 5-二甲基对氨基苯磺酸 (8.3 克; 毫摩尔) 在水 (50 毫升) 中的悬浮液中, 直到所有的酸都溶解, 溶液恰好呈碱性 (pH11)。回流溶液 1 小时, 在减压下除去溶剂得到白色固体, 在真空下用五氧化二磷干燥。产率 8.0 克 (87%)。

I. R. 1167 cm^{-1} (s) (SO_3^-), 文献值为 1200-1145 cm^{-1} (SO_3^-)。

3, 5-二甲基-4-亚硝基苯磺酸酯的钠盐 (DMNBS)

搅拌下将无水乙酸钠 (3.09 克; 37.7 毫摩尔) 溶于冰乙酸 (84.6 毫升) 中。向该溶液中加入 3, 5-二甲基对氨基苯磺酸的钠盐 (8.39 克; 37.7 毫摩

尔)和过氧化氢(30%重量/体积, 30.2毫升; 0.294摩尔)。将反应混合物在60℃加热1小时,然后在室温下搅拌2小时。将反应混合物在室温下放置过夜得到结晶产品。过滤该产品,用冰乙酸(40毫升)、乙醇(40毫升)、二噁烷/乙醚(1:1)(40毫升)和乙醇(40毫升)洗涤获得浅黄色固体。产率4.0克(45%)

I. R. 1266cm^{-1} (s) (芳族C-亚硝基反式二聚体)

FAB-MS (负离子形式, 使用3-NBA作为基体)。在214 (M^+Na , 24%)观测到峰值。

$^1\text{Hnmr}$ (400MHz, D_2O) 2.42(6H, s, $2x\text{-CH}_3$)和7.68(2H, s, 2-H和6-H)。

$^{13}\text{Cnmr}$ (400MHz, D_2O) 18.2($2x\text{-CH}_3$), 126.8(C-2和C-6), 134.6(C-3和C-5), 142.0和145.5(C-1和C-4)。

测试

ESR分析

使用配备 TE_{011} 圆柱形空穴的原型分光计(Jeol(U.K.)Ltd., Welwyn花园城市, 英国)获得ESR光谱。室温下在WG-LG-11石英平面室(Wilmad-Glass, Buena, NJ)中分析样品。一般情况下,该仪器参数是:微波频率9.2GHz,微波功率4mW,中心场(CF)336.7mT,扫描宽度(SW) ± 5 mT,数据点数4095,调幅频率100kHz。对于能同辣根过氧化物酶/过氧化氢/亚硫酸盐反应的自旋捕集剂来说:扫描时间200秒,时间约束0.1秒,调幅宽度0.05。对于能同氧化剂和一氧化氮反应的自旋捕集剂来说:扫描时间150秒,时间约束0.3秒,调幅宽度0.2mT。使用具有500设置标度的A JEOL ES-DM1数字氧化锰指示器(在标度设置上每单位嵌入0.03mm的玻璃管)确保样品之间的再现性和区别在微波场内的信号位置。

SO_3^- 反应(辣根过氧化物酶/过氧化氢/亚硫酸盐)

将自旋捕集剂DBNBS, DCNBS和DMNBS(40mM)的溶液(25, 50, 91, 75, 110.75, 125和156.25微升,在PBS中的最终浓度为4, 8, 14.68, 17.72, 20和25mM)加入到8微升辣根过氧化物酶(在PBS中91 μM)、8微升亚硫酸钾(在水中100mM)和12.5微升过氧化氢(在PBS中5mM)中。体积方面的不同在于PBS(pH7.4)。反应混合物的最终体积为250微升。将反应混合物彻底混合,在室温下保温25分钟后通过ESR光谱学分析。使用单独的反应物

以及缺少自旋捕集剂的上述反应混合物进行对照。

在 SO_3^- 体系中，通过 DBNBS 和 DCNBS 测量基团形成的程度。当 DBNBS 同辣根过氧化物酶 / 过氧化氢 / 亚硫酸盐反应时，在上面指定的 ESR 条件下能观测到成对的三重峰。三重峰是由于在 DBNBS 分子中苯环 4 位的氮超精细分裂，成对是由于在苯环 2 和 6 位的氢超精细分裂。当用 DCNBS 代替 DBNBS 时，较小的氯原子代替了大的溴原子，这将引起信号线宽度从 0.087 到 0.085mT 的下降。

在 SO_3^- 体系中，DBNBS 在 17.72mM、DCNBS 在 20 - 25mM 达到了最佳浓度。因此在这些浓度处比较自旋捕集剂的灵敏度。各自的信号 / 标记比率为 3.33 和 10.62，这表明 DCNBS 比 DBNBS 的灵敏度大 3 倍。

当以捕获亚硫酸根阴离子 (SO_3^-) (由 HRP, 过氧化氢, SO_3^{2-} 产生) 的方式来比较水溶性的自旋捕集剂 DMNBS, DCNBS, DBNBS, DBNBS-d_2 , $\text{DBNBS-}^{15}\text{N}$ 和 $\text{DBNBS-d}_2\text{-}^{15}\text{N}$ 时，发现 DMNBS 获得最大的 ESR 信号。发现该信号的高度比 DBNBS 获得的大 20 倍。而且还发现比用同位素标记的 DBNBS 类似物 $\text{DBNBS-d}_2\text{-}^{15}\text{N}$ 多 3 倍。因此 DMNBS 是对亚硫酸根阴离子特别有用的自旋捕集剂。

一氧化氮的反应

用氮气将图 1 所示的仪器冲洗 15 分钟。然后将含有去离子水 (4 毫升) 的 vacutainer 同系统连接，再用氮气冲洗 15 分钟，以除去在系统中存在的任何氧气，因而阻止了二氧化氮的形成。使 NO 气体经系统鼓泡通过去离子水 45 分钟。通过鼓泡通过两瓶 2M 氢氧化钠除去在加压的一氧化氮容器中存在的少量的二氧化氮。然后，将气体鼓泡通过含有去离子水的洗瓶以除去任何碱性的气溶胶污物。在去离子水步骤之后，将过量的一氧化氮鼓泡通过含有 1M 高锰酸钾 / 1M 氢氧化钠的洗瓶，以阻止过量的一氧化氮从通风橱中逸出。在得到的一氧化氮饱和的水中，一氧化氮的浓度为 2.0mM。

自旋捕集剂溶液

将 DBNBS、DCNBS 和 DMNBS 样品称重放入 vacutainer，蒸发。Tris-HCl 缓冲液，0.01M，pH7.4，通过用氮气鼓泡 15 分钟去氧。通过气体密封的注射器将去氧的缓冲液加入自旋捕集剂中，得到最后的自旋捕集剂的浓度为 0.30M。将该自旋捕集剂溶液简单地用氮气冲洗，然后备用。

时程

将一氧化氮饱和的水 (1 毫升) 加入每个 1 毫升自旋捕集剂溶液 (DBNBS、

DCNBS 和 DMNBS) 中。自旋捕集剂的最终浓度为 0.15M, 一氧化氮为 1mM。通过将 1 毫升去氧水加入自旋捕集剂溶液中得到平行空白液。在每一个时间点, 从待测溶液中取出样品, 用 ESR 光谱分析该样本和空白液, 该空白液作为光谱的基准物。

时程试验表明在使用的条件下, DNBNS (0.15M) 同一氧化氮 (1.0mM) 的反应很慢。发现 DNBNS 同一氧化氮的反应在约 50 小时达到最大。发现 DMNBS 同一氧化氮的反应在 24 - 28 小时达到最大。发现 DCNBS 同一氧化氮的反应进行的最快, 在 20 - 24 小时达到最大。

自旋捕集剂的剂量反应

如上制备自旋捕集剂溶液, 获得反应混合物中最终浓度为 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 和 0.25M 和平行空白液。将一氧化氮饱和的溶液 (0.5 毫升, 最终浓度 1mM) 加入测试溶液中, 将去氧水 (0.5 毫升) 加入空白液中。在用 ESR 光谱学分析之前, 将具有 DNBNS 的反应混合物温育 26 小时, 而具有 DCNBS 的反应混合物温育 22 小时。分别将空白液作为其平行测试光谱的基准物。

灵敏性研究

在浓度为 0.15M 的 DNBNS 处得到 DNBNS 同一氧化氮反应的最大信号强度。就 DCNBS 同一氧化氮反应来说, 在 0.05 - 0.40M 的 DCNBS 处观测到平顶。因此被选择用来评价 DNBNS 和 DCNBS 同一氧化氮反应的灵敏度的浓度是 0.15M。

在一氧化氮饱和的水中, 一氧化氮的浓度是 2.0mM。用去氧水稀释该一氧化氮溶液, 得到反应混合物中最终浓度为 0, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 50 和 100 μ M。将一氧化氮溶液加入 DNBNS 和 DCNBS 中, 得到最终自旋捕集剂的浓度为 0.15M。通过向自旋捕集剂溶液中加入 0.5 毫升去氧水, 得到空白液 (或零点)。将含有 DNBNS 的反应混合物温育 50 小时, 含有 DCNBS 的温育 20 小时。从每一个光谱计算信 / 噪比。溶液的取出和加入都是使用气体密封的注射器进行。

从曲线的直线部分从 0 - 10 μ M 计算检测界限 (信 / 噪比等于 3) 和定量界限 (信 / 噪比等于 10)。发现对于 DCNBS, 测量界限和定量界限各自为 4.06 μ M 和 17.30 μ M。发现对于 DNBNS, 测量界限是 0.23 μ M, 定量界限是 0.92 μ M。因此就一氧化氮来说, 发现 DNBNS 是比 DCNBS 更加灵敏的自旋捕集剂, 而发现 DCNBS 同一氧化氮的反应比 DNBNS 更快。

氧化剂反应

该研究使用来自肾衰竭患者的在不卧床连续腹膜透析 (CAPD) 中的渗析液。当更换渗析液袋时收集渗析液。

将 10mM 的 DBNBS 和 DCNBS 的溶液 (5、8、12、25 和 30 微升, 最终浓度为 0.5、0.8、1.2、2.5 和 3.0mM) 加入到 60 微升的渗析液中。体积方面的区别在于 PBS。将反应混合物彻底混合, 在室温下温育 25 分钟后进行 ESR 光谱学分析。

当 DBNBS 和 DCNBS 同氧化剂反应时, 获得典型的三线 ESR 信号。当 DCNBS 代替 DBNBS 时, 观测到峰宽从 0.495 下降为 0.306mT。在 ESR 光谱学中, 峰宽的降低一般被认为是有利的, 因为其可以导致灵敏度增加。

为了比较 DBNBS 和 DCNBS 的灵敏度, 应当使用过量的自旋捕集剂。剂量反应实验表明在氧化剂系统中, DBNBS 在最终额定浓度大约为 1.2mM 时达到过量, 而 DCNBS 在最终额定浓度大约为 2.5mM 时达到过量。因此 DBNBS 和 DCNBS 的灵敏度各自在 1.2 mM 和 2.5 mM 时进行比较。发现它们获得了几乎一致的结果, 即各自的信号/标志比(signal/marker ratios)为 0.516 和 0.521。DCNBS 具有的优点是其比 DBNBS 更易溶, 所以 DCNBS 不会遇到浑浊问题。因此对于分析尿毒症患者渗析液中的氧化剂来说, DCNBS 是优选的自旋捕集剂。

图 1

制备 NO 饱和的去离子水的系统

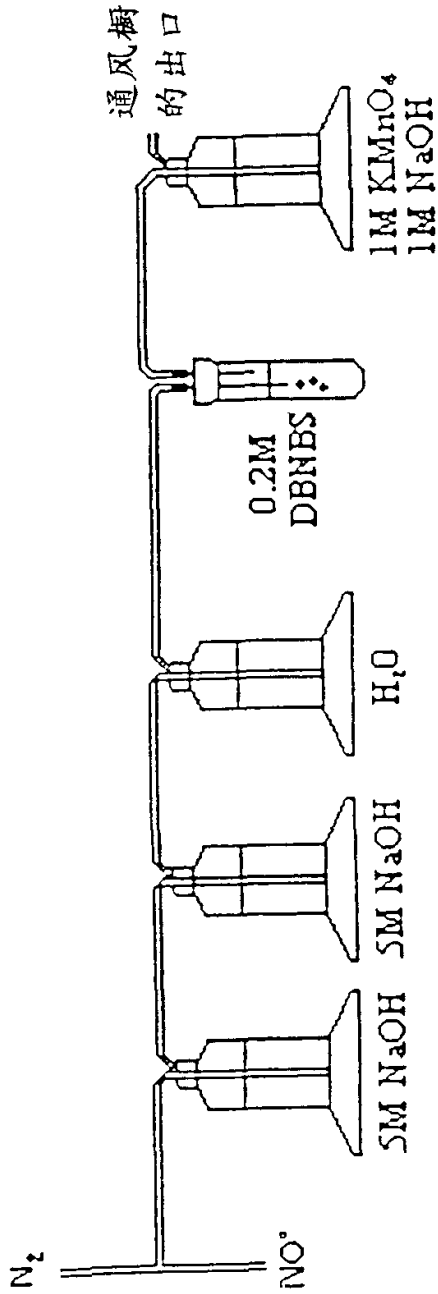
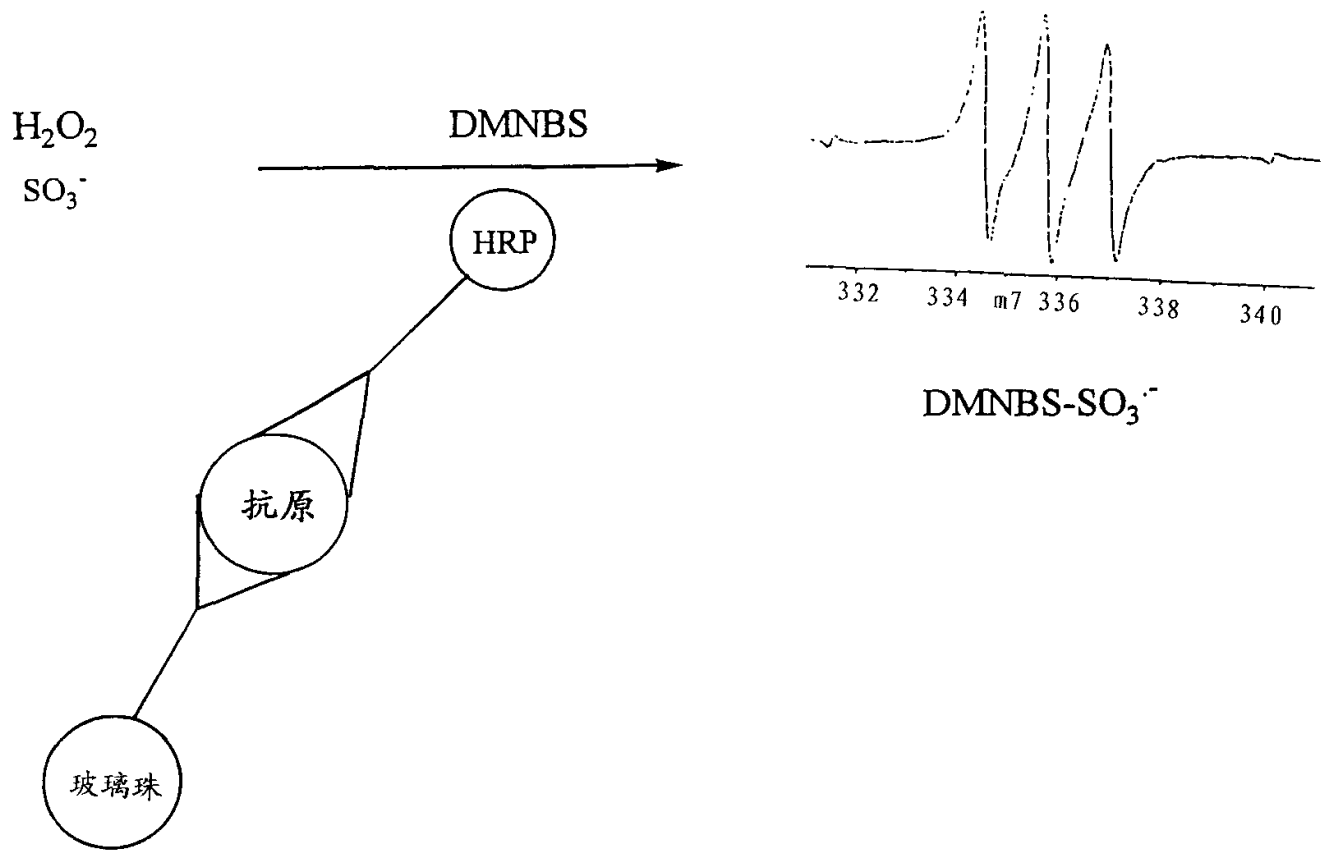


图 2

酶联免疫吸附 - ESR 试验 (ELISA - ESR)



专利名称(译)	亚硝基化合物及其作为自旋捕集剂的用途		
公开(公告)号	CN1362405A	公开(公告)日	2002-08-07
申请号	CN01145441.5	申请日	2001-12-12
[标]申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	兰道克斯实验有限公司		
[标]发明人	L·汉密尔顿 PG温亚德		
发明人	L·汉密尔顿 P·G·温亚德		
IPC分类号	G01N31/00 C07B59/00 C07C309/40 C12Q1/28 G01N24/10 G01N33/535 G01R33/60 G01N33/497 G01N33/00 G01N33/563 C12Q1/68		
CPC分类号	G01R33/60 C07C309/40 Y10T436/177692 Y10T436/18 Y10T436/20 Y10T436/24		
代理人(译)	李华英		
优先权	2000302786 2000-12-12 GB 2001024714 2001-10-15 GB		
其他公开文献	CN1182111C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种右式的化合物或者其盐,其中X是Cl或CH₃。

