



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108640866 A

(43)申请公布日 2018.10.12

(21)申请号 201810557928.8

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2018.06.01

G01N 33/53(2006.01)

G01N 30/02(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 刘尚钟 李奇博 廖敏 崔永亮
王保民

(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 关畅 吴爱琴

(51) Int. Cl.

C07D 207/404(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

C07K 14/795(2006.01)

C07K 16/44(2006.01)

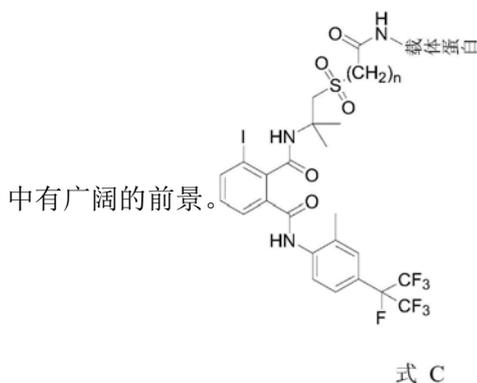
权利要求书4页 说明书13页 附图2页

(54)发明名称

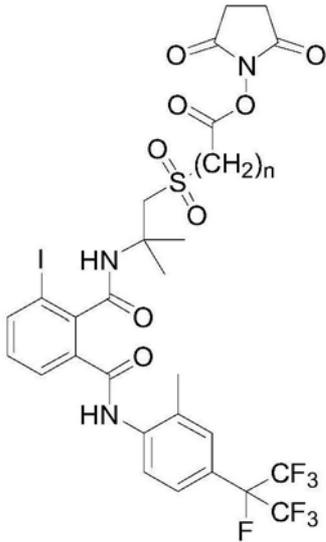
氟苯虫酰胺抗原及其制备方法与应用

(57)摘要

本发明公开了一种氟苯虫酰胺抗原及其制备方法与应用。该氟苯虫酰胺抗原如式C所示,是氟苯虫酰胺与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物。本发明提供的制备氟苯虫酰胺抗原的方法,能够方便、快捷地获得氟苯虫酰胺抗原,且合成步骤简洁明了、合成成本低,效果好。用本发明方法制备的氟苯虫酰胺抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备氟苯虫酰胺抗原的方法及由该方法获得的氟苯虫酰胺抗原在氟苯虫酰胺的快速免疫检测应用中



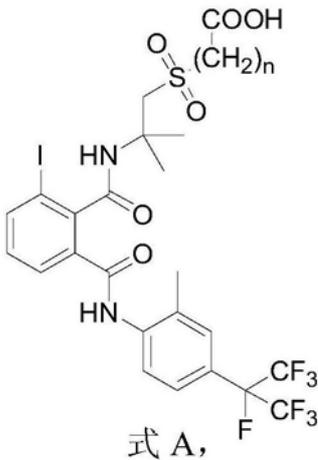
1. 式B所示化合物,



式 B,

式B中,n为1-6的整数。

2. 制备权利要求1中式B所示化合物的方法,为:在N-羟基琥珀酰亚胺存在下,将式A所示化合物与二环己基碳二亚胺或1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐进行缩合反应得到所述式B所示化合物;



式 A,

式A中,n为1-6的整数。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:式A所示化合物、N-羟基琥珀酰亚胺与二环己基碳二亚胺或1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的投料摩尔比为1:1-5:1-5;

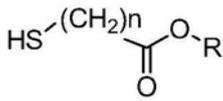
所述缩合反应中,反应温度为0-50℃,反应时间为4-24小时;

所述缩合反应在有机溶剂或水中进行,

所述有机溶剂选自N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷和四氢呋喃中的至少一种。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于:式A所示化合物通过包括下述步骤的方法制备得到:

1') 将2,2-二甲基氮丙啶与式Y所示化合物进行开环反应,得式Y₁所示化合物;

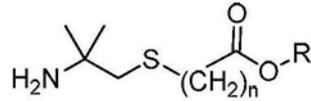
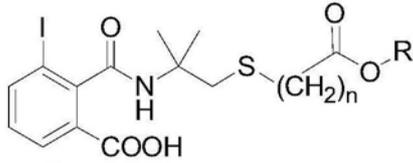


式 Y,

式Y中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

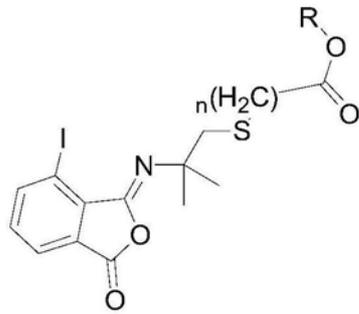
式Y₁中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

2') 将式Y₁所示化合物与3-碘代邻苯二甲酸酐进行开环反应,得到式Y₂所示化合物;

式 Y₁,式 Y₂,

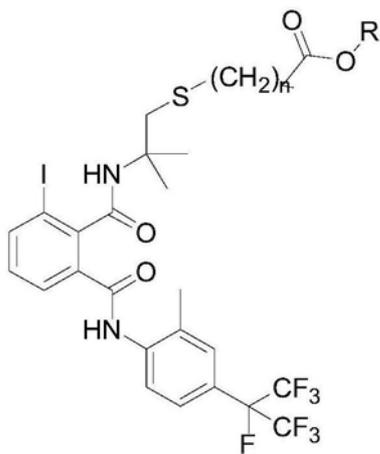
式Y₂中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

3') 将式Y₂所示化合物与三氟乙酸酐进行关环反应,得到式Y₃所示化合物;

式 Y₃,

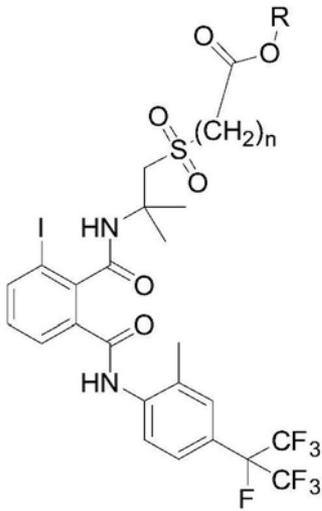
式Y₃中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

4') 将式Y₃所示化合物与2-甲基-4-(七氟异丙基)苯胺进行开环反应,得到式Y₄所示化合物;

式 Y₄,

式Y₄中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

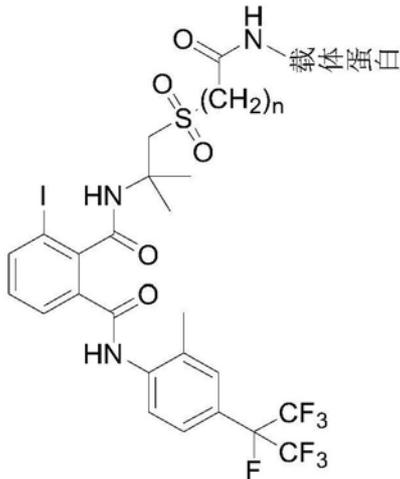
5') 将式Y₄所示化合物与间氯过氧苯甲酸进行氧化反应,得到式Y₅所示化合物。

式 Y₅,

式Y₅中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

6') 式Y₅所示化合物与碱进行水解反应,得到式A所示化合物。

5. 氟苯虫酰胺抗原,为:氟苯虫酰胺与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物,所述酰胺键是权利要求2中式A上的羧基通过活泼酯与载体蛋白上的氨基形成的,其结构式如式C所示:



式 C,

式C中,n为1-6的整数;

所述载体蛋白选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中的至少一种。

6. 制备权利要求5中式C所示氟苯虫酰胺抗原的方法,包括:将权利要求1中式B所示化合物与载体蛋白进行偶联反应,得到式C所示化合物。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述偶联反应中,式B所示化合物与载体蛋白的投料摩尔比为5-30:1;

所述偶联反应中,反应温度为0-50℃,反应时间为8-36小时;系统pH值为5-9。

8. 由权利要求5所述的氟苯虫酰胺抗原进行免疫得到的抗体。

9. 权利要求5所述的氟苯虫酰胺抗原或权利要求8所述的抗体在检测样品中氟苯虫酰

胺中的应用；

或,权利要求5所述的氟苯虫酰胺抗原或权利要求8所述的抗体在制备用于检测样品中氟苯虫酰胺的酶联免疫试剂盒、发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱中的应用。

10. 用于检测样品中氟苯虫酰胺的酶联免疫试剂盒、发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱,含有权利要求5所述的氟苯虫酰胺抗原或权利要求8所述的抗体。

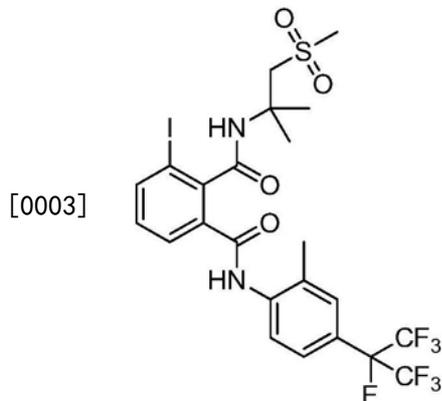
氟苯虫酰胺抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫分析领域,具体涉及氟苯虫酰胺抗原及其制备方法与应用。

背景技术

[0002] 氟苯虫酰胺通用名为Flubendiamide,化学名为为3-碘-N'-(2-甲磺酰基-1,1-二甲乙基)-N-{4-[1,2,2,2-四氟-1-(三氟甲基)乙基]-2-甲基苯基}邻苯二甲酰胺,试验代号NNI-001,商品名为:垄歌;CAS登记号:272451-65-7;分子式为: $C_{23}H_{22}F_7IN_2O_4S$;相对分子量为:682.39。氟苯虫酰胺(flubendiamide)是日本农药公司和拜耳公司联合开发的新型邻苯二甲酰胺类杀虫剂,其通过激活鱼尼丁受体细胞内钙释放通道,导致贮存钙离子的失控性释放,是目前为数不多的作用于昆虫细胞鱼尼丁受体的化合物。其化学结构式如下:

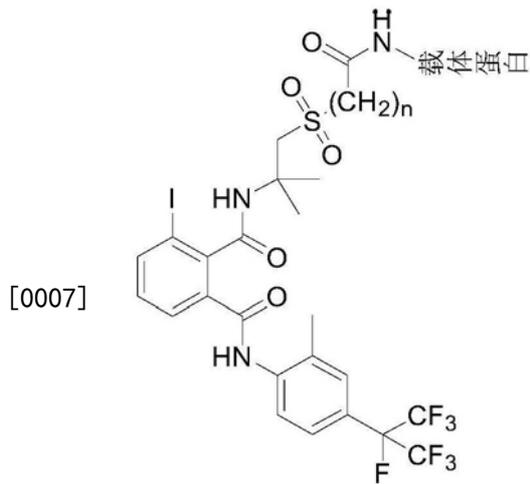


[0004] 目前,氟苯虫酰胺的分析方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液质联用法(HPLC-MS/MS)等。但是这几种检测方法需要使用昂贵的仪器设备,检测费用高,耗时长不适用于现场快速检测。与仪器分析法相比,免疫分析法具有快速、简便、实时、易于进行现场检测、样品前处理简单、灵敏度高、选择性强、适合于高通量分析等优点,而且还能大幅度降低检测成本。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一是提供一种氟苯虫酰胺抗原及其制备方法。

[0006] 本发明所提供的氟苯虫酰胺抗原,为:氟苯虫酰胺与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物,其结构式如式C所示:



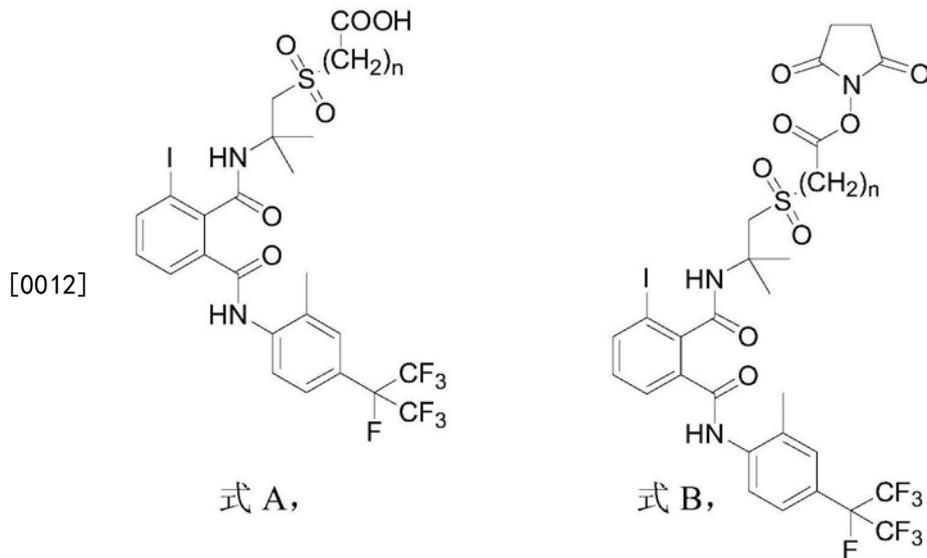
式 C,

[0008] 式C中,n为1-6的整数,具体可为2。

[0009] 所述载体蛋白可选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中的至少一种,具体可为牛血清蛋白或卵清蛋白。

[0010] 上述式C所示氟苯虫酰胺抗原可通过包括下述步骤的方法制备得到:

[0011] 1) 在N-羟基琥珀酰亚胺存在下,将式A所示化合物与二环己基碳二亚胺或1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐进行缩合反应得到所述式B所示化合物,;



[0013] 式A中,n为1-6的整数,具体可为2;

[0014] 式B中,n为1-6的整数,具体可为2;

[0015] 2) 将式B所示化合物与载体蛋白进行偶联反应,得到式C所示化合物。

[0016] 上述方法步骤1)中,式A所示化合物、N-羟基琥珀酰亚胺与二环己基碳二亚胺或1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐的投料摩尔比为1:1-5:1-5,具体可为1:1.3:1.1;

[0017] 所述缩合反应中,反应温度可为0-50℃,具体可为25℃,反应时间可为4-24小时,具体可为8小时。

[0018] 所述缩合反应可在有机溶剂或水中进行,

[0019] 所述有机溶剂可选自N,N-二甲基甲酰胺、二甲基亚砷和四氢呋喃中的至少一种。

[0020] 上述方法步骤2)中,所述载体蛋白可选自牛血清蛋白、卵清蛋白和血蓝蛋白中的至少一种,具体可为牛血清蛋白或卵清蛋白。

[0021] 所述偶联反应中,式B所示化合物与载体蛋白的投料摩尔比可为5-30:1,具体可为15:1;

[0022] 所述偶联反应中,反应温度可为0-50℃,具体可为4℃,反应时间可为8-36小时,具体可为12小时,系统pH值可为5-9,具体可为7.5。

[0023] 所述载体蛋白以载体蛋白溶液的形式参与偶联反应。

[0024] 所述载体蛋白溶液可按照包括如下步骤的方法制备得到:将载体蛋白与缓冲液混匀得到所述载体蛋白溶液;其中,所述缓冲液可选自碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、硼酸盐缓冲液和4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液中的至少一种,所述缓冲液的pH值均为7.5。

[0025] 上述制备式C所示化合物的方法,还包括如下步骤:在所述偶联反应之后,将反应体系进行透析;

[0026] 所述透析步骤中,所用透析液可为pH值为7-10、浓度为0.01-0.2mol/L的PBS溶液;具体地,所述透析液的pH值为7.5,浓度为0.1mol/L。

[0027] 所述透析步骤中,所述pH值为7-10、浓度为0.01-0.2mol/L的PBS溶液按照如下方法制备而得:将NaCl、KH₂PO₄和Na₂HPO₄·12H₂O以质量比8.0:0.2:2.96的比例溶于水中,用水定容到1L。

[0028] 上述方法中式A所示化合物可通过包括下述步骤的方法制备得到:

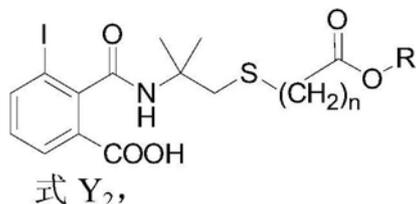
[0029] 1') 将2,2-二甲基氮丙啶与式Y所示化合物进行开环反应,得式Y₁所示化合物;



[0031] 式Y中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

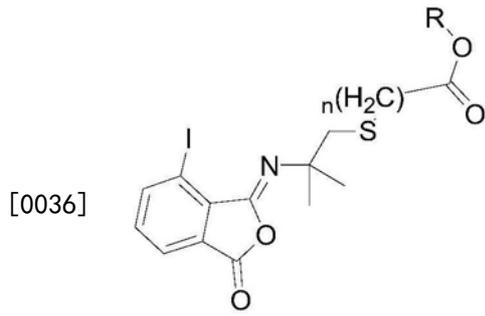
[0032] 式Y₁中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

[0033] 2') 将式Y₁所示化合物与3-碘代邻苯二甲酸酐进行开环反应,得到式Y₂所示化合物;



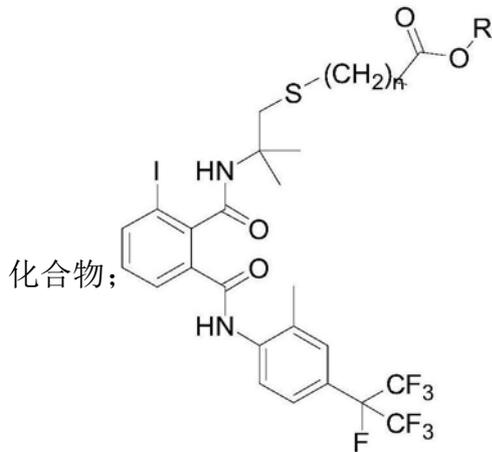
[0034] 式Y₂中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

[0035] 3') 将式Y₂所示化合物与三氟乙酸酐进行关环反应,得到式Y₃所示化合物;

式 Y₃,

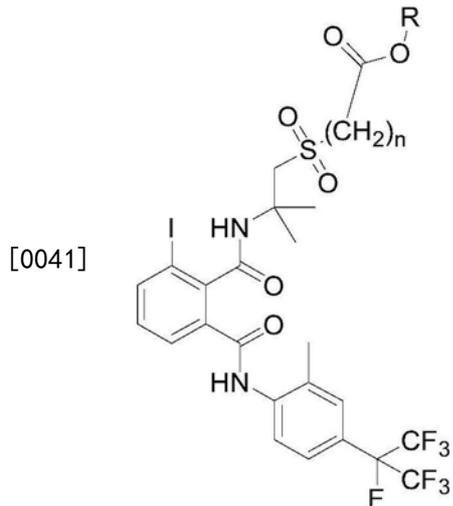
[0037] 式Y₃中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

[0038] 4') 将式Y₃所示化合物与2-甲基-4-(七氟异丙基)苯胺进行开环反应,得到式Y₄所示

式 Y₄,

[0039] 式Y₄中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

[0040] 5') 将式Y₄所示化合物与间氯过氧苯甲酸进行氧化反应,得到式Y₅所示化合物。

式 Y₅,

[0043] 式Y₅中,n为1-6的整数,R为C₁-C₁₆烷基;

[0044] 6') 式Y₅所示化合物与碱进行水解反应,得到式A所示化合物。

- [0045] 上述方法步骤1')中,2,2-二甲基氮丙啶和式Y所示化合物的投料摩尔配比可为1-10:1,具体可为1.1:1;
- [0046] 所述开环反应中,反应温度可为0-150℃,具体可为80℃,反应时间可为1-12小时,具体可为4小时;
- [0047] 所述开环反应在有机溶剂中进行;
- [0048] 所述有机溶剂可选自乙二醇二甲醚、乙醚、四氢呋喃、乙二醇甲醚中的至少一种,具体可为乙二醇二甲醚。
- [0049] 上述方法步骤2')中,所述开环反应在碱存在下进行。
- [0050] 所述碱可为三乙胺或吡啶,具体可为三乙胺。
- [0051] 3-碘代邻苯二甲酸酐和式Y₁所示化合物的投料摩尔配比可为1-10:1,具体可为1:1;
- [0052] 所述碱与式Y₁所示化合物的投料摩尔配比可为1-10:1,具体可为1:1;
- [0053] 所述开环反应中,反应温度可为0-50℃,具体可为25℃,反应时间可为1-12小时,具体可为5小时;
- [0054] 所述开环反应在有机溶剂中进行;
- [0055] 所述有机溶剂可选自二氯甲烷、四氢呋喃、乙腈中的至少一种,具体可为二氯甲烷。
- [0056] 上述方法步骤3')中,三氟乙酸酐与式Y₂所示化合物的投料摩尔配比可为1-10:1,具体可为1:1;
- [0057] 所述关环反应中,反应温度可为0-50℃,具体可为25℃,反应时间可为1-12小时,具体可为3小时;
- [0058] 所述关环反应在有机溶剂中进行;
- [0059] 所述有机溶剂可选自二氯甲烷,甲苯中的至少一种,具体可为甲苯。
- [0060] 上述方法步骤4')中,2-甲基-4-七氟异丙基苯胺和式Y₃所示化合物的投料摩尔配比可为1-10:1,具体可为1:1;
- [0061] 所述开环反应中,反应温度可为0-50℃,具体可为25℃,反应时间可为0.5-6小时,具体可为1小时;
- [0062] 所述开环反应在有机溶剂中进行;
- [0063] 所述有机溶剂可选自二氯甲烷、甲苯中的至少一种,具体可为二氯甲烷。
- [0064] 上述方法步骤5')中,间氯过氧苯甲酸和式Y₄所示化合物的投料摩尔配比可为2-10:1,具体可为2.1:1;
- [0065] 所述氧化反应中,反应温度可为-5-50℃,具体可为25℃,反应时间可为0.5-6小时,具体可为3小时;
- [0066] 所述氧化反应在有机溶剂中进行;
- [0067] 所述有机溶剂可选自二氯甲烷,甲苯中的至少一种,具体可为二氯甲烷。
- [0068] 上述方法步骤6')中,所述碱可为氢氧化锂,氢氧化钠,氢氧化钾中的至少一种,具体可为氢氧化锂;
- [0069] 所述碱和式Y₅所示化合物的投料摩尔配比可为1-20:1,具体可为6:1;
- [0070] 所述水解反应中,反应温度可为-5-100℃,具体可为25℃,反应时间可为0.5-24小

时,具体可为12小时;

[0071] 所述水解反应在有机溶剂中进行;

[0072] 所述有机溶剂可选自甲醇,乙醇,四氢呋喃中的至少一种,具体可为四氢呋喃。

[0073] 由上述氟苯虫酰胺抗原进行免疫得到的抗体也属于本发明的保护范围。

[0074] 本发明的另一目的是提供上述氟苯虫酰胺抗原或由上述氟苯虫酰胺抗原进行免疫得到的抗体检测样品中氟苯虫酰胺的应用。

[0075] 上述氟苯虫酰胺抗原或由上述氟苯虫酰胺抗原进行免疫得到的抗体在制备用于检测样品中氟苯虫酰胺的酶联免疫试剂盒、发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱中的应用。

[0076] 本发明还提供一种含有上述氟苯虫酰胺抗原或由上述氟苯虫酰胺抗原进行免疫得到的抗体的用于检测样品中氟苯虫酰胺的酶联免疫试剂盒、发光免疫试剂盒或免疫亲和色谱柱。

[0077] 所述样品可为水体、药品、食品或土壤。

[0078] 本发明提供的制备氟苯虫酰胺抗原的方法,能够方便、快捷地获得氟苯虫酰胺抗原,合成步骤简洁明了、合成成本低,效果好。用本发明方法制备的氟苯虫酰胺抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明制备氟苯虫酰胺抗原的方法及由该方法获得的氟苯虫酰胺抗原在氟苯虫酰胺的快速免疫检测应用中将有广阔的前景。

附图说明

[0079] 图1为本发明氟苯虫酰胺半抗原的合成路线图。

[0080] 图2为建立的氟苯虫酰胺间接酶联免疫法标准曲线。

具体实施方式

[0081] 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。

[0082] 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、材料等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0083] 下述实施例中所采用的二环己基碳二亚胺(DCC),1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺盐酸盐(EDC),N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),弗氏完全佐剂,弗氏不完全佐剂,牛血清白蛋白和卵清白蛋白均购于Sigma公司;羊抗小鼠IgG-HRP购自Jackson公司;邻苯二胺(OPD),2-氨基-2-甲基-1-丙醇,3-巯基丙酸乙酯和2-甲基-4-七氟异丙基苯胺均购自百灵威科技有限公司;三氟乙酸,三氟乙酸酐等其余常规试剂均购自北京化学试剂公司。

[0084] 2,2-二甲基氮丙啶按照如下文献提供的方法制备而得:Synthesis Stuttgart (2010),20,3423-3428;3-碘邻苯二甲酸酐按照如下文献提供的方法制备而得:Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters (2007),17(21),5819-5824。

[0085] 实施例1、

[0086] 根据图1所示的合成路线图制备式A所示氟苯虫酰胺半抗原3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸化合物

[0087] 步骤a:3-((2-氨基-2-甲基丙基)硫代)丙酸乙酯(附图1中化合物1)的制备

[0088] 100ml三口瓶,加入50mmol 2,2-二甲基氮丙啶、50mmol 3-巯基丙酸乙酯以及50mL

乙二醇二甲醚,加热回流4小时,旋蒸脱溶,残留物柱层析得8.8g 3-((2-氨基-2-甲基丙基)硫代)丙酸乙酯,产率86%。

[0089] 步骤b:2-((1-((3-乙氧基-3-氧代丙基)硫基)-2-甲基丙烷-2-基)氨基甲酰基)-3-碘苯甲酸(附图1中化合物2)的制备

[0090] 100mL三口瓶,将25mmol 3-碘代邻苯二甲酸酐和30mL二氯甲烷加入反应瓶,将25mmol三乙胺和25mmol 3-((2-氨基-2-甲基丙基)硫代)丙酸乙酯溶于30mL二氯甲烷缓慢滴加至反应体系,搅拌反应5h,反应结束后将反应液倒入50mL水中,稀盐酸酸化,用二氯甲烷(3×20mL)萃取,无水硫酸钠干燥,旋转脱溶后直接进行下一步反应。

[0091] 步骤c:(Z)-3-((2-((7-碘-3-氧代异苯并呋喃-1(3H)-亚基)氨基)-2-甲基丙基)硫代)丙酸乙酯(附图1中化合物3)的制备

[0092] 100mL三口瓶,加入上一步反应残留物和25mmol三氟乙酸酐并溶于50mL干燥甲苯中,室温搅拌反应3小时,旋转脱溶直接进行下一步反应。

[0093] 步骤d:3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)硫代)丙酸乙酯(附图1中化合物4)的制备

[0094] 100mL三口瓶,将上一步反应残留物和30mL二氯甲烷加入反应瓶,将25mmol2-甲基-4-七氟异丙基苯胺滴加至反应体系中,再滴加两滴三氟乙酸,室温搅拌反应1h。反应结束,反应液先后被20mL稀盐酸、20mL碳酸钠水溶液和20mL水洗涤,无水硫酸钠干燥,旋转脱溶后柱层析得9.9g 3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)硫代)丙酸乙酯,产率为54%。

[0095] ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 9.57 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 8.03 (s, 1H), 8.01-7.98 (m, 1H), 7.68 (d, J=8.2Hz, 1H), 7.53 (s, 2H), 7.26 (t, J=7.8Hz, 1H), 4.06 (q, J=7.1Hz, 2H), 2.93 (s, 2H), 2.62 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.47 (t, J=7.2Hz, 2H), 2.38 (s, 3H), 1.32 (s, 6H), 1.18 (t, J=7.1Hz, 3H)。

[0096] ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6): δ 171.30, 167.67, 165.75, 141.59, 140.79, 139.63, 136.14, 131.98, 130.12, 127.49, 127.32, 127.18, 124.01, 123.50, 123.36, 121.30, 121.02, 95.21, 89.93, 89.50, 60.06, 54.72, 42.05, 34.56, 28.63, 25.44, 18.03, 14.08。

[0097] HRMS [ESI]: calc $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{F}_7\text{IN}_2\text{O}_4\text{S}[\text{M}-\text{H}]^-$ for 735.0630. found 735.0633。

[0098] 步骤e:3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸乙酯(附图1中化合物5)的制备

[0099] 100mL三口瓶,加入5mmol3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)硫代)丙酸乙酯和20mL二氯甲烷,0℃下,将10.5mmol间氯过氧苯甲酸(m-CPBA)溶于30mL二氯甲烷后滴加至反应体系中。滴加完毕后,转移至室温反应3小时。反应结束后,反应液先后用30mL亚硫酸氢钠水溶液、30mL碳酸钠水溶液洗涤,无水硫酸钠干燥,旋转脱溶后柱层析得3.5g 3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸乙酯,产率92%。

[0100] ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 9.78 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.03 (dd, J=7.9, 0.9Hz, 1H), 7.89 (d, J=8.3Hz, 1H), 7.74 (d, J=7.2Hz, 1H), 7.53 (d, J=8.0Hz, 2H), 7.29 (t, J=7.8Hz, 1H), 4.10 (q, J=7.1Hz, 2H), 3.70 (s, 2H), 3.39-3.34 (m, 2H), 2.68 (t, J=7.3Hz, 2H), 2.39 (s, 3H), 1.54 (s, 6H), 1.19 (t, J=7.1Hz, 3H)。

[0101] ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) : δ 170.16, 167.81, 165.71, 141.50, 140.90, 139.52, 136.09, 133.00, 130.26, 127.42, 127.25, 125.00, 123.49, 123.36, 121.71, 121.44, 120.43 (dd, $J=286.9, 28.0\text{Hz}$), 95.45, 91.26 (dt, $J=200.7, 32.5\text{Hz}$), 79.28, 60.68, 59.03, 52.66, 50.46, 26.72, 26.31, 18.09, 14.01.

[0102] HRMS [ESI]: calc $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{F}_7\text{IN}_2\text{O}_6\text{S}[\text{M}-\text{H}]^-$ for 767.0528 found 767.0533.

[0103] 步骤f: 3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸(附图1中式A所示化合物)的制备

[0104] 100mL三口瓶,加入4mmol 3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸乙酯和30mL四氢呋喃,0℃下,缓慢滴加12mL 2M LiOH。滴加完毕,转移至室温反应过夜。反应结束后旋转脱溶,残留液用稀盐酸酸化,用二氯甲烷(3×10mL)萃取,无水硫酸钠干燥,旋转脱溶后柱层析得2.5g 3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸,产率85%。

[0105] ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6) δ 9.79 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 8.00 (dd, $J=7.9, 0.9\text{Hz}$, 1H), 7.85 (d, $J=9.2\text{Hz}$, 1H), 7.71 (d, $J=7.6\text{Hz}$, 1H), 7.51 (d, $J=7.7\text{Hz}$, 2H), 7.26 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 1H), 3.67 (s, 2H), 3.30 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 2.59 (t, $J=7.4\text{Hz}$, 2H), 2.36 (s, 3H), 1.51 (s, 6H).

[0106] ^{13}C NMR (75MHz, DMSO- d_6) δ 171.65, 167.78, 165.71, 141.49, 140.87, 139.51, 136.07, 132.99, 130.26, 127.41, 127.27, 124.99, 123.53, 123.40, 121.70, 95.47, 79.30, 58.97, 52.67, 50.73, 26.82, 26.29, 18.10.

[0107] HRMS [ESI]: calc $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{F}_7\text{IN}_2\text{O}_6\text{S}[\text{M}-\text{H}]^-$ for 739.0215 found 739.0212.

[0108] 产品经 ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR和高分辨质谱确证,为式A所示氟苯虫酰胺半抗原3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸。

[0109] 实施例2、氟苯虫酰胺-卵清白蛋白(氟苯虫酰胺-OVA)抗原的制备

[0110] 制备氟苯虫酰胺半抗原的琥珀酰亚胺酯:称取实施例1制备所得式A所示氟苯虫酰胺半抗原3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸(0.05mmol), NHS(0.075mmol), 和DCC(0.060mmol)用1mL无水DMF溶解,在室温25℃搅拌反应6小时后,将反应液在8000转下离心5分钟,取上清液,其中含有式B所示化合物,反应后不分离产物,直接将上清液进行如下氟苯虫酰胺-卵清白蛋白(氟苯虫酰胺-OVA)抗原的制备:

[0111] 制备氟苯虫酰胺-卵清白蛋白(氟苯虫酰胺-OVA)抗原:

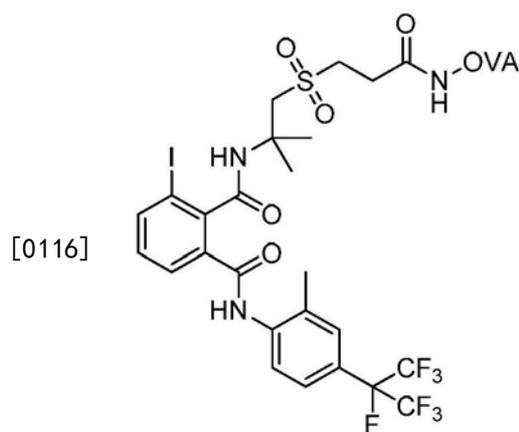
[0112] 将该实施例前述制备所得含有式B所示化合物的上清液缓慢滴加入载体蛋白OVA溶液(该载体蛋白溶液是由182mg OVA溶于10mL pH值为7.5的磷酸盐(PBS)缓冲液混匀而得)中,式B化合物与载体蛋白的投料摩尔比为12:1,在4℃搅拌过夜后,将所得反应液用pH值为7.5、浓度为0.1mol/L的PBS溶液透析三天,将透析完全的反应产物溶液(氟苯虫酰胺-OVA)稀释为1mg/mL的溶液,至于-40℃冻存待用。透析的作用在于去除未反应的3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸或其它小分子,得到3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸与OVA的偶联物,也即式C所示氟苯虫酰胺抗原(如

式C1所示)。

[0113] 实施例3、氟苯虫酰胺-卵清白蛋白(氟苯虫酰胺-OVA)抗原的制备

[0114] 氟苯虫酰胺半抗原的琥珀酰亚胺酯的制备:称取实施例1制备所得式A所示氟苯虫酰胺半抗原3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸(0.05mmol),NHS(0.075mmol),和EDC(0.060mmol)用1mL水溶解,在室温25℃搅拌反应6小时后,将反应液在8000转下离心5分钟,取上清液,其中含有式B所示化合物。

[0115] 氟苯虫酰胺-卵清白蛋白(氟苯虫酰胺-OVA)抗原的制备:将该实施例前述制备所得含有式B所示化合物的上清液按照实施例2所示方法进行氟苯虫酰胺-卵清白蛋白(氟苯虫酰胺-OVA)抗原的制备,得到3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸与OVA的偶联物,也即式C所示氟苯虫酰胺抗原(如式C1所示);



式 C1

[0117] 其中,该PBS溶液按照如下方法制备而得:将NaCl、KH₂PO₄和Na₂HPO₄·12H₂O以质量比8.0:0.2:2.96的比例溶于水中,用水定容到1L。

[0118] 实施例4、氟苯虫酰胺-牛血清白蛋白(氟苯虫酰胺-BSA)抗原的制备

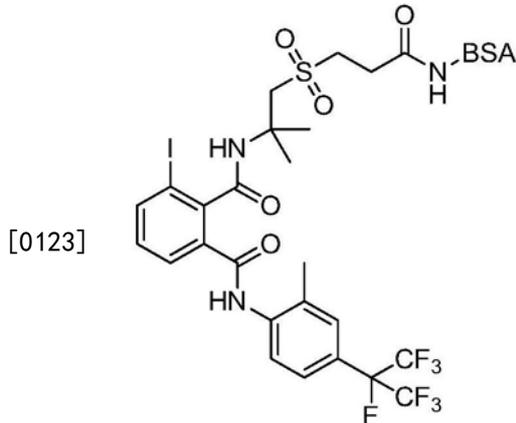
[0119] 氟苯虫酰胺半抗原的琥珀酰亚胺酯的制备:

[0120] 称取实施例1制备所得式A所示氟苯虫酰胺半抗原3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸(0.05mmol),NHS(0.075mmol),和DCC(0.060mmol)用1mL无水DMF溶解,在室温搅拌反应6小时后,将反应液在8000转下离心5分钟,取上清液,其中含有式B所示化合物,反应后不分离产物,直接将上清液进行如下氟苯虫酰胺-牛血清白蛋白(氟苯虫酰胺-BSA)抗原的制备;

[0121] 氟苯虫酰胺-牛血清白蛋白(氟苯虫酰胺-BSA)抗原的制备:

[0122] 将该实施例前述制备所得含有式B所示化合物的上清液缓慢滴加到载体蛋白溶液中(该载体蛋白溶液是由276.8mg BSA溶于10mL pH值为7.5的磷酸盐缓冲(PBS),式B化合物3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸与载体蛋白的投料摩尔比为12:1,在4℃搅拌过夜后,将所得反应液用pH值为7.5、浓度为0.1mol/L的PBS溶液透析三天,将透析完全的反应产物溶液(氟苯虫酰胺-BSA)稀释为1mg/mL的溶液,至于-40℃冻存待用。透析的作用在于去除未反应的3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)

丙酸或未反应的其它小分子,得到3-((2-(2-碘-6-((2-甲基-4-(全氟丙烷-2-基)苯基)氨基甲酰基)苯甲酰氨基)-2-甲基丙基)磺酰基)丙酸与BSA的偶联物,也即式C所示氟苯虫酰胺抗原(如式C2所示)。



式 C2

[0124] 其中,该PBS溶液按照如下方法制备而得:将NaCl、KH₂PO₄和Na₂HPO₄·12H₂O以质量比8.0:0.2:2.96的比例溶于水中,用水定容到1L。

[0125] 实施例5、氟苯虫酰胺-牛血清白蛋白(氟苯虫酰胺-BSA)抗原的应用

[0126] 一、利用氟苯虫酰胺-牛血清白蛋白(氟苯虫酰胺-BSA)抗原制备抗体

[0127] (1) 取6-8周龄的Balb/c小白鼠作为实验动物。

[0128] (2) 基础免疫:由实施例4中得到稀释好的氟苯虫酰胺-BSA抗原溶液(浓度为1mg/mL),经无菌过滤器过滤后加入等体积弗氏完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。用乳化好的完全抗原采用腹腔及背部皮下多点注射Balb/c小鼠,注射剂量为0.1mg乳化抗原/只。

[0129] (3) 加强免疫:基础免疫2周后,取1mL上述稀释好的氟苯虫酰胺-BSA抗原溶液,然后加入1mL弗氏不完全佐剂,用磁力搅拌器充分搅拌乳化,直到滴入水中不扩散。将乳化好的抗原采用腹腔及背部皮下多点注射Balb/c小鼠,每只小鼠的注射剂量为0.1mg乳化稀释抗原(8周龄的Balb/c小鼠体重约23-25g)。

[0130] 加强免疫每隔15天免疫一次,从第三次加强免疫开始,每次免疫后第3-5天,从小鼠眼眶采血,测定抗体效价,包被原为1mg/mL氟苯虫酰胺-OVA稀释500倍用,待效价大于1:8000后(效价定义为零孔显色值为1时,血清的稀释倍数),眼球摘除采血,血液室温静置1小时后,再于4℃冰箱中静置2小时,然后于离心机中8000r/min离心5分钟后,分离出抗血清,即得到氟苯虫酰胺-BSA抗体。用于下述各实验。

[0131] 二、抗体效果检测

[0132] 下述实验中所用的各种缓冲液如下:

[0133] (1) 包被缓冲液:0.05M、pH 9.6的碳酸盐缓冲液;

[0134] (2) 磷酸盐缓冲液PBS (pH 7.5):称量4.0g NaCl、0.1g KH₂PO₄、1.48g Na₂HPO₄·12H₂O用蒸馏水定容到500mL,浓度为0.1M、pH为7.5磷酸盐缓冲液;

[0135] (3) 样品稀释液PBSTG:由0.5mL吐温-20、0.5g明胶和500mL浓度为0.1M、pH为9.6的PBS缓冲液混合得到;

[0136] (4) 柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液:由柠檬酸三钠、Na₂HPO₄和水组成;柠檬酸三钠在柠檬

酸盐-磷酸盐缓冲液中的浓度为0.01M,Na₂HPO₄在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中的浓度为0.03M;柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液的pH值为5.5;

[0137] (5) 底物缓冲液:将20.0mg邻苯二胺(OPD)溶解于10.0mL柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液中,然后加入4μL体积百分含量为30%的H₂O₂水溶液得到的溶液,柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液为(4)中所述;

[0138] (6) 终止缓冲液:2.0M的硫酸水溶液;

[0139] (7) 洗涤液:由NaCl、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、吐温-20和去离子水组成;NaCl在洗涤液中的浓度为8.0g/L,KH₂PO₄在洗涤液中的浓度为0.2g/L,Na₂HPO₄·12H₂O在洗涤液中的浓度为2.96g/L,吐温-20在洗涤液中体积百分含量为1:1000。

[0140] (一) 抗体抑制实验

[0141] 1、氟苯虫酰胺-OVA包被抗原溶液的配制

[0142] 将上述实施例1制备的稀释后的1mg/mL的氟苯虫酰胺-OVA抗原完全解冻后,用包被缓冲液按1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000进行梯度稀释,得到不同浓度的氟苯虫酰胺-OVA的包被抗原溶液。

[0143] 2、氟苯虫酰胺标准品溶液的配制

[0144] (1) 称取10mg氟苯虫酰胺标样,充分溶解于10mL无水甲醇中,即得到1mg/mL氟苯虫酰胺标准品溶液;

[0145] (2) 用样品稀释液将上述步骤(1)的1mg/mL氟苯虫酰胺标准品溶液配成浓度为200ng/mL的氟苯虫酰胺标准品溶液。

[0146] 3、氟苯虫酰胺-BSA抗血清稀释液的配制

[0147] 将上述步骤一制备的氟苯虫酰胺-BSA抗体用样品稀释液按1:500、1:1000、1:2000、1:4000、1:8000进行梯度稀释,得到氟苯虫酰胺-BSA抗血清稀释液。

[0148] 4、抗原、抗体的棋盘格实验

[0149] 包被:在96孔酶标板中每孔加入100μL步骤1制备得到的氟苯虫酰胺-OVA包被抗原溶液,37℃包被3小时,用洗涤液洗涤4次。

[0150] 封闭:封闭液150μL/孔,在37℃湿盒中封闭1h,弃封闭液,洗涤3次。

[0151] 竞争:零孔每孔加50μL样品稀释液,抑制孔每孔加入50μL步骤2制备得到的氟苯虫酰胺标准品溶液。将上述步骤3得到的氟苯虫酰胺-BSA抗血清稀释液(从2.5×10³倍到40×10³倍)加入酶标板中(50μL/孔),置湿盒中37℃条件下30min,洗板4次。

[0152] 加酶标二抗:将羊抗鼠酶标二抗(IgG-HRP, Jackson公司,产品目录号为79556)(0.1mg/mL)稀释1000倍,稀释液是0.1M,pH为9.6的PBSTG,每孔加100μL,置湿盒中37℃条件下30min,洗板4次。

[0153] 显色:将底物缓冲液加入酶标板中,每孔100μL。避光显色10min。

[0154] 终止:每孔加入50μL终止缓冲液,用酶标仪492nm处测定各孔的OD值。

[0155] 效价的定义为零孔OD值为1时的血清稀释倍数。

[0156] 结果如表1所示。

[0157] 表1、抗氟苯虫酰胺小鼠的血清效价检测(OPD 37℃显色10min,200ng标样抑制)棋盘格

血清	500		1000		2000		4000		8000	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
[0158] 500	2.206	0.923	1.651	0.522	1.041	0.324	0.439	0.209	0.215	0.143
1000	2.060	0.517	1.255	0.251	0.711	0.170	0.488	0.144	0.265	0.085
2000	1.790	0.335	0.955	0.185	0.518	0.122	0.398	0.101	0.185	0.070
4000	1.380	0.210	0.768	0.124	0.406	0.092	0.305	0.075	0.171	0.064
8000	0.965	0.139	0.575	0.094	0.312	0.072	0.228	0.067	0.135	0.056

[0159] 注:I表示酶标板中的抑制孔,C表示酶标板中的对照孔。

[0160] 表1中结果表明,当包被抗原稀释度为1:500,抗血清稀释度为1:2000时,此时的抑制率最好,为68.8% (抑制率 = $(A_0 - A_{200}) / A_0 \times 100\%$),也即此时的抑制效果最好。说明上述实施例4制备的氟苯虫酰胺-BSA可以作为免疫原制备出检测氟苯虫酰胺的抗体。

[0161] A_0 为对照孔OD值; A_{200} 为抑制孔OD值;

[0162] 抑制率的计算公式:抑制率 = $(A_0 - A_{200}) / A_0 \times 100\%$ 。

[0163] (二) 氟苯虫酰胺标准曲线的建立

[0164] 将上述制备的氟苯虫酰胺标准品溶液用样品稀释液分别稀释成如下不同的浓度:200ng/mL、100ng/mL、50ng/mL、25ng/mL、12.5ng/mL、6.25ng/mL、3.125ng/mL、1.562ng/mL。

[0165] (1) 包被原的包被:将上述制备的氟苯虫酰胺-OVA抗原按照1:500稀释后加入到酶标板中,每孔100 μ L,37 $^{\circ}$ C温育3小时;倒去酶标板中的溶液,用洗涤液洗板4次,甩干;

[0166] (2) 在步骤(1)的酶标板中分别加入上述不同浓度的氟苯虫酰胺标准品溶液(实验孔),每孔50 μ L,对照孔中不添加氟苯虫酰胺标准品溶液而加入50 μ L样品稀释液;

[0167] (3) 分别向上述实验孔和对照孔中加入稀释倍数为1:2000的氟苯虫酰胺-BSA抗血清稀释液,每孔50 μ L;37 $^{\circ}$ C温育30分钟;倒掉酶标板中的溶液,用洗涤液洗板4次甩干;

[0168] (4) 在实验孔和对照孔中分别加入100 μ L稀释倍数为1:1000的IgG-HRP (Jackson公司,产品目录号为79556) (0.1mg/mL),37 $^{\circ}$ C温育30分钟;用洗涤液洗板4次,倒掉酶标板中的溶液,甩干;

[0169] (5) 向实验孔和对照孔中分别加入100 μ L底物缓冲液,37 $^{\circ}$ C温育15分钟后,再向每孔中加入50 μ L 2.0M的硫酸溶液终止反应;

[0170] (6) 在492nm下测定吸光值;

[0171] (7) 绘制标准曲线:以不同浓度 (ng/mL) 的氟苯虫酰胺标准品溶液作为X轴,以吸光度值的比值 ($B/B_0 \times 100\%$,其中,B为氟苯虫酰胺标准品溶液的平均吸光度值, B_0 为对照孔的平均吸光度值) 作为Y轴,绘制标准曲线图。

[0172] 实验设3次重复,取三次实验结果的平均值,得到的标准曲线图如图2所示。结果表明,其灵敏度 (IC_{50}) 为17.25ng/mL,检测范围是4.06ng/mL-103.59ng/mL。说明上述实施例4制备的氟苯虫酰胺-BSA作为抗原免疫小鼠得到的抗体具有很好的效果。

[0173] (三) 抗体特异性检测

[0174] 1、氟苯虫酰胺类似物标准品溶液的配制

[0175] 氟苯虫酰胺类似物标准品的配制

[0176] 参照步骤(一)中氟苯虫酰胺标准品的配制方法,制备氯虫苯甲酰胺、氰虫酰胺的标准样品。

[0177] 用样品稀释液将上述氯虫苯甲酰胺、氰虫酰胺分别稀释成如下浓度:20000ng/mL、10000ng/mL、5000ng/mL、2500ng/mL、1250ng/mL、625ng/mL、312.5ng/mL、156.2ng/mL。

[0178] 2、建立标准曲线,测定抑制中浓度 IC_{50} (抑制率达到50%的标样浓度值)。

[0179] 标准曲线的建立方法与上述氟苯虫酰胺标准曲线的建立方法相同。

[0180] 交叉反应率(%) = (氟苯虫酰胺 IC_{50}) / (氟苯虫酰胺类似物 IC_{50}) × 100%。

[0181] 实验设3次重复,取三次实验结果的平均值,结果如表2所示。

[0182] 表2、由氟苯虫酰胺-BSA制备的抗体的特异性检测

[0183]

分析物	IC_{50} (ng/mL)	交叉反应率(%)
氟苯虫酰胺	17.25	100
氯虫苯甲酰胺	>10000	---
氰虫酰胺	>10000	---

[0184] 表2中,“---”表示无交叉。

[0185] 结果表明,上述由氟苯虫酰胺-BSA制备得到的抗体与其类似物氯虫苯甲酰胺,氰虫酰胺的交叉反应率很小,说明用氟苯虫酰胺-BSA制备的抗体对氟苯虫酰胺具有很好的特异性。

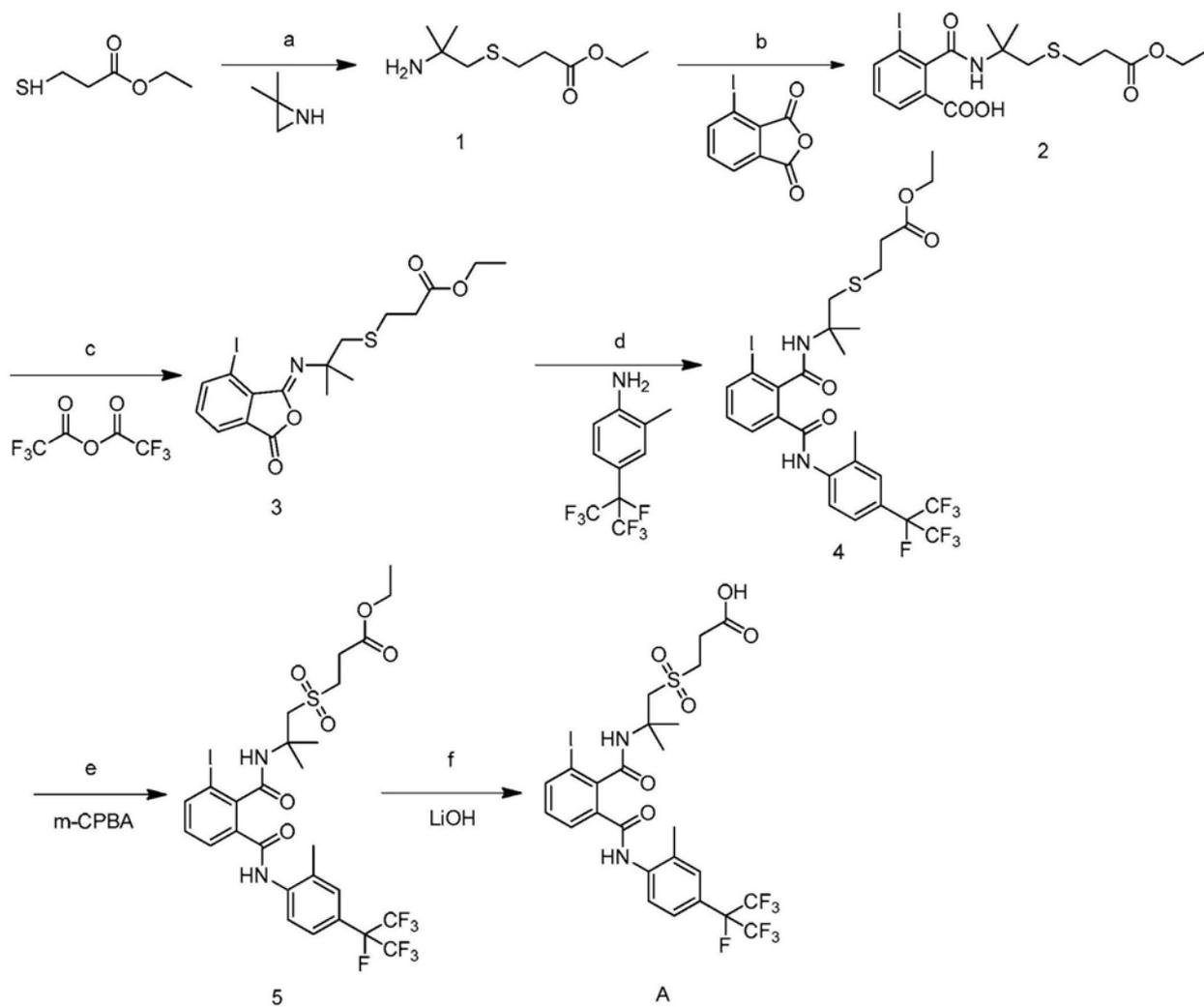


图1

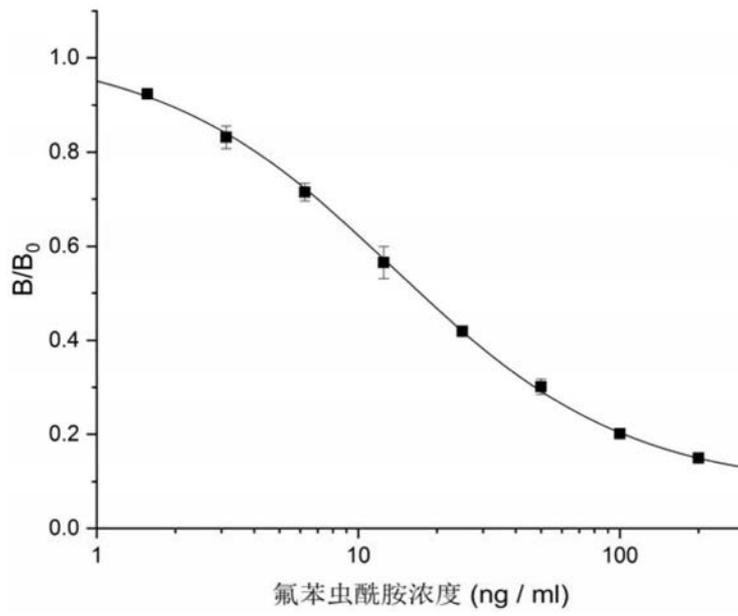


图2

专利名称(译)	氟苯虫酰胺抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN108640866A	公开(公告)日	2018-10-12
申请号	CN201810557928.8	申请日	2018-06-01
[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	刘尚钟 李奇博 廖敏 崔永亮 王保民		
发明人	刘尚钟 李奇博 廖敏 崔永亮 王保民		
IPC分类号	C07D207/404 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 G01N33/535 G01N33/53 G01N30/02		
CPC分类号	C07D207/404 C07K14/765 C07K14/77 C07K14/795 C07K16/44 C07K19/00 G01N30/02 G01N33/53 G01N33/535		
代理人(译)	关畅 吴爱琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氟苯虫酰胺抗原及其制备方法与应用。该氟苯虫酰胺抗原如式C所示，是氟苯虫酰胺与载体蛋白通过酰胺键连接形成的偶联物。本发明提供的制备氟苯虫酰胺抗原的方法，能够方便、快捷地获得氟苯虫酰胺抗原，且合成步骤简洁明了、合成成本低，效果好。用本发明方法制备的氟苯虫酰胺抗原进行免疫得到的抗体的特异性好、最低检测限值低。本发明的制备氟苯虫酰胺抗原的方法及由该方法获得的氟苯虫酰胺抗原在氟苯虫酰胺的快速免疫检测应用中有广阔的前景。

