



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109956895 A

(43)申请公布日 2019.07.02

(21)申请号 201910194037.5

(22)申请日 2019.03.14

(71)申请人 深圳市易瑞生物技术股份有限公司

地址 518102 广东省深圳市宝安区新安街
道留仙一路2-1号易瑞生物园

(72)发明人 杨星星 李细清 付辉 王西丽
陈允玲 黄永健 王炳志 马涛
严义勇 周巧妮

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 许青华 廖苑滨

(51)Int.Cl.

C07D 209/52(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/02(2006.01)

权利要求书3页 说明书11页 附图1页

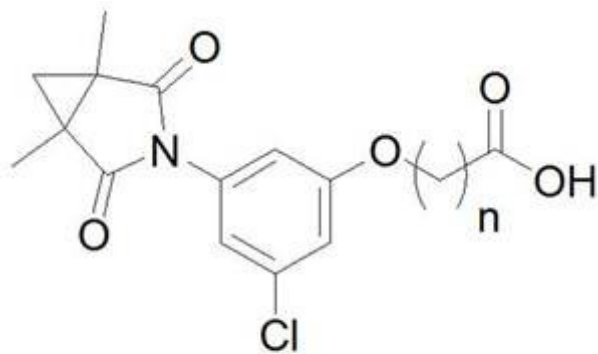
(54)发明名称

一种腐霉利半抗原及其合成方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种腐霉利半抗原及其合成方法和应用,其合成为(1)以 α -氯代丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲酯为起始原料合成1,2-二甲基-1,2-环丙烷二羧酸甲酯;1,2-二甲基-1,2-环丙烷二羧酸甲酯再经过水解和分子内缩合后生成1,2-二甲基环丙烷-1,2-二羧酸酐;(2)以3-氯-5-硝基苯酚、化合物3为原料合成带有手臂的中间体,该中间体经还原反应得到中间体B;(3)1,2-二甲基环丙烷-1,2-二羧酸酐与中间体B经过两次缩合反应成环以及一次水解反应得到最终目标物。本发明中,合成的腐霉利半抗原既最大程度保留了腐霉利的特征结构,使得腐霉利半抗原的免疫原性明显增强,又具有可以与载体发生偶联的羧基,为后续建立腐霉利的各种免疫分析方法提供基础。

1. 一种腐霉利半抗原, 其特征在于, 其结构式如式(I)所示:

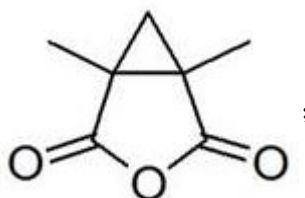


(I)

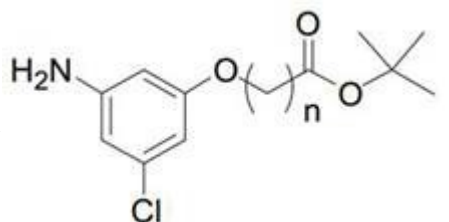
其中, n为-CH₂基团数目, n为1-5的整数。

2. 如权利要求1所述的腐霉利半抗原的合成方法, 其特征在于, 其包括如下步骤:

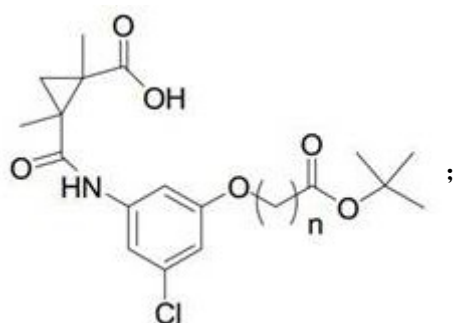
S1, 提供中间体A, 所述中间体A具有结构式



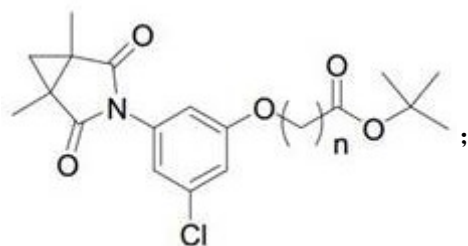
S2, 提供中间体B, 所述中间体B具有结构式



S3, 将所述中间体A和中间体B进行反应, 得到化合物5, 所述化合物5具有结构式



S4, 将所述化合物5进行缩合反应, 得到化合物6, 所述化合物6具有结构式

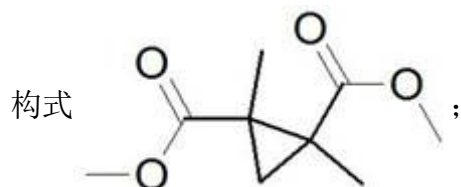


S5,将所述化合物6进行水解反应,得到所述腐霉利半抗原。

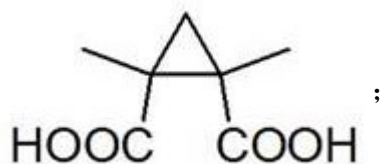
3.如权利要求2所述的腐霉利半抗原的合成方法,其特征在于,所述步骤S4包括如下步骤:将所述化合物5溶解于二氯甲烷中,加入脱水缩合剂,回流反应0.5-5h,反应完毕后,蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物6;其中所述脱水缩合剂为N, N'-二环己基碳酰亚胺、EDC·HCl、或N,N'-羰基二咪唑;所述化合物5和脱水缩合剂的物质的量之比为1:1。

4.如权利要求2所述的腐霉利半抗原的合成方法,其特征在于,所述步骤S1中,所述中间体A的制备方法为:

由甲基丙烯酸甲酯和 α -氯代丙烯酸甲酯进行反应,得到化合物1,所述化合物1具有结



(2)将所述化合物1进行水解反应,得到化合物2,所述化合物2具有结构式



(3)将所述化合物2进行缩合反应,得到中间体A。

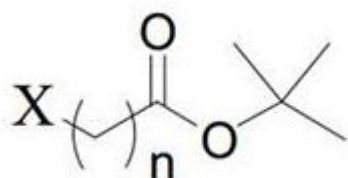
5.如权利要求4所述的腐霉利半抗原的合成方法,其特征在于,所述化合物1的制备方法为:在反应容器中加入反应溶剂,在冰水浴条件下,加入氢化钠,搅拌一定时间后缓慢滴加 α -氯代丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯,滴加完毕后室温反应过夜,反应完毕后,进行分离纯化,得到所述化合物1;其中所述反应溶剂为甲苯、二氯甲烷和DMF中的一种或多种;所述氢化钠、 α -氯代丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯的物质的量之比为(2-5):1:(1-1.3)。

6.如权利要求4所述的腐霉利半抗原的合成方法,其特征在于,所述化合物2的制备方法为:称取化合物1,用乙醇溶解后,加入碱性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后减压蒸馏除去乙醇,加入水,用乙酸乙酯萃取,分离出水层,水层用稀盐酸调节pH至2-3,再用乙酸乙酯萃取,经洗涤、干燥、旋蒸后得到所述化合物2;其中,所述碱性溶液采用质量浓度均为10%以上的氢氧化钠或氢氧化钾溶液。

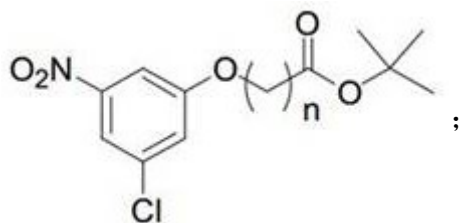
7.如权利要求4所述的腐霉利半抗原的合成方法,其特征在于,所述步骤(3)中缩合反应的步骤为:将所述化合物2加入乙酸酐,回流反应,反应结束后,蒸馏除去乙酸酐,剩余物经油泵减压蒸馏、结晶得到所述中间体A;其中,所述回流反应的时间为2-5h;蒸馏除去乙酸酐的温度为160-180℃。

8.如权利要求2所述的腐霉利半抗原的合成方法,其特征在于,所述步骤S2中,所述中间体B的制备方法为:

(1)将3-氯-5-硝基苯酚和化合物3进行反应,得到化合物4,所述化合物3具有结构式



, 其中化合物3中的X为卤素, 所述化合物4具有结构式



(2) 将所述化合物4进行硝基还原反应, 得到中间体B。

9. 如权利要求8所述的腐霉利半抗原的合成方法, 其特征在于, 所述化合物4的制备方法为: 将3-氯-5-硝基苯酚和所述化合物3溶于DMF中, 再加入无水碳酸钾, 50-110℃下进行反应, 反应结束后, 加入蒸馏水, 用乙酸乙酯进行萃取, 收集乙酸乙酯层, 经洗涤、干燥、旋蒸处理后, 再经过柱层析分离得到所述化合物4; 其中, 所述3-氯-5-硝基苯酚、化合物3、和无水碳酸钾的物质的量之比为1:(1-3):(1.5-10)。

10. 腐霉利半抗原在腐霉利免疫检测分析中的应用, 其特征在于, 所述腐霉利半抗原采用权利要求1所述的腐霉利半抗原。

一种腐霉利半抗原及其合成方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品安全检测技术领域,特别是涉及了一种腐霉利半抗原及其合成方法和应用。

背景技术

[0002] 腐霉利(Procymidone)又称速克灵,杀霉利,二甲菌核利等,属于低毒性杀菌剂,兼具保护和治疗作用,持效期较长,耐雨水冲;可用于防治黄瓜、茄子、番茄、洋葱等的灰霉病,莴苣、辣椒的茎腐病,油菜菌核病等,也用于柑橘、香蕉、苹果、梨、桃等水果储存期的防腐保鲜。少量的农药残留不会导致急性中毒,但长期食用农药残留超标的蔬菜,可能对人体健康产生一定的不良影响,近期国家也时常曝出韭菜、蒜薹中腐霉利超标的情况。

[0003] 现有的腐霉利的检测方法主要有高效液相色谱法(HPLC)、液相-质谱联用(LC-MS)法、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)等。上述检测方法中所用仪器设备操作复杂、成本高、对操作人员技术要求高,且不能立即显示结果,不适用于食品、商检、防疫、畜牧生产者对怀疑对象进行快速的在线检测和监控。

[0004] 与上述检测方法相比,免疫学检测技术具有经济、快速、技术要点低、操作简便且可实现现场检测等优点。免疫分析检测技术是近年来在环境及食品检测等领域开发出来的一种新型快速准确检测方法,现已逐渐成为世界各国有毒有害残留物快速筛选检测的主要方法之一。

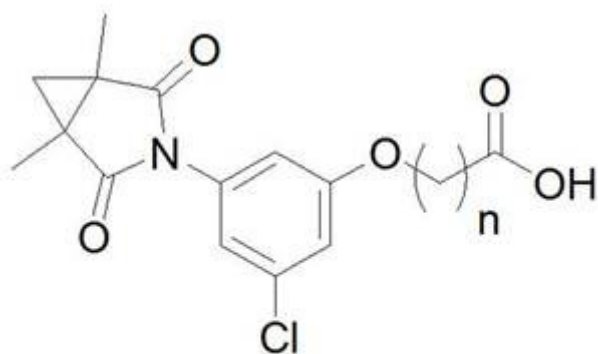
[0005] 在建立免疫学检测方法并应用该检测方法检测腐霉利残留量时,关键技术在于能够获取到特异性强、灵敏度高的抗体,而要实现这一目标,前提条件就是得合成、制备出合适的腐霉利半抗原。但是,目前,国内还没有针对腐霉利半抗原的相关报道。

发明内容

[0006] 为了弥补已有技术的缺陷,本发明提供一种腐霉利半抗原及其合成方法和应用,针对腐霉利的结构特点设计出一种腐霉利半抗原的合成方法,合成腐霉利半抗原,用于进一步合成腐霉利人工抗原,诱导免疫动物产生抗体,从而建立腐霉利各种免疫分析方法。

[0007] 本发明所要解决的技术问题通过以下技术方案予以实现:

一种腐霉利半抗原,其特征在于,其结构式如式(I)所示:

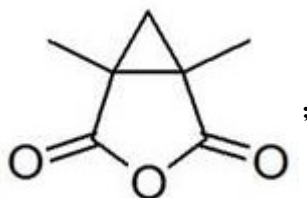


(I)

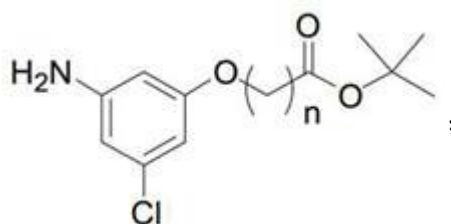
其中, n 为 $-CH_2$ 基团数目, n 为1-5的整数。

[0008] 本发明还提供上述腐霉利半抗原的合成方法, 包括如下步骤:

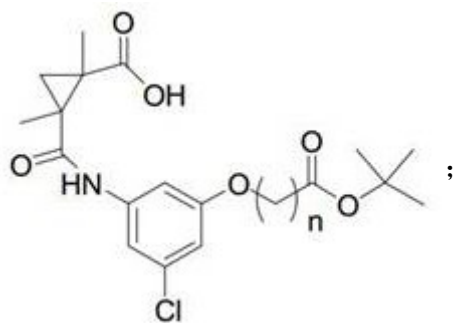
S1, 提供中间体A, 所述中间体A具有结构式



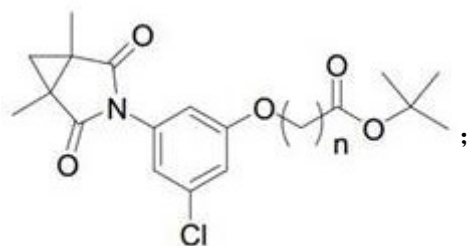
S2, 提供中间体B, 所述中间体B具有结构式



S3, 将所述中间体A和中间体B进行反应, 得到化合物5, 所述化合物5具有结构式



S4, 将所述化合物5进行缩合反应, 得到化合物6, 所述化合物6具有结构式



S5, 将所述化合物6进行水解反应, 得到所述腐霉利半抗原。

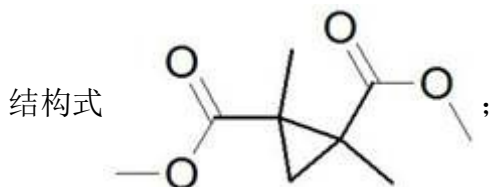
[0009] 进一步地,步骤S3包括如下步骤:称取等物质量的中间体A和中间体B,用有机溶剂溶解后进行反应,反应结束后蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物5;其中,所述有机溶剂为无水吡啶、四氢呋喃和二氯甲烷中的一种或多种;所述反应温度为50-100℃。

[0010] 进一步地,所述步骤S4包括如下步骤:将所述化合物5溶解于二氯甲烷中,加入脱水缩合剂,回流反应0.5-5h,反应完毕后,蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物6;其中所述脱水缩合剂为N, N'-二环己基碳酰亚胺、EDC·HCl、或N,N'-羰基二咪唑;所述化合物5和脱水缩合剂的物质的量之比为1:1。

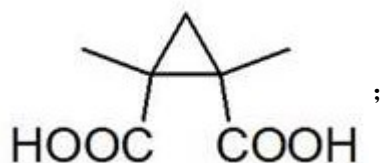
[0011] 进一步地,所述步骤S5包括如下步骤:将所述化合物6溶解于二氯甲烷中,加入三氟乙酸后进行反应,反应完毕后,蒸干溶剂,加入乙醇后,再次蒸干溶剂,经洗涤、干燥、过柱纯化后得到所述腐霉利半抗原;其中,所述二氯甲烷与三氟乙酸的体积比为2:1,反应时间为0.5-5h。

[0012] 进一步地,所述步骤S1中,所述中间体A的制备方法为:

(1) 由甲基丙烯酸甲酯和 α -氯代丙烯酸甲酯进行反应,得到化合物1,所述化合物1具有



(2) 将所述化合物1进行水解反应,得到化合物2,所述化合物2具有结构式



(3) 将所述化合物2进行缩合反应,得到中间体A。

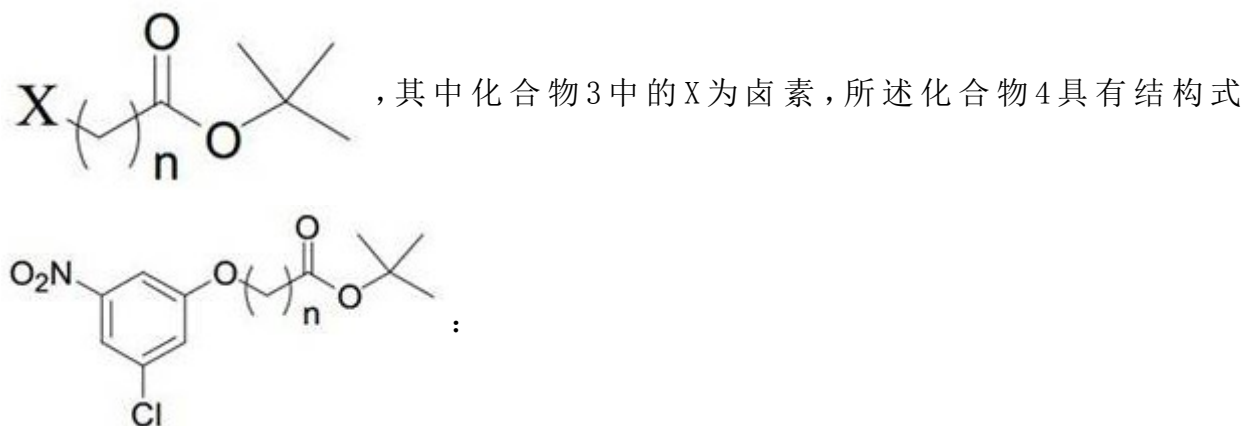
[0013] 进一步地,所述化合物1的制备方法为:在反应容器中加入反应溶剂,在冰水浴条件下,加入氢化钠,搅拌一定时间后缓慢滴加 α -氯代丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯,滴加完毕后室温反应过夜,反应完毕后,进行分离纯化,得到所述化合物1;其中所述反应溶剂为甲苯、二氯甲烷和DMF中的一种或多种;所述氢化钠、 α -氯代丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯的物质的量之比为(2-5):1:(1-1.3);所述分离纯化操作为:加入乙醇,搅拌10-15min后,加入水,用稀盐酸将溶液pH调成5-6,用乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,经洗涤、干燥处理后减压蒸馏除去反应溶剂和乙酸乙酯,剩余物经油泵减压蒸馏纯化得到所述化合物1。

[0014] 进一步地,所述化合物2的制备方法为:称取化合物1,用乙醇溶解后,加入碱性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后减压蒸馏除去乙醇,加入水,用乙酸乙酯萃取,分离出水层,水层用稀盐酸调节pH至2-3,再用乙酸乙酯萃取,经洗涤、干燥、旋蒸后得到所述化合物2;其中,所述碱性溶液采用质量浓度均为10%以上的氢氧化钠或氢氧化钾溶液,其用量为所述化合物1质量的10-15倍。

[0015] 进一步地,所述步骤(3)中缩合反应的步骤为:将所述化合物2加入乙酸酐,回流反应,反应结束后,蒸馏除去乙酸酐,剩余物经油泵减压蒸馏、结晶得到所述中间体A;其中,所述回流反应的时间为2-5h;蒸馏除去乙酸酐的温度为160-180℃。

[0016] 进一步地,所述步骤S2中,所述中间体B的制备方法为:

(1)将3-氯-5-硝基苯酚和化合物3进行反应,得到化合物4,所述化合物3具有结构式



(2)将所述化合物4进行硝基还原反应,得到中间体B。

[0017] 进一步地,所述化合物4的制备方法为:将3-氯-5-硝基苯酚和所述化合物3溶于DMF中,再加入无水碳酸钾,50-110℃下进行反应,反应结束后,加入蒸馏水,用乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,经洗涤、干燥、旋蒸处理后,再经过柱层析分离得到所述化合物4;其中,所述3-氯-5-硝基苯酚、化合物3、和无水碳酸钾的物质的量之比为1:(1-3):(1.5-10)。

[0018] 本发明还提供上述腐霉利半抗原在腐霉利免疫检测分析中的应用。

[0019] 本发明具有如下有益效果:

本发明中,在腐霉利的苯环上衍生连接臂,衍生的连接臂带有羧基,合成的腐霉利半抗原既最大程度保留了腐霉利的特征结构,使得腐霉利半抗原的免疫原性明显增强,又具有可以与载体发生偶联的羧基;腐霉利半抗原与载体偶联后得到的腐霉利人工抗原去免疫动物,更有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体,为后续建立腐霉利的各种免疫分析方法提供基础。

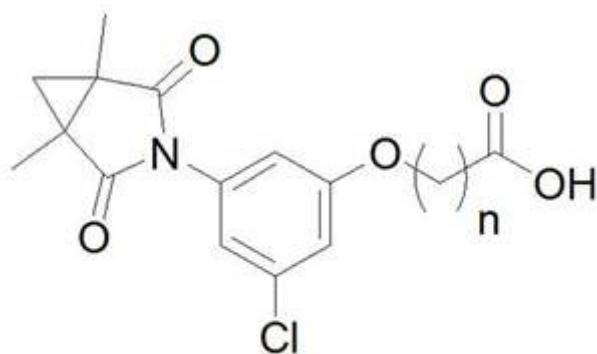
[0020] 本发明中腐霉利半抗原的合成方法,使用的原料易得,反应操作较为简单,反应条件易于控制。本发明的腐霉利半抗原合成方法,腐霉利半抗原的纯度和收率高,合成的氨基酸类除草剂半抗原的收率可达50%以上,整体的合成成本更具优势。

附图说明

[0021] 图1为本发明实施例1中腐霉利半抗原的合成路线。

具体实施方式

[0022] 第一方面,本发明提供一种腐霉利半抗原,其特征在于,其结构式如式(I)所示:



(I)

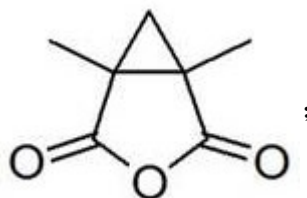
其中, n 为 $-CH_2$ 基团数目, n 为 1-5 的整数。

[0023] 本发明中, 在腐霉利的苯环上衍生连接臂, 衍生的连接臂带有羧基, 合成的腐霉利半抗原既最大程度保留了腐霉利的特征结构, 使得腐霉利半抗原的免疫原性明显增强, 又具有可以与载体发生偶联的羧基; 腐霉利半抗原与载体偶联后得到的腐霉利人工抗原去免疫动物, 更有利于刺激动物免疫应答产生特异性更强、灵敏度更高的抗体, 为后续建立腐霉利的各种免疫分析方法提供基础。

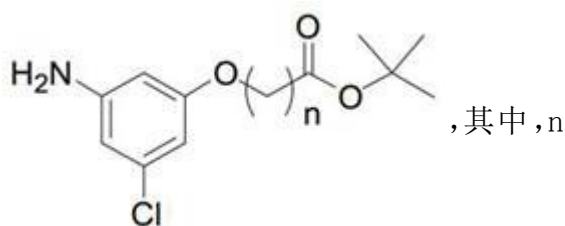
[0024] 本发明的腐霉利半抗原, 不仅合成方法简便、纯度较高, 而且能应用于合成适于动物免疫的抗原体系, 弥补了国内腐霉利免疫学检测方法技术领域的空白, 为腐霉利免疫检测方法的进一步发展奠定了基础。

[0025] 第二方面, 本发明还提供上述腐霉利半抗原的合成方法, 包括如下步骤:

S1, 提供中间体A, 所述中间体A具有结构式

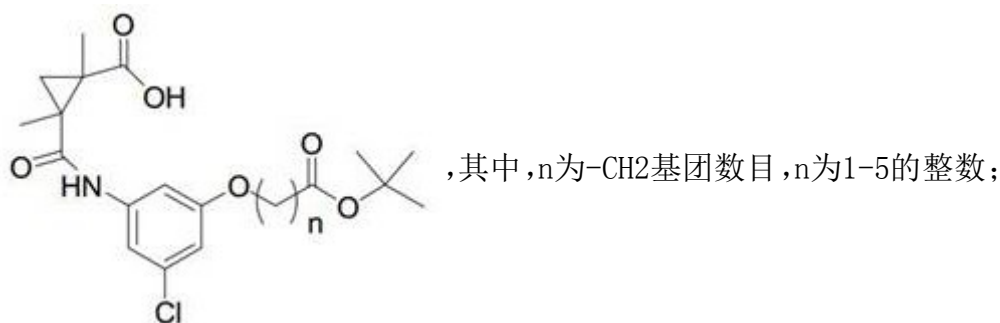


S2, 提供中间体B, 所述中间体B具有结构式



为 $-CH_2$ 基团数目, n 为 1-5 的整数;

S3, 将所述中间体A和中间体B进行反应, 得到化合物5, 所述化合物5具有结构式



S4,将所述化合物5进行缩合反应,得到化合物6,所述化合物6具有结构式

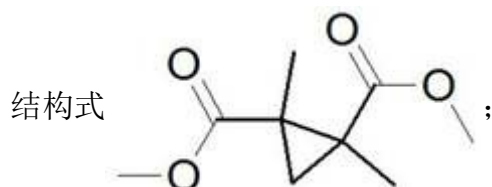


S5,将所述化合物6进行水解反应,得到所述腐霉利半抗原。

[0026] 本发明根据腐霉利的结构特点,合理设计腐霉利半抗原的合成方法,使用的原料易得,反应操作较为简单,反应条件易于控制。本发明的腐霉利半抗原合成方法,腐霉利半抗原的纯度和收率高,合成的氨基酸类除草剂半抗原的收率可达50%以上,整体的合成成本更具优势。

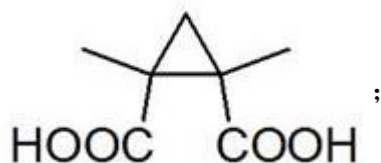
[0027] 其中,所述步骤S1中,所述中间体A的制备方法为:

(1)由甲基丙烯酸甲酯和 α -氯代丙烯酸甲酯进行反应,得到化合物1,所述化合物1具有



优选地,为了进一步提高化合物1的产率和反应效率,所述化合物1的制备方法为:在反应容器中加入反应溶剂,在冰水浴条件下,加入氢化钠,搅拌一定时间后缓慢滴加 α -氯代丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯,滴加完毕后室温反应过夜,反应完毕后,进行分离纯化,得到所述化合物1。其中所述反应溶剂包括但不限于为甲苯、二氯甲烷和DMF中的一种或多种;所述氢化钠、 α -氯代丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯的物质的量之比为(2-5):1:(1-1.3),更优选地,所述氢化钠、 α -氯代丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯的物质的量之比为2:1:1.2;将各原料用量控制在上述范围内,一方面有利于进一步提高化合物1的产率,一方面有利于避免原料过度浪费。所述分离纯化操作优选为:加入乙醇,搅拌10-15min后,加入水,用稀盐酸将溶液pH调成5-6,用乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,经洗涤、干燥处理后减压蒸馏除去反应溶剂和乙酸乙酯,剩余物经油泵减压蒸馏纯化得到所述化合物1。

[0028] (2)将所述化合物1进行水解反应,得到化合物2,所述化合物2具有结构式



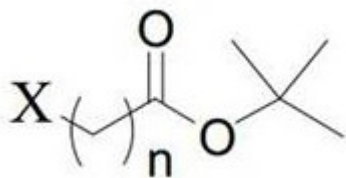
优选地,所述化合物2的制备方法为:称取化合物1,用乙醇溶解后,加入碱性溶液,加热回流,进行水解反应;反应结束后减压蒸馏除去乙醇,加入水,用乙酸乙酯萃取,分离出水层,水层用稀盐酸调节pH至2-3,再用乙酸乙酯萃取,经洗涤、干燥、旋蒸后得到所述化合物2。该步骤有利于进一步提高化合物2的反应效率和反应稳定性。其中,所述碱性溶液采用质量浓度均为10%以上的氢氧化钠或氢氧化钾溶液,其用量为所述化合物1质量的10-15倍。将各原料用量控制在上述范围内,一方面有利于进一步提高化合物2的产率,一方面有利于避免原料过度浪费。

[0029] (3)将所述化合物2进行缩合反应,得到中间体A。

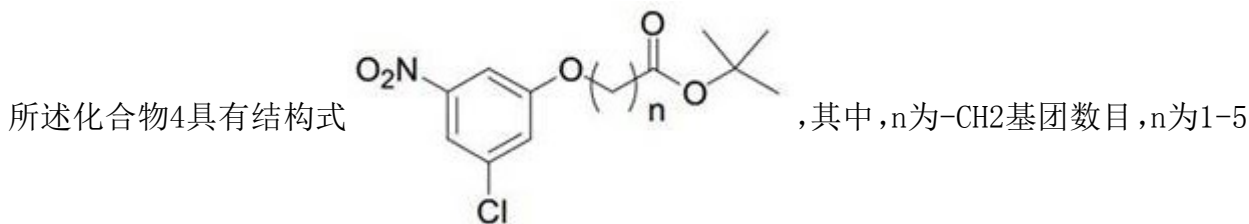
[0030] 本发明中,化合物2进行缩合反应,化合物2的分子内脱水成环。所述缩合反应的方法和条件均可为本领域此类反应的常规方法和条件,本发明特别优选下述方法和条件:将所述化合物2加入乙酸酐,回流反应,反应结束后,蒸馏除去乙酸酐,剩余物经油泵减压蒸馏、结晶得到所述中间体A;其中,所述回流反应的时间为2-5h,更优选地,所述回流反应的时间为3h;蒸馏除去乙酸酐的温度为160-180℃,更优选为170℃。该步骤下,反应具有更高的效率和稳定性。

[0031] 所述步骤S2中,所述中间体B的制备方法为:

(1)将3-氯-5-硝基苯酚和化合物3进行反应,得到化合物4,所述化合物3具有结构式



其中,化合物3中的X为卤素, n为-CH₂基团数目, n为1-5的整数,



的整数;

优选地,所述化合物4的制备方法为:将3-氯-5-硝基苯酚和所述化合物3溶于DMF中,再加入无水碳酸钾,50-110℃下进行反应,反应结束后,加入蒸馏水,用乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,经洗涤、干燥、旋蒸处理后,再经过柱层析分离得到所述化合物4;其中,所述3-氯-5-硝基苯酚、化合物3、和无水碳酸钾的物质的量之比为1:(1-3):(1.5-10),更优选地,所述3-氯-5-硝基苯酚、化合物3、和无水碳酸钾的物质的量之比为1:1.5:2。将各原料用量控制在上述范围内,一方面有利于进一步提高化合物1的产率,一方面有利于避免原料过度浪费。

[0032] (2)将所述化合物4进行硝基还原反应,得到中间体B。

[0033] 所述硝基还原反应是在有机溶剂中,化合物4的硝基与还原铁粉、金属锡、氯化亚锡、含硫化合物、金属氢化物、CO中的一种或几种的混合物反应,或者催化氢化制得氨基,所述硝基还原反应的方法和条件均可为本领域此类反应的常规方法和条件,本发明特别优选下述方法和条件:

将所述化合物4在氢气和催化剂存在的条件下在有机溶剂中进行还原反应,反应结束后,经过滤、蒸干有机溶剂、过柱纯化得到中间B;其中,优选的,所述的催化剂为钨碳,所述的有机溶剂为甲醇;所述催化剂的质量为所述化合物4的质量的10%。

[0034] 所述步骤S3包括如下步骤:称取等物质量的中间体A和中间体B,用有机溶剂溶解后进行反应,反应结束后蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物5;其中,所述有机溶剂包括但不限于为无水吡啶、四氢呋喃和二氯甲烷中的一种或多种;所述反应温度优选为50-100℃,更优选为80℃。该步骤下,中间体A和中间体B能够更充分地反应,从而进一步提高了化合物5的收率和反应效率。

[0035] 所述步骤S4包括如下步骤:将所述化合物5溶解于二氯甲烷中,加入脱水缩合剂,回流反应0.5-5h,反应完毕后,蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物6;其中所述脱水缩合剂包括但不限于为N,N'-二环己基碳酰亚胺、EDC·HCl、或N,N'-羰基二咪唑;所述化合物5和脱水缩合剂的物质的量之比为1:1。该步骤下,反应具有更高的效率和稳定性。

[0036] 所述步骤S5包括如下步骤:将所述化合物6溶解于二氯甲烷中,加入三氟乙酸后进行反应,反应完毕后,蒸干溶剂,加入乙醇后,再次蒸干溶剂,经洗涤、干燥、过柱纯化后得到所述腐霉利半抗原;其中,所述二氯甲烷与三氟乙酸的体积比为2:1,反应时间为0.5-5h。该步骤下,反应具有更高的效率和稳定性。

[0037] 第三方面,本发明还提供上述腐霉利半抗原在腐霉利免疫检测分析中的应用。

[0038] 下面结合实施例对本发明进行详细的说明,实施例仅是本发明的优选实施方式,不是对本发明的限定。

[0039] 实施例1

一种腐霉利半抗原的合成方法,包括如下步骤:

S1,提供中间体A,所述中间体A为1,2-二甲基-1,2-环丙烷酸酐;

所述中间体A的制备方法为:

(1) 在250mL三口瓶中加入100mL甲苯,在冰水浴条件下,加入0.2mol氢化钠,搅拌30min后缓慢滴加0.1mol α -氯代丙烯酸甲酯和0.12mol甲基丙烯酸甲酯,滴加完毕后室温反应过夜,反应完毕后,加入10mL乙醇,搅拌10-15min后,加入200mL水,用稀盐酸将溶液pH调成5-6,用200mL乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,乙酸乙酯层经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥处理后减压蒸馏除去甲苯和乙酸乙酯,剩余物经油泵减压蒸馏纯化,得到1,2-二甲基-1,2-环丙烷二羧酸甲酯,即化合物1;

(2) 称取10g化合物1,用30mL乙醇溶解后,加入100g质量浓度为10%的氢氧化钠溶液,80℃下回流过夜,进行水解反应;反应结束后减压蒸馏除去乙醇,加入水,用乙酸乙酯萃取,分离出水层,水层用稀盐酸调节pH至2-3,再用乙酸乙酯萃取,经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、旋蒸后得到化合物2;

(3) 将8g所述化合物2加入20mL乙酸酐溶解,170℃回流反应2h,反应结束后,蒸馏除去乙酸酐,剩余物经油泵减压蒸馏、结晶得到所述中间体A;

S2,提供中间体B,所述中间体B的制备方法为:

(1)将0.02mol 3-氯-5-硝基苯酚和0.03mol 4-溴丁酸叔丁酯溶于15mL DMF中,再加入0.04mol无水碳酸钾,80℃下进行反应,反应结束后,加入200mL蒸馏水,用乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、旋蒸处理后,再经过柱层析分离得到化合物4;

(2)将2g化合物4用甲醇溶解,加入0.2g钯碳,再通入氢气,室温下搅拌进行反应,反应结束后,经过滤、蒸干甲醇、过柱纯化得到中间B;

S3,称取等物质量的中间体A和中间体B,用无水吡啶溶解后,在80℃进行反应,反应结束后蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物5;

S4,将化合物5溶解于二氯甲烷中,加入脱水缩合剂,回流反应1h,反应完毕后,蒸干溶剂,过柱纯化得到化合物6;其中所述脱水缩合剂为N, N'-二环己基碳酰亚胺;所述化合物5和脱水缩合剂的物质的量之比为1:1;

S5,将化合物6溶解于二氯甲烷中,加入三氟乙酸后室温进行反应1h,反应完毕后,蒸干溶剂,加入乙醇后,再次蒸干溶剂,经洗涤、干燥、过柱纯化后得到所述腐霉利半抗原;其中,所述二氯甲烷与三氟乙酸的体积比为2:1。

[0040] 实施例2

一种腐霉利半抗原的合成方法,包括如下步骤:

S1,提供中间体A,所述中间体A为1,2-二甲基-1,2-环丙烷酸酐;

所述中间体A的制备方法为:

(1)在250mL三口瓶中加入100mL二氯甲烷,在冰水浴条件下,加入0.5mol氢化钠,搅拌30min后缓慢滴加0.1mol α -氯代丙烯酸甲酯和0.1mol甲基丙烯酸甲酯,滴加完毕后室温反应过夜,反应完毕后,加入20mL乙醇,搅拌10-15min后,加入200mL水,用稀盐酸将溶液pH调成5-6,用200mL乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,乙酸乙酯层经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥处理后减压蒸馏除去二氯甲烷和乙酸乙酯,剩余物经油泵减压蒸馏纯化,得到1,2-二甲基-1,2-环丙烷二羧酸甲酯,即化合物1;

(2)称取10g化合物1,用30mL乙醇溶解后,加入120g质量浓度为10%的氢氧化钾溶液,80℃下回流过夜,进行水解反应;反应结束后减压蒸馏除去乙醇,加入水,用乙酸乙酯萃取,分离出水层,水层用稀盐酸调节pH至2-3,再用乙酸乙酯萃取,经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、旋蒸后得到化合物2;

(3)将8g所述化合物2加入20mL乙酸酐溶解,160℃回流反应5h,反应结束后,蒸馏除去乙酸酐,剩余物经油泵减压蒸馏、结晶得到所述中间体A;

S2,提供中间体B,所述中间体B的制备方法为:

(1)将0.02mol 3-氯-5-硝基苯酚和0.06mol 2-溴乙酸叔丁酯溶于15mL DMF中,再加入0.03mol无水碳酸钾,50℃下进行反应,反应结束后,加入200mL蒸馏水,用乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、旋蒸处理后,再经过柱层析分离得到化合物4;

(2)将2g化合物4用甲醇溶解,加入0.2g钯碳,再通入氢气,室温下搅拌进行反应,反应结束后,经过滤、蒸干甲醇、过柱纯化得到中间B;

S3,称取等物质量的中间体A和中间体B,用四氢呋喃溶解后,在50℃进行反应,反应结

束后蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物5;

S4,将所述化合物5溶解于二氯甲烷中,加入脱水缩合剂,回流反应0.5h,反应完毕后,蒸干溶剂,过柱纯化得到化合物6;其中所述脱水缩合剂为EDC·HCl;所述化合物5和脱水缩合剂的物质的量之比为1:1;

S5,将化合物6溶解于二氯甲烷中,加入三氟乙酸后室温进行反应0.5h,反应完毕后,蒸干溶剂,加入乙醇后,再次蒸干溶剂,经洗涤、干燥、过柱纯化后得到所述腐霉利半抗原;其中,所述二氯甲烷与三氟乙酸的体积比为2:1。

[0041] 实施例3

一种腐霉利半抗原的合成方法,包括如下步骤:

S1,提供中间体A,所述中间体A为1,2-二甲基-1,2-环丙烷酸酐;

所述中间体A的制备方法为:

(1)在250mL三口瓶中加入100mLDMF,在冰水浴条件下,加入0.4mol氢化钠,搅拌30min后缓慢滴加0.1mol α -氯代丙烯酸甲酯和0.13mol甲基丙烯酸甲酯,滴加完毕后室温反应过夜,反应完毕后,加入15mL乙醇,搅拌10-15min后,加入200mL水,用稀盐酸将溶液pH调成5-6,用200mL乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,乙酸乙酯层经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥处理后减压蒸馏除去DMF和乙酸乙酯,剩余物经油泵减压蒸馏纯化,得到1,2-二甲基-1,2-环丙烷二羧酸甲酯,即化合物1;

(2)称取10g化合物1,用30mL乙醇溶解后,加入150g质量浓度为12%的氢氧化钠溶液,80℃下回流过夜,进行水解反应;反应结束后减压蒸馏除去乙醇,加入水,用乙酸乙酯萃取,分离出水层,水层用稀盐酸调节pH至2-3,再用乙酸乙酯萃取,经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、旋蒸后得到化合物2;

(3)将8g所述化合物2加入20mL乙酸酐溶解,180℃回流反应3h,反应结束后,蒸馏除去乙酸酐,剩余物经油泵减压蒸馏、结晶得到所述中间体A;

S2,提供中间体B,所述中间体B的制备方法为:

(1)将0.02mol 3-氯-5-硝基苯酚和0.02mol 3-溴丙酸叔丁酯溶于15mL DMF中,再加入0.2mol无水碳酸钾,110℃下进行反应,反应结束后,加入200mL蒸馏水,用乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、旋蒸处理后,再经过柱层析分离得到化合物4;

(2)将2g化合物4用甲醇溶解,加入0.2g钯碳,再通入氢气,室温下搅拌进行反应,反应结束后,经过滤、蒸干甲醇、过柱纯化得到中间B;

S3,称取等物质量的中间体A和中间体B,用二氯甲烷溶解后,在100℃进行反应,反应结束后蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物5;

S4,将所述化合物5溶解于二氯甲烷中,加入脱水缩合剂,回流反应5h,反应完毕后,蒸干溶剂,过柱纯化得到化合物6;其中所述脱水缩合剂为N,N'-羰基二咪唑;所述化合物5和脱水缩合剂的物质的量之比为1:1;

S5,将化合物6溶解于二氯甲烷中,加入三氟乙酸后室温进行反应5h,反应完毕后,蒸干溶剂,加入乙醇后,再次蒸干溶剂,经洗涤、干燥、过柱纯化后得到所述腐霉利半抗原;其中,所述二氯甲烷与三氟乙酸的体积比为2:1。

[0042] 实施例4

一种腐霉利半抗原的合成方法,包括如下步骤:

S1,提供中间体A,所述中间体A为1,2-二甲基-1,2-环丙烷酸酐;

所述中间体A的制备方法为:

(1)在250mL三口瓶中加入100mL甲苯,在冰水浴条件下,加入0.3mol氢化钠,搅拌30min后缓慢滴加0.1mol α -氯代丙烯酸甲酯和0.1mol甲基丙烯酸甲酯,滴加完毕后室温反应过夜,反应完毕后,加入10mL乙醇,搅拌10-15min后,加入200mL水,用稀盐酸将溶液pH调成5-6,用200mL乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,乙酸乙酯层经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥处理后减压蒸馏除去甲苯和乙酸乙酯,剩余物经油泵减压蒸馏纯化,得到1,2-二甲基-1,2-环丙烷二羧酸甲酯,即化合物1;

(2)称取10g化合物1,用30mL乙醇溶解后,加入120g质量浓度为15%的氢氧化钾溶液,80℃下回流过夜,进行水解反应;反应结束后减压蒸馏除去乙醇,加入水,用乙酸乙酯萃取,分离出水层,水层用稀盐酸调节pH至2-3,再用乙酸乙酯萃取,经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、旋蒸后得到化合物2;

(3)将8g所述化合物2加入20mL乙酸酐溶解,170℃回流反应3h,反应结束后,蒸馏除去乙酸酐,剩余物经油泵减压蒸馏、结晶得到所述中间体A;

S2,提供中间体B,所述中间体B的制备方法为:

(1)将0.02mol 3-氯-5-硝基苯酚和0.04mol 6-溴己酸叔丁酯溶于15mL DMF中,再加入0.1mol无水碳酸钾,70℃下进行反应,反应结束后,加入200mL蒸馏水,用乙酸乙酯进行萃取,收集乙酸乙酯层,经饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥、旋蒸处理后,再经过柱层析分离得到化合物4;

(2)将2g化合物4用甲醇溶解,加入0.2g钯碳,再通入氢气,室温下搅拌进行反应,反应结束后,经过滤、蒸干甲醇、过柱纯化得到中间B;

S3,称取等物质量的中间体A和中间体B,用二氯甲烷溶解后,在70℃进行反应,反应结束后蒸干溶剂,过柱纯化得到所述化合物5;

S4,将所述化合物5溶解于二氯甲烷中,加入脱水缩合剂,回流反应3h,反应完毕后,蒸干溶剂,过柱纯化得到化合物6;其中所述脱水缩合剂为N,N'-羰基二咪唑;所述化合物5和脱水缩合剂的物质的量之比为1:1;

S5,将化合物6溶解于二氯甲烷中,加入三氟乙酸后室温进行反应3h,反应完毕后,蒸干溶剂,加入乙醇后,再次蒸干溶剂,经洗涤、干燥、过柱纯化后得到所述腐霉利半抗原;其中,所述二氯甲烷与三氟乙酸的体积比为2:1。

[0043] 以上所述实施例仅表达了本发明的实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制,但凡采用等同替换或等效变换的形式所获得的技术方案,均应落在本发明的保护范围之内。

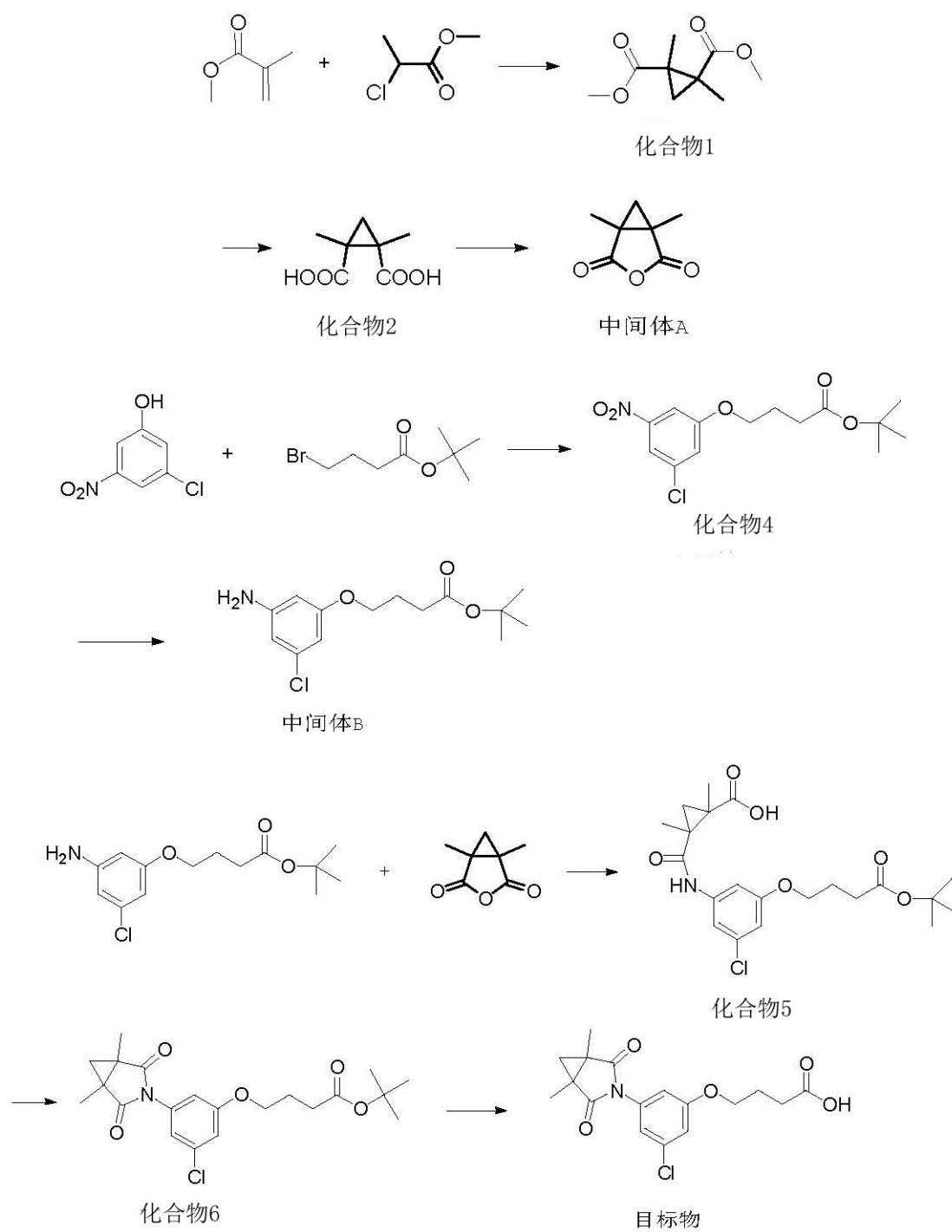
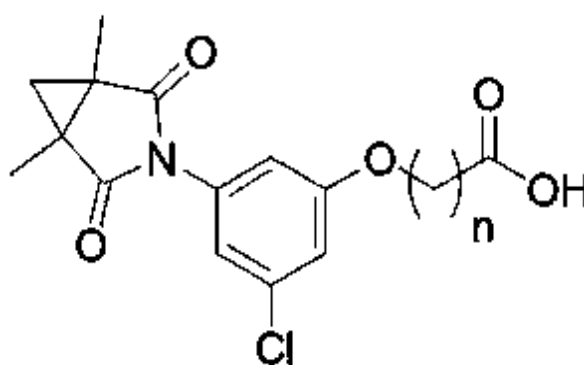


图1

专利名称(译)	一种腐霉利半抗原及其合成方法和应用		
公开(公告)号	CN109956895A	公开(公告)日	2019-07-02
申请号	CN201910194037.5	申请日	2019-03-14
[标]发明人	杨星星 李细清 付辉 王西丽 黄永健 王炳志 马涛 严义勇 周巧妮		
发明人	杨星星 李细清 付辉 王西丽 陈允玲 黄永健 王炳志 马涛 严义勇 周巧妮		
IPC分类号	C07D209/52 G01N33/531 G01N33/02		
CPC分类号	C07D209/52 G01N33/02 G01N33/531		
代理人(译)	许青华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种腐霉利半抗原及其合成方法和应用，其合成为（1）以 α -氯代丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲酯为起始原料合成1,2-二甲基-1,2-环丙烷二羧酸甲酯；1,2-二甲基-1,2-环丙烷二羧酸甲酯再经过水解和分子内缩合后生成1,2-二甲基环丙烷-1,2-二羧酸酐；（2）以3-氯-5-硝基苯酚、化合物3为原料合成带有手臂的中间体，该中间体经还原反应得到中间体B；（3）1,2-二甲基环丙烷-1,2-二羧酸酐与中间体B经过两次缩合反应成环以及一次水解反应得到最终目标物。本发明中，合成的腐霉利半抗原既最大程度保留了腐霉利的特征结构，使得腐霉利半抗原的免疫原性明显增强，又具有可以与载体发生偶联的羧基，为后续建立腐霉利的各种免疫分析方法提供基础。



(I)