



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110330488 A

(43)申请公布日 2019.10.15

(21)申请号 201910540589.7

(22)申请日 2019.06.20

(71)申请人 深圳市易瑞生物技术股份有限公司

地址 518101 广东省深圳市宝安区新安街  
道留仙一路2-1号

(72)发明人 杨星星 王炳志 付辉 金虹  
张鑫 周巧妮 颜文豪 魏世堪  
陈奕耀 陈立

(74)专利代理机构 广州专理知识产权代理事务  
所(普通合伙) 44493

代理人 谭昉

(51)Int.Cl.

C07D 417/12(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

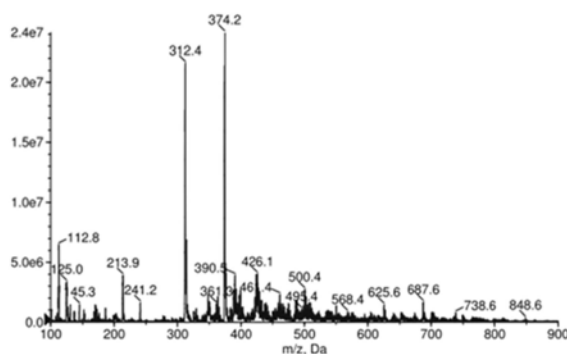
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

### (54)发明名称

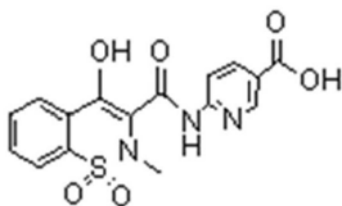
一种吡罗昔康半抗原及其制备方法和应用

### (57)摘要

本发明的目的在于提供一种吡罗昔康半抗原及其合成方法和应用,属于药物安全检测领域,其制备方法包括如下步骤:1)取糖精和溴乙酸乙酯混合反应制得中间产物1;2)将中间产物1与DMSO和MeONa混合并萃取之后得到中间产物2;3)将中间产物2与CH<sub>3</sub>I混合反应后制得中间产物3;4)将中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合反应后制得中间产物4;5)将中间产物4加入试剂混溶反应之后,经提纯得到最终产物为吡罗昔康半抗原。免疫学检测方法具有灵敏度高、特异性强、样品前处理简单、检测时间短、稳定性强、不需要特殊设备和试剂、结果判断直观等优点,因而特别适合于广大基层检验人员以及大批量抗风湿类中成药中非法添加吡罗昔康化学药的快速检测。



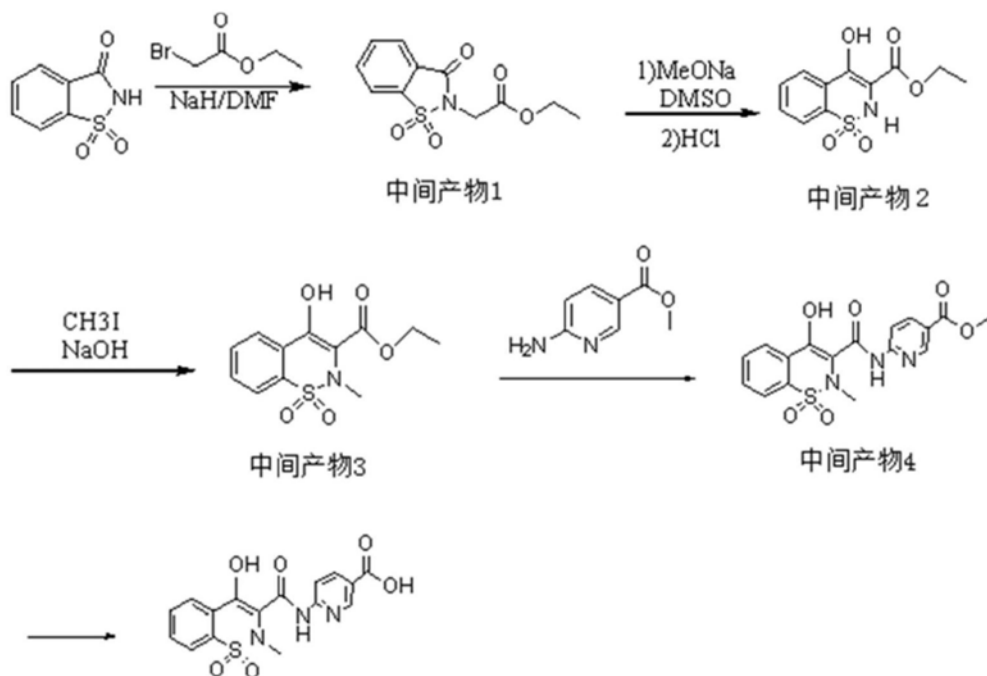
1. 一种吡罗昔康半抗原, 其特征在于, 其结构如下所示:



其分子式为 $C_{16}H_{13}N_3O_6S$ 。

2. 一种吡罗昔康半抗原的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

- 1) 取糖精和溴乙酸乙酯混合反应制得中间产物1;
  - 2) 将中间产物1与DMSO和MeONa混合并萃取之后得到中间产物2;
  - 3) 将中间产物2与 $CH_3I$ 混合反应后制得中间产物3;
  - 4) 将中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合反应后制得中间产物4;
  - 5) 将中间产物4加入试剂混溶反应之后, 经提纯得到最终产物为吡罗昔康半抗原;
- 以上所有反应的合成路线如下:



3. 由权利要求2所述的吡罗昔康半抗原的制备方法, 其特征在于, 步骤1) 中包括将糖精溶解于DMF、冰浴条件下加入NaH以及溴乙酸乙酯, 之后再室温反应。

4. 由权利要求2或3所述的吡罗昔康半抗原的制备方法, 其特征在于, 步骤2) 的中间产物1与DMSO和MeONa混合之后在小于 $30^{\circ}C$ 的条件下反应, 反应完之后进行萃取。

5. 由权利要求2所述的吡罗昔康半抗原的制备方法, 其特征在于, 步骤3) 包括将中间产物2、 $CH_3I$ 、NaOH溶于蒸馏水和乙醇中。

6. 由权利要求2或3或5所述的吡罗昔康半抗原的制备方法, 其特征在于, 步骤4) 的中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合采用包括间二甲苯的试剂溶解。

7. 由权利要求6所述的吡罗昔康半抗原的制备方法, 其特征在于, 步骤4) 的物质混合反应后, 经过回流、蒸发、上柱纯化之后得到中间产物4。

8. 由权利要求7所述的吡罗昔康半抗原的制备方法, 其特征在于, 步骤5) 中的试剂包括

乙醇以及NaOH,具体为将中间产物4先用乙醇溶解后加入NaOH。

9.由权利要求8所述的吡罗昔康半抗原的制备方法,其特征在于,步骤5)中的反应结束后将溶液pH调为微酸性。

10.一种吡罗昔康半抗原的应用,其特征在于,所述吡罗昔康半抗原用于制备吡罗昔康人工免疫抗原,将抗原用于产生抗体,所述吡罗昔康半抗原、抗原以及抗体应用于药物中吡罗昔康残留检测的免疫分析。

## 一种吡罗昔康半抗原及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物安全检测的技术领域,具体涉及一种吡罗昔康半抗原及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 吡罗昔康(化学名称为2-甲基-4-羟基-N-(2-吡啶基)-2H-1,2-苯并噻嗪-3-甲酰胺1,1-二氧化物,分子式为 $C_{15}H_{13}N_3O_4S$ ),是一种苯并噻嗪类非甾体抗炎镇痛解热药,用于类风湿、风湿性关节炎、强直性脊椎炎、骨关节炎、痛风、偏头痛和神经痛,具有明显的镇痛、抗炎及一定的消肿作用。抗风湿类中成药和保健食品中非法添加吡罗昔康屡见不鲜,但长期服用会使人中性粒细胞减少,嗜酸性粒细胞增多,头晕,肝功能异常,血小板减少,中毒性上皮坏死,让人恶心、胃痛、肠道出血等副作用等。

[0003] 现今吡罗昔康主要的分析方法有:高效液相色谱法(HPLC法)、超高效液相色谱-飞行时间质谱联用法(UPLCQ-TOF/MS/MSE)、核磁共振波谱法(NMR)、NIDRS法结合GC-MS法及薄层色谱法(TLC)等,2009年原国家食品药品监督管理局发布了针对抗风湿类中成药中非法添加氢化可的松等13种化学药的药品补充检验方法和检验项目批准件(批准件编号2009025),该方法中TLC法用于快速筛查,HPLC法用于定性检查,再经液质联用方法进行定量验证。仪器分析方法灵敏度高,结果准确,但样品需经一系列复杂的净化处理,且操作繁琐费时,所需仪器设备昂贵,而且需特定的专业技术人员才能操作,不能进行现场检测,时效性差,难以推广普及。

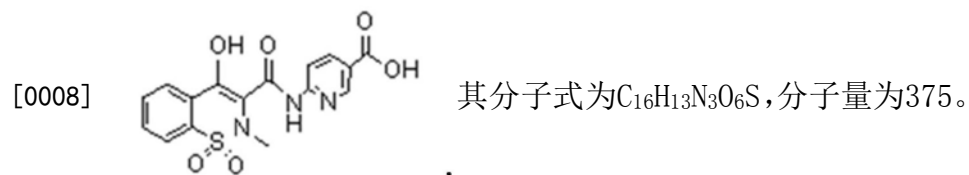
[0004] 在建立免疫学检测方法并应用该检测方法检测吡罗昔康残留量时,关键技术在于能够获取到特异性强、灵敏度高的抗体,而要实现这一目标,前提条件就是得制备出合适的吡罗昔康半抗原。但是,目前国内还没有针对吡罗昔康半抗原的相关报道。

### 发明内容

[0005] 针对上述问题,本发明的目的在于提供一种吡罗昔康半抗原及其合成方法和应用,免疫学检测方法具有灵敏度高、特异性强、样品前处理简单、检测时间短、稳定性强、不需要特殊设备和试剂、结果判断直观等优点,因而特别适合于广大基层检验人员以及大批量抗风湿类中成药中非法添加吡罗昔康化学药的快速检测。

[0006] 本发明的技术方案如下:

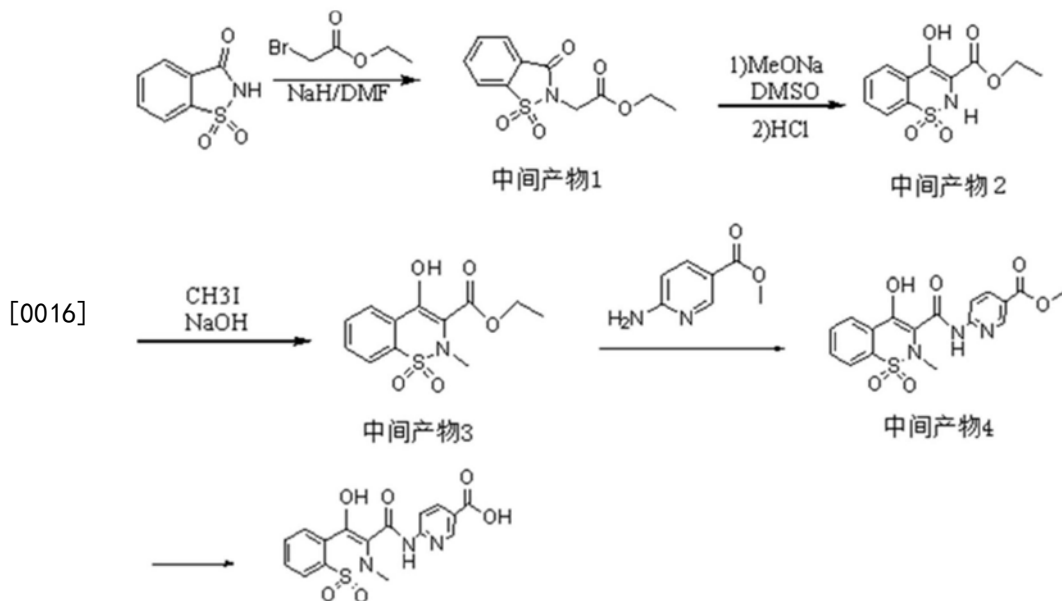
[0007] 一种吡罗昔康半抗原,其结构如下所示:



[0009] 一种吡罗昔康半抗原的制备方法,包括如下步骤:

[0010] 1) 取糖精和溴乙酸乙酯混合反应制得中间产物1;

- [0011] 2) 将中间产物1与DMSO和MeONa混合并萃取之后得到中间产物2；  
 [0012] 3) 将中间产物2与CH<sub>3</sub>I混合反应后制得中间产物3；  
 [0013] 4) 将中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合反应后制得中间产物4；  
 [0014] 5) 将中间产物4加入试剂混溶反应之后，经提纯得到最终产物为吡罗昔康半抗原；  
 [0015] 以上所有反应的合成路线如下：



[0017] 其中，MeONa为甲醇钠的英文同义词，其CAS号为124-41-4，可购于阿拉丁试剂公司或者安耐吉试剂公司。

[0018] 反应物糖精的分子式为C<sub>7</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>S，中间产物1的分子式C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>S，中间产物2的分子式为C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>5</sub>S，中间产物3的分子式为C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>5</sub>S，中间产物4的分子式为C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S，最终产物吡罗昔康半抗原的分子式为C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S；

[0019] 步骤1)中具体包括将糖精(邻苯甲酰磺酰亚胺)溶解于DMF(N,N-二甲基甲酰胺)、冰浴条件下加入NaH以及溴乙酸乙酯，之后再室温反应；

[0020] 步骤2)的中间产物1与DMSO(二甲基亚砷)和MeONa混合之后在小于30℃的条件下反应，反应完之后倒入盐酸中用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>萃取；

[0021] 步骤3)具体包括将中间产物2、CH<sub>3</sub>I、NaOH溶于蒸馏水和乙醇中；

[0022] 步骤4)的中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合采用包括间二甲苯的试剂溶解；各物质混合反应后，经过回流、蒸发、上柱纯化之后得到中间产物4；

[0023] 步骤5)中的试剂包括乙醇以及NaOH，具体为将中间产物4先用乙醇溶解后加入NaOH；反应结束后将溶液pH调为微酸性。

[0024] 一种吡罗昔康半抗原的应用，所述吡罗昔康半抗原用于制备吡罗昔康人工免疫抗原，将抗原用于产生抗体，所述吡罗昔康半抗原、抗原以及抗体应用于药物中吡罗昔康残留检测的免疫分析。

[0025] 本发明的有益效果如下：

[0026] 本发明公开了吡罗昔康半抗原及其制备方法和应用，制备的吡罗昔康半抗原既能最大程度保留吡罗昔康的特征结构、增强吡罗昔康半抗原的免疫性；又具有可以与载体蛋白发生偶联的活性基团，为后续建立吡罗昔康的各种免疫分析方法提供基础；

[0027] 本发明的吡罗昔康半抗原的制备,使用的原料组分比较简单,实验操作比较容易掌握,便于广泛使用该方法;与仪器方法相比较,其检测成本较低。

[0028] 说明书附图

[0029] 图1为吡罗昔康半抗原的质谱图。

### 具体实施方式

[0030] 以下通过具体的实施案例以及附图说明对本发明作进一步详细的描述,应理解这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的保护范围,在阅读了本发明之后,本领域技术人员对本发明的各种等价形式的修改均落于本申请所附权利要求所限定。

[0031] 若无特殊说明,本发明的所有原料和试剂均为常规市场的原料、试剂。

[0032] 实施例1

[0033] 一种吡罗昔康半抗原的制备方法:

[0034] 1) 取糖精和溴乙酸乙酯混合反应制得中间产物1:

[0035] 称取13g糖精溶于25mLDMF中,冰浴下分批加入NaH 1.8g,搅拌10min后缓慢滴加溴乙酸乙酯6.5g,室温下反应1h,之后再80℃条件下反应2.5h。冰浴降温后,将混合液倒入100ml冰水中,将析出的固体抽滤,水洗,烘干得到白色固体粉末即为中间产物1;

[0036] 2) 将中间产物1与DMSO和MeONa混合并萃取之后得到中间产物2:

[0037] 将6g中间产物1加到DMSO (23ml) 和MeONa (2.60g) 的混合溶液中,温度控制在小于30℃,搅拌反应1h溶液颜色由黄色变为褐色;将反应液倒入50ml 3N盐酸中用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>萃取,有机相用蒸馏水洗涤,直到有机相颜色变浅为止,有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥后减压蒸干溶剂,加入10ml乙醇和50ml冰水,有黄色固体析出,过滤干燥得到中间产物2;

[0038] 3) 将中间产物2与CH<sub>3</sub>I混合反应后制得中间产物3:

[0039] 称取中间产物2 2.0g,CH<sub>3</sub>I 1.5ml,NaOH (32%,830ul) 溶于18ml蒸馏水和33ml乙醇中,室温下搅拌24h,蒸干乙醇后加50ml蒸馏水,用稀盐酸将溶液pH调为中性,搅拌,抽滤,洗涤,烘干得到黄色固体,即中间产物3;

[0040] 4) 将中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合反应后制得中间产物4:

[0041] 称取1.8g中间产物3,6-氨基烟酸甲酯1.90g溶于50ml间二甲苯中回流24h,降温至室温后蒸干溶剂直接上柱纯化,得到浅黄色固体,即中间产物4;

[0042] 5) 将中间产物4加入试剂混溶反应之后,经提纯得到最终产物为吡罗昔康半抗原:

[0043] 将500mg中间产物4用10ml乙醇溶解后加入10%NaOH 10ml,室温下反应4h,TLC检测反应进程,待反应结束后将溶液pH调为微酸性,蒸干乙醇,有固体析出,即得到最终目标物-吡罗昔康半抗原。

[0044] 实施例2

[0045] 一种吡罗昔康半抗原的制备方法:

[0046] 1) 取糖精和溴乙酸乙酯混合反应制得中间产物1:

[0047] 称取10g糖精溶于20mLDMF中,冰浴下分批加入NaH 1.5g,搅拌10min后缓慢滴加溴乙酸乙酯6.07g,室温下反应1h,之后再80℃条件下反应2.5h。冰浴降温后,将混合液倒入100ml冰水中,将析出的固体抽滤,水洗,烘干得到白色固体粉末即为中间产物1;

[0048] 2) 将中间产物1与DMSO和MeONa混合并萃取之后得到中间产物2:

[0049] 将5g中间产物1加到DMSO (20ml) 和MeONa (2.45g) 的混合溶液中,温度控制在小于30℃,搅拌反应1h溶液颜色由黄色变为褐色;将反应液倒入50ml 3N盐酸中用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>萃取,有机相用蒸馏水洗涤,直到有机相颜色变浅为止,有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥后减压蒸干溶剂,加入10ml乙醇和50ml冰水,有黄色固体析出,过滤干燥得到中间产物2;

[0050] 3) 将中间产物2与CH<sub>3</sub>I混合反应后制得中间产物3:

[0051] 称取中间产物2 2.0g, CH<sub>3</sub>I 1.6ml, NaOH (32%, 830u1) 溶于16ml蒸馏水和30ml乙醇中,室温下搅拌24h,蒸干乙醇后加50ml蒸馏水,用稀盐酸将溶液pH调为中性,搅拌,抽滤,洗涤,烘干得到黄色固体,即中间产物3;

[0052] 4) 将中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合反应后制得中间产物4:

[0053] 称取1.5g中间产物3, 6-氨基烟酸甲酯1.78g溶于50ml间二甲苯中回流24h,降温至室温后蒸干溶剂直接上柱纯化,得到浅黄色固体,即中间产物4;

[0054] 5) 将中间产物4加入试剂混溶反应之后,经提纯得到最终产物为吡罗昔康半抗原:

[0055] 将500mg中间产物4用10ml乙醇溶解后加入10%NaOH 10ml,室温下反应4h, TLC检测反应进程,待反应结束后将溶液pH调为微酸性,蒸干乙醇,用乙酸乙酯萃取,得到最终目标物-吡罗昔康半抗原。

[0056] 实施例3

[0057] 一种吡罗昔康半抗原的制备方法:

[0058] 1) 取糖精和溴乙酸乙酯混合反应制得中间产物1:

[0059] 称取20g糖精溶于40mLDMF中,冰浴下分批加入NaH 3g,搅拌10min后缓慢滴加溴乙酸乙酯12g,室温下反应1h,之后再80℃条件下反应2.5h。冰浴降温后,将混合液倒入200ml冰水中,将析出的固体抽滤,水洗,烘干得到白色固体粉末即为中间产物1;

[0060] 2) 将中间产物1与DMSO和MeONa混合并萃取之后得到中间产物2:

[0061] 将10g中间产物1加到DMSO (40ml) 和MeONa (5g) 的混合溶液中,温度控制在小于30℃,搅拌反应1h溶液颜色由黄色变为褐色;将反应液倒入100ml 3N盐酸中用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>萃取,有机相用蒸馏水洗涤,直到有机相颜色变浅为止,有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥后减压蒸干溶剂,加入20ml乙醇和100ml冰水,有黄色固体析出,过滤干燥得到中间产物2;

[0062] 3) 将中间产物2与CH<sub>3</sub>I混合反应后制得中间产物3:

[0063] 称取中间产物2 4.0g, CH<sub>3</sub>I 3.5ml, NaOH (32%, 830u1) 溶于35ml蒸馏水和65ml乙醇中,室温下搅拌24h,蒸干乙醇后加100ml蒸馏水,用稀盐酸将溶液pH调为中性,搅拌,抽滤,洗涤,烘干得到黄色固体,即中间产物3;

[0064] 4) 将中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合反应后制得中间产物4:

[0065] 称取3g中间产物3, 6-氨基烟酸甲酯3.8g溶于100ml间二甲苯中回流24h,降温至室温后蒸干溶剂直接上柱纯化,得到浅黄色固体,即中间产物4;

[0066] 5) 将中间产物4加入试剂混溶反应之后,经提纯得到最终产物为吡罗昔康半抗原:

[0067] 将1000mg中间产物4用20ml乙醇溶解后加入10%NaOH 20ml,室温下反应4h, TLC检测反应进程,待反应结束后将溶液pH调为微酸性,蒸干乙醇,用乙酸乙酯萃取,得到最终目标物-吡罗昔康半抗原。

[0068] 实施例4

[0069] 一种吡罗昔康半抗原的制备方法:

[0070] 1) 取糖精和溴乙酸乙酯混合反应制得中间产物1:

[0071] 称取30g糖精溶于50mLDMF中,冰浴下分批加入NaH 4g,搅拌10min后缓慢滴加溴乙酸乙酯15g,室温下反应1h,之后再80℃条件下反应2.5h。冰浴降温后,将混合液倒入250ml冰水中,将析出的固体抽滤,水洗,烘干得到白色固体粉末即为中间产物1;

[0072] 2) 将中间产物1与DMSO和MeONa混合并萃取之后得到中间产物2:

[0073] 将15g中间产物1加到DMSO (50ml) 和MeONa (8g) 的混合溶液中,温度控制在小于30℃,搅拌反应1h溶液颜色由黄色变为褐色;将反应液倒入120ml3N盐酸中用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>萃取,有机相用蒸馏水洗涤,直到有机相颜色变浅为止,有机相用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥后减压蒸干溶剂,加入25ml乙醇和110ml冰水,有黄色固体析出,过滤干燥得到中间产物2;

[0074] 3) 将中间产物2与CH<sub>3</sub>I混合反应后制得中间产物3:

[0075] 称取中间产物2 5g,CH<sub>3</sub>I 5ml,NaOH (32%,830ul) 溶于40ml蒸馏水和70ml乙醇中,室温下搅拌24h,蒸干乙醇后加100ml蒸馏水,用稀盐酸将溶液pH调为中性,搅拌,抽滤,洗涤,烘干得到黄色固体,即中间产物3;

[0076] 4) 将中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合反应后制得中间产物4:

[0077] 称取5g中间产物3,6-氨基烟酸甲酯6g溶于120ml间二甲苯中回流24h,降温至室温后蒸干溶剂直接上柱纯化,得到浅黄色固体,即中间产物4;

[0078] 5) 将中间产物4加入试剂混溶反应之后,经提纯得到最终产物为吡罗昔康半抗原:

[0079] 将1200mg中间产物4用25ml乙醇溶解后加入10%NaOH 30ml,室温下反应4h,TLC检测反应进程,待反应结束后将溶液pH调为微酸性,蒸干乙醇,待到有固体析出,即得到最终目标物-吡罗昔康半抗原,MS鉴定为目标物,如图1所示为吡罗昔康半抗原的质谱图,可知半抗原的分子离子峰为m/z 374.2[M-H]<sup>-</sup>,且为最高峰,与该半抗原的分子量 (375) 相符。

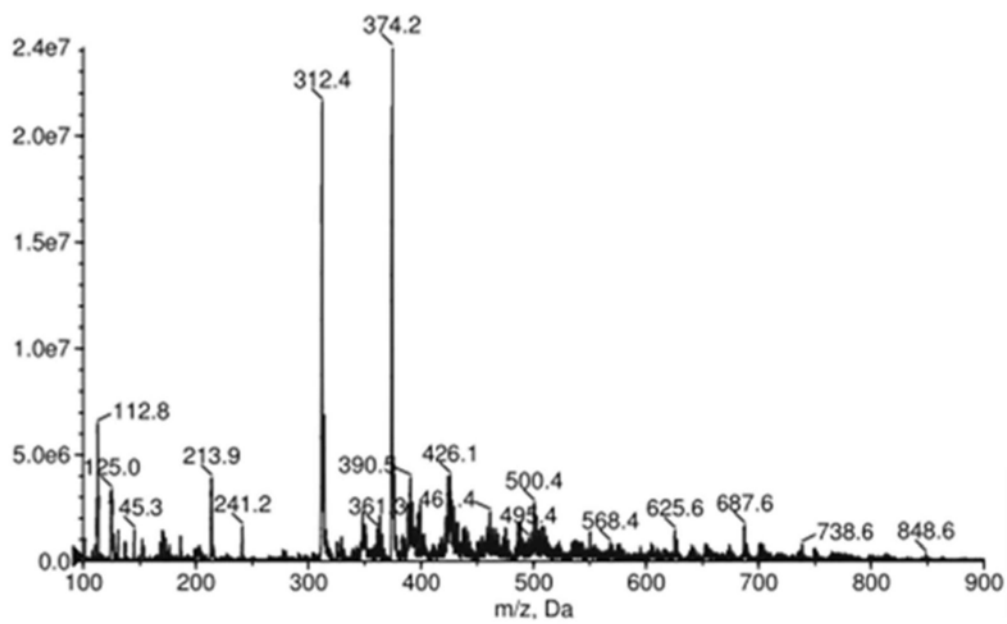


图1

|         |                                                                |         |            |
|---------|----------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译) | 一种吡罗昔康半抗原及其制备方法和应用                                             |         |            |
| 公开(公告)号 | <a href="#">CN110330488A</a>                                   | 公开(公告)日 | 2019-10-15 |
| 申请号     | CN201910540589.7                                               | 申请日     | 2019-06-20 |
| [标]发明人  | 杨星星<br>王炳志<br>付辉<br>金虹<br>张鑫<br>周巧妮<br>颜文豪<br>陈立               |         |            |
| 发明人     | 杨星星<br>王炳志<br>付辉<br>金虹<br>张鑫<br>周巧妮<br>颜文豪<br>魏世臻<br>陈奕耀<br>陈立 |         |            |
| IPC分类号  | C07D417/12 G01N33/531 G01N33/68                                |         |            |
| CPC分类号  | C07D417/12 G01N33/531 G01N33/6854                              |         |            |
| 代理人(译)  | 谭昉                                                             |         |            |
| 外部链接    | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                 |         |            |

#### 摘要(译)

本发明的目的在于提供一种吡罗昔康半抗原及其合成方法和应用，属于药物安全检测领域，其制备方法包括如下步骤：1) 取糖精和溴乙酸乙酯混合反应制得中间产物1；2) 将中间产物1与DMSO和MeONa混合并萃取之后得到中间产物2；3) 将中间产物2与CH<sub>3</sub>I混合反应后制得中间产物3；4) 将中间产物3与6-氨基烟酸甲酯混合反应后制得中间产物4；5) 将中间产物4加入试剂混溶反应之后，经提纯得到最终产物为吡罗昔康半抗原。免疫学检测方法具有灵敏度高、特异性强、样品前处理简单、检测时间短、稳定性强、不需要特殊设备和试剂、结果判断直观等优点，因而特别适合于广大基层检验人员以及大批量抗风湿类中成药中非法添加吡罗昔康化学药的快速检测。

