



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105439997 B

(45)授权公告日 2018.03.27

(21)申请号 201510781611.9

(22)申请日 2015.11.13

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105439997 A

(43)申请公布日 2016.03.30

(73)专利权人 新疆农垦科学院

地址 832000 新疆维吾尔自治区石河子市

乌伊公路221号

专利权人 孙凤霞

(72)发明人 孙凤霞 彭夏雨 罗小玲 卢春霞

罗瑞峰 王静 谢勇 党富民

康立超

(74)专利代理机构 重庆博凯知识产权代理有限公司

公司 50212

代理人 张先芸

(51)Int.Cl.

C07D 307/79(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

(56)对比文件

CN 1384103 A,2002.12.11,说明书实施例1-6.

WO 2008013834 A1,2008.01.31,说明书第55-56页SCHEME 13及实施例58.

US 20100093553 A1,2010.04.15,说明书第162段.

US 5283066 A,1994.02.01,全文.

胡芹芹.蔬菜中氨基甲酸酯类农药残留快速检测技术研究.《万方数据知识服务平台 学位论文》.2009,第1-48页,尤其是正文第19-21页第2.3.1节、第21页第2.3.2.1节. (续)

审查员 徐建国

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

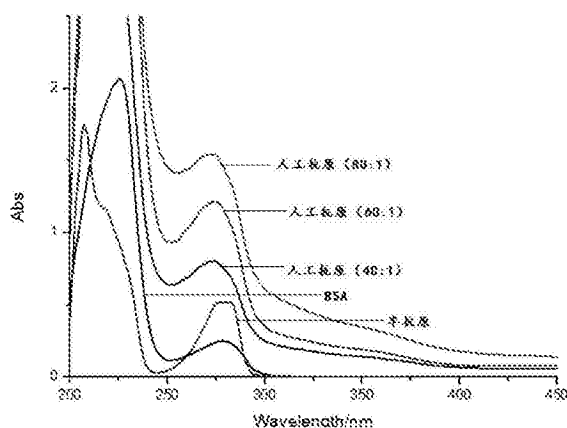
(54)发明名称

一种克百威氨基化半抗原的合成方法及应用

(57)摘要

本发明“一种克百威氨基化半抗原的合成方法及应用”,涉及生物化工技术。本发明是新型的克百威氨基化半抗原合成方法,合成步骤简洁有效,得率高,避免了克百威羧基化半抗原制备中传统三光气合成方法大量使用光气和甲苯的危害性。以呋喃酚为起始原料,通过酯化及胺解、Boc保护和脱保护反应,引入一条含3个碳和氨基端的手臂链,形成氨基化半抗原。采用戊二醛法使半抗原和载体蛋白上的氨基进行缩合,最大程度暴露克百威抗原决定簇,免疫动物实验表明本发明制备的人工抗原具有良好免疫原性。本发明的半抗原及人工抗原可完全用于克百威免疫分析中,满足国内对克百威残留的检测需要,应用

前景广阔。



[转续页]

[接上页]

(56)对比文件

桑光明.残杀威和氯氟氰菊酯的半抗原分子设计、合成及人工抗原制备.《万方数据知识服务平台 学位论文》.2010,第1-60页,尤其是正文第4-12页第1.4-1.5节.

Jean-Michel Vatele.Prenyl carbamates: preparation and deprotection.《Tetrahedron》.2004,第60卷第4251-4260页,尤其是第4252页Scheme 2-3、第4255-4256页Method B及第4257页第4.2.12节.

瞿巧钰.氨基甲酸酯类农药甲萘威、克百威残留免疫检测技术研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2014,(第11期),第D046-116页.

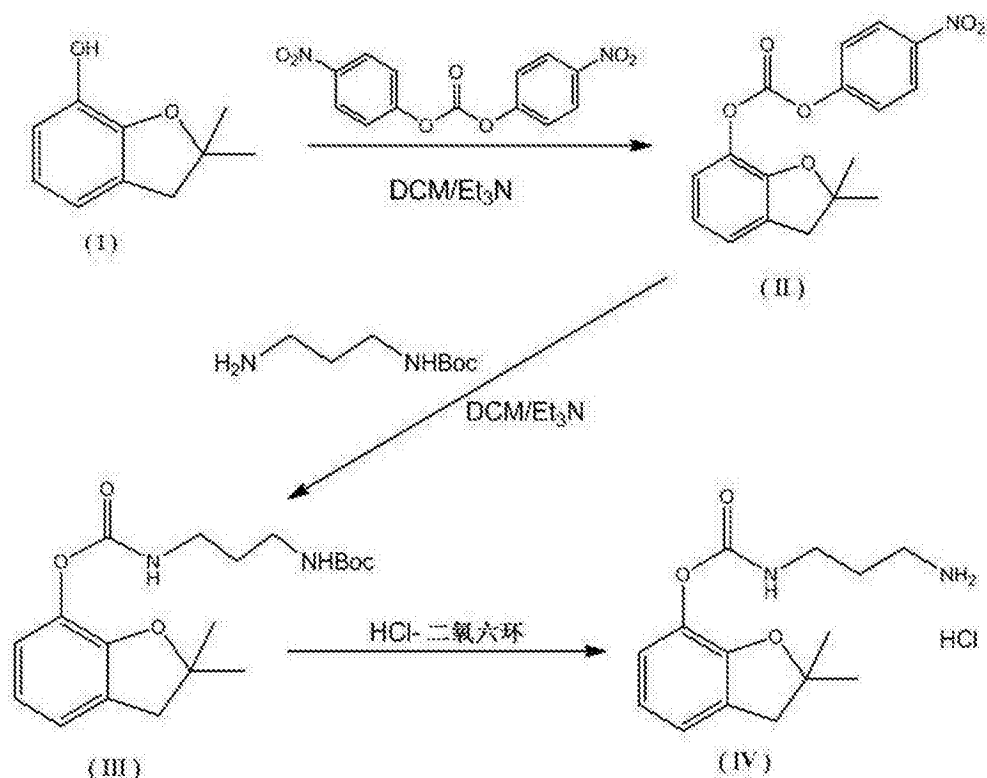
瞿巧钰.氨基甲酸酯类农药甲萘威、克百威

残留免疫检测技术研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 农业科技辑》.2014,(第11期),第D046-116页.

瞿巧钰等.三种常用氨基甲酸酯类农药人工抗原合成方法的设计与优选.《农业资源与环境学报》.2013,第30卷(第6期),第101-108页,尤其是第103页右栏第2段、第103页左栏第2段及图2、第104页左栏第1段、第102页左栏倒数第1段至右栏第1段、第104-106页第2节.

瞿巧钰等.三种常用氨基甲酸酯类农药人工抗原合成方法的设计与优选.《农业资源与环境学报》.2013,第30卷(第6期),第101-108页,尤其是第103页右栏第2段、第103页左栏第2段及图2、第104页左栏第1段、第102页左栏倒数第1段至右栏第1段、第104-106页第2节.

1. 一种克百威人工抗原的合成方法,其特征是以呋喃酚为原料,通过酯化、胺解及Boc保护和脱保护反应,合成克百威氨基化半抗原,具体合成路线如下:



最后将克百威氨基化半抗原偶联到载体蛋白上,包括如下步骤:

(1) 取一定量的呋喃酚溶于50mL二氯甲烷中,冰浴下加入三乙胺,搅拌10分钟后,将二(对硝基苯)碳酸酯溶于15mL二氯甲烷中,缓慢滴加到上述反应体系中,控制反应摩尔比为呋喃酚:二(对硝基苯)碳酸酯=1:1;逐渐升温至30℃,继续搅拌反应1小时,TLC板监控反应完成,展开剂为石油醚:乙酸乙酯=10:1,合成中间产物(II);

(2) 称取一定量经三乙胺碱化的3-叔丁氧羰基氨基丙胺,3-叔丁氧羰基氨基丙胺与呋喃酚的摩尔比为1:1,溶于10mL二氯甲烷中,在冰浴条件下加入到上述反应液中,将温度升到室温并继续搅拌过夜;依次用50mL水和饱和食盐水各洗涤2次;用无水硫酸钠干燥后,过滤除去干燥剂,滤液经真空旋干后经200-300目硅胶柱层析纯化得到中间产物(III),洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯,体积比为12:1,收率为65%;

(3) 将步骤2得到的半抗原中间产物(III)溶于5mL 1,4-二氧六环中,冰浴下加入15mL 盐酸二氧六环,室温反应4小时后将析出固体用30mL石油醚洗涤3次,再以石油醚混合固体,经真空旋干除去水分,得到产物克百威氨基化半抗原(IV),收率为67%;

(4) 称取步骤3得到的半抗原(IV)和牛血清白蛋白BSA溶解在5mL 0.01M, pH 7.4的PBS缓冲液中,室温磁力搅拌下至充分溶解后,避光反应并逐滴加入25%的戊二醛溶液;控制反应摩尔比为半抗原:戊二醛:BSA=80:35:1,温和搅拌反应30分钟后,向反应液中加入硼氢化钠溶液至终浓度为10mg/mL,然后4℃避光反应2小时,即得到人工抗原混合液;

(5) 将人工抗原混合液移入处理过的透析袋中,用0.01M的PBS缓冲液在4℃磁力搅拌下透析2天,再用去离子水透析1天,每天更换3次透析液;透析结束后离心取上清,使用冻干法将其制成粉末,即得到克百威人工抗原。

一种克百威氨基化半抗原的合成方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种克百威氨基化半抗原的合成方法及应用,属于生物化工技术领域。

背景技术

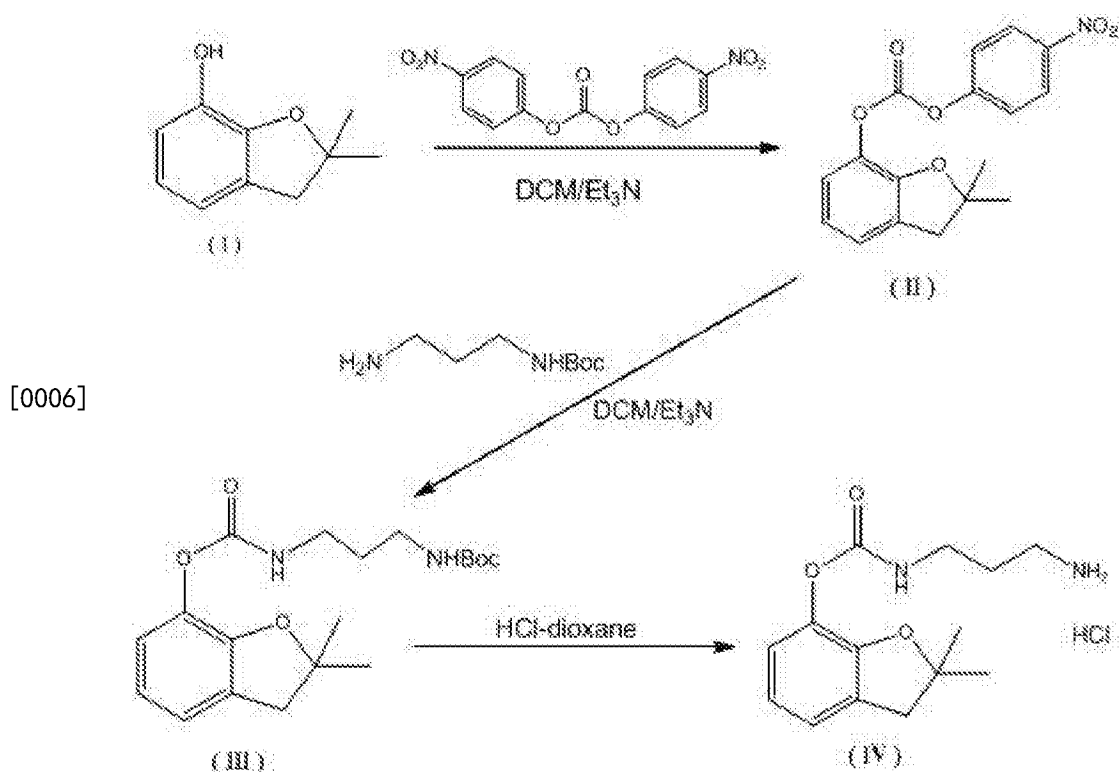
[0002] 克百威(Carbofuran, CAR), 化学名为2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基-N-甲基氨基甲酸酯,商品名为呋喃丹,属于氨基甲酸酯类农药。在农业生产中做为广谱性杀虫、杀线虫剂,可以与胆碱酯酶不可逆结合,使得乙酰胆碱不能分解而蓄积在体内,影响神经中枢传导,具有神经毒性。克百威具有内吸性,可以被植物根部吸收并输送到植物体各器官,在土壤中不急降解,极易污染土壤和地下水源,给农产品安全和环境带来潜在威胁。近年来克百威已被禁止用于蔬菜,但仍有不少违法使用现象,导致克百威在果蔬中时有检出,因此,加强农产品中克百威农药残留的检测迫在眉睫。

[0003] 传统的克百威残留检测多采用仪器分析法,需要昂贵的仪器设备和专业技术人员,对检材要求较高,样品前处理和提纯过程费时费力,不能满足现代检测对现场、方便、快速的要求。基于免疫反应的酶联免疫吸附法和胶体金试纸条法操作简便,对样本要求不高,可实现现场快速检测的要求。免疫分析法的前提是特异性抗体的制备。克百威分子量为221,是典型的小分子化合物,需要制备人工抗原,且本身不含有可偶联的功能基团,必须进行半抗原合成。目前国内外普遍采用传统的三光气合成工艺制备克百威羧基化半抗原,由于大量光气和甲苯的使用,极易危害人体健康,造成环境污染。因此,本发明以呋喃酚为原料,设计一种新的克百威氨基化半抗原合成方法,并制备了完全抗原,为建立克百威免疫检测技术提供物质基础。

发明内容

[0004] 本发明针对三光气传统方法合成克百威羧基化半抗原的危害性,提供了一种新的克百威氨基化半抗原合成方法,采用戊二醛法制备人工抗原,制备得到的半抗原和人工抗原可用于克百威免疫分析方法研究。

[0005] 本发明的技术方案:第一步为氨基化半抗原的制备及检测,以呋喃酚为原料,在三乙酸催化下与二(对硝基苯)碳酸酯发生酯化反应,用3-叔丁氧羰基氨基丙胺进行胺解并N-Boc保护,在盐酸二氧六环下脱保护,最终合成克百威氨基化半抗原;然后利用戊二醛法将半抗原和载体蛋白上的氨基缩合,制备克百威人工抗原。其中克百威氨基化半抗原合成路线为



[0007] 工艺步骤如下。

[0008] 1. 克百威氨基化半抗原合成。

[0009] (1) 将四口烧瓶置于磁力搅拌器上,配置温度计。取一定量的呋喃酚溶于50mL 二氯甲烷(DCM)中,冰浴下加入三乙胺(Et₃N),搅拌10分钟后,将二(对硝基苯)碳酸酯溶于15mL二氯甲烷中,缓慢滴加到上述反应体系中,控制反应摩尔比为呋喃酚:二(对硝基苯)碳酸酯=1:1;逐渐升温至30℃,继续搅拌反应1小时,TLC板监控反应完成,展开剂为石油醚:乙酸乙酯=10:1,合成中间产物(II)。

[0010] (2) 称取一定量经三乙胺碱化的3-叔丁氧羰基氨基丙胺(与呋喃酚摩尔比为1:1),溶于10mL二氯甲烷中,在冰浴条件下加入到上述反应液中,将温度升到室温并继续搅拌过夜;依次用50mL水和饱和食盐水各洗涤2次;用无水硫酸钠干燥后,过滤除去干燥剂,滤液经真空旋干后经200-300目硅胶柱层析纯化得到中间产物(III),洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯,体积比为12:1,收率为65%。

[0011] (3) 将步骤2得到的半抗原中间产物(III)溶于5mL 1,4-二氧六环中,冰浴下加入15mL盐酸二氧六环,室温反应4小时后将析出固体用30mL石油醚洗涤3次,再以石油醚混合固体,经真空旋干除去水分,得到终产物(IV),收率为67%。

[0012] 2. 克百威人工抗原的合成。

[0013] (1) 称取一定量的半抗原和载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)溶解在5mL磷酸盐缓冲液中(PBS,0.01 M,pH 7.4),室温磁力搅拌下至充分溶解后,避光反应并逐滴加入25%的戊二醛(GA)溶液,控制反应摩尔比半抗原:戊二醛:BSA=40~80:35:1,温和搅拌反应30分钟后,向反应液中加入硼氢化钠溶液至终浓度为10mg/mL,然后4℃避光反应2小时,即得到人工抗原混合液。

[0014] (2) 将人工抗原混合液移入处理过的透析袋中,用0.01M的 PBS缓冲液在4℃磁力

搅拌下透析2天,再用去离子水透析1天,每天更换3次透析液;透析结束后离心取上清,使用冻干法将其制成粉末,即得到克百威人工抗原:CAR-BSA。

[0015] 3. 克百威人工抗原的鉴定。

[0016] 分别对半抗原、载体蛋白和人工抗原溶液进行紫外扫描,根据载体蛋白在偶联前后紫外扫描光谱的变化情况来初步判断人工抗原偶联是否成功。然后,将所制备的人工抗原免疫新西兰大白兔,4免后第7天采集抗血清进行检测,判断所制备的人工抗原是否具有免疫原性。

[0017] 本发明的有益效果:本发明是新型的克百威氨基化半抗原合成方法,该反应合成步骤简洁有效,避免了克百威羧基化半抗原合成中传统三光气法大量使用光气和甲苯的危害性,以呋喃酚为起始原料,通过酯化及胺解、Boc保护和脱保护反应,最终合成克百威氨基化半抗原;采用戊二醛法使半抗原和载体蛋白上的氨基进行缩合,最大程度暴露克百威抗原决定簇。免疫实验结果证明,本发明制备的半抗原和人工抗原可完全用于免疫分析中,满足国内对克百威残留的检测需要。

附图说明

[0018] 图1克百威氨基化半抗原的核磁图。

[0019] 图2克百威人工抗原紫外扫描图。

具体实施方式

[0020] 为更好的理解本发明,下面结合具体的实施例来进一步阐明,应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。

[0021] 实施例1 克百威氨基化半抗原的制备。

[0022] (1)将四口烧瓶置于磁力搅拌器上,配置温度计。取2.6g呋喃酚溶于50mL 二氯甲烷中,冰浴下加入1.7g三乙胺,搅拌10分钟后,将4.9g二(对硝基苯)碳酸酯溶于15mL二氯甲烷中,缓慢滴加到上述反应体系中,逐渐升温至30℃后继续搅拌1小时,TLC板监控反应完成,展开剂为石油醚:乙酸乙酯=10:1,得到中间产物(II)。

[0023] (2)称取2.8g经三乙胺碱化的3-叔丁氧羰基氨基丙胺,溶于10mL二氯甲烷中,在冰浴条件下加入到上述中间产物(II)反应液中,将温度升到室温并继续搅拌过夜;依次用50mL水和饱和食盐水各洗涤2次;用无水硫酸钠干燥后,过滤除去干燥剂,滤液经真空旋干后经200-300目硅胶柱层析纯化得到中间产物(III)2.38g,洗脱剂为石油醚:乙酸乙酯,体积比为12:1,收率为65%。

[0024] (3)称取步骤2得到的半抗原中间产物(III)1.82g溶于5mL 1,4-二氧六环中,冰浴下加入15mL盐酸二氧六环,室温反应4小时后将析出固体用30mL石油醚洗涤3次,再以石油醚混合固体,经真空旋干除去水分,得到终产物(IV)0.61g,收率为67%。¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7.95 (br, 3H), 7.84 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 6.86 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H), 6.75 (t, *J* = 8.0 Hz, 7.0 Hz, 1H), 3.12 (m, 2H), 3.03 (s, 2H), 2.82 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 1.40 (s, 6H)。

[0025] 实施例2 克百威人工抗原的制备。

[0026] (1)称取21mg半抗原和牛血清白蛋白67mg溶解在5mLPBS缓冲液中,室温磁力搅拌

下至充分溶解后,避光反应并逐滴加入25%的戊二醛溶液14uI,温和搅拌反应30分钟后,向反应液中加入硼氢化钠溶液至终浓度为10mg/mL,然后4℃避光反应2小时,即得到人工抗原混合液。

[0027] (2)将人工抗原混合液移入处理过的透析袋中,用0.01M的 PBS缓冲液在4℃磁力搅拌下透析2天,再用去离子水透析1天,每天更换3次透析液;透析结束后离心取上清,使用冻干法将其制成粉末,即得到克百威人工抗原:CAR-BSA。

[0028] 实施例3 克百威抗血清的制备。

[0029] 用实施例2 制备的人工抗原作为免疫原,与弗氏完全佐剂等量混合,乳化完全后选取2月龄的健康雌性新西兰大白兔于颈背部皮下多点注射,每间隔3周加强免疫一次。四免后第7天耳缘静脉采血,离心得到抗血清。

[0030] 实验结果表明,本发明制备的克百威人工抗原免疫兔子得到的抗血清,四免效价可达128000,对克百威具有良好的选择性识别能力。

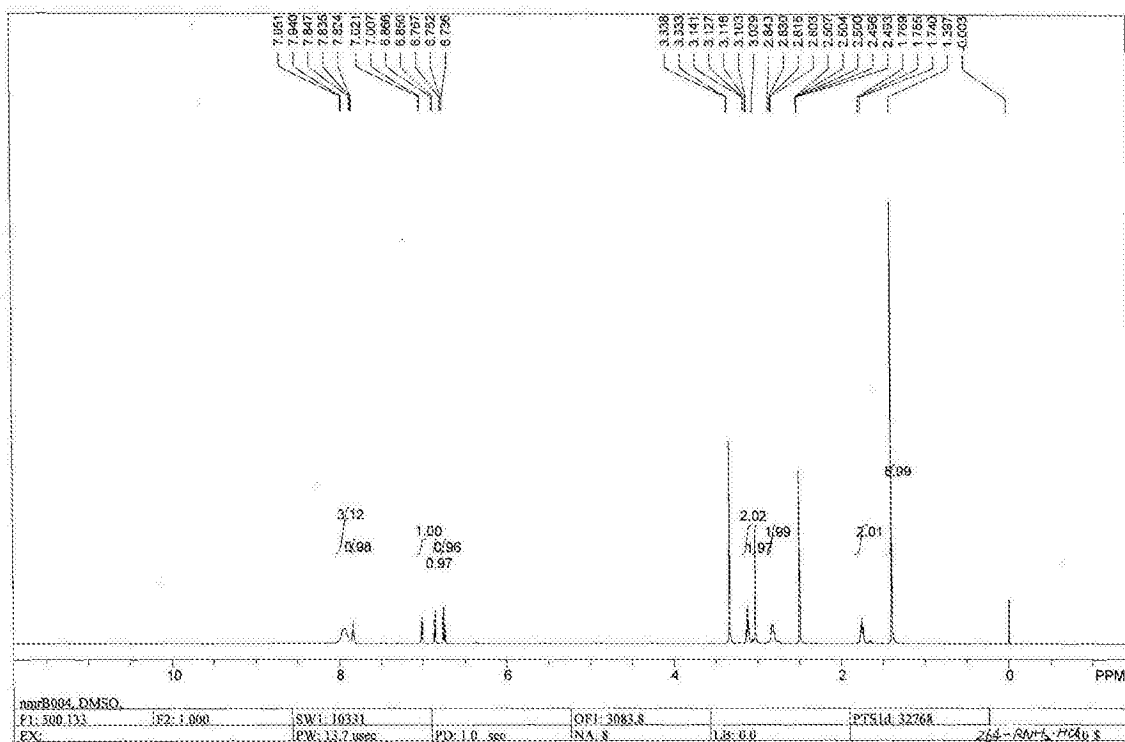


图1

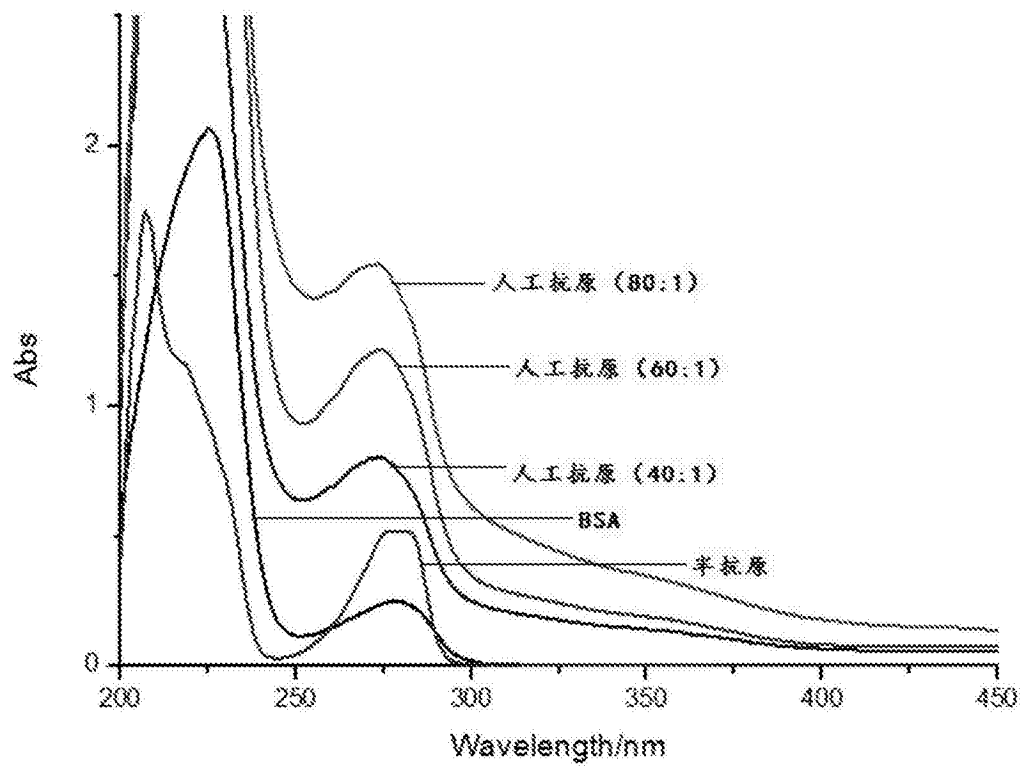


图2

专利名称(译)	一种克百威氨基化半抗原的合成方法及应用		
公开(公告)号	CN105439997B	公开(公告)日	2018-03-27
申请号	CN201510781611.9	申请日	2015-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	新疆农垦科学院 孙凤霞		
申请(专利权)人(译)	新疆农垦科学院 孙凤霞		
当前申请(专利权)人(译)	新疆农垦科学院 孙凤霞		
[标]发明人	孙凤霞 彭夏雨 罗小玲 卢春霞 罗瑞峰 王静 谢勇 党富民 康立超		
发明人	孙凤霞 彭夏雨 罗小玲 卢春霞 罗瑞峰 王静 谢勇 党富民 康立超		
IPC分类号	C07D307/79 C07K14/765 G01N33/531		
CPC分类号	C07D307/79 C07K14/765 G01N33/531		
审查员(译)	徐建国		
其他公开文献	CN105439997A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明“一种克百威氨基化半抗原的合成方法及应用”，涉及生物化工技术。本发明是新型的克百威氨基化半抗原合成方法，合成步骤简洁有效，得率高，避免了克百威羧基化半抗原制备中传统三光气合成方法大量使用光气和甲苯的危害性。以咪唑啉酮为起始原料，通过酯化及胺解、Boc保护和脱保护反应，引入一条含3个碳和氨基端的手臂链，形成氨基化半抗原。采用戊二醛法使半抗原和载体蛋白上的氨基进行缩合，最大程度暴露克百威抗原决定簇，免疫动物实验表明本发明制备的人工抗原具有良好免疫原性。本发明的半抗原及人工抗原可完全用于克百威免疫分析中，满足国内对克百威残留的检测需要，应用前景广阔。

