



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107759547 A

(43)申请公布日 2018.03.06

(21)申请号 201711049977.2

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2017.10.31

(71)申请人 福建安欣睿捷生物科技有限公司

地址 350000 福建省福州市仓山区盖山镇
浦下村后门里122号080室(自贸试验
区内)

(72)发明人 王保民 陈俊玉 王冕 赵亚杰
谭桂玉 刘伟华

(74)专利代理机构 福州君诚知识产权代理有限
公司 35211

代理人 戴雨君

(51)Int.Cl.

C07D 307/86(2006.01)

C07K 14/765(2006.01)

C07K 1/107(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

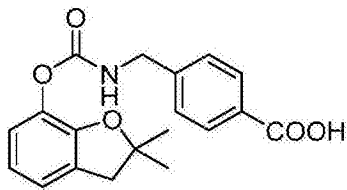
(54)发明名称

一种呋喃丹半抗原、完全抗原及其制备方法
与应用

(57)摘要

本发明公开了一种呋喃丹半抗原、完全抗原及制备方法和应用,所述呋喃丹半抗原以呋喃酚为原料,与氯甲酸异丁酯反应生成中间产物,再将中间产物与4-(氨基甲基)苯甲酸在碳酸钾水溶液中反应得到呋喃丹半抗原。将呋喃丹半抗原与载体蛋白偶联得到呋喃丹完全抗原。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。本发明的呋喃丹半抗原和抗原可用于呋喃丹免疫分析检测,应用前景十分广阔。

1. 一种呋喃丹半抗原,其特征在于:其分子结构为:



2. 如权利要求1所述的一种呋喃丹半抗原的制备方法,其特征在于:其包括以下步骤:

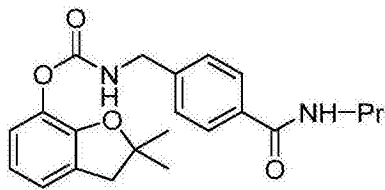
1) 将1份呋喃酚溶解在1~4份的二氯甲烷中,先加入氯甲酸异丁酯1~1.3份,再加入吡啶1~2份吸收生成的氯化氢,反应温度为-5~5℃,反应得混合物A;

2) 将上述混合物A加1~4份水淬灭,液-液分层后,取有机相干燥浓缩,得到的液体为2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯;

3) 将1份2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯溶于1~4份四氢呋喃中,加入1~2份4-(氨基甲基)苯甲酸和1~4份碳酸钾水溶液,反应温度为-5~5℃,反应得混合物B;

4) 将上述混合物B进行液-液分层后,取有机相干燥浓缩,浓缩得到的固体用1~2份乙醇重结晶,得到的产物即为所述呋喃丹半抗原。

3. 一种呋喃丹完全抗原,其特征在于:其分子结构为:



4. 如权利要求3所述的一种呋喃丹完全抗原的应用,其特征在于:所述呋喃丹完全抗原应用于食品中呋喃丹的检测。

5. 如权利要求3所述的一种呋喃丹完全抗原的制备方法,其特征在于:所述呋喃丹完全抗原由权利要求1所述的呋喃丹半抗原制备而成,包括以下步骤:

1) 将呋喃丹半抗原溶于二甲基甲酰胺中,加入二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺,室温搅拌18-24小时得到A液;

其中,呋喃丹半抗原、二甲基甲酰胺、二环己基碳二亚胺和N-羟基琥珀酰亚胺的用量比为20μmol:1mL:60μmol:60μmol;

2) 将载体蛋白溶于碳酸盐缓冲液中,得到B液;其中,载体蛋白和碳酸盐缓冲液的用量比为0.4μmol:3mL;

3) 将上述A液滴加到B液中并于4℃搅拌10-12小时,得到C液;

4) 将C液置于透析袋并于磷酸缓冲液中透析,每3小时换液一次,共透析6次,收集透析袋中的溶液,即为呋喃丹完全抗原。

6. 根据权利要求5所述的一种呋喃丹完全抗原的制备方法,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清蛋白。

一种呋喃丹半抗原、完全抗原及其制备方法与应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物化工技术领域,具体涉及一种呋喃丹半抗原、完全抗原及制备方法与应用。

背景技术

[0002] 呋喃丹 (Carbofuran), 2,3-二氢-2,2-二甲基-7-苯并呋喃基-N-甲基氨基甲酸酯,是一种高效、广谱的农药,对危害粮食、蔬菜、水果及经济作物的昆虫、螨虫、线虫均有防治作用。在防治水稻螟虫、稻蓟马、稻纵卷叶虫、稻飞虱、稻叶蝉、稻象甲、玉米螟、玉米切根虫、棉蚜、棉铃虫、大豆蚜、大豆食心虫等曾广泛应用。呋喃丹对昆虫的致毒方式,主要是内吸杀虫作用。药剂施于土壤作物的根基部分,根系吸收后随水分输送到茎叶部,昆虫取食后进入虫体,达到治虫的目的。

[0003] 尽管呋喃丹的治虫效果显著,但呋喃丹对动物、人体具有潜在的致病性,可以引起头昏、头痛、呕吐、多汗、流涎、瞳孔缩小、视力模糊,严重者出现血压下降、意识不清,皮肤出现接触性皮炎如风疹,局部红肿痛痒,眼结膜充血、流泪、胸闷、呼吸困难等。按中国农药毒性分级标准,呋喃丹属于高毒农药,不能用在蔬菜和果树上。美国、欧洲等国家和地区都严格限制呋喃丹在食品中的残留量。

[0004] 目前,呋喃丹的农药残留检测方法包括液相色谱法、液质联用法、酶联免疫吸附分析法等。其中,酶联免疫吸附法是近年来常用的农残检测方法,建立该方法的首要条件是设计合成有效的半抗原及完全抗原。

发明内容

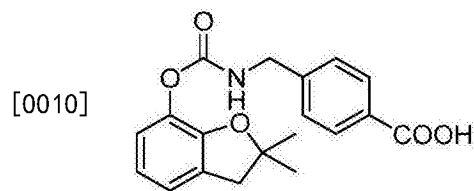
[0005] 本发明的一个目的在于提供一种呋喃丹半抗原以及呋喃丹完全抗原,可有效地刺激被免疫动物产生灵敏度高、特异性强的抗体。

[0006] 本发明的另一个目的在于提供上述呋喃丹半抗原以及呋喃丹完全抗原的制备方法,该方法简单易行。

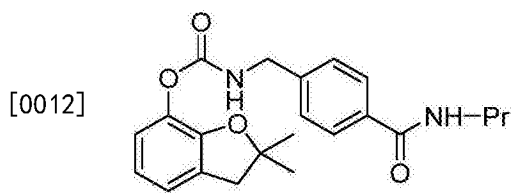
[0007] 本发明制备得到的呋喃丹半抗原和呋喃丹完全抗原可用于后续呋喃丹的免疫分析方法建立,应用于食品中呋喃丹的检测。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0009] 一种呋喃丹半抗原,其分子结构为:



[0011] 一种呋喃丹完全抗原,其分子结构为:



[0013] 所述呋喃丹半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0014] 1) 将1份呋喃酚溶解在1~4份的二氯甲烷中,先加入氯甲酸异丁酯1~1.3份,再加入吡啶1~2份吸收生成的氯化氢,反应温度为-5~5℃,反应得混合物A;

[0015] 2) 将上述混合物A加1~4份水淬灭,液-液分层后,取有机相干燥浓缩得一浅黄色液体,即为2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯;

[0016] 3) 将1份2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯溶于1~4份四氢呋喃中,加入1~2份4-(氨基甲基)苯甲酸和1~4份碳酸钾水溶液,反应温度为-5~5℃,反应得混合物B;

[0017] 4) 将上述混合物B进行液-液分层后,取有机相干燥浓缩得一浅黄色固体,浅黄色固体用1~2份乙醇重结晶得一白色固体,即为所述呋喃丹半抗原,化学名为4-((((2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-基)氧基)羰基)氨基)甲基)苯甲酸。

[0018] 所述呋喃丹完全抗原由呋喃丹半抗原制备而成,其制备方法包括以下步骤:

[0019] 1) 将呋喃丹半抗原溶于二甲基甲酰胺(DMF)中,加入二环己基碳二亚胺(DCC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS),室温搅拌18-24小时得到A液;

[0020] 其中,呋喃丹半抗原、DMF、DCC和NHS的用量比为20 μ mol:1mL:60 μ mol:60 μ mol;

[0021] 2) 将载体蛋白溶于碳酸盐缓冲液中,得到B液;其中,载体蛋白和碳酸盐缓冲液的用量比为0.4 μ mol:3mL;

[0022] 3) 将上述A液滴加到B液中并于4℃搅拌10-12小时,得到C液;

[0023] 4) 将C液置于透析袋并于磷酸缓冲液中透析,每3小时换液一次,共透析6次,收集透析袋中的溶液,即为免疫原溶液,即所述呋喃丹完全抗原,-20℃保存。

[0024] 所述载体蛋白为牛血清蛋白(BSA)。

[0025] 本发明采用以上技术方案,以呋喃酚为原料,与氯甲酸异丁酯反应生成中间产物,再将中间产物与4-(氨基甲基)苯甲酸在碳酸钾水溶液中反应得到呋喃丹半抗原,将呋喃丹半抗原与载体蛋白偶联得到呋喃丹完全抗原。本发明的呋喃丹半抗原以及呋喃丹完全抗原的制备方法简单易行,制备得到的呋喃丹半抗原、呋喃丹完全抗原,可有效地刺激被免疫动物产生灵敏度高、特异性强的抗体,可应用于食品中呋喃丹的检测。

具体实施方式

[0026] 以下结合具体实施例进一步详细说明本发明。实施例的试剂除特别说明外,都是常规市购实验室用试剂。

[0027] 实施例1

[0028] 一种呋喃丹半抗原的制备方法,包括以下步骤:

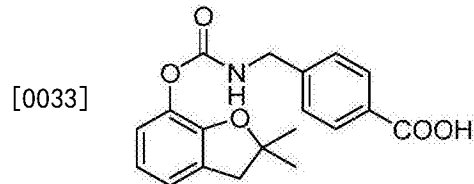
[0029] 1) 将1份呋喃酚溶解在2.5份的二氯甲烷中,先加入氯甲酸异丁酯1.2份,再加入吡啶1.5份吸收生成的氯化氢,反应温度为0℃,反应得混合物A;

[0030] 2) 将上述混合物A加2.5份水淬灭,液-液分层后,取有机相干燥浓缩得一浅黄色液

体,即为2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯;

[0031] 3) 将1份2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯溶于2.5份四氢呋喃中,加入1.5份4-(氨基甲基)苯甲酸和1~4份碳酸钾水溶液,反应温度为0℃,反应得混合物B;

[0032] 4) 将上述混合物B进行液-液分层后,取有机相干燥浓缩得一浅黄色固体,浅黄色固体用1.5份乙醇重结晶得一白色固体,即为所述呋喃丹半抗原,化学名为4-((((2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-基)氧基)羰基)氨基)甲基)苯甲酸,分子结构为:



[0034] 实施例2

[0035] 一种呋喃丹半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0036] 1) 将1份呋喃酚溶解在1份的二氯甲烷中,先加入氯甲酸异丁酯1份,再加入吡啶1份吸收生成的氯化氢,反应温度为-5℃,反应得混合物A;

[0037] 2) 将上述混合物A加1份水淬灭,液-液分层后,取有机相干燥浓缩得一浅黄色液体,即为2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯;

[0038] 3) 将1份2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯溶于1份四氢呋喃中,加入1份4-(氨基甲基)苯甲酸和1份碳酸钾水溶液,反应温度为-5℃,反应得混合物B;

[0039] 4) 将上述混合物B进行液-液分层后,取有机相干燥浓缩得一浅黄色固体,浅黄色固体用1份乙醇重结晶得一白色固体,即为所述呋喃丹半抗原。

[0040] 实施例3

[0041] 一种呋喃丹半抗原的制备方法,包括以下步骤:

[0042] 1) 将1份呋喃酚溶解在4份的二氯甲烷中,先加入氯甲酸异丁酯1.3份,再加入吡啶2份吸收生成的氯化氢,反应温度为5℃,反应得混合物A;

[0043] 2) 将上述混合物A加4份水淬灭,液-液分层后,取有机相干燥浓缩得一浅黄色液体,即为2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯;

[0044] 3) 将1份2,2-二甲基-2,3-二氢苯并呋喃-7-异丁基碳酸酯溶于4份四氢呋喃中,加入2份4-(氨基甲基)苯甲酸和1~4份碳酸钾水溶液,反应温度为5℃,反应得混合物B;

[0045] 4) 将上述混合物B进行液-液分层后,取有机相干燥浓缩得一浅黄色固体,浅黄色固体用2份乙醇重结晶得一白色固体,即为所述呋喃丹半抗原。

[0046] 实施例4

[0047] 以实施例1的呋喃丹半抗原制备呋喃丹完全抗原,包括以下步骤:

[0048] 1) 将20μmol呋喃丹半抗原溶于1mL DMF中,加入60μmol DCC和60μmol NHS,室温搅拌24小时得到A液;

[0049] 2) 将0.4μmol BSA溶于3mL碳酸盐缓冲液中,得到B液;

[0050] 3) 将上述A液滴加到B液中并于4℃搅拌12小时,得到C液;

[0051] 4) 将C液置于透析袋并于磷酸缓冲液中透析,每3小时换液一次,共透析6次,收集透析袋中的溶液,即为免疫原溶液,即所述呋喃丹完全抗原,-20℃保存。

[0052] 实施例5

[0053] 以实施例2的呋喃丹半抗原制备呋喃丹完全抗原,包括以下步骤:

[0054] 1) 将20 μ mol呋喃丹半抗原溶于1mL DMF中,加入60 μ mol DCC和60 μ mol NHS,室温搅拌24小时得到A液;

[0055] 2) 将0.4 μ mol BSA溶于3mL碳酸盐缓冲液中,得到B液;

[0056] 3) 将上述A液滴加到B液中并于4℃搅拌10小时,得到C液;

[0057] 4) 将C液置于透析袋并于磷酸缓冲液中透析,每3小时换液一次,共透析6次,收集透析袋中的溶液,即为免疫原溶液,即所述呋喃丹完全抗原,-20℃保存。

[0058] 实施例6

[0059] 呋喃丹完全抗原的鉴定

[0060] 用实施例4制备的呋喃丹完全抗原免疫Bal b/c小鼠,3免后采集抗血清进行检测,判断所制备的完全抗原是否具有免疫原性。

[0061] 1) 将实施例4制备的呋喃丹完全抗原稀释为2、1、0.5、0.25 μ g/mL后加入酶标板,每孔100 μ L,每个浓度包被6个孔,37℃温育3h后取出,用PBST洗净;

[0062] 2) 取上述采集的的小鼠血清,稀释1000、2000、4000、8000、16000、32000倍,每个抗原浓度孔加一个孔,每孔100 μ L。随后将酶标板置于37℃温育0.5h后取出,用PBST洗净;

[0063] 3) 向酶标孔中加入0.5 μ g/mL的羊抗小鼠抗体,每孔100 μ L,随后将酶标板置于37℃温育0.5h后取出,用PBST洗净;

[0064] 4) 向酶标孔中加入100 μ L的OPD显色液,室温显色15min,读取492nm吸光值;

[0065] 5) 实验结果显示,吸光值随抗原、血清的稀释倍数加大,呈现逐渐下降的规律,小鼠血清效价在16000-32000倍之间。

[0066] 实施例6

[0067] 食品中呋喃丹的检测,包括以下步骤:

[0068] 1) 称取食物(韭菜、马铃薯、红薯等)2g,匀浆,用乙酸乙酯5mL震荡提取30min后,离心取2mL上清,用氮气吹干,加入2mL PBS溶解残渣,即为待测液;

[0069] 2) 将实施例4制备的呋喃丹完全抗原稀释为0.5 μ g/mL后加入酶标板,每孔100 μ L,37℃温育3h后取出,用PBST洗净;

[0070] 3) 向酶标孔中分别加入50 μ L待测液,随后,取实施例5制备的小鼠血清,稀释4000倍,每孔加入50 μ L。随后将酶标板置于37℃温育0.5h后取出,用PBST洗净;

[0071] 4) 向酶标孔中加入0.5 μ g/mL的羊抗小鼠抗体,每孔100 μ L,随后将酶标板置于37℃温育0.5h后取出,用PBST洗净;

[0072] 5) 向酶标孔中加入100 μ L的OPD显色液,室温显色15min,读取492nm吸光值;

[0073] 6) 比较不同样品测定吸光值,样品中呋喃丹残留量越高,吸光值越低;残留量越低,吸光值越高。

专利名称(译)	一种呋喃丹半抗原、完全抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN107759547A	公开(公告)日	2018-03-06
申请号	CN2017111049977.2	申请日	2017-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	福建安欣睿捷生物科技有限公司		
[标]发明人	王保民 陈俊玉 王冕 赵亚杰 谭桂玉 刘伟华		
发明人	王保民 陈俊玉 王冕 赵亚杰 谭桂玉 刘伟华		
IPC分类号	C07D307/86 C07K14/765 C07K1/107 G01N33/535		
CPC分类号	C07D307/86 C07K14/765 C07K19/00 G01N33/535		
代理人(译)	戴雨君		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种呋喃丹半抗原、完全抗原及制备方法和应用，所述呋喃丹半抗原以呋喃酚为原料，与氯甲酸异丁酯反应生成中间产物，再将中间产物与4-(氨基甲基)苯甲酸在碳酸钾水溶液中反应得到呋喃丹半抗原。将呋喃丹半抗原与载体蛋白偶联得到呋喃丹完全抗原。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。本发明的呋喃丹半抗原和抗原可用于呋喃丹免疫分析检测，应用前景十分广阔。

