

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710134500.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 1/10 (2006.01)

C07D 215/233 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月9日

[11] 公开号 CN 101158680A

[22] 申请日 2007.10.31

[21] 申请号 200710134500.4

[71] 申请人 江南大学

地址 214028 江苏省无锡市新区新华路94号  
江南大学国家大学科技园

[72] 发明人 胥传来 李雅丽 王灿辉 唐剑峰  
陈伟 刘丽强 陶冠军 秦昉

[74] 专利代理机构 无锡市大为专利商标事务所

代理人 时旭丹 刘品超

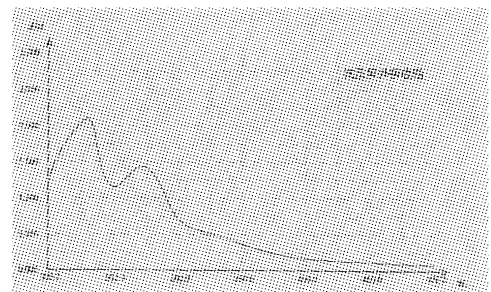
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

[54] 发明名称

一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法

[57] 摘要

一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以诺氟沙星为原料，经过诺氟沙星的衍生化和羧基保护制备半抗原N-2-乙胺-诺氟沙星，再偶联蛋白合成喹诺酮类抗生素多簇抗原N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白。本发明成功合成了喹诺酮类抗生素多簇抗原，合成步骤简洁，经过提纯后处理，纯度可达到99%以上，完全可以用作喹诺酮类多簇酶联免疫试剂盒的应用，为今后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

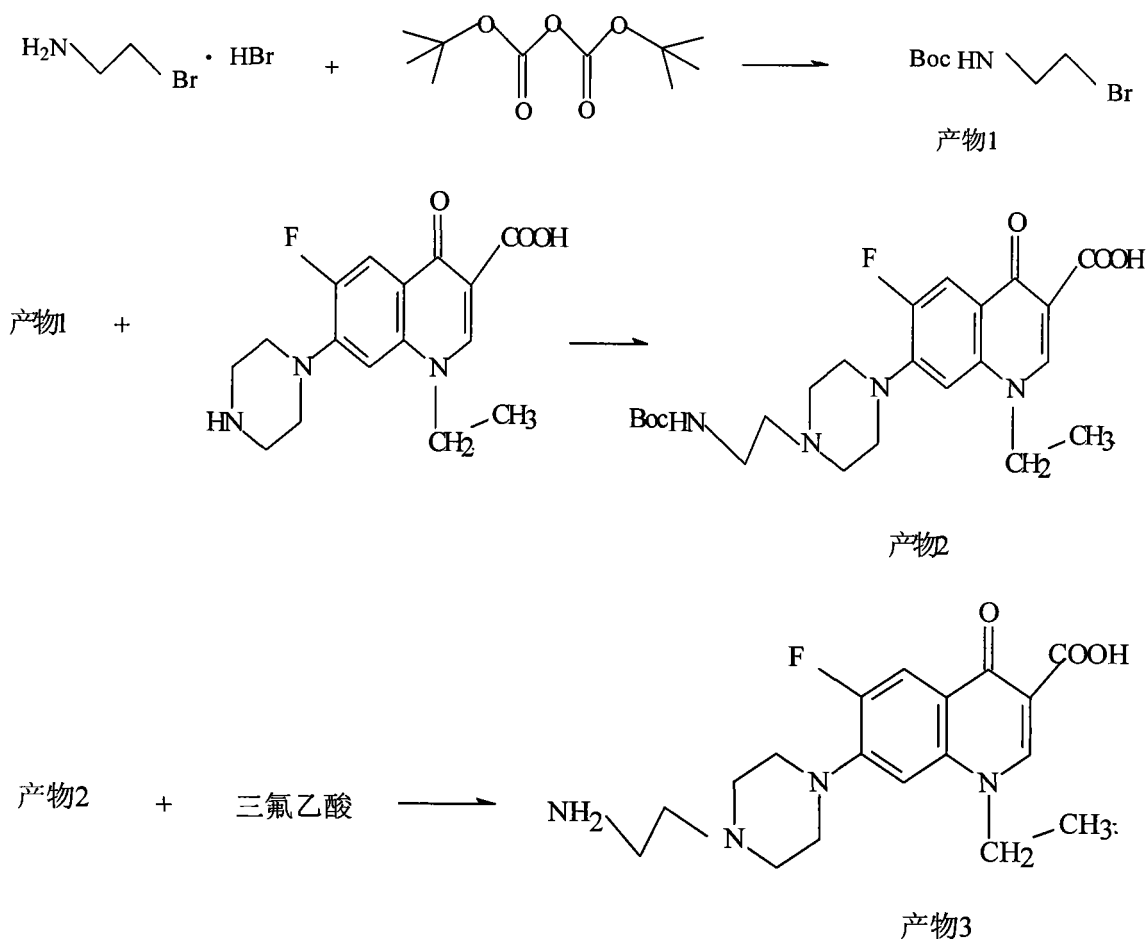


1、一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法，其特征是以诺氟沙星为原料将其衍生化制备半抗原，进而再与牛血清蛋白采用戊二醛法偶联合成抗原；

工艺步骤为：

(1) 人工半抗原的合成

合成路线：



产物 1 的合成：

2-溴乙胺氢溴酸盐和碳酸二叔丁酯  $\text{Boc}_2\text{O}$  反应，配比控制为碳酸二叔丁酯摩尔比过量 20%，以甲醇为反应介质，三乙胺为催化剂，搅拌、加热升温到 60℃，反应 1h，然后室温反应过夜；反应液真空浓缩，残液溶于二氯甲烷，依次用 0.5N 的盐酸、饱和食盐水和饱和的  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗涤，无水硫酸镁干燥，过滤，浓缩，得淡黄色液体产物 1，直接用于下一步反应；

产物 2 的合成：

产物 1 和诺氟沙星反应，控制配比为产物 1 摩尔比过量 20%，以二甲基甲酰胺为反应介质，三乙胺为催化剂，搅拌、加热升温到 80℃，反应过夜，冷至

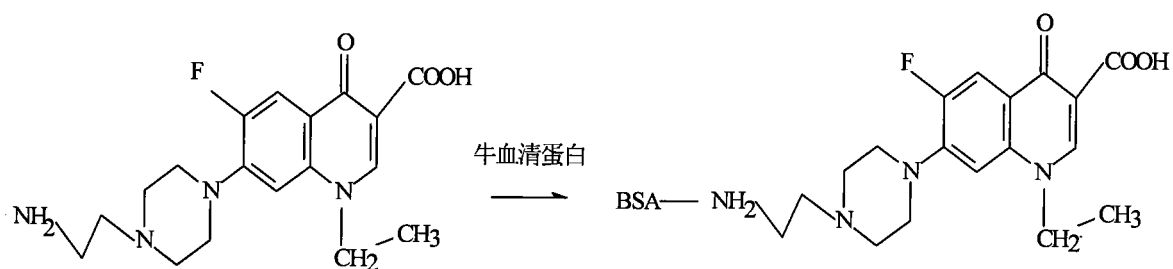
室温，滴加 0.5N 的盐酸控制 pH 6，搅拌使体系重新冷却到室温，过滤，依次用蒸馏水、无水乙醇洗涤滤饼，干燥，得粗产品产物 2，用乙醇重结晶；

产物 3 的合成：

产物 2 和三氟乙酸反应，脱碳酸二叔丁酯基：室温搅拌反应 3 小时，真空浓缩，将残留物溶于乙醇，加入三乙胺，静置，过滤得到的粗品用乙醇和氯仿重结晶提纯，得产物 3 半抗原，命名为 N-2-乙胺-诺氟沙星；

(2) 人工抗原的合成

合成路线：



透析袋的前处理：取 5-10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用；

磷酸盐缓冲溶液的配制：0.2Mol/L 磷酸二氢钠 19mL 和 0.2Mol/L 磷酸氢二钠 81mL 加水至 2000mL 混合即为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液；

偶联蛋白：

取 0.1mmol 的产物 3 溶于 2mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液中，搅拌下缓慢滴加戊二醛溶液，滴加至溶液的戊二醛最终质量浓度为 1.25%，成 A 液；

取 0.002mmol 的牛血清蛋白溶于 10mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中成 B 液；

搅拌条件下将 A 液缓慢滴加到 B 液中，搅拌过夜，磷酸盐缓冲液中透析 5 天，得人工抗原 N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白；

(3) 抗原鉴定：N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白采用紫外扫描测定其偶联比，分别在 262nm、278 nm 处测吸光值，并计算其偶联比。

## 一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法

## 技术领域

一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。

## 背景技术

喹诺酮是一类合成抗生素类药物，英文名称：quinolones (QNS)。在化学上与萘啶酮酸相关，其作用机理是直接作用于细菌的核、抑制细菌的 DNA 旋转酶，使酶不能在 DNA 双链上引入切口，破坏细菌的代谢和繁殖，迅速杀灭细菌。最初这类药物用于治疗尿道感染，现在已发展到治疗系统感染疾病，并且在动物饲养中作为预防和治疗药物普遍使用。近年来，这些药物在动物组织中的残留已引起广泛的注意，我国规定牛、鸡、猪、羊、兔等动物的肌肉、脂肪、肝、肾食品中达氟沙星、二氟沙星、恩诺沙星(环丙沙星与恩诺沙星量之和)、沙拉沙星等喹诺酮类兽药最高残留限量 0.01~1.9mg/kg，欧盟规定在动物肌肉、肝脏和肾脏中达氟沙星、二氟沙星、恩诺沙星(环丙沙星与恩诺沙星量之和)、麻保沙星、沙拉沙星等喹诺酮类兽药最高残留限量 0.01~1.9mg/kg，日本在 2002 年 7 月 1 日对我国产蒲烧鳗鱼实施磺胺类抗生素检测后，又于 2003 年 7 月 1 日起对进口生鳗鱼及其制品进行氧氟沙星、诺氟沙星、环丙沙星、恩诺沙星残留检测，并且将限量控制在方法检测限的 0.05mg/kg。因此，氟喹诺酮类药物残留问题越来越引起人们的重视。为了建立快速检测方法有必要合成一种喹诺酮类抗生素多簇抗原，到目前为止，喹诺酮类抗生素多簇抗原合成方法还未见国内报道。

## 发明内容

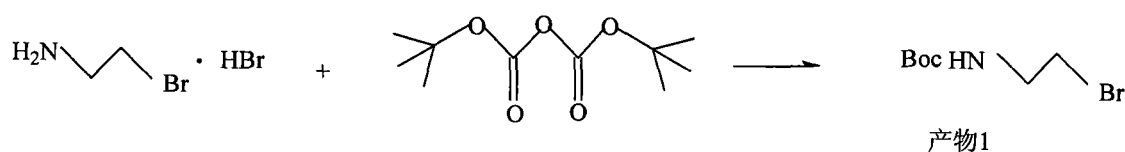
本发明的目的是提供一种喹诺酮类抗生素多簇抗原合成方法，所合成抗原所制备的抗体可对多种喹诺酮类抗生素产生识别，为今后人们的快速检测的研究提供了方便的途径。

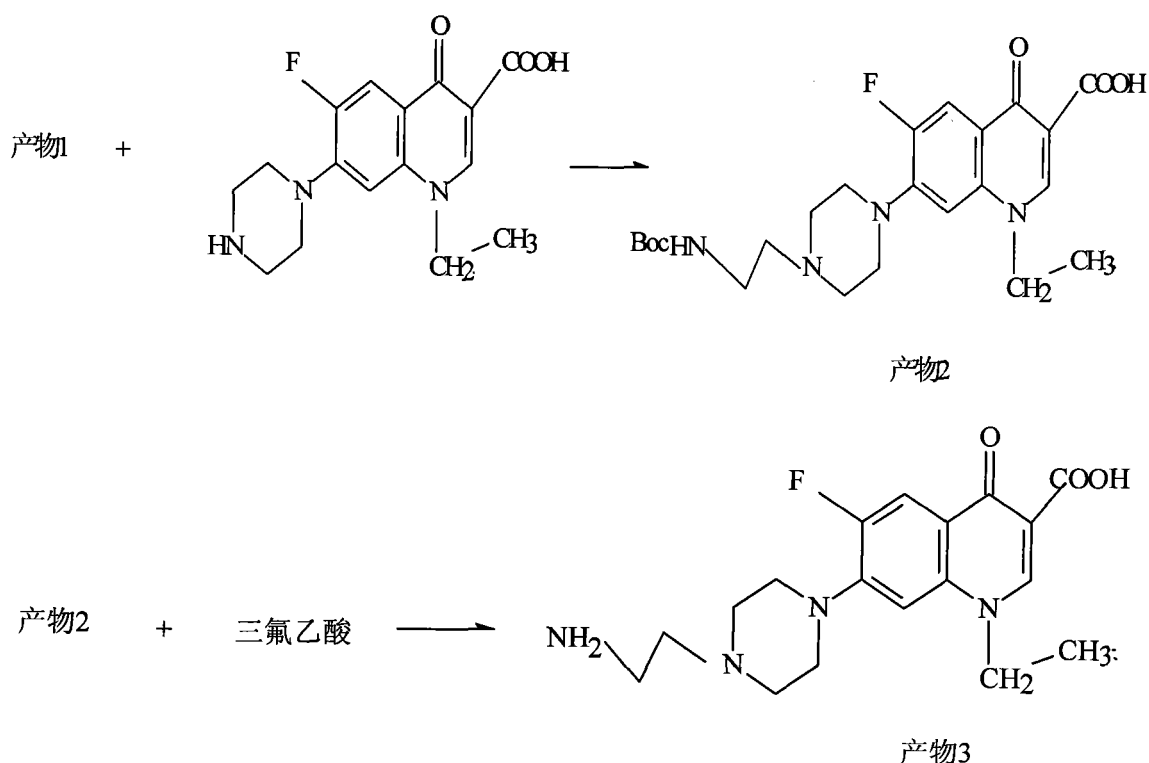
本发明的技术方案：一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法，以诺氟沙星为原料将其衍生化制备半抗原，进而再与牛血清蛋白采用戊二醛法偶联合成抗原；

工艺步骤为：

(1) 人工半抗原的合成

合成路线：





产物1的合成:

2-溴乙胺氢溴酸盐和碳酸二叔丁酯  $\text{Boc}_2\text{O}$  反应, 配比控制为碳酸二叔丁酯摩尔比过量 20%, 以甲醇为反应介质, 三乙胺为催化剂, 搅拌、加热升温到 60 °C, 反应 1h, 然后室温反应过夜; 反应液真空浓缩, 残液溶于二氯甲烷, 依次用 0.5N 的盐酸、饱和食盐水和饱和的  $\text{NaHCO}_3$  溶液洗涤, 无水硫酸镁干燥, 过滤, 浓缩, 得淡黄色液体产物 1, 直接用于下一步反应;

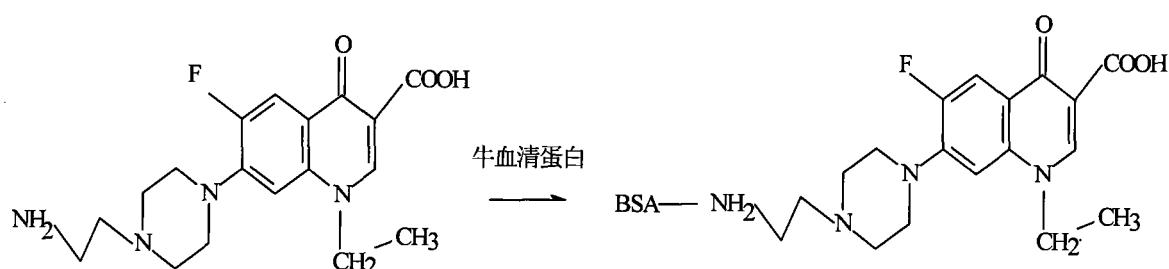
产物2的合成:

产物 1 和诺氟沙星反应, 配比控制为产物 1 摩尔比过量 20%, 以二甲基甲酰胺为反应介质, 三乙胺为催化剂, 搅拌、加热升温到 80 °C, 反应过夜, 冷至室温, 滴加 0.5N 的盐酸控制 pH 至 6, 搅拌使体系重新冷却到室温, 过滤, 依次用蒸馏水、无水乙醇洗涤滤饼, 干燥, 得粗产品产物 2, 用乙醇重结晶;

产物3的合成:

产物 2 和三氟乙酸反应, 脱碳酸二叔丁酯基: 室温搅拌反应 3 小时, 真空浓缩, 将残留物溶于乙醇, 加入三乙胺, 静止, 过滤得到的粗品用乙醇和氯仿重结晶提纯, 得产品 3 半抗原, 命名为 N-2-乙胺-诺氟沙星;

(2) 人工抗原的合成: 合成路线:



透析袋的前处理：取 5-10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用。

磷酸盐缓冲溶液的配制：0.2Mol/L 磷酸二氢钠 19mL，0.2Mol/L 磷酸氢二钠 81mL 加水至 2000mL 混合即为 pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

偶联蛋白：

取 0.1mmol 的产物 3 溶于 2mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中，搅拌下缓慢滴加戊二醛溶液，滴加至使戊二醛的最终质量浓度为 1.25%，成 A 液；

取 0.002mmol 的牛血清蛋白溶于 10mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中成 B 液；

搅拌条件下将 A 液缓慢滴加到 B 液中，搅拌过夜，PBS 透析 5 天，得人工抗原 N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白；

(3) 抗原鉴定：2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白采用紫外扫描测定其偶联比，分别在 262nm、278 nm 处测吸光值，并计算其偶联比。

本发明的有益效果：本发明合成了喹诺酮类抗生素的多簇人工抗原，合成步骤简洁，有效，经过后处理，纯度可达 99% 以上，完全可用于免疫分析中，为今后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

## 附图说明

图 1 半抗原的液相色谱图

图 2 半抗原的质谱正离子图

图 3 半抗原的紫外吸收图

图 4 抗原的紫外吸收图

## 具体实施方式

(1) 人工半抗原的合成

合成过程：

产物 1 的合成：

在一个 1L 的圆底烧瓶中加入 500mL 的甲醇，2-溴乙胺氢溴酸盐 (10g, 49mmol)，三乙胺 (30mL)，碳酸二叔丁酯  $\text{Boc}_2\text{O}$  (13g, 60mmol)，搅拌、加热升温到 60℃，反应 1h，然后室温反应过夜。反应液真空浓缩，残液溶于 500mL 二氯甲烷，依次用 0.5N 的盐酸 (250mLx2)、饱和食盐水 (250mL)、饱和的  $\text{NaHCO}_3$  (250mL) 洗涤，无水硫酸镁干燥，过滤，浓缩，得淡黄色液体产物 1 (收率 63%)，直接用于下一步反应。

产物 2 的合成：

在一个 250ml 的圆底烧瓶中加入诺氟沙星 (5.499g, 17.2mmol), DMF (70mL)，搅拌均匀，加入三乙胺 (4.8mL, 35mmol)，然后加入产物 1 (4.631g, 20.6mmol)，升温至 80℃，反应过夜。反应液冷至室温，滴加 0.5N 的盐酸调 pH 至 6 左右，

搅拌使体系重新冷却到室温，过滤，依次用蒸馏水、无水乙醇洗涤虑饼，干燥，得粗产品产物 2，用乙醇重结晶后，用 H-nmr 检测，结构正确为目标产物。

#### 产物 3 的合成：

在一个 250mL 的圆底烧瓶中加入 50mL 二氯甲烷，3.763g 产物 3，然后加入 35mL 三氟乙酸，室温搅拌反应 3 小时，真空浓缩，将残留物溶于乙醇，加入 1.4mL 的三乙胺，静止，过滤的粗品用乙醇和氯仿重结晶提纯，纯度为 97.61%。

#### (2) 人工抗原的合成。合成过程为：

##### 透析袋的前处理：

取 5-10cm 的透析袋，于沸水中煮沸 5min，再用 60℃ 的去离子水冲洗 3min，保存在 4℃ 去离子水中备用。

##### 磷酸盐缓冲溶液的配制：

磷酸盐缓冲液 (Borate saline buffer): 0.2Mol/L 磷酸二氢钠 19ml 和 0.2Mol/L 磷酸氢二钠 81mL 加水至 2000mL 混合即为 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液。

##### 偶联蛋白

取 0.1mmol 的产物 3 溶于 2mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中，搅拌下缓慢滴加戊二醛溶液，滴加至溶液的戊二醛终浓度为 1.25%，成 A 液。

取 0.002mmol 的牛血清蛋白 (BSA) 溶于 10mL 的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液中成 B 液。

搅拌条件下将 A 液缓慢滴加到 B 液中。搅拌过夜，PBS 透析 5 天。得人工抗原 N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白；

#### (3) 抗原鉴定

摩尔吸收系数  $\epsilon$ ：配制人工半抗原浓度为 0, 10, 20, 30  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 20%乙醇溶液，通过紫外扫描可知人工半抗原的最大吸收波长为 278nm，在 278nm 处测吸光值，每个浓度做平行样。摩尔吸光系数计算为： $\epsilon = \text{吸光值} / \text{摩尔浓度}$ 。

偶联物蛋白浓度测定：配制牛血清蛋白浓度为 0, 40, 60, 80, 100, 120, 160, 200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液 1.5mL，加入 5mL 考马斯亮蓝染色液，立即混匀，30℃ 水浴温热 5 分钟，每个浓度做平行样。、在 595nm 处测吸光值，绘制牛血清蛋白曲线。估算偶联物的蛋白质浓度：蛋白质量/偶联产物的体积，以此来确定稀释比例，让稀释后的浓度在牛血清蛋白曲线以内，稀释过的样品要同牛血清蛋白曲线的测定进行同样测定，经过数据处理可得到偶联产物蛋白浓度。

偶联比测定：配制 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  BSA 的 20%乙醇溶液，将偶联产物用 20%乙醇稀释到 150  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ，在 242nm 处测吸光值，以 20%乙醇为空白，测出的吸光值为  $A_1$ ,  $A_2$ ，则偶联比率  $r$  为： $r = [(A_1 - A_2) / \epsilon] / (150 \times 10^{-3} / 65000)$

其中  $\epsilon$  为摩尔吸光系数 ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}$ )，65000 为 BSA 分子量， $150 \times 10^{-3}$  为 BSA 浓度 ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )。

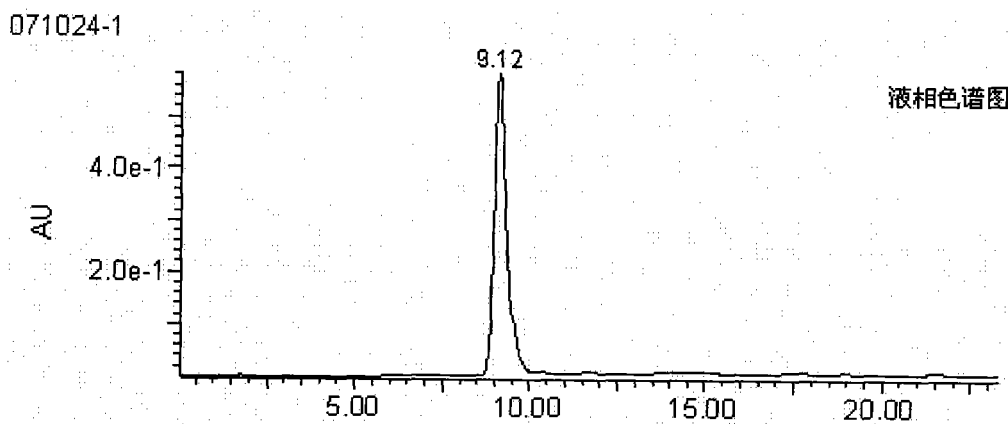


图 1

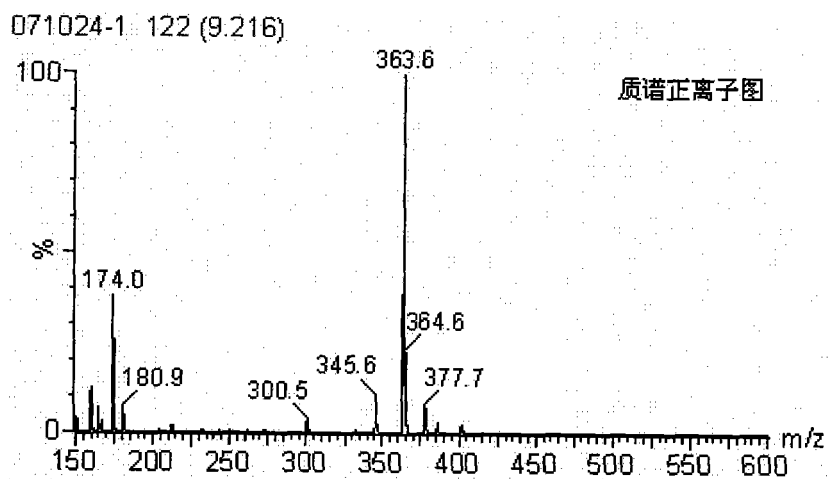


图 2

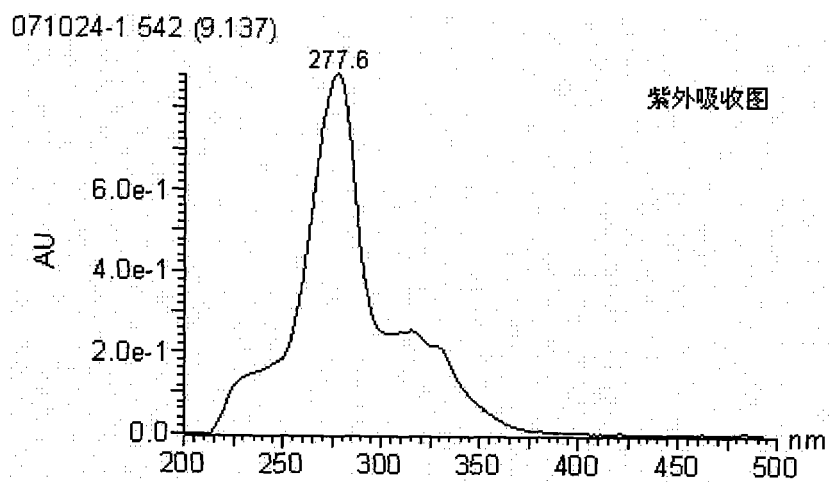


图 3

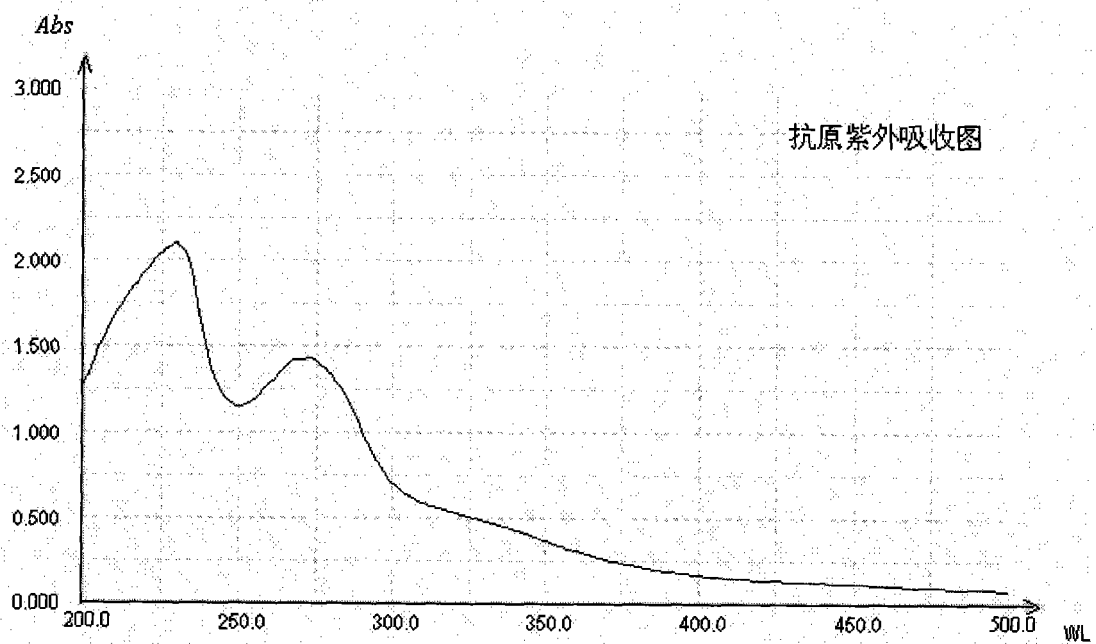


图 4

专利名称(译)	一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101158680A</a>	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN200710134500.4	申请日	2007-10-31
[标]申请(专利权)人(译)	江南大学		
申请(专利权)人(译)	江南大学		
当前申请(专利权)人(译)	江南大学		
[标]发明人	胥传来 李雅丽 王灿辉 唐剑峰 陈伟 刘丽强 陶冠军 秦昉		
发明人	胥传来 李雅丽 王灿辉 唐剑峰 陈伟 刘丽强 陶冠军 秦昉		
IPC分类号	G01N33/53 C07K14/765 C07K11/10 C07D215/233		
其他公开文献	CN101158680B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种喹诺酮类抗生素多簇抗原的合成方法，属于生物化工技术领域。本发明以诺氟沙星为原料，经过诺氟沙星的衍生化和羧基保护制备半抗原N-2-乙胺-诺氟沙星，再偶联蛋白合成喹诺酮类抗生素多簇抗原N-2-乙胺-诺氟沙星-牛血清蛋白。本发明成功合成了喹诺酮类抗生素多簇抗原，合成步骤简洁，经过提纯后处理，纯度可达到99%以上，完全可以用作喹诺酮类多簇酶联免疫试剂盒的应用，为今后人们的研究提供了方便的途径，可以满足国内对其研究的需要。

