

[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 200910085642.5

[51] Int. Cl.

C07D 239/69 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C07K 14/77 (2006.01)

C07K 1/113 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 10 月 28 日

[11] 公开号 CN 101565405A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/566 (2006.01)

[22] 申请日 2009.5.27

[21] 申请号 200910085642.5

[71] 申请人 中国农业大学

地址 100094 北京市海淀区圆明园西路 2 号

[72] 发明人 沈建忠 肖希龙 张素霞 丁双阳

江海洋 王战辉 张 静

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 关 畅 任凤华

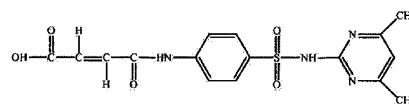
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

[54] 发明名称

磺胺二甲基嘧啶抗原及其制备方法与应用

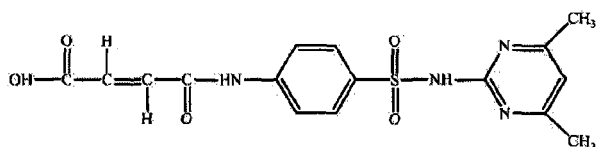
[57] 摘要

本发明公开了一种磺胺二甲基嘧啶抗原及其制备方法与应用。该磺胺二甲基嘧啶抗原是将磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原。磺胺二甲基嘧啶半抗原是一种化合物，其结构为式 I 所示。该磺胺二甲基嘧啶抗原免疫动物可以制备出具有更高亲和力和特异性的抗体。本发明的磺胺二甲基嘧啶抗原可以用于磺胺药物的残留检测。



式 I

1、一种化合物，其结构为式 I 所示。



式 I

2、磺胺二甲基嘧啶抗原，是将权利要求 1 所述的化合物与载体蛋白偶联获得的抗原。

3、根据权利要求 2 所述的磺胺二甲基嘧啶抗原，其特征在于：权利要求 1 所述的化合物与所述载体蛋白以酰胺键偶联。

4、根据权利要求 2 或 3 所述的磺胺二甲基嘧啶抗原，其特征在于：所述载体蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

5、权利要求 1 所述化合物在磺胺药物的残留检测中的应用。

6、权利要求 2 或 3 所述磺胺二甲基嘧啶抗原在磺胺药物的残留检测中的应用。

7、制备权利要求 1 所述化合物的方法，在丙酮或二甲基甲酰胺或二甲基亚砜和无水吡啶混合物中，磺胺二甲基嘧啶与马来酸酐反应，得到的产物用乙酸乙酯萃取，获得所述化合物。

8、根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于：所述丙酮与无水吡啶的体积比为 8：（1-5）。

9、根据权利要求 8 所述的方法，其特征在于：所述磺胺二甲基嘧啶与马来酸酐物质的量的比为 1：（4-6）。

10、制备权利要求 2-4 中任一所述磺胺二甲基嘧啶抗原的方法，是先制备权利要求 1 所述化合物，然后将所述的化合物与载体蛋白偶联获得的抗原。

磺胺二甲基嘧啶抗原及其制备方法与应用

技术领域

本发明涉及磺胺二甲基嘧啶抗原及其制备方法与应用。

背景技术

磺胺二甲基嘧啶 (Sulfamethazine, SM₂)，是一种人工合成的抗菌素，其性质稳定、抑菌谱广、毒性小、口服易吸收且价格低廉，对畜禽疾病控制与治疗起重要作用，是畜牧业上应用最广泛、应用量最大的药物之一。但是由于它在体内的作用时间和代谢时间较长，易残留在动物体内，通过任何途径摄入都有可能在人体中蓄积。药物蓄积浓度超过一定值对人体机能是有害的，长期蓄积则会导致磺胺药抗药性的产生，造成耐药菌的流行性感染，且有潜在的致癌性。因此，联合国食品法典委员会和许多国家规定，食品和饲料中磺胺二甲基嘧啶等磺胺类物质单个均不得超过 100 μg/kg。2002 年 12 月我国农业部公告第 235 号文件规定在所有食品动物的肌肉、脂肪、肝和肾中最高残留限量 100 μg/kg，并将其列为兽药残留监控的重点。

目前，兽药残留检测常用的方法有气相色谱、高效液相色谱以及气质联用等理化分析方法。虽然这些方法特异性强、灵敏度高，但是样品前处理操作步骤繁琐，成本较高，也不适用于大批量样品的筛选检测。免疫化学分析鉴于在抗原抗体的定性定量方面独特的优势和操作简便快速、成本低、灵敏度较高、分析样本量大的优点弥补了理化分析的不足，在磺胺药物的残留检测中起着越来越重要的作用。

影响免疫化学分析质量的根本因素是抗体的特异性与亲和性，这些性质又决定于免疫半抗原分子的结构，因此免疫半抗原的分子设计与合成是产生特异性抗体和建立小分子兽药残留快速检测技术的最基础和最关键的步骤。

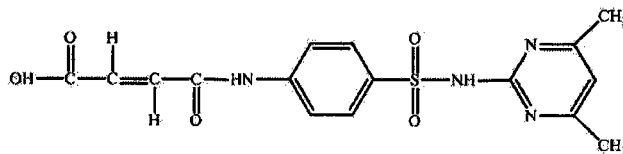
目前磺胺单个药物抗体的制备一般采用重氮化法直接偶联蛋白，或采用戊二醛法与载体蛋白偶联。最近也有报道磺胺二甲基嘧啶先与琥珀酸酐偶联，增加一个四个碳原子的间隔臂，以完全暴露磺胺二甲胺基嘧啶结构。但是含有四个碳原子的间隔臂可以在空间中自由旋转，使连接的磺胺二甲基嘧啶分子有可能被载体蛋白遮蔽，影响动物机体的识别。

发明内容

本发明的目的是提供一种磺胺二甲基嘧啶抗原及其制备方法与应用。

本发明所提供的磺胺二甲基嘧啶抗原，是将磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原。

磺胺二甲基嘧啶半抗原是一种化合物，其结构为式 I 所示。



式 I

磺胺二甲基嘧啶半抗原也属于本发明的保护范围。

其中，磺胺二甲基嘧啶半抗原与所述载体蛋白以酰胺键偶联。所述载体蛋白可以为牛血清白蛋白或卵清蛋白。

磺胺二甲基嘧啶半抗原可以按照如下的方法制备：

在丙酮或 N, N-二甲基甲酰胺（DMF）或二甲基亚砜（DMSO）和无水吡啶混合物中，磺胺二甲基嘧啶与马来酸酐在 60℃ 反应，得到的产物用乙酸乙酯萃取，获得所述化合物。所述丙酮与无水吡啶的体积比为 8：（1-5）。所述磺胺二甲基嘧啶与马来酸酐物质的量的比为 1：（4-6）。

本发明的磺胺二甲基嘧啶半抗原最大程度地保留磺胺二甲基嘧啶的特征结构，同时在磺胺二甲基嘧啶的-NH₂位置，把-NH₂通过化学合成改造成-NH-COCH=CHCOOH，使其具有一定长度的刚性连接臂，又具有与蛋白质偶联的-COOH；而且含有双键的四碳间隔臂，既有利于充分暴露出磺胺二甲基嘧啶，又可以限制间隔臂的随意旋转，从而避免磺胺二甲基嘧啶被载体蛋白遮蔽，影响动物免疫系统的识别。用本发明的磺胺二甲基嘧啶半抗原可合成的磺胺二甲基嘧啶抗原。

本发明的磺胺二甲基嘧啶抗原采用马来酸酐作为磺胺二甲基嘧啶和载体蛋白的间隔臂，马来酸酐分子中含有一个双键，可以大大降低磺胺二甲基嘧啶在空间的自由旋转，提高动物机体识别的几率，从而制备出具有更高亲和力和特异性的抗体。

本发明的磺胺二甲基嘧啶抗原免疫动物，所得抗体的效价、特异性、亲和力都比较好。所得抗体用于 ELISA 方法检测磺胺二甲基嘧啶，最低检测限可达 1.0 ng/mL（1 ppb），检测灵敏度高，与其他磺胺类药物交叉反应率低。

本发明的磺胺二甲基嘧啶半抗原及磺胺二甲基嘧啶抗原的合成方法简单，纯度

和产率高。本发明的磺胺二甲基嘧啶抗原、磺胺二甲基嘧啶半抗原可以用于磺胺药物的残留检测。

附图说明

图 1 为磺胺二甲基嘧啶半抗原负离子质谱图。

图 2 为磺胺二甲基嘧啶抗原的紫外光谱图。

具体实施方式

下述实施例中如无特殊说明所用方法均为常规方法，所用试剂均可从商业途径获得。

实施例 1、制备磺胺二甲基嘧啶半抗原

1) 将 1.0 g 磺胺二甲基嘧啶溶解于 80 mL 丙酮中，加入 10 mL 无水吡啶，混匀致其完全溶解；

2) 将 2.0 g 马来酸酐溶于 20 mL 无水丙酮，与 1) 的到的混合液，60° C 下水浴回流 2 小时，溶液颜色逐渐变红，至反应结束时，反应液颜色变为黑色；

3) 蒸干丙酮和吡啶，获得黑色油状物质，加入 100 mL 5%（质量百分含量）碳酸钠溶液，用 20 mL 二氯甲烷洗涤两遍；

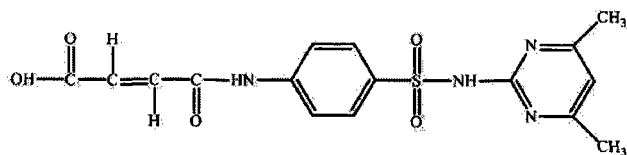
4) 调 pH 值至中性，加入 50 mL 乙酸乙酯提取，弃去水相，减压干燥，获得磺胺二甲基嘧啶半抗原 825 mg，产率为 82.5%。

2. 磺胺二甲基嘧啶半抗原的结构鉴定

所得磺胺二甲基嘧啶半抗原，用质谱确定其结构，质谱检测结果如图 1 所示，其 ESI 分子离子峰为 375 (M-1)。

元素分析（%，计算值）： C, 53.32； H, 4.47； N, 15.55； O, 17.76； S, 8.90。

磺胺二甲基嘧啶半抗原的结构式如式 I 所示：



式 I

实施例 2、制备磺胺二甲基嘧啶抗原

1) 制备磺胺二甲基嘧啶抗原

称取 10 mg 实施例 1 的磺胺二甲基嘧啶半抗原溶解于 5 mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 中, 超声使之完全溶解, 并以冷乙醇冷却; 然后加入 10 mg 的 N,N'-二环己基碳化二亚胺 (DCC) 和 5 mg N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS), 室温反应过夜; 最后逐滴加入牛血清白蛋白或卵清蛋白的碳酸溶液 (50 mg 牛血清白蛋白或卵清蛋白溶解于 5 mL 0.01 M 的碳酸溶液中), 继续搅拌 4 小时; 然后将反应液装入透析袋, 在 4℃ 用生理盐水溶液透析 48 小时, 换水 6 次。将透析液在无菌条件下通过 0.2 μm 的滤膜, 获得磺胺二甲基嘧啶抗原 (SM₂-BSA) 或包被抗原 (SM₂-OVA), 分装于安培瓶中, -20℃ 保存。

2) 磺胺二甲基嘧啶抗原的鉴定

磺胺二甲基嘧啶抗原用 PBS 配成溶液进行紫外 (200-400 nm) 光谱扫描, 以 1 mg/mL 的牛血清白蛋白 (BSA) 作为对照。

紫外 (200-400 nm) 光谱扫描结果见图 2, 磺胺二甲基嘧啶抗原的紫外图谱与 BSA 相比发生了明显变化, 说明磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白 BSA 成功偶联, 经计算实施例 1 的磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白的结合比为 11: 1。

3) 抗原免疫动物及 ELISA 竞争抑制实验

新西兰大白兔 10 只, 随机分成两组, 实验组和对照组, 实验组以 2) 制备的磺胺二甲基嘧啶抗原进行免疫, 对照组以牛血清蛋白 (BSA) 作为抗原进行免疫。每只兔子每次免疫 1 mg/mL (以 BSA 量计), 每两周免疫一次, 共免疫 7 次, 第三次免疫之后 7 天, 耳缘静脉采血, 进行间接竞争 ELISA 分析。

1. 包被: 用包被缓冲液将包被抗原 (SM₂-OVA) 稀释为系列浓度, 每一浓度包被一行, 100 μL /孔, 4℃ 过夜;

2. 洗涤与封闭: 倾去孔内液体, 用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3 分钟。每孔加入 150 μL 封闭液, 37℃ 恒温封闭 1h, 然后洗涤 3 次, 每次 3 分钟;

3. 加样: 将 50 μL 多抗 IgG 与等体积倍比稀释的磺胺二甲嘧啶标准液加到酶标板上反应, 每孔 100 μL , 37℃ 反应 1 小时, 洗涤同步骤 2。然后每孔加入 100 μL HRP-羊抗兔 IgG, 37℃ 反应 1 小时, 洗涤同步骤 2;

4. 显色测定: 每孔加入 TMB 溶液 100 μL , 37℃ 显色 20 min, 然后每孔加入 50 μL 2 mol L⁻¹ H₂SO₄ 以终止反应, 最后用酶标仪测定各孔的 OD_{450nm} 值。

间接竞争 ELISA 结果表明, 第 6 次免疫之后获得了高特异性的抗体, 效价高

达 1: 51200。

建立间接竞争性 ELISA 方法检测磺胺二甲基嘧啶, 经测定最佳包被抗原的浓度为 $0.02 \mu\text{g/ml}$, 抗血清最佳稀释度为 $20000\times$ 。

0ng/ml 、 0.5ng/ml 、 1ng/ml 、 2ng/ml 、 4ng/ml 、 8ng/ml 、 16ng/ml 、 32ng/ml 不同浓度梯度的磺胺二甲基嘧啶标准品溶液进行间接竞争性 ELISA 试验。由 ELISA 方法的标准曲线得出该方法的检测灵敏度高。

结果表明半数抑制量 (IC_{50}) 为 3ng/ml , 最低检测限可达 1.0 ng/mL (1 ppb), 在 0.3 ng/mL – 30ng/ml 范围内, 抑制率与药物浓度的对数值呈显著的线性关系, 相关系数为 $r=0.9924$ 。

选择与磺胺二甲基嘧啶结构类似的6种磺胺类药物测定交叉反应率。通过绘制各种药物的标准曲线分别得到其半数抑制量 (IC_{50})。交叉反应越小, 表明该抗体的特异性越高。

结果表明, 该抗体对磺胺二甲嘧啶 (SM_2)、磺胺甲氧嘧啶 (SM_1)、磺胺间甲氧嘧啶 (SMM)、磺胺嘧啶 (SD)、磺胺喹恶啉 (SQ)、磺胺甲恶唑 (SMZ)、磺胺地索辛 (SDM) 的交叉反应率分别为 100% 、 $<10\%$ 、 $<1\%$ 、 $<1\%$ 、 $<2\%$ 、 $<0.1\%$ 和 $<0.01\%$ 。

建立间接竞争性 ELISA 方法。在倍比稀释的实验组兔血清 (磺胺二甲基嘧啶抗原免疫) 中加入 100 ng/mL 的磺胺二甲嘧啶进行抑制检测, 比较加入磺胺二甲基嘧啶和未加磺胺二甲基嘧啶两者所得 OD 值的差异。

分析结果表明, 与阴性对照 (未加磺胺二甲基嘧啶) 相比, 吸光值明显下降, 随着血清稀释倍数的增加, 吸光值呈明显的递减梯度。说明获得的兔血清能够特异性地识别磺胺二甲基嘧啶。

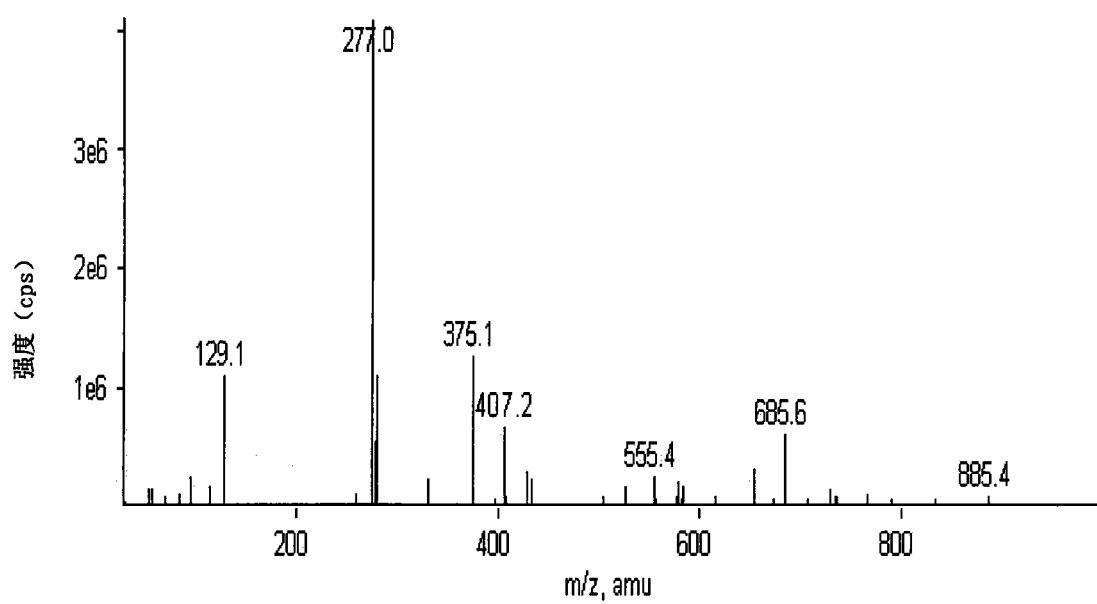


图 1

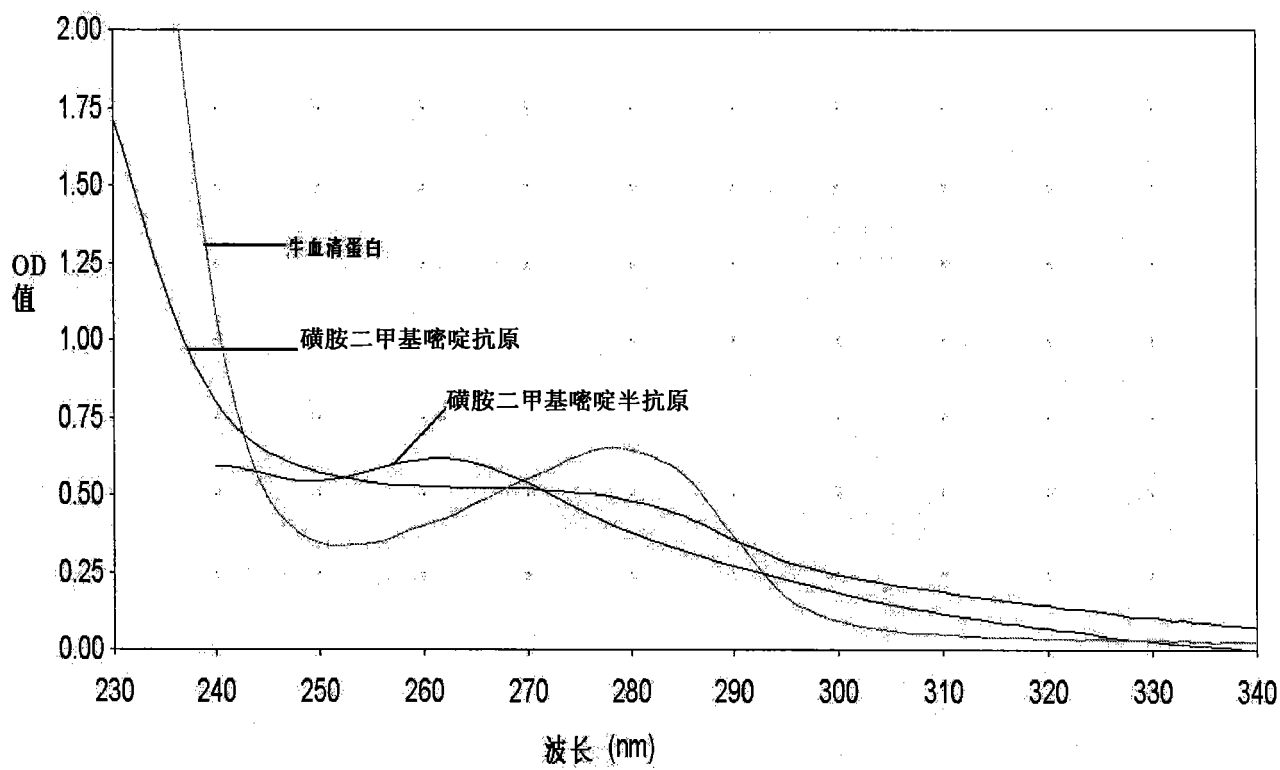
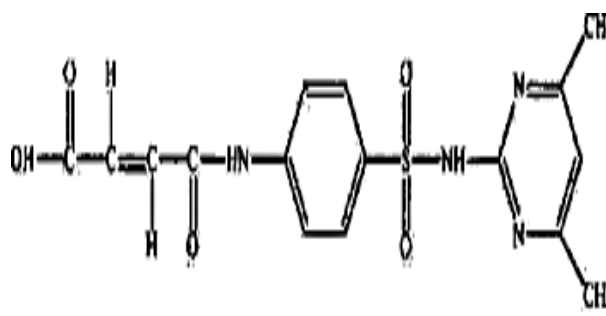


图 2

专利名称(译)	磺胺二甲基嘧啶抗原及其制备方法与应用		
公开(公告)号	CN101565405A	公开(公告)日	2009-10-28
申请号	CN200910085642.5	申请日	2009-05-27
[标]申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国农业大学		
[标]发明人	沈建忠 肖希龙 张素霞 丁双阳 江海洋 王战辉 张静		
发明人	沈建忠 肖希龙 张素霞 丁双阳 江海洋 王战辉 张静		
IPC分类号	C07D239/69 C07K14/765 C07K14/77 C07K11/113 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/566		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN101565405B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种磺胺二甲基嘧啶抗原及其制备方法与应用。该磺胺二甲基嘧啶抗原是将磺胺二甲基嘧啶半抗原与载体蛋白偶联获得的抗原。磺胺二甲基嘧啶半抗原是一种化合物，其结构为式I所示。该磺胺二甲基嘧啶抗原免疫动物可以制备出具有更高亲和力和特异性的抗体。本发明的磺胺二甲基嘧啶抗原可以用于磺胺药物的残留检测。



式I