

磺胺类药物半抗原的合成及结构表征^①

李俊锁^②

(中国农业大学动物医学院)

李喜旺

(河北张家口农业专科学校)

王明安

(中国农业大学基础学院)

摘要 本试验合成了4个模拟磺胺类药物母核结构的半抗原,使用¹HNMR, FABMS和IR对半抗原结构进行了鉴定。产物结构中,4种间隔臂均位于对氨基苯磺酰胺的N¹端(-SO₂NH-),突出了磺胺类药物的共同结构部分,为预期的半抗原。

关键词 磺胺类药物; 半抗原合成

分类号 S859.7; S852.43

Synthesis and Structure Elucidation of Sulfonamide Haptens

Li Junsuo

(College of Veterinary Medicine, CAU)

Li Xiwang

(Hebei Zhangjiakou Agricultural College)

Wang Ming'an

(College of Fundamental Science & Technology, CAU)

Abstract Four sulfonamide haptens were synthesized and identified by ¹HNMR, FABMS and IR. In these structures, the four spacer arms were linked to N¹ section of 4-aminobenzenesulfonamide, and the feature common to sulfonamides was exposed.

Key words sulfonamides; synthesis of haptens

将免疫化学技术与理化分析技术相结合是近年来兽药残留分析的重要发展方向之一,其中最引人注目的是以免疫亲和色谱(immunoaffinity chromatography, IAC)为代表的样本免疫净化技术,亦称抗体介导的净化技术(AMC)。以IAC作为理化测定技术(如HPLC或GC)的样本分离或净化手段,可使残留分析融免疫分析的高选择性和理化分析的快速、灵敏性于一体,避免了单纯免疫测定法(如ELISA或RIA)直接测定样本时信息量少、定量准确性不足,或理化方法选择性差的弊端,使分析过程简化,分析质量亦得到改善。如,动物组织中氯霉素(IAC-HPLC-UV)、甲基睾酮(IAC-GC-MS)、阿维菌素及伊维菌素(IAC-HPLC-UV)残留的测定^[1~4]。

本研究选择磺胺类药物(SAs),其原因一,SAs为目前使用量最大和残留问题最严重的兽药,由此导致的过敏、耐药菌株等问题已引起了广泛关注,特别是近来发现磺胺二甲嘧啶可能有致癌效应^[5];其二,SAs有严格的对氨基苯磺酰胺母核(图1),根据免疫学理论,若合成适宜的模拟SAs母核结构部分的半抗原,并将其N¹端与载体蛋白连接,如制备的抗体(即class-specific antibodies)或IAC可同时对多个SAs残留组分进行净化,且宜于对半抗原和靶化合

收稿日期: 1997-03-24

①国家自然科学基金资助项目 39500112

②李俊锁,北京圆明园西路2号中国农业大学(西校区),100094

物的免疫相关性进行研究。SAs 属低分子量物质,模拟靶化合物化学结构的半抗原的合成是制备抗体、建立 IAC 的关键步骤。拟合成的半抗原(H)及合成路线见图 1。

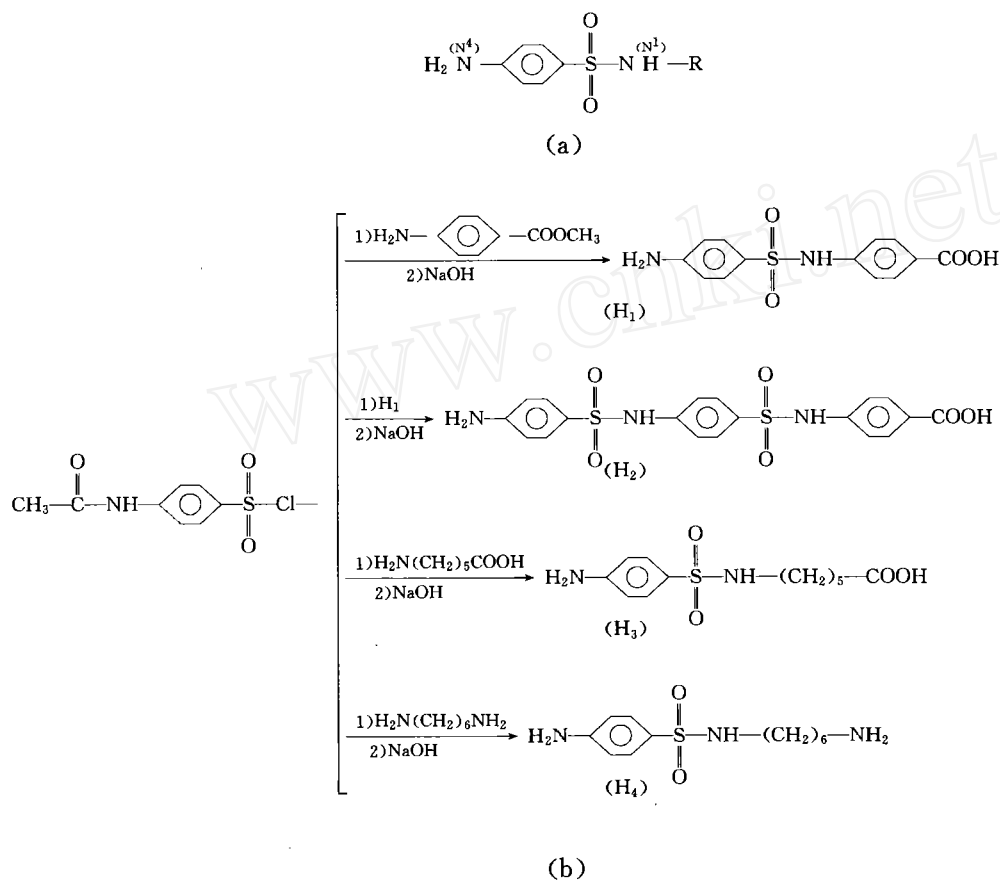


图 1 磺胺类药物的结构(a)和半抗原合成路线(b)


1 实验部分





1.1 仪器和试剂



Kofler 微量熔点测定仪;IR-435 型红外光谱仪;JEOL FX-90Q 型核磁共振仪,¹HNMR 溶剂 DMSO-d₆, 内标 TMS; KYKY-Zhp-5A 型磁质谱仪(FAB 源);薄层层析(TLC)硅胶为 GF₂₅₄(青岛海洋化工厂),展开剂 I 为甲醇-四氢呋喃-氯仿(5:5:90),展开剂 II 为甲醇-四氢呋喃-乙酸-氯仿(15:15:1:119);无水吡啶由市售分析纯试剂加 KOH 回流 1~2 h 后蒸馏制备,保存于粒状 KOH 中备用;其他试剂均为 AR 级。

1.2 半抗原的合成

1.2.1 半抗原 H₁ 的合成 取 9.3 g(0.04 mol)4-乙酰胺基苯磺酰氯置 50 mL 三口鸡心瓶中,在通风橱中,加 10 mL 无水吡啶溶解,机械搅拌下,将 5.0 g(0.033 mol,溶于 10 mL 无水吡啶)4-氨基苯甲酸甲酯逐滴加至反应瓶中,加毕,反应液在油浴上回流 1.5 h 后呈棕红色,冷却至室温,TLC(展开剂 I)监测反应过程。将反应液转移至 500 mL 圆底烧瓶中,加 200 mL

2 mol·L⁻¹ NaOH 溶液,煮沸蒸去吡啶(约需 0.5 h),随时补加适量水,继续回流 2 h,冷却至室温,TLC(展开剂 I)监测反应过程。搅拌下,向反应液中滴加 6 mol·L⁻¹ HCl 至溶液出现混浊(pH4),产物用乙酸乙酯提取(200 mL×1 100 mL×2),收集乙酸乙酯层,减压蒸去溶剂,将残留物真空干燥 72 h,得 9.28 g 白色粉末,m. p. 197~199℃,收率 96.0%。¹HNMR, δ:10.18 (s,1H, COOH),7.70, 7.08(d,4H,AA' BB', J=8.50 Hz, Ar-H), 7.38, 6.50(d,4H, AA' BB', J=8.90 Hz, Ar-H), 6.00(br, s, 2H, NH₂)。N-FABMS, 底物为二乙醇胺(DEA), m/z(%): 292(M⁻,18), 291([M-H]⁻,70), 246([M-H-CO₂H]⁻,6), 156(H₂N  SO₂⁻,25), 136([M-156]⁻,22)。IR(KBr), ν_{max}(cm⁻¹):3 450~3 350(N-H, >N-H), 3 300~3 200(O-H), 1 680(C=O), 1 620, 1 680(Ar), 1 500(Ar), 1 400, 1 320~1 280, 1 240(C-O), 1 155(S=O), 1 090, 920, 830, 780。

1.2.2 半抗原 H₂ 的合成 取 0.18 g(0.77 mmol)4-乙酰胺基苯磺酰氯和 0.10 g(0.34 mmol) H₁,按“1.2.1”中的方法合成 H₂。产物以适量乙酸乙酯溶解后,用制备 TLC(展开剂 I)进行纯化,得 65 mg 淡黄色粉末,m. p. 106~109℃,收率 42.0%。¹HNMR, δ:10.64, 10.53(s,2H, SO₂NH), 7.75, 7.08(d,4H, AA' BB', J=8.50 Hz, Ar-H), 7.64, 7.06(d, 4H, AA' BB', J=8.50 Hz, Ar-H), 7.39, 6.50(d, 4H, AA' BB', J=8.9 Hz, Ar-H), 6.00(br, s, 2H, NH₂)。N-FABMS, 底物 DEA, m/e(%):447(M⁻,40), 446([M-H]⁻,100), 430([M-H-NH₂]⁻,8), 402([M-CO₂H]⁻,10), 311(H₂N  SO₂NH  SO₂⁻,49), 291([M-H₂N  SO₂]⁻,55), 246([M-CO₂H-H₂N  SO₂]⁻,78)。IR(KBr), ν_{max}(cm⁻¹):3 450~3 420(N-H, >N-H), 1 725(C=O), 1 640~1 620(Ar), 1 455(Ar), 1 400,1 290~1 280, 1 240(C-O), 1 170, 1 145(S=O), 900, 827, 768, 740。

1.2.3 半抗原 H₃ 的合成 取 2.0 g(8.6 mmol)4-乙酰胺基苯磺酰氯和 1.4 g(10.7 mmol) 6-氨基己酸,按“1.2.1”中的方法合成 H₃,得 0.52 g 淡黄色粉末,m. p. 126~129℃,收率 21.1%。¹HNMR, δ:11.95(s,1H,COOH), 7.37, 6.58(d,4H, AA' BB', J=8.50 Hz, Ar-H), 5.85 (br, s, 2H, NH₂), 2.66~2.48(m, 2H, SO₂N-CH₂), 2.24~2.07(t, 2H, J=7.2 Hz, CH₂CO₂H),1.56~1.10(br,m, 6H,(CH₂)₃)。N-FABMS, 底物 DEA, m/z(%):286(M⁻,8), 285([M-H]⁻,38), 241([M-CO₂H]⁺,2), 171(H₂N  SO₂NH⁻,8), 156(H₂N  SO₂⁻,15)130([M-156]⁻,12)。IR(KBr), ν_{max}(cm⁻¹):3400, 3320(N-H), 3130(O-H), 2190, 2850(C-H), 1695(C=O), 1630, 1595, 1500(Ar), 1465, 1430, 1410, 1300, 1240(C-O), 1200, 1145(S=O), 1100, 1040, 985, 935, 845,680, 580, 543。

1.2.4 半抗原 H₄ 的合成 取 2.0 g(8.6 mmol)4-乙酰胺基苯磺酰氯和 1.2 g(10.32 mmol) 1,6-己二胺,按“1.2.1”中的方法合成 H₄,得 0.16 g 淡黄色粉末,m. p. 112~115℃,收率 7.0%。¹HNMR, δ:7.35, 6.57(d,4H, AA' BB', J=8.50 Hz, Ar-H) 5.84(br, s, 2H, NH₂), 2.32~2.28(m, 4H, SO₂N-CH₂, CH₂NH₂),1.24~1.16(m, 8H, (CH₂)₄)。P-FABMS, 底物为硝基苄醇(NBA),m/z(%):272([M+H]⁺,60), 270([M-H]⁺,40), 242([M+H-CH₂NH₂]⁺,10), 228([M+H-(CH₂)₂NH₂]⁺,9), 195(20), 173(62)。IR(KBr), ν_{max}(cm⁻¹):3 460~3 250(N-H), 2 900(>C-H) 1 625, 1 560, 1 500(Ar), 1 300, 1 155(S=O), 1 100, 825, 745, 690, 540。

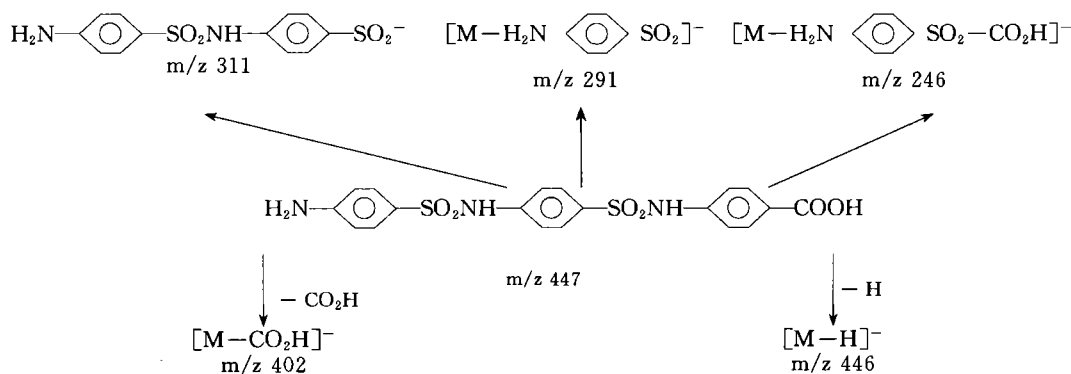
2 结果与讨论

2.1 半抗原合成与结构表征

半抗原 H₁ 的合成主要参考了 Sheth^[6] 的方法, 但本试验省去了中间产物的柱色谱分离步骤, 操作过程大大简化, 且收率 (96.0%) 远高于文献值 (23%)。由于 H₁ 结构中磺酰胺基的存在使芳伯氨基的亲核反应活性降低, 尽管在反应中适当增加了 4-乙酰胺基苯磺酰氯的反应比例, 并延长了反应时间, H₂ 的收率仍不理想 (42.0%)。半抗原 H₃ 和 H₄ 的合成中均使用烷基伯胺, 反应较复杂, 产物收率较低 (7.0%~21.1%)。

半抗原结构中活泼质子较多, 又使用 DMSO-d₆ 作溶剂, 所以活泼质子并未完全出现或包在水峰之中。芳环部分的 ¹HNMR 较为特征: H₃ 和 H₄ 均有一个 AA'BB' 系统, H₁ 有 2 个 AA'BB' 系统, H₂ 有 3 个 AA'BB' 系统。

半抗原 H₄ 的正离子 FABMS 中出现了特征的 [M+H]⁺, [M-H]⁺ 准分子离子峰。H₁, H₂ 和 H₃ 的负离子 FABMS 中除观测到特征的 [M]⁻, [M-H]⁻ 准分子离子峰外, 还出现了特征的碎片离子 [M-CO₂H]⁻ 和互补离子, 如 H₁ 的 m/z 156, 136, H₃ 的 m/z 156, 130 离子。以 H₂ 为例, 其主要裂解途径如下:



2.2 半抗原结构与抗体的制备

合成 SAs 半抗原或人工抗原的传统方法是将 SAs 的芳伯氨基 (N⁴) 重氮化, 然后与载体蛋白质的酪氨酸残基 (酚基) 偶联, 或使用戊二醛将 SAs 与载体直接偶联, 如此制备的抗体 (即 compound-specific antibodies) 主要是针对特定的 SAs N¹ 上 R 取代基^[7,8]。本试验按照产生对各种 SAs (靶化合物) 有最大交叉反应性的抗体这一设计思想合成了上述 4 个半抗原, 基本结构为 N¹ 上连接有间隔臂和活性基团 (-COOH 或 NH₂) 的对氨基苯磺酰胺 (靶化学结构)。由于绝大多数 SAs 的 R 取代基为各种杂环, 所以 H₁ 结构中采用苯环作为间隔臂, 希望能在降低抗体对间隔臂识别的前提下最大程度地模拟靶化合物的立体结构和电子云分布。H₂ 系两个对氨基苯磺酰胺的重叠结构, 以增加半抗原的分子量和针对靶化学结构的抗体的产生。H₃ 和 H₄ 均以 -(CH₂)_n- 做为间隔臂。-(CH₂)_n- 的免疫活性很低, 使用 H₃ 或 H₄ 可望制备出对靶化学结构具有更高选择性、对间隔臂低亲和性的抗体。

参 考 文 献

- 1 Van de Water C, Naagsma N. Determination of chloramphenicol in swine muscle tissue using a monoclonal antibody-mediated clean-up procedure. *J Chromatogr*, 1987, 411:415~421
- 2 Van Ginkel L A, Stephany R W, van Rossum H J, et al. Multi-immunoaffinity chromatography: a simple and high selective clean-up method for multi-anabolic residue analysis of meat. *J Chromatogr*, 1989, 489:111~120
- 3 Li J S, Qian C F. Determination of avermectin B₁ in biological samples by immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography with UV detection. *J AOAC Int*, 1996, 79(5):1 062~1 067
- 4 Li J S, Zhang S Q. Immunoaffinity column clean-up and liquid chromatographic method for determining ivermectin in sheep serum. *J AOAC Int*, 1996, 79(6):1 300~1 302
- 5 Littefield N A, Gaylor D W, Blackwell B N, et al. Chronic toxicity/carcinogenicity studies of sulfamethazine in B₆C₃F₁ mice. *Food Chem Toxicol*, 1989, 27(7):455~464
- 6 Sheth H B, Sporns P. Development of a single ELISA for detection of sulfonamides. *J Agric Food Chem*, 1991, 39:1 696~1 700
- 7 Fleeker J R, Lovett L J. Enzyme immunoassay for screening sulfamethazine residues in swine blood. *J AOAC Int*, 1985, 68(2):172~174
- 8 Dixon-Holland D E, Katz S E. Competitive direct enzyme-linked immunosorbent assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J AOAC Int*, 1988, 71(6):1 137~1 140