



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102757391 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201210271169. 1

(22) 申请日 2012. 08. 01

(73) 专利权人 苏州博源医疗科技有限公司
地址 215163 江苏省苏州市高新区科灵路
78 号

(72) 发明人 虞留明 张曼 田军 蔡江丽

(74) 专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224
代理人 董建林

(51) Int. Cl.

C07D 239/62(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

C07K 16/44(2006. 01)

G01N 21/31(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 35/00(2006. 01)

(56) 对比文件

JP 55-112568 A, 1980. 08. 30, 说明书第 1-4 页.

JP 58-88367 A, 1983. 05. 26, 说明书第 1-5 页.

Hisashi Suzuki, et al.. Active-site characteristics of CYP2C19 and CYP2C9 probed with hydantoin and barbiturate inhibitors. 《Archives of Biochemistry and Biophysics》. 2004, 第 429 卷第 1-15 页.

审查员 冯清伟

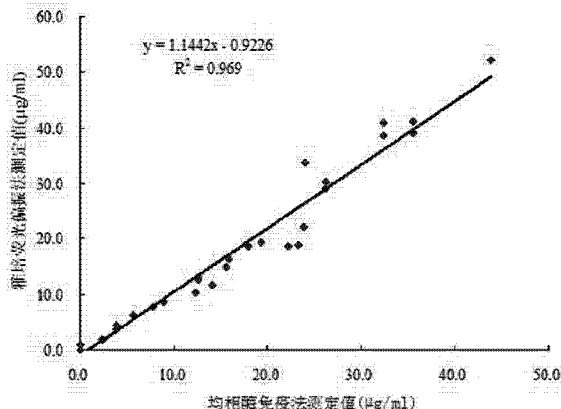
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

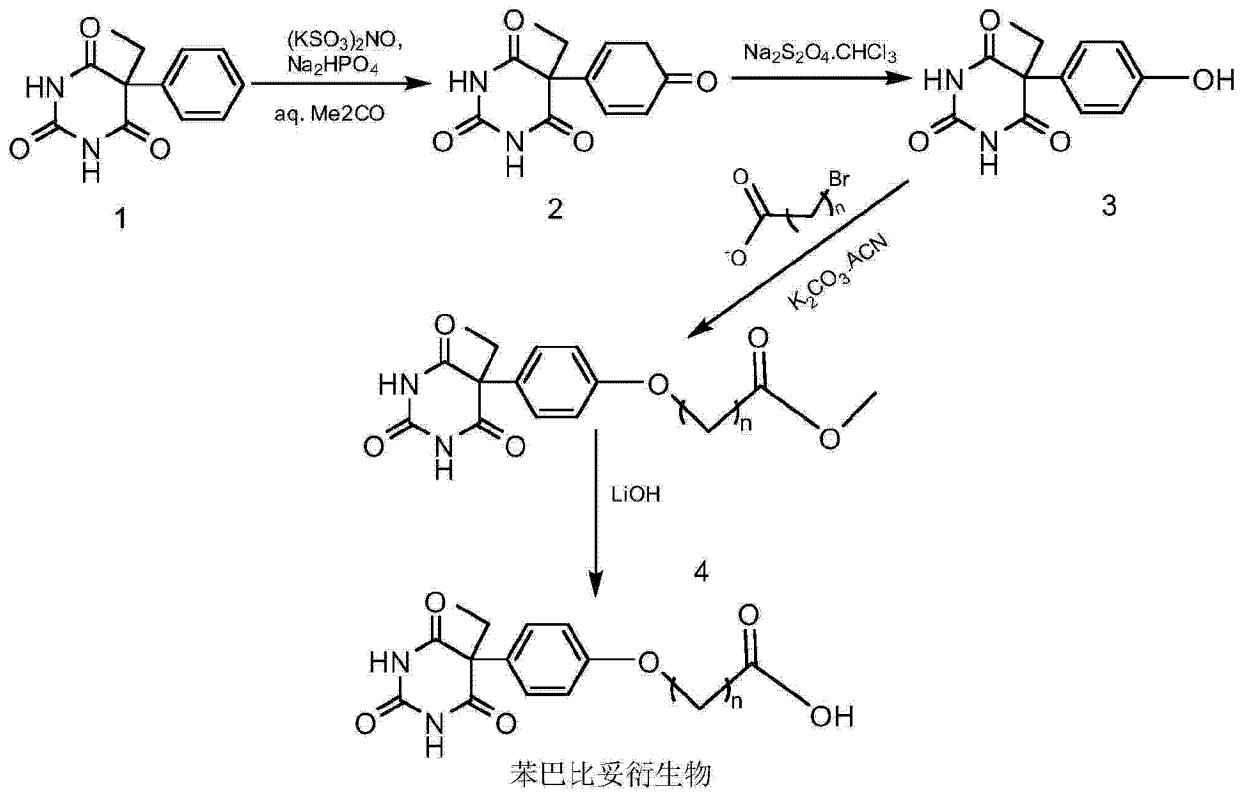
一种苯巴比妥衍生物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种苯巴比妥衍生物及其制备方法, 以及由该衍生物直接获得的苯巴比妥免疫原、间接获得的苯巴比妥特异性抗体, 和含有上述特异性抗体的检测试剂。本发明的有益之处在于: 使用了一种新型的苯巴比妥衍生物, 新的衍生物保留了苯巴比妥的各主要功能基团, 具有更好的识别和区分非特异性药物的性能; 由该新的苯巴比妥衍生物制备了特异性更高的苯巴比妥免疫原和抗苯巴比妥抗体, 与常见 45 种药物无任何交叉反应; 本发明的苯巴比妥检测试剂可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品, 实现苯巴比妥的高通量快速化测定, 准确度高, 特异性强, 精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高, 同时实现了检测过程的全自动化。

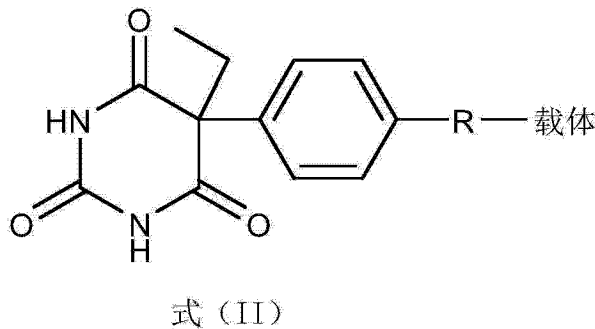


1. 一种合成苯巴比妥衍生物的方法,其特征在于,合成路径如下:



, n 为 1 至 20 之间的整数。

2. 一种苯巴比妥免疫原的合成方法,其特征在于,采用权利要求 1 所述方法合成苯巴比妥衍生物,然后将该衍生物与具有免疫原性的载体连接形成苯巴比妥免疫原,结构式如式 (II) 所示:



上述 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO-$, n 为 1 至 20 之间的整数。

3. 根据权利要求 2 所述的苯巴比妥免疫原的合成方法,其特征在于,上述载体为具有免疫原性的蛋白质。

4. 根据权利要求 3 所述的苯巴比妥免疫原的合成方法,其特征在于,上述载体为牛血清白蛋白。

5. 根据权利要求 2 所述的苯巴比妥免疫原的合成方法,其特征在于,上述 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO-$, n 为 1 至 20 之间的整数。

6. 根据权利要求 5 所述的苯巴比妥免疫原的合成方法,其特征在于,上述 R 为 $-O-(CH_2)_4-COO-$ 。

7. 一种抗苯巴比妥特异性抗体的合成方法,其特征在于,按照权利要求 2 所述的方法合成苯巴比妥免疫原,再用该苯巴比妥免疫原免疫动物后生产得到抗苯巴比妥特异性抗体。

8. 根据权利要求 7 所述的抗苯巴比妥特异性抗体的合成方法,其特征在于,上述 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO-$, n 为 1 至 20 之间的整数;上述载体为具有免疫原性的蛋白质。

9. 根据权利要求 8 所述的抗苯巴比妥特异性抗体的合成方法,其特征在于,上述 R 为 $-O-(CH_2)_4-COO-$;上述载体为牛血清白蛋白。

一种苯巴比妥衍生物及其制备方法和应用

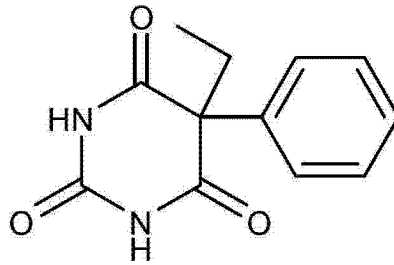
技术领域

[0001] 本发明涉及一种苯巴比妥衍生物及其制备方法,以及该衍生物在制备苯巴比妥免疫原、抗苯巴比妥特异性抗体、苯巴比妥检测试剂上的应用。

背景技术

[0002] 苯巴比妥 (Phenobarbital) 结构式如式(III)所示:

[0003]



[0004] 式(III)

[0005] 苯巴比妥又称为鲁米那,用于镇静和催眠的药物,适用于治疗神经过度兴奋引起的失眠症,同时具有抗惊厥、抗癫痫和麻醉前给药等作用。但由于其有效治疗浓度范围较窄,浓度较低时达不到治疗效果,而过量用药后又会导致头痛、乏力、精神不振甚至昏迷、严重的呼吸和心血管抑制、低血压和休克继而引发肾功能衰竭、死亡等严重毒副作用。因此,在治疗过程中进行药物浓度监测是非常必要的。

[0006] 目前,苯巴比妥进行药物浓度监测的方法主要有高效液相色谱法,放免法和荧光偏振法。高效液相色谱法耗用时间长,样品前处理和操作过程及其复杂,对检测人员技术水平要求高;放免法的放射性射线对操作人员的健康产生了极大的危害,目前国际上已很少使用;荧光偏振法需要的试剂主要依赖进口且费用极其昂贵,同时需要购置价格昂贵的分析仪器。

[0007] 均相酶免疫检测法,以其检测速度快、操作简单、灵敏度高、特异性强且可以在全自动生化分析仪上实现对监测药物的高通量快速化检测的优点,开始得到越来越多的关注。

[0008] 运用均相酶免疫检测法对苯巴比妥进行药物浓度监测的原理是:样本中的苯巴比妥可以与苯巴比妥酶标偶联物竞争性结合抗苯巴比妥特异性抗体,整个反应发生于一个液相均相体系中,无需通过固相分离。样本中苯巴比妥越多,竞争结合的抗体越多,抗体释放出的苯巴比妥酶标偶联物也就越多,通过酶标偶联物与底物反应得到的信号也就越强,利用 OD_{340} 吸光值的变化即可计算出样品中苯巴比妥的含量。所以,能否提供一种结合苯巴比妥能力强的抗苯巴比妥特异性抗体是提高均相酶免疫检测法检测苯巴比妥含量的灵敏度的关键。

发明内容

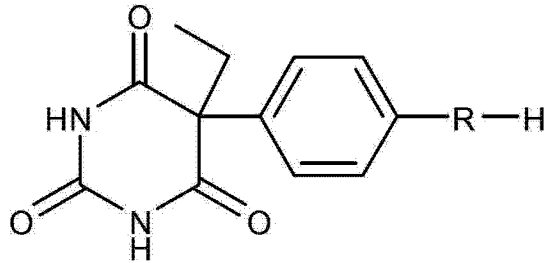
[0009] 本发明的目的在于提供一种苯巴比妥衍生物,由该衍生物制备特异性更高的苯巴

比妥免疫原和抗苯巴比妥特异性抗体,用于更好的识别和区分非特异性药物,并将该特异性更高的苯巴比妥免疫原和抗苯巴比妥特异性抗体应用到检测苯巴比妥的检测试剂中。

[0010] 为了实现上述目标,本发明采用如下的技术方案:

[0011] 一种苯巴比妥衍生物,其特征在于,结构式如式(I)所示:

[0012]



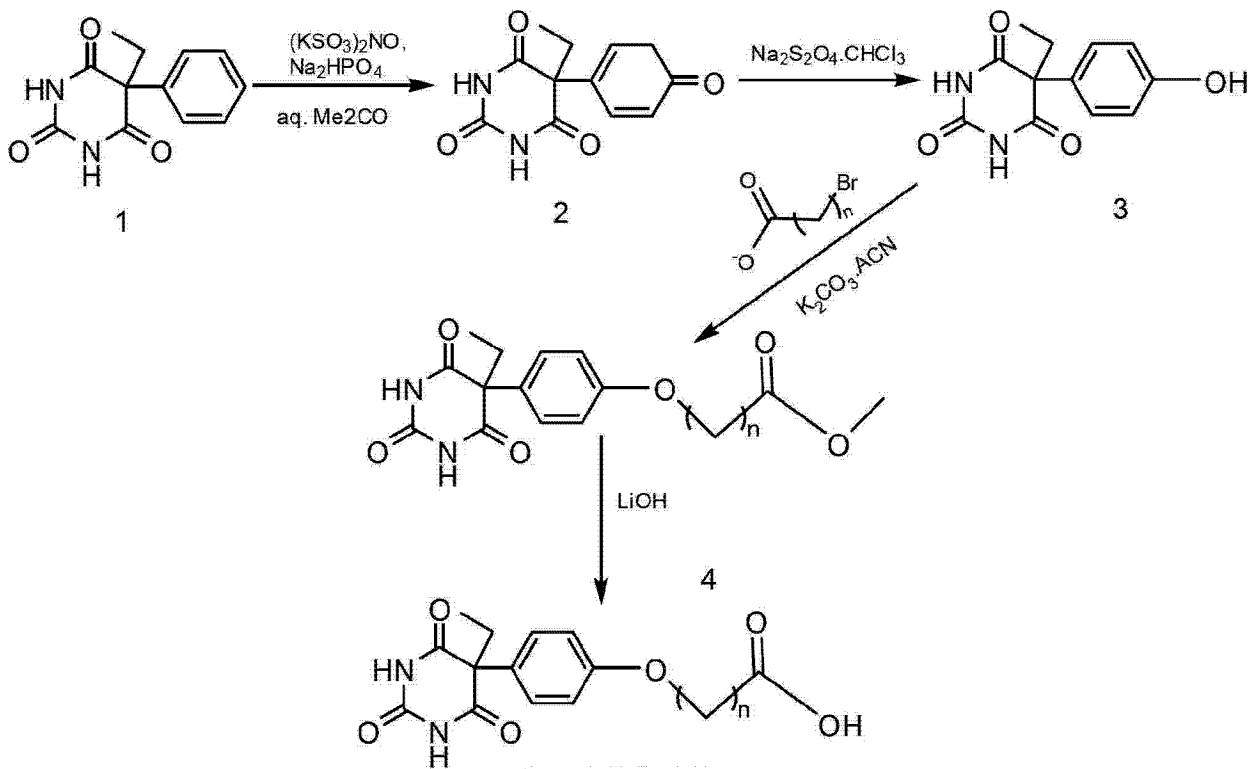
[0013] 式(I)

[0014] 前述R为 $-O-(CH_2)_n-COO-$,或 $-S-(CH_2)_n-COO-$,或 $-NH-(CH_2)_n-COO-$,n为1至20之间的整数。

[0015] 前述的苯巴比妥衍生物,其特征在于,前述R为 $-O-(CH_2)_n-COO-$,n为1至20之间的整数,优选的,前述R为 $-O-(CH_2)_4-COO-$ 。

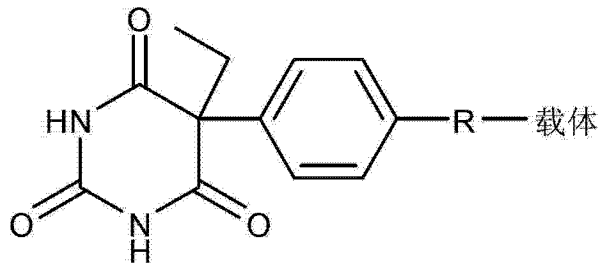
[0016] 合成前述苯巴比妥衍生物的方法,其特征在于,合成路径如下:

[0017]



[0018] 一种苯巴比妥免疫原,其特征在于,由前述的苯巴比妥衍生物与具有免疫原性的载体连接形成,其结构式如式(II)所示:

[0019]



[0020] 式(II)

[0021] 前述的苯巴比妥免疫原,其特征在于,前述载体为具有免疫原性的蛋白质,

[0022] 优选的,前述载体为牛血清白蛋白。

[0023] 前述的苯巴比妥免疫原,其特征在于,前述 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO-$, n 为 1 至 20 之间的整数,优选的,前述 R 为 $-O-(CH_2)_4-COO-$ 。

[0024] 一种抗苯巴比妥特异性抗体,其特征在于,由前述的苯巴比妥衍生物与具有免疫原性的载体连接形成苯巴比妥免疫原,再用前述苯巴比妥免疫原免疫动物后生产得到。

[0025] 前述的抗苯巴比妥特异性抗体,其特征在于,前述 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO-$, n 为 1 至 20 之间的整数,优选的,前述 R 为 $-O-(CH_2)_4-COO-$;前述载体为具有免疫原性的蛋白质,优选的,前述载体为牛血清白蛋白。

[0026] 一种苯巴比妥检测试剂,其特征在于,包括:前述的抗苯巴比妥特异性抗体,用于检测前述抗苯巴比妥特异性抗体与苯巴比妥所形成的复合物的指示试剂;前述指示试剂选自酶试剂、放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。

[0027] 前述的苯巴比妥检测试剂,其特征在于,前述指示试剂选自酶试剂,前述酶试剂包括:酶标偶联物,酶的底物;前述酶标偶联物为前述的苯巴比妥衍生物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶偶联形成的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物;前述酶的底物为葡萄糖-6-磷酸。

[0028] 本发明的有益之处在于:使用了一种新型的苯巴比妥衍生物,新的衍生物保留了苯巴比妥的各主要功能基团,具有更好的识别和区分非特异性药物的性能;由该新的苯巴比妥衍生物制备了特异性更高的苯巴比妥免疫原和抗苯巴比妥抗体,与常见 45 种药物无任何交叉反应;本发明的苯巴比妥检测试剂可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品,实现苯巴比妥的高通量快速化测定,准确度高,特异性强,精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高,同时实现了检测过程的全自动化。

附图说明

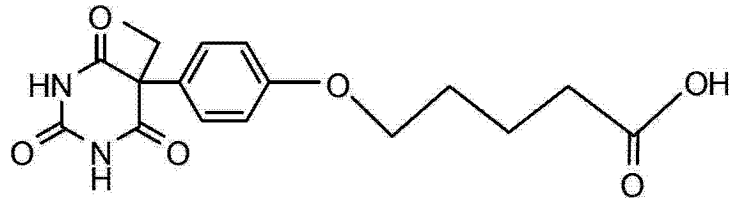
[0029] 图 1 是苯巴比妥均相酶免疫反应标准曲线图;

[0030] 图 2 是苯巴比妥均相酶免疫相关性分析图。

具体实施方式

[0031] 以下结合具体实施例对本发明做具体的说明,实施例中仅详细介绍结构式如式(IV)所示的苯巴比妥衍生物:

[0032]



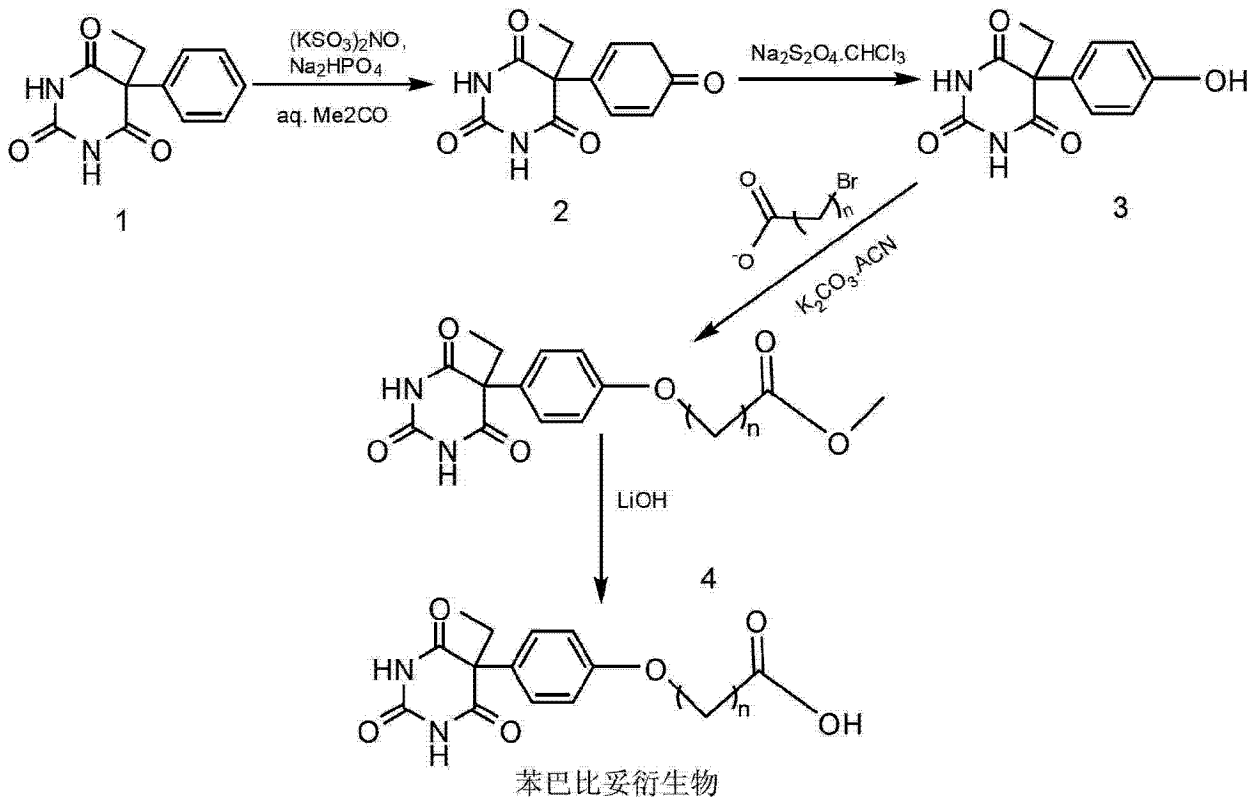
[0033] 式(IV)

[0034] 的制备方法,以及利用该苯巴比妥衍生物制备苯巴比妥免疫原、抗苯巴比妥特异性抗体和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的方法。而式(IV)所示的苯巴比妥衍生物的类似物的制备方法,因与本实施例的制备方法相同,在此不再赘述;利用式(IV)所示的苯巴比妥衍生物的类似物制备苯巴比妥免疫原、抗苯巴比妥特异性抗体和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的方法,因与本实施例的制备方法相同,在此也不再赘述。

[0035] 实施例一:苯巴比妥衍生物的合成及其结构确认

[0036] 式(IV)所示的苯巴比妥衍生物的合成路线如下:

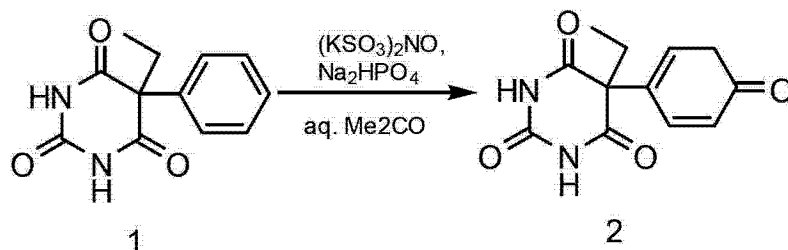
[0037]



[0038] 具体的合成步骤如下:

[0039] 1、化合物 2 的合成

[0040]



[0041] 1)准确称取 2.5g (9.32mmol)的亚硝基二硫酸钾 $(\text{KSO}_3)_2\text{NO}$,即弗里米盐 Fremy's

salt, 和 1.8g (12.70mmol) 磷酸氢二钠 Na_2HPO_4 , 共同放入烧杯 A 中, 加入 95ml 双蒸水溶解, 调节 pH 至 7.22;

[0042] 2) 准确称取 2.96g (12.76mmol) 化合物 1 苯巴比妥 (购买于 Sigma), 放入烧杯 B 中, 加入 60ml 丙酮溶解;

[0043] 3) 将烧杯 A 和烧杯 B 中的溶液混合, 剧烈搅拌, 得到紫色溶液;

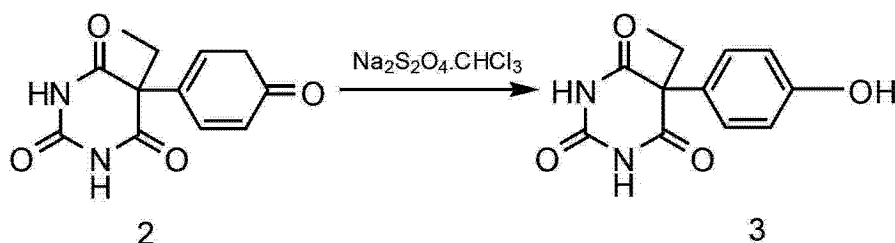
[0044] 4) 将上述紫色溶液加入到丙酮溶液中, 持续搅拌 10 分钟, 过滤, 并置于冰箱中过夜;

[0045] 5) 将上述过夜的溶液经氩气旋转蒸发仪浓缩, 用 500ml 乙醚进行萃取, 收集下层有机层, 萃取完毕后, 将有机相溶剂蒸发;

[0046] 6) 将蒸发残留物用键合硅胶柱进行快速柱层析纯化, 洗脱剂为 4:1 比例混合的己烷 (Hexane) 和氯化四乙铵 (Tetraethoxypropane, TEAC) 溶液, 最后经乙醚 (Diethyl ether, Et_2O) 重结晶并干燥得到 0.12g 化合物 2, 收率为 21%。

[0047] 2、化合物 3 的合成

[0048]



[0049] 1) 准确称取 1.43g (5.8mmol) 化合物 2, 溶解于 50ml CHCl_3 溶液, 将其置于分液漏斗中;

[0050] 2) 准确称取 2.5g (14.3mmol) 连二亚硫酸钠 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, 溶于 20ml 水中制成溶液;

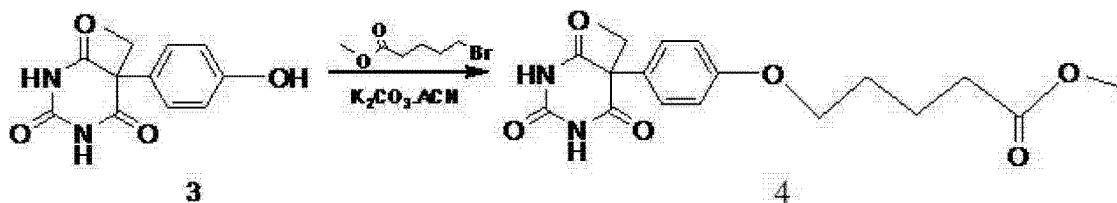
[0051] 3) 在上述分液漏斗中加入上述 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 溶液, 轻轻振荡至有机溶液层的颜色由红色变为黄色, 并静置分层;

[0052] 4) 保留有机溶液层, 有机溶液再用 Na_2SO_4 进行吸水干燥, 通过旋转蒸馏的方法将溶剂蒸发。

[0053] 5) 溶剂蒸发后的残留物进行重结晶并干燥得到 1.1g 淡黄绿色晶体, 即化合物 3, 收率为 92%。

[0054] 3、化合物 4 的合成

[0055]



[0056] 1) 准确称取 1.0g (4.0mmol) 的化合物 3, 加入到 30ml 的丙烯腈 (Acrylonitrile, ACN) 中, 向该溶液中加入 1.38g (10.0mmol) 碳酸钾 K_2CO_3 和 1.16g (6.0mmol) 5-溴正戊酸甲酯 $\text{Br}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOCH}_3$, 室温下搅拌过夜;

[0057] 2) 溶液经真空抽滤方法浓缩, 再用乙酸乙酯 (Acetoacetate, EtOAc) 萃取分离;

[0058] 3) 得到的有机相加入 Na_2SO_4 进行干燥, 再经抽真空过滤;

[0059] 4) 粗提化合物用硅胶键合柱进行快速层析纯化,洗脱剂为按体积比 1:3 比例混合的丙烯酸乙酯和聚乙烯溶液,最后干燥得到 1.1g 白色固体化合物 4,产率为 76%。

[0060] 类似地,当采用 5-溴正戊酸甲酯 $\text{Br}-(\text{CH}_2)_4-\text{COOCH}_3$ 的类似物:直链的、通式为 $\text{Br}-(\text{CH}_2)_n-\text{COOCH}_3$ 的化合物参加反应时,通过改变 n 的数值,可以得到化合物 4 的类似物,在此,5-溴正戊酸甲酯及其类似物均记为化合物 A。n 取不同值时,添加的化合物 A 的质量与对应的化合物 4 的收率关系见表 1。

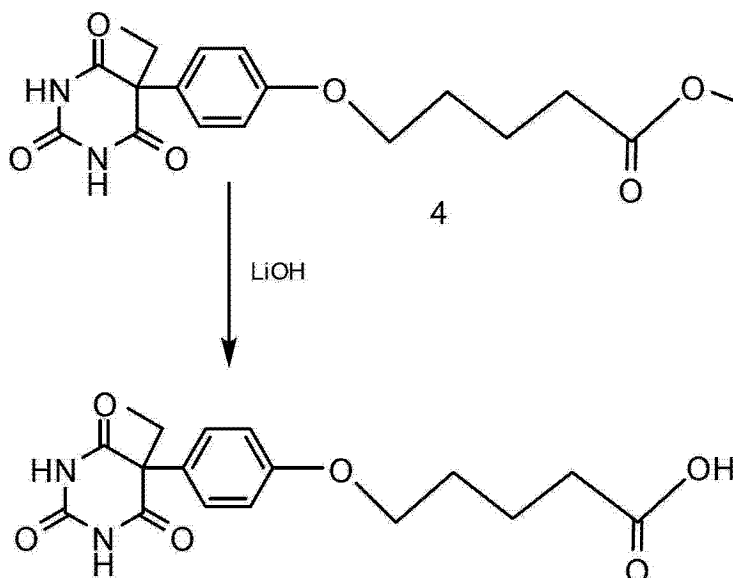
[0061] 表 1 化合物 A 的质量与化合物 4 的收率对应关系

[0062]

n 取值	1	4	10	20
化合物 1 质量 (g)	2.96	2.96	2.96	2.96
化合物 2 收率	21%	21%	21%	21%
化合物 2 质量 (g)	1.43	1.43	1.43	1.43
化合物 3 收率	92%	92%	92%	92%
化合物 3 质量 (g)	1.00	1.00	1.00	1.00
化合物 A 质量 (g)	0.86	1.16	1.66	2.51
化合物 4 收率	83%	76%	72%	68%

[0063] 4、苯巴比妥衍生物的合成

[0064]



[0065] 1) 称取 1.1g (3.0mmol) 上述化合物 4 至 20ml 四氢呋喃(Tetrahydrofuran, THF) 中溶解;

[0066] 2) 再称取 0.48g (11.8mmol) 的含结晶水的氢氧化锂 $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 至 10ml 蒸馏水中溶解;

[0067] 3) 将上述两种溶液混合,于 50℃下搅拌 6 小时后,TLC 显示水解作用完成;

[0068] 4) 将该混合溶液浓缩并酸化至水层 pH 值等于 3,经过滤将固液分离;

[0069] 5) 将白色固体经甲醇(Methanol,MeOH)重结晶后干燥得到 230mg 终产物:苯巴比妥衍生物,产率为 48%。

[0070] 类似地,当采用化合物 4 的类似物 $C_{12}H_{11}N_2O_3-O-(CH_2)_n-COO^-$ 参加反应时,通过改变 n 的数值,可以得到式(IV)所示物质的类似物,该类似物与式(IV)所示物质的不同之处仅在于 $-CH_2-$ 的个数 n 的不同,在此,化合物 4 及其类似物均计做化合物 B。添加的化合物 B 的质量与苯巴比妥衍生物的收率对应关系见表 2。

[0071] 表 2 不同 n 值时化合物 B 的质量与苯巴比妥衍生物的收率对应关系

n 取值	1	4	10	20
化合物 B 的质量	0.9g	1.1g	1.5g	2.1g
[0072] 苯巴比妥衍生物的质量	240mg	230mg	225mg	210mg
苯巴比妥衍生物的收率	56%	48%	43%	39%

[0073] 5、对上述终产物进行结构鉴定

[0074] 1、利用 Bruker Avance III plus400MHz 对上述终产物进行核磁共振光谱扫描,采用 TMS 作为内标。结果如下:¹H NMR(DMSO-d₆, 400MHz):12.04(s, 1H), 7.37-7.45(m, 3H), 7.29-7.35(m, 2H), 5.53(s, 1H), 3.98(t, 2H, J=6.4Hz), 2.68(t, 2H, J=7.2Hz), 1.73-1.85(m, 4H);表征为式(IV)所示的苯巴比妥衍生物。

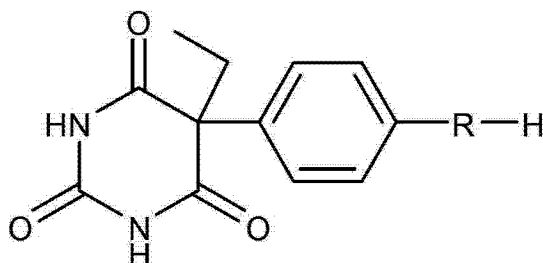
[0075] 2、利用色谱/质谱技术(LC/MS)对得到的终产物进行分析鉴定,采用安捷伦公司的串联四级杆质谱仪 LC/MSD1200 系列,离子源采用正离子或负离子化模式。色谱柱规格为:Welchrom XB-C18(50×4.6mm, 5 μm),柱温为 30℃,流速为 1.5mL/min,流动相为 95%水和 5%乙腈。

[0076] LC/MS 结果显示:该终产物纯度为 99.2%;保留时间 2.869min。

[0077] 综合上述实验,证明该终产物为式(IV)所示的苯巴比妥衍生物,其纯度较高。

[0078] 需要说明的是,上述实施例中苯巴比妥结构中的苯环的对位为氧取代,其还可以是硫取代、氨基取代,即其结构通式如式(I)所示:

[0079]



[0080] 式(I)

[0081] 其中 R 为 $-O-(CH_2)_n-COO^-$, 或 $-S-(CH_2)_n-COO^-$, 或 $-NH-(CH_2)_n-COO^-$, n 为 1 至 20 之间的整数。由于其反应原理和制备过程与对位氧取代是一样的,在此不再赘述。

[0082] 实施例二:BSA-苯巴比妥免疫原的合成

[0083] BSA- 苯巴比妥免疫原由牛血清白蛋白 BSA 与上述苯巴比妥衍生物的 $-O-(CH_2)_n-COO-$ 基团连接而成, 结构式如式(II)所示。下面以 $n=4$ 为例, 详细介绍其合成方法:

[0084] 1) 将 20mg BSA 溶解于 5ml 0.2M, pH=8.5 的磷酸缓冲液(Phosphate buffer solution, PBS)中, 该磷酸缓冲液置于烧杯 C 中;

[0085] 2) 将如下化学品加入到小烧杯 D 中搅拌溶解: 20mg 苯巴比妥衍生物, 0.35ml 二甲基酰胺(dimethylformamide, DMF), 0.35ml 乙醇, 0.7ml 10mM、pH=5.0 的磷酸钾缓冲液, 40mg 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺, 5mg N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, Sulfo-NHS), 于室温下搅拌溶解反应 30 分钟;

[0086] 3) 将小烧杯 D 中溶解好的溶液滴加至烧杯 C 中, 并在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下搅拌过夜, 得到抗原; 将合成好的抗原经过中性磷酸盐缓冲液透析($4 \times 4\text{L}$)纯化, 得到苯巴比妥免疫原, 储存于 -20°C 待用。

[0087] 通常情况下, 载体为具有免疫原性的蛋白质。本发明中采用了血清白蛋白, 当然还可以采用血蓝蛋白、甲状腺球蛋白。

[0088] 实施例三: 抗苯巴比妥特异性抗体的制备

[0089] 将所得到的苯巴比妥免疫原采用常规方法接种实验动物兔, 加强免疫后取抗血清, 具体步骤如下:

[0090] 用 PBS 将合成的苯巴比妥免疫原稀释至 1.0mg/ml, 然后用 1.0ml 的抗原溶液与弗氏完全佐剂混合, 对实验动物兔进行注射。

[0091] $2 \sim 3$ 周后, 再用 1.0ml 相同的抗原溶液与弗氏不完全佐剂对上述实验动物兔注射一次, 之后每隔四周注射一次, 共计进行 4 次注射。

[0092] 对上述实验动物兔取血, 分离纯化得到抗苯巴比妥特异性抗体。经测定, 该抗苯巴比妥特异性抗体的效价为 1:30000。

[0093] 实施例四: 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物的制备

[0094] 1、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)溶液的制备:

[0095] 1) 准确称取 15mg 规格为 100KU 的 G6PDH, 室温溶解于 12mL 含有 72.6mg (0.05M) Tris、8mg MgCl_2 (3.3mM) 和 100mg NaCl 的溶液中, 该溶液 pH=9.0。

[0096] 2) 在上述烧杯 E 中加入 225mg NADH, 135mg G-6-P 以及 0.75mL 卡必醇(Carbitol)。

[0097] 3) 在上述烧杯 E 中再逐滴加入 2mL 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)。

[0098] 2、苯巴比妥衍生物的激活

[0099] 1) 在无水状态下称取 10mg 苯巴比妥衍生物, 溶解于 $600 \mu\text{L}$ DMF 中。

[0100] 2) 使上述溶液温度降到 $-2 \sim -8^\circ\text{C}$ 。

[0101] 3) 加入 $3 \mu\text{L}$ 三丁胺(tributylamine)。

[0102] 4) 加入 $1.5 \mu\text{L}$ 氯甲酸异丁酯(isobutylchloroformate)。

[0103] 5) $-2 \sim -8^\circ\text{C}$ 搅拌 30 分钟。

[0104] 3、G6PDH 与苯巴比妥衍生物的连接

[0105] 1) 将上述激活的苯巴比妥衍生物溶液逐滴加入到上述溶解的 G6PDH 溶液中。

[0106] 2) $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 搅拌过夜。

[0107] 4、纯化产物

[0108] 通过 G-25 凝胶层析柱纯化步骤 3 中的溶液, 得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原

酶标偶联物。于 2-8℃ 下储存。

[0109] 实施例五：苯巴比妥均相酶免疫试剂的制备

[0110] 1. 试剂 A 的制备：将 4.036g (11.25mM)NAD、1.711g (11.25mM)G6P 置于烧杯 F 中，用 1L55mM、pH=8.0 的 Tris 缓冲

[0111] 液溶解制成均相酶底物；将上述制备的抗苯巴比妥特异性抗体加到上述均相酶底物中，抗体与均相酶底物的体积比例可以为 1:100-1:10000，在本实施例中具体的比例为 1:3000。

[0112] 2. 试剂 B 的制备：将上述制备的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物加到 120mM、pH=8.2 的 Tris 缓冲液中，上述偶联物与 Tris 缓冲液的体积比例可以为 1:100-1:10000，在本实施例中具体的比例为 1:2000。。

[0113] 当上述试剂 A 和 B 混合后，试剂 B 中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与试剂 A 中的酶的底物构成指示试剂，用于检测抗苯巴比妥特异性抗体与苯巴比妥所形成的复合物。在本实施例中，指示试剂选用的是酶试剂，即葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-半抗原偶联物与葡萄糖-6-磷酸。指示试剂还可以选择放射性同位素试剂、荧光试剂和化学发光试剂。

[0114] 实施例六：苯巴比妥均相酶免疫检测

[0115] 获得标准曲线：设置迈瑞 BS200 全自动生化分析仪的反应参数，具体参见表 3，检测过程为：先加 150 μl 试剂 A，再加 8 μl 标准品溶液，最后加入 150 μl 试剂 B。加入试剂 B 后，测定不同时间点的吸光值 OD_{340} ，计算出不同标准品浓度时的反应速率，得出反应标准曲线图，参见图 1。

[0116] 需要说明的是，在实际操作过程中，针对不同浓度的试剂 A 和试剂 B，需要不断调整二者的体积比，同时调整测定吸光值 OD_{340} 的时间点，才能得出较理想的反应标准曲线图。

[0117] 表 3 迈瑞 BS200 全自动生化分析仪反应参数

[0118]

迈瑞 BS-200 参数	
试剂 A	150 μ l
试剂 B	150 μ l
样本量	8 μ l
样本稀释	稀释原量 40 μ l 稀释倍数 5
分析方法	动力学方法
主波长	340
次波长	405
反应时间	10 - 20
孵育时间	5
反应方向	上升
结果	mg/L
结果精度	0.01
定标方法	Logistic-Log 5P
定标稀释	稀释样本量 25 μ l 稀释液量 100 μ l 样本量 8 μ l
标准品浓度(mg/L)	0.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0

[0119] 利用上述标准曲线,并在上述参数下重复测定低、中、高浓度质控样本 10 次,上述质控样本为:将苯巴比妥标准品(购于 Sigma 公司)溶解于人血清或血浆中,至浓度分别为 7.5, 15.0, 60.0 μ g/ml。

[0120] 测定结果具体参见表 4。

[0121] 表 4 样品测定及精密度和回收率评估

[0122]

血液样品	低	中	高
样品浓度 (μ g/ml)	7.5	15.0	60.0
1	7.36	14.95	59.94
2	7.55	15.18	59.53
3	7.56	15.17	63.04

[0123]

4	7.66	15.16	61.85
5	7.44	14.75	59.35
6	7.38	15.15	60.05
7	7.58	14.78	61.56

8	7.99	14.88	63.55
9	7.38	14.26	59.98
10	7.59	14.15	62.34
平均值 ($\mu\text{g/ml}$)	7.55	14.84	61.06
标准差(SD)	0.1869	0.3743	1.436
精密度(CV%)	2.48	2.52	2.35
回收率 %	101	99	102

[0124] 检测结果发现：本发明的检测试剂测定的准确度高，回收率达到 95%-105%，精密度高，CV 均低于 3%。

[0125] 实施例七：药物干扰试验

[0126] 选取 45 种常见药物，调整浓度至 $50.0 \mu\text{g/ml}$ ，进行干扰试验测定。

[0127] 常见的 45 种药物以及测定结果具体参见表 5。

[0128] 表 5 常见干扰药物

ID#	化合物名称	等价于苯巴比妥的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于苯巴比妥的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
1	阿司匹林	0.0	24	苯丙醇胺	0.0
2	β -苯基乙胺	0.0	25	普鲁卡因胺	0.0
3	安非他命	0.0	26	普鲁卡因	0.0
4	氨苄青霉素	0.0	27	奎尼丁	0.0
5	甲氨二氮卓	0.0	28	佐美酸	0.0
6	氯丙嗪	0.0	29	苯肾上腺素	0.0

ID#	化合物名称	等价于苯巴比妥的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	ID#	化合物名称	等价于苯巴比妥的浓度 ($\mu\text{g/ml}$)
7	氯拉卓酸	0.0	30	桂皮酰艾克宁	0.0
8	二甲苯氧庚酸	0.0	31	芽子碱	0.0
9	非诺洛芬	0.0	32	地西洋	0.0
10	甲基苯丙胺	0.0	33	可替宁	0.0
11	龙胆酸	0.0	34	阿替洛尔	0.0
12	吉非贝齐	0.0	35	心得安	0.0
13	氢可酮	0.0	36	苯乙哌啶酮	0.0
14	布洛芬	0.0	37	苯基丁氮酮	0.0
15	丙咪嗪	0.0	38	麦角酸二乙基酰胺	0.0
16	二氨基二苯砒	0.0	39	大麻酚	0.0
17	萘普生	0.0	40	洛哌丁胺	0.0
18	氢氯噻嗪	0.0	41	异克舒令	0.0
19	哌替啶	0.0	42	苯基丙氨酸	0.0
20	烯丙羟吗啡酮	0.0	43	盐酸氟西汀	0.0
21	麻黄素	0.0	44	柳丁氨醇	0.0
22	烟酰胺	0.0	45	青霉素	0.0
23	甲胺呋硫	0.0			

[0131] 测定结果：上述 45 种常见药物等价于苯巴比妥的浓度均小于 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 。可见，本发明的抗体是抗苯巴比妥的特异性抗体。

[0132] 实施例八：相关性分析

[0133] 对包括 26 例阳性标本和 10 例阴性标本在内的 36 例临床标本分别使用雅培的荧光偏振法和本发明的均相酶免疫法进行相关性分析，测得的数据具体参见表 6。

[0134] 表 6 对 36 例临床标本进行测定的结果

[0135]

样本号	荧光偏振法 测定值($\mu\text{g}/\text{mL}$)	均相酶免疫法 测定值($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	2.27	1.83
2	3.83	4.32
3	12.64	13.12
4	23.95	33.66
5	32.37	40.93
6	35.48	41.13
7	12.64	12.98
8	26.14	30.12
9	35.48	38.89
10	3.83	3.74
11	12.64	12.61
12	26.14	29.15
13	32.37	38.65
14	43.83	52.14
15	14.07	11.71
16	15.88	16.27
17	19.34	19.43
18	22.18	18.61
19	23.33	18.96
20	5.67	6.32
21	8.89	8.78
22	7.76	7.89
23	15.58	14.89
24	17.98	18.62
25	23.89	22.1
26	12.33	10.37
27	0.00	0.00
28	0.00	0.00
29	0.00	0.00
30	0.00	0.00
31	0.00	0.00
32	0.00	0.00
33	0.00	0.00
34	0.00	0.00
35	0.00	0.83
36	0.00	0.00

[0136] 对上述数据作图,结果见图 2,得到的线性方程为: $y=1.1442x-0.9226$, 相关系数 $R^2=0.969$, 表明本试剂测定的苯巴比妥临床标本准确度高。

[0137] 需要说明的是,以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所做的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

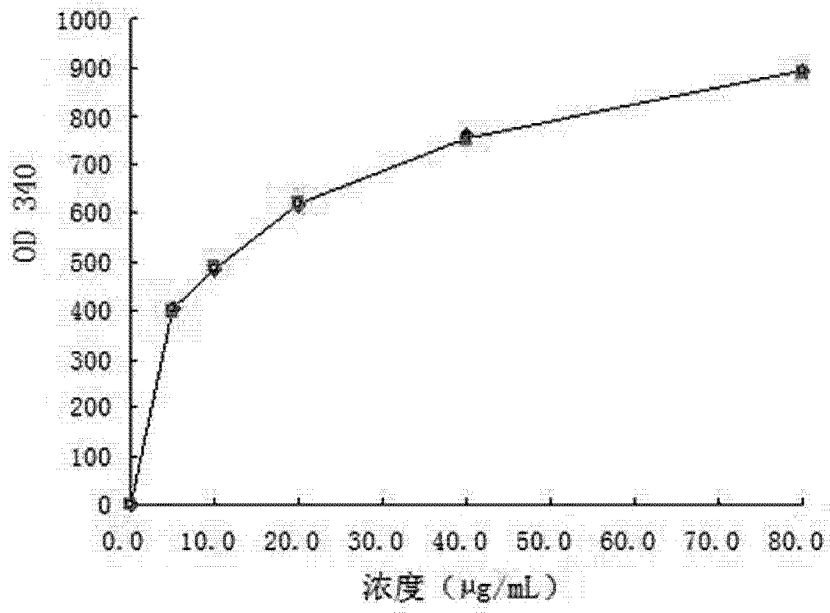


图 1

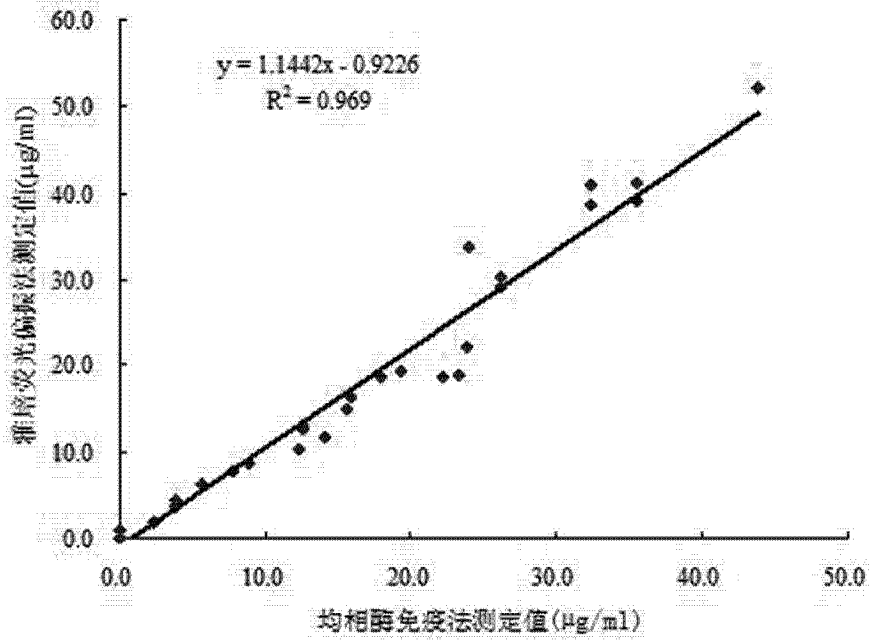


图 2

专利名称(译)	一种苯巴比妥衍生物及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN102757391B	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	CN201210271169.1	申请日	2012-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州博源医疗科技有限公司		
[标]发明人	虞留明 张曼 田军 蔡江丽		
发明人	虞留明 张曼 田军 蔡江丽		
IPC分类号	C07D239/62 C07K14/765 C07K16/44 G01N21/31 G01N33/53 G01N35/00		
代理人(译)	董建林		
其他公开文献	CN102757391A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种苯巴比妥衍生物及其制备方法，以及由该衍生物直接获得的苯巴比妥免疫原、间接获得的苯巴比妥特异性抗体，和含有上述特异性抗体的检测试剂。本发明的有益之处在于：使用了一种新型的苯巴比妥衍生物，新的衍生物保留了苯巴比妥的各主要功能基团，具有更好的识别和区分非特异性药物的性能；由该新的苯巴比妥衍生物制备了特异性更高的苯巴比妥免疫原和抗苯巴比妥抗体，与常见45种药物无任何交叉反应；本发明的苯巴比妥检测试剂可以在全自动生化分析仪上同时测定多个样品，实现苯巴比妥的高通量快速化测定，准确度高，特异性强，精确度和检测效率相比之前都有了较大的提高，同时实现了检测过程的全自动化。

