

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03820525.4

C07C 235/20 (2006.01)

C07K 5/062 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007年5月16日

[11] 授权公告号 CN 1315786C

[22] 申请日 2003.8.18 [21] 申请号 03820525.4
[30] 优先权

[32] 2002.8.29 [33] JP [31] 251616/2002

[86] 国际申请 PCT/JP2003/010394 2003.8.18

[87] 国际公布 WO2004/020397 日 2004.3.11

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.28

[73] 专利权人 东洋纺织株式会社

地址 日本国大阪府

共同专利权人 株式会社田熊

[72] 发明人 西井重明 松井一裕 石桥卓也
冈正则 藤平弘树 三嶋弘次
片冈静夫

[56] 参考文献

METABOLISM OF 2,4 - DICHLOROPHE-
NOXYACETICACID. 8. GAS - LIQUID CHROMA-
TOGRAPHY OF TRIMETHYLSILYL DERIVA-
TIVES OF AMINO ACID CONJUGATES MASOOD
ARJMAND, J. AGRIC. FOOD CHEM., Vol. 24 No.
3 1976

The effect of pretreatment with 2,3,7,8 - tetra-
chlorodibenzo - p - dioxin on the hepatic me-
tabolism of 2,4,5 - trichlorophenoxyacetate and 2,4
- dichlorophenoxyacetate Toxicology and applied
pharmacology, Vol. 91 1987

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 5 页

二恶英类化学物质的检测方法 张志仁,分
析科学学报,第 18 卷第 3 期 2002

审查员 王加松

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 程金山

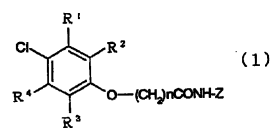
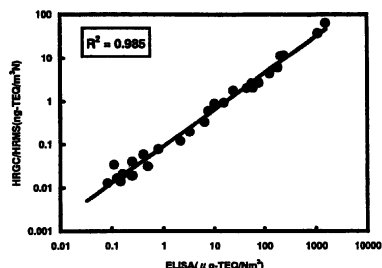
[54] 发明名称

二氧芑免疫测定标准化合物和二氧芑免疫测
定方法

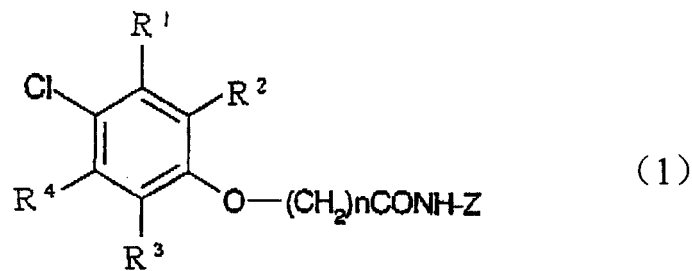
[57] 摘要

式(1)的化合物和使用下面的式(1)化合物作为
标准定量测定样品中二氧芑的免疫测定方法,其中
 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 可以相同或不同并且表示氯或氢,
n 为 1 到 10 的整数,Z 表示氨基酸残基或者肽。

与废气样品(n=29)的仪器
分析测量值的相关性



1. 二氧芑的免疫测定标准，其含有式(1)化合物



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 中的两个是氯原子并且另两个是氢原子， n 为 2 到 6 的整数， Z 表示氨基酸残基或者肽，所述的肽由 1 到 100 个氨基酸残基组成。

2. 含有权利要求 1 的免疫测定标准的二氧芑免疫测定试剂盒。
3. 根据权利要求 2 的试剂盒，其还含有抗二氧芑抗体。
4. 根据权利要求 2 或 3 的试剂盒，其还含有竞争性抗原。
5. 定量测定二氧芑的免疫测定方法，该方法使用权利要求 1 的免疫测定标准。
6. 根据第 5 项的免疫测定方法，其选自酶免疫测定法、放射性免疫测定法和荧光免疫测定法。
7. 测定样品的二氧芑浓度和计算 TEQ 的免疫测定方法，该方法使用权利要求 1 的免疫测定标准。
8. 根据权利要求 7 的免疫测定方法，该方法选自酶免疫测定法、放射性免疫测定法和荧光免疫测定法。
9. 二氧芑的免疫测定方法，其包括下面的步骤：
 - (1) 将样品与抗二氧芑抗体反应以测定与该抗体反应的抗原的量；
 - 和
 - (2) 将与步骤(1)中抗体反应的抗原的量与通过允许已知浓度的权利要求 1 的免疫测定标准与该抗二氧芑抗体反应所测定的抗原的量比较以计算样品中二氧芑的浓度。

10. 根据权利要求 9 的免疫测定方法，其中通过选自酶免疫测定法、放射性免疫测定法和荧光免疫测定法的方法测定与所述抗体反应的抗原的量。

二氧芑免疫测定标准化合物和二氧芑免疫测定方法

技术领域

本发明涉及二氧芑(dioxin)的免疫测定标准。本发明还涉及使用该标准的二氧芑的免疫测定方法,更具体地涉及使用二氧芑类似物作为参比计算空气、废气、土壤、河流、燃烧灰烬等中二氧芑的浓度或毒性当量(TEQ)的方法。

背景技术

二氧芑是多氯化二苯并-对-二氧芑(PCDDs)、多氯化二苯并呋喃(PCDFs)和共面多氯化联苯(Co-PCBs)的一般术语。这三种类型的骨架结构存在大量异构体,它们的氯取代模式不同。在PCDDs和PCDFs的异构体中,在2-、3-、7-、和8-位具有氯取代基的异构体具有高度毒性并且已知导致皮炎、多发性神经机能病、眼球震颤、肝功能不全和由于氯取代导致的类似症状。

还公知长期暴露于即使低浓度的二氧芑可导致慢性症状如迟发性皮肤卟啉病并且还显示出各种毒性如致畸性和致癌性。

此外,最近几年,具有破坏人和野生动物的内分泌功能作用的所谓“内分泌破坏剂”已经作为全球环境问题而成为关注的焦点。还揭示二氧芑可能是具有雌激素活性的内分泌破坏剂。

已经清楚在化学品如除草剂和杀虫剂、来自垃圾焚烧设施的废气和飞灰、来自造纸厂的废水等中含有具有各种毒性的二氧芑。从而,不仅在来自空气、土壤、水和河流的沉积物、大城市附近的海湾和港口的环境样品中,而且还在生物样品如食物、血液、尿和母乳中检测到二氧芑。由于环境的这种广泛污染已经是大的社会问题,所以迫切需要知道环境中二氧芑暴露的量。

二氧芑的测量需要高精确的分析数据。因此,通常使用官方方法,这

些方法包括提取、浓缩和使用各种色谱技术纯化二氧芑紧接着使用昂贵的分析仪如高分辨率气相色谱/质谱仪分析。这些分析方法高度灵敏并且能够进行多组分分析从而可以一次鉴定和定量测定两种或多种化合物。另一方面，这些方法存在问题，因为需要资金投入如昂贵的专门设备和洁净室并且需要能熟练分析的专家，并且由于复杂的预处理，要长时间才能得到结果。

由于这些原因，希望开发高度灵敏、容易的二氧芑免疫测定方法。使用抗体免疫测定的环境污染物检测技术已经吸引了注意来实现该目标。

免疫测定法是利用抗体特异识别抗原的能力检测或定量测定痕量抗原的方法，从而由于抗体对抗原的高亲和性和高特异性，可以高度灵敏的测量抗原。这样，免疫测定具有各种优点如样品预处理的简单性、多种样品的容易且快速的测量和每次测量的低成本，并且已经用于各种领域如医学、生物化学、药学和农业。为了通过免疫测定检测或定量测定靶物质，必须标记抗体或抗原，并且已经开发了各种标记方法。由于其简单性，使用酶的酶免疫测定法(EIA)已经广泛用于临床试验和生物化学领域以定量测定生物样品中的靶物质。基于抗原-抗体的相互作用形式，EIA可大体分为竞争性测定法和非竞争性测定法。低分子量化合物如二氧芑通常通过竞争性测定法确定。

在EIA中，样品中靶化合物的浓度由标准曲线计算，标准曲线通过使用与靶化合物相同的化合物作为标准(standard)并以与样品相同的方式定量地测定该标准制得。然而，由于二氧芑包括具有不同骨架结构的三种类型的化合物的异构体，这些异构体的氯取代模式不同，所以难以决定哪种化合物应该用作标准。

由于同类物和异构体中二氧芑的毒性不同，所以，二氧芑——具有不同毒性的同类物和异构体的混合物——的毒性水平依赖于组分异构体的比例而变化。各种异构体量的简单总和不能准确表示二氧芑毒性。

迄今开发的许多二氧芑EIA系统利用毒性最高的2,3,7,8-四氯苯并-对-二氧芑(2,3,7,8-TeCDD)作为标准(Anal. Chem. 70, 1092-1099)。个别二氧芑异构体的毒性通过毒性当量因子(toxic equivalency factors, TEFs)表示，毒性当量因子是与2,3,7,8-TeCDD相比的相对毒性因子，2,3,7,8-TeCDD的毒

性当量因子被设为 1。通过将该个别异构体的浓度与它们的 TEF 相乘计算它们的毒性。这些毒性值的总和是毒性当量(TEQ)，即，存在于目标中的所有异构体的总毒性。

因此，EIA 系统主要测量 2,3,7,8-TeCDD，不能说是二氧芑毒性的准确测量系统。尤其是，从垃圾焚化炉散发的废气是二氧芑的主要来源，已知该废气的二氧芑 TEQ 与五氯化二苯并呋喃或者六氯化二苯并呋喃而不是 2,3,7,8-TeCDD 的浓度高度相关。此外，当分析物是废气样品时，存在使用常规 EIA 系统所得的测量值与来自仪器分析所得结果显著不同的情况。因此 EIA 系统的用途可能受限。

此外，当 2,3,7,8-TeCDD 或者类似二氧芑异构体用作 EIA 中的标准时，测量人员为了标准制备将处理高度毒性的化合物，导致必需确保安全性和相关问题，如测量人员的精神负担。

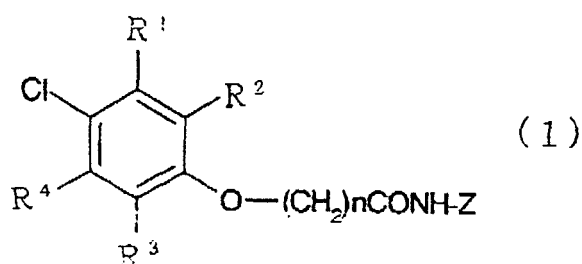
因此，期望无毒化合物作为样品中二氧芑定量测定的标准。关于这一点，日本未审查的专利公开号 128731/2002、131316/2002 和 155023/2002 描述了使用氯酚衍生物作为标准。

发明内容

本发明的一个目的是提供没有毒性当量因子(TEF)的二氧芑免疫测定标准。本发明的另一个目的是提供使用该标准的免疫测定法，该测定法能够简单、高度灵敏地测量环境样品中的二氧芑浓度或毒性当量。

为了实现上面的目的，本发明人进行了深入研究并发现了以下各项：

(i) 当使用式(1)的氯酚衍生物



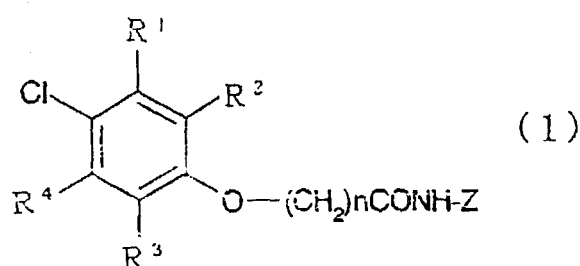
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 可以相同或不同并且表示氯或氢， n 为 1 到 10 的整数， Z 表示氨基酸残基或者肽，

作为标准通过免疫测定法测定样品中二氧芑的浓度，并且从该浓度计算 TEQ 时，所得 TEQ 和通过测定样品中每种二氧芑的浓度的官方方法所得的 TEQ 之间有高度相关性。

(ii) 由于上面的氯酚衍生物不具有毒性当量因子(TEF)，所以使用该化合物作为二氧芑测定标准使得能够安全地计算环境样品中二氧芑的浓度和毒性当量(TEQ)。

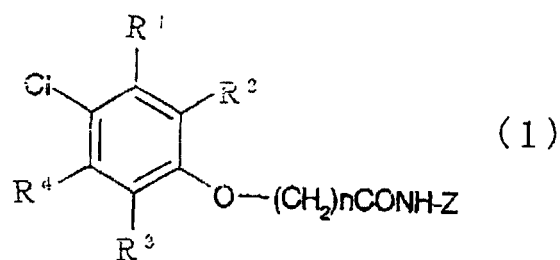
基于上面的发现已经完成了本发明。本发明提供以下各项：

1. 式(1)化合物



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 可以相同或不同并且表示氯或氢， n 为 1 到 10 的整数， Z 表示氨基酸残基或者肽

2. 二氧芑的免疫测定标准，其含有式(1)化合物



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 可以相同或不同并且表示氯或氢， n 为 1 到 10 的整数， Z 表示氨基酸残基或者肽。

3. 含有第 1 项的化合物的二氧芑免疫测定试剂盒。

4. 根据第 3 项的试剂盒，其还含有抗二氧芑的抗体。

5. 根据第 3 项或第 4 项的试剂盒，其还含有竞争性抗原。

6. 定量测定二氧芑的免疫测定方法，该方法使用第 1 项的化合物作为标准。

7. 根据第 6 项的免疫测定方法，其选自酶免疫测定法、放射性免疫测

定法和荧光免疫测定法。

8. 测定样品的二氧芑浓度和计算 TEQ 的免疫测定方法，该方法使用第 1 项的化合物作为标准。

9. 根据权利要求 8 的免疫测定方法，该方法选自酶免疫测定法、放射性免疫测定法和荧光免疫测定法。

10. 二氧芑的免疫测定方法，其包括下面的步骤：

(1) 将样品与抗二氧芑抗体反应以测定与该抗体反应的抗原的量；和

(2) 将与步骤(1)中抗体反应的抗原的量与通过允许已知浓度的第 1 项的化合物与该抗二氧芑抗体反应所测定的抗原的量比较以计算样品中二氧芑的浓度。

11. 根据第 10 项的免疫测定方法，其中通过选自酶免疫测定法、放射性免疫测定法和荧光免疫测定法的方法测定与抗体反应的抗原的量。

本发明提供了不具有毒性当量因子(TEF)的二氧芑免疫测定标准，和使用该标准的免疫测定方法，该测定法能够简单、高度灵敏地测量环境样品中的二氧芑浓度或毒性当量。

更特别地，当使用式(1)的免疫测定标准定量测定样品的二氧芑浓度并且从中计算 TEQ 时，该浓度和 TEQ 与通过仪器分析确定二氧芑浓度的、具有 TEF 的官方方法所得 TEQ 具有良好的相关性。使用本发明化合物作为定量测定二氧芑的标准使得能够准确、高度灵敏地测定样品的 TEQ，从而与现有技术中 EIA 相比可以准确评估二氧芑的毒性。

此外，迄今已知的官方方法花费长时间来评定 TEQ，因为通过测量 29 种二氧芑并从这些浓度计算 TEQ 以得到 TEQ。相比之下，使用本发明化合物的免疫测定法评估 TEQ 花费相对短的时间。

本发明的标准是 WHO 还没有赋予任何毒性当量因子的化合物，因此认为是无毒化合物。本发明的化合物是通过将亚甲基链和一种肽增加至商业途径可得到的氯酚化合物(例如，2,4,5-三氯酚)得到的衍生物，从这一事实也清楚其无毒性。因此，本发明化合物的使用极大地增加了二氧芑免疫测定法的安全性。

如上所示，本发明的化合物和免疫测定方法在环境分析等中发现广泛应用并且也可用于生物样品如食物、母乳、血液和尿的分析。

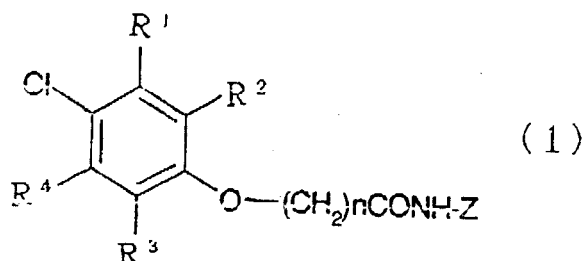
发明公开

下面将详细描述本发明。

(I)本发明的化合物

基本构造

下面式(1)的化合物是没有在任何出版物中描述的新化合物:



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 可以相同或不同并且表示氯或氢, n 为 1 到 10 的整数, Z 表示氨基酸残基或者肽。

优选的化合物

虽然式(1)的化合物中氯取代基的数目和位置不被特别限制,但是考虑到抗二氧苈抗体的反应性,优选该化合物中氯取代基的总数为 3 个或更多,优选 3 个。

在氯取代基总数为 3 的化合物中,优选其中 R^1 和 R^2 为氯并且 R^3 和 R^4 为氢的化合物、 R^1 和 R^3 为氯并且 R^2 和 R^4 为氢的化合物、 R^2 和 R^3 为氯并且 R^1 和 R^4 为氢的化合物、 R^2 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^3 为氢的化合物、 R^3 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^2 为氢的化合物。尤其优选其中 R^2 和 R^3 为氯并且 R^1 和 R^4 为氢的化合物、和 R^2 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^3 为氢的化合物。最优选的为其中 R^2 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^3 为氢的化合物。

优选地, n 为约 0 到 20 的整数,优选约 2 到 6 的整数,最优选 2。当聚亚甲基链的长度 n 在该范围内时,合成容易进行。

Z 表示的氨基酸残基或肽不被特别限制,只要根据肽的通常定义该肽由 100 或更少的氨基酸残基组成。优选氨基酸残基或肽含有约 1 到 50 个残基,尤其约 1 到 10 个残基,最尤其约 1 到 4 个残基,进一步尤其约 1

到3个残基。过长的肽增加了水溶性并在测量时难以溶解在有机溶剂中并且可导致在反应混合物中沉淀。只要氨基酸的数目在上述范围内，那么就不会出现这一问题。

优选的化合物的特定实例为其中 R^1 和 R^2 为氯并且 R^3 和 R^4 为氢， n 为2到6的整数，并且 Z 为具有约1到4个氨基酸残基的肽的化合物；其中 R^1 和 R^3 为氯并且 R^2 和 R^4 为氢， n 为2到6的整数，并且 Z 为具有约1到4个氨基酸残基的肽的化合物；其中 R^2 和 R^3 为氯并且 R^1 和 R^4 为氢， n 为2到6的整数，并且 Z 为具有约1到4个氨基酸残基的肽的化合物；其中 R^2 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^3 为氢， n 为2到6的整数，并且 Z 为具有约1到4个氨基酸残基的肽的化合物；和其中 R^3 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^2 为氢， n 为2到6的整数，并且 Z 为具有约1到4个氨基酸残基的肽的化合物。

其中，优选的化合物为其中 R^2 和 R^3 为氯并且 R^1 和 R^4 为氢， n 为2到6的整数，并且 Z 为具有约1到4个氨基酸残基的肽的化合物；和其中 R^2 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^3 为氢， n 为2到6的整数，并且 Z 为具有约1到4个氨基酸残基的肽的化合物。

尤其优选的化合物为其中 R^2 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^3 为氢， n 为5，并且 Z 为具有约1到3个氨基酸残基的氨基酸或者肽的化合物；和其中 R^2 和 R^3 为氯并且 R^1 和 R^4 为氢， n 为2，并且 Z 为具有约1到3个氨基酸残基的氨基酸或者肽的化合物。

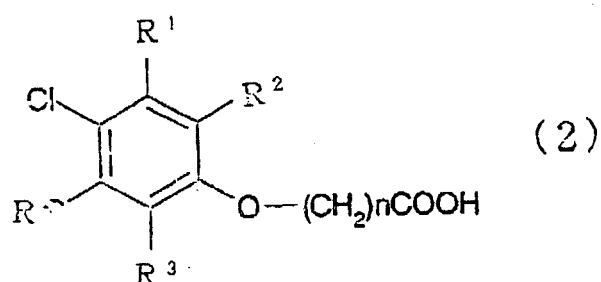
应用

式(1)化合物与抗二氧苄抗体反应并从而可用作二氧苄免疫测定标准。由于该化合物不含毒性当量因子(TEF)，所以该化合物的使用使得可以建立允许安全测量的二氧苄免疫测定系统。

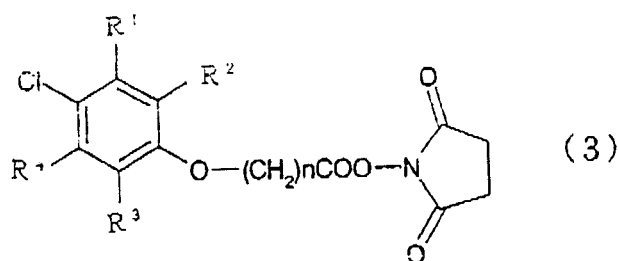
制备方法

例如通过下面的方法可以合成本发明的二氧苄免疫测定标准，但是该方法不局限于此。

通过活化酯方法活化石(2)的化合物



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 可以相同或不同并且表示氯或氢， n 为 1 到 10 的整数，该活化酯方法包括将该化合物与 N-羟基琥珀酰亚胺反应得到式(3)的活化酯化合物



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 和 R^4 可以相同或不同并且表示氯或氢， n 为 1 到 10 的整数。

然后根据常规方法，式(3)化合物与含有氨基的化合物如氨基酸或肽反应得到式(1)化合物。

用作起始化合物的式(2)的氯酚衍生物可以例如，通过下面的方法合成。将氯酚、碳酸钾和 6-溴己酸乙酯在 60°C 搅拌 16 小时。反应完成后，用乙酸乙酯萃取反应混合物。减压浓缩萃取物并将残渣溶于甲醇。加入氢氧化钠溶液后，将混合物在室温搅拌 3 小时。反应完成后，将反应混合物用浓盐酸中和并减压浓缩。所得混合物通过加入浓盐酸酸化，用乙酸乙酯萃取，重结晶得到式(2)的氯酚衍生化合物。

(II) 二氧苈免疫测定试剂盒

本发明的二氧苈免疫测定试剂盒含有作为二氧苈定量测定标准的本发明的式(I)化合物。抗-二氧苈抗体可以由用户制备或者可以包含在试剂盒中。含有抗体的试剂盒是方便的。抗-二氧苈抗体将在后面的另一部分中描

述。对于竞争性免疫测定，试剂盒可以含有另一竞争性抗原。该竞争性抗原也将在后面的另一部分中描述。

该试剂盒可以还含有其他物品如反应容器、用于掩蔽容器的自由表面的封闭剂、缓冲剂、间接竞争性免疫测定的第二抗体，等等。

(III) 二氧芑免疫测定方法

基本构造

本发明的方法是使用式(I)化合物作为标准定量测定二氧芑的免疫测定法。更特别地，本发明的方法是计算样品中二氧芑浓度，或者计算二氧芑浓度并进一步计算 TEQ 的免疫测定法，该方法使用式(1)化合物作为标准。

本发明的二氧芑免疫测定法包括下面的步骤：

- (1) 将样品与抗二氧芑抗体反应以测定与抗体反应的抗原的量；和
- (2) 将与步骤(1)中抗体反应的抗原的量和通过允许已知浓度的式(1)化合物与该抗二氧芑抗体反应测定的抗原的量比较以计算样品中二氧芑的浓度。

本发明的二氧芑免疫测定法其特征在于使用式(1)的氯酚衍生物作为二氧芑免疫测定的标准并且可以以类似于常规免疫测定的方式使用该标准进行。

本发明的化合物可应用于任何公知的免疫测定方法。这些公知的免疫测定方法的实例包括酶免疫测定法(EIA)、放射免疫测定法(RIA)、荧光免疫测定法(FIA)等等。考虑到其测量的简单性而优选 EIA。

EIA 包括竞争性免疫测定法、非竞争性免疫测定法、均相免疫测定法，等。由于二氧芑是低分子量化合物，所以通常使用竞争性测定法。竞争性免疫测定法包括间接竞争性测定法，其中抗原被固定在微量滴定板孔、管等上；和直接竞争性测定法，其中抗体被固定在微量滴定板孔、管等上。

间接竞争性测定法

(i) 竞争性抗原

在间接竞争性测定法中，二氧芑或者二氧芑和载体蛋白的复合物被用作固定于孔上的竞争性抗原。当反应容器是树脂、玻璃等制造的未处理的

容器时, 优选使用二氧芑与载体蛋白的复合物, 因为难以单独将二氧芑固定在容器的表面。对于使用其表面被高度反应性官能团如氨基基团或者羧基基团活化的反应容器的情况, 单独的二氧芑可以通过容器上的官能团而被固定。不考虑载体蛋白的使用, 连接体优选粘附到二氧芑, 由此减轻了位阻并提高了竞争性抗原和抗二氧芑抗体的反应性, 导致对样品中二氧芑的增强的测定灵敏性。

可使用的二氧芑的实例包括多氯化二苯并-对-二氧芑(PCDDs)、多氯化二苯并呋喃(PCDFs)和共面多氯化联苯(Co-PCBs)。通过使用二氧芑或者与有毒二氧芑几乎没有相似性的类-二氧芑化合物, 抗二氧芑抗体与竞争性抗原的反应性小于与样品中二氧芑的反应性, 导致样品中二氧芑浓度的检测灵敏性提高。

载体蛋白不被特别限制并且可以使用任何公知的载体蛋白。载体蛋白的实例包括 KLM(匙孔血蓝蛋白)、牛血清白蛋白(BSA)等等。

连接体优选为不位阻与抗体的结合也不负面影响反应过程中的溶解性的连接体。可用的连接体的实例包括聚亚甲基链等等。连接体被安排在二氧芑或类-二氧芑化合物和容器之间或者二氧芑或者类-二氧芑化合物的载体蛋白复合物与容器之间。

通过使用本发明式(1)的氯酚衍生物作为竞争性抗原可以实现二氧芑的高度灵敏的定量测定。尤其优选竞争性抗原是和用于校准曲线制作的标准相同的化合物。这样, 通过将式(1)表示的标准的被取代化合物的末端的氨基酸或肽部分用载体蛋白质如 BSA 代替可以产生将要被固定的抗原。

(ii) 抗二氧芑抗体

通过公知方法可以制备用于 EIA 的抗体, 该方法包括半抗原化二氧芑如多氯化二苯并-对-二氧芑(PCDD)、多氯化二苯并呋喃(PCDF)或共面多氯化联苯(Co-PCB), 将该半抗原偶联到载体蛋白如 BSA 并使用该偶联物作为免疫抗原免疫哺乳动物(Kun Chae, 等, J. Agric. Food., 25, 1207-1209(1977); Simona G. Merica, 等, Can. J. Chem., 73, 826-834(1995))。

该抗体可以是单克隆或多克隆的并且不被特别限制。考虑到抗体同质性和抗体产生中批次差异的不大可能性, 优选使用单克隆抗体。单克隆抗

体是从单一抗体-产生细胞得到的抗体,通过克隆半抗原化二氧芑免疫的小鼠脾细胞与肿瘤细胞融合产生的杂交瘤制备该单一抗体-产生细胞。可以使用识别二氧芑的任何单克隆抗体。

可以例如以下面的方式实施间接竞争性测定法。首先,将竞争性抗原固定在反应容器如微量滴定板的孔的表面。然后,将没有附着抗原的孔的表面部分用通过商业途径可得到的封闭剂如牛血清白蛋白、酪蛋白等封闭。将样品和第一抗体(抗-二氧芑抗体)加入孔,然后允许样品和被固定的抗原与抗体竞争性地相互作用。洗涤除去未结合到被固定抗原的抗体。然后将第二抗体加入孔中并允许结合到结合固定抗原的第一抗体,该第二抗体为例如,通过用过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶或者类似酶标记山羊抗小鼠免疫球蛋白抗体制备的酶标记的抗体。用缓冲液洗涤所得抗体偶联物几次后,加入所标记酶的底物并测量显色的酶反应产物的吸光度。当酶为过氧化物酶时,过氧化氢可用作底物, o-苯二胺或者四甲基联苯胺可用作显色剂。当酶为碱性磷酸酶时,对-硝基苯基磷酸通常用作底物。

在上面的竞争性测定法中,通过确定相对于无样品的反应混合物的吸光度,受试样品的加入产生的吸光度降低百分数,得到样品的抑制百分数。使用式(1)化合物作为二氧芑标准,以相同方式实施竞争性反应,只是使用几种已知浓度的标准溶液代替样品制备关于标准溶液浓度和抑制百分数的校准曲线。通过比较校准曲线和抑制百分数关于标准溶液浓度计算样品中二氧芑浓度。

直接竞争性免疫测定法

在直接竞争性免疫测定法中,抗二氧芑抗体被固定在反应容器的孔表面并且以和上面相同的方式封闭抗原未结合的孔的部分表面。通过将竞争性酶标记的抗体和受试样品加到孔中,样品和酶标记的抗原被允许与固定的抗体竞争性地相互作用。洗涤除去未结合抗体的酶标记的抗原并加入用于标记酶的底物以测定反应产物的吸光度。

通过将过氧化物酶、碱性磷酸酶或类似酶连接到与用作间接竞争性免疫测定法中的竞争性抗原相同的二氧芑或类-二氧芑化合物连接来制备酶标记的抗原。当使用通过用酶如过氧化物酶或碱性磷酸酶替换式(1)化合物

末端的氨基酸或肽部分时，灵敏性被增强。

当实施 RIA 而不是 EIA 时，可通过用同位素标记二氧芑或类-二氧芑化合物制备标记抗原。当实施 FIA 时，通过将荧光物质如罗丹明或者化学发光物质连接于二氧芑或类-二氧芑化合物可以制备标记抗原。

受试样品

样品类型不被特别限制并可以包括，例如，从环境收集的环境样品、生物样品、食物和类似的各种物品，和为实验制备的二氧芑溶液。本发明的方法特别适于用作受试样品的环境样品。环境样品的实例包括空气；汽车、机器和设备、工厂等的废气；土壤；河水、湖水、海湾或港口的水；烟尘或飞灰等。生物样品包括母乳、血液和尿。

TEQ 计算方法

受试样品可以直接进行免疫测定或者可被预处理以从中提取含有大量二氧芑的部分。优选进行预处理。预处理方法的实例在下面给出，但是并不限定。

(i) 废气样品

收集 $A \text{ Nm}^3$ 的气体样品并用甲苯提取其中所含的物质。调节该提取物为 20ml 并且其被称为粗提物。用硫酸处理 10 ml 该提取物直到硫酸层变成无色。将处理的提取物溶于己烷并通过用 200ml 己烷将其应用于含有 1g 硫酸钠、1g 10%硝酸银硅胶和 3 g 硅胶层的多层硅胶柱使其澄清。将含有该提取物的 1ml DMSO 溶液进行免疫测定。

将关于该标准的所得二氧芑浓度，此后简称为“标准二氧芑浓度”，插入下面的方程以计算毒性当量(TEQ)：

$$\text{TEQ}(\text{ng-TEQ}/\text{Nm}^3) = 0.0922 \times \text{标准二氧芑浓度}(\mu\text{g}/\text{Nm}^3)^{0.8474}$$

在上面的式子中，0.0922 和 0.8474 是通过实施例中本发明方法测定的废气中二氧芑浓度和通过官方方法得到的二氧芑 TEQ 之间的相关方程中

的系数。它们是赋予每种类型的样品的常数。通过下面的式子可以进行标准二氧芑浓度的单位转换：

$$\text{标准二氧芑浓度}(\mu\text{ g/Nm}^3)=\text{标准二氧芑浓度}(\text{ng/ml})\times 1/10\times 20\times 1/A\times 1/1000$$

(ii) 飞灰

收集飞灰(B g)并用甲苯提取其中所含化合物。调节该提取物为 20ml 并且其被称为粗提物。测量 1 ml 该提取物并使其澄清。将含有该提取物的 2 ml DMSO 溶液进行免疫测定。

将所得标准二氧芑浓度插入下面的方程计算毒性当量(TEQ)：

$$\text{TEQ}(\text{ng-TEQ/g})=0.0038\times [\text{标准二氧芑浓度}(\mu\text{ g/g})]^{0.9796}$$

在上面的式子中，0.0038 和 0.9796 是通过实施例中本发明方法测定的飞灰中二氧芑浓度和通过官方方法得到的二氧芑 TEQ 之间的相关方程中的系数。它们是赋予每种类型的样品的常数。通过下面的式子可以进行标准二氧芑浓度的单位转换：

$$\text{标准二氧芑浓度}(\mu\text{ g/g})=\text{标准二氧芑浓度}(\text{ng/ml})\times 2/1\times 20\times 1/B\times 1/1000$$

(iii) 土壤

收集土壤(B g)并用甲苯提取其中所含化合物。调节该提取物为 20ml 并且其被称为粗提物。测量 1 ml 该提取物并使其澄清。将含有该提取物的 2 ml DMSO 溶液进行免疫测定。将所得标准二氧芑浓度插入下面的方程计算毒性当量(TEQ)：

$$\text{TEQ}(\text{ng-TEQ/g})=9.4553\times [\text{标准二氧芑浓度}(\mu\text{ g/g})]^{0.9352}$$

在上面的式子中,值 9.4553 和 0.9352 是通过实施例中本发明方法确定的飞灰中二氧芑浓度和通过官方方法得到的二氧芑 TEQ 之间的相关方程中的系数。这些值是赋予每种类型的样品的常数。可以以和飞灰中相同的方式进行标准二氧芑浓度的单位转化。

实施例

下面给出实施例以更详细地阐明本发明。本发明的范围不被这些实施例限制。

实施例 1

二氧芑免疫反应测定法标准的制备

在本发明式(1)的化合物中,通过下面的方法合成其中 R^2 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^3 为氢的化合物。参考图 1 描述了该合成方法。

在氩气下,混合 15.0 g(76.0 mmol)2,4,5-三氯酚(1)(商业途径可得到的产品)、18.6 g(83.6 mmol)6-溴己酸乙酯、12.60 g (91.2 mmol)碳酸钾和 150 ml 无水二甲基甲酰胺并在 60°C 搅拌过夜。反应完成后,将反应混合物冷却到室温。加入 450 ml 水后,将反应混合物用 225 ml 乙酸乙酯萃取两次。萃取物用硫酸镁干燥,滤除干燥剂并浓缩有机层得到粗产物 30.7 g 淡黄色油。通过硅胶柱层析(硅胶:450 g,洗脱剂:乙酸乙酯/正己烷=1:15)纯化粗产物得到透明油状的 26.5 g 6-(2,4,5-三氯苯氧基)己酸乙酯(100%产率)。

将 6-(2,4,5-三氯苯氧基)己酸乙酯溶于 200 ml 乙醇中并冰冷却下逐滴加入 200 ml 2N 氢氧化钠水溶液并在室温搅拌 3 小时。反应完成后,将反应混合物用 70 ml 浓盐酸中和,浓缩到其原始体积的一半。浓缩的反应混合物通过加入 5 ml 浓盐酸酸化并用 100 ml 乙酸乙酯萃取 1 次,用 150 ml 乙酸乙酯萃取 2 次。有机层用 200 ml 水然后用 200 ml 饱和氯化钠水溶液洗涤并用硫酸镁干燥。滤除干燥剂后,浓缩有机层得到粗产物 23.3 g 固体。加入 25 ml 异丙醚和 50 ml 正己烷后,将粗产物重结晶。过滤收集沉淀的晶体并将其用异丙醚/正己烷(异丙醚/正己烷=1:3)洗涤得到 6-(2,4,5-三氯苯氧基)己酸(3), 其是白色晶体(88.0%产率)。

将 18.2 g(58.4 mmol)6-(2,4,5-三氯苯氧基)己酸(3)溶于 180 ml 二氯甲

烷, 然后加入 12.7 g (70.1 mmol) 1-乙基-3-(3'-二乙基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐和 8.07 g (70.1 mmol) N-羟基琥珀酰亚胺, 然后在室温下搅拌过夜。反应完成后, 将反应混合物加入 1250 ml THF。将有机层连续用 360 ml 水、540 ml 饱和碳酸氢钠水溶液和 540 ml 水洗涤并用硫酸镁干燥。滤除沉淀后, 浓缩有机层得到 21.9 g 粗产物白色固体。通过硅胶柱层析(使用 400 g 硅胶和二氯甲烷作为第一次层析步骤的洗脱剂; 使用 330 g 硅胶和二氯甲烷作为第二次层析步骤的洗脱剂)得到 9.73 g 6-(2,4,5-三氯苯氧基)己酸琥珀酰亚胺酯(4), 其为白色固体(40.7%产率)。

将 20 mg 6-(2,4,5-三氯苯氧基)己酸琥珀酰亚胺酯(4)溶于 100 ml 二甲基亚砜。然后缓慢加入 100 ml 50 mM 的双甘氨酸水溶液并在室温搅拌 3 小时得到二氧苄的免疫测定标准溶液。

以和上面相同的方式只是使用将 2,4,6-三氯酚(商业途径可得到的产品)代替 2,4,5-三氯酚用作起始化合物合成其中 R^2 和 R^3 为氯并且 R^1 和 R^4 为氢的式(1)化合物。

此外, 以和上面相同的方式只是使用将 3,4,5-三氯酚(商业途径可得到的产品)代替 2,4,5-三氯酚用作起始化合物合成其中 R^1 和 R^4 为氯并且 R^2 和 R^3 为氢的式(1)化合物。

实施例 2

竞争性测定法抗原的制备

使用实施例 1 中所得 6-(2,4,5-三氯苯氧基)己酸琥珀酰亚胺酯(4)和牛血清白蛋白(BSA)制备竞争性测定法抗原。更具体地, 首先, 搅拌和冰冷却下将 545.5 μ l 二甲亚砜加入 50 mM 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)中的 1ml 牛血清白蛋白(BSA)溶液(相应于 15 mg (2.27×10^{-7} 摩尔 BSA))。然后, 逐滴加入 454.5 μ l (40 当量(9.09×10^{-6} mol))6-(2,4,5-三氯苯氧基)己酸琥珀酰亚胺酯(BB2-4)并在室温下反应 1 小时。反应后, 透析 4 L PBS 得到竞争性测定法抗原。

实施例 3

废气样品的制备和用官方方法确定二氧苄 TEQ

收集从垃圾焚烧设施放出的废气并根据 JIS K0311 使用高效气相色谱-质谱仪(GC-MS) (官方方法)测定样品的二氧芑浓度。此外,使用气体采样装置从城市垃圾焚烧设施的烟道吸取约 3 Nm³ 废气,并将样品用有机溶剂如甲苯或二氯甲烷萃取,该有机溶剂根据形式如滤纸、树脂或吸收剂液体来选择。将这些萃取物合并并浓缩到 20ml 得到粗提物。

量取 1 ml 粗提物并通过硫酸处理、多层硅胶层析,和活性炭柱层析纯化。使用气体色谱-质谱仪(Micromass 产品)确定二氧芑异构体的浓度。

然后将二氧芑异构体的浓度与它们的 TEF 相乘得到废气样品的二氧芑 TEQ。

同时,量取另外 1 ml 粗提物并通过硫酸处理、多层硅胶层析纯化。蒸发有机溶剂后,将残渣溶于 2ml 二甲基亚砷(DMSO)中并用作 EIA 评估样品。

实施例 4

通过间接竞争性测定法使用抗-二氧芑单克隆抗体的废气样品的 TEQ 测定

将实施例 2 中制备的竞争性测定抗原溶于 PBS 中至约 1 μg/ml 的浓度,并将 100 μl 该溶液吸取到每个孔。将板密封并在 4°C 静置 18 小时以固化溶液。除去抗原溶液后,将板用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤 3 次并向每孔中吸取 300 μl 5 倍稀释的封闭溶液(Nacalai Tesque Co.产品)。将板密封并在 4°C 静置过夜以封闭,从而得到二氧芑的免疫测定板。使用该板,以下面的方式进行二氧芑免疫测定。

将实施例 1 中制备的二氧芑标准用含有 0.01% Triton X100 的 50% DMSO 稀释得到 0 到 0.2 μg/ml 的稀释系列。将实施例 3 中制备的废气样品在 DMSO 中溶解并用含有 0.01% Triton X100 的 50% DMSO 稀释得到测定样品。

同时,在 CO₂ 培养箱中无血清的培养基中 37°C 培养产生抗-二氧芑单克隆抗体的杂交瘤 1 周或更长时间,并通过亲和层析使用蛋白质 A 柱纯化如此获得的培养物上清液并在 PBS 中透析得到抗-二氧芑单克隆抗体。

将二氧芑标准和废气样品的稀释系列每种 50 μg 加入二氧芑测定板并

向每孔加入已经用含有 0.2% BSA 的 PBS 稀释到 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 浓度的 $50 \mu\text{l}$ 抗二氧芑单克隆抗体溶液并在 4°C 反应 1 小时。反应后，除去加入每孔的溶液并将板用含有 0.005%吐温 20 的 PBS 洗涤三次。然后向每孔吸取用含有 0.2% BSA 的 PBS 稀释 2000 倍的山羊抗小鼠 IgG(H+L) HRP 标记的抗体(通过亲和纯化得到，DAKO 产品) $100 \mu\text{l}$ 。板在室温静置 1 小时并用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤 3 次。然后将 $100 \mu\text{l}$ HRP 底物 TMB(BioF_x 产品)吸取到每孔并在室温静置 30 分钟。向每孔加入 $100 \mu\text{l}$ 0.5M 硫酸溶液后，使用微量滴定分光光度计在 455 nm(655 nm 用于对照)的波长测量吸光度。

从使用二氧芑标准所得吸光度数据制作标准曲线(校准曲线)。将使用废气样品得到的吸收数据比较并拟合校准曲线以测定关于标准物质浓度样品中二氧芑的量。

图 2 显示了所得标准曲线。图 2 中，B 表示存在标准时的吸光度， B_0 表示不存在标准时的吸光度。

图 3 显示了实施例 3 中使用 GC-MS 通过定量测定所得二氧芑 TEQ 和实施例 4 中使用本发明的标准进行免疫测定所得样品中二氧芑浓度之间的相关性。从图 3 中可清楚地发现，使用本发明的免疫测定标准通过废气样品的免疫测定法所得测量值和通过官方的仪器分析方法计算的二氧芑 TEQ 之间有良好的相关性($R^2=0.985$)。

实施例 5

制备飞灰样品和通过官方方法测定二氧芑 TEQ

以与实施例 3 相同的方式从 GC-MS 的结果计算飞灰样品中的 TEQ。

实施例 6

通过间接竞争性测定法使用抗二氧芑单克隆抗体测定飞灰样品的 TEQ

以与实施例 4 相同的方式通过 EIA 测定飞灰样品的二氧芑 TEQ。

图 4 显示了实施例 5 中使用 GC-MS 定量测定所得二氧芑 TEQ 和使用实施例 6 中本发明的标准通过实施免疫测定法所得的样品的二氧芑浓度之

间的相关性。从图 4 可清楚地发现，使用本发明的免疫测定标准通过飞灰样品的免疫测定法所得测量值和通过官方的仪器分析方法计算的二氧芑 TEQ 之间有良好的相关性($R^2=0.990$)。

实施例 7

制备土壤样品和通过官方方法测定二氧芑 TEQ

以与实施例 3 相同的方式从 GC-MS 分析的结果计算土壤样品中的 TEQ。

实施例 8

通过间接竞争性测定法使用抗二氧芑单克隆抗体测定土壤样品的 TEQ

以与实施例 4 相同的方式通过 EIA 测定土壤样品的二氧芑 TEQ。

图 5 显示了实施例 7 中使用 GC-MS 定量测定所得二氧芑 TEQ 和使用实施例 8 中本发明的标准通过实施免疫测定法所得的样品二氧芑浓度之间的相关性。从图 5 可清楚地发现，使用本发明的免疫测定标准通过土壤样品的免疫测定法所得测量值和通过官方的仪器分析方法计算的二氧芑 TEQ 之间有良好的相关性($R^2=0.992$)。

上面，关于其中 R^2 和 R^4 为氯并且 R^1 和 R^3 为氢的式(1)化合物讨论了与官方方法的相关性。使用式(1)化合物，其中 R^2 和 R^3 为氯并且 R^1 和 R^4 为氢，和式(1)化合物，其中 R^1 和 R^4 为氯并且 R^2 和 R^3 为氢，可以重复实施例 2 到 8 中相同的步骤。这些化合物和官方方法测定的二氧芑 TEQ 也具有高度相关性。

工业适用性

本发明的化合物和方法适于环境样品如土壤、空气、废气、湖水和河水；生物样品如母乳、血液和尿；和产品如食品中二氧芑的定量测定。

附图简述

图 1 显示了实施例 1 的二氧芑免疫测定标准的合成反应路线。

图 2 显示了使用本发明的二氧芑免疫测定标准的一个实施方案的所得标准曲线。

图 3 显示了通过气相色谱-质谱法所得废气的二氧芑 TEQ 和使用本发明的二氧芑免疫测定标准通过实施免疫测定法所得废气的二氧芑浓度之间的相关性。

图 4 显示了通过气相色谱-质谱法所得飞灰的二氧芑 TEQ 和使用本发明的二氧芑免疫测定标准通过实施免疫测定法所得飞灰的二氧芑浓度之间的相关性。

图 5 显示了通过气相色谱-质谱法所得土壤的二氧芑 TEQ 和使用本发明的二氧芑免疫测定标准通过实施免疫测定法所得土壤的二氧芑浓度之间的相关性。

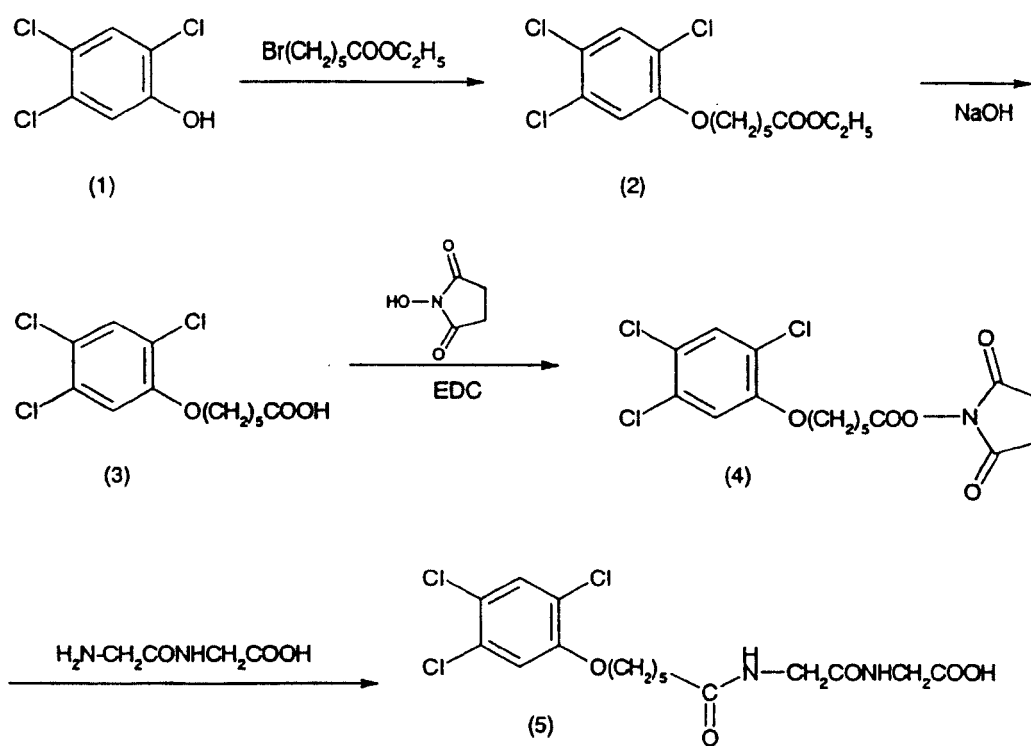


图 1

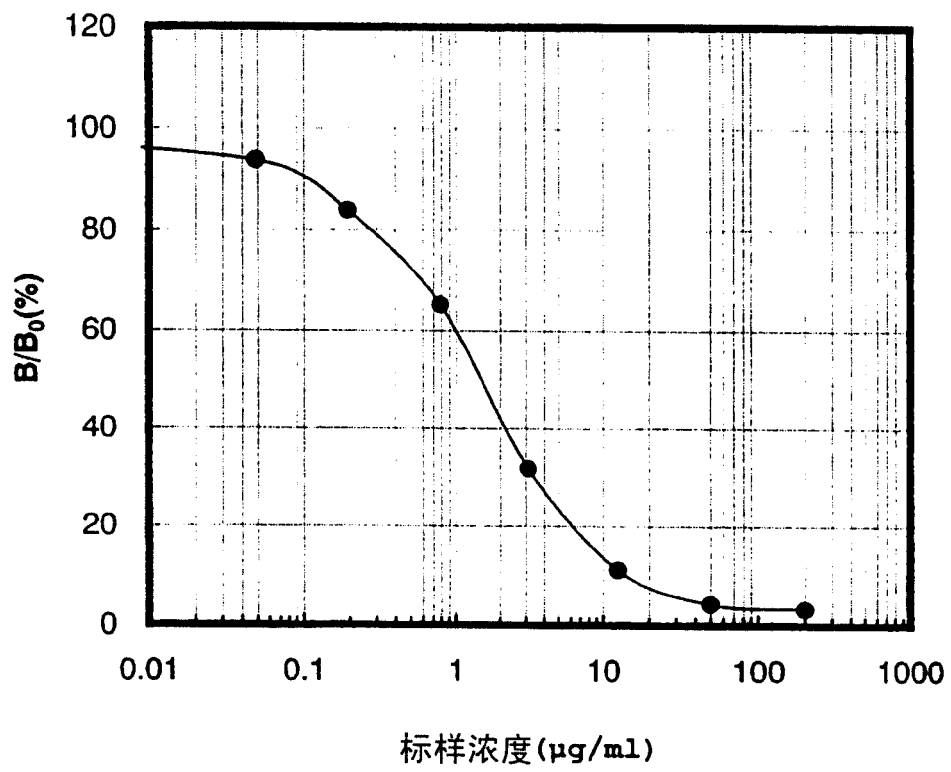


图 2

与废气样品 (n=29) 的仪器
分析测量值的相关性

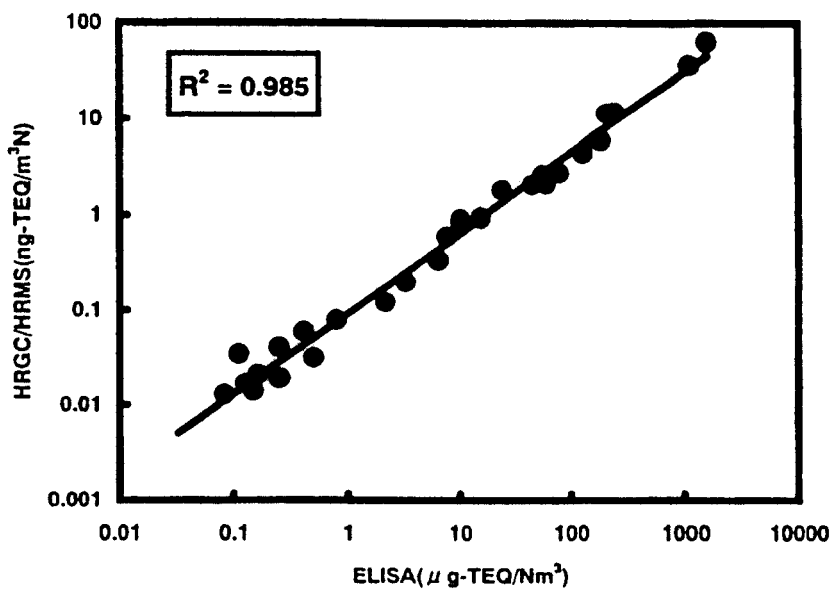


图 3

与飞灰样品 (n=13) 的仪器
分析测量值的相关性

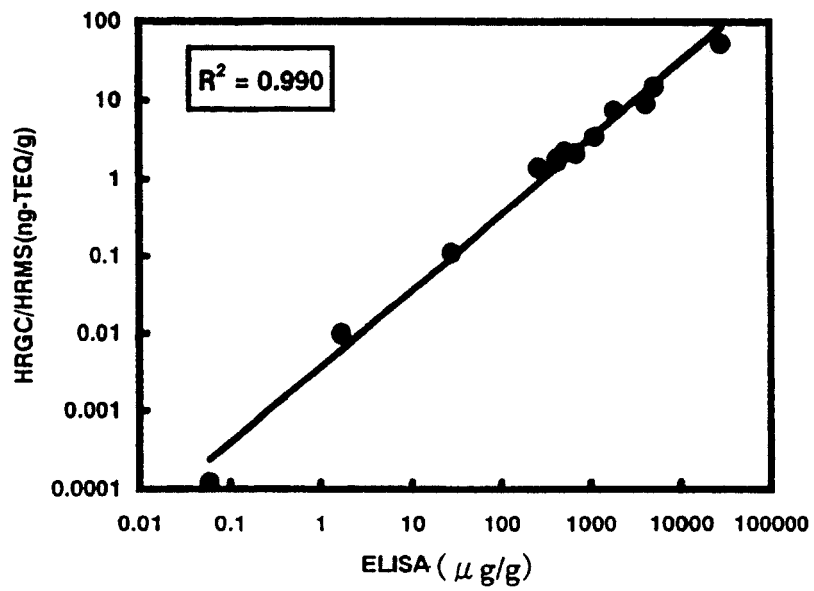


图 4

与土壤样品 (n=9) 的仪器
分析测量值的相关性

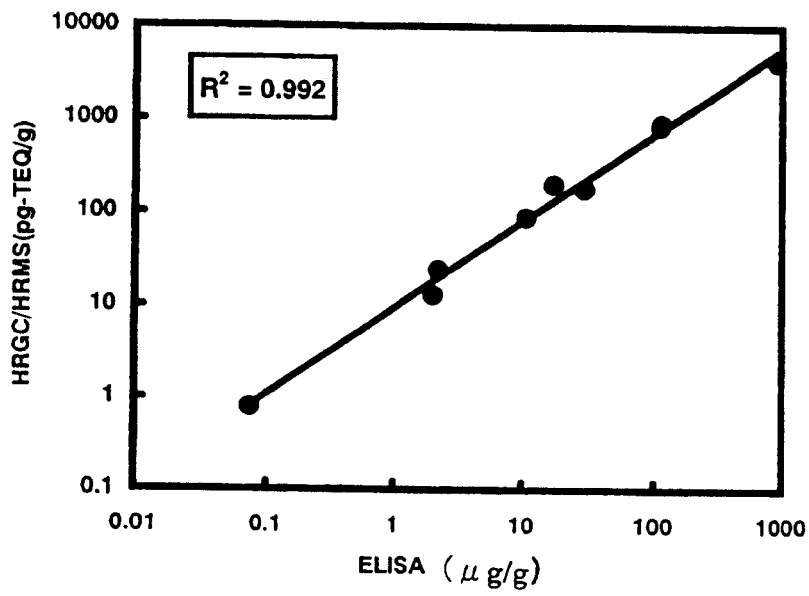


图 5

专利名称(译)	二氧芑免疫测定标准化合物和二氧芑免疫测定方法		
公开(公告)号	CN1315786C	公开(公告)日	2007-05-16
申请号	CN03820525.4	申请日	2003-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	东洋纺绩株式会社 株式会社田熊		
申请(专利权)人(译)	东洋纺织株式会社 株式会社田熊		
当前申请(专利权)人(译)	东洋纺织株式会社 株式会社田熊		
[标]发明人	西井重明 松井一裕 石桥卓也 冈正则 藤平弘树 三嶋弘次 片冈静夫		
发明人	西井重明 松井一裕 石桥卓也 冈正则 藤平弘树 三嶋弘次 片冈静夫		
IPC分类号	C07C235/20 C07K5/062 G01N33/53 G01N33/531 C07K5/06		
CPC分类号	G01N33/5308 C07C235/20 C07K5/06191		
代理人(译)	程金山		
优先权	2002251616 2002-08-29 JP		
其他公开文献	CN1678568A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

式(1)的化合物和使用下面的式(1)化合物作为标准定量测定样品中二氧芑的免疫测定方法，其中R1、R2、R3和R4可以相同或不同并且表示氯或氢，n为1到10的整数，Z表示氨基酸残基或者肽。

与废气样品 (n=29) 的仪器
分析测量值的相关性

