



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110054620 A

(43)申请公布日 2019.07.26

(21)申请号 201910315776.5

(22)申请日 2019.04.19

(71)申请人 北京九强生物技术股份有限公司

地址 100083 北京市海淀区花园东路15号
旷怡大厦5层

(72)发明人 张启飞 金石 龚俊 王贵利
封建新 刘希

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟 程云

(51)Int.Cl.

G07D 403/06(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书3页 说明书9页 附图2页

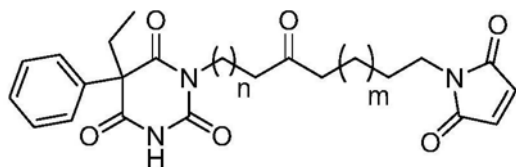
(54)发明名称

一种苯巴比妥衍生物及其在免疫检测中的用途

(57)摘要

本申请公开了一种苯巴比妥衍生物及其在免疫检测中的用途。具体而言,本申请涉及一种苯巴比妥衍生物及其制备方法,以及与含有上述苯巴比妥衍生物的试剂盒及其配制方法。本申请的技术方案使用了一种新型的苯巴比妥衍生物,并使用了选择性较高的马来酰亚胺-巯基的偶联方法,使衍生物和酶进行一比一偶联,大大降低了常规偶联过程所形成的批间差。由此方法得制的苯巴比妥试剂有较好的特异性,与常见超过20种的药物无明显交叉反应。本申请的苯巴比妥检测试剂盒简便、快捷、成本低,可以在多种主流机型上进行自动化检测。

1. 一种苯巴比妥衍生物, 其具有式I所示的结构:



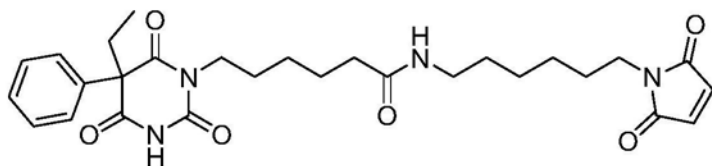
式 I

其中

n为1至10的整数, 优选2至6的整数;

m为1至10的整数, 优选1至5的整数;

优选, 所述苯巴比妥衍生物, 其具有式II所示的结构:



式 II。

2. 一种酶标记物, 其包含:

-权利要求1所述的苯巴比妥衍生物、和

-酶;

其中,

优选, 所述酶和所述苯巴比妥衍生物共价结合;

所述的酶为葡萄糖六磷酸脱氢酶。

3. 一种试剂, 其包含:

权利要求1所述的苯巴比妥衍生物、和/或

权利要求2所述的酶标记物。

4. 一种酶标记物的制备方法, 其包括步骤:

1) 提供权利要求1所述的苯巴比妥衍生物, 优选在非质子性溶剂中提供权利要求1所述的苯巴比妥衍生物;

2) 提供酶, 优选在缓冲液中提供酶;

3) 在18℃至28℃, 将所述苯巴比妥衍生物和所述酶接触1小时至4小时, 优选2小时至3小时, 使得所述苯巴比妥衍生物和所述酶发生偶联, 得到所述酶标记物;

4) 任选, 对所述酶标记物进行纯化, 优选脱盐;

步骤1) 和2) 可互换;

所述缓冲液选自: PBS、Tris、TAPS、TAPSO, 所述缓冲液pH为6.0至8.0;

所述非质子性溶剂选自以下一种或组合: 乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砜;

所述的酶为葡萄糖六磷酸脱氢酶;

优选, 在偶联之前, 所述酶包含至少一个游离的巯基;

更优选, 所述酶的第56位氨基酸取代为半胱氨酸;

步骤3) 中, 所述苯巴比妥衍生物和所述酶的摩尔比范围为1:1至1:500; 优选1:50。

5. 根据权利要求4所述的酶标记物的制备方法, 其包括步骤:

1) 将权利要求1所述的苯巴比妥衍生物溶于N,N-二甲基甲酰胺中;

2) 将含有一个游离巯基的葡萄糖六磷酸脱氢酶溶于缓冲液中;

- 3) 将步骤1) 和步骤2) 的溶液混合, 在18℃至25℃下充分震荡2至3小时;
- 4) 脱盐处理, 得到葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物。
6. 一种酶标记物, 其是权利要求4或5所述方法制备得到的。
7. 一种试剂, 其包含权利要求6所述的酶标记物。

8. 一种苯巴比妥检测试剂盒, 其包含:

- 第一试剂, 其包含缓冲液、权利要求2或6所述的酶标记物;
- 第二试剂, 其包含缓冲液、抗苯巴比妥抗体;
- 任选, 质控品和/或校准品;

其中,

所述缓冲液选自: TAPS、磷酸缓冲液、甘氨酸缓冲液、Tris缓冲液、硼酸缓冲液、MOPS缓冲液、HEPES缓冲液;

所述缓冲液pH为5.0至8.5, 优选7.0至8.0;

所述抗苯巴比妥抗体源自: 小鼠、大鼠、猫、犬、灵长类、牛、马、羊、骆驼科、禽、人;

所述抗苯巴比妥抗体选自: 单抗、多抗、重组抗体、嵌合抗体、抗原结合片段;

所述质控品包含2μg/ml至70μg/ml苯巴比妥, 优选5μg/ml至50μg/ml;

所述校准品包含0μg/ml至100μg/ml苯巴比妥, 优选0μg/ml至80μg/ml。

9. 一种苯巴比妥检测试剂盒, 其包含:

-第一试剂, 其包含:

10ng/mL至500ng/mL葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物、

30mM至80mM TAPS缓冲液、

50mM至120mM NaCl、

0.05%至0.2%w/v防腐剂、

0.05%至0.2%w/v稳定剂;

-第二试剂, 其包含:

0.5mg/L至5.0mg/L抗苯巴比妥抗体、

30mM至80mM Tris缓冲液、

50mM至120mM NaCl、

0.05%至0.2%w/v防腐剂、

0.05%至0.2%w/v稳定剂;

-任选, 质控品和/或校准品;

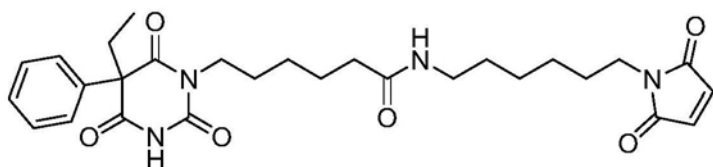
其中,

所述稳定剂选自: 牛血清白蛋白、海藻糖、蔗糖、甘露醇、甘油、甘氨酸、聚乙二醇6000或其组合, 优选牛血清白蛋白;

所述防腐剂选自: 叠氮化合物、MIT、生物防腐剂PC; 优选, 所述叠氮化合物是叠氮钠或叠氮锂; 优选, 所述生物防腐剂PC是PC-300;

所述抗苯巴比妥抗体是羊抗体;

所述苯巴比妥衍生物具有式II所示的结构:



式 II

所述质控品包含5 μ g/ml至50 μ g/ml苯巴比妥；

所述校准品包含0 μ g/ml至80 μ g/ml苯巴比妥。

10.选自以下的任一项或组合在制备检测装置中的用途：

权利要求1所述的苯巴比妥衍生物、权利要求2所述的酶标记物、权利要求6所述的酶标记物；

所述检测装置选自以下一种或组合：试剂、试剂盒、孔板、颗粒、芯片、试纸；

优选，所述检测装置是均相免疫检测试剂。

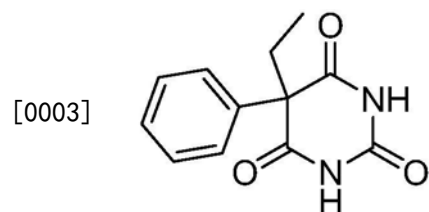
一种苯巴比妥衍生物及其在免疫检测中的用途

技术领域

[0001] 本申请涉及一种苯巴比妥衍生物及其制备方法、一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 苯巴比妥 (Phenobarbital) 结构式如下所示：



[0004] 苯巴比妥又名鲁米那、迦地那，呈白色有光泽结晶状粉末，常温下暴露于空气中性质稳定，难溶于水，不溶于酸，能溶于乙醇、乙醚、丙酮等有机溶剂。

[0005] 苯巴比妥具有镇静、催眠、抗惊厥作用，并可抗癫痫，对癫痫大发作与局限性发作及癫痫持续状态有效，并能诱导肝脏微粒体葡萄糖醛酸转移酶活性，促进胆红素与葡萄糖醛酸结合，降低血浆胆红素浓度，治疗新生儿脑核性黄疸。

[0006] 由于其具有镇静、催眠等生物学功能，一直在临床上被用作为抗癫痫药物。然而，正是因为有这些功能，苯巴比妥又被不法商人非法添加在助眠类保健食品中牟取不法利益，苯巴比妥存在致畸致癌等毒性作用。对中枢神经的抑制作用随着剂量加大，表现为镇静、催眠、抗惊厥及抗癫痫。大剂量对心血管系统、呼吸系统有明显的抑制。过量可麻痹延髓呼吸中枢致死。

[0007] 体外电生理实验见苯巴比妥使神经细胞的氯离子通道开放，细胞过极化，拟似 γ -氨基丁酸 (GABA) 的作用。治疗浓度的苯巴比妥可降低谷氨酸的兴奋作用，加强 γ -氨基丁酸的抑制作用，抑制中枢神经系统单突触和多突触传递，抑制痫灶的高频放电及其向周围扩散。

[0008] 苯巴比妥口服后，在消化道吸收完全但较缓慢，注射后0.5至1小时起效，一般2至18小时血药浓度达到峰值。吸收后分布于体内各组织，血浆蛋白结合率约为40% (20%至45%)。有效血药浓度约为10至40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，超过40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 即可出现毒性反应。成人半衰期 ($t_{1/2}$) 约为50至144小时，小儿约为40至70小时，肝肾功能不全时半衰期延长。约48%至65%的苯巴比妥在肝脏代谢，转化为羟基苯巴比妥。苯巴比妥为肝药酶诱导剂，提高药酶活性，不但加速自身代谢，还可加速其他药物代谢。大部分与葡萄糖醛酸或硫酸盐结合，由肾脏排出，有27%至50%以原型从肾排出。

[0009] 目前国内市场苯巴比妥药物检测的方法主要有高效液相色谱法 (HPLC)、发光免疫、酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 等方法。HPLC法需要复杂的样品前处理，操作复杂周期长且成本昂贵；发光免疫法试剂成本昂贵，不适合常规治疗药物检测，更不利于大范围推广。

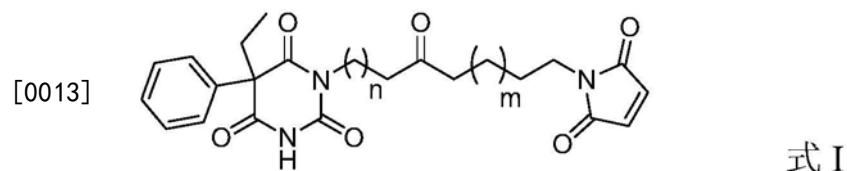
[0010] 专利申请CN102323414A描述了一种苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒，其包含苯巴

比妥衍生物特异的多克隆抗体和葡萄糖六磷酸脱氢酶 (G6PD) 标记的苯巴比妥衍生物;其中所述G6PD标记的苯巴比妥衍生物能与所述苯巴比妥衍生物特异抗体特异性结合。其中,所述G6PD标记的苯巴比妥衍生物的制备包括以下步骤:a) 将15mg G6PD溶解于12mL Tris缓冲液 (pH9.0、0.05mol/L Tris、3.3mmol/L氯化镁、145.4mmol/L氯化钠) 中,然后依次加入225mg还原型辅酶I、135mg葡萄糖-6-磷酸、0.75mL卡必醇和2.25mL二甲基亚砷;b) 将10mg苯巴比妥衍生物溶解于420 μ L二甲基亚砷和180 μ L二甲基甲酰胺中,加入6 μ L三丁胺和350 μ L氯甲酸异丁酯在2-8 $^{\circ}$ C条件下搅拌30分钟;c) 将前述a和b步骤所得溶液混合,在2-8 $^{\circ}$ C条件下搅拌12-16小时,并将偶联物进行G-25凝胶层析柱纯化,得到G6PD标记的苯巴比妥衍生物。

[0011] 然而,现有技术的方法依赖于对苯巴比妥的反应基团(如羧基)进行激活,之后再与酶进行反应。这样的策略难以保证定向反应,也难以实现衍生物和酶之间进行1:1偶联,而导致批间差不稳定。因而,本领域仍需一种改进的苯巴比妥衍生物,以及一种改进的偶联方法。

发明内容

[0012] 根据一些实施方案,提供了一种苯巴比妥衍生物,其具有式I所示的结构:

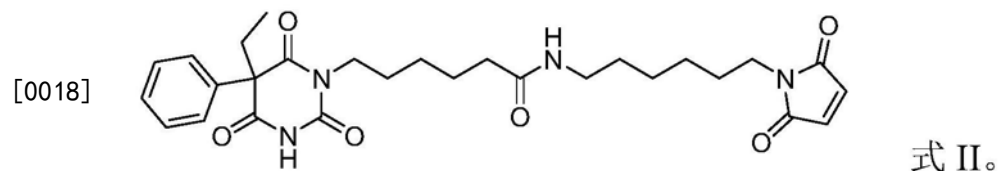


[0014] 其中

[0015] n为1至10的整数,优选2至6的整数;

[0016] m为1至10的整数,优选1至5的整数。

[0017] 在一些具体的实施方案中,苯巴比妥衍生物具有式II所示的结构:



[0019] 根据一些实施方案,提供了一种酶标记物,其包含根据本申请的苯巴比妥衍生物和酶。在一些具体的实施方案中,酶和所述苯巴比妥衍生物共价结合。在一些具体的实施方案中,酶为葡萄糖六磷酸脱氢酶。

[0020] 根据一些实施方案,提供了一种试剂,其包含根据本申请的苯巴比妥衍生物。

[0021] 根据另一些实施方案,提供了一种试剂,其包含根据本申请的酶标记物。

[0022] 根据一些实施方案,提供了一种酶标记物的制备方法,其包括步骤:

[0023] 1) 提供根据本申请的苯巴比妥衍生物,尤其是在非质子性溶剂中提供苯巴比妥衍生物;

[0024] 2) 提供酶,优选在缓冲液中提供酶;

[0025] 3) 在18 $^{\circ}$ C至28 $^{\circ}$ C,按照苯巴比妥衍生物:酶=1:1至1:500的摩尔比(优选1:50),将所述苯巴比妥衍生物和所述酶接触1小时至4小时(例如1、1.5、2、2.5、3、3.5、4小时,或之间的任何值),使得所述苯巴比妥衍生物和所述酶发生偶联,得到酶标记物。

[0026] 在一些具体的实施方案中,根据需要对制得的酶标记物进行纯化,例如但不限于脱盐处理。

[0027] 在本申请上下文中,步骤编号不应理解为步骤的操作顺序。

[0028] 在一些具体的实施方案中,步骤1)和2)可互换顺序。

[0029] 在一些实施方案中,在缓冲液中提供酶,所述缓冲液选自:PBS、Tris、TAPS、TAPSO,所述缓冲液pH为6.0至8.0。

[0030] 在一些实施方案中,非质子性溶剂提供反应媒介环境,其选自以下一种或组合:乙腈、二甲基甲酰胺、二甲基亚砷。

[0031] 在一些实施方案中,酶为葡萄糖六磷酸脱氢酶;尤其是在偶联之前,酶包含至少一个游离的巯基,以允许进行偶联反应。

[0032] 在具体的实施方案中,提供一种酶标记物的制备方法,其包括步骤:

[0033] 1) 将苯巴比妥衍生物溶于N,N-二甲基甲酰胺中;

[0034] 2) 将含有一个游离巯基的葡萄糖六磷酸脱氢酶溶于缓冲液中;

[0035] 3) 将步骤1)和步骤2)的溶液混合,在18℃至25℃下充分震荡2至3小时;

[0036] 4) 脱盐处理,得到葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物。

[0037] 根据一些实施方案,提供了根据本申请方法制备所得的酶标记物。

[0038] 根据一些实施方案,提供了一种苯巴比妥检测试剂盒,其包含:

[0039] -第一试剂,其包含根据本申请的酶标记物;

[0040] -第二试剂,其包含抗苯巴比妥抗体,其源自:小鼠、大鼠、猫、犬、灵长类、牛、马、羊、骆驼科、禽、人;所述抗苯巴比妥抗体选自:单抗、多抗、重组抗体、嵌合抗体、抗原结合片段;

[0041] -任选,质控品;和/或

[0042] -任选,校准品。

[0043] 在一些实施方案中,质控品包含2μg/ml至70μg/ml苯巴比妥,例如5、10、15、20、25、30、35、40、45、50μg/ml(或之间的任意值)苯巴比妥。

[0044] 在一些实施方案中,校准品包含0μg/ml至100μg/ml苯巴比妥,例如0、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100μg/ml(或之间的任意值)苯巴比妥。

[0045] 在一些实施方案中,苯巴比妥检测试剂盒,其包含:

[0046] -第一试剂,其包含:

[0047] 10ng/mL至500ng/mL葡萄糖六磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物、

[0048] 30mM至80mM TAPS缓冲液、

[0049] 50mM至120mM NaCl、

[0050] 0.05%至0.2%w/v防腐剂、

[0051] 0.05%至0.2%w/v稳定剂;

[0052] -第二试剂,其包含:

[0053] 0.5mg/L至5.0mg/L抗苯巴比妥抗体、

[0054] 30mM至80mM Tris缓冲液、

[0055] 50mM至120mM NaCl、

- [0056] 0.05%至0.2%w/v防腐剂、
- [0057] 0.05%至0.2%w/v稳定剂。
- [0058] 根据一些实施方案,提供了本申请的苯巴比妥衍生物在制备检测装置中的用途。
- [0059] 根据一些实施方案,提供了本申请的酶标记物在制备检测装置中的用途。
- [0060] 在一些实施方案中,检测装置体现为选自以下形式:试剂、试剂盒、孔板、颗粒、芯片、试纸。

附图说明

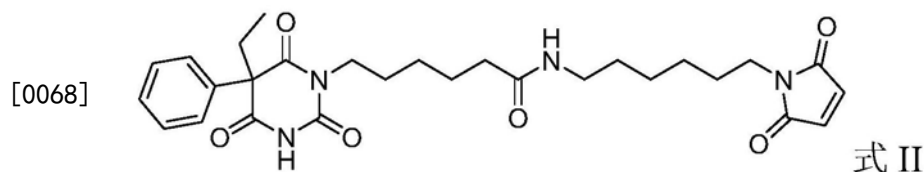
- [0061] 图1是苯巴比妥衍生物的合成路线图。
- [0062] 图2是本申请试剂盒的定标曲线图。
- [0063] 图3是本申请试剂盒的相关性分析图。
- [0064] 图4是本申请试剂盒的线性测试结果。

具体实施方式

[0065] 以下结合具体示例对本申请做出具体说明,示例中仅详细介绍下图所列苯巴比妥衍生物的合成方法,以及利用该衍生物与葡萄糖六磷酸脱氢酶进行偶联的具体方法。

[0066] 实施例1.苯巴比妥衍生物的合成及其结构确认

[0067] 按照图1所示的苯巴比妥衍生物合成路线,合成式II所示化合物:



[0069] 1.化合物3的合成

[0070] 将苯巴比妥 (1.84g, 7.94mmol) 和 K_2CO_3 (1.65g, 11.90mmol) 用 DMF (10mL) 溶解, 向反应体系中加入化合物2 (1.41g, 6.35mmol), 加热至 $50^\circ C$ 反应 16h。反应体系恢复至室温 ($25^\circ C$), 反应体系中加入水, 并使用乙酸乙酯萃取, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 减压除去有机溶剂, 层析柱 (EA/PE=1:3) 纯化, 得到无色油状化合物3 (2.04g, 81%)。

[0071] 2.化合物4的合成

[0072] 用乙醇 (50mL) 将化合物3 (2.04g, 5.20mmol) 溶解, 反应体系中加入 NaOH (2N, 10mL), 室温 ($25^\circ C$) 下搅拌 2h; 使用 HCl (1N) 调 pH=5, 减压除去溶剂, 层析柱 (MeOH/DCM=1:20) 纯化, 得到白色固体化合物4 (1.20g, 60.0%)。

[0073] 3.苯巴比妥衍生物的合成

[0074] 将化合物4 (166mg, 0.48mmol) 和中间体5 (74mg, 0.32mmol) 溶于 DCM (5mL) 中, 向其中滴加三乙胺 (98mg, 0.96mmol), 加入 HATM (147mg, 0.39mmol), 室温 ($25^\circ C$) 搅拌 5h。向反应体系中加入水 (30mL), 用 DCM 进行萃取, 有机相用饱和食盐水洗涤, 无水 Na_2SO_4 干燥, 减压除去溶剂, 制备版纯化 (EA), 得到无色油状苯巴比妥衍生物 (0.18g, 68%)。

[0075] 4.经质谱 (测得 $M+1$ 525.5, $M+23$ 574.6) 和核磁 (1H -NMR) 鉴定, 苯巴比妥衍生物结构正确无误。

[0076] 实施例2:酶标记物制备方法 (本申请方法)

- [0077] 1. 将苯巴比妥衍生物溶于N,N-二甲基甲酰胺中(10mg/ml)；
- [0078] 2. 将200 μ l葡萄糖六磷酸脱氢酶(经人工改造使其含有单一游离巯基,第56位Lys取代为Cys)溶液(6.4mg/ml、0.2M磷酸缓冲液,pH=8.0)加入至750 μ l缓冲溶液(0.05M Na₂HPO₄、150mM NaCl、10mM EDTA、0.1%NaN₃、pH=7.2)中；
- [0079] 3. 然后向其中加入巴比妥衍生物的N,N-二甲基甲酰胺溶液50 μ l；
- [0080] 4. 上述混合溶液,在室温(18至28℃)下充分震荡2-3小时；
- [0081] 5. 脱盐处理,得到苯巴比妥标记的葡萄糖六磷酸脱氢酶(浓度0.1mg/mL-2.0mg/mL)。

[0082] 实施例3. 酶标记物制备方法(对照方法,活化的羧基与G6PDH上的氨基偶联反应)

- [0083] 1. 将15mg葡萄糖六磷酸脱氢酶溶解于12mL Tris缓冲液中,然后依次加入225mg还原态的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸NADH,135mg葡萄糖-6-磷酸、0.75mL卡必醇(Carbitol)和2.25mL二甲基亚砷;所述Tris缓冲液pH为9.0,各组分浓度为:0.05mol/L Tris、3.3mmol/L氯化镁、145.4mmol/L氯化钠。

- [0084] 2. 苯巴比妥衍生物的活化:将10mg苯巴比妥衍生物溶解于420 μ L二甲基亚砷和180 μ L二甲基甲酰胺中,加入6 μ L三丁胺和350 μ L氯甲酸异丁酯在2-8℃条件下搅拌30分钟；

- [0085] 3. 将所述步骤1和2所得的溶液混合,在2至8℃条件下搅拌12至16小时,并将偶联的酶标抗原进行G-25凝胶层析柱纯化,得到葡萄糖-6-磷酸脱氢酶标记的苯巴比妥衍生物。

[0086] 实施例4. 试剂的制备

- [0087] 1. 第一试剂的制备:

- [0088] 将实施例2或3制备的酶标记物按1:2500-1:10000 (V/V) 比例添加到R1缓冲溶液中(50mM TAPS、100mM NaCl、0.1%NaN₃、0.1%BSA、pH=8.0),使得酶标记物的终浓度为10ng/mL至500ng/mL。

- [0089] 2. 第二试剂的制备:

- [0090] 将苯巴比妥抗体(市售、自制均可)按1:200-1:2000 (W/V) 比例添加到R2缓冲溶液中(50mM Tris、100mM NaCl、0.1%NaN₃、0.1%BSA、pH=8.0),使得抗体的终浓度为0.5mg/L至5.0mg/L。

- [0091] 3. 质控品、校准品:

- [0092] 所述质控品为苯巴比妥纯品由缓冲溶液稀释所得,其浓度分别为5-10 μ g/ml、20-30 μ g/ml、40-50 μ g/ml。

- [0093] 所述校准品为苯巴比妥纯品由缓冲溶液稀释所得,其浓度分别为0 μ g/ml、5 μ g/ml、10 μ g/ml、20 μ g/ml、40 μ g/ml、80 μ g/ml。

- [0094] 4. 试剂盒组装:

- [0095] 将上述试剂(任选包含质控品、校准品),组装成苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒。

[0096] 实施例5: 苯巴比妥均相酶免疫检测试剂盒的检测实验

- [0097] 1. 本申请试剂盒基于竞争反应,检测原理如下:

- [0098] 在均相反应体系中,样本中的苯巴比妥和葡萄糖六磷酸脱氢酶-苯巴比妥偶联物同时竞争结合抗苯巴比妥抗体位点,由于抗体与偶联物结合后酶活性下降,样品中游离的苯巴比妥越多,竞争结合的抗体位点越多,抗体与酶偶联物的结合就减少,未结合抗体的酶偶联物催化 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型(NAD⁺)转化为 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原

型 (NADH), 样品中的苯巴比妥浓度与NADH的生成量成正比, 通过吸光度的变化即可得到样品中苯巴比妥的浓度。

[0099] 2. 定标实验

[0100] 请参阅图2, 苯巴比妥校准品溶于缓冲溶液中 (0.9%NaCl, 0.1%NaN₃), 配制成0μg/ml、5μg/ml、10μg/ml、20μg/ml、40μg/ml、80μg/ml共6种浓度的校准品。定标工作体积为2-10μl, 然后加入100-200μl的第一试剂和50-100μl的第二试剂, 速率法, 检测主波长340nm, 副波长405nm, 特定读点的吸光度变化率, 绘制成定标曲线 (图2), 本申请中定标曲线的建立和优化均是在日立7180上完成, 但其他主流机型 (AU680、雅培C16000等) 经检测可用。

[0101] 日立7180设置参数如下:

	检测方法	速率法
	样本量	2.2μl
[0102]	试剂 R1	150μl
	试剂 R2	50μl
	读点	31-34 点
	检测波长 (主)	340
[0103]	检测波长 (副)	405
	曲线拟合方式	Spline。

[0104] 3. 精密度实验

[0105] 利用如上建立起的定标曲线进行精密度测定, 高、中、低质控品分别检测20次。

[0106] 表1. 本申请的苯巴比妥试剂盒精密度实验

[0107]

测次	质控1	质控2	质控3
1	9.96	29.93	53.52
2	9.74	29.89	55.40
3	9.84	29.63	53.59
4	9.98	29.83	51.37
5	10.10	29.47	54.34
6	10.12	30.82	54.54
7	10.34	29.73	52.05
8	9.69	29.57	54.38
9	10.22	30.11	52.23
10	10.03	30.33	55.48
11	10.15	30.27	55.44
12	9.84	29.91	54.08
13	9.95	29.70	52.90
14	10.02	30.40	53.08
15	10.07	29.67	53.26
16	9.97	29.65	52.54

17	9.83	29.02	53.26
18	9.89	29.86	53.04
19	10.00	30.29	55.97
20	9.71	30.30	53.63
均值	9.97	29.92	53.71
标准差	0.17	0.40	1.25
偏差	1.70%	1.35%	2.32%

[0108] 如表1所示,样本测试重复20次,偏差小于3%。

[0109] 4. 药物干扰实验

[0110] 选取常用的20种化合物和药物,在苯巴比妥浓度为15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度左右时,如下浓度的化合物无明显干扰。

[0111] 表2. 药物干扰实验

[0112]	序号	化合物	测试浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
	1	阿米替林	25
	2	阿普比妥	100
	3	卡马西平	500
[0113]	4	卡马西平-10,11-环氧化物	500
	5	氯丙嗪	60
	6	氯拉卓酸	500
	7	乙琥胺	500
	8	乙妥英	200
	9	5-乙基-5-苯海因 (Nirvanol)	100
	10	5-(p-羟苯基)-5-苯海因	100
	11	丙咪嗪	5
	12	美芬妥因	200
	13	甲琥胺	150
	14	去甲替林	10
	15	2-苯基-2-乙基-丙二酰胺(PEMA)	500
	16	苯琥胺	500
	17	苯妥英	60
	18	扑米酮	200
	19	异丙嗪	30
	20	丙戊酸(2-丙基-戊酸)	200

[0114] 5. 线性实验

[0115] 选择低值样本与高值样本按照等差稀释的方法进行稀释,每个样本重复检测3次,所测得线性数据如表3。

[0116] 表3. 苯巴比妥试剂盒线性数据

[0117]

	测值1	测值2	测值3	均值	理论值	相对偏差	绝对偏差
1	2.08	1.99	1.87	1.98	1.78		-0.2
2	10.77	10.88	10.57	10.74	10.77	-0.27%	
3	19.50	19.08	19.17	19.25	19.76	-2.58%	
4	27.95	28.39	27.27	27.87	28.75	-3.07%	
5	37.83	37.70	37.87	37.80	37.74	0.15%	
6	45.67	48.25	47.46	47.13	46.74	0.84%	
7	56.27	55.35	56.57	56.06	55.73	0.60%	
8	68.65	67.80	63.57	66.67	64.72	3.02%	
9	73.07	75.20	74.37	74.21	73.71	0.68%	
10	82.91	77.93	81.19	80.68	82.70	-2.45%	

[0118] 6. 定标周期及机载稳定性

[0119] 选择高、中、低三个浓度的质控品,每天或者隔天检测三次,数据显示本申请的苯巴比妥检测试剂盒定标周期可以稳定两周以上;试剂开封之后放置于机器上,检测显示机载稳定性超过40天,数据如下:

[0120] 表4. 定标周期及机载稳定性

[0121]

	质控 1					质控 2					质控 3				
	测值 1	测值 2	测值 3	均值	偏差	测值 1	测值 2	测值 3	均值	偏差	测值 1	测值 2	测值 3	均值	偏差
0 天	8.77	8.70	8.75	8.74		28.28	28.77	28.69	28.58		52.59	50.09	49.73	50.80	
3 天	9.11	9.60	8.99	9.23	5.64%	29.26	29.21	28.93	29.13	1.94%	52.55	52.49	51.76	52.27	2.88%
4 天	8.67	8.89	8.75	8.77	0.34%	29.18	28.18	29.12	28.83	0.86%	50.18	49.70	50.66	50.18	-1.23%
5 天	8.90	9.04	8.95	8.96	2.56%	28.92	28.76	28.24	28.64	0.21%	49.41	50.30	49.58	49.76	-2.05%
6 天	8.59	9.08	9.09	8.92	2.06%	28.84	28.80	28.68	28.77	0.68%	49.38	49.94	50.24	49.85	-1.87%
7 天	9.28	9.12	9.20	9.20	5.26%	28.85	28.96	28.84	28.88	1.06%	50.75	50.06	50.87	50.56	-0.48%
10 天	8.84	8.81	8.41	8.69	-0.61%	28.52	27.54	28.01	28.02	-1.95%	48.77	49.38	49.20	49.12	-3.32%
11 天	8.60	8.76	8.76	8.71	-0.38%	28.20	28.24	28.04	28.16	-1.47%	48.20	49.17	48.69	48.69	-4.17%
12 天	8.59	8.78	9.04	8.80	0.72%	28.24	28.60	28.58	28.47	-0.37%	48.23	46.93	46.61	47.26	-6.98%
13 天	9.07	9.12	9.02	9.07	3.78%	29.94	29.62	29.44	29.67	3.80%	49.73	49.12	49.38	49.41	-2.74%
14 天	8.75	8.65	8.73	8.71	-0.34%	27.87	27.77	27.65	27.76	-2.86%	47.56	48.34	48.06	47.99	-5.54%
17 天	8.52	8.66	8.99	8.72	-0.19%	27.68	28.23	27.86	27.92	-2.30%	48.40	48.71	47.67	48.26	-5.01%
19 天	8.71	8.93	8.60	8.75	0.08%	28.03	28.22	27.31	27.85	-2.54%	49.29	51.21	49.03	49.84	-1.89%
21 天	8.63	9.07	8.82	8.84	1.14%	27.94	28.65	28.52	28.37	-0.73%	50.21	49.94	49.32	49.82	-1.93%
24 天	9.62	9.18	9.08	9.29	6.33%	28.37	27.14	28.47	27.99	-2.05%	48.94	46.85	46.45	47.41	-6.67%
26 天	8.91	8.75	8.66	8.77	0.38%	27.87	27.38	27.31	27.52	-3.71%	48.43	49.32	47.98	48.58	-4.38%
28 天	8.98	8.64	8.62	8.75	0.08%	27.92	28.24	27.13	27.76	-2.86%	47.95	49.12	47.95	48.34	-4.85%
40 天	8.97	8.89	8.78	8.88	1.60%	25.80	26.17	25.44	25.80	-9.72%	46.58	46.07	45.78	46.14	-9.17%
40 天*	9.11	9.40	9.27	9.26	5.95%	28.59	27.88	28.41	28.29	-1.00%	50.08	48.98	49.36	49.47	-5.34%

[0122] 注:40天*表示机载40天重新定标之后检测数据。

[0123] 以上数据说明,本申请的苯巴比妥检测试剂盒,定标周期超过两周,在机稳定性大于40天。

[0124] 7. 批间差

[0125] 使用三批次本申请试剂和对照试剂分别定标,计算不同批次吸光度变化差异。

[0126] 表5. 试剂批间差数据

[0127]

试剂	校准品	ΔAbs			偏差	
		Lot1	Lot2	Lot3	Lot1/ Lot 3	Lot 2/ Lot 3
本申请 试剂	S1	0.2277	0.2299	0.2240	1.65%	2.63%
	S2	0.2543	0.2536	0.2504	1.56%	1.28%
	S3	0.2754	0.2764	0.2743	0.29%	0.77%
	S4	0.3133	0.3157	0.3115	0.58%	1.35%
	S5	0.2571	0.3565	0.3546	0.71%	0.54%
	S6	0.3909	0.3898	0.3903	0.15%	-0.13%
对照方 法试剂	S1	0.1666	0.1918	0.2013	-17.24%	-4.72%
	S2	0.2401	0.2765	0.3012	-20.29%	-8.20%
	S3	0.2833	0.3300	0.3458	-18.07%	-4.57%
	S4	0.3271	0.3801	0.4155	-21.28%	-8.52%
	S5	0.3634	0.4156	0.4306	-15.61%	-3.48%
	S6	0.3854	0.4628	0.4833	-20.26%	-4.24%

[0128] 以上所述仅为本发明的实施案例,并非全部权利范围,所有应用本发明的说明书及图、表所做的等效结构及等效流程,均包含于本专利保护范围内。

[0129] 本申请的优势在于使用了一种新型的苯巴比妥衍生物,并使用了选择性较高的马来酰亚胺-巯基的偶联方法,使衍生物和酶可以进行一比一的偶联,大大降低了普通偶联过程所形成的批间差。由此方法制得的苯巴比妥试剂有较好的特异性,与常见超过20种的药物无明显交叉反应;准确度和精确度非常高,检测标准差小于2%,相关系数大于98%。本申请的苯巴比妥检测试剂盒简便、快捷、成本低,可以在多种主流机型上进行自动化检测。

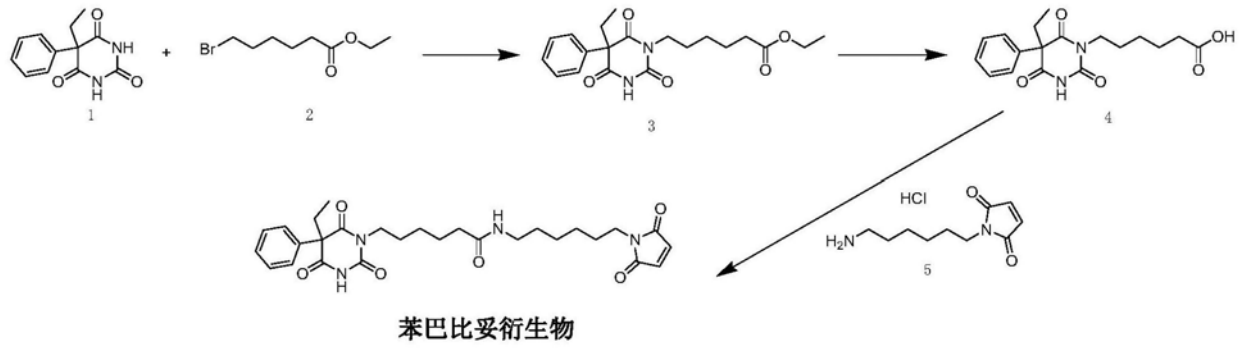


图1

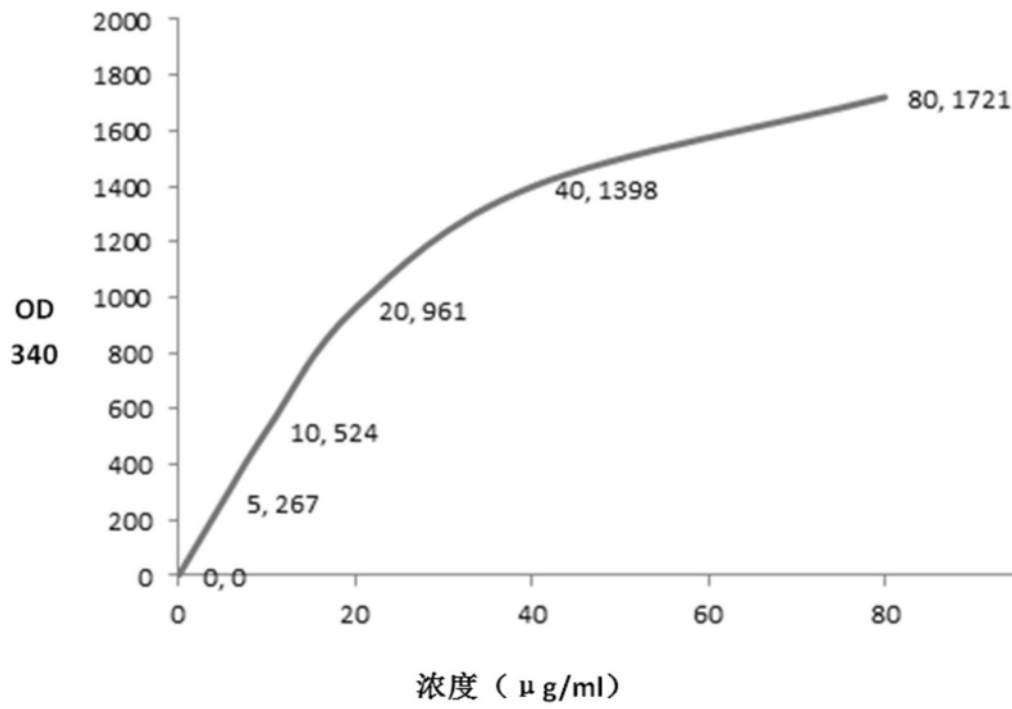


图2

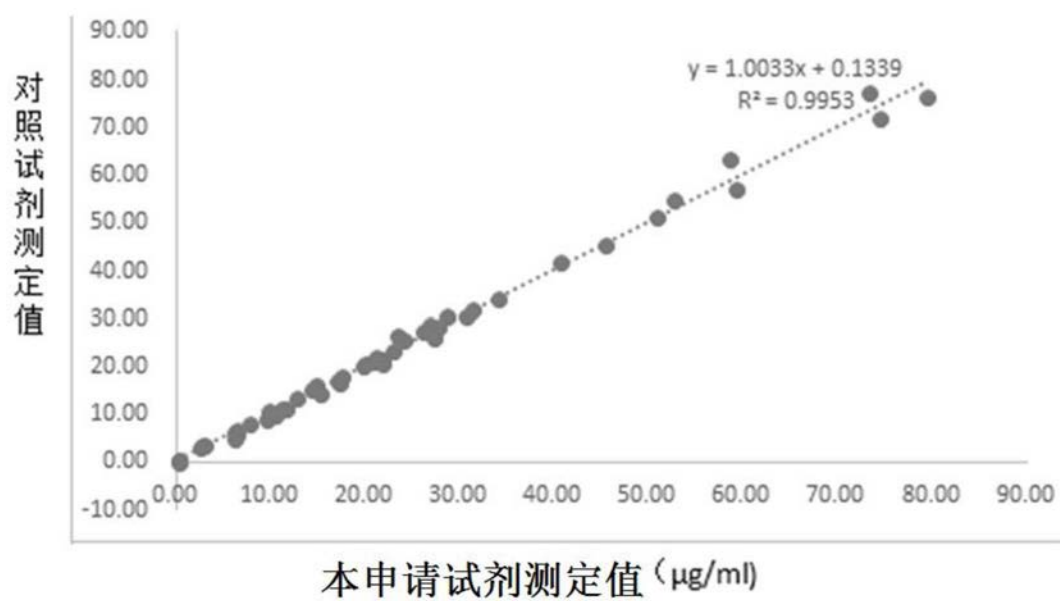


图3

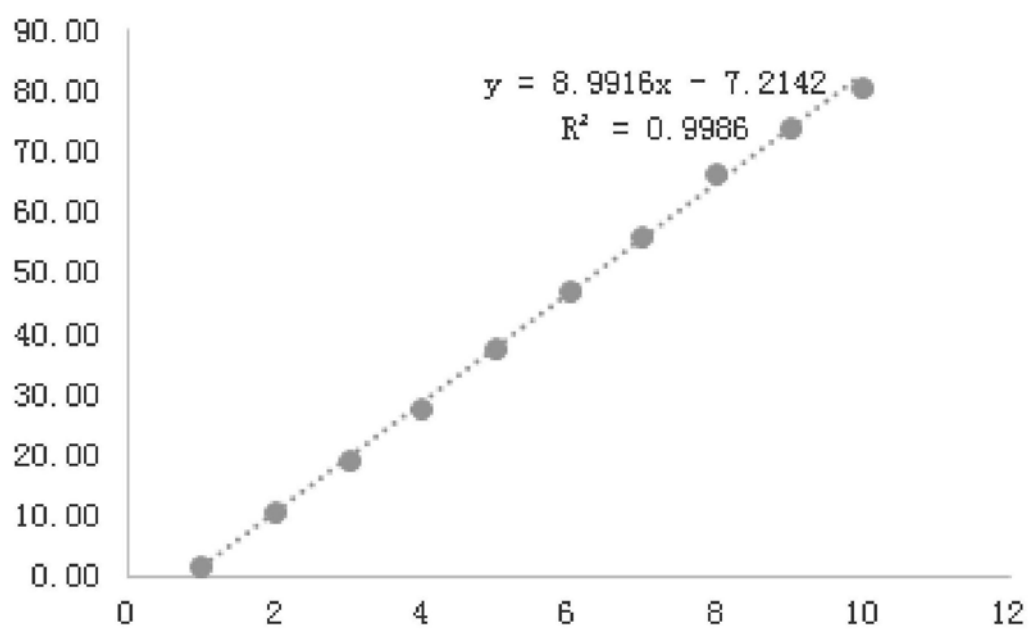
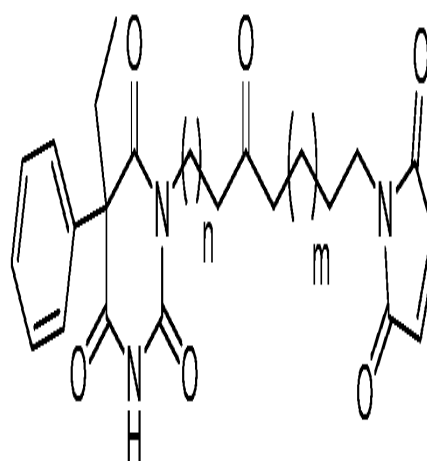


图4

本申请公开了一种苯巴比妥衍生物及其在免疫检测中的用途。具体而言，本申请涉及一种苯巴比妥衍生物及其制备方法，以及与含有上述苯巴比妥衍生物的试剂盒及其配制方法。本申请的技术方案使用了一种新型的苯巴比妥衍生物，并使用了选择性较高的马来酰亚胺-巯基的偶联方法，使衍生物和酶进行一比一偶联，大大降低了常规偶联过程所形成的批间差。由此方法得制得的苯巴比妥试剂有较好的特异性，与常见超过20种的药物无明显交叉反应。本申请的苯巴比妥检测试剂盒简便、快捷、成本低，可以在多种主流机型上进行自动化检测。



式