



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104370761 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 25

(21) 申请号 201410512584. 0

(22) 申请日 2014. 09. 29

(71) 申请人 安徽师范大学

地址 241000 安徽省芜湖市弋江区花津南路
安徽师范大学

(72) 发明人 张明翠 洪文童

(74) 专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 朱圣荣

(51) Int. Cl.

C07C 227/04(2006. 01)

C07C 229/62(2006. 01)

C07C 229/66(2006. 01)

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书3页 说明书7页

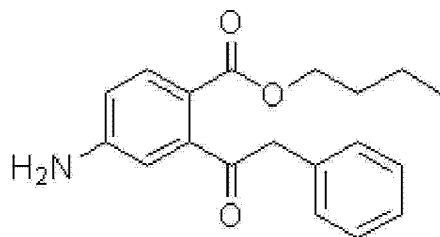
(54) 发明名称

一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物及制备方法、邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法

(57) 摘要

本发明涉及一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物及制备方法、邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法。半抗原衍生物为 4- 氨基邻苯二甲酸丁基苄酯, 衍生物制备方法步骤包括 :4- 硝基邻苯二甲酸酐水解酯化反应、水解酯化产物与氯化苄反应制得 4- 硝基邻苯二甲酸丁基苄酯、4- 硝基邻苯二甲酸丁基苄酯还原得到最终产物, 检测方法包括抗原、抗体制备、标准曲线的绘制及样品邻苯二甲酸丁基苄酯含量测定。检测方法技术灵敏度高, 选择性强, 检测时间短, 成本低。

1. 一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物,其结构为:



2. 一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物的制备方法,步骤包括:

A、将 4- 硝基邻苯二甲酸酐与无水正丁醇混合后加热到 100 ~ 130℃,使其完全溶解成无色透明液体,在 105 ~ 115℃下搅拌回流进行水解酯化反应;

B、在碱性条件和催化剂催化条件下,将步骤A制得的产物与氯化苄在 100 ~ 120℃下反应 2.5 ~ 4 小时,制得 4- 硝基邻苯二甲酸丁基苄酯;

C、将 4- 硝基邻苯二甲酸丁基苄酯溶于有机溶剂中,在酸性条件下与还原剂室温下反应 12 ~ 24 小时后,向反应体系中加入 0 ~ 10℃的冷水,并用无机碱调节 pH 值至 9 ~ 10;分离出有机层,水层再用有机溶剂萃取,合并萃取液,水洗后用干燥剂干燥;蒸馏除去有机溶剂,得到固体,纯化分离,得到邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物。

3. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 A 中 4- 硝基邻苯二甲酸酐与无水正丁醇的物质的量比为 1:1 ~ 3,水解酯化反应时间为 0.5 ~ 2 小时。

4. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 B 中步骤 A 制得的产物与氯化苄物质的量之比为 1:1 ~ 2。

5. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:

所述步骤 B 中碱性条件通过下述方法获得:

将步骤 A 中反应后的液体冷却到 70 ~ 90℃,用碱性溶液中和,再用碱性溶液调节溶液 pH 至 8 ~ 8.5 之间,中和用的碱性溶液选用氢氧化钠,氢氧化钠溶液的百分比为 20% ~ 50%,调节溶液 pH 的碱性溶液选用碳酸钠,碳酸钠溶液的百分比为 10% ~ 30%。

6. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 B 中催化使用的催化剂选自聚乙二醇 400、聚乙二醇 600、聚乙二醇 800 中的一种或几种,催化剂与步骤 A 制得的产物的质量比为。

7. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 C 中有机溶剂选自苯、甲苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、氯仿、乙醚中的一种或几种,优选苯;4- 硝基邻苯二甲酸丁基苄酯在有机溶剂中的浓度为 0.02 ~ 0.04g/ml。

8. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 C 中酸性条件通过下述方法获得:

向溶解 4- 硝基邻苯二甲酸丁基苄酯的有机溶剂中加入强酸,室温下搅拌 10 ~ 30 分钟,并使得 4- 硝基邻苯二甲酸丁基苄酯与强酸的物质的量之比为 1:15 ~ 30;所述强酸为浓硫酸或浓盐酸,优选浓盐酸。

9. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述步骤 C 中还原剂选自锌粉、铁粉、镁粉中的一种或几种,优选锌粉;4- 硝基邻苯二甲酸丁基苄酯与还原剂的物质的量之比为 1:8 ~ 25。

10. 如权利要求 2 所述的制备方法,其特征在于:所述的无机碱选自氢氧化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾中的一种或几种,优选氢氧化钠。

11. 一种邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法,步骤包括:

a、邻苯二甲酸丁基苄酯的免疫全抗原和包被抗原的制备:将由邻苯二甲酸丁基苄酯制备的 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯中加入无机酸,0~5℃下搅拌 5~15 分钟,缓慢加入亚硝酸钠,反应 30~60 分钟;之后加入少量尿素;将牛血清蛋白(BSA)溶于四硼酸钠溶液中制得浓度为 0.01mol/L 的牛血清蛋白溶液,然后逐滴加入到上述溶液中,调节 pH 至 9~9.4,溶液呈现橙黄色,0~5℃下搅拌 3~6 小时,得到抗原的粗产品。将反应液装入透析袋中,置于二次水中透析 5~7 天,得到邻苯二甲酸丁基苄酯的免疫全抗原;

包被抗原的制备基本同免疫全抗原,不同处在于使用卵清蛋白(OVA)代替牛血清蛋白(BSA);

b、邻苯二甲酸丁基苄酯抗体的制备:

以哺乳动物作为免疫对象,步骤 a 制得的邻苯二甲酸丁基苄酯免疫抗原用 0.85%生理盐水稀释一倍,和完全弗氏佐剂已 1:1 体积比混溶后充分乳化,进行初次免疫注射,3 周后再将邻苯二甲酸丁基苄酯免疫抗原与不完全弗氏佐剂进行强化免疫,以后每 2 周再次加强免疫,从第二次加强免疫开始,每次免疫后第 7 天静脉采血,测定血清效价,当效价不再变化时,加强一次免疫,1 周后心脏采血,纯化,得到抗体。

c、标准曲线的绘制及样品邻苯二甲酸丁基苄酯含量测定:

(1) 每孔 50~150 μ L 包被抗原 BBAP-OVA 包被 96 孔酶标板;0~5℃下培养 12 小时,37℃下温育 2~3 小时;甩干,每孔加入 1/4~3/4 体积的 PBST 洗涤 2~5 次,每次 2~6 分钟;

(2) 每孔加入 150~250 μ L 封闭液封闭各孔;封闭液选自 1~5%卵清蛋白溶液、含有 1~3%吐温-20 的 1~5%卵清蛋白溶液、以 PBS 为溶剂的质量百分比为 1~5%的脱脂奶粉溶液中的一种,优选 1~2%脱脂奶粉溶液;37℃下温育 0.5~1.5 小时,甩干,每孔加入 1/4~3/4 体积的 PBST 洗涤 2~5 次,每次 2~6 分钟;

(3) 加入 30~60 μ L/孔浓度分别为 0.0001~1000ng/mL 邻苯二甲酸丁基苄酯标准溶液和样品溶液,30~60 μ L 抗邻苯二甲酸丁基苄酯抗体,每孔加入的邻苯二甲酸丁基苄酯标准溶液、样品溶液和抗邻苯二甲酸丁基苄酯抗体的体积优选每孔加入 45~55 μ L;37℃下温育 1~3 小时,甩干,每孔加入 1/4~3/4 体积的 PBST 洗涤 2~5 次,每次 2~6 分钟;

(4) 每孔加入 50~150 μ L 生物素标记的羊抗兔 IgG;37℃下温育 1~3 小时,甩干,每孔加入 1/4~3/4 体积的 PBST 洗涤 2~5 次,每次 2~6 分钟;

(5) 每孔加入 50~150 μ L HRP 标记的链霉亲和素;37℃下温育 25~60 分钟,甩干,每孔加入 1/4~3/4 体积的 PBST 洗涤 2~5 次,每次 2~6 分钟;

(6) 每孔加入 50~150 μ L 底物液,37℃下温育 15~45 分钟;

(7) 每孔加入 30~60 μ L 终止液,测定吸光度值,绘制标准曲线;

(8) 根据工作曲线求得待测样品溶液中邻苯二甲酸丁基苄酯的含量。

12. 如权利要求 11 所述的检测方法,其特征在于:所述步骤 a 中 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯与无机酸的物质的量之比为 1:2~5;4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯与亚硝酸钠的物

质的量之比为 1 : 1 ~ 1.5 ; 4- 氨基邻苯二甲酸丁基苄酯与尿素的物质的量之比为 1 : 0.5 ~ 1.5 ; 4- 氨基邻苯二甲酸丁基苄酯与牛血清蛋白的质量之比为 1 : 2.5。

一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物及制备方法、邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于有机合成技术领域,特别涉及一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物及制备方法、邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法。

背景技术

[0002] 环境激素,又称环境荷尔蒙,是指外源性干扰生物和人体正常内分泌机能的化学物质,主要由人类活动释放到环境中,并对人体和生物体内的正常激素功能施加影响,具有类似雌性激素的作用,从而导致包括人类在内的各种生物的生殖功能下降、生殖器肿瘤、免疫力降低,并可引起各种生理异常。

[0003] 邻苯二甲酸酯类物质是一种环境激素类物质中的一类化合物,主要用作增塑剂。邻苯二甲酸丁基苄酯(Benzyl butyl phthalate, BBP)是常见的一种邻苯二甲酸酯类化合物,在涂料、农药、化妆品、香料和食品包装材料等的生产中非常常见。由于塑料制品在生活中被广泛使用,从而产生大量的塑料垃圾,加之最近几年频频发生的塑化剂在酒、奶茶等相关食品中超标的发生,为大众敲响了警钟。邻苯二甲酸丁基苄酯是一种低毒物质。其沸点高、不易挥发、空气中浓度不高,不容易引起工业中毒,正是因为这一特性人们一直忽视了邻苯二甲酸酯类的污染特性而大量地使用。这类物质进入人体后,与相应的激素受体结合,干扰血液中激素的正常水平的维持,从而影响人的生殖、发育和行为,长期接触环境激素可对人体造成慢性危害,主要表现为对人和动物的生殖毒性。邻苯二甲酸酯类含有较弱的荷尔蒙活性成分,在人和动物的体内起着类似雌性激素的作用,可导致内分泌紊乱、生殖机能失常。邻苯二甲酸酯类对人体健康的影响是一个慢性的过程,可以通过胎盘和授乳产生跨带的影响。目前主要通过动物实验对其毒性进行研究。PAEs能引起大鼠睾丸的严重萎缩,输精管变形等危害。国内外有许多关于PAEs的报道。

[0004] 所以对BBP的检测显得十分重要。目前邻苯二甲酸酯类的检测方法主要有气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)和气相色谱-质谱法(GC-MS)等。谢利等人采用GC-FID法测定五种邻苯二甲酸酯的含量,检出限为 $0.9 \sim 2.9 \mu\text{g/ml}$ 。王东辉等人采用反相液相色谱串联质谱技术(LC-MS-MS)测定食品包装的塑料中的八种邻苯二甲酸酯的含量,最低检出限为 0.01mg/kg 。这类分析方法测定污染物灵敏度不高,选择性不好,并且检测过程中需要将待测污染物从样品中分离提取并去除杂质干扰,过程十分复杂,操作费时繁琐,仪器和分析成本昂贵。所以开发一种简单、快速、适用于现场监控的痕量分析方法具有重要的现实意义。

[0005] 环境荷尔蒙物质常常以ppt浓度甚至ppq浓度存在,这对环境监测分析提出了很高的要求。目前对邻苯二甲酸丁基苄酯的检测主要是气相色谱、液相色谱和质谱联用等技术,但是由于色谱技术测定过程比较复杂,操作繁琐,检测成本昂贵,分析周期较长并且检测的灵敏度也有限制,难以适应环境激素的检测要求。因此人们迫切需要一种操作简单、灵敏度高、成本低的检测方法。免疫分析法以其特异性和高灵敏的荧光、化学发光、纳米等技

术结合建立相应的荧光免疫等方法可以满足此项要求。自 1958 年 Berson S. A 和 Yellow 创立了放射免疫分析以来,其他各种免疫分析方法如酶联免疫分析法、荧光免疫分析法、化学发光免疫分析法等已在分析检测各种蛋白质、激素、小分子物质等中得到广泛的应用。

[0006] 近年来,多种邻苯二甲酸酯类环境激素免疫分析已经相继被报道,但是文献没有涉及到邻苯二甲酸丁基苄酯的半抗原衍生物、全抗原及免疫分析的报道。由于邻苯二甲酸丁基苄酯是小分子物质,其具有反应特异性,但不具备免疫原性。要制备相应的抗体必须先得到免疫原。又由于邻苯二甲酸丁基苄酯中不含有能与相应蛋白质偶联的基团,先须制备相应的半抗原衍生物。

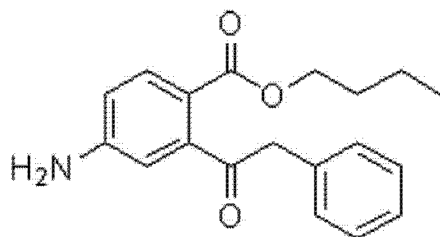
发明内容

[0007] 针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物及制备方法、邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法。本发明邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物制备方法操作简单、产率高,可以得到满足制备免疫原纯度要求的半抗原衍生物。检测方法灵敏度高,选择性强,检测时间短,成本低。

[0008] 本发明采用的技术方案是:

[0009] 一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物,其结构为:

[0010]



[0011] 一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物的制备方法,步骤包括:

[0012] A、将 4-硝基邻苯二甲酸酐与无水正丁醇混合后加热到 100 ~ 130℃,使其完全溶解成无色透明液体,在 105 ~ 115℃下搅拌回流进行水解酯化反应;

[0013] B、在碱性条件和催化剂催化条件下,将步骤 A 制得的产物与氯化苄在 100 ~ 120℃下反应 2.5 ~ 4 小时,制得 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯;

[0014] C、将 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯溶于有机溶剂中,在酸性条件下与还原剂室温下反应 12 ~ 24 小时后,向反应体系中加入 0 ~ 10℃的冷水,并用无机碱调节 pH 值至 9 ~ 10;分离出有机层,水层再用有机溶剂萃取,合并萃取液,水洗后用干燥剂干燥;蒸馏除去有机溶剂,得到固体,纯化分离,得到 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯即邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物。

[0015] 所述步骤 A 中 4-硝基邻苯二甲酸酐与无水正丁醇的物质的量比为 1:1 ~ 3,水解酯化反应时间为 0.5 ~ 2 小时;

[0016] 所述步骤 B 中步骤 A 制得的产物与氯化苄物质的量之比为 1:1 ~ 2;

[0017] 所述步骤 B 中碱性条件通过下述方法获得:

[0018] 将步骤 A 中反应后的液体冷却到 70 ~ 90℃,用碱性溶液中和,再用碱性溶液调节溶液 pH 至 8 ~ 8.5 之间,中和用的碱性溶液选用氢氧化钠,氢氧化钠溶液的百分比为 20% ~ 50%,调节溶液 pH 的碱性溶液选用碳酸钠,碳酸钠溶液的百分比为 10% ~ 30%;

[0019] 所述步骤 B 中催化使用的催化剂选自聚乙二醇 400、聚乙二醇 600、聚乙二醇 800 中的一种或几种,催化剂与步骤 A 制得的产物的质量比为。

[0020] 所述步骤 C 中有机溶剂选自苯、甲苯、二氯甲烷、乙酸乙酯、石油醚、氯仿、乙醚中的一种或几种,优选苯;4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯在有机溶剂中的浓度为 0.02 ~ 0.04g/ml;所述步骤 C 中酸性条件通过下述方法获得:

[0021] 向溶解 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯的有机溶剂中加入强酸,室温下搅拌 10 ~ 30 分钟,并使得 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯与强酸的物质的量之比为 1:15 ~ 30;所述强酸为浓硫酸或浓盐酸,优选浓盐酸;

[0022] 所述步骤 C 中还原剂选自锌粉、铁粉、镁粉中的一种或几种,优选锌粉;4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯与还原剂的物质的量之比为 1:8 ~ 25;

[0023] 所述的无机碱选自氢氧化钠、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾中的一种或几种,优选氢氧化钠;

[0024] 所述的干燥剂为无水硫酸钠、无水硫酸铜、无水氯化钙、硅胶或分子筛,优选无水硫酸钠。

[0025] 所述步骤 c 中纯化分离具体为:将蒸馏除去有机溶剂得到的固体,用有机溶剂重结晶,也可以用薄层层析和柱层析法进行分离纯化;蒸馏可以选用常用蒸馏和减压蒸馏,优选减压蒸馏。本发明中所述的重结晶、薄层层析和柱层析所用的有机溶剂可以是甲醇、乙醇等低碳链醇、乙醚、醋酸、乙酸乙酯、二氯甲烷或丙酮;重结晶所用的有机溶剂优选乙醇,薄层层析和柱层析所用的有机溶剂分别优选乙酸乙酯和正己烷。

[0026] 一种邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法,步骤包括:

[0027] a、邻苯二甲酸丁基苄酯的免疫全抗原和包被抗原的制备:将由邻苯二甲酸丁基苄酯制备的 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯中加入无机酸,0 ~ 5℃ 下搅拌 5 ~ 15 分钟,缓慢加入亚硝酸钠,反应 30 ~ 60 分钟;之后加入少量尿素;将牛血清蛋白 (BSA) 溶于四硼酸钠溶液中制得浓度为 0.01mol/L 的牛血清蛋白溶液,然后逐滴加入到上述溶液中,调节 pH 至 9 ~ 9.4,溶液呈现橙黄色,0 ~ 5℃ 下搅拌 3 ~ 6 小时,得到抗原的粗产品。将反应液装入透析袋中,置于二次水中透析 5 ~ 7 天,得到邻苯二甲酸丁基苄酯的免疫全抗原;

[0028] 所述 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯与无机酸的物质的量之物为 1:2 ~ 5,优选 3 ~ 4;所述无机酸选自浓盐酸或浓硫酸;4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯与亚硝酸钠的物质的量之比为 1:1 ~ 1.5,优选 1:1;4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯与尿素的物质的量之比为 1:0.5 ~ 1.5,优选 1:1;4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯与牛血清蛋白的质量之比为 1:2.5;

[0029] 包被抗原的制备基本同免疫全抗原,不同处在于使用 0.01mol/L 的卵清蛋白 (OVA) 溶液代替 0.01mol/L 的牛血清蛋白 (BSA) 溶液;

[0030] b、邻苯二甲酸丁基苄酯抗体的制备:

[0031] 以哺乳动物作为免疫对象,步骤 a 制得的邻苯二甲酸丁基苄酯免疫抗原用 0.85% 生理盐水稀释一倍,和完全弗氏佐剂以 1:1 体积比混溶后充分乳化,进行初次免疫注射,3 周后再将邻苯二甲酸丁基苄酯免疫抗原与不完全弗氏佐剂进行强化免疫,以后每 2 周再次加强免疫,从第二次加强免疫开始,每次免疫后第 7 天静脉采血,测定血清效价,当效价不再变化时,加强一次免疫,1 周后心脏采血,纯化,得到抗体。

[0032] 所述弗氏佐剂制备方法为:将液体石蜡和羊毛脂按 2:1 体积比用超声清洗器超声

3 小时左右,使之完全混匀,制得不完全弗氏佐剂,临用前加卡介苗即为完全弗氏佐剂,不完全弗氏佐剂与卡介苗的体积比为 6:1。

[0033] c、标准曲线的绘制及样品邻苯二甲酸丁基苄酯含量测定:

[0034] (1) 每孔 50 ~ 150 μ L 包被抗原 BBAP-OVA 包被 96 孔酶标板,包被抗原 BBAP-OVA 体积优选每孔加入 95 ~ 105 μ L;0 ~ 5 $^{\circ}$ C 下培养 12 小时,37 $^{\circ}$ C 下温育 2 ~ 3 小时;甩干,每孔加入 1/4 ~ 3/4 体积的 PBST 洗涤 2 ~ 5 次;PBST 洗涤液体积优选 1/2 ~ 3/4 体积,洗涤次数优选 3 ~ 4 次;每次 2 ~ 6 分钟,优选 3 ~ 5 分钟;

[0035] (2) 每孔加入 150 ~ 250 μ L 封闭液封闭各孔,优选 180 ~ 200 μ L;封闭液选自质量百分比为 1 ~ 5% 卵清蛋白溶液、含有质量百分比为 1 ~ 3% 吐温-20 的质量百分比为 1 ~ 5% 卵清蛋白溶液、以 PBS 为溶剂的质量百分比为 1 ~ 5% 的脱脂奶粉溶液中的一种,优选以 PBS 为溶剂的质量百分比为 1 ~ 2% 脱脂奶粉溶液;37 $^{\circ}$ C 下温育 0.5 ~ 1.5 小时,甩干,每孔加入 1/4 ~ 3/4 体积的 PBST 洗涤 2 ~ 5 次;PBST 洗涤液体积优选 1/2 ~ 3/4 体积,洗涤次数优选 3 ~ 4 次;每次 2 ~ 6 分钟,优选 3 ~ 5 分钟;

[0036] (3) 加入 30 ~ 60 μ L/孔浓度为 0.0001 ~ 1000ng/mL 邻苯二甲酸丁基苄酯标准溶液和样品溶液,30 ~ 60 μ L 抗邻苯二甲酸丁基苄酯抗体,每孔加入的邻苯二甲酸丁基苄酯标准溶液、样品溶液和抗邻苯二甲酸丁基苄酯抗体的体积优选每孔加入 45 ~ 55 μ L;37 $^{\circ}$ C 下温育 1 ~ 3 小时,甩干,每孔加入 1/4 ~ 3/4 体积的 PBST 洗涤 2 ~ 5 次, PBST 洗涤液体积优选 1/2 ~ 3/4 体积,洗涤次数优选 3 ~ 4 次;每次 2 ~ 6 分钟,优选 3 ~ 5 分钟;

[0037] (4) 每孔加入 50 ~ 150 μ L 生物素标记的羊抗兔 IgG,优选 95 ~ 105 μ L;37 $^{\circ}$ C 下温育 1 ~ 3 小时,甩干,每孔加入 1/4 ~ 3/4 体积的 PBST 洗涤 2 ~ 5 次, PBST 洗涤液体积优选 1/2 ~ 3/4 体积,洗涤次数优选 3 ~ 4 次;每次 2 ~ 6 分钟,优选 3 ~ 5 分钟;

[0038] (5) 每孔加入 50 ~ 150 μ L HRP 标记的链霉亲和素,优选 95 ~ 105 μ L;37 $^{\circ}$ C 下温育 25 ~ 60 分钟,甩干,每孔加入 1/4 ~ 3/4 体积的 PBST 洗涤 2 ~ 5 次, PBST 洗涤液体积优选 1/2 ~ 3/4 体积,洗涤次数优选 3 ~ 4 次;每次 2 ~ 6 分钟,优选 3 ~ 5 分钟;

[0039] (6) 每孔加入 50 ~ 150 μ L 底物液,优选 95 ~ 105 μ L;37 $^{\circ}$ C 下温育 15 ~ 45 分钟;

[0040] (7) 每孔加入 30 ~ 60 μ L 终止液,优选 45 ~ 55 μ L;测定吸光度值,绘制标准曲线;

[0041] (8) 根据工作曲线求得待测样品溶液中邻苯二甲酸丁基苄酯的含量。

[0042] 本发明半抗原衍生物 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯可作为原料,用于制备用于动物免疫用的全抗原,如可以与载体蛋白偶联,得到适合于动物免疫的全抗原。本发明制备的半抗原衍生物,不仅其合成方法简便,无需特殊的设备,纯度较高,而且能应用于制备适合于动物免疫的全抗原。

[0043] 本发明采用免疫分析技术对 BBP 进行检测分析。免疫分析技术是基于抗原和抗体的特异性反应进行检测的一种技术手段,一种以抗体作为生物化学检测器,对化合物、酶或蛋白质等物质进行定性和定量的分析技术。生物素-亲和素放大系统的间接酶联免疫反应是利用了生物素与亲和素之间的多级放大效应以及抗原与抗体之间特异性的反应实现的,利用这种方法对 BBP 进行分析检测,较之前的色谱分析技术灵敏度高,选择性强,检测时间短,成本低。

具体实施方式

[0044] 实施例中使用的一部分实验药品：

[0045] 4-硝基邻苯二甲酸酐,正丁醇,氯化苄,聚乙二醇,还原剂(如:锌粉、铁粉等),无机强酸(如:浓盐酸),有机溶剂(如:苯),牛血清蛋白,卵清蛋白,液体石蜡,羊毛脂,硫酸铵,磷酸二氢钠,磷酸氢二钠,柠檬酸,30%过氧化氢,吐温-20,氯化钠,氨水,无水乙醇,卡介苗,25%戊二醛,HRP 标记的羊抗兔 IgG(上海生物工程股份有限公司),邻苯二胺,生物素标记的羊抗兔 IgG(上海生物工程股份有限公司),HRP 标记的链霉亲和素(上海生物工程股份有限公司),脱脂奶粉

[0046] 实施例中使用的实验仪器：

[0047] 多功能酶标仪,LRH250-A 生化培养箱,TGL-16G 高速台式离心机,pHs-3C 型 pH 计,岛津托盘电子分析天平,96 孔酶标板

[0048] 实施例溶液中配制：

[0049] 1、封闭液：以 PBS 为溶剂的质量百分比为 1%的脱脂奶粉溶液。

[0050] 2、稀释液 (0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲液, PBS)：称取 8.0g NaCl, 2.96g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.29g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.1g KCl, 蒸馏水定容到 1000mL。

[0051] 3、洗涤液 (0.01mol/L pH7.4, PBST)：PBS 中加入 0.05%吐温-20。

[0052] 4、底物液：邻苯二胺 4mg 溶于 10mL 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中,临用前加入 15 μL 30%过氧化氢。

[0053] 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液：称取 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.84g, 柠檬酸 0.51g, 然后用蒸馏水定容至 50mL。

[0054] 5、终止液：2mol/L 硫酸溶液。

[0055] 实施例 1

[0056] 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯的合成

[0057] 将 9.655g 4-硝基邻苯二甲酸酐和 5.125mL 无水正丁醇混合加入到带有回流冷凝管,温度计和转子的三口烧瓶中,,搅拌下升温至 120℃,使其完全溶解成无色透明液体,冷却,在 110℃下搅拌回流 1.0 小时,之后将反应的溶液冷却到 80℃,用 40%氢氧化钠溶液中和,再用 20%碳酸钠溶液调节溶液 pH 至 8~8.5。搅拌下加入 6g 聚乙二醇 600,升温至 100℃缓慢滴加氯化苄 26mL,在 100℃下反应 4 小时后,粗产物经冷却后通过柱层析法分离提纯得到黄色油状液体即为 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯。

[0058] 将 0.608g 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯溶于 20mL 苯中,加入部分锌粉;分次加入浓盐酸,使得 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯与浓盐酸的物质的量比为 1:20,室温下搅拌 30 分钟后,加入剩下的锌粉,使得 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯与锌粉的物质的量比为 1:8,室温 20℃下反应 12 小时。向反应体系中加入 4℃的冷水,并用 1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值至 9~10,萃取分离出苯层,水层再用苯萃取分离,重复 3 次之后合并萃取液,再用无水硫酸钠干燥。减压蒸馏除去苯,得到黄色固体,无水乙醇重结晶,得到淡黄色固体,即为 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯,产率 84%。

[0059] ^1H NMR (300MHz, CDCl_3) :

[0060] 7.74-7.67 (t, 3H, ArH)

[0061] 7.43-7.31 (m, 5H, ArH)

[0062] 6.57-6.61 (s, 2H, NH₂)
[0063] 5.34-5.27 (s, 2H, CH₂-Ar)
[0064] 4.18-4.12 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃)
[0065] 1.61-1.56 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃)
[0066] 1.39-1.29 (m, 2H, OCH₂CH₂CH₂CH₃)
[0067] 0.96-0.89 (m, 3H, OCH₂CH₂CH₂CH₃) ppm.
[0068] ¹³C NMR (100MHz, DMSO-D₆): δ 169.46, 169.15, 166.25, 165.89, 150.39, 150.15, 136.02, 131.60, 128.32, 128.09, 127.98, 117.84, 117.04, 114.77, 114.58, 113.12, 112.97, 77.47, 77.05, 76.62, 67.24, 66.49, 65.38, 64.64, 30.47, 30.20, 18.98, 18.91, 13.56, 13.52 ppm.

[0069] 邻苯二甲酸丁基苄酯的检测:

[0070] (1) 每孔 100 μL 包被抗原 BBAP-OVA 包被 96 孔酶标板, 置于 4℃ 下培育 12 小时, 甩干, 每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 分钟。

[0071] (2) 每孔加入 200 μL 1% 脱脂奶粉溶液封闭各孔, 37℃ 下温育 1 小时, 甩干, 每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 分钟。

[0072] (3) 加入 50 μL/孔 浓度分别为 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 ng/mL 邻苯二甲酸丁基苄酯标准溶液和样品溶液, 每孔加入 50 μL 抗邻苯二甲酸丁基苄酯抗体, 37℃ 下温育 2 小时, 甩干, 每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 分钟。

[0073] (4) 每孔加入 100 μL 生物素标记的羊抗兔 IgG, 37℃ 下温育 2 小时, 甩干, 每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次, 每次 3 分钟。

[0074] (5) 每孔加入 100 μL HRP 标记的链霉亲和素, 37℃ 下温育 30 分钟, 甩干, 每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次, 每次 5 分钟。

[0075] (6) 每孔加入 100 μL 底物液, 37℃ 下温育 30 分钟。

[0076] (7) 每孔加入 50 μL 终止液, 测定吸光度值, 绘制标准曲线。

[0077] 根据吸光度及标准溶液浓度绘制线性方程:

[0078] $A = 0.804 - 0.0689 \lg C$ (A: 吸光值; C: 样品浓度)

[0079] 实验得到的标准曲线的线性范围: 0.0001-100 ng/mL; 相关系数: $R^2 = 0.997$ 。

[0080] 最终测得样品溶液中邻苯二甲酸丁基苄酯含量为 0.14 ng/mL, 加标回收率 82.3%。

[0081] 实施例 2

[0082] 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯的合成:

[0083] 将 19.31 g 4-硝基邻苯二甲酸酐和 23.30 mL 无水正丁醇混合加入到带有回流冷凝管, 温度计和转子的三口烧瓶中, 搅拌下升温至 110℃, 使其完全溶解成无色透明液体, 冷却, 在 105℃ 下搅拌回流 2.0 小时, 之后将反应的溶液冷却到 70℃, 用 30% 氢氧化钠溶液中和, 再用 20% 碳酸钠溶液调节溶液 pH 至 8~8.5。搅拌下加入 10 g 聚乙二醇 800, 升温至 115℃ 缓慢滴加氯化苄 25.3 mL, 在 100℃ 下反应 2.5 小时后, 粗产物经冷却后通过柱层析法分离提纯得到黄色油状液体即为 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯, 产率 71%。

[0084] 将 0.525 g 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯溶于 15 mL 苯中, 加入部分镁粉; 分次加入浓硫酸, 使得 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯与浓硫酸的物质的量比为 1:15, 室温下搅拌 20

分钟后,加入剩下的镁粉,使得 4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯与镁粉的物质的量比为 1:20,室温 20℃下反应 20 小时。向反应体系中加入 4℃的冷水,并用 1mol/L 碳酸钾溶液调节 pH 值至 9~10,萃取分离出苯层,水层再用苯萃取分离,重复 3 次之后合并萃取液,再用无水氯化钙干燥。减压蒸馏除去苯,得到黄色固体,无水乙醇重结晶,得到淡黄色固体,即为 4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯,产率 79%。

[0085] ^1H NMR(300MHz, CDCl_3) :

[0086] 7.74-7.67 (t, 3H, ArH)

[0087] 7.43-7.31 (m, 5H, ArH)

[0088] 6.57-6.61 (s, 2H, NH_2)

[0089] 5.34-5.27 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$)

[0090] 4.18-4.12 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

[0091] 1.61-1.56 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

[0092] 1.39-1.29 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)

[0093] 0.96-0.89 (m, 3H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$) ppm.

[0094] ^{13}C NMR(100MHz, $\text{DMSO-}d_6$) : δ 169.46, 169.15, 166.25, 165.89, 150.39, 150.15, 136.02, 131.60, 128.32, 128.09, 127.98, 117.84, 117.04, 114.77, 114.58, 113.12, 112.97, 77.47, 77.05, 76.62, 67.24, 66.49, 65.38, 64.64, 30.47, 30.20, 18.98, 18.91, 13.56, 13.52ppm.

[0095] 邻苯二甲酸丁基苄酯的检测:

[0096] (1) 每孔 100 μL 包被抗原 BBAP-OVA 包被 96 孔酶标板,置于 4℃下培育 12 小时,甩干,每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次,每次 3 分钟。

[0097] (2) 每孔加入 200 μL 1%脱脂奶粉溶液封闭各孔,37℃下温育 1 小时,甩干,每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次,每次 3 分钟。

[0098] (3) 加入 50 μL /孔浓度浓度分别为 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000ng/mL 邻苯二甲酸丁基苄酯标准溶液和样品溶液,每孔加入 50 μL 抗邻苯二甲酸丁基苄酯抗体,37℃下温育 2 小时,甩干,每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次,每次 3 分钟。

[0099] (4) 每孔加入 100 μL 生物素标记的羊抗兔 IgG,37℃下温育 2 小时,甩干,每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次,每次 3 分钟。

[0100] (5) 每孔加入 100 μL HRP 标记的链霉亲和素,37℃下温育 30 分钟,甩干,每孔加入 3/4 体积的 PBST 洗涤 3 次,每次 5 分钟。

[0101] (6) 每孔加入 100 μL 底物液,37℃下温育 30 分钟。

[0102] (7) 每孔加入 50 μL 终止液,测定吸光度值,绘制标准曲线。

[0103] 根据吸光度及标准溶液浓度绘制线性方程:

[0104] $A = 0.979 - 0.06241gC$ (A: 吸光值;C: 样品浓度)

[0105] 实验得到的标准曲线的线性范围:0.001-1000ng/mL;相关系数: $R^2 = 0.985$ 。

[0106] 最终测得样品溶液中邻苯二甲酸丁基苄酯含量为 0.11ng/ml,加标回收率 90%。

专利名称(译)	一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物及制备方法、邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法		
公开(公告)号	CN104370761A	公开(公告)日	2015-02-25
申请号	CN201410512584.0	申请日	2014-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
[标]发明人	张明翠 洪文童		
发明人	张明翠 洪文童		
IPC分类号	C07C227/04 C07C229/62 C07C229/66 G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	朱圣荣		
其他公开文献	CN104370761B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种邻苯二甲酸丁基苄酯半抗原衍生物及制备方法、邻苯二甲酸丁基苄酯的检测方法。半抗原衍生物为4-氨基邻苯二甲酸丁基苄酯，衍生物制备方法步骤包括：4-硝基邻苯二甲酸酐水解酯化反应、水解酯化产物与氯化苄反应制得4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯、4-硝基邻苯二甲酸丁基苄酯还原得到最终产物，检测方法包括抗原、抗体制备、标准曲线的绘制及样品邻苯二甲酸丁基苄酯含量测定。检测方法技术灵敏度高，选择性强，检测时间短，成本低。

