



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105085298 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510514899. 3

(22) 申请日 2015. 08. 20

(71) 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

(72) 发明人 庄惠生 孙瑞艳

(74) 专利代理机构 上海汉声知识产权代理有限公司

公司 31236

代理人 郭国中 陈少凌

(51) Int. Cl.

C07C 229/62(2006. 01)

C07C 227/04(2006. 01)

C07K 14/765(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

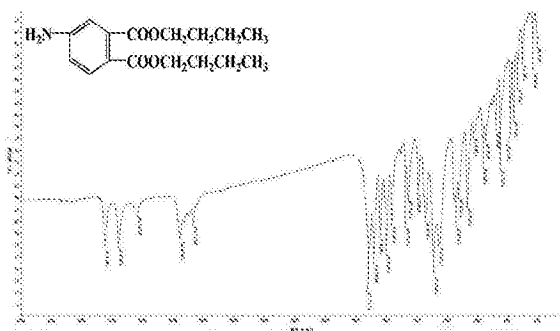
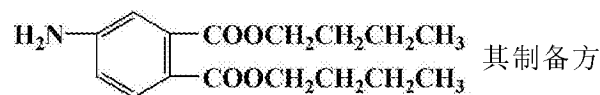
权利要求书1页 说明书9页 附图5页

(54) 发明名称

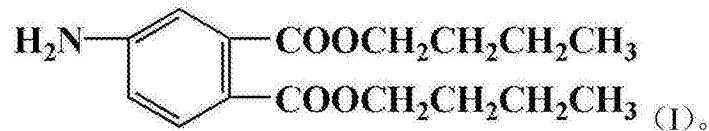
邻苯二甲酸二丁酯半抗原及其制备方法和用途

(57) 摘要

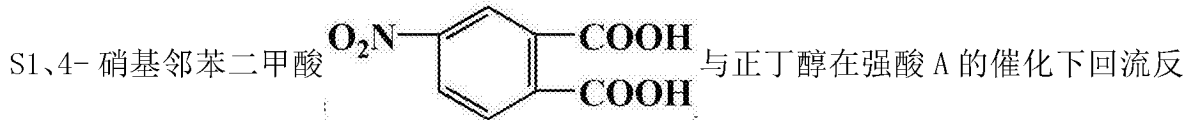
本发明公开了一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原及其制备方法和用途；所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原的结构式为：



1. 一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原,其特征在於,其结构式如式(I)所示:



2. 一种如权利要求1所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备方法,其特征在於,所述方法包括如下步骤:



应,生成4-硝基邻苯二甲酸二丁酯;

S2、以非质子性有机溶剂为溶剂,4-硝基邻苯二甲酸二丁酯和锌粉、强酸B发生还原反应,生成所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原。

3. 根据权利要求2所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备方法,其特征在於,所述4-硝基邻苯二甲酸、正丁醇、强酸A的摩尔比为1:6~7:0.5~0.7;所述4-硝基邻苯二甲酸二丁酯、强酸B、非质子性有机溶剂和锌粉的摩尔比为1:21~22:560~570:18~19。

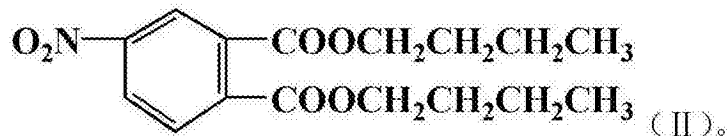
4. 根据权利要求2所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备方法,其特征在於,步骤S1中,所述回流反应的温度为120~130℃,反应时间为6~6.5小时;步骤S2中,所述还原反应的温度为25~30℃,反应时间为10~12小时。

5. 根据权利要求2所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备方法,其特征在於,所述强酸A选自浓硫酸或浓盐酸;所述强酸B选自浓硫酸或浓盐酸。

6. 根据权利要求2所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备方法,其特征在於,步骤S2中的非质子性有机溶剂选自苯或甲苯。

7. 根据权利要求2所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备方法,其特征在於,步骤S1还包括回流反应结束后蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水;此时将液体趁热倒入冰水中,析出固体;过滤后得到的固体粗品用10% Na₂CO₃溶液洗涤至水层呈无色,固体粗品用无水正丁醇重结晶,得到纯化后的4-硝基邻苯二甲酸二丁酯的步骤。

8. 一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原中间体,其特征在於,其结构式如式(II)所示:



9. 一种邻苯二甲酸二丁酯人工全抗原,其特征在於,所述人工全抗原是由如权利要求1所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原通过戊二醛法或重氮化法或碳二亚胺法与蛋白质分子偶联制备而得。

10. 一种如权利要求1所述的邻苯二甲酸二丁酯半抗原在用于痕量塑化剂邻苯二甲酸二丁酯检测中的用途。

邻苯二甲酸二丁酯半抗原及其制备方法和用途

技术领域

[0001] 本发明涉及半抗原及其制备方法,具体涉及一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原及其制备和用途。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸酯类塑化剂(缩写为PAEs),又称酞酸酯类,是一类由邻苯二甲酸与含有4-15个碳的醇发生费歇尔(Fischer)酯化反应所形成的酯的重要衍生物的统称。这类物质有特殊气味,毒性较大,一般情况下状态为粘稠液体;液态条件下温度范围宽,流动性大,挥发性低,不溶于水,易溶于大多数有机溶剂。这类物质用途广泛,它不仅可作为食品包装材料、玩具、农药载体、驱虫剂、润滑剂、乙烯地板和壁纸、去泡剂、清洁剂、医用材料(如人工心脏瓣膜等人工器官、血袋、注射器和胶管)和个人护理用品(主要有化妆品、香味品、指甲油、头发喷雾剂、香皂和洗发液)等近千种产品的生产原材料,还常作为塑料增塑剂被用于改造塑料制品性能。

[0003] 邻苯二甲酸二丁酯(英文名称:Dibutyl phthalate,简称DBP),又名酞酸二丁酯、驱蚊叮等,CAS号为84-74-2,分子式为 $C_{16}H_{22}O_4$,分子量为278.34,无色油状液体,芳香性气味,可燃,易溶于正丁醇、乙醚、丙酮和苯。该物质有较强毒性,反复接触皮肤有严重的刺激,可引起轻度致敏;在生物体内能中等程度的蓄积,可导致中枢神经和周围神经系统发生功能性变化;作为可疑致畸物,可致细胞畸形,可能导致胎儿存活率降低,有削弱生育能力的危险。该物质主要用于纤维素聚合物、粘合剂、油墨和堵缝材料的制造中,少量应用于化妆品及指甲油的制造中。近些年来,儿童玩具及护理用品(如:橡胶奶嘴、沐浴液等)中检测到该物质含量较高从而危及儿童健康,由此该物质含量的检测非常重要。

[0004] 目前对邻苯二甲酸二丁酯的检测手段主要为气相色谱和高效液相色谱等仪器检测方法,这些方法虽然准确可靠,但对样品的预处理方法和操作人员的专业性有很高的要求。正因为这些方法的处理复杂、耗时、仪器价格昂贵而不适合推广使用,也不利于在环境污染事故现场快速检测。为克服这些缺点,寻求一种快速、简便、灵敏且经济实用的分析方法就成为环境监测领域的主要研究方向。

[0005] 20世纪60年代发展起来的免疫分析(Immunoassay, IA)是基于抗原和抗体的特异性、可逆性结合反应的分析技术。免疫分析具有常规理化分析技术无可比拟的选择性和高灵敏性,非常适合复杂介质中痕量组分的分析。因此免疫分析具有的特异性强、灵敏度高、方法快捷简单、分析通量大、检测成本低等优点,使得该类方法可以满足简单、快速、灵敏地检测持久性有机污染物的要求。1971年Engvail, Van Weerman等报道了检测体液中微量物质的固相免疫分析技术,即酶联免疫吸附分析法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。目前,ELISA方法已经成为免疫分析方法中重要的组成部分。ELISA方法是将抗原-抗体之间的免疫反应与酶的高效催化特性有机结合而发展起来的一种免疫分析方法。其中,以亲和素-生物素信号放大系统为基础的亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析法,以生物素标记抗体(抗原),并以酶标亲和素代替ELISA方法中酶标抗体。亲和素是

卵白蛋白中的一种碱性糖蛋白,分子量约为 68kDa。一个亲和素分子由 4 个亚单位组成,每个亚单位都可以与一个生物素分子(分子量为 244) 特异性结合。生物素与亲和素结合特异性强,其亲和力比抗原抗体反应大得多,亲和常数高达 $10^{15}M^{-1}$ 。由于一个亲和素能与 4 个生物素分子结合,因此在检测中可提高被固相结合酶的数量,进而提高检测方法的灵敏度。

[0006] 目前尚没有亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法检测邻苯二甲酸二丁酯的相关报道。

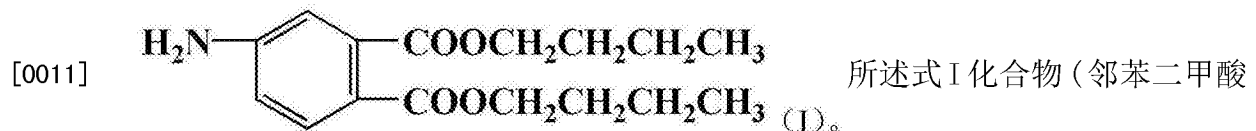
发明内容

[0007] 针对现有技术中的缺陷,本发明的目的在于首次提供一种步骤简单,速度快,产率高的邻苯二甲酸二丁酯半抗原及其制备方法和用途。

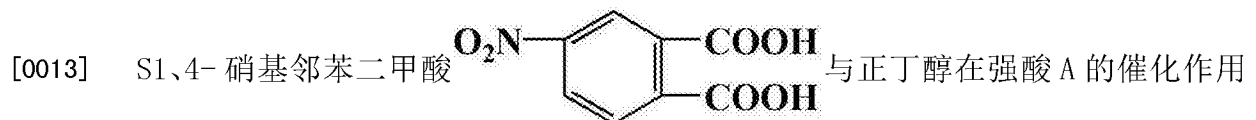
[0008] 本发明的研究机理在于:对于邻苯二甲酸二丁酯免疫监测方法的建立,高纯度合适的半抗原是制备具有高灵敏度和特异性免疫原和高效价抗体的根本,更是建立邻苯二甲酸二丁酯免疫检测方法的关键。因此,本发明的邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备是采用免疫方法测定邻苯二甲酸二丁酯的基础,对于建立塑化剂单体的监测方法,具有重要的应用价值和理论研究意义。

[0009] 本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

[0010] 第一方面,本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原,其结构式如式(I)所示:



[0012] 第二方面,本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备方法,所述方法包括如下步骤:



下回流反应,生成 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯;

[0014] S2、以非质子性有机溶剂为溶剂,4-硝基邻苯二甲酸二丁酯和锌粉、强酸 B 发生还原反应,生成带有氨基活性基团的 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯,即所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原。所引入的氨基基团可与载体蛋白偶联。

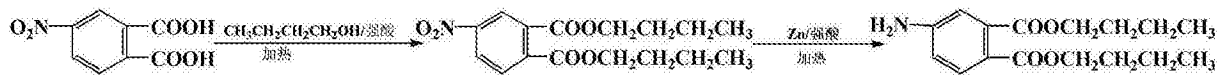
[0015] 优选的,步骤 S1 具体为:将 4-硝基邻苯二甲酸溶解在正丁醇溶液中,得溶液 A,逐渐升温,随后逐渐加入强酸 A 溶液并保持恒温回流反应,直至原料点消失为止。

[0016] 优选的,步骤 S2 具体为:4-硝基邻苯二甲酸二丁酯溶于非质子性有机溶剂环境中,然后分批次加锌粉,再逐滴加入强酸 B 逐渐升温,随后保持恒温反应,直至原料点消失为止。

[0017] 更优选地,所述锌粉等量分为两份,分别在强酸 B 加入前后加入。本发明研究发现,该锌粉的分批加入方式,可显著提高产品得率。

[0018] 其化学反应方程式如下:

[0019]



[0020] 优选的,所述 4-硝基邻苯二甲酸、正丁醇、强酸 A 的摩尔比为 1:6 ~ 7:0.5 ~ 0.7; 所述 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯、强酸 B、非质子性有机溶剂和纯锌粉的摩尔比为 1:21 ~ 22:560 ~ 570:18 ~ 19,其中非质子性有机溶剂作为基质溶液并不参与反应。

[0021] 理想状态下 4-硝基邻苯二甲酸、正丁醇的摩尔比是 1:2,但为了反应顺利进行,一般正丁醇的用量是 4-硝基邻苯二甲酸的摩尔量的 6 倍以上,但不能超过 4-硝基邻苯二甲酸的摩尔量的 7 倍;此外,强酸 A 作为酯化反应的催化剂,所用量一般是原料 4-硝基邻苯二甲酸摩尔量的 0.5 倍以上,但不超过原料 4-硝基邻苯二甲酸摩尔量的 0.7 倍。

[0022] 理想状态下 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯、强酸 B 和锌粉的摩尔比是 1:10:10,为确保反应顺利向右进行,一般纯锌粉的用量是原料 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯摩尔量的 18 倍以上,但不能超过原料 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯摩尔量的 19 倍;此外,强酸 B 作为还原反应的强氧化剂,所用量一般是原料纯锌粉摩尔数的 1 倍以上,但不超过原料纯锌粉摩尔数的 1.2 倍,而非质子性有机溶剂的摩尔数需要是强氧化剂的摩尔数的 25 倍以上,但不超过强氧化剂摩尔数的 28 倍。

[0023] 优选的,步骤 S1 中,所述回流反应的温度为 120 ~ 130℃,反应时间为 6 ~ 6.5 小时;步骤 S2 中,所述还原反应的温度为 25 ~ 30℃,反应时间为 10 ~ 12 小时。

[0024] 优选的,所述强酸 A 选自浓硫酸或浓盐酸;所述强酸 B 选自浓硫酸或浓盐酸。

[0025] 优选的,步骤 S2 中的非质子性有机溶剂选自苯或甲苯。

[0026] 优选的,步骤 S1 还包括回流反应结束后,蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水,再趁热将液体倒入冰水中,下层的黄色油状粗品用 10% Na_2CO_3 溶液洗涤至水层呈无色 (pH 7.0-8.0),最后,固体粗品用无水正丁醇重结晶,得浅黄色针状晶体,即得到纯化后的 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯。

[0027] 优选的,步骤 S2 还包括还原反应结束后用冰水和强碱溶液以终止反应,向反应液中加入苯,分离并干燥有机相,将干燥后的有机相去溶剂,层析柱分离纯化,得到纯化后的邻苯二甲酸二丁酯半抗原的步骤。

[0028] 具体而言,包括以下步骤:

[0029] B、反应结束后用冰水和强碱溶液以终止反应;

[0030] C、向反应液中加入苯,分离并用水多次洗涤,再用苯萃取水层后合并萃取液,有机相用无水 Na_2SO_4 干燥有机相以除去多余的水分;

[0031] D、将干燥后的有机相去溶剂,得到的浅黄色固体再用无水正丁醇重结晶,过层析柱分离纯化,最终得到纯化后的淡黄色针状晶体邻苯二甲酸二丁酯半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯,即式 I 化合物。

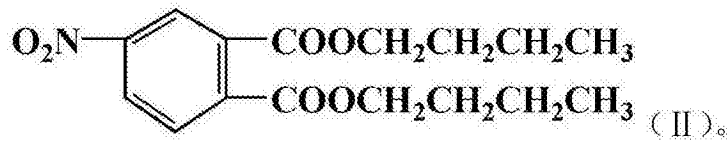
[0032] 优选的,步骤 B 中,所述强碱溶液终止反应的现象为 pH 7.0-8.0;这样有利于终止反应,也防止逆反应的发生。

[0033] 优选的,所述层析柱分离纯化的洗脱液采用体积比为 1:10 的乙酸和正己烷组成的混合溶液。本发明的半抗原是有机相物质,本发明意外发现采用该展开剂更利于半抗原的纯化,使获得的半抗原纯度更高。

[0034] 第三方面,本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原中间体,其结构式如式 (II)

所示：

[0035]



[0036] 第四方面,本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原用于痕量塑化剂邻苯二甲酸二丁酯检测中的用途。

[0037] 优选的,所述检测为免疫检测法。

[0038] 优选的,所述检测包括将所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原通过戊二醛法或重氮化法或碳二亚胺法与载体蛋白偶联制备邻苯二甲酸二丁酯人工全抗原。

[0039] 优选的,所述检测包括：

[0040] 所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原通过戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法与载体蛋白偶联,分别制得人工免疫原和人工包被原；

[0041] 所述人工免疫原通过生物体免疫反应法制备得到抗邻苯二甲酸二丁酯的特异性抗体。

[0042] 检测时,人工包被原和邻苯二甲酸二丁酯与抗邻苯二甲酸二丁酯特异性抗体免疫球蛋白 IgG 发生特异性识别的反应,形成直接竞争关系,进而实现对痕量塑化剂邻苯二甲酸二丁酯检测。

[0043] 本发明涉及邻苯二甲酸二丁酯半抗原及其制备方法、用途；由于邻苯二甲酸二丁酯是小分子物质,只具有反应原性而没有免疫原性,而且该分子上没有能与蛋白质分子直接结合的氨基、羧基等官能团,因此需要对邻苯二甲酸二丁酯分子衍生化使其分子上带上一个氨基。为了免疫分析方法的实现,用戊二醛法或重氮化法或碳二亚胺法将这个含羧基的半抗原与蛋白质分子偶联制备人工全抗原(包括人工免疫原和人工包被原),其中人工免疫原免疫新西兰大白兔,通过生物体内的免疫应答进而制备得到抗邻苯二甲酸二丁酯的特异性抗体,而人工包被原和邻苯二甲酸二丁酯都能与抗邻苯二甲酸二丁酯特异性抗体免疫球蛋白 IgG 发生特异性识别的反应,即人工包被原和邻苯二甲酸二丁酯是直接竞争的关系,从而建立免疫分析方法用于水体、土壤、大气等环境样品和电子产品、纺织印染品、建筑装潢等产品中痕量塑化剂邻苯二甲酸二丁酯的检测。

[0044] 与现有技术相比,本发明具有如下的有益效果：

[0045] 1) 半抗原实用性强：邻苯二甲酸二丁酯半抗原制备和抗体制备具有重要的实用价值和现实意义。该半抗原保留了邻苯二甲酸二丁酯的结构,再利用戊二醛法或碳二亚胺法或重氮化法偶联蛋白质使其具有针对邻苯二甲酸二丁酯的抗原决定簇,可成功制备邻苯二甲酸二丁酯人工免疫原 DBP-BSA 或邻苯二甲酸二丁酯人工包被原 DBP-OVA,为制备特异性好、效价高的抗体和建立亲和素-生物素化酶联免疫吸附分析方法提供了保障。

[0046] 2) 半抗原稳定性好：本发明首次制备获得了邻苯二甲酸二丁酯半抗原,且此法合成的邻苯二甲酸二丁酯半抗原结构具有较好的稳定性,在室温状态下可保存多年,几乎不会失效。

[0047] 3) 半抗原制备技术简便可行：半抗原的整个制备过程无需特别的仪器设备,成本低廉,且制备速度快,产率高,容易工业化规模生产。

附图说明

[0048] 通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述,本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显:

[0049] 图 1 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原中间体的红外光谱图;

[0050] 图 2 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原的红外光谱图;

[0051] 图 3 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原的核磁共振谱图;

[0052] 图 4 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原 DBP-hapten、载体蛋白 BSA 和人工全抗原 DBP-BSA 的紫外光谱图;

[0053] 图 5 为邻苯二甲酸二丁酯半抗原 DBP-hapten、载体蛋白 OVA 和人工全抗原 DBP-OVA 的紫外光谱图。

[0054] 图 6 为间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测邻苯二甲酸二丁酯的标准工作曲线。

具体实施方式

[0055] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进一步理解本发明,但不以任何形式限制本发明。应当指出的是,对本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进。这些都属于本发明的保护范围。

[0056] 实施例 1、邻苯二甲酸二丁酯半抗原中间体的制备

[0057] 称取 10g(0.0474mol) 4-硝基邻苯二甲酸加入到圆底烧瓶中,随后缓慢加入 26.1mL(0.2850mol) 正丁醇,边搅拌边加入 1.65mL(0.0304mol) 浓 H_2SO_4 催化,逐渐升温至 120℃ 回流加热 6.5 小时,直至薄板层析法 (TLC) 检测原料点消失为止 (显色剂:丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾;展开剂,正己烷:乙酸乙酯=5:1);反应结束后将反应液转移至旋转蒸发器中减压蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水,再趁热将液体倒入冰水中,磁力搅拌 5min 后静置一段时间分层,将下层黄色油状液体用 10% Na_2CO_3 溶液洗涤至水层呈无色 (pH 7.0-8.0),再用无水 Na_2SO_4 脱水干燥,得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原中间体。4-硝基邻苯二甲酸二丁酯分子式: $C_{16}H_{21}NO_6$;分子量:323.33;产率:90.1%;纯度 98%。

[0058] 实施例 2、邻苯二甲酸二丁酯半抗原中间体的制备

[0059] 称取 10g(0.0474mol) 4-硝基邻苯二甲酸加入到圆底烧瓶中,随后缓慢加入 26.0mL(0.2844mol) 正丁醇,边搅拌边加入 1.28mL(0.0237mol) 浓 H_2SO_4 催化,逐渐升温至 130℃ 回流加热 6 小时,直至薄板层析法 (TLC) 检测原料点消失为止 (显色剂:丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾;展开剂,正己烷:乙酸乙酯=5:1);反应结束后将反应液转移至旋转蒸发器中减压蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水,再趁热将液体倒入冰水中,磁力搅拌 5min 后静置一段时间分层,将下层黄色油状液体用 10% Na_2CO_3 溶液洗涤至水层呈无色 (pH 7.0-8.0),再用无水 Na_2SO_4 脱水干燥,得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原中间体。4-硝基邻苯二甲酸二丁酯分子式: $C_{16}H_{21}NO_6$;分子量:323.33;产率:90.1%;纯度 98%。

[0060] 实施例 3、邻苯二甲酸二丁酯半抗原中间体的制备

[0061] 称取 10g(0.0474mol) 4-硝基邻苯二甲酸加入到圆底烧瓶中,随后缓慢加入 30.3mL(0.3318mol) 正丁醇,边搅拌边加入 1.54mL(0.0284mol) 浓 H_2SO_4 催化,逐渐升温至 125℃ 回流加热 6 小时,直至薄板层析法 (TLC) 检测原料点消失为止 (显色剂:丙酮溶剂中溶解少量的高锰酸钾;展开剂,正己烷:乙酸乙酯=5:1);反应结束后将反应液转移至旋转蒸发仪中减压蒸馏除去未反应的正丁醇和生成的水,再趁热将液体倒入冰水中,磁力搅拌 5min 后静置一段时间分层,将下层黄色油状液体用 10% Na_2CO_3 溶液洗涤至水层呈无色 (pH 7.0-8.0),再用无水 Na_2SO_4 脱水干燥,得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原中间体。4-硝基邻苯二甲酸二丁酯分子式: $C_{16}H_{21}NO_6$;分子量:323.33;产率:90.1%;纯度 98%。

[0062] 实施例 4、邻苯二甲酸二丁酯半抗原中间体的表征

[0063] 获得的 DBP 半抗原中间体,其结构通过红外光谱、紫外光谱等检测手段分析鉴定,DBP 半抗原中间体的红外光谱图如图 1 所示,其特征如下:IR(KBr) ν/cm^{-1} :1589.43, 1414.58 ($-NO_2$), 1731.58 ($C=O$), 1288.00, 1129.98 ($C-O-C$), 2736.31, 1288.00 ($-CH_3$), 1464.31 ($d-OCH_2-$), 1589.43, 1537.81 ($C=C$), 3049.35, 1612.71, 805.13 ($C-H, Ar$)。分析结果可知,DBP 半抗原中间体 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯的 $-NO_2$ 的不对称伸缩振动 ($\nu_{as NO_2}$) 的吸收带出现在 1589.43 cm^{-1} 附近,对称伸缩振动 ($\nu_{s NO_2}$) 的吸收带出现在 1414.58 cm^{-1} 附近;此外,芳酸酯 $\nu_{C=O}$ 吸收峰明显出现在 1731.58 cm^{-1} 处,邻苯二甲酸酯的伸缩振动的双带出现在 1288.00, 1129.98 cm^{-1} 处;芳核的 $\nu_{C=C}$ 吸收带出现在 1589.43, 1537.81 cm^{-1} 处,上述波峰充分说明反应产物 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯中具备苯环、丁氧基、硝基基官能团的结构特征。

[0064] 实施例 5、邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备

[0065] 称取 1.5g(0.0046mol) DBP 半抗原中间体 (4-硝基邻苯二甲酸二丁酯) 装入容积为 500mL 三口圆底烧瓶底部,随后向瓶底边搅拌边加入 230mL(2.5871mol) 苯,待 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯被苯溶解后再加入 2.80g(0.0428mol) 纯锌粉,搅拌均匀后分次加入 8.2mL 浓 HCl(0.0984mol),室温搅拌 15min 后再次加入 2.80g(0.0428mol) 纯锌粉,室温搅拌反应 12h,薄板层析法 (TLC) 监测反应直至反应完全;反应结束后,将 280mL 冷水加入反应体系,并用 1M NaOH 溶液中和至弱碱性 (pH 7.0-8.5);静置 1h 后分离并保留苯层,再用苯萃取水层,合并萃取液,有机相经水洗后用无水 Na_2SO_4 脱水干燥以除去多余的水分;有机相减压蒸馏以除去苯,得到的粗品再用硅胶柱层析 (洗脱剂为乙酸和正己烷的混合液 (V/V=1:10)) 后减压蒸馏,得到淡黄色晶体 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原。邻苯二甲酸二丁酯半抗原分子式: $C_{16}H_{23}NO_4$;分子量 293.35;产率 89.8%;熔点:68~69℃,纯度 99%。

[0066] 实施例 6、邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备

[0067] 称取 1.5g(0.0046mol) DBP 半抗原中间体 (4-硝基邻苯二甲酸二丁酯) 装入容积为 500mL 三口圆底烧瓶底部,随后向瓶底边搅拌边加入 229mL(2.5760mol) 苯,待 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯被苯溶解后再加入 2.71g(0.0414mol) 纯锌粉,搅拌均匀后分次加入 8.1mL 浓 HCl(0.0966mol),30℃ 搅拌 15min 后再次加入 2.71g(0.0414mol) 纯锌粉,室温搅拌反应 10h,薄板层析法 (TLC) 监测反应直至反应完全;反应结束后,将 271mL 冷水加入反应体系,并用 1M NaOH 溶液中和至弱碱性 (pH 7.0-8.5);静置 1h 后分离并保留苯层,再用苯萃取水层,合并萃取液,有机相经水洗后用无水 Na_2SO_4 脱水干燥以除去多余的水分;有机相减压蒸

馏以除去苯,得到的粗品再用硅胶柱层析(洗脱剂为乙酸和正己烷的混合液(V/V = 1:10))后减压蒸馏,得到淡黄色晶体 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原。邻苯二甲酸二丁酯半抗原分子式: $C_{16}H_{23}NO_4$;分子量 293.35;产率 90.2%;熔点:68 ~ 69°C,纯度 99%。

[0068] 实施例 7、邻苯二甲酸二丁酯半抗原的制备

[0069] 称取 1.5g(0.0046mol)DBP 半抗原中间体(4-硝基邻苯二甲酸二丁酯)装入容积为 500mL 三口圆底烧瓶底部,随后向瓶底边搅拌边加入 234mL(2.6220mol)苯,待 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯被苯溶解后再加入 2.86g(0.0437mol)纯锌粉,搅拌均匀后分次加入 8.4mL 浓 HCl(0.1012mol),室温搅拌 15min 后再次加入 2.86g(0.0437mol)纯锌粉,室温搅拌反应 11h,薄板层析法(TLC)监测反应直至反应完全;反应结束后,将 286mL 冷水加入反应体系,并用 1M NaOH 溶液中和至弱碱性(pH 7.0-8.5);静置 1h 后分离并保留苯层,再用苯萃取水层,合并萃取液,有机相经水洗后用无水 Na_2SO_4 脱水干燥以除去多余的水分;有机相减压蒸馏以除去苯,得到的粗品再用硅胶柱层析(洗脱剂为乙酸和正己烷的混合液(V/V = 1:10))后减压蒸馏,得到淡黄色晶体 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯即 DBP 半抗原。邻苯二甲酸二丁酯半抗原分子式: $C_{16}H_{23}NO_4$;分子量 293.35;产率 90.3%;熔点:68 ~ 69°C,纯度 99%。

[0070] 实施例 8、邻苯二甲酸二丁酯半抗原的表征

[0071] 获得的 DBP 半抗原,其结构通过核磁共振、红外光谱、紫外光谱等检测手段分析鉴定,DBP 半抗原的红外光谱如图 2 所示,其特征如下:IR(KBr) ν / cm^{-1} : 3451.79, 3362.77(-NH₂), 1716.12(C=O), 1290.51, 1142.57(C-O-C), 2956.59, 2871.60(-CH₃), 1458.28(d-OCH₂-), 1602.04, 1565.54, 1476.69(C=C), 1682.88, 850.77(C-H, Ar)。分析结果可知,4-氨基邻苯二甲酸二丁酯的伯胺的 N-H 键的不对称伸缩振动(ν_{as-NH})和对称伸缩振动(ν_{s-NH})的吸收带分别出现在 3451.79 和 3362.77 cm^{-1} 附近,这已证实硝基已经被还原成氨基;此外,芳酸酯 $\nu_{C=O}$ 吸收峰明显出现在 1716.12 cm^{-1} 处,邻苯二甲酸酯的伸缩振动的双带分别出现在 1290.51, 1142.57 cm^{-1} 处;芳核的 $\nu_{C=C}$ 吸收带出现在 1602.07, 1565.54, 1476.69 cm^{-1} 处。总体来看,上述波峰充分说明了反应产物中具备苯环、丁氧基、氨基官能团的结构特征。

[0072] DBP 半抗原的核磁共振氢谱图如图 3 所示,其特征如下:¹H NMR(400MHz, CDCl₃): δ 7.71(d, 1H, ArH), 7.24(d, 1H, ArH), 6.96(d, 1H, ArH), 4.28(t, 2H, OCH₂), 4.24(t, 2H, OCH₂), 4.22(b, 2H, -NH₂), 1.69-1.64(m, 4H, OCH₂CH₂), 1.43-1.38(m, 4H, OCH₂CH₂CH₂), 0.93(t, 6H, OCH₂CH₂CH₂CH₃) ppm。从中可明显看出:苯环上引入氨基偶联臂后, δ 4.17 处出现氨基氢,波谱图中出现的氢原子的位置和个数与所合成的半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯结构相符。

[0073] 实施例 9、邻苯二甲酸二丁酯人工全抗原的制备

[0074] 本发明制备的邻苯二甲酸二丁酯半抗原,主要应用在中环境中邻苯二甲酸二丁酯的免疫检测中。它的主要用途之一,就是可以用来直接和蛋白质大分子偶联,制备出用来免疫动物的免疫原,进而制备出相应的单克隆或多克隆抗体。在此基础上建立邻苯二甲酸二丁酯的免疫测定方法。下面就邻苯二甲酸二丁酯半抗原的使用做以下应用举例:

[0075] 采用重氮化法制备 DBP 免疫原 DBP-BSA,具体合成步骤:将 0.0294g(0.1mM)DBP 半抗原用 100 μ LN, N-二甲基甲酰胺(DMF)溶解,然后在不断搅拌的情况下逐滴加入到装有 40 μ L 浓盐酸和 900 μ L DMF 的混合液的 25mL 锥形瓶中,待混合物加热溶解后置冰浴中冷

却；随后，在 4℃低温搅拌的情况下，逐滴滴加 1M 亚硝酸钠溶液，用 pH 试纸控制反应酸度为 2.0-3.0，同时用淀粉碘化钾试纸显色，显色时间为滴加后的 1-3s，试纸由白色瞬间变成灰蓝色时停止滴加，再继续反应 60min，加 1.0g 尿素以去除未反应的亚硝酸钠；然后，在 4℃低温搅拌的情况下，将上述重氮盐逐滴加入到 0.08mM BSA 溶液 (0.01M pH 9.18 硼酸钠缓冲液溶解) 10mL 中，溶液用 1M 氢氧化钠溶液调节 pH 直至逐渐呈橙红色，继续反应 12h 后，将得到的抗原粗品装入透析袋，置于 0.01M pH7.40 磷酸盐缓冲液中透析 3d，每隔 8h 换水 1 次，最后将终产物 4000r·min⁻¹ 离线 10min，取其上清液即 DBP 免疫原 DBP-BSA。免疫原经紫外-可见分光光度计鉴定后，小量分装，-20℃冷冻干燥、分装并于 -20℃保存。

[0076] 通过戊二醛法制备 DBP 包被原 DBP-OVA，具体合成步骤：0.0294g (0.1mM) DBP 半抗原装入容积为 25mL 的锥形瓶中，边滴加 1mL N,N-二甲基甲酰胺 (DMF) 边搅拌，搅拌均匀后再逐滴加入到 0.08mM OVA 溶液 (0.01M pH 7.40 磷酸盐缓冲液溶解) 10mL 中，随后向该混合体系中缓慢加入 0.038mL 25% 戊二醛，4℃低温闭光搅拌反应 32h 后，将得到的抗原粗品装入透析袋，置于 0.01M pH 7.40 磷酸盐缓冲液中低温 4℃透析 3d，每隔 8h 换水 1 次，最后将终产物 4000r·min⁻¹ 离线 10min，取其上清液即 DBP 包被原 DBP-OVA。包被原经紫外-可见分光光度计鉴定后，冷冻干燥、小量分装，-20℃冷冻保存。

[0077] 偶联物经紫外可见分光光度计扫描鉴定后，从图 4 和图 5 的 DBP 半抗原、载体蛋白和人工全抗原紫外光谱图中可以看出，DBP 半抗原有两个紫外吸收峰即 281nm 和 308nm，其中 308nm 处紫外吸收峰为特征峰；BSA 有两个紫外吸收峰，分别位于 227nm 和 278nm 处，其中 278nm 紫外吸收峰处的吸收值很低；OVA 有三个紫外吸收峰，分别位于 234、241nm 和 268nm 处，其中 279nm 紫外吸收峰处的吸收值较低。偶联物 DBP-BSA 两个紫外吸收峰，分别位于 228nm 和 334nm 处；DBP-OVA 有两个紫外吸收峰，分别位于 228nm 和 372nm 处；此外，我们可以清晰发现，DBP-BSA 和 DBP-OVA 紫外光谱中不仅分别包含 BSA 和 OVA 的特征峰，还在 336 和 360nm 处出现了新的吸收峰。DBP-BSA 和 DBP-OVA 半抗原特征吸收峰发生了红移，这可能是受到载体蛋白的吸收峰的影响所致。吸收峰红移现象的出现，以上信息表明 DBP-BSA 和 DBP-OVA 偶联成功。

[0078] 这些全抗原既可以用于免疫动物，通过动物产生的免疫反应得到可以用来做免疫分析的单克隆或多克隆抗体，又可以作为免疫竞争对象而使用。

[0079] 实施例 10、邻苯二甲酸二丁酯多克隆抗体的制备

[0080] 为证实 DBP 半抗原偶联合成的人工免疫原 DBP-BSA 具有免疫原性，故通过生物体免疫反应制备抗 DBP 多克隆抗体，具体如下：选择 2 只成年健康雄性新西兰白兔，合成出的人工免疫原 DBP-BSA 经过与弗氏完全佐剂充分混合后，对大白兔进行颈部和背部点状注射免疫，经过 7 次加强免疫后，采用间接酶联免疫分析法测定抗血清效价，其抗血清效价均已达到 180000。试验显示交叉反应均不明显，说明其特异性较好。

[0081] 实施例 11、间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测环境样品中邻苯二甲酸二丁酯

[0082] 为了证明 DBP 人工包被原 DBP-OVA 制备成功，通过与 DBP 标准溶液竞争与 DBP 人工免疫原 DBP-BSA 免疫动物制备得到的抗 DBP 多克隆抗体之间的特异性识别反应，进而建立间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测环境中的 DBP，具体步骤如下：用包被缓冲液 (0.05M pH 9.60 碳酸盐缓冲液) 适当稀释包被原溶液 (DBP-OVA)，100 μL/孔，加入 96 孔酶标板中，4℃包被过夜；次日倒掉包被液，每孔加入 200 μL 洗涤液 (0.01M pH 7.40 PBST)，

重复洗涤三次,每次 3min;用吸水纸拍干酶标板后,每孔加入封闭液 200 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时;倒掉封闭液,重复上述洗涤过程三次,生物素化抗 DBP 多克隆抗体 (Bio-pAb-DBP) 稀释至适当浓度,每孔依次加入 50 μ L 生物素化抗体及 50 μ L DBP 标准样品(用含 5%二甲亚砜(DMSO)的 PBS(v/v) 梯度稀释),空白孔每孔加入 100 μ L PBS 缓冲液,37 $^{\circ}$ C 温育 30 分钟;倒掉抗原-抗体反应液,重复洗涤三次,用 PBST 适当稀释辣根过氧化物酶(HRP) 标记的链霉亲和素(HRP-SA),每孔加入 100 μ L,37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时;倒掉 HRP-SA 溶液,重复洗涤五次,每孔加入新鲜配制的显色液(400 μ L 2.5mg/mL 3,3',5,5'-四甲基联苯胺底物溶液与 10mL 磷酸盐-柠檬酸底物缓冲液、10 μ L 30%的 H_2O_2 混合形成显色液)100 μ L/孔,室温下避光反应 15min;每孔加入 50 μ L 终止液(2mol/L 硫酸溶液)以终止显色,然后用酶标仪测定各孔在 450nm 和 630nm 处吸光度值(OD 值),以 $OD = OD_{450} - OD_{630}$ 作为最终读数。实验结果用抑制率来表示,并以抑制率为纵坐标,标准样品浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线,建立的标准工作曲线如图 6 所示。其中,抑制率($\%$) = $(1 - A/A_0) \times 100$,其中 A 为有样品存在的孔的 OD 值, A_0 为没有样品存在的孔的 OD 值。

[0083] 生物素化抗体的制备如下:用 0.05M pH 9.60 碳酸盐缓冲液将纯化后的抗 DBP 多克隆抗体稀释至 1.0mg/mL 左右,取 2mL 加入锥形瓶中;用 DMSO 配制 1.0mg/mL 生物素-N-琥珀酰亚胺基酯(BNHS) 溶液,向上述锥形瓶中加入 BNHS 溶液,使 BNHS:抗 DBP 多克隆抗体的质量比为 1:10,室温下搅拌反应 4 小时;反应结束后将反应液装入透析袋中,用 PBS 缓冲液透析 3d,每天换水 3 次。离心分离去除少量沉淀后,即得相应的生物素化抗体溶液(Bio-pAb-DBP),抗体溶液小体积分装后,于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻保存。

[0084] 间接竞争 BA-ELISA 免疫分析方法检测邻苯二甲酸二丁酯的标准工作曲线如图 6 所示,其标准曲线方程为 $Y = 21.39 \lg C_{DBP} + 59.52$,相关系数 $R^2 = 0.9815$,其中 IC_{50} 表示检测方法的灵敏度,即抑制率为 50% 时对应的分析物浓度 0.361 μ g/L; IC_{10} 表示方法的检测下限,即抑制率为 10% 时对应的分析物浓度 0.0053 μ g/L; IC_{20} - IC_{80} 表示线性范围,即 0.015 μ g/L \sim 8.965 μ g/L。

[0085] 以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是,本发明并不局限于上述特定实施方式,本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改,这并不影响本发明的实质内容。

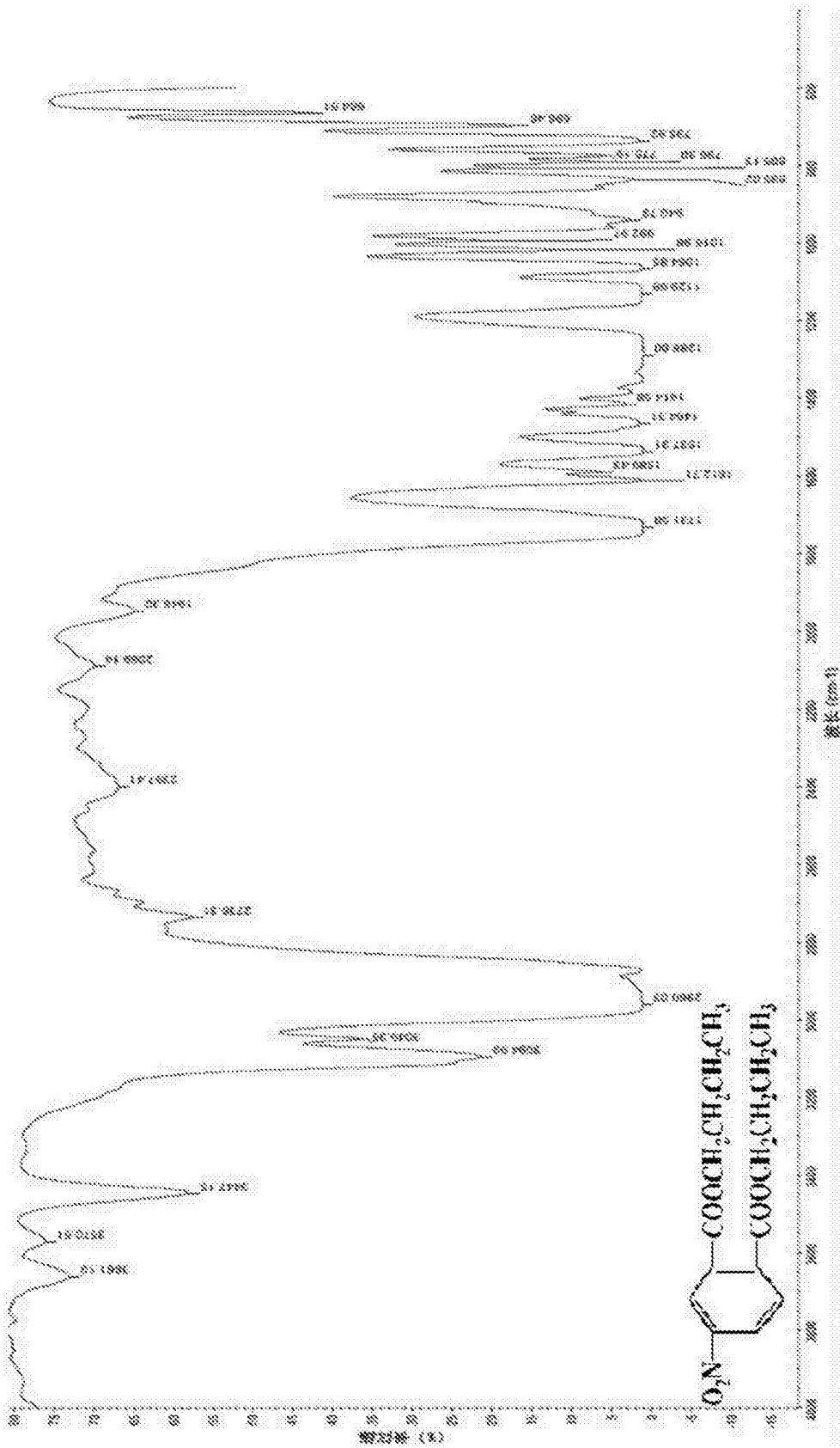


图 1

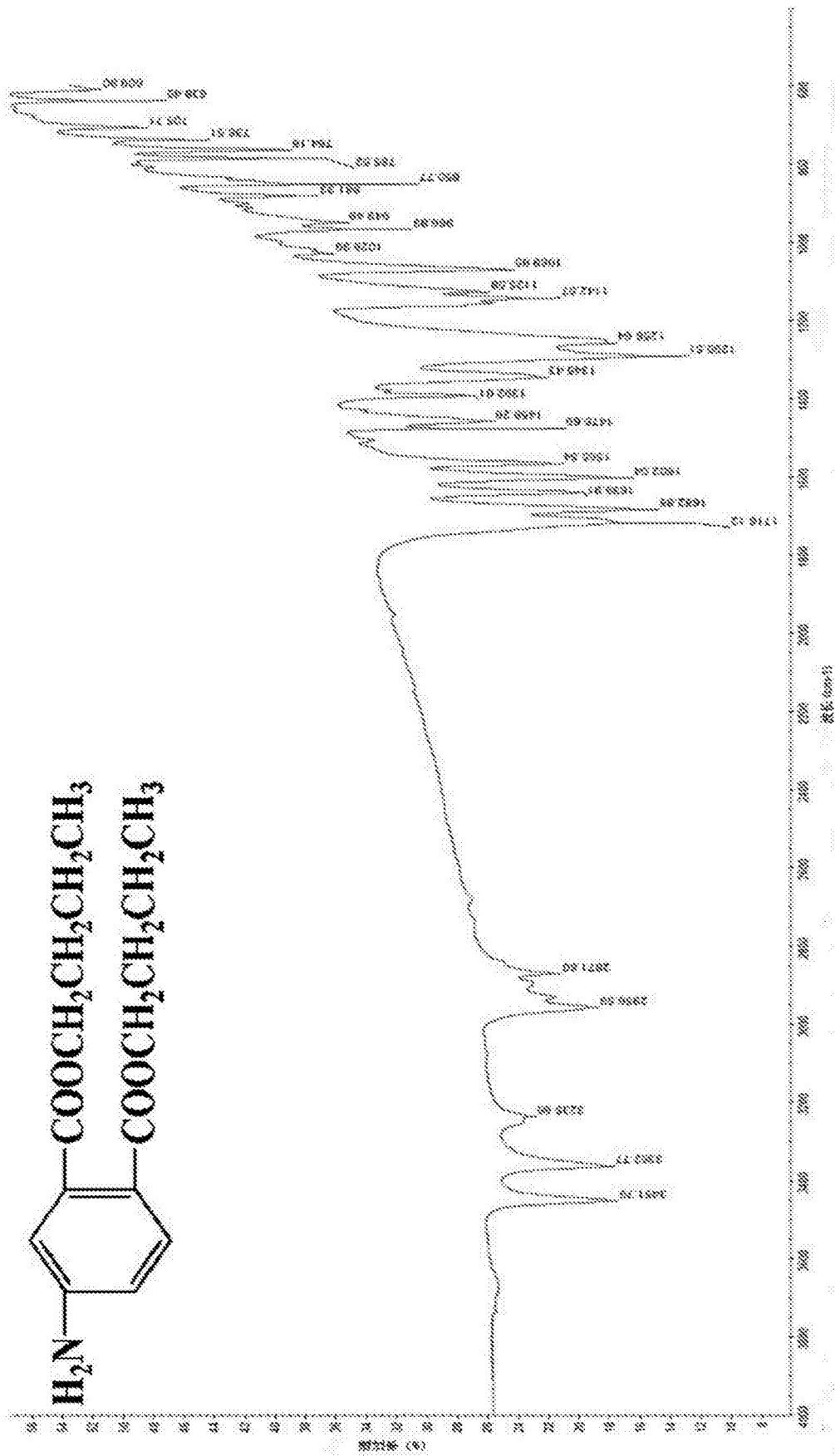


图 2

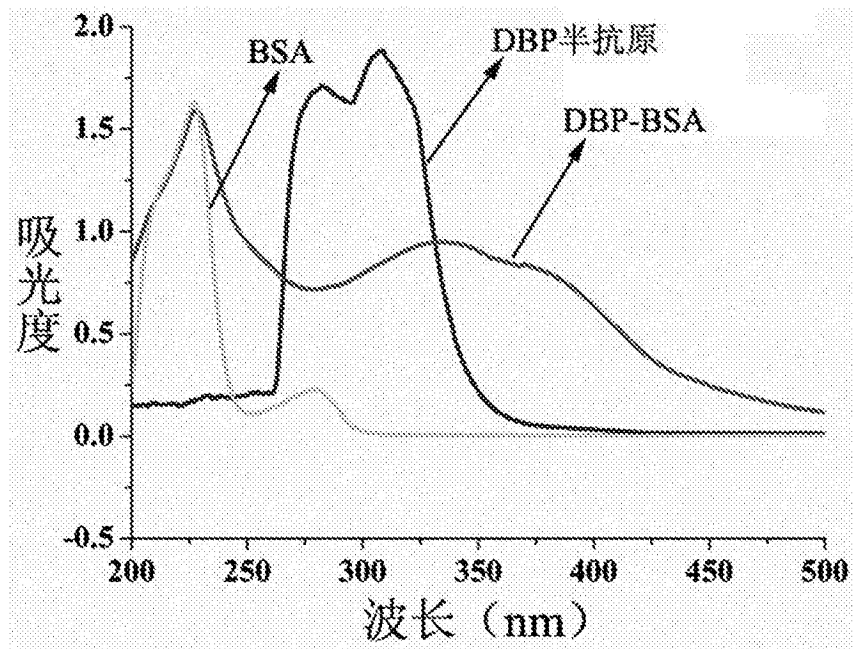


图 4

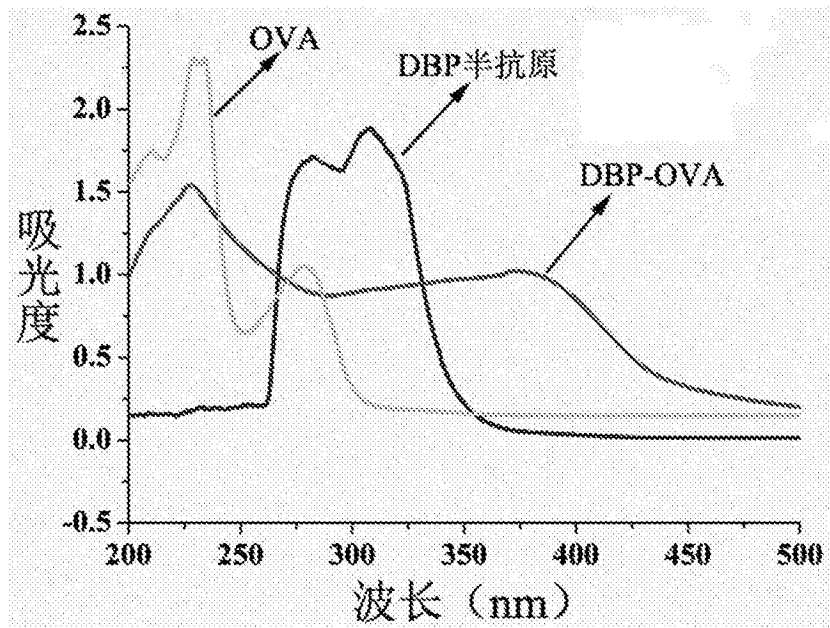


图 5

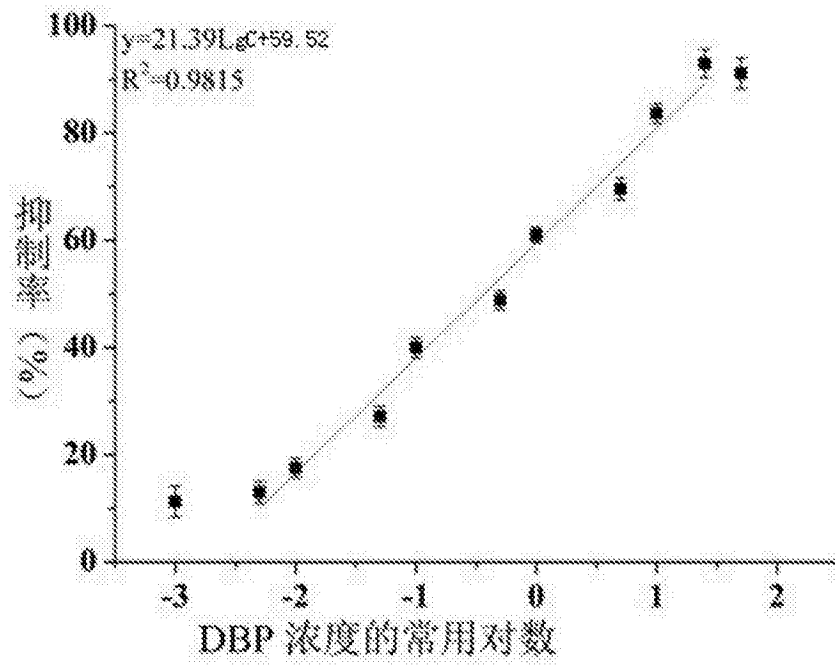


图 6

专利名称(译)	邻苯二甲酸二丁酯半抗原及其制备方法和用途		
公开(公告)号	CN105085298A	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN201510514899.3	申请日	2015-08-20
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	庄惠生 孙瑞艳		
发明人	庄惠生 孙瑞艳		
IPC分类号	C07C229/62 C07C227/04 C07K14/765 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原及其制备方法和用途；所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原的结构式为：其制备方法为以4-硝基邻苯二甲酸为原料，经两步反应制备带有氨基活性基团的DBP半抗原。所述邻苯二甲酸二丁酯半抗原制备方法简便，稳定性好，成本低，容易工业化生产；邻苯二甲酸二丁酯半抗原通过戊二醛法或重氮化法或碳二亚胺法与载体蛋白偶联制备邻苯二甲酸二丁酯人工全抗原，为制备特异性好、效价高的抗体和建立基于亲和素-生物素放大系统的酶联免疫吸附分析方法提供了保障。

