



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102206269 B

(45) 授权公告日 2013.06.12

(21) 申请号 201110114943.3

(22) 申请日 2011.05.05

(73) 专利权人 聊城大学

地址 252059 山东省聊城市东昌府区湖南路
1号

(72) 发明人 王术皓 宋于燕 杜凌云 张霞
庞玉波

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公
司 37205

代理人 李浩成

(51) Int. Cl.

C07K 14/765(2006.01)

C07K 14/77(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

审查员 冯晓亮

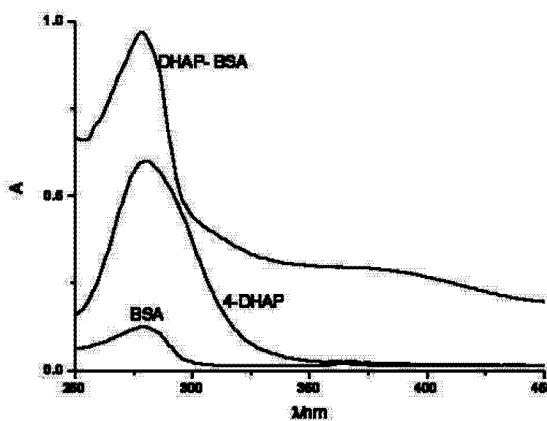
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

邻苯二甲酸二庚酯完全抗原、制备方法及应用

(57) 摘要

本发明公开了一种邻苯二甲酸二庚酯完全抗原及其制备方法:以4-硝基邻苯二甲酸为原料,经过酯化、还原及重氮化反应后,再与牛血清蛋白(BSA)或卵清白蛋白(OVA)偶联等一系列步骤后,合成了邻苯二甲酸二庚酯人工抗原。本发明的制备方法简单可行,制备的完全抗原可用于免疫分析。



1. 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的制备方法,其特征是,以 4-硝基邻苯二甲酸为原料,经过酯化、还原和偶联反应合成;具体步骤如下:

(1) 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 4-硝基邻苯二甲酸中加入庚醇,搅拌条件下加入催化剂,在 115-125℃下搅拌回流,减压蒸去未反应的庚醇和反应生成的水,趁热倒入冰水中,在搅拌下滴加碳酸钠溶液,直到水层的 pH 值为 6.5-7.2 后,分离出油状物经后续处理,得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯;所述的庚醇具体是正庚醇;所述的催化剂为浓盐酸或浓硫酸;所述的碳酸钠溶液质量分数为 10-15%;

(2) 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯中加入甲苯或苯,搅拌条件下加入还原剂,分次滴加浓盐酸,室温下反应 20-40 分钟后,继续加入还原剂,搅拌反应完成后,将溶液倾入冷水中,中和反应至碱性,分离出甲苯或苯层,水层再萃取一次,合并萃取液,干燥、减压除去甲苯或苯,得到淡黄色油状液体 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯;

(3) 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的合成:取 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯溶于盐酸中,放置冰水浴中冷却,搅拌并保持混合物的温度在 4℃以下,避光条件下,滴入亚硝酸钠的水溶液,并随时补充冰块以保持溶液温度,继续搅拌反应 20-40min,然后,向反应体系中逐渐加入溶有 BSA 或 OVA 的缓冲溶液,反应逐渐有橙红色溶液出现,继续反应 1.5-3 小时,得到抗原粗产品,经后续处理得到橙红色产品邻苯二甲酸二庚酯完全抗原。

2. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征是,步骤(1)正庚醇的用量与 4-硝基邻苯二甲酸的物质的量比为 2:1 ~ 3:1。

3. 根据权利要求 2 所述的制备方法,其特征是,正庚醇的用量与 4-硝基邻苯二甲酸的物质的量比为 2.5:1。

4. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征是,催化剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸物质量比为 1:7 ~ 2:7。

5. 根据权利要求 4 所述的制备方法,其特征是,催化剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸物质量比为 1.5:7。

6. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征是,碳酸钠溶液质量分数为 12-14%。

7. 根据权利要求 6 所述的制备方法,其特征是,碳酸钠溶液质量分数为 13%。

8. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征是,步骤(2)所述还原剂为锌粉、铁粉、Sn+HCl 或 LiAlH₄。

9. 根据权利要求 8 所述的制备方法,其特征是,还原剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为 3:1 ~ 2.6:1。

10. 根据权利要求 9 所述的制备方法,其特征是,还原剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为 2.8:1。

11. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征是,步骤(2)所述中和反应使用 1mol / L 的氢氧化钠溶液,萃取时使用甲苯或苯,干燥时使用无水硫酸钠。

12. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征是,所述甲苯或苯与 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为 30:1 ~ 24:1。

13. 根据权利要求 12 所述的制备方法,其特征是,甲苯或苯与 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为 26:1。

14. 根据权利要求 1 所述的制备方法,其特征是,步骤(3)所述缓冲溶液为 BSA 或 OVA

的硼酸钠或 PBS 缓冲溶液, pH 为 7.4-9.5。

15. 根据权利要求 14 所述的制备方法,其特征是,步骤(3)所述缓冲溶液为 BSA 的硼酸钠缓冲液, pH 为 9.2。

邻苯二甲酸二庚酯完全抗原、制备方法及应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种邻苯二甲酸二庚酯完全抗原及其制备方法,属于小分子有机物的免疫化学生物技术领域。

背景技术

[0002] 邻苯二甲酸二庚酯 (DHP) 作为一种主要的增塑剂,用于塑料、橡胶以及化妆品、香料、印染、涂料等行业,而邻苯二甲酸二庚酯 (DHP) 也是一种环境雌激素,近年来的研究发现,邻苯二甲酸二庚酯 (DHP) 物质对环境、生物与食品能造成污染,它可以通过饮食、呼吸和皮肤透过等途径被人体吸收,主要危害人体的雄性生殖系统,邻苯二甲酸二庚酯 (DHP) 具有类雌激素活性,少量就能够对人类的生殖系统产生损害,导致睾丸萎缩、尿道下裂、降低精子活性。商品化使用的邻苯二甲酸酯约有 14 种,其中 6 种被美国 EPA 列为重点控制的污染物,3 种被我国列为优先控制污染物名单,8 种被列为世界野生动物基金会 (WWF) 的环境激素名单中,欧盟曾于 1999 年规定市场销售的 PVC 玩具的邻苯二甲酸酯含量不得超过 0.1%。在塑料中邻苯二甲酸二庚酯 (DHP) 与聚烯烃类塑料分子之间由氢键或范德华力相联结,彼此保留相对独立的化学性质,当遇到油脂、唾液和温度升高时,通过咀嚼或弯曲等机械压力即可溶出。随着塑料制品的使用规模不断扩大,邻苯二甲酸二庚酯 (DHP) 环境激素造成的环境影响和对人类健康的慢性和长期效应,日益受到人们的关注和担忧。目前对邻苯二甲酸二庚酯 (DHP) 环境激素的检测主要有液相色谱 (HPLC)、气相色谱 (GC) 和气液-质谱联用 (GC-MS) 等色谱技术,但由于色谱技术本身的限制,测定前必须进行衍生化,使得试样的前处理十分复杂,操作繁琐,所用的仪器昂贵,而且要求有熟练的操作人员和较长的分析周期,方法的灵敏度也受到限制,难以适应对邻苯二甲酸二庚酯 (DHP) 环境激素的野外检测和实验室内进行大批量的筛选实验的进行等。因此,有必要制备邻苯二甲酸二庚酯人工抗原,用于进行免疫检测。

[0003] 公开号 CN 101328204A(申请号 200810022244.4)的中国专利文献公开了一种邻苯二甲酸二辛酯人工抗原的制备方法,是以 4-硝基邻苯二甲酸为原料,在浓硫酸的催化下与正辛醇发生酯化反应,然后利用铁粉还原法使 4-硝基邻苯二甲酸二辛酯苯环上的硝基还原为胺基,制备半抗原,利用重氮化法对半抗原上的胺基进行重氮化并使之与牛血清蛋白结合,制备邻苯二甲酸二辛酯的人工抗原。公开号 CN 101328217A(申请号 200810021411.3)的中国专利文献公开了一种邻苯二甲酸二己酯人工抗原的制备方法,是以 4-硝基邻苯二甲酸为原料,在浓硫酸的催化下与正己醇发生酯化反应,然后利用铁粉还原法使 4-硝基邻苯二甲酸二己酯苯环上的硝基还原为胺基,制备半抗原,利用重氮化法对半抗原上的胺基进行重氮化并使之与牛血清蛋白结合,制备邻苯二甲酸二己酯的人工抗原。公开号 CN 101328218A(申请号 200810021412.8)的中国专利文献公开了一种邻苯二甲酸二异辛酯人工抗原的制备方法,是以 4-硝基邻苯二甲酸为原料,在浓硫酸的催化下与异辛醇发生酯化反应,然后利用铁粉还原法使 4-硝基邻苯二甲酸二异辛酯苯环上的硝基还原为胺基,制备半抗原,利用重氮化法对半抗原上的胺基进行重氮化并使之与牛血清蛋白结合,制备邻苯

二甲酸二异辛酯的人工抗原。

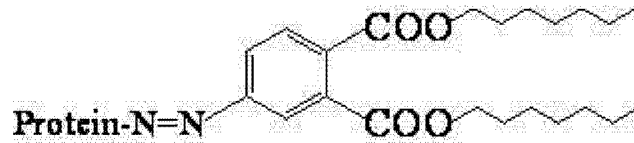
[0004] 邻苯二甲酸二庚酯的相对分子质量较小,不具有免疫原性,必须和大分子的载体蛋白如牛血清白蛋白(BSA)、卵血清白蛋白(OVA)等偶联之后构成完全人工抗原,才能用于动物免疫。但现有技术中尚未有邻苯二甲酸二庚酯的完全抗原。

发明内容

[0005] 本发明的目的就是提供了一种邻苯二甲酸二庚酯完全抗原、制备方法,所制备的产品可用于邻苯二甲酸二庚酯免疫分析方法研究。

[0006] 本发明的方案是,邻苯二甲酸二庚酯完全抗原,结构式如下:

[0007]



[0008] 式中的 Protein 为牛血清白蛋白 BSA 或卵血清白蛋白 OVA。

[0009] 所述的邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的制备方法,是以 4-硝基邻苯二甲酸为原料,经过酯化、还原和偶联反应合成。

[0010] 所述的制备方法,优选的方案是,具体步骤如下:

[0011] (1) 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 4-硝基邻苯二甲酸中加入庚醇,搅拌条件下加入催化剂,在 115-125℃ 下搅拌回流,减压蒸去未反应的庚醇和反应生成的水,趁热倒入冰水中,在搅拌下滴加碳酸钠溶液,直到水层的 pH 值为 6.5-7.2(优选 pH 6.8-7.0)后,分离出油状物经后续处理,得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯;

[0012] (2) 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯中加入甲苯或苯,搅拌条件下加入还原剂,分次滴加浓盐酸,室温下反应 20-40 分钟(优选 25-35 分钟)后,继续加入还原剂,搅拌反应完成后,将溶液倾入冷水中,中和反应至碱性,分离出甲苯或苯层,水层再萃取一次,合并萃取液,干燥、减压除去甲苯或苯,得到淡黄色油状液体 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯;

[0013] (3) 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的合成:取 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯溶于盐酸中,放置冰水浴中冷却,搅拌并保持混合物的温度在 4℃ 以下,避光条件下,滴入亚硝酸钠的水溶液,并随时补充冰块以保持溶液温度,继续搅拌反应 20-40min(优选 25-35 分钟),然后,向反应体系中逐渐加入溶有 BSA 或 OVA 的缓冲溶液,反应逐渐有橙红色溶液出现,继续反应 1.5-3 小时(优选 1.8-2.5 小时),得到抗原粗产品,经后续处理得到橙红色产品邻苯二甲酸二庚酯完全抗原。

[0014] 所述的制备方法,优选的方案是,步骤(1)所述的庚醇具体是正庚醇,优选的,正庚醇的用量与 4-硝基邻苯二甲酸的物质的量比为 2:1 ~ 3:1,优选为 2.5:1。

[0015] 所述的制备方法,优选的方案是,步骤(1)所述的催化剂为浓盐酸或浓硫酸,优选的,催化剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸物质质量比为 1:7 ~ 2:7,优选 1.5:7。

[0016] 所述的制备方法,优选的方案是,步骤(1)搅拌回流时间为 10-13 小时(优选 10.5-12.5 小时,更优选 12 小时),优选的是,步骤(1)所述的碳酸钠溶液质量分数为 10-15%(优选 12-14%,更优选 13%)。

[0017] 所述的制备方法,优选的方案是,步骤(1)所述的后续处理是将所得油状物萃取,合并萃取液,用无水硫酸钠干燥。更加优选的,萃取油状物时使用无水乙醇或二氯甲烷,萃取液经无水硫酸钠干燥后,再旋蒸除去无水乙醇或二氯甲烷,优选的,步骤(2)所述还原剂为锌粉、铁粉、Sn+HCl 或 LiAlH_4 ,更加优选的,所述还原剂的用量与 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比为 3:1 ~ 2.6:1 (优选 2.8:1)。

[0018] 所述的制备方法,优选的方案是,步骤(2)所述中和反应使用 1mol / L 的氢氧化钠溶液,萃取时使用甲苯或苯,干燥时使用无水硫酸钠,优选的,步骤(2)所述甲苯或苯与 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比为 30:1 ~ 24:1 (优选 26:1)。

[0019] 所述的制备方法,优选的方案是,步骤(3)所述缓冲溶液为 BSA 或 OVA 的硼酸钠或 PBS 缓冲溶液,pH 为 7.4-9.5。优选 BSA 的硼酸钠缓冲液,pH 为 9.2。

[0020] 本发明还提供了所述的邻苯二甲酸二庚酯完全抗原在监测邻苯二甲酸二庚酯含量时的用途。

[0021] 本发明的技术优势体现在:以 4- 硝基邻苯二甲酸为原料,与庚醇发生酯化反应,制备 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯,在邻苯二甲酸二庚酯的苯环上引入了一个硝基,然后将硝基还原为能与蛋白质结合的活性氨基,最后 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯与蛋白质结合,形成完全抗原。本发明合成路线简单,成本低,便于应用。

附图说明

[0022] 图 1 是实施例 1 所得 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯(4-DHNP)的紫外光谱图;

[0023] 图 2 是实施例 1 所得 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯(4-DHAP)的紫外光谱图;

[0024] 图 3 是实施例 1 所得邻苯二甲酸二庚酯完全抗原(DHAP- BSA)的紫外光谱图。

具体实施方式

[0025] 下面结合实施例详细说明本发明的技术方案,但保护范围不被此限制。

[0026] 实施例中所用原料皆可从市场购买,比如 4- 硝基邻苯二甲酸购自济南恒化科技有限公司;所用庚醇为正庚醇(CAS 号:111-70-6,无色粘稠液体。熔点 -34.1°C ,沸点 176°C , 155.6°C (53.3kPa)。),购自济南恒化科技有限公司;锌粉、铁粉、 LiAlH_4 购自天津试剂三厂;HCl、硼酸钠购自莱阳精细化工厂;BSA、OVA 购自北京拜尔迪生物技术有限公司。

[0027] 实施例 1 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原及其制备方法

[0028] (1) 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 15g4- 硝基邻苯二甲酸中加入 30ml 庚醇,在搅拌的条件下加入 1.3ml 浓硫酸作为催化剂,温度控制在 120°C ,搅拌回流 12 小时后,减压除去未反应的庚醇和反应生成的水。趁热倒入冰水中,在玻璃棒搅拌下,滴加质量分数为 10% 的碳酸钠溶液,直到水层的 pH 值为中性后,分离出油状产物,油状物用无水乙醇萃取,合并萃取液,用无水硫酸钠干燥,然后旋蒸除去乙醇,得到黄色油状液体 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯 9.75g。

[0029] 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯的核磁共振鉴定:

[0030] ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3), δ : 8.61 (d, 1H, $J=2.4\text{Hz}$, Ar-H), 8.38 (dd, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, $J=2.0\text{Hz}$, Ar-H), 7.84 (d, 1H, $J=8.4\text{Hz}$, Ar-H), 4.35 (t, 4H, $J=6.8\text{Hz}$, OCH_2), 1.75 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.25-1.41 (m, 16H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.87 (m, 6H, $J=7.3\text{Hz}$,

CH₃)。

[0031] 图 1 是实施例所得 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯的紫外光谱图, 由此图可以看出: 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯(4-DHNP) 最大紫外吸收波长为: $\lambda = 262\text{nm}$ 。

[0032] (2) 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯的制备: 取 1.8g 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯中加入 50ml 甲苯, 在搅拌条件下加入 2.4g 纯锌粉。分次滴加 6ml 浓盐酸, 室温下反应半小时后, 继续加入 2.4g 纯锌粉, 室温搅拌 12 个小时后, 反应完成后, 将溶液倾入 80ml 冷水中, 用 1mol / L 的氢氧化钠溶液中和至碱性。用分液漏斗分离出甲苯层, 水层用 20ml 甲苯再萃取一次, 合并萃取液, 用无水硫酸钠干燥, 减压除去甲苯, 得到淡黄色油状液体 1.44g 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯。

[0033] 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯的核磁共振鉴定:

[0034] ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃), δ : 7.71 (d, 1H, J=8.4Hz, Ar-H), 6.71 (d, 1H, J=6.4Hz, Ar-H), 6.67 (dd, 1H, J=8.4Hz, J=2.4Hz, Ar-H), 4.27 (t, 2H, J=7.2Hz, OCH₂), 4.21 (m, 4H, OCH₂, NH₂), 1.70 (m, 4H, OCH₂CH₂), 1.25-1.4 (m, 16H, OCH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 0.88 (t, 6H, J=6.8Hz, CH₃)。

[0035] 图 2 是实施例 1 所得 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯的紫外光谱图, 由此图可以看出 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯(4-DHAP) 最大紫外吸收波长为: $\lambda = 280\text{nm}$ 。

[0036] 通过比较图 1、图 2, 可见 4- 硝基邻苯二甲酸二庚酯(4-DHNP) 最大紫外吸收波长为: $\lambda = 262\text{nm}$, 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯(4-DHAP) 最大紫外吸收波长为: $\lambda = 280\text{nm}$, 合成物中苯环上的硝基还原为氨基后, 其吸收峰红移。

[0037] 由核磁数据及紫外光谱分析可判定成功合成了半抗原衍生物。

[0038] (3) 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的制备: 取 0.5g 4- 氨基邻苯二甲酸二庚酯溶于 4ml 1mol/L 的盐酸中, 放置冰水浴中冷却, 搅拌并保持混合物的温度在 4°C 以下, 避光条件下, 滴入 5ml 0.1mol/L 亚硝酸钠的水溶液, 并随时补充冰块以保持溶液温度为 4°C, 继续搅拌反应 30min, 然后, 向反应体系中逐渐加入 20ml 溶有 100mgBSA 的硼酸钠缓冲液, pH 值为 9.2, 反应逐渐有橙红色溶液出现, 继续反应 2 小时, 得到抗原粗产品。将反应液装入透析袋中, 置中性二次蒸馏水中透析 5 天, 每天换水 3 次, 将得到的橙红色产品, 冷冻干燥冻存。

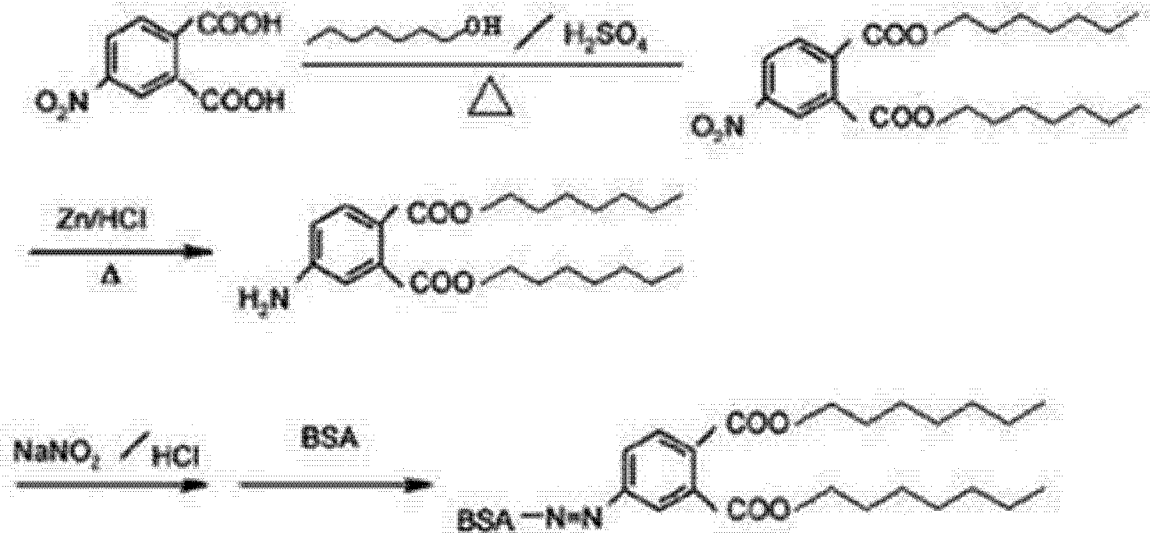
[0039] 硼酸钠缓冲溶液: 称取硼酸 3.09g, 加入 0.1mol/LNaCl 溶液 500ml 中溶解, 再加 0.1mol/LNaOH 溶液调试到 pH=9.2。

[0040] 透析袋前处理: 剪取 15cm 的透析袋, 在 2%NaHCO₃ 和 0.1mol/LEDTA (PH=8.0) 的混合溶液中煮沸 10 分钟, 然后用蒸馏水彻底清洗, 再放入 0.1mol/LEDTA (PH=8.0) 的溶液中煮沸 10 分钟, 冷却后存放于 4°C 溶液中备用, 必须确保透析袋始终浸没在溶液中, 使用前用去离子水冲洗干净。

[0041] 图 3 是实施例 1 所得邻苯二甲酸二庚酯完全抗原(DHAP- BSA) 鉴定的紫外光谱图, 由此图可以看出在 280nm 处都有特征吸收峰, 图谱中 BSA 的浓度与 DHAP- BSA 中 BSA 部分的浓度一致, 而 DHAP- BSA 完全抗原的吸光度比 BSA 与 4-DHAP 曲线的吸光度大, 由吸光度的加和性, 从而判定交联成功。

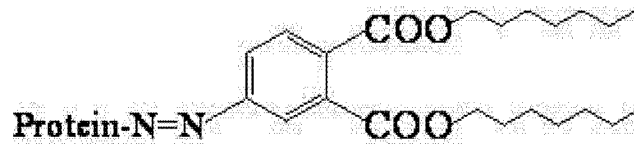
[0042] 本实施例邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的合成路线如下:

[0043]



[0044] 本实施例所得邻苯二甲酸二庚酯完全抗原，结构式如下：

[0045]



[0046] 式中的 Protein 为牛血清白蛋白 BSA。

[0047] 实验例 1 邻苯二甲酸二庚酯抗体的制备(利用实施例 1 所得抗原)

[0048] (1) 抗体的制备实验：实验动物为新西兰大白兔(3 月龄左右，体重为 2.5 kg 左右，雄性)，首次注射用含完全弗氏佐剂的邻苯二甲酸二庚酯完全抗原进行基础免疫，之后用含不完全弗氏佐剂的邻苯二甲酸二庚酯完全抗原加强免疫。采用背部皮下多点注射与腿部肌肉注射相结合的方法，背部皮下免疫 10 点、大腿肌肉注射 2 点(左右大腿各 1 个点)，每次注射 1.0 mg/1mL。2 周后开始加强免疫，以后每 10 天再次加强免疫，从第二次加强免疫开始，每次免疫后第 8 天耳静脉采血，离心分离出血清后检验血清效价，效价合格后颈动脉大量采血。

[0049] (2) 抗体效价的测定：利用间接 ELISA，分别以抗原(E₂-BSA)、BSA 及 E₂-OVA 包被微孔板，以辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(HRP-IgG)为探针，采用电化学 ELISA 测定抗体的效价。以包被抗原包被 96 孔板，每孔 100 mL，4℃下包被过夜；取出后用 PBST 洗涤微孔板，用 1% OVA 封闭，每孔 150 mL，37℃温育 1 h 后取出，洗涤 3 次；每孔中加入 100 mL 系列 PBS 缓冲液稀释抗血清，于 37℃温育 1 h；洗涤(3 次)；加入经 PBS 稀释 1000 倍的羊抗兔 IgG-HRP 溶液 100 mL，于 37℃温育 1 h 后洗涤 3 次；每孔加入 150 mL 底物溶液，在 37℃避光温育 30min 后，每孔加入 30 mL 2.0 mol/L NaOH 终止酶反应，利用微型化的三电极系统直接插入酶联免疫吸附板的微孔中，进行阴极化线性扫描，记录 -0.93V(vs. Ag/AgCl)产物二氨基吩嗪的二阶导数示波极谱波，以峰电流进行定量。通常以结合率为 50% 的血清浓度为中点效价，通过绘制抗体稀释曲线，可见抗体的中点效价为 1:25000；而当效价达 1:500000 时，仍能检测到信号的明显变化，可见满足分析要求。

[0050] (3) 抗血清的纯化：取一定量抗血清加等量的 pH 7.0 PBS 缓冲液，将血清稀释一倍，逐滴加入饱和硫酸铵溶液使溶液中硫酸铵饱和度为 50%，边加边搅拌，此时即有大量的

球蛋白沉淀,上清液中为白蛋白部分;置4℃静置1 h后,离心(3000rpm,15min),弃上清。沉淀用PBS溶解;逐滴加入1/2 PBS体积的饱和硫酸铵边加边搅拌,使饱和度为33%,置4℃冰箱1 h,离心收集沉淀,可得到粗提纯的IgG。

[0051] 将沉淀用PBS溶解后装入透析袋,于pH 7.0 PBS缓冲液中(4℃)进行透析脱盐。每天换液3-4次,直至全部 NH_4^+ 被除去为止。透析后有少量不溶沉淀,离心去除,溶液即为抗体溶液。

[0052] 实验例2 电化学酶联免疫分析测定邻苯二甲酸二庚酯(利用实施例1所得抗原)

[0053] 微孔包被抗原模式非竞争酶免疫分析法步骤:100 μL 的邻苯二甲酸二庚酯-卵清白蛋白包被酶标板4℃过夜,用洗涤液洗3次后,每孔加入150 μL 封闭液,在37℃中温育1 h,洗涤3次后备用;一定量的邻苯二甲酸二庚酯与一定量的生物素化的抗邻苯二甲酸二庚酯抗体混合,在37℃中温育1 h,然后,100 μL 上述温育的邻苯二甲酸二庚酯和抗体的混合物被加入到微孔板的微孔中,在37℃中温育1h。同样洗涤之后,每孔加入100 μL 亲合素-辣根过氧化物酶的稀释缓冲溶液,在37℃中温育0.5 h。洗涤3次之后,每孔加入150 μL 底物溶液,在37℃避光温育30min后,每孔加入30 μL 2.0 mol/L NaOH终止酶反应。于伏安分析仪上,利用微型化的三电极系统直接插入酶联免疫吸附板的微孔中,进行阴极化线性扫描,记录-0.93V (vs. Ag/AgCl)产物二氨基吩嗪的二阶导数示波极谱波,同时做空白,以峰电流进行定量。

[0054] 在选定的条件下,测定邻苯二甲酸二庚酯的线性范围为10.0-600.0 ng/mL,线性回归方程为 $DI = 4.479C + 557.5$, $R^2=0.9931$ (C为邻苯二甲酸二庚酯的浓度)。方法的检出限为8.4 ng/mL。对200.0 ng/mL的邻苯二甲酸二庚酯进行11次平行测定的相对标准偏差为7.8%。

[0055] 样品分析:将100mL水样经过滤,用盐酸或氢氧化钠调节pH 7左右,分别添加不同浓度的邻苯二甲酸二庚酯标准溶液,置于250mL分液漏斗中,取10mL正己烷,倒入分液漏斗中,振摇5min,静置30min,离心分离;水相重复萃取1次,弃去水相,合并有机相,在70~80℃水浴下浓缩至1mL左右,用无水乙醇定容至2mL,作为分析试液。样品测定方法与标准曲线的制作相同,以固相抗原非竞争酶免疫电化学伏安分析法测定。经分析可知,该方法用于水样中邻苯二甲酸二庚酯测定的回收率为93.2-108.5%之间,相对标准偏差为4.5-8.7%之间。

[0056] 实施例2 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原及其制备方法,具体步骤如下:

[0057] (1) 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在4-硝基邻苯二甲酸中加入庚醇(具体是正庚醇),正庚醇的用量与4-硝基邻苯二甲酸的物质的量比为2:1,搅拌条件下加入催化剂浓盐酸,催化剂的用量与4-硝基邻苯二甲酸物质量比为1:7。在115℃下搅拌回流,搅拌回流时间为10小时减压蒸去未反应的庚醇和反应生成的水,趁热倒入冰水中,在搅拌下滴加质量分数为15%的碳酸钠溶液,直到水层的pH值为6.5后,分离出油状物经后续处理,得到黄色油状液体4-硝基邻苯二甲酸二庚酯;

[0058] (2) 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在4-硝基邻苯二甲酸二庚酯中加入甲苯,甲苯与4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为30:1。搅拌条件下加入还原剂铁粉,还原剂的用量与4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为3:1,分次滴加浓盐酸,室温下反应30分钟后,继续加入还原剂,搅拌反应完成后,将溶液倾入冷水中,使用1mol / L的氢氧化钠溶

液中和反应至碱性,分离出甲苯层,水层再使用甲苯或苯萃取一次,合并萃取液,使用无水硫酸钠干燥、减压除去甲苯,得到淡黄色油状液体 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯;

[0059] (3) 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的合成:取 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯溶于盐酸中,放置冰水浴中冷却,搅拌并保持混合物的温度在 4℃以下,避光条件下,滴入亚硝酸钠的水溶液,并随时补充冰块以保持溶液温度,继续搅拌反应 40min,然后,向反应体系中逐渐加入溶有 OVA 的 PBS 缓冲溶液,其 pH 为 7.4,反应逐渐有橙红色溶液出现,继续反应 1.5 小时,得到抗原粗产品,经后续处理得到橙红色产品邻苯二甲酸二庚酯完全抗原。

[0060] 实施例 3 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原及其制备方法,具体步骤如下:

[0061] (1) 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 4-硝基邻苯二甲酸中加入庚醇(具体是正庚醇),正庚醇的用量与 4-硝基邻苯二甲酸的物质的量比为 3:1。搅拌条件下加入催化剂浓硫酸,催化剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸物质量比为 2:7。125℃下搅拌回流,搅拌回流时间为 13 小时,减压蒸去未反应的庚醇和反应生成的水,趁热倒入冰水中,在搅拌下滴加质量分数为 14%的碳酸钠溶液,直到水层的 pH 值为 7.2 后,分离出油状物经后续处理,得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯;

[0062] (2) 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯中加入苯,苯与 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为 24:1。搅拌条件下加入还原剂 LiAlH_4 ,还原剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为 2.6:1,分次滴加浓盐酸,室温下反应 40 分钟后,继续加入还原剂,搅拌反应完成后,将溶液倾入冷水中,使用 1mol / L 的氢氧化钠溶液中和反应至碱性,分离出苯层,水层再使用甲苯或苯萃取一次,合并萃取液,使用无水硫酸钠干燥、减压除去苯,得到淡黄色油状液体 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯;

[0063] (3) 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的合成:取 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯溶于盐酸中,放置冰水浴中冷却,搅拌并保持混合物的温度在 4℃以下,避光条件下,滴入亚硝酸钠的水溶液,并随时补充冰块以保持溶液温度,继续搅拌反应 40min,然后,向反应体系中逐渐加入溶有 BSA A 的硼酸钠缓冲溶液, pH 为 9.5。反应逐渐有橙红色溶液出现,继续反应 2 小时,得到抗原粗产品,经后续处理得到橙红色产品邻苯二甲酸二庚酯完全抗原。

[0064] 实施例 4 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原及其制备方法,具体步骤如下:

[0065] (1) 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 4-硝基邻苯二甲酸中加入庚醇(具体是正庚醇),正庚醇的用量与 4-硝基邻苯二甲酸的物质的量比为 2.5:1。搅拌条件下加入催化剂浓硫酸,催化剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸物质量比为 1.5:7。在 120℃下搅拌回流,搅拌回流时间为 12 小时,减压蒸去未反应的庚醇和反应生成的水,趁热倒入冰水中,在搅拌下滴加质量分数为 13%的碳酸钠溶液,直到水层的 pH 值为 7.0 后,分离出油状物,将所得油状物萃取,合并萃取液,用无水硫酸钠干燥。萃取油状物时使用无水乙醇或二氯甲烷,萃取液经无水硫酸钠干燥后,再旋蒸除去无水乙醇或二氯甲烷,得到黄色油状液体 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯;

[0066] (2) 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯的合成:在 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯中加入甲苯,甲苯与 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为 26:1。搅拌条件下加入还原剂锌粉,还原剂的用量与 4-硝基邻苯二甲酸二庚酯质量的比例为 2.8:1,分次滴加浓盐酸,室温下反应 30 分钟后,继续加入还原剂,搅拌反应完成后,将溶液倾入冷水中,使用 1mol / L 的氢氧化钠溶液中和反应至碱性,分离出甲苯层,水层再使用甲苯或苯萃取一次,合并萃取液,使用无

水硫酸钠干燥、减压除去甲苯或苯,得到淡黄色油状液体 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯;

[0067] (3) 邻苯二甲酸二庚酯完全抗原的合成:取 4-氨基邻苯二甲酸二庚酯溶于盐酸中,放置冰水浴中冷却,搅拌并保持混合物的温度在 4℃以下,避光条件下,滴入亚硝酸钠的水溶液,并随时补充冰块以保持溶液温度,继续搅拌反应 35min,然后,向反应体系中逐渐加入溶有 BSA 的硼酸钠缓冲溶液, pH 为 9.2。反应逐渐有橙红色溶液出现,继续反应 2.5 小时,得到抗原粗产品,经后续处理得到橙红色产品邻苯二甲酸二庚酯完全抗原。

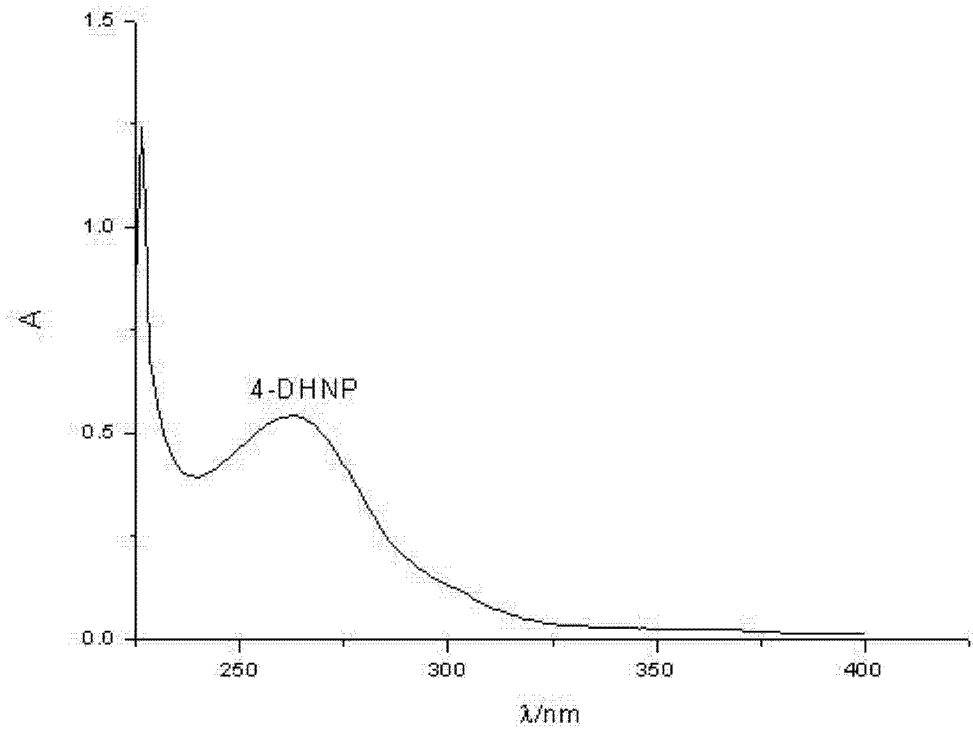


图 1

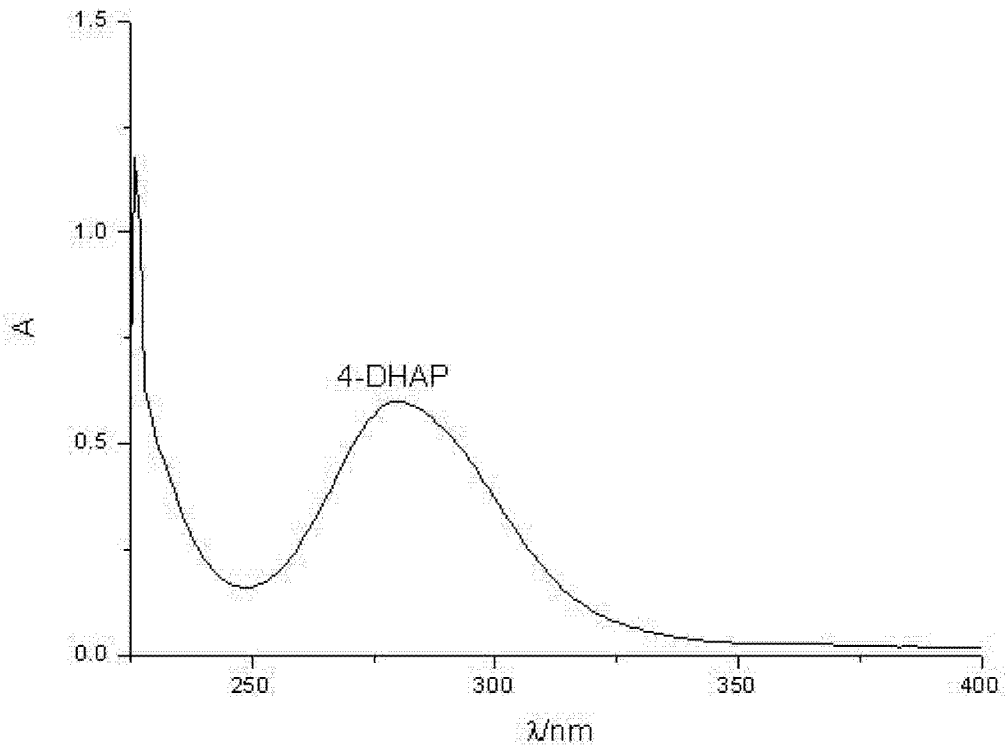


图 2

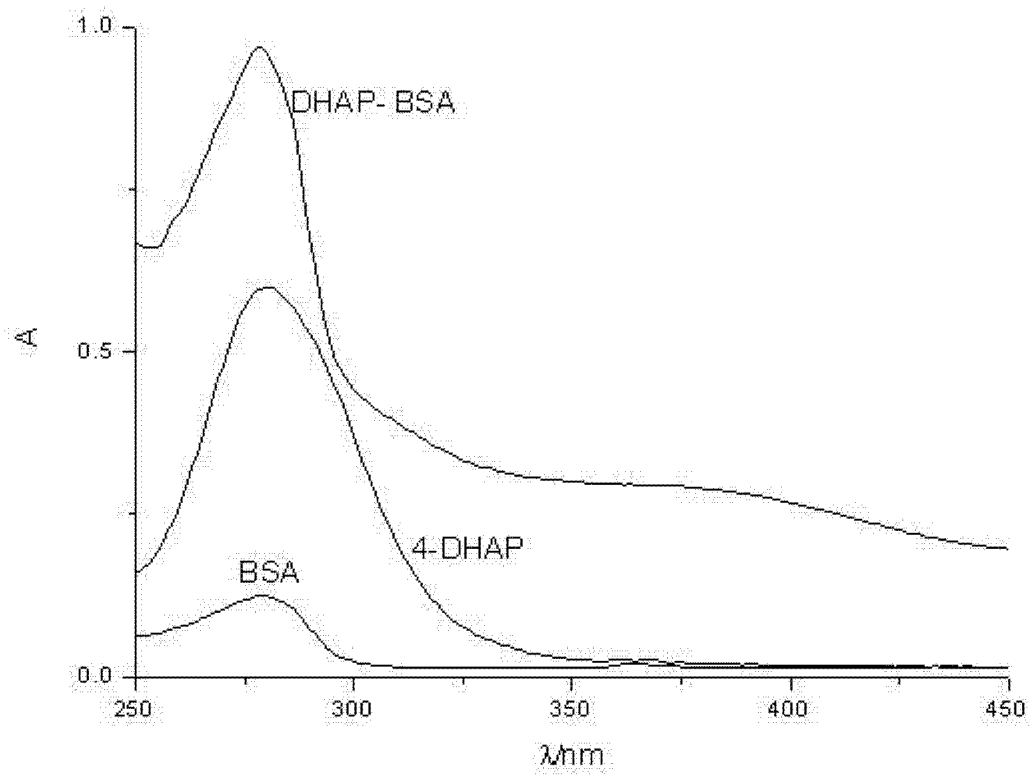


图 3

专利名称(译)	邻苯二甲酸二庚酯完全抗原、制备方法及应用		
公开(公告)号	CN102206269B	公开(公告)日	2013-06-12
申请号	CN201110114943.3	申请日	2011-05-05
[标]申请(专利权)人(译)	聊城大学		
申请(专利权)人(译)	聊城大学		
当前申请(专利权)人(译)	聊城大学		
[标]发明人	王术皓 宋于燕 杜凌云 张霞 庞玉波		
发明人	王术皓 宋于燕 杜凌云 张霞 庞玉波		
IPC分类号	C07K14/765 C07K14/77 G01N33/53		
代理人(译)	李浩成		
审查员(译)	冯晓亮		
其他公开文献	CN102206269A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种邻苯二甲酸二庚酯完全抗原及其制备方法：以4-硝基邻苯二甲酸为原料，经过酯化、还原及重氮化反应后，再与牛血清蛋白（BSA）或卵清白蛋白（OVA）偶联等一系列步骤后，合成了邻苯二甲酸二庚酯人工抗原。本发明的制备方法简单可行，制备的完全抗原可用于免疫分析。

