



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480001311.4

[45] 授权公告日 2009年6月17日

[11] 授权公告号 CN 100501401C

[22] 申请日 2004.5.14
 [21] 申请号 200480001311.4
 [30] 优先权
 [32] 2003.5.20 [33] FR [31] 03/50160
 [32] 2003.5.22 [33] FR [31] 03/50167
 [86] 国际申请 PCT/FR2004/050194 2004.5.14
 [87] 国际公布 WO2004/104579 法 2004.12.2
 [85] 进入国家阶段日期 2005.5.20
 [73] 专利权人 原子能委员会
 地址 法国巴黎
 [72] 发明人 埃里克·埃赞
 马里-阿斯特丽·萨戈
 菲利普·普拉代勒
 [56] 参考文献
 CN1292499A 2001.4.25

WO0205860A1 2002.1.24
 a new method for fluoride determination by using fluorophoresand dyes anchored onto MCM - 41. descalzo et al. CHEM. COMMU. , Vol. 6 . 2002
 审查员 边 昕
 [74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
 代理人 过晓东

权利要求书4页 说明书31页 附图10页

[54] 发明名称
 检测氟化物或氟化氢的方法及试剂盒

[57] 摘要

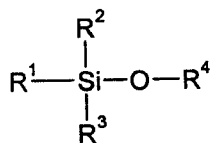
本发明涉及一种检出和/或测定样品中氟化物(F⁻)或氟化氢(HF)浓度的方法,其包括以下步骤:在水溶液中将所述样品与甲硅烷基化的有机化合物接触,以此得到测量溶液,所述甲硅烷基化的有机化合物在氢氟酸或氟化物的存在时发生去甲硅烷基化,使得可以分别检出和/或测定甲硅烷基化的有机化合物和去甲硅烷基化的有机化合物;在所述测量溶液检出和/或测定去甲硅烷基化的有机化合物的出现或甲硅烷基化的有机化合物的消失,如果样品中存在氟化物或氟化氢,则会出现去甲硅烷基化的有机化合物出现或甲硅烷基化的有机化合物消失这种现象。就氟化物或氟化氢的检测而言,本发明的方法检测的量级可以轻易地达到1×10⁻²升 HF/10⁶升(10ppb,气体样品),或0.5至1μg/ml(液体样品)。本发明的试剂盒包含实施该方法所需的成

分。本发明方法的检测限为0.001μg/ml。

1、一种检出和/或测定样品中氟化物或氟化氢浓度的方法，其包括以下步骤：

- 在水溶液中将所述样品与甲硅烷基化的有机化合物接触，以此得到测量溶液，所述甲硅烷基化的有机化合物在氢氟酸或氟化物存在时发生去甲硅烷基化，使得能够相互独立地检出和/或测定甲硅烷基化的有机化合物和去甲硅烷基化的有机化合物；
- 在所述测量溶液中检出和/或测定去甲硅烷基化的有机化合物的出现或甲硅烷基化的有机化合物的消失，如果样品中存在氟化物或氟化氢，则发生去甲硅烷基化的有机化合物的出现或甲硅烷基化的有机化合物的消失。

2、权利要求1所述的方法，其中所述甲硅烷基化的有机化合物的结构式如下：



其中 R^1 、 R^2 和 R^3 相互独立地选自 C_1 至 C_6 烷基，而 R^4 为所述有机化合物。

3、权利要求2所述的方法，其中 R^1 、 R^2 和 R^3 相互独立地选自甲基、乙基、丙基和丁基。

4、权利要求1、2或3之一所述的方法，其中所述有机化合物为羟基化合物，其分子量为250至200000 g/mol。

5、权利要求1或2所述的方法，其中所述有机化合物为选自于以下组中的羟基化合物：雌二醇、肽、高香草酸、两性霉素、甾体、细胞因子和花生四烯酸或这些化合物的衍生物。

6、权利要求 1 所述的方法，其中在所述测量溶液中，利用气相色谱法检出和/或测定甲硅烷基化的有机化合物的消失或去甲硅烷基化的有机化合物的出现。

7、权利要求 1 至 3 之一所述的方法，其中在所述测量溶液中，利用免疫检测法检出和/或测定甲硅烷基化的有机化合物的消失或去甲硅烷基化的有机化合物的出现，在该免疫检测法中采用一种或多种针对未甲硅烷基化或去甲硅烷基化的有机化合物或甲硅烷基化的有机化合物的抗体。

8、权利要求 7 所述的方法，其中所述抗体为一种或多种单克隆抗体。

9、权利要求 7 所述的方法，其中所述免疫检测法为竞争型或非竞争型免疫测定。

10、权利要求 1 所述的方法，其中所述有机化合物为雌二醇或其一种衍生物。

11、权利要求 1 所述的方法，其中所述有机化合物选自雌-1, 3, 5-三烯-3, 17 μ 或 17 μ -二醇或其衍生物。

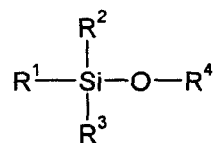
12、权利要求 2、3、6、10 和 11 之一所述的方法，其中所述甲硅烷基化的有机化合物在接触步骤中的使用浓度为 1 至 2000 ng/ml。

13、权利要求 2、3、6、10 和 11 之一所述的方法，其中将接触用水溶液缓冲至 pH 为 4.5 至 5.5。

14、权利要求 2、3、6、10 和 11 之一所述的方法，其中在 54 至 64 °C 下进行接触。

15、一种检出和/或测定样品中氟化物或氟化氢浓度的试剂盒，其包含以下试剂：一种在氟或氢氟酸存在下发生去甲硅烷基化的甲硅烷基化的有机化合物；以及一种检测水溶液中去甲硅烷基化的有机化合物出现或甲硅烷基化的有机化合物消失的装置。

16、权利要求 15 所述的试剂盒，其中所述甲硅烷基化的有机化合物的结构式如下：



其中 R^1 、 R^2 和 R^3 相互独立地选自 C_1 至 C_6 烷基，而 R^4 为所述有机化合物。

17、权利要求 16 所述的试剂盒，其中 R^1 、 R^2 和 R^3 相互独立地选自甲基、乙基、丙基和丁基。

18、权利要求 15、16 或 17 之一所述的试剂盒，其中所述有机化合物为羟基化合物，其分子量为 250 至 200000 g/mol。

19、权利要求 15 或 16 所述的试剂盒，其中所述有机化合物为选自以下组中的羟基化合物：雌二醇、肽、高香草酸、两性霉素、甾体、细胞因子和花生四烯酸或这些化合物的衍生物。

20、权利要求 15 或 16 所述的试剂盒，其中所述有机化合物为雌二醇或其一种衍生物。

21、权利要求 15 所述的试剂盒，其中所述有机化合物选自雌-1, 3, 5-三烯-3, 17 μ 或 17 μ -二醇或其衍生物。

22、权利要求 15、16、17 和 21 之一所述的试剂盒，其还包含一种或多种针对未甲硅烷基化或去甲硅烷基化的有机化合物或甲硅烷基化的

有机化合物的抗体。

23、权利要求 22 所述的试剂盒，其中还包含用于进行竞争型免疫测定所需的试剂和抗体，或者用于进行非竞争型免疫测定所需的试剂和抗体。

24、权利要求 15 所述的试剂盒，其还包含一种聚苯乙烯片，该片上具有一个或多个孔，作为接触步骤和/或检出和/或测定步骤的容器。

25、权利要求 24 所述的试剂盒，其中所述孔中涂布有对抗鼠抗雌二醇抗体的抗体。

26、权利要求 24 所述的试剂盒，其中所述甲硅烷基化的雌二醇结合于所述孔的底部。

检测氟化物或氟化氢的方法及试剂盒

技术领域

本发明涉及检出和/或测定样品中氟化物(F⁻)或氟化氢(HF)浓度的方法，以及实施这一方法的检测试剂盒。本发明使得对环境污染物进行有效且灵敏的检测成为可能。本发明所基于的方法是全新的并且易于实施。

背景技术

氟化氢是一种无机强酸，无色，极易溶于水，溶于水后形成氢氟酸。HF 是一种气体，被广泛用于工业中，特别是用于生产聚合物、制冷剂和灭火剂，可用于精制铝，制作核燃料和用于制造电子元件。此外，在煤、家庭或工业废弃物以及塑料的燃烧过程中也释放出氟化氢。

每 10⁶ 升空气中 HF 含量大于 3×10⁻² 升(30 ppm)即有毒。HF 是一种强刺激剂，与皮肤/粘膜接触后可造成灼伤，同时造成上呼吸道和下呼吸道发炎。此外，体内吸入 HF 可导致新陈代谢紊乱。

另外，HF 对于多种材料如铁、青铜和玻璃具有强腐蚀性。

因此，为保护人类、环境以及工业生产装置，需要建立监测 HF 浓度的方法，特别是需要对工业和实验室废水以及这些设施附近的大气进行监测，以便当 HF 浓度超过危险浓度时，能够采用适当的方法进行处理。

许多国家已经建立了大气 HF 可接受浓度的标准。这些标准规定每 10⁶ 升空气中 HF 含量在 5×10⁻⁵ 至 5×10⁻⁴ l 之间(0.05 至 0.5 ppm)。

在以下的发明描述中，方括号[]中的数字与发明书末尾所附参考文献相对应。

目前，已经发展并公开了多种测定 HF 或氟离子的方法。概括而言，这些方法基于化学、电化学、光谱和光学检测法。大量可用于 HF 检出和测定的装置是可以购买到的。

本发明所附参考文献[1]中描述了多种用于检出和测定样品中 HF 的

量的电化学、光谱和色谱方法。

在 OSHA 网站（参考文献[2]）中描述了一种代号为 ID-110 的方法，其中采用选择性电极进行检测。虽然该方法的灵敏度为 1.2×10^{-2} 升 HF/ 10^6 升空气(12ppb)，但是该方法为实验室方法，难以用于现场检测。就有关的现场检测的方法而言，其方法灵敏度要低得多，量级为 0.2 升 HF/ 10^6 升空气(200ppb)。

另一种方法使用了一种基于碳化硅基质的检测器(金属-绝缘体-半导体结构：MIS)。例如，这种方法在参考文献[3]中有描述。不同制造商提出了多种用于 HF 检测的电子检测仪器。其实例有 Bionics 仪器公司生产的 OEM 氟传感器（注册商标），在其网站中有描述（参考文献[4]），或 NORSK ELEKTRO OPTIKK A/S 公司生产的 LaserGas（注册商标）。

这些仪器的检测限表示为百万分之(ppm)或十亿分之(ppb)(对于气体样品)或每毫升纳克或微克 (ng/ml 或 $\mu\text{g/ml}$ ，对于含水介质)。概括而言，对于最好的仪器，检测限的量级为 10^{-4} 升 HF/ 10^6 升空气(0.1ppm)，对溶液而言，检测限的量级为 1 至 1000 ng HF/ml。

不幸的是，这些方法和仪器占地大，难以移动，有时难以实施并且通常价格昂贵。

一种“理想的检测 HF 的装置”应该具备以下特点：

- 灵敏度：检测限至少为 10^{-4} 升 HF/ 10^6 升空气(0.1ppm)；
- 成本：成本不应过高，使得在需要时可以容易地增加检测器的数目；
- 实用性：很多已发表的技术在市场上得不到，特别是当方法难以实施时；
- 机动性：为适于在不同地点使用，应该易于移动；
- 实施的快速性，以及利用测定结果的快速性。

显然，现有技术中的方法或装置无法满足上述所有要求。

因此，对于尽可能结合上述“理想检测方法”的特点的新型检测技术存在现实的需求。

发明内容

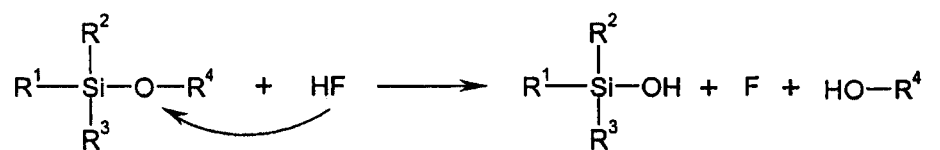
具体而言，本发明所要实现的目的是提供一种检测 HF 的方法和试剂盒，该方法和试剂盒结合了上述所有特点，而且不受上述的现有方法和装置的缺点的困扰。

该目的通过一种检出和/或测定样品中氟化物(F⁻)或氟化氢(HF)浓度的方法得以达成，该方法包括以下步骤：

- 在水溶液中将所述样品与甲硅烷基化的有机化合物接触，以此得到测量溶液，所述甲硅烷基化的有机化合物在氢氟酸或氟化物的存在时发生去甲硅烷基化，使得可以分别检出和/或测定甲硅烷基化的有机化合物和去甲硅烷基化的有机化合物；
- 在所述测量溶液中检出和/或测定去甲硅烷基化的有机化合物的出现或甲硅烷基化的有机化合物的消失，如果样品中存在氟化物或氟化氢，则发生去甲硅烷基化的有机化合物的出现或甲硅烷基化的有机化合物的消失。

在以下的描述中，氟化物(F⁻)、氟化氢(HF)或氢氟酸用术语“氟”或“氟及其衍生物”指代。氟化物被理解为氟的盐。

氟是一种亲核性极强的原子，因此，它可以参与亲核取代反应。更具体而言，它可以按以下化学反应方程式特异性地进攻硅氧键 (Si-O)：



甲硅烷基化的化合物R⁴ 氟化氢 甲硅烷基 化合物R⁴
 (化合物R⁴为去甲硅烷基化的)

HF 和 Si-O 键反应（去甲硅烷基化）的一般性机制

在这一化学反应方程式中，R¹、R²和 R³为 Si 的取代基并与后者构成本发明有机化合物 R⁴的甲硅烷基。

R¹、R²和 R³相互独立地选自 C₁至 C₆烷基。例如，R¹、R²和 R³相互独立地选自甲基、乙基、丙基和丁基。

在这一化学反应方程式中， $-R^4$ 代表实施本发明方法过程中被甲硅烷基化（方程式左边）或去甲硅烷基化（方程式右边）的有机化合物。为了能够被甲硅烷基化，该化合物至少含有一个可以被甲硅烷基化的羟基。优选地，该化合物为一种化合物，以便在实施本发明方法时化合物本身有助于被检测。一般而言，尤其是考虑到溶解度因素，以及氟检出和/或测定结果的灵敏度和重现性，化合物的分子量为 250 至 200000 g/mol，例如，分子量为 250 至 1500 g/mol。该化合物是一种羟基化合物，可选自如雌二醇，肽，如含有 3 至 50 氨基酸残基的肽高香草酸，两性霉素，甾体，细胞因子和花生四烯酸或这些化合物的衍生物。

例如，可用于本发明的肽在参考文献[5]中有描述；例如，可用于本发明的高香草酸及其衍生物在参考文献[6]和[7]中有描述；例如，可用于本发明的两性霉素在参考文献[8]至[10]中有描述；例如，可用于本发明的甾体及甾体衍生物在参考文献[11]至[17]中有描述；例如，可用于本发明的细胞因子及其衍生物在参考文献[18]至[20]中有描述；例如，可用于本发明的花生四烯酸及其衍生物在参考文献[21]至[24]中有描述。

重要的是甲硅烷基化的有机化合物和去甲硅烷基化的有机化合物可以被分别检出和/或测定，使得有可能检出和/或测定测量溶液中这些化合物中的一个化合物的消失，和/或另一个化合物的出现。因此，本发明的方法基于对甲硅烷基化的有机化合物或去甲硅烷基化的有机化合物的检测，或同时分别检测这两个化合物。

在本发明中，可采用任何适用的试剂在所选有机化合物上连接甲硅烷基（甲硅烷基化），只要甲硅烷基化的化合物在氟或其衍生物的简单作用下可以原封不动地回复成去甲硅烷基化的化合物或有机化合物的原始形式即可。可用的甲硅烷基或官能团如以上化学反应方程式所述。

例如，为达到实现本发明的目的，可用于对羟基化有机化合物进行甲硅烷基化的试剂如下：N, O-二(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺（或 BTSFA）、N-甲基-N-(叔丁基二甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺（或 MTBSTFA）、三甲基甲硅烷基（或 TMS）、叔丁基二甲基甲硅烷基（或 t-BDMS）、N, O-二(三甲基甲硅烷基)乙酰胺（或 BSA）、六甲基二硅氮烷（或 HMDS）、N-甲基三甲基甲硅烷基三氟乙酰胺（或 MTSFA）、

三甲基氟硅烷（或 TMCS）、三甲基甲硅烷基咪唑（或 TMSI）等。

例如，在参考文献[25]至[30]中可以找到其他的可用于实施本发明方法的甲硅烷基化试剂及操作模式。

一般而言，这些试剂使用简便并且易得，可以将一个硅烷基（其中含有一个硅原子）转移至所选化合物的羟基上。

为了解释本发明发明者们在本发明中已经证明的另外一个事实，即所采用的硅烷基不同，则检出和/或测定氟的灵敏度和选择性也有所不同，应该特别注意以下两个化合物：

— BTSFA，在所选化合物的羟基上连接一个三甲基甲硅烷基（ $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ ）；

— MTBSTFA，在所选化合物的羟基上连接一个二甲基叔丁基甲硅烷基（ $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ）。

BTSFA 的优点在于，转移至羟基化合物上的硅烷基疏水性不是特别的强，因而使得甲硅烷基化的有机化合物具有相对较好的溶解性。但是，当实施本发明方法时，HF 对于所得甲硅烷基化的化合物转化为去甲硅烷基化的化合物的反应并不总能够表现出特异性。甲硅烷基化的化合物也可以被样品中存在的其他酸转化成去甲硅烷基化的化合物。因此，当不需要考虑氟检测的特异性或者样品中其他酸的浓度足够低以至于不能干扰氟检出或测定时，优选使用这种试剂。

MTBSTFA 向羟基化合物转移一个疏水性更强的硅烷基，所得甲硅烷基化的化合物在水性介质中的溶解度要比采用 BTSFA 制得的甲硅烷基化的化合物差。另一方面，同时也是特别出人意料的是，如实施例所证明的那样，采用 MTBSTFA 进行甲硅烷基化时，所得化合物对于 HF 的特异性要优于其他受测试的酸。因此，当要求考虑氟检测的特异性时，如当样品中其他酸的含量显著时，优选采用这种试剂检测样品中的氟化氢。

因此，特别是通过使用这些试剂，本发明的发明者们已经发现氟进攻 Si-O 键的特异性也依赖于连接在硅和氧原子上的基团。因此，当甲硅烷基化基团选择恰当时，采用本发明方法进行检测时，样品中其他无机或有机酸和盐不干扰检测。例如，当采用本发明方法进行检测时，采用

-Si(CH₃)₃时 HF 和 HCl 去甲硅烷基化的活性基本相同，当采用本发明方法进行检测时，采用-Si(CH₃)₂C(CH₃)₃时 HF 去甲硅烷基化的活性高约 1000 倍（HF 和 HCl 作比较）。

如上述化学反应方程式所示，在氟或其衍生物的作用下，甲硅烷基化的有机化合物向去甲硅烷基化的有机化合物的转化与样品中 HF 的含量成正比。因此，本发明的方法可以对样品中的氟或其衍生物一次且同时进行检出和测定。采用一个测量甲硅烷基化的有机化合物和未甲硅烷基化（去甲硅烷基化）的有机化合物之间的差异的测量方法，进而对氟催化的去甲硅烷基化反应进行检出/测定，从而实现对氟化物和/或氟化氢的检测，这正是本发明的基本特点和发明实质。

可以将样品和甲硅烷基化的有机化合物混合至水溶液中完成发生接触的步骤。混合可以是简单地将样品和氟添加至溶液中，或者通过主动性混合，如利用机械或磁力搅拌器、超声等手段将样品和氟混合至溶液中，其目的在于促进样品中可能存在的氟和甲硅烷基化的有机化合物之间的相互作用，以确保相互发生反应。

样品可以是液体、固体或气体样品。当样品为非液体时，使样品和本发明方法中甲硅烷基化的有机化合物在水溶液中进行接触的步骤包括：将样品溶解在水溶液中，例如，当样品为气体时通过鼓泡的方法，当样品为固体时通过混合或搅拌溶解的方法，溶解的目的在于气体或固体中的氟进入到用于接触的水溶液中。对于本领域技术人员而言，溶解的方法是众所周知的。

本发明的发明者们已经证明向所述用于接触的水溶液中添加与水混溶的有机溶剂可以显著提高本发明方法检出和/或测定氟的灵敏度。例如，有机溶剂可选自二甲基甲酰胺（DMF）、二甲亚砜（DMSO）、乙醇或甲醇或本领域技术人员所熟知的等效有机溶剂。因此，当使用这些溶剂时，本发明的发明者们测得灵敏度的增加幅度为 100 倍，甚至为 500 倍。例如，当使用 DMSO 时，检测灵敏度被扩展至 0.001 μg/ml。

有机溶剂可能具有几种不同的作用：提高甲硅烷基化的有机化合物的溶解度，促进去甲硅烷基化或降低检出中的干扰（特别是在免疫检测中所涉及的）。无论如何，这些作用中的任何一个均不足以解释在有机溶

剂存在下检出灵敏度惊人地显著增加。以用于接触的水溶液的体积计，有机溶剂的含量为 1 至 99%，优选为 50 至 95%，其余为水。

优选地，溶剂的来源为回收甲硅烷基化的有机化合物的溶剂，即有机化合物被甲硅烷基化后对其进行回收的溶剂。此后，通过含氟的水溶液和含甲硅烷基化的有机化合物的有机溶液的混合完成接触步骤。或者，有机溶剂可分别加到用于接触的溶液中。

可以采用本领域技术人员所熟知的任何方法检测消失的甲硅烷基化的有机化合物或出现的去甲硅烷基化的有机化合物，这些方法能够分别证明这些化合物中的一个或另一个的存在。例如，这些方法可以是一种气相色谱检出和/或测定方法，或免疫学检出和/或测定方法。

为了进行检测，按照通常的做法，首先利用本发明方法和已知量的氢氟酸或氟，或利用已知量的甲硅烷基化或未甲硅烷基化的有机化合物测定一系列标准溶液。通过简单的外推，可以利用这一系列标准测定样品中氟、氟化氢或氢氟酸的含量。

在本发明的第一个实施方案中，利用气相色谱进行检出和/或测定。这是因为这项技术可以分别检出和/或测定本发明有机化合物的甲硅烷基化形式或去甲硅烷基化形式，从而检出和/或测定可能存在的氟。可使用的色谱技术为本领域技术人员所熟知的。例如，在参考文献[31]至[33]中描述的技术。

可用于该第一个实施方案中的有机化合物可以是上述的羟基化有机化合物。甲硅烷基化试剂及技术也可以是上述的试剂及技术。

在本发明的第二个实施方案中，优选地，利用免疫检测法检出和/或测定甲硅烷基化的有机化合物的消失或去甲硅烷基化的有机化合物的出现，即利用甲硅烷基化的有机化合物或去甲硅烷基化的有机化合物的抗体进行检出和/或测定。现有技术中未曾报道过这种方法。此外，与现有技术相比，这一实施方案检测灵敏度更高。

按照通常的做法，抗体是蛋白，它能够以非常高的特异性识别并结合被称为抗原的结构，形成可检测的抗体/抗原复合物。但是，由于 HF 分子非常小，不可能生成其抗体。由于不能够生成直接针对 HF 的抗体，本发明的发明者们采取了一种创新性的方法，该方法基于上述氟的化学

性质并且利用了特殊的甲硅烷基化的有机化合物，这些甲硅烷基化的有机化合物的特点在于注射入动物体内可以生成抗体。

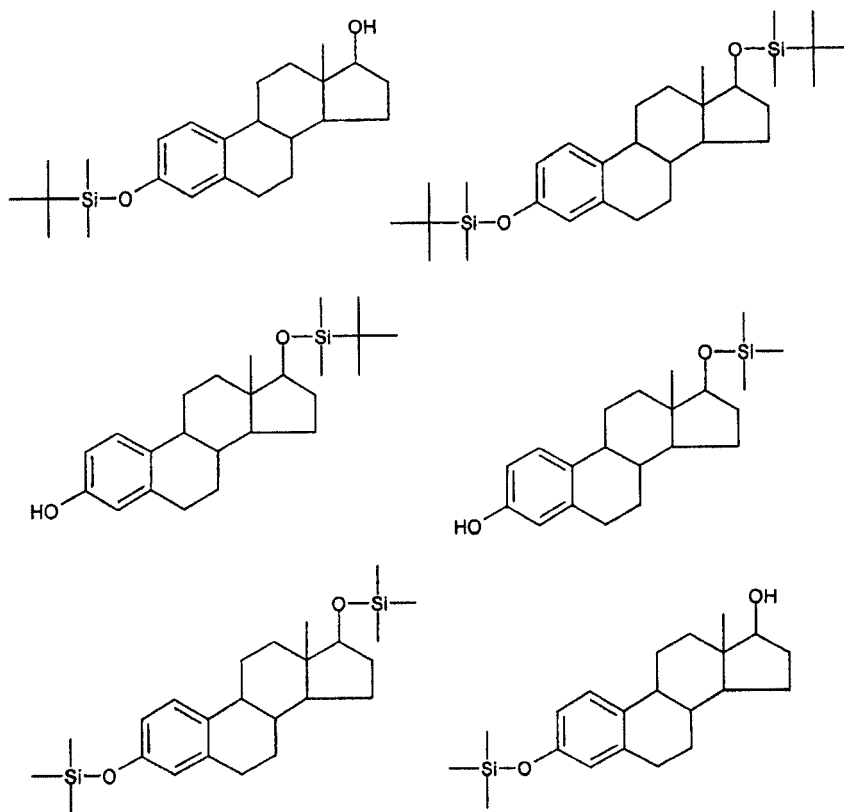
可用于该第二个实施方案的有机化合物为含有一个或多个羟基的有机化合物，其中羟基能够与本发明硅烷基连接，注射进动物体内以后，这些化合物可诱导出甲硅烷基化的有机化合物或未甲硅烷基化的有机化合物抗体的特异性生成。这些有机化合物的分子量一般在 250 至 200000 g/mol 之间，例如，分子量在 250 至 1500 g/mol 之间。例如，有机化合物可选自上述羟基化有机化合物，例如，选自雌二醇，肽，例如含 3 至 50 个氨基酸残基的肽，如参考文献[5]所述的四肽—乙酰化 Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP)，高香草酸，两性霉素，甾体，细胞因子和花生四烯酸或这些化合物的衍生物。例如，有机化合物可以是参考文献[5]至[24]中所述的化合物。

作为一个示例性实施例，有可能使用雌二醇或其衍生物。在本发明中，术语“雌二醇”例如指 1,3,5-雌三烯-3,17 μ 或 17 μ -二醇或其衍生物，或其他等价化合物，只要注射入动物如小鼠体内能够形成抗体，并且能够被本发明方法甲硅烷基化即可。

以下描述本发明的发明者们已经得到的，而且可以被用于本发明的甲硅烷基化雌二醇的实例。如下所述，雌二醇含有-OH基，通过 Si-O 键可以连接硅烷基（例如，与附图 1 所示的原始雌二醇(Es)作比较）。

有关本发明第二个实施方案中的有机化合物的甲硅烷基化试剂，可以是上述试剂，如 BTSFA 或 MTBSTFA。

可用于本发明这一实施方案中的抗体具有区分甲硅烷基化的有机化合物和未甲硅烷基化的有机化合物的特点。这些抗体可以是单克隆抗体。可以利用制备这种类型抗体的常规技术手段进行制备，例如，对小鼠注射甲硅烷基化的有机化合物或未甲硅烷基化的有机化合物以获得仅对这两种化合物中的一个显示特异性的小鼠抗体。为了实施本发明方法，可以对不同批次的抗体进行试验，从中筛选出仅对两种化合物中的一个（甲硅烷基化或未甲硅烷基化）显示特异性的抗体。本领域技术人员熟悉抗体制备的技术。



可用于本发明的甲硅烷基化雌二醇的实例

例如，参考文献[34]至[38]中描述了适于制备可用于本发明的抗体的方法。

例如，参考文献[5]至[24]以及[39]至[42]中还描述了可用于本发明的抗体，其中有机化合物为选自上述化合物的甲硅烷基化的化合物。

在附图 1 所示的实施例中，当雌二醇被甲硅烷基化之后（以下也称为“经修饰的雌二醇”），所筛选出的用于免疫检测的雌二醇抗体不再识别雌二醇或识别力显著降低（即，识别力的差异大到足以检测）。氟对经修饰的雌二醇的作用是进攻 Si-O 键（去甲硅烷基化反应），从而使原始雌二醇重新出现，此后原始雌二醇可以被它的特异性抗体（以下称为“第一抗体”）所识别。

任何本领域技术人员所熟知的用于检测抗原/抗体识别的方法均可用于本发明，以用于检测抗体对去甲硅烷基化的有机化合物（“原始有机化合物”）的识别或者抗体对甲硅烷基化的有机化合物的识别。这就是为什么在本发明中采用术语“检测第一抗体和未甲硅烷基化的有机化合物间相互作用的方法”的原因。利用抗体进行检测的操作条件是本领域技

术人员所熟知的。例如，参考文献[5]至[24]以及[39]至[42]中描述了适用的试验规程、试剂、缓冲液和操作条件。

可以采用“竞争”型或“非竞争”型免疫试验，如常用的免疫学检出方法和/或免疫学测定方法进行该实施方案的检测。

作为本发明第二个实施方案的第一种变体，例如，检测手段可以是一种被称为“示踪剂”的标记分子，对于第一抗体而言，它与甲硅烷基化或未甲硅烷基化的有机化合物，如甲硅烷基化或未甲硅烷基化雌二醇构成竞争。这种标记分子可以是用于检测的酶，如乙酰胆碱酯酶；荧光标记；发光标记；或放射性同位素。

此时甲硅烷基化或未甲硅烷基化的有机化合物的免疫检测（或免疫学检测）被称为“竞争性”检测：这种方法利用存在于标准液或样品中针对甲硅烷基化或未甲硅烷基化的有机化合物如甲硅烷基化或未甲硅烷基化雌二醇的抗体，以及一种与本发明化合物化学结构类似的示踪剂，如雌二醇，其上携带有信号（标记），如酶、荧光、发光、放射性信号。在上述雌二醇的实例中，例如，可以将雌二醇和一种酶如乙酰胆碱酯酶偶联构成示踪剂。

附图 2 或 3 图示了可用于实施本发明方法的“竞争性”检测。在这些附图中所采用的有机化合物为雌二醇。标记分子或示踪剂用符号“T”表示，未甲硅烷基化（未修饰）雌二醇用符号“Es”表示，甲硅烷基化（修饰）雌二醇用符号“Es-M”表示。例如，第一抗体为小鼠抗体(sAb)。附图 2 中显示抗体(sAb)不能识别经修饰的雌二醇（这种不能识别用叉号标记），当 HF 存在时，经修饰的雌二醇(Es-M)转化成能够被第一抗体(sAb)识别的原始雌二醇(Es)。此后原始雌二醇(Es)进入与示踪剂(T)（标记的雌二醇）的竞争。因此可以检测 HF 的存在。在这种方法中，结合抗体的示踪剂的数量与样品中存在的雌二醇的数量呈反比。

在这个竞争性检测方法中，检测第一抗体和未甲硅烷基化的有机化合物间相互作用的方法（或检测第一抗体和甲硅烷基化的有机化合物间相互作用的方法）可以包含第二种抗体(gAb)。例如，第二抗体(gAb)可以是一种山羊抗体(gAb)或兔抗体，它是上述小鼠抗体(sAb)（第一抗体）的抗体。附图 2 图示了使用第二抗体的检测。第二抗体(gAb)可以被结合

至容器(R), 如微孔板的底部。

因此, 在这个实施例中, 检测包含了待测示踪剂和雌二醇针对有限数量的抗体分子间的竞争。反应结束后, 在除去未与抗体结合的示踪剂以后, 就可以对结合抗体的示踪剂的信息进行测定了。

当示踪剂包含一种酶如乙酰胆碱酯酶(图2中用白色方块表示)时, 检测手段还可以包括一种酶指示剂。在上述采用乙酰胆碱酯酶的实施例中, 酶指示剂可包含一种乙酰胆碱和二硫代硝基氟苯(dithionitrofluorobenzene)的混合物。这种指示剂转化成一种黄色物质, 可以用肉眼进行观测或利用光度计在414 nm处进行定量检测。事实上, 为了实施本发明的方法, 采用这种指示剂是为了进行Ellman比色检出和测定。例如, 这种方法在参考文献[43]中有描述。

在本发明第二个实施方案的第二种变体中, 本发明检出和/或测定氟的方法采用了“非竞争性”的免疫检测法。与竞争性检测法相比, 非竞争性检测法的困难在于所选有机化合物应具有两种化学性质: 能够偶联至固相上以及能够被甲硅烷基化。此外, 在偶联至固相上以后, 有机化合物应当能够如液相反应一样进行去甲硅烷基化。这种变体可应用于上述羟基化有机化合物。例如, 可应用于上述雌二醇衍生物, 如雌二醇-3-羧甲基醚, 或肽, 如上述的AcSDKP。

在这种变体中, 甲硅烷基化的化合物被偶联至一种固相, 例如一种载体, 如现行用于实验室的微孔板之上。样品可以和固定于微孔板之上的甲硅烷基化的化合物接触, 并且可以原位进行检出和/或测定。

可以采用适当的、本领域技术人员所熟知的用于将上述甲硅烷基化的有机化合物连接至载体之上同时保持甲硅烷基化的化合物对于氟离子反应活性的方法, 将甲硅烷基化的化合物固定化或偶联至载体之上。所有这一切均有赖于载体和本发明所选用的甲硅烷基化的有机化合物的化学性质。例如, 可以通过共价键实施连接。载体可以是官能化的载体, 这种载体中的化学基团有助于接枝甲硅烷基化的有机化合物的连接。例如, 载体可以是一种含有氨基的板, 如一种Nunc-NH₂板, 或者当所选甲硅烷基化的有机化合物是一种上述的雌二醇衍生物, 如雌二醇-3-羧甲基醚, 或肽, 如上述的AcSDKP时, 载体为一种用聚赖氨酸活化的板。

在与可能存在于样品中的氟离子反应后，连接于载体之上的甲硅烷基化的化合物被转化成一种未甲硅烷基化的化合物。然后采用免疫检测法，如在特异性识别未甲硅烷基化的化合物的第一抗体存在下进行检出和/或测定。

可以采用任何本领域技术人员所熟知的方法，如通过对第一抗体作标记证明第一抗体对未甲硅烷基化的化合物的识别，同时也可以采用可识别第一抗体并且带有标记的第二抗体（此时第二抗体为一种示踪剂）证明这种识别。标记可以是任何本领域技术人员所常用的，例如酶标记。例如，第二抗体可以是一种山羊抗体或兔抗体(gAb)，它是上述鼠抗体(sAb)（第一抗体）的抗体。

图 18 图示了一种“非竞争性”测定的方法。该附图中所采用的有机化合物为雌二醇羧甲基醚 (EstCME)。所采用的第一种抗体是一种抗雌二醇抗体(如鼠抗体)，用符号“sAb”表示(示踪剂)。未甲硅烷基化(未修饰)雌二醇用符号“Es”表示，甲硅烷基化(修饰)雌二醇用符号“Es-M”表示。加入对抗上述鼠抗体 (sAb)的第二种山羊抗体或兔抗体(gAb)，例如，加到微孔板(R)的表面上。gAb 抗体连有标记，如一种酶，以构成示踪剂“T”。该附图显示抗体 (sAb)不能识别经修饰的雌二醇(Es-M)（这种不能识别用叉号标记），然而当 HF 存在时，Es-M 转化成能够被第一抗体 (sAb)识别的原始雌二醇(Es)。因此可以检测 HF 的存在。结合抗体 (sAb)的示踪剂 (gAb+标记)的数量与样品中存在的去甲硅烷基化雌二醇的数量呈正比。

本发明的发明者们已经确定了适于实施本发明方法的各种实施方案的操作条件。如果有必要，当然可以根据所采取的其他硅烷基、甲硅烷基化的有机化合物、或检测手段对于这些操作条件作调整或改进。这些操作条件特别适用于本发明的第二种实施方案。

因此，优选地，本发明方法中的接触步骤在 54 至 64℃间进行。这是因为更高温度下甲硅烷基化的有机化合物将发生自发的去甲硅烷基化反应。本领域的技术人员可以毫无困难地根据所选有机化合物和检测手段调整实施本发明方法的试验温度。

优选地，本发明方法中在 pH 为 4.5 至 6.5，优选为 pH 5.5 时进行接

触，例如使用 50mM 磷酸盐缓冲液或任何适用的缓冲液。这是因为 pH 值更偏酸性时甲硅烷基化的有机化合物将发生自发的去甲硅烷基化反应。同样，本领域的技术人员可以毫无困难地根据所选有机化合物和检测方法调整实施本发明方法的 pH 值。

在本发明中，测试溶液中甲硅烷基化的有机化合物，如雌二醇或其他具有等价分子量的化合物的浓度可依据有机化合物的分子量和所采用的检出和/或测定手段作调整。一般而言，实施本发明方法时，浓度可以为 1 至 2000 ng/ml，如 2 至 500 ng/ml。

本发明还涉及一种用于实施本发明方法的试剂盒，所述试剂盒包含以下试剂：一种在氟或氢氟酸存在下发生去甲硅烷基化的甲硅烷基化的有机化合物；以及一种检测水溶液中去甲硅烷基化的有机化合物出现或甲硅烷基化的有机化合物消失的手段。

在氟或氢氟酸存在下发生去甲硅烷基化的甲硅烷基化的有机化合物如上所述。

检测水溶液中去甲硅烷基化的有机化合物出现或甲硅烷基化的有机化合物消失的手段依据实施本发明方法的检出和/或测定方法而定。可以采用上述方法。因此，检出和/或测定手段包含以下一个或多个单元：有色的指示剂，如上所述的标记，酶，如上所述的测定手段，用于检出和/或测定甲硅烷基化和/或未甲硅烷基化的有机化合物的抗体等。

例如，试剂盒可包含用于进行竞争型免疫测定所需的试剂和抗体，或者可包含用于进行非竞争型免疫测定所需的试剂和抗体。试剂盒可包含一种或多种抗体，例如对抗未甲硅烷基化或甲硅烷基化的有机化合物或对抗甲硅烷基化的有机化合物的鼠抗体。它可另外包含一种或多种对抗上述抗体的一种或多种抗体，如山羊或兔抗体。它也可以包含一种示踪剂，用于证明已经发生的免疫性反应。

在本发明中，试剂盒还可包含一种用于接受试剂的载体，例如一种聚苯乙烯片，其上具有一个或多个孔，这些孔作为本发明方法中接触步骤和/或检出和/或测定步骤的容器。因此，测定和/或检出可方便地在微孔板的孔中进行。在这种载体上，如上述聚苯乙烯片上，孔可以涂布有抗体，如山羊或兔抗体，这些抗体是抗雌二醇鼠抗体的抗体。甲硅烷基

化雌二醇也可以结合至孔的底部。

作为本发明的一项成果，本发明的发明者们成功地开发出了一种实用和快速检验 HF 的方法，其中溶液中 HF 的浓度可以达到 $0.001\mu\text{g/ml}$ 。

本发明方法的灵敏度使其可以面对任何工业应用，特别是最为有用的大气中氢氟酸测定的挑战。在这种情况下，检测的量级可以轻易地达到 1×10^{-2} 升 HF/ 10^6 升空气(10ppb)。因此，该方法的效能要优于现有的检测限在几百个 ppb 水平的现场检测技术。

概括而言，依据样品和所采用测定手段的特性，本发明能够在约 1/2 至 4 小时内得到一个测定结果。虽然所消耗的时间要比某些现有方法更长，但本发明的方法要更为灵敏。

本发明的方法适用于任何含有氢氟酸或氟离子的样品：大气样品，食品、植物或生物介质。在各个情况下，取样和制备样品的条件与其他任何测试氢氟酸或氟离子的方法相同。

本发明的另一个优点在于其操作简单。这一方法与免疫检测的特点相同：如，采用一种现成的试剂，易于分发，结构紧凑，易于运输和重新定位，操作时有可能不需要外加能量，可以通过裸眼进行读数或利用简易的便携式光度计比色读数。

通过阅读以下描述性的，不起定界作用的，采用附图作参照的发明描述能够理解本发明的其他用途和优点。

附图简述

图 1 显示雌二醇分子(Es)被其抗体(Ab)所识别的部分。雌二醇分子中被抗体识别部分的羟基结合硅原子后阻碍了抗体对分子的识别。

图 2 为本发明方法第一实施方案检测 HF 的总图，其中检测为竞争性检测。

图 3 显示竞争性免疫检测（图左侧）和对竞争性免疫检测的信号进行测量（图右侧）。S(%)表示结合抗体(Ab)的示踪剂(T)所发射的信号；而[Es](M)代表原始雌二醇的摩尔浓度(mol/l)。

图 4 显示以下实施例 2 的免疫检测中不同有机酸对于三甲基甲硅烷基雌二醇的去甲硅烷基化的作用效能，其中三甲基甲硅烷基雌二醇采用

BTSFA 制备 (B/Bo 为 HF 存在下的信号 (B 代表结合) 和 HF 不存在时的信号 (Bo 代表不结合) 间的比例)。[H⁺](M)表示图中所示酸的摩尔浓度。

图 5 显示雌二醇去甲硅烷基化反应条件的研究: 温度, 50 mM 磷酸盐(P)缓冲液的 pH 值 (B/Bo 信号的测量如图 4)。

图 6 显示在采用 50 mM 磷酸盐(P)缓冲液、pH 为 5.5 的条件下, 不同酸对于甲硅烷基化雌二醇的去甲硅烷基化的作用效能, [H⁺](M)表示图中所示酸的摩尔浓度。盐酸、硝酸或硫酸的数据基本类似 (B/Bo 信号的测量如图 4)。

图 7 显示与其他亲核性物质及卤素相比, 本发明方法检测 HF 的特异性, [P](M)表示图中所示卤素或亲核性物质的摩尔浓度 (B/Bo 信号的测量如图 4)。

图 8 显示在不同盐的存在下, 本发明方法检测 HF 的特异性, [X⁺F⁻](M)表示图中所示氟盐的摩尔浓度 (B/Bo 信号的测量如图 4)。

图 9 显示对受氟污染的大气样品作检测时, 本发明方法测定(d)的氟浓度[F](μ mol/l)和理论浓度([F]_{th})间的相关性。

图 10 至 14 图示了非竞争性免疫检测中有关特异性抗体对于未甲硅烷基化雌二醇识别的试验结果。其中:

图 10 显示不同雌二醇浓度(μ g/ml)下, 雌二醇羧甲醚(EstCME)与含有氨基的微孔板 (氨基化 Nunc 板) 偶联所得的信号(S)(moD)。

图 11 和 12 显示不同聚赖氨酸浓度(μ g/ml)下, 雌二醇羧甲醚与聚赖氨酸 (poly-Lys) 活化的微孔板偶联所得的信号(S)(moD) (测量 414nm 处的吸光度)。

图 13 显示采用 MTSBTFA 对雌二醇羧甲醚甲硅烷基化的试验: 在不同 MTSBTFA 的稀释度 (1/5; 1/2; 1/1) 以及摄氏温度(°C)下, 以信号(S)(moD)的增加测量甲硅烷基化的效率。

图 14 显示雌二醇羧甲醚甲硅烷基化后所进行的免疫检测: 在 HF 存在或不存在下, 测量信号(S)(moD)。图中 Bo 指 HF 不存在下的信号 (对照值)。

图 15 显示实施本发明方法所得的实验结果, 其中采用甲硅烷基化的

四肽 AcSDKP: 在 414 nm 处测量信号。进行两个系列的试验: 一个系列采用被第一种甲硅烷基化试剂 (MTSBTFA) 甲硅烷基化的四肽, 另一个系列采用被第二种甲硅烷基化试剂 (BSTFA) 甲硅烷基化的四肽。每个系列进行三次试验: 22°C、37°C 和 70°C, 每次试验于 10、30 和 60 分钟进行测量。

图 16 显示了本发明方法在不同去甲硅烷基化温度下 ($T(^{\circ}\text{C})$) 测量氟的效能: 在 414 nm 处测量信号($S(\text{moD})$)。甲硅烷基化的化合物为图 15 所示用 MTSBTFA 制备的化合物。

图 17 显示实施本发明方法所得的实验结果, 其中甲硅烷基化的有机化合物为雌二醇的衍生物: 在不同氟浓度 $[F]$ ($\mu\text{ mol/ml}$)下, 于 414 nm 处测量信号($S(\text{moD})$)。

图 18 图示出可用于本发明方法检测步骤的非竞争性免疫检测的机理。

图 19 显示在二甲亚砜(DMSO)存在下本发明方法检测氟的实验结果: B/B_0 为 HF 存在下的信号和 HF 不存在时的信号之间的比例, 而 $[F^-](\text{M})$ 为氟离子的摩尔浓度。

具体实施方式

以下描述本发明方法的不同方面: 雌二醇免疫检测法的建立, 甲硅烷基化修饰雌二醇的反应条件试验, 通过质谱确定甲硅烷基化的有机化合物, 甲硅烷基化的化合物与 HF 反应的检验, 甲硅烷基化衍生物化学性质的优化, 试剂浓度的优化, 检测灵敏度的提高, 检测方法对于酸的特异性的优化, 检测方法可应用性的检验。以下列出这些实验的主要结果。

采用含氢氟酸的大气样品 (实验室模拟样) 和含氟离子的水样进行实验。

为确定本发明方法的效能, 本发明的发明者们定义了灵敏度参数。与 HF 不存在时所得信号相比, 灵敏度为产生具有显著性差异的信号所需 HF 的数量。在本发明的方法中, 存在于样品中待检测的原始 (未甲硅烷基化) 雌二醇的数量依赖于氟的数量, 其中氟能够将不能被检出的

甲硅烷基化雌二醇转化成能够被检出的未甲硅烷基化雌二醇。因此，在 HF 的检测中，灵敏度被定义为在二甲基叔丁基甲硅烷基雌二醇存在下，能够显著降低抗体和酶示踪剂结合的氟的需要量。

实施例 1：本发明方法在竞争性免疫检出和测定氟中的应用

在这个实施例中，所选有机化合物为 β 17-雌二醇。

1) 抗雌二醇抗体的制备

特别地，采用由 β 17-雌二醇衍生的化合物制备试验用抗体，其中，为达到在小鼠体内产生抗体的目的，化合物与牛白蛋白偶联。

所采用的制备方法如参考文献[39]所示。

2) 利用抗雌二醇抗体制备抗鼠抗体的抗体

采用 Immunotech 公司(Lumigny)出售的抗鼠抗体的山羊抗体涂布 96 孔聚苯乙烯微孔板(Nunc) (浓度: $5 \mu\text{g/ml}$)。涂布后于 4°C 下将板保存在含 0.5%白蛋白的缓冲液中。

通过简单的吸附实现与板的结合。温育时间应足够长以确保蛋白的结合。在本领域技术人员眼中这种制备方法为常规方法。

3) 酶示踪剂的制备

将雌二醇和乙酰胆碱酯酶(AChE)偶联制备酶示踪剂。采用 N-琥珀酰亚胺基-S-硫代乙酸乙酯向雌二醇中引入巯基。将如此修饰的雌二醇与 AChE 偶联，其中 AChE 中引入了与雌二醇巯基反应的马来酰亚胺基。通过凝胶过滤纯化示踪剂然后于 -20°C 下按份保存。

参考文献[44]和[45]中描述了上述制备中的方法和酶示踪剂，这些方法和酶示踪剂在本发明中可以通用。

4) 制品及其他试剂

雌二醇来自 Sigma Aldrich 公司。甲硅烷基化试剂来自 Perbio 公司。氢氟酸来自 Merk-Eurolab 公司。

所有试剂，即示踪剂、抗体、雌二醇和样品用 0.05M 磷酸盐缓冲液

(pH 7) 稀释后使用, 其中磷酸盐缓冲液包含叠氮化物 (0.01% w/v) (% w/v 重量(g)和体积(100ml)比, 即 0.01g/100ml)、牛白蛋白 (0.5% w/v) 和 NaCl (0.9% w/v)。

5) 甲硅烷基化的雌二醇使用浓度的优化

针对与 HF 样品接触的甲硅烷基化雌二醇的浓度进行优化, 其目的在于随后能够检测去甲硅烷基化的雌二醇以及氟。

如果所采用的甲硅烷基化雌二醇浓度非常低, 即使所有甲硅烷基化雌二醇均转化成为雌二醇, 也并不能总是保证检测的精确度。

进行大量实验, 以确定本发明方法中去甲硅烷基化所需的修饰雌二醇的最佳浓度。当然, 浓度需要根据所采用的试剂和操作条件作调整。

在本实施例中, 浓度优选为 200ng/ml。

可以判断这一浓度对于雌二醇或其衍生物而言是处于 1 至 2000 ng/ml, 或优选的 2 至 500 ng/ml 之内, 这些浓度范围仅具有象征意义, 特别是在本实施例的条件下。

6) 雌二醇的甲硅烷基化

以体积计, 将 1 份雌二醇(2 mg/ml)和 4 份 MTBSTFA 混合, 然后室温下温育 30min 至 1hr。

所采用的甲硅烷基化试剂为 BTSFA 或 MTBSTFA。这些产品的来源如上所述。

通过液相色谱和质谱确定雌二醇已经被甲硅烷基化。

甲硅烷基化后, 投入使用前用 100%二甲基甲酰胺(DMF)或 100%二甲亚砜(DMSO)将雌二醇稀释 1000 倍。

7) 雌二醇的去甲硅烷基化

将 2.5 μ l 1M 磷酸盐缓冲液(pH=5.5)和 47.5 μ l 样品或已知浓度的 HF 溶液 (标准溶液) 加到 50 μ l 甲硅烷基化的雌二醇中。

振摇所得混合物, 然后置于 55-66°C 水浴下 1h 将其蒸干。

用 0.05M 磷酸盐缓冲液 (pH 7) 稀释反应混合物以终止去甲硅烷基化反应 (稀释 40 倍), 其中磷酸盐缓冲液包含叠氮化物 (0.01% w/v) (% w/v 重量(g)和体积(100ml)比, 即 0.01g/100ml)、牛白蛋白 (0.5% w/v) 和 NaCl (0.9% w/v)。

w/v 重量(g)和体积(100ml)比, 即 0.01g/100ml)、牛白蛋白 (0.5% w/v) 和 NaCl (0.9% w/v)。

8) 酶示踪剂: 乙酰胆碱酯酶活性的测量 (Ellman 法)

该方法使用了一个假底物, 即乙酰硫代胆碱(AcTCh), 其水解速度与乙酰胆碱相同。水解后生成能够还原二硫代硝基苯 (dithionitrobenzene) (DTNB)的硫代胆碱(TCh)。经还原的 DTNB 在可见光范围内具有强烈的吸收 ($\epsilon_{m412nm}=13600\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{l}$), 产生黄色。

考虑到被过量底物抑止的因素, AcTCh 的浓度为 AchE 催化活性最强的浓度。此外, DTNB 的用量小于 AcTCh 的用量, 以避免所有底物被转化后的比色检测。相反, DTNB 的用量要大于所生成的 TCh 的数量, 以确保水解 1 分子 AcTCh 仅生成 1 分子的还原 DTNB。

依据本发明所提供的信息, 本领域的技术人员知道如何使用 Ellman 法, 并且能够毫无困难地寻找到最利于本发明方法实施的操作条件。

9) 原始雌二醇的免疫检测: HF 的定量

将以上所制得的雌二醇萃取液稀释 40 倍, 分份加入含有示踪剂和雌二醇抗体的检测板中。反应体积为 200 μl 。

免疫反应在室温下进行 1h。

清洗检测板以除去未结合的示踪剂, 加入 0.2ml 指示剂溶液。

约 1h 后, 黄色出现, 用光度计测量光密度。

10) 结果解释

利用系列标准溶液可以确定试验所测样品中氟的含量, 从而证明本发明方法的可行性。

实施例 2: MTBSTFA 修饰的雌二醇和 BTSFA 修饰的雌二醇在 HF 检测特异性方面的差别的研究

在以下所有操作步骤中, 去甲硅烷基化过程中所采用的甲硅烷基化雌二醇的浓度在指定试验的所有样品中均相同。该浓度为 200ng/ml。

其他试剂的浓度如下:

鼠抗雌二醇抗体：5 μ g/ml；

乙酰硫代胆碱：7 $\times 10^{-4}$ M；

5-5'-二硫代联硝基苯甲酸：7 $\times 10^{-4}$ M；

偶联乙酰硫代胆碱的雌二醇：约 1ng/ml。

试验在具有 300 μ l 孔的聚苯乙烯板上进行，方法与实施例 1 相同。

A) 用 BTSFA 甲硅烷基化的雌二醇（具有三甲基甲硅烷基）被 HF 裂解（去甲硅烷基化反应），从而回复成其原始形式。采用其他酸：盐酸（HCl）、硝酸（HNO₃）、硫酸（H₂SO₄）和磷酸（H₂PO₄）也能观察到裂解。结果列于附图 4 中。

因此，采用这种甲硅烷基时，氟对去甲硅烷基化反应并不总是具有特异性。所以只有在仅存在 HF 或其他酸不存在时，这种甲硅烷基化雌二醇才适用于检测 HF。

B) 虽然在水性介质中溶解度较差，但是 MTBSTFA（所传递的硅烷基比 BTSFA 传递的硅烷基更为疏水）甲硅烷基化的雌二醇被 HF 特异性裂解（甲硅烷基化反应），从而回复成其原始形式。如附图 6 所示，在同样反应条件下所测试的酸不能裂解这种被修饰的雌二醇（参见以下实施例 3）。

因此，本发明的发明者们在以下的实施例中采用 MTBSTFA 甲硅烷基化雌二醇。

实施例 3：适用于本发明方法中去甲硅烷基化反应的缓冲液的筛选

由于某些酸对于 MTBSTFA 修饰的雌二醇仍具有去甲硅烷基化作用（参见实施例 2），本发明的发明者们对缓冲液进行筛选，其目的在于提高氟对去甲硅烷基化作用的特异性，同时抑止其他可能存在的具有酸性的化合物的非特异性去甲硅烷基化作用。

浓度高时（用于缓冲高浓度的酸），在酸不存在的情况下，碱如氢氧化钠(NaOH)和氢氧化钾(KOH)也可以诱导雌二醇的去甲硅烷基化（数据未显示）。因此不能采用。

对磷酸根离子浓度为 50mM 的磷酸盐缓冲液（KH₂PO₄/K₂HPO₄）也进行了测试并取得了好的试验结果。对这些溶液的 pH 进行了筛选，以

确保其酸性不至于导致甲硅烷基化雌二醇自发的去甲硅烷基化。

因此，本发明的方法优选在缓冲介质中进行，例如，当样品中含有其他能够诱导有机化合物自发去甲硅烷基化的酸或碱使本发明方法检出和/或测定灵敏度降低时。

而且，本发明的发明者们还发现，在某些条件下，去甲硅烷基化温度过高可能导致经修饰的雌二醇自发去甲硅烷基化（数据未显示）。因此，在不同温度下对不同缓冲液进行了研究。

附图 5 显示所得研究结果。图中“E2M”代表二甲基叔丁基甲硅烷基雌二醇，“A.T.”代表室温。

当磷酸盐缓冲液 pH 为 5.5 或 6 时，94℃ 下出现甲硅烷基化的雌二醇自发去甲硅烷基化，54℃ 下不发生自发去甲硅烷基化。

总之，甲硅烷基化雌二醇去甲硅烷基化的优选条件如下：在 pH 为 5.5 的 50mM 磷酸盐缓冲液中进行，温度为 54 至 64℃ 之间。应该认识到这些条件是针对雌二醇和上述硅烷基以及上述操作条件确定的。

依据本发明所提供的信息，根据所选择的甲硅烷基化的有机化合物、样品以及实施本发明方法的条件，本领域的技术人员能够轻易地确定其他操作条件。

实施例 4：不同酸对于实施本发明方法的影响作用

在上述实施例 3 所描述的条件测试多种其他的酸对于去甲硅烷基化的影响作用。

测试结果列于图 6 中。在该图中，“F.ac”代表甲酸；“ac.ac”代表乙酸；“P.ac”代表磷酸；“OP.ac”代表正磷酸；“T.ac”代表三氟乙酸。

结果清楚地表明，除 HF 以外，这些酸对于 MTBSTFA 甲硅烷基化的雌二醇几乎没有作用。

因此，对于氟检测的特异性而言，硅烷基的筛选起了重要的作用。当待测样品中含有除氟以外的其他成份，特别是这些成份能够诱导所采用的有机化合物发生去甲硅烷基化时，应该考虑这一情况。

实施例 5：与其他卤素和亲核性物质作比较时氟检测的特异性

氟是一种卤素并且具有亲核性。为测试利用雌二醇去甲硅烷基化反

应检测氟的特异性,在以上实施例所描述的操作条件下,采用 MTBSTFA 甲硅烷基化的雌二醇研究其他卤素,如 Bu_4NBr 、 Bu_4NCl 、 Bu_4NI 和 KI ,以及亲核性试剂如 4-硝基苯酚和 4-硝基咪唑的影响作用。

附图 7 显示了本实施例的实验结果。结果证明,与其他物质相比,氟的检测具有特异性。

显然,与其他受试物质相比,氟在雌二醇去甲硅烷基化反应中特异性显著。

实施例 6: HF 和氟离子引发的裂解

在这一实施例中,在以上实施例所描述的操作条件下,将多种氟盐与 MTBSTFA 甲硅烷基化的雌二醇接触。

附图 8 对所得实验结果进行了整理。在该附图中,采用常规化学符号标识所测试的不同氟盐。

就裂解甲硅烷基化的雌二醇而言,氟离子的行为与 HF 类似,以此确认该反应对于氟具有特异性。

实施例 7: 本发明方法的检测能力以及添加有机化合物的效应

在以上实施例所描述的操作条件下,如图 7 和 8 所示,将 HF 溶于水性介质时,检测 HF 的灵敏度约为 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ (即 $1\mu\text{g/ml}$)。

在进行补充实验的过程中,本发明的发明者们发现向水性去甲硅烷基化反应的水性溶液中加入与水混溶的有机溶剂可以进一步提高本发明方法的灵敏度。

采用二甲基甲酰胺(DMF) (参见雌二醇的甲硅烷基化) 和二甲基亚砜(DMSO)进行实验。

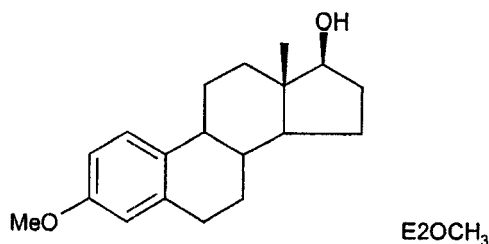
采用二甲基亚砜(DMSO)作溶剂进行本发明方法的去甲硅烷基化时,灵敏度可以提高 500 倍 (约为 10^{-7}M , 即 $0.001\mu\text{g/ml}$)。

图 19 显示以用于接触的水性溶液总体积计,二甲基亚砜体积浓度为 95%时进行反应所得的氟离子剂量—响应曲线。并将所得结果与以上实施例所得结果作了比较。

因此,向所述用于接触的水性溶液中添加有机溶剂可以显著增加本发明方法检出和/或测定氟的灵敏度。

实施例 8: 本发明化合物为雌二醇衍生物时本发明方法的使用情况

在本实施例中, 实施本发明方法的有机化合物为雌二醇的 O-甲基衍生物(E2OCH₃): 17 β -雌二醇-3-甲醚, 结构式如下:



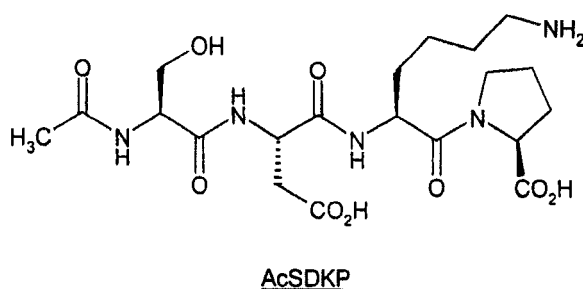
所采用操作条件如以上实施例 1 和 2 所示。

所得实验结果在附图 17 中显示。结果发现在氟的存在下 E2OCH₃ 确实发生了去甲硅烷基化。

因此, 这是本发明方法使用雌二醇衍生物的有说服力的证据。

实施例 9: 有机化合物为具有羟基的肽时本发明方法的使用情况

在本实施例中, 有机化合物为肽。这种肽为四肽, 即乙酰化的 Ser-Asp-Lys-Pro (AcSDKP), 结构式如下:



AcSDKP 是一种具有羟基的肽, 该结构特点有助于其同时被甲硅烷基化并且通过自身的羧基或氨基连接于固相之上。

首先研究这种肽的甲硅烷基化反应, 然后再研究甲硅烷基化的化合物在本发明方法中的使用情况。

于 22°C、37°C 或 60°C 下采用未经稀释的 BSTFA 或 MTBSTFA 对 AcSDKP (1mg/ml) 甲硅烷基化 10、30 或 60 分钟。反应后采用参考文献[5]

所描述的 AcSDKP 特异性竞争试验和兔多克隆抗体检测甲硅烷基化的 AcSDKP。在这种情况下，信号的增强指示免疫反应活性已丧失，说明甲硅烷基化反应已经发生。

如显示所得实验结果的附图 15 所示，60℃时 MTBSTFA 降低了 AcSDKP 的反应性，说明化合物已经被甲硅烷基化。

此后依据本发明方法在 HF 存在下对甲硅烷基化的肽进行去甲硅烷基化试验。附图 16 对所得实验结果进行了整理。可以看出 HF 使肽去甲硅烷基化。硅烷基的丧失使得免疫反应活性增加，信号减弱。如该附图所示，在 HF 存在下信号减弱。

因此，本发明的方法可以采用羟基化的肽作为有机化合物。

实施例 10：溶液中氟的检出和测定

为了检验本发明方法的有效性，作者检测了多种氟含量已知的矿泉水。

实验方法如实施例 1 所述，所采用的有机化合物为 MTBSTFA 甲硅烷基化的雌二醇（二甲基叔丁基甲硅烷基雌二醇）。

下表 1 对本实施例所得实验结果进行了整理。结果显示对各个样品均检出了氟的存在。

对于浓度最高的水样，理论浓度和所检出的浓度相符合。存在于样品中的氟的特性可能是造成偏差的原因。

表 I

矿泉水中氟含量的测定

水样	[氟化物]		[干萃取物] mg/ml	pH	检出的[F] μ M	F 检出的百分比 %
	mg/ml	μ M				
Vichy StYorre	9	470	4774	6.6	780±271	170±60
SanPellegrino	0.61	32	1074	7.5	151	470
Badoit	1	52	1200	6	28.5±12	50±20
Vichy Célestin	6	135	3325	6.8	305±81	97±26
Quézac	2.1	100	-	-	53	53

实施例 11：气体介质中氟的检测

HF 常常以气体形式被检测，为进行检测，需要将气体通入水溶液中。由于本发明的发明者们没有受 HF 污染的气体样品，故在密封的容器中通过蒸发已知浓度的 HF 溶液制备人工样品。HF 被蒸发后，将其他泵入收集缓冲液(DMF)中并在其中鼓泡。

采用一个可以过滤 100L 气体的体系（气体中 HF 浓度为 1.2×10^{-2} 升/ 10^6 升空气（12ppb）），得到 HF 浓度为 10^{-5} M 的溶液（假设吸收率为 100%）。

检测氟的方法如实施例 1 所述，所采用的有机化合物为 MTBSTFA 甲硅烷基化的雌二醇（二甲基叔丁基甲硅烷基雌二醇）。

图 9 显示了各次检测所得的实验结果。氟的理论浓度和检出浓度符合得相当好。

因此，本发明检测空气中 HF 的方法可轻易地检出浓度为 10^{-2} 升/ 10^6 升空气（10ppb）的 HF。

实施例 12：本发明方法在非竞争性免疫检出和测定氟中的应用

1) 总的策略

实验的目的是利用先前所得的实验结果，即有可能优化针对 HF 和甲硅烷基化的化合物相互作用的免疫学识别。

与以上（竞争性）实验方法相比，本免疫检测方法包括通过共价键将甲硅烷基化的化合物固定于固体表面之上。与竞争性实验中使信号消失相反，通过 HF 的转化作用形成免疫反应的活性形式，从而产生一个信号。

这种方法常常使检测灵敏度更高，这可能是由于过量的试剂使反应热力学更佳。此外，由于观察或测量信号的出现要比信号的消失更容易，因此也方便读数。

2) 试剂和方案

采用参考文献[39]所描述的抗体。

采用本领域技术人员所熟知的方法在实验室中进行兔抗体的生物素化，抗生蛋白链菌素或抗体的乙酰胆碱酯酶标记。

所有化学试剂和制品得自 Sigma 或 Merk 公司。化合物来自 Sigma 或 Steraloids (就雌二醇衍生物而言)。

试验用缓冲液为 0.05M 磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 其包含叠氮化物 (0.01%)、牛白蛋白 (0.5%) 和 NaCl (0.9%)。

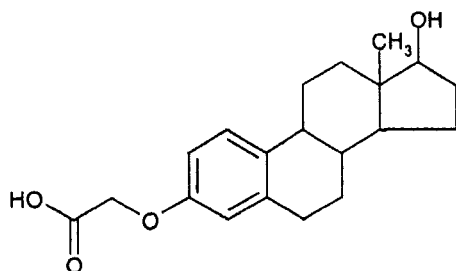
酶指示剂由乙酰硫代胆碱和二硝基氟苯的混合物构成。与示踪剂反应后产生黄色, 可以肉眼观测或采用光度计于 414nm 处定量检测。

用于进行试验, 特别是用于连接雌二醇衍生物的板来自 Nunc 公司 (Rochester, USA)。

所采用的甲硅烷基化试剂为 BSTFA 和 MTBSTFA。

所使用的雌二醇如下所示。该化合物的优点是可以采用以上竞争性试验所开发出的抗体和基本检测原理。

本发明的发明者们首次证实了所获得的雌二醇抗体能够识别未甲硅烷基化的这种化合物, 但是不能识别甲硅烷基化的化合物 (与雌二醇相比, 与抗体发生 53% 的交叉反应)。检验结果为阳性。



雌二醇羧甲醚 (EstCME) 的结构式

此后, 本发明的发明者们测试了这种雌二醇与两种板的共价连接 (结合): 含有氨基的板 (Nunc-NH₂ 板) 和聚赖氨酸 (poly-Lys) 活化的板。

3) 雌二醇衍生物的连接实验

在等摩尔浓度的、用于连接板上氨基和抗原中羧基的试剂 N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)存在下, 将 EstCME 在 Nunc 板中温育 3h。20°C 下用 100 ng/ml 抗雌二醇抗体处理 4 小时, 然后 22°C 下用偶联在乙酰胆碱酯酶上的抗兔抗体的山羊抗体 (2 个 Ellman 单位 gAb-AchE/ml) 处理 2 小时进行显色。加入作为 AchE 底物的 Ellman 试剂对酶活性进行显色。

所得实验结果在附图 10 中显示。结果说明雌二醇被有效地结合，而且在最高测试浓度(100 $\mu\text{l/ml}$)下达到峰值。

采用预先吸附有聚赖氨酸 (poly-Lys) (1 至 100 $\mu\text{g/ml}$ 的磷酸盐缓冲液的溶液) 的板对以上初步实验进行重复。

所得实验结果在附图 11 中显示。在这种情况下，不论聚赖氨酸的浓度如何均取得了相同数量级的实验结果。这也证明了聚赖氨酸所携带的氨基更容易和所选雌二醇结合。

为了更详细地研究聚赖氨酸浓度的影响作用，采用浓度范围更宽的聚赖氨酸重复进行实验。所得实验结果在附图 12 中显示。结果显示最佳聚赖氨酸浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 。

上述两个附图证明，当聚赖氨酸浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ ，雌二醇羧甲醚浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 时，雌二醇衍生物和板产生有效的结合。

4) 雌二醇衍生物的甲硅烷基化

此外，本发明的发明者们设法寻找到上述化合物的最佳甲硅烷基化反应条件。在两个温度 (22 $^{\circ}\text{C}$ 或 33 $^{\circ}\text{C}$) 下，将雌二醇羧甲醚与不同浓度的 MTBSTFA (1/5、1/2 和 1/1) 反应进行甲硅烷基化，反应时间为 0 至 60 分钟。利用甲硅烷基化雌二醇的竞争性试验检测甲硅烷基化反应，其中甲硅烷基化的雌二醇丧失识别力。

附图 13 显示所得实验结果。结果显示在 MTBSTFA 浓度高的情况下雌二醇羧甲醚丧失免疫反应活性。免疫反应活性的丧失通过因识别力丧失所造成的信号增加加以证明。MTBSTFA 被证明具有剂量依赖性。

综合实验结果，即、综合固相偶联效能和甲硅烷基化效能的实验结果，使得能够在板上进行以下的偶联/去甲硅烷基化试验。

5) 偶联/去甲硅烷基化试验

22 $^{\circ}\text{C}$ 下，在相同浓度 MTBSTFA 存在下将雌二醇羧甲醚 (8.3 mg/ml) 反应 1h，此后用水稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$ ，然后于 22 $^{\circ}\text{C}$ 下，在 NHS 存在下在涂布有聚赖氨酸 (1 $\mu\text{g/ml}$) 的板上反应 1h。

在没有 HF 或有 1 mM HF 存在下，于 22、37 和 64 $^{\circ}\text{C}$ 下进行去甲硅烷基化反应，时间为 1 小时。

实验结果显示于图 14 中。如该图所示, 在 HF 存在下可以观察到因甲硅烷基化雌二醇羧甲醚发生去甲硅烷基化所导致的免疫反应活性增加。

以此证明了当甲硅烷基化的有机化合物结合至载体上时, 本发明方法能够检测 HF。

参考文献

[1] 国际氟化物研究学会, Fluoride 31(2), 1998, 74-80-disponible sur le site Internet <http://www.fluoride-journal.com/98-31-2/31274-80.htm>.

[2] 职业安全与健康管理局, <http://www.osha-dlc.gov/dts/sltc/mechods/inorganic/idllo/idllo.html>.

[3] Alexei Vasiliev 等人, Elsevier, Anlytica chimica acta, Sensor and Actuators, B 49 (1998), 133-138.

[4] http://www.bionics-instrument.com/p_fluorine.htm.

[5] Ezan E 等人, 健康志愿者和病人体内一种造血作用负调节剂—NAC-SDKP (seraspenide) 的药代动力学, Drug Metab Dispos 1994 Nov-Doc; 22 (6): 843-848.

[6] Shi RZ 等人, 一种通过酶联免疫吸收剂试验定量检验人尿样中高香草酸[校正浓度]的方法, Clin Chem 1998 Aug; 44(8 pt 1):1674-1679.

[7] Taran F 等人, 尿样中香草基扁桃酸的竞争性酶联免疫检测, Clin Chim Acta 1997 Aug 29; 264(2):177-192

[8] Boschelli 等人, Tetrahedron Letters 26, 5329-5242, 1985.

[9] Machard S 等人, 一种灵敏的, 用于药代动力学和药物分布研究的两性霉素 B 免疫检测法, Antimicrob Agents Chemother 2000 Mar; 44(3):546-550.

[10] Cleary JD 等人, 两性霉素 B 酶联免疫吸收剂试验, Antimicrob Agents Chemother 1996 Mar; 40(3): 637-641.

[11] Fitzgerald RL, Herold DA., 血清睾酮的测定: 免疫检测与气相色谱—阴极化学电离质谱联用之比较, Clin Chem 1996 May; 42(5):749-755.

[12] Luceri F 等人, 气相色谱—质谱联用测量人尿样中 6- β -OH-氢化可的松/氢化可的松的比例: 一种酶诱导的特异性标记, Clin Chem Lab

Med 2001 Dec; 39(12):1234-1249.

[13] Munro CJ 等人, 通过酶联免疫检测和放射性免疫检测研究雌二醇和黄体酮浓度和尿样中主要代谢产物谱间的关系, Clin Chem 1991 Jun; 37(6):838-844.

[14] Metaye T 等人, 采用生物化学法和酶联免疫检测法对乳腺癌受体作对比性检测, Ann Biol Clin (Paris) 1990; 48 (10): 732-736.

[15] Foekens JA 等人, 通过酶联免疫检测法和葡聚糖涂布活性炭法对人乳腺癌胞液中黄体酮受体作对比性检测, J Steroid Biochem 1988 Jun; 29(6): 571-574.

[16] Hosoda H 等人, 甾体酶联免疫检测的灵敏度, 采用单克隆抗体的试验方法中四种标记的酶的比较, Chem Pharm Bull (Tokyo) 1989 Jul; 37(7): 1834-1837.

[17] Hubl W 等人, 一种改进的测量甾体激素和地高辛的固相酶和发光免疫检测系统, Clin Chem 1988 Dec; 34(12): 2521-2523.

[18] Hocart CH 等人, 细胞分裂素叔丁基二甲基甲硅烷基衍生物的质谱和色谱检测, Cytokine Anal Biochem 1986 Feb 15; 153(1): 85-96.

[19] Garcia de Salamone IE 等人, 促进植物生长的根瘤菌及所筛选出的突变株的细胞分裂素的产量, Can J Microbiol 2001 May; 47(5):404-411.

[20] Trione EJ 等人, 植物细胞分裂素的荧光酶联免疫定量检测, Anal Biochem 1987 Apr; 162(1): 301-308.

[21] Steffenrud S 等人, 单羟基二十碳四烯酸的甲酯、三甲基硅醚、烯丙基二甲基硅醚和叔丁基二甲基硅醚的气相色谱-质谱联用检测, J Chromatogr 1987 May 15; 416(2):219-235.

[22] Smith BJ 等人, 毛细管气相色谱-阴极化学电离质谱联用测量血浆中前列腺素 E₂ 的含量, Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1983 Apr; 40(1): 73-86.

[23] David Percival M, 与 96 孔板匹配的前列腺素 E 合成酶活性连续光电测量法, Anal Biochem 2003 Feb 15; 313(2): 307-310.

[24] Hoffman SW 等人, 一种可靠的和灵敏的酶联免疫检测法, 用于检测作为脑损伤实验模型中脂质过氧化标志的 8-异前列腺素 F_{2α}, Neurosci Methods 1996 Oct; 68(2): 133-136.

[25] Knapp RD 1979 Handbook of analytical derivatization reactions, New York John Willey and sons.

[26] Lau HL 等人, 1966, J Gas Chromatography 4, 136.

[27] Tallent WH 等人, 采用二(三甲基甲硅烷基)乙酰胺对用于气-液色谱分析的脂解产物进行甲硅烷基化, J Lipid Res 1968 Jan; 9(1):146-148.

[28] Mawhinney TP 等人, 气-液色谱及质谱分析单-、二-和三羧酸盐的叔丁基二甲基甲硅烷基衍生物, J Chromatogr 1986 Jun 27; 361:117-

[29] Mawhinney TP 等人, 气-液色谱同时检测 N-乙酰葡萄糖胺、N-乙酰半乳糖胺、N-乙酰葡萄糖醇胺和 N-乙酰半乳糖醇胺, J Chromatogr 1986 Jan 3; 351(1):91-102.

[30] Bazan AC 和 Knapp DR, 用于气相色谱-质谱联用分析的 6-羰基前列腺素 F1 的改良衍生物, J Chromatography 1982, 236, 201-207.

[31] Choi MH 等人, 气相色谱-质谱联用检测人毛发中雌甾酮和 17 β -雌二醇, Analyst 2000 Apr; 125(4): 711-714.

[32] Dehennin L, 气相色谱-质谱联用检测血浆中 17 β -雌二醇, 其中利用选择离子法检测混合硅醚-全氟乙酸酯衍生物并采用了多种稳定同位素标记的内标, Clin Chem 1989 Apr; 35(4): 532-

[33] Andersson SH 等人, 气相色谱-质谱联用分析大鼠睾丸组织中的未结合甾体化合物谱, J Steroid Biochem 1985 Oct; 23(4): 469-

[34] Ishikawa E 等人, 灵敏的检测抗体的酶联免疫检测法的开发及应用 (综述), J Clin Lab Anal 1989; 3(4): 252-265.

[35] Ishikawa E, 灵敏的检测大分子抗原的酶联免疫检测法的开发及临床应用 (综述), Clin Biochem 1987 Dec; 20(6): 375-385.

[36] Oellerich M, 酶联免疫检测 (综述), J Clin Chem Clin Biochem 1984 Dec; 22(12): 895-904.

[37] O'Sullivan MJ 等人, 酶联免疫检测 (综述), Ann Clin Biochem 1979 Sep; 16(5): 221-240.

[38] EZAN E 等人, 特异和灵敏的放射性免疫检测法的开发策略, Handbook of Pharmacology: Radioimmunoassay in basic and clinical pharmacology (Patrono C.和 Beskar P.编辑) 82 (1987) 143-179.

[39] Buscarlet L 等人, 17 β -雌二醇与单克隆抗体通过直接 UV 照射的

交联: 在酶联免疫检测中的应用, *Anal Chem* 1999 Mar1; 71(5): 1002-1008.

[40] Nakagomi M 等人, 酶联免疫检测法测量兔尿样中 17α -雌二醇和 17-N-乙酰氨基葡萄糖苷, *Steroids* 1999 Apr; 64(4) : 301-307.

[41] el Jabri J, 采用单克隆抗体酶联免疫检测血浆中雌二醇, *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991 Mar; 38(3): 339-343.

[42] Dhar TK 等人, 采用雌二醇-3-O-羧甲醚作为半抗原的用于检测雌二醇的均相酶联免疫检测法, *Steroids* 1988 May-Jun; 51(5-6): 519-526.

[43] ELLMAN G. L. 等人, (1961) *Biochem. Pharmacol.* 7, 88.

[44] EP-A-0139552.

[45] US 5, 047, 300.

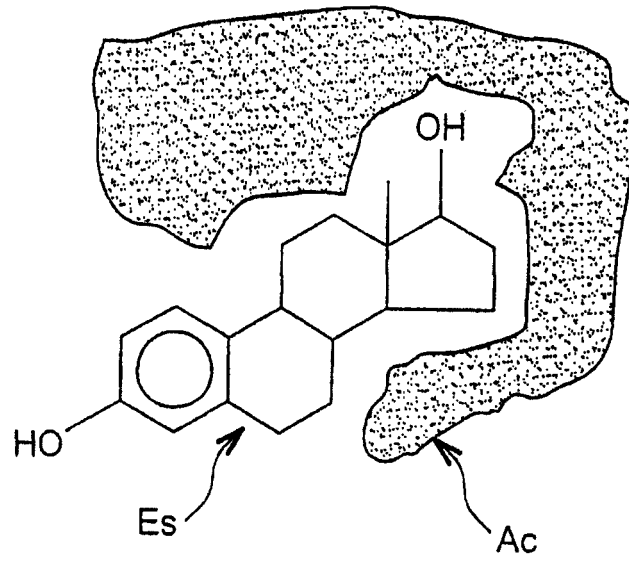


图1

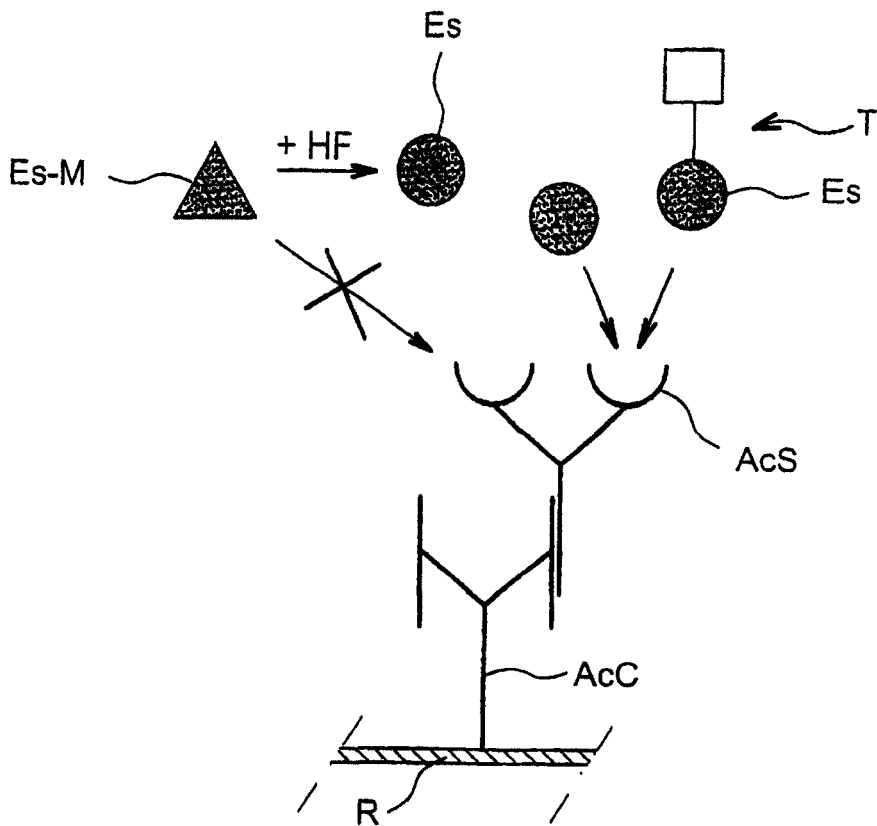


图2

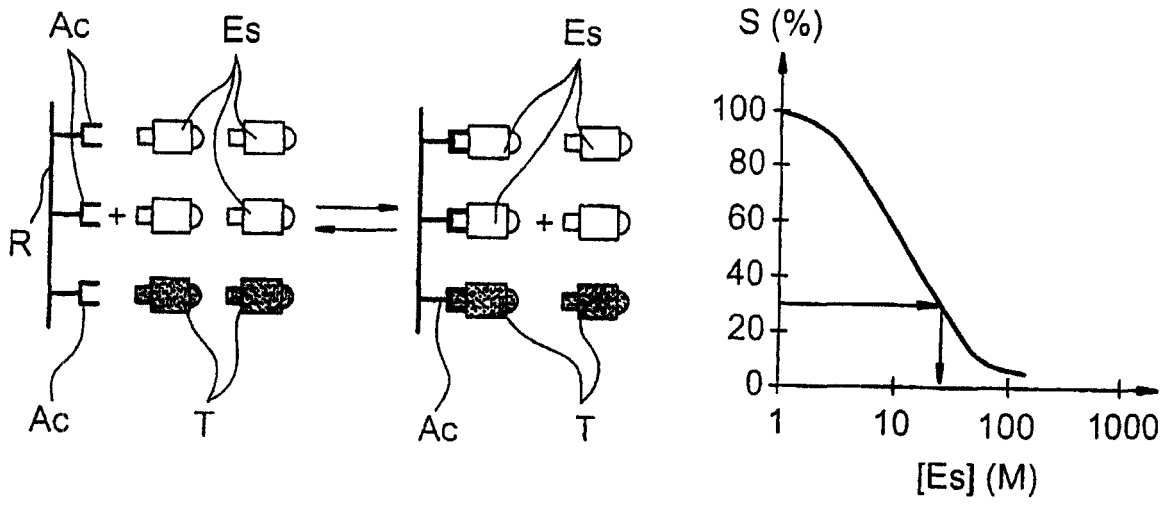


图3

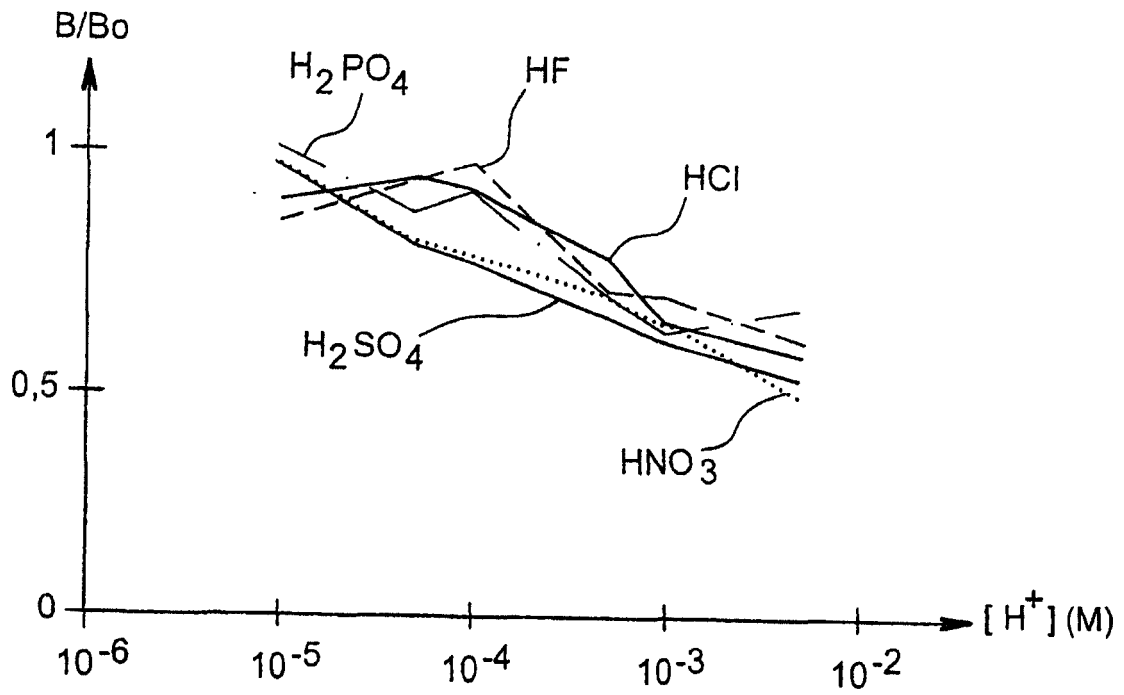


图4

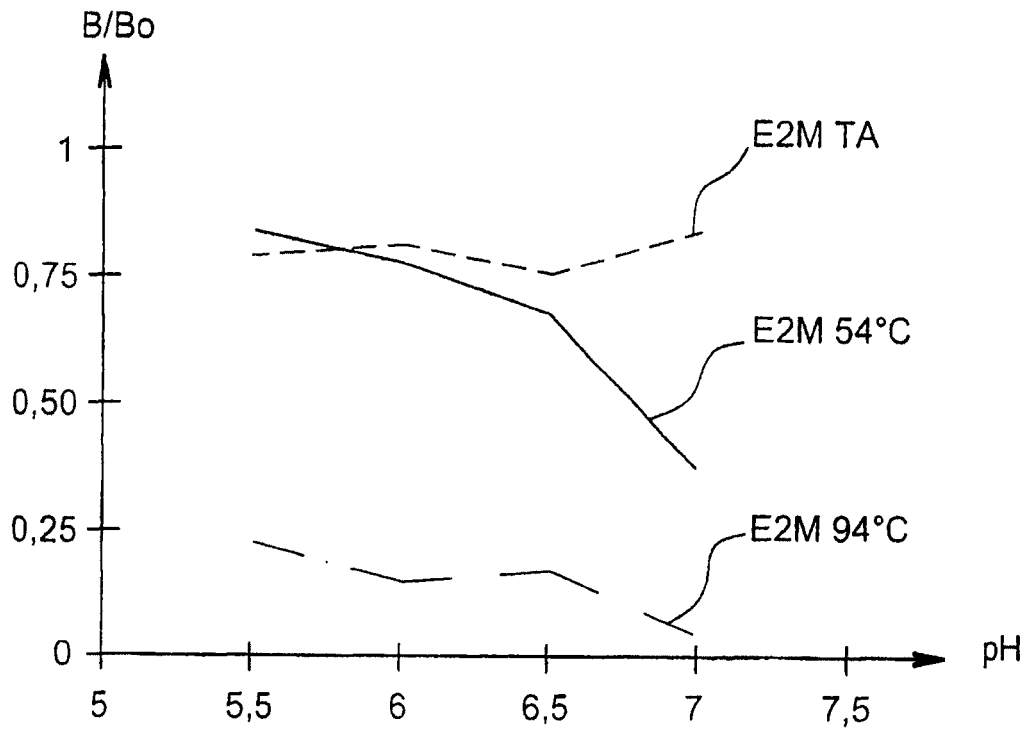


图5

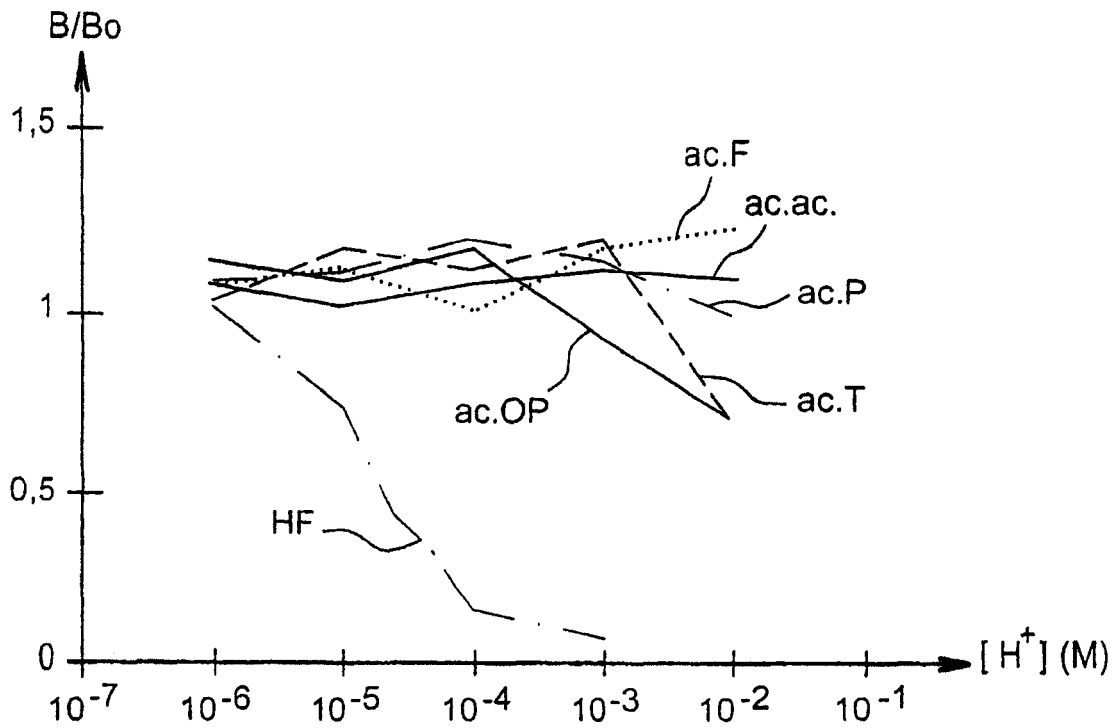


图6

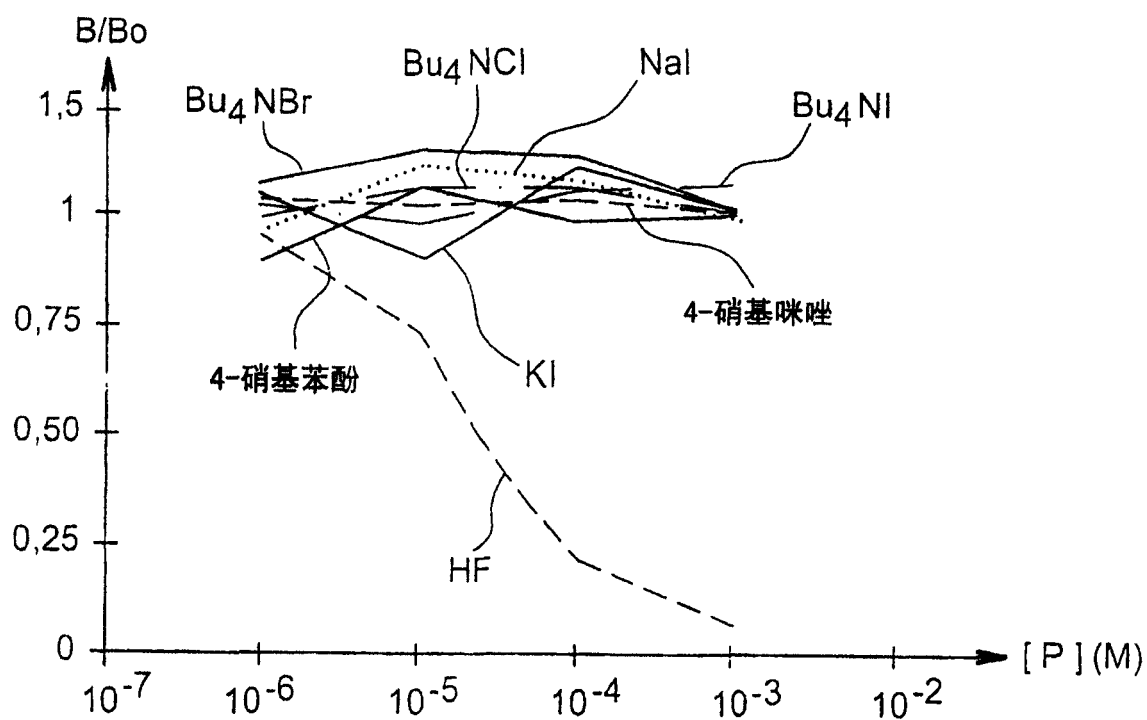


图7

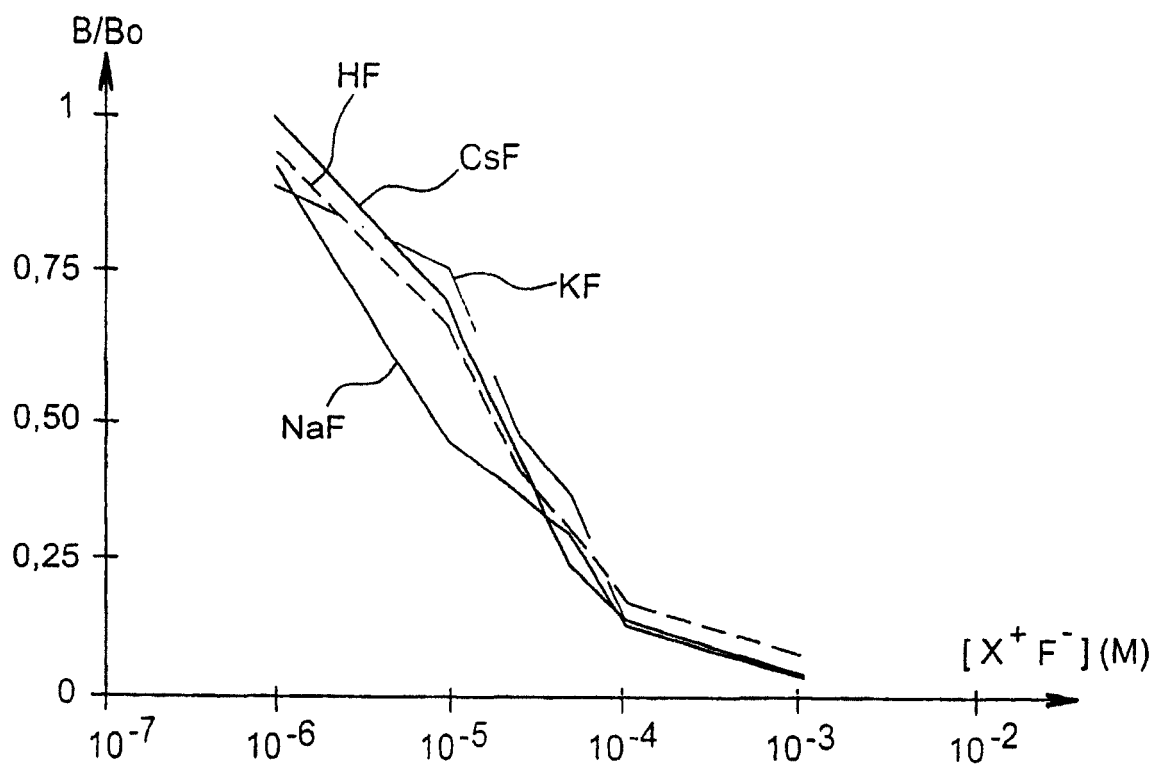


图8

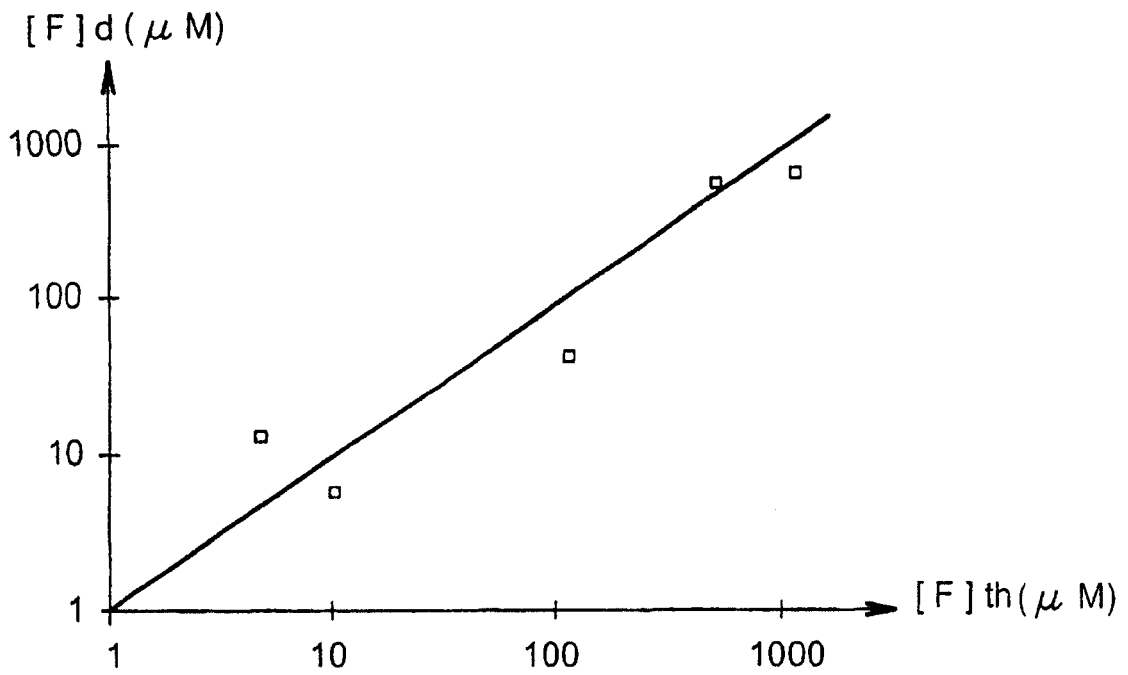


图9

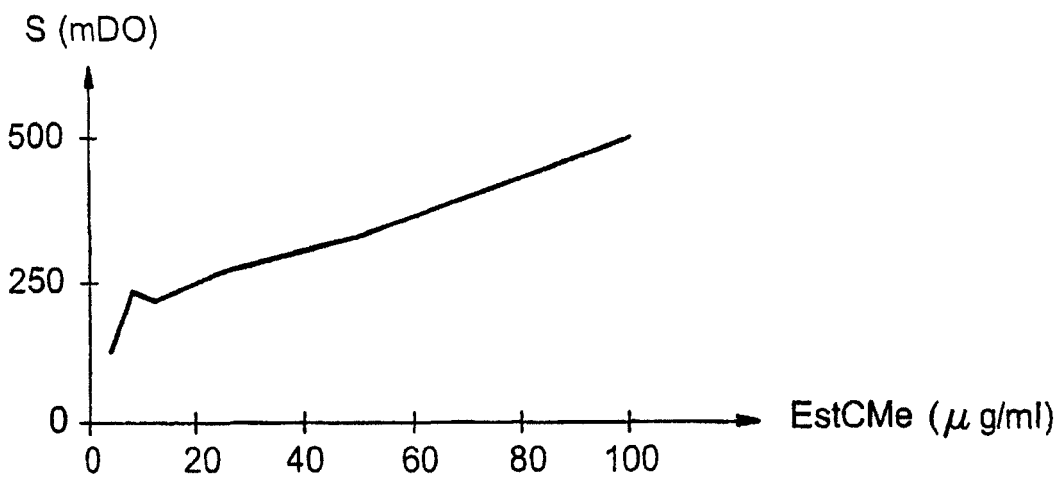


图10

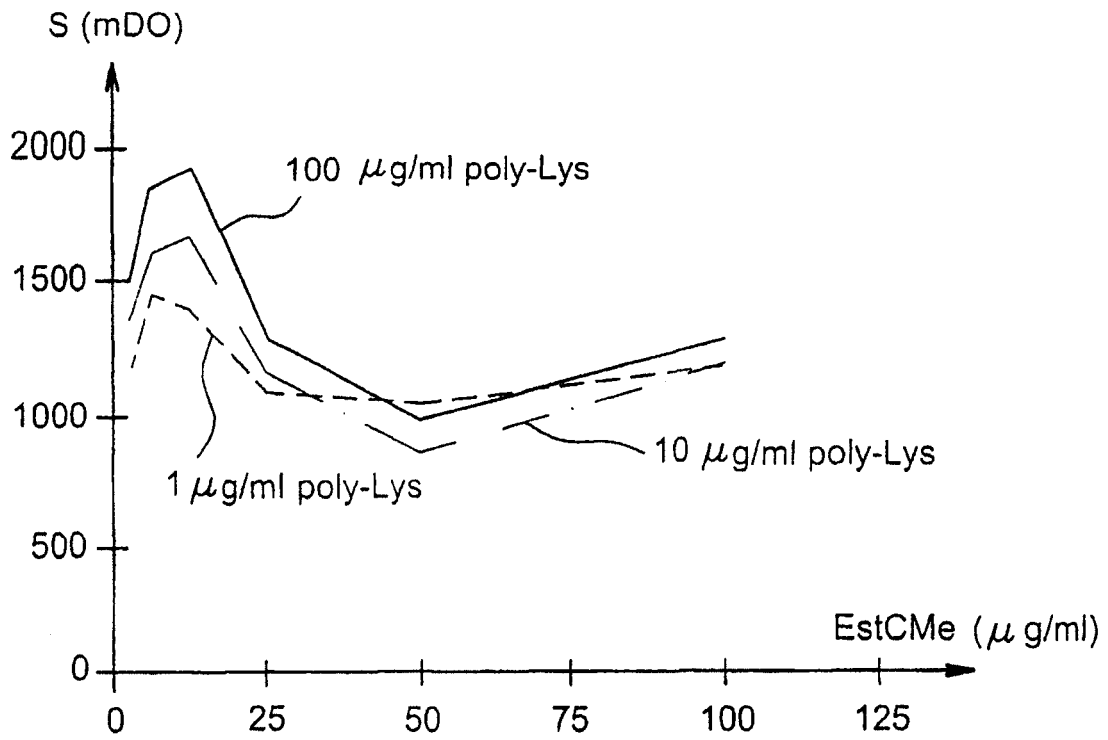


图11

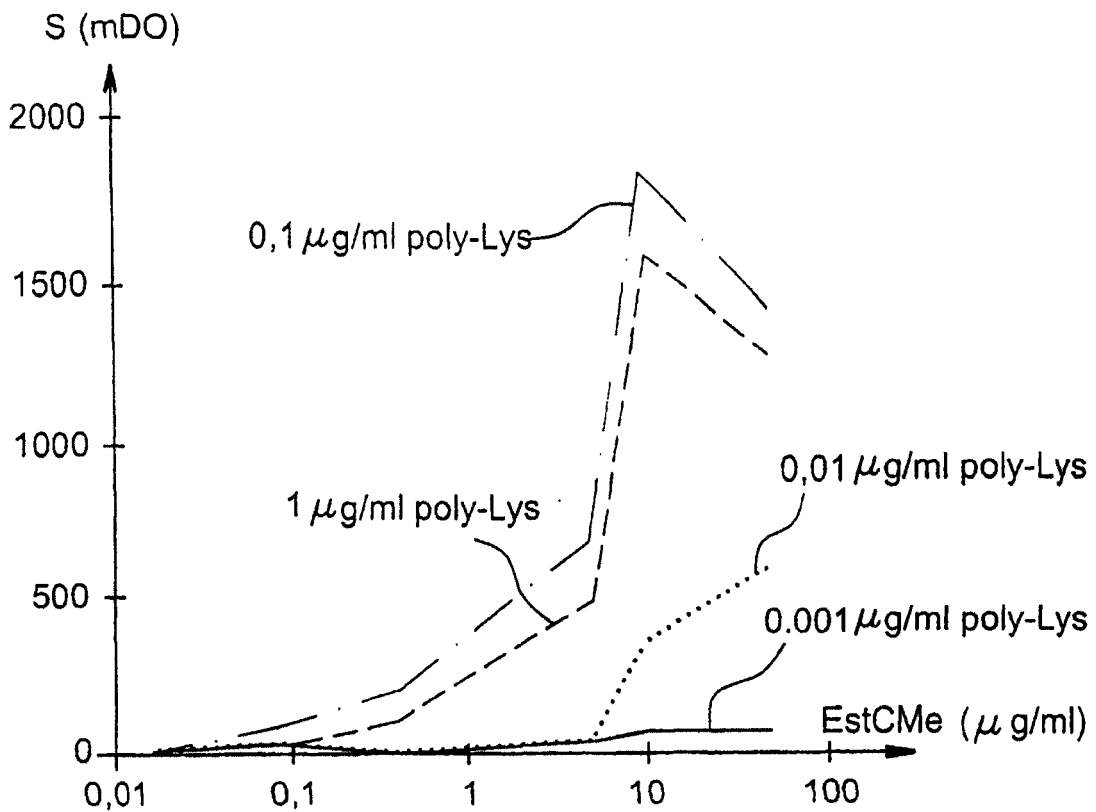


图12

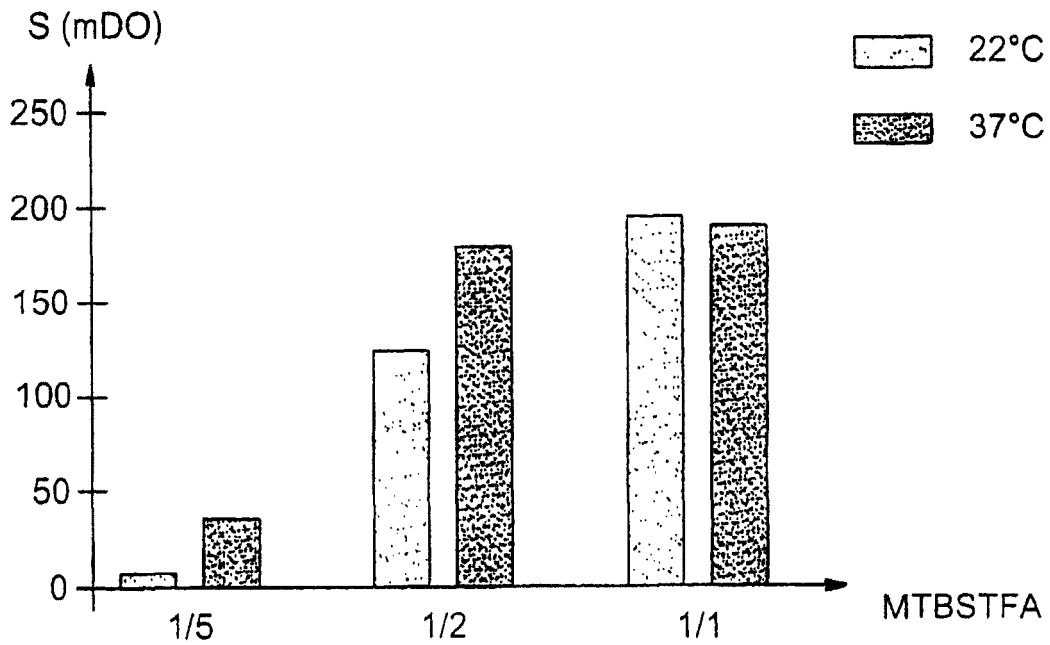


图13

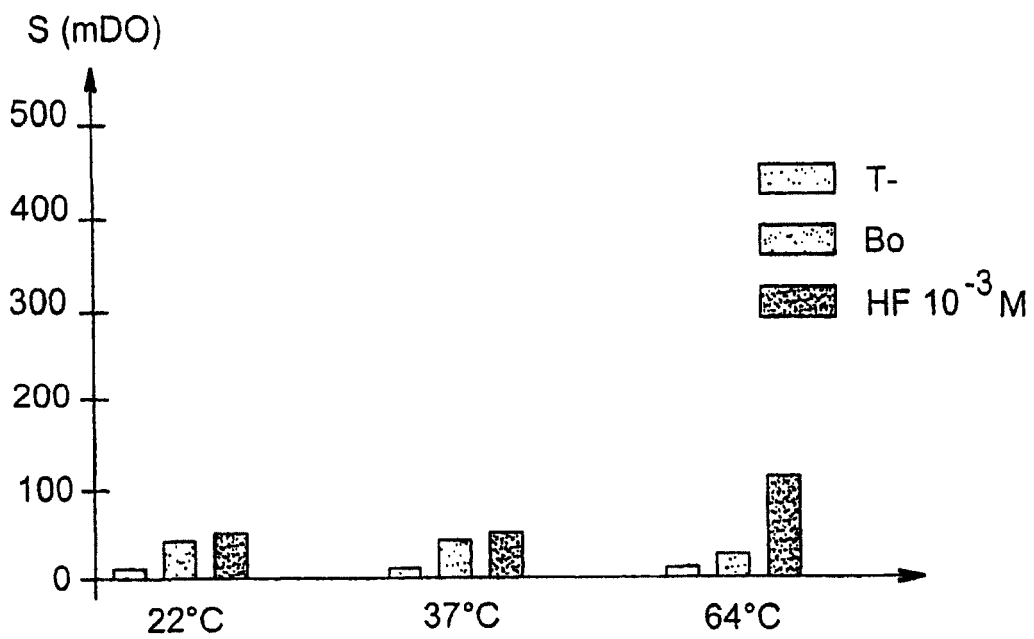


图14

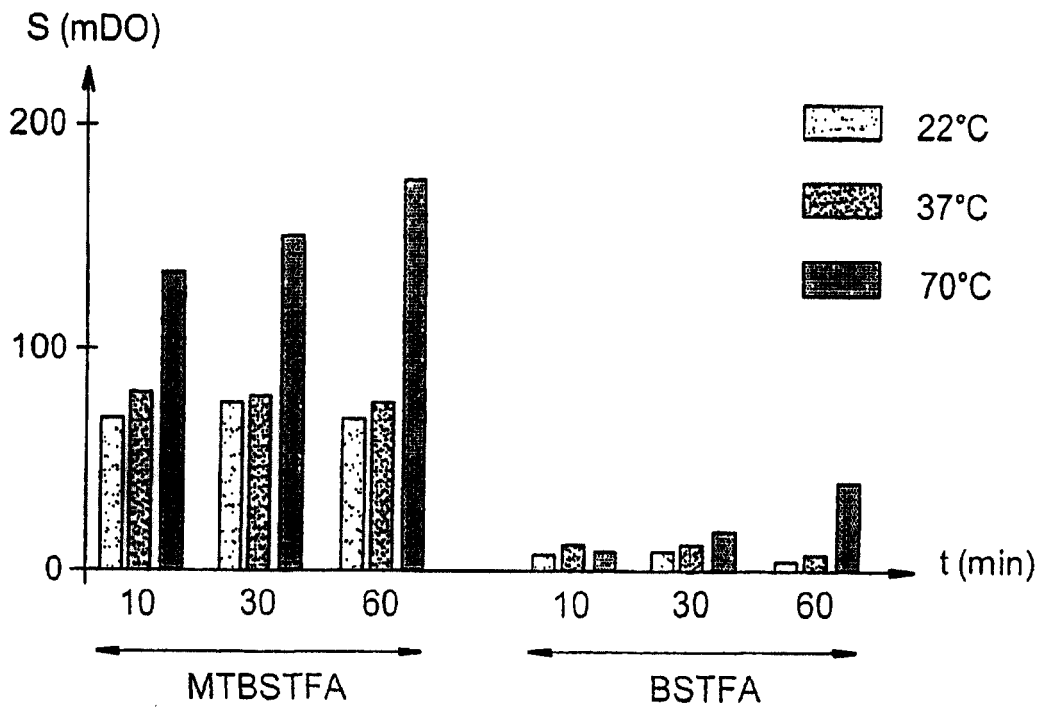


图15

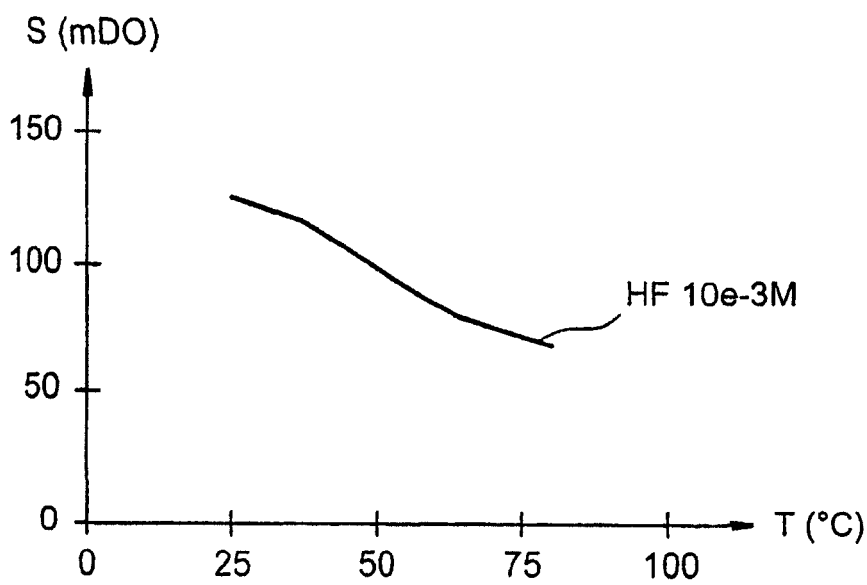


图16

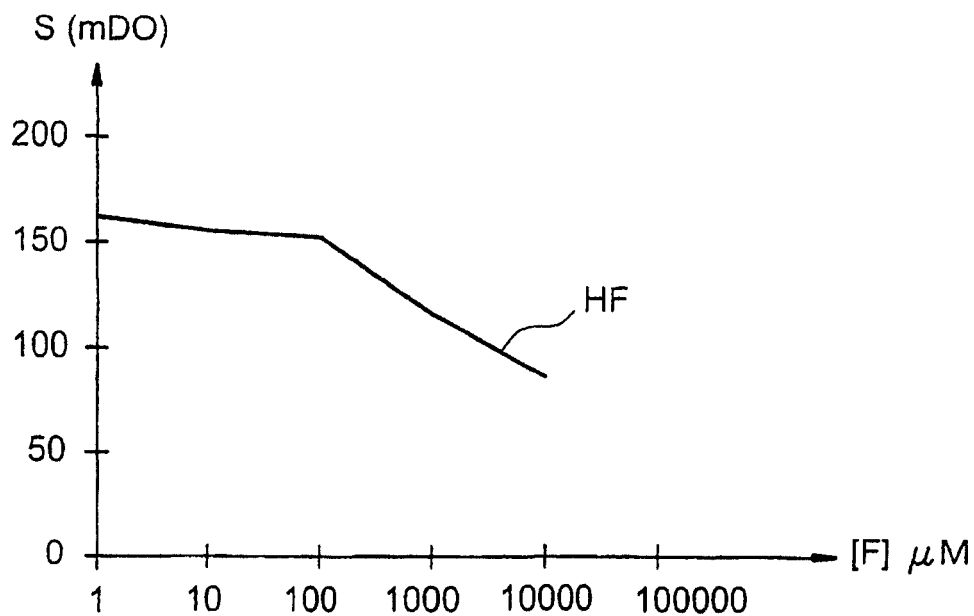


图17

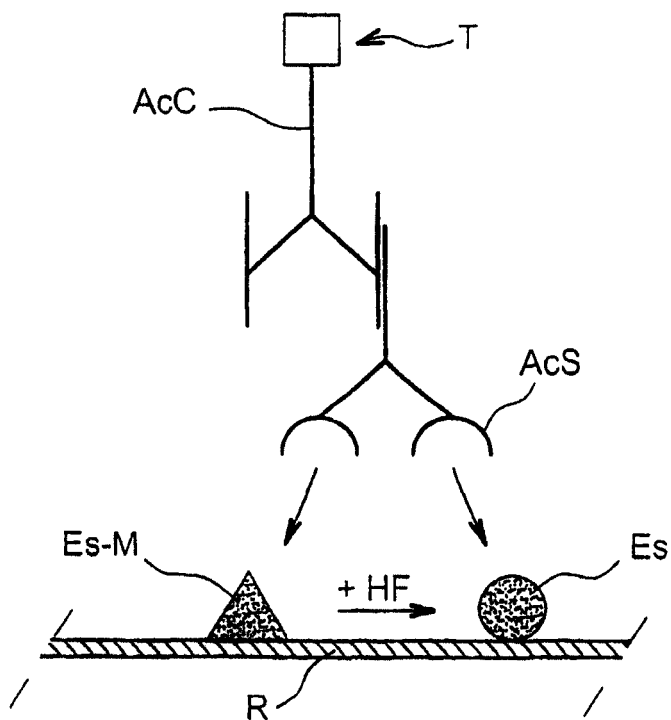


图18

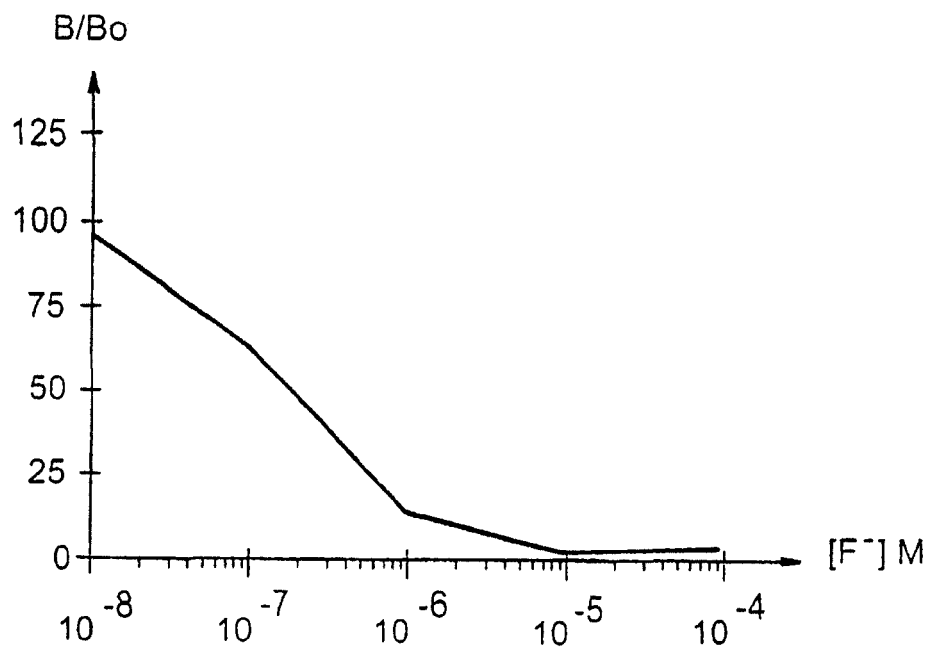


图19

专利名称(译)	检测氟化物或氟化氢的方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN100501401C	公开(公告)日	2009-06-17
申请号	CN200480001311.4	申请日	2004-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	原子能委员会		
申请(专利权)人(译)	原子能委员会		
当前申请(专利权)人(译)	原子能委员会		
[标]发明人	埃里克埃赞 菲利普普拉代勒		
发明人	埃里克·埃赞 马里-阿斯特丽·萨戈 菲利普·普拉代勒		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53		
优先权	2003050167 2003-05-22 FR 2003050160 2003-05-20 FR		
其他公开文献	CN1705881A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检出和/或测定样品中氟化物(F⁻)或氟化氢(HF)浓度的方法，其包括以下步骤：在水溶液中将所述样品与甲硅烷基化的有机化合物接触，以此得到测量溶液，所述甲硅烷基化的有机化合物在氢氟酸或氟化物的存在时发生去甲硅烷基化，使得可以分别检出和/或测定甲硅烷基化的有机化合物和去甲硅烷基化的有机化合物；在所述测量溶液检出和/或测定去甲硅烷基化的有机化合物的出现或甲硅烷基化的有机化合物的消失，如果样品中存在氟化物或氟化氢，则会出现去甲硅烷基化的有机化合物出现或甲硅烷基化的有机化合物消失这种现象。就氟化物或氟化氢的检测而言，本发明的方法检测的量级可以轻易地达到1×10⁻²升HF/106升(10ppb，气体样品)，或0.5至1μg/ml(液体样品)。本发明的试剂盒包含实施该方法所需的成分。本发明方法的检测限为0.001μg/ml。

