



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104744294 B

(45)授权公告日 2018.01.09

(21)申请号 201410336370.2

C07C 233/54(2006.01)

(22)申请日 2014.07.15

C07K 14/765(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

C07K 14/77(2006.01)

申请公布号 CN 104744294 A

C07K 16/44(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(43)申请公布日 2015.07.01

(56)对比文件

(73)专利权人 广州城市职业学院

WO 9747589 A,1997.12.18,

地址 510405 广东省广州市广园中路248号

CN 103204925 A,2013.07.17,

(72)发明人 张挺 谭龙飞 江津津 彭述辉

CN 103822913 A,2014.02.26,

黎海彬

审查员 云益鸣

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司  
44202

代理人 张超

(51)Int.Cl.

C07C 239/20(2006.01)

C07C 231/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原、人工抗原及其抗体制备方法及应用

(57)摘要

本发明公开邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯(英文缩写DEHP)半抗原、人工抗原和抗体制备及应用,属于食品安全领域。本发明中以DEHP为原料,经硝化反应和还原反应,制得带氨基基团的中间产物,再与丁二酸酐、戊二酸酐等试剂反应生成带羧基基团的半抗原;然后通过活泼脂法或者混合酸酐法与蛋白质偶联制备人工抗原。将人工抗原免疫动物后产生对DEHP的特异性抗体。用该抗体建立免疫检测可用于DEHP的现场快速检测,对实现食品安全的快速检测具有重要现实意义。

1. 一种DEHP半抗原的合成方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 按摩尔比为2:1~3:1将浓硝酸与DEHP置于圆底烧瓶中,冰浴条件下滴加到2倍于浓硝酸摩尔量的浓硫酸中,磁力搅拌,反应至室温,再60℃回流反应5h,期间用TLC监控,用1mol/L的氢氧化钠溶液中和反应液至弱碱性,乙酸乙酯萃取3次,有机相于旋转蒸发仪上减压蒸干得到粗的硝化产物DEHP-NO<sub>2</sub>,过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为2:1~3:1的氯仿/环己烷洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的硝化产物DEHP-NO<sub>2</sub>;

(2) 按摩尔比为1:3:3将DEHP-NO<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、铁粉置于圆底烧瓶中,添加到适量的70%乙醇溶液中,磁力搅拌,50℃回流反应5h,期间用TLC监控;反应结束后,向反应液中加入100mL无水乙醇,滤去铁粉,收集滤液,于旋转蒸发仪浓缩近干;向浓缩液中加30mL水,用乙酸乙酯萃取3次,收集有机相,蒸干,得到粗产物DEHP-NH<sub>2</sub>;过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为5:1~4:1的氯仿/甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的还原产物DEHP-NH<sub>2</sub>;

(3) 将0.1mmol纯化的DEHP-NH<sub>2</sub>与0.15mmol酸酐于无水吡啶中40℃搅拌反应过夜,反应液旋转蒸发仪浓缩得到黏稠液体,过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为6:1~4:1的氯仿/甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到产物即为DEHP半抗原。

2. 如权利要求1所述DEHP半抗原的合成方法,其特征在于:浓硝酸为65%的硝酸,酸酐为丁二酸酐或戊二酸酐。

3. 一种DEHP人工抗原的制备方法,包括活泼脂法与混合酸酐法,其特征在于:

所述活泼酯方法为:

(1) 将0.1mmol权利要求1制备得到的DEHP半抗原溶解于1mL的DMF中,然后在该溶液里加入等摩尔的DCC和NHS,室温避光反应过夜;

(2) 4℃离心去除沉淀,取上清液,并将其缓慢加入到5mL pH 9.5的碳酸氢钠缓冲液中,其缓冲液含有载体蛋白BSA或OVA,其中载体蛋白的浓度为10~15mg/mL,在4℃下反应过夜;

(3) 将步骤(2)中的反应液装入透析袋,用0.9%的生理盐水透析3d,得到人工抗原;

所述混合酸酐法为:

(1) 将0.1mmol权利要求1制备得到DEHP半抗原溶于1mL DMF中,加入80μL正三丁胺,冰浴下缓慢滴加0.15mmol氯甲酸异丁酯,4℃搅拌反应1h,此为甲液;

(2) 将60mg载体蛋白BSA或OVA溶于5mL 1mol/L pH 9.6的碳酸氢钠缓冲液中,此为乙液;

(3) 将甲液缓慢滴加到乙液中,4℃磁力搅拌反应过夜,待反应完成后,装入透析袋,然后用0.9%的生理盐水透析3d,得到人工抗原。

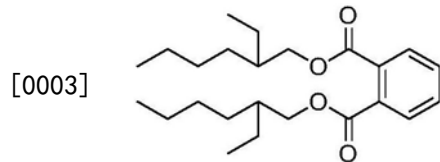
## 邻苯二甲酸二( $\alpha$ -乙基己)酯半抗原、人工抗原及其抗体制备方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全领域,更具体的说,本发明涉及邻苯二甲酸二( $\alpha$ -乙基己)酯半抗原合成、人工抗原和抗体制备,还涉及上述邻苯二甲酸二( $\alpha$ -乙基己)酯半抗原及其相应的人工抗原和抗体的制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 邻苯二甲酸二( $\alpha$ -乙基己)酯(Di(2-ethylhexyl)phthalate),英文缩写DEHP,又名邻苯二甲酸二辛酯,分子量为390.5,25℃时该品在水中溶解度<0.01%,溶于大多数有机溶剂和烃类,其结构式为:



[0004] DEHP属邻苯二甲酸酯类塑化剂,是一种工业原料,是目前使用最广和产量最大的塑化剂。DEHP会被食物及水所吸收,与含有DEHP容器接触的食品也会受到污染,也有不法厂商将其作为添加剂用于食品生产。

[0005] 世界卫生组织指出邻苯二甲酸酯类进入人体和动物体内会有类似雌激素的作用,会干扰内分泌,会造成内分泌失调,阻害生物体生殖机能,包括生殖率降低、流产、天生缺陷、异常的精子数、睾丸损害,还会引发恶性肿瘤或造成畸形儿。临床研究表明服用或长期暴露于DEHP中也会对于心肌细胞有显著的影响,导致心脏不规则节律。因此,DEHP在食品中属于违禁的工业原料。

[0006] 对食品中的邻苯二甲酸酯类塑化剂的检测主要以理化分析法(如GC-MS、HPLC)为主。然而应用仪器方法时,其灵敏度受样品的净化、浓缩等步骤的影响很大,测定方法复杂、繁琐,检测通量小,需要培养专业人员进行检测,检测成本昂贵,不能实现大批量样品的快速检测分析。因此,有必要研制更加简单快捷方便的检测方法。

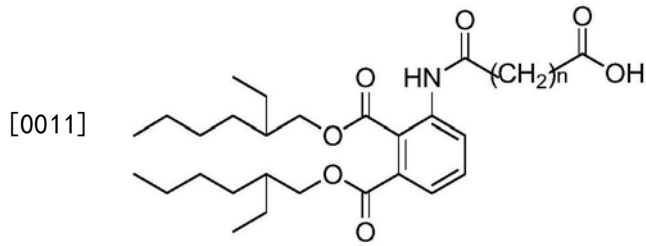
[0007] 免疫检测方法,是目前食品安全快速检测的重要方法之一,检测成本很低,使用简单,适合大量样品的筛选检测,已经在食品安全检测中发挥了重要作用。

### 发明内容

[0008] 本发明解决的技术问题是提供一种邻苯二甲酸二( $\alpha$ -乙基己)酯半抗原合成、人工抗原和抗体制备,还涉及上述邻苯二甲酸二( $\alpha$ -乙基己)酯半抗原及其相应的人工抗原和抗体的制备方法和应用,以通过设计合成DEHP半抗原与人工抗原,免疫动物获得高特异性抗体并应用于免疫检测。

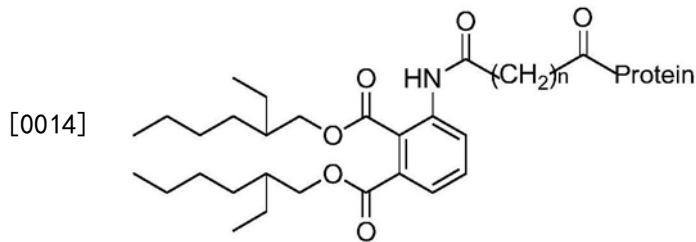
[0009] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:

[0010] 一种DEHP半抗原的分子结构式为:



[0012] n为2或3;所述的n优选为2。

[0013] 所述的DEHP半抗原与载体蛋白结合,得到DEHP人工抗原,其分子结构式为:



[0015] n为2或3;所述的n优选为2;所述的载体蛋白为牛血清白蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)。

[0016] 一种DEHP抗体能与DEHP人工抗原发生特异性免疫反应的免疫球蛋白。

[0017] 所述DEHP半抗原的合成方法,包括以下步骤:

[0018] (1) 按摩尔比为2:1~3:1将浓硝酸与DEHP置于圆底烧瓶中,冰浴条件下滴加到2倍于浓硝酸摩尔量的浓硫酸中,磁力搅拌,反应至室温,再60℃回流反应5h,期间用TLC监控,用1mol/L的氢氧化钠溶液中和反应液至弱碱性,乙酸乙酯萃取3次,有机相于旋转蒸发仪上减压蒸干得到粗的硝化产物DEHP-NO<sub>2</sub>,过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为2:1~3:1的氯仿/环己烷洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的硝化产物DEHP-NO<sub>2</sub>。

[0019] (2) 按摩尔比为1:3:3将DEHP-NO<sub>2</sub>、NH<sub>4</sub>Cl、铁粉置于圆底烧瓶中,添加到适量的70%乙醇溶液中,磁力搅拌,50℃回流反应5h,期间用TLC监控;反应结束后,向反应液中加入100mL无水乙醇,滤去铁粉,收集滤液,于旋转蒸发仪浓缩近干;向浓缩液中加30mL水,用乙酸乙酯萃取3次,收集有机相,蒸干,得到粗产物DEHP-NH<sub>2</sub>;过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为5:1~4:1的氯仿/甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的还原产物DEHP-NH<sub>2</sub>。

[0020] (3) 将0.1mmol纯化的DEHP-NH<sub>2</sub>与0.15mmol酸酐于无水吡啶中40℃搅拌反应过夜,反应液旋转蒸发仪浓缩得到黏稠液体,过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为6:1~4:1的氯仿/甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到产物即为DEHP半抗原。

[0021] 所述的浓硝酸为65%的硝酸,酸酐为丁二酸酐或戊二酸酐。

[0022] 所述DEHP人工抗原的制备方法为活泼酯法与混合酸酐法。

[0023] 所述活泼酯方法包括以下步骤:

[0024] (1) 将0.1mmol的DEHP半抗原溶解于1mL的DMF中,然后在该溶液里加入等摩尔的DCC和NHS,室温避光反应过夜;

[0025] (2) 4℃离心去除沉淀,取上清液,并将其缓慢加入到5mL pH 9.5的碳酸氢钠缓冲液中,其缓冲液含有载体蛋白BSA或OVA,其中载体蛋白的浓度为10~15mg/mL,在4℃下反应过夜;

[0026] (3) 将步骤(2)中的反应液装入透析袋,用0.9%的生理盐水透析3d,得到人工抗

原。

[0027] 所述混合酸酐法包括以下步骤：

[0028] (1) 将0.1mmol DEHP半抗原溶于1mL DMF中，加入80 $\mu$ L正三丁胺，冰浴下缓慢滴加0.15mmol氯甲酸异丁酯，4 $^{\circ}$ C搅拌反应1h，此为甲液；

[0029] (2) 将60mg载体蛋白BSA或OVA溶于5mL 1mol/L pH 9.6的碳酸氢钠缓冲液中，此为乙液；

[0030] (3) 将甲液缓慢滴加到乙液中，4 $^{\circ}$ C磁力搅拌反应过夜，待反应完成后，装入透析袋，然后用0.9%的生理盐水透析3d，得到人工抗原。

[0031] 所述DEHP抗体的制备方法，其具体步骤包括：

[0032] (1) 实验选用2个月的健康雌性的Ba1b/c小鼠或新西兰兔作为实验对象，免疫剂量基础免疫为0.25~1mg/Kg，加强免疫的剂量为0.5~1mg/Kg。采用背部皮下多点注射，每隔15d加强免疫一次，第4次免疫后8~10天内，静脉采血，测定效价和特异性，待其血清效价和特异性合格后，兔子采用心脏采血，分离出抗血清；或用小鼠脾细胞进行细胞融合，获得杂交瘤细胞，进而获得单克隆抗体；

[0033] (2) 采用辛酸-硫酸铵法或Protein G/A亲和层析纯化，得到兔抗血清或小鼠腹水中的免疫球蛋白，即为DEHP抗体。

[0034] 所述的DEHP抗体用于制备检测邻苯二甲酸二( $\alpha$ -乙基己)酯在食品中的残留量的免疫检测剂的应用。

[0035] 所述的免疫检测为酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0036] 所述的酶联免疫吸附测定法为间接竞争法。

[0037] 本发明具有如下有益效果：

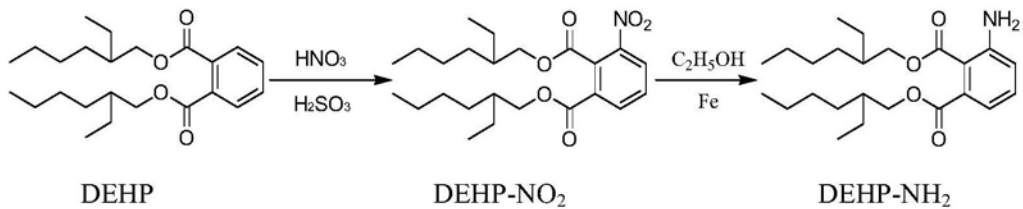
[0038] 本发明中由于DEHP是小分子物质(分子量小于1000Da)，本身不具备免疫原性，必须与大分子蛋白偶联制备为人工抗原，才能使动物产生抗体。由于DEHP本身不具备活性基团，不能与大分子蛋白偶联，因此需要对DEHP进行分子改造，引入-NH<sub>2</sub>、-COOH等活性基团，合成DEHP半抗原。本发明以DEHP为原料，与硝酸、氯化铵、丁二酸酐反应制得DEHP半抗原；通过活泼酯法或混合酸酐法将DEHP半抗原与载体蛋白偶联制得DEHP人工抗原。将DEHP人工抗原免疫动物获得对DEHPD的特异性抗体。应用本发明所制备的DEHP人工抗原和抗体的免疫检测分析方法，与仪器方法相比较，该免疫检测方法成本低，不到仪器检测费用的10%；同时，应用本发明制备的DEHP人工抗原和抗体的免疫检测分析方法能够同时检测大批量的样品，速度快，操作简单，适用于食品中DEHP残留的现场快速检测。

## 具体实施方式

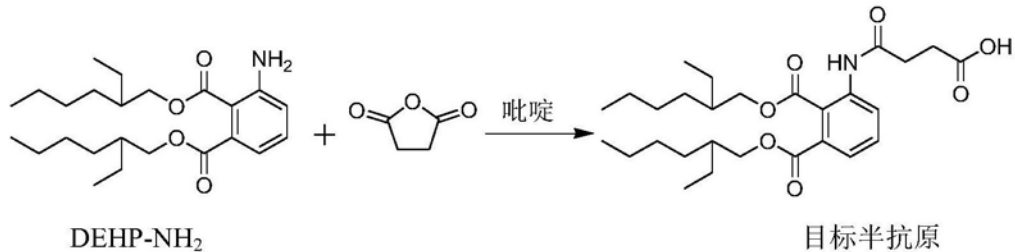
[0039] 实施例1

[0040] DEHP半抗原合成

[0041] 当n=2时，DEHP半抗原制备的路线如下：



[0042]



[0043] 将4mL DEHP (10mmol) 与1mL 65%的浓硝酸 (20mmol) 置于圆底烧瓶中,冰浴条件下加入5mL浓硫酸,磁力搅拌,反应至室温,再60℃回流反应5h,期间用TLC监控。反应结束后,用1mol/L的氢氧化钠溶液中和反应液至弱碱性,乙酸乙酯萃取3次,有机相于旋转蒸发仪上减压蒸干得到粗的硝化产物DEHP-NO<sub>2</sub>,过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为2:1~3:1的氯仿/环己烷洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的硝化产物DEHP-NO<sub>2</sub>。

[0044] 1mmol DEHP-NO<sub>2</sub>、3mmolNH<sub>4</sub>Cl、3mmol铁粉置于圆底烧瓶中,添加到20mL 70%的乙醇溶液中,磁力搅拌,50℃回流反应5h,期间用TLC监控。反应结束后,向反应液中加入100mL无水乙醇,滤去铁粉,收集滤液,于旋转蒸发仪浓缩近干;向浓缩液中加30mL水,用乙酸乙酯萃取3次,收集有机相,蒸干,得到粗产物DEHP-NH<sub>2</sub>;过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为5:1~4:1的氯仿/甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到纯化的还原产物DEHP-NH<sub>2</sub>。

[0045] 将0.1mmol纯化的DEHP-NH<sub>2</sub>与0.15mmol丁二酸酐于无水吡啶中40℃搅拌反应过夜,反应液旋转蒸发仪浓缩得到黏稠液体,过硅胶柱,收集洗脱液为V/V为6:1~4:1的氯仿/甲醇洗脱相,洗脱液浓缩至干,得到产物即为目标半抗原。

[0046] 实施例2

[0047] 人工抗原的合成

[0048] 2.1免疫抗原的合成与纯化:

[0049] 免疫抗原采用活泼酯法。将50μmol的DEHP半抗原溶解于1mL的DMF中,然后在该溶液里加入等摩尔的DCC和NHS,室温避光反应过夜,4℃离心去除沉淀,取上清液,并将其缓慢加入到5mL pH 9.5的碳酸氢钠缓冲液中,其缓冲液含有载体蛋白BSA,其中载体蛋白的浓度为10mg/mL。将混合物在4℃下反应过夜,待反应完成后,装入透析袋,然后用0.9%的生理盐水透析3d。得到透析好的溶液即为人工免疫抗原DEHP-BSA。

[0050] 2.2包被抗原的合成与纯化:

[0051] 包被抗原采用混合酸酐法。将0.1mmol DEHP半抗原溶于1mL DMF中,加入80μL正三丁胺,冰浴下缓慢滴加0.15mmol氯甲酸异丁酯,4℃搅拌反应1h,此为甲液。将60mg载体蛋白OVA溶于5mL 1mol/L pH 9.6的碳酸氢钠缓冲液中,此为乙液。将甲液缓慢滴加到乙液中,4℃磁力搅拌反应过夜,待反应完成后,装入透析袋,然后用0.9%的生理盐水透析3d。得到透析好的溶液即为人工包被抗原DEHP-OVA。

[0052] 实施例3:

[0053] 人工抗原的鉴定:

[0054] 按照分光光度法测定半抗原、载体蛋白以及偶联物的最大吸收值,计算偶联物的偶联比。在200-400nm之间分别对原料、BSA、OVA及偶联物紫外吸收光谱进行扫描,鉴定半抗原与载体蛋白是否发生偶联。同时估算半抗原和载体蛋白偶联比:

[0055] 经计算结果如下:

[0056] DEHP-BSA 18.5:1 DEHP-OVA 6.8:1

[0057] 实施例4:

[0058] 免疫动物及多克隆抗体制备

[0059] 4.1免疫动物制备抗血清

[0060] 实验选用3月、体重2~2.5kg健康雌性的新西兰兔作为实验对象,同时免疫两只兔子,免疫剂量基础免疫为0.25~1mg/kg,加强免疫的剂量为0.5~1mg/kg。采用背部皮下多点注射,每隔15d加强免疫一次,第4次免疫后8~10天内,耳缘静脉采血,测定效价和特异性,待其血清效价和特异性合格后,兔子采用心脏采血,分离出康血清。

[0061] 4.2抗体的纯化

[0062] 纯化抗体可以采用辛酸-硫酸铵盐析法,也可以采用Protein G/A亲和层析纯化。

[0063] 实施例5:DEHP酶联免疫方法建立

[0064] 5.1包被:采用分装的DEHP-OVA进行包被,包被浓度为0.1μg/mL包被抗原。在96孔酶标板上每孔加入100μL含有包被抗原的包被液,4℃过夜。

[0065] 5.2封闭:取出包被好的酶标板,使用洗液洗板两次,每孔加入150μL封闭液,与37℃温箱中温育3h。后将封闭液甩干,置于37℃烘箱1h。

[0066] 5.3点板:在封闭好的半条中每孔加入经系列稀释制备的DEHP各浓度标准液50μL,再加入稀释8000倍的抗体稀释液每孔50μL。在37℃恒温箱里反应30min。使用洗液洗板3次。

[0067] 5.4加酶标二抗每孔加入经1:10000稀释的羊抗兔辣根过氧化物酶稀释液100μL,放在37℃恒温箱里反应30min。使用洗液洗板3次。

[0068] 5.5显色:每孔加入底物TMB-过氧化氢溶液100μL,37℃显色15min后用50μL的10%的H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>终止反应。在酶标仪上测定450nm波长下的吸光值。根据百分吸光度值与DEHP浓度之间的半对数关系作图即得到标准曲线。

[0069] 所述百分吸光度值的计算式为:

[0070] 百分吸光度值(%) = (B/B<sub>0</sub>) × 100

[0071] 其中,B为标准溶液的平均吸光值,B<sub>0</sub>为0浓度标准溶液的平均吸光度值。

[0072] 虽然本发明的较佳实施例已揭露如上,本发明并不受限于上述实施例,任何本技术领域内的技术人员,在不脱离本发明所揭露的范围内,当可作些许的改动与调整。

专利名称(译)	邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯半抗原、人工抗原及其抗体制备方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN104744294B</a>	公开(公告)日	2018-01-09
申请号	CN201410336370.2	申请日	2014-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	广州城市职业学院		
申请(专利权)人(译)	广州城市职业学院		
当前申请(专利权)人(译)	广州城市职业学院		
[标]发明人	张挺 谭龙飞 江津津 彭述辉 黎海彬		
发明人	张挺 谭龙飞 江津津 彭述辉 黎海彬		
IPC分类号	C07C239/20 C07C231/02 C07C233/54 C07K14/765 C07K14/77 C07K16/44 G01N33/53		
代理人(译)	张超		
其他公开文献	CN104744294A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

## 摘要(译)

本发明公开邻苯二甲酸二(α-乙基己)酯(英文缩写DEHP)半抗原、人工抗原和抗体制备及应用,属于食品安全领域。本发明中以DEHP为原料,经硝化反应和还原反应,制得带氨基基团的中间产物,再与丁二酸酐、戊二酸酐等试剂反应生成带羧基基团的半抗原;然后通过活泼脂法或者混合酸酐法与蛋白质偶联制备人工抗原。将人工抗原免疫动物后产生对DEHP的特异性抗体。用该抗体建立免疫检测可用于DEHP的现场快速检测,对实现食品安全的快速检测具有重要现实意义。

