

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-501406

(P2007-501406A)

(43) 公表日 平成19年1月25日(2007.1.25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 30/06 (2006.01)	GO 1 N 30/06	E
GO 1 N 30/88 (2006.01)	GO 1 N 30/88	G
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2006-530438 (P2006-530438)	(71) 出願人	590000514
(86) (22) 出願日	平成16年5月14日 (2004. 5. 14)		コミツサリア タ レネルジー アトミーク
(85) 翻訳文提出日	平成17年4月26日 (2005. 4. 26)		フランス国 パリ リュ ルブラン 25
(86) 国際出願番号	PCT/FR2004/050194		イムーブル “ル ポナン デ”
(87) 国際公開番号	W02004/104579	(74) 代理人	100064908
(87) 国際公開日	平成16年12月2日 (2004. 12. 2)		弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	03/50160	(74) 代理人	100089037
(32) 優先日	平成15年5月20日 (2003. 5. 20)		弁理士 渡邊 隆
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100108453
(31) 優先権主張番号	03/50167		弁理士 村山 靖彦
(32) 優先日	平成15年5月22日 (2003. 5. 22)	(74) 代理人	100110364
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フルオリドまたはフッ化水素の検出方法およびその検出キット

(57) 【要約】

本発明は、サンプル中のフルオリド(F⁻)またはフッ化水素(HF)の濃度を検出および/またはドーズする(dosing)ための方法に関し、前記方法は、測定溶液を得るために水溶液中でサンプルをシリル化有機化合物と接触させる段階であって、フルオリドまたはフッ化水素酸が存在する場合、前記有機シリル化合物は脱シリル化され、それによって、シリル化有機化合物と脱シリル化有機化合物を、識別される形で検出および/またはドーズすることができる段階と、サンプル中にフルオリドまたはフッ化水素が存在する場合に発生する、脱シリル化有機化合物の出現または有機性のシリル化化合物の消失を、前記測定溶液中で検出および/またはドーズする段階とを含む。本発明によって、フッ化水素またはフルオリドの存在を非常に実際的かつ容易な形で、10⁻² l HF/10⁶ l 空気(10ppb)、また0.5~1 μg/mlのHFの溶液中濃度で検出することが可能になる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

サンプル中のフルオリド (F⁻) またはフッ化水素 (HF) を検出および / または濃度測定する方法であって、

測定溶液を得るために、水溶液中で前記サンプルをシリル化有機化合物と接触させるステップであって、ここで前記シリル化有機化合物は、フッ化水素酸またはフルオリドが存在する場合に脱シリル化され、前記シリル化有機化合物と脱シリル化有機化合物は互いに独立に検出および / または測定可能であるステップと、

前記サンプル中にフルオリドまたはフッ化水素が存在している場合に起こる、脱シリル化有機化合物の出現またはシリル化有機化合物の消失を、前記測定溶液中で検出および /

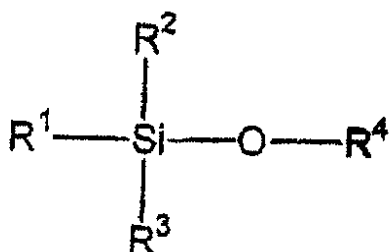
10

を含む方法。

【請求項2】

前記シリル化有機化合物の式が

【化1】



20

(式中、R¹、R²およびR³はC₁~C₆アルキルから独立に選択され、R⁴は前記有機化合物である)

である請求項1に記載の方法。

【請求項3】

R¹、R²およびR³がメチル、エチル、プロピルおよびブチルからなる群から独立に選択される請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記有機化合物が250~200000gモル⁻¹の分子量を有するヒドロキシ化化合物である請求項1、2または3のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項5】

前記有機化合物が、エストラジオール、ペプチド、ホモバニリン酸、アンフォテリシン、ステロイド、サイトカイン、アラキドン酸またはそれらの誘導体からなる群から選択されるヒドロキシ化化合物である請求項1または2に記載の方法。

【請求項6】

前記測定溶液中での、脱シリル化有機化合物の出現またはシリル化有機化合物の消失の検出および / または測定をガスクロマトグラフィーで実施する請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記非シリル化または脱シリル化有機化合物に対するか、シリル化有機化合物に対する1種または複数の抗体を用いた免疫学的試験によって、前記測定溶液中での、脱シリル化有機化合物の出現またはシリル化有機化合物の消失の検出および / または測定を実施する請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項8】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項7に記載の方法。

【請求項9】

前記免疫学的試験が競合または非競合イムノアッセイである請求項7に記載の方法。

【請求項10】

前記有機化合物がエストラジオールまたはその誘導体の1つである請求項1または7に記

50

載の方法。

【請求項 1 1】

前記有機化合物が、エストラ-1,3,5-トリエン-3,17 μ または17 μ -ジオール、あるいはそれらの誘導体からなる群から選択される請求項1または7に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記接触ステップにおいて、前記シリル化有機化合物を1~2000ng/mlの濃度で使用する、請求項1ないし11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

前記接触水溶液のpHを緩衝材で処理してpH4.5~5.5にする、請求項1ないし12のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 4】

前記接触ステップを54~64 の温度で実施する、請求項1ないし13のいずれか一項に記載の方法。

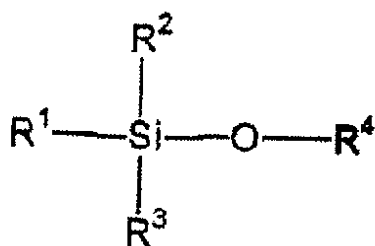
【請求項 1 5】

以下の試薬、すなわち、フッ素またはフッ化水素酸が存在する場合に脱シリル化されるシリル化有機化合物と、水溶液中で、脱シリル化有機化合物の出現またはシリル化有機化合物の消失を検出するための手段としての試薬とを含む、サンプル中のフルオリド(F⁻)またはフッ化水素(HF)の濃度を検出および/または測定するためのキット。

【請求項 1 6】

前記シリル化有機化合物の式が

【化 2】



(式中、R¹、R²およびR³はC₁~C₆アルキルから独立に選択され、R⁴は前記有機化合物である)

である請求項15に記載のキット。

【請求項 1 7】

R¹、R²およびR³がメチル、エチル、プロピルおよびブチルからなる群から独立に選択される請求項16に記載のキット。

【請求項 1 8】

前記有機化合物が250~200000gモル⁻¹の分子量を有するヒドロキシ化化合物である請求項15、16または17のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 1 9】

前記有機化合物がエストラジオール、ペプチド、ホモバニリン酸、アンフォテリシン、ステロイド、サイトカインまたはアラキドン酸あるいはそれらの誘導体からなる群から選択されるヒドロキシ化化合物である請求項15または16に記載のキット。

【請求項 2 0】

前記有機化合物がエストラジオールまたはその誘導体の1つである請求項15または16に記載のキット。

【請求項 2 1】

前記有機化合物が、エストラ-1,3,5-トリエン-3,17 μ または17 μ -ジオール、あるいはそれらの誘導体からなる群から選択される請求項15に記載のキット。

【請求項 2 2】

前記非シリル化または脱シリル化有機化合物に対するか、前記シリル化有機化合物に対

10

20

30

40

50

する1つまたは複数の抗体をさらに含む請求項15から21のいずれか一項に記載のキット。

【請求項23】

競合イムノアッセイの実施に必要な試薬および抗体、または非競合イムノアッセイの実施に必要な試薬および抗体をさらに含む請求項22に記載のキット。

【請求項24】

接触および/または検出および/または測定するステップのためのレセプタクルの働きをする1個または複数のウェルが中に形成されているポリスチレンストリップをさらに含む請求項15、22または23に記載のキット。

【請求項25】

ウェルがマウス抗エストロジオール抗体に対する抗体でコーティングされている請求項14に記載のキット。 10

【請求項26】

シリル化エストロジオールがウェルの底部に結合されている請求項24に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サンプル中に存在するフルオリド(F^-) (fluoride)またはフッ化水素(HF)の濃度を検出および/または測定するための方法、およびその方法を実施するための検出キットに関する。本発明によって、環境汚染物質を効率的にかつ高感度で測定することが可能になる。本発明は、完全に独創的であって容易に実施できる方法に基づくものである。 20

【背景技術】

【0002】

フッ化水素は強い無機酸であり、無色で水に非常に溶解し易く、溶解してフッ化水素酸を形成する。HFは産業界で広く使用されているガスであり、特にポリマー、冷却液および消火用製品の製造、アルミニウム精製、核燃料製造およびエレクトロニクス部品の製造のために使用される。さらに、石炭、家庭廃棄物もしくは産業廃棄物およびプラスチックの燃焼の際に放出される生成物である。

【0003】

HFは 3×10^{-2} l HF/10⁶ l 空気(30ppm)を超えるオーダーの濃度で有毒である。HFは皮膚/粘膜の曝露によってもたらされるやけど、ならびに上気道および下気道の炎症を引き起こす可能性のある強力な刺激物質である。さらにHFの吸収によって、代謝障害がもたらされる可能性がある。 30

【0004】

さらにこの生成物は鉄、青銅およびガラスなどの多くの材料に対して非常に腐食性である。

【0005】

したがって、危険な濃度のHFが検出された場合に適切な手段をとれるようにするために、特に工業排出物中および実験室ならびにこれらの周囲の環境において、人々や環境や工業的な装置を保護するのに、HFの濃度を監視するための手段を確立することが特に必要である。多くの国でHFの許容大気濃度基準が確立されている。これらの基準は一般に、($5 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4}$ l) HF/10⁶ l 空気(0.05 ~ 0.5ppm)である。 40

【0006】

以下の説明では、角括弧[]内の引用番号は本明細書に添付の文献一覧表の番号に対応する。

【0007】

今日まで、HFまたはフッ化物イオンを測定するための多くの方法が開発され報告されている。一般にこれらの技術は、化学的、電気化学的、分光学的または光学的な検出法に基づくものである。HFの量を検出し測定することができる多くの装置が市販されている。

【0008】

サンプル中のHFの量を検出し測定するのに使用できるいくつかの電気化学的方法、分光 50

光度法およびクロマトグラフ法が、添付の参考文献一覧表の文献[1]に記載されている。

【0009】

特定の電極を使用する、ID-110で表示された参照方法がOSHAウェブサイト上に記載されている。参考文献番号[2]である。この方法の感度は 1.2×10^{-2} l HF/ 10^6 l 空気(12ppb)であるが、この方法は現地で適用するのが難しい実験室試験用である。現地用の方法に関する限り、これらの感度はより劣り、0.2 l HF/ 10^6 l 空気(200ppb)のオーダーである。

【0010】

他の方法では、炭化ケイ素基板(「金属絶縁膜半導体(Metal Insulator Semiconductor):MIS)をベースにした検出器を用いる。この方法は、例えば参考文献番号[3]の文献に記載されている。HF測定用の種々の電子検出計器が様々な製造業者によって提案されている。その例としては、ウェブサイト上に記載されている文献番号[4]のBionics Instrument社のOEM Fluorine Sensor(登録商標)計器またはNORSK ELEKTRO OPTIKK A/S社のLaserGas(登録商標)計器がある。

10

【0011】

これらの計器に付与されている検出限界は、ガス媒体の場合、100万分の1もしくは10億分の1の単位(ppmもしくはppb)で表され、水性媒体の場合、ミリリットル当たりのナノグラムもしくはマイクログラム(ng/mlもしくは μ g/ml)で表される。一般に検出限界は、 10^{-4} l HF/ 10^6 l 空気(0.1ppm)のオーダーであり、溶液の場合、最も良好な装置の場合で(1~100ng)HF/mlである。

【0012】

残念ながら、これらの方法および計器はスペースを要し、移動が困難であり、しばしば実施が難しく、また高価であることが多い。

20

【0013】

HFを「検出するための理想的な手段」は以下の特徴を兼ね備えたものでなければならない。

- 感度:少なくとも 10^{-4} l HF/ 10^6 l 空気(0.1ppm)の測定である。
- コスト:必要な場合、容易に検出器の数を増やすことができるようにするために、コストは余り高くてはならない。
- 利用可能性:公開されている技術の多くについては市販品がない。その理由は、実施するのが特に難しいためである。
- 移動性:様々な場所で使用できるように、装置を容易に移動できなければならない。
- 迅速に実施できることおよび速やかに結果を使用できること。

30

【0014】

従来技術のどの方法も装置もこれらの特性を兼ね備えていないようである。

【0015】

したがって、「理想的な検出手段」の上記特徴をできる限り多く兼ね備えた新規の技術の真の必要性がある。

【非特許文献1】[1]International Society for Fluoride Research, Fluoride 31(2)、1998、74~80頁 - disponible sur le site Internet <http://www.fluoride-journal.com/98-31-2/31274-80.htm>

40

【非特許文献2】[2]Occupational Safety and Health Administration", <http://www.osha-dlc.gov/dts/sltc/methods/inorganic/id110/id110.html>

【非特許文献3】[3]Alexei Vasilievら、Elsevier, Analytica chimica acta, Sensor and Actuators、B 49(1998)、133~138頁

【非特許文献4】[4]http://www.bionics-instrument.com/p_fluorine.htm

【非特許文献5】[5]Ezan Eら、「Pharmacokinetics in healthy volunteers and patients of NAc-SDKP(seraspénide), a negative regulator of hematopoiesis」、Drug Metab Dispos 1994年11月~12月;22(6):843~848頁

【非特許文献6】[6]Shi RZら、「Development of an enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibody for quantification of homovanillic acid [corrected]i

50

- n human urine samples」、Clin Chem 1998年8月;44(8 Pt 1):1674 ~ 1679頁
- 【非特許文献 7】[7]Taran F⁵、「Competitive enzyme immunoassay for urinary vanillylmandelic acid」、Clin Chim Acta 1997年8月29日;264(2):177 ~ 192頁
- 【非特許文献 8】[8]Boschelli⁵、Tetrahedron Letters 26、53295242、1985.
- 【非特許文献 9】[9]Machard S⁵、「A sensitive amphotericin B immunoassay for pharmacokinetic and distribution studies」、Antimicrob Agents Chemother 2000年3月;44(3):546 ~ 550頁
- 【非特許文献 10】[10]Cleary JD⁵、「Amphotericin B enzyme-linked immunosorbent assay」、Antimicrob Agents Chemother 1996年3月;40(3):637 ~ 641頁
- 【非特許文献 11】[11]Fitzgerald RL, Herold DA.、「Serum total testosterone: immunoassay compared with negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry」、Clin Chem 1996年5月;42(5):749 ~ 755頁 10
- 【非特許文献 12】[12]Luceri F⁵、「Gas chromatography-mass spectrometry measurement of 6-beta-OH-cortisol/cortisol ratio in human urine:a specific marker of enzymatic induction」、Clin Chem Lab Med 2001年12月;39(12):1234 ~ 1249頁
- 【非特許文献 13】[13]Munro CJ⁵、「Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay」、Clin Chem 1991年6月;37(6):838 ~ 844頁
- 【非特許文献 14】[14]Metaye T⁵、「Comparative measurement of progesterone receptors in breast cancer by biochemical and immunoenzymatic assays」、Ann Biol Clin (Paris) 1990年;48(10):732 ~ 736頁 20
- 【非特許文献 15】[15]Foekens JA⁵、「Comparison of enzyme immunoassay and dextran-coated charcoal techniques for progesterone receptor determination in human breast cancer cytosols」、J Steroid Biochem 1988年6月;29(6):571574頁
- 【非特許文献 16】[16]Hosoda H⁵、「Sensitivity of steroid enzyme immunoassays. Comparison of four label enzymes in an assay system using a monoclonal anti-steroid antibody」、Chem Pharm Bull (Tokyo) 1989年7月;37(7):1834 ~ 1837頁
- 【非特許文献 17】[17]Hubl W⁵、「An improved solid-phase enzyme and luminescent immunoassay system for steroid hormones and digoxin」、Clin Chem 1988年12月;34(12):2521 ~ 2523頁 30
- 【非特許文献 18】[18]Hocart CH⁵、「Mass spectrometry and chromatography of t-butyl dimethylsilyl derivatives of cytokinin bases」、Cytokine Anal Biochem 1986年2月15日;153(1):85 ~ 96頁
- 【非特許文献 19】[19]Garcia de Salamone IE⁵、「Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants」、Can J Microbiol 2001年5月;47(5):404 ~ 411頁
- 【非特許文献 20】[20]Trione EJ⁵、「A quantitative fluorescence enzyme immunoassay for plant cytokinins」、Anal Biochem 1987年4月;162(1):301 ~ 308頁
- 【非特許文献 21】[21]Steffenrud S⁵、「Gas chromatography-mass spectrometry of monohydroxyeicosatetraenoic acids as their methyl esters trimethylsilyl, allyl dimethylsilyl and tert.-butyl dimethylsilyl ethers」、J Chromatogr 1987年5月15日;416(2):219 ~ 235頁 40
- 【非特許文献 22】[22]Smith BJ⁵、「Measurement of plasma prostaglandin E2 using capillary gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry」、Res Commun Chem Pathol Pharmacol 1983年4月;40(1):73 ~ 86頁
- 【非特許文献 23】[23]David Percival M.、「Continuous spectrophotometric assay amenable to 96-well plate format for prostaglandin E synthase activity」、Anal Biochem 2003年2月15日;313(2):307 ~ 310頁
- 【非特許文献 24】[24]Hoffman SW⁵、「A reliable and sensitive enzyme immunoassay 50

y method for measuring 8-isoprostaglandin F2 alpha: a marker for lipid peroxidation after experimental brain injury」、Neurosci Methods 1996年10月;68(2):133~136頁

【非特許文献 2 5】[25]Knapp RD 1979 Handbook of analytical derivatization reactions、New York John Willey and sons

【非特許文献 2 6】[26]Lau HL、1966、J Gas Chromatography 4,136

【非特許文献 2 7】[27]Tallent WH、「Bis(trimethylsilyl)acetamide in the silylation of lipolysis products for gas-liquid chromatography」、J Lipid Res 1968年1月;9(1):146~148頁

【非特許文献 2 8】[28]Mawhinney TP、「Gas-liquid chromatography and mass spectral analysis of mono-,di- and tricarboxylates as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives」、J Chromatogr 1986年6月27日;361:117 10

【非特許文献 2 9】[29]Mawhinney TP、「Simultaneous determination of N-acetylglucosamine,N-acetylgalactosamine,Nacetylglucosaminitol and N-acetylgalactosaminitol by gas-liquid chromatography」、J Chromatogr 1986年1月3日;351(1):91~102頁

【非特許文献 3 0】[30]Bazan AC and Knapp DR、「Improved derivative of 6-ketoprostaglandin F1 for gas chromatography-mass spectrometric analysis」、J Chromatography 1982、236、201~207頁

【非特許文献 3 1】[31]Choi MH、「Determination of estrone and 17 beta-estradiol in human hair by gas chromatography-mass spectrometry」、Analyst 2000年4月;125(4):711~714頁 20

【非特許文献 3 2】[32]Dehennin L、「Estradiol-17 beta determined in plasma by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring of mixed silyl etherperfluoroacyl ester derivatives and use of various stable-isotope-labeled internal standards」、Clin Chem 1989年4月;35(4):532頁~

【非特許文献 3 3】[33]Andersson SH、「Analysis of profiles of unconjugated steroids in rat testicular tissue by gas chromatography-mass spectrometry」、J Steroid Biochem 1985年10月;23(4):469頁~

【非特許文献 3 4】[34]Ishikawa E、「Development and applications of sensitive enzyme immunoassay for antibodies: a review」、J Clin Lab Anal 1989;3(4):252~265頁 30

【非特許文献 3 5】[35]Ishikawa E、「Development and clinical application of sensitive enzyme immunoassay for macromolecular antigens-a review」、Clin Biochem 1987年12月;20(6):375385頁

【非特許文献 3 6】[36]Oellerich M、「Enzyme-immunoassay: a review」、J Clin Chem Clin Biochem 1984年12月;22(12):895~904頁

【非特許文献 3 7】[37]O'Sullivan MJ、「Enzyme immunoassay: a review」、Ann Clin Biochem 1979年9月;16(5):221~240頁

【非特許文献 3 8】[38]EZAN E、「Strategies for developing specific and sensitive radioimmunoassays.In: Handbook of Pharmacology : Radioimmunoassay in basic and clinical pharmacology (Patrono C.and Beskar P.,eds)」82(1987)、143~179頁 40

【非特許文献 3 9】[39]Buscarlet L、「Cross-linking of 17 beta-estradiol to monoclonal antibodies by direct UV irradiation: application to an enzyme immunoassay」、Anal Chem 1999年3月1日;71(5):1002~1008頁

【非特許文献 4 0】[40]Nakagomi M、「Enzyme immunoassay for the measurement of 17-alpha-estradiol 17-N-acetylglucosaminide in rabbit urine」、Steroids 1999年4月;64(4):301~307頁

【非特許文献 4 1】[41]el Jabri J、「Enzyme immunoassay for plasma estradiol using a monoclonal antibody」、J Steroid Biochem Mol Biol 1991年3月;38(3):339~343頁

【非特許文献 4 2】[42]Dhar TK、「Homogeneous enzyme immunoassay of estradiol u 50

sing estradiol-3-0-carboxymethyl ether as hapten」、Steroids 1988年5月～6月、51(5-6):519-526頁

【非特許文献43】[43]ELLMAN G.L.ら、(1961)Biochem.Pharmacol.7,88

【特許文献1】[44]欧州特許第EP-A-0139552号

【特許文献2】[45]米国特許第5,047,300号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0016】

本発明が達成しようとする目的は、具体的には、上記特徴をすべて有して、さらに従来技術の方法および装置の上記欠点を有していない、HFを検出するための方法およびキットを提供することである。 10

【課題を解決するための手段】

【0017】

本発明の目的は、測定溶液を得るために、水溶液中でサンプルをシリル化有機化合物と接触させるステップであって、フッ化水素酸またはフルオリド(F⁻)が存在する場合に前記シリル化有機化合物が脱シリル化され、シリル化有機化合物と脱シリル化有機化合物を互いに独立に検出および/または測定可能であるステップと、

前記サンプル中にフルオリド(F⁻)またはフッ化水素(HF)が存在している場合に起こる、脱シリル化有機化合物の出現またはシリル化有機化合物の消失を、前記測定溶液中で検出および/または測定するステップと 20

を含む、サンプル中のフルオリドまたはフッ化水素の濃度を検出および/または測定する方法によって達成される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

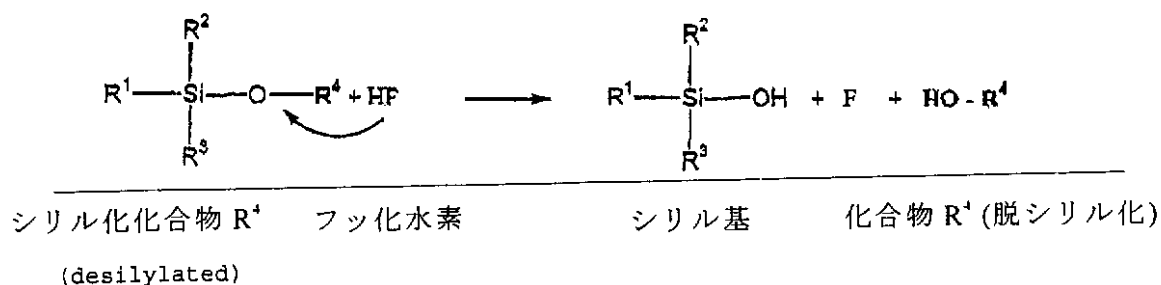
以下の説明において、「フッ素」または「フッ素およびその誘導体」という用語は、フルオリド(F⁻)、フッ化水素(HF)およびフッ化水素酸を暗黙のうちに表している。フルオリドはフッ素の塩の意味として理解されるものである。

【0019】

フッ素は非常に求核的な原子であり、そのため、求核的な置換反応に介在することができる。より具体的には、以下の化学式で示されるような形で、フッ素はケイ素-酸素(Si-O)型の結合を特異的に攻撃することができる。 30

【0020】

【化1】



40

Si-O 結合に対する HF の反応の基本原則(脱シリル化)

【0021】

この化学式において、R¹、R²およびR³は、Siの置換基であり、後者と一緒になって、本発明の意味での有機化合物R⁴のシリル化基を形成する。

【0022】

R¹、R²およびR³は、C₁～C₆アルキルから独立に選択することができる。例えば、R¹、R²およびR³はメチル、エチル、プロピルおよびブチルからなる群から独立に選択される。 50

【0023】

したがってこの化学式では、 $-R^4$ は、本発明の実施の際の、シリル化された有機化合物(左側)、または脱シリル化された有機化合物(右側)を表す。シリル化を可能にするために、この化合物は、シリル化のためにアクセス可能な少なくとも1個の水酸官能基を含有している。本発明の方法を実施する場合にその検出を容易にするために、この化合物は有利には有機化合物である。一般に、特に溶解性の問題、したがって感度ならびにフッ素検出および/または測定結果の再現性の問題から、この化合物は $250 \sim 200000 \text{gモル}^{-1}$ 、例えば $250 \sim 1500 \text{gモル}^{-1}$ の分子量を有する。この化合物は、例えば、エストラジオール、3~50個のアミノ酸残基を含有するペプチドなどのペプチド、ホモバニリン酸、アンフォテリシン、ステロイド、サイトカインおよびアラキドン酸、またはこれらの化合物の誘導体から選択されるヒドロキシル化合物であってよい。

10

【0024】

本発明で利用できるペプチドは例えば文献番号[5]に記載されており、利用できるホモバニリン酸およびその誘導体は例えば文献番号[6]および[7]に、利用できるアンフォテリシンは例えば文献番号[8]~[10]に、本発明で利用できるステロイドおよびステロイド誘導体は例えば文献番号[11]~[17]に、本発明で利用できるサイトカインおよびサイトカイン誘導体は例えば文献番号[18]~[20]に、利用できるアラキドン酸およびその誘導体は例えば文献番号[21]~[24]に記載されている。

【0025】

本質的なことは、測定溶液中において、これらの化合物の一方の消失および/または他方の出現の検出および/または測定を可能にするために、シリル化有機化合物と脱シリル化有機化合物を互いに別々に検出および/または測定できることである。したがって、本発明の方法は、シリル化有機化合物または脱シリル化有機化合物、あるいはこれら2つの化合物(ただし互いに独立に)を検出することに基づいている。

20

【0026】

本発明によれば、シリル化有機化合物に対するフッ素またはその誘導体の単純な作用によって脱シリル化有機化合物またはこの有機化合物の未変性(native)の形態が、損なわれないまま回復され得るという条件付で、選択した有機化合物にシリル基を結合させる(シリル化)ために、任意の適切な試薬を使用することができる。使用できるシリル基もしくは官能基は化学式で上記されている。

30

【0027】

本発明を実施するために、ヒドロキシル化された有機化合物をシリル化するのに使用できるものとして以下の試薬を挙げることができる。すなわち、N,O-ビス(トリメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(すなわちBTSFA)、N-メチル-N-(tert-ブチルジメチルシリル)トリフルオロアセトアミド(すなわちMTBSTFA)、トリメチルシリル(すなわちTMS)、tert-ブチルジメチルシリル(すなわちt-BDMS)、N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(すなわちBSA)、ヘキサメチルジシラザン(すなわちHMDS)、N-メチルトリメチルシリルトリフルオロアセトアミド(すなわちMSTFA)、トリメチルクロロシラン(すなわちTMCS)、トリメチルシリルイミダゾール(すなわちTMSI)等である。

【0028】

本発明の実施のために使用できるシリル化のための他の試薬および操作様式も、添付の参考文献一覧表の例えば文献番号[25]~[30]に示されている。

40

【0029】

一般にこれらの試薬は、使用が簡単であり、容易に入手でき、シリル官能基(ケイ素原子を含有する)を、選択した有機化合物に属している水酸官能基上に転移することを可能にする。

【0030】

本発明において本発明者等はさらに、シリル基によって、本発明によるフッ素の検出および/または測定の感度および選択性にばらつきがあることを実証した事実を例示するために、具体的には以下の2つの試薬すなわち、

50

トリメチルシリル(-Si(CH₃)₃)官能基を、選択された有機化合物の-OH基に結合させるBT SFA、および

ジメチルtert-ブチルシリル(Si(CH₃)₂C(CH₃)₃)官能基を、選択された有機化合物の-OH基に結合させるMTBSTFA

を挙げることができる。

【0031】

BTSFAは、それほど疎水性でもないシリルをヒドロキシル化合物に提供し、それによって、シリル化有機化合物が比較的良好な溶解性を持つことができるようにする利点を示す。しかし、本発明の方法を実施した場合、脱シリル化合物への転換に関して、得られたシリル化合物が、HFに対して常に特異性を示すとは限らない。これらのシリル化合物は、サンプル中に存在する他の酸によって脱シリル化合物に転換される可能性もある。したがって、この試薬は、フッ素についての特異性が必要とされない場合にフッ素を検出するため、あるいは、他の酸の濃度が、フッ素の検出または測定を妨害しない程度に十分低いサンプル中のフッ素を検出するために使用することが好ましい。

10

【0032】

MTBSTFAは、より疎水性のシリル基をヒドロキシル化合物に提供し、得られたシリル化合物の水性媒体中での溶解性は、BTSFAによって得られるシリル化合物の場合より劣る。他方、まったく予想していなかったことだが、実施例で実証するように、MTBSTFAでシリル化合物の脱シリル化は、試験した他の酸に対してより、HFに対してより特異的である。したがって、この試薬は、フッ素に関して特異性を求められる場合、例えばサンプルが相当な濃度で他の酸を含有する場合に、サンプル中のフッ化水素を検出するために有利に用いることができる。

20

【0033】

すなわち、本発明者等は、特にこれらの試薬を使用することによって、フッ素によるSi-O結合への攻撃の特異性も、ケイ素と酸素原子に結合している基に依存することを発見した。したがって、シリル化基を適切に選択すれば、本発明の方法を実施した場合、測定は、サンプル中の他の無機酸または有機酸および塩類によって妨害されない。-Si-(CH₃)₃を用いて本発明の方法を実施した場合、例えば、HFはHClと殆んど同じ脱シリル化活性を有している。-O-Si-(CH₃)₂-C(CH₃)₃を用いて本発明の方法を実施した場合、活性は(HClと比較したHFで)約1000倍の大きさである。

30

【0034】

上記化学式に示すように、フッ素またはその誘導体による、シリル化有機化合物の脱シリル化有機化合物への転換率は、サンプル中に存在するHFの量に比例する。したがって、本発明の方法によって、一度にかつ同時にサンプル中に存在するフッ素およびその誘導体を検出し測定することができる。本発明の本質的な特徴とその発明の本質はまさに、シリル化有機化合物と非シリル化(脱シリル化)有機化合物との間の差を測定する検出手段を用い、それによって、フッ素の存在によって触媒作用を受けた脱シリル化を検出/定量化することによって、フルオリドおよび/またはフッ化水素を検出することにある。

【0035】

接触させるステップは、水溶液中でサンプルとシリル化有機化合物を混合することによって実施することができる。混合は、溶液中でサンプルとフッ素を単に加えることによって、あるいは、例えば機械もしくは磁気攪拌機、または超音波処理等を用いた、溶液中でのサンプルとフッ素の積極的な攪拌によって実施することができる。その目的はもちろん、互いに確実に反応するように、フッ素(もし存在すれば)とシリル化有機化合物との間の相互作用を促進することである。

40

【0036】

サンプルは液体、固体またはガス状のサンプルであってよい。サンプルが液体でない場合、サンプルと本発明のシリル化有機化合物を水溶液中で接触させるステップは、もちろん、サンプルを水溶液中に溶解させることを含む。例えば、サンプルがガスである場合バブリングによって、また、サンプルが固体である場合、攪拌しながら混合または可溶化に

50

よって溶解させる。この溶解の目的は、ガスもしくは固体サンプルのフッ素が、接触水溶液中にも存在するようにすることである。この溶解に使用される方法は当業者によく知られている。

【0037】

本発明者等は、前記接触水溶液への水混和性有機溶媒の添加によって、本発明の方法によるフッ素の検出および/または測定感度を大幅に増大させることができることを実証した。例としては、有機溶媒は、ジメチルホルムアミド(DMF)、ジメチルスルホキシド(DMSO)、エタノールまたはメタノール、あるいは当業者によく知られている同等の有機溶媒から選択することができる。すなわち、本発明者等は、そうした溶媒を使用した場合、100倍さらには500倍のフッ素検出感度の増大が測定された。例えばDMSOを用いた場合、検出感度は0.001 μ g/mlまで向上する。

10

【0038】

有機溶媒はいくつかの異なった効果をもたらす可能性がある。すなわち、シリル化有機化合物の溶解を容易にすること、脱シリル化を容易にすること、または検出中の妨害を少なくすることである(特にイムノテストの場合に注目される)。どれであれ、これらの効果のうちの一つだけでは、有機溶媒存在下での検出感度のまさに驚異的で大幅な増大を説明するには不十分である。有機溶媒は接触水溶液の1~99容積%、有利には接触水溶液の50~95容積%の範囲の量(残りは水)で存在することができる。

【0039】

この溶媒の供給源(origin)は、有利には、シリル化有機化合物を調製した後、すなわち有機化合物がシリル化された後の回収溶媒とすることができる。次いで、フッ素の水性溶液とシリル化有機化合物の有機性溶液とを混合させることによって、接触させるステップを実施することができる。あるいは、有機溶媒を接触溶液に独立に加えることができる。

20

【0040】

消失するシリル化有機化合物または出現する脱シリル化有機化合物の検出は、これらの化合物のうち的一方または他方の存在を別々に実証できるようにする、当業者によく知られた任意の手段を用いて実施することができる。例えば、その手段は、ガスクロマトグラフィーで実施する検出および/または測定、あるいは免疫学的試験で実施する検出および/または測定であってよい。

【0041】

測定を実施するためには、既知量のフッ化水素酸またはフッ素を用いるか、既知量のシリル化有機化合物もしくは非シリル化有機化合物を用いて本発明の方法を適用することによって、一般的な方法で最初に標準シリーズを決定することができる。この標準シリーズによって、次に単純な外挿でサンプル中に存在するフッ素、フッ化水素またはフッ化水素酸の量を決定することが可能になる。

30

【0042】

本発明の第1の実施形態では、検出および/または測定は、ガスクロマトグラフィーで実施することができる。その理由は、この技術が、本発明による有機化合物のシリル化された形態または脱シリル化された形態、したがって存在すればフッ素を、別々に検出および/または測定できるからである。用いられるクロマトグラフィーの技術は当業者に既知のものである。添付の参考文献一覧表の文献番号[31]~[33]に記載されている技術が例として挙げられる。

40

【0043】

第1の実施形態で使用できる有機化合物は上記のヒドロキシ化された有機化合物でよい。シリル化の試薬および技術も上記のものでよい。

【0044】

本発明の第2の実施形態では、非シリル化有機化合物の出現またはシリル化有機化合物の消失の検出および/または測定に免疫学的試験を用いる、すなわち非シリル化有機化合物かまたはシリル化有機化合物のどちらかに対する抗体を用いて実施するのが有利である。従来技術では、この種のアプローチは開示されていない。さらに本実施形態によって、

50

従来の技術より高感度でフッ素を検出することが可能になる。

【0045】

一般的な方法では、抗体は、検出可能な抗体/抗原複合体を形成させるために、非常に高い特異性で抗原と称される構造物を認識しそれに結合することができるタンパク質である。しかし、HFは非常にサイズの小さい分子なので、HFに対する抗体を作るのは不可能である。直接HFに対する抗体を作ることが不可能なので、本発明者等は、上記したフッ素の化学的特性、および、動物に注射した場合に抗体の発生をもたらす特徴を示す特定のシリル化有機化合物を用いることをもとにした独自の方策を取り入れた。

【0046】

第2の実施形態で使用できる有機化合物は、1個または複数の水酸基を有する有機化合物である。これらの有機化合物は、本発明の意味の範囲内でシリル基が結合するのを可能にし、それを注射された動物中で、シリル化有機化合物または非シリル化有機化合物に対する抗体の特異的な生成を誘発する。これらの有機化合物は一般に $250 \sim 200000 \text{gモル}^{-1}$ 、例えば $250 \sim 1500 \text{gモル}^{-1}$ の分子量を有している。これらの有機化合物は、例えば、上記のヒドロキシ化された有機化合物であってよく、例えばエストラジオール;ペプチド、例えば3~50個のアミノ酸残基を含むペプチド、例えば文献番号[5]に記載のテトラペプチドアセチル化Ser-Asp-Lys-Pro(AcSDKP);ホモバニリン酸;アンフォテリシン;ステロイド;サイトカイン;アラキドン酸またはこれらの化合物の誘導體から選択される。これらの有機化合物は、例えば文献番号[5]~[24]に記載のものなどの化合物であってよい。

10

【0047】

例示的なものとしては、エストラジオールまたはその誘導體を使用することができる。本発明によれば、これらが、抗体の生成をもたらすことができるという条件で、かつ、本発明の意味においてシリル化され得るという条件で、動物例えばマウスに注射した場合、「エストラジオール」は例えばエストラチエン-1,3,5-ジオール-3,17 μ または17 μ -ジオールあるいはその誘導體、あるいは他の同等の化合物を意味するものと理解される。

20

【0048】

本発明者等によって得られ、かつ本発明で使用することができるシリル化エストラジオールの例を以下に示す。エストラジオールは-OH官能基を有しており、以下に示すように、Si-O結合によって、この官能基にシリル基を結合させることができる(例えば、添付の図1に示す未変性エストラジオール(Es)と比較されたい)。

30

【0049】

本発明の第2の実施形態を実施するのに選択した有機化合物をシリル化するために使用できる試薬は、上記したもの、例えばBTSFAまたはMTBSTFAであってよい。

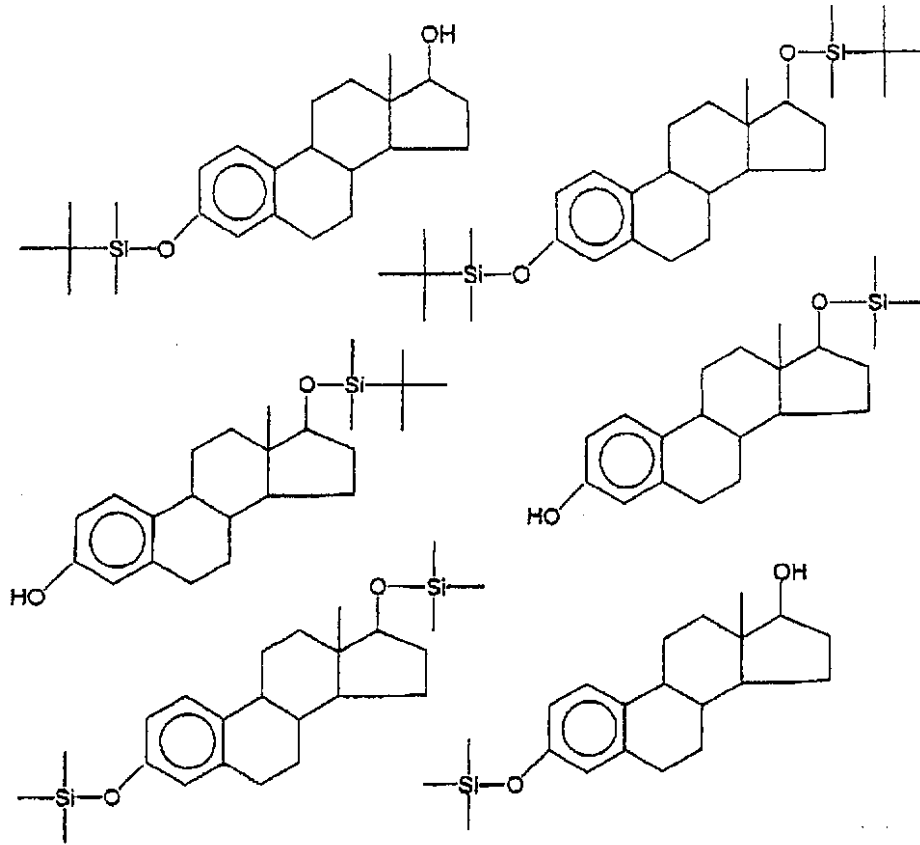
【0050】

本発明のこの実施形態で使用される抗体は、シリル化有機化合物と非シリル化有機化合物を別々に認識するという特徴を示す。これらの抗体はモノクローナルでよい。これらは、この種の抗体を調製するために慣用される技術、例えば、これらの化合物のうちの1つだけに特異的であるマウス抗体を得るために、シリル化有機化合物あるいは非シリル化有機化合物を、マウスに注射することによって調製することができる。本発明の方法を実施する目的で、2つの化合物(シリル化されたまたはシリル化されていない)のうちの1つだけ

40

【0051】

【化 2】



10

20

本発明で使用できるシリル化エストラジオールの例

【0052】

例としては、本発明を実施するのに使用できる抗体を調製するために適した方法の概要が参考文献番号[34]～[38]の文献に記載されている。 30

【0053】

例としては、有機化合物が上記一覧表から選択されるシリル化可能な化合物である場合に、本発明を実施するのに使用できる抗体が、さらに文献番号[5]～[24]および[39]～[42]にも記載されている。

【0054】

添付の図1に示した例では、エストラジオールに対しておりかつイムノアッセイで使用される抗体は、エストラジオールがシリル基で修飾された場合(以下「修飾エストラジオール」とも称する)、抗体が、エストラジオールをもちや認識しない、または、わずかにしか認識しない(すなわち、この認識の差が検出されるのには十分であるという形で)ように選択される。修飾エストラジオールへのフッ素の効果は、Si-O結合を攻撃する(脱シリル化反応)ということであり、それによって未変性エストラジオールは再び出現でき、次いで、以下「第1の抗体」と称するその特異的抗体が未変性エストラジオールを認識できるようになる。 40

【0055】

本発明では、当業者に周知の抗原/抗体認識を検出するための任意の手段を、その抗体による脱シリル化有機化合物(「未変性有機化合物」)の認識か、その抗体によるシリル化有機化合物の認識かのどちらかを検出するために使用することができる。本明細書で、「第1の抗体と非シリル化有機化合物との間の相互作用を検出するための手段」または「第1の抗体とシリル化有機化合物との間の相互作用を検出するための手段」という用語を使用 50

するのはそのためである。抗体を使用したこのような検出のための操作条件は当業者によく知られている。用いられるプロトコール、試薬、緩衝剤および操作条件は、例えば参考文献番号[5]~[24]および[39]~[42]の文献に記載されている。

【0056】

この実施形態による検出は、例えば、免疫学的検出方法および/または免疫学的測定方法で通常用いられるものなどの、「競合」型のイムノアッセイまたは「非競合」型のイムノアッセイを実施することによって行う。

【0057】

本発明のこの第2の実施形態の第1変更形態によれば、検出手段は例えば標識分子であってよい。これは、「トレーサー」と称され、前記第1の抗体に関して、シリル化有機化合物または非シリル化有機化合物、例えばシリル化エストラジオールまたは非シリル化エストラジオールと競合することになる。この標識分子としては、酵素例えばアセチルコリンエステラーゼ、蛍光標識、発光標識または放射性同位体を検出のために使用することができる。

10

【0058】

したがって、シリル化有機化合物または非シリル化有機化合物のイムノアッセイ(すなわち免疫学的測定)は「競合」と称される。このアッセイは、標準シリーズまたはサンプル中に存在するシリル化有機化合物または非シリル化有機化合物、例えばシリル化エストラジオールまたは非シリル化エストラジオールに対する抗体と、本発明による有機化合物例えばエストラジオールに化学的に類似して、シグナル(標識)例えば酵素性、蛍光性、発光性もしくは放射性シグナルを運ぶトレーサーとを使用する。上記のエストラジオールの例では、トレーサーは例えば、エストラジオールを酵素例えばアセチルコリンエステラーゼに結合させることによって得ることができる。

20

【0059】

本発明の方法を実施するために使用できる「競合」の検出を図2および3に示す。この図では用いた有機化合物はエストラジオールである。標識化された分子もしくはトレーサーは「T」で表示され、シリル化されていない(修飾されていない)エストラジオールは「Es」で表示され、シリル化された(修飾された)エストラジオールは「Es-M」で表示されている。第1の抗体は例えばマウス抗体(sAb)である。図2は、修飾エストラジオール(Es-M)は、抗体(sAb)によって認識されないが(認識されないことは、×印で示されている)、HFが存在する場合、このエストラジオールは、未変性エストラジオール(Es)に変換された後、第1の抗体(sAb)によって認識されることを示している。次いでこれはトレーサー(T)(標識エストラジオール)との競合に入る。したがって、HFの存在を検出することができる。この方法では、抗体と結合しているトレーサーの量は、サンプル中に存在するエストラジオールの量と反比例する。

30

【0060】

この競合による検出方法では、第1の抗体(sAb)と非シリル化有機化合物との間の相互作用を検出するための手段(または第1の抗体とシリル化有機化合物との間の相互作用を検出するための手段)には、第2の抗体(gAb)を含むことができる。例えばこの第2の抗体は、上記マウス抗体(sAb)(第1の抗体)に対するヤギ抗体(gAb)またはウサギ抗体であってよい。第2の抗体を用いたこの検出の図解を添付の図2に加えた。この第2の抗体(gAb)はレセプタクル(R)、例えばマイクロタイトレーションプレートの底部に結合させることができる。

40

【0061】

したがってこの例では、このアッセイは、限られた数の抗体分子に関して、トレーサーと測定されるエストラジオールとの間で競合させることにある。反応の最後で、抗体と結合していないトレーサーを除去した後、抗体-結合トレーサーによって運ばれるシグナルを測定することができる。

【0062】

トレーサーが酵素例えばアセチルコリンエステラーゼを含む場合(図2の白い四角で図示されている)、検出手段にさらに酵素インジケータを含めることができる。アセチルコリ

50

ンエステラーゼを用いる上記例では、酵素インジケータはアセチルチオコリンとジチオニトロフルオロベンゼンとの混合物からなる。このインジケータは、肉眼で見られるかまたは分光光度計で414nmで定量できる黄色の生成物に変換される。このインジケータは、実際に、本発明を実施するためのEllman比色分析検出および測定法を適用するために使用される。この方法は例えば文参考文献番号[43]の文献に記載されている。

【0063】

本発明のこの第2の実施形態の第2の変更形態によれば、本発明の方法によるフッ素の検出および/または測定は、「非競合」型のイムノアッセイを用いて実施される。競合アッセイと較べて、非競合アプローチの難しさは選択される有機化合物に関係している。その化合物は、2つの化学的特性、すなわち固相に結合する可能性とシリル化される可能性とを有していなければならない。さらに、固相に結合した場合、液相の場合と同等に有利な条件下で、有機化合物の脱シリル化が可能でなければならない。この変更形態は、上記のヒドロキシ化された有機化合物に適用することができる。例えば、これを、上記のものなどのエストラジオール誘導体例えばエストラジオール3-カルボキシメチルエーテル、またはペプチド例えば上記のAcSDKPに適用することができる。

10

【0064】

この変更形態では、シリル化化合物を、固相例えば支持体、例えば実験室で通常使用されているものなどのマイクロタイトレーションプレートに結合させる。サンプルを、シリル化化合物と接触させ、次いでプレート上に固定化させて、検出および/または測定をその場で実施することができる。

20

【0065】

上記に定義したシリル化有機化合物のうちの1つを支持体に結合させ、同時に、シリル化化合物のフルオリドイオンとの反応性を保持するための当業者に知られた適当な技術によって、シリル化化合物を支持体に固定化させるかまたは結合させることができる。すべては、支持体と、本発明を実施するための選択したシリル化有機化合物の化学的性質によって決まる。この結合は、例えば共有結合によって行うことができる。支持体は、官能化された支持体、すなわちシリル化有機化合物の結合を容易にする化学基がそれにグラフトされた支持体であってよい。例えば、選択されたシリル化有機化合物が、上記のものなどのエストラジオール誘導体例えばエストラジオール-3-カルボキシメチルエーテル、またはペプチド例えばAcSDKPである場合、支持体は例えば、アミノ基例えばNunc-NH₂プレートを含むプレート、またはポリリシンで活性化されたプレートであってよい。

30

【0066】

サンプル中にフルオリドイオンが存在する場合、支持体と結合しているシリル化化合物は、フルオリドイオンとの反応に続いて非シリル化化合物に変換される。次いで、例えば非シリル化化合物を特異的に認識する第1の抗体の存在下で、イムノアッセイ技術によって検出および/または測定を実施することができる。

【0067】

第1の抗体による非シリル化化合物の認識は、当業者に知られている任意の手段、例えば第1の抗体の標識化によっても、また標識を運ぶ第1の抗体を認識する第2の抗体(第2の抗体は次いでトレーサーとなる)によっても実証することができる。標識は、当業者が通常用いる、例えば酵素性シグナルのうちの1つであってよい。例えば、第2の抗体は、第1の抗体(マウス抗体(sAb)であってよい)に対するヤギ抗体またはウサギ抗体(gAb)であってよい。

40

【0068】

「非競合」検出の1つの方法を図18に図解して示す。この図で用いられている有機化合物はエストラジオールカルボキシメチルエーテル(EstCME)である。抗体のうちの第2の抗体は、「sAb」(トレーサー)と表示されている抗エストラジオール抗体(例えばマウス抗体)である。シリル化されていない(修飾されていない)エストラジオールは「Es」で表示され、シリル化された(修飾された)エストラジオールは「Es-M」で表示されている。マウス抗体(sAb)に対する第2のヤギ抗体またはウサギ抗体(gAb)は、例えばマイクロタイトレー

50

シオンプレート(R)の表面に付加される。トレーサー「T」を形成するために、gAb抗体は標識例えば酵素に結合される。この図は、抗体(sAb)が修飾エストラジオール(Es-M)を認識できないこと(認識できないことは×印で示されている)を示している。しかし、HFが存在する場合、Es-Mは、次に第1の抗体(sAb)によって認識され得る未変性エストラジオール(Es)に転換される。したがって、HFの存在を検出することができる。この場合、抗体(sAb)に結合しているトレーサーの量(gAb+標識)は、サンプル中に存在する脱シリル化エストラジオールの量に比例する。

【0069】

本発明者等は、本発明のどの実施形態を用いたとしても、本発明を実施するのに有利な操作条件を決定した。もちろん必要なら、これらの条件は、用いる他のシリル基、他のシリル化有機化合物または他の検出手段のために、本発明の意味の範囲内で適合させるかまたは改変することができる。これらの条件は、本発明の第2の実施形態のために特に有利である。

10

【0070】

したがって、本発明の方法において、接触させるステップは54~64の温度で実施するのが有利である。これは、温度が高すぎると、シリル化有機化合物の自発的な脱シリル化を伴う現象が発生するからである。当業者は、選択した有機化合物および検出方法に応じて、本発明を実施する温度を容易に適合させることができよう。

【0071】

本発明の方法での接触を、例えば50mMのリン酸塩緩衝液中で、または任意の適切な緩衝剤を用いてpH4.5~6.5、好ましくはpH5.5で実施することも有利である。

20

【0072】

その理由は、pH値が余り酸性サイドになり過ぎると、シリル化有機化合物の自発的な脱シリル化を伴う現象が発生する可能性があるからである。この場合も、当業者は、本発明を実施するpHを、選択した有機化合物および検出方法に応じて容易に適合させることができよう。

【0073】

本発明によれば、シリル化有機化合物、例えばエストラジオールまたは同等の分子量の他の化合物などの測定溶液中の濃度を、有機化合物の分子量および用いる検出および/または測定手段に応じて適合させることができる。本発明の方法を実施する場合、一般に濃度は1~2000ng/ml、例えば2~500ng/mlであってよい。

30

【0074】

本発明は、本発明の方法を実施するためのキットにも関し、前記キットは以下の試薬を含む。すなわち、フッ素またはフッ化水素酸が存在下で、脱シリル化されるシリル化有機化合物;水溶液中で、脱シリル化有機化合物の出現またはシリル化有機化合物の消失を検出するための手段を含む。

【0075】

フッ素またはフッ化水素酸の存在下で脱シリル化されるシリル化有機化合物は本明細書で定義の通りである。

【0076】

水溶液中で、脱シリル化有機化合物の出現またはシリル化有機化合物の消失を検出および/または測定するための手段は、もちろん本発明の方法を実施するための検出および/または測定方法に応じて変わる。使用できる方法は上記の定義の通りである。したがって、検出手段および/または測定手段は以下の成分のうちの1つもしくは複数を含むことができる。すなわち、着色インジケータ、上記したものなどのマーカー、酵素、上記したものなどの測定手段、シリル化有機化合物および/または非シリル化有機化合物等を検出および/または測定するのに必要な抗体等を含む。

40

【0077】

例えば、キットは、競合のイムノアッセイを実施するために必要な試薬および抗体、または非競合のイムノアッセイを実施するために必要な試薬および抗体を含むことができる

50

。キットは、非シリル化有機化合物または脱シリル化有機化合物に対する、あるいはシリル化有機化合物に対する1種または複数の抗体、例えばマウス抗体を含むことができる。キットはさらに、上記の抗体に対する1種または複数の抗体、例えばヤギ抗体もしくはウサギ抗体を含むことができる。キットは、実施された免疫学的反応を実証できるようにするトレーサーも含むことができる。

【0078】

本発明によれば、キットは、1個または複数のウェルがその中に形成されている、試薬を受け入れるための支持体、例えばポリスチレンストリップをさらに含むことができる。このウェルは、本発明の方法の接触のステップ、ならびに/または検出および/または測定のためのレセプタクルとして用いられる。したがって、測定および/または検出を、マイクタイトレーションプレートのウェル中で容易に実施することができる。そうした支持体、例えば上記のストリップ上に、マウス抗エストラジオール抗体に対する抗体例えばヤギ抗体またはウサギ抗体で、そのウェルをコーティングすることができる。シリル化エストラジオールをウェルの底部に結合させることもできる。

10

【0079】

本発明の結果、本発明者等は、溶液中で0.001 μ g/mlのオーダーの濃度でHFを検出するための実際的で迅速な試験法を開発することに成功した。

【0080】

有利なことに、本発明の感度は任意の工業的用途、特に、最も有用である大気中のフッ化水素酸の測定を想定することができる。この場合、 1×10^{-2} l HF/ 10^6 l 空気(10ppb)を容易に検出できる。したがって、本方法の性能は、HFを検出するのに数百ppbのオーダーの濃度に限られている従来技術の現地用アッセイの性能より優れている。

20

【0081】

サンプルおよび用いる検出手段の性質によるが、一般に本発明によって、約1/2~4時間で結果を得ることが可能になる。ある種の従来技術の方法のより長い時間を要する場合もあるが、本発明の方法は一般により高感度である。

【0082】

本発明の方法は、フッ化水素酸またはフルオリドイオンを含有する任意のサンプルに有利に適用される。すなわち、大気サンプル、食品、植物、生物学的媒体に適用される。それぞれの場合、サンプリングおよびサンプル調製のための条件は、フッ化水素酸またはフルオリドイオンをアッセイするための任意の他の方法と同様である。

30

【0083】

本発明の他の利点は実施するのが簡単なことである。例えば、その技術はイムノアッセイでの技術と同一であってよい。すなわち、簡易型の試薬の使用、分配のハンドリングが容易であること、コンパクトであること、輸送および再配置が容易であること、エネルギー供給なしで作業できる可能性があること、および肉眼またはポケット型簡易分光光度計を用いた比色計で読み取れることである。

【0084】

添付の図面を参照して、非限定的な形で、例示で示されている以下の説明を読むことによって、本発明の他の用途および利点も明らかになるであろう。

40

【実施例】**【0085】**

本発明の方法の様々な態様を以下で検討した。すなわち、エストラジオールについての免疫学的アッセイの構築、シリル化によってエストラジオールを修飾するための条件の試験、質量分析によるシリル化有機化合物の立証、シリル化化合物のHFとの反応の試験、シリル化された誘導体の化学的性質の最適化、試薬の濃度および測定の感度の最適化、酸についての測定の特異性の最適化、ならびに測定の適用性(applicability)の試験である。これらの検討の主な結果を以下に示す。

【0086】

試験は、大気中のフッ化水素酸のサンプル(実験室でのシミュレーション)と、フルオリ

50

ドイオンを含有する水のサンプルとについて実施した。

【0087】

本発明の方法の能力を判断するために、本発明者等はその感度パラメータを定義した。その感度は、HFの非存在下で得られるシグナルとは統計的に異なるシグナルを発生させるために必要なHFの量を表す。本発明の方法によれば、測定するサンプル中に存在する未変性(シリル化されていない)エストラジオールの量は、検出できないシリル化エストラジオールを、検出できる非シリル化エストラジオールに転換させるためのフッ素の量に応じて変わる。したがって、HFを測定するために、感度を、ジメチルtert-ブチルエストラジオールの存在下に置いた場合に、抗体と酵素トレーサーとの間の結合の著しい低下を誘発することができるフッ素の必要量として定義した。

10

【0088】

(実施例1)

競合イムノアッセイによるフッ素の検出および測定への本発明の方法の適用

この実施例では、選択した有機化合物は 17-エストラジオールの誘導体である化合物である。

【0089】

1)抗エストラジオール抗体の調製

アッセイで使用した抗体は、具体的には、17-エストラジオールから誘導され、マウス中で抗体を得る目的でウシアルブミンに結合させた化合物から作製した。

【0090】

用いた技術は文献番号[39]に記載されているものである。

20

【0091】

2)抗エストラジオール抗体からの抗体マウス抗体の調製

Immunotech company(Lumigny)から販売されているヤギ抗マウス抗体抗体を、96-ウェルのポリスチレンマイクロタイションプレート(Nunc)をコーティングするために使用する(用いた希釈度は:5 μ g/ml)。コーティングした後、プレートを、0.5%アルブミンを含む緩衝液中に4 で保存する。

【0092】

プレートへの結合は簡単な吸収で行う。タンパク質が結合されるように、インキュベーションは十分に長くしなければならない。この調製は当業者の一般的な知見に属するものである。

30

【0093】

3)酵素トレーサーの調製

酵素トレーサーは、エストラジオールをアセチルコリンエステラーゼ(AChE)に結合させて得た。N-スクシンイミジルS-アセチルチオアセテートを用いてチオール基をエストラジオールに導入する。修飾エストラジオールをAChEに結合させる。このAChEに、エストラジオールチオール基と反応するマレイミド基が導入されている。トレーサーはゲル濾過で精製し、次いで一定分量を-20 で保存した。

【0094】

この調製で使用し、かつ本発明で一般に使用できる技術および酵素トレーサーは、参考文献番号[44]および[45]の文献に記載されている。

40

【0095】

4)製品と他の試薬

エストラジオールはSigma Aldrichから入手した。シリル化剤はPerbio companyから入手した。

【0096】

フッ化水素酸はMerck-Eurolab companyから入手した。

【0097】

すべての試薬、すなわちトレーサー、抗体、エストラジオールおよびサンプルは、アジド(0.01重量/容積%)(重量/容積%=重量gと容積100mlの比)(すなわち、この場合、0.01g/10

50

0ml)、ウシアルブミン(0.5重量/容積%)およびNaCl(0.9重量/容積%)を含有する0.05Mリン酸塩緩衝液(pH7)中に希釈させて用いた。

【0098】

5)用いたシリル化エストラジオール濃度の最適化

脱シリル化エストラジオール、したがって、フッ素を続いて検出できるようにするために、HFを含有するサンプルと接触させるシリル化エストラジオールの濃度を最適化した。

【0099】

したがって、用いたシリル化エストラジオールの濃度が非常に低い場合、シリル化エストラジオールがすべてエストラジオールに変換されても、この低濃度によって、高精度での検出の実施が可能になるわけではない。

10

【0100】

本発明の方法での脱シリル化のために使用される修飾エストラジオールの最適濃度を決定するために、複数の試験を実施した。この濃度はもちろん使用する試薬と操作条件によって変わる。

【0101】

ここで示す実施例では、濃度は好ましくは200ng/mlである。

【0102】

エストラジオールおよびその誘導体の場合、この濃度は一般に、1~2000ng/ml、好ましくは2~500ng/mlであると推定することができる。これらの範囲は、特に実施例の条件のための単なる目安としてだけ示したものである。

20

【0103】

6)エストラジオールのシリル化

1容積部のエストラジオール(2mg/ml)を4容積部のMTBSTFAと混合し、全体を室温で30分間~1時間インキュベートする。

【0104】

用いたシリル化剤はBTSFAまたはMTBSTFAである。得られた生成物を上記に示す。

【0105】

液体クロマトグラフィーと質量分析による立証によって、エストラジオールはシリル化されていたことが分かった。

【0106】

シリル化した後、エストラジオールを、使用前に、100%ジメチルホルムアミド(DMF)、あるいは100%ジメチルスルホキシド(DMSO)で1000倍に希釈する。

30

【0107】

7)エストラジオールの脱シリル化

2.5 μ lの1Mリン酸塩緩衝液(pH=5.5)と、47.5 μ lのサンプルもしくは既知の濃度のHF溶液(標準シリーズ)を、50 μ lのシリル化エストラジオールに加える。

【0108】

混合物を振とうし、次いで水浴に55~66 $^{\circ}$ Cで1時間置いて乾燥させる。

【0109】

脱シリル化反応は、アッセイ緩衝液中で混合物を希釈する(40倍希釈)ことによって停止させることができる。この緩衝液は、アジド(0.01重量/容積%)(重量/容積%=重量gと容積100mlの比)(すなわちこの場合、0.01g/100ml)、ウシアルブミン(0.5重量/容積%)およびNaCl(0.9重量/容積%)を含む0.05Mリン酸塩緩衝液(pH7)である。

40

【0110】

8)酵素インジケータ:アセチルコリンエステラーゼ(EIIman反応)の酵素活性の測定

この方法は偽基質、すなわちアセチルチオコリン(AcTCh)を使用する。これは、アセチルコリンと同一速度で加水分解される。この加水分解は、ジチオニトロベンゼン(DTNB)を還元することができるチオコリン(TCh)の生成をもたらす。還元されたDTNBは、可視域($\epsilon_{412nm}=13600\text{モル}^{-1}\text{cm}^{-1}$)に強い吸収を有して黄色に発色する。

【0111】

50

過剰な基質によるその阻害を考慮に入れて、AChEの活性が最大である濃度でAcTChを使用する。さらに、基質のすべてが変換され、比色測定されるのを回避するために、用いるDTNBの量はAcTChの量より少なくする。これに対して、AcTChの1分子の加水分解によって1分子だけの還元DTNBの生成が確実にもたらされるように、使用するDTNBは生成されるTChの量に対して過剰にする。

【0112】

Ellman反応の実施の仕方は当業者に知られており、ここで提供する情報を基に、当業者は本発明を実施するための最適の操作条件を容易に見出すことができる。

【0113】

9)未変性エストラジオールのイムノアッセイ:HFの定量化

10

先に得られたエストラジオール抽出物を1/40に希釈し、トレーサーと抗エストラジオール抗体を存在させてアッセイプレートに分配する。反応容積は200 μ lである。

【0114】

免疫学的反応を環境温度で1時間実施する。

【0115】

未結合トレーサーを除去するためにアッセイプレートを洗浄して、0.2ml容積部のインジケータ溶液を加える。

【0116】

約1時間後、黄色に発色する。分光光度計を用いて光学密度測定を実施する。

【0117】

10)結果の解釈

20

実施したアッセイにおいて、標準HFシリーズを用いて、サンプル中に含有されているフッ素の濃度を測定することが可能であった。したがって、本発明の方法の実現可能性が実証された。

【0118】

(実施例2)

MTBSTFA修飾エストラジオールとBTSFA修飾エストラジオールの場合のHF検出の特異性の差の検討

以下に述べるすべての操作において、脱シリル化の際のシリル化エストラジオールは、所与の実験ですべてのサンプルについて同一濃度で使用した。その濃度は200ng/mlであった。

30

【0119】

他の試薬の場合濃度は以下の通りである。

- マウス抗エストラジオール抗体:5 μ g/ml、
 - アセチルチオコリン: 7×10^{-4} M、
 - 5-5'-ジチオビスニトロベンゾエ-ト: 7×10^{-4} Mおよび
 - アセチルチオコリンに結合されたエストラジオール:約1ng/ml
- である。

【0120】

試験は、実施例1で説明した方法で、ポリスチレンストリップ上の300 μ lウェルで実施した。

40

【0121】

A)BTSFA(これはトリメチルシリル基を提供する)でシリル化されたエストラジオールをHFで開裂させ(脱シリル化反応)、それによってその未変性形態を回復する。このような開裂は他の酸、すなわち塩酸(HCl)、硝酸(HNO₃)、硫酸(H₂SO₄)およびリン酸(H₂PO₄)を用いた場合にも認められる。結果を添付の図4に示す。

【0122】

したがって、このシリル基を用いた場合、脱シリル化反応は必ずしもフッ素に対して特異的ではない。したがって、このシリル化エストラジオールはむしろ、後者がそれのみである場合のHFの検出、あるいは他の酸が存在しない場合のHFの検出に適している。

50

【0123】

B)水性媒体中ではより低い溶解性を示すが、MTBSTFA(BTSFAによって提供されたものより疎水性であるシリル基を提供する)でシリル化されたエストラジオールは、HFによって特異的に開裂され(脱シリル化反応)、それによって未変性形態を回復する。したがって、同一条件下で作成した添付の図6に示すように、試験した他の酸は、この形で修飾されているエストラジオールを開裂させない(以下の実施例3を参照されたい)。

【0124】

したがって本発明者等は、エストラジオールをシリル化するために、以下の実施例ではMTBSTFAを選択した。

【0125】

(実施例3)

本発明の方法におけるフッ素脱シリル化反応に適した緩衝剤の探求

いくつかの酸物質も、MTBSTFAを用いて修飾エストラジオールの脱シリル化に対して効果があるので(実施例2参照)、本発明者等は、フッ素の脱シリル化反応に対する特異的な効果を高め、存在する可能性のある他の化合物の酸の性質に起因する非特異的な効果を阻害する緩衝溶液を探求することにした。

【0126】

高濃度で存在する場合(高酸濃度物を緩衝するために必要)、水酸化ナトリウム(NaOH)や水酸化カリウム(KOH)などの塩基も酸不在下でのエストラジオールの脱シリル化を誘発する(データは示されていない)。したがって、これらは使用できない。

【0127】

リン酸塩イオンで50mMのリン酸塩緩衝($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$)溶液も試験した。これらは良好な結果をもたらした。酸性であることが、シリル化エストラジオールが自発的に脱シリル化される結果をもたらさないことを確実にするために、これらの溶液のpHを検討した。

【0128】

したがって、例えばサンプルが、有機化合物の自発的な脱シリル化を誘発できる他の酸または塩基を含有し、それによって本発明の方法検出および/または測定感度が低下する場合、本発明の方法は緩衝媒体中で有利に実施することができる。

【0129】

さらに、本発明者等は、ある種の条件下では、脱シリル化温度が高すぎると、修飾エストラジオールが自発的に脱シリル化される(データは示していない)結果となることがあることを確認した。このため、種々の緩衝剤のそれぞれについて種々の温度を検討した。

【0130】

得られた結果を添付の図5に示す。この図では、「E2M」はジメチルシリルtert-ブチルエストラジオールを表し、「A.T.」は環境温度を表す。

【0131】

pH5.5または6のリン酸塩緩衝溶液の場合、シリル化エストラジオールの自発的な脱シリル化は94 で起こるが、54 ではそうした脱シリル化は起こらない。

【0132】

結論として、シリル化エストラジオールを脱シリル化するための好ましい条件を以下の通り示した。すなわち、pH5.5の50mMリン酸塩緩衝液中で、54~64 の温度である。これらの条件は、エストラジオールおよび上記のシリル基について、上記操作条件下で決定されたことを理解されよう。

【0133】

本明細書で提供した情報をもとに、当業者は、選択したシリル化有機化合物、サンプルおよび本発明の方法の実施条件に応じて、容易に他の条件を決定することができよう。

【0134】

(実施例4)

本発明の方法の実施に対する種々の酸の効果

脱シリル化に対する様々な他の酸の効果を上記実施例3の条件下で試験した。

10

20

30

40

50

【0135】

これらの試験結果を図6に示す。この図で、「F.ac」はギ酸を表し、「ac.ac」は酢酸を表し、「P.ac」はリン酸を表し、「OP.ac」はオリトリン酸を表し、「T.ac」はトリフルオロ酢酸を表す。

【0136】

これらの結果は、HF以外の酸が、MTBSTFAでシリル化されたエストラジオールに対してほとんど効果がないことを明らかに示している。

【0137】

したがって選択したシリル基はフッ素の検出の特異性に役割を果たしている。試験サンプル中にフッ素以外の化学成分が存在する場合、特にこれらの成分が用いられている有機化合物の脱シリル化を誘発できる場合、この事実を考慮すべきである。

10

【0138】

(実施例5)

他のハロゲンおよび求核物質と比較した場合のフッ素の特異性

フッ素はハロゲンであり、求核的な特徴も有している。エストラジオールの脱シリル化反応におけるフッ素の特異性を試験するために、 Bu_4NBr 、 Bu_4NCl 、 Bu_4NI およびKIなどの他のハロゲン、ならびに4-ニトロフェノールおよび4-ニトロイミダゾールなどの求核物質の効果も、上記実施例の操作条件下で、MTBSTFAでシリル化されたエストラジオールを用いて検討した。

【0139】

添付の図7はこの実施例で得られた実験結果を示し、他の生成物と比較した場合のフッ素の特異性を実証している。

20

【0140】

試験した他の生成物と比較して、フッ素がエストラジオール脱シリル化反応において非常に特異的であることは明らかである。

【0141】

(実施例6)

HFおよびフッ素イオンによる開裂

この実施例では、先の実施例で用いた実験条件下で、様々なフッ素塩をMTBSTFAシリル化エストラジオールと接触させた。

30

【0142】

添付の図8は得られた結果を示している。この図では、試験した異なるフッ素塩を特定するためには、通常の化学記号を用いた。

【0143】

フッ素イオンはシリル化エストラジオールの開裂に関して、HFと同様の挙動をする。これはフッ素の反応の特異性を確認させるものである。

【0144】

(実施例7)

本発明の方法の分析能力と有機溶媒の添加の効果

図7および8に示すように、上記実施例で述べた条件下では、水性媒体で希釈されたHFの場合で、HF測定の感度は約 $5 \times 10^{-5} \text{M}$ (すなわち $1 \mu\text{g/ml}$)である。

40

【0145】

本発明者等は、補足的な検討の過程で、水混和性有機溶媒を水性脱シリル化溶液に加えることによって、本発明の方法の感度をさらに増大させることができることを確認した。

【0146】

実験はジメチルホルムアミド(DMF)(エストラジオールのシリル化を参照されたい)とジメチルスルホキシド(DMSO)を用いて実施した。

【0147】

本発明の方法による脱シリル化を行う溶媒としてジメチルスルホキシド(DMSO)を用いることによって、感度を500倍(約 10^{-7}M 、すなわち $0.001 \mu\text{g/ml}$)向上させることができる。

50

【0148】

図19は、接触水溶液の総容積ベースで95容積%の濃度のジメチルスルホキシドの存在下で実施した反応の場合での、フルオリドイオンについての分量応答曲線(dose-response curve)を示す。これらの結果は上記の実施例からの結果と比較されたい。

【0149】

したがって、前記接触水溶液への有機溶媒の添加によって、本発明の方法によるフッ素の検出および/または測定の感度が実質的に増大する。

【0150】

(実施例8)

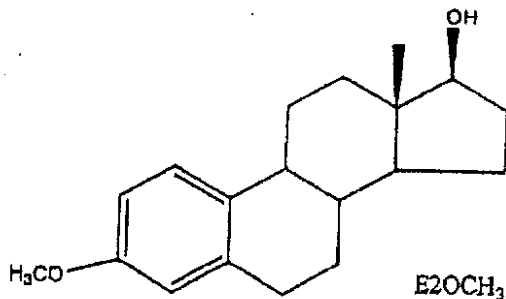
本発明の化合物がエストラジオール誘導体である場合の本発明の方法の使用

10

この実施例では、本発明の方法を実施するために用いた有機化合物は、エストラジオール($E2OCH_3$)の0-メチル誘導体すなわち、次の式の17- エストラジオール-3-メチルエーテルである。

【0151】

【化3】



20

【0152】

操作条件は上記実施例1および2で説明した条件である。

【0153】

得られた実験結果を添付の図17に示す。フッ素の存在下で確かに $E2OCH_3$ が脱シリル化されていることが分かる。

【0154】

30

したがって、本発明の方法でのエストラジオール誘導体の使用に対する説得力のある理由が認められる。

【0155】

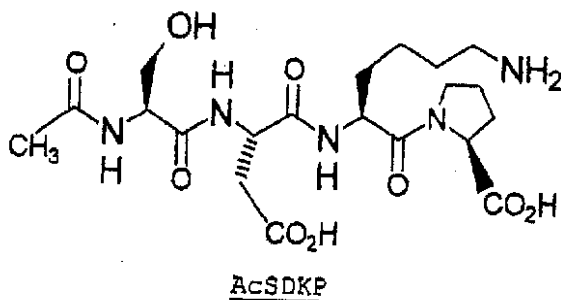
(実施例9)

有機化合物が水酸官能基を有するペプチドである場合の本発明の方法の使用

この実施例では、有機化合物はペプチドである。ペプチドはテトラペプチド、すなわち以下の式のアセチル化Ser-Asp-LysPro(AcSDKP)である。

【0156】

【化4】



40

【0157】

AcSDKPは水酸基を有するペプチドであり、一度にかつ同時にシリル化し、そのカルボキ

50

シルまたはアミノ基によって固相に結合させるのが有利である。

【0158】

最初に、このペプチドのシリル化反応を検討し、続いて本発明の方法でのこのシリル化合物の使用の検討を行った。

【0159】

未希釈のBSTFAまたはMTBSTFAを用いて、AcSDKP(1mg/ml)を22、37 または60 で、10、30または60分間シリル化した。反応後、文献[5]に記載の技術により、かつウサギポリクローナル抗体を用いて、シリル化されたAcSDKPをAcSDKP特異的競合アッセイで検出した。この場合、シグナルの増加は、免疫反応性がなくなり、したがってシリル化が効率的であったことを示している。

10

【0160】

得られた実験結果を報告する添付の図15が示すように、MTSBTFAは、AcSDKPの60 での反応性を低下させる。これは化合物がシリル化されていることを示唆している。

【0161】

次いで本発明によって、HFの存在下で、このシリル化されたペプチドに対する脱シリル化試験を実施した。添付の図16は得られた結果を示す。HFはペプチドを脱シリル化することが分かる。したがって、シリル化された基を失ったことによって免疫反応性が増大し、それによってシグナルがより弱くなる結果となる。図に示すように、HFの存在下でシグナルは低下する。

【0162】

したがって、ヒドロキシ化されたペプチドを有機化合物として使用する場合、本発明の方法を実施することができる。

20

【0163】

(実施例10)

溶液中でのフッ素の検出および測定

本発明の方法の妥当性を立証するために、本発明等は、そのフッ素濃度が既知である種々の鉱水を試験した。

【0164】

用いたプロトコールは実施例1のプロトコールであり、選択した有機化合物はMTBSTFAでシリル化されたエストラジオール(ジメチルtert-ブチルエストラジオール)である。

30

【0165】

表Iはこの実施例で得られた結果を示す。いずれの場合も、この表はフッ素の存在が検出されたことを示している。

【0166】

濃縮した大部分の水サンプルの場合、理論濃度と判明した濃度との間の相関がありそうである。変動がほとんど観察されない原因は、サンプル中に存在するフッ素の性質によるということができる。

【0167】

【表1】

表I
鉱水中のフルオリドの測定

水のサンプル	[フルオリド]		[乾燥抽出物] mg/ml	pH	検出された [F] μM	測定された Fの%
	mg/ml	μM				
ヴィシーサンチョール水 (Vichy St Yorre)	9	470	4774	6.6	780 ± 271	170 ± 60
サンペレグリーノ水 (San-Pellegrino)	0.61	32	1074	7.5	151	470
バドア水(Badoit)	1	52	1200	6	28.5 ± 12	50 ± 20
ヴィシーセレストタン水 (Vichy Celestin)	6	135	3325	6.8	305 ± 81	97 ± 26
ケザック水(Quezac)	2.1	100	-	-	53	53

10

【0168】

(実施例11)

ガス媒体中のフッ素の検出および測定

測定されるHFはしばしばガスの形態であり、測定するために水溶液中にガスを通す必要がある。HFで汚染された空気がなかったため、本発明者等は、既知の濃度のHF溶液を密封容器中で蒸発させて、そうしたサンプルを人為的に作製した。HFを蒸発させた後、空気を収集用緩衝液(DMF)中にポンプで送り、そこでバブリングさせた。

20

【0169】

HF濃度が 1.2×10^{-2} l HF/ 10^6 l 空気(12ppb)である100リットルの空気を濾過できる装置を用いて、溶液中で、 10^{-5} MのHF濃度を得た(収率100%として)。

【0170】

フッ素の検出に使用するプロトコールは実施例1で述べたものである。選択した有機化合物はMTBSTFAでシリル化されたエストラジオールである(ジメチルtert-ブチルエストラジオール)。

30

【0171】

図9に示す結果は、いずれの場合にもフッ素が検出されたことを示している。フッ素の理論濃度と検出濃度間の相関はかなり良好である。

【0172】

したがって、本発明による空気中でHFを検出するための方法によって、 10^{-2} l HF/ 10^6 l 空気(10ppb)のオーダーの濃度でのHFの検出が容易に可能である。

【0173】

(実施例12)

本発明の方法の非競合イムノアッセイによるフッ素の検出および測定への適用

1)概略の方策

目的は、先に得られた結果を用いること、すなわちHFの作用によって、シリル化化合物の免疫学的認識を修飾する可能性についてである。

40

【0174】

先のアッセイフォーマット(競合)に対して、イムノメトリックアプローチは、シリル化化合物を、固体表面上に共有結合的に固定することにある。HFによるその変換は免疫活性形態をもたらし、それによって、シグナルが消失する競合アッセイと反対に、シグナルの発生をもたらされる。

【0175】

50

このフォーマットは優れた感度をもたらすことが多い。それは多分、過剰にある試薬と関連した熱力学的な好都合さと、シグナルの消失よりその出現の方が目視するまたは測定するのにより容易であるという事実に基づく読取の容易さとに起因している。

【0176】

2) 試薬とプロトコール

用いた抗体は文献番号[39]に記載のものである。

【0177】

ウサギ抗体のビオチン化と、アセチルコリンエステラーゼによるストレプトアビジンまたは抗体の標識化とを当業者に周知の通常の技術を用いて実験室で実施した。

【0178】

化学薬品および製品はすべてSigmaまたはMerckから入手したものである。入手した化合物はSigmaまたはSteraloidsからのものである(エストラジオール誘導体の場合)。

【0179】

アッセイ緩衝液はアジド(0.01%)、ウシアルブミン(0.5%)およびNaCl(0.9%)を含有する0.05Mリン酸塩緩衝液(pH7.4)である。

【0180】

酵素インジケータは、アセチルチオコリンとジニトリフルオロベンゼン(dinitrifluoro benzene)の混合物からなる。トレーサーとの反応に続いて、肉眼で視られるかまたは分光光度計で414nmで定量できる黄色が発生する。

【0181】

実験を実施するために、特にエストラジオール誘導体を結合させるために使用したプレートはNunc(Rochester, USA)から入手した。

【0182】

用いたシリル化剤はBSTFAとMTBSTFAである。

【0183】

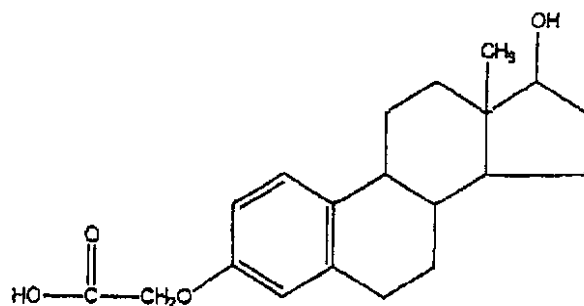
使用したエストラジオールを以下に示す。この化合物の利点は、検出のために抗体を使用することと、競合アッセイ用に先に開発した基本原理を用いることが可能になることである。

【0184】

本発明者等は、得られた抗エストラジオール抗体は、シリル化化合物ではなく、非シリル化化合物を認識することをまず立証した(エストラジオールと比べて、抗体と53%交差反応)。立証は肯定された。

【0185】

【化5】



エストラジオールカルボキシメチルエーテル(EstCME)の構造

【0186】

次いで、本発明者等は、エストラジオールと、2種類のプレートすなわちアミノ基(Nunc-NH₂プレート)を有するプレートとポリリシン(poly-Lys)で活性化したプレートの共有結合について試験した。

【0187】

10

20

30

40

50

3) エストラジオール誘導体の結合の試験

EstCMEを、プレート上でアミノ基を抗原のカルボキシル基に結合させる等モル濃度のN-ヒドロキシスクシニド(NHS)の存在下、22 で3時間、Nuncプレートにインキュベートした。100ng/ml抗エストラジオール抗体を20 で4時間用い、次いで、アセチルコリンエステラーゼ(2Ellman単位のgAb-AchE/ml)に結合させたヤギ抗ウサギ抗体抗体を22 で2時間用いて可視化を実施した。Ellman試薬、AchEの基質を加えて酵素活性を可視化する。

【0188】

得られた結果を添付の図10に示す。エストラジオールが効果的に結合され、試験した最高濃度(100 μ l/ml)で最大値が得られていることを示している。

【0189】

ポリリシン(poly-Lys)(リン酸塩緩衝液中に1~100 μ g/ml)をその上に予め吸収させたプレートを用いて、この最初の実験を繰り返した。

【0190】

得られた結果を添付の図11に示す。この場合、検討したポリリシンの濃度に関わらず同じオーダーの結果である。これはさらに、ポリリシンが担持するアミノ基は、選択されたエストラジオールを結合させるのに、よりアクセスし易いことを実証している。

【0191】

ポリリシンの濃度の影響についてより詳細に検討するために、より広い範囲のポリリシン濃度で試験を繰り返した。得られた結果を添付の図12のグラフに示す。ポリリシンの最適値が約1 μ g/mlであることが示されている。

【0192】

先の2つの図(図11と12)は、1 μ g/mlのポリリシン濃度と、10 μ g/mlのエストラジオールカルボキシメチルエーテル濃度で得られた水平域(plateau)で、エストラジオール誘導体のプレートへの結合が効果的であることを示している。

【0193】

4) エストラジオール誘導体のシリル化

さらに、本発明者等は、上記の化合物のシリル化のための最良条件の実証の検討を行った。エストラジオールカルボキシメチルエーテルとMTBSTFAを、種々の濃度(1/5、1/2および1/1)と2点の温度(22 または37)で0~60分間反応させた。シリル化エストラジオールの競合アッセイによってシリル化を測定する。このアッセイでは、シリル化エストラジオールの認識がされなくなる(またシグナルが増大することになる)。

【0194】

得られた結果を添付の図13に示す。この図は、高いMTBSTFA濃度の条件下では、エストラジオールカルボキシメチルエーテルは、免疫反応性を喪失することを示している。この喪失は、認識の不在に起因するシグナルの増加によって示されている。MTBSTFAが分量効果を有することが実証されている。

【0195】

これらの結果、すなわち固相への結合とシリル化の効果を合わせると、プレート上で行う以下の結合/脱シリル化試験が可能になる。

【0196】

5) 結合/脱シリル化試験

エストラジオールカルボキシメチルエーテル(8.3mg/ml)を、同濃度のMTBSTFAの存在下、22 で1時間反応させ、次いで水に1 μ g/mlまで希釈し、ポリリシン(1 μ g/ml)でコーティングしたプレート上で、NHSの存在下、22 で1時間反応させた。

【0197】

HFの非存在下または1mM濃度のHFの存在下で22 、37 または64 で1時間脱シリル化を実施した。

【0198】

結果を添付の図14に示す。この図から、HFの存在下でのシリル化エストラジオールカルボキシメチルエーテルの脱シリル化に対応する免疫反応性の増加が観察される。

10

20

30

40

50

【 0 1 9 9 】

これによって、シリル化有機化合物を支持体に結合させた場合の、本発明の方法によるHFの検出が実証されている。

[参考文献]

REFERENCE LIST

[1] International Society for Fluoride Research, Fluoride 31(2), 1998, 74-80 - disponible sur le site Internet <http://www.fluoride-journal.com/98-31-2/31274-80.htm>.

10

[2] Occupational Safety and Health Administration", <http://www.osha-dlc.gov/dts/sltc/methods/inorganic/id110/id110.html>.

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

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

20

[5] Ezan E et al, Pharmacokinetics in healthy volunteers and patients of NAC-SDKP (seraspénide), a negative regulator of hematopoiesis, Drug Metab Dispos 1994 Nov-Dec;22(6):843-848.

[6] Shi RZ et al., Development of an enzyme-linked immunosorbent assay with monoclonal antibody for quantification of homovanillic acid [corrected] in human urine samples, Clin Chem 1998 Aug; 44(8 Pt 1):1674-1679.

30

[7] Taran F et al., Competitive enzyme immunoassay for urinary vanillylmandelic acid, Clin Chim Acta 1997 Aug 29; 264(2):177-192.

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

[9] Machard S et al., A sensitive amphotericin B immunoassay for pharmacokinetic and distribution studies, Antimicrob Agents Chemother 2000 Mar; 44(3):546-550.

40

[10] Cleary JD et al., Amphotericin B enzyme-linked immunosorbent assay, Antimicrob Agents Chemother 1996 Mar; 40(3):637-641.

[11] Fitzgerald RL, Herold DA., Serum total testosterone: immunoassay compared with negative chemical ionization gas chromatography-mass spectrometry, Clin Chem 1996 May; 42(5):749-755.

[12] Luceri F et al., Gas chromatography-mass spectrometry measurement of 6-beta-OH-cortisol/cortisol ratio in human urine: a specific marker of enzymatic induction, Clin Chem Lab Med 2001 Dec;39(12):1234-1249

10

[13] Munro CJ et al., Relationship of serum estradiol and progesterone concentrations to the excretion profiles of their major urinary metabolites as measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay, Clin Chem 1991 Jun; 37(6):838-844.

[14] Metaye T et al., Comparative measurement of progesterone receptors in breast cancer by biochemical and immunoenzymatic assays, Ann Biol Clin (Paris) 1990; 48(10):732-736

20

[15] Foekens JA et al., Comparison of enzyme immunoassay and dextran-coated charcoal techniques for progesterone receptor determination in human breast cancer cytosols, J Steroid Biochem 1988 Jun; 29(6):571-574.

30

[16] Hosoda H et al., Sensitivity of steroid enzyme immunoassays. Comparison of four label enzymes in an assay system using a monoclonal anti-steroid antibody, Chem Pharm Bull (Tokyo) 1989 Jul; 37(7):1834-1837

[17] Hubl W et al., An improved solid-phase enzyme and luminescent immunoassay system for steroid hormones and digoxin, Clin Chem 1988 Dec; 34(12):2521-2523

[18] Hocart CH et al, Mass spectrometry and chromatography of t-butyldimethylsilyl derivatives of cytokinin bases, Cytokine Anal Biochem 1986 Feb 15; 153(1):85-96.

40

- [19] Garcia de Salamone IE et al., Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants, *Can J Microbiol* 2001 May; **47**(5):404-411.
- [20] Trione EJ et al., A quantitative fluorescence enzyme immunoassay for plant cytokinins, *Anal Biochem* 1987 Apr; **162**(1):301-308.
- [21] Steffenrud S et al., Gas chromatography-mass spectrometry of monohydroxyeicosatetraenoic acids as their methyl esters trimethylsilyl, allyldimethylsilyl and tert.-butyldimethylsilyl ethers, *J Chromatogr* 1987 May 15; **416**(2):219-235. 10
- [22] Smith BJ et al, Measurement of plasma prostaglandin E2 using capillary gas chromatography negative ion chemical ionization mass spectrometry, *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1983 Apr; **40**(1):73-86. 20
- [23] David Percival M, Continuous spectrophotometric assay amenable to 96-well plate format for prostaglandin E synthase activity, *Anal Biochem* 2003 Feb 15; **313**(2):307-310.
- [24] Hoffman SW et al., A reliable and sensitive enzyme immunoassay method for measuring 8-isoprostaglandin F2 alpha: a marker for lipid peroxidation after experimental brain injury, *Neurosci Methods* 1996 Oct; **68**(2):133-136 30
- [25] Knapp RD 1979 Handbook of analytical derivatization reactions New York John Willey and sons.
- [26] Lau HL et al, 1966, *J Gas Chromatography* **4**, 136.
- [27] Tallent WH, et al., Bis(trimethylsilyl)acetamide in the silylation of lipolysis products for gas-liquid chromatography, *J Lipid Res* 1968 Jan; **9**(1):146-148 40
- [28] Mawhinney TP et al., Gas-liquid chromatography and mass spectral analysis of mono-, di- and

tricarboxylates as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives, *J Chromatogr* 1986 Jun 27; 361:117-

[29] Mawhinney TP et al., Simultaneous determination of N-acetylglucosamine, N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosaminitol and N-acetylgalactosaminitol by gas-liquid chromatography, *J Chromatogr* 1986 Jan 3; 351(1):91-102

10

[30] Bazan AC and Knapp DR, Improved derivative of 6-ketoprostaglandin F1 for gas chromatography-mass spectrometric analysis, *J Chromatography* 1982, 236, 201-207.

[31] Choi MH et al., Determination of estrone and 17 beta-estradiol in human hair by gas chromatography-mass spectrometry, *Analyst* 2000 Apr; 125(4):711-714.

20

[32] Dehennin L, Estradiol-17 beta determined in plasma by gas chromatography-mass spectrometry with selected ion monitoring of mixed silyl ether-perfluoroacyl ester derivatives and use of various stable-isotope-labeled internal standards, *Clin Chem* 1989 Apr; 35(4):532-.

[33] Andersson SH et al., Analysis of profiles of unconjugated steroids in rat testicular tissue by gas chromatography-mass spectrometry, *J Steroid Biochem* 1985 Oct; 23(4):469-.

30

[34] Ishikawa E et al., Development and applications of sensitive enzyme immunoassay for antibodies: a review, *J Clin Lab Anal* 1989; 3(4):252-265.

[35] Ishikawa E, Development and clinical application of sensitive enzyme immunoassay for macromolecular antigens-a review, *Clin Biochem* 1987 Dec; 20(6):375-385.

40

[36] Oellerich M, Enzyme-immunoassay: a review, *J Clin Chem Clin Biochem* 1984 Dec; 22(12): 895-904.

[37] O'Sullivan MJ et al., Enzyme immunoassay: a review, *Ann Clin Biochem* 1979 Sep; **16**(5):221-240.

[38] EZAN E et al, Strategies for developing specific and sensitive radioimmunoassays. In : *Handbook of Pharmacology : Radioimmunoassay in basic and clinical pharmacology* (Patrono C. and Beskar P., eds) **82**(1987)143-179.

10

[39] Buscarlet L et al., Cross-linking of 17 beta-estradiol to monoclonal antibodies by direct UV irradiation: application to an enzyme immunometric assay, *Anal Chem* 1999 Mar 1; **71**(5):1002-1008.

[40] Nakagomi M et al., Enzyme immunoassay for the measurement of 17-alpha-estradiol 17-N-acetylglucosaminide in rabbit urine, *Steroids* 1999 Apr; **64**(4):301-307.

20

[41] el Jabri J, Enzyme immunoassay for plasma estradiol using a monoclonal antibody, *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991 Mar; **38**(3):339-343.

[42] Dhar TK et al., Homogeneous enzyme immunoassay of estradiol using estradiol-3-O-carboxymethyl ether as hapten, *Steroids* 1988 May-Jun; **51**(5-6):519-526.

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

30

[44] EP-A-0139552.

[45] US 5,047,300.

【図面の簡単な説明】

【0200】

【図1】その抗体(Ab)によって認識されるエストラジオール(Es)の部分を示す図であり、抗体によって認識されるエストラジオール分子の部分のSi原子と-OHとの結合が、抗体がこの分子を認識するのを阻止する。

40

【図2】競合によって検出を行う第1の実施形態による、本発明の方法によってHFを検出するための概略のスキームを示す図である。

【図3】競合イムノアッセイ(左側)と、そうしたアッセイを用いて得られるシグナルの測定(右側)とを示す図であり、この図では、S(%)は抗体(Ab)と結合しているトレーサー(T)によってもたらされるシグナルを表し、[Es](M)は未変性エストラジオールのモル濃度(モル/l)を表す。

【図4】BTSFAを用いて得られたトリメチルシリルエストラジオールの脱シリル化に対する種々の有機酸の効果を示すグラフであり(B/Boは、以下の実施例2のプロトコールによる免疫学的試験での、HFの存在下のシグナル(Bは結合を表す)と、HFの非存在下のシグナル(

50

Boは非結合を表す)との比の形でのシグナルの尺度である)、 $[H^+]$ (M)はこのグラフで特定されている各酸の酸モル濃度を表す。

【図5】エストラジオールを脱シリル化するための条件、すなわち、温度、50mMリン酸塩(P)緩衝液のpHの検討を示すグラフである(B/Boシグナルは図4の場合と同様に測定)。

【図6】50mMリン酸塩緩衝液(pH5.5)での、シリル化エストラジオールの脱シリル化に対する種々の酸の効果を示す図であり、 $[H^+]$ (M)はこのグラフで特定されている各酸の酸モル濃度を表す。データは塩酸、硝酸または硫酸でも同様である(B/Boシグナルシグナルは図4の場合と同様に測定)。

【図7】他の求核物質およびハロゲンと比較した場合の、本発明の方法によるHFの検出の特異性を示すグラフであり、 $[P]$ (M)は、ハロゲンまたは他の求核物質のモル濃度を表し、各ハロゲンはこのグラフで特定されている(B/Boシグナルは図4の場合と同様に測定)。

【図8】種々の塩の存在下での、本発明の方法によるHFの検出の特異性を示すグラフであり、 $[X^+F^-]$ (M)はフッ素塩のモル濃度を表し、各塩はこのグラフで特定されている(B/Boシグナルは図4の場合と同様に測定)。

【図9】本発明の方法によって検出された(d)フッ素[F]の濃度(μ モル/l)と、フッ素で汚染された大気サンプル中の理論濃度($[F]_{th}$)との間の相関を示すグラフである。

【図10】図10-14は、非競合の免疫学的アッセイプロトコールにしたがった、特異的抗体による非シリル化エストラジオールの認識に関して得られた実験結果を表すグラフである。図10は、エストラジオールの濃度(μ g/ml)を変えて、アミノ基を有するマイクロタイトレーションプレート(アミノ化Nuncプレート)へのエストラジオールカルボキシメチルエーテル(EstCME)の結合について得られたシグナル(S)(mOD)を示す図である。

【図11】ポリリシン(μ g/ml)を変えて、ポリリシン(poly-Lys)-活性化マイクロタイトレーションプレートへのエストラジオールカルボキシメチルエーテルの結合について得られたシグナル(S)(mOD)(吸光度414nmで測定)を示す図である。

【図12】ポリリシン(μ g/ml)を変えて、ポリリシン(poly-Lys)-活性化マイクロタイトレーションプレートへのエストラジオールカルボキシメチルエーテルの結合について得られたシグナル(S)(mOD)(吸光度414nmで測定)を示す図である。

【図13】MTSBTFAによるエストラジオールカルボキシメチルエーテルのシリル化の試験を示す図であり、シリル化効率は、MTSBTFA(1/5;1/2;1/1)の希釈度と温度()を変えて、シグナル(S)(mOD)の増大で測定する。

【図14】エストラジオールカルボキシメチルエーテルに続く、イムノメトリックフォーマット試験を示す図であり、シグナル(S)(mOD)は、HFが存在するまたはしない場合に依りて測定される。この図で、BoはHFの存在しない場合(対照)のシグナルを表す。

【図15】テトラペプチドすなわちAcSDKPであるシリル化有機化合物を用いて、本発明の方法で実施して得られた実験結果をグラフの形で示す図であり、シグナル(S(mOD))は414nmで測定する。2つのシリーズのアッセイを実施した。一方のシリーズでは第1のシリル化剤(MTSBTFA)でシリル化されたテトラペプチドを用い、他方のシリーズでは第2のシリル化剤(BSTFA)でシリル化されたテトラペプチドを用いた。シリーズごとに22、37および70で3回のアッセイを行い、各ケースで10、30および60分に測定を行った。

【図16】脱シリル化温度(T())を変えて、本発明の方法によるフッ素の検出の効率の検討で得られた実験結果を示すグラフであり、シグナル(S(mOD))は414nmで測定。用いたシリル化化合物はMTBSTFAで得られた図15での化合物である。

【図17】エストラジオールの誘導体であるシリル化有機化合物を用いて、本発明の方法を実施して得られた実験結果を示すグラフであり、シグナル(S(mOD))は、フッ素[F]の濃度(マイクロモル/l(μ M))を変えて、414nmで測定する。

【図18】本発明の方法の検出ステップで用いることができる、非競合の免疫学的検出の機構を図解的に示す図である。

【図19】ジメチルスルホキシド(DMSO)の存在下で、本発明の方法によるフッ素の検出結果を示すグラフであり、B/Boは、HF(B)の存在下のシグナルと、HF(Bo)の非存在下のシグナルの比の形でのシグナルの尺度である。 $[F^-]$ (M)はフルオリドイオンのモル濃度である

10

20

30

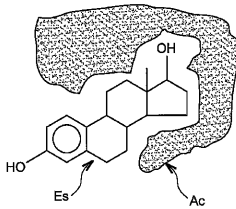
40

50

o

【 図 1 】

FIG. 1



【 図 3 】

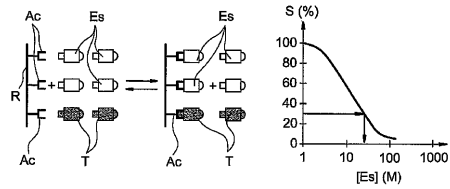
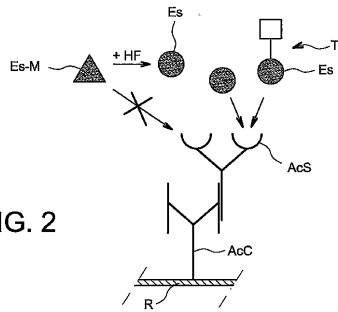


FIG. 3

【 図 2 】

FIG. 2



【 図 4 】

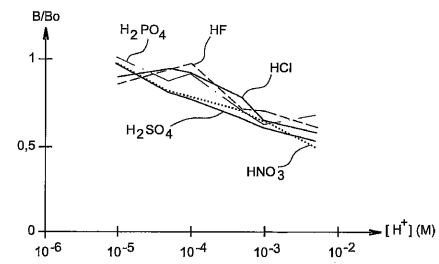


FIG. 4

【 5 】

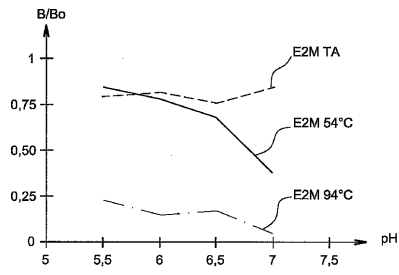


FIG. 5

【 6 】

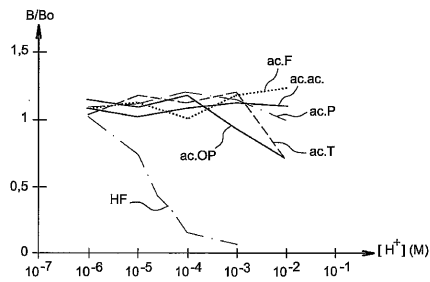


FIG. 6

【 9 】

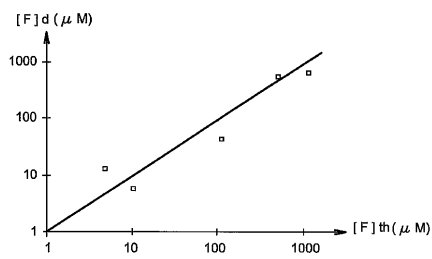


FIG. 9

【 10 】

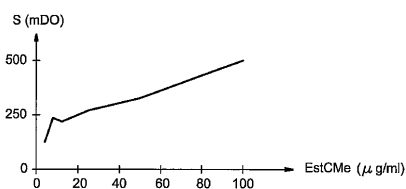


FIG. 10

【 7 】

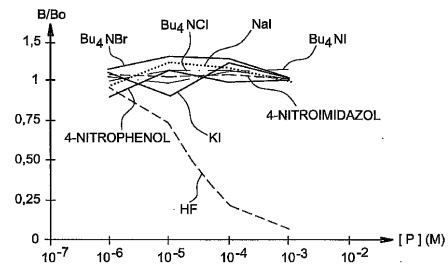


FIG. 7

【 8 】

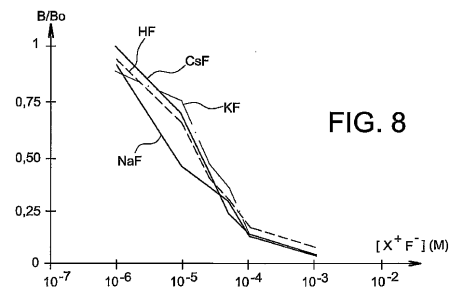


FIG. 8

【 11 】

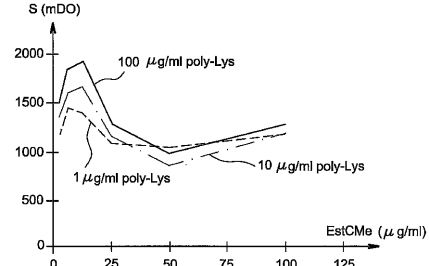


FIG. 11

【 12 】

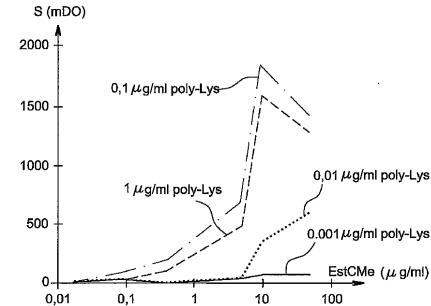


FIG. 12

【 13 】

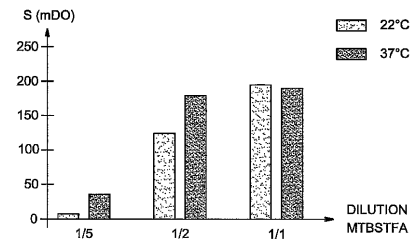


FIG. 13

【 15 】

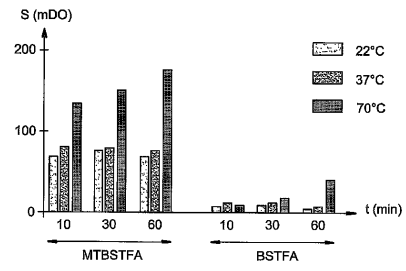


FIG. 15

【 14 】

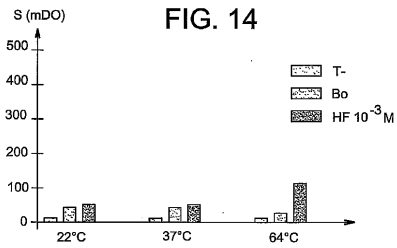


FIG. 14

【 16 】

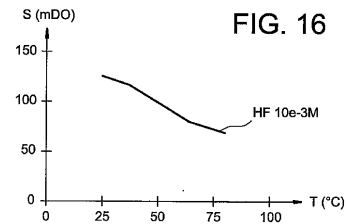


FIG. 16

【 17 】

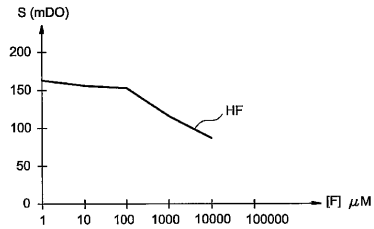


FIG. 17

【 19 】

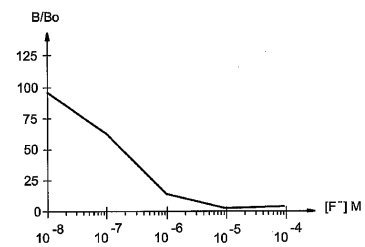


FIG. 19

【 18 】

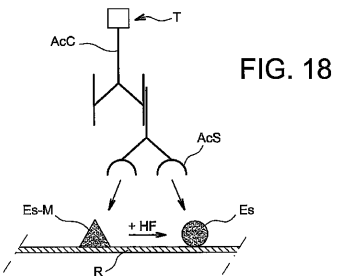


FIG. 18

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/050194

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DESCALZO, ANA B ET AL: "A new method for fluoride determination by using fluorophores and dyes anchored onto MCM-41." CHEM. COMMU., vol. 6, 11 March 2002 (2002-03-11), pages 562-563, XP002275945 the whole document	1, 15
P, X	WO 03/065408 A (BELTRAN PORTER DANIEL ; EL HASKOURI JAMAL (ES); MARCOS MARTINEZ MAR) 7 August 2003 (2003-08-07) the whole document	1, 15
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
E earlier document but published on or after the international filing date		*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		*Z* document member of the same patent family
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
28 September 2004	15/10/2004	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Mauhin, V	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/050194

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2003, no. 06, 3 June 2003 (2003-06-03) & JP 2003 043025 A (TOHOKU TECHNO ARCH CO LTD), 13 February 2003 (2003-02-13) abstract -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR2004/050194

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03065408 A	07-08-2003	WO 03065408 A2	07-08-2003
JP 2003043025 A	13-02-2003	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande Internationale No PCT/FR2004/050194
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 G01N33/53		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, PAJ, WPI Data, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	DESCALZO, ANA B ET AL: "A new method for fluoride determination by using fluorophores and dyes anchored onto MCM-41." CHEM. COMMU., vol. 6, 11 mars 2002 (2002-03-11), pages 562-563, XP002275945 le document en entier	1, 15
P, X	WO 03/065408 A (BELTRAN PORTER DANIEL ;EL HASKOURI JAMAL (ES); MARCOS MARTINEZ MAR) 7 août 2003 (2003-08-07) le document en entier	1, 15
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents		<input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe
* Catégories spéciales de documents cités:		
A document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
E document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date		*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
L document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)		*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
O document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens		*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets
P document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
28 septembre 2004		15/10/2004
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentiaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Mauhin, V

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No
PCT/FR2004/050194

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 2003, no. 06, 3 juin 2003 (2003-06-03) & JP 2003 043025 A (TOHOKU TECHNO ARCH CO LTD), 13 février 2003 (2003-02-13) abrégé -----	1-26

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050194

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03065408	A	07-08-2003	WO 03065408 A2	07-08-2003
JP 2003043025	A	13-02-2003	AUCUN	

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 エリック・エザン

フランス・F - 9 2 2 4 0 ・マラコフ・リュ・ヴィクトル・ウーゴ・1 6

(72) 発明者 マリー - アストリ・サゴ

フランス・F - 9 1 1 5 0 ・アブヴィル・ラ・リヴィール・アンパス・デ・パヴィロン - ボワシャ
ンポー・4

(72) 発明者 フィリップ・プラデール

フランス・F - 9 1 1 4 0 ・ヴィルボン・シュル・イヴェット・リュ・ロサンヌ・3 0

专利名称(译)	检测氟化物或氟化氢的方法及其检测试剂盒		
公开(公告)号	JP2007501406A	公开(公告)日	2007-01-25
申请号	JP2006530438	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)	コミツサリア タレネルジー アトミック		
[标]发明人	エリックエザン マリーアストリサゴ フィリッププラデール		
发明人	エリック・エザン マリー-アストリ・サゴ フィリップ・プラデール		
IPC分类号	G01N30/06 G01N30/88 G01N33/53 G01N31/00 G01N33/00 G01N33/84		
CPC分类号	G01N33/84 Y10T436/19 Y10T436/193333		
FI分类号	G01N30/06.E G01N30/88.G G01N33/53.U		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	2003050160 2003-05-20 FR 2003050167 2003-05-22 FR		
其他公开文献	JP4537402B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及检测和/或定量样品中氟化物 (F-2) 或氟化氢 (HF) 浓度的方法, 将样品与甲硅烷基化的有机化合物在水溶液中接触以在氟化物或氢氟酸存在下获得氟化物或氢氟酸, 将有机甲硅烷基化合物去甲硅烷基化, 以便可以以可识别的方式检测和/或加入甲硅烷基化的有机化合物和脱甲硅烷基化的有机化合物, 并且氟化物或氟化物脱卤有机化合物的出现或有机甲硅烷基化合物的消失, 在卤化氢存在下发生, 并且在测量溶液中检测和/或定量给料。根据本发明, 通过使用 10⁻² l HF / 10⁶ l 空气 (10 ppb), 可以非常实用且容易地制备氟化氢或氟化物的存在。也是 0。可以在溶液中检测浓度为 5 至 1 μg / ml 的 HF。

