

邻苯二甲酸二丁酯免疫检测

I. 人工抗原的制备及表征

张明翠^{a, b} 庄惠生^{a*} 郎 庆^a(^a 东华大学环境科学与工程学院 上海 200051; ^b 安徽师范大学化学与材料科学学院 芜湖)

摘 要 通过保留丁酯基结构和在芳环上引入氨基取代基合成了一种邻苯二甲酸二丁酯半抗原衍生物 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯, 通过 ¹H NMR、IR 和 UV 确证了结构, 其中 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯的 2 个紫外吸收峰分别为: $\lambda_1 = 212 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 258 \text{ nm}$; 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯的 2 个紫外吸收峰分别为: $\lambda_1 = 226 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 288 \text{ nm}$ 。半抗原衍生物通过重氮化反应与 BSA 偶联, 得到人工抗原, 经荧光光谱 ($\lambda_{ex} = 307 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 468 \text{ nm}$)、体系颜色变化和免疫实验确证偶联成功, 抗原结合比为 1:3。为进一步的抗体制备和免疫分析提供可靠的免疫原。

关键词 邻苯二甲酸二丁酯, 人工抗原, 半抗原, 制备, 表征

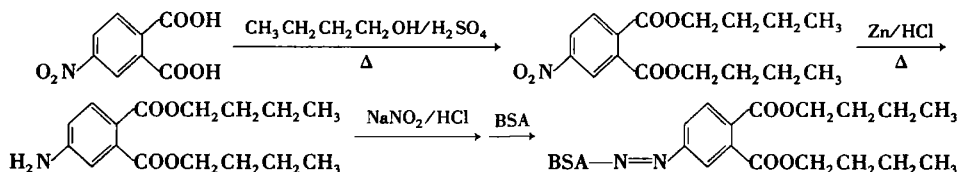
中图分类号: O 625.5 X 502

文献标识码: A

文章编号: 1000-0518(2006)08-0850-04

邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 是一种主要的增塑剂和软化剂, 用于塑料、橡胶以及化妆品、香料、印染、涂料等行业。过去一直认为邻苯二甲酸酯类化合物毒性低且有良好的理化特性, 而无限制地生产和使用。而近年来研究发现邻苯二甲酸酯类物质对环境、生物与食品能造成污染^[1, 2]。K lensassar 等^[3, 4]发现邻苯二甲酸二丁酯对人对上呼吸道黏膜细胞及淋巴细胞有遗传毒性, 通过饮食、呼吸和皮肤等途径被人体吸收, 对雄性生殖系统造成危害。美国环保局 (USEPA) 和世界野生动物基金会 (WWF) 均将 DBP 列为环境激素类物质^[5, 6]。

目前对邻苯二甲酸类环境激素的监测主要有气相色谱、液相色谱和气液联用等色谱技术^[7, 8], 国内外有关免疫分析方法监测邻苯二甲酸酯类环境激素的较少^[9, 10]。免疫分析具有特异性强、灵敏度高、方便快捷、分析容量大、检测成本低、安全可靠等优点可以满足简单、快速、灵敏检测环境激素的要求^[11, 12]。邻苯二甲酸二丁酯为小分子化合物, 仅有反应原性而缺乏免疫原性。如何得到保留其抗原决定簇的人工抗原是实现免疫分析的关键步骤之一。本研究以 4-硝基邻苯二甲酸为原料, 经过酯化、还原和与 BSA 偶联反应等一系列步骤, 合成邻苯二甲酸二丁酯人工抗原, 为进一步建立免疫分析方法检测邻苯二甲酸二丁酯提供可靠的免疫原。合成路线如下:



1 实验部分

1.1 仪器和试剂

XRC-1 型显微熔点测定仪 (温度未经校正); Nicolet FT-R 170s 5DX 型红外光谱仪, KBr 压片; AVANCE DMX 500 型核磁共振谱仪, TMS 为内标; U-3010 型紫外分光光度计 (日本日立); 970CRT 型荧光分光光度计 (上海三科仪器有限公司); pH-3D 型酸度计 (上海雷磁仪器厂); 电子分析天平 (日本岛

2005-09-03 收稿, 2005-11-10 修回

国家自然科学基金资助项目 (20277005)

通讯联系人: 庄惠生, 男, 1955 年生, 教授, 博士生导师; E-mail: hszhuang@dhu.edu.cn; 研究方向: 免疫分析、发光分析及分析试剂合成

津公司)。

4 硝基邻苯二甲酸(纯度 $\geq 99\%$, 香港泰兴盛铭精细化工有限公司), 牛血清白蛋白(BSA, 华美生物工程公司), 乙醇、盐酸、锌粉、羊毛脂、液体石蜡, 卡介苗(上海生物制品研究所)。

实验用水均为二次蒸馏水。所用试剂均为分析纯。

1.2 4 硝基邻苯二甲酸二丁酯的合成

20 g (0.095 mol) 4 硝基邻苯二甲酸中加入 26 mL 正丁醇, 搅拌条件下加入 3.3 mL 浓 H_2SO_4 催化, 120°C 搅拌回流 7 h 后, 蒸馏除去未反应的丁醇和生成的水。趁热倒入冰水中, 油状粗品用质量分数为 10% 的 Na_2CO_3 洗涤至水层无色 (pH 值为 7~8) 后, 分离出油状物, 用无水乙醇溶解除去不溶物, 加热后除去少量乙醇, 趁热置冰箱中冷却, 得到黄色油状液体 27.3 g 产率 89%。

1.3 4 氨基邻苯二甲酸二丁酯的合成

将 1.5 g (5.6 mmol) 4 硝基邻苯二甲酸二丁酯溶于 280 mL 苯中, 加入 2.8 g 纯锌粉。分次加入 8.2 mL 浓 HCl 室温搅拌 15 min 加入 2.8 g 纯锌粉, 室温搅拌 12 h。向反应体系中加入 340 mL 冷水, 用 1 mol/L NaOH 溶液中和至碱性。分离出苯层。水层用苯再萃取。合并萃取液, 水洗后用无水 Na_2SO_4 干燥。蒸馏除去苯, 得浅黄色固体, 无水乙醇重结晶, 得淡黄色晶体 1.36 g 产率 83%。熔点 $67\sim 68^\circ\text{C}$ 。

1.4 4 氨基邻苯二甲酸二丁酯人工抗原的合成

称取 0.046 9 g (0.16 mmol) 4 氨基邻苯二甲酸二丁酯与 0.1 mL 浓 HCl 和 3 mL H_2O 混合, 加热溶解后, 置冰浴中冷至 5°C 以下, 低温搅拌下, 滴入 4 mL 0.011 0 g NaNO_2 的水溶液。继续反应 30 min 加少量尿素除去未反应的 NaNO_2 。将 160 mg BSA 的硼酸钠缓冲液 (pH 值为 9.20) 40 mL 溶液逐滴加入上述重氮盐中, 逐渐有橙红色溶液出现, 继续反应 2 h 得抗原粗品。将反应液装入透析袋, 置中性蒸馏水中透析 5 d 每天换水 2 次, 将获得的橙红色产品冷冻干燥, 分装冻存。

2 结果与讨论

2.1 半抗原衍生物的结构鉴定及理化性质

2.1.1 半抗原衍生物的结构鉴定 分别对上述合成的 4 硝基邻苯二甲酸二丁酯和 4 氨基邻苯二甲酸二丁酯进行红外光谱 (IR) 和核磁共振波谱 ($^1\text{H NMR}$) 分析, 结果如下:

4 硝基邻苯二甲酸二丁酯: IR σ/cm^{-1} : 1 532 1 347 ($-\text{NO}_2$), 1 732 ($\text{C}=\text{O}$), 1 276 1 128 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 2 956 2 871 ($-\text{CH}_3$), 1 416 ($-\text{OCH}_2-$), 1 609 ($\text{C}=\text{C}$); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz CDCl_3), δ 8.42 (d 1H, $J=1.8\text{ Hz A H}$), 8.23 (dd 1H, $J=8.8\text{ Hz A H}$), 7.70 (d 1H, $J=8.8\text{ Hz A H}$), 4.23 (q 2H, $J=7.3\text{ Hz OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.16 (q 2H, $J=7.3\text{ Hz OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.64~1.60 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.59~1.57 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.33~1.31 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.29~1.28 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.86 (t 3H, $J=7.3\text{ Hz OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.82 (t 3H, $J=7.3\text{ Hz OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)。

4 氨基邻苯二甲酸二丁酯: IR σ/cm^{-1} : 3 454 3 356 ($-\text{NH}_2$), 1 734 ($\text{C}=\text{O}$), 1 250 1 151 ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$), 2 956 2 865 ($-\text{CH}_3$), 1 446 ($-\text{OCH}_2-$), 1 605 ($\text{C}=\text{C}$, Ar); $^1\text{H NMR}$ (300 MHz CDCl_3), δ 7.72 (d 1H, $J=8.4\text{ Hz A H}$), 6.70 (d 1H, $J=2.2\text{ Hz A H}$), 6.66 (dd 1H, $J=8.4\text{ Hz A H}$), 4.29 (t 2H, $J=7.3\text{ Hz OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.23 (t 2H, $J=7.3\text{ Hz OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 4.12 (b 2H, NH_2), 1.76~1.65 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.49~1.39 (m, 4H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 0.98 (t 6H, $J=7.3\text{ Hz OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$)。

从 IR 分析结果可知, 4 硝基邻苯二甲酸二丁酯在 $1\,800\sim 1\,720\text{ cm}^{-1}$, 4 氨基邻苯二甲酸二丁酯在 $1\,730\sim 1\,715\text{ cm}^{-1}$ 处分别有明显的芳酸酯 $\nu_{\text{C}=\text{O}}$ 吸收峰, 在 $1\,310\sim 1\,250\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\,150\sim 1\,100\text{ cm}^{-1}$ 处均有邻苯甲酸酯的伸缩振动的双带; 4 硝基邻苯二甲酸二丁酯的 IR 谱在 $1\,530\sim 1\,510\text{ cm}^{-1}$ 有 $-\text{NO}_2$ 不对称伸缩振动 ν_{as} , 在 $1\,350\sim 1\,330\text{ cm}^{-1}$ 处有 $-\text{NO}_2$ 对称伸缩振动 ν_{s} ; 4 氨基邻苯二甲酸二丁酯的 IR 谱在 $3\,500$ 和 $3\,400\text{ cm}^{-1}$ 附近出现了伯胺的 $\text{N}-\text{H}$ 键的不对称伸缩振动 ($\nu_{\text{asN}-\text{H}}$) 和对称伸缩振动 ($\nu_{\text{sN}-\text{H}}$)。

2个吸收带,,证实硝基已被还原为氨基。其它丁基-CH₂的不对称伸缩振动和对称伸缩振动、丁氧基的对称变形振动及芳核的 2个 $\nu_{C=C}$ 吸收带均在相应位置出现。核磁共振谱也证实了二者的结构。

2 1 2 薄层层析 用 $V(\text{乙酸乙酯}) : V(\text{正己烷}) = 1 : 3$ 的混合液作展开剂,在室温下于硅胶板上展开,得其比移值 4硝基邻苯二甲酸二丁酯 $R_f = 0.93$ 4氨基邻苯二甲酸二丁酯 $R_f = 0.70$ 。

2 1 3 紫外光谱比较 原料 4硝基邻苯二甲酸(4 NPA)及合成半抗原衍生物 4硝基邻苯二甲酸二丁酯(4 DBNP)、4氨基邻苯二甲酸二丁酯(4 DBAP)的紫外光谱见图 1。由图可见,4硝基邻苯二甲酸二丁酯的 2个紫外吸收峰分别为 $\lambda_1 = 212 \text{ nm}$ 和 $\lambda_2 = 258 \text{ nm}$, 4氨基邻苯二甲酸二丁酯的 2个紫外吸收峰分别为 $\lambda_1 = 226 \text{ nm}$ 和 $\lambda_2 = 288 \text{ nm}$ 。合成物中苯环上的硝基改为氨基后,其吸收峰红移。

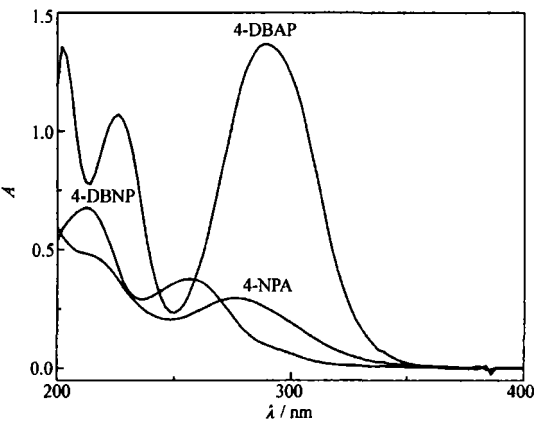


图 1 4 NPA、4 DBNP 和 4 DBAP紫外光谱比较
Fig 1 UV spectra of 4 NPA、4 DBNP and 4 DBAP

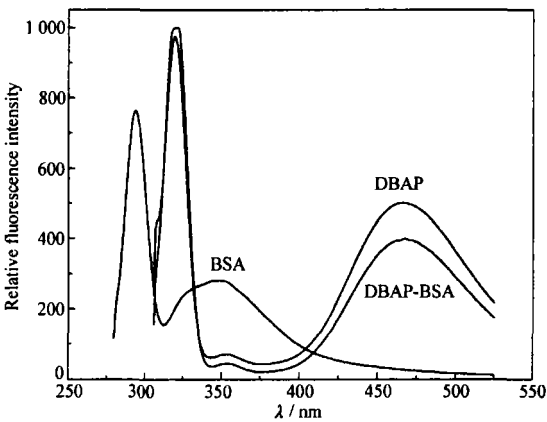


图 2 BSA、DBAP和 DBAP BSA的荧光光谱
Fig 2 Fluorescence spectra of BSA、DBAP and DBAP BSA

2 2 人工抗原的鉴定

分别对 BSA、4氨基邻苯二甲酸二丁酯(DBAP)和合成的邻苯二甲酸二丁酯人工抗原(DBAP-BSA)稀释适当倍数后进行荧光光谱扫描,结果见图 2 其中 BSA 为 $\lambda_{ex} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 350 \text{ nm}$, DBAP 和 DBAP-BSA 均为 $\lambda_{ex} = 307 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 468 \text{ nm}$ 。从荧光光谱图中可见, DBAP具有很强的荧光,当 BSA 与其偶联后,主要呈现 DBAP在 468 nm 的荧光峰,而 BSA 在 350 nm 的荧光峰不明显。DBAP与 BSA 偶联主要是通过 DBAP上的苯氨基与亚硝酸反应形成重氮盐后,直接连接于蛋白质分子中酪氨酸残基上酚羟基的邻位,或与组氨酸残基上的咪唑环或色氨酸残基的吲哚环反应,从而降低了 BSA 的荧光强度,同时 DBAP的荧光峰太强,也可将 BSA 的荧光峰部分掩盖。荧光光谱证实 DBAP与 BSA 偶联成功。由于偶联后形成共轭大 π 键,抗原结合物呈现明显的橙红色进一步证实 DBAP与 BSA 偶联效果较好。抗原结合比按下式进行计算为 13 1。

抗原结合比 = $\frac{\text{半抗原的物质浓度 (mol/L)}}{\text{BSA 物质浓度 (mol/L)}}$

2 3 抗原分子的设计

邻苯二甲酸酯类化合物对环境、生物与食品能造成污染,其主要以水解产生的单酯形式被吸收,单酯被认为是产生毒性的主要化合物。邻苯二甲酸酯被吸收后,主要以蛋白结合体形式通过血液分布于全身各器官。所以在设计制备人工抗原时,为了提高免疫动物后产生抗体的灵敏度和特异性,我们选择保留邻苯二甲酸二丁酯的主要功能团(酯键),而在苯环上引入氨基后与牛血清白蛋白(BSA)结合,作为免疫原用于免疫动物。有研究认为愈远离载体蛋白的基团,其特征反应愈明显,所以我们选择苯环上 4氨基作为偶联基团。

2 4 动物免疫实验

选择 2只成年健康雄性新西兰白兔,用合成的邻苯二甲酸二丁酯人工抗原经背部皮内多点注射和腿部肌肉注射进行免疫。经 6次加强免疫后,用琼脂双扩散法测定抗血清效价达到 1 64 对邻苯二甲酸

二丁酯的特异性也较好,说明全抗原合成非常成功,而且纯度较高。合成抗体经过间接竞争荧光免疫法检测其反应特异性,与其它邻苯二甲酸二丁酯结构类似的邻苯二甲酸酯类的交叉反应率 $<10\%$ 。

参 考 文 献

1 Mackintosh C E, Maldonado J W, Wu J H. *et al Environ Sci Tech*[J], 2004 **38**(7): 2 011
2 Casajuana N, Lacorte S J. *Agric Food Chem*[J], 2004 **52**(12): 3 702
3 K lensassar N H, Weissacher H, Kastenbauer E R. *AEur Arch Otorhinolaryngo*[J], 2000 **257**(6): 337
4 K lensassar N H, Walther B C, Kastenbauer E R. *Teratog Carcinog Mutagen*[J], 2001 **21**(3): 189
5 Q I W en Q (齐文启), SUN Zong Guang(孙宗光). Monitoring of Trace Organic Pollutants(痕量有机污染物的监测) [M]. Beijing(北京): Chemical Industry Press(化学工业出版社), 2002 5
6 Colborn T, Dumanoski D, Myers J P. Our Stolen Future[M]. New York: Penguin Books, 1996
7 Suzuki T, Yanguchi K, Suzuki S. *Environ Sci Tech*[J], 2001 **35**(18): 3 757
8 O take T, Yoshinaga J, Yanagisawa Y. *Environ Sci Tech*[J], 2001 **35**(15): 3 099
9 Ius A, Bacigalupo M A, Meroni G. *et al Fresenius' J Anal Chem*[J], 1993 **345**: 589
10 Goda Y, Kobayashi A, Fukuda K. *et al Water Sci Tech*[J], 2000 **42**(7~8): 81
11 Zhao X Y, Scott A, Shippy. *Anal Chem*[J], 2004 **76**(7): 1 871
12 M kaele N ichkova, Jun Feng, Francisco Sanchez Baeza. *et al Anal Chem*[J], 2003 **75**(1): 83

Imm unological Detection of Dibutyl Phthalate
I . Preparation and Characterization of Artificial Antigen

ZHANG Ming Cui^{a, b}, ZHUANG Hui Sheng^{a*}, LANG Qing^a

(^a College of Environmental Science and Engineering Donghua University, Shanghai 200051;

^b College of Chemistry and materials Science Anhui Normal University, Wuhu)

Abstract Dibutyl phthalate hapten (dibutyl 4-aminophthalate) was synthesized by introducing amino group as a substituent at the aromatic ring while retaining the ester group. The product was characterized by means of ¹H NMR, IR and UV, with $\lambda_1=212\text{ nm}$, $\lambda_2=258\text{ nm}$ for the UV of dibutyl 4-nitrophthalate and $\lambda_1=226\text{ nm}$, $\lambda_2=288\text{ nm}$ for the UV of dibutyl 4-aminophthalate. The hapten was conjugated to BSA via amino diazotization linkage. Thus artificial antigen was prepared and tested by fluorescence spectrum with $\lambda_{\text{ex}}=307\text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}=468\text{ nm}$ and the approximate molar ratio of dibutyl 4-aminophthalate to BSA was 13. The product was used as an immunogen, demonstrating that it is suitable for polyclonal antibody production. The present research has supplied an excellent immune antigen for further preparation and immunoassay of antibody obtained from dibutyl phthalate.

Keywords dibutyl phthalate, artificial antigen, hapten, preparation, characterization