



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108680738 A

(43)申请公布日 2018.10.19

(21)申请号 201810539631.9

(22)申请日 2018.05.30

(71)申请人 中国烟草总公司郑州烟草研究院  
地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

(72)发明人 陈黎 刘惠民 崔华鹏 赵乐  
樊美娟 谢复炜 张晓兵 聂聪  
秦亚琼 尚平平

(74)专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司  
41110  
代理人 姜振东

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

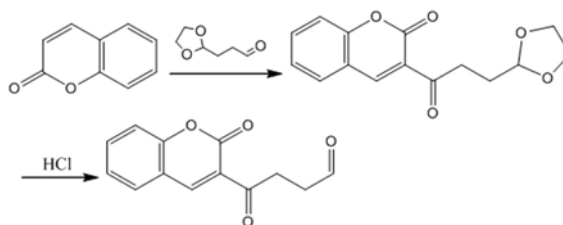
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

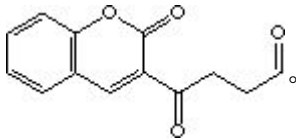
一种检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

(57)摘要

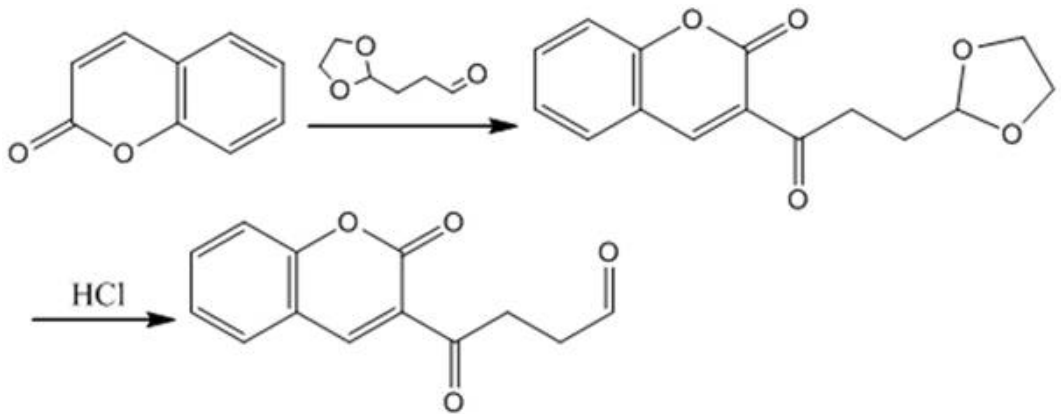
本发明公开了一种检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，所述结合物释放垫上包埋有荧光微球标记的香豆素单克隆抗体，所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区，所述检测区喷涂有香豆素半抗原-载体蛋白偶联物，所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体，所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到的。本发明还提供了该试纸条的制备方法及应用上述试纸条检测样品中香豆素的方法。本发明提供的试纸条和检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低的优点，能够实现对大批量样品中香豆素的快速检测和现场监控。



1. 一种检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,其特征在于:所述结合物释放垫上包埋有荧光微球标记的香豆素单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区,所述检测区喷涂有香豆素半抗原-载体蛋白偶联物,所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体;所述香豆素单克隆抗体是以香豆素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得;所述香豆素半抗原-载体蛋白偶联物是由香豆素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到,其分子结构式为:



2. 根据权利要求1所述的检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于:所述香豆素半抗原的制备反应过程如下:



3. 根据权利要求1所述的检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于:所述荧光微球是直径为100~300 nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,其表面连接有一COOH基团。

4. 根据权利要求3所述的检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于:所述荧光物质为镧系。

5. 根据权利要求1所述的检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,其特征在于:所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白或人血清白蛋白。

6. 一种权利要求1-5任一所述的检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 结合物释放垫的制备:用荧光微球标记香豆素单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备;

2) 硝酸纤维素膜的制备:将香豆素半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区;将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围,制成质控区;

3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴样品吸收垫、包埋有荧光微球标记香豆素单克隆抗体的结合物释放垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为时间分辨荧光免疫层析试纸条。

7. 一种应用权利要求1-5任一所述试纸条检测样品中香豆素的方法,其特征在于包括

以下步骤：

- 1) 样品前处理；
- 2) 用所述试纸条对样品进行检测；
- 3) 用荧光检测仪分析检测结果。

## 一种检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于食品安全中非法添加物检测领域,具体涉及一种检测烟用香精香料、烟草及烟草制品中香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 香豆素系化合物是一类具有芳香气味,母核为苯并 $\alpha$ -吡喃酮结构的天然产物,广泛分布于植物界,根据结构可分为简单香豆素系化合物、呋喃香豆素系化合物、吡喃香豆素系化合物和其他香豆素系化合物等。香豆素(coumarin)又名邻羟基桂酸内酯和1,2-苯并吡喃酮,是一种天然植物次生产品,是广泛存在于自然界中的一种内酯类化合物,于1820年发现于黑香豆中,主要以游离状态和苷的形式存在于植物中,在芸香科和伞形科植物中最多,其次存在于豆科、兰科、木樨科、茄科和菊科植物,少数来自微生物。香豆素作为一种重要的香料,常用作定香剂、脱臭剂,配制香水和香料,也用作饮料、食品、卷烟、塑料制品、橡胶制品等的增香剂,医药上将其加入药剂中作为矫味剂。实验发现,香豆素对小鼠胚胎有毒性,能引起痛觉消失,使中性胆碱酯酶发生变化,对大鼠为可疑致肿瘤物。香豆素在体内的含量达到一定量时具有生理毒性,通过长期的动物实验发现其具有肝毒性,主要是由代谢的途径导致P450(细胞色素P)及其依赖性酶的减少引起的。美国食品药品监督管理局(FDA)早在1954年就禁止将香豆素用作食品添加剂;欧洲食品安全局(EFSA)规定香豆素的每日耐受摄入量(TDI)为0.1 mg/kg bw;欧盟规定,对于洗去型化妆品,香豆素的含量不得超过30  $\mu\text{g/g}$ ,对于非洗去型化妆品,香豆素含量不得高于10  $\mu\text{g/g}$ ;2010年7月,台湾地区食品管理机构发布通知禁止在食品中添加香豆素,同时规定“惟饮料中因使用天然香料,导致天然香料本身含香豆素残留时,其含量仍应在2.0 mg/kg以下”。烟用香精香料在生产制造过程中有可能由天然植物精油引入香豆素,进而通过烟丝中添加的香精香料存在于烟草制品中,对消费者的健康造成潜在危害。因此,建立香豆素的快速检测方法,对香精香料及烟草制品进行质量控制十分必要。

[0003] 目前,常用检测方法有高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法、气相色谱法、气相色谱-质谱联用法等。由于以上方法均需先进检测仪器、检测费用昂贵、步骤繁琐、耗时,且对操作人员专业性要求较高,不适用于基层企事业单位的高通量快速筛查检测。

[0004] 荧光微球免疫层析技术是在荧光染料标记技术上发展起来的,作为一种免疫学检测方法,它是免疫亲和技术、免疫标记技术、免疫层析技术的结合,具有快速、操作简便等优点。相比传统标记物,荧光微球的发光强度可以随激发光的强度增强而增强,所以荧光微球标记有望提高免疫层析技术的检测限;而在微球壳结构的作用下,荧光微球具有相对稳定的形态结构,粒度均一、单分散性好、稳定性好、发光效率高、重复性好,有较好的生物相容性;形成微球后染料荧光猝灭大大减少,发射强而稳定,且基本不受外界环境介质变化的影响。因此相比上述检测方法,荧光微球免疫层析技术同时具有检测灵敏度高、操作简便、稳定性好的优点。

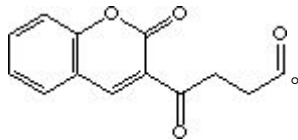
## 发明内容

[0005] 本发明的一个目的是针对上述现有技术的缺陷,提供一种灵敏度高、操作简便、检测快速、价格低廉的检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条;本发明的另一个目的是提供上述试纸条的制备方法;本发明的再一个目的是提供上述试纸条在检测香豆素中的应用。

[0006] 为了实现上述目的,本发明采取的一个技术方案是:

提供一种检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,它包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,所述结合物释放垫上包埋有荧光微球标记的香豆素单克隆抗体,所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区,所述检测区喷涂有香豆素半抗原-载体蛋白偶联物,所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体。

[0007] 所述香豆素单克隆抗体是以香豆素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得;所述香豆素半抗原-载体蛋白偶联物是由香豆素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白或人血清白蛋白,所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到,其分子结构式为:



[0008] 所述香豆素半抗原的制备具体包括以下步骤:

1) 取香豆素1.00 g,加入80 mL氯苯中搅拌溶解,加2.50 g叔丁醇过氧化氢,搅拌充分混匀,加3-(1,3-二氧杂烷-2-基)丙醛0.89 g,100℃搅拌24 h。停止反应后,加100 mL冷水,用100 mL乙酸乙酯萃取3次,使用50 mL水洗,有机相无水硫酸钠干燥蒸干,60 mL石油醚/二氯甲烷(v/v,1/1)重结晶,得到缩醛香豆素化合物1.70 g。

[0009] 2) 取缩醛香豆素1.70 g,加20 mL乙腈溶解,加1 mol/L稀盐酸10 mL,室温剧烈搅拌4 h,停止反应,旋蒸,除去乙腈,加水50 mL,加1mol/L的NaOH调节pH值到6,加70 mL 1,2-二氯乙烷萃取3次,100 mL水洗,蒸干,上硅胶柱,2 L二氯甲烷/甲醇(v/v,5/1)洗脱,分离纯化,得到丁醛香豆素半抗原1.30 g。

[0010] 所述荧光微球是直径为100~300nm的用聚苯乙烯包裹荧光物质的微球,其表面连接有一COOH基团,所述荧光物质为镧系。

[0011] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种制备上述检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条的方法,它包括如下步骤:

1) 结合物释放垫的制备:用市售的荧光微球标记香豆素单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备;

2) 硝酸纤维素膜的制备:将香豆素半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区;将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围,制成质控区;

3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴样品吸收垫、包埋有荧光微球标记香豆素单克隆抗体的结合物释放垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0012] 具体地说,步骤包括:

- 1) 将香豆素进行缩醛反应,制备香豆素半抗原;
- 2) 将香豆素半抗原与载体蛋白偶联,制备香豆素半抗原-载体蛋白偶联物;
- 3) 用香豆素半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌香豆素单克隆抗体的杂交瘤细胞株;
- 4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;
- 5) 分别将香豆素半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜的检测区范围(T)和质控区范围(C);
- 6) 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH为7.2、0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37°C下烘干2 h;
- 7) 用市售的荧光微球标记香豆素单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后备用;
- 8) 在底板上依次搭接粘贴样品吸收垫、包埋有荧光微球标记香豆素单克隆抗体的结合物释放垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0013] 本发明采取的另一个技术方案是提供一种上述检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条在检测香豆素中的应用,它包括如下步骤:

- 1) 样品前处理;
- 2) 用所述的检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条进行检测;
- 3) 用荧光检测仪分析检测结果。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

(1) 特异性强、灵敏度高:本试纸条采用将荧光微球标记的香豆素单克隆抗体包埋在结合物释放垫上,具有亲水性佳、可大容量吸附抗体偶联物、迅速重湿润、抗体结合物释放充分、性能好、释放快、形态好等优势,从而减少误差,降低成本,增加整个体系的反应灵敏度。

[0015] (2) 时间分辨荧光具有较大stock位移,减少了由激发光引起的特异杂散光对检测的干扰,提高荧光检测稳定性;其寿命长,消除了环境中荧光物质对待测物的干扰;其激发波长较宽,发射光谱范围较窄,降低了本底荧光强度,提高了分辨率。

[0016] (3) 荧光微球表面包裹了聚苯乙烯,实现了对荧光物质镧系的保护,减少了外界环境的干扰,增加了荧光微球的稳定性及荧光寿命。

[0017] (4) 荧光微球表面修饰活性基团—COOH,采用化学偶联的方法来标记抗体,形成抗体与微球的稳定结合。

[0018] 目前尚无用于检测烟用香精香料及烟草制品中香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条,本发明填补了该空白。本发明的试纸条具有成本低、操作简单、检测时间短、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点,用本发明试纸条检测香豆素的方法,简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

## 附图说明

[0019] 图1为时间分辨荧光免疫层析试纸条剖面结构示意图;

图2为香豆素半抗原合成路线图(该图作为摘要附图)。

## 具体实施方式

[0020] 下面结合实施例及附图对本发明做进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0021] 实施例1 检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条的构成

### 一、试纸条

所述试纸条是由底板、样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫组成;

所述样品吸收垫1、结合物释放垫2、硝酸纤维素膜3和吸水垫4依次按顺序搭接粘贴在底板7上,结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与硝酸纤维素膜的始端连接,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫的末端与PVC底板的末端对齐;

所述硝酸纤维素膜上固定有检测区5和质控区6,检测区喷涂有香豆素半抗原-载体蛋白偶联物(香豆素半抗原-卵清蛋白偶联物),质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体;

所述底板为PVC底板;所述结合物释放垫为玻璃棉;所述吸水垫为吸水纸。

[0022] 实施例2 检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备

检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

1) 结合物释放垫的制备:用市售的荧光微球标记香豆素单克隆抗体,并将其以特定缓冲体系稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后制备;

2) 硝酸纤维素膜的制备:将香豆素半抗原-载体蛋白偶联物喷涂到硝酸纤维素膜上的检测区范围,制成检测区;将羊抗鼠抗抗体喷涂到硝酸纤维素膜上的质控区范围,制成质控区;

3) 组装和剪切:在底板上依次搭接地粘贴样品吸收垫、包埋有荧光微球标记香豆素单克隆抗体的结合物释放垫、固定有检测区和质控区的硝酸纤维素膜及吸水垫,并剪切成所需的宽度即为时间分辨荧光免疫层析试纸条。

[0023] 下面分步详细叙述:

### (一) 各部件的制备

#### 1、香豆素半抗原-载体蛋白偶联物的合成与鉴定

香豆素是小分子物质,只有免疫反应性,没有免疫原性,不能诱发机体产生免疫应答,必须与大分子载体蛋白偶联后才具有免疫原性。

[0024] (1) 香豆素半抗原的制备

取香豆素1.00 g,加入80 mL氯苯中搅拌溶解,加2.50 g叔丁醇过氧化氢,搅拌充分混匀,加3-(1,3-二氧杂烷-2-基)丙醛0.89 g,100°C搅拌24 h。停止反应后,加100 mL冷水,用100 mL乙酸乙酯萃取3次,使用50 mL水洗,有机相无水硫酸钠干燥蒸干,60 mL石油醚/二氯甲烷(v/v,1/1)重结晶,得到缩醛香豆素化合物1.70 g,收率94.00%。

[0025] 取缩醛香豆素1.70 g,加20 mL乙腈溶解,加1 mol/L稀盐酸10 mL,室温剧烈搅拌4 h,停止反应,旋蒸,除去乙腈,加水50 mL,加1mol/L的NaOH调节pH值到6,加70 mL 1,2-二氯乙烷萃取3次,100 mL水洗,蒸干,上硅胶柱,2 L二氯甲烷/甲醇(v/v,5/1)洗脱,分离纯化,得到丁醛香豆素半抗原1.30 g,收率91.55%。

[0026] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定,<sup>1</sup>H NMR(CDC1<sub>3</sub>, 300MHZ) δ: 9.72 (1H, s,

CHO), 8.45 (1H, s, C=CH), 7.84 (1H, dd, ArH), 7.65 (1H, dd, ArH), 7.42 (2H, dd, ArH), 3.27 (2H, dd, CH<sub>2</sub>), 2.51 (2H, t, CH<sub>2</sub>)。图谱中化学位移 $\delta=9.72$ 的为间隔臂上醛基氢的共振吸收峰, $\delta=3.27$ 、 $2.51$ 的为间隔臂上亚甲基氢的共振吸收峰,除香豆素原有氢特征吸收峰外,这些峰的存在,证明间隔臂偶联成功,香豆素半抗原结构正确。

#### [0027] (2) 免疫原的制备

香豆素半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0028] 取香豆素半抗原16 mg,加乙醇溶解,得到A液,取牛血清白蛋白0.1 g,加pH值为5.6的醋酸盐缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃搅拌20 h,加1 mg硼氢化钠,继续搅拌2 h,0.02 mol/L PB透析纯化三天,每天换液三次,分装,得到免疫原,-20℃保存备用。

#### [0029] (3) 包被原的制备

香豆素半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0030] 取香豆素半抗原5 mg,加乙醇溶解,得到A液,取卵清蛋白50 mg,加pH 9.1的碳酸盐缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃搅拌20 h,加1 mg硼氢化钠,继续搅拌2 h,0.02 mol/L PB透析纯化三天,每天换液三次,分装,得到包被原,-20℃保存,备用。

#### [0031] (4) 鉴定

按合成香豆素偶联抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例,进行紫外(200 nm ~ 400 nm)扫描测定,通过比较三者分别在260 nm和280 nm的吸光值计算其结合比。偶联物香豆素半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与香豆素半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明香豆素半抗原-载体蛋白的合成是成功的。经计算,半抗原与BSA的结合比为16:1,与OVA的结合比为12:1。

### [0032] 2、香豆素单克隆抗体的制备

#### (1) 杂交瘤细胞的获得

1) 动物免疫:将香豆素半抗原-BSA偶联物(免疫原)与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,皮下注射6周龄的Balb/c小鼠,每只0.2 mL;此后,每两周加强免疫一次,用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,方法和剂量同首次免疫;

2) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测定香豆素抗体的效价和抑制作用,有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫:腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1 mL,三天后处死小鼠,取其脾脏淋巴B细胞与骨髓瘤细胞融合;

3) 细胞融合7 d后,用间接ELISA法检测抗体,选择抗体分泌阳性孔,用HT培养基扩大培养后,采用有限稀释法接种于96孔培养板内,选择单个细胞集落孔的培养上清做抗体检测,阳性者用同样方法再次克隆,直至克隆后有杂交瘤细胞生长的抗体分泌阳性率为100%,保存阳性细胞株。

#### [0033] (2) 单克隆抗体的制备

采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5 mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5$ 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到香豆素单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

#### [0034] (3) 单克隆抗体效价的测定

用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1:(200000~500000)。

[0035] 间接竞争ELISA方法:用香豆素半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入香豆素标准品溶液、香豆素单克隆抗体溶液和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体溶液,25℃反应30 min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃反应15 min后,加入终止液终止反应;测定OD<sub>450</sub>。

[0036] (4)单克隆抗体特异性的测定

将BSA和OVA均稀释至与香豆素半抗原-OVA相同浓度进行包被,再加入含抗体腹水,测试其结合显色情况。选择7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮等香豆素的结构类似物,将其等比稀释液替代香豆素稀释液,其他条件相同,做三次平行,测定它们与香豆素单克隆抗体之间的交叉反应率。以50%抑制的香豆素浓度与50%抑制的类似物浓度的百分比为其交叉反应率,反映单克隆抗体的特异性。

$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制的香豆素浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他类似物浓度}} \times 100\%$
--

[0037] 实验结果显示,BSA、OVA均不与香豆素单克隆抗体发生反应,说明筛选获得的香豆素单克隆抗体特异性针对连接在载体蛋白上的香豆素抗原决定簇。下表列出了香豆素单克隆抗体与香豆素结构类似物的交叉反应性。从表1可以看出,香豆素单克隆抗体与7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮均无交叉反应。

[0038]

表1 香豆素单克隆抗体与香豆素类似物的交叉反应率

化合物	交叉反应率/%
7-乙氧基-4-甲基香豆素	4
二氢香豆酯	3.5
7-羟基香豆素	12
3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)	4.5
7-甲氧基香豆素	8.3
茛菪亭	8
6,7-二甲氧基香豆素	7.2
7-甲基香豆素	6.3
环香豆素	7.5
香兰素	2
黄樟素	1
突厥烯酮	1

3、羊抗鼠抗抗体的制备

以羊作为免疫动物,以鼠源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到羊抗鼠抗抗体。

[0039] 4、荧光微球标记香豆素单克隆抗体的制备

(1)活化:取市售的内部包埋荧光染料、表面修饰有羧基官能团的微球悬液100 μL混悬于900 μL活化缓冲液中,于4℃ 10000 r/min离心10min后弃上清,重悬微球于1 mL活化缓冲液中,以此法洗涤微球2次,加入适量活化剂,混匀后室温振荡活化10 min;

(2)偶联:将(1)所述混悬液于4℃ 10000 r/min离心10min后弃上清,重悬于偶联缓冲液中,以此法洗涤微球2次,加入10~20 μL香豆素单克隆抗体溶液(蛋白浓度1 mg/mL),混匀后室温震荡偶联120 min;

(3)封闭:将(2)所述混悬液于4℃ 10000 r/min离心10 min后弃上清,重悬于封闭缓冲液中,以此法洗涤微球1次,混匀后室温震荡封闭30 min;

(4)贮存:将(3)所述混悬液于4℃ 10000 r/min离心10 min后弃上清,重悬于贮存缓冲液中,以此法洗涤微球1次,混匀后于4℃避光保存。

[0040] 所述活化缓冲液为pH值为5.5~6.5、0.05 mol/L的2-(N-吗啡啉)乙磺酸(MES)缓冲液。

[0041] 所述活化剂为水溶性碳二亚胺,其中摩尔质量比EDC:NHS:COOH = (1.5~3):(8~20):1,临用前用活化缓冲液稀释至所需浓度。

[0042] 所述偶联缓冲液为pH值为7.5~8.5 0.05 mol/L的硼酸盐缓冲液(避免使用存在游离胺的溶剂)。

[0043] 所述封闭缓冲液为含0.1~0.4 mol/L伯胺(盐酸羟胺、乙醇胺或氨基乙醇)、1%~10% BSA的pH值为7.4的PB缓冲液。

[0044] 所述贮存缓冲液为含0.01% NaN<sub>3</sub>、0.1% BSA的pH值为7.4的PB缓冲液。

[0045] 5、结合物释放垫的制备

将贮存的荧光微球标记的香豆素单克隆抗体以贮存缓冲液稀释后,将结合物释放垫浸泡于稀释缓冲液中,经真空冷冻干燥后备用。

[0046] 6、硝酸纤维素(NC)膜的制备

用0.05 mol/L、pH值为7.2的PBS缓冲液将香豆素半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到100 μg/mL,用Isoflow点膜仪将其喷涂于NC膜上的检测区(T),喷膜量为1.0 μL/cm;用0.01 mol/L、pH值为7.4的PBS缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200 μg/mL,用Isoflow点膜仪将其喷涂于NC膜上的质控区(C),喷膜量为1.0 μL/cm。将制备好的NC膜置于37℃条件下干燥2 h,备用。

[0047] 7、样品吸收垫的制备

将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(体积分数)、pH值为7.2、0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37℃下烘干2 h。

[0048] (二)试纸条的组装

将样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜、吸水垫从左至右依次搭接粘贴固定在底板上,结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与硝酸纤维素膜的始端相连,硝酸纤维素膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与底板的始端对齐,吸水垫的末端与底板的末端对齐,然后用机器切成3.96 mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,形成试纸卡。香豆素荧光微球免疫层析试纸卡在2~8℃阴凉避光干燥保存,有效期为12个月。

[0049] 实施例3 检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条的应用

1、烟草样品前处理

称取 $1.0 \pm 0.05$  g粉碎的烟草样本至聚苯乙烯离心管中；加入10 mL 50%甲醇水溶液，用匀浆机将其充分打碎，得到样本液；移取75  $\mu$ L样本液与425  $\mu$ L去离子水混匀后待检。

#### [0050] 2、用试纸条检测

吸取100  $\mu$ L待检样本溶液垂直滴加于试纸卡加样孔中，液体流动时开始计时，反应10 min；将试纸卡插入KFT-100A型荧光检测仪的承载器中，通过触摸显示屏选择待检项目，按下“开始检测”按键，荧光检测仪将自动对试纸卡进行扫描测试，通过仪器的显示屏幕上读取或打印检测结果。

#### [0051] 3、检测结果分析

##### (1) 半定量检测

测试完成后，仪器将根据检测得到的检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值，自动计算出提取液中香豆素的浓度值，并根据预设的阈值给出阴阳性判断。

[0052] 阴性(-)：若荧光检测仪的显示屏幕上结果显示为阴性，表示样本中不含有香豆素或其浓度低于检测限。

[0053] 阳性(+):若荧光检测仪的显示屏幕上结果显示为阳性，表示样本中香豆素浓度等于或高于检测限。

[0054] 无效:若质控区未检出荧光信号强度，表明不正确的操作过程或试纸卡已失效。

##### [0055] (2) 定量检测

测试完成后，仪器获得荧光试纸条上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值，基于预先内置的荧光试纸条上检测区时间分辨荧光强度与质控区时间分辨荧光强度的比值与香豆素浓度的关系曲线，获得待测样品提取液中香豆素的含量，最后经换算即得待测样品中香豆素的含量。

#### [0056] 实施例4 样品检测实例

##### 1、检测限试验

向空白烟草样品中分别添加香豆素标准品至终浓度为0.25、0.5、1 mg/kg，用时间分辨荧光免疫层析试纸条进行检测，结果为：香豆素浓度为0.25 mg/kg时，荧光检测仪检测为阴性；香豆素浓度为0.5和1 mg/kg时，荧光检测仪检测为阳性，表明本试纸条对烟草中香豆素的检测限为0.5 mg/kg。

##### [0057] 2、假阳性率、假阴性率试验

取已知香豆素含量大于0.5 mg/kg的阳性烟草样本20份，已知不含香豆素的阴性烟草样本20份，用3个批次生产的时间分辨荧光免疫层析试纸条分别进行检测，计算其阴阳性率。结果见表2。

[0058] 表2 检测阳性、阴性样本结果

浓度 批次	阳性烟草样本 (20份)	阴性烟草样本 (20份)
1	20份阳性	20份阴性
2	20份阳性	20份阴性
3	20份阳性	20份阴性

结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性样本时,结果全为阳性,可知阳性符合率为100%,假阴性率为0;检测阴性样本时,结果全为阴性,可知阴性符合率为100%,假阳性率为0。说明本发明的检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条可以对烟草中香豆素进行快速检测。

### [0059] 3、特异性试验

用香豆素试纸条检测500  $\mu\text{g/L}$ 的7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮。结果显示,荧光检测仪检测为阴性。说明本试纸条对500  $\mu\text{g/L}$ 的7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮无交叉反应。

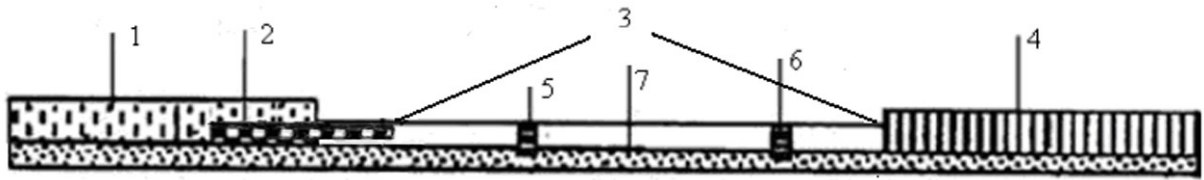


图1

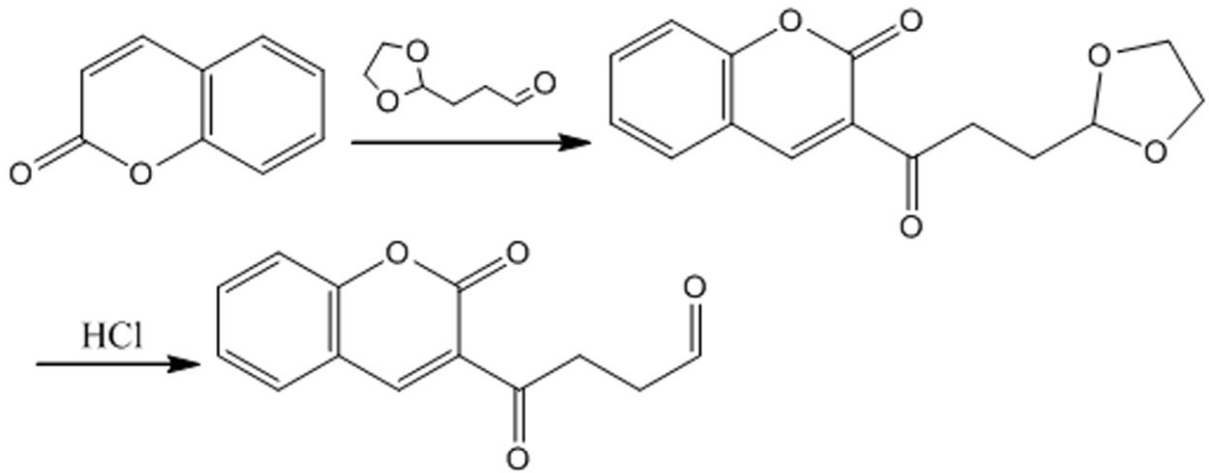


图2

专利名称(译)	一种检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN108680738A</a>	公开(公告)日	2018-10-19
申请号	CN201810539631.9	申请日	2018-05-30
[标]申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院		
申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国烟草总公司郑州烟草研究院		
[标]发明人	陈黎 刘惠民 崔华鹏 赵乐 樊美娟 谢复炜 张晓兵 聂聪 秦亚琼 尚平平		
发明人	陈黎 刘惠民 崔华鹏 赵乐 樊美娟 谢复炜 张晓兵 聂聪 秦亚琼 尚平平		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	姜振东		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种检测香豆素的时间分辨荧光免疫层析试纸条及其制备方法和应用。该试纸条包括底板及在底板上依次搭接粘贴的样品吸收垫、结合物释放垫、硝酸纤维素膜和吸水垫，所述结合物释放垫上包埋有荧光微球标记的香豆素单克隆抗体，所述硝酸纤维素膜上固定有检测区和质控区，所述检测区喷涂有香豆素半抗原-载体蛋白偶联物，所述质控区喷涂有羊抗鼠抗抗体，所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到的。本发明还提供了该试纸条的制备方法及应用上述试纸条检测样品中香豆素的方法。本发明提供的试纸条和检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低的优点，能够实现大批量样品中香豆素的快速检测和现场监控。

