



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108196054 A

(43)申请公布日 2018.06.22

(21)申请号 201710624117.0

(22)申请日 2017.07.27

(83)生物保藏信息

CGMCC NO.13828 2017.04.19

(71)申请人 数字本草中医药检测有限公司

地址 071200 河北省保定市河北省安国市
北环城路318号

(72)发明人 冯红 张兰兰 李细芬 涂媛

(74)专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130

代理人 王为

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书4页 说明书12页 附图2页

(54)发明名称

一种检测甘草酸的试纸条及其制备方法和应用

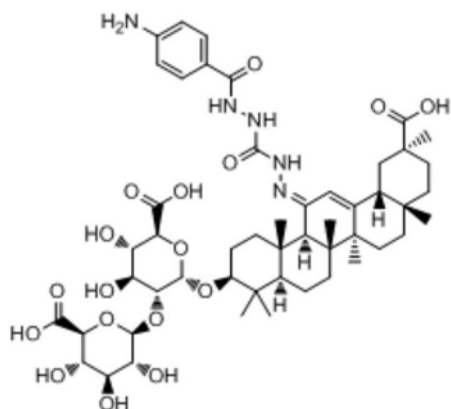
(57)摘要

本发明提供一种检测甘草酸的试纸条及其制备方法和应用,该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和基板;其中,所述反应膜上具有包被有甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被有羊抗鼠抗抗体的质控区,所述结合物释放垫上喷涂有甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物,本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中甘草酸的方法,本发明提供的试纸条和检测方法具有特异性强、灵敏度高、操作简便、可快速读取结果、成本低等特点,适合大量样品的筛查及中药现场质量监控。



1. 一种检测甘草酸的试纸条,其特征在于,所述试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和基板;其中,所述反应膜上具有包被有甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被有羊抗鼠抗抗体的质控区,所述结合物释放垫上喷涂有甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物,其中所述甘草酸单克隆抗体是以甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原对小鼠进行免疫所得杂交瘤细胞株分离得到,该杂交瘤细胞株的保藏编号为 CGMCC13828。

2. 根据权利要求1所述的检测甘草酸的试纸条,其特征在于,其中,所述甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物由甘草酸半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为人血清白蛋白、卵清蛋白或甲胎蛋白,所述甘草酸半抗原,分子结构式为:



3. 根据权利要求1所述的检测甘草酸的试纸条,其特征在于,其中,所述羊抗鼠抗抗体是以鼠源IgG抗体为免疫原对山羊进行免疫制备获得。

4. 根据权利要求1所述的检测甘草酸的试纸条,其特征在于,其中,所述反应膜、吸水垫、结合物释放垫、样品吸收垫依次粘贴在基板上,其中吸水垫覆盖反应膜顶端1-2mm处,结合物释放垫覆盖反应膜底端1-2mm处,样品吸收垫覆盖结合物释放垫底部1/3-1/2部分,检测区和质控区间隔0.5-1cm。

5. 根据权利要求1所述的检测甘草酸的试纸条,其特征在于,其中,所述检测区的检测限浓度100 μ g/L。

6. 根据权利要求1所述的检测甘草酸的试纸条,其特征在于,其中,所述基板为PVC基板或其他硬质不吸水的材料;所述结合物释放垫及样品吸收垫为玻璃纤维素膜或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

7. 权利要求1所述的检测甘草酸的试纸条的制备方法,其特征在于,其中,包括以下步骤:

- 1) 将甘草酸与1-(4-氨基-苯)碳二酰肼反应,制备甘草酸半抗原;
- 2) 将甘草酸半抗原与载体蛋白偶联,制备甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物;
- 3) 用甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌甘草酸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) 分别将甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体包被于反应膜的检测区(T线)和质控区(C线),检测区和质控区间隔0.5-1cm;

6) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;将制备的甘草酸单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物;

7) 将甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物喷涂在结合物释放垫上,37℃烘1h后取出,置于干燥环境中保存备用;

8) 将样品吸收垫用含牛血清白蛋白、磷酸盐缓冲液浸泡,烘干;

9) 在基板上按顺序粘贴上反应膜、吸水垫、结合物释放垫、样品吸收垫,吸水垫覆盖反应膜顶端1-2mm处,结合物释放垫覆盖反应膜底端1-2mm处,样品吸收垫覆盖结合物释放垫底部1/3-1/2部分,最后切成4mm宽的小条。

8. 权利要求7所述的检测甘草酸的试纸条的制备方法,其特征在于,其中,包括以下步骤:

A、甘草酸半抗原的合成

取甘草酸,加乙醇溶解,加碳酸氢钠,加1-(4-氨基-苯)碳二酰肼加热,搅拌,停止反应,旋蒸,除去有机溶剂,加水,乙酸乙酯萃取,蒸干,上硅胶柱,二氯甲烷/石油醚洗脱,分离纯化,得到酰肼甘草酸半抗原;

B、甘草酸偶联抗原的合成

免疫原制备——甘草酸半抗原与人血清白蛋白(HSA)偶联得到免疫原;

取酰肼甘草酸半抗原,加稀盐酸,加水,溶解澄清,低温搅拌,加亚硝酸钠,继续搅拌,得到半抗原活化液A液;取HAS,加碳酸盐缓冲液溶解,平衡,得到B液;将A液滴加到B液中,低温继续搅拌;停止反应,透析纯化,,得到免疫原,-20℃保存备用;

包被原制备——甘草酸半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原;

取酰肼甘草酸半抗原,加稀盐酸,加水,溶解澄清,低温搅拌,加亚硝酸钠,继续搅拌,得到半抗原活化液A液;取OVA,加碳酸盐缓冲液溶解,平衡,得到B液;将A液滴加到B液中,低温继续搅拌;停止反应,透析纯化,得到包被原,-20℃保存备用;

C、甘草酸单克隆抗体的制备

(1) 杂交瘤细胞的获得

1) 首次免疫:将甘草酸半抗原-HSA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;

2) 加强免疫两次:从首次免疫开始,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;

3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,处死小鼠,取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

4) 采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔;利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立稳定分泌甘草酸单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存;

(2) 单克隆抗体的制备

1) 细胞复苏:取出甘草酸单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

2) 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,采集腹水;用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到甘草酸单克隆抗体溶液(-20℃保存);

D、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;

E、反应膜的制备

将甘草酸半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测区,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控区,检测区和质控区间隔0.5-1cm;

包被过程:用磷酸缓冲液将甘草酸半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1mg/mL,将其包被于硝酸纤维素膜上的检测区(T线),包被量为1.0 μ L/cm;用磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释,将其包被于硝酸纤维素膜上的质控区(C线),包被量为1.0 μ L/cm;将包被好的反应膜置于37 $^{\circ}$ C条件下干燥2h,备用;

F、甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物的制备

(1) 胶体金的制备

用双蒸去离子水将氯金酸溶液稀释,置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入柠檬酸三钠溶液,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的酒红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4 $^{\circ}$ C保存;制备好的胶体金用肉眼观察是清亮透明的,没有混浊,液体表面无漂浮物,在日光下观察胶体金的颜色为酒红色;

(2) 甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物的制备

在磁力搅拌下,用碳酸钾溶液调胶体金的pH至7~8,按每毫升胶体金溶液中加入20~50 μ g抗体的标准向胶体金溶液中加入上述甘草酸单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置,加入牛血清白蛋白(BSA)使其在胶体金溶液中的终质量分数为1%,静置离心,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4 $^{\circ}$ C备用;

复溶缓冲液:含BSA的质量分数为0.1%~0.3%、吐温-80的质量分数为0.05%~0.2%、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液;

G、结合物释放垫的制备

将结合物释放垫浸泡于含BSA的磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿烘干;用制备好的甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物均匀喷涂在结合物释放垫上,每1cm结合物释放垫喷涂0.01mL甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物;

H、样品吸收垫的制备

将样品吸收垫用含BSA磷酸盐缓冲液浸泡烘干备用;

I、试纸条的组装

将反应膜、吸水垫、结合物释放垫、样品吸收垫依次按顺序粘贴在PVC基板上;吸水垫的顶端与PVC基板的顶端对齐,吸水垫末端覆盖反应膜顶端1-2mm处,结合物释放垫起始端覆盖反应膜的底端1-2mm处,底端有1/3-1/2区域被样品吸收垫覆盖,样品吸收垫的底端与PVC基板的底端对齐;所述反应膜上有检测区和质控区,检测区(T线)和质控区(C线)均呈与所述试纸条的长相垂直的条状带,检测区位于靠近结合物释放垫的一侧,质控区位于靠近吸水垫的一侧;将试纸条用机器切成4mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,4~30 $^{\circ}$ C条件下可保存12个月。

9. 权利要求1所述的检测甘草酸的试纸条的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 对样品进行前处理;

(2) 用试纸条进行检测;

(3) 分析检测结果。

上述步骤(1)中样品处理方法包括:取样品,加入含水乙醇或甲醇浸泡或超声处理,滤过,将滤液用PBS样品稀释液即可。

所述含水乙醇为50-95%乙醇,

所述PBS浓度为0.005-0.03mol/L,

上述步骤(2)具体检测方法包括:取出试纸条,置于水平桌面,用加样器吸取80 μ L待测样本滴加至加样孔,5-10min观察结果,超时结果判定无效。

上述步骤(3)中分析检测结果包括:

样本中的甘草酸与反应膜检测区的甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物,根据检测区红色条带有无来判断待测样品液中甘草酸含量多少。

10. 权利要求9所述的检测甘草酸的试纸条的使用方法,其特征在于,检测时,样品经处理后滴入样品吸收垫,当甘草酸在样品中的浓度低于检测限时,单克隆抗体-胶体金复合物在层析过程中会与固定在反应膜上的甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物结合,在检测区T线和质控区C线各出现一条红色条带;如果甘草酸在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金复合物会与甘草酸全部结合,从而在检测区T线因为竞争反应不会与甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物结合而不出现红色条带。

一种检测甘草酸的试纸条及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测试纸条,具体是一种用于检测甘草酸的免疫胶体金试纸条,其特别适用于中药材、饮片、中成药、保健品、食品、化妆品等中甘草酸含量的检测。

背景技术

[0002] 现代研究证实,甘草酸(Glycyrrhizic acid,GA, $C_{42}H_{62}O_{16}$)是中药甘草中的主要生物活性物质,含有两分子葡萄糖醛酸和一分子甘草次酸,分子量约为822Da,其含量在3%~13%,具有抗炎、抗溃疡、抗过敏、抗氧化、免疫调节、抗病毒、抗癌、保肝和稳定细胞膜等作用。甘草及其制剂常以甘草酸作为定量指标,用于评价药材和成药的质量、制剂的稳定性及优劣,以制订药品质量标准等。因此,对甘草酸的定量分析在中药的研究上很有现实意义。

[0003] 目前,国内中药材有效成分含量测定的常用方法有化学定量法、比色法、紫外分光光度法、红外光谱法、气相色谱法、薄层色谱法、高压液相色谱法等,各种方法均有其缺点;HPLC与GC法灵敏度高、结果准确,是《中国药典》含量测定的主要技术,但都存在设备昂贵、需专业技术人员、检测周期长、检测成本高等缺点。免疫分析技术是近年来中药有效成分分析技术的新热点。

[0004] 基于甘草酸单克隆抗体免疫反应原理建立的胶体金法具有检测灵敏度、特异性高,不需复杂的样品前处理、快速,5分钟即可读出结果,成本低廉、无需大型仪器设备,适合于野外及现场检测,可定性、定量等优点;该技术对于中药活性成分的分析将是一个重要的补充技术和有力手段,适用于中药材及其制剂有效成分的大量样本检测及现场监控。

[0005] 对小分子中药活性成分采用单抗建立的免疫检测方法已经有报道,如现有技术中中药活性成分甘草酸的单克隆抗体制备及其免疫测定法的建立报道的抗GA的单抗可用于中药材甘草酸含量的测定,但其检测的灵敏度和便利性取决于单抗的特异性,和检测方法的操作性。但甘草酸的特征结构容易受载体蛋白的局部微化学环境或空间位阻的干扰,影响机体免疫系统的识别,难以产生特异性抗体或产生的抗体效价较低。

发明内容

[0006] 现有技术的灵敏度尚存在问题,而且检测方法的便利性需要解决。

[0007] 采用试纸检测的便利性显而易见,但需要灵敏度高的单抗,而现有单抗的特异性无法满足试纸检测的要求。

[0008] 为此,本发明对单抗的种类进行了筛选,找到一种经过改进的灵敏度和特异性极高的单抗,满足了制备试纸的条件。

[0009] 本发明对甘草苷小分子结构进行了改造,然后再与载体蛋白偶联后免疫动物产生单克隆抗体,这样可以保证甘草苷的原有分子特征结构充分暴露在人工抗原的表面,使其能最大限度地被动物的免疫活性细胞所识别,从而刺激机体产生特异性免疫应答,产生对甘草苷具有高亲和力和高特异性的抗体。

[0010] 本发明提供了一种检测甘草酸的免疫胶体金试纸条。具体是一种用胶体金免疫层

析技术检测中药甘草及其制剂中甘草酸的含量,该方法特异性好、灵敏度高、操作简便、检测成本低、适合于批量样品的筛选检测,是理想的快速筛选手段。

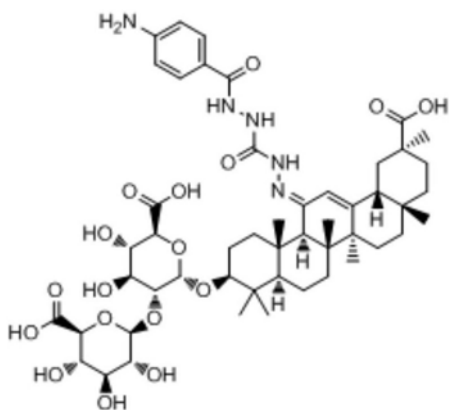
[0011] 本发明另一个发明目的是提供该试纸条的制备方法。

[0012] 本发明的另一个发明目的是提供该试纸条的应用。

[0013] 本发明是通过下述技术方案实现的:

[0014] 一种甘草苷半抗原,其分子结构式:

[0015]

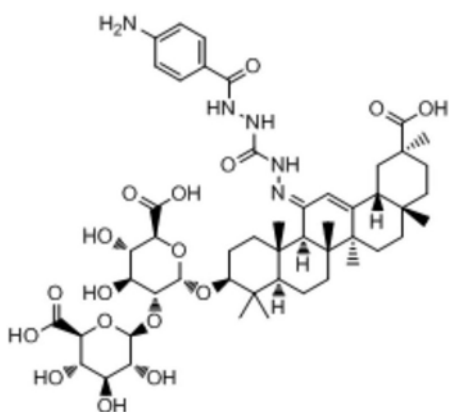


[0016] 所述甘草酸半抗原是由甘草酸与1-(4-氨基-苯)碳二酰肼反应得到。具体如下:甘草酸加碳酸氢钠,加1-(4-氨基-苯)碳二酰肼,加热,搅拌,停止反应,旋蒸,除去有机溶剂,加水,乙酸乙酯萃取,蒸干,上硅胶柱,二氯甲烷/石油醚洗脱,分离纯化。

[0017] 本发明提供了一种检测甘草酸的试纸条,该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和基板;其中,所述反应膜上具有包被有甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被有羊抗鼠抗抗体的质控区,所述结合物释放垫上喷涂有甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物。

[0018] 所述甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物由甘草酸半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为人血清白蛋白、卵清蛋白或甲胎蛋白,所述甘草酸半抗原是由甘草酸与1-(4-氨基-苯)碳二酰肼反应得到,其分子结构式为:

[0019]



[0020] 其中所述甘草酸单克隆抗体是以甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原对小鼠进行免疫所得杂交瘤细胞株分离得到,该杂交瘤细胞株的保藏编号为CGMCC13828。(该细胞株已经保藏在中国普通微生物菌种保藏管理中心,编号为CGMCC13828,保藏日期2017年04月19日,分类命名:甘草酸半抗原-载体蛋白单克隆抗体杂交瘤细胞株,地址北京市朝阳区

区北辰西路1号院3号)。

[0021] 所述羊抗鼠抗抗体是以鼠源抗体为免疫原对山羊进行免疫制备获得。

[0022] 所述反应膜、吸水垫、结合物释放垫、样品吸收垫依次粘贴在基板上,其中吸水垫覆盖反应膜顶端1-2mm处,结合物释放垫覆盖反应膜底端1-2mm处,样品吸收垫覆盖结合物释放垫底部1/3-1/2部分,检测区和质控区间隔0.5-1cm。

[0023] 本发明所述检测区的检测限浓度100 μ g/L。

[0024] 所述基板为PVC基板或其他硬质不吸水的材料;所述结合物释放垫及样品吸收垫为玻璃纤维素膜或聚酯材料;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0025] 本发明还提供了一种制备上述试纸条的方法,包括以下步骤:

[0026] 1) 制备喷涂有甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物的结合物释放垫;

[0027] 2) 制备具有包被有甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被有羊抗鼠抗抗体的质控区的反应膜;

[0028] 3) 将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和基板组装成试纸条。

[0029] 具体地说,步骤包括:

[0030] 1) 将甘草酸与1-(4-氨基-苯)碳二酰肼反应,制备甘草酸半抗原;

[0031] 2) 将甘草酸半抗原与载体蛋白偶联,制备甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物;

[0032] 3) 用甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物免疫小鼠,将小鼠脾细胞和骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到分泌甘草酸单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0033] 4) 提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0034] 5) 分别将甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体包被于反应膜的检测区(T线)和质控区(C线),检测区和质控区间隔0.5-1cm;

[0035] 6) 用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;将制备的甘草酸单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物;

[0036] 7) 将甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物喷涂在结合物释放垫上,37 $^{\circ}$ C烘1h后取出,置于干燥环境中保存备用;

[0037] 8) 将样品吸收垫用含牛血清白蛋白、磷酸盐缓冲液浸泡,烘干;

[0038] 9) 在基板上按顺序粘贴上反应膜、吸水垫、结合物释放垫、样品吸收垫,吸水垫覆盖反应膜顶端1-2mm处,结合物释放垫覆盖反应膜底端1-2mm处,样品吸收垫覆盖结合物释放垫底部1/3-1/2部分,最后切成4mm宽的小条。

[0039] 更具体地,包括如下步骤:

[0040] 1、甘草酸半抗原的合成

[0041] 取甘草酸,加乙醇溶解,加碳酸氢钠,加1-(4-氨基-苯)碳二酰肼加热,搅拌,停止反应,旋蒸,除去有机溶剂,加水,乙酸乙酯萃取,蒸干,上硅胶柱,二氯甲烷/石油醚洗脱,分离纯化,得到酰肼甘草酸半抗原。

[0042] 2、甘草酸偶联抗原的合成

[0043] 免疫原制备——甘草酸半抗原与人血清白蛋白(HSA)偶联得到免疫原。

[0044] 取酰肼甘草酸半抗原,加稀盐酸,加水,溶解澄清,低温搅拌,加亚硝酸钠,继续搅

拌,得到半抗原活化液A液;取HAS,加碳酸盐缓冲液溶解,平衡,得到B液;将A液滴加到B液中,低温继续搅拌;停止反应,透析纯化,,得到免疫原,-20℃保存备用。

[0045] 包被原制备——甘草酸半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0046] 取酰肼甘草酸半抗原,加稀盐酸,加水,溶解澄清,低温搅拌,加亚硝酸钠,继续搅拌,得到半抗原活化液A液;取OVA,加碳酸盐缓冲液溶解,平衡,得到B液;将A液滴加到B液中,低温继续搅拌;停止反应,透析纯化,得到包被原,-20℃保存备用。

[0047] 3、甘草酸单克隆抗体的制备

[0048] (1) 杂交瘤细胞的获得

[0049] 1) 首次免疫:将甘草酸半抗原-HSA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;

[0050] 2) 加强免疫两次:从首次免疫开始,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;

[0051] 3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,处死小鼠,取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

[0052] 4) 采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立稳定分泌甘草酸单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

[0053] (2) 单克隆抗体的制备

[0054] 1) 细胞复苏:取出甘草酸单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

[0055] 2) 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到甘草酸单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0056] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0057] 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。

[0058] 5、反应膜的制备

[0059] 将甘草酸半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测区,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控区,检测区和质控区间隔0.5-1cm。

[0060] 包被过程:用磷酸缓冲液将甘草酸半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1mg/mL,将其包被于硝酸纤维素膜上的检测区(T线),包被量为1.0μL/cm;用磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释,将其包被于硝酸纤维素膜上的质控区(C线),包被量为1.0μL/cm。将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2h,备用。

[0061] 6、甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物的制备

[0062] (1) 胶体金的制备

[0063] 用双蒸去离子水将氯金酸溶液稀释,置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入柠檬酸三钠溶液,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的酒红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备好的胶体金用肉眼观察是清亮透明的,没有混浊,液体表面无漂浮物,在日光下观察胶体金的颜色为酒红色。

[0064] (2) 甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物的制备

[0065] 在磁力搅拌下,用碳酸钾溶液调胶体金的pH至7~8,按每毫升胶体金溶液中加入20~50 μ g抗体的标准向胶体金溶液中加入上述甘草酸单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置,加入牛血清白蛋白(BSA)使其在胶体金溶液中的终质量分数为1%,静置离心,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用。

[0066] 复溶缓冲液:含BSA的质量分数为0.1%~0.3%、吐温-80的质量分数为0.05%~0.2%、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0067] 7、结合物释放垫的制备

[0068] 将结合物释放垫浸泡于含BSA的磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿烘干。用制备好的甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物均匀喷涂在结合物释放垫上,每1cm结合物释放垫喷涂0.01mL甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物;

[0069] 9、样品吸收垫的制备

[0070] 将样品吸收垫用含BSA磷酸盐缓冲液浸泡烘干备用;

[0071] 9、试纸条的组装

[0072] 将反应膜、吸水垫、结合物释放垫、样品吸收垫依次按顺序粘贴在PVC基板上;吸水垫的顶端与PVC基板的顶端对齐,吸水垫末端覆盖反应膜顶端1-2mm处,结合物释放垫起始端覆盖反应膜的底端1-2mm处,底端有1/3-1/2区域被样品吸收垫覆盖,样品吸收垫的底端与PVC基板的底端对齐;所述反应膜上有检测区和质控区,检测区(T线)和质控区(C线)均呈与所述试纸条的长相垂直的条状带,检测区位于靠近结合物释放垫的一侧,质控区位于靠近吸水垫的一侧;将试纸条用机器切成4mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,4~30℃条件下可保存12个月。

[0073] 本发明还提供了一种应用上述试纸条检测样品中甘草酸的方法,包括如下步骤:

[0074] (1) 对样品进行前处理;

[0075] (2) 用试纸条进行检测;

[0076] (3) 分析检测结果。

[0077] 上述步骤(1)中样品处理方法包括:取样品,加入含水乙醇或甲醇浸泡或超声处理,滤过,将滤液用PBS样品稀释液即可。

[0078] 所述含水乙醇为50-95%乙醇,优选70%乙醇。

[0079] 所述PBS浓度为0.005-0.03mol/L,优选0.01mol/L。

[0080] 所述样品包括甘草药材、甘草饮片、含甘草制剂等。

[0081] 上述步骤(2)具体检测方法包括:取出试纸条,置于水平桌面,用加样器吸取80 μ L待测样本滴加至加样孔,5-10min观察结果,超时结果判定无效。

[0082] 上述步骤(3)中分析检测结果包括:

[0083] 样本中的甘草酸与反应膜检测区的甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物,根据检测区红色条带有无来判断待测样品液中甘草酸含量多少。

[0084] 检测时,样品经处理后滴入样品吸收垫,当甘草酸在样品中的浓度低于检测限时,单克隆抗体-胶体金复合物在层析过程中会与固定在反应膜上的甘草酸半抗原-载体蛋白

偶联物结合,在检测区(T线)和质控区(C线)各出现一条红色条带;如果甘草酸在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金复合物会与甘草酸全部结合,从而在检测区(T线)因为竞争反应不会与甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物结合而不出现红色条带。如图2所示。

[0085] 阴性:C线、T线显色均匀,且呈淡红色或红色,表示样本中甘草酸浓度低于检测限。

[0086] 阳性:C线显色均匀,T线位置无明显条带,表示样本中甘草酸浓度等于或高于检测限。

[0087] 无效:当C线不显示出红色条带,则无论T线显示出红色条带与否,该试纸条均判为无效。有益效果

[0088] 1、本发明的检测甘草酸的试纸条采用高度特异性的抗原抗体反应及免疫层析分析技术,将甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物固定于结合物释放垫上,样品中的甘草酸在流动过程中,与结合物释放垫上的甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物结合,形成甘草酸-抗体-胶体金复合物。样本中的甘草苷与反应膜检测区的芍药苷半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合甘草苷单克隆抗体-胶体金复合物,根据检测区红色条带有无来判断待测样品液中芍药苷含量多少。

[0089] 2、本发明试纸条有益的技术效果在于为中药材甘草及其制剂提供了灵敏度高、特异性强、成本低、操作简单、检测时间短、结果可靠的新型技术方法,为传统检测技术方法提供了有效补充。

[0090] 3、基于甘草苷单克隆抗体免疫反应原理建立的胶体金法与酶联免疫法相比,具有灵敏度高、特异性强,不需复杂的样品前处理、快速,5分钟即可读出结果,成本低廉、无需任何仪器设备,适合于野外及现场检测,可定性、定量等优点;该技术对于中药活性成分的分析将是一个重要的补充技术和有力手段,适用于中药材及其制剂中关键成分大量样本检测及现场监控。

[0091] 4、本发明是先对甘草苷小分子结构进行改造,然后再与载体蛋白偶联后免疫动物产生单克隆抗体,这样可以保证甘草苷的原有分子特征结构充分暴露在人工抗原的表面,使其能最大限度地被动物的免疫活性细胞所识别,从而刺激机体产生特异性免疫应答,产生对甘草苷具有高亲和力和高特异性的抗体,从而可以满足试纸检测的要求。

附图说明

[0092] 图1为试纸条剖面结构示意图,图中:1、样品吸收垫;2、结合物释放垫;3、反应膜;4、吸水垫;5、检测区;6、质控区;7、基板;

[0093] 图2为试纸条检测结果判定图;

[0094] 图3为甘草酸半抗原合成图;

[0095] 图4为甘草酸半抗原核磁共振氢谱图。

具体实施方式

[0096] 下面结合具体的实施例来进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而不用来限制本发明的范围。另外,本领域的技术人员在所附权利要求书限定的范围内可能会对本发明进行各种改动或修饰,这些改动或修饰同样应落入发明的保护范围。

[0097] 实施例1 检测甘草酸的试纸条的制备

[0098] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0099] 1) 制备喷涂有甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物的结合物释放垫;

[0100] 2) 制备具有包被有甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被有羊抗鼠抗体的质控区的反应膜;

[0101] 3) 将1) 和2) 制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和PVC基板组装成试纸条。

[0102] 下面分步详细叙述:

[0103] 1、甘草酸半抗原的合成(合成路线见附图3)及鉴定

[0104] 取0.5g甘草酸,加乙醇溶解,加碳酸氢钠0.1g,加1-(4-氨基-苯) 碳二酰肼0.15g, 60℃加热,搅拌4h,停止反应,旋蒸,除去有机溶剂,加水,乙酸乙酯萃取,蒸干,上硅胶柱,二氯甲烷/石油醚(V/V,10/1)洗脱,分离纯化,得到酰肼甘草酸半抗原0.49g,收率83.05%。

[0105] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定,结果见附图4。¹H NMR (CDCl₃,300MHz) δ:11.0 (3H,s,-COOH),9.01 (1H,s,NH),8.00 (1H,s,NH),6.54 (2H,s,ArH),7.53 (2H,s,ArH),7.00 (1H,s,NH),6.27 (1H,s,NH₂),6.00 (1H,s,NH),5.54 (1H,s,C=CH),5.27 (1H,s,CH),5.03 (1H,s,CH),4.55 (1H,t,CH),4.00 (1H,s,NH),3.58 (4H,ddd,-OH),2.77 (1H,s,CH),2.01 (16H,m,CH₂),1.33 (3H,s,CH₃),1.09 (6H,s,CH₃)。图谱中,化学位移δ=8.00、7.00、6.00的为间隔臂上酰肼亚胺氢吸收峰,6.54、7.53的为间隔臂苯环氢吸收峰,6.27为间隔臂上芳香伯胺氢的吸收峰,这些吸收峰的存在证明间隔臂偶联成功,甘草酸半抗原结构正确。

[0106] 2、甘草酸偶联抗原的合成及鉴定

[0107] 免疫原制备——甘草酸半抗原与人血清白蛋白(HSA)偶联得到免疫原。

[0108] 取酰肼甘草酸半抗原35mg,加1mol/L的稀盐酸0.113mL,加水3mL,溶解澄清,低温搅拌,加亚硝酸钠3.12mg,继续搅拌1h,得到半抗原活化液A液;取HAS 60mg,加碳酸盐缓冲液6mL溶解,4℃平衡温度30min,得到B液;将A液滴加到B液中,低温继续搅拌2h;停止反应,透析纯化3d,每天换液三次,得到免疫原,-20℃保存备用。

[0109] 包被原制备——甘草酸半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0110] 取酰肼甘草酸半抗原15mg,加1mol/L的稀盐酸50μL,加水2mL,溶解澄清,低温搅拌,加亚硝酸钠2.1mg,继续搅拌1h,得到半抗原活化液A液;取OVA 50mg,加碳酸盐缓冲液5mL溶解,4℃平衡温度30min,得到B液;将A液滴加到B液中,低温继续搅拌2h;停止反应,透析纯化3d,每天换液三次,得到包被原,-20℃保存备用。

[0111] 按合成甘草酸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(200~400nm)扫描测定,通过比较三者分别在260nm和280nm的吸光度值计算其结合比。偶联物甘草酸半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与甘草酸半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物的合成是成功的。

[0112] 3、甘草酸单克隆抗体的制备

[0113] (1) 杂交瘤细胞的获得

[0114] 1) 首次免疫:将甘草酸半抗原-HSA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0.2mL;

[0115] 2) 加强免疫两次:从首次免疫开始,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;

[0116] 3) 最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测效价和抑制,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0.1mL,三天后处死小鼠,取其脾脏与骨髓瘤细胞融合;

[0117] 4) 采用间接竞争酶联免疫分析方法测定细胞上清液,筛选阳性孔。利用有限稀释法对阳性孔进行克隆化,得到并建立稳定分泌甘草酸单克隆抗体的杂交瘤细胞株,取处于对数生长期的杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,分装于冻存管,在液氮中长期保存。

[0118] (2) 单克隆抗体的制备

[0119] 1) 细胞复苏:取出甘草酸单克隆抗体杂交瘤细胞株冻存管,立即放入37℃水浴中速融,离心去除冻存液后,移入培养瓶内培养;

[0120] 2) 制备腹水与抗体纯化:采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到甘草酸单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0121] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0122] 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。

[0123] 5、甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物的制备

[0124] (1) 胶体金的制备

[0125] 用双蒸去离子水将质量分数为1%的氯金酸溶液稀释成0.01%,取100mL置于锥形瓶中,用恒温电磁搅拌器加热至沸腾,在持续高温、持续搅拌下加入1.5mL质量分数为1%的柠檬酸三钠溶液,继续匀速搅拌加热至溶液呈透亮的酒红色时停止,冷却至室温后用去离子水恢复到原体积,4℃保存。制备好的胶体金用肉眼观察是清亮透明的,没有混浊,液体表面无漂浮物,在日光下观察胶体金的颜色为酒红色。

[0126] (2) 甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物的制备

[0127] 在磁力搅拌下,用0.2mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH至7.2(不同抗体的pH标记范围在7~8之间,可以变化),按每毫升胶体金溶液中加入20~50μg抗体的标准向胶体金溶液中加入上述甘草酸单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置10min,加入10%牛血清白蛋白(BSA)使其在胶体金溶液中的终质量分数为1%,静置10min。12000r/min,4℃离心40min,弃上清液,沉淀用复溶缓冲液洗涤两次,用体积为初始胶体金体积1/10的复溶缓冲液将沉淀重悬,置4℃备用。

[0128] 复溶缓冲液:含BSA的质量分数为0.1%~0.3%、吐温-80的质量分数为0.05%~0.2%、pH7.2的0.02mol/L磷酸盐缓冲液。

[0129] 6、结合物释放垫的制备

[0130] 将结合物释放垫浸泡于含0.5%BSA(质量分数)、pH 7.2的0.5mol/L磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿1h,37℃烘3h备用。用Isoflow喷膜仪将制备好的甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物均匀喷涂在结合物释放垫上,每1cm结合物释放垫喷涂0.01mL甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物,置于37℃环境中(湿度<20%)60min后取出,置于干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

[0131] 7、反应膜的制备

[0132] 将甘草酸半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测区,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控区,检测区和质控区间隔0.5-1cm。

[0133] 包被过程:用磷酸缓冲液将甘草酸半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1mg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测区(T线),包被量为1.0μL/cm;用0.01mol/L、pH7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200μg/mL,用Isoflow点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控区(C线),包被量为1.0μL/cm。将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2h,备用。

[0134] 8、样品吸收垫的制备

[0135] 将样品吸收垫用含0.5%BSA(质量分数)、pH 7.2的0.1mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2h,37℃下烘干2h备用。

[0136] 9、试纸条的组装

[0137] 将反应膜、吸水垫、结合物释放垫、样品吸收垫依次按顺序粘贴在PVC基板上;吸水垫的顶端与PVC基板的顶端对齐,吸水垫末端覆盖反应膜顶端1-2mm处,结合物释放垫起始端覆盖反应膜的底端1-2mm处,底端有1/3-1/2区域被样品吸收垫覆盖,样品吸收垫的底端与PVC基板的底端对齐;所述反应膜上有检测区和质控区,检测区(T线)和质控区(C线)均呈与所述试纸条的长相垂直的条状带,检测区位于靠近结合物释放垫的一侧,质控区位于靠近吸水垫的一侧;将试纸条用机器切成4mm宽的小条,装在特制的塑料制卡中,4~30℃条件下可保存12个月。

[0138] 实施例2 检测甘草酸的试纸条的应用

[0139] 1、样品的前处理

[0140] 取甘草药材、饮片或炙甘草粉末0.1g,在样品杯中加入25mL 70%乙醇,40Hz超声处理30min,摇匀,滤过取续滤液,即得样本浓缩液;

[0141] 取饮片样本浓缩液900μL,加入3600μL 0.01mol/L PBS中,混匀,即得甘草饮片待测样本;

[0142] 取药材样本浓缩液900μL,加入4100μL 0.01mol/L PBS中,混匀,即得甘草药材待测样本;

[0143] 取炙甘草样本浓缩液900μL,加入1600μL 0.01mol/L PBS中,混匀,即得炙甘草饮片待测样本。

[0144] 2、用试纸条进行检测

[0145] 取出试纸条,置于水平桌面,用加样器吸取80μL待测样本滴加至加样孔,5-10min观察结果,超时结果判定无效。

[0146] 3、分析检测结果

[0147] 阴性(-):C线、T线显色均匀,呈淡红色或红色,均表示样本中甘草酸浓度低于检测限,如图2a、2b、2c。

[0148] 阳性(+):C线显色均匀,T线位置无明显条带,表示样本中甘草酸浓度等于或高于检测限,如图2d。

[0149] 无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸条已失效,如图2e、2f。在此情况下,应再次仔细阅读说明书,并用新的试纸条重新测试。

[0150] 实施例3 检测甘草酸的试纸条性能的检测

[0151] 1、检测限试验

[0152] ①检测对照品的灵敏度

[0153] 称取1mg甘草酸溶于1mL甲醇中,将其用0.01mol/L PBS适当稀释,当标准品稀释至2mg/L时,T线位置无线;当标准品稀释至1mg/L时,可见T线出现;当标准品稀释至0.5mg/L时,T线清晰可见。该试纸条在2mg/L时能够消线,故其灵敏度为2mg/L。

[0154] ②检测甘草样品的灵敏度

[0155] 将中药甘草样品待测液用0.01mol/L PBS适当稀释,当样品稀释至7.2mg/L时,T线位置无线;当标准品稀释至3.6mg/L时,可见T线出现;当标准品稀释至1.8mg/L时,T线清晰可见。该试纸条在7.2mg/L时能够消线,故其灵敏度为7.2mg/L。

[0156] 综合以上检测结果,该试纸条检测标准品的灵敏度为2mg/L,检测甘草及炙甘草样品的灵敏度为7.2mg/L。

[0157] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0158] 取已知中药甘草饮片待测液及炙甘草中甘草酸含量大于7.2mg/L的阳性样本各50份,小于7.2mg/L的阴性样本各20份,用三批试纸条进行检测,计算其阴性率与阳性率,结果见表1。

[0159] 表1 中药材甘草样本符合率检测结果

[0160]

结果 批次	中药甘草饮片		中药炙甘草	
	阳性样本（50 份）	阴性样本（20 份）	阳性样本（50 份）	阴性样本（20 份）
1	50 份阳性	20 份阴性	50 份阳性	20 份阴性
2	50 份阳性	20 份阴性	50 份阳性	20 份阴性
3	50 份阳性	20 份阴性	50 份阳性	20 份阴性

[0161] 结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性甘草饮片及炙甘草样本时,结果全为阳性,可知阳性样本符合率为100%,假阴性率为0%;检测阴性甘草饮片及炙甘草样本时,结果全为阴性,可知阴性样本符合率为100%,假阳性率为0%。说明本发明的检测甘草酸的试纸条可以对甘草饮片及炙甘草中甘草酸含量进行快速检测。

[0162] 3、特异性试验

[0163] 将10mg/L芍药苷、紫杉醇、胆酸、橙皮苷、甘草次酸、甘草素、黄芩苷7种结构及配伍易交叉物分别滴加在甘草酸试纸条上,结果显示,试纸条C线和T线均显色,结果呈阴性。说明本试纸条对10mg/L芍药苷、紫杉醇、胆酸、橙皮苷、甘草次酸、甘草素、黄芩苷无交叉反应,特异性较好。

[0164] 4、重复性实验

[0165] 制备3个不同批次的甘草酸检测试纸条,然后每个批次选取10条试纸条,用于检测阴性标准品及阳性标准品各5条,结果表明,3个批次阴性标准品检测结果均为阴性,没有明显差异;3个批次阳性标准品检测结果均为阳性,没有明显差异。说明3个批次试纸条的重复性良好。

[0166] 5、稳定性实验

[0167] 将铝箔袋包装好的甘草酸检测试纸条分别在-20℃、4℃、室温、37℃、45℃温度环境条件下保存7天,每隔一天取出后,用含有0.5mg/L、2mg/L、4mg/L的甘草酸标准品溶液进行测试,结果表明:在不同温度下保存3天、5天、7天后试纸条检测结果与第1天(在各温度条件下保存前)的检测结果无明显差异,0.5mg/L阴性对照溶液点样T线显色,2mg/L甘草酸标准品溶液点样T线消线,4mg/L甘草酸标准品溶液点样T线消线,且C线均显色。

[0168] 6、甘草样本的检测结果

[0169] 随机抽取甘草饮片及炙甘草样本50份,分别用试纸条和HPLC进行检测,比较检测结果,结果见表2。

[0170] 表2 甘草随机样本HPLC与试纸条检测结果符合率

[0171]

样品	HPLC 结果	药典 标准	试纸条 结果	符合 率%	样品	HPLC 结果	药典 标准	试纸条 结果	符合 率%
甘草 1	2.29	≥1.8	+	100	甘草 26	2.94	≥1.8	+	100
甘草 2	2.45	≥1.8	+	100	甘草 27	3.06	≥1.8	+	100
甘草 3	2.32	≥1.8	+	100	甘草 28	3.17	≥1.8	+	100
甘草 4	5.48	≥1.8	+	100	甘草 29	2.40	≥1.8	+	100
甘草 5	5.66	≥1.8	+	100	甘草 30	3.21	≥1.8	+	100
甘草 6	2.62	≥1.8	+	100	甘草 31	3.22	≥1.8	+	100
甘草 7	2.42	≥1.8	+	100	甘草 32	2.17	≥1.8	+	100
甘草 8	4.83	≥1.8	+	100	甘草 33	3.75	≥1.8	+	100
甘草 9	2.67	≥1.8	+	100	甘草 34	2.92	≥1.8	+	100
甘草 10	2.54	≥1.8	+	100	甘草 35	0.00	≥1.8	+	100
甘草 11	2.62	≥1.8	+	100	甘草 G1	2.69	≥1.8	+	100
甘草 12	2.34	≥1.8	+	100	甘草 G2	3.05	≥1.8	+	100
甘草 13	2.12	≥1.8	+	100	甘草 G3	2.16	≥1.8	+	100
甘草 14	2.17	≥1.8	+	100	甘草 G4	3.94	≥1.8	+	100
甘草 15	2.60	≥1.8	+	100	甘草 G5	4.08	≥1.8	+	100
甘草 16	2.50	≥1.8	+	100	炙甘草 G6	1.82	≥1.0	+	100
甘草 17	2.10	≥1.8	+	100	炙甘草 G7	2.33	≥1.0	+	100
甘草 18	2.33	≥1.8	+	100	炙甘草 G8	1.85	≥1.0	+	100
甘草 19	2.76	≥1.8	+	100	炙甘草 G9	3.43	≥1.0	+	100
甘草 20	2.29	≥1.8	+	100	炙甘草 G10	1.81	≥1.0	+	100
甘草 21	3.05	≥1.8	+	100	炙甘草 G11	2.54	≥1.0	+	100
甘草 22	2.61	≥1.8	+	100	炙甘草 G12	2.08	≥1.0	+	100

[0172]

甘草 23	2.62	≥ 1.8	+	100	炙甘草 G13	2.26	≥ 1.0	+	100
甘草 24	3.23	≥ 1.8	+	100	炙甘草 G14	2.20	≥ 1.0	+	100
甘草 25	2.57	≥ 1.8	+	100	炙甘草 G15	2.82	≥ 1.0	+	100

[0173] 根据上表可知,本发明试纸条随机样品检测结果与HPLC结果完全一致,确定该试纸条准确性良好,样本灵敏度判定准确。

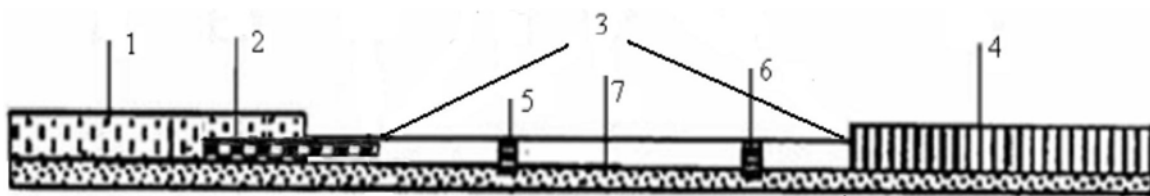


图1

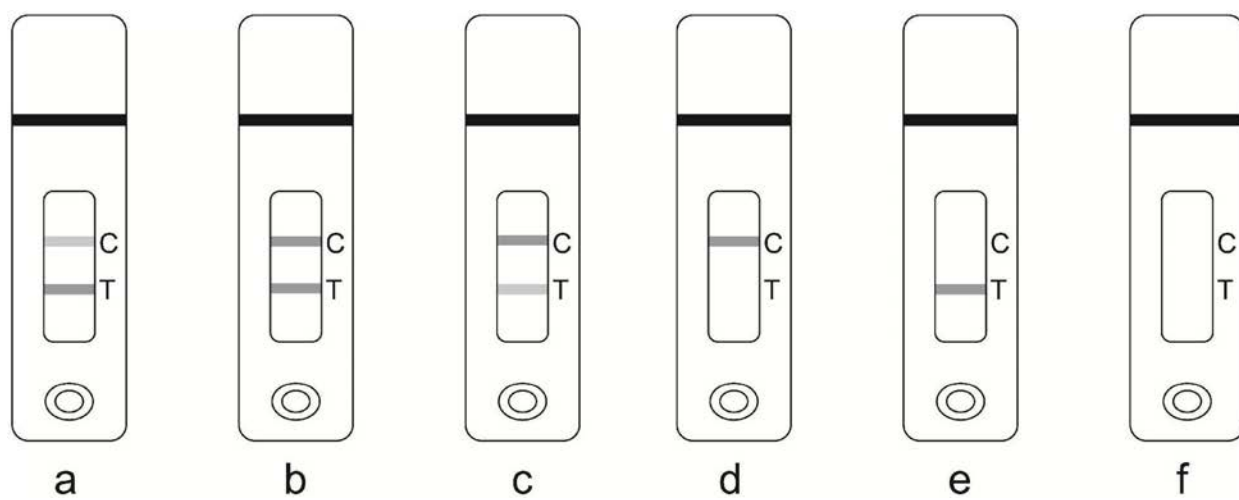


图2

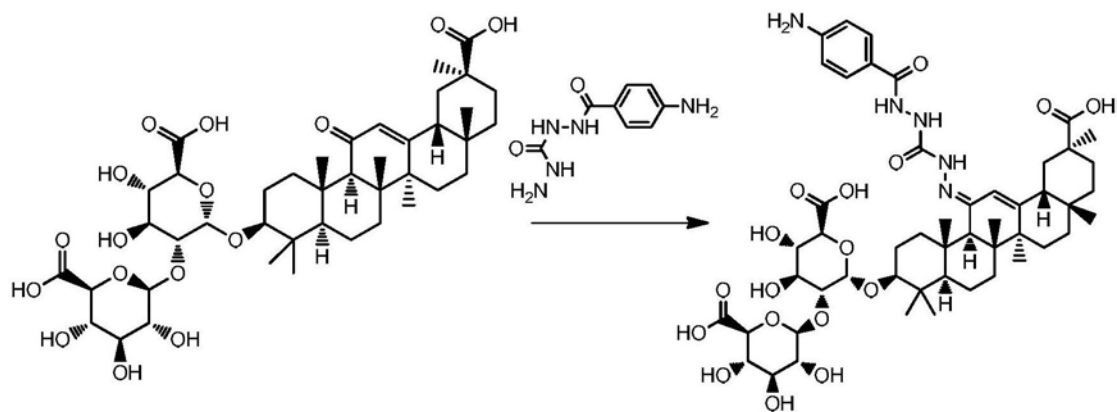


图3

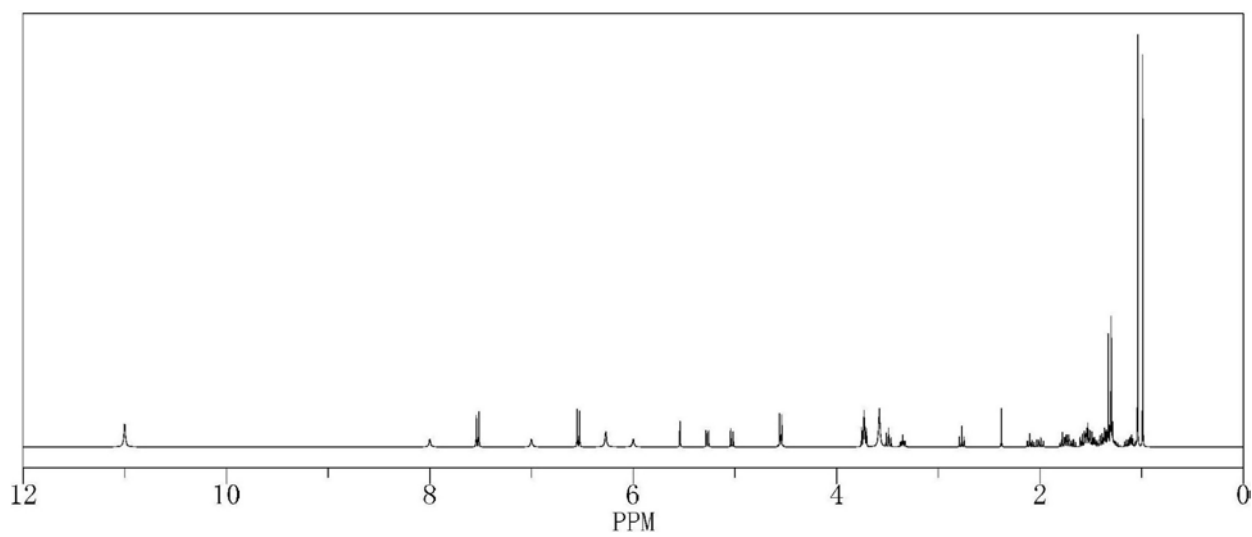


图4

专利名称(译)	一种检测甘草酸的试纸条及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108196054A	公开(公告)日	2018-06-22
申请号	CN2017110624117.0	申请日	2017-07-27
[标]发明人	冯红 张兰兰 李细芬 涂媛		
发明人	冯红 张兰兰 李细芬 涂媛		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/94 G01N33/531 G01N33/558 G01N33/577		
代理人(译)	王为		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测甘草酸的试纸条及其制备方法和应用，该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和基板；其中，所述反应膜上具有包被有甘草酸半抗原-载体蛋白偶联物的检测区和包被有羊抗鼠抗抗体的质控区，所述结合物释放垫上喷涂有甘草酸单克隆抗体-胶体金复合物，本发明还提供一种应用上述试纸条检测样品中甘草酸的方法，本发明提供的试纸条和检测方法具有特异性强、灵敏度高、操作简便、可快速读取结果、成本低等特点，适合大量样品的筛查及中药现场质量监控。

