



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101963617 B

(45) 授权公告日 2013.07.10

(21) 申请号 201010183989.6

(22) 申请日 2010.05.26

(73) 专利权人 江西中烟工业有限责任公司

地址 330096 江西省南昌市高新区金圣
工业科技园

(72) 发明人 蔡继宝 唐萍萍 邓宇 苏庆德

(74) 专利代理机构 南昌佳诚专利事务所 36117

代理人 闵蓉 张建新

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

(56) 对比文件

CN 1603828 A, 2005.04.06, 全文.

WO 2008029031 A2, 2008.03.13, 全文.

黄晓冬等.《原位分子印迹毛细管色谱柱的制
备及其对非对映异构体的分离》.《色谱》.2003,
第21卷(第3期),全文.

权利要求书2页 说明书3页

(54) 发明名称

测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析
法

(57) 摘要

一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫
分析法,涉及体液中尼古丁的测定方法。依次包
括以下步骤:(1)以尼古丁为模板,制备分子印迹
聚合物涂层毛细管;(2)将制备好的毛细管与生
物传感器联用;(3)采用有机酸盐处理尼古丁样
品和标样,调节pH;(4)采用在线分子印记聚合物
萃取-等离子体共振技术联用测定体液中的尼古
丁。本发明的有益效果是:能够有效地将体液中
尼古丁在线完全萃取和预富集,可快速、准确定量
分析体液中尼古丁。

1. 一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法, 特征在于: 依次包括以下步骤:

(1) 将 0.2mmol-0.5mmol 的印记分子尼古丁溶解在烃基取代甲酰胺中, 再加入功能单体, 震荡, 然后再加入交联剂和致孔剂、引发剂, 震荡, 混合均匀, 通氮气后用氮气泵注射进入硅烷化活化的毛细管内, 在水浴下聚合, 聚合反应完成后, 将毛细管连接到氮气泵上, 施加压力除去未反应的溶液并使合成的聚合物压缩到毛细管内壁上, 施压完成后用有机酸醇溶液冲洗毛细管以除去印记分子尼古丁和致孔剂;

(2) 将尼古丁分子用乙基-二甲氨基丙基-碳二亚胺和 N-羟基丁二酰亚胺衍生并键合到 SPR 裸金芯片上, 将制备好的毛细管与生物传感器联用;

(3) 采用磷酸盐缓冲液稀释 Anti-NIC 单克隆抗体, 并加入蛋白质, 采用有机酸盐处理尼古丁样品和标样, 调节 pH;

(4) 采用在线分子印记聚合物萃取-等离子体共振技术联用测定体液中的尼古丁: 首先将 Anti-NIC 单克隆抗体溶液通过毛细管并进入传感器芯片检测, 响应信号为 RU1, 将其作为参照, 然后将待测的尼古丁溶液通过毛细管柱, 尼古丁分子就被管内的聚合物涂层选择性地萃取和富集, 最后再将相同浓度的 Anti-NIC 单克隆抗体溶液通过毛细管进入 SPR 芯片表面, Anti-NIC 单克隆抗体首先被毛细管涂层上萃取的 NIC 抑制, 使剩下的进入芯片表面的 Anti-MC 单克隆抗体量减少, 相应的响应信号也减弱, 为 RU2: $\Delta RU = RU1 - RU2$ 。

2. 根据权利要求 1 所述的一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法, 特征在于: 所述步骤 (4) 所述体液可为尿液、血液、血浆或唾液。

3. 根据权利要求 1 所述的一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法, 特征在于: 所述步骤 (1) 中所述烃基取代甲酰胺为包括一个、二个或三个碳原子取代烷基的甲酰胺。

4. 根据权利要求 1 所述的一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法, 特征在于: 所述步骤 (1) 所述印记分子尼古丁、功能单体、交联剂物质的量比例为 1: (2-10): (30-60)。

5. 根据权利要求 1 所述的一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法, 特征在于: 所述功能单体为包括一个、二个或三个碳原子取代烯烃基的吡啶; 所述交联剂为包括一个、二个或三个碳原子取代烷基的烯酸一元醇酯或多元醇酯; 所述致孔剂为包括十一个、十二个或十三个碳原子一元醇或多元醇; 引发剂为一个、二个或三个烃基的一取代或多取代偶氮。

6. 根据权利要求 1 所述的一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法, 特征在于: 步骤 (1) 中所述震荡为超声震荡或机械震荡; 震荡时间为 30min-60min; 所述通氮气时间为 5-20min; 水浴温度为 40°C-80°C; 水浴时间为 3h-6h; 毛细管连接到氮气泵上, 施加压力为: 10MPa-20MPa; 时间持续 5min-10min。

7. 根据权利要求 1 所述的一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法, 特征在于: 所述有机酸醇溶液冲洗毛细管以除去印记分子尼古丁和致孔剂中有机酸为一个、二个或三个碳原子的一元有机酸或多元有机酸; 醇为一个、二个或三个碳原子的一元醇或多元醇; 有机酸和醇体积比为 1: (3-6); 有机酸醇溶液的量为 1mL-10mL。

8. 根据权利要求 1 所述的一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法, 特征在

于:步骤(3)中所述磷酸盐缓冲溶液pH控制在5-10;蛋白质可为牛血清白蛋白;蛋白质浓度为5-20g/L;有机酸盐为包含一个、二个或三个碳原子酸铵;调节pH为3-6。

测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法

技术领域

[0001] 本发明涉及体液中尼古丁的测定方法,特别是一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法。

背景技术

[0002] 随着全球性控烟运动的不断推进,社会公众对于吸烟与健康问题日益关注。人体体液中的尼古丁作为生物标记物,被广泛用以评价吸烟人群和非吸烟人群暴露于烟草烟气的程度。目前,对尿液、血液、精液、血浆和唾液中尼古丁的分析方法既有高效液相色谱法、毛细管气相色谱-氮磷检测器法,又有酶联免疫法、直接抑制免疫分析法、间接抑制免疫分析法。高效液相色谱法、毛细管气相色谱-氮磷检测器法,又有酶联免疫法需要合适的去杂或浓缩等样品前处理步骤,前处理复杂,选择性、灵敏度较差。对于直接抑制免疫分析法需要对样品预培养,预培养的过程冗长,操作复杂,样品基质影响大。

发明内容

[0003] 本发明的目的正是针对现有技术中存在的不足之处,提供一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法。该方法首先制备高选择性的尼古丁分子印记聚合物涂层毛细管,能够有效地将体液中尼古丁在线完全萃取和预富集,然后用表面等离子体共振技术进行间接免疫分析,从而实现体液中尼古丁的快速、准确定量分析。

[0004] 本发明的目的是通过以下技术方案来实现的:

[0005] 一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法,依次包括以下步骤:

[0006] (1) 将 0.2mmol-0.5mmol 的印记分子尼古丁溶解在烃基取代甲酰胺中,再加入功能单体,震荡,然后再加入交联剂和生孔剂、引发剂,震荡,混合均匀,通氮气后用氮气泵注射进入硅烷化活化的毛细管内,在水浴下聚合。聚合反应完成后,将毛细管连接到氮气泵上,施加压力除去未反应的溶液并使合成的聚合物压缩到毛细管内壁上,施压完成后用有机酸醇溶液冲洗毛细管以除去印记分子尼古丁和致孔剂。

[0007] (2) 将尼古丁分子用乙基-二甲氨基丙基-碳二亚胺和 N-羟基丁二酰亚胺衍生并键合到 SPR 裸金芯片上,将制备好的毛细管与生物传感器联用。

[0008] (3) 采用磷酸盐缓冲液稀释 Anti-NIC 单克隆抗体,并加入蛋白质,采用有机酸盐处理尼古丁样品和标样,调节 pH。

[0009] (4) 采用在线分子印记聚合物萃取-等离子体共振技术联用测定体液中的尼古丁。首先将 Anti-NIC 单克隆抗体溶液通过毛细管并进入传感器芯片检测,响应信号为 RU1,将其作为参照。然后将待测的尼古丁溶液通过毛细管柱,尼古丁分子就被管内的聚合物涂层选择性地萃取和富集。最后再将相同浓度的 Anti-NIC 单克隆抗体溶液通过毛细管进入 SPR 芯片表面, Anti-NIC 单克隆抗体首先被毛细管涂层上萃取的 NIC 抑制,使剩下的进入芯片表面的 Anti-NIC 单克隆抗体量减少,相应的响应信号也减弱 (RU2)。

[0010] $\Delta RU = RU1 - RU2$

[0011] Δ RU 值直接反映了被 NIC 抑制的 MAbs 的浓度, 也间接反映出样品中 NIC 的含量, 根据该原理制备系列标准溶液, 利用外标法定量测定待测物中尼古丁含量。

[0012] 分析条件: 生物传感器: BIACore 3000 传感器 (BIACore AB 公司); 生物芯片: CM5 传感器芯片 (BIACore AB 公司); 缓冲溶液: 磷酸盐缓冲液 PBS (10mmol/L 磷酸盐, 137mmol/L NaCl, 2.7mmol/L KCl, pH7.4, 由 BIACore AB 公司购买的 PBS 缓冲液用二次去离子水稀释 10 倍获得); 流速: 20 μ L/min; 20 μ L。检测温度: 25℃。

[0013] 在本发明中, 步骤 (4) 所述体液可为尿液、血液、血浆或吐液。

[0014] 步骤 (1) 中所述烃基取代甲酰胺为包括一个、二个或三个碳原子取代烷基的甲酰胺。

[0015] 步骤 (1) 所述印记分子尼古丁、功能单体、交联剂物质的量比例为 1: (2-10): (30-60)。所述功能单体为包括一个、二个或三个碳原子取代烯烃基的吡啶。所述交联剂为包括一个、二个或三个碳原子取代烷基的烯酸一元醇酯或多元醇酯。所述生孔剂为包括十一个、十二个或十三个碳原子一元醇或多元醇。引发剂为一个、二个或三个烃基的一取代或多取代偶氮睛。

[0016] 步骤 (1) 中所述震荡为超声震荡或机械震荡; 震荡时间为 30min-60min。所述通氮气时间为 5-20min; 水浴温度为 40℃-80℃; 水浴时间为 3h-6h。毛细管连接到氮气泵上, 施加压力为: 10MPa-20MPa; 时间持续 5min-10min。用有机酸醇溶液冲洗毛细管以除去印记分子尼古丁和致孔剂中有机酸为一个、二个或三个碳原子的一元有机酸或多元有机酸; 醇为一个、二个或三个碳原子的一元醇或多元醇; 有机酸和醇体积比为 1: (3-6); 有机酸醇溶液的量为 1mL-10mL。

[0017] 步骤 (3) 中所述磷酸盐缓冲溶液 pH 控制在 5-10; 蛋白质可为牛血清白蛋白; 蛋白质浓度为 5-20g/L。有机酸盐为包含一个、二个或三个碳原子酸铵; 调解 pH 为 3-6。

[0018] 本发明的有益效果是: 高选择性的尼古丁分子印记聚合物涂层毛细管, 能够有效地将体液中尼古丁在线完全萃取 (SPE) 和预富集, 然后用表面等离子体共振技术进行间接免疫分析, 从而实现体液中尼古丁的快速、准确定量分析。本发明的方法不仅可以测定诸如体液这样的复杂体系中尼古丁含量, 而且选择性强、灵敏度高、准确性好、操作简便快速。

具体实施方式

[0019] 本发明以下将结合实施例作进一步描述, 但并不限制本发明。

[0020] 实施例 1

[0021] a、采用直接在活化的毛细管内聚合的方法制备尼古丁分子印迹聚合物涂层毛细管。将 0.25mmol 印迹分子尼古丁溶解在 0.5mL N,N-二甲基甲酰胺中, 再加入 1mmol 4-乙烯基吡啶。将所得的混合物超声振荡 30min, 然后再加入 5mmol 乙二醇二甲基丙烯酸酯, 2.5mL 正十二醇和 10mg 偶氮二异丁氰腈。将所得的混合物超声振荡 30min 使其混合均匀。最后将所得的预聚合溶液通氮气除氧 5min, 并用氮气泵注射进入硅烷化活化的毛细管内。毛细管两端用橡皮塞封闭并放置在 50℃ 的水浴中反应 4h。聚合反应完成后, 将毛细管连接到氮气泵上, 施加 15MPa 的压力除去未反应的溶液并使合成的聚合物压缩到毛细管内壁上。该过程持续 5min。最后用 2mL 甲醇和乙酸的混合液 (V/V = 4: 1) 冲洗毛细管以除去模板分子尼古丁和致孔剂。

[0022] b、将尼古丁分子用乙基 - 二甲氨基丙基 - 碳二亚胺和 N- 羟基丁二酰亚胺衍生并键合到 SPR 裸金芯片上, 将制备好的毛细管与生物传感器联用。

[0023] c、采用磷酸盐缓冲液 PBS (10mmol/L 磷酸盐, 137mmol/L NaCl, 2. 7mmol/L KCl, pH 7. 4) 稀释 Anti-NIC 单克隆抗体 (MAbs) 50 倍, 加入牛血清白蛋白, 使牛血清白蛋白浓度为 10g/L, 采用乙酸铵处理尼古丁样品和标样, 调节 pH 为 4. 5。

[0024] d、采用在线分子印记聚合物萃取 - 等离子体共振技术联用测定体液中的尼古丁。

专利名称(译)	测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法		
公开(公告)号	CN101963617B	公开(公告)日	2013-07-10
申请号	CN201010183989.6	申请日	2010-05-26
[标]申请(专利权)人(译)	江西中烟工业有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	江西中烟工业有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	江西中烟工业有限责任公司		
[标]发明人	蔡继宝 唐萍萍 邓宇 苏庆德		
发明人	蔡继宝 唐萍萍 邓宇 苏庆德		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/53 G01N1/28		
代理人(译)	张建新		
审查员(译)	王丽华		
其他公开文献	CN101963617A		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

一种测定体液中尼古丁的新型间接抑制免疫分析法，涉及体液中尼古丁的测定方法。依次包括以下步骤：(1)以尼古丁为模板，制备分子印迹聚合物涂层毛细管；(2)将制备好的毛细管与生物传感器联用；(3)采用有机酸盐处理尼古丁样品和标样，调节pH；(4)采用在线分子印记聚合物萃取-等离子体共振技术联用测定体液中的尼古丁。本发明的有益效果是：能够有效地将体液中尼古丁在线完全萃取和预富集，可快速、准确定量分析体液中尼古丁。