



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107907687 A

(43)申请公布日 2018.04.13

(21)申请号 201711246772.3

(22)申请日 2017.12.01

(71)申请人 吴鹏

地址 102206 北京市昌平区回龙观史各庄
179号

(72)发明人 吴鹏

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

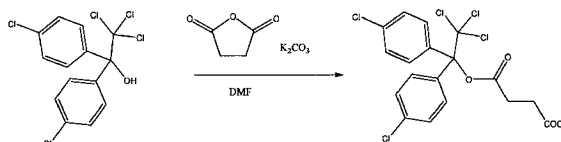
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

一种三氯杀螨醇半抗原制备方法及其应用

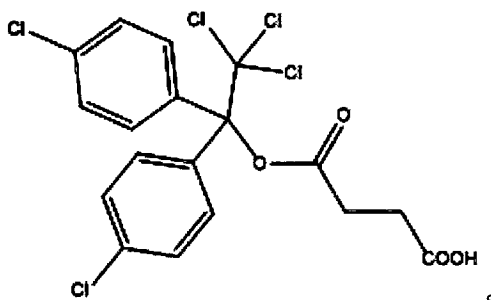
(57)摘要

本发明公开了一种检测三氯杀螨醇的半抗原制备方法,以及它在时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条中的应用。本发明的时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条具有灵敏度高、准确度高、精密度高、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,能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测。本发明提供的时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条,适用于测定茶叶、白菜、大米、植物油、鱼肉、虾肉等样品中三氯杀螨醇的残留量。



1.一种三氯杀螨醇半抗原的制备方法,其特征在于:于单口瓶中倒入20ml DMF,加入3.7g三氯杀螨醇,加入碳酸钾2.76g,室温搅拌20min;加入琥珀酸酐1.2g,缓慢升温至60度,反应10h,降温,加入50ml水,移入分液漏斗,乙酸乙酯萃取;干燥,蒸干溶剂,柱层析纯化,得到3.8g目标物,收率82%,即得到三氯杀螨醇半抗原。

2.如权利要求1所述的一种三氯杀螨醇半抗原的制备方法,其特征在于所述三氯杀螨醇半抗原的分子结构式为:



3.如权利要求1所述的一种三氯杀螨醇半抗原的制备方法,其特征在于所述三氯杀螨醇半抗原能够制备免疫原,所述免疫原的制备方法如下:

(1) 将半抗原2.35g溶于20ml DMF中,加入NHS 0.7g,DCC 1.3g,室温搅拌5h,加入50ml 水,移入分液漏斗,乙酸乙酯萃取;干燥,蒸干溶剂,柱层析纯化,得到2.64g目标物A,收率93%;

(2) 将133mg BSA溶于5ml 0.01M PBS,搅拌溶解;第(1)步的目标物A与BSA比例可在1:1~60:1的范围内调整,本申请选择在加入57mg目标物A(与BSA摩尔比为50:1),加入EDC盐酸盐10mg,室温搅拌2h;移入透析袋中透析48h。

4.如权利要求1所述的一种三氯杀螨醇半抗原的制备方法,其特征在于所述三氯杀螨醇半抗原能够制备包被原,所述包被原的制备方法如下:

(1) 将半抗原2.35g溶于20ml DMF中,加入NHS 0.7g,DCC 1.3g,室温搅拌5h,加入50ml 水,移入分液漏斗,乙酸乙酯萃取;干燥,蒸干溶剂,柱层析纯化,得到2.64g目标物A,收率93%;

(2) 将86mg OVA溶于5ml 0.01M PBS, 搅拌溶解; 第(1)步的目标物A与OVA比例可在1:1~40:1的范围内调整, 本申请选择在加入45.6mg目标物A(与OVA摩尔比为40:1), 加入EDC盐酸盐10mg, 室温搅拌2h; 移入透析袋中透析48h。

5.如权利要求1所述的一种三氯杀螨醇半抗原的制备方法,其特征在于所述三氯杀螨醇半抗原能够用于制备一种检测三氯杀螨醇的时间分辨荧光试纸条,包括样品吸收垫、反应膜以及吸水垫,其特征在于所述反应膜位于中间,样品吸收垫与吸水垫分别搭接于反应膜左右两端;所述样品吸收垫上设有加样区和微球区,微球区上载有三氯杀螨醇时间时间分辨荧光微球;所述反应膜上设有检测线(T线)和质控线(C线),T线接上包被三氯杀螨醇抗原(包被原),C线包被抗兔抗体。

6. 如权利要求1所述的一种三氯杀螨醇半抗原的制备方法,其特征在于所述三氯杀螨醇半抗原能够用于制备一种检测三氯杀螨醇的胶体金免疫层析试纸条,所述试纸条包括样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫,所述反应膜上有检测区和质控区,所述检测区包被三氯杀螨醇抗原(包被原)。

7. 一种检测茶叶、白菜、大米、植物油、鱼肉、虾肉等样品中三氯杀螨醇残留的方法, 其包括步骤:

- 1) 样本前处理;
- 2) 用权利要求5-6任一项所述的试纸条进行检测;
- 3) 分析检测结果。

一种三氯杀螨醇半抗原制备方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种三氯杀螨醇半抗原制备方法及其应用,例如在时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条中的应用,属于快速检测技术领域,用于茶叶、白菜、大米、植物油、鱼肉、虾肉等样品中三氯杀螨醇的含量检测。

背景技术

[0002] 三氯杀螨醇是一种低毒杀螨剂,不溶于水,可溶于多种有机溶剂。在酸性溶液中稳定,碱性介质中容易分解。我国主要在柑橘、苹果、梨及棉花上准许使用。由于其原料来自DDT,因此,三氯杀螨醇的工业品都可能含有一定量的DDT,这会导致使用该药剂的农产品的残留量明显增高。因此,我国目前禁止在茶树及蔬菜上使用。除此之外,水产品中也被检出该药物超标,国家质量监督检验检疫总局要求加强对三氯杀螨醇的监控。GB 2763-2014《食品安全国家标准食品中农药最大残留限量》中规定三氯杀螨醇在棉籽油的最大残留限量为0.5mg/kg,水果(柑橘、橙、柚、柠檬、苹果、梨)的最大残留限量为1mg/kg。

[0003] 目前,检查该药物的方法主要是质谱法等仪器方法,仪器检测方法的精确度较高,但是仪器昂贵,需要专业的技术人员,检测步骤复杂,难以批量检测样品,不适用于基层实验室批量、快速检测样品。而免疫学检测方法操作简单、快速、灵敏,可同时检测多数样品,是理想的快速筛选手段。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种三氯杀螨醇半抗原制备方法,以及它在时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条(简称“胶体金试纸条”)中的应用。

[0005] 本发明所提供了一种检测三氯杀螨醇的时间分辨荧光试纸条,该试纸条包括样品吸收垫、反应膜以及吸水垫三部分。反应膜位于中间,样品吸收垫与吸水垫分别搭接于反应膜左右两端。其中,样品吸收垫上设有加样区和微球区,微球区上载有时间分辨荧光微球;反应膜上设有检测线(T线)和质控线(C线),T线接上包被三氯杀螨醇抗原,C线包被抗兔抗体。

[0006] 所述三氯杀螨醇时间分辨荧光微球,包括检测微球和质控微球,检测微球为表面包被有三氯杀螨醇单克隆抗体的荧光微球,质控微球为表面包被有兔抗标记蛋白的荧光微球。

[0007] 所述荧光微球中填充了镧系元素化合物;较优的,该镧系元素螯合物为镧螯合物;最优的,该镧螯合物可为Eu(TTA)₃/TOPO或Eu(TTA)₃/Phen。

[0008] 所述蛋白可以是牛血清Y-球蛋白(BGG)或小牛血清白蛋白(BSA)。

[0009] 所述时间分辨荧光微球粒径范围为100-1000nm。

[0010] 所述硝酸纤维素膜上,T线上包被的抗体为三氯杀螨醇抗原,C线上包被的抗兔抗体。

[0011] 所述三氯杀螨醇时间分辨荧光免疫定量检测试纸条底部设有塑料底板。

[0012] 所述T线接上包被三氯杀螨醇抗原是由三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白可为牛血清白蛋白、卵清蛋白、血蓝蛋白、甲状腺蛋白、人血清白蛋白。

[0013] 所述三氯杀螨醇单克隆抗体是以三氯杀螨醇半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得,是由三氯杀螨醇单克隆抗体杂交瘤细胞株分泌获得;所述抗兔抗体是将兔源抗体免疫羊得到。

[0014] 所述样品吸收垫为Fusion5膜或其他功能相同的膜;所述结合物释放垫可为玻璃棉或聚酯材料;所述吸水垫为吸水垫;所述反应膜可为硝酸纤维素膜或醋酸纤维素膜。

[0015] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述试纸条的方法,其包括步骤:

[0016] (1) 质控微球制备:

[0017] ①用生物素标记蛋白;

[0018] ②采用上述标记蛋白包被醛基修饰的荧光微球;

[0019] (2) 半抗原制备:经过一系列化学反应得到三氯杀螨醇半抗原产物;

[0020] (3) 将三氯杀螨醇半抗原与载体蛋白偶联,得到三氯杀螨醇半抗原-载体蛋白偶联物;

[0021] (4) 用三氯杀螨醇半抗原-载体蛋白偶联物免疫新西兰大白兔,将新西兰大白兔脾细胞和骨髓瘤细胞通过融合、筛选,得到三氯杀螨醇单克隆杂交瘤细胞株;

[0022] (5) 提取新西兰大白兔IgG免疫健康山羊,得到抗兔抗体;

[0023] (6) 检测微球制备:采用三氯杀螨醇的单克隆抗体包被醛基修饰的荧光微球;

[0024] (7) 空白大卡粘贴:将硝酸纤维素膜粘贴在塑料底板中间,Fusion5膜与吸水垫分别搭接于硝酸纤维素膜左右两端;

[0025] (8) 喷膜:将兔抗标记蛋白的荧光微球和三氯杀螨醇单克隆抗体的荧光微球采用释放缓冲液混合稀释到一定浓度,喷到Fusion5膜的微球区;三氯杀螨醇抗原和抗兔抗体稀释后,分别喷到硝酸纤维素膜的T线和C线位置;

[0026] (9) 干燥及切条:将上述喷好试剂的大卡烘干、切条。

[0027] 喷膜步骤中用到的释放缓冲液含有10%-20%蔗糖、3%-10%海藻糖、0.5%-1% N,0-双三甲硅基乙酰胺(BSA),0.2%-0.5%庆大霉素。

[0028] 喷膜步骤稀释后检测微球终浓度为0.5mg/mL-2mg/mL,质控微球终浓度0.05mg/mL-0.2mg/mL;T线抗原终浓度0.5mg/mL-2mg/mL,C线抗原终浓度0.5mg/mL-2mg/mL;C,T线喷膜液量为0.5μL/cm-1.5μL/cm,微球喷膜量为2μL/cm-8μL/cm。

[0029] 干燥及切条步骤中所述的烘干可在恒温烘箱或者烘房中,37℃烘干8-12小时。

[0030] 本发明的另一个目的是提供一种检测三氯杀螨醇的胶体金免疫层析试纸条,由样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫组成;所述样品吸收垫、所述胶体金垫、所述反应膜和所述吸水垫依次按顺序连接,样品吸收垫的末端与胶体金垫的始端相连,胶体金垫的末端与反应膜的始端相连,反应膜的末端与吸水垫的始端相连;

[0031] 所述胶体金垫上包被有胶体金标记的单克隆抗体;所述单克隆抗体为抗三氯杀螨醇单克隆抗体杂交瘤细胞分泌的单克隆抗体;

[0032] 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)均为与所述试纸轴向垂直的条带状;检测区位于靠近胶体金垫末端的一侧;质控区位于远离胶体金垫末,所述样品吸收垫为纤维素滤膜。所述胶体金垫为包被有胶体金标记的所述单克隆抗体的玻璃纤

维膜。所述反应膜为硝酸纤维素膜(NC膜)。所述吸水垫为吸水纸。

[0033] 所述样品孔位于样本吸收垫上远离胶体金垫末端的一端。

[0034] 所述胶体金试纸条可用于检测三氯杀螨醇。

[0035] 所述胶体金试纸条可用于检测待测样本中是否含有三氯杀螨醇。

[0036] 本发明采用高特异性的三氯杀螨醇单克隆抗体,检验方法方便易行,具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的时间分辨荧光试纸条、胶体金免疫层析试纸条对样品的前处理要求低,样品前处理过程简单,能同时快速检测大批量样品。本发明的时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条具有灵敏度高、准确度高、精密度高、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,能同时快速检测大批量样品,可实现现场高通量快速检测。本发明提供的时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条,适用于测定茶叶、白菜、大米、植物油、鱼肉、虾肉中三氯杀螨醇的残留量。

附图说明

[0037] 图1为三氯杀螨醇半抗原合成路线图。

[0038] 图2为三氯杀螨醇半抗原核磁共振氢谱图。

[0039] 图3为三氯杀螨醇人工抗原合成路线图。

具体实施方式

[0040] 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。

[0041] 实施例1 三氯杀螨醇检测试纸条(时间分辨荧光试纸条、胶体金免疫层析试纸条)的制备

[0042] 1、三氯杀螨醇半抗原的制备

[0043] 于单口瓶中倒入20ml DMF,加入3.7g三氯杀螨醇,加入碳酸钾2.76g,室温搅拌20min;加入琥珀酸酐1.2g,缓慢升温至60度,反应10h,降温,加入50ml水,移入分液漏斗,乙酸乙酯萃取。干燥,蒸干溶剂,柱层析纯化,得到3.8g目标物,收率82%。

[0044] 由三氯杀螨醇半抗原核磁共振氢谱图可知,12.7的羧基峰,7-8的芳香环上氢的峰,以及2.7左右的琥珀酸酐上的亚甲基峰存在,说明三氯杀螨醇与琥珀酸酐已连接完成,目标半抗原合成成功。

[0045] 该方法制备的半抗原并没有改变三氯杀螨醇的结构,而引入了羧基,使得半抗原保留了全部三氯杀螨醇的结构,更促进了机体免疫应答产生针对三氯杀螨醇的抗体。

[0046] 2、人工抗原(免疫原、包被原)的制备

[0047] (1) 将半抗原2.35g溶于20ml DMF中,加入NHS 0.7g,DCC 1.3g,室温搅拌5h,加入50ml水,移入分液漏斗,乙酸乙酯萃取。干燥,蒸干溶剂,柱层析纯化,得到2.64g目标物A,收率93%,。

[0048] (2) 将133mg BSA溶于5ml 0.01M PBS,搅拌溶解。第(1)步的目标物A与BSA比例可在1:1~60:1的范围内调整,本申请选择在加入57mg目标物A(与BSA摩尔比为50:1),加入EDC盐酸盐10mg,室温搅拌2h。移入透析袋中透析48h。该比例下得到三氯杀螨醇免疫原可以在抗原表面暴露出更多的三氯杀螨醇半抗原,从而更好地引起针对三氯杀螨醇的免疫应

答。

[0049] (3) 将86mg OVA溶于5ml 0.01M PBS,搅拌溶解。第(1)步的目标物A与OVA比例可在1:1~40:1的范围内调整,本申请选择在加入45.6mg目标物A(与OVA摩尔比为40:1),加入EDC盐酸盐10mg,室温搅拌2h。移入透析袋中透析48h。得到三氯杀螨醇包被原。该比例下得到三氯杀螨醇包被原在与样品中抗原竞争抗体时,能够充分与抗体反应,从而避免假阳性,也不会因为包被原暴露位点过多,形成空间位阻,从而避免假阴性。

[0050] 4、三氯杀螨醇单克隆抗体的制备

[0051] 将免疫原注入Balb/c新西兰大白兔体内,产生抗血清。取免疫Balb/c新西兰大白兔脾细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合,筛选阳性孔,得到稳定分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞株。将杂交瘤细胞用冻存液制成细胞悬液,备用。将杂交瘤细胞置于细胞培养基中,在37℃条件下进行培养,用辛酸-饱和硫酸铵法将得到的培养液进行纯化,得到单克隆抗体,-20℃保存。

[0052] 所述细胞培养基为向RPMI1640培养基中添加小牛血清和碳酸氢钠,使小牛血清在细胞培养基中的终浓度为20%(质量分数),碳酸氢钠在细胞培养基中的终浓度为0.2%(质量分数);所述细胞培养基的pH为7.4。以羊作为免疫动物,以兔源抗体为免疫原对无病原体羊进行免疫,得到抗兔抗体。

[0053] 5、时间分辨荧光试纸条的制备

[0054] (1) 微球溶液的配制

[0055] 用释放缓冲液(含有20%蔗糖、5%海藻糖、0.5%BSA,0.2%庆大霉素)将质控微球和检测微球配制成时间分辨荧光微球混合液,质控微球终浓度为0.1mg/mL-0.3mg/mL,检测微球终浓度为0.8mg/mL-1.2mg/mL。

[0056] (2) 检测线(T线)溶液的配制

[0057] 用0.01M PB溶液将三氯杀螨醇抗原复合物稀释成0.4mg/mL-0.6mg/mL。

[0058] (3) 质控线(C线)溶液的配制

[0059] 用0.01M PB溶液将链霉亲和素稀释成0.4mg/mL-0.6mg/mL。

[0060] (4) 试纸条的制备

[0061] 反应膜位于中间,样品吸收垫与吸水纸分别搭接于反应膜左右两端,粘贴在带有背胶的塑料底板上。C,T线喷膜液量为0.6μL/cm-1.2μL/cm,微球溶液喷膜量为2μL/cm-6μL/cm。将喷好试剂的三氯杀螨醇大卡在恒温烘箱中37℃烘干12小时。将烘干的三氯杀螨醇大卡切割成3mm-5mm宽度的纸条,即得到三氯杀螨醇时间分辨荧光试纸条。

[0062] 6、胶体金免疫层析试纸条的制备

[0063] (1) 金标抗体溶液的制备

[0064] 用0.1mol/L K₂CO₃水溶液调节胶体金溶液的pH至8.2,然后取10mL加入50mL烧杯中,电磁搅拌器250r/min搅拌,加入单克隆抗体溶液,再加入4mL 5g/100mL BSA水溶液,持续搅拌12min,得到金标抗体溶液。

[0065] (2) 试纸条的制备

[0066] 试纸条由样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫组成;沿试纸条的轴向,样品吸收垫、胶体金垫、反应膜和吸水垫依次按顺序连接,样品吸收垫的末端与胶体金垫的始端相连,胶体金垫的末端与反应膜的始端相连,反应膜的末端与吸水垫的始端相连;胶体金垫上

包被有胶体金标记的单克隆抗体;反应膜上有检测区和质控区,检测区(T线)和质控区(C线)均为与试纸条轴向垂直的条带状;检测区位于靠近胶体金垫末端的一侧;质控区位于远离胶体金垫末端的一侧;检测区包被三氯杀螨醇-OVA,质控区包被羊抗鼠二抗。样品孔位于样本吸收垫上远离胶体金垫末端的一端,即得到三氯杀螨醇胶体金免疫层析试纸条。

[0067] 实施例2 样品中三氯杀螨醇残留的检测

[0068] 1、样品处理

[0069] (1) 白菜/茶叶前处理方法

[0070] 用均质器均质样品;称取 (1.00 ± 0.05) g均质后的样品到10mL聚苯乙烯离心管中,加入2mL 0.1mol/L硫酸,再加入5mL甲醇,用涡旋仪涡动5min;室温下1000r/min离心5min;取上清液200 μ L,加入到800 μ L 0.01M PBS中,充分混匀,取50 μ L用于分析。

[0071] (2) 大米前处理方法

[0072] 用均质器均质样品;称取 (2.00 ± 0.05) g均质后的样品到10mL聚苯乙烯离心管中,分别加入4mL 10%氯化钠,2mL甲醇,用涡旋仪振动5min;室温下4000r/min离心5min;取上清液100 μ L,加入到900 μ L 0.01M PBS中,充分混匀,取其50 μ L用于分析。

[0073] (3) 植物油前处理方法

[0074] 称取50g(精确到0.01g)磨碎的试样于100mL容量瓶中,加入5g氯化钠,用提取液定容至刻度,混匀,转移至均质杯中,高速搅拌提取2min。定量滤纸过滤,移取10.0mL滤液于50mL容量瓶中,加水定容至刻度,混匀,用玻璃纤维滤纸过滤至滤液澄清,收集滤液于干净的容器中。

[0075] (4) 鱼肉/虾肉前处理方法

[0076] 称取5g试料于50mL离心管中,加入乙腈15mL,振荡5min,加入氯化钠1.5g,振荡2min,4000r/min离心5min,取上清液于另一离心管中,残渣中加入乙腈15mL,重复提取一次,合并两次上清液,加乙腈正己烷溶液10mL,振荡混合2min,4000r/min离心5min,除去上层正己烷液,乙腈液中加入正己烷10mL,重复提取一次,弃上层正己烷液。取乙腈层液至鸡心瓶中,于45℃水浴旋转蒸发至干,用甲醇2mL溶解残余物,加入水4mL,混匀,备用。

[0077] 2、用时间分辨荧光试纸条进行检测

[0078] (1) 将试纸条和提取液恢复至室温。用移液器准确吸取60 μ L待检样品,(取样时注意不要吸入气泡)垂直缓慢滴加于加样孔(S)中,加样后开始计时,加样后8分钟读取结果。将试剂卡插入免疫层析检测仪的承载器中,按检测键,仪器将自动对测试卡进行扫描。从免疫层析检测仪的显示屏幕上读取检测结果。

[0079] (2) 分析检测结果

[0080] 检测限范围:10ng/ml-2000ng/ml。

[0081] 3、用胶体金免疫层析试纸条进行检测

[0082] (1) 取出试纸条,开封后平放于桌面,吸取待测样本溶液逐滴加入70 μ L于样品孔中;5-10min判断结果,15min后的判断结果无效。

[0083] (2) 分析检测结果

[0084] 检测限范围:1 μ g/kg。

[0085] 实施例3 样品检测实例

[0086] 1、时间分辨荧光试纸条检测样品

[0087] (1) 检测限试验

[0088] 取空白茶叶/白菜/大米/植物油/鱼肉/虾肉等样品,分别添加三氯杀螨醇至终浓度为5ng/ml、10ng/ml、100ng/ml、600ng/ml、1200ng/ml、1800ng/ml、2000ng/ml、2200ng/ml,取试纸条进行检测,每个样品重复测定三次。

[0089] 用试纸条检测茶叶/白菜/大米/植物油/鱼肉/虾肉等样品时,根据试纸条显示结果确定检测限范围,表明本试纸条检测限范围:10ng/ml-2000ng/ml。

[0090] (2) 样本精密度和准确度试验

[0091] 以回收率作为准确度评价指标,重复测定某一浓度样品的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%) = 实际测定值/理论值 × 100%,其中理论值为样品的添加浓度;相对标准偏差RSD% = SD/X × 100%,其中SD为标准偏差,X为测定数据的平均值。

[0092] 按10ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、1500ng/ml、2000ng/ml五个浓度三氯杀螨醇分别对茶叶/白菜/大米/植物油/鱼肉/虾肉等样品进行添加回收测定,每个样品做4个平行,用三批不同试剂进行测定,计算样品的平均回收率及精密度结果见下表。

[0093] 表1 样品精密度及准确度试验

[0094]

三氯杀螨醇	添加浓度(ng/ml)	回收率(n=4)%	批内RSD(n=4)%	批间RSD(n=3)%
茶叶	10	96.9	8.5	11.6
	500	91.9	7.3	13.3
	1000	100.7	7.6	9.7
	1500	106.0	7.0	13.6
	2000	105.8	7.6	13.5
白菜	10	107.1	6.2	9.8
	500	90.4	7.6	11.8
	1000	97.3	6.5	10.9
	1500	105.4	7.9	11.4
	2000	92.6	8.3	10.0
大米	10	94.4	9.0	13.5
	500	90.9	7.0	12.7
	1000	90.7	6.9	13.1
	1500	93.0	7.9	12.9
	2000	94.0	7.5	12.7

[0095]

植物油	10	90.4	7.5	10.7
	500	95.1	9.1	9.8
	1000	96.2	7.8	11.4
	1500	99.9	7.6	12.8
	2000	96.4	9.2	10.5
鱼肉	10	96.7	7.0	9.6
	500	96.4	9.0	10.3
	1000	106.2	7.7	9.8
	1500	98.3	7.7	13.7
	2000	97.6	9.1	10.2
虾肉	10	95.5	8.2	13.5
	500	107.4	8.3	12.1
	1000	104.4	7.5	13.8
	1500	107.6	8.5	10.3
	2000	94.6	7.7	11.8

[0096] 以10ng/ml、500ng/ml、1000ng/ml、1500ng/ml、2000ng/ml五个浓度的三氯杀螨醇分别对茶叶/白菜/大米/植物油/鱼肉/虾肉等样品进行添加,平均回收率在90.4%~107.6%之间;批内、批间相对标准偏差均小于15%。

[0097] (3) 交叉反应率试验

[0098] 选择与三氯杀螨醇具有类似结构和类似功能的药物进行时间分辨荧光试纸条测定,通过各种药物的标准曲线分别得到其50%抑制浓度,用下式计算本试纸条对其它药物的交叉反应率。

$$[0099] \quad \text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{引起 50\%抑制的三氯杀螨醇浓度}}{\text{引起 50\%抑制的三氯杀螨醇类似物浓度}} \times 100\%$$

[0100] 表2 交叉反应率试验

[0101]

药物名称	交叉反应率(%)
三氯杀螨醇	100

[0102]

三氟羧草醚	<1
三环唑	<1
三氯杀螨砒	<1
三乙磷酸铝	<1

[0103] 1、胶体金免疫层析试纸条检测样品

[0104] (1) 假阳性率和假阴性率

[0105] 取经确证的阴性样品(含三氯杀螨醇 $<1\mu\text{g}/\text{kg}$) 100份,取经确证的阳性样品(含三氯杀螨醇 $\geq 1\mu\text{g}/\text{kg}$) 100份。将样品分别用试纸条进行检测,计算假阳性率和假阳性率。

[0106] 结果:在100份阴性样品样品中,试纸条检测出阳性样品共0份,假阳性率为0%。在100份阳性样品样品测定中,试纸条检测出阴性样品0份,假阴性率为0%。

[0107] (2) 试纸条保存期

[0108] 稳定性试验结果表明,本试纸条在2-8℃或室温条件下阴凉干燥处可保存1年。

[0109] 3、特异性试验

[0110] 用三氯杀螨醇试纸条检测 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 的三氟羧草醚、三环唑、三氯杀螨砒、三乙磷酸铝等药物。结果显示,试纸条质控线和检测线均显色,呈阴性。说明本试纸条对 $500\mu\text{g}/\text{kg}$ 的三氟羧草醚、三环唑、三氯杀螨砒、三乙磷酸铝等药物无交叉反应。

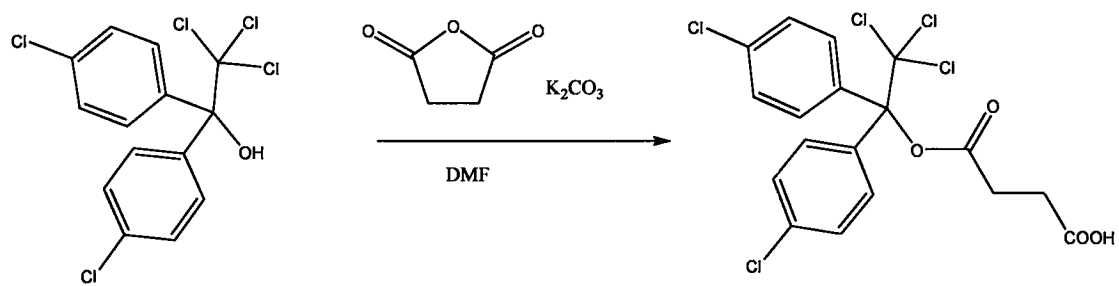


图1

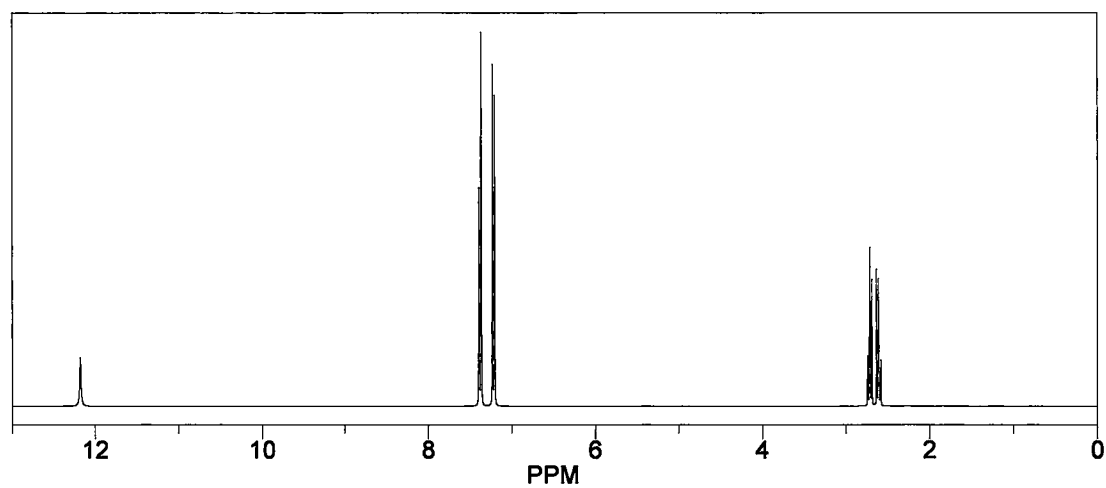


图2

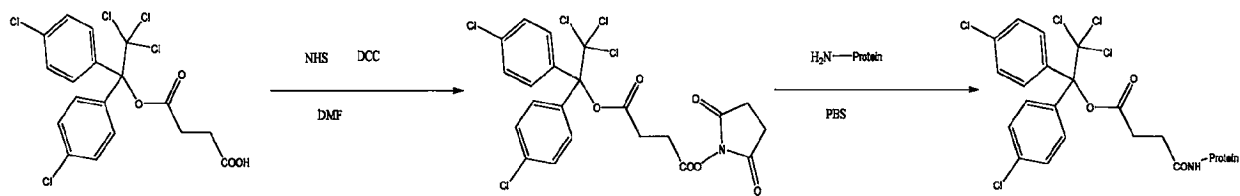


图3

专利名称(译)	一种三氯杀螨醇半抗原制备方法及其应用		
公开(公告)号	CN107907687A	公开(公告)日	2018-04-13
申请号	CN201711246772.3	申请日	2017-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	吴鹏		
申请(专利权)人(译)	吴鹏		
当前申请(专利权)人(译)	吴鹏		
[标]发明人	吴鹏		
发明人	吴鹏		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测三氯杀螨醇的半抗原制备方法，以及它在时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条中的应用。本发明的时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条具有灵敏度高、准确度高、精密度高、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，能同时快速检测大批量样品，可实现现场高通量快速检测。本发明提供的时间分辨荧光试纸条和胶体金免疫层析试纸条，适用于测定茶叶、白菜、大米、植物油、鱼肉、虾肉等样品中三氯杀螨醇的残留量。

