



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771142 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611079691.4

(22)申请日 2016.11.30

(71)申请人 百奥森(江苏)食品安全科技有限公司

地址 214070 江苏省无锡市滴翠路100号创意园三期A幢303

(72)发明人 周合 张根义 张进 周朱晨
杨敏 胡彬 吴念绮

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种氧氟沙星检测方法及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种氧氟沙星检测方法及试剂盒,包含以下步骤,A、样品的处理:将待测样品进行前处理,加入提取剂后进行匀浆,匀浆之后进行超声提取,之后进行第一次离心分离得到上清液,用氮气将上清液吹干后得到的残余物用初始流动相溶解;B、氧氟沙星的测定:将步骤A得到的样品通过检测试剂盒进行测定。本发明的氧氟沙星检测方法及检测试剂盒具有灵敏度高、简便快速、准确的特点,与传统的比色ELISA法比较,灵敏度可以提高一个数量级。能够在动物性食品(如水产品、动物组织、蜂蜜)中的氧氟沙星药物残留检测中发挥重要作用。

1. 一种氧氟沙星检测方法, 其特征在于, 包含以下步骤, A、样品的处理: 将待测样品进行前处理, 加入提取剂后进行匀浆, 匀浆之后进行超声提取, 之后进行第一次离心分离得到上清液, 用氮气将上清液吹干后得到的残余物用初始流动相溶解, 混匀, 之后进行第二次离心分离得到上清液, 取上清液进行微孔滤膜过滤得到的滤液用于UPLC-MS/MS测定; B、氧氟沙星的测定: 将步骤A得到的样品通过检测试剂盒进行测定。

2. 一种氧氟沙星检测试剂盒, 其特征在于, 所述检测试剂盒包括盒体以及设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂, 所述酶标板的各孔包被有以氧氟沙星衍生物与卵清蛋白偶联制成的包被抗原; 所述试剂包括: 喹诺酮类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、喹诺酮类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液。

3. 根据权利要求2所述的一种氧氟沙星检测方法及其试剂盒, 其特征在于, 所述酶标板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光酶标板。

4. 根据权利要求3所述的一种氧氟沙星检测方法及其试剂盒, 其特征在于, 所述包被抗原浓度为20 μ g/mL。

5. 根据权利要求2所述的一种氧氟沙星检测方法及其试剂盒, 其特征在于, 所述喹诺酮类的单克隆抗体是由氧氟沙星衍生物与牛血清蛋白偶合制成的偶联物作为免疫原免疫Balb/c小鼠制备获得。

6. 根据权利要求2所述的一种氧氟沙星检测方法及其试剂盒, 其特征在于, 所述喹诺酮类系列标准溶液浓度分别为: 0ng/mL, 0.1ng/mL, 0.3ng/mL, 0.9ng/mL, 2.7ng/mL和8.1ng/mL。

7. 根据权利要求2所述的一种氧氟沙星检测方法及其试剂盒, 其特征在于, 所述浓缩磷酸盐缓冲液是每升含NaH₂PO₄ • 2H₂O 5.74g、Na₂HPO₄ • 12H₂O 32.6g的水溶液。

8. 一种氧氟沙星检测方法及其试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数0.05%吐温-20的pH=7.4, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液。

9. 一种氧氟沙星检测方法及其试剂盒的制备方法, 其特征在于, 所述化学发光液A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液; B液为100mL溶液含柠檬酸2.1g, 无水Na₂HPO₄ 42.82g, 0.75%的过氧化氢脲0.64mL的溶液, 所述百分比为质量百分比。

一种氧氟沙星检测方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测技术,具体是一种氧氟沙星检测方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 氧氟沙星是一种广谱高效抗菌药物,在临床上的应用相当广泛。氧氟沙星抗生素对大多数革兰氏阳性菌、大肠杆菌、绿脓杆菌有非常好的抑制活性;对葡萄球菌、衣原体、分支杆菌、支原体和尿属支原体有中等强度的抑制活性;对链球菌(尤其是D族链球菌)、肠球菌及厌氧菌有很小或无抑制活性。随着该类药物的广泛应用及深入研究,有关氧氟沙星药物的不良反应和耐药性报道越来越多,其潜在的严重不良反应逐渐受到人们的重视,作为兽药和饲料添加剂而大量的用于动物,因而其残留在动物可食性产品中的可能性相对很大。这些残留物可直接对人造成危害外,更严重的是低浓度的残留药物可能对氧氟沙星药物敏感的致病菌产生耐药性,从而间接危害人类健康。为保护人类健康,控制氧氟沙星抗生素的残留,美国FDA规定沙星类在食物中的残留量小于100 μ g/kg,我国规定的氟诺酮在牛奶中的残留量应小于100 μ g/kg。因此,需要寻求简便、快速、准确检测乳与乳制品中氧氟沙星抗生素残留量的检测方法,才能满足日趋严格的残留限量要求,从而保证人们饮用牛奶的卫生和安全。

[0003] 检测氧氟沙星残留量的方法有微生物法、高效液相色谱法、液相色谱-质谱法、免疫分析法、高效毛细管区带电泳法和化学发光分析法等。目前,牛奶中氧氟沙星抗生素常用的检测方法主要是高效液相色谱法。但采用此法,检测时间较长,而且高效液相色谱法检测氧氟沙星抗生素的检出限较高。

[0004] 目前,对氧氟沙星的检测主要在食品领域以及环境领域,用于抗生素检测的方法主要有高效液相色谱技术、微生物法、免疫分析法,这些方法需要昂贵的检测仪器或专业的检测人员,不适合家庭使用。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种氧氟沙星检测方法及试剂盒,以解决上述背景技术中提出的问题。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种氧氟沙星检测方法,包含以下步骤,A、样品的处理:将待测样品进行前处理,加入提取剂后进行匀浆,匀浆之后进行超声提取,之后进行第一次离心分离得到上清液,用氮气将上清液吹干后得到的残余物用初始流动相溶解,混匀,之后进行第二次离心分离得到上清液,取上清液进行微孔滤膜过滤得到的滤液用于UPLC-MS/MS测定;B、氧氟沙星的测定:将步骤A得到的样品通过检测试剂盒进行测定。

[0007] 作为本发明进一步的方案:所述检测试剂盒包括盒体以及设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂,所述酶标板的各孔包被有以氧氟沙星衍生物与卵清蛋白偶联制成的包被抗原;所述试剂包括:喹诺酮类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、喹诺酮

类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液。

[0008] 作为本发明进一步的方案:所述酶标板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光酶标板。

[0009] 作为本发明再进一步的方案:所述包被抗原浓度为20 μ g/mL。

[0010] 作为本发明再进一步的方案:所述喹诺酮类的单克隆抗体是由氧氟沙星衍生物与牛血清蛋白偶联合成的偶联物作为免疫原免疫Balb/c小鼠制备获得。

[0011] 作为本发明再进一步的方案:所述喹诺酮类系列标准溶液浓度分别为:0ng/mL, 0.1ng/mL, 0.3ng/mL, 0.9ng/mL, 2.7ng/mL和8.1ng/mL。

[0012] 作为本发明再进一步的方案:所述浓缩磷酸盐缓冲液是每升含NaH₂PO₄ • 2H₂O 5.74g、Na₂HPO₄ • 12H₂O 32.6g的水溶液。

[0013] 作为本发明再进一步的方案:所述浓缩洗涤溶液是含有体积分数0.05%吐温-20的pH=7.4, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液。

[0014] 作为本发明再进一步的方案:所述化学发光液A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;B液为100mL溶液含柠檬酸2.1g, 无水Na₂HPO₄ 42.82g, 0.75%的过氧化氢脲0.64mL的溶液, 所述百分比为质量百分比。

[0015] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:本发明的氧氟沙星检测方法及检测试剂盒具有灵敏度高、简便快速、准确的特点,与传统的比色ELISA法比较,灵敏度可以提高一个数量级。能够在动物性食品(如水产品、动物组织、蜂蜜)中的氧氟沙星药物残留检测中发挥重要作用。

具体实施方式

[0016] 下面结合具体实施方式对本专利的技术方案作进一步详细地说明。

[0017] 一种氧氟沙星检测方法,包含以下步骤,A、样品的处理:将待测样品进行前处理,加入提取剂后进行匀浆,匀浆之后进行超声提取,之后进行第一次离心分离得到上清液,用氮气将上清液吹干后得到的残余物用初始流动相溶解,混匀,之后进行第二次离心分离得到上清液,取上清液进行微孔滤膜过滤得到的滤液用于UPLC-MS/MS测定;B、氧氟沙星的测定:将步骤A得到的样品通过检测试剂盒进行测定。

[0018] 所述检测试剂盒包括盒体以及设在盒体内的酶标板和设在盒体内的试剂,所述酶标板的各孔包被有以氧氟沙星衍生物与卵清蛋白偶联制成的包被抗原;所述试剂包括:喹诺酮类单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗体、喹诺酮类系列标准溶液、浓缩磷酸盐缓冲液、浓缩洗涤液、化学发光液。酶标板为乳白色不透明聚苯乙烯96孔化学发光酶标板。包被抗原浓度为20 μ g/mL。喹诺酮类的单克隆抗体是由氧氟沙星衍生物与牛血清蛋白偶联合成的偶联物作为免疫原免疫Balb/c小鼠制备获得。喹诺酮类系列标准溶液浓度分别为:0ng/mL, 0.1ng/mL, 0.3ng/mL, 0.9ng/mL, 2.7ng/mL和8.1ng/mL。浓缩磷酸盐缓冲液是每升含NaH₂PO₄ • 2H₂O 5.74g、Na₂HPO₄ • 12H₂O 32.6g的水溶液。浓缩洗涤溶液是含有体积分数0.05%吐温-20的pH=7.4, 0.1mol/L磷酸盐缓冲液。化学发光液A液为鲁米诺含量为0.01M、对甲苯酚含量为0.001M pH=8.8的三(羟甲基)氨基甲烷溶液;B液为100mL溶液含柠檬酸2.1g, 无水Na₂HPO₄ 42.82g, 0.75%的过氧化氢脲0.64mL的溶液, 所述百分比为质量百分比。

[0019] 本发明的工作原理是:氧氟沙星衍生物合成:A,将氧氟沙星1mmol,溶于15mL三氯

甲烷中,加入DCC2mmol,DMAP催化量,氨基丙酸叔丁酯1.5mmol,室温搅拌5h,TLC监测原料消失,过滤,将液相水洗,无水Na₂SO₄干燥,柱层析纯化(洗脱剂,乙酸乙酯/石油醚,1/5)。B,将上述产物溶于冰醋酸中,室温搅拌2h,TLC监测原料消失,减压脱溶剂,将得到的粘稠物溶于1mol/LNaOH溶液,调节pH3~5,乙酸乙酯萃取,干燥,柱层析纯化(洗脱剂,乙酸乙酯/石油醚,1/1),得喹诺酮类半抗原。(2)免疫原的合成:A,A液制备:取15mg氧氟沙星半抗原,溶解于1mLDMF中,取15EDC用0.2ml水充分溶解后于加入溶解有半抗原的DMF中,室温下搅拌24h,即可得到反应液A。B,BSA偶联:称取BSA40mg,使之充分溶解在3mLPBS(PH7.2)中,将反应液A逐滴缓慢滴加到蛋白溶液中,并于室温下搅拌24h,C,透析:用0.01mol/1PBS4度透析3d每天换3次透析液,以除去未反应的小分子物质。分装,于-20℃保存备用。称取半抗原20mg和OVA30mg,按上述步骤反应,包被抗原,供包被用。

[0020] 样品前处理:用均质器均质组织样本,称取 2.0 ± 0.05 g均质物至50mL聚苯乙烯离心管中,一加入0.6mL0.1M盐酸溶液,再加入5.4mL无水乙醇中混合均匀;振荡3min,3000g以上,室温(20~25℃)离心10min;取上层有机相1mL至10mL干净玻璃试管中,于50~60℃水浴氮气流下吹干,加入1mL正己烷,用涡旋仪涡动30s,再加入1mL磷酸盐缓冲液涡动20s,3000g以上,室温(20~25℃)离心5min,一除去上层正己烷,取下层50μL用于分析。

[0021] 检测步骤:向酶标板微孔中加入氧氟沙星系列标准浓度溶液或样品溶液50μL,然后每孔加入酶标羊抗鼠抗体溶液50μL,再加入氧氟沙星抗体溶液50μL,室温(20~25℃)恒温孵育15min,倾出孔中液体,每孔加入洗涤溶液250μL,洗涤5次,拍干,每孔加入发光溶液100μL,反应3min,用化学发光免疫分析仪测定每孔的发光强度。

[0022] 结果分析,所获得的标准品和样品发光强度值的平均值除以第一个标准(0标准)的发光强度值再乘以100,以抑制率为纵坐标,氧氟沙星浓度的对数为横坐标作标准曲线,每一个样品的浓度可以从标准曲线上读出,相对发光强度(%) = RLU/RLU_0 ,RLU是标准品或者样品溶液测定的发光强度值,RLU₀是空白(浓度为0的标准溶液)的发光强度值。

[0023] 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。不应将权利要求中的任何附图标记视为限制所涉及的权利要求。

[0024] 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种氧氟沙星检测方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN106771142A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611079691.4	申请日	2016-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	百奥森江苏食品安全科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	百奥森(江苏)食品安全科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	百奥森(江苏)食品安全科技有限公司		
[标]发明人	周合 张根义 张进 周朱晨 杨敏 胡彬 吴念绮		
发明人	周合 张根义 张进 周朱晨 杨敏 胡彬 吴念绮		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/577 G01N33/535 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/543 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种氧氟沙星检测方法及试剂盒，包含以下步骤，A、样品的处理：将待测样品进行前处理，加入提取剂后进行匀浆，匀浆之后进行超声提取，之后进行第一次离心分离得到上清液，用氮气将上清液吹干后得到的残余物用初始流动相溶解；B、氧氟沙星的测定：将步骤A得到的样品通过检测试剂盒进行测定。本发明的氧氟沙星检测方法及检测试剂盒具有灵敏度高、简便快速、准确的特点，与传统的比色ELISA法比较，灵敏度可以提高一个数量级。能够在动物性食品(如水产品、动物组织、蜂蜜)中的氧氟沙星药物残留检测中发挥重要作用。