



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105572349 A

(43) 申请公布日 2016. 05. 11

(21) 申请号 201610023795. 7

(22) 申请日 2016. 01. 14

(71) 申请人 江苏大学

地址 212013 江苏省镇江市京口区学府路
301 号

(72) 发明人 张灿 崔涵雨 韩玉凤 蔡健荣

(51) Int. Cl.

G01N 33/543(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 21/78(2006. 01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的
制备及其应用

(57) 摘要

本发明属于分子印迹技术,公开了农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的制备及其应用。本发明采用 Whatman NO. 5 滤纸为固相载体,在其表面进行硅烷化引入双键。将西维因、甲基丙烯酸、乙二醇二甲基丙烯酸酯、偶氮二异丁腈溶于氯仿,加入预先处理过的载体,水浴引发,在滤纸纤维载体上聚合形成西维因的分子印迹层。模拟生物抗体与抗原和酶标抗原竞争性免疫结合反应原理,利用西维因酶标抗原作为反应标记物与西维因进行竞争结合西维因分子印迹聚合物的印迹孔穴位点,加底物显示后通过判断纸片上颜色的变化从而定性检测样本中西维因含量。本发明较生物抗体快速检测试纸条的制作成本低廉,检测方法简便快速,检测结果明显直观,适合现场快速鉴定。



1. 农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的制备方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

(1) 固相载体的预处理:

Whatman NO.5 滤纸于真空干燥箱预干燥以除去水分, 浸泡于含 γ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷(γ -MAPS)乙醇溶液中, 干燥箱固定后切割成一定直径的圆形纸片;

(2) 西维因分子印迹仿生试纸条的制备:

将模板分子西维因、功能单体 MAA、交联剂 EGDMA、引发剂溶于氯仿, 加入经步骤(1)预先处理过的纸片, 脱气后, 水浴中进行热聚合反应, 得到西维因分子印迹仿生试纸条;

(3) 模板分子的去除:

用甲醇-醋酸混合溶液索氏提取模板分子, 反复操作, 直到检测不出模板分子为止, 真空干燥至恒重。

2. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(1)中, 所述乙醇溶液中 γ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷的质量百分浓度为 0.5-0.6%, 所述乙醇溶液的浓度为 80%。

3. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(2)中, 所述模板分子西维因、功能单体、交联剂物质的量之比为 1:4:4; 所述引发剂的用量为功能单体和交联剂总质量的 2~2.5%。

4. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(2)中, 所述热聚合反应的温度为 55-60°C, 时间为 10-20h。

5. 根据权利要求1所述的制备方法, 其特征在于, 步骤(3)中, 所述甲醇-醋酸混合溶液中, 甲醇和醋酸的体积比为 9:1。

6. 根据权利要求1-5任一项制备方法所制备的农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条。

7. 利用权利要求6所述的农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条用于检测西维因的检测方法, 其特征在于, 将待测样品置于甲醇中萃取后, 再加入等体积的西维因酶标抗原稀释液; 将所述检测试纸条置于溶液中反应 1-50min。

8. 根据权利要求7所述的检测方法, 其特征在于, 所述西维因酶标抗原稀释比例为 1:100-1:32000。

农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的制备及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子印迹技术,特别涉及基于滤纸为固相载体制备农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条及其应用。

背景技术

[0002] 西维因,又称甲萘威、胺甲萘,是世界上第一个商品化且大量使用的高效低毒氨基甲酸酯类杀虫剂,广泛用于防治麦、稻、棉、蔬菜、果树等作物的害虫、畜禽外寄生虫等,与有机磷农药混合使用对多种农业害虫具有明显的增效作用。西维因含有一个N-甲基基团,为白色晶体,难溶于水,易溶于有机溶剂如丙酮、二氯甲烷等,在碱性和高温条件下很易被水解。西维因具有中等毒性,可以经过皮肤、消化系统、呼吸系统进入生物体,进入生物体的西维因通过抑制胆碱酯酶的活性,使乙酰胆碱在组织中蓄积,干扰生物体正常的分泌系统,因此具有致畸、致癌、致突变的作用。目前,西维因残留的检测方法主要包括气相色谱-质谱联用法、固相萃取法、高效液相色谱法、毛细管电泳法等。仪器分析检测技术对样品的前处理以及检测条件要求较高,耗时较长,对操作人员要求较高。食品流通从市场到消费者速度快,范围广,为及时确保消费者的食品安全,研究开发快速有效的检测方法势在必行。

[0003] 分子印迹技术主要是将模板分子与功能单体通过共价键或非共价键作用,加入交联剂,在引发剂及溶剂的作用下通过热引发或光引发实现聚合反应。洗去模板分子后的分子印迹聚合物中留有空间大小和形状以及化学作用等方面都与模板分子相匹配的孔穴,可以特异性与模板分子结合。由于分子印迹具有构像预定性、特异识别性和广泛的适用性,在许多领域得到深入的研究和开发。近些年,该技术已被广泛用于色谱分离、生物传感器、抗体和受体模拟等诸多领域,成为一个化学和生物学交叉的新兴领域。

[0004] 以生物抗体为识别元件的免疫分析法中尤以酶联免疫法(ELISA)研究最多,广泛用于各种农兽药小分子危害残留物的定性和定量检测。因ELISA具有快速、简便等优点,目前市场上已有商业化使用的酶联免疫试剂盒及试纸条。试纸条与试剂盒相比前者以定性为主,后者以定量为主,但前者更易携带、更快检测,在现场检测时能快速判定是否含有某种物质,含量是否超过标准。目前免疫分析法所面临的主要问题是生物抗体的制备(特别是小分子化合物的生物抗体),生物抗体的制备周期长、操作繁复,且制得的抗体特异性难以保障,特别是农药等小分子化合物,制备质量稳定的生物抗体具有一定难度。另外生物抗体对外界环境较为敏感,易失去活性,易造成假阳性结果使其应用受限,研究人员不断对其进行改进,目前有研究报道将分子印迹作为人工抗体替代生物抗体应用于ELISA,称之为仿生酶联免疫(BELISA)。分子印迹聚合物表现出对目标物的特异性吸附与天然抗体对抗原的高度亲和性和专一性相类似,因此将印迹聚合物替代生物抗体用于小分子物质的免疫分析是完全可实现的。

发明内容

[0005] 本发明的目的是填补当前尚未有的西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的空白。

提供一种以滤纸为固相载体,制备过程简单,制备产品理化性能好、检测灵敏度较高的快速检测试纸条的方法。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0007] 采用Whatman NO.5滤纸作为固相载体,通过在其纸纤维表面硅烷化后引入功能双键。将西维因、甲基丙烯酸(MAA)、乙二醇二甲基丙烯酸酯(EGDMA)、偶氮二异丁腈(AIBN)溶于氯仿,加入预先硅烷化的滤纸载体,水浴热引发,在滤纸纤维素表面制备西维因分子印迹聚合物。模拟生物抗体与抗原和酶标抗原竞争性免疫结合反应机理,利用西维因酶标抗原作为反应标记物与西维因竞争结合滤纸上西维因分子印迹聚合物的印迹孔穴位点(仿生抗体),底物显色后通过判断检测纸片上颜色变化从而定性检测样本中西维因含量。

[0008] 农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的制备方法,包括如下步骤:

[0009] (1)固相载体的预处理:

[0010] Whatman NO.5滤纸于真空干燥箱预干燥以除去水分,浸泡于含 γ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷 γ -MAPS的乙醇溶液中,干燥箱固定后切割成一定直径的圆形纸片;

[0011] (2)西维因分子印迹仿生试纸条的制备:

[0012] 将模板分子西维因、功能单体MAA、交联剂EGDMA、引发剂溶于氯仿,加入经步骤(1)预先处理过的纸片,脱气后,水浴中进行热聚合反应,得到西维因分子印迹仿生试纸条;

[0013] (3)模板分子的去除:

[0014] 用甲醇-醋酸混合溶液索氏提取模板分子,反复操作,直到检测不出模板分子为止,真空干燥至恒重。

[0015] 步骤(1)中,所述乙醇溶液中 γ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷的质量百分浓度为0.5-0.6%,所述乙醇溶液的浓度为80%。

[0016] 步骤(2)中,所述模板分子西维因、功能单体、交联剂物质的量之比为1:4:4;所述引发剂的用量为功能单体和交联剂总质量的2~2.5%。

[0017] 步骤(2)中,所述热聚合反应的温度为55-60℃,时间为10-20h。

[0018] 步骤(3)中,所述甲醇-醋酸混合溶液中,甲醇和醋酸的体积比为9:1。

[0019] 本发明制备方法所制备的农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条。

[0020] 本发明所述的农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条用于快速检测西维因,将待测样品置于甲醇中萃取后,再加入等体积的西维因酶标抗原稀释液;将所述检测试纸条置于溶液中反应1-50min。

[0021] 所述西维因酶标抗原稀释比例为:1:100-1:32000。

[0022] 同时制备不加模板分子的非印迹仿生检测试纸条。

[0023] 本发明的有益效果是:

[0024] (1)检测方法简便快速,检测结果明显直观,适用于现场快速筛选鉴定。

[0025] (2)制备过程简单,成本低廉。

[0026] (3)制备过程产生的污染较小。

附图说明

[0027] 图1为西维因分子印迹仿生试纸条的制备流程图。

[0028] 图2为西维因分子印迹仿生试纸条的检测示意图。

[0029] 图3酶标抗原优化检测示意图。

[0030] 图4反应时间优化示意图。

[0031] 图5分子印迹仿生试纸条检测不同浓度的西维因结果示意图。

具体实施方式

[0032] 本发明是将分子印迹技术与免疫检测技术相结合,在固相载体滤纸上合成对西维因具有仿生识别的人工抗体替代传统生物抗体制备仿生检测试纸条,以下结合具体实施例来说明本发明。

[0033] 图1为西维因分子印迹仿生试纸条的制备流程图。

[0034] 图2为西维因分子印迹仿生试纸条的检测示意图。

[0035] 图3为酶标抗原优化检测示意图,从图3中可以看出,随着酶标抗原稀释度的增加颜色逐渐变浅。

[0036] 图4反应时间优化示意图,从图4中可以看出,随着反应时间的增加颜色逐渐变深。

[0037] 图5分子印迹仿生试纸条检测不同浓度的西维因结果示意图(从A至C,随着西维因浓度逐渐增加试纸颜色逐渐变浅)。

[0038] 实施例1

[0039] 农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的制备:

[0040] A.固相载体的预处理:Whatman NO.5滤纸于真空干燥箱预干燥以除去水分,浸入含0.5-0.6% γ -甲基丙烯酸氧丙基三甲氧基硅烷(γ -MAPS)的80%乙醇溶液,干燥箱固定后切割成一定直径的圆形纸片。

[0041] B.西维因分子印迹仿生试纸条的制备:摩尔比为1:4:4的模板分子(西维因)、功能单体(MAA)、交联剂(EGDMA),引发剂(含量为功能单体和交联剂总质量的2~2.5%)溶于氯仿,加入预先处理过的纸片,脱气后,55-60℃水浴中热聚合10-20h,得到西维因分子印迹仿生试纸条。

[0042] C.模板分子的去除:用甲醇-醋酸(9:1,V/V)溶液索氏提取模板分子,反复操作,直到检测不出模板分子为止,真空干燥至恒重。

[0043] 选择大米为检测样品,通过添加不同浓度的西维因,用制备的西维因分子印迹仿生试纸条检测在实际样品中的效果。将0.5g待测样品置于1mL甲醇中,再加入等体积的西维因酶标抗原稀释液(酶标抗原稀释度为1:100);将所述检测试纸条置于溶液中反应1-50min。

[0044] 实施例1中西维因分子印迹仿生试纸条应用实际样品的检测步骤如下:

[0045] 样品添加回收实验1:称取三份0.5g大米空白样品,加入1mL甲醇,添加0.25、0.5、1mg kg⁻¹的西维因,振荡后分别与西维因分子印迹仿生试纸条反应,同时加入体积比1:1的酶标抗原稀释液(酶标抗原稀释度为1:100-1:32000),反应1-50min。洗涤后加入底物显色并进行读数分析。

[0046] 使用实施例1的试纸条操作简便,检测结果直观易分辨。西维因分子印迹仿生试纸条对西维因不同浓度添加量与无添加的空白大米样品相比颜色变化明显,且随着添加量的增加检测试纸颜色变浅。本实施例中同时采用了以传统西维因生物抗体为识别元件的ELISA方法验证了添加样品回收率的测定,如表1所示,检测结果具有较好的一致性。

[0047] 表1实施例1中实际样品的添加回收实验

[0048]

样品	添加浓度 (mg kg^{-1})	仿 生 试 纸 条 检 测 (mean $\pm \text{SD}; n=3, \text{mg kg}^{-1}$)	生 物 抗 体 ELISA 检 测 (mean $\pm \text{SD}; n=3, \text{mg kg}^{-1}$)
大米	0.25	0.205 \pm 0.037	0.230 \pm 0.044
大米	0.5	0.462 \pm 0.019	0.458 \pm 0.076
大米	1	0.797 \pm 0.094	1.090 \pm 0.147

[0049] 实施例2

[0050] 选择青菜为检测样品,通过添加不同浓度的西维因,用制备的西维因分子印迹仿生试纸条检测在实际样品中的效果。

[0051] 样品添加回收实验2:称取三份0.5g青菜空白样品,加入1mL甲醇,添加0.25、0.5、1 mg kg^{-1} 的西维因,振荡后分别与西维因分子印迹仿生试纸条反应,同时加入体积比1:1的酶标抗原稀释液(酶标抗原稀释度为1:100-1:32000),反应1-50min。洗涤后加入底物显色并进行读数分析。

[0052] 使用实施例2的试纸条操作简便,检测结果直观易分辨。西维因分子印迹仿生试纸条对西维因不同浓度添加量与无添加的青菜空白样品相比颜色变化明显,且随着添加量的增加颜色变浅。本实施例中同时采用了以传统西维因生物抗体为识别元件的ELISA方法验证了添加样品回收率的测定,如表2所示,检测结果具有较好的一致性。

[0053] 表2实施例2中实际样品的添加回收实验

[0054]

样品	添加浓度 (mg kg^{-1})	仿 生 试 纸 条 检 测 (mean $\pm \text{SD}; n=3, \text{mg kg}^{-1}$)	生 物 抗 体 ELISA 检 测 (mean $\pm \text{SD}; n=3, \text{mg kg}^{-1}$)
青菜	0.25	0.226 \pm 0.008	0.289 \pm 0.039
青菜	0.5	0.519 \pm 0.057	0.450 \pm 0.082
青菜	1	0.853 \pm 0.160	0.860 \pm 0.129

[0055] 实施例3

[0056] 选择从不同农贸市场购买的大米和青菜为检测样品,用制备的西维因分子印迹仿生试纸条定性检测在实际样品中的效果,同时用高效液相色谱对样品进行检测验证。

[0057] 随机样品的检测:取购自不同农贸市场的大米和青菜样品共10份,加入甲醇提取液振荡后分别与西维因分子印迹仿生试纸条混合反应,同时加入体积比1:1的酶标抗原稀释液(酶标抗原稀释度为1:100-1:32000),反应1-50min。洗涤后加入底物显色。以1.0 mg kg^{-1} 的西维因溶液的纸片颜色为参照组进行定性判断。随机样品同时采用HPLC方法进行了检测实验。

[0058] 试验结果如表3所示,以西维因浓度1 mg kg^{-1} 为颜色参照,若颜色比参照浅代表实际样品中西维因的浓度高于1 mg kg^{-1} ,用“+”表示阳性;若颜色比参照深代表样品中西维因浓度

低于 1mgkg^{-1} ,用“-”表示阴性;若颜色与参照类似代表浓度在 1mgkg^{-1} 左右,用“±”表示阳性/阴性。结果表明制备的农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条可以有效实现对样品中西维因的定性检测,其在样品的检测限量可达到 1mg kg^{-1} 。

[0059] 表3随机样品仿生试纸条检测与HPLC的检测结果

	样本	仿生试纸条检测	HPLC(mg kg^{-1})
[0060]	1	-	未检出
	2	-	0.654 ± 0.009
	3	±	1.001 ± 0.008
	4	-	未检出
	5	-	0.556 ± 0.006
	6	-	未检出
	7	+	1.304 ± 0.006
	8	+	1.507 ± 0.009
	9	-	未检出
	10	-	0.523 ± 0.006

[0061] 说明:1,仿生试纸条检测:以西维因浓度 1mgkg^{-1} 为颜色参照,若颜色比参照浅代表浓度高于 1mgkg^{-1} ,用“+”表示阳性;若颜色比参照深代表浓度低于 1mgkg^{-1} ,用“-”表示阴性;若颜色与参照类似代表浓度在 1mgkg^{-1} 左右,用“±”表示阳性/阴性。

[0062] 2,HPLC中“未检出”表示:检测样品中西维因含量均低于 0.005mg kg^{-1}

[0063] 综上所述,本发明基于滤纸为固相载体的农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条既可以用于西维因定量又可以用于定性快速检测,该方法操作简便、成本低廉,适宜现场操作。

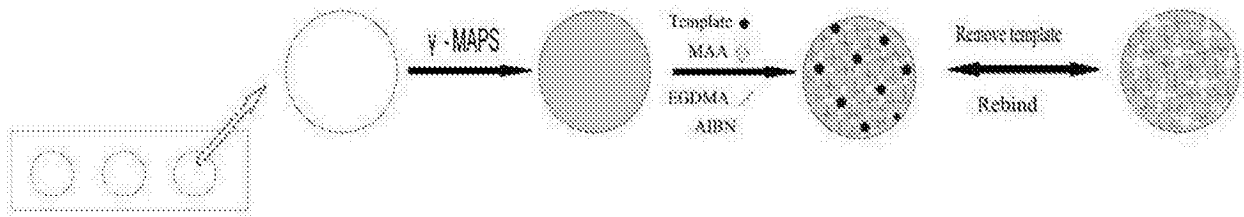


图1

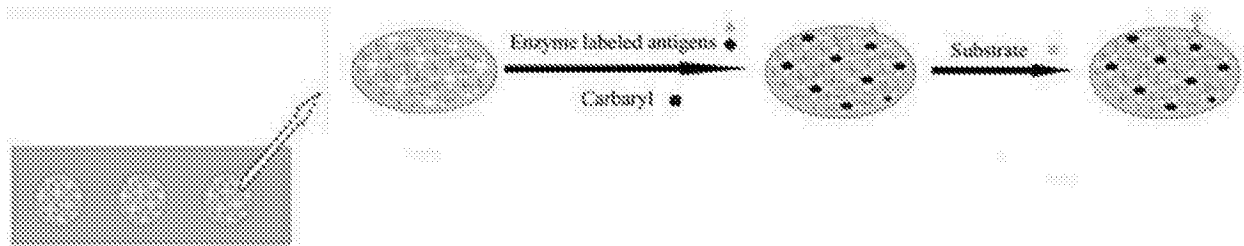


图2

酶标抗原稀释度

1 : 100
1 : 500
1 : 1000
1 : 2000
1 : 4000
1 : 8000
1 : 16000
1 : 32000

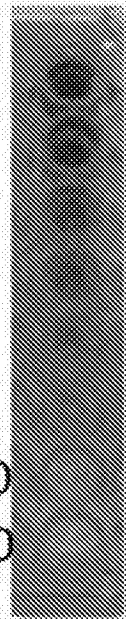


图3

反应时间 (min)

1
3
5
10
20
30
40
50

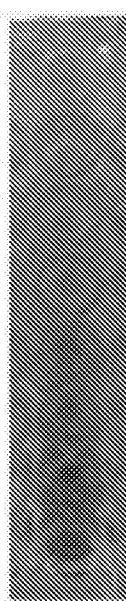


图4

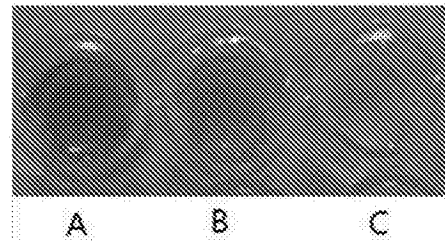


图5

专利名称(译)	农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的制备及其应用		
公开(公告)号	CN105572349A	公开(公告)日	2016-05-11
申请号	CN201610023795.7	申请日	2016-01-14
[标]申请(专利权)人(译)	江苏大学		
申请(专利权)人(译)	江苏大学		
当前申请(专利权)人(译)	江苏大学		
[标]发明人	张灿 崔涵雨 韩玉凤 蔡健荣		
发明人	张灿 崔涵雨 韩玉凤 蔡健荣		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/78		
CPC分类号	G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543 G01N2430/10		
其他公开文献	CN105572349B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于分子印迹技术，公开了农药西维因分子印迹仿生快速检测试纸条的制备及其应用。本发明采用Whatman ? NO.5滤纸为固相载体，在其表面进行硅烷化引入双键。将西维因、甲基丙烯酸、乙二醇二甲基丙烯酸酯、偶氮二异丁腈溶于氯仿，加入预先处理过的载体，水浴引发，在滤纸纤维载体上聚合形成西维因的分子印迹层。模拟生物抗体与抗原和酶标抗原竞争性免疫结合反应原理，利用西维因酶标抗原作为反应标记物与西维因进行竞争结合西维因分子印迹聚合物的印迹孔穴位点，加底物显示后通过判断纸片上颜色的变化从而定性检测样本中西维因含量。本发明较生物抗体快速检测试纸条的制作成本低廉,检测方法简便快速，检测结果明显直观，适合现场快速鉴定。

