



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108931646 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 201810540551.5

CN 101915844 A, 2010.12.15

(22) 申请日 2018.05.30

CN 102504572 A, 2012.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 102928597 A, 2013.02.13

申请公布号 CN 108931646 A

CN 105021815 A, 2015.11.04

(43) 申请公布日 2018.12.04

CN 107188830 A, 2017.09.22

(73) 专利权人 中国烟草总公司郑州烟草研究院

CN 105646536 A, 2016.06.08

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

CN 102718861 A, 2012.10.10

CN 105277536 A, 2016.01.27

(72) 发明人 陈黎 刘惠民 赵乐 崔华鹏

Iain Gardner等. Immunochemical

樊美娟 聂聪 张晓兵 谢复炜

Detection of Covalently Modified Protein Adducts in Livers of Rats Treated with Methyleugenol.《Chem. Res. Toxicol.》.1996, 第9卷(第4期), 全文.

潘立宁 王晓瑜

(74) 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司
41110

Renzo Rossi等. A New Stereocontrolled Synthesis of the Racemic Forms of Savinin and Gadain.《SYNTHESIS》.1997, 全文.

代理人 姜振东

(51) Int. Cl.

肖治理等. 倍硫磷半抗原、人工抗原的合成和鉴定.《现代食品科技》.2012, 第28卷(第8期), 全文.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

(56) 对比文件

李叶青等. 黄樟素类化合物分析检测研究进展.《安徽农业科学》.2015, 第43卷(第25期), 全文.

CN 105259351 A, 2016.01.20

CN 101747429 A, 2010.06.23

JP 2010259382 A, 2010.11.18

审查员 张婷

权利要求书1页 说明书7页 附图1页

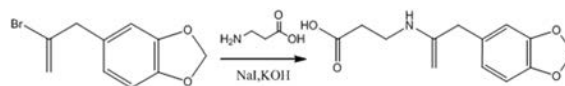
(54) 发明名称

一种检测黄樟素的试纸条及其制备方法和应用

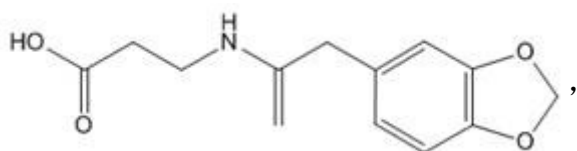
(57) 摘要

本发明提供一种检测黄樟素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、吸水垫和底板；其中，所述反应膜上具有包被有黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗体的质控线，所述结合物释放垫上喷涂有黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物，所述黄樟素半抗原是由5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环与氨基丙酸反应得到的。本发明还提供了黄樟素试纸条的制备方法及应用上述试纸条检测样品中黄樟素的方法。

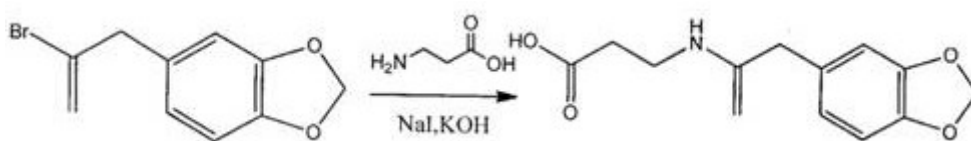
法。本发明提供的试纸条和检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的优点，能够实现对大批量样品中的黄樟素进行快速检测和现场监控。



1. 一种检测黄樟素的试纸条,包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其特征在于,所述反应膜上具有包被有黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物;所述黄樟素单克隆抗体是以黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得;所述黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物由黄樟素半抗原与载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白或人血清白蛋白,所述黄樟素半抗原是由5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环与氨基丙酸反应得到的,其分子结构式为:



所述黄樟素半抗原的制备反应过程如下:



黄樟素半抗原的具体制备方法如下:取5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环1.0 g,加无水二甲基亚砜50 mL溶解,搅拌澄清,加氢氧化钾0.48 g,加无水碘化钠0.20 g,剧烈搅拌后,加氨基丙酸0.41 g,100℃反应4h;停止反应,加水50 mL,加1mol/L盐酸调节pH值到6,加乙酸乙酯80 mL,萃取三次,合并有机相,旋蒸蒸干,上硅胶柱,用体积比为1:5的乙酸乙酯/石油醚洗脱分离,得到半抗原产物丙酸黄樟素0.91g。

2. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上。

3. 根据权利要求1或2任一项所述的试纸条,其特征在于,所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

4. 根据权利要求1所述的试纸条,其特征在于,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。

5. 一种制备权利要求1-4任一项所述试纸条的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 制备喷涂有黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

2) 制备具有包被有黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;

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

6. 一种应用权利要求1-4任一项所述试纸条检测样品中黄樟素的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

1) 对样品进行前处理;

2) 用所述试纸条对样品进行检测;

3) 分析检测结果。

一种检测黄樟素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黄樟素的试纸条及其制备方法和应用,具体涉及一种用于检测黄樟素的胶体金试纸条,其特别适用于烟用香精香料、烟草及烟草制品中黄樟素的检测。

背景技术

[0002] 黄樟素又称黄樟油素、黄樟脑,无色或微黄色液体,不溶于水,易溶于氯仿、乙醚和其他非极性有机溶剂,有樟木气味,天然存在于肉桂、肉豆蔻、黑胡椒和紫苏等植物中,是许多食用天然精油如黄樟精油、八角精油和樟脑油的主要成分。由于其舒适的气味,黄樟油曾经在食品、洗涤用品和化妆品中作为调味剂和调香剂。黄樟素类化合物主要包括黄樟素、异黄樟素、二氢黄樟素等。黄樟素也是非法生产毒品摇头丸的一个重要组成部分。由于试验表明黄樟素对老鼠有致肝肿瘤的效果,因此,各国对黄樟素进行了限量规定。2001年,欧盟委员会规定黄樟素和异黄樟素的总使用限量,食品和饮料中为1 mg/kg,含酒精饮料为5 mg/kg。2005年,欧洲委员会将黄樟素列为怀疑弱致癌物质,虽然没有规定每日限量,但要求设置的尽可能低。我国于2005年实施的《易制毒化学品管理条例》将黄樟素列为第一类易制毒化学品。烟用香精香料在生产制造过程中有可能由天然植物精油引入黄樟素,进而通过烟丝中添加的香精香料存在于烟草制品中,对消费者的健康造成潜在危害。因此,建立黄樟素的快速检测方法,对香精香料及烟草制品进行质量控制十分必要。

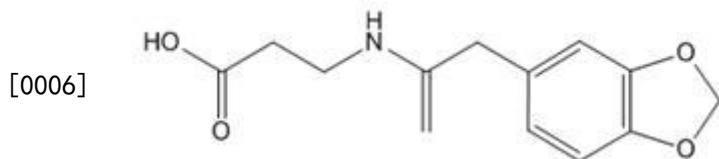
[0003] 目前,黄樟素主要通过直接萃取法、超声萃取法、同时蒸馏萃取法、水蒸气蒸馏法等提取,结合气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)、高效液相色谱法(HPLC)、超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测。仪器分析方法虽可以实现准确定性定量,但需要复杂昂贵的仪器设备及专业操作人员,加之样品前处理繁琐费时、检测费用高,难以满足现场监控和大量样本筛查的需要。因此,开发一种不受检测设备限制并且能够实现对大批量样品进行快速检测的产品和方法成为迫切需要解决的问题。截至目前,与烟用香精香料及烟草中黄樟素检测相关的专利和文献报道较少,市场上尚未有黄樟素试纸条出现。

发明内容

[0004] 本发明的目的正是基于上述现有技术状况提供一种检测黄樟素的试纸条及其制备方法和应用,本发明应用胶体金免疫层析法测定烟用香精香料及烟草制品中的黄樟素,具有准确度高、操作简单、无需专业人员操作、无需配套其他检测设备、方便携带检测、时间短、检测成本低等特点,适用于现场大量样品的筛查。

[0005] 为了实现本发明的目的,本发明提供了一种检测黄樟素的试纸条,该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板;其中,所述反应膜上具有包被有黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线,所述结合物释放垫上喷涂有黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物;所述黄樟素单克隆抗体是以黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得。所述黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物由黄樟素半抗原与

载体蛋白偶联得到,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白或人血清白蛋白,所述黄樟素半抗原是由5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环与氨基丙酸反应得到的,其分子结构式为:



[0007] 所述黄樟素半抗原的制备方法如下:

[0008] 取5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环1.0 g,加无水二甲基亚砜(DMSO) 50 mL溶解,搅拌澄清,加氢氧化钾0.48 g,加无水碘化钠0.20 g,剧烈搅拌后,加氨基丙酸0.41 g,100℃反应4h。停止反应,加水50 mL,加1mol/L盐酸调节pH值到6,加乙酸乙酯80 mL,萃取三次,合并有机相,旋蒸蒸干,上硅胶柱,用体积比为1:5的乙酸乙酯/石油醚洗脱分离,得到半抗原产物丙酸黄樟素0.91g。

[0009] 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。

[0010] 所述样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次粘贴在底板上,所述结合物释放垫1/3~1/2被覆盖于样品吸收垫下。

[0011] 所述底板为PVC底板;所述样品吸收垫为吸滤纸;所述结合物释放垫为玻璃棉;所述吸水垫为吸水纸;所述反应膜为硝酸纤维素膜。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种制备上述试纸条的方法,该方法包括以下步骤:

[0013] 1)制备喷涂有黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0014] 2)制备具有包被有黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;

[0015] 3)将1)和2)制备好的结合物释放垫、反应膜与样品吸收垫、吸水垫和底板组装成试纸条。

[0016] 具体地说,步骤包括:

[0017] 1)通过5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环与氨基丙酸反应,制备黄樟素半抗原;

[0018] 2)将黄樟素半抗原与载体蛋白偶联,制备黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物;

[0019] 3)用黄樟素半抗原-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,得到分泌黄樟素单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0020] 4)提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0021] 5)分别将黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物和羊抗鼠抗抗体包被于反应膜的检测线(T)和质控线(C)上;

[0022] 6)用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0023] 7)将制备的黄樟素单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物;

[0024] 8)将黄樟素单克隆抗体-胶体金标记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;

[0025] 9)将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(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;

[0026] 10)在底板上按顺序粘贴上样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫,结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖。最后切成3mm宽的小条,加塑料盒,真空包装,4~30℃条件下可保存12个月。结合物释放垫的1/3被样品吸收垫覆盖可以延长检测结果观察时间,可使样品吸收垫将检测液体充分吸收并与金标抗体充分反应,从而减少误差。

[0027] 本发明的另一个目的是提供一种应用上述试纸条检测样品中黄樟素的方法,该方法包括如下步骤:

[0028] (1)对样品进行前处理;

[0029] (2)用试纸条进行检测;

[0030] (3)分析检测结果。

[0031] 本发明的检测黄樟素的试纸条利用抗体抗原高度特异性反应及免疫层析分析技术,将黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的黄樟素在流动过程中,与结合物释放垫上的黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成黄樟素-抗体-胶体金标记物。样本中的黄樟素与反应膜检测线上的黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物,根据检测线红色条带深浅来判断待测样品液中是否含有黄樟素残留。

[0032] 检测时,样品经处理后滴入试纸条卡孔内,当黄樟素在样品中的浓度低于检测限或为零时,单克隆抗体-胶体金标记物在层析过程中会与固定在反应膜上的黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物结合,在检测线(T)和质控线(C)处各出现一条红色条带,且T线显色比C线显色深或与C线显色一致;如果黄樟素在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与黄樟素全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物结合而不出现红色条带或比C线显色浅。

[0033] 阴性:当质控线(C)显示出红色条带,检测线(T)同时也显示出红色条带,且T线颜色接近或深于C线时,判为阴性。

[0034] 阳性:当质控线(C)显示出红色条带,而检测线(T)不显色或T线颜色浅于C线时,判为阳性。

[0035] 无效:当质控线(C)不显示出红色条带,则无论检测线(T)显示出红色条带与否,该试纸条均判为无效。

[0036] 目前尚无用于检测烟用香精香料及烟草制品中黄樟素的试纸条,本发明填补了该空白。本发明的半抗原具有适当末端活性基团,修饰位点及间隔臂长度选择合适,且能最大程度模拟黄樟素的分子结构,以此半抗原为基础开发的试纸条具有灵敏度高、特异性强的特点。同时本发明的试纸条具有成本低、操作简单、检测时间短、不受检测设备限制、适合各种单位使用、储存简单、保质期长的优点。综上,用本发明试纸条检测黄樟素的方法,简便、快速、直观、准确、适用范围广、成本低、易推广使用。

附图说明

[0037] 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、检测线;6、质控线;7、底板;

[0038] 图2为试纸条检测结果判定图;

[0039] 图3为黄樟素半抗原合成图(该图作为摘要附图)。

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。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本发明的保护范围。

[0041] 实施例1 检测黄樟素的试纸条的制备

[0042] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0043] 1)制备喷涂有黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0044] 2)制备具有包被有黄樟素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线的反应膜;

[0045] 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底板组装成试纸条。

[0046] 下面分步详细叙述:

[0047] 1、黄樟素半抗原的合成(合成路线见附图3)及鉴定

[0048] 取5-(2-溴-2-丙烯-1-基)-1,3-苯并二氧戊环1.0 g,加无水DMSO 50 mL溶解,搅拌澄清,加氢氧化钾0.48 g,加无水碘化钠0.20 g,剧烈搅拌后,加氨基丙酸0.41 g,100℃反应4 h。停止反应,加水50 mL,加1mol/L盐酸调节pH值到6,加乙酸乙酯80 mL,萃取三次,合并有机相,旋蒸蒸干,上硅胶柱,乙酸乙酯/石油醚(v/v,1/5)洗脱分离,得到半抗原产物丙酸黄樟素0.91g,收率87.37%。

[0049] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定,¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz) δ:11.0(1H, -COOH), 6.90(1H, ArH, J=6.864), 6.68(1H, ArH), 6.76(1H, ArH), 6.07(2H, s, -CH₂-), 4.16(2H, s, -CH₂-), 3.75(1H, dd, =CH₂), 3.12(2H, t, -CH₂-), 2.49(2H, t, -CH₂-), 2.0(1H, s, -NH-)。图谱中化学位移δ=11.0的为羧基氢的共振吸收峰,δ=3.12、2.49的为间隔臂上亚甲基氢的共振吸收峰,这些峰的存在,证明间隔臂偶联成功,黄樟素半抗原结构正确。

[0050] 2、黄樟素偶联抗原的合成及鉴定

[0051] 免疫原制备——黄樟素半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0052] 取黄樟素半抗原9 mg,加N,N-二甲基甲酰胺0.3 mL溶解,澄清,加碳化二亚胺(EDC)8.3 mg,搅拌20 min,加N-琥珀酰亚胺7 mg,继续搅拌30 min,得到半抗原活化液A液;取BSA 50 mg,加0.8%氯化钠水溶液4 mL溶解,得到B液;将A液缓慢滴加到B液中,4℃搅拌4 h,0.02 mol/L PB缓冲液透析纯化3天,得到黄樟素-BSA免疫原,分装,-20℃保存备用。

[0053] 包被原制备——黄樟素半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0054] 取黄樟素半抗原6 mg,加二甲基亚砷0.2 mL溶解,加三乙胺20 μL,加氯甲酸异丁酯18 μL,混匀,4℃反应30 min,得到半抗原活化液A液;取OVA 50 mg,加0.8%氯化钠水溶液4 mL溶解,得到B液;将A液缓慢滴加到B液中,4℃搅拌4 h,0.02 mol/L PB缓冲液透析纯化3天,得到黄樟素-OVA包被原,分装,-20℃保存备用。

[0055] 3、黄樟素单克隆抗体的制备

[0056] (1)动物免疫

[0057] 将步骤1得到的免疫原注入Balb/c小鼠体内,免疫剂量为150 μg/只,使其产生抗血清。

[0058] (2)细胞融合和克隆化

[0059] 取产生特异性抗体的Balb/c小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞SP20融合,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,得到并建立产单克隆抗体的杂交瘤细胞株。

[0060] (3)细胞冻存和复苏

[0061] 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。复苏时取出冻存管,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。

[0062] (4)单克隆抗体的制备与纯化

[0063] 采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油,7~14天后腹腔注射杂交瘤细胞,7~10天后采集腹水。经辛酸-饱和硫酸铵法进行腹水纯化,纯度经SDS-PAGE电泳鉴定,小瓶分装,-20℃保存。

[0064] (5)单克隆抗体效价的测定

[0065] 用间接竞争ELISA法测定抗体的效价为1:(50000~100000)。

[0066] 间接竞争ELISA方法:用黄樟素半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入黄樟素标准品溶液、黄樟素单克隆抗体溶液和辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体溶液,25℃反应30 min,倒出孔内液体,用洗涤液洗涤3~5次,用吸水纸拍干;加入底物显色液,25℃反应15 min后,加入终止液终止反应;设定酶标仪于波长450 nm处测定每孔吸光度值。

[0067] (6)单克隆抗体特异性的测定

[0068] 抗体特异性是指它同特异性抗原结合的能力与同该类抗原类似物结合能力的比较,常用交叉反应率作为评价标准。交叉反应越小,抗体的特异性则越高。

[0069] 本实验将黄樟类似物做系列稀释,分别与单克隆抗体进行间接竞争ELISA,制作标准曲线,分析得到 IC_{50} ,然后按下式计算交叉反应率:

[0070]	$\text{交叉反应率 (\%)} = \frac{\text{引起 50\%抑制的黄樟素浓度}}{\text{引起 50\%抑制的其他类似物浓度}} \times 100\%$
--------	--

[0071] 该抗体与黄樟素类似物的交叉反应率结果见表1。

[0072] 表1 交叉反应率试验

[0073]	<table border="1"> <tr> <th>化合物</th><th>交叉反应率 (%)</th></tr> <tr> <td>黄樟素</td><td>100</td></tr> <tr> <td>异黄樟素</td><td>13.2</td></tr> <tr> <td>二氢黄樟素</td><td>6.7</td></tr> <tr> <td>香豆素</td><td><1</td></tr> <tr> <td>香兰素</td><td><1</td></tr> <tr> <td>突厥烯酮</td><td><1</td></tr> </table>	化合物	交叉反应率 (%)	黄樟素	100	异黄樟素	13.2	二氢黄樟素	6.7	香豆素	<1	香兰素	<1	突厥烯酮	<1
化合物	交叉反应率 (%)														
黄樟素	100														
异黄樟素	13.2														
二氢黄樟素	6.7														
香豆素	<1														
香兰素	<1														
突厥烯酮	<1														

[0074] 从表1可以看出,黄樟素单克隆抗体与异黄樟素、二氢黄樟素、香豆素、香兰素、突厥烯酮均无交叉反应。

[0075] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0076] 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。

[0077] 5、黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0078] (1)胶体金的制备

[0079] 取0.01%氯金酸水溶液100 mL加热至沸,搅动下准确加入预热的1%柠檬酸三钠水溶液4 mL,金黄色的氯金酸水溶液在2 min内变为灰色,然后由灰变为酒红色,继续搅拌煮沸8 min,冷却后用蒸馏水定容到100 mL,4℃保存。制备良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。

[0080] (2)黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0081] 在磁力搅拌下,用0.2 mol/L碳酸钾溶液调胶体金的pH值至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20~50 μg抗体的标准向胶体金溶液中加入上述黄樟素单克隆抗体,搅拌混匀,室温静置10 min,加入10% BSA使其在胶体金溶液中的终质量分数为1%,静置10 min。12000 r/min,4℃离心40 min,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。

[0082] 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0.02 mol/L磷酸盐缓冲液。

[0083] 6、结合物释放垫的制备

[0084] 将结合物释放垫浸泡于含0.5% BSA(质量分数)、pH 7.2的0.5 mol/L磷酸盐缓冲液中,均匀浸湿1 h,37℃烘3 h备用。用Bio dot喷膜仪将制备好的黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物均匀喷涂在结合物释放垫上,每1cm结合物释放垫喷涂0.01 mL黄樟素单克隆抗体-胶体金标记物后,置于37℃环境中(湿度<20%)60 min后取出,置于干燥环境(湿度<20%)中保存备用。

[0085] 7、反应膜的制备

[0086] 将黄樟素半抗原-卵清蛋白偶联物包被到反应膜上构成检测线,将羊抗鼠抗抗体包被在反应膜上构成质控线。

[0087] 包被过程:用磷酸缓冲液将黄樟素半抗原-卵清蛋白偶联物稀释到1 mg/mL,用Bio dot点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的检测线(T),包被量为1.0 μL/cm;用0.01 mol/L、pH值为7.4的磷酸盐缓冲液将羊抗鼠抗抗体稀释到200 μg/mL,用Bio dot点膜仪将其包被于硝酸纤维素膜上的质控线(C),包被量为1.0 μL/cm。将包被好的反应膜置于37℃条件下干燥2 h,备用。

[0088] 8、样品吸收垫的制备

[0089] 将样品吸收垫用含0.5%牛血清白蛋白(质量分数)、pH 7.2的0.1 mol/L磷酸盐缓冲液浸泡2 h,37℃下烘干2 h备用。

[0090] 9、试纸条的组装

[0091] 将样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫依次按顺序粘贴在PVC底板上;结合物释放垫从起始端有1/3区域被样品吸收垫覆盖,结合物释放垫的末端与反应膜的始端连接,反应膜的末端与吸水垫的始端相连,样品吸收垫的始端与PVC底板的始端对齐,吸水垫

的末端与PVC底板的末端对齐;所述反应膜上有检测线和质控线,检测线(T)和质控线(C)均呈与所述试纸条的长相垂直的条状带;检测线位于靠近结合物释放垫的末端的一侧;质控线位于远离结合物释放垫的末端的一侧;将试纸条用机器切成3 mm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。

[0092] 实施例2 样品中黄樟素的检测

[0093] 1、样品的前处理

[0094] 称取 1.0 ± 0.05 g粉碎的烟草样本至聚苯乙烯离心管中;加入10 mL 50%甲醇水溶液,用匀浆机将其充分打碎,得样本液;移取50 μ L样本液与450 μ L去离子水混匀后待检。

[0095] 2、用试纸条进行检测

[0096] 用移液器取待检样本溶液100 μ L垂直滴于加样孔中,液体流动时开始计时,反应10 min,判定结果。

[0097] 3、分析检测结果

[0098] 阴性(-):T线显色比C线显色深或与C线显色一致,表示样品中黄樟素浓度低于检测限,如图2a、2b。

[0099] 阳性(+):T线显色比C线显色浅或T线不显色,表示样品中黄樟素浓度等于或高于检测限,如图2c、2d。

[0100] 无效:未出现C线,表明不正确的操作过程或试纸条已变质失效,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。

[0101] 实施例3 样品检测实例

[0102] 1、检测限试验

[0103] 取空白烟草样品,在其中分别添加黄樟素至终浓度为0.1、0.2、0.4 mg/kg,取试纸条进行检测,每个样本重复测定三次。

[0104] 用试纸条检测烟草样品时,当其中黄樟素添加浓度为0.1 mg/kg时,试纸条上显示出T线显色比C线显色深或与C线显色一致,呈阴性;当其中黄樟素添加浓度为0.2和0.4 mg/kg时,试纸条上显示出T线显色比C线显色浅或T线不显色,呈阳性,表明本试纸条对烟草中黄樟素的检测限为0.2 mg/kg。

[0105] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0106] 取已知黄樟素含量大于0.2 mg/kg的烟草阳性样品20份,已知不含黄樟素的烟草阴性样品20份,用三批试纸条进行检测,计算其阴阳性率。

[0107] 结果表明:用3个批次生产的试纸条检测阳性样品时,结果全为阳性,可知阳性样品符合率为100%,假阴性率为0;检测阴性样品时,结果全为阴性,可知阴性样品符合率为100%,假阳性率为0。说明本发明的检测黄樟素的试纸条可以对烟草中的黄樟素进行快速检测。

[0108] 3、特异性试验

[0109] 用黄樟素试纸条检测500 μ g/L的异黄樟素、二氢黄樟素、香豆素、香兰素、突厥烯酮。结果显示,荧光检测仪检测为阴性。说明本试纸条对500 μ g/L的异黄樟素、二氢黄樟素、香豆素、香兰素、突厥烯酮无交叉反应。

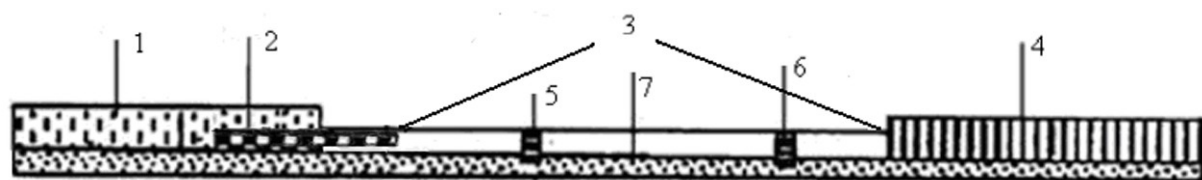


图1

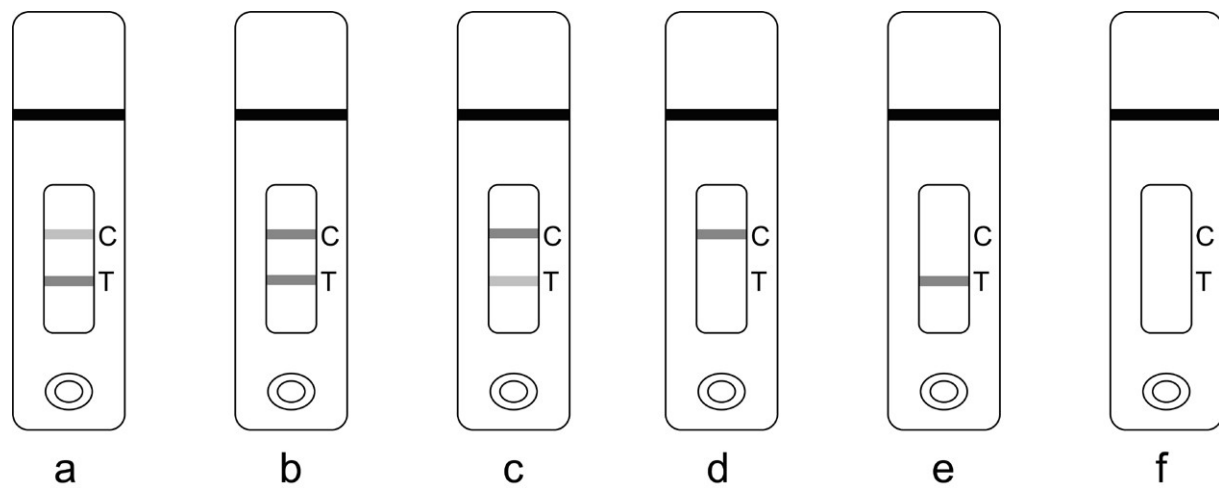


图2

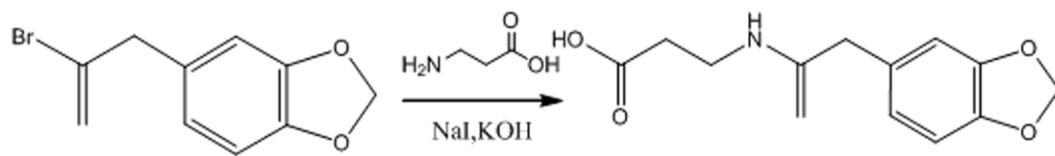


图3