



(21) 申请号 201810540485.1

(22) 申请日 2018.05.30

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108956993 A

(43) 申请公布日 2018.12.07

(73) 专利权人 中国烟草总公司郑州烟草研究院

地址 450001 河南省郑州市高新区枫杨街2号

专利权人 北京勤邦生物技术有限公司

(72) 发明人 陈黎 刘惠民 万宇平 鲁亚辉

崔华鹏 樊美娟 赵乐 潘立宁

扶胜 桑旭升

(74) 专利代理机构 郑州中民专利代理有限公司

41110

代理人 姜振东

(51) Int.Cl.

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 108051517 A, 2018.05.18

CN 104655767 A, 2015.05.27

CN 103983725 A, 2014.08.13

US 5208350 A, 1993.05.04

张秀琴 等. 香豆素类化合物的定量方法 (综述). 《中草药》. 1980, 第11卷 (第12期), 全文.

Zhiqin Ren et al.. Simultaneous Determination of Coumarin and Its Derivatives in Tobacco Products by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. 《Molecules》. 2016, 第21卷 (第11期), 全文.

审查员 胡晓佳

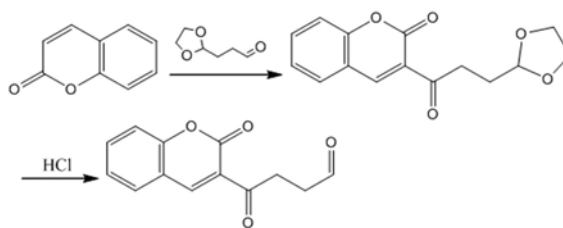
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

#### (54) 发明名称

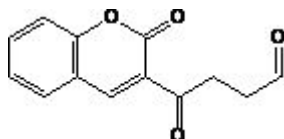
一种检测香豆素的试纸条及其制备方法和应用

#### (57) 摘要

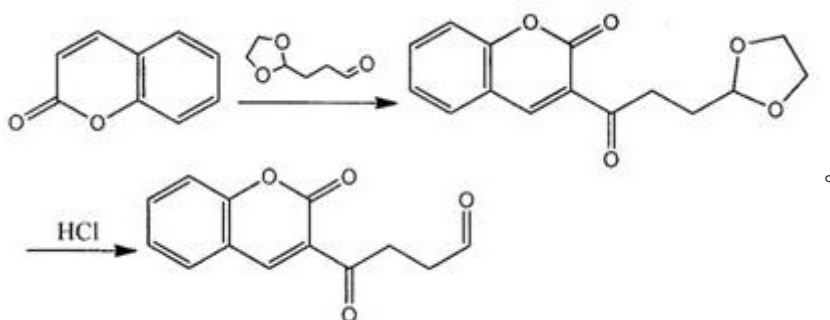
本发明提供一种检测香豆素的试纸条及其制备方法和应用。该试纸条包括样品吸收垫、结合物释放垫、反应膜、吸水垫和底板；其中，所述反应膜上具有包被有香豆素半抗原-载体蛋白偶联物的检测线和包被有羊抗鼠抗抗体的质控线，所述结合物释放垫上喷涂有香豆素单克隆抗体-胶体金标记物，所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到的。本发明还提供了香豆素试纸条的制备方法及应用上述试纸条检测样品中香豆素的方法。本发明提供的试纸条和检测方法具有操作简单、灵敏度高、检测速度快、成本低、不受检测设备限制的优点，能够实现对大批量的香豆素样品进行快速检测和现场监控。



1. 一种检测香豆素的试纸条,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香豆素半抗原-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香豆素单克隆抗体-胶体金标记物;所述香豆素单克隆抗体是以香豆素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得;所述香豆素半抗原-载体蛋白偶联物由香豆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,所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到的,其分子结构式为:



所述香豆素半抗原的制备反应过程如下:



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) 制备喷涂有香豆素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;
- 2) 制备具有包被有如权利要求1中所述的香豆素半抗原-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香豆素的方法,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。

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

### 背景技术

[0002] 香豆素系化合物是一类具有芳香气味,母核为苯并 $\alpha$ -吡喃酮结构的天然产物,广泛分布于植物界,根据结构可分为简单香豆素系化合物、呋喃香豆素系化合物、吡喃香豆素系化合物和其他香豆素系化合物等。香豆素(coumarin)又名邻羟基桂酸内酯和1,2-苯并吡喃酮,是一种天然植物次生产品,是广泛存在于自然界中的一种内酯类化合物,于1820年发现于黑香豆中,主要以游离状态和苷的形式存在于植物中,在芸香科和伞形科植物中最多,其次存在于豆科、兰科、木樨科、茄科和菊科植物,少数来自微生物。香豆素作为一种重要的香料,常用作定香剂、脱臭剂,配制香水和香料,也用作饮料、食品、卷烟、塑料制品、橡胶制品等的增香剂,医药上将其加入药剂中作为矫味剂。实验发现,香豆素对小鼠胚胎有毒性,能引起痛觉消失,使中性胆碱酯酶发生变化,对大鼠为可疑致肿瘤物。香豆素在体内的含量达到一定量时具有生理毒性,通过长期的动物实验发现其具有肝毒性,主要是由代谢的途径导致P450(细胞色素P)及其依赖性酶的减少引起的。美国食品药品监督管理局(FDA)早在1954年就禁止将香豆素用作食品添加剂;欧洲食品安全局(EFSA)规定香豆素的每日耐受摄入量(TDI)为0.1 mg/kg bw;欧盟规定,对于洗去型化妆品,香豆素的含量不得超过30  $\mu\text{g/g}$ ,对于非洗去型化妆品,香豆素含量不得高于10  $\mu\text{g/g}$ ;2010年7月,台湾地区食品管理机构发布通知禁止在食品中添加香豆素,同时规定“惟饮料中因使用天然香料,导致天然香料本身含香豆素残留时,其含量仍应在2.0 mg/kg以下”。

[0003] 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香豆素,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,建立香豆素的快速检测方法,对香精香料及烟草制品进行质量控制十分必要。

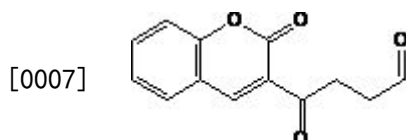
[0004] 目前,香豆素主要通过直接萃取法、超声萃取法、同时蒸馏萃取法、水蒸气蒸馏法等提取,结合气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)、高效液相色谱法(HPLC)、超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测。仪器分析方法虽可以实现准确定性定量,但需要复杂昂贵的仪器设备及专业操作人员,加之样品前处理繁琐费时、检测费用高,难以满足现场监控和大量样本筛查的需要。因此,开发一种不受检测设备限制并且能够实现对大批量样品进行快速检测的产品和方法成为迫切需要解决的问题。截至目前,与烟用香精香料及烟草中香豆素检测相关的专利和文献报道较少,市场上尚未有香豆素试纸条出现。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的正是基于上述现有技术状况提供一种检测香豆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香豆素,

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。

[0006] 为了实现本发明的目的,本发明提供了一种检测香豆素的试纸条,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香豆素半抗原-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香豆素单克隆抗体-胶体金标记物;所述香豆素单克隆抗体是以香豆素半抗原-载体蛋白偶联物作为免疫原制备获得。所述香豆素半抗原-载体蛋白偶联物由香豆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,所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到的,其分子结构式为:

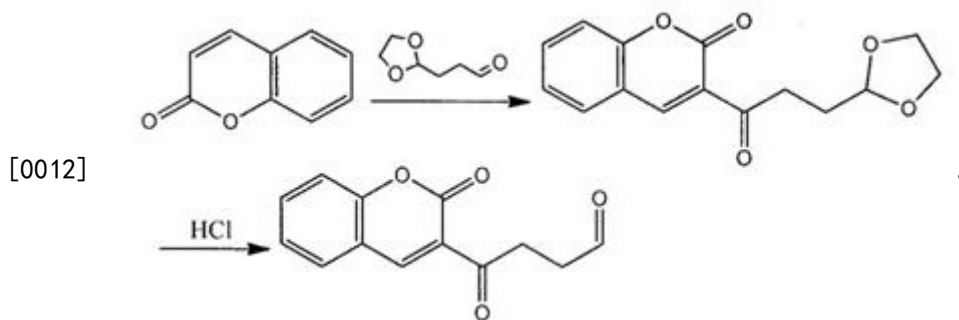


[0008] 所述香豆素半抗原的制备方法如下:

[0009] 1) 取香豆素1.00 g,加入80 mL氯苯中搅拌溶解,加2.50 g叔丁醇过氧化氢,搅拌充分混匀,加3-(1,3-二氧杂环-2-基)丙醛0.89 g,100℃搅拌24 h。停止反应后,加100 mL冷水,用100 mL乙酸乙酯萃取3次,使用50 mL水洗,有机相无水硫酸钠干燥蒸干,60 mL石油醚/二氯甲烷(v/v,1/1)重结晶,得到缩醛香豆素化合物1.70 g。

[0010] 2) 取缩醛香豆素1.70 g,加20 mL乙腈溶解,加1 mol/L稀盐酸10 mL,室温剧烈搅拌4 h,停止反应,旋蒸,除去乙腈,加水50 mL,加1mol/L的NaOH调节pH值到6,加70 mL 1,2-二氯乙烷萃取3次,100 mL水洗,蒸干,上硅胶柱,2 L二氯甲烷/甲醇(v/v,5/1)洗脱,分离纯化,得到丁醛香豆素半抗原1.30 g。

[0011] 其反应过程如下:



[0013] 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。

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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:

[0017] 1) 制备喷涂有香豆素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0018] 2) 制备具有包被有香豆素半抗原-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;

[0019] 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。

[0020] 具体地说,步骤包括:

[0021] 1)将香豆素进行缩醛反应,制备香豆素半抗原;

[0022] 2)将香豆素半抗原与载体蛋白偶联,制备香豆素半抗原-载体蛋白偶联物;

[0023] 3)用香豆素半抗原-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,得到分泌香豆素单克隆抗体的杂交瘤细胞株;

[0024] 4)提取小鼠IgG免疫健康山羊,得到羊抗鼠抗抗体;

[0025] 5)分别将香豆素半抗原-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;

[0026] 6)用柠檬酸三钠与氯金酸反应制备胶体金;

[0027] 7)将制备的香豆素单克隆抗体加入到制备的胶体金中,得到香豆素单克隆抗体-胶体金标记物;

[0028] 8)将香豆素单克隆抗体-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;

[0029] 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;

[0030] 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。

[0031] 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香豆素的方法,该方法包括如下步骤:

[0032] (1)对样品进行前处理;

[0033] (2)用试纸条进行检测;

[0034] (3)分析检测结果。

[0035] 本发明的检测香豆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,将香豆素单克隆抗体-胶体金标记物固定于结合物释放垫上,样品中的香豆素在流动过程中,与结合物释放垫上的香豆素单克隆抗体-胶体金标记物结合,形成香豆素-抗体-胶体金标记物。样本中的香豆素与反应膜检测线上的香豆素半抗原-载体蛋白偶联物竞争结合香豆素单克隆抗体-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香豆素残留。

[0036] 检测时,样品经处理后滴入试纸条卡孔内,当香豆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香豆素半抗原-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;如果香豆素在样品中的浓度等于或高于检测限,单克隆抗体-胶体金标记物会与香豆素全部结合,从而在T线处因为竞争反应不会与香豆素半抗原-载体蛋白偶联物结合而不出现红色条带或比C线显色浅。

[0037] 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。

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 目前尚无用于检测烟用香精香料及烟草制品中香豆素的试纸条,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,且能最大程度模拟香豆素的分子结构,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香豆素的方法,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

[0041] 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;

[0042] 图2为试纸条检测结果判定图;

[0043] 图3为香豆素半抗原合成图。

## 具体实施方式

[0044] 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。

[0045] 实施例1 检测香豆素的试纸条的制备

[0046] 该试纸条的制备方法主要包括以下步骤:

[0047] 1)制备喷涂有香豆素单克隆抗体-胶体金标记物的结合物释放垫;

[0048] 2)制备具有包被有香豆素半抗原-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;

[0049] 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。

[0050] 下面分步详细叙述:

[0051] 1、香豆素半抗原的合成(合成路线见附图3)及鉴定

[0052] 取香豆素1.00 g,加入80 mL氯苯中搅拌溶解,加2.50 g叔丁醇过氧化氢,搅拌充分混匀,加3-(1,3-二氧杂烷-2-基)丙醛0.89 g,100℃搅拌24 h。停止反应后,加100 mL冷水,用100 mL乙酸乙酯萃取3次,使用50 mL水洗,有机相无水硫酸钠干燥蒸干,60 mL石油醚/二氯甲烷(v/v,1/1)重结晶,得到缩醛香豆素化合物1.70 g,收率94.00%。

[0053] 取缩醛香豆素1.70 g,加20 mL乙腈溶解,加1 mol/L稀盐酸10 mL,室温剧烈搅拌4 h,停止反应,旋蒸,除去乙腈,加水50 mL,加1mol/L的NaOH调节pH值到6,加70 mL 1,2-二氯乙烷萃取3次,100 mL水洗,蒸干,上硅胶柱,2 L二氯甲烷/甲醇(v/v,5/1)洗脱,分离纯化,得到丁醛香豆素半抗原1.30 g,收率91.55%。

[0054] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定, $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz)  $\delta$ : 9.72 (1H, s, CHO), 8.45 (1H, s, C=CH), 7.84 (1H, dd, ArH), 7.65 (1H, dd, ArH), 7.42 (2H, dd, ArH), 3.27 (2H, dd,  $\text{CH}_2$ ), 2.51 (2H, t,  $\text{CH}_2$ )。图谱中化学位移 $\delta=9.72$ 的为间隔臂上醛基氢的共振吸收峰, $\delta=3.27$ 、 $2.51$ 的为间隔臂上亚甲基氢的共振吸收峰,除香豆素原有氢特征吸收峰外,这些峰的存在,证明间隔臂偶联成功,香豆素半抗原结构正确。

[0055] 2、香豆素偶联抗原的合成及鉴定

[0056] 免疫原制备——香豆素半抗原与牛血清白蛋白(BSA)偶联得到免疫原。

[0057] 取香豆素半抗原16 mg,加乙醇溶解,得到A液,取牛血清白蛋白0.1 g,加pH值为5.6的醋酸盐缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃搅拌20 h,加1 mg硼氢化钠,继续搅拌2 h,0.02 mol/L PB透析纯化三天,每天换液三次,分装,得到免疫原,-20℃保存备用。

[0058] 包被原制备——香豆素半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0059] 取香豆素半抗原5 mg,加乙醇溶解,得到A液,取卵清蛋白50 mg,加pH 9.1的碳酸盐缓冲液溶解,得到B液,将A液滴加到B液中,4℃搅拌20 h,加1 mg硼氢化钠,继续搅拌2 h,0.02 mol/L PB透析纯化三天,每天换液三次,分装,得到包被原,-20℃保存,备用。

[0060] 按合成香豆素偶联抗原反应所用半抗原、载体蛋白与偶联产物的比例,进行紫外(200 nm ~ 400 nm)扫描测定,通过比较三者分别在260 nm和280 nm的吸光值计算其结合比。偶联物香豆素半抗原-载体蛋白的最大吸收峰与香豆素半抗原、载体蛋白的最大吸收峰相比发生了明显的变化,表明香豆素半抗原-载体蛋白的合成是成功的。经计算,半抗原与BSA的结合比为16:1,与OVA的结合比为12:1。

[0061] 3、香豆素单克隆抗体的制备

[0062] (1)杂交瘤细胞的获得

[0063] 1)动物免疫:将香豆素半抗原-BSA偶联物(免疫原)与等量的弗氏完全佐剂充分乳化,皮下注射6周龄的Balb/c小鼠,每只0.2 mL;此后,每两周加强免疫一次,用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂,方法和剂量同首次免疫;

[0064] 2)最后一次加强免疫一周后眼底静脉采血测定香豆素抗体的效价和抑制作用,有抑制且效价达到1:10000以上时进行如下末次免疫:腹腔注射不加任何佐剂的免疫原溶液0.1 mL,三天后处死小鼠,取其脾脏淋巴B细胞与骨髓瘤细胞融合;

[0065] 3)细胞融合7 d后,用间接ELISA法检测抗体,选择抗体分泌阳性孔,用HT培养基扩大培养后,采用有限稀释法接种于96孔培养板内,选择单个细胞集落孔的培养上清做抗体检测,阳性者用同样方法再次克隆,直至克隆后有杂交瘤细胞生长的抗体分泌阳性率为100%,保存阳性细胞株。

[0066] (2)单克隆抗体的制备

[0067] 采用体内诱生法,将Balb/c小鼠(8周龄)腹腔注入灭菌石蜡油0.5 mL/只,7天后腹腔注射杂交瘤细胞 $5 \times 10^5$ 个/只,7天后采集腹水。用辛酸-饱和硫酸铵法进行纯化,得到香豆素单克隆抗体溶液(-20℃保存)。

[0068] (3)单克隆抗体效价的测定

[0069] 用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1: (200000~500000)。

[0070] 间接竞争ELISA方法:用香豆素半抗原-OVA偶联物包被酶标板,加入香豆素标准品

溶液、香豆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;测定OD<sub>450°</sub>。

[0071] (4)单克隆抗体特异性的测定

[0072] 将BSA和OVA均稀释至与香豆素半抗原-OVA相同浓度进行包被,再加入含抗体腹水,测试其结合显色情况。选择7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮等香豆素的结构类似物,将其等比稀释液替代香豆素稀释液,其他条件相同,做三次平行,测定它们与香豆素单克隆抗体之间的交叉反应率。以50%抑制的香豆素浓度与50%抑制的类似物浓度的百分比为其交叉反应率,反映单克隆抗体的特异性。

[0073]  $CR(\%) = [IC_{50}(\text{香豆素}) / IC_{50}(\text{类似物})] \times 100\%$

[0074] 实验结果显示,BSA、OVA均不与香豆素单克隆抗体发生反应,说明筛选获得的香豆素单克隆抗体特异性针对连接在载体蛋白上的香豆素抗原决定簇。下表列出了香豆素单克隆抗体与香豆素结构类似物的交叉反应性。从表1可以看出,香豆素单克隆抗体与7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮均无交叉反应。

[0075] 表1 香豆素单克隆抗体与香豆素类似物的交叉反应率

| 化合物                 | 交叉反应率/% |
|---------------------|---------|
| 7-乙氧基-4-甲基香豆素       | 4       |
| 二氢香豆酯               | 3.5     |
| 7-羟基香豆素             | 12      |
| 3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素) | 4.5     |
| 7-甲氧基香豆素            | 8.3     |
| 茛菪亭                 | 8       |
| 6,7-二甲氧基香豆素         | 7.2     |
| 7-甲基香豆素             | 6.3     |
| 环香豆素                | 7.5     |
| 香兰素                 | 2       |
| 黄樟素                 | 1       |
| 突厥烯酮                | 1       |

[0077] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0078] 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。

[0079] 5、香豆素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0080] (1)胶体金的制备

[0081] 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。

[0082] (2) 香豆素单克隆抗体-胶体金标记物的制备

[0083] 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香豆素单克隆抗体,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。

[0084] 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。

[0085] 6、结合物释放垫的制备

[0086] 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喷膜仪将制备好的香豆素单克隆抗体-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香豆素单克隆抗体-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。

[0087] 7、反应膜的制备

[0088] 将香豆素半抗原-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。

[0089] 包被过程:用磷酸缓冲液将香豆素半抗原-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。

[0090] 8、样品吸收垫的制备

[0091] 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。

[0092] 9、试纸条的组装

[0093] 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。

[0094] 实施例2 样品中香豆素的检测

[0095] 1、样品的前处理

[0096] 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  $\mu\text{L}$ 样本液与450  $\mu\text{L}$ 去离子水混匀后待检。

[0097] 2、用试纸条进行检测

[0098] 用移液器取待检样本溶液100  $\mu\text{L}$ 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。

[0099] 3、分析检测结果

[0100] 阴性(-):T线显色比C线显色深或与C线显色一致,表示样品中香豆素浓度低于检测限,如图2a、2b。

[0101] 阳性(+):T线显色比C线显色浅或T线不显色,表示样品中香豆素浓度等于或高于检测限,如图2c、2d。

[0102] 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。

[0103] 实施例3 样品检测实例

[0104] 1、检测限试验

[0105] 取空白烟草样品,在其中分别添加香豆素至终浓度为0.5、1、2 mg/kg,取试纸条进行检测,每个样本重复测定三次。

[0106] 用试纸条检测烟草样品时,当其中香豆素添加浓度为0.5 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;当其中香豆素添加浓度为1和2 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香豆素的检测限为1 mg/kg。

[0107] 2、假阳性率、假阴性率试验

[0108] 取已知香豆素含量大于1 mg/kg的烟草阳性样品20份,已知不含香豆素的烟草阴性样品20份,用三批试纸条进行检测,计算其阴阳性率。

[0109] 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。说明本发明的检测香豆素的试纸条可以对烟草中的香豆素进行快速检测。

[0110] 3、特异性试验

[0111] 将7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮等用pH7.2、0.2 mol/L的磷酸盐缓冲液稀释至500  $\mu\text{g/L}$ ,用香豆素试纸条进行检测。结果显示,用该试纸条检测500  $\mu\text{g/L}$  7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮时,试纸条T线显色比C线显色深或与C线显色一致,呈阴性,说明本试纸条对7-乙氧基-4-甲基香豆素、二氢香豆酯、7-羟基香豆素、3,3'-羰基双(7-二乙氨基香豆素)、7-甲氧基香豆素、茛菪亭、6,7-二甲氧基香豆素、7-甲基香豆素、环香豆素、香兰素、黄樟素、突厥烯酮无交叉反应。

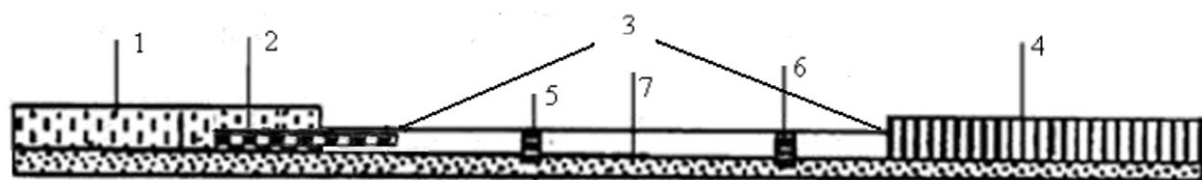


图1

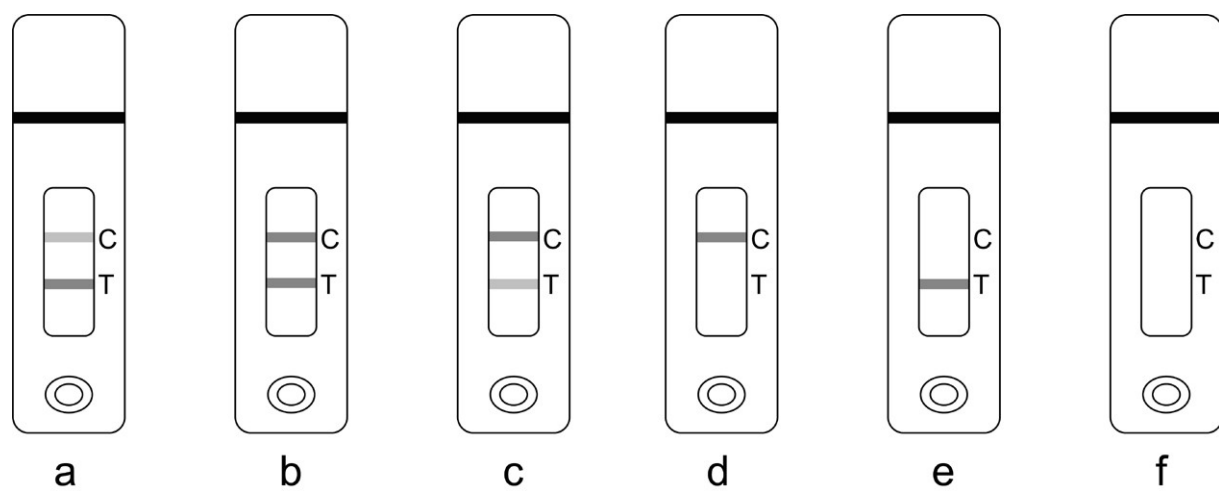


图2

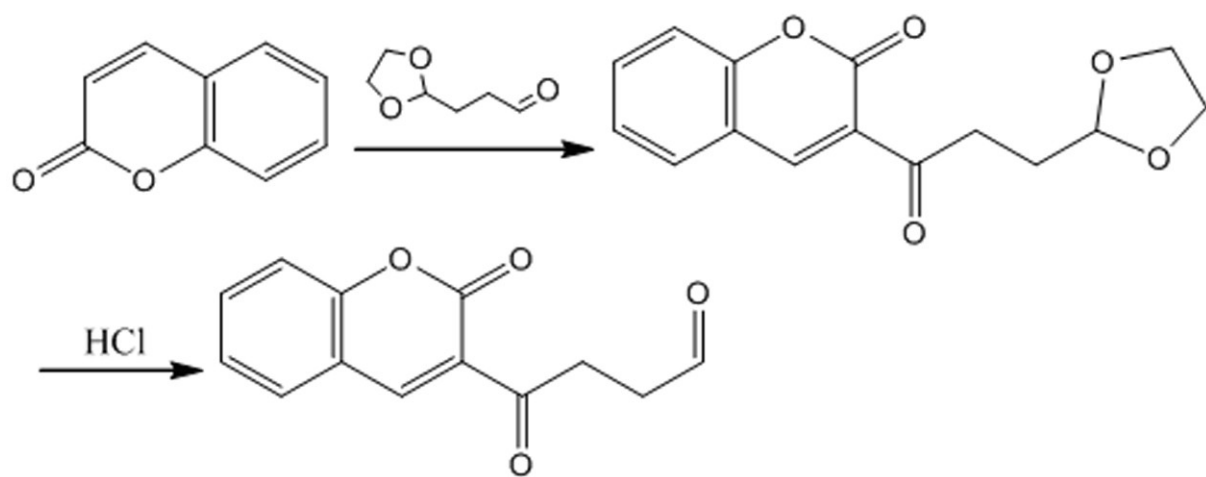


图3