



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105353095 B

(45)授权公告日 2017. 10. 20

(21)申请号 201510782599.3

(22)申请日 2015.11.16

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105353095 A

(43)申请公布日 2016.02.24

(73)专利权人 华南农业大学
地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

(72)发明人 沈玉栋 邓丽华 朱彬 杨金易
李瑞婷 徐振林 王弘 雷红涛
孙远明

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102
代理人 林丽明

(51)Int.Cl.

C07D 487/04(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

CN 101914155 A,2010.12.15,

CN 101914155 A,2010.12.15,

EP 1178316 A1,2002.02.06,

CN 104502554 A,2015.04.08,

CN 103837612 A,2014.06.04,

李瑞婷等.直接竞争酶联免疫吸附法用于
糖浆类保健食品中西地那非检测的研究.《食品
工业科技》.2014,第35卷(第24期),

审查员 段晓露

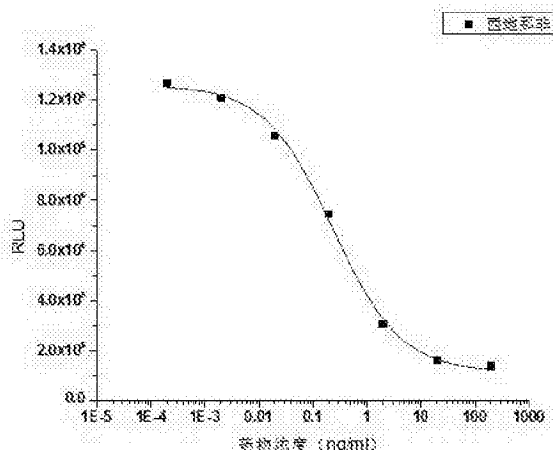
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

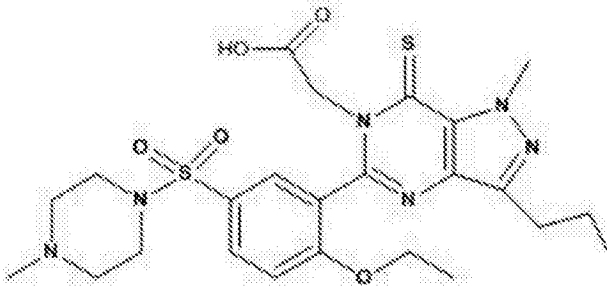
一种西地那非及其结构类似物的免疫检测
方法

(57)摘要

本发明属于免疫检测技术领域,公开了一种
西地那非及其结构类似物的免疫检测方法,即以
巯基西地那非半抗原制备人工抗原,再制备得到
抗体,并用于检测西地那非及其结构类似物,该
方法克服了现有检测西地那非技术的缺陷和步
骤,对西地那非的最大检测范围为0.024~1.21
ng/mL,灵敏度为0.17 ng/mL,检出限为0.008
ng/mL,回收率为86.0~90.8%,该方法检测快速、
大大缩短了检测时间,不考虑检测人员操作熟练
程度的影响,整个检测过程仅仅需要80min左右
即可完成,且检出限更低、灵敏度更高。

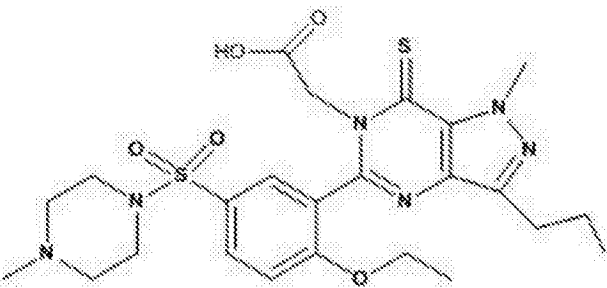


1. 式 (I) 所示结构的物质在免疫检测西地那非及其结构类似物中的应用; 所述西地那非的结构类似物为瓦地那非、巯基西地那非、蒙莫西地那非、那莫西地那非、硫代艾地那非、去甲西地那非、异丙氧基硫代艾地那非、羟基蒙莫西地那非、羟基巯基蒙莫西地那非、羟基硫代瓦地那非、去乙基瓦地那非、乌地那非、巯基蒙莫西地那非; 所述式 (I) 结构如下:



(I)。

2. 式 (I) 所示结构的物质在制备免疫检测西地那非及其结构类似物的制剂中的应用; 所述西地那非的结构类似物为瓦地那非、巯基西地那非、蒙莫西地那非、那莫西地那非、硫代艾地那非、去甲西地那非、异丙氧基硫代艾地那非、羟基蒙莫西地那非、羟基巯基蒙莫西地那非、羟基硫代瓦地那非、去乙基瓦地那非、乌地那非、巯基蒙莫西地那非; 所述式 (I) 结构如下:



(I)。

3. 根据权利要求1或2所述的应用, 其特征在于, 式 (I) 结构的物质的制备方法为: 称取巯基西地那非0.49g, 加入无水碳酸钾0.5g, 加入3~5ml除水后的DMF, 加入少量碘化钾做催化剂, 然后加入0.18g的溴乙酸甲酯先溶于5~10mLDMF中, 反应半小时后, 用浓盐酸调pH至1, 终止反应, 旋转蒸干DMF, 出现黄色浓稠油状物质, 用乙醚和蒸馏水各10mL溶解黄色油状物, 用乙醚萃取至少3次取水层, 将水层边摇动边滴加强的氢氧化钠溶液, 用浓NaOH滴加至白色沉淀不再增加为止, pH为11, 用二氯甲烷将沉淀溶解并萃取, 萃取至少3次后取二氯甲烷层蒸干, 得到具有黏性白色结晶物, 取0.1g该白色结晶物, 用3:2的THF/H₂O溶解, 加LiOH 0.1g, 45℃下水浴搅拌回流反应过夜, 50℃旋转蒸干THF后用盐酸缓慢调节pH至4.5, 用乙酸乙酯反复萃取后将有机层蒸干, 用硅胶柱洗脱纯化, 蒸干, 得到终产物, 呈粉红色结晶颗粒。

4. 一种检测西地那非及其结构类似物的免疫检测方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

S1. 将具有式 (II) 所示分子结构的巯基西地那非人工抗原作为免疫原免疫动物制备巯基西地那非抗体, 并与标记酶结合制备得到酶标抗体;

S2. 将具有式 (III) 所示分子结构的巯基西地那非人工抗原作为包被原包被在微孔板上; 采用直接竞争化学发光酶联免疫法测定样品中西地那非及其结构类似物的含量;

一种西地那非及其结构类似物的免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测技术领域,更具体地,涉及一种西地那非及其结构类似物的免疫检测方法。

背景技术

[0002] 西地那非为PDE-5抑制剂,用于治疗男性勃起功能障碍,属于处方药。然而,一些保健食品生产企业为突出产品的功效,违法在保健食品中添加化学药物,如在抗疲劳产品中非法添加枸橼酸西地那非、他达拉非、伐地那非等,对消费者身体健康构成严重威胁。

[0003] 目前市场的补肾壮阳类、抗疲劳类保健食品违法添加了化学药品的现象可谓是触目惊心。添加的成分主要为:西地那非、他达拉非、伐地那非,其中以非法添加西地那非较常见。2006年3月下旬查处的7种保健食品中有2种添加西地那非,5种添加了他达拉非;2012年山西药监局公布的10种禁售保健食品中,7种含有PDE-5抑制剂,分别为西地那非,他达拉非;2013年1月上海公布的8种禁售的保健食品中,5种含有PDE-5抑制剂,分别为西地那非、伐地那非、他达拉非、豪莫西地那非。与此同时,北京、江苏无锡、安徽铜陵、江苏南通、南京、重庆、湖南衡阳等地的食品药品监督部门在当地的补肾、壮阳、抗疲劳保健食品抽检中均检出西地那非等PDE-5抑制剂;不仅如此,还有一些尚未被批准的西地那非的结构类似物被非法添加在保健食品、能量饮料、中草药中。

[0004] 在不知情的情况下服用了添加西地那非及其结构类似物的保健食品极易引发毒副作用,会出现头晕、昏晕、甚至青光眼,造成对肾功能、心脏功能、心血管疾病的严重损害。长期服用,还会导致食用者勃起不倒,伤及阴部肌肉组织,甚至加重阳痿,甚至变为永久性阳痿。国内已有内服枸橼酸西地那非后死亡报道。因此对西地那非及其结构类似物建立一种快速、有效的检测方法显得尤为重要。

[0005] 西地那非及其结构类似物的检测最常使用的方法为仪器分析法,沈志武等(2008)利用高效液相色谱法测定了保健食品中他达拉非、西地那非、伐地那非的含量;他达拉非和西地那非的检出限为0.3 mg/L,伐地那非的检出限为0.4 mg/L,回收率为95.8~107.0%。国内进出口行业标准(SN/T 1951-2007)中已把HPLC-MS法作为进出口保健食品中西地那非、他达拉非、伐地那非的检测方法之一。该方法在片剂、胶囊剂中对三者的测定低限为1.0 μg/mg,回收率在83.8~101%之间;口服溶液剂中对三者的测定低限为0.01 μg/mL,回收率在94.5~108%之间。虽然上述几种仪器分析法的检测精确度高,但因其仪器化程度高、检测时间长、过程繁琐、检测费用昂贵等,从而阻碍了其推广应用,因而通常作为实验室确证方法,但是无法满足现场或者大批量的快速筛查检测。而免疫分析法因成本低、操作简单、速度快、一次检测样本量大、仪器化程度低,值得我们推广成为常用的筛选方法,现有技术中缺乏一种抗体同时检测西地那非及其结构类药物的免疫方法。

发明内容

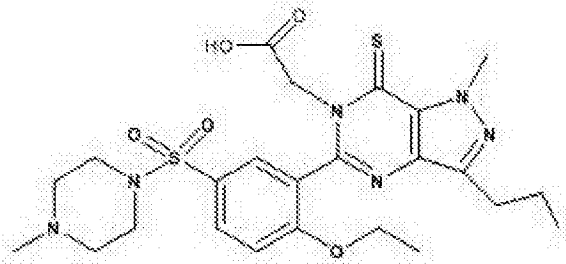
[0006] 本发明要解决的技术问题克服现有技术存在的上述问题,提供一种西地那非及其

结构类似物的免疫检测方法。

[0007] 本发明的目的是通过以下技术方案予以实现的：

[0008] 式(I)所示结构的物质在检测西地那非及其结构类似物中的应用；所述西地那非的结构类似物为瓦地那非、巯基西地那非、蒙莫西地那非、那莫西地那非、硫代艾地那非、去甲西地那非、异丙氧基硫代艾地那非、羟基豪莫西地那非、羟基巯基蒙莫西地那非、羟基硫代瓦地那非、去乙基瓦地那非、乌地那非、巯基蒙莫西地那非、乌地那非、巯基蒙莫西地那非；所述式(I)结构如下：

[0009]



[0010]

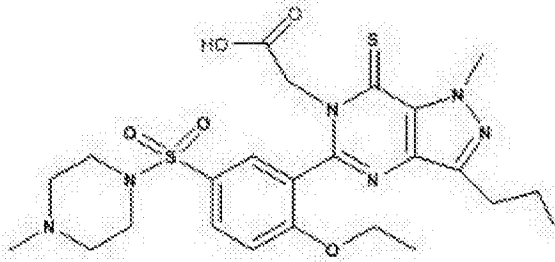
(I)。

[0011] 首先将巯基西地那非抗原包被于固相载体(化学发光酶标板)上,然后加入标准品溶液或待测样品,再加入酶标记的巯基西地那非抗体,包被抗原与待测样品中的西地那非及其结构类似物竞争酶标抗体,待测样品中西地那非及其结构类似物含量高时,则与固相抗原结合的酶标抗体就少,反之结合在固相抗原上的酶标抗体就多,反应后加入发光液加以测定,当酶标抗体量一定时,加入的待测样品含西地那非及其类似物越多,与固相抗原结合酶标抗体就越少,发光反应减弱,百分发光值低,反之,则发光反应增强,百分发光值增高,因而根据百分发光值与西地那非浓度之间的半对数关系作图即得标准曲线,并推算出带刺样品中西地那非的浓度,其他与西地那非的结构类似物是根据它们对西地那非的交叉反应率推算其实际浓度。发明人通过研究发现,利用巯基西地那非制备人工抗原免疫动物后制备得到的抗体检测西地那非及其结构类似物时,效果更好。

[0012] 本领域公知,酶联免疫检测方法的关键在于抗原和抗体的设计与选择,以及灵敏度的高低,而灵敏度受检测过程中的每一个环节的制约,如何设计合适的抗原和抗体及其制备方法,如何选择检测方法及协调每一步骤从而达到最优效果,是酶联免疫检测方法建立的技术难题所在,本发明为了克服现有技术的缺陷,总结出一套优化的西地那非及其结构类似物的直接化学发光酶联免疫检测方法。

[0013] 本发明还提供式(I)所示结构的物质在制备检测西地那非及其结构类似物的制剂中的应用；所述西地那非的结构类似物为瓦地那非、巯基西地那非、蒙莫西地那非、那莫西地那非、硫代艾地那非、去甲西地那非、异丙氧基硫代艾地那非、羟基豪莫西地那非、羟基巯基蒙莫西地那非、羟基硫代瓦地那非、去乙基瓦地那非、乌地那非、巯基蒙莫西地那非、乌地那非、巯基蒙莫西地那非；所述式(I)结构如下：

[0014]



[0015]

(I)。

[0016] 本发明还提供上述半抗原的制备方法,是按质量比1:0.8~1.2将巯基西地那非及无水碳酸钾置于反应器中,用无水DMF溶解,然后加入与巯基西地那非摩尔比1:1~1.4的溴乙酸甲酯反应30~40min后,终止反应,旋转蒸干DMF,用乙醚和蒸馏水(1:1,v/v)溶解残渣,萃取后即得。

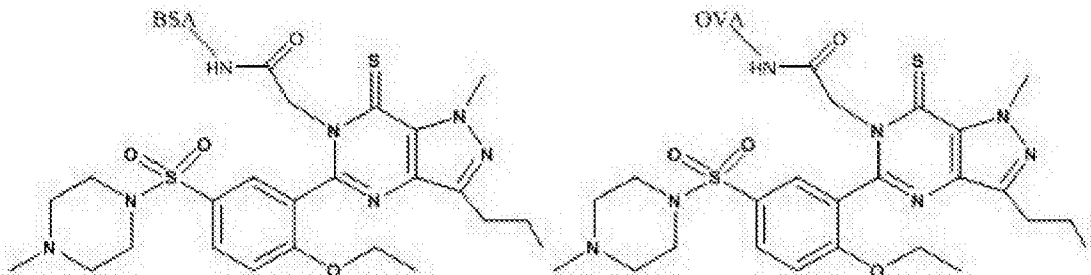
[0017] 具体的,所述萃取是:用乙醚和蒸馏水(1:1,v/v)溶解残渣后,先乙醚萃取,水层用浓NaOH调节pH,用二氯甲烷将沉淀溶解并萃取,二氯甲烷层蒸干,得到具有黏性白色结晶物,取该白色结晶物,用THF/H₂O(3:2)溶解,加与该结晶物摩尔比1:1~1.4的LiOH,45℃反应过夜,蒸干THF,用盐酸缓慢调节pH至4.5,用乙酸乙酯反复萃取后将有机层蒸干即得。

[0018] 本发明还提供一种检测检测西地那非及其结构类似物的免疫检测方法,包括以下步骤:

[0019] S1. 将具有式(II)所示分子结构的巯基西地那非人工抗原作为免疫原免疫动物制备巯基西地那非抗体,并与标记酶结合制备得到酶标抗体;

[0020] S2. 将具有式(III)所示分子结构的巯基西地那非人工抗原作为包被原包被在微孔板上;采用直接竞争化学发光酶联免疫法测定样品中西地那非及其结构类似物的含量。

[0021]



[0022]

(II)

(III)

[0023] 优选地,本发明所述免疫检测方法包括以下步骤:

[0024] S1. 将具有式(II)所示分子结构的巯基西地那非人工抗原作为免疫原免疫动物制备巯基西地那非多克隆抗体;采用过碘酸钠法与辣根过氧化物酶偶联制备辣根过氧化物酶标记的巯基西地那非酶标抗体;

[0025] S2. 将具有式(III)所示分子结构的巯基西地那非人工抗原作为包被原包被在酶标板上;

[0026] S3. 配制西地那非标准品溶液和化学发光液、浓缩洗涤液;采用直接竞争化学发光酶联免疫法测定样品中西地那非类药物的含量。

[0027] 所述包被有巯基西地那非人工抗原的化学发光酶标板是96孔或40孔可拆不透明酶标板,材质为聚苯乙烯,包被有能与抗西地那非抗体特异性结合的西地那非抗原,并封闭

微孔表面未吸附西地那非抗原的位点。

[0028] 另外,可以作为固定西地那非抗原固相载体的物质较多,例如聚苯乙烯、硝酸纤维素、聚乙烯、聚丙烯、聚丙烯酰胺、交联葡萄糖、硅橡胶、琼脂糖凝胶等。该载体的形式可以为凹孔、纸片、小珠等。

[0029] 所述包被有巯基西地那非人工抗原的化学发光酶标板的制备方法为:用包被液将巯基西地那非抗原按需要稀释,向发光板微孔中加入包被液,放入37℃环境进行孵育过夜,倾去包被液,用洗涤液洗涤,然后在每孔中加入封闭液,37℃孵育,倾去孔内液体,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0030] 优选地,所述包被液优选为按比例将1.69g碳酸钠和2.95g碳酸氢钠溶于1L双蒸水中得到,巯基西地那非抗原的包被浓度为41.67 ng/mL;封闭液为取0.1g BSA(牛血清白蛋白)、5g甘氨酸、5g蔗糖溶于100mL PBS(0.01mol/L pH7.4)溶液得到。

[0031] 所述的巯基西地那非酶标抗体制备方法如下:

[0032] (1)所用的免疫原为采用活泼酯法将巯基西地那非半抗原与载体蛋白共价偶联合成得到,以免疫原免疫动物,制备西地那非多克隆抗体,最后收集抗血清,用辛酸硫酸铵沉淀纯化及过亲和层析柱进行纯化得到西地那非多克隆抗体;

[0033] (2)采用过碘酸钠法将标记酶与巯基西地那非抗体进行偶联;所用标记酶为辣根过氧化物酶,原浓度为1mg/mL,辣根过氧化物酶优选使用浓度为0.01 mol/L(用磷酸盐吐温缓冲液稀释5000倍)。

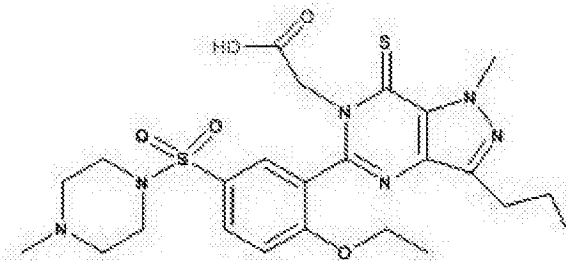
[0034] 所述西地那非标准品溶液的浓度为1mg/mL,使用时用0.01 mol/L PBS缓冲液将标准品溶液稀释成浓度为0、0.0002、0.002、0.02、0.2、2、20、200 ng/mL的一系列西地那非标准品溶液。

[0035] 所述化学发光液由A液和B液组成;A液的配制方法为:将对碘苯酚、鲁米诺、Tris溶于去离子水,用盐酸调pH至8.2~8.6得到;优选为调pH至8.4;B液的配制方法为:将体积分数0.40%的 H₂O₂Tris溶于去离子水,用盐酸调pH至6.8~7.2得到;优选为调pH至7.0;使用时将A液和B液按体积比1:1的比例混合。

[0036] 所述浓缩洗涤液为含有体积浓度0.5% Tween20的pH7.4,0.4mol/L的磷酸盐缓冲液;所述浓缩洗涤液为20倍浓缩洗涤液,使用时用去离子水稀释成1倍洗涤液。

[0037] 优选地,上述免疫检测方法中,式(II)和式(III)所示分子结构的巯基西地那非人工抗原是由式(I)所示分子结构的巯基西地那非半抗原和载体蛋白偶联得到。

[0038]



(I)

[0039]

[0040] 更优选地,所述载体蛋白选自牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或人血蓝蛋白。

[0041] 本发明还提供了上述方法在检测样品中西地那非及其结构类似物中的应用;所述样品为保健食品或保健药品。

[0042] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0043] 本发明提供了一种西地那非及其结构类似物的免疫检测方法,即以巯基西地那非半抗原制备人工抗原,并制备得到抗体,用于检测西地那非及其结构类似物,该方法克服了现有检测西地那非技术的缺陷和步骤,对西地那非的最大检测范围为0.024~1.21 ng/mL,灵敏度为0.17 ng/mL,检出限为0.008 ng/mL,回收率为86.0~90.8%,该方法检测快速、大大缩短了检测时间,不考虑检测人员操作熟练程度的影响,整个检测过程仅仅需要80min左右即可完成,且检出限更低、灵敏度更高。

附图说明

[0044] 图1为巯基西地那非人工抗原紫外全波长扫描图。

[0045] 图2为西地那非标准曲线。

具体实施方式

[0046] 下面结合说明书附图和具体实施例进一步说明本发明的内容,但不应理解为对本发明的限制。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的简单修改或替换,均属于本发明的范围;若未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0047] 具体实施方式中所使用试剂的制备方法如下:

[0048] 包被液:将1.69g碳酸钠和2.95g碳酸氢钠溶于1L双蒸水中得到。

[0049] 20倍浓缩洗涤液:包含有体积分数0.5% Tween20的pH7.4 0.4mol/L的磷酸盐缓冲液,使用时用去离子水稀释成1倍。

[0050] PBS:取5.8g氯化钠,2.9g十二水合磷酸氢二钠,0.2g磷酸二氢钾和0.2g氯化钾溶于1L双蒸馏水中得到。

[0051] 封闭液:取0.1g BSA(牛血清白蛋白)、5g甘氨酸、5g蔗糖溶于100mL PBS溶液(0.01mol/L pH7.4)得到。

[0052] 西地那非标准品溶液:用N,N-二甲基甲酰胺将西地那非标准品稀释成1mg/mL备用;再用0.01 mol/L PBS缓冲液将西地那非标准品稀释成浓度分别为0、0.0002、0.002、0.02、0.2、2、20、200 ng/mL的西地那非标准品溶液,4℃保存。

[0053] 化学发光液:化学发光液由A液和B液组成,A液为将20mg对碘苯酚、8mg鲁米诺、1.21gTris溶于100mL去离子水,用盐酸调pH至8.2~8.6得到;B液为将体积分数0.40%的H₂O₂、1.21g的Tris溶于100mL去离子水,用盐酸调pH至6.8~7.2得到;使用时将A液和B液按体积比1:1的比例混合。

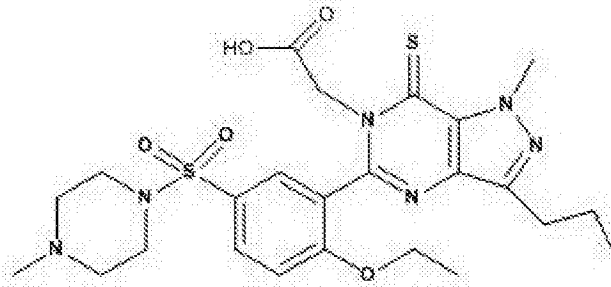
[0054] 实施例1半抗原、人工抗原及抗体的制备

[0055] 1、半抗原的合成

[0056] 称取巯基西地那非0.49 g,加入无水碳酸钾0.5 g,加入3~5ml除水后的DMF,加入少量碘化钾做催化剂,然后加入0.18g的溴乙酸甲酯先溶于5~10mLDMF中,反应半小时后,用浓盐酸调pH至1,终止反应,旋转蒸干DMF,出现黄色浓稠油状物质,用乙醚和蒸馏水各10mL溶解黄色油状物,用乙醚萃取至少3次取水层,将水层边摇动边滴加强的氢氧化钠溶液,用浓NaOH滴加至白色沉淀不再增加为止,pH大概在11左右,用二氯甲烷将沉淀溶解并萃

取, 萃取至少3次后取二氯甲烷层蒸干, 得到具有黏性白色结晶物, 取0.1g该白色结晶物, 用 THF/H₂O (3:2) 溶解, 加LiOH 0.1g, 45℃下水浴搅拌回流反应过夜, 50℃旋转蒸干THF后用盐酸缓慢调节pH至4.5, 用乙酸乙酯反复萃取后将有机层蒸干, 用硅胶柱洗脱纯化, 蒸干, 得到终产物, 呈粉红色结晶颗粒。

[0057]

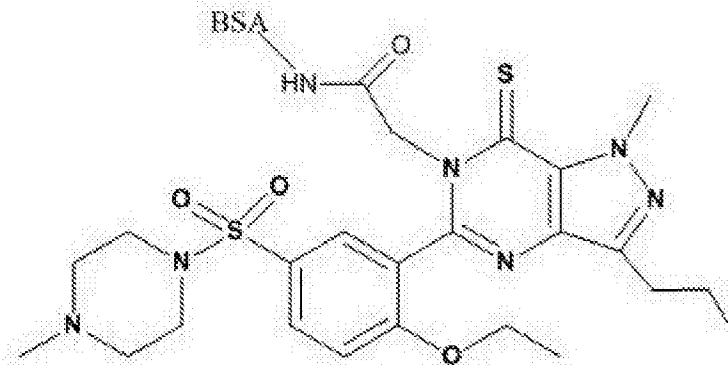


[0058] 式I 半抗原结构式

[0059] 2、人工抗原的合成

[0060] 称取步骤1制备得到的半抗原0.02 mmol溶于0.4 mL DMF中, 边搅拌边加入5.0 mg DCC和3.0 mg NHS, 4℃下磁力搅拌反应过夜, 离心后上清液为A液。称取OVA 9 mg 或 BSA 11.6 mg溶于10 mL 0.1mol/L PBS (pH8.0) 中, 搅拌溶解制备B液, 磁力搅拌下, A 液逐滴滴入B液中, 4℃下反应12h。4℃下用PBS透析3d, 每天更换3次透析液, 得到全抗原以浓度为1mg/mL分装于0.5mL离心管中, 冻存于-20℃冰箱中, 紫外扫描证实偶联成功, 偶联后的紫外全波长扫描图如图1所示, 制备得到两种抗原, 结构如式 II 和式 III。

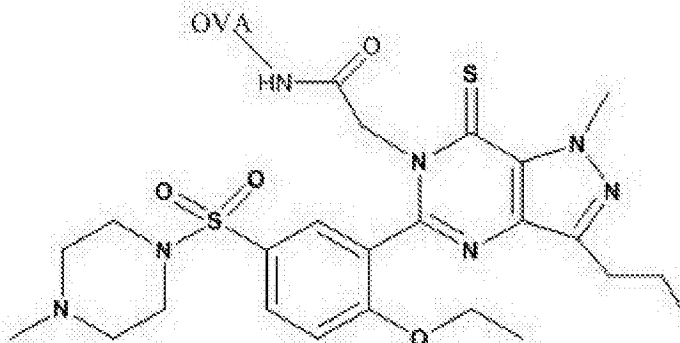
[0061]



[0062]

式 II

[0063]



[0064]

式 III

[0065] 3、巯基西地那非兔多克隆抗体的制备

[0066] 采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以巯基西地那非半抗原与载体蛋白BSA的偶联

物为免疫原对新西兰大白兔进行免疫,多次免疫后测定血清抗体效价,心脏采血,经辛酸-硫酸铵分级沉淀及蛋白A层析柱得到纯化的多克隆抗体。

[0067] 4、酶标巯基西地那非多克隆抗体的制备

[0068] 将巯基西地那非多克隆抗体与辣根过氧化物酶(HRP)采用过碘酸钠法进行偶联。具体方法为:

[0069] (1)溶解5mg的HRP于1mL超纯水中,加入新配置的0.1mol/L过碘酸钠75 μ L,置室温或4 $^{\circ}$ C冰箱反应20min或30min。

[0070] (2)反应完后装入透析袋,加入0.001mol/L pH4.0醋酸缓冲溶液,4 $^{\circ}$ C透析过夜,期间需更换几次透析液(透析液为PBS溶液:称取8.5g NaCl,2.9g Na₂HPO₄·12H₂O,0.2g KCl,0.2g KH₂PO₄,用去离子水定容至1L)。

[0071] (3)将抗体用0.1mol/L碳酸缓冲液稀释至10mg/mL,另外用0.1mol/L碳酸缓冲液将活化好的HRP的溶液pH调至9.5。将0.5mL抗体加入HRP溶液中,置室温或4 $^{\circ}$ C冰箱反应2h。

[0072] (4)加入100 μ L的4mg/mL硼氢化钠,4 $^{\circ}$ C冰箱反应2h。

[0073] (5)用0.01mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)透析过夜,加入保存液(甘油)-20 $^{\circ}$ C保藏备用。

[0074] 实施例2直接竞争化学发光酶联免疫检测方法

[0075] 1、检测方法包括以下步骤:

[0076] (1)将式III所示分子结构的巯基西地那非抗原包被在微孔板上,包被抗原用包被液稀释至41.67 ng/mL,每孔内加入100 μ L包被液,37 $^{\circ}$ C孵育过夜,倾去孔内液体,洗涤液洗涤2次,拍干。然后每孔中加入120 μ L封闭液,37 $^{\circ}$ C孵育3h,倾去孔内液体,置于37 $^{\circ}$ C烘箱中烘干后。

[0077] (2)用0.01 mol/L PBS缓冲液将西地那非标准品稀释成浓度分别为0、0.0002、0.002、0.02、0.2、2、20、200 ng/mL的西地那非标准品溶液。

[0078] (3)取步骤(1)包被好的微孔板,在标准孔加入50 μ L不同浓度的西地那非标准品溶液,样品孔加入50 μ L待测样品,然后每孔加入50 μ L稀释好的巯基西地那非酶标抗体,盖上盖板膜在微量振荡器上振摇10 min后,置于37 $^{\circ}$ C孵育40 min。

[0079] (4)吸除板孔中的反应液,各孔加入洗涤液约300 μ L,静置20秒左右,除去其中液体,如此共洗5次,最后一次将板拍干;也可用自动洗板机洗板5次,洗完后将微孔架倒置在吸水纸上拍打以保证完全除去孔中的液体。

[0080] (5)每孔加入100 μ L A液与B液等体积混合后的化学发光液,轻拍混匀,盖上盖板膜,1~2min后用化学发光免疫分析仪测定各孔的发光值RLU,保存数据;

[0081] 2、检测结果计算与分析

[0082] 抑制率(%)=B/B₀×100(%),式中:B为不同浓度标准品溶液孔(或待测样品孔)的发光值;B₀为0浓度标准品溶液发光值。

[0083] 以抑制率为纵坐标,西地那非标准品溶液浓度的对数为横坐标绘制标准曲线,以西地那非的发光值代入上述标准曲线中求出待测样品中西地那非的含量。不考虑检测人员操作熟练程度的影响,整个检测过程仅仅需要80min左右即可完成。检测结果的分析还可以利用计算机专业软件进行计算与分析。

[0084] 3、标准曲线

[0085] 通过对标准品溶液的检测结果分析得到西地那非标准曲线图(如图2所示),表明了本发明上述方法对西地那非的线性检测范围线性范围为0.024~1.21 ng/mL;检测限为0.008 ng/mL,灵敏度为0.17 ng/mL。

[0086] 实施例3实施例2所述免疫检测方法的应用及精密度、准确度试验

[0087] 检测方法同实施例2。

[0088] 1、待测样品前处理

[0089] 对于基质相对简单的口服溶液类样品,前处理方法采用二氯甲烷提取法:准确吸取液体样品1 mL于50 mL离心管中,添加10 mL二氯甲烷,漩涡震荡5 min,超声10 min,4000 rpm离心5 min后取上清,经无水硫酸钠脱水后,于25 mL梨形瓶中,40℃真空旋转蒸发蒸干,用1mL甲醇溶液复溶后后稀释10倍,备用。

[0090] 对于基质复杂的胶囊、片剂类样品,胶囊类样品先去除胶囊壳,片剂、丸剂样品去除糖衣,研细,备用。前处理方法采用液-液分配提取法:准确称取研细的样品1.0 g于50 mL离心管中,添加5 mL pH 5~6 盐酸水溶液,漩涡震荡5 min,超声10 min,4000 rpm离心5 min后取上清,调节pH至9,添加二氯甲烷10 mL萃取,漩涡震荡5 min,超声10 min,4000 rpm离心5 min,反复萃取三次,合并有机层,经无水硫酸钠脱水后,于50 mL梨形瓶中,40℃真空旋转蒸发蒸干,用1 mL甲醇溶液复溶后后稀释20倍,备用。

[0091] 2、添加回收实验

[0092] 本发明以西地那非为例进行样品添加回收实验。选择口服溶液、片剂、胶囊三种比较经常被违法添加西地那非等的保健食品样品,添加量如表2所示,添加高、中、低三个水平,添加量在dcCLE1A线性范围内。口服溶液用甲醇提取法处理,片剂、胶囊样品经液-液分配提取法处理后,直接用dcCLE1A每个样品测定三次,取平均值,结果如表1所示。

表1 保健食品中西地那非的添加回收试验 (n=3)

样品	西地那非			
	添加量 ng/g	回收量 ng/g	回收率%	变异系数%
口服溶液	0.5	0.43	86	9.8
	5	4.4	88	10.1
	10	9.2	92	8.5
平均			88.7	9.5
片剂	1	1.12	112	8.6
	10	5.7	114	7.9
	20	8.9	89	10.2
平均			105	8.9
胶囊	1	0.82	82	11.5
	10	9.6	96	10.4
	20	21.0	105	10.2
平均			94.3	10.7

[0093]

[0094] 由表1可知,本发明对保健食品中西地那非的最低回收率为82%,最高回收率为114%,平均回收率在88.7~105%之间;最低变异系数为7.9%,最高变异系数为11.5%,平均变异系数在8.9~10.7%之间。以上结果说明本发明所提供的检测方法具有良好的重复性和准确性。

[0095] 实施例4 交叉反应

[0096] 通过对西地那非的结构类似物瓦地那非、蒙莫西地那非、那莫西地那非、硫代艾地那非、伪瓦地那非、去甲西地那非、异丙氧基硫代艾地那非、羟基豪莫西地那非、羟基巯基蒙莫西地那非、羟基硫代瓦地那非、去乙基瓦地那非、乌地那非、巯基蒙莫西地那非、乌地那非、巯基西地那非、巯基蒙莫西地那非等进行交叉反应率的测定,具体操作同标准曲线的绘制。交叉反应率计算公式为:

[0097] 交叉反应率(%)=1C₅₀半抗原/1C₅₀竞争物*100%

[0098] 交叉反应结果表2所示:

表 2 西地那非结构及功能类似物交叉反应结果

药物名称	IC ₅₀ (ng/mL)	交叉反应率 (%)
西地那非	0.170	100.0
瓦地那非	0.350	48.5
巯基西地那非	0.174	97.8
蒙莫西地那非	0.201	84.5
那莫西地那非	0.183	92.7
硫代艾地那非	0.248	68.4
去甲西地那非	0.161	105.6
异丙氧基硫代艾地那非	0.191	89.2
羟基蒙莫西地那非	0.173	98.3
羟基巯基蒙莫西地那非	0.195	87.4
羟基硫代瓦地那非	0.279	61.0
去乙基瓦地那非	0.298	57.0
乌地那非	0.215	79.2
巯基蒙莫西地那非	0.158	107.4

[0099]

[0100] 由表2可知,本发明对西地那非及其类似物均有一定的交叉,所以本发明适合于保健食品中西地那非及其类似物的广谱性检测。

[0101] 对比例1

[0102] 1、半抗原、人工抗原及抗体的制备

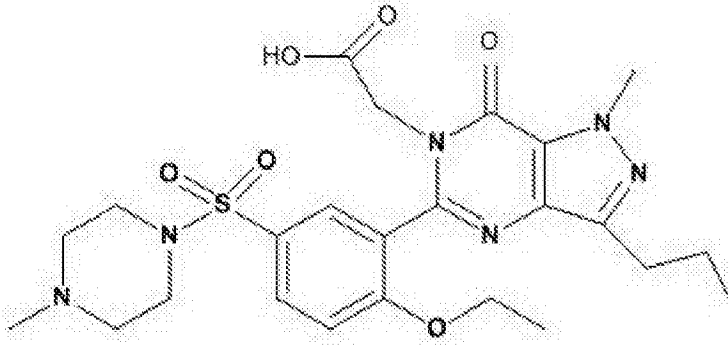
[0103] 实验方法同实施例1,唯一不同的是,所用的原料为西地那非,制备得到的半抗原为式4所示,人工抗原如式5和式6所示。

[0104] 再利用式5所示人工抗原免疫新西兰大白兔制备多克隆抗体(方法同实施例1);再利用制备得到的多克隆抗体与HRP结合制备得到酶标抗体。

[0105] 2、免疫检测方法

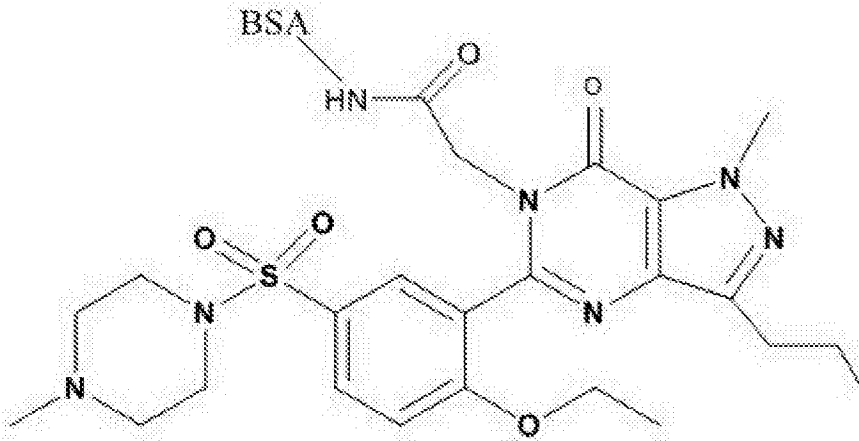
[0106] 将式6所示结构作为包被原,免疫检测方法同实施例2,酶标抗体为本对比例制备得到的酶标抗体,结果表明:利用本对比例的免疫检测方法对西地那非的线性检测范围线性范围为0.6~8.2ng/mL;检测限为0.054ng/mL,灵敏度为1.56ng/mL。

[0107]



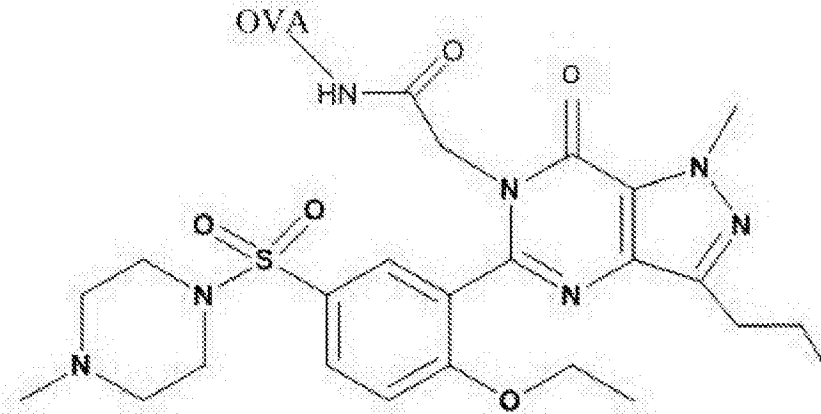
式 4

[0108]



式 5

[0109]



式 6

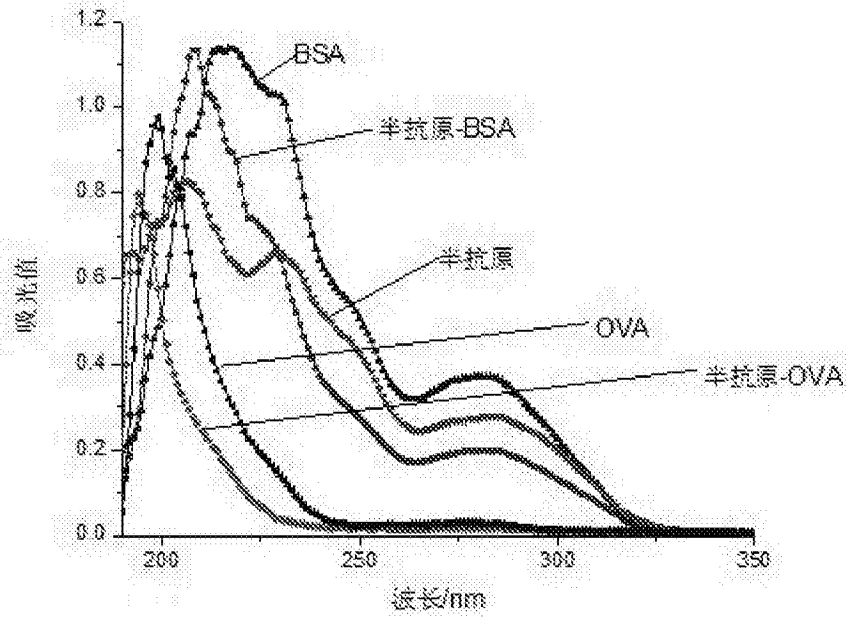


图1

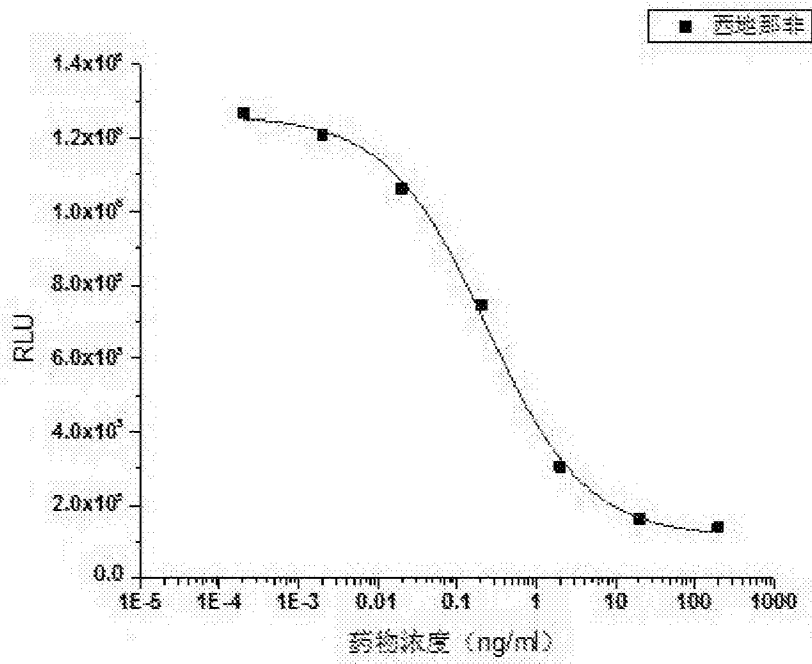


图2

专利名称(译)	一种西地那非及其结构类似物的免疫检测方法		
公开(公告)号	CN105353095B	公开(公告)日	2017-10-20
申请号	CN201510782599.3	申请日	2015-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	沈玉栋 邓丽华 朱彬 杨金易 李瑞婷 徐振林 王弘 雷红涛 孙远明		
发明人	沈玉栋 邓丽华 朱彬 杨金易 李瑞婷 徐振林 王弘 雷红涛 孙远明		
IPC分类号	C07D487/04 G01N33/53		
代理人(译)	林丽明		
审查员(译)	段晓露		
其他公开文献	CN105353095A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫检测技术领域，公开了一种西地那非及其结构类似物的免疫检测方法，即以巯基西地那非半抗原制备人工抗原，再制备得到抗体，并用于检测西地那非及其结构类似物，该方法克服了现有检测西地那非技术的缺陷和步骤，对西地那非的最大检测范围为0.024~1.21 ng/mL，灵敏度为0.17 ng/mL，检出限为0.008 ng/mL，回收率为86.0~90.8%，该方法检测快速、大大缩短了检测时间，不考虑检测人员操作熟练程度的影响，整个检测过程仅仅需要80min左右即可完成，且检出限更低、灵敏度更高。

