

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610011570.6

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

[45] 授权公告日 2010年1月20日

[11] 授权公告号 CN 100582779C

[22] 申请日 2006.3.28

[21] 申请号 200610011570.6

[73] 专利权人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

[72] 发明人 宓捷波 闫瑾 徐菁 赵美萍

[56] 参考文献

CN1657938A 2005.8.24

WO9610179A1 1996.4.4

酶联免疫吸附法检测罂粟碱研究(II)看体制备和酶标抗原合成. 赵春城等. 中国卫生检验杂志, 第13卷第1期. 2003

审查员 边昕

[74] 专利代理机构 北京君尚知识产权代理事务所
(普通合伙)

代理人 董琬雯

权利要求书2页 说明书11页

[54] 发明名称

罂粟碱的酶联免疫定量检测方法及其试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种定量检测罂粟碱的酶联免疫分析方法,以罂粟碱的甲氧基苯环连接载体蛋白制成免疫全抗原并获得其高效价抗体为基础,用罂粟碱的甲氧基苯环连接另一载体蛋白制成的包被全抗原包被酶标板,封闭后,加入所述高效价抗体与试验样品液进行竞争性结合反应,然后加入酶标二抗,显色,检测罂粟碱的存在。通过定量检测吸光度值还可以进一步确定罂粟碱的含量。本发明还提供了一种依据该方法制备的简便易行的试剂盒。由于本发明采用了全新的全抗原合成方法,获得高效价抗体,使检测的灵敏度达到了0.06ng/mL。本发明的方法和试剂盒特异性强,灵敏度高,能快速简单的检测生物体液样品、药用制剂和植物、食品中罂粟碱含量。

1. 一种测定罂粟碱含量的酶联免疫分析方法，包括如下步骤：
 - (1) 活化罂粟碱的苄基甲氧基，分别与不同的载体蛋白偶联制成免疫全抗原和包被全抗原，制备全抗原的步骤具体如下：
 - 1-1. 罂粟碱在 HBr 水溶液中加热回流生成苯环 3 位或 4 位的单脱甲基罂粟碱；
 - 1-2. 苯环 3 位或 4 位的单脱甲基罂粟碱在强碱条件下经卤代羧酸活化生成单脱甲基罂粟碱-O-羧烷基酯；
 - 1-3. 单脱甲基罂粟碱-O-羧烷基酯经 N-羟基琥珀酰亚胺和 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺作用与载体蛋白偶联成全抗原；
 - (2) 用免疫全抗原免疫动物，获得多克隆抗体；
 - (3) 用包被全抗原包被酶标板；
 - (4) 封闭后，加入上述多克隆抗体与待测样品的混合液进行竞争性结合反应，同时以多克隆抗体与标准罂粟碱溶液的混合液作为参比；
 - (5) 加入酶标二抗；
 - (6) 加底物显色，终止反应后目测即可得到罂粟碱的大致含量。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 1-2 中的卤代羧酸为 α -溴乙酸、3-溴丙酸或 3-氯丙酸。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述载体蛋白选自：牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白和钥孔贼血蓝蛋白。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述方法还可以包括步骤 (7) 定量检测吸光度值，确定罂粟碱的含量。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 (5) 使用的是辣根过氧化物酶标记的二抗；步骤 (6) 经酶底物四甲基联苯胺作用显蓝色，加终止液硫酸，变成黄色。
6. 如权利要求 5 所述的方法，其特征在于，该方法还包括步骤 (7) 在 450 nm 处测吸光度值 $A_{450\text{nm}}$ 以确定罂粟碱的含量。
7. 一种测定罂粟碱含量的试剂盒，包括：

包被有抗原的酶标板：抗原为罂粟碱的甲氧基苯环与第一载体蛋白偶联的全抗原罂粟碱-3-O-羧烷基-第一载体蛋白或罂粟碱-4-O-羧烷基-第一载体蛋白；

第一抗体溶液：含有针对罂粟碱的特异性抗体，为罂粟碱的甲氧基苯环与第二

载体蛋白偶联的全抗原罂粟碱-3-O-羧烷基-第二载体蛋白或罂粟碱-4-O-羧烷基-第二载体蛋白免疫动物得到的多克隆抗体，4℃存储；

酶标二抗溶液：含有酶标记的二抗，4℃存储；

罂粟碱标准溶液：用作参比，用于绘制吸光度值-浓度对数的标准曲线；

洗涤缓冲液：含有吐温 20 的生理缓冲溶液，用于洗去酶标板上未结合的物质以及非特异性吸附的物质；

样品稀释液：生理缓冲溶液，用于稀释待测样品或罂粟碱标准溶液；

底物溶液：所含底物可被标记二抗的酶催化成有色产物；

终止液：用于终止酶催化反应。

8. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于，所述载体蛋白选自：牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白和钥孔嘁血蓝蛋白。
9. 如权利要求 7 所述的试剂盒，其特征在于，所述标记二抗的酶为辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或 β -D-半乳糖苷酶。

罂粟碱的酶联免疫定量检测方法及其试剂盒

技术领域

本发明涉及罂粟碱的检测方法，尤其是涉及一种针对罂粟碱的酶联免疫定量检测方法及其试剂盒，属于化合物分析检测领域。

背景技术

罂粟碱（1-[(3,4-二甲氧基苯基)甲基]-6,7-二甲氧基异喹啉）是自然界中存在的一种重要的苜基异喹啉类生物碱，在阿片类植物中含量通常很低（低于1%），目前多用化学合成方法获得。在临床上罂粟碱常用于治疗脑、心和外周血管痉挛引起的缺血以及肾、胆和胃肠道等内脏痉挛，但其无选择的肌肉松弛作用也常导致血压降低，心律失常，其对人的致死剂量为100-500 mg/kg。中药罂粟壳是罂粟科植物 *Papaver somniferum* L. 的干燥成熟果壳，其主要生物活性成分包括吗啡、可待因、蒂巴因、罂粟碱和那可汀等。罂粟壳的主要功能为敛肺、涩肠和止痛，因此常被用于治疗久咳、久泻、脱肛和脘腹疼痛等，但久服易成瘾。

由于罂粟碱及罂粟壳中所含其它成分的毒副作用和久服成瘾的危害，国家卫生部于1996年将罂粟碱列入麻醉药品管制品种，并对罂粟壳的流通和管理作了相应的严格规定。然而近年来一些不法经营者为了招徕顾客，通过不正当途径获得罂粟壳，并添加在其销售的食品（如火锅、卤味调料等）中，因此有必要通过检测（尤其是现场检测）相关食品中吗啡、罂粟碱等成分以实现对其使用情况监督，同时为了控制产品质量和用药安全，在生产过程和药理研究中也需要对罂粟碱含量进行快速、准确的测定。

目前检测罂粟碱的常用方法有化学分析法、光谱法、色谱法、电泳法、电化学法和免疫分析方法等，但对于基体成分复杂的生物、食品类样品，前三种方法的样品预处理过程繁琐、仪器运行费用高、操作复杂。而免疫分析方法通常对样品处理要求低、设备和操作相对简单。但现有的免疫分析方法，基本都是采用 Yeremenko 等（Yeremenko S. N., Sukhov I. Y., Ye I., et al., *Khim.-Farm. Zh.*, 1992, 26: 100-101）创立的方法合成全抗原，制备抗体，最终所建立的酶联免疫分析方法的灵敏度都不是十分理想。

发明内容

本发明的目的在于提供一种简单快速、操作方便、灵敏度高，适于水溶液中及植物成分（如果实、壳等）、食品中罂粟碱含量测定的酶联免疫分析方法。它包括如下步骤：

- (1) 活化罂粟碱 (PAP) 的苄基甲氧基, 分别与不同的载体蛋白偶联制成免疫全抗原和包被全抗原;
- (2) 用免疫全抗原免疫动物, 获得多克隆抗体;
- (3) 用包被全抗原包被酶标板;
- (4) 封闭后, 加入上述多克隆抗体与待测样品的混合液进行竞争性结合反应, 同时以多克隆抗体与标准罂粟碱溶液的混合液作为参比;
- (5) 加入酶标二抗;
- (6) 加底物显色, 终止反应后目测即可得到罂粟碱的大致含量。

此外, 根据需要还可以包括步骤 (7) 定量检测吸光度值, 确定罂粟碱的含量。待测样品中罂粟碱的浓度与吸光度值成反比。

该方法基于竞争酶联免疫分析的原理, 以固定于固相载体上的载体蛋白偶联的罂粟碱与溶液中游离的罂粟碱分子竞争性地结合反应体系中少量的罂粟碱抗体, 通过测量最终与固相罂粟碱结合的抗体数目来指示溶液中参与竞争的游离罂粟碱的含量。这是一种竞争抑制的过程, 最终的测量信号 (吸光度值) 与罂粟碱的含量成反比。

对于免疫分析方法而言, 抗体是决定整个方法性能的重要基础, 而抗体的效果在很大程度上取决于能引起相应动物发生免疫反应的抗原的结构。罂粟碱作为一类小分子化合物, 虽然能与抗体发生免疫反应, 即具有抗原性, 但却不能直接引起动物机体的免疫应答反应, 即不具有免疫原性。它只相当于抗原分子上的一个抗原决定簇, 被称为半抗原。为此, 必须将其与其它载体蛋白偶联, 如: 牛血清白蛋白 (BSA)、鸡卵清白蛋白 (OVA) 和钥孔贼血蓝蛋白 (KLH) 等, 获得全抗原后, 才能用于动物免疫。但是为了使最终获得的抗体与全抗原上的半抗原结构具有良好的结合性质, 在罂粟碱全抗原合成的过程中, 分子活化和偶联位置的选择是至关重要的。本发明发现: 与 Yeremenko 等用罂粟碱分子中异喹啉环的 3 位连接蛋白制备全抗原相比, 尽量保持罂粟碱分子在合成全抗原过程中基本特征骨架 (6,7-二甲氧基异喹啉环) 的完整性, 可以使获得的针对罂粟碱小分子的多克隆抗体的免疫反应性更好, 而且以该抗体与经相应基团连接牛血清白蛋白或鸡卵清白蛋白的罂粟碱包被抗原组合构成的免疫分析方法的灵敏度更高。本发明选择在罂粟碱的苄基甲氧基上进行活化, 与载体蛋白偶联形成全抗原, 既保持 6,7-二甲氧基异喹啉环的完整性, 又保证偶联位置与特征环距离最远, 使罂粟碱分子的特征结构得到充分暴露。

上述测定罂粟碱含量的酶联免疫分析方法中, 步骤 (1) 的载体蛋白选自: 牛血清白

本发明未采用在罂粟碱分子中异喹啉环的3位引入具有反应性的氨基进行活化的传统方法,而是选择在罂粟碱(PAP)的苄基甲氧基上进行活化,与牛血清白蛋白(BSA)、鸡卵清白蛋白(OVA)或钥孔贼血蓝蛋白(KLH)偶联形成全抗原,既保持6,7-二甲氧基异喹啉环的完整性,又保证偶联位置与特征环距离最远,使罂粟碱分子的特征结构得到充分暴露。通过上述方法获得的牛血清白蛋白偶联的罂粟碱全抗原(PAP-BSA)、鸡卵清白蛋白偶联的罂粟碱全抗原(PAP-OVA)或钥孔贼血蓝蛋白偶联的罂粟碱全抗原(PAP-KLH),经免疫家兔,得到高亲和力的多克隆抗体,为整个检测方法的建立奠定了基础。

针对罂粟碱的抗体可以与包被全抗原上的罂粟碱决定簇发生特异性的结合,但任何一个物质过量都会造成竞争反应无效,本发明抗原包被液的浓度应在2-10 $\mu\text{g/mL}$ 之间,5 $\mu\text{g/mL}$ 时最佳;而多克隆抗体工作浓度在0.8-10 $\mu\text{g/mL}$ 之间,4 $\mu\text{g/mL}$ 时最佳。在上述条件下,包被全抗原与多克隆抗体的反应曲线符合免疫反应的特征,而且包被全抗原的结合位点略微过量,保证在抗体的有限结合位点可以发生竞争反应。

在优化的包被和抗体工作浓度下,若样品中含有罂粟碱,则会与包被全抗原竞争有限的抗体结合位点,造成最终结合到包被全抗原上的抗体量减少,引起吸光度值的变化。本发明方法中,最合适的罂粟碱浓度范围是0.1 ng/mL -1000 ng/mL 。

上述步骤(5)通常使用辣根过氧化物酶标记的二抗;步骤(6)经酶底物四甲基联苯胺(TMB)作用显蓝色,加终止液硫酸,变成黄色;步骤(7)在450 nm处测吸光度值 $A_{450\text{nm}}$ 。试样中罂粟碱的浓度与 $A_{450\text{nm}}$ 值成反比,通过绘制吸光度值-浓度对数的标准曲线求出样品中罂粟碱浓度。

本发明的方法适合于水溶液中罂粟碱的测定,该溶液可以是水、含有其他基质的血样、注射液或与水混溶的有机溶剂的水溶液。本发明的方法也适用于植物、食品类样品中罂粟碱的测定,在检测该类样品时,需要先将样品中的罂粟碱提取到一种合适的溶剂中,如水溶液,或甲醇、乙醇等有机溶剂中,一般要求过滤取清液。对于溶液的pH值,较佳的是7~8,保证抗原抗体之间的结合反应。

选用合适的溶剂和方法能够从植物及食品样中提取罂粟碱。用水或含水的甲醇、盐酸等溶液,采用超声、煮沸等方法均可从这些固体样品中提出罂粟碱。较佳的提取方法是选用80%甲醇,在室温下超声30分钟即可完成提取。

本发明的另一个目的在于提供一种结构简单、操作便利、灵敏度高的测定罂粟碱含量

的试剂盒，包括：

包被有抗原的酶标板：抗原为罂粟碱的甲氧基苯环与载体蛋白偶联的全抗原；

第一抗体溶液：含有针对罂粟碱的特异性抗体，为罂粟碱的甲氧基苯环与另一载体蛋白偶联的全抗原免疫动物得到的多克隆抗体，4℃存储；

酶标二抗溶液：含有酶标记的二抗，4℃存储，可选用的酶包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶（AP）和β-D-半乳糖苷酶；

罂粟碱标准溶液：作参比，用于绘制吸光度值-浓度对数的标准曲线；

洗涤缓冲液：含有吐温 20 的生理缓冲溶液，用于洗去酶标板上未结合的物质以及非特异性吸附的物质；

样品稀释液：生理缓冲溶液，用于稀释待测样品或罂粟碱标准溶液；

底物溶液：所含底物可被标记二抗的酶催化成有色产物；

终止液：用于终止酶催化反应。

上述载体蛋白选自：牛血清白蛋白（BSA）、鸡卵清白蛋白（OVA）和钥孔贼血蓝蛋白（KLH），但用于包被的全抗原和免疫的全抗原所选的载体蛋白不同。

上述第一抗体溶液通常配制成 1mg/mL，使用时稀释 1000 倍作为第一抗体工作液。

酶标二抗溶液使用时应稀释后作为酶标抗体工作液，使最终的吸光度值落入 0.2~1.0，稀释倍数通常为 500 倍。

样品稀释液及洗涤缓冲液通常配制成 10×溶液，使用时均作 10 倍稀释。

试剂盒（包括第一抗体工作液和酶标抗体工作液）在 4℃存储，1×样品稀释液、1×洗涤缓冲液配制后可于常温保存。

应用试剂盒检测水溶液及植物成分（如果实，壳等）、食品中罂粟碱含量的方法，首先要求对样品进行适当的处理：若样品为溶液，则可直接进行检测或简单过滤后进行检测；若样品为固体（果实、壳、食品等），则以水或有机溶剂配合煮沸、超声等方法提取后，过滤取清液进行检测。

本发明的有益效果，一是用罂粟碱的甲氧基苯环连接牛血清白蛋白、鸡卵清白蛋白或钥孔贼血蓝蛋白的全抗原免疫动物所获得的多克隆抗体效价较高，并且以该抗体为基础所建立的分析方法的重现性好，灵敏度高，罂粟碱的最低检出限可达 0.06 ng/mL（对火锅底料中添加罂粟壳的实际检出下限可达到 0.025g 罂粟壳/L 汤），比 Yeremenko 等创立的方法灵敏近 10000 倍，比目前最佳的色谱结果灵敏 10 倍。二是样品处理简单，生物体液样品、

医用制剂可以直接测量或稍加稀释即可，而固体类样品则用甲醇或水经过超声提取，简单过滤就可用于检测。一般含有其它基质的样品，如血清，稀释 40 倍就可消除基体效应；而盐酸罂粟碱注射液等基体简单的溶液和罂粟壳、火锅底料等样品的提取液，只要浓度合适，直接检测即可。三是方法所涉及的仪器和试剂简单，通用性好，除全抗原和抗体之外，其它所有试剂、96 孔酶标板、酶标仪及温箱等均极易获得，这使得本方法可以被许多检测机构及相应部门直接使用，作为检测罂粟碱的手段。

综上所述，由于本发明采用了全新的全抗原合成方法，获得高效价抗体，使检测的灵敏度达到了 0.06ng/mL。本发明的方法和试剂盒特异性强，灵敏度高，能快速简单的检测生物体液样品（血液、尿样、分泌液）、药用制剂（注射液）和植物、食品中罂粟碱含量。而常见的色谱法，由于灵敏度所限，还需要进行浓缩等操作，所以本方法适于实现快速、灵敏的检测。这一方法不仅适于广大生产、医疗及检测部门对罂粟碱及罂粟壳的使用进行监测、控制，而且可以进一步制成试剂盒实现现场、及时的检测，这对于及时监控生产过程，观察个体给药以及现场食品监督都具有极其重要的意义。

具体实施方式

实施例

实施例 1：罂粟碱全抗原的制备及相应多克隆抗体的获取

- 1) 单脱甲基罂粟碱 (MDMPAP) 的合成：取 0.5 g 罂粟碱加入 6 mL 40% 的 HBr 水溶液，搅拌加热回流反应 15 min；冷却后以 10 mL 水稀释，并调 pH 为 8.0；接着于室温避光放置 1 hr，过滤，以水洗涤沉淀 3 次，再向沉淀中加入 4 mL 甲醇，加热回流 1 hr；随后旋蒸除去甲醇，加入 0.5 mL 氯仿/甲醇 (v/v=95:5) 混合液溶解固体，并以该溶液作为洗脱液，用硅胶柱色谱分离反应物，最终获得单脱甲基罂粟碱固体约 0.25 g。
- 2) 单脱甲基罂粟碱-O-羧甲基醚 (PAP-O-CME) 的合成：取 45 mg 步骤 1 产物溶于 1.2 mL 干燥 DMSO 溶剂，加入 0.088 g KOH，搅拌反应 5 min；随后加入 28.9 mg 溴乙酸，避光搅拌反应 2 hr，加入 4 mL 冰水终止反应，并调 pH 为 8.0；以氯仿萃取 3 次，回收未参加反应的单脱甲基罂粟碱；再以 1mol/L 的 HCl 调整水相 pH 至 2.0，然后以氯仿萃取 3 次，萃取液经无水硫酸钠干燥，清液旋蒸至干，加入少量甲醇，析出黄白色沉淀，过滤并红外烤干，最终获得产品约 20 mg。
- 3) PAP-BSA 全抗原的合成：在 1 mL 干燥的 DMSO 溶液中加入 7 mg 步骤 2 产物，3.2 mg NHS 和 5.5 mg EDC，室温搅拌反应 2 hr；然后逐滴加入 4 mL 0.1 mol/L pH7.0 的 NaHCO₃

水溶液（含 45 mg BSA）中，持续搅拌反应 2 hr；最后将所得溶液除盐冻干，得约 40 mg 产物， -20°C 保存。

- 4) 免疫动物：用步骤 3 所获得的全抗原按表 1 过程对家兔进行免疫；然后采血，4000 rpm 离心 20 min，取血清， -20°C 冻存。
- 5) 多克隆抗体的纯化：取 1mL 血清，用 0.06mol/L, pH 4.8 的 HAc-NaAc 缓冲液稀释 4 倍，逐滴加入 120 μL 辛酸，搅拌 30min；于室温 12,000 rpm 离心 20min，取上清；接着加入体积为上清 1/10 的 0.1 mol/L, pH 7.4 的 PBS 溶液，并用 1.0 mol/L NaOH 调 pH 为 7.4；搅拌下，滴加等体积 pH 7.4 的饱和硫酸铵溶液，静置 2 hr；于 4°C 12,000 rpm 离心 30min，弃上清，并将沉淀溶于 1 mL 0.01mol/L, pH 7.4 的 PBS 中，透析除盐，最后测定该抗体溶液的浓度，置于 -20°C 冻存待用。

表 1. 罂粟碱全抗原免疫家兔的完整流程

天数	免疫用量	免疫部位
0	0.75 mL 2mg/mL 全抗原与 0.75 mL 弗氏完全佐剂充分乳化，乳化液取 1mL	左右脚掌各 0.5mL
10	0.75 mL 1mg/mL 全抗原与 0.75 mL 弗氏不完全佐剂充分乳化，乳化液取 1mL	左右腭窝淋巴结各 0.5 mL
20	0.75 mL 1mg/mL 全抗原与 0.75 mL 弗氏不完全佐剂充分乳化，乳化液取 1mL	背部脊椎两侧 6 点注射，每点约 0.16 mL
30	0.75 mL 1mg/mL 全抗原与 0.75 mL 弗氏不完全佐剂充分乳化，乳化液取 1mL	臀部及肩胛 4 点注射，每点 0.25 mL
37	采静脉耳血 0.5 mL，用 ELISA 测定血清效价	/
41	颈动脉采血，获多抗血清	/

实施例 2：本发明检测方法的最低检出限及线性范围

在 96 孔酶标板中，每孔用 100 μL 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PAP-OVA 包被，于 4°C 过夜或 37°C 温育 2 小时；以 5% 脱脂奶粉溶液在 37°C 封闭 2 小时后，每孔中加入 50 μL 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的纯化抗体溶液和 50 μL 梯度稀释罂粟碱标准品溶液（浓度分别为 0, 0.2, 2, 20, 200, 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）， 37°C 温育 1 小时，然后每孔加入 100 μL 的合适浓度的酶标二抗，使最终的吸光度值在 0.2~1.0（通常商购的酶标二抗需 1: 500 稀释），经过同样的温育过程后加入底物显色，10-15 分钟后以 2mol/L 硫酸终止。每个试样同时做 5 份平行。

采用 logit-log 法对测定结果进行线性回归。本发明方法的工作曲线的线性范围为：

0.1-1000 ng/mL; 回归方程为 $\ln(A/(A_0-A))=1.489-1.340 \log c_{\text{PAP}}$ ($R=0.991, n=5$)。以竞争罂粟碱含量为 0 的测定结果做为空白参比, 计算其 5 份平行样品的吸光度值的标准偏差 σ , 得出该方法的最低检测限为 0.06 ng/mL (定义为三倍信噪比)。

实施例 3: 本发明与标准的高效液相色谱 (HPLC) 方法的比较

以市售盐酸罂粟碱注射液 (标称参考值为 30 mg/mL) 为测量物, 用本发明的方法和 HPLC 分别测量该注射液的浓度。

1) HPLC 测量

用色谱进行测量的操作条件如下:

色谱柱: C_{18} 反相柱(Dikma Technologies Diamonsil, 5μ , 150×4.6 mm);

流动相: 甲醇-乙腈- H_2O -冰醋酸 (34: 47: 19: 0.05 v/v), 流速: 1.0 mL/min ;

柱温: 25 °C

检测器: 紫外检测器 (UVD), 检测波长为 254 nm;

进样器: 20 μ L 样品环。

以 0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、8.0、10、12、15、20、30 μ g/mL PAP 标准溶液作为工作曲线, 采用峰面积积分, 线性回归, 确定 HPLC 对于罂粟碱的工作曲线为 $A(\text{mAu})=23.35+162.5 c_{\text{PAP}}$ ($R=0.9999, n=3$), 线性范围为: 0.1-30 μ g/mL, 检测限为: 0.05 μ g/mL (定义为三倍信噪比)。

在测量盐酸罂粟碱注射液的过程中, 分别测量了 1.5×10^4 , 6.0×10^3 , 3.75×10^3 , 3.0×10^3 , 2.0×10^3 倍稀释的注射液, 最终测得盐酸罂粟碱注射液的浓度为 28.7 mg/mL。

2) 本发明方法 (ELISA 法) 的测量

ELISA 操作过程及试剂量同实施例 2 中工作曲线的测定部分, 具体测量了 3×10^5 , 1.5×10^6 和 1.5×10^7 倍稀释的盐酸罂粟碱注射液的浓度, 最终测得盐酸罂粟碱注射液的浓度为 30.3 mg/mL。

两种方法的测量结果显示, HPLC 和本发明方法的测量结果基本一致, 但本发明的方法具有更低检测限及检测范围。

实施例 4: 本发明方法的回收率测定

以 20 倍稀释的正常人血清样品为基体, 加入标准罂粟碱, 使样品中罂粟碱的最终浓度分别为 100ng/mL, 20ng/mL, 2ng/mL, 0.8ng/mL, 然后按实施例 2 中的过程与抗体混合进行测定。每个点作 6 份平行, 结果见表 2。

表 2. 人血清模拟样品的回收率测定 (n=6)

加入的标准罂粟碱含量 (ng/mL)	测得罂粟碱含量 (ng/mL)	回收率 (%)	相对标准偏差 (RSD, %)
50.0	52.5	105	6
10.0	10.2	102	7
1.00	1.04	104	13
0.40	0.39	98	11

相对标准偏差表示测量的精密度，用多次测量后的标准差与测量平均值的比值百分数表示。结果表明该方法的回收率很好，且样品溶液中基体的干扰对方法影响小。

实施例 4: 火锅底料中添加罂粟壳的试剂盒检测

一个检测实际样品的罂粟碱检测试剂盒，盒内包括一块 96 孔酶标板，第一抗体溶液（含 1mg/mL 抗体），酶标二抗溶液（100 μ L，1: 500 稀释为工作液），罂粟碱标准溶液（1mL，2mg/mL），10 \times 洗涤缓冲液（20mL，0.1 mol/L PBST），10 \times 样品稀释液（20mL，0.1mol/L PBS），显色液 A（15mL），显色液 B（1 mL 30%H₂O₂），终止液（15mL，2mol/LH₂SO₄）以及操作流程一份。其中：

酶标板包被有抗原，抗原为罂粟碱通过其甲氧基苯环与载体蛋白偶联的全抗原；

第一抗体溶液：含有针对罂粟碱的特异性抗体（1mg/mL），为通过上述全抗原免疫动物得到的多克隆抗体，4 $^{\circ}$ C 存储；

酶标二抗溶液：辣根过氧化物酶标记的二抗，4 $^{\circ}$ C 存储；

罂粟碱标准溶液：作参比，用于绘制吸光度值-浓度对数的标准曲线；

10 \times 洗涤缓冲液：0.1 mol/L 的含吐温 20 的磷酸缓冲液，具体每升含有 2.89 g Na₂HPO₄·12H₂O，80 g NaCl，2 g KCl，2 g KH₂PO₄ 和 0.05 % (v/v) 吐温 20 (Tween 20)，用于洗去酶标板上未结合的物质以及非特异性吸附的物质；

10 \times 样品稀释液：0.1 mol/L 的磷酸缓冲液，具体每升含有 2.89 g Na₂HPO₄·12H₂O，80 g NaCl，2 g KCl，2 g KH₂PO₄，用于稀释待测样品或罂粟碱标准溶液；

显色液 A：含 0.6mg 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB)，44mg Na₂HPO₄·12H₂O，137 mg NaH₂PO₄·2H₂O，100 μ L 二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) 和 10mL 的去离子水，与显色液 B 配合使用，并由辣根过氧化物酶作为催化剂，加速反应显色；

显色液 B: 30%的 H_2O_2 水溶液, 与显色液 A 配合, 并由辣根过氧化物酶作为催化剂, 加速反应显色;

终止液: 2mol/L 的 H_2SO_4 溶液, 用于终止酶催化反应。

试剂盒的检测过程通过以下步骤得以实现:

1. 加样: 将标准溶液、空白及待测样 50 μ l 与 50 μ l 第一抗体工作液混合, 加入酶标板的各孔内, 置于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。
2. 洗板: 用 1 \times 洗涤液将酶标板洗涤 3 次, 每次 3 分钟, 在滤纸上拍干。
3. 每孔加入酶标二抗工作液 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时。
4. 洗板, 同前。
5. 显色: 底物 A 与底物 B 按 1000:1.5 比例混合, 每孔加入上述底物混合液 100 μ L, 暗处反应 10-15 分钟。
6. 终止: 每孔加入终止液 60 μ l, 在 450nm 处测吸光值。通过与标准工作曲线的比较, 得出样品中罂粟碱的含量。

将市售的固体海鲜底料加水超声提取后的溶液上清作为空白火锅汤料, 取 0.5 g 罂粟壳粉碎样加入 8mL 该汤料中, 超声处理 30 分钟后, 离心过滤, 并用空白汤料清液定容至 10mL, 再分别稀释 20、200、2000 倍。然后将上述汤料 50 μ L 与 50 μ L 8 μ g/mL 的第一抗体溶液混合, 加入 96 孔酶标板内, 置于 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时; 以 1 \times 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 再于每个孔内加入 100 μ L 酶标抗体溶液 (1: 500 稀释), 37 $^{\circ}$ C 温育 1 小时; 接着以 1 \times 洗涤缓冲液洗涤 3 次, 每孔加入 100 μ L 显色液 A 与显色液 B 按 1000: 1.5 比例混合的显色液, 置于暗处反应 15 分钟; 最后于每孔内加入 60 μ L 终止液结束反应, 测量 450 nm 处的吸光值。其中每个试样同时做 6 份平行, 并以 0, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μ g/mL 罂粟碱标准溶液为工作曲线, 样品的测量结果见表 3。

表 3. 添加罂粟壳的火锅汤料系列稀释测定结果

稀释倍数	20	200	2000
测得罂粟碱平均浓度 (ng/mL)	48.9	5.14	0.55
RSD (%) (n=6)	14	12	12

表 3 中不同稀释倍数的测定结果基本一致, 表明本试剂盒适合于检测实际火锅汤料中源于罂粟壳的罂粟碱含量。另外, 由于 2000 倍稀释后的测量值已经接近本方法工作曲线

的下限，若以此计算该方法的实际灵敏度，即相当于每升火锅汤料中加入 0.025 克罂粟壳就可被本试剂盒检出，可见该试剂盒的灵敏度完全可以满足食品中非法添加罂粟壳的实际检测的需求。

专利名称(译)	罂粟碱的酶联免疫定量检测方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN100582779C	公开(公告)日	2010-01-20
申请号	CN200610011570.6	申请日	2006-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	宓捷波 闫瑾 徐菁 赵美萍		
发明人	宓捷波 闫瑾 徐菁 赵美萍		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531 G01N21/31		
其他公开文献	CN1821782A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种定量检测罂粟碱的酶联免疫分析方法，以罂粟碱的甲氧基苯环连接载体蛋白制成免疫全抗原并获得其高效价抗体为基础，用罂粟碱的甲氧基苯环连接另一载体蛋白制成的包被全抗原包被酶标板，封闭后，加入所述高效价抗体与试验样品液进行竞争性结合反应，然后加入酶标二抗，显色，检测罂粟碱的存在。通过定量检测吸光度值还可以进一步确定罂粟碱的含量。本发明还提供了一种依据该方法制备的简便易行的试剂盒。由于本发明采用了全新的全抗原合成方法，获得高效价抗体，使检测的灵敏度达到了0.06ng/mL。本发明的方法和试剂盒特异性强，灵敏度高，能快速简单的检测生物体液样品、药用制剂和植物、食品中罂粟碱含量。

