



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108956975 B

(45) 授权公告日 2021.03.12

(21) 申请号 201810540543.0

(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 108956975 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 何方洋 崔海峰
赵乐 崔华鹏 樊美娟 蔡君兰
崔廷婷 贾云祯

(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 33/535 (2006.01)

G01N 33/537 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 104655767 A, 2015.05.27

CN 103983725 A, 2014.08.13

US 5208350 A, 1993.05.04

CN 108051517 A, 2018.05.18

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

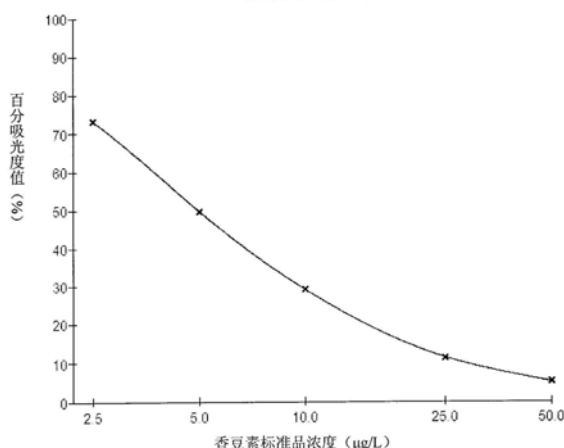
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54) 发明名称

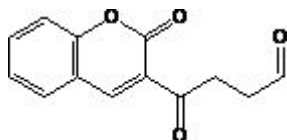
一种检测香豆素的酶联免疫试剂盒及其应用

(57) 摘要

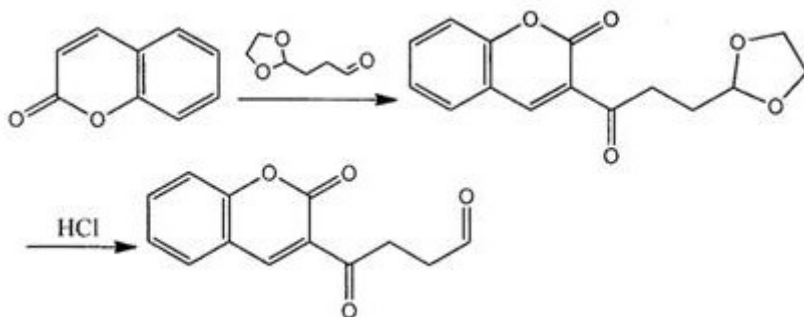
本发明提供一种检测香豆素的酶联免疫试剂盒及其应用。该试剂盒包括：包被有包被原的酶标板、香豆素标准品溶液、酶标二抗、香豆素特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液；所述包被原为香豆素偶联抗原，所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体，所述香豆素特异性抗体是以香豆素偶联抗原作为免疫原制备获得；所述香豆素偶联抗原是由香豆素半抗原与载体蛋白偶联得到，所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到。本发明提供的酶联免疫试剂盒可用于检测烟草及烟用香精香料中香豆素的含量，其操作简便、费用低廉、灵敏度高、能够现场监控且适合大量样本的筛查。



1. 一种检测香豆素的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 它包括: 包被有包被原的酶标板、香豆素标准品溶液、酶标二抗、香豆素特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液; 所述包被原为香豆素偶联抗原, 所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗抗体, 所述香豆素特异性抗体是以香豆素偶联抗原作为免疫原制备获得, 所述香豆素偶联抗原是由香豆素半抗原与载体蛋白偶联得到, 所述香豆素半抗原是由香豆素进行缩醛反应得到, 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. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 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。

3. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述香豆素特异性抗体为香豆素单克隆抗体或香豆素多克隆抗体。

4. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述酶标二抗的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶; 所述酶标二抗是采用改良后的过碘酸钠法进行偶联得到的。

5. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述香豆素标准品溶液6瓶, 浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、2.5 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 。

6. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 当标记酶为辣根过氧化物酶时, 所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成, A液为过氧化氢或过氧化脲, B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺, 所述终止液为1~2mol/L的硫酸溶液或盐酸溶液; 当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时, 所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液, 所述终止液为1~2 mol/L氢氧化钠溶液。

7. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述洗涤液为pH值为7.4, 含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3mol/L的磷酸盐缓冲液, 所述百分比为重量体积百分比。

8. 如权利要求1所述的酶联免疫试剂盒, 其特征在于: 所述复溶液为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

9. 一种应用权利要求1-8任一项所述的酶联免疫试剂盒检测香豆素的方法, 其特征在于: 包括以下步骤:

(1) 样品前处理;

- (2) 用试剂盒进行检测；
- (3) 分析检测结果。

一种检测香豆素的酶联免疫试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及酶联免疫检测技术,具体涉及一种用于检测香豆素的酶联免疫试剂盒及其应用,可定性、定量检测烟草及烟草制品、烟用香精香料中香豆素的残留量。

技术背景

[0002] 香豆素系化合物是一类具有芳香气味,母核为苯并 α -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。由于香豆素的潜在的不良反应,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。

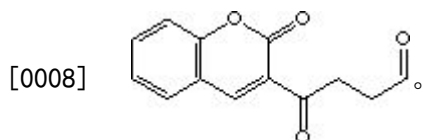
[0004] 目前,香豆素主要通过直接萃取法、超声萃取法、同时蒸馏萃取法、水蒸气蒸馏法等提取,结合气相色谱法(GC)、气相色谱-质谱法(GC-MS)、气相色谱-串联质谱法(GC-MS/MS)、高效液相色谱法(HPLC)、超高效液相色谱-串联质谱法(UPLC-MS/MS)检测。仪器分析方法虽可以实现准确定性定量,但需要复杂昂贵的仪器设备及专业操作人员,加之样品前处理繁琐费时、检测时间长、检测费用高,对于现场检测工作的开展具有局限性。因此,能否提供一种用酶联免疫法测定烟草及烟用香精香料等样品中香豆素残留量的试剂盒,正是本发明的研究重点。

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酶联免疫试剂盒及其应用,本发明应用酶联免疫检测技术测定烟草及烟用香精香料中的香豆素,具有高效、准确、简便、经济等特点,适用于现场大量样品的定性和定量检测。

[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酶联免疫试剂盒,它包括:包被有包被原的酶标板、香豆素标准品溶液、酶标二抗、香豆素特异性抗体、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液,所述包被原为香豆素偶联抗原,所述酶标二抗为酶标记的羊抗鼠抗体,所述香豆素特异性抗体是以香豆素偶联抗原作为免疫原制备获得。

[0007] 所述香豆素偶联抗原是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,其分子结构式为:

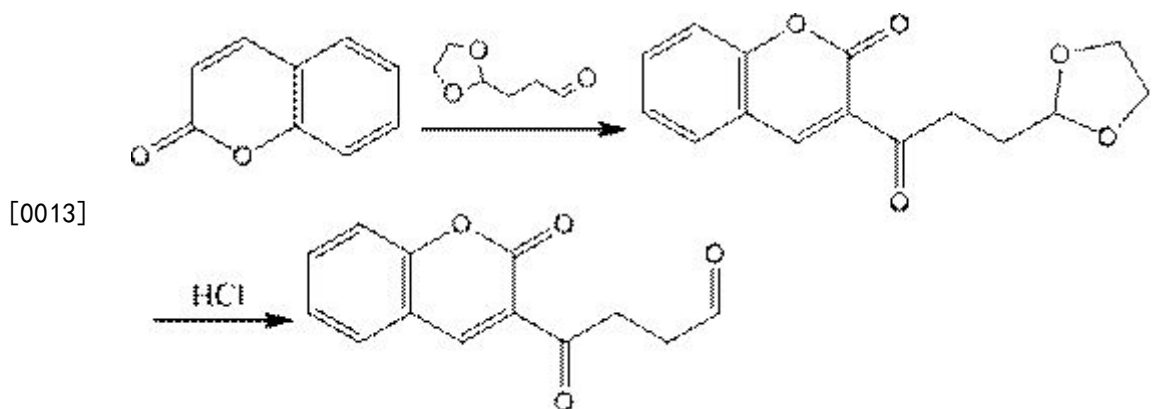


[0009] 所述香豆素半抗原的制备方法主要包括如下步骤:

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 其反应过程如下:



[0014] 所述香豆素特异性抗体为香豆素单克隆抗体或香豆素多克隆抗体,其中优选香豆素单克隆抗体。

[0015] 所述酶标二抗的标记酶为辣根过氧化物酶或细菌提取碱性磷酸酯酶,其中优选辣根过氧化物酶;所述酶标二抗是采用改良后的过碘酸钠法进行偶联得到的。

[0016] 为了方便现场监控和大量样本筛查,所述试剂盒还包括香豆素标准品溶液、底物显色液、终止液、洗涤液、复溶液。

[0017] 所述香豆素标准品溶液6瓶,浓度分别为0 μg/L、2.5 μg/L、5 μg/L、10 μg/L、25 μg/L、50 μg/L。

[0018] 当标记酶为辣根过氧化物酶时,所述底物显色液由底物液A液和底物液B液组成,A液为过氧化氢或过氧化脲,B液为邻苯二胺或四甲基联苯胺,所述终止液为1~2 mol/L的硫

酸溶液或盐酸溶液；当标记酶为细菌提取碱性磷酸酯酶时，所述底物显色液为对硝基磷酸盐缓冲液，所述终止液为1~2 mol/L氢氧化钠溶液。

[0019] 所述洗涤液优选为pH值为7.4，含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01%~0.03%叠氮化钠、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比，单位g/L。

[0020] 所述复溶液优选为pH值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0021] 其中在酶标板制备过程中所用到的包被缓冲液为pH值为9.6、0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液，封闭液为pH值为7.1~7.5，含有1%~3%酪蛋白、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液，所述百分比为重量体积百分比，单位g/L。

[0022] 本发明中酶标板的制备过程为：用包被缓冲液将包被原稀释成20 μg/mL，每孔加入100 μL，25℃避光孵育2 h或4℃过夜，倾去孔中液体，用洗涤液洗涤2次，每次30 s，拍干，然后在每孔中加入150~200 μL封闭液，25℃避光孵育1~2 h，倾去孔内液体拍干，干燥后用铝膜真空密封保存。

[0023] 本发明的检测原理为：

[0024] 采用间接竞争ELISA方法，在酶标板微孔条上预包被香豆素偶联抗原，样本中残留的香豆素与微孔条上预包被的偶联抗原竞争香豆素特异性抗体，加入酶标二抗后，用底物显色液显色，样本吸光度值与其所含香豆素的含量成负相关，与标准曲线比较再乘以其对应的稀释倍数，即可得出样品中香豆素的残留量。

[0025] 本发明还提供了一种应用上述酶联免疫试剂盒检测香豆素的方法，它包括步骤：

[0026] (1) 样品前处理；

[0027] (2) 用试剂盒进行检测；

[0028] (3) 分析检测结果。

[0029] 本发明检测香豆素的酶联免疫试剂盒主要采用ELISA方法定性或定量检测样品中香豆素的含量；对样品的前处理要求低，样品前处理过程简单，能同时快速检测大批量样品；主要试剂以工作液的形式提供，检验方法方便易行，检测速度快、检测成本低，非常容易推广。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剂盒具有特异性高、灵敏度高、精确度高、准确度高等特点。本发明的酶联免疫试剂盒，结构简单、使用方便、价格便宜、携带便利、检测方法高效、准确、简便、适于大批量样品筛选的定性、定量。

附图说明

[0030] 图1为试剂盒标准曲线图。

具体实施方式

[0031] 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。

[0032] 实施例1 检测香豆素试剂盒试剂的制备

[0033] 1、香豆素半抗原的合成及鉴定

[0034] 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%。

[0035] 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%。

[0036] 取上述半抗原经核磁共振氢谱鉴定,¹H NMR(CDC1₃, 300MHZ)δ: 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, CH₂), 2.51 (2H, t, CH₂)。图谱中化学位移δ=9.72的为间隔臂上醛基氢的共振吸收峰,δ=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。

[0037] 2、香豆素偶联抗原的合成及鉴定

[0038] 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。

[0039] 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。

[0040] 包被原制备——香豆素半抗原与卵清蛋白(OVA)偶联得到包被原。

[0041] 取香豆素半抗原5 mg,加乙醇溶解,得到A液,取卵清白蛋白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。

[0042] 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。

[0043] 3、香豆素单克隆抗体的制备

[0044] (1)杂交瘤细胞的获得

[0045] 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Ba1b/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;

[0046] 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;

[0047] 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。

[0048] (2) 单克隆抗体的制备

[0049] 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 5×10^5 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)。

[0050] (3) 单克隆抗体效价的测定

[0051] 用间接竞争 ELISA法测定抗体的效价为1:(200000~500000)。

[0052] 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_{450° 。

[0053] (4) 单克隆抗体特异性的测定

[0054] 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。

[0055] $CR(\%) = [IC_{50}(\text{香豆素}) / IC_{50}(\text{类似物})] \times 100\%$

[0056] 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。

[0057] 表1 香豆素单克隆抗体与香豆素类似物的交叉反应率

[0058]

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

[0059] 4、羊抗鼠抗抗体的制备

[0060] 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。

[0061] 5、酶标板的制备

[0062] 用包被缓冲液将包被原稀释成20 $\mu\text{g/mL}$,每孔加入100 μL ,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 h,倾去孔中液体,用洗涤液洗涤2次,每次30 s,拍干,然后在每孔中加入200 μL 封闭液,25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育2 h,倾去孔内液体拍干,干燥后用铝膜真空密封保存。

[0063] 实施例2 检测香豆素的酶联免疫试剂盒的组建

[0064] 组建检测香豆素的酶联免疫试剂盒,使其包含下述组分:

[0065] (1) 包被香豆素偶联抗原的酶标板;

[0066] (2) 香豆素标准品溶液6瓶,浓度分别为0 $\mu\text{g/L}$ 、2.5 $\mu\text{g/L}$ 、5 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、25 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$;

[0067] (3) 用辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体;

[0068] (4) 香豆素特异性抗体工作液;

[0069] (5) 底物显色液由A液和B液组成,A液为过氧化脲,B液为四甲基联苯胺;

[0070] (6) 终止液为2 mol/L硫酸;

[0071] (7) 洗涤液为pH值为7.4,含有0.5%~1.0%吐温-20、0.01‰~0.03‰叠氮化钠防腐剂、0.1~0.3 mol/L的磷酸盐缓冲液,所述百分比为重量体积百分比;

[0072] (8) 复溶液为pH 值为7.0、0.02 mol/L的磷酸盐缓冲液。

[0073] 实施例3 检测烟草中的香豆素

[0074] 1、样品的前处理

[0075] 称取 1.0 ± 0.05 g粉碎的烟叶样本至聚苯乙烯离心管中;加入10 mL 50%甲醇溶液,用匀浆机将其充分打碎,得样本液;移取50 μL 样本液与450 μL 去离子水混匀后待检。

[0076] 2、用试剂盒进行检测

[0077] 向包被香豆素偶联抗原的酶标板微孔中加入香豆素标准品溶液或经前处理的样本溶液50 μL /孔,然后加入香豆素特异性抗体工作液50 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30 min;小心揭开盖板膜,将孔内液体甩干,用洗涤液250 μL /孔,充分洗涤4-5次,每次间隔10 s,用吸水纸拍干;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠抗抗体100 μL /孔,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应30 min,取出重复洗板步骤;每孔加入底物显色液A液50 μL ,底物显色液B液50 μL ,轻轻振荡混匀,用盖板膜盖板后置25 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境中反应15 min。每孔加入终止液50 μL ,轻轻振荡混匀,设定酶标仪于450 nm处(建议用双波长450/630 nm检测,5 min内读完数据),测定每孔OD值。

[0078] 3、检测结果分析

[0079] 标准品或样本的百分吸光率等于标准品或样本的吸光度值的平均值(双孔)除以第一个标准品(0标准)的吸光度值的平均值,再乘以100%。以标准品百分吸光率为纵坐标,香豆素标准品浓度($\mu\text{g/L}$)的对数为横坐标,绘制标准曲线,见图1。将样本的百分吸光率代入标准曲线中,从标准曲线上读出样本所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样本中香豆素的实际浓度。

[0080] 实施例4 样品检测实例

[0081] 1、试剂盒的检测限和灵敏度

[0082] 按照常规方法测定试剂盒灵敏度,标准曲线的范围为2.5~50 $\mu\text{g/L}$, IC_{50} (50%抑制浓度)浮动范围为4.5~8.1 $\mu\text{g/L}$;对20份空白样品进行检测,从标准曲线上查出对应于各百分吸光率的浓度,以20份样本浓度的平均值加上3倍标准差表示检测限,结果显示,该方法对烟草的检测限为0.25 mg/kg。

[0083] 2、样本准确度和精确度试验

[0084] 以回收率作为准确度评价指标,以重复测定某一浓度样本的检测结果相对标准偏差(RSD%)作为精密度评价指标。计算公式为:回收率(%) = 实际测定值/理论值 $\times 100\%$,其中理论值为样本的添加浓度;相对标准偏差 $\text{RSD}\% = \text{SD}/\bar{X} \times 100\%$,其中SD为标准偏差, $\bar{X}$ 为测定数据的平均值。

[0085] 按0.25 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg三个浓度香豆素对空白烟草样本进行添加回收测定,每个样本做6个平行,用三批不同试剂盒进行测定,计算样本的平均回收率及精密度,结果见下表。

[0086] 表2 精密度及准确度试验

[0087]	样本	添加浓度(mg/kg)	回收率(n=6)%	批内RSD(n=6)%	批间RSD(n=3)%
	烟草	0.25	84.3	6.6	9.3
		0.5	105.1	5.8	8.5
		1.0	97.0	7.4	9.0

[0088] 以0.25 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg三个浓度的香豆素对空白烟草样本进行添加,平均回收率在70%~110%之间;批内、批间相对标准偏差均小于10%。

[0089] 3、试剂盒稳定性试验

[0090] 试剂盒保存条件为2~8 $^{\circ}\text{C}$,经过12个月的测定,试剂盒的最大吸光度值(零标准)、50%抑制浓度、香豆素添加实际测定值均在正常范围之内。考虑在运输和使用过程中,会有非正常保存条件出现,将试剂盒在37 $^{\circ}\text{C}$ 保存条件下放置7天,进行加速老化实验,结果表明该试剂盒各项指标完全符合要求。考虑到试剂盒冷冻情况发生,将试剂盒放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻7天,测定结果也表明试剂盒各项指标完全正常。从以上结果可得出试剂盒可以在2~8 $^{\circ}\text{C}$ 至少保存12个月以上。

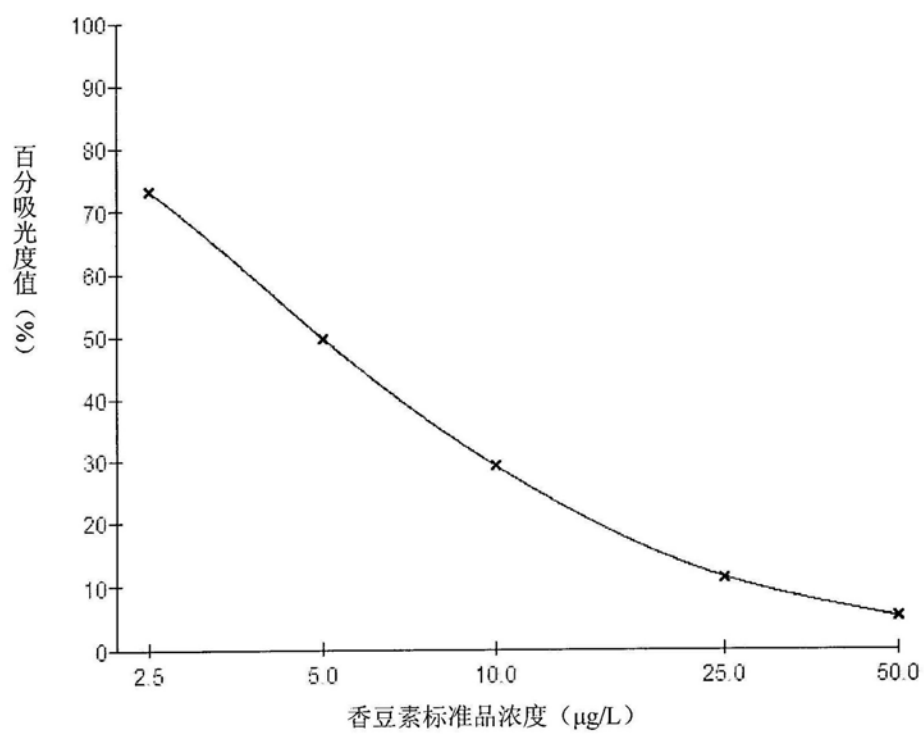


图1