



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104111253 A

(43) 申请公布日 2014. 10. 22

(21) 申请号 201410279116. 3

(22) 申请日 2014. 06. 20

(71) 申请人 武汉高丰生物科技有限公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖开发区高新大道 666 号武汉国家生物产业基地项目 B、C、D 区研发楼 B1 栋

申请人 上海高丰医疗电器有限公司

(72) 发明人 王福进 管利丰 张懿

(74) 专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务所 31233

代理人 黄志达

(51) Int. Cl.

G01N 21/78 (2006. 01)

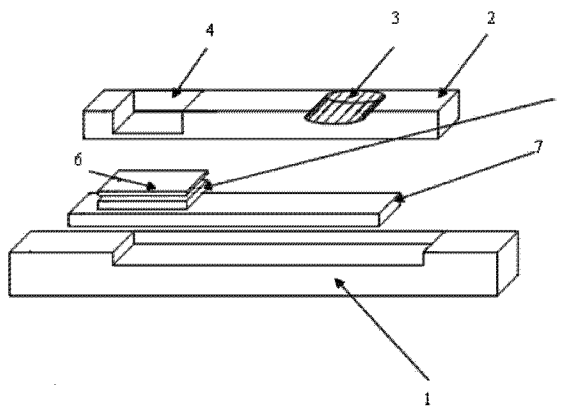
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法, 包括: 滤纸在第一相浸液中浸润后, 在 30-50℃ 热风干燥, 得到酶试剂层; 滤纸在第二相浸液中浸润后, 在 30-50℃ 热风干燥, 得到显色剂层; 将海绵棒在抗抗坏血酸浸润液中浸润, 40-60℃ 热风烘干, 得到抗抗坏血酸海绵棒; 依次将显色剂层、酶试剂层切割成的试纸块, 压在上盖显色孔下, 抗抗坏血酸海绵棒一端上, 即得。本发明解决了现有试纸只能冷藏保存, 常温状态不稳定; GHB 脱氢酶和抗坏血酸有交叉反应, 使存在抗坏血酸的样品产生假阳性反应, 得出错误结果; 很多饮料本身有颜色, 会干扰检测结果等问题。



1. 一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法,包括:
 - (1) 滤纸在第一相浸液中浸润后,在 30-50℃热风干燥,得到酶试剂层;
 - (2) 滤纸在第二相浸液中浸润后,在 30-50℃热风干燥,得到显色剂层;
 - (3) 将海绵棒在抗抗坏血酸浸润液中浸润,40-60℃热风烘干,得到抗抗坏血酸海绵棒;
 - (4) 依次将显色剂层、酶试剂层切割成的试纸块,压在上盖显色孔下,抗抗坏血酸海绵棒一端上,得到抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸。
2. 根据权利要求 1 所述的一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法,其特征在于:所述步骤 (1) 中第一相浸液配制过程具体为:每配制总体积为 100ml 的浸液,在 $\text{pH} = 8.8-10.8$,浓度为 40mmol/L-80mmol/L 的 Tris- 盐酸缓冲液中,分别溶入稳定剂和保护剂 0.1-10g, NAD^+ 辅酶 10.1-2.0g,黄递酶 200-20000iu,4- 羟基丁酸脱氢酶 2000-100000iu。
3. 根据权利要求 2 所述的一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法,其特征在于:所述稳定剂和保护剂为聚合高分子胶体。
4. 根据权利要求 3 所述的一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法,其特征在于:所述聚合高分子胶体为肝素、右旋糖酐,海藻糖、PEG10000、牛血清蛋白中的一种或几种。
5. 根据权利要求 1 所述的一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法,其特征在于:所述步骤 (2) 中第二相浸液为:每 100ml 溶剂中溶入 0.1-0.5g 氯化硝基四氮唑蓝。
6. 根据权利要求 5 所述的一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法,其特征在于:所述溶剂为甲醇或乙醇。
7. 根据权利要求 1 所述的一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法,其特征在于:所述步骤 (3) 中抗抗坏血酸浸润液为:每配制 100ml 的浸润液,在 $\text{pH} = 8.8-10.8$,浓度为 40mmol/L-80mmol/L Tris- 盐酸缓冲液中溶入抗坏血酸氧化酶 20-50mg, 2,6- 二氯酚靛酚钠 50-200mg。
8. 根据权利要求 1 所述的一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的制备方法,其特征在于:所述步骤 (4) 中试纸块为 $0.3 \times 0.3-0.8 \times 0.8\text{cm}$ 。

一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4-羟基丁酸检测试纸的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于检测 4-羟基丁酸试纸的制备领域,特别涉及一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4-羟基丁酸检测试纸的制备方法。

背景技术

[0002] GHB 全名 Gamma-Hydroxybutyrate(伽马-羟基丁酸及其钠盐)是一种麻醉药品。60 年代初医学上利用 GHB 作为麻醉剂,后来发现 GHB 的不良副作用,便停止使用,只利用作为安眠药之用。90 年代不法分子开始使用 GHB 作为娱乐,犯罪之用。GHB 是白色粉状,溶于水后无色,液体状称为 G 水。GHB 无气味,味微咸。GHB 的服后反应跟酒精相似。小剂量会令人放松、个人防线放开、精神起振及有类似轻微喝醉的兴奋感觉。中份量会令人头昏眼花、眼睛不能对准焦点、心情愉悦、能投入音乐、跳舞及谈话。没有时间观念,及不停点头。服用过量(OD)会令人无意识地不停点头或陷入无意识状态,极度眩晕,没有方向感及呕吐。严重过量会中毒,中毒者会全无意识、身体抽搐,呕吐及吸呼严重下降。于服用后 10-20 分钟会开始有反应,主要药效反应可维持 1-3 小时,剩余反应约会维持 2-4 小时甚至更久。如果 GHB 混合其他药物或酒精,很容易会导致服用者“OD”,更甚者更会昏迷及死亡。

[0003] 由于 GHB 为无色无味的药物,而且会混合水来服用,因此服用者根本没有可能知道自己所服用的份量为多少,亦因为这个原因所以很容易会发生服用过量的意外。就算是轻度的服用过量亦会令服用者失去意识甚至进入昏迷,或死亡。GHB 确是一种非常危险的毒品。就 2000 年 1 月美国所发表的报告,单在 1 月份美国已有 60 个服用 GHB 后死亡的个案,由此可以知道它的危险性。不论在生理或心理上 GHB 都会令使用者上瘾的。

[0004] 由于其上述特性,不法分子用它来作为迷幻药,迷奸青年女性,抢劫财物,被害人清醒后难以回忆起之前发生的一切。社会危害很大。《Reliable, Sensitive, Rapid and Quantitative Enzyme-Based Assay for Gamma-Hydroxybutyric Acid(GHB)》(Dawn T. Bravo 等著)中介绍了 GHB 脱氢酶的制备及检测 ghb 的试纸的制备,但是,该方法存在一些严重的问题:试纸只能冷藏保存,常温状态不稳定;GHB 脱氢酶和抗坏血酸有交叉反应,使存在抗坏血酸的样品产生假阳性反应,得出错误结果;很多饮料本身有颜色,会干扰检测结果。而本发明涉及一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4-羟基丁酸的检测装置制备方法,解决了这些问题。本发明的出现解决了上述问题,使检测结果更准确可靠。

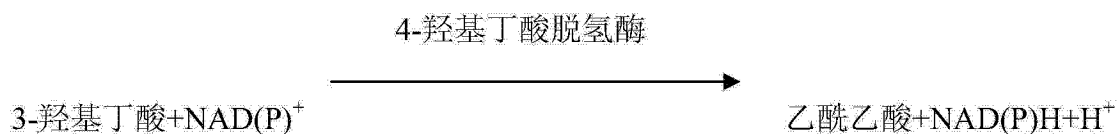
发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4-羟基丁酸检测试纸的制备方法,该方法可以抗检测液中的色素,维生素 C 等的影响,能够常温保存,专一性和灵敏度好。可以用于预防约会强奸,迷奸,及警方侦破案件时现场筛查鉴定。

[0006] 本发明的一种抗抗坏血酸和色素干扰的 4-羟基丁酸检测试纸的制备方法,包括:

[0007] (1) 滤纸在第一相浸液中浸润后,在 30-50℃热风干燥,得到酶试剂层;

- [0008] (2) 滤纸在第二相浸液中浸润后,在 30-50℃热风干燥,得到显色剂层;
- [0009] (3) 将海绵棒在抗坏血酸浸液中浸润,40-60℃热风烘干,得到抗坏血酸海绵棒;
- [0010] (4) 依次将显色剂层、酶试剂层切割成的试纸块,压在上盖显色孔下,抗坏血酸海绵棒一端上,得到抗坏血酸和色素干扰的 4-羟基丁酸检测试纸,其中显色剂层在上,酶试剂层在下。
- [0011] 所述步骤(1)中滤纸为滤纸 whatman23sl。
- [0012] 所述步骤(1)中第一相浸液配制过程具体为:每配制总体积为 100ml 的浸液,在 pH = 8.8-10.8,浓度为 40mmol/L-80mmol/L Tris- 盐酸缓冲液中,分别溶入稳定剂和保护剂 0.1-10g,NAD⁺ 辅酶 I 0.1-2.0g,黄递酶 200-20000iu,4-羟基丁酸脱氢酶 2000-100000iu。
- [0013] 所述稳定剂和保护剂为天然或人工聚合高分子胶体。
- [0014] 所述聚合高分子胶体为肝素、右旋糖酐,海藻糖、PEG10000、牛血清蛋白中的一种或几种。所述步骤(2)中滤纸为 whatman593。
- [0015] 所述步骤(2)中第二相浸液为:每 100ml 溶剂中溶入 0.1-0.5g 氯化硝基四氮唑蓝。
- [0016] 所述溶剂为甲醇或乙醇。
- [0017] 所述步骤(3)中抗坏血酸浸液为:每配制 100ml 的浸液,在 pH = 8.8-10.8,浓度为 40mmol/L-80mmol/L Tris- 盐酸缓冲液中溶入抗坏血酸氧化酶 20-50mg,2,6-二氯酚靛酚钠 50-200mg。
- [0018] 所述步骤(4)中试纸块为 0.3×0.3-0.8×0.8cm。
- [0019] 本发明中将待测样品加在海绵棒另一端的加样孔处,使样品在向显色孔扩散过程中去除夹杂其中的色素和抗坏血酸,消除二者的干扰,使结果更可靠。
- [0020] 本发明的原理:
- [0021] 反应原理:
- [0022]



Diaphorase

- [0023] $\text{NAD(P)H+NBT} \rightarrow \text{NAD(P)}^+ + \text{formazan}$
- [0024] $\text{NAD(P)H+NBT} \rightarrow \text{NAD(P)}^+ + \text{formazan}$
- [0025] 其中 NAD⁺:辅酶 I ;NADH:还原辅酶 I ;Diaphorase:黄递酶 ;NBT: 硝基四氮唑蓝,氯化硝基四氮唑蓝一类显色剂 ;formazan:甲臞(为蓝紫色化合物)。
- [0026] 生成的 formazan 的显色程度与待测体液的 4-羟基丁酸浓度正相关,可以制成标准色卡,显色的程度与标准色可比较从而半定量测定 4-羟基丁酸浓度。
- [0027] 有益效果
- [0028] 本发明试纸克服了现有试纸存在只能冷藏保存,常温状态不稳定 ;GHB 脱氢酶和抗坏血酸有交叉反应,使存在抗坏血酸的样品产生假阳性反应,得出错误结果 ;很多饮料本

身有颜色,会干扰检测结果的缺陷;

[0029] 本发明方法可以抗检测液中的色素,维生素 C 等的影响,能够常温保存,专一性和灵敏度好。可以用于预防约会强奸,迷奸,及警方侦破案件时现场筛查鉴定。

附图说明

[0030] 图 1 为本发明制备的抗抗坏血酸和色素干扰的 4- 羟基丁酸检测试纸的示意图;其中 1 装置下盖,2 装置上盖,3 加样孔,4 显色孔,5 酶试剂层,6 显色剂层,7 海绵棒;

[0031] 图 2 为加入相同 GHB 的水、苹果汁、橙汁的试纸检测显色图。

具体实施方式

[0032] 下面结合具体实施例,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适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明讲授的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0033] 实施例 1

[0034] 第一相酶溶液液总体积为 100mL 的配制过程如下:

[0035] 1) 配 pH8.0 的 50mmol/L Tris- 盐酸缓冲液;

[0036] 2) 溶入牛血清白蛋白 500mg;

[0037] 3) 溶入 NAD^+ 0.5g;

[0038] 4) 溶入黄递酶,10000iu;

[0039] 5) 溶入,4- 羟基丁酸脱氢酶 100000iu。

[0040] 第一相酶试剂层溶液浸渍:

[0041] 溶液制备好后,加入浸渍机,将一卷 whatman23s1 滤纸安装好,烘干温度设定 50°C ,走纸速度设定 3.0。开始浸渍走纸,溶液浸完后滤纸在烘干箱停留 1 小时,以便完全烘干。

[0042] 第二相显色剂层溶液制备:

[0043] 100ml 乙醇溶液,溶入氯化硝基四氮唑蓝 400mg。

[0044] 第二相溶液浸渍:

[0045] 593 超薄滤纸安装好,烘干温度设定 50°C ,走纸速度设定 3.0。开始浸渍走纸,溶液浸完后滤纸在烘干箱停留 1 小时,以便完全烘干。

[0046] 抗抗坏血酸海绵棒浸液总体积为 100mL 时的配制过程如下:

[0047] (1) 配 $\text{pH} = 8.8-10.8$ 的 40mmol/L-80mmol/L Tris- 盐酸缓冲液;

[0048] (2) 溶入抗坏血酸氧化酶 50mg;

[0049] (3) 溶入 2,6- 二氯酚靛酚钠 5mg。

[0050] Hcg 测试笔用海绵棒浸润于上述溶液, 50°C 烘干。

[0051] 测试装置制作:

[0052] 1) 取一段酶试剂层原纸,用 5mm 滚刀切成 5mm 细条,再切成 5mm 宽的试剂块,放到黑色密闭瓶中,放好干燥剂备用。

[0053] 2) 取一段显色剂层原纸,用 5mm 滚刀切成 5mm 细条,再切成 5mm 宽的试剂块,放到

黑色密闭瓶中,放好干燥剂备用。

[0054] 3) 取一根备用的海绵棒,装入下盖槽中,显色孔一端依次压上酶试剂层和显色剂层原纸,盖紧上盖备用。

[0055] 雪碧饮料 4- 羟基丁酸浓度的测定:

[0056] 4- 羟基丁酸钠、雪碧饮料,称取 0.5g4- 羟基丁酸钠,加入 300ml 雪碧饮料中溶解,未加 4- 羟基丁酸钠的雪碧饮料作为阴性对照,取 2 根试装置,加样孔分别滴入上述 2 种溶液 200 μ l,溶液扩散浸润显色孔记时,2 分钟看颜色,结果从阴性的黄色到,阳性紫色梯度区分明显。

[0057] 苹果汁(鲜榨)橙汁(鲜榨),分别称取 0.5g4- 羟基丁酸钠,加入 300ml 苹果汁(鲜榨)橙汁(鲜榨)中溶解,未加 4- 羟基丁酸钠的上述果汁作为阴性对照。取 4 滴上述 4 种溶液滴入加样孔中,显色孔处浸湿,然后 2 分钟看颜色,橙汁结果从阴性的黄色到,阳性紫色梯度区分明显。苹果汁结果从阴性的黄色到,阳性紫色梯度区分明显。

[0058] 实施例 2

[0059] 第一相酶溶液液总体积为 100mL 的配制过程如下:

[0060] 1) 配 pH8.0 的 50mmol/L Tris- 盐酸缓冲液;

[0061] 2) 溶入牛血清白蛋白 500mg;

[0062] 3) 溶入 NAD⁺0.5g;

[0063] 4) 溶入黄递酶,10000iu;

[0064] 5) 溶入,4- 羟基丁酸脱氢酶 50000iu。

[0065] 第一相酶试剂层溶液浸渍:

[0066] 溶液制备好后,加入浸渍机,将一卷 whatman23s1 滤纸安装好,烘干温度设定 50 $^{\circ}$ C,走纸速度设定 3.0。开始浸渍走纸,溶液浸完后滤纸在烘干箱停留 1 小时,以便完全烘干。

[0067] 第二相显色剂层溶液制备:

[0068] 100ml 乙醇溶液,溶入氯化硝基四氮唑蓝 300mg

[0069] 第二相溶液浸渍:

[0070] 593 超薄滤纸安装好,烘干温度设定 50 $^{\circ}$ C,走纸速度设定 3.0。开始浸渍走纸,溶液浸完后滤纸在烘干箱停留 1 小时,以便完全烘干。

[0071] 抗坏血酸海绵棒浸液总体积为 100mL 时的配制过程如下:

[0072] (1) 配 pH = 8.6 的 40mmol/L-80mmol/L Tris- 盐酸缓冲液;

[0073] (2) 溶入抗坏血酸氧化酶 45mg;

[0074] (3) 溶入 2,6- 二氯酚靛酚钠 100mg

[0075] Hcg 测试笔用海绵棒浸润于上述溶液,50 $^{\circ}$ C 烘干。

[0076] 测试装置制作:

[0077] 1) 取一段酶试剂层原纸,用 5mm 滚刀切成 5mm 细条,再切成 5mm 宽的试剂块,放到黑色密闭瓶中,放好干燥剂备用。

[0078] 2) 取一段显色剂层原纸,用 5mm 滚刀切成 5mm 细条,再切成 5mm 宽的试剂块,放到黑色密闭瓶中,放好干燥剂备用。

[0079] 3) 取一根备用的海绵棒,装入下盖槽中,显色孔一端依次压上酶试剂层和显色剂

层原纸,盖紧上盖备用。

[0080] 紫色葡萄汁(鲜榨),分别称取 0.5g 4-羟基丁酸钠,加入 300ml 紫色葡萄汁中溶解,未加 4-羟基丁酸钠的上述果汁作为阴性对照。取 200 μ l 上述 2 种溶液滴入过加样孔中,然后 2 分钟看显色孔处颜色,葡萄汁阴性显黄色,阳性紫色梯度区分明显,此装置克服了葡萄汁紫色的干扰。

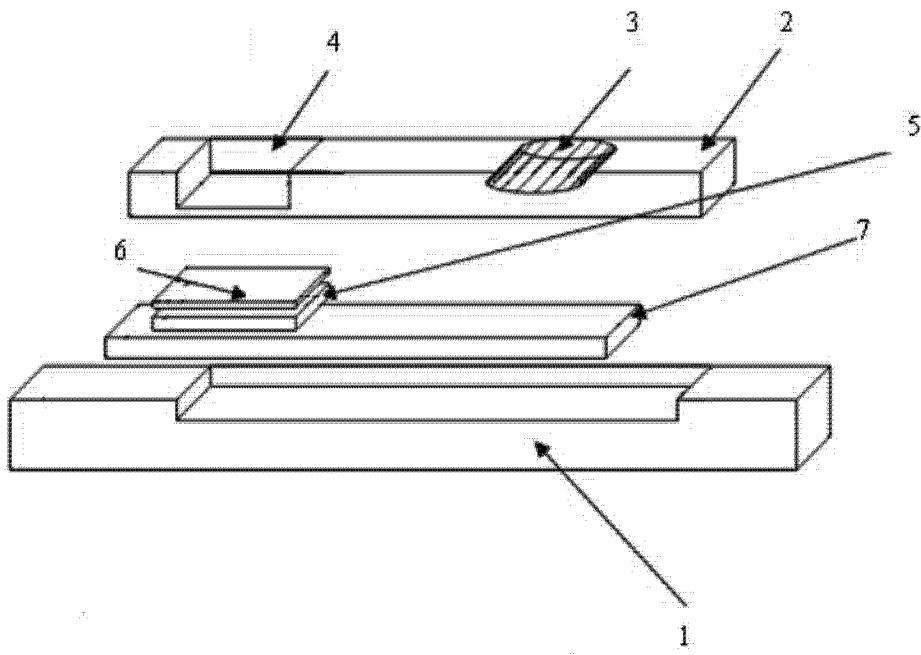


图 1

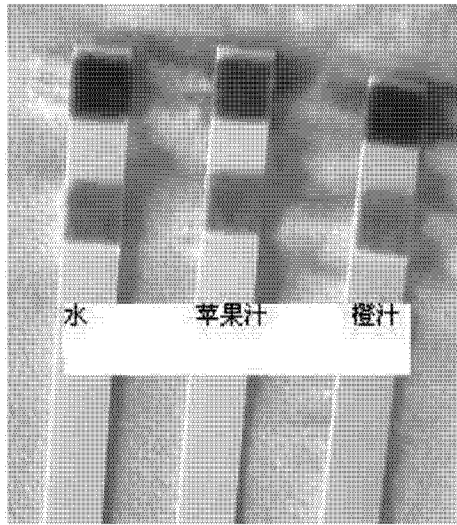


图 2