

DOI:10.3969/j.issn.1003-5060.2024.01.016

睡眠类特膳食品中非法添加地西洋的快速检测

杨雯, 屈玮

(合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230601)

摘要:为快速检测特膳食品中非法添加的地西洋,文章基于经典的免疫层析侧流试纸(lateral flow strips, LFS)结合金纳米粒子(gold nanoparticles,GNPs)标记,建立一种快速、简单、方便的胶体金试纸条检测方法。结果表明:制备的试纸条能够在不到 10 min 的时间内完成检测,且无需复杂的预处理过程,特异性好,灵敏度高,视觉检测限可低至 10.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。该方法操作简单、安全便捷,可以有效地实现睡眠类特殊膳食食品中非法添加地西洋的快速检测。

关键词:免疫层析;地西洋;快速检测;特膳食品;睡眠

中图分类号:TS207.7 **文献标志码:**A **文章编号:**1003-5060(2024)01-0107-06

Rapid detection of illegal addition of diazepam in special dietary foods for sleep

YANG Wen, QU Wei

(School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230601, China)

Abstract:In order to detect illegal addition of diazepam(DZP) in special dietary foods rapidly, a fast, simple and convenient colloidal gold strip method was established based on classical lateral flow strips (LFS) and gold nanoparticles(GNPs) labeling. The results showed that the prepared strip could complete the detection in less than ten minutes without complex pretreatment process, with good specificity and high sensitivity, and the visual detection limit could be as low as 10.0 $\mu\text{g}/\text{L}$. This method is simple, safe and convenient, and can effectively realize the rapid detection of illegal addition of DZP in special dietary foods for sleep.

Key words:immunochromatography; diazepam(DZP); rapid detection; special dietary foods; sleep

0 引言

地西洋(diazepam, DZP)又称安定、苯甲二氮卓,是苯二氮卓类的一种药物,具有抗焦虑、抗惊厥、肌肉放松、镇静和催眠等作用,临床易于获得使用^[1-2]。DZP的作用机制一直被认为是通过与 γ -氨基丁酸(γ -aminobutyric acid, GABA)结合,增强 GABA 对神经系统的抑制作用^[3]。睡眠是健康之本,随着社会的发展,人们生活节奏加快,工作压力增大,越来越多的人受失眠、焦虑的困

扰,但考虑到药物长期累积的不安全性,对纯植物、纯中药高度信任,因此选择食用一些具有改善睡眠效果的特膳食品和保健食品。特膳食品是近年食品工业领域的一个新兴产业^[4],将改善睡眠的中药材和食物组合在一起以实现保健作用,不改变传统的饮食习惯,消费者可接受性好^[5]。我国《食品安全法》已明确指出:“不得向食品中非法添加任何化学药品”^[6]。由于苯二氮卓类药物独具的镇静催眠的特点,常被不法商家非法添加到声称有改善睡眠效果的特膳食品中,尤其是网

收稿日期:2021-08-10;修回日期:2021-09-18

基金项目:国家重点研发计划资助项目(2018YFC1603606)

作者简介:杨雯(1997—),女,山东潍坊人,合肥工业大学硕士生;

屈玮(1979—),男,山东济宁人,博士,合肥工业大学副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail:quwei@hfut.edu.cn.

络出售的睡眠类食品,以达到快速有效的目的,在失眠领域已经逐渐成为应用最广泛的药物。DZP 用于催眠的成人每天用量是 5~10 mg,但长期食用可能会产生药物依赖。由于特膳食品是基于功能性的产品,为达到其有效性,添加量一般会在微量至常量的水平^[7]。保健食品中 75 种非法添加化学药物的检测(BJS 201710)中规定:口服液类、硬胶囊类、软胶囊类、片剂保健食品中非法添加 DZP 的检出限分别是 27、400、120、400 $\mu\text{g/L}$ 。

目前传统检测非法添加 DZP 及其类似物的方法大多是高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)^[8-9]、气相色谱-质谱法(gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)^[10]、液相色谱-质谱法(liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS)^[11-12]、酶联免疫吸附法^[13-14]、放射免疫分析法^[15]、拉曼光谱法^[16-17]和毛细管电泳法^[18-19]等,这些方法虽然灵敏度高、准确性好,但是需要漫长的前处理过程,设备操作繁琐,对操作人员要求高,费时费力,难以满足市场监管对大规模样品现场筛查的需求。

免疫侧向层析技术是近几年发展较为迅速的固相免疫层析快速检测技术,能对目标物进行定性分析,由于其简便性而越来越多地被应用于即时检测^[20-21]。免疫侧向层析技术以抗体-抗原(Ab-Ag)特异性反应为基础,在毛细管作用下,样品在层析材料上移动,液体样品中的待测分析物与层析材料上提前标记好的标记物发生特异性结合,通过胶体金、荧光化合物等可目测信号标记物的显色而快速得到检测结果,已被广泛应用于临床和食品检测等领域^[22-24]。胶体金免疫层析利用胶体金标记抗体,结合胶体金标记、免疫分析和色谱分析等多种方法,不需要昂贵的仪器,操作简单,易于使用,可在几分钟内得到结果,主要作为定性或半定量检测手段来实现现场检测^[25-26]。本文将胶体金免疫侧向层析应用于检测非法添加在特膳食品中的 DZP,样品无需复杂前处理,易于使用,成本低,结果分析速度快,适用于大批量样品的快速筛选。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

氯金酸、柠檬酸三钠(百灵威科技有限公司);蔗糖、碳酸钾、牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA)、卵清蛋白(ovalbumin, OVA)、人血清白蛋白(Human serum albumin, HSA)(国药集团

化学试剂有限公司);硝西洋标准品、氯硝西洋标准品、DZP 标准品、奥沙西洋标准品、劳拉西洋标准品(上海安谱实验科技股份有限公司);地西洋抗体和包被原(中科安体生物科技有限公司);聚氯乙烯(polyvinyl chloride, PVC)底板、玻璃纤维素膜、吸水垫、硝酸纤维素膜(nitrocellulose filter, NC 膜)和羊抗鼠二抗(上海捷宁生物有限公司)。

1.2 仪器与设备

Heraeus Fresco 17 高速冷冻离心机(美国赛默飞世尔公司);JA2003 电子分析天平(上海力辰科技有限公司);A6100L 单反相机(索尼有限公司);JB-3A 磁力加热搅拌器(上海雷磁有限公司);各量程移液器(芬兰雷勃公司);101-1B 恒温鼓风干燥箱(鑫熊发仪器有限公司);XYZ 试纸条喷膜仪、CM4000 试纸条切条机(美国伯乐公司);SI-0246 微型旋涡混合仪(美国 SI 科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 胶体金的制备

胶体金的制备方法是柠檬酸三钠还原法。将 250 mL 锥形瓶放置于磁力加热搅拌器上煮沸清洗 4 次,然后向瓶中倒入 60 mL 双蒸水,在搅拌状态下加入 850 μL 、5 g/L 的氯金酸溶液,加热至微沸后,保持 1 600 r/min 的搅拌转速不变,迅速向锥形瓶中加入一定体积 5 g/L 的柠檬酸三钠溶液。观察到瓶中溶液的颜色迅速改变,呈透明-黑-酒红色,当锥形瓶中液体的颜色不再改变,关闭加热开关,继续搅拌 5 min,冷却至室温,4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.3.2 单克隆抗体-胶体金标记物的制备

取 500 μL 胶体金溶液于 1.5 mL 离心管中,用 0.1 mol/L 的碳酸钾溶液调节溶液 pH 值为弱碱性,再加入 1.5 μL DZP 抗体振荡反应 1 h 后,加入一定质量分数为 10% 的 BSA 溶液封闭多余的位点,继续振荡反应 1 h,10 000 r/min 离心 10 min,产生红色沉淀;去上清后用 10% BSA 50 μL 重悬即可得到地西洋的金标抗体溶液,制备金标垫。

1.3.3 胶体金试纸条的组装

一个完整的试纸条由支撑底板、样品垫、金标垫、NC 膜和吸水垫 5 个部分组成。首先将玻璃纤维素膜切成宽度为 17 mm 的条状,放置在样品垫处理液中浸泡 2 h,26 $^{\circ}\text{C}$ 烘干备用;然后将 DZP 包被原、羊抗鼠二抗用 10 mmol/L 磷酸缓冲

液($\text{pH}=7.4$)分别稀释至 0.4、1.0 g/L,依次吸入喷膜仪后喷至 NC 膜上,作为检测线(T 线)和质控线(C 线), $26\text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘 2 h 至干燥;最后依次将吸水垫、NC 膜和样品垫粘贴在底板上,用切条机切割成 3 mm 宽的条状。

1.3.4 试纸条的检测

1) 可行性验证。对组装好的试纸条进行可行性验证,分别上样 PBS 缓冲液的阴性样品和用 PBS 缓冲液稀释的 $100\text{ }\mu\text{g/L}$ 的阳性样品,观察试纸条的显色情况。

2) 偶联过程关键参数的优化。在胶体金与抗体偶联过程中,优化抗体添加量、偶联时调节 pH 值的碳酸钾用量、重悬液的种类 3 个关键的实验参数,确定最合适的抗体偶联量、偶联 pH 值条件、重悬条件。

1.3.5 灵敏度检测

将 DZP 标准品溶液用 PBS 缓冲液稀释到不同质量浓度,使 DZP 质量浓度分别为 0、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/L}$,分别滴加到试纸条上进行测试,反应 10 min 后观察试纸条显线结果。

1.3.6 特异性检测

为了验证该试纸条的特异性,用 PBS 缓冲液与 DZP 结构类似的硝西洋、氯硝西洋、劳拉西洋、奥沙西洋 4 种苯二氮卓类药物稀释后,用制备好的试纸条进行测试,判断试纸条的特异性。

1.3.7 实际样品检测

向某市售睡眠类特膳饮料中添加 DZP 标准品溶液,使样品中 DZP 质量浓度分别为 0、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0 $\mu\text{g/L}$,分别滴加到试纸条上进行测试,反应 10 min 后观察试纸条显线结果。

2 结果与分析

2.1 检测原理

胶体金试纸条检测 DZP 的原理如图 1 所示。

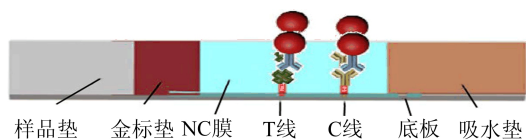


图 1 用于地西洋检测的试纸条原理

其原理基于小分子目标物与包被抗原竞争抗体的三元体系。当溶液中不存在目标物时,金标抗体与 T 线的抗原结合,T 线显线,多余的金标

抗体在毛细管力的作用下继续向前移动,与 C 线的二抗结合,C 线显线;当溶液中存在目标物,游离的 DZP 与 T 线上包被原竞争金标抗体,随着溶液中 DZP 质量浓度的增加,T 线显色逐渐变浅直至完全消线。当 C 线、T 线均显色时,无论颜色深浅,保健食品中地西洋的质量浓度都低于检测限;当 C 线显色,而 T 线没有颜色,地西洋的质量浓度高于或等于检测限。

2.2 可行性验证

可行性验证结果如图 2 所示,从图 2 可以看出,仅含有加载 PBS 缓冲液的阴性样品在 10 min 内显示出红色的 T 线和 C 线,而在 PBS 缓冲液中含有 $100\text{ }\mu\text{g/L}$ DZP 的阳性样品只能观察到 C 线,而 T 线完全消失。颜色对比有力地证实了该试纸条可用于 DZP 检测。

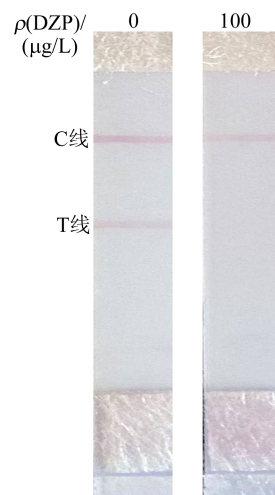


图 2 地西洋试纸条的阴阳性对照

2.3 关键参数优化结果

对侧流试纸(lateral flow strips,LFS)检测结果至关重要的几个参数的优化结果如图 3 所示。从图 3a 可以看出,向相同体积的金纳米粒子(gold nanoparticles,GNPs)溶液中添加不同体积 1.0 mg/mL 的 DZP 抗体,随着抗体量的增加,阴性 T 线强度明显提高,C 线变化不明显, $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 抗体量时的阴性 T 线与 $1.5\text{ }\mu\text{L}$ 时深浅相似,抗体量继续增加颜色不再发生明显变化,考虑到节约原料,最终选择偶联抗体量为 $1.0\text{ }\mu\text{L}$ 。免疫层析试纸条制备过程中偶联时碳酸钾添加量的选择对检测灵敏度极为重要。从图 3b 可以看出,随着碳酸钾添加量的增加,阴性 T 线越来越浅,C 线也逐渐变浅,最终选择偶联时添加的碳酸钾量为 $4\text{ }\mu\text{L}$ 。从图 3c 可以看出,重悬液为 OVA 的试纸

条金标垫上的金标偶联物未完全释放,重悬液为 HSA 的试纸条 C 线颜色均一, T 线较其他组强,灵敏度高,最终选择 HSA 溶液作为偶联时的重悬液。

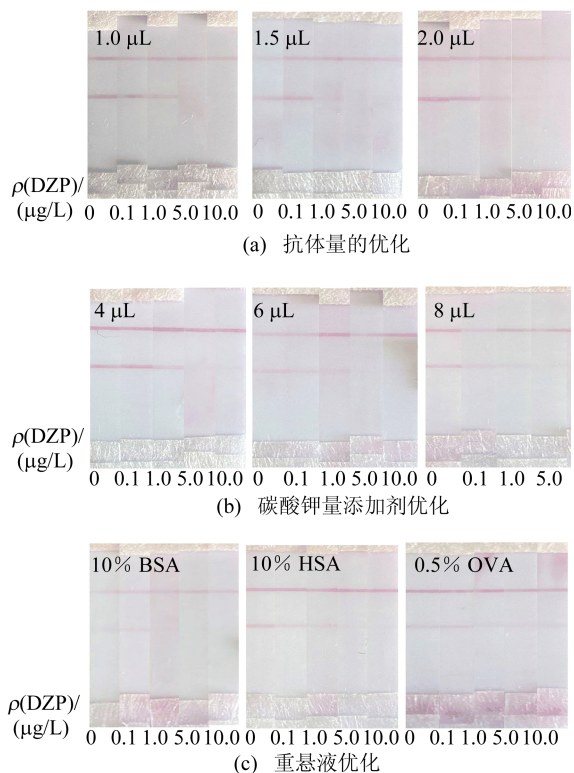
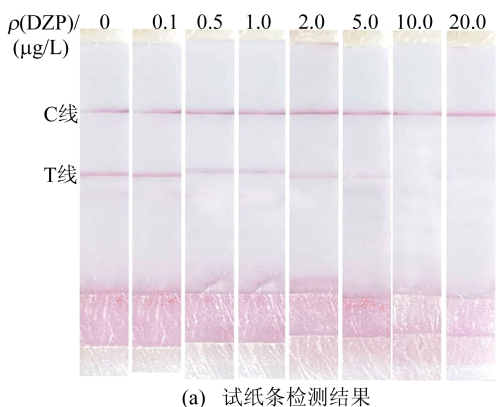


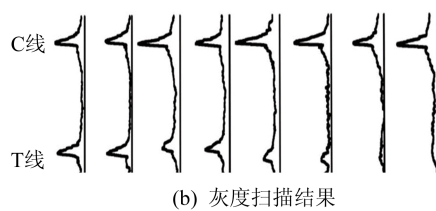
图 3 偶联参数的优化结果

2.4 灵敏度检测结果

制备好的胶体金试纸条可以在 10 min 内肉眼观察到结果, DZP 的灵敏度检测结果如图 4 所示。从图 4 可以看出, 随着 DZP 质量浓度的增大, T 线的显线强度不断减弱, 直至 10.0 μg/L 时 T 线完全消失, 灵敏度可达 10.0 μg/L; T 线信号强度峰值随着地西洋质量浓度的增加不断降低, 直至平缓, 线性良好。



(a) 试纸条检测结果



(b) 灰度扫描结果

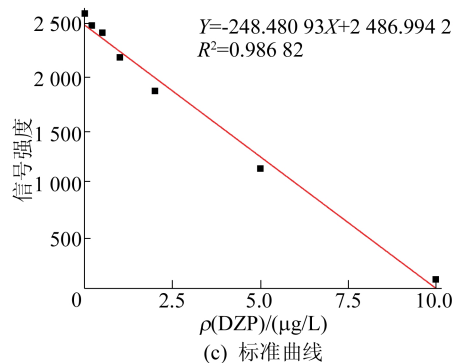


图 4 DZP 灵敏度检测结果

2.5 特异性检测结果

将硝西洋、氯硝西洋、劳拉西洋和奥沙西洋 4 种结构与 DZP 相似的苯二氮卓类药物用 PBS 缓冲液稀释成 100 μg/L 的溶液, 用制备的试纸条进行检测, 试纸条的特异性检测结果如图 5 所示。从图 5 可以看出, C 线均显线, 说明试纸条的有效性, 而只有质量浓度为 10 μg/L 的 DZP 溶液的 T 线消线, 其他 4 种均有明显的 T 线出现, 该结果说明制备的试纸条有良好的选择性。

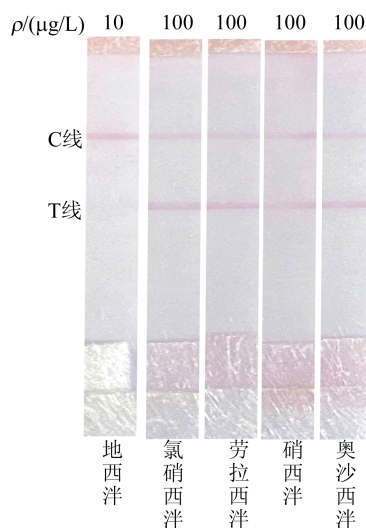


图 5 DZP 特异性检测结果

2.6 实际样品检测结果

考虑到实际样品中蛋白、多肽等基质会对实验结果产生影响, 在上样前 6 300 r/min 进行 7 min 离心处理, 添加 DZP 标品使饮料中 DZP 质量浓度分别为 0、0.1、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、

20.0 $\mu\text{g/L}$,分别滴加到试纸条上进行测试,反应 10 min 后灵敏度检测结果如图 6 所示。从图 6 可以看出,随着地西洋质量浓度的增大,T 线的显线强度不断减弱,直至 10.0 $\mu\text{g/L}$ 时检测线完全消失,质控线显色均匀,与灵敏度检测结果一致;T 线信号强度峰值随 DZP 质量浓度的增加不断降低,直至平缓,表明该试纸条可应用于实际样品的检测。

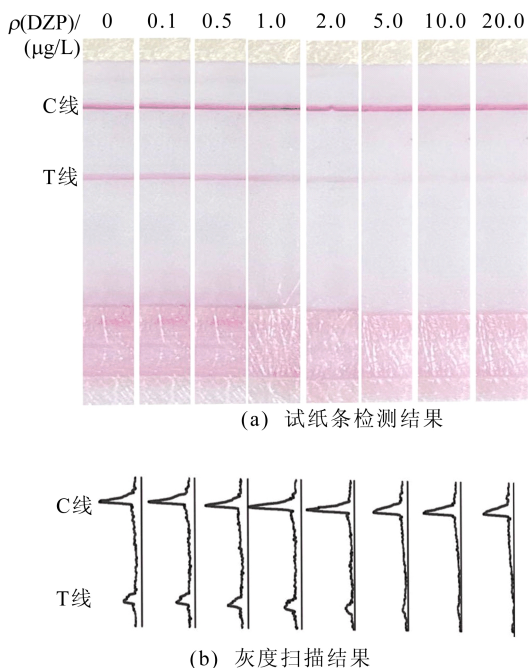


图 6 实际样品的灵敏度检测结果

3 结 论

胶体金免疫侧向层析法是一种新的免疫标记技术方法,以胶体金作为示踪标记物,以抗原抗体特异性反应为基础,是现场筛查的有力工具,因其简单、便携、长期稳定性和成本低而在实际应用中越来越受到关注^[27]。本实验构建了国产蛋白标记的试纸条快速检测睡眠类特殊膳食食品中违禁添加的 DZP,样品无需任何复杂的前处理,结果可在 10 min 内读出。与已报道的代表性方法相比,LFS 法操作简单,易于制备,通过目视观察,实现了低至 10.0 $\mu\text{g/L}$ 的视觉检测限,制备的试纸条特异性好,灵敏性高,可用于实际样品的现场快速检测,为市场监管时大批量检测提供便利。

[参 考 文 献]

[1] WANG X,JOHANSEN S S,ZHANG Y R,et al. Deposition of diazepam and its metabolites in hair following a single dose of diazepam[J]. International Journal of Legal Medi-

cine,2017,131(1):131-141.

- [2] 陈新谦,金有豫,汤光. 新编药理学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:220.
- [3] FUKATA Y,FUKATA M. Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity [J]. Nature Reviews Neuroscience,2010,11(3):161-175.
- [4] 李玲,夏新斌,周良荣. 中医药膳与特膳食品产业融合发展思辨[J]. 食品与机械,2019,35(9):233-236.
- [5] 张芳铭,郑慧,郑淘,等. 改善睡眠功能的食药资源及保健食品应用[J]. 食品科学,2020,41(23):303-310.
- [6] SCHROEDER D. Public health,ethics, and functional foods [J]. Journal of Agricultural & Environmental Ethics,2007,20(3):247-259.
- [7] 曹进,黄湘鹭,张庆生,等. 食品和保健食品中非法添加物筛查策略的建立[J]. 食品科学,2014,35(19):302-306.
- [8] ROUINI M R,ARDAKANI Y H,MOGHADDAM K A, et al. Improved HPLC method for rapid quantitation of diazepam and its major metabolites in human plasma[J]. Talanta,2008,75(3):671-676.
- [9] 王铁杰,韩东岐,鲁艺,等. HPLC 法同时测定安神类保健食品中 17 种添加的化学成分[J]. 药物分析杂志,2015,35(7):1223-1230.
- [10] JOUVEL C,MACIEJEWSKI P,GARCIA P, et al. Detection of diazepam in horse hair samples by mass spectrometric methods[J]. The Analyst,2000,125(10):1765-1769.
- [11] 张璇,杨光听,孔聪,等. 高效液相色谱串联质谱法测定水产品中镇静剂及其代谢物残留[J]. 分析化学,2021,49(3):460-469.
- [12] 林芳,李涛,李继,等. UPLC-DAD 法快速测定改善睡眠类保健食品中违法添加的 14 种精神药物[J]. 食品科学,2013,34(22):218-223.
- [13] 徐泽华,孙铁强,韩振宇,等. 地西洋 scFv-Fc 抗体的制备及其酶联免疫吸附检测方法的建立[J]. 解放军预防医学杂志,2020,38(10):73-78.
- [14] OLIVIERI B, MARIC M, BRIDGE C. Determining the effects of adulterants on drug detection via enzyme-linked immunosorbent assay and adulterant tests strips[J]. Drug Testing and Analysis,2018,10(9):1383-1393.
- [15] RUTTERFORD M G,SMITH R N. Radioimmunoassay of diazepam in samples of forensic interest[J]. The Journal of Pharmacy and Pharmacology,1980,32(7):449-452.
- [16] HAN S Q G W,BAO L,ZHANG M L, et al. Rapid detection of diazepam injection based on surface enhanced Raman spectroscopy[J]. Analytical Sciences,2017,33(7):789-792.
- [17] TOUBOU H,NAMERA A,ARIMA Y, et al. Detection of abused drugs in human blood by using the on-site drug-screening device Oratect (R) III [J]. Legal Medicine,2014,16(5):308-313.
- [18] 王涛,韩芸,滑鹏敏,等. 高效毛细管电泳法同时检测饲料中四种镇静类药物[J]. 河北省科学院学报,2020,37(3):65-68.

- schemes based on self-dual codes[C]//2008 IEEE Information Theory Workshop. [S.l.]:IEEE,2008:338-342.
- [2] MACWILLIAMS F J, SLOANE N J A. The theory of error-correcting codes[M]. Oxford:Elsevier,1977:317-329.
- [3] GEORGIU S, KOUKOUVINOS C. MDS self-dual codes very large prime fields[J]. Finite Fields and Their Applications,2002,8(4):455-470.
- [4] HAEADA M, KHAEGHANI H. Orthogonal designs and MDS self-dual codes[J]. Australasian Journal of Combinatorics,2006,35:57-67.
- [5] GUENDA K. New MDS self-dual codes over finite fields [J]. Designs Codes and Cryptography,2012,62(1):31-42.
- [6] FANG W J, FU F W. New constructions of MDS Euclidean self-dual codes from GRS codes and extended GRS codes [J]. IEEE Transactions on Information Theory, 2019, 65(9):5574-5579.
- [7] YAN H. A note on the constructions of MDS self-dual codes[J]. Cryptography and Communications,2019,11(2):259-268.
- [8] MASSEY J L. Some applications of coding theory in cryptography[M]//Codes and Ciphers: Cryptography and Coding IV. Essex, England:Formara Ltd. ,1995:33-47.
- [9] ZHANG A X, FENG K Q. A unified approach to construct MDS self-dual codes via Reed-Solomon codes [J]. IEEE Transactions on Information Theory, 2020, 66 (6): 3650-3656.
- [10] SOK L. Explicit constructions of MDS self-dual codes[J]. IEEE Transactions on Information Theory,2019,66(6):3603-3615.
- [11] HUANG Z T, FANG W J, FU F W. New constructions of MDS self-dual and self-orthogonal codes via GRS codes [J/OL]. (2021-10-27). <https://arxiv.org/pdf/2103.11665.pdf>.
- [12] JIN L F, XING C P. New MDS self-dual codes from generalized Reed-Solomon codes[J]. IEEE Transactions on Information Theory,2016,63(3):1434-1438.

(责任编辑 朱晓临)

(上接第 111 页)

- [19] WOZNIKIEWICZ A, WIETECZA-POSLUSZNY R, WOZNIKIEWICZ M, et al. A quick method for determination of psychoactive agents in serum and hair by using capillary electrophoresis and mass spectrometry[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,2015,111:177-185.
- [20] CHEN R, REN C P, LIU M, et al. Early detection of SARS-CoV-2 seroconversion in humans with aggregation-induced near-infrared emission nanoparticle-labeled lateral flow immunoassay[J]. American Chemical Society Nano, 2021,15(5):8996-9004.
- [21] ALONSO N, GRIFFA N, MOYANO R D, et al. Development of a lateral flow immunochromatography test for the rapid detection of bovine tuberculosis[J]. Journal of Immunological Methods,2021,491(4):112941.
- [22] 吴玉晗,陈伟. 侧向免疫层析快速检测牛乳中四环素和青霉素[J]. 食品科学,2020,41(24):281-286.
- [23] 钟友好,赵弟萍,薛峰,等. 基于信号增敏型试纸条三聚氰胺超灵敏检测方法[J]. 食品科学,2014,35(8):289-294.
- [24] CHEN W, LI X N, WU Q, et al. Rapid and easy determination of morphine in chafing dish condiments with colloidal gold labeling based lateral flow strips[J]. Food Science and Human Wellness,2019,8(1):40-45.
- [25] HASSANTABAR F, ZORRIEZHARA M J, FIROUZBAKHSI F, et al. Development and evaluation of colloidal gold immunochromatography test strip for rapid diagnosis of nervous necrosis virus in golden grey mullet (*Chelon aurata*) [J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44(6):783-791.
- [26] YANG X D, SUN Z K, TIAN F S, et al. A lateral flow immunochromatographic strip test for rapid detection of hexoestrol in fish samples[J]. Royal Society Open Science, 2018,5(8):180504.
- [27] WANG Y L, WANG L M, XUE J J, et al. Signal-amplified lateral flow test strip for visual detection of Cu^{2+} [J]. PLOS ONE,2017,12(1):e0169345.

(责任编辑 张 镗)