



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111472200 B

(45) 授权公告日 2021.12.24

(21) 申请号 202010423775.5

D21H 19/20 (2006.01)

(22) 申请日 2020.05.19

D21H 17/65 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

D21H 17/34 (2006.01)

申请公布号 CN 111472200 A

C08F 226/10 (2006.01)

C08F 226/06 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.07.31

(56) 对比文件

(73) 专利权人 太原理工大学

CN 107315086 A, 2017.11.03

地址 030024 山西省太原市迎泽西大街79号

CN 103588933 A, 2014.02.19

CN 110325218 A, 2019.10.11

(72) 发明人 马姣 张梦显 赵梦娇 李旺

US 2018169300 A1, 2018.06.21

CN 108815586 A, 2018.11.16

(74) 专利代理机构 太原科卫专利事务所(普通合伙) 14100

CN 105517585 A, 2016.04.20

CN 108342358 A, 2018.07.31

代理人 朱源 曹一杰

CN 105061783 A, 2015.11.18

CN 104350081 A, 2015.02.11

(51) Int. Cl.

审查员 刘炆

D21H 21/14 (2006.01)

D21H 19/14 (2006.01)

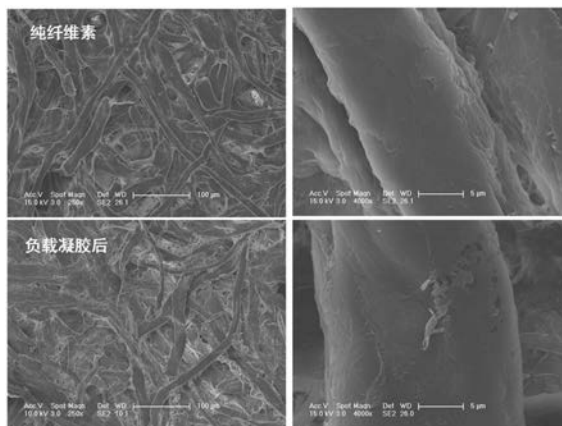
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种纤维素试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种纤维素检测试纸表面原位构筑抗污凝胶涂层的方法,属医用材料领域或体外诊断领域。本发明主要通过葫芦脲[8]与所提供抗污共聚物之间的主客体相互作用,在室温水溶液中快速得到抗污凝胶,并且进一步利用凝胶溶胶转变,以及单宁酸的粘合作用,实现抗污凝胶在纤维素试纸表面的负载及牢固结合。本发明提供的凝胶涂层制备方法简单,温和,无需催化剂且没有副反应,所构筑的凝胶涂层不仅具有优异的抗污效果,而且不影响本体纤维形貌。凭借优异抗污性能与毛细扩散能力,所获得的改性纤维素试纸在试纸检测领域必将有广阔的应用前景。



1. 一种纤维素试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 含有客体分子1-苄基-3-乙烯基咪唑的N-乙烯基吡咯烷酮抗污聚合物的制备

首先量取一定体积的苄基溴,在冰浴条件下,逐滴加至溶有乙烯基咪唑的乙腈溶液中,然后室温反应一定时间,分离提纯得到产物1-苄基-3-乙烯基咪唑;随后利用自由基反应聚合方法,称取BVIZ 0.478g,NVP 1~4mL, 4,4'-偶氮双(4-氰基戊酸) 0.05g,水18mL于三口烧瓶中,氮气鼓泡除去溶剂中氧气,随后对体系进行抽真空,充氮气3次,后体系密封,油浴锅中65℃反应10h;反应完毕后,将聚合物溶液至于3000Da分子量的透析袋中,水中透析3天,后冷冻干燥,最终得到含有客体分子的抗污共聚物p (NVP-co-BVIZ);

(2) 葫芦脲[8]主客体结合制备抗污凝胶

首先配置浓度为25mg/mL的葫芦脲[8]的水溶液,超声混合均匀,后向其中加入p (NVP-co-BVIZ) 抗污共聚物,其中抗污共聚物质量为葫芦脲[8]的2~4倍,超声静置,充分成胶;

(3) 抗污凝胶涂层在试纸表面的负载

首先将上述步骤(2)中制备得到的凝胶在加入足量的水后通过超声作用破坏凝胶网络,形成溶胶溶液;随后取溶胶溶液滴加至纤维素试纸表面,并立即在-20℃下冷冻12h;将上述充分冷冻的纤维素试纸在-45℃进行真空干燥5h,随后向纤维素试纸上滴加与上述溶胶溶液等体积的磷酸缓冲溶液,使得纤维素表面溶胶再次转变成凝胶,最终得到所需抗污凝胶涂层。

2. 如权利要求1所述的一种纤维素试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的方法,其特征在于,步骤(3)中先将纤维素试纸浸泡在单宁酸的水溶液中,清洗后用于凝胶涂层负载;所述单宁酸的水溶液浓度为50mg/mL,浸泡时间为10h。

3. 如权利要求1或2所述的一种纤维素试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的方法,其特征在于,步骤(3)中足量的水是指水的体积是凝胶体积的十倍及以上;磷酸缓冲溶液PH=7.0,摩尔浓度0.01-0.1M。

4. 如权利要求1或2所述的一种纤维素试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的方法,其特征在于,步骤(1)中控制苄基溴和乙烯基咪唑摩尔比相同。

一种纤维素试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种纤维素检测试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的方法,属医用材料领域或体外诊断领域。

背景技术

[0002] 基于纤维素等试纸作为固相载体进行体外检测是一种灵敏、快速、简便、价格低廉,可根据需要随时进行的新颖检测方法,是对传统大型仪器检测的良好补充,在疾病的早期预防,治疗及康复中展现出巨大的发展前景。然而,未改性的纤维素试纸与实际待测的血液样本接触时,在静电引力以及疏水相互作用下,大量血浆蛋白,血小板等生物分子会在试纸表面发生较强的吸附,这种非特异性吸附会占据识别位点,增大背景信号,从而降低检测灵敏度与准确度,甚至出现检测结果假阳性。因此,在检测试纸表面构建抗污涂层,抑制非特异性吸附已成为发展基于试纸分析这类新型体外诊断方法急需解决的关键问题。

[0003] 国际上的研究者先后提出了在试纸表面通过“graft-to”与“graft-from”方法引入亲水性的具有抗污功能的聚合物分子链,从而形成抗污涂层实现抑制血浆蛋白等非特异性吸附。然而这种方法涉及到活性官能团的引入,或引发剂的负载,以及表面聚合反应的进行,步骤繁琐且条件苛刻,而且试纸机械强度差,这为上述方法的实施带来一定困难。近期,研究者将含有不同活性官能团(如醛基、氨基)的抗污聚合物先后负载到纤维素表面,利用官能团之间的化学反应,原位交联制备凝胶涂层。结果表明,所构建凝胶涂层能够削弱后续蛋白质吸附。但是由于表面含有活性官能团,为了阻止蛋白在表面化学结合,仍需要进一步用惰性物质封闭未反应位点。而且含有活性官能团的聚合物分子设计及合成也十分繁琐。

发明内容

[0004] 本发明的目的是通过利用葫芦脲[8]的主客体识别作用,将含有抗污单体N-乙烯基吡咯烷酮与客体分子,乙烯基咪唑的共聚物,原位络合制备凝胶,并在纤维素试纸表面构建抗污凝胶涂层,同时通过单宁酸与纤维素表面以及聚合物之间的多重氢键作用实现凝胶涂层的牢固结合。

[0005] 本发明是采用如下技术方案实现的:

[0006] 一种纤维素试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的方法,包括如下步骤:

[0007] (1)含有客体分子1-苄基-3-乙烯基咪唑的N-乙烯基吡咯烷酮抗污聚合物的制备

[0008] 首先量取一定体积的苄基溴,在冰浴条件下,逐滴加至溶有乙烯基咪唑的乙腈溶液中,然后室温反应一定时间,分离提纯得到产物1-苄基-3-乙烯基咪唑;随后利用自由基反应聚合方法,将抗污单体N-乙烯基吡咯烷酮与1-苄基-3-乙烯基咪唑以5:1~20:1的摩尔比共聚,最终得到含有客体分子的抗污共聚物p(NVP-co-BVIZ);

[0009] (2)葫芦脲[8]主客体结合制备抗污凝胶

[0010] 首先配置浓度为25mg/mL的葫芦脲[8]的水溶液,超声混合均匀,后向其中加入p(NVP-co-BVIZ)抗污共聚物,其中抗污共聚物质量为葫芦脲[8]的2~4倍,超声静置,充分成

胶；

[0011] (3) 抗污凝胶涂层在试纸表面的负载

[0012] 首先将上述步骤(2)中制备得到的凝胶在加入足量的水后通过超声作用破坏凝胶网络,形成溶胶溶液;随后取溶胶溶液滴加至纤维素试纸表面,并立即在在 -20°C 下冷冻12h,;将上述充分冷冻的纤维素试纸在 -45°C 进行真空干燥5h,随后向纤维素试纸上滴加与上述溶胶溶液等体积的磷酸缓冲溶液,使得纤维素表面溶胶再次转变成凝胶,最终得到所需抗污凝胶涂层。

[0013] 为了在试纸表面形成凝胶涂层且不堵塞纤维间的孔道,保证其具有良好的毛细作用,我们首先将上述(2)中制备得到的凝胶在加入大量水后通过超声作用破坏凝胶网络,形成溶胶溶液。随后取溶胶溶液滴加至纤维素试纸表面,并立即冷冻处理。将上述充分冷冻的纤维素试纸先进行冷冻干燥处理,后滴加磷酸缓冲溶液,使得纤维素表面溶胶再次转变成凝胶,最终得到所需抗污凝胶涂层。

[0014] 步骤(1)中的各个工艺以及原料的用量保证了含有客体分子的抗污共聚物p(NVP-co-BVIZ)制备,且该产物的性质有利于后续步骤的实施。步骤(2)可以保证得到符合后续步骤要求的凝胶。步骤(3)中利用凝胶溶胶转变,以及单宁酸的粘合作用,实现抗污凝胶在纤维素试纸表面的负载及牢固结合。所述冷冻处理以及冷冻干燥步骤都对最终抗污涂层的获得起到了重要的作用,并具备了抗污效果。

[0015] 进一步的,步骤(3)中先将纤维素试纸浸泡在单宁酸的水溶液中,清洗后用于凝胶涂层负载;所述单宁酸的水溶液浓度为 50mg/mL ,浸泡时间为10h。

[0016] 本发明提供了一种抗污聚合物,能够与葫芦脲[8]在水中结合形成凝胶,同时该凝胶在大量水中会解离成溶胶溶液,而该溶胶经过冷冻干燥后,可以在一定浓度的磷酸缓冲溶液中再次成胶。而且所得凝胶在血清(试纸检测最常用生物样本)中能够稳定存在。本发明利用这一凝胶溶胶转变性质,以及单宁酸的结合作用,成功在纤维素试纸上原位构建上述凝胶涂层并牢固结合。本发明提供的凝胶涂层制备方法简单,温和,无需催化剂,且涂层中各组分均呈反应惰性,不会与后续蛋白进行化学结合,无需进一步封闭。最终所构筑的凝胶涂层不仅具有优异的抗污效果,而且不影响本体纤维形貌。凭借优异抗污性能与毛细扩散能力,所获得的改性纤维素试纸在试纸检测领域必将有广阔的应用前景。

附图说明

[0017] 图1表示本发明所制备的抗污凝胶及其溶胶转变过程。(a) CB[8]与不同比例p(NVP-co-BVIZ)共聚物成胶图,从左至右分别为NVP与BVIZ摩尔比为5,10,20三种比例;(b)所得凝胶在水中浸泡超声,成为溶胶溶液;(c)冷冻干燥后样品图;(d)加入磷酸缓冲液后,再次成胶,并稳定存在;(e)所得凝胶在血清中放置稳定存在。

[0018] 图2表示负载凝胶涂层后纤维素试纸表面扫描电镜图。图中右侧图为左侧的局部放大图。

[0019] 图3表示纤维素试纸表面负载凝胶前后蛋白质吸附的荧光显微镜图。

具体实施方式

[0020] 现在结合附图和以下实施例对本发明做进一步详细的说明,但应了解的是,这些

实施例仅为例示说明之用,而不应被解释为本发明实施的限制。

[0021] 步骤(1)中控制苄基溴和乙烯基咪唑摩尔比相同。

[0022] 优选的,抗污单体N-乙烯基吡咯烷酮与1-苄基-3-乙烯基咪唑以5:1或10:1或20:1的摩尔比共聚。

[0023] 步骤(3)中足量的水是指水的体积是凝胶体积的十倍及以上;磷酸缓冲溶液PH=7.0,摩尔浓度0.01-0.1M。

[0024] 本实施例中,利用葫芦脲[8]在纤维素试纸表面原位构建抗污凝胶涂层的步骤如下:

[0025] (1)含有客体分子1-苄基-3-乙烯基咪唑(BVIZ)的N-乙烯基吡咯烷酮(NVP)抗污聚合物的制备

[0026] 首先量取50mL乙腈于量筒中,同时取2.264mL 乙烯基咪唑于125mL锥形瓶内混合,并将锥形瓶放置于冰浴中搅拌使其充分混合均匀。10min后,用恒压漏斗向锥形瓶中逐滴滴加2.969mL的苄基溴,滴加要缓慢使其充分反应,待全部滴加完毕后,放置冰浴中逐渐降温,待其充分冷却后,撤掉冰浴,使体系在室温下持续搅拌反应24h。反应完毕后,进行旋蒸挥发溶剂,得到粘稠状黄色液体,在其中加入冷却的乙醚,析出白色沉淀,抽滤清洗得到最终产物:1-苄基-3-乙烯基咪唑。

[0027] 称取BVIZ 0.478 g,NVP 1mL或 2mL或4mL,4,4'-偶氮双(4-氰基戊酸) 0.05 g,水18mL于三口烧瓶中,氮气鼓泡除去溶剂中氧气,随后对体系进行抽真空,充氮气3次,后体系密封,油浴锅中65℃反应10h。反应完毕后,将聚合物溶液至于3000Da分子量的透析袋中,水中透析3天,后冷冻干燥,最终得到含有客体分子的抗污共聚物p(NVP-co-BVIZ)。

[0028] (2)葫芦脲[8]主客体结合制备抗污凝胶

[0029] 首先配置25mg/mL的葫芦脲[8]水溶液,充分混合均匀,后向其中加入p(NVP-co-BVIZ)共聚物,使其浓度达到50-100mg/mL,超声2min,倒置观察,不流动,成胶状(图1a所示)。而向其中加入十倍体积的水并经过超声处理后,凝胶溶解,得到溶胶溶液。随后将上述溶胶溶液进行冷冻干燥处理后,得到絮状网络聚合物。向其中加入磷酸缓冲液(PH=7.0,0.01M)后,再次成胶,而且能够在上述磷酸缓冲液中保持稳定。此外,将其浸泡在100%血清中,观察发现,凝胶可以稳定存在,这一性质使得所构建的抗污凝胶涂层能够用于实际血液样本的检测。

[0030] (3)抗污凝胶涂层在试纸表面的负载

[0031] 先将纤维素试纸浸泡在10mg/mL单宁酸的水溶液中1h,后清洗用于凝胶涂层负载,且保证牢固结合。

[0032] 我们选取上述(2)中NVP与BVIZ摩尔比为10所制备得到的凝胶为例,向凝胶中加入大量水(按照凝胶体积1:10)后通过持续超声作用破坏凝胶网络,形成溶胶溶液(图1b)。随后取0.2mL溶胶溶液滴加至(10*1cm²)纤维素试纸表面,并立即冷冻处理。将上述充分冷冻的纤维素试纸先进行冷冻干燥处理,后滴加磷酸缓冲溶液,使得纤维素表面溶胶再次转变成凝胶,最终得到所需抗污凝胶涂层。从图2中可以看出相比于纯纤维素试纸表面,负载凝胶涂层后,纤维上均匀覆盖着聚合物层,而且这些聚合物层没有将纤维之间孔隙堵塞,表面纤维素试纸的形貌几乎没有改变,良好的毛细扩散作用仍能用于检测试纸。

[0033] 将上述负载凝胶涂层的纤维素试纸与纯纤维素试纸均在磷酸缓冲液中先浸泡1h,

随后将其置于200 μ g/mL 的FITC标记的牛血清白蛋白溶液中,避光在37 $^{\circ}$ C下吸附2h,后用磷酸缓冲液清洗三次,除去表面未吸附蛋白,待样品充分干燥后,在激发波长488nm条件下,采用激光共聚焦显微镜观察,扫描样品表面蛋白吸附情况,采集荧光图片,并计算其荧光强度。从附图3中可以看到,相比于呈现明亮色的纯纤维素试纸表面,负载了抗污凝胶涂层的纤维素表面很暗,这表明相比于纯纤维素表面上吸附的大量蛋白,改性后的纤维素表面蛋白吸附得到明显的抑制,表明所构筑的凝胶涂层展现出良好的抗污效果。

[0034] 总之,本发明提供的利用葫芦脲[8]主客体识别原理构筑抗污凝胶,方法快速,温和,无副反应,而且能够进一步利用溶胶凝胶转变的特点,通过冻融循环,实现抗污凝胶在纤维素试纸表面的负载,在赋予表面优异抗污效果的同时不改变纤维形貌,最终结合上述优异抗污性能与毛细扩散能力,所制备的改性纤维素试纸在检测领域必将有广阔的应用前景。

[0035] 上述较佳实施方式仅用于说明本发明的内容,但这并非是对本发明的限制,本领域的相关技术人员,在不脱离本发明的范围的情况下,还可以做出相应的调整和变型,因此所有等同替换或等效变型的方式形成的技术方案均属于本发明的保护范围。

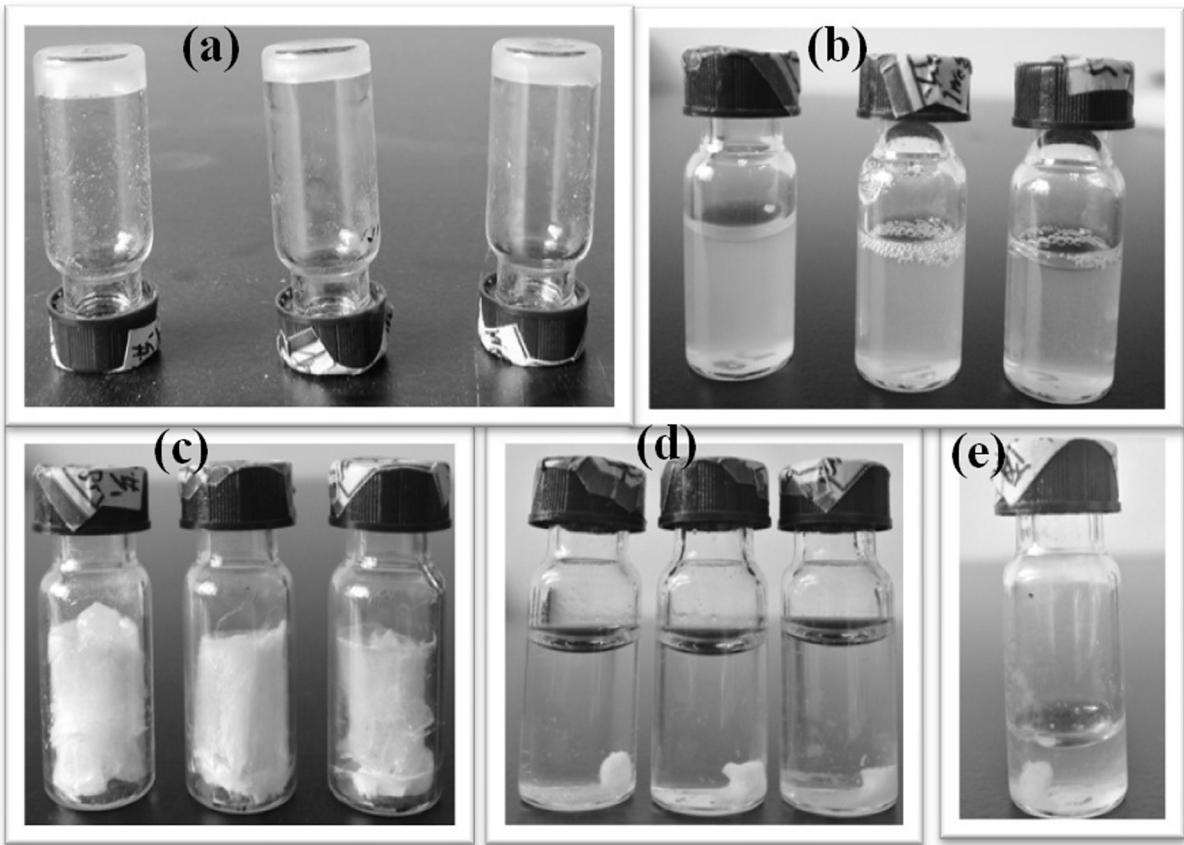


图1

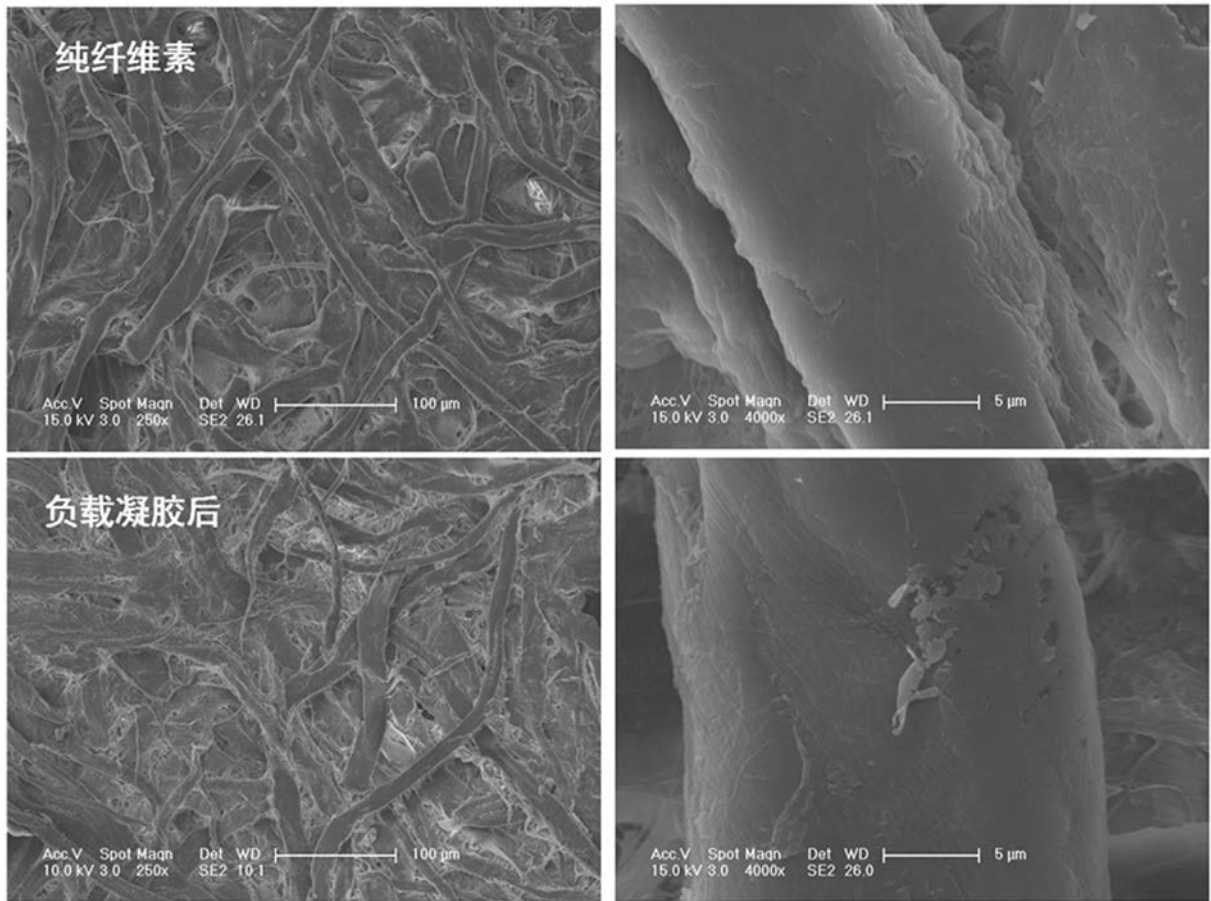


图2

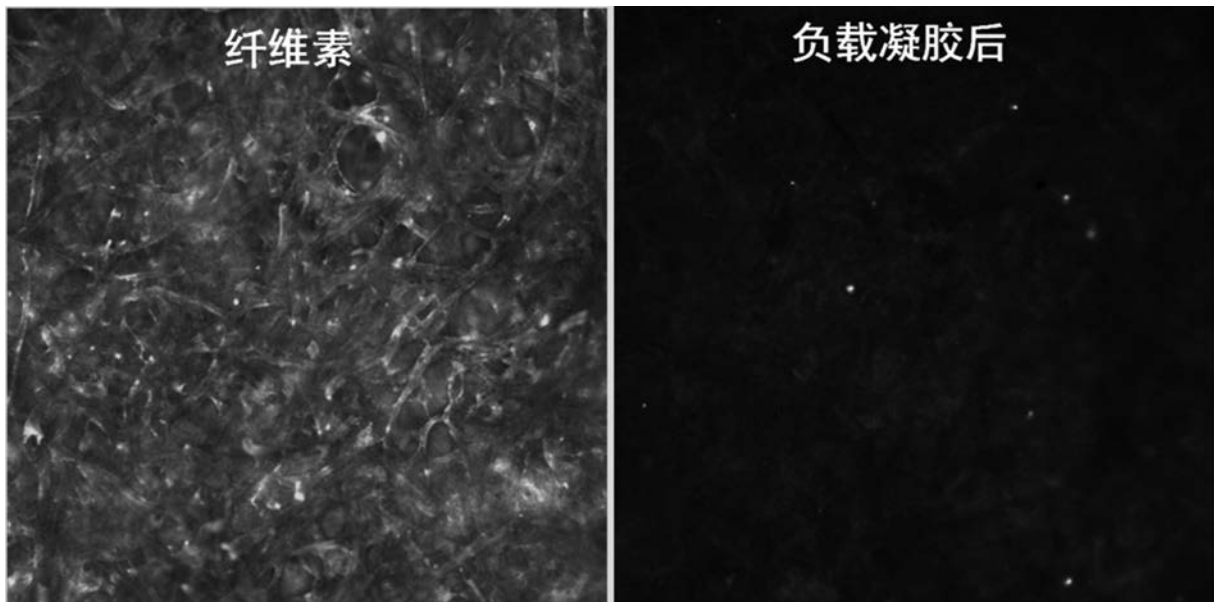


图3