

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2020 年 10 月 1 日 (01.10.2020)



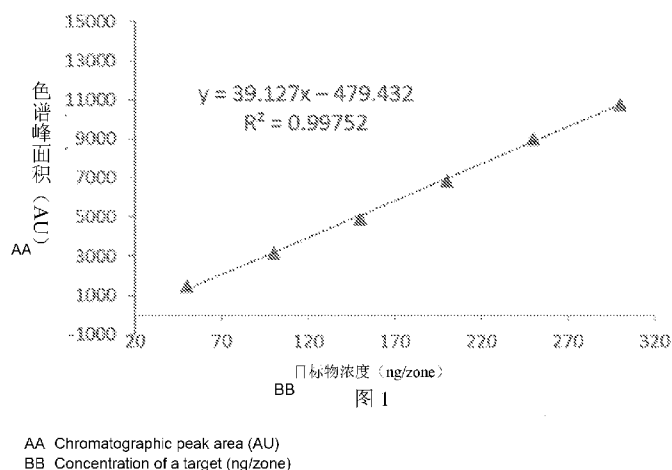
(10) 国际公布号  
**WO 2020/192228 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
**G01N 30/90** (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/130609
- (22) 国际申请日: 2019 年 12 月 31 日 (31.12.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201910231041.4 2019年3月26日 (26.03.2019) CN  
201910486813.9 2019年6月5日 (05.06.2019) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/  
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道  
1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 陈益胜(CHEN, Yisheng); 中国江苏省无  
锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122  
(CN)。 黄彩虹(HUANG, Caihong); 中国江苏省无

锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122  
(CN)。 徐学明(XU, Xueming); 中国江苏省无锡  
市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122  
(CN)。 金征宇(JIN, Zhengyu); 中国江苏省无锡  
市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122  
(CN)。 舒蓝萍(SHU, Lanping); 中国江苏省无锡  
市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122  
(CN)。 卫晓(WEI, Xiao); 中国江苏省无锡市滨  
湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。  
陈启飞(CHEN, Qifei); 中国江苏省无锡市滨湖区  
蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 柏  
玉香(BAI, Yuxiang); 中国江苏省无锡市滨湖区  
蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 张  
煌(ZHANG, Huang); 中国江苏省无锡市滨湖区  
蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 谢  
正军(XIE, Zhengjun); 中国江苏省无锡市滨湖区  
蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 王  
了(WANG, Liao); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖

(54) Title: METHOD FOR SCREENING COMPOUND BY MEANS OF HIGH-PERFORMANCE THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY COMBINED WITH BIOLUMINESCENCE METHOD

(54) 发明名称: 一种高效薄层色谱联用生物发光法筛检化合物的方法



(57) Abstract: A method for screening a compound by means of a high-performance thin-layer chromatography combined with a bioluminescence method, relating to the technical field of food detection. The high-performance thin-layer chromatography and the bioluminescence method are combined for use. The method comprises: spreading a sample to be detected on a thin-layer plate, then coupling to a luminescent bacterium, performing luminescence imaging, and finally performing scanning by using the thin-layer chromatography. The method for screening the compound by means of the high-performance thin-layer chromatography combined with the bioluminescence method can be used for detecting multiple samples, however, only one sample can be detected by using a high-performance liquid chromatography (HPLC). Compared with an existing HPLC, the present invention can achieve fast screening, simultaneously detect multiple kinds of samples in a single experiment, and achieve high throughput screening; a detection limit can reach 0.5-1 mg/kg; the detection method can achieve the repeatability less than 3.4%, and is economic, fast, simple and convenient.

大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 王龙霏 (WANG, Longfei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 (HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 一种高效薄层色谱联用生物发光法筛检化合物的方法, 属于食品检测技术领域。采用高效薄层色谱与生物发光法进行联用; 先将待测样品在薄层板上展开, 之后与发光细菌耦合, 再经过发光成像, 最后用薄层色谱扫描。高效薄层色谱联用生物发光法筛检化合物的方法可检测多个样品, 而采用HPLC法一次只能检测一个样品。与现有的高效液相法相比, 可实现快速筛检, 且单次实验同时检测多种样品, 实现高通量筛检; 检测限可达到0.5~1mg/kg, 检测方法可实现重复性RSD<3.4%, 具有经济、快速、简便的优点。

## 一种高效薄层色谱联用生物发光法筛检化合物的方法

### 技术领域

本发明涉及一种高效薄层色谱联用生物发光法筛检化合物的方法，属于食品检测技术领域。

### 背景技术

硝苯地平(Nifedipine, NDP)属于二氢吡啶类的抗高血压化学药，其药效原理是其为钙拮抗剂，可选择性抑制钙离子进入心肌细胞和平滑肌细胞的跨膜转运，并抑制钙离子从细胞内释放，而不改变血浆钙离子浓度，从而达到降低血压的效果。硝苯地平类降血压化学药功效良好且副作用较小，极易被用于保健茶的掺伪。在保健品市场中，源于药食两用材料的降血压保健品占据很大的份额。根据媒体和食药监部门披露的案例，一些不法分子为实现产品广告宣传中所声称的降血压降糖效果，在降血压保健品中非法添加西药硝苯地平，在降糖保健品中非法掺入西药苯乙双胍。这些行为不仅涉嫌商业欺诈，而且由于化学药物的添加具有大剂量和随意性的特点，消费者在不知情的前提下，往往会因为暂时的显著效果而长期服用，引起严重的毒害及其副作用，严重时甚至会危及生命。目前国内还没有针对这些药物中非法化学药掺伪的专门检测项目，因此建立针对降血压保健品中西药非法掺伪的筛查检测方法具有重要的意义。

目前，食品药品中硝苯地平常用检测方法为高效液相色谱法，此方法样品的前处理复杂，需要将样品中大多数杂质去除，且检测时间较长，一般一个样品需要 20 min，而且实验前需要进行长时间的系统平衡，测定过程只能逐一进行样品检测。

克菌丹(N-(trichloromethylthio)-4-cyclohexene-1,2-dicarboximide)，属于有机硫类物质，是农业生产中最广泛应用于植物保护目的的广谱杀真菌剂之一。特别是对于收获后的各种水果和蔬菜，克菌丹具有良好的保鲜性能，可以保证水果储藏加工后仍然具有新鲜和健康的外观。尽管如此，人们已经注意到滥用克菌丹并且其潜在威胁公共健康的可能性。近期研究证明，除了呕吐和结膜炎等急性中毒症状外，即使在低剂量水平的克菌丹暴露也可能导致对人类生殖系统的损害。因此，对水果和蔬菜中的克菌丹进行快速、简单和可靠的筛查对公共食品安全至关重要。所以，建立一种快速而可靠的分析方法用于快速筛检水果食品中克菌丹的残留具有极其重要的意义。

然而，值得注意的是，克菌丹分子的特点给常规分析方法带来了极大的困难。具体来说，克菌丹分子不仅在电喷雾条件下很难电离，并且在高温下非常不稳定，极易分解。由于这些限制，克菌丹实际上既不适合于 HPLC-MS 分析，也不适合 GC 分析，尽管它们是由于确认和

定量食品中有害残留物的使用最广泛的工具。除此之外，还需要特别注意的是克菌丹分子稳定性对 pH 条件也非常敏感，在样品制备和清理过程中必须避免 pH 波动引起的克菌丹降解。例如，通常用伯-仲胺试剂作为固相萃取吸附剂对食品样品进行清理是进行柱色谱分析之前必须进行的步骤。然而这一试剂的加入可能造成萃取溶液 pH 升至中性或弱碱性条件(pH=7-9)，最终导致克菌丹分解，得到假阴性结果。由此可见，上述问题的存在使得传统的柱色谱方法难以实现克菌丹的准确分析。

发光细菌是一类正常生理条件下能够发射可见光的微生物。其发光原理是在荧光素酶催化和分子氧的作用下，长链脂肪醛和还原型黄素单核苷酸(FMN<sub>H2</sub>)被氧化为长链脂肪酸和氧化型黄素单核苷酸(FMN)，同时释放出 450-490 nm 波长的蓝绿光。基于发光细菌这一特性，常被用来作为生物检测器的光学感应元件。较之常见的理化检测手段，发光细菌最大的优势在于检测能力的非靶向性：其传感原理并非基于对特定化学结构的识别，而是通过生物发光抑制程度表征目标物毒性高低，即当外界环境中存在毒性物质的干扰时，发光细菌的生理过程或细胞呼吸受到影响，导致发光反应受到抑制，而且有毒物质的含量与菌体发光强度变弱的程度呈相关性。

相对于准备工作复杂、周期冗长的斑马鱼、线虫等模式生物的毒性测试方法，发光细菌法的优点在于操作简单(菌体冻干粉复苏后直接使用)和快速高效(最快数分钟之内出结果)，因此具有更广阔的应用前景。目前，基于发光细菌的分析方法已经在欧盟饮用水安全和预警体系中扮演重要的角色。在我国，发光细菌检测技术在“5.12 汶川地震”灾区水质应急保障和太湖水质监控等工作中起到了重要作用。

通常，光密度计或酶标仪是发光细菌法应用的仪器载体。分析人员只需要将菌液与样品混合，经过一段时间的反应后定量检测发光强度变化。这一模式虽简单高效，但存在以下缺陷：① 背景干扰严重；② 缺乏对多元目标物的选择性。

目前 HPTLC 是唯一能与细胞基生物传感器直接联用的色谱工具。和传统的试管法不同，与 HPTLC 的联用可以从根本上解决发光细菌法样品背景干扰强和选择性差的问题。HPTLC 分离可使原本混在一起的目标物按分子结构的差异展开到薄层板上不同的位置形成物理隔离；随后，通过浸渍方式使与薄层板耦合的发光细菌可以方便地实现对样品中多元目标的同时检测。因此，建立在二者联用基础上的分析方法具有选择性高和通用性好的优点，已经成为分析化学的一个新兴热点前沿，在环境监测和天然产物分析等多个领域扮演重要的角色。

## 发明内容

针对上述问题，本发明直接通过 HPTLC 分离使原本混在一起的目标物按分子结构的差

异在薄层板上展开到不同的位置形成物理隔离；随后，通过浸渍方式使与薄层板耦合的发光细菌可以快速地实现对样品中多元目标的同时检测。

本发明的第一个目的是提供一种高效薄层色谱检测方法，所述方法是将高效薄层色谱与生物发光法进行联用。

在本发明一种实施方式中，具体步骤为：先将待测样品在薄层板上展开，之后与发光细菌耦合，再经过发光成像，最后用薄层色谱扫描。

在本发明一种实施方式中，所述薄层板包括硅胶板、纤维素板、酸性氧化铝板和碱性氧化铝板。

在本发明一种实施方式中，成像曝光时间分别为 20~50s。

本发明的第二个目的是提供一种上述方法在化合物检测领域的应用。

本发明的第三个目的是提供一种利用上述的方法检测含有硝苯地平样品。

在本发明一种实施方式中，所述展开剂为甲苯和乙酸乙酯混合溶液，甲苯和乙酸乙酯体积比为 4: 6。

在本发明一种实施方式中，所述薄层板包括硅胶板、纤维素板、酸性氧化铝板和碱性氧化铝板，优选地，薄层板为硅胶板和纤维素板。

在本发明一种实施方式中，所述发光细菌包括：（1）嗜冷发光杆菌 CGMCC 1.8932；（2）印度发光杆菌 CGMCC 1.8728；（3）水发光杆菌，CGMCC 1.12159，优选地，发光细菌为嗜冷发光杆菌 CGMCC 1.8932。

在本发明一种实施方式中，耦合条件为：发光细菌在 24~26℃环境中 80~150r/min 摇瓶培养 10~16h，得到细菌悬浮液，用量为 80~120 mL，耦合时间为 1~3 s，温度为 24~26 °C，pH 为 6.5~7.5。

在本发明一种实施方式中，发光成像条件为：成像曝光时间分别为 20~50s，间隔 1~3 min，拍摄照片至少 10 张，优选地，成像曝光时间为 20~40s。

在本发明一种实施方式中，所述薄层色谱扫描条件为：通过 videoscanner 软件对获得的数字化图像进行模拟扫描，可以实现检测结果的准确定量分析。

在本发明一种实施方式中，待测样品为保健品、食品或药品。

本发明的第四个目的是提供一种利用上述的方法筛选水果中克菌丹残留的样品。

在本发明一种实施方式中，所述的检测方法具体为：将待测水果样品通过简单的 A-QuEChERS 萃取步骤进行制备，然后将萃取液在薄层板上展开，再通过浸渍的方式将明亮发光杆菌悬浮液与色谱分离结果耦合，使用生物发光成像仪记录目标物对细菌生物发光的抑制

作用，并借助数字图像软件分析对检测结果进行定量分析。

在本发明一种实施方式中，所述展开使用流动相是甲苯：乙酸乙酯=8：2（v/v）。

在本发明一种实施方式中，所述生物发光自显影检测是在高效薄层色谱上基于明亮发光杆菌生物传感的检测，明亮发光杆菌悬浮液是浸渍耦合所需的液体，发光菌液需要在 25℃和 100 r/min 条件下的摇床中培养 36h，之后用于已展开薄层板的浸渍耦合。

在本发明一种实施方式中，所述生物发光成像仪是在可视化条件下，检测区域是色谱分离后的目标物在窗口区域干扰细菌生理代谢进而造成生物发光抑制形成黑斑，为肉眼检视提供便利，之后使用基于数字化图像像素模拟扫描的分析可以实现对成像结果的定量分析。

在本发明一种实施方式中，将待测样品通过高效薄层色谱展开，使目标物克菌丹与萃取液中的样品干扰基质物质分离，再通过浸渍的方式将色谱分离结果与明亮发光杆菌生物传感相耦合，通过生物发光成像结合数字图像分析定量评估水果中目标物残留浓度。

在本发明一种实施方式中，所述待测水果样品包括苹果、梨和樱桃。

在本发明的一种实施方式中，将 10g 水果样品的匀浆加入 45-55mL 离心管，继续加入 8-12mL 乙腈，0.1mL 甲酸，振荡混匀，超声水浴 8-12min；再加入 4g 无水硫酸镁和 1g 无水醋酸钠，振荡混匀，3500-4500r/min 离心 4-6min，取上层乙腈相 2-4mL，过 0.45μm 滤膜，即得到可以直接用于分析的液体样品。

在本发明的一种实施方式中，经展开并干燥后的薄层板进行生物发光自显影检测，之后通过生物发光成像装置记录检测结果，可以通过肉眼检视得到非常直观的半定量结果。

在本发明的一种实施方式中，通过 videoscan 软件对获得的数字化图像进行模拟扫描，可以实现检测结果的准确定量分析。

在本发明的一种实施方式中，将经过色谱展开和生物发光自显影后所得的薄层板置于生物发光成像仪拍照，并结合数字化图像软件定量分析，通过绘制标准曲线，计算水果样品中目标物克菌丹的含量。根据扫描定量所得检测结果得到标准曲线： $y = 163.46x + 1336.1$ ，计算水果样品中克菌丹的含量；其中，y 为色谱峰面积，单位 AU；x 为克菌丹含量，单位 ng。

### **本发明的有益效果：**

（1）本发明建立了一种高效薄层色谱联用生物发光法筛检硝苯地平的方法，本发明方法可检测多个样品，一次最多可检测 20 个样品，单次实验时长为 30 min，而采用 HPLC 法一次只能检测一个样品，单次实验时长为 20 min。因此，与现有的高效液相法相比，本发明方法可实现快速筛检，且单次实验同时检测多种样品，实现高通量筛检；本发明方法的回收率 96.8%-98.7%，检测限可达到 0.5~1mg/kg，检测方法可实现重复性 RSD<2.3%，具有经济、快

速、简便的优点。

(2) 本发明还建立了一种高效薄层色谱-生物发光自显影联用快速定量筛检水果中克菌丹残留的方法, 单次运行同时检测多种样品, 实现了高通量筛检的要求。检测限可达到 0.5~1mg/kg, 检测方法可实现重复性 RSD<3.4%, 加标回收率在 78.4%-97.7%, 此方法具有快速、准确、经济的优点; 同时基于高效薄层色谱和生物发光自显影联用检测方法的建立为食品中光谱特征不明显的有害物质残留的快速可靠筛检提供了方法范例。

### 附图说明

图 1 为实施例 2 中不同剂量硝苯地平对生物发光抑制的线性关系。

图 2 为实施例 3 中不同材料的薄层板和发光细菌的耦合效果, 其中, 点样轨道: (1) 硅胶板; (2) 纤维素板; (3) 酸性氧化铝板; (4) 碱性氧化铝板。

图 3 为实施例 3 中不同发光细菌和薄层板的耦合效果, 其中, 点样轨道: 1 为嗜冷发光杆菌 CGMCC 1.8932; 2 为印度发光杆菌 CGMCC 1.8728; 3 为水发光杆菌, CGMCC 1.12159。

图 4 为实施例 3 中不同曝光时间的拍摄效果图。

图 5 为实施例 4 中显影后的样品和标品生物发光图像, 其中, 点样轨道: 1 为保健品一, 2 为保健品一+硝苯地平标准溶液, 3~4 为硝苯地平标准溶液, 5 为保健品二, 6 为保健品二+硝苯地平标准溶液。

图 6 为实施例 5 克菌丹标准溶液展开图与线性关系。

图 7 为实施例 5 的基质效应展开图, 黑白背景。

图 8 为实施例 5 的基质效应扫描图, 彩色背景。

图 9 为实施例 6 中不同材料的薄层板与对检测结果的影响; 其中, (1) 硅胶板; (2) 纤维素板; (3) 酸性氧化铝板; (4) 碱性氧化铝板。

图 10 为实施例 6 中不同发光细菌对检测结果的影响; 其中, (1) 明亮发光杆菌 ATCC 11040; (2) 嗜冷发光杆菌 CGMCC 1.8932; (3) 印度发光杆菌 CGMCC 1.8728; (4) 水发光杆菌, CGMCC 1.12159。

图 11 为实施例 6 中不同展开剂对检测结果的影响; 其中, (1) 为甲苯: 乙酸乙酯=6: 4 (v/v); (2) 甲苯: 乙酸乙酯=7: 3 (v/v); (3) 甲苯: 乙酸乙酯=8: 2 (v/v)。

图 12 为实施例 7 加标回收率展开图; 其中, 1: 苹果; 2: 梨; 3: 克菌丹标准溶液; 4: 樱桃。

### 具体实施方式

以下对本发明的优选实施例进行说明, 应当理解实施例是为了更好地解释本发明, 不用

于限制本发明。

以下实施例所采用的菌（嗜冷发光杆菌 CGMCC 1.8932；印度发光杆菌 CGMCC 1.8728；水发光杆菌，CGMCC 1.12159；明亮发光杆菌 ATCC 11040；水发光杆菌，CGMCC 1.12159；）均购买于微生物菌种保藏中心。

### **实施例 1：高效薄层色谱联用生物发光法的工作发光悬浮液的制备**

工作发光悬浮液的制备过程如下：

#### **（1）模拟海水液体配制：**

按照以下配方配置模拟海水液体培养基：30g/L NaCl, 5g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3mL/L 甘油, 5g/L 蛋白胨和 5g/L 酵母提取物；加入 1 L 超纯水搅拌溶解后，用 1mol/L 的氢氧化钠水溶液将配好的液体培养基 pH 值调节至 7，再使用高压蒸汽灭菌锅 121℃灭菌处理 15min，配制好的液体培养基封装置于冰箱中冷藏备用，不用时在 4℃环境下可保存 7 天；

（2）发光细菌的培养和保藏：将用甘油冷冻保藏的发光细菌接种到装有步骤（1）制备的 100mL 液体培养基的三角瓶中；瓶口用灭菌的四层折叠锡箔纸包裹瓶口，确保培养过程中外界氧气能够进入瓶中，在 25℃环境中 100r/min 摇瓶培养，得到细菌母液；然后在成熟的细菌母液中加入等体积的新鲜液体培养基，制得工作发光悬浮液；工作发光悬浮液不用时，可在 4℃环境中保存 3 天。

### **实施例 2：基于高效薄层色谱联用生物发光法的硝苯地平标准曲线的绘制**

（1）标准溶液配制：用电子天平精确称量 50 mg 的硝苯地平标准品，置于 10 mL 容量瓶，甲醇定容，得到浓度为 5 mg/mL 的标准储备液；将标准储备液平时避光静置在 4℃环境，待临近分析工作开始，取出 1 mL 置于 10 mL 容量瓶，甲醇定容稀释，得到浓度为 0.5 mg/mL 的标准工作溶液；标准工作溶液每次检测之前都要重新配置；

#### **（2）将制得的标准溶液直接用于 HPTLC 点样；**

（3）色谱分离：首先用 100 μL 点样针手动吸取待检溶液，在 0.5 MPa 氮气流协助下通过半自动薄层点样仪定量吹扫到距离薄层板底端 10 mm 的位置，液流吹扫速度 100 nL/s，预排体积 0.2 μL，条带宽度 6 mm，距离两侧边缘至少 15 mm；对由步骤（1）、（2）制备的每个样品进行点样，一个样品点样结束后手动取出点样针，用甲醇清洗三次后，进行下一个样品点样；全部样品点样结束后，取出薄层板，用电吹风烘干 1 min，目的是使点样原点里残留甲醇挥发，使之不影响后续步骤；

色谱分离在全自动薄层展开仪中进行，流动相为甲苯/乙酸乙酯混合物，体积比为 4/6, v/v，展开距离 60 mm；色谱条件：通过饱和氯化镁溶液鼓泡控制展开缸内相对湿度，持续 3 min，

调节相对湿度至 35%，薄层板预平衡 10 min；待流动相前沿到达预定高度，系统自动结束，将薄层板取出，放在薄层加热器上 80℃烘烤 5min，以便挥发去除薄层上残留的有机溶剂；

(4) 生物发光成像检测：使用自动浸渍装置将展开、干燥后的薄层板浸入工作发光悬浮液，浸渍速度 1 mm/s，停留时间 2 s，随后将浸有工作发光悬浮液的薄层板放入生物发光成像仪中成像检测，成像曝光时间 40 s，每次拍照间距 2 min，连续拍摄 15 张；

(5) 分析：将通过生物发光成像仪拍摄的照片保存，然后用 Videoscanner 软件打开，对图片中的像素极性数字化解析得到可处理的色谱图，然后设定积分参数和条件进行定量分析。

不同剂量硝苯地平对生物发光抑制的线性关系如图 1 所示，当硝苯地平浓度为 0.05~0.30mg/g 时，硝苯地平浓度与色谱峰面积呈线性关系，线性方程为  $y=39.127x-479.432$ ， $R^2=0.99752$ ，检测限为 0.5~1μg/kg。

### 实施例 3：高效薄层色谱联用生物发光法检测硝苯地平的条件优化

#### 1、不同硅胶板对检测结果的影响

该方法检测原理是：所述发光菌株具体为在正常生理条件下能够发射可见光的一类微生物。该类细菌的发光原理是在荧光素酶催化和分子氧的作用下，长链脂肪醛和还原型黄素单核苷酸(FMN<sub>H2</sub>)被氧化为长链脂肪酸和氧化型黄素单核苷酸(FMN)，同时释放出 450-490 nm 波长的蓝绿光。基于这一特性，发光细菌常被用来作为生物检测器的光学感应元件。较之常见的理化检测手段，发光细菌生物传感最大的优势在于检测能力的非靶向性：其传感原理并非基于对特定化学结构的识别，而是通过生物发光抑制程度表征目标物毒性高低。

实验过程如下：

(1) 分别制备降血压保健品萃取液：称取降血压保健品粉末 1.0 g 加入 10 mL 甲醇，25℃超声水浴萃取 30 min，取出后 5000 转/min 离心 10 min，离心后取上层 5 mL 清液通过 0.45 μm 尼龙滤膜过滤，由此制得的样品清液直接用于 HPTLC 点样；

(2) 色谱分离：首先用 100 μL 点样针手动吸取待检溶液，在 0.5 MPa 氮气流协助下通过半自动薄层点样仪定量吹扫到距离薄层板底端 10 mm 的位置，液流吹扫速度 100 nL/s，预排体积 0.2 μL，条带宽度 6 mm，距离两侧边缘至少 15 mm；对由步骤 (1)、(2) 制备的每个样品进行点样，一个样品点样结束后手动取出点样针，用甲醇清洗三次后，进行下一个样品点样；全部样品点样结束后，取出薄层板，用电吹风烘干 1 min，目的是使点样原点里残留甲醇挥发，使之不影响后续步骤；所述薄层板材料，包括 (1) 硅胶板；(2) 纤维素板；(3) 酸性氧化铝板；(4) 碱性氧化铝板；

色谱分离在全自动薄层展开仪中进行，流动相为甲苯/乙酸乙酯混合物，体积比为 4/6, v/v，

展开距离 60 mm；色谱条件：通过饱和氯化镁溶液鼓泡控制展开缸内相对湿度，持续 3 min，调节相对湿度至 35%，薄层板预平衡 10 min；待流动相前沿到达预定高度，系统自动结束，将薄层板取出，放在薄层加热器上 80℃烘烤 5min，以便挥发去除薄层上残留的有机溶剂；

(3) 生物发光成像检测：使用自动浸渍装置将展开、干燥后的薄层板浸入工作发光悬浮液，浸渍速度 1 mm/s，停留时间 2 s，随后将浸有工作发光悬浮液的薄层板放入生物发光成像仪中成像检测，成像曝光时间 40 s，每次拍照间距 2 min，连续拍摄 15 张；发光细菌选用嗜冷发光杆菌 CGMCC 1.8932；

(4) 分析：将通过生物发光成像仪拍摄的照片保存，然后用 Videoscan 软件打开，对图片中的像素极性数字化解析得到可处理的色谱图，然后设定积分参数和条件进行定量分析。

采用四种不同材料的薄层板与发光细菌嗜冷发光杆菌耦合效果图见图 2。由图 2 可知，采用纤维素、酸性氧化铝和碱性氧化铝材料的薄层板与发光细菌耦合后条带成像不清楚，只有硅胶板材料的薄层板显现出清晰的条带，说明最适合筛检硝苯地平固定相为硅胶板。

## 2、不同发光细菌对检测结果的影响

采用上述优选的薄层板，区别在于：所述发光细菌包括：(1)嗜冷发光杆菌 CGMCC 1.8932；(2) 印度发光杆菌 CGMCC 1.8728；(3) 水发光杆菌，CGMCC 1.12159，其它步骤和参数同实施例 3 第一部分，采用几种不同菌株的发光细菌与硅胶板耦合效果图见图 3。

由图 3 可知，采用印度发光杆菌和水发光杆菌的发光细菌与薄层板耦合后条带成像不清楚，只有嗜冷发光杆菌的发光细菌显现出清晰的条带，说明最适合筛检硝苯地平的发光细菌为嗜冷发光杆菌。

## 3、不同曝光条件的影响

采用上述优选的薄层板和发光细菌，区别在于：成像曝光时间分别为 50s, 40s, 30s, 20s，其它步骤和参数同实施例 3 第一部分。通过选取不同条件的曝光时间进行成像，结果如图 4 所示，说明适合筛检硝苯地平最佳曝光时间为 40s。

## 实施例 4 高效薄层色谱联用生物发光法检测硝苯地平的性能测试

样品测试步骤如下：

### (1) 重复性实验

采用上述优选的检测方法，分别检测 50 mg/kg、70 mg/kg、90 mg/kg 和 110mg/kg 的样品，每个浓度重复 10 次，计算标准偏差 (SD)、相对标准偏差 (RSD) 及变异系数 (CV)。结果如表 1 示，测定结果 CV 均小于 2.3%，表明在线性范围内，该方法具有较好的重复性。

表 1 重复性实验

| 浓度 (mg/kg) | SD (%) | RSD (%) | CV (%) |
|------------|--------|---------|--------|
| 50         | 1.9    | 2.3     | 2.3    |
| 70         | 1.3    | 1.9     | 1.9    |
| 90         | 1.8    | 2.1     | 2.1    |
| 110        | 1.1    | 1.7     | 1.7    |

## (2) 加标回收实验

向样品中中添加不同浓度的硝苯地平标准品, 采用上述优选的高效液相薄层色谱联用生物法进行检测, 样品和标品展开图如图 5 所示, 每个浓度平行测定 5 次, 取平均值, 并与 HPLC 方法相比较, 测得的加标回收率结果如表 2 所示, 平均回收率为 98%, 且检测结果整体与 HPLC 结果都相符, 说明该试纸条具有良好的准确性。其中, HPLC 的具体操作方法为: 以十八烷基键合硅胶为色谱柱, 甲醇-水为流动相进行梯度洗脱, 检测波长为 235 nm, 柱温为 30°C。

表 2 加标回收率

| 样品       | 添加量 [mg/kg] | 检测量 [mg/kg]* | 回收率 (%)* | HPLC 检测量[mg/kg] |
|----------|-------------|--------------|----------|-----------------|
| 降血压保健品 1 | 60          | 58.1         | 96.8     | 59              |
|          | 120         | 118.4        | 98.7     | 117.9           |
| 降血压保健品 2 | 60          | 58.3         | 97.2     | 58.6            |
|          | 120         | 117.9        | 98.3     | 117             |

另外, 本发明方法可检测多个样品, 一次最多可检测 20 个样品, 单次实验时长为 30 min, 而采用 HPLC 法一次只能检测一个样品, 单次实验时长为 20 min。在两种方法准确性相当的情况下, 本发明方法可实现快速筛检, 单次实验可同时检测 20 个样品, 实现了高通量筛检, 具有经济、快速、简便的优点。

## 实施例 5: 基于高效薄层色谱联用生物发光法的克菌丹标准曲线的绘制

(1) 克菌丹标准液的制备: 用乙酸乙酯为溶剂, 制备浓度为 0.01mg/mL 的克菌丹的标准溶液, 之后建立标准曲线需将标准液进行稀释至 0.001 和 0.0005 mg/mL;

(2) 高效薄层色谱分离: 将 4-8 $\mu$ L 克菌丹的标准品、苹果、梨和樱桃样品用 Linomat 5 进行精确点样, 点样完成后用展开液 (甲苯: 乙酸乙酯=8: 2 (v/v)) 展开, 上行展开距离 60 mm, 展开完成后取出硅胶板置于 100°C 平板加热器上充分干燥 5min;

(3) 生物发光成像仪成像: 将步骤 (2) 高效薄层色谱板通过浸渍的方式将明亮发光杆菌悬浮液与色谱分离结果耦合, 之后置于生物发光成像仪中进行成像;

(4) 数字化图像软件定量分析: 将经过色谱展开和生物发光自显影后所得的薄层板置于生物发光成像仪拍照后, 结合数字化图像软件定量分析。扫描结束后, 以扫描色谱峰面积为

y 轴，克菌丹含量为 x 轴，制作标准曲线。

克菌丹标准溶液展开图与线性关系如图 6 所示，基质效应展开图 7 所示，基质效应扫描图如图 8 所示。通过标准曲线计算样品中克菌丹的含量。

## 实施例 6：高效薄层色谱联用生物发光法检测克菌丹的条件优化

### 1、不同硅胶板对检测结果的影响

该方法检测原理是：所述发光菌株具体为在正常生理条件下能够发射可见光的一类微生物。该类细菌的发光原理是在荧光素酶催化和分子氧的作用下，长链脂肪醛和还原型黄素单核苷酸(FMN<sub>H2</sub>)被氧化为长链脂肪酸和氧化型黄素单核苷酸(FMN)，同时释放出 450-490 nm 波长的蓝绿光。基于这一特性，发光细菌常被用来作为生物检测器的光学感应元件。与其他的理化检测手段相比，发光细菌生物传感最大的优势在于检测能力的非靶向性：其传感原理并非基于对特定化学结构的识别，而是通过生物发光抑制程度表征目标物毒性高低。

实验过程如下：

(1) 分别制备水果样品萃取液：将 10 g 水果样品的匀浆加入 50 mL 离心管，继续加入 10 mL 乙腈，0.1 mL 甲酸，振荡混匀，超声水浴 10 min；再加入 4 g 无水硫酸镁和 1 g 无水醋酸钠，振荡混匀，4000r/min 离心 5 min，取上层乙腈相 2-4 mL，过 0.45 微米滤膜，即可得到可以直接用于分析的液体样品，将其在 4 °C 中冷藏；

(2) 色谱分离：首先用 100  $\mu$ L 点样针手动吸取待检溶液，在 0.5 MPa 氮气流协助下通过半自动薄层点样仪定量吹扫到距离薄层板底端 8 mm 的位置，液流吹扫速度 100 nL/s，预排体积 0.2  $\mu$ L，条带宽度 6 mm，距离两侧边缘至少 12 mm；对由步骤 (1)，制备的每个样品进行点样，一个样品点样结束后手动取出点样针，用甲醇清洗三次后，进行下一个样品点样；全部样品点样结束后，取出薄层板，用电吹风烘干 1 min，目的是使点样原点里残留甲醇挥发，使之不影响后续步骤；所述薄层板材料，包括 (1) 硅胶板；(2) 纤维素板；(3) 酸性氧化铝板；(4) 碱性氧化铝板；

色谱分离在全自动薄层展开仪中进行，流动相经过优化，最终确定为甲苯/乙酸乙酯混合物，体积比为 8/2, v/v，展开距离 60 mm；色谱条件：通过饱和氯化镁溶液鼓泡控制展开缸内相对湿度，持续 3 min，调节相对湿度至 35%，薄层板预平衡 10 min；待流动相前沿到达预定高度，系统自动结束，将薄层板取出，放在薄层加热器上 100 °C 烘烤 5 min，以便挥发去除薄层上残留的有机溶剂；

(3) 生物发光成像检测：使用自动浸渍装置将展开、干燥后的薄层板浸入工作发光悬浮液，浸渍速度 1 mm/s，停留时间 2 s，随后将浸有工作发光悬浮液的薄层板放入生物发光成像

仪中成像检测，成像曝光时间 40 s，每次拍照间距 2 min，连续拍摄 15 张；发光细菌优化后选用明亮发光杆菌 ATCC 11040；

(4) 分析：将通过生物发光成像仪拍摄的照片保存，然后用 Videoscan 软件打开，对图片中的像素极性数字化解析得到可处理的色谱图，然后设定积分参数和条件进行定量分析。

采用四种不同材料的薄层板与明亮发光杆菌耦合效果图见图 9。由图 9 可知，采用纤维素、酸性氧化铝和碱性氧化铝材料的薄层板与发光细菌耦合后条带成像不清楚，只有硅胶板材料的薄层板显现出清晰的条带，说明最适合筛检克菌丹的固定相为硅胶板。

## 2、不同发光细菌对检测结果的影响

采用上述优选的薄层板，区别在于：所述发光细菌包括：(1) 明亮发光杆菌 ATCC 11040；(2) 嗜冷发光杆菌 CGMCC 1.8932；(3) 印度发光杆菌 CGMCC 1.8728；(4) 水发光杆菌，CGMCC 1.12159；其它步骤和参数同实施例 6 第一部分，采用几种不同菌株的发光细菌与硅胶板耦合效果图见图 10。

由图 10 可知，采用印度发光杆菌和水发光杆菌的发光细菌与薄层板耦合后条带成像不清楚，而嗜冷发光杆菌和明亮发光杆菌的发光细菌显现较清晰的条带，相比之下，明亮发光杆菌条带最清晰，说明最适合筛检克菌丹的发光细菌为明亮发光杆菌。

## 3、不同展开剂的比例对检测结果的影响

采用上述优选的薄层板和发光细菌，区别在于展开剂的比例不同：展开流动相的测试，首先选取甲苯：乙酸乙酯=6：4 (v/v) 进行测试，因选择的展开流动相的极性太强，导致目标条带距离板底部太近，效果不佳，如图 11 (1)，所以通过减少乙酸乙酯的量增加甲苯的量，来降低展开剂的极性；二次测试选取甲苯：乙酸乙酯=7：3 (v/v)，因选择的流动相极性减小，展开距离比之前高，但还是偏下而且有拖尾现象，如图 11 (2)；三次测试选取甲苯：乙酸乙酯=8：2 (v/v)，如图 11 (3) 展开效果最佳，解决了展开距离和拖尾现象，最终选择甲苯：乙酸乙酯=8：2 (v/v) 作为展开流动相。其它步骤和参数同实施例 6 第一部分。通过选取不同比例的展开剂，结果如图 11 所示，说明适合筛检克菌丹最佳流动相为甲苯：乙酸乙酯=8：2 (v/v)。

## 实施例 7 高效薄层色谱联用生物发光法检测硝苯地平的性能测试

对苹果、梨和樱桃以及不同的加标量进行检测：

分别对水果：苹果、梨和樱桃的预处理：将 10 g 水果样品的匀浆加入 50 mL 离心管，继续加入 10 mL 乙腈，0.1 mL 甲酸，振荡混匀，超声水浴 10 min；再加入 4 g 无水硫酸镁和 1 g 无水醋酸钠，振荡混匀，4000r/min 离心 5 min，取上层乙腈相 2-4 mL，过 0.45 微米滤膜，

即可得到可以直接用于分析的液体样品，将其在 4 °C 中冷藏。

加标回收率样液的预处理：将 10 g 水果样品的匀浆加入 50 mL 离心管，继续加入 10 mL 乙腈，0.1 mL 甲酸，振荡混匀，超声水浴 10 min；再加入 4 g 无水硫酸镁和 1 g 无水醋酸钠，振荡混匀，4000r/min 离心 5 min，取上层乙腈相 2-4 mL，过 0.45 微米滤膜，即得到可以直接用于分析的液体样品。苹果萃取液中加入 15 $\mu$ L 0.01mg/mL 的克菌丹，梨萃取液中加入 10 $\mu$ L 0.01mg/mL 的克菌丹和樱桃萃取液中加入 10 $\mu$ L 0.01mg/mL 的克菌丹，将其在 4 °C 中冷藏。

采用 0.5MPa 氮气为载体，用 100 $\mu$ L 注射器(CAMAG)将样品和克菌丹标准品用 Linomat 5 进行精确点样于 20 $\times$ 10 cm 的薄层板上，点样的条带长 6 mm，条带距离底部 8 mm，距离左端 12 mm，条带间距 1.7 mm。点样完成后用 ADC-2 (CAMAG)展开仪展开，展开前，通过在另一槽注入 10 mL 的流动相使缸内达到饱和状态。取 10 mL 优化后的展开液（甲苯：乙酸乙酯=8：2 (v/v)），上行展开 60 mm 取出，置于 100 °C 平板加热器上充分干燥 5 min。随后通过浸渍的方式将明亮发光杆菌悬浮液与色谱分离结果耦合。

之后将其置于生物发光成像仪上，在 40 秒曝光条件下获取硅胶板的图像，随后在电脑上使用数字化图像软件进行定量分析。人工添加不同含量的克菌丹均能够获得清晰的成像，图 12 结果显示，根据 1-4 的检测结果可计算不同样品克菌丹回收率的标准曲线，将苹果、梨和樱桃的色谱峰值代入标准曲线，经计算，苹果中克菌丹含量为 734.22，梨中克菌丹含量为 455.21，樱桃中克菌丹含量分为 461.23，苹果中克菌丹加标回收率为 97%，梨中克菌丹的加标回收率为 91%，樱桃中克菌丹的加标回收率为 92.2%，与 HPLC 检测结果基本一致。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

## 权 利 要 求 书

1、一种高效薄层色谱检测方法，其特征在于，所述方法是将高效薄层色谱与生物发光法进行联用；具体方法为：先将待测样品在薄层板上展开，之后与发光细菌耦合，再经过发光成像，最后用薄层色谱扫描。

2、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述薄层板包括硅胶板、纤维素板、酸性氧化铝板和碱性氧化铝板。

3、权利要求1或2所述的方法在化合物检测领域的应用。

4、一种筛检硝苯地平的方法，其特征在于，采用权利要求1所述的方法检测含有硝苯地平的待测样品。

5、根据权利要求4所述的方法，其特征在于，所述展开是采用甲苯和乙酸乙酯混合溶液作为展开剂。

6、根据权利要求5所述的方法，其特征在于，甲苯和乙酸乙酯体积比为4:6。

7、根据权利要求4所述的方法，其特征在于，耦合条件为：发光细菌在24~26℃环境中80~150r/min摇瓶培养10~16h，得到细菌悬浮液，用量为80~120 mL，耦合时间为1~3 s，温度为24~26℃，pH为6.5~7.5。

8、根据权利要求4所述的方法，其特征在于，发光成像条件为：成像曝光时间分别为20~50s，间隔1~3 min，拍摄照片至少10张。

9、根据权利要求4所述的方法，其特征在于，待测样品为保健品、食品或药品。

10、一种筛检水果中克菌丹残留的方法，其特征在于，采用权利要求1所述的方法检测含有克菌丹的待测样品。

11、根据权利要求10所述的方法，其特征在于，具体的筛检方法为：首先通过固液萃取对待测水果匀浆进行制样和样品清理，再将萃取物通过高效薄层色谱展开，使目标物克菌丹与萃取液中的样品干扰基质物质分离，再通过浸渍的方式将色谱分离结果与明亮发光杆菌生物传感相耦合，通过生物发光自显影结合数字图像分析定量评估水果中目标物克菌丹残留浓度。

12、根据权利要求11所述的方法，其特征在于，所述的明亮发光杆菌具体为：明亮发光杆菌 ATCC 11040。

13、根据权利要求11所述的方法，其特征在于，所述生物发光自显影检测是在高效薄层色谱上基于明亮发光杆菌生物传感的检测。

14、根据权利要求11所述的方法，其特征在于，所述待测水果为苹果、梨和樱桃。

15、根据权利要求11所述的方法，其特征在于，所述制样和样品清理具体为：将10g水

果样品的匀浆加入 45-55mL 离心管，继续加入 8-12mL 乙腈，0.1mL 甲酸，振荡混匀，超声水浴 8-12min；再加入 4g 无水硫酸镁和 1g 无水醋酸钠，振荡混匀，3500-4500r/min 离心 4-6min，取上层乙腈相 2-4mL，过 0.45 $\mu$ m 滤膜，即得到可以直接用于分析的液体样品。

16、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述展开是采用采用甲苯和乙酸乙酯混合溶液作为展开剂。

17、根据权利要求 16 所述的方法，其特征在于，甲苯和乙酸乙酯体积比为 8: 2。

18、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，所述展开具体为：将 1-10 $\mu$ L 用于分析的液体样品点样，点样后按体积比甲苯: 乙酸乙酯=8: 2 作为流动相展开，上行展开距离 60mm 后停止，展开完成后将薄层板置于 100 °C 平板加热器上充分干燥 5min。

19、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，经展开并干燥后的薄层板进行生物发光自显影检测，之后通过生物发光成像装置记录检测结果，通过肉眼检视得到直观的半定量结果。

20、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，将经过色谱展开和生物发光自显影后所得的薄层板置于生物发光成像仪拍照，并结合数字化图像软件定量分析，通过绘制标准曲线，计算水果样品中目标物克菌丹的含量。

21、根据权利要求 11 所述的方法，其特征在于，据检测结果得到标准曲线： $y = 163.46x + 1336.1$ ，计算水果样品中克菌丹的含量；其中，y 为色谱峰面积，单位 AU；x 为克菌丹含量，单位 ng。

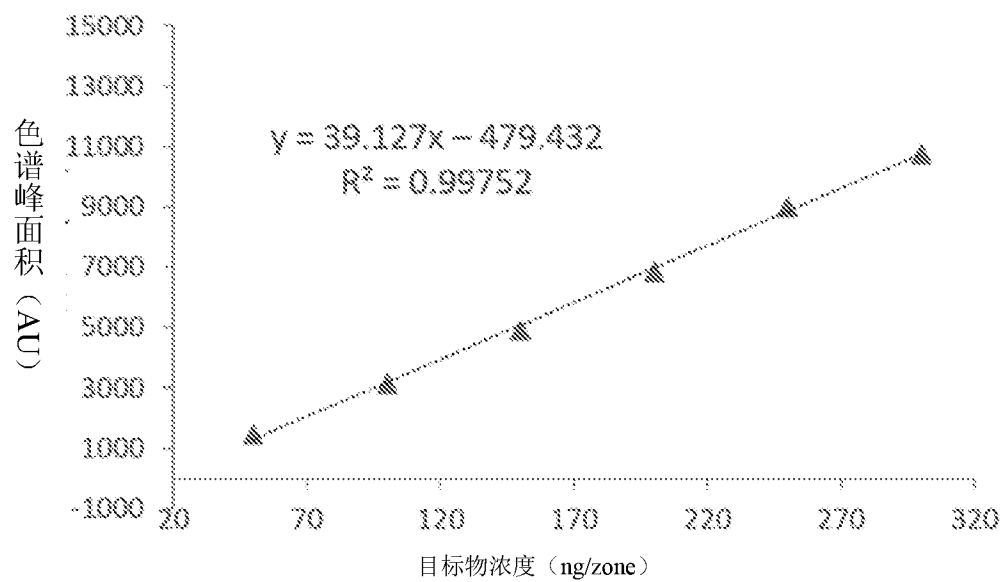


图 1

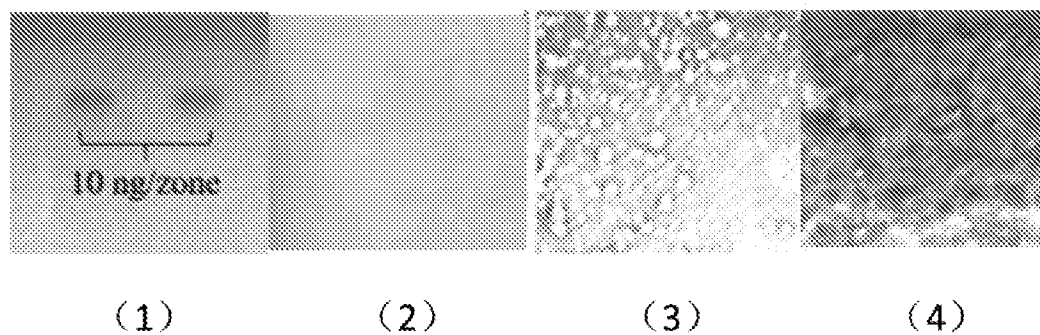


图 2

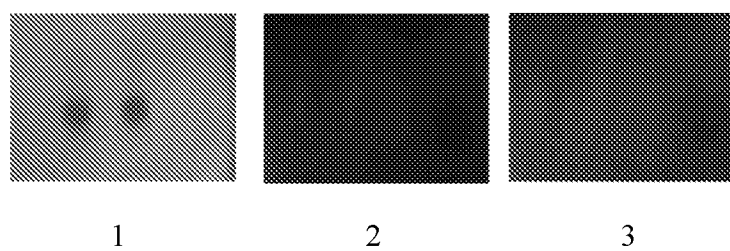


图 3

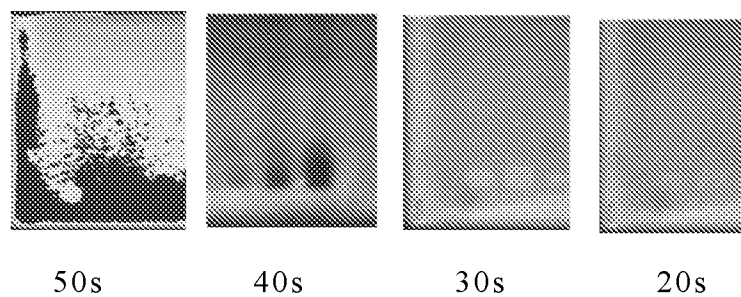


图 4

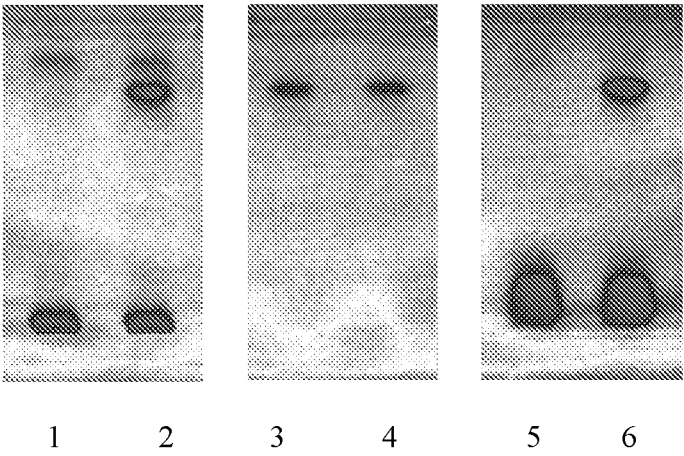


图 5

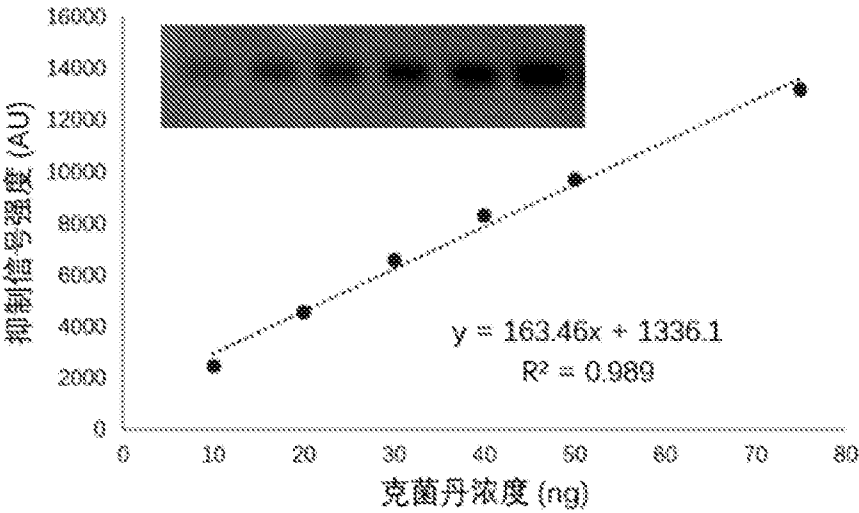


图 6

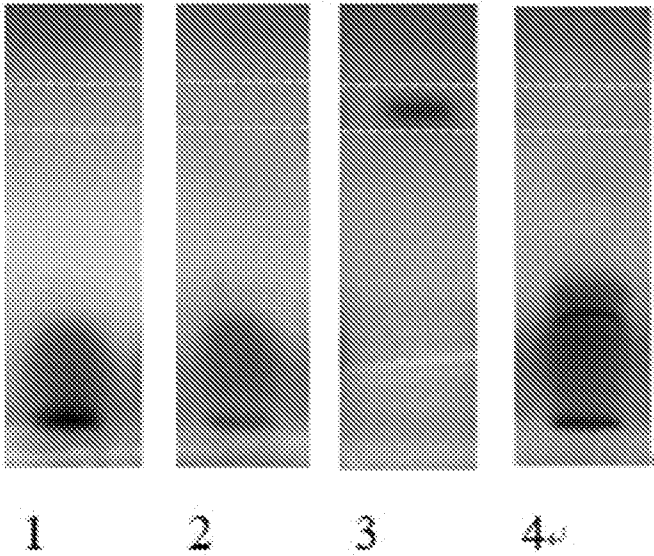


图 7

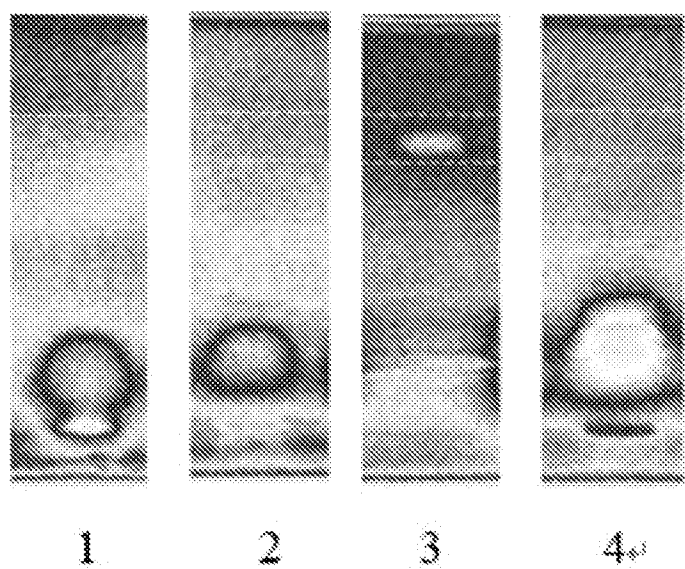


图 8

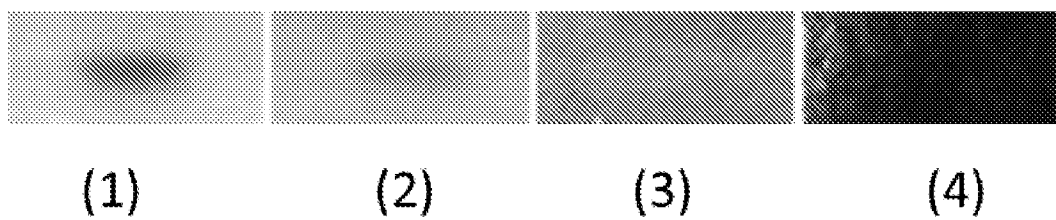


图 9

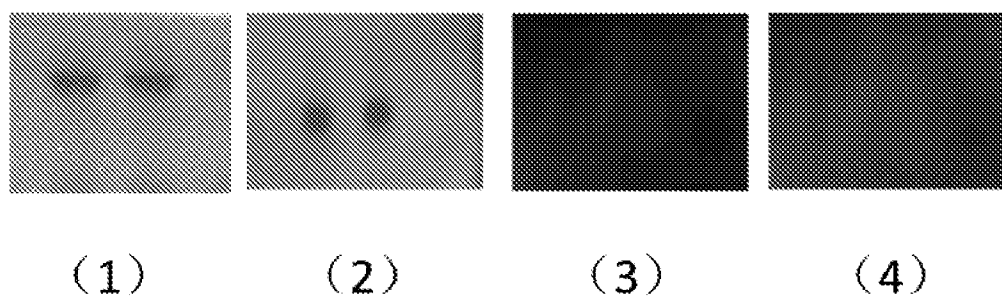


图 10

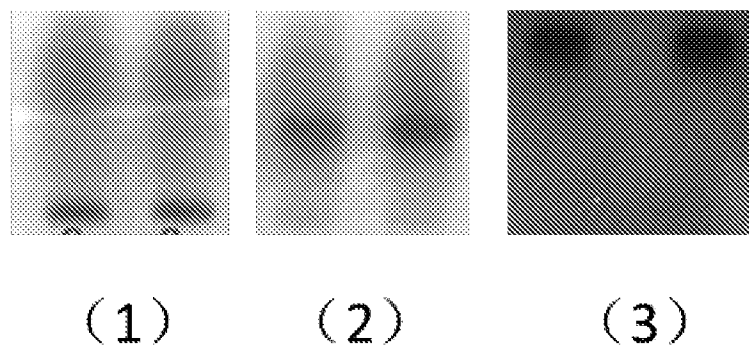


图 11

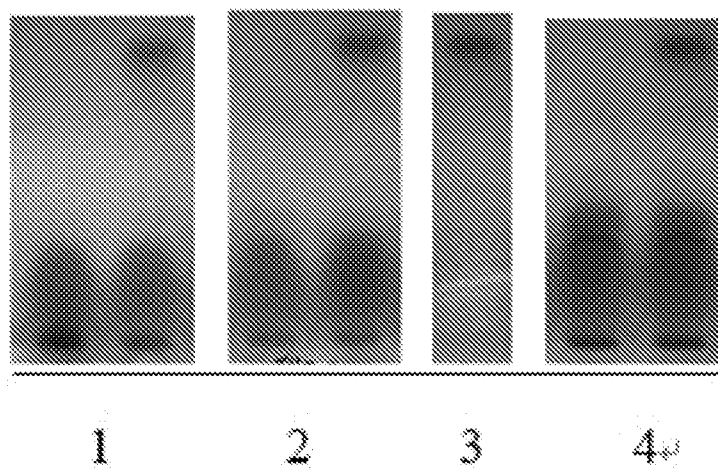


图 12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/130609

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

G01N 30/90(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N30/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, WPI, EPODOC, CNKI: 薄层, 色谱, 生物, 发光, 细菌, 扫描, 硝苯地平, 克菌丹, bioluminescence, chromatography, image, photobacterium, phosphoreum, captan, nifedipine, screen, scan

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| X         | KANATIWELA, H.M.C.K. et al. "A TLC-bioassay based method for detection of fungicide residues on harvested fresh produce"<br><i>J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka</i> , 31 December 2009 (2009-12-31), pp. 257-262                                                                                 | 1-10, 14-18, 21       |
| Y         | KANATIWELA, H.M.C.K. et al. "A TLC-bioassay based method for detection of fungicide residues on harvested fresh produce"<br><i>J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka</i> , 31 December 2009 (2009-12-31), pp. 257-262                                                                                 | 11-13, 19, 20         |
| Y         | 王双英 编译 (edited by WANG, Shuangying). "薄层色谱直接生物自显影方法(TLC-Bioautography)在抗菌剂分析中的应用 (Non-official translation: Application of TLC-Bioautography in the Analysis of Antibacterial Agents)"<br><i>国外医药抗生素分册 (World Notes on Antibiotics)</i> , Vol. 33, No. 2, 31 March 2012 (2012-03-31), pp. 67-69 | 11-13, 19, 20         |
| PX        | CN 110231429 A (JIANGNAN UNIVERSITY et al.) 13 September 2019 (2019-09-13) claims 1-10                                                                                                                                                                                                          | 1-9                   |
| PX        | CN 109884239 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 14 June 2019 (2019-06-14) claims 1-8                                                                                                                                                                                                                       | 10-21                 |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2020

Date of mailing of the international search report

26 March 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/  
CN)  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2019/130609**

### C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                         | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | US 4285698 A (PEANUT RESEARCH & TESTING LABORATORIES, INC.) 25 August 1981 (1981-08-25)<br>entire document | 1-21                  |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2019/130609**

| Patent document<br>cited in search report |           |   | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |         |   | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------|---|--------------------------------------|-------------------------|---------|---|--------------------------------------|
| CN                                        | 110231429 | A | 13 September 2019                    | None                    |         |   |                                      |
| CN                                        | 109884239 | A | 14 June 2019                         | None                    |         |   |                                      |
| US                                        | 4285698   | A | 25 August 1981                       | GB                      | 2109549 | A | 02 June 1983                         |
|                                           |           |   |                                      | GB                      | 2109549 | B | 20 February 1985                     |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/130609

## A. 主题的分类

G01N 30/90(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

## B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N30/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, WPI, EPDOC, CNKI: 薄层, 色谱, 生物, 发光, 细菌, 扫描, 硝苯地平, 克菌丹, bioluminescence, chromatography, image, photobacterium, phosphoreum, captan, nifedipine, screen, scan

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                    | 相关的权利要求         |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|
| X    | H.M.C.K. Kanatiwela 等. "A TLC-bioassay based method for detection of fungicide residues on harvested fresh produce"<br>J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31),<br>257-262页  | 1-10, 14-18, 21 |
| Y    | H.M.C.K. Kanatiwela 等. "A TLC-bioassay based method for detection of fungicide residues on harvested fresh produce"<br>J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31),<br>第257-262页 | 11-13, 19-20    |
| Y    | 王双英 编译. "薄层色谱直接生物自显影方法(TLC-Bioautography)在抗菌剂分析中的应用"<br>《国外医药抗生素分册》, 第33卷, 第2期, 2012年 3月 31日 (2012 - 03 - 31),<br>第67-69页                                                                            | 11-13, 19-20    |
| PX   | CN 110231429 A (江南大学 等) 2019年 9月 13日 (2019 - 09 - 13)<br>权利要求1-10                                                                                                                                    | 1-9             |
| PX   | CN 109884239 A (江南大学) 2019年 6月 14日 (2019 - 06 - 14)<br>权利要求1-8                                                                                                                                       | 10-21           |

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

\* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布但在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&amp;” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 3月 16日

国际检索报告邮寄日期

2020年 3月 26日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

刘婉姬

电话号码 86-(10)-53962646

## C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落                                                                                    | 相关的权利要求 |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| A    | US 4285698 A (PEANUT RESEARCH & TESTING LABORATORIES, INC.) 1981年 8月 25日<br>(1981 - 08 - 25)<br>全文 | 1-21    |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/130609

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 |         |   | 公布日<br>(年/月/日) |
|-------------|-----------|---|----------------|------|---------|---|----------------|
| CN          | 110231429 | A | 2019年 9月 13日   | 无    |         |   |                |
| CN          | 109884239 | A | 2019年 6月 14日   | 无    |         |   |                |
| US          | 4285698   | A | 1981年 8月 25日   | GB   | 2109549 | A | 1983年 6月 2日    |
|             |           |   |                | GB   | 2109549 | B | 1985年 2月 20日   |