

盐酸西布曲明人工抗原的合成与鉴定

吴昊, 戴彩霞, 刘佳, 何计国*

(中国农业大学食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要: 目的: 建立盐酸西布曲明的免疫分析方法。方法: 4-氯苯乙腈和 1,3-二溴丙烷为原料合成与盐酸西布曲明具有相同母核结构的小分子双去甲基西布曲明(M2), 以双去甲基西布曲明为半抗原, 并分别通过活泼酯法、戊二醛法和混合酞酐法将半抗原与牛血清白蛋白(BSA)和卵清蛋白(OVA)偶联制备免疫原(M2-BSA)和包被抗原(M2-OVA)。结果: 紫外光谱扫描证明半抗原 M2 与载体蛋白偶联比为 24.6:1(M2-BSA)和 16.2:1(M2-OVA), 抗血清 ELISA 效价均达到 1:8000 以上, $IC_{50}=0.42 \mu g/mL$ 。结论: 半抗原 M2 与载体蛋白均已成功偶联, 其中活泼酯法对半抗原活性基团的影响最小, 合成人工抗原的特异性最强。

关键词: 盐酸西布曲明; 双去甲基西布曲明; 违禁添加物; 免疫学分析

Synthesis and Characterization of Artificial Antigen for Sibutramine Hydrochloride

WU Hao, DAI Cai-xia, LIU Jia, HE Ji-guo*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract: In order to establish an immunoanalytical method for the detection of sibutramine hydrochloride, the hapten of *N,N*-didesmethyl sibutramine hydrochloride (M2) was synthesized from 4-chlorophenylacetonitrile and 1,3-dibromopropane and then conjugated to the carrier protein of bovine serum albumin (BSA) or ovalbumin (OVA) by active ester method, glutaraldehyde method or mixed anhydride method to prepare immunogens and coating antigens. The results indicated that the coupling ratios of M2-BSA and M2-OVA were 24.6:1 and 16.2:1 as indicated by UV spectroscopic analysis. The antisera displayed high-level affinity to each coating antigen with a titer of more than 1:8000 and an IC_{50} of $0.42 \mu g/mL$. Therefore, M2 hapten and carrier proteins were successfully conjugated. The active ester method revealed the smallest damage on the reactive groups of the hapten and the highest specificity. These results suggested that the artificial antigens could be used for the preparation of monoclonal antibodies.

Key words: sibutramine hydrochloride; *N,N*-didesmethyl sibutramine hydrochloride (M2); prohibited additives; immunoassay

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)03-0140-06

1997 年, 西布曲明获美国 FDA 批准上市, 同类产品风靡全球。自从 20 世纪 90 年代面世之后, 一直存在着很大争议——它可以抑制食欲, 但可能增加患心血管疾病的风险^[1-2]。但由于此前一直缺乏大样本权威实验数据支持, 所以这类减肥药一直在争议声中存在甚至热销。2010 年 1 月, 欧盟人用医药产品委员会(CHMP), 暂停所有含西布曲明成分的减肥药在欧盟地区销售使用^[3-4]。10 月 8 日, 美国 FDA 发文, 责令含此类药物的产品撤出美国市场。2010 年 10 月 30 日, 中华人民共和国国家食品药品监督管理局宣布国内停止生产、销售和使用西布曲明制剂和原料药, 撤销其批准证明文件, 已上市

销售的药品由生产企业负责召回销毁。但因其价格低廉, 仍有不法商贩将其添加到减肥保健品中。

目前保健食品中西布曲明的检测方法包括薄层色谱法^[5]、高效液相色谱^[6]、二极管阵列检测法^[7]、LC-MS-MS 联用技术等^[8], 这些方法准确可靠, 但样品前处理复杂, 对仪器设备的要求也比较严格。酶联免疫法检测食品药品中添加的盐酸西布曲明, 方法简便、快速、灵敏度高, 适用于现场监控, 是保健食品中违法添加西药监管的重要技术支撑。江南大学胥传来等^[9]合成了一种适用于盐酸西布曲明的免疫原, 但未见抗原免疫学特征鉴定的报道。本实验采用双去甲基西布曲明(M2)作

收稿日期: 2011-04-08

作者简介: 吴昊(1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与食品安全。E-mail: 1987christina@sina.com

* 通信作者: 何计国(1966—), 男, 副教授, 研究方向为功能食品以及食品安全检测。E-mail: hejiguo0870@sina.com

为半抗原, 将其与载体蛋白偶联制备相应的人工抗原并进行免疫学鉴定, 为下一步单克隆抗体的制备提供可靠的免疫原和包被原。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牛血清白蛋白(BSA)(第五组分, 含量>98%)、卵清蛋白(OVA)(第五组分, 98%)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂 美国 Sigma 公司; *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、1,4-二氧六环 北京化工厂; 三正丁胺 北京益利精细化工品有限公司; 氯甲酸异丁酯 美国 Alfa Aesar 公司; 4-氯苯乙腈、1,3-二溴丙烷、对乙基-*N,N*-二甲基丙基碳二亚胺(EDC) 国药集团化学试剂有限公司; Tween-20(纯度>98.0%)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS) 美国 Fluka 公司; 0.01mol/L pH7.4 的 PBS 溶液(磷酸缓冲液)、考马斯亮蓝染液、包被缓冲液(0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液)、封闭液(含 1% 明胶的 0.05mol/L pH9.6 的碳酸盐缓冲液)、洗涤液 PBST(含 0.05% Tween-20 的 0.01mol/L, pH7.4 的 PBS)、底物缓冲液(pH5.0 的磷酸-柠檬酸缓冲液)、底物 TMB(2mg/mL DMSO)、终止液(2mol/L H₂SO₄)均为实验室配制。

1.2 仪器与设备

Multiskan 酶标仪 美国 Thermo 公司; 96 孔聚苯乙烯酶标板 美国 Costar 公司; 紫外-可见分光光度计 上海光谱仪器有限公司; FA1004 电子分析天平 北京长安科学仪器厂; JB-1 磁力搅拌器 上海雷磁新泾仪器有限公司; 722S 分光光度计 上海精密科学仪器厂。

1.3 实验动物

6 周龄 Balb/c 小鼠, 雌性, 体质量 18~22g, 购自军事医学科学院实验动物中心。

1.4 方法

1.4.1 双去甲基西布曲明半抗原的合成^[10]

1.4.1.1 1-(4-氯苯基)环丁腈的制备

在 100mL 的三颈瓶中, 装入含 9.6g 氢氧化钾(细粉)的 30mL 二甲亚砜悬浮液, 将 4-氯苯乙腈 15.15g (0.10mol) 和 1,3-二溴丙烷 21.2g (0.11mol) 溶于 50mL 乙醚, 倒入 100mL 的恒压漏斗中, 于 20~25℃ 充分搅拌下将此溶液慢慢滴入三颈瓶中, 同时通入氮气保护, 滴毕后继续搅拌 30min, 滴加冰水 20mL 于反应混合物中, 再加入 100mL 乙醚, 经硅藻土过滤、滤渣用乙醚洗涤、合并滤液和洗涤液到分液漏斗, 弃去水层, 油层用 100mL 乙醚提取 2 次。合并醚层并用 100mL 水洗涤 3 次, 无水硫酸镁干燥。蒸干乙醚, 残余物为橙色油状物, 减压蒸馏(168~169℃, 2666Pa)得无色油状物。

1.4.1.2 1-[1-(4-氯苯基)环丁基]-3-甲基丁胺的制备(双去甲基西布曲明的制备)

格氏试剂制备: 在三颈瓶中将镁粉 4.8g (0.198mol) 边搅拌边滴加到无水乙醚(80mL)中, 再将异丁基溴 31.5g (0.23mol) 缓慢加入到上述混合液中, 此混合液即为异丁基溴化镁溶液。

将 1-(4-氯苯基)环丁腈 25g (0.13mol) 溶于 100mL 干燥甲苯中, 将此溶液滴入异丁基溴化镁溶液中。并通过蒸馏除去乙醚, 调整滴加速度使之与蒸馏速度与大致相等, 以保证滴定完毕时乙醚亦蒸除。混合物在 90℃ 搅拌 18h 后停止加热, 将反应物加到 15g (0.39mol) 热硼氢化钠-500mL 异丙醇的悬浮液中, 得到的混合物加热回流 6h, 室温放置 18h 后旋转蒸发仪蒸干溶剂, 残余物加 500mL 水混匀, 放置 30min, 用 100mL 乙酸乙酯分别提取 3 次。酯层用 100mL 的水洗涤 2 次, 无水硫酸镁干燥, 蒸干溶剂, 得淡黄色油状物, 总反应式见图 1。

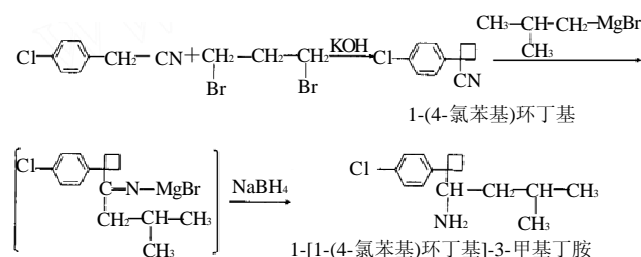


图 1 双去甲基西布曲明合成路线

Fig.1 Synthetic route of *N,N*-didesmethyl sibutramine hydrochloride

1.4.2 人工抗原的制备

1.4.2.1 活泼酯法^[11]

免疫原(EDC-BSA)的合成采用 BSA 为载体, 合成路线见图 2。称取 88.0mg BSA 加入 10mL 磷酸盐缓冲液中, 待 BSA 溶解后加入 34.5mg (0.3mmol) NHS(溶于 100μL DMF) 和 46.6mg (0.3mmol) EDC(溶于 100μL DMF), 室温下搅拌过夜。称为 A 液。半抗原 M2 88mg (0.35mmol) 溶于 100μL DMF 中, 称为 B 液。并将 B 液边搅拌边逐滴加入到 A 液中, 滴毕后 4℃ 搅拌过夜。反应液于 4℃ 冰箱中用 pH7.4 的 PBS 透析 72h, 每 8h 换液一次。另以 OVA 为载体蛋白, 同法合成人工包被原(EDC-OVA)。

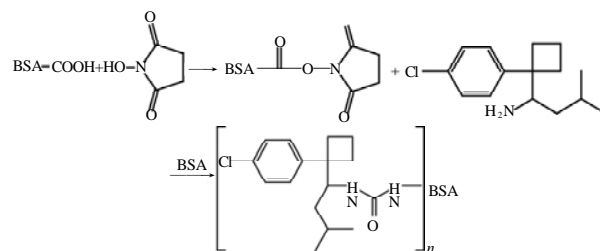


图 2 活泼酯法人工免疫原的合成路线

Fig.2 Synthetic route of immunogen using active ester method

1.4.2.2 戊二醛法^[12]

免疫原(W-BSA)的合成采用BSA为载体,合成路线见图3。称取44.0mg BSA加入到8mL磷酸盐缓冲液中,充分溶解后,逐滴加入100 μ L戊二醛于反应液中,4 $^{\circ}$ C搅拌3h后将反应液至于经处理的透析袋中,于pH7.4的PBS中透析18h,6h换液一次,称为A液。称取半抗原M2 50.2mg(0.20mmol)溶于100 μ L DMF中,并将其在4 $^{\circ}$ C条件下边搅拌边缓慢滴加入A液中,滴毕,4 $^{\circ}$ C冰箱中搅拌过夜,次日将反应液与pH7.4的PBS中透析72h。另以OVA为载体蛋白,同法合成人工包被原(W-OVA)。

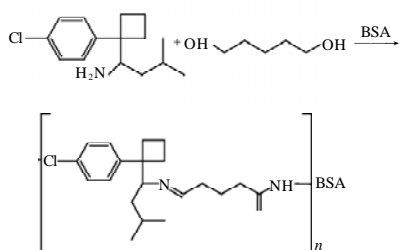


图3 戊二醛法人工免疫原的合成路线

Fig.3 Synthetic route of immunogen using glutaraldehyde method

1.4.2.3 混合酸酐法^[9]

混合酸酐法制备人工抗原(M-BSA),合成路线见图4。称取25.1mg(0.10mmol)半抗原M2溶于溶有5mg(0.05mmol)丁二酸酐的吡啶溶液中,室温避光搅拌24h,用氮气吹干后再加入DMF 0.6mL,使其充分溶解。取三正丁胺10 μ L(0.04mmol)溶于100 μ L DMF中,在冰浴下边搅拌边逐滴加于上述溶液。再将氯甲酸异丁酯6 μ L(0.04mmol)溶于100 μ L DMF中,与上述溶液搅拌反应2h,将上述反应液称为A液。称取60mg BSA溶于10mL磷酸盐缓冲液中,在冰浴下,边搅拌边将A液缓慢逐滴加入到B液中,4 $^{\circ}$ C搅拌过夜。次日将反应液于处理过的透析袋中,透析72h,8h换液一次。

另以OVA为载体蛋白,同法合成M-OVA。

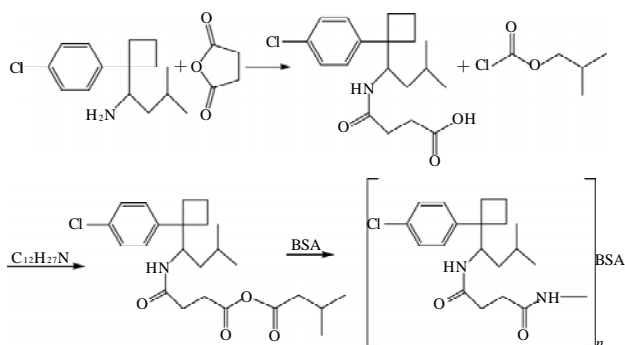


图4 混合酸酐法人工免疫原的合成路线

Fig.4 Synthetic route of immunogen using mixed anhydride method

1.4.3 人工抗原的鉴定

1.4.3.1 人工抗原中BSA含量的测定(考马斯亮蓝G-250法)

按表1的数据配制0、0.02、0.04、0.06、0.08、1mg/mL BSA溶液,分别加入6个7mL离心管中,加入5mL考马斯亮蓝G-250试剂,混匀数次后静置2min后,在波长595nm处比色,测定OD值,绘制标准曲线。根据标准曲线测定人工抗原中BSA含量。同法分别将3种不同方法合成的免疫原(统称M2-BSA)和包被原(统称M2-OVA)溶液(10倍稀释)与考马斯亮蓝G-250比色后测定OD值。

表1 免疫方案

Table 1 Immunization protocols

免疫次数	免疫剂量/(μ g/只)			佐剂	免疫方法
	EDC-BSA组	W-BSA组	M-BSA组		
一免	100	100	100	弗氏不完全佐剂	颈背部皮下多点注射
二免	100	100	100	弗氏完全佐剂	颈背部皮下多点注射
三免	100	100	100	弗氏完全佐剂	颈背部皮下多点注射
终免	200	200	200	无	腹腔注射

1.4.3.2 偶联物的鉴定与偶联比的计算^[13]

利用紫外全波长扫描的化学方法鉴定人工抗原是否合成,根据偶联物中所测蛋白的质量浓度,分别将小分子质量浓度调至0.05mg/mL,载体蛋白和偶联物质量浓度调至0.5mg/mL,并将上述溶液在波长190~400nm扫描其紫外吸收,根据扫描图谱进行偶联产物的鉴定。

c_a/c_b 为偶联物中M2和BSA的偶联物质的量比。在载体蛋白和半抗原的最大波长处检测偶联物的光吸收值,按公式(1)计算两种物质在偶联物中的浓度比,即偶联比:

$$c_a/c_b = (A_{266nm} \times A'_{278nm} - A_{B266nm} \times A_{278nm}) \times c_1 / (A_{278nm} \times A'_{266nm} - A_{M278nm} \times A_{266nm}) \times c_2 \quad (1)$$

式中: A_{266nm} 为抗原在小分子最大吸收波长266nm处的吸光度; A'_{278nm} 为BSA在其最大吸收波长278nm处的吸光度; A_{B266nm} 为BSA在小分子最大吸收波长266nm处的吸光度; A'_{266nm} 为小分子在其最大吸收波长266nm处的吸光度; A_{M278nm} 为小分子在BSA最大吸收波长处的吸光度; A_{278nm} 为偶联物在BSA最大吸收波长处的吸光度; c_1 为小分子标准物浓度/(mol/L); c_2 为BSA标准物浓度/(mol/L)。M2-OVA偶联物鉴定时,将BSA替换成OVA即可,方法同上。

1.4.4 动物免疫

选取6~8周龄的健康Balb/c雌性小鼠20只,将其中的18只随机分成3组,每组6只,分别用于EDC-BSA、W-BSA和M-BSA的免疫,另2只用于阴性血清的制备。

各剂量组的免疫剂量均为 $100\mu\text{g}/\text{只}$ 。免疫原与弗氏佐剂等体积混合。用 5mL 的注射器将混合液充分乳化后免疫动物, 免疫周期为 2 周。第 3 次免疫后 10d 采血, 并对手血清进行鉴定。如效价未达到要求可间隔两周后加强免疫一次。融合前 3d, 用不加佐剂的免疫原生理盐水溶液腹腔注射, 进行终免。具体免疫方案如表 1 所示。

1.4.5 抗血清的测定

第 3 次免疫后 10d, 小鼠内眦静脉采血 0.1mL 。室温静置 1h, 4°C 冰箱过夜, $3000\text{r}/\text{min}$ 离心 15min, 收集血清, 4°C 保存。

1.4.5.1 抗血清效价的测定

将抗血清分别稀释成 2000、4000、8000、16000、32000、64000、128000、256000、512000 倍, 每个稀释倍数均作 3 个平行孔, 另设一个阴性对照和一个空白对照(用样品稀释液代替)。血清稀释一定倍数至其测得的 OD 值是阴性血清最大 OD 值的 2.1 倍时, 这个稀释倍数就是该血清的效价, 所用波长为 450nm 。

1.4.5.2 最佳包被质量浓度和抗血清稀释倍数的确定

用包被缓冲液将包被原作系列稀释, 质量浓度为 10、5、2.5、1.25、0.625、0.3125、0.156、0.0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 用样品稀释液将抗血清作倍比稀释, 分别为 1:200、1:400、1:800、1:1600、1:3200、1:6400、1:12800、1:32000。将包被原按质量浓度递减的顺序在酶标板上从上排到下排依次加入, 将抗血清按稀释倍数递增的顺序从左到右依次加入。按间接 ELISA 方法测定, 最后选取 $\text{OD}_{450\text{nm}}$ 在 1.5 左右, 且处在曲线平台下降的那一点的稀释倍数作为抗原抗体的最佳稀释倍数。

1.4.5.3 抗血清与西布曲明包被原及西布曲明小分子的相对亲和力测定

根据确定的最佳条件, 采用间接竞争 ELISA 方法测定盐酸西布曲明小分子与西布曲明包被原竞争结合抗血清的能力。

2 结果与分析

2.1 半抗原的质谱鉴定

采用飞行质谱可以测定待测物的相对分子质量, 合成产物的质谱见图 5。

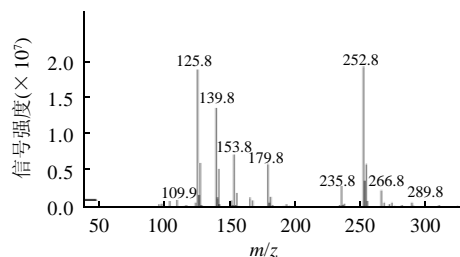


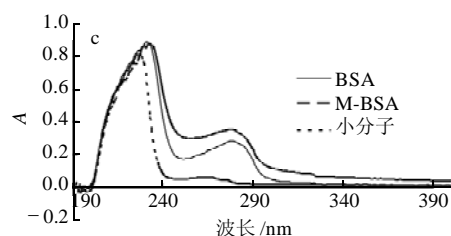
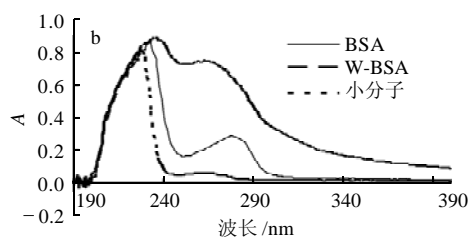
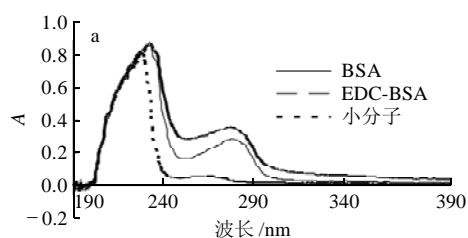
图 5 半抗原 M2 的质谱图

Fig.5 MS spectrum of hapten M2

由图 5 可见, 最强峰 m/z 为 252.8, 是合成产物的离子峰 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (M 为合成产物), 与目标产物半抗原 HP 的理论相对分子质量(251.5)相符。表明通过反应生成了相对分子质量与目标物分子质量一致的新物质, 结合反应路线, 可以推断合成产物即为所需的目标产物 M2, 说明该合成路线可以用于盐酸西布曲明半抗原的合成。

2.2 人工抗原的紫外扫描结果分析

半抗原与载体蛋白均具有各自的紫外吸收特征, 因此其偶联物应兼具有二者的紫外吸收特征, 因此, 通过紫外扫描可以判断人工抗原是否偶联成功。M2、BSA(OVA)和偶联物的紫外吸收扫描图见图 6。反应产物的吸收峰是底物 M2、BSA 的吸收峰的叠加, M2 已成为 BSA 的一个特征结构即抗原决定簇, 初步鉴定免疫原合成成功, 还有待于用动物免疫进一步证实。反应产物的吸收峰是底物 M2、OVA 的吸收峰的叠加, M2 已成为 OVA 的一个特征结构即抗原决定簇, 包被原合成成功。



a. EDC-BSA; b. W-BSA; c. M-BSA。

图 6 3 种免疫原(M2-BSA)的紫外扫描图谱

Fig.6 UV scanning spectra of HP, BSA and M2-BSA

2.3 人工抗原的蛋白质量浓度和偶联比

通过计算得到人工抗原的蛋白质量浓度和偶联比,

结果见表2。初步证明了,利用3种方法小分子都已和载体蛋白偶联上。

表2 人工抗原的蛋白质量浓度和偶联比测定结果

Table 2 Protein concentrations and conjugation ratios of artificial antigens

人工抗原	蛋白质量浓度/(g/L)	偶联比
EDC-BSA	2.78	24.6:1
EDC-OVA	4.43	16.2:1
W-BSA	1.97	45.3:1
W-OVA	3.96	36:1
M-BSA	4.33	23.4:1
M-OVA	2.62	29:1

2.4 人工抗原的免疫分析鉴定

2.4.1 血清效价的测定结果

效价为抗血清 OD_{450nm} 是阴性对照孔 OD_{450nm} 2.1 倍时的稀释倍数。三免后分别用不同的包被原对不同免疫原免疫的小鼠进行效价测定,效价理想的结果见表3。表明3种方法合成的人工抗原都刺激小鼠产生了抗体。

表3 以不同包被原测定小鼠血清效价的结果

Table 3 Titers of antisera as determined using different M2-OVA as coating antigens

名称	效价结果		
	EDC-BSA	W-BSA	M-BSA
EDC-OVA	1:8000		1:16000
W-OVA	1:64000	1:64000	1:128000
M-OVA	1:64000		

2.4.2 方阵滴定法测定最佳包被质量浓度和血清稀释倍数

选取 OD_{450nm} 值最接近 1.5 的阳性孔所对应的包被原质量浓度和血清稀释倍数作为 ELISA 实验工作质量浓度。不同包被原和免疫原的最佳工作条件见表4。

表4 不同包被原和免疫原的最佳工作条件

Table 4 Optimal working concentrations of different coating antigens and antibodies

名称	最佳血清稀释倍数	最佳包被质量浓度/(μg/mL)
EDC-BSA与EDC-OVA	32000	10
W-BSA与EDC-OVA	2000	5
M-BSA与EDC-OVA	2000	2.5
EDC-BSA与W-OVA	4000	10
W-BSA与W-OVA	4000	10
M-BSA与W-OVA	4000	5
EDC-BSA与M-OVA	16000	5
W-BSA与M-OVA	2000	10
M-BSA与M-OVA	8000	10

2.4.3 抗血清与西布曲明包被原及西布曲明小分子的相对亲和力

相对亲和力是指小分子物质能够从包被原上竞争抗体的能力,是反映抗体的最低检出限的指标。根据方阵滴定法确定的最佳包被抗原质量浓度和抗体稀释倍数,对表3中较为理想的组合进行抗血清与西布曲明包被原及西布曲明小分子的相对亲和力测定。测定结果为 EDC-BSA 与 M-OVA 的 IC₅₀=0.71 μg/mL, EDC-BSA 与 W-OVA 的 IC₅₀=0.42 μg/mL, EDC-BSA 与 EDC-OVA 的 IC₅₀=2.5 μg/mL。表明 EDC-BSA 免疫的抗血清和 W-OVA 为包被原的最低检出限最低,其抑制曲线见图7。

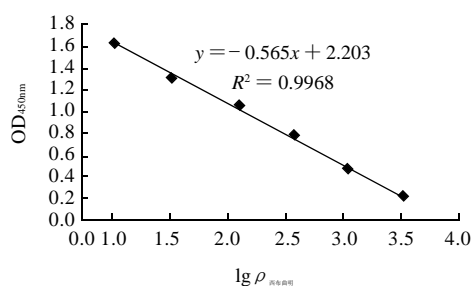


图7 以 W-OVA 为包被原,西布曲明对以 EDC-BSA 为免疫原 6 号小鼠抗血清抑制曲线

Fig.7 The inhibition curve of sibutramine to No.6 mouse antiserum using EDC-BSA as immunogen and M-OVA as coating antigen

由图7可见,西布曲明质量浓度在 150~3000ng/mL 之间时,lg ρ_{西布曲明} 与 OD 值呈现良好的线性关系,表明该抗血清的检出范围为 150~3000 μg/kg,最低检出限为 150 μg/kg。

3 讨论

采用传统的有机合成方法,合成了半抗原双去甲基西布曲明。该合成的关键是反应前的试剂脱水和反应中的 4-氯苯乙腈与 1,3-二溴丙烷混合乙醚溶液的滴加速度及回收中的减压蒸馏,由于把握住实验中的关键步骤,其产物的纯度较高(95%)。在得到了半抗原双去甲基西布曲明后,分别用3种方法进行了半抗原和载体蛋白的连接,由于在活泼酯法的反应是在酰胺类体系中进行,而参加反应的均为脂溶性较高物质,其产物具有共轭性极强酰胺基团,因此与其他两种方法相比与 BSA 形成氢键的几率高^[15],与 OVA 结合能力强,因此得到的抗血清效价最高,且产生的抗体与西布曲明包被原及西布曲明小分子的相对亲和力最强,最低检出限低于其他方法获得的抗体。

参考文献:

- [1] FANGHÄNEL G, CORTINAS L, SÁNCHEZ-REYES L, et al. A clinical trial of the use of sibutramine for the treatment of patients suffering essential obesity[J]. *Int J Obes Relat Metab Disord*, 2000, 24(2): 144-150.
- [2] 裴振峨, 蔡皓东. 西布曲明的不良反应及其防治[J]. *药物不良反应杂志*, 2006, 8(4): 276-279.
- [3] MedlinePlus. Sibutramine[EB/OL]. (2010-01-21)[2010-03-18]. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/druginfo/meds/601110.html>.
- [4] 孙忠实, 山广志, 姚静, 等. 前途未卜的减肥药: 西布曲明[J]. *药品评价*, 2010(6): 2-7.
- [5] 张小松, 夏铮铮, 周琳, 等. 检测中药保健品中非法掺入的盐酸西布曲明[J]. *华西药理学杂志*, 2005, 20(4): 293-295.
- [6] 陈国章. HPLC法测定保健品中枸橼酸西地那非[J]. *实用预防医学*, 2004, 11(2): 370.
- [7] 曹玲, 张好琳, 王宝珠. 减肥保健食品中非法添加盐酸西布曲明的检测[J]. *食品科学*, 2008, 29(2): 340-343.
- [8] 李敏, 王美菡, 李春盛, 等. 特定食品中盐酸西布曲明的检测[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(12): 1520.
- [9] 胥传来, 李灼坤, 马伟, 等. 一种检测盐酸西布曲明的方法及其应用, 中国: 0810028617[P]. 2008-06-06.
- [10] JEFFERY J E, KERRIGAN F, MILLER T K, et al. Synthesis of sibutramine, a novel cyclobutylalkylamine useful in the treatment of obesity, and its major human metabolites[J]. *J Chem Soc Perkin Trans*, 1996, 21: 2583-2589.
- [11] CHOUHAN R S, BABU K V, KUMAR M A, et al. Detection of methyl parathion using immuno-chemiluminescence based image analysis using charge coupled device[J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21: 1264-1271.
- [12] SHENG Jianwu, HE Miao, SHI Hanchang, et al. A comprehensive immunoassay for the detection of microcystins in waters based on polyclonal antibodies[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 572: 309-315.
- [13] 胥传来, 刘剑波, 彭池方, 等. 氯霉素 - BSA 和氯霉素 -OVA 偶联物的制备与鉴定[J]. *细胞分子免疫学杂志*, 2005, 21(6): 799-801.
- [14] 李述文, 范如霖. 实用有机化学手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 237-276.
- [15] 张福田. 分子界面化学基础[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2006: 203-311.