



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105181957 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510455774. 8

(22) 申请日 2015. 07. 28

(71) 申请人 广东产品质量监督检验研究院

地址 510110 广东省广州市广州开发区科学
城揽月路 80 号

(72) 发明人 刘付建 唐穗平 谭婉琪 王娜
陈纪文 陈满英

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理
有限公司 44224

代理人 李海恬 万志香

(51) Int. Cl.

G01N 33/535(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

权利要求书3页 说明书11页

(54) 发明名称

双酚 S 检测试剂盒及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种双酚 S 检测试剂盒及其制备和使用方法,属于添加剂检测技术领域。该试剂盒包括每个微孔内包被浓度为 0. 5-2. 5 μ g/mL 双酚 S 特异性抗原的酶标板,浓度为 0. 5-2. 5 μ g/mL 的双酚 S 特异性抗体工作液,且所述双酚 S 特异性抗原与双酚 S 特异性抗体的用量为 1:1。本发明的试剂盒可以快速检测在食品接触制品中双酚 S 的含量以及食品模拟物中双酚 S 的迁移情况,也可以快速检测饮料中双酚 S 的污染水平,具有特异性高,结果准确且前处理简单,对仪器设备要求低、检测成本低的特点。

1. 一种双酚 S 检测试剂盒,其特征在于,主要包括:

1) 包被双酚 S 特异性抗原的酶标板:所述酶标板的每个微孔内双酚 S 特异性抗原的浓度为 $0.5\text{--}2.5\ \mu\text{g/mL}$;

2) 双酚 S 特异性抗体工作液:该双酚 S 特异性抗体的浓度为 $0.5\text{--}2.5\ \mu\text{g/mL}$;
所述双酚 S 特异性抗原与双酚 S 特异性抗体的用量比为 1:1。

2. 根据权利要求 1 所述的双酚 S 检测试剂盒,其特征在于,还包括有酶标二抗,所述酶标二抗是浓度按 1:10000 的比例稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗。

3. 根据权利要求 2 所述的双酚 S 检测试剂盒,其特征在于,所述双酚 S 特异性抗原为双酚 S 与载体蛋白的偶联物,该双酚 S 特异性抗原的浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$;所述双酚 S 特异性抗体为鼠源单克隆抗体,该双酚 S 特异性抗体的浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$ 。

4. 根据权利要求 3 所述的双酚 S 检测试剂盒,其特征在于,还包括双酚 S 标准品溶液、底物显色剂、洗涤液、终止液、封闭液和浓缩样品稀释液。

5. 根据权利要求 4 所述的双酚 S 检测试剂盒,其特征在于,所述载体蛋白为兔血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清白蛋白、甲状腺球蛋白中的一种;所述双酚 S 标准品溶液的浓度分别为 $1\times 10^4\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^3\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^2\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^1\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^0\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.5\ \mu\text{g/L}$;所述底物显色剂由显色剂 A 和显色剂 B 组成,所述显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲,所述显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺;所述洗涤液为含有 0.05%–0.5%吐温-20 的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述终止液为 1–2mol/L 的硫酸溶液;所述封闭液为含 5%脱脂奶粉的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩样品稀释液为 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述酶标板的材料为聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯中的一种。

6. 权利要求 1–5 任一项所述的双酚 S 检测试剂盒的制备方法,其特征在于,主要包括以下步骤:

1) 制备双酚 S 特异性抗原:

将双酚 S 和碳酸钾分散于二甲基甲酰胺中,加入 4-溴丁酸乙酯,加热回流,使双酚 S 的酚羟基被丁酸乙酯基所取代,得到中间产物;随后将中间产物加入三氟乙酸中,回流反应,脱去乙基的保护,裸露出羧基,制得能够与蛋白质偶联的双酚 S 的半抗原;再将其与 N-羟基丁二酰胺和碳二亚胺混合后反应,与载体蛋白偶联制备得到双酚 S 特异性抗原;所述载体蛋白为兔血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清白蛋白、甲状腺球蛋白中的一种;

2) 包被酶标板:

将上述双酚 S 特异性抗原包被于酶标板中,所述酶标板的每个微孔内双酚 S 特异性抗原的浓度为 $0.5\text{--}2.5\ \mu\text{g/mL}$;

3) 制备双酚 S 特异性抗体:

以步骤 1) 中得到的双酚 S 特异性抗原作为免疫原对小鼠进行免疫;免疫后,取血清效价高的小鼠,取其脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合;采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞,得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株;并取不完全佐剂腹腔注射进行致敏后的小鼠,将杂交瘤细胞混悬液注射到小鼠腹腔中,收集腹水,经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化,得到纯化的双酚 S 单克隆抗体;制备浓度为 $0.5\text{--}2.5\ \mu\text{g/mL}$ 的双酚 S 单克隆抗体工作液。

7. 根据权利要求 6 所述的双酚 S 检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤 1) 中,制备

双酚 S 特异性抗原的具体方法为：

将 1mmol 双酚 S 与 10mmol 碳酸钾分散于 80mL 无水二甲基甲酰胺中，常温搅拌 30min，加入 10mmol 的 4- 溴丁酸乙酯，加热回流 5h，使双酚 S 的酚羟基被丁酸乙酯基所取代，得到中间产物；随后将中间产物加入过量三氟乙酸中，回流搅拌 1h，脱去乙基的保护，裸露出羧基，制得能够与蛋白质偶联的双酚 S 的半抗原；再将其与 N- 羟基丁二酰胺和碳二亚胺混合后反应，与牛血清白蛋白偶联制备得到双酚 S 特异性抗原。

8. 根据权利要求 6 所述的双酚 S 检测试剂盒的制备方法，其特征在于，步骤 3) 中，制备双酚 S 特异性抗体的具体方法为：

以步骤 1) 中得到的双酚 S 特异性抗原作为免疫原对 10 周龄的 Balb/c 小鼠进行免疫，首次免疫使用完全弗氏佐剂与双酚 S 特异性抗原溶液乳化，抗原浓度为 0.45mg/mL，剂量为 110 μ g/ 只，以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与双酚 S 特异性抗原溶液乳化，剂量同初次免疫；初次免疫两周后，每间隔 10 天加强免疫一次，共免疫 7-10 次，当抗体效价不再升高时，进行最后一次免疫；最后一次不加免疫佐剂直接用双酚 S 特异性抗原水溶液腹腔注射，剂量同初次免疫；尾部取血检测血清效价后，取血清效价高的小鼠，在无菌条件下，取其脾细胞按 6:1 的比例与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合；采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株；并于一周前采用不完全佐剂腹腔注射 Balb/c 小鼠进行致敏，剂量为 0.5mL/ 只；将细胞浓度为 1.5 万 /mL 的杂交瘤细胞混悬液注射到小鼠腹腔中，剂量为 0.5mL/ 只；接种杂交瘤细胞 7-10 天后，收集腹水，反复收集数次；存于 4℃ 冰箱保存；经辛酸 - 硫酸铵沉淀法进行腹水纯化，得到纯化的双酚 S 单克隆抗体。

9. 权利要求 1-5 任一项所述的双酚 S 检测试剂盒的使用方法，其特征在于，主要包括以下步骤：

1) 样品前处理

准确量取待测样品，提取后定量吸取或萃取上清液，吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶，并以水稀释定容，得到样品检测液；

2) 检测

采用权利要求 1-5 任一项所述的试剂盒进行检测，向包被有双酚 S 特异性抗原的酶标板中加入标准品或样品检测液，再加入双酚 S 特异性抗体工作液，温育后洗板，加入酶标二抗进行酶活性的放大，再次洗板，加入底物显色剂、终止液，然后以酶标仪测定吸光度值；

3) 结果分析

以抑制率 I% 为纵坐标，以双酚 S 浓度的对数 lg[双酚 S] 为横坐标，绘制双酚 S 竞争抑制曲线；将样品的抑制率代入标准曲线回归方程，从标准曲线上读出样品所对应的浓度，乘以其对应的稀释倍数即为样品中双酚 S 的实际含量；

所述抑制率计算公式如下：

$$I = \frac{B - B_N}{B_0 - B_N} \times 100\%$$

其中：I——抑制率

B——样品溶液的平均吸光度值

B₀——0 μ g/L 标准溶液的平均吸光度值

B_N ——参比空白对照平均吸光度值。

10. 根据权利要求 9 的双酚 S 检测试剂盒的使用方法,其特征在于,步骤 1) 样品前处理中:

当待测样品为塑料制品,则定量称取待测样品,加入二氯甲烷超声提取,随后以甲醇萃取,定量吸取甲醇,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

当待测样品为水基食品、酸性液体或酒精类液体,则定量称取待测样品,冷冻干燥后以甲醇溶解,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

当待测样品为脂类液体,则定量称取待测样品,减压干燥后以甲醇溶解,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

当待测样品为果汁饮料,则定量称取待测样品,6000-9000r/min 离心 3-10min,取上清液用乙酸调节 pH 值为 3-5,再以固相萃取小柱萃取洗脱,收集洗脱液,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

当待测样品为碳酸饮料,则定量称取待测样品,超声脱气,再以固相萃取小柱萃取洗脱,收集洗脱液,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液。

双酚 S 检测试剂盒及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种添加剂检测技术,特别是涉及一种双酚 S 检测试剂盒及其制备和使用方法。

背景技术

[0002] 双酚 S,即 4,4'-二羟基二苯砜(4,4'-Sulfonyldiphenol, BPS),是农药、染料、助剂的中间体,主要用作固色剂,也可用作热敏纸的显色剂;同时,由于 BPS 具有耐热、耐光和抗氧化等许多优良性能,可作为双酚 A 的代用品,用于合成聚碳酸酯、聚酯、酚醛树脂、环氧树脂、聚砜和聚醚砜,近年来逐渐成为医用高分子材料及各种塑料的重要原料,在食品接触材料等行业被广泛应用。

[0003] 众所周知,由于双酚 A 存在健康风险,正被各个国家限制使用。当前市场上许多婴儿奶瓶和塑料制品都开始贴上“不含双酚 A”的标志,宣称可放心安全使用,但据业内专家透露,这些产品大多使用了 BPS 作为替代品。有研究表明,与双酚 A 化学结构相似的 BPS 对生物体产生的雌性激素影响与双酚 A 类似,也是一种内分泌干扰素(环境荷尔蒙),具有扰乱生殖系统的危害,如:美国、加拿大和韩国的研究表明 BPS 的暴露会影响斑马鱼的性激素调节、生殖和大脑发育;德克萨斯大学研究显示,较低浓度的 BPS 可能中断激素传导。如果过量摄入 BPS,可能会导致内分泌失调,从而威胁人体健康。日本和韩国明确规定食品模拟物中 BPS 迁移量不得超过 0.05mg/L,欧盟塑料法规(EU)No. 10/2011 以及我国《食品容器、包装材料用添加剂使用卫生标准》(GB 9685-2008)均规定食品模拟物中 BPS 的迁移限量为 0.05mg/kg。

[0004] 但是,目前检测双酚 S 的方法较少,且主要为耗时较长的、难以实现现场检测的色谱质谱检测方法,所以亟需一种合适的快速检测 BPS 的方法。

发明内容

[0005] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种双酚 S 检测试剂盒,该检测试剂盒以酶联免疫反应为基础,可以快速检测双酚 S 的含量。

[0006] 一种双酚 S 检测试剂盒,主要包括:

[0007] 1) 包被双酚 S 特异性抗原的酶标板:所述酶标板的每个微孔内双酚 S 特异性抗原的浓度为 0.5-2.5 $\mu\text{g/mL}$;

[0008] 2) 双酚 S 特异性抗体工作液:该双酚 S 特异性抗体的浓度为 0.5-2.5 $\mu\text{g/mL}$;

[0009] 所述双酚 S 特异性抗原与双酚 S 特异性抗体的用量比为 1:1。

[0010] 上述双酚 S 检测试剂盒的检测原理为:将双酚 S 特异性抗原吸附于固相载体酶标板上,加入待测样品检测液或双酚 S 标准溶液以及双酚 S 特异性抗体工作液,使待测样品中的双酚 S 和固相载体上包被的双酚 S 特异性抗原竞争结合双酚 S 特异性抗体,孵育后,加入酶标二抗进行酶活性的放大,显色后测定样品的吸光度,该值与样品中双酚 S 的量呈负相关,与标准曲线比较即可得出双酚 S 浓度范围。因而该试剂盒能够快速检测双酚 S 的含量。

[0011] 在其中一个实施例中,该试剂盒还包括有酶标二抗,所述酶标二抗是浓度按 1:10000 的比例稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗。上述酶标二抗具有最佳的酶活性放大效果。

[0012] 在其中一个实施例中,所述双酚 S 特异性抗原为双酚 S 与载体蛋白的偶联物,该双酚 S 特异性抗原的浓度为 $2\mu\text{g/mL}$;所述双酚 S 特异性抗体为鼠源单克隆抗体,该双酚 S 特异性抗体的浓度为 $2\mu\text{g/mL}$ 。选用上述种类和浓度的抗原抗体,具有最佳反应比例,酶联免疫反应最彻底,形成的免疫复合物沉淀最多、最大。

[0013] 在其中一个实施例中,该试剂盒还包括双酚 S 标准品溶液、底物显色剂、洗涤液、终止液、封闭液和浓缩样品稀释液。使检测人员在使用该试剂盒时具有方便快捷的优点。

[0014] 在其中一个实施例中,所述载体蛋白为兔血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清白蛋白、甲状腺球蛋白中的一种;所述双酚 S 标准品溶液的浓度分别为 $1\times 10^4\mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^3\mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^2\mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^1\mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^0\mu\text{g/L}$ 、 $0.5\mu\text{g/L}$;所述底物显色剂由显色剂 A 和显色剂 B 组成,所述显色剂 A 为过氧化氢或过氧化脲,所述显色剂 B 为邻苯二胺或四甲基联苯胺;所述洗涤液为含有 0.05%–0.5%吐温-20 的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述终止液为 1–2mol/L 的硫酸溶液;所述封闭液为含 5%脱脂奶粉的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩样品稀释液为 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液;所述酶标板的材料为聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯中的一种。

[0015] 本发明还公开了一种上述的双酚 S 检测试剂盒的制备方法,主要包括以下步骤:

[0016] 1) 制备双酚 S 特异性抗原:

[0017] 将双酚 S 和碳酸钾分散于二甲基甲酰胺中,加入 4-溴丁酸乙酯,加热回流,使双酚 S 的酚羟基被丁酸乙酯基所取代,得到中间产物;随后将中间产物加入三氟乙酸中,回流反应,脱去乙基的保护,裸露出羧基,制得能够与蛋白质偶联的双酚 S 的半抗原;再将其与 N-羟基丁二酰胺和碳二亚胺混合后反应,与载体蛋白偶联制备得到双酚 S 特异性抗原;所述载体蛋白为兔血清白蛋白、牛血清白蛋白、卵清白蛋白、甲状腺球蛋白中的一种;

[0018] 2) 包被酶标板:

[0019] 将上述双酚 S 特异性抗原包被于酶标板中,所述酶标板的每个微孔内双酚 S 特异性抗原的浓度为 $0.5\text{--}2.5\mu\text{g/mL}$;

[0020] 3) 制备双酚 S 特异性抗体:

[0021] 以步骤 1) 中得到的双酚 S 特异性抗原作为免疫原对小鼠进行免疫;免疫后,取血清效价高的小鼠,取其脾细胞与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合;采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞,得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株;并取不完全佐剂腹腔注射进行致敏后的小鼠,将杂交瘤细胞混悬液注射到小鼠腹腔中,收集腹水,经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化,得到纯化的双酚 S 单克隆抗体;制备浓度为 $0.5\text{--}2.5\mu\text{g/mL}$ 的双酚 S 单克隆抗体工作液。

[0022] 采用上述方法制得的双酚 S 特异性抗原和特异性抗体,具有特异性好的优点。

[0023] 在其中一个实施例中,步骤 1) 中,制备双酚 S 特异性抗原的具体方法为:

[0024] 将 1mmol 双酚 S 与 10mmol 碳酸钾分散于 80mL 无水二甲基甲酰胺中,常温搅拌 30min,加入 10mmol 的 4-溴丁酸乙酯,加热回流 5h,使双酚 S 的酚羟基被丁酸乙酯基所取代,得到中间产物;随后将中间产物加入过量三氟乙酸中,回流搅拌 1h,脱去乙基的保护,

裸露出羧基,制得能够与蛋白质偶联的双酚 S 的半抗原;再将其与 N-羟基丁二酰胺和碳二亚胺混合后反应,与牛血清白蛋白偶联制备得到双酚 S 特异性抗原。

[0025] 在其中一个实施例中,步骤 3) 中,制备双酚 S 特异性抗体的具体方法为:

[0026] 以步骤 1) 中得到的双酚 S 特异性抗原作为免疫原对 10 周龄的 Balb/c 小鼠进行免疫,首次免疫使用完全弗氏佐剂与双酚 S 特异性抗原溶液乳化,抗原浓度为 0.45mg/mL,剂量为 110 μ g/只,以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与双酚 S 特异性抗原溶液乳化,剂量同初次免疫;初次免疫两周后,每间隔 10 天加强免疫一次,共免疫 7-10 次,当抗体效价不再升高时,进行最后一次免疫;最后一次不加免疫佐剂直接用双酚 S 特异性抗原水溶液腹腔注射,剂量同初次免疫;尾部取血检测血清效价后,取血清效价高的小鼠,在无菌条件下,取其脾细胞按 6:1 的比例与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合;采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞,得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株;并于一周前采用不完全佐剂腹腔注射 Balb/c 小鼠进行致敏,剂量为 0.5mL/只;将细胞浓度为 1.5 万/mL 的杂交瘤细胞混悬液注射到小鼠腹腔中,剂量为 0.5mL/只;接种杂交瘤细胞 7-10 天后,收集腹水,反复收集数次;存于 4℃ 冰箱保存;经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化,得到纯化的双酚 S 单克隆抗体。

[0027] 本发明还公开了一种上述的双酚 S 检测试剂盒的使用方法,主要包括以下步骤:

[0028] 1) 样品前处理

[0029] 准确量取待测样品,提取后定量吸取或萃取上清液,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

[0030] 2) 检测

[0031] 采用上述的试剂盒进行检测,向包被有双酚 S 特异性抗原的酶标板中加入标准品或样品检测液,再加入双酚 S 特异性抗体工作液,温育后洗板,加入酶标二抗进行酶活性的放大,再次洗板,加入底物显色剂、终止液,然后以酶标仪测定吸光度值;

[0032] 3) 结果分析

[0033] 以抑制率 I% 为纵坐标,以双酚 S 浓度的对数 lg[双酚 S] 为横坐标,绘制双酚 S 竞争抑制曲线;将样品的抑制率代入标准曲线回归方程,从标准曲线上读出样品所对应的浓度,乘以其对应的稀释倍数即为样品中双酚 S 的实际含量;

[0034] 所述抑制率计算公式如下:

[0035]
$$I = \frac{B - B_N}{B_0 - B_N} \times 100\%$$

[0036] 其中:I——抑制率

[0037] B——样品溶液的平均吸光度值

[0038] B_0 ——0 μ g/L 标准溶液的平均吸光度值

[0039] B_N ——参比空白对照平均吸光度值。

[0040] 上述使用方法中,通过对样品前处理,可以将待测物中的双酚 S 较好的提取出来,并根据需要进行富集,再通过高灵敏度高特异性的酶联反应试剂盒测定浓度,具有检出限低,准确性高的优点。

[0041] 在其中一个实施例中,步骤 1) 样品前处理中:

[0042] 当待测样品为塑料制品,则定量称取待测样品,加入二氯甲烷超声提取,随后以甲醇萃取,定量吸取甲醇,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

[0043] 当待测样品为水基食品、酸性液体或酒精类液体,则定量称取待测样品,冷冻干燥后以甲醇溶解,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

[0044] 当待测样品为脂类液体,则定量称取待测样品,减压干燥后以甲醇溶解,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

[0045] 当待测样品为果汁饮料,则定量称取待测样品,6000-9000r/min 离心 3-10min,取上清液用乙酸调节 pH 值为 3-5,再以固相萃取小柱萃取洗脱,收集洗脱液,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

[0046] 当待测样品为碳酸饮料,则定量称取待测样品,超声脱气,再以固相萃取小柱萃取洗脱,收集洗脱液,吹干后加入与水互溶的有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液。

[0047] 针对不同类型的待测样品,选用不同的前处理方法,能够较好得将待测样品中的双酚 S 提取后检测。

[0048] 在其中一个实施例中,步骤 2) 中,检测的具体方法为:首先用 2 μ g/mL 的双酚 S 特异性抗原包被 96 孔酶标板,100 μ L/ 孔,放置于 4℃ 冰箱包被过夜,用 250 μ L/ 孔封闭液封闭后以洗涤液洗涤,并拍干;然后加入双酚 S 标准品溶液或样品检测液 50 μ L,再加入浓度为 2 μ g/mL 的双酚 S 特异性抗体工作液 50 μ L,混合均匀,37℃ 温育 1h;随后洗涤拍干,加入以稀释液按 1:10000 比例稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗工作液,100 μ L/ 孔,37℃ 温育 1h;最后洗涤拍干,每孔加入 50 μ L 显色剂 B、10 μ L 显色剂 A,显色 15min,加入浓度为 2mol/L 的硫酸溶液,50 μ L/ 孔,终止反应,设定酶标仪于 450nm 处,测定吸光度值。

[0049] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0050] 本发明的一种双酚 S 检测试剂盒,利用竞争酶联免疫测定法检测双酚 S,具有特异性高,结果准确,对仪器设备要求低、检测成本低的特点。

[0051] 同时,本试剂盒中的试剂以方便使用的工作液形式提供,操作简单、快捷,为使用者节省了时间并减少因步骤复杂造成的误差。适用于快速而准确地检测大批量样品中的双酚 S。

[0052] 本发明的双酚 S 检测试剂盒的制备方法,通过特定的方法制得双酚 S 特异性抗原和特异性抗体,使最终得到的试剂盒具有高特异性,高灵敏度的优点。

[0053] 本发明的双酚 S 检测试剂盒的使用方法,具有样品前处理简便,检出限低,准确性高的优点。

具体实施方式

[0054] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明,但不对本发明的内容造成任何限制。

[0055] 实施例 1

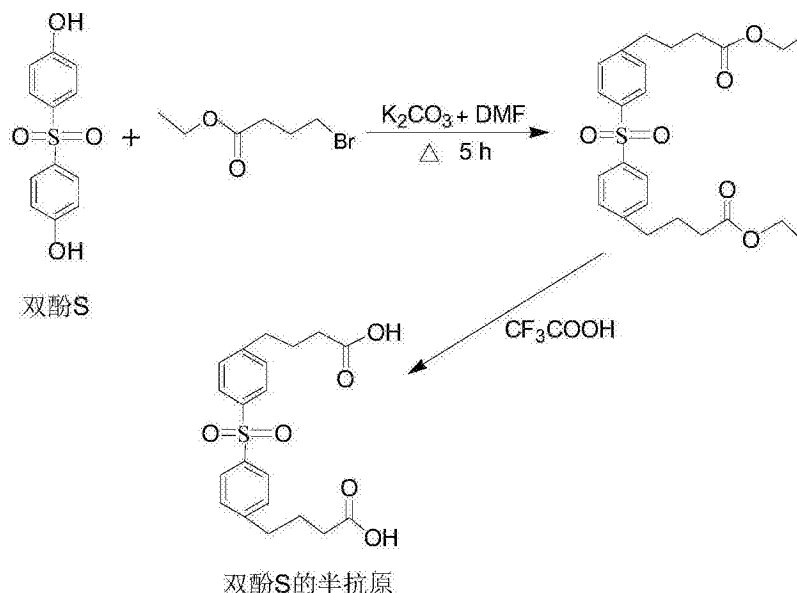
[0056] 一种双酚 S 检测试剂盒,主要组成成份如下:

[0057] 1) 双酚 S 特异性抗原工作液。

[0058] 通过以下方法制得：将 0.25g (即 1mmol) 双酚 S 与 1.01g (即 10mmol) 碳酸钾分散于 80mL 无水二甲基甲酰胺 (DMF) 中，常温搅拌 30min，加入 1.95g (即 10mmol) 的 4-溴丁酸乙酯，加热回流 5h，双酚 S 的酚羟基被丁酸乙酯基所取代，得到中间产物。

[0059] 随后将中间产物加入 30 倍的三氟乙酸中，回流搅拌 1h，脱去乙基的保护，裸露出羧基，制得能够与蛋白质偶联的双酚 S 的半抗原，具体反应过程如下：

[0060]



[0061] 再将其与 N-羟基丁二酰胺 (NHS) 和碳二亚胺 (EDC) 混合后反应，与牛血清白蛋白混合，室温搅拌 1h，偶联制备双酚 S 特异性抗原，并用浓缩样品稀释液稀释至浓度为 2 μg/mL。

[0062] 2) 双酚 S 特异性抗体工作液。

[0063] A、单克隆抗体的获得：

[0064] 将上述合成得到的双酚 S 特异性抗原作为免疫原对 10 周龄的 Balb/c 小鼠进行免疫。首次免疫使用完全弗氏佐剂与双酚 S 特异性抗原的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液乳化，抗原浓度为 0.45mg/mL，剂量为 110 μg/只，以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与双酚 S 特异性抗原的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液乳化，剂量同初次免疫。初次免疫两周后，每间隔 10 天加强免疫一次，共免疫 7-10 次，当抗体效价不再升高时，进行最后一次免疫。最后一次不加免疫佐剂直接用双酚 S 特异性抗原的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液直接腹腔注射，剂量同初次免疫。

[0065] 然后在尾部取血检测血清效价。取血清效价高的小鼠，在无菌条件下，取其脾细胞按 6:1 比例与骨髓瘤细胞 SP2/0 进行细胞融合。采用有限稀释法筛选杂交瘤细胞，得到完全同质的单克隆抗体和稳定的单克隆杂交瘤细胞株。

[0066] B、单克隆抗体的纯化：

[0067] 取 Balb/c 小鼠，于一周前采用不完全佐剂腹腔注射进行致敏，剂量为 0.5mL/只。将细胞浓度为 1.5 万/mL 的杂交瘤细胞混悬液注射到小鼠腹腔中，剂量为 0.5mL/只。接种杂交瘤细胞 7-10 天后，收集腹水，反复收集数次。存于 4℃ 冰箱保存。经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化。

[0068] 具体方法：每 1 份腹水中加入 3 份乙酸钠缓冲液（浓度 0.05mol/L, pH 4.0），用浓度为 0.1mmol/L 的 NaOH 调整 pH 至 4.5，在 4℃ 下搅拌 30min，期间缓慢加入辛酸，按稀释前腹水体积计算 40 μL/mL；在 4℃ 静止 3h，离心（10140r/min, 30min），取上清液，保持在 4℃ 环境中，30min 内加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 使终浓度为 0.277g/mL，静止 1h，4℃ 离心（10140r/min, 30min），弃上清液，得到单克隆抗体沉淀，并用浓缩样品稀释液稀释至浓度为 2 μg/mL。

[0069] 3) 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗。

[0070] 由商业公司提供的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗。

[0071] 4) 双酚 S 标准品溶液 6 瓶。

[0072] 浓度分别为： $1 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ 。

[0073] 5) 酶标板。

[0074] 96 孔聚苯乙烯酶标板，由商业公司提供。

[0075] 6) 底物显色剂。

[0076] 由显色剂 A 和显色剂 B 组成，显色剂 A 为浓度为 30% 的过氧化氢水溶液，显色剂 B 为浓度为 10mg/mL 的四甲基联苯胺 DMSO 溶液。

[0077] 7) 洗涤液。

[0078] 为含有重量比为 0.05% -0.5% 吐温 -20 的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液。8) 终止液。

[0079] 为 2mol/L 的硫酸溶液。

[0080] 9) 封闭液。

[0081] 为含 5% 脱脂奶粉的 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0082] 10) 浓缩样品稀释液。

[0083] 为 0.01M, pH7.4 的磷酸盐缓冲液（即磷酸根浓度为 0.01M/L, pH7.4 的磷酸盐缓冲液）。

[0084] 11) 自封袋。

[0085] 由商业公司提供。

[0086] 实施例 2

[0087] 间接竞争 ELISA 方法的建立。

[0088] 采用间接竞争 ELISA 法检测双酚 S 单克隆抗体的竞争抑制率，方法如下：

[0089] 1) 用 2 μg/mL 的双酚 S 特异性抗原包被 96 孔酶标板，100 μL/孔，放置于 4℃ 冰箱包被过夜，用 250 μL/孔封闭液（即 5% 脱脂奶粉）封闭后用洗涤液洗涤，并拍干。

[0090] 2) 加入双酚 S 标准品溶液（浓度分别为： $1 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$ ）或样品溶液 50 μL，再加入浓度为 2 μg/mL 的双酚 S 特异性抗体工作液 50 μL，混合均匀，37℃ 温育 1h。

[0091] 3) 洗涤拍干后，加入用稀释液按 1:10000 比例稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗工作液，100 μL/孔，37℃ 温育 1h。

[0092] 4) 洗涤拍干，每孔加入 50 μL 显色液 B 液、10 μL 显色液 A 液显色 15min，加入浓度为 2mol/L 的硫酸溶液，50 μL/孔，终止反应，设定酶标仪于 450nm 处（优选双波长 450/630nm 检测，在 5min 内读完数据），测定 OD（吸光度）值。

[0093] 以抑制率 I% 为纵坐标, 以双酚 S 浓度的对数 $\lg[\text{双酚 S}(\text{ng/mL})]$ 为横坐标, 绘制双酚 S 竞争抑制曲线。将样品的抑制率代入标准曲线回归方程, 从标准曲线上读出样本所对应的浓度, 乘以其对应的稀释倍数即为样本中双酚 S 的实际含量。

[0094] 抑制率计算公式如下:

$$[0095] \quad I = \frac{B - B_N}{B_0 - B_N} \times 100\%$$

[0096] 其中: I——抑制率

[0097] B——样品溶液的平均吸光度值

[0098] B_0 —— $0 \mu\text{g/L}$ 标准溶液的平均吸光度值

[0099] B_N ——参比空白对照平均吸光度值。

[0100] 实施例 3

[0101] 试剂盒灵敏度、特异性、准确度实验。

[0102] 1. 灵敏度测定

[0103] 利用实施例 2 的间接竞争 ELISA 法建立双酚 S 检测的标准工作曲线, 结果如下:

[0104] 双酚 S 单克隆抗体在 $0.5 \mu\text{g/L} \sim 1 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 范围内有良好的线性, $\text{IC}_{50} = 1103.6 \text{ ng/mL}$, 最低检测限为 0.37 ng/mL , 检测范围 (抑制 $20\% \sim 80\%$ 之间) 为 $1.593 \text{ ng/mL} \sim 1021.7 \mu\text{g/mL}$ 。

[0105] 取不同来源, 不同材质的不含双酚 S 的空白样品, 通过梯度加标实验测定其检测限, 结果为: 食品接触塑料制品中双酚 S 的检测限为 $5.2 \mu\text{g/kg}$; 食品模拟物中双酚 S 的检测限为 $0.005 \mu\text{g/kg}$; 饮料中双酚 S 的检测限为 $0.004 \mu\text{g/kg}$ 。

[0106] 2. 特异性测定

[0107] 采用实施例 2 的间接竞争 ELISA 法测定双酚 S 结构类似物 (双酚 A、双酚 B、双酚 F、双酚 AF、硫代双酚、4, 4'-二氯二苯基砜) 与单抗混合物的交叉反应。将系列浓度 ($1 \times 10^6 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $0.5 \mu\text{g/L}$) 的上述物质分别与抗体同时加入到已包被封闭好的酶标板中, 具体步骤同实施例 2, 分别计算各类似物的抑制率。利用单克隆抗体对双酚 S 的 IC_{50} 值与单克隆抗体对各类似物的 IC_{50} 值的比值得到交叉反应率 (CR%), 公式如下:

[0108]

$$CR\% = \frac{\text{双酚 S 的 } \text{IC}_{50} \text{ 值}}{\text{类似物的 } \text{IC}_{50} \text{ 值}} \times 100\%$$

[0109] 结果表明双酚 S 单克隆抗体与双酚 A、双酚 B、双酚 F、双酚 AF、硫代双酚、4, 4'-二氯二苯基砜的交叉反应率分别为 0.9% 、 0.5% 、 0.3% 、 1.1% 、 1.5% 、 2.1% , 符合要求。

[0110] 3. 准确度测定

[0111] 向食品接触塑料制品样品中分别添加 $200 \mu\text{g/kg}$ 和 $5000 \mu\text{g/kg}$ 的双酚 S; 向 4 种食品模拟物、饮料样品中分别添加 $0.02 \mu\text{g/kg}$ 和 $20 \mu\text{g/kg}$ 的双酚 S, 重复三次, 每次做三个平行, 采用实施例 2 的间接竞争 ELISA 法测定抑制率, 然后将抑制率 (三个平行的平均值) 代入标准曲线回归方程, 算出含量, 并计算回收率。

[0112] 回收率公式如下:

[0113]

$$\text{回收率} = \frac{\text{测定值}}{\text{添加值}} \times 100\%$$

[0114] 结果表明：食品接触塑料制品的回收率为 81.7%~92.4%；食品模拟物的回收率为 88.5%~105%；饮料的回收率为 90.1%~101%。

[0115] 实施例 4

[0116] 检测食品接触塑料制品中的双酚 S。

[0117] 1. 样品的前处理

[0118] 取具有代表性的试样，用适当的工具将其剪碎至约 5mm×5mm 的大小，经液氮冷冻后粉碎，混匀。准确称取 0.5g（精确至 0.001g）样品于 10mL 具塞比色管中，加入 5mL 二氯甲烷，超声 30min，然后边涡旋边滴加甲醇至刻度，3000r/min 离心 5min，取 2mL 上清液置于 40℃ 水浴中氮吹至干，加入 0.1mL 甲醇涡旋 1min，然后用水稀释至 1.0mL，涡旋混匀，取 50 μL 进行分析。

[0119] 2. 间接竞争 ELISA 法检测样品中双酚 S 含量

[0120] 采用实施例 2 的方法进行检测，根据测定结果，计算出抑制率，代入标准曲线方程求出双酚 S 的含量，见下表 1。

[0121] 表 1 食品接触塑料制品中双酚 S 的含量

[0122]

食品接触塑料制品	实验次数	溶液中双酚 S 浓度 (μg/L)	样品中双酚 S 的含量 (μg/kg)	含量平均值 (μg/kg)
塑料制品 1	1	2.58	25.8	25.6
	2	2.53	25.3	
塑料制品 2	1	1.21×10^3	1.21×10^4	1.18×10^4
	2	1.15×10^3	1.15×10^4	
塑料制品 3	1	15.32	153.2	153.7
	2	15.42	154.2	
塑料制品 4	1	ND.	ND.	ND.
	2	ND.	ND.	
备注: ND.为样品中的含量低于 5.2 μg/kg。				

[0123] 实施例 5

[0124] 检测食品模拟物中的双酚 S。

[0125] 1. 样品的前处理

[0126] 根据 GB/T 23296.1-2009《食品接触材料塑料中受限物质塑料中物质向食品及食

品模拟物特定迁移试验和含量测定方法以及食品模拟物暴露条件选择的指南》，选用水（模拟物 A）、3%（质量浓度）乙酸水溶液（模拟物 B）、10%（体积分数）乙醇水溶液（模拟物 C）、95%（体积分数）乙醇水溶液（模拟物 D）分别作为水基食品、酸性食品、酒精类食品和脂类食品的模拟物，针对食品接触材料的使用特性进行迁移实验，获得 4 种对应的食品模拟物试液。

[0127] 水基食品、酸性食品和酒精类食品模拟物试液：称取 10.0g 试液于 50mL 烧杯中，进行真空冷冻干燥。待试液全部干燥后，向烧杯中加入 1mL 甲醇，超声 30s，将甲醇转移至氮吹管中，用 2mL 甲醇分 2 次洗涤烧杯，每次超声 30s，合并至氮吹管中，于 40℃ 水浴中氮吹至干，加入 100 μ L 10%（体积分数）甲醇水溶液，涡旋混匀，取 50 μ L 进行分析。

[0128] 脂类食品模拟物试液：称取 10.0g 试液于 50mL 圆底烧瓶中，60℃ 水浴旋转蒸发至干，加入 1mL 甲醇，涡旋 30s，将甲醇转移至氮吹管中，用 2mL 甲醇分 2 次洗涤圆底烧瓶，每次涡旋 30s，合并至氮吹管中，于 40℃ 水浴中氮吹至干，加入 100 μ L 10%（体积分数）甲醇水溶液，涡旋混匀，取 50 μ L 进行分析。

[0129] 2. 间接竞争 ELISA 法检测样品中双酚 S 含量

[0130] 采用实施例 2 的方法进行检测，根据测定结果，计算出抑制率，代入标准曲线方程求出双酚 S 的含量，见下表 2。

[0131] 表 2 食品模拟物中的双酚 S 含量

[0132]

食品接触材料样品	食品模拟物种类	食品模拟物中双酚 S 浓度 (μ g/kg), n=2		平均值 (μ g/kg)
塑料制品 1	A	ND.	ND.	ND.
	B	ND.	ND.	ND.
	C	ND.	ND.	ND.
	D	ND.	ND.	ND.
塑料制品 2	A	0.03	0.03	0.03
	B	0.04	0.03	0.04
	C	0.07	0.08	0.08

[0133]

	D	0.17	0.15	0.16
塑料制品 3	A	ND.	ND.	ND.
	B	ND.	ND.	ND.
	C	ND.	ND.	ND.
	D	ND.	ND.	ND.
塑料制品 4	A	ND.	ND.	ND.
	B	ND.	ND.	ND.
	C	ND.	ND.	ND.
	D	ND.	ND.	ND.
备注: ND.为样液中的含量低于 0.005 μ g/kg。				

[0134] 实施例 6

[0135] 检测饮料中的双酚 S。

[0136] 1. 样品的前处理

[0137] 果汁饮料:取 30-40mL 样品于 50mL 聚四氟乙烯离心管中,8000r/min 离心 5min,除去絮状物,用乙酸调节清液 pH 值为 3-5。

[0138] 碳酸饮料:取 30-40mL 样品于 100mL 烧杯中,超声脱气 20min。

[0139] 准确称取 10.0g 经上述处理的样品,分 2 次加入已活化的 ENVI-Carb 固相萃取小柱(依次用 10mL 甲醇和 10mL 水活化平衡)中,待样液全部流出后,依次加入 10mL 水和 6mL 30%(体积分数)甲醇水溶液淋洗,用 6mL 甲醇洗脱,收集洗脱液,置于 40℃水浴中氮吹浓缩至干,加入 100 μ L 10%(体积分数)甲醇水溶液,涡旋混匀,取 50 μ L 进行分析。

[0140] 2. 间接竞争 ELISA 法检测样品中双酚 S 含量

[0141] 采用实施例 2 的方法进行检测,根据测定结果,计算出抑制率,代入标准曲线方程求出双酚 S 的含量,见下表 3。

[0142] 表 3 饮料中双酚 S 的含量

[0143]

饮料	实验次数	样液中双酚 S 浓 度 (μg/kg)	样品中双酚 S 的 含量 (μg/kg)	含量平均值 (μg/kg)
饮料 1	1	ND.	ND.	ND.
	2	ND.	ND.	
饮料 2	1	0.82	0.0082	0.0084
	2	0.85	0.0085	
饮料 3	1	1.71	0.0171	0.0173
	2	1.75	0.0175	
饮料 4	1	ND.	ND.	ND.
	2	ND.	ND.	
备注: ND.为样品中的含量低于 0.004μg/kg。				

[0144] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0145] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

专利名称(译)	双酚S检测试剂盒及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN105181957A	公开(公告)日	2015-12-23
申请号	CN201510455774.8	申请日	2015-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	广东产品质量监督检验研究院		
申请(专利权)人(译)	广东产品质量监督检验研究院		
当前申请(专利权)人(译)	广东产品质量监督检验研究院		
[标]发明人	刘付建 唐穗平 谭婉琪 王娜 陈纪文 陈满英		
发明人	刘付建 唐穗平 谭婉琪 王娜 陈纪文 陈满英		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577		
其他公开文献	CN105181957B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种双酚S检测试剂盒及其制备和使用方法，属于添加剂检测技术领域。该试剂盒包括每个微孔内包被浓度为0.5-2.5μg/mL双酚S特异性抗原的酶标板，浓度为0.5-2.5μg/mL的双酚S特异性抗体工作液，且所述双酚S特异性抗原与双酚S特异性抗体的用量为1:1。本发明的试剂盒可以快速检测在食品接触制品中双酚S的含量以及食品模拟物中双酚S的迁移情况，也可以快速检测饮料中双酚S的污染水平，具有特异性高，结果准确且前处理简单，对仪器设备要求低、检测成本低的特点。

$$I = \frac{B - B_N}{B_0 - B_N} \times 100\%$$