



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105181957 B

(45)授权公告日 2017.03.15

(21)申请号 201510455774.8

(22)申请日 2015.07.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105181957 A

(43)申请公布日 2015.12.23

(73)专利权人 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 陈锦汉 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)

(56)对比文件

CN 103308685 A,2013.09.18,

CN 103257232 A,2013.08.21,

CN 104101702 A,2014.10.15,

CN 101413945 A,2009.04.22,

CN 101863981 A,2010.10.20,

CN 101328215 A,2008.12.24,

WO 0072020 A1,2000.11.30,

EP 2894478 A1,2015.07.15,

姚卫蓉等.双酚A的酶联免疫检测方法的建立.《食品工业科技》.2011,(第1期),

Yang Lu et al.Development of sensitive direct and indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for monitoring bisphenol-A in canned foods and beverages.《Analytical and Bioanalytical Chemistry》.2012,第403卷(第6期),

Yang Lu et al.Development of sensitive direct and indirect enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for monitoring bisphenol-A in canned foods and beverages.《Analytical and Bioanalytical Chemistry》.2012,第403卷(第6期),

李月明等.酶联免疫法检测食品中的双酚A残留.《食品研究与开发》.2012,第33卷(第6期),

审查员 李进进

权利要求书3页 说明书10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0.5-2.5μg/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。

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0.5-2.5 $\mu\text{g/mL}$;

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0.5-2.5 $\mu\text{g/mL}$;

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;

所述双酚S特异性抗原的制备方法为:

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。

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,所述载体蛋白为牛血清白蛋白;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;所述载体蛋白为牛血清白蛋白;

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0.5-2.5 $\mu\text{g/mL}$;

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0.5-2.5 μ 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 $^{\circ}$ C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1%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——0μg/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'-二羟基二苯砵(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、聚砵和聚醚砵,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 μ 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 μ 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 $^{\circ}$ C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1%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] B₀——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2μg/mL的双酚S特异性抗原包被96孔酶标板，100μL/孔，放置于4℃冰箱包被过夜，用250μL/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50μL，再加入浓度为2μg/mL的双酚S特异性抗体工作液50μL，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，100μL/孔，37℃温育1h；最后洗涤拍干，每孔加入50μL显色剂B、10μL显色剂A，显色15min，加入浓度为2mol/L的硫酸溶液，50μL/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。适合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

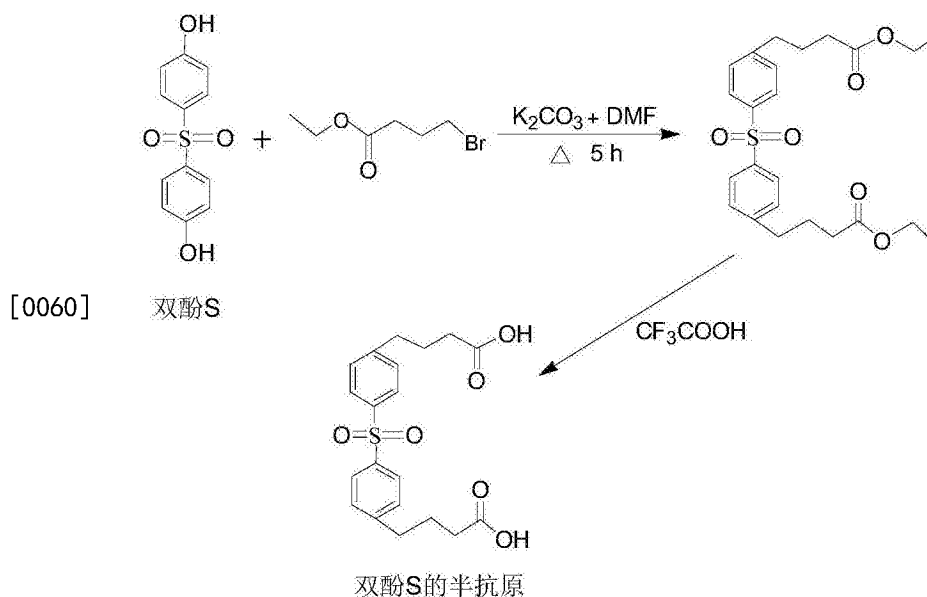
[0056] 一种双酚S检测试剂盒，主要组成成份如下：

[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:



[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 μ g/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 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 $^{\circ}$ C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 $^{\circ}$ C下搅拌30min,期间缓慢加入辛酸,按稀释前腹水体积计算40 μ L/mL;在4 $^{\circ}$ C静止3h,离心(10140r/min,30min),取上清液,保持在4 $^{\circ}$ C环境中,30min内加入(NH₄)₂SO₄使终浓度为0.277g/mL,静止1h,4 $^{\circ}$ C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 $2\mu\text{g/mL}$ 。

[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 , $\text{pH}7.4$ 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 , $\text{pH}7.4$ 的磷酸盐缓冲液。

[0082] 10)浓缩样品稀释液。

[0083] 为 0.01M , $\text{pH}7.4$ 的磷酸盐缓冲液(即磷酸根浓度为 0.01M/L , $\text{pH}7.4$ 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 $2\mu\text{g/mL}$ 的双酚S特异性抗原包被96孔酶标板, $100\mu\text{L/孔}$,放置于 4°C 冰箱包被过夜,用 $250\mu\text{L/孔}$ 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 $50\mu\text{L}$,再加入浓度为 $2\mu\text{g/mL}$ 的双酚S特异性抗体工作液 $50\mu\text{L}$,混合均匀, 37°C 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, $100\mu\text{L/孔}$, 37°C 温育1h。

[0092] 4)洗涤拍干,每孔加入 $50\mu\text{L}$ 显色液B液、 $10\mu\text{L}$ 显色液A液显色15min,加入浓度为 2mol/L 的硫酸溶液, $50\mu\text{L/孔}$,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1%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] B₀——0μg/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0.5μg/L~1×10⁴μg/L范围内有良好的线性,1C₅₀=1103.6ng/mL,最低检测限为0.37ng/mL,检测范围(抑制20%~80%之间)为1.593ng/mL~1021.7μg/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5.2μg/kg;食品模拟物中双酚S的检测限为0.005μg/kg;饮料中双酚S的检测限为0.004μg/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'-二氯二苯基砵)与单抗混合物的交叉反应。将系列浓度(1×10⁶μg/L、1×10⁵μg/L、1×10⁴μg/L、1×10³μg/L、1×10²μg/L、1×10¹μg/L、0.5μg/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1C₅₀值与单克隆抗体对各类似物的1C₅₀值的比值得到交叉反应率(CR%),公式如下:

$$[0108] \quad CR\% = \frac{\text{双酚S的IC}_{50}\text{值}}{\text{类似物的IC}_{50}\text{值}} \times 100\%$$

[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'-二氯二苯基砵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200μg/kg和5000μg/kg的双酚S;向4种食品模拟物、饮料样品中分别添加0.02μg/kg和20μg/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:

$$[0113] \quad \text{回收率} = \frac{\text{测定值}}{\text{添加值}} \times 100\%$$

[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50μL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100μL 10%(体积分数)甲醇水溶液,涡旋混匀,取50μL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100μL 10%(体积分数)甲醇水溶液,涡旋混匀,取50μL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

	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 (μg/kg), n=2		平均值 (μg/kg)
[0132]	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 0.005μg/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ENV1-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100μL 10%(体积分数)甲醇水溶液,涡旋混匀,取50μL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	CN105181957B	公开(公告)日	2017-03-15
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	陈锦汉 刘付建 唐穗平 谭婉琪 王娜 陈纪文 陈满英		
发明人	陈锦汉 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		
审查员(译)	李进进		
其他公开文献	CN105181957A		
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。

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