



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102590493 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 18

(21) 申请号 201210035454. 3

(22) 申请日 2012. 02. 17

(71) 申请人 南开大学

地址 300071 天津市南开区卫津路 94 号

(72) 发明人 郝日沫 田溪 孟萌 尹永梅

张波 宋佩 薛虎寅 张太昌

邢玥 王鹏 徐志环

(74) 专利代理机构 天津佳盟知识产权代理有限

公司 12002

代理人 侯力

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

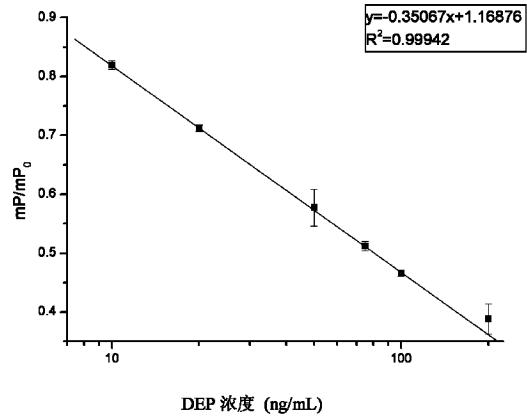
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒

(57) 摘要

一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒,包括荧光标记物储备液、DEP 标准溶液、DEP 多克隆抗体血清和浓缩磷酸盐(PBS)缓冲溶液并分别封装于试剂管中,用于检测样品中 DEP 的浓度。该检测方法采用荧光偏振技术,通过测量一系列已知浓度的 DEP 溶液的荧光偏振得到标准曲线,利用该标准曲线计算混合物中 DEP 的浓度。本发明的优点是:该检测方法将抗体-抗原反应的高度特异性与荧光标记的高度灵敏性结合起来,操作简便快速,检测时无需进行分离等操作,检测精度高,对 DEP 的最大检测范围为 10-200ng/mL,灵敏度可达 40. 4ng/mL,在水、果汁饮料及胶囊等实际体系中残留 DEP 的快速检测中发挥重要作用。



1. 一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒,其特征在于:包括荧光标记物储备液、DEP 标准溶液、DEP 多克隆抗体血清和浓缩磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液并分别封装于试剂管中,荧光标记物储备液为将异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记 DEP 的荧光偶联物溶于 200 μ L 甲醇所得的溶液并封装于一个容积为 1.5mL 的试剂管中;DEP 标准溶液按 DEP 在甲醇溶剂的不同浓度设置并分别封装于七个容积为 1.5mL 的试剂管中,溶剂为甲醇,每管 1mL;DEP 多克隆抗体血清为 600 μ L 并封装于一个容积为 1.5mL 的试剂管中;浓缩 PBS 缓冲溶液封装于两个容积为 10mL 的试剂管中,每个试剂管内装液 9mL。

2. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒,其特征在于:所述荧光标记物储备液的配制方法是,将 1mg 4-氨基-邻苯二甲酸二乙酯与 1mg FITC 在 500 μ L 质量百分比含量为 25% 的三乙胺的甲醇中,在 4 $^{\circ}$ C 温度下反应 8-10 小时,取上述混合溶液 50 μ L,在薄层层析硅胶片底部画一条带,将此薄层层析硅胶片放入氯仿与甲醇的体积比为 4 : 1 的展开剂中层析,然后刮下薄层层析硅胶片上 Rf 为 0.5 的带,溶于 200mL 甲醇并过滤,取滤液作为荧光标记物储备液。

3. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒,其特征在于:所述 DEP 标准溶液设置的浓度为 0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、75ng/mL、100ng/mL 和 200ng/mL,甲醇为溶剂,每管 1mL;配制方法为是将 0.2mg DEP 标准品溶解在 1mL 甲醇中配制成 200ng/mL 的标准溶液,然后用甲醇将 200ng/mL 的标准溶液梯度稀释为 100ng/mL、75ng/mL、50ng/mL、20ng/mL 及 10ng/mL 的标准溶液,取 1mL 甲醇作为 0ng/mL 的空白对照标准溶液。

4. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒,其特征在于:所述 DEP 多克隆抗体血清的配制方法是,将 DEP 半抗原改造物 4-氨基-邻苯二甲酸二乙酯的氨基与牛血清蛋白偶联制得 DEP 免疫抗原,将免疫抗原纯化冻干后,分 5 次注射入新西兰大白兔体内,心脏采血离心后,得到多克隆抗体血清,分装后于 -20 $^{\circ}$ C 温度下保存。

5. 根据权利要求 1 所述邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒,其特征在于:所述浓缩磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液中各组分浓度为 27mmol/L KCl、1380mmol/L NaCl、70mmol/L Na_2HPO_4 和 15mmol/L KH_2PO_4 。

一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒

【技术领域】

【0001】 本发明涉及食品检验免疫分析技术,特别是一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒。

【背景技术】

【0002】 2011年4月,台湾有关部门在例行抽检食品时发现“净元益生菌”中含有塑化剂邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP),浓度高达600ppm(百万分之一浓度)。5月23日,台湾发现昱伸香料公司在食品添加剂“起云剂”(即乳化剂)中违法添加有毒的塑化剂,导致9家知名运动饮料及果汁、酵素饮品污染,台湾受事件牵连的厂商近200家。截至2011年6月6日,国家质检总局又公布了最新的“台湾地区受塑化剂污染的问题企业及其产品名单”,台湾问题产品从6月3日公布的812种上升至945种。涉及塑化剂污染的食品包含运动饮料;果汁饮料;茶饮料;果酱、果浆或果冻;胶囊锭状粉状食品;添加剂等六大类。

【0003】 塑化剂是台湾说法,而大陆一般称为增塑剂,它是塑料制品的伴生品,添加增塑剂可降低塑料的玻璃转化温度,使硬而刚性的塑料变得软且柔韧,是工业上被广泛使用的高分子材料助剂,在塑料加工中添加这种物质,可以使其柔韧性增强,容易加工,可合法用于工业用途。

【0004】 塑化剂的品种繁多,在其研究发展阶段其品种曾多达1000种以上,作为商品生产的增塑剂不过200多种,以邻苯二甲酸酯类居多。邻苯二甲酸酯是由二羧酸邻苯二甲酸及醇类所形成的酯类,有良好的防水性及防油性。目前用在工业上有十四种,它也正是激素玩具、有毒化妆品中的有害成分。这类塑化剂不属于食品或食品添加剂,具有毒性。因其分子的不稳定性,它会随着使用时间的推移,不断从材料中释出,挥发至大气、土壤和水域中,因此,人类会通过呼吸,饮食等各种途径吸入体内。正常途径摄入的塑化剂微乎其微,基本都会在短时间内被人体排泄掉。2011年5月起台湾食品中先后检出DEHP、DINP、DNOP、DBP、DMP、DEP等6种邻苯二甲酸酯类塑化剂成分,药品中检出DEP和DIDP。

【0005】 中华人民共和国卫生部公告2011年第16号规定,食品中可能违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂邻苯二甲酸酯类(第六批)包括:邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)、邻苯二甲酸二苯酯、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二戊酯(DPP)、邻苯二甲酸二己酯(DHXP)、邻苯二甲酸二壬酯(DNP)、邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)、邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)、邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)、邻苯二甲酸丁基苄基酯(BBP)、邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯(DMEP)、邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯(DEEP)、邻苯二甲酸二(2-丁氧基)乙酯(DBEP)、邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯(BMPP)等。可能添加的食品品种有:乳化剂类食品添加剂、使用乳化剂的其他类食品添加剂或食品等。

【0006】 2011年6月3日,国家药监局正式下发紧急通知,要求各地暂停生产销售含邻苯二甲酸酯的两种保健食品,即协和牌灵芝孢子粉片(国食健字G 20070306)和美中清素牌多种氨基酸片(国食健字G 20100217),并要求对市场上正在销售的这两种产品立即下架。通

知还强调,保健食品企业要开展自查,凡配方中含邻苯二甲酸酯的保健食品,要立即暂停生产,对市场上正在销售的产品立即召回,并及时报告所在地食品药品监督管理部门。此外,还有柔妍胶囊等多种胶囊被检测出含有邻苯二甲酸酯类塑化剂。

[0007] 我国药用辅料中,共有 3 种邻苯二甲酸酯类物质可以使用。分别是邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丁酯。上述物质在药品生产过程中主要作为辅料使用,多用于片剂包衣、胶囊等。2010 版中国《药典在药用辅料目录中明确将“邻苯二甲酸二乙酯”列为可用的药用辅料。《药典》中说,该物质类别属于药用辅料、增塑剂和包衣材料等。但《药典》并没有对“邻苯二甲酸二乙酯”的剂量、安全性等方面进行限制或提示。而美国药典虽然也允许将邻苯二甲酸酯类似物作为药用辅料,但同时规定了其同系物总日摄取量的上限。

[0008] 卫生部网站指出,邻苯二甲酸酯类物质对健康的影响取决于其摄入量,偶然食用少量的邻苯二甲酸酯类物质不会对健康造成危害。据了解,以 60kg 体重的成人作为例,世界卫生组织、美国食品与药品监管局和欧盟分别认为,每人每天摄入 1.5mg、2.4mg、3.0mg 及以下的邻苯二甲酸酯类物质是安全的。

[0009] 各地对塑化剂检测标准情况如下:

[0010] 1、台湾:

[0011] 依据台湾地区“食品器具容器包装卫生标准”规定,DEHP 塑化剂溶出限量是 1.5ppm、DBP 是 0.3ppm。相关报道:台湾地区食品器具容器包装卫生修订标准已实施。内地标准《GB 9685-2008 食品容器、包装材料用添加剂使用卫生标准》中规定:DBP 在塑料、橡胶中特定迁移量或最大残留量为 0.3mg/kg

[0012] 2、中国大陆:

[0013] 2011 年 7 月 8 日,国家认证认可监督管理委员会制订了《食品中邻苯二甲酸酯的测定》行业标准,该测定标准可一次性检测 22 种邻苯二甲酸酯(包括国际高度关注的 DINP、DIDP 和 DAP 等),检出限值(0.01-0.5mg/kg)。

[0014] 3、国际规定:

[0015] 按照惯例,目前各国可容忍的 60kg 成人每日摄入量范围为 1.2-8.4mg,这样的含量标准内,人体会将其以尿液、粪便形式代谢出体外。

[0016] 4、香港塑化剂检验——比国际标准更严:

[0017] 香港特区政府制定食品药品中含塑化剂“邻苯二甲酸二酯”(DEHP)上限为 1.5ppm,并将塑化剂纳入恒常监测范围,对进口产品加强抽检。倘发现产品中的 DEHP 超出上限,则根据食品安全法严禁在港发售,发售的产品也必须回收销毁。中国对邻苯二甲酸酯类塑化剂检测通常采用仪器方法,常用高效液相色谱法和气相色谱法。

[0018] 国标采用的是 GB/T21911-2008 的 GC-MS 法,其原理是:各类食品提取、净化后经气相色谱-质谱联用仪进行测定。采用特征选择离子监测扫描模式(SIM),以碎片的丰度比定性,标准样品定量离子外标法定量进行检测。不含油脂类物质采用正己烷提取,含油脂类物质采用乙酸乙酯、环己烷提取,凝胶渗透色谱(GPC)净化后用液质联用检测分析。此标准方法中,含油脂样品中各邻苯二甲酸酯化合物的检出限为 1.5mg/kg,不含油脂样品中各邻苯二甲酸酯化合物的检出限为 0.05mg/kg。

[0019] 欧盟委员会联合研究中心(JRC)于 2011 年 7 月 29 日发布消息称,针对“台湾塑化

剂事件”研究制定了 3 种塑化剂检测方法,主要检测邻苯二甲酸二异辛酯 (DEHP),分别采用气相色谱质谱联用 (GC-MS) 法、超高液相色谱串联质谱法 (UHPLC-MS/MS)、顶空固相微萃取气相色谱质谱联用 (HS-SPME-GC-MS) 法。以上 3 种方法也在广泛收集来自方法使用者的意见反馈,以不断改进,提高方法的适用性和稳定性。这三种方法的应用范围:检测运动饮料中浓度范围在 3-100mg/L 的 DEHP。

[0020] 有害物质在食品药品中的非法添加,与人民的健康息息相关。建立快速准确的检测方法,控制好食品质量,可更好地为人民的健康提供保障。另一方面,我国与世界贸易往来日益密切,有害物质在食品药品中的非法添加,是影响我国出口的一个重要因素。如果没有快速准确的检测方法把关,出口产品质量达不到出口国的要求,将会造成我国出口贸易的巨大经济损失,并损害中国在世界的形象。

【发明内容】

[0021] 本发明目的是克服现有技术存在的上述不足,提供一种操作简便快速且检测精度高的邻苯二甲酸二乙酯 (DEP) 荧光偏振免疫检测试剂盒。

[0022] 本发明的技术方案:

[0023] 一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒,包括荧光标记物储备液、DEP 标准溶液、DEP 多克隆抗体血清和浓缩磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液并分别封装于试剂管中,荧光标记物储备液为将异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记 DEP 的荧光偶联物溶于 200 μ L 甲醇所得的溶液并封装于一个容积为 1.5mL 的试剂管中;DEP 标准溶液按 DEP 在甲醇溶剂的不同浓度设置并分别封装于七个容积为 1.5mL 的试剂管中,溶剂为甲醇,每管 1mL;DEP 多克隆抗体血清为 600 μ L 并封装于一个容积为 1.5mL 的试剂管中;浓缩 PBS 缓冲溶液封装于两个容积为 10mL 的试剂管中,每个试剂管内装液 9mL。

[0024] 所述荧光标记物储备液的配制方法是,将 1mg 4-氨基-邻苯二甲酸二乙酯与 1mg FITC 在 500 μ L 质量百分比含量为 25% 的三乙胺的甲醇中,在 4 $^{\circ}$ C 温度下反应 8-10 小时,取上述混合溶液 50 μ L,在薄层层析硅胶片底部画一条带,将此薄层层析硅胶片放入氯仿与甲醇的体积比为 4:1 的展开剂中层析,然后刮下薄层层析硅胶片上 R_f 为 0.5 的带,溶于 200mL 甲醇并过滤,取滤液作为荧光标记物储备液。

[0025] 所述 DEP 标准溶液设置的浓度为 0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、75ng/mL、100ng/mL 和 200ng/mL,甲醇为溶剂,每管 1mL;配制方法为是将 0.2mg DEP 标准品溶解在 1mL 甲醇中配制成 200ng/mL 的标准溶液,然后用甲醇将 200ng/mL 的标准溶液梯度稀释为 100ng/mL、75ng/mL、50ng/mL、20ng/mL 及 10ng/mL 的标准溶液,取 1mL 甲醇作为 0ng/mL 的空白对照标准溶液。

[0026] 所述 DEP 多克隆抗体血清的配制方法是,将 DEP 半抗原改造物 4-氨基-邻苯二甲酸二乙酯的氨基与牛血清蛋白偶联制得 DEP 免疫抗原,将免疫抗原纯化冻干后,分 5 次注入新西兰大白兔体内,心脏采血离心后,得到多克隆抗体血清,分装后于 -20 $^{\circ}$ C 温度下保存。

[0027] 所述浓缩磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液中各组分浓度为 27mmol/L KCl、1380mmol/L NaCl、70mmol/L Na₂HPO₄ 和 15mmol/L KH₂PO₄。

[0028] 本发明的检测原理:

[0029] 该试剂盒的检测方法采用荧光偏振技术,使用溶剂从样品中提取 DEP,通过将提取

物、荧光标记物和 DEP 多克隆抗体相混合得到混合物, 荧光标记物能够与 DEP 多克隆抗体结合以产生能够检测的荧光偏振变化。荧光标记物通过适合的荧光团与 DEP 偶联得到, 制备抗体的人工免疫原由 DEP 与牛血清蛋白偶联制成。测量混合物的荧光偏振。通过测量一系列已知浓度的 DEP 溶液的荧光偏振得到标准曲线, 然后测量混合物的荧光偏振, 再利用该标准曲线计算混合物中 DEP 的浓度。

[0030] 本发明的优点和积极效果:

[0031] 该试剂盒将抗体-抗原反应的高度特异性与荧光标记的高度灵敏性结合起来, 利用抗原抗体结合后荧光偏振的变化来检测样品浓度, 操作简便快速, 检测时无需进行分离等操作, 检测精度高, 对 DEP 的最大检测范围为 10-200ng/mL, 灵敏度可达 40.4ng/mL, 在水、果汁饮料及胶囊等实际体系中残留 DEP 的快速检测中发挥重要作用。

【附图说明】

[0032] 图 1 为本发明 DEP 抗体的抑制率曲线。

[0033] 图 2 为本发明的标准曲线。

【具体实施方式】

[0034] 实施例:

[0035] 一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒, 包括荧光标记物储备液、DEP 标准溶液、DEP 多克隆抗体血清和浓缩磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液并分别封装于试剂管中, 荧光标记物储备液为将异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记 DEP 的荧光偶联物溶于 200 μ L 甲醇所得的溶液并封装于一个容积为 1.5mL 的试剂管中; DEP 标准溶液按 DEP 在甲醇溶剂的不同浓度设置并分别封装于七个容积为 1.5mL 的试剂管中, 溶剂为甲醇, 每管 1mL; DEP 多克隆抗体血清为 600 μ L 并封装于一个容积为 1.5mL 的试剂管中; 浓缩 PBS 缓冲溶液封装于两个容积为 10mL 的试剂管中, 每个试剂管内装液 9mL。

[0036] 所述溶液的配制:

[0037] 1) 荧光标记物储备液的配制方法是, 将 1mg 4-氨基-邻苯二甲酸二乙酯与 1mg FITC 在 500 μ L 质量百分比含量为 25% 的三乙胺的甲醇中, 在 4 $^{\circ}$ C 温度下反应 8-10 小时, 取上述混合溶液 50 μ L, 在薄层层析硅胶片底部画一条带, 将此薄层层析硅胶片放入氯仿与甲醇的体积比为 4:1 的展开剂中层析, 然后刮下薄层层析硅胶片上 Rf 为 0.5 的带, 溶于 200mL 甲醇并过滤, 取滤液作为荧光标记物储备液。

[0038] 2) DEP 标准溶液设置的浓度为 0ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL、75ng/mL、100ng/mL 和 200ng/mL, 甲醇为溶剂, 每管 1mL; 配制方法为是将 0.2mg DEP 标准品溶解在 1mL 甲醇中配制成 200ng/mL 的标准溶液, 然后用甲醇将 200ng/mL 的标准溶液梯度稀释为 100ng/mL、75ng/mL、50ng/mL、20ng/mL 及 10ng/mL 的标准溶液, 取 1mL 甲醇作为 0ng/mL 的空白对照标准溶液。

[0039] 3) DEP 多克隆抗体血清的配制方法是, 将 DEP 半抗原改造物 4-氨基-邻苯二甲酸二乙酯的氨基与牛血清蛋白偶联制得 DEP 免疫抗原, 将免疫抗原纯化冻干后, 分 5 次注射入新西兰大白兔体内, 心脏采血离心后, 得到多克隆抗体血清, 分装后于 -20 $^{\circ}$ C 温度下保存。

[0040] 4) 浓缩磷酸盐 (PBS) 缓冲溶液中各组分浓度为 27mmol/L KCl、1380mmol/L NaCl、

70mmol/L Na_2HPO_4 和 15mmol/L KH_2PO_4 。

[0041] 具体实施步骤：

[0042] 1) 免疫抗原的合成

[0043] 称取 0.05328g (0.24mmol) 4-氨基邻苯二甲酸二乙酯与 0.1mL 浓 HCl 和 3mL H_2O 混合, 加热溶解; 置冰浴中冷至 5°C 以下, 低温搅拌下, 滴入 4mL 0.0110g NaNO_2 的水溶液, 继续反应 30min; 将 160mg BSA 的硼酸钠缓冲液 (pH 值为 9.2) 40mL 溶液逐滴加入上述重氮盐中, 逐渐有橙红色溶液出现, 继续反应 2h, 得抗原粗品反应液; 将反应液装入透析袋在 PBS 缓冲液中 4°C 透析 2 天, 接着在 PBS 缓冲液中 4°C 透析 6 天后, 冻干, 得到 DEP 免疫抗原的橙红色固体粉末。

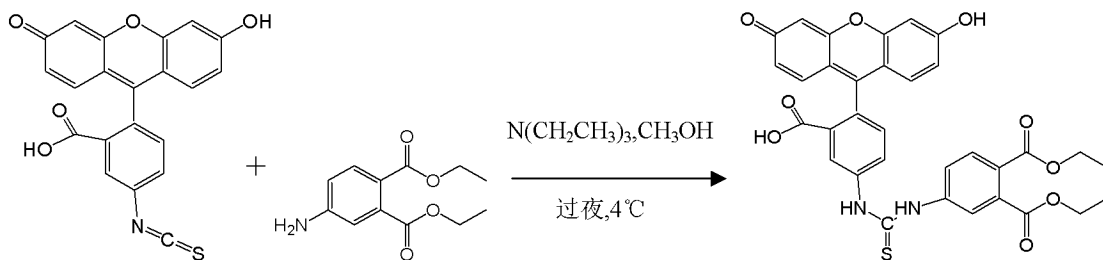
[0044] 2) DEP 多克隆抗体血清的制备

[0045] 采用新西兰大白兔作为免疫动物, 以 DEP 半抗原改造物与牛血清蛋白的偶联物为免疫抗原, 首次免疫剂量为 $500 \mu\text{g}/\text{mL}$, 首免时将免疫抗原溶于等体积的生理盐水和弗氏完全佐剂制成乳化剂, 颈背部多点注射, 以后免疫取剂量减半的免疫抗原溶于等体积的生理盐水和弗氏不完全佐剂混合乳化, 首免与二免间隔 20 天, 以后每隔两周免疫一次, 共免疫五次, 最后一次不加佐剂。7 天以后心脏采血, 离心得 DEP 多克隆抗体血清。

[0046] 3) 荧光标记物储备液的制备

[0047] 荧光标记物储备液的制备反应如下所示：

[0048]



FITC

DEP 半抗原改造物

荧光标记物: DEP-FITC 偶联物

[0049] 将 1mg 4-氨基-邻苯二甲酸二乙酯与 1mg FITC 溶于 $500 \mu\text{L}$ 含 25% 三乙胺的甲醇中, 4°C 下过夜反应 8 小时; 取上述混合物溶液 $50 \mu\text{L}$, 在薄层层析硅胶片底部画一条带, 并在此带左右两侧分别点少量 FITC 及 4-氨基-邻苯二甲酸二乙酯作为对照; 将此薄层层析硅胶片放入氯仿: 甲醇 = (4 : 1) 的展开剂中, 约 5min 后, 展开剂到达距薄层层析硅胶片顶部约 1cm 处, 取出。该板呈现两条主带, 一条为 $R_f = 0.5$ 的带, 一条为 $R_f = 0.3$ 的带; 刮下薄层层析硅胶片上 $R_f = 0.5$ 的带, 溶于 $200 \mu\text{L}$ 甲醇并过滤, 取滤液作为荧光标记物储备液。

[0050] 4) 荧光偏振检测方法的建立

[0051] ①荧光标记物储备液稀释度优选：

[0052] 将荧光标记物储备液分别稀释 500、1000、2000、4000、8000 倍, 分别取 1mL 加入试管中, 并在荧光偏振仪读数 (读取工作缓冲液 PBS 的数值设为空白); 荧光值是工作缓冲液 5 倍的数值最为灵敏准确, 最终选取荧光标记物的稀释度为 1 : 1000。

[0053] ②多克隆抗体血清稀释度优选：

[0054] 将多克隆抗体血清分别稀释 50、100、200、400、800、1600 倍, 分别加入盛有 0.5mL

上述优选稀释度的荧光标记物的试管中,涡旋混匀,并在荧光偏振仪读数;此时荧光值与 mP 值分别有所不同,抗体越浓, mP 值越大,根据经验选取 mP 值是最大 mP 值 0.7 倍为最佳,最终选取抗体的稀释度为 1 : 300。

[0055] ③抗体灵敏度的测定及标准曲线的建立:

[0056] 根据上述对抗体及荧光标记物浓度的优选实验,选择并确定多克隆抗体血清稀释度为 1 : 300,荧光标记物储备液稀释度为 1 : 1000,分别制得荧光标记物工作溶液及抗体工作溶液,进行抗体的灵敏度的测定,具体步骤如下:

[0057] 加样:向 4mL 荧光偏振检测小试管中加入 DEP 荧光标记物工作溶液 495 μ L,加入各不同浓度的 DEP 标准溶液 10 μ L,涡旋混匀;

[0058] 孵育:然后加入 DEP 抗体工作溶液 495 μ L,涡旋混匀 0.5min 后,室温 (25 $^{\circ}$ C) 恒温孵育 13.5min;

[0059] 检测:用荧光偏振仪测定每管的荧光偏振强度;

[0060] 检测结果以抑制率计算: %抑制率 = % mP/mP₀, mP 是不同浓度的药物作为竞争者的荧光偏振值, mP₀ 是不加药的荧光偏振值。

[0061] 图 1 为本发明 DEP 抗体的抑制率曲线,以外加药物 (DEP) 浓度的 log 值为横坐标,荧光偏振值与空白对照的荧光偏振值比值 mP/mP₀ 为纵坐标作图,每个点为 5 次重复测试结果的平均值,计算 50%抑制率时药物的浓度即为该抗体的灵敏度。荧光标记物储备液稀释度是 1 : 1000,多克隆抗体血清稀释倍数为 1/300,此时的 IC₅₀ 及线性范围最佳,方法的灵敏性最好。

[0062] 图 2 为本发明的标准曲线,是通过截取抑制率曲线的直线部分 (DEP 浓度在 10-200ng mL⁻¹ 范围内的部分) 绘制,标准曲线对应的直线方程为 $y = -0.35067x + 1.16876$, $R^2 = 0.99942$ (R 为线性相关系数),根据标准曲线直线方程计算待测样品中的 DEP 浓度值。图中表明:DEP 浓度在 10ng/mL ~ 200ng/mL 范围内荧光偏振值比值 mP/mP₀ 与药物浓度对数值之间线性良好。

[0063] DEP 的免疫试剂盒的检测应用:

[0064] 1) 试剂的配制

[0065] :工作缓冲溶液:将试剂盒中提供的浓缩 PBS 缓冲溶液用蒸馏水稀释 10 倍后使用。

[0066] 荧光标记物工作溶液:将荧光标记物储备液用工作缓冲溶液稀释至 1000 倍后使用。

[0067] 抗体工作溶液:将多克隆抗体血清用工作缓冲溶液稀释至 1000 倍后使用。

[0068] 2) 样品预处理

[0069] 桶装饮用水:取 600mL 桶装饮用水于分液漏斗中,加入 30mL 正己烷,振荡后分液,分离得到上层萃取液 25mL,旋蒸至干后,加入 1.25mL 甲醇,涡旋 3min 后过 0.22 μ m 滤膜,取清液得到待测样品。

[0070] 果汁饮料:称取 60mL 样品,加入 24mL 正己烷,振荡后分液,分离得到上层萃取液 20mL,旋蒸至干后,加入 10.0mL 甲醇,涡旋 3min,过 0.22 μ m 滤膜取清液得到待测样品。

[0071] 胶囊:称取 4.6g 肠溶胶囊,打开除去内容药物,将胶囊外壳加入 200mL 水中,70 $^{\circ}$ C 水浴加热 40min 后胶囊溶解,加入 46mL 正己烷,振荡后分液,分离得到上层萃取液 15mL,旋蒸至干后,加入 10.0mL 甲醇,涡旋 3min,过 0.22 μ m 滤膜取清液并将溶液稀释到 80 倍得到

待测样品。

[0072] 3) 检测步骤

[0073] 加样:向 4mL 荧光偏振检测试管中加入 DEP 荧光标记物工作溶液 495 μ L, 加入待测样品溶液 10 μ L, 涡旋混匀;

[0074] 孵育:然后加入 DEP 抗体工作溶液 495 μ L, 涡旋混匀 0.5min 后, 室温 (25 $^{\circ}$ C) 恒温孵育 13.5min;

[0075] 检测:用荧光偏振仪测定每管的荧光偏振强度。

[0076] 4) 待测样品检验结果及试剂盒性能鉴定

[0077] 样品的抑制率 (%) = DEP 溶液或样品的荧光偏振值 (或样品) / 无 DEP 的样品荧光偏振值 \times 100%

[0078] 将样品的抑制率的值 (作为 y 值) 带入标准曲线 (图 2) 对应的直线方程 $y = 0.35067x + 1.16876$, 计算待测样品中的 DEP 浓度值 (即 x 值)。

[0079] 精密度和准确度试验:

[0080] 以果汁饮料的检测为例, 将含有 DEP 的果汁饮料根据最大允许添加量适度稀释为 1/50 倍, 检测 3 种浓度饮料的 DEP 添加量, 计算 DEP 的检测回收率。同一天测定 5 次计算批内变异系数。每天重复测定 5 次, 测定 3 天, 计算批间变异系数 (共检测 45 个样品)。根据标准曲线的线性方程计算回收率的定量计算, 公式如下:

[0081] %回收率 = % [加标样品测定值 (ppm) - 对照溶液测定值 (ppm)] / 添加浓度 (ppm)

[0082] 试剂盒测定结果见表 1:

[0083] 表 1. 试剂盒精密度和准确性检测结果

样品	样品中 DEP 浓度 (μ g mL $^{-1}$)	DEP 检测浓度 (μ g mL $^{-1}$)	平均回收率 (%)	批间变异系数 (%)
[0084]	0.5	0.57 \pm 0.04	114.9	6.6
果汁饮料	2.5	2.63 \pm 0.45	105.2	17.0
	5	4.79 \pm 0.64	95.8	13.3

[0085] 检测结果显示:变异系数低于 17.0%, 回收率在 80 ~ 120% 之间。表明本试剂盒有很好的重复性和准确度, 是一种操作简便快速且检测精度高的邻苯二甲酸二乙酯 (DEP) 荧光偏振免疫检测试剂盒。

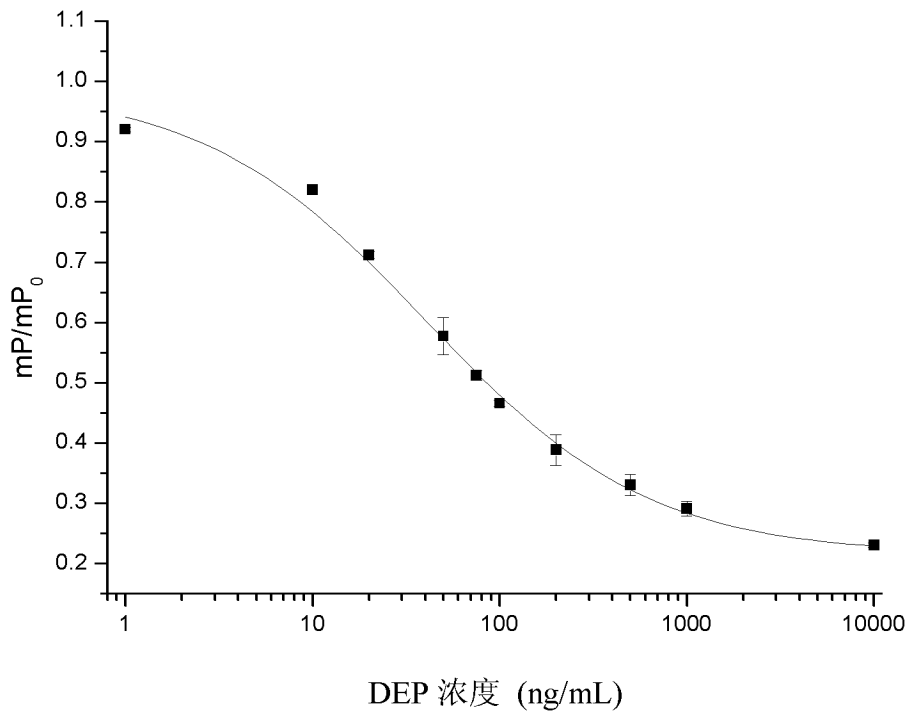


图 1

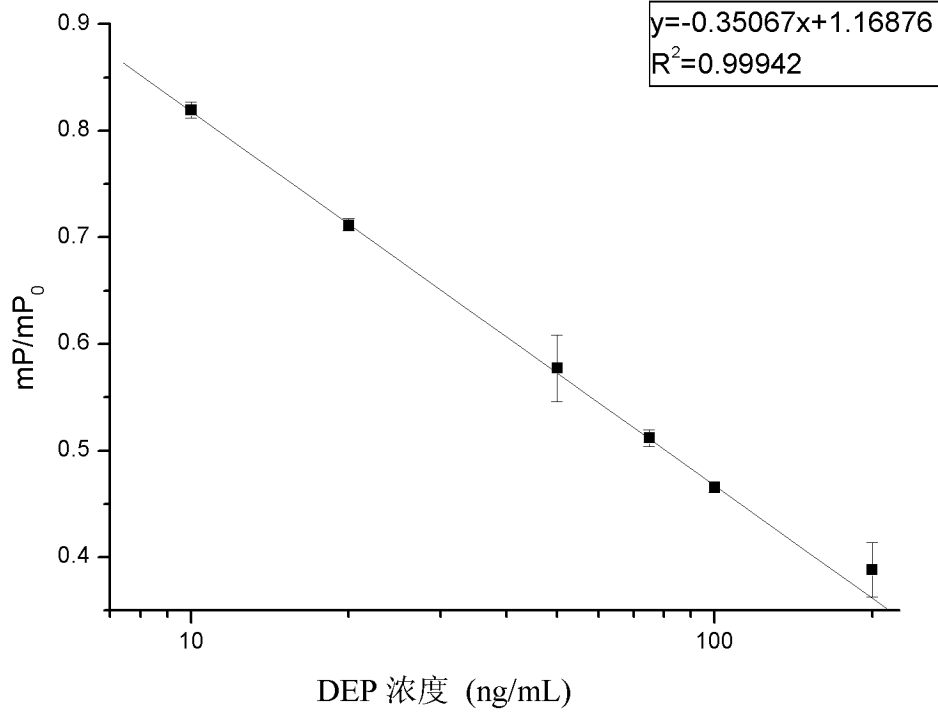


图 2

专利名称(译)	一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒		
公开(公告)号	CN102590493A	公开(公告)日	2012-07-18
申请号	CN201210035454.3	申请日	2012-02-17
[标]申请(专利权)人(译)	南开大学		
申请(专利权)人(译)	南开大学		
当前申请(专利权)人(译)	南开大学		
[标]发明人	郗日沫 田溪 孟萌 尹永梅 张波 宋佩 薛虎寅 张太昌 邢玥 王鹏 徐志环		
发明人	郗日沫 田溪 孟萌 尹永梅 张波 宋佩 薛虎寅 张太昌 邢玥 王鹏 徐志环		
IPC分类号	G01N33/533		
代理人(译)	侯力		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种邻苯二甲酸二乙酯荧光偏振免疫检测试剂盒，包括荧光标记物储备液、DEP标准溶液、DEP多克隆抗体血清和浓缩磷酸盐(PBS)缓冲溶液并分别封装于试剂管中，用于检测样品中DEP的浓度。该检测方法采用荧光偏振技术，通过测量一系列已知浓度的DEP溶液的荧光偏振得到标准曲线，利用该标准曲线计算混合物中DEP的浓度。本发明的优点是：该检测方法将抗体-抗原反应的高度特异性与荧光标记的高度灵敏性结合起来，操作简便快速，检测时无需进行分离等操作，检测精度高，对DEP的最大检测范围为10-200ng/mL，灵敏度可达40.4ng/mL，在水、果汁饮料及胶囊等实际体系中残留DEP的快速检测中发挥重要作用。

