



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108802395 A

(43)申请公布日 2018.11.13

(21)申请号 201810635222.9

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2018.06.20

G01N 33/531(2006.01)

(71)申请人 广州质量监督检测研究院

地址 510000 广东省广州市番禺区石楼潮
田工业区珠江路1-2号

(72)发明人 陈立伟 黄金凤 吴楚生 寻知庆
黄宇峰 郭燕华 郭新东 侯向昶
吴玉銮 冼燕萍

(74)专利代理机构 广州市越秀区海心联合专利
代理事务所(普通合伙)
44295

代理人 王洪娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

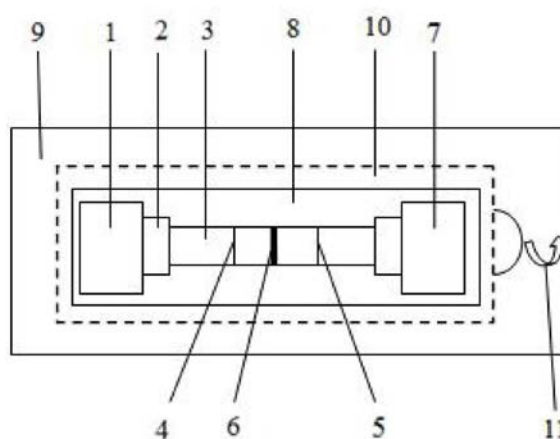
权利要求书3页 说明书9页 附图1页

(54)发明名称

检测三氯羟基二苯醚的检测卡及其制备方
法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种检测三氯羟基二苯醚的检测卡及其制备方法和应用,属于添加剂检测技术领域。该检测卡上设有顺次搭接粘贴在背衬上的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;硝酸纤维素膜上由样品垫端至吸水垫端依次设有第一质控线、检测线和第二质控线;金标垫上包被有胶体金标记的第一抗体,第一抗体为特异性抗三氯羟基二苯醚的抗体;检测线包被有完全抗原,所述完全抗原为三氯羟基二苯醚与载体蛋白的偶联物;第一质控线和第二质控线均包被有第二抗体,第二抗体可与所述第一抗体特异性结合,且不与所述完全抗原结合。上述检测卡采用双质控线,结果准确,结构简单,使用方便,适用于三氯羟基二苯醚的快速检测。



1. 一种检测三氯羟基二苯醚的检测卡,其特征在于,所述检测卡上设有顺次搭接粘贴在背衬上的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述硝酸纤维素膜上由样品垫端至吸水垫端依次设有第一质控线、检测线和第二质控线;

所述金标垫上包被有胶体金标记的第一抗体,所述第一抗体为特异性抗三氯羟基二苯醚的抗体;所述检测线包被有完全抗原,所述完全抗原为三氯羟基二苯醚与载体蛋白的偶联物;所述第一质控线和第二质控线均包被有第二抗体,所述第二抗体可与所述第一抗体特异性结合,且不与所述完全抗原结合。

2. 根据权利要求1所述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡,其特征在于,还包括密封袋,所述检测卡套装于所述密封袋内,所述密封袋上设有可拆式覆膜区,所述可拆式覆膜区撕拆后将所述样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫暴露。

3. 根据权利要求1所述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡,其特征在于,所述第二抗体为羊抗鼠IgG抗体、兔抗鼠IgG抗体或驴抗鼠IgG抗体。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡,其特征在于,

所述完全抗原通过以下方法制备得到:将三氯羟基二苯醚、碳酸钾分散至吡啶中,然后加入4-溴丁酸乙酯,加热回流反应,随后加入过量三氟乙酸,回流搅拌,脱去乙基,裸露出羧基,制得三氯羟基二苯醚半抗原,将纯化后的三氯羟基二苯醚半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺混合反应;然后称取载体蛋白,溶解在NaHCO₃溶液中得到载体蛋白溶液,得载体蛋白溶液,将含有三氯羟基二苯醚半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中反应,得到三氯羟基二苯醚-载体蛋白偶联物,即得完全抗原;

所述第一抗体通过以下方法制备得到:

(a) 动物免疫:取上述完全抗原,与等体积的弗氏完全佐剂乳化完全后,腹部注射免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,免疫后尾静脉采血,间接ELISA检测血清效价,选择结果最佳的小鼠准备融合;

(b) 细胞融合:取经选定的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞通过PEG介导进行融合,用间接ELISA法测定上清液进行阳性克隆筛选;

(c) 第一抗体制备:将阳性克隆经有限稀释亚克隆后获得遗传稳定的单克隆细胞株,细胞株扩大培养后,接种经降植烷致敏Balb/C小鼠腹腔诱导生产单克隆抗体的腹水;腹水经硫酸粗纯化,再通过辛酸硫酸法纯化得到特异性抗三氯羟基二苯醚的第一抗体;

所述胶体金标记的第一抗体通过以下方法制备得到:

(a) 胶体金溶液制备:在水中加入柠檬酸三钠,煮沸后加入氯金酸,继续搅拌加热,当溶液的颜色变为透明的紫红色后停止加热,补水至原体积,冷却,保存备用;

(b) 胶体金标记物的制备:取已制备好的胶体金溶液,用K₂CO₃调节胶体金溶液pH;取上述第一抗体,加入到上述胶体金溶液中,室温孵育,离心后弃上清;将所得沉淀用PBS缓冲液溶解稀释,即获得胶体金标记的第一抗体。

6. 根据权利要求5所述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡,其特征在于,所述完全抗原通过以下方法制备得到:将三氯羟基二苯醚、碳酸钾分散至吡啶中搅拌,然后加入4-溴丁酸乙酯,加热回流反应6h,随后加入过量三氟乙酸,回流搅拌1h,脱去乙基,裸露出羧基,制得三

氯羟基二苯醚半抗原,将纯化后的三氯羟基二苯醚半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺混合反应;然后称取载体蛋白,溶解在pH 7.0的0.1mol/L NaHCO₃溶液中得到载体蛋白溶液,得载体蛋白溶液,将含有三氯羟基二苯醚半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中反应,得到三氯羟基二苯醚-载体蛋白偶联物,即得完全抗原;

所述第一抗体通过以下方法制备得到:

(a) 动物免疫:取上述制得的完全抗原,与等体积的弗氏完全佐剂乳化完全后,腹部皮下多点注射免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,免疫7-10天,尾静脉采血,间接ELISA检测血清效价,选择结果最佳的小鼠准备融合;

(b) 细胞融合:取经选定的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞通过PEG介导进行融合,用间接ELISA法测定上清液进行阳性克隆筛选;

(c) 第一抗体制备:阳性克隆经有限稀释亚克隆后获得遗传稳定的单克隆细胞株,细胞株扩大培养后,接种经降植烷致敏Balb/C小鼠腹腔诱导生产单克隆抗体的腹水;腹水经硫酸胺粗纯化,再辛酸硫酸胺法纯化得相应抗三氯羟基二苯醚化合物的第一抗体;

所述胶体金标记的第一抗体通过以下方法制备得到:

(a) 胶体金溶液制备:在100mL超纯水中加入1mL 1%柠檬酸三钠,煮沸后加入1mL 1%氯金酸,继续搅拌加热,当溶液的颜色变为透明的紫红色时,维持5min后停止加热,补水至原体积,冷却,得半径为30nm-40nm胶体金溶液保存备用;

(b) 胶体金标记的第一抗体的制备:取已制备好的胶体金溶液,用0.1mol/L K₂CO₃调节胶体金溶液pH至8.2;按每毫升胶体金溶液20μg抗体的量加入抗体溶液,混合均匀,室温孵育,离心后弃上清;将所得沉淀用PBS缓冲液溶解稀释,即获得第一抗体。

7. 根据权利要求6所述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡,其特征在于,所述第一抗体的浓度为10-30μg/mL,在检测卡上的用量为40-60μL/cm;

所述检测线包被的完全抗原的浓度为1-3mg/mL,在检测卡上的用量为1-3μL/cm;

所述第一质控线和第二质控线包被的第二抗体的浓度为1-3mg/mL,在检测卡上的用量为1-3μL/cm。

8. 权利要求1-7任一项所述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 金标垫的制备:将所述胶体金标记的第一抗体喷在载体玻璃纤维棉上,烘干,备用;

(6) 硝酸纤维素膜制备:将所述第二抗体、完全抗原和第二抗体依次喷涂在硝酸纤维素膜上,依次形成第一质控线、检测线和第二质控线,烘干,备用;

(7) 检测卡的组装:在所述背衬上依次粘贴样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,组装成检测卡,切割为预定宽度,即得。

9. 权利要求1-7任一项所述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡在检测三氯羟基二苯醚中的应用。

10. 根据权利要求9所述的应用,其特征在于,包括以下前处理步骤:对于包装材料样品,按照每克包装材料30-60mL溶剂的量加入三氯甲烷浸泡1-4h,浸泡液旋转蒸发至近干,用少量甲醇溶解残渣后,以水稀释1-5倍,即得待测溶液;

对于食品样品:将待测样品粉碎后,按照每克食品样品5-15mL的量加入水,混匀后加入按照每克食品样品5-15mL的量加入甲醇,涡旋提取1-3min,提取液离心后取上清,即得待测

溶液；

对于日化产品：按照每克日化样品5-15mL的量加入水，混匀后加入按照每克日样品5-15mL的量加入甲醇，涡旋提取1-3min，提取液离心后取上清，即得待测溶液。

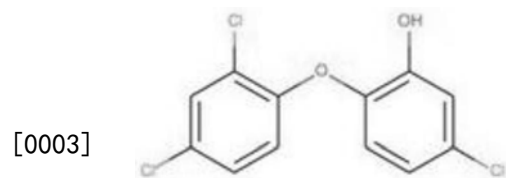
检测三氯羟基二苯醚的检测卡及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及食品、食品包装以及日化产品检测装置技术领域,特别是涉及一种检测三氯羟基二苯醚的检测卡及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 三氯羟基二苯醚,又名三氯生,是一种广谱高效抗菌剂,对革兰氏阳性、阴性菌、真菌、病毒等都有杀灭和抑制作用,被广泛用于农业生产、食品加工、食品包装材料及日化用品等领域,其结构如下式I所示。



式 I

[0004] 添加了三氯羟基二苯醚的食品包装材料具有一定抗菌性,能在保证食品质量、安全和新鲜的同时抑制微生物生长、延长货架期。添加三氯羟基二苯醚的食品包装产品主要有:熟食包装盒/纸/膜、可再加热方便食品容器、冷鲜肉包装膜、餐盘、保鲜膜、餐盘等。此外,目前大量用于清洁餐具和水果的家用食品清洁剂中也加入了三氯羟基二苯醚。除了食品相关产品,三氯羟基二苯醚也广泛用于日化产品,例如牙膏、肥皂、洗手液等。

[0005] 由于其强亲脂性,三氯羟基二苯醚可在生物体内长期累积。美国食品药品监督管理局对三氯羟基二苯醚的使用安全性提出质疑,指出三氯羟基二苯醚可扰乱机体激素稳态。三氯羟基二苯醚与雌二醇具有相似的化学结构,可通过与内源性雌激素竞争结合雌激素受体,影响雌激素受体活性,干扰机体代谢稳态作用。此外,研究发现,三氯羟基二苯醚可通过乳汁和胎盘进入胎儿体内,影响胎儿生长发育,除了发育毒性,还具有甲状腺系统毒性和肝毒性。

[0006] 目前,世界各国纷纷对三氯羟基二苯醚的使用进行了限制,鉴于此,建立相关产品的三氯羟基二苯醚的快速检测方法,开展定期监测和安全性评估,对于规范行业发展,保证产品质量,保护消费者身体健康和保护环境等具有深远的意义。我国国家标准GB 22115-2008《牙膏用原料规范》中限定牙膏中允许添加三氯羟基二苯醚的含量不能超过0.3%,与加拿大、欧盟等国家的要求一致。

[0007] 目前,国内外对三氯羟基二苯醚的检测主要集中在日化产品和环境样品方面,食品和塑料包装材料方面鲜有报道。而常用的检测方法主要有高效液相色谱法、气相色谱法、紫外-可见分光光度法和分子印迹法等。色谱法等仪器法具有特异性高、结果准确的优点,但缺点是样品前处理繁琐,消耗大量溶剂,且需要昂贵的实验室设备,检测成本高。

发明内容

[0008] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种检测三氯羟基二苯醚的检测卡,该检测卡可以便捷、快速、直观的检测三氯羟基二苯醚,还具有成本低的特点,适合现场快速检测。

[0009] 一种检测三氯羟基二苯醚的检测卡,所述检测卡上设有顺次搭接粘贴在背衬上的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫;所述硝酸纤维素膜上由样品垫端至吸水垫端依次设有第一质控线、检测线和第二质控线;

[0010] 所述金标垫上包被有胶体金标记的第一抗体,所述第一抗体为特异性抗三氯羟基二苯醚的抗体;所述检测线包被有完全抗原,所述完全抗原为三氯羟基二苯醚与载体蛋白的偶联物;所述第一质控线和第二质控线均包被有第二抗体,所述第二抗体可与所述第一抗体特异性结合,且不与所述完全抗原结合。

[0011] 上述检测卡采用双质控线,结果准确,结构简单,使用方便,适用于三氯羟基二苯醚的快速检测。

[0012] 在其中一个实施例中,该检测卡还包括密封袋,所述检测卡套装于所述密封袋内,所述密封袋上设有可拆式覆膜区,所述可拆式覆膜区撕拆后将所述样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫暴露。

[0013] 在其中一个实施例中,所述载体蛋白为牛血清蛋白、卵清蛋白、钥孔血蓝蛋白中的至少一种;所述第二抗体为羊抗鼠IgG抗体、兔抗鼠IgG抗体或驴抗鼠IgG抗体。

[0014] 在其中一个实施例中,所述完全抗原通过以下方法制备得到:将三氯羟基二苯醚、碳酸钾分散至吡啶中,然后加入4-溴丁酸乙酯,加热回流反应,随后加入过量三氟乙酸,回流搅拌,脱去乙基,裸露出羧基,制得三氯羟基二苯醚半抗原,将纯化后的三氯羟基二苯醚半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺混合反应;然后称取载体蛋白,溶解在NaHCO₃溶液中得到载体蛋白溶液,得载体蛋白溶液,将含有三氯羟基二苯醚半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中反应,得到三氯羟基二苯醚-载体蛋白偶联物,即得完全抗原;

[0015] 所述第一抗体通过以下方法制备得到:

[0016] (a) 动物免疫:取上述完全抗原,与等体积的弗氏完全佐剂乳化完全后,腹部注射免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,免疫后尾静脉采血,间接ELISA检测血清效价,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0017] (b) 细胞融合:取经选定的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞通过PEG介导进行融合,用间接ELISA法测定上清液进行阳性克隆筛选;

[0018] (c) 第一抗体制备:将阳性克隆经有限稀释亚克隆后获得遗传稳定的单克隆细胞株,细胞株扩大培养后,接种经降植烷致敏Balb/C小鼠腹腔诱导生产单克隆抗体的腹水;腹水经硫酸胺粗纯化,再通过辛酸硫酸胺法纯化得到特异性抗三氯羟基二苯醚的第一抗体;

[0019] 所述胶体金标记的第一抗体通过以下方法制备得到:

[0020] (a) 胶体金溶液制备:在水中加入柠檬酸三钠,煮沸后加入氯金酸,继续搅拌加热,当溶液的颜色变为透明的紫红色后停止加热,补水至原体积,冷却,保存备用;

[0021] (b) 胶体金标记物的制备:取已制备好的胶体金溶液,用K₂CO₃调节胶体金溶液pH;取上述第一抗体,加入到上述胶体金溶液中,室温孵育,离心后弃上清;将所得沉淀用PBS缓冲液溶解稀释,即获得胶体金标记的第一抗体。

[0022] 在其中一个实施例中,所述完全抗原通过以下方法制备得到:将三氯羟基二苯醚、

碳酸钾分散至吡啶中搅拌,然后加入4-溴丁酸乙酯,加热回流反应6h,随后加入过量三氟乙酸,回流搅拌1h,脱去乙基,裸露出羧基,制得三氯羟基二苯醚半抗原,将纯化后的三氯羟基二苯醚半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺混合反应;然后称取载体蛋白,溶解在pH 7.0的0.1mol/LNaHCO₃溶液中得到载体蛋白溶液,得载体蛋白溶液,将含有三氯羟基二苯醚半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中反应,得到三氯羟基二苯醚-载体蛋白偶联物,即得完全抗原;

[0023] 所述第一抗体通过以下方法制备得到:

[0024] (a) 动物免疫:取上述制得的完全抗原,与等体积的弗氏完全佐剂乳化完全后,腹部皮下多点注射免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,免疫7-10天,尾静脉采血,间接ELISA检测血清效价,选择结果最佳的小鼠准备融合;

[0025] (b) 细胞融合:取经选定的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞通过PEG介导进行融合,用间接ELISA法测定上清液进行阳性克隆筛选;

[0026] (c) 第一抗体制备:阳性克隆经有限稀释亚克隆后获得遗传稳定的单克隆细胞株,细胞株扩大培养后,接种经降植烷致敏Balb/C小鼠腹腔诱导生产单克隆抗体的腹水;腹水经硫酸粗纯化,再辛酸硫酸法纯化得相应抗三氯羟基二苯醚化合物的第一抗体;

[0027] 所述胶体金标记的第一抗体通过以下方法制备得到:

[0028] (a) 胶体金溶液制备:在100mL超纯水中加入1mL 1%柠檬酸三钠,煮沸后加入1mL 1%氯金酸,继续搅拌加热,当溶液的颜色变为透明的紫红色时,维持5min后停止加热,补水至原体积,冷却,得半径为30nm-40nm胶体金溶液保存备用;

[0029] (b) 胶体金标记的第一抗体的制备:取已制备好的胶体金溶液,用0.1mol/L K₂CO₃调节胶体金溶液pH至8.2;按每毫升胶体金溶液20μg抗体的量加入抗体溶液,混合均匀,室温孵育,离心后弃上清;将所得沉淀用PBS缓冲液溶解稀释,即获得第一抗体。

[0030] 在其中一个实施例中,所述第一抗体的浓度为10-30μg/mL,在检测卡上的用量为40-60μL/cm;

[0031] 所述检测线包被的完全抗原的浓度为1-3mg/mL,在检测卡上的用量为1-3μL/cm;

[0032] 所述第一质控线和第二质控线包被的第二抗体的浓度为1-3mg/mL,在检测卡上的用量为1-3μL/cm。

[0033] 本发明还公开了上述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡的制备方法,包括以下步骤:

[0034] (1) 金标垫的制备:将所述胶体金标记的第一抗体喷在载体玻璃纤维棉上,烘干,备用;

[0035] (6) 硝酸纤维素膜制备:将所述第二抗体、完全抗原和第二抗体依次喷涂在硝酸纤维素膜上,依次形成第一质控线、检测线和第二质控线,烘干,备用;

[0036] (7) 检测卡的组装:在所述背衬上依次粘贴样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,组装成检测卡,切割为预定宽度,即得。

[0037] 本发明还公开了上述的检测三氯羟基二苯醚的检测卡在检测三氯羟基二苯醚中的应用。

[0038] 在其中一个实施例中,该应用包括以下前处理步骤:对于包装材料样品,按照每克包装材料30-60mL溶剂的量加入三氯甲烷浸泡1-4h,浸泡液旋转蒸发至近干,用少量甲醇溶

解残渣后,以水稀释1-5倍,即得待测溶液;

[0039] 对于食品样品:将待测样品粉碎后,按照每克食品样品5-15mL的量加入水,混匀后加入按照每克食品样品5-15mL的量加入甲醇,涡旋提取1-3min,提取液离心后取上清,即得待测溶液;

[0040] 对于日化产品:按照每克日化样品5-15mL的量加入水,混匀后加入按照每克日样品5-15mL的量加入甲醇,涡旋提取1-3min,提取液离心后取上清,即得待测溶液。

[0041] 本发明的检测卡的检测原理为:

[0042] 本发明采用竞争法免疫层析的原理,免疫筛选得到的第一抗体能特异性识别三氯羟基二苯醚。将三氯羟基二苯醚与载体蛋白偶联形成的复合物固定于硝酸纤维素膜上的检测线上(固相抗原)。将待检样本加到试纸卡一端的样品垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合金标垫上胶体金标记的第一抗体,再依次移动至第一质控线、检测线、第二质控线。如果样本中不含有任何三氯羟基二苯醚,胶体金标记的第一抗体与检测线包被的完全抗原结合,从而被固定在检测线上,在检测线上形成红色条带。如果样本中含有三氯羟基二苯醚,金标垫上胶体金标记的第一抗体在被溶解后会先与样本中三氯羟基二苯醚结合,从而抑制胶体金标记的第一抗体与检测线上的完全抗原结合,检测线的条带颜色将会减弱或者消失。

[0043] 简单来说,当待检样本中含有三氯羟基二苯醚时,检测线显色,当待检样本中含有三氯羟基二苯醚,则检测线颜色消失或颜色明显减弱。

[0044] 本发明试纸卡在质控线设置有第二抗体,所述第二抗体特异性结合于所述第一抗体,无论待检样品中是否含有三氯羟基二苯醚,胶体金标记的第一抗体总能与质控区的第二抗体结合形成红色条带,该条带是判定层析过程是否正常和试纸卡是否失效的标准。

[0045] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0046] 本发明的检测三氯羟基二苯醚的检测卡,采取免疫学竞争法的原理,结合胶体金标记技术和免疫层析法设计,可快速特异地半定量检测包括塑料食品包装材料样本,或者面包、蛋糕、饼干等食品样本,或者牙膏、洗洁精等日化产品中的三氯羟基二苯醚,具有特异性强的优点,可避免其它检测方法的假阳性导致的误检问题。还通过将一个检测线设置于两个质控线之间,便于对检测线结果的对比,检测结果更加直观。

[0047] 并且该检测卡由于样本量需要少、检测速度快,检测时间为5-10min,操作简便,不需由专业人员操作,适用范围广,易于推广使用,可分批或单个样品及时检测。

附图说明

[0048] 图1为实施例1中检测卡俯视结构示意图。

[0049] 图中:1-样品垫、2-金标垫、3-硝酸纤维素膜、4-第一质控线、5-第二质控线、6-检测线、7-吸水垫、8-背衬、9-密封袋、10-可拆式覆膜区、11-打开标记。

具体实施方式

[0050] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻

全面。

[0051] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。本文所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0052] 以下实施例所用原料均为市售购得。

[0053] 实施例1

[0054] 一种检测三氯羟基二苯醚的检测卡,如图1所示,所述检测卡上设有顺次搭接粘贴在背衬上的样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3和吸水垫7;所述硝酸纤维素膜3上由样品垫端至吸水垫端依次设有第一质控线4、检测线6和第二质控线5;

[0055] 所述金标垫2上包被有胶体金标记的第一抗体,所述第一抗体为特异性抗三氯羟基二苯醚的抗体;所述检测线6包被有三氯羟基二苯醚的完全抗原,所述完全抗原为三氯羟基二苯醚与载体蛋白的偶联物;所述第一质控线4和第二质控线5均包被有第二抗体,在本实施例中,所述第二抗体为市售购得的羊抗鼠IgG多抗,该第二抗体可与所述第一抗体特异性结合,且不与所述完全抗原结合。

[0056] 在本实施例中,还包括密封袋9,所述检测卡套装于所述密封袋9内,所述密封袋9上设有可拆式覆膜区10,所述可拆式覆膜区10撕拆后将所述样品垫1、金标垫2、硝酸纤维素膜3和吸水垫7暴露。并且,在所述可拆式覆膜区撕边缘设有可将该可拆式覆膜区域的覆膜拆除的手撕条,该手撕条旁设有打开标记11,用于指示、提示该可拆式覆膜区10。

[0057] 可以理解的,所述背衬可以用任何不透水的稳定无孔材料制成,但其硬度应足以支撑粘于其上的各组成元件,如本实施例中选用的聚氯乙烯膜胶板。

[0058] 所述样品垫可用任何吸收性材料制成,可使用的材料包括:硝酸纤维素、尼龙、纤维素、乙酸钠纤维素、玻璃纤维和聚醚砜。在本实施例中采用硝酸纤维素。

[0059] 所述吸水垫可以用任何能吸收液体的材料制成,但吸收能力应足够大。可使用的材料包括:吸水滤纸和纤维素。在本实施例中采用吸水滤纸。

[0060] 使用上述检测卡进行检测时,先将待检测样品制备得到的待测溶液滴注入样品垫上,由于毛吸作用原理,使待测溶液及金标垫所含的胶体金标记的第一抗体一起向硝酸纤维素膜扩散,5-10分钟内观察结果。

[0061] 该检测卡的主要反应是免疫学的抗原和抗体反应,在硝酸纤维素膜上迁移的胶体金标记的第一抗体,在检测线上分别与三氯羟基二苯醚的完全抗原,以及第一质控线和第二质控线的第二抗体反应,形成红色条带。若样品中有待检三氯羟基二苯醚存在,当样品加入后即与抗体发生反应,而不会与检测线所包被的完全抗原反应,从而不显色。主要反应的结果有以下几种情况:

[0062] 1、当显示检测线T和质控线C1及C2同时显现红色印迹带,且检测线T的颜色比质控线C1及C2深或一样深,则表示检测结果为阴性,说明被检测样品中三氯羟基二苯醚含量未超标或被检测样品中无三氯羟基二苯醚;

[0063] 2、当检测线T不显示颜色,只有质控线C1及C2显现红色印迹,检测结果为阳性,或其颜色比质控线C1及C2浅,说明被检测样品中三氯羟基二苯醚含量超标;

[0064] 3、当质控线C1或C2任一条不显色,则表明检测试条已失效;

[0065] 4、当质控线C1和C2的显色深浅不一致,则表明检测试条可能失效,建议重新测试。

[0066] 实施例2

[0067] 实施例1的检测三氯羟基二苯醚的检测卡制备方法,包括以下步骤:

[0068] (1) 三氯羟基二苯醚-载体蛋白偶联物的合成:

[0069] 将0.29g三氯羟基二苯醚和1.38g碳酸钾分散至50mL吡啶,搅拌30min,加入0.39g 4-溴丁酸乙酯,加热回流反应6h,使三氯羟基二苯醚的酚羟基被丁酸乙酯取代,得到中间产物,随后加入过量三氟乙酸,回流搅拌1h,脱去乙基,裸露出羧基,制得三氯羟基二苯醚半抗原。将纯化后的三氯羟基二苯醚半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺混合于吡啶中,搅拌过夜。

[0070] 称取0.144g牛血清载体蛋白(市售购得),溶解于5mL pH 7.0的0.1mol/L NaHCO₃中,得载体蛋白溶液,将上述含有三氯羟基二苯醚半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中,边搅拌边缓慢滴加,反应过夜,所得溶液4℃透析3天,即得三氯羟基二苯醚载体蛋白偶联物,分装后-20℃保存。

[0071] (2) 第一抗体的制备:

[0072] (a) 动物免疫:取上述制得的三氯羟基二苯醚-载体蛋白偶联物,与等体积的弗氏完全佐剂乳化完全后,腹部皮下多点注射免疫6-8周龄的雌性Balb/C小鼠,免疫7-10天,尾静脉采血,间接ELISA检测血清效价,选择结果最佳的小鼠准备融合。

[0073] (b) 细胞融合:取经选定的小鼠脾细胞和小鼠骨髓瘤SP2/0细胞通过PEG介导进行融合,用间接ELISA法测定上清液进行阳性克隆筛选;

[0074] (c) 第一抗体制备:阳性克隆经有限稀释亚克隆后获得遗传稳定的单克隆细胞株,细胞株扩大培养后,接种经降植烷致敏Balb/C小鼠腹腔诱导生产单克隆抗体的腹水。腹水经硫酸铵粗纯化,再辛酸硫酸法纯化得相应抗三氯羟基二苯醚化合物的第一抗体,保存在4℃。

[0075] (3) 胶体金标记的第一抗体制备:

[0076] (a) 胶体金溶液制备:在100mL超纯水中加入1mL 1%柠檬酸三钠,煮沸后迅速加入1mL 1%氯金酸,继续搅拌加热,当溶液的颜色完全变为透明的紫红色时,维持5min后停止加热,补水至原体积,冷却至室温,得半径为30nm-40nm胶体金溶液,4℃下保存备用。

[0077] (b) 胶体金标记物的制备:取已制备好的半径为30nm-40nm胶体金溶液,用0.1mol/L K₂CO₃调节胶体金溶液pH至8.2;按每毫升胶体金溶液20μg抗体的量加入抗体溶液,磁力搅拌下与胶体金溶液混合,室温孵育15min进行标记,10000r/min离心30min,弃上清;将所得沉淀用含2%BSA、0.1%叠氮钠的10mM的PBS缓冲液(pH7.2)溶解稀释至第一抗体浓度为20μg/mL,即获得胶体金标记的第一抗体,4℃保存备用。

[0078] (4) 检测卡制备

[0079] (a) 金标垫的制备:将上述已制备好的胶体金标记的第一抗体溶液以50μL/cm的浓度均匀铺涂在聚酯材料上,37℃烘干3h,密封,4℃保存备用。

[0080] (b) 硝酸纤维素膜制备:将制得的三氯羟基二苯醚的完全抗原稀释至浓度为2mg/mL,以1.5μL/cm的浓度包被在硝酸纤维素膜上构成检测线,并将羊抗鼠IgG多抗(市售购得)作为第二抗体,稀释75倍至浓度为2mg/mL,以1.5μL/cm的浓度包被于硝酸纤维素膜上构成第一质控线 and 第二质控线。37℃烘干8h,密封,4℃保存备用。

[0081] (5) 检测卡的组装:在背衬上依次粘贴样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,用切条机切成4mm的检测卡,置于密封袋内,将样品垫面向可撕覆膜面,加入干燥剂密封包装保存。

[0082] 实施例3

[0083] 采用实施例1的检测卡进行检出限试验。

[0084] 一、方法。

[0085] 准确称取三氯羟基二苯醚,以少量甲醇溶解后,再以50%甲醇溶液为稀释剂,制备标准工作溶液,浓度为均为0ng/mL、5ng/mL、10ng/mL、20ng/mL、50ng/mL。

[0086] 取上述标准工作溶液作为样品滴加到实施例1的检测三氯羟基二苯醚的检测卡上,加样后5min观察结果。

[0087] 二、结果。

[0088] 检测线T和质控线C的显色结果见表1。

[0089] 表1三氯羟基二苯醚最低检出限量试验

[0090]	试管	标准品	溶液浓度	显色结果	测定结果
[0091]	编号		(ng/mL)		
	1	三氯羟基二苯醚	0	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2 显色相同	阴性
	2		5	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2 显色相近	阴性
	3		10	检测线 T 显色比质控线 C1 和 C2 略淡	阳性
	4		20	检测线 T 显色稍淡	阳性
	5		50	检测线 T 不显色	阳性

[0092] 从上述结果可以看出,上述实施例1的半定量检测三氯羟基二苯醚的检测卡的对三种三氯羟基二苯醚均能检出,且其检出限约为10ng/mL。

[0093] 实施例4

[0094] 采用实施例1的检测卡检测塑料食品包装袋和食品中的三氯羟基二苯醚。

[0095] 一、实验方法

[0096] 1、样品前处理:

[0097] 将塑料食品包装袋剪碎,称取2g(精确至0.01g)样品,加入100mL三氯甲烷,浸泡2h后,移取浸泡液至圆底烧瓶中,旋转蒸发至近干,加入1mL甲醇溶解残渣后,加入1mL水,振荡混匀后,待测。

[0098] 将饼干样品粉碎后,称取1g(精确至0.01g)样品,加入10mL水,涡旋分散后,再加入10mL甲醇,涡旋提取2min,取部分提取液于15000r/min离心5min,上清液待测。

[0099] 称取1g(精确至0.01g)牙膏样品,加入10mL水,涡旋分散后,再加入10mL甲醇,涡旋提取2min,取部分提取液于15000r/min离心5min,上清液待测。

[0100] 2.样品检测:

[0101] 将检测试纸卡平放,撕开手撕条,用滴管吸取待检样本溶液,垂直滴加3滴于样品垫中心,加样后开始计时。并同时上述待测试样以液相色谱仪进行平行检测,检测方法参见SN/T 1786-2006《进出口化妆品中三氯生和三氯卡班的测定-液相色谱法》,作为参比。

[0102] 3、结果读取:

[0103] 5-10分钟内读取检测结果,结果判断如下:

[0104] 表2样品检测结果

[0105]

	编号	显色结果	测定结果	对比检测结果 μg/mL
食品包装袋	1	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
	2	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
	3	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
	1	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
	2	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
饼干	1	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
	2	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
	3	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
牙膏	1	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1

[0106]		C2 相近		
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
	2	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<1
	3	检测线 T 不显色	阳性	4.8
		检测线 T 不显色	阳性	5.0

[0107] 从上述结果可以看出,采用实施例1的检测卡,能够检出食品包装制品、食品和日化品中的三氯羟基二苯醚,且与液相色谱串联质谱法检测方法相比,具有很好的一致性。

[0108] 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。

[0109] 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。

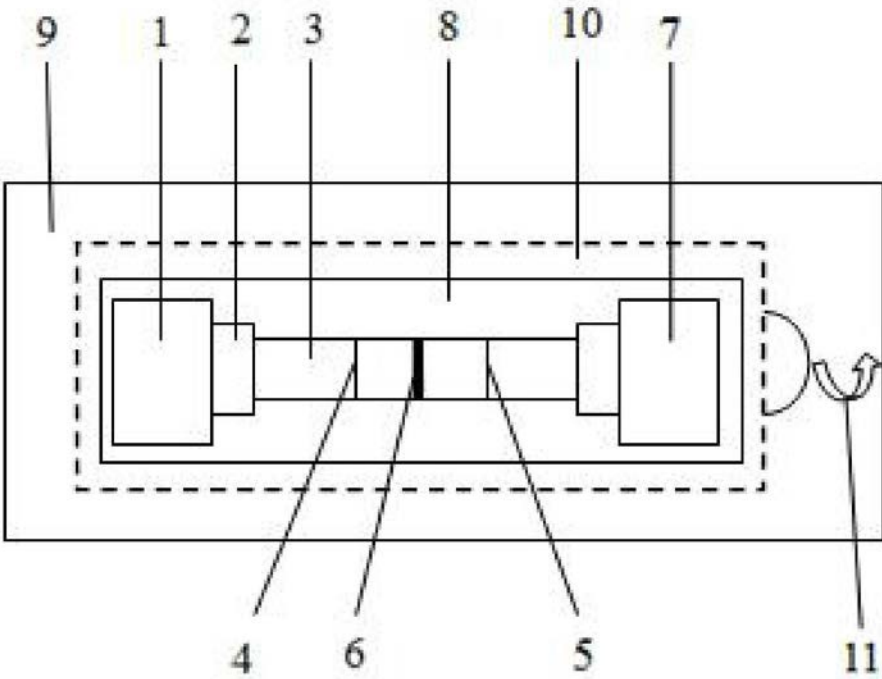


图1

专利名称(译)	检测三氯羟基二苯醚的检测卡及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108802395A	公开(公告)日	2018-11-13
申请号	CN201810635222.9	申请日	2018-06-20
[标]申请(专利权)人(译)	广州质量监督检测研究院		
申请(专利权)人(译)	广州质量监督检测研究院		
当前申请(专利权)人(译)	广州质量监督检测研究院		
[标]发明人	陈立伟 黄金凤 吴楚生 寻知庆 黄宇峰 郭燕华 郭新东 侯向昶 吴玉鑫 冼燕萍		
发明人	陈立伟 黄金凤 吴楚生 寻知庆 黄宇峰 郭燕华 郭新东 侯向昶 吴玉鑫 冼燕萍		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/558 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/543 G01N33/558		
代理人(译)	王洪娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测三氯羟基二苯醚的检测卡及其制备方法和应用，属于添加剂检测技术领域。该检测卡上设有顺次搭接粘贴在背衬上的样品垫、金标垫、硝酸纤维素膜和吸水垫；硝酸纤维素膜上由样品垫端至吸水垫端依次设有第一质控线、检测线和第二质控线；金标垫上包被有胶体金标记的第一抗体，第一抗体为特异性抗三氯羟基二苯醚的抗体；检测线包被有完全抗原，所述完全抗原为三氯羟基二苯醚与载体蛋白的偶联物；第一质控线和第二质控线均包被有第二抗体，第二抗体可与所述第一抗体特异性结合，且不与所述完全抗原结合。上述检测卡采用双质控线，结果准确，结构简单，使用方便，适用于三氯羟基二苯醚的快速检测。

