



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102507926 A

(43) 申请公布日 2012. 06. 20

(21) 申请号 201110308171. 7

(22) 申请日 2011. 10. 12

(71) 申请人 安徽信灵检验医学科技有限公司

地址 230001 安徽省安庆市桐城市经济开发区东一北路

(72) 发明人 王之侃

(74) 专利代理机构 安徽汇朴律师事务所 34116

代理人 胡敏

(51) Int. Cl.

G01N 33/553 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

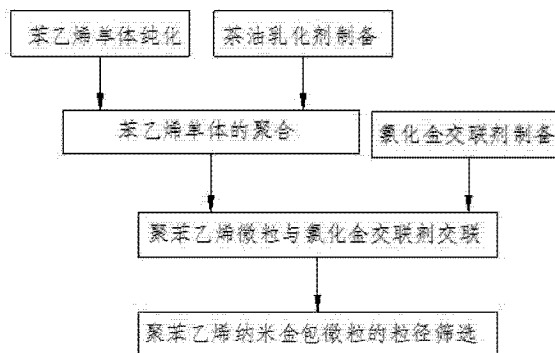
权利要求书 2 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

聚苯乙烯纳米金包微粒及其制备方法

(57) 摘要

本发明涉及一种聚苯乙烯纳米金包微粒及其制备方法。所述的聚苯乙烯纳米金包微粒成份为:苯乙烯单体(纯化)、茶油乳化剂、氯化金交联剂、聚乙二醇 6000、聚醚三醇、过碘酸钠、氢氧化钠、白磷乙醚饱和液、蒸馏水;所述聚苯乙烯纳米金包微粒制备方法包括:苯乙烯单体纯化、茶油乳化剂制备、氯化金交联剂制备、苯乙烯单体的聚合、聚苯乙烯微粒与氯化金交联剂交联、金包微粒的粒径筛选。本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒作为抗原或抗体载体参加免疫浊度反应,呈几何级数放大了测定目标抗原或抗体的灵敏度,把复杂的化学发光、酶联免疫反应才能检测的微克级、纳克级的目标抗原或抗体,在生化分析仪即可直接测定,实际使用效果好。



1. 一种聚苯乙烯纳米金包微粒,作为抗原或抗体载体参加免疫浊度反应,并在生化分析仪直接测定,其特征在于,所述的聚苯乙烯纳米金包微粒由下列重量比例的成份构成:

苯乙烯单体(纯化):	11.8~12.2;
茶油乳化剂:	5.2~5.6;
氯化金交联剂:	3.8~4.2;
聚乙二醇 6000:	1.4;
聚醚三醇:	2.4;
过碘酸钠:	5.54;
氢氧化钠:	1.46;
白磷乙醚饱和液:	8.2;
蒸馏水:	余量。

2. 如权利要求 1 所述的一种聚苯乙烯纳米金包微粒,其特征在于,所述的苯乙烯单体(纯化)重量份比例为 12%。

3. 如权利要求 1 所述的一种聚苯乙烯纳米金包微粒,其特征在于,所述的茶油乳化剂重量份比例为 5.2%。

4. 如权利要求 1 所述的一种聚苯乙烯纳米金包微粒,其特征在于,所述的氯化金交联剂重量份比例为 3.8%。

5. 如权利要求 1 所述的一种聚苯乙烯纳米金包微粒,其特征在于,所述的聚苯乙烯纳米金包微粒制备方法如下:

步骤一、苯乙烯单体纯化

按 2:1 重量份比例取聚苯乙烯单体和浓度为 1mmol/L 的氢氧化钠溶液于分液漏斗中,萃取 10 分钟,静置 15 分钟,分离并弃去下层氢氧化钠水溶液,用蒸馏水如此反复处理,直至苯乙烯单体洗至中性为止;

步骤二、茶油乳化剂制备

取 100 毫升茶油和 100 毫升蒸馏水,加热至 60℃,搅拌 10~15 分钟,再加入氢氧化钠固体 20 克和蒸馏水 200 毫升,加热搅拌到 80℃,加热维持 40~60 分钟,直至皂化完全为止,即得到茶油乳化剂;

步骤三、氯化金交联剂制备

将整个包装(小瓶或安瓿瓶)一次性溶解,按 1:99 重量份比例,用 3.5-二甲巯基甲苯二胺配成氯化金交联剂;

步骤四、苯乙烯单体的聚合

按照重量份比例分别取出以下成份:

茶油乳化剂:	5.2~5.6
苯乙烯单体:	12
过碘酸钠:	5.54
氯化金交联剂:	3.8~4.2
聚乙二醇 6000:	1.4
聚醚三醇:	2.4
氢氧化钠:	1.46

白磷乙醚饱和液： 8.2

蒸馏水： 余量

在蒸馏水中首先加入茶油乳化剂加热至 60℃，以 200 次 / 分钟速度连续搅拌 5~8 分钟，再分别加入苯乙烯单体、过碘酸钠，继续加热并维持 85℃ 以上，且不停搅拌 6 小时，随后取样镜检，无单体油珠，聚合反应完成，即将苯乙烯单体聚合，得到聚苯乙烯微粒；

步骤五、聚苯乙烯微粒与氯化金交联剂交联

在步骤四中所得的聚苯乙烯微粒中，按照步骤四所述的重量份比例依次加入氯化金交联剂、聚乙烯醇 6000、聚醚三醇、氢氧化钠，用工作频率大于 40KHz 超声波机进行超声乳化 15 分钟，再加热至沸腾，一次性快速加入步骤四所述的白磷乙醚饱和液，并混匀，再保持沸腾 8~10 分钟，溶液颜色首先变黑，再逐渐变成混浊的酒红色，交联反应完成，交联成聚苯乙烯金包微粒；

步骤六、金包微粒的粒径筛选

取上述合成的聚苯乙烯金包微粒与蒸馏水按照 2:8 的重量份比例稀释，分别倒入塑料管中，用转速为 4500 转 / 分钟进行离心 15 分钟，去除沉淀物厚，再放入高速离心机中，用 13000 转 / 分钟转速再离心 15 分钟，即可得到 300~500nm 粒度的微粒沉淀，在高倍镜下可见淡红色乳胶颗粒，此即聚苯乙烯纳米金包微粒。

聚苯乙烯纳米金包微粒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学免疫体外诊断领域,特别涉及医疗器械体外诊断试剂中采用免疫透射比浊法,作为参与反应的抗原或抗体(蛋白质等生物高分子物质)的一种非特异性的载体及其制备方法。

背景技术

[0002] 免疫透射比浊法的基本原理是检测一定体积的溶液通过的光线量。当光线通过时,由于被测液中的抗原抗体复合物对光线的反射和吸收,引起透射光的减少,测定的光通量和抗原抗体复合物的量成反比。现有的体外诊断试剂免疫透射比浊法方法是:用测定目标抗原或抗体的免疫动物(如羊或兔等)产生抗体或抗抗体(蛋白质)后,采集其血液分离血清,即多克隆抗血清,滴定效价,制成一定校价的抗血清溶液,即为体外诊断试剂。再与人体高效价的目标抗原或抗体反应产生一定的浊度,然后用免疫透射比浊法来测定其浓度。由于这种方法的灵敏度不高,若测定的目标抗原或抗体的含量在毫克级、微克级甚至纳克级时,在生化分析仪上用免疫透射比浊法就无法测定。为解决这一困扰临床检验医学的技术难题,人们提出多种技术解决方案,中国专利申请 CN200810057556.9 提供一种前白蛋白检测试剂盒,CN201010526950.X 提供一种颗粒增强免疫透射比浊法试剂盒及其制备方法。本发明提供一种聚苯乙烯纳米金包微粒,并提供一种聚苯乙烯纳米金包微粒的制备方法。

发明内容

[0003] 为了解决免疫透射比浊法测定的灵敏度问题,本发明提供一种聚苯乙烯纳米金包微粒及其制备方法,由于微粒的金表面粗糙、非特异性物理吸附在等电点范围的抗体或抗抗体,形成特异性的抗体或抗原体吸附的金包微粒体,即免疫增强体外诊断试剂。与测定的目标抗原或抗体反应时,产生的浊度大为增加,几何级数地增大了测定的灵敏度,从而实现在生化分析仪上用免疫透射比浊法测定人体含量在毫克级、微克级甚至纳克级抗原或抗体。

[0004] 本发明所述的技术方案如下:

本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒由下列重量比例的成份构成:

苯乙烯单体(纯化):	11.8~12.2;
茶油乳化剂:	5.2~5.6;
氯化金交联剂:	3.8~4.2;
聚乙二醇 6000:	1.4;
聚醚三醇:	2.4;
过碘酸钠:	5.54;
氢氧化钠:	1.46;
白磷乙醚饱和液:	8.2;
蒸馏水:	余量。

[0005] 所述的苯乙烯单体(纯化)重量份比例为 12%。

[0006] 所述的茶油乳化剂重量份比例为 5.2%。

[0007] 所述的氯化金交联剂重量份比例为 3.8%。

[0008] 所述的聚苯乙烯纳米金包微粒制备方法如下：

步骤一、苯乙烯单体纯化

按 2:1 重量份比例取聚苯乙烯单体和浓度为 1mmol/L 的氢氧化钠溶液于分液漏斗中，萃取 10 分钟，静置 15 分钟，分离并弃去下层氢氧化钠水溶液，用蒸馏水如此反复处理，直至苯乙烯单体洗至中性为止；

步骤二、茶油乳化剂制备

取 100 毫升茶油和 100 毫升蒸馏水，加热至 60℃，搅拌 10~15 分钟，再加入氢氧化钠固体 20 克和蒸馏水 200 毫升，加热搅拌到 80℃，加热维持 40~60 分钟，直至皂化完全为止，即得到茶油乳化剂；

步骤三、氯化金交联剂制备

将整个包装(小瓶或安瓿瓶)一次性溶解，按 1:99 重量份比例，用 3,5-二甲巯基甲苯二胺配成氯化金交联剂；

步骤四、苯乙烯单体的聚合

按照重量份比例分别取出以下成份：

茶油乳化剂：5.2~5.6

苯乙烯单体：12

过碘酸钠：5.54

氯化金交联剂：3.8~4.2

聚乙烯醇 6000：1.4

聚醚三醇：2.4

氢氧化钠：1.46

白磷乙醚饱和液：8.2

蒸馏水：余量

在蒸馏水中首先加入茶油乳化剂加热至 60℃，以 200 次/分钟速度连续搅拌 5~8 分钟，再分别加入苯乙烯单体、过碘酸钠，继续加热并维持 85℃ 以上，且不停搅拌 6 小时，随后取样镜检，无单体油珠，聚合反应完成，即将苯乙烯单体聚合，得到聚苯乙烯微粒；

步骤五、聚苯乙烯微粒与氯化金交联剂交联

在步骤四中所得的聚苯乙烯微粒中，按照步骤四所述的重量份比例依次加入氯化金交联剂、聚乙烯醇 6000、聚醚三醇、氢氧化钠，用工作频率大于 40KHz 超声波机进行超声乳化 15 分钟，再加热至沸腾，一次性快速加入步骤四所述的白磷乙醚饱和液，并混匀，再保持沸腾 8~10 分钟，溶液颜色首先变黑，再逐渐变成混浊的酒红色，交联反应完成，交联成聚苯乙烯金包微粒；

步骤六、金包微粒的粒径筛选

取上述合成的聚苯乙烯金包微粒与蒸馏水按照 2:8 的重量份比例稀释，分别倒入塑料管中，用转速为 4500 转/分钟进行离心 15 分钟，去除沉淀物，再放入高速离心机中，用 13000 转/分钟转速再离心 15 分钟，即可得到 300~500nm 粒度的微粒沉淀，在高倍镜下可见

淡红色乳胶颗粒,此即聚苯乙烯纳米金包微粒。

[0009] 本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒的水溶液为均匀分散的混悬液,未经高速离心不会沉淀。金包微粒作为抗原或抗体载体参加免疫浊度反应,呈几何级数放大了测定目标抗原或抗体的灵敏度,大大提高了免疫透射比浊法测定灵敏度,把复杂的化学发光、酶联免疫反应才能检测的微克级、纳克级的目标抗原或抗体,在生化分析仪即可直接测定,实际使用效果好。

附图说明

[0010] 图 1 为本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒制备流程图。

具体实施方式

[0011] 下面将结合具体的实施例来说明本发明的内容。

[0012] 本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒由下列重量比例的成份构成：

苯乙烯单体(纯化)：	11.8~12.2；
茶油乳化剂：	5.2~5.6；
氯化金交联剂：	3.8~4.2；
聚乙二醇 6000：	1.4；
聚醚三醇：	2.4；
过碘酸钠：	5.54；
氢氧化钠：	1.46；
白磷乙醚饱和液：	8.2；
蒸馏水：	余量。

[0013] 本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒成份中,苯乙烯单体(纯化)重量份优化比例为 12%,茶油乳化剂重量份优化比例为 5.2%,氯化金交联剂重量份优化比例为 3.8%。

[0014] 如图 1 所示为本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒制备流,其制备方法分为六个步骤,具体如下：

步骤一、苯乙烯单体纯化

按 2:1 重量份比例取聚苯乙烯单体和浓度为 1mmol/L 的氢氧化钠溶液于分液漏斗中,萃取 10 分钟,静置 15 分钟,分离并弃去下层氢氧化钠水溶液,用蒸馏水如此反复处理,直至苯乙烯单体洗至中性为止；

步骤二、茶油乳化剂制备

取 100 毫升茶油和 100 毫升蒸馏水,加热至 60℃,搅拌 10~15 分钟,再加入氢氧化钠固体 20 克和蒸馏水 200 毫升,加热搅拌到 80℃,加热维持 40~60 分钟,直至皂化完全为止,即得到茶油乳化剂；

步骤三、氯化金交联剂制备

由于氯化金易潮解,制备时将整个包装(小瓶或安瓿瓶)一次性溶解,按 1:99 重量份比例,用 3.5-二甲巯基甲苯二胺配成氯化金交联剂；

步骤四、苯乙烯单体的聚合

按照重量份比例分别取出以下成份：

茶油乳化剂：	5.2~5.6
苯乙烯单体：	12
过碘酸钠：	5.54
氯化金交联剂：	3.8~4.2
聚乙烯醇 6000：	1.4
聚醚三醇：	2.4
氢氧化钠：	1.46
白磷乙醚饱和液：	8.2
蒸馏水：	余量

在蒸馏水中首先加入茶油乳化剂加热至 60℃，以 200 次 / 分钟速度连续搅拌 5~8 分钟，再分别加入苯乙烯单体、过碘酸钠，继续加热并维持 85℃ 以上，且不停搅拌 6 小时，随后取样镜检，无单体油珠，聚合反应完成，即将苯乙烯单体聚合，得到聚苯乙烯微粒；

步骤五、聚苯乙烯微粒与氯化金交联剂交联

在步骤四中所得的聚苯乙烯微粒中，按照步骤四所述的重量份比例依次加入氯化金交联剂、聚乙烯醇 6000、聚醚三醇、氢氧化钠，用工作频率大于 40KHz 超声波机进行超声乳化 15 分钟，再加热至沸腾，一次性快速加入步骤四所述的白磷乙醚饱和液，并混匀，再保持沸腾 8~10 分钟，溶液颜色首先变黑，再逐渐变成混浊的酒红色，交联反应完成，交联成聚苯乙烯金包微粒；

步骤六、金包微粒的粒径筛选

取上述合成的聚苯乙烯金包微粒与蒸馏水按照 2:8 的重量份比例稀释，分别倒入塑料管中，用转速为 4500 转 / 分钟进行离心 15 分钟，去除沉淀物厚，再放入高速离心机中，用 13000 转 / 分钟转速再离心 15 分钟，即可得到 300~500nm 粒度的微粒沉淀，在高倍镜下可见淡红色乳胶颗粒，此即聚苯乙烯纳米金包微粒。

[0015] 本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒，进行了如下两个实例试验，可供对照参考。

[0016] 【实例 1】乳胶凝集试验

乳胶颗粒对蛋白质等多种生物高分子物质虽有良好的吸附性能(但与金表面的吸附是无法相比的)，可以利用它作为载体吸附某种抗原(或抗体)，适合条件下，即可发生颗粒凝集现象，此为乳胶凝集试验。若乳胶颗粒过大，在稀浓度悬液中稳定性差，颗粒表面积大，不能定量吸附某种抗原(特别是抗体)，只能做定性或半定量试验。

[0017] 【实例 2】胶体金标记技术试验

胶体金是氯金酸在还原剂的作用下，聚合成一定大小的金颗粒，形成带负电的疏水胶溶液(胶体金表面吸附很强但胶体稳定性差)。利用它在碱性环境中带负电荷的性质，与蛋白质分子的正电荷范围借静电吸引而形成牢固结合，做成金标试剂，以硝酸纤维素膜为载体，将试剂及标本滴加在膜上，通过渗滤而逐步反应，阳性结果在膜上呈现红色斑点，为定性试验。

[0018] 为进一步验证本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒，进行了如下 2 项检测：

【检测 1】金包微粒粒径检测

将上述合成的金包微粒，在 4500 转 / 分钟的转速下离心 15 分钟，再弃去沉淀物，再在 13000 转 / 分钟的高转速下离心 15 分钟，收集沉淀物。在油浸镜下，用目镜测微器

和镜台测微器配合测其粒径。结果为：镜下见到粒度均匀的淡红色乳胶颗粒，粒径均在 300nm~500nm，此即为聚苯乙烯纳米金包微粒。

[0019] 【检测 2】将金包微粒水溶液稀释后加电解质，做破胶试验

将金包微粒分散液进行倍比稀释，稀释比例依次为：1:2、1:4、1:8、1:16、1:32、1:64、1:128……。用分光光度计进行比浊，使吸光度 A (吸光度 $A=LgI_0/I$ ，其中 I_0 为入射光强度，I 为透过光强度) 从 0 到 0.8 的低浓度范围 (即符合朗白-比尔定律)，加入同体积生理盐水进行 24h 破胶沉淀试验。其结果是：从低浓度到高浓度的金包微粒仍是均匀的水溶液。

[0020] 本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒的水溶液为均匀分散的混悬液，未经高速离心不会沉淀。金包微粒作为抗原或抗体载体参加免疫浊度反应，呈几何级数放大了测定目标抗原或抗体的灵敏度，大大提高了免疫透射比浊法测定灵敏度，把复杂的化学发光、酶联免疫反应才能检测的微克级、纳克级的目标抗原或抗体，在生化分析仪即可直接测定，实际使用效果好。

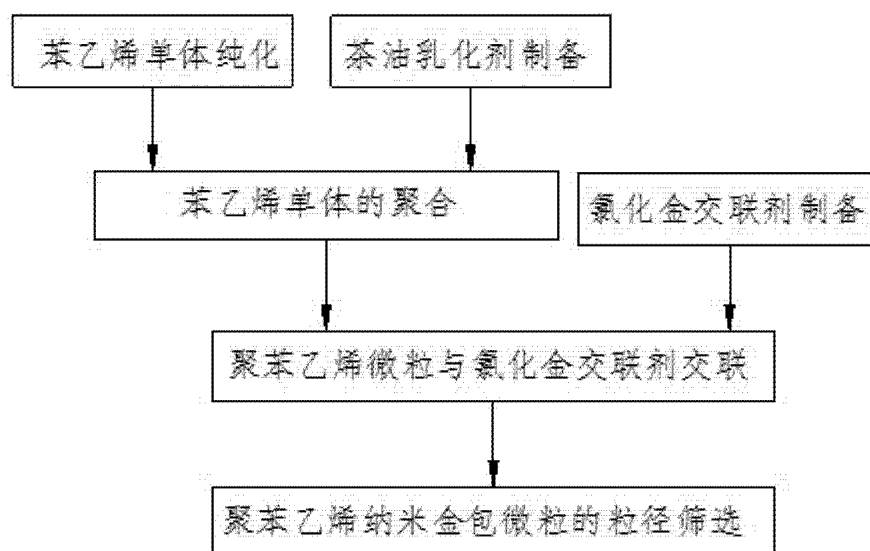


图 1

专利名称(译)	聚苯乙烯纳米金包微粒及其制备方法		
公开(公告)号	CN102507926A	公开(公告)日	2012-06-20
申请号	CN201110308171.7	申请日	2011-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	安徽信灵检验医学科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	安徽信灵检验医学科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	安徽信灵检验医学科技有限公司		
[标]发明人	王之侃		
发明人	王之侃		
IPC分类号	G01N33/553 G01N33/531		
代理人(译)	胡敏		
其他公开文献	CN102507926B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种聚苯乙烯纳米金包微粒及其制备方法。所述的聚苯乙烯纳米金包微粒成份为：苯乙烯单体（纯化）、茶油乳化剂、氯化金交联剂、聚乙二醇6000、聚醚三醇、过碘酸钠、氢氧化钠、白磷乙酰饱和液、蒸馏水；所述聚苯乙烯纳米金包微粒制备方法包括：苯乙烯单体纯化、茶油乳化剂制备、氯化金交联剂制备、苯乙烯单体的聚合、聚苯乙烯微粒与氯化金交联剂交联、金包微粒的粒径筛选。本发明所述的聚苯乙烯纳米金包微粒作为抗原或抗体载体参加免疫浊度反应，呈几何级数放大了测定目标抗原或抗体的灵敏度，把复杂的化学发光、酶联免疫反应才能检测的微克级、纳克级的目标抗原或抗体，在生化分析仪即可直接测定，实际使用效果好。

