



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105067805 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201510452064. X

(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 唐穗平 刘付建 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 33/53(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

权利要求书3页 说明书11页

(54) 发明名称

Irgacure 907 检测试剂盒及其制备和使用方法

(57) 摘要

本发明涉及一种 Irgacure 907 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 0.5-3.0 $\mu\text{g/mL}$ Irgacure 907 特异性抗原的酶标板,浓度为 0.5-3.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 Irgacure 907 特异性抗体工作液,且所述 Irgacure 907 特异性抗原与 Irgacure 907 特异性抗体的用量为 1:1。本发明的试剂盒可以快速检测 Irgacure 907 在纸质包装制品、液态食品模拟物、干性食品模拟物和饮料中的含量,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 Irgacure 907 检测试剂盒,其特征在于,主要包括:

1) 包被 Irgacure 907 特异性抗原的酶标板:所述酶标板的每个微孔内 Irgacure 907 特异性抗原的浓度为 $0.5-3.0 \mu\text{g/mL}$;

2) Irgacure 907 特异性抗体工作液:该 Irgacure 907 特异性抗体的浓度为 $0.5-3.0 \mu\text{g/mL}$;

所述 Irgacure 907 特异性抗原与 Irgacure 907 特异性抗体的用量比为 1:1。

2. 根据权利要求 1 所述的 Irgacure 907 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 1:8000 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 Irgacure 907 检测试剂盒,其特征在于,所述 Irgacure 907 特异性抗原为 Irgacure 907 与载体蛋白的偶联物,该 Irgacure 907 特异性抗原的浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$;所述 Irgacure 907 特异性抗体为鼠源单克隆抗体,该 Irgacure 907 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 Irgacure 907 检测试剂盒,其特征在于,还包括 Irgacure 907 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 Irgacure 907 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 Irgacure 907 标准品溶液的浓度分别为 $1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$;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, pH7.5 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, pH7.5 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩样品稀释液为 0.01M, pH7.5 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 Irgacure 907 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 Irgacure 907 特异性抗原:

将 Irgacure 907 溶解于二氯甲烷中,反应体系温度控制在 -10°C 至 -1°C ,滴加三溴化硼二氯甲烷后恢复至室温,反应完全后在 0°C 冰水淬灭,抽滤得到带有酚巯基的 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮;将上述 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮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 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮的酚巯基被丁酸乙酯所取代,得到中间产物;随后将该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 Irgacure 907 的半抗原;再将其与 N-羧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 Irgacure 907 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 Irgacure 907 特异性抗原包被于酶标板中,所述酶标板的每个微孔内 Irgacure 907 特异性抗原的浓度为 $0.5-3.0 \mu\text{g/mL}$;

3) 制备 Irgacure 907 特异性抗体:

以步骤 1) 中得到的 Irgacure 907 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 Irgacure 907 单克隆抗体;制备浓度为 0.5-3.0 $\mu\text{g/mL}$ 的 Irgacure 907 单克隆抗体工作液。

7. 根据权利要求 6 所述的 Irgacure 907 检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤 1) 中,制备 Irgacure 907 特异性抗原的具体方法为:

将 1mmol 的 Irgacure 907 溶解于 20mL 无水二氯甲烷中,反应体系温度控制在 -5°C ,缓慢滴加 10mL 三溴化硼二氯甲烷溶液,恢复至室温,反应完全后在 0°C 冰水淬灭,抽滤得到带有酚巯基的 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮;将 0.8mmol 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮和碳酸钾分散于无水二甲基甲酰胺中,常温搅拌下加入 1.52g 4-溴丁酸乙酯,加热回流 3h,使 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮的酚巯基被丁酸乙酯所取代,得到中间产物;随后将中间产物加入过量三氟乙酸中,回流搅拌反应 1h,脱去乙基的保护,裸露出羧基,制得能够与蛋白质偶联的 Irgacure 907 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 Irgacure 907 特异性抗原。

8. 根据权利要求 6 所述的 Irgacure 907 检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤 3) 中,制备 Irgacure 907 特异性抗体的具体方法为:

以步骤 1) 中得到的 Irgacure 907 特异性抗原作为免疫原对 7-8 周龄的 Balb/c 小鼠进行免疫,首次免疫使用完全弗氏佐剂与 Irgacure 907 特异性抗原溶液乳化,抗原浓度为 1mg/mL,剂量为 200 μg /只,以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与 Irgacure 907 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 1 周加强免疫一次,共免疫 5-7 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 Irgacure 907 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 10:1 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 1.2 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°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 Irgacure 907 单克隆抗体。

9. 权利要求 1-5 任一项所述的 Irgacure 907 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,定量加入有机溶剂,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 Irgacure 907 特异性抗原的酶标板中加入标准品或样品检测液,再加入 Irgacure 907 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 Irgacure 907 浓度的对数 $\lg[\text{Irgacure 907}]$ 为横坐标, 绘制 Irgacure 907 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 Irgacure 907 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

B_0 —— $0 \mu\text{g/L}$ 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 Irgacure 907 检测试剂盒的使用方法, 其特征在于, 步骤 1) 中, 所述有机溶剂为乙腈;

步骤 2) 中, 采用权利要求 5 所述的试剂盒, 检测的具体方法为: 首先用 $2 \mu\text{g/mL}$ 的 Irgacure 907 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 $250 \mu\text{L/孔}$ 封闭液封闭后以洗涤液洗涤, 并拍干; 然后加入 Irgacure 907 标准品溶液或样品检测液 $50 \mu\text{L}$, 再加入浓度为 $2 \mu\text{g/mL}$ 的 Irgacure 907 特异性抗体工作液 $50 \mu\text{L}$, 混合均匀, 37°C 温育 1h; 随后洗涤拍干, 加入以稀释液按 1:8000 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; 最后洗涤拍干, 每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 显色剂 B、 $10 \mu\text{L}$ 显色剂 A, 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, 测定吸光度值。

Irgacure 907 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 Irgacure 907 检测试剂盒及其制备和使用方法。

背景技术

[0002] Irgacure 907,学名为 2-甲基-1-(4-甲硫基)苯基 2-吗啉基-1-丙酮(2-Methyl-4'-(methylthio)-2-morpholinopropiophenone, cas 号为 71868-10-5),是一种光引发剂(Photoinitiators,PIs)。

[0003] 随着 UV 印刷工艺的普及,PIs 作为紫外光固化油墨的主要成分被广泛用于纸质包装印刷,有助于引发或催化相应的聚合反应,提高紫外光油墨的固化干燥效率。但有研究表明,UV 印刷油墨固化完成后,其中残留的 PIs 在一定条件下可以发生化学迁移,能够穿过包装材料或者通过表面接触污染包装内的食品,从而对人体的健康造成潜在的危害。因此,瑞士、欧盟等国家和组织相继颁布了法规和许可清单以限制食品接触材料中 PIs 的使用,其中规定 Irgacure 907 的特定迁移量(SML)为 0.01mg/kg。

[0004] 因此,食品纸包装材料、食品模拟物和纸包装食品中 PIs 的检测研究已成为研究的热点,但目前的检测方法以色谱质谱仪器方法为主,这些方法具有耗时较长、难以实现现场检测的缺陷,所以亟需一种合适的快速检测 Irgacure 907 的方法。

发明内容

[0005] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种 Irgacure 907 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 Irgacure 907 的含量。

[0006] 一种 Irgacure 907 检测试剂盒,主要包括:

[0007] 1) 包被 Irgacure 907 特异性抗原的酶标板:所述酶标板的每个微孔内 Irgacure 907 特异性抗原的浓度为 0.5-3.0 $\mu\text{g/mL}$;

[0008] 2) Irgacure 907 特异性抗体工作液:该 Irgacure 907 特异性抗体的浓度为 0.5-3.0 $\mu\text{g/mL}$;

[0009] 所述 Irgacure 907 特异性抗原与 Irgacure 907 特异性抗体的用量比为 1:1。

[0010] 上述 Irgacure 907 检测试剂盒的检测原理为:将 Irgacure 907 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 Irgacure 907 标准溶液以及 Irgacure 907 特异性抗体工作液,使待测样品中的 Irgacure 907 和固相载体上包被的 Irgacure 907 特异性抗原竞争结合 Irgacure 907 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 Irgacure 907 的量呈负相关,与标准曲线比较即可得出 Irgacure 907 浓度范围。因而该试剂盒能够快速检测 Irgacure 907 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 1:8000 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 Irgacure 907 特异性抗原为 Irgacure 907 与载体蛋白的偶联物,该 Irgacure 907 特异性抗原的浓度为 $2\ \mu\text{g/mL}$;所述 Irgacure 907 特异性抗体为鼠源单克隆抗体,该 Irgacure 907 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 Irgacure 907 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 Irgacure 907 标准品溶液的浓度分别为 $1\times 10^3\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^2\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^1\ \mu\text{g/L}$ 、 $1\times 10^0\ \mu\text{g/L}$ 、 $0.1\ \mu\text{g/L}$;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, pH7.5 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, pH7.5 的磷酸盐缓冲液;所述浓缩样品稀释液为 0.01M, pH7.5 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 Irgacure 907 检测试剂盒的制备方法,主要包括以下步骤:

[0016] 1) 制备 Irgacure 907 特异性抗原:

[0017] 将 Irgacure 907 溶解于二氯甲烷中,反应体系温度控制在 -10°C 至 -1°C ,滴加三溴化硼二氯甲烷后恢复至室温,反应完全后在 0°C 冰水淬灭,抽滤得到带有酚巯基的 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮;将上述 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮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 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮的酚巯基被丁酸乙酯所取代,得到中间产物;随后将该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 Irgacure 907 的半抗原;再将其与 N-羧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 Irgacure 907 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 Irgacure 907 特异性抗原包被于酶标板中,所述酶标板的每个微孔内 Irgacure 907 特异性抗原的浓度为 $0.5-3.0\ \mu\text{g/mL}$;

[0020] 3) 制备 Irgacure 907 特异性抗体:

[0021] 以步骤 1) 中得到的 Irgacure 907 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 Irgacure 907 单克隆抗体;制备浓度为 $0.5-3.0\ \mu\text{g/mL}$ 的 Irgacure 907 单克隆抗体工作液。

[0022] 采用上述方法制得的 Irgacure 907 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 Irgacure 907 特异性抗原的具体方法为:

[0024] 将 1mmol 的 Irgacure 907 溶解于 20mL 无水二氯甲烷中,反应体系温度控制在 -5°C ,缓慢滴加 10mL 三溴化硼二氯甲烷溶液,恢复至室温,反应完全后在 0°C 冰水淬灭,抽滤得到带有酚巯基的 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮;将 0.8mmol 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮和碳酸钾分散于无水二甲基甲酰胺中,常温搅拌下加入 1.52g 4-溴丁酸乙酯,加热回流 3h,使 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮的酚巯基被丁酸乙酯所取代,得到中间产物;随后将中间产物加入过量三氟乙酸中,回流搅拌反应 1h,脱去乙基的保护,裸露出羧基,制得能够与蛋白质偶联的 Irgacure 907 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 Irgacure 907 特异性抗原。

[0025] 在其中一个实施例中,步骤 3) 中,制备 Irgacure 907 特异性抗体的具体方法为:

[0026] 以步骤 1) 中得到的 Irgacure 907 特异性抗原作为免疫原对 7-8 周龄的 Balb/c 小鼠进行免疫,首次免疫使用完全弗氏佐剂与 Irgacure 907 特异性抗原溶液乳化,抗原浓度为 1mg/mL,剂量为 200 μg /只,以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与 Irgacure 907 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 1 周加强免疫一次,共免疫 5-7 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 Irgacure 907 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 10:1 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 1.2 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°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 Irgacure 907 单克隆抗体。

[0027] 本发明还公开了一种上述的 Irgacure 907 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,定量加入有机溶剂,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 Irgacure 907 特异性抗原的酶标板中加入标准品或样品检测液,再加入 Irgacure 907 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(OD)值;

[0032] 3) 结果分析

[0033] 以抑制率 I% 为纵坐标,以 Irgacure 907 浓度的对数 $\lg[\text{Irgacure 907}]$ 为横坐标,绘制 Irgacure 907 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 Irgacure 907 的实际含量;

[0034] 所述抑制率计算公式如下:

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

[0036] 其中：I——抑制率

[0037] B——样品溶液的平均吸光度值

[0038] B₀——0 μg/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 Irgacure 907 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] 上述步骤 1) 样品前处理中,针对不同类型的待测样品,前处理方法具有以下差异:

[0042] 对于纸质包装制品,准确裁取待测样品,定量加入有机溶剂,并将样品完全浸泡于该有机溶剂中,提取后定量吸取上清液,吹干后加入有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

[0043] 对于液态食品,准确称取待测样品,定量加入有机溶剂,混匀,加入 NaCl,提取后吸取上清液,吹干后加入有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液;

[0044] 对于干性食品,准确称取待测样品,定量加入有机溶剂,混匀,提取后定量吸取上清液,吹干后加入有机溶剂复溶,并以水稀释定容,得到样品检测液。

[0045] 在其中一个实施例中,步骤 1) 中,所述有机溶剂为乙腈;乙腈具有提取效率高和易挥发易处理的特点。

[0046] 步骤 2) 中,检测的具体方法为:首先用 2 μg/mL 的 Irgacure 907 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/孔封闭液封闭后以洗涤液洗涤,并拍干;然后加入 Irgacure 907 标准品溶液或样品检测液 50 μL,再加入浓度为 2 μg/mL 的 Irgacure 907 特异性抗体工作液 50 μL,混合均匀,37℃ 温育 1h;随后洗涤拍干,加入以稀释液按 1:8000 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;最后洗涤拍干,每孔加入 50 μL 显色剂 B、10 μL 显色剂 A,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,测定吸光度值。

[0047] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0048] 本发明的一种 Irgacure 907 检测试剂盒,利用竞争酶联免疫测定法检测 Irgacure 907,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。

[0049] 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 Irgacure 907。

[0050] 本发明的 Irgacure 907 检测试剂盒的制备方法,通过特定的方法制得 Irgacure907 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。

[0051] 本发明的 Irgacure 907 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

[0052] 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。

[0053] 实施例 1

[0054] 一种 Irgacure 907 检测试剂盒,主要组成成份如下:

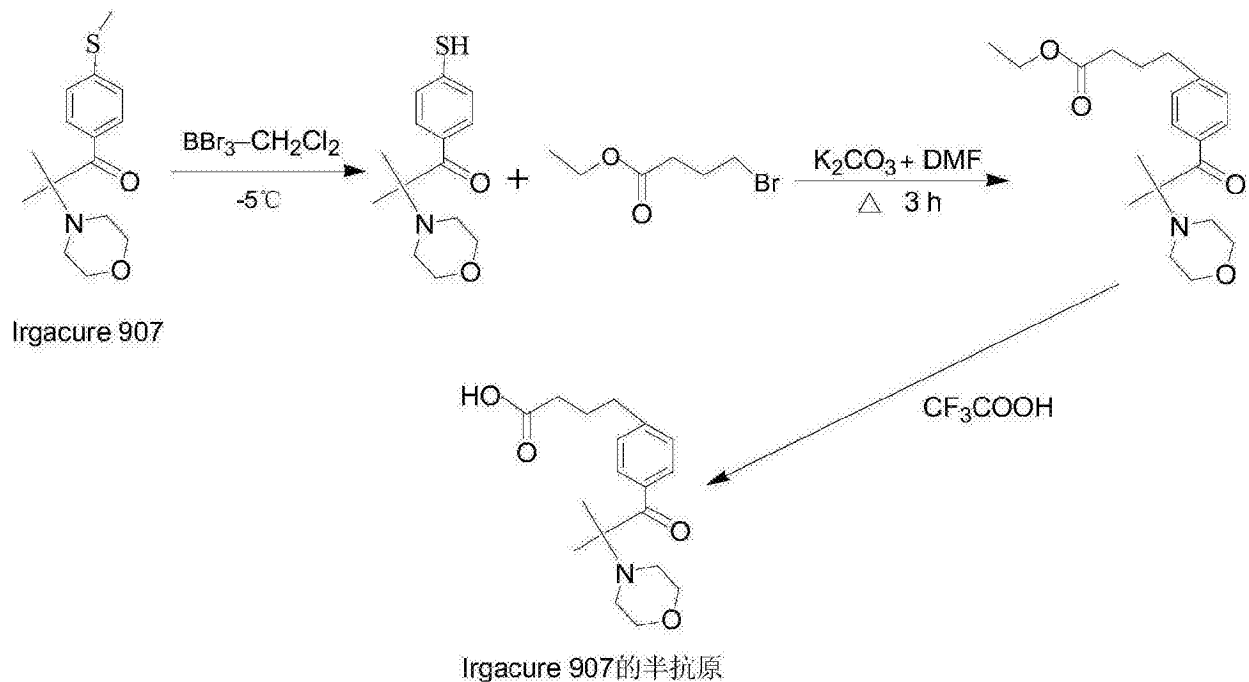
[0055] 1) Irgacure 907 特异性抗原工作液。

[0056] 通过以下方法制得:将 0.279g(即 1mmol)的 Irgacure 907 溶解于 20mL 无水二氯甲烷中,反应体系温度控制在 -5°C ,缓慢滴加 10mL 三溴化硼二氯甲烷溶液,然后缓慢恢复至室温,反应完全后在 0°C 冰水淬灭,抽滤得到固体,即为带有酚巯基的 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮。

[0057] 将 0.236g(即 0.8mmol) 2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮和碳酸钾分散于无水二甲基甲酰胺(DMF)中,常温搅拌,加入 1.52g 4-溴丁酸乙酯,加热回流 3h,2-甲基-4-巯基-2-吗啉苯丙酮的酚巯基被丁酸乙酯所取代,得到中间产物。

[0058] 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 Irgacure 907 的半抗原,具体反应过程如下:

[0059]



[0060] 再将上述半抗原与 N-羟基丁二酰胺(NHS)和碳二亚胺(EDC)混合,并与牛血清白蛋白混合,室温搅拌反应 1h,偶联制得 Irgacure 907 特异性抗原,并用浓缩样品稀释液稀释至浓度为 $2\mu\text{g/mL}$ 。

[0061] 2) Irgacure 907 特异性抗体工作液。

[0062] A、单克隆抗体的获得:

[0063] 将上述合成得到的 Irgacure 907 特异性抗原作为免疫原对 7-8 周龄的 Balb/c 小鼠进行免疫。首次免疫使用完全弗氏佐剂与 Irgacure 907 特异性抗原的 0.01M, pH7.5 的

磷酸盐缓冲液乳化,抗原浓度为 1mg/mL,剂量为 200 μ g/只,以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与 Irgacure 907 特异性抗原的 0.01M, pH7.5 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 1 周加强免疫一次,共免疫 5-7 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 Irgacure 907 特异性抗原的 0.01M, pH7.5 的磷酸盐缓冲液腹腔注射,剂量同初次免疫。

[0064] 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 10:1 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。

[0065] B、单克隆抗体的纯化:

[0066] 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 1.2 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。

[0067] 具体方法为:每 1 份腹水中加入 3 份乙酸钠缓冲液(浓度 0.05mol/L, pH4.0),用 0.1mmol/L 的 NaOH 调整 pH 至 4.5,在 4℃ 下搅拌 30min,期间按稀释前腹水体积计算 40 μ L/mL 的量缓慢加入辛酸;在 4℃ 静置 3h,离心(11000r/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,静置 1h,4℃ 离心(11000r/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 μ g/mL。

[0068] 3) 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗。

[0069] 由商业公司提供的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗。

[0070] 4) Irgacure 907 标准品溶液 6 瓶。

[0071] 浓度分别为: $1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $0 \mu\text{g/L}$ 。

[0072] 5) 酶标板。

[0073] 96 孔聚苯乙烯酶标板,由商业公司提供。

[0074] 6) 底物显色剂。

[0075] 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 的四甲基联苯胺的 DMSO 溶液。

[0076] 7) 洗涤液。

[0077] 为含有重量比为 0.05% -0.5% 吐温-20 的 0.01M, pH7.5 的磷酸盐缓冲液。

[0078] 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, pH7.5 的磷酸盐缓冲液。

[0082] 10) 浓缩样品稀释液。

[0083] 为 0.01M, pH7.5 的磷酸盐缓冲液(即磷酸根浓度为 0.01M/L, pH7.5 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 Irgacure 907 单克隆抗体的竞争抑制率,方法如下:

[0089] 1) 用 2 μg/mL 的 Irgacure 907 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)封闭后以洗涤液洗涤,并拍干。

[0090] 2) 加入 Irgacure 907 标准品溶液(浓度分别为: $1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $0 \mu\text{g/L}$)或样品溶液 50 μL,再加入浓度为 2 μg/mL 的 Irgacure 907 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 1:8000 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 Irgacure 907 浓度的对数 $\lg[\text{Irgacure 907}(\text{ng/mL})]$ 为横坐标,绘制 Irgacure 907 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品中 Irgacure 907 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] 试剂盒的灵敏度、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 Irgacure 907 检测的标准工作曲线,结果如下:

[0104] Irgacure 907 在 $0.1 \mu\text{g/L} \sim 1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 范围内有良好的线性, $IC_{50} = 26.7 \text{ng/mL}$,最低检测限为 0.32ng/mL ,检测范围(抑制 20%~80%之间)为 $0.32 \text{ng/mL} \sim 873.5 \text{ng/mL}$ 。

[0105] 取不同来源,不同材质的不含 Irgacure 907 的空白样品,通过梯度加标实验测定其检测限,结果为:食品接触纸包装制品中 Irgacure 907 的检测限为 $0.008 \mu\text{g/dm}^2$;液态食品模拟物中 Irgacure 907 的检测限为 $0.2 \mu\text{g/kg}$,干性食品模拟物中 Irgacure 907 的检测限为 $0.08 \mu\text{g/kg}$;饮料中 Irgacure 907 的检测限为 $0.2 \mu\text{g/kg}$ 。

[0106] 2. 特异性测定

[0107] 采用实施例 2 的间接竞争 ELISA 法测定 Irgacure 907 结构类似物(Irgacure184、

Irgacure 369、Irgacure 379、Irgacure 1173、Irgacure 631) 与单抗混合物的交叉反应。将系列浓度 ($1 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $1 \times 10^0 \mu\text{g/L}$ 、 $0.1 \mu\text{g/L}$) 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 Irgacure 907 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]

$$CR\% = \frac{\text{Irgacure 907 的 } IC_{50} \text{ 值}}{\text{类似物的 } IC_{50} \text{ 值}} \times 100\%$$

[0109] 结果表明 Irgacure 907 单克隆抗体与 Irgacure 184、Irgacure 369、Irgacure 379、Irgacure 1173、Irgacure 631 的交叉反应率均小于 0.1%, 符合要求。

[0110] 3. 准确度测定

[0111] 向食品接触纸包装制品中分别添加 $0.1 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ 和 $5 \mu\text{g}/\text{dm}^2$ 的 Irgacure 907; 向 3 种食品模拟物、饮料样品中分别添加 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 的 Irgacure 907, 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: 食品接触纸包装制品的回收率为 93.2% ~ 107%; 食品模拟物的回收率为 88.1% ~ 103%; 饮料的回收率为 82.1% ~ 97.5%。

[0115] 实施例 4

[0116] 检测食品接触纸包装制品中的 Irgacure 907 含量。

[0117] 1. 样品的前处理

[0118] 准确裁取 0.5dm^2 印刷纸包装制品样品, 剪碎至约 $5 \text{mm} \times 5 \text{mm}$ 的大小, 置于 50mL 塑料离心管中, 加入 50mL 乙腈, 将样品完全浸泡于乙腈中, 超声 30min, 5000r/min 离心 5min, 取 5mL 上清液置于 40°C 水浴中氮吹至干, 加入 0.1mL 乙腈涡旋 30s, 然后用水稀释至 1.0mL, 涡旋混匀, 取 $50 \mu\text{L}$ 进行分析。

[0119] 2. 间接竞争 ELISA 法检测样品中 Irgacure 907 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 Irgacure 907 的含量, 见下表 1。

[0121] 表 1 食品接触印刷纸包装制品中 Irgacure 907 的含量

[0122]

食品接触印刷 纸包装制品	实验次数	溶液中 Irgacure 907 浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	样品中 Irgacure 907 的含量 ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)	含量平均值 ($\mu\text{g}/\text{dm}^2$)
纸包装制品 1	1	0.385	7.7	7.9
	2	0.405	8.1	
纸包装制品 2	1	0.025	0.5	0.5
	2	0.025	0.5	
纸包装制品 3	1	ND.	ND.	ND.
	2	ND.	ND.	

[0123]

纸包装制品 4	1	ND.	ND.	ND.
	2	ND.	ND.	
备注: ND.为样品中的含量低于 $0.008\mu\text{g}/\text{dm}^2$ 。				

[0124] 实施例 5

[0125] 检测食品模拟物中的 Irgacure 907 含量。

[0126] 1. 样品的前处理

[0127] 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》和 EN 14338-2003《拟于食品接触的纸与纸板——用改良聚苯醚做模拟物测定从纸和纸板迁移的条件》，结合纸质及纸塑印刷包装材料的实际使用情况，选用水（模拟物 A）和 3%（质量浓度）乙酸水溶液（模拟物 B）作为液态食品模拟物，选用改性聚苯醚（模拟物 C）作为干性食品模拟物，进行迁移实验，获得 3 种对应的食品模拟物试样。

[0128] 水和 3%（质量浓度）乙酸水溶液：准确称取 5.0g 液态食品模拟物试样于 50mL 塑料离心管中，加入 5mL 乙腈，涡旋 2min，然后加入 3g NaCl，涡旋 2min，4000r/min 离心 3min，吸取上层清液于氮吹管中，重复用 5mL 乙腈萃取 1 次，合并上层清液，置于 40℃ 水浴中氮吹浓缩至干，加入 0.2mL 乙腈涡旋 30s，然后用水稀释至 2.0mL，涡旋混匀，取 50 μL 进行分析。

[0129] 改性聚苯醚：将 1.0g 改性聚苯醚的干性食品模拟物转移至 10mL 比色管中，加入 10mL 乙腈，涡旋 2min，3000r/min 离心 3min，吸取上清液至氮吹管中，于 40℃ 水浴中氮吹至干，加入 50 μL 乙腈涡旋 30s，然后加水 150 μL ，涡旋混匀，取 50 μL 进行分析。

[0130] 2. 间接竞争 ELISA 法检测样品中 Irgacure 907 含量

[0131] 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 Irgacure 907 的含量，见下表 2。

[0132] 表 2 食品模拟物中的 Irgacure 907 含量

[0133]

食品接触材料样品	食品模拟物种类	食品模拟物中 Irgacure 907 浓度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), n=2		平均值 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
制品 1	A	ND.	ND.	ND.
	B	ND.	ND.	ND.
	C	38.3	40.1	39.2
制品 2	A	ND.	ND.	ND.
	B	ND.	ND.	ND.
	C	2.5	2.6	2.5
制品 3	A	ND.	ND.	ND.
	B	ND.	ND.	ND.
	C	ND.	ND.	ND.
制品 4	A	ND.	ND.	ND.
	B	ND.	ND.	ND.
	C	ND.	ND.	ND.
备注: ND.为液态食品模拟物中的含量低于 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$, 干性食品模拟物中的含量低于 $0.08\mu\text{g}/\text{kg}$ 。				

[0134] 实施例 6

[0135] 检测软包装饮料中的 Irgacure 907 含量。

[0136] 1. 样品的前处理

[0137] 准确称取 5.0g 饮料样品于 50mL 塑料离心管中,加入 5mL 乙腈,涡旋 2min,然后加入 3gNaCl,涡旋 2min,4000r/min 离心 3min,吸取上层清液于氮吹管中,重复用 5mL 乙腈萃取 1 次,合并上层清液,置于 40℃ 水浴中氮吹浓缩小于 2mL,用乙腈定容至 2.0mL,转入已加有 50mg N-丙基乙二胺 (PSA) 和 25mg 十八烷基键合硅胶 (C18) 填料的 2mL 聚四氟乙烯离心管中,涡旋振荡 1min,10000r/min 离心 3min,取上清液 1.0mL,于 40℃ 水浴中氮吹浓缩至干,加入 0.1mL 乙腈涡旋 30s,然后用水稀释至 1.0mL,涡旋混匀,取 $50\mu\text{L}$ 进行分析。

[0138] 2. 间接竞争 ELISA 法检测样品中 Irgacure 907 含量

[0139] 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 Irgacure 907 的含量,见下表 3。

[0140] 表 3 饮料中 Irgacure 907 的含量

[0141]

饮料	实验次数	样液中 Irgacure 907 浓度($\mu\text{g}/\text{kg}$)	样品中 Irgacure 907 的含量($\mu\text{g}/\text{kg}$)	含量平均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)
饮料 1	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
饮料 2	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
饮料 3	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
饮料 4	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
备注: ND.为样品中的含量低于 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ 。				

[0142] 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。

[0143] 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)	Irgacure 907检测试剂盒及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN105067805A	公开(公告)日	2015-11-18
申请号	CN201510452064.X	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	唐穗平 刘付建 王娜 陈纪文 陈满英		
发明人	唐穗平 刘付建 王娜 陈纪文 陈满英		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
其他公开文献	CN105067805B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种Irgacure 907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0.5-3.0μg/mL Irgacure 907特异性抗原的酶标板，浓度为0.5-3.0μg/mL的Irgacure 907特异性抗体工作液，且所述Irgacure 907特异性抗原与Irgacure 907特异性抗体的用量为1:1。本发明的试剂盒可以快速检测Irgacure 907在纸质包装制品、液态食品模拟物、干性食品模拟物和饮料中的含量，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。

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