



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108663508 A

(43)申请公布日 2018.10.16

(21)申请号 201810635738.3

(22)申请日 2018.06.20

(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 黄金凤 寻知庆 王强 叶嘉荣  
汪晨霞 陈立伟 侯向昶 吴玉銮  
冼燕萍 郭新东

(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 33/53(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

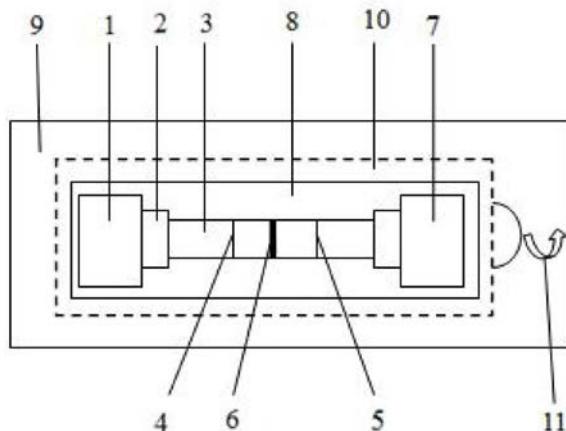
权利要求书3页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡及其  
制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种检测酚类抗氧化剂的免疫层析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酚类抗氧化剂的抗体；检测线包被有完全抗原，所述完全抗原为酚类抗氧化剂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。上述检测卡能够同时检测多种酚类抗氧化剂，采用双质控线，结果准确，结构简单，使用方便，适用于酚类抗氧化剂的快速检测。



A

CN 108663508

CN

1. 一种检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡，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酚类抗氧化剂的抗体；所述检测线包被有完全抗原，所述完全抗原为酚类抗氧化剂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所述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡，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所述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡，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；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。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡，其特征在于，所述完全抗原通过以下方法制备得到：将酚类抗氧化剂、碳酸钾、3-溴丙胺分散至二甲基甲酰胺中，加热回流反应，制得酚类抗氧化剂半抗原，将纯化后的酚类抗氧化剂半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入二甲基甲酰胺中溶解，搅拌反应；然后称取载体蛋白，溶解在NaHCO<sub>3</sub>溶液中得到载体蛋白溶液，得载体蛋白溶液，将含有酚类抗氧化剂半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中反应，得到酚类抗氧化剂-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酚类抗氧化剂的第一抗体；

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K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>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。

5. 根据权利要求4所述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡，其特征在于，所述酚类抗氧化剂为抗氧化剂1076。

6. 根据权利要求5所述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡，其特征在于，所述完全抗原通过以下方法制备得到：将抗氧化剂1076、无水碳酸钾分散至二甲基甲酰胺中，再加入

3-溴丙胺,加热回流反应6-10h,制得抗氧化剂1076半抗原;将经硅胶色谱柱纯化后的抗氧化剂1076半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入二甲基甲酰胺中溶解,搅拌反应,然后加入载体蛋白,溶解于pH7.0的0.1mol/LNaHCO<sub>3</sub>中,得载体蛋白溶液,将含有抗氧化剂1076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,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;腹水经硫酸粗纯化,再辛酸硫胺法纯化得相应抗酚类抗氧化剂化合物的第一抗体;

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,煮沸后迅速加入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/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节胶体金溶液pH至8.2;按每毫升胶体金溶液50μg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所述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡,其特征在于,所述第一抗体的浓度为40-60μg/mL,在检测卡上的用量为15-30μL/cm;

所述检测线包被的完全抗原的浓度为0.5-2mg/mL,在检测卡上的用量为0.5-2μL/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0.5-2mg/mL,在检测卡上的用量为0.5-2μL/cm。

8. 权利要求1-7任一项所述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡的制备方法,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任一项所述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡在检测抗氧化剂3114,抗氧化剂1010和抗氧化剂1076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,按照每平方厘米包装材料1-3mL溶剂的量加入三氯甲烷浸泡1-4h,浸泡液于40℃水浴中用氮气吹干,用少量甲醇溶解残渣后,以50%甲醇溶液稀释8-18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3-7mL的量加入水,混匀后加入

按照每克食品样品3-7mL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。

## 检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡及其制备方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及添加剂检测技术领域,特别是涉及一种检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡及其制备方法和应用。

### 背景技术

[0002] 食品安全问题是关系民生的重大问题之一,受到了社会和消费者极大的重视,而食品安全不仅指食品自身的安全,还包括食品包装材料使用安全等。

[0003] 目前食品包装主要以塑料包装为主,而为了提高塑料产品的力学性能、化学稳定性及使用寿命等应用性能,往往会在材料基体中添加一些抗氧化剂、光稳定剂、热稳定剂、增塑剂等小分子物质。这些小分子添加剂会由于其与塑料基体材料相容性的差异,从而由材料内部向材料表面迁移。而食品包装往往是直接与食物直接接触,这就造成了食物在储存和运送过程中,塑料包装中的添加剂会由包装材料中迁移到食品中,进而导致食品中的有害化学物质超标,威胁到消费者的身体健康。

[0004] 塑料中加入抗氧化剂,可降低塑料在加工过程中受热氧化,减缓塑料在储存使用过程中由于曝露在光线下而进行的自发氧化,防止塑料变黄、变碎以延长塑料商品的寿命。酚类抗氧化剂作为一类环境雌激素,可以在人体内蓄积,有急性毒性和慢性致癌作用,因而抗氧化剂在食品包装材料中的添加量日益引起关注并受到严格的控制。我国国家标准GB 9685-2016《食品安全国家标准食品接触材料及制品用添加剂使用标准》和欧盟ROHS指令2011/65/EU等均规定了食品容器、包装材料用添加剂的使用原则、允许使用的添加剂品种、使用范围、最大使用量、最大残留量或特定迁移量。例如,我国GB 9685-2016中规定抗氧化剂1076的特定迁移限量(SML)为6mg/kg。鉴于此,建立相关产品的酚类抗氧化剂的快速检测方法,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。

[0005] 目前对酚类抗氧化剂的常用分析方法有气相色谱法、气相色谱-质谱法、液相色谱法、液相色谱-质谱法等。色谱法和色谱质谱联用法具有特异性高、结果准确的优点,但是这两种方法的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

[0006] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡,该检测卡不但可以同时检测多种酚类抗氧化剂,还具有便捷、快速、直观、成本低的特点,适合现场快速检测。

[0007] 一种检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡,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;

[0008] 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酚类抗氧

化剂的抗体；所述检测线包被有完全抗原，所述完全抗原为酚类抗氧化剂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。

[0009] 上述检测卡能够同时检测多种酚类抗氧化剂，采用双质控线，结果准确，结构简单，使用方便，适用于酚类抗氧化剂的快速检测。

[0010] 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。

[0011] 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。

[0012] 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：将酚类抗氧化剂、碳酸钾、3-溴丙胺分散至二甲基甲酰胺中，加热回流反应，制得酚类抗氧化剂半抗原，将纯化后的酚类抗氧化剂半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入二甲基甲酰胺中溶解，搅拌反应；然后称取载体蛋白，溶解在NaHCO<sub>3</sub>溶液中得到载体蛋白溶液，得载体蛋白溶液，将含有酚类抗氧化剂半抗原的溶液加入上述载体蛋白溶液中反应，即得完全抗原；

[0013] 所述第一抗体通过以下方法制备得到：

[0014] (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；

[0015] (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；

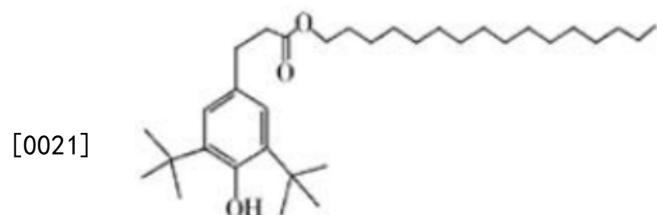
[0016] (c) 第一抗体制备：将阳性克隆经有限稀释亚克隆后获得遗传稳定的单克隆细胞株，细胞株扩大培养后，接种经降植烷致敏Balb/C小鼠腹腔诱导生产单克隆抗体的腹水；腹水经硫胺粗纯化，再通过辛酸硫胺法纯化得到特异性抗酚类抗氧化剂的第一抗体；

[0017] 所述胶体金标记的第一抗体通过以下方法制备得到：

[0018] (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；

[0019] (b) 胶体金标记物的制备：取已制备好的胶体金溶液，用K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>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。

[0020] 在其中一个实施例中，所述酚类抗氧化剂为抗氧化剂1076。该抗氧化剂1076的结构式如下：



抗氧化剂 1076

[0022] 选用抗氧化剂1076制备完全抗原。由于三种抗氧化剂具有共同的母核结构2,6-二叔丁基苯酚,采用抗氧化剂1076制备完全抗原,可确保所制备的完全抗原适用于3种目标化合物的检测,并具有较好的特异性。

[0023] 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:将抗氧化剂1076、无水碳酸钾、3-溴丙胺分散至二甲基甲酰胺中,加热回流反应,制得抗氧化剂1076半抗原,将纯化后的抗氧化剂1076半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入二甲基甲酰胺中溶解,搅拌反应,然后加入载体蛋白,溶解于pH7.0的0.1mol/LNaHCO<sub>3</sub>中,得载体蛋白溶液,将含有抗氧化剂1076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,即得完全抗原;

[0024] 所述第一抗体通过以下方法制备得到:

[0025] (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;

[0026] (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;

[0027] (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酚类抗氧化剂化合物的第一抗体;

[0028] 所述胶体金标记的第一抗体通过以下方法制备得到:

[0029] (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,保存备用;

[0030] (b) 胶体金标记的第一抗体的制备:取已制备好的半径为30nm-40nm胶体金溶液,用0.1mol/LK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节胶体金溶液pH至8.2;按每毫升胶体金溶液50μg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。

[0031] 在其中一个实施例中,所述第一抗体的浓度为40-60μg/mL,在检测卡上的用量为15-30μL/cm;

[0032] 所述检测线包被的完全抗原的浓度为0.5-2mg/mL,在检测卡上的用量为0.5-2μL/cm;

[0033] 所述第一质控线和第二质控线包被的第二抗体的浓度为0.5-2mg/mL,在检测卡上的用量为0.5-2μL/cm。

[0034] 本发明还公开了上述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡的制备方法,包括以下步骤:

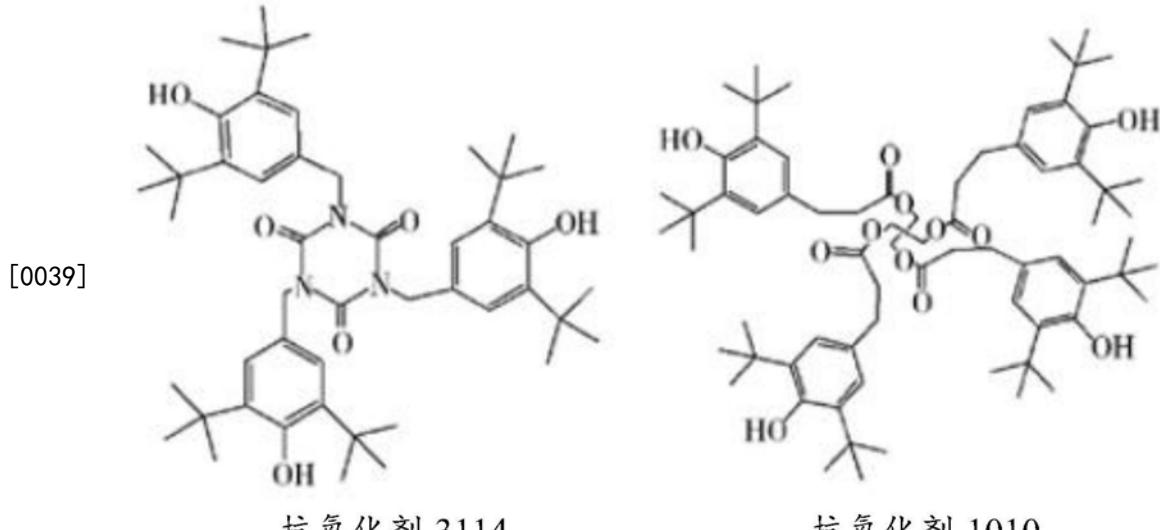
[0035] (1) 金标垫的制备:将所述胶体金标记的第一抗体喷在载体玻璃纤维棉上,烘干,备用;

[0036] (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;

[0037] (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。

[0038] 本发明还公开了述的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡在检测抗氧化剂3114,抗氧化剂1010和抗氧化剂1076中的应用。所述抗氧化剂3114,抗氧化剂1010的结构式如下:



[0040] 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,按照每平方厘米包装材料1-3mL溶剂的量加入三氯甲烷浸泡1-4h,浸泡液于40℃水浴中用氮气吹干,以50%甲醇溶液稀释8-18倍,即得待测溶液;

[0041] 对于食品样品:将待测样品粉碎后,按照每克食品样品3-7mL的量加入水,混匀后加入按照每克食品样品3-7mL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。

[0042] 本发明的检测卡的检测原理为:

[0043] 本发明采用竞争法免疫层析的原理,酚类抗氧化剂化合物的结构中共同拥有3,5-二叔丁基-4-羟基苯基结构,通过免疫筛选得到的抗体能共同识别此类似部位。将酚类抗氧化剂化合物中的某一种与载体蛋白偶联形成的复合物固定于硝酸纤维膜上的检测线上(固相抗原)。将待检样本加到检测卡一端的样品垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合金标垫上的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酚类抗氧化剂化合物,胶体金标记的第一抗体与酚类抗氧化剂的完全抗原结合,被固定在检测线上,从而在检测线上形成红色条带。如果样本中含有某种酚类抗氧化剂化合物,例如含有抗氧化剂1010,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的抗氧化剂1010结合,从而抑制第一抗体与检测线上的完全抗原的结合,检测线的条带颜色将会减弱或者消失。

[0044] 简单来说,当待检样本中含有酚类抗氧化剂化合物时,检测线不变色,当待检样本中含有以下酚类抗氧化剂化合物:抗氧化剂3114,抗氧化剂1010、抗氧化剂1076或其组合,则检测线颜色消失或颜色明显减弱。

[0045] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0046] 本发明的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡,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、饼干等食品样本中的酚类抗氧化剂,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。

### 实施例1

[0054] 一种检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡，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酚类抗氧化剂的抗体；所述检测线6包被有酚类抗氧化剂的完全抗原，所述完全抗原为酚类抗氧化剂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,在检测线上分别与酚类抗氧化剂的完全抗原,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。若样品中有待检酚类抗氧化剂存在,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,说明被检测样品中酚类抗氧化剂含量未超标或被检测样品中无酚类抗氧化剂;

[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,说明被检测样品中酚类抗氧化剂含量超标;

[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的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡制备方法,包括以下步骤:

[0068] (1) 酚类抗氧化剂-载体蛋白偶联物的合成:

[0069] 将0.53g抗氧化剂1076和1.38g无水碳酸钾分散至50mL二甲基甲酰胺中,搅拌30min,加入0.30g 3-溴丙胺,加热回流8h,使抗氧化剂1076的酚羟基被丙胺基取代,经硅胶色谱柱纯化后制得抗氧化剂1076半抗原。

[0070] 将纯化后的抗氧化剂1076半抗原、N-羟基丁二酰亚胺和1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐加入二甲基甲酰胺中溶解,搅拌反应过夜。然后加入0.12g牛血清载体蛋白(市售购得),溶解于5mL pH 7.0的0.1mol/L NaHCO<sub>3</sub>中,得载体蛋白溶液,将含有抗氧化剂1076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,即得酚类抗氧化剂载体蛋白偶联物,分装后-20℃保存。

[0071] (2) 第一抗体的制备:

[0072] (a) 动物免疫:取上述制得的酚类抗氧化剂-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。腹水经硫酸粗纯化,再辛酸硫酸法纯化得相应抗酚类抗氧化剂化合物的第一抗体,保存在4摄氏度。

[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 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调节胶体金溶液pH至8.2;按每毫升胶体金溶液50μg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50μg/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20μL/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:将制得的酚类抗氧化剂的完全抗原稀释至浓度为1mg/mL,以1μL/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120倍至浓度为1mg/mL,以1μL/cm的浓度包被于硝酸纤维素膜上构成第一质控线和第二质控线。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] 准确称取酚类抗氧化剂抗氧化剂3114,抗氧化剂1010和抗氧化剂1076,以少量甲醇溶解后,再以50%甲醇溶液为稀释剂,分别制备单独的及混合的系列梯度的混合标准工作溶液,浓度为均为0ng/mL、25ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、500ng/mL。

[0086] 取上述标准工作溶液作为样品滴加到实施例1的检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡上,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酚类抗氧化剂最低检出限量试验

[0090]

试管 编号	标准品	溶液浓度 (ng/mL)	显色结果	测定结果
1	抗氧化剂 3114	0	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2 显色相同	阴性
2		25	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2 显色相近	阴性
3		50	检测线 T 显色比质控线 C1 和 C2 略淡	阳性
4		100	检测线 T 显色稍淡	阳性
5		500	检测线 T 不显色	阳性
1	抗氧化剂 1010	0	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2 显色相同	阴性
2		25	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2 显色相近	阴性
3		50	检测线 T 显色比质控线 C1 和 C2 略淡	阳性
4		100	检测线 T 显色稍淡	阳性
5		500	检测线 T 不显色	阳性
1	抗氧化剂 1076	0	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2 显色相同	阴性
2		25	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2 显色相近	阴性
3		50	检测线 T 显色比质控线 C1 和 C2 略淡	阳性
4		100	检测线 T 显色稍淡	阳性
5		500	检测线 T 不显色	阳性
1	混合抗氧	均为 0	检测线 T 显色与质控线 C1 和 C2	阴性

[0091]

	化剂 1076		显色相同	
2		均为 25	检测线 T 显色比质控线 C1 和 C2 稍淡	阳性
3		均为 50	检测线 T 显色比质控线 C1 和 C2 较淡	阳性
4		均为 100	检测线 T 显色很淡	阳性
5		均为 500	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的半定量检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡的对三种酚类抗氧化剂均能检出,且其检出限约为50ng/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酚类抗氧化剂。

[0095] 一、实验方法

[0096] 1.样品前处理:

[0097] 将塑料食品包装袋测得面积后,按每平方厘米2mL的量注入三氯甲烷,或采用全部浸泡的方法,其面积以包装袋的二面计算,在室温(>20℃)浸泡2h后,取100μL提取液至2mL离心管中,于40℃水浴中用氮气吹干,加入100μL甲醇溶解残渣后,加入900μL 50%甲醇溶液样,振荡混匀后,待测。

[0098] 将饼干样品粉碎后,称取2g(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] 2.样品检测:

[0100] 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。并同时将上述待测试样以液相色谱串联质谱法进行平行检测,检测方法参见《超高效液相色谱法同时测定食品塑料包装材料中的紫外吸收剂和抗氧化剂》(陈立伟,吴楚森,汪毅,等.分析测试学报,2016,35(2):206-212.),作为参比。

[0101] 3.结果读取:

[0102] 5-10分钟内读取检测结果,结果判断如下:

[0103] 表2样品检测结果

[0104]

	编号	显色结果	测定结果	对比检测结果 ng/mL
食品包装袋	1	检测线 T 不显色	阳性	690
		检测线 T 不显色	阳性	742
	2	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
	3	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
饼干	1	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
	2	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
	3	检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500
		检测线 T 显色与质控线 C1 及 C2 相近	阴性	<500

[0105] 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和食品中的酚类抗氧化剂,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。

[0106] 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。

[0107] 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，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

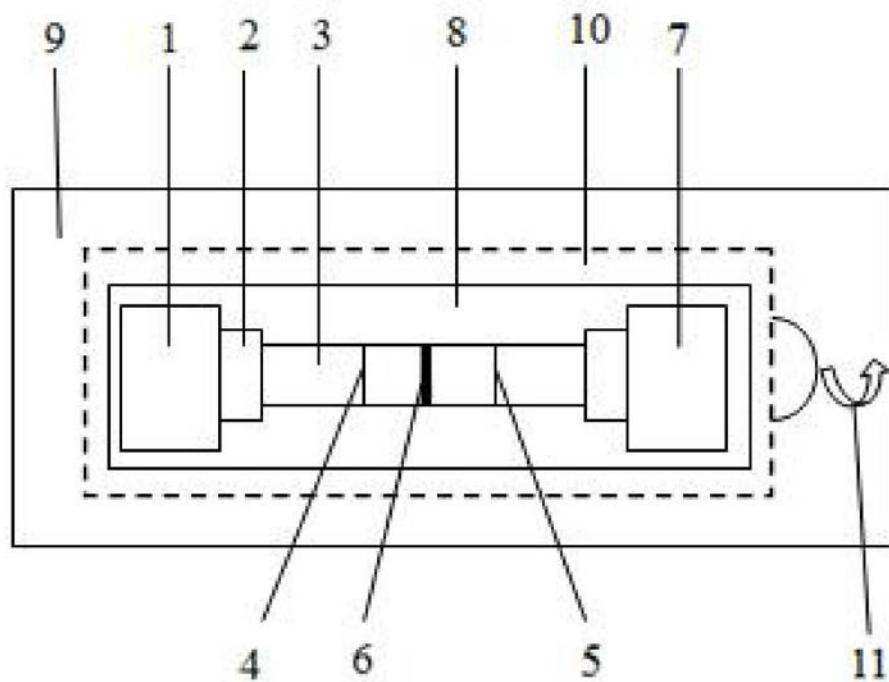


图1

专利名称(译)	检测酚类抗氧化剂的免疫层析检测卡及其制备方法和应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN108663508A</a>	公开(公告)日	2018-10-16
申请号	CN201810635738.3	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	黄金凤 寻知庆 王强 叶嘉荣 汪晨霞 陈立伟 侯向昶 吴玉銮 冼燕萍 郭新东		
发明人	黄金凤 寻知庆 王强 叶嘉荣 汪晨霞 陈立伟 侯向昶 吴玉銮 冼燕萍 郭新东		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/532		
代理人(译)	王洪娟		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明涉及一种检测酚类抗氧化剂的免疫层析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酚类抗氧化剂的抗体；检测线包被有完全抗原，所述完全抗原为酚类抗氧化剂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。上述检测卡能够同时检测多种酚类抗氧化剂，采用双质控线，结果准确，结构简单，使用方便，适用于酚类抗氧化剂的快速检测。

