



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108776223 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(21)申请号 201810354778.0

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2018.04.19

G01N 21/31(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 黄金凤 刘冬虹 寻知庆 刘香梅
郭新东 汪晨霞 陈立伟 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 33/543(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

(54)发明名称

紫外吸收剂UV-326检测试剂盒及其制备方
法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种紫外吸收剂UV-326检测试
剂盒及其制备方法和应用,属于添加剂检测技术
领域。该试剂盒包括:紫外吸收剂UV-326特异性
抗原工作液,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原
为紫外吸收剂UV-326与载体蛋白的偶联物;紫外
吸收剂UV-326特异性抗体工作液,所述紫外吸收
剂UV-326特异性抗体是鼠源单克隆抗体。该试剂
盒利用竞争酶联免疫测定法检测紫外吸收剂UV-
326,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。同时,本试
剂盒中的试剂以工作液形式提供,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
中的紫外吸收剂UV-326。

1. 一种紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,其特征在于,包括:

紫外吸收剂UV-326特异性抗原工作液,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原为紫外吸收剂UV-326与载体蛋白的偶联物;

紫外吸收剂UV-326特异性抗体工作液,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体是鼠源单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,其特征在于,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、兔血清白蛋白、甲状腺球蛋白中的一种。

3. 根据权利要求1所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,其特征在于,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原包被于酶标板上,形成特异性抗原酶标板;所述试剂盒还包括酶标二抗、洗涤液、底物显色剂、终止液、标准品溶液、封闭液和浓缩样品稀释液。

4. 根据权利要求3所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,其特征在于,所述酶标二抗是浓度按1:10000比例稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗。

5. 根据权利要求3所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,其特征在于,所述酶标板的材料为聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯中的一种;

所述洗涤液为含有0.05%-0.5%吐温-20的0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液;

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;

所述终止液为1-2mol/L的硫酸溶液;

所述标准品溶液中UV-326浓度分别为 $2 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^0 \mu\text{g/L}$;

所述封闭液为含5%脱脂奶粉的0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液;

所述浓缩样品稀释液为0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,其特征在于,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原通过以下方法制备得到:将紫外吸收剂UV-326、3-氨基-1-丙醇、三苯基膦分散于干燥四氢呋喃中,超声,超声过程中加入偶氮二甲酸二异丙酯,继续超声反应,经柱色谱分离后制得能够与蛋白质偶联的紫外吸收剂UV-326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,与载体蛋白偶联制备得到紫外吸收剂UV-326特异性抗原;

所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体通过以下方法制备得到:以上述合成的紫外吸收剂UV-326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,得到纯化的紫外吸收剂UV-326单克隆抗体。

7. 根据权利要求6所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,其特征在于,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原通过以下方法制备得到:将0.32g紫外吸收剂UV-326、0.075g 3-氨基-1-丙醇、0.29g三苯基膦溶解于2.0mL干燥四氢呋喃中,常温超声5min,超声过程中逐滴加入0.22mL偶氮二甲酸二异丙酯,继续超声反应20min,经反应完毕后使用柱色谱分离,制得能够与蛋白质偶联的紫外吸收剂UV-326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紫外吸收剂UV-326特异性抗原;

所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体通过以下方法制备得到:以上述合成的紫外吸收剂UV-326特异性抗原作为免疫原对10周龄的Ba1b/C小鼠进行免疫,首次免疫使用完全弗氏佐剂与紫外吸收剂UV-326特异性抗原溶液乳化,抗原浓度为0.5mg/mL,剂量为100 μ g/只,以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与紫外吸收剂UV-326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10天加强免疫一次,共免疫8-10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用紫外吸收剂UV-326特异性抗原水溶液直接腹腔注射,剂量同初次免疫;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6:1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Ba1b/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1.5万/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6-10天后,收集腹水,反复收集数次;存于4 $^{\circ}$ C冰箱保存;经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化,得到纯化的紫外吸收剂UV-326单克隆抗体。

8. 根据权利要求6所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,其特征在于,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原与所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体的用量质量比为1:2。

9. 权利要求1-8任一项所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒的制备方法,其特征在于,主要包括以下步骤:

1) 制备紫外吸收剂UV-326特异性抗原工作液:将所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原的浓度配制为0.5-2.5 μ g/mL;

2) 制备紫外吸收剂UV-326特异性抗体工作液:将所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体的浓度配制为1-5 μ g/mL。

10. 权利要求1-8任一项所述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒的使用方法,其特征在于,

若检测对象为塑料食品包装制品,则包括以下前处理步骤:按预定量量取蒸馏水在30-50 $^{\circ}$ C浸泡待测物200-300hr,即得待测溶液;

若检测对象为食品,则包括以下前处理步骤:将待测物均质,加入甲酸铵溶液和氨水萃取,过滤,滤液加入到经活化的HLB固相萃取柱,用20-40%甲酸水溶液淋洗小柱,弃去淋洗液,随后以体积比为0.5-1.5:1的甲醇-二氯甲烷混合溶液淋洗小柱,收集洗脱液,回收溶剂,适量丙酮溶解后加入水,即得待测溶液;

若检测对象为日化产品,则包括以下前处理步骤:将待测物混匀,加入甲酸铵溶液和氨水萃取,过滤,滤液加入到经活化的HLB固相萃取柱,用20-40%甲酸水溶液淋洗小柱,弃去淋洗液,随后以体积比为0.5-1.5:1的甲醇-二氯甲烷混合溶液淋洗小柱,收集洗脱液,回收溶剂,适量丙酮溶解后加入水,即得待测溶液。

紫外吸收剂UV-326检测试剂盒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,特别是涉及一种紫外吸收剂UV-326检测试剂盒及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 紫外线吸收剂UV-326,化学名称为2'-(2'-羟基-3'-叔丁基-5'-甲基苯基)-5-氯苯并三唑,是苯并三氮唑类紫外线吸收剂中较有代表性的一种,可有效吸收波长为270nm-380nm的紫外线。

[0003] 在食品包装领域,由塑料制成的各类包装膜、袋、桶、箱、瓶、罐及复合包装材料等得到了广泛应用,且用量在逐年增加。然而,这些高分子材料在阳光和一些人造光线的照射下,因紫外光的作用,容易产生自动氧化反应,导致聚合物降解,使外观及机械性能变坏,使用寿命会降低。为了防止紫外光的破坏作用,人们使用紫外光稳定剂来解决阳光暴露下塑料的降解问题。

[0004] 紫外线吸收剂是光稳定剂的主要类型之一,它们能有效地吸收紫外线,并使之以无害热能形式释放,从而起到抑制紫外光对塑料的降解作用。研究表明,部分紫外吸收剂有毒有害,长期摄入将对机体的生殖、发育等产生影响,与食品接触的材料中若含有这些紫外吸收剂,可能通过吸收、溶解、扩散等途径迁移到食品中,从而危害消费者健康。欧盟指令(EU) No.10/2011对接触食品的塑料材料和制品中UV-326、UV-327和UV-234的最大残留量作出了规定。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》亦规定了食品接触材料及制品中允许使用的紫外吸收剂种类(包括UV-326、UV-327、UV-329、UV-531、UV-71、UV-24、UV-9、UV-0)、使用范围和最大使用量以及相关的最大残留量或特定迁移限量,如规定UV-326的特定迁移总量限量[SML(T)]为30mg/kg。另外,在化妆品等日化产品领域,某些不法商人亦会在例如防晒化妆品中超范围添加紫外吸收剂。鉴于此,建立相关产品的紫外吸收剂的快速检测方法,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,紫外吸收剂的测定方法主要有液相色谱法、气相色谱-质谱法以及液相色谱-串联质谱法等;前处理方法主要有固相萃取(SPE)、索氏提取(SE)、快速溶剂萃取(ASE)、微波辅助提取(MAE)、超临界流体萃取(SFE)、超声萃取(UE)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。

[0006] 而紫外吸收剂UV-326作为紫外吸收剂中的一种,也亟需一种合适的快速检测方法。

发明内容

[0007] 基于此,有必要针对上述问题,提供一种紫外吸收剂UV-326检测试剂盒及其制备方法,采用盖试剂盒,能够在检测紫外吸收剂UV-326时一次连续检测多个样品,具有便捷,

快速,灵敏、成本低的特点。

[0008] 一种紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,包括:

[0009] 紫外吸收剂UV-326特异性抗原工作液,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原为紫外吸收剂UV-326与载体蛋白的偶联物;

[0010] 紫外吸收剂UV-326特异性抗体工作液,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体是鼠源单克隆抗体。

[0011] 上述试剂盒,利用竞争酶联免疫测定法检测紫外吸收剂UV-326,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。

[0012] 在其中一个实施例中,所述载体蛋白为牛血清白蛋白、卵清蛋白、兔血清白蛋白、甲状腺球蛋白中的一种。

[0013] 在其中一个实施例中,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原包被于酶标板上,形成特异性抗原酶标板;所述试剂盒还包括酶标二抗、洗涤液、底物显色剂、终止液、标准品溶液、封闭液和浓缩样品稀释液。

[0014] 在其中一个实施例中,所述酶标二抗是浓度按1:10000比例稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗。

[0015] 在其中一个实施例中,所述酶标板的材料为聚苯乙烯、聚乙烯、聚丙烯中的一种;

[0016] 所述洗涤液为含有0.05%-0.5%吐温-20的0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液;

[0017] 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;

[0018] 所述终止液为1-2mol/L的硫酸溶液;

[0019] 所述标准品溶液中UV-326浓度分别为 $2 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^0 \mu\text{g/L}$;

[0020] 所述封闭液为含5%脱脂奶粉的0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液;

[0021] 所述浓缩样品稀释液为0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液。

[0022] 在其中一个实施例中,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原通过以下方法制备得到:将紫外吸收剂UV-326、3-氨基-1-丙醇、三苯基膦分散于干燥四氢呋喃中,超声,超声过程中加入偶氮二甲酸二异丙酯,继续超声反应,经柱色谱分离后制得能够与蛋白质偶联的紫外吸收剂UV-326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,与载体蛋白偶联制备得到紫外吸收剂UV-326特异性抗原;

[0023] 所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体通过以下方法制备得到:以上述合成的紫外吸收剂UV-326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,得到纯化的紫外吸收剂UV-326单克隆抗体。

[0024] 在其中一个实施例中,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原通过以下方法制备得到:将0.32g紫外吸收剂UV-326、0.075g 3-氨基-1-丙醇、0.29g三苯基膦溶解于2.0mL干燥四氢呋喃(THF)中,常温超声5min,超声过程中逐滴加入0.22mL偶氮二甲酸二异丙酯,继续超声反应20min,经反应完毕后使用柱色谱分离,制得能够与蛋白质偶联的紫外吸收剂UV-

326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紫外吸收剂UV-326特异性抗原;

[0025] 所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体通过以下方法制备得到:以上述合成的紫外吸收剂UV-326特异性抗原作为免疫原对10周龄的Balb/C小鼠进行免疫,首次免疫使用完全弗氏佐剂与紫外吸收剂UV-326特异性抗原溶液乳化,抗原浓度为0.5mg/mL,剂量为100 μ g/只,以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与紫外吸收剂UV-326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10天加强免疫一次,共免疫8-10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用紫外吸收剂UV-326特异性抗原水溶液直接腹腔注射,剂量同初次免疫;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6:1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1.5万/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6-10天后,收集腹水,反复收集数次;存于4 $^{\circ}$ C冰箱保存;经辛酸-硫酸铵沉淀法进行腹水纯化,得到纯化的紫外吸收剂UV-326单克隆抗体。

[0026] 在其中一个实施例中,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原与所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体的用量质量比为1:2。

[0027] 本发明还公开了上述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒的制备方法,主要包括以下步骤:

[0028] 1) 制备紫外吸收剂UV-326特异性抗原工作液:将所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原的浓度配制为0.5-2.5 μ g/mL;

[0029] 2) 制备紫外吸收剂UV-326特异性抗体工作液:将所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体的浓度配制为1-5 μ g/mL。

[0030] 在其中一个实施例中,所述步骤1)中,紫外吸收剂UV-326特异性抗原工作液的浓度为1.5 μ g/mL;所述步骤2)中,所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体工作液的浓度为3 μ g/mL。

[0031] 本发明还公开了上述的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒的使用方法,即

[0032] 若检测对象为塑料食品包装制品,则包括以下前处理步骤:按预定量量取蒸馏水在30-50 $^{\circ}$ C浸泡待测物200-300hr,即得待测溶液;

[0033] 若检测对象为食品,则包括以下前处理步骤:将待测物均质,加入甲酸铵溶液和氨水萃取,过滤,滤液加入到经活化的HLB固相萃取柱,用20-40%甲酸水溶液淋洗小柱,弃去淋洗液,随后以体积比为0.5-1.5:1的甲醇-二氯甲烷混合溶液淋洗小柱,收集洗脱液,回收溶剂,适量丙酮溶解后加入水,即得待测溶液;

[0034] 若检测对象为日化产品,则包括以下前处理步骤:将待测物混匀,加入甲酸铵溶液和氨水萃取,过滤,滤液加入到经活化的HLB固相萃取柱,用20-40%甲酸水溶液淋洗小柱,弃去淋洗液,随后以体积比为0.5-1.5:1的甲醇-二氯甲烷混合溶液淋洗小柱,收集洗脱液,回收溶剂,适量丙酮溶解后加入水,即得待测溶液。

[0035] 本发明的紫外吸收剂UV-326检测原理为:

[0036] 将紫外吸收剂UV-326抗原吸附于固相载体上,加入样品或紫外吸收剂UV-326的标准溶液及紫外吸收剂UV-326抗体工作液,待测样品中紫外吸收剂UV-326和固相载体上包被

的紫外吸收剂UV-326抗原竞争结合紫外吸收剂UV-326抗体,孵育后,加入酶标二抗进行酶活性的放大作用,孵育,显色后终止,测定样品的吸光度,该值与样品中紫外吸收剂UV-326的量呈负相关,与标准曲线比较即可得出紫外吸收剂UV-326浓度范围。

[0037] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0038] 本发明的紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,利用竞争酶联免疫测定法检测紫外吸收剂UV-326,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。同时,本试剂盒中的试剂以工作液形式提供,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紫外吸收剂UV-326。

具体实施方式

[0039] 为了便于理解本发明,下面将本发明进行更全面的描述。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。

[0040] 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。

[0041] 以下实施例中所用原料均为市售。

[0042] 实施例1

[0043] 一种紫外吸收剂UV-326检测试剂盒,主要组成成份如下:

[0044] 1) 紫外吸收剂UV-326特异性抗原工作液;

[0045] 通过以下方法制得:将0.32g(即1.0mmol)的带酚羟基的紫外吸收剂UV-326;0.075g(即1.0mmol)的3-氨基-1-丙醇和0.29g(即1.1mmol)的三苯基膦溶解于2.0mL干燥四氢呋喃(THF)中,常温超声5min,超声过程中逐滴加入0.22mL(即1.1mmol)偶氮二甲酸二异丙酯,继续超声反应20min,经反应完毕后使用色谱柱分离,制得能够与蛋白质偶联的紫外吸收剂UV-326的半抗原;再将其与N-羟基丁二酰胺(NHS)和碳二亚胺(EDC)混合,与牛血清白蛋白混合,室温搅拌1h,偶联制备紫外吸收剂UV-326特异性抗原,并用浓缩样品稀释液(0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液)稀释至浓度为1.5 μ g/mL。

[0046] 2) 紫外吸收剂UV-326特异性抗体工作液;

[0047] 通过以下方法制得:将上述合成得到的紫外吸收剂UV-326特异性抗原作为免疫原对10周龄的Balb/C小鼠进行免疫。首次免疫使用完全弗氏佐剂与紫外吸收剂UV-326特异性抗原的0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液乳化,抗原浓度为0.5mg/mL,剂量为100 μ g/只,以后每次加强免疫使用不完全弗氏佐剂与紫外吸收剂UV-326特异性抗原的0.01M,pH7.4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10天加强免疫一次,共免疫8-10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紫外吸收剂UV-326特异性抗原的0.01M,pH7.4的磷酸盐缓冲液直接腹腔注射,剂量同初次免疫。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6:1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。

[0048] 单克隆抗体的制备与纯化: 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1.5万/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6-10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。具体方法: 每1份腹水中加入3份乙酸钠缓冲液(浓度0.05mol/L, pH4.0), 用浓度0.1mmol/L NaOH调整pH值至4.5, 在4℃下搅拌30min, 期间缓慢加入辛酸, 按稀释前腹水体积计算40μL/mL; 在4℃静置3h, 离心(10140r/min, 30min), 取上清液, 保持在4℃环境中, 30min内加入(NH₄)₂SO₄使终浓度为0.277g/mL, 静置1h, 4℃离心(10140r/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3μg/mL。

[0049] 3) 酶标板;

[0050] 96孔聚苯乙烯酶标板, 由商业公司提供;

[0051] 4) 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗;

[0052] 由商业公司提供的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗;

[0053] 5) 洗涤液;

[0054] 为含有重量比为0.05%-0.5%吐温-20的0.01M, pH为7.4的磷酸盐缓冲液;

[0055] 6) 底物显色剂;

[0056] 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DMSO溶液;

[0057] 7) 终止液;

[0058] 为2mol/L的硫酸溶液;

[0059] 8) 紫外吸收剂UV-326标准品溶液6瓶;

[0060] 浓度分别为: $2 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^0 \mu\text{g/L}$;

[0061] 9) 封闭液;

[0062] 为含5%脱脂奶粉的0.01M, pH7.4的磷酸盐缓冲液;

[0063] 10) 浓缩样品稀释液;

[0064] 为0.01M, pH7.4的磷酸盐缓冲液(即磷酸根浓度为0.01M/L, pH7.4的磷酸盐缓冲液);

[0065] 11) 自封袋;

[0066] 由商业公司提供。

[0067] 实施例2

[0068] 间接竞争ELISA方法的建立。

[0069] 采用间接竞争ELISA法检测紫外吸收剂UV-326单克隆抗体的竞争抑制率, 方法如下:

[0070] 1) 用1.5μg/mL的紫外吸收剂UV-326特异性抗原工作液包被96孔酶标板, 100μL/孔, 放置于4℃冰箱包被过夜, 用250μL/孔封闭液(即5%脱脂奶粉)封闭后用洗涤液洗涤, 并拍干;

[0071] 2) 加入紫外吸收剂UV-326标准品溶液(浓度分别为: $2 \times 10^5 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^4 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^3 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^2 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^1 \mu\text{g/L}$ 、 $2 \times 10^0 \mu\text{g/L}$)或样品待测溶液50μL, 再加入浓度为3μg/mL

的紫外吸收剂UV-326特异性抗体工作液100μL,混合均匀,37℃温育1h;

[0072] 3) 洗涤拍干后,加入用稀释液按1:10000比例稀释的辣根过氧化物酶标记羊抗鼠二抗工作液,100μL/孔,37℃温育1h;

[0073] 4) 洗涤拍干,每孔加入50μL显色液B液、10μL显色液A液显色15min,加入浓度为2mol/L的硫酸溶液,50μL/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值。

[0074] 以抑制率I%为纵坐标,以紫外吸收剂UV-326浓度的对数lg[紫外吸收剂UV-326 (ng/mL)]为横坐标,绘制紫外吸收剂UV-326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本中紫外吸收剂UV-326的实际含量。

[0075] 抑制率计算公式如下:

$$[0076] \quad I = \frac{B - B_N}{B_0 - B_N} \times 100\%$$

[0077] 其中:I——抑制率

[0078] B——(样本溶液的平均吸光度值)

[0079] B₀——(0μg/L标准溶液的平均吸光度值)

[0080] B_N——(参比空白对照平均吸光度值)

[0081] 实施例3

[0082] 试剂盒灵敏度、特异性、准确度。

[0083] 1. 灵敏度测定。

[0084] 利用实施例2的间接竞争ELISA法测定结果建立紫外吸收剂UV-326检测的标准工作曲线。紫外吸收剂UV-326单克隆抗体在2μg/L~2×10⁵μg/L范围内有良好的线性,IC₅₀=958.4ng/mL,最低检测限为5.81ng/mL,检测范围(抑制20%~80%之间)为49.50ng/mL~1650μg/mL。塑料食品包装制品的检测限为2.91ng/cm²,食品样品的检测限为1.16ng/g,日化产品的检测限为5.81ng/g。

[0085] 采用实施例2的间接竞争ELISA法测定紫外吸收剂UV-326结构类似物(紫外吸收剂UV-327、紫外吸收剂UV-234、紫外吸收剂UV-329、紫外吸收剂UV-71、紫外吸收剂UV-360)与单抗混合物的交叉反应。将系列浓度(1×10⁷μg/L、1×10⁶μg/L、1×10⁵μg/L、1×10⁴μg/L、1×10³μg/L、1×10²μg/L、1×10¹μg/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。利用单克隆抗体对紫外吸收剂UV-326的IC₅₀值与单克隆抗体对各类似物的IC₅₀值的比值得到交叉反应率(CR%),公式如下:

$$[0086] \quad CR\% = \frac{VBL的IC_{50}值}{类似物的IC_{50}值} \times 100\%$$

[0087] 结果表明紫外吸收剂UV-326单克隆抗体与紫外吸收剂UV-327、紫外吸收剂UV-234、紫外吸收剂UV-329、紫外吸收剂UV-71、紫外吸收剂UV-360的交叉反应率均检测不到具体数值,为少于0.05%。

[0088] 3. 准确度测定

[0089] 向空白塑料食品包装制品和食品样品中添加0.1μg/mL和10μg/mL的紫外吸收剂UV-326,化妆品样品中添加1μg/mL和10μg/mL的紫外吸收剂UV-326,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。

[0090] 回收率公式如下:

$$[0091] \quad \text{回收率} = \frac{\text{测定值}}{\text{添加值}} \times 100\%$$

[0092] 结果表明塑料制品的回收率为95.6%~102%,食品的回收率为92.5%~99.4%,日化产品的回收率为89.5%~97.2%。

[0093] 实施例4

[0094] 检测塑料食品包装制品中紫外吸收剂UV-326的迁移。

[0095] 1.样品的前处理。

[0096] 按测得的样品体积准确量取蒸馏水加入空心制品中,在40℃浸泡240h。大于1.1L的塑料容器、塑料薄膜袋、薄膜等也可裁成试片进行测定。可盛放溶剂的塑料薄膜袋应浸泡无文字图案的内壁部分,可将袋口张开置于适当大小的烧杯中,加入适量蒸馏水依法浸泡。复合食品包装袋则按每平方厘米2mL计,注入蒸馏水依上法浸泡。在40℃浸泡240h,取50μL进行分析。

[0097] 2.间接竞争ELISA法检测样品中紫外吸收剂UV-326的残留。

[0098] 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紫外吸收剂UV-326的含量,见下表2。

[0099] 表2塑料制品中紫外吸收剂UV-326的迁移量。

[0100]

塑料制品	编号	溶液中紫外吸收剂 UV-326 浓度 (ng/L)	样品中紫外吸收剂 UV-326 的迁移量 (ng/厘米 ²)	迁移量平均值 (ng/厘米 ²)
空心制品 (透明)	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
塑料薄膜 袋	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
保鲜膜	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
彩色塑料 水杯	样品 1	23904	47.8	50.1
	样品 2	26200	52.4	
备注: ND. 为样品中的含量低于 2.91 ng/cm ²				

[0101] 实施例5

[0102] 检测食品中紫外吸收剂UV-326。

[0103] 1.样品的前处理。

[0104] 用均质器将样品均质,称取10g(精确至0.01g)样品,加入30mL 0.5mol/L甲酸铵溶液和200μL氨水,混匀,超声萃取15min,以10000r/min离心10min,用滤纸过滤,将滤液加入到预先用6mL二氯甲烷,6mL甲醇和6mL去离子水活化过的HLB(3mL,60mg)固相萃取柱,控制流速不大于1mL/min,待全部样液通过后,用6mL 30%甲酸水溶液淋洗小柱,弃去淋洗液,和6mL甲醇-二氯甲烷混合溶液(1:1,V/V)淋洗小柱,收集洗脱液,于40℃水浴中氮气吹至近干后,加入100μL丙酮,涡旋溶解残渣,然后再加入1.9mL超纯水,混匀,取50μL进行分析。

[0105] 2.间接竞争ELISA法检测样品中紫外吸收剂UV-326的残留。

[0106] 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紫外吸收剂UV-326的含量,见下表3。

[0107] 表3食品中紫外吸收剂UV-326的含量。

[0108]

食品	编号	溶液中紫外吸收剂 UV-326 浓度 (ng/L)	样品中紫外吸收剂 UV-326 的含量 (ng/g)	含量平均值 (ng/g)
食品 1	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
食品 2	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
食品 3	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
食品 4	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
备注: ND. 为样品中的含量低于 1.16 ng/g				

[0109] 实施例6

[0110] 检测日化产品中紫外吸收剂UV-326。

[0111] 1.样品的前处理。

[0112] 称取混匀后的样品(洗涤剂或化妆品)2g(精确至0.01g)于50mL塑料离心管中,加入30mL 0.5mol/L甲酸铵溶液和200μL氨水,混匀,超声萃取15min,以10000r/min离心10min,用滤纸过滤,将滤液加入到预先用6mL二氯甲烷,6mL甲醇和6mL去离子水活化过的HLB(3mL,60mg)固相萃取柱,控制流速不大于1mL/min,待全部样液通过后,用6mL 30%甲酸水溶液淋洗小柱,弃去淋洗液,和6mL甲醇-二氯甲烷混合溶液(1:1,V/V)淋洗小柱,收集洗脱液,于40℃水浴中氮气吹至近干后,加入100μL丙酮,涡旋溶解残渣,然后再加入1.9mL超纯水,混匀,取50μL进行分析。

[0113] 2.间接竞争ELISA法检测样品中紫外吸收剂UV-326的残留。

[0114] 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

求出紫外吸收剂UV-326的含量,见下表4。

[0115] 表4日化产品中紫外吸收剂UV-326的含量。

[0116]

日化产品	编号	溶液中紫外吸收剂 UV-326 浓度	样品中紫外吸收剂 UV-326 的含量 (ng/g)	含量平均值 (ng/g)
------	----	-----------------------	-------------------------------	-----------------

[0117]

		(ng/L)		
日化产品 1	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
日化产品 2	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
日化产品 3	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
日化产品 4	样品 1	ND.	ND.	ND.
	样品 2	ND.	ND.	
备注: ND. 为样品中的含量低于 5.81 ng/g				

[0118] 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。

[0119] 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,发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

专利名称(译)	紫外吸收剂UV-326检测试剂盒及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN108776223A	公开(公告)日	2018-11-09
申请号	CN201810354778.0	申请日	2018-04-19
[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 刘香梅 郭新东 汪晨霞 陈立伟 侯向昶 吴玉奎 冼燕萍		
发明人	黄金凤 刘冬虹 寻知庆 刘香梅 郭新东 汪晨霞 陈立伟 侯向昶 吴玉奎 冼燕萍		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/543 G01N33/535 G01N21/31		
CPC分类号	G01N33/577 G01N21/31 G01N33/535 G01N33/54306		
代理人(译)	王洪娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种紫外吸收剂UV-326检测试剂盒及其制备方法和应用，属于添加剂检测技术领域。该试剂盒包括：紫外吸收剂UV-326特异性抗原工作液，所述紫外吸收剂UV-326特异性抗原为紫外吸收剂UV-326与载体蛋白的偶联物；紫外吸收剂UV-326特异性抗体工作液，所述紫外吸收剂UV-326特异性抗体是鼠源单克隆抗体。该试剂盒利用竞争酶联免疫测定法检测紫外吸收剂UV-326，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。同时，本试剂盒中的试剂以工作液形式提供，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。适用于快速而准确地检测大批量样品中的紫外吸收剂UV-326。

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