



中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3949—2014

塑料包装 有害物质双酚 A 的检测方法 抗原抗体结合法

Plastic package—Determination of harmful material bisphenol A—
Conjunction of antigen and antibody method

2014-04-09 发布

2014-11-01 实施

中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国上海出入境检验检疫局、上海近岸科技有限公司。

本标准主要起草人：缪文彬、周辉、陈相、冉晓园、陶海华、张晓蓉、蔡丽君、朱洪坤、蒋伟、李蔚、郑华、蔡晓峰、朱化星。

塑料包装 有害物质双酚 A 的检测方法

抗原抗体结合法

1 范围

本标准规定了塑料包装双酚 A 的抗原抗体结合测定方法的试剂和材料、仪器、试验步骤和结果计算。

本标准适用于塑料包装双酚 A 的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 方法原理

塑料经过超声提取后获得的滤液用于后续的检测。在酶标板上固定一定量的双酚 A 偶联抗原,加入样本溶液或双酚 A 标准品溶液后,接着加入一定量的双酚 A 特异性抗体,使待测抗原和固定抗原竞争性地与溶液中游离的双酚 A 特异性抗体结合,充分洗涤未反应的抗体和抗原,再加入一定量的酶标二抗(抗抗体)进行放大作用,充分洗涤后,加底物显色液显色。结果如待测抗原含量越多,与固相抗体结合的抗体越少,酶标二抗的量就越少,显色越浅,两者呈负相关。此实验的条件是:固定抗原限量,抗体定量,酶标二抗限量。固定抗原与待测抗原和抗体结合的位点相同,竞争性地与抗体结合。

4 试剂和材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯。实验用水应符合 GB/T 6682 中一级水的规格。

4.1 双酚 A 标准品(色谱纯,99%以上)。

4.2 甲醇。

4.3 牛血清蛋白。

4.4 碳酸氢钠。

4.5 碳酸钠。

4.6 吐温 20。

4.7 磷酸氢二钠十二水合物。

4.8 磷酸二氢钾。

4.9 氯化钾。

4.10 氯化钠。

4.11 柠檬酸。

4.12 醋酸钠。

4.13 甘油。

- 4.14 乙二胺四乙酸二钠。
- 4.15 四甲基联苯胺。
- 4.16 二甲基亚砷。
- 4.17 甲苯。
- 4.18 硫酸。
- 4.19 30%双氧水。
- 4.20 双酚 A 标准水溶液(0.2 $\mu\text{g/L}$, 1.0 $\mu\text{g/L}$, 3.0 $\mu\text{g/L}$, 10.0 $\mu\text{g/L}$, 20.0 $\mu\text{g/L}$):准确称取 50.0 mg 双酚 A 粉末,用蒸馏水溶解,以蒸馏水定容至 50 mL。之后配成双酚 A 质量浓度分别为 0.2 $\mu\text{g/L}$, 1.0 $\mu\text{g/L}$, 3.0 $\mu\text{g/L}$, 10.0 $\mu\text{g/L}$, 20.0 $\mu\text{g/L}$ 的标准溶液。
- 4.21 酶标二抗:HRP 标记的羊抗兔 IgG。
- 4.22 包被抗原双酚 A-BSA(5.65 mg/mL)。
- 4.23 双酚 A 多克隆抗体。
- 4.24 包被液(pH=9.6):0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液(Carbonate Buffer Saline,CBS),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。准确称取碳酸钠 1.59 g;碳酸氢钠 2.93 g,溶于 800 mL 蒸馏水中,加热搅拌,待全部溶解后,加蒸馏水至 1 000 mL。
- 4.25 PBS 稀释液:磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffer Saline,PBS),4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。准确称取氯化钠 8 g;氯化钾 0.2 g;磷酸二氢钾 KH_2PO_4 0.24 g;磷酸氢二钠十二水合物 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9 g,溶于 800 mL 蒸馏水中,加热搅拌,待全部溶解后,加蒸馏水至 1 000 mL。
- 4.26 洗涤液:1 000 mL PBS 稀释液加 0.5 mL Tween-20。
- 4.27 封闭液:准确称取 10.0 mg 牛血清白蛋白,用 10 mL PBS 稀释液溶解,尽量不要起泡。
- 4.28 底物显色液 A:醋酸钠 13.6 g,柠檬酸 1.6 g,30%双氧水 0.3 mL,溶于 400 mL 蒸馏水中,待全部溶解后,加蒸馏水至 500 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。
- 4.29 底物显色液 B:乙二胺四乙酸二钠 0.2 g,柠檬酸 0.95 g,甘油 50 mL,0.15 g 四甲基联苯胺,3 mL 二甲基亚砷,溶于 400 mL 蒸馏水中,待全部溶解后,加蒸馏水至 500 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存。

5 仪器

- 5.1 酶标仪。
- 5.2 天平:0.1 mg。
- 5.3 氮吹仪。
- 5.4 培养箱。
- 5.5 洗板机。
- 5.6 旋转蒸发仪。

6 分析步骤

6.1 样品预处理

将 5 g~10 g 塑料产品先人工剪碎成 5 mm \times 5 mm 以下大小,再粉碎成粉末状。称取 0.5 g(精确至 0.01 g)待测样品于 25 mL 螺旋管中,加入 20 mL 二氯甲烷,样品经超声萃取 30 min。将萃取液转移至 250 mL 的平底烧瓶中,并用 2 mL 甲醇分 2 次淋洗样品残渣,将淋洗液与萃取液合并,置于旋转蒸发仪上浓缩至近干。用甲醇-水(1:9,体积比)溶解并定容至 5 mL,经 0.22 μm 有机相滤膜过滤,滤液用于后续检测。

6.2 抗原抗体结合检测

将用包被液稀释 2 000 倍的包被抗原双酚 A-BSA 包被酶标板,每孔 100 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。取出酶标板,弃去包被液,甩干后置于洗板机中进行洗涤。程序设置为加洗涤液后静置 1 min,重复洗涤 3 次。洗后拍干。用封闭液进行封闭,每孔 120 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 1 h 后从培养箱中取出,洗涤 3 次,拍干。将双酚 A 标准溶液 0 $\mu\text{g/L}$,0.2 $\mu\text{g/L}$,1.0 $\mu\text{g/L}$,3.0 $\mu\text{g/L}$,10.0 $\mu\text{g/L}$,20.0 $\mu\text{g/L}$ 依次加入酶标板上的对应孔中,每孔 50 μL ;同时加入用 PBS 配制好的稀释 8 000 倍双酚 A 多克隆抗体溶液,每孔 50 μL ,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中温育 1 h 后洗涤 3 次,拍干。酶标二抗用 PBS 稀释 4 000 倍,每孔加入 100 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 h,洗涤 4 次,拍干。分别加入显色液 A 和显色液 B 各 50 μL ,室温暗处 5 min~10 min。向每孔中加入 50 μL 的 2 mol/L 的硫酸溶液。用酶标仪测定其在 450 nm 的吸光度 A。

7 结果计算

7.1 绘制标准曲线

每次实验均需重新绘制标准曲线。以双酚 A 标准溶液吸光度值为纵坐标,标准浓度的对数值为横坐标绘制标准曲线。得出方程[见式(1)]:

$$A = a \times \ln C + b \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A ——吸光度;

a ——斜率;

$\ln C$ ——双酚 A 浓度($\mu\text{g/L}$)的自然对数;

b ——截距。

7.2 待测样品双酚 A 浓度的计算

用式(2)计算待测样品滤液的双酚 A 浓度:

$$C_s = e^{\left[\frac{(A-b)}{a}\right]} \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_s ——待测样品滤液双酚 A 浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

e ——对数底为 e;

A ——吸光度;

a ——斜率;

b ——截距。

7.3 样品双酚 A 浓度的计算

用式(3)计算待测样品滤液的双酚 A 浓度:

$$C_a = C_s \times 5 \times 10^{-3} / 0.5 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

C_a ——待测样品双酚 A 含量,单位为微克每克($\mu\text{g/g}$);

C_s ——待测样品滤液双酚 A 浓度,单位为微克每升($\mu\text{g/L}$);

5 ——滤液的体积,单位为毫升(mL);

10^{-3} ——mL 换算成 L 的系数;

0.5 ——样品的重量,单位为克(g)。

SN/T 3949—2014

8 检测限

滤液的检测下限为 $0.2\ \mu\text{g/L}$; 样品双酚 A 的检测下限为 $2\times 10^{-3}\ \mu\text{g/g}$ 。滤液的检测上限为 $20\ \mu\text{g/L}$; 样品双酚 A 的检测下限为 $0.4\ \mu\text{g/g}$ 。

9 精密度

在重复性条件下, 获得两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。
