

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2019.05.012

间接竞争 ELISA 检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯

Development of indirect Competitive ELISA for the detection of dibutyl phthalate in food

尚淑娜^{1,2} 生威^{1,2} 王璐璐^{1,2} 赵秋霞^{1,2} 王硕^{1,2}

SHANG Shu-na^{1,2} SHENG Wei^{1,2} WANG Lu-lu^{1,2} ZHAO Qiu-xia^{1,2} WANG Shuo^{1,2}

(1. 食品营养与安全国家重点实验室[天津科技大学], 天津 300457;

2. 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

(1. State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety[Tianjin University of Science and Technology], Tianjin 300457, China; 2. College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China)

摘要:以 4-氨基邻苯二甲酸为原料,通过酯化反应合成半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯,将合成的半抗原通过重氮化反应与钥孔血蓝蛋白(KLH)进行偶联制备免疫抗原,与牛血清白蛋白(BSA)进行偶联制备包被抗原。通过免疫新西兰大白兔获得邻苯二甲酸二丁酯抗血清,利用纯化获得的抗体和包被抗原建立邻苯二甲酸二丁酯间接竞争酶联免疫检测方法(ELISA)。该方法的 IC_{50} 为 40.68 $\mu\text{g/L}$,最低检测限 IC_{15} 为 1.98 $\mu\text{g/L}$,方法对邻苯二甲酸二丁酯具有较好的特异性。经对白酒、牛奶、食用油样品进行检测,添加回收率为 84.57%~102.40%,用气相色谱—质谱法(GC-MS)进行验证,两种方法均呈现良好的线性相关性($R^2=0.9908$)。研究建立的方法可以被应用于食品中塑化剂邻苯二甲酸二丁酯的快速检测。

关键词:间接竞争 ELISA; 邻苯二甲酸二丁酯; 多克隆抗体; 酶联免疫分析法; 食品分析

Abstract: In this study, 4-aminophthalic acid was used to synthesize hapten Dibutyl 4-aminophthalate by esterification reaction, and the synthesized hapten was coupled with keyhole limpet hemocyanin (KLH) by diazotization reaction to prepare the immune antigen and coupled with bovine serum albumin (BSA) to prepare the coating antigen. The New Zealand white rabbits were immunized to obtain the antiserum against dibutyl phthalate. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay

(ELISA) for dibutyl phthalate was established using the purified antibodies. For the developed ELISA, the IC_{50} was 40.68 $\mu\text{g/L}$ and the limit of detection was 1.98 $\mu\text{g/L}$. The method was applied to detect liquor, milk and edible oil samples, and the recoveries ranged from 84.57% to 102.40%. There was a good correlation ($R^2=0.9908$) between the this ELISA and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) for the detection of DBP in the spiked samples. The method established in this study can be applied to the rapid detection of dibutyl phthalate in food.

Keywords: dibutyl phthalate; polyclonal antibody; enzyme-linked immunosorbent assay; food analysis

邻苯二甲酸酯(PAEs)类塑化剂主要添加在塑料中,用来提高其柔软度及延展性^[1-2],产量大、种类多,广泛存在于食品容器、玩具、乙烯基涂料、油漆和香水中^[3]。邻苯二甲酸酯类塑化剂与塑料基质不以化学键结合,随着时间、温度和 pH 值等的影响,它会从塑料制品中不断迁移到环境或食品中,进而进入人体^[4]。

邻苯二甲酸酯类塑化剂稳定性高,具有生物富集作用和雌激素效应,会干扰机体内正常的激素水平,可能会引起生殖系统异常致畸、致癌等。此外,邻苯二甲酸酯类塑化剂不易降解,会对环境造成污染,已成为全球普遍的污染物之一^[5-7]。邻苯二甲酸二丁酯(DBP)是邻苯二甲酸酯类塑化剂中应用最广泛的一种,最容易从塑料包装膜中向被包装食品迁移,具有肝脏毒性和生殖毒性,会引发动物肝脏病变和精子畸变率增高^[8-9]。中国 2016 年发布的 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》,要求邻苯二甲酸二丁酯生产的材料或制品不得用于接触脂肪性、乙醇含量高于 20% 的食品以及婴幼儿食品,最大残留量和特定迁移限量为

基金项目:天津市科技计划项目(编号:16PTSJJC00130);天津科技大学省部共建食品营养与安全国家重点实验室开放基金(编号:SKLFNS-KF-201819)

作者简介:尚淑娜,女,天津科技大学在读硕士研究生。

通信作者:王硕(1969—),男,天津科技大学教授,博士。

E-mail: s.wang@tust.edu.cn

收稿日期:2019-01-03

0.3 mg/kg。GB 6675.1—2014 中规定儿童玩具和儿童护理产品中邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸丁基苯酯(BBP)和邻苯二甲酸(2-乙基)己酯(DEHP)物质含量的总和不得超过 0.1%。

对于邻苯二甲酸酯的检测,目前主要采用气相色谱法^[10-12]、气相色谱—质谱法^[13-14]、液相色谱法^[15-16]、液相色谱—质谱法^[17]等。这些仪器检测方法前处理过程较为繁琐,且仪器昂贵、耗时长、操作过程复杂,不适于样品的现场分析和大量样品的检测。相比较仪器方法而言,免疫分析方法具有灵敏度高、特异性好、成本低和易操作等特点。本研究拟以邻苯二甲酸二丁酯(DBP)为研究对象,以 4-氨基邻苯二甲酸为原料,通过酯化反应合成半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯(DBAP),利用重氮化法合成免疫原,得到抗邻苯二甲酸二丁酯的抗体,进而建立间接竞争 ELISA 方法,用于检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

4-氨基邻苯二甲酸:纯度 95%,萨恩化学技术(上海)有限公司;

正丁醇、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)、脱脂乳粉、乙酸乙酯、石油醚、甲醇:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

钥孔血蓝蛋白(KLH)、牛血清白蛋白(BSA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂:美国 Sigma 公司;

雄性新西兰大白兔:3 月龄,体重 1.5 kg,北京兴隆实验动物养殖场。

1.1.2 主要仪器设备

超纯水系统:Milli-Q Integral 型,美国 MILLIPORE 公司;

洗板机:MTS 2/4 digital 型,美国 BIO-RAD 公司;

酶标仪:F200 PRO 型,美国 Thermo 公司;

蛋白纯化仪:731-8300 型,美国 BIO-RAD 公司;

分析天平:BL610 型,赛多利斯仪器(北京)系统有限公司;

紫外分光光度计:Evolution 300 型,美国 Varian 公司;

气质联用仪:4000MS 型,美国 Varian 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯(DBAP)的合成与鉴定

(1) 将 4.5 g 4-氨基邻苯二甲酸加入到 15 mL 正丁醇中,超声 20 min,在搅拌条件下缓慢加入浓硫酸至液体呈透明,120 °C 回流反应 6~7 h。

(2) 减压蒸馏除去未反应的正丁醇和水 2~3 h,反应

完成后趁热倒入冰水中,用乙酸乙酯萃取水层,并用 10% 的 Na₂CO₃ 调节 pH 至碱性,用分液漏斗分离,重复萃取,合并萃取液,旋蒸去除乙酸乙酯,得浅黄色固体。

(3) 将得到的浅黄色固体用硅胶板进行纯化。展开剂为体积比 1:3 的乙酸乙酯—石油醚混合液,将所需要的条带刮下后加入乙酸乙酯浸泡、涡旋振荡,离心后,取有机相过 0.22 μm 有机膜,重复几遍后,合并所得到的有机相,旋蒸,最终得到淡黄色的固体,然后进行质谱鉴定。

1.2.2 人工抗原的合成与鉴定 取 1.17 mg 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯(DBAP)溶解于 100 μL 的 DMF,加入到 1 mL 0.1 mol/L 预冷盐酸中,置冰浴中搅拌;逐滴加入 1 mol/L 的 NaNO₂ 溶液(5~10 μL)至淀粉碘化钾试纸变成深紫色,继续避光搅拌 30 min,加入尿素,使试纸不再显色;将 20 mg KLH 用 2 mL 碳酸钠缓冲液(pH=9.5)溶解,缓慢加入到上述重氮盐中,加入 1 mol/L 的氢氧化钠溶液,使溶液 pH 值维持在 9.0~9.5,溶液逐渐变为橙红色。在 4 °C 下避光搅拌反应 3 h,PBS 透析 3 d,得到免疫抗原(DBAP-KLH)。同样按上述方法制得包被抗原(DBAP-BSA)。

用紫外分光光度法观察 DBAP-KLH/BSA,DBAP 和载体蛋白 KLH/BSA 的特征吸收峰的变化情况,鉴定人工抗原是否成功偶联。

1.2.3 抗体制备与纯化 选取体重约 1.5 kg 的新西兰大白兔(3 个月),采用皮下多点注射方式制备抗体。将等量的免疫原和弗氏完全佐剂乳化后进行初次免疫,在之后的加强免疫中使用弗氏不完全佐剂代替弗氏完全佐剂。每次免疫后 7~8 d,耳静脉采血进行抗血清效价及特异性测定,在最后一次免疫后的 8~10 d 取全血,8 000 r/min 离心后分装冻存在 -20 °C 冰箱,使用 Protein A-Sepharose 4B 柱对兔抗血清进行纯化,制得多克隆抗体。

1.2.4 间接竞争 ELISA 方法检测步骤 将 DBAP-BSA 包被抗原用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释至一定浓度后,96 孔酶标板每孔中加入 100 μL,4 °C 过夜(12~14 h)或 37 °C 放置 3 h,洗板 3 次,在滤纸上拍干;每孔加入 200 μL 封闭液,37 °C 放置 1 h,洗板 3 次,拍干;加入 50 μL DBP 标准溶液或者待测样品和 50 μL 一定稀释倍数的抗体,37 °C 孵育 1 h,洗板 4 次,拍干;加入 100 μL/孔酶标二抗(HRP-羊抗兔 IgG),37 °C 孵育 30 min,洗板 5 次,拍干;每孔加入 100 μL 的底物显色液,37 °C 孵育 10~20 min,加入终止液 50 μL。用酶标仪测定其在 450 nm 下的吸光度值。

1.2.5 间接竞争 ELISA 方法条件优化

(1) 包被量及抗体稀释倍数的优化:选取 0.01,0.05,0.10,0.50 μg/孔的包被量和不同的抗体稀释倍数组合进行间接竞争 ELISA 方法的建立,计算不同包被量下的抗

体稀释倍数分别对应的 IC_{50} 值。选取 OD_{450} 值在 1 左右并且 IC_{50} 值最小的组合作为最优的条件,进行后续试验。

(2) 封闭液的优化:选取 0.50% 脱脂乳粉、1.00% 脱脂乳粉、0.50% OVA 和 1.00% OVA 作为封闭液进行间接竞争 ELISA 方法的建立,分别计算 IC_{50} 值,确定 OD_{450} 在 1 左右且 IC_{50} 值最小的作为最适封闭液。

(3) 邻苯二甲酸二丁酯多克隆抗体间接竞争 ELISA 标准曲线的建立:在最佳条件下,将邻苯二甲酸二丁酯标准品从 5 000 $\mu\text{g/L}$ 开始,以 3 倍梯度稀释 10 个浓度梯度,进行间接竞争 ELISA 测定,以邻苯二甲酸二丁酯标准溶液浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,用 Origin 9.1 绘制标准曲线进行拟合,并计算 IC_{50} 和 IC_{15} 的值。

1.2.6 特异性测定 选取邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二丙酯、邻苯二甲酸二异丁酯等 18 种邻苯二甲酸二丁酯的结构类似物进行交叉反应的测定,以评估邻苯二甲酸二丁酯抗体的特异性,交叉反应率 (CR) 越小,则说明抗体对该目标物的特异性越高,CR 按式(1)计算:

$$CR = \frac{IC_{50}(\text{DBP})}{IC_{50}(\text{结构类似物})} \times 100\%, \quad (1)$$

式中:

CR——交叉反应率, %;

$IC_{50}(\text{DBP})$ ——抑制率为 50% 时所对应的 DBP 的浓度, $\mu\text{g/L}$;

$IC_{50}(\text{结构类似物})$ ——抑制率为 50% 时所对应的 DBP 结构类似物的浓度, $\mu\text{g/L}$ 。

1.2.7 样品处理

(1) 白酒:取 2 mL 白酒样品,用 PBS 稀释 3 倍后用于检测。

(2) 牛奶:取 2 mL 牛奶样品,加入 3% 的三氯乙酸,沉降牛奶中的蛋白质,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加入 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH 值至中性,用 PBS 稀释 2 倍后用于检测。

(3) 食用油:称取 1.0 g 食用油样品,加入 5 mL 乙腈,涡旋 1 min,4 000 r/min 离心 2 min,收集上清液,重复提取 1 遍,将 2 次收集的上清液混合,旋蒸至干,加入 2 mL 甲醇混合后在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下冷冻 2 h,4 000 r/min 离心 2 min,取上清液浓缩至近干,加入 2 mL 含 5% 甲醇的 PBS 样本稀释液复溶^[18]。

1.2.8 添加回收率的测定 在选取的样品中分别添加 0, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/L}$ 浓度的 DBP 标准溶液,每个浓度做 3 个平行,按 1.2.7 中方法进行样品的处理,进行间接竞争 ELISA 的测定,计算回收率。

1.2.9 气相色谱—质谱法仪器方法验证 参考 GB 5009.271—2016,选用 GC-MS(气相色谱—质谱法)对本试验建立的方法进行验证,确定方法的准确性。

2 结果与分析

2.1 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯的合成与鉴定

合成的半抗原 DBAP 的分子量为 293,由图 1 可以看出其负离子 (MS-1) 为 292.23,与其分子量相符,可以证明半抗原 DBAP 合成成功。

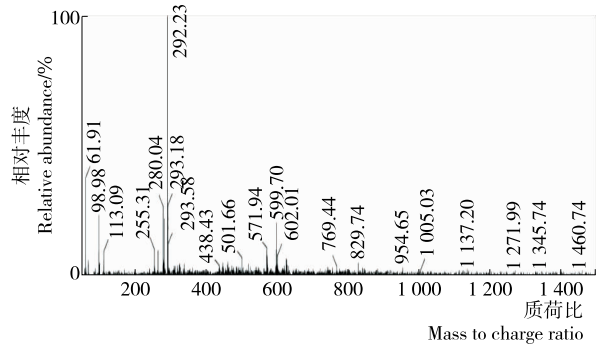


图 1 半抗原 DBAP 的表征质谱图

Figure 1 Mass spectrum of haptin DBAP

2.2 人工抗原的紫外鉴定

用紫外分光光度计对半抗原、载体蛋白和偶联物进行测定,结果如图 2 所示。由图 2 可以看出:KLH 与 BSA 蛋白在紫外下的吸收波长为 280 nm,半抗原 DBAP 在 285 nm 左右有特征吸收峰,半抗原与蛋白质偶联物 DBAP-BSA 和 DBAP-KLH 的特征吸收峰与 KLH 和 BSA 蛋白相比发生了明显的改变,说明人工免疫抗原与包被抗原制备成功。

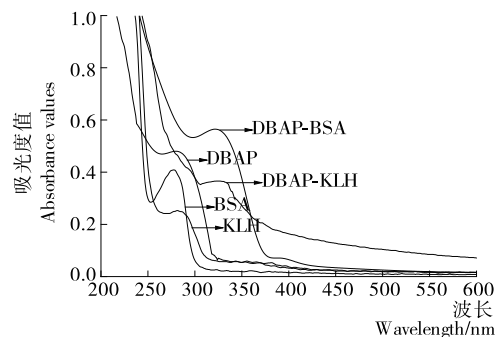


图 2 DBP、KLH/BSA、DBAP-KLH/BSA 紫外可见光谱

Figure 2 UV-Vis spectra of DBP, KLH/BSA, DBAP-KLH/BSA

2.3 间接竞争 ELISA 方法条件优化

2.3.1 包被量及抗体稀释倍数的优化 由表 1 可以看出:包被量一定时,随着抗体稀释倍数增加, OD_{450} 值降低, IC_{50} 值呈下降趋势;比较不同包被量的 IC_{50} 值和 OD_{450} 值,当包被量为 0.05 $\mu\text{g/孔}$,抗体稀释倍数为 5 000 时, IC_{50} 值较低,且其 OD_{450} 值在 1 左右。因此选择包被量为 0.05 $\mu\text{g/孔}$,抗体稀释倍数为 5 000 作为最优条件进行试验。

表 1 包被量及抗体稀释倍数的优化

Table 1 Optimization of coating amount and antibody dilution factor

| 包被抗原包被量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{Well}^{-1}$) | 抗体稀释倍数 | OD_{450} | $IC_{50}/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) |
|--|-----------|------------|---|
| 0.01 | 1 : 2 500 | 1.210 | 49.05 |
| | 1 : 3 500 | 1.050 | 44.97 |
| | 1 : 4 500 | 0.836 | 43.53 |
| 0.05 | 1 : 4 000 | 1.293 | 47.86 |
| | 1 : 5 000 | 0.978 | 42.58 |
| | 1 : 6 000 | 0.759 | 40.34 |
| 0.10 | 1 : 4 000 | 1.481 | 48.46 |
| | 1 : 5 000 | 1.196 | 45.66 |
| | 1 : 6 000 | 0.864 | 43.90 |
| 0.50 | 1 : 5 000 | 1.350 | 49.54 |
| | 1 : 6 000 | 1.143 | 46.78 |
| | 1 : 7 000 | 0.928 | 44.93 |

2.3.2 封闭液的优化 由图 3 可知:封闭液的种类会对 OD_{450} 和 IC_{50} 值产生影响。当选用 0.50% 的脱脂乳粉作为封闭液时,所得到的 IC_{50} 值最低,并且 OD_{450} 值在 1 左右,故选用 0.50% 的脱脂乳粉作为封闭液进行试验。

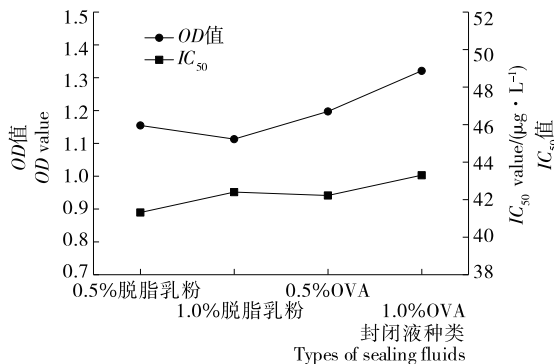


图 3 封闭液的优化

Figure 3 Optimization of blocking solution

2.3.3 邻苯二甲酸二丁酯多克隆抗体间接竞争 ELISA 标准曲线的建立 根据优化的条件,选用 0.05 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 的包被量,5 000 倍的抗体稀释倍数,0.50% 的脱脂乳粉作为封闭液,2 万倍的二抗稀释倍数,DBP 标准品从 5 000 $\mu\text{g}/\text{L}$ 开始进行 3 倍梯度稀释,显色 15 min 左右,建立间接竞争 ELISA 方法,得出目标物 DBP 的标准曲线如图 4 所示。由图 4 可知:方法的灵敏度 (IC_{50}) 和检测限 (IC_{15}) 分别是 $(40.68 \pm 0.35) \mu\text{g}/\text{L}$ 和 $(1.98 \pm 0.15) \mu\text{g}/\text{L}$ 。

2.4 特异性测定

用间接竞争 ELISA 方法对邻苯二甲酸二丁酯的结构类似物进行特异性检测,结果如表 2 所示。

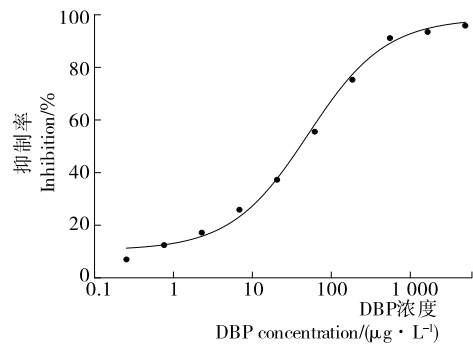


图 4 DBP 间接竞争 ELISA 标准曲线

Figure 4 Standard curve of indirect competition ELISA for DBP

表 2 DBP 多克隆抗体与其他结构类似物的交叉反应 Table 2 Cross-reactivity of DBP polyclonal antibodies with other structural analogs

| 名称 | $IC_{50}/(\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ | CR/% |
|--------------------------|---|--------|
| 邻苯二甲酸二丁酯(DBP) | 40.68 | 100.00 |
| 邻苯二甲酸二甲酯(DMP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二乙酯(DEP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二丙酯(DPRP) | 458.70 | 8.90 |
| 邻苯二甲酸二戊酯(DPP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二己酯(DHXP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二环己酯(DCHP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二壬酯(DNP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸(2-乙基)己酯(DEHP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP) | 472.30 | 8.60 |
| 邻苯二甲酸二异壬酯(DINP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二苯酯(DPHP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸丁基苄酯(BBP) | 684.50 | 5.90 |
| 邻苯二甲酸二(4-甲基-2 戊基)酯(BMPP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯(DEEP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯(DMEP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸二(2-丁氧基)乙酯(DBEP) | — | <0.01 |
| 邻苯二甲酸(PA) | — | <0.01 |

由表 2 可以看出:所制备的抗体与 DPRP、DIBP 和 BBP 有较低的交叉反应,交叉率都低于 10%。可能是因为它们的结构较为相似,与其他结构类似物都无交叉反应。因此,邻苯二甲酸二丁酯的结构类似物对本方法的建立无影响,所获得的邻苯二甲酸二丁酯抗体特异性较好。

2.5 样品的测定

在白酒、牛奶、食用油样品中,分别添加 0,10,20,50,100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度的邻苯二甲酸二丁酯标准溶液,每个浓度做 3 个平行,处理后进行间接竞争 ELISA 的测定,结果如表 3 所示。由表 3 可以得知:添加回收率在 84.57%~102.40%。同时,采用气相色谱—质谱法(GC-MS)对间接

竞争 ELISA 方法进行验证,线性方程为: $y=31\ 355x+184\ 546$, $R^2=0.999\ 8$,添加回收率在 85.14%~96.83%。将两种方法进行相关性分析,结果见图 5。由图 5 可知:两种方法具有良好的相关性($R^2=0.990\ 8$),证明本试验所建立的间接竞争 ELISA 方法较为准确,可以对白酒、牛奶、食用油中的邻苯二甲酸二丁酯进行检测。

表 3 ELISA 和 GC-MS 添加回收结果

Table 3 The recovery results of ELISA and GC-MS ($n=3$)

| 样品 | 添加浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | ELISA | | GC-MS | |
|-----|--|--|-------------|--|------------|
| | | 检测浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | 平均回收率/% | 检测浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) | 平均回收率/% |
| 白酒 | 0 | — | — | — | — |
| | 10 | 9.16±0.53 | 91.63±5.28 | 8.51±0.26 | 85.14±2.63 |
| | 20 | 20.48±0.68 | 102.40±3.40 | 17.85±0.80 | 89.24±3.99 |
| | 50 | 47.40±1.96 | 94.79±3.91 | 46.19±1.11 | 92.38±2.21 |
| | 100 | 98.54±5.33 | 98.54±5.33 | 95.21±2.37 | 95.21±2.37 |
| 牛奶 | 0 | — | — | — | — |
| | 10 | 8.51±0.42 | 85.11±4.21 | 8.66±0.64 | 86.57±6.37 |
| | 20 | 17.48±1.09 | 87.40±5.44 | 17.97±0.88 | 89.84±4.39 |
| | 50 | 46.09±2.81 | 92.17±5.61 | 43.72±2.05 | 87.43±4.09 |
| | 100 | 94.36±2.53 | 94.36±2.53 | 92.65±1.41 | 92.65±1.41 |
| 食用油 | 0 | 32.14±2.85 | — | 36.01±1.96 | — |
| | 10 | 40.60±0.36 | 84.57±3.64 | 44.65±0.15 | 86.40±1.48 |
| | 20 | 49.26±0.40 | 85.58±1.98 | 53.61±0.58 | 87.98±2.89 |
| | 50 | 76.92±2.26 | 89.55±4.52 | 81.81±0.93 | 91.59±1.85 |
| | 100 | 127.82±5.67 | 95.68±5.67 | 132.85±2.53 | 96.83±2.53 |

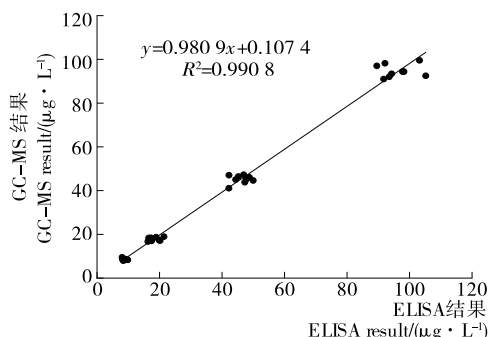


图 5 ELISA 和 GC-MS 检测结果相关性

Figure 5 Comparison of ELISA and GC-MS results

3 结论

本试验直接将 4-氨基邻苯二甲酸作为合成原料,通过酯化反应合成半抗原 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯,与之前文献^[19-20]报道的合成步骤相比,无需经过 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯的硝基还原,整个合成过程更简单。试验建立的间接竞争 ELISA 方法的 IC_{50} 值为 40.68 $\mu\text{g}/\text{L}$,最低检测限 IC_{15} 为 1.98 $\mu\text{g}/\text{L}$,对邻苯二甲酸二丁酯具有较好的特异性。样品中邻苯二甲酸二丁酯的检测方法与

GC-MS 测定结果有较好的一致性($R^2=0.990\ 8$),证明该方法具有很好的准确性,可以用于食品中邻苯二甲酸二丁酯的检测。本研究方法的灵敏度还不够高,今后可以借助新型荧光标记材料建立新方法提高检测灵敏度。

参考文献

- [1] 李冰,李玉双.邻苯二甲酸酯检测方法的研究进展[J].北方园艺,2017(18):175-179.
- [2] GONZALEZ-SALAMO J, SOCAS-RODRIGUEZ B, HEMANDEZ-BORGES J. Analytical methods for the determination of phthalates in food[J]. Current Opinion in Food Science, 2018, 22: 122-136.
- [3] LEE K S, LIM Y H, KIM K N, et al. Urinary phthalate metabolites concentrations and symptoms of depression in an elderly population[J]. Science of the Total Environment, 2018, 625: 1 191-1 197.
- [4] CUI Xi-ping, WU Pan-pan, LAI Dan, et al. Development of a highly specific fluorescence immunoassay for detection of diisobutyl phthalate in edible oil samples[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015, 63(42): 9 372-9 378.

(下转第 155 页)

- 国轻工业出版社, 2009: 14-20.
- [7] 张洁天, 让庆澜. 核磁共振成像一维空间频率编码教学实验研究: 全国高等学校物理实验教学研讨会[J]. 物理实验, 2006(10): 3-8, 13.
- [8] 杨晓静, 赵茹茜, 陈杰, 等. 猪背最长肌纤维类型的发育性变化及其品种和性别特点[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(1): 90-95.
- [9] HONIKEL K O. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat[J]. Meat Science, 1998, 49(4): 447-457.
- [10] 牛力. 冻结和冻藏对鸡胸肉食用品质的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2012: 25-26.
- [11] MARIANNE N L, MARCHEN S H. The combined effect of antioxidants and modified atmosphere packaging on protein and lipid oxidation in beef patties during chill storage[J]. Meat Science, 2007, 76(2): 226-233.
- [12] 谢小雷, 李侠, 张春晖, 等. 牛肉干中红外—热风组合干燥工艺中水分迁移规律[J]. 农业工程学报, 2014, 30(14): 322-330.
- [13] 张楠, 庄昕波, 黄子信, 等. 低场核磁共振技术研究猪肉冷却过程中水分迁移规律[J]. 食品科学, 2017, 38(11): 103-109.
- [14] 吕彤, 林俊杰, 周昌瑜, 等. 热处理强度对猪肉肌球蛋白结构及风味成分吸附特性的影响[J]. 农业工程学报, 2016, 32(8): 285-291.
- [15] 黄鸿兵. 冷冻及冻藏对猪肉冰晶形态及理化品质的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2005: 1-8.
- [16] 庞之列, 殷燕, 李春保. 解冻猪肉品质和基于 LF-NMR 技术的检测方法[J]. 食品科学, 2014, 35(24): 219-223.
- [17] DENG Y, ROSENVOLD K, KARLSSON A H, et al. Relationship Between Thermal Denaturation of Porcine Muscle Proteins and Water-holding Capacity[J]. Journal of Food Science, 2010, 67(5): 1 642-1 647.
- [18] 霍晓娜, 李兴民, 刘毅, 等. 猪腿肉脂肪酸组成及脂肪氧化的研究[J]. 食品科学, 2006, 27(1): 79-82.
- [19] BERTRAM H C, KARLSSON A H, RASMUSSEN M, et al. Origin of Multiexponential T2 Relaxation in Muscle Myowater[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(6): 3 092-3 100.
- [20] 夏列, 蒋爱民, 卢艳, 等. 不同冷冻方式下猪肉贮藏期持水力的变化[J]. 食品与机械, 2013, 29(2): 154-158.
- [21] RYU Y C, CHOI Y M, KIM B C. Variations in metabolite contents and protein denaturation of the longissimus dorsi muscle in various porcine quality classifications and metabolic rates[J]. Meat Science, 2005, 71(3): 522-529.
- [22] 周爱梅, 曾庆孝, 刘欣, 等. 冷冻鱼糜蛋白在冻藏中的物理化学变化及其影响因素[J]. 食品科学, 2003, 24(3): 135-139.
- [23] KAALE L D, EIKEVIK T M. The influence of superchilling storage methods on the location/distribution of ice crystals during storage of Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Food Control, 2015, 52(3): 19-26.
- [24] SANCHEZ-ALONSO I, MORENO P, CARECHE M. Low field nuclear magnetic resonance (LF-NMR) relaxometry in hake (*Merluccius merluccius*, L.) muscle after different freezing and storage conditions[J]. Food Chemistry, 2014, 153(12): 250-257.
-
- (上接第 71 页)
- [5] 刘庆, 杨红军, 史衍玺, 等. 环境中邻苯二甲酸酯类(PAEs) 污染物研究进展[J]. 中国生态农业学报, 2012, 20(8): 968-975.
- [6] 陈荣圻. 邻苯二甲酸酯增塑剂对人类健康的危害性[J]. 印染助剂, 2016, 33(2): 1-7.
- [7] 刘慧杰, 舒为群. 邻苯二甲酸酯类化合物的毒理学效应及对人群健康的危害[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(19): 1 778-1 781.
- [8] 陆嘉莉, 赵家雄, 谢威, 等. 塑料食品接触材料中邻苯二甲酸酯的迁移研究[J]. 轻工科技, 2018, 34(11): 10-11.
- [9] 纪红蕊, 杜霞, 宋永彬, 等. 邻苯二甲酸二丁酯的毒性作用及机制[J]. 沈阳工业大学学报, 2017, 39(2): 230-235.
- [10] 杨莹莹. 气相色谱法测定食醋中邻苯二甲酸二丁酯及其不确定度评定[J]. 中国酿造, 2017, 36(1): 171-175.
- [11] 王建娥, 苏凤仙, 杨玲, 等. 气相色谱法测定工业废水中邻苯二甲酸二丁酯含量[J]. 合成技术及应用, 2016, 31(3): 48-52.
- [12] 杨瑛, 樊文娟. GC-FID 法测定塑料包材中 16 种邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 食品科学, 2013, 34(20): 250-254.
- [13] 闫茗. 气相色谱—质谱法检测食品中增塑剂[J]. 现代食品, 2018(11): 121-122, 126.
- [14] 罗静, 王英, 谢红. GCMS 法测定白酒中邻苯二甲酸二丁酯(DBP)的不确定度评定[J]. 食品与发酵科技, 2016, 52(2): 82-83, 100.
- [15] 王少杰, 孟雨吟, 李秋顺, 等. 高效液相色谱法测定蔬菜中邻苯二甲酸二丁酯残留[J]. 山东农业科学, 2012, 44(1): 112-114.
- [16] 韩敏, 樊晓涛, 郭艳利, 等. 高效液相色谱法测定简易塑料手套中邻苯二甲酸二丁酯的研究[J]. 应用化工, 2015, 44(11): 2 018-2 021.
- [17] 孙春峰, 秦芳. 化妆品塑料包装中邻苯二甲酸酯含量的测定[J]. 塑料工业, 2018, 46(1): 95-98.
- [18] 金雯. 食品中邻苯二甲酸二丁酯(DBP)IC-ELISA 检测方法的建立及初步应用[D]. 长春: 吉林大学, 2016: 33.
- [19] 张明翠, 庄惠生, 郎庆. 邻苯二甲酸二丁酯免疫检测 I: 人工抗原的制备及表征[J]. 应用化学, 2006, 23(8): 850-853.
- [20] 刘媛媛, 陈奇娜, 徐光辉, 等. 邻苯二甲酸酯类半抗原的设计合成与抗原制备[J]. 精细化工, 2018, 35(3): 534-540.