



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102520153 A

(43) 申请公布日 2012.06.27

(21) 申请号 201110420216.X

(22) 申请日 2011.12.15

(71) 申请人 安徽师范大学

地址 241000 安徽省芜湖市弋江区花津南路  
安徽师范大学

(72) 发明人 张明翠 胡玉嵘 焦莉娟

(74) 专利代理机构 芜湖安汇知识产权代理有限公司 34107

代理人 方南

(51) Int. Cl.

G01N 33/542(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

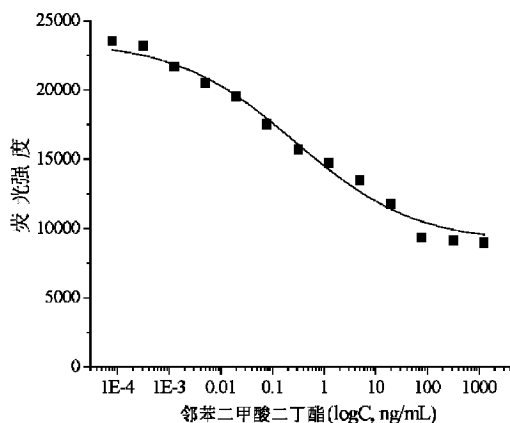
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法,包括以下步骤:a:抑制曲线的建立步骤、b:样品的检测步骤,本发明与现有技术相比,具有灵敏度高、快速、特异性强,方法简单、耗时短,适合环境污染物 DBP 的快速分析,而且对邻苯二甲酸酯的测定有着重要意义。



1. 一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法,包括以下步骤:

a:抑制曲线的建立步骤:

在建立邻苯二甲酸二丁酯的抑制曲线之前,先配制不同浓度的标准品:邻苯二甲酸二丁酯标准品用 1-2mL 的无水乙醇溶解后,用稀释液稀释至一系列浓度,分别为 1100ng/mL、366ng/mL、122ng/mL、40ng/mL、13ng/mL、4.5ng/mL、1.5ng/mL、0.5ng/mL、0.16ng/mL、0.055ng/mL、0.018ng/mL、0.006ng/mL。竞争时加入这一系列浓度的标准液,测定结果的平均值经过 Origin6.0 软件处理后绘制成抑制曲线;

(1) 包被步骤:

用浓度为 5  $\mu$ g/mL 的邻苯二甲酸二丁酯包被抗原包被 96 孔酶标板,每孔 100  $\mu$ L,放置培养箱 37 $^{\circ}$ C 温育 2h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;

(2) 封闭步骤:

在包被好的酶标准版中加入 1% 卵清蛋白溶液,每孔 150  $\mu$ L,37 $^{\circ}$ C 温育 30min 后,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;

(3) 竞争步骤:

每孔加入 50  $\mu$ L 邻苯二甲酸二丁酯标准溶液和 50  $\mu$ L 荧光标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;

(4) 检测步骤:

用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为 485nm,发射波长为 528nm 时的荧光强度;

b:样品的检测步骤

除 (3) 竞争步骤:每孔加入 50  $\mu$ L 样品溶液和 50  $\mu$ L 的荧光标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;外,其余与 a:抑制曲线的建立步骤相同。

2. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法,其特征在于:

除 (3) 竞争步骤:每孔加入 25  $\mu$ L 样品和 25  $\mu$ L 邻苯二甲酸二丁酯标准溶液,再加入 50  $\mu$ L 荧光标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;外,其余与 a:抑制曲线的建立步骤相同。

3. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法,其特征在于:

所述的邻苯二甲酸二丁酯包被抗原通过以下方法制备:

称取 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 0.0248g,溶于 50  $\mu$ L 浓盐酸 (12mol/L) 中,加入 1.5mL 蒸馏水,在冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 中搅拌;加入 2mL 0.1mol/L 的 NaNO<sub>2</sub> 溶液,搅拌 30min 后,再加入 0.001g 尿素,除去未反应的 NaNO<sub>2</sub>;

再加入 20mL 溶有 80mg 卵清蛋白的四硼酸钠的溶液中 (pH = 9.18),冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 搅拌 3-6h 后,将反应液装入透析袋,在蒸馏水中透析 5 天,每天换水两次,得棕红色邻苯二甲酸二丁酯包被抗原溶液。

4. 根据权利要求 1 所述的一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法,其特征在于:

所述的荧光标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体的制备步骤,包括免疫抗原的制备步骤、抗体的制备步骤、荧光标记步骤:

所述的荧光标记步骤:

称取 N-羟基丁二酰亚胺 0.004g, N, N' -二环己基碳酰亚胺 0.006g, 和氟硼二吡咯衍生物 10.4mg, 溶于 1mL 无水的二甲基甲酰胺溶液中, 室温 (20-25°C) 搅拌过夜; 第二天, 在上述溶液中加入 500  $\mu$ L 1,4-二氧杂环乙烷, 室温 (20-25°C) 搅拌 30min;

将 250  $\mu$ L 抗邻苯二甲酸二丁酯抗体与 750  $\mu$ L 0.05mol/L, pH 7.3 磷酸缓冲液混匀后, 逐滴加入上述溶液中, 室温搅拌 2h 后, 全部转移入透析袋中, 在 0.05mol/L, pH 7.3 磷酸缓冲液中透析过夜, 次日从透析袋中取出合成的溶液装入离心管中, 避光低温 (0-4°C) 保存待用;

5. 根据权利要求 4 所述的一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法, 其特征在于:

所述的抗邻苯二甲酸二丁酯抗体通过以下方法制备:

免疫抗原的制备步骤:

称取 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 0.0248g, 溶于 50  $\mu$ L 浓盐酸 (12mol/L) 中, 并加入 1.5mL 蒸馏水, 在冰水浴 (0-4°C) 中搅拌; 加入 2mL 0.1mol/L 的  $\text{NaNO}_2$  溶液, 搅拌 30min 后, 再加入 0.001g 尿素, 除去未反应的  $\text{NaNO}_2$ ;

再加入 20mL 溶有 80mg 牛血清蛋白的四硼酸钠的溶液, 冰水浴 (0-4°C) 搅拌 3-6h 后, 将反应液装入透析袋, 在蒸馏水 (pH = 7.0) 中透析 5 天, 每天换水两次, 得棕红色邻苯二甲酸二丁酯免疫抗原溶液;

抗体的制备步骤:

将棕红色邻苯二甲酸二丁酯免疫抗原溶液与弗氏佐剂以 1 : 1 (v/v) 混溶, 对三只新西兰大白兔进行多次免疫, 第一次动物免疫将免疫抗原与弗氏完全佐剂混溶, 之后的加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶, 经五次免疫后, 制得抗邻苯二甲酸二丁酯抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法, 其特征在于:

所述的免疫步骤为

选用三只月龄 3 个月左右, 体重为 1.5-2kg 左右的健康新西兰雄兔作为免疫对象, 首次注射用含完全弗氏佐剂的抗原进行基础免疫, 之后用含不完全弗氏佐剂的抗原加强免疫: 用剪刀剪去兔背部, 酒精消毒, 采用背部皮下多点注射的方法, 免疫剂量为 0.5mg ~ 1mg/kg/次, 每次背部皮下免疫 10 点, 每次注射 1mL, 3 周后开始加强免疫, 以后每 2 周再次加强免疫, 经 5 次免疫后, 从兔心脏采血, 血清室温 (20-25°C) 静置 0.5-1h, 在冰箱 (4°C) 静止 2h 后吸取上层澄清的血清。

## 一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种邻苯二甲酸二丁酯的检测方法。

### 背景技术

[0002] 2011年4月份以来,在台湾发生的食品添加剂起云剂中加入有害健康的塑化剂事件引起轩然大波。塑化剂是一种对树脂或塑料或橡胶或粘合剂等高分子材料有溶剂化作用的一类功能性化学品,是一种高分子材料助剂,常用的增塑剂是邻苯二甲酸酯。研究信息表明,邻苯二甲酸酯对环境和人体可能存在不良影响。欧盟是最早对邻苯二甲酸酯的应用做出限制的国际组织。欧盟2005/84/EC指令列出了六种邻苯二甲酸酯物质DEHP、DBP、BBP(邻苯二甲酸丁苄酯)、DINP、DIDP(邻苯二甲酸二异癸酯)、DNOP(邻苯二甲酸二正辛酯)进行限制,其中前三种DEHP、DBP、BBP不得用于儿童玩具和用品中,在塑料中的含量每种不得超过0.1%。后三种DINP、DIDP、DNOP不得用于能入口的儿童玩具及儿童类物品中,每种含量不得超过0.1%。

[0003] 目前邻苯二甲酸酯类的检测技术主要有分光光度法、气相色谱法、液相色谱法、红外光谱法、薄层色谱法等。最常采用的检测技术是气相色谱法和液相色谱法,但是监测费用昂贵,需专业人员操作,样品前处理烦琐,很难进行批量处理,难以适应食品业快速诊断的形势。

### 发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题是提供一种灵敏度高、检测限低、快速简便的从食品样品中测定邻苯二甲酸二丁酯的方法。

[0005] 本发明解决技术问题的技术方案为:一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法,包括以下步骤:

[0006] a:抑制曲线的建立步骤:

[0007] 在建立邻苯二甲酸二丁酯的抑制曲线之前,先配制不同浓度的标准品。邻苯二甲酸二丁酯标准品用1-2mL的无水乙醇溶解后,用PBS稀释至一系列浓度,分别为1100ng/mL、366ng/mL、122ng/mL、40ng/mL、13ng/mL、4.5ng/mL、1.5ng/mL、0.5ng/mL、0.16ng/mL、0.055ng/mL、0.018ng/mL、0.006ng/mL。竞争时加入这一系列浓度的标准液,测定结果的平均值经过Origin6.0软件处理后绘制成抑制曲线。

[0008] (1) 包被步骤:

[0009] 用浓度为5 $\mu$ g/mL的邻苯二甲酸二丁酯包被抗原(DBAP-OVA)包被96孔酶标板,每孔100 $\mu$ L,放置培养箱37 $^{\circ}$ C温育2h后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤3-5min,总共洗涤3次。

[0010] (2) 封闭步骤:

[0011] 在包被好的酶标准版中加入1%卵清蛋白(OVA)溶液,每孔150 $\mu$ L,封闭没有包被抗原的多余的部分,避免抗体的非特异吸附在酶标板上。37 $^{\circ}$ C温育30min后,甩掉孔内溶

液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;

[0012] (3) 竞争步骤:

[0013] 每孔加入 50  $\mu$ L 邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 标准溶液和 50  $\mu$ L 荧光标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;以除去游离的 DBP 及抗体结合物。

[0014] (4) 检测步骤:

[0015] 用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为 485nm,发射波长为 528nm 时的荧光强度。

[0016] b:样品的检测步骤

[0017] 除 (3) 竞争步骤:每孔加入 50  $\mu$ L 样品溶液和 50  $\mu$ L 的荧光标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;外,其余与 a:抑制曲线的建立步骤相同。

[0018] 为了建立方法的重复性好,以及检测的准确度,需要在样品中加入标准品,进行加标回收实验。

[0019] 除 (3) 竞争步骤:每孔加入 25  $\mu$ L 样品和 25  $\mu$ L 邻苯二甲酸二丁酯标准溶液,再加入 50  $\mu$ L 荧光标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次;外,其余与 a:抑制曲线的建立步骤相同。

[0020] 所述的邻苯二甲酸二丁酯包被抗原通过以下方法制备:

[0021] 称取 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 0.0248g,溶于 50  $\mu$ L 浓盐酸 (12mol/L) 中,加入 1.5mL 蒸馏水,在冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 中搅拌。缓慢加入 2mL 0.1mol/L 的 NaNO<sub>2</sub> 溶液,搅拌 30min 后,再加入 0.001g 尿素,除去未反应的 NaNO<sub>2</sub>。再缓慢加入 20mL 溶有 80mg 卵清蛋白 (OVA) 的四硼酸钠的溶液中 (pH = 9.18),冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 搅拌 3-6h 后,将反应液装入透析袋 (MWC0:Nominal:8,000-14,000),在蒸馏水 (pH = 7.0) 中透析 5 天,每天换水两次,得棕红色邻苯二甲酸二丁酯包被抗原溶液。

[0022] 所述的荧光标记的邻苯二甲酸二丁酯抗体,通过以下方法制备:

[0023] 免疫抗原的制备步骤:

[0024] 称取 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 0.0248g,溶于 50  $\mu$ L 浓盐酸 (12mol/L) 中,并加入 1.5mL 蒸馏水,在冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 中搅拌;缓慢加入 2mL 0.1mol/L 的 NaNO<sub>2</sub> 溶液,搅拌 30min 后,再加入 0.001g 尿素,除去未反应的 NaNO<sub>2</sub>;

[0025] 再缓慢加入 20mL 溶有 80mg 牛血清蛋白 (BSA) 的四硼酸钠的溶液中 (pH = 9.18),冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 搅拌 3-6h 后,将反应液装入透析袋 (MWC0:Nominal:8,000-14,000),在蒸馏水 (pH = 7.0) 中透析 5 天,每天换水两次,得棕红色邻苯二甲酸二丁酯免疫抗原溶液

[0026] 抗体的制备步骤:

[0027] 将棕红色邻苯二甲酸二丁酯免疫抗原溶液与弗氏佐剂以 1:1 (v/v) 混溶,对三只新西兰大白兔进行多次免疫,第一次动物免疫将免疫抗原与弗氏完全佐剂混溶,之后的加强免疫是将免疫抗原与弗氏不完全佐剂混溶,经五次免疫后,制得抗邻苯二甲酸二丁酯抗体。

[0028] 荧光标记步骤:

[0029] 称取 N-羟基丁二酰亚胺 0.004g, N, N' - 二环己基碳酰亚胺 0.006g, 和氟硼二吡

咯衍生物 (BODIPY) 10.4mg, 溶于 1mL 无水的二甲基甲酰胺溶液中, 室温 (20-25℃) 搅拌过夜。第二天, 在上述溶液中加入 500 μL 1,4- 二氧杂环乙烷, 室温 (20-25℃) 搅拌 30min ;

[0030] 将 250 μL 抗邻苯二甲酸二丁酯抗体与 750 μL 0.05mol/L, pH 7.3 磷酸缓冲液 (PB 溶液) 混匀后, 逐滴加入上述溶液中, 室温 (20-25℃) 搅拌 2h 后, 全部转移入透析袋 (MWC0 : Nominal :8, 000-14, 000) 中, 在 PB 溶液中透析过夜, 次日从透析袋中取出合成的溶液装入离心管中, 避光低温 (0-4℃) 保存待用 ;

[0031] 所述的弗氏佐剂通过以下方法制备 :

[0032] 将液体石蜡和羊毛脂按 2 : 1 体积比用超声清洗器超声 3-4h, 使之完全混匀, 即滴一滴乳化剂到冰水混合液中半分钟之内不扩散才能算混合完全。此油包水乳化剂称之为不完全佐剂。不完全佐剂低温 (0-4℃) 贮存, 临用前加液体卡介苗即为完全佐剂。

[0033] 所述的免疫步骤为

[0034] 选用三只月龄 3 个月左右, 体重为 1.5-2kg 左右的健康新西兰雄兔作为免疫对象。首次注射用含完全弗氏佐剂的抗原进行基础免疫, 之后用含不完全弗氏佐剂的抗原加强免疫。用剪刀剪去兔背部, 酒精消毒, 采用背部皮下多点注射的方法, 免疫剂量为 0.5mg ~ 1mg/kg/ 次, 每次背部皮下免疫 10 点, 每次注射 1mL。3 周后开始加强免疫, 以后每 2 周再次加强免疫, 经 5 次免疫后, 从兔心脏采血, 血清室温 (20-25℃) 静置 0.5-1h, 在冰箱 (4℃) 静止 2h 后吸取上层澄清的血清。

[0035] 本发明与现有技术相比, 具有以下的特点 :

[0036] 本发明采用荧光信号作为检测信号, 与传统的酶联免疫技术相比, 不需要底物溶液的加入及温育时间, 缩短了操作时间 ; 本发明的检测限为 0.003ng/mL, 与之前的荧光免疫法技术报道的 0.02ng/mL、0.05ng/mL 相比, 均低一个数量级。本发明的灵敏度为 0.66ng/mL, 比之前的荧光免疫法技术报道的 10.53ng/mL 相比, 低两个数量级 ; 本发明通过免疫动物, 制备出了抗 DBP 的多克隆抗体, 通过特异性的考察, 得出制备的抗体具有高度特异性 ; 本发明无需大量的样品前处理过程, 节省了检测时间, 简化了分析过程, 提高了工作效率, 减少了样品处理时的溶剂对测定结果的影响。

[0037] 综上所述, 本发明灵敏度高、快速、特异性强, 方法简单、耗时短, 适合环境污染物 DBP 的快速分析, 而且对邻苯二甲酸酯的测定有着重要意义。

## 附图说明

[0038] 图 1 为实施例本发明的抑制曲线图。

## 具体实施方式

[0039] 下面结合实施例对本发明作详细的说明。

[0040] 牛血清白蛋白 (BSA)、卵清蛋白 (OVA) Sigma 公司

[0041] 液体卡介苗 苗芜湖新芜区医院

[0042] 液体石蜡 上海试剂有限公司

[0043] 羊毛脂 国药集团化学试剂有限公司

[0044] 氟硼二吡咯衍生物 (BODIPY) 见文献 (Jiao LJ, Yu CJ, Liu MM, Wu YC, Cong KB, Meng T, Wang YQ, and Hao EH. Synthesis and Functionalization of Asymmetrical

Benzo-Fused BODIPY Dyes. *J. Org. Chem.* 2010, 75, 6035-6038)

[0045] 其余化学试剂均为分析纯,配制溶液的水均为二次蒸馏水

[0046] 溶液的配制

[0047] (1) 包被缓冲液 (0.05mol/L pH 9.6 碳酸盐缓冲液):称取 1.59g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 2.94g  $\text{NaHCO}_3$ , 加蒸馏水至 1000mL

[0048] (2) 稀释液 (0.01mol/L pH 7.4 磷酸盐缓冲液, PBS): 称取 NaCl 8.0g,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.29g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.96g, KCl 0.1g, 加蒸馏水至 1000mL

[0049] (3) 洗涤液 (0.01mol/L pH 7.4, PBST): PBS 中加入 0.05%吐温 -20

[0050] (4) 封闭液:1%卵清蛋白 (OVA) 溶液

[0051] (5) 透析液 (0.05mol/L pH 7.3, PB):称取  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.897g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  5.999g, 加蒸馏水至 500mL

[0052] 实施例 1:

[0053] 邻苯二甲酸二丁酯的抑制曲线的建立

[0054] (1) 包被步骤:

[0055] 浓度为  $5 \mu\text{g/mL}$  的包被抗原 DBAP-OVA 包被 96 孔酶标板,每孔  $100 \mu\text{L}$ , 放置培养箱  $37^\circ\text{C}$  温育 2h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液 PBST 洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次。

[0056] (2) 封闭步骤:

[0057] 加入 1% OVA 溶液,每孔  $150 \mu\text{L}$ ,封闭没有包被抗原的多余的部分,避免抗体的非特异吸附在酶标板上。 $37^\circ\text{C}$  温育 30min 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,然后同上洗涤。

[0058] (3) 竞争步骤:

[0059] 每孔加入  $50 \mu\text{L}$  DBP 标准溶液和  $50 \mu\text{L}$  荧光物质标记的 DBP 抗体,使之发生竞争反应。 $37^\circ\text{C}$  下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DBP 及抗体结合物。

[0060] (4) 检测步骤:

[0061] 用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为 485nm,发射波长为 528nm 时的荧光强度。

[0062] 将实施例取得的荧光强度信号转化为数值,应用 Origin6.0 软件对其结果作图,如图 1 所示。该抑制曲线在 0.006-1100ng/mL 浓度范围内与荧光强度有良好的线性关系。

[0063] 线性回归方程为  $Y = 8984 + 14556 / [1 + (X/0.66)^{0.379}]$ ,此式中 Y 为荧光强度, X 为 DBP 的浓度。检测限为 0.003ng/mL,计算方法见文献 (Cao YS, Lu YT, Long SY, Hong JB, Sheng GQ. Development of an ELISA for the detection of bromoxynil in water. *Environment International*, 2005, 31, 33-42)。

[0064] 该技术方法的检测限比之前的检测邻苯二甲酸二丁酯的检测限  $0.02 \mu\text{g/L}$  (Zhang MC, Wang QE, Zhuang HS. A novel competitive fluorescence immunoassay for the determination of dibutyl phthalate. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386, 1401-1406),  $0.05 \mu\text{g/L}$  (Zhang MC, Wang QE, Zhuang HS. Determination of dibutyl o-phthalate by antigen-coated competitive fluorescence immunoassay. *Analytical Letters*, 2007, 40, 127-137) 均低一个数量级。

[0065] 在免疫分析中,方法的灵敏度通常用  $\text{IC}_{50}$  表示: $\text{IC}_{50}$  的值越小,表明分析的灵

敏度越高,具体说明见文献(Wang YZ, Wei DP, Yang H, Yang Y, Xing WW, Li Y, Deng AP. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) for detection of Sudan I in food samples. *Talanta*, 2009, 77:1783-1789)。该技术方法的灵敏度为 0.66ng/mL,比之前的相关文献报道灵敏度为 10.53  $\mu$ g/L(Zhang MC, Wang QE, Zhuang HS. A novel competitive fluorescence immunoassay for the determination of dibutyl phthalate. *Anal Bioanal Chem*, 2006, 386, 1401-1406) 低两个数量级。

[0066] 综上所述,该竞争荧光免疫分析法检测邻苯二甲酸二丁酯的检测限和灵敏度都较之前的相关文献数值更低,因此适合实际样品中快速简便地进行邻苯二甲酸二丁酯痕量分析。

[0067] 实施例 2:

[0068] 检测全脂牛奶中的邻苯二甲酸二丁酯的含量及加标回收实验

[0069] 全脂牛奶的预处理步骤:称取 2.0g 全脂牛奶固体粉末(购于芜湖市超市),溶解于 10mL 热(70-90 $^{\circ}$ C)的蒸馏水中,待其冷却后。将 2mL 无水乙醇加入上述 10mL 溶液中,震荡 5min,随后在低温下(0-4 $^{\circ}$ C)10,000 转/分钟离心 10min。离心后,取出试管,去除上层脂肪层,中间的溶液层转移到干净的玻璃容器中,并且用 1mol/L NaOH 或者 1mol/L HCl。调节该溶液 pH 至 7.0,保存在低温(0-4 $^{\circ}$ C)下。

[0070] 1、检测全脂牛奶中的邻苯二甲酸二丁酯的含量

[0071] 除

[0072] (3) 竞争步骤:

[0073] 每孔加入 50  $\mu$ L 处理过的全脂牛奶溶液和 50  $\mu$ L 荧光物质标记的 DBP 抗体溶液,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DBP 及抗体结合物。外,其余与实施例 1 相同。

[0074] 2、全脂牛奶中的邻苯二甲酸二丁酯加标回收实验

[0075] 除

[0076] (3) 竞争:每孔加入 25  $\mu$ L 处理过的全脂牛奶溶液、25  $\mu$ L 指定浓度的 DBP 标准溶液(0.1、1、10ng/mL)和 50  $\mu$ L 荧光物质标记的 DBP 抗体,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DBP 及抗体结合物。外,其余与实施例 1 相同。

[0077] 将实施例取得的荧光强度信号转化为数值,计算结果如表 1 所示。

[0078] 表 1

[0079]

样品	DBP 含量 (ng/mL)	DBP 加入值 (ng/mL)	DBP 测得值 (ng/mL)	回收率(%)
全脂牛奶	0.025	0.1	0.13	105.0
		1	0.95	92.5
		10	9.34	93.2

[0080] 表 1 显示：实际样品全脂牛奶中的 DBP 含量低，回收率在参考范围（80% -120%）内，符合实验要求，说明该发明技术准确度及精密度好。

[0081] 实施例 3：检测液体奶茶中的邻苯二甲酸二丁酯的含量及加标回收实验

[0082] 液体奶茶的预处理步骤：

[0083] 将 2mL 无水乙醇加入 10mL 购买的液体奶茶（购于芜湖市超市）溶液中，震荡 5min，随后在低温下（0-4℃）10,000 转 / 分钟离心 10min。离心后，取出试管，去除上层脂肪层，中间的溶液层转移到干净的玻璃容器中，并且用 1mol/L NaOH 或者 1mol/L HCl 调节该溶液 pH 至 7.0，保存在低温（0-4℃）下。

[0084] 1、检测奶茶中的邻苯二甲酸二丁酯含量

[0085] (1) 包被步骤：

[0086] 浓度为 5 μg/mL 的包被抗原 DBAP-OVA 包被 96 孔酶标板，每孔 100 μL，放置培养箱 37℃ 温育 2h 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，再用洗涤液 PBST 洗涤并甩干，每次洗涤 3-5min，总共洗涤 3 次。

[0087] (2) 封闭步骤：

[0088] 加入 1% OVA 溶液，每孔 150 μL，封闭没有包被抗原的多余的部分，避免抗体的非特异吸附在酶标板上。37℃ 温育 30min 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，然后同上洗涤。

[0089] (3) 竞争步骤：

[0090] 每孔加入 50 μL 处理过的奶茶溶液和 50 μL 荧光物质标记的 DBP 抗体，使之发生竞争反应。37℃ 下温育 2.5h 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，同上洗涤，除去游离的 DBP 及抗体结合物。

[0091] (4) 检测步骤：

[0092] 用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为 485nm，发射波长为 528nm 时的荧光强度。

[0093] 2、液体奶茶中的邻苯二甲酸二丁酯加标回收实验

[0094] (1) 包被：浓度为 5 μg/mL 的包被抗原 DBAP-OVA 包被 96 孔酶标板，每孔 100 μL，放置培养箱 37℃ 温育 2h 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，再用洗涤液 PBST 洗涤并甩干，每次洗涤 3-5min，总共洗涤 3 次。

[0095] (2) 封闭：加入 1% OVA 溶液，每孔 150 μL，封闭没有包被抗原的多余的部分，避免抗体的非特异吸附在酶标板上。37℃ 温育 30min 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，然后同上洗涤。

[0096] (3) 竞争：每孔加入 25 μL 处理过的奶茶溶液、25 μL 指定浓度的 DBP 标准溶液

(0.1、1、10ng/mL) 和 50  $\mu$  L 荧光物质标记的 DBP 抗体,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DBP 及抗体结合物。

[0097] (4) 检测:用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为 485nm,发射波长为 528nm 时的荧光强度。

[0098] 将实施例取得的荧光强度信号转化为数值,计算结果如表 2 所示。

[0099] 表 2:液体奶茶中的邻苯二甲酸二丁酯的含量及加标回收率

[0100]

样品	DBP 含量 (ng/mL)	DBP 加入值 (ng/mL)	DBP 测得值 (ng/mL)	回收率(%)
液体奶茶	0.085	0.1	0.19	105.0
		1	1.05	96.5
		10	9.53	94.5

[0101] 表 2 所示:实际样品液体奶茶中的 DBP 含量低,回收率在参考范围 (80% -120%) 内,符合实验要求,说明该发明技术准确度及精密度好。

[0102] 实施例 4:

[0103] 检测长江水(芜湖境内)中的邻苯二甲酸二丁酯的含量及加标回收实验

[0104] 长江水样的预处理步骤:

[0105] 用玻璃瓶盛装样品,在灌瓶前用长江水将瓶冲洗三次。采集长江水后过夜,待悬浮物沉淀之后,过滤得澄清滤液,用 1mol/L HCl 或 1mol/L NaOH 将澄清滤液的 pH 值调至 7.0 左右,置于低温 (0-4 $^{\circ}$ C) 保存待用。

[0106] 1、检测长江水(芜湖境内)中的邻苯二甲酸二丁酯含量

[0107] (1) 包被步骤:

[0108] 浓度为 5  $\mu$ g/mL 的包被抗原 DBAP-OVA 包被 96 孔酶标板,每孔 100  $\mu$  L,放置培养箱 37 $^{\circ}$ C 温育 2h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,再用洗涤液 PBST 洗涤并甩干,每次洗涤 3-5min,总共洗涤 3 次。

[0109] (2) 封闭步骤:

[0110] 加入 1% OVA 溶液,每孔 150  $\mu$  L,封闭没有包被抗原的多余的部分,避免抗体的非特异吸附在酶标板上。37 $^{\circ}$ C 温育 30min 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,然后同上洗涤。

[0111] (3) 竞争步骤:

[0112] 每孔加入 50  $\mu$  L 处理过的长江水样和 50  $\mu$  L 荧光物质标记的 DBP 抗体,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 2.5h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DBP 及抗体结合物。

[0113] (4) 检测步骤:

[0114] 用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为 485nm,发射波长为 528nm 时的荧光强度。

[0115] 2、长江水(芜湖境内)中的邻苯二甲酸二丁酯加标回收实验

[0116] (1) 包被步骤：

[0117] 浓度为  $5 \mu\text{g/mL}$  的包被抗原 DBAP-OVA 包被 96 孔酶标板，每孔  $100 \mu\text{L}$ ，放置培养箱  $37^\circ\text{C}$  温育 2h 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，再用洗涤液 PBST 洗涤并甩干，每次洗涤 3-5min，总共洗涤 3 次。

[0118] (2) 封闭步骤：

[0119] 加入 1% OVA 溶液，每孔  $150 \mu\text{L}$ ，封闭没有包被抗原的多余的部分，避免抗体的非特异吸附在酶标板上。 $37^\circ\text{C}$  温育 30min 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，然后同上洗涤。

[0120] (3) 竞争步骤：

[0121] 每孔加入  $25 \mu\text{L}$  处理过的长江水样、 $25 \mu\text{L}$  指定浓度的 DBP 标准溶液 (0.1、1、10ng/mL) 和  $50 \mu\text{L}$  荧光物质标记的 DBP 抗体，使之发生竞争反应。 $37^\circ\text{C}$  下温育 2.5h 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，同上洗涤，除去游离的 DBP 及抗体结合物。

[0122] (4) 检测步骤：

[0123] 用多功能酶标仪测定各孔在激发波长为 485nm，发射波长为 528nm 时的荧光强度。

[0124] 将实施例取得的荧光强度信号转化为数值，计算结果如表 3 所示。

[0125] 表 3

[0126]

样品	DBP 含量 (ng/mL)	DBP 加入值 (ng/mL)	DBP 测得值 (ng/mL)	回收率(%)
长江水	0.11	0.1	0.22	110.0
		1	1.13	102.0
		10	9.63	95.2

[0127] 表 3 所示：实际样品长江水中的 DBP 含量低，回收率在参考范围 (80% - 120%) 内，符合实验要求，证明该发明技术准确度及精密度好。

[0128] 实施例 5：

[0129] 抗体特异性的测定

[0130] 分别测定其他结构与 DBP 相似的邻苯二甲酸酯，如邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)、邻苯二甲酸二丙酯 (DPrP)、邻苯二甲酸二戊酯 (DAP)、邻苯二甲酸二环己酯 (DCHP)、邻苯二甲酸二 (2-乙基己基) 酯 (DEHP)，与抗体的交叉反应情况，从而考察抗体的特异性。取上述 7 种邻苯二甲酸酯标准物质  $50 \mu\text{L}$  分别溶解在少量 (1-10mL) 的无水乙醇中，用  $0.01\text{mol/L}$  pH7.5 的 PBS 定容至 100mL 后，配制成一系列浓度 (0.001、0.01、0.1、1、10、100、1000ng/mL)。竞争反应时用这些标准品代替 DBP 竞争抗体结合位点，测定其荧光强度值，以荧光强度值的值为纵坐标，标准品浓度的对数值  $\log C$  为横坐标绘制标准曲线，计算出上述 7 种邻苯二甲酸酯标准物质的  $IC_{50}$ ，根据以下公式计算出各种物质的交叉反应率。交叉反应率 (CR) = ( $IC_{50}$  时 DBP 浓度 /  $IC_{50}$  时其他结构相似物)  $\times 100\%$ ，计算结果如表 4 所示。

[0131] 表 4 :六种邻苯二甲酸酯与抗 DBP 抗体的交叉反应率

[0132]

邻苯二甲酸酯	IC <sub>50</sub> (ng/ml)	CR (%)
邻苯二甲酸二丁酯(DBP)	0.66	100
邻苯二甲酸二甲酯(DMP)	11.81	5.58
邻苯二甲酸二乙酯(DEP)	7.37	8.95
邻苯二甲酸二丙酯(DPrP)	5.39	12.24
邻苯二甲酸二戊酯(DAP)	5.26	12.54
邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)	11.61	5.68
邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)	11.16	5.91

[0133] 从表 4 的结果可知,六种邻苯二甲酸酯与抗体的交叉反应率均小于 13%,说明制备的抗邻苯二甲酸二丁酯的抗体特异性高。

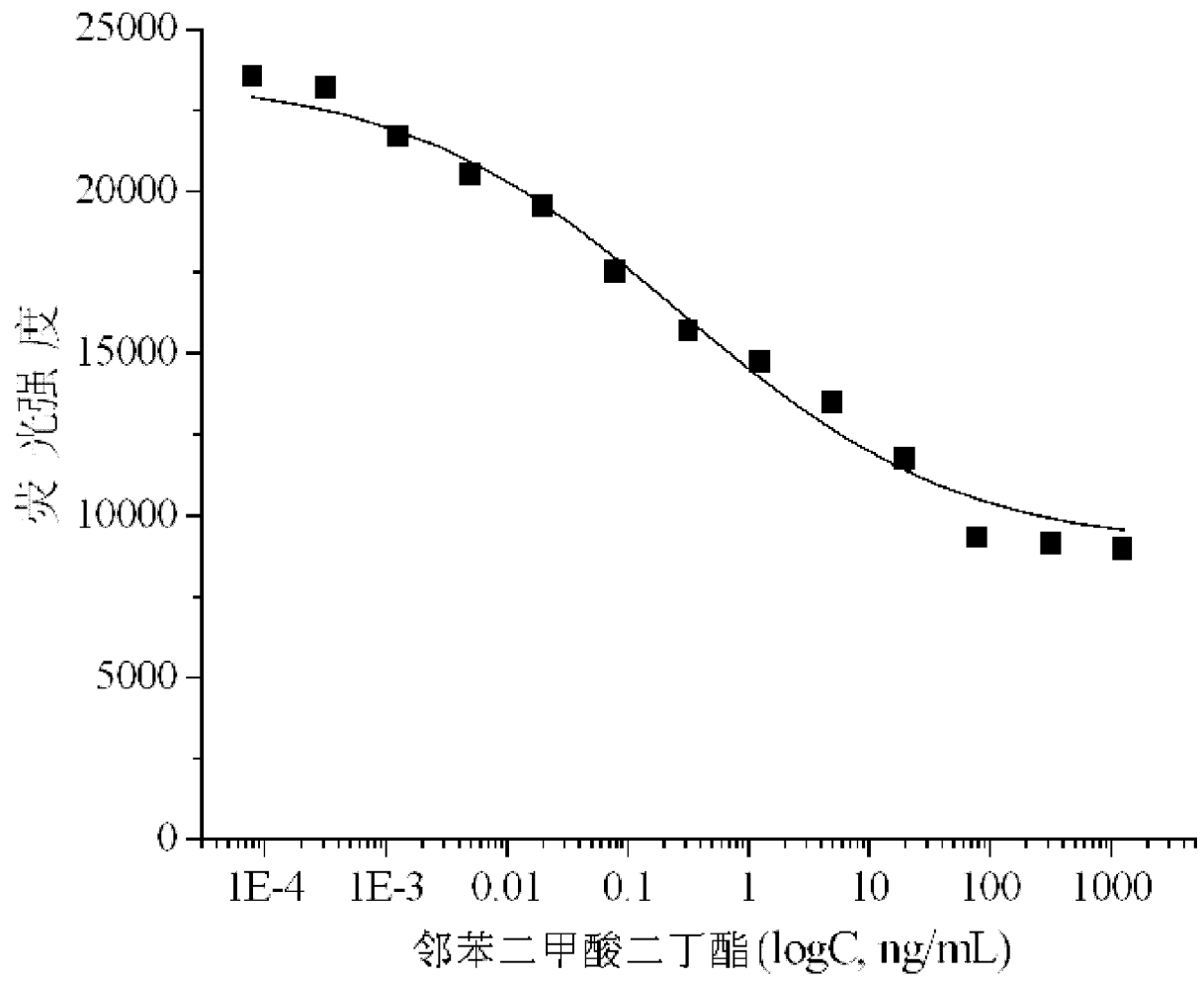


图 1

专利名称(译)	一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102520153A</a>	公开(公告)日	2012-06-27
申请号	CN201110420216.X	申请日	2011-12-15
[标]申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽师范大学		
[标]发明人	张明翠 胡玉嵘 焦莉娟		
发明人	张明翠 胡玉嵘 焦莉娟		
IPC分类号	G01N33/542 G01N33/531 G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	方南		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种快速检测食品中的邻苯二甲酸二丁酯的方法，包括以下步骤：a：抑制曲线的建立步骤、b：样品的检测步骤，本发明与现有技术相比，具有灵敏度高、快速、特异性强，方法简单、耗时短，适合环境污染物DBP的快速分析，而且对邻苯二甲酸酯的测定有着重要意义。

