

(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102539743 A

(43) 申请公布日 2012. 07. 04

(21) 申请号 201110419687. 9

(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 于晓娜

(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 33/543 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

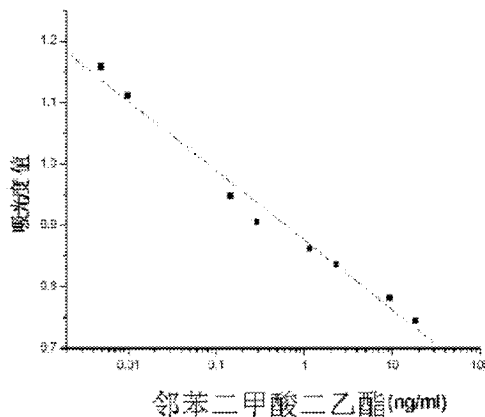
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法,包括以下步骤:a:标准曲线的建立步骤;b:样品的检测步骤;本发明与现有技术相比,该发明中提供的塑化剂邻苯二甲酸二乙酯 (DEP) 抗体的特异性强,在交叉反应试验中,对检测的几大邻苯二甲酸酯类物质几乎无任何交叉反应,因此其选择性很高,从而简化了样品前处理过程。本发明的灵敏度为 0. 0049ng/ml,较之文献报道用直接竞争酶联免疫法测定 DEP 的浓度 (Analytical Biochemistry 406 (2010) 24-28) 0. 096ng/ml,灵敏度明显提高,与标准方法高效液相色谱法 0. 88ng/ml 比较,灵敏度提高了两个数量级。



1. 一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法,包括以下步骤:

a:标准曲线的建立步骤:

在建立邻苯二甲酸二乙酯的标准曲线之前,先配制不同浓度的标准品:邻苯二甲酸二乙酯标准品用 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 0.0048ng/ml、0.0097ng/ml、0.14ng/ml、0.29ng/ml、1.2ng/ml、2.3ng/ml、9.3ng/ml、18ng/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 软件处理后绘制成标准曲线;

(1) 包被步骤:

用邻苯二甲酸二乙酯包被抗原包被 96 孔酶标板,每孔 100 μ 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 μ 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 μ L 邻苯二甲酸二乙酯标准溶液和 50 μ L 邻苯二甲酸二乙酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 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) 显色步骤

每孔加入 100 μ L 酶标羊抗兔抗抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 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;每孔加入 100 μ L 底物液,37 $^{\circ}$ C 下温育 30min,从培养箱内取出,每孔加入 50 μ L 终止液;

(5) 检测步骤:

用多功能酶标仪测定各孔在波长为 490nm 吸收光强度;

b:样品的检测步骤

除 (3) 竞争步骤:每孔加入 50 μ L 样品溶液和 50 μ L 的邻苯二甲酸二乙酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 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:标准曲线的建立步骤相同。

2. 根据权利要求 1 所述的一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法,其特征在于:除 (3) 竞争步骤:每孔加入 25 μ L 样品和 25 μ L 邻苯二甲酸二乙酯标准溶液,再加入 50 μ L 邻苯二甲酸二乙酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 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:标准曲线的建立步骤相同。

3. 根据权利要求 1 所述的一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法,其特征在于:

所述的邻苯二甲酸二乙酯包被抗原通过以下方法制备:

称取 4-氨基邻苯二甲酸二乙酯 0.0245g,溶于 150 μ L 浓盐酸 (12mol/L) 中,加入 3mL 蒸馏水,在冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 中搅拌;加入 2mL 0.1mol/L 的 NaNO₂ 溶液,搅拌 30min 后,再加入 0.001g 尿素,除去未反应的 NaNO₂;再加入 25ml 溶有 126mg 卵清蛋白的四硼酸钠的溶液,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 7 天,每天换水两次,得棕红色邻苯二甲酸二乙酯包被抗原溶液 (4mg/ml)。

4. 根据权利要求1所述的一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法,其特征在于:所述的酶标羊抗兔抗体通过以下方法制备:

取辣根过氧化物酶 10mg 溶于 0.4mL 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液,待溶解后加入体积分数 25% 戊二醛 0.1mL,然后 37°C 温育 2h;之后加入 0-4°C 的无水乙醇 2mL,2500r/min 离心 15min,倾去上清液;

取沉淀以体积比 80% 乙醇 4mL 混悬,同上离心,倾去乙醇,将管倒置,使乙醇充分流出;

沉淀用 1mL 0.05mol/L pH9.6 碳酸盐缓冲液溶解,加入羊抗兔抗抗体 3mg,放在冰箱内 4°C 过夜后,加入 0.5-2mgNaH₂PO₄,调至溶液 pH7-8,即可,制备好的酶标羊抗兔抗抗体放置在 4°C 保存。

5. 根据权利要求1所述的一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法,其特征在于:

所述的邻苯二甲酸二乙酯抗体,通过以下步骤制备:

免疫抗原的制备步骤:

称取 4-氨基邻苯二甲酸二乙酯 0.0245g,溶于 150 μ L 浓盐酸 (12mol/L) 中,加入 3mL 蒸馏水,在冰水浴 (0-4°C) 中搅拌,加入 2mL 0.1mol/L 的 NaNO₂ 溶液,搅拌 30min 后,再加入 0.001g 尿素,除去未反应的 NaNO₂;

再加入 25ml 溶有 126mg 牛血清蛋白的四硼酸钠的溶液 (pH = 9.18),冰水浴 (0-4°C) 搅拌 3-6h 后,将反应液装入透析袋,在蒸馏水中透析 7 天,每天换水两次,得棕红色邻苯二甲酸二乙酯包被抗原溶液;

将棕红色邻苯二甲酸二乙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乙酯抗体。

6. 根据权利要求5所述的一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法,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。

一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法。

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乙酯的方法。

[0005] 本发明解决技术问题的技术方案为:一种邻苯二甲酸二乙酯的方法,包括以下步骤:

[0006] a:标准曲线的建立步骤:

[0007] 在建立邻苯二甲酸二乙酯的标准曲线之前,先配制不同浓度的标准品。邻苯二甲酸二乙酯标准品用1-2mL的无水乙醇溶解后,用PBS稀释液稀释至一系列浓度,分别为0.0048ng/ml、0.0097ng/ml、0.14ng/ml、0.29ng/ml、1.2ng/ml、2.3ng/ml、9.3ng/ml、18ng/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软件处理后绘制成标准曲线。

[0008] (1) 包被步骤:

[0009] 用邻苯二甲酸二乙酯包被抗原(DEP-OVA)包被96孔酶标板,每孔100 μ 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 μ 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 μ L 邻苯二甲酸二乙酯 (DEP) 标准溶液和 50 μ L 邻苯二甲酸二乙酯抗体使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 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 DEP 及抗体结合物。

[0014] (4) 显色步骤

[0015] 每孔加入 100 μ L 酶标羊抗兔抗抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 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;以除去游离酶标羊抗兔抗抗体。每孔加入 100 μ L 底物液,37 $^{\circ}$ C 下温育 30min,从培养箱内取出,每孔加入 50 μ L 终止液。

[0016] (5) 检测步骤:

[0017] 用多功能酶标仪测定各孔在波长为 490nm 吸收光强度。

[0018] b:样品的检测步骤

[0019] 除 (3) 竞争步骤:每孔加入 50 μ L 样品溶液和 50 μ L 的邻苯二甲酸二乙酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 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:标准曲线的建立步骤相同。

[0020] 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。

[0021] 除 (3) 竞争步骤:每孔加入 25 μ L 样品和 25 μ L 邻苯二甲酸二乙酯标准溶液,再加入 50 μ L 邻苯二甲酸二乙酯抗体,37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 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:标准曲线的建立步骤相同。

[0022] 所述的邻苯二甲酸二乙酯包被抗原通过以下方法制备:

[0023] 称取 4-氨基邻苯二甲酸二乙酯 0.0245g,溶于 150 μ L 浓盐酸 (12mol/L) 中,加入 3mL 蒸馏水,在冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 中搅拌。缓慢加入 2mL 0.1mol/L 的 NaNO_2 溶液,搅拌 30min 后,再加入 0.001g 尿素,除去未反应的 NaNO_2 。再缓慢加入 25ml 溶有 126mg 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 7 天,每天换水两次,得棕红色邻苯二甲酸二乙酯包被抗原溶液 (4mg/ml)。

[0024] 所述的邻苯二甲酸二乙酯抗体,通过以下方法制备:

[0025] 免疫抗原的制备步骤:

[0026] 称取 4-氨基邻苯二甲酸二乙酯 0.0245g,溶于 150 μ L 浓盐酸 (12mol/L) 中,加入 3mL 蒸馏水,在冰水浴 (0-4 $^{\circ}$ C) 中搅拌。缓慢加入 2mL 0.1mol/L 的 NaNO_2 溶液,搅拌 30min 后,再加入 0.001g 尿素,除去未反应的 NaNO_2 ;

[0027] 再缓慢加入 25ml 溶有 126mg 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 7 天,每天换水两次,得棕红色邻苯二甲酸二乙酯包被抗原溶液。

[0028] 抗体的制备步骤:

[0029] 将棕红色邻苯二甲酸二乙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乙酯抗体。

[0030] 所述的弗氏佐剂通过以下方法制备:

[0031] 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。

[0032] 所述的免疫步骤为:

[0033] 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℃)静置 2h 后吸取上层澄清的血清(7.5mg/ml)。

[0034] 所述的酶标羊抗兔抗抗体,通过以下方法制备:

[0035] 本实验采用戊二醛作为交联剂,利用戊二醛分子上对称的两个醛基,分别与酶和抗体中游离的氨基、酚基等以共价键结合而进行标记,制备出了酶标羊抗兔抗抗体,其制备过程如下:

[0036] 取辣根过氧化物酶 10mg 溶于 0.4mL 0.05mol/L pH9.6CB 缓冲液,待溶解后加入体积分数 25% 戊二醛 0.1mL,然后 37℃ 温育 2h。之后加入 0-4℃ 的无水乙醇 2mL,2500r/min 离心 15min,倾去上清液。取沉淀以体积比 80% 乙醇 4mL 混悬,同上离心,倾去乙醇,将管倒置,使乙醇充分流出。沉淀用 1mL 0.05mol/L pH9.6CB 缓冲液溶解,加入羊抗兔抗抗体 3mg,放在冰箱内 4℃ 过夜后,加入 0.5-2mg NaH₂PO₄,调至溶液 pH7-8,再用饱和硫酸铵溶液将其纯化,制备好的酶标羊抗兔抗抗体放置在 4℃ 保存。

[0037] 本发明与现有技术相比,具有以下的特点:该发明中提供的塑化剂邻苯二甲酸二乙酯(DEP)抗体的特异性强,在交叉反应试验中,对检测的几大邻苯二甲酸酯类物质几乎无任何交叉反应,因此其选择性很高,从而简化了样品前处理过程。本发明的灵敏度为 0.0049ng/ml,较之文献报道用直接竞争酶联免疫法测定 DEP 的浓度 (Analytical Biochemistry 406 (2010) 24-28) 0.096ng/ml,灵敏度明显提高,与标准方法高效液相色谱法 0.88ng/ml 比较,灵敏度提高了两个数量级。

附图说明

[0038] 图 1 为实施例本发明的标准曲线图。

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

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] 羊抗兔抗抗体 博美生物科技有限公司
- [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, CB) :称取 1.59g Na_2CO_3 , 2.94g 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,用 PBS 稀释
- [0051] (5) 底物液 (柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液, pH = 5 ;柠檬酸 0.5106g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.8408g 溶于蒸馏水,定容到 50ml ;加底物液前 15-30min 前加入邻苯二胺 OPD 于缓冲液中, 10ml 缓冲液中加入 4mg ;加底物液前 3-5min 加入质量分数为 30%的 H_2O_2 , 10ml 缓冲液中加入 15 μL ;)
- [0052] (6) 终止液 (硫酸溶液, 2mol/L)
- [0053] (7) 邻苯二甲酸二乙酯包被抗原 (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 用 CB 稀释 4mg/ml 邻苯二甲酸二乙酯包被抗原溶液)
- [0054] (8) 邻苯二甲酸二乙酯抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 用 PBS 稀释 7.5mg/ml 邻苯二甲酸二乙酯抗体)
- [0055] (9) 酶标羊抗兔抗抗体 (体积比 1 : 4000, PBS 稀释)
- [0056] 实施例 1 :
- [0057] 邻苯二甲酸二乙酯的标准曲线的建立
- [0058] (1) 包被步骤 :
- [0059] 用邻苯二甲酸二乙酯包被抗原 (DEP-OVA) 包被 96 孔酶标板,每孔 100 μL , 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, 再用洗涤液洗涤并甩干, 每次洗涤 3-5min, 总共洗涤 3 次。
- [0060] (2) 封闭步骤 :
- [0061] 在包被好的酶标准版中加入 1%卵清蛋白 (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 $^\circ\text{C}$ 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 ;
- [0062] (3) 竞争步骤 :
- [0063] 每孔加入 50 μL 邻苯二甲酸二乙酯 (DEP) 标准溶液和 50L 邻苯二甲酸二乙抗体使之发生竞争反应。37 $^\circ\text{C}$ 下温育 3h 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 DEP 及抗体结合物。
- [0064] (4) 显色步骤
- [0065] 每孔加入 100 μL 酶标羊抗兔抗抗体, 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 3h 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 ;以除去游离酶标羊抗兔抗抗体。每孔加入 100 μL 底物液, 37 $^\circ\text{C}$ 下温育 30min, 从培养箱内取出, 每孔加入 50 μL 终止液。

[0066] (5) 检测步骤：

[0067] 用多功能酶标仪测定各孔在波长为 490nm 吸收光强度。

[0068] 将实施例取得的吸收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。该标准曲线在 0.001-50ng/mL 浓度范围内与荧光强度有良好的线性关系。线性回归方程为 $Y = 0.87606 - 0.11317X$,此式中 Y 为吸收光强度, X 为 DEP 的浓度。检测限为 0.00494ng/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)。该技术方法的检测限比之前的检测邻苯二甲酸二乙酯的检测限 0.096ng/ml (Analytical Biochemistry 406 (2010) 24-28), 低一个数量级。

[0069] 实施例 2：

[0070] 检测牛奶中的邻苯二甲酸二乙酯的含量及加标回收实验

[0071] 牛奶的预处理步骤：取 3ml 牛奶（购于芜湖市超市），将 100 μ L 无水乙醇加入上述牛奶中，震荡 5min，随后在低温下（0-4 $^{\circ}$ C）4000 转 / 分钟离心 5min。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。

[0072] 1、检测全脂牛奶中的邻苯二甲酸二乙酯的含量

[0073] 除

[0074] (3) 竞争步骤：

[0075] 每孔加入 50 μ L 处理过的牛奶溶液和 50 μ L DEP 抗体溶液,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DEP 及抗体结合物。外,其余与实施例 1 相同。

[0076] 2、全脂牛奶中的邻苯二甲酸二乙酯加标回收实验

[0077] 除

[0078] (3) 竞争：每孔加入 25 μ L 处理过的牛奶溶液、25 μ L 指定浓度的 DEP 标准溶液（0.1、1、10ng/mL）和 50 μ L DEP 抗体,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DEP 及抗体结合物。外,其余与实施例 1 相同。

[0079] 将实施例取得的吸收光强信号转化为数值,计算结果如表 1 所示。

[0080] 表 1 显示：实际样品全脂牛奶中的 DEP 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

[0082] 检测液体奶茶中的邻苯二甲酸二乙酯的含量及加标回收实验

[0083] 液体奶茶的预处理步骤：

[0084] 将 100 μ L 无水乙醇加入 3ml 购买的液体奶茶（购于芜湖市某饮料站）溶液中,震荡 5min,随后在低温下（0-4 $^{\circ}$ C）4000 转 / 分钟离心 5min。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。

[0085] 1、检测奶茶中的邻苯二甲酸二乙酯含量

[0086] 除

[0087] (3) 竞争步骤：

[0088] 每孔加入 50 μ L 处理过的奶茶溶液和 50 μ L DEP 抗体溶液,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DEP 及抗体结合物。外,其余与实施例 1 相同。

[0089] 2、全脂牛奶中的邻苯二甲酸二乙酯加标回收实验

[0090] 除

[0091] (3) 竞争:每孔加入 25 μ L 处理过的奶茶溶液、25 μ L 指定浓度的 DEP 标准溶液 (0.1、1、10ng/mL) 和 50 μ L DEP 抗体,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DEP 及抗体结合物。外,其余与实施例 1 相同。

[0092] 将实施例取得的吸收光强信号转化为数值,计算结果如表 1 所示。

[0093] 表 1 显示:实际样品全脂牛奶中的 DEP 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。

[0094] 实施例 4:

[0095] 检测酸奶中的邻苯二甲酸二乙酯的含量及加标回收实验

[0096] 液体酸奶的预处理步骤:

[0097] 将 100 μ L 无水乙醇加入 3mL 购买的液体酸奶 (购于芜湖超市) 溶液中,震荡 5min,随后在低温下 (0-4 $^{\circ}$ C) 4000 转 / 分钟离心 5min。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。

[0098] 1、检测酸奶中的邻苯二甲酸二乙酯含量

[0099] 除

[0100] (3) 竞争步骤:

[0101] 每孔加入 50 μ L 处理过的酸奶溶液和 50 μ L DEP 抗体溶液,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DEP 及抗体结合物。外,其余与实施例 1 相同。

[0102] 2、酸奶中的邻苯二甲酸二乙酯加标回收实验

[0103] 除

[0104] (3) 竞争:每孔加入 25 μ L 处理过的酸奶溶液、25 μ L 指定浓度的 DEP 标准溶液 (0.1、1、10ng/mL) 和 50 μ L DEP 抗体,使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 后,从培养箱内取出,甩掉孔内溶液,同上洗涤,除去游离的 DEP 及抗体结合物。外,其余与实施例 1 相同。

[0105] 将实施例取得的吸收光强信号转化为数值,计算结果如表 1 所示。

[0106] 表 1 显示:实际样品全脂牛奶中的 DEP 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。

[0107] 实施例 5:

[0108] 检测果汁中的邻苯二甲酸二乙酯的含量及加标回收实验

[0109] 果汁的预处理步骤:取 3ml 果汁 (购于芜湖市超市),将 100 μ L 无水乙醇加入上述牛奶中,震荡 5min,随后在低温下 (0-4 $^{\circ}$ C) 4000 转 / 分钟离心 5min。离心后,取出试管,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。

[0110] 1、检测果汁中的邻苯二甲酸二乙酯的含量

[0111] 除

[0112] (3) 竞争步骤：

[0113] 每孔加入 50 μ L 处理过的果汁溶液和 50 μ L DEP 抗体溶液，使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，同上洗涤，除去游离的 DEP 及抗体结合物。外，其余与实施例 1 相同。

[0114] 2、果汁中的邻苯二甲酸二乙酯加标回收实验

[0115] 除

[0116] (3) 竞争：每孔加入 25 μ L 处理过的果汁溶液、25 μ L 指定浓度的 DEP 标准溶液 (0.1、1、10ng/mL) 和 50 μ L DEP 抗体，使之发生竞争反应。37 $^{\circ}$ C 下温育 3h 后，从培养箱内取出，甩掉孔内溶液，同上洗涤，除去游离的 DEP 及抗体结合物。外，其余与实施例 1 相同。

[0117] 将实施例取得的吸收光强信号转化为数值，计算结果如表 1 所示。

[0118] 表 1 显示：实际样品果汁中的 DEP 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。

[0119] 表 1

[0120]

食品样	DEP 量 (ng/mL)	加标量 (ng/mL)	总量 (ng/mL)	回收率 RSD (%)
果汁	0.032	0.1	0.125 \pm 0.016	92.9 \pm 1.6
		1.0	0.943 \pm 0.023	91.1 \pm 2.3
		10	9.297 \pm 0.028	92.7 \pm 2.8
奶茶	0.025	0.1	0.154 \pm 0.021	92.0 \pm 2.1
		1.0	1.154 \pm 0.035	109.3 \pm 3.5
		10	9.198 \pm 0.047	91.4 \pm 4.7
牛奶	0.062	0.1	0.154 \pm 0.021	92.0 \pm 2.1
		1.0	1.154 \pm 0.039	109.3 \pm 3.9
		10	9.198 \pm 0.046	91.4 \pm 4.6
酸奶	0.058	0.1	0.164 \pm 0.034	105.7 \pm 3.4
		1.0	0.942 \pm 0.045	88.4 \pm 4.7
		10	10.606 \pm 0.024	105.5 \pm 2.4

[0121] 实施例 6：

[0122] 抗体特异性的测定

[0123] 分别测定其他结构与 DEP 相似的邻苯二甲酸酯,如邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二丙酯 (DPrP)、邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 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 μ L 分别溶解在少量 (1-10mL) 的无水乙醇中,用 0.01mol/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 DEP 竞争抗体结合位点,测定其吸收光强度值,以吸收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 DEP 浓度 / IC_{50} 时其他结构相似物) \times 100%,计算结果如表 2 所示。

[0124] 从表 2 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乙酯的抗体特异性高,符合实验要求。

[0125] 表 2

[0126]

结构类似物	交叉反应率 (%)
邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)	100%
邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)	4%
邻苯二甲酸二丙酯 (DPrP)	2.0%
邻苯二甲酸二丁酯 (DBP)	2.5%
邻苯二甲酸二戊酯 (DAP)	1.4%
邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯 (DEHP)	1.6%
邻苯二甲酸二环己酯 (DCHP)	1.25%

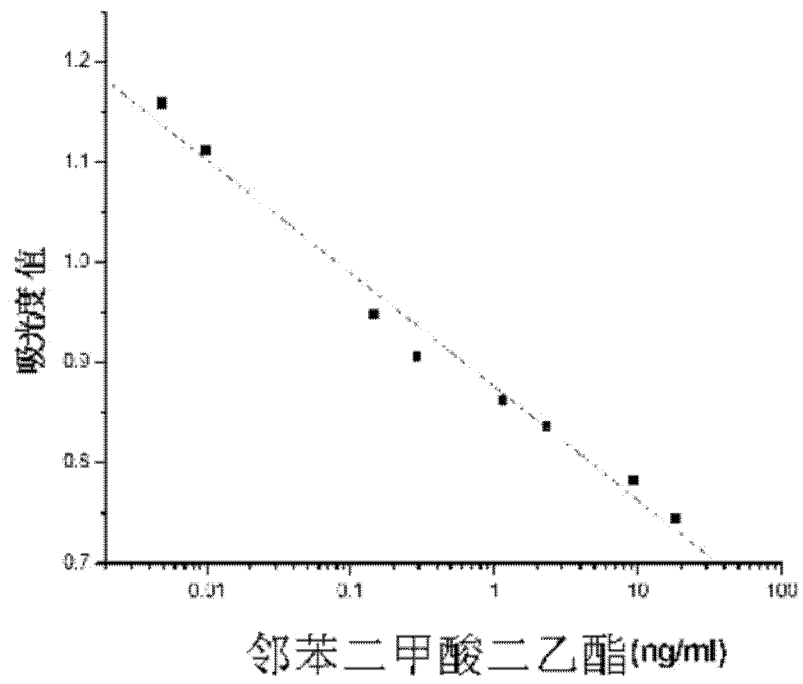


图 1

专利名称(译)	一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法		
公开(公告)号	CN102539743A	公开(公告)日	2012-07-04
申请号	CN201110419687.9	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 于晓娜		
发明人	张明翠 于晓娜		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
代理人(译)	方南		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种邻苯二甲酸二乙酯的检测方法，包括以下步骤：a：标准曲线的建立步骤；b：样品的检测步骤；本发明与现有技术相比，该发明中提供的塑化剂邻苯二甲酸二乙酯(DEP)抗体的特异性强，在交叉反应试验中，对检测的几大邻苯二甲酸酯类物质几乎无任何交叉反应，因此其选择性很高，从而简化了样品前处理过程。本发明的灵敏度为0.0049 ng/ml，较之文献报道用直接竞争酶联免疫法测定DEP的浓度(*Analytical Biochemistry* 406(2010)24-28)0.096ng/ml，灵敏度明显提高，与标准方法高效液相色谱法0.88ng/ml比较，灵敏度提高了两个数量级。

