

崔 银,李 明,杜道林.邻苯二甲酸酯类化合物免疫检测技术研究进展[J].江苏农业科学,2020,48(4):33-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.04.005

邻苯二甲酸酯类化合物免疫检测技术研究进展

崔 银,李 明,杜道林

(江苏大学环境与安全工程学院/江苏大学环境健康与生态安全研究院环境生态研究所,江苏镇江 212013)

摘要:邻苯二甲酸酯(PAEs)类化合物是一种被广泛使用的环境激素类塑化剂,其对环境和人类健康的危害已经引发多方关注,该类物质的检测,特别是简便快速检测对于保障环境食品安全及消费者健康具有重要意义。目前,已有一系列免疫快速检测技术以其简单快速、低成本、高灵敏、高特异性、高通量的优势而被应用于 PAEs 检测,可以弥补色谱检测技术设备昂贵、操作繁琐、需要专业技术人员、难以实现大量样品筛选目标等不足。本文介绍了 PAEs 抗体及其免疫快速检测技术的研究进展,并进行评价和展望,以期 PAEs 快速检测技术的发展和应提供指导和帮助。

关键词:邻苯二甲酸酯;塑化剂;免疫检测;研究进展

中图分类号: X132;TS207 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)04-0033-08

邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters,简称 PAEs,别称酞酸酯)类化合物是广泛存在的一类环境激素类塑化剂,其作为增塑剂、软化剂、载体及添加剂,被广泛用于塑料、汽车、润滑剂、化妆品、服装、农药等行业^[1-4]。PAEs 具有很强的生物富集性和抗降解性,不仅对人体生殖、发育有很大影响,对神经系统也有较大危害,此外还有致癌风险和环境生态风险^[5-8]。随着长期使用和暴露,PAEs 在环境介质中释放和进入食物供应链,导致其在大气、水体、土壤和食品中均有不同程度的检出,对环境和人体有极大的风险^[9-11]。

2011 年“中国台湾塑化剂风波”和 2012 年“大陆白酒塑化剂事件”使 PAEs 为广大消费者熟知并引起一定程度的恐慌^[12-13]。近年来,PAEs 的环境食品污染和毒理学研究已经受到广泛关注并成为当前的研究热点。PAEs 种类繁多,其 20 余种常见品种及其化学结构式见表 1,最常见的是 DBP、DEHP,其中 DEHP 已经被美国国家环境保护局(Environmental Protection Agency,简称 USEPA)列为

2B 类致癌物^[14]。许多国家已经将多种 PAEs 确定为环境优先控制的污染物,并制定限量或禁用标准。美国不允许在食品接触材料中添加 DBP、DIBP 和 DEHP,要求儿童玩具或儿童护理用品中 6 种 PAEs(DEHP、DBP、BBP、DINP、DIDP、DnOP)的总含量不得超过 0.1%^[15]。欧盟指令 2008/105/EC 规定,地表水中 DEHP 的限值为 1.3 $\mu\text{g/L}$ 。此外,欧盟不允许在食品接触材料中添加 DIBP,允许 DBP、DEHP 在非油脂食品接触材料中使用,迁移限量为 0.3 mg/kg ^[16]。原中国卫生部规定(卫办监督函[2011]551 号),食品及食品添加剂中 DBP、DEH、DINP 的最大残留量分别为 0.3、1.5、9.0 mg/kg 。GB 5749—2006《生活饮用水卫生标准》中水质参考指标及限值规定,DEP 的限值为 0.3 mg/L ,DBP 的限值为 0.003 mg/L ,水质非常规指标及限值规定,DEHP 的限值为 0.008 mg/L ^[17]。

关于 PAEs 检测方法的报道以气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)、液相色谱串联质谱法(HPLC-MS)等色谱检测技术和一系列免疫快速检测技术为主。加强 PAEs 检测技术,特别是高灵敏、简便快速、高通量筛选、现场检测方法的应用,对于保障环境生态安全和食品消费安全尤为重要。本文重点阐述国内外广泛关注的 PAEs 免疫快速检测技术的研究进展,以期 PAEs 快速检测技术的发展和应提供研究思路 and 方向。

收稿日期:2019-01-09

基金项目:中国博士后基金(编号:2016M601745);江苏大学高级人才启动基金(编号:16JDG035)。

作者简介:崔 银(1994—),女,江苏镇江人,硕士研究生,主要从事有毒有害物质的快速分析研究。Tel:(0511)88790955;E-mail:candyminicy@163.com。

通信作者:杜道林,博士,教授,主要从事环境污染物的生态效应和毒理研究。Tel:(0511)88790955;E-mail:ddl@ujs.edu.cn。

表 1 常见 PAEs 的名称和化学结构式

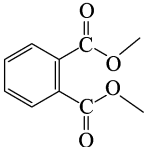
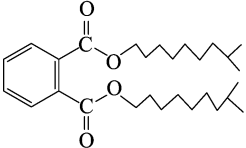
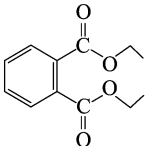
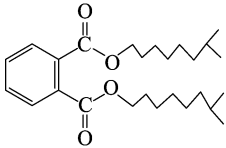
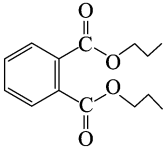
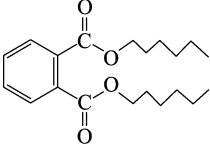
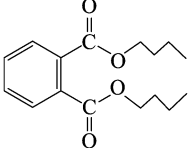
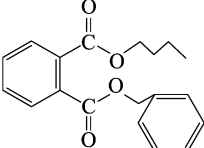
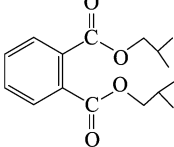
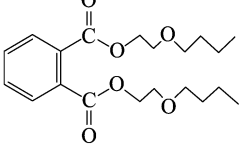
中文名称	英文名称	英文缩写	化学结构式
邻苯二甲酸二甲酯	dimethyl phthalate	DMP	
邻苯二甲酸二异癸酯	diisodecyl phthalate	DIDP	
邻苯二甲酸二乙酯	diethyl phthalate	DEP	
邻苯二甲酸二异壬酯	diisononyl phthalate	DINP	
邻苯二甲酸二丙酯	dipropyl phthalate	DPrP	
邻苯二甲酸二己酯	di - n - hexyl phthalate	DHXP	
邻苯二甲酸二丁酯	dibutyl phthalate	DBP	
邻苯二甲酸丁苄酯	benzyl butyl phthalate	BBP	
邻苯二甲酸二异丁酯	diisobutyl phthalate	DIBP	
邻苯二甲酸二(2 - 丁氧基)乙酯	bis (2 - n - butoxyethyl) phthalate	DBEP	

表 1(续)

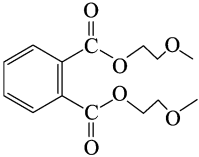
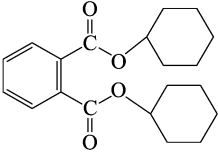
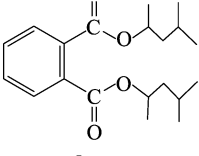
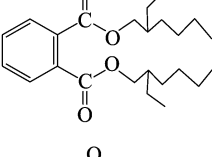
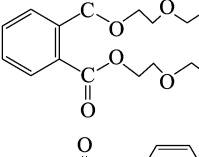
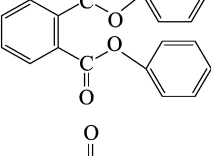
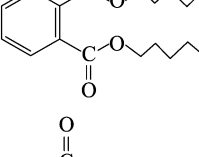
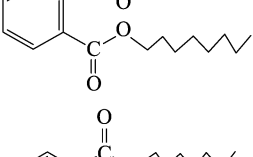
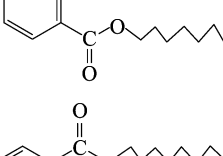
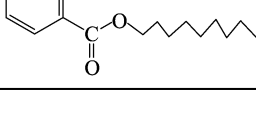
中文名称	英文名称	英文缩写	化学结构式
邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯	bis (2-methoxyethyl) phthalate	DMEP	
邻苯二甲酸二环己酯	dicyclohexyl phthalate	DCHP	
邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯	bis (4-methyl-2-pentyl) phthalate	BMPP	
邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯	bis (2-ethyl hexyl) phthalate	DEHP	
邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯	bis (2-ethoxyethyl) phthalate	DEEP	
邻苯二甲酸二苯酯	diphenyl phthalate	DPhP	
邻苯二甲酸二戊酯	dipentyl phthalate	DPP	
邻苯二甲酸二正辛酯	di-n-octyl phthalate	DNOP	
邻苯二甲酸二庚酯	diheptyl phthalate	DIHP	
邻苯二甲酸二壬酯	di-n-nonyl phthalate	DNP	

表 1(续)

中文名称	英文名称	英文缩写	化学结构式
邻苯二甲酸二异辛酯	diisooctyl phthalate	DIOP	
邻苯二甲酸单(2-乙基)己酯	monoethylhexyl phthalate	MEHP	

1 PAEs 抗原抗体的研制

免疫快速检测方法的灵敏度和特异性与抗体的质量和分析方法的类型密切相关。半抗原、人工抗原、抗体、标记物是免疫分析的基本要素,其中抗体是免疫分析的核心试剂,半抗原、抗原的合成是小分子化合物抗体制备和分析方法建立的关键步骤^[18]。研究表明,半抗原的结构、连接臂的长度和结构及其活性基团的连接位点、抗体获得途径对抗体的特异性识别和灵敏度具有不同程度的影响。

1.1 抗原

对 PAEs 类塑化剂的化学结构式进行分析可知,该类化合物拥有 1 个相同刚性平面芳烃-邻苯二甲酸酯基团,区别在于 2 个可塑的非线性脂肪侧链基团。因此,PAEs 半抗原化学合成改造也具有相似的途径。分析当前的报道可知,目前主要采用 3 种策略合成 PAEs 半抗原。第 1 种策略如 Ius 等以 4-羟基邻苯二甲酸、甲醇为原料,合成 4-羟基 DMP 后,与羧甲基羟胺半盐酸盐进行化学反应,获得带有一COOH 间隔臂的 DMP 目标半抗原^[19]。第 2 种策略如 Yanaihara 等以 4-硝基邻苯二甲酸和甲醇为原料,从 DMP 分子苯环的酯基间位引入—NO₂,合成 4-硝基 DMP,酯化反应和还原反应后获得 4-氨基 DMP 半抗原^[20]。第 3 种策略如 Tang 等在 DMP 的苯环酯基间位引入—NH₂后,通过缩合反应与羧甲基羟胺半盐酸盐、丁二酸酐分别合成了 2 种长度—COOH 间隔臂的 DMP 半抗原^[21]。在 PAEs 免疫分析研究中,研究人员主要采用上述第 2 种策略,即从 PAEs 分子苯环酯基间位引入—NH₂活性基团的策略化学合成半抗原。在随后的研究中,研究人员同样采用第 2 种策略分别合成 DCHP、DMP、DPPrP、DIBP、DEP 和 DBP 的 4-氨基半

抗原^[22-31]。

在 PAEs 半抗原合成的基础上,研究人员通常采用重氮法将—NH₂ 化半抗原与牛血清白蛋白(BSA)或鸡卵清蛋白(OVA)分别偶联获得免疫抗原和包被抗原,采用碳二亚胺法将—COOH 半抗原与载体蛋白偶联制备人工抗原。

1.2 抗体

研究人员用制备获得的人工免疫抗原免疫新西兰大白兔,从兔血清中分别纯化获得 DCHP 多克隆抗体、DPPrP 多克隆抗体、DIBP 多克隆抗体、DEP 多克隆抗体、DBP 多克隆抗体和 DMP 多克隆抗体^[22,24-26,28,30,32-33]。Wei 等通过小白鼠免疫、细胞融合、杂交瘤细胞筛选和抗体生产等流程,获得 DBP 单克隆抗体^[29,31]。Ius 等用连接臂较长的 DMP 半抗原偶联蛋白制备抗原后免疫新西兰大白兔,获得的多克隆抗体对 DMP 和其他多种 PAEs 均表现出较高度度的亲和力,可以作为广谱抗体对多种 PAEs 塑化剂进行多组分检测,表明较长的间隔臂有利于制备广谱 PAEs 抗体^[19,21]。

2 PAEs 免疫的快速分析检测

根据检测模式、载体和标记物的不同,多种免疫快速检测技术被开发用于 PAEs 的分析检测。研究人员将各种免疫分析模式和标记物质用于 PAEs 的快速分析检测,开发获得一系列免疫分析方法,并对方法的性能开展详细的评估,使 PAEs 分析检测技术得到极大的丰富,可以为 PAEs 安全风险监控储备关键技术和重要生化材料。

2.1 微孔免疫分析检测

2.1.1 酶免疫分析检测 作为免疫分析方法的经典方法和基础方法,酶联免疫吸附分析方法(ELISA)被广泛用于 PAEs 分析方法的开发和应用

中,其中针对 DMP、DBP 的 ELISA 研究最多,也最深入。Zhang 等将 DMP 多克隆抗体和辣根过氧化物酶(HRP)偶联获得酶标记抗体,建立直接竞争 ELISA(dc-ELISA)检测 DMP,线性范围为 0.1 ~ 2 000 ng/mL,检测限为 0.09 ng/mL,与其他结构类似物的交叉反应很低(<8.8%)^[23]。Sun 等在将 DMP 抗体生物化的基础上,建立生物素-链霉亲和素放大 ELISA 方法检测 DMP,检测范围为 24 ~ 6 027 ng/mL,IC₅₀ 为 356 ng/mL,检测限(LOD)为 8.2 ng/mL,特异性较高,与类似物的交叉率低于 10%,在检测实际牛奶和奶制样品中表现出很高的准确度和精密度,并用 GC-MS 验证其检测结果^[27]。Wei 等采用聚乙烯微孔表面羧基化和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC)偶联反应将半抗原 4-氨基 DBP 直接固定,建立基于单克隆抗体 DBP 的间接竞争 ELISA(ic-ELISA)方法,相比于将包被抗原固定在微孔表面(IC₅₀ 为 106 ng/mL),这种直接固定半抗原的策略使灵敏度得到很大提高(IC₅₀ 为 14.6 ng/mL)。在特异性方面,除了对 BBP 的交叉率为 21.3% 外,其余的均低于 7.98%,在食品样品检测中也表现出良好的准确性和精确性,并通过 GC-MS 验证^[29]。万宇平等建立白酒中 DBP 检测的 ELISA 方法,并研制成功试剂盒应用于白酒样品的检测,方法检测 IC₅₀ 为 86.5 ng/mL,检测范围为 0 ~ 1 620 ng/mL,在特异性方面对 DIBP 有 45% 的交叉率,对其他的交叉率均较低^[34]。Xu 等建立 ic-ELISA 检测白酒中的 DBP,检测限达到 64.5 ng/mL,检测范围为 64.5 ~ 1 606.2 ng/mL,并与 GC-MS 进行比对,发现其相关系数为 0.928^[30]。Sun 等将 DBP 多克隆抗体生物素化,建立生物素-亲和素系统放大的 ELISA 检测方法,检测限达到 5 pg/mL,IC₅₀ 为 0.36 ng/mL,检测范围为 0.45 ~ 7.06 ng/mL,具有很高的特异性(<3.8%),在饮料和应用水检测中发现 0.45 ~ 7.06 ng/mL 的 DBP 被检出^[35]。Zhou 等设计合成 DBP 半抗原和人工抗原,制备获得单克隆抗体,建立的 ELISA 的最低检测限为 0.06 ng/mL,IC₅₀ 为 7.34 ng/mL,具有很高的特异性(<1.25%),该方法比多克隆抗体提高了 1 000 倍的灵敏度,比其他报道的单抗灵敏度高 5 倍,并被应用于人类尿液中 DBP 含量的分析检测。结果表明,在 1 246 份尿液样本中,有 72.87% 的检出率,浓度为 0 ~ 42.98 ng/mL,年轻人体内的浓度低于年长者体内

的浓度^[31]。

关于其他几种 PAEs 的 ELISA 报道主要有 DPrP、DEP、DEHP。Zhang 等将 DPrP 包被抗原和 HRP 偶联作为标记物,建立直接竞争化学发光 ELISA(CL-ELISA)用于水样、牛奶样品中 DPrP 的检测,IC₅₀ 为 0.19 ng/mL,LOD 为 0.03 ng/mL,交叉反应率低于 9%,样品未经净化处理和浓缩,表现出很小的基质影响,很好地展示出该免疫分析方法的简便性^[24]。Zhang 等建立 DEP 的 ic-ELISA,检测范围为 0.005 ~ 18.6 ng/mL,检测限为 0.004 9 ng/mL,与其他结构类似物的交叉反应率很低(<9%),在果汁、奶茶、纯奶和酸奶样品中的添加回收率在 91.1% ~ 109.3% 之间^[26]。Zhang 等制备获得 DEHP 多克隆抗体并与 HRP 偶联作为检测探针建立了 dc-ELISA 方法,最低检测限为 0.004 2 ng/mL,检测范围为 0.001 ~ 1 000 ng/mL,与结构类似物的交叉反应率低于 1%,并且被成功应用于婴儿用品中 DEHP 的检测^[36]。

2.1.2 荧光免疫分析检测 荧光免疫分析方法(FIA)以荧光物质作为标记物,荧光信号赋予该分析方法更高的特异性和更高的光量子效率,使检测准确性和灵敏度获得进一步提高。Zhang 等建立了基于多克隆抗体的 DBP 间接竞争 FIA,方法检测限为 0.02 ng/mL,IC₅₀ 为 10.53 ng/mL,检测范围为 0.1 ~ 300 ng/mL,与其他 PAEs 塑化剂的交叉率低于 9.6%,并对稻田水、河水、自来水、矿泉水进行了添加检测^[28]。Zhang 等将异硫氰酸荧光素(FITC)和羊抗兔二抗偶联制备荧光标记二抗,结合制备的 DCHP 兔源多克隆抗体建立了 FIA,DCHP 检测范围为 0.1 ~ 200 ng/mL,检测限为 0.05 ng/mL,特异性较高[交叉反应率(CR) < 8.7%],在多种水样检测中均表现出良好的重现性^[22]。Zhang 等在用 dc-ELISA 检测 DMP 的研究中,还将 DMP 多克隆抗体和 FITC 偶联制备荧光标记抗体,建立了 DMP 直接竞争 FIA(dc-FIA),线性范围为 0.05 ~ 30 ng/mL,检测限为 0.02 ng/mL,在使用同种抗原和抗体的情况下,灵敏度较 dc-ELISA 提高了 4 倍以上,并被应用于水样的检测^[23]。Zeng 等在制备特异性 DBP 单克隆抗体的基础上,建立 FIA 分析方法对 DBP 在小鼠体内的分布进行了检测,并建立了 ic-ELISA 检测小鼠不同脏器内 DBP 的累积情况,将免疫分析技术很好地应用到生物活体检测方面^[37]。Cui 等制备获得 DIBP 多克隆抗体和羊抗兔-FITC,建立间接

竞争 FIA 方法用于食用油样品中 DIBP 的检测,方法检测限达到 5.82 ng/mL, IC_{50} 为 61.2 ng/mL,检测范围为 10.47 ~ 357.06 ng/mL,方法具有很高的特异性($CR < 1.5\%$)^[25]。

2.1.3 均相免疫分析检测 免疫分析检测从非均相模式转变为均相模式将使分析检测步骤更加简便,检测时间明显缩短,偏振检测技术、磁分离技术的应用可以实现均相模式的检测,进而简化检测程序和提高检测效率。Tian 等用 FITC 标记 DEP 抗体,开发了 DEP 的荧光偏振免疫分析方法(FPIA),检测限为 6.0 ng/mL, IC_{50} 为 40.4 ng/mL,线性范围为 10 ~ 200 ng/mL,瓶装水样品的检测限为 1.46 ng/mL,果汁样品的检测限为 340 ng/mL,药物胶囊样品的检测限为 50 000 ng/g,3 种样品的回收率为 85.9% ~ 114.9%,相对标准偏差为 4.3% ~ 17.0%^[38]。笔者所在研究室的 Zhu 等将 DEP 多克隆抗体通过羊抗兔二抗定向负载在磁珠表面,包被抗原与铜离子螯合剂偶联作为标记物,建立了 1 种磁珠均相直接竞争时间分辨荧光免疫分析方法(TRFIA),方法的检测限达到 5.92 pg/mL,并且被应用于镇江市水环境中的 DEP 分布检测,实际检测到的 DEP 浓度为 2.98 ~ 306.19 ng/mL^[39]。这 2 种 PAEs 免疫分析技术将均相模式、磁分离的高效性和荧光信号的高灵敏度结合,使检测能力显著提升,可为其他物质高灵敏、均相、高效痕量检测提供参考。

2.2 超灵敏 PCR 免疫分析检测

随着人类对环境和食品安全意识的提高,对有毒有害物质的检测也提出了更高要求。在此情形下,能够准确灵敏地检测样品中超低含量有毒有害物质的检测技术被极大地需求和欢迎。Sun 等报道了基于金纳米颗粒的实时定量-免疫 PCR 分析技术用于 DEP 的超高灵敏度检测,检测范围为 4 fg/mL ~ 40 pg/mL,检测限为 1.06 fg/mL,特异性很高($CR < 5\%$),进而被用于食品中 DEP 的痕量检测^[27]。该报道将免疫分析和超灵敏 PCR 技术结合,使得 DEP 的检测灵敏度得到极大提高(理论提高 3 个数量级以上),是当前灵敏度最高的标记检测策略,对于其他有毒有害物质的超痕量检测发展具有重要指导价值。

2.3 多组分免疫分析检测

随着 PAEs 塑化剂在环境中长期暴露,环境样品中同时存在多种 PAEs 的可能性大大增强,当前

主要是针对单一组分的检测方法难以满足多组分同时检测的需求。为了扩大免疫分析的检测范围,研究人员将研究目标投向多种分析物分析,也叫作宽谱特异性分析、多组分分析或宽选择性分析^[40]。区别于单组分分析的是,多组分分析可以对多种分析物进行总量的检测或分别进行定量检测,在初筛或初检中是一种很好的方法^[41]。Ius 等将多克隆抗体生物素化,将链霉亲和素与铜系络合物的双向螯合剂(BCPDA)偶联作为标记物,建立了广谱 PAEs 的 TRFIA,与 DMP、DEP、DBP、BBP、DNOP 的交叉率分别为 100%、110%、106%、104%、97%,与其他类似物的交叉率低于 3.5%,可用于这 5 种 PAEs 塑化剂的同时分析检测,且交叉率相近,检测范围为 0.5 pmol/mL ~ 2 nmol/mL^[19]。Tang 等通过合成 PAEs 通用半抗原,免疫制备获得多克隆抗体,能够识别多种 PAEs(包括 DMP、DEP、DBP、DNOP、BBP、DEHP、DCHP),交叉反应率在 63.9% ~ 103.6% 之间, IC_{50} 在 17.12 ~ 102.57 ng/mL 之间,最低检测限在 0.012 ~ 0.042 ng/mL 之间,检测到温室土壤样品中的 PAEs 浓度为 1 260 ~ 3 580 ng/g,且使用 10 年的温室土壤比使用 5 年的能够检测出更高 PAEs 浓度^[21]。PAEs 多组分免疫分析检测技术的开发,为样品中多种 PAEs 同时存在提供了便捷的筛选手段,对于简化初筛程序、提高检测效率具有重要价值。

2.4 免疫亲和层析分析检测

免疫亲和层析分析技术是通过层析技术将免疫分析技术展示出来,便于更直观、更便捷地分析待测物质,可以实现定性和半定量检测。关于 PAEs 免疫分析主要是前文提到的方法,没有采用免疫亲和层析技术对其进行研究的报道,但在实际应用中,研究人员采用免疫亲和层析技术开发 PAEs 检测卡,也有多家生化试剂公司生产和销售 PAEs 类塑化剂检测卡。

3 PAEs 免疫检测装置及应用

PAEs 免疫检测装置主要是免疫检测试剂盒和检测卡,这 2 种装置分别以 ELISA、胶体金免疫亲和层析为核心技术,在此基础上进行产品化,形成可用于生产实际中 PAEs 污染检测的产品。当前,国内外已有多个生化试剂公司生产和销售 PAEs 类试剂盒和检测卡。如国内的北京勤邦生物技术有限公司可以提供用于白酒样本中 DBP、DIBP 检测的

ELISA 试剂盒、化学发光试剂盒和检测卡,其中 ELISA 试剂盒的灵敏度为 10 ng/mL,样品检测限为 100 ng/mL,检测回收率稳定,变异系数小于 10%。北京普赞生物技术有限公司的 DBP 检测试剂盒的灵敏度达 30 ng/mL,样品回收率为 $(95 \pm 20)\%$,变异系数、交叉率均低于 10%,可用于定性、定量检测饮用水、饮料、酒等样品中的 DBP。美国 REAGEN 公司的 DBP 试剂盒检测灵敏度为 50 ng/mL,回收率为 70% ~ 130%。美国 GTX 公司的 DEHP 试剂盒检测限达 100 ng/mL,适用于肌肉和肝脏组织、尿样、血清、饲料中 DEHP 的检测。在检测装置的应用方面,也有相关报道,曹必溥等将北京普赞生物技术有限公司生产的塑化剂 ELISA 检测试剂盒应用于红酒中 DBP 的快速检测,并用 GC-MS 法对检测结果进行比较研究,结果表明,试剂盒能够满足对 DBP 的初筛要求,且样品前处理简单、检测快速、特异性高^[42]。PAEs 检测试剂盒和检测卡的生产和供应,可为环境和食品安全检测提供便捷快速的保障。

4 PAEs 免疫快速检测技术的发展趋势

PAEs 免疫快速检测技术作为一种简便快速的技术手段,在前期抗原抗体制备和免疫分析方法开发的基础上形成常见 PAEs 塑化剂检测的技术储备,并且重点部分种类已经有检测试剂盒和检测卡产品储备和商品化。这一系列 PAEs 免疫分析技术的开发可以为仪器分析检测提供替代和补充方法。由于这些免疫分析技术本身性能的差异和独特优势能够满足不同检测场所和检测需求,消费者在实际应用时可以灵活选择。然而,目前尚未有关于多种 PAEs 免疫快速分析方面的研究报道,有必要将此不足补充完善作为重要技术储备。此外,鉴于环境和食品中 PAEs 广泛存在、暴露风险大、超痕量水平样品难以准确检测,对免疫分析检测的质量要求也更加严格。免疫分析检测能否获得更高的灵敏度和特异性,以及更加简便快捷的操作,作为核心试剂的抗体起着关键作用。然而,用传统经典方法从动物体内获得的抗体,其质量和性状难以改变和提高。因此,加强 PAEs 抗体和免疫分析方法的研究,特别是应用新技术新方法制备高灵敏度、高特异性、多功能的抗体,对于推动免疫快速分析技术更多更广泛地应用于 PAEs 分析检测中具有重要意义。当前的免疫快速检测装置主要是试剂盒和检测卡,前期研究中灵敏度更为显著的荧光免疫分析

和 PCR 免疫分析技术,以及更加便捷高效的均相免疫分析技术应该更好地将其产品化并加以推广应用,以便进一步完善免疫快速检测体系,更好地保护环境和食品安全,保障消费者健康。

参考文献:

- [1] 曹九超,金青哲. 食用油中塑化剂的污染途径及分析方法的研究进展[J]. 中国油脂,2013,38(5):1-5.
- [2] 褚 玥,梁德沛,孙远明,等. 食品中 16 种邻苯二甲酸酯类塑化剂的 GC-MS 检测方法研究[J]. 中国粮油学报,2014,29(2):94-99.
- [3] Sedha S, Gautam A K, Verma Y, et al. Determination of *in vivo* estrogenic potential of di-isobutyl phthalate (DIBP) and di-isononyl phthalate (DINP) in rats[J]. Environmental Science and Pollution Research,2015,22(22):18197-18202.
- [4] 李晓贝,张 腾,周昌艳,等. 四种蔬菜对 DBP 和 DEHP 及其代谢物的吸收累积研究[J]. 农业资源与环境学报,2018,35(1):87-94.
- [5] Heudorf U, Mersch - Sundermann V, Angerer J. Phthalates: toxicology and exposure[J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health,2007,210(5):623-634.
- [6] 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.
- [7] 左 蓓,邹柯婷,李永波,等. 食用油中邻苯二甲酸酯类塑化剂检测及迁移研究进展[J]. 现代食品,2018,4(7):7-13.
- [8] 严煌倩,李 勇,翟丽菲,等. 气相色谱-质谱法结合 QuEChERS 法快速检测青椒中 15 种邻苯二甲酸酯[J]. 江苏农业学报,2018,34(2):459-465.
- [9] Rudel R, Camann D E, Spengler J D, et al. Phthalates, alkylphenols, pesticides, polybrominated diphenyl ethers, and other endocrine-disrupting compounds in indoor air and dust[J]. Environmental Science & Technology,2003,37(20):4543-4553.
- [10] Yao J R, Xu H, Lv L L, et al. A novel liquid-phase microextraction method combined with high performance liquid chromatography for analysis of phthalate esters in landfill leachates[J]. Analytica Chimica Acta,2008,616(1):42-48.
- [11] Komesli O T, Bakirdere S, Bayören C, et al. Simultaneous determination of selected endocrine disrupter compounds in wastewater samples in ultra trace levels using HPLC-ES-MS/MS[J]. Environmental Monitoring and Assessment,2012,184(8):5215-5224.
- [12] Feng J J, Sun M, Bu Y N, et al. Nanostructured copper-coated solid-phase microextraction fiber for gas chromatographic analysis of dibutyl phthalate and diethylhexyl phthalate environmental estrogens[J]. Journal of Separation Science,2015,38(1):128-133.
- [13] 陈满英,邹旭凤,刘杏宜,等. 食品及食品包装材料中塑化剂的检测研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2017,8(4):1305-1311.
- [14] 徐敦明,郑向华,杨黎忠,等. 液相色谱-串联质谱法测定饮料

- 中邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯和邻苯二甲酸二异壬酯[J]. 分析化学, 2012, 40(2): 304-308.
- [15] 陈山丹, 费桂琴. 气相色谱-串联质谱法测定玩具产品中 23 种增塑剂[J]. 中国标准化, 2017, 9(18): 22-24.
- [16] 李晓敏, 王景, 张庆合, 等. 食品中邻苯二甲酸酯类化合物的分析方法研究进展[J]. 色谱, 2015, 33(11): 1147-1154.
- [17] 中华人民共和国卫生部, 中国国家标准化管理委员会. 生活饮用水卫生标准: GB 5749—2006[S]. 中华人民共和国卫生部, 2006.
- [18] 宋娟, 王榕妹, 王悦秋, 等. 半抗原的设计、修饰及人工抗原的制备[J]. 分析化学, 2010, 38(8): 1211-1218.
- [19] Ius A, Bacigalupo M A, Meroni G, et al. Development of a timeresolved fluoroimmunoassay for phthalate esters in water[J]. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1993, 345(8): 589-591.
- [20] Yanaihara N, Kato I, Nagasawa S, et al. Immunoassay for phthalic acid esters: 6399318[P]. 2002-10-15.
- [21] Tang M, Wei J Y, Du H H, et al. Synthesis of an artificial antigen and preparation of a polyclonal antibody for the sensitive determination of phthalate esters by enzyme-linked immunoassay[J]. Analytical Methods, 2015, 7(8): 3402-3410.
- [22] Zhang M C, Sheng Y L. An indirect competitive fluorescence immunoassay for determination of dicyclohexyl phthalate in water samples[J]. Journal of Fluorescence, 2010, 20(6): 1167-1173.
- [23] Zhang M C, Liu B L, Cong Y, et al. Development of highly specific fluorescence immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for detection of dimethyl phthalate in water samples[J]. Food and Agricultural Immunology, 2011, 22(4): 297-309.
- [24] Zhang M C, Hu Y R, Liu S H, et al. Rapid monitoring of dipropyl phthalate in food samples using a chemiluminescent enzyme immunoassay[J]. Food Analytical Methods, 2012, 5(5): 1105-1113.
- [25] Cui X P, Wu P P, Lai D, 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): 9372-9378.
- [26] Zhang M C, Yu X N, Wang Y, et al. A highly sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) by antigen coating for diethyl phthalate analysis in foods[J]. Food Analytical Methods, 2013, 6(4): 1223-1228.
- [27] Sun R Y, Zhuang H S. An ultrasensitive gold nanoparticles improved real-time immuno-PCR assay for detecting diethyl phthalate in foodstuff samples[J]. Analytical Bioanalytical, 2015, 480: 49-57.
- [28] Zhang M C, Wang Q E, Zhuang H S. A novel competitive fluorescence immunoassay for the determination of dibutyl phthalate[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2006, 386(5): 1401-1406.
- [29] Wei C X, Ding S M, You H H, et al. An immunoassay for dibutyl phthalate based on direct hapten linkage to the polystyrene surface of microtiter plates[J]. PLoS ONE, 2011, 6(12): e29196.
- [30] Xu F, Wang W J, Jiang H Y, et al. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of dibutyl phthalate in white wine, compared with GC-MS[J]. Food Analytical Methods, 2014, 7(8): 1619-1626.
- [31] Zhou L F, Lei Y J, Zhang D, et al. An ultra-sensitive monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for dibutyl phthalate in human urinary[J]. Science of the Total Environment, 2016, 541: 570-578.
- [32] Sun R Y, Zhuang H S. An indirect competitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of dimethyl phthalate (DMP) in milk and milk products[J]. Journal of Environmental Science and Health (Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes), 2015, 50(4): 275-284.
- [33] 庄惠生, 郎庆, 张明翠, 等. 抗体包被荧光免疫法测定水中的邻苯二甲酸二环己酯[J]. 分析化学, 2006, 34(特刊): 211-213.
- [34] 万宇平, 陶光灿, 李勇, 等. 邻苯二甲酸二丁酯(塑化剂) ELISA 检测方法的研究[J]. 食品工业, 2013, 34(9): 194-196.
- [35] Sun R Y, Zhuang H S. Biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of dibutyl phthalate in beverages and drinking water using a specific polyclonal antibody[J]. Food Analytical Methods, 2015, 8(8): 1990-1999.
- [36] Zhang M C, Hong W T, Wu X Y, et al. A highly sensitive and direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in infant supplies[J]. Analytical Methods, 2015, 7: 5441-5446.
- [37] Zeng Q, Wei C X, Wu Y, et al. Approach to distribution and accumulation of dibutyl phthalate in rats immunoassay[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 56: 18-27.
- [38] Tian X, Dong Y Q, Wang Y F, et al. Quantification of diethyl phthalate by a rapid and homogenous fluorescence polarization immunoassay[J]. Analytical Letters, 2015, 48(18): 2843-2855.
- [39] Zhu F, Mao C M, Du D L. Time-resolved immunoassay based on magnetic particles for the detection of diethyl phthalate in environmental water samples[J]. Science of the Total Environment, 2017, 601/602: 723-731.
- [40] Xu Z L, Xie G M, Li Y X, et al. Production and characterization of a broad-specificity polyclonal antibody for *O,O*-diethyl organophosphorus pesticides and a quantitative structure-activity relationship study of antibody recognition[J]. Analytica Chimica Acta, 2009, 647(1): 90-96.
- [41] Piao Y Z, Kim Y J, Kim Y A, et al. Development of ELISAs for the class-specific determination of organophosphorus pesticides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(21): 10004-10013.
- [42] 曹必溥, 曹庸, 苗建银, 等. ELISA 试剂盒法与 GC-MS 法检测红酒中塑化剂的比较研究[J]. 食品与机械, 2015, 31(1): 82-85.