

酱油与白酒中邻苯二甲酸二甲酯的化学发光酶免疫分析方法研究

朱彬 朱帆 徐振林 杨金易 柳春红 孙远明
王弘 雷红涛 沈玉栋*

(广东省食品质量安全重点实验室, 华南农业大学食品学院, 广州 510642)

摘 要 本研究以邻苯二甲酸二甲酯(DMP)为研究目标,以4-氨基邻苯二甲酸二甲酯为半抗原,通过重氮化法偶联载体蛋白并免疫动物,制备针对DMP的特异性免疫多克隆抗体。通过棋盘滴定法和单因素实验确定最佳的实验参数,即包被原浓度为50 $\mu\text{g/L}$,一抗浓度为92.5 $\mu\text{g/L}$,二抗浓度为1 $\mu\text{g/mL}$,药物稀释液为pH 6.0的纯水,竞争反应时间为40 min,基于此建立了间接竞争化学发光酶联免疫分析法检测DMP。本方法对DMP的检出限为0.29 $\mu\text{g/L}$,线性检测范围为0.74 ~ 30.32 $\mu\text{g/L}$,与13种结构和功能类似物的交叉反应率均<5%,通过倍比稀释降低白酒、酱油样品基质干扰,对样品的平均回收率在80.2% ~ 116.0%之间,平均相对标准偏差<3.6%,结果与GC-MS法的测定结果相符。本方法适用于食品样品中DMP的快速检测。

关键词 邻苯二甲酸二甲酯; 化学发光酶免疫分析; 白酒; 酱油

1 引言

邻苯二甲酸酯类(Phthalate acid esters, PAEs)物质是一种广泛应用于工程材料、医学材料、食品包装、农业佐剂的塑化剂^[1],属于环境雌激素类物质,具有中枢神经系统抑制、干扰内分泌、致癌等潜在危害^[2~5]。邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl phthalate, DMP)是最常用的PAEs之一,易溶于水,可通过迁移溶出而进入食物链污染农产品和食品^[5~7],已被美国环保局(EPA)列为优先控制污染物,同时被台湾环保署列管为第一类毒性化学物质管制^[8],也是我国列入优先监测污染物黑名单的3种高风险PAEs之一^[9],被严格禁止用于食品^[10]。因此,开发准确、快速、灵敏、低成本的DMP检测方法具有重要意义。

目前,DMP的检测主要采用大型仪器方法,如气相色谱法^[11~13]、液相色谱法^[14,15]、液相色谱-质谱联用^[16,17]、气相色谱-质谱联用^[18~22]等,检测可达pg/L ~ mg/L水平,还可以实现包括DMP在内的多种PAEs同时检测。但是,大型仪器法普遍存在设备昂贵、检测耗时、成本高等问题,不易普及,特别是我国农业生产存在分散经营、量大面广等特点,单靠仪器检测无法满足实际监测需求。基于抗原-抗体特异性识别的免疫分析技术是联合国粮农组织向发展中国家推荐的一种高效、低成本、易普及的快速检测技术,与大型仪器法搭配使用可以有效提高对DMP检测效率,大大降低检测成本,符合我国国情。Zhang等^[23,24]报道了环境水样基质中DMP的ELISA和FIA检测法,定量下限达0.02 ng/mL; Sun等^[25]采用生物素-链霉亲和素信号放大系统,建立了奶制品中DMP的BA-ELISA检测方法,虽然检测灵敏度达到pg水平,但生物素系统的引入使试剂盒的构建复杂化,成本较高,保存稳定性降低,还未见相关实际应用。本研究基于重氮化法制备DMP抗原,免疫动物制备抗DMP多克隆抗体,结合高灵敏、抗干扰性强的化学发光检测技术,建立了白酒及酱油基质样品中DMP的间接竞争化学发光酶免疫分析(Indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay, icCLEIA)检测方法,并与国标确证技术进行比对,对于快速筛查食品中塑化剂DMP具有重要参考和实用价值。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

96孔白色发光板(深圳金灿华公司); EYELA 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器公司); DEM-3 型自动洗

2015-02-20 收稿; 2015-05-16 接受

本文系广东省科技计划(No. 2013B040402006, 2014A020219008)、广州市科技计划(Nos. 2011Y2-00007, 2013J4100053)、国家自然科学基金(No. 31371769)和广东省优秀博士学位论文作者(徐振林)项目资助

* E-mail: syd_tyx@163.com

板机(北京拓普分析仪器公司); SpectraMax L Luminescence Microplate Reader(美国 MD 公司); GC-MS-QP2010Plus 气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司)。

4-氨基邻苯二甲酸(APA, 安耐吉化学公司); 氯化亚砷(SOCl_2)及其它试剂(天津科密欧试剂公司); 柱层层析硅胶(100~200目, 青岛谱科分离材料公司); DMP及13种类似物(Dikma); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体(武汉博士德生物公司); 化学发光底物液、增强液(广州万联生物公司); 实验用水为 $18.2\text{ m}\Omega\cdot\text{cm}$ 超纯水; 白酒、酱油样品购于广州某超市。

2.2 实验方法

2.2.1 半抗原及抗原合成 取0.2 g APA溶于10 mL无水甲醇, 室温下逐滴加入5 mL SOCl_2 , 于 70°C 水浴回流12 h。反应结束后, 旋蒸除去溶剂, 残余物用硅胶柱层析纯化得白色粉末状半抗原4-氨基邻苯二甲酸二甲酯(ADMP), 并进行质谱和核磁共振鉴定。采用重氮化法^[24]偶联载体蛋白BSA和OVA, 获得免疫原ADMP-BSA和包被原ADMP-OVA, 用紫外扫描法对偶联物进行鉴定^[26]。

2.2.2 抗体制备与纯化 参照文献[27]的免疫程序, 将抗原ADMP-BSA免疫两只雌性新西兰大白兔(2.0~2.5 kg), 得到兔多克隆抗体, 用辛酸-硫酸铵法^[28]纯化抗体, -20°C 保存备用, 并鉴定其效价和抑制性能。

2.2.3 icCLEIA方法的建立 icCLEIA步骤参照文献[29]进行。将稀释后的包被原 $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入96孔白色发光板中, 37°C 包被过夜。洗涤2次, 加入封闭液 $120\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, 振荡混匀, 于 37°C 封闭3 h, 甩干孔中液体, 37°C 烘干。标准品稀释成系列浓度 $50\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入板孔, 振荡混匀; 加入稀释后的抗体 $50\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育40 min; 洗板5次, 加入 $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ HRP标记羊抗兔抗体, 37°C 孵育50 min; 洗板5次, $100\text{ }\mu\text{L}/\text{孔}$ 加入化学发光底物液和增强液等体积混合溶液, 振荡反应1 min, 立即测定各孔发光值(RLU)。

icCLEIA条件优化: 采用棋盘滴定法确定包被原和抗体浓度; 以单因素实验, 考察药物稀释缓冲液、pH值、二抗浓度、竞争反应时间对icCLEIA影响。在最优条件下, 以DMP浓度对数为横坐标, RLU/RLU_0 (RLU为添加药物时的RLU值, RLU_0 为不添加药物时的RLU值)为纵坐标; 用Origin9.0软件进行四参数拟合绘制标准曲线, 计算DMP半抑制浓度(IC_{50})、检出限(LOD, IC_{10})和线性范围($\text{IC}_{20}\sim\text{IC}_{80}$)。

2.2.4 方法特异性 采用交叉反应率(CR)评价方法的特异性, CR越大, 特异性越差^[29]。采用2.2.3节方法分别绘制DMP结构及功能类似物的竞争抑制曲线, 通过公式(1)计算DMP结构及功能类似物对DMP抗体的CR。

$$\text{CR}(\%) = \frac{\text{IC}_{50(\text{DMP})}}{\text{IC}_{50(\text{类似物})}} \times 100 \quad (1)$$

2.2.5 样品前处理方法 取1 mL样品(市售白酒和酱油)调至pH 4~5, 乙醚萃取2次, $3000\text{ r}/\text{min}$ 离心5 min, 取上清液 38°C 旋蒸, 用1 mL 10%甲醇(pH 6.0)复溶, 再用水(pH 6.0)稀释, 即可用于检测。

2.2.6 样品基质效应的消除 采用倍比稀释消除样品基质效应。具体操作: 将空白样品经前处理后的样品提取液用水(pH 6.0)稀释0.5、10倍, 将此作为标准品稀释液, 配制成8个不同浓度的DMP标准溶液, 再分别绘制标准曲线, 比较不同稀释倍数下标准曲线与采用水(pH 6.0)做溶剂建立的标准曲线。

2.2.7 实际样品检测 白酒和酱油样品各取3份, 分别添加20、50和 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{L}$ 的DMP标准品, 按2.2.5节方法处理, 采用国标方法^[18]复溶并检测; 同时, 将该复溶液适当稀释后, 取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 用所建立的icCLEIA法进行测定。

3 结果与讨论

3.1 半抗原设计合成

对于结构简单的小分子, 增加半抗原的复杂性和共轭芳环, 能增强诱导动物机体免疫应答产生特异性抗体的能力^[30]。DMP为仅含一个孤立苯环的酯类小分子, 不利于产生特异性抗体。而蛋白中的酪氨酸含有苯酚结构侧链, 易与芳基伯胺进行重氮化反应。因此, 将半抗原ADMP用重氮化法偶联载体

蛋白,通过偶氮键形成共轭体系(图1),更利于动物机体产生DMP特异性抗体。ADMP的ESI-MS和HNMR鉴定数据为:ESI-MS (positive) m/z : 210.0 $[M+H]^+$, 440.9 $[2M+Na]^+$; 1H -NMR (600 MHz, $CDCl_3$): δ 3.89 (s, 6H, 2CH₃), 4.19 (s, br, 2H, NH₂), 6.66 (dd, $J=8.4$ Hz, $J=2.4$ Hz, 1H, ArH), 6.70 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, ArH), 7.70 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, ArH)。结果表明,成功合成了ADMP。

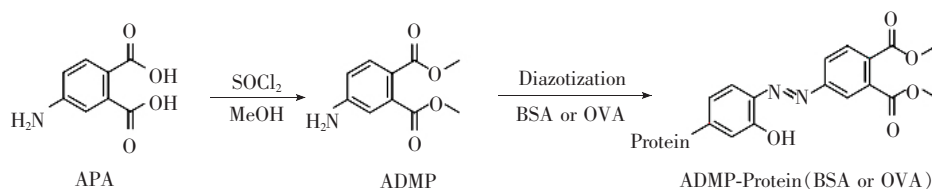


图1 邻苯二甲酸二甲酯半抗原及抗原合成路线

Fig. 1 Synthesis of hapten and antigen of dimethyl phthalate (DMP)

3.2 人工抗原鉴定

将重氮化法获得的抗原ADMP-BSA、ADMP-OVA与BSA、OVA及ADMP进行紫外扫描对照,发现偶联后相对于半抗原ADMP的288 nm特征吸收峰,在抗原上表现为红移至311 nm,应为重氮化形成偶氮键苯环共轭所致,说明偶联成功^[26]。

3.3 抗体的鉴定

参照文献[28],采用辛酸-硫酸铵法纯化抗体,并通过ELISA法测定抗体效价为1:128000,在1 mg/L DMP竞争抑制浓度下,抑制率为70.4%,表明得到高亲和力的DMP抗体。

3.4 检测DMP的icCLEIA方法建立

对影响icCLEIA的实验参数进行了优化,以 RLU_0/IC_{50} 值作为评价指标,比值越大说明灵敏度越高,重复性越好^[29]。由于DMP是中等极性物质,缓冲液中的离子会降低DMP的溶解度,而DMP在水(pH 6.0)作稀释液时获得结果最佳,所以选择水(pH 6.0)为稀释液。同时,对包被浓度、一抗浓度、二抗浓度、反应时间等参数也进行了优化,获得最优条件为:包被原浓度为50 $\mu g/L$,一抗浓度为92.5 $\mu g/L$,二抗浓度为1 $\mu g/mL$,竞争反应时间为40 min。在此条件下,绘制icCLEIA法检测DMP的标准曲线(图2),其 IC_{50} 为4.75 $\mu g/L$,检出限(IC_{10})为0.29 $\mu g/L$,线性检测范围($IC_{20} \sim IC_{80}$)为0.74 ~ 30.3 $\mu g/L$ 。

3.5 特异性实验

实验测定了13种与DMP结构功能类似的塑化剂的交叉反应率(CR,表1),结果表明,13种类似物的 $CR < 5\%$,说明此方法对DMP具有良好的特异性。

3.6 样品基质效应的消除

实际样品通常因复杂的基质成分(如蛋白质、脂肪等)而产生基质干扰效应,造成假阳性或假阴性结果^[30],从而限制方法应用。酱油富含氨基酸和色素,而白酒中醇类和风味物质酯类较多,因而有效消除基质效应非常必要。实验结果(图3a和b)表明,将酱油、白酒样品提取液用稀释液分别稀释10倍、5倍所得标准曲线与稀释液所得标准曲线一致性较好,且 IC_{50} 和线性范围接近,证明有效降低了基质干扰。因此,酱油、白酒样品经过前处理和复溶后最佳稀释倍数确定为10倍和5倍,用于实际样品分析。

3.7 实际样品检测

向阴性样品(酱油和白酒)添加20、50和100 $\mu g/L$ 的DMP,采用所建立的icCLEIA法检测,计算回

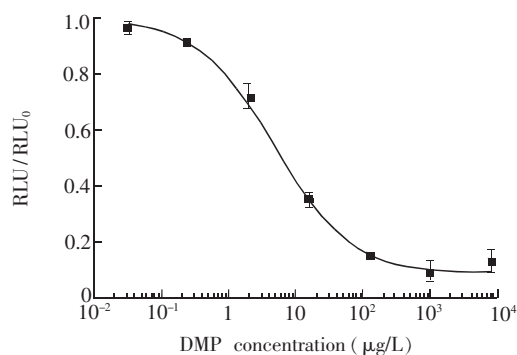


图2 icCLEIA检测DMP的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay (icCLEIA) for detection of DMP ($n=6$)

收率与相对标准偏差 (RSD) ; 同时 ,采用国标方法^[17] 采用的气相色谱-质谱联用法进行检测比对 (表 2) 。结果表明 ,icCLEIA 法样品平均回收率在 80.2% ~ 116.0% 之间 ,平均 RSD < 3.6% ; 国标方法样品平均回收率在 74.5% ~ 95.2% 之间 ,平均 RSD < 6.2% ,说明所建立的 icCLEIA 方法准确度和精密度好。

表 1 DMP 及其类似物与抗体的交叉反应

Table 1 Cross-reactivity of DMP and its analogues with antibody

类似物 Analogues	半抑制浓度 IC ₅₀ Half-inhibitory concentration (μg/L)	交叉反应率 Cross reactivity (%)
邻苯二甲酸二甲酯 Dimethyl phthalate (DMP)	4.75	100
邻苯二甲酸二壬酯 Dinonyl phthalate (DNP)	> 10000	ND
邻苯二甲酸二异壬酯 Di-iso-nonyl phthalate(DINP)	> 10000	ND
邻苯二甲酸二正辛酯 Di- <i>n</i> -octyl phthalate(DNOP)	690.33	< 1
邻苯二甲酸二苯酯 Diphenyl phthalate(DPhP)	> 10000	ND
邻苯二甲酸二(2-乙基) 己酯 Bis(2-ethylhexyl) phthalate(DEHP)	> 10000	ND
邻苯二甲酸二环己酯 Dicyclohexyl phthalate(DCHP)	427.50	< 5
邻苯二甲酸丁基苄基酯 Butyl benzyl phthalate (BBP)	413.06	< 5
邻苯二甲酸二(2-乙氧基) 乙酯 Bis(ethoxyethyl) phthalate(DEEP)	> 10000	ND
邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基) 酯 Di(4-methyl-2-pentyl) phthalate(BMPP)	> 10000	ND
邻苯二甲酸二(2-甲氧基) 乙酯 Bis(2-methoxyethyl) phthalate(DMEP)	> 10000	ND
邻苯二甲酸二丁酯 Dibutyl phthalate (DBP)	399.21	< 5
邻苯二甲酸二异丁酯 Di-iso-butyl phthalate (DIBP)	458.93	< 5
邻苯二甲酸二乙酯 Diethyl phthalate (DEP)	861.32	< 1

ND: 表示未检测出(Not detected) 。

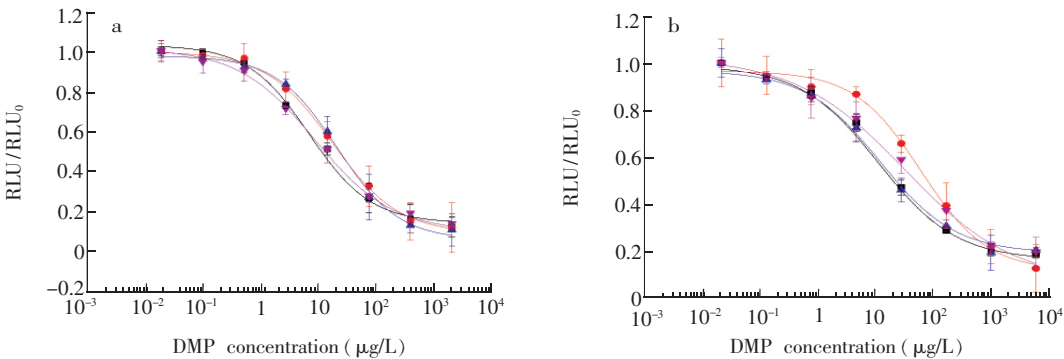


图 3 酱油 (a) 和白酒样品 (b) 基质效应

Fig.3 Matrix effect of soy sauce (a) and liquor (b)

■ 药物稀释液(Analyte diluent) ; ● 样品提取液不稀释(Sample extract) ; ▲ 样品提取液稀释 5 倍(Sample extract diluted 5-folds) ; ▼ 样品提取液稀释 10 倍(Sample extract diluted 10-folds) 。

表 2 化学发光酶免疫法与气相色谱-质谱联用法测定结果的比较

Table 2 Determination results of icCLEIA and gas chromatography-mass spectrometry(GC-MS) (*n* = 3)

样品 Samples	加标浓度 Spiked level (μg/L)	化学发光酶免疫法 icCLEIA			气相色谱-质谱联用法 GC-MS		
		测得值 Found (μg/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)	测得值 Found (μg/L)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%)
白酒 Liquor	20	16.56 ± 1.54	82.8	9.3	17.38 ± 1.42	86.9	8.2
	50	40.10 ± 0.98	80.2	2.4	46.13 ± 0.43	92.3	0.9
	100	116.03 ± 1.62	116.0	1.4	92.90 ± 10.06	92.9	10.8
酱油 Soy sauce	20	22.40 ± 0.72	112.0	3.2	17.82 ± 0.86	89.1	4.8
	50	42.60 ± 0.55	85.2	1.3	37.24 ± 2.92	74.5	7.8
	100	90.47 ± 3.35	90.5	3.7	95.23 ± 4.20	95.2	4.4

References

- 1 XU Xiang-Hua , DING Zhuo-Pin , TAO Ning-Ping , FANG Xiao-Ming. *Modern Sci. Instrum.* , **2008** , (3) : 32 – 35
徐向华 , 丁卓平 , 陶宁萍 , 方晓明. 现代科学仪器 , **2008** , (3) : 32 – 35
- 2 Kamrin M A. *J. Toxicol. Environ. Health B* , **2009** , 12(2) : 157 – 174
- 3 ZHAO Yi-Na , MO Fei , FU Xiao-Wei. *Modern Agric. Sci. Technol.* , **2011** , (22) : 285 – 286
赵意娜 , 莫非 , 傅小伟. 现代农业科技 , **2011** , (22) : 285 – 286
- 4 Guo Y , Zhang Z F , Liu L Y , Li Y F , Ren N Q , Kannan K. *J. Agric. Food Chem.* , **2012** , 60(27) : 6913 – 6919
- 5 LIU Chun-Hong , SUN Yuan-Ming , YANG Yi-Chao , LIANG Tian. *Modern Food Sci. Technol.* , **2012** , (3) : 339 – 341
柳春红 , 孙远明 , 杨艺超 , 梁添. 现代食品科技 , **2012** , (3) : 339 – 341
- 6 Van H M , Geerts L , Vanermen G , Servaes K , Sioen I , de H S , Fierens T. *Environ. Res.* , **2014** , 134 : 345 – 352
- 7 Bradley E L , Burden R A , Leon I , Mortimer D N , Speck D R , Castle L. *Food Addit. Contam. A* , **2013** , 30(4) : 722 – 734
- 8 GUO Yong-Mei. *Plast. Addit.* , **2012** , (4) : 18 – 20
郭永梅. 塑料助剂 , **2012** , (4) : 18 – 20
- 9 YANG Run , LIU Hua-Liang. *J. Environ. Health.* , **2012** , 9 : 825 – 827
杨润 , 刘华良. 环境与健康杂志 , **2012** , 9 : 825 – 827
- 10 No. 551 [2011]. *The Letter About the Maximum Residual Amount of Phthalic Acid Esters in Food and Food Additives Informed by the Office of the Ministry of Health.* Ministry of Health of the People's Republic of China
卫生部办公厅关于通报食品及食品添加剂中邻苯二甲酸酯类物质最大残留量的函. 中华人民共和国卫生部. [2011]551 号
- 11 Sibali L L , Okonkwo J O , Mccrindle R I. *J. Environ. Sci. Health A* , **2013** , 48(11) : 1365 – 1377
- 12 Yan H Y , Cheng X L , Liu B M. *J. Chromatogr. B* , **2011** , 879(25) : 2507 – 2512
- 13 LUO Yao-Zhong , LI Zhong-Ying , LIU Zheng-Hua , LI Yong-Jun. *Journal of Analytical Science* , **2014** , 30(6) : 890 – 894
罗跃中 , 李忠英 , 刘正华 , 李拥军. 分析科学学报 , **2014** , 30(6) : 890 – 894
- 14 CAO Yang , YIN Xue-Yan , ZHOU Fang-Qing , QI Fei-Fei , XU Qian. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2013** , 41 (12) : 1837 – 1843
曹阳 , 殷雪琰 , 周方晴 , 祁菲菲 , 许茜. 分析化学 , **2013** , 41(12) : 1837 – 1843
- 15 Li S Q , Li T , Gao P , Lu R H , Zhou W F , Gao H X. *J. Chromatogr. Sci.* , **2014** , 52(9) : 1127 – 1134
- 16 Hayasaka Y. *J. Chromatogr. A* , **2014** , 1372 : 120 – 127
- 17 ZHANG Hai-Jing , HU Xiao-Jian , LIN Shao-Bin. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2014** , 42(9) : 1281 – 1287
张海婧 , 胡小键 , 林少彬. 分析化学 , **2014** , 42(9) : 1281 – 1287
- 18 GB/T 21911-2008 , *Determination of Phthalate Esters in Foods.* National Standards of the People's Republic of China.
食品中邻苯二甲酸酯的测定. 中华人民共和国国家标准. GB/T 21911-2008
- 19 Ierapetritis I , Lioupis A , Lampi E. *Food Anal. Method.* , **2014** , 7(7) : 1451 – 1457
- 20 LU LI , GONG Xu , FENG You-Long. *Chinese Journal of Chromatography* , **2014** , 32(11) : 1286 – 1292
芦丽 , 宫旭 , 冯有龙. 色谱 , **2014** , 32(11) : 1286 – 1292
- 21 Sun H W , Yang Y L , L H Zhang J X , Sun N. *J. Agric. Food Chem.* , **2012** , 60(22) : 5532 – 5539
- 22 Cinelli G , Avino P , Notardonato I , Centola A , Russo M V. *Anal. Chim. Acta* , **2013** , 769 : 72 – 78
- 23 Zhang M C , Liu S H , Zhuang H S , Hu Y R. *Appl. Biochem. Biotech.* , **2012** , 166(2) : 436 – 445
- 24 Zhang M C , Liu B L , Cong Y , Liu S H , Hu Y R. *Food Agric. Immunol.* , **2011** , 22(4) : 297 – 309
- 25 Sun R Y , Zhuang H S. *J. Environ. Sci. Health B* , **2015** , 50(4) : 275 – 284
- 26 Luo L , Shen Y D , Wang H , Xiao Z L , Sun Y M , Lei H T , Yang J Y , Xu Z L. *Food Anal. Method.* , **2015** , 8(5) : 1101 – 1111
- 27 ZHU Li-Ping , CHEN Xue-Qing. *Commonly Used Experimental Methods in Immunology.* Beijing: People's Military Medical Press , **2000** : 351 – 357
朱立平 , 陈学清. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社 , **2000** : 351 – 357

- 28 YI Li-Hua , YANG Yi-Chao , SUN Yuan-Ming , LEI Hong-Tao , LIU Chun-Hong , SHEN Yu-Dong. *Sci. Technol. Food Ind.* , **2013** , 34(18) : 221 – 224
羿利华 , 杨艺超 , 孙远明 , 雷红涛 , 柳春红 , 沈玉栋. 食品工业科技 , **2013** , 34(18) : 221 – 224
- 29 SUN Wen-Jia , SHEN Yu-Dong , SUN Yuan-Ming , LEI Hong-Tao , WANG Hong , ZEN Dao-Ping , YANG Jin-Yi. *Chinese J. Anal. Chem.* , **2012** , 40(9) : 1397 – 1402
孙文佳 , 沈玉栋 , 孙远明 , 雷红涛 , 王 弘 , 曾道平 , 杨金易. 分析化学 , **2012** , 40(9) : 1397 – 1402
- 30 Luo L , Xu Z L , Yang J Y , Xiao Z L , Li Y J , Beier R C , Sun Y M , Lei H T , Wang H , Shen Y D. *J. Agric. Food Chem.* , **2014** , 62(51) : 12299 – 12308
- 31 Gomaa A , Boye J. *Food Chem.* , **2015** , 175(9) : 585 – 592

Indirect Competitive Chemiluminescent Enzyme Immunoassay Method for Determination of Dimethyl Phthalate in Soy Sauce and Liquor

ZHU Bin , ZHU Fan , XU Zhen-Lin , YANG Jin-Yi , LIU Chun-Hong , SUN Yuan-Ming ,
WANG Hong , LEI Hong-Tao , SHEN Yu-Dong*

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Food Quality and Safety , College of Food Science ,
South China Agricultural University , Guangzhou 510642 , China)

Abstract 4-Amino dimethyl phthalate as the hapten was coupled to carrier protein and then used to immunize New Zealand rabbits. Polyclonal antibody which showed specific binding to dimethyl phthalate (DMP) was thus obtained , and on the basis of this , an indirect competitive chemiluminescent enzyme-linked immunoassay (icCLEIA) was developed. The experimental parameters of icCLEIA were optimized as follows: the concentration of coating antigen was 50 $\mu\text{g/L}$, the primary antibody concentration was 92. 5 $\mu\text{g/L}$, the secondary antibody concentration was 1 $\mu\text{g/mL}$, distilled water (pH 6. 0) was used as diluent solution and the competitive reaction time was 40 min. Under the optimal conditions , the icCLEIA exhibited a linear working range from 0. 74 $\mu\text{g/L}$ to 30. 32 $\mu\text{g/L}$ with the limit of detection of 0. 29 $\mu\text{g/L}$. The cross-reactivity of thirteen structural analogues was lower than 5% . The recovery of DMP from spiked liquor and soy sauce samples ranged from 80. 2% to 116. 0% and the average RSD was less than 3. 6% . The detection results of the spiked liquor and soy sauce samples were consistent with those by standard gas chromatography-mass spectrometry method. The developed icCLEIA method exhibited a practical potential for detecting DMP residue in food samples.

Keywords Dimethyl phthalate; Indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay; Liquor; Soy sauce

(Received 20 February 2015; accepted 16 May 2015)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31371769)