

邻苯二甲酸酯类塑化剂人工抗原的制备及表征

羿利华, 杨艺超, 孙远明, 雷红涛, 柳春红*, 沈玉栋*

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

摘要:以邻苯二甲酸酯类增塑剂为目标, 根据共性结构设计合成一种能够检测所有邻苯二甲酸酯类(PAEs)化合物所需的抗原。以4-硝基邻苯二甲酸为原料, 经过还原, 衍生生成4-氨基邻苯二甲酸, 将合成的半抗原衍生物通过戊二醛法与牛血清白蛋白BSA(或卵清白蛋白OVA)偶联, 得到人工抗原, 再免疫新西兰大白兔, 经间接竞争ELISA法检测其特异性。经紫外光谱和免疫实验确证偶联成功, 抗原4-PAE-BSA和4-PAE-OVA的结合比为分别为15:1和12:1, 经间接竞争ELISA法检测, 反应特异性较好。该抗原的合成为进一步制备针对邻苯二甲酸的宽谱特异性抗体奠定了基础。
关键词:邻苯二甲酸酯, 人工抗原, 制备, 表征

Preparation and characterization of artificial antigen for phthalate acid ester plasticizers

YI Li-hua, YANG Yi-chao, SUN Yuan-ming, LEI Hong-tao, LIU Chun-hong*, SHEN Yu-dong*

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

Abstract: To prepare artificial antigens of phthalate acid esters (PAEs) as plasticizers, an antigen for an immunological detection of PAEs was designed and synthesized, which was based on the common hydrolysis product of the PAEs. The artificial hapten of PAEs had been successfully synthesized from 4-nitrophthalic acid via deoxidization. The hapten was conjugated to bovine serum albumin (BSA) or ovalbumin (OVA) via glutaric dialdehyde linkage. Thus the antiserum of New Zealand white rabbits were obtained after injection of the artificial antigen and indirect competitive ELISA (icELISA) was established to analyze the specificity of the artificial antigen. The successful linkage of the antigen was tested and confirmed by UV, and immune effects. And the approximate coupling ratio of 4-amino phthalate to BSA and OVA was 15:1 and 12:1 respectively. The icELISA assay had shown high sensitivity and specificity to 4-PAE. The synthesis of the artificial antigen made it possible to establish broad-specificity antibodies of PAEs.

Key words: phthalate acid esters (PAEs); artificial antigen; preparation; characterization

中图分类号: TS201.6

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2013)18-0221-05

邻苯二甲酸酯 (Phthalic Acid Esters, PAEs, 又名酞酸酯) 作为热塑性塑料生产中常用的一类增塑剂, 是大约30种化合物的总称^[1], 广泛应用于食品包装材料、容器、医疗用具、人造革、儿童玩具等方面, 但其大量使用后在环境中的释放及食品中的迁移已经对

生态系统和人类的健康造成了很大威胁^[2]。邻苯二甲酸酯类增塑剂是一种具有生殖毒性和发育毒性的环境雌激素, 能通过消化系统、呼吸系统和皮肤进入人体, 有研究发现^[3], DBP的代谢产物MBP对大鼠具有胚胎毒作用, 导致胚胎生长缓慢。研究认为^[4], 邻苯二甲酸二异辛酯 (DEHP) 是大鼠和小鼠的致癌物, 能使啮齿类动物致癌。美国EPA和我国环境检测总部都将其列为环境中优先控制的有机污染物^[1]。2011年4月, 台湾爆出了堪称“30年最严重的食品掺毒事件”的塑化剂风波。为了防止此类事件的继续蔓延, 卫生部迅速将16种邻苯二甲酸酯类物质列入《食品中可能

收稿日期: 2013-03-15 * 通讯联系人

作者简介: 羿利华(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品化学与营养。

基金项目: 广东省教育部科技部产学研结合项目(2012B090600005);

广州市科技计划项目(11BppZXcc2100021); 广东省教育厅科技创新项目(2012KJCX0020)。

菌Z-10菌体及芽孢的影响[J]. 食品工业科技, 2009, 30(6): 177-180.

[17] 孔青. 丁酸梭菌培养与发酵动力学以及调节腹泻小鼠肠

道菌群平衡的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.

[18] 徐世荣, 陈骧, 吴云鹏. 细菌芽孢形成机制在微生物制剂生产中的应用[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(4): 121-125.

违法添加的非食用物质和易滥用的食品添加剂名单(第六批)》。

由于邻苯二甲酸酯种类繁多,且多个化合物同时被检测出来的现象十分普遍,因此,非常有必要建立可同时检测多个PAEs的多残留检测方法(multi-residues analysis)。PAEs的分析多采用仪器分析法,关皓月等^[5]用气质联用色谱法测定明胶空心胶囊中的邻苯二甲酸酯类化合物,杨荣静等^[6]用高效液相色谱-串联质谱法检测食品接触材料中17种邻苯二甲酸酯类增塑剂。仪器分析方法可以实现多残留检测,但样品前处理繁琐费时、检测费用高,难以满足高通量、快速、在线检测的需要。免疫分析技术具有特异性强、灵敏度高,方便快捷、分析容量大、检测成本低、安全可靠等优点,被认为是21世纪最具竞争性和挑战性的超微量检测技术^[7]。目前国内外主要集中在针对单一邻苯二甲酸酯建立特异性免疫检测方法研究^[8],尚无检测邻苯二甲酸酯类总量的全抗原设计与抗体制备的相关研究。为此,本文根据邻苯二甲酸酯类增塑剂水解后能得到共有物质邻苯二甲酸^[9]的设计,设计能够检测邻苯二甲酸总含量的人工抗原,通过摩尔比例,最终得到邻苯二甲酸酯污染总摩尔量。其前处理方式具有简便、快速、灵敏度高的优点。这种全新的抗原设计模式,将为建立邻苯二甲酸酯的多残留免疫检测技术开拓新的研究思路。

1 材料与方 法

1.1 材料与仪器

4-硝基邻苯二甲酸 纯度 $\geq 99\%$,百灵威化学试剂有限公司;钯碳 百灵威化学试剂有限公司;高纯氢气 广州市君多气体有限公司;二环乙基碳二亚胺(DCC)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、牛血清蛋白(BSA, 98.6%)、卵清蛋白(OVA, 98%)、弗氏完全佐剂与不完全佐剂 美国Sigma公司;SPF级新西兰大白兔(合格证号:0089839) 来源:南方医科大学,雌性10周龄左右,体重1.8~2.2kg,中科院广州生物医药与健康研究院;N,N-二甲基甲酰胺(DMF) 广州化学试剂厂;羊抗兔IgG-HRP二抗 武汉博士德生物工程有限公司;其他试剂 国产分析纯;Tris-HCl缓冲溶液(T液)。

DRX-400/600NMR型核磁共振仪 德国-瑞士布鲁克(Bruker)公司;QP50型质谱仪 日本岛津(Shimadzu)公司;JB-3型定时恒温磁力搅拌器 上海雷磁仪器厂新泾分厂;YD型氧气袋 上海汇丰医疗器械有限公司;U-3010型紫外-可见分光光度仪 日本日立(Hitachi)公司;MK2型洗板机 美国热电(Thermo)公司;微量可调移液器 美国Eppendorf公司生产;TGL-16G型高速台式离心机 上海安亭科学仪器厂生产;DG3022A型酶标仪 南京华东电子集团医疗装备有限责任有限公司生产;96孔酶标板 厦门云鹏科技有限公司。

1.2 人工抗原的合成与鉴定

根据“在分子结构、立体化学、电子分布和疏水性上,半抗原应与待测物分子尽可能相似,以便于机体对特征结构进行识别”的原则^[10],本文重新合成半

抗原,即在抗原决定簇(邻苯二甲酸结构)的最远端(苯环4号位)引入含氨基基团的半抗原手臂,再经戊二醛法与载体蛋白偶联,在半抗原与载体蛋白之间连接了一条含5个碳的手臂链,使邻苯二甲酸的结构得以在载体蛋白表面暴露,防止其被载体蛋白包埋,以便诱导动物产生较强的免疫应答效应。

1.2.1 半抗原合成 以4-硝基邻苯二甲酸为原料,在钯碳催化下通入 H_2 还原成4-氨基邻苯二甲酸,即半抗原,合成路线如图1所示。取0.845g(4mmol)4-硝基邻苯二甲酸和1.8g钯碳溶于20mL乙醇,缓慢通入 H_2 ,常温下搅拌,反应2h。反应结束后过滤,上清液旋转蒸发浓缩,用乙酸乙酯溶解后再次过滤,滤液减压蒸干后得到灰色固体(即半抗原)0.72g,产率 $>99\%$ 。产物经薄层层析鉴定纯度后,进一步用质谱(MS)及核磁共振(NMR)进行结构鉴定。

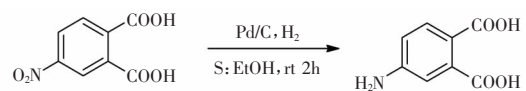


图1 半抗原合成路线图

Fig.1 Synthesis of haptent

1.2.2 抗原合成 采用戊二醛法^[11-12]将上述半抗原分别与牛血清蛋白(BSA)和卵白蛋白(OVA)偶联制备人工抗原,合成路线如图2所示。取0.0025mmol的BSA(或OVA)溶于5mL PBS中,再另取半抗原0.1mmol溶于0.5mL DMF中,并逐滴滴加至上述PBS中,称为A液;将含量25%的戊二醛用PBS稀释10倍后吸取200 μ L,磁力搅拌下,逐滴缓慢加入A液中,滴加时间为2h,4 $^{\circ}$ C下反应12h装入透析袋,用PBS透析3d,每天换水三次,得到棕黄色的邻苯二甲酸全抗原溶液。

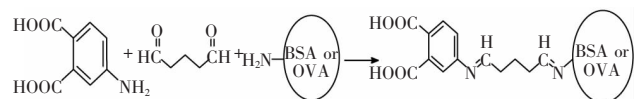


图2 抗原合成路线图

Fig.2 Synthesis of antigens

1.2.3 抗原的鉴定及偶联率的确定 为鉴定半抗原是否成功偶联到载体蛋白上,分别将偶联物、载体蛋白、半抗原溶液在200~400nm波长间进行紫外吸收光谱测定,鉴定半抗原与载体蛋白(BSA或OVA)是否偶联成功^[13]。

全抗原结合比的测定^[14]:利用紫外分光光度法定量抗原中BSA的浓度,利用4-PAE 280nm处的紫外峰定量透析的抗原溶液中4-PAE未反应量,用加入量减去未反应量得到抗原中4-PAE的量。根据下列公式计算抗原结合比^[15]:

$$\text{结合比} = \frac{4\text{-PAE浓度}/4\text{-PAE的相对分子质量}}{\text{BSA浓度}/\text{BSA相对分子质量}}$$

1.3 免疫动物及抗血清检测^[16]

选取10周龄的SPF级新西兰大白兔2只,以邻苯二甲酸免疫抗原(4-PAE-BSA)作免疫原免疫。4-PAE-BSA用生理盐水稀释至1mg/mL(以蛋白浓度

计),加等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,免疫剂量为1mL/只。腹腔及背部多点注射进行免疫^[7],每次间隔14d加强免疫一次,再次免疫改用弗氏不完全佐剂乳化抗原。免疫5次后再7d尾部取血进行ELISA检测。

以邻苯二甲酸包被抗原(4-PAE-OVA)作为包被原,将4-PAE-BSA抗血清倍比稀释,采用间接ELISA法对抗血清进行检测,同时做两条抗体稀释曲线,其中一条每孔中加入50μL 1μg/mL的phthalic acid标准品,另一条每孔中加入等体积的T液作为对照,反应后于450nm下测定OD值。以抗血清稀释倍数为横坐标,OD值为纵坐标,建立竞争抑制曲线。

1.4 抗体特异性分析

将ELISA方法中的药物分别换成稀释的邻苯二甲酸(PA)、邻苯二甲酸二甲酯(DMP)、邻苯二甲酸二乙酯(DEP)、邻苯二甲酸二丁酯(DBP)、邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)、邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)、苯甲酸等,计算各竞争物的IC₅₀,比较抗体对它们的亲和性。同时,根据下式计算各竞争物与抗邻苯二甲酸抗体的交叉反应率。

$$\text{交叉反应率}(\%) = \frac{\text{IC}_{50}(\text{邻苯二甲酸})}{\text{IC}_{50}(\text{竞争物})} \times 100$$

2 结果与分析

2.1 半抗原合成结果分析

对半抗原4-氨基邻苯二甲酸(4-PAE)进行了质谱(MS)与核磁共振(NMR)分析(图3~图5),结果表明合成成功。其波谱数据及结构归属如下:APCI-MS(positive) m/z: 182.0[M+H]⁺; ¹H-NMR(600MHz, DMSO): δ6.57-6.59(m, 2H, ArH), 7.55(d, J=8.4Hz, 1H, ArH); ¹³C-NMR(150MHz, DMSO) δ111.93, 113.38,

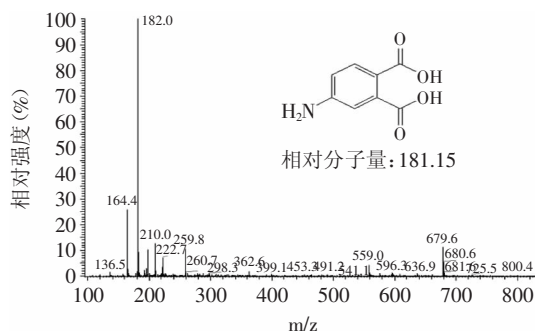


图3 半抗原4-PAE的APCI-MS图谱([M-H]⁺)
Fig.3 APCI-MS Spectrum of hapten 4-PAE([M-H]⁺)

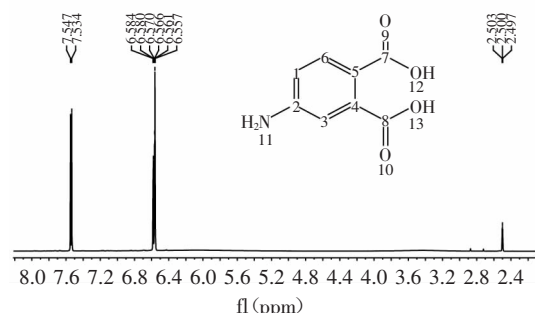


图4 半抗原4-PAE的¹H-NMR图谱
Fig.4 ¹H-NMR Spectrum of hapten 4-PAE

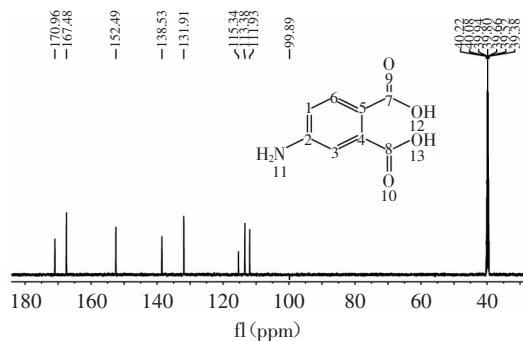


图5 半抗原4-PAE的¹³C-NMR图谱
Fig.5 ¹³C-NMR Spectrum of hapten 4-PAE

115.34, 131.91, 138.53, 152.49, 167.48, 170.96。从以上可知,4-PAE(分子量181.15)的电喷雾质谱中在其对应的出峰位置有明显的吸收峰,证明了4-PAE的存在;4-PAE的核磁氢谱中有明显的苯环1号位和3号位的氢原子吸收峰,然而氨基和羧基上的氢为活泼氢,氢谱图常常不能体现出其特征峰,但可说明苯环上的氢受到了氨基和羧基两个官能团的影响;在4-PAE的核磁碳谱中的特征吸收峰一一归属4-APA上的8个碳原子,验证了4-PAE的碳原子构架。通过以上分析,可以确认合成物为4-氨基邻苯二甲酸。

2.2 抗原的鉴定

经紫外分光光度计测定,得到载体蛋白、半抗原以及合成的人工抗原紫外扫描图,见图6。

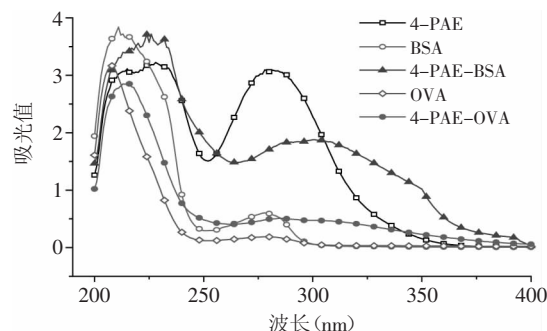


图6 抗原紫外扫描图
Fig.6 Ultraviolet scanning of synthesized antigens

从图6可以看出,4-氨基邻苯二甲酸(4-PAE)在230nm和280nm处有两个特征吸收峰,载体蛋白BSA和OVA在210nm左右和280nm左右出现显著吸收峰,邻苯二甲酸免疫抗原(4-PAE-BSA)在225nm和305nm处也存在两个特征吸收峰;而邻苯二甲酸包被抗原(4-PAE-OVA)在215nm和285nm。邻苯二甲酸抗原全抗原由于4-PAE的氨基和蛋白质发生了偶联,所以紫外光谱中峰形发生了改变,同时具备载体蛋白和半抗原的吸收特征。这说明在载体蛋白BSA和OVA上分别连接了半抗原4-PAE,人工免疫抗原和包被抗原偶联成功。

通过公式计算,得到4-PAE-BSA的结合比为15:1,4-PAE-OVA的结合比为12:1。

2.3 抗血清检测

新西兰大白兔经5次免疫后采血清,采用间接竞争

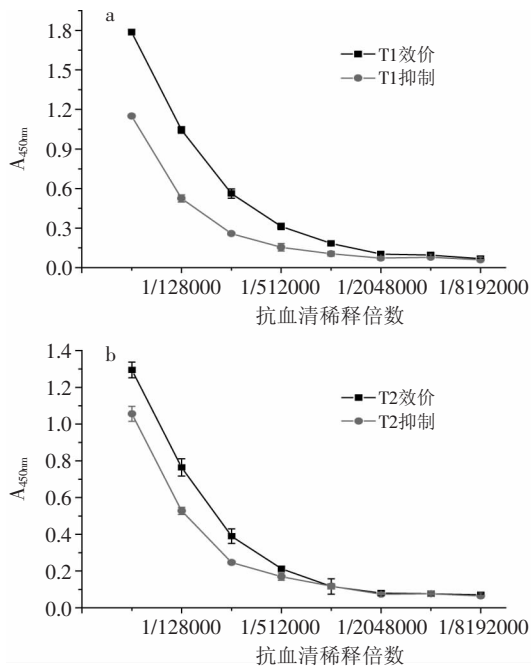


图7 T1和T2竞争抑制曲线

Fig.7 The competitive inhibition curve of T1 and T2

竞争酶联免疫吸附法 (icELISA) 对抗血清效果进行检测, 以4-PAE-OVA作为包被原, 将4-PAE-BSA抗血清倍比稀释, 采用间接ELISA法对抗血清进行检测, 同时做两条抗体稀释曲线, 其中一条每孔中加入50 μ L 1 μ g/mL的phthalic acid标准品, 另一条每孔中加入等体积的T液作为对照, 反应后于450nm下测定OD值。以抗血清稀释倍数为横坐标, OD值为纵坐标, 建立竞争抑制曲线如图7。兔子T1的效价和抑制率均比T2高, 故选取T1进行后续实验。其中T1效价为128K, 抑制率达50%。

2.4 抗体特异性分析

本文采用icELISA方法对半抗原4-PAE (4-氨基邻苯二甲酸)、邻苯二甲酸、对氨基苯甲酸、对硝基苯甲酸、对羟基苯甲酸甲酯等12种邻苯二甲酸的结构类似物进行了方法特异性评价, 其灵敏度和交叉反

表1 icELISA对12种药物的灵敏度及特异性

Table 1 Sensitivity and specificity of icELISA for 12 drugs

编号	交叉反应物	IC ₅₀ (ng/mL)	CR (%)
1	半抗原4-PAE	109.69	152.9
2	邻苯二甲酸	167.71	100
3	对氨基苯甲酸	>200000	<0.1
4	对硝基苯甲酸	>200000	<0.1
5	对羟基苯甲酸甲酯	>200000	<0.1
6	邻苯二甲酸二环己酯	>200000	<0.1
7	邻苯二甲酸二乙酯	>200000	<0.1
8	邻苯二甲酸二丁酯	>200000	<0.1
9	邻苯二甲酸二正辛酯	68206.01	0.3
10	邻苯二甲酸单乙酯	30084.62	0.6
11	邻苯二甲酸二甲酯	>200000	<0.1
12	邻苯二甲酸单甲酯	46071.07	0.4

注: IC₅₀: 灵敏度; CR: 交叉反应率。

应率如表1所示。可以看出, 12种药物中, 除半抗原4-PAE和邻苯二甲酸外, 只有3种药物有一定的交叉反应, 分别是: 邻苯二甲酸二正辛酯、邻苯二甲酸单乙酯、邻苯二甲酸单甲酯, 但交叉反应率均小于0.6%。因此, 表明以邻苯二甲酸免疫抗原 (4-PAE-BSA) 免疫大白兔所获的抗体建立的icELISA方法特异性好。

3 结论与讨论

本实验采用H₂还原法合成邻苯二甲酸的半抗原, 经核磁共振图、H谱、C谱鉴定合成成功。采用戊二醛法偶联蛋白, 合成人工抗原, 经紫外扫描知偶联成功。对所产生的抗体进行ELISA检测, 选出效价、抑制率较好的血清进行后续实验。与邻苯二甲酸、对氨基苯甲酸、对硝基苯甲酸等12种药物的交叉反应结果显示抗体具有良好的特异性, 可以用于邻苯二甲酸总量的测定。

本实验合成了能够检测邻苯二甲酸的人工抗原, 该抗原使得含有多种邻苯二甲酸酯类增塑剂的食物等经过水解处理后即可检测出其污染的PAEs摩尔总量的目标得以实现。同时, 由于任何一种邻苯二甲酸酯都能被水解成邻苯二甲酸, 因此, 该方法也可以作为食品是否污染邻苯二甲酸酯类塑化剂的前期筛选方法。本研究利用H₂还原, 优于通常采用的锌粉还原法^[18], 因其可以避免催化剂Zn参与反应的弊端; 并且原料反应充分, 产率几乎达到100%, 只需通过简单的过滤取出催化剂钯碳, 无需萃取、浓缩和过硅胶柱等复杂的化学提纯工艺。通过戊二醛法与载体蛋白偶联制备全抗原的方法, 也优于前人在制备单种邻苯二甲酸酯的全抗原时采用的重氮法^[19]。任海涛等^[20]实验中设计几种手臂长度不同的免疫原, 结果发现连接手臂长的免疫原得到的抗血清效价高且灵敏度好, 本实验在半抗原与载体蛋白之间连接了一条含5个碳的手臂链, 使邻苯二甲酸的抗原决定簇 (即两个羧基) 远离载体蛋白, 能够完全暴露于载体蛋白表面, 避免被包埋的风险, 用来免疫动物的效果更佳。因此, 可以推测以该人工抗原作为免疫原继续免疫有望得到特异性更好的抗血清, 这对下一步继续建立检测PAEs总含量的宽谱特异性抗体免疫分析方法良好的铺垫。

参考文献

- [1] 任仁. 警惕邻苯二甲酸酯污染[J]. 大学化学, 2003, 18(6): 33-36.
- [2] Giam C S, Chan H S, Neff G S, et al. Phthalate ester plasticizers: a new class of marine pollutant[J]. Science, 1978, 199 (4327): 419-421.
- [3] 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): 1778-1781.
- [4] Dees J H, Gazouli M, Papadopoulos V. Effect of mono-ethylhexyl phthalate on MA-10 Leydig tumor cells[J]. Reproductive Toxicology, 2001, 15(2): 171-187.
- [5] 关皓月, 赵霞, 孙会敏. GC-MS/SIM法测定明胶空心胶囊中

(下转第228页)

- hypertensive rats[J]. Life Sci Including Pharmacology Letters, 1998, 63(19):1679-1684.
- [3] Hanson J R, de Oliveira B H. Stevioside and related sweet diterpenoid glycosides[J]. Nat Prod Rep, 1993, 10:301-309.
- [4] 何群, 胡洪天, 冷吉亮, 等. 甜叶菊种子阳畦育苗及农艺措施[J]. 中国糖料, 2007(3):45-47.
- [5] 苏婷婷, 杨婷婷, 王钰, 等. 离子束辐照甜叶菊种子的当代生物学效应[J]. 核技术, 2010, 33(7):547-550.
- [6] 中华人民共和国卫生部中国国家标准化管理委员会. GB 2760-2007. 食品添加剂使用卫生标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.
- [7] Brandle JE, Telmer PG. Steviol glycoside biosynthesis[J]. Phytochemistry, 2007, 68(4):1855-1863.
- [8] Oliveira BH, Packer JF, Chimelli M, et al. Enzymatic modification of stevioside by cell-free extract of *Gibberella fujikuroi*[J]. Journal of Biotechnology, 2007, 131(1):92-96.
- [9] 郑国香, 任南琪, 李永峰. 选育高效产氨细菌的诱变剂选择[J]. 哈尔滨工业大学学报, 2008, 40(8):1233-1237.
- [10] 聂世现, 王钰, 黄文静, 等. 高产酒精酵母菌株及甘薯品种筛选[J]. 食品工业科技, 2011, 32(2):159-162.
- [11] 白丽娟, 季中梅, 李向东. 一株高产胞外多糖米酒乳杆菌的诱变筛选[J]. 食品工业科技, 2012, 33(23):195-197.
- [12] 刘靖, 王立梅, 齐斌. 丙酸杆菌素高产菌株的诱变选育[J]. 食品工业科技, 2012, 33(9):187-189.
- [13] 沈萍, 陈向东. 微生物学实验[M]. 第4版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
- [14] 向阳. 藤赤霉的诱变及营养缺陷型筛选研究[J]. 华中师范大学学报: 自然科学版, 1993, 27(4):507-511.
- [15] 谈心, 马欣荣. 赤霉素生物合成途径及其相关研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2008, 14(4):571-577.
- [16] J E Brandle, P G Telmer. Steviol glycoside biosynthesis[J]. Phytochemistry, 2007, 68(14):1855-1863.
- [17] Yoshio Shigematsu, Noboru Murofushi, Nobutaka Takahashi. Structures of the Metabolites from Steviol Methyl Ester by *Gibberella fujikuroi*[J]. Agric Biol Chem, 2007, 46(9):2313-2318.
- [18] James R Hanson, Bras H D Oliveira. The microbiological transformation of steviol derivatives by *Rhizopus stolonzeer* and *Gzbbarella fujzkuroz*[J]. Phytochemistry, 1990, 29(12):3805-3807.
- [19] 胡静, 陈育如, 魏霞, 等. 高产环糊精葡萄糖基转移酶的枯草芽孢杆菌选育、产酶与酶学特性[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(4):97-102.
- [20] 廖德仲, 楼建平, 徐汉生. 甜菊苷的结构改造[J]. 科学通报, 1988, 15:1151-1153.
- [21] Jaitak V, Kumar Kaul V, Bandna Kumar N, et al. Simple and efficient enzymatic transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus firmus*[J]. Biotechnol Lett, 2009, 31(9):1415-1420.
- [22] Abelyan V A, Balayan A M, Ghochikyan V T, et al. transglycosylation of stevioside by cyclodextrin glucanotransferases of various groups of microorganisms[J]. Appl Biochem Micro, 2004, 40(2):129-134.
- [23] Milagre H M S, Martins L R, Takahashi J A. Novel agents for enzymatic and fungal hydrolysis of stevioside[J]. Braz Microbiol, 2009, 40(2):367-372.
- [24] Wehrli C. Process for the enzymatic preparation of steviol from stevioside: Europe, WO 2011089031[P]. 2011-07-28.

(上接第224页)

- 的邻苯二甲酸酯类化合物[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(4):482-485.
- [6] 杨荣静, 卫碧文, 高欢, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测食品接触材料中的17种邻苯二甲酸酯类增塑剂[J]. 环境化学, 2012, 31(6):925-929.
- [7] Gao Y, Tu S, Li T, et al. Effective synthesis of 7-Amino-6-cyano-5-aryl-5H-pyran[2,3-d] pyrimidine-2,4(1H,3H)-diones under microwave irradiation[J]. Synthetic Communications, 2004, 34:1295-1299.
- [8] 张明翠. 邻苯二甲酸酯类环境激素的荧光免疫分析研究及应用[D]. 上海: 东华大学, 2006.
- [9] Cao XL. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods[J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety, 2010, 9(1):21-43.
- [10] Goodrow M H, Harrison R O, Hammock B D. Hapten synthesis, antibody development, and competitive inhibition enzyme immunoassay for s-triazine herbicides[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990, 38:990-996.
- [11] 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(8):1211-1218.
- [12] 吴扬, 袁均林, 杨旭, 等. 草丁膦人工抗原的合成与免疫效价的测定[J]. 环境科学与技术, 2007, 30(4):40-42.
- [13] 周思祥, 刘福成. 农药人工抗原的合成研究进展[J]. 农药, 2005, 44(8):337-341.
- [14] 庄惠生, 李玉科, 张明翠. 环境荷尔蒙邻苯二甲酸二甲酯的人工全抗原合成与表征[J]. 化学试剂, 2005, 27(9):559-562.
- [15] 周兰香, 徐忠民, 李幼荣, 等. 磺胺对甲氧嘧啶全抗原的制备研究[J]. 江苏农业研究, 2001, 22(4):55-58.
- [16] P TIJSEN. Practice and theory of enzyme immunoassay [M]. Amsterdam: Elsevier, 1985:43-47.
- [17] CD Ercegovich. Analysis of Pesticide Residues: Immunological Techniques[M]. Washington D C: American Chemical Society, 1971:162-165.
- [18] 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.
- [19] 任海涛, 沈玉栋, 徐振林, 等. 咪唑啉酮代谢物单克隆抗体制备及酶联免疫吸附分析方法[J]. 分析化学, 2012, 40(5):745-751.