



郑盛武, 赖 丹, 赵肃清. 邻苯二甲酸二丁酯人工抗原的制备及免疫鉴定[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(2): 107-112.

邻苯二甲酸二丁酯人工抗原的制备及免疫鉴定

郑盛武, 赖 丹, 赵肃清

(广东工业大学 轻工化工学院, 广东 广州 510006)

摘要:【目的】制备并鉴定 1 种新型邻苯二甲酸二丁酯人工抗原。【方法】以 4-硝基邻苯二甲酸为原料, 经过酯化、还原生成 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯(DBAP), DBAP 再与戊二酸酐反应, 衍生成 4-戊二酸单酰邻苯二甲酸二丁酯(DBCP)。将合成的半抗原衍生物 DBCP 通过活性酯法与牛血清蛋白(BSA)或卵清蛋白(OVA)偶联, 得到人工抗原。通过免疫新西兰大白兔获得抗血清, 经间接竞争酶联免疫法(icELISA)检测抗体特异性。【结果】经质谱、核磁共振谱图鉴定, 半抗原衍生物合成成功, 经紫外光谱、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和免疫试验证实偶联成功, 并计算得出 DBCP 与载体蛋白 BSA 和 OVA 的结合比分别为 11:1 和 17:1。经 icELISA 法检测, 兔 1 和兔 2 的血清效价均达到 1:128 000, IC_{50} 分别为 301 和 308 $ng \cdot mL^{-1}$, 反应特异性较好。【结论】半抗原衍生物的合成是方便、安全的。邻苯二甲酸人工抗原的成功制备使获得 DBP 多克隆抗体以及建立 DBP 免疫分析方法成为可能。

关键词: 邻苯二甲酸二丁酯; 人工抗原; 光谱; 免疫鉴定

中图分类号: R446.6; O65

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2016)02-0107-06

Synthesis and identification of artificial antigen for dibutyl phthalate

ZHENG Shengwu, LAI Dan, ZHAO Suqing

(Department of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract:【Objective】This study was aimed to prepare and identify a new kind of artificial antigen for dibutyl phthalate. 【Method】Dibutyl 4-aminophthalate (DBAP) was obtained via esterification and reduction of 4-nitrophthalic acid. The hapten derivative monoglutaryl 4-amino-dibutyl phthalate (DBCP) was prepared through DBAP reacting with glutaric anhydride. DBCP was conjugated to bovine serum albumin (BSA) or ovalbumin (OVA) to make artificial immunogen via activated ester method. Then the antiserum of two female New Zealand white rabbits was obtained after injecting with artificial immunogens which were successfully coupled. Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (icELISA) was used to analyze the sensitivity and specificity of the antiserum. 【Result】The successful synthesis of hapten derivative was identified by mass spectrometry (MS) and 1H nuclear magnetic resonance (1H NMR). The successful coupling was proved by ultraviolet spectroscopy (UV) and SDS polyacrylamide gels electrophoresis (SDS-PAGE). Furthermore, the numbers of DBCP molecules per BSA/OVA molecules for two conjugates were 11:1 and 17:1 respectively, estimated by ultraviolet spectrophotometry. The icELISA method indicated high specificity for the antiserum with the highest titer being 1:128 000 for samples from both rabbits, and the IC_{50} being 301 and 308 $ng \cdot mL^{-1}$ respectively. 【Conclusion】The hapten derivative can be synthesized in a convenient and secure way. The successful synthesis of the arti-

收稿日期: 2015-05-25 优先出版时间: 2016-01-18

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20160118.1651.030.html>

作者简介: 郑盛武(1989—), 男, 硕士研究生, E-mail: bntzsw@sohu.com; 通信作者: 赵肃清(1969—), 男, 教授, 博士, E-mail: sqzhao@gdut.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(41271340); 广东省自然科学基金(2013040013021, S2013030013338)

<http://xuebao.scau.edu.cn>

ficial antigen for dibutyl phthalate makes it possible to get polyclonal antibodies and establish immunoassay for DBP.

Key words: dibutyl phthalate; artificial antigen; spectrum; immunity identification

邻苯二甲酸酯类化合物 (PAEs) 又称钛酸酯, 是大约 30 种化合物的总称, 主要用作塑料的增塑剂, 以增大塑料的可塑性和强度^[1]。邻苯二甲酸二丁酯 (DBP) 是塑化剂的一种, 工业上主要用于硝基漆和聚氯乙烯 (PVC) 塑料的生产, 以增强产品的柔韧性。此外, DBP 还用于生产防泡剂、乳胶黏合剂和纺织助剂等^[2]。塑化剂的大量生产和频繁应用, 导致在人们的日常生活中塑化剂污染严重。据报道, 中国南京市的大气塑化剂污染中, DBP 占到了 58.7%^[3]。DBP 是一种具有生殖毒性和遗传毒性的环境雌激素, 具有雌激素的作用, 致突变, 对胎儿有毒性, 对肌肉、骨骼、中枢神经系统有影响, 能通过消化系统、呼吸系统和皮肤进入人体^[4], 对人体产生不同程度的危害作用。有研究发现, DBP 的代谢产物 MBP 对大鼠具有胚胎毒性作用, 导致胚胎生长缓慢, 同时对胚胎有致畸作用^[5]。

早在 1975 年, DBP 就被世界野生动物基金会列为具有内分泌紊乱作用的物质之一^[6]。DBP 还被欧盟 2005/84/EC 指令限制使用于儿童玩具和用品中, 在塑料中的含量不得超过 0.1%。美国、加拿大、日本、韩国等多个国家也相继发布了与欧盟类似的法律和标准^[7], 我国也将其列为优先控制污染物黑名单^[8]。近年来爆发的“台湾塑化剂事件”和“白酒塑化剂事件”, 让人们重新认识了作为包装材料添加剂的“塑化剂”, 由此引发了对食品包装材料安全性能的高度关注^[9]。目前对塑化剂的检测方法主要为气相色谱 (GC)、高效液相色谱 (HPLC) 和质谱 (MS) 等, 但这些方法费时, 仪器昂贵, 需专业人士操作, 样品前处理复杂, 不能同时大量分析^[10]。本研究采用的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^[11]。

小分子物质邻苯二甲酸二丁酯只有反应原性, 没有免疫原性, 不能刺激动物发生免疫反应。为了获得具有免疫原性的完全抗原, 必须将其与大分子载体进行偶联^[12]。本研究利用戊二酸酐合成了连接有 5 个碳臂长的半抗原衍生物 4-戊二酸单酰邻苯二甲酸二丁酯 (DBCP), 再通过活性酯法将 DBCP 与载体蛋白——牛血清蛋白 (BSA) 或卵清蛋白 (OVA) 偶联获得人工抗原, 最后利用间接酶联免疫法

(icELISA) 检测抗体。该抗原的合成成为免疫分析技术的建立奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

4-硝基邻苯二甲酸 (质量分数 ≥ 99%)、钨碳: 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, 质量分数为 98.6%)、卵清蛋白 (OVA, 质量分数为 98%)、弗氏完全佐剂与不完全佐剂: 美国 Sigma 公司; SPF 级雌性新西兰大白兔: 广东省动物中心; 羊抗兔 IgG-HRP 二抗: 武汉博士德生物工程有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。TU-1901 紫外-可见分光光度仪: 北京谱析通用仪器有限责任公司; RT-2100C 型酶标仪: 雷杜生命科学股份有限公司; 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

1.2.1 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯 (DBNP) 的合成

按照文献 [13] 中的方法, 称取 20 g (0.095 mol) 4-硝基邻苯二甲酸, 加入 26 mL 正丁醇, 搅拌下加入 3.3 mL 浓 H₂SO₄ 催化, 120 ℃ 搅拌回流 7 h 后, 蒸馏除去未反应的丁醇和生成的水。趁热导入冰水中, 油状粗品用质量分数为 10% Na₂CO₃ 洗涤至水层无色 (pH7 ~ 8) 后, 分离出油状物, 用无水乙醇溶解除去不溶物, 加热后除去少量乙醇, 趁热置冰箱中冷却, 得到黄色油状液体 28.5 g, 产率 93%。

1.2.2 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 (DBAP) 的合成

取 2 g (6.19 mmol) 4-硝基邻苯二甲酸二丁酯和 0.4 g 钨碳溶于 15 mL 甲醇, 缓慢通入 H₂, 50 ℃ 条件下回流搅拌反应 5 h, 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过滤, 旋转蒸发浓缩后得淡黄色固体 1.78 g, 产率 98%。产物经硅胶柱层析提纯, 通过氢核磁共振 (¹H NMR) 和质谱 (MS) 鉴定。

1.2.3 4-戊二酸单酰邻苯二甲酸二丁酯 (DBCP) 的合成

将 0.29 g (1 mmol) DBAP 和 0.22 g (2 mmol) 戊二酸酐溶解在 20 mL 四氢呋喃 (THF) 中, 60 ℃ 条件下回流搅拌反应 8 h, 再转移至室温搅拌反应 12 h, 蒸馏除去 THF。残余物溶于 10 mL 乙酸乙酯中, 并用 10

mL 双蒸水洗涤,分离出乙酸乙酯层,转旋蒸发除去乙酸乙酯,得到黄色油状液体 0.31 g,产率 75%。

1.2.4 人工抗原的合成 将 40.7 mg (0.1 mmol) DBCP, 17 mg (0.15 mmol) NHS 完全溶于 1 mL 的二甲基甲酰胺 (DMF) 后,加入 31 mg (0.15 mmol) DCC, 4 ℃ 条件下反应 12 h,离心分离出上清液。取 900 μL 得到的上清液,滴加到 8 mL 溶有 113 mg BSA 的磷酸盐缓冲液 (PBS, pH 7.4) 中,4 ℃ 条件下反应 12 h。10 000 g · min⁻¹ 条件下离心 10 min。将上清液装入透析袋,用 PBS 透析 3 d,每 12 h 换液 1 次,得到棕黄色的邻苯二甲酸全抗原溶液。

1.2.5 人工抗原的鉴定 为鉴定半抗原与载体蛋白是否偶联成功,分别将半抗原、载体蛋白和偶联物稀释至一定浓度进行 SDS-PAGE 鉴定,并在 200 ~ 400 nm 波长间进行紫外吸收光谱测定,以紫外分光光度法估算偶联物的结合比^[14]。

1.3 免疫动物及抗血清检测

以 DBCP-BSA 作免疫原,用 PBS 溶液 (pH 7.4) 稀释至 1 mg · mL⁻¹,与等体积的弗氏完全佐剂充分乳化,对 2 只成年健康雌性新西兰大白兔采用背部多点注射和肌肉注射。3 周后再次免疫改用等量的弗氏不完全佐剂进行乳化,以后每隔 2 周免疫 1 次,免疫后 7 ~ 8 d 耳缘静脉取血^[15]。

以 DBCP-OVA 作包被原,将抗血清用 PBS 溶液

倍比稀释,采用间接 ELISA 法检测抗体效价,并用间接竞争 ELISA 法^[16] 检测抗体的特异性。以标准品 DBP 浓度的自然对数值为横坐标, D/D_0 (D 、 D_0 分别为加免抗血清和阴性血清对应的光密度) 为纵坐标,建立竞争抑制曲线。

1.4 抗体特异性分析

采用 icELISA 法分别检测邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)、邻苯二甲酸二异丁酯 (DIBP)、邻苯二甲酸单苄酯 (MBzP)、4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 (DBAP)、邻苯二甲酸二环己酯 (DCHP)、邻苯二甲酸二正辛酯 (DNOP) 与抗体的交叉反应,并计算各竞争物的半抑制率 (IC_{50}),比较抗体对它们的亲和性。根据以下公式计算各竞争物与 DBP 抗体的交叉反应率^[17]。

交叉反应率 = $\frac{\text{DBP 的 } IC_{50}}{\text{竞争物的 } IC_{50}} \times 100\%$ 。

2 结果与分析

2.1 半抗原衍生物合成结果分析

对半抗原衍生物 4-氨基邻苯二甲酸二丁酯 (DBAP) 和 4-戊二酸单酰邻苯二甲酸二丁酯 (DB-CP) 进行了质谱 (MS) 与氢核磁共振 (¹H NMR) 扫描,结果 (图 1 和图 2) 表明合成成功。

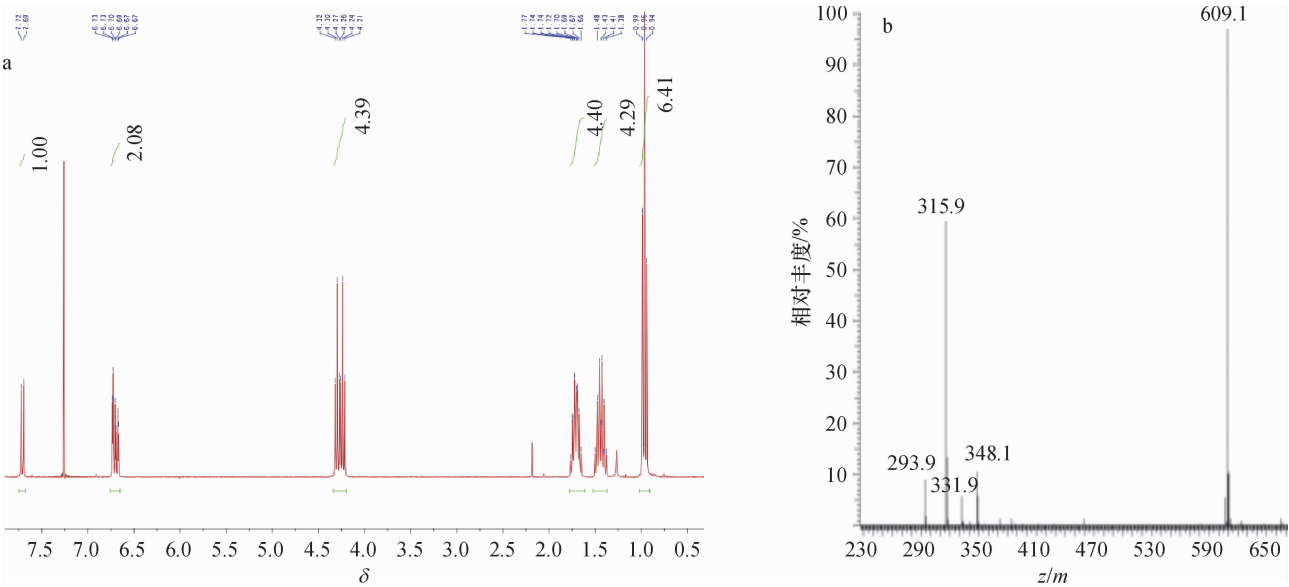


图 1 半抗原衍生物 DBAP 的¹H NMR (a) 和 MS (b) 图谱
Fig. 1 ¹H NMR (a) and MS (b) spectrums of hapten derivative DBAP

由图 1a 分析可知, DBAP 的 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 7.71 (*d*, *J* = 8.4 Hz, 1H), 6.76 ~ 6.65 (*m*, 2H), 4.27 (*dt*, *J* = 17.6, 6.7 Hz, 4H), 1.78 ~ 1.61 (*m*, 4H), 1.52 ~ 1.37 (*m*, 4H), 0.96

(*t*, *J* = 7.3 Hz, 6H), 其 MS 图 (图 1b) 中 293.9 是 $M + H^+$, 315.9 是 $M + Na^+$, 331.9 是 $M + K^+$, 348.1 是 $M + Na^+ + CH_3OH$, 609.1 是 $2M + Na^+$ 。由此可知, 该化合物的相对分子质量为 293, 与计算结果吻合。

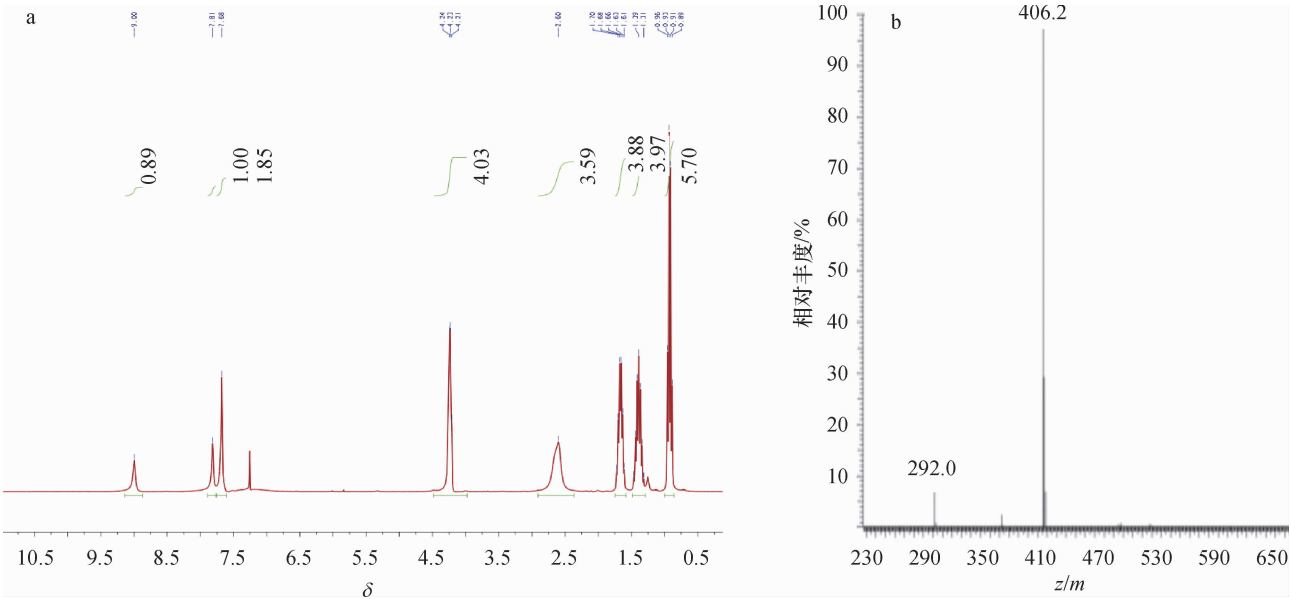


图 2 半抗原衍生物 DBCP 的¹H NMR(a)和 MS(b)图谱

Fig.2 ¹H NMR(a) and MS(b) spectrums of hapten derivative DBCP

由图 2a 分析可知 DBCP 的 ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 9.02 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.69 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 4.24 (td, J = 6.7, 3.2 Hz, 4H), 2.46 ~ 2.21 (m, 4H), 2.01 ~ 1.83 (m, 2H), 1.74 ~ 1.56 (m, 4H), 1.39 (dp, J = 14.4, 7.3 Hz, 4H), 0.92 (q, J = 7.3 Hz, 6H), 其 MS 图 (图 2b) 中, 406.2 是 M - H⁺。由此可知, 该化合物的相对分子质量为 407.2, 与计算结果吻合。

2.2 抗原的鉴定

2.2.1 紫外可见光吸收光谱鉴定 经紫外可见光分光光度计测定, 得到载体蛋白、半抗原衍生物以及人工抗原的紫外扫描图 (图 3)。从图 3 中可以看出, DBCP 在波长 204、223 和 269 nm 处出现特征吸收峰, 载体蛋白 BSA 在波长 202 和 280 nm 处出现特征吸收峰, OVA 在 205 和 280 nm 处出现特征吸收峰, 而 DBCP-BSA 则在 205 和 272 nm 处有显著吸收峰, DBCP-OVA 在 203 和 269 nm 处有显著吸收峰。由于 DBCP 的羧基与载体蛋白的氨基发生偶联, 所以紫外光谱中特征峰发生改变, 但同时具备半抗原和载体蛋白的吸收特征, 间接说明半抗原和载体蛋白偶联成功^[18]。根据紫外分光光度法估算 DBCP-BSA 和 DBCP-OVA 的结合比分别为 11:1 和 17:1。

2.2.2 SDS-PAGE 鉴定 人工抗原及蛋白的 SDS-PAGE 结果见图 4。由图 4 可知, 人工抗原的迁移速率均比载体蛋白的迁移速率小, 表明偶联产物的相对分子质量均比载体蛋白的相对分子质量大。其中, DBCP-OVA 和 OVA 在电泳图中的区分效果较

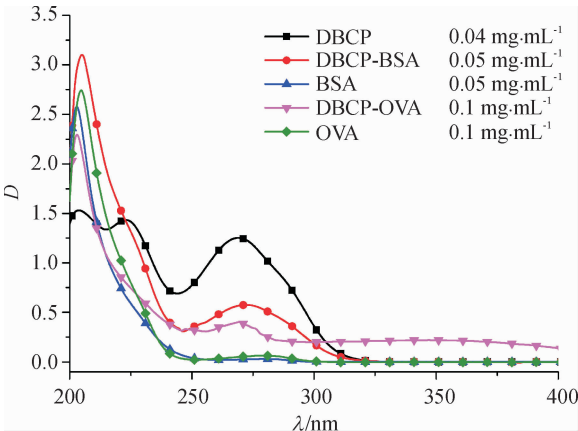


图 3 人工抗原紫外扫描图

Fig.3 Ultraviolet scanning of artificial antigens

好, 可能是 OVA 的相对分子质量较小、结合上的 DBCP 较多的缘故 (结合比 17:1)。电泳图表明半抗原衍生物与载体蛋白偶联成功。

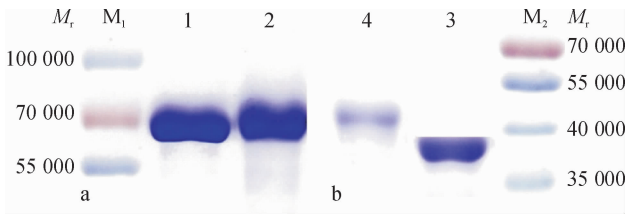


Fig.4 SDS-PAGE gel of BSA, DBCP-BSA, OVA and DBCP-OVA

图 4 BSA 和 DBCP-BSA 以及 OVA 和 DBCP-OVA 的 SDS-PAGE 电泳图

Fig.4 SDS-PAGE gel of BSA, DBCP-BSA, OVA and DBCP-OVA

2.3 抗血清检测

对兔子进行5次免疫后耳部静脉采血,经离心得到抗血清,利用间接ELISA法检测抗体效价,结果见表1。从表1可知,兔1和兔2抗血清效价均达到1:128 000。包被抗原DBCP-OVA经方阵滴定法确定最佳包被质量浓度为2 000 ng·mL⁻¹。以抗血清最高效价稀释倍数,利用icELISA法测定其半抑制率(IC₅₀),竞争抑制曲线如图5,可知兔1和兔2的IC₅₀分别为301和308 ng·mL⁻¹。

表1 抗血清效价测定结果
Tab.1 Detection result of serum titer

血清稀释度	<i>D</i> _{450 nm}	
	兔1	兔2
1:2 000	1.708 3	1.458 7
1:4 000	1.601 3	1.397 5
1:8 000	1.415 7	1.164 7
1:16 000	1.249 3	0.943 6
1:32 000	1.005 0	0.745 7
1:64 000	0.737 0	0.414 8
1:128 000	0.468 0	0.285 3
1:1 000(阴性对照)	0.028 0	0.030 3

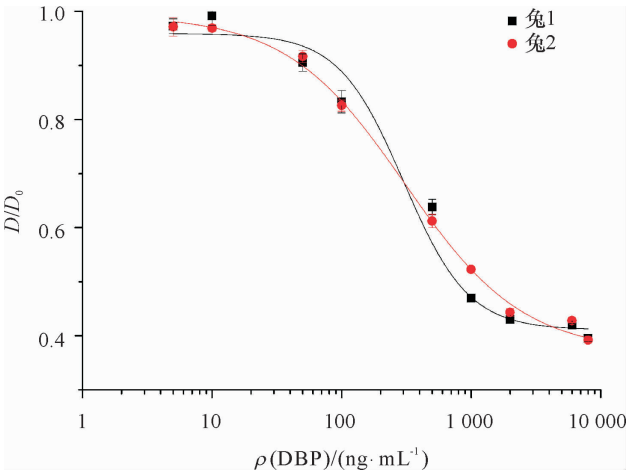


图5 DBP标准竞争抑制曲线

Fig.5 Standard competitive inhibition curves for DBP

2.4 抗体特异性分析

采用icELISA法对邻苯二甲酸二甲酯、邻苯二甲酸二乙酯、邻苯二甲酸二异丁酯、邻苯二甲酸单苄酯等邻苯二甲酸结构类似物进行特异性检测,结果如表2所示。从表2中可以看出,除DBP和DBAP外,其他结构类似物的交叉反应率均小于4.3%。因此,表明DBCP-BSA免疫新西兰大白兔所获抗体建立的icELISA方法特异性良好。

表2 多克隆抗体与DBCP结构类似物的交叉反应
Tab.2 Cross-reactivity of the polyclonal antibody against DBCP related compounds

交叉反应物	IC ₅₀ /(nmol·mL ⁻¹)	交叉反应率/%
邻苯二甲酸二丁酯(DBP)	1.1	100
4-氨基邻苯二甲酸二丁酯(DBAP)	1.7	64.7
邻苯二甲酸二甲酯(DMP)	>41.3	<2.6
邻苯二甲酸二乙酯(DEP)	>42.7	<2.6
邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)	>34.1	<3.2
邻苯二甲酸单苄酯(MBzP)	>32.0	<3.4
邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)	>30.3	<3.6
邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)	>25.3	<4.3

3 讨论与结论

半抗原的设计、半抗原的修饰和人工抗原的合成是制备抗小分子化合物抗体、建立相应的免疫分析方法的重要过程。之前的研究中,邻苯二甲酸二丁酯人工抗原的研究多以4-氨基邻苯二甲酸二丁酯为半抗原通过重氮化法与载体蛋白偶联制备^[3,11,13],这种方法在半抗原制备过程中通常使用苯等有毒有机溶剂,不利于试验操作人员的健康。其次,重氮化法的操作有一定的危险性,且步骤比较繁琐。Wei等^[2]在其研究中曾经制备带4个碳链的邻苯二甲酸二丁酯人工抗原,但在其研究中主要将这种抗原作为包被原来使用,并未深入探究这种抗原的免疫活性。

本研究在DBAP的4位氨基上利用戊二酸酐在半抗原与载体之间连接了1条含5个碳的手臂链,充分暴露出了半抗原分子的特征结构,而且连接了5个碳手臂链,更有利于人工抗原表面突显半抗原的结构特征,以利于产生具有高特异性的抗体^[19]。利用H₂还原、钨碳作催化剂,大大缩短了反应时间,避免了使用有毒试剂苯,试验操作更安全更简便,也提高了反应产率。使用戊二酸酐反应与戊二醛法反应相比较,产物更稳定,副产物少,专一性更强,产率更高。因此,该抗原的合成成为下一步建立免疫分析技术奠定了基础。

本试验使用戊二酸酐反应合成了半抗原衍生物,经质谱、氢核磁共振谱图鉴定,衍生物合成成功。采用活性酯法将半抗原衍生物与载体蛋白进行偶联,合成人工抗原,经紫外光谱、SDS-PAGE鉴定,偶联成功。所得抗体经icELISA法检测知其具有较高灵敏度和较好特异性,可用于邻苯二甲酸二丁酯含

量的测定。

参考文献:

[1] XU F, WANG W, JIANG H, 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.

[2] 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.

[3] KUANG H, LIU L, XU L, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for dibutyl phthalate in Liquor [J]. Sensors, 2013, 13(7): 8331-8339.

[4] 王民生. 邻苯二甲酸酯(塑化剂)的毒性及对人体健康的危害[J]. 江苏预防医学, 2011, 22(4): 68-70.

[5] 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.

[6] 谭君, 林竹光. GC-EI-MS 内标法分析鱼肉中邻苯二甲酸酯 [J]. 化学学报, 2007, 65(24): 2875-2882.

[7] 杨涛. 台湾塑化剂风暴对饮料及饮料包装行业的影响 [J]. 塑料包装, 2011, 21(4): 35-39.

[8] 王少杰, 孟雨吟, 李秋顺, 等. 高效液相色谱法测定蔬菜中邻苯二甲酸二丁酯残留 [J]. 山东农业科学, 2012, 44(1): 112-114.

[9] 方丽, 林泽鹏, 林晨, 等. 气质联用法测定食品包装材料中 22 种邻苯二甲酸酯残留方法的探讨 [J]. 食品工业, 2015, 36(1): 291-296.

[10] FENG X, LU S, LIU D, et al. Direct competitive immunosorbent assay for detection of MEHP in human urine [J]. Chemosphere, 2013, 92(1): 150-155.

[11] ZHANG M, LIU S, ZHUANG H, et al. Determination of dimethyl phthalate in environment water samples by a highly sensitive indirect competitive ELISA [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166(2): 436-445.

[12] 王建华, 张冲. 小分子抗原人工合成进展 [J]. 应用化学, 2011, 28(4): 367-375.

[13] ZHANG M, WANG Q, ZHUANG H. A novel competitive fluorescence immunoassay for the determination of dibutyl phthalate [J]. Anal Bioanal Chem. 2006, 386(5): 1401-1406.

[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): 559-560.

[15] ZHOU J, ZHAO S, ZHANG J, et al. An indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol-A based on the synthesis of a poly-L-lysine-hapten conjugate as a coating antigen [J]. Anal Methods, 2013, 5(6): 1570.

[16] 郑劼, 张焜, 赵肃清. 双酚 A 人工抗原的光谱表征及免疫鉴定研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2008, 28(7): 1583-1586.

[17] 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.

[18] 赵肃清, 蔡燕飞, 雷红涛, 等. 农药甲胺磷人工抗原的光谱鉴定研究 [J]. 光谱学与光谱分析, 2004, 24(2): 207-209.

[19] 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.

【责任编辑 李晓卉】