

曾 昆, 周 军, 邵 杰, 等. 应用酶联免疫分析方法检测镇江市内水域水样和底泥中的邻苯二甲酸二乙酯[J]. 农业环境科学学报, 2016, 35(11): 2237-2244.

ZENG Kun, ZHOU Jun, SHAO Jie, et al. Development of a enzyme-linked immunosorbent assay for diethyl phthalate analysis in water and sediment samples from rivers in Zhenjiang City[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2016, 35(11): 2237-2244.

应用酶联免疫分析方法检测镇江市内水域水样和底泥中的邻苯二甲酸二乙酯

曾 昆^{1,2}, 周 军¹, 邵 杰¹, 张 祯^{1*}

(1. 江苏大学环境与安全工程学院, 江苏 镇江 212013; 2. 江苏大学环境生态研究所, 江苏 镇江 212013)

摘 要:应用邻苯二甲酸二乙酯(Diethyl phthalate, DEP)抗体,建立了间接竞争性 ELISA 方法,并对反应条件进行优化,进而测定了镇江市内水域中 DEP 含量。结果显示优化后的 ELISA 方法检测范围为 $20\sim 320\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,最低检测限为 $8.2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。方法特异性高,与其他邻苯二甲酸酯类物质几乎无交叉反应。ELISA 方法批内差在 $3.38\%\sim 9.09\%$,批间差在 $3.76\%\sim 12.78\%$ 。检测方法检测水样和底泥样本中 DEP 含量,添加回收率在 $90.46\%\sim 122.75\%$ 。镇江市内古运河和运粮河水样和底泥样本中 DEP 的检出率分别为 62.5% 和 87.5% ,其中水样中 DEP 含量最高可为 $6.61\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,底泥样本中 DEP 含量最高为 $86.9\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

关键词:塑化剂; DEP; 抗体

中图分类号: X78 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2016)11-2237-08 doi:10.11654/jaes.2016-0303

Development of a enzyme-linked immunosorbent assay for diethyl phthalate analysis in water and sediment samples from rivers in Zhenjiang City

ZENG Kun^{1,2}, ZHOU Jun¹, SHAO Jie¹, ZHANG Zhen^{1*}

(1. College of Environmental and Safety Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Environment and Ecology, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

Abstract: Based on a polyclonal antibody targeting diethyl phthalate (DEP), a sensitive indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was proposed and several parameters were investigated. Under the optimized conditions, the developed method showed high sensitivity to DEP (the limit of detection, $8.2\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and high selectivity with cross-reactivities less than 4.29% to seven structurally related phthalate esters. The linear range was from $20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ to $320\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$. The recoveries ($90.46\%\sim 122.75\%$) and reproducibility (CV of intra-assay, $3.38\%\sim 9.09\%$; CV of inter-assay, $3.76\%\sim 12.78\%$) were satisfactory. Our proposed ELISA indicated that it had good agreement with those given by GC-MS, which was applied to detect DEP in waters and sediments from ancient canal and Yunliang River. And DEP was found in most of target areas (the detection rate, 62.5% in waters and 87.5% in sediments), the concentration was up to $6.61\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $86.9\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ in water and sediments, respectively.

Keywords: plasticizer; DEP; antibody

邻苯二甲酸酯(Phthalate esters, PAEs)类塑化剂广泛应用于塑料及一次性塑料消费品,还可以作为原

料用于香味剂、化妆品和冷凝剂^[1-3]。随着工业生产的发展及塑料制品的大量使用,PAEs 已经成为全球性最普遍的一类污染物^[4]。其中邻苯二甲酸二乙酯(Diethyl phthalate, DEP)是 PAEs 中的重要成员,近年来被越来越多地用作增塑剂和食品添加剂^[11],在法国^[5]、印度^[6]、西班牙^[7]以及我国广州^[8]、台湾^[9]等地区的水体和底泥中均有检出。研究表明 DEP 是一类严重的环境激素,易造成生物体内分泌失调,引起生

收稿日期: 2016-03-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502118, 21577051); 江苏省自然科学基金项目(BK20130507); 中国博士后基金项目(2013M541606)

作者简介: 曾 昆(1980—),女,湖北襄阳人,博士,讲师,从事污染物快速分析研究。E-mail: kjj80116@163.com

* 通信作者: 张 祯 E-mail: zhzenok@163.com

殖功能障碍,甚至还会诱发恶性肿瘤^[10-14]。我国生活饮用水卫生标准(GB 5749—2006)中规定 DEP 的限值为 $0.003 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此,建立简单、快速、高通量的分析方法,对环境水体和底泥中此类污染物进行分析尤为必要。

目前 DEP 的检测方法主要有气相色谱法、高效液相色谱法以及色谱-质谱联用技术等^[15-18],这些仪器方法对环境样本的前处理方法要求严苛,操作流程繁琐,并不适用于大量环境样本的筛查。以抗原-抗体特异性结合为基础的免疫分析方法,因其灵敏度高、特异性强、操作简便等优势,近年来在环境分析领域被广泛应用。因此,本研究利用自主制备的 DEP 抗体,建立了灵敏、快速的 ELISA 方法,优化了反应条件,并以此对镇江地区部分市内河流中 DEP 的污染状况进行调查。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

抗 DEP 多克隆抗体和包被抗原 OVA-DEP 为本实验室自制,明胶、Tween-20、四甲基联苯胺(Tetramethylbenzidine, TMB)购自 Sigma-Aldrich 公司,辣根过氧化酶标记羊抗兔(IgG-HRP)购自北京博奥森生物技术有限公司,DEP、邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate, DBP)、邻苯二甲酸丁酯本甲酯(Butyl benzyl phthalate, BBP)、邻苯二甲酸二正辛酯(*n*-Dioctyl phthalate, DnOP)、邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯(Dimethoxyethyl phthalate, MEP)、邻苯二甲酸单-2-乙基己酯(Monoethylhexyl phthalate, MEHP)、邻苯二甲酸二异辛酯(Diisooctyl(o-)-phthalate, DiOP)、邻苯二甲酸单丁酯(Monobutyl phthalate, MBP)标准品购自北京北纳创联研究院,正己烷及其余常规试剂均来自国药集团化学试剂有限公司(分析纯)。96 孔酶标板购自上海生工生物工程技术有限公司。所用酶标仪为 Multiskan MK3 型酶标仪;氮吹仪为 MD200-2 型,购自上海睿玥实验器材有限公司。

1.2 竞争性 ELISA 方法检测流程

96 孔板中加入一定浓度的 OVA-DEP,每孔 $100 \mu\text{L}$, 4°C 过夜。倒掉孔内液体,用洗涤液(含 0.05% Tween-20 的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, pH 7.4)洗涤 1 次,拍干。每孔加封闭液(含 1% 明胶的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, pH 7.4) $200 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 2 h,倒掉孔内液体,拍干。用抗体稀释液(含 0.1% 明胶的 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS, pH 7.4)将 DEP 标准品配成系列浓度(1、10、20、40、80、

160、320 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$),每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 标准品,再加入 $50 \mu\text{L}$ 适量浓度的 DEP 抗体, 37°C 孵育后洗涤液洗涤 3 次,拍干。每孔加入适量浓度的 IgG-HRP $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 h 后洗涤液洗涤 3 次,拍干。每孔加新鲜配制的 TMB 底物溶液($0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $100 \mu\text{L}$,显色 10 min。每孔加终止液($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{H}_2\text{SO}_4$) $50 \mu\text{L}$,检测吸光度 $\text{OD}_{450\text{nm}} \sim \text{OD}_{630\text{nm}}$ 。

1.3 条件优化

1.3.1 包被抗原及一抗最佳反应浓度

采用棋盘法摸索抗原抗体最佳反应浓度。96 孔酶标板每行包被不同浓度的 OVA-DEP(浓度分别 1:1000、1:2000、1:4000、1:8000、1:16 000),每孔 $100 \mu\text{L}$, 4°C 过夜。洗涤及封闭同 1.2 节。将 DEP 抗体用抗体稀释液从 1:2500 开始倍比稀释到 1:40 000,并依次加入不同浓度包被的孔板中,每孔 $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育 1 h 后洗涤液洗涤 3 次,拍干。加入酶标记物、显色、读值,流程同前。以阳性对照/阴性对照(Positive/Negative, P/N) ≥ 2.1 、吸光度在 1.0 左右时的抗原及一抗浓度为最佳反应浓度 [$\text{P/N} = (\text{OD}_{\text{标本}} - \text{OD}_{\text{空白对照}}) / (\text{OD}_{\text{阴性对照}} - \text{OD}_{\text{空白对照}})$]。

1.3.2 最佳竞争反应时间的优化

在 DEP 抗体与 DEP 标准品反应时,采用不同的反应时间(5、15、30、45、60 min),按 1.2 节方法进行检测,每组 3 个平行,建立标准曲线并计算半数抑制率(50% Inhibitory Concentration, IC_{50})。选择最大吸光度(B_0 值)较高且 IC_{50} 值较小时的反应时间为最佳竞争反应时间。

1.3.3 最佳酶标二抗浓度的优化

采用不同浓度(1:250、1:500、1:1000、1:2000)的酶标二抗,按 1.2 节方法进行检测,每组 3 个平行,建立标准曲线并计算 IC_{50} 。选择 B_0 值较高且 IC_{50} 值较小时的酶标二抗浓度为最佳使用浓度。

1.3.4 最佳反应 pH 值的优化

分别配制 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.4、8.0 的 PBS 缓冲液,用该缓冲液将 DEP 标准储备液稀释为一系列浓度的 DEP 标准溶液,按 1.2 节方法进行检测,每组 3 个平行,建立标准曲线并计算 IC_{50} 。选择 B_0 值较高且 IC_{50} 值较小时的 pH 值为最佳反应 pH 值。

1.3.5 最佳离子强度的优化

分别配制离子强度为 0.01、0.05、0.1、0.15、0.2 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PBS 缓冲液,用该缓冲液将 DEP 标准储备液稀释为一系列浓度的 DEP 标准溶液,按 1.2 节方法进行检测,每组 3 个平行,建立标准曲线并计算 IC_{50} 。

选择 B_0 值较高且 IC_{50} 值较小时的离子强度值为最佳离子强度。

1.4 环境水样中 DEP 测定

采集镇江市内水体(古运河和运粮河)中的水样和底泥样本。水样采集于水面以下 0.5 m 处,放入棕色玻璃瓶 4℃保存,一周内检测。在各个水样采集点周围布设 3 个底泥采样点,利用抓斗式采样器采集表层底泥,然后混合均匀组成一个底泥样本,放入棕色玻璃瓶 4℃保存,一周内检测。

1.4.1 ELISA 方法检测 DEP

取 5 mL 水样,加入 5 mL 正己烷,上下颠倒振荡 30 min, 6000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min, 取 2.5 mL 上清,用氮吹仪吹干。最终样品用 0.5 mL PBS 复溶,用于 DEP 含量测定。底泥样本在 50℃下彻底干燥。取 5 g 底泥样本,加入 5 mL 正己烷,上下颠倒振荡 30 min, 6000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min, 取 1 mL 上清,用氮吹仪吹干。最终样品用 0.5 mL PBS 复溶,用于 DEP 含量测定。

1.4.2 GC-MS 方法检测 DEP

参照 Khosravi 等^[19]的方法,采用 GC-MS 方法对样本中的 DEP 进行检测。水样和底泥样本如 1.4.1 节,直接取正己烷层进行 GC-MS 分析。检测范围为 2.56~1780 $ng \cdot mL^{-1}$,定量限为 0.68 $ng \cdot mL^{-1}$,检测限为 0.21 $ng \cdot mL^{-1}$ 。

1.5 竞争性 ELISA 方法的性能评估

1.5.1 标准曲线和分析方法的灵敏度

基于 1.3 节中优化后的条件,按照 1.2 节中的操作流程,DEP 标准品浓度为 10、20、40、80、160、320 $ng \cdot mL^{-1}$,建立标准曲线,每组实验设 3 组平行。以 DEP 标准品浓度的对数为横坐标, B/B_0 为纵坐标绘制标准曲线,其中 B 为不同浓度标准品对应的 OD 值, B_0 为标准品浓度为 0 时对应的 OD 值,即最大 OD 值。 B/B_0 值与标准品的对数呈线性回归关系,可以得出回归曲线的方程,从而计算 IC_{50} 和最低检测限,其中最低检测限为抑制率在 90%时的标准品浓度,检测范围为抑制率在 20%~80%的标准品浓度区间^[20]。

1.5.2 交叉反应

选取 DEP 结构类似物(DBP、MEP、BBP、MEHP、DiOP、MBP、DnOP)进行交叉反应测定,评价本实验方法的特异性。

交叉反应的计算公式为:交叉反应(CR%)= IC_{50} (DEP)/ IC_{50} (类似物) $\times 100\%$

1.5.3 精密度

DEP 标准曲线重复测定 10 次,隔日再次检测,计

算批内和批间变异系数(Coefficient of Variation, CV)。 $CV=SD/\text{mean} \times 100\%$,其中 SD 为标准差(Standard Deviation)。

1.5.4 添加回收实验

阴性水样选择全玻璃双蒸水并储存在玻璃瓶中,阴性底泥样本则是在远离居民区的河流区域采集,并且经 GC-MS 方法检测,未检测到 DEP。

取 1 mL 水样或 1 g 底泥样本,添加 DEP 标准品,使其终浓度为 20、50、100 $ng \cdot mL^{-1}$ 或 $ng \cdot g^{-1}$,充分混合均匀,4℃放置 12 h。按照 1.4.1 节方法处理样本后用于 ELISA 检测。

2 结果与分析

2.1 ELISA 反应条件的优化

基于抗原抗体特异性反应的 ELISA 方法受到多种因素的影响,包括使用的抗原抗体的浓度、竞争性反应的时间、竞争结合时的 pH 以及离子强度等。

采用棋盘法筛选包被抗原 OVA-DEP 与特异性抗 DEP 抗体反应的最佳使用浓度,结果见表 1。吸光度在 1.0 左右的值有 3 组,分别为抗原 1:1000/抗体 1:20 000、抗原 1:2000/抗体 1:10 000、抗原 1:4000/抗体 1:2500,其中第一组和第三组的空白值较高(>0.1),故采用抗原 1:2000/抗体 1:10 000 作为最佳使用浓度。

酶标二抗的使用浓度直接影响 ELISA 的读值的高低,也会影响方法的灵敏度。使用的酶标二抗浓度过高不仅浪费试剂,而且过高的 OD 值会掩盖掉竞争性反应的趋势,降低方法的灵敏度。从实验结果上看(图 1a),随着酶标物稀释度的增加, B_0 值逐渐减小;在酶标物浓度较高(1:250)时, IC_{50} 值较高(209 $ng \cdot mL^{-1}$),随着稀释度的增加, IC_{50} 值在一定范围内波动。其中当酶标物浓度为 1:500 时, B_0 值较高而 IC_{50} 值最低,因此我们认为该条件为最佳酶标二抗浓度。

表 1 棋盘法筛选最佳包被抗原及一抗反应浓度
Table 1 Optimal concentration of coating antigen and antibody by checkerboard method

抗体稀释倍数 Dilution of antibody	包被原稀释倍数 Dilution of antigen					
	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16 000	空白
1:2500	3.16	2.06	1.00	0.89	0.89	0.10
1:5000	2.52	1.59	0.80	0.71	0.62	0.03
1:10 000	1.83	1.07	0.73	0.59	0.77	0.03
1:20 000	1.15	0.70	0.65	0.52	0.58	0.02
1:40 000	0.70	0.61	0.56	0.59	0.53	0.06
空白	0.14	0.04	0.05	0.03	0.02	

抗原抗体的结合是非共价键的作用,因此抗原抗体复合物始终处在结合-解离-结合的动态平衡过程中。选择合适的时间节点,使得特异性抗体更多的与游离 DEP 而非板上固化的 OVA-DEP 结合,对于所建立的方法的灵敏度有显著影响。从实验结果来看(图 1b),在一定的孵育时间(5~45 min)内,随着时间延长, B_0 不断增加, IC_{50} 也呈下降的趋势,但是当孵育时间达到 60 min 时, IC_{50} 却呈现出升高的趋势。当竞争反应时间为 45 min 时, B_0 值较高而 IC_{50} 值最低,因此我们认为该条件为最佳反应时间。

从图 1c 可以看出,pH 对 B_0 值的影响并不大, IC_{50} 值出现了先降低后又升高的态势,当 pH 为 7.4 时, IC_{50} 值最低。溶液的离子强度对 B_0 值影响较大(图 1d),离子强度越高, B_0 值越小,而 IC_{50} 值整体呈上升的趋势。当离子强度为 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, B_0 值最高而 IC_{50} 值最低。

2.2 DEP 标准曲线的建立

基于以上优化后的反应条件,建立了 DEP 检测的标准曲线,见图 2。该方法的线性范围为 $20 \sim 320 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, IC_{50} 为 $72 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,检测限为 $8.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.3 ELISA 方法的特异性

抗体制备过程中,将抗原特有的抗原决定簇暴露于机体的免疫系统而获得相应的抗体。如果目标化合物与其类似物具有相同的分子结构或者官能团,则所得的抗体就会同时识别目标物及其类似物,那么所建立的分析方法测得的物质浓度为具有类似官能团的化合物的总浓度,不能实现目标物质的特异性检测。本研究旨在建立特异性的 DEP 检测方法,因此所用

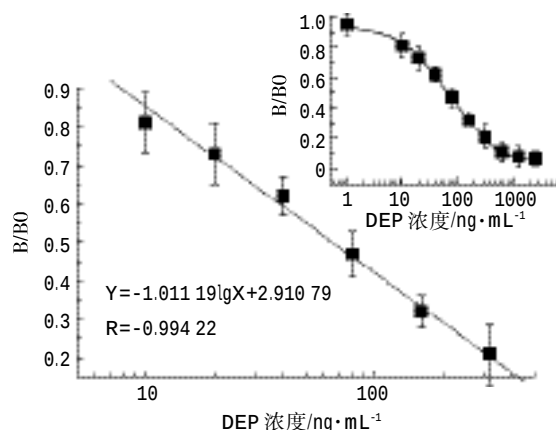


图2 ELISA方法检测DEP的标准曲线

Figure 2 Calibration curve for detection of DEP by ELISA

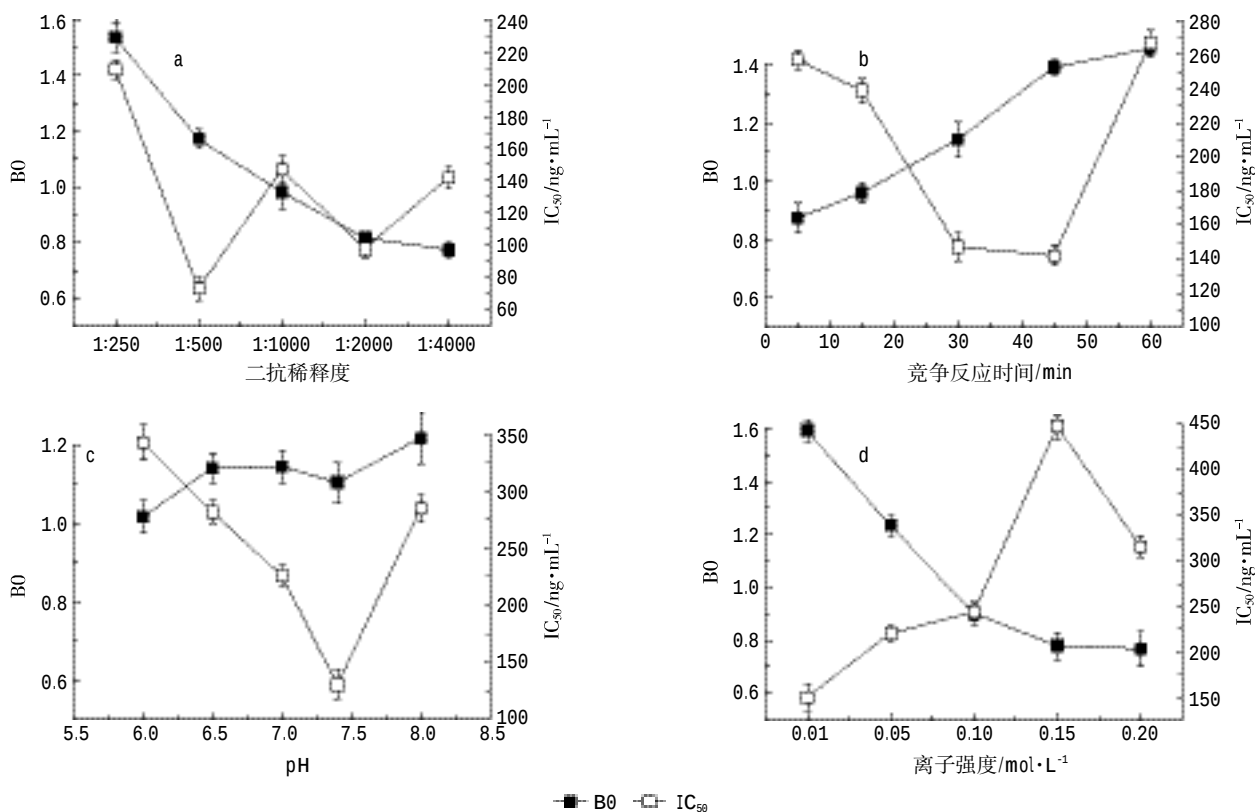


图1 不同反应条件的优化

Figure 1 Influence of parameters on ELISA

抗体与 DEP 类似物的结合能力越低,则该方法的特异性就越强。从交叉反应的实验结果(表 2)可以看出,DEP 抗体仅与 DBP、MEP、BBP 有较弱的交叉反应,分别为 4.29%、2.03%、0.035%,与 MEHP、DiOP、MBP、DnOP 没有明显的交叉反应($CR<0.1\%$),显示了本方法具有较好的特异性。

2.4 ELISA 方法的精密度

以同一块板上的孔间平均变异系数来表示批内差异,以不同时间检测的孔间平均变异系数来表示批间差异,结果见表 3。本方法的批内差在 3.38%~9.09%,平均值为 7.15%;批间差在 3.76%~12.78%,平均值为 8.14%。批内差小于 10%,批间差小于 20%,该方法具有较高的精密度。

2.5 ELISA 检测 DEP 方法的准确性

为评估所建立的 ELISA 方法的准确性,我们进

表 2 ELISA 方法与 DEP 类似物的交叉反应
Table 2 Cross-reactivity of DEP structural compounds

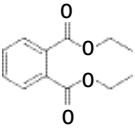
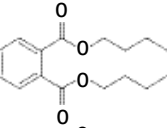
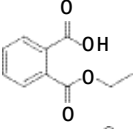
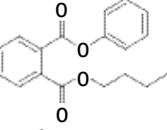
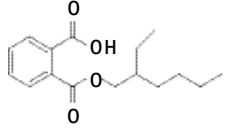
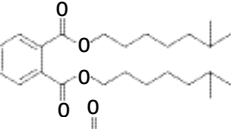
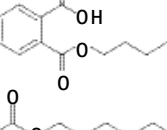
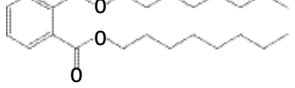
化合物 Compound	结构式 Structure	IC ₅₀ / ng·mL ⁻¹	交叉反应率/% Cross-reactivity
DEP		72	100
DBP		1 677.33	4.29
MEP		3 547.53	2.03
BBP		5 671.56	0.035
MEHP		—	<0.01
DiOP		—	<0.01
MBP		—	<0.01
DnOP		—	<0.01

表 3 ELISA 方法的批内和批间差异
Table 3 Intra-assay and inter-assay variance of ELISA

DEP/ ng·mL ⁻¹	批内差 Intra-assay		批间差 Inter-assay	
	均值 Average/ ng·mL ⁻¹ (n=10)	CV/%	均值 Average/ ng·mL ⁻¹ (n=10)	CV/%
1	1.21±0.11	9.09	1.29±0.14	10.85
10	9.21±0.73	7.93	11.04±1.22	11.05
20	23.45±2.12	9.04	25.37±3.24	12.78
40	37.61±2.76	7.34	43.72±4.96	11.34
80	73.56±6.42	8.73	78.62±5.23	6.65
160	172.75±7.86	4.55	184.79±8.72	4.72
320	317.45±10.74	3.38	336.28±12.65	3.76
平均值 Average		7.15		8.14

行了添加回收实验。由于 DEP 污染的广泛性,难以获得有效的空白样本,因此添加回收实验是采用由 GC-MS 方法验证的阴性样本进行的,其中水样来自古运河严家桥采样点,底泥样本来自玉带河。进行添加回收实验的同时测定未添加时的本底浓度,如有本底浓度测出,则在计算回收率时扣除本底再行计算。结果显示(表 4),所采用的水样和泥样中并没有 DEP 检出,检测的回收率在 90.46%~122.75%,平均回收率 110.88%,说明该方法的准确性较高。

2.6 环境样本中 DEP 的测定

由于塑化剂广泛存在于塑料制品中,为避免采样工具对样本的污染,造成检测结果不准确,采用棕色玻璃瓶作为采样和储存工具。并且玻璃瓶在使用前,先用丙酮浸润 1 h,后用正己烷洗涤 3 次,最大限度地避免了来自采样工具的污染。由于水样中 DEP 含量

表 4 添加回收实验
Table 4 Recovery of DEP from spiking waters and sediments samples

	添加浓度 Spiked concentration/ ng·mL ⁻¹ (水样 n=3); ng·g ⁻¹ (泥样 n=3)	检测浓度 Detection concentration/ ng·mL ⁻¹ (水样 n=3); ng·g ⁻¹ (泥样 n=3)	回收率 Recovery/%
水样	0	ND	—
Waters	20	23.21±2.74	116.05±13.7
	50	56.84±6.89	113.68±13.78
	100	108.11±7.25	108.11±7.25
泥样	0	ND	—
Sediments	20	24.55±3.54	122.75±17.7
	50	45.23±6.78	90.46±13.56
	100	114.26±9.87	114.26±9.87
平均回收率 Average of recovery rate/%			110.88%

注:“ND”表示未检出;“—”表示无实验结果。下同。

相对较低,我们对水样进行了浓缩前处理。采用正己烷提取的前处理方法,应用 ELISA 方法检测水样的检测限为 $1.19 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,底泥样本的检测限为 $5.95 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

应用建立的 ELISA 方法以及 GC-MS 方法对镇江市内古运河以及运粮河水样及底泥样本中的 DEP 进行检测。结果显示(表 5),在 18 个样本中,15 个样本的 ELISA 和 GC-MS 检测结果一致,具有较好的相关性。实验室的自来水样中并未检测到 DEP,但是采集的其他 8 个样本中,5 个水样和 7 个底泥样本中有 DEP 检出,检出率分别为 62.5% 和 87.5%。水样中 DEP 含量在 $\text{ND} \sim 6.51 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,底泥样本中 DEP 含量在 $\text{ND} \sim 86.92 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。同时对 ELISA 结果和 GC-MS 结果进行相关性分析,发现两者具有较好的一致性(图 3)。

3 讨论

随着塑料制品的生产、使用和废弃,PAEs 越来越多地渗透到环境中。由于 PAEs 是亲脂性化合物,正辛醇-水分配系数(K_{ow})值较高,因而在水中的挥发损失小,进入水环境的 PAEs 很难向大气环境迁移转化,易于从水中吸附到沉积物以及土壤等有机物中。表 6 汇总了 DEP 在水样和底泥样本中的分布情况,可以看出 DEP 分布广泛,在水样中的含量可达数十 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 水平,而底泥样本中 DEP 含量显著高于水样,最高达上千 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 水平。

建立快速、灵敏的分析方法监测环境样本中 DEP 的分布状况,是评价 DEP 生态风险的重要手段。常规仪器分析方法因设备昂贵、需要专业人员等缺陷,不适用于大量环境样本的快速筛选与分析。ELISA 方法以抗原-抗体特异性结合为基础,通过酶促反应放大信号,从而实现痕量物质的快速检测。其中特异性抗

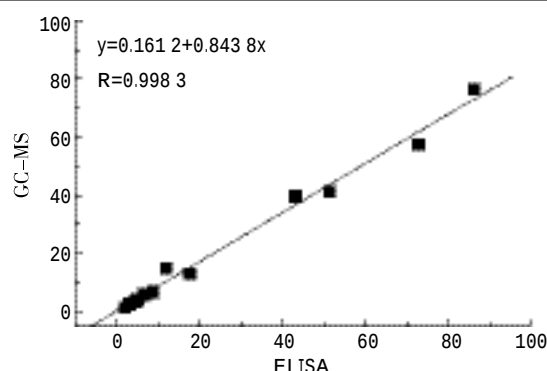


图 3 ELISA 结果和 GC-MS 结果相关性分析

Figure 3 Correlation analysis of the results of ELISA and GC-MS

体是 ELISA 方法建立的关键因素,其灵敏度、特异性等直接影响方法的检测性能。DEP 分子量较小,不能诱导动物机体产生免疫反应,因此需将其与大分子载体蛋白(如牛血清白蛋白、卵清白蛋白等)偶联,免疫动物才能获得相应的抗体。因此,DEP 抗体的获得较为困难,目前基于 DEP 抗体的免疫分析方法报道较少。Zhang 等^[29]建立了直接竞争 ELISA 方法,检测范围在 $0.1 \sim 3500 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,并用于环境水样的检测;随后,Zhang 等^[30]又建立了间接竞争 ELISA 方法,检测范围缩小到 $0.005 \sim 18.6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。相对于文献报道,本研究所建立的方法灵敏度有一定的差距,主要原因可能与所使用的抗体灵敏度不高有关。由于环境样本,尤其是水样中污染物浓度偏低,许多分析方法(包括 LC-MS/MS 等仪器分析方法)的固有灵敏度并不足以分析环境样本中的痕量污染物。因此,样品前处理时进行相应的富集,富集倍数因其前处理方法差异而不同,通常可达数十乃至数百倍。在本研究中,ELISA 方法固有灵敏度为 $8.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,但经过前处理的 10 倍富集后检测限可达到 $1.19 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,完全可以满足水

表 5 镇江市内水样和底泥样本中的 DEP 含量
Table 5 Analysis DEP in real waters and sediments samples

地点 Sites	水样 Waters/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$		底泥 Sediments/ $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$	
	ELISA(n=3)	GC-MS(n=3)	ELISA(n=3)	GC-MS(n=3)
古运河 Ancient canal	严家桥	ND	ND	3.56 ± 0.28
	丁卯桥	1.86 ± 0.09	1.43 ± 0.11	16.91 ± 1.34
	虎踞桥	ND	0.52 ± 0.03	13.95 ± 1.25
	光明桥	ND	8.62 ± 0.64	6.75 ± 0.35
	团结桥	6.51 ± 0.32	0.57 ± 0.43	12.48 ± 1.09
	京口闸	3.06 ± 0.21	2.43 ± 0.18	43.65 ± 2.56
运粮河 Yunliang River	中游	4.58 ± 0.19	3.37 ± 0.21	50.77 ± 3.34
	下游	ND	0.23 ± 0.02	72.34 ± 5.57
自来水 Tap water	4.92 ± 0.36	4.03 ± 0.33	86.92 ± 6.86	75.34 ± 6.36
	ND	ND	—	—

表 6 DEP 在水样和底泥样本中的分布情况
Table 6 Occurrence of DEP in waters and sediments samples

水样 Waters			底泥 Sediments		
地点 Sites	含量 Concentration/ng·mL ⁻¹	文献 References	地点 Sites	含量 Concentration/ng·g ⁻¹	文献 References
中国松花江	1.33~6.67	21	中国松花江	26.70~38.20	21
中国广州	31	8	中国台湾	ND~1300	24
中国台湾	500	9	中国永定河	9~54	25
中国磨盘山水库	ND~0.06	22	中国台湾	100~1100	9
法国索姆河	0.26~6.98	5	中国长江	ND~1270	26
印度高韦里河	0.24	6	印度高韦里河	16.50	6
西班牙 Llobregat 河	0.22~6.85	7	印度戈默蒂河	ND~35	27
南非东伦敦港	0.03~33.10	23	尼日利亚奥贡河	80~350	28
中国镇江	1.86~6.61	本研究	中国镇江	8.6~86.9	本研究

样中痕量 DEP 的分析要求。

对镇江市内古运河以及运粮河水样及底泥样本的检测结果可以看出,DEP 污染较为严重,检出率分别为 62.5%(水样)和 87.5%(底泥),原因可能是由于河流周边人口密集,加剧了污染的发生。与其他各地水体中的 DEP 浓度相比,镇江水体中的 DEP 浓度与中国松花江、法国索姆河以及西班牙 Llobregat 河等接近。虽然我国目前未出台针对地表水中 DEP 的限量标准,但水体中 DEP 的严重污染也应引起我们的足够重视。底泥中的 DEP 的检出率高于水体,并且其含量也高于同一采样点水体中 DEP 的浓度,这一结果可能是由于 DEP 易于从水中吸附到沉积物中。底泥沉积于河底,随着时间延长,DEP 等污染物不断积累、吸附,容易造成新的生态环境隐患。

4 结论

采用 DEP 多克隆抗体建立的间接竞争 ELISA 法,优化反应条件后,方法的检测范围为 20~320 ng·mL⁻¹,IC₅₀ 为 72 ng·mL⁻¹,最低检测限为 8.2 ng·mL⁻¹。该方法具有较高的特异性,与其他邻苯二甲酸酯类似物几乎无交叉反应。ELISA 方法准确性高,与仪器方法比对具有较好的一致性。以建立的方法检测了镇江市内水体中水样和底泥样本中 DEP,发现环境样本中 DEP 有较高的检出率。酶联免疫分析方法的建立可为环境中塑化剂分布研究,进而评估其生态风险提供有效的技术手段。

参考文献:

[1] 张军伟. 食品中塑化剂分析方法研究综述[J]. 中国科技信息, 2014 (8):77-78.
ZHANG Jun -wei. Review of analysis methods for plasticizer in food

analysis[J]. China Science and Technology Information, 2014(8):77 - 78.
[2] 雷艳虹. 常见塑化剂简介[J]. 化学教学, 2013(4):71-73.
LEI Yan - hong. Brief introduction for plasticizers[J]. Education in Chemistry, 2013(4):71-73.
[3] 陈海婷, 魏丹毅, 郭智勇. 邻苯二甲酸酯类增塑剂的分析方法研究进展[J]. 塑料助剂, 2008, 67(1):17-21.
CHEN Hai-ting, WEI Dan-yi, GUO Zhi-yong. Progress in the analysis of phthalic acid esters[J]. Plastics Additives, 2008, 67(1):17-21.
[4] Jobling S, Reynolds T, White R, et al. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic[J]. Environmental Health Perspectives, 1995, 103(6):582 - 587.
[5] Net S, Dumoulin D, El-Osmani R, et al. Case study of PAHs, Me-PAHs, PCBs, phthalates and pesticides contamination in the Somme River water, France[J]. International Journal of Environmental Research, 2014, 8 (4):1159-1170.
[6] Selvaraj K K, Sundaramoorthy G, Ravichandran P K, et al. Phthalate esters in water and sediments of the Kaveri River, India: Environmental levels and ecotoxicological evaluations[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2015, 37(1):83-96.
[7] Céspedes R, Lacorte S, Raldúa D, et al. Distribution of endocrine disruptors in the Llobregat River basin (Catalonia, NE Spain)[J]. Chemosphere, 2005, 61(11):1710-1719.
[8] Zeng F, Cui K, Xie Z, et al. Occurrence of phthalate esters in water and sediment of urban lakes in a subtropical city, Ghangzhou, South China [J]. Environment International, 2008, 34(3):372-380.
[9] Yuan S Y, Liu C, Liao C S, et al. Occurrence and microbial degradation of phthalate esters in Taiwan river sediments[J]. Chemosphere, 2002, 49 (10):1295-1299.
[10] 周开胜, 吕超田, 杨 刚, 等. 水体中酞酸酯类环境激素污染及生物降解研究进展[J]. 环境科技, 2009, 22(4):56-59.
ZHOU Kai-sheng, LÜ Chao-tian, YANG Gang, et al. Research progress on pollution and biodegradation of environmental hormone -phthalate esters in water[J]. Environmental Science and Technology, 2009, 22(4): 56-59.
[11] Call D J, Markee T P, Geiger D L, et al. An assessment of the toxicity of

- phthalate esters to freshwater benthos. 1. Aqueous exposures[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2001, 20(8):1798-1804.
- [12] Yang J, Hauser R, Goldman R H. Taiwan food scandal: The illegal use of phthalates as a clouding agent and their contribution to maternal exposure[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 58:362-368.
- [13] Crinnion W J. Toxic effects of the easily avoidable phthalates and parabens[J]. *Alternative Medicine Review*, 2010, 15(3):190-197.
- [14] Ventrice P, Ventrice D, Russo E, et al. Phthalates: European regulation, chemistry, pharmacokinetic and related toxicity[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(1):88-96.
- [15] Schechter A, Lorber M, Guo Y, et al. Phthalate concentrations and dietary exposure from food purchased in New York State[J]. *Environmental Health Perspectives (Online)*, 2013, 121(4):473.
- [16] Battle R, Nerin C. Application of single-drop microextraction to the determination of dialkyl phthalate esters in food simulants[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, 1045(1):29-35.
- [17] Fierens T, Servaes K, Van Holderbeke M, et al. Analysis of phthalates in food products and packaging materials sold on the Belgian market[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2012, 50(7):2575-2583.
- [18] Holadová K, Prokúpková G, Hájšlová J, et al. Headspace solid-phase microextraction of phthalic acid esters from vegetable oil employing solvent based matrix modification[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2007, 582(1):24-33.
- [19] Khosravi K, Price G W. Determination of phthalates in soils and biosolids using accelerated solvent extraction coupled with SPE cleanup and GC-MS quantification[J]. *Microchemical Journal*, 2015, 121:205-212.
- [20] 刘艳梅, 钟 辉, 黄建芳, 等. 直接竞争 ELISA 检测大米样品中的重金属镉[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(6):528-532.
- LIU Yan-mei, ZHONG Hui, HUANG Jian-fang, et al. Amplification of direct competition ELISA in cadmium ions detection of rice samples[J]. *Immunological Journal*, 2015, 31(6):528-532.
- [21] Gao D, Li Z, Wen Z, et al. Occurrence and fate of phthalate esters in full-scale domestic wastewater treatment plants and their impact on receiving waters along the Songhua River in China[J]. *Chemosphere*, 2014, 95:24-32.
- [22] Liu Y, Chen Z, Shen J. Occurrence and removal characteristics of phthalate esters from typical water sources in Northeast China[J]. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2013, 2013(2):606-612.
- [23] Fatoki O S, Noma A. Solid phase extraction method for selective determination of phthalate esters in the aquatic environment[J]. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2002, 140(1/2/3/4):85-98.
- [24] Huang P C, Tien C J, Sun Y M, et al. Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(4):539-544.
- [25] Wang X T, Ma L L, Sun Y Z, et al. Phthalate esters in sediments from guanting reservoir and the Yongding River, Beijing, People's Republic of China[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2006, 76(5):799-806.
- [26] Wang F, Xia X, Sha Y. Distribution of phthalic acid esters in Wuhan section of the Yangtze River, China[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 154(1):317-324.
- [27] Srivastava A, Sharma V P, Tripathi R, et al. Occurrence of phthalic acid esters in Gomti River Sediment, India[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2010, 169(1-4):397-406.
- [28] Adeniyi A A, Okedeyi O O, Yusuf K A. Flame ionization gas chromatographic determination of phthalate esters in water, surface sediments and fish species in the Ogun river catchments, Ketu, Lagos, Nigeria[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2011, 172(1/2/3/4):561-569.
- [29] Zhang M, Cong Y, Sheng Y, et al. A direct competitive enzyme-linked immunosorbent assay by antibody coated for diethyl phthalate analysis [J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 406(1):24-28.
- [30] Zhang M, Yu X, 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.