

邻苯二甲酸二甲酯免疫层析快速检测试纸的研制

朱帆, 邓丽华, 朱彬, 杨金易, 徐振林, 孙远明, 王弘, 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: 邻苯二甲酸酯类塑化剂是一类具有生殖毒性的环境激素类物质, 通过违规添加或迁移而造成食品污染问题颇为严峻, 开发适合现场的塑化剂快速监测方法非常重要。本研究以邻苯二甲酸二甲酯(DMP)为对象, 建立了DMP的胶体金标记免疫层析检测试纸方法。采用柠檬酸三钠还原氯金酸制备了胶体金, 将其标记DMP多克隆抗体, 制备了金标抗体; 采用棋盘法和单因素试验确定最佳包被浓度和二抗浓度分别为3000 $\mu\text{g/mL}$ 和1600 $\mu\text{g/mL}$, 抗体浓度为稀释1.4倍, 基于此建立了DMP免疫层析快速检测方法, 其检测限为0.4 $\mu\text{g/mL}$, 5 min内肉眼可观察到检测结果, 与其它结构功能类似物无明显交叉反应, 特异性良好, 白酒样品添加检测结果与GC-MS法相符。本法快速简单, 稳定可靠, 适用于实际样品中DMP的现场快速检测。

关键词: 胶体金; 层析; 邻苯二甲酸甲酯; 快速检测

文章编号: 1673-9078(2017)3-279-284

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.3.042

Development of a Colloidal Gold Immunochromatographic Strip for the Rapid Determination of Dimethyl Phthalate

ZHU Fan, DENG Li-Hua, ZHU Bin, YANG Jin-Yi, XU Zhen-Lin, SUN Yuan-Ming, WANG Hong, SHEN Yu-Dong
(Key Laboratory of Food Quality and Safety of Guangdong Province, College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Phthalate ester plasticizer, a type of environmental hormone that is toxic to reproductive systems, has become a serious health threat because of its illegal transport and addition into foods intended for human consumption. Thus, development of an *in situ* testing method for the rapid detection of the plasticizer is essential. Herein, a colloidal gold-labeled immunochromatographic test paper method was developed for the rapid detection of dimethyl phthalate (DMP). To prepare the gold-labeled antibodies, anti-DMP polyclonal antibodies were labeled with colloidal gold prepared by the reduction of HAuCl_4 using trisodium citrate. The chessboard method and the single-factor test were used to determine the optimal coating concentration and secondary antibody concentration, which were revealed to be 3000 $\mu\text{g/mL}$ and 1600 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The antibody was diluted 1.4-fold. The limit of detection of the developed assay was 0.4 $\mu\text{g/mL}$, and the visual detection time was within 5 min. Cross-reaction experiments showed no interference from substances with similar structures, indicating the high specificity of the method. The results from strip testing of baijiu liquor were consistent with those from GC-MS. This proposed immunochromatographic assay is fast, simple, and reliable, providing a valid method for the rapid *in situ* detection of DMP in foods.

Key words: colloidal gold; chromatography; dimethyl phthalate; rapid detection

邻苯二甲酸酯类(Phthalate acid esters, 简称PAEs), 属于环境激素类物质, 一般为无色透明均匀黏稠液体。由于其成本低廉, 耐高温且易与其他助剂配合, 被作为增塑剂广泛的应用于塑料制品中, 涵盖

收稿日期: 2016-02-23

基金项目: 广东省科技计划(2013B040402006, 2014A020219008); 国家自然科学基金项目(31371769); 广州市科技计划(2011Y2-00007, 2013J4100053); 广东省优秀博士学位论文作者项目

作者简介: 朱帆(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 食品质量安全免疫分析技术

通讯作者: 沈玉栋(1977-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 食品质量安全快速检测, 生物分析与传感

范围广^[1]。研究表明, 邻苯二甲酸酯类塑化剂可干扰人体的内分泌系统, 从而造成生殖毒性, 其次, 其致癌、致畸以及致突变的作用也不容忽视^[2,3]。邻苯二甲酸二甲酯(Dimethyl phthalate, DMP), 作为其主要应用于塑化剂领域的添加剂之一, 可以通过消化系统、呼吸系统和皮肤接触等进入人体, 已被我国政府列在优先污染物黑名单中, 同时世界卫生组织对DMP的每天摄入量也限定在500 $\mu\text{g/kg}$ 以内。我国是白酒消费大国, DMP在白酒中的残留情况不容忽视。广东省酒类检测中心熊含鸿等^[4]建立了GC-MS方法, 对白酒的中17种邻苯二甲酸酯的检测范围在0.5~8.00 $\mu\text{g/mL}$, 彭俏容^[5]等使用QuEChERS前处理技术, 建立了

HPLC-UV 方法检测白酒中 13 种邻苯二甲酸酯, 该方法在 0.20~25 $\mu\text{g/mL}$ 范围内具有良好的线性关系, 王朝霞^[6]等对烟台市市售白酒中 12 种邻苯二甲酸酯类物质污染进行调查, DMP 检出率高达 25%, 高志越^[7]等发现某类市售白酒 DMP 含量达 41.67 $\mu\text{g/mL}$, 因此, 建立针对 DMP 快速筛查方法尤为需要。

DMP 的检测方法主要包括液相色谱法^[8]、气相色谱法^[9]、液相色谱-质谱联用^[10]和气相色谱-质谱联用^[11]等。免疫分析方法具有灵敏、快速和经济等特点, 符合大量样品的快速准确筛查检测需求, 已成为研究的热点。已报道的 DMP 快速检测方法主要有酶联免疫吸附法^[12]、化学发光酶免疫分析法^[13]和荧光偏振免疫定量法^[14]。但这些检测技术仍需在实验室进行, 无法实现现场筛查。

因此, 本研究旨在采用免疫层析原理建立 DMP 胶体金免疫层析检测试纸方法, 用于现场检测, 简便快速, 对于食品中 DMP 的现场快速筛检具有重要参考和实用价值。目前, 关于 DMP 胶体金免疫层析检测方法并未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

DMP 兔多克隆抗体、DMP 包被抗原及各种缓冲溶液均由实验室制备; DMP 及其类似物购自北京迪马 Dikma 科技有限公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司; 牛血清蛋白(BSA, 99%)、卵清蛋白(OVA, 98%)和吐温-20 购自美国 Sigma 公司, 白酒(52°)购自华南农业大学奇康超市; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

5417R 高速冷冻离心机, 德国 Eppendorf 公司; U-3010 紫外可见光谱仪, 日本 Hitachi 公司; MULTISKANMK3 酶标仪, 美国 Thermo 公司; Tecnai12 透射电子显微镜, 荷兰 FEI 公司。

1.3 方法

1.3.1 胶体金的制备

取 99 mL 蒸馏水加入 500 mL 烧瓶中, 再加入 1.0 mL、1%的氯金酸, 电热套加热至沸腾, 1 min 后将 1.5 mL、1%柠檬酸三钠迅速加入到烧瓶中, 观察颜色变化, 当溶液变为透明的红色颜色且稳定后, 继续加热 3 min, 关闭热源继续搅拌, 待冷却后转移到玻璃瓶中。

1.3.2 DMP 金标抗体的制备

取 5.0 mL 胶体金溶液于 10 mL 血清瓶中, 用 0.1 M K_2CO_3 调 pH 至 8.5, 搅拌下逐滴加入 24.0 μL 抗体(浓度为 2000 $\mu\text{g/mL}$), 室温反应 30 min 后, 加入 50.0 μL 的 10% BSA 溶液封闭多余的结合位点, 继续搅拌 30 min。将上述溶液于 4 $^\circ\text{C}$ 下, 8000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 沉淀用抗体复溶液复溶为原体积的 1/5, 4 $^\circ\text{C}$ 下贮存备用。

1.3.3 金标抗体浓度和包被原浓度的选择

将离心纯化后复溶至原体积 1/5 的金标抗体分别稀释 4 倍、7 倍、10 倍和 14 倍, 喷涂在结合物垫上烘干; 将包被抗原分别稀释 1 倍、2 倍、3 倍和 4 倍, 划膜烘干。将两者组装试纸条进行棋盘法检测阴性缓冲液和阳性标准品, 比较 T 线的深浅和灵敏度, 选出金标抗体和检测线包被抗原稀释倍数的最佳组合。

1.3.4 质控线羊抗兔稀释倍数的优化

将二抗羊抗兔分别稀释为 400、800、1600、3200 和 6400 $\mu\text{g/mL}$ 划膜于质控线(C 线), 烘干组装试纸条, 与 T 线颜色进行比对。

1.3.5 试纸条的组装

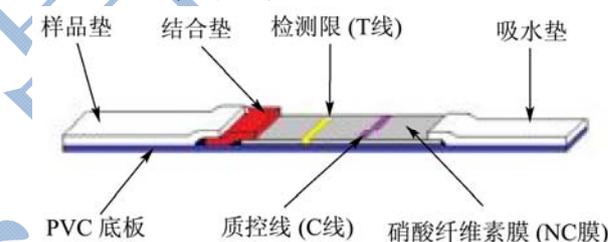


图 1 胶体金免疫层析试纸条组装示意图

Fig.1 Assemblage of the immunochromatographic strip

试纸条由样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜(NC膜)、吸水纸和底板 5 部分组成。将玻璃纤维膜裁成宽度 15 mm 的长条, 用优化的样品垫稀释液打湿, 37 $^\circ\text{C}$ 烘干作为样品垫。将玻璃纤维膜裁成宽度 4 mm 的长条, 将金标抗体稀释至最佳稀释倍数后, 喷涂在长条上, 37 $^\circ\text{C}$ 烘干 1 h 作为结合垫。将 NC 膜粘在底板的胶面, 并用划膜机将稀释至最佳倍数和浓度的包被抗原和二抗划膜固定于 NC 膜上分别作为检测线(T 线)和质控线(C 线), 两线间距 6 mm, 37 $^\circ\text{C}$ 烘 1 h。将吸水纸裁成 10 mm 宽的长条, 烘干。将按下图 5 所示, 将准备好的材料组装, 用切条机切成 4 mm 宽的试纸条, 装入卡壳中, 放入干燥剂密封, 常温保存。当试纸条的检测线为红色且与质控线颜色一致, 说明结果为阴性; 检测线颜色较阴性浅为弱阳性, 完全无色为强阳性。每次测定实验平行 3 次。

1.3.6 乙醇耐受量的测定

有机溶剂含量会影响抗体的活性, 进而对试纸条

测试结果产生影响。白酒中含有部分的乙醇，因此用含乙醇 0%、5%、10%、15%、20%、25%和 30%体积的 0.01 M、pH 7.8 磷酸盐缓冲溶液，将标准品稀释成 0.40 μg/mL，同时进行空白对照，比较不同有机溶剂下试纸条的灵敏度，T 线阴性和阳性颜色梯度清晰程度，显线速度以及和质控线的对比情况。

1.3.7 检测限 (LOD) 的确定

用 0.01 M、pH 7.8 磷酸盐缓冲液将标准品分别稀释成阴性空白、0.10、0.20、0.30、0.40、0.80 和 1.0 μg/mL，反应 5 min 后观察，当试纸条检测线完全消失的浓度即为试纸条的检测限，平行测定 3 次。

1.3.8 特异性实验

用 0.01 M、pH 7.8 磷酸盐的药物稀释液将与待测物结构及功能类似的 15 种主要的邻苯二甲酸酯类物质配制成 0.40、2.0 和 4.0 μg/mL。用试纸条进行检测，观察显色情况，平行测定 3 次。

1.3.9 稳定性实验

将组装好的试纸条置于铝箔袋中，加入干燥剂密封，分别置于室温 (25 °C) 和 37 °C 烘箱贮藏，分别每隔 14 d 和 1 d 取出 3 条，分别进行阴性和阳性测试，观察质控线和检测线的颜色，及金标抗体的释放情况。

1.3.10 实际样品检测

分别向白酒中添加 2.0、4.0 和 6.0 μg/mL DMP 标准品，稀释 10 倍后直接测定，同时进行 GC-MS 仪器比对。

2 结果与讨论

2.1 胶体金的制备与表征

本实验烧制的胶体金溶液澄清无沉淀，呈酒红色；用红外激光笔照射，形成一条笔直的光路，无散射现象，说明颗粒较为均匀。如下图 2 所示，胶体金溶液

在特征吸收峰为 522 nm，吸收峰窄而尖，说明粒径较接近，颗粒均匀；透射电镜扫描，可看出胶体金颗粒大小均匀、圆滑无棱角，计算得胶体金的粒径为 35 nm。

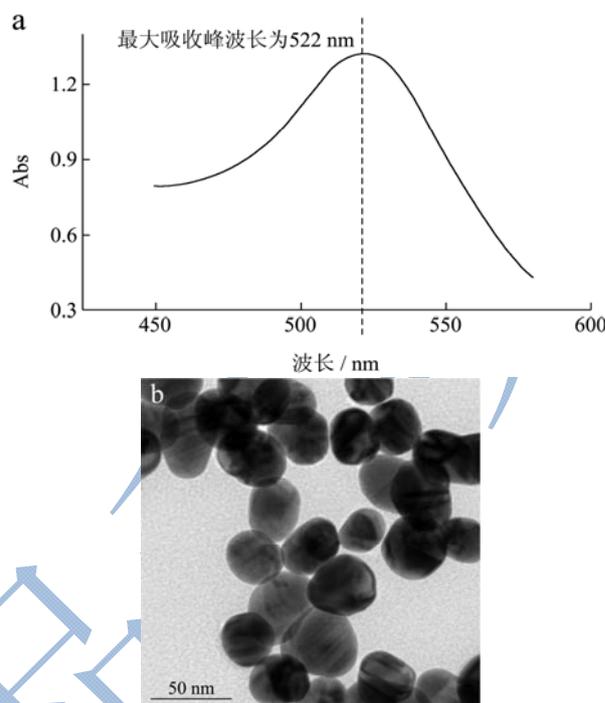


图 2 胶体金溶液紫外扫描图(a)，胶体金溶液透射电镜图(b)
Fig.2 UV absorbance spectrum of colloidal gold solution(a), TEM image of colloidal gold particles(b)

2.2 金标抗体浓度和包被原浓度的选择

合适金标抗体浓度与包被原浓度能提高试纸条的灵敏度。由表 1 可看出，当金标抗体稀释 7 倍、包被抗原稀释 3 倍时，此时试纸条的阴性和阳性 T 线对比最明显。所以选择 DMP 金标抗体稀释 7 倍（稀释至原体积 1.4 倍）、包被抗原稀释 3 倍 (3000 μg/mL) 这个组合最佳。

表 1 金标抗体和包被原的稀释倍数棋盘法

Table 1 Chessboard method for titration of the colloidal gold-labeled antibody and coating antigen (n=3)

棋盘法 (阴性: 0.01 M 磷酸盐缓冲溶液; 阳性: 0.40 μg/mL)	T 线包被原稀释倍数							
	1		2		3		4	
复溶后金标抗体稀释倍数	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
4	+++	++	+++	++	+++	+	++	+
7	+++	+	++	±	++	-	+	-
10	+++	+	+	±	+	-	±	-
14	+	+	+	-	±	-	±	-

注：“+”表示显示强度；“±”表示隐约可见；“-”表示不显色。

2.3 质控线羊抗兔稀释倍数的优化

商品化的二抗 (羊抗兔) 较制备的包被抗原固定

在 NC 膜上更稳定，所以一般将二抗固定在 NC 膜上作为质控线，用作试纸条质量的参考指标。当逐渐增加二抗浓度时，C 线颜色逐渐加深，但仍较 T 线浅，

当浓度提高至 1600 $\mu\text{g/mL}$ 时, C 线与阴性样品显色接近, 与阳性样品差别较明显; 继续提高二抗浓度, 则 C 线又较 T 线要深, 易造成假阳性判断。因此, 选择二抗浓度 1600 $\mu\text{g/mL}$ 作为质控线二抗的最佳浓度。

如表 2 所示, 随着药物稀释液中乙醇含量的增加,

试纸条颜色越来越浅, 当其含量大于 10% 时, 阴性和阳性对比无差别。因此, 乙醇最大耐受 10%。

2.4 乙醇耐受量的测定

表 2 不同乙醇含量对试纸条的影响

Table 2 Effect of different ethanol concentrations on the strip

乙醇含量	0		5		10		15	
T 线比对	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
	++	-	++	+	++	+	+	+
显线速度	快		快		快		快	
金标抗体释放情况	完全		完全		完全		完全	

乙醇含量	20		25		30	
T 线比对	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
	+	+	-	-	-	-
显线速度	快		快		快	
金标抗体释放情况	完全		完全		完全	

注: “+” 表示显示强度; “±” 表示隐约可见; “-” 表示不显色。

2.5 检测限 (LOD) 的确定

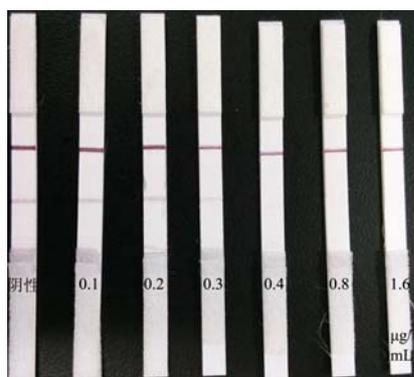


图 3 DMP 试纸条检测限

Fig.3 Limit of detection of the strip (n=3)

表 3 DMP 试纸条交叉反应

Table 3 Results of cross-reaction on the strip (n=3)

DMP 及其类似物	浓度/($\mu\text{g/mL}$)		
	0.4	2.0	4.0
阴性	++	++	++
邻苯二甲酸酯 (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(2-乙基)己酯(DEHP)	++	++	++
邻苯二甲酸二环己酯(DCHP)	++	++	++
邻苯二甲酸二(2-甲氧基)乙酯(DEMP)	++	++	++
邻苯二甲酸二(2-乙氧基)乙酯(DEEP)	++	++	++
邻苯二甲酸二异丁酯(DIBP)	++	++	++
邻苯二甲酸丁基苯基酯(BBP)	++	++	++

邻苯二甲酸二正辛酯(DNOP)	++	++	++
邻苯二甲酸二(4-甲基-2-戊基)酯(BMPP)	++	++	++
邻苯二甲酸二壬酯(DNP)	++	++	++
邻苯二甲酸二异壬酯(DINP)	++	++	++
邻苯二甲酸二异癸酯(DIDP)	++	++	++
邻苯二甲酸(PA)	++	++	++

注: “+” 表示显示强度; “±” 表示隐约可见; “-” 表示不显色。

用 0.01 M、pH 7.8 磷酸盐缓冲液将 DMP 标准品配制成阴性空白、0.10、0.20、0.30、0.40、0.80 和 1.0 $\mu\text{g/mL}$, 其测试结果如表 3 和图 3 所示, 当标准品浓度较低时, 其与阴性 T 线颜色接近, DMP 标准品浓度为 0.40 $\mu\text{g/mL}$ 时, T 完全线消失呈阳性。因此, 肉眼判断 DMP 试纸条的检测限为 0.40 $\mu\text{g/mL}$ 。

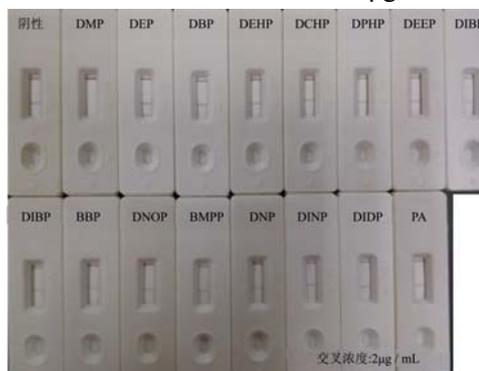


图 4 DMP 试纸条交叉反应

Fig.4 Results of cross-reaction on the strip

2.6 试纸条特异性实验

交叉反应是衡量试纸条特异性的重要指标。由表 3 和图 4 看出,类似物的检测结果均为阴性,而当增加浓度为 4.0 $\mu\text{g/mL}$ 时,只有 DEP 的检测结果为弱阳性。这是由于 DEP 的结构与 DMP 的结构极其接近,脂链上多一个 $-\text{CH}_2$,所以制备的抗体对 DEP 也有部分识别,但只有在高浓度下才能识 DEP。因而,试纸条对 DMP 的特异性好。

2.7 稳定性实验

将组装好的试纸条,于室温(25 $^{\circ}\text{C}$)干燥环境贮藏和 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存再进行测试。结果显示室温下保存 4 个月,试纸条的 T 线和 C 线及灵敏度仍与刚制备的试纸条保持一致;而 37 $^{\circ}\text{C}$ 保存第 3 d 时,试纸条的 T 线变浅,第 5 d,阴性较难判断,第 7 d 时,阴性和阳性都无完全消失。因此,试纸条可在室温干燥(25 $^{\circ}\text{C}$)环境至少贮藏 4 个月,37 $^{\circ}\text{C}$ 最长能保存 3 d。

2.8 实际样品检测

表 4 GC-MS 与试纸条检测样品的添加回收实验结果对比
Table 4 Comparison between strip and GC-MS detection results for liquor samples (n=3)

样品	DMP 添加浓度 /($\mu\text{g/mL}$)	GC-MS /($\mu\text{g/mL}$)	试纸条 T 线
白酒	不添加	未检出	++
	2.0	1.90	+
	4.0	4.03	-
	6.0	6.33	-

注:“+”表示显示强度;“±”表示隐约可见;“-”表示不显色。



图 5 试纸条的样品添加回收结果

Fig.5 Strip results for liquor samples

GC-MS 与试纸条检测样品的添加回收实验结果对比如表 4 和图 5 所示,当 DMP 浓度 $<4.0 \mu\text{g/mL}$ 时,试纸条 T 线较阴性 T 线要浅,说明有部分抑制,但抑制不完全,当样品中 DMP 浓度为 $>4.0 \mu\text{g/mL}$ 时, T 线处的包被原被抑制的较完全,GC-MS 检测结果与试

纸条的检测结果一致,说明本实验研制的试纸条结果准确。

3 结论

基于 DMP 检测的需求,本文利用 35 nm 的胶体金标记 DMP 多克隆抗体,制备了 DMP 胶体金免疫层析试纸条,检测限为 0.40 $\mu\text{g/mL}$,且可直接用于白酒样品的定性或半定量分析,目测结果。该方法简便快捷、成本低、稳定且准确性好,适合样品的现场快速筛检。

参考文献

- [1] Pereira C, Mapuskar K, Rao C V. Chronic toxicity of diethyl phthalate-A three generation lactational and gestational exposure study on male Wistar rats [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2007, 23(3): 319-327
- [2] Cao X. Phthalate esters in foods: Sources, occurrence, and analytical methods [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2010, 9(1): 21-43
- [3] Doulla J, Cafleyb R, Elcombe C. A cancer risk assessment of Di (2-ethylhexy) phthalate: application of the new U.S.EPA risk assessment guidelines [J]. Regul. Toxicol. Pharmacol., 1999, 29(3): 327-357
- [4] 熊韩鸿,曾玩娟.白酒中 17 种邻苯二甲酸酯测定方法初探 [J].酿酒,2013,40(3):93-97
- XIONG Han-hong, ZENG Wan-xian. The method for determination of liquor in 17 adjacent benzene two formic acid ester content [J]. Liquor Making, 2013, 40(3): 93-97
- [5] 彭俏容,于淑新,赵连海,等.QuEChERS-HPLC 快速测定白酒中 13 种邻苯二甲酸酯[J].酿酒科技,2014,235(1):89-92
- PENG Qiao-rong, YU Shu-xin, ZHAO Lian-hai, et al. Fast determination of 13 kinds of phthalate esters in liquor by QuENchERS-HPLC [J]. Liquor-making Science and Techology, 2014, 235(1): 89-92
- [6] 王朝霞,姜梅,宫春波,等.烟台市市售白酒中 16 种邻苯二甲酸酯类物质污染调查[J].中国食品卫生杂志,2015,27(3): 304-307
- WANG Zhao-xia, JIANG Mei, GONG Chun-bo. Determination an analysis of 16 phthalates plasticizer in white spirits of Yantai [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2015, 27(3): 304-307
- [7] 高志越,薛菲,高娅玲.线性扫描基极谱法检测白酒中邻苯二甲酸酯二甲酯[J].食品科学,2015,36(8):211-215
- GAO Zhi-yue, XUE Fei, GAO Ya-ling. Determination of dimethyl phthalate in chinese liquors by linear sweep

- polarography [J]. Food Chemistry, 2015, 36(8): 211-215
- [8] Chen D, Miao H, Zou J, et al. Determination of phthalate esters in liquor by high resolution mass spectrometry [J]. Analytical Letters, 2015, 48(5): 739-751
- [9] Fan, J, Wu L, Wang X F, et al. Determination of the migration of 20 phthalate esters in fatty food packaged with different materials by solid-phase extraction and UHPLC-MS/MS [J]. Analytical Methods, 2012, 4(12): 4168-4175
- [10] 吴惠勤,朱志象,黄晓兰,等.不同类别食品 21 种邻苯二甲酸酯的气相色谱-质谱测定及其分布情况研究[J].分析测试学报.2011,30(10):1079-1087
- WU Hui-qin, ZHU Zhi-xiang, HUANG Xiao-lan, et al. Study on determination of 21 phthalate acid esters and their distribution in different types of foods by gas chromatography-mass spectrometry [J]. Journal of Instrument Analysis, 2011, 30(10): 1079-1087
- [11] SUN Rui-yan, ZHUANG Hui-sheng. Development of a high sensitive biotin-streptavidin enzyme-linked immunosorbent assay for detecting diethyl phthalate based on a specific polyclonal antibody [J]. Food and Agricultural Immunology, 2015, 26(5): 746-740
- [12] TANG Ming-wei, JIANG Yong, DU Hui-hui. Synthesis of a polyclonal antibody for the sensitive determination of phthalate esters by enzyme-linked immunoassay [J]. Analytical Methods, 2015, 7(8): 3402-3410
- [13] 朱彬,朱帆,沈玉栋,等.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[J].分析化学,2015,43(7): 1027-1032
- ZHU Bin, ZHU Fan, SHEN Yu-dong, et al. Indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay method for determination of dimethyl phthalate in soy sauce and liquor [J]. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2015, 43(7): 1027-1032
- [14] TIAN Xi, DONG Yang-qing, WANG Yun-feng, et al. Quantification of diethyl phthalate by a rapid and homogenous fluorecence polarization immunoassay [J]. Analytical Letters, 2015, 48(18): 2843-2855