

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710049361.5

[43] 公开日 2007年11月28日

[11] 公开号 CN 101078723A

[22] 申请日 2007.6.25

[21] 申请号 200710049361.5

[71] 申请人 四川大学

地址 610065 四川省成都市武侯区一环路南一段24号

[72] 发明人 邓安平 韩丹

[74] 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任公司
代理人 邓继轩

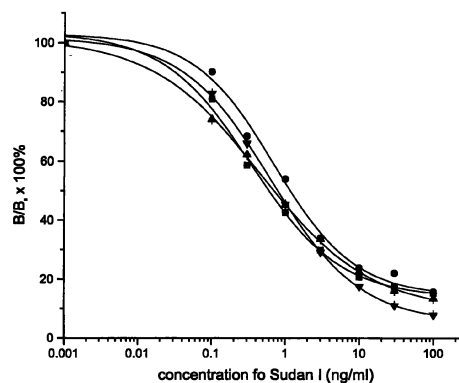
权利要求书3页 说明书12页 附图2页

[54] 发明名称

测定食品中苏丹红1号含量的酶联免疫吸附分析方法

[57] 摘要

本发明公开了测定食品中苏丹红1号含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA),其特点是合成了两种不同碳桥长度的苏丹红衍生物,并将衍生物与载体蛋白质交联,获得四种多克隆抗体。有8种测试组合,7种组合可用于对苏丹红1号的免疫分析,标准曲线的浓度范围为0.1~100ng/mL, IC_{50} 为0.3~2.0ng/mL。四种抗体与苏丹红2-4号的交叉反应率为0.1~14.3%,与6种食品可添加色素几乎没有交叉反应,说明抗体对苏丹红1号有很高的特异性。6种市售食品用作加标样品。经简单的样品处理后,萃取液直接稀释,用于ELISA测定。苏丹红1号的加标回收率92.4~114%,相对标准偏差为5.9~24.8%。用HPLC对加标样品进行分析,并与ELISA结果对比。两种方法有较高的相关性($R=0.9851$; $n=7$)。



1、测定食品中苏丹红 1 号含量的酶联免疫吸附分析方法，其特征在于该方法包括以下步骤：

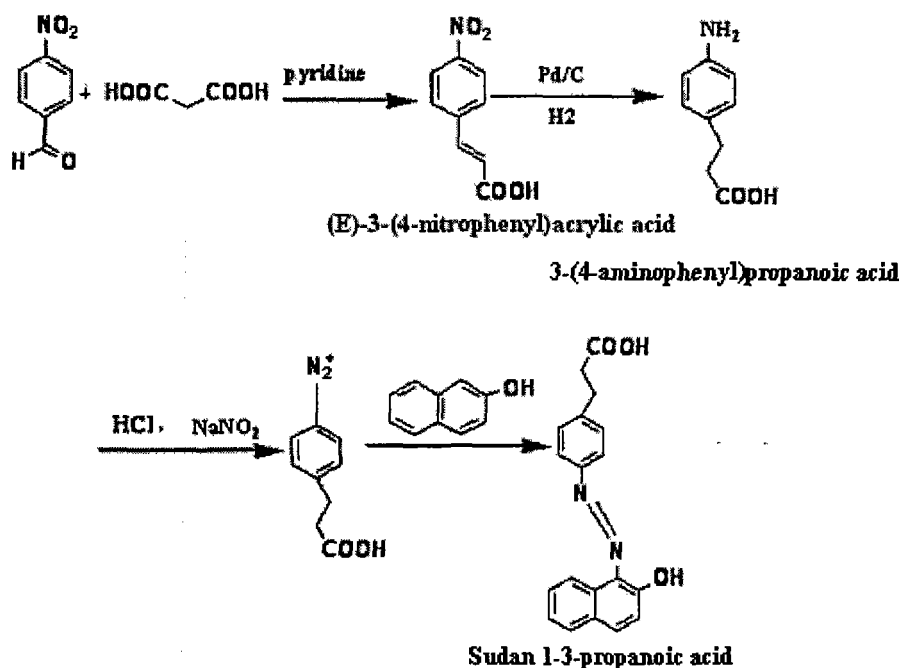
(1) 苏丹红 1 号修饰物的制备

1) 苏丹红 1 号-3-丙酸(Sudan 1-C3)的制备

将丙二酸 0.02~0.08 mol 溶于 20~80 mL 新蒸吡啶中，加入对硝基肉桂酸 0.02~0.1 mol 及醋酸胺 0.001~0.004 mol，此混合物在温度 100~150℃回流 1~7 小时，冷却后，将反应物用醋酸重结晶，得到步骤 1 产物 4~10 g，熔程：275~280℃；

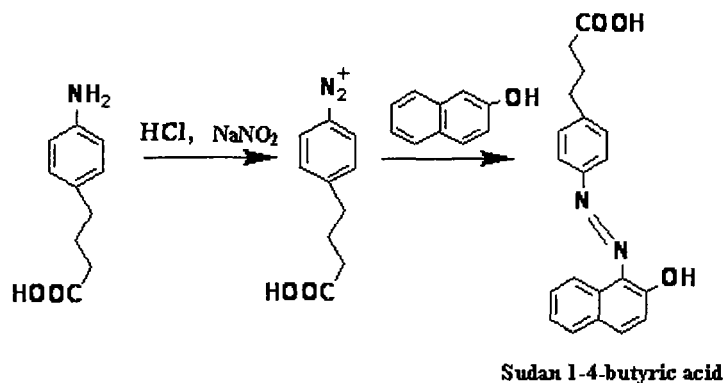
将 0.15~0.65g 步骤 1 产物，5~35 mg 钯碳，2~15 mL 甲醇，加入到反应釜中，通入氢气，于温度 100~120℃反应 1~5 小时，过滤反应物，收集滤液，用旋转蒸发器旋干滤液，用二氯甲烷:甲醇=5:1 的体积比过柱，收集 TLC 板实验中 Rf 值为 0.3 的产物，旋干溶液，得到乳白色固体；

将 0.1 g 步骤 2 产物溶解在 1.5~2.5mL 的浓盐酸中，在温度 5~10℃，加入含 0.01~0.06 g 亚硝酸钠的水溶液 0.5mL，搅拌数分钟，得到淡黄色重氮盐溶液，将 0.04~0.12g 2-萘酚溶解于 8~12%的氢氧化钠溶液 3~5mL 中，冷却至 5℃，再缓慢加入重氮盐溶液中，得到 0.12~0.30 g Sudan 1-C3，其反应式如下：



2) 苏丹红 1 号-4-丁酸(Sudan 1-C4)的制备

将 0.05-0.4g 对氨基苯丁酸溶解在 1~4 mL 浓盐酸中, 在冰浴中条件下, 加入含 0.01~0.06 g 亚硝酸钠的水溶液 0.5mL, 搅拌数分钟, 得到重氮盐溶液; 将 0.03~0.11g 2-萘酚溶解于 8~12%的氢氧化钠溶液 3~5mL 中, 冷却至 5℃, 再缓慢加入重氮盐溶液中, 得到约 0.10~0.40 g 产品, 其反应式如下:



(2) 免疫原和包被抗原的制备

分别称取 0.10~0.45 mmol 的 Sudan 1-C3 和 0.10~0.45 mmol Sudan 1-C4, 二环己基碳二亚胺 0.10~0.80 mmol, N-羟基琥珀酰亚胺 0.10~0.80 mmol, 溶解于 100~600 μ L 的二甲基甲酰胺中, 室温下搅拌过夜, 将混合液离心 5~20 分钟, 取上层清液, 缓慢加入到 0.01~0.02% 的牛血清白蛋白(BSA)和 0.01~0.02%卵清白蛋白(OV), 搅拌 1~10 小时, 离心分离, 取上层清液, 透析数天, 溶液冷冻干燥, 置冰箱中存放, 其中, Sudan 1-C3-BSA 和 Sudan 1-C4-BSA 为免疫原; Sudan 1-C3-OV 和 Sudan 1-C4-OV 为包被抗原;

(3) 苏丹红 1 号抗体的制备

两种免疫原分别免疫两只兔子: 将 1~4 mg 免疫原溶解于 0.5~4mL 的生理盐水中, 加入 0.5~3mL 完全福氏佐剂, 混合成油包水的乳浊液, 每只兔子每次吸取 0.5~2.0mL 乳浊液, 多次皮下注射入兔子背部, 1~5 周后, 对兔进行加强免疫, 使用不完全福氏佐剂, 其余与第一次免疫相同, 第二次免疫后, 2~5 周进行下一次免疫, 并且第三次、第四次免疫后, 5~7 天抽取 0.1~0.5mL 耳血, 检测抗体产生的情况, 第五次免疫后, 5~15 天处死兔子, 取全血, 将血液在冰箱中放置过夜, 吸取上层清液, 分装, 于低温冰箱中储存, 本发明共制得四种抗体 C₃-I, C₃-II, C₄-I 和 C₄-II;

(4) 建立测定苏丹红 1 号的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)

对所制得的抗体进行性能表征, 在实验条件优化的基础上, 建立测定食品中苏丹红 1 号含量的 ELISA;

(5) ELISA 对加标样品中苏丹红 1 号含量的测定

选择了六种食品：新鲜番茄、番茄汁、番茄酱、豆瓣酱 A，豆瓣酱 B，辣椒面为加标样品，同一样品取两份平行进行，一份加入适量的苏丹红 1 号甲醇溶液，另一份加入与第一份相同体积的甲醇，静置过夜，超声震荡 5~30 分钟，涡旋混合半分钟，静置 10~30 分钟，取上清液，离心分离 5~20 分钟，离心液用 5%甲醇稀释，ELISA 直接测定，样品的测定条件以及结果如表 3 所示，从表中可见，回收率在 92.4~114.0%之间，相对标准偏差在 5.9~24.8%之间，说明方法准确性和精密度都比较好；

(6) ELISA 与 HPLC 的比较

苏丹红 1 号的 HPLC 测定条件为：色谱条件: Hypersil Gold 柱，柱温为室温，流动相为含 0.1%甲酸的甲醇:含 0.1%甲酸的水=85:15，流量 1mL/ min，进样 20 μ L，紫外检测波长：480 nm，标准溶液浓度为：0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10 μ g/mL，样品萃取液用 0.25 μ m 的滤膜过滤后直接测定；

对加标样品及辣椒酱 B 未加标阳性样品，以 HPLC 的测定结果为横坐标，ELISA 的测定结果为纵坐标作图得两者的相关曲线，详见图 4 所示，回归曲线为 $y=0.9068x+0.0.5322$ ，相关系数 $R=0.9851$ ，表明 ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

测定食品中苏丹红 1 号含量的酶联免疫吸附分析方法

技术领域

本发明涉及一种测定食品中苏丹红 1 号含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA),属于食品安全监督或食品分析的研究领域。

背景技术

苏丹红是一类人工合成的偶氮类油溶性的化工染色剂,被大量用于机油、汽车蜡和鞋油等工业品,还可以用于烟火礼花的着色。家用的红色地板蜡或红色鞋油通常含有苏丹红 1 号。随着人们对苏丹红毒性的逐步了解,国际癌症研究机构将苏丹红归为第三类致癌物质,具有潜在的危险。

在食品加工过程中,为求制品色彩的艳丽或保持原有的色泽,借以改善食品的感官性状,增进人们的食欲,常常添加一些食用色素。1995 年欧盟禁止将苏丹红(尤其是苏丹 1 号)作为食用色素添加在食品当中,对此我国也明文禁止。但是,由于添加了苏丹红 1 号的辣椒粉等调味品色泽鲜亮持久,依然有少量食品违规使用苏丹红。2005 年 2 月英国发出食品警告,召回被苏丹红污染的食品。2005 年 2 月 23 日中国国家质量监督总局发布了关于加强对苏丹红 1 号食品检验监管的紧急通知,防止含有苏丹红的食品在市场上销售。2005 年 4 月卫生部发布公告,重申不得将苏丹红作为食品添加剂生产、经营和使用。

苏丹红的检测方法主要是色谱分析法。欧盟推荐的标准方法(European Commission. NEWS notification: 03/ 99: Corrected method for the detection of Sudan. 2005.)是将含有苏丹红成分的检测物先经过乙腈提取后,过滤,滤液用高效液相色谱(HPLC)分析,以波长可变的紫外-可见光度检测器定性与定量,确证苏丹红可以使用液相色谱-电喷雾离子化质谱联用技术。在我国,国家质检总局发布的国家标准(GB/T 19681-2005),采用正相吸附和固相萃取原理,一次性去除样品中辣椒色素和番茄色素对食品中苏丹红检测的影响,对苏丹红1-4号进行了HPLC检测。国内、外还报道了一些改良的色谱分析法,如Mazzetti M.等(Food Addit Contam, 2004, 21: 935-941)介绍了一种简单而快速的苏丹1号的检测方法; Di Donna L.等(Anal Chem, 2004, 76: 5104-5108)基于反相液相-串联电喷

射质谱技术, 建立测定辣椒中苏丹红1-4号的液相-质谱联用检测方法; 苏小川等(中国卫生检验杂志, 2005(15): 1073-1074)探索并建立了气相色谱/质谱技术检测苏丹1号的方法。

尽管色谱分析方法较准确, 但色谱法仪器昂贵、样品预处理复杂、费时、检测成本高。我国从2005年2月爆发苏丹红事件以来, 虽经多次整治, 食品“涉红”案件时仍有出现。为了加强食品监督, 保障消费者的身体健康, 迫切需要建立快速、简便、价廉、灵敏、特异的苏丹红测定新方法。

酶联免疫吸附分析方法(ELISA)具有灵敏度高、特异性强、分析快速的优点, ELISA已用于医学临床、药物、食品和环境等分析领域中, 但国内外均未见有ELISA测定食品中苏丹红1号含量的文献报道。

发明内容

本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种测定食品中苏丹红1号含量的酶联免疫吸附分析方法, 其特点是基于抗原与抗体之间特异性反应而建立的分析方法。

本发明的目的由以下技术措施实现, 其中所述原料份数除特殊说明外均为重量份数。

测定食品中苏丹红1号含量的酶联免疫吸附分析方法

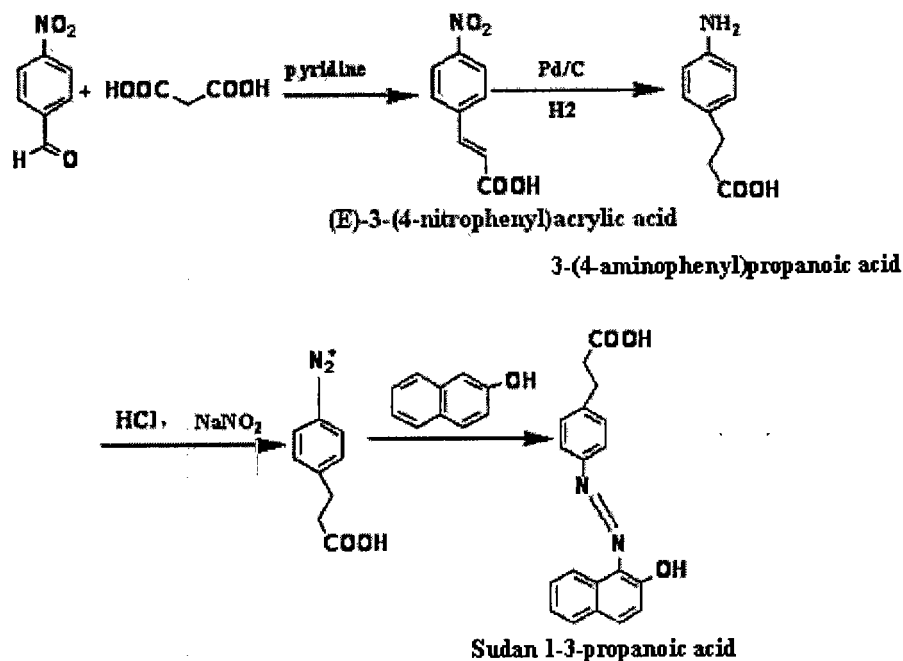
(1) 苏丹红1号修饰物的制备

1) 苏丹红1号-3-丙酸(Sudan 1-C3)的制备

将丙二酸 0.02~0.08 mol 溶于 20~80 mL 新蒸吡啶中, 加入对硝基肉桂酸 0.02~0.1 mol 及醋酸胺 0.001~0.004 mol, 此混合物在温度 100~150℃回流 1~7 小时, 冷却后, 将反应物用醋酸重结晶, 得到步骤 1 产物 4~10 g, 熔程: 275~280℃;

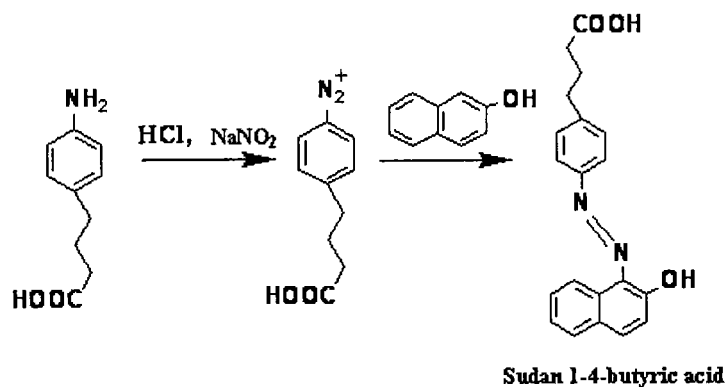
将 0.15~0.65g 步骤 1 产物, 5~35 mg 钯碳, 2~15 mL 甲醇, 加入到反应釜中, 通入氢气, 于温度 100~120℃反应 1~5 小时, 过滤反应物, 收集滤液, 用旋转蒸发器旋干滤液, 用二氯甲烷:甲醇=5:1 的体积比过柱, 收集 TCL 板实验中 Rf 值为 0.3 的产物, 旋干溶液, 得到乳白色固体;

将 0.1 g 步骤 2 产物溶解在 1.5~2.5mL 的浓盐酸中, 在温度 5~10℃, 加入含 0.01~0.06 g 亚硝酸钠的水溶液 0.5mL, 搅拌数分钟, 得到淡黄色重氮盐溶液, 将 0.04~0.12g 2-萘酚溶解于 8~12%的氢氧化钠溶液 3~5mL 中, 冷却至 5℃, 再缓慢加入重氮盐溶液中, 得到 0.12~0.30 g Sudan 1-C3, 其反应式如下:



2) 苏丹红 1 号-4-丁酸(Sudan 1-C4)的制备

将 0.05-0.4g 对氨基苯丁酸溶解在 1~4 mL 浓盐酸中，在冰浴中条件下，加入含 0.01~0.06 g 亚硝酸钠的水溶液 0.5mL，搅拌数分钟，得到重氮盐溶液；将 0.03~0.11g 2-萘酚溶解于 8~12%的氢氧化钠溶液 3~5mL 中，冷却至 5℃，再缓慢加入重氮盐溶液中，得到约 0.10~0.40 g 产品，其反应式如下：



(2) 免疫原和包被抗原的制备

分别称取 0.10~0.45 mmol 的 Sudan 1-C3 和 0.10~0.45 mmol Sudan 1-C4，二环己基碳二亚胺 0.10~0.80 mmol, N-羟基琥珀酰亚胺 0.10~0.80 mmol，溶解于 100~600 μL 的二甲基甲酰胺中，室温下搅拌过夜，将混合液离心 5~20 分钟，取上层清液，缓慢加入到 0.01~0.02% 的牛血清白蛋白(BSA)和 0.01~0.02%卵清白蛋白(OV)，搅拌 1~10 小时，离心分离，取上层清液，透析数天，溶液冷冻干燥，置冰箱中存放，其中，Sudan 1-C3-BSA 和 Sudan 1-C4-BSA 为免疫原；Sudan 1-C3-OV 和 Sudan 1-C4-OV 为包被抗原；

(3) 苏丹红 1 号抗体的制备

两种免疫原分别免疫两只兔子：将 1~4 mg 免疫原溶解于 0.5~4mL 的生理盐水中，加入 0.5~3mL 完全福氏佐剂，混合成油包水的乳浊液，每只兔子每次吸取 0.5~2.0mL 乳浊液，多次皮下注射入兔子背部，1~5 周后，对兔进行加强免疫，使用不完全福氏佐剂，其余与第一次免疫相同，第二次免疫后，2~5 周进行下一次免疫，并且第三次、第四次免疫后，5~7 天抽取 0.1~0.5mL 耳血，检测抗体产生的情况，第五次免疫后，5~15 天处死兔子，取全血，将血液在冰箱中放置过夜，吸取上层清液，分装，于低温冰箱中储存，本发明共制得四种抗体 C₃-I, C₃-II, C₄-I 和 C₄-II；

(4) 建立测定苏丹红 1 号的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)

对所制得的抗体进行性能表征，在实验条件优化的基础上，建立测定食品中苏丹红 1 号含量的 ELISA；

本发明的优点：

1. 在国内、外首次成功建立测定食品中苏丹红 1 号含量的 ELISA。
2. 灵敏度高、特异性强。
3. 样品处理简单、测试量大、测试费用低。
4. 对样品的测定，ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

附图说明

图 1. 免疫原的紫外-可见光谱图

- a. Sudan 1-C3-BSA 的紫外-可见光谱图
- b. Sudan 1-C3-BSA 的紫外-可见光谱图

由图 1 可知，在 280nm(BSA), 320nm 和 492 nm 处(Sudan 1 号)均有特征吸收，表明苏丹红 1 号已成功与蛋白交联。

图 2. 苏丹红 1 号的同类组合的标准曲线

▼包被抗原 Sudan 1-C3-OA, 1:30,000 (e.g. 6.7 ng/well); 抗体 C3-I, 1:150,000; GaRIgG-HRP, 1:20,000; IC₅₀ 0.64 ng/mL. ■包被抗原 Sudan 1-C3-OA, 1:30,000 (e.g. 6.7 ng/well); 抗体 C3-II, 1:150,000; GaRIgG-HRP 1:20,000; IC₅₀ 0.35 ng/mL; ●包被抗原 Sudan 1-C4-OA, 1:10,000 (e.g. 20 ng/well); 抗体 C4-I; 1:100,000; GARIgG-HRP, 1:20,000; IC₅₀ 0.70 ng/mL; ▲包被抗原 Sudan 1-C4-OA 1:30,000 (e.g. 6.7 ng/well); 抗体 C4-II, 1:150,000; GARIgG-HRP 1:20,000; IC₅₀ 0.76 ng/mL。

图 3. 苏丹红 1 号的异类组合的标准曲线

▲包被抗原 Sudan 1-C3-OA, 1:30000 (e.g. 6.7 ng/well); 抗体 C4-I, 1:70,000; GaRIgG-HRP, 1:20000; IC₅₀ 0.70 ng/mL ●包被抗原 Sudan 1-C4-OA, 1:10000 (e.g. 20 ng/well); 抗体 C3-I, 1:50,000; GaRIgG-HRP 1:20,000; IC₅₀ 0.75 ng/mL; ■包被抗原 Sudan 1-C4-OA, 1:10000 (e.g. 20 ng/well); 抗体 C3-II, 1:50,000; GaRIgG-HRP 1:20,000; IC₅₀ 1.0 ng/mL.

图 4. ELISA 与 HPLC 对 6 个加标样品及辣椒酱 B 未加标阳性样品中苏丹红 1 号测定结果的相关曲线

具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行具体的描述, 有必要在此指出的是本实施只用于对发明进行进一步说明, 但不能理解为对本发明保护范围的限制, 该领域的技术熟练人员可以根据上述本发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

实施例:

1. 苏丹红 1 号修饰物的制备

苏丹红 1 号是小分子化合物, 没有免疫原性, 不能直接免疫动物产生抗体, 必须对苏丹红 1 号的分子结构进行合理、有效的化学修饰, 使其带有活性基团, 才能与载体蛋白交联, 制得免疫原和包被抗原。

制备两种苏丹红 1 号修饰物: 对氨基苯丙酸经亚硝酸盐氧化后在冰盐浴条件下与 2-萘酚反应, 合成苏丹红 1 号-3-丙酸(Sudan 1-C3); 对氨基苯丁酸在相同条件下与 2-萘酚反应, 合成苏丹红 1 号-4-丁酸 (Sudan 1-C4)。

(1) 苏丹红 1 号-3-丙酸(Sudan 1-C3)的制备

步骤 1: 将丙二酸 0.02~0.08 mol 溶于 20~80 mL 新蒸吡啶中, 加入对硝基肉桂酸 0.02~0.1 mol 及醋酸胺 0.001~0.004 mol, 此混合物在温度 100~150℃回流 1~7 小时, 冷却后, 将反应物用醋酸重结晶, 得到产物 4~10 g, 熔程: 275~280℃;

步骤 2: 将 0.15~0.65g 步骤 1 产物, 5~35 mg 钯碳, 2~15 mL 甲醇, 加入到反应釜中, 通入氢气, 于温度 100~120℃反应 1~5 小时, 过滤反应物, 收集滤液, 用旋转蒸发器旋干滤液, 用二氯甲烷:甲醇=5:1 的体积比过柱, 收集 TLC 板实验中 R_f 值为 0.3 的产物。旋干溶液, 得到乳白色固体。

步骤 3: 将 0.1 g 步骤 2 产物溶解在 1.5~2.5mL 的浓盐酸中, 在温度 5~10℃, 加入

含 0.01~0.06 g 亚硝酸钠的水溶液 0.5mL, 搅拌数分钟, 得到淡黄色重氮盐溶液, 将 0.04~0.12 g 2-萘酚溶解于 8~12%的氢氧化钠溶液 3~5mL 中, 冷却至 5℃, 再缓慢加入重氮盐溶液中, 得到约 0.12~0.30 g Sudan 1-C3。

(2) 苏丹红 1 号-4-丁酸(Sudan 1-C4)的制备

将 0.05~0.4 对氨基苯丁酸溶解在 1~4 mL 浓盐酸中, 在冰浴中条件下, 加入含 0.01~0.06 g 亚硝酸钠的水溶液 0.5mL, 搅拌数分钟, 得到重氮盐溶液; 将 0.03-0.11g 2-萘酚溶解于 8~12%的氢氧化钠溶液 3~5mL 中, 冷却至 5℃, 再缓慢加入重氮盐溶液中, 得到约 0.10~0.40 g 产品。

(3) Sudan 1-C3 和 Sudan 1-C4 的表征

$^1\text{H-NMR}$ 用 Bruker AMX-300 核磁共振仪测试 Sudan I-C3 和 Sudan I-C4 的核磁谱, 以氘代氯仿溶液为溶剂, 内标为 TMS。

Sudan 1-C3 $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): δ 14.30 (b, 1 H), 8.55 (d, $J = 4.2$ Hz, 1 H), 7.73-7.50 (m, 4 H), 7.41-7.14 (m, 4 H), 6.89 (d, $J = 3.96$, 1 H), 3.45 (b, 1 H), 3.05 (t, $J = 7.50$ Hz, 2 H), 2.76 (t, $J = 7.46$ Hz, 2 H)。6.8~8.0 之间的峰表明物质结构中有苯环和萘环; 3.0 以下的峰表示有脂肪族烷烃结构, 有两个峰, 表明有两种不同的氢, 谱图信息符合目标产物 Sudan 1-C3 结构;

Sudan 1-C4 $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3): 8.58 (d, $J = 8.57$ Hz, 1 H), 7.75-7.51 (m, 4 H), 7.41-7.09 (m, 4 H), 6.90 (d, $J = 6.89$, 1 H), 3.51 (b, 1 H), 2.76 (t, $J = 7.46$ Hz, 2 H), 2.44 (t, $J = 6.86$ Hz, 2 H), 2.07 (m, 2 H)。6.8~8.0 之间的峰表明物质结构中有苯环和萘环; 三个 3.0 以下的峰表示有脂肪族烷烃结构, 有三个峰, 表明有三种不同的氢。包括三种不同的氢谱图信息谱图符合目标产物 Sudan 1-C4 结构。

2. 免疫原和包被抗原的制备

带有活性基团的苏丹红 1 号修饰物与载体蛋白交联, 形成苏丹红 1 号-载体蛋白结合物, 用作免疫原和包被抗原: 分别称取 0.10~0.45 mmol 的 Sudan 1-C3 和 0.10~0.45 mmol Sudan 1-C4, 二环己基碳二亚胺 0.10~0.80 mmol, N-羟基琥珀酰亚胺 0.10~0.80 mmol, 溶解于 100~600 μL 的二甲基甲酰胺中, 室温下搅拌过夜, 将混合液离心 5~20 分钟, 取上层清液, 缓慢加入到 0.01~0.02% 的牛血清白蛋白(BSA)和 0.01~0.02%卵清白蛋白(OV), 搅拌 1~10 小时, 离心分离, 取上层清液, 透析数天, 溶液冷冻干燥, 置冰箱中存放, 其中, Sudan 1-C3-BSA 和 Sudan 1-C4-BSA 为免疫原; Sudan 1-C3-OV 和

Sudan 1-C4-OV 为包被抗原。

图 1 为免疫原 Sudan 1-C3-BSA 和 Sudan 1-C4-BSA 的紫外-可见光谱图。苏丹红 1 号与蛋白质的摩尔比分别为 17 和 37；包被抗原(Sudan 1-C3-OV 和 Sudan 1-C4-OV)的紫外-可见光谱图与图 1 相似，两种包被抗原中苏丹红 1 与蛋白质的摩尔比均约为 20。

3. 苏丹红 1 号抗体的制备

两种免疫原分别免疫两只兔子：将 1~4 mg 免疫原溶解于 0.5~4mL 的生理盐水中，加入 0.5~3mL 完全福氏佐剂，混合成油包水的乳浊液，每只兔子每次吸取 0.5~2.0mL 乳浊液，多次皮下注射入兔子背部，1~5 周后，对兔进行加强免疫，使用不完全福氏佐剂，其余与第一次免疫相同，第二次免疫后，2~5 周进行下一次免疫，并且第三次、第四次免疫后，5~7 天抽取 0.1~0.5mL 耳血，检测抗体产生的情况，第五次免疫后，5~15 天处死兔子，取全血，将血液在冰箱中放置过夜，吸取上层清液，分装，于低温冰箱中储存，本发明共制得四种抗体 C₃-I, C₃-II, C₄-I 和 C₄-II；

4. 优化实验条件，建立测定苏丹红 1 号的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)

对所制得的抗体进行性能表征，在实验条件优化的基础上，建立测定苏丹红 1 号含量的酶联免疫吸附分析方法。

(1) 溶液配制

(a). 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液

称取 2.606g Na₂CO₃·10H₂O, 3.434g NaHCO₃, 用 800mL 超纯水混匀溶解后，调节 pH 值，加水至 1L，配成 0.05 mol/L, pH=9.6 的碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液；

(b). 磷酸缓冲液(储备液, PBSx10)

称取 21.961g Na₂HPO₄·12H₂O, 6.031g NaH₂PO₄·2H₂O, 87.666g NaCl, 加 800mL 超纯水混合，加热溶解；用 1 mol/L 的 NaOH 调节 pH=7.4；加超纯水至 1L，配成含 0.15 mol/L NaCl, pH=7.4 的 0.1mol/L 磷酸缓冲液(储备液)；

(c). 酪蛋白溶液

称取酪蛋白加热溶解于 0.01 mol/L 的 PBS 中，配成 0.5-2%酪蛋白溶液；

(d). 磷酸缓冲液-吐温储备液 (含 1%Tween20 的 0.1 mol/L 磷酸缓冲储备液, PBSTx10, pH=7.4)。

(e). 甲醇溶液：

移取分析纯甲醇溶液 10mL 于 200mL 容量瓶中，加超纯水定容，配成 5%甲醇溶

液;

(f). 苏丹红 1 号储备液

称取 0.380g 苏丹红 1 号标准品(sigma), 溶于 3.80mL 的二甲基甲酰胺中, 配成 0.1mg/mL 苏丹红 1 号储备液;

(g) 底物溶液 (20mL 纯水; 1mL 醋酸钠缓冲液; 200 μ l 四甲基联苯胺 (TMB) (1%); 20 μ l 过氧化氢 (5%))

①. 醋酸钠缓冲液

称取 3.450g $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 用 100mL 超纯水溶解, 再用 1 mol/L 柠檬酸 (称取 21.031g $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\cdot \text{H}_2\text{O}$ 溶解于 100mL 水中) 调节 pH= 5.8 后, 再加水到 250mL 容量瓶中, 配成 0.1 mol/L 醋酸钠缓冲液;

②. TMB: 称取 0.0717g TMB, 用 7.17mL 二甲基亚砷溶解, 混匀, 配成 1%, w/v;

③. 过氧化氢: 取 20 μ l 30%的过氧化氢加入 100 μ l 超纯水中, 混匀, 配成 5%;

(h). H_2SO_4 溶液: 移取 25mL 浓 H_2SO_4 , 溶解于 475mL 的超纯水中, 配成 5% H_2SO_4 溶液;

(2) 主要仪器

洗板机: A5082, Tecan, Austria; 酶标仪: A2082, Tecan, Austria; 高效液相色谱仪: Alltech-1001

(3) 间接竞争 ELISA 步骤

(a) 加入一定浓度的包被抗原于酶标板中, 每孔 200 μ L, 冰箱 4 $^\circ\text{C}$ 过夜;

(b) 用 PBST 缓冲液 (PBST 储备液, 1:10 稀释, 350 μ l/孔) 洗板三次;

(c) 加入酪蛋白进行封阻, 每孔 300 μ L, 室温保温保湿放置 1 小时;

(d) 用 PBST 缓冲液洗板三次;

(e) 在酶标板的每孔中依次分别加入 100 μ L 标准溶液和 100 μ L 一定稀释度的抗体, 室温保温保湿放置 1 小时;

(f) 用 PBST 缓冲液洗板三次;

(g) 加入酶标二抗 (羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶, GaRIgG-HRP), 每孔 200 μ L, 室温保温保湿放置 1 小时;

(h) 用 PBST 缓冲液洗板三次;

(i) 加入底物溶液 (临用新配), 每孔 200 μ L, 室温保温保湿避光反应, 在微量振荡器

上振荡约 15~25 分钟;

(j) 加入 5% H₂SO₄ 溶液, 每孔 50~100 μL, 终止酶反应;

(k) 用酶标仪测定吸光度, 作出标准曲线, 进行结果分析与讨论。

(4) ELISA 的优化条件和灵敏度

本发明中有两种包被抗原 Sudan 1-C3-OV, Sudan 1-C4-OV, 四种抗体 C₃-I, C₃-II, C₄-I 和 C₄-II, 共有八种组合, 分为同类组合(即包被抗原为 Sudan 1-C₃-OV; 抗体为 C₃-I 或 C₃-II; 包被抗原为 Sudan 1-C₄-OV, 抗体为: C₄-I 或 C₄-II) 和异类组合(即包被抗原为 Sudan 1-C₄-OV; 抗体为 C₃-I 或 C₃-II; 包被抗原为 Sudan 1-C₃-OV, 抗体为: C₄-I 或 C₄-II)。八个组合的 ELISA 优化测定条件以及 IC₅₀ 如表 1 所示。除了包被抗原为 Sudan 1-C₃-OV, 抗体 C₄-I 的组合外, 其他 7 个组合七个组合的 IC₅₀ 都不高于 2 ng/mL, 包被抗原稀释范围为: 1: 10,000~1: 30,000; 抗体的稀释范围为: 1: 25,000~1: 150,000; 酶标二抗稀释范围为: 1: 15,000~1:20,000。最佳组合为: 包被抗原 Sudan I-C₃-OV 1: 30,000, 抗体 C₃-II 1:150,000, 酶标二抗 1: 20,000, IC₅₀ 为 0.3~1.5 ng/mL, 该组合被用于阳性样品的检测及加标实验。

(5) ELISA 的标准曲线

苏丹红 1 号标准液的浓度为: 0, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 10, 30, 100ng/mL, 由苏丹红 1 号储备液(0.1mg/mL) 经 5% 甲醇溶液稀释而得。以苏丹红 1 号浓度的对数为横坐标, 以相对信号 B/B₀×100% 为纵坐标作出标准曲线(B₀: 标准浓度为 0 ng/mL 所对应的吸光度; B: 其它标准浓度所对应的吸光度)。图 2 为同类组合的标准曲线, 图 3 是异类组合的标准曲线。从图上可见, 两种组合在灵敏度上没有太大的差别, IC₅₀ 值都在 0.35~1.0 ng/mL 之间。

(6) ELISA 的特异性

ELISA 特异性可用交叉反应率的大小来表示。交叉反应率(CR%) = 苏丹红 1 号的 IC₅₀ / 测试物质的 IC₅₀ × 100%。交叉反应率越小, ELISA 的特异性越高。

在本发明选择苏丹红 2-4 号和其它 6 种食品常用色素(柠檬黄, 日落黄, 靛蓝, 亮兰, 苋菜红, 胭脂红)进行交叉反应实验, 结果如表 2 所示。四个抗体与苏丹红 2-4 号的交叉反应率在 0.1%~14.3% 之间, 与其它 6 种食品色素的交叉反应率均小于 0.01%, 说明所制得的四种抗体对苏丹红 1 号的特异性都较高。

5. ELISA 的对加标样品中苏丹红 1 号含量的测定

选择了六种食品：新鲜番茄、番茄汁、番茄酱、豆瓣酱 A，豆瓣酱 B，辣椒面为加标样品。同一样品取两份平行进行，一份加入适量的苏丹红 1 号甲醇溶液，另一份加入与第一份相同体积的甲醇，静置过夜，超声震荡 5~30 分钟，涡旋混合半分钟，静置 10~30 分钟，取上清液，离心分离 5~20 分钟，离心液用 5%甲醇稀释，ELISA 直接测定。样品的测定条件以及结果如表 3 所示。从表中可见，回收率在 92.4~114.0%之间，相对标准偏差(RSD)在 5.9~24.8%之间，说明方法准确性和精密度都比较好。

6. ELISA 与 HPLC 的比较

苏丹红 1 号的 HPLC 测定条件为：色谱条件: Hypersil Gold 柱(250 ×2.1 mm, 5 μ m)，柱温为室温，流动相为含 0.1%甲酸的甲醇:含 0.1%甲酸的水=85:15，流量 1mL/ min，进样 20 μ L，紫外检测波长：480 nm。标准溶液浓度为：0.2、0.5、1.0、2.0、5.0 和 10 μ g/mL，样品萃取液用 0.25 μ m 的滤膜过滤后直接测定。

对加标样品及辣椒酱 B 未加标阳性样品，以 HPLC 的测定结果为横坐标，ELISA 的测定结果为纵坐标作图得两者的相关曲线，详见图 4 所示，回归曲线为 $y=0.9068x+0.0.5322$ ，相关系数 $R=0.9851$ ($n=7$)，表明 ELISA 与 HPLC 有很好的相关性。

表1 八种组合的 ELISA 优化实验条件和 IC₅₀ 值

名称	包被抗原		抗体		酶标二抗	IC ₅₀ *
	稀释度	ng/孔	名称	稀释度	稀释度	(ng/mL)
Sudan1-C3-OV	1:10,000	20	C3-I	1:100,000	1:15,000	0.45~1.7
	1:30,000	6.7	C3-II	1:150,000	1:20,000	0.3~1.5
	1:50,000	4	C4-I	1:1,000,000	1:30,000	>100
	1:30,000	6.7	C4-II	1:70,000	1:20,000	0.7~2.0
Sudan1-C4-OV	1:5000	40	C3-I	1:25,000	1:20,000	0.7~2.0
	1:10,000	20	C3-II	1:50,000	1:20,000	1.0~1.5
	1:10,000	20	C4-I	1:100,000	1:15,000	0.7~1.5
	1:30,000	6.7	C4-II	1:50,000	1:20,000	0.7~1.5

* IC₅₀ 为标准曲线中最大信号值降低 50% 所对应的待测物浓度。IC₅₀ 用来表示 ELISA 的灵敏度，其值越小，灵敏度越高。本表中 IC₅₀ 是从 6 条标准曲线中得到。

表2 抗体 C₃-I, C₃-II, C₄-I, and C₄-II 与苏丹红 1-4 号及其它 6 种食品常用色素的交叉反应率

	C ₃ -I		C ₃ -II		C ₄ -I		C ₄ -II	
	IC ₅₀	CR %	IC ₅₀	CR %	IC ₅₀	CR %	IC ₅₀	CR %
苏丹红 1 号	1.52	100	0.84	100	0.85	100	2.55	100
苏丹红 2 号	28.61	5.3	169.82	0.49	59.81	1.4	74.24	3.4
苏丹红 3 号	26.29	5.8	14.30	5.8	17.20	4.9	26.84	9.5
苏丹红 4 号	62.14	2.4	176.51	0.47	154.62	0.56	135.94	1.9
日落黄	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1
柠檬黄	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1
苋菜红	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1
胭脂红	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1
靛蓝	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1
亮蓝	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1	>1000	<0.1

表3 加标实验的条件和结果

名称	样品重量 (g)	加入质量 (μg)	加标浓度 ($\mu\text{g/g}$)	加入甲醇体积 (mL)	稀释度	测定浓度 ($\mu\text{g/g}$) $\pm\text{SD}$	批间 RSD(%)	回收率 (%)
新鲜番茄	1	1	1	5	1:100	1.14 \pm 0.09	7.6	114.0
番茄酱	1	2	2	5	1:200	2.07 \pm 0.22	10.6	103.5
番茄汁	1	2	2	5	1:100	2.06 \pm 0.51	24.8	103.2
辣椒酱 A	5	10	2	50	1:100	2.08 \pm 0.39	18.8	104.1
辣椒酱 B	5	10	2	50	1:400	3.27 \pm 0.76	23.2	103.0*
辣椒面	1	10	10	10	1:1000	9.25 \pm 0.55	5.9	92.4

*未加标的辣椒酱 B 的测定值为 1.21 $\mu\text{g/g}$ ，为阳性样品；加标的辣椒酱 B 的测定值为 3.27 $\mu\text{g/g}$ ，故回收率为： $(3.27-1.21)/2 \times 100\%=103.0\%$ 。

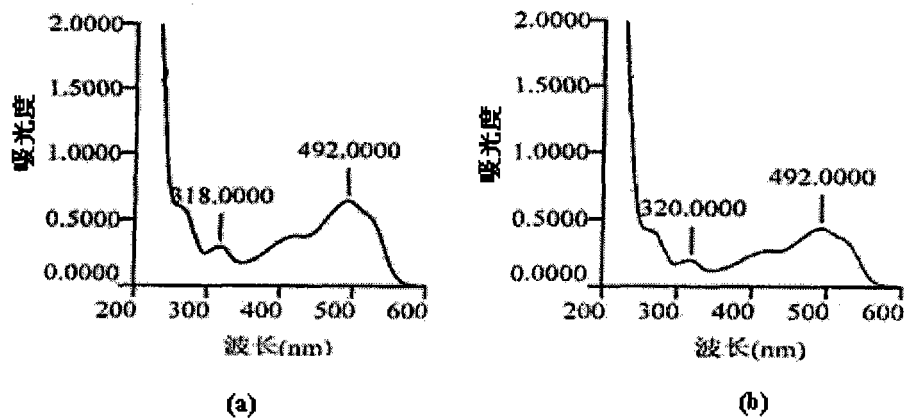


图 1

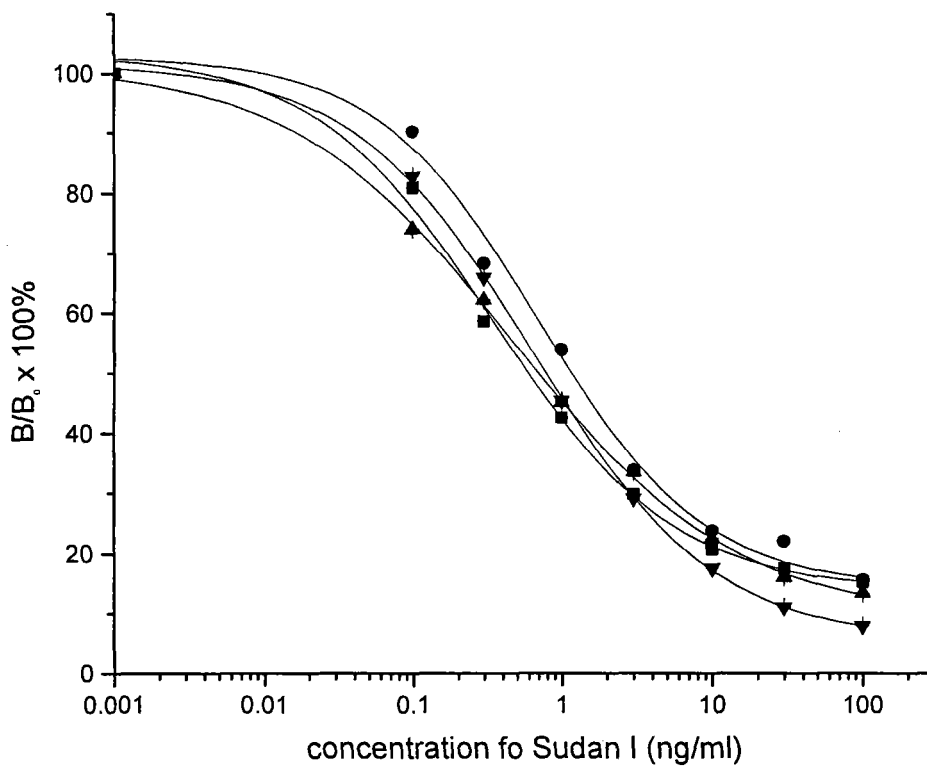


图 2

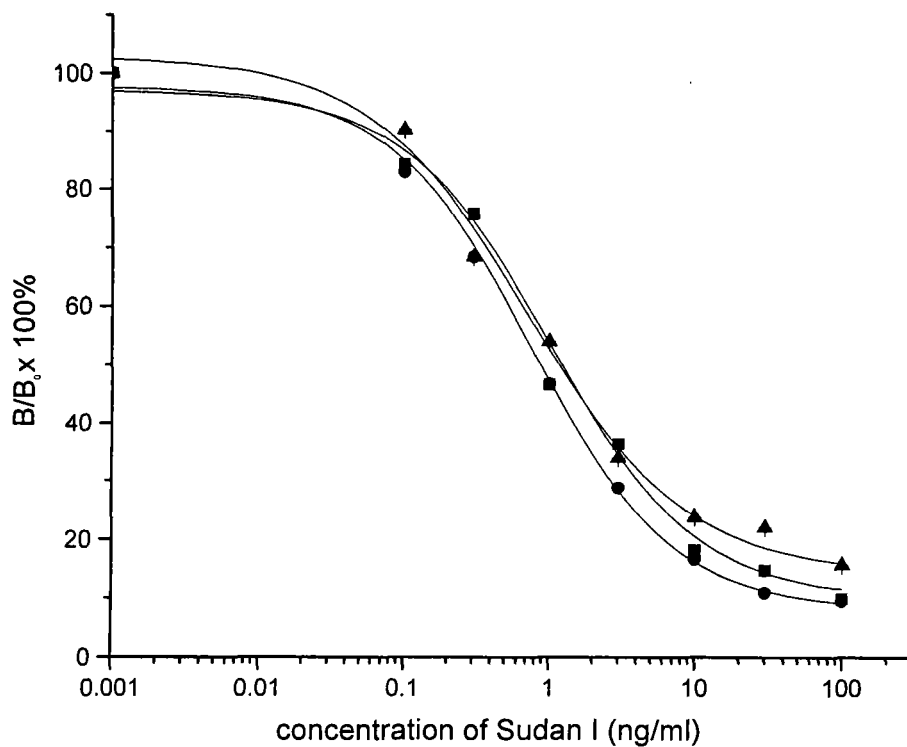


图 3

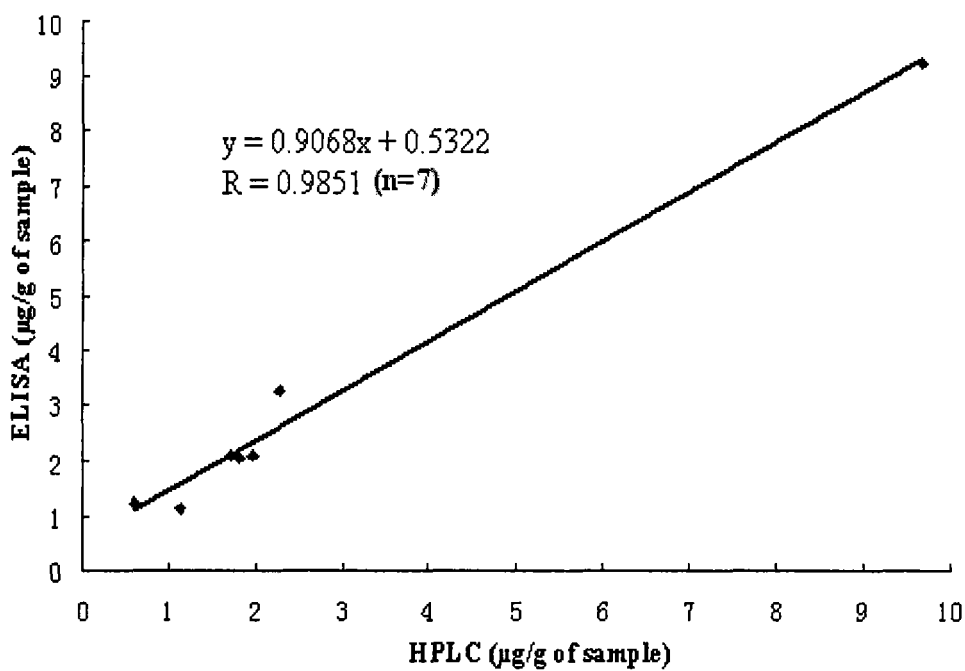


图 4

专利名称(译)	测定食品中苏丹红1号含量的酶联免疫吸附分析方法		
公开(公告)号	CN101078723A	公开(公告)日	2007-11-28
申请号	CN200710049361.5	申请日	2007-06-25
[标]申请(专利权)人(译)	四川大学		
申请(专利权)人(译)	四川大学		
当前申请(专利权)人(译)	四川大学		
[标]发明人	邓安平 韩丹		
发明人	邓安平 韩丹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/535		
其他公开文献	CN101078723B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了测定食品中苏丹红1号含量的酶联免疫吸附分析方法(ELISA)，其特点是合成了两种不同碳桥长度的苏丹红衍生物，并将衍生物与载体蛋白质交联，获得四种多克隆抗体。有8种测试组合，7种组合可用于对苏丹红1号的免疫分析，标准曲线的浓度范围为0.1~100ng/mL，IC50为0.3~2.0ng/mL。四种抗体与苏丹红2-4号的交叉反应率为0.1~14.3%，与6种食品可添加色素几乎没有交叉反应，说明抗体对苏丹红1号有很高的特异性。6种市售食品用作加标样品。经简单的样品处理后，萃取液直接稀释，用于ELISA测定。苏丹红1号的加标回收率92.4~114%，相对标准偏差为5.9~24.8%。用HPLC对加标样品进行分析，并与ELISA结果对比。两种方法有较高的相关性(R=0.9851；n=7)。

