



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102115451 A

(43) 申请公布日 2011. 07. 06

(21) 申请号 201010599388. 3

(22) 申请日 2010. 12. 22

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路
22 号

(72) 发明人 沈萍萍 徐加发 范祚舟

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 胡锡瑜

(51) Int. Cl.

C07C 245/10 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

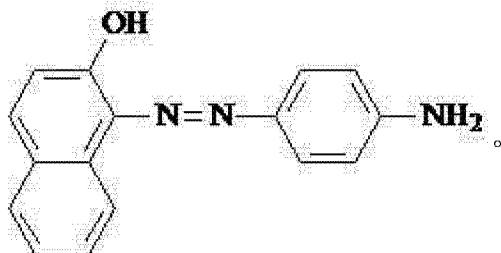
(54) 发明名称

一种可直接标记的苏丹红 I 号及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明属于免疫学检测技术领域,具体涉及一种可直接标记的苏丹红 I 号的制备方法及其应用。该方法主要利用从头合成的技术路线,在不改变苏丹红 I 号主体分子结构中抗原决定簇的前提下,成功引入了活性基团氨基,为苏丹红 I 号提供了一种可以直接与荧光物质和酶连接的修饰物的制备方法,为建立苏丹红 I 号竞争性一步法 ELISA 检测体系解决了竞争性抗原制备这一重要问题。整个方法简单易行,操作简便,与荧光物质和酶连接的效率高。

1. 一种可直接标记的苏丹红 I 号,其结构为:



2. 根据权利要求 1 所述可直接标记的苏丹红 I 号的制备方法,其特征在于合成步骤为:

(1)、将 18.5mmol 对苯二胺溶解于无水四氢呋喃中,在搅拌的条件下,将溶解于无水四氢呋喃中的 18.5mmol 乙酸酐逐滴加入到对苯二胺溶液中,TLC 监测反应是否完全;

(2)、将反应液过滤,留沉淀,沉淀用甲醇重结晶,得单氨基保护产物;

(3)、将 3.3mmol 单氨基保护的样品搅拌溶解于 50ml 含有 2.5ml 浓盐酸的冰水中;将 3.3mmol 亚硝酸钠溶液缓慢滴加到上述溶液中,持续搅拌反应,得重氮盐溶液;

(4)、将溶解于 10% NaOH 溶液中的 3.3mmol β -萘酚逐滴加入到上述重氮盐溶液中,滴加完毕后,继续搅拌反应 4 小时可见红色沉淀生成;

(5)、过滤,留沉淀,沉淀用甲醇溶解,按摩尔比 1:10 加入相应量的 1M 盐酸,加热回流反应 3-6 小时,过柱即得产物。

3. 根据权利要求 1 所述可直接标记的苏丹红 I 号,其特征在于与其偶联的分子可以为带羧基的荧光分子物质或 ELISA 检测中的辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

4. 根据权利要求 1 所述一种可直接标记的苏丹红 I 号在竞争性一步法 ELISA 检测体系中的应用。

一种可直接标记的苏丹红 I 号及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学检测技术领域,具体涉及一种可直接标记的苏丹红 I 号的制备方法及其应用。

背景技术

[0002] 苏丹红 I 号是一种人工合成的偶氮类染料,不溶于水,具有很好的亲脂性。作为一种常用的工业染料,它被广泛用于溶剂的增色以及纺织品的增光等方面。

[0003] 自 21 世纪初有关苏丹红 I 号污染食品的相关事件被曝光以来,人们越来越关注苏丹红 I 号所引起的危害。研究表明:苏丹红 I 号的致毒性与其代谢所生成的胺类及萘酚类物质密切相关。当人食用或接触含有苏丹红 I 号的食品后,它可以通过人体皮肤或消化系统进入体内。肝脏作为苏丹红 I 号产生致癌性的主要靶器官,一方面,其代谢产物苯胺可直接作用于肝细胞,引起肝脏疾病,并且有可能诱发基因突变,增加癌变的几率;另一方面,苯胺进入人体后的代谢产物可以将 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,使得血红蛋白无法结合氧从而导致患上高铁血红蛋白症。苏丹红 I 号的另一种代谢产物 1-氨基-2-萘酚具有致癌、致畸、致敏、致突变的潜在毒性。

[0004] 国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将苏丹红 I 号归为三类致癌物,即动物致癌物。1995 年欧盟等国家禁止苏丹红作为食品添加剂,中国也在 1996 年的《食品添加剂卫生标准》中明令禁止使用苏丹红。但是由于其价廉易得、色泽鲜亮持久等特点,仍然有一些不法食品生产商违规加工、违法使用苏丹红染料。这不但给国家的食品安全带来了很大的隐患,而且也给消费者的身心健康带来严重威胁。

[0005] 目前,国内外对食品中苏丹红 I 号的常用检测方法是高效液相色谱法(HPLC)、高效液相-质谱联用法(HPLC-MS)、气相色谱-质谱联用法(GC-MS)、化学发光法等。这些方法的样品前处理比较复杂繁琐,需要精密昂贵的仪器设备,同时还要有专门的仪器操作人员等,很难达到快速、简便的现场检测要求,因此限制了其在基层检测部门的大规模推广使用。

[0006] 酶联免疫检测分析(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)由于具有特异性强、灵敏度高、简便、快速等优点,近年来备受人们的关注。苏丹红 I 号作为小分子物质,对于它的检测,传统的 ELISA 分析方法主要采用非竞争性间接 ELISA,其操作步骤相对较多,引入人为误差的几率较大。目前,国际上著名的检测公司如拜耳等商业化的检测小分子物质试剂盒很多均采用竞争性一步法 ELISA,其工作原理是:将小分子物质直接标记上酶或者其他的一些直接可以检测的荧光基团,与待测样品同时加入到检测体系中,两者与酶标板上的抗体竞争性结合,待测物的含量与输出信号呈负相关。这种方法大大缩短了检测步骤,从而达到快速、简捷、减少人为误差的目的。但是,苏丹红 I 号本身没有可以直接和载体蛋白偶联的氨基或羧基,因此需要引入。

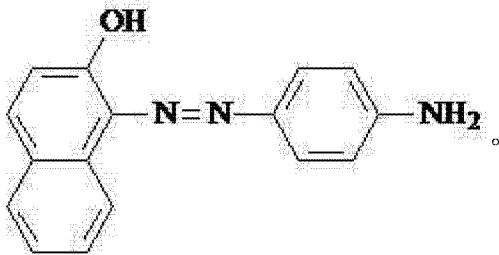
发明内容

[0007] 本发明要解决的技术问题是：

苏丹红 I 号自身没有可以直接和载体蛋白偶联的氨基或羧基，因此需要引入。本发明利用从头合成的方法在不改变苏丹红 I 号主体分子结构中抗原决定簇的前提下，引入了活性基团氨基，然后直接与荧光物质和酶连接，为建立苏丹红 I 号竞争性一步法 ELISA 检测体系解决竞争性抗原制备这一重要问题。

[0008] 本发明的技术方案是：

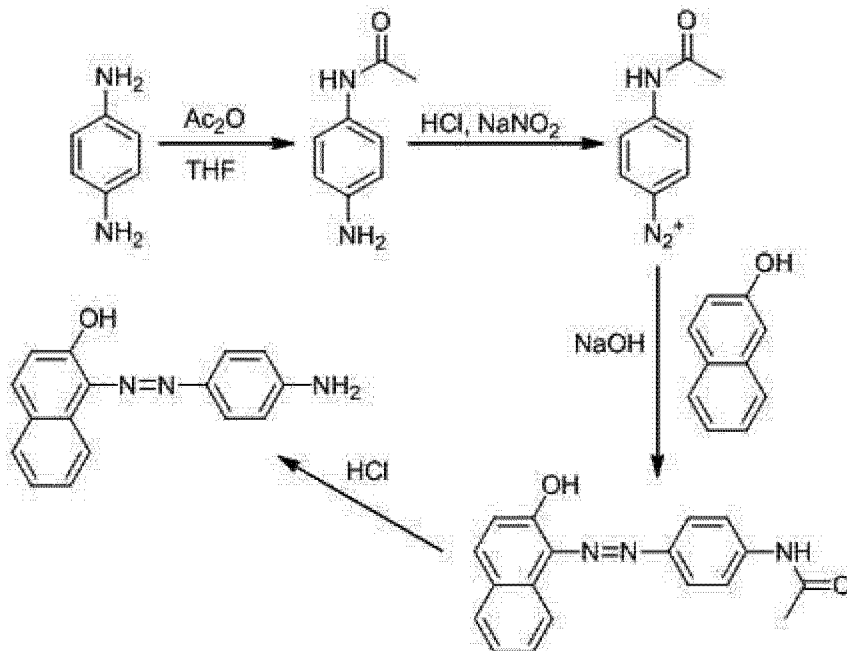
本发明所述的一种可直接标记的苏丹红 I 号的结构为：



[0009] 一种可直接标记的苏丹红 I 号的合成方法为：

- 1、将对苯二胺用乙酸酐进行单氨基保护；
- 2、将单氨基保护的样品在浓盐酸、亚硝酸钠的作用下进行重氮化反应；
- 3、将反应得到的重氮盐与 β -萘酚反应得到氨基保护的苏丹红 I 号的衍生物；
- 4、将氨基保护的苏丹红 I 号的衍生物进行酸水解最终得到可直接标记的苏丹红 I 号产物。

[0010] 一种可直接标记的苏丹红 I 号的合成路线为：



[0011] 本发明其有益效果是：

目前所报道的可直接标记的苏丹红 I 号的修饰物中主要是在其结构上引入羧基以用于制备苏丹红 I 号的人工抗原和包被原。由于很多的荧光物质只具有羧基，因此绝大多数的小分子物质是很难通过引入羧基的方法而用于直接标记上荧光基团的。所以，对于大多

数小分子而言,怎样在合适的位点引入氨基便成为建立其竞争性一步法 ELISA 检测体系的难点。在本发明中,我们在已有的工作基础上,分析了苏丹红 I 号的抗原决定簇的位置以及对免疫分析的影响后,通过采用从头合成的方法,在不改变苏丹红 I 号抗原决定簇的前提下,成功地引入了活性基团氨基,然后直接与荧光物质和酶连接,这为建立苏丹红 I 号竞争性一步法 ELISA 检测体系解决了一个关键性问题。整个方法简单易行,操作简洁,与荧光物质和酶连接的效率高。

附图说明

[0012] 图 1 可直接标记的苏丹红 I 号的核磁共振图。

具体实施方式

[0013] 通过以下实施例以进一步详细说明本发明,但是值得注意的是,本发明的范围不受此实施例的任何限制。

[0014] 实施例 1 可直接标记的苏丹红 I 号的合成

1、将对苯二胺(2.0g, 18.5mmol)溶解于 30ml 无水四氢呋喃中,在搅拌的条件下,将溶解于 4ml 无水四氢呋喃中的乙酸酐(1.7ml, 18.5mmol)在 1 小时内逐滴加入到对苯二胺溶液中, TLC 监测反应是否完全;

2、将反应液过滤,留沉淀,后用甲醇重结晶,得单氨基保护产物;

3、将单氨基保护的样品(0.5g, 3.3mmol)溶解于 50ml 含有 2.5ml 浓 HCl 的冰水中;将溶解于 1ml 冰水中的亚硝酸钠(0.228g, 3.3mmol)缓慢滴加到上述溶液中,滴加完毕后,继续搅拌反应 15 分钟,得重氮盐溶液;

4、将溶解于 2ml 10% NaOH 溶液中的 β -萘酚(0.488g, 3.3mmol)逐滴加入到上述重氮盐溶液中,滴加完毕后,继续在 0-4°C 条件下搅拌反应 4 小时此时可见红色沉淀生成;

5、过滤,留沉淀,将其溶解于甲醇,按摩尔比 1:10 加入相应量的 1M HCl,加热回流反应 3-6 小时,过柱即得产物。

[0015] 实施例 2 可直接标记的苏丹红 I 号的生物素标记

首先,将生物素用酰氯进行酰化,后将其加入到可直接修饰的苏丹红 I 号的无水四氢呋喃溶液中,并在此反应体系中加入少量吡啶以吸收反应释放的氯化氢。反应结束后过柱纯化得生物素标记的苏丹红 I 号偶联物,此偶联物一方面可以竞争性结合苏丹红 I 号单体;另一方面,由于 4 个生物素可以与一个链亲和素分子结合,因此运用于竞争性一步法检测体系中时可以提高检测的灵敏度。

[0016] 实施例 3 可直接标记的苏丹红 I 号的酶标记

目前,在小分子物质的免疫检测体系中所用的酶绝大多数为辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AP),在已有的许多竞争性一步法检测体系中,小分子和酶的偶联比例多为 1:1,原因在于这些小分子主要通过和酶分子上的氨基进行脱水形成酰胺,而对于酶来说,其结构中可用于偶联的氨基数量明显低于羧基数。据报道,对于辣根过氧化物酶而言,可用于偶联的氨基数只有一个。这样容易导致由于小分子物质本身太小和数量过少而被包裹在酶分子中,从而降低了检测的灵敏度。因此,我们利用经过氨基修饰的苏丹红 I 号通过与酶分子中的羧基结合可以在酶分子上引入多个小分子,以提高检测的敏感性。

[0017] 实施例 4 可直接标记的苏丹红 I 号的荧光物质标记

通过将带有羧基的荧光物质如香豆素、罗丹明 B 等进行酰化或直接将其与经过氨基修饰的苏丹红 I 号进行偶联,得到具有荧光的苏丹红 I 号的衍生物,将其运用到竞争性一步法 ELISA 检测中可以省略加酶标二抗以及后面的显色和终止反应等步骤,大大节约检测时间,提高检测效率。

[0018] 实施例 5 可直接标记的苏丹红 I 号在竞争性一步法 ELISA 检测中的应用

将标记了荧光物质或酶的苏丹红 I 号与苏丹红 I 号的标准品或待测样品按照一定的比例加入到包被有苏丹红 I 号抗体的微孔板中,标记荧光物质或酶的苏丹红 I 号与抗体结合的量与苏丹红 I 号标准品或待测样品中的苏丹红 I 号与抗体结合的量呈负相关,通过直接测定荧光或酶分子的显色反应即可以得出苏丹红 I 号的标准曲线或待测样品中的苏丹红 I 号含量。

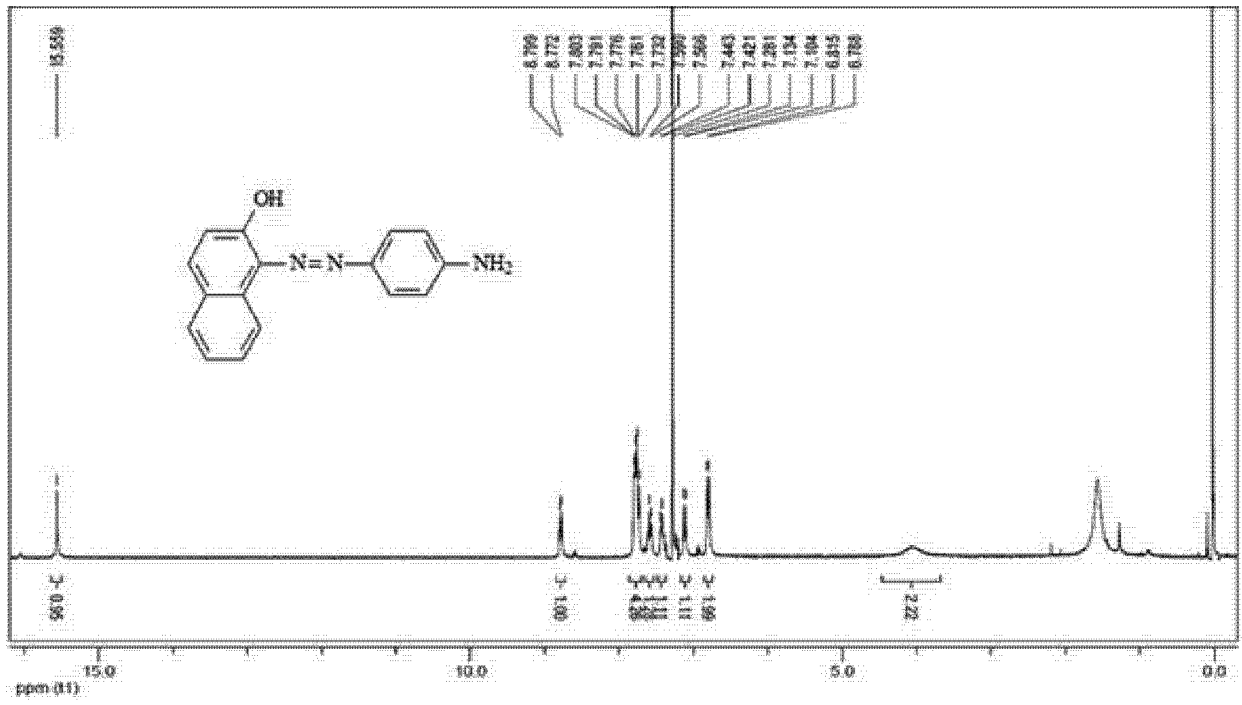


图 1

