

食品中苏丹红 I 酶联免疫检测方法的建立及酶学性质研究

匡 华, 勇倩倩, 刘丽强, 胡拥明, 宋珊珊, 胥传来

(江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 为了检测食品中非法添加物苏丹红, 采用重氮化法合成了 2 种苏丹红 I 的衍生物, 通过液相色谱-质谱(LC/MS)鉴定后, 分别将两种衍生物与载体蛋白牛血清白蛋白(BSA)以及卵清蛋白(OVA)偶联制备完全抗原。紫外光谱表征结果证明衍生成功。将制备的 BSA 络合物做为免疫原免疫兔子, 制备了多克隆抗体。采用方阵法确定了抗体和包被抗原的稀释比例。对影响酶免疫检测方法(ELISA)的因素包括包被液, 封闭液, 样品稀释液, 抗体稀释液, 反应时间等进行了优化。在最适反应条件下, 以苏丹红质量浓度为横坐标, 吸光度值为纵坐标建立了抑制曲线, 线性范围为 0.3~23.4 ng/mL, 苏丹红 I 的半数抑制率(IC_{50})为 3.0 ng/mL, 检测限(LOD)为 0.1 ng/mL。交叉反应测试表明, 与对位红交叉反应率为 140%; 与苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 G 的交叉反应率分别为 1.1%, 6.85%, 6.5%; 与苏丹红 IV 的交叉反应率<0.1%。以辣椒粉为样本, 在 5 ng/g 和 20 ng/g 添加水平下得到回收率分别为 90.4%和 96.0%, 变异系数分别为 1.8%和 4.9%。

关键词: 苏丹红; 酶免疫测定; 多克隆抗体; 辣椒粉

中图分类号: TS 207.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)10—1049—08

Establishment of ELISA for Sudan I Residues in Food

KUANG Hua, YONG Qian-qian, LIU Li-qiang, HU Yong-ming, SONG Shan-shan, XU Chuan-lai

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Two sudanI hapten derivatives were synthesized by diazotization and the resulting products were characterized by liquid chromatography-mass spectrum. The haptens were conjugated with bovine serum albumin (BSA) and ovalbumin (OVA) respectively. UV spectrum and electrophoresis confirmed the successful conjugation. The BSA conjugates were used to immunize New Zealand rabbits for preparation of antibody while OVA conjugates were used as coating antigen. Indirect competitive ELISA methods were developed. Various factors including coating buffer, blocking solution, sample solution, antibody solution, reaction time and so on were optimized. Under the optimum conditions, an inhibition curve was established with IC_{50} value of 3.0 ng/mL and linear range 0.3~23.4 ng/mL. The limit of detection (LOD) was calculated as 0.1 ng/mL. Cross-reaction tests showed that the antibody recognized para red well with cross-reactivity of 140% while

收稿日期: 2013-03-27

基金项目: 国家“十二五”科技支撑项目(2012BAK17B10; 2012BAK08B01)。

作者简介: 匡 华(1981—), 女, 河南长垣人, 工学博士, 副教授, 主要从事食品安全分析与检测研究。E-mail: kuangh@jiangnan.edu.cn

little recognition to sudan II (1.1%), sudan III (6.85%), sudan G (6.5%) and sudan IV (less than 0.1%). Fortified chili powder of two levels (5 ng/g and 10 ng/g) were tested using the developed immunoassay. The recoveries were 90.4% and 96.0% with coefficients of variation 1.8% and 4.9%.

Keywords: Sudan I, ELISA, polyclonal antibody, chili powder

苏丹红类染料已被国际癌症研究机构将归为三类致癌物,即动物致癌物。肝脏是苏丹红作用的主要靶器官,此外苏丹红类物质还可引发膀胱、脾脏等脏器的肿瘤,同时苏丹红还具有遗传毒性。1995年欧盟等国家禁止苏丹红作为食品添加剂^[1],频频发生的苏丹红事件,给食品安全敲响了警钟。我国也在1996年的《食品添加剂卫生标准》中明令禁止在食品工业中使用苏丹红^[2]。然而,但由于苏丹红染料价廉易得,色泽鲜亮持久等特点,印度等一些国家在加工辣椒粉的过程中还容许添加苏丹红I。我国2005年在对全国18个省、市、区可能含有苏丹红的食品展开专项检查后发现,在30多家生产企业的88种食品及食品添加剂含有违禁添加物苏丹红^[3-8]。关于苏丹红的检测方法,国内外常用的是高效液相色谱法,高效液相-质谱联用法、气相色谱-质谱联用法等^[9-16]。做为一种快速检测技术,酶免疫检测方法具有廉价、高通量、灵敏的优点。作者通过对苏丹红I的结构改造,制备了抗原和兔源多克隆抗体。在此基础上,建立了辣椒粉中苏丹红I的ELISA测定方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

苏丹红I,苏丹红II,苏丹红III,苏丹红IV,2-萘酚,对氨基苯丁酸,N,N-二环己基碳二亚胺(dicyclohexylcarbodiimide,DCC),福氏完全佐剂和不完全佐剂等均:购自Sigma公司;苏丹红G,对位红和聚乙烯醇(PVA):购自上海晶纯试剂有限公司;聚乙二醇(PEG):购自国药集团化学试剂有限公司;聚乙烯吡咯烷酮(PVP),酪蛋白:购自北京拜尔迪生物技术有限公司;牛血清蛋白(Bovine serum albumin,BSA),卵清白蛋白(Ovalbumine,OVA):购自上海伯奥生物科技有限公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG(HRP-IgG):购自康成生物工程公司;四甲基联苯胺(TMB):购自华美生物工程公司。

1.2 仪器与设备

石英自动双重纯水蒸馏器:金坛市荣华仪器制造有限公司产品;ZD-9556水平摇床:太仓科教器材厂产品;Costar96孔8×12可拆酶标板:购自上海吉泰生物科技有限公司;Multiska Mks酶标仪以及可调式移液器为:Thermo Labsystems公司产品;电子天平AB104-N:购自上海Mettler Toledo Group;U-3000紫外扫描仪:购自日本岛津公司;DHG-9070A型电热恒温鼓风干燥箱:购自上海精宏实验设备有限公司;RJ-LD-IIB低速离心机:购自无锡市瑞江分析仪器有限公司;液相色谱-质谱仪(WATERS MALDI SYNAPT Q-TOF MS):购自美国waters公司,采用电喷雾(ESI)离子源。

1.3 半抗原合成

取对氨基苯丁酸(PABA)179.2 mg,加入4 mL 1 mol/L的盐酸,再加入NaNO₂,至淀粉试纸变蓝,4℃反应30 min,得到A液。取2-萘酚144.2 mg,溶解在无水乙醇中,得到B液。把A液缓慢滴加入B液中,溶液立即变红色,用NaOH调pH 8~9左右,产生大量絮状沉淀,室温反应1 h,离心取沉淀,烘干,备用,即得苏丹红衍生物H-1,另外,用对氨基苯甲酸(PABA)代替对氨基苯丁酸,按照上述合成途径,制备苏丹红衍生物H-2。将产物进行液相色谱-质谱鉴定。

1.4 完全抗原合成

以BSA载体蛋白为例,首先活化载体蛋白。取无水乙二胺67 mL,加双蒸水,再加入6 mol/L HCL 50 mL,冰浴冷却至25℃,调pH至4.7,加入BSA 5 g,溶于25 mL纯水中,加入EDC 1.8 g,维持原温度和pH,搅拌反应2 h,加入4 mol/L醋酸缓冲液30 mL,终止反应,在4℃纯水中透析,冻干,保存备用。

称取半抗原34.2 mg,溶解在2 mL二甲基甲酰胺(DMF)中,调pH在8~9,加入DCC 25 mg,NHS 21 mg,室温反应12 h,离心取上清。将活化后的蛋白30 mg溶解在2 mL 0.05 mol/L的碳酸盐缓冲液^[16]中。将半抗原溶液上清缓慢滴加到蛋白溶液中,缓

慢搅拌,过夜反应。然后,将反应液装入透析袋,4℃下用 0.01 mol/L 的 NaHCO_3 溶液中透析 3 d。透析后溶液经离心取上清液,分装后,在-20℃下保存。按照上述方法,制备 OVA 的络合物。

1.5 抗体制备和鉴定

将制备的完全抗原(BSA 偶联物)做为免疫原免疫新西兰大白兔,动物免疫的方法参考文献。在第 5 次免疫后 10 天,心脏采血,分离血清,用间接酶联免疫方法(ELISA)测试血清。将 OVA 偶联物做为包被抗原,用方阵法测定抗原抗体的最佳稀释比^[17]。采用以下的 ELISA 操作过程^[18]:

1.5.1 包被 将包被抗原用包被缓冲液(0.05 mol/L, pH 9.6 的碳酸盐缓冲液)作系列稀释后,按列包被 96 孔酶标板,100 μL /孔,于 4℃冰箱放置过夜。

1.5.2 封闭 取出过夜包被的酶标板回升至室温,每孔加入 200 μL PBST 洗涤液(含有 0.05% tween-20, 0.01 mol/L, pH 7.4 磷酸盐缓冲液),水平摇床上振荡 3 min,用力甩掉洗液并在吸水纸上拍干,继续洗涤 3 次。用封闭缓冲液(含有 0.5% BSA 的 PBST 溶液)封闭酶标板,200 μL /孔,于 37℃温育箱内温育 2 h 后取出酶标板,洗涤 4 次,37℃烘干待用。

1.5.3 ELISA 测定 取封闭好的酶标板,对照孔中添加测定液(含有体积分数 20% 甲醇的磷酸盐缓冲液)50 μL /孔,测试孔中添加用样本测定液系列稀释的苏丹红标准溶液(0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50 ng/mL),50 μL /孔;每个浓度设置 5 个重复。然后每孔添加抗体溶液,50 μL /孔,放置于 37℃ 30min 孵育。之后,弃去微孔板中的溶液,采取上述洗涤方法洗涤微孔板,拍干。加入酶标记抗体 HRP-IgG 溶液(1:3 000 稀释),100 μL /孔,37℃ 30min 孵育。反应结束后,弃去微孔中溶液,洗涤微孔板 4 次,拍干。加入底物液 100 μL /孔[60 mg TMB 溶于 100 mL 乙二醇;底物缓冲液(0.933 g 柠檬酸+3.68 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ +18 μL 体积分数 30% H_2O_2 ,用超纯水定容至 100 mL;将两种溶液在使用前按照 1:5 的体积比混匀)。将酶标板放置于暗处反应 15 min,之后,加终止液(2 mol/L 硫酸溶液),50 μL /孔。用酶标仪测定各个孔在 450 nm 波长下的吸光值 A_{450} ,求出各浓度的 B/B_0 值 [B 校正值为 A 实测值(均值)- A 空白值(均值); B_0 为标准溶液为 0 ng/mL 时,即阴性对照孔的校正值];建立以 B/B_0 为纵坐标,苏丹红质量浓度为横坐标的抑制曲线。半数抑制率 (IC_{50}) 为达到

50%最大吸光值($A_{\max}$)所需的苏丹红浓度。

1.6 ELISA 检测方法的优化 对包被液(分别用 pH 7.4 的 PBS 缓冲液、pH 8.0 的 Tris-HCL 缓冲液、pH 9.6 的 CBS 缓冲液)、封闭液(在 0.05 mol/L 的 CBS 溶液中分别加入质量分数 0.1%, 0.2%, 0.5% 的明胶、酪蛋白、聚乙烯吡咯烷酮 PVP、聚乙二醇 PEG 等)、抗体稀释液(在 PBST 溶液中加入质量分数 0.1%, 0.2%, 0.5% 的明胶、BSA)、样品稀释液(PBS、PBST、10% 甲醇 PBS、PBST+2% PVP、PBST+2% PEG、PBST+2% OVA)、反应时间(30 min、45 min、60 min)进行优化,选择 $A_{\max}$ 吸光值在 1.5~1.8 之间, IC_{50} 最低的条件作为最佳操作条件。

1.7 交叉反应测定

在最佳操作条件下,测定 ELISA 体系对苏丹红 I, 苏丹红 II, 苏丹红 III, 苏丹红 IV, 对位红等类似物的 IC_{50} 值,按照以下公式:交叉反应率($\text{CR}\%$)=苏丹红 I IC_{50} 值/类似物 IC_{50} 值 $\times 100\%$ 计算交叉反应率。

1.8 辣椒粉中苏丹红的 ELISA 测定

分别称取阴性辣椒粉 1 g,按照 5、20 ng/g 两个水平进行样本添加试验,同时设定空白对照。加入甲醇 5 mL 萃取,混匀,超声 10 min,离心去上清,收集清液。然后在剩余物中再加入 5 mL 甲醇重复提取一次,离心去上清,合并两次提取液,用氮气吹干,然后用 ELISA 样品稀释液溶解残渣,采用上述建立的 ELISA 方法进行检测,并计算回收率。

2 材料与方法

2.1 半抗原的鉴定

2.1.1 半抗原 H-1 的鉴定 图 1 是提纯后的 1-[(4-丁酸苯)偶氮]-2-萘酚(即 H-1, 相对分子质量为 324)的色谱-质谱表征图。在总离子图,即图 1(a)中能看到分别在 6.15 min 和 5.26 min 有 2 个吸收峰,苏丹红特征吸收 485 nm 下有特征紫外吸收。经过质谱图比较,5.26 min 处为苏丹红母体物质,6.15 min 处为目标物质(H-1)。如图 1(b)中所示,在正离子检测模式下,在 6.15 min 处,得到分子离子峰 m/z 325($M+1$)的碎片,分析分子碎片符合衍生物的结构特征,液相图、质谱图相互印证表明半抗原衍生化成功。

2.1.2 半抗原 H-2 的鉴定 图 2 是提纯后的 1-[(4-甲酸苯)偶氮]-2-萘酚(H-2, 相对分子质量

292)的质谱图,在总离子图,图2(a)中能看到分别在4.2 min和2.45 min有2个吸收峰,其中4.2 min处峰为目标物质H-2的色谱峰;2.45 min处的色谱峰为母体物质。在负离子检测模式下,如图2(b)所示,得到 m/z 291(M-1)的分子离子峰碎片,分析分子碎片符合衍生物的结构特征,液相图、质谱图相互印证表明半抗原衍生化成功。

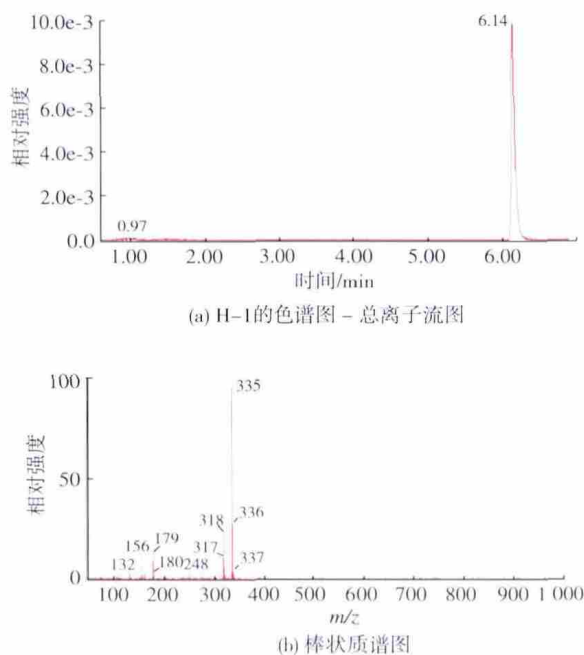


图1 半抗原H-1的质谱鉴定结果

Fig. 1 Identification of the H-1 by LC/MS

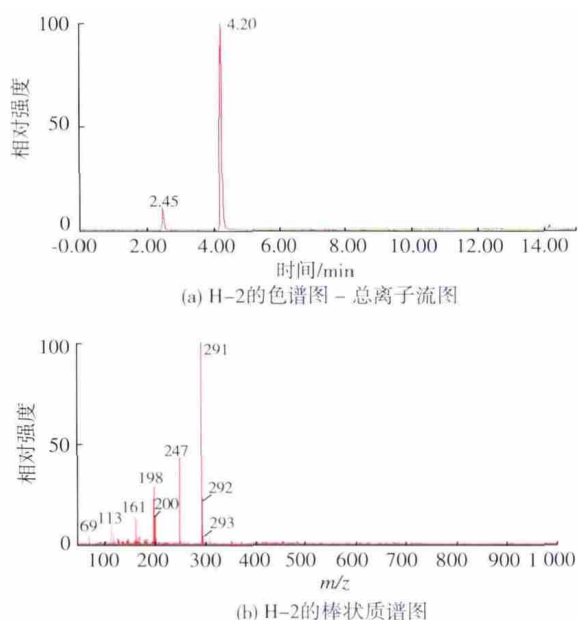


图2 半抗原H-2的色谱-质谱鉴定

Fig. 2 Identification of the hapten H-2 by LC/MS

2.2 完全抗原的合成和鉴定

2.2.1 紫外鉴定 以半抗原H-1 (SUDAN-PABA)的偶联物鉴定为例,从图3可见,苏丹红衍生物的特征吸收波长在485 nm,BSA活化物(CBSA)的特征吸收波长为278 nm,偶联产物SUDAN-PAPA-CBSA分别在278 nm和485 nm都有特征吸收峰,在紫外扫描图中表现出各自光谱迭加的性质,证明偶联结合实验的成功。计算得抗原溶液的蛋白浓度为6.05 mg/mL,根据苏丹红的特征吸收峰,计算出苏丹红半抗原的摩尔数量,因而得到偶联率15.6。同样地,从图4可见-OVA偶联产物分别在278 nm和485 nm都有特征吸收峰,证明偶联成功。计算偶联率为10.4。采用上述方法同样测定了H-2衍生物(H-2-BSA,H-2-OVA的偶联率分别为17.3和11.2)

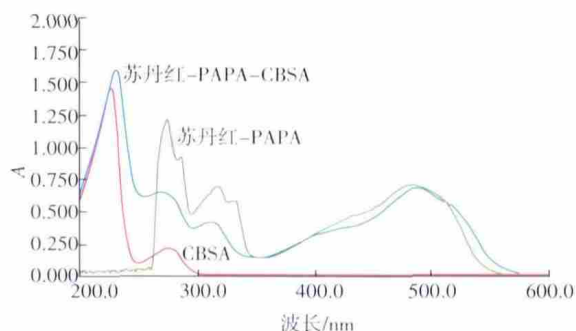


图3 完全抗原SUDAN-PAPA-CBSA的紫外扫描图谱

Fig. 3 Identification of the SUDAN-PAPA-CBSA by UV

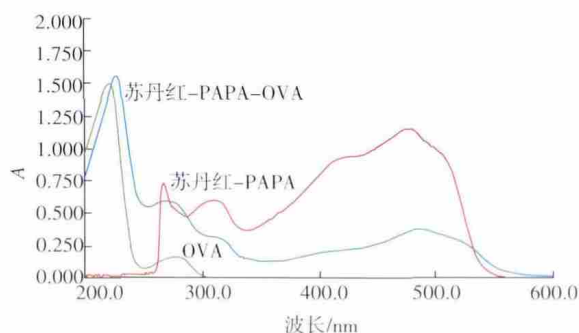


图4 完全抗原SUDAN-PAPA-OVA的紫外扫描图谱

Fig. 4 Identification of the SUDAN-PAPA-OVA by UV

2.2.2 电泳表征 以H-1 (SUDAN-PABA)的BSA偶联物鉴定为例,如图5所示,分别将BSA和偶联物进行SDS-PAGE电泳,电泳方向是由上至下。从图中可以看出免疫原的迁移速度相比CBSA的速度要慢,进一步证明偶联成功。



图 5 免疫原电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE of BSA conjugates

2.3 抗体的鉴定

以 OVA 偶联物做包被原,用包被缓冲液系列稀释成 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000,兔抗血清系列稀释成 1:1 000、1:2 000、1:4 000、1:8 000、1:16 000、1:32 000 和 1:64 000,进行方阵测试,以阳性血清的 $A_{450\text{ nm}} \geq$ 阴性血清的 2.1 倍作为抗血清的效价,测定结果可知 H-1-BSA 和 H-2-BSA 兔血清的效价为 64 000。

根据 ELISA 检测的要求,选择吸光值在 1.5~1.8,同时阳性血清的 $A_{450\text{ nm}} \geq$ 阴性对照孔的 2.1 倍做为最适工作浓度,则兔血清最佳稀释比例为 1:16 000;包被抗原稀释度为 1:4 000。

2.4 ELISA 参数的优化

2.4.1 包被液的选择 试验中比较了 3 种常用包被液:0.01 mol/L CBS、0.01 mol/L PBS 以及 0.01 mol/L Tris-HCl 对 ELISA 关键指标 IC_{50} 和最大吸光度值 (A_{max}) 的影响, A_{max}/IC_{50} 愈高愈佳。从表 1 可以看出,就 A_{max} 而言,碳酸盐缓冲液包被时最高,其次为 PBS 溶液和生理盐水。3 种包被液对 IC_{50} 的影响变化很大。采用 Tris-HCl 缓冲液时, A_{max}/IC_{50} 值远大于另外两者。因此,TRIS-HCl 缓冲液做为本试验后续用包被溶液。

表 1 包被溶液的优化

Table 1 Optimization of coating buffer

缓冲液类型	最大吸光度值 A_{max}	半数抑制率 $IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50} 比值
PBS 缓冲液	1.69	10.1	0.167
CBS 缓冲液	2.22	19.2	0.115
Tris-HCl 缓冲液	1.560	5.6	0.278

2.4.2 封闭液的选择 在 0.05 mol/L 的 CBS 溶液中分别加入质量分数 0.1%、0.2%、0.5% 的明胶、酪

蛋白、PVP、PEG。从表 2 看到,当使用质量分数 0.5% 明胶进行封闭时,所测定的 IC_{50} 最低,且 A_{max}/IC_{50} 最高,所以选择含有质量分数 0.5% 明胶的 CBS 溶液做为封闭液。

表 2 封闭液的优化

Table 2 Optimization of blocking solution

溶液类型 (质量分数)	最大吸光度值 A_{max}	半数抑制率 $IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50} 比值
明胶 0.5%	1.63	5.7	0.29
明胶 0.2%	0.95	6.9	0.14
明胶 0.1%	0.72	8.0	0.09
酪蛋白 0.5%	2.06	34.2	0.06
酪蛋白 0.2%	1.92	31.3	0.06
酪蛋白 0.1%	1.99	22.5	0.09
PVP0.5%	1.55	6.8	0.23
PVP0.2%	1.92	8.1	0.24
PVP0.1%	1.74	9.0	0.19
PEG0.5%	1.60	7.6	0.21
PEG0.2%	1.16	12.3	0.09
PEG0.1%	2.62	16.7	0.17

2.4.3 样品稀释液的选择 分别选择 PBS、PBST、质量分数 10% 甲醇 PBS、PBST+质量分数 2% PVP、PBST+质量分数 2% PEG、PBST+质量分数 2% PVA 做为样品稀释液,从表 3 看出,总体来讲采用 PBST 溶液体系的比 PBS 体系的效果好。当采用 PBST+质量分数 2% PVP 的做为样品稀释液时 IC_{50} 最低, A_{max}/IC_{50} 最高,所以选择 PBST+质量分数 2% PVP 的做为样品稀释液。

表 3 样品稀释液的优化

Table 3 Optimization of sample solution

溶液类型	最大吸光度值 A_{max}	半数抑制率 $IC_{50}(\text{ng/mL})$	A_{max}/IC_{50} 比值
PBS	1.718	68.9	0.025
质量分数10% 甲醇 PBS	1.962	55.5	0.035
PBST	1.558	34.2	0.045
PBST+质量分数 2%PVP	1.902	4.9	0.388
PBST+质量分数 2%PEG	1.269	10.2	0.124
PBST+质量分数 2%PVA	1.410	38.4	0.036

2.4.4 抗体稀释液的选择 在 PBST 溶液中加入质

量分数 0.1%, 0.2%, 0.5% 的明胶, BSA, 从表 4 可知, 抗体稀释液用 PBST+0.2%BSA 的条件下, IC_{50} 最低, A_{max}/IC_{50} 最高, 所以选择 PBST+质量分数 0.2%BSA 作为抗体稀释液。

表 4 抗体稀释液的优化

溶液类型	最大吸光度值 A_{max}	半数抑制率 IC_{50} (ng/mL)	A_{max}/IC_{50} 比值
PBST+质量分数 0.5%BSA	1.85	4	0.46
PBST+质量分数 0.2%BSA	1.78	3	0.59
PBST+质量分数 0.1%BSA	1.80	6	0.30
PBST+质量分数 0.5%明胶	0.90	3.8	0.24
PBST+质量分数 0.2%明胶	0.78	3.7	0.21
PBST+质量分数 0.1%明胶	0.97	3.6	0.27

2.4.5 反应时间优化 加入抗血清后, 设置在 37℃ 分别选择孵育时间 30, 45, 60 min, 结果表明, 随着时间的增加, 最大吸光度值 A_{max} 随之增加, 然而半数抑制率 IC_{50} (ng/mL) 并无改善。因此将 30 min 做为抗血清捕获抗原的最佳孵育时间。同样地, 加入酶标记抗体后, 优化孵育时间 (30, 45, 60 min), 结果表明, 无论是最大吸光度值 A_{max} 还是增半数抑制率 IC_{50} (ng/mL) 均无改善, 因此酶标记抗体识别抗血清的反应时间亦优化为 30 min。

2.5 标准抑制曲线

以 B/B_0 为纵坐标, 以苏丹红 I 标准溶液浓度的对数值为横坐标作图, 得到苏丹红 I 的标准抑制曲线, 如图 6 所示, IC_{50} 为 3.0 ng/mL, 线性范围为 0.3~32.4 ng/mL, 以产生 20% 的抑制时的苏丹红 I 质量浓度 x 为检测限, 计算为 0.1 ng/mL。

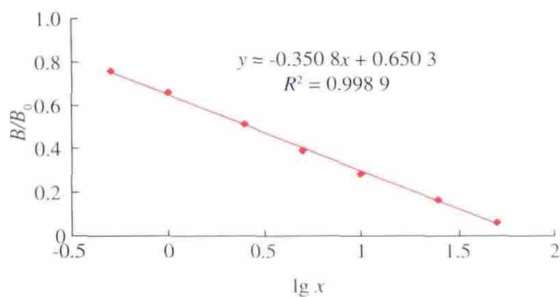


图 6 ELISA 标准曲线

Fig. 6 Standard curve of ELISA

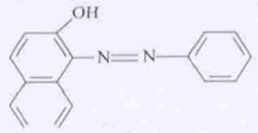
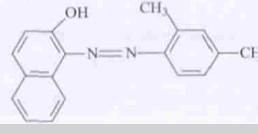
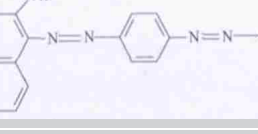
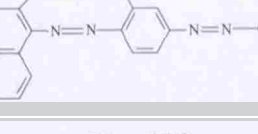
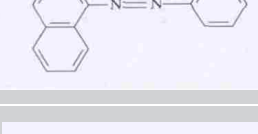
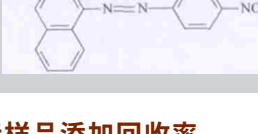
2.6 交叉反应

在最优化的条件下, 分别测定该方法对苏丹红 II、苏丹红 III、苏丹红 IV、苏丹红 G 和对位红 5 个物质的半数抑制率, 结果如表 5 所示。从表 5 可知, 该

抗体对苏丹红 I 的特异性较好, 对苏丹红 II、III、G 有一定的识别能力, 但交叉率均小于 10%。与苏丹红 IV 几乎没有交叉反应 (<0.1%), 可能的原因在于苏丹红 IV 在苯环对位还有一个苯环, 邻位还有甲基, 影响了与抗体的结合能力。由于对位红和苏丹红 I 有共同的苯环偶氮结构, 该抗体表现出对对位红较好的识别能力, 交叉反应率达到了 140%。

表 5 交叉反应率测定

Table 5 Determination of the cross-reactivity

药物	结构式	半数抑制率 IC_{50} /(ng/mL)	交叉反应率/%
苏丹红 I		3.0	100
苏丹红 II		27	1.10
苏丹红 III		43.78	6.85
苏丹红 IV		1 315.8	<0.1
苏丹红 G		45.8	6.5
对位红		2.1	140

2.7 实际样品添加回收率

由表 6 可见, 采用本方法, 辣椒粉中苏丹红 I 的回收率在 5 ng/g 的添加水平下为 90.4%, 变异系数为 1.80%。在 20 ng/g 的添加水平下为 96%, 变异系数为 4.9%; 回收率分别为和变异系数均满足残留检测要求。

表 6 辣椒粉样本添加回收率结果

Table 6 Recovery results of in chili powder samples

样品	添加质量 分数/(ng/g)	实测质量 分数/(ng/g)						回收率/%	变异系数/%
辣椒粉	5	4.4	4.5	4.5	4.6	4.6		90.40	1.80
	20	19.6	19.5	19.6	17.4	19.0		96.00	4.90

3 结 语

通过对苏丹红 I 结构进行改造,制备了两个苏丹红衍生物,将其做为半抗原,分别制备了免疫原和包被抗原。通过免疫大白兔获得了免源多克隆抗体,抗体的效价为 1:16 000。通过对影响 ELISA 测定的因素包括包被溶液、封闭溶液、样品稀释液以

及抗体稀释液等进行优化,建立了苏丹红的 ELISA 测定方法,线性范围为 0.3~23.4 ng/mL。交叉反应表明,作者所制备的抗体除了对苏丹红 I 和对位红染料具有较好的亲和性之外,对其他苏丹红染料的识别性较差,交叉反应率均在 10%以下。通过测试辣椒粉的添加样本,表明该方法适用于食品中苏丹红 I 的快速筛查。

参考文献:

- [1] Stiborovam, Martinek V, Rydlova H, et al. Sudan I is a potential carcinogen for humans; evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes[J]. **Cancer Research**, 2002, 62(20): 56, 78-84.
- [2] 王炫, 沈骏. 偶氮染料-苏丹红[J]. 化学教育, 2005, 5: 1-3.
WANG Xuan, SHEN Jin. Azo dyestuff: sudan red[J]. **Chinese Journal of Chemical Education**, 2005, 5: 1-3. (in Chinese)
- [3] 张颖, 毛华明. 食品安全我们共同的期待[J]. 中国动物检疫, 2005, 22(6): 20-21.
ZHANG Ying, MAO Hua-ming[J]. **Chinese Journal of Animal Quarantine**, 2005, 22(6): 20-21. (in Chinese)
- [4] 主桅. 国内外主要食品安全事件[J]. 中国动物保健, 2001, 11: 28-29.
ZHU Gui. **China Animal Health**, 2001, 11: 28-29. (in Chinese)
- [5] 肖秀英. 食用色素与食品安全[J]. 生活与健康, 2005, 9: 6-7.
XIAO Xiu-ying. Edible pigment and food safety[J]. **China Animal Health**, 2005, 9: 6-7. (in Chinese)
- [6] 陈兆波. 农产品质量安全分子生物检测的研究现状和发展趋势[J]. 食品生物技术学报, 2009, 28(4): 444-450.
CHEN Zhao-bo. Molecular detection of the quality and safety of agricultural produces; advances and trends[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(4): 444-450. (in Chinese)
- [7] ZHANG Yan-tu, ZHANG Zhu-jun. Development and optimization of an analytical method for the determination of Sudan dyes in hot chili pepper by high-performance liquid chromatography with on-line electro generated BrO-luminol chemiluminescence detection[J]. **Journal of chromatography A**, 2006, 1192(1): 34-40.
- [8] Calbiani F, Careri M, Elviri L, et al. Accurate mass measurements for the confirmation of Sudan azo-dyes in hot chili products by capillary liquid chromatography-electrospray tandem quadruple orthogonal-acceleration time of flight mass spectrometry [J]. **Journal of Chromatography A** (2004), 1058(1-2), 127-135.
- [9] 彭科怀, 向仕学, 汤晓勤, 等. 辣椒制品中苏丹红 I 的极谱法快速测定[J]. 预防医学情报杂志, 2005, 21(3): 286-288.
PENG Ke-luai, XIANG Shi-ming, TANG Xiao-qin, et al. Determination of Sudan I in chilli products by rapid polarographic Analysis[J]. **Journal of Preventive Medicine Information**, 2005, 21(3): 286-288. (in Chinese)
- [10] Johns S M, Jickells S M, Read W A, et al. Studies on functional barriers to migration. 3. Migration of benzophenone and model ink components from cartonboard to food during frozen storage and microwave heating[J]. **Packaging Technology and Science**, 2000, 13(3): 99-104.
- [11] Sagratini G, Caprioli G, Cristalli G, et al. Determination of ink photoinitiators in packaged beverages by gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. **Journal of Chromatography A**, 2008, 1194(2): 213-220.
- [12] Rhodes M C, Bucher J R, Peckham J C, et al. Carcinogenesis studies of benzophenone in rats and mice [J]. **Food and Chemical Toxicology**, 2007, 45(5): 843-851.
- [13] Cook N, Freeman S. Photosensitive dermatitis due to sunscreen allergy in a child [J]. **Australasian Journal of Dermatology**,

- 2002, 43(2):133-135.
- [14] Horton J K, Swinburne S, Sullivan M J. A novel rapid, single-step immunochromatographic procedure for the detection of mouse immunoglobulin[J]. **Journal of Immunological Methods**, 1991, 140:131-134.
- [15] McEwen S C, W D Black. Antibiotic residue prevention methods, farm management, and occurrence of antibiotic residues in milk [J]. **Journal of Dairy Science**, 1991, 74:2128-2137.
- [16] Abraham G E. Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 beta [J]. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 1969, 29:866-870.
- [17] 甘金华, 邓薇, 李进平, 等. 级强力霉素人工抗原的合成和抗体的制备[J]. **食品与生物技术学报**, 2011, 30(2):316-320.
GAN Jin-hual, DENG Weil, LI Jin-pin, et al. Artificial antigen synthesis and antibody preparation of doxycycline [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2011, 30(2):316-320. (in Chinese)
- [18] 孙海新, 凌红丽, 张玉兰, 等. 特布他林人工抗原的合成和抗体的制备[J]. **食品与生物技术学报**, 2009, 28(3):371-376.
SUN Hai-xin, LING Hong-li, ZHANG Yu-lan, et al. Synthesis of terbutalin artificial antigen and preparation of anti-terbutalin antibody[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2009, 28(3):371-376. (in Chinese)

会 议 信 息

会议名称(中文): 2013 中国生物制品年会暨第十三次全国生物制品学术研讨会

所属学科: 生物技术与生物工程, 生物医学工程学, 药学, 公共卫生与预防医学

开始日期: 2013-11-14

结束日期: 2013-11-15

所在城市: 上海市 黄浦区

主办单位: 中华预防医学会生物制品分会 中国药学会生物药品与质量研究专业委员会

承办单位: 《中国新药杂志》国药中生上海生物制品研究所

联系人: 赵然

联系电话: 010-52245049 13810965728

E-MAIL: swzpfh@163.com

会议网站: <http://www.cbpac.org/2013/cn/index.asp?hid=>

会议背景介绍: 当前医药生物技术已成为世界关注的热点, 为促进中国生物制品事业的发展, 搭建专业研究人员在产学研方面的交流与合作平台, 更及时地交流生物制品领域的研究成果、产业转化以及面临的机遇和挑战, 2013 中国生物制品年会暨第十三次全国生物制品学术研讨会定于 2013 年 11 月在上海召开。本次大会由中华预防医学会生物制品分会和中国药学会生物药品与质量研究专业委员会共同主办, 《中国新药杂志》和国药中生上海生物制品研究所有限责任公司联合承办。

会议名称(中文): 第五届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会

所属学科: 动植物微生物学, 生物物理学、生物化学及分子生物学, 细胞生物学, 遗传与发育生物学, 生物技术与生物工程, 生物信息学, 进化与系统生物学, 生态学

开始日期: 2013-11-22

结束日期: 2013-11-25

所在城市: 广东省 广州市

主办单位: 中国微生物学会微生物资源专业委员会

承办单位: 广东省微生物研究所 中国农业科学院农业资源与农业区划研究所 中山大学 广东省微生物学会

联系人: 邓名荣

联系电话: 13760724481

E-MAIL: cmr2013@caas.ac.cn

会议网站: <http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=1971>