

日落黄酶联免疫试剂盒的制备及应用

谢倩¹, 李庆², 李佳楠¹

(1. 江汉大学生命科学学院, 湖北武汉 430056) (2. 武汉云克隆科技股份有限公司, 湖北武汉 430056)

摘要: 为了快速准确检测食品中的日落黄, 本研究通过羰基二咪唑法, 将日落黄与载体蛋白偶联, 并使用紫外光谱进行鉴定, 结果显示日落黄检测抗原和免疫抗原成功合成; 通过免疫小鼠制备了效价高达 1:64000 以上的抗日落黄单克隆抗体, 研制了日落黄 ELISA 检测试剂盒。试剂盒性能检测分析结果显示, 试剂盒标准曲线的线性检测范围为 62.50~1000 ng/mL, 检测限为 1.50 ng/mL, 检测灵敏度 IC₅₀ 值为 6.50 ng/mL; 试剂盒中, 用于检测的单克隆抗体对日落黄的交叉反应率为 100%, 对诱惑红有弱交叉反应, 反应率为 2%, 与其他 2 种色素添加剂未见交叉反应; 检测市售果汁、水果罐头和果冻类样品的批内、批间回收率分别为 89.18%~101.13%、87.69%~97.90%, 且批内、批间试验的相对标准偏差均小于 10%, 说明试剂盒具有良好的灵敏度和准确性, 且操作方便快捷。本研究应用免疫学方法成功地制备了日落黄酶联免疫试剂盒, 并检测了水果类制品中添加的日落黄, 为大批量测定食品中日落黄含量提供了高效准确的实验方法。

关键词: 日落黄; 人工抗原; 单克隆抗体; 酶联免疫吸附试验 (ELISA)

文章编号: 1673-9078(2021)06-326-332

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.0947

Preparation and Application of ELISA Kit for Detection of Sunset Yellow

XIE Qian¹, LI Qing², LI Jia-nan¹

(1. Life Science College, Jianghan University, Wuhan 430056, China)

(2. Wuhan Cloud-Clone Co. Ltd., Wuhan 430056, China)

Abstract: In order to detect quickly and accurately sunset yellow in food, the sunset yellow was coupled with a carrier protein by the carbonyl diimidazole method and ultraviolet spectroscopy was used for identification of sunset yellow in this study. The results showed that the antigen and immune antigen for sunset yellow detection were successfully synthesized. A monoclonal antibody with a titer of 1:64000 was prepared by immunizing mice and an ELISA kit was developed for detecting sunset yellow. The results of the kit's detection and analysis performance showed that the linear detection range of the kit's standard curve was from 62.50~1000 ng/mL with the detection limit being 1.50 ng/mL and the detection sensitivity IC₅₀ value as 6.50 ng/mL; the cross-reaction rate of the monoclonal antibody towards sunset yellow in this kit was 100%. A weak cross-reaction towards allure red (reaction rate: 2%) was found, with no cross-reactions towards other two color additives were detected. The intra-assay recoveries and inter-assay recoveries of the commercially available samples such as fruit juices, canned fruits and jellies were in the ranges of 89.18%~101.13% and 87.69%~97.90%, respectively, with the relative standard deviations of the intra-assay and inter-assay tests less than 10%. These results demonstrated that the ELISA kit was sensitive, accurate, convenient and fast. In this study, an immunological method was used to prepare successfully an ELISA kit for sunset yellow detection, and the sunset yellow added in fruit products was detected, which provides an efficient and accurate experimental method for large-volume detection of the sunset yellow content in food in large quantities.

Key words: sunset yellow; artificial antigen; monoclonal antibody; enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

引文格式:

谢倩,李庆,李佳楠.日落黄酶联免疫试剂盒的制备及应用[J].现代食品科技,2021,37(6):326-332

XIE Qian, LI Qing, LI Jia-nan. Preparation and application of ELISA kit for detection of sunset yellow [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 326-332

日落黄 (sunset yellow, SY) 是一种水溶性的合成着色剂, 由于其颜色均匀性好、稳定性高、生产成

收稿日期: 2020-10-15

作者简介: 谢倩 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品生物技术

通讯作者: 李佳楠 (1978-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品生物技术

本低等诸优点, 因而被广泛用于食品工业中^[1-4], 然而食品中的 SY 含量必须严格控制, 因为它会引起敏感人群的过敏、腹泻, 当 SY 在体内积聚时, 会引起肾脏和肝脏的损害^[5]。因此, 中国《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760-2011)^[6]对各种食品中的日落黄

添加量进行了严格的规定。目前,用于测定食品中日落黄含量的方法众多,其中《食品中合成着色剂的测定》(GB/T 5009.35-2003)^[7]中指定的食品中合成着色剂的检测方法为薄层色谱法,《食品安全国家标准食品中合成着色剂的测定》(GB 5009.35-2016)^[8]中用于食品中合成着色剂的检验方法为高效液相色谱法,前者检测方法较快,但准确度较差,后者灵敏且准确,但时效性较差;除此之外,日落黄的检测方法还有示波极谱法^[9]、近红外光谱法^[10]和紫外分光光度法^[11]等,这些方法均无法兼顾灵敏度和时效性的要求,因此迫切需要建立新的检测体系,对食品中的日落黄进行快速准确大批量的测定。

酶联免疫法是将抗原抗体反应的高度特异性与酶的高效催化作用相结合,发展建立起来的一种免疫分析方法^[12]。酶联免疫法具有操作简便、可大批量对食品样品进行检测处理、不需要昂贵的仪器设备、灵敏度高、特异性强等优点,目前在抗生素残留、食品兽药残留、重金属污染、农药残留等方面均有广泛的应用^[13-16]。酶联免疫法检测食品添加剂一般采用商品化的试剂盒,试剂盒具有操作简便、携带方便、检测效率高、特异性强等优势,因此日落黄酶联免疫试剂盒的研究拥有广阔的应用前景。本研究通过合成日落黄的人工抗原及制备单克隆抗体,开发了用于检测食品中日落黄的ELISA检测试剂盒,并测试了该试剂盒的检测性能和特异性,检测了市售水果类制品中的日落黄含量,结果显示回收率和精密度均达到了较高水平,为研究用于测定食品添加剂的免疫学检测方法提供了实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

卵清蛋白(OVA)、牛血清白蛋白(BSA):北京政博伟业生物科技有限公司;N,N'-羰基二咪唑(CDI)、3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂:美国Sigma公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠IgG:武汉云克隆科技股份有限公司;洗涤缓冲液(PBST):含0.05% Tween-20的PBS;包被缓冲液(CBS):0.05 mol/mL, pH 9.6;检测溶液A:抗SY单克隆抗体;检测稀释液A(PBS):0.01 mol/L pH 7.4;检测溶液B:辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗鼠IgG;检测稀释液B:0.5% BSA溶液;TMB底物:0.01 g TMB溶解于1 mL二甲亚砜(DMSO)中;封闭液:100 mL PBS中加入1 g OVA;终止液:2 M H₂SO₄;其它试剂均为国产分析纯。

酶标仪(波长范围450~630 nm):武汉云克隆科技股份有限公司;紫外分光光度计UV2600:日本岛津公司;高速离心机KDC140-HR:安徽中科中佳科学仪器有限公司;96孔酶标板:美国Corning公司。

1.2 实验方法

1.2.1 人工抗原合成及鉴定^[17,18]

本研究采用羰基二咪唑法合成人工抗原,其中免疫抗原(SY-BSA)的合成方法为:将9 mg日落黄标准品和11.5 mg CDI混匀并溶解于1 mL DMSO中,于25 °C避光搅拌5 h,而后逐滴加入2 mL浓度为10 mg/mL的BSA溶液中,在室温下反应过夜(约12 h),然后用PBS缓冲液透析人工合成的抗原两天,期间换液4次;并使用相同的方法合成检测抗原(SY-OVA)。真空冷冻干燥透析后的免疫抗原(SY-BSA)和检测抗原(SY-OVA),于-20 °C冷冻保存备用。

人工合成的抗原使用紫外光谱扫描法进行鉴定。使用浓度为0.01 mol/L, pH为7.4的PBS分别配制浓度为0.5 mg/mL的BSA、SY、SY-BSA、SY-OVA溶液,并用PBS进行基线调零,在200~700 nm波长范围内对以上4种溶液进行紫外光谱扫描,记录不同波长下的吸光值,分析数据并组合紫外光谱图,利用组合图分析SY是否与BSA、OVA偶联。

1.2.2 单克隆抗体的制备及纯化^[19]

初免,将用PBS配成浓度为1 mg/mL的人工抗原(SY-BSA)与等量的弗氏完全佐剂混合,乳化后采用皮下多点注射免疫的方法免疫6~8周龄的雌性BALB/C小鼠,两周后进行第二次免疫,取1 mg/mL的SY-BSA与弗氏不完全佐剂,乳化后对进行过初免的两只小鼠进行腹腔注射免疫,经过四次免疫和冲击免疫后的小鼠检测其血清效价,取血清抗体效价大于9 k小鼠的脾细胞,与SP2/0骨髓瘤细胞按5:1(数量配比)比例融合,测定细胞上清液,筛选阳性孔,对阳性孔进行亚克隆,筛选得到能够稳定分泌SY单克隆抗体的细胞株;BALB/C小鼠腹腔注射灭菌石蜡油,0.5 mL/只,7 d后注射稳定的单克隆杂交瘤细胞株,待小鼠腹部隆起且基本不再变化时采集腹水,用ProteinG亲和层析法进行腹水纯化,于-20 °C保存。

1.2.3 单克隆抗体效价检测^[20]

采用棋盘滴定法检测单克隆抗体的效价,将450 nm处吸光值在1.0左右时的稀释浓度作为抗SY单克隆抗体的工作浓度,酶标板依次用浓度为0.125 μg/mL、0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL的检测抗原(SY-OVA)包被,并通过间接竞争ELISA测定单克隆抗体的效价。将用包被液稀释后的包被抗原以每孔

100 μL 加入到酶标板中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 弃去孔中液体, 每孔加入 300 μL PBST 洗涤缓冲液进行洗涤, 5 min 后弃去洗涤液, 重复 3 次; 加入用包被液稀释的 1% OVA 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, 然后用 PBST 洗涤液洗涤 3 次; 每孔加入浓度为 100 ng/mL 的 SY 标准品 50 μL , 同时每孔加入用 PBS 缓冲液倍比稀释(1:4000、1:8000、1:16000、1:32000、1:64000、1:128000、1:256000) 的单克隆抗体稀释液 50 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1 h, 然后用 PBST 洗涤液洗涤 4 次; 每孔加入按 1:2000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (IgG-HRP) 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 40 min, 并用 PBST 洗涤液洗涤 5 次; 每孔加入 100 μL TMB, 约 8 min 后, 每孔加入 50 μL 终止液以终止反应; 在 450~630 nm 波长范围内, 用酶标仪测定各孔吸光值, 以分析抗原 (SY-OVA) 和抗体的最佳反应浓度, 同时分析当 pH 值为 5.0~9.0, Na^+ 离子浓度为 20~500 mmol/L, 以及甲醇溶液浓度为 0~30% 时 ELISA 反应的敏感性, 以选择最佳的间接竞争 ELISA 反应条件。

1.2.4 间接竞争 ELISA 标准曲线的建立^[21-24]

在最佳的间接竞争 ELISA 反应条件下, 纵坐标为 B/B_0 值 (B 是不同浓度 SY 标准品 450 nm 处的吸光值; B_0 为未添加标准品时 450 nm 处的吸光值), 横坐标为 SY 标准品浓度 (0.4、1.2、3.7、11.1、33.3、100、300 ng/mL) 的对数值, 绘制间接竞争 ELISA (ic-ELISA) 标准曲线并进行相关性分析。灵敏度用 IC_{50} 值表示, 表示标准品与检测抗原偶联时的半数抑制浓度; 线性范围代表最大信号值 20%~80% 的抑制率 (IC_{20} ~ IC_{80}); 检测限由 IC_{10} 值计算得出。

1.2.5 交叉反应分析^[25]

用日落黄检测试剂盒检测食品中常用的日落黄、酒石黄、胭脂红和诱惑红, 根据公式 1 计算交叉反应率。

$$\text{日落黄交叉反应率} = \frac{\text{SY 的 } \text{IC}_{50}}{\text{其他化合物的 } \text{IC}_{50}} \times 100\% \quad (1)$$

1.2.6 日落黄检测试剂盒的制备

表 1 日落黄检测试剂盒组成

Table 1 Composition of sunset yellow detection kit

试剂名称	数量	试剂名称	数量
96 孔板	1	96 孔板覆膜	4
标准品	2	标准品稀释液	1×20 mL
检测溶液 A	1×120 μL	检测稀释液 A	1×12 mL
检测溶液 B	1×120 μL	检测稀释液 B	1×12 mL
试剂稀释液	1×300 μL	终止液	1×6 mL
TMB 底物	1×9 mL	说明书	1
洗涤液(30×)	1×20 mL		

将检测抗原 (SY-OVA) 用包被液稀释到终浓度为 0.25 $\mu\text{g/mL}$, 并以 100 μL /孔包被酶标板以制成固相载体。37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h 或者 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; 弃去孔中液体并控干, 加入用包被液稀释的浓度为 1% 的 OVA 溶液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 1 h, PBST 洗涤液洗涤 3 次; 控干后密封包装。试剂盒组成见表 1。

1.2.7 日落黄检测试剂盒对市售样品的检测

从市场购买经 HPLC 检测不含 SY 的果汁饮料、水果罐头和果冻样品, 液体样品直接取样, 固体及半固体样品进行匀浆, 将 SY 标准品分别加入到以上的样品中, 使终浓度分别为 900 ng/mL、300 ng/mL 和 100 ng/mL, 将混合物均质混匀。用 5 mL PBS 浸提 3 min, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10000 r/min 下离心 10 min, 取上清液, 使用 ic-ELISA 法, 用日落黄检测试剂盒进行检测, 并根据公式 2 计算回收率。

$$\text{回收率} / \% = \frac{\text{检测到的 SY 含量}}{\text{添加的 SY 标准品含量}} \times 100\% \quad (2)$$

2 结果与讨论

2.1 人工抗原的紫外扫描鉴定

人工抗原通过紫外光谱法鉴定。将 BSA、SY、SY-BSA、SY-OVA 溶液在 200~700 nm 波长范围内进行紫外光谱扫描。结果如图 1 所示, 其中使用半抗原 SY 与载体蛋白 BSA 的紫外图谱作为对照。由图 1 可知, BSA 在 280 nm 处有很强的特征吸收, SY 在 482 nm 处有特征吸收, 而 SY-BSA 在 485 nm 附近有宽吸收峰, 相对于 SY 半抗原的吸收峰有所蓝移, 说明半抗原 SY 和载体蛋白 BSA 成功偶联。SY-OVA 在 485 nm 处也有宽吸收峰, 且相对于 SY 半抗原的吸收峰也出现了蓝移, 说明检测抗原 SY-OVA 也成功合成。

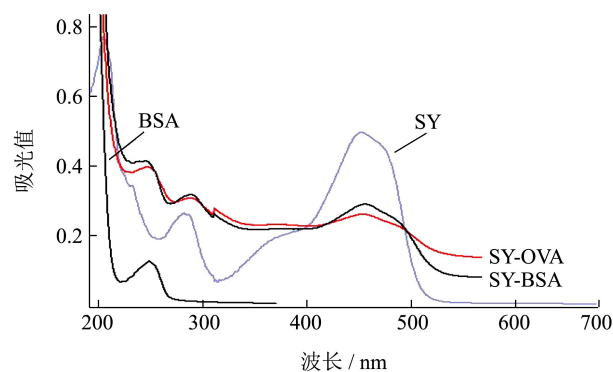


图 1 BSA, SY, SY-OVA 和 SY-BSA 的紫外可见吸收光谱

Fig.1 The UV-vis absorption spectra of BSA, SY, SY-OVA and SY-BSA, respectively

2.2 单克隆抗体效价测定结果

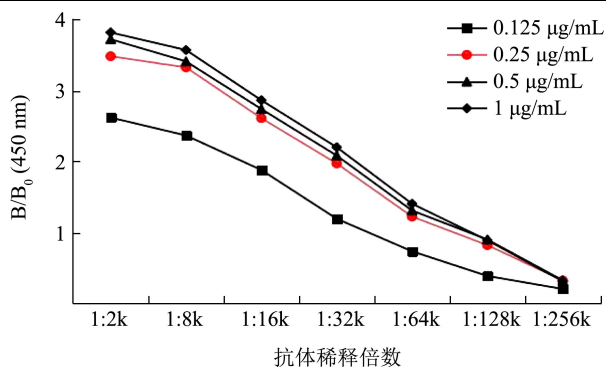


图2 ELISA的棋盘免疫滴定

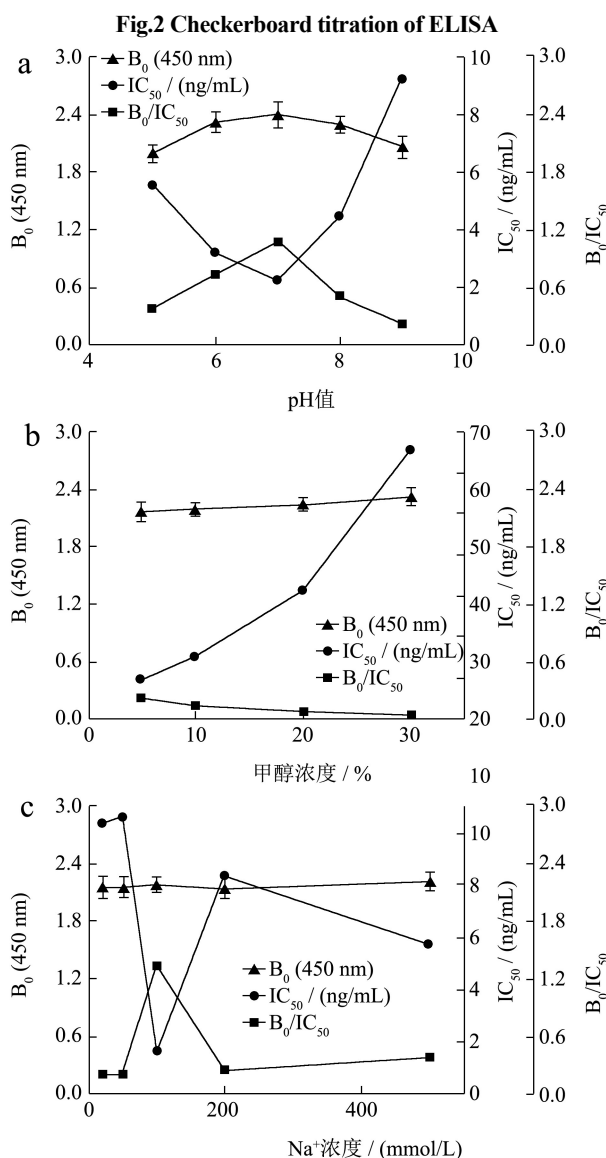


图3 pH值、有机溶剂和离子强度对ELISA敏感性的影响
Fig.3 Effects of pH value, organicsolvent, and ionic strength on ELISA sensitivity (n=3)

将酶标板用浓度为0.125 μg/mL、0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL的检测抗原(SY-OVA)包被,通过间接竞争ELISA法测定纯化后的抗体效价,选取吸光值为1.0时对应的最高稀释倍数作为该抗体的检测效

价。棋盘滴定检测结果如图2所示,当检测抗原浓度为0.125 μg/mL时,抗SY的单克隆抗体效价为1:32000,而当检测抗原浓度分别为0.25 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL时,抗SY单克隆抗体效价均可达1:64000以上,因此,间接竞争ELISA反应的检测抗原SY-OVA最佳反应浓度为0.25 μg/mL,证明SY单克隆抗体制备成功,同时也进一步证明SY与载体蛋白BSA、OVA成功偶联。

同时,在检测抗原浓度为0.25 μg/mL的条件下,分析了pH值为5.0、6.0、7.0、8.0、9.0,Na⁺离子浓度为20、50、100、200、500 mmol/L以及甲醇浓度为0、5%、10%、20%、30%时在PBS溶液中间接竞争ELISA反应的敏感性。IC₅₀代表标准品与检测抗原偶联时的半数抑制浓度,B₀/IC₅₀值是评价不同因素对间接竞争ELISA反应灵敏度的重要参数。图3最上面的图显示,pH值在5.0~9.0范围内升高时,B₀/IC₅₀值先升高后降低,当pH值为7.0时,B₀/IC₅₀值最大;图3中间的图显示,有机溶剂甲醇对ELISA反应的敏感性有着显著影响,甚至可抑制抗SY抗体和检测抗原SY-OVA的结合;图3最下面的图显示,Na⁺浓度为100 mmol/L时,B₀/IC₅₀值最大,当Na⁺浓度升高时,B₀/IC₅₀值显著降低,表明较高的Na⁺浓度ELISA反应的敏感性有严重影响。综上所述,ELISA反应在pH为7.0、Na⁺浓度为100 mmol/L,无有机溶剂的PBS缓冲液中具有最高的灵敏度,适合在此反应条件下来检测样品和建立间接竞争ELISA标准曲线。

2.3 间接竞争ELISA标准曲线的建立

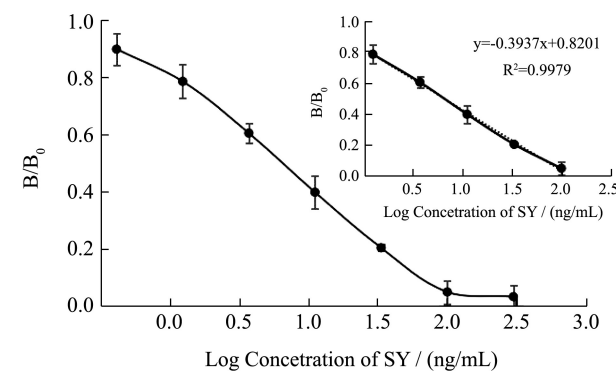


图4 SY的竞争性抑制曲线和标准曲线

Fig.4 The competitive inhibition curve and calibration curve in the line arrange (inset) for SY (n=3)

根据棋盘滴定法的结果,将酶标板用浓度为0.25 μg/mL的SY-OVA包被,并将SY单克隆抗体以1:32000稀释上样,优化的间接竞争ELISA标准曲线如图4所示。结果显示,间接竞争ELISA抑制曲线线性良好,回归方程式为 $y = -0.3937x + 0.8201$ ($R^2 =$

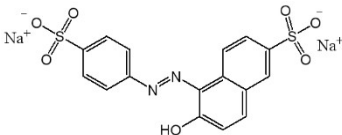
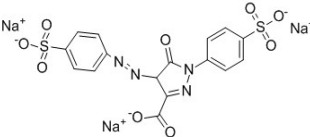
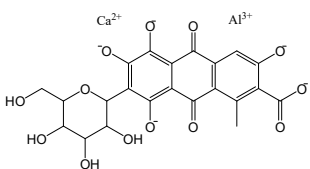
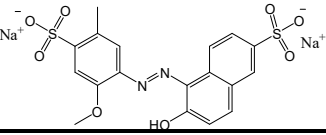
0.9979), IC₅₀ 值为 6.50 ng/mL, 经计算得出标准曲线的线性检测范围为 62.50~1000 ng/mL, 检测限为 1.50 ng/mL, 相比于金一萍^[26]文献中报道的紫外分光光度计检测日落黄, 本研究中的检测限 1.50 ng/mL 显著低于紫外的检测限 0.10~0.60 μg/mL, 且样品中的杂质对

紫外检测的影响较大, 易造成实验结果不准确, 而本文所制备的单克隆抗体效价高、灵敏度高、特异性强, 因此可进一步用于制备日落黄检测试剂盒。

2.4 交叉反应分析结果

表 2 抗 SY 抗体与 SY 及其他食用色素的交叉反应

Table 2 Cross-reactivity of anti-SY antibody with SY and other fooddyes

食用色素	分子结构	IC ₅₀ /(ng/mL)	交叉反应/%
日落黄		6.50	100
酒石黄		NR	<0.01
胭脂红		NR	<0.01
诱惑红		512.53	2

注: NR: 无反应。

表 3 食品样品中 SY 含量的回收率分析

Table 3 Recovery analysis of the SY spiked in food samples

样品	加标/(ng/g)	ELISA			
		批内 ^a		批间 ^b	
		含量/(ng/g)	回收率/%	含量/(ng/g)	回收率/%
果汁饮料	100	101.13±0.67	101.13	97.69±15.61	97.69
	300	267.54±42.61	89.18	269.84±0.94	89.95
	900	820.22±35.83	91.14	891.98±2.62	89.11
水果罐头	100	97.29±16.74	97.29	90.23±12.14	90.23
	300	275.01±21.19	91.67	268.28±59.68	89.43
	900	858.08±96.76	95.34	881.14±106.42	97.90
果冻	100	98.81±23.57	98.81	93.33±19.81	93.33
	300	276.54±47.93	92.18	292.02±67.09	97.34
	900	836.21±86.34	92.91	789.17±36.33	87.69

注: a: 批内分析为 1 d 内 4 次重复测定; b: 批间分析为分开的 3 d 测定的样品含量, 每次 3 个重复。

对抗 SY 单克隆抗体与 SY 及其它三种食用色素(酒石黄、胭脂红、诱惑红)的交叉反应进行分析, 表 2 的结果显示抗 SY 单克隆抗体与日落黄的反应率

为 100%, 对诱惑红有弱交叉反应, 其交叉反应率为 2%, 推测是因为日落黄和诱惑红的分子结构较相似所致; 而其对酒石黄和胭脂红无交叉反应, 说明了制备

的日落黄试剂盒对 SY 具有较高的特异性,可用于 SY 的特异性检测分析,相关研究^[27]表明高效液相色谱法检测日落黄的准确度及分离度均较高,但由于检测时间长及不能现场检测等缺点限制了其应用,而酶联免疫法高效、快速及可大批量检测的优点使得其非常适合对食品添加剂等微量物质的检测。

2.5 加标样品 SY 回收率检测

使用间接竞争 ELISA 法检测添加了 SY 标准品的果汁饮料、水果罐头和果冻样品中 SY 含量,计算出实际样品中的 SY 回收率。结果显示 SY 的回收率和精密度均达到了较高水平。数据结果如表 3 所示。

经检测分析,SY 的批内、批间回收率分别为 89.18%~101.13%、87.69%~97.90%,且批内、批间试验的相对标准偏差均小于 10%。结果表明,制备的日落黄检测试剂盒对 SY 分析的回收率较高,可准确用于分析样品中的 SY 含量;已有文献^[20]报道用于测定肉类食品中色素胭脂红酸的 ELISA 检测试剂盒,此试剂盒加标回收率结果显示各类样品的加标回收率均较高,且批内、批间相对标准偏差基本小于 10%,且 HPLC 法检测与 ELISA 检测结果相关性分析显示,两种检测方法在胭脂红酸的检测结果上具有较高一致性,相关系数为 0.927,证明 ELISA 试剂盒用于检测食品中的添加剂具有准确性和普遍性。

3 结论

合成具有免疫原性的人工抗原是建立食品添加剂免疫分析法的第一步,良好的人工抗原才能刺激机体产生免疫应答,从而得到高效的特异性抗体,为后续研究打好基础。日落黄属于小分子物质,无法使机体产生抗体,本文将日落黄与载体蛋白 BSA 及 OVA 偶联制备了免疫抗原与检测抗原,用 SY-BSA 免疫小鼠获得了抗 SY 单克隆抗体,通过棋盘滴定法测定了单克隆抗体的效价达 1:64000 以上,同时探究了间接竞争 ELISA 反应的最佳条件为 pH 7.0、Na⁺浓度 100 mmol/L 及无有机溶剂的 PBS 缓冲液,建立了检测 SY 的 ic-ELISA 方法,其中 IC₅₀ 为 6.50 ng/mL,线性范围为 62.50~1000 ng/mL,检测限 IC₁₀ 为 1.50 ng/mL。本方法具有良好的特异性,除了与诱惑红有 2%的弱交叉反应外,与其他两种色素的交叉反应均小于 0.01%;通过对加标样品的 SY 进行检测发现其批内、批间回收率分别为 89.18%~101.13%、87.69%~97.90%,且批内、批间试验的相对标准偏差均小于 10%,说明试剂盒检测性能和重复性较好,可用于食品中日落黄的检测。本研究通过制备日落黄酶联免疫试剂盒对快速准

确测定食品中日落黄含量具有重要意义,为食品中违法或超量添加日落黄的监督检验提供了科学的方法,具有较高的实际应用价值。

参考文献

- [1] Vani J, Katti P. Food colorant sunset yellow (E110) intervenes developmental profile of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Applied Toxicology, 2019, 39(4): 571-581
- [2] Media A H, Narmin S A, Rebwar O H, et al. Use of flow injection analysis with chemiluminescence detection for determination of sunset yellow (E110) in drink samples [J]. Journal of the Iranian Chemical Society, 2020, 17: 1369-1375
- [3] Aysegul K B, Emine A, Mehmet A. A novel voltammetric platform based on dysprosium oxide for the sensitive determination of sunset yellow in the presence of tartrazine [J]. Analytica Chimica Acta, 2019, 1087: 93-103
- [4] Li Q, Liu W, Zhu X S. Green choline amino acid ionic liquid aqueous two-phase extraction coupled with HPLC for analysis sunset yellow in beverages [J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(11): 2527-2534
- [5] Ding Z Y, Deng P H, Wu Y Y, et al. A novel modified electrode for detection of the food colorant sunset yellow based on nanohybrid of MnO₂ nanorods-decorated electrochemically reduced graphene oxide [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(6): 1178
- [6] GB 2760-2011, 食品添加剂使用标准[S]
GB 2760-2011, Food Additives Use Standards [S]
- [7] GB/T 5009.35-2003, 食品中合成着色剂的测定[S]
GB/T 5009.35-2003, Determination of Synthetic Colorants in Food [S]
- [8] GB 5009.35-2016, 食品中合成着色剂的测定[S]
GB 5009.35-2016, Determination of Synthetic Colorants in Food [S]
- [9] 刘洋. 食品中着色剂的研究进展[J]. 内蒙古科技与经济, 2014, 7(13): 18-20
LIU Yang. Research progress of colorants in food [J]. Inner Mongolia Technology and Economy, 2014, 7(13): 18-20
- [10] 田晶, 李巧玲. 近红外光谱法快速检测饮料中的日落黄[J]. 中国食品添加剂, 2017, 6: 195-199
TIAN Jing, LI Qiao-ling. Rapid determination of sunset yellow for fruit beverage by near infrared spectroscopy [J]. China Food Additives, 2017, 6: 195-199
- [11] 郭群, 杜艳红, 张李文, 等. 紫外分光光度法测定合成色素日落黄和柠檬黄[J]. 农技服务, 2016, 33(14): 18-19
GUO Qun, DU Yan-hong, ZHANG Li-wen, et al.

- Determination of synthetic pigments sunset yellow and lemon yellow by ultraviolet spectrophotometry [J]. Agricultural Technology Service, 2016, 33(14): 18-19
- [12] Thimo R, Aya C T, Jasmit K, et al. Commercial fish ELISA kits have a limited capacity to detect different fish species and their products [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020, 100(12): 4353-4363
- [13] 徐誉.水产品中总砷含量 ELISA 检测方法的建立[D].石河子:石河子大学,2019
XU Yu. Establishment of ELISA method for detecting total arsenic in aquatic products [D]. Shihezi: Shihezi University, 2019
- [14] Jia Q Y, Han D, Lan W. Detection of metallothionein proteins by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. Current Pharmaceutical Biotechnology, 2020, 21(7): 544-554
- [15] Wu X L, Yu S J, Kang K R. Development of a monoclonal antibody-based indirect competitive immunosorbent assay for 4(5)-Methylimidazole detection in caramels [J]. Food Chemistry, 2015, 170: 354-359
- [16] 向雅洁,邹大松.农药残留快速检测仪在乡镇的应用探讨[J].安徽农学通报,2020,26(11):98-99
XIANG Ya-jie, ZOU Da-song. Discussion on the application of pesticide residue quick detector in towns [J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2020, 26(11): 98-99
- [17] 何峰容,杨帆帆,李佳楠.胭脂红酸人工抗原合成及多克隆抗体的制备[J].现代食品科技,2019,35(3):270-274,240
HE Feng-rong, YANG Fan-fan, LI Jia-nan. Synthesis of carminic acid artificial antigen and preparation of polyclonal antibody [J]. Modern Food Science and Technology, 2019, 35(3): 270-274, 240
- [18] Kong T, Liu G W, Li X B, et al. Synthesis and identification of artificial antigens for cadmium and copper [J]. Food Chemistry, 2010, 123(4): 1204-1209
- [19] 谢琿,章先,王歆,等.黄曲霉毒素 B1 单克隆抗体的制备及间接竞争 ELISA 检测技术研究[J].微生物学通报,2015,42(10): 2033-2040
XIE Hui, ZHANG Xian, Wang Xin, et al. Preparation of aflatoxin B1 monoclonal antibody and research on indirect competitive ELISA detection technology [J]. Microbiology Bulletin, 2015, 42(10): 2033-2040
- [20] 李佳楠,杨帆帆,何峰容.胭脂红酸 ELISA 检测试剂盒的制备及应用[J].江汉大学学报(自然科学版),2019,47(5):436-447
LI Jia-nan, YANG Fan-fan, HE Feng-rong. Preparation and application of carminic acid ELISA kit [J]. Journal of Jiangnan University (Natural Science), 2019, 47(5): 436-447
- [21] Yang F, Zhu L, Meng W, et al. Novel artificial antigen synthesis for antibody production and development of an indirect competitive ELISA of cyanocobalamin [J]. Anal Methods, 2015, 7: 5275-5281
- [22] Huo J Q, Bogdan B, Li Z F, et al. Hapten synthesis, antibody development, and a highly sensitive indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of dicamba [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2019, 67: 5711-5719
- [23] Lu X, Chen G, Qian Y, et al. Development of a new monoclonal antibody by more active enramycin a and indirect competitive ELISA for the detection of enramycin in edible animal tissues [J]. Food Analytical Methods, 2019, 12(8): 1895-1904
- [24] Cao Y, Shi H, Le T, et al. Development a monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay for screening pyrimethanil in fruits and vegetables [J]. Food and Agricultural Immunology, 2019, 30(1): 548-563
- [25] 柳心梅,田巍,冯春梅,等.重金属镉特异性抗体的制备及 icELISA 检测方法的建立[J].现代食品科技,2020,36(8): 325-332,37
LIU Xin-mei, TIAN Wei, FENG Chun-mei, et al. Preparation of specific antibody to cadmium and establishment of icELISA detection method [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 325-332, 37
- [26] 金一萍,肖全松,陶瑞民,等.紫外光谱法测定食品中多种合成色素的研究[J].新余学院学报,2017,22(6):22-24
JIN Yi-ping, XIAO Quan-song, Tao Rui-min, et al. Study on the determination of various synthetic pigments in food by ultraviolet spectroscopy [J]. Journal of Xinyu University, 2017, 22(6): 22-24
- [27] 吴卓彦,吴俣.液相色谱法快速检测梅鱼中日落黄、柠檬黄的含量[J].食品安全质量检测学报,2019,10(9):2786-2790
WU Zhuo-yan, WU-Yu. Rapid detection of sunset yellow and lemon yellow in *Collichthys niveatus* by liquid chromatography [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2019, 10(9): 2786-2790