

一种检测杂环胺类化合物的酶联免疫检测方法的建立

赵秋霞, 生威*, 王璐璐, 尚淑娜, 张燕, 王硕

(天津科技大学食品工程与生物技术学院, 食品营养与安全国家重点实验室, 天津 300457)

摘要: 为了制备一种广谱性杂环胺抗体, 并建立一种可以实现多种杂环胺同时检测的快速分析方法。以杂环胺2-氨基-3,4-二甲基咪唑[4,5-f]喹啉(MeIQx)为原料, 将其与丁二酸单甲酯酰氯(MCO)反应合成杂环胺半抗原, 通过活化酯法将半抗原与蛋白偶联制备免疫原进一步制备多克隆抗体, 最终建立间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)。该方法灵敏度(IC_{50} , 以 MeIQx 计)为 $81.16 \mu\text{g/L}$, 检测限(IC_{15})为 $12.07 \mu\text{g/L}$ 。方法对喹啉类杂环胺(IQ、MeIQ)、喹啉咪类杂环胺(IQx、MeIQx、4,8-DiMeIQx、7,8-DiMeIQx、4,7,8-TriMeIQx)以及吡啶类杂环胺(PhIP)具有相同的识别能力, 交叉反应率均达到93%以上。油炸牛肉和肉松样品中杂环胺(MeIQx)添加回收率在91.18%~98.64%之间, 检测结果与液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)有很好的-致性($R^2 = 0.9927$)。本文建立的酶联免疫分析方法可以实现喹啉类、喹啉咪类以及吡啶类杂环胺总量的检测, 为热加工肉制品中杂环胺的检测提供了一种简单、准确的快速检测方法。
关键词: 杂环胺, 广谱性抗体, ELISA, 加工食品

Establishment of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Method for Detection of Heterocyclic Amines

ZHAO Qiu-xia, SHENG Wei*, WANG Lu-lu, SHANG Shu-na, ZHANG Yan, WANG Shuo

(State Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: A broad-spectrum heterocyclic aromatic amine polyclonal antibody was prepared and an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ic-ELISA) was developed to simultaneously detect multiple heterocyclic aromatic amines. MeIQx was applied to synthesize the hapten via reacting with monomethyl succinate chloride (MCO). The polyclonal antibody was prepared by coupling hapten to protein by activated ester method to prepare immunogen, and the ic-ELISA method was established finally. The sensitivity of this ELISA (IC_{50} , for MeIQx) was $81.16 \mu\text{g/L}$ and the limit of detection (IC_{15}) was $12.07 \mu\text{g/L}$. This method had similar recognition capacity for the quinoline heterocyclic aromatic amines (IQ, MeIQ), quinoxaline heterocyclic aromatic amines (IQx, MeIQx, 4,8-DiMeIQx, 7,8-DiMeIQx, 4,7,8-TriMeIQx) and pyridines (PhIP) and the cross-reaction rates reached more than 93%. The recoveries of heterocyclic aromatic amine (MeIQx) in fried beef and dried meat floss samples were between 91.18% and 98.64%. There was a good correlation ($R^2 = 0.9927$) between the ELISA and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for the detection of MeIQx in the spiked samples. The ELISA established in this paper can be applied to detect the total amount of quinoline, quinoxaline and pyridine heterocyclic aromatic amine, and provide a simple and accurate approach for the detection of multiple heterocyclic aromatic amines in processed meat products.

Key words: heterocyclic aromatic amines; broad-spectrum antibody; ELISA; processed foods

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)21-0058-07

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2019.21.010

引文格式: 赵秋霞, 生威, 王璐璐, 等. 一种检测杂环胺类化合物的酶联免疫检测方法的建立[J]. 食品工业科技, 2019, 40(21): 58-64.

杂环胺(Heterocyclic aromatic amines, HAAs)是富含蛋白质的物质在进行热加工时形成的一种物质^[1]。截至目前, 已经在熟食中分离出了约30种诱变型杂环胺^[2]。这些杂环胺可以分为氨基咪唑氮杂芳烃类

(AIA)与氨基咪唑类^[3]。肉类在日常饮食中必不可少, 家庭条件下对肉类的烹调温度一般设定为170~230℃^[4], 而两类杂环胺中的氨基咪唑氮杂芳烃类的形成温度范围为100~300℃^[5], 所以, 日常肉制品中易

收稿日期: 2019-02-18

作者简介: 赵秋霞(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品安全, E-mail: 1687607570@qq.com。

*通讯作者: 生威(1980-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品安全, E-mail: shengwei@tust.edu.cn。

基金项目: 国家自然科学基金重点项目(31430068); 天津市科技计划项目(16PTSJJC00130)。

形成该类杂环胺。相关研究表明,如果长时间摄入含有杂环胺的食品,患癌的几率将会增加,尤其是结肠、乳腺以及肝脏方面的癌症^[6]。为确保食品安全,实现对杂环胺的快速而准确的检测具有十分重要的意义。

目前,杂环胺的检测手段主要有高效液相色谱^[7]、液相色谱-质谱法^[8-10]、气相色谱、气相色谱-质谱法^[11]以及荧光检测^[12]等方法,这些检测方法都有灵敏度高、准确性好的特点,但对仪器、操作过程以及财力的要求较高^[13-15]。免疫分析方法对仪器的要求较低,并且具有检测速度快、检测结果灵敏准确等特点。目前关于采用免疫分析方法检测杂环胺的报道较少,Martin等^[16]制备了PhIP的四种结构类似物PhIP-1,-2,-3和-4的抗体,并对4种抗体之间的特异性和选择性进行了研究;Wei等^[17]制备了IQ的抗体并建立了直接竞争酶联免疫分析方法(dc-ELISA),这些方法只能针对杂环胺中的一种物质进行检测,而杂环胺在肉制品中的含量较低,所以建立一种可以同时检测肉制品中多种杂环胺的检测方法具有重要意义。

本文主要针对广谱性多克隆抗体的制备开展研究,以杂环胺2-氨基-3,4-二甲基咪唑[4,5-f]喹啉(MeIQx)为原料,将其与丁二酸单甲酯酰氯(MCO)反应合成杂环胺半抗原,通过活化酯法将半抗原与蛋白偶联制备免疫原进一步制备多克隆抗体,最终建立间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)。旨在建立能够同时检测多种杂环胺的酶联免疫分析方法,为加工肉制品中杂环胺的检测和监控提供有用的工具。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

2-氨基-3,4-二甲基咪唑[4,5-f]喹啉(MeIQx)、2-氨基-3-甲基咪唑[4,5-f]喹啉(IQ)、2-氨基-3,4-二甲基咪唑[4,5-f]喹啉(MeIQ)、2-氨基-3-甲基咪唑[4,5-f]喹啉(IQx)、2-氨基-3,4,8-三甲基咪唑[4,5-f]喹啉(4,8-DiMeIQx)、2-氨基-3,7,8-三甲基咪唑[4,5-f]喹啉(7,8-DiMeIQx)、2-氨基-3,4,7,8-四甲基咪唑[4,5-f]喹啉(4,7,8-TriMeIQx)、2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑[4,5-b]吡啶(PhIP)、2-氨基-9H-吡啶[2,3-b]吡啶(AαC)、1-甲基-9H-吡啶[3,4-b]吡啶(Harman)、9H-吡啶[3,4-b]吡啶(Norharman)、丁二酸单甲酯酰氯(MCO)、钥孔血蓝蛋白(KLH)、卵清蛋白(OVA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、无水二氯甲烷 美国Sigma公司;甲醇(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司;新西兰大白兔 月龄3个月,体重1.5 kg左右,北京兴隆实验动物养殖场。

NGC蛋白纯化仪 美国BIO-RAD公司;96孔酶标板 丹麦Nunc公司;F200 PRO酶标仪 美国Thermo公司。

1.2 试验方法

1.2.1 半抗原合成 在氮气环境下,向20 mL溶解

有21.32 mmol的2-氨基-3,4-二甲基咪唑[4,5-f]喹啉(MeIQx)的无水二氯甲烷溶液中,逐滴加入6 mL浓度为50.29 mmol/L的丁二酸单甲酯酰氯(MCO)-无水二氯甲烷溶液,冰浴反应5 h后,室温反应过夜^[18],薄层色谱(Thin layer chromatography, TLC)监测(展开剂组分及比例为二氯甲烷:无水甲醇:氨水=9:1:0.1, V/V/V^[19])。反应完成后,用饱和NaHCO₃溶液去除产物中的氢离子,并用无水Na₂SO₄干燥,过滤后60 °C减压旋蒸,获得MeIQx半抗原。

1.2.2 偶联蛋白及抗体制备 称取1.0 mg半抗原和1.2 mg二亚胺盐酸盐(EDC)溶于0.1 mL的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,将其加入4 mL溶解有20 mg钥孔血蓝蛋白(KLH)的碳酸氢钠溶液(130 mmol/L)中,室温搅拌5 h后,加入0.6 mg EDC,4 °C反应过夜^[18]。将所得反应溶液在4 °C下用pH7.4的0.01 mol/L的磷酸盐缓冲液(PBS)透析3 d,得到杂环胺免疫原MeIQx-KLH。以上述同样的方法合成包被原MeIQx-OVA,通过紫外扫描(200~550 nm)进行鉴定。采用多点皮下注射法免疫新西兰大白兔,最后一次免疫后采用股动脉采血法采集全血^[20]。4 °C进行离心(10000 r/min,10 min),收集血清,通过ProteinA-Sepharose 4B亲和柱层析法纯化抗体。

1.2.3 半抗原及完全抗原的鉴定 通过紫外扫描,比较免疫原相对半抗原和蛋白的紫外吸收峰的红移值,如果免疫原的最大吸收峰波长在半抗原最大吸收波长和蛋白紫外最大吸收波长之间,则表示免疫原紫外吸收基团相对于半抗原和蛋白都有变化,即半抗原和蛋白偶联成功。

1.2.4 间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)的建立

1.2.4.1 间接竞争酶联免疫分析(ic-ELISA)方法步骤 将包被原(100 μL/well)包被在96孔板上,4 °C条件下过夜;用PBST洗板3次后,加入200 μL/well封闭液在37 °C下封闭1 h;用PBST洗板3次后,加入标准品或样品溶液(50 μL/well)和抗体(50 μL/well),在37 °C环境中孵育1 h;用PBST洗板4次后,加入酶标二抗(15000倍稀释,100 μL/well),37 °C孵育30 min;用PBST洗板5次后,加入底物溶液,37 °C下显色15 min;加入硫酸(1.25 mol/L,50 μL/well)终止反应,利用酶标仪在波长450 nm下读取吸光度值,计算抑制率^[16],抑制率公式如下:

$$\text{抑制率}(\%) = \frac{\text{OD效价} - \text{OD抑制}}{\text{OD效价} - \text{OD空白}} \times 100$$

其中:OD空白是加入100 μL PBS的孔对应的吸光度值;OD效价是加入50 μL PBS和50 μL抗血清溶液的孔对应的吸光度值;OD抑制是加入50 μL标准品和50 μL抗血清溶液的孔对应的吸光度值。

1.2.4.2 包被抗原及抗体稀释度的确定 选取0.01、0.05和0.1 μg/well的包被抗原量和不同稀释倍数的抗体进行组合,测定不同条件下的OD值,并计算相应的抑制率和IC₅₀值,选取吸光度值在1.0左右、IC₅₀值最低时的条件为最佳包被量和抗体稀释比例。

1.2.4.3 封闭液选择及浓度优化 确定包被量及抗体稀释比例后,分别用0.5%和1%的明胶溶液、0.5%

表1 MeIQx 质谱信息

Table 1 Mass spectrum information of MeIQx

保留时间(min)	母离子(m/z)	子离子(m/z)	源内碎裂电压(V)	碰撞能量(V)
23	214.3	199.2	135	35 45

和1%的BSA溶液以及0.5%和1%的脱脂乳粉溶液作为封闭液进行ELISA测定,最终选取吸光度值在1.0左右、 IC_{50} 值最低时对应的封闭液用于后续实验。

1.2.4.4 甲醇含量对间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)的影响 考虑到进行样品检测时需要用甲醇对提取物进行复溶,本实验使用含0%、1%、3%、5%、10%、20%、40%的甲醇的PBS缓冲液,建立标准曲线,考察甲醇对ELISA方法的影响,最终选择能够完全溶解样品提取物且与甲醇含量为0时的 IC_{50} 值相近的甲醇-PBS混合液为样品提取液。

1.2.4.5 杂环胺间接竞争ELISA标准曲线的建立 在上述优化条件下,梯度稀释MeIQx标准品,进行间接竞争ELISA测定,得到不同浓度MeIQx所对应的吸光度值,通过吸光度值计算抑制率,以MeIQx浓度为横坐标,抑制率为纵坐标绘制标准曲线,通过进行拟合得到S型标准曲线,通过曲线计算得到本方法的灵敏度(IC_{50})和检测限(IC_{15})。

1.2.5 杂环胺抗体特异性测定 实验选取与杂环胺MeIQx结构类似的喹啉类杂环胺IQ、MeIQ,喹啉类杂环胺IQx、4,8-DiMeIQx、7,8-DiMeIQx、4,7,8-TriMeIQx,吡啶类杂环胺PhIP以及氨基喹啉类杂环胺A α C、Norharman和Harman进行抗体特异性测定,以MeIQx的 IC_{50} 和结构类似物的 IC_{50} 之比的百分数为交叉反应率。

1.2.6 样品前处理方法 将牛肉切成碎末,制成直径4cm、厚0.5cm的薄饼,在200℃下油炸2min^[21],然后将油炸过的牛肉和购买的肉松在-80℃、0.35MPa的条件下进行冻干处理(24h),取冻干后的样品1g,放入50mL离心管中,加入5mL乙酸乙酯、2mL氢氧化钠溶液,振荡后超声萃取10min,8000r/min离心10min,取上清,3mL乙酸乙酯再次提取,合并上清,46℃氮吹至干,1mL甲醇复溶^[22],再加入1mL正己烷,涡旋混合5min,8000r/min离心,取下层清液,46℃氮吹至干,用1mL含有5%甲醇的甲醇-PBS混合液复溶得到样品提取溶液。

1.2.7 提取液稀释倍数优化 将1.2.5方法处理得到的样品提取溶液用PBS分别进行2、4、8、16倍稀释,通过对比建立的基质曲线和标准曲线,选取基质影响基本消除的稀释倍数进行后续实验。

1.2.8 添加回收实验 向油炸牛肉和肉松样品中分别添加60、100、300 μ g/kg的MeIQx标准品,用方法1.2.6处理样品,用建立的ic-ELISA方法进行测定并计算回收率。

1.2.9 液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)验证 参照林翠萍^[10]的液相色谱-串联质谱联用分析法进行验证。液相条件:色谱柱:Zorbax Eclipse Plus C₁₈柱,2.1mm \times 100mm,3.5 μ m;流速:0.2mL/min;柱温:25℃;进样量:1 μ L;分析时间:23min;流动相:A:

10mmol/L甲酸水(pH3.5,甲酸调节);B:乙腈;流动相梯度洗脱程序:0~12min,90%A,10%B;12min,40%A,60%B;14min,90%A,10%B。

质谱参数:离子化模式:电喷雾电离正离子模式(ESI⁺);质谱扫描方式:多反应监测(MRM);雾化气和碰撞气:N₂;雾化气压力:40psi;毛细管电压:4000V;干燥器温度:350℃;干燥器流量:10L/min;目标物质MeIQx的监测离子对信息见表1。

1.3 数据处理

酶联免疫检测方法中所有实验数据均为重复3次的实验结果。采用Origin 9.1软件统计分析数据,计算标准误差并绘制标准曲线。

2 结果与分析

2.1 半抗原和完全抗原的鉴定

杂环胺MeIQx的分子量为213.24,MCO分子量为150.56,经1.2.1反应生成分子量为327.34的产物,图1显示有很明显的328.53加氢峰即[M+H]⁺,MS(ESI)数据与化合物的分子量(327.24)吻合,合成产物为目标化合物。将合成的半抗原分别偶联KLH和OVA,得到免疫原MeIQx-KLH和包被原MeIQx-OVA。由图2可以看出,二者的紫外最大吸收峰分别在274、271nm处,在MeIQx半抗原的影响下,相对于纯蛋白KLH和OVA的最大吸收峰位置(278nm)均向左发生了偏移^[22],后期产生的相应抗体和建立的检测方法也充分证明,免疫原MeIQx-KLH和包被原MeIQx-OVA偶联成功。

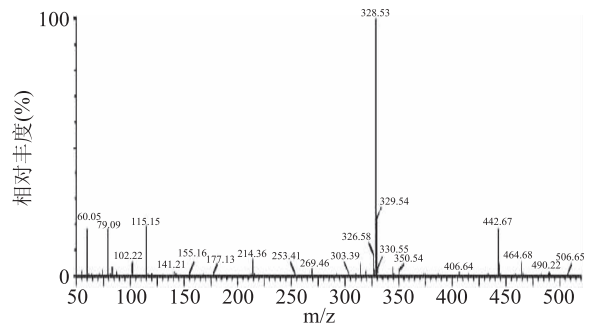


图1 MeIQx 半抗原的质谱分析图

Fig.1 Mass analysis diagram of haptens MeIQx

2.2 包被量及抗体稀释度的确定

包被量及抗体稀释度的优化结果如图3所示。由图3可以看出,包被量相同时,随着抗体稀释倍数的增大, IC_{50} 值减小。针对不同包被量,当包被量为0.05 μ g/well、抗体稀释倍数为1:10000时对应的 IC_{50} 值最小,但此时的OD值小于0.8,不利于检测。而当包被量为0.05 μ g/well、抗体稀释倍数为1:9000时,对应的OD值在1.0左右且 IC_{50} 值较小,所以最佳包被量确定为0.05 μ g/well,最佳抗体稀释倍数为1:9000。

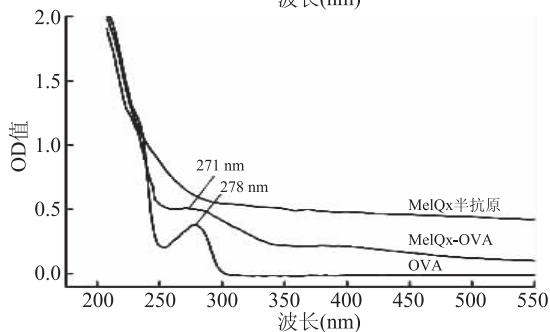
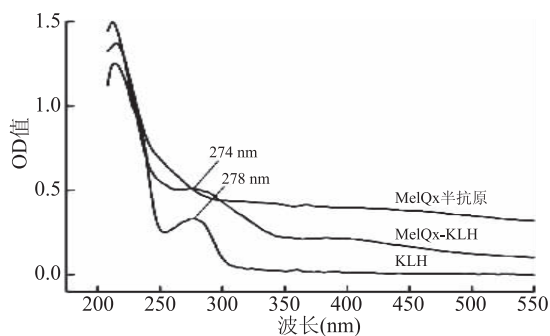


图2 MeIQx-KLH 免疫原和 MeIQx-OVA 包被原的紫外扫描图
Fig.2 Ultraviolet spectrum of immunogen MeIQx-KLH and MeIQx-OVA

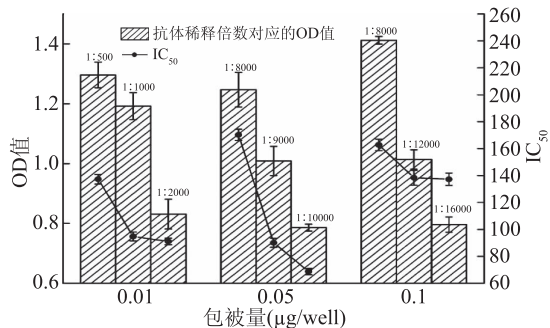


图3 包被量和抗体稀释倍数的优化
Fig.3 Optimization of the amount of immobilized coating-antigen and antibody concentration

2.3 封闭液的优化

由图4可以看出,封闭液的种类及其浓度对ELISA方法均有影响,当用BSA和明胶溶液进行封闭时,IC₅₀值均大于用乳粉溶液封闭时的IC₅₀值,且用乳粉溶液进行封闭时OD值在1.0左右,相对于1%乳粉作封闭液,0.5%乳粉作为封闭液时对应的IC₅₀值最小,因此选择0.5%的乳粉封闭液用于后续实验。

2.4 甲醇含量对间接竞争酶联免疫分析(ic-ELISA)方法的影响

为了将样品提取物充分溶解,需要用含有一定量甲醇的甲醇-PBS混合液对提取物进行复溶,但是甲醇会对ELISA方法的灵敏度产生影响。如图5所示,甲醇含量为1%、3%及5%时的IC₅₀值与甲醇含量为0时的IC₅₀值比较接近,可见该范围内的甲醇含量对ELISA方法的影响不明显;当甲醇含量达到10%时,IC₅₀值开始变大,并且随着甲醇浓度的增大,OD值开始下降,IC₅₀值明显增大,说明10%以上的甲

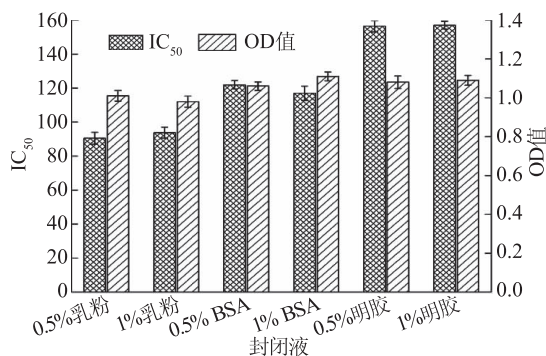


图4 封闭液的优化
Fig.4 The optimization of blocking solution

醇含量会对ELISA方法产生影响。但鉴于甲醇含量越多,越有助于样品提取物的溶解,所以本实验选取含有5%甲醇的PBS缓冲液复溶样品提取物。

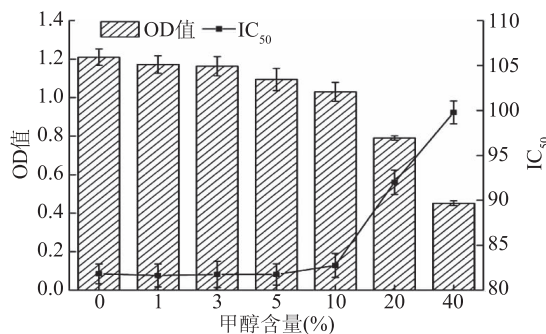


图5 甲醇含量对间接竞争酶联免疫分析(ELISA)方法的影响

Fig.5 The influence of methanol concentration on ic-ELISA

2.5 杂环胺间接竞争ELISA标准曲线的建立

经过上述一系列的优化,所建立的MeIQx杂环胺间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)的最优工作条件为:0.05 μg/well包被抗原、1:9000稀释抗体、0.5%乳粉作为封闭液。在上述条件下,按照1.2.4.5方法建立标准曲线,通过四参数拟合得到S型标准曲线如图6所示,

曲线方程为 $y = 95.11452 + (-1.38549 - 95.11452) / [1 + (x/70.25321)^{0.9012}]$ ($R^2 = 0.99984$), 通过计算得出本方法的灵敏度 $IC_{50} = (81.16 \pm 3.15) \mu\text{g/L}$, 检测限 $IC_{15} = (12.07 \pm 1.43) \mu\text{g/L}$ 。

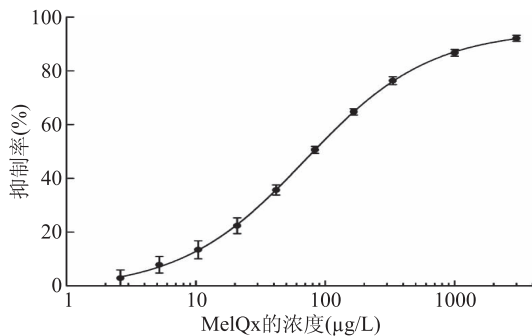


图6 间接竞争酶联免疫分析方法标准曲线
Fig.6 Standard curve of MeIQx by ic-ELISA

2.6 杂环胺抗体特异性测定

配制与MeIQx结构类似的其他几种杂环胺(IQ、

MeIQ、IQ_x、MeIQ_x、4,8-DiMeIQ_x、7,8-DiMeIQ_x、4,7,8-TriMeIQ_x、PhIP、A α C、Norharman 和 Harman) 的标准溶液,用建立的 ELISA 进行检测,测定 IC₅₀ 值并计算交叉反应率,考察所制备的杂环胺抗体对其他杂环胺的识别能力,由表 2 可以看出,MeIQ_x 抗体可以对喹啉类杂环胺(IQ、MeIQ)、喹啉咪唑类杂环胺(IQ_x、MeIQ_x、4,8-DiMeIQ_x、7,8-DiMeIQ_x、4,7,8-TriMeIQ_x) 以及吡啶类杂环胺(PhIP) 进行识别,与上述各种杂环胺的交叉反应率均在 93% 以上;而对氨基咪唑类杂环胺(以 A α C、Norharman 和 Harman 为例) 没有明显的识别能力。说明本实验所制备的

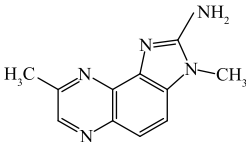
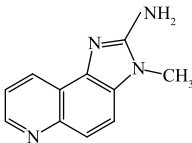
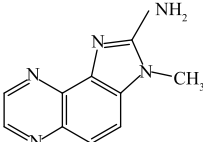
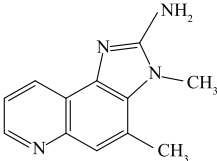
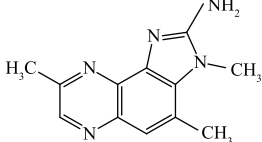
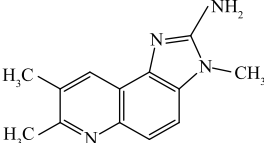
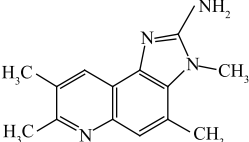
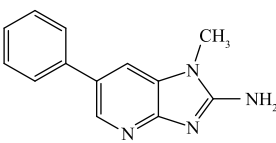
MeIQ_x 抗体能够识别大部分氨基咪唑氮杂芳烃类杂环胺,具有很好的广谱性,所建立的方法可以对食品中的喹啉类杂环胺、喹啉咪唑类杂环胺以及吡啶类杂环胺的总量进行检测。

2.7 提取液稀释倍数优化

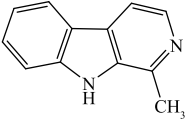
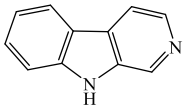
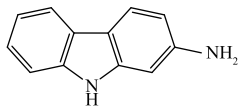
不同稀释倍数的油炸牛肉样品提取液所对应的基质曲线如图 7(A) 所示,由图 7(A) 可以看出,2 倍稀释油炸牛肉样品提取液时,基质曲线偏离标准曲线较远,说明此时的基质影响比较明显,进一步对提取液稀释 4、8 及 16 倍时,基质曲线与标准曲线基本吻合,基质影响消除,因此,油炸牛肉样品提取液经 4

表 2 交叉反应测定结果

Table 2 The detection results of cross-reactivity

化合物名称	结构	IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率 (%)
MeIQ _x		81.16	100.00
IQ		70.69	114.81
IQ _x		86.67	93.64
MeIQ		83.55	97.13
4,8-DiMeIQ _x		80.91	100.31
7,8-DiMeIQ _x		85.92	94.46
4,7,8-TriMeIQ _x		83.36	97.36
PhIP		84.15	96.44

续表

化合物名称	结构	IC ₅₀ (μg/L)	交叉反应率 (%)
Harman		>2000	<0.01
Norharman		>2000	<0.01
AαC		>2000	<0.01

倍稀释后可以用来进行 ELISA 检测;不同稀释倍数的肉松样品提取液所对应的基质曲线如图 7(B) 所示,由图 7(B) 可以看出,2 倍稀释肉松样品提取液时,基质曲线偏离标准曲线较远,说明此时的基质影响比较明显,对提取液稀释 4、8 及 16 倍时,基质曲线与标准曲线基本吻合,基质影响消除,因此,肉松样品提取液经 4 倍稀释后可以用来进行 ELISA 检测。

2.8 添加回收实验结果

以本文建立的间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)为检测手段,对油炸牛肉样品和肉松样品进行添加回收实验,结果如表 3 所示。由表 3 可知,ic-ELISA 测得的添加回收率在 91.18%~98.64% 之间,LC-MS/MS 法测得的添加回收率在 86.69%~91.11% 之间。对 ic-ELISA 测得的添加回收率与 LC-MS/MS 法测得的添加回收率进行线性回归分析见图 8。由图 8 可以看出,两种方法的检测结果有较好的一致性($R^2 = 0.9927$)。此外,对间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)和 LC-MS/MS 法的检测结果进行比对可以发现,间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA)的回收率高于 LC-MS/MS 法,其原因可能在于 ELISA 方法的样品前处理方法简单,不需要经过固相萃取等复杂的提取步骤,样品中的杂环胺标准品损失较少,由此可见,用 ic-ELISA 在对杂环胺进行检测时,操作简单且结果较为准确。

3 结论

本文通过合成杂环胺半抗原,制备了杂环胺免

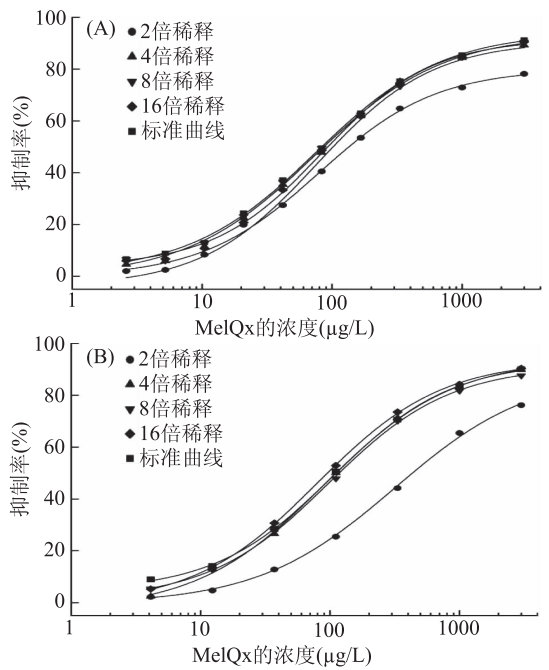


图 7 油炸牛肉样品(A)和肉松样品(B)的稀释度优化
Fig.7 Dilution optimization of fried beef sample(A) and dried meat floss(B)

疫原并获得了广谱性杂环胺多克隆抗体,本文利用该抗体建立了间接竞争酶联免疫分析方法(ic-ELISA),方法灵敏度(IC₅₀,以 MeIQx 计)为 81.16 μg/L,检测限(IC₁₅)为 12.07 μg/L。该抗体能

表 3 ELISA 和 LC-MS/MS 的回收试验结果(n=3)

Table 3 The recovery experiment results of ELISA and LC-MS/MS(n=3)

样品	添加浓度 (μg/kg)	ELISA 结果		LC-MS/MS 结果	
		回收率 (%)	CV (%)	回收率 (%)	CV (%)
油炸牛肉	60.0	93.66	12.12	86.69	4.85
	100.0	98.64	8.10	86.99	4.01
	300.0	91.51	3.56	89.44	6.03
肉松	60.0	98.41	9.67	91.11	2.44
	100.0	92.14	14.62	90.51	3.55
	300.0	91.18	4.63	89.78	3.96

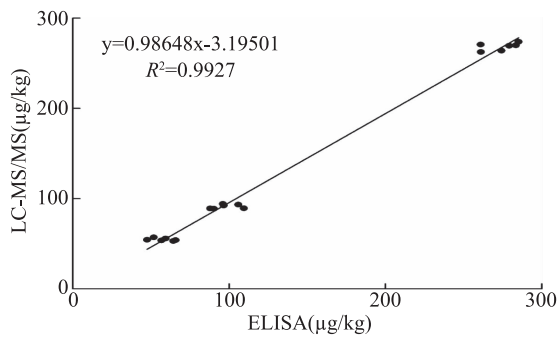


图8 油炸牛肉样品和肉松样品 ELISA 和 LC-MS/MS 回收试验结果的一致性分析

Fig.8 Consistency analysis of ELISA and LC-MS/MS recovery experiment

results of fried beef samples and dried meat floss

够广谱识别喹啉类杂环胺(IQ、MeIQ)、喹啉类杂环胺(IQ_x、MeIQ_x、4,8-DiMeIQ_x、7,8-DiMeIQ_x、4,7,8-TriMeIQ_x)以及吡啶类杂环胺(PhIP),交叉反应率均在93%以上;此外,本文建立的ic-ELISA对油炸牛肉和肉松样品中杂环胺(MeIQ_x)的添加回收率均在91.18%以上,并且该方法的检测结果与LC-MS/MS法检测结果具有较好的一致性($R^2 = 0.9927$)。综上,本文所建立的杂环胺酶联免疫检测方法可以对加工肉制品中喹啉类、喹啉类以及吡啶类杂环胺的总量进行准确、快捷的检测,可以为安全的饮食提供保障。在以后的研究中,还可以利用该抗体能够识别喹啉类、喹啉类以及吡啶类杂环胺这一广谱性特点,开展更广泛的应用,建立更加快速、更加灵敏的新型检测方法。

参考文献

[1] Alaejos M, Afonso A. Factors That affect the content of heterocyclic aromatics amines in foods [J]. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2011, 10 (20): 52-108.

[2] Oz F, Kizil M, Celik T. Effect of different cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in goose meat [J]. *Journal of Food Processing and Preservation*, 2016, 40 (5): 1047-1053.

[3] Sugimura T. Studies on environmental chemical carcinogenesis in Japan [J]. *Science*, 1986, 233 (4761): 312-318.

[4] Puangsombat K, Gadgil P, Houser T A, et al. Occurrence of heterocyclic amines in cooked meat products [J]. *Meat Science*, 2012, 90(3): 739-746.

[5] Guo H, Wang Z, Pan H, et al. Effect of traditional Chinese cooking methods on formation of heterocyclic aromatics amines in lamb patties [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2014, 23 (3): 747-753.

[6] Jiyeong Lee, Ahyoung Dong, Kyunghye Jung, et al. Influence of extra virgin olive oil on the formation of heterocyclic amines in

roastedbeef steak [J]. *Food Science and Biotechnology*, 2011, 20 (1): 159-165.

[7] 孟晓霞,彭增起,冯云.煎炸对肉制品中杂环胺及多环芳香烃化合物含量的影响及其控制措施[J].*肉类研究*,2009(6):52-55.

[8] 徐琦,杨洪生,吴光红,等.超高效液相色谱-电喷雾串联质谱法同时测定鱼类加工品中12种杂环胺类化合物[J].*南方水产科学*,2012,8(4):7-15.

[9] Pais P, Moyano E, Puignou L, et al. Liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a routine method for the analysis of mutagenic amines in beef extracts [J]. *J Chrom A*, 1997, 778(1): 207-218.

[10] 林翠萍.肉制品中杂环胺的LC-MS/MS检测方法的研究[D].天津:天津科技大学,2012.

[11] Kataoka H, Nishioka S, Kobayashi M, et al. Analysis of mutagenic heterocyclic amines in cooked food samples by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detector [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2002, 69(5): 682-689.

[12] Fernando De Andrés, Mohammed Zougagh, Gregorio Castañeda, et al. Simultaneous determination of six nonpolar heterocyclic amines in meat samples by supercritical fluid extraction-capillary electrophoresis under fluorimetric detection [J]. *Electrophoresis*, 2010, 31: 2165-2173.

[13] 王敏,郭德华,丁卓平.食品中杂环胺检测的分析方法[J].*现代科学仪器*,2010(6):145-153.

[14] 李可,韩雪,谢美娟,等.SPE-UPLC-MS/MS法测定酱卤鸡腿老汤中10种杂环胺[J].*食品工业*,2017,38(8):306-310.

[15] 印瑜洁,薛斌.硅胶柱层析分离煎炸中极性和非极性组分的研究[J].*粮油与油脂*,2016,29(6):72-74.

[16] Martin Vanderlaan, Bruce E Watkins, Mona Hwang, et al. Monoclonal antibodies to 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and their use in the analysis of well-done fried beef [J]. *Carcinogenesis*, 1989, 10(12): 2215-2221.

[17] Wei S, Ran X, Hu G, et al. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline (IQ) in processed foods [J]. *Food Analytical Methods*, 2016, 9(4): 1036-1045.

[18] 王静,马宁宁,宋洋.杂环胺人工抗原的合成以及多克隆抗体的制备[J].*食品科学*,2017,38(4):45-50.

[19] 贾爱娟,刘姚,张挺,等.基于3种载体蛋白的莱克多巴胺抗原的合成与检测[J].*广东农业科学*,2017,44(7):125-131.

[20] Wang Shuo, Allan Robin D, Skerritt John H, et al. Development of a class-specific competitive ELISA for the benzoylphenylurea insecticides [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, 46(8): 3330-3338.

[21] 李利洁.微波加热中杂环胺 PHIP 的形成规律及抑制机制[D].无锡:江南大学,2018.

[22] 赵肃清,蔡燕飞,雷红涛,等.农药甲胺磷人工抗原的光谱鉴定研究[J].*光谱学与光谱分析*,2004,24(2):207-209.