

实验技术与方法

间接竞争酶联免疫吸附法测定黄原胶

秦红梅¹ 黄 颢¹ 郑剑玲² JOHN H. H WILLIAMS³

(1. 辽宁省卫生监督所, 辽宁 沈阳 110005; 2. 辽宁中医学院职业技术学院, 辽宁 沈阳 110101;

3. University of Chester, Chester CH1 4BJ UK)

摘要:目的 建立间接竞争酶联免疫吸附法测定食品中的黄原胶。方法 应用黄原胶抗原免疫的绵羊多克隆抗体,采用间接竞争酶联免疫吸附方法,对黄原胶进行检测分析。结果 黄原胶的检测限为 0.1 ng/ml,有效检测区间为 0.1 ~ 1 × 10³ ng/ml。组间及组内差异均小于 10%。烧烤酱和凯撒沙拉酱中的黄原胶检测限为 50 ng/ml,有效检测区间为 50 ~ 5 × 10³ ng/ml。烧烤酱和凯撒沙拉酱中黄原胶回收率分别为 72.0% ~ 89.8% 和 102.6% ~ 119.0%。结论 本方法简单、快速、成本低,重现性好,适合检测食品中的黄原胶。

关键词:黄原胶;酶联免疫吸附测定;食品

Determination of Gum Xanthan by Indirect Competitive Enzyme-linked Immunosorbent Assay

QIN Hong-mei, HUANG Biao, ZHENG Jian-ling, JOHN H. H WILLIAMS

(Liaoning Health Inspection Institute, Liaoning Shenyang 110005, China)

Abstract: Objective To determine xanthan by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in food stuffs. **Method** Sheep against xanthan polyclonal antibodies have been used in IC-ELISA to detect xanthan. **Results** The limit of detection for this assay was 0.1 ng/ml for pure xanthan. The active range was between 0.1 and 1 × 10³ ng/ml. Intra-assay and inter-assay coefficients of variation (CV) were lower than 10% within the active range of the assay. The limit of detection for BBQ sauce and Caesar dressing was 50 ng/ml while the active range was between 50 and 5 × 10³ ng/ml. Recovery rates of this assay were between 72.0% ~ 89.8% in BBQ sauce and 102.6% ~ 119.0% in Caesar dressing. **Conclusion** An IC-ELISA assay was developed for detection of xanthan, which could be simple, rapid, money saving and reliable for detecting xanthan in food stuffs.

Key word: Xanthan; Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; Food

黄原胶,水溶胶的一种,是 *Xanthomonas campestris* 细菌分泌至细胞外的多聚糖。黄原胶的基本化学结构见(图 1),为五聚糖的重复多聚体。被我国及美国 FDA 允许作为食品添加剂,在欧盟被允许作为食品中的乳化剂和稳定剂^[1]。在食品中黄原胶主要用于沙拉酱、汤料、调味汁、甜点、卤汁、饮料以及加工食品、半加工食品和方便食品^[2]。黄原胶还可以作为骨胶和面筋的替代物以满足某些特殊健康人群或宗教信仰人群的需求。由于黄原胶能够增加食品的粘稠度,形成胶体,所以有少数不法食品生产企业利用黄原胶制造假冒伪劣食品,如以牟取暴利为目的,向保健食品中违规添加黄原胶等水溶胶。因此,建立食品中黄原胶的检测方法是十分必要的。

对黄原胶等水溶胶的分析通常需要结合物理和化学的方法才能完成^[3],复杂、耗时且检测费用高。例如电泳法或免疫印迹法。酶联免疫吸附法简易、

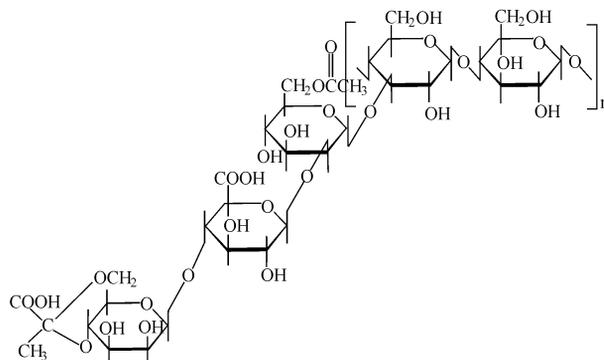


图 1 黄原胶分子式

节约(已被用于区分一些不同的胶体^[4]),亦可降低食品中复杂的基质对分析方法的干扰。因此,本研究采用酶联免疫吸附法对黄原胶进行测定。

1 材料与方法

1.1 材料

多克隆抗体(UC-XAN-sp-01,以下称第一抗体)来自黄原胶免疫绵羊(Micropharm Ltd.,

作者简介:秦红梅 女 副主任医师

Llandeilo, UK)。过氧化物酶结合抗绵羊特异性抗体 (Peroxidase-conjugated anti-sheep specific antibody, A3415, 以下称第二抗体) Sigma 产品。黄原胶及其他试验用胶体 (淀粉、魔芋、果胶、Seyal 阿拉伯橡胶、塞内加尔阿拉伯橡胶、阿拉伯胶、瓜尔胶、哥地胶、结冷胶、卡拉胶、康柏树胶) 来自 University of Chester, UK。除特殊标出, 所用试剂均为分析级 (Sigma Chemical Co. Ltd., Poole, UK)。酶标底物 (TMB) Vetoquinol Ltd., Bicester, United Kingdom。ELISA 缓冲液 氯化钠 140 mmol/L, 氯化钾 3 mmol/L, 磷酸氢二钠 2 mmol/L, 磷酸二氢钾 10 mmol/L, pH 7.2。黄原胶标准液 黄原胶在 20 下溶于 ELISA 缓冲液, 浓度分别为: 1 000、100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01、0 $\mu\text{g/ml}$ 。洗涤缓冲液 ELISA 缓冲液含有 0.05% (体积分数) Tween 20。96 孔聚苯乙烯酶标板 Immulon 4HBX, Dynex Technologies Ltd., Worthing, West Sussex, UK。酶标仪 Dynex MRXII。烧烤酱和凯撒沙拉酱 Tesco, Chester, UK。

1.2 方法

1.2.1 试样的处理 称量 0.6 g 试样, 加入 2.4 ml ELISA 缓冲液, 旋转振荡 5 s 后取 1 ml 至 1.5 ml 于离心管中, 在 20 下离心 (离心力即相对径向加速度为 5 000 g) 20 min。吸取上清液备用。

凯撒酱 IC-ELISA 条件 第一抗体以 ELISA 缓冲液稀释至 1/2 000, 第二抗体以含有 3% (重量体积比) 脱脂奶粉的洗涤缓冲液稀释至 1/2 000。烧烤酱 IC-ELISA 条件 第一抗体以 ELISA 缓冲液稀释至 1/5 000, 第二抗体以含有 3% (重量体积比) 脱脂奶粉的洗涤缓冲液稀释至 1/2 000。

1.2.2 检测 用 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 的黄原胶标准液包被聚苯乙烯酶标板的反应孔, 100 $\mu\text{l/孔}$ 。置于 4 下过夜。之后弃去孔内溶液, 用含 3% (重量体积比) 的脱脂奶粉的 ELISA 缓冲液覆盖, 250 $\mu\text{l/孔}$, 在 37 下放置 1 h。弃去孔内溶液, 用洗涤缓冲液洗脱 3 次。再分别加入含待测试样及第一抗体 (稀释至 1/5 000) 的 ELISA 缓冲液, 每孔 50 μl , 在 25 下放置 1 h, 之后洗脱 3 次。加入第二抗体 (用含有 3% (重量体积比) 脱脂奶粉的洗涤缓冲液稀释至 1/5 000), 100 $\mu\text{l/孔}$ 。在 25 下放置 1 h, 之后洗脱 3 次。加入 100 $\mu\text{l/孔}$ 的酶标底物 (TMB)。在暗箱中 25 下放置 1 h。每孔加入 50 μl 1 mol/L 磷酸结束反应。酶标仪以波长 450 nm 检测和读取数据。

1.2.3 校正曲线的制作 黄原胶标准液浓度分别为 1 000、100、10、1、0.1、0.01、0.001、0.000 1、0.000 01、0 $\mu\text{g/ml}$ 。检测步骤同 1.2.2。

2 结果

以 IC-ELISA 法对黄原胶标准溶液测定, 获得一典型的校正曲线 (图 2)。在波长 450 nm 下吸光值随黄原胶溶液浓度的增加而降低。黄原胶的最低检测限为 0.1 ng/ml。有效检测范围为 0.1 ~ 1 $\times 10^3$ ng/ml。组内差异低于 7.01%, 组间差异低于 10% (见表 1)。该方法在检测含有黄原胶成分的食品时检测限有所升高 (为 50 ng/ml)。对于凯撒沙拉酱和烧烤酱, 检测限为 50 ng/ml, 有效检测范围为 50 ~ 5 $\times 10^3$ ng/ml。将黄原胶标准液加入不含黄原胶的烧烤酱和凯撒沙拉酱中进行回收率实验, 结果见表 2。凯撒沙拉酱中黄原胶的回收率在 72.0% ~ 89.8%, 烧烤酱中黄原胶的回收率在 102.6% ~ 119.0%。

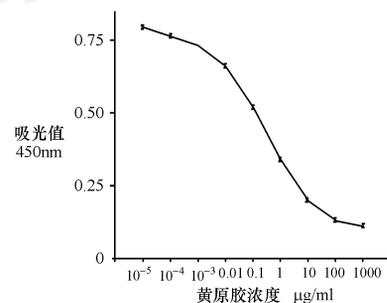


图 2 IC-ELISA 黄原胶校正曲线

表 1 黄原胶 IC-ELISA 法的精密度

黄原胶浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	1	0.1	0.01	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	0
组内差异 (%) $n=8$	7.01	5.04	3.15	3.73	1.57	6.58	3.08
组间差异 (%) $n=6$	6.15	8.40	8.33	9.26	8.55	9.18	6.34

注: n 为检测次数。

表 2 黄原胶 IC-ELISA 法回收率

黄原胶加标回收浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	5	0.5	0.05
烧烤酱中黄原胶回收率 (%)	89.8	72.0	84.0
凯撒沙拉酱中黄原胶回收率 (%)	119.0	118.0	102.6

通过对淀粉、魔芋、果胶、Seyal 阿拉伯橡胶、塞内加尔阿拉伯橡胶、阿拉伯胶、瓜尔胶、哥地胶、结冷胶、卡拉胶及康柏树胶等水溶胶的测定显示, 在黄原胶浓度高达 1 mg/ml 时仍没有抑制反应发生 (图 3), 显示本方法对黄原胶具有高度的特异性。黄原胶溶液 (1 mg/ml) 在 80 下加热 1 h, 用液态氮速冻室温解冻重复 7 次, 以检测本方法的稳定性 (图 4、5), 不论加热还是冷冻黄原胶都没有对校正曲线产生明显的影响。

3 讨论

作为五聚糖的重复多聚体, 黄原胶是多分散分子构成物, 其水溶胶的特性决定其在食品中使用量较少, 加之食品中复杂的基质成分 (游离糖、蛋白质、脂质等) 的干扰, 都影响常规方法对黄原胶的分析。

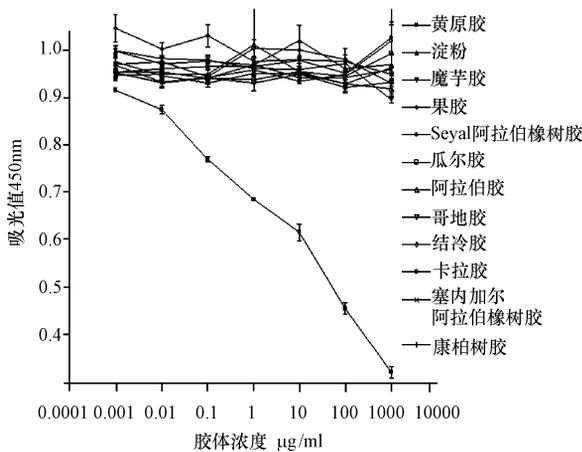


图3 IC-ELISA 黄原胶与其他水溶胶的交叉反应

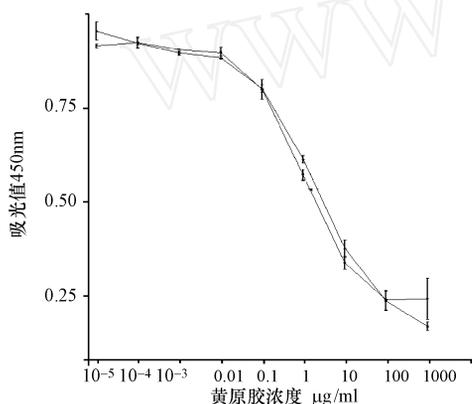


图4 加热对黄原胶 IC-ELISA 法影响

本研究成功地建立了简单、快速的黄原胶酶联免疫吸附分析法。在本研究中,以黄原胶作抗原产生多克隆抗体,再通过抗原与抗体的特异性结合,使得在食品中的微量黄原胶被检测出,因此具有高敏感性。同时未出现抗黄原胶抗体与其他胶体(抗原)的交叉反应,反映了本方法的特异性。冷冻和解冻过程没有影响本方法,提示在样品冷冻保藏的条件下本检测方法仍能够灵敏并特异地检测黄原胶。加热过程亦未对本方法产生影响,这意味着食品的加工过程将不会影响检测结果。本次对烧烤酱、凯撒沙拉酱的检测显示,可以用本方法对黄原胶进行检测分析。

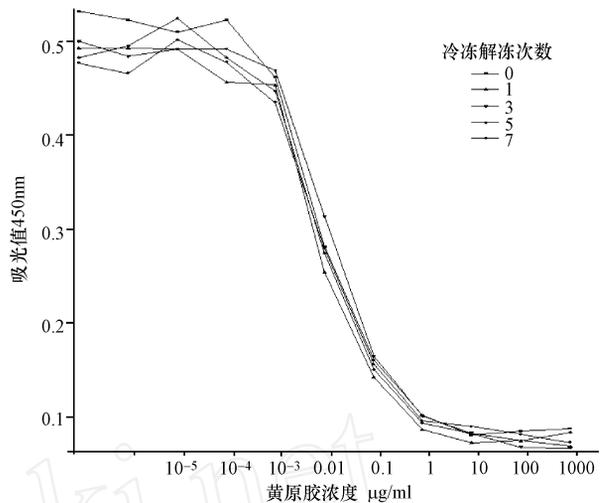


图5 冷冻和解冻对黄原胶 IC-ELISA 法影响

尽管灵敏度不如对纯黄原胶的测定,但仍能检测到低水平的黄原胶。良好的回收率表明了对黄原胶量检测的准确度好。抗体的特异性保证了在含有其它水溶胶成分或大量食品基质的影响因素存在的条件下能够检测出黄原胶。如果在食品中发现黄原胶检测阳性,则极大程度显示黄原胶的存在。因此,本方法对在食品中测定黄原胶的研究具有实践性意义。

参考文献

- [1] UK FSA. Current EU approved additives and their E Numbers [EB/OL]. [2007 - 07 - 27] <http://www.food.gov.uk/safereating/chemsafe/additivesbranch/enumberlist>.
- [2] GARCIA-OCHOA F, SANTOS V E, CASAS J A, et al. Xanthan gum: production, recovery, and properties [J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18(7): 549-579.
- [3] BORDI F, PARADOSSI G, RINALDI C, et al. Chemical and physical hydrogels: two casesystems studied by quasi elastic light scattering [J]. *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, 2002, 304(1-2): 119-128.
- [4] PICKLES N A, IRELAND H E, SL-ASSAF S, et al. Applications of immunoassay in hydrocolloid research [C]. // *Gums and stabilisers for the food industry: Designing structure into Foods*. Royal Society of Chemistry, United Kingdom, 2004.

[收稿日期:2007 - 12 - 05]

中图分类号:R15;TS202.3

文献标识码:B

文章编号:1004 - 8456(2008)03 - 0241 - 03

[上接]

“食品营养标签管理规范”颁发了,为了这个规范,有关研究人员做了大量的基础性工作。要达到指引消费者合理选择食品,促进膳食营养平衡,保护消费者知情权和身体健康的目的,规范仅是第一步,接着的工作还很多:实验室的、宣传教育的(对消费者、从业者、管理者)。在宣传、贯彻中可能会有疑问、异议,欢迎大家关注、行动、论述。