

酶联免疫分析在调味料安全质量检测中的应用

杨明泉

(广东美味鲜调味食品有限公司, 广东 中山 528401)

摘要: 酶联免疫分析是一种基于特异抗原抗体的反应、具有灵敏、简便而且成本低廉的免疫分析技术。本文对这种技术进行概述, 详细评述该技术在调味料污染物检测中的应用, 包括微生物污染以其生物毒素残留, 违禁有机化合物污染和食品过敏原残留等; 同时阐述了该技术在调味料质量安全监控的应用前景。

关键词: 酶联免疫分析; 调味料; 质量检测

中图分类号: TS207.7; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)05-0479-04

Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay in Quality Analysis of Condiments

YANG Ming-quan

(Gongdong Meiweixian Flavoring Foods Co. Ltd, Zhongshan 528401, China)

Abstract: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) is a sensitive, convenient and economical immunoassay technology established on the combination of the highly specific antigen-antibody reaction. In this paper, this technology was briefly introduced, and its application in quality analysis of condiments was commented in detail, including pathogenic microorganism contamination, biotoxins, forbidden organic compounds and food allergens. The application prospects of ELISA in the quality control of condiments were also presented.

Key words: ELISA; condiments; quality analysis

调味料可分为传统调味料和复合调味料。酱油、醋、味精等传统调味料是居家的必需品, 复合调味料以不同类型调味原料配搭, 经特殊风味设计、特殊工艺赋予食品和菜肴特殊风味。随着食品工业、餐饮业和家庭厨房的现代化, 调味料的应用范围越来越广, 生产原料来源越来越丰富, 生产加工技术越来越复杂, 调味料的质量安全问题受到日益关注。调味料主要质量问题包括: 原料以及加工贮藏过程中的微生物污染和生物毒素残留; 原料的农兽药残留; 加工过程中食品添加剂使用超标; 原料含有食物过敏原在最终产品中残留; 不法生产商加入违禁工艺助剂等; 调味料在原料、生产、贮藏、运输、消费等各个环节都存在各种不同类型不同程度的污染物^[1]。调味料中污染物常用的检测方法如气相色谱法、高效液相色谱法等存在操作步骤多, 样品前处理烦琐的问题, 而且所需设备昂贵, 操作时需要专门的技术人员, 难以覆盖调味料检测的各个环节。现代调味料发展趋势要求相应的检测技术向着系列化、速测化、便携化的方向发展。酶联免疫分析 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 因其操作程序的规范化、简单化和检测的高

灵敏性, 在调味料污染物检测中表现出其独特的优势, 本文综述 ELISA 在调味料多种不同类型污染物的检测应用情况。

1 ELISA 检测技术原理与方法

ELISA 是以抗原与抗体的特异性反应为基础, 加上酶与底物的特异性反应, 使反应的灵敏度放大的一种技术。ELISA 是根据酶反应底物显色的深浅进行定性或定量分析, 由于酶促反应的放大作用使免疫反应的灵敏度大大提高。随着蛋白质分离纯化技术和单克隆抗体制备技术的不断发展, 各种高纯度抗体、单克隆抗体的应用, 使得该检测技术在特异性、灵敏度方面都有了大幅度的提高, 具有精确的定量分析能力, 使用范围不断扩大, 成为各种复杂体系中痕量物质分析定量的主要技术手段。ELISA 具有选择性好、灵敏度高、结果判断客观准确、实用性强等优点, 弥补了经典化学分析方法和其它仪器测试手段的不足, 目前已广泛应用于临床医学、生物学和分析化学等领域, 在食品安全检测分析中也有不少应用报道^[3]。

2 ELISA 在调味料质量检测中的应用现状

收稿日期: 2007-12-28

调味料是一种复杂的食品化学体系,成分复杂,针对体系里痕量污染物的检测分析一般都要经过分离提取等前处理过程,而 ELISA 所特有的专一性和敏感性,使得这个步骤可以省略,可直接进行定量定性分析^[2]。该技术具有操作简便、灵敏度高和测试成本低等优点,近年来,已在调味料质量检测中有较多应用报道,检测的污染类型主要包括:微生物污染、生物毒素污染、违禁有机化合物残留、食品过敏原污染等。

2.1 微生物污染及生物毒素残留的检测

调味料在原料采收、加工贮藏过程中都易受到微生物的污染,导致成品或半成品微生物超标,这是当前我国调味料生产中面临的主要问题之一。调味料属于一类特殊的食品配料,为了不影响调味料的成分和原有风味,对调味料原料加工前一般不作任何处理,加工时的灭菌处理通常选择低温烘烤、紫外灭菌、臭氧灭菌和辐照灭菌等温和的加工手段,调味料中常见霉菌、酵母菌及耐酸菌、好气性嗜热菌和蜡样芽孢杆菌等微生物污染^[3]。因此,寻找快速方便的检测方法对调味料的微生物污染进行监控是必要的。早在 1986 年, Lin 和 Lister 采用 ELISA 方法检测到番茄酱中 3 种霉菌,该方法可检测番茄酱中 1 $\mu\text{g/g}$ 干霉菌样品^[4]。Kisko 和 Stegeman 采用青霉素和曲霉菌的特异的多聚糖作为抗原制备抗体,建立竞争 ELISA 检测到红辣椒粉里的这些病原真菌,该法比真菌克隆计算法更加灵敏,更加快速^[5]。Anand 和 Rati 采用赭曲霉的菌丝体为抗原制备特异抗体,建立间接非竞争 ELISA 检测到红辣椒粉中赭曲霉的存在,该方法能预测调味料中的真菌的生物量^[6]。

在生物毒素污染方面,施敬文等对香辛料中多种生物毒素包括黄曲霉毒素、伏马毒素、赫曲霉毒素等的污染状况进行了调研,结果表明香辛原料成分中霉菌污染是普遍的,灭菌处理可大幅度降低霉菌污染,但是霉菌毒素的清除是非常有限的^[7]。Sharma 和 Ferreira 采用一种放大式 ELISA 法对马铃薯沙拉、香草牛至调味酱等半流式食品中的肉毒杆菌毒素进行检测,发现该法对 A、B、E 和 F 四种类型的肉毒杆菌毒素都有很好的灵敏性,检测限可低至 2 ng/mL ^[8]。Azzazi-Fazeli 和 Noviani 用 ELISA 方法检测印尼传统调味料花生辣椒酱的黄曲霉毒素含量,发现市场上 75% 的产品含有黄曲霉毒素,该结果和 HPLC 检测结果一致^[9]。这些研究结果说明了 ELISA 分析能预测调味料的微生物污染程度,并且能准确检测由微生物污染所产生的生物毒素的含量。因此,ELISA 分析技术将对调味料原料采收、加工过程中的微生物污染程度快速检

测有很好的应用前景。

2.2 违禁有机化合物残留污染

农产品中的农兽药残留,通过食品加工途径向食品体系转移,已成为食品安全的突出问题。现代调味料为了实现调味料功能的最大化,其生产原料来源更加复杂,包括蔬菜、肉制品和水产品等等,生产原料的农兽药残留是调味料一个主要违禁有机化合物污染源。Amita 和 Roshni 通过制备针对高毒农药硫丹的特异抗体建立竞争 ELISA 方法来检测红辣椒和胡椒粉中残留的硫丹是否超标,该方法检测限可低于 1.4 ng/g ^[10]。因此建立快速灵敏的 ELISA 方法来检测调味料原料中农兽药残留是一项很有应用前景的新技术。

调味料生产中为了使风味更加浓郁,常使用动植物蛋白水解液作为辅料。酸法水解生产的动植物蛋白液含有氯丙醇,对人体的肝、肾和神经系统有损害,是调配酱油和各种复合调味酱的一大污染源^[11]。目前,国内外常用氯丙醇检测方法包括气相色谱法、气质联用法等,这些方法使用仪器贵重,需专业人员操作,不适于调味料的大规模检测的需要。黄晓钰等制备了针对氯丙醇特异识别的单克隆抗体,并建立了快速检测酱油中的痕量氯丙醇的 ELISA 方法^[12]。ELISA 分析方法为调味料氯丙醇污染监控提供一个快速的技术手段,并且对其它违禁添加物的监测具有应用前景。

调味料在加工过程中添加的合成食品添加剂和工艺助剂等有机化合物,近年来已发现存在慢性毒性或致癌、致畸作用。这些违禁有机化合物残留,通过加工途径在最终产品中残留,成为调味料污染物的一大类型。洋红酸是一种蒽醌类天然色素,常用作调味料的添加剂,但是该添加剂使用必须精制,其杂质可使人体过敏,导致过敏性哮喘等疾病。Yoshida 和 Takagaki 建立了针对食品添加剂洋红酸的竞争 ELISA 分析法检测到面酱和海鲜酱等红色调味料中的洋红酸含量超标,该法检测限低至为 0.2 mg/g ,是一种快速灵敏的检测方法^[13]。苏丹红是一种人工合成的油溶性的化工染色剂,是一种潜在的致癌物,因其在调味料体系中色泽鲜亮持久,个别企业违法添加到调味料中,造成食品安全事故。沈建忠等建立检测苏丹红的 ELISA 分析方法,可检测红辣椒酱和红辣椒油中苏丹红的含量,该法操作方便,成本低而且灵敏度高,适合于对大批量样品进行筛选^[14]。韩丹等建立测定苏丹红的间接 ELISA 分析方法,对番茄酱和辣椒面中苏丹红含量进行检测,灵敏性高,检测限为 0.12 $\mu\text{g/L}$ ^[15]。这些研究结果表明,ELISA 分析法是一种很好的监控手段,能够准确检测调味料中食品添加剂超标情况以

及一些违禁化学添加物的残留量,提高调味料的食用安全性。

2.3 调味料中食品过敏原的检测

食品过敏能引发包括皮肤湿疹、哮喘、呕吐、腹泻、肠胃痉挛和过敏性休克等临床症状,是一个影响公众健康的安全问题。一般来说,食品过敏原仅占食品总蛋白的极小一部分,但是微量的食品过敏原即可引起严重的过敏反应。调味料原料来源丰富,特别复合调味料成分复杂,生产过程中为了保持原料的特殊风味,加工程度不高,而且最终成品往往不标明各种原料的成分,个别原料含有过敏原生产者往往不加重视,常造成调味料食用过敏事故。因此调味料中含有的食品过敏原是公众健康的一个潜在威胁,必须建立相应检测方法来实现监控。

目前,调味料中过敏原的检测手段主要有血清特异性 IgE 检测分析、组胺释放分析和免疫分析法,其中免疫方法应用较为广泛。Oancea 和 Stoia 报道了用免疫亲和色谱在调味料中检测小麦麸质的研究报告,报告指出这些调味料中麸质的含量有 2 mg/kg,可导致对麸质过敏人群的肠胃不适^[16]。ELISA 检测试剂盒作为一种特异性强、灵敏度高而且快速的痕量过敏原检测方法,现在已有针对鸡蛋、牛奶、花生、小麦等来源的过敏原 ELISA 检测试剂盒。这些试剂盒对调味料中食品过敏原污染程度起重要监测作用。Bando 和 Tsuji 采用夹心 ELISA 方法检测了一系列豆类加工食品中的大豆过敏原含量,发现在豆腐、豆奶等豆类食品中含有大豆过敏原,而在传统发酵制品如纳豆、酱油和豆酱等豆类调味料中不含有过敏原^[17]。Hashimoto 和 Yoshida 用 ELISA 分析方法研究小麦过敏原和大豆过敏原在酱油发酵过程中的分解和消除机制^[18]。Sletten 和 Lovberg 采用 ELISA 分析法检测混合香料中痕量干酪素过敏原,检测结果不同样品中干酪素含量为 1~1.5 mg/kg^[19]。Kawagoshi 和 Kamei 报道了一则关于黑胡椒粉中荞麦过敏原的 ELISA 检测报告,结果显示黑胡椒粉中荞麦过敏原含量达 0.1 mg/g,有潜在的风险^[20]。这些研究结果表明调味料存在食品过敏原残留,不同类型的调味料的过敏原残留程度不一样。调味料的加工形式决定过敏原的残留量,传统发酵方法加工的调味料一般不含有过敏原,而其它的加工手段往往残留过敏原。ELISA 分析可监控调味料生产过程中的食品过敏原的残留情况,从而选择合理的加工手段,降低调味料的过敏原残留引起的安全问题。

3 ELISA 在调味料质量检测中的应用前景

国内外对食品安全问题十分重视,调味料的质量安全也日益引起人们的高度关注。欧盟规定调味料生产必须遵守食品卫生法规、食品中污染物的管理通则、食品中允许使用的添加剂指导规则、调味料中使用的添加剂、香料物质检测程序等通用标准^[21]。我国是调味料生产和消费大国,调味料产品种类繁多,并且随着技术的发展,各类新型调味料不断涌现,涉及调味料加工的工艺日益复杂。目前我国调味料的质量安全状况令人担忧,酱油类调味料非法添加酸法水解蛋白,味精类调味料掺盐造假,食醋中含有工业冰醋酸等报道屡见报端。粉状调味料质量安全隐患更为严重,使用霉变的陈化粮、工业色素、过期香精等原料进行生产的企业屡见曝光。调味料的质量好坏,不仅仅会影响到食用的口感,还会影响到消费者的健康。因此,必须研究开发简便快速的检测方法来加强调味料污染物的监控。

目前用于调味料体系中残留污染物检测的方法有很多,但是都各有其缺点和局限性:微生物学方法且只能定性不能准确定量;薄层色谱法只能半定量,灵敏度低;气相色谱法和高效液相色谱法需复杂的样品预处理,设备昂贵、检测费用高,难以推广使用。与这些检测方法相比,ELISA 具有以下优势:高特异性和灵敏性,检测范围在 ng 至 pg 水平,属于痕量分析技术。廉价、操作简单、样品处理量大。这些优势正好满足调味料污染物残留检测的需要。调味料是一种成分复杂,体系中污染物形式多样。另外,调味料产品种类繁多,常以小包装的形式销售,检测量大。这些因素决定了调味料污染物检测需要一系列相关 ELISA 检测技术来支持。因此,应加快相关 ELISA 试剂盒的研究开发以及产业化进度,建立基于 ELISA 分析技术的调味料污染物监控平台,建立调味料质量安全体系,促进调味料行业健康发展。

参考文献

- [1] 曹雁平,于群.调味料的作用、安全风险与对策[J].中国调味品,2006,1:10-15
- [2] 张也,刘以祥.酶联免疫技术与食品安全快速检测[J].食品科学,2003,24(8):200-204
- [3] 李宗军,杨雨平,宋亚娟.中式肉品加工中常用香辛料的微生物学研究[J].食品科学,2005,26(2):46-50
- [4] Clark, M. F., Lister, R. M., et al. ELISA techniques. Methods in Enzymology[M], 1986, 118
- [5] Anand, S. and E. R. Rati. An enzyme-linked immunosorbent assay for monitoring of *Aspergillus ochraceus* growth in

- coffee powder, chili powder and poultry feed[J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(1): 59-65
- [6] Kisko, G., H. Stegeman, et al. Detection of molds in paprika powder by enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Acta Alimentaria, 1998, 27(1): 97-103
- [7] 施敬文, 韩伟, 顾鸣. 香辛料中多种生物毒素的污染状况调查[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(5): 589-592
- [8] Sharma, S. K., J. L. Ferreira, et al. Detection of type A, B, E, and F Clostridium botulinum neurotoxins in foods by using an amplified enzyme-linked immunosorbent assay with digoxigenin-labeled antibodies[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(2): 1231-1238
- [9] azzazi-Fazeli, E., C. T. Noviandi, et al. A survey of aflatoxin B1 and total aflatoxin contamination in baby food, peanut and corn products sold at retail in Indonesia analysed by ELISA and HPLC[J]. Mycotoxin Research, 2004, 20(2): 51-58
- [10] Amita Rani, B. E., K. R. Roshni, et al. Immunoanalysis of Endosulphan Residues in Spices[J]. Food and Agricultural Immunology, 2003, 15(2): 105-113
- [11] 王顺民, 董文宾, 赵旭博, 等. 现代气相色谱及质谱技术在分析调味品中氯丙醇的应用(上) [J]. 中国调味品, 2004, 12: 37-40
- [12] Huang, X., H. Lei, et al. Preparation of hapten comprising 3-chloro-1,2-propanediol and monoclonal anti-3-chloro-1,2-propanediol antibody for immunoassay. Application: CN, (South China Agricultural University, Peop. Rep. China). 2006
- [13] Yoshida, A., Y. Takagaki, et al. Enzyme immunoassay for carminic acid in foods[J]. Journal of AOAC International, 1995, 78(3): 807-11
- [14] Shen, J., F. He, et al. ELISA kit and method for detection of sudan red residue in chili-containing food. Application: CN (Beijing Wanger Biotechnology Co., Ltd., Peop. Rep. China). 2006
- [15] 韩丹, 于梦, 吴梅. 酶联免疫吸附分析法测定食品中的苏丹红 I 号[J]. 分析化学, 2007, 35(8): 1168-1170
- [16] Oancea, S. and M. Stoia. Identification of gluten in condiment foodstuffs by the immunochromatographic test[J]. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 2006, 12(1): 95-100
- [17] Bando, N., H. Tsuji, et al. Quantitative analysis of Gly m Bd 28K in soybean products by a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1998, 44(5): 655-664
- [18] Hashimoto, Y., T. Yoshida, et al. Clarification of decomposition/removal mechanism for wheat and soybean allergens in shoyu brewing[J]. Shoyu no Kenkyu to Gijutsu, 2005, 31(6): 347-351
- [19] Sletten, G. B., K. E. Lovberg, et al. A comparison of time-resolved fluoroimmunoassay and ELISA in the detection of casein in foodstuffs[J]. Food and Agricultural Immunology, 2005, 16(3): 235-243
- [20] Kawagoshi, M., M. Kamei, et al. Establishment of allergy substances in processed foods[M]. Annual Report of Osaka City Institute of Public Health and Environmental Sciences, 2003, 65: 83-84
- [21] 许建军, 周凤娟. 我国调味品安全标准存在的主要问题分析[J]. 中国调味品, 2006, 11: 4-8

(上接第 492 页)

在香料工业中是一种重要的香料原料, 被广泛应用于化妆品香料和水果类食品香料; 又如诺卡酮(nootkatone), 它由伏令夏橙烯转化而成的, 在柚果高产优质栽培研究和香气成分鉴定中证明, 明显影响成品柚质量的高低, 可以作为成品柚的最主要特征香气物质。

3.2.2 柚内白皮的精油组成

由柚内白皮精油提取物的总离子流色谱图鉴定了 22 种化合物, 占总组成的 80.42%。结果表明(表 2), 江永香柚内白皮精油提取物的组成与外黄皮精油提取物的组成完全不同。柚外黄皮中精油含量中以碳氢化合物类成分组成为主, 碳氢化合物类成分组成占了精油总量的 85%以上; 相反, 柚内白皮精油组成则以含氧化合物类成分组成为主, 碳氢化合物类成分组成为

辅, 含氧化合物类成分组成占了精油总量的 85%以上。在江永香柚内白皮精油组成中, 主要成分为 9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)- (十八碳二烯酸, 32.28%) 和 Hexadecanoic acid (棕榈酸, 23.05%), 两者占了总含量的近 60%, 其次为 Ethylene oxide heptamer (七聚氧化乙烯, 14.35%), 而组成外黄皮精油含量最大的柠烯(Limonene)则没有检出。

参考文献

- [1] 王华, 吴厚玖, 焦必林, 等. 柚香精油的提取与成分研究. 中国南方果树, 1999, 28(6): 13-15
- [2] 陈卫东, 张友胜, 肖更生, 等. GC-MS 联用分析金柚外黄皮和内白皮中挥发性化学成分. 食品科学, 2005, (10): 210-212