

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法测定 饮料中红豆含量

林海珠*, 何嫦嵘, 冯昕韡, 李 军

[可口可乐饮料(上海)有限公司, 上海 200241]

摘 要: **目的** 建立十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)法定量分析植物蛋白饮料中红豆成分含量的方法。**方法** 从 8 个主要蛋白条带中选取一个蛋白条带作为定量标记蛋白, 配制红豆标准品进行 SDS-PAGE 实验, 用 Image J 软件测量特征蛋白条带的灰度面积值, 得到特征蛋白条带灰度面积与红豆含量关系的标准曲线。最后以市售红豆饮料为实际样品, 检验该方法对于复杂样品的实用性。**结果** 红豆含量在 3~8 g/100 mL 范围内, 特征蛋白条带灰度面积与红豆含量呈良好的线性关系($r^2 = 0.9944$)。向市售样品中添加 2 g/100 mL 标品, 得到加标回收率为 99.2%, 相对标准偏差为 1.68% ($n=3$)。**结论** 该方法为红豆饮料中红豆含量的检测提供了一个可行的手段。日后, 该方法可推广应用于其他以蛋白为标志物的饮料成分的定量测定。

关键词: 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳法; 红豆; 植物蛋白饮料; 蛋白质定量

Determination of red bean content in beverages by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

LIN Hai-Zhu*, HE Chang-Rong, FENG Xin-Wei, LI Jun

[Coca-Cola Beverages (Shanghai)Limited Company, Shanghai 200241, China]

ABSTRACT: Objective To establish a method for quantitative analysis of red bean in plant protein beverages by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). **Methods** One of the 8 main protein bands was selected as a quantitative marker. A series contents of red bean protein standard solutions were prepared and analyzed by SDS-PAGE, and the spectrum was treated by Image J software to measure gray area values of the marker bands. A standard curve was drawn between the gray area and red bean content. Finally, the applicability of the method was tested by a real sample, a commercially available red bean beverage. **Results** A good linear relationship between the gray area and the red bean content was found ($r^2=0.9944$) in the range of 3–8 g/100 mL. Adding 2 g/100 mL standard solution to a commercial product, the recovery rate was calculated to be 99.2%, and relative standard deviation was 1.68% ($n=3$). **Conclusion** This method provides a convenient and feasible method for the quality detection of red bean beverages. In the future, this method can be extended to apply to the quantitative determination of other ingredients in beverages with protein as markers.

KEY WORDS: sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; red bean; plant protein beverage; protein quantification

*通信作者: 林海珠, 博士, 主要研究方向为饮料的品质和安全检测。E-mail: annlin@coca-cola.com

*Corresponding author: LIN Hai-Zhu, Ph.D, Coca-Cola Beverages (Shanghai) Limited Company, Shanghai 200241, China. E-mail: annlin@coca-cola.com

0 引言

近年来,随着素食主义的流行,以及有些人群对牛奶中乳糖不耐受等原因,人们更青睐于以植物(如豆类、坚果类、椰子等)为主要原料的植物蛋白饮品^[1-2]。植物的种类和添加量对饮料的品质和成本有重要影响。一些不良商家为了提高经济利益,可能会在生产中出现一些掺假行为,例如:向牛乳制品中掺杂廉价易得的大豆蛋白^[3],以及向核桃饮料中掺杂花生或大豆^[4]。这些欺诈行为严重侵害了消费者的权益。因此,食品质量监管部门需要关注的不仅是蛋白饮品中的蛋白质总量,更重要的是特定来源的蛋白质含量。对科学家们而言,从饮料产品中鉴别出植物的特征蛋白质以及验证产品配料表中声明的配料成分含量是个具有挑战性且值得研究的课题^[5-6]。

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)是一个分析蛋白质的强有力工具^[7-9],它可以将蛋白质按分子量大小进行分离。染色后,蛋白条带根据蛋白含量的不同呈现出不同的灰度,对灰度面积的定量分析是蛋白质定量的重要手段。以植物的特征蛋白质作为标志物,可以估算目标植物的含量。目前已有一些 SDS-PAGE 应用于定性鉴别方面的研究,孙克江等^[4]用 SDS-PAGE 分析了核桃、杏仁、花生、大豆中提取的蛋白,发现不同的物种具有各自特征的蛋白指纹图谱,而同一物种、不同产地的核桃的图谱则显示出高度的同源性,由此,通过谱图的比对可以鉴别植物蛋白饮料中的蛋白成分来源,为进一步定量分析奠定了良好的基础。定量方面,用 SDS-PAGE 定量某个目标蛋白的手段已经比较成熟^[3,10-12],彭成成等^[10]用 SDS-PAGE 灰度分析法(Image J 分析)定量检测病毒 HA 蛋白,可用于病毒疫苗研发及生产过程的质量控制;史瑾等^[11]通过 SDS-PAGE 与 Image J 图像处理软件的使用,建立了一种定量检测人体泪液中一种叫溶菌酶的特定蛋白含量的方法,对眼科疾病的临床诊断和治疗具有重要意义;管方方等^[3]选取了大豆的特征蛋白,使用光密度仪对其定量分析,可以得知乳品中是否掺假了大豆蛋白,以及掺假的浓度。不过,国内以饮料为实际样品的蛋白定量研究尚比较缺乏。

红豆,学名赤小豆,含有糖类、蛋白质、脂肪、粗纤维等丰富的营养成分,具有消肿利尿等功效^[13],近年来在植物蛋白饮料中的应用颇为广泛。红豆作为主要配料,其含量的测定对其饮品质量的检验具有重要意义。本研究以红豆为例,在孙克江等^[4]对植物定性分析工作的基础上,参考定量分析蛋白质的报道^[3,10-12],进一步开展了对饮料中植物成分的定量分析研究,建立了一种 SDS-PAGE 法测定植物蛋白饮料中红豆成分含量的方法,以期在红豆饮料产品在研发和品质控制中提供一种定量检测红豆成分的分

析方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Invitrogen PB0112 SDS-PAGE 跑胶系统、Pierce 22840 染色仪(美国 Thermo 公司);AG285 分析天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];Capsulefuge PMC-880 掌上离心机(日本 Tomy Kogyo 公司);Centrifuge 5810 离心机(德国 Eppendorf 公司)。

NuPAGE 12%预制胶(凝胶浓度:12%,尺寸:8 cm×8 cm,厚度 1.0 mm)、NuPAGE 4-12%预制胶(凝胶浓度:4%~12%,尺寸:8 cm×8 cm,厚度 1.0 mm)、NuPAGE LDS 4X 样品缓冲液、NuPAGE MES SDS 20X 电泳缓冲液、PageRuler Plus 10~250 kDa 预染色蛋白标记物、PageRuler Plus 14.4~116.0 kDa 非预染蛋白标记物、Pierce MiniGel Power 染色套装(美国 Thermo 公司)。

红豆熟粉(北京朔方科技发展股份有限公司);全脂乳粉、酪蛋白酸钠、绿豆熟粉、黑豆熟粉、薏仁熟粉以及某品牌红豆饮料均为市售。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液配制

红豆粉水溶液(8 g/100 mL):称取 64 mg 红豆粉于小离心管,加入 800 μL 水。充分振荡均匀后,室温下于混旋仪中混旋约 30 min,提取水溶性蛋白。然后在 5000 r/min 下离心 5 min,溶液从上到下分为油层、水层和沉淀 3 层,移取中间层备用(弃去油层和沉淀)。

绿豆粉水溶液(8 g/100 mL)、黑豆粉水溶液(8 g/100 mL)、薏仁粉水溶液(20 g/100 mL)、全脂乳粉水溶液(1.5 g/100 mL)、酪蛋白酸钠水溶液(0.45 g/100 mL):分别称取 8 mg 绿豆粉、8 mg 黑豆粉、20 mg 薏仁粉、1.5 mg 全脂乳粉、0.45 mg 酪蛋白酸钠于小离心管,分别加 100 μL 水。其他步骤同红豆粉。

1.2.2 样品前处理

对于红豆粉标准溶液及对照粉水溶液,用移液枪移取 20 μL 中间层清液于小离心管,加入 17.5 μL 水、12.5 μL LDS 样品缓冲液(4X),摇匀后,在 99 °C 放置 10 min,然后直接在 10000 r/min 转速下离心 5 min,取 10 μL 中间清液上样到预制胶(表面有浮油时应尽量避免取到浮油)。

对于复杂的市售红豆饮料样品,将饮料充分摇匀后,取 1 mL 饮料液于小离心管,13000 r/min 离心 10 min 之后,可见上层有白色漂浮油,下层有大颗粒的沉淀物,取 20 μL 中间层于小离心管,其他步骤同上。

1.2.3 SDS-PAGE 分析

(1)电泳:将 19 mL NuPAGE MES SDS 电泳缓冲液(20X)与 361 mL 水混合配制制成 380 mL 1X 电泳缓冲液。

200 V 恒压模式, 电泳时间 35 min。

(2)染色-脱色: 参照 Pierce MiniGel Power 染色套装说明书。

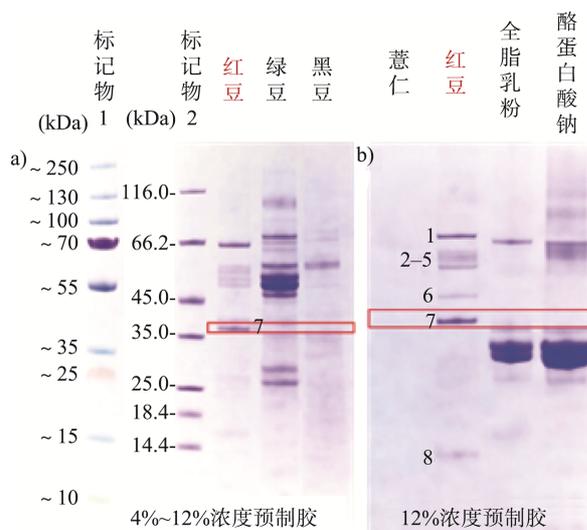
(3)拍照及谱图分析: 将凝胶小心放入透明的密实袋里, 用激光扫描仪扫描得到 TIFF 图像。采用 Image J 软件处理图片和测量灰度面积。

2 结果与分析

2.1 选取红豆粉的特征蛋白条带

由于红豆饮料中红豆的加工工艺通常为: 红豆加水煮熟, 变软, 之后研磨, 然后适量添加到饮料中。这里需要注意的是, 饮料中的红豆是煮熟的。本研究旨在测定红豆的添加量, 因此购买了熟制的红豆粉, 免去了前期煮熟、研磨等繁琐步骤。作为对照的其他绿豆、黑豆、薏仁等植物粉也同样为市售的熟制粉。

首先, 本研究获取红豆粉的 SDS-PAGE 谱图, 然后根据市场调研, 了解并选择一些其他相关植物或蛋白, 收集它们的 SDS-PAGE 谱图, 这里选择红豆饮料的类似产品有绿豆、黑豆, 另外还有配料中经常共同添加到饮料中的干扰物质, 包括薏仁、全脂乳粉、酪蛋白酸钠。收集的 SDS-PAGE 谱图见图 1。



注: a) 凝胶浓度为 4%~12% 的预制胶上红豆、绿豆、黑豆粉水溶液的 SDS-PAGE 谱图; b) 凝胶浓度为 12% 的预制胶上薏仁、红豆、全脂乳粉、酪蛋白酸钠的 SDS-PAGE 谱图; 红豆的 8 条主要蛋白条带用数字 1-8 标记在图上)。

图 1 SDS-PAGE 图谱
Fig.1 SDS-PAGE patterns

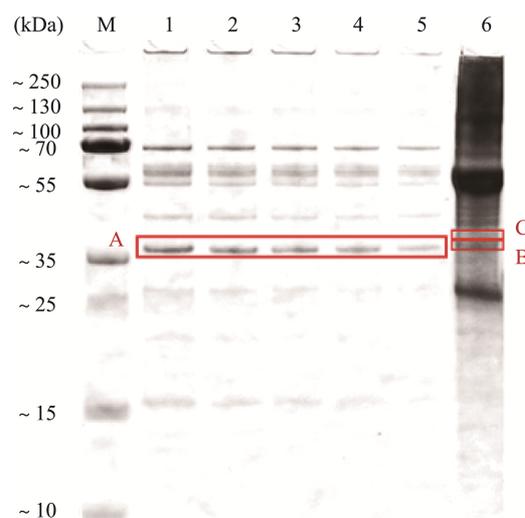
图 1 中, 红豆的条带 7 颜色比较清晰, 且图 1b 中的 12% 浓度的预制胶上, 条带 7 的区分度明显优于图 1a 中 4%~12% 浓度的预制胶, 因此后续实验均选用 12% 浓度的预制胶。

综合考虑, 本研究最终选取了图 1 中的条带 7 (分子量约为 35 kDa) 作为红豆的特征蛋白条带。

将本研究中红豆粉的 SDS-PAGE 图谱与文献中报道的核桃、花生、黄豆、杏仁蛋白的 SDS-PAGE 图谱^[4]相比较, 结果显示红豆粉的图谱指纹与其他 4 种植物来源的蛋白图谱指纹具有明显区别: 黄豆和杏仁蛋白在 10~130 kDa 范围内具有广泛的分布, 可以直接和红豆区分开; 而核桃和花生在 35~40 kDa 内无清晰条带出现, 即无红豆的特征蛋白条带, 因此也可以进行区分。

2.2 标准曲线

上样一系列不同含量的红豆粉水溶液标准品, 制作标准曲线。取红豆粉水溶液 (8 g/100 mL) 体积分别为 10、7.5、6.25、5、3.75 μ L 上样至预制胶, 对应的红豆粉含量分别为 8、6、5、4、3 g/100 mL。电泳结束后, 得到的胶谱图用图像处理软件 Image J 处理分析, 结果见图 2。随着 1~5 号跑道标品浓度的递减, 特征蛋白条带的颜色深度也呈现出递减的趋势。特征蛋白条带的颜色越深, 对应的灰度值越高, 用 Image J 可以绘制相应的灰度曲线, 并通过对特征蛋白条带灰度值的积分获得灰度面积。以红豆粉含量为横坐标, 特征蛋白条带的灰度面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到标准曲线方程: $Y=4013.5X-4290$ ($r^2=0.9944$), 线性关系良好。



注: 凝胶跑道: M 为预染色蛋白质分子量标记物; 1-5 为红豆粉含量 8、6、5、4、3 g/100 mL; 6 为市售的红豆饮料样品。
图 2 不同浓度红豆粉标准溶液以及实际红豆饮料样品的 SDS-PAGE 谱图

Fig.2 SDS-PAGE patterns of standard red bean solution with different concentrations and real red bean beverage sample

2.3 检出限、回收率及精密度

为考察方法的检出限, 取一系列低浓度标品进行跑

胶实验。取 8 g/100 mL 红豆粉水溶液体积分别为 2、1.25、1 μ L 上样至预制胶, 对应的红豆粉含量分别为 1.6、1、0.8 g/100 mL。通过 SDS-PAGE 实验分析, 结果显示当浓度低至 0.8 g/100 mL 时, 特征蛋白条带依然具有明显的灰度, 因此本方法的检出限为 0.8 g/100 mL, 与市售样品中红豆粉的含量(通常为 $\geq 4\sim 6$ g/100 mL)相比是一个足够低的水平。

考察方法的回收率, 以含有 4 g/100 mL 红豆粉的红豆饮料为样品, 添加 2 g/100 mL 红豆粉标品进行加标回收实验。经过处理计算得到加标回收率为 99.2%。结果显示该方法具有良好的准确度。

为考察方法的精密度, 以添加 2 g/100 mL 的红豆饮料(终含量 6 g/100 mL)为样品进行跑胶, 上样到同一胶上的 3 个孔中做平行实验。SDS-PAGE 谱图用软件处理后, 用标准曲线计算出来的 3 个红豆含量的相对标准偏差为 1.68% ($n=3$), 说明方法具有良好的精密度。

2.4 市售红豆饮料中红豆含量的定量分析

取一罐市售的红豆饮料样品为实际样品, 其标注的红豆平均添加量为 $\geq 4\%$, 发现实际样的条带具有一定的背景色, 在前期的尝试中, 为了降低样品的复杂性, 本研究分别尝试了 3 种预处理方法: 己烷萃取除油^[14]、加入更多的 LDS 样品缓冲液、乙醇沉淀提纯法^[15], 但结果显示, 与直接在 99 $^{\circ}$ C 加热 5~10 min 后高速离心相比, 效果并没有得到优化。原因可能是实际的饮料样品成分比较复杂, 除了油之外, 果胶会增加样品的粘度, 造成拖带; 其他蛋白质的大量存在也会对目标条带来干扰。在这种情况下, 稀释样品也不可取, 因为稀释后特征蛋白条带颜色会变得太浅而无法准确定量。最后本研究采用扣除背景的方法来应对实际样背景色深的情况。

实际样与标准溶液在同一块预制胶上进行跑胶和图片处理后(图 2), 以特征条带相邻的区块(框中 C)为背景, 用特征蛋白条带(框中 B)的灰度面积值(52983.26), 减去背景块的灰度面积值(41287.97), 得到特征蛋白条带的灰度面积净值(11695.29), 根据同一块胶上的标准曲线方程($Y=4013.5X-4290$), 计算得到对应的红豆粉的含量为 3.98 g/100 mL, 与其标注值非常接近。说明该方法能够适用于实际红豆饮料样品中的红豆含量的定量测定。

3 结论与讨论

本研究选取红豆的特征蛋白为标记物, 建立了一种 SDS-PAGE 法测定红豆饮料中红豆含量的方法。饮料中红豆含量在 3~8 g/100 mL 范围内, 红豆特征蛋白条带的灰度面积与红豆含量呈现良好的线性关系($r^2=0.9944$)。本研究也考察了方法的检出限、回收率和精密度。最后以一款市售红豆饮料为实际样品, 采用了扣除背景法, 用该法测得

的结果与包装标注相符, 说明该方法适用于复杂的实际饮料样品, 这也是本工作相比于其他文献的一个进步。该方法可改进的地方是饮料中其他复杂配料的干扰问题有待进一步解决, 比如加一步预纯化等。该方法为红豆饮料的品质检测提供了一个可行的手段, 日后, 该方法可推广应用于其他以蛋白为标志物的饮料成分的定量测定。

参考文献

- [1] 丁保森, 覃瑞, 熊海容, 等. 植物蛋白饮料及其稳定性的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2019, 10(1): 160-165.
DING BM, QIN R, XIONG HR, *et al.* Research progress on plant protein beverages and their stability[J]. J Food Saf Qual, 2019, 10(1): 160-165.
- [2] 鲁永明, 董晓鹏, 张秦. 植物蛋白饮料的营养价值及发展前景[J]. 现代食品, 2019, (11): 90-92.
LU YM, DONG XP, ZHANG Q. Study on nutritional value and development prospect of vegetable protein beverage [J]. Mod Food, 2019, (11): 90-92.
- [3] 管方方, 卢伟京, 许旭, 等. 大豆特征蛋白的 SDS-PAGE 研究[J]. 精细化工, 2015, (4): 82-86.
GUAN FF, LU WJ, XU X, *et al.* A study on the characteristic soybean protein by SDS-PAGE [J]. Fine Chem, 2015, (4): 82-86.
- [4] 孙克江, 张甜, 曲梅丽, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳法快速检测植物源性食品中的蛋白成分[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 895-899.
SUN KJ, ZHANG T, QU ML, *et al.* Rapid detection of proteins in plant-derived foods by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis [J]. J Food Saf Qual, 2017, 8(3): 895-899.
- [5] 王利刚, 费云滢, 陈欣, 等. 食品中植物源性成分的检验技术研究与应用进展[J]. 检验检疫学刊, 2020, 30(1): 121-126.
WANG LG, FEI YY, CHEN X, *et al.* Progress in research and application of inspection technology of plant-derived ingredients in food [J]. J Inspect Quar, 2020, 30(1): 121-126.
- [6] 张淑霞, 李珂, 祝伟霞, 等. 我国植物蛋白饮料掺假检测技术研究现状[J]. 粮食与食品工业, 2020, 27(1): 55-59.
ZHANG SX, LI K, ZHU WX, *et al.* Research status of adulteration detection technology for plant protein beverages in China [J]. Cereal Food Ind, 2020, 27(1): 55-59.
- [7] 唐亚丽, 施用晖, 赵伟, 等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳及其在食品检测中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2007, (12): 111-116.
TANG YL, SHI YH, ZHAO W, *et al.* The application of polyacrylamide gel electrophoresis on food examination [J]. Food Ferment Ind, 2007, (12): 111-116.
- [8] 朱云飞, 初正云, 李洪江. SDS-PAGE 凝胶电泳法对不同种鹿茸蛋白质差异化研究[J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(6): 48-51.
ZHU YF, CHU ZY, LI HJ. Study of the different kinds of pilose antler protein differentiation by SDS-PAGE gel [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2017, 19(6): 48-51.
- [9] 张彩艳. 燕麦萌发过程中总蛋白与 4 种组分蛋白的变化[J]. 兰州工业学院学报, 2020, 27(2): 86-89.
ZHANG CY. Changes of total protein and four component proteins during oat germination [J]. J Lanzhou Inst Technol, 2020, 27(2): 86-89.
- [10] 彭成成, 吴熠潇, 刘旭平, 等. H9N2 亚型禽流感病毒纯化及病毒 HA 蛋白定量方法研究[J]. 中国畜牧兽医, 2019, 46(7): 2069-2078.

PENG CC, WU YX, LIU XP, *et al.* Study on methods for purification of H9N2 subtype avian influenza virus and quantification of viral HA protein [J]. *China Anim Husband Veter Med*, 2019, 46(7): 2069–2078.

[11] 史瑾, 杨小琳, 赵金礼. Tricine-SDS-PAGE 电泳定量检测人体泪液中溶菌酶含量[J]. *临床医学研究与实践*, 2018, 3(2): 4–6.

SHI J, YANG XL, ZHAO JL. Quantitative detection of lysozyme in human tears by Tricine-SDS-PAGE electrophoresis [J]. *Clin Res Prac*, 2018, 3(2): 4–6.

[12] 李珊珊, 王加启, 魏宏阳, 等. 凝胶成像系统 SDS-PAGE 法测定乳及乳制品中乳铁蛋白[J]. *农业工程学报*, 2008, 24(2): 283–288.

LI SS, WANG JQ, WEI HY, *et al.* Quantitative determination of lactoferrin in milk and dairy products by SDS-PAGE electrophoresis based on gel imaging system [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2008, 24(2): 283–288.

[13] 徐哲, 邓林林, 王嘉琳, 等. 红豆薏米保健饮料的研制[J]. *山东化工*, 2015, 44(19): 34–35, 38.

XU Z, DENG LL, WANG JL, *et al.* Study on health beverage of red beans and coix seed [J]. *Shandong Chem Ind*, 2015, 44(19): 34–35, 38.

[14] AMAGLIANI L, O'REGAN J, KELLY AL, *et al.* Composition and protein profile analysis of rice protein ingredients [J]. *J Food Compos Anal*, 2017, 59: 18–26.

[15] 孙姗姗, 李婷婷, 覃玲, 等. 饮料中提取酪蛋白的方法选择[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(7): 2509–2515.

SUN SS, LI TT, QIN L, *et al.* Selection of extraction method for casein in beverages [J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(7): 2509–2515.

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



林海珠, 博士, 主要研究方向为饮料的品质和安全检测。
E-mail: annlin@coca-cola.com



“动物性食品加工与质量安全”专题征稿函

当前我国经济飞速发展, 人们对动物性食品的要求也不再仅仅是数量上的追求, 正在向质量要求进行转变, 然而目前国内动物性食品在各个方面仍需要进行完善。因此, 如何解决这些问题, 使动物性食品安全真正得到保障, 已显得尤为重要。

鉴于此, 本刊特别策划了“动物性食品加工与质量安全”专题, 由东北农业大学食品学院许晓曦教授担任专题主编。专题将围绕现代化加工与副产物综合利用技术、质量安全和检测技术、营养及风味成分分析技术、污染防控与危害分析、法律法规和发展政策几方面, 或您认为本领域有意义的问题综述及研究论文均可, 专题计划在 2021 年 5 月出版。

本刊主编国家食品安全风险评估中心吴永宁研究员与本专题主编许晓曦教授特邀请有关食品领域研究人员为本专题撰写稿件, 综述、研究论文和研究简报均可。请在 2021 年 4 月 1 日前通过网站或 E-mail 投稿。我们将快速处理并经审稿合格后优先发表。

同时烦请您帮忙在同事之间转发一下, 希望您能够推荐该领域的相关专家并提供电话和 E-mail。再次感谢您的关怀与支持!

投稿方式(注明专题**动物性食品加工与质量安全**):

网站: www.chinafoodj.com(备注: 投稿请登录食品安全质量检测学报主页-作者

登录-注册投稿-投稿栏目选择“2020 专题: **动物性食品加工与质量安全**”)

邮箱投稿: E-mail: jfoodsq@126.com(备注: **动物性食品加工与质量安全**专题投稿)

《食品安全质量检测学报》编辑部