环介导等温扩增技术在食品安全检测领域的应用研究进展

范安妮,佘之蕴,张　娟,周臣清,梁宇斌
(广东产品质量监督检验研究院,广东顺德 528300)

摘　要:环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP)是近年发展起来的一种新型核酸检测技术。其采用特异识别靶序列上6个位点的4条引物和一种具有链置换活性的DNA聚合酶,在等温条件下进行核酸扩增,与传统核酸检测技术(PCR法、实时荧光定量PCR法)相比,具有操作简单、特异性强、灵敏度高、可肉眼判读结果等优点。核酸检测是食品安全检测技术的一个重要手段,本文综述了LAMP技术在食品微生物检测、转基因成分检测、过敏原成分检测和动物源性成分检测领域的应用研究进展,探讨了LAMP技术在食品检测领域的发展前景,以期为食品快速、高通量检测技术建立提供参考。

关键词:环介导等温扩增技术(LAMP),食品安全,检测,核酸扩增

Application research progress on loop-mediated isothermal amplification in food safety detection

FAN An-ni,SHE Zhi-yun,ZHANG Juan,ZHOU Chen-qing,LIANG Yu-bin
(Guangdong Testing Institute of Product Quality Supervision,Shunde 528300,China)

Abstract:Loop-mediated isothermal amplification(LAMP) is a novel nucleic acid amplification method developed in recent years.The nucleic acid amplification is performed ender isothermal conditions by a set of four specially designed primers and a DNA polymerase with strand displacement activity.Compared with the traditional nucleic acid detection technology(PCR and real-time fluorescence quantitative PCR),it has the advantages of easy operation,high specificity,sensitivity and visual interpretation.Nucleic acid detection is an important means of food safety detection.This review summarized the application research progresses mainly focused on food safety detection,including food microorganisms testing,genetically modified organisms testing,food allergens testing and food derived ingredients testing.In addition,the perspectives of LAMP in food detection were discussed for better and high volume testing in food safety detection.

Key words:loop-mediated isothermal amplification(LAMP);food safety;detection;nucleic acid amplification
中图分类号:TS207.3　　**文献标识码**:A　　**文 章 编 号**:1002-0306(2018)10-0330-05
doi:10.13386/j.issn1002-0306.2018.10.061
引文格式:范安妮,佘之蕴,张娟,等.环介导等温扩增技术在食品安全检测领域的应用研究进展[J].食品工业科技,2018,39(10):330-334.

核酸扩增是分子生物学研究领域的一项重要技术,目前已广泛应用于医学诊断、食品检测、动植物检验检疫等行业中。核酸扩增技术分为变温扩增技术和恒温扩增技术两大类。传统的核酸扩增技术以变温扩增技术为主,包括常规PCR、梯度PCR、实时荧光定量PCR、巢式PCR、多重PCR等,扩增过程需循环经历变性、退火、延伸三个基本反应步骤,每个步骤的反应温度不一,因此扩增过程依赖专业仪器设备进行,同时由于反复调温,导致反应时间较长。随着分子生物学研究的不断深入,Notomi等[1]建立了一种新型的核酸扩增技术:环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification,LAMP)。LAMP是利用能识别靶序列上的6个位点的4个特殊设计的引物和一种链置换活性的DNA聚合酶,在恒温条件下特异、高效、快速地在体外扩增核酸的新技术。与传统变温核酸扩增技术相比,LAMP仅需简单便宜的恒温器(水浴、金属浴、恒温箱等)即可完成反应,操作简单,反应的结果通过肉眼观察白色浑浊或绿色荧光的生成来判断,也可通过荧光信号监测来判断,符合食品快速检测和现场检测的需要,在食品检测领域具有广阔的应用前景。本文重点介绍LAMP技术在食品微生物检测、转基因成分检测、过敏原成分检测和动物源性成分检测领域的应用研究进展,以期为食品快速、高通量检测技术建立提供参考。

1　环介导等温扩增技术在食品微生物检测领域的应用

食源性致病微生物一直是引发食品安全事故的主要因素[2],其产生的疾病严重危害公众健康,因此被

收稿日期:2017-10-16
作者简介:范安妮(1986-),女,硕士研究生,工程师,研究方向:食品及食品相关产品质量安全检测与风险评估,E-mail:annie1860@126.com。
基金项目:广东省质量技术监督局科技项目(2013PS02);广州市科技计划项目(201804010244)。

列为食品卫生安全检测的重要指标[3]。开展快速、便捷的食源性致病菌检验技术的研究,防止被污染的食品进入市场,对保障消费者健康安全有着极为重要的意义。

1.1 LAMP 技术在检测食品中沙门氏菌方面的应用

沙门氏菌可分离于猪肉、牛肉、鸡肉及其加工产品中,是常见的病原菌之一[4-6]。现行国家标准 GB 4789.4-2016《食品安全国家标准 食品微生物学检验 沙门氏菌检验》是采用培养法进行检测,整个过程需要 2~3 个工作日,如有可疑菌落,还需要做生化鉴别。王瑾等[7]根据沙门氏菌 *invA* 基因序列设计了特异性 LAMP 引物,建立了沙门氏菌 LAMP 检测方法,该方法检测过程仅需 45 min,灵敏度达到 6 CFU/管,其灵敏度和准确性与国标法相当,但是检测时间大大缩短。黄金海等[8]根据沙门氏菌 invA 基因设计一组环介导等温扩增引物,检测 7 种不同血清型沙门氏菌和 4 种非沙门氏菌,并与活菌计数法比较,结果表明该方法具有较高的特异性与灵敏性,适用于沙门氏菌污染食品的快速检测。吴家林等[9]对环介导等温扩增技术检测沙门氏菌的反应条件进行优化,包括 dNTP 浓度,$MgCl_2$ 浓度,外引物浓度和内引物浓度,优化后该方法对细菌纯培养物检测的灵敏度达到 10^1 CFU/mL。有研究表明,环介导等温扩增技术检测食品中沙门氏菌的符合率为 98%,明显优于常规 PCR 技术(90%)[10]。

1.2 LAMP 技术在检测食品中阪崎肠杆菌方面的应用

阪崎肠杆菌为革兰氏阴性菌,产黄色毒素,可引起新生儿脑膜炎、菌血症、败血症等严重疾病。我国国家标准明确规定,适合 0~6 月龄婴儿配方食品不得检出阪崎肠杆菌。胡连霞等[11]以阪崎肠杆菌的 16S-23S rRNA 区间序列作为靶序列,设计了一套 LAMP 引物,包括内引物、外引物和环引物。该方法检测阪崎肠杆菌的灵敏度达到 0.101 CFU/mL,人工污染阪崎肠杆菌的婴儿配方奶粉的检出限为 1.1 CFU/g,而 PCR 方法对照检测阪崎肠杆菌的检出限为 1.1 CFU/g,人工污染阪崎肠杆菌的婴儿配方奶粉的检出限为 11000 CFU/g,灵敏度明显低于 LAMP。而且 LAMP 检测从样品处理到报告结果,仅需 1 h,结果肉眼可判读,方便快捷。董鑫悦等[12]以阪崎肠杆菌 OmpA 序列为靶基因设计引物,并对反应条件进行优化,该新建方法检测阪崎肠杆菌纯培养物的灵敏度是 PCR 方法的 10 倍,特异性好。

1.3 LAMP 技术在检测食品中蜡样芽孢杆菌方面的应用

蜡样芽孢杆菌生存范围广,富含蛋白质和碳水化合物的食品,更容易受污染,由于蜡样芽孢杆菌具有致病性,因此容易引发食物中毒[13-15]。贾雅菁等[16]根据已公布的蜡样芽胞杆菌 *hblA* 基因序列设计内外引物,利用 SYBRGreen I 作为染料进行实时荧光监测,该方法检测纯菌的灵敏度达到 8.2 CFU/mL,反应时间仅需 20 min,同时采用 21 株致病菌(4 株蜡样芽孢杆菌和 17 株非蜡样芽孢杆菌)进行特异性实验,该方法能够进行准确判读。

1.4 LAMP 技术在检测食品中单增李斯特菌方面的应用

单增李斯特菌是一种常见的人畜共患的食源性致病菌,可引发脑膜炎、败血症等严重疾病。其在 4 ℃的环境中仍可生长繁殖,因此是冷藏食品中最主要的致病菌[17-18]。张体银等[19]根据单增李斯特菌 hly 基因的保守序列设计特异性 LAMP 引物,LAMP 反应在 65 ℃下进行,1 h 内即可检出单增李斯特菌,结果表明该方法灵敏度达到 100 CFU/mL,对 13 株致病菌以及 50 种样品进行特异性检测,同时与国标方法进行比较,符合率达到 100%,可满足大批量样品快速筛选的要求。

综上所述,与国标检测方法相比,使用 LAMP 技术检测食源性致病菌,检测时间从 3~5 d 缩短到 1 d 即可,为食源性致病菌的快速筛选带来极大便利,同时也提高了检测效率。与 PCR 方法比较,LAMP 也显示出更高的灵敏度。姜侃等[20]建立了一种同时检测沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌的三重 LAMP 法,分别针对沙门氏菌 *invA* 基因、金黄色葡萄球菌 *nuc* 基因、单增李斯特菌 *hly* 基因设计三套 LAMP 引物,优化反应条件,该方法能在 90 min 内一次性检出以上 3 种致病菌,检测灵敏度是 PCR 的 1000 倍。

2 环介导等温扩增技术在食品转基因成分检测领域的应用

据农业生物技术应用国际服务组织(ISAAA)统计,2015 年全球种植了近 1.8 亿公顷转基因农作物,从 1996 年转基因作物商业化到 2015 年,全球转基因作物累计种植面积达到 20 亿公顷,转基因作物也扩展到了四大作物(玉米、大豆、棉花和油菜)以外[21]。转基因农作物即利用基因工程技术,将来源于任何种类的遗传物质引入到不同种类的植物中[22-23],使其通过遗传信息的交流以改良农艺性状、提高品质性状,例如抗除草剂大豆、抗除草剂玉米、抗虫大豆、抗虫玉米、富含高赖氨酸玉米等[24-26]。随着农业生物技术的发展,为了施行对转基因作物的有效监管,许多国家和机构都制定了转基因标识条例,因此建立高效、快速、准确的转基因产品检测方法十分关键。

目前常用的食品转基因成分检测技术分为两大类,一类是蛋白水平的检测,通过检测外源基因的表达产物来判断。一类是核酸水平的检测,检测的靶基因通常是选择通用元件或者是外源基因。由于核酸比蛋白质稳定,对于经过深加工的转基因食品,核酸水平的检测更为广泛。常规的 PCR 方法或实时荧光定量 PCR 方法对设备和人员要求较高,耗时长,无法实现现场快速检测,而 LAMP 技术正好弥补了这一缺陷。陈金松等[27]针对转基因玉米表达载体的花椰菜花叶病毒 35S 启动子(CaMV35S)设计了一套特异 LAMP 引物,并对反应体系成分进行优化,结果表明,该方法比常规 PCR 方法方便快捷、具有更高的灵敏度。闫兴华等[28]根据转基因玉米 LY038 外源基因 cordapA 基因设计了 4 条特异性高的 LAMP 引物,该检测体系在 63 ℃恒定温度下反应 50 min,即可完成检测,灵敏度达到 0.01%,是常规 PCR 方法的 5 倍。周杰等[29]针对 DAS-81419-2、DP356043-5、A2704-12、FG72、BPSCV127-9 和 MON89788 等 6 种常见转基因大豆的旁侧序列,分别设计了 LAMP 引物,该方法仅需在恒温条件下反应 30 min,即可进行结果判读,灵敏度达到 0.1%。

综上,LAMP 方法检测食品中的转基因成分,比

PCR 方法具有更高的灵敏度,与 PCR、实时荧光定量 PCR 方法相比,反应用时更短,操作更简单,将来有望成为食品转基因检测的主要检测技术。

3 环介导等温扩增技术在食品过敏原成分检测领域的应用

食物过敏是导致皮肤、肠道及呼吸道疾病等多种急性症状的重要原因[30],美国每年急诊患者中有43%病人的发病由食物过敏引起[31]。目前,治疗食物过敏症最有效最直接的方法就是避免食用含有过敏原的食物,这就要求生产商在食品标签上正确标示出导致过敏的成分,以免消费者因不知情而误食引起过敏。各国特别是西方发达国家制定了各种法令或条款对食品过敏原以及食品标签作出规定[32-34],国际食品法典委员会、美国、欧盟、日本、澳大利亚、新西兰及其他国家对过敏原标签都有要求[35-36]。随着贸易全球化的发展、不同地域间食物的相互流通以及深加工技术的广泛应用[37-40],过敏人群接触食物中过敏原的种类日益增多[41-43],因此开发出高灵敏度以及快速的食品过敏原检测方法势在必行[44-47]。

现阶段国内外常用的检测食品过敏原成分的方法分为两大类:免疫学检测方法和核酸检测方法。核酸检测技术具有灵敏、快速、准确的特点,经过深加工后的食品,核酸成分仍然保持一定的稳定性,因此成为主要的检测技术。本项目组以八大类食物过敏原(花生、坚果、小麦、虾等)中的典型产品为研究对象,分别筛选出特异性高的过敏原基因片段为检测对象,设计 LAMP 引物并优化反应体系,建立一套快速检测食品过敏原成分的方法。以过敏原小麦成分检测为例,选取 GAG56D 基因的特异性高的片段,设计 4 条 LAMP 引物和 2 条环引物,在 65 ℃进行恒温扩增 1 h,选用 SYBR Green Ⅰ作为荧光染料,反应结束后,阴性结果呈现橙色,阳性结果呈现绿色,该方法灵敏度达到 0.01%,对 50 份样品(小麦原料样品 20 份,小麦加工制品 23 份,未含小麦成分样品 7 份)进行检测,结果与实时荧光定量 PCR 一致,符合率 100%,LAMP 检测时间大大缩短,操作更简单[48]。

4 环介导等温扩增技术在食品动物源性成分检测领域的应用

肉类食品的安全追溯及种属鉴别已逐渐受到各国政府部门、食品生产企业和消费者的关注。为保证肉类产品质量安全,保障消费者的合法权益,避免市场不公平竞争现象的发生,亟待建立一种能快速准确鉴别、检测动物源性成分的方法。

当前,国内外对于肉类品种的鉴定方法主要有蛋白质鉴定和核酸鉴定两大类。蛋白质技术鉴定肉类物种的可靠性和稳定性较差,无法满足现代肉类掺杂掺假检测的要求。相比之下,由于 DNA 的相对稳定性,只要知道动物物种的特异性基因或蛋白的基因序列就能实现检测。宋涛平等[49]根据鸡、鸭、牛、羊物种 cytb、cox3、12S rRNA、cytb 特异性基因分别设计 LAMP 引物,在 63 ℃恒温条件下反应 45 min 后进行结果判读,该方法对熟肉制品掺杂肉检测的检出限达到 0.01%。刘少宁等[50]针对狐狸线粒体 cox Ⅰ基因设计一套 LAMP 引物并对反应条件进行摸索优化,从而建立一种能够快速检测出绵羊肉中掺入狐狸源性成分的方法,该方法可检测出掺假率为 1.0%的羊肉制品。谭贵良等[51]针对猪、牛、羊、鸭的线粒体 cytb 基因分别设计 LAMP 引物并优化反应参数,建立了食用植物油和地沟油中动物源性成分的 LAMP 检测方法,该方法可以快速检测出混合油脂中的动物源性成分,动物油脂的检出限为 1%,地沟油的检出限为 5%。与常规 PCR 和实时荧光定量 PCR 方法相比,LAMP 检测方法不需要依赖昂贵的 PCR 仪,操作简单,结果肉眼可判别,方便快捷,可满足室外检测及现场执法的要求。

5 基于环介导等温扩增的芯片技术在食品检测领域的应用

LAMP 技术作为一种等温核酸扩增技术,以其快速、特异、高效、结果易于判读的优点,广泛应用于食品检测领域。常规的 LAMP 技术只能检测 1~2 个目标序列,随着生物技术的不断发展,基因芯片作为分子生物学的一个技术突破,以其高通量、自动化、集成化、微型化的特点,具有强大的发展活力。张国豪等[52]设计了一种基于 LAMP 原理的微流控芯片,该芯片设有微反应阵列,每张芯片在特定反应池包埋固定一套引物用于一种核酸靶序列的扩增与检测,可同时对多种核酸靶基因进行高通量并行检测。目前已有商品化芯片检测试剂盒应用于食品中多种致病菌的检测,该试剂盒可定性检测 3 种常见食品致病菌,包括:沙门氏菌、金黄色葡萄球菌和肠出血性大肠埃希氏菌 O157。将食品进行增菌后,提取增菌液的核酸作为模板进行扩增,芯片已经包埋了 3 套引物,一次可检测 3 个样本,每个样本可同时定性检测 3 种致病菌。这为食源性致病菌快筛提供了极大的便利。

6 结论与展望

环介导等温扩增技术作为一种快速、便捷的核酸检测手段,与常规 PCR、实时荧光定量 PCR 方法一起成为食品安全检测的重要工具。我国目前已有基于环介导等温扩增技术的食品检测系列标准:包括出口食品中转基因成分环介导等温扩增(LAMP)检测方法和进出口食品中致病菌环介导等温扩增(LAMP)检测方法。与传统的 PCR 方法相比,LAMP 的突出优势在于:不依赖昂贵的 PCR 仪,仅需恒温设备即可;反应时间仅需 30~60 min,结果肉眼可判读;基于 LAMP 原理的芯片技术,可实现对单一样品多种靶基因同时检测,也可实现多样品的高通量检测。同样,该技术也存在一定的问题:LAMP 反应需要设计 4 条引物,为了加快反应速度,通常会再设计 2 条环引物,引物设计过程比较复杂、费时;当样品 DNA 质量不高时,LAMP 检测效果会低于 PCR 方法[53];食品中存在的多种水溶性 DNA 聚合酶抑制剂和脂肪等,会影响扩增效果,因此致病菌的快速检测都需要进行预增菌,从而使检测时间变长;利用多重 LAMP 进行多个靶基因的同时检测时,如何避免引物间的干扰,确保引物的特异性。随着技术研究的不断深入,LAMP 技术有望得到进一步优化和完善,例如多重 LAMP 的设计、LAMP 与芯片技术的结合,实现快速、特异、灵敏、高通量的目的,这将成为核酸检测领域的重要工具,可广泛应用于食品安全检测、检验检疫、卫生防疫、疾病诊断等领域,前景非常广阔。

参考文献

[1] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic Acids Research, 2000,28(12):e63.
[2] Tzschoppe M, Martin A, Beutin L. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104:H4 strain from ready-to-eat vegetables [J]. International Journal of Food Microbiology,2012,152(1-2):19-30.
[3] Lam H M, Remais J, Fung M C, et al. Food supply and food safety issues in China[J]. Lancet,2013,381(9882):2044-2053.
[4] Cossu A, Witkowsky R D, Levin R E. Fat removal with hydrolyzed corn starch for real-time qPCR detection of Salmonella enterica in ground beef in 4.5 hours without enrichment[J]. Food Control,2014,46:475-479.
[5] Park S H, Aydin M, Khatiwara A, et al. Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of Salmonella in poultry and poultry products[J]. Food Microbiology,2014,38:250-262.
[6] Torlak E, Akan I M, İnal M. Evaluation of rapid chek select for the screening of Salmonella in meat and meat products[J]. Journal of Microbiological Methods,2012,90:217-219.
[7] 王瑾,林丽萍,郜彦彦,等.实时荧光环介导等温扩增快速检测鸡肉中沙门氏菌[J].食品科学,2016,37(24):170-174.
[8] 黄金海,孙跃辉,陈瑞,等.食品沙门氏菌 LAMP 快速检测方法的建立[J].天津大学学报,2012,45(5):468-472.
[9] 吴家林,沙丹,马广源,等.沙门氏菌 LAMP 检测方法的建立[J].中国病原生物学杂志,2015,10(7):611-614.
[10] 孔超,董娜,高伟.应用环介导等温扩增法快速检测食品中沙门氏菌的研究[J].中国病原生物学杂志.2015,10(9):816-818.
[11] 胡连霞,张伟,张先舟,等.改良环介导等温扩增技术快速检测婴儿配方奶粉中的阪崎肠杆菌[J].微生物学报,2009,49(3):378-382.
[12] 董鑫悦,满朝新,卢雁,等.环介导等温扩增法快速检测乳中阪崎肠杆菌[J].食品工业科技,2013,34(5):318-320.
[13] Mantynen V, Lindstrom K. A rapid PCR-based DNA test for enterotoxic Bacillus cereus [J]. Applied and Environmental Microbiology,1998,64(5):1634-1639.
[14] 赵宁,吕琦,姚丽艳,等.原料乳中蜡样芽孢杆菌的快速检测[J].中国乳品工业,2009,37(9):43-45.
[15] 蒋建明.一起蜡样芽孢杆菌污染饮水引起食物中毒调查[J].浙江预防医学,2009,21(2):38-39.
[16] 贾雅菁,付博宇,王羽,等.实时荧光环介导等温扩增技术检测牛乳中的蜡样芽孢杆菌[J].食品科学,2016,37(6):184-189.
[17] 周晓辉,焦新安.产单核细胞李斯特菌的分子鉴定与亚分型研究[J].中国人兽共患病杂志,2003,19(5):44-47.
[18] Gottlieb S L, Newbem E C, Grifin P M. Multistate outbreak of Listeriosis linked to turkey deli meat and subsequent changes in US regulatory policy[J]. Clinical Infectious Diseases, 2006, 42(1):2-36.
[19] 张体银,郑晶,黄晓蓉,等.环介导等温扩增技术快速检测食品中的单增李斯特氏菌[J].中国食品学报,2010,10(3):200-204.
[20] 姜侃,吕沁风,汪新,等.三重 LAMP 法检测食品中沙门氏菌、单增李斯特菌和金黄色葡萄球菌[J].食品科学,2013,34(24):182-187.
[21] Clive James.2015 年全球生物技术/转基因作物商业化发展态势[J].中国生物工程杂志,2016,36(4):1-11.
[22] Zhou J, Berman K H, Breeze M L, et al. Compositional variability in conventional and glyphosate-tolerant soybean (*Glycine max* L.) varieties grown in different regions in Brazil [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry,2011,59(21):11652-11656.
[23] Esteve A L, Armstrong P R, Tallada J G, et al. Differences between conventional and glyphosate tolerant soybeans and moisture effect in their discrimination by near infrared spectroscopy[J]. Food Chemistry,2013,141(3):1895-1901.
[24] Liu P F, He X Y, Chen D L, et al. A 90-day subchronic feeding study of genetically modified maize expressing Cry1Ac-M protein in Sprague-Dawley rats [J]. Food and Chemical Toxicology,2012,50(9):3215-3221.
[25] Zhu Y X, He X Y, Luo Y B, et al. A 90-day feeding study of glyphosate-tolerant maize with the G2-aroA gene in Sprague-Dawley rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 51:280-287.
[26] He X Y, Tang M Z, Luo Y B, et al. A 90-day toxicology study of transgenic lysine-rich maize grain (Y642) in Sprague-Dawley rats[J]. Food and Chemical Toxicology, 2009, 47(2):425-432.
[27] 陈金松,黄丛林,张秀海,等.环介导等温扩增技术检测含有 CaMV35S 的转基因玉米[J].华北农学报,2011,26(4):8-14.
[28] 闫兴华,许文涛,商颖,等.环介导等温扩增技术(LAMP)快速检测转基因玉米 LY038[J].农业生物技术学报,2013,21(5):621-626.
[29] 周杰,黄文胜,邓婷婷,等.环介导等温扩增法检测 6 种转基因大豆[J].农业生物技术学报,2017,25(2):335-344.
[30] 张春梅,陈蕴光,赖荷,等.患儿鸡蛋、牛奶过敏原体外检测分析[J].标记免疫分析与临床,2009,16(3):153-155.
[31] Ross M P, Ferguson M, Street D, et al. Analysis of food allergic and anaphylactic events in the national electronic injury surveillance system[J]. Journal of Allergy Clinical Immunology, 2008,121(1):166-171.
[32] Wal J M. Structure and function of milk allergens [J]. Allergy,2001,56(67):35-38.
[33] Mills E N, Valovirta E, Madsen C, et al. Information provision for allergic consumers-where are we going with food allergen labeling[J]. Allergy,2004,59(12):1262-1268.
[34] Bock S A, Munoz F A, Sampson H A. Fatalities due to anaphylactic reactions to foods [J]. Journal of Allergy Clinical Immunology,2000,107:191-193.
[35] 邹丽,李欣,佟平,等.欧盟、澳大利亚和新西兰食物过敏原标识管理及对我国启示[J].食品工业科技,2016,37(4):365-373.
[36] 郑颖,陈曙光,叶钰,等.日本食物过敏原的管理及对我国的启示[J].食品科学,2016,37(3):253-257.
[37] 李欣,陈红兵.过敏原在食品加工中的变化[J].食品工业,2005(1):50-52.
[38] 王雪,汪何雅,钱和,等.发酵法降低食品过敏性[J].食品科技,2011,36(6):302-304.
[39] 孙佳益,王锡昌,刘源,等.食物过敏原的低过敏性处理

方法及其评价体系研究进展[J].分析测试学报,2012,31(4):495-501.
[40]Sharma S,Kumar P,Betzel C,et al.Structure and function of proteins involved in milk allergies[J].Journal of Chromatography B,2001,756:183-187.
[41]Su M,Venkatachalam M,Teuber S S,et al.Impact of γ-irradiation and thermal processing on the antigenicity of almond,cashew nut and walnut proteins[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2004,84(10):1119-1125.
[42]Byun M W,Lee J W,Yook H S,et al.Application of γ-irradiation for inhibition of food allergy[J].Radiation Physice Chemistry,2002,63:369-370.
[43]夏秀华.食品加工技术对于食品过敏原的影响[J].粮食与食品工业,2012,19(5):52-55.
[44]陈颖,王玮.食物过敏原检测方法研究进展[J].检验检疫学刊,2011,21(3):4-7.
[45]郑义成,华萍,杨安树,等.食物中过敏原检测技术研究进展[J].食品科学,2010,31(21):417-421.
[46]孙秀兰,管露,单晓红,等.食品过敏原体外检测方法研究进展[J].东北农业大学学报,2012,43(2):126-132.
[47]顾可飞,李春红,高美须,等.食物过敏原及检测技术的研究进展[J].食品科技,2006,8:1-5.
[48]范安妮,佘之蕴,张施敬,等.环介导等温扩增技术检测致敏小麦的研究[J].广东化工,2016,43(2):31.
[49]宋涛平,杨丽霞,邱华丽,等.动物源性成分实时等温扩增检测方法的建立[J].食品安全质量检测学报,2017,8(8):3207-3212.
[50]刘少宁,陈智,张志民,等.鉴别绵羊肉中狐狸源性成分的环介导等温扩增检测方法的建立[J].中国食品卫生杂志,2016,28(1):75-78.
[51]谭贵良,刘垚,李向丽,等.食用植物油和地沟油中动物源性成分LAMP检测方法的建立[J].现代食品科技,2015,31(12):331-337.
[52]张国豪,黄国亮,郭素,等.一种微流控芯片及其应用:中国,201210311357.2[P].2013-01-23.
[53]Wang D,Huo G,Wang F,et al.Drawback of loop-mediated isothermal amplification[J].African Journal of Food and Science,2008(2):83-86.

(上接第235页)

胆汁排出进入肠道,在肠道内槲皮素葡萄糖苷能够被肠道菌群完全代谢为槲皮素或其他物质而被肠道重吸收[7],即槲皮素的肠肝循环。而且肠道内的糖苷水解酶只能作用于单分子葡萄糖苷,对双糖苷无活性[16],故槲皮素葡萄糖苷在肠道内比芦丁更易吸收[17]。

此外,肠道菌群个体差异也会导致苦荞提取物中芦丁在人体内的吸收差异。随着医疗水平的发展,抗生素滥用造成机体肠道菌群紊乱,由肠道菌群产生的糖苷水解酶不能正常分泌,以致人体不能有效吸收苦荞提取物中的芦丁而发挥生物活性。通过酸水解直接将苦荞提取物中的芦丁转化为槲皮素,不仅避免了肠道菌群差异带来的吸收差异性,而且还有利于提高苦荞提取物中芦丁和槲皮素的累计吸收量。

3 结论

以盐酸百分含量0.91%、水解时间6 h、乙醇百分含量50%、水解温度70 ℃为工艺条件对苦荞提取物进行酸水解,苦荞提取物中的芦丁可最大程度的转化为槲皮素。药代动力学结果表明,苦荞提取物经酸水解后其进入机体发挥生物活性的苷元槲皮素增多,达峰时间缩短、峰浓度增加。这不仅可改善苦荞提取物中芦丁吸收差和吸收慢的现象,而且对于指导苦荞的提取、深加工,开发高利用率苦荞产品具有重要意义,同时对于其他类似苷和苷元的产品开发具有借鉴作用。

参考文献

[1]朱云辉,郭元新.我国苦荞资源的开发利用研究进展[J].食品工业科技,2014,35(24):360-364.
[2]清源.苦荞的价值及开发利用现状[J].南方农业,2014,8(27):131-133.
[3]Guo XN,Yao HY.Fractionation and characterization of tartary buckwheat flour proteins[J].Food Chemistry,2006,98(1):90-94.
[4]张强,李艳琴.苦荞菜中总黄酮的测定[J].食品与药品,2007,9(4):24-25.
[5]李玉山.芦丁的资源、药理及主要剂型研究进展[J].氨基酸和生物资源,2013,35(3):13-16.
[6]骆明旭,罗丹,赵万红.槲皮素药理作用研究进展[J].中国民族民间医药,2014(17):12-14.
[7]Yang J,Qian DW,Jiang S,et al.Identification of rutin deglycosylated metabolites produced by human intestinalbacteria using UPLC-Q-TOF/MS[J].Journal of Chromatography B,2012,898(7):95-100.
[8]Schneider H,Schwiertz A,Collins MD,et al.Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract[J].Archives of Microbiology,1999,171(2):81-91.
[9]薛彩福,郭建明,钱大伟,等.黄葵醇提物中黄酮类成分在体肠吸收研究[J].药学学报,2011,46(4):454-459.
[10]Liu ZQ,Jiang ZH,Liu L,et al.Mechanisms responsible for poor oral Bioavailability of paeoniflorin:Role of intestinal disposition and interactions with sinomenine[J].Phamarceutical Reaserch,2006,23(12):2678-2780.
[11]Crespy V,Morand C,Besson C,et al.Comparison of the intestinal absorption of quercetin,phloretin and their glucosides in rats[J].Jouranl of Nutition,2001,131(8):2109-2114.
[12]胡一冰,赵钢,邹亮,等.苦荞籽提取物抗小鼠躯体疲劳作用初探[J].成都大学学报,2008,27(3):181-182.
[13]宋雨,胡一晨,李维,等.芦丁与槲皮素不同配比对大鼠体内芦丁药动学的影响[J].中国药房,2017,28(7):902-905.
[14]孟宪昉,陆兰丽.香椿叶中提取槲皮素的稳定性研究[J].食品研究与开发,2007,28(1):46-48.
[15]杨秀伟,郝美荣,服部征雄.中药成分代谢分析[M].北京:中国医药科技出版社,2003:34-35.
[16]Liu Y,Liu Y,Dai Y,et al.Enteric Disposition and Recycling of Flavonoids and Ginkgo Flavonoids[J].The Journal of Alternative and Complementary Medicine,2003,9(5):631-640.
[17]Hollman PCH,Bijsman MNCP,Gameren YV,et al.The sugar moiety is a major deteminatant of the absorption of dietary flavonoid glycosides in human[J].Free Radical Research Communication,1999,31(6):569-573.