

实时荧光 PCR 法鉴别玛咖 及其掺假物芜菁

韩建勋, 陈颖*, 张九凯, 马秀丽, 张宏蕊

(中国检验检疫科学研究院农产品安全研究中心, 北京 100176)

摘要:为建立玛咖原料及其制品中玛咖及其掺假物芜菁物种鉴别方法,根据 defensin 基因序列,分别设计了玛咖、芜菁的特异引物探针,建立了两种植物源性成分的实时荧光 PCR 检测方法。以玛咖、芜菁等 33 份样品 DNA 为模板,经实时荧光 PCR 扩增,结果表明:已建立方法分别能特异扩增玛咖、芜菁成分;灵敏度测试结果表明:本方法检测玛咖、芜菁成分的绝对灵敏度均达 0.01 ng/ μ L,相对灵敏度均达 0.1% (w/w),且能准确鉴别市售玛咖制品中的玛咖与芜菁成分。由此说明所建立方法可作为检测玛咖原料及其制品中玛咖与掺假物芜菁成分的特异性鉴别方法。

关键词:实时荧光 PCR, 玛咖, 芜菁, 掺假, 鉴别

Identification of *Lepidium meyenii* Walp (Maca) and Adulterated *Brassica rapa* L. (Rappini) by Real-time PCR

HAN Jian-xun, CHEN Ying*, ZHANG Jiu-kai, MA Xiu-li, ZHANG Hong-rui

(Agro-product Safety Research Center, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

Abstract: By the defensin gene, specific primers and probes of maca and rappini were designed, and the real-time fluorescence PCR methods for detection of both botanical components were established. The specificity of both methods were verified by using 33 samples DNA, including maca, rappini, and so on. Sensitivity test results showed that the absolute sensitivity for detecting both components reached 0.01 ng/L, the relative sensitivity was 0.1% (w/w), and the methods could accurately identify maca and rappini components in commercial maca products. Above all, the established methods could be used for the specific identification of maca and its adulterated component rappini in maca raw materials and its products.

Key words: real-time PCR; *Lepidium meyenii* Walp; *Brassica rapa* L.; adulteration; identification

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2019)06-0141-07

doi:10.13386/j.issn1002-0306.2019.06.024

引文格式: 韩建勋, 陈颖, 张九凯, 等. 实时荧光 PCR 法鉴别玛咖及其掺假物芜菁[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 141-146, 156.

玛咖 (*Lepidium meyenii* Walp) 是十字花科独行菜属植物, 药食两用, 原产于南美洲秘鲁, 现已在我国云南、四川、西藏、新疆等地大面积引种^[1]。玛咖富含生物碱、芥子油苷、甾醇、脂肪酸、多酚、玛咖酰胺和玛咖烯等多种生物活性物质^[2-4], 作为重要的保健品和新资源食品原料, 虽然当前产量不断攀升, 但仍具有价格优势。由于芜菁 (*Brassica rapa* L.) 外形与玛咖极为相似, 受经济利益驱使, 不法商家将芜菁冒充玛咖, 制成玛咖粉、玛咖片、玛咖饮品等谋取暴利, 这给玛咖健康产业有序发展带来了严重负面影响。

目前鉴别玛咖真伪的主要技术包括显微镜法^[5]、红外光谱^[6-7]、气/液相色谱^[8]、电子鼻^[9]、普通 PCR (Polymerase Chain Reaction)^[10]、RPA (Recombinase

Polymerase Amplification)^[11]、ISSR (Inter - Simple Sequence Repeat)^[12]、DNA 条形码^[13]以及 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)^[14]等。如通过对比玛咖与芜菁横切面和粉末颗粒的显微特征可鉴别两种植物^[5], 利用近红外光谱^[6-7]、电子鼻^[9]等技术结合化学计量学, 构建模式识别模型可实现玛咖产地与等级的判别, 以及采用气质联用质谱^[4], 分析玛咖挥发性组分的种类和数量差异来判定玛咖的产地和质量等。实时荧光 PCR 方法现已成为肉类^[15-16]、谷物^[17-18]、乳制品^[19]等食品原料及制品中动植物成分种类鉴定的首选, 部分检测方法已经标准化推广应用。防御素 (defensin) 是一类广泛存在于生物界的内源性抗菌肽。有文献利用玛咖 defensin 基因设计

收稿日期: 2018-04-23

作者简介: 韩建勋 (1983-), 男, 博士, 助理研究员, 研究方向: 食品真伪鉴别, E-mail: hanjianxun19830418@163.com。

* 通讯作者: 陈颖 (1972-), 女, 博士, 研究员, 研究方向: 食品质量安全与控制, E-mail: chenyingcai@163.com。

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFF0211004)。

了可特异鉴定玛咖成分的普通 PCR 引物^[10]。本研究根据 defensin 基因序列,分别设计了玛咖及掺假物芜菁特异引物探针,建立了玛咖原料及制品中玛咖与芜菁两种植物成分的实时荧光 PCR 检测方法,为鉴别玛咖真实属性提供了新的技术依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

玛咖(*L.meyenii* Walp)样品 13 份,产地分别为云南(3 份)、西藏(3 份)、四川(3 份)、新疆(3 份)及秘鲁(1 份);芜菁(*B.rapa*)样品 3 份,收集自山东、河南及新疆(详见表 1),上述样品均经云南省农业科学院药用植物研究所李晚谊研究员生态学鉴定为玛咖和芜菁;马铃薯、红薯、木薯、山药、葛根、独行菜、油菜、芥菜、甘蓝、白菜、萝卜、胡萝卜、人参、花生、大米、玉米及黄豆等原料样品 均购于北京超市;人参玛咖片、玛咖压片糖果、玛咖粉、玛咖晶华固体饮料、玛咖人参固体饮料、黑玛咖干片及玛咖片等加工制品(编号 S1~S7) 均购于北京商城(见表 1);TaqMan[®] 预混合液(4369016) 美国 ABI 公司;植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305) 天根生化科技(北京)有限公司。

BS 电子天平 德国 Sartorius 公司;M20 研磨机 德国 IKA 公司;7500 实时荧光 PCR 仪 美国 ABI 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 引物与探针设计 植物通用引物探针引自文

献[18],玛咖、芜菁特异引物探针是根据两种植物的 defensin 基因序列自行设计(表 2),由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 样品 DNA 提取 所有样品均采用天根生化科技(北京)有限公司植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)进行 DNA 提取,具体操作步骤按照说明书进行。

1.2.3 实时荧光 PCR 反应 反应体系:TaqMan[®] 预混合液 12.5 μL ;上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL ;探针(10 $\mu\text{mol/L}$)0.5 μL ;DNA 模板 5 μL ,用无菌水补至总体积为 25 μL 。

扩增程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共运行 45 个循环。

1.2.4 方法特异性分析 采用玛咖、芜菁特异引物探针分别实时荧光 PCR 扩增 13 份玛咖、3 份芜菁以及同为十字花科的独行菜、油菜、芥菜、甘蓝、白菜、萝卜和其它科属的马铃薯、红薯、木薯、山药、葛根、胡萝卜、人参、花生、大米、玉米及黄豆等 33 份样品 DNA,以确证方法的特异性,扩增程序按照 1.2.3,每个样品重复扩增 3 次。

1.2.5 方法灵敏度分析

1.2.5.1 绝对灵敏度 将已测定浓度的云南产玛咖(编号:YN1)及新疆产芜菁(编号:XJWJ)DNA,用无菌水稀释至浓度为 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$,各取 10 μL 浓度为 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 DNA 至 90 μL 无菌水中,得到浓度为 10 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 的 DNA,由此依次 10 倍梯度稀释至 1、0.1

表 1 试验样品信息

Table 1 The experimental samples information

样品名称	编号	产地	备注
玛咖	YN1	云南丽江宁蒗县	干果;有机认证
	YN2	云南丽江宁蒗县	干果;有机认证
	YN3	云南丽江宁蒗县	干果;有机认证
	XZ1	西藏林芝	干果;海拔 3000
	XZ2	西藏日喀则	粉末;海拔 3400
	XZ3	西藏拉萨	粉末
	SC1	四川阿坝县	粉末
	SC2	四川松潘县	粉末
	SC3	四川稻城	粉末
	XJ3	新疆塔县	粉末
	XJ4	新疆且末县	粉末
	XJ5	新疆且末县	干果
	BJ1	秘鲁	干果
芜菁	SDWJ	山东	鲜果
	HNWJ	河南	鲜果
	XJWJ	新疆	干果
人参玛咖片	S-1	主要配料信息:玛咖粉、人参、玉米淀粉等	
玛咖压片糖果	S-2	主要配料信息:玛咖粉,占 33.3%	
玛咖粉	S-3	主要配料信息:玛咖粉	
玛咖晶华固体饮料	S-4	主要配料信息:玛咖粉	
玛咖人参固体饮料	S-5	主要配料信息:玛咖粉,占 80%、菊粉、人参粉等	
黑玛咖干片	S-6	主要配料信息:黑玛咖	
玛咖片	S-7	主要配料信息:玛咖粉	

表2 引物探针序列
Table 2 The sequence of primers and probes

样品名称	序列(5'-3')	扩增长度	片段名称
植物通用	F:TCTGCCCTATCAACTTTCGATGCTA	137 bp	18S rRNA
	R:AATTTGCGCGCTGCTGCCCTTCCTT		
	P:FAM-CCGTTTCTCAGGCTCCCTCTCCGGAATCGAACCC-TAMRA		
玛咖	F:TCTTCTTTTGCTGCTTTTGC	119 bp	defensin
	R:TTGCTGCTGATTCTGCATTT		
	P:FAM-CATATGCAGGTGAAGTTTGTCTTT-Eclipse		
茺菁	F:GGAGCACGACATGGATCTTG	115 bp	defensin
	R:CACACAAGCACACACAGTT		
	P:FAM-AGGTGTATCTGCTACTTCCCA-Eclipse		

及 0.01 ng/μL,按照 1.2.3 进行实时荧光 PCR 扩增,分析方法的绝对灵敏度,每个样品重复扩增 3 次。

1.2.5.2 相对灵敏度 取云南产玛咖(编号:YN1)及新疆产茺菁(编号:XJWJ)各 100 g 干燥块茎样品,分别用研磨机粉碎成 60 目粉末状。取 10 g 玛咖粉加入到 10 g 茺菁粉中,充分混合均匀,保证样品在茺菁粉中均匀散布,制成含有 50% (w/w) 玛咖成分的样品;取 4 g 含有 50% (w/w) 玛咖成分的样品加入到 16 g 茺菁粉中,充分混匀制成含有 10% (w/w) 玛咖成分的样品;取 10 g 含有 10% (w/w) 玛咖成分的样品加入到 10 g 茺菁粉中,充分混匀制成含有 5% (w/w) 玛咖成分的样品;取 4 g 含有 5% (w/w) 玛咖成分的样品加入到 16 g 茺菁粉中,充分混匀制成含有 1% (w/w) 玛咖成分的样品;取 2 g 含有 1% (w/w) 玛咖成分的样品加入到 18 g 茺菁粉中,充分混匀制成含有 0.1% (w/w) 玛咖成分的样品;按照此方法再依次制成玛咖粉中含有 50%、10%、5%、1% 及 0.1% (w/w) 茺菁成分的样品。取不同重量比的玛咖粉和茺菁粉样品, DNA 提取后按照 1.2.3 进行实时荧光 PCR 扩增,分析方法的相对灵敏度,每个样品重复扩增 3 次。

1.2.6 方法适用性验证 为判定已建立方法是否适用玛咖制品中玛咖与茺菁成分的鉴别,研究中选取玛咖干片、糖果压片、干粉以及固体饮料等 4 类 7 份市售玛咖常见加工品(见表 1,编号:S-1~S-7)进行测试,每个样品取样 2 份,提取 DNA 后先扩增 18S rRNA 基因以确保样品 DNA 提取的有效性,以避免假阴性结果发生;然后扩增玛咖和茺菁的 defensin 基因以判断样品中是否含有两种植物成分,每个样品重复扩增 3 次。

1.2.7 检测结果判定 样品经植物通用引物探针实时荧光 PCR 扩增时,出现明显的荧光扩增曲线, C_t 值 < 45.0, 视为样品 DNA 提取有效;否则 DNA 提取无效,应重新提取 DNA,直至 C_t 值 < 45.0^[20]。而经玛咖、茺菁引物探针扩增时,样品如出现明显的荧光扩增曲线, C_t 值 < 40.0, 则判定样品含有玛咖或茺菁植物源性成分;如 C_t 值 \geq 45.0, 则判定为不含玛咖或茺菁植物源性成分;如 $40.0 < C_t < 45.0$, 则需重复实验,再次扩增后的 C_t 值仍 < 45.0, 则判定该样品含有玛咖或茺菁植物源性成分;再次扩增后结果 C_t 值 \geq 45.0, 则判定该样品不含玛咖或茺菁植物源性成分。

2 结果与分析

2.1 方法特异性

从 NCBI 数据库下载玛咖(GenBank. AY829229.1)和同属十字花科的茺菁(GenBank.AY383485.1)、油菜(GenBank.KC967208.1)、芥菜(GenBank.DQ191752.1)以及禾本科的玉米(GenBank.AJ849917.1) defensin 基因序列,利用 Clustal Omega 在线软件进行比对,在序列差异区分别设计了玛咖与茺菁实时荧光 PCR 特异引物及探针(图 1)。

采用植物通用引物探针扩增玛咖、茺菁、马铃薯、红薯、木薯、山药、葛根、独行菜、油菜、芥菜、甘蓝、白菜、萝卜、胡萝卜、人参、花生、大米、玉米及黄豆等 33 份样品 DNA 的 18S rRNA 基因, C_t 值在 $(19.32 \pm 0.03) \sim (30.47 \pm 0.29)$ (表 3),表明 33 份样品均提取到质量较好的 DNA;采用玛咖引物探针对上述样品进行扩增的结果显示:13 份玛咖样品均得到扩增, C_t 值在 $(27.10 \pm 0.14) \sim (31.06 \pm 0.18)$,其它样品和空白对照(无菌水)无扩增, C_t 值均为 45.0(表 3);经茺菁引物探针扩增,所有样品中 3 份茺菁和白菜样品产生典型荧光扩增曲线, C_t 值在 $(29.78 \pm 0.17) \sim (32.35 \pm 0.11)$,其它样品及空白对照(无菌水)无荧光扩增信号, C_t 值均为 45.0(表 3)。本实验结果表明,所设计的玛咖引物探针具有很好的特异性,能够有效扩增玛咖成分,且与其它植物均无交叉反应;茺菁引物探针虽与白菜有交叉反应,但与玛咖无交叉反应。

2.2 方法灵敏度

2.2.1 绝对灵敏度 将浓度为 100、10、1、0.1 及 0.01 ng/μL 的云南产玛咖(编号:YN1)及新疆产茺菁(编号:XJWJ) DNA 样品分别进行实时荧光 PCR 扩增(图 2),结果表明,当玛咖和茺菁 DNA 浓度在 0.01 ng/μL 及以上时均得到荧光扩增,空白对照(无菌水)无扩增,说明方法检测玛咖及茺菁的浓度下限均可达 0.01 ng/μL。

2.2.2 相对灵敏度 采用实时荧光 PCR 扩增质量比分别为 50%、10%、5%、1% 及 0.1% (w/w) 的云南产玛咖(编号:YN1)及新疆产茺菁(编号:XJWJ)粉末 DNA。结果表明:当玛咖粉和茺菁粉含量在 0.1% (w/w) 及以上时,均有典型荧光扩增曲线,空白对照(无菌水)无扩增,说明方法检测玛咖和茺菁的相对



图1 玛咖、芜菁、油菜、芥菜以及玉米 defensin 基因序列比对结果

Fig.1 Alignment results of defensin gene sequence among maca, rappini, rape, mustard, and corn
注:方框无灰色底纹标记序列为玛咖上、下游引物,方框有灰色底纹标记序列为玛咖探针;
下划线无灰色底纹标记序列为芜菁上、下游引物,下划线有灰色底纹标记序列为芜菁探针。

表3 玛咖与芜菁引物探针特异性分析结果

Table 3 The result of specific amplification by primers and probes of both maca and rappini

样品名称	编号	DNA 提取质量		玛咖成分		芜菁成分	
		C _i 值 ± SD	检出情况	C _i 值 ± SD	检出情况	C _i 值 ± SD	检出情况
玛咖	YN1	25.66 ± 0.05	+	30.51 ± 0.14	+	45.00	-
	YN2	26.95 ± 0.12	+	31.06 ± 0.18	+	45.00	-
	YN3	24.73 ± 0.14	+	30.25 ± 0.10	+	45.00	-
	XZ1	23.63 ± 0.20	+	27.14 ± 0.17	+	45.00	-
	XZ2	24.54 ± 0.01	+	28.86 ± 0.01	+	45.00	-
	XZ3	26.71 ± 0.57	+	30.08 ± 0.38	+	45.00	-
	SC1	22.20 ± 0.59	+	27.10 ± 0.14	+	45.00	-
	SC2	24.52 ± 0.14	+	29.35 ± 0.12	+	45.00	-
	SC3	23.33 ± 0.29	+	28.94 ± 0.21	+	45.00	-
	XJ3	24.93 ± 0.02	+	28.16 ± 0.20	+	45.00	-
	XJ4	25.60 ± 0.04	+	30.19 ± 0.27	+	45.00	-
	XJ5	24.98 ± 0.26	+	29.84 ± 0.14	+	45.00	-
	BJ1	22.94 ± 0.19	+	27.46 ± 0.09	+	45.00	-
	SDWJ	25.24 ± 0.03	+	45.00	-	31.11 ± 0.14	+
	芜菁	HNWJ	26.04 ± 0.01	+	45.00	-	29.78 ± 0.17
XJWJ		24.77 ± 0.17	+	45.00	-	31.31 ± 0.29	+
白菜		/	21.42 ± 0.08	+	45.00	-	32.35 ± 0.11
独行菜	/	19.54 ± 0.01	+	45.00	-	45.00	-
芥菜	/	20.42 ± 0.14	+	45.00	-	45.00	-
甘蓝	/	20.05 ± 0.01	+	45.00	-	45.00	-
油菜	/	22.13 ± 0.12	+	45.00	-	45.00	-
萝卜	/	19.32 ± 0.03	+	45.00	-	45.00	-
胡萝卜	/	19.95 ± 0.13	+	45.00	-	45.00	-
马铃薯	/	19.55 ± 0.07	+	45.00	-	45.00	-
木薯	/	21.69 ± 0.07	+	45.00	-	45.00	-
山药	/	20.68 ± 0.01	+	45.00	-	45.00	-
葛根	/	24.63 ± 0.11	+	45.00	-	45.00	-
人参	/	21.44 ± 0.17	+	45.00	-	45.00	-

续表

样品名称	编号	DNA 提取质量		玛咖成分		芫菁成分	
		C _i 值 ± SD	检出情况	C _i 值 ± SD	检出情况	C _i 值 ± SD	检出情况
红薯	/	20.95 ± 0.03	+	45.00	-	45.00	-
花生	/	28.42 ± 0.47	+	45.00	-	45.00	-
大米	/	22.33 ± 0.05	+	45.00	-	45.00	-
玉米	/	30.47 ± 0.29	+	45.00	-	45.00	-
黄豆	/	23.86 ± 0.24	+	45.00	-	45.00	-

注:SD 为标准偏差;“+”代表检出;“-”代表未检出;“/”代表未编号。

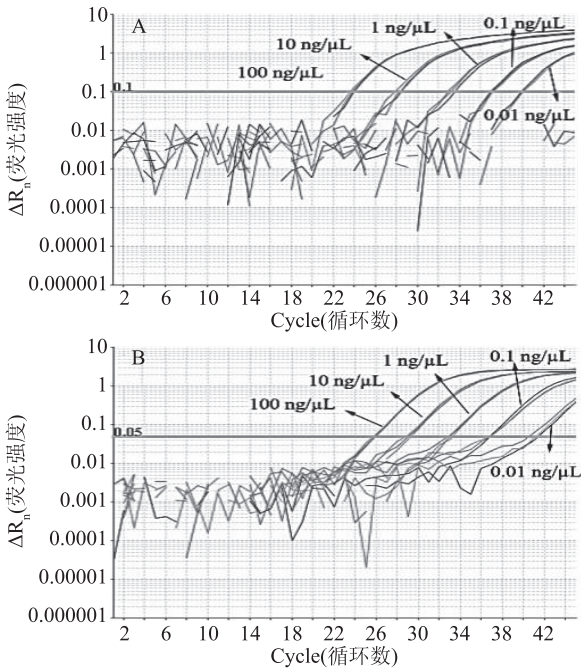


图2 实时荧光 PCR 方法绝对灵敏度检测结果

Fig.2 The absolute sensitivity of real-time PCR

注:A:玛咖;B:芫菁;图3同。

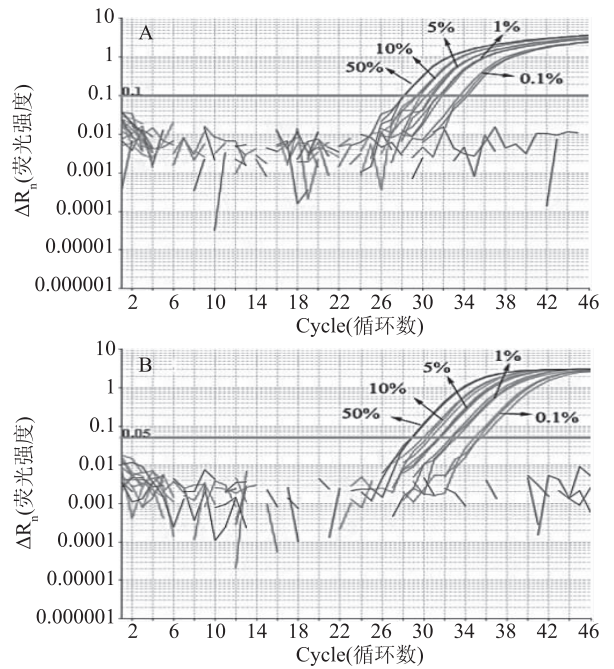


图3 实时荧光 PCR 方法相对灵敏度检测结果

Fig.3 The relative sensitivity of real-time PCR methods

灵敏度均为 0.1% (w/w) (图 3)。

2.3 对市售样品的检测

提取人参玛咖片、玛咖压片糖果、玛咖粉、玛咖晶华固体饮料、玛咖人参固体饮料、黑玛咖干片及玛咖片(编号:S-1~S-7)等7份制品 DNA(样品信息见表1),经植物通用引物探针扩增,均有典型的荧光扩增曲线,说明所有制品提取到质量合格的 DNA(图4);采用设计的玛咖检测引物探针扩增上述制品,7份标称含有玛咖成分的制品 DNA 均有显著的荧光增幅,说明7份制品中均含有标识的玛咖成分(图5A);经芫菁检测引物探针扩增发现,人参玛咖片(S-1)和玛咖粉(S-3)DNA 也有荧光增幅(图5B),而其它5份制品未出现荧光增幅,说明S-1和S-3两份样品中检出了未标识的芫菁成分。上述结果表明,本研究所建立的实时荧光 PCR 法可用于市售玛咖制品中玛咖与芫菁源性成分的鉴定。

3 讨论与结论

近年来,基于 DNA 的现代分子生物学技术克服了传统检测方法受环境、气候、加工方式等因素影响的局限性,已广泛应用在食品真伪鉴别领域。前期有文献基于普通 PCR 方法^[10]和 RPA 方法^[11]应用于

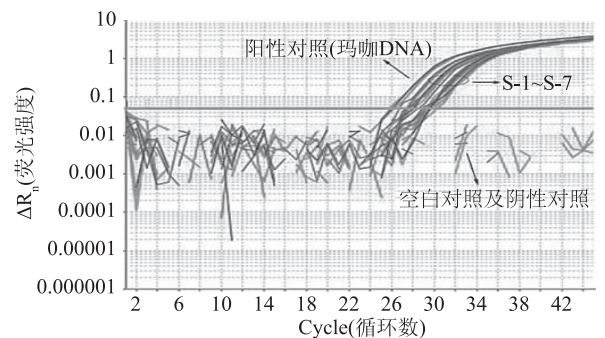


图4 市售玛咖制品 DNA 提取质量实时荧光 PCR 检测结果

Fig.4 Detection results of commercial maca products DNA quality by real-time PCR methods

玛咖、芫菁成分的检测。刘冬虹等^[10]根据玛咖 defensin 基因序列设计了玛咖特异性引物,建立了玛咖及其制品中玛咖源性成分普通 PCR 检测方法,绝对灵敏度达 0.1 ng/μL,相对灵敏度达 0.1% 以上,PCR 扩增产物片段长度为 173 bp;同时,根据芫菁 H 蛋白基因序列,设计了特异性检测芫菁源性成分的 PCR 引物,扩增产物片段长度为 147 bp。该方法只需要设计特异性引物,检测成本低,适合基层实验室

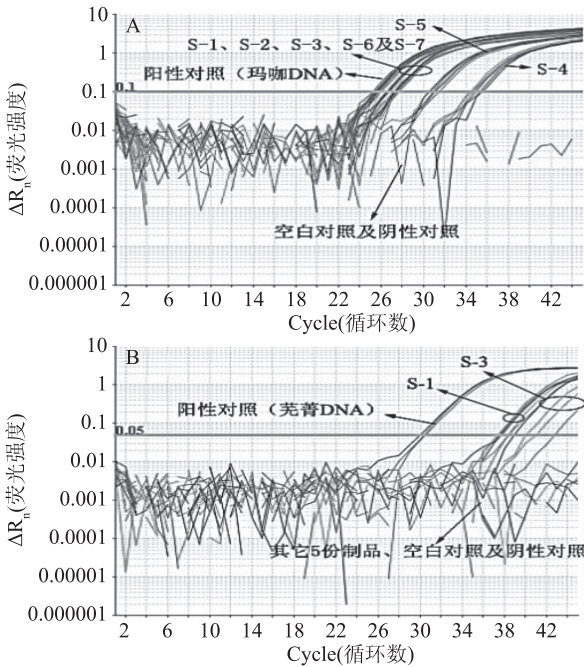


图5 市售制品中玛咖与茛菪成分实时荧光 PCR 检测结果
Fig.5 Detection results of both maca and rappini in commercial products by real-time PCR methods
注:A:玛咖;B:茛菪。

应用。郭燕华等^[11]采用 RPA 技术,根据玛咖 defensin 序列设计了玛咖特异性引物,建立了玛咖及其制品中玛咖源性成分 RPA 检测方法,检测灵敏度也达 $0.1 \text{ ng}/\mu\text{L}$,扩增产物片段长度为 186 bp 。此方法可在室温环境下完成扩增反应,检测速度更快,该研究中未提及掺假物茛菪源性成分的 RPA 检测方法。上述两种方法操作简单、成本低,但均需要琼脂糖凝胶电泳和 EB 染色,相对费时费力。比较而言,本研究建立的实时荧光 PCR 方法更灵敏,并且无需电泳、染色步骤,避免了电泳过程中易污染问题,更适于标准化推广应用。由于玛咖制品为深加工产品,受加工过程中的机械外力、化学因素的影响,其 DNA 完整性较差,因此,本研究在建立玛咖、茛菪成分实时荧光 PCR 检测方法过程中,在保证靶标基因片段特异性的前提下,尽可能缩短了检测基因扩增长度,其中玛咖扩增片段长度为 119 bp ,茛菪为 115 bp ,两者均短于上述普通 PCR 法和 RPA 法,更利于精深加工品中玛咖、茛菪物种成分的鉴定。本研究中玛咖和茛菪的特异性引物探针均是根据 defensin 基因序列设计的,由于根部膨大的茛菪由白菜驯化而成,因此两者基因同源性极高,导致茛菪的特异性引物探针与白菜也有交叉反应。但目前玛咖的掺假主要是以茛菪替代玛咖而非白菜,因此茛菪与白菜的交叉反应仍能满足玛咖掺假的鉴别。

本研究针对茛菪冒充玛咖问题,根据 defensin 基因分别设计了玛咖、茛菪特异引物探针,建立了玛咖及其制品中两种植物成分的实时荧光 PCR 鉴别方法。经验证,该方法特异性好,灵敏度高,其绝对灵敏度达 $0.01 \text{ ng}/\mu\text{L}$,相对灵敏度达 0.1% (w/w),并能准确应用于市售制品中玛咖与茛菪源性成分的检

测。上述方法仍为定性检测方法,随着微滴数字 PCR 技术在转基因产品含量^[21]以及肉制品^[22]、米制品^[23]等物种定量鉴别中的成功应用,后续拟开展玛咖及其掺假物茛菪的精准定量检测方法研究,以期对玛咖及其制品的真伪鉴别提供更有力的技术支撑。

参考文献

- [1] 张志鹏, 王文婷, 谭晓蕾, 等. 云南玛卡主产区栽培技术与生产现状调查[J]. 中国现代中药, 2015, 17(12): 1305-1307.
- [2] Valentová K, Frček J. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and Maca (*Lepidium meyenii*), Traditional andean crops as new functional foods on the European market [J]. Chemické Listy, 2001, 95(10): 594-901.
- [3] Zheng B L, He K, Kim C H, et al. Effect of a lipidic extract from *Lepidium meyenii* on sexual behavior in mice and rats [J]. Urology, 2000, 55(4): 598-602.
- [4] 郭承刚, 薛润光, 和寿星, 等. 不同产地玛咖挥发油成分的 GC-MS 分析[J]. 贵州农业科学, 2016, 44(12): 129-132.
- [5] 李学芳, 邱斌, 蒲星宇. 玛卡与混淆品茛菪的比较鉴别[J]. 中药材, 2015, 38(8): 1643-1645.
- [6] 刘宇, 陈文仿, 王江瑞, 等. 红外光谱结合化学计量分析对不同产地玛咖的鉴别[J]. 中药材, 2016, 39(12): 2733-2737.
- [7] 王元忠, 赵艳丽, 张霖, 等. 红外光谱结合统计分析对不同产地玛咖的鉴别分类[J]. 食品科学, 2016, 37(4): 169-175.
- [8] 刘兴勇, 邵金良, 陈兴连, 等. 基于高效液相色谱指纹图谱的玛咖及其制品真实性识别[J]. 农业工程学报, 2016, 32(6): 302-307.
- [9] 党艳婷, 苑鹏, 夏凯, 等. 基于气味指纹图谱的玛咖品质快速鉴定方法[J]. 食品科学, 2018, 39(6): 291-297.
- [10] 刘冬虹, 王德莲, 郭燕华, 等. 玛卡及其制品的 PCR 方法鉴别研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1): 319-333.
- [11] 郭燕华, 王德莲, 刘冬虹, 等. 重组聚合酶等温扩增技术快速鉴别玛卡及其制品的研究[J]. 粮食与油脂, 2017, 30(7): 51-54.
- [12] 谭晓蕾, 易帆, 谭芳, 等. 不同产地玛卡遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国现代中药, 2016, 18(11): 1443-1447.
- [13] 王江瑞, 陈文仿, 许莉, 等. 基于 ITS2 条形码的玛咖药材鉴别及 9 种元素的测定[J]. 药物分析杂志, 2017(4): 677-687.
- [14] Zhao J, Wang M, Khan I A. Detection of adulteration in dietary supplements: Maca (*Lepidium meyenii*) case study by NMR approach [J]. Planta Medica, 2015, 81(11): 12.
- [15] Alkahtani H A, Ismail E A, Asif A M. Pork detection in binary meat mixtures and some commercial food products using conventional and real-time PCR techniques [J]. Food Chemistry, 2017, 219: 54-60.
- [16] Meira L, Costa J, Villa C, et al. EvaGreen real-time PCR to determine horse meat adulteration in processed foods [J]. LWT-Food Science and Technology, 2017, 75: 408-416.
- [17] Carloni E, Amagliani G, Omiccioli E, et al. Validation and application of a quantitative real-time PCR assay to detect common wheat adulteration of durum wheat for pasta production [J]. Food Chemistry, 2016, 224: 86-91.

(下转第 156 页)

polydextrose as dietary fiber in foods [J]. Journal of Aoac International, 2000, 83(4):1006-1012.

[10] 张丰, 李远, 韦琴, 等. 香蕉皮不溶性膳食纤维提取工艺优化及其在面包中的应用研究[J]. 安徽农学通报, 2016, 22(6):136-138.

[11] 王婷婷. 内源乳化法制备干酪乳杆菌微胶囊及其在乳清发酵中应用[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2016:13-15.

[12] Siaterlis A, Deepika G, Charalamopoulos D. Effect of culture medium and cryoprotectants on the growth and survival of probiotic lactobacilli during freeze drying [J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 48(3):295-301.

[13] 李宁. 双歧杆菌微胶囊制备工艺及功能特性的研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2007:14-15.

[14] 冯超. 植物乳杆菌微胶囊制备技术及其消化道耐受性研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2012:51-53.

[15] 肖仔君, 陈惠音, 杨汝德. 嗜酸乳杆菌及其应用研究进展[J]. 广州食品工业科技, 2003, 19(增1):90-92.

[16] 郝莹, 王卫卫, 马齐, 等. 冻干乳酸双歧杆菌微胶囊的制备及存活性能研究[J]. 食品科学, 2009, 30(9):163-167.

[17] 周裔军, 张玉苍, 张德拉, 等. 超声辅助碱处理对卡拉胶影响的研究[J]. 食品科技, 2016, 41(3):91-94.

[18] 宋雅娟. 壳聚糖/黄原胶益生菌微胶囊制备及应用[D]. 西安: 陕西科技大学, 2015:20-22.

[19] 徐晶, 刘欢, 夏光辉, 等. β -环糊精包埋柠檬醛微胶囊工艺优化及其缓释性能[J]. 食品科学, 2014, 35(14):82-86.

[20] 谢清若, 郑立文, 凌新龙, 等. 响应面法优化微波辅助提取松针多糖工艺研究[J]. 食品科技, 2010, 35(12):201-205.

[21] 马光路, 吕建波, 曹青. 玉米秸秆中木质素、半纤维素和

纤维素的组分分离研究[J]. 中国农业科技导报, 2015, 17(6):70-79.

[22] 张艳荣, 魏春光, 崔海月, 等. 马铃薯膳食纤维的表征及物性分析[J]. 食品科学, 2013, 34(11):19-23.

[23] 王碧, 覃松, 杨意, 等. 海藻酸钠-硫酸软骨素共混膜的结构及性能研究[J]. 化学研究与应用, 2007, 19(7):740-744.

[24] 张雁飞, 孟繁蓉, 郭艺伟, 等. 食品包装用卡拉胶-甲基纤维素膜的制备及表征[J]. 食品科技, 2017, 42(11):62-66.

[25] 李晓娣. 大豆分离蛋白微胶囊的研制及其对乳酸菌保护效果评价[D]. 哈尔滨: 黑龙江大学, 2012:29-32.

[26] 李萍, 舒展, 申晓霞, 舒婷. 超声波法制备八角茴香油- β -环糊精微胶囊及其表征分析[J]. 食品科学, 2017, 38(4):243-249.

[27] 廖霞, 杨小兰, 李瑶, 等. 槲皮素微胶囊的贮藏稳定性及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2017, 38(1):60-66.

[28] Kim W, Chung H, Shin I, et al. Characterization of calcium alginate and chitosan - treated calcium alginate gel beads entrapping allyl isothiocyanate [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(4):566-573.

[29] 李丹丹, 金征宇, 徐学明, 等. 菊糖- κ -卡拉胶-牛奶饮料的流变行为[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(2):172-176.

[30] Wang Y, Funk M A, Garleb K A, et al. The effect of fiber source in enteral products on fecal weight, mineral balance, and growth rate in rats [J]. Jpn Journal of Parenteral & Enteral Nutrition, 1994, 18(4):340-345.

[31] Roopa B S, Bhattacharya S. Alginate gels: I. Characterization of textural attributes [J]. Journal of Food Engineering, 2008, 85(1):123-131.

(上接第146页)

[18] 韩建勋, 吴亚君, 王斌, 等. 实时荧光 PCR 法快速检测食用淀粉中的木薯成分[J]. 检验检疫学刊, 2015(6):4-8.

[19] Šnirc M, Fekete T, L'ubomir Bele, et al. Detection of ovine milk adulteration using Taqman real-time PCR assay [J]. Potravinarstvo, 2017, 11(1):338-343.

[20] SN/T 3729.6-2013 出口食品及饮料中常见水果品种的鉴定方法, 第6部分: 苹果成分检测, 实时荧光 PCR 法[S].

[21] Dobnik D, Spilberg B, Bogožalec A, et al. Multiplex quantification of twelve EU authorized GM maize lines with

droplet digital PCR [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(16):8218-8226.

[22] Ren J, Deng T, Huang W, et al. A digital PCR method for identifying and quantifying adulteration of meat species in raw and processed food [J]. Plos One, 2017, 12(3):1-17.

[23] Bucher T B, Köppel R. Duplex digital droplet PCR for the determination of non-Basmati rice in Basmati rice (*Oryza sativa*) on the base of a deletion in the fragrant gene [J]. European Food Research & Technology, 2016, 242(6):927-934.

因本刊已被《中国知网》
(包括“中国知网”优先数字出版库)
独家全文收录, 所以所付稿酬中
已包含该网站及光盘应付的稿酬。