

## 实验技术与方法

## 固相萃取-高效液相色谱法测定禽蛋中斑螫黄和叶黄素

陈东洋,张昊,冯家力,曾栋,袁春晖,刘先军,李帮锐

(湖南省疾病预防控制中心,湖南长沙 410005)

**摘要:**目的 对目前尚未列入监控的禽蛋中类胡萝卜素着色剂(斑螫黄和叶黄素)建立高效液相色谱检测方法。通过优化测定条件及前处理方法,有效排除蛋黄中脂肪、蛋白质等带来的干扰。**方法** 样品经正己烷超声提取,过中性氧化铝柱净化,采用 $C_{30}$ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m)分离,用含0.1%二丁基羟基甲苯的乙腈-甲基叔丁基醚(8:2, V/V)和水溶液梯度洗脱,高效液相色谱法测定,外标法定量。**结果** 在优化后色谱条件下,斑螫黄和叶黄素在0.20~10.0 mg/L浓度范围内,线性关系良好,相关系数( $r$ ) $\geq 0.999 3$ ,方法检出限分别为0.02和0.08 mg/kg,回收率为89.3%~102%,相对标准偏差(RSD)为2.2%~4.9%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏,适用于禽蛋中斑螫黄和叶黄素的同时测定。

**关键词:**禽蛋;类胡萝卜素;斑螫黄;叶黄素;高效液相色谱

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2020)01-0045-05

DOI:10.13590/j.cjfh.2020.01.008

### Determination of canthaxanthin and xanthophyll in eggs by SPE-high performance liquid chromatography

CHEN Dongyang, ZHANG Hao, FENG Jiali, ZENG Dong, YUAN Chunhui, LIU Xianjun, LI Bangrui  
(Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hunan Changsha 410005, China)

**Abstract: Objective** An analytical method was established for the two carotenoid colorants, which had not been included in the monitoring. The interferences such as fat and protein were effectively excluded through the optimization of pretreatment and detection conditions. The method on simultaneous determination of canthaxanthin and xanthophyll in eggs was successfully developed. **Methods** The samples were extracted by a simple ultrasonic extraction procedure with n-hexane and cleaned up on a neutral alumina cartridge. The analytes was separated by  $C_{30}$  column (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu$ m) with acetonitrile; methyl tertiary butylether (8 : 2, V/V, containing 0.1% butylated hydroxytoluene) and water solution as mobile phases in gradient model. Then the carotenoids were detected with DAD detector. **Results** Under optimizing chromatographic conditions, the linear of the method were 0.20-10.0 mg/L with  $r \geq 0.999 3$ . The recoveries of the method were 89.3%-102% with relative standard deviations (RSDs) of 2.2%-4.9%. The limits of detection were 0.02-0.08 mg/kg. **Conclusion** The method was convenient, accurate and sensitive, and it was suitable for the determination of canthaxanthin and xanthophyll in egg samples.

**Key words:** Egg; carotenoid; canthaxanthin; xanthophyll; high performance liquid chromatography

禽蛋是消费最为广泛的食品之一,具有橙红色蛋黄的禽蛋深受广大消费者的喜爱,因此有养殖者通过喂养含着色剂的饲料使蛋黄产生理想颜色以迎合消费者的喜好。类胡萝卜素中斑螫黄和叶黄素是饲料中应用较广的能对禽蛋进行着色的添加剂,在我国农业部第2045号公告《饲料添加剂品种目录(2013)》中允许作为家禽饲料着色剂使用。但

斑螫黄和叶黄素对禽体没有营养价值,其经肠道吸收后仍保持原来的颜色和分子结构,并在蛋黄内沉积而起到着色效果<sup>[1]</sup>,而人体过量摄入此类物质可能带来健康威胁,如斑螫黄会积累在视网膜上导致视力减退等眼疾<sup>[2]</sup>。联合国粮食及农业组织和世界卫生组织联合食品添加剂专家委员会规定斑螫黄每日允许摄入量为0.03 mg/kg BW<sup>[3]</sup>,日本“肯定列表制度”规定禽蛋中斑螫黄的最大残留限量为0.1 mg/kg,而我国对动物源性食品中斑螫黄和叶黄素最大残留量尚无规定;因此,对禽蛋中斑螫黄和叶黄素进行监测是十分必要的。

目前斑螫黄和叶黄素的测定方法主要有紫外

收稿日期:2019-10-18

作者简介:陈东洋 男 主管技师 研究方向为理化检验技术

E-mail: dychen2008@126.com

通信作者:冯家力 男 主任技师 研究方向为实验室质量控制

E-mail: goodlucklkh@163.com

可见分光光度法<sup>[4]</sup>、高效液相色谱(HPLC)法<sup>[5-6]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[7]</sup>等。其中紫外分光光度法灵敏度较低;液相色谱-串联质谱法灵敏,但使用成本高;HPLC仪普及率高,分析速度快,适合基层应用。此外,禽蛋中含有大量的蛋白质、脂肪,若直接提取测定会损伤色谱柱,且影响目标物的分离,因此有必要对样品进行净化,常见的除脂方法有液液萃取法、凝胶渗透色谱法、固相萃取法等。液液萃取法和凝胶渗透色谱法所需时间长,耗费溶剂多。固相萃取法是纯化脂溶性色素的有效方法<sup>[8]</sup>。PÉREZ FERNÁNDEZ等<sup>[9]</sup>以C<sub>18</sub>为填料,利用基质固相分散技术,对虹鳟鱼中的斑螫黄等进行纯化,有效去除杂质。李欢等<sup>[10]</sup>采用氨基固相萃取小柱(LC-NH<sub>2</sub>)纯化大黄鱼皮肤的类胡萝卜素,回收率达83.28%~96.58%;因此本试验建立禽蛋中斑螫黄和叶黄素的HPLC测定方法,通过固相萃取前处理消除禽蛋中蛋白质、脂肪及其他杂质的干扰。建立的方法快速、准确、灵敏,可用于禽蛋中斑螫黄和叶黄素的同时测定,对保护消费者权益有重要的现实意义。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪附二极管阵列(DAD)检测器(美国 Agilent)、超声波清洗仪、TGL16 高速冷冻离心机、VORTE-X 涡旋混匀器。

斑螫黄(35520035, 100 mg/L, 上海安谱实验科技股份有限公司), 叶黄素(B21485, 纯度≥98%, 上海源叶生物科技有限公司), 乙腈、甲基叔丁基醚、正己烷、丙酮、二氯甲烷均为色谱纯, 无水硫酸钠、二丁基羟基甲苯(BHT)均为优级纯, 其他试剂除特别说明, 均为分析纯。试验用水为经 Millipore 处理的一级水。中性氧化铝柱(500 mg, 6 ml, 上海安谱实验科技股份有限公司), 硅胶柱(500 mg, 6 ml, 美国 Supelco)。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 样品前处理

取若干禽蛋除去蛋清, 取蛋黄均质后取样。称取 5.0 g 样品于 50 ml 离心管中, 加入 0.1 g BHT 和 5 ml 20 g/L 硫酸钠溶液, 涡旋 30 s。加入 20 ml 正己烷超声提取 15 min, 涡旋混匀, 8 000 r/min 离心 10 min(离心半径 125 mm), 取上清液 10 ml 过中性氧化铝柱(预先用 5.0 ml 正己烷活化), 用 5 ml 正己烷淋洗, 再用 5 ml 二氯甲烷-甲基叔丁基醚(1:1, V/V)洗脱, 洗脱液氮吹至近干, 用 1.0 ml 初始流动相溶液复溶, 经 0.22 μm 有机滤膜过滤后, 待 HPLC 测定。

#### 1.2.2 标准溶液配制

准确称取叶黄素标准物质于 10 ml 容量瓶中, 用二氯甲烷溶解定容。吸取斑螫黄和叶黄素标准储备液用 0.1% BHT 乙腈稀释制备成 10.0 mg/L 标准中间液, 临用前, 用初始流动相溶液稀释成相应的标准曲线浓度。

#### 1.2.3 仪器条件

色谱柱:C<sub>30</sub>柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温 30 ℃, 流动相及梯度:A 为含 0.1% BHT 的乙腈-甲基叔丁基醚(8:2, V/V)溶液, B 为水溶液; 梯度洗脱程序:0~6 min, 75% A, 6~10 min, 75%~99% A, 10~16 min, 99% A, 16~17 min, 99%~75% A; 17~25 min, 75% A; 流速 1.0 ml/min; 进样量 10 μl; 检测波长:斑螫黄 473 nm, 叶黄素 447 nm。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱条件的优化

在化学合成的类胡萝卜素着色剂中, 反式构型比顺式更为稳定, 且着色效果更佳<sup>[11]</sup>, 因此人为添加的斑螫黄和叶黄素主要为反式异构体。研究<sup>[12]</sup>表明斑螫黄和叶黄素在动物体内经消化、吸收、血液运输和肝脏代谢后, 其分子几何异构体无明显变化, 因此本试验以全反式斑螫黄和叶黄素为待测物。

目前斑螫黄和叶黄素的测定常采用正相色谱法<sup>[13-14]</sup>。而在类胡萝卜素的测定中, 研究者常采用长碳链的反相色谱柱如 C<sub>30</sub>、YMC-pack 硅胶柱通过增强固定相与类胡萝卜素分子的作用来改善类胡萝卜素的保留时间、峰形及分离类胡萝卜素同分异构体<sup>[15]</sup>。本方法考察了 C<sub>30</sub>、YMC-pack 硅胶柱和 C<sub>18</sub>柱对斑螫黄和叶黄素的分离效果。发现 3 种色谱柱均对叶黄素和斑螫黄有很好的分离能力, 但考虑到如玉米等为饲料可能带入的其他类胡萝卜素的干扰, 故选用 C<sub>30</sub> 色谱柱。此外, 通过 HPLC-DAD 检测器对斑螫黄和叶黄素进行光谱扫描, 以确定最大吸收波长, 结果表明斑螫黄的最大吸收波长为 473 nm, 叶黄素为 447 nm。

加入适量甲基叔丁基醚有助于斑螫黄和叶黄素的洗脱。比较甲基叔丁基醚的浓度对分离效果的影响。分别添加 0%、10%、20%、30%、40%、50% 甲基叔丁基醚于乙腈中, 试验发现添加甲基叔丁基醚有助于改善两种类胡萝卜素的峰形, 但甲基叔丁基醚含量过高, 色谱噪声会增大, 甲基叔丁基醚浓度为 20% 时峰形最好, 因此在含 0.1% BHT 的乙腈溶液中加入 20% 的甲基叔丁基醚作为流动相(图 1)。

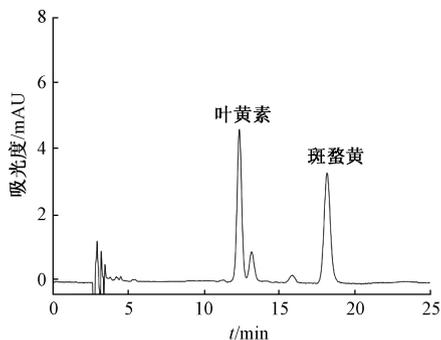


图1 斑螫黄和叶黄素标准色谱图

Figure 1 Chromatogram of canthaxanthin and xanthophylls standards

## 2.2 前处理方法的优化

### 2.2.1 样品的处理

目前对蛋黄的取样方式,主要采用煮熟后取蛋黄部分和冷冻后取样。前者在加热过程类胡萝卜素会分解或转化导致类胡萝卜素的损失<sup>[16]</sup>,后者操作繁琐,亦可能导致待测物的降解,因此本试验采用去壳后直接取蛋黄使用。此外,研究<sup>[17]</sup>认为只有游离态的类胡萝卜素才能被禽类吸收,斑螫黄和叶黄素经肠道吸收后在蛋黄中仍以游离态存在,因此测定禽蛋中斑螫黄和叶黄素不需皂化处理。

此外,禽蛋富含蛋白质、脂肪,直接提取测定会带来干扰。有文献采用乙腈提取,乙腈饱和的正己烷除脂<sup>[18]</sup>,但试验发现脂溶性的斑螫黄和叶黄素会进入正己烷层,造成损失;因此,样品提取后进行固相萃取净化。

### 2.2.2 提取溶液的选择

斑螫黄和叶黄素为脂溶性化合物,考察了正己烷、二氯甲烷、二氯甲烷-正己烷(1:1, V/V)、二氯甲烷-丙酮(8:2, V/V)对斑螫黄和叶黄素的提取效果。结果发现4种溶剂均能把斑螫黄和叶黄素提取出来,但考虑到后续固相萃取处理采用了正相萃取柱,二氯甲烷、二氯甲烷-正己烷(1:1, V/V)、二氯甲烷-丙酮(8:2, V/V)均出现“穿透”现象,因此采用正己烷作为提取液。

### 2.2.3 固相萃取条件的优化

考察了硅胶柱和中性氧化铝柱对蛋黄中斑螫黄和叶黄素的净化效果。结果表明硅胶柱对斑螫黄有较好的吸附效果,回收率达106%,但对叶黄素的保留稍弱,目标物能穿透柱体。而中性氧化铝柱对这两种类胡萝卜素有较好的吸附效果,能对样品进行较好的净化,因此,选用中性氧化铝柱对斑螫黄和叶黄素进行净化。采用5.0 ml 二氯甲烷-甲基叔丁基醚(1:1, V/V)洗脱,回收率为93.2%~102%。

## 2.3 方法性能

### 2.3.1 方法线性范围及检出限

在确定最佳测定条件下,按1.2.3色谱条件,以浓度为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归。斑螫黄和叶黄素在0.20~10.0 mg/L浓度范围线性关系良好,相关系数 $r \geq 0.9993$ 。以仪器信噪比(S/N)为3时所对应的标准溶液浓度为仪器检出限,根据前处理方法,方法的检出限分别为0.02、0.08 mg/kg(表1)。

表1 方法线性范围,回归方程及检出限

Table 1 Linear range, regression equation and detection limit of the methods

名称	线性范围/(mg/L)	回归方程	相关系数 $r$	检出限/(mg/kg)
斑螫黄	0.20~5.0	$y = 12.371x + 0.3546$	0.9997	0.02
叶黄素	0.50~10.0	$y = 5.729x - 0.5432$	0.9993	0.08

### 2.3.2 方法回收率及精密度

在空白样品及阳性样品中分别添加3个水平的混合标准溶液,每个添加浓度平行测定6次。按1.2.1进行前处理并分析,计算回收率和相对标准偏差(RSD)。两种类胡萝卜素的回收率为89.3%~102%,RSD为2.2%~4.9%,结果表明建立的方法重复性好,回收率结果理想,见表2。

表2 方法的回收率和RSD( $n=6$ )

Table 2 Method recoveries and relative standard deviations

待测物	本底/(mg/kg)	添加水平/(mg/kg)	回收率/%	RSD/%
斑螫黄	ND	0.2	96.3	4.8
		0.4	98.7	4.2
		0.8	102	3.2
	5.05	2.5	99.5	4.9
		5.0	101	3.3
		10.0	97.2	3.4
叶黄素	ND	0.5	92.8	4.4
		1.0	99.1	2.2
		2.0	98.3	3.8
	5.95	3.0	89.3	4.2
		6.0	99.4	4.1
		12.0	98.6	2.8

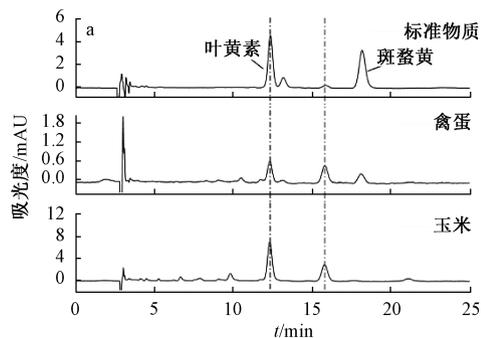
注:ND为未检出

## 2.4 实际样品检测

采用本试验建立的方法对市售鲜鸡蛋、鸭蛋和鹅蛋共8份样品进行测定,均检出叶黄素,2份样品同时检出叶黄素和斑螫黄。叶黄素浓度为3.27~7.31 mg/kg,而斑螫黄含量为5.05~8.37 mg/kg。

另一方面,玉米饲料含有玉米黄素、叶黄素、 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、 $\alpha$ -隐黄素、 $\beta$ -隐黄素、环氧二氢胡萝卜素和莖菜黄素等多种类胡萝卜素,叶黄素、玉米黄素为主要成分,且互为同分异构体,因此玉米黄素是对禽蛋中叶黄素测定结果干扰的主要

因素<sup>[19]</sup>。为排除玉米饲料本身含有的其他类胡萝卜素对结果的干扰,将玉米样品按同样前处理步骤处理后测定。图2a可以看出玉米和禽蛋样品各组分色谱峰分离良好,峰形尖锐,无明显干扰峰存在。此外发现这两种样品均含有叶黄素峰及未知峰,通过特征光谱辅助鉴别这两个峰具有类似的特征光



谱(图2b),将其与已有报道<sup>[20]</sup>比较,推测该未知峰可能为玉米黄素峰。此外,C<sub>30</sub>色谱柱亦被证实是分离叶黄素和玉米黄素的有效手段<sup>[21]</sup>;因此玉米饲料基质引入的其他类胡萝卜素对禽蛋中的叶黄素测定无明显干扰,本方法适用于禽蛋中叶黄素和斑蝥黄的同时测定。

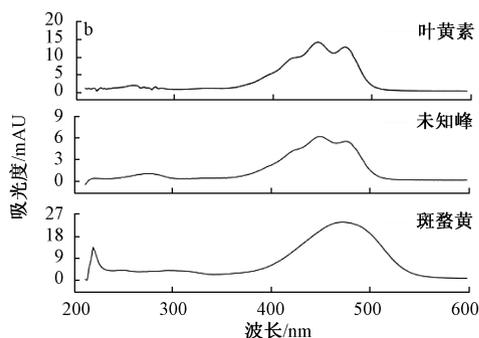


图2 样品色谱图(a)和光谱图(b)

Figure 2 Chromatogram (a) and spectrograms (b) of the samples

### 3 小结

本试验建立了固相萃取-HPLC同时测定禽蛋中斑蝥黄和叶黄素的方法。采用中性氧化铝柱对这两种类胡萝卜素进行净化,获得简单、快捷的前处理方法;同时对HPLC分离检测条件进行优化。斑蝥黄和叶黄素的检出限分别为0.02和0.08 mg/kg,回收率为89.3%~102%,RSD为2.2%~4.9%。方法灵敏、可靠,适用于禽蛋中斑蝥黄和叶黄素的同时测定。

### 参考文献

- [1] DAI M G, CAMOES M F G F C, OLIVEIRA L. Carotenoid stability in fruits, vegetables and working standards-effect of storage temperature and time [J]. Food Chemistry, 2014, 156 (1): 37-41.
- [2] JIA J, WANG Y X, LIU Y Y, et al. Exploration of interaction of canthaxanthin with human serum albumin by spectroscopic and molecular simulation methods [J]. Luminescence, 2018, 33 (2): 425-432.
- [3] Evaluations of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). Canthaxanthin [S/OL]. [2019-10-17]. <http://apps.who.int/food-additives-contaminants-jecfa-database/chemical.aspx?chemID=1268>.
- [4] 赵婷,惠伯棣,裴凌鹏. 斑蝥黄质在雄性大鼠血清中的积累研究[J]. 食品科学, 2012, 33(5): 260-262.
- [5] 郑国建,关岩,杨方,等. 高效液相色谱法检测婴幼儿奶粉中的叶黄素[J]. 中国乳品工业, 2016, 44(1): 51-53.
- [6] LIGOR M, KOVÁČOVÁ J, GADZAŁA-KOPCIUCH M, et al. Study of RP HPLC retention behaviours in analysis of carotenoids [J]. Chromatographia, 2014, 77(15/16): 1047-1057.
- [7] BRIZIO P, BENEDETTO A, RIGHETTI M, et al. Astaxanthin and canthaxanthin (xanthophylls) as supplements in rainbow

trout diet; in vivo assessment of residual levels and contributions to human health [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61 (46): 10954-10959.

- [8] CHEN D Y, ZHANG H, FENG J L, et al. Research on the determination of 10 industrial dyes in foodstuffs [J]. J Chromatogr Sci, 2017, 55(10): 1021-1025.
- [9] PÉREZ FERNÁNDEZ P, VENTURA S, TOMAI P, et al. Determination of target fat-soluble micronutrients in rainbow trout's muscle and liver tissues by liquid chromatography spectrometry detection [J]. Electrophoresis, 2017, 38(6): 886-896.
- [10] 李欢,段青源,桑卫国. 固相萃取-反相高效液相色谱法测定大黄鱼皮肤主要色素[J]. 食品工业科技, 2015, 36(4): 57-61.
- [11] PRIYADARSHANI A M. A review on factors influencing bioaccessibility and bioefficacy of carotenoids [J]. Crit Rev Food Scid Nutr, 2017, 57(8): 1710-1717.
- [12] 惠伯棣,赵婷,裴凌鹏. 斑蝥黄质分子在大鼠体内代谢中的几何异构体组成变化[J]. 中国食品添加剂, 2012(1): 134-139.
- [13] 李俊,程业飞,苏越,等. 阿朴酯和斑蝥黄复合对蛋鸡抗氧化功能、蛋品质和蛋黄色素沉积的影响[J]. 湖北农业科技, 2018, 57(18): 88.
- [14] 中华人民共和国农业部. 饲料中斑蝥黄的测定 高效液相色谱法: NY/T 2896—2016[S]. 北京: 中国农业出版社, 2016.
- [15] TSIAKA T, LANTZOURAKI D Z, SIAPI E, et al. Macular carotenoids in lipid food matrices: DOE-based high energy extraction of egg yolk xanthophylls and quantification through a validated APCI(+) LC-MS/MS method [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2018, 1096(8): 160-171.
- [16] 孙丹丹,柳且明,刘东东. 市售鸡蛋中类胡萝卜素含量的检测及稳定性研究[J]. 广东饲料, 2013, 22(10): 21-23.
- [17] 赵学超,陆建安,王淼,等. 鸡蛋黄中叶黄素清除 DPPH 自由基活性研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(10): 149-151.
- [18] 杨梅,张姮婕,陈红. 超高效液相色谱-串联质谱法测定禽蛋中2种色素残留[J]. 中国食品卫生杂志, 2017, 29(2): 176-180.

- [19] FENG F Q, WANG Q F, ZHANG J, et al. Assessment of carotenoid and tocopherol level in sweet corn inbred lines during kernel development stages [J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 2015, 75(2): 196-200.
- [20] STINCO C M, BENÍTEZ-GONZÁLEZ A M, MELÉNDEZ-MARTÍNEZ A J, et al. Simultaneous determination of dietary

isoprenoids ( carotenoids, chlorophylls and tocopherols) in human faeces by rapid resolution liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 2019, 1583(11): 63-72.

- [21] 曾东慧. 柑橘果皮类胡萝卜素提取物对鸡蛋蛋黄中类胡萝卜素成分及其色泽影响的研究 [D]. 杭州: 浙江师范大学, 2013.

## 实验技术与方法

# 转基因甜菜 GTSB77 品系特异性实时荧光聚合酶链式反应检测方法建立

刘二龙<sup>1</sup>, 卢丽<sup>2</sup>, 吕英姿<sup>1</sup>, 蒋湘<sup>1</sup>, 李嘉琪<sup>1</sup>, 夏柔菲<sup>1</sup>

(1. 黄埔海关技术中心, 广东 广州 510730; 2. 广州海关技术中心, 广东 广州 510623)

**摘要:**目的 为实现转基因甜菜 GTSB77 的标识管理, 建立其品系特异性实时荧光聚合酶链式反应 (PCR) 检测方法。方法 针对 GTSB77 的 3' 端外源插入片段与甜菜基因组 DNA 之间的邻接区序列设计引物和探针, 建立 GTSB77 品系特异性实时荧光 PCR 检测方法, 并对该方法的特异性、灵敏度和重复性进行检测。结果 建立的 GTSB77 检测方法特异性强, 定量限 (LOQ) 为 16 拷贝, 扩增效率为 102%, 重复性测试结果相对标准偏差 (RSD) 介于 0.21%~1.66% 之间。结论 建立的实时荧光 PCR 方法可应用于 GTSB77 的鉴定检测。

**关键词:** 转基因甜菜 GTSB77; 实时荧光聚合酶链式反应; 品系特异性

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)01-0049-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.01.009

## Establishment of event-specific quantitative real-time polymerase chain reaction for detecting genetically modified sugarbeet GTSB77

LIU Erlong<sup>1</sup>, LU Li<sup>2</sup>, LYU Yingzi<sup>1</sup>, JIANG Xiang<sup>1</sup>, LI Jiaqi<sup>1</sup>, XIA Roufei<sup>1</sup>

(1. Huangpu Customs Technology Center, Guangdong Guangzhou 510730, China;

2. Guangzhou Customs Technology Center, Guangdong Guangzhou 510623, China)

**Abstract: Objective** For implementation of labeling regulations, an event-specific real-time polymerase chain reaction (PCR) method for quantitative detection of sugarbeet GTSB77 was established. **Methods** The specific primer pairs and probe based on the 3' flanking sequence of GTSB77 were designed. The specificity, sensitivity and repeatability of the developed method were examined, respectively. **Results** The specificity test showed it specific for GTSB77 detection. The limit of quantification (LOQ) was 16 copies and the amplification efficiency was 102%. Repeatability of the established method was assessed and the relative standard deviation (RSD) ranged from 0.21%-1.66%. **Conclusion** This event-specific real-time PCR method is suitable for identification of GTSB77.

**Key words:** Sugarbeet GTSB77; real-time polymerase chain reaction; event-specific

甜菜是一种重要经济作物, 目前美国和加拿大 95% 以上种植的甜菜均为转基因甜菜。目前上市的转基因甜菜品系共有三个: GTSB77、T120-7 和 H7-1, 其中仅 H7-1 获得我国农业部批准用于糖、甜菜浆及加工原料。

转基因甜菜 GTSB77 (以下简称 GTSB77) 是由诺华公司和孟山都公司研发的具抗草甘膦除草剂特性的甜菜品系, 商品名为: InVigor™ sugarbeet。1998—2004 年间, 陆续在美国、日本、加拿大、澳大利亚、菲律宾被批准作为食品或饲料用途<sup>[1]</sup>。

GTSB77 经农杆菌转入 *cp4-epsps*、*uidA* 和修饰过的 *gox* 三个外源基因研发而成, *uidA* 基因来自大肠埃希菌的  $\beta$ -葡萄糖醛酸酶作为筛选标记, *cp4-epsps* 和 *gox* 基因均为草甘膦除草剂耐受基因, *cp4-epsps* 基因编码 5-烯醇式丙酮酰莽草酸-3-磷酸合成酶, 对

收稿日期: 2019-12-22

基金项目: 广东出入境检验检疫局科技项目 (2018GDK50)

作者简介: 刘二龙 男 高级兽医师 研究方向为动植物检疫技术

E-mail: erlongliu@126.com