

研究报告

赤小豆加工食品中红豆成分定性和定量 PCR 检测

梁颖婕,高东微,董洁,李志勇,关丽军,李思德,刘津
(广州海关技术中心,广东 广州 510623)

摘要:目的 为实现赤小豆加工食品的真伪和品质鉴别,建立赤小豆加工食品中被误用或混用的红豆成分实时荧光聚合酶链式反应(PCR)定性和微滴数字聚合酶链式反应(ddPCR)定量检测方法。方法 根据赤小豆和红豆基因组 DNA 中保守基因,分别设计适用于赤小豆和红豆成分实时荧光 PCR 定性检测的特异性引物探针,并设计适用于赤小豆加工食品中红豆成分双重 ddPCR 定量检测的通用引物探针,建立赤小豆加工食品中红豆成分质量百分比-DNA 拷贝数浓度百分比线性关系式。结果 本方法对赤小豆和红豆基因组 DNA 检测下限分别为 0.1 和 0.01 ng/ μL ,对赤小豆和红豆基因组 DNA 拷贝数浓度定量检测限均为 6 copies/ μL ,可对赤小豆加工食品中质量百分比为 5%~80% 的红豆成分准确定量。结论 本方法可用于赤小豆加工食品中红豆成分的定性和质量百分比定量检测。

关键词:赤小豆;红豆;实时荧光聚合酶链式反应;微滴数字聚合酶链式反应;定性;定量

中图分类号:R155 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2022)02-0225-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.02.006

Qualitative and quantitative detection of adzuki bean ingredient in rice bean processed foods

LIANG Yingjie, GAO Dongwei, DONG Jie, LI Zhiyong, GUAN Lijun, LI Side, LIU Jin
(Guangzhou Customs Technology Center, Guangdong Guangzhou 510623, China)

Abstract: Objective In order to achieve the authenticity and quality identification of rice bean processed food, qualitative real-time fluorescent polymerase chain reaction (PCR) and quantitative droplet digital PCR (ddPCR) methods were established for adzuki bean ingredients misused or mixed in rice bean processed food. **Methods** Specific primers and probes for qualitative real-time fluorescent PCR were designed according to their conserved sequences in genomic DNA, as well as universal primers and probe for quantification of adzuki bean ingredient in rice bean processed foods using duplex droplet digital PCR. Then a linear formula of mass ratio-DNA copy was established. **Results** The LODs of real-time fluorescent PCR for rice bean and adzuki bean were 0.1 and 0.01ng/ μL separately, and the LOQs of ddPCR for both were 6 copies/ μL . Accurate quantification of adzuki bean ingredient with a mass ratio from 5% to 80% in rice bean processed foods therefore could be achieved. **Conclusion** This method could be used for qualitative and mass ratio quantification determination of adzuki bean ingredients in rice bean processed food.

Key words: Rice bean; adzuki bean; real-time polymerase chain reaction; droplet digital polymerase chain reaction; qualitative; quantification

食品加工过程中粉碎、高温、高压、搅拌等各种加工工艺和食品添加剂的使用,使得人们难以通过感官辨别加工食品中原材料的真伪,无形中为食品

掺假提供了极大的可操作空间。各种以次充好、以假充真等经济利益驱动的掺假行为(Economically Motivated Adulteration, EMA)不仅严重妨碍公平贸易、损害消费者的利益,也对食品安全监管提出了严峻挑战^[1]。食品中植物源性成分掺假广泛存在,大多是以口感类似、颜色相近的低价植物原料添加香精后冒充贵价的原料^[2-3]。此外,植物源性食材本身也存在相近物种被误用混用的情况。无论是出于经济利益驱动的植物原料掺假,还是植物原料的误用混用,在粉状或糜状的加工食品中都非常常见。

收稿日期:2022-01-14

基金项目:广东省科技计划项目(2017B020207008);广州市科技计划项目(201704030125);原广东出入境检验检疫局科技计划项目(2017GDK44)

作者简介:梁颖婕 女 硕士研究生 研究方向为食品分子生物学检测 E-mail: 441860140@qq.com

通信作者:刘津 女 高级工程师 研究方向为食品分子生物学检测 E-mail: ivfhonline@126.com

药食同源物质是指在中国传统中医学和食疗学中使用的既可食用又可药用的食物^[4]。赤小豆(*Vigna umbellata*)与红豆(*Vigna angularis*)同属豆科豇豆属(*Vigna*)植物。赤小豆是《卫生部关于进一步规范保健食品原料管理的通知》(卫法监发[2002]51号)中《既是食品又是药品的物品名单》所列食药同源物质之一^[5]。中医认为赤小豆具有行血补血、健脾去湿、利水消肿之效,而红豆食用过多会胀气、消化不良,使人湿气加重^[6]。

在民间,赤小豆有“红豆”的别称,红豆又称“赤豆”。它们外观相似、加工后口味相近,因此极易发生混淆。例如,市面上声称具有健脾祛湿和利水消肿功效的五谷杂粮粉、赤小豆糕和赤小豆沙等食品,经常发生以红豆代替赤小豆掺入配料中的情况。无论是因为混淆赤小豆和红豆而造成的无意误用混用,还是由于其他原因故意以红豆替换赤小豆,这些行为都对药食同源相关产业的良性发展和消费者健康安全造成隐患。现有的食品检测标准中暂无针对赤小豆和红豆的鉴别检测方法,在甄别上述混淆或掺假行为方面存在明显的技术空白,不能满足相关食品真实性检验监管的技术需求。

数字聚合酶链式反应(Digital polymerase chain reaction, dPCR)是近年来对目标DNA实现拷贝数浓度精准定量的新技术^[7]。与实时荧光PCR相比,数字PCR摆脱了依赖系列梯度标准品绘制标准曲线的定量方式,可直接对样品中的目标DNA片段进行拷贝数浓度准确定量^[8-9]。本文以赤小豆加工食品为研究对象,分别基于实时荧光PCR和双重ddPCR技术,建立赤小豆成分和红豆成分的定性和质量百分比定量检测方法,可用于以赤小豆为原料的加工食品中赤小豆成分含量的标签符合性检验监管,为相关食品真伪和品质鉴别提供准确可靠的技术依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

QX200™ Droplet Digital PCR 系统(C1000 Touch™

热循环仪、微滴生成仪、微滴分析仪和封膜仪,美国Bio-Rad公司),ABI 7900 HT 实时荧光PCR仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),Nanospec 微量核酸蛋白测定仪(日本岛津公司),Centrifuge 5424 小型高速离心机(德国Eppendorf公司),IKA® Tube-Mill Control 试管研磨机(德国IKA公司),MS2 旋涡混合器(德国IKA公司),HR2166 Viva Collection 搅拌机(荷兰飞利浦公司),AB204-S METLER TOLEDO 电子天平(瑞士梅特勒公司)。

红豆、赤小豆、绿豆、大豆、荷包豆、芸豆、莲子、花生、芝麻、核桃、榛子、红枣、芡实、薏苡仁、玉米、山药、大米、小麦共18种豆类和五谷杂粮类食材(购自本地超市),养生茶、五谷杂粮粉和赤小豆蓉等10种赤小豆加工食品(购自电商平台)。Wizard® Genomic DNA Purification Kit(美国Promega公司),微滴式数字PCR反应预混液、微滴生成油、微滴分析油及相应耗材(美国Bio-Rad公司),TaqMan™ Fast Advanced Master Mix(美国Thermo Fisher Scientific公司),引物、探针(上海闪晶分子生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 植物基因组DNA提取

按照植物基因组DNA提取试剂盒说明书的操作步骤顺序进行样品DNA提取和测定,特别注意在DNA提取过程中试剂的加入和移液操作应固定体积,以最大程度上保证定量检测的准确性。具体包括:核酸裂解液用量为700 μL,蛋白沉淀后上层水相转移仅取550 μL,DNA溶解于50 μL DNA溶解液。此外,蛋白沉淀后得到的550 μL上层水相先与550 μL 酚/氯仿/异戊醇(体积比为25:24:1)混合并剧烈颠倒混匀进行抽提,离心后仅移取400 μL上层水相进行异丙醇沉淀。

1.2.2 实时荧光PCR

运用Primer Express5.0软件,根据NCBI GeneBank公布的红豆和赤小豆的基因组DNA序列,分别设计赤小豆和红豆的特异性引物探针,以及赤小豆红豆通用引物探针(表1)。

表1 引物和探针

Table 1 Primers and probes

物种名称	序列(5'-3')	片段长度/bp	GenBank No.
红豆	红豆-F:CACTACTGCTCTCTCCCTCAAAAC	163	XM_017587507.1
	红豆-R:AGATTGGGAAAGATTCCGTTGG		
	红豆-P:FAM-TCTTATCACAAGCCCTCCCTGCATC-BHQ1		
赤小豆	赤小豆-F:GTGTGCAGTTACGTGGAATATG	141	DQ333268.3
	赤小豆-R:TTTGTAAATTTGGGAAAATGTTG		
	赤小豆-P:FAM-CAAAATTAAGTTTCATATAAACG-MGB		
通用	通用-F:TCTCTGTGGTTGTGATTCTC	139	XM_017556135.1
	通用-R:CATCCCTCACCTCCACTTCC		
	通用-P:VIC-TCGTTTGTGATAAAAAGCAATATCTGC-BHQ1		

实时荧光 PCR 反应体系 (25 μL): 2 \times PCR Premix ExTaq 12.5 μL , 上、下游引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 探针 0.2 $\mu\text{mol/L}$, DNA 模板 2 μL , ddH₂O 补足体积。反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 45 个循环。

1.2.3 ddPCR

ddPCR 反应体系 (20 μL): ddPCRTM Supermix for Probes (no dUTP) 10 μL , 红豆上、下游引物和通用上、下游引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$, 红豆探针和通用探针各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, DNA 模板 2 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min (1 $^{\circ}\text{C/s}$); 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s (1 $^{\circ}\text{C/s}$), 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min (1 $^{\circ}\text{C/s}$), 49 个循环; 12 $^{\circ}\text{C}$ 保存反应产物。

1.2.4 引物探针特异性评估

提取 1.1 中 18 种豆类和五谷杂粮样品植物基因组 DNA, 每个样品 DNA 进行 2 平行的实时荧光 PCR, 验证表 1 中 3 套引物探针的特异性。

1.2.5 实时荧光 PCR 检测低限评估

将赤小豆和红豆基因组 DNA 分别用绿豆基因组 DNA 进行梯度稀释, 得到赤小豆和红豆基因组 DNA 浓度为 100、10、1、0.1、0.01 和 0.001 ng/ μL 的系列 DNA 溶液, 每个浓度 DNA 进行 2 平行的实时荧光 PCR, 评估赤小豆和红豆实时荧光 PCR 方法的实时荧光 PCR 检测低限。

1.2.6 ddPCR 拷贝数浓度定量检测限评估

对 1.3.4 得到的赤小豆和红豆基因组 DNA 提取物进行 ddPCR 检测, 测定赤小豆和红豆基因组 DNA 拷贝数浓度。

对已知拷贝数浓度的赤小豆和红豆基因组 DNA 分别用绿豆基因组 DNA 进行梯度稀释, 得到赤小豆和红豆基因组 DNA 拷贝数浓度为 100、50、20、10、5 和 1 copies/ μL 的系列 DNA 溶液, 每个拷贝数浓度 DNA 进行 3 平行的 ddPCR, 评估赤小豆和红豆 ddPCR 方法的拷贝数浓度定量检测限。

1.2.7 红豆质量百分比-DNA 拷贝数浓度百分比关系式的建立

以赤小豆为基质, 掺入不同质量的红豆, 得到红豆质量百分比 (即红豆质量占红豆和赤小豆质量的百分比) 分别为 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 的混合样品各 100 g。10 个混合样品粉碎后, 每个样品称量 3 个平行 50 mg 并进行植物基因组 DNA 提取, 用 ddH₂O 稀释 10 倍后进行双重 ddPCR 检测, 每个 DNA 提取物进行单平行 ddPCR, 测定红豆基因和通用基因拷贝数浓度。计算红豆拷贝数浓度百分比 (即红豆拷贝数占红豆和赤小豆拷贝数浓度的百分比), 以混合样品的红豆质量百分比为横坐标、红豆拷贝数浓度百分比为纵

坐标, 绘制红豆质量百分比-DNA 拷贝数浓度百分比曲线并建立关系式。

1.2.8 利用模拟样品对定量检测线性范围的验证

赤小豆蓉模拟样品的制备方式为: 先制备以赤小豆为基质, 红豆质量百分比分别为 5%、10%、20%、40%、60%、80% 的混合样品各 100 g; 再将混合样品通过煮制、去皮、磨浆、调配和铲蓉等步骤制成赤小豆蓉模拟样品, 制备时每个样品加入 45 g 白砂糖、20 g 糖稀和 30 g 植物油^[10]。

五谷杂粮粉模拟样品的制备方式为: 同上先制备红豆质量百分比分别为 5%、10%、20%、40%、60%、80% 的混合样品各 100 g; 再粉碎并称取混合样品 12 g, 加入其他谷物粉包括薏米 8 g、小米 4 g、高粱 4 g、黑米 12 g、荞麦 2.5 g, 搅拌均匀后 120 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 30 min, 90 目过筛^[11], 得到五谷杂粮粉模拟样品。

每个样品称量 3 个平行 50 mg 并进行植物基因组 DNA 提取, 进行双重 ddPCR 检测, 每个 DNA 提取物进行单平行 ddPCR, 测定红豆基因和通用基因拷贝数浓度。计算红豆基因与通用基因拷贝数浓度比值, 将红豆基因与通用基因拷贝数浓度比值代入红豆质量百分比-DNA 拷贝数浓度百分比关系式, 求得红豆质量百分比含量, 计算回收率, 评价定量检测线性范围。

1.2.9 市售食品检测

对 10 种市售赤小豆加工食品中红豆质量百分比含量进行检测。每个样品称量 3 个平行 50 mg 并进行植物基因组 DNA 提取。对 DNA 提取物进行实时荧光 PCR 定性检测。对同时检出赤小豆和红豆基因的样品进行双重 ddPCR 定量检测, 评价本方法的适用性。

1.3 统计学分析

计算数字 PCR 实验中 3 平行检测数据的标准偏差 (SD) 和相对标准偏差 (RSD), 进行可重复性分析。采用 GraphPad Prism7 对实验数据进行统计学分析和图表绘制。

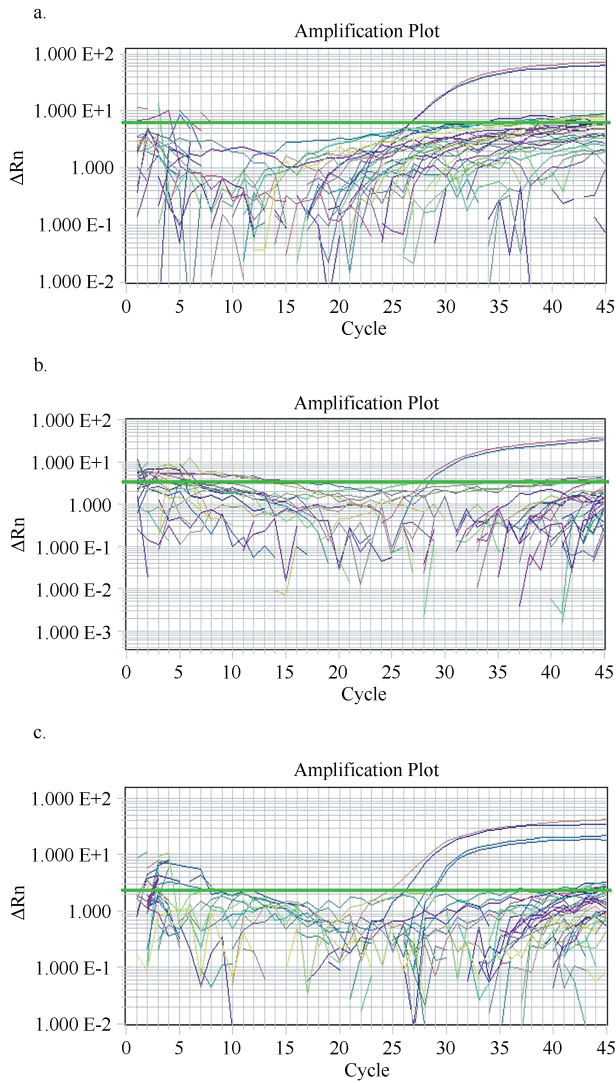
2 结果

2.1 引物探针特异性

引物探针特异性评估结果见图 1。本文设计的赤小豆和红豆基因引物探针, 分别只对赤小豆和红豆基因组 DNA 发生特异性扩增, 通用基因引物探针同时对赤小豆和红豆发生特异性扩增, 3 套引物探针均对其他物种 DNA 无交叉反应。

2.2 实时荧光 PCR 检测低限

实时荧光 PCR 检测低限评估结果见图 2。以



注:a.红豆基因引物探针扩增曲线;b.赤小豆基因引物探针扩增曲线;c.通用基因引物探针扩增曲线

图1 引物探针特异性评估

Figure 1 Evaluation on specificity of primers and probes

Ct 值<35 为“检出”的判断条件,赤小豆基因的实时荧光 PCR 检测低限为 0.1 ng/μL,红豆基因的实时

荧光 PCR 检测低限为 0.01 ng/μL。

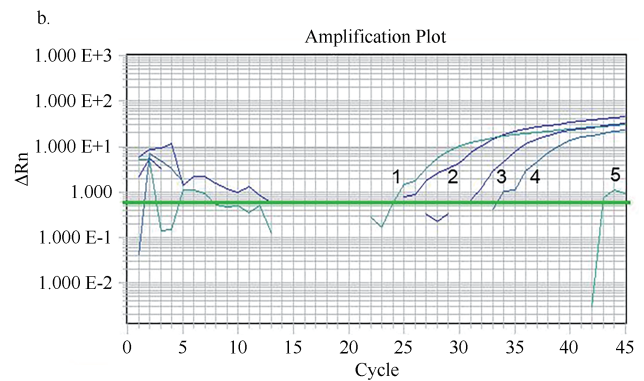
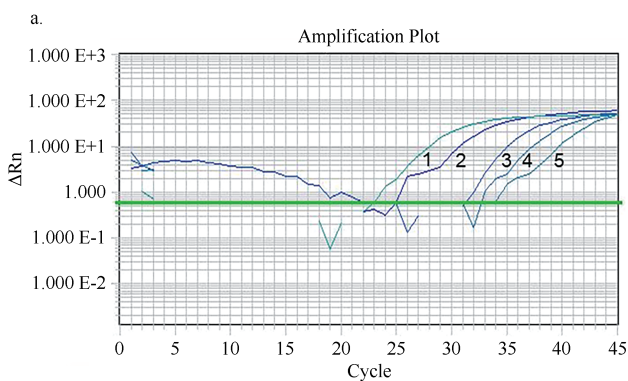
2.3 ddPCR 拷贝数浓度定量检测限

ddPCR 拷贝数浓度定量检测限评估结果见表 2。为保证定量检测精密性,以 3 平行检测结果的 RSD ≤25% 作为数据评价的关键指标^[12]。当红豆 DNA 拷贝数浓度为 5 copies/μL 时红豆基因和通用基因引物探针的检测结果分别为 (5.22 ± 0.55) copies/μL 和 (5.32 ± 0.53) copies/μL, RSD 分别为 10.60% 和 10.06%;当赤小豆拷贝数浓度为 5 copies/μL 时通用基因引物探针的检测结果为 (5.10 ± 0.53) copies/μL, RSD 为 10.38%。据此,评估本方法对赤小豆和红豆的拷贝数浓度定量检测限均为 6 copies/μL。

2.4 红豆质量百分比—DNA 拷贝数浓度百分比关系式和定量检测线性范围

红豆质量百分比—DNA 拷贝数浓度百分比关系式见图 3。当绘制红豆质量百分比—DNA 拷贝数浓度百分比曲线时,为保证准确性,以 R²≥0.99 作为建立关系式时数据评价的关键指标。因此,本文建立的红豆质量百分比—DNA 拷贝数浓度百分比关系式基于红豆质量百分比为 5%~80% 的数据,红豆质量百分比为 1% 的数据不予采用。

为验证关系式的定量检测线性范围,制备了 2 套模拟样品进行检测,结果见表 3。随后,通过系列红豆质量百分比含量的赤小豆蓉和谷物粉模拟样品对这个关系式进行性能验证。为保证定量检测结果的准确性,以回收率 80%~120% 作为定量检测线性范围评价的关键指标^[13]。数据显示,红豆质量百分比 5%~80% 的赤小豆蓉和五谷杂粮粉模拟样品均可以使用红豆质量百分比—DNA 拷贝数浓度百分比关系式进行准确的红豆质量百分比含量检测。



注:1~5 分别为 100、10、1、0.1、0.01 ng/μL DNA 浓度的扩增曲线

a.红豆基因引物探针扩增曲线;b.赤小豆基因引物探针扩增曲线

图2 实时荧光 PCR 检测低限评估

Figure 2 Evaluation on LOD_{real-time}

表2 ddPCR 拷贝数浓度定量检测限评估

Table 2 Evaluation on LOQ_{copy}

DNA 拷贝数浓度/ (copies/ μ L)	红豆基因		通用基因			
	红豆 DNA 检测结果		赤小豆 DNA 检测结果		通用基因引物探针检测结果	
	平均值 \pm SD/(copies/ μ L)	RSD/%	平均值 \pm SD/(copies/ μ L)	RSD/%	平均值 \pm SD/(copies/ μ L)	RSD/%
100	97.67 \pm 1.53	1.56	100.67 \pm 5.03	5.00	99.67 \pm 6.11	6.13
50	49.37 \pm 0.91	1.84	50.93 \pm 1.35	2.65	50.27 \pm 0.90	1.79
20	19.8 \pm 0.70	3.54	20.53 \pm 1.31	6.36	18.93 \pm 1.53	8.07
10	10.27 \pm 0.87	8.51	10.32 \pm 0.69	6.72	9.57 \pm 0.95	9.88
5	5.22 \pm 0.55	10.60	5.10 \pm 0.53	10.38	5.32 \pm 0.53	10.06
1	1.33 \pm 0.61	45.83	1.34 \pm 0.72	53.62	1.63 \pm 0.57	35.23

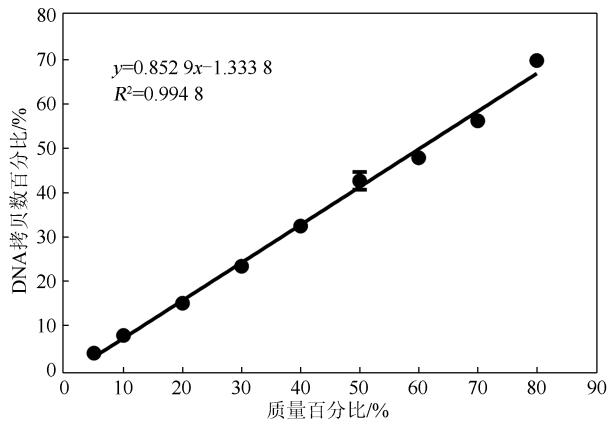


图3 红豆质量百分比-DNA 拷贝数浓度百分比关系式
Figure 3 Adzuki bean Mass ratio-DNA copy number ratio formula

2.5 市售食品检测

市售食品检测结果见表 4。实时荧光 PCR 结果显示,3 个养生茶样品、3 个谷物粉样品和 1 个赤小豆蓉样品中未检出赤小豆成分,1 个谷物粉样品和 1 个赤小豆蓉样品同时检出赤小豆成分和红豆成分,与标签信息不符。对同时检出赤小豆成分和

红豆成分的 2 个样品进行 ddPCR 定量检测发现,红豆成分质量百分比含量分别为 74.18% 和 >80%,而食品标签列明的配料为赤小豆。检测结果表明,在赤小豆相关食品的生产中,以红豆替代赤小豆的误用混用或有意掺假极为常见。

3 讨论

利用基因检测技术测定食品中生物成分的含量,技术基石是该基因在细胞中具有恒定的拷贝数,通常选用基因组 DNA 片段作为研究对象。本文所选取的红豆、赤小豆和通用基因片段,均来自于基因组 DNA。

文献调研表明,加工食品难以通过测定特定基因拷贝数直接求得该基因对应的生物成分在深加工食品中的质量含量^[14]。如何建立基因拷贝数与生物成分质量含量之间的精准关联性,是在基因水平上对深加工食品成分定量检测的关键点^[15]。

本文从成本和实际应用等方面的因素出发,同

表3 定量检测线性范围的验证

Table 3 Evaluation on linear range of quantification

红豆质量百分比/%	赤小豆蓉模拟样品		五谷杂粮粉模拟样品	
	平均值 \pm SD/%	回收率/%	平均值 \pm SD/%	回收率/%
5	4.98 \pm 0.31	99.61 \pm 6.12	4.72 \pm 0.24	94.37 \pm 4.78
10	8.71 \pm 0.76	87.13 \pm 7.56	9.28 \pm 0.19	92.82 \pm 1.92
20	17.45 \pm 0.32	87.27 \pm 1.59	18.87 \pm 1.09	94.35 \pm 5.44
40	39.35 \pm 1.36	98.39 \pm 3.41	36.59 \pm 2.22	91.47 \pm 5.55
60	51.66 \pm 1.05	86.09 \pm 1.76	55.68 \pm 0.88	92.79 \pm 1.46
80	79.72 \pm 1.47	99.65 \pm 1.84	78.06 \pm 0.92	97.57 \pm 1.15

表4 市售食品的检测

Table 4 Detection of market foods

样品名称	标签信息	实时荧光 PCR		ddPCR 红豆质量百分比/%
		赤小豆	红豆	
养生茶 1	赤小豆、红豆	—	+	100
养生茶 2	赤小豆、红豆	—	+	100
养生茶 3	17% 赤小豆、17% 红豆	—	+	100
养生茶 4	赤小豆	+	—	0
谷物粉 1	赤小豆	—	+	100
谷物粉 2	赤小豆	—	+	100
谷物粉 3	赤小豆	+	+	74.18 \pm 2.46
谷物粉 4	赤小豆	—	—	—
赤小豆蓉 1	赤小豆	+	+	>80
赤小豆蓉 2	4% 赤小豆	—	—	—

时建立了红豆和赤小豆实时荧光 PCR 定性检测方法和 ddPCR 定量检测方法,在赤小豆相关食品的真伪鉴别上可先采用成本低廉、操作简便的实时荧光 PCR 方法初筛检测,对确有必要进一步进行质量百分比定量的可疑样品实施 ddPCR 定量检测。在定量检测方面,将研究方向从质量定量转为质量百分比定量,基于食品加工过程中不同生物成分经历了同等程度的损耗,因此比例关系保持相对稳定,以此为出发点建立生物成分 DNA 拷贝数百分比和质量百分比之间的关联性,从而实现加工食品中生物成分质量百分比的测定^[16-18]。此外,本文再次证实采用将 DNA 拷贝数浓度百分比换算为质量百分比的定量方式是确定加工食品中生物成分含量比例切实可行的技术路线。

目前,基于基因的检测方法仅能对特定基因片段的拷贝数浓度进行精准定量,而将拷贝数浓度换算为质量仍然存在局限性,采用本文建立的方法仅能对以赤小豆为原料的加工食品中红豆占红豆和赤小豆的质量百分比进行检测,不能得到红豆占加工食品总质量的百分比。尽管如此,本文建立的方法可用于检测以赤小豆为主要原料的加工食品中被误用或混用的红豆成分质量百分比,为相关食品真伪和品质鉴别提供准确可靠的技术依据,具有实际应用价值。

参考文献

- [1] EVERSTINE K, SPINK J, KENNEDY S. Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents [J]. *Journal of Food Protection*, 2013, 76(4): 723-735.
- [2] 人民网. 板栗饼店一夜叫停[EB/OL]. (2016-01-14)[2022-01-01]. <http://shipin.people.com.cn/GB/n1/2016/0114/c85914-28051815.html>. Peoples Network. The chestnut cake shop was shut down overnight [EB/OL]. (2016-01-14)[2022-01-01]. <http://shipin.people.com.cn/GB/n1/2016/0114/c85914-28051815.html>.
- [3] 孙良广, 黄文婧. 实时荧光 PCR 技术快速检测莲蓉制品中芸豆成分 [J]. *食品科学*, 2017, 38(22): 330-334. SUN L G, HUANG W J. A real-time PCR assay for rapid detection of Kidney Bean component in Lotus Seed paste product [J]. *Food Science*, 2017, 38(22): 330-334.
- [4] 唐雪阳, 谢果珍, 周融融, 等. 药食同源的发展与应用概况 [J]. *中国现代中药*, 2020, 22(9): 1428-1433. TANG X Y, XIE G Z, ZHOU R R, et al. Development and application of one root of medicine and food [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2020, 22(9): 1428-1433.
- [5] 阙灵, 杨光, 李颖, 等. 《既是食品又是药品的物品名单》修订概况 [J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(7): 521-524. QUE L, YANG G, LI Y, et al. Overview of revision of the catalogue of the substances traditionally considered as both food and Chinese medicine [J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2017, 52(7): 521-524.
- [6] (明)李时珍. 本草纲目 [M]. 长春: 时代文艺出版社, 2005. (The Ming dynasty) Li S Z. *Compendium of materia medica* [M]. Changchun: Times literary and Art Press, 2005.
- [7] BAKER M. Digital PCR hits its stride [J]. *Nature Methods*, 2012, 9(6): 541-544.
- [8] HINDSON C M, CHEVILLET J R, BRIGGS H A, et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 1003-1005.
- [9] QUAN P L, SAUZADE M, BROUZES E. dPCR: a technology review [J]. *Sensors: Basel, Switzerland*, 2018, 18(4): 1271.
- [10] 解蕊. 红豆沙加工工艺的研究 [J]. *粮油食品科技*, 2010, 18(4): 38-41. XIE R. Study on the technology of processing red bean paste [J]. *Science and Technology of Cereals, Oils and Foods*, 2010, 18(4): 38-41.
- [11] 公丽艳, 许青, 杨平, 等. 五谷杂粮养生糊的研制 [J]. *农业科技与装备*, 2018(5): 51-53. GONG L Y, XU Q, YANG P, et al. Development of coarse cereals health maintenance paste [J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 2018(5): 51-53.
- [12] COTTENET G, BLANCPAIN C, CHUAH P F. Performance assessment of digital PCR for the quantification of GM-maize and GM-soya events [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2019, 411(11): 2461-2469.
- [13] MAYER W, SCHULLER M, VIEHAUSER M C, et al. Quantification of the allergen soy (Glycine max) in food using digital droplet PCR (ddPCR) [J]. *European Food Research and Technology*, 2019, 245(2): 499-509.
- [14] LIANG Y J, GAO D W, DONG J, et al. A quantitative detection of mung bean in chestnut paste using duplex digital PCR [J]. *Current Research in Food Science*, 2022, 5: 34-40.
- [15] DONG X W, GAO D W, DONG J, et al. Mass ratio quantitative detection for kidney bean in lotus seed paste using duplex droplet digital PCR and chip digital PCR [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020, 412(7): 1701-1707.
- [16] CAI Y C, LI X, LV R, et al. Quantitative analysis of pork and chicken products by droplet digital PCR [J]. *BioMed Research International*, 2014, 2014: 810209.
- [17] KÖPPEL R, LEDERMANN R, VELSEN F, et al. Duplex digital droplet PCR for the determination of apricot kernels in marzipan [J]. *European Food Research and Technology*, 2020, 246(5): 965-970.
- [18] REN J N, DENG T T, HUANG W S, 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): e0173567.