# 《八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光PCR法》（征求意见稿）编制说明

## 工作简介

### 任务来源

《八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光PCR法》团体标准由广西物品编码与标准化促进会批准立项，由广西—东盟食品检验检测中心提出。根据2024年12月27日中期交流会上与会单位代表和专家的意见，**将标准名字从《八角茴香真伪快速鉴别》改为《八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光PCR法》**。

### 起草单位、主要起草人（姓名、单位、职务/职称、参与编制标准分工情况）等

本文件由广西—东盟食品检验检测中心、玉林市食品药品检验检测中心、广州双螺旋基因技术有限公司、广西民生中检联检测有限公司、广西壮族自治区标准技术研究院、广电计量检测（南宁）有限公司共同起草。主要起草人见表1。

表1

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 姓名 | 单位 | 职务/职称 | 参与编制标准分工情况 |
| 李锐 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 副主任药师 | 项目统筹、条款编制和审核 |
| 陈宇 | 玉林市食品药品检验检测中心 | 副主任药师 | 项目筹划和实施、条款编制和研究 |
| 王海波 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 主任药师 | 方法研究 |
| 邓玉秀 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 高级工程师 | 调研、方案审核 |
| 巫坚 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 工程师 | 调研、方案审核 |
| 卢森华 | 玉林市食品药品检验检测中心 | 副主任药师 | 进度管理 |
| 樊文研 | 玉林市食品药品检验检测中心 | 主任技师 | 质量管理 |
| 韦涛 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 副主任药师 | 产品评价 |
| 张璜 | 广州双螺旋基因技术有限公司 | 技术经理 | 方法研究 |
| 陈灏挺 | 广州双螺旋基因技术有限公司 | 工程师 | 方法验证 |
| 戴向东 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 主任药师 | 调研、方案制定 |
| 韦春梦 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 工程师 | 标准编制 |
| 韦兰青 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 助理工程师 | 标准编制 |
| 陆柔 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 工程师 | 标准编制 |
| 黄海霞 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 工程师 | 标准编制 |
| 杨尚超 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 助理工程师 | 标准编制 |
| 韦升坚 | 广西—东盟食品检验检测中心 | 副主任技师 | 标准编制 |
| 谢庆剑 | 广西民生中检联检测有限公司 | 主管药师 | 标准编制 |
| 钟超凡 | 广西壮族自治区标准技术研究院 | 助理工程师 | 标准格式修改 |
| 卢艺 | 广西壮族自治区标准技术研究院 | / | 标准格式修改 |
| 赵刚 | 南通中智检测服务有限公司 | 工程师 | 标准应用及推广 |
| 苏周雯 | 广电计量检测（南宁）有限公司 | / | 标准验证 |
| 黄漫漫 | 广电计量检测（南宁）有限公司 | / | 标准验证 |
| 杜妮 | 江西省检验检测认证总院工业产品检验检测院 | 工程师 | 标准验证 |

## 二、标准编制过程

### 1、成立编制工作组。

2023年12月4日-12月6日，标准制定任务下达后，首先确定了工作组的主要组成人员及人员分工，主要由从事标准制修订、检测分析的专业研究人员组成；召开了标准起草会议，项目负责人对标准的立项情况做了详细介绍，制定了标准研制的总体思路和框架。

### 2、展开调研，收集资料

八角茴香（anisi stellati fructus）为木兰科植物八角茴香（Illicium verum Hook. f.）的干燥成熟果实，亦称八角、大茴香等。八角茴香在2002年被我国卫生部纳入《既是食品又是药品的物品名单》，既有药用价值也作为可食用材料，还是著名的调味香料。我国八角产量占世界总产量的90%以上，是世界上八角主要的生产国和出口国。广西既是八角原产地又是主产区，占全国总产量的77%以上，八角种植是我区农户提高经济收入、脱贫致富的支柱产业之一。

在庞大的市场需求和经济利益前，市售八角茴香存在较严重的掺伪现象，常见伪品多为同属木兰科植物的莽草、红茴香、野八角、短柱八角等植物果实；一些伪品一旦食用将引起食物中毒事件，存在巨大安全隐患。八角茴香与其伪品的鉴别方法有形态分类法、显微鉴别法、理化检验法、光谱色谱法等，但上述方法或者对检验人员的专业性要求极高、或者需要大型精密仪器并配备昂贵的对照品，因此有必要建立一种简便可靠的八角茴香真伪快速鉴别方法，并制订相关标准文件，规范检测方法。

基于实时荧光PCR（聚合酶链式反应）检测技术建立一种八角茴香的真伪快速鉴别方法，其灵敏度高、特异性好、操作简便，能克服现有分子生物学检测技术步骤复杂、操作繁琐的缺点；为种植户、医院、药店、企业、市场监管机构等行业或单位提供快速可靠的八角茴香真伪鉴定方案。

2023年12月7日-12月31日，工作组在充分进行市场调研，收集、研究国内外相关法律法规、标准及检测方法的基础之上，经过核酸提取条件比对优化、探针筛选、试验条件优化，确立了采用实时荧光PCR（聚合酶链式反应）法对八角茴香进行真伪快速鉴别，并撰写标准草案。

### 通过实验、研讨确定主体内容

2024年1月-2024年2月，工作组搜集到八角各类真品和伪品/混淆品。

2024年3月-4月，试制出八角茴香真伪快速鉴别试剂盒，用试剂盒进行八角茴香真伪快速鉴别检测。

2024年5月-11月根据实验室检测结果反复调试方法、优化试剂盒，调试后的试剂盒能区分八角与地枫皮野八角、大八角、红茴香。

2024年12月形成方法文本及编制说明的讨论稿，12月27日召开中期交流会，汇报当前进展并对方法文本及编制说明进行讨论。按照与会单位代表和专家的意见，把标准名字补充完善，将《八角茴香真伪快速鉴别》改为《八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光PCR法》。

2025年1-7月，工作组根据收集的八角真品及伪品（野八角、地枫皮、大八角、红茴香）对试剂盒进行方法学验证。分别对试剂盒及方法特异性、方法检出限、重复性实验、基质效应进行了验证、验证结果为薄荷与其伪品（野八角、地枫皮、大八角、红茴香）根据试剂盒说明书Ct值要求能够区分开。方法及试剂盒的检出限可达到5%，对八角干样粉末和其他样品粉末混合、八角干样、八角鲜样都能检出，说明试剂盒对不同基质检测效果一致。

## 标准编制原则

### 1、规范性原则

本标准的格式根据GB/T 1.1 的规定编写，引用文件完全符合相关的国家标准，所引用的规范性文件都是现行有效，没有违反现行法律、法规和有关国家强制性标准。

### 2、一致性原则

本标准保持与国家有关法律、法规及相关政策的一致性，确保标准的合法性和权威性。在标准编制过程中，每个文件内各部分之间，其结构以及要素的表述保持一致。

### 3、可操作性原则

本标准制定过程中，充分考虑了国内八角行业检测现状和实际检测能力，标准的技术方法实用、合理、先进、针对性强，达到了国内先进水平。方法经过多家实验室验证，能在我区正常开展检测。

### 4、通用性

本标准在尊重科学、紧密结合实践、广泛征求意见及调查研究的基础上形成，适用于八角茴香的真伪鉴别，满足香料八角茴香真伪快速鉴别需求。

## 主要内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则）的论据

《八角茴香真伪快速鉴别 实时荧光PCR法》分为11个章节：范围、规范性引用文件、术语定义和缩略语、原理、试剂和材料、仪器设备、试样制备、检验步骤、质量控制措施、结果判定及表述、检测过程中防止交叉污染的措施。其中试剂和材料、检验步骤、质量控制措施、结果判定及表述是本标准的最主要内容。

试剂和材料、检验步骤：根据特定基因序列设计上游引物、下游引物和探针，通过反复摸索确定了检验步骤和所需的试剂和材料，并经过了多家不同的实验室进行验证。质量控制措施、结果判定及表述：参照国家标准《实验室质量控制规范 食品分子生物学检测》GB/T 27403，通过试验确定。以下是对这些内容中技术指标的优化和论据。

1、引物的设计

设计步骤如下：

Taqman荧光探针技术根据特定基因序列设计上游引物、下游引物和探针，特异性识别靶序列上的3个独立区域，利用DNA聚合酶启动扩增反应。Taqman探针法基于“荧光共能量转移”这一原理，其探针含有1对适合的荧光物质分别作为能量供体和受体。当它们的空间距离少于10 nm的时候，且供体发射光谱与吸收光谱重，则会发生供体的荧光能量被受体吸收，使供体能量衰减而受体增加。当PCR反应进行时，DNA聚合酶的外切酶活性会水解探针，使探针的供体和受体空间距离多于10 nm，“荧光共能量转移”消失，供体恢复荧光，荧光信号也随之大幅度增强，通过仪器可实时监测反应结果,设计步骤如下：

a)在NCBI中查找出八角的全基因组序列，用BLAST进行序列比对，找出序列保守区域，保守序列如下：

TTTGTCACTGTCACAGCAGAAGCCTTACGCTTCAGGCAGATACAGAGAGAATTTCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCCGGGAGACGTGGACCTCACTCTGAACTGGGGGCAGGATTACAACACAATTCACAGCAGTAATTGCTACTATTCATGCTTTCAGGACCACTTTTATTACTTTTTTTTGCAATGTTACATTTTTTTGATTCTAGTGTGATTTTTTCTTTTGAAGACTCTACTGGTTTAGCATCCTGAGCGACAGAATCGTCAGCATCAGCTACAATTATTCCTTTTGACCAATTCGGACAACTGCAAGCATCTACTTTTGATATTCCGTATATTATCATCAGGGCATCCTTTAGGCGTCTTAATGTATCGCTGCTTTCGATGGTCCCTTGAGGAGTAGAGAAACATGGGAGGGTGGGAACAACCAACATCGGCGC

根据序列交由生工生物工程（上海）有限公司进行质粒合成。

b)使用Primer Express 3.0.1设计特异引物，结果如表 1所示。

表 1

|  |  |
| --- | --- |
| 引物名称 | 序列 |
| verum -1-F | TCGATGGTCCCTTGAGGAGTA |
| verum -1-R | GCGCCGATGTTGGTTGTT |
| verum -1-P | FAM- AGAAACATGGGAGGGTGG -MGB |
| verum -2-F | GGGTGGGAACAACCAACATC |
| verum -2-R | TGCCTTATTCCGTTCGTGATT |
| verum -2-P | FAM- CGGCATGCGTCAAG -MGB |

2、Taqman反应体系的建立

参考文献及以往开发经验，初步确定25μL的Taqman反应体系，其成分包括：2X实时荧光定量PCR反应液12.5μL；上游引物（10 μmol/L）1μL；下游引物（10μmol/L）1μL；探针（10 μmol/L）0.5μL；样品DNA或对照5μL；超纯水5μL。

将除模板外其他试剂配备成混合液混匀后，每管分装20 μL，加入20 μL密封液后再分别加入5 μL模板DNA或阴阳性对照模板。最后参照TIANLONG 32 使用说明书，将混合物置于反应孔中。荧光PCR仪反应程序为：Holding Stage为 37℃ 10 min，95℃ 5min 1个循环；Cycling Stage 为95℃ 15 s，60℃ 60 s，40个循环，于60℃ 30 s处收集荧光信号，根据检测结果进行引物初步验证。

应用设计的引物，采用上述反应体系，进行引物的初步测试，结果显示所有引物均能进行扩增（图1，图2），两套引物阴性对照均没有出现翘尾，但第1套引物出峰时间更早，可进行下一步测试。

|  |
| --- |
|  |
| IMG_256 |  |

图 1 verum -1扩增曲线

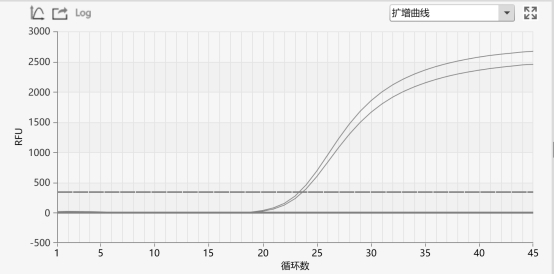
|  |
| --- |
|  |
|  | IMG_257 |

图 2 verum -2扩增曲线

3、稳定性试验

按照荧光PCR仪反应程序：Holding Stage为 37℃ 10 min，95℃ 5min 1个循环；Cycling Stage 为95℃ 15 s，60℃ 60 s，45个循环，于60℃ 60 s处收集荧光信号，使用超纯水作为阴性对照，重复20次，另增阳性对照2个重复，进行阴性对照稳定性实验。

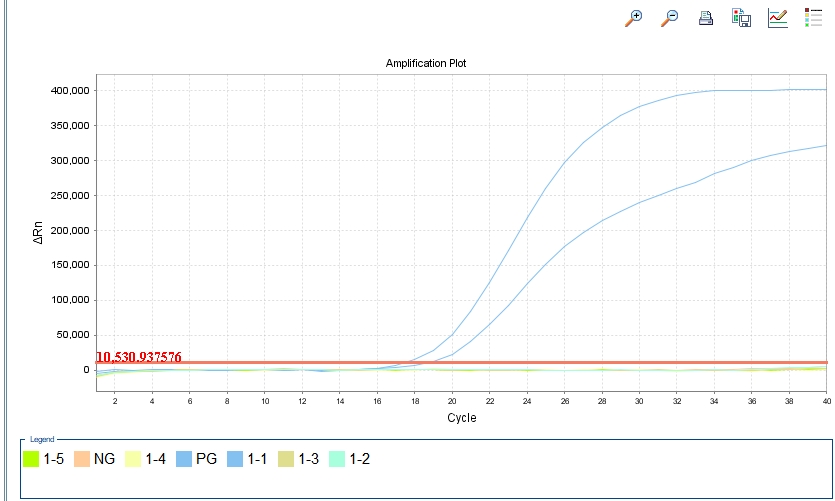
使用10 ng/μL浓度正品八角DNA作为阳性对照，所有引物阴性稳定性良好，没有出现非特异性扩增的情况。

 图 3 verum -1阴性稳定性扩增曲线

4、特异性实验

以八角、野八角、地枫皮、大八角、红茴香等八角以及亲缘品种的基因组作为模板，荧光PCR仪反应程序为：Holding Stage为 37℃ 10 min，95℃ 5min 1个循环；Cycling Stage 为95℃ 15 s，60℃ 60 s，40个循环，于60℃ 60 s处收集荧光信号，根据检测结果进行分析。

分别以正品八角、野八角、地枫皮、大八角、红茴香等八角以及亲缘品种的基因组作为模板，以ddH2O作为阴性对照，结果如下图所示：

 图 4 verum -1特异性扩增曲线

正品八角出现特异性扩增；野八角、地枫皮、大八角、红茴香不扩增，特异性良好。

5、灵敏度实验

用TE缓冲液10倍梯度稀释质粒DNA，得到10 pg/μL至0.01 fg/μL共7个浓度梯度，按照Holding Stage为 37℃ 10 min，95℃ 5min 1个循环；Cycling Stage 为95℃ 15 s，60℃ 30 s，40个循环，于60℃ 60s处收集荧光信号，进行灵敏度的检测。结果发现引物verum -1的检出限为0.01 fg/μL。

|  |
| --- |
|  |
|  | IMG_260 |

图 5 verum -1灵敏度扩增曲线

6、绝对灵敏度实验

用TE缓冲液10倍梯度稀释正品八角DNA，得到10ng/μL至1pg/μL共5个浓度梯度，按照Holding Stage为 37℃ 10 min，95℃ 5min 1个循环；Cycling Stage 为95℃ 15 s，60℃ 60 s，45个循环，于60℃ 60 s处收集荧光信号，进行灵敏度的检测。结果发现引物verum -1的绝对检出限为1 pg/μl 。

|  |
| --- |
|  |
|  | IMG_261 |

图 6 verum -1绝对灵敏度扩增曲线

## 与原标准或其他标准的主要差异和水平对比

用PCR方法对八角茴香的真伪鉴别尚无国家标准及行业标准，广西当地也缺乏地方标准。植物源性成分的鉴别采用PCR方法的有出入境检验检疫行业标准如《食用淀粉植物源成分鉴别方法 实时荧光PCR法 第4部分：藕淀粉》SNT 5522.4-2023、《冬虫夏草真伪鉴别 实时荧光PCR方法》SNT3957-2014、《三系杂交水稻种子真伪分子鉴定方法》SNT2669-2010等，本标准技术上与上述标准水平相当。

## 解决的主要问题。

通过基因层面的精准检测解决传统鉴别中的模糊性、局限性。当样本为干品或碎片时，形态特征失效，通过分析物种特异性DNA序列，可绕过表型差异，实现分子级别的精准鉴别。利于监管部门高质量高效率地监管八角茴香的交易及实用。

## 主要试验（或验证）情况分析

选取广西—东盟食品检验检测中心、广东旋达检测技术服务有限公司、广州双螺旋基因技术有限公司、广电计量检测（南宁）有限公司、广西民生中检联检测有限公司5家实验室对方法进行验证。

基本原则：本方法为定性方法，主要对方法中引物探针的特异性和方法的检出限、方法适用性等进行评价。

1、方法特异性验证

分别以八角、野八角、地枫皮、大八角、红茴香等成分进行扩增，考察八角引物和探针对目标成分荧光PCR检测的特异性，同时设置空白对照，阳性对照。

验证结果显示所选用的引物探针引物特异性良好，八角出现特异性扩增；野八角、地枫皮、大八角、红茴香不扩增。非特异扩增。

2、方法检出限验证

分别对检出限验证样品按照方法文本方法进行检出限测定，八角真品混合地枫皮样品（质量比为5%八角和95%地枫皮）设置3-5个平行。

实验室验证结果显示: 八角茴香源性成分检出限验证：最低检测限可达 5 %（质量分数）,最终确定本方法检出限为5%（质量分数）。

3、实际样品的测定

对提供的实际样品按照方法文本进行测定。最终测试结果与样品实际源性成分靶标结果一致。

4、重复性实验测定结果

对提供的实际样品真八角和伪八角按照方法文本进行测定；分别计算阳性样品检出和阴性样品未检出所占的比率。

实验室验证结果显示：阳性样品检出所占的比率：100%；阴性样品未检出所占的比率：100%。

5、基质效应测定结果

分别对正品八角的鲜样, 正品八角的干样, 正品八角的干样粉末和其他粉末混合样按照方法文本进行测定，评价不同基质对检测结果的影响。

实验室验证结果显示：方法对八角鲜样、干样及混合样品均适用，对不同基质检测效果一致。

## 标准中涉及的专利情况

无。

## 产业化情况

本文件是香料交易和使用产业的应用，与目前已有的相关标准相对接，有效解决该领域依赖传统的眼看手摸鼻闻或者借助大型精密仪器才能鉴别八角茴香真伪的问题。

## 采用国际标准和国外先进标准情况

无。

## 与相关国家标准、行业标准及其他标准，特别是强制性标准的协调性

本标准内容不违反相关法律法规及强制性标准；各项指标不低于国家强制性标准、推荐性国家标准和行业标准。

目前与八角茴香真伪快速鉴别相关的标准有：国家标准《八角》（GB/T 7652-2016）、国家标准《食品安全国家标准 食品添加剂 八角茴香油》（GB 1886.140-2015）、国家标准《八角茴香（精）油》（GB/T 15068-2008），地方标准《地理标志产品 广西八角》（DB45/ 226-2017）、地方标准《地理标志产品 上林八角》（DB45/T 1350-2022）。国家标准《八角》（GB/T 7652-2016）、《食品安全国家标准 食品添加剂 八角茴香油》（GB 1886.140-2015）、《八角茴香（精）油》（GB/T 15068-2008）规定了八角、作为食品添加剂的八角茴香油、八角茴香（精）油的术语和定义、技术要求、检验方法，地方标准《地理标志产品 广西八角》（DB45/ 226-2017）、《地理标志产品 上林八角》（DB45/T 1350-2022）仅对广西、上林的八角作了相关要求。上述标准均未涉及八角茴香真伪快速鉴别的检验方法描述，本标准与上述标准对于八角的描述均能保持协调一致。

## 重大分歧意见的处理经过和依据

无。

## 贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等）

本标准为广西的八角茴香真伪快速鉴别提供科学、便利的检测方法，保障我区八角茴香交易的规范，助力香料行业健康发展。建议在广西的香料交易企业中积极宣传贯彻本标准。

## 其它应予说明的事项。

无。

注：如果上述内容的某项对某一标准项目不适用，应在相应标题下写“无”或在编制中予以说明。