DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20251014003
引用格式: 邓玉秀, 李锐, 王海波, 等. 实时荧光定量聚合酶链式反应法快速鉴别薄荷真实性[J]. 食品安全质量检测学报, 2026, 17(5): 51–58.
DENG YX, LI R, WANG HB, *et al*. Rapid identification of the authenticity of *Mentha* by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2026, 17(5): 51–58. (in Chinese with English abstract).

实时荧光定量聚合酶链式反应法快速鉴别薄荷真实性

邓玉秀[1,2], 李　锐[1,2], 王海波[1,2], 巫　坚[1,2], 曹孝斌[3], 张　璜[4], 陈灏挺[4], 杨尚超[1,2*]

[1. 广西—东盟食品检验检测中心, 南宁　537100; 2. 国家市场监督管理总局技术创新中心(天然香料香精), 南宁　537100; 3. 江西康怡食品有限公司, 宜春　336000; 4. 广州双螺旋基因技术有限公司, 广州　510000]

摘　要: 目的　构建实时荧光定量聚合酶链式反应法快速鉴别药食同源物种薄荷真实性的方法。**方法**　基于荧光探针技术(TaqMan probe technology, TaqMan), 针对叶绿体 DNA 的核糖体蛋白 L16 编码基因(ribosomal protein L16, *rpl16*)内含子区域的保守区域, 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。建立 TaqMan 反应体系实现了对薄荷及其同源性植物的快速准确鉴别。**结果**　该方法特异性良好, 薄荷出现扩增, 薄荷常见伪品均无扩增; 在灵敏度方面, 在较广范围内(0.01~10000.00 fg/μL), 循环阈(cycle threshold, Ct)值与模板浓度对数呈线性关系(r^2=0.9999), 薄荷质粒 DNA 的绝对检出限为 0.01 fg/μL, 薄荷真实样品含量检出限可达 0.1%(质量分数); 稳定性检测结果显示, 所有引物阴性稳定性良好, 没有出现非特异性扩增的情况。**结论**　该方法具有高特异性、灵敏度和稳定性, 能将薄荷及其伪品进行有效区分。

关键词: 实时荧光聚合酶链式反应法; 薄荷; 真伪鉴别; 快速检测

Rapid identification of the authenticity of *Mentha* by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction

DENG Yu-Xiu[1,2], LI Rui[1,2], WANG Hai-Bo[1,2], WU Jian[1,2], CAO Xiao-Bin[3], ZHANG Huang[4], CHEN Hao-Ting[4], YANG Shang-Chao[1,2*]

[1. *Guangxi—asean Food Inspection and Testing Center*, *Nanning* 537100, *China*; 2. *Technology Innovation Center* of *Natural Flavors and Fragrances*, *State Administration for Market Regulation*, *Nanning* 537100, *China*; 3. *Jiangxi Kangyi Food Co.*, *Ltd*., *Yichun* 336000, *China*; 4. *Guangzhou Double Helix Gene Technology Co*., *Ltd.*, *Guangzhou* 510000, *China*]

ABSTRACT: Objective　To establish a rapid method for identifying the authenticity of medicinal and edible plant *Mentha* authenticity by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. **Methods**　Based on TaqMan probe technology (TaqMan), upstream and downstream primers, and a TaqMan probe were designed targeting the

收稿日期: 2025-10-14
基金项目: “协同”行动计划(广西区域创新能力提升计划)项目(桂科 XT2503960001); 广西壮族自治区市场监督管理局科技项目(GXSJK2025-19)
第一作者: 邓玉秀(1984—), 女, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测及质量分析。E-mail: 375663709@qq.com
***通信作者:** 杨尚超(1999—), 男, 助理工程师, 主要研究方向为食品检测及质量分析。E-mail: 1459705146@qq.com

conserved region within the intron of the chloroplast DNA-encoded ribosomal protein L16 (*rpl16*) gene to specifically recognize 3 independent regions on the target sequence. A TaqMan reaction system was established to achieve rapid and accurate identification of *Mentha* and its homologous species. **Results** The method demonstrated good specificity showing amplification exclusively in *Mentha* samples, and no amplification was observed in common adulterants. In terms of sensitivity, the cycle threshold (Ct) values exhibited a linear relationship with the logarithm of template concentration over a broad range (0.01–10000.00 fg/μL) (r^2=0.9999). The absolute limit of detection for *Mentha* plasmid DNA was 0.01 fg/μL, and the limit of detection for *Mentha* in real samples reached 0.1% (quality score). Stability testing results showed that all negative controls remained stable without non-specific amplification. **Conclusion** This method exhibits high specificity, sensitivity and stability, enabling effective differentiation between *Mentha* and its adulterants.

KEY WORDS: real-time fluorescent polymerase chain reaction; *Mentha*; authenticity verification; rapid detection

0 引 言

薄荷为唇形科薄荷属植物薄荷(*Mentha haplocalyx* Briq.)[1]的干燥地上部分。夏、秋二季茎叶茂盛或花开至 3 轮时, 选晴天, 分次采割, 晒干或阴干。薄荷的有效成分主要是挥发油、黄酮类[2–4], 其成分决定了薄荷具有保肝利胆[5–6]的药理作用。研究表明, 薄荷挥发油中的薄荷醇、薄荷酮等成分可通过调节肝脏代谢酶活性, 显著降低血清转氨酶水平, 从而发挥保肝作用[6–7]。同时, 其黄酮类成分具有抗氧化和抗炎特性, 可协同增强利胆效果。作为一种常见中药材, 薄荷被《中国药典》收录, 具有宣散风热、清利头目、透疹功能, 主治风热感冒风温初起头痛、目赤、喉痹、口疮、风疹、麻疹、胸胁胀闷等症, 在临床应用广泛。同时薄荷也是香料工业的重要原料并大量出口[7]。从薄荷植物茎、叶中提取的挥发油经加工后被广泛地应用于食品、化妆品、香料、烟草等工业[8–11], 有极高的经济价值。有研究表明, 薄荷精油对黄曲霉菌存在一定的抑制作用[12], 其抑菌效果与浓度呈正相关, 在食品防腐领域也出现广阔的应用前景。

遗传多样性是指地球上所有生物所携带的遗传信息的总和, 是生物多样性的重要组成部分, 是物种多样性和生态多样性的基础[13]。薄荷属植物具有丰富的遗传多样性[14–17], 其种质资源外部形态呈现性状丰富、类型多样[18–20], 给传统的形态学鉴别工作带来挑战, 且当薄荷经加工晒干、磨成粉以后无法通过形态学来鉴定, 给薄荷的质量控制与品种保护带来了严峻的挑战。

目前, 鉴别薄荷的方式有 3 种。第 1 种即传统的形态分类方法[21–23]。此方法一般通过植株的根、茎、叶、花、果实的形态特征来区分。这类鉴别方法对鉴别人员的专业性有极高的要求, 一般需要长期的培训和长期的经验积累, 培养成本极高, 主观性也较大。另一方面, 薄荷属重要的鉴别特征集中在花。实际操作过程中, 薄荷及其制品很难观测到其植株的花, 这大大提高了传统形态鉴别的难度。第 2 种方法是化学分类[23–25], 主要是通过薄荷属植物的单萜类成分进行区分, 一般分为香芹酮类和薄荷脑两类。此方法在区分自然杂交源中起到重要的, 但由于化学分类结果往往和生物亲缘关系无直接关联, 一个种中常常出现多个化学组, 其结果容易造成歧义, 不利于解释。此外, 单萜类成分[26]的测定一般需要用到色谱仪、氢火焰离子化检测器等昂贵仪器, 对实验人员、实验环境均有严格要求, 检测成本较高, 不利于推广。自 20 世纪 90 年代以来, 分子生物学技术[27–28]逐渐成为继性状和理化鉴别之后的第 3 种重要鉴别手段。目前已报道的检测技术包括普通聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、间隔区特异性引物扩增(inter-simple sequence polymorphism, ISSP)、随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、多重连接探针扩增(multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA)及 DNA 条形码技术[29–30]等, 均存在普遍依赖于高质量的凝胶电泳分离(耗时、污染风险高), 且数据解读复杂; 而 DNA 条形码虽然具备标准化鉴定流程, 但需进行二次测序验证, 增加了时间成本, 操作烦琐、设备昂贵或成本高昂等问题。相比之下, 实时荧光 PCR 凭借其自动化全封闭反应体系, 不仅显著提高了检测的特异性和灵敏度, 更大幅缩短了检测周期并降低了综合成本, 在薄荷真伪鉴别中具有极高的应用潜力。

实时荧光 PCR 技术主要分为染料法和探针法, 探针法由于特异性较好而多应用在物种鉴定方面。实时荧光 PCR[31–32]探针法仅见利用 MLPA 技术鉴定薄荷和留兰香的应用报道[33]。MLPA 探针组设计要求较高, 需要探针通过杂交后连接酶连接再进行扩增, 且对样本的浓度需要精准测定。本研究基于荧光探针技术(TaqMan probe technology, 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“荧光共振能量转移[34]”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叠, 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, “荧光共振能量转移”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。

叶绿体 DNA 的核糖体蛋白 L16 编码基因(ribosomal protein L16, *rpl16*)内含子区域已被证明可用于区分薄荷组内部不同物种, 在原植物鉴别中具有较高的物种分辨能力[35–36]。基于此, 本研究选取 *rpl16* 区段作为检测靶标, 构建了一种基于 TaqMan 荧光探针技术的薄荷源性快速检测方法, 以期提升薄荷及其相关产品的真实性鉴别效率, 推动薄荷质量控制与监管技术的发展。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

1.1.1　材　料

薄荷干样、紫苏干样、野苏干样、石荠宁干样、益母草干样由广西壮族自治区药品检测研究院提供, 产地为广西。薄荷鲜样购买自仙葫农贸市场。

阳性对照: 质粒由生工生物工程(上海)有限公司合成, 稀释至 100 ng/μL 备用。

1.1.2　试　剂

2×实时荧光定量 PCR 反应液(康润生物科技有限公司); Taqman 引物和探针[生工生物工程(上海)有限公司]; 无水乙醇(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 无菌双蒸水(南京建成生物工程研究所); 三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸(Tris-ethylenediaminetetraacetic acid buffer, TE)缓冲液(pH 8.0)(碧云天生物技术有限公司); 香料基因组提取试剂盒(SM-071151L-E01, 广州双螺旋基因公司)。

1.2　仪器与设备

TDE60086FV-ULT 冷冻冰柜(–80 ℃)、QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Mini-10K+C 掌上离心机、MIX-28 漩涡混合器(杭州米欧仪器有限公司); HVS-1800 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司); TIANLONG 32 荧光 PCR 仪器(西安天隆科技有限公司); HM100-Pro 恒温振荡金属浴、D1524R 离心机[北京大龙兴创实验仪器(北京)股份有限公司]; JYS-M01 组织粉碎机(九阳股份有限公司); ONETOUCH 核酸蛋白分析仪[强生(中国)医疗器材有限公司]; ME103T 电子天平(感量 0.001 g, 瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.3　实验方法

1.3.1　引物与探针设计

本方法基于高灵敏度的 TaqMan 荧光探针技术原理, 针对叶绿体基因组特征进行设计。叶绿体基因组相较于核基因组突变速率更高且变异性更强, 是理想的 DNA 条形码基因, 特别是对于加工后的样品(如晒干、磨粉)。本方法根据叶绿体 DNA 的 *rpl16* 内含子区域(rpl16)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。

序列如下: GGCCCGATAGTATGAAAACCGATTCATCACTTCATATTATCTGGATCTAAAGAACCAGTCAAGATATGTTAAATCAGTCATGTCTTTGTAGCAACTGAAATAATTAAACTTGAACTTTTTTAAATTTAAAGAAAAATTACAGAAGAAAGGTGTGGATAAGAAGAAAGGTGTGGATAAATGGAAGGATGAGAGAAAGATAGAAATCGTGAGGGTTCAAGTCCCTCTATCCCCAATAAAAATAAATAAAAAAGCCTGATTCCTAAGTAATCATTTATTCTCTTTTTTCGTCAGCGGTTCCAAATTTGGTATCTTTCTCACTCATTCGACTCTTTTTACAAACAAATAGAAACAAGGGGTTCTTTTTGAAGATCCAAGAAATTCCAGCACCTAGG; 根据序列交由生工生物工程(上海)有限公司进行质粒合成。使用 Primer Express 3.0.1 设计特异引物, 结果如表 1 所示。

表 1　引物和探针序列

Table 1　Sequences of rimer and probe

引物名称	序列
薄荷引物 1	F: TGGATCTAAAGAACCAGTCAAGATATGT
	R: CCTTTCTTCTTATCCACACCTTTCTT
	P: FAM AATCAGTCATGTCTTTGTAGCAA-MGB
薄荷引物 2	F: TCAGTCATGTCTTTGTAGCAACTGAA
	R: TCCTTCCATTTATCCACACCTTTCT
	P: FAM-TTATCCACACCTTTCTTCTGTAA-MGB

注: F 代表上游引物; R 代表下游引物; P 代表探针。

1.3.2　基因组 DNA 的提取

样品制备: 取益母草、紫苏叶、石荠宁、野苏、薄荷样品组织用液氮或破壁机把样品研磨或匀浆, 将制备好的样品备用。

DNA 提取: 称取 50~150 mg 新鲜或 15~40 mg 干燥样品至 2 mL 离心管中(如提取的核酸浓度过低, 可考虑多管富集, 一管收集核酸); 按照香料基因组提取试剂盒的方法提取样品 DNA, 每个样品提取 2 个重复平行。所提取的 DNA 用核酸蛋白分析仪测定核酸纯度及质量, 质量浓度大于 30.00 ng/μL 时, 且 OD_{260}/OD_{280} 在 1.7~1.9 之间, 适宜于 PCR 扩增。

1.3.3　实时荧光 PCR 反应体系

反应体系总体积为 25 μL[37], 2×实时荧光定量 PCR 反应液 12.5 μL; 上游引物(10 μmol/L) 1 μL; 下游引物(10.00 μmol/L) 1 μL; 探针(10.00 μmol/L) 0.5 μL; 样品 DNA 或对照 5 μL; 灭菌双蒸水 5 μL。也可使用等效商品化的薄荷源性成分扩增试剂盒。按照荧光 PCR 仪器反应程

序: 保温阶段为 37 ℃ 10 min; 95 ℃ 5 min 1 个循环; 循环阶段为 95 ℃ 15 s, 60 ℃ 60 s, 40 个循环, 在循环反应 60 ℃ 60 s 收集荧光信号。

检验过程分别设阳性对照、阴性对照、空白对照。以薄荷物种提取的 DNA 为阳性对照, 以已知不含薄荷的物种 DNA 为阴性对照, 以灭菌双蒸水为空白对照。样品和对照设置 2 个平行的反应体系。

1.3.4 质粒灵敏度验证与标准曲线的建立

用 TE 缓冲液 10 倍梯度稀释质量浓度为 100.00 ng/μL 的质粒 DNA, 得到 0.01、0.10、1.00、10.00、100.00、1000.00、10000.00 fg/μL 共 7 个浓度梯度, 按照 1.3.3 反应体系进行灵敏度的检测, 每个浓度重复 3 次。

1.3.5 核酸 DNA 灵敏度验证

将薄荷核酸 DNA(浓度为 2.28×10^4 copies/μL)梯度稀释, 用 TE 缓冲液 10 倍梯度稀释核酸 DNA, 得到 2.28×10^2~2.28×10^4 copies/μL 共 5 个浓度梯度, 按照 1.3.3 反应体系进行灵敏度的检测。

1.3.6 特异性及检出限验证

以薄荷编号 2-1、紫苏叶编号 2-2、益母草编号 2-3、野苏编号 2-4、石荠宁编号 2-5 等薄荷亲缘品种的基因组作为模板, 以灭菌双蒸水作为阴性对照, 按照 1.3.3 反应体系及反应程序进行特异性的检测。

以薄荷 10.0%/益母草 90.0%混合物(标记为 BH 10.0%)、薄荷 5.0%/益母草 95.0%混合物(标记为 BH 5.0%)、薄荷 1.0%/益母草 99.0%混合物(标记为 BH 1.0%)、薄荷 0.5%/益母草 99.5%混合物(标记为 BH 0.5%)、薄荷 0.1%/益母草 99.9%混合物(标记为 BH 0.1%)的核酸作为模板, 按照 1.3.3 反应体系及反应程序进行检出限检测。

1.3.7 阴性稳定性试验

使用 10.00 pg/μL 质量浓度质粒作为阳性对照, 使用灭菌双蒸水作为阴性对照, 重复 20 次, 另增阳性对照 2 个重复。按照 1.3.3 反应体系及反应程序进行阴性稳定性检测。

1.3.8 重复性试验

取质量浓度为 10000.00、100.00、1.00 fg/μL 的阳性质粒, 以灭菌双蒸水作为阴性对照。按照 1.3.3 反应体系及反应程序进行重复性分析。针对每个浓度的阳性质粒, 设置 20 个重复样本, 计算不同浓度的循环阈(cycle threshold, Ct)值的平均值(Mean)、标准偏差(standard deviation, SD)以及变异系数(coefficient of variation, CV)以评估稳定性。见公式(1)。

$$CV/\%=\frac{SD}{Mean}\times100\% \quad (1)$$

1.3.9 实际样品准确性试验

分别对薄荷真品及薄荷近源物种编号(2-24 至 2-39)进行 DNA 提取后, 按照 1.3.3 反应体系及反应程序进行准确度的检测。

1.4 数据处理

本研究的所有实验均进行了 3 次独立重复。实验数据的记录、整理、制表与绘图均使用 WPS Office (12.1.0.24657)完成。数据采用常规统计方法进行分析, 结果以平均值表示。如无特殊说明, 所有统计分析均依据相同的数据处理流程执行。

2 结果与分析

2.1 引物和探针的设计与筛选

应用表 1 中设计的引物, 采用 1.3.3 中的反应体系, 进行引物的初步测试, 结果显示所有引物均能进行扩增, 但薄荷引物 2 阴性对照出现翘尾见(图 1), 所以选择薄荷引物 1 进行下一步测试。筛选出一套出峰时间早, 信号强的薄荷引物 1, 成功建立了的检测方法。

实验结果表明, 薄荷引物-1 在扩增测试中均呈现阳性扩增信号(图 1), 证实该引物设计满足特异性与灵敏度要求, 其扩增效率与检测限符合预期标准。

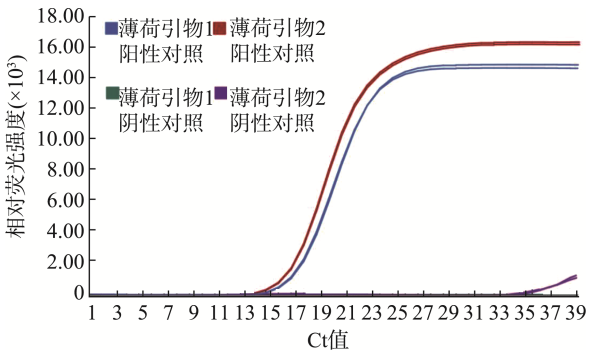


图 1 薄荷引物 1 实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig.1 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves of *Mentha* primer 1

2.2 灵敏度与线性结果

标准曲线显示: 在 0.01~10000.00 fg/μL 范围内, Ct 值与模板浓度对数呈线性关系(r^2=0.9999), 薄荷的绝对检出限为 0.01 fg/μL。标准曲线方程如图 2, 灵敏度反应结果见图 3。

标准曲线分析显示, Ct 值与模板浓度对数呈现高度相关(r^2=0.9999), 充分验证了该检测体系具备优异的定量能力。验证实验进一步证实, 该检测体系在极低浓度条件下表现出良好的稳定性和重现性。这种高灵敏检测特性为薄荷源性成分的精准识别提供了可靠的技术支持。

2.3 核酸 DNA 灵敏度结果

将浓度为 2.28×10^4 copies/μL 的薄荷核酸 DNA 梯度稀

释，用 TE 缓冲液 10 倍梯度稀释核酸 DNA，得到 2.28×10^{0}~2.28×10^{4} copies/μL 共 5 个浓度梯度，验证核酸 DNA 灵敏度，结果见图 4。由图 4 可知，对于薄荷的核酸 DNA，该检出体系的绝对灵敏度为 2.28×10^{2} copies/μL。

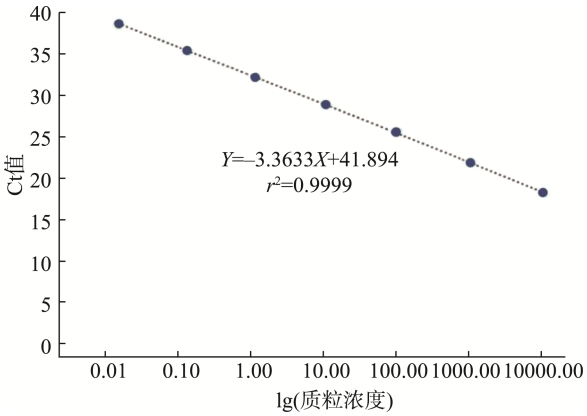


图 2　薄荷质粒实时荧光定量 PCR 标准曲线

Fig.2　Standard curves of real-time fluorescence quantitative PCR for *Mentha* plasmids

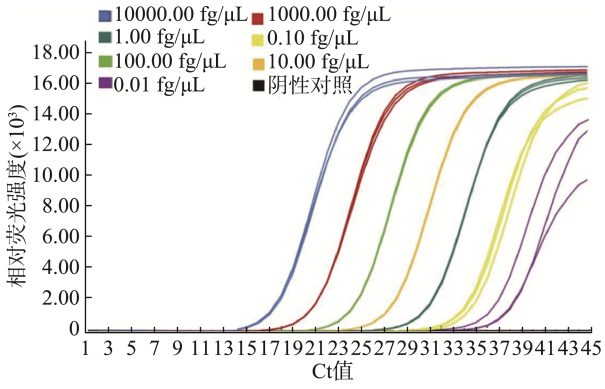


图 3　薄荷质粒实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig.3　Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves of the *Mentha* plasmid

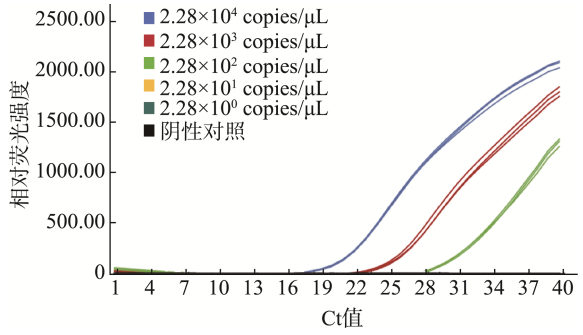


图 4　薄荷核酸实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig.4　Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves of *Mentha* nucleic acid

2.4　特异性与检出限结果

根据特异性检测结果得出，阳性对照(positive control, PG)、空白对照(negative control, NG)、薄荷编号 2-1 的 Ct 值为 13.431，紫苏叶编号 2-2、益母草编号 2-3、野苏编号 2-4、石荠宁编号 2-5 均无扩增现象，特异性结果见图 5，检出限结果见图 6。特异性检测结果表明，仅薄荷样本呈现显著扩增信号，而与其亲缘关系较近的紫苏叶、益母草、野苏及石荠宁等物种均未检测到扩增产物，充分证实了该检测体系对薄荷源性成分具有高度特异性，能够有效区分薄荷与其他近缘植物成分。同时，检出限分析显示，该检测方法对薄荷真实样品的含量检出限低至 0.1%(质量分数)，表明其具备优异的检测灵敏度，能够准确识别样品中痕量薄荷成分，为薄荷源性成分的精准检测提供了可靠的技术支持。

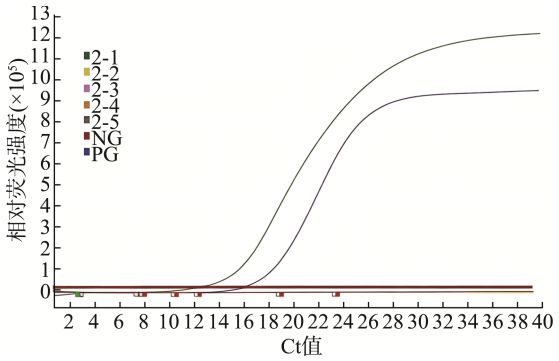


图 5　薄荷实时荧光定量 PCR 特异性扩增曲线

Fig.5　Specific amplification curves of real-time fluorescence quantitative PCR of *Mentha*

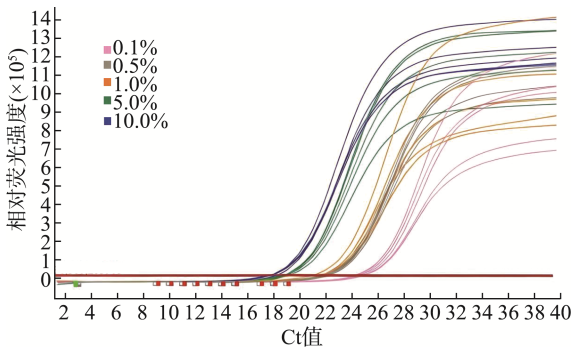


图 6　薄荷实时荧光定量 PCR 检出限扩增曲线

Fig.6　Amplification curves of the limit of detection of real-time fluorescence quantitative PCR for *Mentha*

2.5　阴性稳定性检测结果

结果如图 7 所示，结果分析表明，所有阴性对照样本在检测过程中均未出现非特异性扩增现象，引物扩增信号稳定且基线清晰，表明该检测体系在实验条件下具有优异

的稳定性。这一结果进一步验证了引物设计的特异性和反应体系的可靠性，排除了实验过程中可能出现的假阳性干扰，为后续样本检测提供了稳定的基线参照，确保了检测结果的准确性和可重复性。

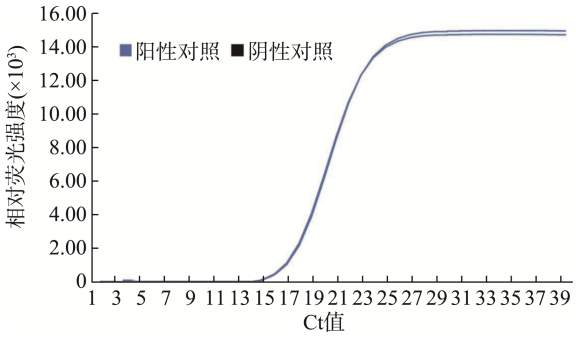


图 7 薄荷稳定性实时荧光定量 PCR 扩增曲线

Fig.7 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curve of *Mentha* stability

2.6 重复性检测结果

结果如表 2 所示，10000.00 fg/μL 的阳性重复性试验 CV 为 0.86%; 100.00 fg/μL 的阳性重复性试验 CV 为 1.00%; 1.00 fg/μL 的阳性重复性试验 CV 为 0.40%；重复性试验 CV 均小于 5%。结果表明，建立的检测体系具有良好的重复性。

表 2 重复性结果

Table 2 Results of repeatability test

质量浓度/(fg/μL)	平均值	CVs/%
10000.00	17.70±0.15	0.86
100.00	24.47±0.24	1.00
1.00	30.57±0.12	0.40

2.7 实际样品准确性检测结果

所有薄荷样品的 Ct 值均小于 25，所有薄荷近源物种样品均无 Ct 值。扩增结果见表 3。该结果与前期特异性实验数据高度一致，进一步确证了该检测体系在实际样品鉴别中的准确性。其判定标准(Ct 值小于等于 25 为阳性，大于 35 为阴性)通过严格的阈值设置，在确保检测灵敏度的同时，有效规避了假阳性风险，为复杂基质中薄荷源性成分的精准鉴别提供了可靠依据。

表 3 实际样品实时荧光定量 PCR 扩增结果

Table 3 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification results of actual samples

孔位	样本编号	样本名称	样本类型	荧光	目标基因	Ct 值
E10	2-24	薄荷 1	待测	6-羧基荧光素(6-carboxyfluorescein, FAM)	薄荷	18.316
F10	2-25	薄荷 2				23.215
G10	2-26	薄荷 3				20.621
H10	2-27	薄荷 4				24.426
E11	2-28	益母草 1				-
F11	2-29	紫苏叶 1				-
G11	2-30	野苏				-
H11	2-31	石荠宁				-
A12	2-32	紫苏叶 2				-
B12	2-33	益母草 2				-
C12	2-34	益母草 1 薄荷混合物				21.361
D12	2-35	紫苏叶 1 薄荷混合物				22.398
E12	2-36	野苏薄荷混合物				23.165
F12	2-37	石荠宁薄荷混合物				22.137
G12	2-38	益母草 2 薄荷混合物				21.103
H12	2-39	益母草 1 紫苏 1 混合物				-
C11	NG	空白				-
D11	PG	阳性质控				14.973

注: -表示无具体数值。

3　讨论与结论

薄荷多态性较好, 遗传多样性水平较高, 具有较多的遗传种质资源, 对使用形态学方法鉴别薄荷带来局限性, 目前, 常规 PCR 技术及其衍生的巢式 PCR、多重 PCR、环介导等温扩增以及实时荧光定量 PCR 等方法已在植物分类领域得到广泛应用。其中, 实时荧光定量 PCR 因其结果准确、灵敏度高且无需电泳等优势而备受关注。本研究基于 TaqMan 探针的实时荧光定量 PCR 建立的一种薄荷的真伪快速鉴别方法, 实现薄荷与其近源物种的鉴别。与普通 PCR 法相比, 其无需对 PCR 产物进行操作, 避免了扩增产物的污染。经扩增后, 通过 Ct 值大小进行判定。具有时间短、操作简便、结果易读、成本低、检测周期短等优势。

本研究通过比对薄荷的全基因序列, 设计了 2 套引物, 从中筛选出一套出峰时间早, 信号强的引物薄荷引物 1, 建立了的检测方法。检测结果显示引物稳定性好、方法特异性良好, 薄荷 Ct 值小于 25, 益母草、紫苏叶、野苏、石荠宁均无 Ct 值或 Ct 值大于 30; 灵敏度高, 薄荷质粒的检出限为 0.01 fg/μL, 薄荷核酸的检出限为 2.28×10^2 copies/μL, 真实样品含量检出限为 0.1%。与传统普通 PCR 相比, 本研究建立的 TaqMan 实时荧光 PCR 方法灵敏度提升约 100~1000 倍(检出限达 0.01 fg/μL), 且无需后续电泳步骤, 显著降低污染风险; 相较于形态学鉴定, 该方法不受药材加工形式(如粉末、切片)限制, 对薄荷及其近缘种(如益母草、紫苏叶等)的区分准确率达 100%, 而形态学方法在非完整样本中误判率高达 20%~40%。研究结果表明实时荧光 PCR 能将薄荷及其近源物种区分开, 且方法灵敏度高、特异性好、重复性高、操作简便, 能克服现有分子生物学检测步骤复杂、操作烦琐的缺点; 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薄荷真伪鉴定方案。

参考文献

[1] 郭明遗, 邓艳, 杜前红, 等. 青李薄荷酒发酵工艺优化及风味成分分析[J]. 食品与机械, 2023, 39(6): 201–209.
GUO MY, DENG Y, DU QH, *et al*. Optimization of fermentation process and analysis of flavor components in plum and mint wine [J]. Food & Machinery, 2023, 39(6): 201–209.

[2] 孙文豪, 杨扬, 陈恒, 等. 薄荷有效成分药理作用研究进展[J]. 江苏中医药, 2023, 55(5): 78–82.
SUN WH, YANG Y, CHEN H, *et al*. Research progress on the pharmacological effects of active ingredients in menthol [J]. Jiangsu Journal of Traditional Chinese Medicine, 2023, 55(5): 78–82.

[3] 王菲, 吴晓宇, 陈书婷, 等. 薄荷醇药理学研究进展[J]. 安徽农学通报, 2025, 31(16): 82–88.
WANG F, WU XY, CHEN ST, *et al*. Advances in pharmacology of menthol [J]. Journal of Anhui agricultural Science Bulletin, 2025, 31(16): 82–88.

[4] FATEMEH S, FERELDOUNI M, KHAN H, *et al*. *Mentha longifolia* essential oil and pulegone in edible coatings of alginate and chitosan: Effects on pathogenic bacteria in lactic cheese [J]. Molecules, 2023, 28(11): 4554.

[5] 曹继华, 朱聪明, 李艳丽. 薄荷及其伪品的鉴别[J]. 河南中医学院学报, 2004, 19(1): 30–31.
CAO JH, ZHU CM, LI YL. Identification of mint and its counterfeits [J]. Journal of Henan University of Chinese Medicine, 2004, 19(1): 30–31.

[6] 张静. 基于网络药理学探讨薄荷治疗肝硬化的作用机制[J]. 工业微生物, 2025, 55(3): 177–180.
ZHANG J. Exploring the mechanism of mentha in the treatment of liver cirrhosis based on network pharmacology [J]. Industrial Microorganisms, 2025, 55(3): 177–180.

[7] 梁呈元, 刘艳, 李维林, 等. 薄荷属植物遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中药材, 2011, 34(8): 1190–1193.
LIANG CY, LIU Y, LI WL, *et al*. ISSR analysis of genetic diversity in *Mentha* plant [J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2011, 34(8): 1190–1193.

[8] 李红红. 野栽薄荷种质资源表型与遗传多样性研究[D]. 伊宁: 伊犁师范大学, 2025.
LI HH. Study on phenotypic and genetic diversity of wild mint germplasm resources [D]. Yining: Yili normal University, 2025.

[9] MAQBOOL T, HADI F, NAZ S, *et al*. Pulegone induced apoptotic and anti-proliferative potential in cervical cancer via P53, BAX and BCL2 [J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 34217.

[10] HUANG J, YAO L, SUN J, *et al*. Topical application of emu oil and menthol alleviates inflammation via modulation of NF-*k*B pathway in mouse model [J]. Food Nutrition and Health, 2024, 1(1): 9.

[11] SUBRAMANIAN M, MANAVALAN B, PONNUSAMY S, *et al*. Investigation of structural properties and antibacterial activity of AgO nanoparticle extract from *Solanum nigrum*/*Mentha* leaf extracts by green synthesis method [J]. Green Processing and Synthesis, 2023, 12(1): 20230080.

[12] 刘嘉欣, 陶越攀, 周兴旺, 等. 薄荷精油对黄曲霉生长的抑制作用研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2023, 14(24): 152–158.
LIU JX, TAO YP, ZHOU XW, *et al*. Study on the inhibitory effect of *Mentha piperita* essential oil on the growth of *Aspergillus flavus* [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2023, 14(24): 152–158.

[13] 王少铭, 李德文, 罗莉斯, 等. 薄荷种质资源形态性状遗传多样性[J]. 贵州农业科学, 2018, 46(8): 6–10.
WANG SM, LI DW, LUO LS, *et al*. Genetic diversity of morphological characters of *Mentha* germplasm resources [J]. Guizhou Agricultural Science, 2018, 46(8): 6–10.

[14] 施立明, 贾旭, 胡志昂. 遗传多样性[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
SHI LM, JIA X, HU ZANG. Genetic diversity [M]. Beijing: Science Press, 1993.

[15] NASEEM I, KHAN AM, HABIB U, *et al*. Morphological profiling and DNA barcoding revealed genetic diversity and phylogeny of *Mentha* species cultivated in Pakistan [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2024, 72(3): 1–19.

[16] SIBEL K, NEZAHAT K, FETULLAH T, *et al*. Investigation of antimicrobial activities and molecular characterization of the species belong to origanum, thymus and thymbra genera by ISSR [J]. Molecular

Biology Reports, 2022, 50(1): 289–298.

[17] SOILHI Z, TRINDAD H, VICENTE, *et al*. Assessment of the genetic diversity and relationships of a collection of *Mentha* spp. in Tunisia using morphological traits and ISSR markers [J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2020, 95(4): 483–495.

[18] 谢玉芬. 小型渔-花(薄荷)闭环共生系统的构建及其微生物群落结构多样性的研究[D]. 银川: 宁夏大学, 2022.
XIE YF. Study on the construction of small-scale fish-plant (mentha) closed-loop symbiotic system and diversity of microbial community structure [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2022.

[19] KOURCHI EC, BELHOUSSAME O, AUERD O, *et al*. Essential oils of *Mentha pulegium* L: Chemical biodiversity and bioactivity (*in vitro* and *in silico*) influenced by geographic variation [J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2025, 121: 105012.

[20] WAURECK A, DESCHAMOS C, CIPRIA NO, *et al*. Chemical diversity of essential oil from mint species in South of Brazil [J]. Journal of Essential Oil Research, 2025, 37(2): 1–12.

[21] 汪海斌, 李运华, 袁如柏, 等. 薄荷及其混伪品的微性状鉴别[C]. 2015 年中国药学大会暨第十五届中国药师周论文集, 2015.
WANG HB, LI YH, YUAN, RB, *et al*. Micro-morphological identification of mentha and its adulterants [C]. Proceedings of the 2015 China National Pharmaceutical Congress and the 15th China Pharmacists' Week, 2015.

[22] RATMASEKHAR C, KHA S, RAI KA, *et al*. Rapid metabolic fingerprinting meets machine learning models to identify authenticity and detect adulteration of essential oils with vegetable oils: *Mentha* and *Ocimum* study [J]. Food Chemistry, 2025, (471): 142709.

[23] 王菲菲, 刘杰, 何风艳, 等. 薄荷属 3 种植物及变种的性状鉴别、化学成分分析及 DNA 条形码研究比较[J]. 药学学报, 2019, 54(11): 2083–2088.
WANG FF, LIU J, HE FY, *et al*. Comparative study for morphological identification, component analysis, and DNA barcode determination of three chemical plants and their varieties in genus *Mentha* [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2019, 54(11): 2083–2088.

[24] 刘萍, 林果, 吴育强. 炎热清片中薄荷脑、栀子鉴别方法的改进研究[J]. 中国药物评价, 2019, 36(2): 126–129.
LIU P, LIN G, WU YQ. Improvement of identification methods for menthol and gardenia in yanreqing tablets [J]. China Drug Evaluation, 2019, 36(2): 126–129.

[25] 胡冰, 王鼎峰. GC 法同时测定薄荷桉油含片(II)中桉油精、(-)-薄荷酮、薄荷脑的含量[J]. 海峡药学, 2023, 35(6): 39–42.
HU B, WANG DF. Determination of eucalyptol menthone and menthol in bohe anyou tab-let by GC [J]. Strait Pharmacy, 2023, 35(6): 39–42.

[26] 朱小洁, 周翔宇, 范航, 等. 9 种唇形科芳香植物挥发性萜类成分的比较分析[J]. 植物研究, 2020, 40(5): 696–705.
ZHU XJ, ZHOU XY, FAN H, *et al*. Comparative analysis of volatile terpene components in nine aromatic plants of the Lamiaceae family [J]. Plant Research, 2020, 40(5): 696–705.

[27] 庞晓慧, 徐海滨, 韩建萍, 等. 中药材薄荷的 DNA 条形码鉴定研究[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1114–1117.
PANG XH, XU HB, HAN JP, *et al*. DNA barcoding for authentication of traditional Chinese medicine peppermint (*Mentha haplocalyx*) [J]. Chinese Journal of Chinese Materia Medica, 2012, 37(8): 1114–1117.

[28] AHEMED MS. Molecular identification of *Lavendula dentata* L, *Mentha longifolia* (L) Huds. and *Mentha piperita* L by DNA barcodes [J]. Bangladesh Journal of Plant Taxonomy, 2018, 25(2): 149–157.

[29] WALLINGER C, JUEN A, STAUDAUCHE K, *et al*. Rapid plant identification using species- and group-specific primers targeting chloroplast DNA [J]. PLoS One, 2012, 7(1): 29473.

[30] LETSIOU S, MADESIDIS P, VASDEKIS E, *et al*. DNA barcoding as a plant identification method [J]. Applied Sciences, 2024, 14(4): 1415.

[31] 李婷, 黄瑾, 张卓, 等. 基于遗传编码荧光探针的精氨酸实时监测新技术[J]. 科学通报, 2025, 70(24): 3999–4002.
LI T, HUANG J, ZHANG Z, *et al*. A new real-time monitoring technology of arginine based on genetically encoded fluorescent probes [J]. Chinese Science Bulletin, 2020, 70(24): 3999–4002.

[32] ABEDIN MK, YAQOOBI AM. Laser-induced fluorescence spectroscopy of certain essential oils by blue and violet diode laser excitation [J]. Results in Optics, 2024, 16: 100693.

[33] 汪波, 胡敏, 李小芳, 等. 一种鉴定薄荷与留兰香的 MLPA 探针组及其应用: 中国, CN116463451A [P]. 2023-07-21.
WANG B, HU M, LI XF, *et al*. An MLPA probe set for distinguishing mentha haplocalyx and mentha spicata and its application: China, CN116463451A [P]. 2023-07-21.

[34] 利用荧光共振能量转移技术实现 PTEN 活体成像[J]. 生物医学工程与临床, 2025, 29(3): 360.
PTEN living imaging with fluorescence resonance energy transfer technology [J]. Journal of Biomedical Engineering and Clinical, 2025, 29(3): 360.

[35] MASUMO TO, MICHIHO N. Genetic identification of the original plant species for mentha herb listed in the Japanese pharmacopoeia and analyses of their essential oil composition [J]. Journal of Natural Medicines, 2023, 77(3): 489–495.

[36] BUNSAWAT J, ELLIOTT NE, HERTWECK KL, *et al*. Phylogenetics of mentha (Lamiaceae): Evidence from chloroplast DNA sequences [J]. Systematic Botany, 2004, 29(4): 959–964.

[37] 王晶, 张晓磊, 白玉, 等. 不同玉米转化体通用 PCR 检测体系建立[J]. 生物技术通报, 2024, 40(12): 34–44.
WANG J, ZHANG XL, BAI Y, *et al*. Establishment of a universal PCR detection system for different maize events [J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(12): 34–44.

(责任编辑: 韩晓红 安香玉)