

玛咖酰胺分析方法研究进展

李绍辉^{1,2},许秀丽¹,章飞芳²,周伟娥¹,郑阳^{1,2},张元¹,李红娜¹,张峰^{1,*}

(1.中国检验检疫科学研究院食品安全研究所,北京 100176;

2.华东理工大学药学院,上海 200237)

摘要:玛咖是原产于秘鲁的珍稀药食两用植物,含有丰富的营养物质。具有缓解疲劳、改善睡眠、改善性功能及抗氧化等生物活性。玛咖酰胺是玛咖中特有的活性物质,有很强的生物活性。玛咖酰胺在玛咖中含量很低,目前主要用溶剂回流、超声等方法提取,高效液相色谱法及液质联用方法进行检测。本文对玛咖酰胺提取分析研究进行综述,为其进一步深入研究提供参考。

关键词:玛咖,玛咖酰胺,高效液相色谱法,液质联用

Research progress in analysis methods of macamides

LI Shao-hui^{1,2}, XU Xiu-li¹, ZHANG Fei-fang², ZHOU Wei-e¹, ZHENG Yang^{1,2}, ZHANG Yuan¹,
LI Hong-na¹, ZHANG Feng^{1,*}

(1.Institute of Food Safety, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China;

2.School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Maca was a rare medicinal and edible plant, originating in Peru. It contains abundant nutrients. Maca has the ability to relieve fatigue, improve sleep, improve the function and antioxidant and other biological activity. Macamides were the special active substances in Maca, having strong biological activity. The content of the macamides in maca was low. At present, the method of solvent reflux, ultrasonic extraction, HPLC and liquid chromatography-mass spectrometry were used to detect it. In this paper, the extraction and analysis of macamides were reviewed, which provides a reference for its further research.

Key words: maca; macamides; HPLC; LC-MS

中图分类号: TS201.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2016)04-0370-04

doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2016.04.066

玛咖 (*Lepidium meyenii Walp.*) 是十字花科独行菜属植物,原产秘鲁。具有很丰富的营养价值,能够缓解疲劳^[1-3]、改善睡眠^[4]、改善性功能^[5-7]和抗氧化^[8-10],被称为“秘鲁人参”。玛咖作为南美传统的药食两用植物,已经在国际保健品市场上崭露头角。我国卫生部2002年时正式批准玛咖进入中国并开始在中国云南等地种植,2011年卫生部公告第13号文件批准玛咖粉为新资源食品。

玛咖酰胺是玛咖中特有的活性成分,有研究表明^[11]玛咖酰胺具有很强的生物活性,并且有改善性功能,提升生育能力^[12-13]等功能。有文献^[14]用高效液相色谱法(HPLC)对干玛咖中玛咖酰胺含量进行测定,测得其含量仅为0.0016%~0.0123%。玛咖酰胺作为玛咖独特的化学成分,关于其生物活性方面的研究却很少,可能与玛咖酰胺的含量低有关。目前,国内市场上有很多玛咖产品热销,如玛咖粉、玛咖精

片、玛咖酒、玛咖口服液等。而对玛咖产品质量好坏的评价,没有统一规范的标准。玛咖酰胺作为其特有的活性成分,对其含量的准确测定将会对评价玛咖质量好坏及质量标准的建立有重要的意义。本文就国内外文献中有关玛咖酰胺的研究,着重对其提取及分析检测研究进行综述。

1 玛咖酰胺的形成过程

Eliaana等^[15]研究了新鲜玛咖在干燥过程中玛咖酰胺的形成过程。在鲜玛咖干燥过程中,细胞膜和脂质释放出大量游离脂肪酸。苜蓿子油苷在芥子酶作用下经过一系列水解反应形成苜蓿胺。苜蓿胺和游离脂肪酸反应形成了玛咖酰胺。不同的游离脂肪酸和苜蓿胺就形成了不同的玛咖酰胺。

2 玛咖酰胺的发现

Zheng B L等^[16]用乙醇水溶液在干燥玛咖中提取到一类结构独特的生物碱,通过HPLC方法分离纯

收稿日期:2015-05-04

作者简介:李绍辉(1989-),男,硕士研究生,研究方向:中药学,E-mail:shaohui_L@126.com。

* 通讯作者:张峰(1974-),男,博士,研究员,研究方向:分析化学,E-mail:fengzhang@126.com。

基金项目:国家重大科学仪器设备开发专项项目(2012YQ14000806);北京市科技计划课题(Z141100002614020);质检公益性行业科研专项(201410088);中国检验检疫科学研究院基本科研业务费专项资金资助项目(2015JK008)。

化,再用气质联用(GC-MS)方法进行结构鉴定,检出了3种玛咖酰胺。分别是N-苄基八烷酰胺、N-苄基-16-羟基-9-羰基-(10E, 12E, 14E)-十八碳三烯酰胺、N-苄基-(9, 16)-二羰基-(10E, 12E, 14E)-十八碳三烯酰胺。Muhammad I等^[17]采用石油醚从干燥玛咖中提取,并经过高分辨质谱(HRMS)、红外光谱(IR)、核磁共振(NMR)确定结构,得到了2个新的玛咖酰胺:N-苄基十六烷酰胺、N-苄基-5-羰基-(6E, 8E)-十八碳二烯酰胺。Zhao J P等^[18]报道发现了7种玛咖酰胺,其中有5个新结构:N-苄基-9-羰基-12Z-十八碳烯酰胺、N-苄基-9-羰基-(12Z, 15Z)-十八碳二烯酰胺、N-苄基-13-羰基-(9E, 11E)-十八碳烯酰胺、N-苄基-15Z-二十四烷酰胺、N-(3-甲氧基苄基)-十八烷酰胺。高大方等^[19]用干燥玛咖粉末经过乙醇超声提取,经过超高效液相色谱串联质谱法(UPLC-MS/MS)分离分析得到3种新型结构的玛咖酰胺:N-对羟基苄基-5-羰基-(6E, 8E, 10E)-十八碳三烯酰胺、N-对羟基苄基-5-羰基-(6E, 8E)-十八碳二烯酰胺、N-苄基-2E-十八碳烯酰胺。Fernando E等^[20]对干玛咖用正己烷索氏提取,经过二维核磁结构鉴定,得到两个新玛咖酰胺:N-(4, 5-二甲氧基苄基)-十六碳酰胺、N-苄基二十四碳酰胺。

玛咖中酰胺类物质很多,主要区别在两方面,一方面是苯环上的取代基种类和取代基的位置不同。另一方面是碳链的长度,碳链的不饱和度,不饱和键的位置,还有顺反异构体的差别。随着研究的深入,更多高新技术的应用,可能会有越来越多的新玛咖酰胺被发现。

3 提取方法

3.1 回流提取

回流提取是用有机溶剂通过加热的方式对玛咖粉末中的酰胺类物质进行提取的一种方法。当溶剂挥发后又被冷却回到溶剂中,这样周而复始对酰胺物质进行提取,直到提取完全。唐燕文等^[21]对比了不同提取溶剂回流提取对玛咖中酰胺类物质的提取效果。文中分别用石油醚、乙醚、不同纯度的乙醇水溶液对玛咖粉末进行提取,结果表明乙醇浓度为95%时玛咖酰胺的提取效率最高。玛咖酰胺是弱极性物质,所以弱极性有机溶剂能够将其从粉末中提取出来,由于玛咖酰胺的酰胺键具有成氢键的能力,所以与纯乙醇相比,95%的乙醇提取效率更高。回流提取需要长时间加热,在提取玛咖酰胺时可能会因温度过高导致提取物的不稳定。回流提取的优点是装置简易,节省溶剂,操作简单,普通实验室都很容易满足实验要求。然而回流提取消耗的溶剂量比较大,耗时较长,大量溶剂必然会对环境造成污染。

3.2 超声提取

超声的原理主要是产生空化效应,热效应和机械效应^[22]。空化效应是指液体中由于超声原因产生负压,当负压达到一定临界值时,就会将液体拉断,从而在液体中形成局部气体或蒸汽空腔的现象。机械效应是超声在液体内传播过程中,传递的机械能使液体质点在其传播空间内发生振动,强化了液体

的扩散和传质,加速溶解。热效应是超声在传播过程中其机械能被介质吸收转换成热能。空化效应及伴随的机械效应和热效应促进玛咖酰胺向液体中溶解,从而加快提取过程,提高效率。

Eliaana等^[15]在研究玛咖酰胺形成过程时,用超声提取,液质方法检测其含量变化。玛咖粉末用溶剂超声提取,固相萃取(SPE)净化后测定含量,避免了较大基质效应对检测的影响。朱颖秋等^[23]将玛咖粉末用乙醇超声提取,提取液用HPLC方法测定玛咖酰胺的含量。由于杂质的干扰,研究的3个标准品只有2个其相邻色谱峰分离度达到要求,另一个色谱峰不符合要求无法进行含量计算。

超声的优点是加速提取过程,提高效率,节省溶剂和时间,操作简单。但会对玛咖细胞造成破坏使更多的物质被溶剂提取出来,直接检测会造成干扰。HPLC检测时,很多具有紫外吸收的成分会与玛咖酰胺共流出,必须分离效果良好才能准确定量,加大了定量分析的难度。用质谱检测,杂质会对质谱检测产生较大的基质效应,造成结果偏高或偏低。

3.3 超临界流体萃取

超临界流体萃取技术是利用超临界流体从液体或固体中萃取特定成分,达到分离目标产物的一种新型分离技术^[24]。超临界流体萃取安全无毒,操作条件温和,不易对玛咖酰胺造成破坏^[25-26]。朱颖秋等^[23]对比了超临界流体萃取、超声提取、回流提取等提取方法的效率。结果表明超临界流体萃取的效率和超声提取效率相同,都低于回流提取。由于超临界流体萃取的设备价格高昂,提取效率与超声提取和回流提取相比并没有明显的优势,所以用于玛咖酰胺的提取并不太合适。

4 分析方法

4.1 高效液相色谱法(HPLC)

高效液相色谱法是在经典液相色谱法和气相色谱法的基础上发展起来的新型分离分析技术。具有分离效能高、选择性高、检测灵敏度高和分析速度快等特点,适用于复杂样品的分离分析。文献中对采用HPLC的方法对玛咖酰胺进行检测^[27-30]。Megan M等^[14]用合成的N-苄基十六烷酰胺作为外标物,用HPLC方法对玛咖中的酰胺类物质进行定量分析。测得不同秘鲁玛咖样品中酰胺类物质含量从0.0016%到0.0123%不等。朱颖秋等^[23]用实验室自制的3种玛咖酰胺作为标准品,用HPLC方法对丽江、香格里拉、会泽和攀枝花等4个产地的玛咖进行分析。玛咖粉末经超声提取后用C₁₈色谱柱分离,208 nm作为检测波长,用0.05%磷酸的乙腈-水溶液作为流动相梯度洗脱。结果对2种玛咖酰胺进行了定量分析,另一种由于分离度不好,达不到定量要求。该方法平均回收率达到98%以上,线性系数 $r=0.9999$,具有良好的精密度、稳定性和重复性。用HPLC方法对玛咖样品中玛咖酰胺进行检测,具有高效、快速等特点。但是由于玛咖酰胺种类很多,在检测过程中很难避免杂质对检测的干扰,导致结果偏高,应对提取液进行净化,使检测解结果更为准确。

4.2 液质联用(LC-MS)

近年来,液质联用技术得到极大的重视和发展且应用日益广泛。液相色谱法具有对复杂基质样品的高效分离能力,质谱法具有高选择性、高灵敏度,可对样品目标物进行结构分析以及定性、定量检测^[1]。LC-MS技术利用液相色谱的高效分离能力对复杂样品进行分离,再以质谱为检测器提供化合物的结构信息。综合了色谱和质谱的特点形成一种优势互补的分离鉴定技术,使样品分离、定性和定量成为一个连续的过程。特别是液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)不仅分离能力强,选择性好,灵敏度高,而且还可以对复杂基质样品中的痕量成分进行确证分析,为玛咖中酰胺类物质的准确定性定量分析提供便利。

液质联用仪由HPLC、接口装置及MS三大单元组成。目前常用的液相色谱与质谱联用包括四极杆质谱和飞行时间质谱等。四级杆质谱优势在于性能稳定、成本较低、可以同时很好地进行定性和定量分析;不足之处在于只能得到低分辨质谱数据。飞行时间质谱仪中不同质量的离子在质谱计中飞行时间的不同而达到分离。本法具有高灵敏度高选择性,能得到高质量谱图和化合物精确分子量。

随着对玛咖研究的深入,越来越多的液质联用技术应用于玛咖酰胺的结构发现及含量测定^[32-34]。朱延财等^[35]采用液相色谱-飞行时间质谱法对云南产黑色玛咖中玛咖酰胺含量进行分析,具有灵敏度高,分辨率高,操作简单等特点。实验中12种玛咖酰胺的酰胺键与阳离子结合,形成稳定的[M+H]⁺和[M+Na]⁺峰,有些能形成微弱的[M+K]⁺峰。对3个不同品种的玛咖样品进行定量,结果表明云南黑色玛咖中酰胺含量最高。高大方等^[18]采UPLC-MS/MS对云南产玛咖进行成分分析鉴定,发现了6种首次报道的玛咖酰胺类成分。UPLC-MS/MS提供更丰富的分子量信息,为玛咖酰胺的分析鉴定提供一定的科学依据。

5 展望

玛咖有“秘鲁人参”之称,药食两用,能缓解疲劳。玛咖酰胺是玛咖中特有的活性成分,具有缓解疲劳,提高生育能力等功效。由于玛咖酰胺含量很低,至今研究较少,主要集中在提取分离,分析鉴定方面,现已有回流提取、超声提取和超临界流体萃取等提取技术应用于玛咖酰胺的分离,高效液相色谱法和液质联用等分析技术应用于玛咖酰胺的分析检测。由于含量较低,检测方法需要更好的灵敏度,先进的液质联用方法将起到重要的作用。由于玛咖酰胺的烷基链很长,疏水作用强,所以用普通的反向色谱柱进行分析,保留时间长,检测过程耗时。如果增大有机相比例,保留时间将有所提前,但用液质方法检测时不利于样品离子化,会降低方法的灵敏度。考虑到玛咖酰胺都有酰胺键,可尝试键合氨基的色谱柱,采用高水相的流动相洗脱,这样既可以使保留时间提前,又有利于样品离子化,提高液质检测方法的灵敏度。玛咖提取物中杂质很多,必然会对分析造成干扰,因此前处理净化过程至关重要。固相萃取适用

于复杂样品的净化,对玛咖酰胺的分析可能会有较好的效果。鉴于玛咖酰胺含量较低,分子印迹技术应用于玛咖酰胺的富集净化,将会为分析方法提供便利。通过分子印迹技术的富集,普通的液相检测就能满足分析要求,大大降低了成本。随着研究的深入,固相萃取、分子印迹、液质联用等技术将会发挥重要的作用,对玛咖酰胺的研究将会更进一步。

参考文献

- [1] 余龙江,金文闻. 玛咖(*Lepidium meyenii*.)干粉的营养成分及抗疲劳作用研究[J]. 食品科学,2004,25(2):164-166.
- [2] 赵裕虎,曹建民,郭娴,等. 玛咖对运动训练大鼠睾酮及相关激素和抗疲劳能力的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,23:164-168.
- [3] 柳琴,程贝. 西藏玛咖对小鼠抗疲劳作用的初步研究[J]. 中国药师,2015,3:511-513.
- [4] 艾中. 玛咖(*Lepidium meyenii*)提取物抗抑郁和改善睡眠作用及机理研究[D]. 武汉:华中科技大学,2013.
- [5] Zhang Y, Yu L, Ao M, et al. Effect of ethanol extract of *Lepidium meyenii* Walp. on osteoporosis in ovariectomized rat[J]. Journal of ethnopharmacology, 2006, 105(1): 274-279.
- [6] Zheng BL, Kim CH, Wolthoff S, et al. Extract of *Lepidium meyenii* roots for pharmaceutical applications: America, US6267995B1[P]. 2001-7-31.
- [7] 金文闻. 药食两用植物玛咖(*Lepidium meyenii*)的功效物质研究[D]. 武汉:华中科技大学,2007(1):1-135.
- [8] 甘瑾. 玛咖(*Lepidium meyenii* Walp.)抗氧化活性及活性物质基础的研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2013.
- [9] Valentová K, Ulrichová J. Smallanthus sonchifolius and *Lepidium meyenii*-prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases[J]. Biomed Papers, 2003, 147(2): 119-130.
- [10] 杜广香. 玛咖生物碱的分离纯化及抗氧化活性研究[D]. 广州:华南理工大学,2011.
- [11] 刘跃金,王钰楠,冯鸿雁,等. N-苄基十六碳酰胺与玛卡醇提取物小鼠抗疲劳作用[J]. 中国公共卫生,2015,31(1):92-93.
- [12] 乔同岭. 玛咖和东哥阿里对游泳训练大鼠血清睾酮水平的影响[D]. 苏州:苏州大学,2012.
- [13] 余龙江,梅松,金文闻,等. 玛咖提取物对雄性小鼠性活力的影响[J]. 中国新药杂志,2003(12):1014-1015.
- [14] McCollom M M, Villinski J R, McPhail K L, et al. Analysis of macamides in samples of Maca (*Lepidium meyenii*) by HPLC-UV-MS/MS[J]. Phytochemical Analysis, 2005, 16(6): 463-469.
- [15] Esparza E, Hadzich A, Kofer W, et al. Bioactive maca (*Lepidium meyenii*) alkamides are a result of traditional Andean postharvest drying practices[J]. Phytochemistry, 2015, 116(8): 138-148.
- [16] 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.
- [17] Muhammad I, Zhao J, Dunbar D C, et al. Constituents of *Lepidium meyenii* 'maca'[J]. Phytochemistry, 2002, 59(1): 105-110.

- [18] Zhao J, Muhammad I, Dunbar D C, et al. New alkalimides from maca (*Lepidium meyenii*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(3): 690-693.
- [19] 高大方, 张泽生. 新资源食品玛咖中功能成分的UPLC-MS/MS研究[J]. 安徽农业科学, 2013(2): 830-832.
- [20] Chain F E, Grau A, Martins J C, et al. Macamides from wild 'Maca', *Lepidium meyenii* Walpers (Brassicaceae) [J]. Phytochemistry Letters, 2014(8): 145-148.
- [21] 唐燕文, 何卫华, 廖霞俐, 等. 玛咖有效成分多种提取方法的比较研究[J]. 食品工业科技, 2015(5): 189-193.
- [22] 郭孝武. 超声提取分离[M]. 化学工业出版社, 2008: 11-42.
- [23] 朱颖秋, 邓小宽, 沈洋, 等. 不同产地玛咖中酰胺含量分析[J]. 天然产物研究与开发, 2014(12): 1982-1985.
- [24] 秦正龙. 超临界流体萃取[J]. 现代化工, 1997, 17(4): 41-42.
- [25] 赵余庆. 中药及天然产物提取制备关键技术[M]. 北京中国医药科技出版社, 2012: 9-11.
- [26] Lee S H, Kang J I, Lee S Y, et al. Isolation and identification of macamides from the lipidic extract of maca (*Lepidium meyenii*) using supercritical carbon dioxide[J]. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering, 2008.
- [27] Avula B, Wang Y H, Zhao J, et al. Separation and determination of macaene, macamides and phytosterols of *Lepidium meyenii* (maca) collected in Peru by LC-UV and LC-ELSD methods[J]. Planta Medica, 2008, 74(3): P-139.
- [28] Ganzera M, Zhao J, Muhammad I, et al. Chemical profiling and standardization of *Lepidium meyenii* (Maca) by reversed phase high performance liquid chromatography[J]. Chemical and Pharmaceutical Bulletin-Tokyo-, 2002, 50(7): 988-991.
- [29] Melnikovova I, Havlik J, Cusimamani E F, et al. Macamides and fatty acids content comparison in maca cultivated plant under field conditions and greenhouse[J]. Boletin Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas, 2012, 11(5): 420-427.
- [30] Melnikovova I, Havlik J, Halamova K, et al. Variation in Chemical Composition of the Hypocotyle of Maca (*Lepidium meyenii* Walp.) cultivated in Czech Republic and in Peru [J]. Competition for Resources in a Changing World: New Drive for Rural Development, TROPENTAG, 2008: 177.
- [31] 盛龙生, 苏焕华, 郭丹滨. 色谱质谱联用技术[M]. 化学工业出版社: 化学与应用化学出版中心, 2006: 130-131.
- [32] Pino-Figueroa A J, Bohlke M, Wu H, et al. An approach to standardize *Lepidium meyenii* (Maca) extracts by evaluating macamide content with an LC-MS/MS method[J]. The FASEB Journal, 2011, 25(1): 541.3.
- [33] McCollom M, Gafner S, Craker L E. Synthesis of n-Benzylhexadecanamide as a Standard for Quantifying Macamides in Maca[J]. HortScience, 2004, 39(4): 779-779.
- [34] Zhao J, Muhammad I, Dunbar D C, et al. New alkalimides from maca (*Lepidium meyenii*) [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(3): 690-693.
- [35] 朱财廷, 李炳辉, 罗成贵, 等. 高效液相色谱-质谱法分析植物玛咖中的玛咖烯和玛咖酰胺[J]. 分析仪器, 2014, 5: 010.

(上接第369页)

- [34] 蔡琴, 张文学, 陈沁. 含扩增内标的花生过敏原PCR检测方法[J]. 食品与机械, 2013(4): 63-66.
- [35] 张舒亚, 于翠, 宋青, 等. 食品过敏原大豆P34蛋白基因的实时荧光PCR检测[J]. 中国油料作物学报, 2012(6): 661-665.
- [36] 张舒亚, 李妮, 刘金华, 等. 食品过敏原荞麦的实时荧光PCR检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2012(6): 1237-1239.
- [37] 吉坤美, 李就鸿, 李盟, 等. 时间分辨免疫荧光法测定食物中鸡蛋过敏原蛋白成分[J]. 食品工业科技, 2009(8): 323-326.
- [38] 王伟, 韩建勋, 吴亚君, 等. 芥末等8种食物过敏原的多重PCR检测技术[J]. 食品与发酵工业, 2011(6): 156-160.
- [39] 邱昌将, 周桐, 吴志华, 等. 蛋白质标准物质的制备概况[J]. 食品工业科技, 2014(19): 384-387.
- [40] 杨德智, 郭永辉, 张丽, 等. 大黄素国家级纯度有证标准物质研制[J]. 中国现代应用药学, 2013(9): 933-941.
- [41] 徐慕华, 刘军. 牛磺酸标准物质的研制[J]. 化学分析计量, 2013, 5(3): 5-8.
- [42] 刘全国, 马贵平, 李炎鑫, 等. 金黄地鼠羊瘙痒病病理性质蛋白标准物质的研制[J]. 中国动物检疫, 2010(7): 37-39.
- [43] Yoo Y, Perzanowski M S. Allergic Sensitization and the Environment: Latest Update[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2014, 14(10): 1-9.
- [44] Crevel R, Ballmer-Weber B, Holzhauser T, et al. Thresholds for food allergens and their value to different stakeholders [J]. Allergy, 2008, 63(5): 597-609.
- [45] Kroes R, Galli C, Munro I, et al. Threshold of toxicological concern for chemical substances present in the diet: a practical tool for assessing the need for toxicity testing[J]. Food and Chemical Toxicology, 2000, 38(2): 255-312.
- [46] Ballmer-Weber B K, Holzhauser T, Scibilia J, et al. Clinical characteristics of soybean allergy in Europe: a double-blind, placebo-controlled food challenge study[J]. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2007, 119(6): 1489-1496.
- [47] Schwenk M, Illing H P A. Checklist: Toxicological Risk Assessment in Practice[J]. Regulatory Toxicology, 2014: 871-874.
- [48] Entink R H K, Remington B C, Blom W M, et al. Food allergy population thresholds: an evaluation of the number of oral food challenges and dosing schemes on the accuracy of threshold dose distribution modeling[J]. Food and Chemical Toxicology, 2014, 70: 134-143.
- [49] Muraro A, Hoffmann-Sommergruber K, Holzhauser T, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines. Protecting consumers with food allergies: understanding food consumption, meeting regulations and identifying unmet needs[J]. Allergy, 2014, 69(11): 1464-1472.
- [50] Rolinck-Werninghaus C, Niggemann B, Grabenhenrich L, et al. Outcome of oral food challenges in children in relation to symptom-eliciting allergen dose and allergen-specific IgE[J]. Allergy, 2012, 67(7): 951-957.