

位点特异性PCR鉴别桃仁中掺入苦杏仁的方法分析

卢雪蕊¹, 史中飞², 滕宝霞², 倪琳², 杨平荣², 宋平顺^{2*}

(1. 兰州大学药学院, 兰州 730000;

2. 甘肃省药品检验研究院 国家药品监督管理局中药材及饮片质量控制重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 由于中药材传统真伪鉴别方法的局限性, 本研究拟通过位点特异性聚合酶链式反应(PCR)建立一种能够快速鉴别桃仁中掺有苦杏仁的方法。方法: 通过比对苦杏仁与桃仁的核糖体DNA内转录间隔区(ITS)基因序列, 寻找单核苷酸多态性(SNP)位点并设计特异性鉴别引物。利用不同的苦杏仁和桃仁样品进行PCR扩增, 对影响PCR反应体系的退火温度、引物浓度、循环数等条件进行优化, 并对该方法的专属性和检出限进行了考察。另外, 利用建立的PCR鉴别方法对不同来源和不同产地桃仁中掺有不同比例苦杏仁的样品进行检测, 以验证该方法的稳定性和准确性。结果: 建立了桃仁中掺混苦杏仁的特异性PCR鉴别方法, 在退火温度63℃和引物循环数30个时仅有苦杏仁能扩增得到432 bp的特异性条带, 桃仁样品则无此条带。该方法对苦杏仁的最低检出限为0.2 ng, 其对桃仁中掺入苦杏仁的检出限为1%, 可用于日常桃仁中掺混苦杏仁的检测。结论: 建立的位点特异性PCR方法能够准确地检测桃仁中是否掺有苦杏仁, 可为桃仁的质量控制提供实验依据, 以保障其临床用药安全。

[关键词] 桃仁; 苦杏仁; 核糖体DNA内转录间隔区(ITS); 基因序列; 聚合酶链式反应(PCR); 单核苷酸多态性(SNP)位点; 特异性引物

[中图分类号] R22; Q523; R28; R932 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2021)11-0155-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210448

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210104.1406.001.html>

[网络出版日期] 2021-1-4 16:14

Identification of Armeniacae Semen Amarum Adulterated in Persicae Semen by Allele-specific Polymerase Chain Reaction

LU Xue-rui¹, SHI Zhong-fei², TENG Bao-xia², NI Lin², YANG Ping-rong², SONG Ping-shun^{2*}

(1. School of Pharmacy, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. Key Laboratory of Quality Control of Chinese Medicinal Materials and Decoction Pieces, National Medical Products Administration, Gansu Institute for Drug Control, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** Due to the limitation of traditional identification methods of Chinese medicinal materials, the study established a rapid method to identify Persicae Semen mixed with Armeniacae Semen Amarum by allele-specific polymerase chain reaction (PCR). **Method:** By comparing the ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS) gene sequences of Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum, single nucleotide polymorphism (SNP) sites were searched and specific primers were designed. Different Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum samples were amplified by PCR, the effects of annealing temperature, primer concentration and cycle number on the PCR reaction system were optimized, and the specificity and detection limit of this method were investigated. In addition, the established PCR method was used to detect the

[收稿日期] 20200924(015)

[基金项目] 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2019YFC1711500); 甘肃省药品监督管理局药品科研项目(2020GSMPA024)

[第一作者] 卢雪蕊, 在读硕士, 从事中藏药的检验与分析, E-mail: 1278969407@qq.com

[通信作者] * 宋平顺, 主任药师, 从事中药材饮片质量与标准制定的研究, E-mail: 2530517601@qq.com

samples of *Persicae Semen* mixed with different proportion of *Armeniaca Semen Amarum* from different sources and producing areas. **Result:** A specific PCR method for identifying *Persicae Semen* mixed with *Armeniaca Semen Amarum* was established. When the annealing temperature was 63 °C and the number of primer cycles was 30, only *Armeniaca Semen Amarum* could be amplified with 432 bp specific band, while *Persicae Semen* samples did not have this band. The minimum detection limit of this method for *Armeniaca Semen Amarum* was 0.2 ng, and the detection limit for *Armeniaca Semen Amarum* adulterated in *Persicae Semen* was 1%. **Conclusion:** The established allele-specific PCR method can accurately detect whether there is *Armeniaca Semen Amarum* in *Persicae Semen*, which can provide experimental basis for the quality control of *Persicae Semen* and guarantee the safety of its clinical use.

[Key words] *Persicae Semen*; *Armeniaca Semen Amarum*; ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS); gene sequence; polymerase chain reaction (PCR); single nucleotide polymorphism (SNP) site; specific primer

桃仁和苦杏仁是临床常用中药饮片,桃仁为蔷薇科植物桃或山桃的干燥成熟种子,具有活血祛瘀、润肠通便、止咳平喘之功效,用于经闭痛经、癥瘕痞块、肺痈肠痈、跌扑损伤、肠燥便秘、咳嗽气喘;苦杏仁为蔷薇科植物山杏、西伯利亚杏、东北杏或杏的干燥成熟种子,具有降气止咳平喘、润肠通便之功效,用于咳嗽气喘、胸满痰多、肠燥便秘^[1]。

桃仁和苦杏仁在外形上十分相似,尤其是经脱皮、炮制加工后更难区分,在实际应用中这2种药材经常被混淆。桃仁和苦杏仁的临床功效不同,且桃仁的应用更为广泛、价格更高,近年来市场上常发现在桃仁中掺入苦杏仁、炒桃仁中掺入炒苦杏仁的问题^[2]。苦杏仁中苦杏仁苷含量较高,该化合物被苦杏仁酶代谢分解后会产生有毒的氢氰酸,过量使用可能会引起中毒^[3],苦杏仁掺杂到桃仁中使用,存在一定的用药风险,严重影响人民群众的用药安全。

传统的中药材饮片鉴定依靠性状鉴别、显微鉴别和理化方法,由于主观判断存在很大的局限性,且这些传统技术受制于检验人员的专业知识和从业经验,因此,亟需寻求一种准确、稳定和快捷的方法来解决混伪品及掺伪品问题。因此,建立一种准确鉴定桃仁和苦杏仁,特别是在桃仁中掺入苦杏仁的专属性检验方法具有十分重要的意义。

近年来,随着脱氧核糖核酸(DNA)分子遗传标记技术不断发展和广泛应用,聚合酶链式反应(PCR)扩增技术已被收录于2010年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)的中药材鉴定方法,目前已被广泛用于中药材的真伪鉴定^[4-5]。核糖体DNA内转录间隔区(ITS)广泛分布于真核生物中,具有进化程度较快、核苷酸序列变化较大、变异位

点和信息位点丰富等特点,且其变异以相互独立的点突变为,有利于不同物种的区分,在药用植物条形码和分子鉴定中发挥着关键作用^[6-13]。高琳惠等^[14]只鉴别出桃仁DNA分子标记,未能实现该条件下同步检验苦杏仁,不能解决桃仁中掺入苦杏仁的问题。因此,本实验拟通过对桃仁与苦杏仁的ITS序列进行比对,根据单核苷酸多态性(SNP)位点设计苦杏仁鉴别引物,通过PCR条件优化,建立了准确且专属性强的鉴别桃仁中掺伪苦杏仁的检测方法。

1 材料

Veriti型PCR扩增仪(美国ABI公司), NanoDrop One型微量核酸定量仪(赛默飞世尔有限公司), GelDoc-It2型凝胶成像系统[斯柏贸易(北京)有限公司], Dry Block Heater2型恒温金属浴[艾卡(广州)仪器设备有限公司], Sub-Cell GT型琼脂糖凝胶电泳仪(美国Bio-Rad公司)。桃仁对照药材(山桃)和苦杏仁对照药材(杏)(中国食品药品检定研究院,批号分别为121560-201302, 121554-201204); rTaq DNA聚合酶, Taq Plus DNA聚合酶, 2×Taq PCR MasterMix, D2000 DNA Marker, 植物DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为ET101, ET105, KT201, MD114, DP305]; PrimeSTAR[®] HS DNA聚合酶(TaKaRa公司,批号R010A), 琼脂糖(Invitrogen公司,批号75510-019), GelRed(Biotium公司,批号41003)。桃仁与苦杏仁样品均由甘肃省药品检验研究院宋平顺主任药师收集并鉴定,样品信息见表1,美国国立生物技术信息中心(NCBI)下载序列见表2。

2 方法与结果

2.1 SNP位点的筛选和特异性引物设计 利用

表 1 桃仁和苦杏仁的相关样品信息

Table 1 Sample information of Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum

编号	中药	种名	拉丁学名	产地/收集地
Pa1	苦杏仁	山杏	<i>Prunus armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	甘肃康县/甘肃康县
Pa2	苦杏仁	山杏	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	山西/安国药材市场
Pa3	苦杏仁	山杏	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	陕西/亳州药材市场
Pa4	甜杏仁	杏	<i>P. armeniaca</i>	甘肃康乐县/甘肃康乐县
Pa5	炒苦杏仁	山杏	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	甘肃/兰州安泰堂中药饮片有限公司
Pa6	炒苦杏仁	山杏	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	陕西/兰州复兴厚药材有限责任公司
Pa7	苦杏仁	西伯利亚杏	<i>P. sibirica</i>	河北承德/启泰药业(集团)有限公司
Pa8	苦杏仁	东北杏	<i>P. mandshurica</i>	河北承德/启泰药业(集团)有限公司
Pa9	苦杏仁	东北杏	<i>P. mandshurica</i>	河北承德/启泰药业(集团)有限公司
Pa10	燂苦杏仁	杏	<i>P. armeniaca</i>	新疆库车县/亳州市康美中药城
Pa11	燂苦杏仁	杏	<i>P. armeniaca</i>	新疆库车县/亳州市康美中药城
Pa12	燂苦杏仁	山杏	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	新疆库车县/亳州市康美中药城
Pp1	山桃仁	山桃	<i>P. davidiana</i>	甘肃徽县/甘肃徽县
Pp2	桃仁	桃	<i>P. persica</i>	甘肃成县/甘肃成县
Pp3	山桃仁	山桃	<i>P. davidiana</i>	山西/安国药材市场
Pp4	生桃仁	山桃	<i>P. davidiana</i>	陕西/安国药材市场
Pp5	炒桃仁	山桃	<i>P. davidiana</i>	陕西/兰州复兴厚药材有限责任公司
Pp6	山桃仁	山桃	<i>P. davidiana</i>	甘肃庆城/黄河药材市场
Pp7	桃仁	桃	<i>P. persica</i>	甘肃康县/黄河药材市场
Pp8	山桃仁	山桃	<i>P. davidiana</i>	青海
Pp9	桃仁	桃	<i>P. persica</i>	甘肃皋兰县/甘肃皋兰县
Pp10	炒桃仁	桃	<i>P. persica</i>	甘肃/兰州安泰堂中药饮片有限公司
Pp11	燂桃仁	桃	<i>P. persica</i>	河南/亳州市康美中药城
Pp12	燂桃仁	桃	<i>P. persica</i>	河南/亳州市康美中药城
Pp13	燂桃仁	山桃	<i>P. davidiana</i>	河南/亳州市康美中药城
Pp14	燂桃仁	山桃	<i>P. davidiana</i>	河南/亳州市康美中药城

表 2 苦杏仁与桃仁 ITS 的 GenBank 序列

Table 2 GenBank sequences of ITS from Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum

名称	拉丁名	基因登录号
杏	<i>P. armeniaca</i>	EF211085.1, EF211084.1, EF211083.1, AF318756.1, AF185620.1, JF978107.1, JF978075.1, MG735482.1, KX890460.1, KX890459.1, JQ776883.1, FJ649670.1
西伯利亚杏	<i>P. sibirica</i>	AF318739.1, JF978140.1, JF978139.1, MH711531.1, MG772981.1, FJ980390.1, JQ034171.1
东北杏	<i>P. mandshurica</i>	EF211082.1, AH009375.2, AF318714.1, JF978109.1, JQ776884.1, JF978108.1
山桃	<i>P. davidiana</i>	AF318744.1, JF978080.1, JF978079.1, JF978078.1, JF978077.1, JF978076.1, EU669084.1, MH711207.1, DQ003550.1, DQ006281.1
桃	<i>P. persica</i>	EF211087.1, AF318741.1, JQ280475.1, JQ280474.1, AF185621.1, AF143535.1, JF978131.1, DQ006273.1, DQ006272.1, JF978128.1, JF978120.1

DNAMAN 8.0 软件对 GenBank 数据库中苦杏仁和桃仁的 ITS 序列进行比对, 寻找差异性 SNP 位点。通过 Primer Premier 5.0 软件在 SNP 位点设计苦杏仁的特异性鉴别引物 PAF (正向引物, 5'-GTCTCGGCGTGCTCCTCGT-3', 长度 19 bp) -PAR

(反向引物, 5'-ATTTATGCCAACCGCGCGA-3', 长度 19 bp), 送北京华大科技有限公司合成。

2.2 基因组总 DNA 的提取 取桃仁和苦杏仁样品, 用 75% 乙醇消毒, 后用灭菌超纯水冲洗, 晾干, 称取样品粉末 30 mg, 置于 1.5 mL 离心管中, 按植物

DNA提取试剂盒说明书提取总DNA。取不同样品DNA,用微量核酸定量仪测定模板DNA浓度和质量,调整质量浓度至 $20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 苦杏仁及桃仁位点特异性PCR鉴别 利用PAF-PAR特异性引物对不同样品进行特异性PCR分析,PCR体系(总体积 $25\text{ }\mu\text{L}$)组成为 $10\times\text{PCR buffer } 2.5\text{ }\mu\text{L}$, $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ dNTPs } 2\text{ }\mu\text{L}$,引物PAF和PAR各 $0.3\text{ }\mu\text{L}$,*rTaq* DNA聚合酶 $0.5\text{ }\mu\text{L}$,DNA模板($20\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) $1\text{ }\mu\text{L}$,灭菌蒸馏水补足至 $25\text{ }\mu\text{L}$ 。反应条件设定为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 s , 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min 。反应结束后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测特异性PCR扩增产物,在 130 V 电压条件下电泳约 50 min ,利用凝胶成像系统拍照。若供试品凝胶电

泳图谱中,在与苦杏仁对照药材凝胶电泳图谱相应位置上($250\sim 500\text{ bp}$),检出1条DNA条带(432 bp),则表明供试品中掺有苦杏仁;若未检出1条DNA条带,则表明未掺有苦杏仁。

2.4 引物设计 对NCBI数据库中苦杏仁和桃仁的ITS序列进行比对,发现二者ITS序列存在多个SNP位点,如第59~62位碱基为GTCT(G为鸟嘌呤;C为胞嘧啶;T为胸腺嘧啶),第67~71位碱基为GTGCT,第73位碱基为C,第75~77位碱基为CGT,第472位碱基为T,都是苦杏仁特有的SNP位点,基于这些SNP位点,设计苦杏仁与桃仁特异性PCR引物PAF-PAR,见图1。利用设计的引物对苦杏仁与桃仁进行特异性PCR扩增,得到长度为 432 bp 的特异条带。

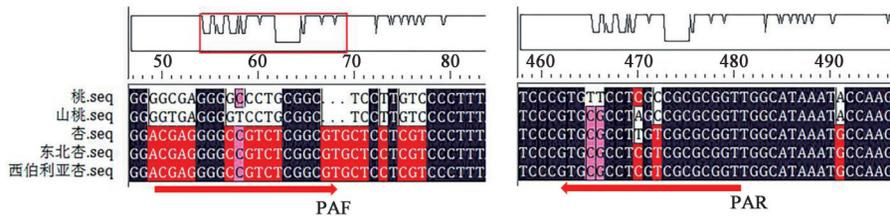


图1 基于ITS序列的苦杏仁与桃仁特异性引物设计

Fig. 1 Specific primers designed for identification of Persicae Semen and Armeniaca Semen Amarum based on ITS sequences

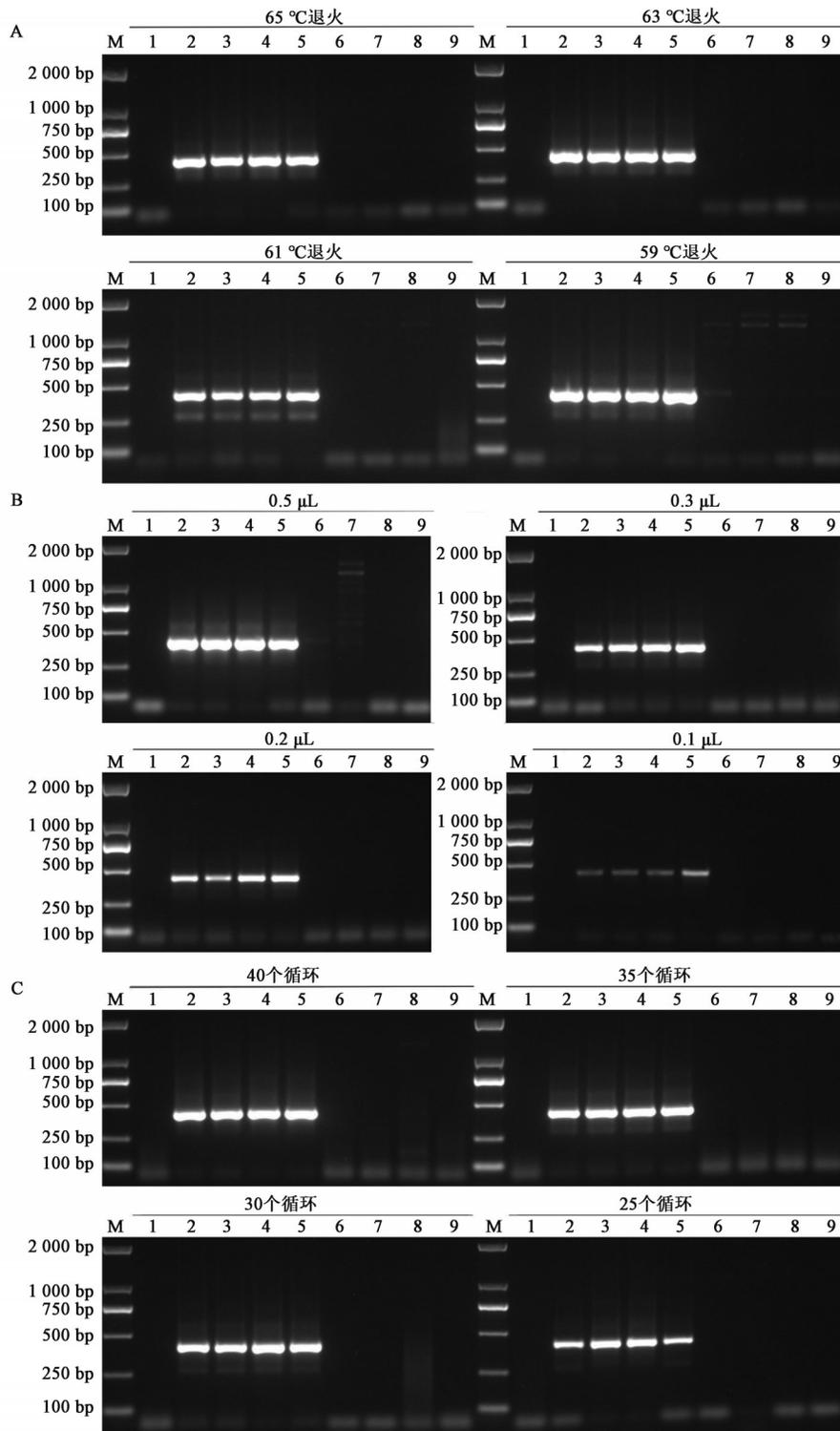
2.5 PCR反应条件的优化 选取苦杏仁和山桃的对照药材各1份、样品各2份,按2.2项下方法提取基因组DNA,在预试验确定的PCR反应体系和程序的基础上,进一步考察对PCR反应影响较大的因素(退火温度、引物浓度、循环次数和酶类型)。结果表明在退火温度 $59\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,桃仁出现了不同程度的非特异性扩增,而在退火温度为 $61\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,苦杏仁能扩增得到长度为 432 bp 的特异条带,桃仁则无非特异性扩增,见图2(A),说明退火温度在 $61\sim 65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时,对PCR扩增无影响,故选择退火温度 $63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。加入上下游引物PAF和PAR($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$ 时,桃仁出现了非特异性扩增;加入鉴别引物分别为 $0.3, 0.2, 0.1\text{ }\mu\text{L}$ 时,桃仁均无非特异性扩增,但是随着加入引物量的减少,苦杏仁的扩增效率也随之降低,见图2(B),故选择加入PAF和PAR($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)鉴别引物均为 $0.3\text{ }\mu\text{L}$ 。循环数为 $40, 35$ 个时,桃仁样品出现了不同程度的非特异性扩增;而循环数在 $30, 25$ 个时,桃仁均未出现非特异性扩增,见图2(C),但循环数为 25 个时,苦杏仁的扩增效率随之降低,故选择PCR循环数为 30 个。

2.6 Taq酶类型考察 在确定PCR反应体系和程序的基础上,对*rTaq* DNA聚合酶, $2\times\text{Taq PCR}$

MasterMix DNA聚合酶,*Taq Plus* DNA聚合酶及PrimeSTAR[®] HS DNA聚合酶4种聚合酶进行考察,见图3。结果发现4种酶中只有*rTaq* DNA聚合酶能实现苦杏仁与桃仁的鉴别,而且不受酶形式的影响;*Taq Plus* DNA聚合酶与PrimeSTAR[®] HS DNA聚合酶进行鉴别时,桃仁出现了不同程度的假阳性条带。这可能与高保真酶具有3'-5'外切酶活性有关,可以纠正3'-5'外切酶错配的碱基,导致实验中特异性引物3'端错配的碱基被酶切,因此,扩增时表现与常规PCR一致^[13]。

2.7 准确性考察 采用优化后的特异性PCR反应体系和程序对26份样品进行特异性PCR扩增,见图4。结果发现仅有苦杏仁出现 432 bp 的特异性条带,桃仁样品均无假阳性结果出现。

2.8 检出限考察 使用已经建立的特异性PCR鉴别方法对不同用量的苦杏仁和桃仁DNA模板进行PCR分析,以考察苦杏仁的检测限。结果表明PCR体系中苦杏仁在 2 ng 时能出现特异性鉴别条带,而苦杏仁DNA模板用量在 0.2 ng 时仍能见到较暗的特异性鉴别条带,推测建立的苦杏仁特异性PCR鉴别方法对苦杏仁的检测限为 0.2 ng ,见图5。为了检测特异性PCR对桃仁中掺入苦杏仁的鉴别能力,将



A. 退火温度; B. 引物量; C. 循环数; M. D2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2. 苦杏仁对照药材; 3~5. 苦杏仁样品 Pa1~3; 6. 桃仁对照药材; 7~9. 桃仁样品 Pp1~3(图3, 5同)

图2 不同因素对苦杏仁与桃仁位点特异性PCR鉴别的影响

Fig. 2 Effect of different factors on allele-specific PCR authentication of Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum

不同质量的桃仁粉末和苦杏仁粉末充分混匀, 混合物共 1.0 g。得桃仁粉末中掺有 0, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 30%, 50%, 100% 的苦杏仁混合粉末, 使用按 2.2 项下方法提取的 DNA 并进行特异性 PCR

鉴定, 以检测所建立的方法对掺伪苦杏仁的检出效果, 见图 6。结果发现桃仁样品中掺有 1% 以上苦杏仁时均可检出, 说明该方法对桃仁掺伪苦杏仁的检出限为 1%。

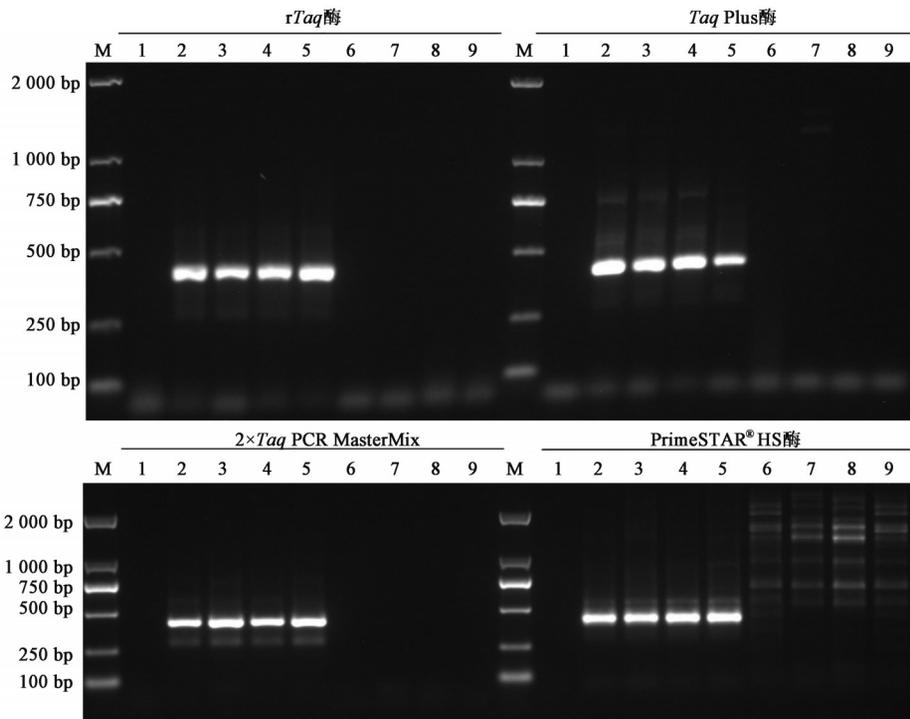
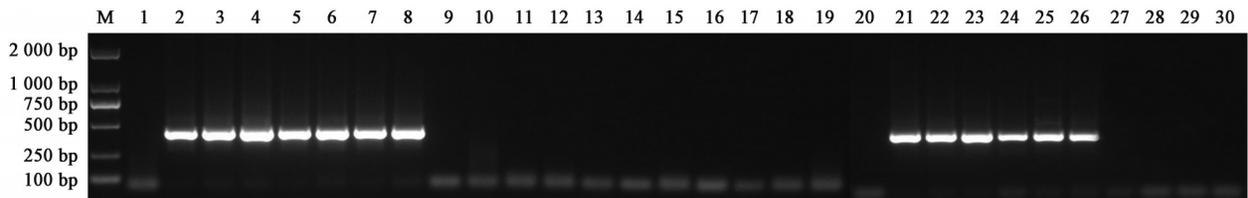


图3 不同类型 Taq 酶对苦杏仁与桃仁位点特异性 PCR 鉴别的影响

Fig. 3 Effect of different Taq polymerases on allele-specific PCR authentication of Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum



M.D2000 DNA Marker; 1, 20. 空白对照; 2. 苦杏仁对照药材; 3~8. 苦杏仁样品 Pa1~6; 9. 桃仁对照药材; 10~19. 桃仁样品 Pp1~10; 21~26. 苦杏仁样品 Pa7~12; 27~30. 桃仁样品 Pp11~14

图4 苦杏仁与桃仁位点特异性 PCR 鉴别

Fig. 4 Allele-specific PCR authentication of Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum

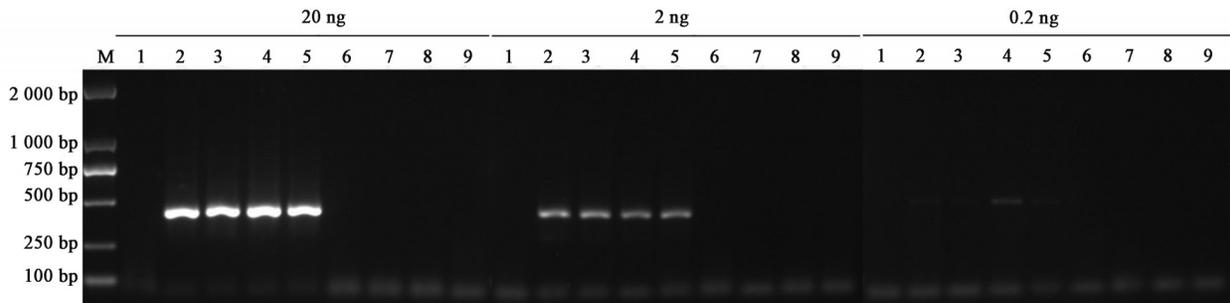


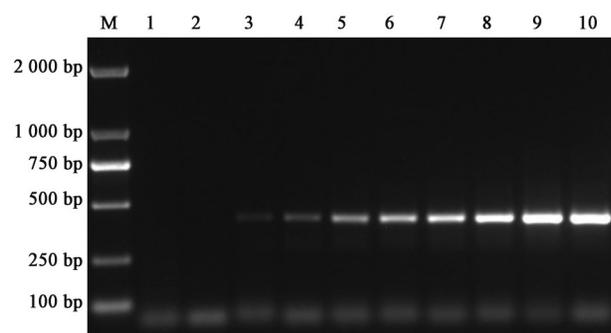
图5 不同苦杏仁和桃仁 DNA 模板用量对位点特异性 PCR 的影响

Fig. 5 Effect of different amounts of DNA template of Persicae Semen and Armeniacae Semen Amarum on allele-specific PCR

3 讨论

桃仁和苦杏仁均为2020年版《中国药典》收载的品种,且均为常用药材,但各自临床应用范围不同,而苦杏仁作为毒性药材,如果滥用或误用可能会导致健康问题。两者混合后难以区分,在市场中

人为或无意掺杂会对中药安全用药造成极大威胁。高琳惠等^[14]设计的位点特异性引物通过PCR扩增后,桃仁能够扩增出333 bp清晰条带,但该研究实际上仅完成了桃仁DNA快速鉴别,未能找到苦杏仁的特征条带,故而不能解决桃仁中是否掺有苦杏仁



M. D2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2~10. 桃仁中掺入0, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, 30%, 50%, 100%的苦杏仁

图6 桃仁中混合不同比例苦杏仁后的位点特异性PCR鉴别

Fig. 6 Allele-specific PCR identification of Persicae Semen mixed with different proportions of Armeniaca Semen Amarum

的检测。熊超等^[15]利用高分辨率熔解曲线(HRM)可以区分桃仁与苦杏仁,但需配套荧光PCR仪采集荧光信号,仪器配套成本高且实验较为繁琐,实际应用存在一定局限性。因此,亟需探索新的桃仁和苦杏仁掺伪鉴别方法。

本研究通过对桃仁和苦杏仁的ITS序列进行比对,基于SNP位点设计苦杏仁的特异性扩增引物,对影响PCR特异性的关键因素进行了考察,建立了桃仁中掺入苦杏仁的位点特异性PCR鉴别方法。同时,为了考察该方法的准确性,对不同批次的桃仁与苦杏仁样品进行了实验验证,结果发现苦杏仁均获得正确的阳性鉴别结果,桃仁均为阴性,与形态学鉴定结果完全吻合,还对桃仁样品中掺入不同比例苦杏仁的混合样品进行了特异性PCR扩增,结果在桃仁中掺入苦杏仁的检出限达到了1%,表明该方法稳定性好、灵敏度高,可满足市场检验需求。但本研究只是对桃仁和苦杏仁药材进行掺伪鉴别,对于中成药中桃仁掺入苦杏仁的鉴别是否同样适用尚需实验验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:210,290.
[2] 魏锋,刘薇,严华,等. 我国中药材及饮片的质量情况

及有关问题分析[J]. 中国药学杂志,2015,50(4): 277-283.

[3] 杜虹韦,张爱华,赵欣蕾. 苦杏仁毒性及其解毒方法研究进展[J]. 黑龙江中医药,2013,42(4):58-59.
[4] 曹晖,邵鹏柱,毕培曦. 中药分子鉴定技术与应用[M]. 北京:人民卫生出版社,2016:18-40.
[5] 刘亚辉,李佳兴,王升,等. 欧洲花楸病程相关蛋白基因SaPR1-like的克隆及序列分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(21):118-123.
[6] 赵丹,周涛,江维克,等. 基于ITS2序列SNP位点鉴定白及药材及其混伪品[J]. 中国中药杂志,2015,40(18):3573-3578.
[7] 蒋超,罗宇琴,袁媛,等. 多重位点特异性PCR鉴别人参、三七、西洋参掺杂[J]. 中国中药杂志,2017,42(7):1319-1323.
[8] 罗宇琴,蒋超,袁媛,等. 多重位点特异性PCR鉴别霍山石斛、铁皮石斛与齿瓣石斛药材[J]. 药学报,2017,52(6):998-1006.
[9] 戚文涛,李剑超,王晨,等. 应用ITS2条形码及种子形态鉴定柴胡属种子[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(11):170-177.
[10] 产清云,蒋露,程铭恩,等. 位点特异性PCR鉴别延胡索、齿瓣延胡索和夏天无药材[J]. 中国中药杂志,2019,44(15):3261-3267.
[11] 赵晴,谢红波,央拉,等. 基于DNA条形码技术的北柴胡种子分子鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(14):182-189.
[12] 方强强,王燕. 多基原民族药岩陀DNA条形码鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(17):142-150.
[13] BYEONG M, WOOK K, INKYU P, et al. Establishment of a PCR assay for the detection and discrimination of authentic cordyceps and adulterant species in food and herbal medicines[J]. Molecules, 2018,23(8):1932.
[14] 高琳惠,尹艳,李佳,等. 基于ITS序列位点特异性PCR鉴别桃仁与苦杏仁[J]. 世界中医药,2017,12(9):2190-2194.
[15] 熊超,李景剑,孙伟,等. HRM结合DNA条形码在苦杏仁对桃仁掺混检测中的应用[J]. 药学报,2017,52(4):647-652.

[责任编辑 刘德文]