

香加皮与五加皮、地骨皮的PCR-RFLP鉴别

刁晓微¹, 刘亚男¹, 金艳^{2*}, 蒋超², 赵玉洋², 袁媛^{2*}

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012; 2. 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)法快速鉴别香加皮与其混淆品五加皮、地骨皮, 避免因基原混乱影响用药安全。方法: 从CGIR数据库获取的香加皮DSS标记序列, 对香加皮DSS序列进行酶切位点分析, 筛选香加皮与五加皮、地骨皮间差异位点, 选择香加皮的特异性酶切位点 *Cl*a I, 设计PCR-RFLP反应引物, 对影响PCR-RFLP反应的退火温度、循环数、*Taq* 酶、不同型号PCR仪、酶切时间等条件进行考察。利用建立的PCR-RFLP鉴别方法对不同产地香加皮与五加皮、地骨皮进行适用性考察。结果: 在退火温度59℃、循环数为40个时, 香加皮与五加皮、地骨皮样品经过特异性引物进行PCR扩增后, 可出现清晰明亮的片段, 酶切时间30 min, 香加皮药材及其基原物种均可产生约140 bp和290 bp的目的片段, 而2种混淆品五加皮和地骨皮药材及其基原物种只在250~500 bp有一条约430 bp的目的片段。该方法能对香加皮及其混淆品五加皮、地骨皮进行准确鉴别。结论: 建立了香加皮与五加皮、地骨皮的PCR-RFLP鉴别方法, 稳定性好、灵敏度高、适用性好, 为香加皮与五加皮、地骨皮的质量控制提供参考。

[关键词] 香加皮; 五加皮; 地骨皮; 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性; 分子鉴定

[中图分类号] R284.2; R289; R287; R22; R2-031; R33; R24 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2024)04-0042-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231716 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20231212.1636.002>

[网络出版日期] 2023-12-13 10:53:47

PCR-RFLP for Distinguishing Periplocae Cortex from Acanthopanax Cortex and Lycii Cortex

DIAO Xiaowei¹, LIU Yanan¹, JIN Yan^{2*}, JIANG Chao², ZHAO Yuyang², YUAN Yuan^{2*}

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method for rapid distinguishing Periplocae Cortex from Acanthopanax Cortex and Lycii Cortex, so as to avoid the influence of genetic confusion on drug safety. **Method:** The DSS-tagged sequences of Periplocae Cortex were obtained from the Chloroplast Genome Information Resource (CGIR) and analyzed to find the enzymatic cleavage sites that were different from those of Acanthopanax Cortex and Lycii Cortex. The specific enzymatic cleavage site, *Cl*a I, of Periplocae Cortex was selected, on the basis of which the primers for PCR-RFLP were designed. Furthermore, the factors such as annealing temperature, number of cycles, *Taq* enzyme, PCR instruments, and enzymatic treatment time that may influence PCR-RFLP were

[收稿日期] 2023-07-16

[基金项目] 国家科技性基础资源调查项目(2018FY100800); 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A041, CI2021B014); 青年岐黄学者项目; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZXT202217)

[第一作者] 刁晓微, 在读硕士, 从事中药资源与鉴定学研究, E-mail: 17852625983@163.com

[通信作者] * 袁媛, 研究员, 博士生导师, 从事中药鉴定与分子生药学研究, Tel: 010-64087649, E-mail: y_yuan0732@163.com;

* 金艳, 副研究员, 从事中药鉴定工作, E-mail: jy20047@163.com

studied. The established PCR-RFLP method was applied to the identification of Periplocae Cortex, Acanthopanacis Cortex, and Lycii Cortex samples produced in different regions. **Result:** The PCR-RFLP at the annealing temperature of 59 °C and with 40 cycles showed clear bands of the samples. When the enzyme digestion time was 30 min. The reaction produced the target bands at about 140 bp and 290 bp for both Periplocae Cortex and its original plant and only a band at about 430 bp for Acanthopanacis Cortex, Lycii Cortex, and their original plants. The method can accurately distinguish Periplocae Cortex from its confounders Acanthopanacis Cortex and Lycii Cortex. **Conclusion:** The PCR-RFLP method for distinguishing Periplocae Cortex from Acanthopanacis Cortex and Lycii Cortex was established. It has high stability, sensitivity, and applicability, providing a reference for the quality control of Periplocae Cortex, Acanthopanacis Cortex, and Lycii Cortex.

[Keywords] Periplocae Cortex; Acanthopanacis Cortex; Lycii Cortex; polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); molecular identification

香加皮,亦称北五加皮,为萝藦科植物杠柳 *Periploca sepium* 的干燥根皮,味辛、苦,性温,具有利尿消肿、祛风湿、强筋骨的功效,常用于下肢浮肿、心悸气短、风寒湿痹、腰膝酸软等^[1]。现代药理研究表明,其在强心、抗肿瘤、免疫调节、抗炎等方面也具有重要作用^[2-3],临床上使用的含香加皮中成药包括舒精活血胶囊、肾炎消肿片等。香加皮为有毒中药,其主要化学成分包括强心苷类、葡萄糖苷类、萜类、甾类、挥发类等物质^[4],其中以杠柳毒素和杠柳皂苷为代表的强心苷类是其强心利尿的起效物质,也是主要的毒性来源,能引起胃肠道紊乱及心脏和神经系统症状。香加皮主要的混淆品为五加皮和地骨皮,前者为五加科植物细柱五加 *Acanthopanax gracilistylus* 的干燥根皮,也称南五加皮;后者为枸杞属植物枸杞 *Lycium chinense* 或宁夏枸杞 *L. barbarum* 的根皮。三者名称与性状相似,据李万波等^[5]调查,直至清末,北五加皮几乎全部代替了南五加皮,而在现代临床使用中也极易混淆^[6]。香加皮与五加皮、地骨皮有效成分不同,临床用量也不同,应加以严格区别,以确保用药安全。因此,对三者进行准确鉴别是极为重要的。

从性状来看,香加皮多呈槽状,外皮多为黄褐色,易脱落,内表面黄白色,较光滑,有细纵皱纹,质脆,很容易折断,香气浓郁,味苦;而五加皮呈卷筒状,外表灰褐色,除有“一”字形横长皮孔外,其余地方较光滑,内表面灰黄色,有细纵纹,质脆易折断,气味轻微,味微辛而苦;地骨皮与香加皮性状极相似,但几乎无香气,口尝微甜,俗语“糟皮白里无香气”。从显微特征来看,香加皮含草酸钙方晶,五加皮含草酸钙簇晶,而地骨皮含草酸钙砂晶,在薄壁细胞中形成砂晶囊;香加皮乳汁管较多,五加皮树脂道碎片较多,地骨皮没有树脂道和乳汁管,淀

粉粒很多,多复粒,由2~8粒淀粉粒复合而成^[7-11]。由于上述几种方法都极大地受限于鉴定人员的主观经验,且炮制会导致药材的性状和显微特征发生变化,影响鉴定的准确性。有文献研究分别利用光谱成像技术对香加皮和五加皮进行了鉴别^[12-13],刘浩等^[14]利用广义二维相关光谱建立了香加皮与五加皮的鉴别方法,但光谱法要求鉴定人员需要具备相应的专业知识,且鉴定成本较高。因此,亟需建立一种客观、简便的鉴定方法,用以区分香加皮与五加皮、地骨皮。

近年来,限制性片段长度多态性(RFLP)技术与聚合酶链式反应(PCR)相结合在中药材的鉴别中得到了广泛应用,如木香、川木香与藏木香^[15]、西洋参与人参^[16]、梅花鹿鞭与马鹿鞭^[17]、天南星与半夏^[18]、石菖蒲与藏菖蒲^[19]、罗布麻与伪品白麻^[20]、当归与伪品欧当归^[21],以及天麻纯度^[22]和覆盆子^[23]、马蓝^[24]、霍山石斛^[25]、虻虫及其混伪品^[26]等药材鉴定,具有稳定性好、特异性高、操作简单等特点。本研究通过利用香加皮与五加皮、地骨皮的DNA特征序列(DSS)建立了香加皮及其混淆品五加皮和地骨皮的PCR-RFLP鉴别方法,为保障临床用药安全奠定基础。

1 材料

1.1 样品信息 采集香加皮、五加皮、地骨皮的基原植物及药材样品,其中香加皮原植物6批、药材6批,五加皮原植物5批、药材4批,地骨皮原植物枸杞、宁夏枸杞各4批,地骨皮药材枸杞、宁夏枸杞各2批,凭证标本保存于中国中医科学院中药资源中心,由金艳副研究员鉴定,见表1。

1.2 仪器及试剂

1.2.1 仪器 Wonbio-48P型高通量植物组织研磨仪(上海万柏生物科技有限公司),VORTEX-2

表1 原植物和药材样品信息

Table 1 Sample information of original plants and medicinal materials

基原植物名	拉丁名	采集地
杠柳(原植物)	<i>Periploca sepium</i>	甘肃庆阳市
杠柳(原植物)	<i>P. sepium</i>	甘肃天水市
杠柳(原植物)	<i>P. sepium</i>	甘肃平凉市
杠柳(原植物)	<i>P. sepium</i>	河北唐山市
杠柳(原植物)	<i>P. sepium</i>	内蒙古通辽市
杠柳(原植物)	<i>P. sepium</i>	宁夏吴忠市
杠柳(药材)	<i>P. sepium</i>	山东沂南县
杠柳(药材)	<i>P. sepium</i>	河北元氏县
杠柳(药材)	<i>P. sepium</i>	河北博野县
杠柳(药材)	<i>P. sepium</i>	甘肃徽县
杠柳(药材)	<i>P. sepium</i>	宁夏银川市
杠柳(药材)	<i>P. sepium</i>	河南安阳县
细柱五加(原植物)	<i>Acanthopanax gracilistylus</i>	湖南武冈市
细柱五加(原植物)	<i>A. gracilistylus</i>	湖南涟源市
细柱五加(原植物)	<i>A. gracilistylus</i>	湖南靖州县
细柱五加(原植物)	<i>A. gracilistylus</i>	四川大竹县
细柱五加(原植物)	<i>A. gracilistylus</i>	贵州石阡县
细柱五加(药材)	<i>A. gracilistylus</i>	安徽黄山市
细柱五加(药材)	<i>A. gracilistylus</i>	安徽来安县
细柱五加(药材)	<i>A. gracilistylus</i>	安徽寿县
细柱五加(药材)	<i>A. gracilistylus</i>	陕西佳县
枸杞(原植物)	<i>Lycium chinense</i>	湖南隆回县
枸杞(原植物)	<i>L. chinense</i>	安徽濉溪县
枸杞(原植物)	<i>L. chinense</i>	安徽濉溪县
枸杞(原植物)	<i>L. chinense</i>	安徽濉溪县
枸杞(药材)	<i>L. chinense</i>	山东青岛市
枸杞(药材)	<i>L. chinense</i>	安徽来安县
宁夏枸杞(原植物)	<i>L. barbarum</i>	宁夏银川市
宁夏枸杞(原植物)	<i>L. barbarum</i>	甘肃平凉市
宁夏枸杞(原植物)	<i>L. barbarum</i>	内蒙古鄂托克旗
宁夏枸杞(原植物)	<i>L. barbarum</i>	宁夏银川市
宁夏枸杞(药材)	<i>L. barbarum</i>	宁夏贺兰县
宁夏枸杞(药材)	<i>L. barbarum</i>	宁夏灵武市

GENIE型漩涡振荡仪(美国Scientific Industries公司), Eppendorf 5424型离心机(德国Eppendorf公司), Nanodrop 2000型微量核酸定量分析仪(美国Thermo Scientific公司), VeritiPro™型PCR仪、GeneAmp 9700型PCR仪(美国Applied Biosystem公司), TC-512型PCR仪(上海Techne公司), PTC-100型PCR仪(Gene公司), PowerPac™型电泳仪、凝

胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2.2 试剂 植物基因组DNA提取试剂盒Plant Genomic DNA Kit(DP305)[天根生化科技(北京)有限公司]; 2×M5 PCR Mix(北京聚合美生物科技有限公司, 货号MF164-10); 2×Taq PCR Mix(北京金百特生物技术有限公司, 货号P0195); rTaq DNA聚合酶、LA Taq HS DNA聚合酶、6×Loading Buffer(日本TaKaRa公司, 货号分别为R001B、RR042A、9156); 限制性内切酶Cla I(NEB公司、TaKaRa公司, 货号分别为R0197V、1034S); Trans2K DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司, 货号BM101); GelRed核酸染料(北京兰博利德公司, 货号CR001)。

2 实验方法

2.1 基因组DNA提取 使用经75%乙醇擦拭的镊子取样品适量, 用高通量组织研磨仪打成粉末, 取粉末约30 mg, 根据Hi-DNAsecure Plant Kit高效植物基因组DNA提取试剂盒说明书进行DNA提取。用Nanodrop2000型微量核酸定量分析仪测定其DNA浓度, 并根据吸光度 $A_{260/280}$ 、 $A_{260/230}$ 判断DNA质量, -20℃保存备用。

2.2 酶切位点分析和引物设计 使用BioEdit软件对测序获得的香加皮、五加皮、地骨皮序列进行多重比对后, 获得了香加皮特有的DSS标记(PSB-5)。使用DNAMAN软件对香加皮的DSS进行酶切位点分析, 寻找香加皮与五加皮、地骨皮具有差异的酶切位点, 同时排除DSS上下游具有同一酶切位点的情况。使用Premier Primer 5.0设计PCR-RFLP分析的扩增引物, 调整参数使引物扩增产物包含此DSS标记, 其中上游引物序列PSB-6为5'-GGATGCTTCGTGAAGTGCT-3'、下游引物序列PSB-6为5'-CATAAAGGGTATTCAAGAATCG-3', 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.3 PCR-RFLP分析 使用鉴别引物对香加皮及五加皮、地骨皮原植物的DNA模板进行PCR扩增, PCR反应体系为25 μL, 包括2×M5 PCR Mix 12.5 μL, 鉴别引物(10 μmol·L⁻¹)各0.3 μL, 模板2 μL, 用无菌双蒸水补足至25 μL, 同法另取无菌双蒸水, 作为阴性对照。将200 μL离心管置PCR仪中, 初始PCR反应程序为95℃预变性3 min, 40个循环(94℃变性15 s, 59℃退火30 s, 72℃延伸30 s), 72℃终延伸5 min。反应结束后, 取PCR产物5 μL, 点样于GelRed染色的1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳检测后, 置凝胶成像仪成像观察。

反应结束后取香加皮与五加皮、地骨皮原植物的PCR产物进行RFLP分析,将产物置于200 μL PCR管中,进行酶切反应,酶切反应体系为20 μL,包含10×Buffer 2 μL,PCR产物10 μL,*Cla* I限制性内切酶(10 U·μL⁻¹)0.5 μL、无菌双蒸水补足至20 μL,同法另取无菌双蒸水,作为阴性对照。酶切反应在37℃水浴反应1 h。酶切反应结束后,取酶切产物5 μL,点样于于GelRed染色的1.5%琼脂糖凝胶上进行电泳检测后,置凝胶成像仪成像观察。

2.4 PCR扩增条件和限制性内切酶酶切条件考察

使用鉴别引物对香加皮及其混淆品五加皮、地骨皮进行PCR扩增,使用*Cla* I限制性内切酶进行RFLP分析,在确定引物后,为避免出现假阳性结果,需要对影响鉴别准确性和稳定性的PCR扩增条件和酶切条件进行考察,包括退火温度、循环数、不同型号PCR仪、不同种类*Taq*酶及酶切条件、不同厂家*Cla* I限制性内切酶。同时,还需对该方法的耐用性和适用性进行检测,以确保结果稳定。

3 结果

3.1 差异性酶切位点的获得

将香加皮特有的DSS标记序列导入DNAMAN软件中进行限制性酶切分析,发现香加皮和五加皮、地骨皮间存在一个SNP差异位点,其中香加皮为G,五加皮、地骨皮均为T,该SNP位点位于*Cla* I内切酶酶切位点(AT[^]CGAT)上。将香加皮与五加皮、地骨皮的PCR扩增产物进行酶切反应之后,香加皮可被酶切成2个片段,而五加皮和地骨皮均不能被酶切,仍保留原扩增产物的片段,见增强出版附加材料。同时,该DSS标记两端200 bp序列不存在其他*Cla* I限制性内切酶酶切位点,可作为香加皮和五加皮、地骨皮的鉴别标记,使用PCR-RFLP法进行分子鉴别。

3.2 PCR-RFLP鉴别反应条件的考察

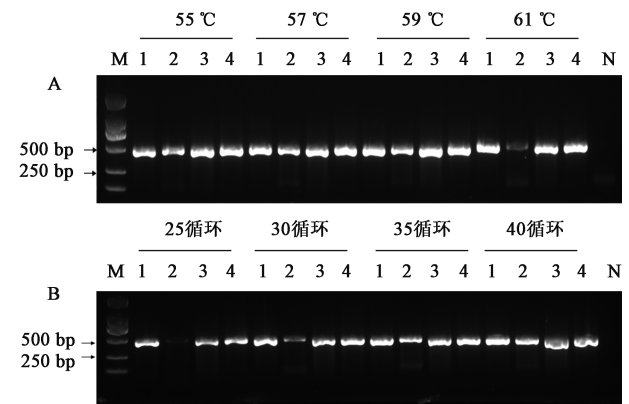
3.2.1 退火温度

使用鉴别引物对香加皮及其混淆品五加皮、地骨皮的原植物进行PCR扩增,设置退火温度为55~61℃进行考察,结果显示55、57、59、61℃均能扩增得到目的片段,但当退火温度为61℃时,五加皮的原植物较55~59℃退火温度的片段暗,见图1A。为保证实验结果的重现性,故选择59℃作为本研究的最佳退火温度。

3.2.2 循环次数

使用鉴别引物对香加皮及其混淆品五加皮、地骨皮的原植物进行PCR扩增,设定了25~40个循环次数进行考察,每增加5个循环为一组,结果显示25个循环次数时,部分样品的目的片段微弱,见图1B;30个循环次数时,部分样品的目

的片段较35~40个循环次数弱,35~40个循环次数均能扩增得到明亮的目的片段,见图1B。为保证后续RFLP反应的正常进行,所以本研究选择PCR循环数为40个。



注:A. 退火温度;B. 循环次数;M. Trans 2K DNA Marker;1. 杠柳;2. 细柱五加;3. 枸杞;4. 宁夏枸杞;N. 空白对照(以ddH₂O为模板)

图1 不同退火温度和循环数对香加皮、五加皮和地骨皮PCR鉴别结果的影响

Fig. 1 Effect of different annealing temperatures and cycle numbers on PCR identification results of *Periplocae Cortex*, *Acanthopanax Cortex* and *Lycii Cortex*

3.3 耐受性考察

3.3.1 不同*Taq*酶考察

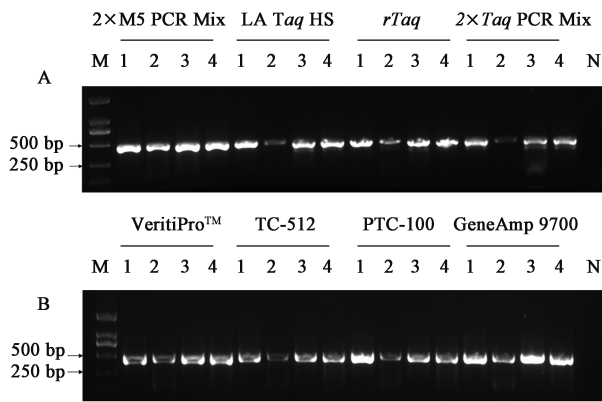
为测试不同种类的*Taq*酶对香加皮及其混淆品PCR扩增结果的影响,分别使用2×M5 PCR Mix、2×*Taq* PCR Mix、TaKaRa公司的*rTaq* DNA聚合酶和高保真酶LA *Taq* HS DNA聚合酶进行PCR扩增,结果显示4种*Taq*酶均能扩增得到约430 bp的目的片段,由于4种*Taq*酶的活力不同导致扩增效率有所差异,但不影响最终结果的判定,其中2×M5 PCR Mix得到的目的片段最亮,故选择2×M5 PCR Mix作为本研究PCR反应的扩增酶,见图2。

3.3.2 不同PCR仪考察

因不同型号PCR仪的升控温速率有所不同,为测试不同型号的PCR仪对香加皮及其混淆品PCR扩增结果的影响,本研究使用TC-512型、PTC-100型和Applied Biosystem公司的VeritiPro™型和GeneAmp 9700型4种型号的PCR仪进行PCR扩增,结果显示,4种型号的PCR扩增仪均能扩增得到430 bp的目的片段,表明不同型号PCR扩增仪对PCR扩增结果无影响,本研究所用的PCR仪为VeritiPro™型PCR仪,见图2。

3.4 酶切条件的考察

PCR-RFLP反应会受PCR扩增条件的影响,在一定条件下,也会受到酶切条

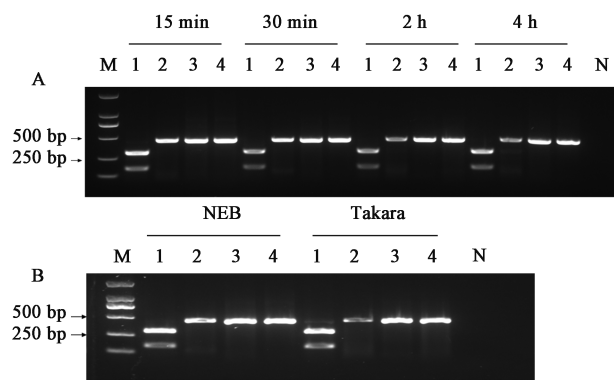


注: A. *Taq* 酶种类; B. PCR 仪型号; M. Trans 2K DNA Marker; 1. 杠柳; 2. 细柱五加; 3. 枸杞; 4. 宁夏枸杞; N. 空白对照(以 ddH₂O 为模板)

图2 香加皮、五加皮和地骨皮 PCR 鉴别结果的耐受性考察
Fig. 2 Identification results of tolerance about specific PCR for *Periplocae Cortex*, *Acanthopanax Cortex* and *Lycii Cortex*

件的影响,因此本研究对酶切反应时间、不同公司内切酶进行了考察。

3.4.1 酶切时间 本研究在确定了 PCR 鉴别条件后,取香加皮及其混淆品的扩增产物进行酶切反应,设置酶切反应分别为 15 min、30 min、2 h、4 h。结果显示,当酶切时间为 15~120 min 时,香加皮均能被限制性内切酶 *Cla* I 酶切,而混淆品五加皮和地骨皮均不能被酶切;当酶切时间为 4 h 时,五加皮样品出现了新活性,见图 3。为减少香加皮及其混淆品的鉴别时间,同时保证酶切反应的进行,本研究选择 30 min 作为香加皮 RFLP 反应的酶切时间。



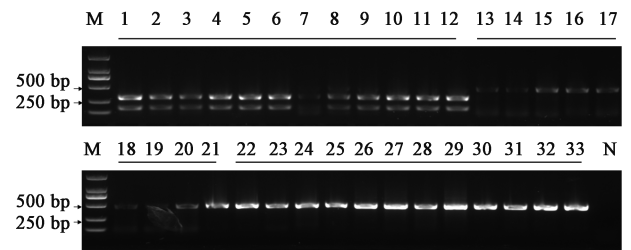
注: A. 酶切时间; B. 不同内切酶; M. Trans 2K DNA Marker; 1. 杠柳; 2. 细柱五加; 3. 枸杞; 4. 宁夏枸杞; N. 空白对照(以 ddH₂O 为模板)

图3 香加皮、五加皮和地骨皮的酶切条件考察
Fig. 3 Study on conditions of enzymatic digestion of *Periplocae Cortex*, *Acanthopanax Cortex* and *Lycii Cortex*

3.4.2 *Cla* I 酶种类 为测试不同公司内切酶对 RFLP 反应的影响,选择了 NEB 公司和 TaKaRa 公司

的限制性内切酶进行试验,结果显示两个公司的内切酶均可获得正确的酶切结果,表明不同公司的内切酶对香加皮 RFLP 反应无影响,见图 3。

3.5 适用性考察 为了考察该方法的有效性,根据确定的最优 PCR 鉴别条件和酶切条件,对香加皮及其混淆品五加皮、地骨皮的原植物、药材样品进行 PCR 扩增,所有样品均扩增得到约 430 bp 的目的片段,经 *Cla* I 酶切后,香加皮样本均产生约 140 bp 和 290 bp 的两条片段,而混淆品五加皮和地骨皮均不能被 *Cla* I 酶切,凝胶电泳图谱为约 430 bp 的单一片段,见图 4。以上结果表明该方法对香加皮具有特异性,可以准确、稳定地鉴别有毒药材香加皮。



注: M. Trans 2 000 DNA Marker; 1~6. 杠柳; 7~12. 香加皮; 13~17. 细柱五加; 18~21. 五加皮; 22~25. 枸杞; 26~29. 宁夏枸杞; 30~33. 地骨皮; N. 空白对照(以 ddH₂O 为模板)

图4 香加皮、五加皮和地骨皮 PCR-RFLP 鉴别
Fig. 4 PCR-RFLP identification of *Periplocae Cortex*, *Acanthopanax Cortex* and *Lycii Cortex*

4 小结

香加皮与五加皮均为祛风湿类药,功效相似,历史上长期混用,但二者各有侧重,且香加皮有毒,不能完全替代。DNA 分子鉴定是一类常见的中药鉴定方法,本课题组前期开发的 DSS 标记具有较高准确度,不需要比对序列,可以与 RFLP 等其他分子标记技术结合。本研究利用从 CGIR 数据库获取的香加皮 DSS 标记进行 RFLP 分析,获得了香加皮的特异性酶切位点,并对影响 PCR-RFLP 鉴别的 PCR 条件(如退火温度、循环次数、不同 *Taq* 酶、不同型号的 PCR 仪)和酶切条件(如酶切时间、不同公司的内切酶)进行考察后,确定了最佳反应参数。在此基础上,使用确定的最佳 PCR 鉴别条件和酶切条件对不同产地的香加皮及其混淆品五加皮、地骨皮进行了适用性考察,结果显示香加皮药材和基原物种均产生约 140 bp 和 290 bp 的目的片段,而两种混淆品五加皮和地骨皮药材和基原物种只在 250~500 bp 有一条约 430 bp 的目的片段,为香加皮与五加皮、地骨皮的鉴定提供参考。

[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.
- [2] 杨雪,李梦雨,颜昌钰,等. 香加皮的化学成分与药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中国中药杂志,2020,45(12):2772-2783.
- [3] 徐硕,金鹏飞,徐文峰,等. 中药香加皮的研究进展[J]. 西北药学杂志,2017,32(1):118-121.
- [4] 姚鹏,李洋,杜昆泽,等. UPLC同时测定香加皮中六种成分[J]. 中国现代中药,2019,21(10):1377-1381,1396.
- [5] 李万波,李强. 五加本草考证及其原产地的品种调查[J]. 陕西中医,1984(5):40-42.
- [6] 邓玉萍,崔亚君,杨敏. 香加皮的研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2012,26(3):111-115.
- [7] 王海涛,杨燕梅,郑学东,等. 五加皮与其混伪品的生药鉴别研究[J]. 中兽医医药杂志,2020,39(3):69-71.
- [8] 潘家峰. 五加皮、香加皮、地骨皮三种药材区别的研究[J]. 内蒙古中医药,2016,35(2):107.
- [9] 鞠康,刘耀武. 五加皮及混淆品的生药学研究[J]. 长江大学学报(自科版)医学下旬刊,2014(12):206-207,212.
- [10] 何爱玲. 五加皮与香五加的经验鉴别及功效[J]. 中国药物经济学,2013(5):294-295.
- [11] 代萍,傅光辉. 五加皮、香加皮和刺五加鉴别[J]. 实用中医药杂志,2009,25(1):43.
- [12] 赵静,马骥,庞其昌,等. 香加皮等5种皮类中药的光谱成像技术比较鉴别与分析[J]. 时珍国医国药,2012,23(1):188-190.
- [13] 王琳,马骥,庞其昌,等. 光谱成像技术快速鉴别五加皮及其混淆品香加皮[J]. 辽宁中医药大学学报,2011,13(7):49-52.
- [14] 刘浩,相秉仁,屈凌波,等. 香加皮和五加皮的二维相关近红外光谱快速无损鉴别[J]. 中国药科大学学报,2006,37(2):181-184.
- [15] 燕梦遥,宋平顺,赖晶,等. 基于 ITS 序列 PCR-RFLP 鉴别木香、川木香和藏木香[J]. 南京中医药大学学报,2022,38(4):339-346.
- [16] 王雪松,周雨晴,李丹,等. 基于 PCR-RFLP 的西洋参和人参指纹特征鉴定[J]. 北华大学学报:自然科学版,2018,19(1):49-52.
- [17] 周童,吴楠,孟媛,等. 梅花鹿鞭与马鹿鞭 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 吉林医药学院学报,2023,44(2):81-86.
- [18] 肖建才,闫滨滨,杨健,等. 天南星、半夏的 PCR-RFLP 鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(6):194-201.
- [19] 杜晓伟,宋平顺,倪琳. 石菖蒲药材及饮片掺混藏菖蒲 PCR-RFLP 鉴别方法研究[J]. 中国中医药信息杂志,2023,30(5):121-126.
- [20] 刘流,邵顺章,支荣荣. PCR-RFLP 法鉴别罗布麻与混淆品白麻及其 psbA-trnH 序列分析[J]. 药学与临床研究,2021,29(6):411-415.
- [21] 史中飞,滕宝霞,赖晶,等. PCR-RFLP 鉴别当归药材及饮片中掺混伪品——欧当归的方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(9):168-175.
- [22] 谢莹,华中一,赵玉洋,等. 快速筛选高纯度天麻 PCR-RFLP 鉴定方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2022,28(17):113-118.
- [23] 郑诚,留钰秀,袁莉霞,等. 覆盆子及其近缘混淆品的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 中国现代应用药学,2022,39(11):1458-1463.
- [24] 黄韵璇,朱晓燕,侯惠婵,等. 基于 ITS2 条形码鉴别南大青叶的 PCR-RFLP 研究[J]. 中草药,2021,52(20):6350-6356.
- [25] 胡冲,张亚中,袁媛,等. 霍山石斛的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 药物分析杂志,2020,40(12):2109-2115.
- [26] 蒋超,李军德,袁媛,等. 虻虫的 PCR-RFLP 鉴别研究[J]. 中国现代中药,2017,19(1):16-20.

[责任编辑 顾雪竹]