

· 资源与鉴定 ·

## 基于 HRM 的常见伞形科香辛料快速鉴定

张梦婷<sup>1,2</sup>, 孙伟<sup>2</sup>, 师玉华<sup>2</sup>, 邬兰<sup>2</sup>, 熊超<sup>2,3</sup>, 王彩霞<sup>2\*</sup>, 刘霞<sup>1\*</sup>

(1. 武汉理工大学 化学化工与生命科学学院, 武汉 430070;

2. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 3. 湖北中医药大学 药学院, 武汉 430065)

**[摘要]** **目的:** 4种香辛料小茴香、孜然、葛缕子、莳萝子与其混伪品蛇床子、防风子因外形特征相似,易混淆使用,带来安全隐患。针对鉴别困难的问题,建立高分辨率熔解曲线(HRM)分析法,以实现简便、快速鉴别的目的。**方法:**收集这4种香辛料及常见混伪品蛇床子、防风子共23份样本,作为参照样本,提取总DNA,基于内转录间隔区2(ITS2)序列通过聚合酶链式反应(PCR)进一步确定物种,并应用HRM技术建立检测方法和熔解曲线模型。香辛料市场收集这4种香辛料共17份样本,作为市场样本,通过HRM技术鉴定物种是否与标签相符。**结果:**小茴香、孜然、葛缕子、莳萝子、蛇床子、防风子的熔解曲线均表现出良好差异性,能明显区分开;17份市场样本中,编号N1和N3样品熔解曲线与标签显示的莳萝子熔解曲线具有明显差异,进一步测序结果显示二者均为毒芹子。**结论:**HRM技术能实现小茴香等伞形科香辛料及其混伪品间的可视化鉴别,可作为DNA条形码技术的有力补充,在中药资源鉴定中应用前景广阔。

**[关键词]** 伞形科; 香辛料; 高分辨率熔解曲线; 内转录间隔区2; DNA条形码; 可视化鉴别; 小茴香

**[中图分类号]** R22;R282;Q523;R93;TQ65;F323.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0026-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20180705

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180112.1450.004.html>

**[网络出版时间]** 2018-01-15 15:40

### Rapid Identification of Common Umbelliferae Spices Based on HRM

ZHANG Meng-ting<sup>1,2</sup>, SUN Wei<sup>2</sup>, SHI Yu-hua<sup>2</sup>, WU Lan<sup>2</sup>, XIONG Chao<sup>2,3</sup>, WANG Cai-xia<sup>2\*</sup>, LIU Xia<sup>1\*</sup>

(1. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Sciences,

Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China;

2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

3. Pharmacy Faculty, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

**[Abstract]** **Objective:** Desiccative ripe fruits of *Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum*, *Anethum graveolens*, *Carum carvi*, *Cnidium monnieri* and *Saposhnikovia divaricata* were used as the research objects, these fruits had similar appearance and they are easy to be confused, which will give rise to security risks. To develop a high resolution melting curve (HRM) analysis method in a fast and easy way targeted on the problem of identification of these medicinal materials. **Method:** Detection method and melting curve model was established for identification based on internal transcribed spacer 2 (ITS2) region of the four spices and their common adulterants of *C. monnieri* fruit and *S. divaricata* fruit, there were 23 reference samples. Then the four spices (including 17 market samples) were collected from spice market, and they were identified if the species was compatible with the label by HRM. **Result:** The melting curves of the four spices and their adulterants had clear diversity. The two of

**[收稿日期]** 20171024(025)

**[基金项目]** 国家“重大新药创制”科技重大专项(2014ZX09304-307-001-020);国家自然科学基金青年基金项目(81503196,81603248)

**[第一作者]** 张梦婷,硕士,从事中药资源与分子鉴定、中药质量标准研究,E-mail:zmt19930321@163.com

**[通信作者]** \*王彩霞,博士,助理研究员,从事中药功效成分合成生物学、中药鉴定研究,E-mail:cxwang@icmm.ac.cn;

\*刘霞,博士,副教授,硕士生导师,从事中药资源和中药分子鉴定、中药质量标准研究,E-mail:lr1125@126.com

the 17 market samples, N1 and N3, were potentially mislabeled, and their sequencing results showed that both were *Cicuta virosa*. **Conclusion:** HRM technology can realize the visual identification of common Umbelliferae spices and their adulterants, and it can be used as a powerful supplement of DNA barcoding technology.

[**Key words**] Umbelliferae; spices; high resolution melting curve; internal transcribed spacer 2; DNA barcoding; visual identification; *Foeniculi Fructus*

天然中药香辛料大多是药食同源品种,用于食品调味和药用,且具有不同的功效。小茴香始载于《新修本草》,既是中药又是常用香辛料,2015年版《中国药典》收载药材小茴香为伞形科植物茴香 *Foeniculum vulgare* 的干燥成熟果实,具有散寒止痛、理气和胃的作用<sup>[1]</sup>。葛缕子为伞形科植物葛缕子 *Carum carvi* 的干燥成熟果实,又称野茴香,除用作食品调味外,也是常用的藏族药之一,具有理气、止痛、解毒的作用<sup>[2]</sup>。莨菪子为伞形科植物莨菪 *Anethum graveolens* 的干燥成熟果实,具有温胃健脾、散寒止痛的功效。孜然为伞形科植物孜然芹 *Cuminum cyminum* 的干燥成熟果实。

这些药食两用的天然香辛料的外形特征相似,易引起混淆使用,如历代本草考证莨菪子长期混作小茴香使用<sup>[3]</sup>。另外这些香辛料也常被其他混伪品混用,如同科植物防风、蛇床、毒芹等的干燥成熟果实防风子、蛇床子、毒芹子<sup>[4]</sup>。其中毒芹含有毒成分毒芹素,而市场上多地习惯将毒芹子充当莨菪子贩售用于香料,也有将毒芹子作为小茴香或蛇床子入药的现象<sup>[5]</sup>。目前,小茴香等及其混伪品的性状特征和显微特征已有记载<sup>[4,6]</sup>,但这些传统鉴定方法存在主观性强、客观性差等问题。丁少纯等<sup>[7]</sup>从薄层色谱和紫外吸收光谱两方面对蛇床子、莨菪子及毒芹子进行了鉴别实验,王仁堂等<sup>[8]</sup>采用蛋白质电泳方法区分小茴香和莨菪子,这些理化检验操作耗时耗力且难以区分近缘物种。因此,寻求一种准确、快速的新方法来解决混伪品的问题,对这些香辛料的安全使用具有十分重要的意义。

高分辨率熔解曲线 (high-resolution melting, HRM) 是一种可应用于突变扫描、序列匹配和基因分型等的新型分子诊断技术。DNA 双链的热稳定性由其自身碱基组成和长度决定,随着加热升温,与双链 DNA 结合的荧光染料会从局部解链的 DNA 分子上释放,利用实时荧光定量聚合酶链式反应技术在线监测核苷酸双链熔解过程中荧光信号的积累,从而可直观看到不同核苷酸熔解曲线变化的差异,使用高精密度仪器的基础上,配合饱和染料,于是产生了 HRM 分析技术<sup>[9-10]</sup>。近年来该技术已在药用

植物鉴定中逐渐兴起<sup>[11-12]</sup>,是对 DNA 条形码技术在物种鉴定方面的补充。我国研究者通过对大量样本的系统研究,提出内转录间隔区 2 (ITS2) 序列可作为植物鉴别的通用条形码用于鉴定药用植物<sup>[13]</sup>。本实验基于植物 DNA 条形码的 ITS2 序列,采用 HRM 技术分析,建立小茴香等香辛料的熔解曲线模型,并通过比较熔解曲线的差异来实现其真伪品的可视化鉴别,将 HRM 技术作为 DNA 条形码技术的有效补充,能够更快速、准确地对小茴香等香辛料进行检测。

## 1 材料

Research Plus 型移液枪 (德国 Eppendorf 公司), Scientz-48 型高通量组织研磨仪和 DH-II 型旋转混合仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司), DK-8D 型电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司), DYY-8C 型电泳仪 (北京六一仪器厂), NanoDrop 2000 型微量分光光度计和 2720 型热循环聚合酶链式反应 (PCR) 扩增仪 (美国 Thermo Scientific 公司), GelDoc™ EZ 型全自动凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司), Rotor-Gene Q 型实时荧光定量 PCR 仪 (德国 QIAGEN GmbH-Hilden 公司)。

植物基因组 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司], 2 × Taq plus PCR MasterMix 酶 (北京艾德莱生物科技有限公司), 2 × HRM PCR MasterMix 试剂盒 (德国 QIAGEN 公司), 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], SYBR Green I 电泳染料和琼脂糖 (北京索莱宝科技有限公司)。本研究通过购买等方式收集小茴香等香辛料及其混伪品样本 23 份, 作为参照样本。其中小茴香 5 份, 孜然 7 份, 莨菪子 3 份, 葛缕子 2 份; 混伪品样品有蛇床子 3 份, 防风子 3 份 (毒芹子难以获得样本)。实验材料均经中国中医科学院中药研究所孙伟副研究员鉴定, 凭证标本保存于中国中医科学院中药研究所。另从 GenBank 数据库下载小茴香、孜然芹、莨菪、葛缕子、蛇床和防风的内转录间隔区 2 (ITS2) 序列各 2 条, 详细信息见表 1, 2。另外从香辛料市场收集到小茴香 4 份、孜然 6 份、莨菪子 5 份、葛缕子 2 份, 共 17 份, 作为市场样本, 并分别对其编号, 见表 3。

表 1 4 种香辛料及 2 种混伪品的样本信息

Table 1 Sample information of 4 kinds of spices and 2 kinds of their adulterants

物种	基原植物拉丁名	数量/份	编号	来源
小茴香	<i>Foeniculum vulgare</i>	5	XHX01 ~ XHX05	北京
		2	HQ377215, KX674861	GenBank
孜然	<i>Cuminum cyminum</i>	7	ZR01 ~ ZR07	北京, 新疆吐鲁番
		2	KT347713, HM176655	GenBank
茴萝卜子	<i>Anethum graveolens</i>	3	SLZ01 ~ SLZ03	四川, 广西贵港
		2	GQ148794, KM210328	GenBank
葛缕子	<i>Carum carvi</i>	2	GLZ01, GLZ02	北京
		2	AF077878, KF454471	GenBank
蛇床子	<i>Cnidium monnieri</i>	3	SCZ01 ~ SCZ03	北京, 安徽亳州
		2	KX675029, JF421487	GenBank
防风子	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	3	FFZ01 ~ FFZ03	安徽亳州
		2	KX675121, AB570260	GenBank

表 2 23 份参照样本的基原鉴定

Table 2 Original identification of 23 reference samples

样本编号	专家鉴定结果	ITS2 序列 比对结果	最高相似度 /%
XHX01	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	97
XHX02	<i>F. vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	92
XHX03	<i>F. vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	100
XHX04	<i>F. vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	100
XHX05	<i>F. vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	94
ZR01	<i>Cuminum cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
ZR02	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
ZR03	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
ZR04	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
ZR05	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
ZR06	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
ZR07	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
SLZ01	<i>Anethum graveolens</i>	<i>A. graveolens</i>	100
SLZ02	<i>A. graveolens</i>	<i>A. graveolens</i>	100
SLZ03	<i>A. graveolens</i>	<i>A. graveolens</i>	100
GLZ01	<i>Carum carvi</i>	<i>C. carvi</i>	100
GLZ02	<i>C. carvi</i>	<i>C. carvi</i>	100
SCZ01	<i>Cnidium monnieri</i>	<i>C. monnieri</i>	100
SCZ02	<i>C. monnieri</i>	<i>C. monnieri</i>	100
SCZ03	<i>C. monnieri</i>	<i>C. monnieri</i>	100
FFZ01	<i>Saposhnikovia divaricata</i>	<i>S. divaricata</i>	100
FFZ02	<i>S. divaricata</i>	<i>S. divaricata</i>	100
FFZ03	<i>S. divaricata</i>	<i>S. divaricata</i>	100

表 3 17 份市场样本的信息及 ITS2 序列比对情况

Table 3 Information and ITS2 sequence alignment of 17 market samples

样本编号	标签	ITS2 序列 比对结果	最高相似度 /%
N1	<i>Anethum graveolens</i>	<i>Cicuta virosa</i>	99
N2	<i>A. graveolens</i>	<i>A. graveolens</i>	100
N3	<i>A. graveolens</i>	<i>C. virosa</i>	99
N4	<i>A. graveolens</i>	<i>A. graveolens</i>	100
N5	<i>A. graveolens</i>	<i>A. graveolens</i>	100
N6	<i>Carum carvi</i>	<i>C. carvi</i>	100
N7	<i>C. carvi</i>	<i>C. carvi</i>	100
N8	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	98
N9	<i>F. vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	98
N10	<i>F. vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	100
N11	<i>F. vulgare</i>	<i>F. vulgare</i>	94
N12	<i>Cuminum cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
N13	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
N14	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
N15	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
N16	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100
N17	<i>C. cyminum</i>	<i>C. cyminum</i>	100

## 2 方法与结果

**2.1 DNA 提取** 取样品 30 ~ 50 mg, 加入到灭菌后 2 mL 离心管中, 采用高通量组织研磨仪在 50 Hz 的频率下研磨 2 min, 利用植物基因组 DNA 提取试剂

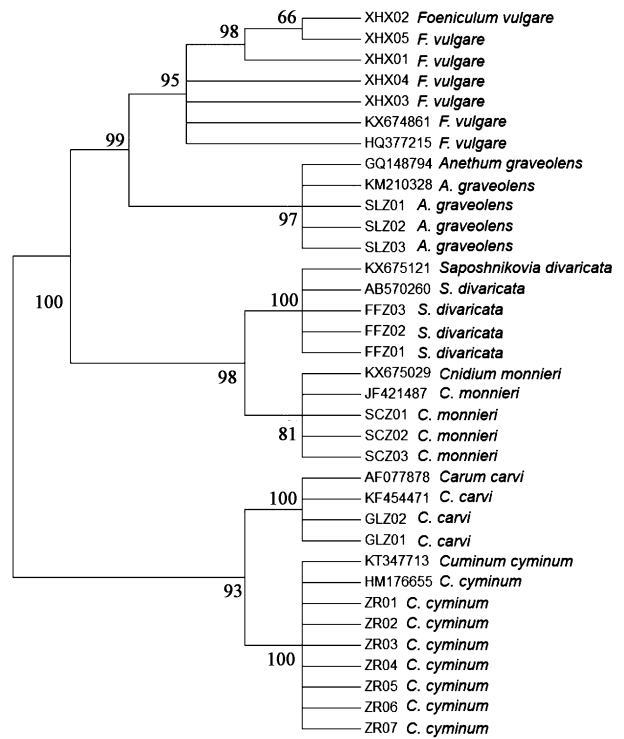
盒结合改良十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取总 DNA。采用 NanoDrop 2000 型微量分光光度计测定吸光度比值 ( $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$ ) 及 DNA 浓度, 并将 DNA 浓度调整到  $50 \sim 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 作为模板用于 PCR 扩增和熔解曲线分析。

**2.2 PCR 扩增** ITS2 的最佳 PCR 扩增体系为  $25 \mu\text{L}$ 。  $2 \times \text{Taq plus PCR MasterMix}$  酶  $13 \mu\text{L}$ , 正反向引物 (P3:  $5' \text{-YGACTCTCGGCAACGGATA-3'}$ , E4:  $5' \text{-RGTTTCTTTTCCTCCGCTTA-3'}$ ) ( $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $1 \mu\text{L}$ , 模板 DNA  $1 \mu\text{L}$ , 余下  $9 \mu\text{L}$  用灭菌后双蒸水补足。扩增程序为  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $5 \text{ min}$ ;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  退火  $30 \text{ s}$ , 于温度  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $45 \text{ s}$ , 循环  $35$  次;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $10 \text{ min}$ 。扩增产物委托上海美吉生物医药科技有限公司进行测序。

**2.3 HRM-PCR** 反应试剂来自 HRM PCR MasterMix 试剂盒, 序列扩增引物采用 ITS2 通用引物 P3/E4。反应体系为  $2 \times \text{HRM PCR MasterMix}$   $5 \mu\text{L}$ , 正反向引物 ( $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 各  $0.5 \mu\text{L}$ , 模板 DNA  $0.8 \mu\text{L}$ , 补足灭菌后双蒸水至  $10 \mu\text{L}$ 。最佳反应条件是采用  $72$  孔反应模块, 扩增程序为  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  预变性  $4 \text{ min}$ ;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$  变性  $30 \text{ s}$ ,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$  退火  $1 \text{ min}$ ,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$  延伸  $1 \text{ min}$ , 循环  $35$  次。每个循环结束时收集荧光信号数据, 扩增产物的熔解步骤在 PCR 循环结束后立即进行, 程序为熔解温度从  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  逐渐升温至  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ , 每  $0.1 \text{ }^\circ\text{C}$  收集  $1$  次荧光信号。

**2.4 参照样本的序列分析及聚类分析** 利用 DNA 条形码技术进一步确定参照样本的基原, 对收集的  $23$  个参照样本进行 PCR 扩增, 返回的序列经过 CondonCode Aligner V3.7.1 软件处理, 获得  $23$  条 ITS2 序列, 在 GenBank 数据库中应用 BLAST (basic local alignment search tool) 方法进行结果判定, 见表 2。结果显示样本 XHX02, XHX05 与 *F. vulgare* 的最高相似度相对较低, 但专家鉴定 XHX01 ~ XHX05 均为小茴香, 推测出现这种情况的原因是 GenBank 数据库中小茴香这个物种的 ITS2 序列未涵盖全部。

将在 GenBank 数据库下载的  $12$  条 ITS2 序列与实验所得  $23$  条 ITS2 序列用邻接 (neighbor joining, NJ) 法构建系统聚类树, 见图 1。结果发现小茴香、莳萝子、防风子、蛇床子、葛缕子、孜然序列各自聚为一支, 表现出良好的单系性, 更直观地表明这  $6$  个物种在一定程度上可以通过 ITS2 序列得到很好的区分, 为进一步利用 HRM 技术鉴定常见伞形科香辛料提供了依据。



Bootstrap 1 000 次重复, 仅显示支持率  $\geq 50\%$  的分支

图 1 基于 ITS2 序列构建 6 个物种的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of 6 species based on ITS2 sequences

**2.5 熔解曲线模型的建立** 对  $23$  个参照样本进行熔解曲线分析, 设定基因型置信值 (GCPs)  $\geq 90\%$ 。差异视图除了用标准化的双链熔解随温度变化的形式来表示外, 也可通过其派生的其他曲线形式来展示, 见图 2。归一化分析可以使随温度变化的曲线差异更加显著, 结果显示小茴香、莳萝子、防风子、蛇床子、葛缕子、孜然这  $6$  个物种的高分辨率熔解曲线都表现出不同的形状特点, 且能够明显地区分开。另外, XHX02, XHX05 和小茴香其他样本的高分辨率熔解曲线虽有差异但非常接近, 这一结果与图 1 系统发育树呈现的结果比较吻合。

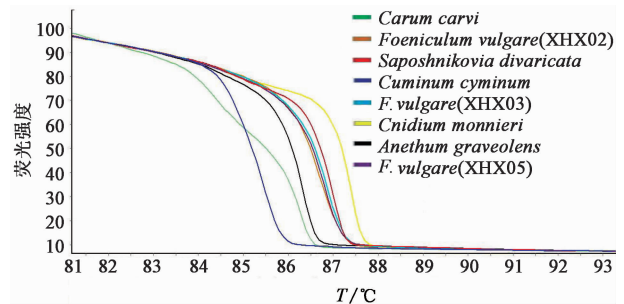
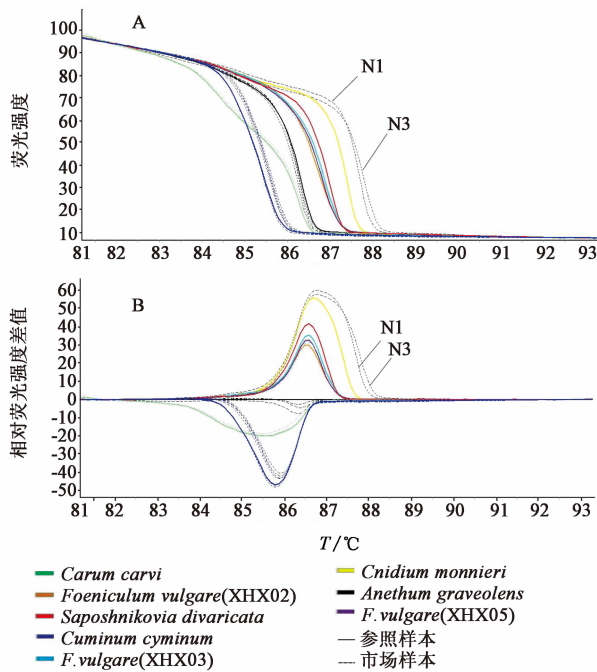


图 2 基于 ITS2 的 6 个物种 HRM 归一化曲线模型

Fig. 2 HRM normalized curve model of 6 species based on ITS2 sequences

## 2.6 HRM 技术在常见伞形科香辛料中的鉴定应用

以上述熔解曲线模型为参考,同样设置 GCPs  $\geq 90\%$ ,在相同条件下对 17 个市场样本进行熔解曲线分析,见图 3。图 3A 是 HRM 归一化曲线。图 3B 是以蒔萝子样品 SLZ02 为基线,与其他样本相对荧光强度的差值为纵坐标而生成的差异化曲线,这种曲线使基因型差异更加得以放大,从而更方便观察基因型间的差别。结果表明 N1 和 N3 样本的熔解曲线与这 6 个物种的熔解曲线模型均存在很大差异,与标签显示的蒔萝子不符,可能是其他未知物种,有待进一步确定;其余 15 个样本的熔解曲线分别与小茴香、孜然、蒔萝子、葛缕子熔解曲线模型接近,结果显示均与标签一致。



A. HRM 归一化曲线; B. HRM 差异化曲线

图 3 17 个市场样本的熔解曲线分析

Fig. 3 Analysis of melting curves about 17 market samples

## 2.7 市场样本的序列分析

为了验证 HRM 的实验结果,将产物直接进行双向测序,拼接处理后获得 17 条 ITS2 序列,用 BLAST 方法进行比对,结果中相似性最高的序列对应物种为查询序列最接近的物种,见表 3。结果显示 N1 和 N3 样本的 ITS2 序列与毒芹子 *Cicuta virosa* 的序列相似度最高,确实与标签不符;而其他 15 个样本序列相似性最高的物种均与标签相符。其中样本 N1 和 N3 的序列比对后长度为 231 bp,存在 2 个变异位点,在 6 位点腺嘌呤(A)-胞嘧啶(C)变异,在 219 位点胸腺嘧啶(T)-A 变异,因此样本 N1 和 N3 的序列存在变异位点,导

致 HRM 归一化曲线存在差异,但都是毒芹子。样本 N11 与 *F. vulgare* 的最高相似度虽然相对较低,但其高分辨率熔解曲线与参照样本 XHX05 的曲线几乎重合,说明其确实是小茴香。比对鉴定结果与 HRM 结果相吻合,由此可见,HRM 技术能准确鉴别小茴香、孜然、蒔萝子、葛缕子香辛料及其混伪品,是 DNA 条形码技术在物种鉴别中的有效补充。

## 3 讨论

目前 HRM 分析技术仅在木通、鹿茸、三七、升麻、桃仁等少数药材真伪鉴定中得到应用<sup>[14-18]</sup>。本研究以药食两用的常见伞形科香辛料及其混伪品为对象,其外形特征相似,但功效不同,混乱使用会对食品和药物安全造成威胁。结果显示小茴香、蒔萝子、防风子、蛇床子、葛缕子、孜然这 6 个物种的高分辨率熔解曲线都表现出不同的形状特点,且存在明显差异,说明小茴香、孜然、蒔萝子、葛缕子与其混伪品防风子、蛇床子能通过 HRM 技术很好地区分开来。并且结合 HRM 技术与 DNA 条形码技术随机对市场中的 17 份样本进行检测,发现存在将毒芹子当作蒔萝子出售的情况,而毒芹子有毒可能会导致严重的健康问题,应当引起监管部门的重视。

近年来,中药材安全问题备受关注,市场流通的药材经常无标记或加工后难以辨认,DNA 条形码技术的兴起为鉴定中药材提供了新方法<sup>[19]</sup>。刘义梅等<sup>[20]</sup>采用 DNA 条形码技术鉴定了小茴香及其常见混伪品,本研究在前人的研究基础上,利用 HRM 分析技术鉴定小茴香等物种及其混伪品。HRM 技术依据熔解曲线的峰形区分不同样品的 DNA,其简便、快速、可视化的特点在药材伪品检测方面具有独特的优势。本研究证明 HRM 技术操作简便、灵敏度高,对小茴香等及其混伪品的鉴定能力强,对快速识别市场常见伞形科香辛料真伪具有一定优势,为后续实际应用提供理论与技术基础,并且有很大的潜力应用于其他药材及其混伪品的检测,是传统中药鉴定及 DNA 条形码技术的有效补充。

## [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,2015:47-48.
- [2] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国卫生部药品标准:藏药. 第一册[M]. 北京:中华人民共和国卫生部,1995:131.
- [3] 何金鹭,陈家骅. 小茴香、蒔萝与马芹的本草考证[J]. 中药材,1992,15(11):40-42.
- [4] 孙迎东,汪凤芹,张静,等. 小茴香与伪品的鉴别研究

- [J]. 时珍国医国药, 2005, 16(4): 338.
- [5] 沙启营, 孙景卫. 毒芹子质量控制研究[J]. 山东中医杂志, 2013, 32(3): 194-196.
- [6] 郑末晶. 蒺藜子与伪品毒芹子的鉴别[J]. 中国药理学杂志, 1989, 24(5): 281-282.
- [7] 丁少纯, 姜慧祯. 蛇床子、蒺藜子及其伪品毒芹子的薄层与紫外光谱鉴别[J]. 中药材, 1995, 18(12): 615-616.
- [8] 王仁堂, 董素琴. 小茴香与蒺藜子的蛋白电泳鉴别[J]. 中国中药杂志, 1990, 15(1): 13-14.
- [9] 陈康, 蒋超, 袁媛, 等. 高分辨率熔解曲线技术及其在中药DNA分子鉴定中的应用[J]. 药学报, 2015, 50(12): 1581-1588.
- [10] Druml B, Cichna-Markl M. High resolution melting (HRM) analysis of DNA-its role and potential in food analysis[J]. Food Chem, 2014, 158(9): 245-254.
- [11] Osathanunkul M, Madesis P, de-Boer H. Bar-HRM for authentication of plant-based medicines: evaluation of three medicinal products derived from Acanthaceae species[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128476.
- [12] Osathanunkul M, Suwannapoom C, Ounjai S, et al. Refining DNA barcoding coupled high resolution melting for discrimination of 12 closely related Croton species [J]. PLoS One, 2015, 10(9): e0138888.
- [13] CHEN S, YAO H, HAN J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species[J]. PLoS One, 2010, 5(1): e8613.
- [14] 童宇茹, 蒋超, 黄璐琦, 等. 基于DNA熔解曲线分析技术的三七粉分子鉴定[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(8): 1384-1390.
- [15] 胡峻, 詹志来, 袁媛, 等. 基于熔解曲线分析技术的木通类药材的分子鉴别[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(12): 2304-2308.
- [16] 陈康, 蒋超, 袁媛, 等. 基于熔解曲线分析技术的鹿茸药材分子鉴别[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 619-623.
- [17] 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, 40(4): 647-652.
- [18] 孙伟, 熊超, 李景剑, 等. 高分辨率熔解曲线技术在多基原药材升麻鉴定中的应用[J]. 药学报, 2016, 51(10): 1638-1642.
- [19] 陈美君, 李峰庆, 吕蒙, 等. 白及与其混伪品ITS2序列二级结构比较与鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 46-52.
- [20] 刘义梅, 罗焜, 陈科力, 等. ITS2序列鉴定小茴香及其常见混伪品[J]. 环球中医药, 2011, 4(4): 260-263.

[责任编辑 刘德文]