

基于聚类分析与多元统计分析的东北林蛙油及其类似品、 伪品的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱鉴别

李晶峰¹, 兰梦², 边学峰¹, 吕经纬¹, 张辉^{1*}, 姚辉^{3*}

(1. 长春中医药大学 吉林省人参科学研究院, 长春 130117;

2. 吉林鑫水科技开发有限公司, 长春 130117;

3. 中国医学科学院 北京协和医学院 药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] **目的:** 建立一种基于聚类分析与多元统计分析对东北林蛙油及其类似品黑龙江林蛙油、伪品中华蟾蜍油、牛蛙油的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱有效分类与鉴别的方法。**方法:** 利用 SDS-PAGE 法, 得到 18 批药材的电泳图谱, 将 SDS-PAGE 电泳图谱转化为数据矩阵, 利用 NTSYSpc 2.10e 统计分析软件进行聚类分析, 结合 SMICA-P 14.1 分析软件进行多元统计分析中的无监督的主成分分析(PCA), 有监督的偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA)方法进行多元分析评价。**结果:** SDS-PAGE 电泳图谱技术结合聚类分析与多元统计分析方法能够对东北林蛙油及其类似品、伪品进行准确分类、鉴别。除 1 号药材外, 聚类分析可将四类药材聚为 4 支。PCA 分析结果优于聚类分析, 多元统计分析中有监督的 PLS-DA 和 OPLS-DA 的分析结果优于无监督的 PCA 分析, OPLS-DA 的分类与鉴别效果最优, OPLS-DA 将东北林蛙油、黑龙江林蛙油、牛蛙油、中华蟾蜍聚成 4 类, 并通过 VIP(variable importance in projection) 值与 OPLS-DA 载荷图综合分析得到 6 个差异性蛋白质成分, 相对分子质量分别为 51.363, 35.838, 14.565, 17.563, 15.358 及 21.696 kDa。**结论:** SDS-PAGE 电泳图谱技术结合聚类分析及多元统计分析方法可以作为一种有效分类、鉴别东北林蛙油及其类似品、伪品的方法。该研究为东北林蛙油的品质评价及筛选提供了一定的参考依据。

[关键词] 东北林蛙; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 聚类分析; 多元统计分析; 差异性成分

[中图分类号] R284.1; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)24-0111-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191614

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190505.0907.004.html>

[网络出版时间] 2019-05-08 9:30

Discrimination of *Rana dybowskii*, Its Analogues and Counterfeits Based on Polyacrylamide Gel Electrophoretograms Combined with Cluster Analysis and Multivariate Statistical Analysis

LI Jing-feng¹, LAN Meng², BIAN Xue-feng¹, LYU Jing-wei¹, ZHANG Hui^{1*}, YAO Hui^{3*}

(1. Jilin Ginseng Academy in Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China;

2. Jilin Xinshui Science and Technology Development Co. Ltd., Changchun 130117, China;

3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences,
Peking Union Medical College, Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an effective classification and identification method for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) maps of *Rana dybowskii*, its analogues and counterfeits

[收稿日期] 20181207(006)

[基金项目] 国家公益性行业科研专项(201507002)

[第一作者] 李晶峰, 博士, 从事中药化学研究, E-mail: 972057198@qq.com

[通信作者] * 张辉, 教授, 从事中药化学研究, Tel: 0431-80812267, E-mail: zhanghui_8080@163.com;

* 姚辉, 博士, 研究员, 从事中药资源研究, Tel: 010-57833194, E-mail: scauyaoh@sina.com

based on cluster analysis and multivariate statistical analysis. **Method:** SDS-PAGE maps of 18 batches of *R. dybowskii*, its analogues and 2 counterfeits were obtained by SDS-PAGE method. SDS-PAGE maps were transformed into data matrix. NTSYSpc 2.10e statistical analysis software was used for cluster analysis, and SMICA-P 14.1 software was used for multivariate statistical analysis. Unsupervised Principal Component Analysis (PCA), Supervised Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) and Orthogonal Partial Least Squares Discriminant Analysis (OPLS-DA) were performed for multivariate analysis and evaluation. **Result:** SDS-PAGE maps technology combined with cluster analysis and multivariate statistical analysis could accurately classify and identify *R. dybowskii*, its analogues and counterfeits. Cluster analysis could cluster four kinds of medicinal materials into four branches except No. 1 medicinal materials. PCA results were superior to cluster analysis. Supervised PLS-DA and OPLS-DA results in multivariate statistical analysis were superior to unsupervised PCA. The classification and identification efficiencies of OPLS-DA were better than those of unsupervised PCA. OPLS-DA aggregated *R. dybowskii*, its analogues and 2 counterfeits into four groups. Six different protein components were obtained by comprehensive analysis of variable importance in projection (VIP) value, and OPLS-DA Bi load diagram, with relative molecular weights were 51.363, 35.838, 14.565, 17.563, 15.358 and 21.696 kDa, respectively. **Conclusion:** SDS-PAGE maps combined with cluster analysis and multivariate statistical analysis can be used as an effective method to classify and identify *R. dybowskii*, its analogues and counterfeits. This study provides a reference for the quality evaluation and screening of *R. dybowskii*.

[**Key words**] *Rana chensinensis*; polyacrylamide gel electrophoresis; cluster analysis; multivariate statistical analysis; differential components

东北林蛙(*Rana dybowskii*)属于蛙科林蛙属,其主要分布在我国东北地区^[1],是我国的传统中药材,同时具有较高的营养食用价值^[2]。哈蟆油的原动物基原问题存在着重大分歧,现今学术界主要有 3 种观点:其一是《中国药典》所记载的中国林蛙 *Rana temporaria chensinensis*,为亚种级;其二是中国林蛙长白山亚种 *R. chensinensis changbaishanensis*,也为亚种级;其三是东北林蛙,为种级。上述 3 种观点均表明哈蟆油原动物是分布于我国东北长白山区域的中国林蛙居群,而不是至今一直沿用的中国林蛙^[3-4]。王孟虎课题组对哈蟆油的基原动物进行考证,认为哈蟆油的基原动物为东北林蛙^[5]。

黑龙江林蛙油为东北林蛙油的类似品,2 种林蛙均具有较高的经济价值和药用价值^[6],蟾蜍油与牛蛙油为林蛙油伪品,与林蛙油易混淆。蛋白质凝胶电泳方法已广泛应用于对动物类药材蛋白质的鉴别,该方法在物种、品种鉴别中较为成熟^[7]。石俊英等^[8]研究了哈蟆油及其混伪品的凝胶电泳指纹图谱,但其图谱为手绘,张嵩等^[9]采用测定膨胀度,1-甲基海因,总蛋白等含量比较哈蟆油与其相似品及伪品的质量,未提及凝胶电泳图谱,黄瑶等^[10]对哈蟆油与其类似品及伪品的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE)和十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱进行比较分析,林燕等^[11]

利用凝胶电泳分离-液相色谱-质谱法对比蛤蟆油及其伪品的特异性蛋白。为了寻找快速、简便的鉴别东北林蛙油及其类似品、伪品的方法,本文共收集东北林蛙油、黑龙江林蛙油、中华蟾蜍油与牛蛙油 4 个种类 18 个批次的药材,结合聚类分析与多元统计分析,针对其蛋白质成分建立了 SDS-PAGE 图谱。

1 材料

DYY-10C 型电泳仪电源, DYCZ-24DN 型电泳槽(北京六一仪器厂); DSHZ-300A 旋转式恒温振荡器(太仓市实验设备厂), KQ3200B 型超声波清洗器(150 W, 40 kHz, 昆山市超声仪器有限公司), TGL-16B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂), 超纯水器(Water Purifier), SARTORIUS AG 型 1/1 万电子天平(Mettler Toledo), UV I 型凝胶成像系统(英国 Uvitec 公司)。

蛋白质分子标记物(电泳级, Thermo Scientific, 批号 26617), 蛋白质凝胶试剂盒(电泳级, 上海碧云天生物技术有限公司, 批号 P0012A); 三羟甲基氨基甲烷(Tris), 甘氨酸, 十二烷基硫酸钠(SDS), 考马斯亮蓝 R-250, 冰乙酸, 三氯乙酸, 甲醇, 丙酮, 石油醚, 所有试剂均为分析纯。实验药材收集于我国东北三省, 东北林蛙油 11 批、黑龙江林蛙油 3 批、牛蛙油 3 批、中华蟾蜍油 1 批, 经长春中医药大学姜大成教授鉴定为东北林蛙油、黑龙江林蛙油、牛蛙油和中

华蟾蜍油,品种及来源见表 1。

表 1 药材的种类及来源

Table 1 Type and source of medicinal materials

No.	种类	简称	收集地点	拉丁名称
1	东北林蛙	DBLW1	吉林省吉林市	<i>Rana dybowskii</i>
2	东北林蛙	DBLW2	吉林省吉林市	<i>R. dybowskii</i>
3	东北林蛙	DBLW3	吉林省吉林市	<i>R. dybowskii</i>
4	黑龙江林蛙	HLJLW1	黑龙江哈尔滨市	<i>R. amurensis</i>
5	东北林蛙	DBLW4	黑龙江哈尔滨市	<i>R. dybowskii</i>
6	东北林蛙	DBLW5	黑龙江哈尔滨市	<i>R. dybowskii</i>
7	中华蟾蜍	HLJLW2	辽宁省沈阳市	<i>Bufo gargarizans</i>
8	东北林蛙	DBLW6	辽宁省沈阳市	<i>Rana dybowskii</i>
9	东北林蛙	DBLW7	辽宁省沈阳市	<i>R. dybowskii</i>
10	东北林蛙	DBLW8	吉林省延吉市	<i>R. dybowskii</i>
11	黑龙江林蛙	HLJLW2	吉林省延吉市	<i>R. amurensis</i>
12	东北林蛙	DBLW9	吉林省长春市	<i>R. dybowskii</i>
13	东北林蛙	DBLW10	黑龙江哈尔滨市	<i>R. dybowskii</i>
14	东北林蛙	DBLW11	黑龙江哈尔滨市	<i>R. dybowskii</i>
15	牛蛙	NW1	黑龙江哈尔滨市	<i>R. catesbeiana</i>
16	黑龙江林蛙	HLJLW3	黑龙江哈尔滨市	<i>R. amurensis</i>
17	牛蛙	NW2	辽宁省沈阳市	<i>R. catesbeiana</i>
18	牛蛙	NW3	辽宁省沈阳市	<i>R. catesbeiana</i>

2 方法

2.1 供试品溶液的制备 取干燥哈蟆油粉碎,过 100 目筛,精密称定 0.2 g,加石油醚 5 mL,室温振摇 10 min,静置 1 h,3 500 r·min⁻¹离心 5 min,弃去上清液,沉淀物室温下干燥后加 0.5 mol·L⁻¹ Tris 盐酸 (pH 6.8) 5 mL,冰水浴超声 30 min,3 500 r·min⁻¹离心 10 min,收集上清液。残渣同法提 1 次,合并上清液,合并液与 10% 三氯乙酸等体积混合,冰水浴静置处理 5 min,1 万 r·min⁻¹离心 10 min,弃去上清液,同法处理 2 次,残渣加丙酮 1 mL,冰水浴中静置 5 min,1 万 r·min⁻¹,离心 10 min,除去上清液,沉淀于 4 ℃ 放置 30 min,挥尽丙酮后取出,加入上样缓冲液 0.2 mL,100 ℃ 加热 5 min,1 万 r·min⁻¹离心 5 min,收集上清液^[10]。

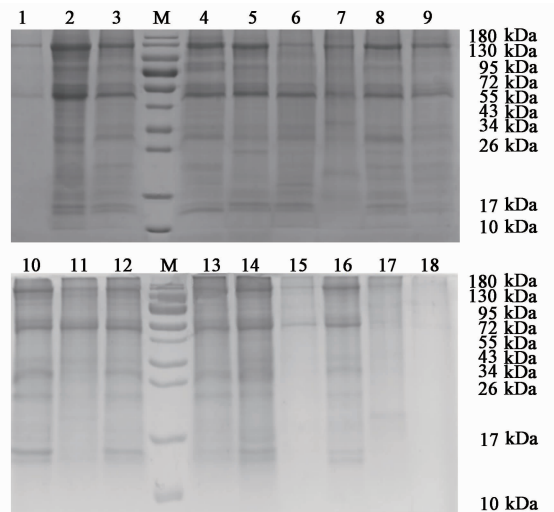
2.2 电泳步骤 采用不连续体系垂直板电泳进行分析,配制 12% 分离胶,待分离胶聚合后,在其上方灌注 5% 浓缩胶溶液,凝胶厚度为 1 mm。按预定顺序加样,在泳道中分别加入供试品溶液 10 μL,蛋白质分子标记物 (Marker) 5 μL,开始电泳。电泳时浓缩胶电压为 80 V,分离胶电压为 120 V。电泳结束

后取出胶片,考马斯亮蓝染液浸泡凝胶,于 37 ℃,40 r·min⁻¹染色约 4 h。将胶片取出置于脱色液中,37 ℃,40 r·min⁻¹,脱色至条带清晰。

2.3 数据分析 将电泳图导入 UVI 凝胶成像系统自带软件,经过扣除背景、手动校正、基线校准等处理后,得到凝胶电泳图谱。根据电泳结果计算 Rf 值,在相同值位置上有蛋白质谱带的记为 1,无带记为 0,得到原始数据矩阵,采用 NTSYSpc 2.10e 统计分析软件对进行凝胶电泳图谱聚类分析^[12]。凝胶电泳图谱数据转化为 Excel 数据后导入 SMICA-P 14.1 (瑞典 Umetrics, Umea,) 软件进行分析,根据分析结果,筛选出组间存在的显著性差异成分。

3 结果

3.1 哈蟆油及其类似品、伪品的电泳图谱 凝胶电泳图谱及指纹图谱叠加见图 1,2。



1~3,5,6,8~10,12~14. 东北林蛙;4,11,16. 黑龙江林蛙;7. 中华蟾蜍;15,17,18. 牛蛙;M. Marker (图 2,3,表 2 同)

图 1 东北林蛙油及其类似品、伪品的蛋白质凝胶电泳

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoretograms of *Rana dybowskii*, its analogues and counterfeits

3.2 标准曲线绘制及样品相对分子质量测定 以 Marker 的比移值为横坐标,相对分子质量的对数 (lg M) 为纵坐标建立标准曲线,得标准曲线方程 $Y = -1.5495X + 2.3021$ ($R^2 = 0.9993$)。将不同蛋白条带的比移值代入标准曲线方程,可得到各蛋白条带的相对分子质量,记录数据。

3.3 东北林蛙油及其类似品、伪品蛋白质电泳图谱的聚类分析 聚类分析数据矩阵结果见表 2,经 NTSYSpc 2.10e 统计分析软件处理,得到聚类分析图,见图 3。由聚类分析图可见,除了 1 号药材所有东北林蛙油聚为一支 (2,3,5,6,9,8,10,12,14,

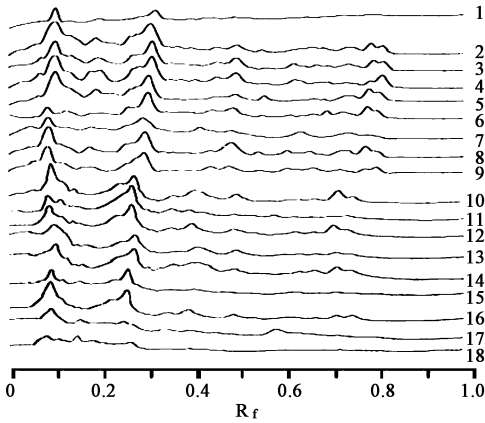


图 2 东北林蛙油及其类似品、伪品的蛋白质凝胶电泳指纹谱叠加
Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoresis fingerprint of *Rana dybowskii*, its analogues and counterfeits

表 2 东北林蛙油及其类似品、伪品蛋白质凝胶电泳图谱聚类分析数据矩阵

Table 2 Cluster analysis data matrix of polyacrylamide gel electrophoretograms of *Rana dybowskii* oil, its analogues and counterfeits

相对分子质量	序号																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
173.830	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
128.914	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
105.879	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
81.341	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
60.572	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0
51.363	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
35.838	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
30.884	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
25.724	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0
21.696	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19.697	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
19.170	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
17.563	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
15.358	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
14.565	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0

累计贡献率达到了 88.4%，说明这 4 个主成分可以解释原始样本信息的 88.4%。图中每个点代表 1 个样本，牛蛙油与中华蟾蜍油分离明显，东北林蛙油与黑龙江林蛙油之间差异不明显，黑龙江林蛙油聚集程度差，组内差异大于组间差异。

3.4.2 偏最小二乘法判别分析(PLS-DA)和正交偏最小二乘法判别分析(OPLS-DA) PCA 不能忽略组内误差，不能消除与研究目的无关的随机误差，有监督的 PLS-DA 及 OPLS-DA 可将各组数据组内差

异降低，突出组间变异规律^[14-16]。但在扩大组间差异的同时容易发生过度拟合的现象，需要用外部模型验证方法排列实验来证明模型的有效性，图 5A，5B 显示模型的拟合程度良好，左端任何一次在排列实验中随机排列产生的 R^2 和 Q^2 值均小于右端的原始值，表明原始模型的预测能力较任何一次随机排列 y 变量的预测能力都大，即模型有效^[17]。图 5C 和图 5D 可知，经过 PLS-DA 分析，东北林蛙油及其类似品、伪品组内样本聚集程度高，组间按照种类

13)，黑龙江林蛙油聚为一支(4, 11, 16)，牛蛙油(15, 18, 17)聚为一支，中华蟾蜍油单独为一支(7)，较好的将 4 个不同种类分别聚类，为了更好地区分哈蟆油及其类似品、伪品，找到差异标志蛋白质，进一步采用多元统计分析方法。

3.4 东北林蛙油及其类似品、伪品蛋白质电泳图谱的多元统计分析

3.4.1 主成分分析(PCA) PCA 是在尽可能保留原有数据的基础上，将高维数空间的信息映射到低维数的几个主成分上，将维数降低数据简化来揭示数据的特征^[13]。东北林蛙油及其类似品、伪品蛋白质电泳图谱二维的 PCA 得分散点图见图 4，拟合主成分个数为 4 个，前 4 个主成分分别代表了 48.6%，17.1%，16.4% 及 6.3% 的样品变量信息，

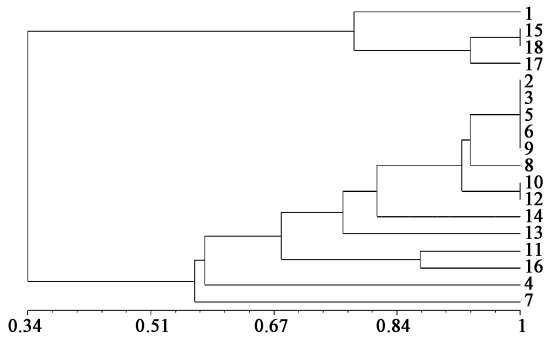


图 3 东北林蛙油及其类似品、伪品蛋白质凝胶电泳图谱聚类分析
Fig. 3 Cluster analysis of polyacrylamide gel electrophoretograms of *Rana dybowskii* oil, its analogues and counterfeits

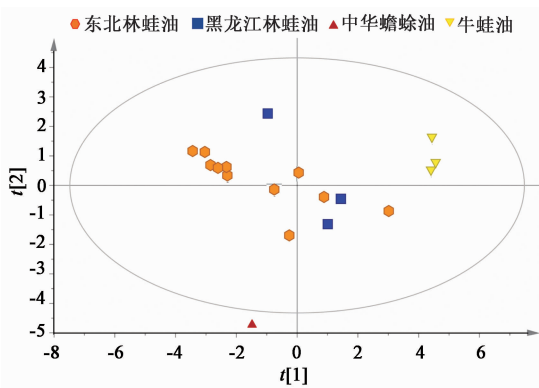


图 4 东北林蛙油及其类似品、伪品蛋白质凝胶电泳图谱分析的 PCA 得分散点
Fig. 4 PCA scatter scatter plot of polyacrylamide gel electrophoretograms of *Rana dybowskii* oil, its analogues and counterfeits

各自聚为一类,分类效果优于 PCA, OPLS-DA 进一步去除不相关差异,将组间差异最大化,得到了优于 PLS-DA 的分类结果,东北林蛙油、黑龙江林蛙油、牛蛙油与中华蟾蜍油集中在 4 个区域,完全区分开。

OPLS-DA 载荷图见图 6A, OPLS-DA Bi 载荷图见图 6B。综合了 OPLS-DA 得分图和 OPLS-DA 载荷图的全部信息,可以直观的观察变量对样品间的相似性与差异性贡献率大小。曲线上的每一个点均代表一个变量,距离原点越远,对区分组间差异性的贡献越大,变量对分类的贡献度由变量权重重要性排序 (VIP) 的大小来衡量^[18]。通过筛选 VIP 值 > 1 (图 6C)并结合 OPLS-DA Bi 载荷图,筛选出贡献较大的成分,由图分析可知相对分子质量 51.363, 35.838, 14.565, 17.563, 15.358 及 21.696 kDa 可以作为区分东北林蛙油及其类似品、伪品的主要差异性蛋白。相对分子质量 51.363 kDa 的蛋白质在东北林蛙油中含量

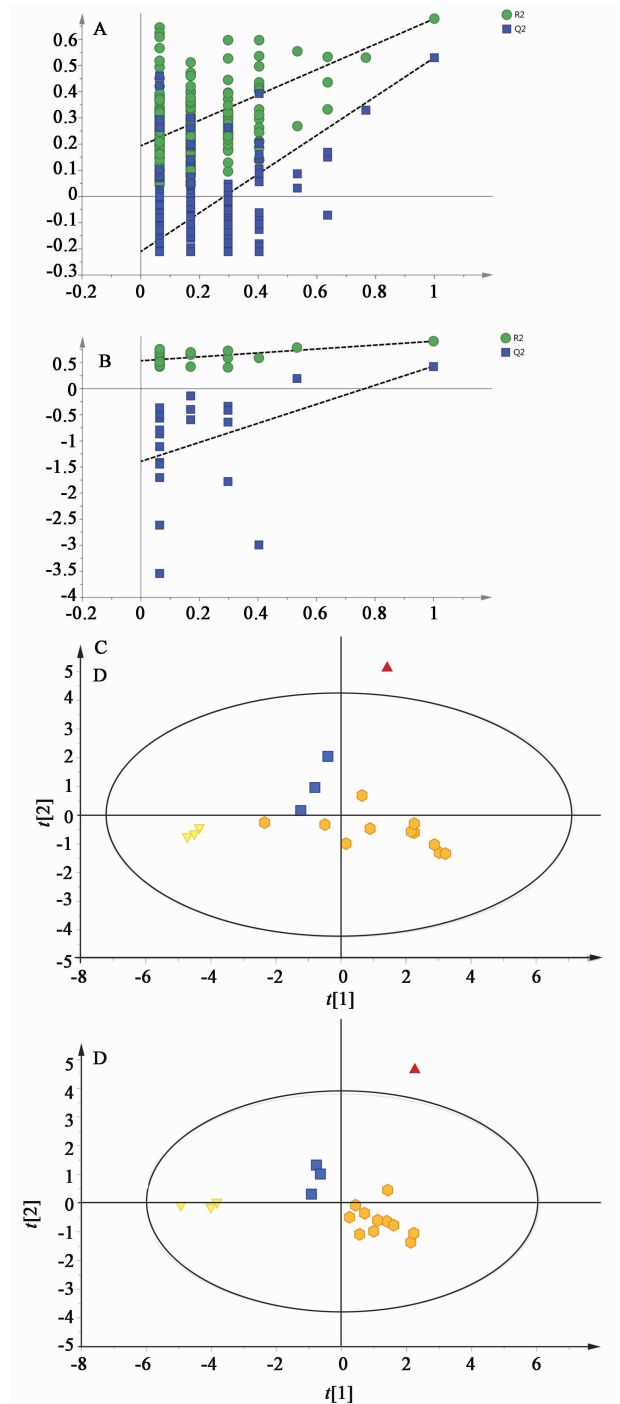


图 5 PLS-DA 模型验证 (A, C) 和 OPLS-DA 模型验证 (B, D)
Fig. 5 PLS-DA model validation plot (A, C), OPLS-DA model validation plot (B, D)

最高,相对分子质量 35.838 kDa 的蛋白质在牛蛙油中不存在,相对分子质量为 17.563 kDa 的蛋白质仅存在于东北林蛙油与中华蟾蜍油中,相对分子质量为 14.565, 15.358 kDa 的蛋白质仅存在于东北林蛙油与黑龙江林蛙油中,相对分子质量为 21.696 kDa 的蛋白质仅在与黑龙江林蛙油中,不存在于其他种类。

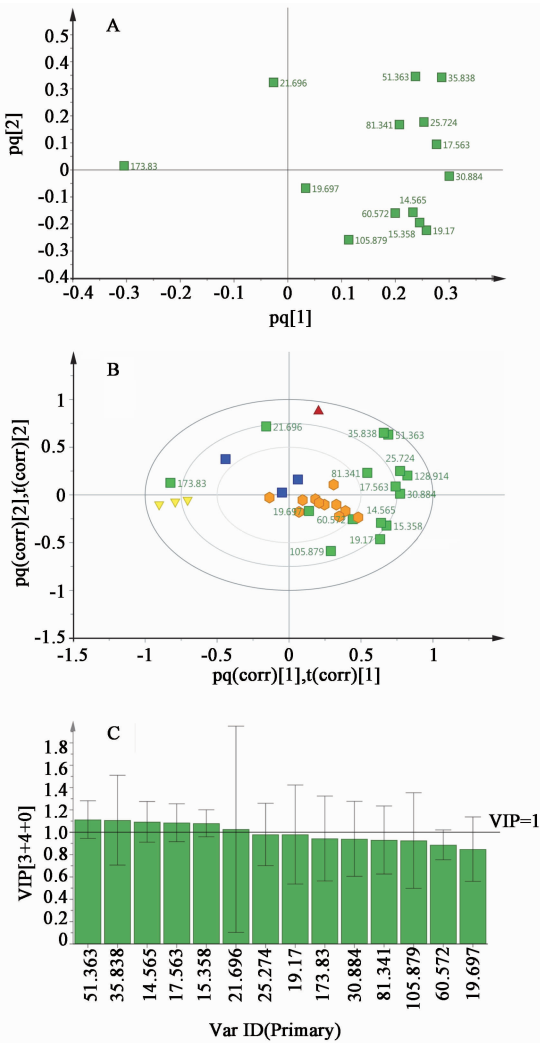


图 6 OPLS-DA 载荷 (A), OPLS-DA Bi 载荷 (B), OPLS-DA-VIP 值 (C)

Fig. 6 OPLS-DA loading plot (A), OPLS-DA loading plot (B), OPLS-DA-VIP value (C)

4 讨论

动物类中药蛋白质含量丰富,电泳分析易于进行。因该法专属性强、分辨率高,来源于同属不同种或同种不同入药部位的中药材均可被明显区分^[19-21]。实验结果表明,东北林蛙油及其类似品、伪品的电泳图谱差异显著,并具有各自的鉴别特征带,可作为不同种类药材的鉴别依据。

通过 SDS-PAGE 电泳图谱技术,运用 NTSYSpc 2.10e 与 SMICA-P 14.1 软件,采用聚类分析结合多元统计分析方法,本实验对 18 批次东北林蛙油及其类似品、伪品进行分析评价,得到了良好的分类与鉴别效果。聚类分析结果显示,除了 1 号东北林蛙油药材,其他东北林蛙油聚为一类,说明与其他 10 批东北林蛙油相比,1 号东北林蛙油药材有明显差异,

凝胶电泳图谱中也可观察到 1 号药材的条带较少,说明其蛋白种类及含量相对较低;黑龙江林蛙油聚为一类,且与东北林蛙油距离相近,表明东北林蛙油类似品—黑龙江林蛙油在蛋白质成分及含量上与东北林蛙油相近;伪品牛蛙油、中华蟾蜍油各自聚为一类。总体来说,东北林蛙油及其类似品、伪品得到了较好的区分,说明种类不同则在蛋白成分上存在差异。

通过无监督的 PCA 分析,结果与聚类分析一致,牛蛙油与中华蟾蜍油分离明显且各自聚集于不同区域,东北林蛙油与黑龙江林蛙油之间差异不明显,黑龙江林蛙油组内分散,与东北林蛙油有交叉,说明东北林蛙油与黑龙江林蛙油在蛋白成分及含量上相似。有监督的 PLS-DA 和 OPLS-DA 分析能够有效降低组内差异,进一步运用此 2 种分析方法对 4 种不同种类药材进行分析,PLS-DA 将 3 批黑龙江林蛙油聚为一类,但与林蛙油仍有交叉。OPLS-DA 结果表明 4 种不同种类药材能明显区分,并筛选出 6 种差异性蛋白质成分。相对分子质量 51.363 kDa 的蛋白质在林蛙油中含量高与其他种类,相对分子质量 35.838 kDa 的蛋白质牛蛙油中不存在,相对分子质量为 17.563 kDa 的蛋白质仅存在于林蛙油与中华蟾蜍油中,相对分子质量为 14.565,15.358 kDa 的蛋白质仅存在于林蛙油与黑龙江东北林蛙油中,相对分子质量为 21.696 kDa 的蛋白质仅在黑龙江林蛙油中含有,故此 6 种分子量不同的蛋白质可作为区分哈蟆油及其类似品、伪品的差异性成分。这一指标为东北林蛙油及其类似品、伪品的鉴别提供了依据,同时也为东北林蛙油药材的品质评价奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 田新民,石兰英,杨少成,等.东北林蛙胃肠道三种消化酶活性研究[J].黑龙江畜牧兽医,2017(23):216-218.
- [2] 陈佳丽,云观,金建丽,等.东北林蛙消化系统 SOD 和 POD 同工酶电泳分析[J].黑龙江畜牧兽医,2017(1):219-221.
- [3] 姜大成.中国林蛙与哈蟆油[M].长春:吉林科学技术出版社,2010:2.
- [4] 肖井雷,姜大成.名贵中药哈蟆油原动物基原的探讨[C]//中华中医药学会第九届中药鉴定学术会议论文集.长春:长春中医药大学,2008:134-136.
- [5] 王孟虎,康廷国,许亮,等.基于 COI 序列的哈蟆油基原动物 DNA 条形码鉴定研究[J].中国中药杂志,

- 2017,42(8):1572-1577.
- [6] 李殿伟,赵文阁,刘鹏,等. 黑龙江省东部两种林蛙两性异形比较研究[J]. 黑龙江畜牧兽医,2015,7(13):222-224.
- [7] 任艳,万德光,卢先明,等. 蛋白电泳技术在动物类民族药真伪鉴别中的应用[C]//第四届中医药现代化国际科技大会论文集. 科技部,中国科学院,中国工程院,国家中医药管理局,成都,2013:1-2.
- [8] 石俊英,彭艳丽,李定格,等. 哈蟆油、鸡内金等动物类中药及其混淆品的电泳鉴别研究[J]. 山东中医杂志,1994,13(2):73-74.
- [9] 张嵩,王维宁,陈芳芳,等. 哈蟆油与类似品和伪品的质量评价[J]. 沈阳药科大学学报,2012,29(12):951-958.
- [10] 黄瑶,常乐,张思雯,等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳法鉴别哈蟆油药材及其伪品[J]. 沈阳药科大学学报,2017,34(12):1049-1054,1083.
- [11] 林燕,徐蕾,李重九,等. 凝胶电泳分离-液相色谱-质谱法分析林蛙油及其伪品中的特异性蛋白[J]. 质谱学报,2017,38(2):227-233.
- [12] 张秋红,于姗姗,李磊. 酸枣仁中蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析[J]. 中国现代中药,2017,19(7):972-977,991.
- [13] 李涛,何璇. 红景天¹H-NMR 指纹图谱-化学模式识别研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(4):888-891.
- [14] 米霞,李震宇,秦雪梅,等. 基于 NMR 代谢组学技术的不同性状款冬花药材的化学比较[J]. 药学学报,2013,48(11):1692-1697.
- [15] 黎丹,李三华,杨龙江,等. 基于组效关系的石上柏挥发油抗肿瘤有效成分的辨识[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(2):44-50.
- [16] 徐彤,黄萌萌,陈家进,等. 安宫牛黄丸 HPLC 指纹图谱及化学模式识别分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(20):14-19.
- [17] 田栋,李震宇,范圣此,等. 基于 NMR 代谢组学技术的不同产地黄芪水溶性浸出物化学组成分析[J]. 药学学报,2014,49(1):89-94.
- [18] 李琴瑜,吴卫刚,崔波,等. 高效液相色谱法结合多元统计分析用于苍术药材的质量评价[J]. 药物分析杂志,2018,38(4):598-608.
- [19] 康馨元,刘睿,李春楠,等. 不同产地山羊角凝胶电泳指纹图谱及其混伪品鉴别研究[J]. 中国现代中药,2015,17(1):20-23.
- [20] 王迪,李科,王桂臻,等. 基于内切-1,4-β-甘露聚糖酶水解的黄芪糖指纹图谱的建立及不同种质资源黄芪鉴别[J]. 中国中药杂志,2018,43(14):2964-2972.
- [21] 牛放,赵雨,唐任能,等. 梅花鹿鹿角托盘蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳指纹图谱研究[J]. 中国药业,2010,19(10):21-23.

[责任编辑 顾雪竹]