

逍遥片原料药材及中间提取物赭曲霉毒素A UPLC-FLD检测方法的建立

程实¹, 王萍², 孙巍², 张磊², 章顺楠³, 叶正良^{4*}

1. 天津中医药大学 研究生院, 天津 301608

2. 天士力医药集团股份有限公司 国际产业中心, 天津 300402

3. 天士力医药集团股份有限公司 中药先进制造技术国家地方联合工程实验室, 天津 300402

4. 天士力控股集团有限公司, 天津 300402

摘要: 目的 建立免疫亲和柱前处理、超高效液相色谱串联荧光检测器(UPLC-FLD)分析,同时用于检测逍遥片原料药材柴胡、当归、炙甘草、炒白术、白芍及中间提取物1和2中赭曲霉毒素A(ochratoxin A, OTA)的方法。方法 样品用80%甲醇-水溶液(体积比)超声提取,离心,免疫亲和柱纯化, ACQUITY UPLC BEH C₁₈色谱柱分离,流动相A为0.5%冰醋酸溶液(pH值为2.97),流动相B为乙腈,梯度洗脱。激发波长310 nm,发射波长465 nm,柱温30 °C,体积流量0.3 mL/min,进样体积2 μL,荧光检测器检测。结果 OTA在1.5~37.5 ng/mL显示良好的线性关系, R² ≥ 0.999 1。OTA加标回收率为92.36%~119.89%, RSD为2.50%~9.12%。样品在48 h内稳定。共检测42批次样品,33批呈阳性,柴胡和炙甘草被污染。结论 建立的免疫亲和柱前处理、UPLC检测的方法可用于中药和中间提取物中OTA的检测,排除假阳性结果,适合痕量分析,结果准确可靠。

关键词: 逍遥片; 赭曲霉毒素A; 免疫亲和柱; 限度; 超高效液相色谱串联荧光检测器

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)03-0512-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.03.008

Establishment of UPLC-FLD method for determination of ochratoxin A in raw materials and intermediate extracts of Xiaoyao Tablets

CHENG Shi¹, WANG Ping², SUN Wei², ZHANG Lei², ZHANG Shunnan³, YE Zhengliang⁴

1. Graduate School, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301608, China

2. Tasly Pharmaceutical Group Company Limited, International Department, Tianjin 300402, China

3. Tasly Pharmaceutical Group Company Limited, National&Local United Engineering Laboratory of TCM Advanced Manufacturing Technology, Tianjin 300402, China

4. Tasly Holding Group Company Limited, Tianjin 300402, China

Abstract: Objective To establish an immunoaffinity pre-column processing, high performance liquid chromatography tandem fluorescence detector analysis, and to detect the raw materials of Xiaoyao Tablets *Bupleuri Radix*, *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma*, *Radix Paeoniae Alba*, *Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*, *Radix Angelicae Sinensis* and Intermediate Extract 1, Extract 2 Method of Ochratoxin A. **Method** The sample was extracted with 80% methanol-water solution (volume ratio) ultrasonically, centrifuged, and purified by immunoaffinity column, separated by ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column, mobile phase A: 0.5% glacial acetic acid-water solution (pH = 2.97), mobile phase B : Acetonitrile elution, excitation wavelength 310 nm, emission wavelength 465nm, column temperature 30 °C, flow rate 0.3 mL/min, injection volume 2 μL, fluorescence detector detection. **Results** Ochratoxin A showed a good linear relationship in the mass concentration range of 1.5 to 37.5 μg/mL, and R² was greater than 0.999 1. The recovery rate of ochratoxin A was 92.36%—119.89%, and the relative standard deviation was 2.50%—9.12%. The sample is stable within 48 hours. A total of 42 batches of samples were detected and 33 batches were positive. *Bupleuri Radix* and *Glycyrrhizae Radix Et Rhizoma* were contaminated. **Conclusion** The established immunoaffinity column pretreatment and ultra-high performance liquid chromatography detection method is suitable for the detection method of OTA in traditional Chinese medicine and intermediate extracts, eliminating

收稿日期: 2020-10-12

基金项目: 国家科技部“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09303024)

第一作者: 程实(1996—),女,在读硕士研究生,从事中药质量标准研究。Tel: 15945882990 E-mail: chengshi96a@gmail.com

*通信作者: 叶正良,博士,研究员,从事中药质量标准研究。Tel: (022)86342066 E-mail: yezl@tasly.com

false positive results, suitable for trace analysis, conforming to international reporting standards, and the results are accurate and reliable.

Key words: Xiaoyao Tablets; ochratoxin A; immunoaffinity column; limit; UPLC-FLD

赭曲霉毒素是霉菌毒素的一种,主要为赭曲霉 *Aspergillus Ochraceus*、纯绿青霉 *Penicillium verrucosum* 和碳黑曲霉 *As-pergillus carbonarius* 等真菌产生一组结构相似的有毒代谢产物^[1],包括赭曲霉毒素 A (Ochratoxin A, OTA)、B、C 等。其中 OTA 对谷物和草药的污染最大,毒性最高,具有免疫毒性、肝肾毒性、致畸性、致突变性和致癌性^[2]。1993 年,OTA 被国际癌症机构定性为 2B 类可能人类致癌物^[3]。欧洲药典 0277 甘草项下规定 OTA 含量应 $\leq 20 \mu\text{g}/\text{kg}$ ^[4]。

目前,霉菌毒素的前处理方法包括固相萃取小柱、免疫亲和色谱 (Immunoaffinity Chromatography, IAC)、固相微萃取、中空纤维液相微萃取、分散液-液微萃取、分子印迹聚合物萃取等^[5]。免疫亲和柱可以去除样品中的大量干扰杂质峰,并确保目标峰和基质峰达到基线分离,具有操作简单、特异性好、纯化效果好等优点,符合药典对样品的纯化要求^[6]。霉菌毒素的检测定量方法包括酶联免疫吸附测定法、气相色谱法、高效液相色谱法和超高效液相色谱与紫外或荧光检测器相结合、液相-质谱联用技术等^[7]。当前,OTA 检测主要针对食品和谷物,干果、可可粉、香料、葡萄酒、啤酒和肉类产品等都检测出 OTA^[8-9]。波兰的 OTA 暴露风险评估中共检测波兰市场上 473 个食品样品,其中黑麦粉、葡萄干和速溶咖啡普遍被污染,葡萄干污染最为严重^[10]。目前多种中药已被检测,但药材中间提取物报道较少,药材中间提取物是制剂的关键中间体,其质量与制剂密切相关,除了确保中药原料的安全和质量外,中间提取物的安全性也十分重要。

逍遥片由经典名方逍遥散加减化裁而来,具有抗抑郁等作用^[11-12],为欧盟申报上市项目。逍遥片主要由柴胡、当归、炙甘草、炒白术、白芍 5 种药材组成,经过中间提取物 1 和 2 制成的制剂。本研究建立了逍遥片的 5 种药材和中间提取物 1、2 的 OTA 检测方法,符合欧洲药典的要求,为安全和质量控制提供了思路和方法,为国际药品申报提供参考。本研究选取免疫亲和柱用作预处理方法,根据 OTA 特殊的荧光性质,采用超高效液相色谱串联荧光检测器 (UPLC-FLD) 的方法进行检测。

1 材料

1.1 药材与主要试剂

6 批柴胡、7 批炙甘草、3 批白芍、3 批炒白术和 3

批当归随机购自天津的药店和市场,由天士力医药集团股份有限公司王萍高级工程师鉴定为柴胡、炙甘草、白芍、炒白术和当归正品。以这 5 种药材为原料,制备了 2 种混合提取物各 10 批,命名为提取物 1 和提取物 2,留样存放在天士力医药集团股份有限公司国际产业中心。

OTA 对照品,10.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$,批号 L18304B,德国 LGC Standards。冰醋酸、乙腈和甲醇,色谱纯,德国 Merck; 聚山梨酯 20、碳酸氢钠和氯化钠,分析级,均为市售。碳酸氢钠缓冲液: NaCl 25 g/L、NaHCO₃ 5 g/L、聚山梨酯 20 0.1 mg/L (pH 7.4)。

1.2 主要仪器

OchraTest 免疫亲和柱,批号 M030701、M030801,天津 Agela; QUINTIX224-1CN 型万分之一天平,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司; SK3200LHC 型超声,上海科导超声仪器有限公司; milli-Q 超纯水机,美国 Millipore 公司; Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱系统; FLR 荧光检测器(汞氙灯),KOBRA Cell 电化学流通池; ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)。

2 方法与结果

2.1 对照品溶液的制备

OTA 的对照品质量浓度为 10.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$,用 30% 甲醇配制质量浓度分别为 0.015、0.001 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液。所有溶液均在 -20 $^{\circ}\text{C}$ 棕色量瓶或液相小瓶中避光保存。

2.2 样品制备

将药材粉碎并过药典 3 号筛。提取物 1、提取物 2 为浓稠液体,称量前混合均匀。称定样品 15 g,精密加入 80% 甲醇溶液 50 mL,超声 30 min,充分溶解后,3 000 r/min 离心 15 min,精密量取上清液 15 mL,于 50 mL 量瓶中,用 2% 聚山梨酯 20 稀释至刻度,摇匀,玻璃纤维滤纸滤过,取滤液 30 mL 上样至免疫亲和柱。调节体积流量 3 mL/min,完全通过后再依次用 10 mL 碳酸氢钠缓冲液淋洗 1 次,10 mL 纯化水淋洗 1 次,弃去洗脱液,注入空气 10 s 使纯化水完全通过。免疫亲和柱洗脱 3 次,每次用 0.5 mL 色谱级甲醇,至 5 mL 量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,过 0.2 μm GHP 材质的有机滤膜,即得。

2.3 色谱条件

荧光检测器,激发波长 (Ex) 310 nm,发射波

长(Em)465 nm。自动进样器样品瓶托盘保持在15 °C。流动相A:0.5%冰醋酸溶液;流动相B:乙腈,体积流量为0.3 mL/min,进样量为2 μL。柱温为30 °C。OTA保留时间约在2.9 min。梯度洗脱如下:0~6 min,52%流动相A等度洗脱,7~12 min流

动相B从48%增加到90%,冲洗色谱柱后回到初始比例。根据校准曲线确定测试溶液中OTA的浓度。

2.4 专属性

OTA的保留时间(2.9 min)内无干扰色谱峰。如图1所示。

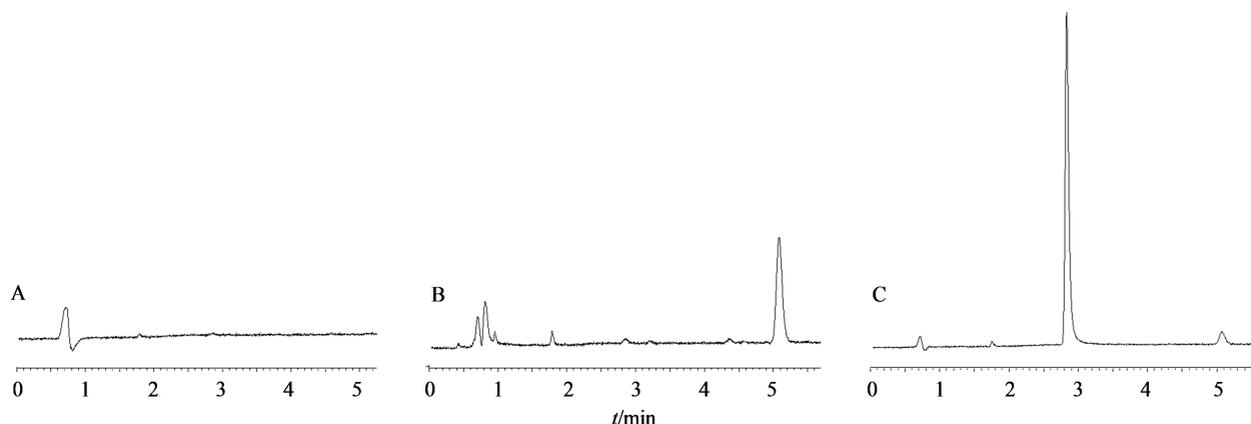


图1 空白溶剂(A)、柴胡样品(批号201903201,B)、对照品溶液(C)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank solvent (A), *Bupleuri Radix* sample (batch number 201903201, B), standard sample (C) chromatogram

2.5 标准曲线的绘制

选取1.5、7.5、5.0、30.0、37.5 ng/mL OTA对照品5点校正,以色谱峰面积为纵坐标,OTA的质量浓度为横坐标,进行线性回归,得到标准曲线 $Y=9 \times 10^{-6} X - 3031.3$, $R^2=0.9991$ 。

2.6 稳定性试验

分别取OTA对照品、样品(批号201903201),样品加入OTA对照品20 μg/kg,分别在0、4、8、12、24、30、36、42、48 h分别精确吸取2 μL对照品溶液和样品溶液,记录各色谱峰峰面积,并计算各时间点峰面积与0 h峰面积的相对标准偏差(RSD)值。对照品溶液RSD为2.35%,炙甘草样品溶液RSD为1.00%,柴胡样品溶液RSD为1.56%,白芍样品溶液RSD为2.42%,当归样品溶液RSD为1.85%,炒白术样品溶液RSD为1.32%,提取物1样品溶液RSD为1.82%,提取物2样品溶液RSD为2.02%,表明对照品和样品在48 h内稳定。

2.7 加样回收率试验

将OTA对照品加标低于限度2 μg/kg、等于限度20 μg/kg、高于限度30 μg/kg 3个水平,每个水平制备3份样品。按所建立方法进行分析测定。在这7种基质中,样品回收率在92.36%~119.89%。炙甘草的9个样品的RSD最大,为9.12%,见表1。

2.8 精密度试验

由人员1和2每天平行称取3个样品(批号

表1 9个样品在2、20、30 μg·kg⁻¹水平下的回收率和9个样品的RSD

Table 1 Recoveries of nine samples at levels of 2, 20 and 30 μg·kg⁻¹ and RSD of nine samples

样品	平均回收率/%	RSD/%
炙甘草	101.57	9.12
炒白术	106.39	3.06
当归	113.08	2.96
柴胡	103.45	8.63
白芍	114.88	3.00
提取物1	108.86	3.60
提取物2	99.68	2.50

201903201),加标20 μg/kg,计算6份样品回收率的RSD。炙甘草、炒白术、当归、柴胡、白芍、提取物1和提取物2 RSD分别为6.44%、1.08%、1.71%、3.55%、1.02%、2.13%、4.16%。

2.9 定量限和检出限

取“2.7”项下最低水平的结果为定量限(S/N=10)。炙甘草的定量限为3.34 μg/kg、当归的定量限为3.07 μg/kg、白芍药材的定量限为2.14 μg/kg、炒白术的定量限为2.61 μg/kg、柴胡的定量限为6.28 μg/kg、提取物1的定量限为3.66 μg/kg、提取物2的定量限为6.03 μg/kg。以S/N=3作为检出限。

2.10 耐用性

精密称取同一批(批号201903201)样品15 g,6份样品,分别加入OTA对照品20 μg/kg,过华安麦

科和 Agela 免疫亲和柱,按照“2.2”项下方法制备 6 个样品溶液,计算 6 份样品回收率的 RSD,RSD 分别为 8.23%、1.39%、1.17%、1.95%、1.73%、2.01%、5.74%。

2.11 检测结果

应用本研究建立的方法共检测 6 批柴胡、7 批炙

甘草、3 批白芍、3 批炒白术、3 批当归、10 批提取物 1 和 10 批提取物 2。柴胡和炙甘草均为阳性。2 种提取物以药材为原料制备,呈阳性。柴胡最高污染水平为 4.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均为 2.13 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。炙甘草的最高污染水平为 3.27 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均为 1.22 $\mu\text{g}/\text{kg}$,见表 2。

表 2 42 批次样品的检测结果

Table 2 Test results of 42 batches of samples

批号	名称	OTA/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	批号	名称	OTA/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$	批号	名称	OTA/ $(\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1})$
201903201	炙甘草	1.13	20190115	炒白术	0	20181201	提取物 1	0.10
201903202	炙甘草	0.67	20181211	炒白术	0	20181202	提取物 1	0.76
201903203	炙甘草	1.09	201903201	当归	0	20181203	提取物 1	0.24
20190115	炙甘草	0.54	201903202	当归	0	20181204	提取物 1	0.45
20181216	炙甘草	3.27	201806020	当归	0	20181205	提取物 2	0.21
201809009	炙甘草	1.67	201903201	白芍	0	20181206	提取物 2	0.35
201612001	炙甘草	0.20	201903202	白芍	0	20181207	提取物 2	1.19
201810040	柴胡	4.98	201903203	白芍	0	20181208	提取物 2	0.77
201903201	柴胡	1.21	20190109	提取物 1	0.11	20190502	提取物 2	0.13
201903202	柴胡	0.31	20190501	提取物 1	0.35	20190503	提取物 2	1.24
201811004	柴胡	2.10	20190405	提取物 1	1.20	20190504	提取物 2	0.34
201809009	柴胡	1.11	20190108	提取物 1	0.60	20190110	提取物 2	0.20
201612001	柴胡	3.07	20190406	提取物 1	1.37	20190111	提取物 2	0.19
201903201	炒白术	0	20190407	提取物 1	2.11	20190601	提取物 2	0.32

3 讨论

3.1 方法优化

3.1.1 优化 OTA 的 UPLC 条件 比较了 2%、1%、0.5% (pH 值分别为 2.42、2.76、2.97)、0.2% 的冰醋酸溶液和超纯水作为流动相。当冰醋酸浓度 $>0.5\%$ 时,目标峰峰形和对称性良好。超纯水、0.2% 冰醋酸作为流动相时,无法获得良好峰型。 C_{18} 色谱柱虽具有广泛的耐酸碱性能,但实际操作中使用过酸的流动相会降低色谱柱柱效。本研究选择 0.5% 的冰醋酸溶液为流动相 A。

3.1.2 样品制备优化 提取溶剂的选择:试验了 80% 甲醇、60% 乙腈和 30% 碳酸氢钠的提取能力。当提取物 1、提取物 2 使用 60% 乙腈和 30% 碳酸氢钠溶液提取时,离心后分层不明显,不能有效分离上清液。因此,使用 80% 的甲醇作为提取溶剂。

稀释溶剂的选择:前处理中,甘草和柴胡基质复杂,当用纯化水定容时,会产生沉淀,溶液浑浊,影响免疫亲和柱的吸附效果。聚山梨酯 20 表面活性剂可使沉淀减少溶液澄清,易于后续过滤,具有良好的除杂作用,选择 2% 聚山梨酯 20 作为稀释溶剂。

超声时间选择:超声 20 min 和 30 min,药材之

间无显著提取效率差异,超声 30 min 质地相对黏稠的提取物能完全溶解,需超声 30 min。

免疫亲和柱洗脱液选择:试验了 3 种洗脱试剂的洗脱效果。1)用 10 mL 纯净水冲洗 2 次。2)依次用 10 mL 碳酸氢钠缓冲液 1 (配制方法见“2.1”项)和 10 mL 纯化水冲洗。3)依次用 10 mL 碳酸氢钠缓冲液 2 (NaCl 12.5 g/L、 NaHCO_3 2.5 g/L、聚山梨酯 20 0.1 mL/L)和 10 mL 净化水冲洗。药材基质复杂,基质作用大,仅用纯化水清洗过滤困难。结果表明,用碳酸氢钠缓冲液洗脱可有效提高 OTA 的回收率并减少其他杂质峰干扰。2 种不同称样量的碳酸氢钠洗脱液洗脱结果无显著差异,选择碳酸氢钠缓冲液 1 (NaCl 12.5 g/L、 NaHCO_3 5 g/L、聚山梨酯 20 0.1 mL/L)作为洗脱液。

滤膜的选择:试验过程中,炒白术不同水平加标样品的回收率出现不规律的偏低。排除未提取出、免疫亲和柱未富集和甲醇未冲洗下等因素后,发现 0.2 μm 尼龙滤膜会吸附 OTA,因此选取 0.2 μm 的 GHP 滤膜、0.22 μm 的尼龙滤膜 (津腾) 和 0.22 μm 的尼龙滤膜 (Agela) 进行了试验。结果表明,尼龙材质的滤膜会吸附炒白术样品中的 OTA,其他基质无此现象。所以使用 Waters 0.2 μm GHP 滤膜,回收率满足要求。

3.2 均匀度和抽样建议

为了研究OTA污染是否均匀,选取炙甘草(批号20181216)和柴胡(批号201810040)各1批进行洒水高温密闭处理,四分法从每批中选择3样品进行检测。3个柴胡样品测得值分别为29.82、16.89、37.04 $\mu\text{g}/\text{kg}$,平均值为27.92 $\mu\text{g}/\text{kg}$,RSD为36.58%。炙甘草的3个样品分别为24.41、131.56、8.88 $\mu\text{g}/\text{kg}$,样品平均值为54.95 $\mu\text{g}/\text{kg}$,RSD为121.56%。由此可知,样品污染极不均匀,为确保检测数值能真实反映污染程度,在制备样品过程中,应采取均匀混合、加大取样量、增加采样点等方法。

3.3 污染原因分析

有文献报道甘草被OTA污染,柴胡被污染罕见报道。对柴胡、甘草污染原因分析如下:(1)化学成分:柴胡的主要成分是皂苷,炙甘草的主要成分是三萜类化合物、类黄酮和多糖,皂苷成分和多糖成分均是真菌的良好培养基,易于真菌繁殖。(2)水分:在受污染的批次中,水分含量高于未污染的批次,过高的水分会促进OTA产生和蓄积^[13]。(3)包装方式:柴胡和甘草由双层塑料袋包装,封闭的包装使真菌容易繁殖。而未被污染的中药由编织袋包装,透气,不利于真菌繁殖。基于上述原因,建议在储存药物时应监测其水分和透气性,保持干燥清洁,减少霉菌毒素和其他有害物质的影响,严格控制中药质量。

本研究建立了一种IAC-UPLC-FLD方法,可用于中药及其提取物的检测,建立的方法快速、结果准确,符合样品中痕量检测的要求,补充了中间提取物真菌毒素检测的空白。前处理中使用表面活性剂减少基质的干扰;免疫亲和柱特殊的抗体填料与OTA特异性结合,降低了假阳性的结果的出现;UPLC-FLD检测避免了柱后衍生,缩短了检测时间。此方法需要进一步试验是否满足更广泛的中药及相关提取物的检测。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Pantelides I S, Aristeidou E, Lazari M, et al. Biodiversity and ochratoxin A profile of *Aspergillus* section *Nigri* populations isolated from wine grapes in Cyprus vineyards [J]. *Food Microbiol*, 2017, 67: 106-115.
[2] Wang Y, Wang L, Liu F, et al. Ochratoxin A producing fungi, biosynthetic pathway and regulatory mechanisms

[J]. *Toxins (Basel)*, 2016, 8(3). doi:10.3390/toxins8030083.
[3] IARC (International Agency for Research on Cancer). Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins [S]. World Health Organization, Lyon, 1993: 56.
[4] European Pharmacopoeia 9.0. Liquorice Root [S]. 2012: 0277
[5] Nielsen K F, Ngemela A F, Jensen L B, et al. Correction to UHPLC-MS/MS determination of ochratoxin A and fumonisins in coffee using QuEChERS extraction combined with mixed-mode SPE purification [J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(7): 2117.
[6] Lasram S, Oueslati S, Chebil S, et al. Occurrence of ochratoxin A in domestic beers and wines from Tunisia by immunoaffinity clean-up and liquid chromatography [J]. *Food Addit Contam Part B Surveill*, 2013, 6(1): 1-5.
[7] Al-Hadithi N, Kössler P, Karlovsky P. Determination of ochratoxin A in wheat and maize by solid bar microextraction with liquid chromatography and fluorescence detection [J]. *Toxins*, 2015, 7(8): 3000-3011.
[8] Wei D, Wu X, Xu J, et al. Determination of ochratoxin A contamination in grapes, processed grape products and animal-derived products using ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectroscopy system [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2051.
[9] Abd-Elghany S M, Sallam K I. Rapid determination of total aflatoxins and ochratoxins A in meat products by immunoaffinity fluorimetry [J]. *Food Chem*, 2015, 179: 253-256.
[10] Hajok I, Kowalska A, Piekut A, et al. A risk assessment of dietary exposure to ochratoxin A for the Polish population [J]. *Food Chem*, 2019, 284: 264-269.
[11] 吴丹, 高耀, 田俊生, 等. 逍遥散"异病同治"抑郁症和糖尿病的网络药理学作用机制研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(8): 1818-1827.
Wu D, Gao Y, Tian J S, et al. An exploration on mechanisms of "treating different diseases with same method" of Xiaoyao Powder in treating depression and diabetes based on network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2019, 50(8): 1818-1827.
[12] 吕梦, 王雅泽, 赵迪, 等. 基于粪便代谢组学技术的逍遥散抗抑郁作用机制研究 [J]. *中草药*, 2020, 51(13): 3482-3492.
Lv M, Wang Y Z, Zhao D, et al. Anti-depression mechanisms of Xiaoyao Powder based on fecal metabolomics [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2020, 51(13): 3482-3492.
[13] Pscheidt J W, Heckert S, Wiseman M, et al. Fungi associated with and influence of moisture on development of kernel mold of hazelnut [J]. *Plant Dis*, 2019, 103(5): 922-928.

[责任编辑 兰新新]