

基于超快速 VPCR 荧光可视化检测技术的小檗皮及其藏成药中原料药的 真伪鉴别研究

李红颖¹, 宋文俊², 李慧林¹, 张继晨³, 范刚^{2*}, 陈蓉^{2*}

1. 成都中医药大学药学院, 四川 成都 611137

2. 成都中医药大学民族医学院, 四川 成都 611137

3. 四川天府新区新经济发展研究中心, 四川 成都 610299

摘要: **目的** 建立藏药小檗皮 *Berberis Cortex* 及藏成药中小檗皮特异性 DNA 的超快速荧光可视化检测方法, 实现对小檗皮药材及藏成药中小檗皮的快速鉴别。**方法** 将小檗皮及其混淆品的 ITS2 序列进行比对, 筛选出小檗皮药材特异性 DNA 序列; 针对该序列设计小檗皮特异性引物, 建立小檗皮药材以及藏成药中小檗皮特异性 DNA 的超快速 VPCR 扩增体系; 后将该扩增体系与 SYBR Green I 荧光染料相结合, 实现对扩增产物的荧光可视化检测; 同时对该体系的特异性、灵敏度以及在真实样本中的适用性进行考察。**结果** 该体系可以在 40 min 内完成对小檗皮以及藏成药中小檗皮特异性 DNA 的扩增及荧光可视化检测; 检测限低至 10 pg/ μ L; 对 16 个批次的小檗皮药材进行分析, 其中 15 个批次的样本产生阳性信号鉴定为小檗皮, 与测序结果 100%一致, 1 个批次的样本产生阴性信号, 该样本经通用引物测序鉴定为黄柏; 对 3 种含有小檗皮的藏成药进行分析, 3 个样本均产生阳性信号。**结论** 所建方法缩短了检测时间, 并且特异性良好, 灵敏度高, 可以对小檗皮及其藏成药中小檗皮进行快速、准确的可视化鉴别。

关键词: 小檗皮; VPCR; 快速扩增; 可视化检测; 藏成药

中图分类号: R286.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2023)12-3983-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.024

Identification of *Berberis Cortex* and its Tibetan patent medicine based on Ultra-fast VPCR and fluorescence visual identification technology

LI Hong-ying¹, SONG Wen-jun², LI Hui-lin¹, ZHANG Ji-chen³, FAN Gang², CHEN Rong²

1. School of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

2. School of Ethnic Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

3. Sichuan Tianfu New Area New Economic Development Research Center, Chengdu 610299, China

Abstract: Objective To develop an ultra-fast VPCR fluorescence visual identification method for Xiaobopi (*Berberis Cortex*)-specific DNA to realize fast identification of *Berberis Cortex* and its Tibetan patent medicine. **Methods** Specific primers for *Berberis Cortex* were designed according to the alignment results of the *Berberis Cortex* and its confusions. A fast VPCR amplification system was established for *Berberis Cortex*-specific DNA both in crude drugs and in Tibetan patent medicine. Moreover, this fast VPCR assay is also developed as a visual detection method by combing SYBR Green I fluorescent dye. Characters of an identification method including specificity, sensitivity, and generality were systematically studied. **Results** The amplification and fluorescence visual identification of *Berberis Cortex*-specific DNA could be finished within 40 minutes. The detection limit is as low as 10 pg/ μ L. A total of 16 batches of *Berberis Cortex* were analyzed by the developed method, of which 15 batches generated positive signals and one batch generated negative signal which was identified as Huangbo (*Phellodendri Chinensis Cortex*) using DNA sequencing method. All these results were 100% consistent with the sequencing results. Three kinds of Tibetan patent medicines containing *Berberis Cortex* were analyzed and all samples yielded positive signals. **Conclusion** The developed

收稿日期: 2022-12-09

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874370); 国家自然科学基金资助项目 (81973434); 四川省重点研发项目 (2022YFS0434); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划 (QNXZ2018043)

作者简介: 李红颖, 女, 硕士研究生, 研究方向为中药及民族药质量评价。E-mail: 1850631575@qq.com

*通信作者: 范刚, 男, 博士, 教授, 研究方向为民族药质量控制及药效物质基础。E-mail: fangang1111@163.com

陈蓉, 女, 博士, 副教授, 研究方向为中药及民族药分析及质量评价。E-mail: chenrong@cdutcm.edu.cn

method not only greatly shortens the detection time, but also has a good specificity and sensitivity, which can effectively identify *Berberis Cortex* and its Tibetan patent medicine.

Key words: *Berberis Cortex*; VPCR; fast amplification; visual detection; Tibetan patent medicine

藏医药是中国传统医学宝库的重要组成部分,在藏族几千年的发展历史当中一直发挥着重要的作用,由于生长环境的特殊性,藏药通常有着特殊的疗效,吸引了国内外学者的广泛关注。小檗皮(藏文译音:给尔驯、吉尔哇、杰星等)始载于《四部医典》^[1],是藏医临床治疗“京尼萨库”病(糖尿病)及其并发症的常用药^[2],现代药理学研究发现,小檗皮能改善糖尿病肾病的病理变化和药效学指标^[3-6]。小檗皮目前尚未被收入《中华人民共和国卫生部药品标准·藏药分册》标准正文,仅在标准附录中规定其来源为小檗科植物甘肃小檗 *Berberis kansuensis* Schneid.及其同属多种植物的干燥内皮。此外,小檗皮还常作为原料药在多种藏成药中使用,如四味姜黄汤散、八味小檗皮散的处方中均使用了大剂量的小檗皮^[7]。

小檗属植物约有 500 余种,广泛分布于世界各地,我国大约有 200 种,根据文献记载和实际调查研究发现^[8],我国目前药材市场、藏医院和藏药厂使用的小檗皮主流品种为甘肃小檗 *B. kansuensis* Schneid.、鲜黄小檗 *B. diaphana* Maxim.、匙叶小檗 *B. vernae* Schneid.以及刺红珠 *B. dictyophylla* Franch.。由于芸香科黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid.的干燥树皮黄柏与小檗皮的外形十分相似,市场上常出现以黄柏掺入小檗皮混用的情况,严重影响了药材的质量和临床疗效。此外,小檗皮作为一种常用藏药材,在多种藏成药中使用,藏成药通常是由几味甚至几十味药材组成,化学成分十分复杂,药材粉碎以后也不能从外观性状上进行鉴别,所以藏成药中原料药的真伪鉴别则更加充满挑战。

DNA 分子非常稳定,不受药材生长环境、采

摘时间、产地等影响,可以清晰准确的提供药材或者成药当中原料药的物种信息,以 DNA 条形码、位点特异性 PCR 为代表的 DNA 分子鉴定技术已经被广泛地应用于多种中药材^[9-12]以及中成药中原料药的真伪鉴别^[13-14];川贝母、乌梢蛇、蕲蛇、石斛等药材的 PCR 鉴别法也已被《中国药典》2020 年版收载^[15]。目前 PCR 扩增常用的方法包括三步法和两步法(图 1),三步法在变性、退火、延伸 3 个温度点分别停留一定的时间来确保核酸分子的扩增;两步法则是将退火和延伸 2 个步骤合二为一,但在高低两个温度点仍旧保持 15~45 s 的停留时间;课题组在前期的研究中发现,PCR 过程并不需要在固定温度点的时间停留,反应体系只需要在高低 2 个温度点之间进行往复升降温,扩增过程能够在动态的升降温过程中完成。这样的加热方式可以将 DNA 扩增的时间从原来的 1 h 以上缩短至 20~30 min 以内,由于体系的温度-时间曲线图中呈现多个“V”型,所以此方法被命名为“VPCR”^[16-18]。SYBR Green I 是一种灵敏度非常高的双链 DNA 荧光染料,在游离状态下,SYBR Green I 发出微弱的荧光,与双链 DNA 结合后,荧光大大增强,在紫外灯下呈现肉眼可见的绿色荧光。所以本研究将 VPCR 扩增与 SYBR Green I 荧光染料相结合,通过 VPCR 实现小檗皮特异性 DNA 的快速扩增,再将 SYBR Green I 染料加入到 VPCR 扩增产物中,实现对扩增产物的荧光可视化检测^[19-20]。该体系反应时间短,整个扩增和检测过程可在 40 min 内完成,特异性好,灵敏度高,不仅可以应用于小檗皮药材的真伪鉴别,还可以应用于藏成药中小檗皮的定性鉴别,期望可以对制药企业产品的质量控制、监管部门的快速检测提供参考。

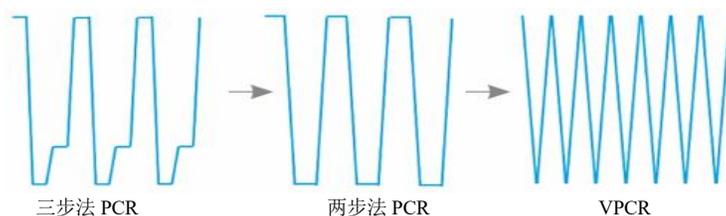


图 1 3 种 PCR 体系的温度-时间曲线图

Fig. 1 Temperature-time curves of three PCR modes

1 材料与仪器

1.1 材料

本研究建立方法时所使用的4批小檗皮基原植物由成都中医药大学范刚教授鉴定且经DNA条形码

码验证,用于方法适用性考察的16批小檗皮药材以及3种含有小檗皮的藏成药购自各大藏医院及药材市场,所有样品详细信息见表1,小檗皮药材、混淆品黄柏药材、藏成药照片见图2。

表1 所用药材及藏成药信息

Table 1 Medicinal materials and Tibetan patent medicine used in this study

编号	代号	名称	来源
1	GS	甘肃小檗 <i>B. kansuensis</i>	青海省泽库县麦秀乡
2	SY	匙叶小檗 <i>B. verna</i>	甘肃省夏河县达麦店村
3	XH	鲜黄小檗 <i>B. diaphana</i>	甘肃省合作市
4	CHZ	刺红珠 <i>B. dictyophylla</i>	云南省香格里拉县四村乡
5	Xbp-1	小檗皮	甘肃省夏河县王格尔塘镇
6	Xbp-2	小檗皮	青海省大通县
7	Xbp-3	小檗皮	甘肃省卓尼县地利村
8	Xbp-4	小檗皮	甘肃省卓尼县刀告乡
9	Xbp-5	小檗皮	四川省甘孜州德格县藏医院
10	Xbp-6	小檗皮	四川省甘孜州白玉县藏医院
11	Xbp-7	小檗皮	四川省阿坝州藏医院
12	Xbp-8	小檗皮	青海省门源县
13	Xbp-9	小檗皮	青海省同仁县曲库乎乡
14	Xbp-10	小檗皮	甘肃省临潭县术布乡
15	Xbp-11	小檗皮	甘肃省卓尼县
16	Xbp-12	小檗皮	西藏自治区食品药品检验所
17	Xbp-13	小檗皮	西藏自治区山南雍布拉康藏药厂
18	Xbp-14	小檗皮	青海省某藏医院
19	Xbp-15	小檗皮	云南省迪庆州藏医院
20	Xbp-16	小檗皮	云南香格里拉县机场路边
21	BBJ	八味小檗皮胶囊(批号 20190502)	青海久美藏药药业有限公司
22	BBS	八味小檗皮散(批号 20211202)	昌都加卡尼伟藏医康复医院
23	SWJH	四味姜黄汤散(批号 20220520)	阿坝州藏医院藏医药研究所

1~4-4种小檗皮基原植物 5~20-小檗皮待测药材 21~23-待测藏成药

1—4-four different original plants of *Berberis Cortex* 5—20-the tested medicinal materials of *Berberis Cortex* 21—23-the tested Tibetan patent medicine



图2 小檗皮、黄柏药材以及待测藏成药

Fig. 2 *Berberis Cortex*, *Phellodendri Chinensis Cortex* and Tibetan patent medicine to be tested

1.2 试剂与仪器

LifeTouch 型基因扩增仪 (杭州博日科技股份有限公司), DYY-6C 型电泳仪电源 (北京六一生物科技有限公司), JY04S-3C 型凝胶电泳成像系统 (北京君意东方电泳设备有限公司), H1650-K 型台式微量高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), S1010 型掌上离心机 (SCILOGEX), XW-80A 型旋涡混合器 (上海驰唐电子有限公司), ThermoCell MixingBlock 型振荡恒温金属浴 (杭州博日科技股份有限公司), ZF-90 型多功能暗箱式紫外透射仪 (上海宝山顾村光电仪器厂)。

EasyTaq DNA 聚合酶 (货号: AP111) 购自北京全式金生物技术有限公司。Marker (货号 B500350)、琼脂糖 (A620014)、10 mmol/L dNTP Mixture Solution (B500056) 和 50×TAE 缓冲液 (B548101) 均购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 50X TAE 缓冲液使用前用 H₂O 稀释成 1×的工作液。Goldview I 型核酸染料 (货号: G8140) 购于北京索莱宝科技有限公司。SYBR Green I 核酸染料 (货号: S7563) 购于 Invitrogen, 使用前用 DMSO 稀释成 500×的工作液。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成并纯化 (HAP 纯化), 超纯灭菌水溶解, -20 °C 保存。植物基因组 DNA 提取试剂盒 (货号: DE-06111) 购于成都福际生物技术有限公司。

2 方法

2.1 DNA 的提取

取药材或藏成药样品适量, 研磨均匀后分别置于 1.5 mL 离心管中, 采用植物 DNA 提取试剂盒提取样品 DNA, 利用超微量紫外可见分光光度计测定 DNA 提取液的浓度和纯度, 并用通用引物对成药 DNA 模板的质量进行检验。DNA 提取液置于 -20 °C 保存备用。

2.2 ITS2 序列扩增及检测

将 4 种小檗皮基原植物和黄柏的 DNA 提取物用 ITS2 序列的通用引物^[21]S2F (5'-ATGCGAT-ACTTGGTGTGAAT-3') 和 S3R (5'-GACGCTT-CTCCAGACTACAAT-3') 进行 PCR 扩增。反应总体积为 25 μL, 包括 10×buffer 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 引物各 1 μL, *EasyTaq* 0.5 μL, DNA 提取液 1 μL, 加灭菌水补足 25 μL。藏成药扩增体系总体积仍为 25 μL, 其中将 DNA 提

取液增加至 2 μL。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 90 s; 95 °C 变性 10 s, 55 °C 复性 10 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环。反应结束后取各 PCR 产物 5 μL, 与 1 μL 6×DNA 上样缓冲液混合后点样, 在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 200 V 电压下电泳 8 min, 在凝胶成像仪下观察并采集图像, 出现明亮清晰的条带即为扩增成功, 将扩增成功的 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行双向测序。

2.3 特异性引物的设计

利用 LaserGene 软件中 Megalign 对测序得到的 4 种小檗皮及混淆品黄柏的 ITS2 序列进行分析, 根据序列对比结果找出其稳定变异位点, 采用 Primer Premier 5.0 软件设计出能够扩增 4 种小檗皮药材的特异性引物, 同时经过 BLAST 发现, 小檗属植物的序列相似度极高, 本实验设计的引物也可以扩增同属的其他多种小檗皮, 即可应用于其他同属小檗皮药材的鉴定。

2.4 VPCR 荧光可视化检测体系的建立

以“2.1”项下制备的 DNA 作为模板, 采用小檗皮特异性引物进行 VPCR 扩增, 反应总体积为 25 μL, 包括 10×buffer 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL, 引物各 1 μL, *EasyTaq* 0.5 μL, DNA 5 μL, 加灭菌水补足 25 μL。VPCR 反应体系: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 0.1 s, 55 °C 复性 0.1 s, 35 个循环。反应结束后取各 PCR 产物 5 μL, 与 1 μL 6×DNA 上样缓冲液混合后点样, 在 2% 的琼脂糖凝胶上进行电泳, 200 V 电压下电泳 8 min, 在凝胶成像仪下观察并采集图像; 荧光可视化检测则直接向 PCR 产物中加入 1 μL 500×SYBR Green I 型荧光染料, 混匀, 在 365 nm 紫外光下观察并拍照记录。

3 结果与分析

3.1 序列对比以及特异性引物的设计

4 种基原植物和黄柏测序所得序列与 GenBank 中所登记序列一致, 且对比结果显示 4 种小檗皮之间的序列差异较小, 但是与混淆品黄柏序列差异较大, 比对结果如图 3 所示。利用 Primer Premier 5.0 软件, 结合引物设计原则, 设计出能够同时扩增 4 种小檗皮, 但不能扩增黄柏的特异性引物 XBPa-F (5'-CCTAAATGATGGCCTCGA-3') 和 XBPa-R (5'-ACAAGGGTTTGTACAGCT-3'), 引物扩增后片段大小为 112 bp。



图3 小檗皮主流品种和黄柏的 ITS2 序列分析

Fig. 3 Sequence alignments of ITS2 from main varieties of *Berberis Cortex* and *Phellodendri Chinensis Cortex*

3.2 VPCR 荧光可视化检测体系的建立以及特异性考察

利用“2.4”项下的方法对我国使用的4个小檗皮主流品种（匙叶小檗、鲜黄小檗、甘肃小檗、刺红珠）以及常见的混淆品黄柏的基因组DNA进行扩增和检测，建立VPCR荧光可视化检测体系，同时考察体系的特异性。实验结果如图4所示，4种小檗皮在112 bp处可出现清晰明亮的特异性扩增条带，黄柏样品不出现扩增条带；在荧光检测图中，只有4种小檗皮样品发出绿色荧光，黄柏样品不出现荧光，表明VPCR荧光检测体系特异性良好，结果直观，可以明确区分小檗皮及常见混淆品黄柏。

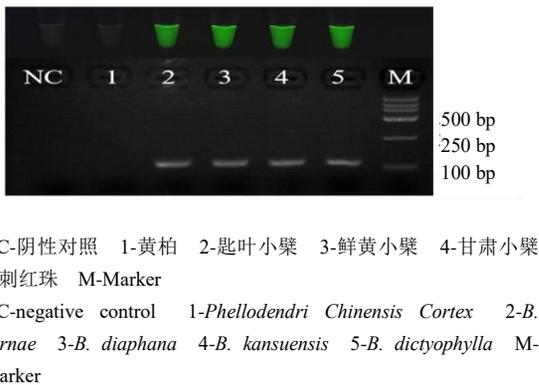


图4 VPCR 荧光可视化检测体系的特异性考察
Fig. 4 Specificity results of VPCR fluorescence visible detection system

3.3 VPCR 荧光可视化检测体系的灵敏度考察

将等量的4种小檗皮DNA提取液充分混匀，稀释成不同质量浓度的提取液，利用小檗皮特异性引物分别对质量浓度为1~1×10⁴ pg/μL的小檗皮DNA提取液进行VPCR荧光检测，检测结果如图5所示，当模板质量浓度为100~1×10⁴ pg/μL时，凝胶电泳图中出现清晰扩增条带，荧光检测图中出现绿色荧光，当DNA模板浓度降至10 pg/μL时，有较暗条带产生，荧光检测图中也出现较浅的绿色荧光，所以该体系的灵敏度为10 pg/μL。

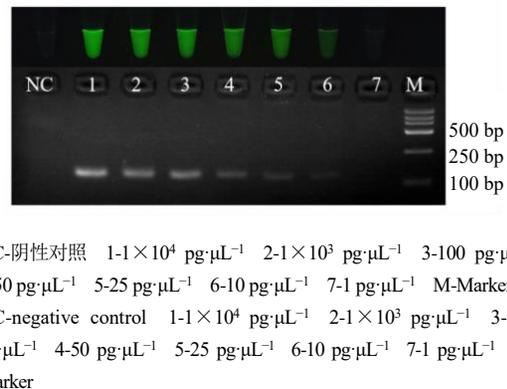
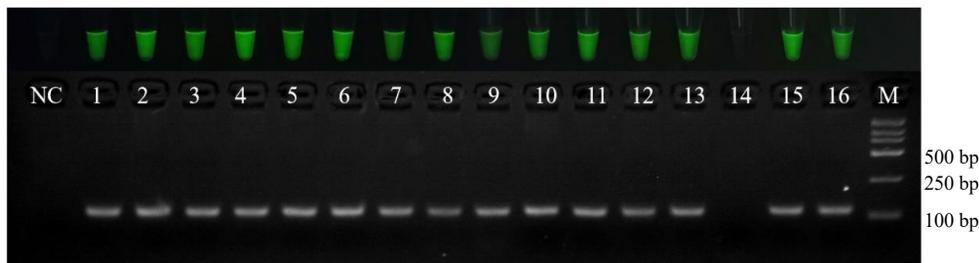


图5 VPCR 荧光可视化检测体系的灵敏度考察
Fig. 5 Sensitivity results of VPCR fluorescence visible detection system

3.4 真实样本检测结果

利用所建立的小檗皮 VPCR 荧光可视化检测体系对来自甘肃、青海、四川、云南、西藏的 16 个批次小檗皮药材进行真伪鉴定，鉴定结果如图 6 所示，除 14 号样本以外，其余 15 个样本在电泳图中均出现明显清晰的扩增条带，在荧光检测图中出现明显的绿色荧光。为验证检测结果的准确性，按照

“2.2”项下操作利用 ITS2 通用引物对所有样本的基因组 DNA 进行扩增，并将得到的 PCR 产物进行测序，测序结果显示 14 号样本的 ITS2 序列与数据库中黄柏序列 (MN966484.1) 一致，判断 14 号样本为黄柏，其余扩增产物测序结果均与小檗皮序列一致。上述结果表明所建立的 VPCR 荧光可视化检测体系具有较高的准确性，可以应用于小檗皮药材的真伪鉴别。



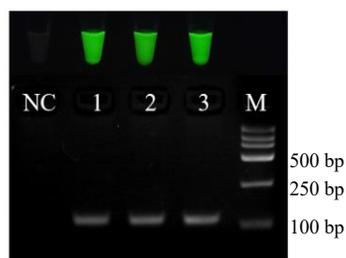
NC-阴性对照 1~16-小檗皮待测样本 M-Marker
NC-negative control 1-16-the tested medicinal materials of *Berberis Cortex* M-Marker.

图 6 待测样本检测结果

Fig. 6 Amplification and fluorescent results of 16 *Berberis Cortex* by specific primers

3.5 藏成药 DNA 质量评价

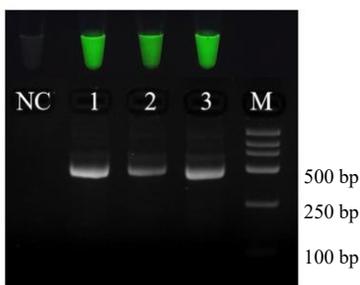
将“2.1”项下提取的藏成药 DNA 采用 ITS2 通用引物 (S2F/S3R) 进行 PCR 反应，检测藏成药的 DNA 质量。PCR 产物凝胶电泳结果 (图 7) 显示，这 3 种藏成药均在 500 bp 处有清晰明亮的扩增条带；荧光检测图中 3 种藏成药也均显示出明显的绿色荧光，说明本实验提取出的藏成药 DNA 均可以用于分子鉴别。



NC-阴性对照 1-BBJ 2-BBS 3-SWJH M-Marker
NC-negative control 1-BBJ 2-BBS 3-SWJH M-Marker

图 8 小檗皮特异性引物扩增 3 种藏成药

Fig. 8 Amplification and fluorescent results of three Tibetan patent medicine using specific primers



NC-阴性对照 1-BBJ 2-BBS 3-SWJH M-Marker
NC-negative control 1-BBJ 2-BBS 1-SWJH M-Marker

图 7 ITS2 通用引物扩增 3 种藏成药

Fig. 7 Amplification and fluorescent results of three Tibetan patent medicine using ITS2 universal primers

3.6 藏成药中小檗皮原料药的真伪鉴别

利用所建立的小檗皮 VPCR 荧光可视化检测体系对藏成药基因组 DNA 进行扩增和检测，检测结果如图 8 所示，3 个样本在电泳图中均出现明显

清晰的扩增条带，在荧光检测图中均出现明显的绿色荧光。上述结果表明，所建立的检测方法可以成功地检测出藏成药八味小檗皮胶囊、八味小檗皮散和四味姜黄汤散中的小檗皮原料药。

4 讨论

小檗皮品种多样，基原复杂，且资源有限，大宗中药材黄柏与小檗皮药材的外形均为黄色或鲜黄色，性状十分相似，所以药材市场上常出现以黄柏掺入小檗皮混用的情况，严重影响了药材的质量和临床疗效。药材的混用还会导致藏成药中原料药的混用，藏成药均为多味药制成，化学成分复杂，药材经过粉碎加工，其本身的性状已难以辨别，所以藏成药中原料药的真伪鉴别比原药材的真伪鉴别更

加困难。本研究通过对小檗皮特异性 DNA 进行检测可以实现对小檗皮药材以及藏成药中原料药的真伪鉴别, 研究结果显示该方法具有较高的特异性、准确性和灵敏度。值得一提的是, 藏成药中的药材多以粉末形式入药, 本研究使用的藏成药均不涉及提取物入药, 所以可以轻松提取到足够量的 DNA 用于后续检测。如涉及以提取物形式入药的成药, 药材 DNA 损失较大, 还需要对其 DNA 提取和富集方式进行考察和优化, 方能实现成药中原料药 DNA 的检测。

PCR 技术是病原微生物检测、遗传疾病诊断、物种分类中最常用的检测技术之一, 传统的 PCR 扩增方法需要在 3 个或 2 个特定的温度点保持一定的停留时间, 整个操作需要 60~70 min, 本研究利用课题组自主研发的超快速 VPCR 技术对小檗皮特异性 DNA 进行扩增, 扩增时间可缩短至 30 min 左右。由于本研究采用的 PCR 扩增仪配置较低, 升降温速度较慢 (平均升降温速率约为 1.6 °C/s), 所以扩增时间较长, 如采用升降温速率更快的 PCR 扩增仪, 扩增时间可进一步降低至 15~20 min。在扩增产物的检测方面, 传统的凝胶电泳法耗费时间较长且操作繁琐, 本研究利用 SYBR Green I 染料可与双链 DNA 结合发出绿色荧光的原理, 实现了检测产物的可视化分析, 使得检测结果更加直观, 提高了检测效率。综上, 本研究建立了小檗皮药材以及藏成药中小檗皮的快速可视化鉴别方法, 对小檗皮的真伪鉴定提供了科学的技术手段, 有利于药材及藏成药的质量控制和评价, 同时本研究所用的方法为药材的分子鉴定提供了技术参考, 也可以推广到其他品种的中药与民族药。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 宇妥·元丹贡布. 四部医典 [M]. 马世林, 罗达尚, 毛继祖, 王振华译. 上海: 上海科学技术出版社, 1987: 23.
- [2] 罗达尚. 中华藏本草 [M]. 北京: 民族出版社, 1997: 84-85.
- [3] 张燕, 孟宪丽, 岳丽珺, 等. 藏药小檗皮对糖尿病模型小鼠血糖水平影响的初步研究 [J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(19): 3619-3622.
- [4] Bhardwaj D, Kaushik N. Phytochemical and pharmacological studies in genus *Berberis* [J]. *Phytochem Rev*, 2012, 11(4): 523-542.
- [5] 艾小鹏, 王小博, 王小艳, 等. 基于代谢组学的小檗皮对 STZ 诱导糖尿病大鼠肾病的保护机制研究 [J]. 中药药理与临床, 2019, 35(2): 67-73.
- [6] 徐鑫梅, 杜欢, 易欢, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS 代谢组学技术筛选不同基原小檗皮品种鉴别的指标性成分 [J]. 中草药, 2022, 53(23): 7524-7531.
- [7] 中华人民共和国卫生部药品标准. 藏药. [S]. 第一册, 1995: 340.
- [8] 李艳. 藏药小檗皮 DNA 条形码鉴定及质量控制研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2016.
- [9] 吴艳, 刘佳, 王梦月, 等. 海龙及其常见伪品的 RAPD 鉴别 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(14): 1758-1760.
- [10] 阚萌萌, 王恒, 康东建, 等. 新疆荒地阿魏遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 中草药, 2017, 48(10): 2100-2104.
- [11] 蒲婧哲, 张亚中, 朱夜琳, 等. 基于物种特异性 PCR 方法的鸡内金真伪鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 142-147.
- [12] 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.
- [13] 朱林, 蒲婧哲, 张亚中, 等. PCR-RFLP 法对蛇胆川贝散中川贝母的鉴别研究 [J]. 淮海医药, 2017, 35(6): 719-722.
- [14] 崔占虎, 蒋超, 袁媛, 等. 6 种成药中原料药材金银花的分子鉴别研究 [J]. 包头医学院学报, 2014, 30(1): 1-3.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 263.
- [16] Chen R, Ding S, Wei Y H, et al. Ultrafast identification of *Pinelliae Rhizoma* using colorimetric direct-VPCR [J]. *3 Biotech*, 2021, 11(12): 493.
- [17] Chen R, Lu X, Li M, et al. Polymerase chain reaction using “V” shape thermal cycling program [J]. *Theranostics*, 2019, 9(6): 1572-1579.
- [18] 陈蓉, 余佳文, 徐瑞超, 等. 虎掌南星超快速 Real-time VPCR 闭管检测方法的建立及应用 [J]. 中草药, 2021, 52(18): 5722-5728.
- [19] 蒋超, 侯静怡, 黄璐琦, 等. 快速 PCR 方法在金银花真伪鉴别中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(19): 3668-3672.
- [20] 魏艺聪, 袁媛, 陈建雄, 等. 快速 PCR 法鉴别鱼腥草与百部还魂的方法研究 [J]. 中草药, 2016, 47(12): 2163-2166.
- [21] 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.

[责任编辑 时圣明]