

引用:雷庆,赵中开,金昊嵩.多重荧光定量PCR法同时定量检测金银花中山银花的研究[J].中医药导报,2025,31(11):45-50.



多重荧光定量PCR法同时定量检测 金银花中山银花的研究*

雷 庆,赵中开,金昊嵩
(自贡检验检测院,四川 自贡 643000)

[摘要] 目的:建立一种同时定量检测金银花中4种山银花的方法。方法:采用多重荧光定量PCR仪,分别利用金银花和山银花种源灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬特异性核酸的引物和探针检测金银花中混合的山银花成分,通过定量标准曲线计算5种植物物种的DNA浓度。结果:采用本方法分别建立了金银花、灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬的实时荧光定量PCR检出限和定量标准曲线。结论:该方法稳定、可靠、专属性强,能在一个实时荧光定量PCR仪反应体系中同时、快捷、准确地检测出金银花中4种山银花种源的DNA成分。

[关键词] 金银花;山银花;实时荧光定量PCR;快速检测

[中图分类号] R286.0 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)11-0045-06

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.11.008

Study on Simultaneous Quantitative Detection of Lonicerae Flos in Lonicerae Japonicae Flos Using Multiplex Fluorescence Quantitative PCR

LEI Qing, ZHAO Zhongkai, JIN Haosong

(Zigong Inspection and Testing Institute, Zigong Sichuan 643000, China)

[Abstract] Objective: To establish a method for simultaneously quantifying four species of Lonicerae Flos in Lonicerae Japonicae Flos. Methods: Using multiplex fluorescent quantitative PCR, species-specific primers and probes for Lonicera japonica flos and four Lonicera flos species (*Lonicera macranthoides*, *Lonicera hypoglauca*, *Lonicera confusa*, and *Lonicera fulvotomentosa*) were employed to detect mixed Lonicera flos components in Lonicera japonica flos. DNA concentrations of the five plant species were calculated via quantitative standard curves. Results: Real-time fluorescent quantitative PCR detection limits and quantitative standard curves were established for *Lonicera japonica flos*, *Lonicera macranthoides*, *Lonicera hypoglauca*, *Lonicera confusa*, and *Lonicera fulvotomentosa*. Conclusion: This method is stable, reliable and highly specific, and it enables the simultaneous, rapid, and accurate quantitative detection of DNA from four *Lonicera flos* species in *Lonicera japonica flos* within a single real-time fluorescent quantitative PCR reaction system.

[Keywords] *Lonicerae japonicae flos*; *Lonicerae flos*; real-time fluorescent quantitative PCR; rapid identification

金银花和山银花来源不同,金银花来源为忍冬科植物忍冬的干燥花蕾或带初开的花,山银花来源为忍冬科植物灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬或黄褐毛忍冬的干燥花蕾或带初开的花^[1]。金银花性寒而山银花性热,金银花用于清热解毒、通经活络,而山银花则在某些方面与其功效完全相反^[2-4]。金银花中含有较多的木樨草苷,而山银花几乎不含。这些药

性和成分的差别也会导致二者药用功效不同^[5-7]。金银花的一大用途是做注射液原料。目前临床用量很大的双黄连注射液、清开灵注射液,都以金银花做原料。以灰毛毡忍冬为代表的山银花富含皂苷,而皂苷有溶血风险^[8-9]。自2005年版《中华人民共和国药典》将山银花作为单个药材列出后^[10],由于金银花价格昂贵且山银花与金银花形状特征十分相似,市场上常有

*基金项目:四川省药品监督管理局药品科技计划项目(2022014)

用山银花假冒或混淆金银花的现象^{[1]-[3]}。按照传统标准方法鉴别具有较大困难^{[4]-[5]}。目前《中华人民共和国药典》鉴别山银花与金银花的主要方法为性状及液相色谱法,性状鉴别易受采收加工及炮制方法的影响,同时性状鉴别对检验人员专业能力及经验水平要求较高;液相鉴别方法主要是根据化学成分的差异进行鉴别,成本较高且耗时较长^{[6]-[8]}。因此,为保证临床用药安全,有必要建立快速、准确、稳定的补充鉴别方法。本研究的目的在于使用多重实时荧光定量PCR技术^[9],对药材的核酸提取物采用特异性引物和探针在一个反应池中能准确鉴定出4种山银花种源成分。另外,本研究通过分别制作金银花、灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬的实时荧光定量标准曲线,开展实时荧光定量PCR检测,通过循环数计算出DNA浓度^{[20]-[22]}。

1 材料与方法

1.1 药材 金银花(样品编号:JYH-1,产地:山东省)、灰毡毛忍冬(样品编号:HJM-1,产地:湖南省)、红腺忍冬(样品编号:HX-1,产地:广西省)、华南忍冬(样品编号:HN-1,产地:广西省)和黄褐毛忍冬(样品编号:HHM-1,产地:贵州省)均由成都中医药大学提供,经林琪宇副主任中药师鉴定为正品。

1.2 主要仪器 全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司,型号:JXFSTPRP-32);冷冻离心机(湖南湘仪离心机有限公司,型号:H2050R-1);荧光定量PCR仪(瑞士罗氏公司,型号:LightCycler96);超微量分光光度计(北京凯奥科技发展有限公司,型号:K5800);各种量程移液器(英国吉尔森公司)。

1.3 主要试剂 磁珠法植物基因组提取试剂盒(批号:Y1105)、去离子水(DNase/RNase-Free Deionized Water)(批号:S8129)、Multi PCR Kit多重PCR扩增试剂盒(批号:Y1320)均购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.4 引物探针序列 从Gene Bank中查找相关物种的核酸序列,采用Primer Express 5.0软件设计金银花、灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬的特异性引物、探针。所有引物、探针的合成与标记均由北京擎科生物技术有限公司完成,实时荧光PCR引物和探针序列见表1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物探针序列

名称	序列(5' → 3')	引物长度/bp
内参引物上游	TCAACTCTATGTATTCCCTATCCGTAG	28
内参引物下游	ACAAAGATAGTTATAATCGTTAGCACC	29
内参探针	FAM-TACATTGAATCTACAGAAATG-MGB	21
金银花引物上游	GTTTCAAGAAAATTTAAGAAAATGAG	29
金银花引物下游	TTACTATTCGGTAAATCCGATC	25
金银花探针	CY5-TCTTTTACTTCTTAT-MGB	19
红腺忍冬引物上游	GGTTAAAAAACCAAATCATCTTCC	25
红腺忍冬引物下游	TAAAAGCTCCTCGCACAAATCG	22
红腺忍冬探针	HEX-CCTTTGAACTTGTACATT-MGB	22
华南忍冬引物上游	CTTGTCATTTAACAGTTGCT	25
华南忍冬引物下游	GGTGATTTATTACAATAATTCAACAGA	31
华南忍冬探针	TEXAS RED-AATTGCACTAATGATAA-MGB	17
灰毡毛忍冬引物上游	TAAGAAAAGGAGGATTAAGATGCAAG	26

续表1:

名称	序列(5' → 3')	引物长度/bp
灰毡毛忍冬引物下游	CATGCCGCCAAATTGATACA	20
灰毡毛忍冬探针	FAM-CGTACTCCAGAAAA-MGB	14
黄褐毛忍冬引物上游	AAAATTGTTATTTCTCATCCACC	26
黄褐毛忍冬引物下游	GTGATAAGAGAAAAACATTTCCGC	24
黄褐毛忍冬探针	CY5-TTACAAATAAGATC-MGB	18

注:内参引物用于5种植物源性成分检测。

1.5 DNA的提取及浓度、纯度的测定 采用磁珠法提取金银花、灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬的DNA,步骤如下:(1)取组织约50 mg(干重),加入液氮充分研磨;(2)将研磨好的粉末迅速转移到预先装有400 μL缓冲液GPM和5 μL RNase A(10 mg/mL)的离心管中,迅速颠倒混匀后,将离心管放在70 °C水浴60 min,水浴过程中颠倒离心管以混合样品数次;(3)13 400×g离心4 min,转移300 μL上清至新的离心管中;(4)加入300 μL缓冲液GHB,300 μL异丙醇和15 μL磁珠悬浮液G,振荡混匀;(5)室温放置5 min;(6)将离心管放置于磁力架上静置1 min,待磁珠完全吸附时小心去除液体;(7)将离心管从磁力架上取下,加入500 μL去蛋白液RD(使用前已加入无水乙醇),振荡混匀30 s;(8)将离心管放置于磁力架上静置30 s,磁珠完全吸附后,小心吸去液体;(9)加入600 μL漂洗液PWB,振荡混匀30 s;(10)将离心管放置于磁力架上静置30 s,磁珠完全吸附后,小心吸去液体;(11)重复步骤(9)和(10)1次;(12)将离心管于磁力架上,室温晾干10~15 min;(13)将离心管从磁力架上取下,加入75 μL洗脱缓冲液TB,振荡混匀,置于65 °C孵育3 min;(14)将离心管放置于磁力架上静置1 min,磁珠完全吸附后,小心将DNA溶液转移至一个新离心管中,-20 °C保存备用。用超微量分光光度计测量260 nm和280 nm处的吸光度A260和A280,以A260/A280的比值确定DNA的纯度并计算其浓度。

1.6 多重实时荧光PCR反应体系与条件 通过预试验筛选出最佳的引物和探针浓度。q-PCR反应体系为:Premix Ex Taq (Probe qPCR) (2X) 10 μL,4种山银花物种上游引物(10 μmol/L)各0.7 μL,4种物种下游引物(10 μmol/L)各0.7 μL,4种探针各0.6 μL,模板1 μL,超纯无菌水1 μL,反应总体积为20 μL。反应液配制在冰上完成。设定反应条件为95 °C预变性5 min;95 °C 15 s,55 °C 30 s,40个循环。

1.7 有效性检测 金银花和山银花中的红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的核酸提取物作为阳性对照,以灭菌超纯水作为空白对照。按照“1.6”的程序进行内参检测,每个反应设置2次平行。以出现荧光典型扩增曲线且Ct值≤35为阳性反应,无荧光典型扩增曲线为阴性反应。

1.8 特异性检测 金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的核酸提取物分别用金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的特异性引物和探针经PCR反应体系进行扩增,进行专属性验证。

1.9 检出限的确定 将采用磁珠法提取的金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬DNA溶液进行连续10倍稀释,制成原液含量为1%、0.1%、0.01%、0.001%、0.000 1%

的梯度稀释液,然后进行实时荧光PCR扩增。

1.10 山银花的多重实时荧光PCR检测 红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬分别按1:1:1:1的比例进行混合后按“1.5”的方法提取DNA,提取后采用“1.6”所述方法对混合样品进行多重荧光PCR检测,每个反应设置2次平行。

1.11 定量标准曲线的制作 将金银花的目的基因标准质粒稀释制成 3.33×10^0 copies/ μL ,加灭菌双蒸水进行10倍梯度稀释,制备5个浓度的质粒DNA溶液(浓度1: 3.33×10^8 copies/ μL 、浓度2: 3.33×10^7 copies/ μL 、浓度3: 3.33×10^6 copies/ μL 、浓度4: 3.33×10^5 copies/ μL 、浓度5: 3.33×10^4 copies/ μL)。将红腺忍冬的目的基因标准质粒稀释制成 9.15×10^{10} copies/ μL ,加灭菌双蒸水进行10倍梯度稀释,制备5个浓度的质粒DNA溶液(浓度1: 9.15×10^9 copies/ μL 、浓度2: 9.15×10^8 copies/ μL 、浓度3: 9.15×10^7 copies/ μL 、浓度4: 9.15×10^6 copies/ μL 、浓度5: 9.15×10^5 copies/ μL)。将华南忍冬的目的基因标准质粒稀释制成 1.86×10^{10} copies/ μL ,加灭菌双蒸水进行10倍梯度稀释,制备5个浓度的质粒DNA溶液(浓度1: 1.86×10^7 copies/ μL 、浓度2: 1.86×10^6 copies/ μL 、浓度3: 1.86×10^5 copies/ μL 、浓度4: 1.86×10^4 copies/ μL 、浓度5: 1.86×10^3 copies/ μL)。将灰毡毛忍冬的目的基因标准质粒稀释制成 2.56×10^{10} copies/ μL ,加灭菌双蒸水进行10倍梯度稀释,制备5个浓度的质粒DNA溶液(浓度1: 2.56×10^8 copies/ μL 、浓度2: 2.56×10^7 copies/ μL 、浓度3: 2.56×10^6 copies/ μL 、浓度4: 2.56×10^5 copies/ μL 、浓度5: 2.56×10^4 copies/ μL)。将黄褐毛忍冬的目的基因标准质粒稀释制成 2.70×10^{10} copies/ μL ,加灭菌双蒸水进行10倍梯度稀释,制备5个浓度的质粒DNA溶液(浓度1: 2.70×10^7 copies/ μL 、浓度2: 2.70×10^6 copies/ μL 、浓度3: 2.70×10^5 copies/ μL 、浓度4: 2.70×10^4 copies/ μL 、浓度5: 2.70×10^3 copies/ μL)。

分别以不同稀释浓度的质粒DNA为模板进行荧光定量PCR扩增反应程序,反应条件同“1.6”,进行定量检测的检测试验。以Ct值为纵坐标,lg(质粒拷贝数)为横坐标绘制金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的标准曲线。每组重复3次,计算阳性反应的平均Ct值。

2 结 果

2.1 核酸纯度及浓度检测 经微量分光光度计260 nm和280 nm检测,金银花和4种山银花的DNA浓度在110~130 ng/ μL 的范围内,A260/A280的比值均在1.8~1.9范围内,均能保证后续实时荧光PCR实验的要求。(见表2)

2.2 有效性检测 5种药材(金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬)所提取的DNA进行内参荧光检测后,均出现荧光扩增曲线,Ct值均小于35,空白对照无扩增曲线,

说明提取的DNA适用于实时荧光PCR扩增。(见表3)

表2 金银花和4种山银花DNA的浓度和纯度 ($\bar{x} \pm s$)

药材名称	n	浓度/(ng/ μL)	A260/A280
金银花	3	123.2±3.9	1.80±0.08
红腺忍冬	3	124.6±5.9	1.80±0.13
华南忍冬	3	119.5±5.1	1.85±0.10
灰毡毛忍冬	3	114.6±3.4	1.84±0.11
黄褐毛忍冬	3	117.2±3.3	1.81±0.13

表3 5种药材核酸提取物的有效性检测结果

样本名称	内参检测结果
金银花	阳性
红腺忍冬	阳性
华南忍冬	阳性
灰毡毛忍冬	阳性
黄褐毛忍冬	阳性
空白对照(H_2O)	阴性

2.3 特异性检测 将金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的核酸提取物分别用金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬引物探针的PCR反应体系进行扩增,特异性结果见表4。5种样品提取的核酸经金银花反应体系检测后,仅金银花产生了“S”型荧光扩增曲线;5种样品提取的核酸经红腺忍冬反应体系检测后,仅红腺忍冬产生了“S”型荧光扩增曲线;5种样品提取的核酸经华南忍冬反应体系检测后,仅华南忍冬产生了“S”型荧光扩增曲线;5种样品提取的核酸经灰毡毛忍冬反应体系检测后,仅灰毡毛忍冬产生了“S”型荧光扩增曲线;5种样品提取的核酸经黄褐毛忍冬反应体系检测后,仅黄褐毛忍冬产生了“S”型荧光扩增曲线。

2.4 检出限检测 以制备好的金银花和山银花中红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬DNA样本作为模板,按“1.7”的方法,进行实时荧光PCR扩增。当DNA样本稀释浓度为0.01%及以下时,Ct值大于35;当DNA样本稀释浓度为0.1%及以上时,均有明显扩增曲线且Ct值小于35。因此确定0.1%作为本方法的检出限。

2.5 多重实时荧光PCR检测 红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的混合样品(比例1:1:1:1)进行多重实时荧光PCR检测后的结果表明,4种山银花均能在多重实时荧光PCR反应体系的对应荧光信号通道中产生Ct值≤35的典型荧光扩增曲线。表明能成功采用多重荧光实时PCR方法在一个反应体系里面同时检测出红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬混合成分。(见表5、图1~4)

表4 5种药材核酸提取物的特异性检测结果

药材名称	金银花探针(cy5)检测结果	红腺忍冬探针(hex)检测结果	华南忍冬探针(texas red)检测结果	灰毡毛忍冬探针(fam)检测结果	黄褐毛忍冬探针(cy5)检测结果
金银花	阳性	阴性	阴性	阴性	阴性
红腺忍冬	阴性	阳性	阴性	阴性	阴性
华南忍冬	阴性	阴性	阳性	阴性	阴性
灰毡毛忍冬	阴性	阴性	阴性	阳性	阴性
黄褐毛忍冬	阴性	阴性	阴性	阴性	阳性

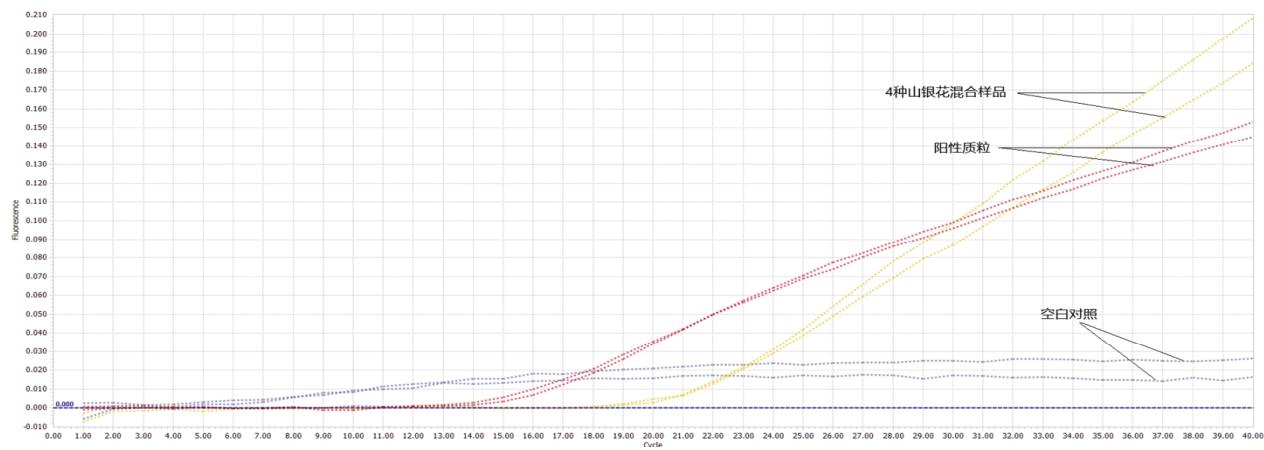


图1 多重实时荧光PCR检测混合样品中红腺忍冬的荧光扩增曲线

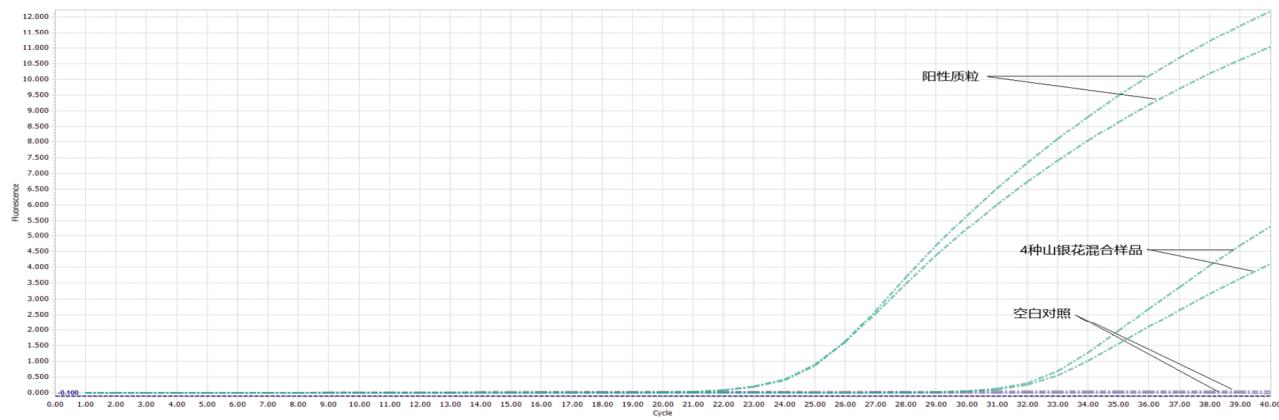


图2 多重实时荧光PCR检测混合样品中华南忍冬的荧光扩增曲线

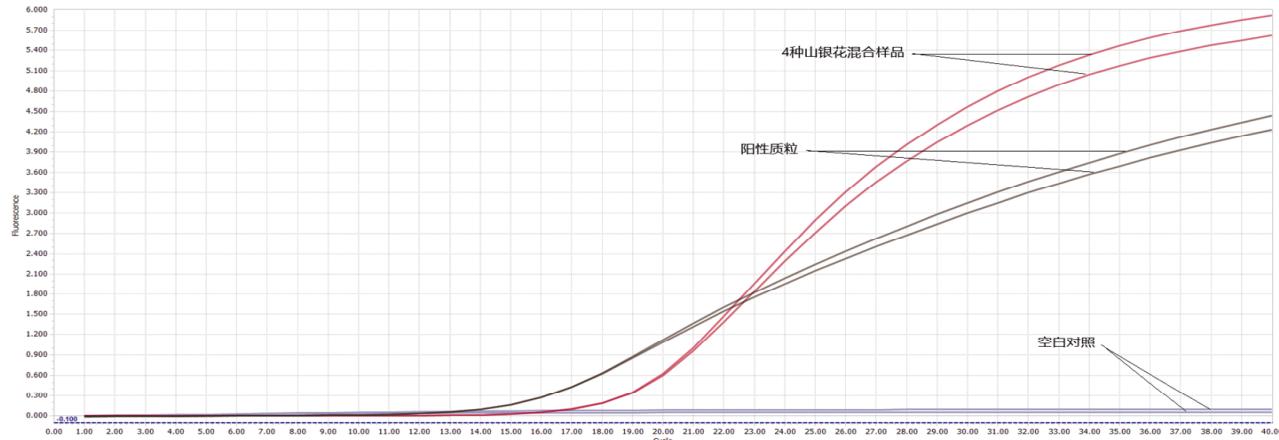


图3 多重实时荧光PCR检测混合样品中灰毡毛忍冬的荧光扩增曲线

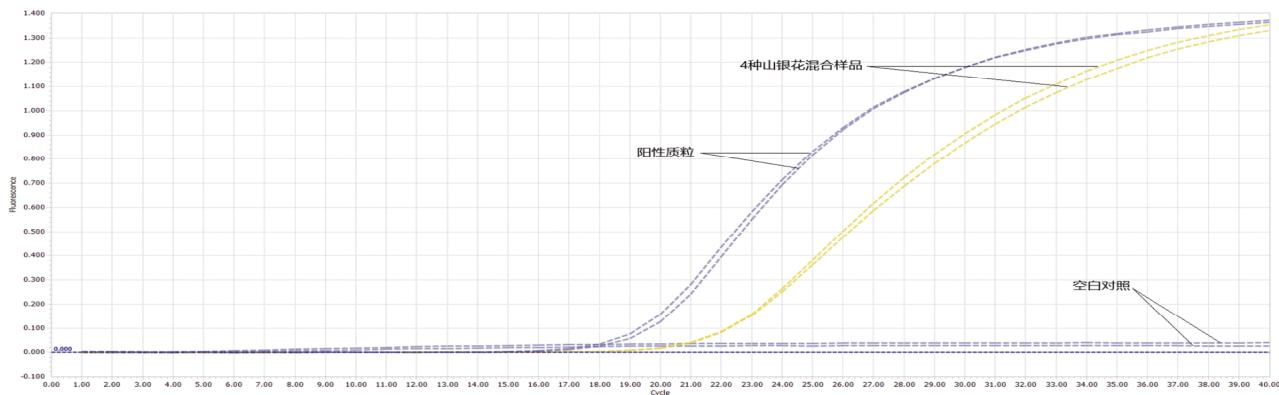


图4 多重实时荧光PCR检测混合样品中黄褐毛忍冬的荧光扩增曲线

表5 山银花混合样品的多重实时荧光PCR检测结果

检测靶标	平均Ct值
红腺忍冬(Hex)	22.04
华南忍冬(Texas Red)	30.08
灰毡毛忍冬(FAM)	15.98
黄褐毛忍冬(Cy5)	21.26

2.6 定量标准曲线的制作结果 金银花和4种山银花的5个浓度目的基因标准质粒DNA溶液的荧光定量PCR试验结果见表6。

表6 金银花和4种山银花的实时荧光定量检测结果

样本名称	不同浓度DNA质粒的平均Ct值				
	浓度1	浓度2	浓度3	浓度4	浓度5
金银花	13.69	17.09	20.43	24.31	27.48
红腺忍冬	10.57	13.84	17.10	20.19	23.38
华南忍冬	15.10	18.60	21.89	25.07	28.28
灰毡毛忍冬	13.48	16.82	20.27	23.93	27.19
黄褐毛忍冬	16.56	20.01	23.61	26.89	29.84

本研究使用 ΔCt 法进行相对定量,质粒DNA浓度的对数值与其对应的Ct值呈线性关系,以Ct值为纵轴、质粒DNA浓度的对数值为横轴得到回归方程,由试验结果得出:金银花的实时荧光定量PCR的标准曲线方程为: $y=-3.4814x+43.3070$, $R^2=0.9992$,图5为该标准曲线;红腺忍冬的实时荧光定量PCR的标准曲线方程为: $y=-3.1978x+42.4750$, $R^2=0.9999$,图6为该标准曲线;华南忍冬的实时荧光定量PCR的标准曲线方程为: $y=-3.2826x+39.0820$, $R^2=0.9996$,图7为该标准曲线;灰毡毛忍冬的实时荧光定量PCR的标准曲线方程为: $y=-3.4547x+42.4780$, $R^2=0.9997$,图8为该标准曲线;黄褐毛忍冬的实时荧光定量PCR的标准曲线方程为: $y=-3.3453x+41.5520$, $R^2=0.9987$,图9为该标准曲线。 y 为Ct值, x 为lg(质粒DNA拷贝数),求得 x 值后再计算出DNA拷贝数。因此,可通过将样本提取DNA后荧光定量检测的Ct值代入标准曲线的公式中,计算得到药材提取的核酸溶液中金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的目的基因定量检测结果。以上研究结果表明,金银花、红腺忍冬、华南忍冬、灰毡毛忍冬和黄褐毛忍冬的引物和探针在目的基因定量检测方面具有较好的检测能力。

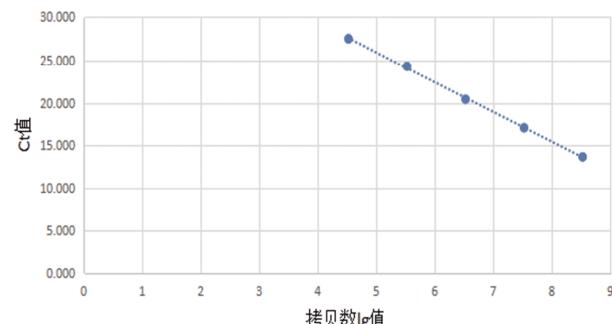


图5 金银花目的基因定量检测标准曲线

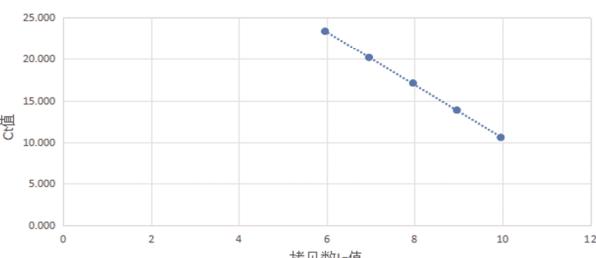


图6 红腺忍冬目的基因定量检测标准曲线

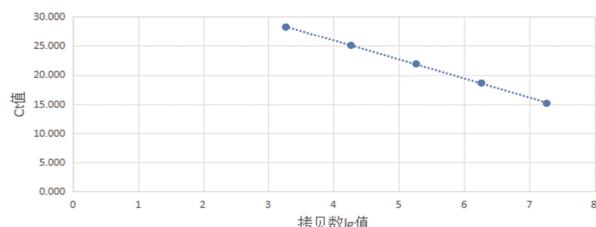


图7 华南忍冬目的基因定量检测标准曲线

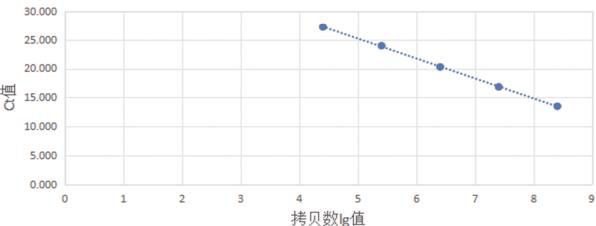


图8 灰毡毛忍冬目的基因定量检测标准曲线

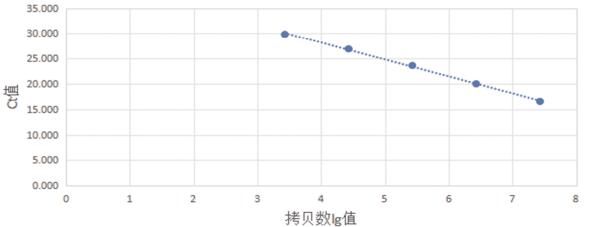


图9 黄褐毛忍冬目的基因定量检测标准曲线

3 讨论

由于金银花价格昂贵,市场上常有用山银花假冒或混淆金银花的现象。两者虽然在药理作用上有一定共性,但在某些药理作用上两者还是有一定差异,如山银花中存在致敏反应的皂苷成分,而金银花中皂苷则不会导致过敏反应^[23-24]。目前《中华人民共和国药典》虽已有金银花与山银花的鉴别方法,但该方法检测灵敏度较低,成本高,对检验人员专业技术水平要求较高,不利于广泛快速筛查。因此为保证临床用药安全,建立快速、简便、灵敏度好的检测方法是十分必要的。本研究建立了能对金银花和山银花(灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬)的核酸进行准确高效提取的方法,提取到了适用于实时荧光定量的DNA。本研究通过软件设计出了5个物种用于实时荧光定量PCR的特征性引物和探针,并合成了引物和4种添加不同荧光标记信号的探针产品。本研究使用实时荧光定量PCR技术,采用5种引物探针组经实时荧光PCR反应体系后分别成功检出金银花和山银花(灰毡毛忍冬、红腺忍冬、华南忍冬和黄褐毛忍冬)成分,同时分别研究出了5个物种的检出限和目的基因定量标准曲线。与传统理化鉴别方法相比,本研究的TaqMan探针法特异性好、灵敏度高,不仅可以鉴别药材及饮片,还可以鉴别金银花制剂

中原料药材的真伪。由于药材生产加工、运输中,不同原料或产品间存在交叉污染的可能性,且分子鉴定技术的方法有极高的灵敏度^[25],因此,不能离开定量而简单定性,避免误判。

本研究采用多重荧光定量PCR技术,能在一个反应体系中一次性成功检测出山银花的所有种源,全过程大约2 h。该方法和传统方法相比不但节省了检测原料及试剂成本,还大大缩短了检测时间^[26],特别是为涉及金银花掺假的食品药品安全应急执法检测提供了较为可靠且快捷的补充方法。

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,2015:30–31,221.
- [2] 张志美,郭时金,付石军,等.金银花活性成分及药理作用研究进展[J].家畜生态学报,2013,34(6):89–91.
- [3] 郑义,陈晓兰,丁宁,等.金银花和山银花有效成分测定及比较分析[J].甘肃农业大学学报,2015,50(4):170–174,180.
- [4] 欧水平,张文志,陈灵.金银花与山银花抗病毒酚酸类和黄酮类成分的差异性研究[J].中国药房,2015,26(33):4750–4752.
- [5] 胡律江,罗江南,郭慧玲,等.金银花和山银花差异性比较[J].江西中医药大学学报,2019,31(5):120–124.
- [6] 李文沛,俸婷婷,周英.金银花、山银花药效与安全性研究[J].山地农业生物学报,2018,37(4):89–94.
- [7] 郭娅,王文婷,何世新.银翘解毒丸中山银花替代金银花投料掺假研究[J].海峡药学,2022,34(11):44–47.
- [8] 王立伟,徐达,安丽娜,等.金银花及其制剂中掺伪山银花的快速鉴别研究[J].中国药业,2019,28(1):39–44.
- [9] 杨倩茹,赵媛媛,郝江波,等.金银花与山银花化学成分及其差异的研究进展[J].中国中药杂志,2016,41(7):1204–1211.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典—一部[M].北京:化学工业出版社,2005:21–22,152–153.
- [11] 成差群,谭秀芬,钟碧莲.金银花和山银花的鉴别与归属[J].中国地方病防治杂志,2017,32(6):686–687.
- [12] 高珊,郭月秋,刘斯亮.现时金银花与山银花比较鉴别分析[J].中国医药科学,2017,7(1):52–55,154.
- [13] 姜军华,吴良发,许妍,等.小儿咽扁颗粒中掺伪山银花检验方法研究[J].中国药事,2023,37(4):443–449.
- [14] 张泽帅,裴洁荣,叶瑞平,等.非线性化学振荡指纹图谱法鉴别金银花、山银花及其混合品[J].中成药,2023,45(6):2067–2072.
- [15] 林永强,王淑华,徐丽华,等.金银花与山银花的鉴别方法研究[J].药学研究,2013,32(2):69–71.
- [16] 伍婷,杜家会,李振斌,等.金银花与山银花现代鉴别方法研究概况[J].中国民族民间医药,2022,31(15):61–64.
- [17] 罗姣姣,李旭东,赵豆豆,等.GC-MS指纹图谱技术结合多元统计分析对“银花”类药材的鉴定[J].化学研究与应用,2024,36(5):990–996.
- [18] 梁巧文,欧阳美子,陈波,等.忍冬属药材金银花与山银花的微性状和显微鉴别的差异比较[J].海峡药学,2023,35(7):29–32.
- [19] 龚美蓉,陈凤丽,曹晨,等.实时荧光定量PCR技术及其在中医药研究中的应用[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(22):238–241.
- [20] 齐大明,董诚明,刘天亮,等.基于指纹图谱对金银花与山银花的区别及各品种金银花质量评价[J].中草药,2023,54(6):1946–1952.
- [21] 安钢力.实时荧光定量PCR技术的原理及其应用[J].中国现代教育装备,2018(21):19–21.
- [22] 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.
- [23] 李倩,陈燕,窦霞,等.金银花、山银花、川银花化学成分及药理作用研究进展[J].中国民族民间医药,2023,32(15):67–72.
- [24] 韦晶玥,罗诗雯,冯龄燃,等.金银花与山银花活性成分抗炎作用及机制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2024,30(11):273–281.
- [25] 时圣明,潘明佳,王洁,等.分子鉴定技术在中药中的应用[J].中草药,2016,47(17):3121–3126.
- [26] 刘霞宇,陈亮,乔永刚,等.金银花花器官实时荧光定量PCR内参基因的筛选[J].山西农业科学,2017,45(4):514–517.

(收稿日期:2025-04-01 编辑:罗英姣)

(上接第25页)

- [23] 杨永琴,申剑,王帅哲,等.补天大造丸干预早期卵巢功能不全大鼠免疫功能的作用机制[J].中医药导报,2025,31(6):49–54,66.
- [24] 程成,张晶,朱柯璇,等.基于“八脉隶乎肝肾”理论探讨张晶治疗早发性卵巢功能不全经验[J].中医药导报,2025,31(6):186–188,200.
- [25] 李艳华,薛晓鸥,李颖,等.补肾疏肝法联合五行音乐对抑郁型小鼠卵巢储备功能的影响[J].中医学报,2021,36(9):1980–1984.

- [26] 史薇,银雪梅,王智超,等.新加苁蓉菟丝子汤通过调控AMPK/SIRT1信号通路对卵巢储备功能减退大鼠线粒体功能的影响[J].中成药,2023,45(10):3221–3227.
- [27] 史薇,刘敏,王智超,等.新加苁蓉菟丝子汤含药血清对雷公藤甲素诱导下人卵巢颗粒细胞线粒体能量代谢、氧化应激及动力学的影响[J].中药材,2023,46(10):2573–2578.
- [28] 方育恩,舒蒙蒙,杨炜敏,等.针药结合辅助治疗卵巢储备功能减退的临床观察及对颗粒细胞线粒体活性的影响[J].北京中医药大学学报,2022,45(11):1168–1174.

(收稿日期:2025-05-26 编辑:罗英姣)