

## HRM 结合 DNA 条形码在苦杏仁对桃仁掺混检测中的应用

熊超<sup>1,2</sup>, 李景剑<sup>3</sup>, 孙伟<sup>2</sup>, 刘合刚<sup>1</sup>, 邬兰<sup>1,2</sup>, 刘迪<sup>1</sup>,  
胡志刚<sup>1,2\*</sup>, 陈士林<sup>1,2\*</sup>

(1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065; 2. 中药鉴定与安全性检测评估北京市重点实验室, 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 3. 华南农业大学林学与风景园林学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 桃仁为常用中药, 由于外形相似常与近缘中药材苦杏仁互混, 但苦杏仁具有小毒, 掺杂到桃仁中存在一定风险, 需谨慎用药。为控制桃仁药材质量以及安全用药, 需要建立一个可靠的检测方法来解决桃仁与伪品之间掺混的情况。本研究利用高分辨率熔解曲线技术 (high resolution melting, HRM) 结合 ITS2 序列对桃仁进行分析, 结果表明 HRM 技术不仅可以区分正品 (桃仁) 与混伪品 (苦杏仁), 而且该技术在混合样品定量检测中具有强大的优势, 苦杏仁对桃仁的掺杂检出限可以达到 1%, 其相关系数  $r=0.96$ , 且在快速识别市场桃仁药材真伪具有一定优势。本研究证明 HRM 技术操作简便、灵敏度高, 可用于桃仁药材的质量控制, 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 条形码技术有效补充。

**关键词:** 桃仁; 苦杏仁; 高分辨率熔解曲线; ITS2; 鉴定; 中药

中图分类号: R931

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 04-0647-06

## Application of HRM combined with DNA barcoding to analysis of the Armeniaca semen amarum mixed in Persicae semen

XIONG Chao<sup>1,2</sup>, LI Jing-jian<sup>3</sup>, SUN Wei<sup>2</sup>, LIU He-gang<sup>1</sup>, WU Lan<sup>1,2</sup>, LIU Di<sup>1</sup>,  
HU Zhi-gang<sup>1,2\*</sup>, CHEN Shi-lin<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Key Laboratory of Beijing for Identification and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 3. College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Persicae semen has been used for years as a traditional Chinese medicine to treat diseases. Because of their similar morphologies, Persicae semen was commonly inadvertently mixed with Armeniaca semen amarum (a toxic herbal seed). Development of a reliable method for discriminating Persicae semen from its adulterant is necessary to reduce confusion for the drug safety in clinical practices. This study evaluates the efficiency of high-resolution melting (HRM) combined with internal transcribed spacer 2 (ITS2) to analyze Persicae semen. Our findings show that HRM allows not only the identification of adulteration but also the quantification of the most common admixture. HRM sensitivity in adulterant detection was assessed through the analysis of mixing samples with different proportions of *Prunus persica* and *Prunus armeniaca* control. The results are presented as a linear regression with  $r$  of 0.96 and imply the capability of the method to detect adulteration. In particular, HRM detected seeds of *Prunus persica* in *Prunus armeniaca* at concentrations as

收稿日期: 2017-02-20; 修回日期: 2017-03-03.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项项目 (2014ZX09201021-008, 2014ZX09304307001-021).

\*通讯作者 Tel: 86-27-68890106, Fax: 86-27-68890101, E-mail: zghu0608@163.com; slchen@icmm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0152

low as 1%, and commercial products labeled as ‘Persicae semen’ were purchased from markets and could rapid authenticated by HRM analyses. This study is significant in the verification of the authenticity in the quality control of herbal medicine. In the near future, it is promising to be the main trend for identifying traditional Chinese medicinal materials.

**Key words:** Persicae semen; Armeniaca semen amarum; high resolution melting; ITS2; identification; traditional Chinese medicinal materials

2015 版《中国药典》规定桃仁为蔷薇科植物桃 *Prunus persica* (L.) Batsch 或山桃 *P. davidiana* (Carr.) Franch. 的干燥成熟种子, 具有活血祛瘀、润肠通便、止咳平喘的功效; 苦杏仁为蔷薇科植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim.、东北杏 *P. mandshurica* (Maxim.) Koehne、西伯利亚杏 *P. sibirica* L. 或杏 *P. armeniaca* L. 的干燥成熟种子, 具有降气止咳平喘、润肠通便的功效<sup>[1]</sup>。在外形上两者颇为相似, 色泽、大小均具有较高的相似度, 尤其是去皮后的桃仁和苦杏仁更加难以区分。在药效上, 两者功效亦较为相近, 但是在临床上应用范围却不同, 且两者互为混伪品。药理学研究证明苦杏仁具有小毒, 苦杏仁掺杂到桃仁中存在一定风险, 需谨慎用药<sup>[2]</sup>。因此, 建立一种准确鉴定桃仁和苦杏仁的分子鉴定体系, 以及苦杏仁对桃仁进行掺伪鉴定, 以控制桃仁的药材质量, 对桃仁以及中药材的用药安全都具有十分重要的意义。目前, 中药材鉴定技术主要依靠显微鉴定、理化鉴定及化学分析, 但是这些传统技术局限于研究人员的专业知识和主观判断, 存在一定的局限性, 因此, 迫切需要寻求一种准确、客观和快捷的新方法来解决混伪品及掺伪品的问题。

高分辨率溶解曲线 (high resolution melting, HRM) 技术作为本草基因组学的重要组成部分<sup>[3]</sup>, 是一种较为前沿的实时定量 PCR 技术<sup>[4, 5]</sup>, 在核苷酸差异检测中具有快速、灵敏和准确等突出的优点, 在基因突变、基因分型和遗传多样性等研究中发展迅速<sup>[6–10]</sup>。DNA 条形码 (DNA barcoding) 技术具有较强的通用性, 作为物种鉴定的新技术, 颇受国内外研究者关注, 近几年迅速成为物种分类和鉴定的研究热点。该技术

通过筛选确定通用条形码, 建立条形码数据库和鉴定平台进而对物种进行鉴定。中国学者通过大样本量系统性研究, 提出 internal transcribed spacer 2 (ITS2) 序列可以作为植物物种鉴别的通用条形码用于鉴定药用植物和近缘种<sup>[11]</sup>。目前以 ITS2 序列为主体的《中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则》已被纳入 2015 版《中国药典》第四部。近几年来, 国内外学者将 HRM 技术结合 DNA 条形码应用于药用植物及中成药产品鉴定, 表现出较强的鉴定能力<sup>[12, 13]</sup>。本研究运用 HRM 技术, 基于植物 DNA 条形码 ITS2 序列对苦杏仁掺桃仁进行定性、定量检测分析, 研究 HRM 技术对桃仁中药材基原物种鉴定的适用性和对苦杏仁混品定量的灵敏性, 以期对桃仁中药材及其产品真实性进行快速准确的鉴定, 为其生产过程、市场监管和临床用药安全提供科学依据和保障。

## 材料与方法

**材料** 本研究通过实地采集桃仁和苦杏仁各基原植物, 实验材料经中国中医科学院中药研究所孙伟副研究员鉴定, 凭证标本保存于湖北中医药大学药学院, 详细信息见表 1。另外从药材市场收集到 5 份桃仁药材, 并分别对其编号为 Com 1~5。

**试剂** 植物基因组 DNA 提取试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司。2× HRM PCR master mix 试剂盒购于凯杰 (德国) 生物技术有限公司。其他试剂均为国产分析纯试剂。

**样品 DNA 提取** 取桃仁和苦杏仁各基原植物叶片 30 mg, 或刮去种子外表皮取药材内部约 50 mg, 用研磨仪 (Sceintz-48, 宁波新芝) 研磨 2 min (50 次/秒)

**Table 1** Sample information and number of Persicae semen and Armeniaca semen amarum used in this study

Chinese name	Species name	Sample	Voucher number	Location
Persicae semen	<i>Prunus persica</i>	4	YC0055MT29, 30, 31; HB2544MT01	Beijing, Hubei
	<i>P. davidiana</i>	3	YC0080MT01, 02, 04	Sichuan, Tianjin
Armeniaca semen amarum	<i>P. armeniaca</i>	3	YC0428MT09, 10; HB2541MT03	Hubei, Sichuan
	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>	3	YC0582MT01, 02; FDC026	Beijing, Hebei, Tianjin
	<i>P. mandshurica</i>	3	YC0451MT02, 03, 04	Jilin
	<i>P. sibirica</i>	3	YC0583MT02, 03, 04	Beijing

后, 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (Tiangen Biotech Co., China) 提取总 DNA。采用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA) 测定 OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值及 DNA 浓度。利用 Qubit 3.0 分光光度计 (Invitrogen Co., USA) 将 DNA 浓度稀释到 50~60 ng·μL<sup>-1</sup> 并保存于 -20 °C 备用。

为了检验 HRM 方法对中药掺杂的灵敏性和可行性, 根据参考文献设计了一系列的苦杏仁对桃仁的掺杂比例, 分别为 0、1%、5%、7%、10%、15%、30%、50% 和 100%<sup>[14]</sup>。药材充分研磨成粉末状后按不同比例混合均匀, 每个比例的总量为 100 mg, 每个比例做 3 次物理重复。

**PCR 扩增** PCR 扩增和高分辨率熔解曲线分析在 Rotor-Gene Q MDx (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) 荧光 PCR 仪上进行, 反应试剂来自 QIAGEN<sup>®</sup> HRM PCR master mix 试剂盒, 序列扩增引物采用 ITS2 通用引物 (ITS2F: 5'-ATG CGA TAC TTG GTG TGA AT-3', ITS3R: 5'-GAC GCT TCT CCA GAC TAC AAT-3')。在实验过程中, 对反应体系进行了优化实验, 结果发现最佳的反应体系为 25 μL: 50~60 ng 基因组 DNA 1.0 μL, 2× HRM PCR master mix 12.5 μL, 上下游引物 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 各 1.0 μL, 补足 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL。最佳反应条件是采用 72 孔反应模块, 扩增程序为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 循环 40 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 °C 逐渐升温至 90 °C, 每 0.15 °C 收集一次荧光信号。HRM-PCR 扩增产物使用 ABI 3730XL 测序仪 (Applied Biosystems Co., USA) 进行双向测序。

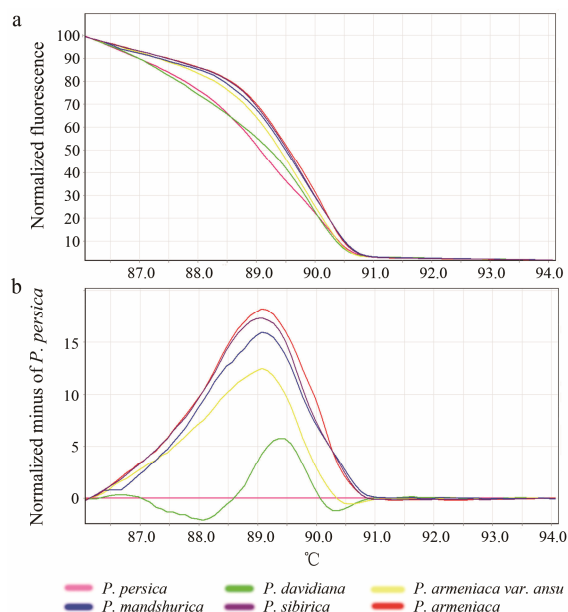
**数据分析** 高分辨率熔解曲线分析用 QIAGEN 公司的 Rotor-Gene Q (version 2.3.1.49) 软件进行。运用 CodonCode Aligner V 6.0.5 (CodonCode Co., USA) 对获得的序列进行校对拼接, 并去除低质量序列及引物区; 使用基于隐马尔可夫模型的 HMMer 注释方法<sup>[15]</sup>去除两端 5.8S 和 28S 区段, 获得 ITS2 间隔区序列。

## 结果与分析

### 1 HRM 技术在中药材桃仁和苦杏仁中的鉴定应用

图 1 (图 1a 和 1b) 显示桃仁与苦杏仁两种药材能够很好地区分开, 且桃与山桃能够分开, 但杏、西伯利亚杏、东北杏、山杏区分不为明显。标准化的随温度变化的熔解曲线 (normalized and shifted melting

curve) 可以展示分型间的差异 (图 1a), 也可派生出其他曲线形式 (normalized and temp-shifted difference plot) (图 1b) 将其间差异进行放大, 更方便观察物种及基因型间的差别。通过基因型 (genotypes) 设置, 以基原物种桃 *P. persica* 为基因型 (图 1b), 并设置基因型置信值 GCPs (genotype confidence percentages) ≥90%, 结果显示, 桃仁和苦杏仁能更为明显地鉴定区分。



**Figure 1** Melting curve profiles of amplicons obtained by HRM analysis of Persicae semen and Armeniaca semen amarum with the ITS2 type indicated. (a) Normalized melting profiles of three species with the ITS2 type indicated. (b) Difference curves of three species with one haplotype of *P. persica* as the reference genotype. Color-coded legend of species corresponded to the colors of the melting curves.

### 2 HRM 技术在苦杏仁对桃仁掺伪中的鉴定应用

经调查发现桃仁的主要来源为桃, 苦杏仁为杏, 故本文将测序获得的桃和杏的 ITS2 序列经 BLASTN 比对分析, 结果表明桃仁 (桃) 和苦杏仁 (杏) 的核苷酸序列之间存在一定的种间差异, 相似度为 95.3% (图 2)。由此可知, 尽管在形态学上两种药材基原难以区分, 但两者的 ITS2 序列的差异位点可以为进一步建立桃仁药材 HRM 鉴定方法提供依据。用 HRM 技术检测 7 个不同比例的杏与桃混合样品, 结果显示, 7 个不同比例的混合样品产生了 7 个不同的熔解曲线, 且各曲线差异显著 (图 3)。以桃 *P. persica* 设为基因型作为参照, 并设置基因型置信值 GCPs ≥90%, 与杏对桃不同比例的混合样本产生相对荧光值的差值为纵坐标而生成派生熔解曲线。图 3 结果显示, 不同

		111	111	111	122	222	222	223	333	333	333	444	444	444	455	555	555	556			
	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	
Prunus_persica	CAC	GCC	GTT	GCC	CCC	CCC	CAT	CTA	CTC	CTT	CGG	GAT	TGC	GGG	GGG	GCG	GAT	GAT	GGC	CTC	
Prunus_armeniaca	...	.T.	...	..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
		666	666	666	777	777	777	788	888	888	889	999	999	999	111	111	111	111	111	111	111
	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	
Prunus_persica	CCG	TGC	GCC	TGC	CCG	CGC	GGT	TGG	CAT	AAA	TAC	CAA	GTC	CTC	GGC	GAC	GCA	CGC	CAC	GAC	
Prunus_armeniaca	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	..G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
		111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111
	222	222	222	333	333	333	344	444	444	445	555	555	555	666	666	666	677	777	777	778	
	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	
Prunus_persica	AAT	CGG	TGG	TTG	CGA	AAC	CTC	GGT	TGC	CCG	TCG	TGT	GCG	TTC	GTC	GCG	CAT	CGA	GGG	CTC	
Prunus_armeniaca	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	G..	...	...	...	...	...	...	
		111	111	111	111	111	111	122	222	222	222	222	22								
	888	888	888	999	999	999	900	000	000	001	111	11									
	123	456	789	012	345	678	901	234	567	890	123	45									
Prunus_persica	GAA	AAA	AAT	GCT	CGG	CTC	CGG	CTC	GGC	TTT	CAA	CG									
Prunus_armeniaca	...	...	.T.	..C	G..	...	...	...	...	...	...	...									

Figure 2 Sequence alignment of *Prunus persica* and *P. armeniaca*

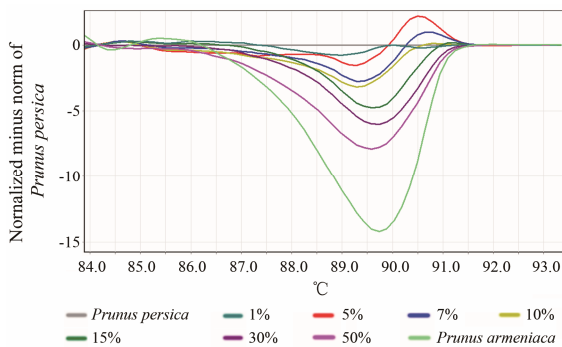


Figure 3 *Prunus persica* mixed with the adulterations of *P. armeniaca* detected by HRM analysis. Different graphs of HRM curves of the ITS2 region primer assay. HRM data are presented as graphs displaying the fluorescence of two amplicons and are applied to reference mixtures containing 1%, 5%, 7%, 10%, 15%, 30%, and 50% of seed from pure *P. armeniaca* in pure *P. persica*. The difference graph of seven proportions using *P. persica* as the reference genotype is shown. Color-coded legend of proportions corresponded to the colors of the melting curves

比例的杏与桃样品之间的基因型置信值具有一定的规律相关性，且线性回归模型相关系数为  $r=0.96$  (图 4)。根据图 3 和图 4 的结果，可以推断 HRM 技术对杏样品的最低检出限为 1%。将 HRM-PCR 产物进行 Sanger 测序后发现，混合样品的序列峰图都出现套峰现象，无法通过 DNA Barcoding 的方法进行鉴定。而 HRM 技术在混合样品检测上却具有非常高的灵敏度，通过 HRM 曲线的可视化结果可以直观判断某样品是否为混合样品，并且可以根据曲线的峰型推算出混伪品的掺入量。

### 3 HRM 技术市场收集的桃仁药材中的鉴定应用

利用 HRM 技术结合 ITS2 条形码序列对药材市场收集到的 5 份样品进行检测，检测结果如图 5 所示，研究发现 Com 1、2 曲线与山桃 *P. davidiana* 接近；

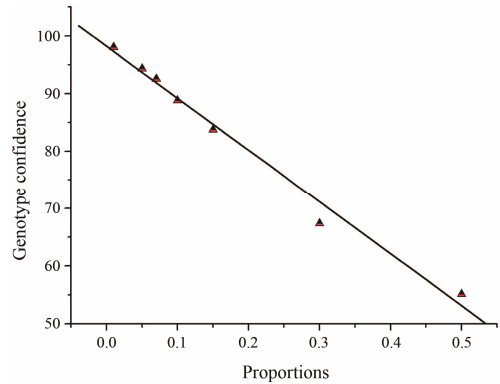


Figure 4 Pure *Prunus persica* was mixed with *P. armeniaca* in progressive proportions (1%, 5%, 7%, 10%, 15%, 30%, 50%). The results are presented as a linear regression with  $r=0.96$

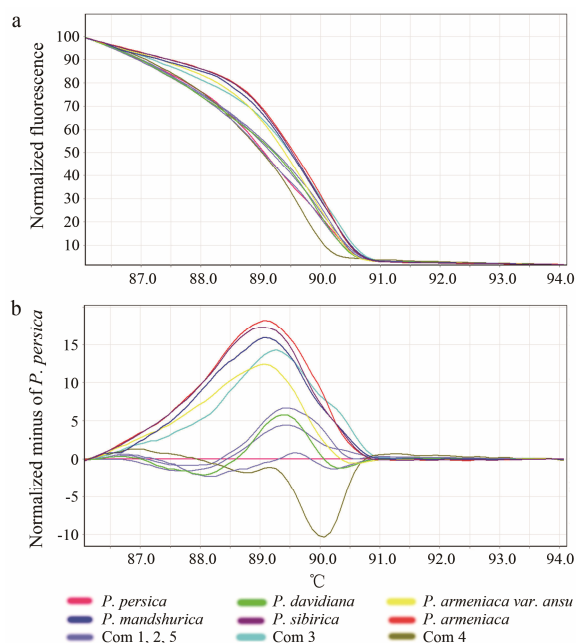
Com 5 曲线与桃 *P. persica* 接近；Com 3 曲线与东北杏 *P. mandshurica* 接近；Com 4 曲线在另一侧，没有与已知物种的曲线所对应，经测序比对发现为麦李 *P. glandulosa*。为了确保 HRM 的实验结果的准确性，将 HRM-PCR 产物进行 DNA 条形码测序验证。将获得的 ITS2 序列在中药材 DNA 条形码鉴定系统 ([www.tcmbarcodes.cn](http://www.tcmbarcodes.cn)) 和 GenBank 数据库中应用 BLAST (basic local alignment search tool) 方法进行结果判定，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，结果见表 2。比对鉴定结果表明，与 HRM 结果相吻合，从另一方面说明 HRM 技术具有快速识别正伪品、可疑物种等优势，是 DNA 条形码技术有效的补充。

### 讨论

近年来，中药中毒事件时有发生，中药准确安全使用的情况备受人们关注，DNA 条形码技术的兴起为检测中药材的替代品和掺假药材提供新的鉴定方

**Table 2** The results of ITS2 sequences in this study

Sample name	Tcmbarcode result	Similarity/%	Genbank result	Similarity/%
Com 1	<i>P. armeniaca</i>	99.6	<i>P. armeniaca</i>	99.6
Com 2	<i>P. armeniaca</i>	99.6	<i>P. armeniaca</i>	99.6
Com 3	<i>P. mandshurica</i>	98.0	<i>P. mandshurica</i>	98.0
	<i>P. armeniaca</i> var. <i>ansu</i>			
	<i>P. sibirica</i>			
Com 4	<i>P. armeniaca</i>	98.0	<i>P. armeniaca</i>	98.0
	<i>P. glandulosa</i>			
Com 5	<i>P. persica</i>	100	<i>P. persica</i>	100



**Figure 5** Melting curve profiles of amplicons obtained by HRM analysis of species of Persicae semen, Armeniaceae semen amarum and commercial herbal products with the ITS2 type indicated. (a) Normalized melting profiles of three species with the ITS2 type indicated. (b) Difference curves of three species with one haplotype of *P. persica* as the reference genotype. Color-coded legend of species corresponded to the colors of the melting curves

法。2010年, Chen等<sup>[11]</sup>对753个属的4800种植物6600份样品,7种候选DNA条形码序列(*psbA-trnH*、*matK*、*rbcL*、*rpoC1*、*ycf5*、ITS2和ITS)进行筛选,发现ITS2序列在种级水平上的鉴定率高达92.7%。ITS2序列现已被广泛应用于中草药中,例如ITS2序列能够很好地对羌活及其混伪品,以及对含有马兜铃酸等药用植物<sup>[16,17]</sup>进行准确鉴定并区分。2015版《中国药典》第四部已将以ITS2序列为主,*psbA-trnH*序列为辅作为植物类药材核心条形码序列,列入“中药材DNA条形码分子鉴定指导原则”。

DNA条形码技术对评估中国药材市场出售的中草药具有重要的潜力。药材市场出售的药材产品经常未标记或加工后难以辨认,如粉末、细小种子或其

他干燥药材,给中药鉴定带来很大困难,再如本研究中的桃仁和苦杏仁,若将两者混合后难以肉眼区分,人为或无意掺杂对中药安全用药造成极大威胁。Lin等<sup>[18]</sup>采用ITS2序列已成功对桃仁及其近缘混伪品进行鉴定区分,其中也包含苦杏仁。桃仁和苦杏仁均为《中国药典》收录的品种,同为常用药,但各自临床应用范围不同,且不可相互替换使用。而苦杏仁作为毒性药材,如果不正确使用(滥用或误用)可能会导致严重的健康问题。本研究也表明HRM技术能够提供便捷、快速、高灵敏度的方法对苦杏仁进行量化<sup>[19]</sup>,相信在不久的将来此技术也将会在中医药中广泛应用。

本文通过大量物种及样本筛选,以及不断学习和总结经验<sup>[20-22]</sup>,最终选取形态、大小、质地相近的桃仁与苦杏仁作为研究对象。HRM结果显示,桃仁和苦杏仁能够很好的区分,并可以准确鉴定到各自的物种。然而实际上,只单单采用测序往往无法识别混合样品中出现套峰的杂质,不能很好地阐明两个或多个物种共同存在而产生的套峰。HRM技术对检测桃与杏混合产生的7种不同比例的样本混合物,能够检测到其最低混合限度1:100,为以后市场药材检测提供一定的技术基础。HRM技术可以很好地补充DNA条形码,并提供一个快速识别(时间<2h)、闭管操作(操作过程无需开盖)、灵敏度高(能够识别单碱基差异)、无损样品(产物可直接测序)及低成本的检测技术,也是本草基因组学重要的组成部分。将HRM技术结合DNA条形码ITS2序列,对《中国药典》种子类药材桃仁的准确鉴定和定量将起到一定的作用,保证了药材在临床上的安全准确应用。

## References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. 2015 ed. Vol 1. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 201-278.

- [2] Ye HZ, Cai JZ. Identification and application of Armeniaceae Semen amarum and Persicae Semen [J]. Strait Pharm J, 2008, 20: 85–86.
- [3] Chen SL, Song JY. Herbage genomics [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2016, 41: 3881–3889.
- [4] Wittwer CT. High resolution DNA melting analysis: advances and limitations [J]. Hum Mutat, 2009, 30: 857–859.
- [5] Vietina M, Agrimonti C, Marmioli N. Detection of plant oil DNA using high resolution melting (HRM) post PCR analysis: a tool for disclosure of olive oil adulteration [J]. Food Chem, 2013, 141: 3820–3826.
- [6] Krypuy M, Newnham GM, Thomas DM, et al. High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer [J]. BMC Cancer, 2006, 6: 295.
- [7] Lin CY, Li MJ, Chang JG, et al. High-resolution melting analyses for genetic variants in ARID5B and IKZF1 with childhood acute lymphoblastic leukemia susceptibility loci in Taiwan [J]. Blood Cells Mol Dis, 2014, 52: 140–145.
- [8] Madesis P, Ganopoulos I, Anagnostis A, et al. The application of Bar-HRM (Barcode DNA-High Resolution Melting) analysis for authenticity testing and quantitative detection of bean crops (Leguminosae) without prior DNA purification [J]. Food Control, 2012, 25: 576–582.
- [9] Sakaridis I, Ganopoulos I, Argiriou A, et al. A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using High Resolution Melting (HRM) analysis [J]. Meat Sci, 2013, 94: 84–88.
- [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: 245–254.
- [11] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. PLoS One, 2010, 5: e8613.
- [12] Osathanunkul M, Madesis P, De BH. Bar-HRM for authentication of plant-based medicines: evaluation of three medicinal products derived from *Acanthaceae* species [J]. PLoS One, 2015, 10: e0128476.
- [13] 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: e0138888.
- [14] Ganopoulos I, Madesis P, Tsafaris A. Universal ITS2 barcoding DNA region coupled with high-resolution melting (HRM) analysis for seed authentication and adulteration testing in leguminous forage and pasture species [J]. Plant Mol Biol Rep, 2012, 30: 1322–1328.
- [15] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S–28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. Gene, 2009, 430: 50–57.
- [16] Xin TY, Yao H, Luo K, et al. Stability and accuracy of the identification of *Notopterygii Rhizoma et Radix* using the ITS/ITS2 barcodes [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2012, 47: 1098–1105.
- [17] Wu L, Sun W, Wang B, et al. An integrated system for identifying the hidden assassins in traditional medicines containing aristolochic acids [J]. Sci Rep, 2015, 5: 11318.
- [18] Lin YH, Liu X, Hu ZG, et al. Molecular identification of *Persicae semen* and its sibling species based on ITS2 sequence [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术-中医药现代化), 2013, 15: 429–434.
- [19] Bosmali I, Ganopoulos I, Madesis P, et al. Microsatellite and DNA-barcode regions typing combined with High Resolution Melting (HRM) analysis for food forensic uses: a case study on lentils (*Lens culinaris*) [J]. Food Res Int, 2012, 46: 141–147.
- [20] Chen K, Jiang C, Yuan Y, et al. High resolution melting and its application in traditional Chinese medicine [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2015, 50: 1581–1588.
- [21] Li JJ, Song M, Xiong C, et al. Application of barcode high-resolution melting for rapid authentication of the medicinal plant *Psammosilene tunicoides* [J]. Biotechnol Biotechnol Equip, 2016. DOI: 10.1080/13102818.2016.1181988.
- [22] Sun W, Li JJ, Xiong C, et al. The potential power of Bar-HRM technology in herbal medicine identification [J]. Front Plant Sci, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00367.