

市售中药材冬葵子和苘麻子 ITS2 条形码鉴定

高 婷¹, 辛天怡², 宋洁洁¹, 宋经元^{2*}

1. 青岛农业大学生命科学学院, 山东省高校植物重点实验室, 山东 青岛 266109

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 中草药物质基础与资源利用教育部重点实验室, 北京 100193

摘要: 目的 利用 ITS2 条形码序列对市售中药材冬葵子、苘麻子进行分子鉴定, 以保证药材使用的正确性和临床药效。方法 收集冬葵子、苘麻子及其 3 种混伪品样品共 87 份。对实验样品进行 ITS2 基因片段扩增并双向测序, 利用 HMMer 注释方法获得 ITS2 序列, 再经 CodonCode Aligner 6.0.2 拼接, 使用 MEGA6.0 进行种内、种间变异分析, 遗传距离计算并构建 NJ 系统发育树; 将所得序列转换成二维码图片, 扫描识读后通过中药材 DNA 条形码数据库进行验证。结果 冬葵子和苘麻子外观形态相似; 冬葵子 ITS2 序列长度 232 bp, GC 量为 67.6%; 苘麻子 ITS2 序列长度 231 bp, GC 量为 54.1%, 二者均无种内变异。冬葵子和苘麻子 ITS2 序列比对后长度为 233 bp, 共存在 50 个变异位点。鉴定结果显示, 收集的 56 份冬葵子药材中 26 份均为苘麻子, 剩余 30 份为正品。冬葵子和苘麻子与其他 3 个混伪品的 K2P 遗传距离为 0.224~0.868, 平均距离为 0.630, 种间遗传距离远大于种内遗传距离。基于 ITS2 序列构建系统发育树可见冬葵子、苘麻子及其 3 个混伪品各自单独聚成一支, ITS2 序列能够明显将其区分; 此外, 使用二维 DNA 条形码扫描可准确验证 5 个物种。结论 ITS2 序列能够成功鉴定冬葵子、苘麻子及其常见混伪品, 为种子类药材鉴别提供了新工具; 二维码技术与 DNA 条形码技术的结合可以为药材的基原物种提供准确唯一的二维 DNA 条形码信息, 可更好实现药材市场的信息化监管。

关键词: 冬葵子; 苘麻子; ITS2; 二维码; DNA 条形码鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)13-2740-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.13.024

Identification of *Malvae Semen* and *Abutili Semen* using ITS2 DNA barcode

GAO Ting¹, XIN Tian-yi², SONG Jie-jie¹, SONG Jing-yuan²

1. Key Laboratory of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China

2. Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine, Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Ministry of Education, Beijing 100193, China

Abstract: **Objective** To discriminate *Malvae Semen*, *Abutili Semen* and other common adulterants using ITS2 barcode, then guarantee the quality and clinical effect of these medical materials. **Methods** A total of 87 samples comprising *Malvae Semen*, *Abutili Semen* and three common adulterants (*Astragali Complanati Semen*, *Semiaquilegiae Radix* and *Daturae Metelis Semen*) were collected. Genomic DNA sequences were extracted from the samples. ITS2 sequences were amplified and sequenced bi-directionally. These sequences were assembled using CodonCode Aligner 6.0.2. The variable sites, genetic distance and neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree were calculated using MEGA 6.0 in accordance with the kimura 2-parameter (K2P) model. The obtained sequences were transformed into chromatic barcode images and two-dimensional DNA barcode. ITS2 sequences were verified after scanning and reading two-dimensional codes based on DNA barcode system. **Results** The recognition difficulty between *Malvae Semen* and *Abutili Semen* was expanded with a lot of similarities on the morphological properties. The length of ITS2 sequences of *Malvae Semen* and *Abutili Semen* were 232 and 231 bp, respectively. The GC content of *Malvae Semen* and *Abutili Semen* were 67.6% and 54.1%. The intra-specific K2P distances of these two crude drugs were both zero. The length of aligned sequences was 233 bp, and there were 50

收稿日期: 2016-12-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81373922); 山东省自然科学基金高校联合专项资助项目 (ZR2013HL021); 山东省高等学校科技计划项目 (J14LE13)

作者简介: 高 婷 (1982—), 女, 硕士生导师, 副教授, 研究方向为药用植物分子生物学。Tel: (0532)86080640 E-mail: gt_kelly@163.com

*通信作者 宋经元 Tel: (010)57833199 E-mail: jysong@implad.ac.cn

mutation sites between *Malvae Semen* and *Abutili Semen* sequences. The identification results showed that 26 samples were *Abutili Semen* and 30 samples were *Malvae Semen* in 56 samples of *Malvae Semen* collected. The inter-specific K2P distances were 0.224—0.868. The average inter-specific K2P distance was 0.630. The minimum inter-specific K2P distances were all larger than the minimum intra-specific distances. NJ tree of ITS2 regions could divide those five species obviously. Those five species could also be correctly verified using the ITS2 two-dimensional codes. **Conclusion** ITS2 sequence barcode is able to identify *Malvae Semen*, *Abutili Semen* and other three common adulterants. It provides the important molecular evidence for the identification of those seed Chinese medicines. The combination of two-dimensional code technology and DNA barcode provide accurate and unique two-dimensional DNA barcode information for the original species of medicinal herbs, it can better realize the information supervision of Chinese medicinal materials market.

Key words: *Malvae Semen*; *Abutili Semen*; ITS2; two-dimensional codes; DNA barcode identification

冬葵子和苘麻子为市售传统药材。《中国药典大辞典》1935 年版将苘麻子、冬葵子列为 2 种药材, 但随后《中国药典》等均把冬葵子列为苘麻子的别名^[1], 直到《中国药典》1995 年版又将二者分别收编。《北京市中药饮片调剂规程》2011 年版^[2]规定: 临床应用苘麻子时, 不应再写“冬葵子”, 而应写“苘麻子”。《中国药典》2015 年版规定苘麻子 *Abutili Semen* 为锦葵科植物苘麻 *Abutilon theophrasti* Medicus 的干燥成熟种子; 冬葵果为同科植物冬葵 *Malva verticillata* L. 的干燥成熟果实^[3], 冬葵子 *Malvae Semen* 为冬葵的干燥成熟种子。冬葵子和苘麻子均有清热功效, 但冬葵主利尿、消肿; 苘麻偏重于解毒、利湿、退翳, 2 味药材在临床疗效上存在一定差异, 不能混用^[4-6]。但在实际应用中, 苘麻子代替冬葵子的现象广泛存在。此外, 天葵子和沙苑子及有毒的风茄子都曾作为二者的混伪品出现^[7-9]。这些成熟的种子外观类似, 难于区别, 严重影响冬葵子、苘麻子的药材品质和疗效。

对于冬葵子和苘麻子的传统鉴别主要集中在性状鉴定、显微鉴定、化学指纹图谱及理化鉴定方面^[10-12]。传统鉴定需要较高的专业技术知识, 且受主观因素影响较大。DNA 条形码鉴定技术具有简捷便利、准确高效、重复性好、易于推广和标准化等诸多优势^[13], 为快速区分中药材及其种子种苗^[14]提供了可能。该技术近些年发展迅速并形成了标准化, 《中国药典》2015 年版已收载“中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则”作为中药材质量控制的新方法^[15]。ITS2 条形码序列在物种水平上突变位点多, 已被证实对当归、重楼、金线莲、北沙参等多种不同药用植物物种具有较高的区分度^[16-19]。但到目前为止, 对冬葵子、苘麻子的条形码鉴定研究未见报道。本研究拟利用 ITS2 条形码序列对市售种子类药材冬葵子、苘麻子及其常见混伪品进行区别鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究自山东、河北、江苏、重庆等地区的不
同药店共收集冬葵子、苘麻子药材样本 58 份。同时, 收集混伪品风茄子基原植物洋金花 *Datum metel* L. 样本 5 份, 混伪品沙苑子基原植物扁茎黄芪 *Astragalus complanatus* R. Brown. 样本 1 份。采集的基原植物经中国医学科学院药用植物研究所林余霖副研究员鉴定。另从 GenBank 下载 ITS2 序列: 冬葵子、苘麻子共 4 条, 混伪品沙苑子、风茄子、天葵子[基原植物天葵 *Semiaquilegia adoxoides* (DC.) Mak.] 共 19 条(表 1)。下载的序列均通过 DNA 条形码鉴定网站(www.tcmbarcode.cn)对其进行验证^[20]。

1.2 方法

1.2.1 样品鉴定 观察种子的形态特征并拍照记录。取药材干燥种子用酒精棉擦拭消毒, 用刀片将种子切成两片, 称取 50 mg 左右, 用高通量组织球磨仪(30 次/s)研磨 2~4 min。使用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒提取样品总 DNA, 进行 PCR 扩增及产物测序。具体操作步骤参考“中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则”^[15,20]。

1.2.2 数据分析 应用 CodonCode Aligner V 6.0.2 软件对测序峰图进行校对拼接。得到的序列使用 HMMer 方法进行注释, 切除两端的 5.8 S 和 28 S 区段得到 ITS2 间隔区序列。将各单倍型 ITS2 序列提交至 GenBank 获得序列号, 如与 GenBank 已有序列一致则不提交。使用 MEGA6.0 进行序列分析, 计算种内种间遗传距离(Kimura 2-Parameter, K2P), 基于比对相似度的算法构建 NJ 系统邻接树, bootstrap 1 000 次重复, 枝上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ 。基于编写代码将所得的 DNA 条形码序列转化为彩色条形码图片, 将其及相应物种拉丁名基于开源代码 PHPQR Code 编码方式转换成二维码图片, 再通过不同移动终端的二维码扫描软件对其进行识读鉴定^[21]。

表 1 样品信息

Table 1 Sample information of five species

样本编号	样本量	购买时药材名	鉴定结果	采样地点	序列号
YD01~YD05	5	冬葵子	冬葵子	山东青岛	—
YD08~YD12	5	冬葵子	冬葵子	山东济南	—
YD13~YD19	7	冬葵子	冬葵子	河北唐山	—
YD53~YD56	4	冬葵子	冬葵子	重庆	—
YD32~YD34	3	冬葵子	冬葵子	江苏无锡	—
YD35~YD40	6	冬葵子	冬葵子	北京	—
YD57	1	—	冬葵子	GenBank	EF419487
YD41~YD52	12	冬葵子	苘麻子	北京	—
YD20~YD28	9	冬葵子	苘麻子	河北唐山	—
YD29、YD30	2	冬葵子	苘麻子	湖北武汉	—
YD06、YD07	2	冬葵子	苘麻子	山东青岛	—
YD31	1	冬葵子	苘麻子	江苏无锡	—
YQ01、YQ02	2	苘麻子	苘麻子	河北唐山	—
YQ03~YQ05	3	—	苘麻子	GenBank	GQ434460, DQ006017, DQ287984
YF01	1	—	风茄子	北京	GQ434671
YF02	1	—	风茄子	福建莆田	GQ434672
YF03~YF05	3	—	风茄子	广西南宁	JN24431~JN24433
YF06~YF07	2	—	风茄子	GenBank	JX467604, KF055237
YS01	1	—	沙苑子	北京	GU217602
YS02~YS15	14	—	沙苑子	GenBank	KM588073, EU591995, AF521950, U50501, KT163379, KT163380, KT163382~KT163388, KR082765
YT01~YT03	3	—	天葵子	GenBank	DQ410731, JX233770, EF437123

2 结果与分析

2.1 不同来源冬葵子、苘麻子形态和分子鉴定结果

来自不同药店的市售冬葵子、苘麻子样品经过 ITS2 序列鉴定显示收集的 2 份苘麻子药材均为药典规定的基原植物苘麻；收集的 56 份冬葵子药材中有 30 份为《中国药典》2015 年版规定的基原植物冬葵，但其余 26 份均为苘麻子的基原植物苘麻。

形态观察显示，冬葵子为扁平菊瓣状，直径 1.5~2.0 mm，外被棕黄的包壳（果皮），去除果皮后种子为棕褐色；苘麻子呈三角状肾形，长 3.5~6.0 mm，宽 2.5~4.5 mm，表面为灰黑色或暗褐色，被白色绒毛，与文献描述一致^[3,10]。如图 1 所示，二者形态相似，大小有微小差异，肉眼可以辨别但具有一定难度，易出现偏差。

2.2 ITS2 序列特征和种内、种间差异

本研究中冬葵子共 31 条 ITS2 序列，长度均为 232 个碱基，GC 量均为 67.6%；苘麻子共 31 条 ITS2 序列，长度均为 231 个碱基，GC 量均为 54.1%。二



图 1 冬葵子 (A) 和苘麻子 (B) 的形态特征

Fig. 1 Morphological features of *Abutili Semen* (A) and *Malvae Semen* (B)

者均只有 1 个单倍型，种内均未发现变异位点。冬葵子和苘麻子 ITS2 序列比对后长度为 233 bp，共存在 50 个变异位点（图 2）。冬葵子、苘麻子及其 3 个混伪品天葵子、沙苑子、风茄子的 ITS2 序列长度范围为 212~232 bp，比对后序列长度为 242 bp，存在信息位点 152 个，变异位点 176 个。

2.3 遗传距离分析

冬葵子与苘麻子的种内各 ITS2 序列 K2P 遗传距离均为 0。5 个物种的种间遗传距离值见表 2。同科植物冬葵子与苘麻子种间平均遗传距离最小为 0.224，

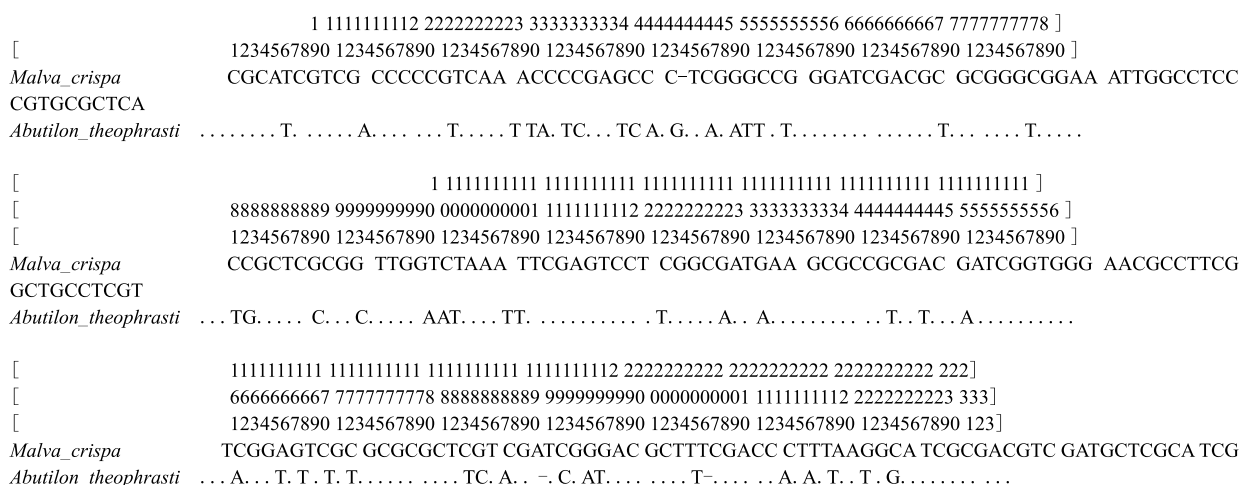


图 2 苘麻子和冬葵子的 ITS2 序列比对结果

Fig. 2 Sequence alignment of *Abutilon Semen* and *Malvae Semen* in ITS2 region

表 2 正伪品的种间 K2P 遗传距离

Table 2 Interspecific K2P distances of five species

种间遗传距离	最大值	最小值	平均值
冬葵子与苘麻子	0.224	0.224	0.224
冬葵子与沙苑子	0.720	0.643	0.652
冬葵子与天葵子	0.730	0.713	0.724
冬葵子与风茄子	0.609	0.578	0.583
苘麻子与沙苑子	0.743	0.672	0.681
苘麻子与天葵子	0.875	0.853	0.868
苘麻子与风茄子	0.730	0.672	0.680

冬葵子、苘麻子与天葵子的种间平均遗传距离最大，分别为 0.724 和 0.868。种间平均遗传距离为 0.630，可以看出种间遗传距离远大于种内遗传距离。

2.4 NJ 树分析

基于冬葵子、苘麻子及相应混伪品 ITS2 序列，以锦葵科黄蜀葵 *Abelmoschus manihot* L. 的 ITS2 序列为外类群，构建系统 NJ 聚类树（图 3）。邻接树显示：不同来源的 31 个冬葵子和苘麻子序列各自聚在一支，自展支持率均达到 99%，表现为单性系。冬葵子与苘麻子为同科植物，遗传距离较小，聚得较近。

混伪品天葵子、沙苑子、风茄子也分别聚在一支，自展率高。从 NJ 树看出，基于 ITS2 的 DNA 条形码鉴定技术可以清晰地区分冬葵子、苘麻子及其常见伪品。

2.5 二维 DNA 条形码及信息交换

基于自行编写的代码将各物种的 ITS2 主导单倍型序列转换为彩色条形码图片（图 4-左），以数字表示碱基序列长度，颜色表示核苷酸种类。此外，

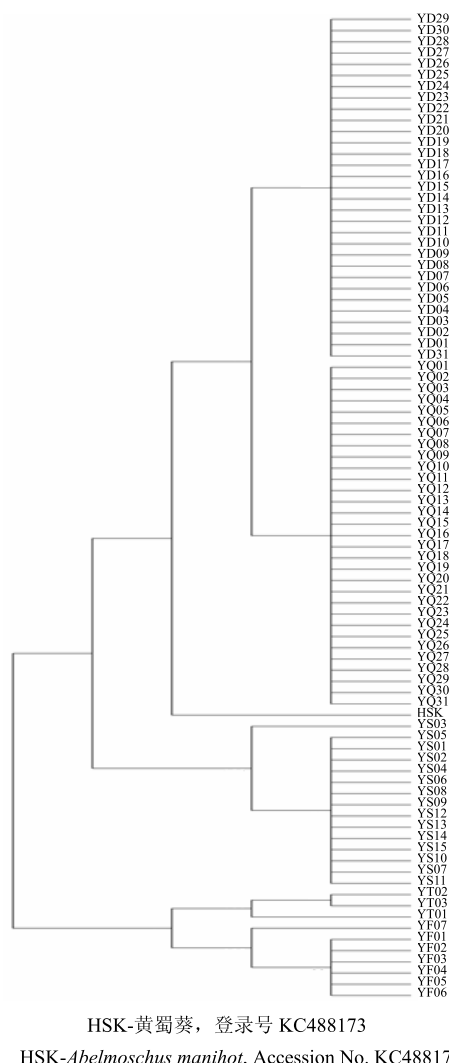


图 3 基于 ITS2 序列构建的冬葵子、苘麻子及其混伪品的 NJ 树

Fig. 3 NJ tree of *Abutilon Semen*, *Malvae Semen*, and three common adulterants based on ITS2 sequences

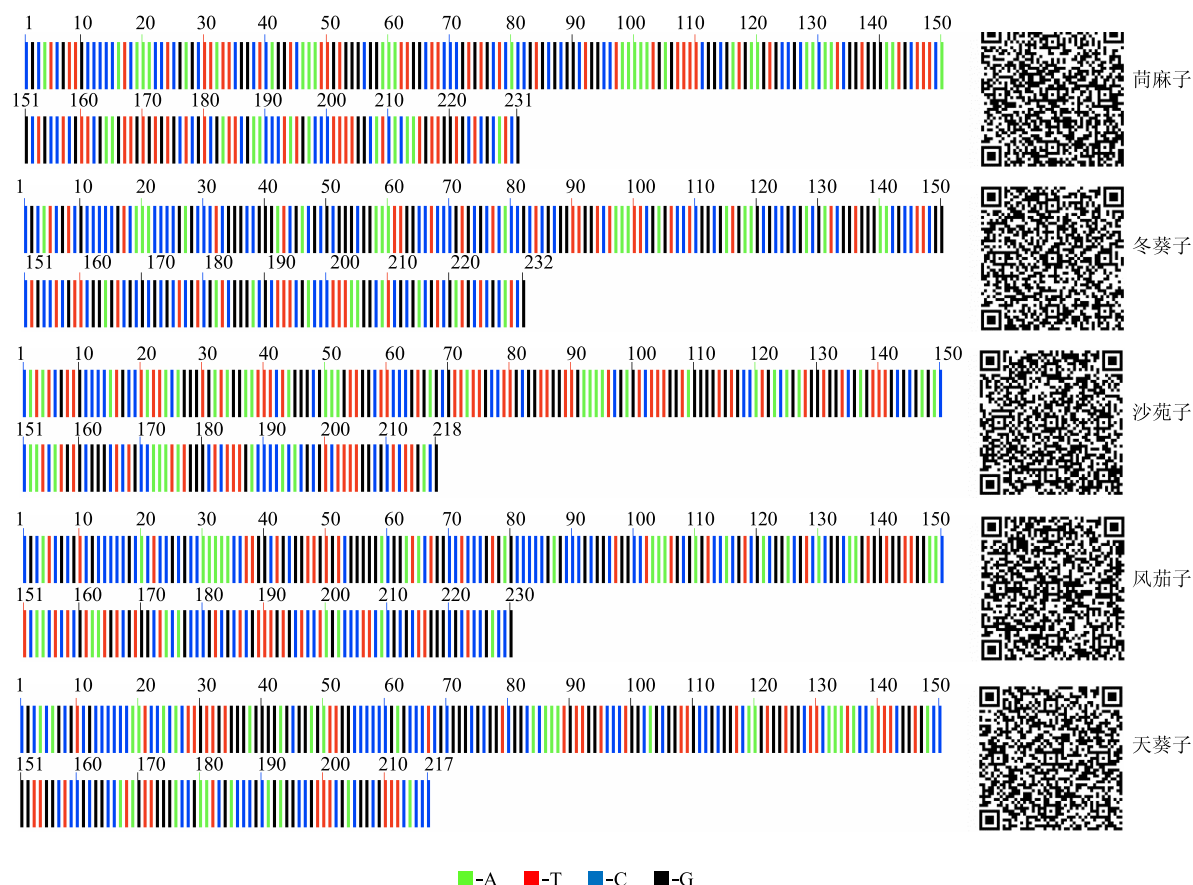


图 4 各物种 DNA 条形码及二维 DNA 条形码

Fig. 4 DNA barcodes and two-dimensional DNA barcode images of five species

基于开源代码 PHPQR Code 的编码方式将各药材基原物种拉丁名和 ITS2 序列进行编码, 获得各药材二维 DNA 条形码图片 (图 4-右), 通过移动终端扫描二维码即可获得各药材 ITS2 序列及拉丁名。对该药材的二维码进行扫描, 获得其拉丁名及其 ITS2 序列, 进入 DNA 条形码鉴定网站进行序列验证。结果显示序列均与各自查询物种序列相似性达到 99% 以上。因此 ITS2 二维码序列能跨平台准确鉴定本研究各物种。

3 讨论

冬葵子为常用中药, 有着悠久的用药历史, 最早载于《神农本草经》, 列为上品。《名医别录》对冬葵子的药效作了介绍;《重修政和经史证类备用本草》同样将其列为上品, 与《中国植物志》对比可确定是现在的冬葵或野葵。苘麻子最早载于《新修本草》, 李时珍《本草纲目》和吴其浚《植物名实图考》都对其作过描述, 结合产地为北方可证明苘麻即为锦葵科植物苘麻。崔熙等^[22]曾对冬葵子和苘麻子进行了本草考证, 纠正了有关文献对冬葵子原植物记载的错误。《中国药典》2015 年版规定, 二者

非同一种药材, 在临床疗效上有很大区别, 应区别对待。但在实际应用中, 苘麻子代替冬葵子的现象广泛存在。本研究首次对易混药材冬葵子、苘麻子进行市场监测, 发现 56 份市售“冬葵子”样本中高达 46% 的样品经检验应为苘麻子, 其中不乏一些知名大药店。在走访时发现, 多数药师根本不知苘麻子, 或误认苘麻子即是冬葵子。据药店人员反映, 可能由于苘麻子作伪品时间已久, “冬葵子”药效得不到发挥, 因此冬葵子在药方中并不常见。可见, 混淆现象已严重影响了冬葵子和苘麻子的临床用药、质量控制及开发利用。因此, 亟需加强二者的鉴别与管理。

掺假的主要原因应为二者形态类似, 苘麻子流入各地充作冬葵子正品。此外, 一些不法商贩制伪、掺伪、牟取利益等因素也是出现伪劣药材的原因。针对该现象, 本研究首次采用 DNA 条形码分子鉴定指导原则^[20]对冬葵子、苘麻子及其混伪品进行研究。结果显示: 本研究中收集的实验样品均能提出 DNA 并扩增出 ITS2 序列, DNA 提取率及 PCR 扩

增率均为 100%。PCR 产物均得到电泳检测, 并有清晰明亮条带。种间遗传距离均远远大于种内遗传距离。建立的 NJ 树也可以看出冬葵等 5 个物种可被清晰分类, 说明 ITS2 条形码序列适用于冬葵子类种子药材的鉴定。依据种子类药材的传统分类虽然可以进行, 但如无鉴定经验相对较难, 而基于 ITS2 序列的 DNA 条形码鉴定方法, 更为简便、快捷、高效, 为市售药材冬葵子与苘麻子的鉴别提供了新的依据。

DNA 二维条形码可以方便用户快速识别药材基原物种的二维条码标签, 区分真伪, 进一步保证了中药材的准确性、安全性、有效性。该二维码系统可以实现跨平台联系, 在中药材流通体系各个环节发挥重要保障作用, 为消费者提供了一种新的溯源手段, 为药材市场监测提供了新型有力手段, 符合未来中药材发展现代化、标准化的需求。

参考文献

- [1] 马爱华. 冬葵子与苘麻子的对比研究进展 [J]. 安徽医学院学报, 1996, 15(5): 59-62.
- [2] 北京市中药饮片调剂规程 [S]. 2011.
- [3] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [4] 肖耀军. 常用易混中药饮片的对比及正确书写与调配 [J]. 中医中药, 2014, 8: 71-74.
- [5] 刘秀志. 常用中药饮片及其杂品的鉴别 [J]. 临床合理用药, 2013, 10(6): 77.
- [6] 刘洪延, 陈代红. 冬葵子与苘麻子应区别药用 [J]. 时珍国医国药, 2004, 15(12): 823.
- [7] 朱小平, 李水福, 范火发. 几种有毒药材的真伪鉴别 [J]. 中国药业, 2001, 10(5): 57-58.
- [8] 周景春, 吴金昱. 天葵子与冬葵子、冬葵果的鉴别 [J]. 首都医药, 2014(7): 52.
- [9] 莫萍珊. 冬葵子与沙苑子的鉴别 [J]. 中国中药杂志, 1986, 11(2): 20.
- [10] 李松林. 冬葵子和苘麻子的鉴别研究 [J]. 中药材, 1992, 15(9): 20-22.
- [11] 潘穗生. 苘麻子和冬葵子的薄层色谱分析 [J]. 中国医学导报, 2010, 7(22): 79-80.
- [12] 马爱华. 冬葵子和苘麻子中无机元素含量测定及对比分析 [J]. 时珍国医医药, 1999, 10(2): 94.
- [13] 辛天怡, 雷美艳, 宋经元. 中药材 DNA 条形码鉴定研究进展 [J]. 中国现代中药, 2015, 17(2): 170-176.
- [14] 张娜娜, 辛天怡, 金 钺, 等. 基于中药材 DNA 条形码系统的泽泻种子鉴别研究 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(1): 18-23.
- [15] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [16] 叶 方, 柳施一, 胡 培, 等. 武当山区重楼属植物基于 ITS2 的种内鉴别研究 [J]. 中草药, 2017, 48(3): 550-558.
- [17] 阎梦颖, 房敏峰, 祝 娟, 等. 基于 ITS 条形码标记对当归属药用植物的鉴别 [J]. 中草药, 2016, 47(6): 974-981.
- [18] Lv T, Teng R, Shao Q, *et al.* DNA barcodes for the identification of *Anoectochilus roxburghii*, and its adulterants [J]. *Planta*, 2015, 242(5): 1167-1174.
- [19] Zhu X, Zhang Y, Liu X, *et al.* Authentication of commercial processed *Glehniae Radix*, (Beishashen) by DNA barcodes [J]. *Chin Med*, 2015, 10: 35.
- [20] 陈士林, 姚 辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(2): 54-61.
- [21] 辛天怡, 李西文, 姚 辉, 等. 中药材二维 DNA 条形码流通监管体系研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(7): 695-702.
- [22] 崔 熙, 李松林, 王琳琳, 等. 冬葵子与苘麻子使用变迁考 [J]. 中国医药学报, 1992, 7(1): 19-21.