

• 药材与资源 •

三七片 DNA 条形码分子鉴定及方法学考察

魏妙洁^{1,2}, 石林春², 赵 晴^{2,3}, 央 拉⁴, 徐晓兰⁵, 祖玛丽¹, 李明玥², 刘金欣^{2,3*}, 阿里穆斯^{1*}

1. 中央民族大学药学院, 北京 100081

2. 中国医学科学院 北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

3. 承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000

4. 西藏大学医学院, 西藏 拉萨 850000

5. 福建农林大学动物科学学院(蜂学学院), 福建 福州 350002

摘要: 目的 为研究 DNA 条形码技术在中成药鉴定中的应用, 以三七片为研究对象, 对方法的适用性、专属性与精密度进行考察。方法 收集 15 批次市售三七片样品, 考察三七片 DNA 提取条件, 并对“中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则”中 PCR 扩增、序列获得、结果判定等方法适用性进行确认; 收集三七、人参、西洋参, 制作三七片及其掺伪品, 考察方法的专属性和重现性。结果 三七片取样量 100 mg, 56 °C 水浴 8 h 所获得 DNA 的质量浓度平均值为 60.7 ng/μL, PCR 扩增、序列获得和结果判定均可获得成功; 三七、人参和西洋参的 ITS2 序列长度均为 230 bp, 三七与人参、三七与西洋参的序列间均存在 7 个稳定的 SNP 位点, 自制三七片和掺伪三七片均可成功获得 ITS2 序列, 不同比例三七与人参、三七与西洋参的测序峰图在 SNP 位点处呈现相应峰高比的 SNP 套峰具备专属性; 重复性、中间精密度和重现性考察符合《中国药典》2015 年版(通则 9101)相关要求。结论 ITS2 序列作为 DNA 条形码能够稳定、准确鉴定三七片的原料药材, 具备良好的专属性和精密度, 三七片 DNA 条形码分子鉴定法将为保障三七片临床用药安全提供新的技术手段, 并对《中国药典》其他收载单方制剂的鉴定提供参考。

关键词: 三七片; 三七; 人参; 西洋参; ITS2; 鉴定

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)07-1893-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.07.026

Molecular identification of Sanqi Tablets using DNA barcoding and its methodological evaluation

WEI Miao-jie^{1,2}, SHI Lin-chun², ZHAO Qing^{2,3}, YANG La⁴, XU Xiao-lan⁵, ZU Ma-li¹, LI Ming-yue², LIU Jin-xin^{2,3}, BORJIGIDAI Almaz¹

1. School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

3. Hebei Key Laboratory of Study and Exploitation of Chinese Medicine, Chengde Medical College, Chengde 067000, China

4. Medicinal College, Tibet University, Lasa 850000, China

5. College of Animal Science (College of Bee Science), Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

Abstract: Objective In order to study the application of DNA barcoding in the authentication of Chinese patent medicines, Sanqi Tablets were used as the object to investigate the applicability, specificity and precision of this method. **Methods** Fifteen batches of commercially available Sanqi Tablet samples were collected. The conditions of DNA extraction for Sanqi Tablet had been first investigated, and the DNA was used for testing the applicability of the methods such as PCR amplification, sequence acquisition, and species authentication in the principles for molecular identification of traditional Chinese materia medica using DNA barcoding. The specificity and reproducibility of DNA barcoding in identification of Sanqi Tablets and its adulterations from the roots of *Panax notoginseng*, *P. ginseng* and *P. quinquefolius* were also studied. **Results** The Sanqi Tablet sample with an amount of sampling to be 100 mg and a water bath at 56 °C for 8 h gave an average concentration of 60.7 ng/μL and then the PCR amplification, sequence acquisition and species assignment were all successful. The ITS2 sequences of *P. notoginseng*, *P. ginseng* and *P. quinquefolius* were all 230 bp in length, and there were seven stable SNP loci between *P. notoginseng* and *P. ginseng*, *P. notoginseng* and

收稿日期: 2019-10-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(81703659); 国家自然科学基金项目(81503189); 中国博士后科学基金资助项目(2017M610815); 北京市自然科学基金资助项目(7202109)

作者简介: 魏妙洁, 女, 研究生, 研究方向为民族资源保护与利用。E-mail: 354873928@qq.com

*通信作者 刘金欣, 副教授, 研究方向为中药资源及鉴定。E-mail: liujx_23@163.com

阿里穆斯, 教授, 研究方向为民族资源保护与可持续发展研究。E-mail: almaz_b@muc.edu.cn

P. quinquefolius. ITS2 sequences could be successfully obtained from lab-made and the adulterated Sanqi Tablets, and the Sanger sequencing chromatograms of different ratios of *P. notoginseng* and *P. ginseng* mixtures, *P. notoginseng* and *P. quinquefolius* mixtures had heterozygous peaks with corresponding peak height ratio at SNP positions. The repeatability, intermediate precision and reproducibility were all in line with the requirements of “General Regulation 9101” in the Chinese Pharmacopoeia. **Conclusion** The ITS2 sequence can stably and accurately authenticate the raw materials of Sanqi Tablets with substantial specificity and precision. The DNA barcoding identification method of Sanqi Tablets will provide a new technical tool for ensuring the safety of Sanqi Tablets in clinical medications, and provide reference for the identification of other single-herb products documented in the *Chinese Pharmacopoeia*.

Key words: Sanqi Tablets; *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen; *Panax ginseng* C. A. Mey.; *Panax quinquefolium* L.; ITS2; identification

三七片是将三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根和根茎粉碎成细粉,加适量辅料制成颗粒,压片制得,为《中国药典》2015 年版收载品种^[1]。三七片具散瘀止血、消肿定痛的功效,临床用于治疗外伤出血、跌扑肿痛等症。另有研究报道^[2],三七片还可用于治疗心肌缺血再灌注导致的心律失常和慢性肾炎患者贫血。随着三七药材纳入国家卫计委规定的可用于保健食品的中药名单,以三七为主要成分的三七片的销量有逐年增加趋势,受众人群十分广泛,然而由于连作障碍、土传病虫害等原因,三七的产量并未随之增加,某些年份甚至出现三七片售价与三七药材价格倒挂现象。有报道称不法商家利用大黄粉末的显微特征与三七显微特征的相似之处,将大黄 *Rheum palmatum* L. 粉末掺入含三七药品中进行造假^[3-4],或者利用人参、西洋参与三七均含有皂苷类成分的特点,将人参和西洋参与三七掺杂混用^[5]。大黄苦、寒,泻下作用峻烈。人参 *P. ginseng* C. A. Mey.、西洋参 *P. quinquefolium* L.、三七虽同属五加科人参属植物,形态和化学成分具有较大相似性,但在中医临床用药上,三者具有很大区别,人参性温,功效大补元气、固脱生津、安神^[6];三七性温,功效散瘀止血、消肿定痛^[7];西洋参性凉,功效补气养阴、清热生津^[8],三者不能混用。

DNA 条形码分子鉴定法利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列进行物种鉴定,具有通用、快速、准确等特点^[9],已纳入中国^[10]、英国^[11]、日本^[12]等国家药典,当前主要用于药用植物、药材及部分饮片的鉴别。随着“DNA 测序技术指导原则”完成公示并计划纳入《中国药典》2020 年版,基于 DNA 条形码分子鉴定法的成方制剂鉴定将成为趋势。对于三七片的主要伪品大黄和同属物种来说,由于大黄属于蓼科植物,三七属于五加科植物,基于 DNA 条形码分子鉴定法的三七与大黄鉴别极其容易^[13];基于 ITS2 序列的三七、人参、西洋参原植物及药材鉴定方法也已相继建立^[14-17]。因此,本研究选择研究基础较好的三七片为研究对象,对 DNA 条形码分子鉴定法在三七片鉴

定中适用性进行确认,并对方法的专属性以及重复性、中间精密度、重现性进行考察,建立基于 ITS2 序列的三七片 DNA 条形码分子鉴定方法,为三七片的质量保障提供新技术手段。

1 仪器与材料

1.1 仪器

MM400 型球磨机(Retsch 公司,德国);SHZ-05 型电热恒温振荡水浴锅(博彩公司,中国);1-14 型离心机(Sigma 公司,德国);TC-96 型基因扩增仪(博日公司,中国);TAdvanced 96 SG 型基因扩增仪(Biometra 公司,德国);T100 型基因扩增仪(Bio-Rad 公司,美国);ChemiDoc MP 型凝胶成像仪(Bio-Rad 公司,美国);NanoDrop 2000 型超微量分光光度计(Thermo Fisher 公司,美国);各种量程的微量移液器(Eppendorf 公司,德国)。

1.2 试剂

CTAB、PVP 40、1 M Tris-HCl (pH 8.0) 和 0.5 mol/L EDTA 溶液购自北京索莱宝科技有限公司;2×Taq PCR Master Mix 购自北京艾德莱生物科技有限公司;DL2000 DNA maker 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司;ITS2 序列扩增引物 ITS2F/ITS3R 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;其他实验试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 材料

收集包含 5 个厂家的 15 批次三七片样品,对 DNA 条形码分子鉴定法在三七片鉴定中的适用性进行确认。收集 21 份三七、人参和西洋参的基原植物、药材和对照药材样品,经中国医学科学院药用植物研究所石林春副研究员鉴定为三七 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen、人参 *Panax ginseng* C. A. Mey.、西洋参 *Panax quinquefolium* L.,用于确定单核苷酸多态性(SNP)位点;制作成三七与人参、西洋参 10:0、9:1、5:5、1:9、0:10 不同混合比例的三七片及掺伪三七片,对方法的专属性进行考察。样品来源及 ITS2 序列登录号见表 1。另从文献报道^[12,18-33]获取 54 条三七、人参和西洋参的 ITS2 序列,登录号见表 2。

表 1 样品采集信息及 ITS2 序列登录号

Table 1 Sample information and GenBank accession numbers

样品编号	样品名称	来源	ITS2 登录号
SQP01	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414284
SQP02	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414285
SQP03	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414286
SQP04	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414287
SQP05	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414288
SQP06	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414289
SQP07	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414290
SQP08	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414291
SQP09	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414292
SQP10	三七片	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414279
SQP11	三七片	湖北诺得胜制药有限公司	MN414280
SQP12	三七片	广西圣特药业有限公司	MN414281
SQP13	三七片	四川依科制药有限公司	MN414282
SQP14	三七片	四川依科制药有限公司	MN414283
SQP15	三七片	黑龙江福和华星制药股份有限公司	MN414314
PSSQ01	三七	云南文山	MN414301
PSSQ02	三七	云南文山	MN414302
PSSQ03	三七	云南文山	MN414303
YCSQ04	三七	云南文山	MN414304
YCSQ05	三七	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414305
YCSQ06	三七	中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所	MN414306
RSSQ07	三七	中国食品药品检定研究院	MN414300
PSRS01	人参	吉林集安	MN414293
PSRS02	人参	吉林集安	MN414294
PSRS03	人参	吉林集安	MN414295
YCRS04	人参	吉林集安	MN414296
YCRS05	人参	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414297
YCRS06	人参	中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所	MN414298
RSRS07	人参	中国食品药品检定研究院	MN414299
PSXYS01	西洋参	吉林集安	MN414313
PSXYS02	西洋参	吉林集安	MN414312
PSXYS03	西洋参	吉林集安	MN414311
YCXYS04	西洋参	吉林集安	MN414310
YCXYS05	西洋参	北京同仁堂科技发展股份有限公司	MN414309
YCXYS06	西洋参	中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所	MN414308
RSXYS07	西洋参	中国食品药品检定研究院	MN414307

表 2 三七、人参和西洋参的 ITS2 序列登录号

Table 2 Accession numbers of ITS2 sequences for *P. notoginseng*, *P. ginseng* and *P. quinquefolius* downloaded from GenBank

物种	登录号
三七	AY271919、HQ112434、HQ112435、HQ112436、JX996143、JX996144、JX996145、MH345105、MH345106、MH345107、MH345108、MH345109、MH345110、MH345111、MH345112、MH345113、MH345114、MH345178、MK087943、U41684、U41685
人参	AB043871、AB043872、AJ786235、AY233326、DQ284918、HQ112415、HQ112416、JX996141、KM207674、KX674875、KX674876、KX674877、MF096544、MF096545、MF096546、MF096547、MF096548、MF096549、MK087942、U41680、U41682
西洋参	HQ112439、HQ112440、JX996142、MG217816、MG217889、MG218783、MG219300、MG219313、MK087944、U41687、U41688、U41689

2 方法

2.1 DNA 提取、PCR 扩增与测序

对于 15 份市售三七片供试样品, 先用 75%乙醇擦拭表面后烘干, 如有包薄膜衣 (大片), 需去除包薄膜衣再擦拭表面, 使用核分离提取液漂洗 3~5 次至上清透明。为建立三七片的 DNA 提取方法, 取 1 份供试样品 (SQP01), 分别比较 50、100、150、200 mg 取样量, 以及 65 °C、2 h, 56 °C、4 h 和 56 °C、8 h 水浴温度和时间, 考察不同条件对 DNA 质量和 PCR 扩增的影响。采用改良的 CTAB 法提取 DNA, 使用 NanoDrop 2000 型微量分光光度计测定 DNA 浓度并计算 A_{260}/A_{280} 值。ITS2 序列扩增依照中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则^[9], PCR 扩增时设置不添加模板 DNA 的阴性对照。PCR 产物经纯化后使用 ABI-3730XL 型测序仪进行双向测序。

2.2 数据分析

利用 CondonCode Aligner V 8.0.2 软件进行序列校对、拼接、去除引物区和 SNP 分析; 基于隐马尔可夫模型 (Hidden Markov model, HMM) 去除 5.8 S rRNA 和 28 S rRNA 基因区^[34]。采用 MEGA X 软件对序列进行多序列比对和邻接 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树构建。

2.3 专属性与精密度考察

专属性与精密度考察依照《中国药典》2015 年版“药品质量标准分析方法验证指导原则” (通则 9101) 和“中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则” (通则 9107) 项下相关要求。

3 结果与分析

3.1 三七片供试样品处理、DNA 提取方法建立和 PCR 扩增

DNA 提取方法考察结果表明, 所获得 DNA 的质量浓度为 20.0~85.6 ng/μL, A_{260}/A_{280} 位于 1.6~1.8, DNA 检测结果见表 3。所获得 DNA 照“中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则” (通则 9107) 进行 PCR 扩增, 电泳检测均可在 500 bp 左右观察到清晰明亮条带, 阴性对照无条带。综合考虑 DNA 浓度和纯度, 采用取样量 100 mg, 56 °C 水浴 8 h 对剩余 14 份进行市售三七片供试样品 DNA 提取, 质量浓度为 58.4~64.2 ng/μL, A_{260}/A_{280} 位于 1.6~1.8, PCR 扩增均成功, 见图 1。

3.2 三七片供试样品 ITS2 条形码序列获得与结果判定

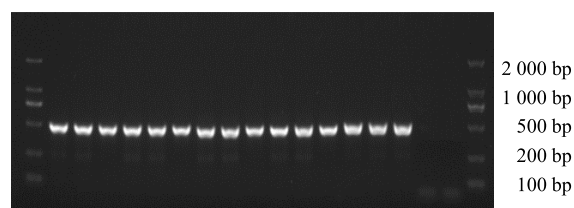
对于 15 份市售三七片供试样品的 PCR 产物,

表 3 三七片 DNA 提取影响因素考察与结果

Table 3 Investigation and results of factors affecting DNA extraction of Sanqi Tablets

试验号	取样量/ mg	水浴温度/ °C	水浴时间/ h	质量浓度/ (ng·μL ⁻¹)	A_{260}/A_{280}	PCR 结果
1	50	65	2	20.0	1.76	扩增成功
2	50	56	4	23.3	1.71	扩增成功
3	50	56	8	25.8	1.63	扩增成功
5	100	65	2	24.1	1.81	扩增成功
6	100	56	4	30.8	1.71	扩增成功
7	100	56	8	44.8	1.83	扩增成功
9	150	56	2	25.4	1.60	扩增成功
10	150	56	4	43.9	1.65	扩增成功
11	150	56	8	60.7	1.66	扩增成功
13	200	56	2	40.9	1.68	扩增成功
14	200	56	4	55.2	1.64	扩增成功
15	200	56	8	85.6	1.73	扩增成功

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 CK M



CK-阴性对照 M-Marker 1~15-三七片 SQP01~SQP15

CK-negative control M-Marker The samples in lane 1—15 are SQP01—SQP15

图 1 市售三七片供试样品 PCR 扩增的电泳检测结果

Fig. 1 PCR amplification results of 15 commercially available samples of Sanqi Tablets

采用凝胶回收试剂盒进行回收, 回收率约为 50%, 双向测序拼接后采用 HMM 模型进行注释以获得供试品 ITS2 序列, 所获得 ITS2 序列的质量均符合《中国药典》“DNA 测序技术指导原则 (征求意见稿)”的要求, 与《中国药典中药材 DNA 条形码标准序列》的主导单倍型序列特征完全一致, 无变异位点。在“中药材 DNA 条形码鉴定系统” (<http://www.tcmbarcode.cn>) 进行比对表明, 所获得 ITS2 序列与三七 *P. notoginseng* 的序列相似性为 100% (图 2)。

3.3 三七片 DNA 分子鉴定法专属性考察

主要考察三七片原料药材三七与同属近源物种人参、西洋参的 DNA 分子鉴定法专属性。三七、人参、西洋参 ITS2 序列分别为 28、28、19 条, 长度均为 230 bp, 三七包含 4 个单倍型 (H1~H4)。

物种鉴定结果				
这里是与您所查询序列最接近的物种: <i>P. notoginseng</i> , [<i>P. notoginseng</i> [p]; <i>P. pseudoginseng</i> var. <i>notoginseng</i> [p]](三七)				
序列比对信息				
编号/登录号	物种	序列相似性/%	分值	E 值
Y1301030	<i>P. notoginseng</i>	100.0	456.0	e-128
SN02MT31	<i>P. notoginseng</i>	100.0	456.0	e-128
SN02MT30	<i>P. notoginseng</i>	100.0	456.0	e-128

图 2 市售三七片供试样品 ITS2 序列在“中药材 DNA 条形码鉴定系统”中的鉴定结果 (以 SQP01 为例)

Fig. 2 Identification results of ITS2 sequences obtained from Sanqi Tablets commercially available samples in “DNA Barcoding System for Identifying Herbal Medicine” (taking SQP01 as example)

与 H1 相比, H2 为 160 位点 T-Y 变异; H3 为 83、175、216 位点 C-T 变异, 160 位点 T-C 变异; H4 为 160 位点 T-C 变异。人参和西洋参种内无变异。三七和人参 ITS2 序列 7 个可鉴定的 SNP 位点, 分别为 28、207 位点 T-C 变异, 34、43、218 位点 C-T 变异, 46 位点 T-G 变异, 140 位点 T-A 变异; 三七和西洋参 ITS2 包含 7 个可鉴定 SNP 位点, 分别为 28、207 位点 T-C 变异, 32、34、218 位点 C-T 变异, 46 位点 T-G 变异, 140 位点 T-A 变异, 见图 3。

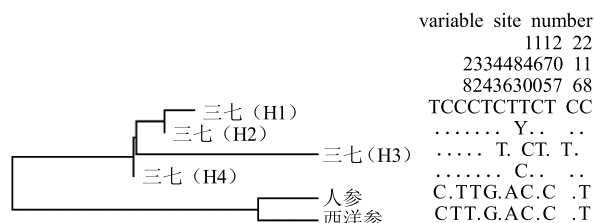


图 3 基于三七、人参、西洋参单倍型构建的 NJ 系统发育树与变异位点分析

Fig. 3 Analysis of NJ phylogenetic trees and variation loci based on haplotypes of *P. notoginseng*, *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

制作三七与人参、西洋参 10:0、9:1、5:5、1:9、0:10 不同混合比例的三七片及掺伪三七片, 考察 SNP 位点是否呈现在最终测序峰图上及与混合比例的相关性, 结果表明, 三七与人参、西洋参的 SNP 位点呈现相对应的测序套峰, 且套峰的峰高比与混合比例基本一致; 与纯三七片相比, 低至 10% 的人参或西洋参混入可以通过 SNP 分型准确检出, 见图 4。

3.4 三七片 DNA 分子鉴定方法学考察

根据《中国药典》2015 年版“通则 9107”和“通则 9101”相关要求, 从重复性、中间精密度、重现性 3 方面进行精密度考察。

3.4.1 重复性试验 取 1 份样品 (SQP01), 同一操作人员、相同仪器的 6 次重复试验结果表明其 DNA 提取、PCR 扩增和测序均成功, 所获得的 ITS2 条形码序列完全一致, 经鉴定均为三七 *P. notoginseng*。

3.4.2 中间精密度试验 取 3 份样品 (SQP04、SQP06、SQP10), 2 名实验操作人员在 4 个日期通过 3 台不同型号基因扩增仪完成实验, 结果表明其 DNA 提取、PCR 扩增和测序均成功, 所获得的 ITS2 条形码序列完全一致, 经鉴定均为三七 *P. notoginseng*。

3.4.3 重现性试验 通过在 3 家不同实验室, 按照本研究确立的三七片 (SQP01) DNA 分子鉴定法进行实验, 结果表明其 DNA 提取、PCR 扩增和测序均成功, 所得的 DNA 条形码序列完全一致, 经鉴定均为三七 *P. notoginseng*。

4 讨论

4.1 三七片 DNA 条形码鉴定方法稳定性和准确性良好

本研究通过自制三七片及其掺伪品, 收集 5 个厂家的 15 批市售三七片样品, 优化 DNA 提取方法并考察取样量与水浴时间对 DNA 提取结果的影响, 采用陈士林等^[35]推荐的 ITS2 通用引物, 所有样品均可成功扩增、测序并拼接获得可用的 ITS2 条形码序列, 说明中药材 DNA 条形码分子鉴定法对三七片鉴定具有适用性。5 个不同厂家的市售三七片均可成功鉴定, 重复性、中间精密度与重现性所获得的 PCR 扩增成功率与鉴定成功率均为 100%, 证实三七片 DNA 条形码鉴定方法具有稳定性。研究中为考察 DNA 条形码鉴定中成药三七片的专属性, 选取易与三七掺伪的人参和西洋参^[5], 按照 10:0、1:9、5:5、9:1、0:10 制作三七与人参、西洋参的掺伪三七片, 采用 SNP 分型技术可以检测低至

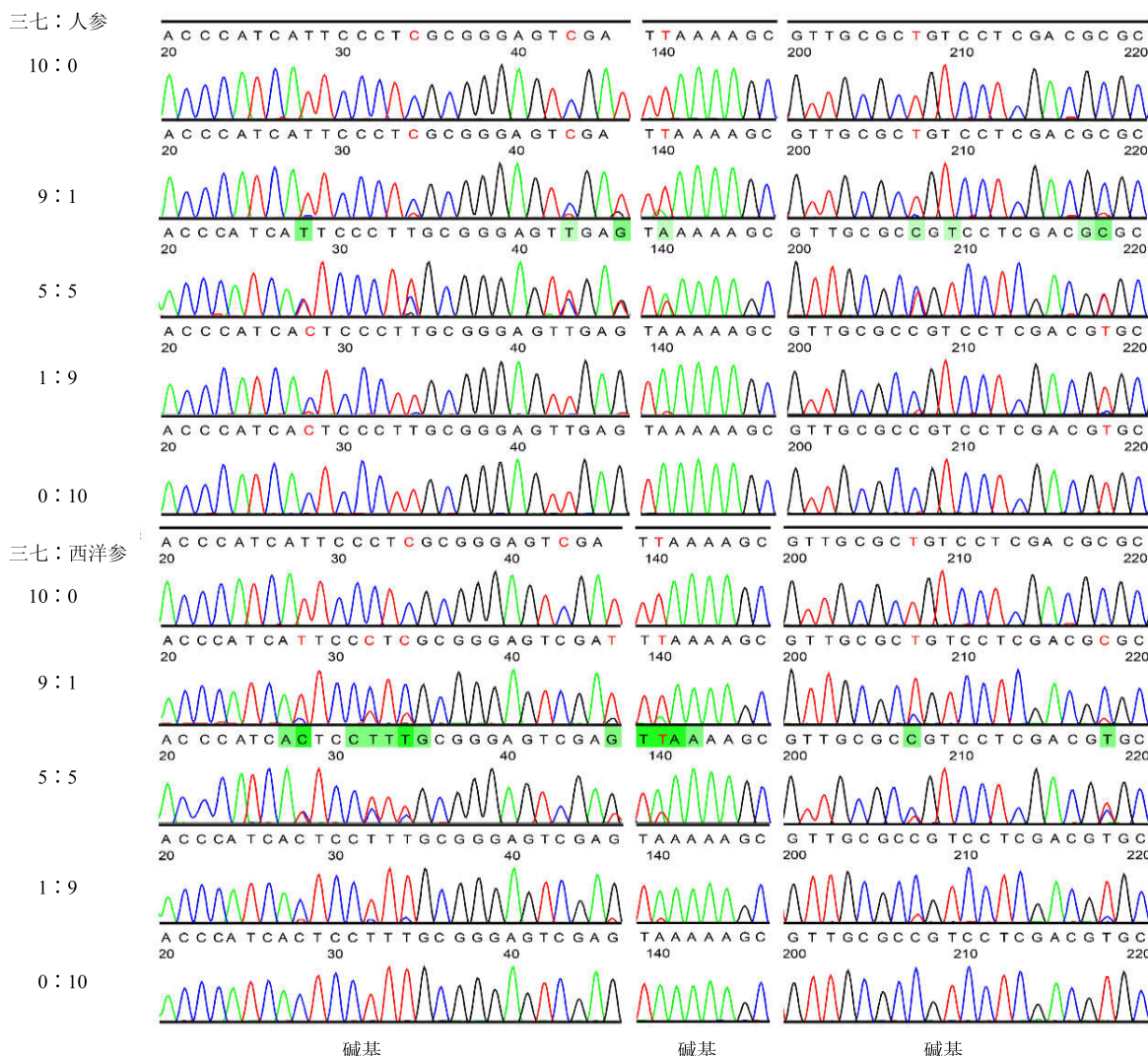


图 4 三七片及三七与人参、西洋参不同混合比例的掺伪三七片的测序峰图

Fig. 4 Sequencing chromatogram of Sanqi Tablets and adulterated Sanqi Tablets made from different proportions of *P. notoginseng*, *P. ginseng* and *P. quinquefolius*

10%的原料药材掺伪,表明以 ITS2 序列为基础的三七片 DNA 条形码鉴定方法具有准确性。

4.2 中成药 DNA 条形码分子鉴定面临的困难与前景

中成药是以中药饮片为原料,在中医药理论指导下,以规定的处方和方法加工制成的中药制品^[36]。与传统药用植物和中药材不同,中成药原料品种繁多、原料炮制方法不一,且剂型种类繁多、制备工艺差异较大,再加上大部分中成药在制备过程中都需要添加一定的辅料,给中成药的 DNA 条形码鉴定带来困难与挑战^[37]。因此,以处方成分单一、工艺相对简单的三七片探讨中成药 DNA 条形码鉴定的稳定性与准确性,对其他单方制剂的 DNA 条形码鉴定具有借鉴意义,同时本研究所采用的 SNP 分

型技术也可用于复方制剂中贵细药材的物种鉴定。

近年来,随着高通量测序技术的高速发展,测序成本和周期都得到了大幅降低,将高通量测序技术与 DNA 条形码技术相结合的 DNA 宏条形码技术已用于多种复方中成药的处方成分鉴定,例如 Xin 等^[38]利用鸟枪法宏基因组测序技术对市售龙胆泻肝丸进行了鉴定,发现其中含有木通的混伪品小木通;石林春等^[39]基于 DNA 宏条形码技术对如意金黄散处方成分进行鉴定,结果表明市售样品存在朝鲜苍术代替苍术,虎掌南星代替天南星入药的现象。以上研究表明 DNA 条形码技术以及 DNA 宏条形码技术在中成药的处方成分鉴定中具有广阔的发展前景,将为中成药的质量控制提供新的技术手段。

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [2] 李丰良, 袁嘉丽, 沈颖, 等. 三七片治疗慢性肾炎患者贫血的临床研究 [J]. 云南中医学院学报, 2004, 27(2): 29-30.
- [3] 张铮, 王唯红, 白瑞. 近红外光谱法对三七片一致性检验的研究 [J]. 安徽医药, 2011, 15(6): 689-690.
- [4] 王晓玲. 伪品三七片的鉴别 [J]. 安徽医药, 2004, 8(5): 400.
- [5] 蒋超, 罗宇琴, 袁媛, 等. 多重位点特异性PCR鉴别人参、三七、西洋参掺杂 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(7): 115-119.
- [6] 许见春. 人参在实际应用中的药理作用 [J]. 时珍国医国药, 2006, 17(4): 578.
- [7] 占颖, 刘春生, 刘洋洋, 等. 人参和三七活性成分与药理作用对比研究进展 [J]. 中国中医药科技, 2014, 21(6): 711-712.
- [8] 张尚鹏. 西洋参鉴别十二法 [J]. 中草药, 2001, 32(9): 845-846.
- [9] 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): 141-148.
- [10] 中国药典 [S]. 四部. 2015.
- [11] British Pharmacopoeia [S]. 2016.
- [12] Chen X C, Xiang L, Shi L C, *et al.* Identification of crude drugs in the Japanese Pharmacopoeia using a DNA barcoding system [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42325.
- [13] Chen S L, Yao H, Han J P, *et al.* Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species [J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8613.
- [14] 廖保生, 王丽丽, 王晓玥, 等. 基于分子身份证的三七药材快速鉴定方法 [J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(22): 1954-1959.
- [15] 孙涛, 孔德英, 滕少娜, 等. 基于ITS2条形码的人参属物种鉴定研究 [J]. 湖北农业科学, 2016, 55(19): 5072-5074.
- [16] 詹鑫婕, 田程, 张媛, 等. 基于ITS2条形码SNPs的人参和西洋参PCR-SSCP分子鉴别研究 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(24): 3748-3751.
- [17] Chen X C, Liao B S, Song J Y, *et al.* A fast SNP identification and analysis of intraspecific variation in the medicinal *Panax* species based on DNA barcoding [J]. *Gene*, 2013, 530(1): 39-43.
- [18] Llongueras J P, Nair S, Salas-Leiva D, *et al.* Comparing DNA extraction methods for analysis of botanical materials found in anti-diabetic supplements [J]. *Mol Biol*, 2013, 53(3): 249-256.
- [19] Kim K, Lee S, Lee J, *et al.* Comprehensive survey of genetic diversity in chloroplast genomes and 45S nrDNAs within *Panax ginseng* species [J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e117159.
- [20] Larrauri A, Núñez O, Hernández-Cassou S, *et al.* Determination of polyphenols in white wines by liquid chromatography: Application to the characterization of Alella (Catalonia, Spain) wines using chemometric methods [J]. *J AOAC Int*, 2017, 100(2): 323-329.
- [21] Zuo Y J, Chen Z J, Kondo K, *et al.* DNA barcoding of *Panax* species [J]. *Planta Med*, 2011, 77(2): 182-187.
- [22] Yelome O I, Audenaert K, Landschoot S, *et al.* Exploring genetic diversity and disease response of cultivated rice accessions (*Oryza* spp.) against *Pyricularia oryzae* under rainfed upland conditions in Benin [J]. *Genet Res Crop Evol*, 2018, doi: 10.1007/s10722-018-0638-1.
- [23] Sharma S, Sharma P, Yadav S, *et al.* Homogenous PCR of heterogeneous DNA from phenolic rich barks of terminalia species for DNA based adulteration detection [J]. *Proceed Nat Acad Sci*, 2015, doi: 10.1007/s40011-015-0576-z.
- [24] Berns D S, Rager-Zisman B. Medical research in Israel and the Israel biomedical database [J]. *Isr Med Assoc J*, 2000, 2(11): 811-815.
- [25] Park M, Kim M K, In J, *et al.* Molecular identification of Korean ginseng by amplification refractory mutation system-PCR [J]. *Food Res Int*, 2006, 39(5): 568-574.
- [26] Artyukova E V, Gontcharov A A, Kozyrenko M M, *et al.* Phylogenetic relationships of the far eastern Araliaceae inferred from ITS sequences of nuclear rDNA [J]. *Russian J Genet*, 2005, 41(6): 649-658.
- [27] Li R, Wen J. Phylogeny and biogeography of *Dendropanax* (Araliaceae), an amphi-pacific disjunct genus between tropical/subtropical asia and the neotropics [J]. *Syst Bot*, 2013, 38(2): 536-551.
- [28] Wen J, Zimmer E A. Phylogeny and biogeography of *Panax* L. (the ginseng genus, Araliaceae): Inferences from ITS sequences of nuclear ribosomal DNA [J]. *Mol Phyl Evol*, 1996, 6(2): 167-177.
- [29] Lee C, Wen J. Phylogeny of *Panax* using chloroplast trnC-trnD intergenic region and the utility of trnC-trnD in interspecific studies of plants [J]. *Mol Phyl Evol*, 2004, 31(3): 894-903.
- [30] Pyankov V, Ziegler H, Kuz'Min A, *et al.* Origin and evolution of C4 photosynthesis in the tribe Salsoleae (Chenopodiaceae) based on anatomical and biochemical types in leaves and cotyledons [J]. *Plant System Evol*, 2001, 230(1/2): 43-74.
- [31] Xue F, Nie X B, Shi J P, *et al.* Quercetin inhibits LPS-induced inflammation and ox-LDL-induced lipid

- deposition [J]. *Front Pharm*, 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00040.
- [32] Coleiny G, Venkat R. Theoretical study of in desorption during MBE growth of InGaAs/GaAs [J]. *J Crystal Growth*, 2003, 250(1/2): 22-28.
- [33] Kuzmina M L, Braukmann T W A, Fazekas A J, *et al.* Using herbarium-derived DNAs to assemble a large-scale DNA barcode library for the vascular plants of Canada [J]. *Appl Plant Sci*, 2017, 5(12): 1700079.
- [34] Keller A, Schleicher T, Schultz J, *et al.* 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1): 50-57.
- [35] 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): 141-148.
- [36] 张的凤. 中成药学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2009.
- [37] 崔占虎, 龙 平, 王颖莉, 等. DNA 分子标记技术在中药鉴定中的应用与展望 [J]. 中药材, 2015, 38(1): 188-192.
- [38] Xin T Y, Su C, Lin Y L, *et al.* Precise species detection of traditional Chinese patent medicine by shotgun metagenomic sequencing [J]. *Phytomedicine*, 2018, doi: 10.1016/j.phymed.2018.04.048.
- [39] 石林春, 刘金欣, 魏妙洁, 等. 基于 DNA metabarcoding 技术的如意金黄散处方成分鉴定研究 [J]. 中国科学: 生命科学, 2018, 48(4): 490-497.