

菟丝子及混伪品的 DNA 条形码鉴定

秦新月¹, 金 钱¹, 高志晖^{1*}, 魏建和^{1,2*}

1. 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 濒危药材繁育国家工程实验室, 北京 100193
2. 中国医学科学院北京协和医学院 药用植物研究所海南分所 海南省南药资源保护与开发重点实验室 国家中医药管理局沉香可持续利用重点研究室, 海南 海口 570311

摘要: 目的 调研市售菟丝子 *Cuscutae Semen* 混杂情况, 为菟丝子药材质量的提升和安全应用提供依据。方法 收集市售菟丝子 25 份, 对样品进行 ITS2 基因扩增并双向测序, 利用 HMMer 注释方法获得 ITS2 序列, 使用 MEGA6.0 进行遗传距离计算并构建邻接法 (neighbor-joining, NJ) 系统发育树; 运用 DNAsp5.0 进行功能域检测和单倍型分析; 比较菟丝子及杂质的二级结构差异; 用 R 语言将所得序列转换成彩色条形码图片及二维码。结果 通过序列分析、遗传距离分析、构建系统发育树、二级结构分析、功能域分析及单倍型分析可将菟丝子药材中不同科属及同一属的杂质准确区分; 成功检测出 25 份菟丝子中分别含有藜种子、绿穗苋种子、虫实种子、铁苋菜种子、稗子、酸模叶蓼种子、大豆碎粒等 1 种或多种杂质。**结论** 首次调研了市售菟丝子的混杂情况, 表明其混杂种类多, 且部分混杂种子有毒, 为菟丝子相关标准制定提供了依据。此外, ITS2 序列可准确鉴定菟丝子及其混伪品, 为微小种子类药材鉴别提供了理论依据; 与二维码技术结合可实现菟丝子监管的标准化和信息化。

关键词: 菟丝子; 混伪品; ITS2; 彩色条形码; 二维码; DNA 条形码

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2024)17 - 5982 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.17.024

Identification of *Cuscutae Semen* and adulterants using DNA barcode

QIN Xinyue¹, JIN Yue¹, GAO Zhihui¹, WEI Jianhe^{1,2}

1. National Engineering Laboratory for Breeding of Endangered Medicinal Materials, Key Laboratory of Bioactive Substances and Resources Utilization of Chinese Herbal Medicine of Ministry of Education, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China
2. Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Agarwood Sustainable Utilization, Hainan Provincial Key Laboratory of Resources Conservation and Development of Southern Medicine, Hainan Branch of the Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Haikou 570311, China

Abstract: Objective To investigate the purity and species of adulterants in commercially available Tusizi (*Cuscutae Semen*) in order to provide a basis for the improvement of the quality of *Cuscuta* and its safe application.. **Methods** Genomic DNA was extracted from a total of 25 *Cuscutae Semen* samples collected from markets. ITS2 sequences were amplified, sequenced and then annotated by HMMer. MEGA6.0 was used to calculate genetic distance and construct a NJ phylogenetic tree. The functional domain, haplotype and secondary structures of ITS2 sequences were analyzed using DNAsp5.0. The obtained sequences were transformed into chromatic barcode images and two-dimensional DNA barcodes using the R Program. **Results** The adulteration of commercially available *Cuscutae Semen* was serious. All *Cuscuta* samples contained at least one adulterant. Seeds of *Chenopodium album*, *Amaranthus hybridus*, *Corispermum hyssopifolium*, *Acalypha australis*, *Echinochloa crus-galli*,

收稿日期: 2024-01-26

基金项目: 国家重点研发计划项目“高品质中药材生态调控栽培技术研究”(2022YFC3501504); 医科院重大协同创新项目“药用植物种质资源库建设”(2021-I2M-1-032)

作者简介: 秦新月, 硕士研究生, 研究方向为分子育种。E-mail: 1804651869@qq.com

*通信作者: 高志晖, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药用植物次生代谢产物调控机制研究及分子育种。E-mail: huihuigao@163.com

魏建和, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药用植物基因资源、分子育种及次生代谢产物调控机制研究。

Tel: (010) 57833016 E-mail: wjianh@263.net

Persicaria lapathifolia and cracked soybean (*Glycine max* (Linn.) Merr.) were successfully identified in *Cuscutae Semen* as adulterants. **Conclusion** This study confirmed the serious adulteration of *Cuscutae Semen* and clarified the species of these adulterants. ITS2 sequence barcode is able to identify *Cuscuta* and other common adulterants, providing a method for identifying tiny seeds. In addition, a combination of ITS2 sequences and two-dimensional code technology enables standardization and informationization in the management of *Cuscuta* market.

Key words: *Cuscutae Semen*; adulterants; ITS2; color barcode; two-dimensional codes; DNA barcode

菟丝子别名菟丝实、吐丝子、无娘藤米米、黄藤子、龙须子、萝丝子、黄网子、黄萝卜、豆须子、缠龙子、黄丝子，为旋花科一年生寄生缠绕草本植物南方菟丝子 *Cuscuta australis* R. Br. 或菟丝子 *C. chinensis* Lam. 的干燥成熟种子^[1]。具有补益肝肾、固精缩尿、安胎、明目、止泻之功效，外用具有消风祛斑之功效。常用于肝肾不足、腰膝酸软、阳痿遗精、遗尿尿频、肾虚胎漏、胎动不安、目昏耳鸣、脾肾虚泻；外治白癜风^[2-3]。目前菟丝子应用比较广泛，菟丝子主要含有黄酮类、有机酸类等成分，是产复欣颗粒、滋肾育胎丸等中成药的主要成分，又常作为饮片，在市场上被大量销售，消费者很容易从网上购买^[4]。菟丝子采用极小粒（千粒重 1 g 左右，平均粒径 1~1.5 mm）种子入药，由于菟丝子为来自丝状寄生植物，南方菟丝子或菟丝子在田间成片生长，杂草不易拔除，因此收获时很容易混入杂草种子，由于菟丝子种子很小、混入的杂草种子等也很小、因此很难去除，会严重影响药材质量。但迄今混杂程度、混入的杂质种类等没有准确鉴定的研究报道。因此开展研究，为菟丝子的药材质量提升提供参考^[5]。DNA 条形码技术是近年来分子生药鉴定的研究热点和方向^[6]，是利用基因组中一段公认的、相对较短的 DNA 序列来进行物种鉴定的一种分子生物学技术，具有简捷便利、准确高效、重复性好、易于推广和标准化等优点，摆脱传统鉴定方法对形态特征的依赖^[7-8]。此外，与二维码相结合也使该技术运用更广泛和快捷。因此，本研究采用形态鉴别和 DNA 条形码鉴定方法对收集的市售菟丝子及其混杂品进行鉴定，并分析市售药材的混杂情况，以期为相关的科研工作和市场监管提供借鉴。

1 材料与仪器

1.1 材料

网络销售的 25 种不同的菟丝子（表 1），国家药用植物种质资源库 2 份菟丝子材料作为标准品。收集的基原植物经中国医学科学院药用植物研究所魏建和研究员鉴定，鉴定结果为菟丝子 *C. australis*

R. Br. 和南方菟丝子 *C. chinensis* Lam.。

离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒（天根生化科技（北京）有限公司 货号 DP 305），2×KAPA HiFi 高保真热启动 DNA 聚合酶预混液（2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit，美国 Kapa Biosystems 公司，货号 KK 2602）。无水乙醇（天津方北联精细化学品开发有限公司），三氯甲烷（北京化工厂），β-巯基乙醇（北京化工厂）。

1.2 仪器与试剂

OLYMPUS SZX9 体视显微镜（日本），MM 400 混合型球磨仪（德国 Retsch 公司），veriti 96 well Thermal Cycler 聚合酶链式反应（PCR）仪（美国 Applied Biosystems 公司），小型高速离心机 Centrifuge 5424（德国 eppendorf 公司）。研磨不锈钢珠 4 mm [柏奥易杰（北京）科技有限公司]，紫外分光光度计 NANODROP 2000（美国 Thermo 公司）。

2 方法

2.1 菟丝子千粒重及种子外形观察

分别从每一种菟丝子中用 SLY-C 型微电脑自动数粒仪随机抽取 2 个重复，每个重复取 1 000 粒用电子天平（0.000 1）进行称定质量，取平均值估算出千粒重。将每一种菟丝子中的种子依据外观特征：籽粒的颜色（黑色、淡褐色、浅黄）、形状（卵圆形、长卵形、宽卵形）、大小（直径差异大的）以及其他特征（表面有无光泽、表明有无凹陷等）进行分类，同类种子用体视镜随机选取 2~3 粒进行拍照观察记录，并用 Toupview 软件进行种子种径法测量种子横纵直径取平均值估算出种子直径，再统计不同品牌菟丝子里每一百粒所含杂质的数量，选取 2 个重复。

2.2 菟丝子 DNA 提取及 PCR 扩增

每类至少取 15 mg 种子用球磨仪加两颗钢珠 4 mm 进行研磨，用植物基因组提取试剂盒进行提取总 DNA，并用紫外分光光度计进行测定浓度。本研究的引物（ITS2F /ITS3R）由北京新时代众合科技

有限公司合成， $25 \mu\text{L}$ PCR 体系， $2 \times$ KAPA HiFi 高保真热启动 DNA 聚合酶预混液 $12.5 \mu\text{L}$ ，引物 ITS2F/ITS3R ($10 \mu\text{mol/L}$) 各 $1 \mu\text{L}$ ，基因组 DNA $2 \mu\text{L}$ ，双蒸水 $8.5 \mu\text{L}$ 。扩增反应程序为 95°C 预变性 3 min ； 98°C 变性 20 s ， 55°C 退火 15 s ， 72°C 延伸 20 s ，共计 40 个循环； 72°C 延伸 7 min 。将 PCR 产物送北京新时代众合科技有限公司进行双向测序。

2.3 ITS2 序列数据处理

将测序得到的正反向序列利用 SeqMan 软件进行剪切拼接，去除引物和低质量区。基于 HMMer 模型的注释方法，去除两端 5.8 S 和 28 S 区段即可获得 ITS2 间隔区序列^[9]。

把序列利用 DNAMAN 软件对测序所得菟丝子 ITS2 序列进行多重序列比对；利用 NCBI 数据

库进行 BLAST 鉴定分析，将 Genbank 数据库中比对相似度达 99% 以上的序列下载用于进化树分析，并用 MEGA 6.0^[10]计算序列 GC 含量和种内、种间 Kimura 双参数模型 (K2P) 遗传距离，利用邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统进化树，同时以自展值 (bootstrap) $1\,000$ 次重复检验各分支的支持率，枝上数值仅显示自展支持率 $\geq 50\%$ ；应用 DNAsp 5.0 软件对 ITS2 序列的功能域和单倍型进行检测。基于 ITS2 数据库 (<http://its2.bioapps.biozentrum.uni-wuerzburg.de/>) 预测 ITS2 序列的二级结构^[11-12]。运用 R 语言基于自行编写的代码把 DNA 序列转化成 DNA 彩色条形码图片，并利用在线二维码生成器将植物拉丁名和序列生成二维码图片^[13]。

表 1 菟丝子样品信息

Table 1 Sample information of *Cuscutae Semen*

编号	商品名称	产地	类型	规格	价格/元
Cus01	菟丝子	内蒙古赤峰/安徽亳州	初级农产品	$150 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	59.00
Cus02	菟丝子	山东	初级农产品	$10 \text{ g} \times 25 \text{ 包}$	28.75
Cus03	菟丝子	山东	初级农产品	$500 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	17.80
Cus04	菟丝子	安徽亳州	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	32.80
Cus05	菟丝子	内蒙古	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	12.80
Cus06	菟丝子	内蒙古	净制	$250 \text{ g} \cdot \text{袋}^{-1}$	20.25
Cus07	特级野生菟丝子	内蒙古	初级农产品	$500 \text{ g} \cdot \text{袋}^{-1}$	39.80
Cus08	菟丝子	安徽	初级农产品	$100 \text{ g} \cdot \text{袋}^{-1}$	40.00
Cus09	菟丝子	内蒙古	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{袋}^{-1}$	49.90
Cus10	菟丝子	安徽亳州	初级农产品	$100 \text{ g} \cdot \text{袋}^{-1}$	29.22
Cus11	菟丝子	安徽亳州	初级农产品	$500 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	44.56
Cus12	菟丝子	安徽亳州	初级农产品	$200 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	42.90
Cus13	菟丝子	内蒙古	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	28.05
Cus14	中药材	内蒙古	初级农产品	$500 \text{ g} \cdot \text{袋}^{-1}$	32.00
Cus15	菟丝子	安徽亳州	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	38.00
Cus16	菟丝子	安徽亳州	初级农产品	$100 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	32.90
Cus17	菟丝子	内蒙古	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	40.00
Cus18	菟丝子	安徽亳州	初级农产品	$40 \text{ g} \times 4 \text{ 包}$	66.01
Cus19	中药材	内蒙古	净制	$5 \text{ g} \times 20 \text{ 包}$	10.60
Cus20	菟丝子	内蒙古	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	32.80
Cus21	菟丝子	漯河	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	23.00
Cus22	菟丝子	内蒙古	初级农产品	$300 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	28.00
Cus23	菟丝子	内蒙古	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	20.00
Cus24	菟丝子	亳州	初级农产品	$250 \text{ g} \cdot \text{罐}^{-1}$	25.00
Cus25	菟丝子	内蒙古	初级农产品	$500 \text{ g} \cdot \text{袋}^{-1}$	30.00

3 结果与分析

3.1 基于 ITS2 序列物种鉴定

将测序得到的 27 条序列导入 DNAMAN 软件进行多重序列比对(图 1)。序列 1 和 2 是国家药用植物种质库菟丝子序列, 从图中可以看发现, 序列 4、5、14、19、20、21、22、23、24、25、26、27 与序列 1 和 2 有明显的差异, 可得出这些序列非菟丝子。通过 Blast 序列比对, 它们分别为藜、铁苋菜、虫实、大豆碎粒、稗子、酸模叶蓼和地肤, 表明 ITS2 序列可以鉴定出菟丝子中不同科的物种。

菟丝子及混伪品 ITS2 全长范围 195~250 bp, GC 含量 54%~68%; 其中铁苋菜和菟丝子 ITS2 全长和 GC 含量比较接近。27 条 ITS2 序列中, 鉴定出菟丝子或南方菟丝子有 14 条, 藜有 7 条, 铁苋菜 1 条, 虫实 1 条, 大豆碎粒 1 条, 稗子 1 条, 酸模叶蓼 1 条, 地肤 1 条。表明菟丝子中藜种子混杂的含量最多(表 2)。

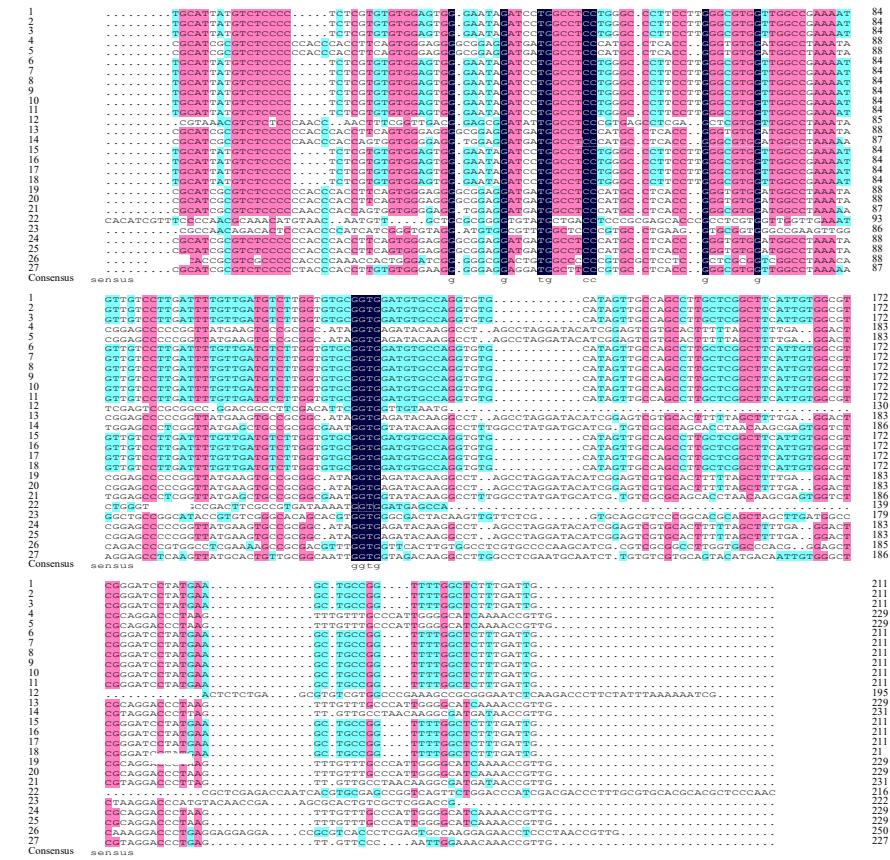


图 1 菟丝子及混伪品种子的 ITS2 多重序列比对

Fig. 1 Multiple alignment of ITS2 sequences of *Cuscutae Semen* and their adulterants

表 2 菟丝子及其混淆品 ITS2 序列比对信息

Table 2 Characteristics of ITS2 sequences from decoction pieces of *Cuscutae Semen* and adulterants

基原植物	序列数目	序列长度/bp	GC/%
南方菟丝子/菟丝子	14	211	54.0
藜	7	229	57.6
铁苋菜	1	195	55.4
虫实	1	231	58.5
大豆碎粒	1	217	58.5
稗子	1	222	64.0
酸模叶蓼	1	250	68.0
地肤	1	227	55.5

3.2 菟丝子与混伪品的遗传距离及亲缘关系

运用 MEGA 6.0 软件计算种内、种间 Kimura 双参数模型(K2P)遗传距离, 结果显示菟丝子与混伪品的遗传距离皆较远, 与最常见的混伪品藜的遗传距离是 0.452, 最远的是与稗子的遗传距离 0.733, 最近的是与虫实的遗传距离为 0.430, 其他分别是与蓼的遗传距离是 0.626, 与铁苋菜的遗传距离是 0.549, 与大豆的遗传距离是 0.533, 与地肤的遗传距离是 0.453。菟丝子种内的遗传距离是 0.000。

利用 NJ 法构建系统进化树, 同时以自展值(bootstrap) 1 000 次重复检验各分支的支持率(图 2)。与“3.1”项鉴定结果一致。

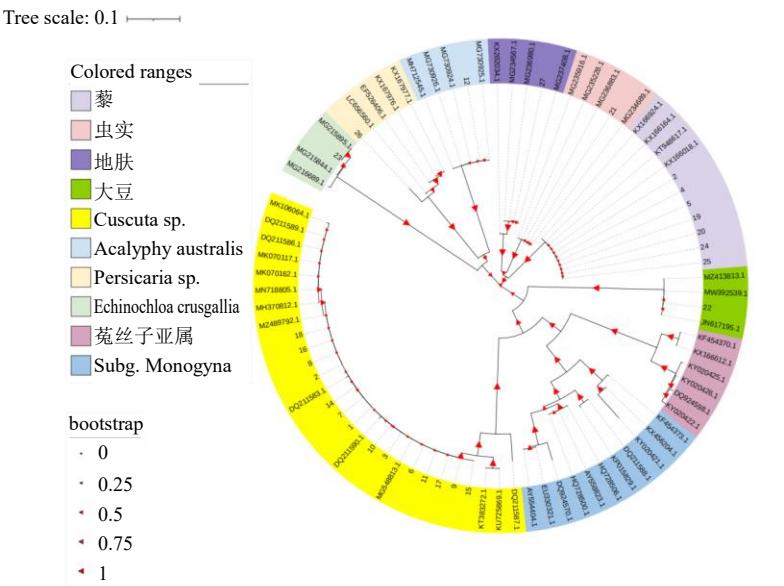


图2 基于ITS2序列构建的菟丝子及其混伪品的NJ树

Fig. 2 NJ tree of *Cuscutae Semen* and adulterants based on ITS2 sequences

3.3 ITS2 单倍型及二级结构分析

应用DNAsp 5.0软件对菟丝子的功能域和单倍型进行分析。可以得到突变位点大部分都在功能域内,所以这些都是有效突变。如图3所示,所有ITS2序列共可分为8个单倍型。这与进化树的聚类分析结果一致。菟丝子的ITS2序列(H1)二级结构,均由1个中心环和4个螺旋区构成,分别为I、II、III

和IV,每个螺旋上又有大小、数目和位置有差异的茎环结构。不同物种螺旋区的茎环结构存在明显的区别。

3.4 市售菟丝子及其混杂物的形态特征及混杂情况

基于上述鉴定结果,对市售材料的混杂物的形态特征、混杂程度情况等进行了详细分析汇总。所有菟丝子均含有杂质,如表3、图4所示,菟丝子

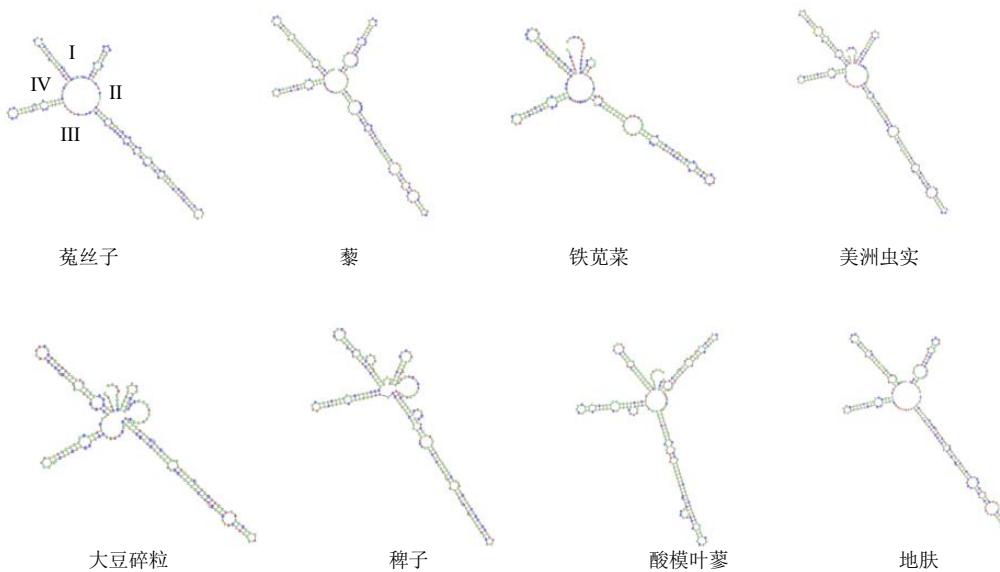


图3 菟丝子及其混伪品ITS2序列单倍型的二级结构

Fig. 3 Secondary structures of ITS2 haplotypes of *Cuscutae Semen* and adulterants

表 3 菟丝子种子外观形态特征

Table 3 Morphological characteristics of *Cuscutae Semen*

编号	物种	颜色	形状	平均粒径/mm
1	菟丝子、南方菟丝子	淡褐色	卵圆形	1.30
2	藜	黑色	卵圆形	1.24
3	铁苋菜	淡褐色	卵形	1.45
4	虫实	黄绿色	长卵形	2.06
5	稗子	淡黄色	卵形	1.93
6	地肤	黑褐色	瓜子形	1.45
7	绿穗苋	黑色、有光泽	卵圆形	0.61
8	酸模叶蓼	棕褐色、有光泽	宽卵形	1.82
9	大豆碎粒	黄色	不规则状	1.47
10	田野菟丝子	黄褐色	卵形	1.58

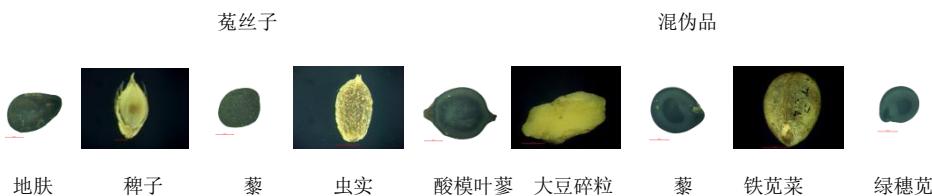


图 4 菟丝子和杂质的形态特征

Fig. 4 Morphological characteristics of *Cuscutae Semen* and adulterants

及其杂质、混伪品非常微小，直径都在 1.09~2.03 mm，如表 4 所示样品的千粒重也很小，都在 1.005~1.405 g。肉眼辨别具有很大难度，容易出现偏差。藜种子、地肤种子、铁苋菜种子和菟丝子大小接近，其中铁苋菜种子和菟丝子颜色大小更为类似，极易和菟丝子混淆。绿穗苋种子略小，虫实种子略大。

据表 4 可看出，本实验购买的菟丝子药材均不是纯净单一的，至少都含有一种杂质藜种子，不同品牌菟丝子所含杂质的数量和种类不同，其中，藜和绿穗苋种子是最常见的混伪品。质量差的药材所含藜和绿穗苋的含量达 30% 以上，质量优的品牌藜或绿穗苋为 2% 左右，但大部分样品混杂量为 10% 以上。因此可见市售菟丝子药材质量差别很大。此外，菟丝子药材中还有一些其他杂质，因量少且种类杂，在此没有进行鉴定。另外，由菟丝子药材的质量和价格存在一定的正相关，价格越高，混伪品越少。

3.5 DNA 条形码、二维码分析

用 R 语言编写的代码将不同物种的 ITS2 单倍型 DNA 序列转换为彩色条形码图片（图 5），其中不同颜色代表不同碱基，数字代表序列长度。利用二维生成器将各物种拉丁名和 ITS2 序列进行编码，获得不同物种的二维码图片（图 5），通过扫描该该物种对应的二维码，得到其拉丁名和 ITS2 序列。该序列进入 DNA 条形码鉴定网站（<http://www.tcmbarcode.cn>）对该序列进行序列验证。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中各物种。

4 讨论

菟丝子是缠绕寄生植物，极易与寄主、其他杂草种子混杂，又由于种子比较微小，极难与杂质区分及挑选出来，因此市场上流通的菟丝子药材一般都是混伪品，但关于其混杂情况包括常见混杂物、

表4 菟丝子每100粒所含杂质的种类和数量

Table 4 Types and numbers of adulterants per 100 grains of *Cuscutae Semen*

编号	千粒重/g	混伪品1	混伪品2	混伪品3	混伪品4
Cus01	1.2043	23粒绿穗苋	10粒藜	1粒稗子	1粒其他
Cus02	1.0051	15粒藜	2粒稗子	2粒地肤	1粒其他
Cus03	1.4050	19粒藜	1粒稗子		
Cus04	1.0034	7粒藜	2粒地肤	2粒其他	
Cus05	1.1141	26粒绿穗苋	8粒藜	2粒其他	
Cus06	1.3122	16粒藜	1粒其他		
Cus07	1.2132	17粒藜			
Cus08	1.0214	1粒藜	1粒大豆碎粒	1粒其他	
Cus09	1.0653	10粒绿穗苋	9粒藜	3粒其他	
Cus10	1.4085	9粒藜	1粒绿穗苋		
Cus11	1.3139	1粒藜	1粒大豆碎粒	1粒其他	
Cus12	1.2432	15粒藜	2粒绿穗苋	3粒秸秆	2粒其他
Cus13	1.2179	16粒藜	1粒其他		
Cus14	1.1362	2粒藜	1粒地肤	1粒大豆碎粒	
Cus15	1.3330	4粒藜	2粒绿穗苋	2粒其他	
Cus16	1.1770	4粒藜	1粒绿穗苋	2粒其他	
Cus17	1.3192	7粒藜	2粒地肤	2粒其他	
Cus18	1.2452	1粒藜	2粒其他		
Cus19	1.2565	10粒藜	1大豆碎粒		
Cus20	1.2075	8粒藜	1粒绿穗苋		
Cus21	1.2541	9粒藜	1粒绿穗苋		
Cus22	1.1282	8粒藜			
Cus23	1.0458	23粒藜			
Cus24	1.3682	19粒藜	1粒稗子		
Cus25	1.2147	7粒藜	2粒地肤	2粒其他	

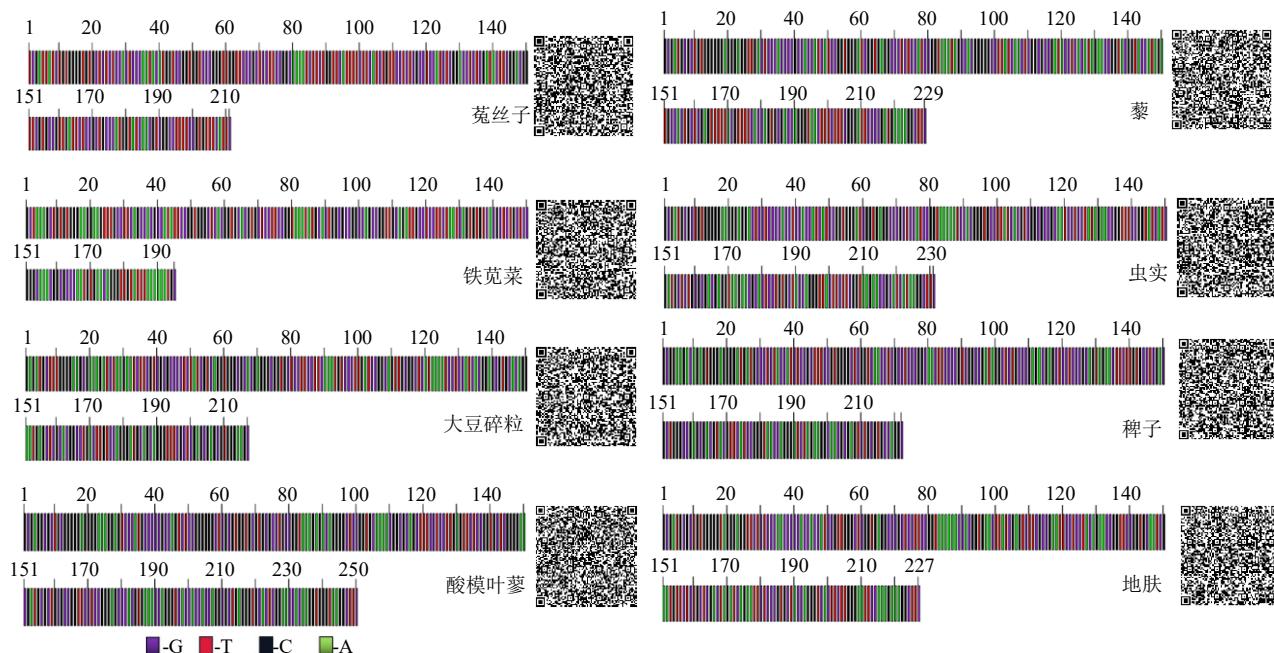


图5 各物种DNA条形码和二维码

Fig. 5 DNA barcodes and two-dimensional DNA barcode images of eight species

混杂比例等的研究一直未有报道，影响了菟丝子种子质量标准的制定，以及规范种植、对菟丝子药材的监管及市场流通的把关。

本研究发现市售菟丝子中混杂情况严重，大部分样品混杂量为10%以上，最高混杂量可达30%以上，藜种子、绿穗苋种子、稗子、地肤子、大豆碎粒、蓼种子、铁苋菜种子、虫实种子等为常见混伪品。其中藜种子、绿穗苋种子、蓼种子是有毒种子^[14-15]。藜种子属于藜科藜属，种子含有大量皂苷类化合物，可能会引起溶血现象^[16-17]。绿穗苋属于苋科苋属，该属植物种子含凝集素，可能会引起腹泻、恶心、腹胀、呕吐，营养不良和免疫（过敏）反应^[18-19]。酸模叶蓼属于蓼科蓼属，蓼种子含大量鞣质，可能会导致人体出现便秘、腹痛、呕吐^[20-21]。本实验样品中有很多品牌的藜种子和绿穗苋种子的混杂量很高，除影响药效外，可能还会对人体产生一定的危害。

刘爱朋等^[22]研究对细小种子类药材的鉴别主要利用微性状分析等传统鉴定手段，这需要鉴定人有专业的鉴定经验且容易受种子发育形态和环境条件的影响。本研究首次证实了ITS2序列可以为易混淆的微小种子类中药材的鉴定提供了借鉴，弥补了传统鉴定方法的不足。为药材原料的准确采购、市场流通及质量监管提供了技术参照，以确保微小种子类中药材的有效性和安全性。

此外，本研究还利用R语言编写代码生成了菟丝子及其混伪品的DNA条形码和二维码。辛天怡等^[23]提出将二维DNA条形码技术应用于中药材流通监管领域，建立中药材二维DNA条形码流通监管体系的构想。贾静等^[24]首先在动物药僵蚕药材中得到运用，开创“互联网+”二维条形码技术，基于DNA条形码信息的跨平台转换，建立了僵蚕药材二维DNA条形码流通监管体系。随后在植物药中，任莉等^[25]建立了酸枣仁的专属二维DNA条形码，雷美艳等^[26]构建了常山药材二维DNA条形码鉴定体系，实现“互联网+”的跨平台信息交换。本研究建立菟丝子等微小种子类药材二维DNA条形码鉴定体系，菟丝子等微小易混淆种子类中药材可以通过移动终端扫描二维码识读进行种子混伪品鉴别，确保种子的正确性与安全性，以一种简单科学，易于推广与监督的方式，进行中药材市场标准化管理。因此，本研究对提升菟丝子等微小种子的质量，完善种子生产经营管理模式，进一步加快形

成中药材种子信息化、标准化的运行管理机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 322.
- [2] Donnapee S, Li J, Yang X, et al. *Cuscuta chinensis* Lam.: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 157: 292-308.
- [3] 卓小霞, 段宏婷, 闫媛聪, 等. 菟丝子中黄酮类成分的生物活性及体内代谢的研究进展 [J]. 华西药学杂志, 2023, 38(6): 705-710.
- [4] 王莹, 张婧如, 田伟, 等. 菟丝子及其提取物药理机制研究进展 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(11): 1961-1962.
- [5] 杨志业, 林锦锋. 菟丝子及其混伪品DNA条形码鉴别研究 [J]. 中国科协第334次青年科学家论坛会议手册, 2018: 9-10.
- [6] 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.
- [7] 陈士林, 庞晓慧, 罗煜, 等. 生物资源的DNA条形码技术 [J]. 生命科学, 2013, 25(5): 458-466.
- [8] 王丽丽. DNA条形码鉴定中药材和中成药的应用研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.
- [9] Keller A, Schleicher T, Schultz J, et al. 5.8S-28S rRNA interaction and HMM-based ITS2 annotation [J]. *Gene*, 2009, 430(1/2): 50-57.
- [10] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [11] 戚文涛, 李剑超, 王晨, 等. 应用ITS2条形码及种子形态鉴定柴胡属种子 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(11): 170-177.
- [12] 姜钊, 色里玛, 李捷, 等. 基于ITS2序列的藏当归及易混植物DNA分子鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2021, 49(17): 58-63.
- [13] 高婷, 辛天怡, 宋洁洁, 等. 市售中药材冬葵子和苘麻子ITS2条形码鉴定 [J]. 中草药, 2017, 48(13): 2740-2745.
- [14] 陈冀胜, 郑硕. 中国有毒植物 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 36.
- [15] 中国科学院植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 78.
- [16] Milone M. Handbook of toxicologic pathology [J]. *Hum Pathol*, 2002, 33: 947.
- [17] 孟驿佳, 康乐, 王媛, 等. 2020年版《中国药典》(一部)

- [17] 有毒中药毒性成分及毒性特点分析 [J]. 中药药理与临床, 2023, 39(1): 99-104.
- [18] 傅书遐. 湖北植物志 (一) [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001: 42.
- [19] 翁成国. 有毒中药的传统药性特征研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [20] 白贞芳, 王宁, 吴菲, 等. 常见有毒药材的毒性差异分析 [J]. 中国药物警戒, 2022, 19(4): 353-356.
- [21] 张洪岐, 刘颖, 周超凡. 中药材科属与毒性关系探讨 [J]. 中国药物警戒, 2022, 19(3): 283-286.
- [22] 刘爱朋, 张树旺, 王世信, 等. 10 种细小果实种子类药材的微性状鉴别 [J]. 中成药, 2022, 44(6): 1869-1874.
- [23] 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.
- [24] 贾静, 石林春, 姚辉, 等. 市售动物药材僵蚕的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 药学学报, 2016, 51(11): 1784-1790.
- [25] 任莉, 陈新连, 石林春, 等. 应用 DNA 条形码技术鉴定中药材酸枣仁 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(1): 35-39.
- [26] 雷美艳, 张娜娜, 张军, 等. 基于 DNA 条形码鉴定植物药常山及其混伪品 [J]. 植物科学学报, 2017, 35(3): 379-386.

[责任编辑 时圣明]