基于DNA metabarcoding技术的如意金黄散处方成分鉴定研究

石林春^{1,2}, 刘金欣^{1,3}, 魏妙洁¹, 谢丽芳⁴, 宋经元^{1*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 北京 100193;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

3. 承德医学院河北省中药研究与开发重点实验室, 承德 067000;

4. 中国医学科学院&北京协和医学院信息中心, 北京 100730

* 联系人, E-mail: jysong@implad.ac.cn

收稿日期: 2017-09-16; 接受日期: 2017-12-03; 网络版发表日期: 2018-03-27

国家自然科学基金(批准号: 81703659)、中国博士后科学基金(批准号: 2017M610815)、河北省教育厅青年拔尖项目(批准号: BJ201602)和河北省自然科学基金(批准号: H2017406031)资助

摘要 中药的有效性和安全性是国内外关注的热点, 本研究以如意金黄散为例, 基于DNA metabarcoding技术, 尝试从投料药材真伪角度评价中药的有效性和安全性。首先, 收集如意金黄散处方成分药材及其混伪品样品161份, 从已发表文献中下载密切相关物种序列154条, 构建“如意金黄散DNA条形码鉴定数据库”, 该数据库包含10属119个物种。收集不同批次的如意金黄散样品3份, 以ITS2序列为条形码, 使用Illumina HiSeq平台进行PE250深度测序, 利用本研究构建的“如意金黄散DNA条形码鉴定数据库”进行投料药材基原物种识别, 结果表明, 基于DNA metabarcoding技术可检测到除厚朴外的全部处方成分, 不同药材的测序量存在显著差异; 检测到苍术药材的混伪品朝鲜苍术和天南星药材的混伪品虎掌南星, 提示如意金黄散临床使用的有效性和安全性存在潜在风险; 不同批次鉴定结果具有稳定性和可重复性。本研究表明, 基于DNA metabarcoding技术的如意金黄散处方成分鉴定方法符合中药复杂体系特点, 有望成为中成药鉴定的新方法, 并为中成药的有效性和安全性评价提供参考。

关键词 中成药, DNA metabarcoding, 处方成分, 鉴定, 安全性

中成药是现代中医辨证施治、临床应用的重要工具。近年来, 一系列中药安全事件使中药的安全性、有效性问题受到广泛关注。“龙胆泻肝丸事件”中将关木通与木通混淆使用, “云南白药含草乌事件”中未在说明书中标注含草乌, “四磨汤事件”中的槟榔致毒争议。2012年, Coghlan等人^[1]从15个澳大利亚海关截获的中

成药样品中鉴定出濒危和有毒物种, 包括亚洲黑熊(*Ursus thibetanus*)、赛加羚羊(*Saiga tatarica*)等濒危物种, 麻黄属(*Ephedra*)、细辛属(*Asarum*)等有毒植物。2013年, Newmaster等人^[2]对北美42种草药产品进行鉴定, 发现1/3的草药产品处方成分存在掺伪现象, 30种草药产品使用了处方成分的替代品。当前, 我国中药类

引用格式: 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. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 490–497
Shi L C, Liu J X, Wei M J, et al. DNA metabarcoding identification of prescription ingredients in traditional medicine Ruyi Jinhuang San (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 490–497, doi: [10.1360/N052017-00204](https://doi.org/10.1360/N052017-00204)

产品出口仍以植物提取物、中药材和中药饮片等原料药为主, 中成药的国际化水平有待提高. 据海关统计数据^[3], 2015年我国中药类产品出口额为37.70亿美元, 其中植物提取物21.63亿美元, 占58%; 中药材及中药饮片10.58亿美元, 占28%; 中成药2.62亿美元, 占7%. 因此, 以国际通行方法, 从物种识别层面建立中成药的有效性、安全性评价体系, 是中成药获得国际认可的重要前提.

随着基于DNA条形码技术的检测方法纳入中国、英国等世界主流药典^[4,5], DNA条形码技术已成为中药鉴定的国际通行标准^[6], 用于中药生产、流通、销售和国际贸易的各个环节^[7-9]. 2012年, Taberlet等人^[10]在题为“Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding”一文中提出了“DNA metabarcoding”的概念, 即通过从混合样品中直接提取全部动植物的DNA, 扩增DNA条形码序列, 使用高通量测序技术进行深度测序, 利用DNA条形码的研究策略从混合样品中鉴定所有动植物的物种组成. DNA metabarcoding技术可实现高通量鉴定混合样品中的多个物种, 已成功用于混合样品中动植物群落物种构成的研究. 2012年, Yu等人^[11]利用DNA metabarcoding技术研究7个节肢动物的物种构成, 表明DNA metabarcoding技术是一种快速有效评估生物群落中物种多样性的方法. Bienert等人^[12]通过构建14个蚯蚓物种的参考数据库, 重新设计短的序列引物, 实现对土壤样品中蚯蚓物种构成的分析. 2013年, Leray等人^[13]设计扩增产物为313 bp的*COI*引物, 利用DNA metabarcoding技术对珊瑚礁鱼的肠道内含物进行物种多样性分析, 发现分属于16个门的334个分类单元序列.

如意金黄散初见于明代·陈实功所著的《外科正宗》, 为外科常用药^[14]. 据2015版《中国药典》记载^[15], 如意金黄散清热解毒, 消肿止痛, 用于热毒瘀滞肌肤所致疮疡肿痛、丹毒流注, 含天花粉、姜黄、大黄、黄柏、白芷、陈皮、甘草、苍术、厚朴、生天南星等10味药材, 制法为“将十味药材粉碎成细粉, 过筛, 混匀即得”. 处方中甘草、厚朴、黄柏为《国家重点保护野生药材物种名录》收录的中药材, 生天南星为禁止上市非法经营的28种有毒中药材之一. 本研究选取中药传统散剂如意金黄散为研究对象, 探讨DNA metabarcoding技术在中成药处方成分鉴定中的可行性.

1 材料与方法

1.1 材料

本研究共收集如意金黄散处方成分及其混伪品样品161份, 含35个物种(网络版附表1). 另从已发表文献中下载密切相关物种ITS2序列154条, 含90个物种(网络版附表2). 从北京某药店购买如意金黄散样品3份, 生产批号分别为: 16101001(JHS001), 16101004(JHS002), 16101006(JHS003), 执行标准为《中华人民共和国药典》2010版一部. 全部凭证样本保存于中国医学科学院药用植物研究所, 原植物样品均经中国医学科学院药用植物研究所林余霖研究员鉴定.

1.2 DNA提取、PCR扩增和序列测定

原植物和药材样品称取30~50 mg, 中成药样品称取60 mg, 使用RBC Bioscience的MagCore® HF16 Plus全自动核酸提取仪和MagCore® Genomic DNA Plant Kit进行DNA提取. PCR扩增使用ITS2序列短引物^[16] *MS2F*: 5'-GAGTCTTTGAACGCAAGTTG-3'和*MS2R*: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3', 引物合成时在引物5'端添加MID标签: ACATGACGAC(JHS001), ACGTCTCATC(JHS002), AGCACTGTAG(JHS003). 使用优化的PCR mix (专利申请号: CN201510532874.6), PCR反应体系(25 μ L): PCR mix 12.5 μ L, *MS2F*引物1 μ L, *MS2R*引物1 μ L, DNA 2 μ L, ddH₂O 8.5 μ L; 为避免环境污染影响, PCR扩增体系配制使用Opentrons实验室自动化工作站完成. 原植物和药材样品的PCR产物测序使用ABI 3730XL测序仪完成, 测序结果均提交到NCBI的GenBank数据库(MF589342-MF589502). 中成药PCR产物测序使用Illumina HiSeq测序平台完成, 测序结果提交到NCBI的SRA数据库(SRX3057215).

1.3 数据分析方法

ABI测序峰图拼接和引物去除使用Codoncode Aligner 7.0 (CodonCode, USA)软件; 利用muscle 3.8程序进行多序列比对^[17]; 应用PUAP 4.0软件计算种内、种间遗传距离^[18], 种内、种间遗传距离分析方法参照Chen等人^[19]的方法; 利用Mega 7.0软件进行NJ邻接树构建^[20]. 使用FLASH 1.9软件完成Pair-End reads拼接^[21]; 使用Trimmomatic 0.36软件完成低质量Reads过

滤^[22]; 使用UCHIME 4.2软件去除人工嵌合体^[23], 参考数据库使用Chen等人^[6]构建的中草药DNA条形码鉴定数据库, 其他使用默认参数; 使用HMMER 3.1软件完成ITS2序列注释^[24]; 使用Python 2.7软件和BioPython 1.68软件完成Uniq序列获取; 使用BLAST方法和Tree-Building方法进行物种鉴定。

2 结果

2.1 如意金黄散DNA条形码鉴定数据库构建

除厚朴基原物种厚朴(*Magnolia officinalis*)和凹叶厚朴(*Magnolia officinalis* var. *biloba*)无法获得ITS2条形码序列外, 本研究共获得如意金黄散处方成分9味药材及其混伪品的161条ITS2序列, 含35个物种。另从已发表文献中下载密切相关物种的154条ITS2序列, 含90个物种。

以上述ITS2条形码序列构建如意金黄散DNA条形码鉴定数据库, 共10属119物种315条ITS2序列, 包含172个ITS2序列单倍型, 相关条形码数据纳入中草药DNA条形码鉴定数据库(www.tcmbarcode.cn)。数据库中序列的种间距离 $\bar{x}$ 为 0.0546 ± 0.0454 , 种间平均 θ' 值为 0.0389 ± 0.0324 , 种间最小距离 $\bar{x}$ 为 0.0231 ± 0.0299 ; 种内距离 $\bar{x}$ 为 0.0042 ± 0.0112 , 种内平均 θ' 值为 0.0105 ± 0.0268 , 种内最大距离 $\bar{x}$ 为 0.0127 ± 0.0272 。为减少NJ系统发育树的复杂度, 使用ITS2序列单倍型构建NJ系统发育树。9个药材基原物种的单倍型可聚为独立的枝, 与密切相关物种及易其混伪品可区分白芷、大黄、甘草、天花粉等4味药材的不同基原物种之间区分困难(图1)。

2.2 Illumina高通量测序及数据分析

3批次如意金黄散样品所提取DNA的浓度均大于200 ng/ μ L, $A_{260/280}$ 比值处于1.7~2.0, 电泳检测结果存在弥散现象, 表明样品基因组DNA浓度和纯度较高, 但完整性较差。使用在5'端添加MID标签的引物分别扩增3个如意金黄散样品的ITS2序列, 构建一个混合的PE250文库, 使用Illumina HiSeq测序平台进行深度测序, 根据MID标签区分不同样品, 每个样品分别获得97642, 95299和96230条PE250 reads。数据分析流程及分析结果如下(图2): (i) Pair-End reads拼接: 3个样品分别获得70933, 69991和70098拼接后序列; (ii) 低质量Reads过滤: 过滤后3个样品分别获得70311, 69568,

69593条序列; (iii) 去除人工嵌合体: 3个样品分别发现16, 32, 32条人工嵌合体; (iv) ITS2序列注释: 3个样品分别获得69044, 67537和68321条注释后的ITS2序列; (v) Uniq序列获取: 3个样品分别获得294, 312和312条Uniq的ITS2序列。

2.3 如意金黄散有效性及安全性评价

处方与中成药药源的一致性保障中成药有效性与安全性的前提, 本研究使用以下评价标准从处方药材投料真伪角度评价如意金黄散的有效性: (i) 有效性: 是否可以检测到处方成分药材; (ii) 安全性: 是否可以检测到处方成分药材的混伪品或替代品。

有效性: 如意金黄散处方成分所含10味药材, 厚朴由于所选条形码序列限制无法检测到^[25]。使用DNA metabarcoding技术, 可检测到天花粉、姜黄、大黄、黄柏、白芷、陈皮、甘草、苍术等8味药材, 未检测到天南星药材(表1)。

安全性: 天花粉、姜黄、大黄、黄柏、白芷、陈皮、甘草等7味药材的基原物种与2015版《中国药典》规定相符。除检测到苍术药材的正品基原物种外, 还检测到苍术药材的主要混伪品朝鲜苍术。可检测到天南星药材主要替代品虎掌南星(表1)。

3 讨论

3.1 中成药生产中混伪品的使用危害中药安全性和有效性

中药材市场存在混伪品、替代品, 影响中药产业健康发展, 危害中药临床用药的安全性和有效性, 也影响中药的国际声誉。“马兜铃酸肾病事件”导致国际上对中草药和中成药的质疑, 部分欧美媒体称之为“中草药肾病”, 其原因^[26,27]是误用了防己的替代品广防己, 木通的替代品关木通。广防己是马兜铃科植物广防己(*Aristolochia fangchi*)的干燥根。防己是防己科植物粉防己(*Stephania tetrandra*)的干燥根。关木通是马兜铃科植物关木通(*Aristolochia manshuriensis*)的干燥藤茎, 木通是木通科植物木通(*Akebia quinata*)、三叶木通(*A. trifoliata*)或白木通(*A. trifoliata* subsp. *australis*)的干燥藤茎。“马兜铃酸肾病事件”后, 2005版及之后《中国药典》已不再收载关木通和广防己。“鱼腥草注射剂事

图 1 基于119个物种的172条ITS2序列单倍型构建的NJ系统发育树

H代表单倍型

件”使人们对中药注射剂的安全性提出质疑, 引发社会对中药注射剂存废的争论. 鱼腥草注射剂除自身化学

成分性质不稳定等因素外, 有研究表明, 鱼腥草注射剂的原料来源极其混乱, 采收加工也不规范^[28,29], 2015

表 1 如意金黄散处方成分药材鉴定结果^{a)}

	药材名	植物名	拉丁名	JHS001	JHS002	JHS003
正品	白芷	白芷	<i>Angelica dahurica</i>	√	√	√
	白芷	杭白芷	<i>A. dahurica</i> var. <i>formosana</i>	√	√	√
	苍术	苍术	<i>Atractylodes lancea</i>	√	√	√
	陈皮	橘	<i>Citrus reticulata</i>	√	√	√
	大黄	药用大黄	<i>Rheum officinale</i>	√	√	√
	大黄	掌叶大黄	<i>R. palmatum</i>	√	√	√
	大黄	唐古特大黄	<i>R. tanguticum</i>	√	√	√
	甘草	光果甘草	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	√	√	√
	甘草	胀果甘草	<i>G. inflata</i>	√	√	√
	甘草	甘草	<i>G. uralensis</i>	√	√	√
	厚朴	厚朴	<i>Magnolia officinalis</i>	×	×	×
	厚朴	凹叶厚朴	<i>M. officinalis</i> var. <i>biloba</i>	×	×	×
	黄柏	黄皮树	<i>Phellodendron chinense</i>	√	√	√
	姜黄	姜黄	<i>Curcuma longa</i>	√	√	√
	天花粉	栝楼	<i>Trichosanthes kirilowii</i>	√	√	√
	天花粉	双边栝楼	<i>T. rosthornii</i>	√	√	√
	天南星	东北天南星	<i>Arisaema amurense</i>	×	×	×
	天南星	天南星	<i>A. erubescens</i>	×	×	×
	天南星	异叶天南星	<i>A. heterophyllum</i>	×	×	×
混伪品	苍术混伪品	朝鲜苍术	<i>Atractylodes koreana</i>	√	√	√
	天南星混伪品	虎掌南星	<i>Pinellia pedatisecta</i>	√	√	√

a) “√”表示可检测到该物种序列; “×”表示未检测到该物种序列

版《中国药典》^[15]规定鱼腥草的基原为三白草科植物蕺菜(*Houttuynia cordata*), 而部分地区使用裸蒴(*Gymnotheca chinensis*)和白苞裸蒴(*Gymnotheca involucrate*)代替蕺菜使用。

中药材市场混伪品、替代品存在的现象较为普遍。国家“七·五”重点科技攻关项目“常用中药材品种整理和质量研究”的市场药源调查表明^[30], 123类常用中药材品种均存在不同程度的混伪品或替代品现象。2016年, 韩建萍等人^[31]研究表明, 中药材市场中存在约4.2%的混伪品。截止2017年6月, 以“中药伪品”为关键词在中国知网(<http://www.cnki.net>)进行检索, 有超过1000篇有关中药伪品的研究。例如, 余伯阳和徐国钧^[32]对从24个省、市(区)收集到的69份商品麦冬样品进行鉴定, 发现有9种2变种沿阶草属和山麦冬属植物的块根。贾静等人^[33]对市售鹿茸粉药材鉴定表明仅约38%待检样品基原为2010版《中国药典》规定的梅花

鹿或马鹿。刘旭朝等人^[34]研究表明, 54.8%的市售水牛角药材来源于水牛, 29%的市售水牛角药材来源于牦牛。辛天怡等人^[35]研究表明, 市售红景天药材只有40%属于《中国药典》规定的基原物种大花红景天(*Rhodiola crenulata*)。中药材市场混伪品、替代品的存在必然会反映到中成药处方成分中。本研究在如意金黄散中检测到苍术和天南星的替代品朝鲜苍术和虎掌南星。其中生天南星为国家规定的28种严禁非法销售毒性中药品种之一, 天南星的替代品虎掌南星也是毒性植物, 毒性药材的使用混乱给如意金黄散的安全用药带来不确定性。

3.2 中成药鉴定技术需伴随着现代科学技术的发展不断进步, 以保障中药的安全性和有效性

中成药鉴定相较于中药材鉴定更为困难。古代中药鉴定技术仅限于运用眼、耳、鼻、舌等感官器官对

图 2 如意金黄散DNA metabarcoding鉴定数据分析流程

中药的外观、性状、气味等进行鉴定^[36]。新中国成立后,虽然中药鉴定技术有了较显著的发展,但在1953年版《中国药典》^[37]和1963年版《中国药典》^[38]的中药成方制剂项下并未收载鉴定方法。1977年版《中国药典》^[39]增加了中药成方制剂的显微鉴别法。1985年版《中国药典》^[40]增加了中药成方制剂的薄层色谱法,同时显微鉴别法成为中成药鉴定的重要手段^[41]。1995年版《中国药典》^[42]增加了中药成方制剂的高效液相色谱法和气相色谱法。2000年版《中国药典》^[43]直至2015年版《中国药典》^[15]并未增加新的中药成方制剂鉴定方法,中成药鉴定方法有待伴随着现代科学技术的发展突破与提高。以如意金黄散为例,2015年版《中国药典》^[15]收载了显微鉴别法、薄层色谱法和高效液相色谱法等鉴别方法。显微鉴别法适用于处方成分中大黄、陈皮、苍术、生天南星、黄柏、甘草、

厚朴和天花粉等8味药材的鉴定;薄层色谱法适用于处方成分中大黄、黄柏、厚朴、甘草和白芷等5味药材的鉴定;高效液相色谱法适用于处方中姜黄所含姜黄素的含量测定。中成药传统鉴别方法一般仅适用于对处方中几味药材的鉴定,适用范围有限,且鉴定结果依赖于鉴定者专业知识和经验的积累,对同属物种的区分能力有限^[44]。当前,中药材DNA条形码鉴定方法已经纳入中国药典^[4],与高通量技术相结合的DNA metabarcoding技术在中成药鉴定中将具有广阔应用前景。2017年,贾静等人^[45]基于DNA条形码(ITS2, *psbA-trnH*)和高通量测序技术(SMRT)对中药益母丸生物成分进行鉴定,表明DNA metabarcoding技术可作为有效方法检测中药益母丸的合法性和安全性。本研究进一步表明, DNA metabarcoding技术符合中药复杂体系特点,有望成为中成药鉴定的新方法。

参考文献

- 1 Coghlan M L, Haile J, Houston J, et al. Deep sequencing of plant and animal DNA contained within traditional Chinese medicines reveals legality issues and health safety concerns. *PLoS Genet*, 2012, 8: e1002657
- 2 Newmaster S G, Grguric M, Shanmughanandhan D, et al. DNA barcoding detects contamination and substitution in North American herbal products. *BMC Med*, 2013, 11: 222
- 3 柳燕, 于志斌, 姜丽, 等. 2015年中药商品进出口分析. *中国现代中药*, 2016, 18: 225-229

- 4 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2015年版, 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015. 383–385
- 5 British Pharmacopoeia Commission. British pharmacopoeia, 2017 Edition. London: TSO, 2016
- 6 Chen S, Pang X, Song J, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA. *Biotech Adv*, 2014, 32: 1237–1244
- 7 辛天怡, 姚辉, 罗焜, 等. 羌活药材 ITS/ITS2 条形码鉴定及其稳定性与准确性研究. *药学报*, 2012, 47: 1098–1105
- 8 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. *中国科学: 生命科学*, 2015, 45: 695–702
- 9 张改霞, 金钺, 贾静, 等. 药用植物羌活种子 DNA条形码鉴定研究. *中国中药杂志*, 2016, 41: 390–395
- 10 Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Mol Ecol*, 2012, 21: 2045–2050
- 11 Yu D W, Ji Y, Emerson B C, et al. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods Ecol Evol*, 2012, 3: 613–623
- 12 Bienert F, De Danieli S, Miquel C, et al. Tracking earthworm communities from soil DNA. *Mol Ecol*, 2012, 21: 2017–2030
- 13 Leray M, Yang J Y, Meyer C P, et al. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front Zool*, 2013, 10: 34
- 14 陈实功. 外科正宗. 北京: 人民卫生出版社, 1964
- 15 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2015年版, 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015, 224, 892–893
- 16 Song J, Shi L, Li D, et al. Extensive pyrosequencing reveals frequent intra-genomic variations of internal transcribed spacer regions of nuclear ribosomal DNA. *PLoS ONE*, 2012, 7: e43971
- 17 Edgar R C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 1792–1797
- 18 Swofford D L. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) PAUP* 4.0. Sunderland: Sinauer, 1999
- 19 Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 2010, 5: e8613
- 20 Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33: 1870–1874
- 21 Magoč T, Salzberg S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, 27: 2957–2963
- 22 Bolger A M, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014, 30: 2114–2120
- 23 Edgar R C, Haas B J, Clemente J C, et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics*, 2011, 27: 2194–2200
- 24 Zhang Z, Wood W I. A profile hidden Markov model for signal peptides generated by HMMER. *Bioinformatics*, 2003, 19: 307–308
- 25 陈士林. 中国药典中药材DNA 条形码标准序列. 北京: 科学出版社, 2015. 333
- 26 陈文, 谌贻璞, 李安, 等. 马兜铃酸肾病的临床与病理表现. *中华医学杂志*, 2001, 81: 1101–1105
- 27 Wu L, Sun W, Wang B, et al. An integrated system for identifying the hidden assassins in traditional medicines containing aristolochic acids. *Sci Rep*, 2015, 5: 11318
- 28 曾聪彦, 梅全喜. 从“鱼腥草注射液事件”看中药注射剂不良反应产生的根源. *中国药房*, 2007, 18: 401–403
- 29 李曼, 赵志恒, 王忠, 等. 鱼腥草注射液安全性的计量学评价. *中国药物警戒*, 2012, 9: 85–88
- 30 徐国钧, 徐珞珊. 常用中药材品种整理和质量研究. 南方协作组, 第一册, 1994
- 31 Han J, Pang X, Liao B, et al. An authenticity survey of herbal medicines from markets in China using DNA barcoding. *Sci Rep*, 2016, 6: 18723
- 32 余伯阳, 徐国钧. 麦冬类中药的药源调查和商品鉴定. *中国药科大学学报*, 1991, 22: 150–153
- 33 贾静, 石林春, 徐志超, 等. 市售鹿茸粉药材的DNA条形码鉴定. *药学报*, 2015, 50: 1356–1361
- 34 刘旭朝, 周丽思, 刘金欣, 等. 基于COI序列的水牛角及其易混伪品DNA条形码鉴定研究. *药学报*, 2017, 52: 494–499
- 35 Xin T, Li X, Yao H, et al. Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues. *Sci Rep*, 2015, 5: 8337
- 36 康廷国. 中药鉴定学. 北京: 中国中医药出版社, 2012
- 37 中央人民政府卫生部. 中华人民共和国药典, 1953年版, 一部. 上海: 商务印书馆, 1953
- 38 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典, 1963年版, 一部. 北京: 人民卫生出版社, 1964
- 39 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典, 1977年版, 一部. 北京: 人民卫生出版社, 1978
- 40 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典, 1985年版, 一部. 北京: 人民卫生出版社, 化学工业出版社, 1985
- 41 康廷国, 赵立彦, 欧阳新燕. 新药典中成药显微鉴别浅析. *中成药*, 1987, 8: 003
- 42 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典, 1995年版, 一部. 广州: 广东科技出版社, 北京: 化学工业出版社, 1995

- 43 国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2000年版, 一部. 北京: 化学工业出版社, 2000
- 44 陈士林, 郭宝林, 张贵君, 等. 中药鉴定学新技术新方法研究进展. 中国中药杂志, 2012, 37: 1043–1055
- 45 Jia J, Xu Z, Xin T, et al. Quality control of the traditional patent medicine Yimu Wan based on SMRT sequencing and DNA barcoding. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 926

DNA metabarcoding identification of prescription ingredients in traditional medicine Ruyi Jinhuang San

SHI LinChun^{1,2}, LIU JinXin^{1,3}, Wei MiaoJie¹, Xie LiFang⁴ & SONG JingYuan¹

1 Key Lab of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of the People's Republic of China, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

2 Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

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

4 Information Centre, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

The efficacy and safety of traditional Chinese medicine are global concerns. Here, we selected a traditional medicinal powder Ruyi Jinhuang San as a research subject and employed DNA metabarcoding technology to identify its ingredients. First, 161 specimens constituting the ingredients of Ruyi Jinhuang San and their adulterants were collected. In addition, 154 ITS2 sequences belonging to the closed related species of these ingredients were extracted from the published literatures. First, a DNA barcode reference library of Ruyi Jinhuang San, comprising 119 species belonging to 10 genera, was constructed. Second, three different batches of Ruyi Jinhuang San were collected, and ITS2 was selected as a DNA barcode. PCR products were sequenced with the Illumina HiSeq sequencing platform using PE250 libraries. Taxonomy assignments were completed with the help of the above-mentioned DNA barcode reference library. The results indicated that all ingredients of Ruyi Jinhuang San can be successfully detected except Houppo. The medicine Cangzu had been contaminated with *Atractylodes koreana*. The medicine Tiannanxing had been substituted with *Pinellia pedatisecta*. The contamination and substitution of medicinal ingredients are potential threats to consumer safety and medicinal effectiveness. The authentication results of different samples are repeatable and stable. In conclusion, DNA metabarcoding is a valuable technology to validate the efficacy and safety of traditional Chinese medicine and has the potential to be a new method for identifying traditional Chinese medicine ingredients.

traditional Chinese medicine, DNA metabarcoding, prescription ingredients, identification, adulteration

doi: [10.1360/N052017-00204](https://doi.org/10.1360/N052017-00204)