基于ITS2序列的川贝母中成药的鉴定

高梓童¹, 王晓玥¹, 刘杨¹, 韦学敏¹, 韩建萍^{1*}, 陈士林^{2*}

1. 中国医学科学院&北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193;

2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

* 联系人, E-mail: jphan@implad.ac.cn; slchen@icmm.ac.cn

收稿日期: 2017-08-27; 接受日期: 2017-10-16; 网络版发表日期: 2018-02-23

国家自然科学基金(批准号: 81673552)、中国医学科学院北京协和医学院创新团队(批准号: CIFMS, 2016-I2M-3-016)资助

摘要 润肺圣药川贝母资源匮乏, 为国家三级保护植物. 近年雾霾天气频发使得其资源需求加大, 导致以川贝母入药的中成药掺假现象严重. 中成药成分复杂, 单利用普通的DNA条形码鉴定流程无法对其一次性完成鉴定, 因此需结合单克隆分析逐一鉴定. 本研究首先建立了包含贝母属208条ITS2序列的数据库; 收集了市售20份川贝母中成药, 其中包含15份蛇胆川贝胶囊, 4份川贝末胶囊和1份蛇胆川贝散. 扩增其ITS2序列, 对PCR产物进行克隆测序, 对测序结果进行BLAST比对; 同时本实验还选取了3份蛇胆川贝胶囊进行高通量测序, 利用单克隆和二代测序相结合的混合测序方法对该3份中成药中川贝母再次鉴定. 基于二代测序数据对中成药组分解析存在数据冗余现象, 而单克隆结果与选取的克隆数量有关, 二者结合可相互弥补缺陷. 单克隆结果数据表明, 15份蛇胆川贝胶囊中3份含有平贝母, 10份含有伊贝母及14份含有黄花贝母等非标签成分, 4份川贝末胶囊中有2份检测到川贝母, 2份检测到平贝母, 但同时3份中还检测到黄花贝母; 1份蛇胆川贝散中仅检测到伊贝母与黄花贝母. 二代测序结果表明, 3份蛇胆川贝胶囊中主要检测出平贝母、伊贝母等非标签成分. 通过比对二者序列, 发现无论克隆还是二代测序数据均表明混合测序的3份蛇胆川贝胶囊中均不含川贝母; 研究表明, 基于单克隆和二代测序辅助的方法可以准确对川贝母中成药进行鉴定. 目前川贝母中成药掺假现象严重, 平贝母和伊贝母是川贝母中成药的主要掺伪品, 应加强对中成药市场的监管.

关键词 川贝母, 蛇胆川贝, 中成药, ITS2, 单克隆, 高通量测序

中药安全事件频发, 给中药临床应用带来极大挑战. 有研究表明, 在发展中国家约10%的药品为假冒伪劣品, 网络出售假药现象突出, 通过互联网购买的药品约50%是假药^[1-3]. 韩建萍等人^[4]对中国7个主要中药材市场的1260份中药材的鉴定结果表明, 约4.2%的中药材为混伪品; 中药材是中成药的原料药, 中成药用量

较大, 《国家基本药物目录》1996~2012年的版本中, 中成药所占比例为30%~70%不等^[5]. 王晓玥等人^[6]应用“当归分子身份证”对市场上售卖的成分表中标有“当归”的中成药以及粉末进行了鉴定, 结果表明其中26.92%的中成药, 以及77.78%的粉末含有混伪品.

川贝母(*Fritillariae cirrhosae* Bulbus)作为中国传

引用格式: 高梓童, 王晓玥, 刘杨, 等. 基于ITS2序列的川贝母中成药的鉴定. 中国科学: 生命科学, 2018, 48: 482-489

Gao Z T, Wang X Y, Liu Y, et al. Identification of Chinese patent medicines containing *Fritillariae cirrhosae* bulbus using ITS2 region (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2018, 48: 482-489, doi: [10.1360/N052017-00201](https://doi.org/10.1360/N052017-00201)

统常用药材已经有长达2000年的历史, 其因味苦, 性微寒, 具有清热润肺, 化痰止咳等主要功效, 被称为“润肺圣药”^[7,8]. 大量研究表明, 川贝母对急性支气管炎和支气管炎症有很好的疗效^[9,10], 近几年全国各地雾霾频发, 对川贝母中成药的需求加大. 目前市场上已经有超过350种川贝母中成药, 每年的销售额可以达到30亿人民币. 然而与极大市场需求相反, 川贝母的年产量为100~200吨, 仅占市场份额5%~10%, 如今的价格已经达到4000元/kg. 川贝母与其5种同基原植物暗紫贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia)、梭砂贝母(*Fritillaria delavayi* Franch.)、瓦布贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen与*Fritillaria unibracteata* var. *longinectarea*)、太白贝母(*Fritillaria taipaiensis* P. Y. Li)、甘肃贝母(*Fritillaria przewalskii* Maxim)均被列为国家三级保护植物. 由于中成药本身的特殊性, 如化学成分复杂、溶解性差别较大、指标成分含量较低等, 给其多组分的提取以及同时分离测定带来了一定的困难. 传统的化学方法(色谱), 仅能从化学层面上侧面体现出中成药中包含的化学成分, 但对于无特征性化学物质的药用成分及污染物无法进行追溯, 且存在相同化学成分也可能存在其他物种的替代品, 目前还没有一个较完善的方法可以溯源中成药的成分组成. 中成药鉴定方法缺失, 为不法药商造假提供了可趁之机^[11].

DNA条形码作为存在于基因组中一段标准短小片段现已经被广泛应用于物种鉴定、亲缘关系的研究. 因其可以不受物种的性状、形态约束, 拥有比传统的形态、理化鉴定等更强的鉴定优势^[12,13]. ITS2作为核糖体内转录翻译区的一段短片段, 具有重复率高, 重组率快, 种内保守, 长度适宜的特点, 现被大量用于物种鉴定研究^[14]. 罗焜等人^[15]的研究也表明, 利用ITS2序列可以将川贝母与其混伪品进行有效的区分, 且其二级结构也存在明显差异; 向丽等人^[16]对川贝母的鉴定结果表明, ITS2序列可以准确区分川贝母与其混淆品. 目前二代测序, 即高通量测序结合宏基因组学可以对物种丰富的生物群落进行分析测评^[17]. 中成药成分复杂, 通常含有多种药材, 鉴定存在困难. 高通量测序即可通过大量测序与条形码扩增对中成药的整体成分进行分析, 即基于meta-barcoding对中成药进行鉴定. 然而二代测序技术解析其组分尚存在一定缺陷, 测序

结果通常繁杂冗余且会引入大量污染对结果分析造成干扰. Cheng等人^[18]的研究显示, 通过二代测序在六味地黄丸中检测到了其他非标签成分; Coghlan等人^[19]对26份中药材进行二代测序后得出50%的样品检测出未知植物或动物序列的结果; Ivanova等人^[20]则以膳食补充剂作为研究对象进行了二代测序实验, 结果表明检测到真菌, 推测是来自于样品加工发酵过程中. 考虑到二代测序在得到大量可信数据的同时, 也会产生大量冗余及污染数据. 因此本研究为弥补高通量测序的不足, 采用单克隆实验对二代测序实验结果进行验证, 其可因克隆数量多少决定对扩增混合产物的分离情况且会减少污染情况, 与二代测序相互弥补缺陷, 确保实验结果的可信度.

本研究首先建立了贝母属ITS2序列数据库, 采用单克隆和二代测序相结合对市售20份川贝中成药进行鉴定.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 数据库获取与样品采集. 本次建立了包含25个贝母属物种, 1种非贝母属物种, 一共208条ITS2序列的数据库. 其中155条来自课题组已发表文章^[16]; 24条由中国医学科学院药用植物研究所张本刚研究员提供; 14条由药用植物研究所新疆分所提供; 15条来自于GenBank数据库, 其中10条已发表(网络版附表1)^[21,22]. 20份中成药分别采购于各大药房, 包括7份不同厂家批次的蛇胆川贝胶囊, 8份不同厂家批次的牛黄蛇胆川贝胶囊, 4份川贝末胶囊以及1份蛇胆川贝散.

1.2 方法

(1) DNA提取. 取样品40~50 mg, 利用芮宝16全自动核酸提取仪进行DNA提取, 具体流程参照操作说明书.

(2) 单克隆PCR扩增. 采用TaKaRa LA Taq高保真酶进行PCR扩增, 引物为ITS2F/3R, 体系25 μ L. 扩增程序采用ITS2通用扩增程序^[14], 并将扩增产物利用TAE凝胶电泳进行检测与切胶纯化. 纯化产物与Peasy载体进行连接, 并且转入DH5 α 进行克隆, 挑取30个单克隆进行培养, 菌液利用普通PCR进行扩增检测, 并利用1%的TBE琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 合格的产物送

至中国农业科学院重大工程实验室进行测序。

(3) 高通量测序PCR扩增. 挑选了3份蛇胆川贝胶囊, 分别为SDCB02-04, 为了区分不同的中成药样品, 设计10 bp的MID (multiplex identifier)标签添加到ITS2的通用引物ITS2F/3R的5'端; 考虑到中成药的DNA降解严重, 扩增长片段存在困难, 另设计引物扩增300 bp左右的ITS2短片段, 该引物同样添加有MID标签(网络版附表2). 利用高保真酶进行短片段和ITS2序列的PCR扩增(25 μ L体系), 扩增体系同前. 扩增产物利用1%的TAE凝胶进行检测, 并在紫外灯下对目的片段进行胶回收, 具体操作流程参考回收试剂盒(DP209, 天根生化科技有限公司(北京)). 将纯化合格的样品送至北京诺赛基因组研究中心有限公司进行二代高通量测序(Illumina HiSeq 2500).

(4) 克隆数据处理. 应用软件CodonCode Aligner 6.0.2去除测序接头、低质量区, 与序列拼接, 在ITS2 database中进行ITS2序列注释, 去除5.8S与28S多余片段. 所有序列在本次建立的数据库中进行比对, 确定物种.

(5) 高通量序列数据处理. 利用Putty链接服务器, 利用FileZilla Client进行服务器与本地的数据传输, 利用Trimmomatic 0.33 (USAELLA.org)去除测序接头、低质量区, 进行数据筛选, 过滤; 运用QIME 1.9.0进行数据统计和多样性分析, NGS QC Toolkit v2.3.3软件包进行数据组装和质量控制, 最终得到合格序列, 剔除短于100 bp的片段, 在数据库中进行序列比对, 确定物种.

2 结果

2.1 川贝母及其混淆品ITS2序列数据库的建立

本研究建立了川贝母及其混淆品的ITS2序列数据库. 该库包括川贝母(*F. cirrhosa* D. Don)、暗紫贝母(*F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia)、梭砂贝母(*F. delavayi* Franch.)、瓦布贝母(*F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* (S.Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen与*Fritillaria. unibracteata* var. *longinectarea*)、太白贝母(*F. taipaiensis* P. Y. Li)、甘肃贝母(*F. przewalskii* Maxim.)、混伪品平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)、伊贝母(*Fritillaria pallidiflora* Schrenk)、新疆贝母(*Fritillaria walujewii* Regel)、黄花贝母(*Fritillaria verticillata* Willd.)、小花

贝母(*Fritillaria meleagroides* Patrin)、裕民贝母(*Fritillaria yuminensis* X.Z.Duan)、浙贝母(*Fritillaria thunbergii* Miq.)、粗茎贝母(*Fritillaria crassicaulis* S. C. Chen)、皖贝母(*Fritillaria anhuiensis* S. C. Chen & S. F. Yin in S. F. Yin)、湖北贝母(*Fritillaria hupehensis* Hsiao et K. C. Hsia)、天目贝母(*Fritillaria monantha* Migo)、中华贝母(*Fritillaria sinica* S. C. Chen)和轮叶贝母(*Fritillaria maximowiczii* Freyn)以及土贝母(*Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet)在内的193条ITS2序列. 其中155条来自课题组已发表文章^[15]. 原植物样品采自于全国各地, 具有一定代表性. 下载的15条来自GenBank的序列中有10条序列已在文章中发表. 数据库序列包括了市场上常见的川贝母混淆品的序列, 所有ITS2序列可以准确将正品川贝母与混淆品如浙贝母、伊贝母、平贝母、轮叶贝母以及土贝母进行区分, 伊贝母与新疆贝母亲缘关系较近. BLAST结果表明, 数据库中所有数据准确可靠, 可以用于后续中成药分析.

2.2 克隆测序结果BLAST分析

20份中成药通过ITS2通用引物扩增成功率为100%, 均达到了测序要求. 通过Sanger测序后得到的测序峰图皆为套峰, 表明PCR产物中存在多个物种. 因此对20份中成药进行了单克隆, 每份挑取30个克隆进行测序, 将所获得序列放入贝母ITS2序列数据库中进行BLAST分析. 结果表明, 在8份牛黄蛇胆川贝胶囊中均检测到伊贝母或近缘种黄花贝母, 并未检测到川贝母. 在7份蛇胆川贝胶囊中3份检测到平贝母(SDCB02, SDCB06-07), 5份检测到黄花贝母等成分(SDCB01-05), 4份检测到了小花贝母(SDCB01,05-07), 并未检测到川贝母. 在4份川贝末胶囊中其中两份检测到了川贝母(CBM02-03), 两份检测到了平贝母(CBM03, CBM04), 但这4份均检测到了伊贝母和黄花贝母序列, 其中3份确定为黄花贝母(CBM01-03). 蛇胆川贝散中没有检测到川贝母, 仅检测到了伊贝母及黄花贝母(表1).

2.3 高通量测序结果分析

3份蛇胆川贝胶囊(SDCB02-04)进行高通量测序(HiSeq2500)后最终获得1033165条序列. 经过过滤低质量序列、去除接头(index)、在数据库中进行BLAST

的结果表明, 3份样品中均检测到了平贝母序列, 其中在SDCB02, SDCB03, SDCB04中分别检测到了205257, 114999和694条. 在SDCB02, SDCB03, SDCB04中检测到了伊贝母序列, 分别为43, 20, 2257条, 在SDCB04中获得一条裕民贝母序列. 所有3份样品中均未检测到川贝母的任何一个基原物种.

对克隆序列和高通量测序序列分析结果表明, SDCB02样品两种测序结果分析一致, 均检测到平贝母和伊贝母, 但在SDCB03, SDCB04样品中克隆实验结果完整度低于高通量测序, 仅检测到了伊贝母以及伊贝母的近缘种黄花贝母, 而高通量测序除伊贝母外

还检测到了平贝母和裕民贝母, 且通过两种测序手段均未检测出川贝母(表2).

为了进一步验证BLAST结果的准确性, 本研究将数据库标准序列与克隆和高通量测序的单倍型一起构建了NJ系统发育树, 其聚类分析结果表明, 川贝母及其同基原物种与伊贝母、平贝母亲缘关系较远, 聚在不同枝上, 可以进行准确区分. 伊贝母同新疆贝母及黄花贝母存在较近亲缘关系, 裕民贝母与小花贝母之间亲缘关系较近(图1). NJ树鉴定结果也与BLAST鉴定结果一致, 实验获得的川贝母序列可以和数据库序列聚为一支, 且与实验数据中的伊贝母、黄花贝母、平

表 1 20份中成药测序结果汇总

No.	中成药名称	成分	产地	克隆测序结果
SDCB01	蛇胆川贝胶囊	蛇胆汁、川贝母	山西大同	伊贝母、黄花贝母、小花贝母
SDCB02	蛇胆川贝胶囊	蛇胆汁、川贝母	湖北武汉	伊贝母、平贝母、黄花贝母
SDCB03	蛇胆川贝胶囊	蛇胆汁、川贝母	湖北武汉	伊贝母、黄花贝母
SDCB04	蛇胆川贝胶囊	蛇胆汁、川贝母	福建漳州	伊贝母、黄花贝母
SDCB05	蛇胆川贝胶囊	蛇胆汁、川贝母	广东广州	伊贝母、小花贝母
SDCB06	蛇胆川贝胶囊	蛇胆汁、川贝母	湖北武汉	平贝母、黄花贝母、小花贝母
SDCB07	蛇胆川贝胶囊	蛇胆汁、川贝母	湖北武汉	平贝母、黄花贝母、小花贝母
NHSD01	牛黄蛇胆川贝胶囊	人工牛黄、蛇胆汁、川贝母	安徽合肥	伊贝母、黄花贝母
NHSD02	牛黄蛇胆川贝胶囊	人工牛黄、蛇胆汁、川贝母	安徽合肥	黄花贝母
NHSD03	牛黄蛇胆川贝胶囊	人工牛黄、蛇胆汁、川贝母	安徽合肥	伊贝母、黄花贝母
NHSD04	牛黄蛇胆川贝胶囊	人工牛黄、蛇胆汁、川贝母	安徽合肥	伊贝母、黄花贝母
NHSD05	牛黄蛇胆川贝胶囊	人工牛黄、蛇胆汁、川贝母	安徽合肥	黄花贝母
NHSD06	牛黄蛇胆川贝胶囊	人工牛黄、蛇胆汁、川贝母	安徽合肥	伊贝母、黄花贝母
NHSD07	牛黄蛇胆川贝胶囊	人工牛黄、蛇胆汁、川贝母	安徽合肥	黄花贝母
NHSD08	牛黄蛇胆川贝胶囊	人工牛黄、蛇胆汁、川贝母	安徽合肥	伊贝母、黄花贝母
CBM01	川贝末胶囊	川贝母	湖北襄阳	黄花贝母
CBM02	川贝末胶囊	川贝母	陕西西安	川贝母、黄花贝母
CBM03	川贝末胶囊	川贝母	陕西西安	川贝母、平贝母、黄花贝母
CBM04	川贝末胶囊	川贝母	陕西西安	平贝母、伊贝母
SDCBS01	蛇胆川贝散	蛇胆汁、川贝母	广东佛山	伊贝母、黄花贝母

表 2 克隆测序与二代测序结果对比

编号	平贝母		伊贝母		裕民贝母		川贝母	
	克隆测序	二代测序	克隆测序	二代测序	克隆测序	二代测序	克隆测序	二代测序
SDCB02	√	√ (205257)	√	√ (43)	—	—	—	—
SDCB03	—	√ (114999)	√	√ (20)	—	—	—	—
SDCB04	—	√ (694)	√	√ (2257)	—	√ (1)	—	—

图1 基于混合测序ITS2序列与数据库序列NJ树(网络版彩图)

图中标红序列为实验序列, 标黑序列为数据库序列

贝母、裕民贝母、小花贝母等可以明显分开。且通过川贝母标准序列与其余贝母实验序列进行种间分析可以看出川贝母与其余5种非基原贝母都存在5个以上的变异位点(网络版附表3)。

3 讨论

3.1 当前市售川贝母中成药掺假情况严重

根据本次研究结果可得, 购买的市售20份中成药中无一达标, 含有大量平贝母及伊贝母成分, 掺假率达100%, 仅9%含有川贝母成分, 这无疑反映了在川贝母资源稀缺而市场需求量巨大的不平衡下存在的严重掺假现象。造成这种掺假行为的原因可分析如下: (i) 贝母属植物种类繁多分布广泛, 且无论是形态还是活性成分都有相似之处, 然而价格却天差地别, 为获取高昂利润, 掺假者将价格低廉的贝母掺入川贝母中成药中; (ii) 川贝母本身有强大的市场需求, 然而资源稀缺, 为了满足生产所需弥补资源不足, 不法商家便选取其余贝母作为替代品, 如平贝母、贝母与川贝母药效相近, 可以作为川贝母的代用药材^[23,24], 市场上有以平贝母入药的中成药, 但若某一中成药采用平贝母应备案并在包装盒标明具体成分及具体含量, 否则所生产的药品皆为假药; (iii) 目前对于贝母中成药的检测

方法还处于初级阶段, 因此在监控不严格的情况下, 将其他贝母作为代替品生产中成药并不易被检测出来。根据《中华人民共和国药典》(2015版), 《中华人民共和国卫生部药品标准中药成方制剂》以及《新药转正标准》, 现记载的以川贝母为君药的中成药中绝大多数关于贝母的标准仅存在鉴别项, 而定量标准并不完善^[25]。目前对于川贝母常用的鉴别方式, (i) 显微鉴别, 描述项主要为与浙贝母的区别, 并未涉及其余贝母属如平贝母、伊贝母的鉴别区别。 (ii) 鉴别的方式是根据川贝母的药理活性物质如贝母素乙、西贝母碱等进行薄层色谱鉴定。然而这两项不足以作为中成药中川贝母成分检测的有效方法, 且就对于本研究中的蛇胆川贝胶囊而言, 川贝母在每克中成药中含量并未提及, 即便可用HPLC方法进行含量检测, 也可通过其余贝母属物种代替以次充好、混淆结果。 (iii) 在2015版《中国药典》中收录了对川贝母的分子鉴定方法, 但该方法只能对正品川贝母进行鉴定, 而无法对其中存在的混伪品进行区分, 鉴定不完全, 存在缺陷。可见不止蛇胆川贝胶囊, 所有市售川贝母中成药的检测方法都存在不足。中成药鉴定方法缺失使得掺假现象层出不穷, 这不仅严重违反了国家法律, 也深深侵害到了市场药品的安全秩序, 伤害到了消费者的基本权益。

3.2 二代测序与DNA条形码克隆测序相结合可有效鉴定川贝母中成药

DNA条形码检测可以弥补目前检测手段的不足,其可以从物种DNA而不仅是形态学或者是活性化学成分进行判断,更具有说服力.且因DNA条形码均为短片段,具有极高的重复率与重组率,针对已经多次处理的中成药也可以做到成功获取目的片段.本研究中的胶囊样品均未经过度处理,基本是原粉入药,因此DNA未出现过度降解的情况,可以扩增出完整条形码片段.片段长度满足二代测序的需求.蛇胆川贝胶囊与川贝末胶囊成分简单,原药材中仅含有川贝母,然而鉴于贝母成分存在多物种掺杂,PCR过程中产生碱基错配或者扩增失败的情况,普通的PCR无法一次检测,因此进行了单克隆对中成药成分进行解析,且并未得到川贝母成分.单克隆无法得到中成药中所有成分,在本研究中大部分中成药虽未获得川贝母成分,并不能得到该份中成药中不存在川贝母的结论,但鉴于检测到大量未在成分表上的其余贝母成分,可以表明目前所购买的蛇胆川贝胶囊与川贝末胶囊中的确存在严重的掺假现象.

此外,挑选了3份蛇胆川贝胶囊进行了二代测序(Illumina HiSeq 2500),获得了大量的数据,然而鉴于在制药过程和加工处理过程都会引入外界污染,且污染随机,导致最终测序结果中存在大量污染数据冗余的情况.本次测序结果中除去有效贝母属序列外,测序结果还包含多种成分表中未标注的物种.对比二者结果可以看出,两种测序结果均检测出了伊贝母成分,两份中成药在克隆测序中未检测到平贝母成分,而在二代测序中可以检测出,且两种测序方法均未检测到

川贝母成分.结合两种测序方法可以看出克隆测序与二代测序方法各有优劣,在大量数据获取并广泛测序上二代测序较克隆测序可以获得更广泛的数据量,其中在2份中成药中有所体现,其除去伊贝母外还检测到了平贝母成分以及裕民贝母成分,然而二代测序过程中难以避免存在引入外源污染问题以及数据冗余现象,对后期数据处理带来了极大的困难.而克隆测序则不存在数据冗余外源污染等问题,所有克隆结果均取决于实验挑选克隆的数量,且可以对二代测序结果进行二次验证,确保测序准确性.因此单克隆(浅度测序)和二代测序(深度测序)相互校正可弥补方法上的缺陷.

综合二代测序结果与克隆测序结果,在20份市售川贝母中成药中,存在大量平贝母、伊贝母与黄花贝母掺假的现象,仅在2份川贝末胶囊中检测到川贝母成分,分析实验序列与数据库序列建树结果也明显可以看出伊贝母、平贝母与川贝母之间序列差异较大,聚在不同的支上,可以准确进行区分,掺假率高达100%.

3.3 DNA条形码鉴定的局限性

DNA条形码具有通过分子水平直接鉴定物种的优势,且可通过聚类分析、遗传分析等手段分析正品与混伪品之间亲缘关系,但这并不表明可以代替常用的化学检测手段如HPLC,因其并不能做到明确的含量测定,而中成药中某一药材的活性成分的含量测定对于该成药的质量保证至关重要.在对于贝母中成药的检测手段可以采用化学与分子手段相结合的方式,二者可以相互弥补检测的不足,完善中成药的质量监督,保证消费者安全用药.

致谢 感谢药用植物研究所新疆分所向丽、张本刚研究员提供序列.

参考文献

- 1 Fotiou F, Aravind S, Wang P P, et al. Impact of illegal trade on the quality of epoetin alfa in Thailand. *Clin Therapeut*, 2009, 31: 336–346
- 2 World Health Organization. Medicines: spurious falsely—labelled falsified counterfeit (SFFC) medicines. 2018. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs275/en/>
- 3 Garuba H A, Kohler J C, Huisman A M. Transparency in Nigeria's public pharmaceutical sector: perceptions from policy makers. *Glob Health*, 2009, 5: 14
- 4 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

- 5 陈晶, 聂青, 刘妍. 我国中药基本药物存在的问题及建议. 中草药, 2014, 45: 2883–2886
- 6 Wang X, Liu Y, Wang L, et al. A nucleotide signature for the identification of *Angelicae sinensis* Radix (Danggui) and its products. *Sci Rep*, 2016, 6: 34940
- 7 余世春, 肖培根. 中药贝母的药用历史及发展方向. 中国中药杂志, 1990, 15: 6–8
- 8 王天志, 杜蕾蕾, 王曙. 川贝母的研究进展. 华西药学杂志, 2001, 16: 200–203
- 9 李厚忠, 齐敏, 张羽飞. 中药川贝对哮喘大鼠NO、TNF- α 、MDA浓度和SOD活力及支气管平滑肌炎症反应的影响. 中医药学报, 2013, 41: 64–67
- 10 孙涛, 彭成, 谢晓芳, 等. 川贝母止嗽颗粒对大鼠急性支气管炎的影响. 中药药理与临床, 2013, (3): 150–153
- 11 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 中国医药科技出版社, 2015. 1487
- 12 Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci*, 2003, 270: 313–321
- 13 陈士林, 宋经元. 本草基因组学. 中国中药杂志, 2016, 41: 3881–3889
- 14 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
- 15 罗焜, 马培, 姚辉, 等. 基于ITS2序列鉴定川贝母及其混伪品基原植物. 世界科学技术: 中医药现代化, 2012, 14: 1153–1158
- 16 Xiang L, Su Y, Li X, et al. Identification of *Fritillariae bulbus* from adulterants using ITS2 regions. *Plant Gene*, 2016, 7: 42–49
- 17 Tringe S G, Rubin E M. Metagenomics: DNA sequencing of environmental samples. *Nat Rev Genet*, 2005, 6: 805–814
- 18 Cheng X, Su X, Chen X, et al. Biological ingredient analysis of traditional Chinese medicine preparation based on high-throughput sequencing: the story for Liuwei Dihuang Wan. *Sci Rep*, 2014, 4: 5147
- 19 Coghlan M L, Maker G, Crighton E, et al. Combined DNA, toxicological and heavy metal analyses provides an auditing toolkit to improve pharmacovigilance of traditional Chinese medicine (TCM). *Sci Rep*, 2015, 5: 17475
- 20 Ivanova N V, Kuzmina M L, Braukmann T W A, et al. Correction: authentication of herbal supplements using next-generation sequencing. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0168628
- 21 Rønsted N, Law S, Thornton H, et al. Molecular phylogenetic evidence for the monophyly of *Fritillaria* and *Lilium* (Liliaceae; Liliales) and the infrageneric classification of *Fritillaria*. *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 35: 509–527
- 22 Gao Y D, Hohenegger M, Harris A, et al. A new species in the genus *Nomocharis* Franchet (Liliaceae): evidence that brings the genus *Nomocharis* into *Lilium*. *Plant Syst Evol*, 2012, 298: 69–85
- 23 刘宁. 平贝母的研究进展. 黑龙江医药, 2006, 19: 496–497
- 24 李兴斌, 高燕飞, 李吉良. 平贝母化学成分及药理活性研究进展. 中医药信息, 2004, 21: 28–29
- 25 陈丽华, 张清华, 张丽华, 等. 含贝母类中成药质量标准现状分析与思考. 中华中医药杂志, 2014, (10): 3044–3046

Identification of Chinese patent medicines containing *Fritillariae cirrhosae* bulbus using ITS2 region

GAO ZiTong¹, WANG XiaoYue¹, LIU Yang¹, WEI XueMin¹, HAN JianPing^{1*} & CHEN ShiLin²

¹ 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

Fritillariae cirrhosae bulbus (BM CPMs), which is used as an effective treatment for moistening lung, has been listed in the third level of protection category due to its decline in the wild. The demand has greatly increased since 2013 along with the growing concern over the high frequency of fog and haze. Shedanchuanbei particles are one of the adulterants or substituents that frequently occur in Chinese patent medicines containing BM CPMs. In this research, we first established a BM database comprising 208 ITS2 sequences from 25 species of *Fritillaria* and 1 adulterant. We then collected 20 commercial BM CPMs, selecting 20 CPMs for cloning experiments, which included 15 batches of shedanchuanbei particles, 4 batches of chuanbeimo particles, and 1 batch of shedanchuanbei powder. Results of cloning experiments revealed that among 15 batches of shedanchuanbei particles, 3 batches contained *F. ussuriensis* bulbus, 10 batches contained *F. pallidiflorae* bulbus, and 14 batches contained *F. verticillate*. Moreover, among 4 batches of chuanbeimo particles, only 2 batches contained BM CPM, but these batches were adulterated with *F. ussuriensis* bulbus and *F. verticillate*. Both *F. pallidiflorae* bulbus and *F. verticillate* were detected in shedanchuanbei powder. Three batches of shedanchuanbei particles were also analyzed using high-throughput sequencing, which detected no BM CPM. This study presents the seriousness of the herbal adulterant problem and the feasibility of the TA cloning with high-throughput sequencing for identifying CPM.

***Fritillariae cirrhosae*, shedanchuanbei particles, Chinese patent medicines, ITS2, TA clone, high-throughput sequencing**

doi: [10.1360/N052017-00201](https://doi.org/10.1360/N052017-00201)