

关于中成药水蜜丸制剂掺伪米粉监管方法的研究

王菲菲[#], 任秀[#], 李静, 白继超, 张聿梅, 刘雅丹^{*}, 崔生辉^{*}, 马双成(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 为了解决中成药水蜜丸掺伪米粉无检测方法的问题, 引入普通PCR方法和荧光探针PCR方法并制定相应新标准, 以完善中成药掺伪检测的监管体系。方法: 以通宣理肺丸为例, 着重介绍引入PCR方法在完善中成药米粉掺伪检测体系中发挥的新作用。方法通过优化样品前处理和DNA提取过程, 采用生物信息学分析和试验验证对检索得到的引物和探针特异性进行评估, 并对2种方法的特异性、检出限、精密度和重复性进行考察和比较, 对市售样品进行筛查。结果: 试验通过评估DNA分子提取质量, 选定了天根DNA提取试剂盒; 建立了普通PCR方法和荧光探针PCR方法, 并获得了适合于本研究的特异性引物和探针; 2种PCR方法的检出限均为 $1 \text{ g} \cdot \text{Kg}^{-1}$; 普通PCR方法精密度和重复性良好, 荧光探针PCR方法的精密度RSD为1.56% (Ct值=29.74), 重复性RSD为1.98% (Ct值=29.88)。试验对3个厂家9批次样品进行筛选, 结果表明6批次A厂家的样品掺入了米粉。PCR产物经过克隆测序后, 与NCBI数据库比对, 确认为水稻 (*Oryza sativa* L.)。根据不同PCR检测方法的特点, 通过参考其他行业标准, 首次制定了中成药掺伪米粉的PCR检验检测标准。结论: 建立了水蜜丸中普通PCR和荧光探针PCR掺伪检测方法并制定相应检测标准, 通过新方法和新标准的建立, 弥补了掺伪检测在监管中的漏洞, 完善了中成药监管的标准化体系。

关键词: 中成药标准化体系; 监管方法; 米粉掺伪; 普通PCR反应; 荧光探针PCR方法

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2021)12-1364-11

doi:10.16153/j.1002-7777.2021.12.007

Research on the Supervision Method about the Detection of Adulterated Rice in Chinese Patent Medicines

Wang Feifei[#], Ren Xiu[#], Li Jing, Bai Jichao, Zhang Yumei, Liu Yadan^{*}, Cui Shenghui^{*}, Ma Shuangcheng (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: In order to solve the problem that there is no detection method for the detection of adulterated rice in water pills, the conventional PCR and fluorescence probe PCR method were introduced and corresponding new standards were formulated to improve the supervision system for the adulteration detection in Chinese patent drugs. **Methods:** Taking Tongxuan Lifei Wan as an example, the new role of PCR in perfecting the adulteration detection system of Chinese patent medicine rice flour was introduced emphatically. The sample pretreatment and process of DNA extraction was optimized, the specificity of the retrieved primers and TaqMan

作者简介: 王菲菲, 博士, 副研究员; 研究方向: 中药化学, 中药分子生物学和实验室质量控制; Tel: (010) 53851366; E-mail: sophice999@sina.com
共同第一作者: 任秀, 硕士, 主管药师; 研究方向: 食品微生物学, 食品分子生物学; Tel: (010) 67095927; E-mail: wanwan329@sina.com
通信作者: 崔生辉, 博士, 研究员; 研究方向: 食品微生物学, 食品生物技术; Tel: (010) 67065601; E-mail: cuishenghui@aliyun.com
刘雅丹, 硕士, 主管药师; 研究方向: 实验室质量管理, 能力验证及标准物质质量体系研究; Tel: (010) 53851487;
E-mail: liuyadan@nifdc.org.cn

probes was evaluated by bioinformatics analysis and experimental validation. The specificity, limit of detection (LOD), precision and repeatability of the two methods were investigated and compared, and commercial samples were screened. **Results:** TianGen DNA extraction kits were selected by evaluating the quality of DNA molecular extraction. The common PCR method and fluorescence probe PCR method were established, and the specific primers and probes suitable for this study were obtained. The detection limits were 0.001g in the two PCR methods. The conventional PCR method maintained good precision and reproducibility. In fluorescence probe PCR analysis, the precisions (RSD, %) were 1.56% (Ct =29.74) and the respectabilities were 1.98% (Ct = 29.88). Total 9 batches of samples from 3 factories were screened and the results show that 6 batches of samples from manufacturer A were adulterated with rice flour. The PCR product was compared with NCBI database by cloning and sequencing and confirmed as Rice (*Oryza sativa* L.). The PCR detection standards for adulterated rice flour of Proprietary Chinese medicine were established for the first time by considering characteristics of different PCR detection methods and referring to other industry standards. **Conclusion:** A conventional PCR and fluorescence probe PCR method was established to identify rice adulteration samples and corresponding detection standards were formulated. The new methods and standards were urgently needed for making up for the gap in the regulation of adulteration in Chinese patent medicines and enriching the supervision standardization system.

Keywords: standard system in Chinese patent drug; supervision method; rice adulteration; a conventional PCR method; a TaqMan based real-time PCR method

党的十八大以来，医药产业快速健康发展，人民群众用药需求得到更好的满足。随着改革不断向纵深推进，药品监管体系和监管能力存在的短板与问题也日益凸显，影响了药品监管改革的成效^[1]。2021年2月19日，习近平总书记主持召开中央全面深化改革委员会第十八次会议，审议通过《关于全面加强药品监管能力建设的实施意见》。会议指出，全面加强药品监管能力建设，要坚持人民至上、生命至上，落实“四个最严”要求，强基础、破瓶颈、促提高，推进监管创新，建立健全科学、高效、权威的药品监管体系，坚决守住药品安全底线^[2]。

自新型冠状病毒疫情暴发以来，我国中医药产业体现出独特的优势，深度介入疫情的诊疗全过程，成为抗疫“中国方案”的重要组成部分^[3]。近年来，随着中药材资源的萎缩和需求量的上涨，价格不断攀升，出现伪品、品种混乱、人为掺假、炮制不符合规范以及药材霉变等问题，导致产品的合格率一直较低^[4-5]。然而，利用中药材和饮片加工而成的中成药制剂，由于检测方法还停留在成分鉴别和含量测定上，已不能满足市场监管的需求，新技术、新方法的开发迫在眉睫。

自2020年中下旬以来，针对疫情期间查处的某厂家用米粉替代药材投料的问题，国家药品监督

管理局相继发布了“通宣理肺丸（水蜜丸）、九味羌活丸（水丸）中水稻源性成分检查项补充检验方法”和“黄连上清丸（水丸）、龙胆泻肝丸（水丸）、防风通圣丸（水丸）和风寒咳嗽丸（水丸）中水稻源性成分检查项补充检验方法”等新方法^[6-7]。这是我国首次发布基于聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）的中成药掺伪检验检测标准，有效填补了水稻源性成分（米粉）非法加入中成药制剂以增重的检测漏洞。

中成药是遵循中药研制规律，中医药理论和人用经验、临床疗效相结合的复方制剂^[8]。部分商家抓住检验检测方法不健全的漏洞，将米粉加入中成药制剂中，降低处方药材的投药量，严重影响了中成药的有效性。本研究以通宣理肺丸（水蜜丸）为例，系统介绍了补充检验方法的建立和标准制修订过程中的重点和难点问题。

通宣理肺丸是治疗感冒和急性支气管炎等疾病的常见复方中药制剂^[9]。它的处方是由紫苏叶、前胡、桔梗、苦杏仁、麻黄、甘草、陈皮、半夏（制）、茯苓、枳壳（炒）和黄芩等11味原料，粉碎成细粉，过筛，混匀。每100 g粉末用炼蜜35~45 g制成水蜜丸^[10]。由于米粉没有明确的显微特征和化学成分，目前尚无检验检测方法。本文从米粉基因入手，建立了普通PCR方法和荧光探针

PCR方法,可有效检测出掺伪样品。

普通PCR方法是在DNA聚合酶参与下,根据碱基互补配对原则定向扩增目的片断的过程。荧光PCR方法是在普通PCR反应的基础上发展起来的荧光检测技术,按所使用的荧光化学材料不同,可分为荧光染料法和荧光探针法两类。荧光染料法价格低廉,但非特异性荧光化学材料可产生假阳性结果的风险。TaqMan探针技术是在PCR扩增时与引物一同加入特异性的荧光探针寡核苷酸,与PCR产物互补时产生化学荧光。TaqMan探针技术特异性好、准确性高、假阳性率低^[11]。本文建立了水蜜丸(通宣理肺丸)掺伪米粉的普通PCR方法和荧光探针PCR方法。根据中成药水蜜丸制剂的特点,结合其它行业PCR标准,制定了首个适用于中成药掺伪检测的标准,完善了中成药掺伪检测的标准化体系。

1 材料和方法

1.1 仪器

CFX96 Touch荧光定量PCR检测系统(美国Bio-rad公司);梯度PCR仪(美国ABI公司);EPS-301电泳仪(美国Amersham公司);DHG-9075A干烤箱(上海一恒科学仪器有限公司);XS105十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司);FA2004B万分之一电子分析天平(上海越平科学仪器有限公司);Milli-Q超纯水仪(美国Millipore公司);Eppendorf MiniSpin离心机、Centrifuge 518R离心机、移液枪(10~1000 μ L)(美国Eppendorf公司);MM400球磨仪(德国Retsch公司);微量紫外分光光度计Nano Vue plus(通用电气医疗集团);全自动凝胶成像系统Gel Doc XR+(美国Bio-rad公司)。

1.2 试药、试剂与样品

紫苏叶(批号120914-201712),前胡

(批号120951-201706),桔梗(批号121028-201612),苦杏仁(批号121554-201204),麻黄(批号121051-201606),甘草(批号120904-202021),陈皮(批号120969-202011),半夏(批号121272-201806),茯苓(批号121117-201910),枳壳(批号120981-201605)和黄芩(批号120955-201810),均购自中国食品药品检定研究院。

试验收集了3个厂家9批次共计35份样品及自制阴性样品1份(见表1)。实验室于北京超市购得市售大米10批,小麦、花生、薏苡仁、红薯、荞麦、大麦、黑豆、燕麦、红豆、糙米、绿豆、大麦若叶、土豆、黄豆、玉米面、江米、紫米和麦芽样品各1批,经中国食品药品检定研究院余坤子副研究员鉴定。多脉芸香草、狗尾草、马唐和牛筋草均由中国食品药品检定研究院张南平副研究员提供并鉴定。上述全部药材经ITS2引物(见表2)扩增,将克隆测序后的基因序列与美国国家生物信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)数据库比对(见表4)。

植物DNA提取试剂盒(货号69104)购自美国Qiagen公司,新型植物基因组DNA提取试剂盒(货号DP305-03,离心柱型)购自天根生化科技(北京)有限公司,上、下游引物、探针由Invitrogen公司合成(见表2),TE缓冲溶液(pH 8.0,货号B548106-0500)、TAE电泳缓冲液(货号B548101-0500)、10 \times PCR buffer(货号B650060-0006)及PCR产物克隆试剂盒(货号B522213-0020)购自工生物工程(上海)有限公司,组织核酸提取试剂盒(货号69504)、Taq DNA聚合酶(货号R007WZ)、琼脂糖(货号5260)和DL 500 DNA marker(货号3590A)购自Takara公司。

表 1 样品信息表

序号	样品名称	厂家	批号	数量	剂型	样品来源
1	通宣理肺丸	A	1201	7		四川, 青海
2	通宣理肺丸	A	0201	3		四川
3	通宣理肺丸	A	0101	6		甘肃
4	通宣理肺丸	A	0302	3		四川
5	通宣理肺丸	A	0203	4	水蜜丸	青海
6	通宣理肺丸	A	2302	4		四川
7	通宣理肺丸	B	0001	3		北京
8	通宣理肺丸	B	5010	1		北京
9	通宣理肺丸	C	5106	4		北京
10	阴性样品	自制	0001	1		北京
11	阳性对照	自采	/	10	/	北京超市
12	特异性样品 [*]	自采	/	23	/	北京超市
13	空白对照	/	/	1	/	/

注：^{*} 特异性样品：用于检测引物的特异性的样品，详见 1.2 试药、试剂与样品和表 4 所示。

表 2 引物和探针序列及退火温度汇总

序号	名称	引物 (5' -3') 和探针序列	退火温度 /°C	碱基数 /bp
I	Osi ^[12]	Fw: ATCGCCATTAAGGGATCAATAAATA	60	67
		Rv: CATTCGATGCGTCCAAATAATAC		
		Primer: CCGGAGACAATAAT		
II	Orb ^[13]	Fw: CGCCGCGTTCCTGCT	60	71
		Rv: CGTTGTAGGAGATGATCGACATG		
		Primer: CTCATCGTCGTTGGTCACCGCG		
III	Org ^[13]	Fw: TTAGCCTCCCGCTGCAGA	60	68
		Rv: AGAGTCCACAAGTGCTCCCG		
		Primer: CGGCAGTGTGGTTGGTTTCTTCGG		
IV	ITS2 ^[14]	Fw: ATCGGATACTTGGTGTGAAT	72	/
		Rv: GACGCTTCTCCAGACTACAAT		

2 方法

2.1 样品制备和DNA提取

供试样品：取通宣理肺丸适量粉碎，称取10 g，加入50 mL 65℃预热的TE缓冲溶液，65℃水浴振荡至完全分散，立即吸取0.5 mL混悬液至2 mL离心管中。按试剂盒说明书，加入裂解液继续提取，直至DNA提取完成，储存于-20℃备用，下同。

阴性样品：取紫苏叶、胡前、桔梗、苦杏仁、麻黄、甘草、陈皮、半夏、茯苓、枳壳和黄芩对照药材粉碎，按处方配置，混合均匀。称取阴性样品10 g，加入50 mL 65℃预热的TE缓冲溶液，65℃水浴振荡至完全分散，立即吸取0.5 mL混悬液至2 mL离心管中，提取DNA样品。

空白对照：取0.5 mL的无菌TE缓冲溶液至2 mL离心管中，提取DNA样品。

阳性对照和特异性样品：取大米或特异性样品磨碎，称取10 g，加入50 mL 65℃预热的TE缓冲溶液，65℃水浴振荡至完全分散，立即吸取0.5 mL混悬液至2 mL离心管中，提取DNA样品。

2.2 PCR反应条件

普通PCR方法：反应体系（25 μL）：2×PCR预混液（包含DNA聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液等）12.5 μL，上、下游引物（50 μmol·L⁻¹）各0.2 μL，模板DNA溶液2 μL，无菌超纯水10.1 μL。每个样品设置2个平行。PCR反应参数：95℃预变性3 min，循环反应40次（95℃ 30 s，62℃ 30 s，72℃ 30 s），72℃延伸10 min，4℃保存反应产物。

电泳检测：配制浓度为2%的已加入GelRed染色剂的琼脂糖凝胶。样品DNA上样量为10~20 μL，DL 500DNA分子量标记物上样量为5 μL。电泳结束后，取凝胶片在凝胶成像仪上检视。

荧光探针PCR方法：反应体系（25 μL）：2.5 μL 10×PCR缓冲液，dNTP 1 μL，上、下游引物（50 μmol·L⁻¹）各0.2 μL，探针0.25 μL，Taq DNA聚合酶0.2 μL，模板DNA溶液2 μL，无菌超纯水18.65 μL。每个样品设置2个平行。PCR反应参数：95℃预变性3 min，循环反应40次（95℃ 30 s，60~63℃ 30 s，72℃ 30 s（FAM通道收集荧光信号），72℃延伸10 min，4℃保存反应产物。

2.3 克隆测序

参照PCR产物克隆试剂盒使用说明书，将特征

条带产物克隆到T载体上进行克隆测序，将测序结果与NCBI数据库进行比对分析。

2.4 引物生物信息学验证

使用NCBI数据库中“Primer-BLAST”功能，对I-III号引物序列进行验证。

2.5 引物特异性实验

取特异性样品、阴性样品、阳性对照和空白对照，按“样品制备和DNA提取”和“PCR反应条件”的要求进行试验，比较电泳图谱和扩增曲线。试验分析了小麦等23种特异性样品的C_t值，并与米粉检测数据进行对比。

2.6 方法检出限、精密度和重复性

检出限：将10 g自制阴性样品中加入1, 0.1, 0.01和0.001 g的米粉，至米粉终含量为1·10⁻¹, 1·100⁻¹, 1·1000⁻¹和1·10000⁻¹，按“样品制备和DNA提取”方法制备样品，提取DNA，进行PCR扩增和荧光采集，电泳验证或计算C_t值。

重复性：取1批含有米粉的供试样品，按“供试样品制备”方法平行制备6份，提取DNA，进行PCR扩增和荧光采集，电泳验证或计算C_t值。

精密度：取上述制备的重复性样品1份，重复检测6次，电泳验证或计算C_t值。

2.7 样品检测

根据本研究建立的方法对3个厂家9个批次（共计35份）的市售通宣理肺丸（水蜜丸）样品进行检测。

3 结果

3.1 样品DNA提取和质量检测结果

试验选取Qiagen、Takara和天根3个厂家的DNA提取试剂盒提取，分别提取供试样品、阴性样品、阳性对照和空白对照的DNA分子，扩增后的PCR产物经电泳验证。结果发现，Takara试剂盒提取的所有样品无PCR扩增条带检出；采用Qiagen试剂盒提取时，仅阳性对照检出与目的片段大小一致的条带，（含米粉）供试样品无条带检出；采用天根试剂盒提取后，（含米粉）供试样品有与阳性对照大小一致的条带检出，试验结果稳定。

本研究选取了天根试剂盒成功提取了通宣理肺丸供试样品（35份）、阴性样品（1份）、特异性样品（23份）、阳性对照（10份）和空白对照（1份），每批次样品重复提取3次，共计210份。采用紫外分光光度计检测，A_{260/280}吸光度值均

在1.8~2.2之间，测得DNA含量在10~50 ng · μL⁻¹之间。实验将23份特异性样品基因组经ITS2通用引物扩增，Ct值均在15~25之间，PCR产物DNA序列在NCBI数据库中检索经确认，基原正确（见表4）。

3.2 小麦特异性引物的生物信息学分析

将引物（I-III）序列导入NCBI数据进行Blast

比对，Osi引物匹配了8条基因序列，均来源于水稻；Orb引物匹配了13条基因序列，均来源于水稻；Org引物匹配了11条基因序列，均来源于水稻；表3均列出匹配度最高的前3个植物来源信息，可见3对引物验证结果符合预期，均为水稻基因（*Oryza sativa* L.）。

表 3 序列检索结果

序号	名称	NCBI 号	检索靶基因
1	Osi	CP056053.1	<i>Oryza sativa Indica Group</i> cultivar Zhenshan 97 chromosome 2
		CP054677.1	<i>Oryza sativa Indica Group</i> cultivar Minghui 63 chromosome 2
		XM_015768313.2	<i>Oryza sativa Japonica Group</i> ubiquinol oxidase 2, mitochondrial (LOC4329156), mRNA
2	Orb	CP056055.1	<i>Oryza sativa Indica Group</i> cultivar Zhenshan 97 chromosome 4
		CP054679.1	<i>Oryza sativa Indica Group</i> cultivar Minghui 63 chromosome 4
		XM_015780617.2	<i>Oryza sativa Japonica Group</i> oryzain beta chain-like (LOC4337351), mRNA
3	Org	CP056057.1	<i>Oryza sativa Indica Group</i> cultivar Zhenshan 97 chromosome 6
		CP054681.1	<i>Oryza sativa Indica Group</i> cultivar Minghui 63 chromosome 6
		CP018162.1	<i>Oryza sativa Indica Group</i> cultivar Shuhui498 chromosome 6 sequence

3.3 米粉引物适用性筛选

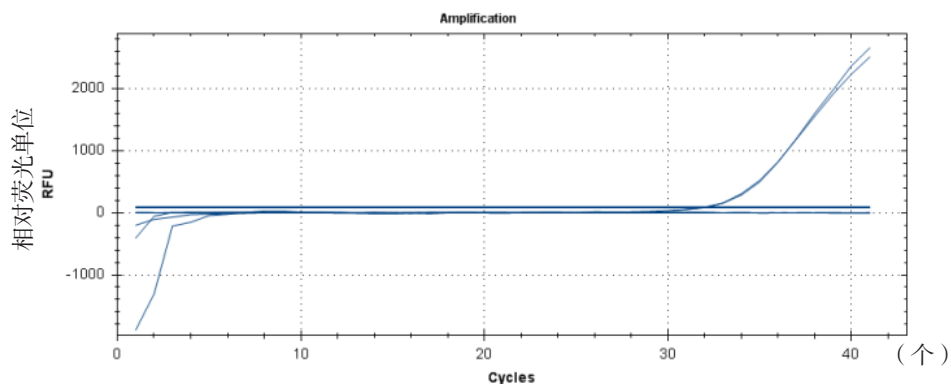
为了检测检索得到的3对引物在本研究中的适用性，试验分别以供试样品、阴性样品、阳性对照和空白对照作为模板，进行PCR试验，筛选出荧光信号响应值高的引物和探针。结果表明，Org（III）引物检测（含米粉）供试样品的扩增曲线特异性良好，且空白对照和阴性样品没有荧光信号检出。Osi（I）和Orb（II）引物在检测（含米粉）供试样品时，无荧光信号检出（见图1）。将PCR产物经凝胶电泳验证：在Osi引物的PCR反应中，仅可检出部分（含米粉）供试样品有扩增条带；在Orb引物的PCR反应中，（含米粉）供试样品检出多条杂带；在Org引物的PCR反应中，（含米粉）

供试样品均可检出与阳性对照大小一致的扩增条带，阴性样品和空白对照无条带检出。经比较，本试验选择Org引物进行下一步研究。

3.4 方法学验证

3.4.1 特异性

为了检测Org引物的特异性，试验对小麦等23种来自其他植物的样品（特异性样品）进行测试，计算Ct值，评估Org引物的特异性（图2及表4所示）。由表4可知，Org引物可检出糙米、糯米和紫米等水稻属植物的荧光信号。1~4号样品的PCR产物经克隆测序后，结果均为水稻（*Oryza sativa* L.），而其他植物样品没有荧光信号检出，表明Org引物可以特异性检测出水稻基因。



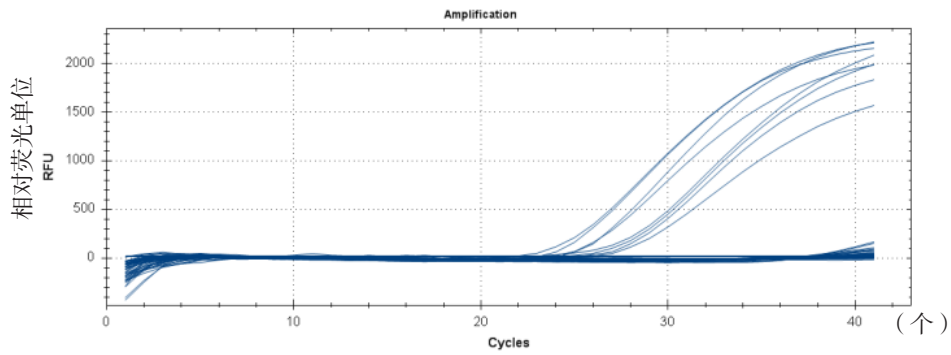
注: 1: Org (III) , 2: Osi (I) 和 Orb (II)

图 1 引物和探针的适用性扩增曲线

表 4 Org 引物和探针的特异性检测结果

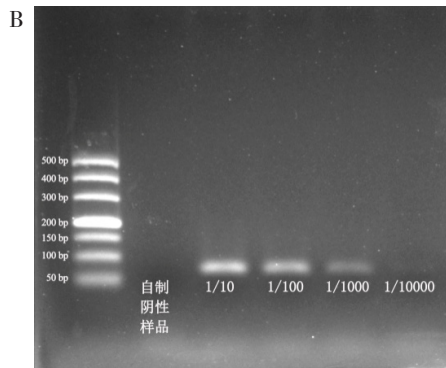
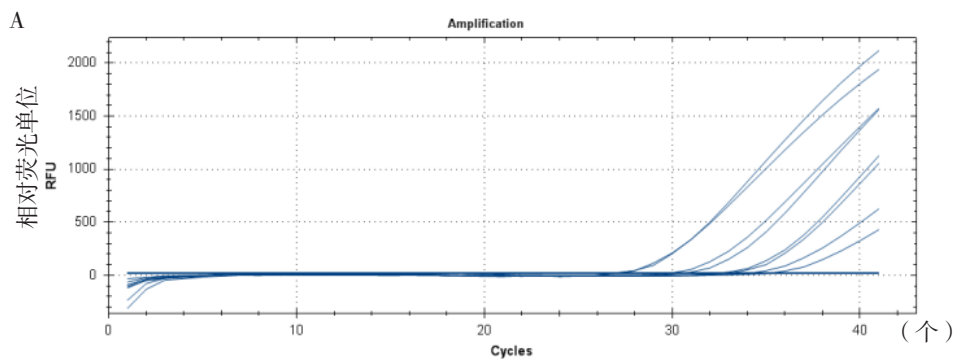
序列	中文名	测序结果	种属	Ct 值
1	大米	<i>Oryza sativa</i> L.	Gramineae	24.5
2	糙米	Brown rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Gramineae	23.8
3	糯米	Polished Glutinous Rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Gramineae	24.3
4	紫米	Black glutinous rice (<i>Oryza sativa</i> L.)	Gramineae	22.4
5	小麦	<i>Triticum aestivum</i> L.	Gramineae	-
6	大麦若叶	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Gramineae	-
7	麦芽	<i>Hordeum vulgare</i> L.	Gramineae	-
8	多脉芸香草	<i>Cymbopogon distans</i> (Nees) Wats.	Gramineae	-
9	芦根	<i>Rhizoma Phragmitis</i> Communis	Gramineae	-
10	天竺黄	<i>Bambusa textilis</i> McClure	Gramineae	-
11	薏苡仁	<i>Coix lacryma-jobi</i> L.var.mayuen (Roman.) Stapf	Gramineae	-
12	燕麦	<i>Avena sativa</i> L.	Gramineae	-
13	狗尾草	<i>Setaria viridis</i> (L.) Beauv.	Gramineae	-
14	马唐	<i>Digitaria sanguinalis</i> (L.) Scop.	Gramineae	-
15	牛筋草	<i>Eleusine indica</i> (L.) Gaertn.	Gramineae	-
16	玉米面	<i>Zea mays</i> L.	Gramineae	-
17	花生	<i>Arachis hypogaea</i> Linn.	Leguminosae	-
18	红薯	<i>Ipomoea batatas</i> (L.) Lam.	Convolvulaceae	-
19	荞麦	<i>Fagopyrum esculentum</i> Moench.	Polygonaceae	-
20	黑豆	<i>Glycine max</i> (L.) merr.	Leguminosae	-
21	红豆	<i>Abrus precatorius</i> L.	Leguminosae	-
22	绿豆	<i>Vigna radiata</i> (Linn.) Wilczek	Leguminosae	-
23	土豆	<i>Solanum tuberosum</i> L.	Solanaceae	-
24	黄豆	<i>Glycine max</i> (Linn.) Merr.	Leguminosae	-

注: -, 代表无信号检出。



注：1. 紫米，2. 糙米，3. 大米和糯米。

图2 Org 探针的特异性分析



注：A. 荧光探针 PCR 方法；B. 普通 PCR 方法。

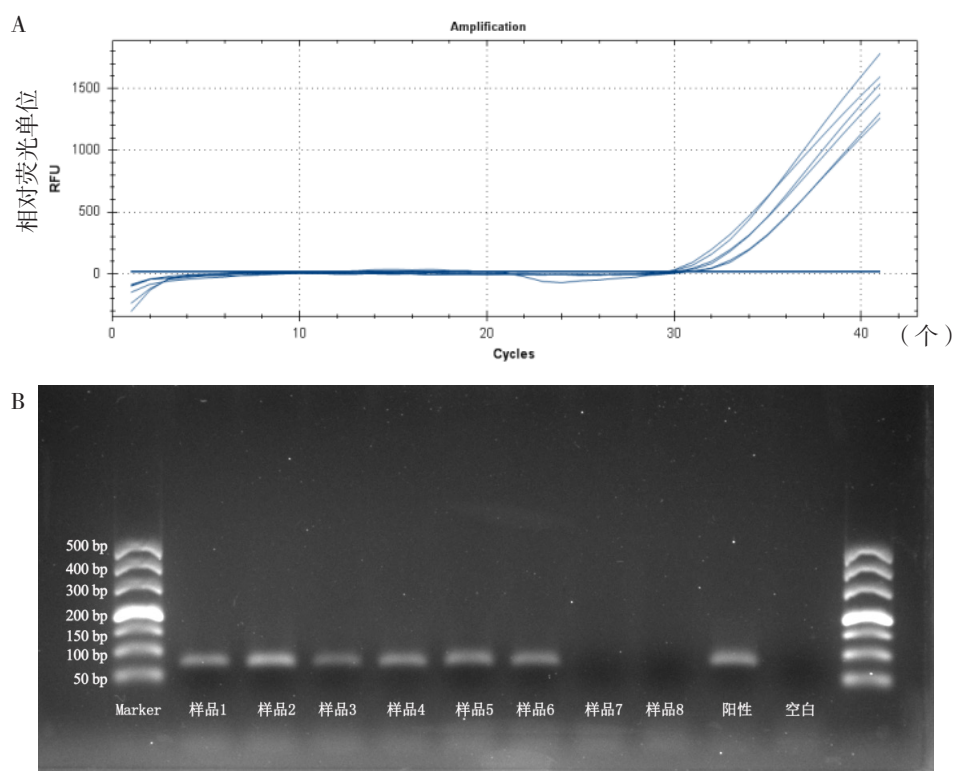
图3 通宣理肺丸的检出限

3.4.3 重复性和精密度考察

经计算，试验的重复性Ct值为29.88，RSD为1.98%；检测仪器的精密度Ct值为29.74，RSD为1.56%，表明荧光探针PCR方法的重复性和精密度良好。普通PCR反应结果经电泳验示，试验重复性和仪器的精密度均良好。

3.5 供试样品检测结果

试验对市售的35份供试样品进行筛查，结果表明：普通PCR方法和荧光探针PCR方法均测得来自A厂家的6批次样品（1~6号）掺入米粉成分。PCR产物经克隆测序在NCBI数据库中Blast比对，结果与水稻基因的同源性为100%，且无其它同源DNA序列检出。



注：A. 荧光探针 PCR 反应；B. 普通 PCR 反应。

图4 通宣理肺丸的 PCR 检测结果

表5 通宣理肺丸检测结果统计表

序号	样品名称	厂家	批号	荧光探针 PCR 方法	普通 PCR 方法	克隆测序结果
1	通宣理肺丸	A	1201	+	+	水稻
2	通宣理肺丸	A	0201	+	+	水稻
3	通宣理肺丸	A	0101	+	+	水稻
4	通宣理肺丸	A	0302	+	+	水稻
5	通宣理肺丸	A	0203	+	+	水稻
6	通宣理肺丸	A	2302	+	+	水稻
7	通宣理肺丸	B	0001	-	-	-
8	通宣理肺丸	B	5010	-	-	-
9	通宣理肺丸	C	5106	-	-	-

注：“+”表示 PCR 反应为阳性，“-”表示 PCR 反应为阴性。

4 讨论

本文以通宣理肺丸（水蜜丸）为例，详细介绍了国家药品监督管理局发布的通宣理肺丸等六种中成药制剂水稻源性成分检查项补充检验方法的制修订全过程。补充检验方法首次将普通PCR方法引入中成药检验检测中，有效地筛查出了米粉掺伪样品，为中成药市场监管提供了有力的技术支撑。此外，本文还研究了荧光探针PCR方法在中成药掺伪检测中应用的可行性，以期提升原检测方法的准确性、灵敏度和时效性，为其它应急检验检测任务提供技术储备。基于PCR技术的中成药检测标准罕有报道，本文从标准制定角度出发，针对样品制备、结果判定、方法学比较和尚存问题等方面，探讨新标准制定中考虑的关键因素和存在的不足。

4.1 增加样品取样量以提高检测样品的代表性

在一般科研用检测试剂盒中，样品取样量多为20~200 mg鲜（干）重。毫克级取样可以满足科研要求，常用于均匀样品的检测。中成药一般多以复方入药，存在局部混合不均匀的现象。本方法增加了样品的取样量——将10 g通宣理肺丸加热完

全溶解于50 mL预热TE缓冲液中，吸取悬浊液进行DNA的提取，以降低少取或漏取样的几率。

4.2 采用克隆测序对阳性结果再确认

本试验收集了35份市售通宣理肺丸（水蜜丸）样品，检出A厂家的6批次样品添加米粉成分。为了确保试验结果的可靠性，所有阳性结果的PCR产物须进行克隆测序，序列应与NCBI等数据库（或其它权威数据库）进行比对，当且仅当PCR产物的序列与水稻序列100%匹配时，才能判定为掺伪样品。

4.3 PCR方法学的比较

普通PCR方法和荧光探针PCR方法都是分子鉴定的常用方法^[15]，本文依据试验数据对两种方法的方法学进行比较（见表6）。普通PCR方法和荧光探针PCR方法均表现出良好的试验重复性和准确性，检出限均为每g样品可检出0.001 g米粉。实时荧光探针PCR方法可以实时监测PCR的反应进程，TaqMan探针可以与目的序列互补配对，提高试验准确性，排除假阳性结果。

表6 普通PCR反应与荧光探针PCR方法的比较

	普通PCR方法	荧光探针PCR方法
重复性	良好	良好
精密度	良好	良好
检出限	每1g样品中0.001g水稻粉	每1g样品中0.001g水稻粉
可定量	X	半定量
实时监测反应进程	X	√
电泳检测	√	X
易污染，存在假阳性	√	X
试验所需时间	约3-4小时	约1-2小时
药典方法	√	X
仪器价格	10-20万	10-50万
专业操作人员	√	√
实验室覆盖率	高	较高
结果判定	50-100 bp 有于阳性一致的条带检测出	Ct ≤ 35, 阳性结果 Ct > 35, 阴性结果
结果验证方法	PCR产物测序	PCR产物测序

4.4 PCR方法在中成药检验检测中的不足

在通宣理肺丸处方中没有米粉作为辅料添加的工艺,但在试验中应考虑工厂生产线可能存在少量的污染。在荧光探针PCR反应中,由检出限数据可知,当供试样品的Ct值>35时,米粉在样品中的含量小于千分之一,为了排除环境污染的可能性,建议将结果判定为阴性。普通PCR反应目前还有设定掺伪或污染米粉检测阈值的方法。

应该指出的是,中药材由于加工、炮制和贮存都会使DNA分子发生降解,严重影响了DNA分子的提取效率^[14,16,17]。现有的PCR技术还不能对掺伪样品的含量进行评估,这是目前中药DNA分子定量检测的难点。今后希望有更多的分子生物学新技术和新标准能够应用在中药监管体系中,有效治理市场乱象,引导企业发挥主体责任,不断推动中医药事业和产业的高质量发展。

参考文献:

- [1] 国务院办公厅. 关于全面加强药品监管能力建设的实施意见[R/OL]. (2021-5-10) [2021-9-18]. http://www.gov.cn/zhengce/content/2021-05/10/content_5605628.htm.
- [2] 人民网. 全面加强药品监管能力建设为保障药品安全有效提供有力支撑[R/OL]. (2021-5-13) [2021-9-18]. <https://baijiahao.baidu.com/s?id=1699593672918640512&wfr=spider&for=pc>.
- [3] 人民微看点. 中医药面对国内外疫情的责任担当[R/OL]. (2021-6-22) [2021-7-13]. <https://www.takefoto.cn/viewnews-2518531.html>.
- [4] 赵五申, 井建梅. 中药材市场常见伪品情况及识别要点[J]. 临床合理用药杂志, 2011, 4(8): 140-141.
- [5] 魏锋, 刘薇, 严华, 等. 我国中药材及饮片的质量情况及有关问题分析[J]. 中国药理学杂志, 2015(4): 277-283.
- [6] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于发布小活络丸(大蜜丸)中异性有机物补充检验方法的公告[EB/OL]. (2020.08.31) [2021-7-13]. <http://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20200831170415108.html>.
- [7] 国家药品监督管理局. 国家药监局关于发布妇科调经片中金胺O检查项补充检验方法等3项补充检验方法的公告[EB/OL]. (2021.01.06) [2021-7-13]. <http://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20210106172628129.html>.
- [8] 培月. 遵循中医药理论开展中药剂型研制工作[J]. 齐鲁药事, 1987(4): 11-12.
- [9] 孙国祥, 赵新, 闫娜娜. 通宣理肺丸毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2010, 8(5): 383-386.
- [10] 中华人民共和国药典[S]. 2020.
- [11] 袁继红. 实时荧光定量PCR技术的实验研究[J]. 现代农业科技, 2010, (13): 20-22.
- [12] Campos MD, Valadas V, Campos C, et al. A TaqMan Real-time PCR Method Based on Alternative Oxidase Genes for Detection of Plant Species in Animal Feed Samples[J]. PLoS ONE, 2018, 13(1): e0190668.
- [13] Hernandez M, Esteve T, Pla M. Real-time Polymerase Chain Reaction Based Assays for Quantitative Detection of Barley, Rice, Sunflower, and Wheat[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(18): 7003-7009.
- [14] 王菲菲, 刘杰, 何风艳, 等. 薄荷属3种植物及变种的性状鉴别, 化学成分分析及DNA条形码研究比较[J]. 药学报, 2019, 54(11): 2083-2088.
- [15] 宫淑敏, 钱会南. 荧光定量PCR在中医药研究中的应用[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(4): 758-760.
- [16] 郭宝林, 李家实, 阎玉凝. 中药材DNA分子标记研究的技术问题 I. 植物药基因组DNA的提取[J]. 中草药, 2000, 31(12): 951-954.
- [17] 于绍文. 中成药质量问题探讨[J]. 安徽医药, 1999(4): 46-47.

(收稿日期 2021年9月19日 编辑 李亚微)