

## · 研究进展 ·

## 中药鉴定方法及其发展概况

刘杰<sup>#</sup>, 房文亮<sup>#</sup>, 谷海媛, 戴胜云, 连超杰, 乔菲, 郑健\* (中国食品药品检定研究院, 北京 102629)

**摘要** **目的:** 对中药的传统与现代鉴别技术进行综述, 以为中药鉴定方法的开发与中药质控标准的提升提供参考与借鉴。**方法:** 对中药的传统鉴定方法、中药的现代鉴定方法、DNA条形码鉴定技术、基于DNA条形码的SNP分型方法、下一代测序(NGS)技术在中药鉴定中的应用等几个方面进行了梳理。**结果:** 中药鉴定学在传统鉴别技术的基础上逐步形成与植物系统分类学、植物化学、生物化学、分子生物学、细胞生物学及现代仪器分析等多学科的知识和技术的大融合, 为中药真伪的鉴别提供了更广泛的选择。**结论:** 中药的应用历史源远流长, 同时中药在漫长的历史沿革与传承中也存在严重的混伪、代用现象。中药鉴定是促进中药应用国际化和质控标准化的基础, 是保障人民用药安全的重要前提。

**关键词:** 中药; 传统鉴定方法; 现代鉴定方法; DNA条形码; SNP分型; 下一代测序技术

中图分类号: R95; R932 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)11-1332-009

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.11.014

### Identification Methods of the Traditional Chinese Medicine and Their Development Overview

Liu Jie<sup>#</sup>, Fang Wenliang<sup>#</sup>, Gu Haiyuan, Dai Shengyun, Lian Chaojie, Qiao Fei, Zheng Jian\* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**Abstract Objective:** By reviewing the traditional and modern identification methods of traditional Chinese medicine, to provide references for the development of traditional Chinese medicine identification methods and improve quality control standards. **Methods:** The article sorted the following aspects to identify the traditional Chinese medicine, such as the traditional and modern identification methods, DNA barcoding identification technology, SNP typing method based on DNA barcoding, and the next generation sequencing technology. **Results:** On the basis of traditional identification technology, traditional Chinese medicine identification has gradually formed a great fusion of multidisciplinary knowledge and technology such as plant taxonomy, phytochemistry, biochemistry, molecular biology, cell biology and modern instrumental analysis, which provided a wider choice for the identification of the authenticity of traditional Chinese medicine. **Conclusion:** The application of traditional Chinese medicine has a long history. At the same time, in the long historical evolution and inheritance of traditional Chinese medicine, there are serious phenomena of falsification and substitution. The identification of traditional Chinese medicine is the basis for promoting the internationalization of traditional

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年培养基金(编号 2023A4)

作者简介: 刘杰 Tel: (010) 53851401; E-mail: liujie19890215@163.com

共同第一作者: 房文亮 Tel: (010) 53851523; E-mail: fangwenliang1995@163.com

通信作者: 郑健 Tel: (010) 53852080; E-mail: zhengjian@nifdc.org.cn

Chinese medicine application and the standardization of quality control, and is an important prerequisite for ensuring the safety of medication.

**Keywords:** traditional Chinese medicine; traditional identification methods; modern identification methods; DNA barcoding; SNP (single nucleotide polymorphism) typing; next generation sequencing technology

中药是指在中医药理论指导下用以防治疾病的药物,其药用历史悠久,具有资源丰富、品种众多、来源复杂、形态和组织千变万化、化学成分或有效成分复杂的特点。在中药的历史沿革中,由于本草记载粗略,存在正品、混淆品、习用品、伪品、野生品、栽培品等的差异,同时由于中药材在使用过程中存在同物异名、同名异物现象,导致中药的混伪、代用现象严重,加之中药成分的复杂性,使得中药质量控制过程中存在着难以定性定量分析、没有统一的质量标准等问题,中药质量不稳定、难以控制。同时,在药材的生产加工过程中,由于生产加工人员素质和业务能力的参差不齐,以及市场利益驱使的影响,使得我国中药材市场中存在不少问题,给中药的深入研究带来很大困难<sup>[1-2]</sup>。

中药鉴定学是在古代本草学和现代生药学的基础上形成并发展起来的一门学科,是鉴定中药的品种和质量,研究、寻找和扩大新药源的应用学科,是在继承传统鉴别经验的基础上,对近代自然科学的理论和鉴定方法的运用,是保障中药用药安全的前沿学术课题,是中药标准化和国际化的基础,具有现代科学和传统文化的双重内涵<sup>[3-4]</sup>。

中医药的应用历史源远流长。在当前我国大力加强中药研究和加速中药现代化进程的形势下,中药的准确鉴别是确保中药质量合格和科研结果可靠的重要工作。中药鉴定工作者对传统鉴别技术中有价值的部分进行继承与发扬,并在此基础上不断研究和发展的中药现代鉴别技术,逐步形成与植物系统分类学、植物化学、生物化学、分子生物学、细胞生物学及现代仪器分析等多学科的知识和技术的大融合。21世纪初开始,现代生物技术、现代仪器分析技术和计算机技术被大量应用于中药的鉴定研究,生物鉴定方法也得到不断发展与完善,这些都标志着中药鉴定学已经进入了生命科学和信息科学的时代,推动了中药鉴定学步入一个新的发展阶段。

## 1 中药的传统鉴定方法

中药鉴定是进行中药相关应用型研究中的基

本工作,随着中药鉴定研究的技术与方法的不断进步,传统的中药鉴定方法仍具有重要意义<sup>[5]</sup>。二十世纪八十年代至九十年代中后期,楼之岑院士和徐国钧院士牵头开展了对213类中药材品种整理与质量评价的系统研究,对多来源中药进行本草考证、整理与鉴别,并形成了中药鉴定学“四大鉴别”方法的研究体系<sup>[6-7]</sup>,主要包括基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定,以上方法均有其独特优势和适用的鉴定对象,有时候还需要选择其中两种或两种以上方法配合使用,才能准确完成一种中药材的鉴定。

基原鉴定是中药鉴定的基础,是采用系统分类学的方法确定中药的来源物种,一般以植物药为多,在碰到较完整的植物药材时,应用植物分类学的知识直接通过肉眼观察或借助放大镜、解剖显微镜等外部工具观察其根、茎、叶和果实等部位的特征,以达到准确鉴定的目的。传统本草和现代著作中记载的中药、民族药来源是当代中药、民族药的用药依据之一,通过与植物分类学相关的著作和中药鉴定方面的著作核对,可确定中药来源,在有条件的情况下还可以通过核对标本进行鉴定<sup>[5]</sup>。其是对中药品种的古今使用情况进行考证并探讨其演变历史、对药材原植物进行实地分类鉴定、结合现代临床药材应用情况和药理药化研究进展进行中药品种的整理工作,是中药传统鉴定研究的一个基本方法<sup>[8]</sup>。

性状鉴别是以传承传统的鉴别经验为基础,是古今众多医者在长期工作过程中对积累的经验的总结,传承了“辨状论质”的传统鉴别经验与方法,该方法简单、易行,通过眼观、手摸、鼻闻、口尝、水试、火试等,观察中药的形状、大小、颜色、质地、表面特征、断面情况、气味以及水试和火烧反应,来判断中药的种类和品质<sup>[1]</sup>。水试法通常将中药与水以浸泡、湿润等方式处理,观察某些中药材遇水后或在水中产生的各种比较明显或特殊的变化以鉴定其品种真伪、优劣,是非常实用的方法,主要包括显色反应、旋转现象、挂甲反应、膨

胀反应、沉浮反应、黏液反应、乳化反应、泡沫现象、荧光反应。火试主要是对中药材进行加热、燃烧等方式处理,观察药材的各种变化,例如颜色的改变(火焰、药材、灰烬)、烟雾的大小、爆鸣声响及熔化、升华现象的改变等,利用这些现象进行鉴别<sup>[8]</sup>。这些方法具有简便、快速的特点,但对多来源药材、破碎药材、粉末药材和中成药进行鉴定时就存在一定的局限性,无法客观、准确地进行鉴定<sup>[9]</sup>。

20世纪70年代到80年代显微鉴别技术发展起来<sup>[10]</sup>,显微鉴定是用显微镜观察中药组织结构和粉末特征的方法,建国后中国才真正开始药材粉末的显微鉴别研究,这是中药鉴定研究的重要内容<sup>[8]</sup>。通过观察药材的组织切片、粉末、解离组织或表面制片及成方制剂中药材的组织构造、细胞形状或内含物等特征,鉴定药材真伪、纯度、品质。显微鉴别方法主要包括横切片或纵切片观察、粉末制片观察、表面制片观察、解离组织片观察、显微化学法观察、由粉末药材制成的成方制剂的观察等,通常应用于单凭性状不易识别的药材、破碎药材、粉末药材以及丸、散、膏、丹等中药成方制剂的鉴别<sup>[5]</sup>。

80年代后期理化鉴别逐渐兴起<sup>[10]</sup>,理化鉴定是采用物理方法或化学方法,对中药中所含有的有效成分或特征性成分进行定性或定量分析,用以鉴定药材的真伪和质量的优劣。中药中的有效成分是其发挥药效的物质基础,理化鉴别方法主要包括显色反应、沉淀反应、荧光法、微量升华法、分光光度法、色谱法、膨胀度测定法、旋光度测定法、折光率测定法、pH测定法、酸值和皂化值的测定法、水分测定法、灰分测定法、浸出物测定法、挥发油测定法等<sup>[5]</sup>。

中药鉴定是促进中药应用国际化和质控标准化的基础,是保障人民用药安全的重要前提,也是中药在传承几千年的过程中一直有待解决的问题。中药鉴定中的现代鉴定方法与传统鉴定方法是相辅相成的,既需要借助现代科学技术对传统鉴定方法进行科学的计量,又要在传统鉴定方法的基础上不断创新,开发新的鉴定策略<sup>[2]</sup>。

## 2 中药的现代鉴定方法

早期中药鉴定方法包括基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定四大鉴别法,随着中药材

鉴定技术与方法不断发展与革新,性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定的方法也结合新的技术,形成专属性更强、准确性更高的新的鉴定方法。90年代分子鉴别技术逐渐兴起,又逐渐发展和完善了生物鉴定法<sup>[8,10]</sup>。

中药的性状鉴定通过与现代数码技术、信息技术和计算技术的结合,发展形成了中药形态结构计算机三维重建与实时动态显示技术、中药微形态鉴定技术、中药脉序图谱鉴别技术和仿生识别技术等<sup>[11]</sup>,通过将现代先进的智能识别技术应用于中药的性状鉴别,发展并形成了较为客观的中药性状评价方法。其中,中药的微形态鉴定方法是借助仪器观察中药材表面(包括断面)的微形态特征,即肉眼不易察觉的细微性状特征,该方法丰富了性状鉴定的信息,是较为简单、实用和直观的方法<sup>[8]</sup>。

数码摄影技术和偏光显微镜、体视显微镜、透射显微镜、荧光显微镜、电子显微镜、扫描电子显微镜等的发展,以及显微鉴定技术与电子技术、数码图像化技术的结合,使中药材及中药饮片的细胞、组织、内含物等微观结构特征的深入研究成为可能<sup>[12]</sup>。透射显微镜能观察到亚显微和细胞器结构,体视显微镜、扫描电镜能清楚地辨别细胞表面的精微纹饰和附属物,偏光和荧光显微镜能观察显微结构和显微特征的鉴别信息<sup>[8]</sup>。显微鉴定法具有快速、简便、准确的优点,是中药鉴定的主要方法之一<sup>[3,10]</sup>。

随着中药理化鉴定技术的发展,色谱、光谱鉴定方法成为中药定性定量分析的主要物理化学方法。近些年来,中药鉴定常用光谱法有近红外光谱法(Near Infrared Spectrometry, NIR)、中红外光谱法(Mid-infrared Spectroscopy, MIR)、质谱法(Mass Spectrometry, MS)与X射线衍射法(X-ray Diffraction, XRD)、紫外-可见光谱法、拉曼光谱鉴定法等。其中红外光谱法是根据待鉴定药材中所含化学成分在红外光区产生的吸收与叠加光谱特征同正品药材进行对比,以判定药材的真伪;紫外-可见光谱法鉴定中药材的原理与红外光谱法类似,也是通过待鉴定药材所含化学成分的吸收叠加形成复合谱,根据紫外叠加光谱的特异性和稳定性,以及相同药材间紫外叠加光谱存在的规律性而作出正伪品的判别。色谱法在中药鉴定中得到广泛应用,根据流动相与固定相的分子聚集状态以

及操作形式的差异,色谱法又分为纸色谱法、柱色谱法、薄层色谱法(Thin Layer Chromatography, TLC)、气相色谱法(Gas Chromatography, GC)、高效液相色谱法(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)等。薄层色谱法(TLC)最早广泛应用于中药材的鉴定中,高效液相色谱法(HPLC)是目前中药材鉴定中主要采用的方法<sup>[13]</sup>。此外,色谱与光谱联用技术也被广泛应用于中药材的鉴定中,该方法是将具高效分离性能的色谱技术和能够获取丰富的化学成分结构信息的光谱技术相结合而形成的新的鉴别技术,包括高效液相色谱-质谱(High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, HPLC-MS)技术、气相色谱-质谱(Gas Chromatography-Mass Spectrometry, GC-MS)技术、红外光谱-质谱(Infrared Spectra-Mass Spectrometry, IR-MS)技术、质谱-质谱(Mass Spectrometry-Mass Spectrometry, MS-MS)技术、气相色谱-傅里叶变换红外光谱(Gas Chromatography-Fourier Translation Infrared Spectroscopy, GC-FTIR)技术、高效毛细管电泳-质谱(High Performance Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry, HPCE-MS)技术,以上这些技术在中药品种鉴定与质量评价方面产生了重大的作用,其中应用最广泛的是液质(HPLC-MS)联用技术<sup>[14-15]</sup>。

DNA分子遗传标记技术是通过比较物种间DNA分子的遗传多样性差异来进行物种鉴定的分子生物学技术,该技术主要包括限制性片断长度多态性分析技术、多聚酶链反应测序技术、随机扩增多态性DNA(Random Amplification Polymorphic DNA, RAPD)技术、DNA序列标记技术、生物芯片技术、DNA条形码鉴定技术等<sup>[13,16]</sup>,DNA分子作为生物体遗传信息的直接载体,具有不受外界因素和生物体发育阶段及器官组织差异的影响的特点,每一生物体个体的任一体细胞中均含有相同的遗传信息,因此用DNA分子特征作为遗传标记鉴别物种更为准确可靠<sup>[17]</sup>。

随着生物检定技术的发展,细胞生物学技术、免疫层析技术、适配体层析技术、蛋白质标记技术、生物效应鉴定技术等也被应用于中药鉴定中,增加了中药材的鉴定方向和中药材正伪与质量

评价的准确度<sup>[15,17]</sup>。

### 3 DNA条形码鉴定技术

DNA条形码(DNA Barcoding)技术是指选用一段标准的短DNA片段自动化地对物种进行快速、准确地鉴定与识别的技术<sup>[18]</sup>。Paul Hebert首次提出DNA条形码的概念,并将该技术引进到生物物种的鉴定中<sup>[19]</sup>。DNA条形码技术在近些年来被广泛应用于生物物种分类与鉴定中,已发展成为物种鉴定相关研究方面的热点,具有广阔的应用前景<sup>[20]</sup>。中药鉴定是研究中药品种、质量,制定中药标准,寻找和扩大药源的前提和基础,传统的中药鉴定主要是根据药材的形态特征进行性状鉴定,要求鉴定人具有足够丰富的分类学知识和鉴别经验,且中药大多为植物的某个部位,有时鉴别特征不明显或不存在,容易造成混淆。DNA条形码技术在中药鉴定中的应用与发展为中药基原的准确鉴定提供了技术支撑,弥补和克服了传统中药鉴定方法中的一些缺陷和难题<sup>[20]</sup>。

用于物种鉴定的理想的DNA条形码序列,其种内遗传距离应该明显小于种间遗传距离,且存在明显的种间差异,形成间隔区,可用来区分不同物种及判断种内不同个体之间的变异程度<sup>[20]</sup>。利用标准的、有足够变异的、易扩增且相对较短的DNA片段对中药材物种进行DNA条形码鉴定,具有鉴定结果准确、重复性良好、方法通用性强等优点。DNA条形码技术已经在中药材的物种鉴定中得到广泛应用,同时由国家药典委员会编纂的《中华人民共和国药典》2020年版四部中收录了9107中药材DNA条形码分子鉴定法指导原则<sup>[21]</sup>。在近年来的中药物种鉴定中,DNA条形码技术逐步成为了研究的重点,在中药材鉴定、药品流通、监督等诸多方面都取得了很好的应用成果。

已有研究证明,快速发展的DNA条形码技术是区分中药材及其相近品种的有力工具<sup>[19]</sup>。通常中药材由于保存不当、时间过长、加工炮制等原因,会导致长DNA片段(>200bp)的提取和扩增成功率非常低<sup>[22]</sup>。Chen SL等<sup>[23]</sup>对超过6600份植物样本进行了ITS2(Internal Transcribed Spacer 2)序列鉴别能力的测试,这些植物样本在植物分类学中分布广泛,结果显示ITS2在种的水平上的鉴别成功率达92.7%。ITS2区域具有可用于设计通用引物的保守

区域,易于扩增,具有足够的变异用以区分亲缘物种。基于以上特征,ITS2区域可作为中药材鉴定的潜在标准DNA条形码序列。

#### 4 基于DNA条形码的单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 分型方法

美国Utah大学Wittwer实验室在2003年首次提出了高分辨率熔解 (High Resolution Melting, HRM) 曲线技术,这项技术是基于新型饱和荧光染料LC Green的发明而进行的基因突变检测<sup>[24-25]</sup>。其优点主要有灵敏性高、特异性强、自动化程度高、聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 污染少、精确定量和无需使用特异性探针等,在突变扫描、基因型分析和甲基化分析等研究中应用广泛<sup>[26]</sup>。HRM分析技术因其高度的敏感性和特异性,在序列差异扫描、单核苷酸多态性、插入/缺失、微卫星序列/简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSR)、甲基化检测及定量分析中均具有显著的优势<sup>[24]</sup>。同时,该技术融合了PCR反应灵敏性高和光谱检测技术精确定量的优点,可用于中药材的物种鉴定,具有操作简便、不受药材形态限制、无需特异性探针、引物通用性强等优点,在人参和西洋参、金银花和山银花以及鹿茸等的真伪快速鉴别中均得到成功应用<sup>[27-29]</sup>。

竞争性等位基因特异性PCR (Kompetitive Allele Specific PCR, KASP) 技术可在广泛的基因组DNA样品中对SNPs和特定位点上的插入和缺失进行精准的双等位基因判断,是基于引物末端碱基的特异匹配来对SNP分型以及插入和缺失进行检测。KASP方法利用通用荧光探针,就可以通过简单的touch-down PCR的方法实现SNP分型。作为一项灵活、经济、准确的SNP检测方法,KASP技术结合酶标仪使用就可以完成SNP分型的鉴定。KASP分型技术目前在农业种质资源研究和疾病筛选中应用得比较广泛,Alexanda M. Allen等<sup>[30]</sup>首次通过KASP基因分型技术区分两个品种小麦的基因型,并生成连锁图。KASP技术还被应用于玉米的种质资源提高和SNP分型研究<sup>[31]</sup>。

多重连接依赖探针扩增 (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification, MLPA) 技术最早由荷兰学者Dr. Schouten JP于2002年提出,是近几年

发展起来的一种针对待检DNA序列进行定量和半定量分析的新技术。MLPA可以快速地同时鉴定几十个基因的缺失和插入,可用于血液、肿瘤样本的DNA和mRNA的表达谱分析。而且MLPA方法可以用于甲基化分析。该技术具有高效性和特异性,可在同一反应管内检测多达50个核苷酸序列的拷贝数变化。目前该方法在一些疾病的筛查方面得到应用,例如微小缺失综合征、亚端粒异常筛查、脊髓性肌肉萎缩症诊断、肿瘤诊断等方面,具有可多重检测、需要样本量少、使用的仪器少、高通量、稳定性好、易于定量、成本较低的特点<sup>[32-33]</sup>。

实时荧光定量PCR (Quantitative Real-time PCR, qPCR) 技术是一种在DNA扩增反应过程中,以荧光化学物质作为内参或者外参进行标记,对待测样品中特定的DNA序列进行定量分析的方法,是在PCR扩增过程中,通过荧光信号标记,对PCR扩增反应进程进行实时检测的方法。在PCR扩增的指数时期,模板的Ct值与该模板的起始拷贝数之间存在一定的线性关系,因此可作为定量的依据。目前主要的qPCR检测方法有染料法和TaqMan探针法。qPCR反应过程中,荧光信号的积累与PCR扩增产物的形成同步发生,在特定光信号的激发下产生荧光信号并被荧光监测系统捕捉,从而达到实时检测的目的。在采用定量PCR方法进行核酸分子的检测时(例如GMO检测、食源性病原微生物的检测、法医学检测等),主要依赖于基于标准品检测绘制而成的标准曲线。定量检测结果的准确性依赖于标准物质的准确检测与准确定标<sup>[34]</sup>。

数字PCR (Digital PCR, dPCR) 是一种对PCR反应体系进行绝对稀释,随后在有限个不同的独立反应空间内进行PCR扩增反应,反应结束后可以根据泊松分布原理以及阳性微滴的数量与比例计算得出靶分子的起始拷贝数或浓度的技术。数字PCR技术是一种灵敏度高、定量精确、检测范围宽、特异性好、费用适中的分子定量检测手段,可以对靶DNA或RNA分子的变异情况进行精确的定量分析,可以进行病原体的检测与监测。微滴式数字PCR具有绝对定量的优势,且可以排除杂蛋白、RNA分子、盐成分等对结果的干扰<sup>[34]</sup>。数字PCR通过对PCR扩增体系的微滴化处理,使得稀有的待检测目标片段从高浓度的非目的检测DNA中分离出来,从

而提高了检测的灵敏度及精确性<sup>[35]</sup>。

## 5 下一代测序 (NGS) 技术在中药鉴定中的应用

20世纪90年代,下一代测序技术(Next-Generation Sequencing, NGS)开始登上历史舞台,454测序仪上市标志着正式进入高通量测序时代,之后Illumina公司和ABI公司相继推出Solexa和SoLid测序技术<sup>[36]</sup>。然而,读长相对较短仍是NGS进一步应用的主要瓶颈<sup>[37]</sup>,较短的测序读长为组装基因组带来巨大困难,尤其是高GC含量的基因组的组装<sup>[38]</sup>。为了弥补上述的高通量测序技术的缺陷,更好地发掘DNA序列信息,研究人员研发出单分子测序技术(Single-molecule Sequencing),主要包括Pacific Biosciences(PacBio)公司的单分子实时(Single-molecule Realtime, SMRT)测序技术、Oxford Nanopore公司的单分子纳米孔测序技术(The Single-molecule Nanopore DNA Sequencing)和Helicos公司的真正单分子测序技术(True Single-molecule Sequencing, tSMSTM)等<sup>[39]</sup>。

进入21世纪,自第一个植物基因组拟南芥被完整破解<sup>[40]</sup>以来,有近300种植物的基因组被陆续破解,并在此基础上建立了相应的植物基因组数据库,中药材植物是其中重要的组成部分。中药材品种数量众多,一项市场调查发现,123种常用的中药材都有不同程度的掺假或混用的情况<sup>[41]</sup>。传统的DNA条形码技术虽然具有很好的物种区分能力,但是一般是针对单一的物种进行鉴定,碍于桑格测序的技术局限性,其对多药味的中成药的鉴别存在困难。NGS测序则可以解决多药味处方的鉴别的问题,目前已有许多关于NGS技术应用于中药材产品的报道。

### 5.1 用于中药产品的质量控制的

Peng Zhang等<sup>[42]</sup>尝试用Pacific Biosciences(PacBio)公司的单分子实时(Single-molecule Realtime, SMRT)测序技术对生脉散中各个药味进行检测,不同于传统的NGS测序,其开发了一种Full-length Multi-barcoding的策略,直接对ITS2和PsbA-trnH的片段进行了测序,并选择三味蒺藜散用于验证方法的可行性。最终通过不同通用DNA引物的组合可以实现对生脉散与三味蒺藜散中所有药味的鉴定,同时可以鉴定出外源性的物种,充分证

明了此种方法用于中成药质量控制的可行性。

由于龙胆泻肝丸中川木通的混用会引起马兜铃肾病,因此其质量检测要求比较严格,通过鸟枪法宏基因组测序<sup>[43-44]</sup>技术使用Illumina HiSeq 2500平台对龙胆泻肝丸<sup>[45]</sup>中的木通进行验证,从实验室制作的2个参考样本(RF01和RF02)中获得了ITS2、PsbA-trnH和MatK三个序列的共计129个有用的Contigs,实现了对木通及龙胆泻肝丸中其余药味样本的检测。将该方法应用于市场收集样本的检测,发现市场样品多存在产品投料缺失、伪品混用、川木通代替木通投料等情况,证明了该方法用于中药材尤其中成药质量控制方面具有可行性。

Cheng等<sup>[46]</sup>基于高通量测序方法开发了一种新的用于识别中药中生物成分的M-TCM方法,对六味地黄丸的生物成分进行分析。分析过程中选择了3批不同制造商的六味地黄丸的药材及自己实验室制备的参考样本,最终实现了对六味地黄丸中不同药味与外源性生物的检测,并通过该方法进一步验证了有些厂家以加工过的原材料进行投料生产的猜测。

目前对于天南星的化学检测方法较少,且天南星根茎具有毒性,Li等<sup>[47]</sup>通过高通量测序与实时PCR技术检测在传统如意金黄散处方中是否存在掺伪的情况,并通过是否能鉴别如意金黄散中有毒的天南星及其混伪品虎掌来确定此方法的可行性。结果显示,市场收集的如意金黄散样品中未检测到天南星与厚朴,却检测到了虎掌和当归,实时PCR方法与NGS测序的检测结果一致,进一步验证了结果的准确性。

Xin等<sup>[44]</sup>利用PACBIO RSII SMRT平台对3份市场来源和2份实验室自制的九味羌活丸样品进行测序,通过对ITS2和PsbA-trnH两种DNA条形码的测序结果分析,发现实验室自制的样品中所有的药味均被检出,而市场购买的样品中黄芩、苍术、白芷、川芎等药味未被检测到,同时朝鲜苍术、白术等非处方药味和外源性的物种例如杜鹃属、牵牛属等却有检出。

Williams A等<sup>[48]</sup>利用PacBio平台结合PCR-DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)的方法检测当归补血方中处方药味的投料是否准确,并通过高效液相色谱<sup>[49]</sup>的方法检测当归和黄芪中的

质量标志物, 确定其剂量关系。

## 5.2 用于SNP位点的检测

针对松果菊属中松果菊、狭叶松果菊、淡紫松果菊的种内区分难度大及全缘叶银胶菊存在掺假的问题, 张等人<sup>[50]</sup>通过Illumina MiSeq平台对9种常见松果菊属物种的全叶绿体基因组进行测序与组装。结果显示, ITS2和PsbA-trnH引物对比MatK和RbcL引物对的分辨率更高, 同时组装得到的叶绿体全基因组中SNP位点的检测更加便捷, 且相较于通用的DNA条形码序列更长, 蕴含更多的遗传信息。

## 5.3 用于贵重药材或濒危药材的检测

Arulandhu等<sup>[51]</sup>开发了一种多点DNA条形码技术, 通过Illumina MiSeq平台对29种动物和17种濒危植物的DNA样本进行检测, 并对包括提取、测序、生物信息学分析与数据比对的整个全流程的可行性进行评估, 结果显示, 由于Illumina测序系统准确率较高, 且一次运行可检测多个样本, 能够实现对濒危物种的检测。通过Illumina MiSeq平台验证了NGS技术应用于监管与执法方面的可行性, 其具有较好的应用前景。

## 6 展望

中药鉴定是保障中药用药安全的前沿学术课题, 是中药标准化和国际化的基础, 具有现代科学和传统文化的双重内涵。在当前我国大力加强中药研究和加速中药现代化进程的形势下, 中药的准确鉴别是确保中药质量合格和科研结果可靠的重要工作。中药鉴定学在传统鉴别技术的基础上逐步形成与植物系统分类学、植物化学、生物化学、分子生物学、细胞生物学及现代仪器分析等多学科的知识和技术的大融合。中药是一个非常复杂的体系, 从上世纪开始的显微鉴定, 到不断发展的化学方法, 都为中药的质量控制作出了巨大的贡献。随着近年来中药鉴定技术的发展, DNA条形码技术在中药材的物种鉴定中得到广泛应用, 通过建立中药材标准序列的DNA条形码数据库, 以及检测标记的筛选、获得和检测, 可以逐步实现中药材物种鉴定的标准化。NGS具有高通量和低成本的优势, 可有效实现对草药产品的分子生物学鉴定, 目前有越来越多应用NGS技术进行中药质量控制或检测的探索研究, 旨在探索建立中药质量新的评价方法。

## 参考文献:

- [1] 郑巍. 中药鉴定方法中的性状鉴定[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(2): 141.
- [2] 谢世虎. 探究传统中药鉴定方法的继承及创新[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(40): 7906, 7908.
- [3] 赵中振, 陈虎彪, 肖培根, 等. 传统中药鉴定学科的继承与创新[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3385-3390.
- [4] 罗伦, 冉会敏. 浅论中药鉴定学新技术新方法的研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(37): 189, 191.
- [5] 胡妮娜, 田淑琴, 于景伟, 等. 传统中药鉴定方法的研究发展概况[J]. 中医药信息, 2008(3): 15-18.
- [6] 蔡少青, 王璇. 常用中药材品种整理与质量研究: 北方编第六册[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2001.
- [7] 刘萌萌, 李峰. 显微鉴定新技术在中药材鉴定中的应用进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2011, 13(12): 50.
- [8] 陈科力, 黄林芳, 刘义梅. 中药鉴定方法学发展历程[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(7): 1203-1208.
- [9] 沈昌明, 王琳. 传统中药鉴定方法的应用[J]. 医药论坛杂志, 2010, 31(20): 205-207.
- [10] 代丽萍, 陈随清. 论中药鉴定学的内涵与外延[J]. 药学教育, 2015, 31(6): 6-8.
- [11] 黄璐琦, 胡之璧. 中药鉴定新技术新方法及其应用[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [12] 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[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1043-1055.
- [13] 刘兴朵. 中药材鉴定新技术新方法研究分析[J]. 中国民康医学, 2019, 31(9): 101-102.
- [14] 梁珊珊, 黄江红. 现代中药鉴定方法研究进展[J]. 深圳中西医结合杂志, 2019, 29(18): 188-189.
- [15] 胡晓宇, 杨馨玥, 姚金剑, 等. 中药现场鉴定技术研究进展[J]. 药学研究, 2019, 38(12): 724-728.
- [16] 吕东方. 中药特征图谱技术在中药鉴定中的应用[J]. 临床医药文献电子杂志, 2018, 5(99): 198.
- [17] 焦玉. 中药鉴定新技术研究概况[J]. 湖北中医杂志, 2014, 36(9): 71-73.
- [18] 郭慧, 王谦博, 贾力维, 等. 中药材DNA条形码技术研究进展[J]. 中国药师, 2016, 19(3): 566-570.
- [19] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL. Biological Identifications through DNA Barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society

- B: Biological Sciences, 2003, 270 ( 1512 ) : 313-321.
- [20] Li DZ, Liu JQ, Chen ZD, et al. Plant DNA Barcoding in China[J]. Journal of Systematics & Evolution, 2011, 49 ( 3 ) : 165-168.
- [21] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 490-492.
- [22] Mankga L, Kowiyu Y, Moteete A, et al. Efficacy of the Core DNA Barcodes in Identifying Processed and Poorly Conserved Plant Materials Commonly Used in South African Traditional Medicine[J]. ZooKeys, 2013, 365: 215-233.
- [23] Chen SL, Yao H, Han JP, et al. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species[J]. PLoS One, 2015, 5 ( 1 ) : 1-8.
- [24] 陈康, 蒋超, 袁媛, 等. 高分辨率熔解曲线技术及其在中药DNA分子鉴定中的应用[J]. 药学学报, 2015, 50 ( 12 ) : 1581-1588.
- [25] Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, et al. High Resolution Genotyping by Amplicon Melting Analysis Using LCGreen[J]. Clinical Chemistry, 2003, 49 ( 6 Pt 1 ) : 853-860.
- [26] 李旦, 王加启, 卜登攀, 等. 高分辨率熔解曲线及其应用[J]. 生物技术通报, 2009 ( 7 ) : 48-51.
- [27] 王志科, 鲁放, 熊超, 等. Bar-HRM技术在人参和西洋参药材鉴定中的应用研究[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2016, 18 ( 2 ) : 191-195.
- [28] 胡凯, 王微, 游玉明. 基于DNA条形码和HRM技术对金银花及山银花药材的快速鉴别[J]. 时珍国医国药, 2015, 26 ( 12 ) : 2923-2926.
- [29] 陈康, 蒋超, 袁媛, 等. 基于熔解曲线分析技术的鹿茸药材分子鉴别[J]. 中国中药杂志, 2015, 40 ( 4 ) : 619-623.
- [30] Allen AM, Barker GLA, Berry ST, et al. Transcript-specific, Single-nucleotide Polymorphism Discovery and Linkage Analysis in Hexaploid Bread Wheat ( *Triticum aestivum* L. ) [J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9 ( 9 ) : 1086-1099.
- [31] Semagn K, Babu R, Hearne S, et al. Single Nucleotide Polymorphism Genotyping Using Kompetitive Allele Specific PCR (KASP): Overview of the Technology and its Application in Crop Improvement[J]. Molecular Breeding, 2013, 33 ( 1 ) : 1-14.
- [32] Gupta R, Kaur G, Kumar L, et al. Nucleic Acid Based Risk Assessment and Staging for Clinical Practice in Multiple Myeloma[J]. Annals of Hematology, 2018, 97 ( 12 ) : 2447-2454.
- [33] Qu C, Liang F, Long Q, et al. Genetic Screening Revealed Usher Syndrome in a Paediatric Chinese Patient[J]. Hearing, Balance and Communication, 2017, 15 ( 2 ) : 98-106.
- [34] Doescher A, Loges U, Petershofen EK, et al. Evaluation of Droplet Digital PCR for Quantification of Residual Leucocytes in Red Blood Cell Concentrates[J]. Vox Sanguinis, 2017, 112 ( 8 ) : 744-750.
- [35] 李浩, 杨冬燕, 杨永存, 等. 运用微滴式数字PCR技术鉴定漏水的初步研究[J]. 中国保健营养旬刊, 2013 ( 5 ) : 22-23.
- [36] 梁焯, 陈双燕, 刘公社. 新一代测序技术在植物转录组研究中的应用[J]. 遗传, 2011, 33 ( 12 ) : 1317-1326.
- [37] 柳延虎, 王璐, 于黎. 单分子实时测序技术的原理与应用[J]. 遗传, 2015, 37 ( 3 ) : 259-268.
- [38] Shin SC, Ahn do H, Kim SJ, et al. Advantages of Single-molecule Real-time Sequencing in High-GC Content Genomes[J]. PLoS One, 2013, 8 ( 7 ) : e68824.
- [39] 李明爽, 赵敏. 第三代测序基本原理[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12 ( 10 ) : 1980-1982.
- [40] The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the Sequence of the Flowering Plant Arabidopsis Thaliana[J]. Nature, 2000, 408 ( 6814 ) : 796-815.
- [41] Yang G, Wang N, Zhan ZL, et al. Study on Status of Criteria for Formulating Specification and Grade of Chinese Medicinal Materials Based on Filed Survey in Medicine Market[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41: 761-763.
- [42] Zhang P, Liu CS, Zheng XS, et al. Full-Length Multi-Barcoding: DNA Barcoding from Single Ingredient to Complex Mixtures[J]. Genes, 2019, 10 ( 5 ) : 343-361.
- [43] Jia J, Xu Z, Xin T, et al. Quality Control of the Traditional Patent Medicine Yimu Wan Based on SMRT Sequencing and DNA Barcoding[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 926.
- [44] Xin TY, Xu ZC, Jia J, et al. Biomonitoring for Traditional



- Herbal Medicinal Products Using DNA Metabarcoding and Single Molecule, Real-time Sequencing[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2018, 8 ( 3 ) : 488-497.
- [45] Xin TY, Su C, Lin YL, et al. Precise Species Detection of Traditional Chinese Patent Medicine by Shotgun Metagenomic Sequencing[J]. *Phytomedicine*, 2018, 47: 40-47.
- [46] Cheng XW, Su XQ, Chen XH, et al. Biological Ingredient Analysis of Traditional Chinese Medicine Preparation Based on High-throughput Sequencing: the Story for Liuwei Dihuang Wan[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 5147-5158.
- [47] Li Q, Sun Y, Guo HJ, et al. Quality Control of the Traditional Chinese Medicine Ruyi Jinhuang Powder Based on High-throughput Sequencing and Real-time PCR[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8 ( 1 ) : 8261.
- [48] Williams A, Storton D, Buckles J, et al. Improvement of PCR-free NGS Library Preparation to Obtain Uniform Read Coverage of Genome with Extremely High AT Content[J]. *Journal of Biomolecular Techniques*, 2012, 23 ( Suppl ) : S34.
- [49] Xie PS, Chen SB, Liang YZ, et al. Chromatographic Fingerprint Analysis—a Rational Approach for Quality Assessment of Traditional Chinese Herbal Medicine[J]. *Journal of Chromatography A*, 2006, 1112: 171-180.
- [50] Zhang N, Erickson DL, Ramachandran P, et al. An Analysis of Echinacea Chloroplast Genomes: Implications for Future Botanical Identification[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7 ( 1 ) : 216.
- [51] Arulandhu AJ, Staats M, Hagelaar R, et al. Development and Validation of a Multi-locus DNA Metabarcoding Method to Identify Endangered Species in Complex Samples[J]. *Gigascience*, 2017, 6 ( 10 ) : 1-18.

( 收稿日期 2023年6月27日 编辑 李亚徽 )