

· 药学基础 ·

基于Herb-Q方法的当归药材及其加工品的分子定量检测

张鸣宇^{1,2}, 姜汶君², 纪宝玉¹, 王悦², 张海涛², 张浩博², 冯雪^{2*}, 李西文^{1,2,3*}

(1. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 2. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;
3. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193)

[摘要] 目的: 当归作为常用大宗药食同源药材, 市场掺伪现象频发, 严重影响制剂临床疗效。目前其混伪品定性鉴别技术已较为成熟, 但其加工品掺伪定量检测方法尚属空白。该研究以当归及其主要近缘易混伪品“土当归”(朝鲜当归)为例开展定量检测研究, 旨在建立当归及其加工品的草药分子定量检测方法(Herb-Q), 为当归药材及其相关健康产品的定量检测技术的建立提供示范。方法: 基于叶绿体基因组全序列筛选当归及朝鲜当归的特异性单核苷酸多态性(SNP)位点。选取当归特异性位点通过不同掺伪比例的混合药材粉末进行定量方法学的考察(线性、定量限、检测限和重现性)。采用3个不同掺伪比例(15%、25%、35%)的活血止痛散验证Herb-Q方法对于含当归的中成药定量检测准确度。结果: 通过比对当归属123条叶绿体基因组序列, 基于种内保守、种间特异及满足焦磷酸高通量测序要求的原则, 确定叶绿体基因组序列NC_042826.1中的第9 674位点(A/G)和叶绿体基因组序列NC_029393.1中第38 592位点(T/C)可分别作为当归和朝鲜当归的专属性分子鉴别位点。选取当归专属性第9 674位点(A/G)进行所建立的Herb-Q方法线性关系 R^2 值为0.997 4($R^2>0.99$), 线性关系良好。定量限与检测限均为2.0%, 重现性较好[相对标准偏差(RSD)<2.0%]。基于Herb-Q方法构建的定量体系检测活血止痛散中伪品朝鲜当归掺入量, 3次分子定量重复平均偏差为1.3%。结论: 该研究表明基于当归叶绿体基因组序列NC_042826.1中的第9 674位点(A/G)所构建的Herb-Q定量检测方法在当归和“土当归”及其在加工品中具有良好的适用性、客观性和准确性, 可为市售当归衍生产品如中药制剂、膳食营养补充剂及保健品的定量检测提供技术支持。

[关键词] 草药分子定量检测方法(Herb-Q); 当归; 掺伪; 焦磷酸测序; 定量研究

[中图分类号] R284;R285;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)10-0192-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20251415

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20251020.1648.001>

[网络出版日期] 2025-10-21 10:50:25 **[增强出版附件]** 内容详见<http://www.syfjxzz.com>或<http://cnki.net>



Quantitative Molecular Detection of Angelicae Sinensis Radix and Its Processed Products Based on Herb-Q Method

ZHANG Mingyu^{1,2}, JIANG Wenjun², JI Baoyu¹, WANG Yue², ZHANG Haitao², ZHANG Haobo²,
FENG Xue^{2*}, LI Xiwen^{1,2,3*}

(1. School of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;
2. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700,
China; 3. Institute of Medicinal Plant Development, China Academy of Medical Sciences,
Beijing 100193, China)

[Abstract] **Objective:** Angelicae Sinensis Radix, a commonly used medicinal herb with both medicinal and edible properties, is frequently adulterated in the market, severely affecting the clinical efficacy of preparations. While qualitative identification techniques for adulterants and counterfeits are now relatively mature, quantitative detection methods for adulterated

[收稿日期] 2025-02-20

[基金项目] 北京市自然科学基金项目(7244492); 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2024C003YN)

[第一作者] 张鸣宇, 在读硕士, 从事生药鉴定研究, E-mail: zmy421317@163.com

[通信作者] * 冯雪, 博士, 助理研究员, 从事中药材抗逆育种及质量评价研究, E-mail: xfeng0413@icmm.ac.cn;

* 李西文, 研究员, 博士生导师, 从事品质中药材栽培及分子鉴定研究, E-mail: xwli@icmm.ac.cn

processed products remain unexplored. Quantitative detection research of *Angelicae Sinensis Radix* and its primary closely related adulterant, "Tu Dangui" (*Angelica gigas*), was conducted to establish a herbal quantitative molecular detection (Herb-Q) method for *Angelicae Sinensis Radix* and its processed products, providing a model for the establishment of quantitative detection technologies for *Angelicae Sinensis Radix* and related health products. **Methods:** The specific single-nucleotide polymorphism (SNP) loci of *Angelicae Sinensis Radix* and *Angelica gigas* Nakai were screened based on the complete chloroplast genome sequence. The specific SNP loci of *Angelicae Sinensis Radix* were selected for quantitative methodological investigations (linearity, limit of quantification, limit of detection, and reproducibility) by mixing the powder of the herbs with different adulteration ratios. Huoxue Zhitong powder with three distinct adulteration ratios (15%, 25%, and 35%) was utilized to ascertain the precision of the Herb-Q method for the quantitative detection of Chinese patent medicines containing *Angelicae Sinensis Radix*. **Results:** By comparing the 123 chloroplast genome sequences of *Angelicae Sinensis Radix*, based on the principles of intraspecies conservation, interspecies specificity, and meeting the requirements of pyrophosphate high-throughput sequencing, it was determined that 9 674th locus (A/G) in the chloroplast genome sequence NC_042826.1 and 38 592nd locus (T/C) in the chloroplast genome sequence NC_029393.1 could be the exclusive molecular identification loci of *Angelicae Sinensis Radix* and *Angelica gigas* Nakai, respectively. The linear relationship R^2 of the Herb-Q method established by selecting the specific 9 674th locus (A/G) of *Angelicae Sinensis Radix* was 0.997 4 ($R^2 > 0.99$), indicating an excellent linear relationship. The limits of quantification and detection were established at 2.0%, exhibiting excellent reproducibility [relative standard deviation (RSD) < 2.0%]. The established quantitative system based on the Herb-Q method detected the adulteration amount of counterfeit *A. gigas* in the Huoxue Zhitong powder, with an average deviation of 1.3% for three molecular quantitative replicates. **Conclusion:** This research demonstrates that the Herb-Q quantitative detection method established based on the 9 674th locus (A/G) in the chloroplast genome sequence NC_042826.1 of *Angelicae Sinensis Radix* has good applicability, objectivity, and accuracy for *Angelicae Sinensis Radix* and *A. gigas*, and its processed products. This method has the capacity to provide technical support for the quantitative detection of commercially available *Angelicae Sinensis Radix* derivatives, including traditional Chinese medicinal preparations, dietary supplements, and nutraceuticals.

[Keywords] herbal quantitative molecular detection (Herb-Q) method; *Angelicae Sinensis Radix*; adulteration; pyrophosphate sequencing; quantitative research

当归为我国药食同源的大宗常用中药材^[1],始载于《神农本草经》,为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根茎,外表皮浅棕色至棕褐色,香气浓郁^[2],主要分布于我国甘肃、四川、云南等地^[3],具有活血补血、调经止痛、润肠通便的功效。市售当归多通过栽培获得,野生资源极少^[4-5]。在当归药材的种植和流通过程中,混用、掺伪现象较为常见,药材质量和临床疗效难以保证。在栽培过程中,由于种质遗传背景不清晰或种植管理方式不佳,常出现种质混杂的现象,药材质量稳定性降低^[6-8];另一方面,当归经过切片或粉碎处理后,与常见混伪品独活、欧当归等的外观差异仅凭经验或初步目测难以准确区分^[9-12];此外,由于不同地区对药材名称的认知差异,将一些与当归形态相似的药材作为替代品使用,如在东北、朝鲜等地区将“土当归”作正品当归出售^[13-14]。基于紫外吸收光谱、薄层色谱及DNA条形码等鉴别技术可实现当归及其常见混伪品独活、牛尾独活及欧当归等的定性检测^[15-19],但缺乏当归及其加工品中近缘物种掺伪比例定量检测方法。药材的混用或掺伪不仅影响临床安全性,还影响其产品的疗效,而掺伪程度和复方中单味药剂量不符合规定同样会影响其质量。近年来,国家发布相关法律法规严格把控中药材的质量。《药品生产质量

管理规范(2010年修订)^[20]要求在药品生产过程中严格控制物料质量,并对原材料的成分及质量进行定量分析和记录。2020年版《中华人民共和国药典》规定中草药外源污染杂质不得超过3%^[2]。国际贸易协定和条约中也包含了对中草药掺假行为的禁止规定^[21],防止中草药掺假行为。因此,建立当归药材及其加工品中混伪品掺入量的检测方法,对保障当归质量和临床疗效具有重要的应用价值。

性状鉴定方法^[22-23]适用于对当归完整药材、切断品及饮片的鉴别,难以对当归加工品进行检测。高效液相色谱(HPLC)和气相色谱-质谱联用(GC-MS)等现代化学检测技术被应用于当归中阿魏酸、挥发油和多糖等成分的定量检测分析^[24],但鉴定物种不具有专属性。扩增片段长度多态性(AFLP)^[25]、简单重复序列间扩增多态性(ISSR)^[26]、DNA条形码^[18]等分子方法已广泛应用于当归物种区分鉴定、品质控制和遗传多样性分析等,但缺乏当归及其加工品中定量检测掺伪比例的方法。目前,已有微滴式数字聚合酶链式反应(ddPCR)、VCQA^[27-28]等定量技术运用于混合物种定量鉴别的报道,但对于近缘物种的定量检测具有局限性^[29-31]。草药分子定量检测(Herb-Q)是一种基于特异单核苷酸多态性(SNP)位点结合焦磷酸高通量测序的定

量方法,其优势在于易操作、可视化及易于鉴别近缘物种混用或掺伪量。已有研究报道证实该方法可对半夏^[32]、川贝母^[33]及其同属近缘易掺伪物种进行定量检测。当归常见掺伪品有“土当归”、欧当归、独活及牛尾独活等,其中“土当归”(朝鲜当归)为其同属近缘物种。研究发现朝鲜当归与当归的成分含量存在差异^[34-35],市场上将其掺入当归中使用对消费者的用药安全构成威胁。掺伪定量检测方法的建立可为正品当归鉴定及其加工品中混伪品掺入量检测提供有效的技术支持。

本研究选取当归常见混伪品之一朝鲜当归,用于构建基于Herb-Q方法的当归及其常见混伪品的定量检测体系。通过NCBI数据库中所记载的当归属所有物种完整叶绿体基因组序列进行分析,筛选出当归的特异性SNP位点,此SNP位点可用于区分当归与当归同属物种。并筛选出朝鲜当归的特异性位点从而实现定量方法体系的构建。完成基于Herb-Q方法的当归定量检测体系的方法学考察,采用自制混合药材粉末和中成药活血止痛散检测该方法的适用性和准确性,旨在建立一种快速、高效的检测方法,为当归产品的定量检测提供技术保障。

1 材料

1.1 药物 本试验收集当归及朝鲜当归药材共8批,均为整株根新鲜样品,分别来自甘肃省兰州市、定西市,安徽省亳州市,云南省曲靖市,辽宁省沈阳市及吉林省长春市、白山市、通化市地区,见表1。经中国中医科学院中药研究所李西文研究员鉴定为当归药材 *Angelica sinensis* 和朝鲜当归药材 *A. gigas*。为保证试验样品状态一致,本试验收集的所有药材均经切片、50 °C干燥30 h后用于后续试验。将每批样品分别密封于双层无菌自封袋中,置于阴凉通风处,并附上包括编号、产地、收集日期等信息的标签。

1.2 仪器 JXFSTPRP-48L型全自动样品快速研磨仪(上海净信实业发展有限公司);PyroMark Q48 Autoprep型焦磷酸测序仪(凯杰企业管理上海有限公司);SYG-A2-6型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);Thermo Scientific NanoDrop型分光光度计(赛默飞世尔科技中国有限公司);TC-96/G/H(b)B型基因扩增仪(杭州博日科技股份有限公司);DYY-6C型双稳定时电泳电源(北京六一生物科技有限公司);JY-SPCT型水平电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司);XK-400型医用离心机(江

表1 所收集样品的编号、拉丁学名、来源地及收集日期

Table 1 Sample number, Latin name, place of origin, and date of collection of collected samples

编号	物种	拉丁名称	来源	收集日期
AS1	当归	<i>Angelica sinensis</i>	甘肃省兰州市	2024-05-10
AS2	当归	<i>A. sinensis</i>	安徽省亳州市	2024-05-10
AS3	当归	<i>A. sinensis</i>	甘肃省定西市	2024-05-13
AS4	当归	<i>A. sinensis</i>	云南省曲靖市	2024-05-15
AG1	朝鲜当归	<i>A. gigas</i>	吉林省长春市	2024-05-09
AG2	朝鲜当归	<i>A. gigas</i>	辽宁省沈阳市	2024-05-14
AG3	朝鲜当归	<i>A. gigas</i>	吉林省白山市	2024-05-17
AG4	朝鲜当归	<i>A. gigas</i>	吉林省通化市	2024-05-21

苏新康医疗器械有限公司)。

1.3 试剂 乙二胺四乙酸(EDTA)溶液、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液(北京博奥拓达科技有限公司,批号分别为TOP0857、TOP0871);DNA提取液(金克隆北京生物技术有限公司,批号EX0128);Powerpol 2×聚合酶链式反应(PCR)混合液(含染料)、Safe Red安全核酸染料(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号分别为RM20 388、RM19 009);PyroMark Q48 Advanced Reagents型试剂盒(德国QIAGEN公司,批号974002);琼脂糖G-10(西班牙Biowest公司,批号111860);PCR扩增及测序引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(批号112860718)。

2 方法

2.1 DNA提取 称取当归及朝鲜当归根茎切片100 mg,利用快速研磨仪研磨成粉末,频率为55 Hz,快速旋转4次,每次40 s。针对根茎类药材采用改良十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法^[36]提取当归及朝鲜当归样品基因组DNA。提取完毕后,取DNA原液1 μL,使用Nanodrop One超微量核酸蛋白测定仪对样品的DNA浓度及质量进行检测。通过 A_{260}/A_{280} 判断提取的DNA纯度^[37],比值在1.8~2.0,则表明DNA纯度高,可满足后续试验的要求。DNA模板储存于-30 °C。

2.2 基于CP序列位点筛选与引物设计 在美国国家生物技术信息中心(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中GenBank数据库下载当归属所有物种的叶绿体基因组序列(CP)。基于Herb-Q方法中SNP位点筛选原则对当归与朝鲜当归候选位点进行筛选^[32]。选取候选SNP位点前后部分CP序列片段,并运用NCBI的BLAST工具验证候选位点的特异性,筛选鉴别当归和朝鲜当归的特异性SNP位点。

使用 PyroMark Assay Design 软件设计样品的正反向特异性引物及焦磷酸测序引物。通过分析所设计引物间的结合状态来确认候选 SNP 位点是否适宜使用,以防止形成发夹结构或引物二聚体。

2.3 PCR 扩增及引物有效性验证 以当归及朝鲜当归粉末提取得到的基因组 DNA 为模板,采用以下的反应体系配制进行 PCR 扩增(25 μL): Powerpol 2 \times PCR Mix with Dye 12.5 μL , 正反向引物(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 1 μL , DNA 模板 100 ng, 用灭菌去离子水补充至 25 μL 。CP 序列 PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 45 s (40 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$, 10 min。在 PCR 反应结束后,通过 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行质量检测,以确认目的条带是否明亮、清晰且单一。

2.4 定量方法学考察 选择朝鲜当归与当归混匀粉末作为方法学考察的待测样本,以线性、检测限(LOD)、定量限(LOQ)、重现性和准确性深入评估 Herb-Q 方法的可靠性。

2.4.1 线性、定量限和检测限 当归为正品,朝鲜当归为伪品。通过向正品中添加 10%、30%、50%、70% 和 90%^[38]的伪品来制备混合粉末。每个样品设置 3 次技术重复,建立药材粉末实际混合比例与目标 SNP 位点处碱基化学发光信号值比例的线性关系。

使用朝鲜当归粉末占比为 1%、2% 与之相对应的当归粉末占比为 99%、98% 的混合粉末样品来评估 Herb-Q 的 LOD 和 LOQ。LOD 定义为稳定检测 \geq 95%, LOQ 测定以 RSD \leq 25% 为准。每个样品进行 20 次重复^[30]。

2.4.2 重现性和准确性 使用 80% 的当归和相应比例为 20% 的朝鲜当归的混合粉末验证 Herb-Q 方法的重现性和准确性,不同操作人员在不同实验室不同时间利用不同仪器对特定比例的混合样品各进行 6 次技术重复。根据测序结果的准确性来检验 Herb-Q 方法的重现性是否良好。

2.5 检测活血止痛散中伪品的掺入量 为进一步验证基于 Herb-Q 建立的定量检测方法的准确性和适用性,选取含有当归成分的中成药活血止痛散(HXZT)。按照 2020 年版《中华人民共和国药典》规定成分质量同比例缩小混合制备自制 HXZTs^[2]: 当归 0.100 g、三七 0.020 g、乳香(制) 0.020 g、冰片 0.005 g、锻自然铜 0.050 g、土鳖虫 0.030 g(以上药材经中国中医科学院中药研究所李西文研究员鉴定均为正品)。在当归粉末中按照 3 个不同比例(15%、25%、35%)掺入伪品朝鲜当归粉末。当检测

值和实际值之间的偏差 $<$ 25% 时,认为基于 Herb-Q 方法的定量体系构建成功^[39]。

3 结果与分析

3.1 SNP 位点筛选及引物有效性验证 从 GenBank 数据库中下载当归属所有物种 123 条完整叶绿体基因序列进行比对分析,初步筛选发现 CP 序列 NC_042826.1 中的第 1 681、1 949 和 9 674 位点均可作为当归的特异性鉴别位点,CP 序列 NC_029393.1 中的第 22 181 和 38 592 位点均可作为朝鲜当归的特异性鉴别位点。而进一步分析发现 CP 序列 NC_042826.1 中的第 1 681 和第 1 949 位点前后含有连续较多的碱基 A 和 T,在 CP 序列 NC_029393.1 中的第 22 181 位点处所有物种的基因分型为 A 或 G。基于焦磷酸测序仪的原理,这可能会影响定量检测结果。因此,最终将 CP 序列 NC_042826.1 的第 9 674 位点和 CP 序列 NC_029393.1 的第 38 592 位点分别作为当归(A)和朝鲜当归(T)的特异性鉴别位点用于后续试验,见表 2、表 3、图 1。依据特有 SNP 位点所在的序列片段设计样品专属性检测引物,见表 4,并以当归、朝鲜当归混合粉末的 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。电泳结果显示 PCR 产物的条带与预期的片段长度相匹配,条带单一、清晰且明亮,未观察到引物二聚体。这些结果表明,设计的特异引物可有效扩增目标片段,可利用该扩增体系获取后续测序所需的模板。

表 2 当归物种 CP9674 SNP 位点特异性碱基分布

Table 2 SNP site-specific base distribution of *Angelica sinensis* species CP9674 SNP

物种	碱基分布					
	9 672	9 673	9 674	9 675	9 676	9 677
当归	T	C	A	G	C	A
同属其他物种	T	C	G	G	C	A

表 3 朝鲜当归 CP38592 SNP 位点特异性碱基分布

Table 3 SNP site-specific base distribution of *Angelica gigantis* CP38592 SNP

物种	碱基分布					
	38 590	38 591	38 592	38 593	38 594	38 595
朝鲜当归	T	C	T	T	A	G
同属其他物种	T	C	C	C	A	G

3.2 Herb-Q 定量方法学考察 在本研究中,随机选取当归药材 AS1 与朝鲜当归药材 AG3,使用当归和朝鲜当归的药材粉末制备不同比例的混合物。验证并评估 Herb-Q 方法的线性关系、定量限、检测限

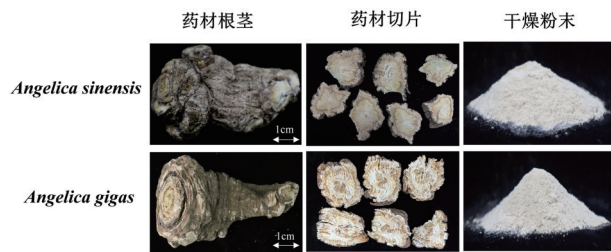


图1 当归及其掺伪品朝鲜当归的形态特征
Fig. 1 Morphological characteristics of *Angelica sinensis* Radix and its adulterant, *Angelica gigantis* Radix

表4 引物序列
Table 4 Primer sequences

物种	SNP位点	引物	序列(5'-3')	长度/bp
当归	CP 9674	DGF1	GCGCGAGTTCCAATTTAAT	20
		DGR1	biotin-CTCAATCGGGAGATGT TTCG	20
		DGS1	TGCCAGCATTGAATAGA	17
朝鲜当归	CP 38592	CXF2	TTTTGCCTCTTATTCTCCCTCTG	23
		CXR2	biotin-TTGCATAATCTCATT CTTTCGA	24
		CXS2	AGTTCCATAATACAAGTCG	20

3.2.2 定量限及检测限 采用朝鲜当归粉末占比为1%、2%即当归粉末占比为99%、98%的混合粉末确定定量限和检测限,重复测试20次。当混合粉末中伪品掺入比例为1%时,相对标准偏差(RSD)为177.8%(>25%)。而当掺伪率为2%时,RSD为11.5%(<25%)。因此,Herb-Q的LOQ为2%。又因混合粉末样品中掺杂1%检出率25%,2%的稳定检测可以达到95%,所以LOD为2%。见表5。

表5 检测限与定量限方法学验证(n=20)
Table 5 Limit of detection and limit of quantification methodological validation (n=20) %

朝鲜当归 粉末比例	最大值	最小值	平均值	RSD	检出率
1%	1	0	0.25	177.8	25
2%	2	1	1.95	11.5	95

3.2.3 重现性与准确性 本试验进一步验证Herb-Q方法的重现性与准确性。使用Herb-Q方法对PCR产物进行测序,得到的12次试验结果均能检测出伪品朝鲜当归在CP序列NC_042826.1的第9674位点碱基G的荧光信号值,且只有1次检测为19%,平均值达到19.91%,RSD(RSD)=1.45%(n=12,<2.0%)。见增强出版附加材料。由此可见,Herb-Q方法具有很好的重现性与准确性。

3.3 Herb-Q方法在自制活血止痛散中当归药材掺伪定量检测中的应用 为了验证基于Herb-Q方法

及重现性。选取当归特异性鉴别位点CP序列NC_042826.1的第9674位点(A/G)进行定量方法学考察。

3.2.1 线性关系考察 通过在当归粉末中掺入朝鲜当归粉末比例为10%、30%、50%、70%和90%,建立了朝鲜当归(碱基G)粉末的掺入比例(X)和等位基因频率(Y)的线性方程。回归方程为 $Y=0.972X-0.0414$, R^2 值为0.9974(>0.99),线性关系良好。见增强出版附加材料。

构建的定量体系的适用性,检测自制HXZTs中伪品朝鲜当归粉末掺入含量。在CP序列NC_042826.1的第9674位点对掺入朝鲜当归粉末3种不同比例的活血止痛散进行检测,每个比例平行3次测定。在CP序列NC_042826.1的第9674位点,当有15%、25%、35%朝鲜当归粉末掺入混合时,结果显示,可检测到朝鲜当归粉末的平均掺入量分别为15%、24%、35%,见图2、表6。经计算这3次结果的偏差<25%。由此可见,Herb-Q方法在当归加工品中具有较好的应用。

4 讨论

近年来,中药材的安全性问题受到社会的广泛关注^[40]。中药材的质量把控是中药现代化和国际化的重要内容,也是中药产业发展的瓶颈问题。基于3大传统鉴别方法对中药材混伪检测已逐渐显露出缺点:主观经验依赖性强,过程繁琐复杂,检测结果的准确性和稳定性也相对不佳。目前,基于分子生物学的中药材鉴别方法日渐增多,如对不同地区的关苍术及北苍术具有差异的DNA片段进行检测,结合相关分子标记方法,最终可实现快速地对苍术基原鉴别研究,无需复杂的流程及大量的样本^[41]。另有研究通过对铁皮石斛和石斛的叶绿体基因序列进行比对分析,根据特异性鉴别SNP位点设计特异的铁皮石斛鉴别引物,通过聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术进行鉴别,结

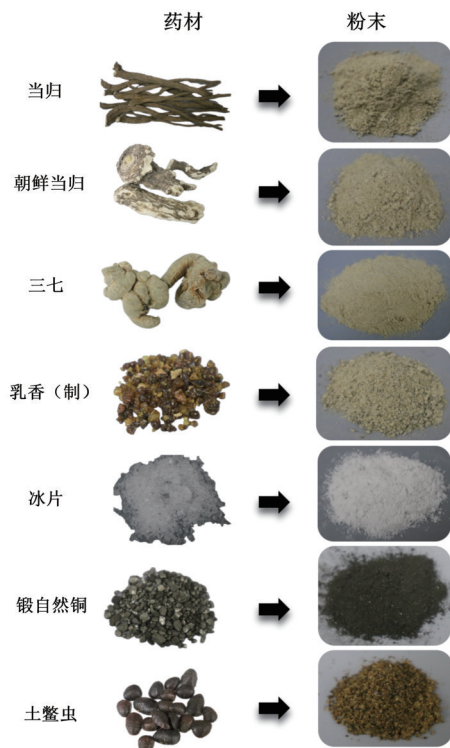


图2 活血止痛散中药材及对应粉末形态

Fig. 2 Traditional Chinese medicine of Huoxue Zhitong powder and its corresponding powder morphology

表6 当归粉末与朝鲜当归粉末3个比例平行检测

Table 6 Limit of detection and limit of quantification methodological validation %

朝鲜当归/当归(%/%)	批次	检测结果	平均值	偏差
15/85	1	15/85	15/85	0
	2	14/86		
	3	16/84		
25/75	1	24/76	24/76	4
	2	24/76		
	3	24/76		
35/65	1	37/63	35/65	0
	2	34/66		
	3	33/67		

注:SNP位点为CP9674

果表明可通过此方法鉴别铁皮石斛及其近缘种^[42]。然而所获得结果多为定性,中药材定量相关研究多为药材成分的检测,鲜有对药材本身进行定量的方法,因此急需建立可量化中草药物种的检测体系。

当归作为我国一种重要的中药材,存在于养血当归胶囊、舒尔经颗粒、养血饮口服液等多种市售的中成药中,市场需求大。市场流通中易将外形相似的物种掺入当归使用,包括“土当归”、欧当归、独

活及牛尾独活等^[9-17]。通过观察正品当归的主根、支根、表皮及断面的形态特征^[43],或对当归的全归、归头、归身、归尾4个不同部位化学成分进行鉴别^[44],可简单区分当归及常见混伪品。但只能判断混伪品的存在而不能确定实际掺伪量。本研究基于Herb-Q方法构建当归及其加工品定量检测体系,利用所筛选得到的特异性SNPs鉴别当归及其伪品朝鲜当归。为确保Herb-Q方法满足定量检测的需求,对线性、LOD、LOQ、重现性和准确性进行验证。为进一步验证该方法的适用性,以自制活血止痛散中掺入伪品朝鲜当归粉末样品进行测定,结果显示3次分子定量重复平均偏差为1.3%。此前有研究表明基于Herb-Q构建的定量体系对半夏及川贝母的检测结果偏差均在4%左右^[32-33],与其结论相一致。通过试验验证,基于Herb-Q方法的定量体系构建成功,并表现出高准确性的优势。二代测序(NGS)主要包括以Illumina为代表的桥式PCR扩增结合可逆终止子测序技术、Ion Torrent的半导体测序技术、焦磷酸测序技术等^[45-49]。相较于Illumina和Ion Torrent等技术,焦磷酸测序在中药材定量分析中展现出独特优势,基于光信号强度与核酸模板量直接关联的定量机制,避免PCR扩增偏好性(PCR bias)对检测的干扰,尤其适用于中药复方中多来源成分的定量分析,如通过焦磷酸仪器检测出8批市售蛇胆川贝胶囊中9%~15%的掺假及半夏、人参等药材的定量检测^[32-33,49]。本研究的定量体系可对市售衍生产品如中药制剂、农产品及保健品的定量检测提供参考,为当归药材的市场流通和临床使用安全提供保障。基于Herb-Q方法构建的定量体系可检测当归及其加工品中混伪品掺入的含量,但目前因未有合适的外标物无法精确到伪品朝鲜当归粉末掺入量的实际重量。随着GenBank数据库中当归属更多叶绿体基因组的公布,外标物的选择可不断优化筛选,有望选择合适的外标物对伪品掺入的实际重量进行检测,进一步扩大该方法的适用范围,可尝试将其应用到更多的物种定量检测中。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 陈保祯,陈芳,朱建平,等. 药食同源中药调控氧化应激防治冠心病的研究进展[J]. 中草药,2022,53(17):5582-5592.
CHEN Y Z, CHEN F, ZHU J P, et al. Research progress on medicinal food homology traditional Chinese medicine in prevention and treatment of coronary heart disease through regulation of oxidative stress [J]. Chin Tradit Herb Drugs,

- 2022,53(17):5582-5592.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:1902.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part One [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 1902.
- [3] 谢田朋,柳娜,王雅莉,等. 不同产地当归品质的研究进展[J]. 中医学报,2020,48(1):72-75.
XIE T P, LIU N, WANG Y L, et al. Quality research progress of *Angelica sinensis* from different regions [J]. Acta Chin Med Pharm, 2020, 48(1): 72-75.
- [4] 赵锐明,陈垣,郭凤霞,等. 甘肃岷县野生当归资源分布特点及其与栽培当归生长特性的比较研究[J]. 草业学报,2014,23(2):29-37.
ZHAO R M, CHEN Y, GUO F X, et al. Comparative study on distributed feature of wild *Angelica sinensis* resources and the difference in growth characteristics with its cultivars native to Min county of Gansu [J]. Acta Pratac Sin, 2014, 23 (2) : 29-37.
- [5] WEI W L, ZENG R, GU C M, et al. *Angelica sinensis* in China-A review of botanical profile, ethnopharmacology, phytochemistry and chemical analysis [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 190: 116-141.
- [6] 吴宝华,隋立军,钟心尧,等. 当归属植物资源及开发利用[J]. 安徽农业科学,2014,42(3):702-703.
WU B H, SUI L J, GUO X Y, et al. Resource and exploitation of *Angelica* L [J]. J Anhui Agric Sci, 2014, 42(3): 702-703.
- [7] 靳康荣. 当归规范化种植及病虫害防治技术[J]. 农业技术与装备,2024(6):163-164,168.
JIN K R. Technology of standardized planting and pest control of *Angelica sinensis* [J]. Agric Technol Equip, 2024 (6):163-164,168.
- [8] 李春玉,马晓霞,刘小莉. 当归“辨状论质”品质评价及道地性品质形成研究进展[J]. 中草药,2025,56(3):1104-1114.
LI C Y, MA X X, LIU X L, et al. Quality evaluation and genuine quality formation of *Angelicae Sinensis Radix* "quality evaluation through morphological identification" [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2025, 56(3): 1104-1114.
- [9] 张平,马潇,王晓琳,等. 当归中混入不同比例独活 HPLC 特征指纹图谱研究[J]. 中国中医药信息杂志,2018,25(11):83-86.
ZHANG P, MA X, WANG X L, et al. Study on HPLC fingerprint of different proportions of *Angelicae Pubescentis Radix* in *Angelicae Sinensis Radix* [J]. Chin J Chin Mater Med, 2018, 25(11): 83-86.
- [10] PRISCA M, 陆占魁,李子涵,等. 紫外可见光谱结合化学计量学对当归及其掺伪品的可视化鉴别[J]. 分析测试学报,2024,43(11):1858-1862.
PRISCA M, LU Z K, LI Z H, et al. Visual identification of *angelicae sinensis radix* with its adulterants by ultraviolet-visible spectroscopy combined with chemometrics [J]. J Instrum Anal, 2024, 43(11): 1858-1862.
- [11] 史中飞,滕宝霞,赖晶,等. PCR-RFLP 鉴别当归药材及饮片掺混伪品——欧当归的方法[J]. 中国实验方剂学杂志,2021,27(9):168-175.
SHI Z F, TENG B X, LAI J, et al. Identification of *Levisticum officinale* adulterated in *Angelica sinensis* by PCR-RFLP [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(9): 168-175.
- [12] 王亚丹,陈明慧,闫建功,等. UPLC 指纹图谱结合化学计量学方法比较当归和欧当归药材的成分差异[J]. 中草药,2022,53(22):7214-7220.
WANG Y D, CHEN M H, YAN J G, et al. Comparison of chemical constituents between *Angelica sinensis* and *Levisticum officinale* by UPLC fingerprints combined with chemometrics methods [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2022, 53 (22): 7214-7220.
- [13] 赵奎君,董婷霞,詹华强. 中、日、韩三国当归中阿魏酸、藜本内酯及总多糖的含量比较[J]. 中国药师,2007,10(6):536-537,540.
ZHAO K J, DONG T X, ZHAN H Q, et al. contents comparison of ferulic acid, ligustilide and total polysaccharide in *Radix Angelicae Sinensis* cultivated in China, Japan and South Korea [J]. Front Pharm Sci, 2007, 10 (6) : 536-537, 540.
- [14] 刘莲萱,洪霖,张会永,等. “土当归”化学成分及药理作用研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2022,39(6):748-759.
LIU L X, HONG L, ZHANG H Y, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activities of *Angelica gigas Nakai* [J]. J Shenyang Pharm Univ, 2022, 39 (6): 748-759.
- [15] 王硕,齐兰婷,王佩燕,等. 基于 ITS2 的可视化荧光探针对当归及其混淆品的鉴别分析[J]. 分子植物育种,2025,doi:46.1068.S.20230405.1003.002.
WANG S, QI L T, WANG P Y, et al. Identification of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and its adulterants from different origins based on visual fluorescent probe technology of ITS2 sequence [J]. Mol Plant Breed, 2025, doi: 46. 1068. S. 20230405. 1003. 002.
- [16] 郑梦迪,孙咪咪,贺紫涵,等. 基于 ITS2 序列及二级结构对易混淆药材牛尾独活、当归、独活和羌活的鉴别研究[J]. 药学学报,2021,56(8):2289-2294.
ZHENG M D, SUN M M, HE Z H, et al. *Molecular authentication* of the medicinal species of *Rhizoma et Radix Heraclei*, *Radix Angelicae Sinensis*, *Radix Angelicae Pubescentis* and *Rhizoma et Radix Notopterygii* by integrating ITS2 and its secondary structure [J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(8): 2289-2294.
- [17] 车苏容,张家源,张秋梅,等. 当归及其混淆品独活、欧当归的紫外鉴别[J]. 亚热带植物科学,2020,49(6):473-476.
CHE S R, ZHANG J Y, ZHANG Q M, et al. Identification of *Angelica sinensis Radix*, *Angelica pubescens Radix* and *Levisticum officinale Radix* by UV [J]. Subtrop Plant Sci, 2020, 49(6): 473-476.
- [18] 阎梦颖,房敏峰,祝娟,等. 基于 ITS 条形码标记对当归属药

- 用植物的鉴别[J]. 中草药, 2016, 47(6):974-981.
- YAN M Y, FANG M F, ZHU J, et al. Identification of medicinal plants in *Angelica L.* based on ITS barcode label [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2016, 47(6):974-981.
- [19] 殷文娟. 当归及其易混淆品鉴别[J]. 黑龙江中医药, 2010, 39(5):50-51.
- YIN W J. *Angelica* and its easily confused products [J]. Heilongjiang J Tradit Chin Med, 2010, 39(5):50-51.
- [20] 中华人民共和国卫生部. 药品生产质量管理规范(2010年修订)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2011.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. Good Manufacturing Practice for Drugs (2010 Revision) [M]. Beijing: Ministry of Health of the People's Republic of China, 2011.
- [21] SOLIMENE U, ALKOFI A S, ALLEMANN C, et al. WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues [M]. Geneva: World Health Organization, 2007.
- [22] ZHANG Z Y, WANG Y J, YAN H, et al. Rapid geographical origin identification and quality assessment of *Angelicae Sinensis Radix* by FT-NIR spectroscopy [J]. J Anal Methods Chem, 2021, doi:10.1155/2021/8875876.
- [23] 王宝君, 杨樱. 不同产地当归的鉴别及现代药理的研究[J]. 中国医药科学, 2014, 4(22):80-81, 101.
- WANG B J, YANG Y. Study on the identification of *Danggui* from different districts and modern pharmacological research [J]. China Med Pharm, 2014, 4(22):80-81, 101.
- [24] WANG K, LIU X, CAI G, et al. Chemical composition analysis of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels and its four processed products by ultra-high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole-orbitrap mass spectrometry combining with nontargeted metabolomics [J]. J Sep Sci, 2023, 46(24):e2300473.
- [25] 张宏意, 廖文波. 当归种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中药材, 2014, 37(4):572-575.
- ZANG H Y, LIAO W B. AFLP analysis on genetic diversity of *Angelica sinensis* [J]. J Chin Med Mater, 2014, 37(4):572-575.
- [26] 朱田田, 晋玲, 张裴斯, 等. 基于 ISSR 的甘肃不同产区栽培当归遗传多样性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(23):3549-3557.
- ZHU T T, JIN L, ZHANG P S, et al. Genetic diversity analysis on *Angelica sinensis* from different habitats in Gansu province based on ISSR [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2015, 46(23):3549-3557.
- [27] 熊苏玥, 李家鹏, 李金春, 等. 一种基于双重 ddPCR 的肉制品中牛源性成分的定量分析方法 [J]. 食品科学, 2022, 43(24):318-324.
- XIONG S Y, LI J P, LI J C, et al. Quantification of bovine-derived ingredients in meat products by duplex droplet digital polymerase chain reaction [J]. Food Sci, 2022, 43(24):318-324.
- [28] ZHAO B, XIONG C, LI J, et al. Species quantification in complex herbal formulas-vector control quantitative analysis as a new method [J]. Front Pharmacol, 2020, 11:488193.
- [29] XU W, ZHU P, XIN T, et al. Droplet digital PCR for the identification of plant-derived adulterants in highly processed products [J]. Phytomedicine, 2022, 105:154376.
- [30] YU N, XING R, WANG P, et al. A novel duplex droplet digital PCR assay for simultaneous authentication and quantification of *Panax notoginseng* and its adulterants [J]. Food Control, 2022, 132:108493.
- [31] LEE H J, HAN Y S, CHO I S, et al. Development and application of reverse transcription droplet digital PCR assay for sensitive detection of apple scar skin viroid during *in vitro* propagation of apple plantlets [J]. Mol Cell Probes, 2022, 61:101789.
- [32] PEI Y, LIU Z, YU D, et al. Molecular quantification of herbs (Herb-Q): A pyrosequencing-based approach and its application in *Pinellia ternata* [J]. Chin J Nat Med, 2024, 22(7):663-672.
- [33] LIU Z, PEI Y, CHEN T, et al. Molecular quantification of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* and its adulterants [J]. Chin Med, 2024, 19(1):138.
- [34] 张露云, 徐倩, 于俊林, 等. 东北当归属植物的成分与药理作用研究进展 [J]. 通化师范学院学报, 2019, 40(8):60-66.
- ZHANG L Y, XU Q, YU J L, et al. Progress in the study of the composition and pharmacological effects of *Angelica* spp. from Northeast China [J]. J Tonghua Norm Univ, 2019, 40(8):60-66.
- [35] 赵长跃, 吕惠子. 朝鲜当归高效液相指纹图谱的研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(11):2631-2633.
- ZHAO C Y, LV H Z. Study on the high performance liquid chromatographic fingerprints of *Angelica gigas* [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(11):2631-2633.
- [36] 李西文, 冯雪, 刘姿怡. 一种以地下部分入药药材的 DNA 提取方法: 中国专利, CN202310324604.0 [P]. 2023-07-04.
- LI X W, FENG X, LIU Z Y. A method of extracting DNA from underground parts of medicinal herbs: Chinese Patent, CN202310324604.0 [P]. 2023-07-04.
- [37] 谢登辉, 李娟, 向雅丽, 等. 三种蛙不同组织的 DNA 得率及质量分析 [J]. 当代水产, 2024, 49(4):76-78.
- XIE D H, LI J, XIANG Y L, et al. DNA yield and quality analysis of different tissues from three frog species [J]. Curr Fish, 2024, 49(4):76-78.
- [38] GHEMRAWI M, FISCHINGER F, DUNCAN G, et al. Developmental validation of SpeID: A pyrosequencing-based assay for species identification [J]. Forensic Sci Int Genet, 2021, 55:102560.
- [39] BERG V D. Definition of minimum performance requirements for analytical methods of GMO testing [M]. Brussels: European Union Reference Laboratory for Genetically Modified Food and Feed, 2015.
- [40] ZHOU X, LI C G, CHANG D, et al. Current status and major

- challenges to the safety and efficacy presented by Chinese herbal medicine[J]. *Medicines (Basel)*, 2019, doi: 10.3390/medicines6010014.
- [41] 陈研,冯露露,黄荣,等. 基于 SCAR 标记和 DNA 条形码技术的苍术基原鉴别研究[J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2024, 26(2): 490-501.
CHEN Y, FENG L L, HUANG R, et al. Identification of *Atractylodes chinensis* and *A. japonica* based on SCAR molecular markers and DNA barcoding technology[J]. *World Sci Technol Mod Tradit Chin Med*, 2024, 26(2): 490-501.
- [42] 王孟颖,万林春,赵雯,等. 铁皮石斛的 PCR-RFLP 鉴别方法[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(3): 509-515.
WANG M Y, WAN L C, ZHAO W, et al. Identification of *Dendrobium officinale* Kimura et Migo by PCR-RFLP [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(3): 509-515.
- [43] 魏江霞,李越峰,杨秀娟,等. 当归不同药用部位的本草考证、化学成分、药理作用研究概况[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(10): 127-134.
WEI J X, LI Y F, YANG X J, et al. Research on herbal research, chemical composition and pharmacological action of different medicinal parts of *Angelica sinensis* [J]. *China Arch Tradit Chin Med*, 2024, 42(10): 127-134.
- [44] 杨燕,于春强,郭子娴,等. 基于 HPLC 指纹图谱及多指标成分定量分析的不同产地当归质量特征研究[J]. *中草药*, 2021, 52(15): 4666-4674.
YANG Y, YU C Q, GUO Z X, et al. Quality characteristics of *Angelicae Sinensis Radix* from different producing areas based on HPLC fingerprint and multi-component quantitative analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(15): 4666-4674.
- [45] MUZZEY D, EVANS E A, LIEBER C. Understanding the basics of NGS: From mechanism to variant calling [J]. *Curr Genet Med Rep*, 2015, 3(4): 158-165.
- [46] BOERS S A, JANSEN R, HAYS J P. Understanding and overcoming the pitfalls and biases of next-generation sequencing (NGS) methods for use in the routine clinical microbiological diagnostic laboratory [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(6): 1059-1070.
- [47] NASH P A, SILVA-PINHEIRO P, MINCZUK M A. Genotyping single nucleotide polymorphisms in the mitochondrial genome by pyrosequencing [J]. *J Vis Exp*, 2023, doi: 10.3791/64361.
- [48] 徐石勇,赵新,张富丽,等. 基于焦磷酸测序分析技术的金银花掺伪鉴别方法研究[J]. *生物技术进展*, 2020, 10(6): 637-645.
XU S Y, ZHAO X, ZHANG F L, et al. Study on authenticity identification method of honeysuckle based on pyrosequencing analysis technology [J]. *Curr Biotechnol*, 2020, 10(6): 637-645.
- [49] JIANG W, PEI Y, ZHANG M, et al. Fluorescent signal-based molecular method for identification and quantification of adulteration in *Panax ginseng* from raw materials to processed products [J]. *Food Bioscience*, 2025, 68: 106426.

[责任编辑 顾雪竹]