

## 地龙(参环毛蚓)配方颗粒的位点特异性PCR鉴别

胡力<sup>1</sup>, 赵玉洋<sup>2</sup>, 袁媛<sup>2\*</sup>, 蒋超<sup>2\*</sup>

(1. 安徽中医药大学药学院, 合肥 230012;

2. 中国中医科学院中药资源中心道地药材国家重点实验室培育基地, 北京 100700)

**[摘要]** 目的:为保障临床用药的安全性和有效性,建立地龙(参环毛蚓)药材及其加工制品混伪、掺假特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴定方法。方法:根据地龙氧化酶亚基1(CO I)基因序列筛选出地龙配方颗粒的稳定引物区间,并根据区间内筛选获得地龙的特异性单核苷酸多态性(SNP)位点,根据SNP位点设计地龙特异性鉴别引物dlshmy-F及dlshmy-R,分别采集地龙及其混伪品,建立地龙配方颗粒特异性PCR鉴别方法并优化PCR反应体系,对该方法进行耐受性和适用性考察。结果:退火温度为62℃,循环次数为36次,地龙及其配方颗粒经PCR反应及凝胶电泳后,可在约170 bp处观察到单一明亮的特异性鉴别条带,其他近源伪品如通俗环毛蚓、保宁腔蚓、栉盲环毛蚓等20种伪品及阴性对照均无条带。结论:该研究建立的特异性PCR鉴别方法可快速准确的鉴别出地龙药材、配方颗粒、冻干粉中的参环毛蚓源性成分,准确鉴定出全国广地龙中药材及饮片以及地龙的基原,也可为其他的中药配方颗粒质量标准研究提供了参考。

**[关键词]** 地龙(参环毛蚓); 配方颗粒; 聚合酶链式反应

**[中图分类号]** R284.2;R289;R22;R2-031;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0119-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221211

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220715.1316.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-07-15 16:54

## Identification of *Pheretima (Pheretima aspergillum)* Formula Granule by Allele-specific PCR

HU Li<sup>1</sup>, ZHAO Yuyang<sup>2</sup>, YUAN Yuan<sup>2\*</sup>, JIANG Chao<sup>2\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China;

2. State Key Laboratory Breeding Base of Dao-Di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** In order to ensure the safety and effectiveness of clinical drug use, the identification method of mixed and adulterated specific polymerase chain reaction (PCR) identification of *Pheretima aspergillum* and its processed products was established. **Method:** Based on the cytochrome C oxidase subunit I sequence of *P. aspergillum*, primers were designed to cover the whole sequences, and the stable DNA ranges suitable for the identification of *Pheretima (P. aspergillum)* formula granule were screened out. Specific primers were designed according to the specific single nucleotide polymorphisms (SNP) of *P. aspergillum* in the stable DNA range. The *P. aspergillum* and its mixture were collected respectively, the PCR reaction system was established and optimized, and PCR reaction system and procedure were optimized, and the tolerance and applicability were investigated. **Result:** When the annealing temperature was 62℃ and the cycle number was 36, both *P. aspergillum* formula granule and its formula particles could amplify a single specific identification

**[收稿日期]** 2022-06-08

**[基金项目]** 中国中医科学院科技创新工程重大攻关项目(CI2021A04104);东城区优秀人才培养项目(2021-dchrcpyzz-7);青年岐黄学者项目

**[第一作者]** 胡力,在读硕士,从事中药鉴定学研究,E-mail:hu\_li0701@163.com

**[通信作者]** \*袁媛,研究员,博士生导师,从事中药鉴定与分子生药学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y\_yuan0732@163.com;

\*蒋超,副研究员,从事中药分子鉴定研究,Tel:010-64087649,E-mail:jiangchao0411@163.com

band of about 170 bp, and the other 20 adulterants and negative controls had no band. **Conclusion:** The allele-specific PCR identification method established in this study can quickly and accurately identify the *P. aspergillum* formula granule. The origin of Chinese herbal medicine and decoction pieces and *P. aspergillum* were accurately identified. It can also provide a reference for other studies on the quality standard research of other Chinese herbal formula granule.

[**Keywords**] *P. aspergillum*; formula granule; polymerase chain reaction (PCR)

地龙是我国传统名贵中药,2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)规定其分别为来源于参环毛蚓的“广地龙”和来源于通俗环毛蚓、威廉环毛蚓或栉盲环毛蚓的“沪地龙”两类<sup>[1]</sup>。地龙是中药商品基原物种最为复杂的中药之一,药源调查和商品鉴定表明,我国市售地龙类药材至少有34个物种基原,市售地龙商品总正品率约为55%<sup>[2]</sup>,标称广地龙的药材混伪情况尤为严重。混伪品的存在严重影响了地龙的质量稳定,也对临床用药的安全性、有效性造成了威胁,需要建立准确、有效的鉴别方法。目前市售地龙药材主要为地龙干燥体,但由于价值较高,混伪情况较严重,其经现代化技术加工为配方颗粒,具有规格统一,标准一致,疗效确切、稳定的优势;然而地龙加工后,饮片失去了形态,提取物、配方颗粒失去了显微等鉴别特征,其基原鉴别更为困难。地龙配方颗粒也难以找到专属性化学成分,需要建立针对地龙配方颗粒合理、科学、快速、简便的检验方法<sup>[3-4]</sup>。尤其是,根据国家药监局《中药配方颗粒质量控制与标准制定技术要求》(2021年第16号)的要求,来源如为多基原中药材,应固定一个基原,不同基原的中药材不可相互混用。广地龙在地龙品种因个头大、质佳,具有极高的药用价值,有必要建立专属性地龙配方颗粒基原鉴别方法,保障临床用药的安全性和有效性。

与传统鉴别方法相比,分子鉴定具有稳定、准确、特异性好、不受生物发展阶段与储藏加工影响等特点,受到了众多研究人员的广泛关注,已建立多种中药材及中药饮片的分子鉴定方法<sup>[5-11]</sup>,也有中成药分子鉴定的报道<sup>[12-17]</sup>。特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴定已广泛应用于中药材提取液、中成药、贵重药材、配方颗粒的基原鉴定中,2020年版《中国药典》收录了分子生物学检查法1001“聚合酶链式反应法”<sup>[18-20]</sup>,中华中医药学会2021年发布了《T/CACM 1027.201—2021 当归配方颗粒 PCR 鉴别》《T/CACM 1027.202—2021 人参配方颗粒 PCR 鉴别》《T/CACM 1027.203—2021 法半夏配方颗粒

PCR 鉴别》3个配方颗粒分子鉴别团体标准,为配方颗粒专属性鉴别提供了解决方法,也提高了临床用药的安全性。本文拟建立地龙(参环毛蚓)配方颗粒PCR鉴别方法,为规范地龙(参环毛蚓)及其产品质量提供检测工具。

## 1 材料

**1.1 药材及配方颗粒来源** 广地龙药材、冻干粉、地龙(参环毛蚓)配方颗粒由华润三九医药股份有限公司提供,见表1。广地龙药材经蒋超副研究员鉴定为参环毛蚓 *Pheretima aspergillum*,样品保存于中国中医科学院中药资源中心。以鉴定准确的广地龙药材制备了15批冻干粉,3批配方颗粒中试冻干粉,3批配方颗粒成品。另从不同药材市场收集了所有4种2020年版《中国药典》规定地龙基原物种及20种较常出现在中药市场上的伪品地龙品种(含药材和原动物样品),包括通俗环毛蚓10批,威廉环毛蚓3批,栉盲环毛蚓3批,地龙类伪品药材及原动物共20种56批,具体样品信息见表1-表3,另制备了部分物种的配方颗粒冻干粉5批,用于检测建立的方法的专属性和适用性,见表4。

**1.2 仪器** Veriti™型PCR仪(Applied Biosystems公司); GeneAmp 9700型PCR仪(美国 Applied Biosystem公司); PTC-100型PCR仪、SYNGENE SYNGENE型凝胶成像系统(美国 Gene公司); TC-512型PCR仪(上海 Techne公司)。

**1.3 试剂** Wizard® SV Genomic DNA Purification System(美国 Promega生物公司,批号 A2361), DNeasy® Blood & Tissue Kit 试剂盒、QIAquick Nucleotide Removal Kit 试剂盒(德国凯杰生物技术有限公司,批号分别为 69106、28306), 2×T5 super Mix(擎科生物技术有限公司,批号 TSE005), 2×MightyAmp Taq(日本 Takara公司,批号 R071A), 2×M5 PCR Mix(北京聚合美生物技术有限公司,批号 MF164), 2×I5HifiTaq Mix(美国 MClab公司,批号 I5HM-100), Trans 2K DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司,批号 BM101,广地龙对照药材(中国食品药品检定研究院批号,120987-201508)。

表1 15批广地龙药材

Table 1 Fifteen batches of *Pheretima aspergillum* medicinal materials

序号	品名	批号	产地	物种
1	广地龙	1905004	广西省玉林市容县	参环毛蚓 <i>Pheretima aspergillum</i>
2	广地龙	1905005	广西省玉林市容县	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
3	广地龙	1905007	广东省茂名市高州市	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
4	广地龙	1905008	广东省茂名市高州市	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
5	广地龙	1905010	广东省肇庆市四会市	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
6	广地龙	1905011	广东省肇庆市四会市	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
7	广地龙	1905013	广东省佛山市顺德区	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
8	广地龙	1905014	广东省佛山市顺德区	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
9	广地龙	1905018	广东省惠州市惠阳区	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
10	广地龙	1906019	广西玉林市容县	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
11	广地龙	1906020	广东省茂名市高州市	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
12	广地龙	1906021	广东省肇庆市四会市	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
13	广地龙	1906022	广东省佛山市顺德区	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
14	广地龙	1906023	广东省惠州市惠阳区	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
15	广地龙	1906024	广东省惠州市惠阳区	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>

表2 实验使用市售地龙药材样品信息

Table 2 Commercial medicinal materials of *Pheretima* used in this study

No.	材料名称	拉丁名	数量/个	样品采集号	采集地
1	参环毛蚓	<i>Pheretima aspergillum</i>	3	20180303051、20180303059、20180305016	亳州
2	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	3	20170711003、20170711013、20170711015	安国
3	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	3	20180402001、20180402002、20180402006	玉林
4	参环毛蚓	<i>P. aspergillum</i>	1	20180116017	成都
7	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	3	20180303031、2018030303、20180303039	亳州
8	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	3	20170712028、20170623003、20170712015	安国
9	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	2	20180509001、20180605013	玉林
10	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	1	20180605018	荷花池
11	通俗环毛蚓	<i>P. vulgaris</i>	1	20180405027	普宁
12	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	2018041804	上海
13	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	20180605014	亳州
14	威廉环毛蚓	<i>P. guillelmi</i>	1	141028021	安国
15	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	1	2018041102	上海
16	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	1	140617001	上海药材公司
17	栉盲环毛蚓	<i>P. pectinifera</i>	1	20170712062	安国
18	保宁腔蚓	<i>Metaphire magna</i>	3	20180303033、20180303034、20180303037	亳州
19	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	1	20170725001	清平
20	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	3	20180402003、20180509002、20180402004	玉林
21	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	3	20180605002、20180605003、20180605005	荷花池
22	保宁腔蚓	<i>M. magna</i>	3	20170623002、20170623006、20170623008	安国
24	豆叶远盲蚓	<i>Amyntas phaselus</i>	2	20180303061、140220045	亳州
25	豆叶远盲蚓	<i>A. phaselus</i>	2	20180116025、20180511010	荷花池

续表 2

No.	材料名称	拉丁名	数量/个	样品采集号	采集地
26	豆叶远盲蝽	<i>A. phaseus</i>	1	20170712020	安国
27	暗孔远盲蝽	<i>A. octopapillatus</i>	3	20170711011、20170712007、20170712014	安国
28	暗孔远盲蝽	<i>A. octopapillatus</i>	1	20180116009	玉林
29	暗孔远盲蝽	<i>A. octopapillatus</i>	1	20180316002	亳州
30	多肉远盲蝽	<i>A. carnosus</i>	2	20180408029、20180408029-2	清平
31	安德爱胜蝽	<i>Eisenia andrei</i>	1	20180605015	安国
32	枯萎远盲蝽	<i>A. marcidus</i>	1	140219050	亳州
33	毛利远盲蝽	<i>A. morrisi</i>	2	20170711009、20170711063	安国
34	壮伟远盲蝽	<i>A. robustus</i>	1	DL-20	重庆
35	皮质远盲蝽	<i>A. corticis</i>	1	20180303035	亳州
36	优雅远盲蝽	<i>A. gracilis</i>	1	20180404020	普宁
37	舒脉腔蝽	<i>M. schmardae</i>	1	DL-43	安国
38	阿美远盲蝽	<i>A. amis</i>	1	20180511002	上海
39	参状远盲蝽	<i>P. aspergillum</i>	1	DL-18	重庆
40	通俗环毛蝽	<i>P. vulgaris</i>	2	2018041803、DL-63	杭州
41	威廉环毛蝽	<i>P. guillelmi</i>	1	DL-64	杭州
42	多肉远盲蝽	<i>A. carnosus</i>	2	DL-23、2018041101、	重庆
43	光亮远盲蝽	<i>A. candidus</i>	1	DL-7	重庆
44	加州腔环蝽	<i>M. californica</i>	1	2018041805	重庆
45	加州腔环蝽	<i>M. californica</i>	3	2018050301、2018050302、2018050303	上海
46	加州腔环蝽	<i>M. californica</i>	2	20180514001、20180514002	苏州
47	露玻远盲蝽	<i>A. tayalis</i>	1	DL-34	重庆
48	毛利远盲蝽	<i>A. morrisi</i>	1	DL-1	重庆
49	葡腺远盲蝽	<i>A. uvaglandularis</i>	1	DL-3	重庆
50	棋盘远盲蝽	<i>A. tessellatus</i>	1	DL-2	重庆
51	十字远盲蝽	<i>A. cruxus</i>	1	DL-39	重庆
52	舒脉腔蝽	<i>M. schmardae</i>	1	DL-43	重庆
53	双颐腔蝽	<i>M. ebucculenta</i>	1	DL-9	重庆
54	透明远盲蝽	<i>A. lubricata</i>	1	DL-6	贵州
55	王氏远盲蝽	<i>A. wangi</i>	1	DL-44	重庆

## 2 方法

**2.1 DNA提取** 分别使用 Wizard® SV Genomic DNA Purification System 试剂盒依据说明书操作步骤提取。样品模板DNA溶液提取完成后,置4℃冰箱中保存备用。

**2.2 引物设计** 通过比对广地龙(参环毛蚓)、通俗环毛蚓、威廉环毛蚓、栉盲环毛蚓及其他寡毛纲钜蚓科动物细胞色素C氧化酶亚基1(CO I)序列选择特异性片段设计广地龙特异性PCR鉴别引物,上游引物5'-GTGCCATGTTTCTTGCTGAA-3',下游引物5'-GACTGCTCCCACTTATACTAAGA-3',预

期PCR产物长度约170 bp。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**2.3 PCR扩增条件** 取地广龙药材、混伪品及配方颗粒DNA,考察以下方面。

①退火温度60、62、64、66℃;②PCR循环数32、34、36、38个循环;③Taq种类:T5, MightyAmpTaq, M5和I5 HifiTaq;④DNA模板量:3、10、30和90 ng对PCR鉴别结果稳定性的影响。筛选出最适鉴别条件,对地龙(参环毛蚓)配方颗粒进行位点特异性PCR鉴别。PCR产物使用1.5%浓度琼脂糖凝胶进行电泳检测。

表3 广地龙(参环毛蚓)标准汤剂冻干粉、中试冻干粉、配方颗粒成品

Table 3 *Pheretima aspergillum* standard decoction with freeze-dried powder, pilot freeze-dried powder, formula granule products

No.	品名	批号	物种
1	地龙(参环毛蚓)配方颗粒	2007001Y	参环毛蚓 <i>Pheretima aspergillum</i>
2	地龙(参环毛蚓)配方颗粒	2007002Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
3	地龙(参环毛蚓)配方颗粒	2007003Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
4	标准汤剂冻干粉	1906011Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
5	标准汤剂冻干粉	1906008Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
6	标准汤剂冻干粉	1906014Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
7	标准汤剂冻干粉	1907018Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
8	标准汤剂冻干粉	1906004Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
9	标准汤剂冻干粉	1906005Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
10	标准汤剂冻干粉	1907022Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
11	标准汤剂冻干粉	1907023Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
12	标准汤剂冻干粉	1907024Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
13	标准汤剂冻干粉	1906010Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
14	标准汤剂冻干粉	1907019Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
15	标准汤剂冻干粉	1906007Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
16	标准汤剂冻干粉	1906013Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
17	标准汤剂冻干粉	1907020Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
18	标准汤剂冻干粉	1907021Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
19	中试冻干粉	5200601Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
20	中试冻干粉	5200602Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>
21	中试冻干粉	5200603Y	参环毛蚓 <i>P. aspergillum</i>

注:制造商均为华润三九(表4同)

表4 实验使用自制地龙配方颗粒混伪品颗粒

Table 4 Adulterants of *Pheretima* formula granule used in this study

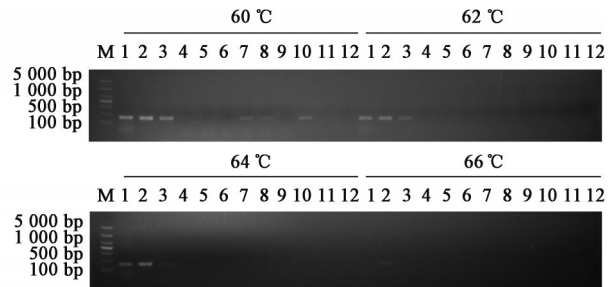
No.	品名	批号	物种
1	混伪品配方颗粒	1905001	保宁腔蚓 <i>M. magna</i>
2	混伪品配方颗粒	1905003	暗孔远盲蚓 <i>A. octopapillatus</i>
3	混伪品配方颗粒	1905006	多肉远盲蚓 <i>A. carnosus</i>
4	混伪品配方颗粒	1906001	皮质远盲蚓 <i>A. corticis</i>
5	混伪品配方颗粒	1906003	加州腔环蚓 <i>M. californica</i>

### 3 结果与分析

#### 3.1 PCR鉴别条件的确定与耐用性考察

3.1.1 退火温度 使用广地龙特异性鉴别引物进行PCR扩增,分别设置退火温度60、62、64、66℃,结果表明在62~64℃时,广地龙药材、标准汤剂、配

方颗粒能扩增得约170 bp的亮带,混伪品和阴性对照在此范围内均未扩增,60℃时部分样本有弱扩增,产生假阳性条带,66℃时退火温度过高,所有样品均无扩增,见图1。选择PCR退火温度为62℃。



注:M.DL5000 Marker; 1.广地龙药材; 2.地龙(参环毛蚓)配方颗粒标准汤剂冻干粉; 3.地龙(参环毛蚓)配方颗粒; 4.通俗环毛蚓; 5.威廉环毛蚓; 6.栉盲环毛蚓; 7.多肉远盲蚓; 8.壮伟远盲蚓; 9.保宁腔蚓; 10.皮质远盲蚓; 11.暗孔远盲蚓; 12.空白(图2-图5同)

图1 退火温度对地龙(参环毛蚓)配方颗粒鉴别结果的影响

Fig. 1 Effect of annealing temperature on results of *Pheretima aspergillum* formula granule

3.1.2 循环次数考察 分别选用32、34、36、38个循环进行考察,结果表明在32~40个循环时广地龙药材、标准汤剂、配方颗粒能扩增得约170 bp的亮带,均能得到正确鉴别结果,混伪品和阴性对照在此范围内均未扩增,见图2。为保证结果的稳定性和准确性,选择中间的36个循环进行PCR反应。

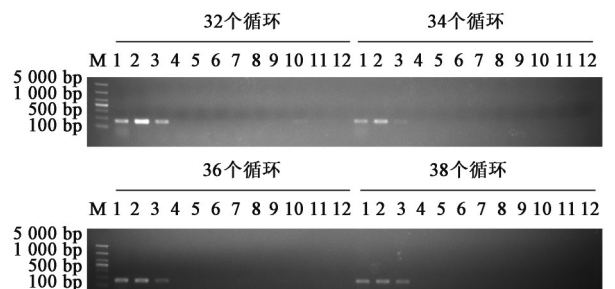


图2 PCR循环次数对地龙(参环毛蚓)配方颗粒鉴别结果的影响

Fig. 2 Effect of PCR cycles on results of *Pheretima aspergillum* formula granule

3.1.3 不同Taq酶考察 使用2×T5 super Mix, 2×MightyAmp Taq, 2×M5 PCR Mix和2×I5HifiTaq Mix进行试验,结果不同公司的酶由于活力不同其扩增条带的亮度有差异,且在部分Taq条件下均产生了假阳性条带,见图3(泳道7、8、10),在I5和T5 PCR mix扩增效果不佳,仅部分样品获得扩增。其中2×M5 PCR结果可获得明显且明亮条带,因此优化的Taq酶选择2×M5PCR Mix作为地龙(参环毛蚓)配方颗粒PCR鉴别用酶。

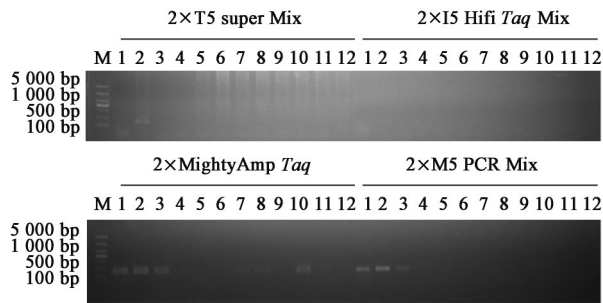


图3 不同 Taq DNA 聚合酶对地龙(参环毛蚓)配方颗粒鉴别结果的影响

Fig. 3 Effect of different Taq DNA polymerases on results of *Pheretima aspergillum* formula granule

3.1.4 DNA 模板量考察 对 25  $\mu\text{L}$  PCR 反应体系中的模板 DNA 用量进行了考察,分别设置 3、10、30、90  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DNA 模板(DNA 量分别为 3、10、30、90 ng),结果表明 3  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  均能扩增,而浓度过高则扩增受到抑制,见图 4。选择 25  $\mu\text{L}$  体系中加入 1  $\mu\text{L}$ (30  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )作为最优模板浓度。

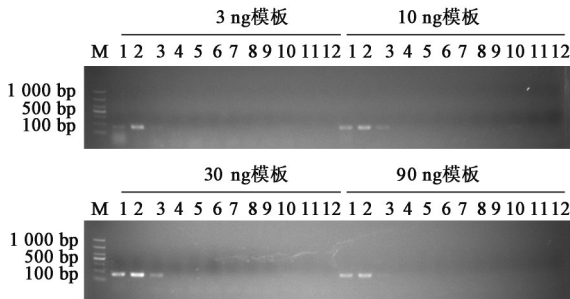


图4 DNA 模板量对地龙(参环毛蚓)配方颗粒鉴别结果的影响

Fig. 4 Effect of DNA concentration on identification of *Pheretima aspergillum* formula granule

根据以上结果,确定地龙(参环毛蚓)配方颗粒 PCR 鉴别的条件为反应体系包括 2 $\times$  PCR Mix 12.5  $\mu\text{L}$ ,地龙(参环毛蚓)配方颗粒鉴别引物(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )各 0.4  $\mu\text{L}$ ,DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ ,无菌双蒸水 10.7  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应参数:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,循环反应 36 次(94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,62  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s),72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。

3.1.5 不同 PCR 仪考察 为测试不同 PCR 仪对地龙(参环毛蚓)配方颗粒及其混伪品鉴别结果的影响,分别使用 4 种 PCR 仪进行扩增,结果表明 Veriti<sup>TM</sup> 型、GeneAmp 9700 型等 PCR 仪均可获得正确的鉴定结果,而 PTC-100 型、TC-512 型 PCR 仪部分伪品出现微弱扩增条带,表明进行地龙配方颗粒 PCR 鉴别时应对 PCR 扩增温度进行微调,并进行方法确认,见图 5。

3.2 专属性考察 对广地龙药材,配方颗粒标准汤

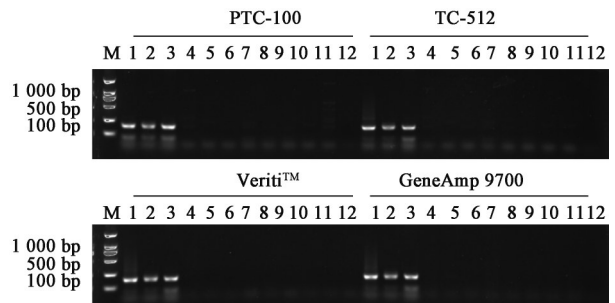
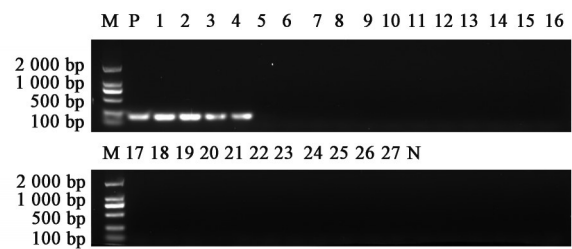


图5 不同 PCR 仪对地龙(参环毛蚓)配方颗粒鉴别结果的影响

Fig. 5 Effect of different PCR instruments of *Dilong* (*Shenhuanmaoyin*) formula granule

剂,中试冻干粉和配方颗粒成品及其混伪品(包括原动物和配方颗粒冻干粉)进行鉴定,结果广地龙药材,配方颗粒标准汤剂,中试冻干粉和配方颗粒成品均能扩增出与对照药材一致的特异性鉴别条带,20 种混伪品均无条带,见图 6。



注: M. DL5000 Marker; 1. 广地龙药材; 2. 地龙(参环毛蚓)配方颗粒标准汤剂冻干粉; 3. 广地龙中试冻干粉; 4. 地龙(参环毛蚓)配方颗粒; 5. 通俗环毛蚓; 6. 威廉环毛蚓; 7. 栉盲环毛蚓; 8. 多肉远盲蚓; 9. 壮伟远盲蚓; 10. 保宁腔蚓; 11. 皮质远盲蚓; 12. 暗孔远盲蚓; 13. 豆叶远盲蚓; 14. 安德爱胜蚓; 15. 枯萎远盲蚓; 16. 优雅远盲蚓; 17. 阿美远盲蚓; 18. 加州腔环蚓; 19. 露玻远盲蚓; 20. 毛利远盲蚓; 21. 葡腺远盲蚓; 22. 棋盘远盲蚓; 23. 十字远盲蚓; 24. 舒脉腔蚓; 25. 双颞腔蚓; 26. 透明远盲蚓; 27. 王氏远盲蚓; N. 空白对照(以 dd H<sub>2</sub>O 为模版)

图6 广地龙及其混伪品的 PCR 鉴别

Fig. 6 PCR identification of *Pheretima aspergillum* formula granule and its adulterants

3.3 适用性考察 使用本方法对 15 批固定产地的广地龙药材、10 批市售广地龙药材,15 批配方颗粒标准汤剂,3 批广地龙中试冻干粉和 3 批地龙(参环毛蚓)配方颗粒成品进行鉴定,以验证本方法的适用性,结果所有样本 PCR 供试品凝胶电泳图谱中与广地龙(参环毛蚓)对照药材电泳图谱相应的位置上均可扩增获得约 170 bp 单一特异性鉴别条带,空白对照无条带,见图 7。

## 4 讨论

多基原现象在动物药材中非常常见,2020 年版《中国药典》收录了 51 味动物药材,其中 25 味为多基原药材。一药多基原的现象对于扩大产业规模,



注: M. DL2000 DNA 分子量标准; P. 对照药材; 1~15. 固定产地采集的广地龙药材; 16~25. 10批不同市场采集的广地龙药材; 26~40. 15批广地龙标准汤剂冻干粉; 41~43. 广地龙中试冻干粉; 44~46. 地龙(参环毛蚓)配方颗粒, N. 空白对照(以 ddH<sub>2</sub>O 为模版)

图7 地龙(参环毛蚓)配方颗粒适用性考察

Fig. 7 PCR identification of medicinal materials, strand *Pheretima aspergillum* formula granule

满足临床用药的需求,扩大药源都有一定的益处,但却极大增加了质量控制难度,其不同基原的区别可能导致临床用药的差异<sup>[21]</sup>。地龙历来分为来源于参环毛蚓的“广地龙”和来源于通俗环毛蚓、威廉环毛蚓或栉盲环毛蚓的“沪地龙”两类,其传统用药习惯和用药量有一定区别。对地龙药材及其加工制品进行准确的物种鉴定尤其有必要。

此前已有地龙药材特异性 PCR 鉴别方法的报道<sup>[22]</sup>,然而该方法不适用于高度降解的配方颗粒成品。由于地龙(参环毛蚓)配方颗粒经过了高温水煮、干燥、制粒等一系列制备程序, DNA 高度降解,成品中难以存留超过 200 bp 的 DNA 片段。无法直接使用此前已报道的特异性 PCR 或 DNA 条形码方法进行分子鉴定(扩增产品片段大小分别为 366、658 bp)而该方法扩增产物条带过大<sup>[23-25]</sup>。本研究在此基础上,设计了新的参环毛蚓物种特异性鉴别引物,本成功从地龙(参环毛蚓)配方颗粒中扩增出约 170 bp 的扩增条带,可用于地龙(参环毛蚓)配方颗粒的鉴别。

在原有地龙 PCR 鉴别方法的基础上,本文针对参环毛蚓与其他物种差异位点设计扩增片段更小的特异性鉴别引物对,并且对影响 PCR 方法的循环次数、退火温度、Taq 酶种类、DNA 模板浓度等相关影响因素进行了考察,依据最佳鉴别条件进行了方法学适用性考察,建立了一种适用于地龙(参环毛蚓)配方颗粒真伪鉴别方法。在地龙(参环毛蚓)配方颗粒样品中均在 170 bp 可见单一条带,其余地龙混伪品及不同来源均无此条带。使用建立的特异性 PCR 方法对多批广地龙药材、汤剂、配方颗粒等进行检验,结果显示,46 批样品均在 170 bp 处可见单一特异性鉴别条带,以上结果表明本文建立的广

地龙特异性鉴别方法对配方颗粒具有适用性。可为地龙(参环毛蚓)药材及其配方颗粒等加工产品提供相应的检测工具,完善了地龙(参环毛蚓)的质量控制体系,为其临床应用提供了保障,也为其他中药品种的配方颗粒鉴别奠定了基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 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,2020:127.  
[2] 格小光,蒋超,田娜,等. 基于 DNA 测序技术的市售地龙类药材基原调查与考证研究[J]. 中国现代中药,2019,21(9):1206-1214.  
[3] 张中华,牟倩倩,张亚会. 不同厂家当归配方颗粒与当归饮片的质量分析研究[J]. 西部中医药,2018,31(3):30-32.  
[4] 郑舟. 中药配方颗粒的发展与革新探讨[J]. 中医临床研究,2017,9(23):132-134.  
[5] 蒋超,袁媛,刘贵明,等. 基于 EST-SSR 的金银花分子鉴别方法研究[J]. 药学学报,2012,47(6):803-810.  
[6] JIANG C, JIN Y, ZHAO X, et al. Rapid and robust authentication of deer antler velvet product by fast PCR-RFLP analysis[J]. Mitochondrial DNA Part A, 2018,29:266-272.  
[7] 蒋超,崔占虎,袁媛,等. 菟丝子、莱菔子与其易混淆品的快速 PCR 法鉴别研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(2):211-215.  
[8] 陈璐,王清蓉,敖慧,等. 适合果实类中药的 DNA 条形码鉴定方法研究[J]. 辽宁中医杂志,2018,45(5):1028-1030.  
[9] 陈康,蒋超,袁媛,等. 快速 PCR 方法在蛇类药材真伪鉴别中的应用[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3673-3677.  
[10] 蒲婧哲,张亚中,朱夜琳,等. 基于物种特异性 PCR 方

- 法的鸡内金真伪鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 142-147.
- [11] 何志一, 唐先明, 刘建辉, 等. 快速PCR方法在哈蟆油真伪鉴别中的应用研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2467-2472.
- [12] 程春松, 谭天琪, 龙泽, 等. 中成药DNA提取技术优化及其在人参类制剂分子鉴定中的应用[J]. 中草药, 2015, 46(17): 2549-2555.
- [13] 王巍, 邓赟, 戴宇, 等. 全天麻胶囊中天麻的DNA鉴定[J]. 中药与临床, 2015, 6(1): 38-39, 42.
- [14] 崔占虎, 蒋超, 李旻辉, 等. 连翘败毒丸中原料药材的分子鉴别[J]. 药学学报, 2013, 48(4): 590-596.
- [15] 崔占虎, 蒋超, 袁媛, 等. 6种成药中原料药材金银花的分子鉴别研究[J]. 包头医学院学报, 2014, 30(1): 1-3.
- [16] 田晓轩, 刘杰, 窦永杰, 等. 中成药大黄蛰虫丸的宏条形码基原鉴定[J]. 天津中医药, 2014, 31(4): 234-237.
- [17] 朱林, 蒲婧哲, 张亚中, 等. PCR-RFLP法对蛇胆川贝散中川贝母的鉴别研究[J]. 淮海医药, 2017, 35(6): 719-722.
- [18] 聚合酶链式反应法通则起草组. 《中国药典》聚合酶链式反应法的建立[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(19): 4537-4544.
- [19] 蒋超, 屠李婵, 袁媛, 等. 金银花配方颗粒的位点特异性PCR鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(13): 2484-2491.
- [20] 孟虎彪, 袁媛, 刘富艳, 等. 牛膝及川牛膝配方颗粒位点特异性PCR鉴别研究[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(5): 945-951.
- [21] 杨瑞, 袁伯川, 马永生, 等. 3种不同基原甘草中4个主要黄酮类化合物的含量分析[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(10): 1729-1736.
- [22] 田娜, 魏艺聪, 袁媛, 等. 地龙的多重位点特异性PCR鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(17): 124-129.
- [23] 韦健红. 地龙类药材DNA条形码分子鉴定的研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.
- [24] 陈梓媛, 王丽, 蒋超, 等. 金银花配方颗粒质量快速检测体系研究[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(5): 1070-1075.
- [25] JIANG C, LIU J, JIN Y, et al. Entire industrial chain botanical origin authenticity control of ginseng formula granule products using simple PCR-based identification [J]. Indust Crops Prod, 2018, 123: 556-562.

[责任编辑 顾雪竹]