

· 资源与鉴定 ·

基于DNA条形码技术的毒性药材金钱白花蛇药源调查

石林春¹, 唐先明², 胡志刚³, 赵春颖⁴, 冯丽肖⁴, 刘金欣^{1,4*}

- (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. 哈尔滨市食品药品检验检测中心, 哈尔滨 150525; 3. 湖北中医药大学 药学院, 武汉 430065;
4. 承德医学院 河北省中药研究与开发重点实验室, 河北 承德 067000)

[摘要] 目的:建立基于DNA条形码技术的毒性药材金钱白花蛇药源调查方法,调查市售金钱白花蛇的药源构成。方法:建立金钱白花蛇正品及其主要混伪品的参考细胞色素C氧化酶亚基I(Co I)条形码库,收集51份市售金钱白花蛇样品,分别获取每份样品头部和尾部的Co I序列,通过构建邻接系统发育树进行物种鉴定。结果:共获得60条金钱白花蛇正品及其主要混伪品的Co I条形码,银环蛇种内最大遗传距离0.020 1,与金环蛇、赤链蛇和赤链华游蛇的种间最小遗传距离分别为0.156 1,0.208 8和0.209 3,种内最大变异小于种间最小变异;金钱白花蛇正品及其混伪品在邻接系统发育树上聚为独立的支,金钱白花蛇正品及其混伪品在系统发育树上可明确区分。所有市售金钱白花蛇样品均可从头部和尾部成功获得Co I序列,药源调查结果表明银环蛇29份,赤链蛇20份,赤链华游蛇2份,混伪品占比43%;基于头部和尾部的鉴定结果一致。结论:DNA条形码技术可用于市售金钱白花蛇的药源调查;金钱白花蛇市场混乱、混伪品较多,质量问题严重。

[关键词] 金钱白花蛇; 细胞色素C氧化酶亚基I; DNA条形码; 药源调查; 银环蛇; 混伪品

[中图分类号] R22;R282;R931;R284;Q523 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0016-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181706

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180615.1310.004.html>

[网络出版时间] 2018-06-15 16:14

Investigation of Medicinal Sources for Bungarus Parvus by DNA Barcoding Technology

SHI Lin-chun¹, TANG Xian-ming², HU Zhi-gang³, ZHAO Chun-ying⁴, FENG Li-xiao⁴, LIU Jin-xin^{1,4*}

- (1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;
2. Harbin Food and Drug Inspection Center, Harbin 150525, China;
3. College of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;
4. Hebei Key Laboratory of Research and Development of Chinese Medicine, Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** Based on the DNA barcoding technology, a method of investigating medicinal sources for poisonous herbal medicine (Bungarus Parvus) was established to investigate medicinal sources of this medicine in Chinese herbal markets and drug stores. **Method:** Firstly, a reference cytochrome C oxidase subunit I (Co I) barcode library was established for the authentic Bungarus Parvus and its main adulterants. Then, 51 samples of the commercially available Bungarus Parvus were collected from herbal markets and drug stores, and

[收稿日期] 20180202(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703659);河北省“三三三人才工程”项目(A2017002090);河北省教育厅拔尖人才项目(BJ201602);河北省自然科学基金项目(H2017406031)

[第一作者] 石林春,博士,副研究员,从事中药资源相关研究,Tel:010-57833206,E-mail:linchun_shi@163.com

[通信作者] *刘金欣,博士,讲师,从事中药资源相关研究,Tel:0314-2291908,E-mail:liujx_23@163.com

then *Co I* sequences for the head and the tail tissue of each samples were obtained. Finally, the species identification of head and tail tissues of these commercially available samples was achieved by constructing the neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree. **Result:** A total of 60 *Co I* sequences were obtained from the authentic *Bungarus Parvus* and its main adulterants. The maximum intra-specific variation of *Bungarus multicinctus* was 0.020 1, whereas the minimum inter-specific variations of *B. multicinctus* and their main adulterants (*B. fasciatus*, *Lycodon rufozonatus* and *Sinonatrix annularis*) were 0.156 1, 0.208 8 and 0.209 3, respectively; the maximum intra-specific variation of *B. multicinctus* was less than its minimum inter-specific variations. The authentic *Bungarus Parvus* and its main adulterants showed independent branches in the NJ phylogenetic tree and could be discriminated clearly. *Co I* sequences could be successfully obtained from both the head and the tail of all the commercially available *Bungarus Parvus* samples and the investigation results showed that 29 of *B. multicinctus*, 20 of *L. rufozonatus* and 2 of *S. annularis*. The total of adulterants accounted for 43% and the results based on heads and tails were the same. **Conclusion:** DNA barcoding technology can be used to investigate the medicinal source of the commercially available *Bungarus Parvus*. The market of *Bungarus Parvus* is in disorder and has serious quality problems with a lot of adulterants.

[**Key words**] *Bungarus Parvus*; cytochrome C oxidase subunit I; DNA barcoding; investigation of medicinal source; *Bungarus multicinctus*; adulterant

金钱白花蛇为眼镜蛇科动物银环蛇 *Bungarus multicinctus* 的幼蛇干燥体^[1],用于治疗风湿顽痹、麻木拘挛、中风口眼喎斜、半身不遂、抽搐痉挛、破伤风、麻风、疥癣,是中医临床的贵重动物药材。金钱白花蛇味甘、咸,性温,有毒,头部毒腺中含强烈的神经毒素^[2],是许多中成药的重要成分,如消栓再造丸、风湿祛痛胶囊和罗浮山风湿膏药等。金钱白花蛇的基原动物银环蛇在我国南部各省、自治区及台湾地区均有分布^[3],夏、秋二季捕捉。传统上,通过捕捉银环蛇成年雌蛇自然产卵或野外挖洞取卵,孵化所得幼蛇用于制作金钱白花蛇。近年来由于市场需求持续增长,人工饲养技术尚待完善,野生资源逐渐匮乏,金钱白花蛇已被列入《国家重点保护野生药材物种名录》,市场上出现了相当比例的伪品和混淆品,以游蛇科动物赤链蛇 *Lycodon rufozonatus* 和赤链华游蛇 *Sinonatrix annularis* 为主^[4],给中医临床使用金钱白花蛇带来了安全风险。

2015 年版《中国药典》仅规定了金钱白花蛇的性状鉴别方法^[1],已不能满足金钱白花蛇的鉴定需求,建立新的鉴定方法是金钱白花蛇研究的热点问题。王义权等^[5]通过对金钱白花蛇及其主要伪品赤链蛇、赤链华游蛇以及尖吻蝮的 *Cytb* 基因片段进行差异分析,设计一对金钱白花蛇高度特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴定引物。陈振江等^[6]基于金钱白花蛇与赤链华游蛇蛋白质成分的相对分子质量差异,采用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE)技术鉴定金钱白花蛇及其伪品赤链华游蛇。冯成强等^[7]根据金钱白花蛇及其 6 种混淆品的线粒体 *Cytb* 基因序列,设计了 1 对专门用于金钱白花蛇鉴别的 PCR 特异引物。赵静雪等^[8]通过对金钱白花蛇及其 20 种混伪品的 *Cytb* 序列进行序列比对分析,设计 1 对金钱白花蛇快速 PCR 鉴别特异性引物。崔丽娜等^[9]对金钱白花蛇及其混伪品共 4 个种 11 份样品的细胞色素 C 氧化酶亚基 I (*Co I*) 条形码序列进行比较,结果表明 DNA 条形码技术鉴定金钱白花蛇及其混伪品在方法上具有可行性。许靖等^[10]开展了金钱白花蛇药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究。CHAO 等^[11]研究表明基于 *Co I* 条形码可以鉴定金钱白花蛇及其 8 种混伪品。2015 年,张鑫等^[12]根据金钱白花蛇及其 3 种混伪品的 *Co I* 序列差异,开展了多重 PCR 鉴定研究。随着 DNA 测序技术的普及^[13]和中药材 DNA 条形码分子鉴定法指导原则纳入 2015 年版《中国药典》^[14],DNA 条形码技术已成为金钱白花蛇鉴定研究的重点之一。本实验拟确立金钱白花蛇及其混伪品的参考 *Co I* 条形码库,基于 DNA 条形码技术对 51 份金钱白花蛇市售药材进行药源调查研究,为金钱白花蛇的市场监管提供依据。

1 材料

BSA224S 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司),MM400 型球磨机(德国 Retsch 公司),1-14 型离心机(德国 Sigma 公司),VORTEX-5 型涡旋混合器(海门市其林贝尔仪器制造有限公司),NanoDrop

2000 型超微量分光光度计和 3730XL 型 DNA 测序仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),DYCP-32 型电泳仪(北京六一仪器厂),T100 型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国 Bio-Rad 公司)。

动物 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司],PCR MasterMix 试剂(北京艾德莱生物科技有限公司)。为获得金钱白花蛇及其混伪品的参考 Co I 条形码库,收集金钱白花蛇正品 41 份,包含基原动物样品 4 份,符合 2015 年版《中国药典》规定的药材样品 37 份,见表 1。基原动物样品经药用植物研究所石林春副研究员鉴定,鉴定依据为《中国动物志》^[3]。药材样品经哈尔滨市食品药品

检验检测中心唐先明副主任药师鉴定,鉴定依据为 2015 年版《中国药典》^[1]。从文献[15-17]中下载银环蛇 Co I 序列 5 条(登录号 KF698925, KF698926, KF698927, KF698928, NC_011392),金环蛇 Co I 序列 3 条(登录号 KF698923, KF698924, NC_011393),赤链蛇 Co I 序列 9 条(登录号 JQ798868, JQ798869, KF698933, KF698934, KF698935, KF698936, KF698937, KJ179950, NC_024559),赤链华游蛇 Co I 序列 2 条(登录号 KF698966, KF698967)。收集市售金钱白花蛇样品 51 份,样品购自安徽亳州药市、广西玉林药市、河北安国药市、四川成都荷花池药市,以及国内中药零售店,见表 2。

表 1 金钱白花蛇正品样品来源及 Co I 序列登录号

Table 1 Specimen information and Co I sequence accession numbers of authentic Bungarus Parvus

样品编号	来源	登录号	样品编号	来源	登录号
JQA01	四川省自贡市	MG736838	JQM18	中国中药有限公司	MG736856
JQA02	四川省自贡市	MG736885	JQM19	中国中药有限公司	MG736857
JQA03	湖北省武汉市	MG736872	JQM20	中国中药有限公司	MG736858
JQA04	湖北省武汉市	MG736873	JQM21	中国中药有限公司	MG736859
JQM01	北京同仁堂	MG736820	JQM22	中国中药有限公司	MG736860
JQM02	北京同仁堂	MG736842	JQM23	中国中药有限公司	MG736824
JQM03	中国中药有限公司	MG736843	JQM24	中国中药有限公司	MG736861
JQM04	中国中药有限公司	MG736844	JQM25	中国中药有限公司	MG736862
JQM05	中国中药有限公司	MG736845	JQM26	中国中药有限公司	MG736863
JQM06	中国中药有限公司	MG736846	JQM27	中国中药有限公司	MG736864
JQM07	中国中药有限公司	MG736821	JQM28	中国中药有限公司	MG736865
JQM08	中国中药有限公司	MG736822	JQM29	中国中药有限公司	MG736825
JQM09	中国中药有限公司	MG736823	JQM30	中国中药有限公司	MG736866
JQM10	中国中药有限公司	MG736847	JQM31	中国中药有限公司	MG736867
JQM11	中国中药有限公司	MG736870	JQM32	中国中药有限公司	MG736826
JQM12	中国中药有限公司	MG736871	JQM33	中国中药有限公司	MG736827
JQM13	中国中药有限公司	MG736851	JQM34	中国中药有限公司	MG736828
JQM14	中国中药有限公司	MG736852	JQM35	中国中药有限公司	MG736829
JQM15	中国中药有限公司	MG736853	JQM36	中国中药有限公司	MG736830
JQM16	中国中药有限公司	MG736854	JQM37	中国中药有限公司	MG736831
JQM17	中国中药有限公司	MG736855			

2 方法

2.1 DNA 提取,PCR 扩增及 DNA 测序 金钱白花蛇基原动物样品保存于 90% 乙醇中,药材样品彻底烘干后保存于装有变色硅胶的自封袋中。称取样品约 10 mg,药材样品称取 15 ~ 20 mg,用 MM400 型球磨仪研磨 2 min(30 次/s),使用动物 DNA 提取试剂

盒提取总 DNA,使用超微量分光光度计测定 DNA 浓度及质量。PCR 扩增的引物、反应体系和扩增程序参照中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则^[14],扩增产物经纯化后使用 DNA 测序仪进行双向测序。

2.2 序列拼接、遗传距离计算和邻接(NJ)树构建 使用 CodonCode Aligner V7.0.1 软件去除低质量

表 2 基于 DNA 条形码技术的市售金钱白花蛇药源调查

Table 2 Medicinal source investigation of commercially available Bungarus Parvus specimens by DNA barcoding technology

样品编号	来源	药源	登录号	样品编号	来源	药源	登录号
JQS01	安徽亳州药市	金钱白花蛇	MG736833	JQS27	新疆乌鲁木齐某药店	赤链蛇	MG736901
JQS02	安徽亳州药市	金钱白花蛇	MG736834	JQS28	安徽亳州药市	金钱白花蛇	MG736832
JQS03	安徽亳州药市	金钱白花蛇	MG736835	JQS29	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736897
JQS04	安徽亳州药市	金钱白花蛇	MG736887	JQS30	甘肃兰州某药店	赤链蛇	MG736892
JQS05	安徽亳州药市	金钱白花蛇	MG736836	JQS31	甘肃兰州某药店	金钱白花蛇	MG736874
JQS06	安徽亳州药市	金钱白花蛇	MG736837	JQS32	四川成都荷花池药市	金钱白花蛇	MG736875
JQS07	安徽亳州药市	金钱白花蛇	MG736888	JQS33	四川成都荷花池药市	赤链蛇	MG736893
JQS08	广西玉林药市	金钱白花蛇	MG736839	JQS34	宁夏银川某药店	金钱白花蛇	MG736876
JQS09	广西玉林药市	金钱白花蛇	MG736840	JQS35	宁夏银川某药店	赤链蛇	MG736890
JQS10	广西玉林药市	金钱白花蛇	MG736841	JQS36	福建福州某药店	金钱白花蛇	MG736877
JQS11	广西玉林药市	金钱白花蛇	MG736848	JQS37	福建福州某药店	金钱白花蛇	MG736878
JQS12	广西玉林药市	金钱白花蛇	MG736849	JQS38	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736899
JQS13	广西玉林药市	金钱白花蛇	MG736850	JQS39	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736906
JQS14	广西玉林药市	赤链蛇	MG736894	JQS40	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736905
JQS15	广西玉林药市	赤链蛇	MG736895	JQS41	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736907
JQS16	广西玉林药市	赤链华游蛇	MG736910	JQS42	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736902
JQS17	广西玉林药市	赤链华游蛇	MG736911	JQS43	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736908
JQS18	广西玉林药市	金钱白花蛇	MG736889	JQS44	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736904
JQS19	河北安国药市	赤链蛇	MG736891	JQS45	安徽亳州药市	赤链蛇	MG736903
JQS20	四川成都荷花池药市	金钱白花蛇	MG736886	JQS46	山东济南某药店	金钱白花蛇	MG736879
JQS21	河南新乡某药店	金钱白花蛇	MG736868	JQS47	山东济南某药店	金钱白花蛇	MG736880
JQS22	新疆乌鲁木齐某药店	金钱白花蛇	MG736869	JQS48	黑龙江哈尔滨某药店	金钱白花蛇	MG736881
JQS23	西藏拉萨某药店	赤链蛇	MG736898	JQS49	黑龙江哈尔滨某药店	金钱白花蛇	MG736882
JQS24	西藏拉萨某药店	赤链蛇	MG736896	JQS50	湖南长沙某药店	金钱白花蛇	MG736883
JQS25	西藏拉萨某药店	赤链蛇	MG736900	JQS51	湖南长沙某药店	金钱白花蛇	MG736884
JQS26	西藏拉萨某药店	赤链蛇	MG736909				

注:头部和尾部鉴定结果相同。

区域、校对拼接和切除引物序列。拼接结果经核对后使用 BankIt 工具提交到 GenBank 数据库。使用 Muscle 3.8 软件完成多序列比对^[18]。使用 PUAP 4.0 软件计算种内和种间遗传距离^[19]。使用 MEGA 7.0 软件进行 NJ 系统发育树构建^[20]。

3 结果

3.1 金钱白花蛇 DNA 提取,PCR 扩增与测序 对于金钱白花蛇基原动物样品和药材样品,从尾部取样品约 10 mg 进行 DNA 提取;对于市售金钱白花蛇样品,从头部和尾部分别取样品 10 mg 进行独立 DNA 提取。裂解完成后加入等体积的苯酚-三氯甲烷-异戊醇(25:24:1)以消除蛋白质污染。将提取到的基因组 DNA 进行电泳检测,观察到 DNA 条带

在琼脂糖凝胶上均呈弥散状态,表明所提取到的 DNA 存在较为严重的降解;使用超微量分光光度计进行 DNA 质量检测,结果表明所有样品的 DNA 质量浓度均 > 0.1 g · L⁻¹。PCR 扩增前需将样品的 DNA 质量浓度稀释到 0.1 ~ 0.2 g · L⁻¹。将所获得的 DNA 进行 Co I 序列 PCR 扩增,PCR 产物经电泳检测后发现其在琼脂糖凝胶上均呈明亮单一条带,片段大小约 700 bp。所有 PCR 产物均可获得高质量的双向测序结果,序列拼接后均可找到并切除正、反向引物,以及翻译成连续的蛋白质序列,表明所获得的 Co I 序列质量较好,可满足后续分析要求。

3.2 金钱白花蛇 Co I 序列特征及其与混伪品的种间变异分析 金钱白花蛇 Co I 序列共 46 条,序列

长度均为 658 bp,鸟嘌呤(G)和胞嘧啶(C)所占的比率(GC 质量分数)为(43.27 ± 0.07)%,分为 3 个单倍型(H1, H2, H3)。H1 为主导单倍型,包含 33 条序列,H2 包含 12 条序列,H3 包含 1 条序列。金钱白花蛇 *Co I* 序列包含 13 个变异位点,分别为 5, 500 和 622 位点 C-胸腺嘧啶(T)变异,112 位点 C-腺嘌呤(A)变异,181,499 和 628 位点 A-G 变异,184 和 517 位点 G-A 变异,217 位点 G-C 变异,268 和 298 位点 T-C 变异,562 位点 T-A 变异。基于 K2P

模型计算遗传距离,金钱白花蛇种内最大遗传距离 0.020 1,种内平均遗传距离 0.001 4 ± 0.003 8。与金环蛇相比,种间最小遗传距离 0.156 1,种间平均遗传距离 0.156 9 ± 0.000 8;与赤链蛇相比,种间最小遗传距离 0.208 8,种间平均遗传距离 0.214 3 ± 0.003 2;与赤链华游蛇相比,种间最小遗传距离 0.209 3,种间平均遗传距离 0.211 9 ± 0.000 9。金钱白花蛇与金环蛇、赤链蛇、赤链华游蛇在 NJ 树上聚为不同的支,相互之间可以明确区分,见图 1。

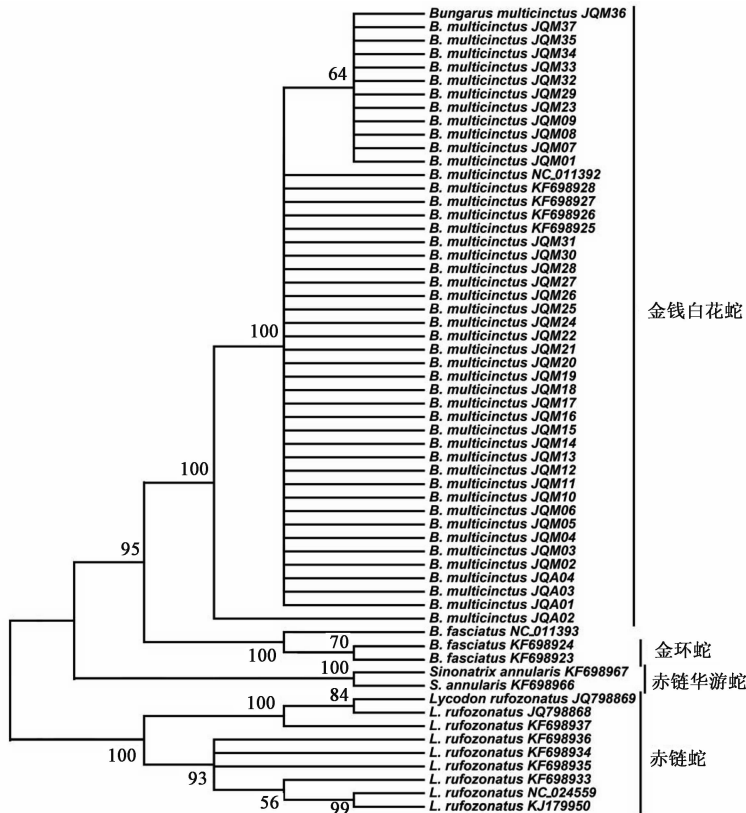


图 1 基于 *Co I* 序列构建的金钱白花蛇及其混伪品的 NJ 系统发育树

Fig. 1 NJ phylogenetic tree constructed by *Co I* sequences of Bungarus Parvus and its adulterants

3.3 基于 DNA 条形码技术的市售金钱白花蛇药源调查 共收集市售金钱白花蛇药材 51 份,32 份购自药材市场,19 份购自国内中药零售店,最低价格为 1.5 元/条,最高价格为 125 元/条,价格相差 80 余倍。基于金钱白花蛇及其混伪品的参考 *Co I* 条形码库,通过构建邻接系统发育树分别对市售金钱白花蛇药材的头部和尾部进行物种鉴定,见图 2。结果表明金钱白花蛇 29 份,赤链蛇 20 份,赤链华游蛇 2 份,混伪品占比 43%;头部和尾部的鉴定结果一致,未发现采用成体银环蛇身体装上其他幼蛇头部的伪品类型,见表 2。

4 讨论

4.1 金钱白花蛇商品来源复杂、市场混乱,危害中医临床用药安全 金钱白花蛇的商品药材呈圆盘状,盘径 3 ~ 6 cm,以盘径 3 ~ 4 cm 为佳,称为“金钱”,蛇体直径 0.2 ~ 0.4 cm,依赖传统方法进行形态和性状鉴定较为困难^[21]。近年来,由于金钱白花蛇药源不足,价格攀升,市售药材常混有其他蛇作为混伪品销售。金钱白花蛇的伪品加工方法多样^[22-23],如赤链蛇、赤链华游蛇和金环蛇经涂漆、染色或脱色制成;成体银环蛇经纵向剖开,切割多刀后搓成细条,再装上其他幼蛇蛇头。人为造假改变了

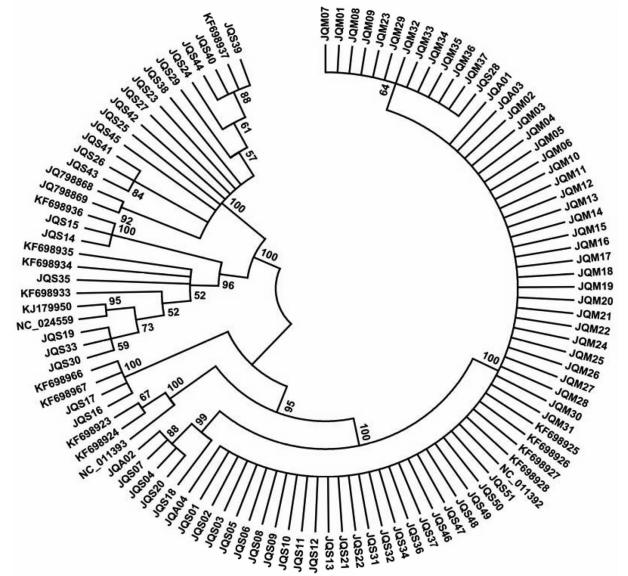


图 2 基于构建的 NJ 系统发育树对市售金钱白花蛇进行物种鉴定
Fig. 2 Species identification of commercially available Bungarus Parvus specimens based on constructed NJ phylogenetic tree

金钱白花蛇的外观性状,进一步增加了形态和性状鉴定的难度。2001 年出版的《常用中药材品种整理和质量研究》^[24](南方协作组,第四册)对市售的 188 件金钱白花蛇药材进行鉴定,正品仅 62 件,伪品占比 67%。本研究共收集 51 份金钱白花蛇市售药材,正品为 29 份,伪品占比 43%,说明金钱白花蛇的市场较为混乱,应加强质量监管。

4.2 基于 DNA 条形码技术开展金钱白花蛇药源调查具有独特的技术优势 2015 年版《中国药典》仅规定了金钱白花蛇的性状鉴别方法,实践中主要依据其骨骼和鳞被特征进行鉴定^[25],对鉴定者的专业知识和经验积累具有较高的要求,易受造假手段的干扰。中药材 DNA 条形码技术基于生物的遗传信息进行物种鉴定,可摆脱对中药材外观性状的依赖,具有通用、客观、准确、可数字化的特点^[26]。根据《中国动物志》记载^[3],银环蛇为眼镜蛇科环蛇属动物,环蛇属在中国仅金环蛇和银环蛇 2 种,银环蛇的种内最小序列相似性 98.2%,金环蛇和银环蛇的最大序列相似性 86%。除金环蛇外,银环蛇的主要伪品赤链蛇和赤链华游蛇均为游蛇科动物,在分类上与银环蛇分属不同的科,最大序列相似性仅 82%。因此,通过 DNA 条形码技术可以清晰、准确地鉴定金钱白花蛇及其混伪品。此外,本研究所采用的 DNA 条形码技术采用通用引物对特定条形码序列进行扩增,基于 DNA 测序结果进行物种比较分析,可避免 PCR 鉴别技术因研究范围不同和目的基因

变化导致的引物设计差异,以及假阳性、假阴性和种内变异对鉴定结果的干扰^[27]。随着测序技术的发展和测试成本的降低,特别是中药材 DNA 条形码鉴定系统的建立^[28]和中药材 DNA 条形码鉴定软件的开发,DNA 条形码技术已在中药材真伪鉴定实践中广泛应用,并将深刻影响中药鉴定学的发展方向。后续将进一步丰富和完善金钱白花蛇及其混伪品的参考 Co I 条形码库,开发专业的生物信息学鉴定模块,为该药材的市场质量监管提供可靠的技术支撑。

[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,2015:219.
 [2] 郭辉,张翠英,雷留成,等. 金钱白花蛇药酒的质量标准改进研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2002,8(2): 63-64.
 [3] 赵尔宓,黄美华,宗愉,等. 中国动物志·爬行纲. 第三卷[M]. 北京:科学出版社,1998:337-341.
 [4] 黄成勇. 金钱白花蛇真伪鉴别研究综述[J]. 中草药, 2002,33(4):382-384.
 [5] 王义权,周开亚,徐璐珊,等. 金钱白花蛇及其伪品的 Cyt b 基因片段序列分析和 PCR 鉴别研究[J]. 药理学学报,1998,33(12):941-947.
 [6] 陈振江,李其兰,陈科力,等. SDS-PAGE 鉴别金钱白花蛇及其混伪品[J]. 中药材,2000,23(12):741-743.
 [7] 冯成强,唐晓晶,黄璐琦,等. 金钱白花蛇及其混伪品高特异性 PCR 的鉴别[J]. 中国中药杂志,2006,31(13):1050-1053.
 [8] 赵静雪,崔光红,辛敏通,等. 金钱白花蛇快速 PCR 鉴别方法的建立[J]. 药理学学报,2010,45(10): 1327-1332.
 [9] 崔丽娜,杜鹤,张辉,等. 基于 Co I 条形码序列的金钱白花蛇及其混伪品的 DNA 分子鉴定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2011,13(2):424-428.
 [10] 许靖,王成芳,杜树山,等. 金钱白花蛇商品药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中成药,2014,36(3):563-566.
 [11] CHAO Z, LIAO J, LIANG Z B, et al. Cytochrome C oxidase subunit I barcodes provide an efficient tool for Jinqian Baihua She (Bungarus Parvus) authentication [J]. Pharmacogn Mag,2014,10(40):449-457.
 [12] 张鑫,王福,陈美君,等. 金钱白花蛇与三种常见混伪品多重 PCR 鉴别方法[J]. 时珍国医国药,2015,26(12):2927-2929.
 [13] 张彩云,黄珊珊,颜海飞. DNA 条形码技术在中药鉴定中的应用进展[J]. 中草药,2017,48(11): 2306-2312.

- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 四部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 383-385.
- [15] Jeong T J, JUN J, HAN S, et al. DNA barcode reference data for the Korean herpetofauna and their applications [J]. *Mol Ecol Resour*, 2013, 13(6): 1019-1032.
- [16] CAO S, GUO L, LUO H, et al. Application of *CO I* barcode sequence for the identification of snake medicine (*Zaocys*) [J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2016, 27(1): 483-489.
- [17] QIAN L F, ZHANG C L, HUANG X, et al. Mitochondrial genome of *Dinodon rufozonatum* (Squamata: Colubridae: *Dinodon*) [J]. *Mitochondrial DNA A DNA Mapp Seq Anal*, 2016, 27(2): 970-971.
- [18] Edgar R C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity [J]. *BMC Bioinformatics*, 2004, doi: 10.1186/1471-2105-5-113.
- [19] Swofford D L. *PAUP * . Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods)* [M]. Version 4. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002: 301-314.
- [20] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets [J]. *Mol Biol Evol*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [21] 廖婧, 梁镇标, 张亮, 等. 常见药用蛇类的 DNA 条形码研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2013, 48(15): 1255-1260.
- [22] 姚明全, 何佩华, 金珍钱. 金钱白花蛇与常见伪品鉴别 [J]. *时珍国医国药*, 2000, 11(2): 142.
- [23] 党应川, 刘志红. 金钱白花蛇及其几种伪品的鉴别 [J]. *中草药*, 1999, 30(10): 783-784.
- [24] 徐国钧, 徐珞珊, 王峥涛. 常用中药材品种整理和质量研究(南方协作组). 第四册 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 2001: 796-847.
- [25] 张乐, 陶明宝, 陈鸿平, 等. 常用蛇类药材鉴别研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(4): 222-227.
- [26] 陈士林, 姚辉, 宋经元, 等. 基于 DNA barcoding(条形码)技术的中药材鉴定 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2007, 9(3): 7-12.
- [27] 刘金欣, 李耿, 陈彩霞, 等. 基于 ITS2 序列的中药材苍术种苗 DNA 条形码鉴定 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(2): 34-38.
- [28] CHEN S L, PANG X L, SONG J Y, et al. A renaissance in herbal medicine identification: from morphology to DNA [J]. *Biotechnol Adv*, 2014, 32(7): 1237-1244.

[责任编辑 刘德文]