

猪胆粉及其中成药的特异性 PCR 鉴别方法

王丽^{1,2}, 金艳¹, 蒋超^{1*}, 袁媛^{1*}

(1. 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;
2. 北京城市学院, 北京 100083)

[摘要] **目的:** 建立一种适用于猪胆粉及其中成药的特异性聚合酶链式反应(PCR)鉴别方法,为复杂组分中动物源性成分的鉴定提供示范。**方法:** 根据猪源性鉴别引物,建立 PCR 鉴别方法,优化反应体系,并对此方法进行考察和验证。利用建立的 PCR 鉴别方法,对 20 批自制猪胆粉药材,19 批市售猪胆粉药材和 22 批含猪胆粉中成药的猪源性成分进行鉴别,将市售的猪胆粉药材和含猪胆粉中成药 PCR 扩增的阳性产物进行酶切验证和序列测定验证。**结果:** 20 批自制猪胆粉药材、猪胆粉对照药材均能扩出约 212 bp 的特异性鉴别条带,牛和羊参考品均无条带;19 批市售猪胆粉药材中仅 5 批扩出特异性鉴别条带;22 批含猪胆粉中成药中有 10 批检出猪源性成分;猪胆粉对照药材及市售猪胆粉药材 PCR 扩增的阳性产物经 *Mnl* I 酶切后均能产生约 200 bp 的条带;猪胆粉及其中成药中扩增产物序列与 GenBank 数据库中相似性最高的物种为 *Sus scrofa*,一致性为 99%,与猪的序列高度一致。**结论:** 该文建立的特异性 PCR 鉴别方法可准确鉴别猪胆粉及其中成药中的猪源性成分。

[关键词] 猪胆粉; 中成药; 特异性聚合酶链式反应; 分子鉴别

[中图分类号] R284.2;R285;R22;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)17-0136-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191714

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190515.1736.013.html>

[网络出版时间] 2019-05-17 13:13

Specific PCR Method for Identification of Suis Fellis Pulvis and Its Chinese Patent Medicines

WANG Li^{1,2}, JIN Yan¹, JIANG Chao^{1*}, YUAN Yuan^{1*}

(1. 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;
2. Beijing City University, Beijing 100083, China)

[Abstract] **Objective:** A polymerase Chain reaction (PCR) identification method for Suis Fellis Pulvis and its Chinese patent medicines was established to provide an example for the identification of animal-derived components in complex components. **Method:** A PCR identification method was established based on swine derivatives identification primers, the reaction system was optimized, and the established method was investigated and verified. By the established PCR identification method, the swine derivatives of 20 batches of self-made Suis Fellis Pulvis material, 19 batches of commercially available Suis Fellis Pulvis and 22 batches of Chinese patent medicines containing Suis Fellis Pulvis were identified. The commercially available Suis Fellis Pulvis material and Chinese patent medicines containing Suis Fellis Pulvis positive products that were amplified PCR were verified by

[收稿日期] 20190319(010)

[基金项目] 国家药典委员会“《中国药典》药品标准提高项目”(2017-6);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(ZZ10-008);中央本级重大增减支项目(2060302)

[第一作者] 王丽,在读硕士,从事中药分子鉴定研究,E-mail:975240432@qq.com

[通信作者] *袁媛,研究员,从事中药鉴定与分子药理学研究,Tel:010-64087649,E-mail:y_yuan0732@163.com;

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

enzyme digestion and sequencing. **Result:** Totally 20 batches of self-made Suis Fellis Pulvis material and Suis Fellis Pulvis control material could expand the specific identification band of about 212 bp, and there was no bands in bovine and ovine reference, only 5 batches of the 19 batches of commercially available Suis Fellis Pulvis had expanded specific identification bands, 10 batches of 22 batches of Chinese patent medicines containing Suis Fellis Pulvis were detected to have swine derivatives, the Suis Fellis Pulvis control material and the PCR-amplified commercially available Suis Fellis Pulvis material positive products can produce about 200 bp of bands after digestion with *Mnl* I. The highest similarity between the amplification products sequence of Suis Fellis Pulvis and its Chinese patent medicines, and the GenBank database was *Sus scrofa*, the consistency was 99%, which conformed to the sequence of swine. **Conclusion:** The PCR identification method established in this paper can accurately identify the biological origin of Suis Fellis Pulvis and its Chinese patent medicines.

[**Key words**] Suis Fellis Pulvis; Chinese patent medicine; specific polymerase Chain reaction (PCR); molecular identification

猪胆粉始载于《名医别录》，为猪科动物猪 *Sus scrofa domestica* 胆汁的干燥品^[1]。猪胆粉具有清热润燥、止咳平喘、解毒等功效，是含猪源性中成药最常见组分。2015 年版《中国药典》一部收载处方中含猪胆粉中成药数目约占含猪源性成分中成的 56%，常见的有鼻炎康片、熊胆救心丸、护肝胶囊以及康妇消炎栓等。

猪胆粉为胆汁制品，传统制法是将猪宰杀后，剖腹将胆囊取出，胆汁鲜用或将胆囊挂起晾干^[2]，现代制法为将猪的胆汁滤过，干燥，粉碎制得^[1]。在加工成药材过程中，猪胆粉已失去形态鉴别特征，存在严重的混伪风险，而含猪胆粉的中成药种类繁多，制剂、加工形式多样，缺乏准确、稳定的鉴别方法，投料基原鉴别困难。自 2000 年版《中国药典》一部以来，猪胆粉鉴别方法均为薄层色谱鉴别，缺乏更为专属的鉴定方法。因此，需要建立一种适用于猪胆粉及其中成药的鉴别方法。近年来 DNA 分子鉴别方法尤其是特异性聚合酶链式反应(PCR)技术已广泛用于中药材、中药饮片、中成药乃至中药提取物的物种基原鉴别^[3-4]，具有专属性好、灵敏度高以及稳定性强的特点。2010 年版《中国药典》及其增补本相继收录了乌梢蛇、蕲蛇的 PCR 鉴别法、川贝母的聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性鉴别方法(PCR-RFLP)。2015 年版《中国药典》增补本收录了金钱白花蛇的 PCR 鉴别方法。

随着 DNA 提取、PCR 扩增等技术的发展，特异性 PCR 技术已开始用于含胆汁药材的鉴别研究，这些方法多利用胆壁脱落细胞或游离的微量 DNA，通过多种方式去除胆酸、胆红素或者血红蛋白分解物等多种 PCR 扩增抑制物，提取出极微量的 DNA，最终建立分子鉴别方法。吴桂凡等^[5]收集了 20 种蛇

胆汁和 7 种常见伪品，建立蛇胆汁 DNA 提取方法，对蛇胆汁和其他动物类胆汁进行了特异性 PCR 鉴别；Kwon 等^[6]建立了熊胆特异性 PCR 鉴别方法，能准确鉴别熊胆汁、猫胆汁和猪胆汁。然而对含胆粉类的中成药制品，其 DNA 进一步降解，目前仍缺乏有效的 PCR 鉴别方法。

本研究使用特异性 PCR 技术对猪胆粉及中成药进行研究，建立了猪胆粉及中成药的 PCR 鉴别方法，为复杂组分中动物源性成分的鉴定提供示范。

1 材料

1.1 参考样品 猪胆粉对照药材购自中国食品药品检定研究院(批号 121273-201502)；牛肉参考品(编号 201809001)购自北京东城区京东超市；羊肉参考品(编号 201809002)购自北京东城区华联超市。

1.2 猪胆粉药材 共 39 批样品(表 1)，其中 19 批猪胆粉购自不同地区的商铺，20 批属于实验室自制，制作过程如下，取不同个体的新鲜猪胆(北京第五肉联厂提供)，从中取出猪胆汁，用纱布过滤，45℃烘箱烘干，研成胆粉，即得。

1.3 中成药 16 种 2015 年版《中国药典》收录的含猪胆粉中成药(共 22 批)购自不同药店(表 2)。

1.4 仪器 Veriti™ 型 PCR 仪，GeneAmp 9700 型 PCR 仪(Applied Biosystem 公司)；PTC-100 型 PCR 仪，SYNGENE SYNGENE 型凝胶成像系统(Gene 公司)，TC-512 型 PCR 仪(上海 Techne 公司)；VORTEX-2 GENIE 型漩涡震荡仪(美国 Scientific Industries 公司)；Nanodrop2000 型微量核酸定量分析仪(Thermo Scientific 公司)。

1.5 试剂 Dneasy 血液及组织核酸提取试剂盒(上海凯杰企业管理有限公司，批号 69506)，Ezup

表 1 猪胆粉原药材样品

Table 1 Samples of raw materials for *Suis Fellis Pulvis*

No.	批号	采集地	DNA 质量浓度 /mg·L ⁻¹
1	20180905001	北京	20
2	20180905002	安徽	138.5
3	20180905003	安徽	325.9
4	20180905004	安徽	209.2
5	20180905005	江西	31.2
6	20180905006	江西	30.9
7	20180905007	江西	27.3
8	20180905008	上海	76.9
9	20180905009	福建	35.9
10	20180905010	安徽	306.6
11	20180905011	安徽	110.9
12	20180905012	安徽	151.5
13	20180905013	安徽	116.8
14	20180905014	安徽	267.8
15	20180905015	安徽	196.9
16	20180905016	安徽	182.5
17	20180905017	安徽	125.3
18	20180905018	安徽	74.0
19	20180905019	广东	8.9
20	20181026001	北京	97.3
21	20181026002	北京	15.8
22	20181026003	北京	21.9
23	20181026004	北京	33.6
24	20181026005	北京	25.9
25	20181026006	北京	13.1
26	20181026007	北京	19.7
27	20181026008	北京	38.2
28	20181026009	北京	28.8
29	20181026010	北京	32.1
30	20181026011	北京	9.3
31	20181026012	北京	19.7
32	20181026013	北京	13.8
33	20181026014	北京	10.9
34	20181026015	北京	7.5
35	20181026016	北京	14.2
36	20181026017	北京	11.0
37	20181026018	北京	29.8
38	20181026019	北京	7.5
39	20181026020	北京	7.4

表 2 含猪胆粉成分中成药样品

Table 2 Samples of Chinese patent medicines containing *Suis Fellis Pulvis*

No.	品名	批号	DNA 系列浓度 /mg·L ⁻¹	PCR 鉴别
1	胆乐胶囊	1801101	24.3	-
2	康妇消炎栓	20180101	107.8	-
3	新癍片	171008	31.1	-
4	鼻炎康片	17034	182.0	-
5	熊胆痔灵栓	171106	32.7	+
6	熊胆痔灵栓	20180102	40.8	+
7	藿胆片	180201	22.9	+
8	安脑丸	20150207	16.6	+
9	熊胆救心丸	170501.07	6.5	+
10	藿胆丸	1707002	125.5	-
11	藿胆丸	20171003	92.3	-
12	藿胆丸	171001	126.8	-
13	茵胆平肝胶囊	1708055	26.0	-
14	珍黄胶囊	1703009	190.8	-
15	珍黄胶囊	1710052	37.3	+
16	护肝片	201704080	57.6	-
17	护肝片	20180118	20.4	+
18	护肝胶囊	171005055	14.7	-
19	护肝胶囊	180101056	8.3	+
20	护肝胶囊	170101	1.3	+
21	痔疮片	180102	15.3	+
22	复方珍珠暗疮片	18002	18.3	-

柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物公司,批号 B518251-0050),TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号 DP304-02),Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System 试剂盒(普洛麦格北京生物技术有限公司,批号 A2361);SpeedSTAR HS *Taq* DNA 聚合酶(批号 RR070A),*ExTaq* DNA 聚合酶(批号 RR001B),*rTaq* DNA 聚合酶(批号 R001B),均购自大连 Takara 公司;*Mnl* I 限制性内切酶(批号 10012456),2 × Master Mix with standard buffer(批号 M0484S),*Taq* 2 × Master Mix(批号 M0496S),均购自北京纽英伦生物技术有限公司;2 000 bp DNA Marker(北京全式金生物技术有限公司,批号 BM101)。

2 方法

2.1 引物 参照“聚合酶链式反应法”通则(2020

年版《中国药典》公示稿),确定猪胆粉的鉴别引物,上游引物(PidF):5'-GCCTAAATCTCCCCTCAA TGGA-3';下游引物(PidR):5'-ATGAAAGAGG CAAATAGATTTTCG-3',引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2.2 DNA 提取 分别使用十六烷基三甲基溴化铵法(CTAB法),十二烷基硫酸钠法(SDS法),Dneasy 血液及组织核酸提取试剂盒,Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒,TIANamp Genomic DNA Kit 血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒,Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System 试剂盒等根据说明书操作提取猪胆粉对照药材、样品及牛羊肉参考品。样品模板 DNA 制备完成后,置-20℃保存备用。

2.3 猪胆粉药材 PCR 扩增条件的确定 猪胆粉特异性 PCR 反应初始体系:PCR 反应体系 25 μL,包含 10 × PCR buffer 2.5 μL, 10 mmol · L⁻¹ dNTPs 1.5 μL,上游及下游引物 0.25 μL, rTaq DNA 聚合酶 0.2 μL, DNA 模板 1 μL,加灭菌蒸馏水补足至 25 μL。PCR 反应在 Veriti™ 型 96 孔梯度 PCR 仪上进行。猪胆粉 PCR 鉴别条件:94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 57℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 个循环;最后 72℃终延伸 5 min。PCR 反应结束后,取反应产物,加入 6 × Loading buffer(Takara 公司)5 μL,混匀后于溴化乙腈(EB)染色的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,SYNGENE 凝胶成像系统观察、成像。

对 PCR 条件进行考察,分别考察了①退火温度,55,57,59,61℃;②PCR 循环次数,33,35,37,39;③模板 DNA 用量,90,30,10,3 ng;④Taq 酶用量,0.2,0.25,0.3,0.4 μL;⑤不同型号 PCR 仪,Veriti™ 型,ABI 9700 型,PTC-100 型,TC-512 型;⑥Taq 酶种类,ExTaq, 2 × Taq PCR Master Mix, Taq 2 × Master Mix, SpeedSTAR HS Taq 预混液对 PCR 反应稳定性的影响。

2.4 含猪胆粉的中成药 PCR 扩增条件的确定 根据 2.3 项的结果,确定含猪胆粉中成药的 PCR 反应体系 25 μL,包含 FBI buffer 2.5 μL, 10 mmol · L⁻¹ dNTPs 1.5 μL,上游及下游引物各 0.5 μL, SpeedSTAR HS DNA 聚合酶 0.2 μL, DNA 模板 1 μL,加灭菌蒸馏水补足至 25 μL。PCR 反应条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,57℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 40 个循环;最后 72℃终延伸 5 min。

2.5 酶切验证 将市售猪胆粉特异性 PCR 扩增的阳性产物进行酶切验证,限制性内切酶酶切反应体系为 PCR 反应产物 10 μL, Mnl I 反应缓冲液 2 μL, Mnl I 酶 1 μL,加灭菌蒸馏水补足至 20 μL。Mnl I 限制性内切酶酶切反应条件为 37℃ 60 min。

2.6 序列测定 将市售猪胆粉和含猪胆粉中成药特异性 PCR 扩增的阳性产物,使用 Sanger 法进行测序,由北京睿博兴科科技有限公司完成。对获得的序列,使用 BLASTn 程序在 NCBI 核酸数据库中进行比对,以判断鉴别结果的准确性。

3 结果与分析

3.1 DNA 提取结果 经对 CTAB 法,SDS 法和 4 种 DNA 提取试剂盒进行提取结果比对,使用 Promega Wizard SV Genomic DNA Purification System 试剂盒提取的效果最好,可从对照药材和所有自制猪胆粉样品中提取出 DNA(表 1)。

3.2 猪胆粉药材 PCR 鉴别 使用猪源性成分鉴定引物,优化反应体系,并对此方法进行考察和验证,结果表明退火温度在 55~59℃时,猪胆粉药材及对照药材均能扩出约 212 bp 的特异性鉴别条带,牛、羊参考品均无条带,退火温度过高导致条带微弱,所以最终确定其退火温度为 57℃(图 1);分别选用 33,35,37,39 循环进行考察,循环数在 37 次时,牛源性对照出现了微弱条带,最终确定其循环数为 37 次;对 25 μL PCR 反应体系中的模板 DNA 用量进行了考察,调整 DNA 质量浓度约 30 mg · L⁻¹,分别设置相当于 3,1,0.33,0.11 倍的 DNA 模板(DNA 量分别为 90,30,10,3 ng),结果表明所有样本均能扩增(图 2)。为了防止模板浓度过高产生假阳性或过低产生假阴性的错误鉴别结果,确认选择 25 μL 体系中加入 1 μL(约 30 ng)作为最终模板浓度;Taq 酶用量在 0.2~0.4 μL 时,所有样本均能扩增,为保证 PCR 的稳定性,最终确定 Taq 酶用量为 0.2 μL;在所选择的 4 种 Taq 酶和 PCR 仪中,猪胆粉药材及对照药材均能扩出约 212 bp 的特异性鉴别条带,牛、羊参考品均无条带(图 3)。

最终确立猪胆粉 PCR 鉴别条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,57℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,共 35 个循环;最后 72℃终延伸 5 min。使用该条件对 20 批自制猪胆粉药材和 19 批市售猪胆粉药材进行了 PCR 鉴定,20 批自制猪胆粉药材、猪胆粉对照药材均能扩出约 212 bp 的特异性鉴别条带,牛、羊参考品均无条带,19 批市售猪胆粉药材仅 5 批扩出鉴别条带(图 4)。正品率约 25%。



M. DL2000 Marker; 1. 猪胆粉样品 (批号 20181026004); 2. 猪胆粉样品 (批号 20180905007); 3. 猪胆粉对照药材; 4. 牛肉参考品; 5. 羊肉参考品; 6. 阴性对照 (图 2, 3 同)

图 1 PCR 退火温度 (A) 和循环数 (B) 考察

Fig. 1 Investigation of PCR annealing temperature (A) and thermo cycles number (B)

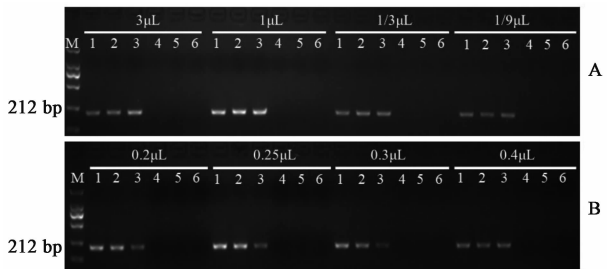


图 2 DNA 模板量 (A) 和 Taq 酶用量 (B) 考察

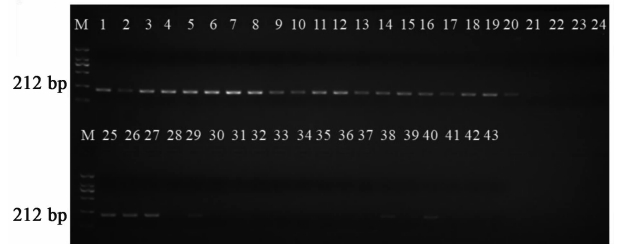
Fig. 2 Investigation of DNA concentration (A) and amount of Taq polymerase (B)



图 3 Taq 酶种类 (A) 和不同 PCR 仪 (B) 考察

Fig. 3 Investigation of different kinds of Taq polymerases (A) and thermocyclers (B)

3.3 含猪胆粉中成药 PCR 鉴别 使用优化后的 PCR 鉴别方法检测市售含猪源性成分的中成药, 22 批中成药中有 10 批检出猪源性成分 (图 5, 表 2), PCR 鉴别总正品率约为 45%。其中胆乐胶囊, 康妇消炎栓, 新癍片, 鼻炎康片, 藿胆丸, 茵胆平肝胶囊, 珍黄胶囊 (批号 1703009), 护肝片 (批号 201704080), 护肝胶囊 (批号 171005 055), 复方珍珠暗疮片使用本研究建立的 PCR 鉴别方法未检出猪源性成分, 有待进一步确实是否含有猪胆粉组分。而珍黄胶囊 (批号 1710052), 护肝片 (批号 20180118), 护肝胶囊 (批号 180101056) 条带较弱,



M. DL2000 Marker; 1 ~ 20. 自制猪胆粉药材 (批号 20181026001-20181026020); 21 ~ 39. 市售猪胆粉药材 (批号 20180905001-20180905019); 40. 猪胆粉对照药材; 41. 牛肉参考品; 42. 羊肉参考品; 43. 阴性对照

图 4 猪胆粉药材特异性 PCR 鉴别

Fig. 4 Specific PCR identification of Suis Fellis Pulvis

需要进一步确定适合该中成药的 DNA 提取方法, 或该中成药中是否足量投药。中成药熊胆痔灵栓、藿胆片、安脑丸、熊胆救心丸、痔疮片均能检出明亮条带, 表明该方法适用于这些中成药的鉴别。



M. DL2000 Marker; 1. 胆乐胶囊; 2. 康妇消炎栓; 3. 新癍片; 4. 鼻炎康片; 5. 熊胆痔灵栓; 6. 熊胆痔灵栓; 7. 藿胆片; 8. 安脑丸; 9. 熊胆救心丸; 10. 藿胆丸; 11. 藿胆丸; 12. 藿胆丸; 13. 茵胆平肝胶囊; 14. 珍黄胶囊; 15. 珍黄胶囊; 16. 护肝片; 17. 护肝片; 18. 护肝胶囊; 19. 护肝胶囊; 20. 护肝胶囊; 21. 痔疮片; 22. 复方珍珠暗疮片; 23. 猪胆粉对照药材; 24. 阴性对照

图 5 含猪胆粉中成药特异性 PCR 鉴别

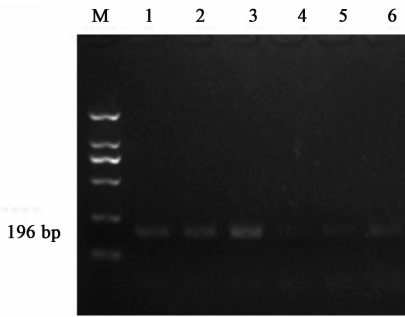
Fig. 5 Specific PCR identification of Chinese patent medicines containing Suis Fellis Pulvis

3.4 猪胆粉的酶切验证 猪源性成分 DNA 经 *PidF* 和 *PidR* 扩增后, PCR 产物含 *Mnl I* 内切酶的识别位点, 可被酶切为 196 bp 片段。为了进一步验证鉴别结果的准确性, 将猪胆粉对照品及 PCR 扩增的猪胆粉药材阳性产物经 *Mnl I* 酶切后均能产生约 200 bp 的条带 (图 6)。

3.5 序列测定 将测序结果利用 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 结果显示, 猪胆粉及其中成药中扩增产物序列与 GenBank 数据库中相似性最高的物种为 *Sus scrofa* (即猪 *S. scrofa domestica*^[7]), 其序列一致性为 99% (Genbank 登录号 KY964306. 1), 与猪的序列高度一致。表明市售的 5 批猪胆粉和其中 10 批中成药中含有猪源性成分。

4 结论与讨论

本研究建立了猪胆粉及含猪胆粉中成药的特异



M. DL 2000 DNA Marker; 1 ~ 5. 猪胆粉药材 (批号分别为 20180905005, 20180905006, 20180905007, 20180905009, 20180905018); 6. 猪胆粉对照药材

图 6 *Mnl* I 限制性内切酶酶切

Fig. 6 *Mnl* I restriction endonuclease digestion results

性 PCR 鉴别方法,在猪胆粉对照药材和自制猪胆粉药材中均能扩出 212 bp 的特异性鉴别条带,牛、羊参用品均无条带。使用建立的方法检测市售的猪胆粉及含猪胆粉的中成药,结果仅 5 批药材和 10 批中成药中能检出猪源性成分,表明市场猪胆粉药材基原混乱,中成药中可能存在掺伪、掺假或没有投料或投料不足等问题,为用药安全提出了警示。

猪胆粉作为一种古老而传统的来源于动物的中药,活性明确、疗效确切、药材资源十分丰富,然而在定性鉴别方面方法比较单一^[8]。本研究建立的猪胆粉及含猪胆粉中成药的特异性 PCR 鉴别方法,为猪胆粉及中成药的鉴别提供了新的技术支持。也为动物药的鉴别提供借鉴,说明 DNA 分子鉴定技术不仅能对无形的动物药材整体及破碎部分器官组织进行准确的鉴定,而且还可以对以动物粉末、体液、分泌物和排泄物入药的生药及制剂进行有效的真伪鉴定^[9]。

中成药中原料药材的 DNA 提取是中成药鉴别的基础。中成药的组成复杂,大部分中成药为多种药材混合加工而成,制剂形式多样、原药材入药的形式多样,多含有各种辅料,导致其质量控制难度大,掺伪、混伪现象也更为严重,如何鉴定成药中原料药材来源一直是中药鉴定领域中的难点问题^[10-12]。本研究对多种 DNA 提取试剂盒及经典 CTAB 法, SDS 法进行了测试,筛出了最适 DNA 提取方法,发

现基于 SDS 的柱式 DNA 提取方法能从猪胆粉样品中提出高质量 DNA,该方法也为牛黄、蛇胆、熊胆粉等其他动物分泌物 DNA 提取提供了借鉴。

[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,2015:139.

[2] 石岩,耿颖,郑天骄,等. 猪胆粉 HPLC-ELSD 全轮廓谱图主要胆汁酸测定及化学计量学分析[J]. 药物分析杂志,2017,37(2):283-289.

[3] 黄璐琦,袁媛,袁庆军,等. 中药分子鉴定发展中的若干问题探讨[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3663-3667.

[4] 杨晶凡,蒋超,袁媛,等. 快速 PCR 方法在山药真伪鉴别中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(22):45-49.

[5] 吴桂凡,张文娟,程显隆,等. 特异性 PCR 方法鉴别蛇胆汁及其伪品[J]. 中国中药杂志,2018,43(10):2053-2056.

[6] Kwon K R, Baek S I, Choi S H. Identification of Fel ursi and Cattle and Pig Bile Juices by species-specific PCR and PCR-RFLP[J]. J Pharmacopunct, 2009, 12(1):13-20.

[7] 蒋超,黄璐琦,袁媛,等. 《中国药典》动物药材基原物种中文名和拉丁学名引证规范[J]. 中国科学:生命科学,2018,48(7):772-782.

[8] 石岩,魏锋,马双成. 猪胆药用研究进展及质量控制概况[J]. 中国中药杂志,2018,43(4):637-644.

[9] 黄璐琦,唐仕欢,李军德,等. 动物药材分子鉴定研究策略[J]. 中国中药杂志,2011,36(3):234-236.

[10] 陈蓉,吴成丽,邓赟,等. DNA 分子鉴定技术在中成药真伪性鉴别中的应用与研究进展[J]. 中药与临床,2016,7(2):83-86.

[11] 崔占虎,龙平,王颖莉,等. DNA 分子标记技术在中成药鉴定中的应用与展望[J]. 中药材,2015,38(1):188-192.

[12] 苟惠,王译伟,郑茜,等. 含当归中成药的 DNA 提取及其分子鉴定[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(1):44-50.

[责任编辑 顾雪竹]