

PCR-RFLP鉴别当归药材及饮片中掺混伪品——欧当归的方法

史中飞, 滕宝霞*, 赖晶, 倪琳, 宋平顺

(甘肃省药品检验研究院 国家中药材及饮片质量控制重点实验室, 甘肃省中藏药检验检测技术
工程实验室, 兰州 730000)

[摘要] 目的: 该研究拟通过限制性片段长度多态性聚合酶链反应方法(PCR-RFLP)建立一种能快速鉴别当归药材及饮片中掺伪欧当归的方法。方法: 通过比对当归和欧当归的核糖体DNA内转录间隔区(ITS)序列酶切位点, 选择欧当归的特异性酶切位点Fnu4H I, 并设计PCR-RFLP反应引物, 对影响PCR-RFLP反应的退火温度、引物浓度、循环数和酶切时间等条件进行优化, 并对该方法的准确性进行了考察。另外, 利用建立的PCR-RFLP鉴别方法对掺伪不同比例和不同来源的当归掺伪样品进行了适用性考察。结果: 建立了当归药材及饮片中掺伪欧当归的PCR-RFLP鉴别方法, 在退火温度63℃, 循环数为30时, 掺有欧当归的当归样品经过特异性引物扩增后, 能被Fnu4H I限制性内切酶酶切, 在100~500 bp检出2条单一DNA条带, 当归样品则无此条带。该方法对当归中掺入欧当归的检出限为3%, 可用于日常当归中掺混欧当归的检测。结论: 建立的PCR-RFLP鉴别方法能够灵敏、准确地检测当归药材及饮片中是否掺有欧当归, 可为当归的质量控制提供检验依据, 以保障其临床用药安全。

[关键词] 当归; 欧当归; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法; 掺伪鉴别

[中图分类号] R284.2; R289; R22; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)09-0168-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20210514

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210222.0935.001.html>

[网络出版日期] 2021-2-22 9:56

Identification of *Levisticum officinale* Adulterated in *Angelica sinensis* by PCR-RFLP

SHI Zhong-fei, TENG Bao-xia*, LAI Jing, NI Lin, SONG Ping-shun

(NMPA Key Laboratory for Quality Control of Traditional Chinese Medicine and Prepared Slices, Gansu Institute for Drug Control, Gansu Engineering Laboratory for Chinese and Tibetan Medicine Control Technology, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a rapid method to identify *Levisticum officinale* adulterated in *Angelica sinensis* by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Method:** By comparing sequences restriction sites in ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer(ITS) of *A. sinensis* and *L. officinale*, the specific restriction site Fnu4HI of *L. officinale* was selected, and the primers for PCR-RFLP reaction were designed. Different *A. sinensis* and *L. officinale* were amplified by PCR. The conditions affecting the PCR-RFLP reaction, such as annealing temperature, primer concentration, cycle number and enzyme digestion reaction time, were optimized, and the accuracy of the method was investigated. The established PCR-RFLP identification method was used to investigate the applicability of *L. officinale* adulterated in *A. sinensis* with different adulteration ratios and different origins. **Result:** A PCR-RFLP method for identifying *A. sinensis* mixed with *L. officinale* was established. When the annealing temperature was 62℃ and the number

[收稿日期] 20201123(022)

[基金项目] 甘肃省药品监督管理局药品科研项目(2020GSMPA024, 2020GSMPA-KL09); 国家重点研发计划“中医药现代化研究”重点专项(2019YFC1711500)

[第一作者] 史中飞, 硕士, 检验员, 从事分子生药学鉴定工作, E-mail: zhongfeishi@126.com

[通信作者] * 滕宝霞, 主任药师, 从事药品检验和相关方法研究工作, E-mail: Tengbx66@163.com

of cycles was 30, when the *L. officinale* adulterated in *A. sinensis* could be digested by Fnu4H I restriction endonuclease after amplification with specific primers, and the two single DNA bands were detected between 100-500 bp, the *A. sinensis* were all negative. The minimum detection limit of this method for adulterated *L. officinale* in *A. sinensis* was 3%, which could be used for the detection of adulterated *L. officinale* in *A. sinensis*. **Conclusion:** The established PCR-RFLP identification method is sensitive and accurate in detecting whether there is *L. officinale* in *A. sinensis*, and it provides inspection reference and basis for the quality control of *A. sinensis*, with great significance to ensure the safety of its clinical medication.

[Key words] *Angelica sinensis*; *Levisticum officinale*; polymerase chain reaction -restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP); admixture identification

中药当归为伞形科植物当归 *Angelica sinensis* 的干燥根,具有活血补血、调经止痛、润肠通便的功效^[1]。欧当归为伞形科植物欧当归 *Levisticum officinale* 的干燥根,具有为通经止痛,发汗利尿的功效^[2]。两者在植物基源上相近,但由于欧当归气味及功效与当归不同,在临床应用上不可混用^[3]。由于欧当归具有栽培容易,生长期短,所以在我国部分地区仍有种植^[4]。在市场中出现以欧当归药材或饮片充当当归或当归饮片以及掺杂混用的现象,这会严重影响人民群众用药安全。

传统的中药材及饮片鉴别主要依靠性状鉴别、显微鉴别和理化方法,由于这些传统技术受制于检验人员的专业知识和从业人员经验,主观判断存在很大的局限性,而当归和欧当归形态相似,化学成分相近,很难用传统的鉴别方法对其进行鉴别,在加工成饮片后,更难对其当归中掺混的欧当归进行鉴别。近年来,随着DNA分子遗传标记技术不断发展和广泛的应用,弥补了传统中药材鉴别的不足^[5-6]。近年来在《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)几种中药材出现了限制性片段长度多态性聚合酶链反应方法(PCR-RFLP)的鉴别方法,该方法具有特异性高、简单、稳定性好等特点,能满足药品质量控制实践的需要^[7-9]。目前,已有学者利用PCR-RFLP技术对药用植物束花石斛、流苏石斛、鹿血、紫草等进行鉴别研究^[10-12],未见当归药材及饮片中掺伪欧当归的方法研究。本研究通过对当归和欧当归 ITS 序列酶切位点进行比对分析,设计 PCR-RFLP 反应引物,选择欧当归的特异性限制酶进行切割,使欧当归或掺有欧当归的样品出现特异性条带,而当归无特异性条带进行鉴别,建立 PCR-RFLP 鉴别当归药材及饮片中掺伪欧当归的方法。

1 材料

Dry Block Heater2 型恒温金属浴(德国艾卡公司); Veriti 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司);

SureCycler 8800 型 PCR 扩增仪(安捷伦公司); NanoDrop One 型微量核酸定量仪(赛默飞世尔有限公司); Sub-Cell GT 型琼脂糖凝胶电泳仪(美国伯乐公司); GelDoc-It2 型凝胶成像系统(斯柏贸易(北京)有限公司)。rTaq DNA 聚合酶, Taq Plus DNA 聚合酶, D2000 DNA Marker, Marker I [天根生化科技(北京)有限公司,批号分别为 ET101, ET105, MD114, MD101]; Fnu4H I 限制性内切酶(New England Biolabs 公司,批号 R0178L); 琼脂糖(Invitrogen 公司,批号 75510-019); GelRed(Biotium 公司,批号 41003); 其他相关试剂均为分子生物学级别,购自天根生化科技(北京)有限公司。本研究中所有的当归与欧当归样品均由甘肃省药品检验研究院宋平顺总检验师收集并鉴定,样品信息见表 1。当归对照药材(批号 120927-201617)购于中国食品药品检定研究院,欧当归参照药材由甘肃省药品检验研究院宋平顺总检验师鉴定提供。美国国立生物技术信息中心(NCBI)下载序列见表 2。

2 方法

2.1 基因组总 DNA 的提取 取当归样品约 20 g,用 75% 乙醇消毒,再用灭菌超纯水冲洗,晾干表面水分,粉碎成细粉,过 3 号筛,取粉末 30 mg 置于 1.5 mL 离心管中,用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根 DP305)按照说明提取基因组 DNA;另取当归对照药材 30 mg,同法制成对照药材模板 DNA 溶液。取不同样品 DNA,用 NanoDrop One 微量核酸定量仪测定模板 DNA 浓度和质量。

2.2 酶切位点的选择和 PCR-RFLP 反应扩增引物设计 利用 NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>)在线对 GenBank 数据库及测序的当归和欧当归的 ITS 序列酶切位点进行比对分析,选择欧当归的特异性酶切位点,并用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR-RFLP 反应鉴别引物 Lo-F, Lo-R, 引物序列及扩增程序见表 3。

表 1 当归及欧当归样品信息

Table 1 Information of *Angelica sinensis* and *Levisticum officinale* samples

样品编号	名称	拉丁名称	来源
As-1	当归	<i>Angelica sinensis</i>	甘肃岷县清水镇沟力堡村
As-2	当归	<i>A. sinensis</i>	云南省鹤庆县草海镇
As-3	当归	<i>A. sinensis</i>	甘肃岷县岷县麻子川镇岭峰村
As-4	当归	<i>A. sinensis</i>	甘肃漳县尾桥镇竹林村
As-5	当归	<i>A. sinensis</i>	甘肃渭源县上湾镇上湾村
As-6	当归	<i>A. sinensis</i>	甘肃宕昌县阿坞镇
As-7	当归	<i>A. sinensis</i>	甘肃武都区马营镇梁楞坎村
As-8	当归	<i>A. sinensis</i>	云南省鹤庆县草海镇新峰村
As-9	当归	<i>A. sinensis</i>	云南省丽江市古城区龙山乡
As-10	当归	<i>A. sinensis</i>	四川省平武县泗海乡
As-11	当归	<i>A. sinensis</i>	青海省互助县五峰乡扎塔尔村
As-12	当归	<i>A. sinensis</i>	青海省互助县五峰乡海子村
Lo-1	欧当归	<i>Levisticum officinale</i>	甘肃临洮县
Lo-2	欧当归	<i>L. officinale</i>	甘肃宕昌县
Lo-3	欧当归	<i>L. officinale</i>	甘肃嘉峪关市
Lo-4	欧当归	<i>L. officinale</i>	甘肃宕昌县
Lo-5	欧当归	<i>L. officinale</i>	甘肃临洮县
Lo-6	欧当归	<i>L. officinale</i>	甘肃宕昌县
Lo-7	欧当归	<i>L. officinale</i>	甘肃陇西县
Lo-8	欧当归	<i>L. officinale</i>	甘肃玉门市
GS2020YW00129	当归饮片	<i>A. sinensis</i>	甘肃陇西药材市场
GS2020YW00130	当归饮片	<i>A. sinensis</i>	甘肃临洮药材市场
GS2020YW00131	当归饮片	<i>A. sinensis</i>	甘肃岷县药材市场

表 2 当归和欧当归 ITS 的 GenBank 序列信息

Table 2 GenBank sequence Information of ITS from *A. sinensis* and *L. officinale*

名称	拉丁名称	基因登录号
当归	<i>A. sinensis</i>	FJ204235, GU289653, AY277247, KJ999447, KJ999482, KJ999457, KJ999526, AF393784, DQ263570, FJ572042, GU395144, JX022936, GU289658, GU289656, EU591999, JN704872, KF725039, KU853483, MH807960
欧当归	<i>L. officinale</i>	AF077899, GU395146, KC812809, KU853643, KT944674, KT944673, KT944672, KT944671, KJ999469, KJ999466, MG218304

表 3 PCR-RFLP 反应扩增引物 Lo 及 PCR 反应条件

Table 3 PCR-RFLP primers and PCR reaction conditions

序列(5'-3')	PCR 反应条件
上游 ACGACCCGCTAACATGTA	94 °C 预变性 3 min; 30 个循环
下游 ATTCGCGCGACAAGACAT	(94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s); 72 °C 延伸 5 min; 4 °C +∞

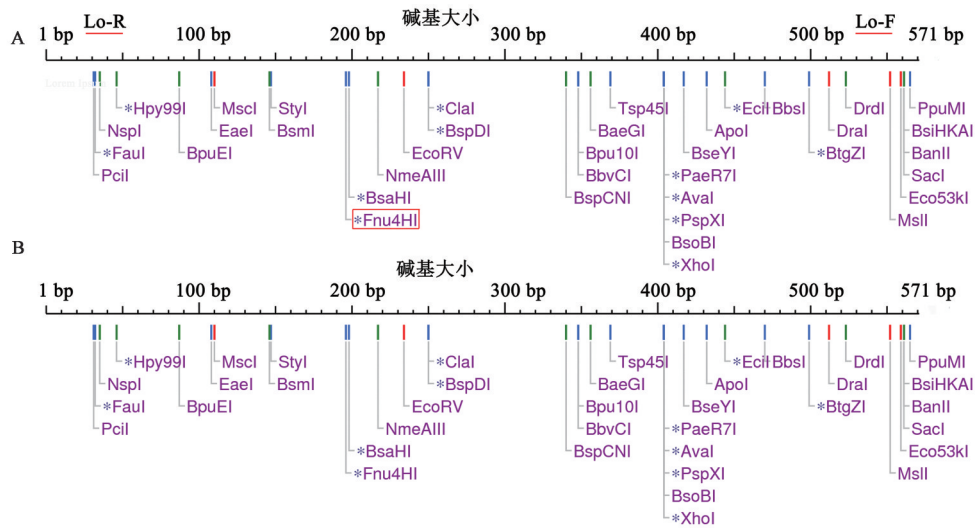
2.3 当归药材及饮片中掺假欧当归 PCR-RFLP 反应鉴别 样品按照 2.1 项下的方法提取基因组 DNA 后,进行 PCR-RFLP 反应,PCR 反应体系(总体积为 25 μL)组成:10 \times Taq Plus Buffer 2.5 μL , dNTPs (2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL ,引物 Lo 上游(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 0.5 μL ,引物 Lo 下游(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)0.5 μL , Taq Plus DNA 聚合酶(2.5 U)0.5 μL , DNA 模板 1 μL ,灭菌 ddH₂O 补足至 25 μL 。反应结束后取 PCR 反应液,置于 200 μL PCR 管中,进行酶切反应,反应总体积 20 μL ,反应体系包括 10 \times NE Buffer 2 μL ,PCR 反应液 10 μL ,Fnu4H I (10 U)0.4 μL ,无菌 ddH₂O 补足至 20 μL ,酶切反应在 37 °C 水浴反应 1 h。另取无菌 ddH₂O,同法上述 PCR-RFLP 反应操作,作为空白对照。反应结束后,取酶切产物 8 μL ,用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,然后利用凝胶成像分析仪拍照分析。若供试品凝胶电泳图谱中,在与欧当归参照药材凝胶电泳图谱相应位置上,在 100~500 bp 检

出两条单一 DNA 条带,则样品掺有欧当归。

3 结果与分析

3.1 酶切位点选择和 PCR-RFLP 反应扩增引物设计 在线对 GenBank 数据库及测序的当归和欧当归 ITS 序列酶切位点进行比对分析,结果见图 1。欧当归 ITS 序列在 1~571 bp,在第 198 位和第 406 位存在 Fnu4H I 和 Xho I 两个特异性酶切位点,而当归没有此酶切位点。由于 Fnu4H I 酶切位点 GC[^]NGC 中欧当归和当归存在两个碱基的差异,而 Xho I 酶

切位点 C[^]TCGAG 中欧当归与当归只存在一个碱基的差异,所以本方法选择欧当归的特异性酶切位点 Fnu4H I,并用 Primer Premier 5.0 软件设计 PCR-RFLP 反应引物 Lo-F,Lo-R 见图 1,引物序列见表 3。当归和欧当归经 Lo-F,Lo-R 引物扩增后均得到大小为 522 bp 的特异性条带,欧当归经 Fnu4H I 限制性内切酶酶切后得到两条大小分别为 178 bp 和 345 bp 的特异性 DNA 条带,而当归则不能被 Fnu4H I 限制性内切酶酶切。



A. 欧当归 ITS 序列酶切位点;B. 当归 ITS 序列酶切位点

图 1 当归和欧当归 ITS 序列酶切位点分析

Fig. 1 Restriction endonucleases analysis on ITS sequence of *A. sinensis* and *L. officinale*

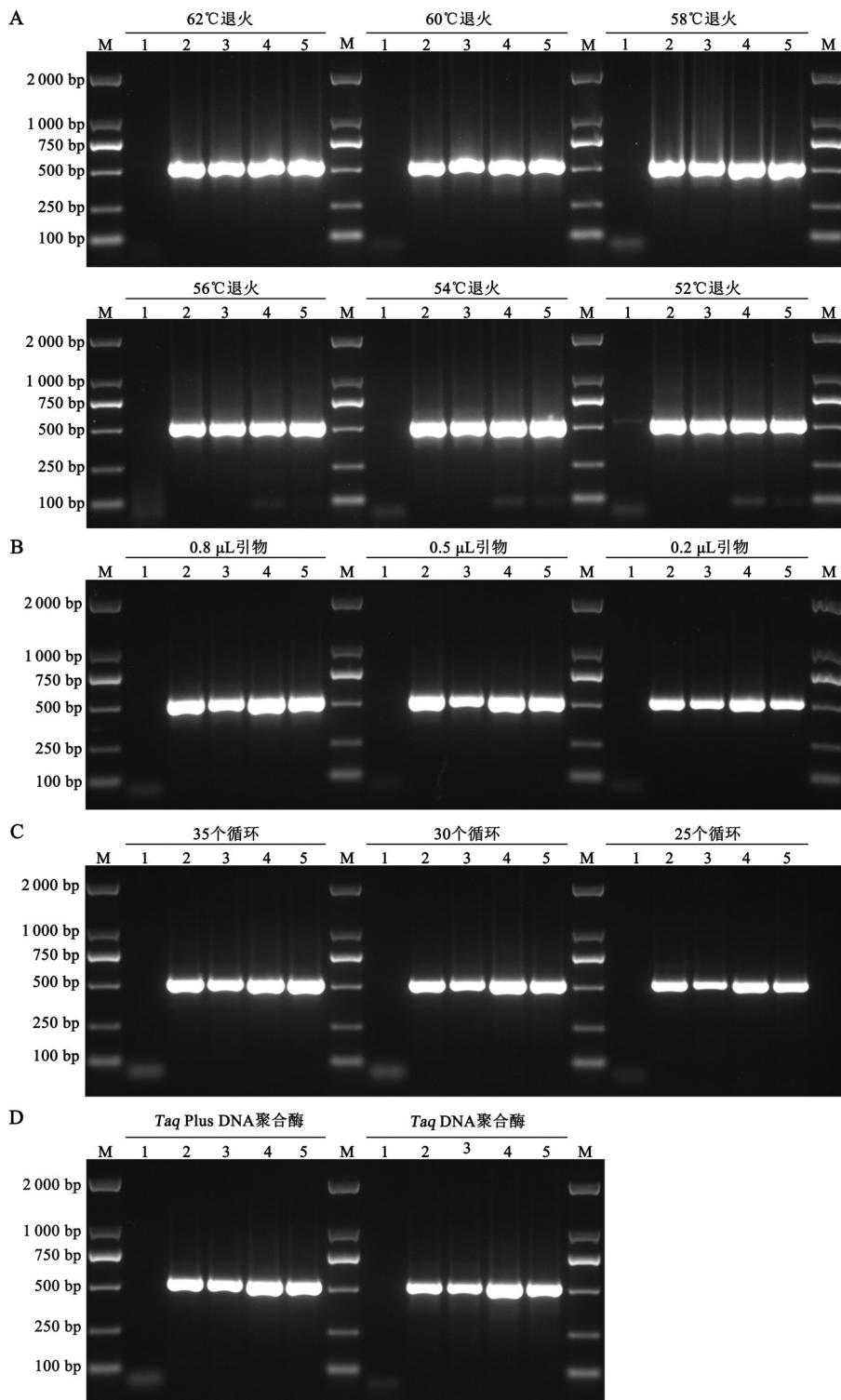
3.2 PCR-RFLP 反应条件的优化

3.2.1 PCR 反应条件的优化 本方法选取不同产地的欧当归和当归样品各 2 份,对 PCR-RFLP 反应中影响最大的退火温度、引物浓度、循环次数和 PCR 反应酶类型进行考察,用 1.0% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。实验结果表明,退火温度在 52~54 °C 时,空白对照出现了非特异性扩增,但退火温度在 56~62 °C 时,空白对照均未出现非特异性扩增,且欧当归和当归条带单一,扩增效率高,见图 2A;由于退火温度越高,PCR 扩增的特异性越高,所以本方法选取 62 °C 做为该反应的退火温度。加入 Lo-F 和 Lo-R 扩增引物(10 μmol·L⁻¹)分别为 0.2,0.5,0.8 μL 时,PCR 扩增均未出现非特异性扩增,且欧当归和当归条带单一,扩增效率高,见图 2B;由于扩增效率随着引物浓度的增加而增加,而较高的引物浓度会引起非特异性扩增,所以本方法选择加入 Lo-F 和 Lo-R 鉴别引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.5 μL。循环数为 35 时,欧当归和当归样品出现了非特异性扩增,但循环数在 25 和 30 时,欧当归和当归样品均未出现

非特异性扩增,见图 2C,但循环数为 25 时,PCR 扩增效率较低,不利于 PCR-RFLP 反应检测,所以本方法选择 PCR 循环数为 30。

本方法在普通 *Taq* DNA 聚合酶(天根公司)的基础上,用高保真的 *Taq* Plus DNA 聚合酶(天根)进行了实验,结果显示用高保真的 *Taq* Plus DNA 聚合酶进行 PCR 扩增时,欧当归和当归的扩增条带单一,无非特异性扩增出现,扩增效率高于普通的 *Taq* DNA 聚合酶,表明该方法建立的 PCR 反应不受 PCR 反应酶类型的影响,但是 *Taq* Plus DNA 聚合酶的扩增效率和效果高于普通 *Taq* DNA 聚合酶,见图 2D,所以该方法选择高保真 *Taq* Plus DNA 聚合酶作为该方法 PCR 反应的扩增酶。

3.2.2 不同类型 PCR 扩增仪的考察 本方法对不同产地的 2 份欧当归和当归样品,用 Applied Biosystems Veriti PCR 扩增仪和安捷伦的 SureCycler 8800 PCR 扩增仪进行 PCR 扩增,并用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,见图 3。所有样品均在 500~750 bp 扩增出一条特异性 DNA 条带,表



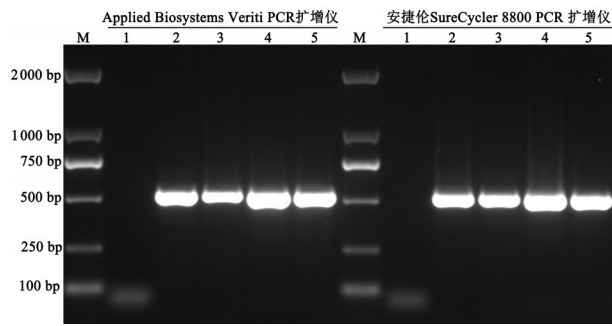
A. 退火温度; B. 引物量; C. 循环数; D. *Taq* DNA 聚合酶类型; M. D2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2. Lo-1; 3. Lo-2; 4. As-1; 5. As-2
图2 不同因素对PCR反应的影响

Fig. 2 Effect of different influence factors on PCR reaction

明2.3项建立的PCR反应体系和程序不受PCR扩增仪类型的限制。

3.2.3 限制性内切酶酶切反应体系的优化 PCR-RFLP反应除了受PCR反应体系的影响,同时也受

到酶切反应时间,PCR产物量等的影响,因此本研究对酶切反应时间、酶切体系中加入PCR产物的量进行了考察,结果见图4。酶切时间分别为15,30,60 min时,欧当归样品均能完全被Fnu4H I 酶酶切,

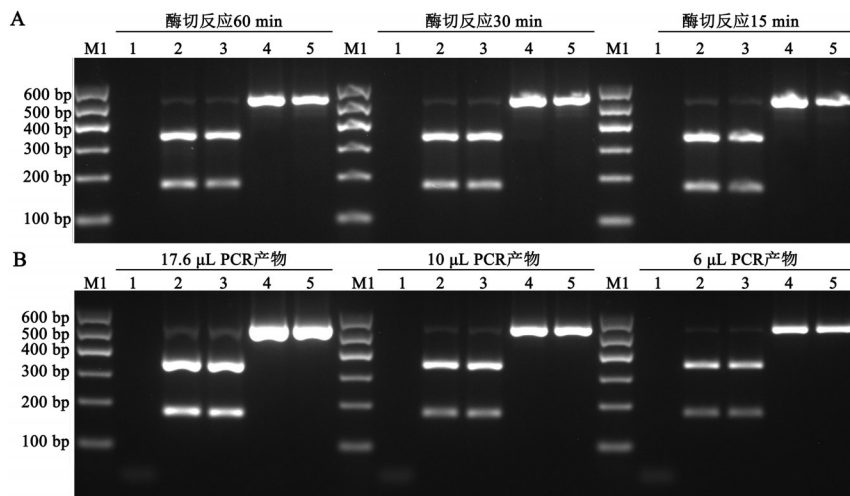


M.D2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2.Lo-1; 3.Lo-2; 4.As-1; 5.As-2

图3 不同PCR扩增仪对PCR反应的影响

Fig. 3 Effect of different PCR Instrument on PCR reaction

在100~500 bp 检出两条单一 DNA 条带, 见图4A。酶切体系(20 μ L)中加入PCR产物分别为17.6, 10, 6 μ L时, 欧当归样品在100~500 bp 均能检出两条单一的DNA条带, 且条带亮度随着加入PCR产物量的降低而降低, 见图4B。根据2015年版《中国药典》四部通则1001聚合酶链式反应法4测定法中, 反应产物检测中酶切反应总体积一般为20 μ L, 加入PCR扩增产物一般为5~10 μ L, 快速限制性内切酶的反应时间不得超过1 h的相关要求, 所以本方法选择加入PCR扩增产物的量为10 μ L, 选择酶切时间为60 min。



A. 酶切反应时间; B. 加入PCR产物量; M1. Marker I; 1. 空白对照; 2.Lo-1; 3.Lo-2; 4.As-1; 5.As-2

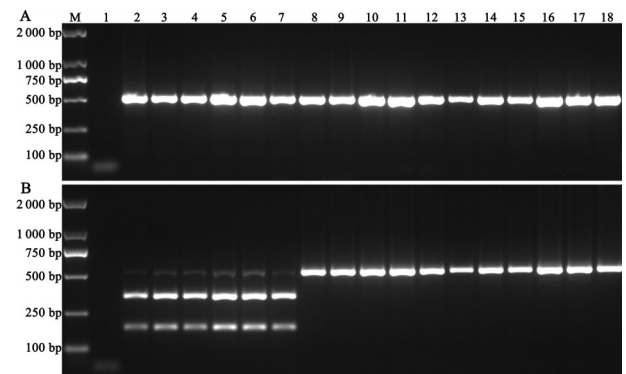
图4 不同因素对酶切反应的影响

Fig. 4 Effect of different factors on restriction endonuclease digestion

3.3 方法学的考察

3.3.1 适用性的考察 为了考查该方法的适用性, 使用建立的方法对6份不同产地的欧当归、当归对照药材和10份不同产地的当归样品进行PCR-RFLP反应鉴别, 结果见图5。所有样品经过PCR扩增后, 在500~750 bp 均扩增出一条单一的DNA条带, 见图5A, 经过Fnu4H I 限制性内切酶酶切后, 6份欧当归样品在100~500 bp 均检出2条单一的DNA条带, 当归对照药材和10份当归样品在100~500 bp 均未检出两条单一DNA条带, 见图5B, 表明该方法对欧当归具有特异性。

3.3.2 专属性验证 在同一批当归中分别掺入同一批次0%, 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 30%, 50%, 80%, 100%的欧当归样品进行PCR-RFLP反应鉴别, 结果见图6。当归对照药材和掺入比例为0%的样品, 只在500~750 bp 检出一条单一DNA条带, 在100~500 bp 均未检出两条单一的DNA条带; 当归中掺入1%



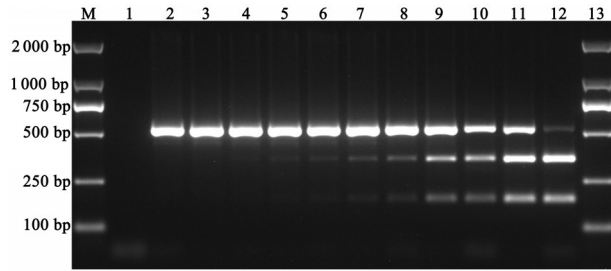
A. PCR 扩增产物; B. Fnu4H I 限制性内切酶酶切产物; M. D2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2.Lo-3; 3.Lo-4; 4.Lo-5; 5.Lo-6; 6.Lo-7; 7.Lo-8; 8. 当归对照药材; 9.As-3; 10.As-4; 11.As-5; 12.As-6; 13.As-7; 14.As-8; 15.As-9; 16.As-10; 17.As-11; 18.As-12

图5 不同产地欧当归和当归样品PCR-RFLP反应检测

Fig. 5 Results on PCR-RFLP reaction of *A. sinensis* and *L. officinale* samples from different areas

和2%的欧当归时, 在100~500 bp 检出2条很淡的单一DNA条带; 但当归中掺入3%以上的欧当归时,

所有样品均在100~500 bp 检出2条单一的DNA条带。



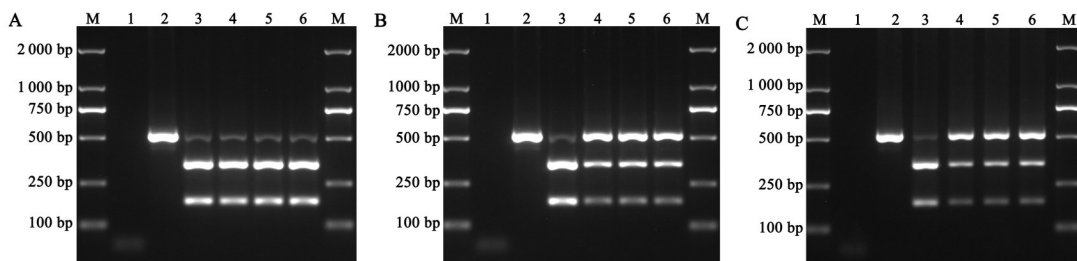
M.D2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2. 当归对照药材; 3.0%; 4.1%; 5.2%; 6.3%; 7.5%; 8.10%; 9.30%; 10.50%; 11.80%; 12.100%

图6 同一批次当归中掺入同一批次不同比例的欧当归样品PCR-RFLP反应检测

Fig. 6 Detection limit of one mixed with other one species by PCR-RFLP

在不同批次当归中分别掺入不同批次的50%欧当归,进行PCR-RFLP反应鉴别,结果见图7。掺假不同批次50%欧当归的当归样品均在100~500 bp 检出2条单一的DNA条带。以上结果表明该条带具有专属性,该研究建立的方法可以用于日常当归掺伪欧当归的检查。

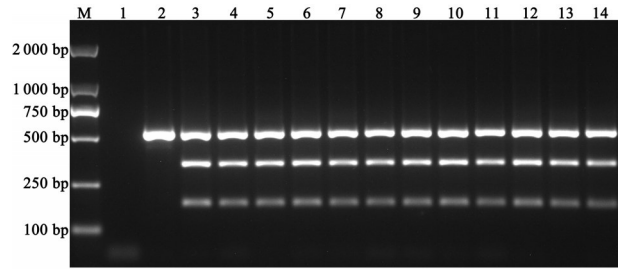
3.3.3 掺伪检品的验证 对药材市场中收集到的3批掺伪当归饮片样品按照本方法建立的当归药材及饮片中掺伪欧当归检查的方法进行检查,结果见图8,当归饮片1凝胶电泳图谱中,在与欧当归参照药材凝胶电泳图谱相应位置上,在100~500 bp 检出两条单一的DNA条带,且检查结果与欧当归参照药材一致(图8A),则当归饮片1为欧当归饮片;当归饮片2和当归饮片3凝胶电泳图谱中,在与欧当归参照药材凝胶电泳图谱相应位置上,在100~500 bp 检出2条单一DNA条带,见图8B,C,则当归饮片2和当归饮片3为掺有欧当归的当归饮片。



A. 当归饮片1(GS2020YW00129); B. 当归饮片2(GS2020YW00130); C. 当归饮片3(GS2020YW00131); M.D2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2. 当归对照药材; 3. 欧当归参照药材; 4. 平行样品1; 5. 平行样品2; 6. 平行样品3

图8 市场中3批当归样品PCR-RFLP反应检测

Fig. 8 PCR-RFLP reaction test results of three batches *A. sinensis* samples in market



M.D2000 DNA Marker; 1. 空白对照; 2. 当归对照药材; 3.Lo-1掺入As-3; 4.Lo-1掺入As-4; 5.Lo-2掺入As-5; 6.Lo-2掺入As-7; 7.Lo-3掺入As-6; 8.Lo-3掺入As-9; 9.Lo-4掺入As-8; 10.Lo-4掺入As-11; 11.Lo-5掺入As-5; 12.Lo-5掺入As-10; 13.Lo-6掺入As-6; 14.Lo-6掺入As-12

图7 不同批次欧当归掺入不同批次当归50%样品PCR-RFLP反应

Fig. 7 Different batches *A. sinensis* mixed with different batches 50% *L. officinale* samples by PCR-RFLP

4 讨论

当归和欧当归均为2020年版《中国药典》收载的品种,两者在外观上很相似,但各自临床应用范围不同,在临床应用及药品生产中应仔细鉴别,不可混用。而在药材市场中存在以欧当归饮片冒充当归饮片或掺杂混用的现象,严重影响人民群众用药安全。温子帅等^[13]对当归和欧当归的定性定量鉴别研究,能利用基原、性状、显微、理化手段对当归与欧当归的药材与饮片进行定性和定量分析,但未能解决当归中掺伪欧当归的鉴别问题;辛天怡等^[14]的研究虽然基于ITS2条形码序列构建系统发育树,能将当归药材及其混伪品进行区分,但也不能解决当归药材及其饮片中掺有欧当归的鉴别问题。PCR-RFLP反应法具有简单、稳定、专属性强和反应灵敏等优势,在药用植物鉴定中发挥着关键作用。本研究通过对当归和欧当归ITS序列酶切位点进行比对分析,选择欧当归的特异性酶切位点Fnu4H I,并设计PCR-RFLP反应引物,建立了当归

药材及饮片中掺伪欧当归的检查方法。该方法简单、稳定。

PCR-RFLP反应常常受到PCR反应体系、反应条件以及酶切时间等的影响,其中,最重要的是退火温度、引物浓度和循环数,引物浓度与退火温度选择不好会造成非特异性扩增,出现假阳性^[15]。因此筛选出的最佳的PCR-RFLP反应条件是实现该方法准确、有效鉴别的首要前提。本研究对当归药材及饮片中掺伪欧当归的PCR-RFLP方法进行了各因素的优化实验和系统的考察,确定了PCR-RFLP方法检查当归药材及饮片中掺伪欧当归的最佳反应条件。同时,为了考察本方法准确性,对不同产地的欧当归和当归样品进行实验验证,结果发现欧当归均获得正确的阳性鉴别结果,当归均为阴性,表明该方法准确性好。在此基础上还对同一批当归中分别掺入同一批次不同比例的欧当归样品和不同批次当归中分别掺入不同批次50%的欧当归样品,进行适用性考查,结果表明该方法灵敏度高,稳定性好。同时本方法中所有的药材均经过严格的形态鉴定,当归和欧当归分类均与PCR-RFLP反应鉴别结果完全一致,进一步验证了该研究建立的当归药材及饮片中掺假欧当归鉴别的PCR-RFLP反应法可靠,可用于当归药材及饮片中掺假欧当归的鉴别,对于保障人民群众用药安全具有重要意义。

[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,2020:139.
- [2] 史巧霞,杨锡仓. 欧当归的合理开发与应用探讨[J]. 内蒙古中医药,2016,35(16):37.
- [3] 胡双丰. 欧当归不可代替中药当归药用[J]. 中国当代医药,2009,16(4):41-45.
- [4] 方洪钜,吕瑞绵,刘国声,等. 挥发油成分的研究——

II. 中国当归与欧当归主要成分的比较[J]. 药学报,1979(10):617-623.

- [5] 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.
- [6] 杨慧洁,杨世海,张淑丽,等. 药用植物DNA条形码研究进展[J]. 中草药,2014,45(18):2581-2587.
- [7] 梁宇庭,蒋超,周骏辉,等. 高卢蜜环菌PCR-RFLP快速鉴别方法研究[J]. 中国中药杂志,2019,44(17):3622-3626.
- [8] WANG C Z, LI P, DING J Y, et al. Identification of *Fritillaria pallidiflora* using diagnostic PCR and PCR-RFLP based on nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences[J]. *Planta Med*, 2005, 71(4):384-386.
- [9] WANG C Z, LI P, DING J Y, et al. Simultaneous identification of *Bulbus Fritillariae cirrhosae* using PCR-RFLP analysis[J]. *Phytomedicine*, 2006, 14(9):628-632.
- [10] 张婷,徐璐珊,王峥涛,等. 药用植物束花石斛、流苏石斛及其形态相似种的PCR-RFLP鉴别研究[J]. 药学报,2005,40(8):728-733.
- [11] 王凤霞,陈媛媛,任贵奇,等. 鹿血的PCR-RFLP鉴定研究[J]. 中草药,2018,49(8):1914-1918.
- [12] 李谦,刘杰,过立农,等. 基于ITS2序列的紫草PCR-RFLP鉴别研究[J]. 药物分析杂志,2016,36(9):1611-1617.
- [13] 温子帅,刘爱朋,景松松,等. 当归和欧当归的定性定量鉴别[J]. 中成药,2018,40(12):2719-2723.
- [14] 辛天怡,姚辉,韩建萍,等. 当归药材及其混伪品ITS2条形码鉴定[J]. 科研信息化技术与应用,2013,4(3):76-82.
- [15] 刘阳,杨淑霞,李敏惠,等. 引物浓度与退火温度不当导致巢式PCR非特异性扩增[J]. 成都医学院学报,2008(2):111-114.

[责任编辑 顾雪竹]