

质量分析

中成药中全蝎掺伪 DNA 分子鉴定*

段宝丽^{1,2}, 尤春雪^{2**}, 蒋超^{1**}

(1. 道地药材品质保障与资源持续利用全国重点实验室 中国中医科学院中药资源中心, 北京 100700;

2. 天津农学院 动物科学与动物医学学院 天津市农业动物繁育与健康养殖重点实验室, 天津 300392)

摘要 目的:建立有效检出中成药中细尖狼蝎成分的方法,检测获得中成药中全蝎掺伪情况。**方法:**收集《中华人民共和国药典》收录的 30 种含全蝎成分的中成药,提取 DNA,比对线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (CO I) 基因序列差异,分别设计全蝎源性和细尖狼蝎源性特异性鉴别引物并对退火温度、循环次数、Taq 酶以及 DNA 浓度进行优化,最终确定细尖狼蝎最适 PCR 鉴别条件包括退火温度 52 °C,循环数为 36, Taq 酶为 2 × PCR Mix, DNA 模板为 1 μL,通过建立的中成药中细尖狼蝎成分检出方法对市售 30 种中成药中全蝎投料情况进行鉴定。**结果:**经凝胶电泳检测,30 个全蝎成分中成药均检出正品东亚钳蝎特有 DNA 条带,18 种中成药(60%)在 100 ~ 250 bp 可见单一细尖狼蝎特异性 DNA 条带,空白对照无条带。对检出细尖狼蝎特异性条带的 PCR 产物进行 TA 克隆后测序,序列均与细尖狼蝎参考序列具有很高的相似性(92% ~ 98%),系统发育结果表明获得的序列均与细尖狼蝎为同一支系而与东亚钳蝎不同,因此在 120 bp 左右出现单一条带可鉴定为细尖狼蝎。**结论:**中成药中全蝎投料存在以细尖狼蝎掺伪全蝎投料的现象,需要加强监管。本研究建立的方法可以快速准确检出中成药中细尖狼蝎成分,有利于完善全蝎中成药的质量控制方法,为其临床应用提供保障。

关键词:中成药;全蝎;东亚钳蝎;细尖狼蝎;聚合酶链式反应;分子鉴定;TA 克隆;系统发育树

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)07 - 1267 - 09

doi: 10. 16155/j. 0254 - 1793. 2023 - 0482

Molecular DNA identification of adulteration in processed Chinese herbal medicine containing whole scorpions*

DUAN Bao - li^{1,2}, YOU Chun - xue^{2**}, JIANG Chao^{1**}

(1. State Key Laboratory for Quality Ensurance and Sustainable Use of Dao - di Herbs, National Resource Center for Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Tianjin Key Laboratory of Agricultural Animal Breeding and Healthy Husbandry, College of Animal Science and Veterinary Medicine, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300392, China)

Abstract Objective: To establish an effective method for detecting the components of *Lychas mucronatus* and investigating instances of adulteration with whole scorpions in Chinese patent medicines. **Methods:** Thirty Chinese patent medicines containing whole scorpion components, as documented in the Pharmacopoeia of the People's Republic of China, were collected. DNA was extracted, and differences in the mitochondrial cytochrome C

* 国家自然科学基金项目(83073972);中国中医科学院中药资源中心自主选题研究项目(ZZXT202212)

** 通信作者 尤春雪 Tel:17302270087;E-mail:youchunxue@mail.bnu.edu.cn

蒋超 Tel:15201185624;E-mail:jiangchao0411@126.com

第一作者 Tel:15822942460;E-mail:1658119464@qq.com

oxidase subunit I (CO I) gene sequences were compared. Specific primers for the identification of *Mesobuthus martensii* and *Lychas mucronatus* DNA were designed. Annealing temperature, cycle number, Taq polymerase, and DNA concentration were optimized to establish the most suitable PCR identification system and conditions. The optimal PCR conditions for distinguishing the sharp-tailed wolf scorpion were finally determined to be an annealing temperature of 52 °C, 36 cycles, 2 × PCR Mix Taq enzyme, and 1 μL of DNA template. The developed method was applied to identify the presence of *Centruroides gracilis* components in 30 commercially available Chinese patent medicines. **Results:** Gel electrophoresis revealed the presence of authentic DNA bands specific to the *Mesobuthus martensii* in all 30 whole scorpion-containing Chinese patent medicines. Eighteen medicines (60%) showed a single specific DNA band between 100–250 bp, indicative of *Lychas mucronatus*, while the blank control exhibited no bands. Sequencing of the PCR products containing the identified *Lychas mucronatus*-specific bands, after TA cloning, revealed sequences with high similarity (92%–98%) to the reference sequences of *Lychas mucronatus*. Phylogenetic analysis indicated that the obtained sequences belonged to the same lineage as *Lychas mucronatus* and were distinct from the *Mesobuthus martensii*. Therefore, the presence of a single band around 120 bp indicates the identification of *Lychas mucronatus*. **Conclusion:** The presence of *Lychas mucronatus* components mixed with authentic scorpion materials in Chinese patent medicines indicates a need for strengthened supervision. The method established in this study enables the rapid and accurate detection of *Lychas mucronatus* components in Chinese patent medicines. This is beneficial for improving the quality control of whole scorpion-containing Chinese patent medicines, providing assurance for their clinical applications.

Keywords: Chinese patent medicine; *Buthus martensii*; *Mesobuthus martensii*; *Lychas mucronatus*; polymerase chain reaction; molecular identification; TA clone; phylogenetic tree

中成药已失去绝大多数性状和显微鉴别特征,其投料基原的鉴定一直是中药鉴定的难点问题,尤其是含动物药材中成药的鉴定更是中药鉴定的瓶颈问题。全蝎是中成药中常用药味,基原为钳蝎科动物东亚钳蝎(*Buthus martensii* Karsch)的干燥体,具有息风镇痉、通络解毒、攻毒散结的功效^[1]。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)收录了35个含有全蝎药材的中成药处方。全蝎为有毒药材,主要毒性成分为毒囊蛋白^[2],其毒囊尺寸、蛋白含量及Na⁺/K⁺毒素肽等均优于其他蝎类^[3]。细尖狼蝎(*Lychas mucronatus* Fabricius)为钳蝎科狼蝎属物种,是东南亚地区钳蝎科的优势种,已通过合法或不合法手段流入我国药材市场^[4]。市场调查结果表明,超过30%的全蝎药材中存在混伪情况,混伪品均为细尖狼蝎^[5]。全蝎药材或饮片形态相对完整,易与混伪品区分,尤其是全蝎尾节只有1个毒齿,而细尖狼蝎具有明显的亚毒齿结构^[6];但对于已失去形态和显微鉴别特征的全蝎中成药,目前仍缺乏有效的真伪鉴别手段。目前全蝎中成药是否存在混伪风险不明,混伪比例不清。

DNA分子鉴定技术凭借其稳定准确、不受外观形态影响的特点,已逐步用于中药材、配方颗粒及中成药投料基原鉴定^[7-15]。为全面调研中成药中全蝎混伪情况,本研究收集了30个含全蝎成分中成药,并建立有效DNA分子鉴别方法。发现30个全蝎成分中成药均检出正品东亚钳蝎特有DNA条带,但其中18种中成药(60%)检出细尖狼蝎成分,表明目前中成药中全蝎存在较大混伪风险,需要加强监管。

1 材料

1.1 药材及中成药的来源

全蝎对照药材(中国食品药品检定研究院,批号121044-201104),细尖狼蝎药材经中国中医科学院蒋超副研究员鉴定(购自河南许昌,编号2207001W)。中成药购自不同药店,样品保存于天津农学院(表1)。

1.2 主要仪器

S1000™型PCR仪(BIO RAD公司);ChemiDO-CXRS+型凝胶成像仪(BIO RAD公司);AX224ZH/E型电子天平,感量0.0001g(奥豪斯仪器有限公司);ZSBB-712型恒温水槽(上海智城分析仪器制造有限公司);Blue pard®电热恒温培养箱(上海一恒

表1 含全蝎中成药

Tab. 1 Contains scorpion proprietary Chinese medicine

样品 序号 编号 (No.) (sample No.)	样品名称 (sample information)	全蝎成分比例 (proportion of scorpion composition)/%
1	23022701 小儿七珍丸(Xiaoer Qizhen pills)	18.87
2	23022702 小儿至宝丸(Xiaoer Zhibao pills)	3.62
3	23022703 小儿惊风七厘散(Xiaoer Jingfeng Qili powder)	25.29
4	23022704 止痛化癥片(Zhitong Huazheng tablets)	5.02
5	23022705 止痛化癥胶囊(Zhitong Huazheng capsules)	5.02
6	23022706 中风回春丸(Zhongfeng Huichun pills)	1.11
7	23022707 中风回春片(Zhongfeng Huichun tablets)	1.11
8	23022708 牛黄千金散(Niuhuang Qianjin powder)	12.99
9	23022709 牛黄镇惊丸(Niuhuang Zhenjing pills)	12.93
10	23022710 复方牵正膏(Fufang Qianzheng ointment)	10.64
11	23022711 再造丸(Zaizao pills)	18.12
12	23022713 脉络舒通丸(Mailuo Shutong pills)	2.41
13	23022714 脉络舒通颗粒(Mailuo Shutong granules)	2.42
14	23022715 活血壮筋丸(Huoxue Zhuangjin pills)	4.94
15	23022716 培元通脑胶囊(Peiyuan Tongnao capsules)	2.88
16	23022717 脑心通胶囊(Naoxintong capsules)	3.24
17	23022718 通痹片(Tongbi tablets)	1.42
18	23022719 通痹胶囊(Tongbi capsules)	1.42
19	23022720 医痫丸(Yixian pills)	2.46
20	23022722 麝香风湿胶囊(Shexiang Fengshi capsules)	3.27
21	23022723 麝香抗栓丸(Shexiang Kangshuan pills)	0.96
22	23022724 风湿马钱片(Fengshi Maqian tablets)	6.86
23	23022725 复方夏天无片(Fufang Xiatianwu tablets)	0.39
24	23022726 清眩治瘫丸(Qingxuan Zhitan pills)	1.14
25	23022727 腰痛宁胶囊(Yaotongning capsules)	6.8
26	23022728 中风再造丸(Zhongfeng Zaizao pills)	0.56
27	23022729 八宝惊风散(Babao Jingfeng powder)	2.03
28	23022730 醒脑再造胶囊-甲(Xingnao Zaizao capsules - Jia)	0.63
29	23022731 醒脑再造胶囊-乙(Xingnao Zaizao capsules - Yi)	0.63
30	23022732 人参再造丸(Renshen Zaizao pills)	1.95

科学仪器有限公司);新华牌 LMQ. C 型立式灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司);蛋白电泳转印系统(BIO RAD 公司);JY - SPGT 型电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司)。

1.3 试剂

Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega 生物公司,批号 A2361), 2 × T5 super Mix (擎科生物技术有限公司,批号 TSE005), 2 × MightyAmp

Taq(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 × I5 HifiTaq Mix(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), pTOPO - T 连接试剂盒(北京聚合美生物技术有限公司,批号 MF019), 大肠杆菌 DH5α 感受态细胞(北京聚合美生物技术有限公司,批号 MF038)。

2 方法与结果

2.1 DNA 提取

取市售中成药样品丸剂 0.1 g, 散剂、片剂和胶囊粉末 0.05 g, 膏药 1 cm²(除去盖衬,剪碎),用于 DNA 提取。使用 Wizard® SV Genomic DNA Purification System 试剂盒,依据说明书步骤进行操作,模板 DNA 溶液置 -20 °C 冰箱中保存备用。

2.2 引物设计

比对全蝎、细尖狼蝎及其伪品 CO I 序列,寻找细尖狼蝎差异位点,为保证设计出的引物能适用于细尖狼蝎原动物、药材及中成药,调整使预期扩增产物片段大小不超过 200 bp,差异 SNP 位点位于上游或下游引物 3' 末端。最终设计细尖狼蝎特异性 PCR 鉴别引物 XJ. F 5' - TCTGTTGATTTAACTATTTTCAG - 3', XJ. R 5' - AATAAAGGAAGCTCGCTCCAT - 3', 预期 PCR 产物长度约 120 bp, 见图 1。全蝎特异性 PCR 鉴别引物: QX. F 5' - GGAGATTGGAATACCTGGAG - 3' 和 QX. F 5' - GGAGCCACCACCATCAAC - 3', 预期 PCR 产物长度约 150 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

使用细尖狼蝎鉴别引物 XJ. F/R 对全蝎对照药材、细尖狼蝎药材及中成药 DNA 进行如下考察,①退火温度:50、52、54、56 °C;②PCR 循环数:34、36、38、40 个循环;③Taq 种类:2 × T5 super Mix, 2 × MightyAmp Taq, 2 × M5 PCR Mix 和 I5 Hifi Taq;④DNA 模板量:3、10、30、90 ng 对 PCR 鉴别结果稳定性的影响。筛选出最适鉴别条件,对中成药中细尖狼蝎进行位点特异性 PCR 鉴别。将 PCR 反应扩增得到的细尖狼蝎特异性 DNA 片段的产物与载体连接,连接产物转入 DH5α 感受态细胞中,进行克隆转化。使用全蝎对照药材、细尖狼蝎药材及上述中成药 DNA 进行扩增,初始 PCR 反应体系 25 μL(包含 2 × M5 PCR Mix 12.5 μL, 全蝎特异性引物 QX. F/R 各 0.25 μL, DNA 模板 1 μL, 双蒸灭菌水 11 μL)。

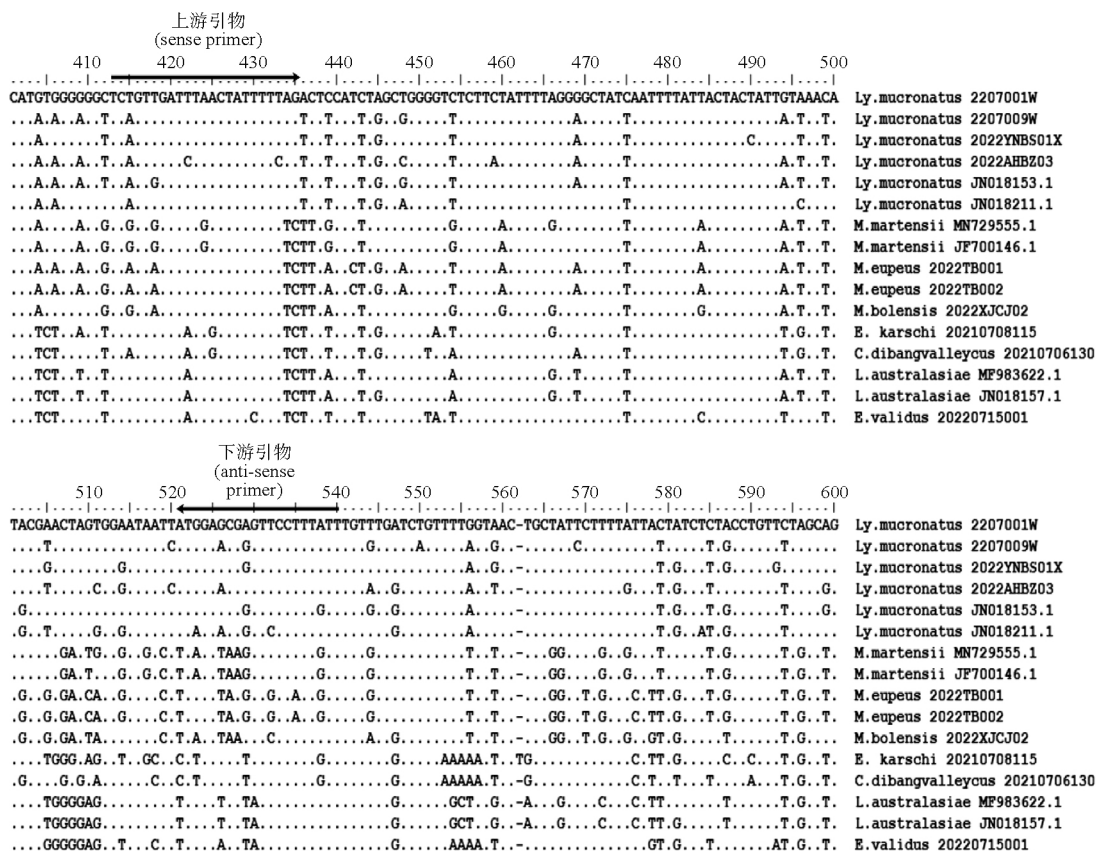


图 1 细尖狼蝎引物设计序列对比图

Fig. 1 Comparison diagram of the design sequence of the primer of the *Lychas mucronatus*

PCR 初始反应参数:95 °C 预变性 5 min, 循环反应 38 次(95 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s), 72 °C 延伸 5 min。PCR 反应结束后, 取反应产物 10 μL 点样于 GelRed 核酸染料染色的 1.5% 琼脂糖凝胶上, 190 V 电压条件下电泳 25 min, 置 BIO RAD 凝胶成像系统观测。

2.4 PCR 产物 TA 克隆

室温下建立 10 μL 体系(纯化后的 PCR 产物 4 μL, pTOPO-TA 1 μL, 10x Enhancer 1 μL, 灭菌水补齐), 室温连接 10 min, 转化到事先解冻的感受态细胞 100 μL 中, 加入连接液 5 μL 轻轻混匀, 室温放置 10 min, 加 LB 培养基(不含抗生素)800 μL, 37 °C 180 r · min⁻¹ 振荡培养 30 min; 为得到较多克隆, 3 000 r · min⁻¹ 离心 1 min, 吸弃掉部分上清, 保留 100 μL, 轻弹悬浮菌体, 取全部菌液涂板(含氨苄青霉素 100 μg · mL⁻¹), 过夜培养。

2.5 菌粒 PCR

挑取氨苄阳性平皿中单一菌落使用通用引物 M13F/M13R (M13. F 5' - GTAAACGACGGCCAG -

3', M13. R 5' - CAGGAAACAGCTATGAC - 3') 进行菌粒 PCR, 菌粒 PCR 反应体系包括 2 × M5 PCR Mix 12.5 μL, 通用引物 M13F/M13R (10 μmol · μL⁻¹) 各 0.25 μL, 单一菌粒 1 个, 无菌双蒸水补齐。PCR 反应参数:95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 52 °C 30 s, 72 °C 30 s; 72 °C 5 min; 4 °C 保存。PCR 产物进行电泳检测, 转化成功的 PCR 产物, 送北京华大基因进行一代测序。

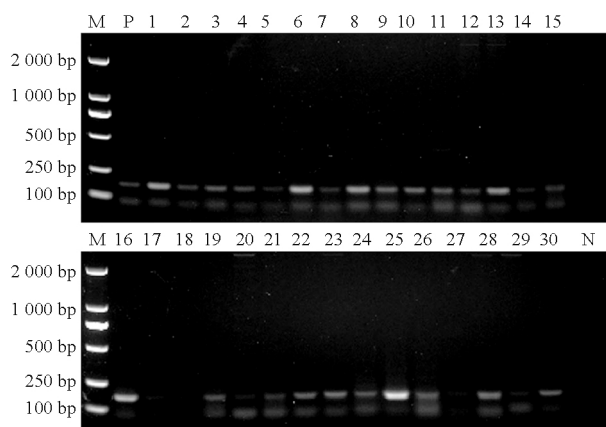
2.6 构建系统发育树

登录美国国家生物技术信息中心(National Center of Biotechnology Information, NCBI) 网站 Genbank 数据库中下载的蝎的序列(钳蝎科 Buthidae: 东亚钳蝎, 登录号为 MN729555.1、JF700146.1、JF700145.1; 细尖狼蝎, 登录号为 JN018211.1、JN018210.1、JN018153.1; 半蝎科 Hemiscorpiidae: 澳链尾蝎 *Liocheles australasiae*, 登录号为 MF983622.1、JN018157.1) 和之前收集蝎样本 CO I 序列(钳蝎科: 东亚钳蝎, 样品编号为 2207007、2207008、2022SDHZ01、2022HB01; 条纹钳蝎 *Mesobuthus eupeus*, 样品编号为 2022TB001 ~ 3、2022TB005、2022TB007; 博乐正钳蝎 *Mesoduthus bolensis*

sis, 样品编号为 2022XJCJ01。豚蝎科 Chaerilidae: 迪邦豚蝎 *Chaerilus dibangvalleycus*, 样品编号为 20210706108 ~ 111、20210706130、20210708143。真蝎科 Euscorpiidae: 库氏真蝎 *Euscorpiops kubani* 作为外类群, 样品编号为 20220715001) 与中成药中细尖狼蝎一代测序 Blast 比对成功的结果, 使用 MEGA - X^[16] 软件, 构建 NJ 系统发育树。

2.7 中成药中全蝎成分鉴别

对中成药中全蝎成分进行鉴定, 结果 30 种中成药均能扩增出与全蝎对照药材一致的特异性鉴别条带, 阴性对照无条带, 见图 2。



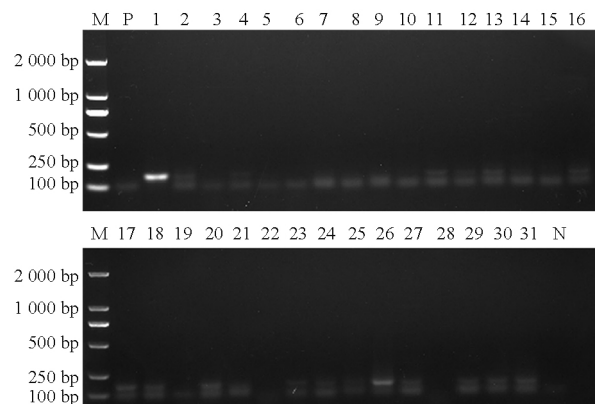
M. DL2000 Marker P. 全蝎对照药材 (Scorpion control medicinal herbs)
 1. 小儿七珍丸 (Xiaoer Qizhen pills) 2. 小儿至宝丸 (Xiaoer Zhibao pills) 3. 小儿惊风七厘散 (Xiaoer Jingfeng Qili powder) 4. 止痛化癥片 (Zhitong Huazheng tablets) 5. 止痛化癥胶囊 (Zhitong Huazheng capsules) 6. 中风回春丸 (Zhongfeng Huichun pills) 7. 中风回春片 (Zhongfeng Huichun tablets) 8. 牛黄千金散 (Niu Huang Qianjin powder) 9. 牛黄镇惊丸 (Niu Huang Zhenjing pills) 10. 复方牵正膏 (Fufang Qianzheng ointment) 11. 再造丸 (Zaizao pills) 12. 脉络舒通丸 (Mailuo Shutong pills) 13. 脉络舒通颗粒 (Mailuo Shutong granules) 14. 活血壮筋丸 (Huoxue Zhuangjin pills) 15. 培元通脑胶囊 (Peiyuan Tongnao capsules) 16. 脑心通胶囊 (Naoxintong capsules) 17. 通痹片 (Tongbi tablets) 18. 通痹胶囊 (Tongbi capsules) 19. 医痫丸 (Yixian pills) 20. 麝香风湿胶囊 (Shexiang Fengshi capsules) 21. 麝香抗栓丸 (Shexiang Kangshuan pills) 22. 风湿马钱片 (Fengshi Maqian tablets) 23. 复方夏天无片 (Fufang Xiatianwu tablets) 24. 清眩治瘫丸 (Qingxuan Zhitan pills) 25. 腰痛宁胶囊 (Yaotongning capsules) 26. 中风再造丸 (Zhongfeng Zaizao pills) 27. 八宝惊风散 (Babao Jingfeng powder) 28. 醒脑再造胶囊 - 甲 (Xingnao Zaizao capsules - Jia) 29. 醒脑再造胶囊 - 乙 (Xingnao Zaizao capsules - Yi) 30. 人参再造丸 (Renshen Zaizao pills) N. 空白 (blank)

图 2 中成药中全蝎成分鉴别的结果

Fig. 2 Results of identification of scorpion components in proprietary Chinese medicine

2.8 中成药中细尖狼蝎成分鉴别

使用本方法对 30 种中成药进行鉴定, 以检测含有细尖狼蝎成分的中成药, 结果经 PCR 凝胶电泳发现, 有 18 个样本与细尖狼蝎药材在相应的位置上均可扩增出单一特异性鉴别条带, 空白对照无条带, 见图 3。



M. DL2000 Marker P. 全蝎对照药材 (Scorpion control medicinal herbs)
 1. 细尖狼蝎药材 (*Lychas mucronatus* medicine) 2. 小儿七珍丸 (Xiaoer Qizhen pills) 3. 小儿至宝丸 (Xiaoer Zhibao pills) 4. 小儿惊风七厘散 (Xiaoer Jingfeng Qili powder) 5. 止痛化癥片 (Zhitong Huazheng tablets) 6. 止痛化癥胶囊 (Zhitong Huazheng capsules) 7. 中风回春丸 (Zhongfeng Huichun pills) 8. 中风回春片 (Zhongfeng Huichun tablets) 9. 牛黄千金散 (Niu Huang Qianjin powder) 10. 牛黄镇惊丸 (Niu Huang Zhenjing pills) 11. 复方牵正膏 (Fufang Qianzheng ointment) 12. 再造丸 (Zaizao pills) 13. 脉络舒通丸 (Mailuo Shutong pills) 14. 脉络舒通颗粒 (Mailuo Shutong granules) 15. 活血壮筋丸 (Huoxue Zhuangjin pills) 16. 培元通脑胶囊 (Peiyuan Tongnao capsules) 17. 脑心通胶囊 (Naoxintong capsules) 18. 通痹片 (Tongbi tablets) 19. 通痹胶囊 (Tongbi capsules) 20. 医痫丸 (Yixian pills) 21. 麝香风湿胶囊 (Shexiang Fengshi capsules) 22. 麝香抗栓丸 (Shexiang Kangshuan pills) 23. 风湿马钱片 (Fengshi Maqian tablets) 24. 复方夏天无片 (Fufang Xiatianwu tablets) 25. 清眩治瘫丸 (Qingxuan Zhitan pills) 26. 腰痛宁胶囊 (Yaotongning capsules) 27. 中风再造丸 (Zhongfeng Zaizao pills) 28. 八宝惊风散 (Babao Jingfeng powder) 29. 醒脑再造胶囊 - 甲 (Xingnao Zaizao capsules - Jia) 30. 醒脑再造胶囊 - 乙 (Xingnao Zaizao capsules - Yi) 31. 人参再造丸 (Renshen Zaizao pills) N. 空白 (blank)

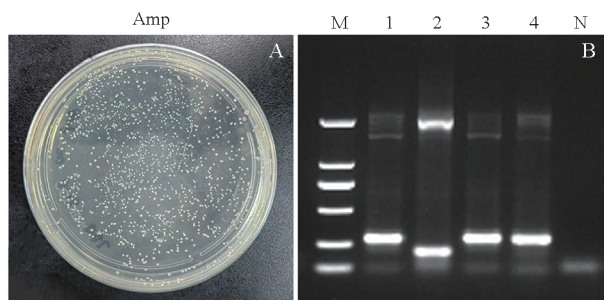
图 3 中成药中细尖狼蝎成分鉴别的结果

Fig. 3 Identification results of *Lychas mucronatus* components in proprietary Chinese medicine

2.9 TA 克隆结果讨论与分析

经克隆转化后进行菌粒 PCR 见图 4 - A, PCR 扩增后进行电泳, 克隆成功会在 260 bp 处出现单一明亮条带, 见图 4 - B。将测序结果与 GenBank 中的细尖狼蝎完整基因组序列 (NC_072215. 1) 匹配结果均

在 92% 以上,具体结果见表 2。证明克隆得到的片段是目的片段。



A. 细尖狼蝎 DNA 克隆后菌斑图谱 (plaque map after DNA cloning of *Lychas mucronatus*) B - M. DL2000 Marker 1~4. 小儿七珍丸 (Xiao'er Qizhen pills) N. 空白 (blank)

图 4 中成药中细尖狼蝎成分 TA 克隆菌斑结果

Fig. 4 Results of TA clonal plaque of *Lychas mucronatus* component in proprietary Chinese medicine

2.10 系统发育树圈图分析

NJ 系统发育树支持 (BS = 87) 中成药 TA 克隆获得的序列与细尖狼蝎为同一种,但物种之间可能存在个体差异,如图 5,此外系统发育树圈图显示细尖狼蝎与全蝎药材均聚类在同一分支进一步证实同为钳蝎科物种,且与其他物种均不在同一分支,由此可以证明中成药中细尖狼蝎伪品真实存在。

3 讨论

3.1 退火温度的确定

使用细尖狼蝎特异性鉴别引物进行 PCR 扩增,分别设置退火温度 50、52、54、56 °C,结果表明在 50 ~ 52 °C 时,小儿七珍丸、复方牵正膏、腰痛宁胶囊及醒脑再造胶囊 - 甲在 100 ~ 250 bp 可见单一细尖狼蝎特异性 DNA 条带,全蝎对照药材及阴性对照在此温度内均未扩增出条带,54 ~ 56 °C 时退火温度过高,样本扩增较弱,见图 6。选择 PCR 退火温度为 52 °C。

表 2 中成药中细尖狼蝎成分检测转化感受态后测序结果比对

Tab. 2 Comparison of sequencing results after detection and transformation of competent components of *Lychas mucronatus* in proprietary Chinese medicines

序号 (No.)	样品编号 (sample No.)	样品名称 (sample information)	数量 (quantity)	GenBank 同源性 (GenBank homology)
1	230227X	细尖狼蝎药材 (<i>Lychas mucronatus</i> medicine)	5	93.02%、92.31%、92.25%、93.02%、93.03%
2	23022701	小儿七珍丸 (Xiao'er Qizhen pills)	1	96.90%
3	23022703	小儿惊风七厘散 (Xiao'er Jingfeng Qili powder)	1	93.03%
4	23022710	复方牵正膏 (Fufang Qianzheng ointment)	1	93.02%
5	23022711	再造丸 (Zaizao pills)	1	93.02%
6	23022713	脉络舒通丸 (Mailuo Shutong pills)	1	93.02%
7	23022716	培元通脑胶囊 (Peiyuan Tongnao capsules)	1	97.67%
8	23022717	脑心通胶囊 (Naointong capsules)	4	93.02%、97.67%、93.02%、93.02%
9	23022718	通痹片 (Tongbi tablets)	1	98.41%
10	23022720	医痫丸 (Yixian pills)	3	96.90%、97.67%、97.67%
11	23022722	麝香风湿胶囊 (Shexiang Fengshi capsules)	2	93.02%、93.02%
12	23022724	风湿马钱片 (Fengshi Maqian tablets)	3	93.02%、93.02%、93.02%
13	23022725	复方夏天无片 (Fufang Xiatianwu tablets)	1	93.02%
14	23022726	清眩治瘫丸 (Qingxuan Zhitan pills)	1	97.67%
15	23022727	腰痛宁胶囊 (Yaotongning capsules)	2	97.67%、91.47%
16	23022728	中风再造丸 (Zhongfeng Zaizao pills)	5	93.02%、96.85%、97.67%、97.67%、97.67%
17	23022730	醒脑再造胶囊 - 甲 (Xingnao Zaizao capsules - Jia)	1	93.02%
18	23022731	醒脑再造胶囊 - 乙 (Xingnao Zaizao capsules - Yi)	3	93.02%、97.67%、97.67%
19	23022732	人参再造丸 (Renshen Zaizao pills)	2	93.02%、93.02%

3.2 循环次数考察的确定

分别选用 34、36、38、40 个循环进行考察,结果表明在 34 个和 36 个循环时小儿七珍丸、复方牵正膏、

腰痛宁胶囊及醒脑再造胶囊 - 甲均在 100 ~ 250 bp 可见单一细尖狼蝎特异性 DNA 条带,38 个循环中 2、3 和 5 泳道条带有点模糊,40 个循环中 2 和 5 泳道有

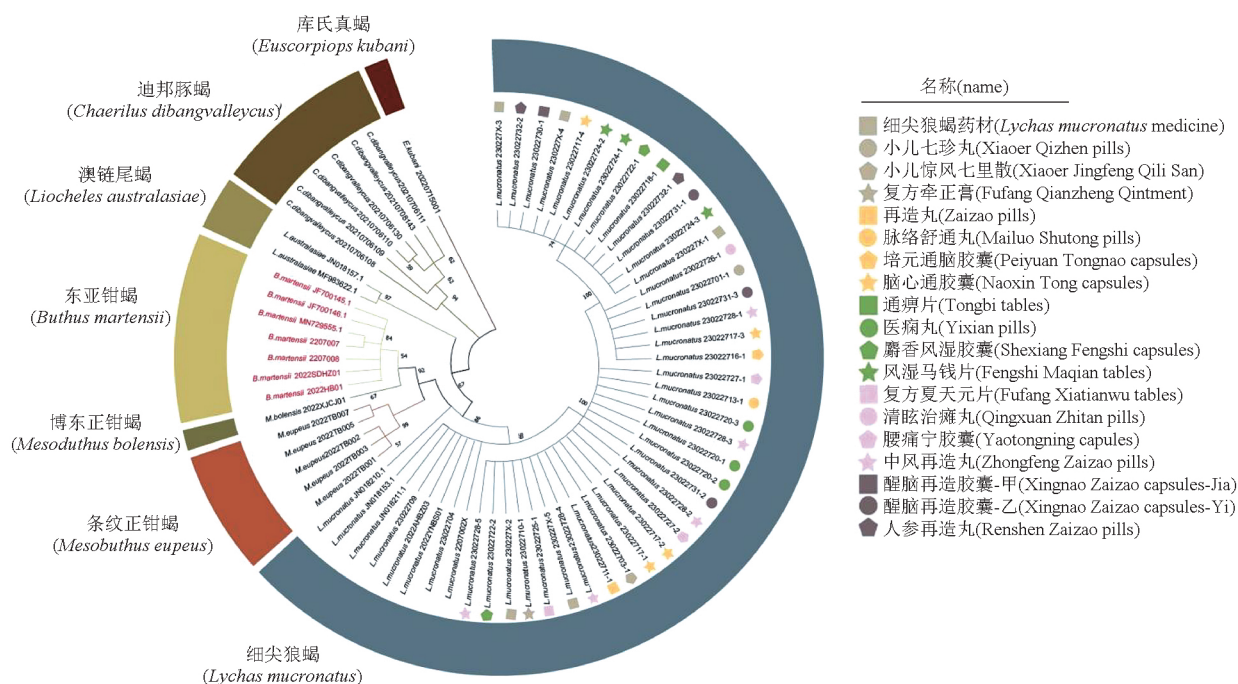
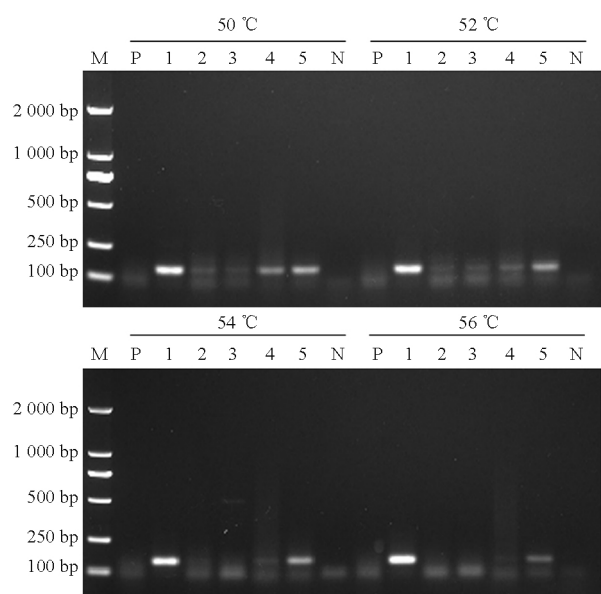


图 5 含全蝎成分中成药 PCR 扩增产物克隆测序的系统发育树

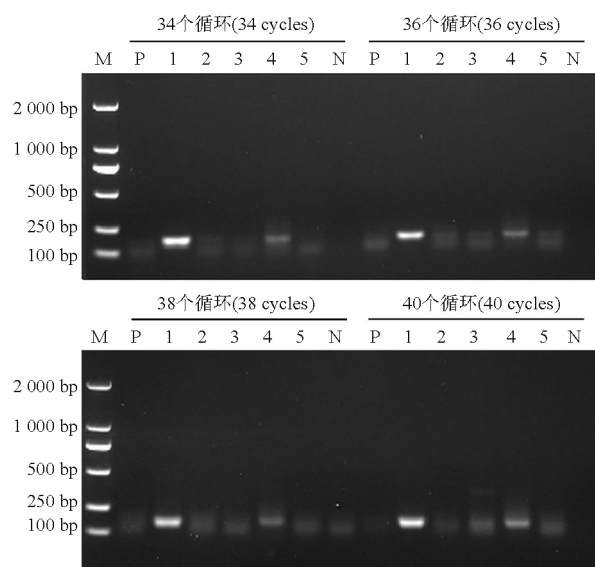
Fig. 5 Phylogenetic tree for cloning and sequencing of PCR amplification products of proprietary Chinese medicines containing whole scorpion components



M. DL2000 marker P. 全蝎对照药材 (Scorpion control medicinal herbs)
 1. 细尖狼蝎药材 (*Lychas mucronatus* medicine) 2. 小儿七珍丸 (Xiaoer Qizhen pills)
 3. 复方牵正膏 (Fufang Qianzheng ointment) 4. 腰痛宁胶囊 (Yaotongning capsules)
 5. 醒脑再造胶囊-甲 (Xingnao Zaizao capsules - Jia) N. 空白 (blank)

图 6 退火温度对中成药中细尖狼蝎成分鉴别结果的影响
 Fig. 6 Effect of annealing temperature on the identification results of *Lychas mucronatus* components in proprietary Chinese medicine

点模糊,但均符合正确鉴别结果,全蝎对照药材和阴性对照在此范围内均未扩增,见图 7。为确保结果的稳定性和准确性,选择 36 个循环进行 PCR 反应。

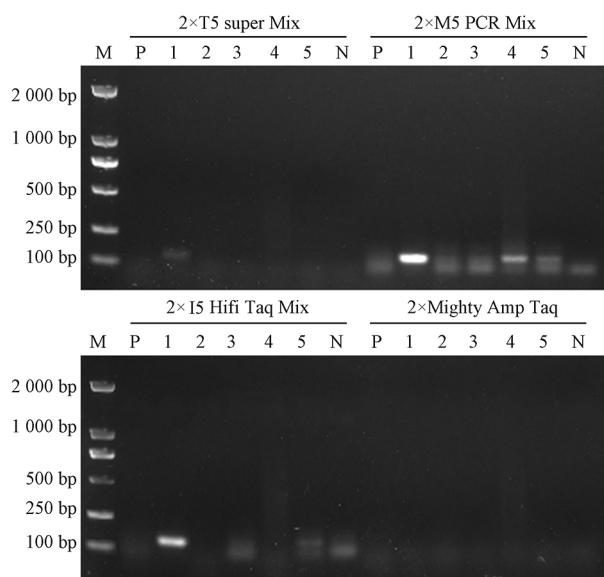


M、P、1~5、N. 同图 6 (same as Fig. 6)

图 7 循环数对中成药中细尖狼蝎成分鉴别结果的影响
 Fig. 7 Effect of cycle number on the identification results of *Lychas mucronatus* components in proprietary Chinese medicines

3.3 不同 Taq 酶考察的确定

使用 2 × T5 super Mix、2 × M5 PCR Mix、2 × I5 HifiTaq Mix 和 2 × MightyAmp Taq 进行试验,结果表明,由于不同公司酶活力不同导致其扩增条带的亮度有明显差异,在 2 × T5 super Mix 和 2 × MightyAmp Taq 中扩增效果不佳,没有获得扩增样品;在 2 × I5 HifiTap Mix 中部分样品扩增条带较暗;其中 2 × M5 PCR Mix Trp 扩增条带较好,见图 8,因此选择 2 × M5 PCR Mix Taq 酶作为鉴别全蝎配方颗粒 PCR 酶。



M、P、1~5、N. 同图 6 (same as Fig. 6)

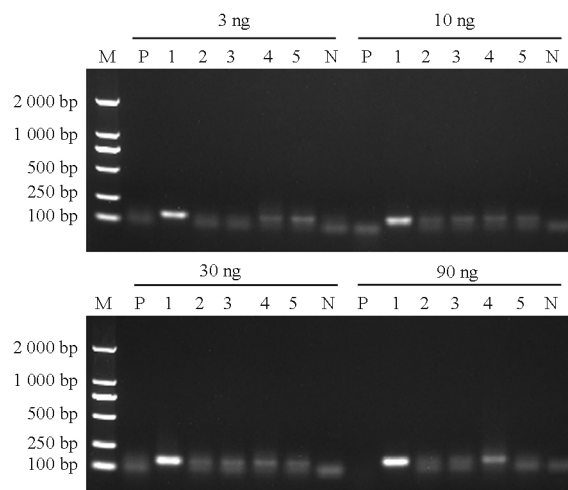
图 8 不同酶对中成药中细尖狼蝎成分鉴别结果的影响

Fig. 8 Effects of different enzymes on the identification results of *Lychas mucronatus* components in proprietary Chinese medicines

3.4 DNA 模板量考察的确定

对 25 μL 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 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 DNA 模板 (DNA 量分别为 3、10、30、90 ng),结果表明 3~90 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 均能扩增,浓度越高反而抑制了条带的扩增,见图 9。选择 25 μL 体系中加入 1 μL (30 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 作为最优模板浓度。

根据以上结果,确定细尖狼蝎 PCR 鉴别的条件反应体系包括 2 × PCR Mix 12.5 μL ,全蝎配方颗粒鉴别引物 (10 $\mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 各 0.25 μL ,DNA 模板 1 μL ,无菌双蒸水 11 μL 。PCR 反应参数:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,循环反应 36 次 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,52 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。



M、P、1~5、N. 同图 6 (same as Fig. 6)

图 9 DNA 浓度对中成药中细尖狼蝎成分鉴别结果的影响

Fig. 9 Effect of DNA concentration on the identification results of *Lychas mucronatus* components in proprietary Chinese medicines

4 结论

30 种中成药中含全蝎比例在 25.29%~0.39%,其中含量在 10% 以上有 6 个,含量在 10%~5% 有 4 个,含量在 5%~1% 有 15 个,含量在 1% 以下有 5 个。其中 18 个中成药检出含有细尖狼蝎成分,4 个含量在 10% 以上,占比为 66.7%。2 个含量在 10%~5%,占比为 50%。8 个含量在 5%~1%,占比为 53.3%。4 个在 1% 以下,占比为 80%。结果表明,细尖狼蝎是中成药中全蝎主要混伪品,细尖狼蝎属于钳蝎科物种,与东亚钳蝎形态极为相似。全蝎药材在运输过程中难免会受到挤压破坏形态影响鉴别,且中成药属于大批量生产药品,其生产链长,体系复杂,原药材需求量大,全蝎原药材伪品情况严重,采购过程中难免会出现误采的情况,影响中成药的质量。

本文通过全蝎、细尖狼蝎和其他物蝎种差异位点设计扩增片段 < 200 bp 的特异性鉴别引物,成功在 100~250 bp 扩增出单一 DNA 条带,可用于中成药中细尖狼蝎成分的鉴别。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,依据最佳鉴别条件对中成药进行检测,对检出细尖狼蝎特异性条带的 PCR 产物进行 TA 克隆后测序,序列均与细尖狼蝎参考序列有很强的相似性 (92%~98%),系统发育树结果显示获得的序列均与细尖狼蝎为同一支系而与东亚钳

蝎不同,建立了一种适用于中成药中细尖狼蝎成分的鉴别方法。结果显示,30个全蝎成分中成药均检出正品东亚钳蝎特有DNA条带,18种中成药(60%),在100~250 bp可见单一细尖狼蝎特异性DNA条带。该方法可以有效地鉴别出细尖狼蝎成分,达到鉴别的效果,为含有全蝎成分中成药质量控制提供一种安全便捷的方法。

参考文献

- [1] 中华人民共和国药典 2020 年版. 一部[S]. 2020: 149
ChP 2020. Vol I [S]. 2020: 149
- [2] NNUES - NESI A, ARAUJO WL, OBATA T, *et al.* Regulation of the mitochondrial tricarboxylic acid cycle[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2013, 16(3): 335
- [3] 卫秋阳, 邓小书, 竭航, 等. 药用全蝎毒液的蛋白差异分析[J]. *亚太传统医药*, 2023, 19(5): 42
WEI QY, DENG XS, JIE H, *et al.* Analysis of protein differences in the venom of medicinal scorpions [J]. *Asia Pac Tradit Med*, 2023, 19(5): 42
- [4] KOCH LE. The taxonomy, geographic distribution and evolutionary radiation of Australo - papuan scorpions [J]. *Rec West Aust Mus*, 1977, 5(2): 83
- [5] 陈爱娟. 新发现的一种全蝎伪品细尖狼蝎[J]. *河南中医*, 2015, 35(12): 3197
CHEN AJ. Identification and preliminary study of a newly discovered counterfeit scorpion *Lychas mucronatus* [J]. *Henan Tradit Chin Med*, 2015, 35(12): 3197
- [6] 李文鑫. 蝎生物学与毒素[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 216
LI WX. Scorpion Biology and Toxins [M]. Beijing: Science Press, 2016: 216
- [7] 陈广玉, 田慧, 赵成坚, 等. 蛤蚧分子鉴定技术研究进展[J]. *沈阳药科大学学报*, 2021, 38(3): 328
CHEN GY, TIAN H, ZHAO CJ, *et al.* Advances in molecular identification techniques of *Gekko gecko* [J]. *J Shenyang Pharm Univ*, 2021, 38(3): 328
- [8] 刘晶晶, 杨晶凡, 姚令文, 等. 基于 CO I 基因对中成药中土鳖虫的分子鉴别研究[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(5): 880
LIU JJ, YANG JF, YAO LW, *et al.* Molecular identification of *Eupolyphaga steleophaga* in Chinese patent medicine based on CO I gene [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(5): 880
- [9] 王丽, 金艳, 蒋超, 等. 猪胆粉及其中成药的特异性 PCR 鉴别方法[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(17): 136
WANG L, JIN Y, JIANG C, *et al.* Specific PCR method for identification of *Suis Fellis Pulvis* and its Chinese patent medicines [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2019, 25(17): 136
- [10] 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
GOU H, WANG YW, ZHENG Q, *et al.* DNA extraction and molecular identification in *Angelicae Sinensis Radix* preparations [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2018, 24(1): 44
- [11] 胡力, 袁媛, 张辉, 等. 烫水蛭(蚂蟥)配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别[J]. *中国现代中药*, 2023, 25(8): 1676
HU L, YUAN Y, ZHANG H, *et al.* Identification of *Whitmania pigra* Whitman formula granules by allele - specific PCR [J]. *Mod Chin Med*, 2023, 25(8): 1676
- [12] 石吻, 胡力, 赵玉洋, 等. 地骨皮的多重位点特异性 PCR 鉴别[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(4): 35
SHI Y, HU L, ZHAO YY, *et al.* Identification of original plants of *Lycii Cortex* by multiplex allele - specific PCR [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form*, 2024, 30(4): 35
- [13] 胡力, 陈梓媛, 赵玉洋, 等. 五倍子配方颗粒的位点特异性 PCR 鉴别[J]. *中国现代中药*, 2023, 25(8): 1668
HU L, CHEN ZY, ZHAO YY, *et al.* Identification of *Wubeizi* formula granules by allele - specific PCR [J]. *Mod Chin Med*, 2023, 25(8): 1668
- [14] 莫静, 王文斌, 程华春, 等. 利用分子方法鉴别白花蛇舌草及其伪品伞房花耳草[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(4): 676
MO J, WANG WB, CHENG HC, *et al.* Identification of *Hedyotis diffusa* and its adulterant *Hedyotis corymbosa* by molecular method [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(4): 676
- [15] 段庆梓, 王巍, 尚柯, 等. 一种用于鉴别湖北麦冬的 PCR - RFLP 方法研究[J]. *药物分析杂志*, 2023, 43(11): 1974
DUAN QZ, WANG W, SHANG K, *et al.* A new method based on PCR - RFLP for identification of root of *Liriope spicata* [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(11): 1974
- [16] KUMAR S, STECHER G, LI M, *et al.* MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms [J]. *Mol Biol Evol*, 2018, 35(6): 1547

(本文于 2024 年 1 月 27 日修改回)