

常用蛇类药材鉴别研究进展

张乐, 陶明宝, 陈鸿平, 刘友平*

(成都中医药大学药学院, 中药材标准化教育部重点实验室, 四川省中药资源系统研究与开发利用重点实验室——省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

[摘要] 蛇是人类宝贵的野生动物资源,也是我国重要的蛇类药材来源。它具有祛风、通络、定惊止痉等功效,在风湿痹证方面具有良好的治疗效果。近年来,在经济利益驱使下,加上我国蛇种类繁多,现有蛇类多达 241 种,且各自形态特征差异不明显,使得准确鉴定药材困难,容易导致市场用药品种混乱。文章就近 10 年来用于常用蛇类药材(主要以《中国药典》收载品种乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇为例)及其混伪品的鉴别方法进行了整理研究,综述了各类鉴别方法在蛇类药材中的研究进展,包括传统的性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别及近年来发展的微性状鉴别、色谱质谱技术和一些现代的分子鉴别方法如 DNA 条形码技术,并阐述了各种鉴别方法的适用对象及其优缺点,以期对蛇类药材或者动物类药材的鉴别研究提供思路和参考。发现目前药用蛇在现场快检、中成药的鉴别和优劣鉴别方面仍然面临着一些困难,提示对药用蛇品质进行客观评价时,还需将传统与现代鉴别方法相结合、真伪与优劣鉴别技术相联系。

[关键词] 蛇类药材; 混伪品; 鉴别方法; 分子鉴别

[中图分类号] R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)04-0222-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017040222

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1556.016.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 15:56

Research Progress of Identification Methods for Common Medicinal Snakes

ZHANG Le, TAO Ming-bao, CHEN Hong-ping, LIU You-ping*

(Pharmacy College, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Breeding Base of State Key Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Chinese Herbal Medicines Co-constructed by Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China and Sichuan Province, Chengdu 611137, China)

[Abstract] Snakes are not only precious wildlife resources, but also an important source of medicinal snakes, and it has a good effect in the treatment of rheumatic arthralgia syndrome. In recent years, driven by economic interests, coupled with more species and inconspicuous morphological differences, there are a large number of adulterants. Paper focuses on the identification methods of medicinal snakes and its adulterants over the last decade, and a comprehensive overview of various identification methods researches progress in this herb were displayed, including the character identification, microscopic identification, physical and chemical identification and molecular identification, and the applicable objects, advantages and disadvantages of each method of identification are described and discussed. It is found that medicinal snakes in the field of fast check, identification of *Traditional Chinese Medicine Patent Prescription* are still faced with some difficulties, and it showed that traditional and modern methods should be combined, authenticity of identification and pros and cons of identification should be combined when objective assessment of medicinal snakes.

[Key words] medicinal snakes; adulterants; identification methods; molecular identification

[收稿日期] 20160416(003)

[第一作者] 张乐, 博士, 从事中药化学成分与质量标准化研究, Tel:13540608320, E-mail: 1107423943@qq.com

[通讯作者] * 刘友平, 博士, 研究员, 从事中药化学成分与质量标准化研究, Tel:15308000633, E-mail: liuyouping@163.com

蛇类药材是我国动物药的重要组成部分,用药历史悠久。早在刘宋时代雷敫所著《雷公炮炙论》中就有关于蕲蛇、乌梢蛇入药的记载^[1]。根据《The Reptile Database》的收录,我国现有蛇类 241 种,已知可药用的种类多达 5 科,70 种^[2]。常用的蛇类药材主要分布在游蛇科(如乌梢蛇、滑鼠蛇、王锦蛇等),眼镜蛇科(如银环蛇、眼镜蛇、眼镜王蛇等),蝰科(如五步蛇、山烙铁头、白唇竹叶青等)等。其中,乌梢蛇 *Zaocys dhumnades*, 金钱白花蛇 *Bungarus multinflus*, 蕲蛇 *Agkistrodon acutus* 被《中国药典》2015 年版一部收载^[3]作为商品中药材被广泛使用。蛇的药用价值很高,具有祛风、通络、定惊止痉等功效,用于风湿顽痹、半身不遂、破伤风等证。近年来,由于野生蛇资源紧缺、人工养蛇发展滞后、药用蛇需求旺盛,导致蛇类药材价格连年上涨。在经济利益驱使下,加上蛇类品种较多、形态相近,给药材鉴别带来了困难,市场上出现了诸多混伪品,质量问题屡有报道。丁晴等^[4]在 2013—2014 年江苏省中药材及饮片针对性监督检验汇总中,发现蛇类药材及饮片掺伪、炮制不当等现象普遍。魏锋等^[5]汇总并分析了 2013 年全国中药材及饮片抽验情况,发现蕲蛇、金钱白花蛇及乌梢蛇的不合格率分别高达 75%, 75%, 55%, 问题多为掺入了伪品。为了保证蛇类药材的质量和临床疗效,科研工作者做了大量关于蛇类药材真伪优劣的鉴别研究。文章就近 10 年来用于常用蛇类药材(主要以蕲蛇、乌梢蛇、金钱白花蛇为例)鉴别的主要方法进行了总结,并阐述了各鉴别方法的适用对象及其优缺点,最后提出了目前药用蛇鉴别面临的难题并展望了相关鉴别方法的发展趋势,以期对蛇类药材及其鉴别方法的深入研究和开发利用提供依据。

1 性状鉴别

适用于鉴别完整的蛇体,多用于真伪鉴别。根据蛇头部、脊棱、环纹数、背鳞、有无毒牙等性状的差异进行区分。性状鉴别比较形象,注重找出专属性特征,如蕲蛇的翘鼻头、方胜纹、连珠斑、佛指甲,乌梢蛇的剑脊等。芦柏震等^[6]鉴别了金钱白花蛇与常见混伪品,并指出了正品以身干、头尾齐全、肉色黄白、盘径小者为佳,其性状鉴别要点见表 1。结果表明该方法简便、直观,但前提是有丰富经验的积累,而且主观性较强。如蛇体环纹的色泽,其深浅会因环境、炮制方法、人为处理、观察者等因素的不同而各异。

此外,近年在性状鉴别方面,出现了一种新方法——中药微性状鉴别。是借助仪器(体视显微

镜、生物显微镜等)观察中药材表面(包括断面)肉眼不易察觉的细微性状特征,并以此作为依据的一种鉴别方法^[7]。不同于性状鉴别,它是借助仪器对药材放大的性状特征进行观察;又区别于显微鉴别,它可以自由调节放大倍数,看到的是物体表面反射光线所生成的影像特征,也不需要透化制片。具有简便、快速、成本低等优点,可以有效完善和佐证传统的性状鉴别,适用于基层工作者。穆二廷等^[8]通过样品蛇背部和鳞片的微性状对比,鉴别了金钱白花蛇和赤链蛇,其微性状鉴别要点如表 1。目前,微性状鉴别在蛇类药材鉴别上仍处于起步阶段,相关的鉴别指标、特征图还需要建立与完善。

2 显微鉴别

适用于鉴别破碎状或者粉末状的蛇类样品以及相关中成药,多用于真伪鉴别。主要用蛇的粉末或者鳞片在显微镜下观察,根据角质鳞片、横纹肌纤维、背鳞形状及纹理等显微特征的差异进行鉴别。其中背鳞为蛇的主要鳞片,选择背鳞进行显微鉴别,具有一定代表性。芦柏震等^[6]总结了金钱白花蛇与常见混伪品的显微鉴别特征,见表 1。综合各样品细微结构的微小差别可以鉴别出正品,但该方法过分依赖于鉴别者扎实的专业知识,并且当粉末中不存在鳞片或者为超微粉时就凸显出一定局限性。

3 理化鉴别

近年来,以仪器分析方法(主要为色谱法、光谱法)为主的各种理化鉴别技术广泛应用于蛇类药材化学成分分析中(表 2)。理化鉴别既能够实现蛇的真伪鉴别,又可以用于鉴别蛇的优劣。常用于蛇类真伪鉴别的方法有薄层色谱法(TLC),高效毛细管电泳(HPCE)指纹图谱、电泳法等,而高效液相色谱法(HPLC),分光光度法、浸出物含量测定法一般用于蛇的优劣鉴别。如李峰课题组先后建立了蕲蛇、金钱白花蛇和乌梢蛇的 HPCE 指纹图谱^[16-18]。研究发现 3 种蛇的指纹图谱中均有自己的共有峰,且指纹峰有明显的差异,说明 HPCE 指纹图谱对蛇类药材品种的鉴别具有一定意义。陈振江等^[13]发现伪品蛇的外观形态与正品蛇极为相似,但二者的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)图谱完全不同。主要表现为各蛋白质成分的相对分子量及相对迁移率 Rm 完全不一样。目前关于蛇类药材优劣鉴别的研究较多,但因缺乏指标成分,故实际应用较少,2015 年版《中国药典》也仅采用浸出物含量来控制乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇的质量。

表 1 金钱白花蛇及其混伪品的鉴别要点

Table 1 Differential points of *Bungarus multifus* and its adulterants

品名	性状鉴别 ^[6]	微性状鉴别 ^[8]	显微鉴别(背鳞表面) ^[6]
金钱白花蛇	白色窄环纹 45~58 个,黑白相间;无颊鳞;脊鳞扩大呈六角形;肛鳞完整,尾下鳞单行	黑色斑纹鳞片相间排列,鳞沟明显;鳞片含有棕色颗粒状色素,顶端明显呈黑色斑点	类圆形;游离端钝圆;无鳞棱;表面有极细密的点状突起及纵直条纹,波纹细密
金环蛇	环纹 23~33 对,黑黄相间;无颊鳞;背鳞扩大呈六角形;肛鳞完整,尾下鳞单行	-	近棱形;游离端微凹;有鳞棱;表面具刺状、点状突起,网纹无规则,无波纹区
赤链蛇	淡红色窄环纹 90 个左右,黑红相间;颊鳞 1 个;背鳞不扩大;肛鳞两分,尾下鳞双行	黑色斑纹鳞片覆瓦状排列,鳞沟不明显;鳞片密集分布平行纹理,顶端边缘呈棕色加深	近棱形;游离端钝圆;无鳞棱;网纹较小,类圆形,有细纵条纹,波纹稀疏
水赤链蛇	环纹 60 个以上,灰褐色淡黄色相间;颊鳞 1 个;背鳞不扩大;肛鳞两分,尾下鳞双行	-	近椭圆形;游离端微凹或略平;有鳞棱;网纹多角形,无细纵条纹,无波纹区

表 2 常用蛇类药材的理化鉴别

Table 2 Physical and chemical identification of common medicinal snakes

分析方法	内容	参考文献
TLC	金钱白花蛇与伪品黄链蛇的比较鉴别	[9]
HPCE 指纹图谱	蕲蛇药材高效毛细管电泳指纹图谱 金钱白花蛇商品药材的高效毛细管电泳指纹图谱 乌梢蛇药材的高效毛细管电泳指纹图谱	[10] [11] [12]
电泳法	贵重动物类中药材蛋白质 SDS-PAGE 的图谱	[13]
分光光度法	商品药材乌梢蛇中总磷脂含量 商品药材蕲蛇中总磷脂含量	[14] [15]
HPLC	蕲蛇中核苷类成分含量 商品乌梢蛇中核苷类成分的含量 蕲蛇中四种氨基酸含量 蝮蛇药材中的次黄嘌呤的含量	[16] [17] [18] [19]
醇溶性浸出物测定法	乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇的浸出物含量	[3]
全自动氨基酸分析仪	乌梢蛇的氨基酸指纹图谱 人工饲养蕲蛇与野生蕲蛇中氨基酸含量	[20] [21]
HPLC-MS/MS	蝮蛇肉中肌苷的鉴定与含量测定	[22]
紫外、红外、质谱	蕲蛇 II 型胶原蛋白的提取与鉴定表征	[23]

4 分子鉴别

蛇类药材传统的鉴别方法以性状鉴别为主,需要工作者经验丰富,但市售饮片多为蛇段,缺少完整形态,其性状鉴别存在一定困难。而分子鉴别技术适用于鉴别原药材形态结构遭到破坏的样品,它可以在分子水平上通过比较不同物种之间遗传信息的差异来区分物种。多用于蛇类药材的真伪鉴别。

4.1 DNA 分子标记技术 近年来应用于蛇类药材鉴别的 DNA 分子标记技术主要有 ①DNA 测序技术。通过测定目的基因片段的核苷酸序列,根据序列间的差异来确定各类群间有鉴定意义的特异性位点,从而鉴别药材^[24]。但该技术难度大、鉴别成本高。宋文成等^[25]利用 Cyt b 基因对蕲蛇药材及其市场收集样品进行了序列测定与分析。结果显示正品的种内个体间 Cyt b 基因序列差异率远远小于常见

混伪品。②高特异性 PCR 技术。根据药材正品及其混淆品生物特定区域的 DNA 序列数据,设计出只能有效扩增来自正品药材 DNA 模板中特定区域的鉴别引物。唐晓晶等^[26]设计了一对能特异性扩增乌梢蛇 12 S rRNA 基因片段的鉴别引物 HWL-1 和 HWH-1,研究发现在 65 °C 复性温度下 PCR 扩增,正品乌梢蛇得到约 320 bp 的扩增带,而混淆品无扩增带,成功鉴别出乌梢蛇及其混淆品。③多重 PCR 技术。在一个 PCR 反应体系中加入二对以上特异性引物,同时扩增出多个目的片段^[27]。具有高效、快速、低成本等优点,适合大量样本的分析与鉴别。张鑫等^[28]采用多重 PCR 方法鉴别了金钱白花蛇与三种常见混伪品。根据各样品的 COI 序列设计出 4 对特异性引物,在建立的多重 PCR 反应体系中,通过琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物相对分子质量差异来

实现蛇类药材的快速鉴别。Dubey 等^[29]也借助多重 PCR 技术快速鉴别了印度的 3 种濒危蛇种。④快速 PCR 技术。在保证 PCR 反应特异性、灵敏性和保真度等前提下,在更短时间内完成对核酸分子扩增。提取到合格的 DNA 是实现鉴别的前提,而短时间内提取出 DNA 则是快速 PCR 的优势。蒋超等^[30]通过改良碱裂解法于 10 min 内完成了 DNA 的快速提取,相比于平常 2~3 h 获得 DNA 模板的时间明显缩短了十几倍。陈康等^[31]建立了乌梢蛇、金钱白花蛇、蕲蛇的快速 PCR 真伪鉴别方法。该研究经碱裂解法快速提取 DNA,PCR 扩增,荧光染料法检测等步骤,在 30 min 左右可完成蛇类药材真实性鉴别。此外,还有限制性片段长度多态性聚合酶链式反应技术(PCR-RFLP),随机扩增多态 DNA 技术(RAPD)等。如 Dubey 等^[32]借助简单的 PCR-RFLP 技术对印度的三种濒危蛇种进行了分子鉴别。

4.2 DNA 条形码技术 DNA 条形码(DNA barcoding)技术,是近年来基于 DNA 分子标记技术发展起来的一种物种鉴别新技术。它具体是指利用一段标准的、易扩增且相对较短的 DNA 片段作为物种标记而创建的一种新的身份识别系统^[33]。这段特殊的 DNA 序列被称作 DNA 条形码。目前,植物药鉴定的通用条形码是 ITS2 序列和 *psbA-trnH* 序列^[34-35];动物药以 COI(Cytochrome c oxidase I, COI)序列为主,ITS2 序列为辅^[36-37]。近年来,DNA 条形码技术因其通用性好、易于推广等优点已广泛应用于大戟科^[38]、鹿科^[39]、重楼属^[40]、角类^[41]、虫草^[42]、秦艽^[43]等中药的鉴别,在蛇类药材的鉴别上也有较多应用。廖婧等^[44]对华南地区 23 种常见药用蛇类的 DNA 条形码进行研究。通过收集与处理样品、提取 DNA,PCR 扩增、序列测定等手段,获得了各种蛇的 DNA 条形码,再用遗传距离分析种内、种间变异及 NJ(邻接)系统树分析各物种的聚类情况。结果可知蛇类物种间遗传距离值(0.085 0~0.256 8)明显大于种内(0~0.040 9),并且样品聚类为 3 个类群,各物种形成相对独立的枝,实现了实验中各药用蛇类的准确鉴定。CAO 等^[45]运用 COI 条形码序列对来源于 17 种蛇 51 个样品进行了身份验证,成功鉴别了乌梢蛇及假冒品。CHAO 等^[46]搜集了金钱白花蛇及其混伪品共 39 个样本并建立了基于 COI 序列的数据库,研究证明了 DNA 条形码技术在金钱白花蛇身份识别方面的有效性。Zoltán 等^[47]基于新设计的 COI 引物,用 DNA 条形码对马达加斯的爬行类动物(包含蛇)进行了大规模物种

鉴定分类评价。

此外,由于 DNA 条形码 COI 序列的长度(约 650 bp)限制了它的应用范围(如不适用于 DNA 降解严重的馆藏标本等),在此基础上出现了一项新技术——DNA 微型条形码(DNA mini-barcoding)技术。它具体是指通过通用引物扩增出比 COI 全序列更短的一段序列,并通过该序列进行物种鉴定、分类等研究工作^[48]。如 Dubey 等^[49]采用 DNA 微型条形码技术对印度一些濒危蛇种进行了鉴别及分类学研究。

5 讨论

综上所述,从传统的性状鉴别到现代的分子鉴别,药用蛇的鉴别已取得了许多成果。纵观现有的鉴别技术,分子鉴别已成为时代发展趋势。2010 年版《中国药典》首次采用特异性 PCR 对乌梢蛇、蕲蛇进行鉴别。

目前蛇类药材的鉴别,面临的难题。一、现场快检。现场快检既要实现现场快速鉴别的原则,同时又要满足有效、价廉的实用性。目前蛇类药材的现场快检,主要还是依赖于传统的性状鉴别和显微鉴别,但其对工作者的经验和专业水平要求较高,而且也存在个人影响因素大、可控性差等缺陷。而快速 PCR 技术操作简单、快速、结果判定明确,适用于真伪鉴别试剂盒的开发,有望推广应用。二、中成药的鉴别。蛇类药材主要以全蛇(或去除内脏的蛇)、蛇段和蛇粉的形式入药,制成蛇酒、汤剂或纯蛇粉(或含蛇粉)制剂,如龟蛇酒、纯蛇粉胶囊、乌蛇止痒丸等。故除鉴别蛇的药材和饮片外,对含蛇的中成药的准确鉴别也尤为重要。①以药材原粉直接入药的中成药鉴别。目前主要采用显微鉴别法鉴别蛇粉或含蛇粉的制剂,如乌蛇止痒丸中乌梢蛇的鉴别,但仍然存在上述问题与缺陷。而 DNA 条形码技术是近期物种分类和鉴定的研究热点,目前已有运用该技术鉴别混合粉末或制剂的相关报道^[50-52],可为蛇粉的鉴别提供一定的参考依据和技术支撑。②以非药材原粉入药的中成药鉴别。蛇酒既可由全蛇、蛇段直接浸泡制得,又可以通过蛇粉渗漉提取制成,如蕲蛇药酒。前者可以通过性状, DNA 条形码^[53]等实现对蛇的鉴别;而后者因缺乏蛇体,再加上无专属性化学成分,故实现该类酒剂的准确鉴别存在很大困难。三、优劣鉴别。蛇类药材主要含有氨基酸、蛋白质、无机元素等化学成分,其有效成分尚不明确。目前虽有通过理化鉴别如测定总磷脂、核苷类成分、浸出物、氨基酸等含量来控制药材质量的报道,但因

缺乏专属性,故不能很好地从物质基础层面进行内在品质评价。而分子鉴别同样也存在区分真伪易辨别优劣难的缺陷。2015年版《中国药典》也尚无收载含量测定项。故很难实现对不完全掺伪、掺杂蛇类中药的鉴别。所以还需加强药用蛇活性成分和药效学的相关研究,探寻合适的质量控制模式。今后若能解决这些难题,将会从真伪鉴别与优劣鉴别2个方面更好地实现对蛇类药材的品质评价与质量控制。

[参考文献]

[1] 王义权,周开亚. 蛇类药材的本草考证[J]. 基层中药杂志,1995,9(3):3-6.

[2] 李丕鹏,王维胜,吕晓平. 中国蛇类保护和利用概述:历史、现状和未来[J]. 沈阳师范大学学报:自然科学版,2013,31(2):129-135.

[3] 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,2015:78,219,372.

[4] 丁晴,仇雅静,房克慧,等. 动物来源中药材、饮片质量现状及原因分析[J]. 中国中药杂志,2015,40(21):4309-4312.

[5] 魏锋,刘薇,严华,等. 我国中药材及饮片的质量情况及有关问题分析[J]. 中国药学杂志,2015,50(4):277-283.

[6] 芦柏震,王奇,何晓波,等. 金钱白花蛇与混淆品的辨别[J]. 海峡药学,2005,17(2):91-92.

[7] 周建理,杨青山. 中药微性状鉴定法[J]. 安徽中医学院学报,2011,30(1):66-68.

[8] 穆二廷,刘耀武,杨青山,等. 金钱白花蛇的微性状鉴别[J]. 安徽中医药大学,2016,35(1):83-85.

[9] 王军喜. 金钱白花蛇与其伪品黄链蛇的比较鉴别[J]. 中南药学,2005,3(6):3737-3740.

[10] 王成芳,包永睿,孟宪生,等. 蕲蛇药材高效毛细管电泳指纹图谱的研究[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(5):893-894.

[11] 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.

[12] 李峰,张阳,张振秋,等. 乌梢蛇药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(10):1953-1954.

[13] 陈振江,沈瑜琪,刘焱文. 贵重动物类中药材蛋白质 SDS-PAGE 的图谱研究[J]. 中药材,2007,30(7):769-771.

[14] 林秀玉,丁怡,张阳. 商品药材乌梢蛇中总磷脂含量的比较研究[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(11):1731-1732.

[15] 林秀玉,李可强. 商品药材蕲蛇中总磷脂含量的比较

研究[J]. 辽宁中医杂志,2009,36(11):1959-1960.

[16] 丁兴红. HPLC 法测定蕲蛇中核苷类成分的研究[J]. 浙江中医药大学学报,2011,35(6):906-912.

[17] 张阳,吴宏丽,李峰,等. HPLC 法测定商品乌梢蛇中核苷类成分的含量[J]. 辽宁中医杂志,2008,35(4):581-582.

[18] 柴士伟,董改英,瞿晶田,等. 正交实验优选蕲蛇煎煮工艺[J]. 中国药房,2015,26(25):3569-3571.

[19] 赵玉霖,王贵金,孙佳明,等. 蝮蛇质量标准的研究[J]. 中药材,2009,32(8):1193-1194.

[20] 黄文琦,林葵,黄岛平,等. 乌梢蛇氨基酸图谱研究[J]. 蛇志,2015,27(1):4-6.

[21] 丁兴红,丁志山,范永升. 人工饲养蕲蛇与野生蕲蛇中重金属元素及氨基酸含量的比较研究[J]. 氨基酸和生物资源,2012,34(1):51-53.

[22] 王贵金,孙佳明,王丹,等. 蝮蛇肉中肌苷的 HPLC-MS/MS 鉴定与含量测定[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2007,9(5):68-70.

[23] 谷恒存,胡金波,丁志山,等. 蕲蛇 II 型胶原蛋白的提取和鉴定表征[J]. 中国中药杂志,2013,38(21):3672-3675.

[24] 韩艳丽,朱建华. DNA 分子标记技术在中草药鉴定中的应用[J]. 现代中药研究与实践,2008,22(4):62-65.

[25] 宋文成,宋社五,刘道芳,等. 蕲蛇药材及市售混淆品的 Cytb 基因序列与分析[J]. 中草药,2006,37(12):1862-1865.

[26] 唐晓晶,冯成强,黄璐琦,等. 高特异性 PCR 方法鉴别乌梢蛇及其混淆品[J]. 中国药学杂志,2007,42(5):333-336.

[27] Chamberian J S, Gibbs R A, Ranier J E, et al. Detection screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification[J]. Nucl Acids Res,1988,16(23):1141-1156.

[28] 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.

[29] Dubey B, Meganathan P R, Ikramul H. Multiplex PCR assay for rapid identification of three endangered snake species of India[J]. Conserv Genet,2009,10(6):1861-1864.

[30] 蒋超,黄璐琦,袁媛,等. 使用碱裂解法快速提取药材 PCR 方法的研究[J]. 药物分析杂志,2013,33(7):1081-1090.

[31] 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.

[32] Dubey B, Meganathan P R, Ikramul H. Molecular

- identification of three indian snake species using simple PCR-RFLP method [J]. *Forensic Sciences*, 2010, 55(4):1065-1067.
- [33] Hebert P D, Ratnasingham S, Dewaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidize subunit I divergences among closely related species [J]. *Proceed Royal Soc*, 2003, 270(1): 96-99.
- [34] LOU S K, WONG K L, LI M, et al. An integrated web medicinal materials DNA database: MMDBD (medicinal materials DNA barcode database) [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11(1): 402-405.
- [35] 陈士林, 庞晓慧, 姚辉, 等. 中药 DNA 条形码鉴定体系及研究方向 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2011, 13(5): 747-750.
- [36] YAO H, SONG J Y, LIU C, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13102.
- [37] 陈士林, 姚辉, 韩建萍, 等. 中药材 DNA 条形码分子鉴定指导原则 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(2): 141-147.
- [38] PANG X H, SONG J Y, ZHU Y J, et al. Using DNA barcoding to identify species within Euphorbiaceae [J]. *Planta Medica*, 2010, 76(15): 1784-1786.
- [39] 刘冬, 钱齐妮, 张红印, 等. 基于 COI 条形码的鹿类中药材 DNA 条形码分子鉴定 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2014, 16(2): 274-278.
- [40] 朱英杰, 陈士林, 姚辉, 等. 重楼属药用植物 DNA 条形码鉴定研究 [J]. *药学报*, 2010, 45(3): 376-382.
- [41] YAN D, LUO J Y, HAN Y M, et al. Forensic DNA barcoding and bio-response studies of animal horn products used in traditional medicine [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55854.
- [42] XIANG L, SONG J Y, XIN T Y, et al. DNA barcoding the commercial Chinese caterpillar fungus [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2013, 347(2): 156-162.
- [43] LUO K, MA P, YAO H, et al. Identification of *gentiana macrophyllae* radix using the ITS2 barcodes [J]. *Acta Pharm Sin*, 2012, 47(12): 1710-1717.
- [44] 廖婧, 梁镇标, 张亮, 等. 常见药用蛇类的 DNA 条形码研究 [J]. *中国药学杂志*, 2013, 48(15): 1255-1260.
- [45] CAO S P, GUO L N, LUO H M, et al. Application of COI barcode sequence for the identification of snake medicine (*Zaocys*) [J]. *Mitochondr DNA Part A*, 2016, 27(1): 483-489.
- [46] 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.
- [47] Zoltán T N, Gontran S, Frank G, et al. First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of madagascar, based on newly designed COI primers [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): 506-512.
- [48] Hajibabaei M, Smith M A, Janzen D H, et al. A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded [J]. *Mol Ecol Not*, 2006, 6(14): 959-964.
- [49] Dubey B, Meganathan P R, Haque I. DNA mini-bar coding: an approach for forensic identification of some endangered Indian snake species [J]. *Forensic Sci Int-Gen*, 2011, 5(3): 181-184.
- [50] CHEN R, DONG J, CUI X, et al. DNA based identification of medicinal materials in Chinese patent medicines [J]. *Sci Rep-UK*, 2012, 2(10): 1-5.
- [51] 向丽, 汤欢, 成金乐, 等. 超微破壁饮片 DNA 条形码基原物种追溯 [J]. *药学报*, 2015, 50(12): 1660-1667.
- [52] 贾静, 石林春, 徐志超, 等. 市售鹿茸粉药材的 DNA 条形码鉴定 [J]. *药学报*, 2015, 50(10): 1356-1361.
- [53] 廖婧, 晁志, 张亮. 广东药酒中常见蛇类的 DNA 条形码研究 [J]. *中药材*, 2013, 36(11): 1740-1742.

[责任编辑 邹晓翠]