

中国医药工业杂志



2018-11
第49卷·第11期

- 全国中文核心期刊
- 中国生物医学核心期刊
- 中国期刊方阵入选期刊
- 中国科技核心期刊
- 中国科学引文数据库来源期刊
- 华东地区优秀期刊

关注患者的顺应性

使用卡乐康包衣的片剂才是完美的

聪明的企业正通过口服固体制剂的外观设计来减少用药差错，并提高患者服药的顺应性。他们相信——片剂产品的外观会影响患者对药物的辨识和感受。监管部门同样深知这一点。

利用卡乐康薄膜包衣技术开发易于吞服的、独特的、品牌化的片剂可以为产品带来额外的价值。卡乐康为您打开了片剂设计的窗口，通过不同颜色、形状和薄膜包衣的组合，打造与众不同的片剂外观。联系我们，使您的片剂更完美。

从片芯到包衣
您可信赖的供应商
www.colorcon.com.cn





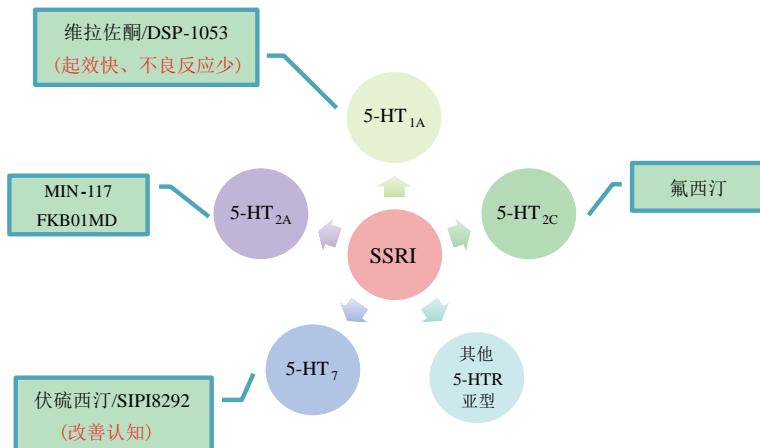
主 办
上海医药工业研究院
中国药学会
中国化学制药工业协会



微信号 : cjph-cjph

· 专论与综述 ·

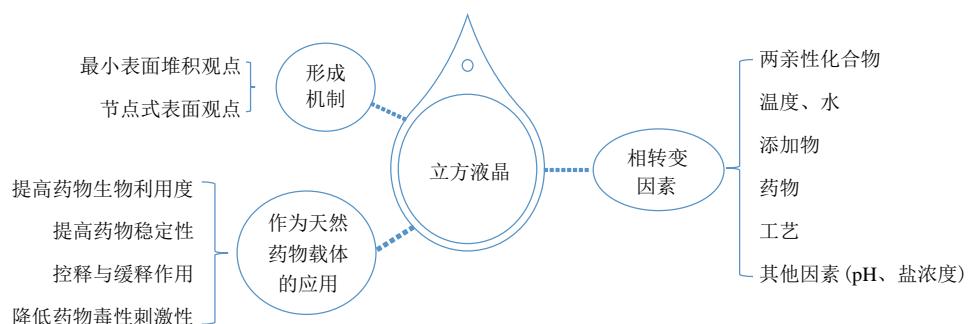
- 1481** 5-HT 再摄取抑制/5-HT 受体亚型多重作用抗抑郁药物研究进展..... 谷正松, 李建其*
- DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.001



- 1492** 3D 打印技术在透皮领域的研究进展..... 杨雅丽, 童想柳, 边琼, 罗华菲*
- DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.002

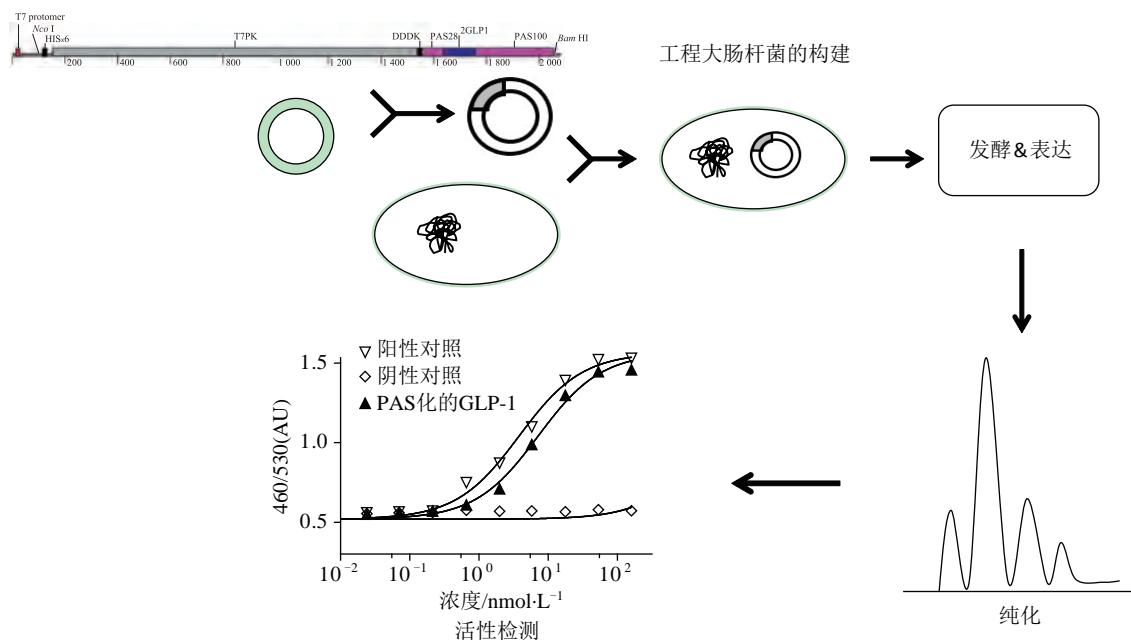


- 1500** 立方液晶作为天然药物载体的研究进展..... 徐玲霞, 申宝德, 金晨, 朱卫丰*
- DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.003

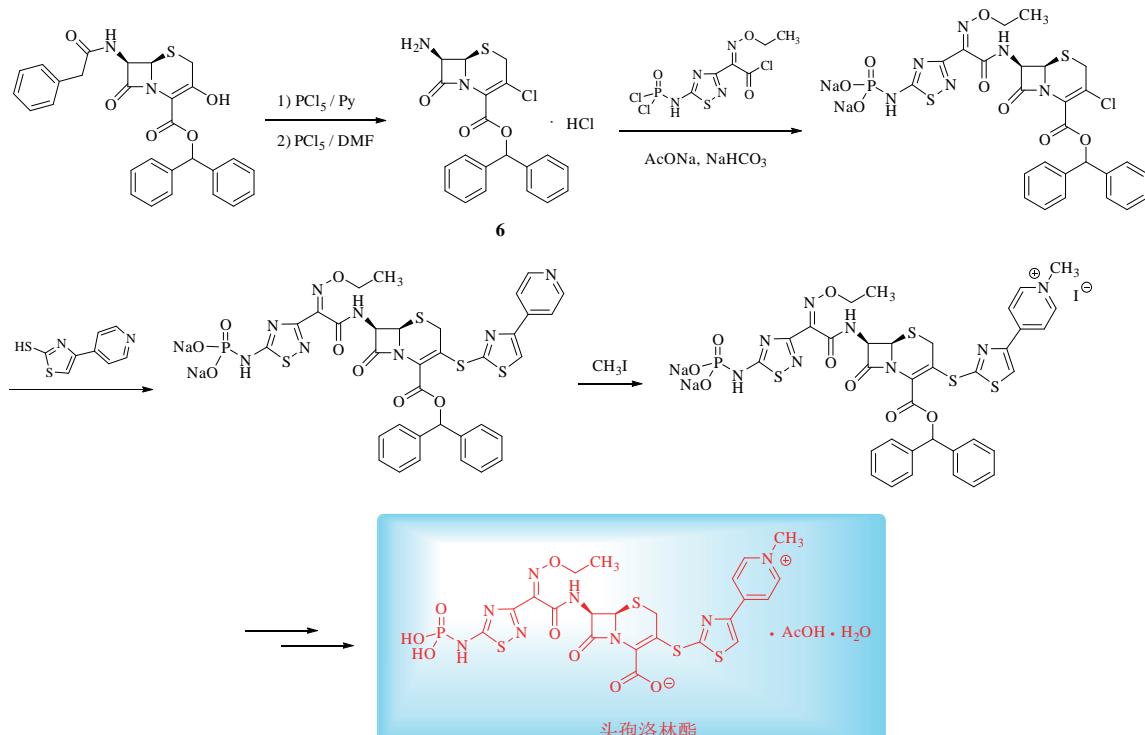


· 研究论文 ·

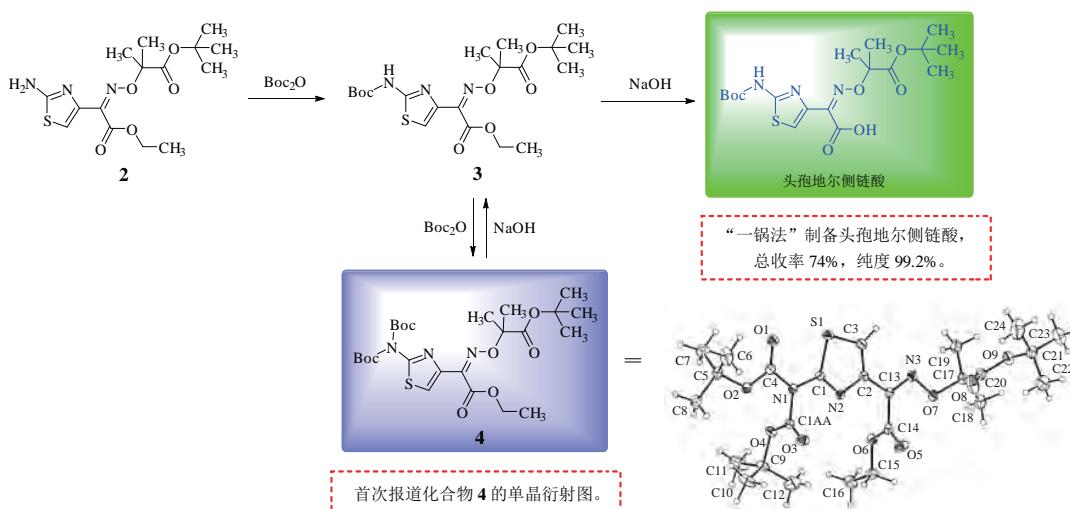
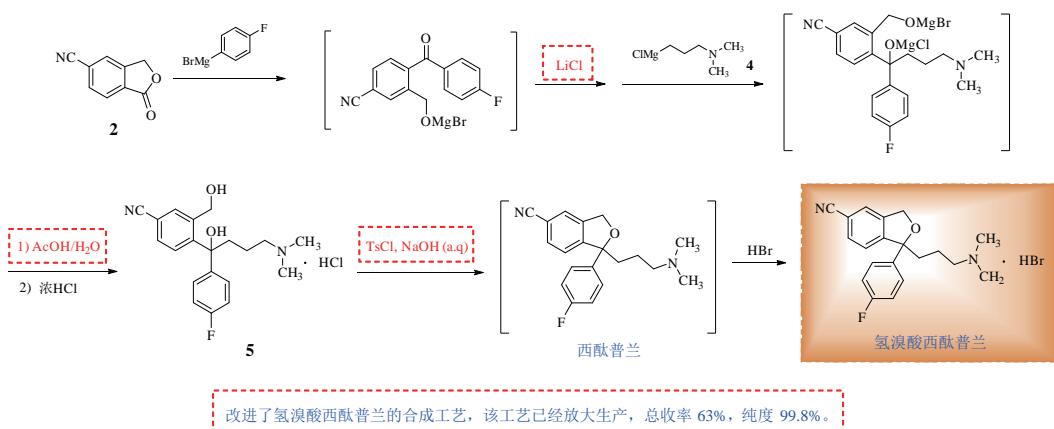
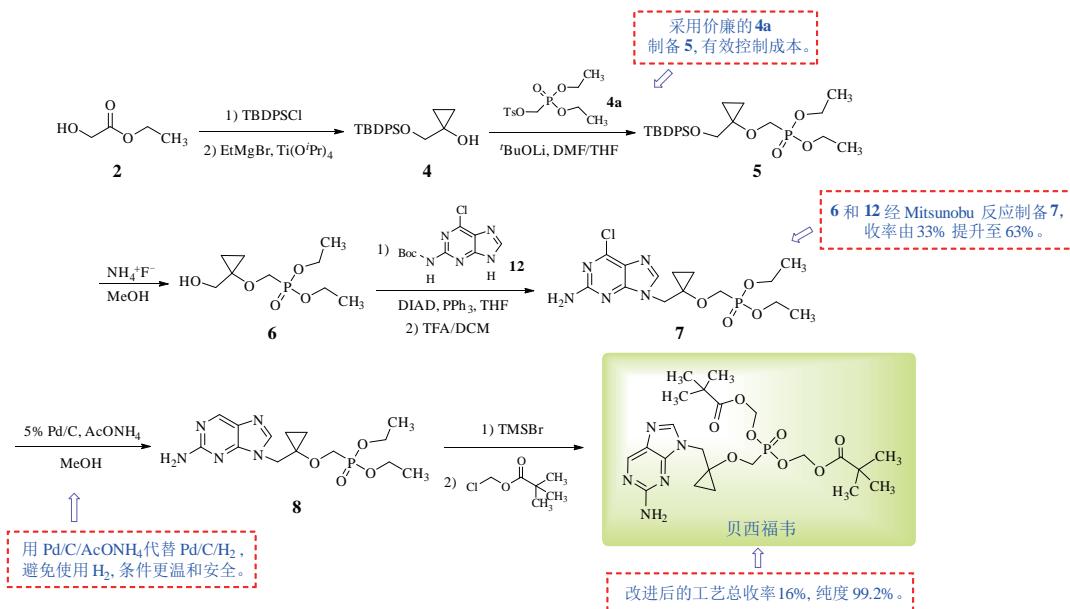
1508 GLP-1 融合蛋白的表达、纯化及其初步活性分析………姜旖旎，黄宗庆，马洁，冯军*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.004



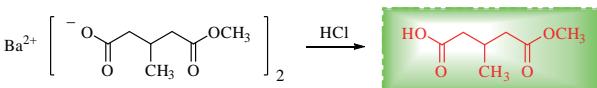
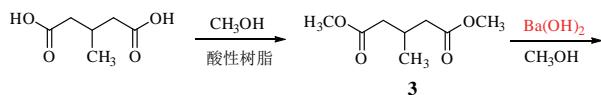
1518 头孢洛林酯的合成新工艺………郭新亮，张乃华，鲍广龙，张仲奎，张贵民*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.005



采用新工艺合成了头孢洛林酯，纯度99.56%，总收率34.8%，本工艺已经过中试验证。

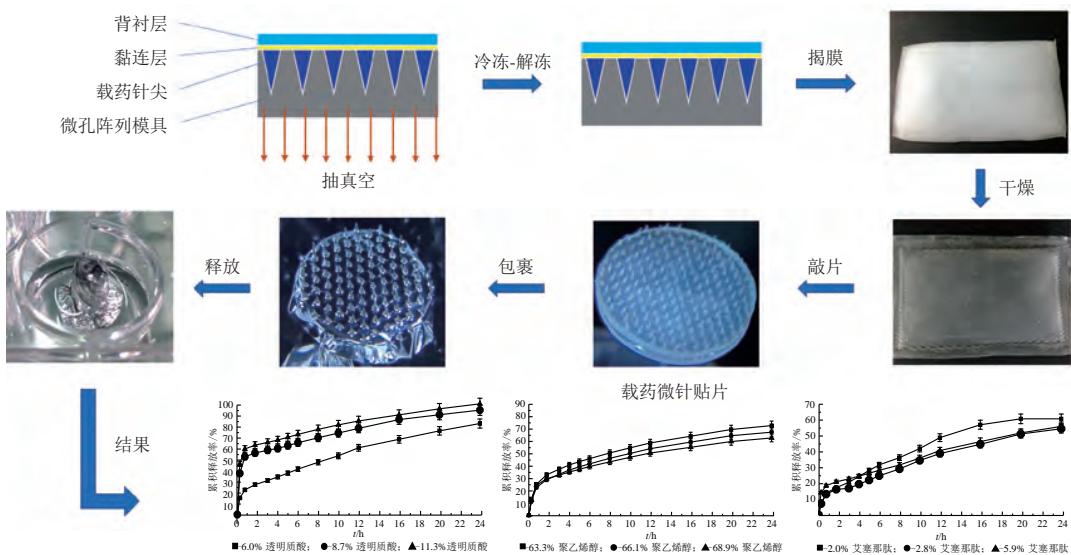


1538 β -甲基戊二酸单甲酯的合成.....赵丽华
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.009

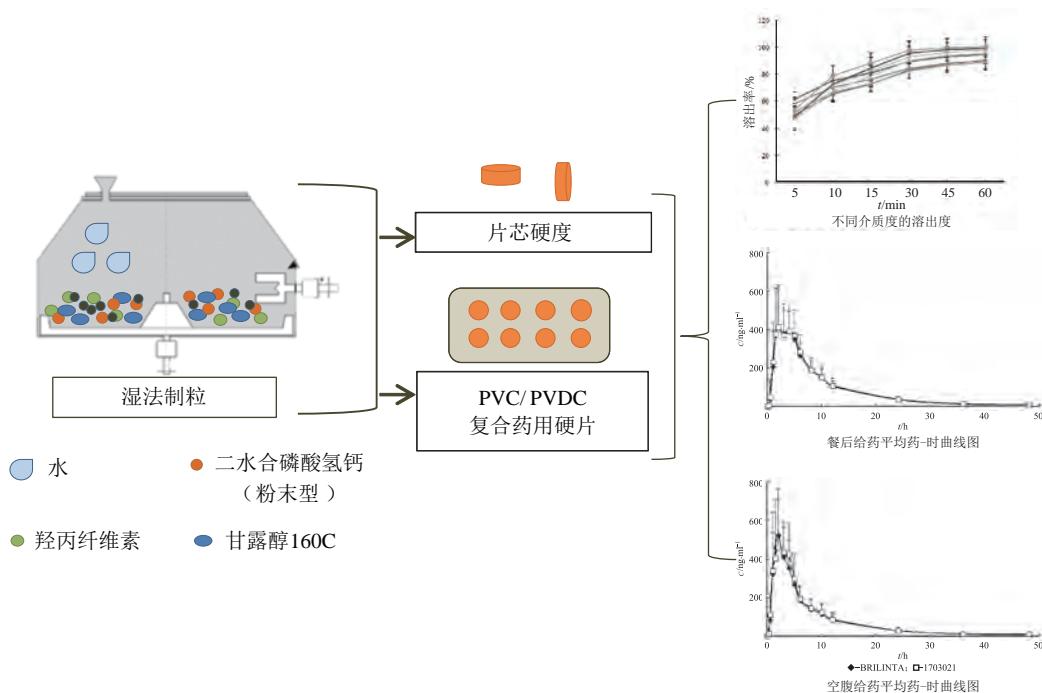


利用氢氧化钡对酯的温和碱解反应，开发了一条合成 β -甲基戊二酸单甲酯的新路线，总收率 90.3%。此工艺已经过中试验证。

1541 艾塞那肽相转化微针的制备及处方优化.....朱嗣文，刘 锋，吴 飞，金 拓*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.010



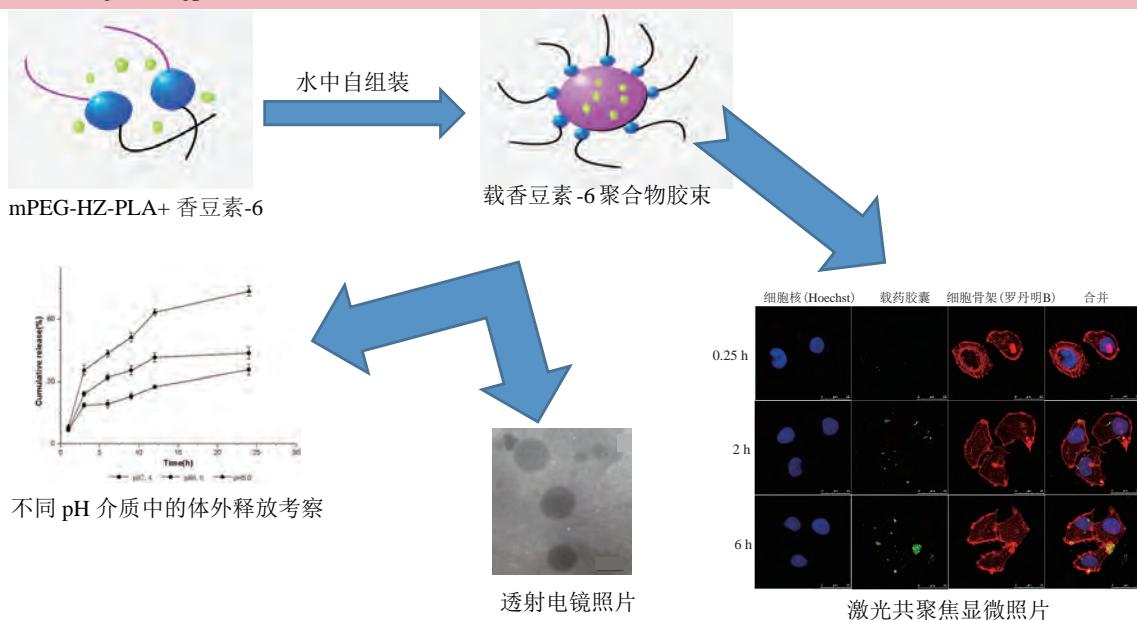
1548 替格瑞洛片处方工艺考察及其人体生物等效性.....刘 双，屈 芮，唐 云，朱永强*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.011



1559 包载荧光探针香豆素-6的pH敏感型聚合物胶束的制备与评价

赵善科, 尹美林, 郑岩, 史淑丹, 孙玉琦*

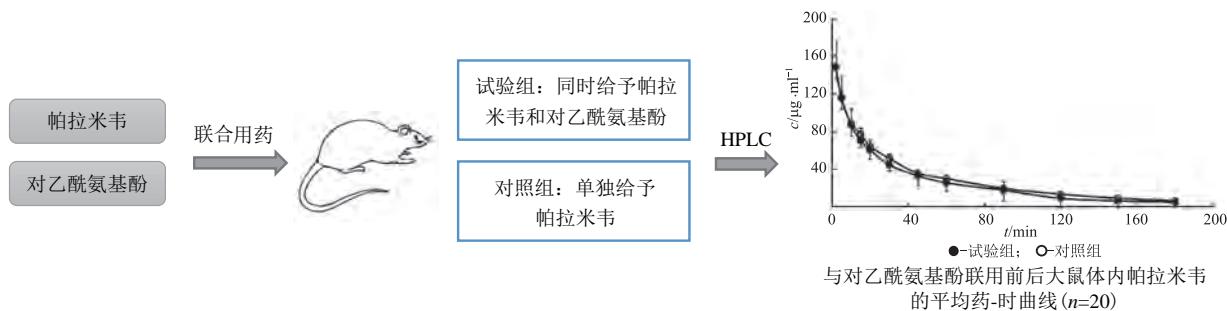
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.012



1567 对乙酰氨基酚对帕拉米韦在大鼠体内药动学的影响

赵晓娟, 黄博雅, 刘秀菊, 赵永红, 张志清*

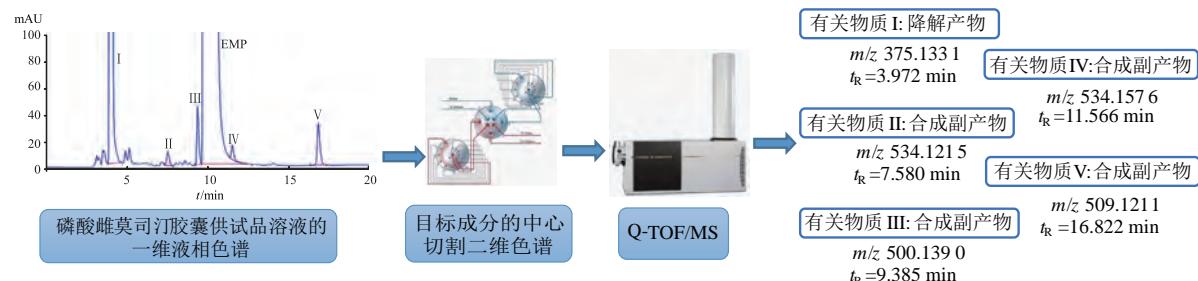
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.013



1571 中心切割二维高效液相质谱联用法分析磷酸雌莫司汀胶囊中的有关物质

邓云菲, 王林波, 吴晓莺*, 彭兴盛, 林梅

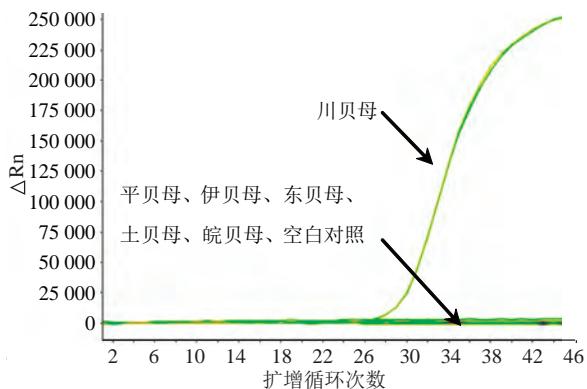
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.014



1581 川贝母物种特异性 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法的建立

王成, 常志远, 兰青阔, 赵新, 兰璞*

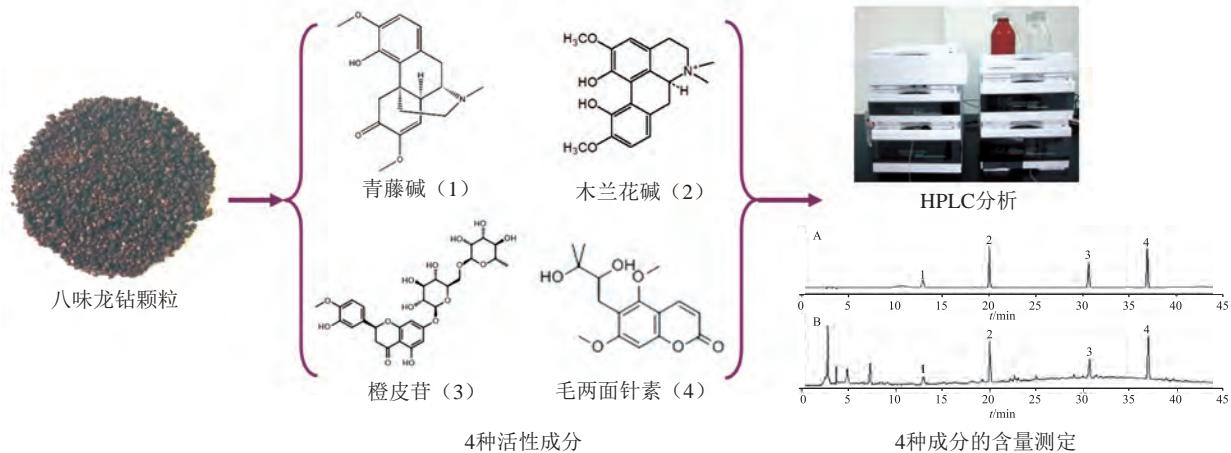
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.015



1586 壮药八味龙钻颗粒中 4 种有效成分的 HPLC 法测定

李海娇, 李琪, 方刚, 王平, 范刚*

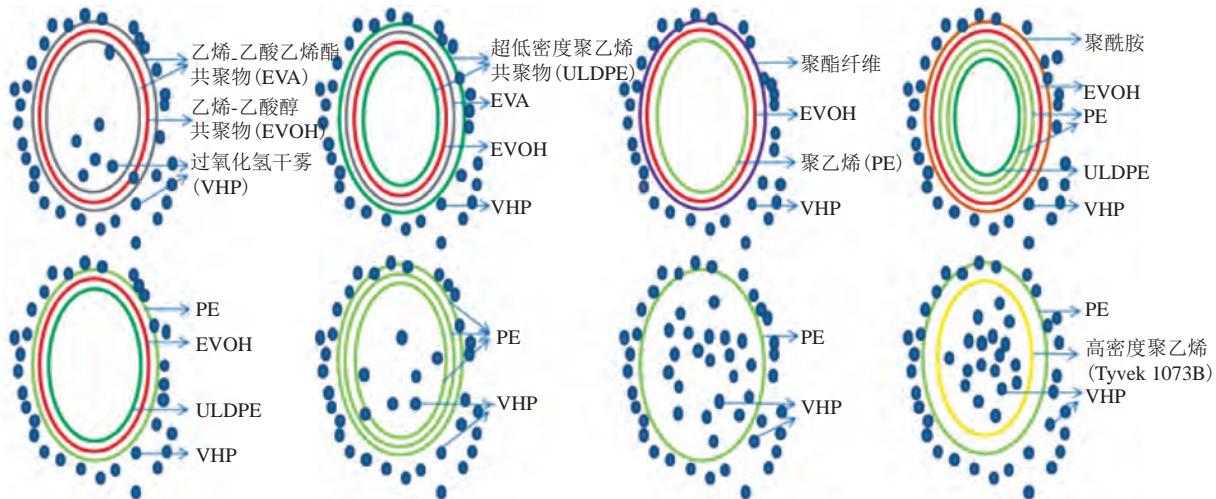
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.016

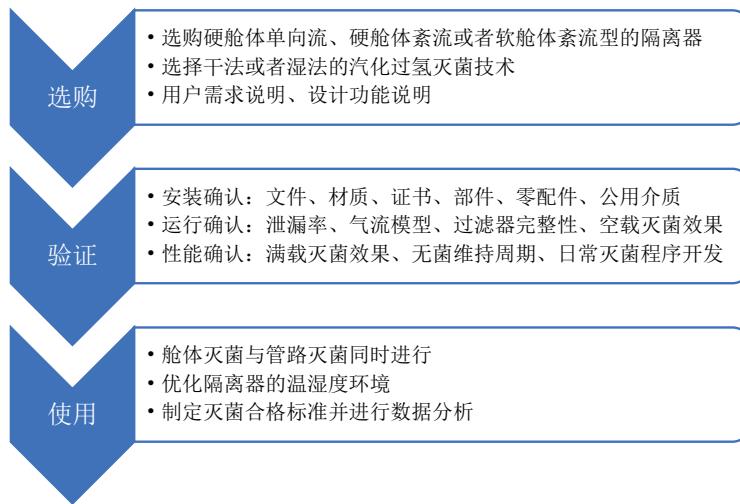
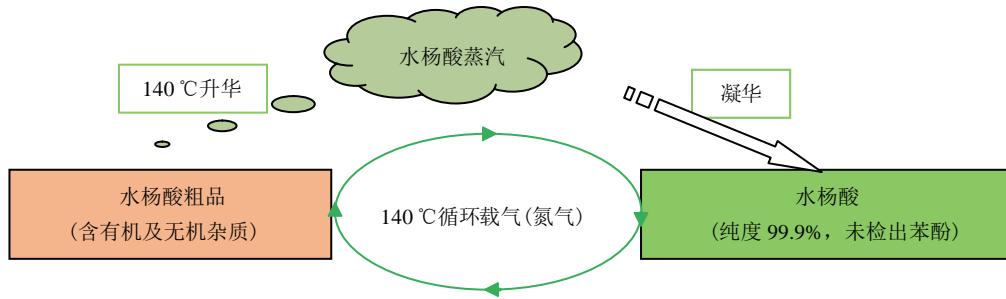


1591 隔离器 VHP 灭菌时呼吸袋及储液袋穿透性探究

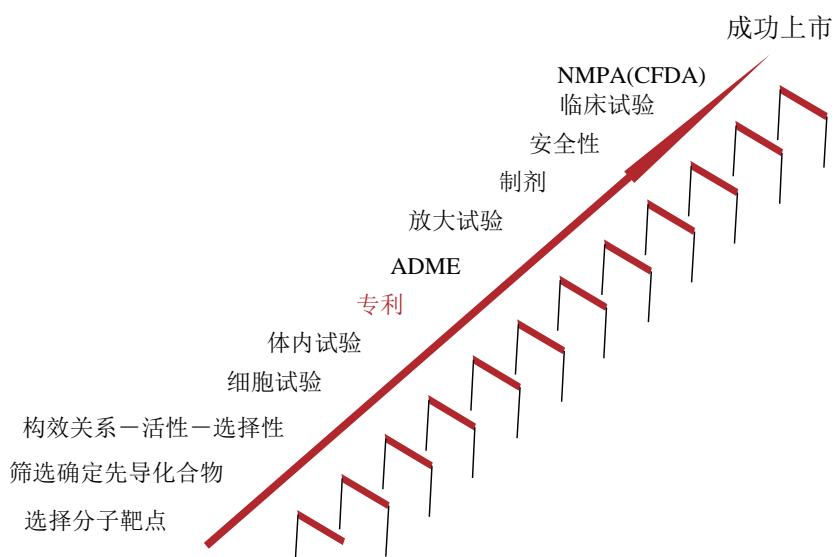
刘向东, 梁开宇, 邓启, 徐威, 王威*

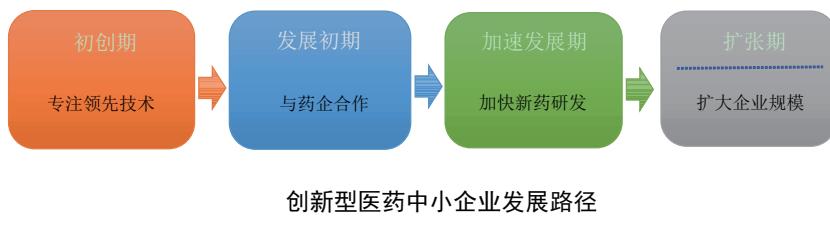
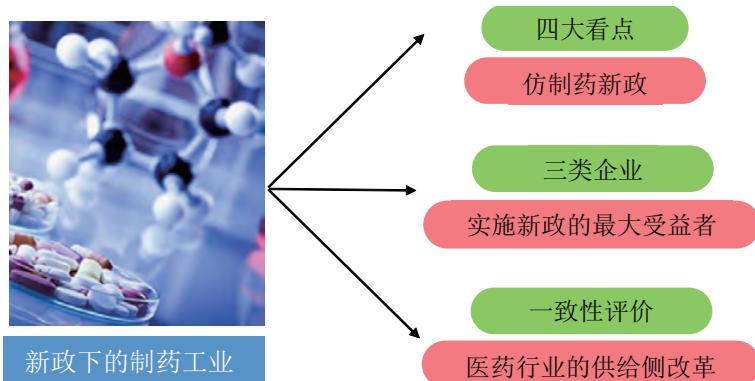
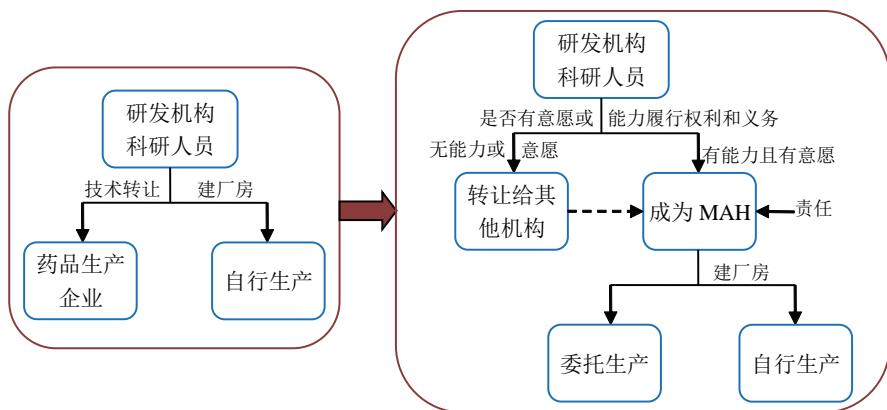
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.017





· 药学管理与信息 ·





· 其他 ·

广告索引(1516)

CONTENTS

Chinese Journal of Pharmaceuticals

Founded in 1970, Monthly

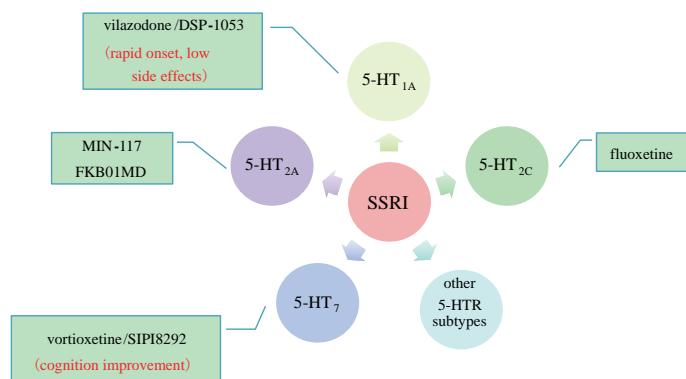
Volume 49, Number 11

November 10, 2018

Perspectives & Review

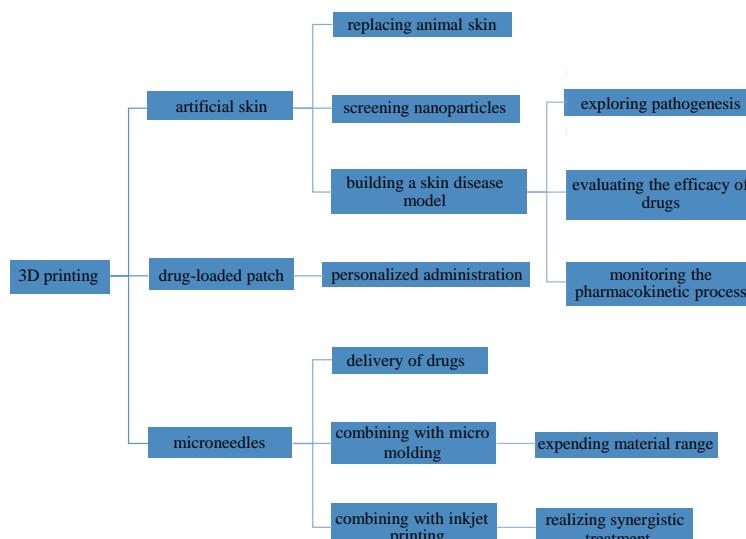
- 1481** Research Progress of Multi-target Antidepressants with SSRI and 5-HT Receptor Subtypes Activity *GU Z S, LI J Q**

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.001



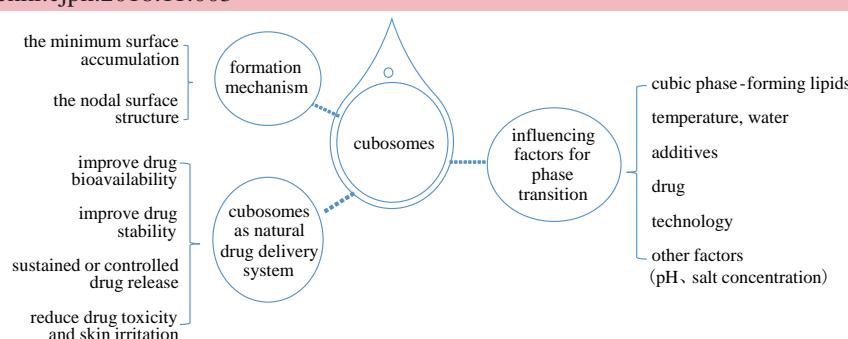
- 1492** Recent Advances of 3D Printing Technology in Transdermal Drug Delivery System *YANG Y L, TONG X L, BIAN Q, LUO H F**

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.002



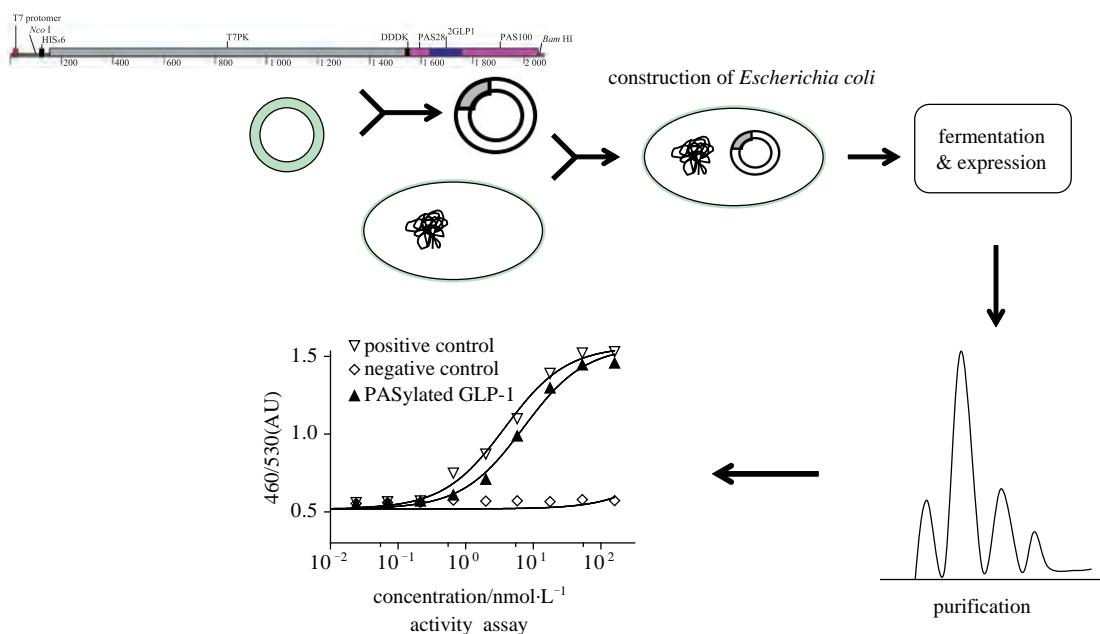
- 1500** Research Advance in Cubosomes as Carriers for Natural Medicines *XU L X, SHEN B D, JIN C, ZHU W F**

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.003

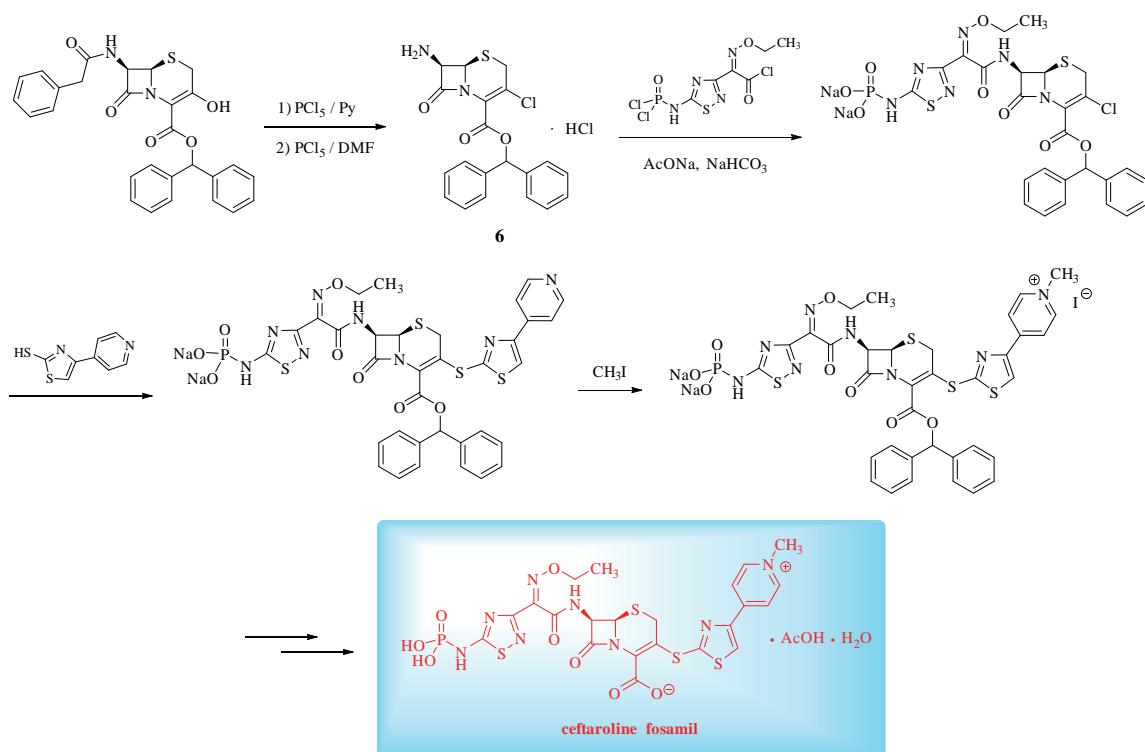


Paper

- 1508** Expression, Purification and Preliminary Activity Analysis of GLP-1 Fusion Protein.....
.....JIANG Y N, HUANG Z Q, MA J, FENG J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.004

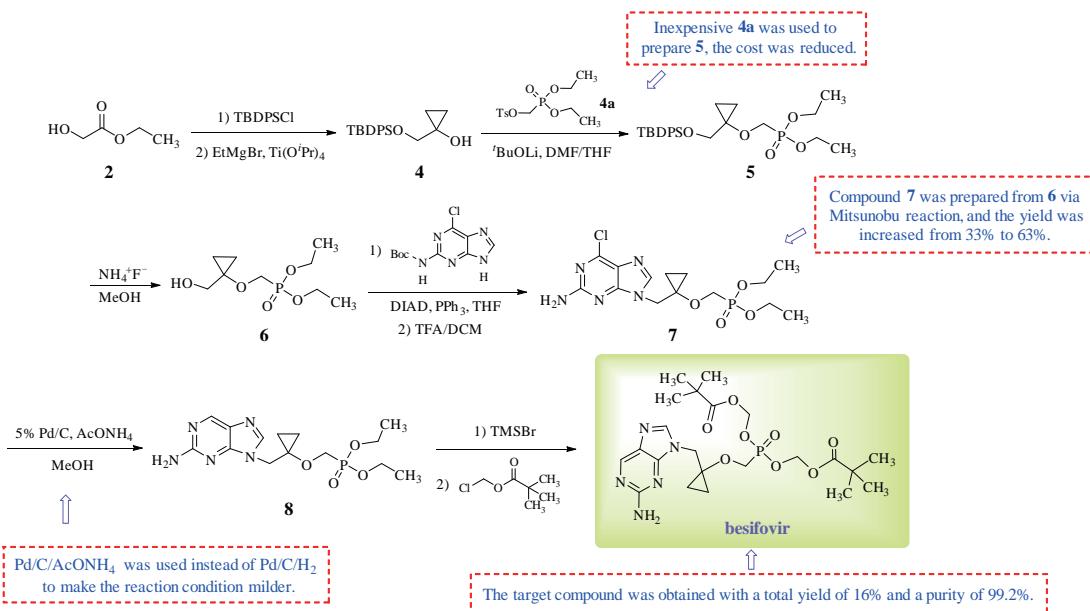


- 1518** A Novel Synthetic Process for Ceftaroline Fosamil.....
.....GUO X L, ZHANG N H, BAO G L, ZHANG Z K, ZHANG G M*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.005

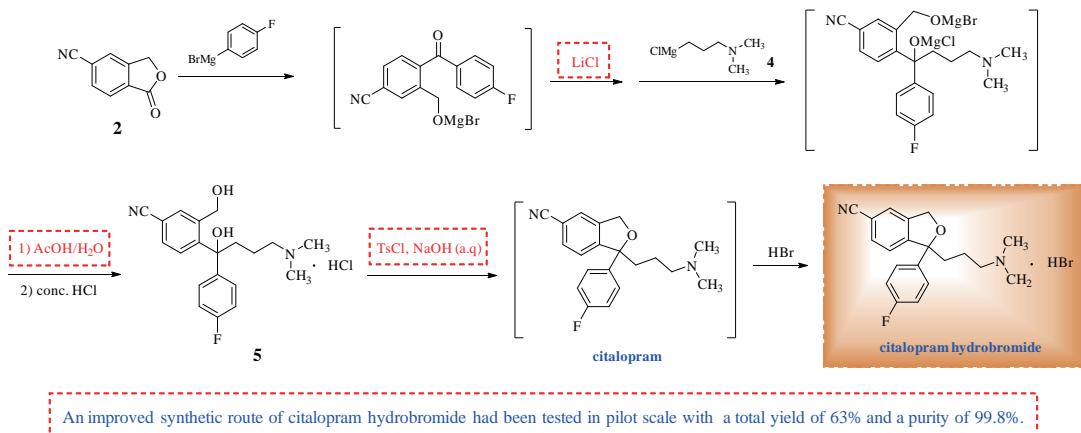


Ceftaroline fosamil was synthesized with a purity of 99.56% and a total yield of 34.8%, and this new process had been tested in pilot scale.

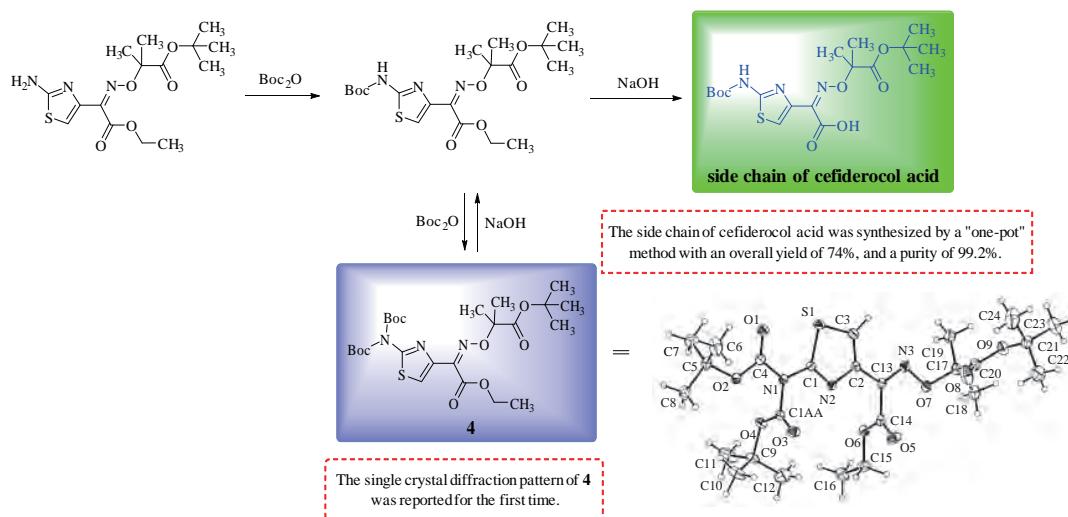
1524 Synthesis Improvement of Besifovir.....*WU Y, LIAO G C, HAO L H, WANG P C, SUN P H**
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.006



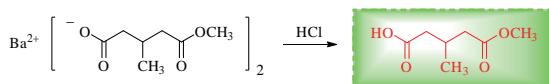
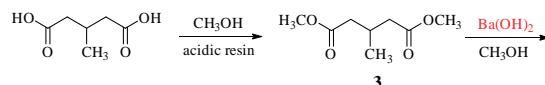
1530 Process Improvement for Citalopram Hydrobromide.....*HUANG W F, YU W L, HU J X, ZHANG J**
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.007



1534 Synthesis of the Side Chain of Cefiderocol Acid.....*TANG Z Y, YANG X W, LU K K, MAO Z J**
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.008

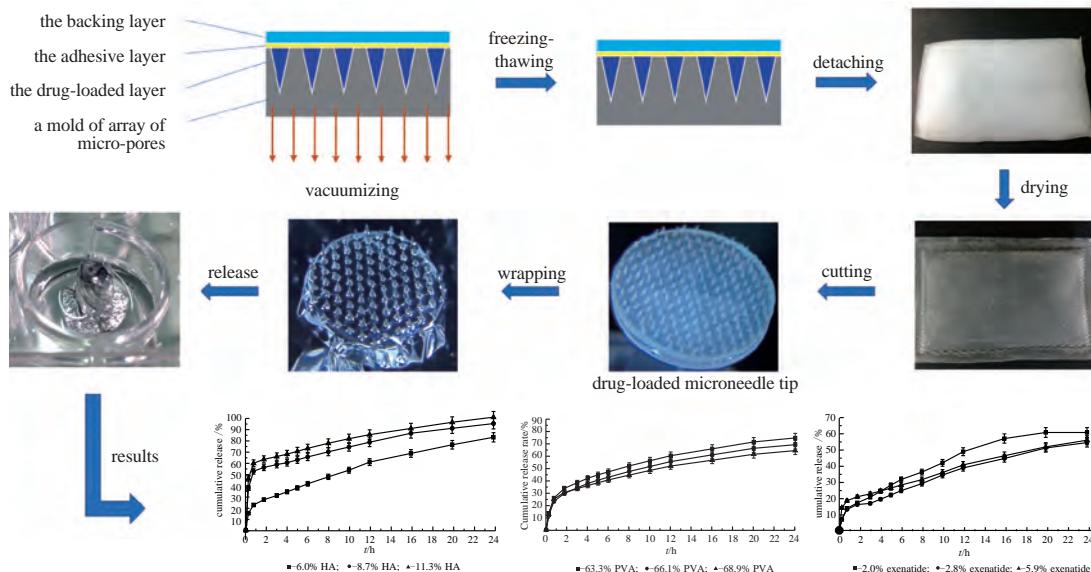


1538 Synthesis of Monomethyl β -Methylglutarate.....**ZHAO L H**
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.009

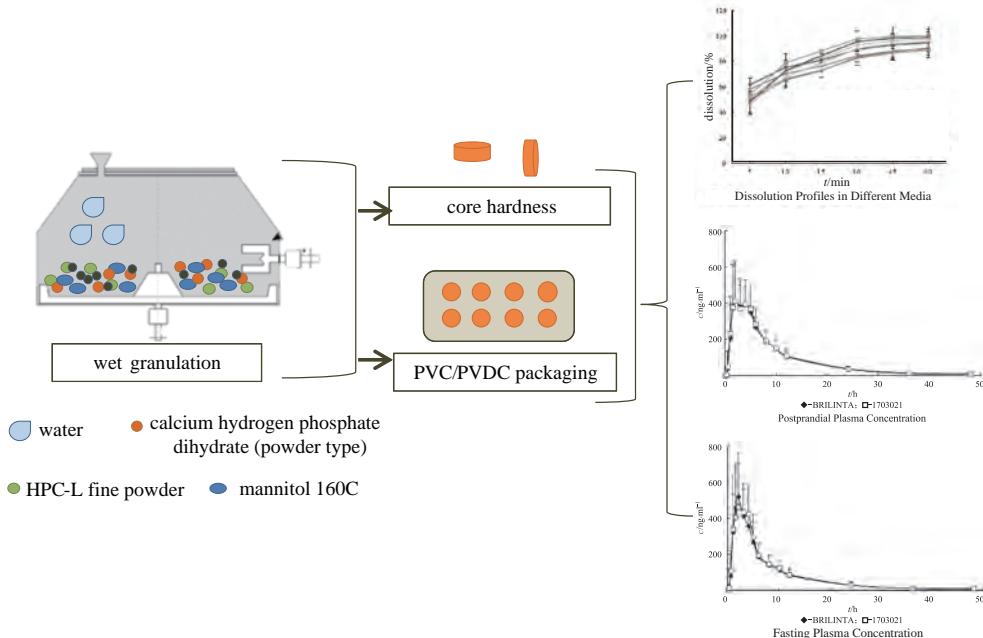


A novel synthetic process for monomethyl β -methylglutarate by utilizing the mild alkaline hydrolysis of barium hydroxide was developed. This new process had been validated in pilot scale with a total yield of 90.3%.

1541 Preparation and Formulation Optimization of the Exenatide Phase-transition Microneedle Tips.....**ZHU S W, LIU F, WU F, JIN T***
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.010



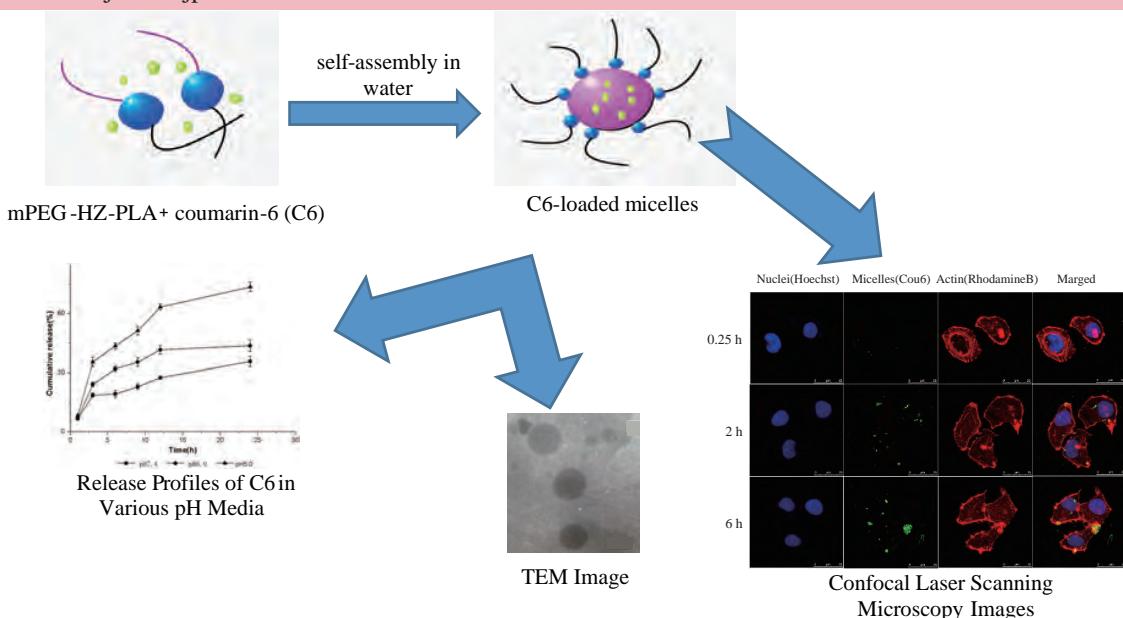
1548 Investigation on Formulation and Process of Ticagrelor Tablets and Their Human Bioequivalence.....**LIU S, QU R, TANG Y, ZHU Y Q***
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.011



1559 Preparation and Evaluation of pH-Sensitive Polymer Micelles Coated with Fluorescent Probe Coumarin-6.....

ZHAO S K, YIN M L, ZHENG Y, SHI S D, SUN Y Q*

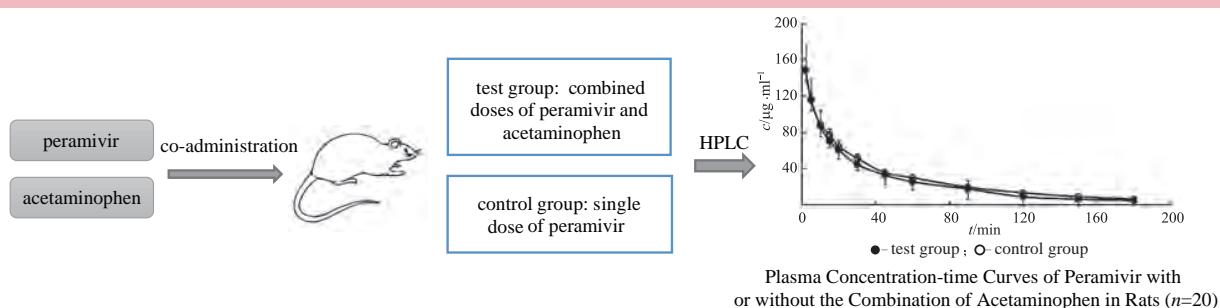
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.012



1567 Effect of Acetaminophen on the Pharmacokinetics of Peramivir in Rats.....

ZHAO X J, HUANG B Y, LIU X J, ZHAO Y H, ZHANG Z Q*

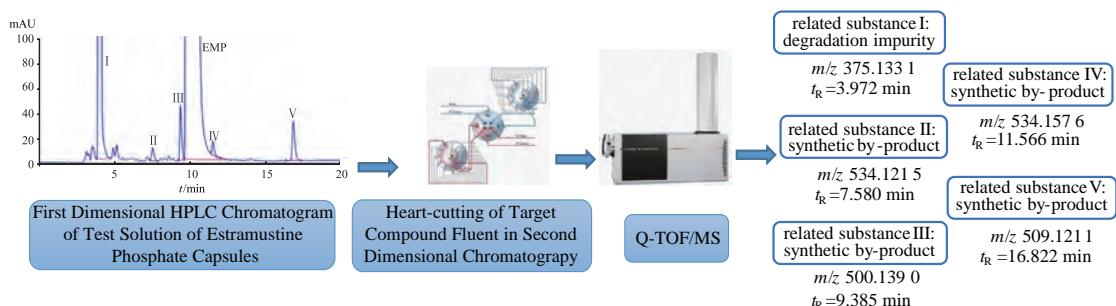
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.013



1571 Analysis of Related Substances in Estramustine Phosphate Capsules by Heart-cutting Two-dimensional Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry.....

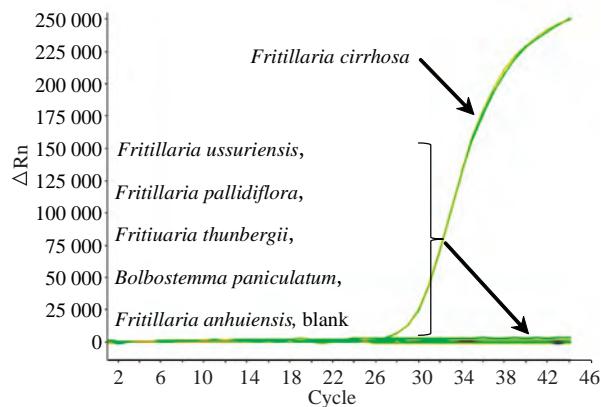
DENG Y F, WANG L B, WU X L*, PENG X S, LIN M

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.014



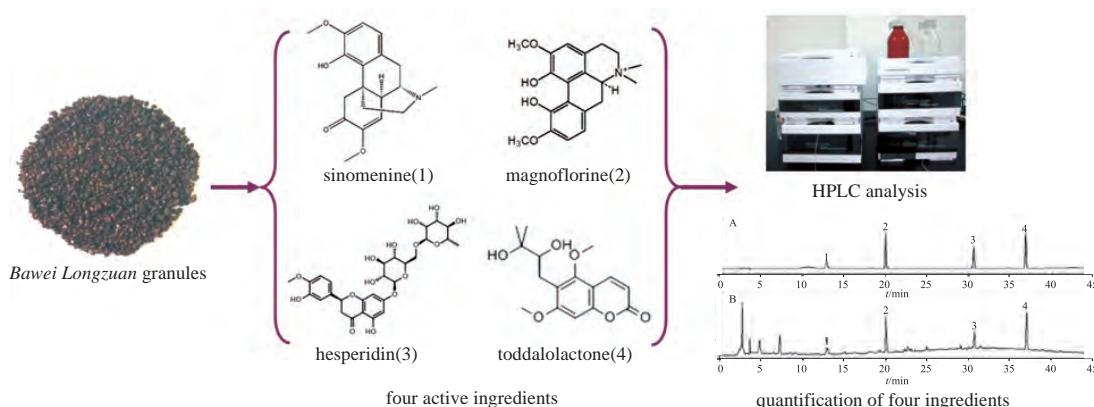
1581 Establishment of Real-time Quantitative PCR for TaqMan Probe Method of *Fritillaria cirrhosa* Species.....WANG C, CHANG Z Y, LAN Q K, ZHAO X, LAN P*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.015



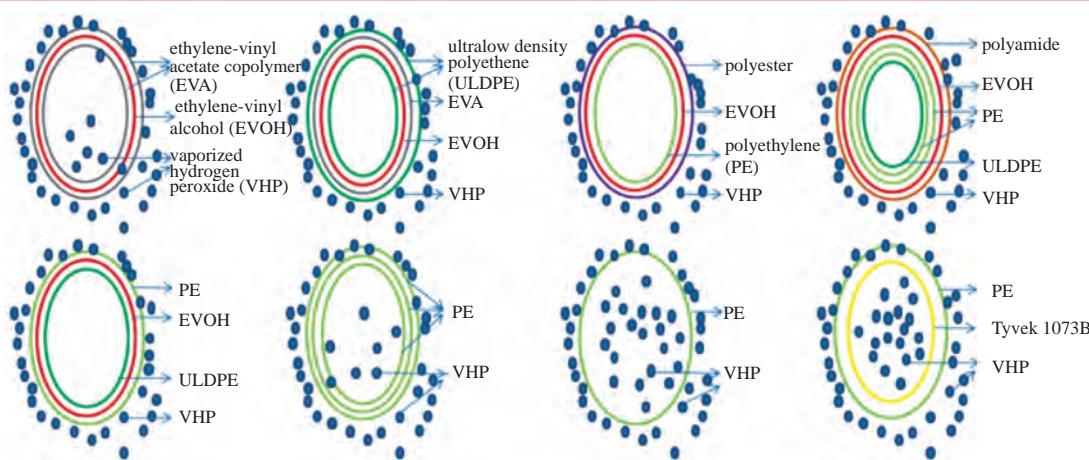
1586 Determination of Four Active Ingredients in *Bawei Longzuan* Granules by HPLC.....LI H J, LI Q, FANG G, WANG P, FAN G*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.016

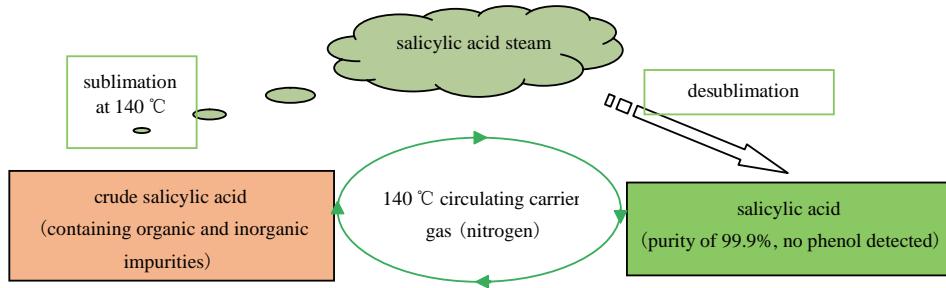


1591 Penetrability Tests of Breathe Bags and Bioprocess Containers during VHP Sterilization.....LIU X D, LIANG K Y, DENG Q, XU W, WANG W*

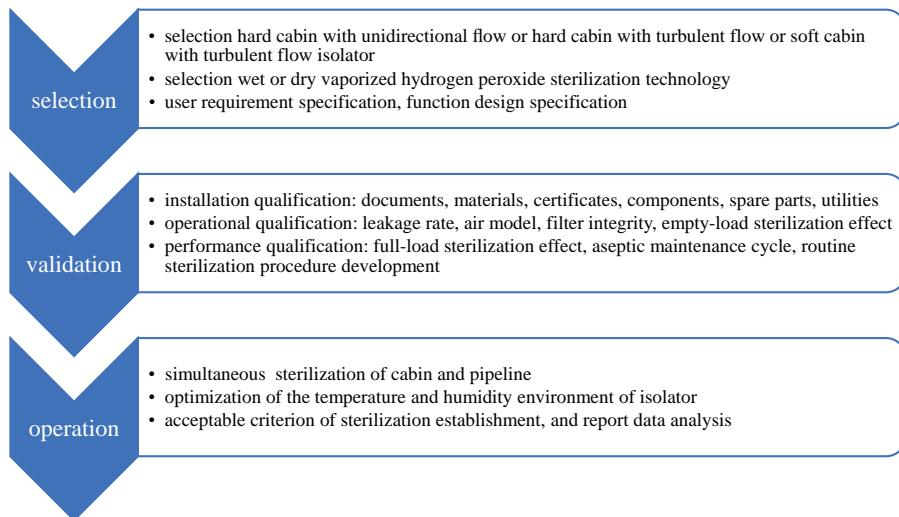
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.017



1595 Purification of Salicylic Acid by Sublimation.....*XU L, XU X, LIN B, LIU F, ZHAO G B**
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.018

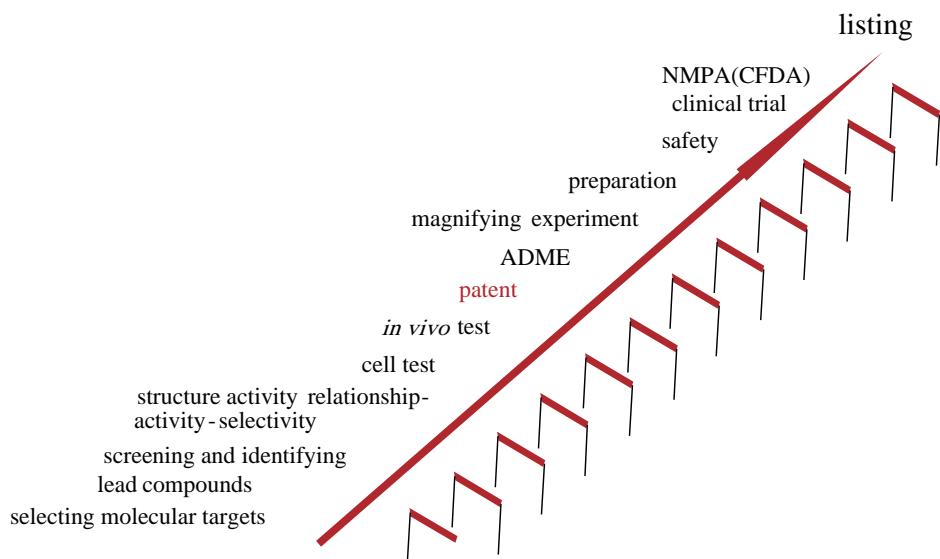


1602 Selection, Validation and Operation of Isolator for Sterility Test.....*HUANG J L, WANG Y*, HE R, XU X E*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.019



Pharmaceutical Management & Information

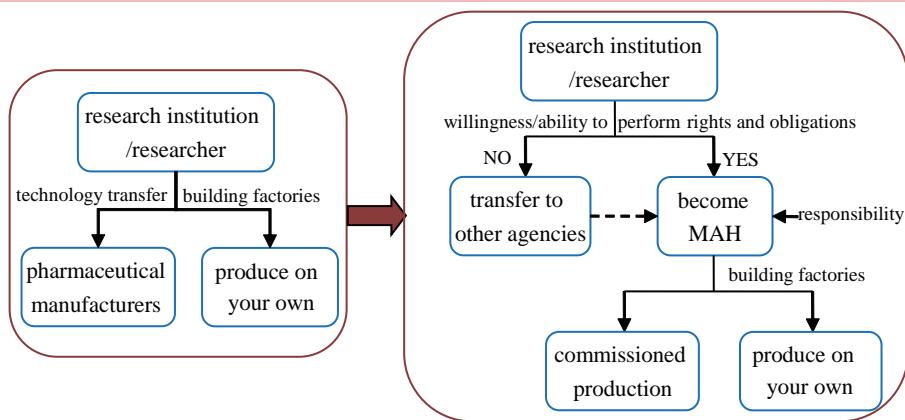
1610 Patent Protection Strategies in New Drug Development.....*LIU G M, HUANG C F*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.020



1615 Discussion of the Link between Rules of Marketing Authorization Holder and the Existing System

ZHAO H T, YAN J Z, SHAO R*

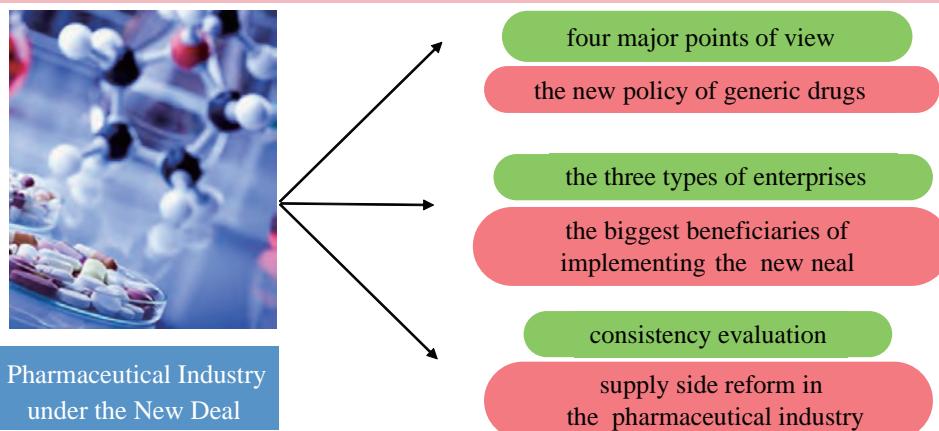
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.021



1624 New Ideas for the Development of Chinese Pharmaceutical Industry under the New Policy of Medicine

XU P H, LIU T Y*, GAN R F

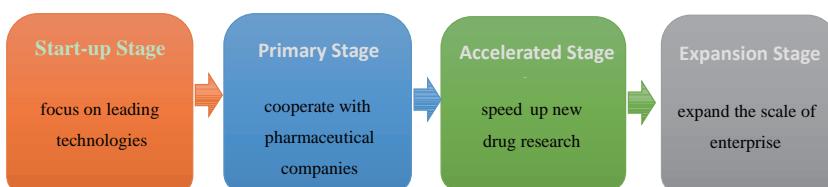
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.022



1629 Development Path of Innovative Small and Medium-sized Pharmaceutical Enterprises: Taking Ionis Pharmaceuticals for Example

LU J, YAN J Z, SHAO R*

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.023



Development Path of Innovative Small and Medium-sized Pharmaceutical Enterprises

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2018年第49卷 第11期 11月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.49 No.11 November 10, 2018

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	王 盈	Executive Editor	WANG Ying
编 辑 出 版	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of <i>Chinese Journal of Pharmaceuticals</i>
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号(200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电 话	021-62474272	Tel	021-62474272
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com	E-mail	taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人: 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*154*zh*P*20.00* *23*2018-11

2018年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205

国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



公众微信
微信号: cjph-cjph



公众微博
weibo.com/cjph

《中国医药工业杂志》第十四届编辑委员会

EDITORIAL BOARD OF 《CHINESE JOURNAL OF PHARMACEUTICALS》

(以姓名拼音为序)

名誉主编(HONORARY EDITOR-IN-CHIEF)

桑国卫*(SANG Guowei)

顾问(CONSULTANT)

陈凯先*(CHEN Kaixian)

蒋建东(JIANG Jiandong)

沈克康(SHEN Jingkang)

杨胜利*(YANG Shengli)

丁 健*(DING Jian)

孔德云(KONG Deyun)

王广基*(WANG Guangji)

朱宝泉(ZHU Baoquan)

侯惠民*(HOU Huimin)

李绍顺(LI Shaoshun)

吴晓明(WU Xiaoming)

主任编委(EDITOR-IN-CHIEF)

陈芬儿*(CHEN Fener)

副主任编委(ASSOCIATE EDITOR-IN-CHIEF) (^常务副主任编委)

白 鹏(BAI Hua)

陈桂良(CHEN Guiliang)

唐 岳(TANG Yue)

魏宝康(WEI Baokang)

张 霽(ZHANG Ji)

周 斌(ZHOU Bin)

朱建伟(ZHU Jianwei)

陈 兵(CHEN Bing)

胡文浩(HU Wenhao)

王 浩^△(WANG Hao)

杨 超(YANG Chao)

张万斌(ZHANG Wanbin)

周伟澄^△(ZHOU Weicheng)

陈代杰^△(CHEN Daijie)

李明华(LI Minghua)

王军志(WANG Junzhi)

张贵民(ZHANG Guimin)

张绪穆(ZHANG Xumu)

周 燕(ZHOU Yan)

编委(MEMBER OF THE EDITORIAL BOARD)

蔡正艳(CAI Zhengyan)

邓卫平(DENG Weiping)

董树沛(DONG Shupei)

冯 军(FENG Jun)

干荣富(GAN Rongfu)

何严萍(HE Yanping)

黄志红(HUANG Zhihong)

刘玲玲(LIU Lingling)

龙亚秋(LONG Yaqiu)

罗国强(LUO Guoqiang)

马 璞(MA Jing)

邵 蓉(SHAO Rong)

孙飘扬(SUN Piaoyang)

孙 逊(四川大学)(SUN Xun)

屠永锐(TU Yongrui)

王 昱(WANG Min)

王 彦(WANG Yan)

吴 伟(WU Wei)

杨立荣(YANG Lirong)

杨玉社(YANG Yushe)

张福利(ZHANG Fulì)

张卫东(ZHANG Weidong)

赵临襄(ZHAO Linxiang)

钟大放(ZHONG Dafang)

周建平(ZHOU Jianping)

陈少欣(CHEN Shaoxin)

丁锦希(DING Jinxi)

范代娣(FAN Daidi)

傅 磊(FU Lei)

郭 文(GUO Wen)

胡海峰(HU Haifeng)

李范珠(LI Fanzhu)

刘新泳(LIU Xinyong)

陆伟根(LU Weigen)

罗一斌(LUO Yibin)

潘卫三(PAN Weisan)

宋秋玲(SONG Qiuling)

孙小强(SUN Xiaoqiang)

陶 涛(TAO Tao)

王建新(WANG Jianxin)

王全瑞(WANG Quanrui)

王玉成(WANG Yucheng)

吴 勇(WU Yong)

杨 明(YANG Ming)

殷 明(YIN Ming)

张启明(ZHANG Qiming)

张英俊(ZHANG Yingjun)

赵文杰(ZHAO Wenjie)

钟为慧(ZHONG Weihui)

程卯生(CHENG Maosheng)

董江萍(DONG Jiangping)

方 浩(FANG Hao)

甘 勇(GAN Yong)

何 菱(HE Ling)

胡又佳(HU Youjia)

李建其(LI Jianqi)

刘 忠(LIU Zhong)

陆伟跃(LU Weiyue)

吕 扬(LÜ Yang)

朴虎日(PIAO Huri)

苏为科(SU Weike)

孙 逊(复旦大学)(SUN Xun)

涂 涛(TU Tao)

王 健(WANG Jian)

王善春(WANG Shanchun)

吴 彤(WU Tong)

吴勇琪(WU Yongqi)

杨苏蓓(YANG Subei)

尤启冬(YOU Qidong)

张庆文(ZHANG Qingwen)

张志荣(ZHANG Zhirong)

郑起平(ZHENG Qiping)

周虎臣(ZHOU Huchen)

*院士

《中国医药工业杂志》编辑部成员(EDITORIAL STAFF)

总编辑(Managing Editor): 周伟澄(ZHOU Weicheng)

副总编辑(Associate Managing Editor): 黄志红(HUANG Zhihong), 刘玲玲(LIU Lingling)

责任编辑(Editor): 刘玲玲(LIU Lingling)(兼), 王 盈(WANG Ying), 郭琳琳(GUO Linlin), 马建芳(MA Jianfang)

美术编辑(Art Editor): 沈建成(SHEN Jiancheng), 陆燕玲(LU Yanling), 钱苗苗(QIAN Miaomiao)

编辑助理(Editorial Assistant): 韦旭华(WEI Xuhua)

广告、发行负责(Advertisement Manager): 陶旭辉(TAO Xuhui), 欧阳怡(OUYANG Yi)

川贝母物种特异性 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 方法的建立

王成, 常志远, 兰青阔, 赵新, 兰璞*

(天津市农业质量标准与检测技术研究所, 天津 300381)

摘要:建立了TaqMan探针实时荧光PCR法对川贝母进行真伪性鉴别。设计川贝母物种特异性引物、探针,通过筛选、特异性测试、扩增条件优化以及方法灵敏度测试,形成一套川贝母物种特异性实时荧光PCR方法。在此基础上建立标准曲线,并对已知含量的川贝母供试品进行定量测试,以检验方法的准确性。其中,引物探针组合“川贝母-3-1QF/1QR/2P”的特异性较好,且当引物终浓度 $1.2\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、探针终浓度 $0.6\text{ }\mu\text{mol/L}$ 时,可检测川贝母含量低至0.05%的样品。本方法特异性和灵敏度高,能对未知含量的川贝母真伪混样进行相对定量,且操作简便快捷,可用于鉴别川贝母真伪性及相对定量。

关键词:川贝母; 实时荧光定量PCR; TaqMan探针; 鉴别

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-8255(2018)11-1581-05

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.11.015

川贝母 (*Fritillaria cirrhosa* D. Don) 具有悠久的药用历史,以川贝母为原料生产的中成药多达200种^[1]。但川贝母生长周期长、产量低,同时经过多年采挖,资源破坏严重,其价格逐年攀升^[2],导致大量掺伪品流通于市^[3-4]。传统的药材鉴别方法有性状鉴别法^[5]、显微鉴别^[6]、光谱法^[7]、薄层色谱法^[8]。中国药典2015年版一部中,新增了川贝母聚合酶链式反应-限制性内切酶长度多态性方法(PCR-RFLP)鉴别,且对川贝母进行了定义,即川贝母为百合科植物川贝母、暗紫贝母(*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia)、甘肃贝母(*Fritillaria przewalskii* Maxim.)、梭砂贝母(*Fritillaria delavayi* Franch.)、太白贝母(*Fritillaria taipaiensis* P. Y. L.)或瓦布贝母 [*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia var. *wabuensis* (S. Y. Tang et S. C. Yue) Z. D. Liu, S. Wang et S. C. Chen] 的干燥鳞茎。该方法灵敏度和准确度高,但只能对掺伪品进行定性检测,并不能直观地反映

出川贝母的含量。据此,本试验采用TaqMan探针法,建立了实时荧光定量PCR法特异性检测川贝母,并实现了掺伪品中川贝母含量的准确测定。

1 仪器与试药

MM400型球磨仪(德国Retsch公司);ND-1000型超微量紫外分光光度计(美国Thermo Fisher公司);SteponePlus型实时荧光定量PCR仪(美国ABI公司)。

新型植物基因组DNA提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,货号DP320-03];Premix Ex Taq(TaKaRa公司,货号RR390);引物和探针(苏州金唯智生物技术有限公司);鲑鱼精DNA(Solarbio,货号H1060)。对照药材川贝母和特异性鉴定样品平贝母(*Fritillaria ussuriensis* Maxim.)、伊贝母(*Fritillaria pallidiflora* Schrenk)均为国家标准物质(中国食品药品检定研究院);暗紫贝母、甘肃贝母、梭砂贝母、太白贝母、瓦布贝母、东贝母(*Fritillaria thunbergii* Miq. Var. *Chekiangensis* Hsiao et K. C. Hsia)、土贝母 [*Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet]、皖贝母(*Fritillaria anhuiensis* S. C. Chen et S. P. Yin)均购自河北省安国中药材市场,并对每个样品进行了ITS2序列测序验证。

2 方法与结果

2.1 样品处理、序列分析及引物设计

取东贝母、土贝母、皖贝母各1g,用70%乙醇擦拭表面,晾干,用球磨仪磨成极细粉末。分别精密称取上述细粉100mg,置2ml离心管中,待

收稿日期: 2018-01-04

作者简介: 王成(1988—),男,硕士,从事中药分子检测技术研究工作。

Tel: 15822477770

E-mail: wangcheng880625@126.com

通信联系人: 兰璞(1987—),男,助理副研究员,主要从事农产品质量安全管理工作。

Tel: 13920827328

E-mail: lanpu28@163.com

用。参照新型植物基因组 DNA 提取试剂盒操作提取 DNA, 利用超微量紫外分光光度计测量 DNA 的浓度及纯度。

根据 Xin 等利用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记鉴别川贝母的研究报道^[9], 获得 CBM08 川贝母特异性序列。通过 NCBI-Blast 序列比对, 未见与之同源的其他物种, 因此利用 Primer Express 3.0 软件, 设计 10 对川贝母特异性引物、探针 (见表 1)。

表 1 川贝母物种的特异性引物、探针
Tab.1 Species Specific Primers and Probes of *Fritillaria cirrhosa* D. Don

序号	引物、探针名称	序列 (5'→3')
1	川贝母-1-QF	GCAGAGCGGACACGGACTA
	川贝母-1-QR	CTGTAGCCTCTAACCCCTATCCA
	川贝母-1-IP	TCTCTTGTCCCAGATGGATGATCCGTACT
2	川贝母-1-QF	GCAGAGCGGACACGGACTA
	川贝母-1-QR	CTGTAGCCTCTAACCCCTATCCA
	川贝母-1-2P	CCCGATGGATGATCCGTACTGGCC
3	川贝母-2-1QF	TAGAGGCTACAGTCGTGCTTGCT
	川贝母-2-1QR	ACCTTGTCGCAAGCCCATAT
	川贝母-2-1P	CTGTGGATCGTCCCTTAACCCCTGCG
4	川贝母-2-1QF	TAGAGGCTACAGTCGTGCTTGCT
	川贝母-2-1QR	ACCTTGTCGCAAGCCCATAT
	川贝母-2-2P	CGTTCCCTTAACCCCTGCGGATGG
5	川贝母-2-2QF	GAGGCTACAGTCGTGCTTGCT
	川贝母-2-2QR	GACCTTGTCGCAAGCCCATAT
	川贝母-2-1P	CTGTGGATCGTCCCTTAACCCCTGCG
6	川贝母-2-2QF	GAGGCTACAGTCGTGCTTGCT
	川贝母-2-2QR	GACCTTGTCGCAAGCCCATAT
	川贝母-2-2P	CGTTCCCTTAACCCCTGCGGATGG
7	川贝母-3-1QF	GTGGAGGAATCCCTGGGAAT
	川贝母-3-1QR	ATCCCTCGGAATCAAGAACAT
	川贝母-3-1P	AGGACATAACCGCTCAACCGCCCCA
8	川贝母-3-1QF	GTGGAGGAATCCCTGGGAAT
	川贝母-3-1QR	ATCCCTCGGAATCAAGAACAT
	川贝母-3-2P	ACATAACCGCTCAACCGCCCCACTACA
9	川贝母-3-2QF	TGGAGGAATCCCTGGGAAT
	川贝母-3-2QR	GCGGATCCCTCGGGAAAT
	川贝母-3-1P	AGGACATAACCGCTCAACCGCCCCA
10	川贝母-3-2QF	TGGAGGAATCCCTGGGAAT
	川贝母-3-2QR	GCGGATCCCTCGGGAAAT
	川贝母-3-2P	ACATAACCGCTCAACCGCCCCACTACA

2.2 引物、探针筛选

以川贝母基因组 DNA 为模板, 对所设计的 10 对引物、探针组合进行筛选 (图 1)。结果显示, 随着引物、探针组合扩增循环数的增加, 其荧光曲线

上升幅度变小。综合比较, 编号 8 的曲线线型较好, 明显优于其他组合。因此引物、探针组合“川贝母-3-1QF/1QR/2P”为川贝母实时荧光 PCR 检测方法的候选组合。

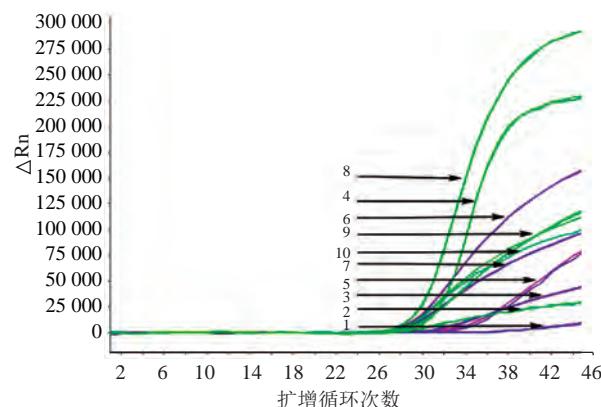


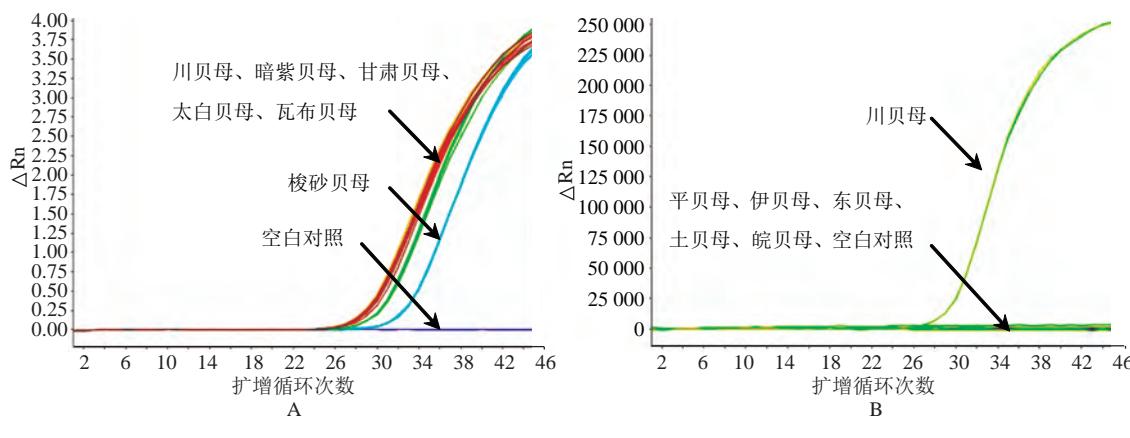
图 1 川贝母引物、探针筛选
Fig.1 Screening of Primers and Probes from *Fritillaria cirrhosa* D. Don

2.3 引物、探针特异性测试

首先利用引物、探针组合“川贝母-3-1QF/1QR/2P”, 以川贝母、暗紫贝母、甘肃贝母、梭砂贝母、太白贝母和瓦布贝母 DNA 为模板进行品种内特异性测试; 再以川贝母、平贝母、伊贝母、东贝母、土贝母、皖贝母 DNA 为模板, 进行品种间特异性测试。品种内特异性测试结果显示, 除空白对照外, 其他几种样品均出现典型的扩增曲线 (图 2A); 品种间特异性测试结果显示, 只有以川贝母为模板时, 出现典型的扩增曲线, 其余样品均未出现扩增 (图 2B), 说明该引物、探针组合无论在川贝母品种内还是品种间, 均具有良好的物种特异性, 可以用于下一步试验。

2.4 PCR 扩增体系及程序的优化

选择引物、探针组合“川贝母-3-1QF/1QR/2P”, 设置 6 个探针浓度梯度 (0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 和 0.6 $\mu\text{mol/L}$), 对应的引物浓度为探针浓度的 2 倍, 进行 PCR 扩增。结果 (图 3) 显示, 随着引物、探针浓度的增加, 荧光扩增曲线上升幅度增大。结合体系配制的限制, 确定 PCR 扩增体系中



A : 药典定义为川贝母的品种 ; B : 药典定义范围外的近缘品种

图 2 特异性测试结果

Fig.2 Specificity Test Results

引物终浓度为 $1.2 \mu\text{mol/L}$, 探针终浓度为 $0.6 \mu\text{mol/L}$ (表 2)。PCR 扩增程序为: 95°C 变性 10 min ; 95°C 变性 15 s , 60°C 退火延伸 60 s , 45 个循环; 在第二阶段的退火延伸 (60°C) 时段收集荧光信号。

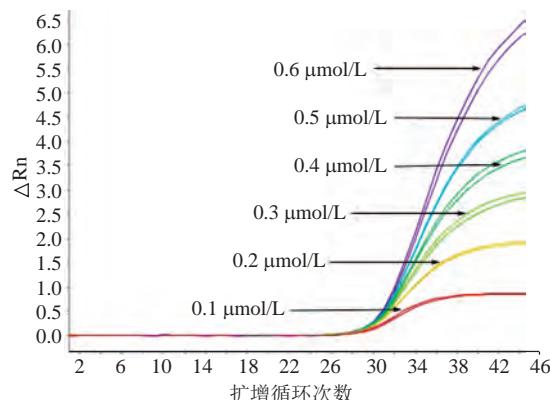


图 3 引物、探针组合浓度的优化

Fig.3 Optimization of Combination Concentrations of Primers and Probes

2.5 方法灵敏度测试

将提取的川贝母基因组 DNA 用鲑鱼精 DNA 进行梯度稀释, 至 DNA 浓度分别为 100% 、 10% 、 1% 、 0.5% 、 0.1% 、 0.05% 、 0.01% 和 0 , 利用优化后的 PCR 扩增条件进行扩增。结果表明, 当川贝母质量分数 $\geq 0.05\%$ 时, 扩增曲线的 C_t 值 (即实时荧光定量 PCR 中起始模板扩增达到一定产物量时所对应的循环数) ≤ 36 ; 当川贝母质量分数为

表 2 实时荧光定量 PCR 扩增体系中各试剂的用量、初始浓度和终浓度

Tab.2 Amounts, Initial and Final Concentrations of Reagents in Amplification System of Quantitative Real-time PCR

名称及初始浓度	终浓度	用量/ μl
10倍工作浓度, PCR缓冲液 ¹⁾	1倍工作浓度	2.5
25 mmol/L氯化镁溶液	2.5 mmol/L	2.5
三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTPs) 混合溶液(各2.5 mmol/L)	0.2 mmol/L	2.0
10 $\mu\text{mol/L}$ 川贝母-3-QF	1.2 $\mu\text{mol/L}$	2.4
10 $\mu\text{mol/L}$ 川贝母-3-QR	1.2 $\mu\text{mol/L}$	2.4
10 $\mu\text{mol/L}$ 川贝母-3-2P	0.6 $\mu\text{mol/L}$	1.2
Taq DNA聚合酶 ²⁾	0.025 u/ μl	—
25 mg/L DNA模板	2.0 mg/L	2.0
总体积		20.0(用重蒸水调节)

注: ¹⁾ 如果 PCR 缓冲液中含有氯化镁, 则不加氯化镁溶液, 根据 Taq DNA 聚合酶的浓度确定其体积, 并相应调整重蒸水的体积, 使反应体系总体积达到 $20.0 \mu\text{l}$; 若采用实时荧光 PCR 试剂盒, 则按试剂盒说明书的推荐用量配制反应体系, 但上下游引物用量按表 2 执行; ²⁾ “—”表示体积不确定

0.05% 以下时, 扩增曲线的 C_t 值 >36 。据此可得本方法的灵敏度为 0.05% 。

2.6 标准曲线的建立

将川贝母基因组 DNA 用鲑鱼精 DNA 进行梯度稀释, 至 DNA 浓度分别为 100% 、 10% 、 1% 、 0.5% 、 0.1% 、 0.05% 、 0.01% 和 0 , 利用优化后的 PCR 扩增条件进行扩增。以扩增曲线的 C_t 值为纵坐标, 相应含量 c 为横坐标, 绘制标准曲线。结果所得线性方程为 $C_t = -3.251c + 31.575$, $R^2 = 0.994$, 扩

增效率 $E=103.043\%$, 符合预期要求^[10]。

将川贝母和非川贝母粉末材料, 分别按质量比(真:伪)9:1、3:7、3:47混合, 制备已知含量(90%、30%、6%)的川贝母掺伪品。利用优化后的PCR扩增条件进行扩增, 并根据标准曲线进行定量测定。结果显示, 上述3种掺伪品的相对定量结果分别为90.34%、29.78%和5.93%, RSD分别为0.58%、0.23%和0.21%($n=2$), 回收率分别为100.38%、99.27%和98.83%, 结果准确。

2.7 样品测定

在实际检测工作中, 针对25批次的不同样品, 利用本方法分别对其进行检测。同时, 通过中国药典2015年版方法加以验证。结果表明, 在25批次的市售川贝母检测样品中, 3批次样品川贝母含量为100%, 21批次样品均出现掺假情况, 川贝母含量为64%~82%, 有1批次样品鉴定为不含有川贝母。药典方法的验证结果与本法所得结果一致。

3 讨论

中国药典2015年版川贝母药材收载有以下多种基原:川贝母、暗紫贝母、甘肃贝母、梭砂贝母、太白贝母和瓦布贝母。本试验所得引物探针组合在扩增出以上所有基原的同时, 对非川贝母药材进行特异性区分, 证明了所建立的方法可用于川贝母药材的质量控制, 具有较强的实用价值。

目前, 市场上用其他川贝母近缘品种(如常见伪品平贝母和伊贝母)充当川贝母出售的现象十分普遍。张文娟等将川贝母药材DNA与伊贝母药材DNA按不同比例混合, 当掺伪量为0.5%时, 川贝母伪品的条带在凝胶图上肉眼可见, 而当掺伪量低至0.1%时, 伪品条带消失, 所以确定该方法的检出限为0.5%^[11]。当掺伪量至50%时, 无明显酶切的条带, 与100%伪品组无明显差异。虽然该方法能够做到川贝母掺伪量的半定量检测, 但普通PCR法试验周期长, 需要与电泳分析相结合, 而且无法对扩增过程进行实时监测, 不适合分子检测的发展趋势。

随着PCR技术的发展和对检测要求的不断提高, 运用实时荧光定量PCR(qPCR)及数字

PCR(dPCR)技术可以对检测成分进行相对定量甚至绝对定量的测定^[12~13]。实时荧光PCR技术已经普遍用于与分子检测相关的各个领域, 而在中药成分的分子鉴定方面, 尤其是用于川贝母真伪性鉴定上, 相关报道为数不多。其中罗达龙等利用实时荧光PCR的SYBR Green染料法, 实现了川贝母与平贝母、浙贝母、土贝母的特异性鉴别, 但该方法依旧只能对供试品进行定性分析, 未实现掺伪品中川贝母含量的定量测定^[14]。除此之外, 暂无利用qPCR进行川贝母检测的报道。

本研究首次利用TaqMan探针法实现了对川贝母掺伪品的相对定量检测, 通过引物、探针组合的设计与筛选, 特异性测试和PCR扩增体系的优化, 使得方法的灵敏度达到了0.05%, 这几乎覆盖了所有川贝母掺伪的比例, 并运用标准曲线对3种比例的自混掺伪样进行了检测, 结果与预期的结果相仿, 证明本方法有较高的精确性和较好的实用性。与传统的PCR-PFLP法相比, 消除了有毒有害试剂对试验人员的影响, 并且能够实时监测试验结果, 操作更加便捷, 大大缩短了检测周期, 为今后的川贝母检测工作提供了一种技术手段。

参考文献:

- [1] 吴玉良, 杨杰, 吴纯洁. 川贝母综合利用的思考[C]// 中华中医药学会中药炮制分会2011年学术年会论文集. 中华中医药学会中药炮制分会2011年学术年会. 2011.
- [2] 刘薇, 张文娟, 林丽君, 等. 我国川贝母的质量分析[J]. 中国药学杂志, 2015, 50(4): 305~309.
- [3] 王保华. 川贝母、浙贝母、平贝母的异同[J]. 中医临床研究, 2015, (23): 23~24.
- [4] 吴小婷. 川贝母的真伪鉴别[J]. 海峡药学, 2014, 17(6): 39~41.
- [5] 潘莉, 徐道华. 川贝母的真伪鉴别[J]. 中国药业, 2008, 17(20): 55~56.
- [6] 刘志梅, 赵华, 明延波. 川贝母及其伪品小东贝母的鉴别[J]. 中国当代医药, 2013, 20(8): 70~71.
- [7] 王文娜, 陈地灵, 朱梅芳, 等. 激光拉曼光谱法无损分析鉴别川贝母[J]. 光谱学与光谱分析, 2013, 33(8): 2109~2111.
- [8] 陈杰, 吕银姣. 川贝母及其混淆品东贝母的鉴别[J]. 时

- 珍国医国药, 2000, 11(9): 807.
- [9] XIN G Z, LAM Y C, MAIWULANJIANG M, et al. Authentication of *Bulbus Fritillariae cirrhosae* by RAPD-derived DNA markers [J]. *Molecules*, 2014, 19(3): 3450-3459.
- [10] 农业部2259号公告-5-2015. 转基因植物及其产品成分检测 实时荧光定量PCR方法制定指南[S]. 北京: 中国农业出版社, 2015.
- [11] 张文娟, 刘 薇, 魏 锋, 等. 聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性法用于检定川贝母掺伪情况的研究[J]. 药物分析杂志, 2014, (10): 1830-1835.
- [12] BREŽNÁ B, HUDECOVÁ L, KUCHTA T. Detection of pea in food by real-time polymerase chain reaction (PCR) [J]. *Eur Food Res Technol*, 2006, 222(5/6): 600-603.
- [13] SCOLLO F, EGEA L A, GENTILE A, et al. Absolute quantification of olive oil DNA by droplet digital-PCR (ddPCR): Comparison of isolation and amplification methodologies [J]. *Food Chem*, 2016, 213: 388-394.
- [14] 罗达龙, 黄林杰, 黄 琳. 实时荧光定量 PCR 对川贝母的鉴别应用[J]. 中国药师, 2016, 19(6): 1068-1070.

Establishment of Real-time Quantitative PCR for TaqMan Probe Method of *Fritillaria cirrhosa* Species

WANG Cheng, CHANG Zhiyuan, LAN Qingkuo, ZHAO Xin, LAN Pu*

(Institute of Tianjin Agriculture Quality Standard and Testing Technology, Tianjin 300381)

ABSTRACT: Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to identify the authenticity of *Fritillaria cirrhosa* with TaqMan probe, and to realize the relative quantification of *Fritillaria cirrhosa*. Species specific PCR primers and probes of *Fritillaria cirrhosa* were designed and screened, then a specific real-time PCR method with TaqMan probe was developed for identification and quantification of *Fritillaria cirrhosa* species through specificity testing, PCR reaction condition optimization, and sensitivity testing. On this basis, the standard curve was established and the method accuracy was verified by quantitation of *Fritillaria cirrhosa* whose content was already known. The specificity of the primer and probe CBM-3-1QF/1QR/2P was the best. When the final concentrations of the primer and the probe were 1.2 $\mu\text{mol/L}$ and 0.6 $\mu\text{mol/L}$, the method could detect the samples with a minimum *Fritillaria cirrhosa* content of 0.05%. In the blind test, the accuracy of the method was verified by comparison with the results of the Chinese pharmacopoeia method. This method has the advantages of high specificity and sensitivity, and can be used to identify the authenticity and determine the content of *Fritillaria cirrhosa*.

Key Words: *Fritillaria cirrhosa*; real-time quantitative PCR; TaqMan probe; identification

