

# 川贝母 PCR-RFLP 法鉴别检验能力验证活动分析

张文娟, 赵萌, 项新华, 魏锋\*, 马双成\* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要** 目的: 考察相关实验室执行《中华人民共和国药典》川贝母 PCR-RFLP 法鉴别检验项目的技术能力, 促进分子生物学技术在中药检定中的广泛应用。方法: 测试样品为粉末, 对样品的均匀性和稳定性进行评价, 样品种类分为阳性和阴性两种, 采用随机单盲方式分配至参与能力验证的实验室。各实验室按照作业指导书进行检测, 并以规定格式书写原始记录。检测结果与样品性质一致的实验室为满意。对各实验室的反馈结果进行汇总和分析。结果: 最终报名参加的实验室总计 50 家, 能力验证结果为满意的 26 家, 占 52%, 不满意 24 家, 占 48%。其中 3 家实验室未按要求返回结果, 判定为不满意。分别统计不同类型参加实验室的满意率, 地市级食药检机构满意率最高, 为 70.6%。结论: 总体满意率偏低, 川贝母 PCR-RFLP 法鉴别检验项目的整体技术水平有待提高。

**关键词:** 能力验证; 川贝母鉴别; PCR-RFLP

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)01-0058-05

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.01.009

## Analysis of the Proficiency Test of the Identification of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* by the Method of PCR-RFLP

Zhang Wenjuan, Zhao Meng, Xiang Xinhua, Wei Feng\*, Ma Shuangcheng\* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To evaluate the technical capability of relevant laboratories to perform the identification of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* by the method of PCR-RFLP method according to Chinese Pharmacopoeia 2015 edition and to promote the application of molecular biological technology in the field of TCM identification, a proficiency test of the identification of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* by the method of PCR-RFLP was organized by National Institutes for Food and Drug Control. **Methods:** Samples for testing were in the form of powder and the homogeneity and stability of the samples were examined. The samples were classified into two types, positive and negative, which was randomly and single blindly distributed to the laboratories participating in the proficiency test. The laboratories carried out the tests according to the instruction book as designed and records were made in the specific forms. The satisfied judgment was only made when the testing result was in accord with the nature of the sample (positive or negative). Finally, Results from different laboratories were collected and analyzed. **Results:** A total of 50 laboratories participated in the proficiency test, 26 laboratories were satisfied, accounting for 52%, 24 laboratories were unsatisfied, accounting for 48%. 3 laboratories failed to return the results as required and were considered to be unsatisfied. The laboratories affiliated to cities got the highest rate of the satisfaction,

基金项目: 国家科技部“重大新药创制”重大专项(编号 2014ZX09304307-001, 2014ZX09304307-002)

作者简介: 张文娟, 博士, 副研究员, 主要从事中药编号分子鉴定研究; Tel: (010) 67095995; E-mail: zhangwenjuan@nifdc.org.cn

通信作者: 马双成, 博士, 研究员, 主要从事中药整体质量控制研究; Tel: (010) 67095272; E-mail: mase@nifdc.org.cn

魏锋, 博士, 研究员, 主要从事中药材及饮片质量控制研究; Tel: (010) 67095432; E-mail: weifeng@nifdc.org.cn

70.6%. **Conclusion:** The overall ratio of the satisfied is low. The technical level of the identification of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus* by the method of PCR-RFLP needs to be improved.

**Keywords:** proficiency test; identification of *Fritillariae Cirrhosae Bulbus*; PCR-RFLP

川贝母是我国传统大宗中药材,具有良好的止咳化痰功效,在中药临床和日常生活中应用甚广<sup>[1]</sup>。近年来随着其市场价格逐年攀升,以贝母属其他品种充当川贝母出售的现象亦愈加严重<sup>[2-3]</sup>。长期以来,川贝母的鉴别检验主要依靠性状鉴别,但是,有些混淆品的外观性状与川贝母十分相似,很难就此作出客观准确的判断。DNA分子鉴定技术不会受到药材外观性状变化的影响,可从DNA水平实现准确鉴别,伴随着相关方法的不断开发和完善,对中药鉴定的影响与日俱增<sup>[4-5]</sup>。自《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2010年版第一增补本起,川贝母项下收录了聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,用于川贝母鉴别。该方法较传统性状鉴别法客观准确,应在全国大力推广应用<sup>[6-7]</sup>。然而,由于分子生物学技术在中药检定中属于比较新的技术,在该药典方法颁布之初,很多药检机构在技术人员和实验室设施等方面条件欠缺,尚不具备该方法的检验能力。近年来,中国食品药品检定研究院(以下简称中检院)通过针对全国药检系统举办培训班、培养地方药检所进修人员等方式,为推广和普及中药分子鉴定方法做出大量努力。在中检院的指导和帮助下,一些药检机构建立了中药分子生物学检测实验室,并开始承接川贝母PCR-RFLP法鉴别检验项目,但是,这些实验室在该项目的检验能力上还有待评估。

能力验证即利用实验室间比对,按照预先制定的准则评价参加者的能力,是实验室质量保证体系中的一个重要组成部分。国家认可制度中对实验室参加能力验证并取得满意结果提出了明确的要求<sup>[8]</sup>。2017年,中检院组织了川贝母PCR-RFLP法鉴别检验能力验证项目(NIFDC-PT-102),旨在考察执行《中国药典》标准相关实验室的技术能力和管理水平,促进分子生物学技术在中药检定中的广泛应用,提高检测水平,为全面监控中药材的质量提供科学、可靠的技术平台<sup>[9-10]</sup>。本文将对此次能力验证活动的情况进行

总结,并对其中发现的问题进行解析,以期为参与能力验证的实验室提高检测能力和改进质量管理体系提供帮助。

## 1 能力验证方法

### 1.1 检测项目和要求

检测项目为川贝母【鉴别】聚合酶链式反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)法。本实验方法依据《中国药典》2015年版一部川贝母【鉴别】3要求,并参照《作业指导书》的要求进行检验和报告结果。

### 1.2 能力验证样品描述

能力验证样品为川贝母粉末,装于1.5 mL离心管,20 mg/管。每个实验室发放1管。样品源自留存的检验样品,分为阴性样品和阳性样品两类,依据CNAS GL03:2006《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》对样品进行均匀性和稳定性评价<sup>[11]</sup>。检验合格后,样品通过EMS快递分发,每个实验室1份,样品的类型(阴性或阳性)为随机单盲分配到各个实验室。

### 1.3 结果评价原则

#### 1.3.1 检验依据

按照《中国药典》2015年版一部川贝母【鉴别】聚合酶链式反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)法的规定:供试品凝胶电泳图谱中,在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上,在100~250 bp位置应有两条DNA条带,空白对照无条带。

#### 1.3.2 检验能力评定

根据药典规定,阳性(合格)样品的检测结果应为供试品凝胶电泳图谱中,在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上,于100~250 bp位置可见两条DNA条带,空白对照无条带。阴性(不合格)样品的检测结果应为供试品凝胶电泳图谱中,在与对照药材凝胶电泳图谱相应的位置上,于100~250 bp位置未见两条DNA条带,空白对照无条带。根据以上要求,各参加实验室得出正确的检验结论即为满意,否则为不满意。

## 2 结果

### 2.1 参加实验室情况

本计划共有50家实验室报名参加，发出样品50份。3家实验室在收到样品后告知样品破损，给予及时补寄。另有3家实验室收样前未表示退出，收样后至今亦未反馈结果。最终，本次能力验证项目共47家实验室按要求提交了结果报告单。

参加本次能力验证的实验室分布于全国20个省（自治区）、直辖市，浙江省最多（8家）。实验室类型以各级食品药品检验机构为主，其中省级18家，占比36%，地市级17家，占比34%；另有第三方检测机构12家，占比24%，出入境检验检疫机构3家，占比6%。具体实验室类型统计见图1。

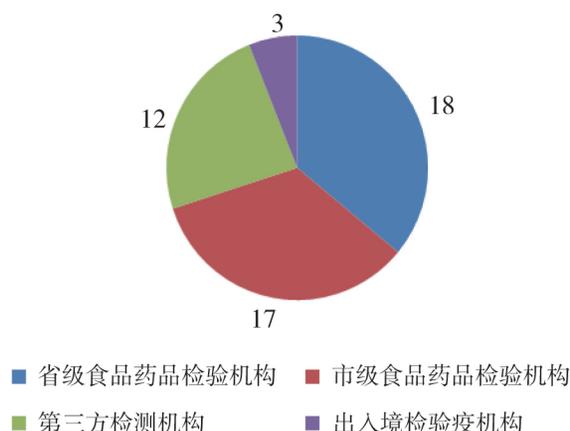


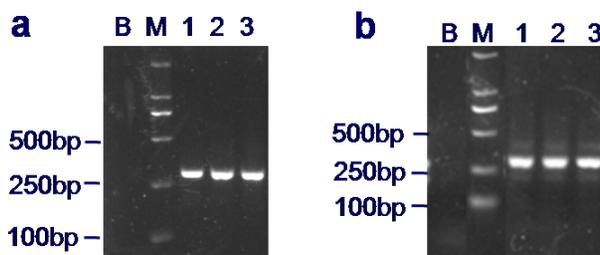
图1 参加实验室的类型统计

### 2.2 样品均匀性与稳定性测试

将所有待发放川贝母样品混合均匀打粉，取3份提取DNA并进行PCR-RFLP法检测。阴性样品和阳性样品分别取样检测。3份样品均得到一致预期结果：即阴性样品皆有条带扩增，但不能被Sma I酶切；阳性样品既有条带扩增，又能被Sma I酶切

割成两个条带，大小在100~250 bp之间。以上结果表明样品的均匀性良好。

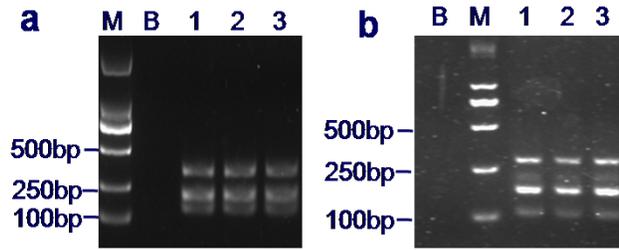
将打粉后的样品于室温放置一个月后，再次提取DNA并用PCR-RFLP法进行检测，发现得到的结果与一个月前基本一致。以上结果表明样品的稳定性良好。具体结果详见图2、图3。



a. 样品打粉处理后PCR-RFLP结果；b. 样品打粉处理后室温放置一个月PCR-RFLP结果。

B. 空白对照；M. DNA分子量标记DL2000；1~3. 样品。

图2 阴性样品均匀性稳定性测试



a. 样品打粉处理后PCR-RFLP结果；b. 样品打粉处理后室温放置一个月PCR-RFLP结果。  
B. 空白对照；M. DNA分子量标记DL2000；1~3. 样品。

图3 阳性样品均匀性稳定性测试

2.3 参加实验室能力验证结果统计

报名的50家实验室中，47家按要求反馈了结果。另3家实验室因为在收到样品前未表示退出，收到样品后未反馈结果，判定为不满意<sup>[12]</sup>。

能力验证结果：满意26家，占52%；不满意24家，占48%，见图4。对不同类型参加实验室满意率分别进行统计的结果见表1。

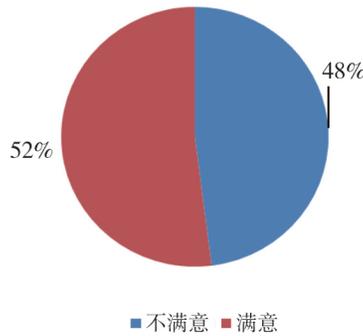


图4 满意率统计

表1 不同类型检验机构满意率统计

检验机构	满意 / 家	不满意 / 家	合计	满意率 / %
省级食药检机构	6	12	18	33.3
地市级食药检机构	12	5	17	70.6
企业 / 第三方检测	6	6	12	50
出入境检验检疫机构	2	1	3	66.7
合计	26	21	50	52

### 3 技术分析和建议

在本次能力验证中,不满意的技术原因主要归结为以下三方面:

#### 3.1 PCR 扩增结果阴性

不论阴性还是阳性样品,都应有PCR扩增的条带出现。PCR扩增结果阴性,说明参加单位在DNA提取或者PCR试验操作中存在不足,需要通过规范化的练习提高这方面的试验技能。大多数未通过能力验证的实验室都属于这种情况,说明该方面的问题具有普遍性。

#### 3.2 阳性样品有扩增条带但酶切失败

理论上,阳性样品应有扩增条带且酶切成功,凝胶电泳图谱可见两条酶切后的条带。酶切试验的影响因素较少,可控性好,试验结果稳定,一般不容易在此步骤出现问题。而少数几家实验室结果显示,对照药材可酶切,样品不能酶切,由于对照药材与样品应为同时操作,理论上不应出现此种情况。相关单位在今后试验中应该特别注意将对照与样品的平行操作贯穿始终。

#### 3.3 结果正确,结论错误

个别实验室的原始记录显示得到了正确结果,但最后结论中对结果的判断有误。例如结果出现了阳性酶切条带,但被描述为“隐约可见例”,最后结论判定为“不符合规定”。出现此种情况,提示实验人员对于标准规定的理解存在偏差。定性试验中不应出现含糊的用词,实验者应通过重复试验确定究竟“可见”或“未见”,最终得到明确结果和正确判断。

### 4 结论

本次能力验证活动中,总体满意率仅为52%,与其他能力验证项目相比,满意率偏低,说明对于这个检测项目而言,普遍的检测水平有待提高。特别是省级药检机构的满意率要低于市级,这种情况在一般的能力验证活动中并不多见,强烈提示省级药检机构应在今后特别注意加强中药分子鉴定技术相关检验检测能力的训练和储备。一次能力验证的结果只能证明实验室参加本次能力验证活动的情况,不能全面体现实验室的检测水平。只有持续参加同一项目的能力验证活动,其总体结果才能反映实验室的能力状况<sup>[13]</sup>。此外,未能通过此次能力验证的实验室,还可以通过这个项目后续的测量审核活动重新评估检测能力。本次能力验证活动为

各实验室提供了一个衡量和验证自我检测能力的平台,同时也为政府管理部门和社会委托检验提供可靠的选择依据,并对促进参加实验室提高川贝母PCR-RFLP鉴别检验能力起到积极的推动作用。

#### 参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015.
- [2] 崔国静,石思佳,宋桂英.川贝母的来源与鉴别[J].首都医药,2012,19(9):44.
- [3] 罗焜,马培,姚辉,等.基于ITS2序列鉴定川贝母及其混伪品基原植物[J].世界科学技术—中医药现代化,2012,14(1):1153-1158.
- [4] ZHANG W J, ZHANG X L, LI M H, et al. Identification of Chinese Caterpillar Medicinal Mushroom, *Ophiocordyceps sinensis* (Ascomycetes), from Counterfeit Species[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2017, 19(12):1061-1070.
- [5] 潘杰,陈虹,冯睿,等.杂交探针技术结合熔解曲线鉴别川贝母与伊贝母的研究[J].中药新药与临床药理,2019,30(3):344-348.
- [6] WANG C Z, LI P, DING J Y, et al. Simultaneous Identification of *Bulbus Fritillariae Cirrhosae* Using PCR-RFLP Analysis[J]. Phytomedicine, 2007, 14(9):628-632.
- [7] 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,2014,34(10):830-835.
- [8] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL01 实验室认可规则[S]. 2011.
- [9] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL03 能力验证提供者认可准则[S]. 2010.
- [10] 国际标准化组织/合格评定委员会. ISO/IEC 17025 检测和校准实验室能力的通用要求[S]. 2005.
- [11] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL03 能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S]. 2006.
- [12] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-GL02 能力验证结果的统计处理和评价指南[S]. 2014.
- [13] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-RL02 能力验证规则[S]. 2010.

(收稿日期 2019年7月22日 编辑 邹宇玲)