论 文

哈蟆油基原考证及DNA条形码物种鉴定研究

石林春^{1,4}, 刘金欣¹, 唐先明^{2*}, 刘建辉², 姚辉¹, 张立秋³, 向丽⁴, 张琴¹, 谢彩香¹, 宋经元^{1*}

1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 国家中医药管理局中药资源保护重点研究室, 中药资源教育部工程研究中心, 北京 100193;

2. 哈尔滨市食品药品检验检测中心, 哈尔滨 150525;

3. 通化师范学院制药与食品科学学院, 通化 134002;

4. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700

* 联系人, E-mail: 15945160973@qq.com; jysong@implad.ac.cn

收稿日期: 2019-02-13; 接受日期: 2019-04-10; 网络版发表日期: 2019-07-17

国家自然科学基金(批准号: 81703659)、中国博士后科学基金(批准号: 2017M610815)、公益性行业科研专项经费项目(批准号: 201507002-4-1-2)和四川省科技计划项目重点研发项目(批准号: 2019YFS0017)资助

摘要 哈蟆油为我国珍稀名贵中药材, 存在混伪品多、基原有争议、系统分类历史复杂、鉴定困难等难题. 本研究首先通过本草考证和现代研究资料整理, 结合基于线粒体全基因组的分子系统发育关系分析, 以及哈蟆油传统产区与原动物地理分布叠加比较, 证实中国林蛙、东北林蛙和黑龙江林蛙均为有效种, 中国林蛙仅限于华北和华东分布, 拉丁名应为“*R. chensinensis* David, 1875”, 《中国药典》采用“*Rana temporaria chensinensis* David”为中国林蛙拉丁名不妥, 哈蟆油的基原应为东北林蛙*R. dybowskii* Günther, 1876. 然后设计新的PCR引物以解决哈蟆油COI序列的非特异性扩增难题, 建立包含哈蟆油及其混伪品的DNA条形码物种鉴定数据库. 最后, 基于市售药材验证所建立的哈蟆油DNA条形码物种鉴定方法, 发现市场中存在青蛙油、牛蛙油等混伪品, DNA条形码技术可将哈蟆油及其混伪品准确鉴定到物种水平. 本研究将为保障哈蟆油的临床用药安全和消费者的合法权益提供技术支持.

关键词 哈蟆油, 基原物种, DNA条形码, 混伪品, 鉴定

哈蟆油为名贵中药材和传统滋补珍品, 具补肾益精、养阴润肺等功能, 用于病后体弱、神疲乏力、心悸失眠、盗汗、癆嗽咳血^[1], 现代研究表明哈蟆油具有抗疲劳、延缓衰老、增强机体免疫力等药理活性^[2]. 根据清代本草记载^[3,4], 哈蟆油的俗名“哈士蟆(马)”, 与当今东北民间称谓一致, 产地为“盛京”、“兴京”, 即今

辽宁省沈阳市和新宾满族自治县一带. 1961年出版的《中药志》^[5]明确哈蟆油的原动物为中国林蛙*Rana temporaria chensinensis* David和黑龙江林蛙*R. amurensis* Boulenger, 1886, 主产于“黑龙江, 吉林桦甸、蛟河、敦化、延吉、汪清、通化、永吉, 辽宁凤城、桓仁、新宾、本溪、清源等地”. 此后出版的《中药大辞

引用格式: 石林春, 刘金欣, 唐先明, 等. 哈蟆油基原考证及DNA条形码物种鉴定研究. 中国科学: 生命科学, 2019, 49: 1032–1040
Shi L C, Liu J X, Tang X M, et al. Herbalogical studies of *Ranae* oviductus (Hamayou) and its species identification using DNA barcoding method (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2019, 49: 1032–1040, doi: 10.1360/N052018-00231

典》^[6]、《中国药用动物志》^[7]、《全国中草药汇编》(第二版)^[8]、《新编中药志》^[9]等均载明哈蟆油的基原物种为中国林蛙, 但黑龙江林蛙亦可作哈蟆油用, 明确哈蟆油的主产地为我国东北地区。

2015版《中国药典》^[1]规定哈蟆油的基原物种为中国林蛙, 有学者认为“*R. temporaria chensinensis* David”不符合国际动物命名法规, 与中国林蛙的现代分类矛盾。1875年, David(谭卫道)^[10]将陕西秦岭、涝浴河谷的殷家坡标本定名为中国林蛙*R. chensinensis* David, 1875。1938年, Boring^[11]将中国林蛙归并入欧洲林蛙*R. temporaria* Linnaeus, 1758, 认为中国林蛙为欧洲林蛙的一个亚种, 拉丁名修订为*R. temporaria chensinensis* Boring, 1938, 即欧洲林蛙中国亚种之意。1940年Pope和Boring^[12]以“背侧褶弯曲和雄性有声囊”将包含东北林蛙*R. dybowskii* Günther, 1876、黑龙江林蛙的中国北方林蛙属物种都归并到中国林蛙。2009年出版的《中国动物志·两栖纲(下卷)·无尾目·蛙科》^[13]根据中国学者刘承钊等人^[14]、吴政安^[15]、魏刚等人^[16]、谢锋^[17]等的形态学和分子生物学证据确认中国林蛙、东北林蛙、黑龙江林蛙均为有效种, 中国林蛙的拉丁名恢复为*R. chensinensis* David, 1875, 明确中国林蛙的地理分布为我国华北和华中地区, 北至内蒙古中部和河北北部, 我国东北地区的常见林蛙属物种为东北林蛙和黑龙江林蛙。因此, 李宜平等人^[18]、肖井雷等人^[19,20]、王孟虎等人^[21]指出《中国药典》采用中国林蛙为哈蟆油的基原物不妥, 哈蟆油的基原应为原中国林蛙的东北居群, 即东北林蛙*R. dybowskii* Günther, 1876。

近年来, 哈蟆油价格不断攀升, 市场上常有以黑斑蛙(青蛙)、牛蛙、蟾蜍等的输卵管混作哈蟆油销售的现象^[22,23]。此外, 产自山东、甘肃等地的中国林蛙油和产自东北的黑龙江林蛙油常作为哈蟆油的类似品销售。2015版《中国药典》收录了哈蟆油的性状鉴定法、高效液相色谱鉴别法和膨胀度检查法^[1]。在鉴定实践中, 性状和膨胀度与哈蟆油的采收加工方法、存储年限密切相关^[24], 1-甲基海因(1-methylhydantoin, 1-MID)作为哈蟆油真伪鉴别的专属性有待进一步验证^[25], DNA条形码技术已成为哈蟆油真伪鉴定的研究热点, 但存在诸多困难^[21,26,27]。当前, 哈蟆油的鉴定研究主要面临以下问题: (i) 系统分类历史复杂, 分类体系交叉混乱使用; (ii) 基原物种不统一, 存在争议;

(iii) 混伪品多, 鉴定困难; (iv) 药材样本DNA提取和PCR扩增困难。

本文首先从本草考证、文献梳理、分子系统发育分析、地理信息叠加比较等对哈蟆油的基原物种进行考证。然后解决哈蟆油的DNA提取、PCR扩增和数据库构建等技术难题, 建立哈蟆油的DNA条形码物种鉴定方法, 以解决哈蟆油物种鉴定难题。

1 材料与方 法

1.1 材料

本研究共收集东北林蛙*R. dybowskii* Günther, 1876、黑龙江林蛙*R. amurensis* Boulenger, 1886、中国林蛙*R. chensinensis* David, 1875、黑斑侧褶蛙*Pelophylax nigromaculatus* Hallowell, 1860和中华蟾蜍*Bufo gargarizans* Cantor, 1842的雌性个体109只(表1), 其中68只的输卵管经采制干燥获得哈蟆油及其混伪品的药材样品, 原动物经中国科学院昆明动物研究所蒋珂和哈尔滨市食品药品检验检测中心唐先明进行物种鉴定, 凭证标本保存于中国医学科学院药用植物研究所和哈尔滨市食品药品检验检测中心。另从GenBank中下载牛蛙*Rana catesbeiana* Shaw, 1802、欧洲林蛙*R. temporaria* Linnaeus, 1758、金线侧褶蛙*Rana plancyi* Lataste, 1880等43个物种的150条COI序列(网络版附表S1)。黑龙江林蛙、中国林蛙、东北林蛙等10个物种的全长线粒体序列来自于GenBank(网络版附表S2)。

1.2 DNA提取、PCR扩增和序列测定

新鲜肌肉取自后肢胫部肌肉, 称取约10 mg置于1.5 mL离心管中, 使用剪刀剪碎。药材样品称取约5 mg, 加入500 mL解黏液(专利公开号: CN106350508A), 使用研磨杵充分研磨至无颗粒。使用血液/组织/细胞基因组提取试剂盒(Tiagen Biotech Co., China)提取总DNA, 采用NanoDrop 2000(Thermo Scientific Co., 美国)测定 A_{260}/A_{280} 比值及DNA浓度。为解决哈蟆油扩增难题, 从GenBank获得蛙科Ranidae和蟾蜍科Bufonidae的162条全长COI序列, 设计COI序列的PCR扩增引物: LWF01: TCTCTACTAATCATAAAGAYATYGG和LWR01: TAAACTTCAGGGTGACCAAARAATCA, 扩增程序经优化确定为: 94℃ 1 min; 94℃ 1 min; 52~54℃ 1.5 min, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 5 min。PCR扩增

表 1 样品采集信息及其COI序列GenBank登录号^{a)}

Table 1 Sample information and their cytochrome c oxidase subunit I (COI) sequence GenBank accession numbers

样品编号	物种名	拉丁名 ^{a)}	采集地	登录号
HSSA0001-HSSA0006	中华蟾蜍 (6只)	<i>Bufo gargarizans</i> Cantor, 1842	北京市顺义区, 江苏省 盐城市	MH481272-MH481277
HSSA0007-HSSA0009	黑斑侧褶蛙 (3只)	<i>Pelophylax nigromaculatus</i> Hallowell, 1860	四川省成都市, 黑龙江省 鸡西市	MH481278-MH481280
HSSA0010-HSSA0014	黑龙江林蛙 (5只)	<i>Rana amurensis</i> Boulenger, 1886	黑龙江省鸡西市、伊春市	MH481267-MH481271
HSSA0015-HSSA0026	中国林蛙 (12只)	<i>Rana chensinensis</i> David, 1875	河北省承德市, 内蒙古自治 区呼伦贝尔市	MH481255-MH481266
HSSA0027-HSSA0109	东北林蛙 (83只)	<i>Rana dybowskii</i> Günther, 1876	黑龙江省哈尔滨市、鸡西 市、伊春市, 吉林省白山 市、吉林市、延边朝鲜族 自治州, 辽宁省本溪市、抚 顺市、营口市	MH481172-MH481254

a) 拉丁名依据2009年出版的《中国动物志·两栖纲(下卷)·无尾目·蛙科》^[13]

产物经纯化后, 使用ABI 3730XL 测序仪进行双向测序。

1.3 数据分析

使用CodonCode Aligner v7. 0. 1 软件(CodonCode Co., 美国)去除两端低质量区、校对拼接和切除双向引物序列。拼接结果经核对后提交到GenBank数据库^[28]和“中药材DNA条形码物种鉴定数据库”^[29]。使用Muscle v3. 8软件^[30]完成多序列比对。使用PUAP 4. 0软件^[31]计算K-2p遗传距离, 参数设置为“Set criterion=distance; dset distance=k2p”。使用MEGA v7.0软件^[32]进行邻接(Neighbor-Joining, NJ)系统发育树构建, 检验方法采用Bootstrap, 次数为1000次, 距离模型采用Kimura-2-Parameter, Gap处理方式Pairwise Deletion。使用建树法、遗传距离法和基于BLAST的序列相似性方法计算数据库的物种鉴定效率^[33]。在中药材DNA条形码物种鉴定系统(www.tcmbarcode.cn)中完成市售药材的物种鉴定^[29]。动物地理分布和哈蟆油产区叠加分析使用ArcGIS 10.1软件(ESRI Co., USA)完成绘制, 地图资料来源于国家基础地理信息系统(<http://nfgis.nsd.gov.cn/>)。

2 结果

2.1 中国林蛙、黑龙江林蛙和东北林蛙的分子系统发育关系

中国林蛙自1875年由David(谭卫道)命名, 曾被划归为欧洲林蛙的中国亚种, 又并入黑龙江林蛙、东北

林蛙等北方其他林蛙物种, 20世纪末又陆续恢复中国林蛙、黑龙江林蛙和东北林蛙为有效种, 分类地位多有争议。为进一步澄清分类地位, 本研究从GenBank获取黑龙江林蛙、中国林蛙、东北林蛙等10个物种的全长线粒体序列(网络版附表S2), 以*Aquarana*亚属的牛蛙和佛罗里达沼泽蛙*R. okaloosae* Moler, 1985为外类群, 构建基于线粒体全基因组序列的NJ系统发育树(图1)。由系统发育树可知, 中国林蛙、高原林蛙*R. kukunoris* Nikolskii, 1918、桓仁林蛙*R. huanrenensis* Liu, Zhang *et* Liu, 1993和东北林蛙聚为一大支, Bootstrap值为100, 东北林蛙位于最外侧, 中国林蛙和高原林蛙在内部聚为一小支, Bootstrap值为100, 具有更近的亲缘关系。昭觉林蛙*R. chaochiaoensis* Liu, 1946、峨眉林蛙*R. omeimontis* Ye & Fei, 1993、昆嵛林蛙*R. kunyuensis* Lu & Li, 2002和黑龙江林蛙聚为另一大支, Bootstrap值为100, 昭觉林蛙和峨眉林蛙在内部聚为一小支, Bootstrap值为85。由基于线粒体全基因组的分子系统发育关系可知, 中国林蛙、黑龙江林蛙和东北林蛙均为有效种。

2.2 哈蟆油本草考证

哈蟆油初见於北宋苏颂等编撰的《本草图经》^[34], 列于虾蟆(蝦蟇)项下, “又有一种大而黄色, 多在山石中藏蛰, 能吞气饮风露, 不食杂虫, 谓之山蛤。山中人亦食之, 此主小儿劳瘦及疳疾等, 最良”。明朝李时珍^[35]编撰的《本草纲目》将“山蛤”从蛤蟆(蝦蟇)项下分出, 描述与《本草图经》同。清朝阿桂等^[3]纂修的

图 1 基于线粒体全基因组构建的中国北方林蛙属动物NJ系统发育树

Figure 1 Neighbor-joining phylogenetic tree constructed using whole mitochondrial genomes of *Rana* species distributed in North China

《四库全书·盛京通志》明确“山蛤”即“哈什蟆”，“多伏岩中，似蝦蟆而头腹黄红色，俗呼哈什蟆”。清朝金毓绂等^[4]编写的《辽海丛书·沈故》载“哈士马”，“形似田鸡，腹有油如粉条，有子如鲜蟹黄，取以作羹，味故肥美，然唯兴京一带有之”。由本草资料可明确：(i) 形态特征“大而黄色”、“头腹黄红色”、“腹有油如粉条”，与《中国动物志·两栖纲(下卷)·无尾目·蛙科》所载的东北林蛙和黑龙江林蛙最为接近；(ii) 哈蟆油原动物非“蟾蜍”、“蛤蟆(蝦蟆)”或“田鸡”；(iii) 哈蟆油具有鲜明的地理特征，即今东北长白山地区。

2.3 哈蟆油传统产区与东北林蛙、黑龙江林蛙、中国林蛙地理分布的叠加比较

使用ArcGIS 10.1软件进行哈蟆油产区 and 原动物地理分布叠加分析，结果显示哈蟆油的传统产区主要为东北的嫩江流域和长白山区，包括黑龙江大部、吉林全境和辽宁北部，中国林蛙则以秦岭北坡和太行山、贺兰山、阴山南坡的种群资源最为丰富。东北林蛙的地理分布主要包括内蒙古东北部、黑龙江西北部和南部、吉林大部、辽宁中北部和东部。黑龙江林蛙则以黑龙江的种群资源最为丰富。

2.4 哈蟆油DNA条形码获取实验方法的建立

哈蟆油的膨胀度可达55倍以上，常规裂解方法无上清或仅少量上清(图2A)，无法进行后续实验，使用解黏液预处理后可获得大于400 μ L的上清液，所提取DNA的浓度均大于50 ng/ μ L， A_{260}/A_{280} 比值为1.6~2.0之

间。采用COI通用引物LCO1490/HCO2198和通用扩增条件进行PCR扩增，电泳检测结果表明肌肉和药材样品均存在非特异扩增(图2B)，这与王孟虎等人^[21]的研究一致，说明COI的通用引物和扩增条件不适合哈蟆油药材扩增。

本研究重新设计扩增哈蟆油及其混伪品的COI序列的通用引物LWF01/LWR01，使用梯度PCR仪(温度范围为50~60 $^{\circ}$ C)筛选合适的PCR退火温度，发现最佳退火温度为52~54 $^{\circ}$ C(图2C)。使用LWF01/LWR01引物和优化的扩增程序对肌肉和药材样品分别进行PCR扩增，电泳结果表明肌肉和药材样品均可获得清晰、明亮、单一的条带，扩增效果图见图2D，经测序验证均为目标物种的COI序列。

2.5 东北林蛙、黑龙江林蛙和中国林蛙的COI条形码序列特征及序列差异分析

东北林蛙*R. dybowskii* Günther, 1876. 共84条序列，GC含量为49.39% $\pm$ 0.08%，分为17个单倍型A1~A17，包含17个变异位点，种内遗传距离最大值为0.0123，与黑龙江林蛙和中国林蛙的种间距离最小值分别为：0.1797和0.1379。黑龙江林蛙*R. amurensis* Boulenger, 1886共6条序列，GC含量为46.02% $\pm$ 0.16%，分为4个单倍型B1~B4，包含5个变异位点，种内遗传距离最大值为0.0046，与东北林蛙和中国林蛙的种间距离最小值分别为0.1797和0.1739。中国林蛙*R. chensinensis* David, 1875共13条序列，GC含量为48.95% $\pm$ 0.04%，分为3个单倍型C1~C3，包含19个变异位点。

图 2 哈蟆油实验条件优化. A: 直接使用裂解液裂解; B: 使用通用 *COI* 引物 LCO1490/HCO2198 和通用扩增程序扩增; C: LWF01/LWR01 引物最佳退火温度筛选, 从左至右分别为 60, 59.4, 58.3, 56.3, 53.9, 52.0, 50.7 和 50°C; D: 使用 LWF01/LWR01 引物和 54°C 为退火温度的 PCR 扩增结果(网络版彩图)

Figure 2 Optimization of experimental conditions for *Ranae oviductus* (Hamayou) using DNA barcoding identification. A: Using a lysing reagent directly; B: cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) sequence amplification using universal *COI* primer pair and program; C: optimization of annealing temperature for primer pair LWF01/LWR01. Annealing temperatures from left to right were 60, 59.4, 58.3, 56.3, 53.9, 52.0, 50.7, and 50°C; D: *COI* sequence amplification using primer pair LWF01/LWR01 and 54°C as the annealing temperature (color online)

种内遗传距离最大值为 0.0297, 与东北林蛙和黑龙江林蛙的种间距离最小值分别为 0.1379 和 0.1739。因此, 东北林蛙、黑龙江林蛙和中国林蛙的种内遗传距离最大值均显著小于相互间的种间距离最小值, 物种之间具有清晰的界限。

2.6 哈蟆油 DNA 条形码物种鉴定数据库及其在鉴定实践中的应用

哈蟆油 DNA 条形码物种鉴定数据库共 259 条序列, 包含东北林蛙、黑龙江林蛙、中国林蛙、欧洲林蛙、侧褶黑斑蛙、金线侧褶蛙、牛蛙、中华蟾蜍等哈蟆油及其混伪品的 43 个物种, 数据库中物种的种间距离平均值为 0.3898 ± 0.2809 , 种间距离 θ 值为 0.1629 ± 0.2001 , 种间距离最小值的平均值为 0.0970 ± 0.1059 , 种内距离的平均值为 0.0098 ± 0.0215 , 种内距离 θ 值为 0.0183 ± 0.0478 , 种内距离最大值的平均值为 0.0281 ± 0.0553 。基于建树法、距离法和 BLAST 法的物种鉴定效率均为 100%, 表明数据库内的物种可以相互区分, 可以用于哈蟆油及其混伪品的物种鉴定。为验证哈蟆油 DNA 条形码鉴定方法, 从药材市场收集哈蟆油药材 10 份, 产地包含四川、广州、东北长白山区和山东等, 价格从 700~9000 元/kg 不等, 采用本研究确立的 DNA 提取和 PCR 扩增方法, 所有样品均可成功获得 *COI* 条形码

序列, 鉴定结果表明市售药材中包含东北林蛙油、黑斑侧褶蛙(青蛙)油、牛蛙油、黑龙江林蛙油和中国林蛙油(网络版附表 S3)。

3 讨论

3.1 建议将哈蟆油的基原物种修订为东北林蛙

哈蟆油在历代本草中记载较少, 1955 年, 刘仁甫^[36]援引日本医学中央杂志的记述, 认为哈蟆油的原动物为黑龙江林蛙, 《中药志》^[5-9]等记载哈蟆油的基原为中国林蛙, 但明确黑龙江林蛙亦可作药用, 《中国药典》^[1]仅收录中国林蛙为哈蟆油基原。哈蟆油基原收录的混乱导致药学研究和质量标准制定过程中常采用不同的基原物种为研究对象。例如, 2017 年, 陈虹等人^[27]在“雪蛤基因组 DNA 提取方法和条形码分子鉴定研究”中采用桓仁林蛙为实验对象, 桓仁林蛙为陆宇燕等人^[37]根据采自中国辽宁桓仁八甸子的标本订立的新种, 尚未有记载可作为哈蟆油基原物种使用。哈蟆油基原物种混乱的根源是在药学研究中对林蛙属现代分类体系的交叉混用, 既承认 Pope 和 Boring^[12]将包含中国林蛙、东北林蛙、黑龙江林蛙的中国北方林蛙归并到欧洲林蛙的中国亚种, 采用“*R. temporaria chensi-nensis*”为中国林蛙拉丁名; 同时又采用 2009 年《中国

动物志·两栖纲(下卷)·无尾目·蛙科》^[13]确立的分类体系, 将黑龙江林蛙、中国林蛙和东北林蛙定为有效种. 中国林蛙、黑龙江林蛙和东北林蛙的分类地位演化详见图3.

因此, 确定和统一哈蟆油的基原物种是开展哈蟆油研究的当务之急^[22], 这包含两方面内容: (i) 统一分类体系. 与《中国动物志·两栖纲(下卷)·无尾目·蛙科》^[13]、《中国药用动物志》(第二版)^[40]、国际两栖动物分类数据库(Amphibian Species of the World 6.0)和NCBI Taxonomy等国际分类数据库^[41]统一, 结合基于线粒体全基因组的系统发育关系分析, 建议将中国林蛙、东北林蛙和黑龙江林蛙恢复为种级地位, 拉丁名分别采用*R. chensinensis* David, 1875, *R. dybowskii* Günther, 1876, *R. amurensis* Boulenger, 1886. (ii) 明确基原物种. 由哈蟆油传统产区与东北林蛙、黑龙江林蛙、中国林蛙地理分布的叠加比较可知, 哈蟆油的传统产区与中国林蛙的地理分布无重叠, 而与东北林蛙的地理分布完全重叠, 与黑龙江林蛙的地理分布部分重叠. 因此, 建议将哈蟆油的基原物种统一为原中国林蛙的东北居群, 即被称为“哈士蟆”的东北林蛙, 同时进一步讨论黑龙江林蛙是否可作为哈蟆油的基原物种使用. 《中药志》等均认为黑龙江林蛙也可作为哈蟆油使用, 市场上也常见黑龙江林蛙油与东北林蛙油混合

出售, 但黑龙江林蛙油的性状、吸水膨胀度、1-甲基海因含量均与东北林蛙油区别, 在市场上俗称“小油”.

3.2 DNA条形码技术可有效鉴定哈蟆油及其混伪品

市场上哈蟆油的混伪品众多, 主要来源分为3种情况: (i) 华中、华北和西北地区出产的中国林蛙油. 哈蟆油的主产地为我国东北地区, 历史上华中、华北和西北地区并不出产哈蟆油. 由于《中国药典》规定哈蟆油的基原物种为中国林蛙, 近年来有山东、甘肃等地的中国林蛙油流入市场, 但其输卵管的产出率和吸水膨胀度相对东北产哈蟆油均较低, 个体间相差也较大、质量亦不稳定^[42], 也缺乏系统的药理研究支持. (ii) 黑龙江林蛙油. 黑龙江林蛙油占有一定的市场比例^[22,23], 有研究表明其药材性状、高效液相色谱法鉴别和膨胀度检查均符合2015年版《中国药典》规定^[1], 但是否将黑龙江林蛙列为哈蟆油的基原动物仍有争议. (iii) 青蛙油和牛蛙油、中华蟾蜍油. 性状与正品哈蟆油差别明显, 一般通过膨胀度检查即可予以判别^[43], 但无法确定混伪品的物种信息.

当前, “中药材DNA条形码分子鉴定指导原则”已经纳入2015版《中国药典》^[44], 并已广泛应用于动物药材的鉴定实践. 本研究全面克服哈蟆油DNA提取、

图3 中国林蛙、黑龙江林蛙和东北林蛙的分类地位演化^[10-17,38,39]

Figure 3 Classification evolution of *Rana chensinensis*, *R. amurensis*, and *R. dybowskii*^[10-17,38,39]

PCR非特异扩增等技术困难,建立了包含哈蟆油及其混伪品的DNA条形码物种鉴定数据库,基于市售药材的鉴定实践表明哈蟆油DNA条形码物种鉴定方法可

将市售伪品准确鉴定到物种水平,相较于哈蟆油的传统鉴定方法具有通用性、精确性和客观性等特点,是解决哈蟆油市场混乱的关键技术手段。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Chinese Pharmacopoeia (in Chinese). 2015 edition, Vol 1. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2015. 255–256 [国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2015年版, 一部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015. 255–256]
- 2 Xiao W, Deng H Z. The overview of chemical constituents and pharmacology of Ranae oviducts (in Chinese). J Chin Med Mater, 2002, 25: 681–683 [肖炜, 邓虹珠. 哈蟆油化学成分与药理研究概况. 中药材, 2002, 25: 681–683]
- 3 A G, et al. Shengjing Tongzhi (in Chinese). Shenyang: Liaohai Publishing House, 1997, 107: 21–22 [阿桂等纂修. 盛京通志. 沈阳: 辽海出版社, 1997. 21–22]
- 4 Jin Y F. Liaohai Congshu (in Chinese). Shenyang: Liaohai Publishing House, 1985. 299 [金毓绂. 辽海丛书. 沈阳: 辽沈书社, 1985. 299]
- 5 The Institute of Materia Medica, et al. Chinese Material Medica (in Chinese), vol 4. Beijing: People's Health Publishing House, 1961. 144–147 [中国医学科学院药物研究所等. 中药志(第四册). 北京: 人民卫生出版社, 1961. 144–147]
- 6 Nanjing University of Chinese Medicine. Chinese Materia Medica Dictionary, 2 edition (in Chinese). Shanghai: Shanghai Scientific & Technical publishers, 2006. 2325 [南京中医药大学. 中药大辞典(下册). 第二版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006. 2325]
- 7 The Compilation Group of Medicinal Fauna of China. Medicinal Fauna of China (in Chinese). Tianjin: Tianjin Science and Technology Press, 1979. 174–176 [《中国药用动物志》协作组. 中国药用动物志. 天津: 天津科学技术出版社, 1979. 174–176]
- 8 The Compilation Group of Chinese Herbal Medicine Compilation. Chinese Herbal Medicine Compilation (in Chinese). Beijing: People's Medical Publishing House, 1996. 446 [《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编(下册). 北京: 人民卫生出版社, 1996. 446]
- 9 Xiao P G. Modern Chinese Materia medica (in Chinese). Beijing: Chemical Industry Press, 2006. 138–143 [肖培根. 新编中药志(第四卷). 北京: 化学工业出版社. 2006. 138–143]
- 10 David A. Journal de mon Troisième Voyage d'exploration dans l'Empire Chinois. vol 2. Paris: Hachette, 1875. I: 1–383, II. 1–348
- 11 Boring A M. Studies in variation among Chinese Amphibia. II. Variation in five wide-ranging common Salientia. Peking Nat History Bull, 1938, 13: 89–110
- 12 Pope C H, Boring A M. A survey of Chinese Amphibia. Peking Nat History Bull, 1940, 15: 13–86
- 13 Fei L, Hu S Q, Ye C Y, et al. Fauna Sinica Amphibia Vol. 3 Anura Ranidae (in Chinese). Beijing: Science Press, 2009. 969–1042 [费梁, 胡淑琴, 叶昌媛, 等. 《中国动物志》两栖纲(下卷)无尾目蛙科. 北京: 科学出版社, 2009. 969–1042]
- 14 Liu C Z, Hu S Q. Chinese Anura Amphibians (in Chinese). Beijing: Science Press, 1961. 1–364 [刘承钊, 胡淑琴. 中国无尾两栖类. 北京: 科学出版社, 1961. 1–364]
- 15 Wu Z A. Karyotype of Rana chensinensis from Beijing (in Chinese). J Genet Genom, 1981, 8: 138–144 [吴政安. 北京产中国林蛙的染色体组型. 遗传学报, 1981, 8: 138–144]
- 16 Wei G, Chen F G, Xu N, et al. New subspecies of Rana Chensinensis from China (in Chinese). Zool Syst, 1991, 16: 375–382 [魏刚, 陈服官, 徐宁, 等. 中国林蛙新亚种研究. 动物分类学报, 1991, 16: 375–382]
- 17 Xie F. Taxonomical studies on brown frogs (Rana) from northeastern China (Amphibia: Ranidae) (in Chinese). Zool Syst, 1999, 24: 224–231 [谢锋. 中国东北地区林蛙属物种的分类学研究(两栖纲: 蛙科). 动物分类学报, 1999, 24: 224–231]
- 18 Li Y P, Zhang J G, Liu M, et al. Study on the origin for Oviductus Ranae, China (in Chinese). J Chin Mater Med, 2003, 28: 15–17 [李宜平, 张晋纲, 刘淼, 等. 哈蟆油动物基原问题探讨. 中国中药杂志, 2003, 28: 15–17]
- 19 Xiao J L, Jiang D C, Liu Y C. The discussion on the original animal classification of Ranae Oviductus (in Chinese). Acad Period Changchun College Trad Chin Med, 2005, 21: 40–41 [肖井雷, 姜大成, 刘玉翠. 哈蟆油的原动物分类阶元探讨. 长春中医学院学报, 2005, 21: 40–41]
- 20 Xiao J L, Jiang D C. On origin of Oviductus Ranae in Chinese Pharmacopoeia (in Chinese). China J Chin Mater Med, 2010, 21: 2931–2933 [肖井雷, 姜大成. 《中国药典》中哈蟆油的基原问题议. 中国中药杂志, 2010, 21: 2931–2933]
- 21 Wang M H, Kang T G, Xu L, et al. Identification of Ranae Oviductus original animal based on COI sequences (in Chinese). China J Chin Mater Med, 2017, 42: 1572–1577 [王孟虎, 康廷国, 许亮, 等. 基于COI序列的哈蟆油基原动物DNA条形码鉴定研究. 中国中药杂志, 2017, 42:

1572–1577]

- 22 Liu Y Z, Xu G J, Xu Y Q. The review and prospect of Ranae oviducts authentication (in Chinese). *J Yanbian Med College*, 1990, 13: 70–74 [刘永镇, 徐光俊, 徐源清. 哈蟆油真伪鉴别研究的回顾和展望. 延边大学医学学报, 1990, 13: 70–74]
- 23 Wu X C. The discriminate between Ranae oviducts and its adulterants (in Chinese). *Lishizhen Med Mater Med Res*, 2005, 16: 1131–1133 [吴晓春. 哈蟆油的真伪辨析. 时珍国医国药, 2005, 16: 1131–1133]
- 24 Xiao J L, Jiang D C. The preliminary study on the effect of storage years on the quality of Ranae oviducts (in Chinese). *Jilin J Trad Chin Med*, 2010, 30: 338–340 [肖井雷, 姜大成. 贮藏年限对哈蟆油质量影响的初步研究. 吉林中医药, 2010, 30: 338–340]
- 25 Gao Z Q, Liu J T, Wang C Y, et al. Query about 1-MID in the identification of Ranae oviducts in Chinese Pharmacopoeia (in Chinese). *Central South Pharm*, 2013, 11: 608–610 [高竹青, 刘俊亭, 王春媛, 等. 对中国药典用1-甲基海因鉴别哈蟆油方法的商榷. 中南药学, 2013, 11: 608–610]
- 26 Gao X C, Liu D, Bai J W, et al. DNA molecular identification of Ranae oviductus original species (in Chinese). *Jilin J Trad Chin Med*, 2014, 34: 1147–1148, 1162 [高晓晨, 刘冬, 白俊武, 等. 哈蟆油基原物种DNA分子鉴定研究. 吉林中医药, 2014, 34: 1147–1148, 1162]
- 27 Chen H, Peng W N, Hu Q, et al. DNA extraction from Ranae oviductus and molecule barcode identification (in Chinese). *Food Sci Technol*, 2017, 42: 321–325 [陈虹, 彭韦楠, 胡青, 等. 雪蛤基因组DNA提取方法的研究及条形码分子鉴定. 食品科技, 2017, 42: 321–325]
- 28 Benson D A, Cavanaugh M, Clark K, et al. GenBank. *Nucleic Acids Res*, 2012, 41: D36–D42
- 29 Chen S, Pang X, Song J, et al. A renaissance in herbal medicine identification: From morphology to DNA. *Biotech Adv*, 2014, 32: 1237–1244
- 30 Edgar R C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: 1792–1797
- 31 Swofford D L. *PAUP**. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. 301–314
- 32 Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*, 2016, 33: 1870–1874
- 33 Chen S, Yao H, Han J, et al. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE*, 2010, 5: e8613
- 34 Su S, Shang Z J. *Bencao Tujing* (in Chinese). Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 1994. 500 [宋·苏颂(编), 尚志钧(辑校). 本草图经. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1994. 500]
- 35 Li S Z. *Compendium of Materia Medica (Bencao Gangmu)*, 2 ed (in Chinese). Beijing: People's Health Publishing House, 2017. 2345 [明·李时珍. 本草纲目(下册). 第二版. 北京: 人民卫生出版社, 2017. 2345]
- 36 Liu R P. A preliminary introduction to Ranae oviductus (Hamayou) (in Chinese). *Chin Pharm J*, 1955, 11: 517 [刘仁甫. 哈什蟆油初步介绍. 中国药学杂志, 1955, 11: 517]
- 37 Lu Y Y, Wang J Q, Dong B J, et al. A new record of *Rana huanrenensis* in Jilin Province, China (in Chinese). *Sichuan J Zool*, 2005, 24: 259 [陆宇燕, 王晶琦, 董丙君, 等. 吉林省两栖动物一种新纪录——桓仁林蛙. 四川动物, 2005, 24: 259]
- 38 Günther A. XLI.—Description of a new frog from North-eastern Asia. *Ann Mag Nat History*, 1876, 17: 387
- 39 Boulenger G A. Note sur les grenouilles rousses d'Asie. *Bulletin De La Société Zoologique De France*, 1886, 11: 595–600
- 40 Li J D, Huang L Q, Qu X B. *Medicinal Fauna of China*, 2 ed (in Chinese). Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 2013. 1087–1092 [李军德, 黄璐琦, 曲晓波. 中国药用动物志. 第二版. 福州: 福建科技出版社, 2013. 1087–1092]
- 41 Federhen S. The NCBI taxonomy database. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40: D136–D143
- 42 Gao Y L. Studies on the quality of Hamayou from Gansu region (in Chinese). *Chin Trad Herbal Drugs*, 1996, 27: 82–83 [高燕玲. 甘肃地产蛤蟆油品质研究. 中草药, 1996, 27: 82–83]
- 43 Liu Y Z. Determination of the expansion coefficient of the Ranae oviductus (Hamayou) (in Chinese). *J Chin Med Mater*, 1990, 13: 18–19 [刘玉珍. 哈蟆油膨胀系数的测定. 中药材, 1990, 13: 18–19]
- 44 Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia* (in Chinese). 2015 ed, Vol 4. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 2015. 383–385 [国家药典委员会. 中华人民共和国药典, 2015年版, 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015. 383–385]

Herbalogical studies of *Ranae oviductus* (Hamayou) and its species identification using DNA barcoding method

SHI LinChun^{1,4}, LIU JinXin¹, TANG XianMing², LIU JianHui², YAO Hui¹, ZHANG LiQiu³,
XIANG Li⁴, ZHANG Qin¹, XIE CaiXiang¹ & SONG JingYuan¹

¹ Engineering Research Center of Traditional Chinese Medicine Resource, Ministry of Education, Key Lab of Chinese Medicine Resources Conservation, State Administration of Traditional Chinese Medicine of China, Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;

² Harbin Food and Drug Inspection Center, Harbin 150525, China;

³ College of Pharmaceutical and Food Science, Tonghua Normal University, Tonghua 134002, China;

⁴ Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China

Ranae oviductus is a rare and precious Chinese medicine; however, there are many challenges connected with identifying this medicine, such as presence of many adulterants, the controversy over its origin, and the complexity of its classification history. First, we performed textual criticism of herbal literature and modern research data, constructed a phylogenetic relationship using whole mitochondrial genomes, and created a spatial overlay for the traditional production areas of *Ranae oviductus* and animal geographical distribution. The results obtained confirm that *Rana chensinensis*, *R. dybowskii*, and *R. amurensis* can be considered as a valid species for *Ranae oviductus* and that the *Chinese Pharmacopoeia's* use of *Rana temporaria chensinensis* David. as the scientific name for Chinese brown frog is inappropriate. We further believe that the original species for *Ranae oviductus* could be *R. dybowskii*. Second, a debonding solution was prepared and used to pretreat medicinal materials to overcome the harmful effects of high expansion properties of *Ranae oviductus* during its DNA extraction. A new polymerase chain reaction primer pair was designed to resolve nonspecific amplification of cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) sequences of *Ranae oviductus* using universal primers. A DNA barcoding reference library was established that contained 259 *COI* barcodes for 43 species covering *Ranae oviductus* and most of its adulterants. Finally, the DNA barcoding procedure for the identification of *Ranae oviductus* was verified based on simulation of real identification practices using commercially available medicinal materials. The results indicate that there are several adulterants, such as frog oil (*Pelophylax nigromaculatus*) and bullfrog oil (*R. catesbeiana*), in the herbal market. This study shows that DNA barcoding can successfully distinguish *Ranae oviductus* and its adulterants. In addition, the procedure established in this study can provide strong support for the safety of *Ranae oviductus* and protect the interests of consumers.

***Ranae oviductus*, original species, DNA barcoding, adulterants, identification**

doi: [10.1360/N052018-00231](https://doi.org/10.1360/N052018-00231)