

动物药鉴定的研究现状与对策探讨

徐莹¹, 陈晨², 沈玉萍¹, 顾芹英¹, 郑卫平¹, 杨欢^{1*}, 吴启南^{3*}

1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013

2. 江苏大学京江学院, 江苏 镇江 212013

3. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023

摘要: 动物药应用历史悠久, 一直受到医药学家和政府部门的重视, 是中药体系的重要组成部分。然而, 动物药鉴定的研究基础相对薄弱, 特别是缺乏具有动物药特色的鉴定策略与手段。就近年来对动物药鉴定的相关研究进行了总结与分析, 并首次提出以标志蛋白和多肽作为动物类药材与饮片鉴定的特征识别物, 以基质辅助激光解吸串联飞行时间质谱为核心技术进行解析, 并以其含有的特异性多肽片段作为鉴定动物药的直接依据, 从而为动物药鉴定的现代研究提供参考。

关键词: 动物药; 中药鉴定; 标志蛋白和多肽; 特征识别物; 基质辅助激光解吸串联飞行时间质谱

中图分类号: R282.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)04-0578-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.04.023

Research status and strategy on authentication of animal medicines

XU Ying¹, CHEN Chen², SHEN Yu-ping¹, GU Qin-ying¹, ZHENG Wei-ping¹, YANG Huan¹, WU Qi-nan³

1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

2. Jingjiang College of Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

3. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Key words: animal medicines; authentication of Chinese materia medica; signature proteins and peptides; specific markers; MALDI-TOF/TOF-MS

中药鉴定体系是一个包容与开放的系统, 始终伴随科技的发展而与时俱进, 从而适应中药现代化的要求。目前, 中药鉴定已从传统“四大鉴别法”发展到了“四大鉴别-现代仪器分析技术-分子生物学方法”新体系, 该体系中的各种方法利用中药的不同性质相互配合, 在中药的现代化研究与应用中发挥着至关重要的作用, 而提高灵敏度和专属性则始终是中药鉴定技术研究的首要任务。

动物药应用历史悠久, 早在中医经典著作《黄帝内经》和《伤寒论》中就有使用乌贼骨、水蛭、牡蛎等动物药组方治病的记载。现存最早的药理学专著《神农本草经》中则记载有白僵蚕、羚羊角、麝香等 67 种动物药, 占药物总量的 18.36%;《唐本草》共计记载动物药 128 种;《本草纲目》中, 对 461

种动物药进行了详细地分类; 而当代《中华本草》和《动物本草》中收录的动物药更是高达 1 051 种和 1 731 种^[1]。《中国药典》2010 年版一部^[2]收录 51 味动物药药材 (其中 36 味另列有共 61 种饮片)、1 种提取物及 365 种含动物药制剂, 占全部 2 165 个品种的 19.3%。由此可见, 动物药历来受到医药学家和政府部门的重视, 是中药体系的重要组成部分。但是, 由于动物药富含蛋白等生物信息大分子物质, 这一性质与植物药富含次生代谢产物有着很大的区别, 也极大增加了鉴定研究的难度, 因而从总体上说动物药鉴定的研究基础相对薄弱, 特别是缺乏具有动物药特色的鉴定策略与手段。

本文就近年来对动物药鉴定的相关研究进展进行了总结与分析, 并首次提出以标志蛋白和多肽作

收稿日期: 2013-10-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81303174); 中国博士后科学基金项目 (2013M530241); 江苏省自然科学基金资助项目 (BK2012290); 江苏大学学生科研立项项目 (12A174); 江苏省普通高校研究生科研创新计划项目 (CXLX13_691)

作者简介: 徐莹 (1991—), 女, 硕士研究生 研究方向为生药学。E-mail: 986356094@qq.com

*通信作者 杨欢, 男, 副教授。E-mail: yanghuan1980@ujs.edu.cn

吴启南, 男, 教授, 研究方向为中药鉴定学。Tel: (025)85811059

为目标分子,采用特异性强、灵敏度高的基质辅助激光解吸串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS),这一目前蛋白质研究的最有力工具为核心技术,解析动物类药材与饮片中的标志蛋白和多肽,以作为动物药鉴定的特征识别物,并以其含有的特异性多肽片段作为鉴定动物药的直接依据。这一对策为动物药的专属性鉴定提供了一条新的研究途径,通过建立关键的鉴别技术,对确保动物类中药材、饮片和中成药的质量,从而保证用药的安全性、有效性具有重大的应用价值。同时,本文所提出的对策可促进蛋白质组学、生物信息学与中药鉴定的有机结合,有着重要的学术意义。

1 动物药鉴定的基本研究现状与分析

1.1 大多数动物药的鉴定技术为性状鉴定和显微鉴定

长期以来,性状鉴定和显微鉴定在动物药鉴定中发挥了重要作用。李峰等^[3]对动物药残留毛进行了研究,结合显微摄影与计算机图像处理技术,建立了显微技术平台与数字化图谱谱库。需要指出的是,这两种方法要求供试品或为完整的药材、饮片,或具有特定的微观或宏观的可视特征,因此难以作为识别同属近似种、胶类药物、动物甲壳、炮制品的专属性鉴定手段。

1.2 采用了与植物药相似的理化鉴定方法,缺乏针对性、专属性

虽然近年来利用现代仪器分析技术鉴定动物药的研究有所增加,但主要是利用色谱或光谱等技术检测一种或几种小分子成分或其总量^[4]。陈建波等^[5]采用红外光谱对冬虫夏草进行了鉴定,比较了冬虫夏草与北虫草、伪品麻脊背草中部虫体脂肪量的差异。此外,研究表明,动物药中小分子物质的种类远少于植物药,且特异性差,因此导致了多味动物药使用同一小分子化合物为指标性成分进行质量评价^[6]。《中国药典》2010年版中,阿胶的“含量测定”项下测定L-羟脯氨酸、甘氨酸、丙氨酸、L-脯氨酸4种氨基酸的量,而鹿角胶也以这几种氨基酸作为指标性成分^[7],缺乏专属性。

1.3 胶类和龟甲类药物是动物药鉴定的难点和热点

市场上胶类和龟甲类动物药的混淆品、伪品和掺伪品较多。阿胶药材常见牛皮胶、猪皮胶和杂皮胶等伪品和掺伪品,龟甲药材常见马来龟甲、印度棱背龟甲和红耳泥龟甲等混淆品,而利用传统方法很难对这两类药材进行准确鉴别。虽然近几年有学

者以超高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF)等技术寻找胶类动物药中具有专属性鉴别意义的特征肽段^[8],然而由于以原有总蛋白的水解产物^[9]为特征识别物以及所用技术存在的固有限制(如未能有效区分不同性质的蛋白和多肽、不能用于研究炮制后原有蛋白和多肽发生的修饰等变化、最大测定的相对分子质量小等),因此难以实现对掺伪品(包括人为添加合成的小分子特征肽段)、炮制品的准确识别,亦不能直接对动物药中原有蛋白和多肽的化学结构进行解析。

1.4 动物药炮制及饮片鉴定的现代化研究少

动物药材在炮制成饮片的过程中,其外在可视特征与内含化学成分均产生很大变化,鉴定技术研究的难度也随之增加,相关报道较少,主要为显微鉴定、微量元素测定或色谱法测定饮片中分子物质的量^[10];动物药饮片的应用十分广泛,因而其鉴定技术的现代化研究亟待加强。近几年有学者利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析了地龙、水蛭、全蝎等炮制前后水溶性蛋白的差异^[11-14],但是所研究蛋白的一级结构(即氨基酸序列)未知,因而难以清晰地描述炮制后这些蛋白的变性、降解位点、修饰类别等;而且,这些研究没有对蛋白和多肽进行区分,不能体现每个动物药的特征属性。

1.5 常用的DNA分子鉴定技术存在局限性

目前,国内外学术界已充分认识到,生物大分子如DNA、多肽和蛋白等,与作为二级代谢产物的小分子相比,具有更高的特异性,因而,现代生物技术作为新兴的动物药鉴定手段,尤其是基于生物信息物质的鉴定方法,近年来得到了快速的发展。其中聚合酶链式反应(PCR)技术已被运用于乌梢蛇、蕲蛇、阿胶等动物药的DNA分子鉴定^[15-16],具有较高的专属性。然而,基于PCR技术的DNA分析有一些局限性^[17]:(1)动物药中常含有PCR抑制物,易引起DNA复制失败;(2)DNA分子具有物种内和个体内同一性,特异性仍显不足;(3)PCR技术不能被应用于角类、动物甲壳类等不含DNA的药物;(4)引物设计时,需要足够的DNA序列信息,必须完成大量测序工作。鉴于以上4点,DNA不是最合适的用于鉴定的特征生物大分子。

2 动物药鉴定的研究思路与对策

2.1 动物药鉴定研究应选择适宜的特征识别物

动物中蛋白和多肽的量与种类十分丰富^[18],除了不同物种或同一物种的不同组织所含的共有蛋白

和多肽外,还存在大量的标志蛋白和多肽,它们具有以下性质^[19-20]:(1)不同动物物种、同一物种不同组织中标志蛋白和多肽的种类有别,特异性极高,并且其在同一物种中表达稳定;(2)标志蛋白和多肽广泛存在于动物不同组织中,包括角、甲壳等缺少DNA的部位;(3)借助现代生物质谱及生物信息技术,可快速完成对标志蛋白和多肽的氨基酸测序工作,进而实现对动物物种、组织等的准确判别;(4)蛋白质组学研究技术已发展成熟,可对标志蛋白和多肽进行定量比较分析,以及研究它们的结构变化。由此可见,标志蛋白和多肽作为动物药鉴定的特征识别物具有独特之处。

2.2 动物药鉴定研究必须建立可靠的关键技术

目前常用的电泳、高效液相色谱(HPLC)和免疫组化等技术在研究蛋白(多肽)时都有关键性不足,如等电聚焦电泳(IEF)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和HPLC主要利用净电荷、相对分子质量或憎水性的差别来分析蛋白和多肽,但如果氨基酸残基被另一带有相同电荷的氨基酸所取代,相对分子质量相近或待分析物无紫外-可见吸收,其鉴别能力将大大降低,因而分析结果的可靠性存疑;而且HPLC对蛋白和多肽的分辨率低、分析时间长;免疫组化虽然专属性强,但使用前需开发和制备特异性抗体,代价高昂,且假阳性结果也直接影响其准确性。特别要指出的是,以上方法不能测定蛋白和多肽结构中的特征信息,如多肽片段、氨基酸序列等,因而难以实现对蛋白和多肽的准确识别,不足以单独发展成为研究动物药鉴定研究的关键技术。

基质辅助激光解吸串联飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)是当前描述蛋白和多肽等大分子中特征信息最有力的技术^[21],它超越以上技术的优势在于:(1)可检测低至飞摩尔级的痕量物质,灵敏度极高;(2)样品测定耗时短(以秒计),可进行高通量分析;(3)具备测定氨基酸序列的能力,在区分蛋白和多肽时,极具专属性;(4)校正用标准物质与样品在同条件下测定,可确保分析结果的高可靠性;(5)联合应用定向酶切、MS/MS等技术,可研究蛋白和多肽的变性、修饰与降解等。

该技术用于研究蛋白等的主要过程是用一定强度激光照射多肽片段(蛋白等经酶消化得到或样品中直接存在)与基质形成的共结晶薄膜,基质从激光中吸收能量,并转移给其中的多肽片段,使其电

离并从基质中解吸,电离的多肽片段分子在电场作用下加速飞过飞行管道,在不同时间到达检测器并被捕获,最终得到离子的质荷比。此后,蛋白和多肽等的解析可通过使用以下3种方法得以实现^[22-24]:(1)肽质量指纹图谱(peptide mass fingerprint, PMF),即一级质谱(MS);(2)选择一级质谱的前体多肽离子(precursor peptide ions)进行二级质谱(MS/MS)分析,并在数据库中寻求匹配;(3)对数据库中不存在的多肽片段(来源于新颖蛋白等)进行从头测序(*de-novo sequencing*),即根据肽段有规律碎裂的特点,确定氨基酸序列。

动物药中原有标志蛋白和多肽的种类丰富,被消化为多肽片段后,复杂程度进一步增加,或不能采用原始的MS直接解析。但是,通过利用二维电泳、二维纳流液相色谱等其他蛋白质组学技术,对蛋白和多肽及其经消化后所得多肽片段进行分离后,联合应用MS/MS和*de-novo sequencing*,可极大地增强对复杂蛋白和多肽的解析能力。此外,动物药药材在炮制成为饮片的过程中,受机械力、加热和辅料等因素的影响,所含蛋白和多肽可能失去原有结构而发生变性(氢键等次级键断裂)或降解(肽键等断裂),或氨基酸残基发生非酶糖基化等修饰。但是,在一定条件下,很多蛋白和多肽的变性是可逆的,当外界变性因素去除后可以复性,而且有些蛋白和多肽可耐受高温而不发生变化。另外,原有结构的失去并不影响氨基酸序列的测定,而MALDI-TOF/TOF-MS亦可研究蛋白等的非酶糖基化修饰等;除此之外,只要原有蛋白和多肽没有被完全炭化或被降解为相对分子质量<1 000的小分子寡肽,仍可利用上述技术对其进行研究。

由此可见,以MALDI-TOF/TOF-MS为核心技术,并结合二维电泳、二维纳流液相色谱和肽序列从头测序算法等手段,可解析多基源、复合体类、角类、动物甲壳类和胶类动物药材与饮片中的标志蛋白和多肽等,以确定它们的特征识别物,并建立动物药的关键鉴定技术。

3 结语

动物药虽然应用历史悠久,是中药体系的重要组成部分之一,但是对其专属性鉴定的研究基础相对薄弱。因此,选择特异性高的目标分子,采用灵敏度高的分析技术,开展相应的基础研究并最终实现对动物药的准确鉴别显得十分急迫。本文提出使用氨基酸序列惟一的标志蛋白和多肽作为动物药的

特征识别物,以其所包含的特异性多肽片段作为鉴定的直接依据,从而克服小分子、DNA和共有蛋白的固有局限。同时,采用MALDI-TOF/TOF-MS等成熟的蛋白质组学研究手段解析动物药标志蛋白和多肽,充分发挥其专属性强、灵敏度高、测定速度快的特点,建立关键技术,以弥补目前研究较多的电泳、免疫学和色谱技术的不足,为动物药品种的准确鉴定以及动物药商品的质量控制与标准制订等方面提供切实可行的研究途径,并且伴随着蛋白质组学研究设备的推广普及,相关研究领域有望在不久的将来引起更多的关注并得以快速发展。

参考文献

- [1] 傅鹏,朱华,万德光,等. 中药动物药的现代研究亟待加强 [A] // 中华中医药学会第九届中药鉴定学术会议论文集 [C]. 建德: 中华中医药学会, 2008.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [3] 李峰,刘春丽,李贺君,等. 鹿鞭药材商品的显微鉴别研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2010, 37(8): 1558-1559.
- [4] 赵清,徐月清,冯天铸,等. 不同炮制方法对僵蚕指标性成分的含量影响研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22(3): 657-660.
- [5] 陈建波,周群,王晓平,等. 冬虫夏草的红外光谱真伪鉴定 [J]. 光谱学与光谱分析, 2012, 32(10): 21-22.
- [6] Chen P, Li W, Li Q, *et al.* Identification and quantification of nucleosides and nucleobases in Geosaurus and Leech by hydrophilic-interaction chromatography [J]. *Talanta*, 2011, 85(3): 1634-1641.
- [7] 周芳妍,刘力. 胶类中药质量控制方法研究进展 [J]. 中国药业, 2013, 22(1): 1.
- [8] 魏锋,程显隆,石岩,等. UPLC-QTOF-MS技术用于胶类药材的专属性检测方法研究及应用 [A] // 2011年中国药学会大会暨第11届中国药师周论文集 [C]. 烟台: 中国药学会, 2011.
- [9] 石岩,范晓磊,肖新月,等. 鹿角胶中4个主要氨基酸的测定研究 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 783-787.
- [10] 谭晓梅,王新雨,张明明,等. 5种贝壳类动物药及其煎出物中微量元素含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1): 61-64.
- [11] 李冰宁,武彦文,欧阳杰,等. 应用红外光谱技术研究中药水蛭的炮制过程 [J]. 光谱学与光谱分析, 2011, 31(4): 979-982.
- [12] 侯林,姬涛,田景振,等. 不同炮制方法对全蝎有效成分和活性的影响 [J]. 中草药, 2011, 42(5): 897-899.
- [13] 杨丰云,付廷明,郭立玮,等. 地龙湿法超微粉碎提取物在模拟胃肠环境中的降解研究 [J]. 药学学报, 2012, 47(1): 110-115.
- [14] 吴文如,李薇,赖小平,等. 地龙药材蛋白质电泳鉴定的初步研究 [J]. 广东药学院学报, 2011, 27(3): 267-270.
- [15] 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.
- [16] Jin G S, Wang X L, Li Y, *et al.* Development of conventional and nested PCR assays for the detection of *Ophiocordyceps sinensis* [J]. *J Basic Microbiol*, 2013, 53: 340-347.
- [17] Yip P Y, Chau C F, Mak C Y, *et al.* DNA methods for identification of Chinese medicinal materials [J]. *Chin Med*, 2007, 2(1): 9-27.
- [18] 包华音,石俊英. 不同产地和不同部位的壁虎药材蛋白质比较研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 69-72.
- [19] Hughes C, Ma B, Lajoie G A. De novo sequencing methods in proteomics [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 604: 105-121.
- [20] Zhang Y, Li N, Brown P W, *et al.* Liquid chromatography/tandem mass spectrometry based targeted proteomics quantification of P-glycoprotein in various biological samples [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2011, 25(12): 1715-1724.
- [21] Mädler S, Boeri Erba E, Zenobi R. MALDI-TOF mass spectrometry for studying noncovalent complexes of biomolecules [J]. *Top Curr Chem*, 2013, 331: 1-36.
- [22] Noble W S, Maccoss M J. Computational and statistical analysis of protein mass spectrometry data [J]. *PLoS Comput Biol*, 2012, 8(1): e1002296.
- [23] Zhang L Y, Reilly J P. De novo sequencing of tryptic peptides derived from *Deinococcus radiodurans* ribosomal proteins using 157 nm photodissociation MALDI TOF/TOF mass spectrometry [J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(6): 3025-3034.
- [24] Laakmann S, Gerdt G, Erler R, *et al.* Comparison of molecular species identification for North Sea calanoid copepods (Crustacea) using proteome fingerprints and DNA sequences [J]. *Mol Ecol Resour*, 2013, 13(5): 862-876.