

动物药鉴别研究进展

李国华

吉林农业工程职业技术学院, 吉林 四平 130061

摘要 本文综述了近年来各种应用于动物药鉴定研究的技术方法。包括传统经验鉴定法、薄层扫描鉴别法、红外与紫外光谱法、HPLC 色谱法、蛋白电泳技术鉴别法、X 射线衍射分析法、DNA 分子诊断技术法、生物芯片技术、发酵技术法、免疫技术等。

关键词 动物药; 鉴别; 进展

中图分类号: R282.740.3

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2010) 03-0241-03

中国动物药的研究整理工作起始于 20 世纪 60 年代初。当时拥有现代分类学知识的学者和专家, 在对市场销售的动物药调查中发现了大量问题, 如本草记载与临床应用不符、同名异物、同物异名、假伪品泛滥等状况。由于动物药具有疗效高、活性强、应用广、潜力大的特点, 故越来越引起国内外学者的关注和重视, 世界卫生组织 (WHO) 在广泛征求全球有关专家的意见后, 认为 21 世纪将是动物药研究发展的世纪。药用动物的研究和应用将随着现代科学技术的进步而不断发展。因此加强动物药真伪优劣的鉴别研究, 确保动物药的质量具有重要意义^[1]。本文概括了我国动物药鉴别研究状况。

1 动物药的传统经验鉴别

1.1 性状鉴别

性状鉴别是识别药材最基本、运用最广泛的方法, 从动物药的表面特征 (形状、颜色、纹路、突起、裂缝、附属物等), 到药材断面特征 (颜色、纹理等)、质地 (光滑、粗糙、角质性等), 注意找出具有专属性的性状特征^[2]。如羚羊角的“合把”、“乌云盖顶”等^[3]。

1.2 显微鉴别

用解剖学的方法在显微镜下观察细胞形态、组织构造、细胞内含物等, 在植物类药材中应用较早且广泛。由于动物药材组成复杂, 显微鉴定的应用受到一定的影响和限制, 起步较晚, 发展较慢。苑冬敏^[4]通过收集 10 种含刚毛的昆虫、小动物类药材, 3 种含毛的动物药材, 2 种羽毛类动物药材, 分别对这些药材所含的残留毛进行深入的显微鉴定研究, 拍摄了 2 000 余幅残留毛的显微特征照片, 利

用测量软件提取了大量的残留毛显微特征参数, 如刚毛长度、毛干直径、髓质指数、单枝节长、节部刺长等。研究表明, 3 类动物药材所含的残留毛在颜色、形状、表面纹理、长度、直径、髓质指数等方面均存在不同程度的差异。通过研究结果可以确认, 不同种类动物药材, 其所含残留毛大多具有明确的显微特征差异, 且具有生物学稳定的特性。通过对所含残留毛的显微鉴别来研究和鉴定动物类药材是科学、可行的。这种鉴别方法对含残留毛的动物药材的鉴别具有很好的应用价值。

1.3 其它

如尝、嗅、试 (手试、火试、水试) 等方法。口尝识别药材, 如熊胆味苦回甜, 有钻舌感; 利用药材的特殊气味识别, 如麝香的特异香气; 手试如麝香手握成团, 轻揉即散, 不沾手, 不染手; 水试如哈蟆油水浸后可膨胀 10~15 倍, 而伪品则至多膨胀 3~7 倍; 火试如马宝粉置于锡纸上加热, 其粉聚集, 发出焦骨气味闭。

2 动物药的薄层扫描鉴别

张莅峡等^[5]对蜈蚣、全蝎、乌梢蛇、地龙、水蛙等 8 种动物药进行了水解氨基酸的系统分析。使用简便、快速的薄层扫描法 (TLCS), 对 8 种动物药经薄层色谱后, 用茚三酮-乙醇试液显色, 进行游离氨基酸的扫描鉴定, 获得了有鉴别意义的 8 种动物药的特征指纹图谱, 可作为动物药材鉴定的参考依据。

3 红外与紫外光谱法

金向群等^[6]通过不同产地的中华大蟾蜍耳后腺分泌物的红外光谱分析表明, 两者红外光谱的峰位、形状、强度是一致的, 说明了光谱的重现性较好,

收稿日期: 2010-01-15

作者简介: 李国华 (1960-), 男, 讲师。Tel: 13804378816, E-mail: 237353663@qq.com

中华大蟾蜍和华西大蟾蜍谱图十分相似,但华西大蟾蜍耳后腺分泌物的红外光谱在 931、945 及 1410cm^{-1} 处有吸收峰,而中华大蟾蜍耳后腺分泌物的红外光谱在此处无吸收峰,这就可以把差别极小的中华大蟾蜍与华西大蟾蜍区分开。王喜军等^[7]把整个胆汁看成一个“化合物”,各组分看成一个“官能团”,各“官能团”有特征吸收(无发色或助色结构者无吸收),复合成一个“化合物”的特征吸收图谱。胆汁的组成对同种动物是一定的。只是由于产地,采收季节等因素不同,各组分的相对量不同,但性质是一致的。因而,对于一个确定的胆汁来说,吸收峰的位置应是不变的。只是由于各组分相对浓度的变化,峰的相对强弱不同。因而吸收峰的位置具有专属性。对送检的熊胆及收集的上述胆汁进行了重复多次的试验,表明上述结果具有重现性,建立了其指纹谱图,具有鉴定意义。

4 HPLC 色谱法鉴别

采用高效液相色谱(HPLC)法建立三斑海马的参考指纹图谱。研究表明所建立的三斑海马的参考指纹图谱可用于药材的真伪鉴别^[8]。

5 蛋白电泳技术鉴别

电泳技术是一种广泛使用的蛋白质分离分析技术。凝胶电泳是一种杰出的分析手段,是蛋白质纯化过程中重要的监测手段。通过电泳可以准确简便的比较大量样品,并获得蛋白质图谱。将 2 种基于不同分离原理的电泳方法进行组合能够大大提高分离效果,如双向电泳。目前电泳技术已经广泛应用于动物药的鉴定研究。史克莉等^[9]利用 SDS-PAGE 技术对 3 种蜂王浆、牛血清蛋白、金钱白花蛇、乌梢蛇、鹿蹄筋、炮制前后的蝎子进行了鉴别分析。

6 X 射线衍射分析法

当对某物质(晶体或非晶体)进行衍射分析时,该物质被 X 射线照射产生不同程度的衍射现象,物质组成、晶型、分子内成键方式、分子的构型、构象等决定该物质产生特有的衍射图谱。如果物质是混合物(动物药)则所得衍射图是各组分衍射效应的叠加,只要混合物组成恒定,该衍射图谱就可作为该混合物的特征图谱。这是 X 射线衍射法用于中药鉴定的理论基础^[10]。由于不同中药的成分各不相同,其衍射图谱各不相同,就可达到对动物药鉴定的目的。朱志峰等^[11]通过粉末 X 射线衍射的方法,对 2 个蛤蚧与 1 个西藏蛤蚧样品进行分析,结果蛤

蚧与西藏蛤蚧具有相似的几何拓扑图形,在西藏蛤蚧中包含 9 个蛤蚧的特征标记峰值,表明蛤蚧与西藏蛤蚧虽然属于不同科动物,但它们所含的主要成分相近。王树春等^[12]采用 X 衍射 Fourier 谱对 4 个花鹿茸样品进行分析,它们的衍射图形的几何拓扑特征相同,可取它们共有的 10 个峰为花鹿茸的特征标记峰,以作为识别花鹿茸的依据。又用本法识别比较熊胆与伪品、天然熊胆与引流熊胆干燥品之间的差异,结果引流熊胆与天然熊胆 X 射线衍射 Fourier 图谱是一致的,说明两者所含成分的一致性,表明本法对于动物药熊胆的鉴别具有一定的参考价值,且 X 射线衍射 Fourier 图谱能识别熊胆伪品,是一种快速、简便易行的物理鉴定方法,可作为熊胆质量控制手段之一^[13]。

7 DNA 分子诊断技术

DNA 分子诊断技术也称 DNA 分子标记技术。是通过直接分析遗传物质的多态性来诊断生物内在基因排布规律及外在性状表现规律的技术,故较前述方法更具有准确性,其核心是 DNA 扩增技术和电泳技术。这类技术的共同点是,首先利用合成随机引物通过聚合酶链式反应(PCR)扩增不同个体的 DNA 分子,然后直接进行电泳分析来揭示其 DNA 的多态性,找出真品特有的 DNA 片断并对其进行测序,用以检测相应的药材,是一种简便、准确的中药鉴定方法。主要有随机扩增 DNA 多态性法(RAPD)、限制性片段长度多态性分析法(RFLP)等。王义权等^[14]用 DNA 分子遗传标记技术对蛇类药材的鉴别研究表明,用 RAPD 方法可以准确地区别乌梢蛇及其混淆品和金钱白花蛇及其伪品,显示出 DNA 分子遗传标记技术可望成为一种准确鉴别蛇类药材的新方法。Hashimoto 等^[15]用 PCR 方法扩增了鹿茸、蝮蛇和海马的 12s rRNA 和 cytb 基因序列,并对鹿茸的 PCR 产物进行了测序,结果表明动物类药材可以用标准的药材作参照,同时进行 PCR 扩增,经电泳达到鉴别的目的。唐晓晶等^[16]建立蕲蛇药材 DNA 分子标记鉴别方法,完成了蕲蛇及其 7 种常见混淆品的高特异性 PCR 鉴别。王晶娟等^[17]对蜈蚣、全蝎、僵蚕、土鳖虫、蝉蜕进行了 PCR 扩增和 18s rRNA 基因测序基础上的对切酶鉴别的初步研究。

8 生物芯片技术

生物芯片根据所应用材料不同可以分为:基因

芯片^[18]、蛋白质芯片^[19]、细胞芯片和组织芯片。生物芯片^[20]是指通过微加工技术将生物材料如蛋白质、DNA、RNA、细胞、组织等有序的高密度的分布在一定的载体上如膜、玻璃片、硅片等表面,与标记的样品分子进行杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号强度,对样品分子进行定性、定量和结构分析,具有快速、准确、自动化的优点。生物芯片可以广泛应用于中药材的真伪鉴定、有效成分筛选及药理药效研究等领域。生物芯片技术的出现有利于同时检测某一种药物或者中药对众多基因或靶蛋白的作用,从而缩短药物筛选的时间和成本,能够在药物和基因之间架起一座桥梁,从而在基因水平、分子水平上解释药物作用机制,有助于从分子水平阐明中药的治疗机制。

9 发酵技术

发酵工程指在人工条件下利用细胞的快速增殖与次生代谢产物的产生,为人工资源的生产提供技术平台。崔莉等^[21]通过优化发酵工艺和发酵条件提高了水蛭素的产量。利用微生物生长代谢生产动物药活性成分,具有增加工业生产产量,提高效率,节约资源等特点。

10 免疫技术

免疫鉴别法是一种特异性很强的鉴别方法,以药材中含有的特异蛋白为抗原,制备出特异的抗体,再与检验品中的特异抗原结合产生沉淀反应,据此鉴别药材的真伪^[22]。丁培贤等^[23]利用虎、豹等骨骼中的特异抗原成分制备虎、豹骨等多种动物骨骼的抗体,还能将豹骨进一步鉴别为雪豹、云豹或金钱豹。

11 结语

现代生物技术已成为现代高科技的主要内容和标志,它将成为动物研究鉴定的主潮流之一,我国的传统中药鉴别研究,也应当走综合发展的道路,积极吸纳先进的科技手段,不断发展自己。

参考文献:

- [1] 李建平,林 喆,邓明鲁. 中国动物药概况[J]. 中药研究与信息, 2003, (08): 24-27.
- [2] 姜大成,王永生. 动物药的鉴定研究状况[J]. 中药材, 2004, (04): 237-239.
- [3] 沈 圆. 羚羊角类药材的宏观与微观鉴别研究[J]. 药学学报, 1982, (01): 3.
- [4] 苑冬敏. 动物药残留毛的显微鉴定研究(II) [D]. 辽宁

中医学院, 2004.

- [5] 张莅峡,韩 薇,刘 泓,等. 八种动物药的氨基酸的分析及薄层扫描鉴定[J]. 中药材, 1990, (01): 11-14.
- [6] 金向群,张豁中,杨立宏,等. 中华大蟾蜍与华西大蟾蜍的红外光谱鉴定[J]. 动物学研究, 1990, (12): 84-92.
- [7] 王喜军,孙 晖,陈彩霞. 胆汁类中药的鉴定方法研究 I-紫外光谱法[J]. 中医药学报, 1991, (6): 51-52.
- [8] 李 蓉,唐旭利,李国强,等. 海洋药用生物系列 HPLC 化学指纹图谱研究 II. 斑海马 HPLC 化学指纹图谱研究[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2009, (04): 729-734.
- [9] 史克莉,陈振江. 几种动物类中药材 SDS-PAGE 的电泳鉴别[J]. 中成药, 2004, 26(5):411-413.
- [10] 黄 燕,娄国菁. X 射线衍射法在中药鉴定中的应用[J]. 山东中医杂志, 2004, (04): 232-234.
- [11] 朱志峰,王树春,刘旭英,等. 中药材蛤蚧的 X 衍射 Fourier 谱分析[J]. 中草药, 2001, (10): 932-933.
- [12] 王树春,龚宁波,陈海明,等. 中药材鹿茸(花鹿茸)的 X 衍射 Fourier 谱分析[J]. 中草药, 2001, (12): 1123-1124.
- [13] 王树春,吕 扬,吴 桶,等. 中药材熊胆的 X 衍射 Fourier 谱分析[J]. 中草药, 2000, (3): 214-215.
- [14] 王义权,周开亚,秦树臻. 用 RAPD 标记检测六种蛇基因组 DNA 多态性[J]. 动物学报, 1996, (02): 172-181.
- [15] Hashimoto A, Nishimura N, Kokusenya Y, et al. Studies on "Signal" constituents for evaluation of animal crude drugs. IV: application of DNA analytical technique to quality evaluation of medicines containing animal containing animal crude drugs [J]. *Nat Med*, 1998, 52:38.
- [16] 唐晓晶,冯成强,黄璐琦,等. 蕲蛇及其混滑品高特异性 PCR 鉴别[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(2):152-155.
- [17] 王晶娟,张贵君,白根本. 蜈蚣等 5 种动物类中药 18SrRNA 基因酶切鉴定的初步研究[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(8):582-584.
- [18] 严春光,陈钧辉,王新昌. 基因芯片及其应用[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(5):321-323.
- [19] 严春光,陈钧辉,王新昌. 蛋白质芯片及其应用[J]. 中国生化药物杂志, 2006, 27(4):256-258.
- [20] 李荣发,吴 臻,杨建雄. 现代生物技术在中药活性组分筛选中的应用[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(11):1099-1101.
- [21] 崔 莉,谭树华,吴梧桐. 重组水蛭素III的工程菌的培养及高密度发酵[J]. 药物生物技术, 2004, 11(1):22-24.
- [22] 刘 睿,李友宾,段金廛. 现代生物技术在动物药研究中的应用[J]. 中国生化药物杂志, 2008, (04): 288: 290.
- [23] 丁培贤,贺天笙. 生物免疫化学法鉴定虎、豹骨的研究[J]. 中国药理学杂志, 1989, 24(8):457-460.