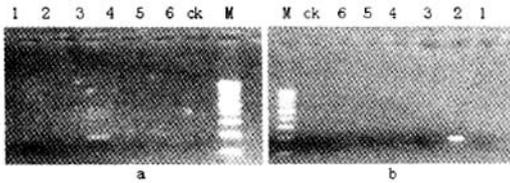


表 2 PCR 引物对
Table 2 Pair of PCR primer

名称/引物	序列	配对引物
梅花鹿/EP-1	5'GTTATGTAAACAAAACCTATTCGCCAGAGTACTACCGGC3'	H1478
马鹿/EP-2	5'GTTATGTAAACAAGACTGTTCGCCAGAGTACTACCGGC3'	H1478



1-水鹿 2-梅花鹿 3-马鹿 4-白唇鹿 5-爪哇鹿
6-坡鹿 ck-空白模板 M-DNA 标记
1-*C. unicolor* 2-*C. nippon* 3-*C. elaphs* 4-*C. albirostris*
5-*C. timorensis* 6-*C. eldi* ck-control M-DNA marker

图 5 特异 PCR 扩增

Fig. 5 Specificity of primers PCR amplification

值相差越小越好, 否则其他影响特异性的条件都可能掩盖 PCR 的特异性。

3 讨论

由于动物鹿源药材因器官、加工等原因, 给常规鉴定带来了很大困难, 单从 12S rRNA 基因序列的来源研究不同鹿种具有很好的稳定性。在本研究中有 6 个鹿种进行了 2 样本的重复测序, 其结果表现出高度的一致性, 证明了在种的水平上该区段进化是保守的, 属间序列差异明显大于种间差异。

动物药材的基因鉴定很好地克服了不同器官以

及样品保存时间等给鉴定带来的复杂性, 但从序列鉴定仍然较难推广, 高度特异性引物极大地简化了鉴定程序。在本研究中, 所用的试验材料有鹿血和存放时间数年的鹿茸, 在基因片段的调用上取得了同样的效果。特异引物的设计在技术上除了遵循引物设计的基本原则外, 序列之间的差异大小直接影响特异性扩增的效果, 马鹿和梅花鹿在所分析的片段上仅有 2 个碱基的差异, 但所设计的引物对(马鹿: PE-1, H1478; 梅花鹿: PN-1, H1478)都特异地扩增出长度约 400 bp 的 12S rRNA 基因片段, 这与根据测序结果设计的序列长度一致。

在本研究中, 马鹿和梅花鹿特异性扩增引物对中都用了共同引物 H1478。事实上, 如果将下游引物设计其他碱基变异较大的区域将会取得更好的鉴别效果。此外, 引物质量直接影响特异性扩增的效果, 引物设计时遵循引物设计的一般技术指标外, 要尽可能地选择差异较大的区域, 如果遇到差异数仅 1~2 个, 且间隔距离又较远时, 要尽可能地差异碱基放在引物的 3' 端, 同时引物的 T_m 值越匹配越好。

References:

- [1] Liu Z Q, Wang Y Q, Zhou K Y, et al. Study on highly specific diagnostic PCR of the traditional chinese medicine tortoise plastron and its original animals [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1999, 34(12): 941-945.
- [2] Wang J J, Zhang G J, Bai G B. Study on endonuclease cutting of 18S rRNA gene in five animal drugs including *Scolopendra* [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2002, 37(8): 582-584.

近红外光谱鉴别冬虫夏草道地药材

王钢力¹, 石岩¹, 魏玉海², 王慧春², 徐晓杰³, 林瑞超¹

- (1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050; 2. 青海省药品检验所, 青海 西宁 810000;
3. 热电(上海)科技仪器有限公司, 北京 100032)

摘要:目的 研究冬虫夏草药材的道地性。方法 收集不同产地的冬虫夏草药材样品 102 批, 采用漫反射法, 测定药材粉末及药渣的近红外光谱, 采用透射法测定药材甲醇提取物的近红外光谱。采用 TQ 定量分析软件, 对样品的青海和西藏产地进行判别分析。结果 药材粉末的判断准确率达到 100%, 药材的甲醇提取物光谱较药渣更能显示药材的产地差别。结论 在扩大建模样本的前提下, 近红外光谱分析可以用于冬虫夏草药材的产地鉴别。

关键词: 近红外光谱; 冬虫夏草; 地道药材; 鉴别

中图分类号: R282.7 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2006)10-1569-03

Application of NIR analysis in identification of genuine *Cordyceps*

WANG Gang-li¹, SHI Yan¹, WEI Yu-hai², WANG Hui-chun², XU Xiao-jie³, LIN Rui-chao¹

- (1. National Institute for Control of Biological and Pharmaceutical Products, Beijing 100050, China; 2. Qinghai

Provincial Institute for Drug Control, Xining 810000, China; 3. Thermal Electron (Shanghai) Technologies and Instruments Co., Ltd., Beijing 100032, China)

Key words: near infrared (NIR); *Cordyceps*; genuine Chinese medicinal materials; identification

冬虫夏草 *Cordyceps* 是我国名贵中药材之一, 与人参、鹿茸并称为补品“三宝”, 具有良好的医疗保健作用, 几百年来被医务工作者誉为补虚圣药, 深受群众青睐, 在历版中国药典均有记载。冬虫夏草是真菌的一种, 系麦角菌科冬虫夏草菌(中华虫草菌) *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 寄生于鳞翅目昆虫虫草蝙蝠 *Hepialus armoricanus* Oberthur 幼虫上的子座及幼虫尸体的复合体。

冬虫夏草为传统名贵药材, 大都集中分布在海拔 3 000~4 600 m 的高山草甸区中, 主要产于我国西部地区, 如青海省, 其果洛州、玉树州生长的虫草历来被视作虫草中的上品, 此外在四川、云南、西藏等地也有分布。近红外光谱分析系通过测定被测物质在近红外谱区(波长在 780~2 500 nm)的特征光谱并利用适宜的化学计量学方法提取相关信息后, 对被测物质进行定性、定量分析的一种分析技术。近红外光谱主要由 C-H、N-H、O-H 和 S-H 等基团基频振动的倍频和合频组成, 由于其吸光强度远低于中红外光谱的基频振动, 而且吸收峰重叠严重, 因此难以采用常规的红外光谱分析方法对被测物质进行定性、定量分析, 而必须采用对测得的近红外光谱数据经验证的数学方法处理后, 才能对被测物质进行定性、定量分析。笔者对冬虫夏草的近红外图谱进行研究, 旨在阐明青海省产冬虫夏草与其他产区冬虫夏草药材的差异, 控制药材质量, 保护道地药材的资源。

1 虫草药材粉末样品测定

1.1 试验部分: 仪器: Thermo Electron Nicolet Antaris 近红外光谱仪; 样品: 收集来自青海、西藏、四川等不同产地样品共 102 批。经中国药品生物制品检定所中药标本馆张继鉴定, 所有样品标本均保存于中国药品生物制品检定所中药标本馆。

样品处理: 将采集的虫草样品经粉碎研磨后过 65 目筛, 备用。

光谱采集: 将处理好的样品置于石英瓶中, 采用漫反射光谱测定, 扫描次数: 32; 分辨率: 4 cm⁻¹。冬虫夏草药材粉末近红外光谱图见图 1。

1.2 数据处理: 采用 TQ 定量分析软件, 对冬虫夏草药材粉末样品的青海和西藏产地进行判别分析, 运用多元散射校正(MSC)和一阶导数处理, 结果见图 2(□青海样品, △西藏样品)。

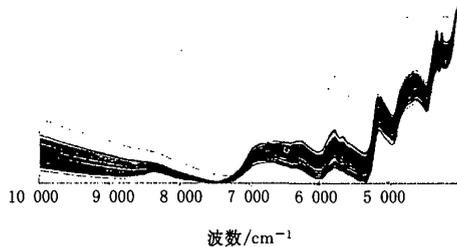


图 1 102 批冬虫夏草药材粉末近红外光谱图

Fig. 1 NIR Spectra of 102 batches of *Cordyceps* powder

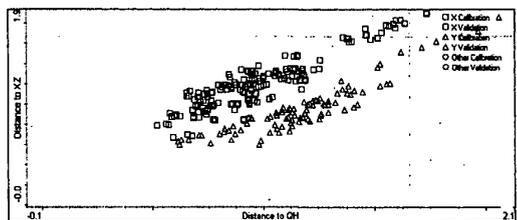


图 2 青海和西藏产地药材样品判别分析图

Fig. 2 Discriminating analysis of samples from Qinghai and Tibet habitats

可以看出, 近红外光谱分析可以较好地区分青海和西藏两种产地的样品, 对 20 个未知样品的预测准确率达 100%。从主成分谱图中亦可以看出较为明显的差异。

同时尝试将青海产地样品与其他产地样品进行判别分析, 亦取得较为满意的结果, 见图 3(□青海样品, △其他样品)。

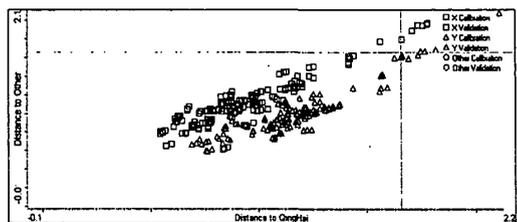


图 3 青海产地样品与其他产地药材样品判别分析图

Fig. 3 Discriminating analysis of samples from Qinghai and other habitats

2 虫草药材甲醇提取液近红外分析

2.1 样品的制备: 称取 0.45 g 药材粉末, 加 50 mL 甲醇超声提取, 滤过, 取滤液蒸干甲醇, 残渣用 2 mL 二甲亚砜溶解。

2.2 溶解溶剂的选择: 由于甲醇提取液浓缩以后, 用二甲基亚砜作溶剂, 溶解性能良好, 可以代表提取

物的特点,故选用二甲亚砜溶解。

2.3 近红外光谱测定:将样品置于 1 mm 液体池中,采用透射法采集光谱。扫描次数:32;分辨率:4 cm^{-1} 。药材提取液光谱图见图 4。

2.4 数据处理:同样采用 TQ 软件对 102 批药材提取物的近红外光谱图进行判别分析,结果见图 5。可以看出,甲醇提取液亦可以较好地将不同产地样品区分开来。

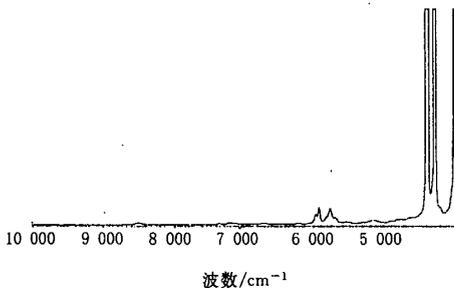


图 4 冬虫夏草甲醇提取物近红外光谱图

Fig. 4 NIR Spectrum of methanol extract of *Cordyceps*

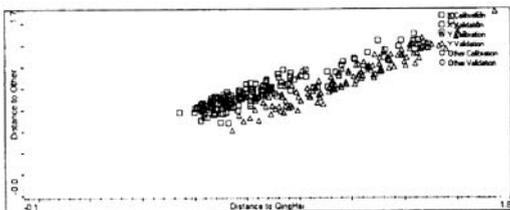


图 5 青海产地样品与其他产地药材样品判别分析图(提取物)

Fig. 5 Discriminating analysis of samples from Qinghai and other habitats (extract)

3 提取后药渣近红外分析

3.1 样品处理:将提取后药渣挥干溶剂后进行近红外光谱测定。

3.2 光谱采集:将处理好的样品置于石英瓶中,采用漫反射光谱测定,扫描次数:32;分辨率:4 cm^{-1} 。冬虫夏草样品药渣近红外光谱图见图 6。

3.3 数据处理:同样采用 TQ 软件进行判别分析,结果见图 7。可以看出,药渣结果稍差,可能原因是经过提取后样品所含的化学成分发生变化;改变了原有样品组成,光谱特征性降低,从而使不同产地样品重叠较多。

4 讨论

研究结果可以看出,各批次虫草甲醇提取液差

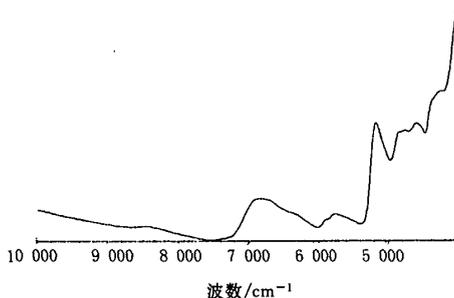


图 6 冬虫夏草样品药渣近红外光谱图

Fig. 6 NIR Spectrum of *Cordyceps marc*

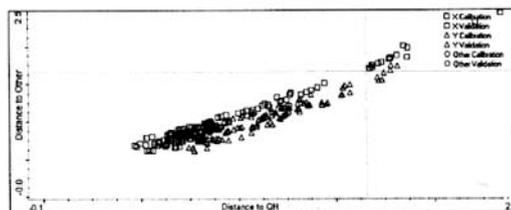


图 7 青海产地样品与其他产地药材样品判别分析图(药渣)

Fig. 7 Discriminating analysis of samples from Qinghai and other habitats (marc)

别明显,而甲醇提取后的药渣差别则不如提取物明显。因此推测被测的 102 批冬虫夏草甲醇提取物的近红外光谱图可以较好地显示出青海产药材与其他产地药材的差异,判断准确率可以达到 95% 以上。故认定药材的甲醇提取物所体现的化合物组成的信息可以作为确定药材产地的依据之一。

HPLC 是常用的色谱分析方法之一,被广泛用于天然药物产品的定性定量分析。但由于 HPLC 仪对测试样品的要求(有一定极性、能溶于强极性溶剂且澄明度好等),导致其可检测的物质的量在药材所含的化合物组成中非常有限。笔者尝试过测定冬虫夏草药材的 HPLC 指纹图谱,但由于该法主要是针对药材中所含的核苷类成分建立的,由于这类成分冬虫夏草药材中分布的普遍性,因而分析结果难以显示药材的地域性差别。

采用近红外光谱分析可以较好地用于冬虫夏草青海和西藏的产地鉴别,通过进一步加大样本的采集量,扩充模型,有望使其成功地用于中药道地药材鉴别,为中药生产过程的质量控制和中药现代化奠定良好的基础。