

- [20] Chen X Y, Cui L, Duan X T, *et al.* Pharmacokinetics and metabolism of the flavonoid scutellarin in humans after a single oral administration [J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34 (8): 1345-1352.
- [21] Ju W Z, Chu J H, Tan R X, *et al.* Study on metabolites of scutellarin in gastrointestinal tract by UPLC-MS/MS method [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2006, 11(3): 292-295.
- [22] Zhang J L, Chen Q M, Li S Z, *et al.* Study on metabolism of scutellarin in rats by HPLC-MS and HPLC-NMR [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2003, 5(4): 249-256.
- [23] Xing J, Chen X Y, Zhong D F. Stability of baicalin in biological fluids *in vitro* [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 39: 593-600.
- [24] Chen D W, Zhang Y Q, Zou Y S, *et al.* Study on pharmacodynamics and pharmacokinetics of breviscapin sustained-release pellets in rabbits [J]. *Chin J Pharm* (中国药理学杂志), 2003, 1(2): 63-67.
- [25] Xiong F, Wang H, Cheng J, *et al.* Determination of scutellarin in mouse plasma and different tissues by high performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 835: 114-118.
- [26] Ding C G, Ge Q H. Pharmacokinetics of scutellarin in mice [J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2006, 37(1): 26-31.
- [27] Lu T, Song J, Xie L, *et al.* Simultaneous determination of baicalin and wogonoside by HPLC in rat plasma administered with Huangqin Decoction and its pharmacokinetic study [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(6): 870-873.

RAPD 技术在中药材鉴定中的应用进展

朱永宏, 李学敏, 韩宝玲

(天津天士力集团有限公司, 天津 300402)

随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 技术是 1990 年由 Williams 等发展起来的一项 DNA 分子标记技术。RAPD 技术是建立在 PCR 技术的基础上, 用一系列 (通常数百个) 不同的随机排列碱基序列的寡核苷酸单链 (一般为 10 bp) 作为引物, 对所研究的基因组 DNA 进行单引物扩增。模板 DNA 经 90~94 变性解链后在较低温度 (36~37 °C) 下退火, 这时形成的单链模板会有许多位点与引物互补配对, 在 72 °C 下, 通过链延伸, 形成双链结构, 完成 DNA 合成。重复上述过程, 即可产生片段大小不等的扩增产物, 通过电泳分离和显色便可得到许多不同的条带, 从中筛选出特征性条带。扩增产物片段的多态性反映了基因组 DNA 的多态性。如果基因组在这些区域内发生 DNA 片段插入、缺失或碱基突变就可能导致这些特定结合位点的分布发生相应的变化, 而使 PCR 产物增加、缺少或发生相对分子质量的改变。因此, 通过对 PCR 产物的检测即可测出基因组 DNA 在这些区域的多态性。进行 RAPD 分析时, 可用引物的数量很大, 虽然对每个引物而言, 其检测基因组 DNA 多态性的区域是有限的, 但是利用一系列引物则可以使检测区域几乎覆盖整个基因组。因此, RAPD 可以对整个基因组 DNA 进行多态性检测。

目前 RAPD 技术已经广泛地应用医学、农业、林业、畜牧水产业等多个领域。根据现代分子生物学的研究, 中药材 (除矿物药外) 所依赖的生物资源“物种”的多样性是由于其基因多态性的结果, 而基因多态性可在 DNA 分子诊断技术水平上检测, 这比在形态、组织和化学水平上检测更能代表其变异类型的遗传标记。这是 RAPD 技术应用于中药材鉴定的基础, 在这一方面, 学者也开展了大量的研究工作, 并取

得了很大的成绩。

1 药材道地性研究

中药十分讲究道地性, 道地药材是传统公认来源于特定产区的名优正品药材。然而, 道地药材的形态、性状与其他药材无明显区别, 故采用传统方法鉴别困难, 具有很大的主观性。另外, 中药道地产区变迁也十分普遍, 产生变迁的原因除对优质药材的进一步认识和有目的的选择外, 还有政治、文化和市场等诸多原因。因而, 仅仅根据地域来确定道地药材也是不可取的。

道地药材从生物学内涵讲是居群, 其一个重要特征是遗传特征, 应看成是一个具有共同基因库的由交配和亲缘关系联系起来的同一物种的个体群, 因此 DNA 分子标记技术可以用于道地药材的鉴别和道地性的研究。

Nakai 等^[1]用 RAPD 技术对淫羊藿属 8 种植物进行了 DNA 分析, 结果发现中国特有种箭叶淫羊藿和日本其他 7 种淫羊藿属内变异较大, 与形态学不符。此后, 应用 RAPD 技术对药材道地性的研究逐渐增多, 王培训等^[2]对不同产地的西洋参采用 RAPD 技术进行研究, 结果表明, 各地产的西洋参 DNA 指纹图谱基本一致; 胡珊梅等^[3]运用 RAPD 技术研究了金钱莲同种不同产地的遗传变异性; 胡珊梅等^[4]对福建、江西、四川产的泽泻进行 RAPD 研究, 结果发现同种异地药材所形成的不同居群具有不同的遗传特性; 高文远等对来自不同产地的当归进行分析, 结果表明样品地理分布距离越小, 遗传差异越小, 反之亦然。顾华等^[5]采用 RAPD 方法研究了来自山西襄城、长治、平顺、壶关、屯留及安泽 6 个地区 11 个连翘地方栽培品系的亲缘关系, 并用 HPLC 方法测定连翘主要指标成分——连翘苷量的变异情况。结果表明,

连翘栽培的地方品系间存在明显的 DNA 水平上的多样性变异,并且这种 DNA 分子多样性差异与化学指标成分量的差异具有相关性,说明连翘的遗传基础可能对化学指标成分的形成和积累有显著的影响。李颖等^[7]对产于广东石牌、高要、湛江和海南省的广藿香进行了研究,RAPD 图谱展示了这几个产地的广藿香之间的基因组发生了细微的变异,可以凭 RAPD 图谱鉴定广藿香的道地性。徐吉银等^[8]对来自不同居群(春湾、蟠龙和云南)的阳春砂仁样品进行 RAPD 分析,结果得出 3 个居群阳春砂的聚类树状图,表明春湾和蟠龙两个居群的亲缘关系较近,云南居群与春湾、蟠龙两居群的亲缘关系较远。

2 药材真伪的鉴定

中药的传统鉴定是利用植物或动物形态分类学和解剖学特征,从基原、性状、显微特征、理化等方面进行药材鉴别。大部分经药材加工、炮制等处理后,往往失去了原来的形态和解剖特征,甚至显微特征也会发生改变,从而使药材的真伪优劣难以鉴别。我国中药材品种来源复杂,互混、互代现象时有发生,特别是对一些故意造假、以次充好的药材更是难以鉴别。因此假劣药材、混淆品充斥中药材市场的状况一直未能得到根本改善。

采用 RAPD 指纹分析技术既可以鉴定一般经典方法能鉴定的药材,又可以克服经典方法的局限性。Shao 等^[9]率先将 RAPD 技术应用于中药材的鉴别,鉴定出人参属的 3 个种及 4 个伪种,效果很好,证明 RAPD 是一种有效的中药鉴别方法。此后,更多的研究者将该技术应用于药材鉴定。如对冬虫夏草及其伪品的鉴定^[10],人参与假人参的鉴定^[11],对射干及混淆品共 5 种原植物的鉴别^[12]等,都取得了比较理想的结果。

3 药材基原研究

中药的基原鉴定是中药研究的基础和关键。一些中药,其基原往往有数种甚至数十种,如目前用的贯众、独活、厚朴等中药,就来源于 20 多种不同种属植物;大青叶各地用的药材有所不同,有蓼科蓼蓝、十字花科菘蓝、爵床科马蓝、马鞭草科大青等,药用部分也有用叶及带叶茎枝的不同。而且,同名异物的现象也很普遍。药材基原品种不同,主要化学成分或有效成分差异很大,少则数倍,多则几十倍。

Yumazaki 等^[13]对 4 种菊科甘草属植物光果甘草、甘草、刺毛甘草和刺果甘草进行了 RAPD 分析,其 DNA 指纹图谱表明,光果甘草与甘草遗传非常接近,刺毛甘草和刺果甘草的遗传关系相距较远,这与植物分类学研究相吻合。对 4 种商品甘草药材(新疆甘草、西北甘草、西伯利亚甘草、阿富汗甘草)采用 RAPD 方法做遗传距离估算,来对其进行基原鉴别,逐步证实了阿富汗甘草来源于光果甘草,西伯利亚甘草来源于甘草,新疆甘草和西北甘草来源于刺果甘草^[14]。曹晖等^[15]对菊科植物地胆草、白花地胆草和假地胆草以及 4 种苦地胆商品药材进行了 RAPD 研究,获得清晰可靠的 DNA 指纹图谱,根据 DNA 带型差异鉴别出地胆草及其混淆品。同时通过对 DNA 指纹图谱的相似指数数值计算,证实 4 种

苦地胆商品药材的基原为菊科植物地胆草。

4 结语

中药材鉴定是一项艰巨的任务。常用的中药材一般是干品,新鲜材料比较少,有的药材是经过多道工序加工处理,其内部的遗传物质 DNA 存在一定程度的损伤,丧失了完整性。即使新鲜材料也因自身含次生代谢产物,如生物碱、酚类等物质,获得的基因组 DNA 质量较差,很难适合其他 DNA 分子标记。RAPD 技术应用于中药材的鉴定,具有效率高、灵敏度高、样品用量少、简便易行等优点。然而,RAPD 应用于中药材鉴定时,结果必须具有稳定性与可靠性,才能使不同实验室的结果具有可比性,实现中药材鉴定标准化。因此,要使 RAPD 在中药材鉴别中的结果具有重复性和可靠性,就应使 RAPD 技术标准化。相信随着 RAPD 规范化的不断提高,RAPD 在中药材鉴别中应用会更加广泛。

References:

- [1] Nakai R, Shayama Y, Shirashi S. Genetic characterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 67-71.
- [2] Wang P X, Huang F. Identification of commercial *Panax quinquefolium* L. by DNA finger print [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (药物分析杂志), 1999, 10(6): 367-369.
- [3] Hu S M, Zhang Q G, Yuan W J, et al. Studies on valuable and rare Chinese herbs *Anoetochilus roxburghii* by DNA fingerprints using RAPD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(12): 944-946.
- [4] Hu S M, Zhou H T, Zhang Q G, et al. Studies on DNA fingerprint of genuine Chinese herbs *Alisma orientalis* by RAPD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(2): 161-162.
- [5] Gao W Y, Qin E Q, Xiao X H, et al. Analysis on genuineness of *Angelica sinensis* by RAPD [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32(10): 926-929.
- [6] Gu H, Gai L, Zhou T S, et al. A preliminary study on the molecular and chemical characteristics of authenticity (Daodixing) of a traditional Chinese medicinal plant *Forsythia suspensa* Vahl [J]. *J Fudan Univ: Nat Sci* (复旦学报:自然科学版), 2002, 41(6): 664-668.
- [7] Li Y, Li J P. Studies on the genuineness of *Ageratum* by RAPD [J]. *Modern Med Health* (现代医药卫生), 2006, 22(13): 2027-2028.
- [8] Xu J Y, Ding P. Analysis of genuineness of *Amomum villosum* Lour. from different habitats by RAPD [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2005, 16(3): 194-196.
- [9] Shaw P C, But P P H. Authentication of *Panax* species and their adulterants by random-primed polymerase chain reaction [J]. *Planta Med*, 1995(6): 466-468.
- [10] Cheng K T, Su C H, Chang H C. Differentiation of genuine and counterfeits of *Cordyceps* species using random amplified polymorphic DNA [J]. *Planta Med*, 1998, (64): 251-253.
- [11] Watandes T, Kawatuchi K, Suzuki H. Random amplified polymorphic DNA analysis and saponin contents of *Himalayan ginseng* (*Panax-pseudo ginseng* Wall) [J]. *Nat Med*, 1998, 52: 426-429.
- [12] Huang Y, Qin M J, Yang G, et al. Identification of *Belamcanda chinensis* and related Chinese material medica of *Iris* L. by RAPD analysis [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(8): 935-936.
- [13] Yamazaki M, Sato A, Shimomura K, et al. Genetic relationships among *Glycyrrhiza* plants determined by RAPD and RFLP analysis [J]. *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(11): 1529-1531.
- [14] Yamazaki M, Sam A, Shimomura K, et al. Extraction of DNA and RAPD analysis from dried licorice root [J]. *Nat Med*, 1995, 49(4): 488-451.
- [15] Cao H, Bi P X. The identification of Chinese medicinal material *KuDiDan* by DNA fingerprints [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 1996, 19(12): 608-612.