

动物药材鉴别及质量评价方法研究进展与策略

王海璐¹, 李庆杰², 赵海平¹, 李春义^{1,3*}

1. 中国农业科学院特产研究所 特种动物分子生物学国家重点实验室 吉林省鹿茸工程研究中心, 吉林 长春 130112

2. 长春中医药大学附属医院, 吉林 长春 130118

3. 长春科技学院, 吉林 长春 130600

摘要: 动物药材在传统中药应用中有着极为重要的地位, 是中药的重要组成部分, 被认为具有活性强、潜力大和应用广等优势。随着人们对动物药材需求量的不断增大, 市场上大量出现伪品、劣品和混淆品的现象严重影响了动物药材的使用效果和质量评价工作; 同时动物药材在鉴别和质量评价方面研究也比植物类中药发展缓慢、体系薄弱, 特别是缺乏特色和专属的鉴定指标与评价手段。因此, 如何构建和完善动物药材质量评价体系尤为重要, 将成为今后研究的重点和热点工作。对动物药材鉴别和质量评价方法研究进展现状进行概述, 对构建其质量评价体系中存在的问题和挑战进行合理建议和分析, 为动物药材质量评价体系的构建和完善研究提供参考和新思路。

关键词: 动物药材; 药材鉴别; 质量评价; DNA 条形码; X 射线衍射

中图分类号: R282.74 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)16-3942-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.031

Research progress and strategy on identification and quality evaluation of animal-derived medicinal materials

WANG Hai-lu¹, LI Qing-jie², ZHAO Hai-ping¹, LI Chun-yi^{1,3}

1. Deer Antler Engineering Research Center of Jilin Province, State Key Laboratory for Molecular Biology of Special Economic Animal, Institute of Special Animal and Plant Sciences, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Changchun 130112, China

2. First Affiliated Hospital to Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130118, China

3. Changchun Science and Technology University, Changchun 130600, China

Abstract: Animal-derived medicinal materials as the integral part play an extremely important role in the application of Chinese material medica (CMM), which are considered to have the advantages of strong activity, great potential, and wide applications. With the increasing demands for animal-derived medicinal materials, a large number of counterfeit, inferior, and confusing products have appeared in the market, which has seriously affected the use and quality evaluation of animal-derived medicinal materials. At the same time, the research development on identification and quality evaluation of animal-derived medicinal materials is slower than that of plant-derived medicinal materials, and the system is weak, especially lacking of characteristic and exclusive identification index and evaluation means. Therefore, how to establish and perfect the quality evaluation system of animal-derived medicinal materials is particularly important and will become the focus and hot work in the future. In this paper, the research progress of animal-derived medicinal materials identification and quality evaluation methods is summarized, and the problems and challenges in constructing its quality evaluation system are analyzed, so as to provide reference and new ideas for the establishment and improvement of animal medicine quality evaluation system.

Key words: animal-derived medicinal materials; identification of traditional Chinese medicinal materials; quality evaluation; DNA barcoding; X-ray diffractometer

动物药材指来源于动物机体、器官、生理或病理产物等可入药用的中药材, 是中药材的重要组成部分^[1]。早在《黄帝内经》时就有记载乌贼骨、水蛭、牡蛎等动物药材进行治病的组方,《神农本草经》

收稿日期: 2018-04-17

作者简介: 王海璐 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为鹿茸成分及药理作用。E-mail: 1317002453@qq.com

*通信作者 李春义, 研究员, 博士生导师, 研究方向为鹿茸生物学。E-mail: lichunyi1959@163.com

更是收载白僵蚕、羚羊角、麝香等 67 种动物药材, 占总药物的 18.36%; 说明在很早以前人们就有应用动物药材的历史, 对其具有一定的疗效认识和用药经验。随着对动物药材应用经验的不断积累和认识的深入, 《中药大辞典》已收载 740 余种动物药材, 《中华本草》则已多达 1 050 种; 中医临床常用中药材约 300 种, 其中动物类约占 10%^[2]。截止到《中国药典》2015 年版已收载 55 味动物药材、1 种动物药材提取物和 458 种含动物药材制剂, 占全部 2 598 个品种药材的 18%^[1], 同时动物药材的应用和临床疗效也越来越多地受到人们关注和重视^[3]。

因动物药材富含蛋白质等大分子物质^[4], 相较于植物药材明确单一成分的鉴别有着很大区别, 使其质量评价更为复杂, 鉴别难度更大。近些年, 动物药材在真伪鉴定、成分含量和质量评价方面研究突破性进展较少, 评价手段还主要停留在依靠经验、显微和理化鉴别等传统的方法上。现代技术没有广泛和完善地应用于动物药材质量评价体系中, 最主要的原因可能是动物药材缺乏专属性有效成分和鉴别方法, 研究基础相对薄弱^[5]; 其中动物药材明确的、可标记的、有效的特征性成分研究鲜有记载和报道, 这也可能会成为今后构建和完善动物药材质量评价体系研究中的难点和重点工作。现代分析方法的日新月异, 将会给动物药材质量评价体系带来契机, 与传统方法结合可能会在动物药材应用、质量评价和药效控制研究中发挥出重要作用。

本文对近些年动物药材鉴别及质量评价方法的研究进展进行概述, 指出其质量评价体系中存在的问题与挑战并进行分析和建议。相较于其他此类研究, 本文明确提出以药效蛋白作为动物药材标志活性成分和建立适宜的动物药材特色检测方法思路作为切入点的观点; 同时笔者认为应从将动物药材化学成分组成与生物效价相互关联的角度出发, 在体现其药效物质基础上, 寻求映射标志性成分和检测方法的方式, 作为动物药材质量控制和评价的专属性指标和方法的突破口, 为构建和完善动物药材质量评价体系提供参考和新思路。

1 动物药材鉴别及质量评价方法

1.1 性状鉴别法

性状鉴别法是指从动物药材本身的表面和断面特征或专属性的性状特征来鉴别真伪和质量优劣的方法, 是鉴别动物药材最基本的方法之一, 应用广泛。但此方法也存在一定的缺点, 要求人们掌握和

具备辨别各种动物药材性状鉴别特征的经验, 具有局限性和主观性, 结果准确性不稳定; 同时也要求药材和饮片的完整性, 具有特定的微观或宏观可视性特征, 否则难以作为鉴别同属近似种、动物甲壳类、胶类、炮制品类药物的专属性方法^[2]。

1.2 显微鉴别法

显微鉴别法是利用显微镜对动物药材的品种真伪和质量优劣进行鉴别, 包括组织鉴别和粉末鉴别。由于动物药材组织复杂和传统显微镜的局限性, 扫描电镜已经成功应用于皮毛动物和昆虫类动物药材的表面结构鉴别研究上^[6], 显微镜技术的革新有利于动物药材微观特征鉴别的发展。如对不同品种的进口蜈蚣进行鉴别, 蜈蚣的头壳和足的爪、爪刺、跗刺等微性状特征均可利用电子目镜明显鉴别^[7]。李峰等^[8]通过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, 为动物药材残留毛研究提供依据。传统的显微鉴别虽然不能揭示动物药材之间的成分差异和精准鉴别, 但结合现代技术还是可以在动物药材微观特征鉴别中发挥重要作用, 为动物药材质量评价提供依据。

1.3 理化鉴别法

由于动物药材成分复杂和特征成分不明确, 一般理化鉴别常常作为一种辅助的鉴别方法。如熊胆细粉在 365 nm 紫外灯下观察显黄白色荧光, 伪品则显棕黄色荧光^[9]。杨远帆等^[10]以茚三酮显色法检测 5 种蜂蜜、13 种果葡糖浆、蜂蜜和果葡糖浆混合物中氨基酸的含量, 建立了快速评价蜂蜜品质的新方法。余兰等^[11]将三氯乙酸沉淀法与双缩脲比色法结合测定水蛭提取液中总蛋白含量, 结果准确可靠。楼小红等^[12]用 Folin 酚试剂法检测鹿茸中水溶性蛋白质含量, 结果可靠、方法快捷。汪树理等^[13]采用考马斯亮兰法测定东北梅花鹿茸腊片、粉片、纱片和骨片的水溶性蛋白含量, 差异明显, 说明不同部位的东北梅花鹿茸片之间存在质量差异, 为鹿茸的质量评价提供依据。

1.4 色谱法

1.4.1 薄层色谱法 薄层色谱是利用各成分对同一吸附剂吸附能力不同而将成分分离出来的一种方法, 可同时鉴别多种样品, 具有简单和快速等特点。蜈蚣药材中游离的精氨酸和丝氨酸可进行薄层色谱鉴别, 展开效果良好, 可作为其质量标准的依据^[14]。张建英等^[15]采用薄层色谱法对珍珠层粉胶囊中氨基酸成分进行研究, 得到清晰的斑点并且分离度好、

重现性好,为珍珠层粉胶囊质量控制建立了有效的方法。

1.4.2 高效液相色谱法 (HPLC) HPLC 具有灵敏度高、分析速度快、分离效率高、重现性好、流动相选择广和色谱柱可反复使用等特点,可用于分析中药有效成分的含量和构建指纹图谱的研究中,是目前最常用的分离和分析化学成分的方法。

HPLC 已广泛应用于动物药材及其产品的质量评价和控制方面的研究。钟宁等^[16]应用 HPLC 测定鹿茸血酒中嘌呤类成分的含量,可作为评价鹿茸血酒质量的方法之一;周芳妍等^[17]利用柱前衍生法辅助建立鹿角胶氨基酸的 HPLC 指纹图谱,指认 13 个共有峰,构建了鹿角胶药材的指纹图谱,10 批药材的相似度均为 1.000,这可为鹿角胶中氨基酸成分质量评价提供全面的依据。孙印石等^[18]建立 UPLC 法测定梅花鹿鹿茸中尿嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤等 13 种核苷类成分含量的方法,研究不同加工方式和不同部位的梅花鹿鹿茸核苷类成分含量的差异。鹿茸的碱基成分通过 HPLC 检测可以作为其标志性指标,反映出不同产地和不同区段组织鹿茸的差异,HPLC 法也可应用于其他鹿茸中成分的分析 and 检测^[19-20],已广泛应用于鹿产品及相关制品的质量评价研究中。

动物药材成分复杂和绝大部分有效成分不明确的特点成为限制构建其全面质量评价体系的主要难题之一。截止到《中国药典》2015 年版,只收录了 11 种通过使用 HPLC 测定专属性有效成分的动物药材,其中包括哈蟆油、阿胶、斑蝥、蜂胶、蟾酥等^[21]。因此,控制一类有效成分只能是一种过渡性的动物药材质量控制方法。建立动物药材指纹图谱可以较为全面地反映动物药材及其制剂中所含化学成分的种类与数量,进而对其质量进行整体描述和评价。王梦月等^[22]建立 6 种产地的海龙及其伪品的 HPLC 指纹图谱,用于海龙药材的质量评价。徐佳等^[23]以黄嘌呤和次黄嘌呤为对照峰,建立 10 批水蛭 HPLC 指纹图谱,进一步为水蛭质量评价提供依据。黄玉明等^[24]采用 HPLC 及磷酸水溶液梯度洗脱系统,结合计算机辅助相似性评价系统检测蛤蟆油药材是否质量合格。陈萍红等^[25]也利用 HPLC 柱前衍生法测定阿胶药材中 18 种氨基酸含量和指纹图谱,根据中药指纹图谱相似度评价系统确定和构建了 13 批阿胶药材 20 个共有特征峰的指纹图谱来评价不同产地阿胶药材的质量。肖云芝等^[26]采用

HPLC-DAD 结合聚类分析和主成分分析,建立了 12 个产地的鳖甲药材样品的指纹图谱共有模式,对鳖甲药材质量评价提供有效参考。王欣丽等^[27]建立的土鳖虫及其混淆品 HPLC 指纹图谱和姬诚等^[28]建立的蟾酥饮片 HPLC 指纹图谱,均可较全面地反映出 2 种药材的内在质量,可用于其质量控制和质量评价标准的建立。陈宏等^[29]建立同时测定乌梢蛇中尿嘧啶等 6 种核苷类成分含量的 HPLC 方法,用于乌梢蛇核苷类成分含量测定和质量评价研究。动物药材 HPLC 指纹图谱的研究和建立,是评价动物药材质量标准的主要手段,对完善动物药材质量评价体系具有重要意义。

1.4.3 气相色谱法 在鉴别动物药材方面,气相色谱法常用于分析其挥发性成分,胡晓炜^[30]运用此方法对羚羊角和其混伪品的差异进行鉴别和准确区分。彭新君等^[31]以此方法测定羚羊角塞注射液和未醇沉液中游离氨基酸的含量,为羚羊角进一步研究提供实验依据。

1.4.4 其他联用技术 《中国药典》2015 年版收载对胶类动物药材如阿胶、鹿角胶采用 HPLC-MS 的鉴定方法^[1]。刘海洋等^[32]利用 GC-MS 技术对蜂蜡中成分进行柱前衍生化分析,对 14 个不同来源的蜂蜡样品指纹图谱进行鉴别分析,主成分分析得出影响其质量差异的化合物,建立简单、快捷的质量评价方法,同时提出蜂蜡质量标准应该在控制总烷酸类成分含量的同时,也控制烷烃及游离烷酸的含量的观点。肖维等^[33]建立了可快速测定林蛙油中 4 种雌激素的固相萃取净化-液相色谱串联质谱的分析方法,并选择反应监测 (SRM) 负离子模式进行定性和定量分析,为林蛙油中雌激素的残留分析检测提供合理的质量评价方法。刘丽娜等^[34]采用柱后光化学衍生 HPLC 荧光检测法对僵蚕、金钱白花蛇、全蝎、鳖甲和羚羊角动物药材中黄曲霉毒素进行测定,为相关动物药材的质量评价提供依据。各种联用色谱分析技术可对成分复杂的动物药进行结构解析和定性鉴别,适合于缺乏明确对照品的动物药鉴别和质量控制的研究,如二维液相色谱、高效液相色谱-质谱联用、气相色谱-质谱联用以及新的高效通用检测器如蒸发光散射检测器等分析技术方法。

1.5 光谱法

光谱法包括红外光谱、紫外光谱、原子光谱、质谱和核磁共振光谱等,具有取样量小、快速、简便和准确等特点,可检测一种或几种小分子成分及

其总量^[35],在动物药的质量评价研究中应用广泛。赵文静等^[36]运用连续光源原子吸收光谱测定虎斑游蛇中 5 种微量元素的含量;金向群等^[37]采用红外光谱和紫外光谱分析蟾蜍耳后腺分泌物来区分和鉴别中华大蟾蜍和与其相似的华西大蟾蜍;红外光谱也可对冬虫夏草、北虫草及其伪品等虫体脂肪量的差异进行比较鉴别^[38]。张晗星等^[39]采用蛋白质组学同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)质谱分析技术对不同生长发育阶段冬虫夏草的差异蛋白质组进行比较,为 iTRAQ 质谱作为冬虫夏草质量评价标准提供参考。左甜甜等^[40]采用电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法测定蛤蚧、蝉蜕、地龙、蜈蚣、全蝎和金钱白花蛇等 18 种动物药材中铅、镉、砷、汞重金属及有害元素的残留含量及初步风险分析,为进一步提高动物药材的质量,保证其用药安全提供了依据。但此类方法均以大量的代表性样品进行分析,对检测小批量和稀少动物药样品具有局限性。

1.6 生物鉴别法

1.6.1 电泳鉴定技术 目前,此项技术主要根据同一电场下动物药材中各种成分的相对分子质量大小和组分的净电荷泳动距离特性来进行分离和鉴别的方法,如蛋白质 SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳技术和高效毛细管电泳法(HPCE)等。近些年来 SDS-PAGE 电泳技术可用于多种动物药材的质量评价研究,如地龙^[41-42]、全蝎^[43]、水蛭^[44]等,为其质量评价和鉴别研究提供参考依据。朱云飞等^[45]利用 SDS-PAGE 法考察不同品种鹿茸的蛋白差异,为不同品种鹿茸的定性研究提供依据和研究基础。陈振江等^[46]采用 SDS-PAGE 电泳技术测定蝮蛇、乌梢蛇、金钱白花蛇、人工牛黄、鹿蹄筋及其伪品的主要蛋白相对分子质量,可为其及相关制剂生产提供质量控制的参考。王成芳^[47]采用 HPCE 法测定蛤蚧、蕲蛇、土鳖虫、地龙、僵蚕等各药材样品的指纹图谱,建立各特征指纹图谱并计算共有模式的相似度。陈昭等^[48]将 HPCE 法与药理学实验结合,初步探索和研究土鳖虫镇痛作用机制与药效物质基础的关联,确定出尿囊素和氯氮草 2 个化合物可作为其指标性成分。该方法以药效为导向和切入点,为动物药材的研究及质量控制提供了借鉴和新思路。

1.6.2 生物免疫印记技术 生物免疫印记技术是利用动物的不同种特异性蛋白质作为抗原,制备与被检验动物药的抗原结合的特异性抗体来鉴别药材真

伪的技术。目前,此技术已应用于金钱豹、云豹和雪豹的豹骨药材之间的鉴别^[49]。

1.7 DNA 条形码技术

随着生物信息技术的不断发展,DNA 条形码技术已成熟,也为动物药的品种鉴别提供了准确和可靠的方法。《中国药典》2010 年版首次收录了动物药蕲蛇饮片的 PCR 检测方法^[50];《中国药典》2015 年版四部新增了中药材 DNA 条形码分子鉴定的指导原则。张蓉等^[51]通过设计鹿科动物 DNA 条形码通用引物和对不同来源鹿科鹿茸的 PCR 扩增、序列分析和构建系统进化树,已成功对 90%鹿茸样本进行有效地鉴别和区分。目前,此技术已应用于鹿茸^[52]、穿山甲^[53]、鳖甲^[54]、龟甲^[55]、水蛭^[56]、斑蝥^[57]、蛤蚧^[58]、紫河车^[59]、蛇蜕^[60]、金钱白花蛇^[61]和药用蛇类^[62]等动物药的鉴别研究中。

1.8 X 射线衍射 Fourier 图谱

王树春等^[63]对 4 份梅花鹿鹿茸样品进行 X 衍射 Fourier 谱分析,结果显示它们具有相同的衍射图形几何拓扑特征,提取了 10 个共有峰为其特征标记峰,为鉴别和评价梅花鹿鹿茸的质量提供了参考。李兰燕等^[64]采用 X 射线衍射 Fourier 谱对广地龙进行分析,获得其标准 X 射线衍射 Fourier 图谱和特征标记峰,用于广地龙的鉴别研究。

1.9 基于灰色关联度模型的动物药材质量评价模式

因动物药成分复杂,建立灰色关联度质量评价模型数据集可构建主成分之间多元相关回归方程,为简化动物药质量评价指标提供依据。乔歌^[65]对全蝎、僵蚕、蜈蚣和土鳖虫 4 种动物药中总蛋白质、总多糖、总磷脂、核苷类、多胺类主成分含量进行测定和分析比较,构建灰色关联度模型,评价不同地区 4 种动物药材商品的质量标准。

1.10 联合技术

目前,因动物药成分复杂和特征性成分不明确,单一的鉴别方法已经不能满足并限制了动物药的质量评价研究的发展,越来越多的研究者将传统技术和新兴技术联合运用,取长补短,以期在动物药质量评价研究中得到新的发现和成果;联合技术的多方位、多角度和分析全面等特点为动物药质量评价带来新的思考方式。

采用氢核磁共振(¹H-NMR)代谢组学技术对不同生产厂家的阿胶酸水解成分进行差异比较和图谱分析,通过化学成分归属分析找出了差异性的特征成分^[66]。靳梦亚等^[67]采用 iTRAQ 同位素标记法

与中心切割二维液相色谱串联质谱(2DLC-MS/MS)法相结合的方法,对不同加工方式的鹿茸进行蛋白质组研究和比较。赵恒强等^[68]采用亲水色谱-电喷雾飞行时间质谱(HILIC-ESI-TOF/MS)法对基质复杂、化合物种类繁多的柄海鞘、黄海葵等海洋动物药进行 9 种核苷类化合物含量测定,建立了差异性成分特征指纹图谱。张高慧^[69]将 HPLC、气-质联用色谱法、紫外光谱法、放射免疫法、原子吸收和原子荧光光谱法等方法联用,首次对梅花鹿鹿尾和马鹿鹿尾中 6 类营养成分和 5 种重金属元素进行系统分析和比较,构建出评价鹿尾质量的灰色关联度模型。李楠^[70]建立了人工神经网络、紫外光谱法和 HPLC 联用技术,对乌梢蛇、乌风蛇、乌风梢、土鳖虫、蟾蜍、地龙 6 种动物药中次黄嘌呤、黄嘌呤和腺嘌呤活性成分进行测定,为其质量评价体系的构建提供依据。

2 动物药材鉴别和质量评价体系构建的研究现状

在古代,动物药材以中医的“血肉有情”之性用于治疗各种疾病的组方中,历史悠久;在当代,动物药材具有临床特效性、前景广泛性和资源匮乏性等特性^[3],其应用和功效无法替代,在中药材市场上有着巨大潜力和重要地位。

2.1 动物药材鉴别和质量评价研究的现状

随着人们对动物药材认识的不断深入,其市场需求量也不断扩大,但大部分动物药材并没有明确的鉴别方法和质量评价标准,无法构建完善的质量评价体系。《中国药典》2015 年版一部收载动物药材质量评价方法包括液-质联用法鉴别阿胶、龟甲胶、鹿角胶;PCR 法鉴别乌梢蛇和蕲蛇;薄层色谱法检测龟甲、穿山甲、鹿茸等,水蛭等重金属及有害元素及地龙等药材中黄曲霉毒素检查等,而《中国药典》2015 年版四部附录收载 48 种动物药材,仅有药材来源,无具体质量评价和控制项目。

2.2 动物药材鉴别和质量评价体系构建缓慢

动物药材虽然种类少于植物药材,但具有一定的药用价值,及特效性强、发展快和前景好等优势,已受到人们广泛的重视和关注。相比植物药材的研究进展,动物药材近些年来不管是基础研究还是应用研究均发展缓慢,其中资源少、价格贵和品种溯源混乱等现象是制约其发展的问题。同时,市场上动物药材绝大部分为珍贵的紧缺药材,常以粉末或是炮制品等形式入药,药材的外部形态不完整、被破坏及近缘种鉴定困难等问题是准确鉴定动物药应

最先解决的重点之一。没有明确鉴别和评价标准的动物药材研究现状严重影响了其质量评价体系的构建,这也让对动物药材不了解或是了解较少的消费者,存在不敢轻易和抵触使用的心理,阻碍了动物药材及其产品的市场开拓,更是制约了其药理和药效的深入研究。

2.3 动物药材缺少专属性活性成分和质量评价方法

不同于植物药材中苷类、黄酮类、香豆素类和生物碱类等明确的活性成分,动物药材成分较为复杂,多是蛋白质类等生物大分子物质,药用物质基础尚不明确,严重影响其后续的研究;同时,大多数动物药材的鉴定技术还是主要依靠性状鉴定、显微鉴定以及与植物药材相似的理化鉴定方法,缺乏对其具有针对性、专属性的鉴定方式与手段,研究基础相对植物药材薄弱和落后。

各类动物药材成分的种类和组成未知,分离困难、成分紫外吸收能力弱和检测手段不灵敏等因素均制约其专属性成分进一步的发掘,这也是导致动物药材品种差异鉴别困难、药效物质基础不明确和功效难以验证等问题出现的根本原因。各类成分与功效无法对应和关联,临床应用出现局限性和不确定性,对现行的动物药材质量评价体系提出了更为严峻的挑战。

总之,动物药材在品种溯源、特征差异鉴别、活性成分测定和药理药效作用研究等方面均没有形成全面和明确的评价体系,导致动物药材质量评价的研究难以实现突破性进展。动物药鉴别和质量评价体系的不完善将影响其基础研究、配方研究、药效研究和替代品开发研究等一系列相关方面的研究进展。因此,构建和完善动物药材的质量评价体系势在必行,且在动物药今后发展中扮演着重要角色和提供理论依据。

3 动物药材质量评价体系构建存在的挑战和策略

3.1 动物药材质量评价研究存在的挑战

3.1.1 动物药材成分复杂,标志性成分不明确 动物药材主要成分为蛋白质、多糖和核苷等,分离和纯化难度较大、基础研究薄弱,导致动物药材各部分成分与药材的主治功能无法一一对应,也造成了其品质评价和品种鉴定研究中出现混乱现象。因此,如何结合动物药材的自身特点,寻找出符合当前动物药材实际应用品种鉴定与质量控制的方法与指标的解决办法,是构建动物药材质量评价体系的关键。

3.1.2 缺少检测动物药材各类成分特效、专属的方

法 为突破动物药材构建和完善质量评价研究的困境, 首先应解决各动物药材的专属成分和有效成分是否一致及其谱效关系、量效关系和毒效关系等问题; 其次运用现代联合技术手段, 开发动物药材特色的专属性检测方法; 最后检测指标可从单一成分指标向多指标同步测定方向转移。从多技术、多指标和多角度来构建安全、有效、准确的动物药材质量评价体系将成为今后研究的趋势。

3.2 以药效活性蛋白作为动物药材的质量标志物

大多数功能与主治明确的动物药材, 其化学成分主要为蛋白质和核苷等。不同种或同一种动物药材的不同组织中均含共有的蛋白和多肽, 但同时也存在大量的标志蛋白、糖蛋白和多肽类成分, 这类蛋白类成分在各种疾病的治疗中, 均有着其独特的功能和药效, 如地龙活性蛋白中蚓激酶能溶解纤维蛋白, 溶解血栓和抗肿瘤效果显著^[71]; 蛇毒蛋白酶和蛇毒酶等蛋白质成分在治疗血栓方面也有着较好的效果^[72]; 蟾蜍糖蛋白具有强心利尿作用^[73], 蝮蛇精氨酸酯酶具有抗脑血栓和抗血栓闭塞性动脉炎作用^[74]。此外, 目前临床应用上各种生长因子大多数为活性较强的多肽类成分, 因此动物药材中多肽类成分也受到广泛的关注, 如蜂毒肽的镇痛抗炎^[75]、抗肿瘤^[76]和抗菌^[77]作用, 水蛭素的抗肿瘤和抗凝血作用^[78], 以及海绵、软体、昆虫及两栖动物中抗生肽成分均有一定的抗细菌和抗病毒作用。

随着现代物质谱、生物信息技术和蛋白质组学研究技术的成熟, 动物药材中标志蛋白和多肽类成分可快速完成氨基酸测序、定性和定量比较分析以及结构修饰的研究, 解决动物药材物种、用药组织部位等的准确判别及成分组成分析等难题。由此可见, 标志蛋白和多肽类成分作为动物药材活性成分和特征识别物具有独特之处和可行性。

3.3 建立适宜的动物药材特色检测方法和思路

随着现代技术对动物药材品种鉴定与质量评价研究的大量介入和支持, 从多技术、多指标和多角度来建立适宜的动物药材特色检测方法的思路具有合理和可行性, 如基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱(MALDI-TOF/TOF-MS)联合技术为目前解析蛋白质和多肽类等大分子成分特征信息的最有力技术^[79], 灵敏度高、专属性强和测定速度快等特点均可弥补电泳、免疫学和色谱技术的不足; 同时, 联合二维电泳、二维纳流液相色谱和肽序列测序等手段, 可进一步解析出多基原、复合体类及角类、甲壳类、胶

类动物药材中标志蛋白质和多肽类成分, 确定出特征识别物和标志成分, 为动物药材品种的鉴定和质量控制与评价提供切实可行的途径和方法。

此外, 构建动物药材质量评价体系也可打破传统思路和观念, 从指纹图谱反映化学成分组成与生物效价相互关联角度, 直接以生物效价测定结果或药理指标来指导动物药材活性成分的分离、分析, 以阐明药效物质基础, 探究反映药效的标志蛋白类成分和检测方法, 作为动物药材质量控制和评价的专属性指标和方法。

4 展望

动物药材是我国中药宝库中的重要部分, 在中医临床应用上有着一定的潜力, 具有疗效高、活性强、应用广、潜力大等优势, 也受到国内外学者和消费者越来越多的关注和重视。因此, 在保证动物药材安全、有效、质量可控的基础上, 应进一步发掘其更大的市场潜力, 改善相比植物类中药严重落后的发展局面。但植物药研究思路并不符合动物药的自身特点, 因此, 需要建立具有动物药材特色的质量评价体系, 探寻可标记动物药材中活性成分指标和特色的专属性检测手段为技术核心的解决策略。通过对现行动物药材药理及药效的研究发现, 活性蛋白可能是标记动物药材活性成分指标的突破点, 这样现代生物技术如生化分离、蛋白质组学、蛋白质鉴定标记分析、发酵和免疫等也将有可能成为其质量评价体系研究的重要手段, 为解决动物药材质量评价相关问题带来新的尝试和突破。全面和系统的动物药材质量评价体系和方法有利于其差异鉴别、药效评价及毒副作用的研究, 有利于保障动物药材的疗效; 推动动物药材实现现代化、产业化和国际化的长期发展的要求, 有望在不久的将来使更多的动物药材相关领域和产业得到更多的业内关注和快速发展。

参考文献

- [1] 中国药典[S]. 一部. 2015.
- [2] 徐莹, 陈晨, 沈玉萍, 等. 动物药鉴定的研究现状与对策探讨[J]. 中草药, 2014, 45(5): 578-581.
- [3] 陈世平, 陈倩, 李庆诒. 动物类中药材的特殊性[J]. 中医临床研究, 2011, 3(3): 43.
- [4] 张豁中. 十五年来动物药活性成分的研究[J]. 药学通报, 1980, 15(10): 15-19.
- [5] 王玄, 欧阳罗丹, 代春美, 等. 动物类中药质量控制的生物评价研究[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(12): 2228-2235.

- [6] 姜红, 陈霞. 半显微性状鉴定法快速鉴别中药材真伪 [J]. 中国民族民间医药, 2008, 17(11): 10-12.
- [7] 胡云飞, 鞠康, 荣百玲, 等. 不同品种进口蜈蚣的性状鉴别 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(8): 39-44.
- [8] 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.
- [9] 冯立芹. 熊胆的真伪鉴别 [J]. 首都医药, 2014(8): 55-56.
- [10] 杨远帆, 倪辉, 吴黎明, 等. 茚三酮法测定蜂蜜及果葡糖浆中的氨基酸含量 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(2): 171-176.
- [11] 余兰, 于香安. 三氯乙酸沉淀法结合双缩脲比色法测定水蛭提取液中总蛋白含量 [J]. 中国药物与临床, 2004, 4(9): 685-686.
- [12] 楼小红, 陈建真. 鹿茸中水溶性蛋白含量的测定 [J]. 中国中医药科技, 2003, 10(1): 31.
- [13] 汪树理, 潘浦群, 李晓红, 等. 4种东北梅花鹿茸片总糖与水溶性蛋白的分析 [J]. 经济动物学报, 2007, 11(4): 194-195.
- [14] 李桃, 谭晓梅, 龙群, 等. 蜈蚣药材薄层鉴别及抗凝活性定量的研究 [J]. 中药材, 2012, 35(5): 686-689.
- [15] 张建英, 刘惠军, 张艳慧, 等. 珍珠层粉胶囊中氨基酸的薄层色谱鉴别 [J]. 中国医药指南, 2018, 8(29): 42-43.
- [16] 钟宁, 李芳, 刘兆霖, 等. 高效液相色谱法测定鹿茸血酒中嘌呤类物质 [J]. 现代预防医学, 2012, 39(21): 5652-5654.
- [17] 周芳妍, 李婷, 刘力, 等. 鹿角胶中氨基酸类成分的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(9): 54-58.
- [18] 孙印石, 王燕华, 王玉方, 等. UPLC 法测定不同加工方式梅花鹿鹿茸中的核苷类成分 [J]. 中药材, 2018, 49(4): 840-846.
- [19] 曹越, 田淋淋, 李航, 等. 基于主成分分析模式对不同产地梅花鹿茸 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 吉林中医药, 2014, 34(12): 1258-1260.
- [20] 靳丹虹, 梁芳慧, 董丽丹, 等. RP-HPLC 测定冻干鹿茸中的尿嘧啶和尿苷 [J]. 现代科学仪器, 2013(2): 141.
- [21] 程樱, 费毅琴, 肖凌. 动物类中药材质量评价研究概况及分析 [J]. 中国药事, 2017, 31(4): 381-388.
- [22] 王梦月, 韦静斐, 史海明, 等. 海龙药材及其伪品的 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(24): 1847-1858.
- [23] 徐佳, 杨瑶琨, 刘晓帆, 等. 水蛭的高效液相指纹图谱研究 [J]. 环球中医药, 2013, 6(8): 596-599.
- [24] 黄玉明, 汤海燕, 郭小玲, 等. 利用仪器分析方法鉴定和研究动物药的真伪及内在质量的控制 [J]. 内蒙古中医药, 2014, 10(7): 62-63.
- [25] 陈萍红, 王书芳, 田守生, 等. 柱前衍生 RP-HPLC 法测定阿胶中 13 种氨基酸 [J]. 中草药, 2013, 44(14): 1995-1999.
- [26] 肖云芝, 万露, 刘朝勇, 等. 鳖甲 HPLC 指纹图谱的分析模式探讨 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(6): 32-36.
- [27] 王欣丽, 李清, 李博惠, 等. 土鳖虫及其混淆品 HPLC 指纹图谱分析 [J]. 中草药, 2016, 47(10): 1780-1784.
- [28] 姬诚, 郭万周. 蟾酥的高效液相指纹图谱研究 [J]. 光明中医, 2016, 31(12): 1727-1729.
- [29] 陈宏, 徐保利. HPLC 法测定乌梢蛇中六种核苷类成分含量 [J]. 现代中药研究与实践, 2018, 32(1): 13-16.
- [30] 胡晓炜. 化学模式识别与判别分析法鉴别羚羊角及其混伪品 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(2): 405-409.
- [31] 彭新君, 吴萍, 杨广民, 等. 乙醇沉淀操作对羚羊角塞注射液肽类成分和游离氨基酸含量的影响 [J]. 湖南中医学院学报, 2000, 20(3): 26-28.
- [32] 刘海洋, 耿放, 尹丽颖, 等. 基于 GC-MS 和主成分分析的蜂蜡质量控制方法研究 [J]. 化学工程师, 2015(6): 28-31.
- [33] 肖维, 万译文, 伍远安, 等. 固相萃取净化高效液相色谱串联质谱法测定林蛙油中 4 种环境雌激素的含量 [J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2018, 41(2): 58-62.
- [34] 刘丽娜, 李耀磊, 金红宇, 等. 免疫亲和净化 HPLC 柱后光化学衍生荧光法测定动物药中黄曲霉毒素 [J]. 中草药, 2017, 48(6): 1220-1224.
- [35] 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.
- [36] 赵文静, 万羽, 李淑莲, 等. 虎斑游蛇的微量元素含量测定及与乌梢蛇的比较分析 [J]. 中医药信息, 2002, 19(4): 64.
- [37] 金向群, 张豁中, 张薇, 等. 中华大蟾蜍与华北大蟾蜍耳后腺分泌物的显微和薄层层析鉴定 [J]. 中药材, 1991, 14(9): 26-27.
- [38] 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.
- [39] 张晗星, 钱正明, 苏尧, 等. 冬虫夏草不同发育时期蛋白质组 iTRAQ 质谱分析 [J]. 菌物学报, 2016, 35(4): 411-422.
- [40] 左甜甜, 李耀磊, 金红宇, 等. ICP-MS 法测定 18 种动物药中重金属及有害元素的残留量及初步风险分析 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(2): 237-242.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] 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.
- [45] 朱云飞, 初正云, 李洪江. SDS-PAGE 凝胶电泳法对不同种鹿茸蛋白质差异化研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(6): 48-51.
- [46] 陈振江, 沈瑜琪, 刘焱文. 贵重动物类中药材蛋白质 SDS-PAGE 的图谱研究 [J]. 中药材, 2007, 30(7): 769-771.
- [47] 王成芳. 动物药材商品高效毛细管电泳指纹图谱的研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2010.
- [48] 陈昭, 陈伟韬, 罗文汇, 等. HPCE 法研究土鳖虫镇痛作用与其指纹图谱的关系 [J]. 中成药, 2016, 38(5): 1074-1077.
- [49] 丁培贤, 贺天笙. 生物免疫化学法检定虎、豹骨的研究 [J]. 中国药理学杂志, 1989, 24(8): 457-460.
- [50] 中国药典 [S]. 一部. 2010.
- [51] 张蓉, 刘春生, 黄璐琦, 等. 鹿茸饮片的 DNA 条形码鉴别研究 [J]. 中国药理学杂志, 2011, 46(4): 263-266.
- [52] 贾静, 石林春, 徐志超, 等. 市售鹿茸粉药材的 DNA 条形码鉴定 [J]. 药学学报, 2015, 50(10): 1356-1361.
- [53] 贾静, 张红印, 陈俊, 等. 名贵动物药材穿山甲的 DNA 条形码分子鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2212-2215.
- [54] 杜鹤, 崔丽娜, 张辉, 等. 鳖甲及其混伪品的 DNA 分子鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(2): 429-434.
- [55] 刘晓帆, 刘春生, 杨瑶琨, 等. 基于 COI 基因的龟甲及其混伪品的 DNA 条形码研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(7): 947-950.
- [56] 刘晓帆, 刘春生, 杨瑶琨, 等. 基于 COI 基因的水蛭及其混伪品的 DNA 条形码研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(1): 63-66.
- [57] 陈仕江, 鲁增辉, 廖玉凤, 等. 7 种中药材斑蝥 COI 基因序列的分子系统学研究 [J]. 西南农业学报, 2013, 26(5): 1809-1813.
- [58] 张红印, 石林春, 刘冬, 等. 基于 COI 条形码序列的蛤蚧及其混伪品的 DNA 分子鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 269-273.
- [59] 陈俊, 贾静, 徐晓兰, 等. 基于 COI 序列的紫河车药材及其混伪品的 DNA 条形码鉴定研究 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(12): 2204-2207.
- [60] 石林春, 陈俊, 刘冬, 等. 基于 COI 条形码的中药材蛇蜕及其混伪品的 DNA 分子鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(3): 284-287.
- [61] 崔丽娜, 杜鹤, 张辉, 等. 基于 COI 条形码序列的金钱白花蛇及其混伪品的 DNA 分子鉴定 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(2): 424-428.
- [62] 廖婧, 梁镇标, 张亮, 等. 常见药用蛇类的 DNA 条形码研究 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 38(15): 1255-1260.
- [63] 王树春, 吕扬. 中药材熊胆 X 衍射 Foure 谱分析 [J]. 中草药, 2000, 31(10): 932-933.
- [64] 李兰燕, 王树春. 广地龙的 X 射线衍射 Foure 谱鉴定 [J]. 中成药, 2001, 24(5): 380-381.
- [65] 乔歌. 基于灰色关联度模型的动物药材质量评价模式研究 (II) [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2009.
- [66] 那丽丹, 陈建丽, 秦雪梅, 等. 基于 ¹H-NMR 代谢组学的阿胶化学成分差异性分析方法初探 [J]. 中草药, 2015, 46(17): 2573-2579.
- [67] 靳梦亚, 董玲, 罗元明, 等. 利用 iTRAQ 技术联合 2D LC-MS 研究不同加工工艺鹿茸的差异蛋白质组学 [J]. 药学学报, 2015, 50(12): 1637-1644.
- [68] 赵恒强, 陈军辉, 史倩, 等. 基于核苷类化合物 HILIC-ESI-TOF/MS 分析的海洋动物药指纹图谱方法 [J]. 高等学校化学学报, 2012, 33(1): 44-48.
- [69] 张高慧. 鹿尾化学成分分析及质量评价模式研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2011.
- [70] 李楠. 动物药材中嘌呤类物质的提取与测定 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [71] 刘涛, 谭清红, 王晓霞, 等. 基于酶活性的地龙质量标准再评价研究 [J]. 中药材, 2014, 37(9): 1535-1537.
- [72] 李灵欣, 刘欣, 宁淑香, 等. 蛇毒蛋白与血小板血栓形成 [J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(1): 37-41.
- [73] 吴喜燕, 高慧敏, 王智民. 蟾蜍类药材化学成分研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(14): 207-220.
- [74] 韦传宝, 徐建芬. 白眉蝮蛇蛇毒精氨酸酯酶对小鼠的生殖毒性及 F1 子代的影响 [J]. 应用与环境生物学报, 2004, 10(5): 623-625.
- [75] 杨明, 程欣, 王岩, 等. 蜂毒多肽镇痛抗炎及降压作用 [J]. 特产研究, 1992(4): 6-8.
- [76] 张晨, 万旭英, 李柏, 等. 蜂毒素对肝癌细胞系 BEL-7402 细胞凋亡的影响 [J]. 安徽中医学院学报, 2003, 22(4): 44-46.
- [77] 伊琳娜·塔图, 陈福生, 厚山, 等. 蜂毒的抗菌作用 [J]. 养蜂科技, 1990, (1): 28-29.
- [78] 严令耕, 黄臣虎, 陆茵, 等. 水蛭素抗凝血和抗肿瘤转移的研究进展 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6): 667-670.
- [79] Madler S, Boeri Erba E, Zenobi R. MALDI-TOF mass spectrometry for studying noncovalent complexes of biomolecules [J]. *Top Curr Chem*, 2013, 331(15): 1-36.