

中药现代化丛书

分子生物学技术与中药鉴别

——RAPD技术的研究与应用

主编 王培训
周 联
赖小平

H_2O

CO_2

H_2O

H_2



世界图书出版公司

Q7
w3-5

分子生物学技术与中药鉴别

——RAPD 技术的研究与应用

主 编：王培训 周 联 赖小平

副主编：林瑞超 陈浩桢 陈建南

编写人员（按姓氏笔画）：

王文君 王培训 李劲平 陈浩桢 陈建南

林瑞超 周 联 俞 瑜 韩 凌 赖小平

潘华新



世界图书出版公司

广州 · 上海 · 西安 · 北京

图书在版编目 (CIP) 数据

分子生物学技术与中药鉴别/王培训编著.—广州: 广东世界图书出版有限公司, 2002

ISBN 7-5062-3761-X

I. 分… II. 王… III. ①分子生物学②中药材—中药鉴定学
IV. ①Q7②R282.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 031003 号

分子生物学技术与中药鉴别

出版发行: 广东世界图书出版公司

(广州市新港西路大江冲 25 号 邮编: 510300)

电 话: 020-84451969 84452179

E-mail: gzwpcgd@public1.guangzhou.gd.cn

经 销: 各地新华书店

印 刷: 广东邮电南方彩色印务有限公司

(广州市天河高新技术工业园建工路 17 号 邮编: 510630)

版 次: 2002 年 6 月第 1 版 2002 年 6 月第 1 次印刷

开 本: 890mm×1240mm 1/32

印 张: 10

印 数: 0 001~3 000 册

书 号: ISBN 7-5062-3761-X/R · 0030

出版社注册号: 粤 014

定 价: 28.00 元

如发现因印装质量问题影响阅读, 请与本公司联系退换。

编写说明

随着现代科技的迅速发展，分子生物学的理论和技术已在医药卫生和工农业生产等各个领域得到广泛应用。

中药是祖国医药的重要组成部分，中药材是中药饮片和中成药的原料，其真伪优劣直接影响中药的质量和疗效。传统的药质评价方法主要靠外观性状特征，主观性强；随后发展的理化鉴别具有较好的重复性和稳定性，但鉴别近缘品种存在困难。

用任意引物进行基因组指纹分析是检测 DNA 多态性的一种通用方法。这种方法是用随机选择的引物在一定反应条件下产生 DNA 指纹。这样获得的指纹有的只包括几个主要的聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction，简称 PCR）产物，有的则包括 100 多个。这样的产物通常被称为随机扩增多态性 DNA（Random Amplified Polymorphic DNA，简称 RAPD）。

RAPD 技术是 20 世纪 90 年代以后迅速发展起来的一种新型遗传标记方法，可用于动、植物品种的鉴别，也可用来观察个体或群体的遗传变异。RAPD 技术具有快速、简便和高效等优点，其最大特点是无须知道特异 DNA 序列遗传信息即可进行中药材品种鉴别。RAPD 技术不但可作为现有中药材鉴别方法的重要补充，同时也为今后中药材种质资源库的建立等奠定基础。

编者以应用 RAPD 技术对西洋参、诃子、阳春砂等干燥商品中药材进行的鉴定研究为基础，介绍了与 RAPD 技术密切相关的分子生物学背景知识，各种分子标记技术的基本原理，RAPD 技术的具体实验操作及其注意事项以及 RAPD 技术在中药材鉴别中的应

用和展望。该项目的研究获得广东省科委、国家中医药管理局和卫生部的资助，并获得 2000 年度广东省科技进步二等奖。

本书可为从事中药鉴定、中药资源开发、遗传育种和生物多样性研究的科技工作者及高等医药院校相关专业的教学、科研人员和研究生提供参考。

由于时间和水平所限，书中难免有错漏之处，恳请读者批评指正。

编 者

2001 年 6 月 10 日

目 录

第一章 中药鉴别的历史源流及现代研究概况	1
第一节 中药鉴别的产生及萌芽阶段	1
第二节 中药鉴别的发展和现状	4
第三节 中药生物鉴别的现状	11
第二章 核酸与基因	31
第一节 核酸概述	31
第二节 脱氧核糖核酸 (DNA)	36
第三节 核糖核酸 (RNA)	41
第四节 核酸的性质	46
第五节 基因组的结构与功能	50
第三章 核酸的分离与纯化	71
第一节 核酸分离提取的原则	71
第二节 分离纯化核酸的基本原理及常用方法	73
第三节 真核细胞 DNA 和 RNA 的制备	82
第四节 植物药材 DNA 的制备	92
第五节 动物药材 DNA 的制备	109
第四章 核酸电泳技术与离心技术	113
第一节 核酸电泳技术	113
第二节 核酸离心技术	133
第五章 PCR 原理与 RAPD 技术	145
第一节 PCR 原理和方法	146
第二节 PCR 常见问题及处理	155
第三节 PCR 相关技术及其应用	156
第四节 RAPD 技术	163

第六章 DNA 多态性及其分析技术	207
第一节 多态性概述	207
第二节 DNA 多态性的分类	211
第三节 DNA 多态性分析技术	219
第四节 DNA 多态性分析技术在中药鉴别中的应用	236
第七章 部分中药材的 RAPD 研究	247
第一节 西洋参	248
第二节 西红花	259
第三节 砂仁	262
第四节 诃子	266
第五节 溪黄草	269
第六节 蛤蚧	271
第七节 南五味子、北五味子	273
第八节 中药材 RAPD 鉴别的实用性	275
第八章 分子生物学技术在中药材鉴定中的发展趋势	283
第一节 DNA 测序技术在中药材鉴定中的应用	283
第二节 生物芯片	292
参考文献	309

第一章 中药鉴别的历史源流及现代研究概况

中药是中华文化宝库的重要组成部分，在经过几千年的文化沉淀之后，她博大精深的理论体系和独到的思维方式，对现代医学仍起着积极的作用。尤其是其副作用小，对慢性、消耗性疾病具有独特的、西药不可取代的作用。

在科学技术迅猛发展的今天，中药要想在世界医药学舞台上占有举足轻重的一席，就必须吸取现代科学的先进技术，进行中药现代化，其中中药材质量控制的规范化和现代化是中药走向世界的重要前提。在这种形势下，加强中药鉴别的研究可以确保中药材和制剂的质量可靠，确保中药现代化及其他各项工作得以顺利进行。

下面就我国中药鉴别的产生、发展及现状作简单的介绍。鉴于分子生物学在中药鉴别应用中的深入，我们将重点介绍该方面的现状及各种技术的优、缺点。

第一节 中药鉴别的产生及萌芽阶段

中医药理论的形成与发展在一定程度上是我国古代科学认识方式和科学发展成果的结晶。由于自然哲学是古代科学发展的最高成就，所以中医药学理论势必蕴涵着大量的哲学理论，在当时较为落后的科学认识水平情况下，这种理论的思维方式主要是直观的和综合的，即试图通过粗糙的科学观察手段凭借合理的猜测以探求事物

的本质，把表面上极为复杂的自然现象归结为简单的基本概念关系。中医的“理、法、方、药”的理论就渗透着深厚的古代哲学思想和观点。中医将每一味药材视为单一的不可分割的“个体”，复方方剂则根据中医理论和临床实践将若干“个体”组合成“群体”，归结为“君、臣、佐、使”的关系，使之各司其职，发挥不可分割的“整体作用”。经过历代的发展和演绎，形成了一个有浓厚古典自然哲学思想与民族文化背景的理论体系。

任何事物的发现，必然伴随着一个鉴别认识的过程。同样，中药的鉴别与中药的发现是同源的，即中药鉴别是中药产生一开始就有的。《淮南子·修务训》记载：“神农……尝百草之滋味，水泉之甘苦，令民知所避就。当此之时，一日而遇七十毒”。这是中药鉴定的萌芽阶段，对于药材的真伪优劣是通过感官把药材作为一个整体分辨其形态气味，而对制剂制备的质量控制，由于当时没有科学的检测手段，则认为“丸散膏丹，神仙难辨”，只能以“修合虽无人见，存心自有天知”的道德修养来约束，这是由当时的生产力水平和人们的思维方式决定的。

公元 3 世纪，出现了记载有性状鉴别的本草——《吴普本草》。中药的鉴定单凭文字记述，不详尽，也不易理解。于是，在公元 5~6 世纪应运而生了《芝草图》及《灵秀本草图》，书中药图形象生动，看图认药，一目了然，这在鉴别的发展上是一大进步。明代以前关于药物鉴别的记述，多散在于整个药物知识的记述之中。明清时期，则逐渐条理化、专业化。并有一些着重讨论鉴定问题的本草出现，如宋朝苏颂的《图经本草》，明朝陈嘉谟的《本草蒙筌》，李时珍的《本草纲目》和清朝郑天岩的《伪药条辩》等著作更是重视中药鉴别的佳作。《本草纲目》全书共收载药物

1 892 种, 附方 11 096 条, 按药物自然属性自立分类系统, 提纲挈领, 结构严谨, 是为自然分类的先驱。如将大戟、甘遂、泽漆、续断排在一起, 并都指櫛有白汁。今天看来, 上述药物属大戟科植物, 具有白汁, 也是大戟科的特征之一, 与自然分类法完全相符。总体来说, 这一阶段的鉴别研究特点是以人的经验鉴别为主, 即以药材的形状、大小、颜色、气、味、表面特征、质地、断面等判别药材的真伪, 对部分药材, 还辅以简单的理化实验, 如火烧实验、沉水实验等多种方法, 具体叙述如下:

1. 性状鉴定 即利用外观包括形状、大小、颜色、质地、表面特征、气味等作为最常用的鉴别方法。如鉴别太子参 (*Radix Pseudostellariae*), 李时珍谓: “其形似人形者, 谓之孩儿参”。鉴别川乌 (*Radix Aconiti*), 吴谱谓: “乌头, 形如鸟之头也”。从大小来看, 苏颂谓大黄 (*Radix et Rhizoma Rhei*): “大干乃佳……根如芋, 大者如碗, 长一二尺”。苏恭谓白头翁 (*Radix Pulsatillae*): “实大者如鸡子, 白毛寸余”。从颜色来看, 鉴别白芍 (*Radix Paeoniae Alba*) 时, 马志谓: “有赤、白两种, 其花亦有赤白二色”。从气味来说, 鉴别鱼腥草 (*Herba Houttuyniae*), 李时珍又谓: “其叶腥气, 故俗称为鱼腥草”。

2. 染甲 (挂甲) 鉴别 利用药材在指甲上所染的颜色对药材进行鉴定。如对于牛黄 (*Calculus Bovis*) 的鉴别, 苏颂谓: “然人多伪之, 试法但揩摩手指甲上, 透甲黄者为真”。这是最早的“挂甲实验”记录。

3. 纹理鉴定 对肉豆蔻 (*Semen Myristicae*) 的鉴别, 李时珍谓: “外有皱纹, 而内有斑缬, 纹如槟榔纹”。

4. 结晶实验 李时珍谓芒硝 (*Natrii Sulfas*) “生于盐卤之

地，状似末盐……煎炼入盆，凝结在下粗朴者为朴硝，在上有芒者为芒硝，有牙者为马牙硝”。

5. 水浸实验 对于青黛（*Indigo Naturalis*）的鉴别，李时珍又谓：“以蓝浸水一宿，入石灰搅至干下，澄去水，则青黑色”。

6. 火烧实验 《海药本草》载降香（*Ligni Dalbergiae Odoriferae*）：“其香似苏方木，烧之初不甚香，得诸香和之则特美”。

7. 荧光鉴别 对于秦皮（*Cortex Fraxini*）的鉴别，苏恭谓：“取皮渍水便碧色，书纸看之皆青色者，是真”。此为历史上最早观察荧光现象应用于药材的记载。而欧美直到 19 世纪中叶以后开始注意荧光现象的应用，比我国迟了 1200 年。

8. 声音鉴别 对于浮海石（*Pumex*）的鉴别，《本草衍义》谓：“以指擦之，铮铮有声，此石花（浮海石）也”。

以上这些早期鉴别中药的方法还有很多，在此不一一枚举，但他们的特点都是以人的感官、经验为主，主观性较强，缺乏科学性，这是由当时的生产力和人们的思维方式决定的。对处于萌芽阶段的中药鉴别来说，能够运用这些简便、快速、直观的方法进行鉴别，已是中药鉴别史上的一大进步，值得一提的是，其中的某些方法经过几千年的锤炼，至今仍不失为中药鉴定工作者初筛药物的好方法。

第二节 中药鉴别的发展和现状

显微镜的发明及细胞的发现促进了生物解剖的发展，物质分

子、原子的发现促进了化学的发展。正是在这些发展基础上,19世纪50年代,德国科学家 Schleiden 发表了“Grundriss der Pharmakognosie des Pflanzenreiches”(《植物性生药学基础》)一书,描述了许多植物性生药的显微构造。其后,Berg 于1885年,Vogl 于1887年先后发表了生药解剖图谱,于是利用显微镜鉴别生药的方法就得到了进一步的发展,而成为生药鉴定的重要手段之一。1934年赵燏黄、徐伯璠等编著了我国第一部介绍近代中药学的著作《现代本草学——生药学》上册,1937年叶三多编著该书下册,这套著作首次将显微技术引入中国,并应用到中药鉴别中。

18世纪中叶以瑞典博物学家林奈(Carl Linnaeus)的“自然系统”为标志,创立了一个完整的植物分类系统和植物的科学命名法。它授予物种明确的特征概念,使其成为可比较的基本单元。同时采用高级阶元分类体系对物种进行归类。此后,植物分类系统不断完善。

20世纪30年代赵燏黄等学者利用现代植物分类学的知识,对本草进行研究整理,为我国中药学基原鉴定打下了良好的基础。随着西方天然药物化学的迅速发展,以及物理学、生物学等相关科学的发展,使比重、旋光度、折光率、荧光分析和色谱分析等方法相继引入中药鉴别中,所以理化分析、色谱及光谱分析等逐步替代了建立在经典分类学基础上的形态分析学。

至20世纪50年代,中药鉴别中较为全面的“四大鉴别”已初具雏形,它从生物分类学(基原鉴别)、细胞组织学(显微鉴别)、性状、化学(理化鉴别)等角度建立了比较客观的质量鉴别标准。现分述如下:

一、来源鉴定

即应用生物分类学的知识和方法，对中药的来源进行生物学鉴定，确定其正确的学名，这是中药鉴定工作的基础。此方法具有宏观性，主要适用于带花、果实、枝叶（或皮毛、骨骼）、昆虫和多数全草类等中药的鉴定。

二、性状鉴别

性状鉴别就是运用眼看、手摸、鼻闻、口尝、水试及火试等十分简便的方法来鉴别中药的外观性状，如形状、大小、色泽、表面、质地、气味等特征作为鉴别的依据，它是我国中医药工作者长期积累的丰富经验的总结，具有简单、快速、直观的优点。适用于鉴定各类完整的药材及饮片。

水试法是利用中药在水中发生浮沉溶解、颜色变化、透明度、味甜辣、膨胀度、旋转性、粘性、酸碱变化等现象进行鉴别。

火试法是利用中药受火燃烧后发生的颜色、烟雾、响声、膨胀、熔融聚散等现象进行鉴别，如秦皮浸入水中，浸出液在日光下显碧蓝色荧光，苏木投热水中，水显鲜艳的桃红色。麝香少许用火烧是有轻微爆鸣声，起油点如珠，似毛发烧焦但无臭气，灰为白色。

三、显微鉴别

显微鉴别是利用显微镜(光学显微镜和电子显微镜)来观察中药的组织构造，细胞形状、细胞内容物或其他显微特征，用以鉴定药材真伪、纯度甚至品质。显微鉴定法具有微观性，适用于性状特征

不明显或外形相似而组织构造不同的药材、粉末药材；已经破碎，性状难以区分的药材；丸、散、膏、丹等中成药制剂的鉴别。光镜下主要比较药材的组织结构、细胞形态及内含物（如纤维、淀粉颗粒大小等）特征，由于这些缺乏种属特异性，甚至不同科属来源药材也会具有相似的组织细胞特征，所以在鉴别中有一定的局限性。

随着自然科学的迅速发展和精细分工，现代电子仪器的广泛应用，使电子显微镜、扫描电子显微镜、放射自显影等技术的迅速发展，促进了现代细胞学的发展，在微观上，已从显微亚显微到分子水平，内质网、微管、微粒体等新的细胞器不断发现，阐明了核酸与蛋白质合成的关系，能研究细胞内很多物质的位置、合成时间和运转，并能确定植（动）物的化学成分在细胞中的分布，如用透射显微镜可从罂粟蒴果的乳汁细胞里观察到密集地充满的生物碱气囊（Alkaloidal Vesicles）；扫描电子显微镜（SEM）能清楚地辨别细胞表面的精微特征，目前已被广泛应用在植物药的鉴定中，对于一些具有高度品种专属性的超微结构如花粉壁、种皮、毛茸的雕纹、叶表面角质的沉积纹理，SEM 是有效的中药鉴定技术，如其能明确辨认出颠茄叶的粉末中掺杂的臭椿和美商陆叶。

四、理化鉴别

又称化学鉴别，是利用药材中存在的某种化学成分的化学性质和物理性质，通过化学方法或仪器分析来鉴定药材的真伪和纯度以及内在质量的方法。这种方法发展较为成熟、应用广泛。适用于含不同化学成分的同名异物或性状相似无明显显微特征的药材及树脂、加工品、合成品和矿物类等中药的鉴定，以及中药的质量检

查。它的优点是鉴别依据的量化，排除了主观人为误差，并具有较高的重复性和准确性。

随着分析手段的不断进步，分析仪器功能的逐步强大，在中药的化学成分方面，分析化学是将中药加以“分解”，对中药成分的了解也越来越深刻。已成功地应用于中药鉴别的技术或方法有：各种层析法，如全自动化的气相色谱、高压液相色谱、分子筛层析、离子交换层析及薄层扫描等；超过滤技术、电泳及同位素技术；紫外光谱、红外光谱、质谱及核磁共振、X 射线衍射技术等近年来都有新的进展，并都成功地应用到中药鉴定中。下面举例说明：

（一）色谱法

色谱法是在 20 世纪初产生，60 年代开始用于中药分析，经逐步完善后于 1977 年纳入中国药典，随后，色谱法得到了广泛的应用，并成为中药鉴别最主要的方法之一。其中薄层色谱法具有快速、经济、可靠、操作简单、适用范围广、重现性好等优点。在中药的新药研制中，几乎所有的新药都必须提供薄层层析谱，并须附有标准品或阴性、阳性药材对照的彩色照片。高效液相色谱法（HPLC）由于具有分离效能高、分析速度快等优点，现已广泛用于中药的定量分析，在中药的定性鉴别中也发挥很好的作用，洪筱坤对 3 种正品大黄的 9 个样品进行 HPLC 分析，将相对保留值 α 和相对峰面积 A_r 两者结合起来，建立了大黄样品的 HPLC-相对保留值指纹图谱，反映了该中药的化学组成及其含量分布状况，其特征可作为鉴别中药的依据。气相色谱（GC）以气体为流动相，具有高效、高选择性、高灵敏度、用量少、分析速度快等优点，对于一些具有挥发性成分的中药鉴别，GC 能发挥独特的优点。如将气相

色谱与质谱联用 (GC/MS), 不仅具有 GC 的高分离效能, 而且兼备了 MS 鉴定的高灵敏性和准确性。苏薇薇对 45 个细辛样品进行了 GC-MS 分析, 并从样品挥发油组分总离子流图中获取不同种细辛样品化学本质差异的数量化分类特征, 经过 PRIMA 法处理, 实现了计算机对 3 种细辛的鉴别分类, 结果与实际相符。

(二) 光谱法

选择某一波段波长, 以此通过中药的粉末或提取液, 测定中药对这一波段波长的吸收并记录其吸收光谱, 此为光谱鉴别中药的原理。其中紫外光谱是依据中药中一些含有不饱和结构的成分对紫外光 (通常是 200~350nm) 有吸收而用于鉴别。由于不同中药所含成分的不饱和程度有差异, 因而导致其紫外吸收曲线的形态、峰位、峰强度亦有差异而以此达到鉴别的目的。导数光谱可消除样品中一些无关吸收, 排除原图谱中的某些干扰, 从而达到较好的鉴别效果。张亮等不经分离直接测定 32 种石斛药材粉末氯仿浸出液的 UV 光谱, 经综合分析, 获得满意结果。红外光谱是对整个化合物的鉴别, 比单纯的官能团的化学定性鉴别专一性更强。中药材的红外光谱是中药在红外光区域内 (通常使用 $4\,000\sim666\text{cm}^{-1}$), 总体官能团吸收的叠加。本法在中药鉴别中具有制作简单、实验快速和图谱具有“指纹性”等优点, 应用较广。核磁共振 (NMR) 类似于红外和紫外光谱, 是另一种形式的吸收光谱。在无线电波 (波长 10~100cm) 照射下, 中药成分的溶液中某些特定元素 (通常选用 H) 的原子可以吸收电磁辐射, 以吸收频率为横座标、峰强度为纵座标作图, 即得该物质的 NMR 谱。考虑到中药中的组分太复杂, 通常选用某一溶剂的特征提取物进行分析, 获得该中药的 HNMR 指纹图。质谱法 (MS) 是指物质的质量谱, 将中药提取液

置质谱仪中进行电子轰击电离,可获得提取液中化学成分的 EI-MS 图,不同中药提取液所含成分不同,所得质谱所显示的分子离子基峰及进一步的裂解碎片峰亦不一致,可资鉴别。梁惠玲等对中药天麻及其伪品进行了 EI-MS 分析,获得了满意的鉴别效果。本法具有准确、灵敏和指纹特征性强的优点。但仪器价格昂贵,花费高,对主要成分的含量要求较高,尚未普及使用。

(三) X 射线衍射分析法(XRD)

X 射线衍射法是研究物质的物相和晶体结构的主要方法。当对某一物质进行衍射分析时,该物质被 X 射线照射而产生不同程度的衍射现象,物质的组成、晶型、分子内成键方式、分子的构型、构象等决定物质产生特有的衍射光谱,如果该物质是一混合物,则所得衍射图是各组分衍射效应的叠加。只要混合物的组成是恒定的,这衍射图就可作为该混合物的特征图谱。由于衍射法获得的图谱信息量大、指纹性强、稳定可靠且可以记录,因此我们便可以此作为该物质定性鉴别的可靠依据。周俊国等对 12 个不同产地的蛇床子样品进行了粉末 X 射线衍射分析,建立了蛇床子的特征图谱,并阐明其与同属植物兴安蛇床、碱蛇床的区别,认为该法可用于种内不同产地样品的鉴别。

随着西方自然科学的引入,中药鉴别走的是与西方国家天然药物制剂大致相同的以活性成分或指标成分为目标的质量控制模式。而亲缘关系较近的药材,所含的已知化学成分往往相似,单纯进行化学成分种类的比较分析鉴别中药材常有一定困难。而且单一比较某类化学成分的含量差异只能说明其质量的优劣,不足以鉴别其真伪。另外,中药是以中医理论为基础,常以复方形式应用于临床,这种单一化学成分分析的观点,反映了牛顿经典力学之后形成