

中药科学鉴定方法与技术丛书

张贵君 主编

常用中药 生物鉴定

张贵君 李晓波 李仁伟 等编著



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

中药科学鉴定方法与技术丛书

张贵君 主编

常用中药生物鉴定

张贵君 李晓波 李仁伟 等编著



化学工业出版社

化学与应用化学出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

常用中药生物鉴定/张贵君等编著. —北京: 化学工业出版社, 2006. 1
(中药科学鉴定方法与技术丛书)
ISBN 7-5025-7842-0.

I. 常… II. 张… III. 生物鉴定-中药鉴定学
IV. R28

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 128295 号

中药科学鉴定方法与技术丛书

张贵君 主编

常用中药生物鉴定

张贵君 李晓波 李仁伟 等编著

责任编辑: 任惠敏

文字编辑: 周 侗 张春娥 赵爱萍

责任校对: 蒋 宇

封面设计: 郑小红

*

化学工业出版社 出版发行

化学与应用化学出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷

三河市延风装订厂装订

开本 720mm×1000mm 1/16 印张 26¼ 字数 497 千字

2006 年 1 月第 1 版 2006 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-7842-0

定 价: 49.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

前 言

中药是治疗疾病和卫生保健的特殊物质，它的使用价值是由其属性所决定的，其属性构成了使用价值的物质基础，而使用价值集中体现为品质。中药的质量不合格，就失去了使用价值。为保证临床用药的安全性、有效性、稳定性和可控性，必须对其品质进行科学的鉴定，制定出规范化的质量标准。

中药的品质鉴定是一个复杂的关键问题，评价中药品质一定要以疗效为准绳。重视中药药效与形态特征、理化特征和生物特征的相关性研究，根据它们的相关性评价中药品质就比较客观。

以往对中药的鉴定多把研究对象局限在中药材上，通常认为中药鉴定就是鉴别药材的真伪，这是一个误区。众所周知，中药绝大多数是以复方或制剂的形式进入临床，所以对中成药的鉴定至关重要。如果鉴定研究脱离了中药应用价值这一基本目标，也就迷失了研究的方向。张贵君教授强调：“在中药鉴定的科学研究过程中，只有把中药材、饮片、复方及其制剂的鉴定方法与鉴别特征联系起来，采用综合的方法评价中药的品质，进行关键技术的整合，这样才能真正达到鉴定目的。”这是中药鉴定学科领域不可忽视的一个关键性问题。目前，从整体上来综合评价中药品质的研究较少，中药鉴定方法学专著更是凤毛麟角，药材、饮片和中成药的鉴定研究出现互相脱节的现象，由于受传统的思想影响，有些先进技术没有真正应用到实际工作中去，应该加大这方面的研究力度。我们认为，中药要实现现代化，必须紧密结合中药生产和临床应用的实际，建立综合品质鉴定和全面的质量管理（GSP）的科学体系；中药鉴定的对象是复杂的和多种多样的，重要的是解决方法学的问题，中药鉴定的方法和技术要不断创新，这样才能不断地精练和提升中药的质量标准。为此，我们组织编写了《中药科学鉴定方法与技术丛书》，旨在为中药的现代化贡献力量。

中药品质评价的方法是中药现代化的关键，没有中药品质评价方法的现代化，就不能保证中药的质量。在长期的生产和医疗实践中，人们积累了有关中药品质评价的丰富经验和方法，为中药品质的评价和质量控制奠定了坚实的基础。

在中药品质的现代评价方法中，中药的生物鉴定法就是其重要内容之一。它是采用生物效应和基因等生物学的方法鉴定其品质的一种方法，是 21 世纪产生并发展起来的中药鉴定最新方法。为此，我们对该方法进行了较为系统的整理和科学总结，旨在促进中药品质评价方法的科学化进程。

本书共 8 章，重点阐述了中药生物鉴定的基本概念、基本理论和基本方法，

并介绍了这些方法在常用中药品质鉴定中的运用。中药生物鉴定法是一种实用技术，它是利用中药或其所含的化学组分对生物体的作用强度，以及用生命信息物质（DNA、蛋白质等）特异性遗传标记特征和基因表达差异等来鉴定中药品质的一种方法。换言之，就是通过对中药中的生命信息物质和生物效应等的识别，以达到品质鉴定目的的一种方法。该鉴定方法既能体现中药的内在质量，又具有准确性和科学性等特征。例如生物效价鉴定法就是利用生物体的反应来鉴定中药有效组分（或有效成分）的含量或效价，测定药物的疗效和毒性的方法。再如动植物药的性状随入药部位、加工方法的变化而变化，这些变化常给中药鉴定带来困难，用生物鉴定法就很容易解决这些问题。该书介绍了生物鉴定的成功方法和技术，充分反映了现代中药品质评价方法的最新成果和发展方向。

本书由北京中医药大学、上海交通大学、重庆医科大学、黑龙江大学、大庆市第二医院等长期从事中药品质鉴定研究的专家撰写，可作为中医药类和医药类专业的博士和硕士研究生、本科生的专业教材，也可作为执业中药师的培训教材，亦是医药行业的各层次人员提高专业素质的参考书。

本书由张贵君主持编写，李晓波、李仁伟、白根本参与编著相关章节并参与全书稿的组织与审阅。承担各单章编写工作的分别为：第一章（张贵君）、第二章（白根本、苏民、陆景珊、张贵君、李仁伟）、第三章（张贵君、李仁伟、苏民）、第四章（李仁伟、王奕洁、张贵君）、第五章（李仁伟、王奕洁、张贵君）、第六章（李仁伟、陆景珊、王奕洁、常立军、孔增科、张贵君）、第七章（李晓波、李仁伟、郑春英、张贵君）、第八章（张贵君、李晓波、李仁伟、聂波）。李仁伟和王奕洁参加了统稿工作。

本书在编写过程中得到了化学工业出版社的大力支持，在此表示衷心地感谢。由于编者水平所限，错误和不完善之处难免，敬请广大读者批评指正。

《中药科学鉴定方法与技术丛书》编委会

2005年8月于北京

目 录

第一章 概述	1	参考文献	58
第一节 中药生物鉴定的概念及其发展历程	1	第三章 电泳鉴定法	60
一、中药生物鉴定的基本概念	1	第一节 概述	60
二、中药生物鉴定的发展历程	1	一、纸电泳法	60
第二节 中药生物鉴定的常用方法	7	二、醋酸纤维素薄膜电泳法	61
一、免疫鉴定法	7	三、琼脂糖凝胶电泳法	62
二、电泳鉴定法	7	四、聚丙烯酰胺凝胶电泳法	63
三、生物效价鉴定法	8	五、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法	64
四、单纯指标鉴定法	8	六、毛细管电泳法	66
五、细胞生物学鉴定法	8	第二节 常用中药鉴定举例	67
六、DNA 遗传标记鉴定法	9	一、含蛋白质类的中药鉴定	67
七、mRNA 差异显示鉴定法	13	1. 蛤蚧	67
第二章 免疫鉴定法	14	2. 海马	69
第一节 概述	14	3. 合欢皮	71
一、基础理论	14	4. 何首乌	71
二、抗原	15	5. 羚羊角	72
三、抗体	17	6. 鹿鞭	74
第二节 免疫鉴定的方法	20	7. 马钱子	75
一、放射免疫分析法	20	8. 阿胶	76
二、荧光免疫分析法	24	9. 冬虫夏草	77
三、酶免疫分析法	29	10. 决明子	78
四、免疫扩散法	32	11. 川贝母	79
五、免疫电泳法	35	12. 小茴香	82
第三节 常用中药鉴定举例	39	13. 大黄	82
1. 甘草	39	14. 砂仁	83
2. 西洋参	42	15. 牛蒡子	84
3. 全蝎	45	16. 桃仁	85
4. 金牡蛎胶囊	48	17. 熊胆	86
5. 鹿茸	52	18. 蛇床子	87
6. 灵芝	53	19. 鳖甲	89
7. 蛇毒	55	20. 沙苑子	90
8. 青蒿	57	21. 紫苏子	91
		22. 人参	92

23. 石菖蒲	92	9. 狗脊	155
24. 哈蟆油	93	10. 榧子	156
25. 乌梢蛇	95	参考文献	158
26. 羚羊角	95	第四章 生物效价鉴定法	161
27. 栀子	97	第一节 概述	161
28. 川楝子	98	一、基本理论	161
29. 天麻	99	二、应用范围	161
二、含同工酶类中药的鉴定	101	三、量反应与质反应	161
1. 当归	101	四、生物效价鉴定的实验设计	162
2. 白首乌	101	五、生物效价鉴定的基本原则与 要求	162
3. 红花	104	第二节 生物反应的量效关系	164
4. 人参	105	一、质反应的量效关系	164
5. 红曲	108	二、量反应的量效关系	166
6. 金银花	109	三、统计分析	166
7. 哈蟆油	112	第三节 常用中药鉴定举例	179
8. 菟丝子	113	1. 益母草	179
9. 延胡索	115	2. 益母草制剂	182
10. 贝母	116	3. 板蓝根	184
11. 榆耳	119	4. 大蒜油	185
12. 黄芪	122	5. 洋地黄苷	187
13. 鱼腥草	122	6. 类凝血酶	190
14. 麦冬	126	7. 蚓激酶	192
15. 天麻	127	8. 鲑鱼降钙素	193
16. 甘草	131	参考文献	195
17. 灵芝	133	第五章 单纯指标鉴定法	196
18. 地龙	136	第一节 概述	196
19. 砂仁	138	第二节 单纯指标的测定方法	196
20. 知母	139	一、黏稠度的测定	196
21. 猪苓	140	二、溶血指数的测定	199
三、含多肽类中药的鉴定	143	三、等电点的测定	199
1. 乌梅	143	四、氨基酸的测定	200
2. 枸杞子	144	第三节 常用中药鉴定举例	200
3. 三七	145	一、黏稠度的测定	200
4. 穿山甲	146	1. 蛤蚧	200
5. 鸡内金	148	2. 乌梢蛇	201
6. 龙眼肉	149	3. 当归	203
7. 云芝	151	4. 泽兰	205
8. 紫苏子	154		

二、溶血指数的测定	206	3. 五味子	268
柴胡	206	4. 菟丝子	270
三、等电点的测定	207	5. 千金子	273
1. 蛤蚧	207	6. 沙苑子	274
2. 鹿角胶	209	7. 白刺	276
四、氨基酸的测定	210	8. 酸枣仁	277
1. 薄荷	210	9. 月见草子	278
2. 狗脊	211	10. 金挖耳	279
3. 天冬	213	11. 牛蒡子	281
4. 牡蛎	213	12. 黄金菊	282
5. 水蛭	214	13. 胡芦巴	283
6. 枸杞子	215	14. 鸡冠花	284
7. 红曲	217	15. 马蔺	285
8. 薤白	220	16. 毛酸浆	287
9. 鳖甲	221	17. 鬼针草	289
五、其他单纯指标的测定	223	二、其他植物类中药的鉴定	291
1. 白芷	223	1. 甘草	291
2. 红花	225	2. 麦冬	292
3. 广藿香	226	3. 石蒜	293
4. 红景天	229	三、动物类中药的鉴定	295
5. 石菖蒲	231	1. 麝香	295
6. 黄花倒水莲	236	2. 南草蜥	297
7. 桃仁	239	3. 水城棘腹蛙	298
8. 水蛭	240	参考文献	299
参考文献	242	第七章 DNA 遗传标记鉴定法	301
第六章 细胞生物学鉴定法	245	第一节 基本理论	301
第一节 基本理论	245	一、遗传标记	301
一、染色质的结构	245	二、分子标记	302
二、染色体的结构	253	第二节 DNA 分子标记鉴定的	
第二节 染色体分析	255	常用方法	306
一、核型分析与带型分析	256	一、DNA 序列测定法	306
二、核型标记	258	二、随机扩增多态性 DNA	
三、性染色体分析	258	(RAPD) 分析	310
四、染色体多态性	260	三、任意引物 PCR (AP-PCR)	
第三节 常用中药鉴定举例	263	技术	311
一、果实及种子类中药的鉴别	263	四、限制性片段长度多态性	
1. 栀子	263	(RFLP) 分析	311
2. 枸杞子	266	五、扩增片段长度多态性	

(AFLP) 技术	311
六、SCAR 技术	312
第三节 中药 DNA 和 RNA 制备的	
基本方法	312
一、核细胞染色体 DNA 的制备	312
二、RNA 的制备	314
第四节 植物药 DNA 的制备	317
一、材料的预处理	317
二、试剂与仪器	318
三、原理和方法	318
四、多糖、多酚与其他次生物质的	
去除	320
第五节 动物药 DNA 的制备	322
一、材料的预处理	322
二、试剂与材料	322
三、原理和方法	322
第六节 常用中药鉴定举例	323
1. 当归	323
2. 人参	325
3. 浙贝母	328
4. 麻黄	331
5. 山参	332
6. 甘草	334
7. 鹿茸	336
8. 柴胡	337
9. 姜黄	339
10. 厚朴	341
11. 蛇胆	344
12. 玉竹	346
13. 木蓝属植物药	348
14. 蓼大青叶	349
15. 人参	351
16. 金银花	351
17. 溪黄草	352
18. 诃子	354
19. 山药	356

20. 石斛	359
21. 三七	359
22. 银杏	362

参考文献	364
------------	-----

第八章 mRNA 差异显示鉴

定法	366
----------	-----

第一节 基本理论	366
----------------	-----

一、mRNA 差异显示技术的基本	
原理	366

二、操作流程	367
--------------	-----

第二节 mRNA 差异显示鉴定的	
------------------	--

方法	367
----------	-----

一、材料与引物的选择	367
------------------	-----

二、RNA 的提取	368
-----------------	-----

三、逆转录和 cDNA 扩增	368
----------------------	-----

四、筛选和再扩增	368
----------------	-----

五、鉴定	369
------------	-----

第三节 差异表达基因芯片	369
--------------------	-----

一、基本原理与芯片的制作	369
--------------------	-----

二、差异表达基因芯片实验	
方法	370

三、差异表达芯片的应用	373
-------------------	-----

第四节 常用中药鉴定举例	374
--------------------	-----

1. 虹尾刺	374
--------------	-----

2. 全蝎	378
-------------	-----

3. 眼镜蛇	381
--------------	-----

4. 大黄	389
-------------	-----

5. 杜仲	392
-------------	-----

6. 葛根素	393
--------------	-----

7. 烟碱	397
-------------	-----

8. 雄黄	399
-------------	-----

9. 苦参碱	399
--------------	-----

10. 紫杉醇	401
---------------	-----

参考文献	405
------------	-----

第一章 概 述

第一节 中药生物鉴定的概念及其发展历程

一、中药生物鉴定的基本概念

生物鉴定 (bioassay) 法又称“生物检定”或“生物测定法”, 是利用中药或其所含的化学组分对生物体 (organism) 的作用强度, 以及用生命信息物质 (DNA、蛋白质等) 特异性遗传标记特征和基因表达差异等来鉴别中药品质的一种方法。换言之, 就是通过对中药生命信息物质和生物效应等的识别, 以达到品质鉴定目的的一种方法。目前主要分为生物效应鉴定法和基因鉴定法两大类。

生物效应鉴定法是利用药物对于生物 (整体或离体组织) 所起的作用, 测定药物生物活性 (biological activity) 强度或药理作用, 以鉴别中药品质的方法。该方法以药理作用和分子生物学为基础, 以生物统计学为工具, 运用特定的实验方法和病理模型, 通过比较被测物与相应的对照品在一定条件下产生特定生物反应的剂量比例, 测出药物的活性作用强度。常用的方法有免疫鉴定法、电泳鉴定法、生物效价鉴定法、单纯指标鉴定法、细胞生物学鉴定法等。基因鉴定法包括 DNA (deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸) 遗传标记鉴定法和 mRNA (messenger ribonucleic acid, 信使 RNA) 差异显示鉴定法等。

二、中药生物鉴定的发展历程

作为一种系统的中药鉴定方法学体系的提出, 中药生物鉴定法之名始见于 21 世纪高等医药院校教材《中药鉴定学》。

中药生物鉴定法孕育在长期的中药鉴定学发展过程中并逐渐形成, 它的出现弥补了中药理化鉴定方法的不足, 为中药品质鉴定提供了有效的手段。生物鉴定法是在分子生物学、细胞生物学、免疫学、受体学和药效学等现代技术基础上延伸出来的新的方法学体系, 归纳起来可分为以下几个阶段。

(一) 萌芽阶段

本阶段是伴随边缘学科的发展而发展起来的。20 世纪 60 年代亨尼希 (Hennig) 提出了生物学的分支系统学, 强调以共同祖先亲缘关系的近度作为种群关系的标准, 创立了祖征、衍征、外类群、近祖和近裔共性等概念和方法。

20 世纪 80 年代分子生物学理论和技术迅速渗入生物分类学, 形成了分子系统学 (molecular systematics)。分子系统学的问世, 把生物的形态学扩展到了生物信息学, 生物的三级信息物质 (DNA、RNA、蛋白质) 成为了有价值的分类指标。三级信息物质是物种特征的根本所在, 它可以反映生物遗传密码传递顺序。

生物分类学的发展引导了中药品质鉴定的现代化研究, 展示了中药信息物质用于品质鉴定的广阔空间。中药绝大部分来自于生物, 其优势品种 (物种) 经历了复杂的历史生态变迁过程。在长期的中药应用实践中, 人们逐渐认识到: 只有把握生物的信息特征, 才能把中药品质鉴定研究提升到新的层次和水平。

(二) 发展阶段

本阶段出现了现代生物技术用于中药鉴定的实例研究, 并取得了显著的成绩。

1. 免疫技术的应用

自 1971 年 Engvall 等建立了检测可溶性物质的酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 和 1972 年 Rubenstein 等建立了均相酶免疫测定 (即酶放大免疫分析, EMIT) 以来, 酶联免疫检测方法进展很快, 目前已成为一类较为成熟的方法。酶联免疫检测方法具有微量、特异性强、高效、经济、方便和安全等特点, 广泛应用于生物学和医药学的许多领域, 在理论研究和实际工作中都发挥了重要作用。

20 世纪 90 年代出现了利用中药的蛋白质和多糖等进行免疫化学、血清学和酶免疫技术等专属性鉴定方法的研究。

在此期间, 对植物类中药主要采用专属性强的生物初级或次级代谢产物与化学对照品比较测定, 作为中药品质标准或指标性成分。但大量的研究表明, 单一化学成分所表述的信息量有限, 中药基原的不同亲缘种、亚种间常含相同成分; 同一品种在环境因素作用下也可能含不同质和量的化学成分。动物类中药由于缺乏专属性的次级代谢产物, 用理化鉴定方法进行有效地鉴定有一定的困难。

丁培贤等采用免疫化学的方法鉴别虎骨、豹骨。冯振波等利用虎的血清蛋白对家兔进行免疫, 制备抗血清, 使用抗虎血清等分别与虎骨、狮骨、豹骨、猢狲骨、原猫骨、牛骨、羊骨、猪骨、熊骨的骨质蛋白进行环状沉淀反应, 结果均未出现交叉反应, 证明该鉴定方法具有专属性。

日本学者使用家兔获得了高效价的抗牛黄、抗地龙的抗血清, 并用其鉴定中成药, 证实了这两种血清与存在于成药的抗原成分发生反应, 既能用于定性也能用于定量。

吴谦等采用 ELISA 确证了长牡蛎特征蛋白抗原, 制备免疫抗血清, 对海王牡蛎胶囊中的原料药牡蛎成功地进行了鉴别和含量测定。该技术的缺点是实验周

期长,所需动物量大,特异性高的抗体不易制备;免疫血清存在交叉反应(属于多克隆抗体);干燥中药各种蛋白的降解较难解决,导致了该技术在中药鉴定应用中的局限性。

亦有采用免疫印迹法(immunoblotting)鉴定的实例,该方法既可原位转印电泳区带、辅助确证品种特征抗原分布,也可以把供试品点样于硝酸纤维素膜上直接进行斑点酶联免疫吸附测定法(dot-ELISA)鉴定。

2. 电泳技术的应用

来自于生物的中药普遍含有受遗传基因控制的蛋白质或酶,利用蛋白质或酶分子的电泳谱带特征可达到鉴定的目的。

一般采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),把中药所含的全蛋白分散开来,染色后就可看到不同的蛋白质谱带。通过分析谱带数目、宽窄、位置及染色程度等,可获得专属性的鉴定信息。

1981年,王龙首次报告了采用电泳法鉴别虎骨的实例。随着大分子印迹技术、计算机技术的发展,蛋白质印迹技术大大地改善了电泳分析手段,电泳图谱也可用自动成像仪扫描,由计算机进行结果分析和统计学处理,使结果的准确性和客观性显著提高。

3. 同工酶分析技术的应用

在生物的不同个体、同一个体的不同组织,或生长发育的不同阶段,都可以检测到一系列功能相同、结构上略有差异的酶存在,这就是同工酶。同工酶的变异非常丰富,结构的差异直接来源于基因的差异,并能够稳定地遗传。因此,用它可以鉴别许多从外部形态上难以区分的遗传变异。另外,由于同工酶分析系统采用酶活性染色和电泳检测,非酶类成分不被显示,其电泳图谱往往比蛋白质电泳图谱清晰。

利用同工酶作为遗传标记进行某些中药和药用植物的鉴定是一种行之有效的方法。赵华英等对忍冬藤(*Lonicera japonica* Thunb.)、何首乌藤(*Polygonum multiflorum* Thunb.)、南蛇藤(*Celastrus orbiculatus* Thunb.)等6种藤茎类中药进行了过氧化物酶、酯酶和淀粉酶的同工酶电泳分析,其中过氧化物同工酶的谱带最清晰,其谱带数及迁移率各不相同,能显示种间的明显区别特征。张渝华等对紫堇属8种及2个变种进行了过氧化物同工酶酶谱分析,证明该属的药用植物种间差异明显。

为了防止酶失活,同工酶分析技术一般使用新鲜样品,取样必须是新陈代谢活跃的部位,分析条件比蛋白质要求高。这也限制了同工酶分析技术在干燥中药鉴定上的应用。另外,同一个体不同生长时间、不同药用部位、不同炮制方法和储藏条件,都可能造成同工酶的不同差异,所以,解决特异性和代表性是该方法的关键问题。

4. 细胞生物学技术的应用

细胞生物学技术主要用于药用植物的基原鉴定,一般采用染色体鉴别技术。染色体是遗传基因的载体,生物在一个种群的所有个体和同一个体的所有体细胞中染色体的形态、组型与带型都是一致而稳定的,具有一定的专属性。

杨蕾等对葱属 (*Allium*) 植物 6 个种 11 个居群的染色体的数目和核型进行了研究,发现了韭菜 (*A. tuberosum*) 的野生二倍体居群,为各供试品的种内群间关系和核型研究打下了基础。

景望春等对葱属宽叶组 (*A. sect. anguinum*) 的 5 个种及 3 个变种 23 个地方居群进行研究,发现总体上组内的核型表现出较大的相似性,但在种间和种内各居群间也存在一定差异,主要表现为有的种内存在染色体的倍性变化,染色体在种间和种内表现出一定的多态性。

染色体分析其取材一般均需新鲜组织,获得的鉴定特征信息如染色体数目和形态、相对长度、着丝点位置等较少,虽然核型分析可以反映出染色体的结构变化,但不能显示出个体基因的变化,因此对于多种近缘属的药用植物难以达到鉴定的目的。

虽然上述这些方法与传统的中药鉴定相比有一定的优越性,然而这些鉴定的依据几乎均为生物体的遗传表现型,它们不仅受到遗传因素的影响,而且与生长发育阶段、环境、加工炮制等有着密切的关系,具有较大的差异性。因此,上述鉴别技术难免存在主观性强、重复性和稳定性差的特点。

5. DNA 分子标记技术的应用

20 世纪 90 年代随着分子遗传学和基因工程技术的发展和广泛应用,利用现代生物学技术构建中药 DNA 指纹图成为可能。DNA 是绝大多数生物遗传信息的载体,由于 DNA 指纹图具有高度种属和个体特异性,因而以其作为中药鉴别技术具有准确性和科学性等特点。在 DNA 分子水平上,限制性片段长度多态性 (PFLP)、聚合酶链反应 (PCR) 已经逐渐成为中药基因多态性检测的常规技术,而在其基础上建立的随机扩增多态性 DNA 指纹分析 (RAPD)、任意引物 PCR 反应技术 (AP-PCR) 和限制性内切酶酶切片段长度多态性分析则是发展起来的基因鉴定行之有效的办法。

1993 年荷兰 Keggene 公司 Zabeau 和 Vos 等结合 RFLP 和 PCR 技术的优点,发明了扩增片段长度多态性 (AFLP) 标记方法,为不同来源基因组分析提供了技术支持,曾在玉米、西红柿等农作物的改良研究上得到了较好的应用,对中药良种选育、道地性鉴定具有重要意义。邵鹏柱等报道了用 AFLP 法鉴定人参、西洋参不同产地遗传差异的特征。王亚明等人成功地从保存 9 年以上的中药龟甲和鳖甲中提取出了 DNA,并用细胞色素 b 基因片段的通用引物对通过 PCR 扩增到了长约 500bp 的 DNA 片段,提供 PCR 技术鉴定中药的基础资料。

1994 年香港学者采用 AP-PCR 指纹图技术对人参和西洋参进行了基原鉴别。之后便出现了定量 PCR (Q PCR system) 技术, 定量 PCR 一般采用已知模板同步内标, 通过标记物探针杂交绘制标准曲线, 使用 Q PCR 仪定量复制, 只须简单运算即可知原始拷贝数。

20 世纪 80 年代初 Botsteh 首先提出利用 RFLP 作为标记构建遗传图谱, 直到 1987 年 Donis Keller 等人才构建出第一个人的 RFLP 图谱。此后, 人们便开展起分子水平上 DNA 多态性的应用研究。水上员等对日本 8 个产地的柴胡采用水稻 rDNA 作为探针, 用限制性核酸内切酶 *Dra* I、*Kpn* I、*Taq* I 酶解进行 RFLP 分析, 结果发现不同地理品系的 RFLP 图谱明显不同。他们还采用 *Dra* I、*Kpn* I、*Eco* RV、*Sac* I 对中国和日本野生的苍术类共 19 个地理品系进行酶切, 结果显示, 日本所产的茅苍术与中国所产的茅苍术基本一致, 并能明显区分茅苍术、白术及关苍术。

Yamazaki 等采用 RFLP 方法分析羽扇豆属 (*Lupinus*) 5 种药用植物的亲缘关系及与其双稠哌啶类生物碱的相关性, 结果表明 RFLP 可以区别这些羽扇豆属药用植物。

Liston 应用 PCR 将黄芪属 (*Astragalus*) 14 个近缘种叶绿体基因组一段约 4.1kb 的片段扩增出来, 然后用 23 种不同的限制性酶酶解 PCR 产物, 发现了 37 个突变点和 1 个 10bp 的长度变异。丁士友等在此基础上, 用 PCR 将黄芪亚族 7 属 9 种及甘草亚族 1 属 4 种植物叶绿体基因组中 *ndhF* 和 *psbA* 基因中一段约 3.1kb 的 DNA 扩增出来并进行酶切, 为黄芪亚族的分子分类打下了良好的基础。何兴金等用 PCR 对代表中国全部 9 组 18 种葱属植物进行扩增, 得到了叶绿体的 2520bp 的 *trnK* (TRNA-Lys) 和 1230bp 的 *rpl16* (ribosomal protein L 16) 2 条基因, 又用 26 种内切酶进行酶解, 将所得片段与以往结果对比, 从分子水平上探讨了葱属植物的系统发育。

Mizukami 等采用 *Hind* III 酶解 5S rRNA 扩增的基因片段, 鉴别了当归、柴胡、北沙参等中药。山崎美保等应用 PCR-RFLP 鉴定了花鹿茸和马鹿茸。

1990 年 Williams 和 Welsh 几乎同时采用 PCR 技术建立了 RAPD 检测方法。山崎等采用 RAPD 和 RFLP 两种分子标记方法研究了 4 种甘草属植物遗传关系, 结果发现富含甘草甜素 (glycyrrhizin) 的品种光果甘草和甘草之间遗传关系非常相近, 这两者与不含甘草甜素或含量极低的刺甘草和刺果甘草的遗传关系较远, 与植物分类学研究的相吻合。Nabai 等采用 RAPD 标记方法对淫羊藿属 8 种植物进行了鉴定。Kohjyouma 等对日本野生或栽培的茅苍术及其变种、北苍术、关苍术和白术采用 RAPD 分析它们的挥发油组成和亲缘关系, 结果表明苍术酮 (atractylon) 不仅在关苍术和白术中存在, 而且在茅苍术及其变种中也有发现。曹晖等利用 AP-PCR 和 RAPD 分子标记技术对蒲公英及其 6 种土公英混淆品进

行了 DNA 指纹鉴别研究,结果显示它们的 DNA 指纹图谱存在明显的差异,利用这种差异可从分子水平上鉴别蒲公英及其相似品。

Mizukana 等从当归、三岛柴胡、珊瑚菜的鲜茎中提取 DNA,用 5S rRNA 的通用引物对进行扩增,得到了 300bp 片段的产物,经测序后发现,2 个栽培品系间的 5S rRNA 基因片段上第 202 号、第 207 号、第 254 号核苷酸序列不同,而中药当归的扩增产物与日本当归完全一致,即可用 5S rRNA 分析中药当归的基原。

葛颂等采用 PCR 直接测序法,对沙参属全部 2 组 7 亚组的 10 个种及作为外类群的风铃草属 2 个种的核糖体 DNA ITS (内转录间隔区) 片段进行了序列分析。结果表明,在沙参属中 ITS 片段在长度、GC 含量和位点变异上均比较一致;沙参属种间在 ITS 片段上的分化很小 (0~3.9%),沙参属与风铃草属间的分化却很高 (17.8%~19.2%)。

Fushimi 等通过变异等位基因扩增技术 (MASA) 对 *mat K* 基因片段测序发现,人参、西洋参与竹节参间的 *mat K* 基因片段上第 102 号核苷酸序列不同。Wen 和 Zimmer 对人参属 12 种植物的 ITS 区和 5.8S rRNA 基因进行了序列分析,结果表明:在美洲东北部的 2 个种西洋参与三叶人参 (*P. trifolium* L.), 西洋参与东亚种人参、竹节参、三七具有更近的亲缘关系,而且 ITS 序列证明人参、西洋参和三七不是一个单系群 (monophyly)。

王建云等从鸡内金中提取 DNA,采用 *cyt-b* 基因特异扩增,得到 1 个长度约为 300bp 的片段, DNA 测序得到约 143 个碱基的序列片段,其中 36 个碱基的差异可以明确区分鸡内金和鸭内金。并用 *cyt-b* 基因中的 L14841 和 H15149 引物对鹿鞭进行了鉴定。吴平等在鳖甲和龟甲的研究中,用线粒体 12S rRNA 的引物进行扩增,鉴定了不同的品种。

20 世纪 90 年代后期李萍等将 DNA 分子遗传标记技术在中药鉴定中的应用以概述的形式载入全国高等医药院校的教材《生药学》中。

(三) 完善和成熟阶段

本阶段出现了中药生物鉴定方法的理论体系,并作为中药鉴定的五大方法之一。21 世纪初期生物技术在中药鉴定中的应用得到了快速的发展,在通过对应应用成果的系统整理的前提下,生物鉴定技术在中药鉴定中的应用得到了科学理论的提升和方法学的延伸,张贵君等提出了中药生物鉴定法的理论、概念和方法学体系,归纳为生物效应鉴定法和基因鉴定法两大类,作为一种独立的中药鉴定方法学成功地载入了 21 世纪全国高等医药院校教材《中药鉴定学》中,并佐以人参 (植物药)、鹿茸 (动物药) 和注射用双黄连 (中成药) 等鉴定实例。

中药生物鉴定法作为中药品质鉴定的有效方法,是中药现代化的产物,方兴未艾,具有广阔的发展空间和应用前景。

第二节 中药生物鉴定的常用方法

一、免疫鉴定法

免疫鉴定法是利用中药含有的特异蛋白为抗原制备的特异抗体，与供试品中特异抗原结合产生沉淀反应的一种方法。它是通过制备特异抗原试剂，采用免疫电泳（immuno-electrophoresis）或琼脂免疫扩散等方法达到鉴定目的的。本方法具有专属性强的特点，适用于中药的品质鉴别。它涉及的相关技术主要有血清学方法、药理学方法、受体学方法、免疫化学方法、酶联免疫法、免疫印迹法等。

其中利用中药含有多糖类、蛋白质等具有抗原决定簇的大分子，用它们制成特异性抗体（抗血清）进行中药鉴定，是一种具有高度选择性的血清学鉴定方法。血清学鉴定法可用于来源科以上到种以下各分类等级的药用动植物分类，也可以用于药用动植物的亲缘关系研究。血清学鉴定特征的研究对中药复方制剂的鉴定具有适用性和重要价值。

血清学鉴定法中比较重视免疫印迹法（immuno blotting）。该法既可原位转印电泳区带，协助确证中药特征抗原分布，也可把待鉴别供试品点在硝酸纤维素膜上，直接进行斑点酶联免疫吸附测定法（dot-ELISA）鉴别。

该方法的缺点是：实验周期长，所需动物量大，特异性高的抗体不易制备；免疫血清属于多克隆抗体，存在交叉反应，干燥中药各种蛋白的降解较难解决。

二、电泳鉴定法

电泳（electrophoresis, EP）是一种分离和鉴定混合物中带电离子的技术，其原理是利用中药含有蛋白质带电荷的成分，在同一电场作用下，由于各组分带电荷的性质、电荷数目以及分子质量不同，而泳动方向和速度不同，在一定时间内，各成分的泳动率不同，结合谱带数和染色不同达到鉴定的目的。本方法用于含有蛋白质、多肽和酶类等中药的鉴定，其特点是快速、准确、专属性强、灵敏度高、重现性好。鉴定对象多数为动物药类，植物药的果实和种子类、部分根及根茎类中药，以及含有上述成分的中成药。

常用的方法有 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点聚焦凝胶电泳、不连续性聚丙烯酰胺凝胶电泳、醋酸纤维素薄膜电泳、区带毛细管电泳、胶束毛细管电泳等。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）具有机械性能好、与被分离物质不起反应、对 pH 值和温度变化较稳定、重复性好、灵敏度高等优点。聚丙烯酰胺凝胶电泳是由丙烯酰胺和 N,N'-亚甲基双丙烯酰胺在催化剂作用下聚合交联成三维网

状结构的凝胶，并以此为支持物的电泳技术。在电泳开始阶段，由于连续 pH 梯度作用，将样品压缩成 1 条狭窄的区带（浓缩效应），从而提高样品的分离效果。

三、生物效价鉴定法

生物效价鉴定（estimation of biological potency）就是测定药物对生物机体某方面作用的强度。如黄连、黄柏、黄芩等具清热功效中药的抑菌率或抗菌效价（titer）的测定，对洋地黄强心指标生物效价的测定等。生物效价鉴定法也叫生物检定或生物测定法，换言之，是利用生物体的反应来鉴定中药有效成分的含量或效价，测定药物的疗效和毒性（toxicity）的方法。

有些中药，如洋地黄及其制剂、铃兰毒苷及其注射液，到目前为止还没有找到一种比较合适的化学分析方法来确定它们的有效成分含量或效价。所以，就宜用生物效价鉴定法进行测定。生物效价鉴定法的原则是将供试品与对照品（包括中药，纯成分）在严格规定的条件下，比较它们对生物体所产生的反应强度，再计算出中药或其制剂的剂量标准。中药的效价通常以 1g 中药中所具有的“作用单位”数来表示。这种单位是指在一定条件下所表现一定生理作用的最小剂量。例如，《中华人民共和国药典》（2005 版）规定洋地黄制剂的质量标准：洋地黄叶（folium digitalis）要保证同样洋地黄制剂的各种商品的效价一致，而并不是为了使不同的精制强心苷效价相等。因为这种方法不能把它在肠内吸收的差别、作用的快慢以及效力的久暂等估计在内。此种生物效价鉴定法包括蛙法、猫法、豚鼠法及鸽法等。

四、单纯指标鉴定法

单纯指标鉴定法就是测定某药物或某类药物某一特性或某一药理作用的强弱。如对含皂苷类中药溶血指数的测定，如使用溶血法鉴定柴胡和大叶柴胡；对含苦味中药苦味指数的测定；对含蒽醌类大黄的泻下作用的测定；对青黛中靛玉红、两头尖中竹节香附素 A 的抗癌活性的测定；对黄芪中黄芪皂苷甲、三七中三七皂苷降血压和扩张血管作用的测定；对人参中人参多糖、刺五加根中刺五加多糖和红花多糖的免疫作用的测定；对三七抗凝血作用的测定等。

五、细胞生物学鉴定法

细胞生物学鉴定法主要是采用染色体（chromosome）的分类技术对中药进行鉴定。染色体是遗传基因的载体，中药某个特定种群的生物体细胞中染色体的形态、组型、带型是稳定不变的，代表着该种群的基本遗传特征，根据该特征即可以鉴定中药的品种。本法根据染色体的排列，制成核型模式图；或用“不对称核型分类”标准确定其核型，并与染色体的背景资料比较，达到鉴定的目的。由