

## · 巴西草药研究专题 ·

# 基于 DNA 条形码—产地—形态分析联用的巴西草药 *BARDANA* (牛蒡) 的品种鉴定及高效液相色谱研究

余春霞 顾选 李妍芃 肖瑶 赵百孝 刘春生 马长华 韩丽

**【摘要】** 目的 对巴西草药牛蒡的品种进行鉴定,同时研究其中的牛蒡苷含量,为其品种整理和药理研究提供依据。方法 利用 DNA 条形码—产地—形态分析联用技术鉴定巴西草药牛蒡的基原,高效液相色谱法测定其牛蒡苷含量。结果 DNA 条形码初步鉴定巴西草药牛蒡为菊科牛蒡属植物,且与牛蒡达到最高相似度 99%,产地及形态分析进一步确证其为牛蒡的地上部分;巴西牛蒡草中牛蒡苷平均含量为 0.281%,明显低于中国牛蒡草牛蒡苷平均含量 3.72%。结论 巴西草药牛蒡来源于牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥地上部分,其牛蒡苷含量极低。

**【关键词】** 巴西草药; 牛蒡; 品种鉴定; 牛蒡苷

**【中图分类号】** R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.006

**Research on the source of varieties and high performance liquid chromatography of Brazilian herb *BARDANA* based on a combined analysis of DNA barcoding-origin-morphology** YU Chun-xia, GU Xuan, LI Yan-peng, et al. Henan Province for Drug Evaluation Certification Center, Zhengzhou 450004, China

Corresponding author: LIU Chun-sheng, E-mail: max\_liucs@263.net

**【Abstract】 Objective** To trace the source and study on the content of arctiin of Brazilian herb *BARDANA* for varieties systematics and pharmacological analysis. **Methods** The source of varieties of Brazilian herb *BARDANA* was identified by a technology combined DNA barcoding, plant geographical origin and morphological features, and the content of arctiin was analyzed by HPLC. **Results** DNA barcoding preliminarily identified *BARDANA* belongs to the stretch of *Arctium* of Compositae with a similarity level of 99%. Geographical and morphological verification further confirmed the aforementioned finding. The content of arctiin in the Brazilian was 0.281%, which was significantly lower than the Chinese arctiin (3.72%). **Conclusion** Brazilian herb *BARDANA* derives from *Arctium lappa* L., and the content of arctiin was very low.

**【Key words】** Brazilian herb; *BARDANA*; Source of varieties; Arctiin

由于中医药事业的蓬勃发展和全球化趋势,世界各民族医药理论和应用对中医药都存在着一定

的影响,尤其在所用药物方面存在很多交集。因此,国内外各民族药的研究有利于丰富中药资源品种和促进中药的安全、有效使用,对实现可持续发展具有重要意义。目前在巴西已开发和有待开发的药用植物很多,并且国家也逐渐重视对植物药的研究和开发工作。有文献记载,巴西使用的药用植物中约有三分之一的种类与中国相同或为近缘种,但其中某些种类的使用方法、部位或主治证有所差异<sup>[1]</sup>。药用植物多在巴西偏僻乡村和印第安部落,一些仍处于原始状态。因为诸多因素,过去的几个世纪里巴西没有植物药药典,相关知识和使用主要是口

基金项目: 国家国际科技合作专项(2011DFA31370)

作者单位: 450004 郑州,河南省药品审评认证中心(余春霞);北京华邈中药工程技术开发中心(顾选);北京中医药大学中药学院[李妍芃(硕士研究生)、肖瑶、刘春生、马长华],针灸推拿学院(赵百孝),养生学研究所(韩丽)

作者简介:余春霞(1972-),女,本科,工程师。研究方向:中药制剂与分析。E-mail: ycxzzh@126.com

通讯作者:刘春生(1964-),博士,教授,博士生导师。研究方向:药用植物与分子生药。E-mail: max\_liucs@263.net

授家传;没有权威配伍药方,大多是单方茶剂。20 世纪后半叶,由于科学的发展、中医中药的推广和人们对自然养生及自然疗法的追求,巴西政府开始在植物药研究和开发上进行投资<sup>[2]</sup>。之后巴西出版了许多刊物对已知和常见的药用植物进行介绍,同时及时报道本国或其他国家新开发的药用植物,这些都对巴西草药的开发应用研究具有重要意义。然而,由于地区间的发展不平衡,巴西民族药的研究开发存在一定的滞后现象,往往存在口耳相传、缺少文献记载、使用特殊的语言符号收载、品种混乱、基原和资源量不清、入药部位混乱、品质不详等现象。

巴西草药基原品种和质量尚不明确,导致药材的使用和开发受到一定的限制,因此有必要对其进行品种整理和品质评价。近年来 DNA 条形码鉴定已成为生物分类学和物种鉴定的热点之一<sup>[3]</sup>,在药用植物种质资源研究中的应用与成果已经被国内外学者所肯定<sup>[4]</sup>。本文报道运用课题组建立的 DNA 条形码—产地—形态联用分析方法和高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC)对巴西草药牛蒡进行品种鉴定和质量研究,以期对巴西草药的品种整理和合理应用,亦为进一步开发和扩大药用植物资源和促进中医药事业的发展提供支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

巴西草药牛蒡(巴西名 BARDANA)3 份,每份约 200 g,2012 年 4 月购自巴西隆城药材集散地,样品的凭证标本保存于北京中医药大学标本室。中国牛蒡草(购于北京同仁堂药店)经北京中医药大学刘春生教授鉴定为菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的地上部分。

安捷伦 LC 1100 液相色谱仪(美国安捷伦科技公司),FW-100 粉碎机(北京中兴伟业仪器有限公司),电子天平 sartorius AG BS110S(北京赛多利斯仪器系统有限公司),KQ-300DB 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

牛蒡苷(规格 20 mg,批号为 110819-201108,中国药品生物制品检定所),甲醇(色谱纯,美国 Fisher 公司),娃哈哈纯净水。

### 1.2 方法

巴西草药牛蒡品种鉴定采用 DNA 条形码—产地—形态联用鉴定方法<sup>[5]</sup>。按照 2010 版《中华人

民共和国药典》(一部)规定的牛蒡子含量测定项下牛蒡苷的测定方法进行含量测定<sup>[6]</sup>,每批样品平行测定 3 次,取平均值。

## 2 结果与分析

### 2.1 品种鉴定

2.1.1 基于 DNA 条形码的鉴定 3 份样品的测序峰图良好,测序结果一致,故选取一条序列用于后续分析。截取 ITS 片段后,经美国国立生物技术信息中心数据库检索,样品与菊科牛蒡属 *Arctium* L. 植物相似度最高,相似度范围为 97% ~ 99%,与其他属相似度均低于 97%。因此,该样品来自菊科牛蒡属植物。种的鉴定根据分子鉴定指标(相同物种相似度达到 97% 以上),牛蒡 *Arctium lappa* (GU724290.1,99%)、毛头牛蒡 *Arctium tomentosum* (GQ281034.1,98%) 及小牛蒡 *Arctium minus* (KC603906.1,98%) 植物可能为巴西草药牛蒡的基原,其中最佳鉴定结果为牛蒡 *A. lappa*。

2.1.2 基于产地分析的鉴定 根据 DNA 条形码鉴定结果进行产地验证,《Uso Tradicional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos》(《传统药用植物和草药的使用》)中记载 *A. lappa*,并且为药用植物,进一步验证巴西草药牛蒡的基原为牛蒡 *A. lappa*。

2.1.3 基于形态分析的鉴定 本品经过加工,叶片完全破碎,握之成团,可见白色蛛丝状柔毛黏连。由叶片及少量叶柄组成。上表面多绿色无毛,下表面密被灰白色蛛丝状绒毛,叶柄空心,较粗壮,具纵沟,微带紫色,生有微毛。体轻质脆,气微特异,味苦,苦味较重且持久,嚼之有胶质感,且有细渣残留感。不易吸水,浮于水面。见图 1。

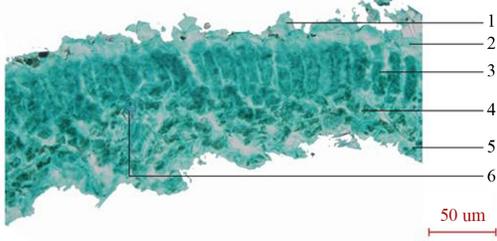


图 1 巴西草药牛蒡的性状图

制作叶片的显微横切片,上表皮细胞呈长方形,下表皮细胞较小,呈略扁圆形,大小不一,有较多气孔与非腺毛。叶组织结构为叶内栅栏组织 1 ~ 2 层,海绵组织 4 ~ 6 层,排列疏松。叶内可见小型导

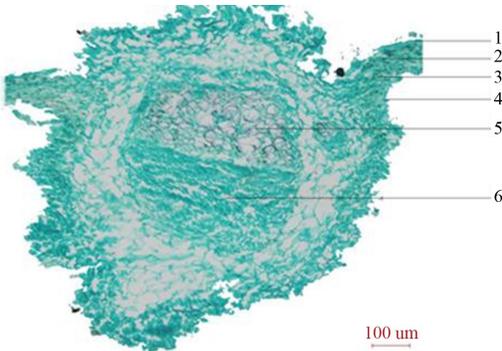
管。上面主脉不明显,下面主脉显著突出,主脉维管束外韧型,韧皮部与木质部均近半圆形,维管束类圆形。见图 2~图 3。

粉末深绿色。非腺毛多为多细胞,基部多个细胞呈圆柱形渐小,顶端锐尖或多数一条或分叉形成几条细长单细胞,单细胞易错结成团;少数单细胞,内陷,呈倒圆锥形。气孔不等式,副卫细胞 4 个,呈花瓣状围绕气孔,表皮细胞多角形,细胞壁微呈波状。叶柄表皮细胞略显紫红色,近长方形。叶主脉处表皮细胞近长方形或多角形,沿一定方向排列,较整齐。螺纹导管或网纹导管较易见。见图 4。



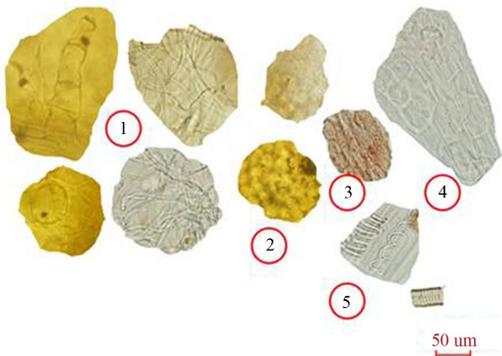
1. 非腺毛; 2. 上表皮; 3. 栅栏组织; 4. 海绵组织; 5. 下表皮; 6. 导管

图 2 巴西草药牛蒡的叶横切面显微图



1. 上表皮; 2. 栅栏组织; 3. 海绵组织; 4. 下表皮; 5. 木质部; 6. 韧皮部

图 3 巴西草药牛蒡的叶子(主脉)显微图



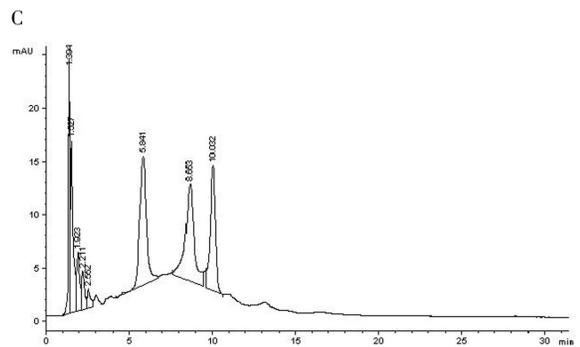
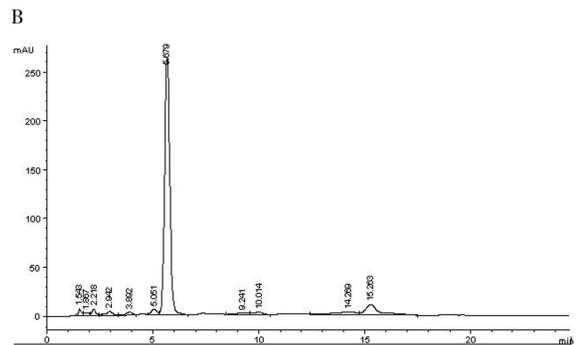
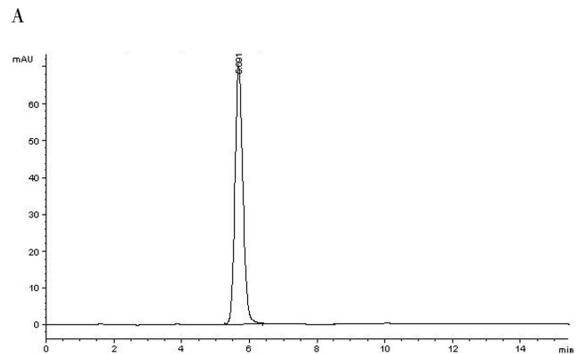
1. 非腺毛; 2. 气孔; 3. 叶柄表皮细胞; 4. 叶(主脉处)表皮细胞; 5. 导管

图 4 巴西草药牛蒡的粉末显微图

形态分析结果表明,本品与菊科植物牛蒡 *Lappa* 的干燥地上部分的特征相符合。

### 2.2 质量研究

将配制好的牛蒡苷标准品溶液、中国牛蒡草和巴西牛蒡草样品溶液在规定的色谱条件下进样,结果如图 5。牛蒡苷对照品、中国牛蒡和巴西牛蒡样品的保留时间分别为 5.691 分钟、5.679 分钟和 5.841 分钟,均呈现尖峰且基线分离,杂峰少,表明该色谱条件可用于牛蒡苷的定量检测。



A 牛蒡苷对照品色谱图 B 中国牛蒡草样品色谱图 C 巴西牛蒡草样品色谱图

图 5 对照品溶液及各试品溶液的 HPLC 图

6 批中国和巴西牛蒡中牛蒡苷的含量见表 1,中国牛蒡草中牛蒡苷的平均含量为 3.72%,巴西牛蒡草中牛蒡苷的平均含量为 0.28%,可以看出中国牛蒡草中牛蒡苷含量远高于巴西。(下转本期 1349 页)