

· 巴西草药研究专题 ·

基于“二维特征鉴别法”的巴西草药 *TANCHAGEM* 真伪鉴别

徐文英 马恺悦 冯孟鑫 顾选 李妍芃 赵百孝 刘春生 马长华 韩丽

【摘要】 目的 综合巴西草药 *TANCHAGEM* 的化学与遗传学信息对其进行质量控制。方法 利用“二维特征鉴别法”,即 DNA 条形码技术联用 HPLC 技术的方法,鉴定巴西草药 *TANCHAGEM* 的基原,并测定其大车前苷的含量。结果 DNA 条形码初步鉴定巴西草药 *TANCHAGEM* 为车前科车前属 *Plantago* L. 植物,且与中药车前草相似度达 99% 以上;巴西车前草、中药车前草中均含有 2010 年版《中华人民共和国》(一部)规定指标成分大车前苷,含量分别为 0.1025% 和 0.1030%。结论 巴西草药 *TANCHAGEM* 为巴西车前草,其大车前苷含量与中药车前草含量相近。本实验为车前草品种的质量控制、资源普查、新品种选育提供一定的参考依据。

【关键词】 巴西草药; 车前草; 特征图谱; DNA 条形码; 大车前苷

【中图分类号】 R284 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.011

Research on authentication of Brazilian herb *TANCHAGEM* based on “Two Dimensional Feature Identification Method” XU Wen-ying, MA Kai-yue, FENG Meng-xin, et al. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China

Corresponding author: MA Chang-hua, E-mail: machanghua60@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To control the quality of Brazilian herb *TANCHAGEM* by chemical and genetic information. **Methods** The method of “two dimensional feature identification method”, that is, DNA barcodes technology combined with the HPLC technology, it was used to identify the botanical origin of Brazilian herb *TANCHAGEM* and detect the content of plantagoside. **Results** DNA barcoding method showed Brazilian herb *TANCHAGEM* was belong to *Plantaginaceae Plantago* L. and the similarity between *TANCHAGEM* and Chinese *plantago asiatica* was more than 99%. The plantagoside was existed in both Brazilian herb *TANCHAGEM* (contents was 0.1025%) and Chinese *plantago asiatica* (contents was 0.1030%) which was specified index component in Chinese Pharmacopoeia index components. **Conclusion**

Brazilian herb *TANCHAGEM* is considered *plantago asiatica* in Brazilian, and the content of plantagoside is similar with Chinese *plantago asiatica*. This experiment provided a reference for quality control, resource survey and breeding of new varieties.

【Keywords】 Brazilian herb; Plantaginis herba; Characteristic patterns; DNA barcoding; Plantagoside

车前草为车前科 *Plantaginaceae* 植物车前 *Plantago asiatica* L. 或平车前 *Plantago depressa* wild.

的干燥全草,是 2010 年版《中华人民共和国》(一部)收录的常用中药。车前草性寒,味甘,具有清热利尿、祛痰、凉血、解毒之功效,用于水肿尿少、暑湿泻痢、痰热咳嗽、痈肿疮毒等症^[1]。*TANCHAGEM* 为巴西的常用草药,根据《葡汉词典》^[2],*TANCHAGEM* 在葡萄牙语中意为车前草,其药物性状与功能主治也与中药车前草类似,但由于巴西各地区间发展不平衡,其民族药的研究开发往往存在缺少文献记载、品种混乱、基原不清、品质不详等现象^[3]。因此,为解决上述质量控制中存在的问题,本课题组

基金项目: 国家国际科技合作专项 (2011DFA31370)

作者单位: 100102 北京中医药大学中药学院[徐文英(硕士研究生)、马恺悦(硕士研究生)、冯孟鑫(硕士研究生)、李妍芃(硕士研究生)、刘春生、马长华], 针灸推拿学院(赵百孝), 中医养生研究所(韩丽); 北京华邈中药工程技术开发中心(顾选)

作者简介: 徐文英(1988-),女,2012 级硕士研究生硕士。研究方向: 药品质量控制。E-mail: 903074743@qq.com

通讯作者: 马长华(1960-),本科,教授,硕士生导师。研究方向: 药品质量控制。E-mail: machanghua60@sina.com

对巴西草药 *TANCHAGEM* 进行全面的质​​量研究,提出了一种新型研究思路“二维特征鉴别法”,即从药物本身的化学特征和遗传学特征两方面入手,先采用 DNA 条形码技术对药物的基原进行确定,解决“真伪问题”;再通过 HPLC 技术对药物的化学信息进行检测,解决“优劣问题”。

首先采用 DNA 条形码技术并利用 ContigExpress 软件,检索 NCBI 中注册的与巴西草药相似度最高的物种,以相似度 97% 以上为物种溯源依据,确定其基原。其次以车前草的专属性成分大车前苷为其指标成分,利用 HPLC 法比较巴西草药 *TANCHAGEM* 与中药车前草中大车前苷的含量,综合两者结果为巴西草药 *TANCHAGEM* 及相关制剂的质量标准制订提供科学依据^[4-10]。

1 材料与仪器

1.1 材料

药材:巴西草药 *TANCHAGEM* 三份(巴西隆城市场),样品的凭证标本保存于北京中医药大学大学标本室;中药车前草(北京市花家地南里同仁堂药店,经北京中医药大学刘春生教授鉴定为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 的干燥全草),大车前苷(中国药品生物制品鉴定所,批号:111833-201102)。试剂:乙腈(色谱纯, Fisher), 甲醇(色谱纯, Fisher), 娃哈哈纯净水,液氮。

1.2 仪器

植物 DNA 提取试剂盒(北京博迈德生物有限公司,批号:69691125)、TProfessional 型 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司,批号:20092237)、ContigExpress 软件、FW400A 高速万能粉碎机(北京科伟永兴仪器有限公司)、Sartorius BS110S 分析天平、KQ-400KDE 型高功率数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)、Waters 1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)、Breeze 2 HPLC 色谱工作站、Waters 2998 二极管阵列检测器、Waters 2707 自动进样器、Waters 038040 柱温箱、资生堂 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。

2 方法与结果

采用 DNA 条形码技术及 HPLC 技术对巴西草药 *TANCHAGEM* 以及中药车前草进行检测分析。

2.1 DNA 条形码分析

2.1.1 DNA 提取和 PCR 扩增 取巴西样品,一式

三份,分别用液氮冷冻后研磨成细粉,采用植物 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。采用 ITS 序列通用引物,上游 P1:5'-AGAAGTCGTAACAAGGTTTC-3'; 下游 P4:5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3',在 PCR 扩增仪上进行扩增。PCR 扩增条件:50 μL 体系含 2×Taq PCR MasterMix 25 μL,引物 P1 和 P4 各加 2.5 μL(5 μmol/L),DNA 模板 4 μL, ddH₂O 16 μL。PCR 扩增程序:94℃ 预变性 5 分钟,94℃ 变性 1 分钟,55℃ 退火 1 分钟,72℃ 延伸 1 分钟,40 个循环后,72℃ 延伸 10 分钟。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下检视,产物均由上海生工生物工程技术有限公司测序部测序。各样品均采用正向和反向测序,以保证测序的准确性。



图 1 *TANCHAGEM* 的性状图

2.1.2 序列分析方法 利用 ContigExpress 软件对测序获得的正、反向序列进行拼接,根据 NCBI 中 BLAST 功能,检索 NCBI 中注册的相似度最高的物种,按照相似度最高的物种截取 ITS 全长。以相似度 90% 以上为属的溯源依据,以相似度 97% 以上为物种溯源依据,获得溯源结果。

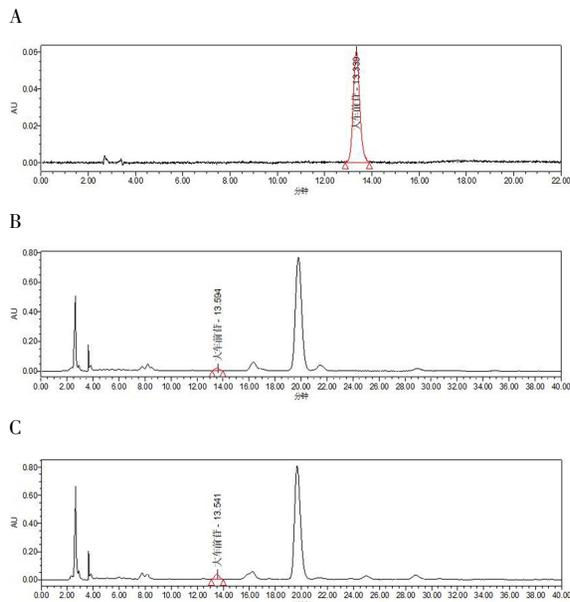
2.2 特征图谱分析

2.2.1 对照品及供试品溶液的制备 对照品溶液的制备 取大车前苷对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加 60% 甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,即得。取样品粉末(60 目)1 g,一式三份,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入 60% 甲醇 50 mL,称定重量,超声处理(功率 250 W,频率 40 kHz)30 分钟,放冷,再称定重量,用 60% 甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱:资生堂 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 甲酸溶液(17:83);检测波长:330 nm;流速:1.0 mL/min;进

样量:10 μL ;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.2.3 专属性考察 按“2.2.1”项下方法制备对照品溶液及各供试品溶液,分别精密吸取对照品溶液或供试品溶液 10 μL ,按上述色谱条件进样分析,各色谱图见图 2。如图所示,测定方法专属性好,待测成分与其它成分分离度大于 1.5,且其他成分对待测成分测定无干扰。



A:大车前苷标准品;B:中国车前草样品;
C:巴西草药 TANCHAGEM 样品

图 2 对照品溶液及各供试品溶液的 HPLC 图

2.2.4 线性关系考察 精密吸取对照品溶液 1 μL 、5 μL 、10 μL 、20 μL 、30 μL 、40 μL ,按“2.2.2”项下色谱条件进行测定,记录峰面。以对照品的进样量为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程: $Y = 1445396276687.18X - 182497.06$, $R^2 = 0.9989$ 。结果表明,大车前苷在 0.1014 ~ 4.056 μg 质量范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 取大车前苷对照品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加 60% 甲醇制成每 1 mL 含 0.1 mg 的溶液,按“2.2.2”项下色谱条件进行测定,连续进样 6 次,每次进样 10 μL ,记录峰面积。RSD

为 1.10%,符合 2010 年版《中华人民共和国》(一部)规定,本法精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 取中国车前草样品,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置 0、2、4、6、8、10、12 小时,在上述色谱条件下进样分析,记录峰面积。RSD 为 2.00%,符合 2010 年版《中华人民共和国》(一部)规定,本法稳定性良好。

2.2.7 重复性考察 取中国车前草样品,一式 6 份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,在上述色谱条件下进样分析,记录峰面积,计算 RSD 值。RSD 为 1.60%,符合 2010 年版《中华人民共和国》(一部)规定,表明本法重复性良好。

2.2.8 加样回收率实验 取 6 份中国车前草样品,每份约 0.5 g,精密称定,分别精密加入一定量的大车前苷标准溶液,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.2”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算回收率与 RSD。结果表明大车前苷的平均回收率为 105.8%,RSD 为 2.00%,均符合 2010 年版《中华人民共和国》(一部)规定,表明本法含量测定结果良好。见表 1。

2.3 结果

2.3.1 DNA 条形码结果 3 份巴西样品测序结果一致,选择一条序列用于后续分析。截取 ITS 片段后,经 BLAST 检索,样品与车前科车前属植物相似度最高,相似度范围为 96 ~ 99%,因此巴西草药 TANCHAGEM 来自车前科车前属 *Plantago* L. 植物。根据 DNA 条形码相似度达到 99% 以上的溯源指标, *Plantago myosuroides*、*Plantago australis*、*Plantago virginica*、*Plantago unguiculata*、*Plantago trinitatis*、*Plantago asiatica* 可能为巴西草药 TANCHAGEM 的基原。见图 3 ~ 4。

2.3.2 大车前苷含量测定结果 分别取巴西草药 TANCHAGEM、中药车前草约 1 g,精密称定,一式三份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.2”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,计算待测成分含量,结果见表 2。

表 1 中国车前草中大车前苷的加样回收率结果

序号	称样量(g)	样品含量(mg)	加入量(mg)	实测量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	0.4971	0.338	0.412	0.7857	108.7	105.8	2.00
2	0.5310	0.362	0.412	0.8076	108.2		
3	0.5209	0.354	0.412	0.7862	104.8		
4	0.5013	0.341	0.412	0.7718	104.5		
5	0.4893	0.333	0.412	0.7594	103.6		
6	0.4582	0.311	0.412	0.7441	105.2		

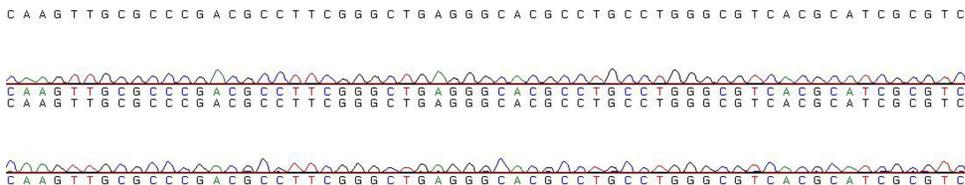


图 3 巴西样品 TANCHAGEM 的 ITS 片段图

Sequences producing significant alignments:

Select: All None Selected 0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Plantago mvosuros 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer	1042	1042	100%	0.0	99%	AY101873.1
Plantago australis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer	1037	1037	100%	0.0	99%	AF313038.1
Plantago virginica genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and complete sequence	1031	1031	100%	0.0	99%	AB281170.1
Plantago uniolunius 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer	1031	1031	100%	0.0	99%	AY101875.1
Plantago trinitatis 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer	1031	1031	100%	0.0	99%	AY101871.1
Plantago sp. Garmock-Jones & Tay 2566 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and intr	1026	1026	100%	0.0	99%	FJ024520.1
Plantago australis voucher ML Tay 019 & P.J Garmock-Jones, WELTU 20181 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5	1026	1026	100%	0.0	99%	FJ024518.1
Plantago asiatica 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer	1026	1026	100%	0.0	99%	AY101862.1

图 4 巴西样品 TANCHAGEM 的 ITS 序列 BLAST 结果

表 2 巴西草药 TANCHAGEM、中国车前草中大车前苷的含量 (n=3)

样品编号	大车前苷含量 (%)
TANCHAGEM-1	0.1021±0.0003
TANCHAGEM-2	0.1007±0.0005
TANCHAGEM-3	0.1047±0.0009
中药车前草-1	0.1034±0.0003
中药车前草-2	0.1029±0.0002
中药车前草-3	0.1002±0.0016
中药车前草-4	0.1051±0.0010
中药车前草-5	0.1025±0.0009
中药车前草-6	0.1037±0.0004

巴西样品 TANCHAGEM 与中药车前草的特征性谱图相似度极高,且两者均含有 2010 年版《中华人民共和国》(一部)规定的车前草指标成分大车前苷,巴西车前草中大车前苷含量为 0.1025%,中药车前草中含量为 0.1030%,两者含量接近,均符合 2010 年版《中华人民共和国》(一部)规定。巴西草药 TANCHAGEM 内控指标符合要求,品质优良。

3 讨论

本实验采用“二维特征鉴别法”,利用中药 DNA 条形码的遗传学唯一特性,以及中药指标性成分可量化的特点,对未知样品按照先“真伪”再“优劣”的研究思路进行质量控制,该法可实现对样品基原、指标性成分以及相应 HPLC 图谱的综合控制,相较于仅考察单一指标的传统质控方法,“二维特征鉴别法”能更为全面的反应样品信息。

综上所述,巴西样品 TANCHAGEM 为车前科车前属 *Plantago* L. 植物,其 HPLC 图谱与中药车前草

相似度极高,且所含大车前苷含量符合 2010 年版《中华人民共和国》(一部)规定。本实验为下一步是否扩大样本量进行采摘和研究巴西车前草提供了参考依据,同时也为巴西车前草的质量研究、药用价值研究、是否引种巴西车前草以及扩大中药资源和应用等方面提供了重要依据。

参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:14.
- [2] 陈用仪. 葡汉词典[M]. 北京:商务印书馆,2010.
- [3] 许利嘉,肖伟,马培,等. 具开发前景的南美洲常用草药简介[J]. 现代药物与临床,2011,26(2):84-90.
- [4] 李敏,程敏. 中药车前草化学成分与药理研究的新进展[J]. 现代中医药,2005,(3):60.
- [5] 耿放,孙虔,杨莉,等. 车前子与车前草利尿作用研究[J]. 上海中医药杂志,2009,43(8):72.
- [6] Choi S Y, Jung S H, Lee H S. Glycation in inhibitory activity and the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract [J]. *Phytother Res*, 2008, (22):323.
- [7] Chiang L C, Chiang W, Chang M Y, et al. Antiviral activity of *Plantago* major extracts and related compounds in vitro [J]. *Antiviral Res*, 2002, 55(1):53-62.
- [8] Chung M J, Park K W, Kim K H. Asian plantain (*Plantago asiatica*) essential oils suppress 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-co-enzyme A reductase expression in vitro and in vivo and show hypocholesterolaemic properties in mice [J]. *Br J Nutr*, 2008, 99(1):67-75.
- [9] Nhiem N X, Tai B H, Van Kiem P, et al. Inhibitory activity of *Plantago* major L. on angiotensin I-converting enzyme [J]. *Arch Pharm Res*, 2011, 34(3):419-423.
- [10] 俞亚静,方晶. 车前草水提取物对肝脏保护作用的实验研究[J]. 中国实用医药,2008,3(16):71-72.

(收稿日期:2015-08-22)

(本文编辑:董历华)