

车前子及其混淆品的微观特征荧光鉴别研究[△]

罗晋萍^{1*}, 宁红婷¹, 郭景文¹, 康 帅^{2#}, 张南平², 连超杰², 马双成²(1.山西省食品药品检验所, 太原 030001; 2.中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

中图分类号 R282.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0665-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.18

摘要 目的:建立车前子及其混淆品的微观特征荧光鉴别方法,为中药饮片的市场监管及检验提供技术支持。方法:应用荧光体式显微镜分别在可见光和紫外光下观察,从整体表面特征、种脐特征和切面特征3个方面对车前子[车前(*Plantago asiatica* L.)、平车前(*Plantago depressa* Willd.)的种子]及其混淆品大车前(*Plantago major* L.)的种子、荆芥(*Schizonepeta tenuifolia* Briq.)的果实、党参[*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.]的种子、地肤[*Kochia scoparia* (L.) Schrad.]的种子(去皮)、北柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)的果实进行比较研究和鉴别。结果:在可见光下观察,正品车前子表面纹理为波状条纹或细皱纹,混淆品分别为波状条纹、纵棱或纹理不明显;正品车前子种脐位于腹面中央,混淆品除大车前子外其余位于一端;正品车前子切面可见明显的胚直生其中,混淆品除大车前子外其余胚细小或呈环形。在紫外光下观察,正品车前子表面波状条纹明显,呈橙色与浅蓝绿色相间的荧光,平车前表面为网格状皱纹,呈灰蓝色与灰棕色相间的荧光;正品车前子种脐荧光强烈,混淆品中除荆芥果实外其余荧光微弱;正品车前子与混淆品切面在荧光颜色、胚大小及分布位置上均有明显差异。结论:荧光体式显微技术可有效、准确地鉴别车前子药材的真伪。**关键词** 荧光体式显微技术;车前子;混淆品;微观特征;整体表面特征;种脐特征;切面特征

Study on Fluorescence Identification of Microscopic Characteristics of Plantagin Semen and Its Adulterants

LUO Jinping¹, NING Hongting¹, GUO Jingwen¹, KANG Shuai², ZHANG Nanping², LIAN Chaojie², MA Shuangcheng² (1. Shanxi Institute for Food and Drug Control, Taiyuan 030001, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a fluorescence identification method of the microscopic characteristics for Plantagin Semen and its adulterants, and to provide technical support for the market supervision and inspection of TCM decoction pieces. METHODS: Under visible and ultraviolet light, comparative study and identification of the Plantagin Semen (seeds of *Plantago asiatica* L. and *Plantago depressa* Willd.) and its adulterants as seeds of *Plantago major* L., fruits of *Schizonepeta tenuifolia* Briq., seeds of *Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf, seeds (peeled) of *Kochia scoparia* (L.) Schrad., fruits of *Bupleurum chinense* DC. were carried out by means of stereoscopic fluorescence microscopy from aspects of overall surface characteristics, umbilicus characteristics and section characteristics. RESULTS: Under visible light, the surface texture of Plantagin Semen was wavy stripe or fine wrinkle, while the adulterants were wavy stripe, longitudinal edge or texture was not obvious. The umbilicus of Plantagin Semen was located in the center of the ventral surface, while that of adulterants were located at one end except for *P. major*. In the section of Plantagin Semen, there were obvious direct embryos, in which the adulterants were small or circular embryos except for *P. major*. Under ultraviolet light, *P. asiatica* had obvious wavy stripes in surface, orange and light blue-green fluorescence; *P. depressa* had grid-shaped wrinkles and gray-blue and gray-brown fluorescence; the umbilical fluorescence of Plantagin Semen was strong, and the fluorescence of the adulterants was weak except for *S. tenuifolia*. There were obvious differences in fluorescence color, embryo size and distribution between the section of Plantagin Semen and adulterants. CONCLUSIONS: The stereoscopic fluorescence microscopy is effect and accurate for the identification of Plantagin Semen.

KEYWORDS Stereoscopic fluorescence microscopy; Plantagin Semen; Adulterants; Microscopic characteristics; Overall surface characteristics; Umbilicus characteristics; Section characteristics

车前子为常用传统中药,始载于《神农本草经》,曰:“车前子,味甘,性寒。主气癃,止痛,利水道小便;除湿

[△]基金项目:山西省科技基础条件平台项目(No.201605D121025)

* 副主任药师。研究方向:中药鉴定与分析。电话:0351-2029682。E-mail:jinpluo@163.com

通信作者:副研究员,硕士。研究方向:中药鉴定与分析。电话:010-67012886。E-mail:kangshuaiksk@163.com

痹。久服轻身耐老。一名当道,生平泽。”^[1]目前,全世界车前科植物共有3个属,而在我国仅有车前属1属,有17种2变种1变形^[2]。我国传统车前子商品分为大粒车前子和小粒车前子,其中大粒车前子为车前科植物车前(*Plantago asiatica* L.)的种子,小粒车前子为车前科植物大车前(*Plantago major* L.)及平车前(*Plantago depressa*

Willd.)的种子,而市场上小粒车前子的商品来源又主要为大车前^[3]。在2015年版《中国药典》(一部)(以下简称药典)中,车前子主要有2个基原,即车前科植物车前和平车前^[4]。虽然在《维吾尔药材标准》(1993年版)中曾将大车前作为车前子的来源收载,但在现行版药典中未将其作为车前子的正品来源。

由于车前子细小(长约2 mm,宽约1 mm),混淆品较多,如荆芥(*Schizonepeta tenuifolia* Briq.)的果实、党参[*Codonopsis pilosula* (Franch.) Nannf.]的种子、地肤[*Kochia scoparia* (L.) Schrad.]的干燥果实及种子、北柴胡(*Bupleurum chinense* DC.)的果实等,肉眼识别困难,掺伪现象时有发生。有研究通过薄层色谱法对大车前子、车前子和平车前子^[5]以及其质量标志物^[6]进行鉴定,但均未成功;还有研究者试图通过高效毛细管电泳结合聚合酶链式技术鉴别车前子^[7-8],但因检测成本和技术问题,难以实现快检和基层监管。有的研究者对车前子及其部分混淆品的粉末进行了显微鉴别^[9-10],以及采用放大镜或解剖镜在自然光下观察其表面微性状特征^[11-13]。但目前未见采用荧光体式显微技术对车前子及其伪品进行鉴定的报道。

荧光体式显微技术利用短波长的光线照射生物体或用荧光素染色被检物体,使之受激发产生长波长的荧光进行观察达到鉴别目的。该方法已广泛应用于医学、生物学、工业检测、司法刑侦等领域,但在中药鉴定方面,无论国家或地方的法定标准以及检验检测中均未得到有效应用。该方法较粉末显微鉴别快速,较一般自然

光下微性状特征的鉴定更具专属性,且因不需试剂处理样品更加经济环保。因此,针对当前中药材混杂现状,建立一种准确、快速、简便易行的筛查中药材真伪品的方法就显得十分必要。

1 材料

1.1 仪器

SZX-12型荧光体式显微镜及数码成像系统(德国卡尔蔡司股份有限公司)。

1.2 药品

药典品种来源:车前子于2016年采集于湖北,大车前于2017年采集于河北,均由中国食品药品检定研究院张南平主任药师鉴定为正品;平车前子于2015年采集于山西,由山西食品药品检所郭文菊主任药师鉴定为正品。混淆品来源:荆芥果于2012年收集于安徽、党参子于2012年收集于甘肃、地肤的种子(去皮)于2012年收集于河北、北柴胡果于2012年收集于甘肃,均由中国食品药品检定研究院张继主任药师鉴定为正品。所有样品均收藏于中国食品药品检定研究院中药标本馆。

2 方法与结果

2.1 整体表面特征

取车前子及其混淆品,置于荧光体式显微镜的载物台上,分别在可见光及紫外光下观察样品的形状、颜色、大小、表面纹理等特征差异,同时采用景深扩展进行拍摄及合成图像。车前子与其混淆品的整体表面特征观察图见图1,表面纹理观察图见图2,对比结果见表1。

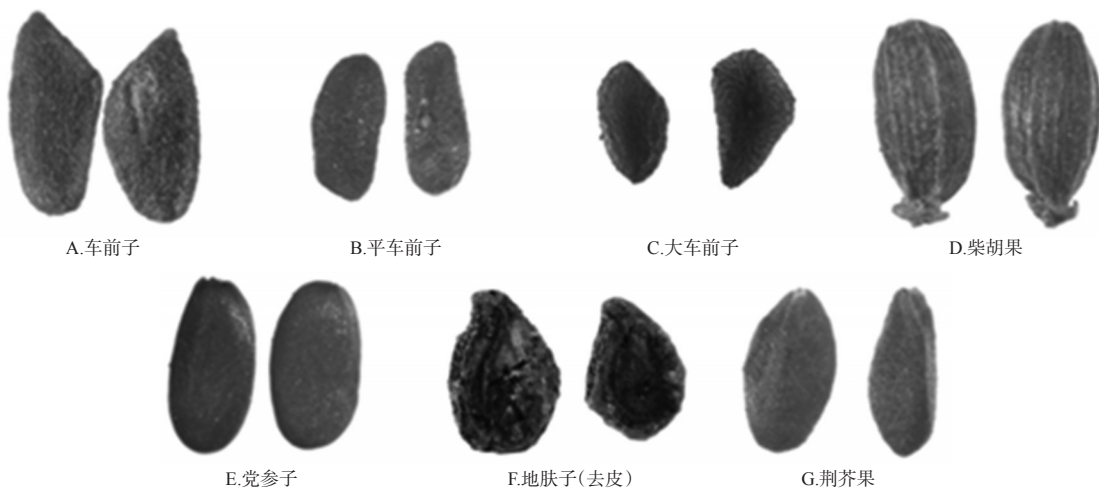


图1 车前子及其混淆品的整体表面特征观察图(×40)

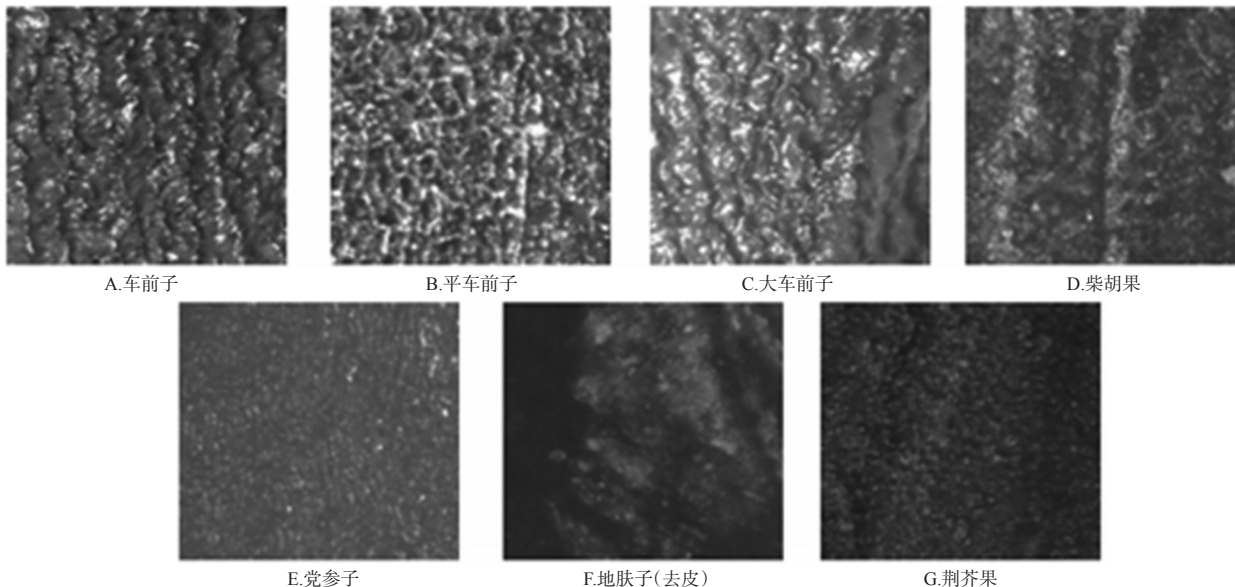
Fig 1 Chart of overall surface characteristics of Plantaginis Semen and its adulterants(×40)

由图1、图2和表1可知,车前子与大车前子形状及表面纹理相近,二者大小虽有差异,但也存在一定范围的交集。平车前子与大车前子大小与颜色均相近,车前子、平车前子和大车前子在可见光下较难识别,极易混淆;而在紫外光下观察,三者所展示的微观特征(表面纹理、荧光颜色及强度等)有明显区别。党参与荆芥果

在可见光下呈现的颜色、形状及表面纹理相近;而在紫外光下观察,前者为细纵网纹,后者为点状细密网纹,较易区分。在可见光下,无法辨识地肤子(去皮)表面特征细节;但在荧光体式显微镜下,其表面有花纹状荧光,切面环形胚的红色荧光特征十分突显。

2.2 种脐特征

可见光下:



紫外光下:

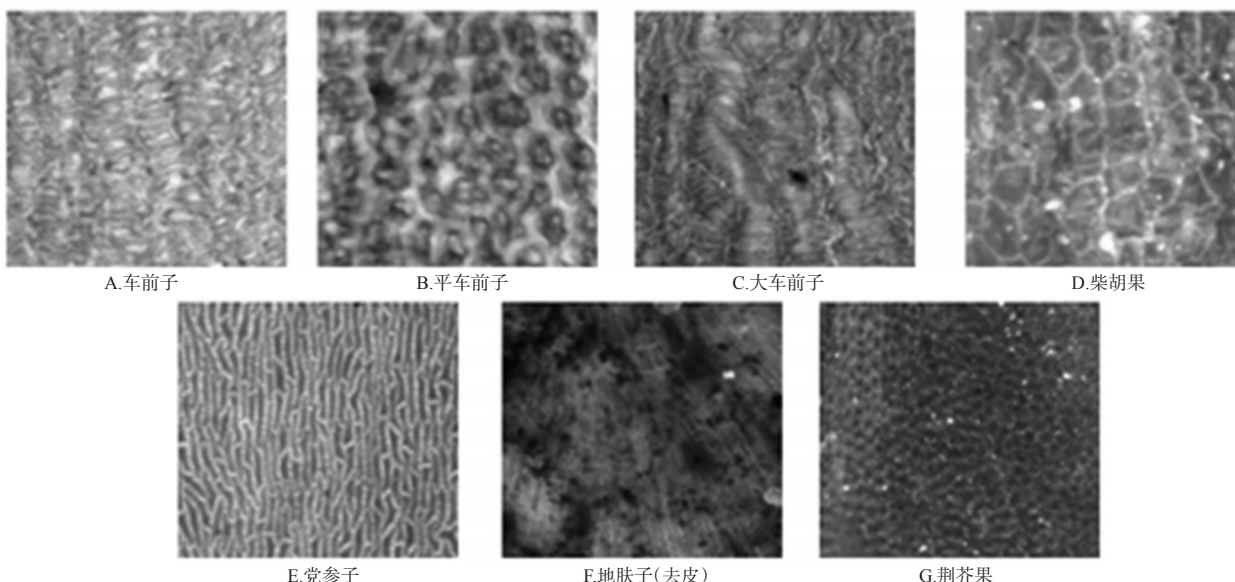


图2 车前子及其混淆品表面纹理观察图(×150)

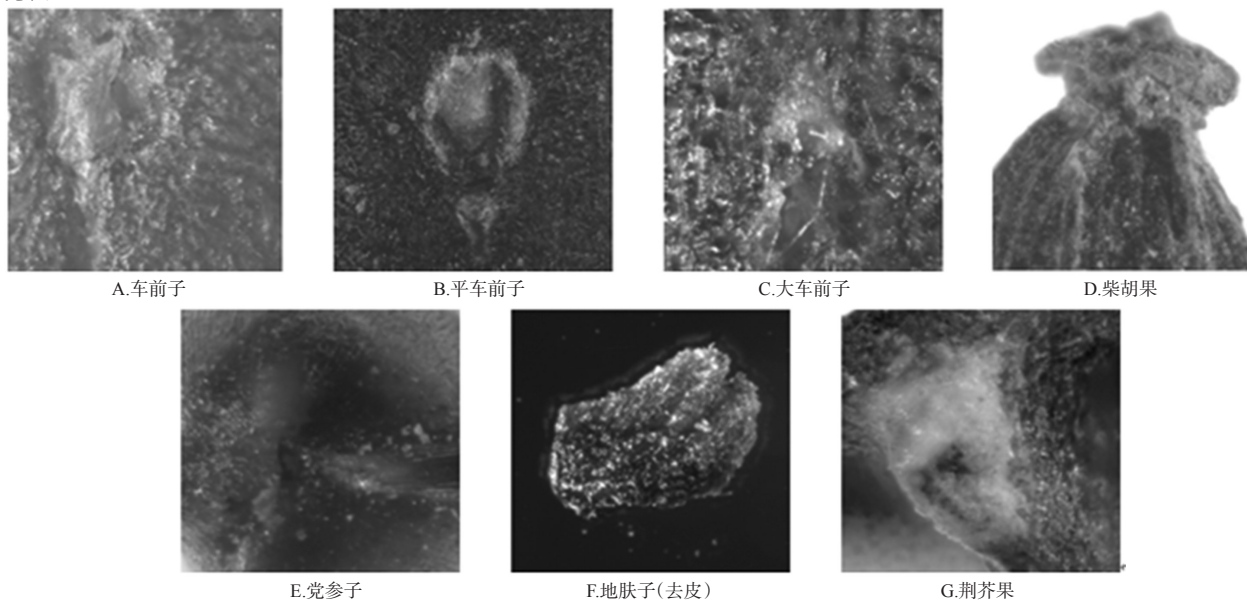
Fig 2 Charts of surface texture of Plantaginis Semen and its adulterants(×150)

表1 车前子及其混淆品的整体表面特征对比结果

Tab 1 Comparison result of overall surface characteristics of Plantaginis Semen and its adulterants

| 品名 | 形状 | 大小 | 颜色 | | 表面纹理及放大观察 | |
|---------|----------------------|---|--------------|---------------|------------------------------|---|
| | | | 可见光下 | 紫外光下 | 可见光下 | 紫外光下 |
| 车前子 | 不规则长圆形或三角状长圆形, 略扁 | 长1.2~2 mm, 宽0.8~1.2 mm | 棕色至黑褐色 | 橙色至浅棕黄荧光 | 平行凸起的波状条纹隐约可见, 凸起部位颜色略深于凹陷部位 | 平行凸起的波状条纹明显, 纹理略呈网格状, 凸起部位纹浅棕黄色荧光, 凹陷部位浅蓝绿色荧光 |
| 平车前子 | 多为长椭圆形, 有的略呈多角形 | 长1.2~1.8 mm, 宽约0.8 mm | 棕色或深棕色 | 浅灰棕色荧光 | 凹凸细皱纹 | 凹凸网格状, 凸起部位灰蓝色荧光, 凹陷部位呈灰棕色 |
| 大车前子 | 菱形, 类三角形或不规则形 | 长0.8~1.2 mm, 宽0.5~0.8 mm ^[4] | 棕色或棕褐色 | 浅棕黄色荧光 | 平行凸起的波状条纹隐约可见, 凸起部位与凹陷部位颜色相近 | 平行凸起的波状条纹明显, 间距较宽, 凸起部位浅棕黄色荧光, 凹陷部位浅蓝绿色荧光 |
| 柴胡果 | 分生果广椭圆形, 具明显纵棱, 棱狭翼状 | 长约3 mm, 宽约2 mm | 淡棕色至棕黑色 | 黄褐色, 棱略显蓝白色荧光 | 略呈网格状 | 黄棕色与蓝白色相间的网格状纹理 |
| 党参子 | 长卵形 | 长1.5~1.8 mm, 宽0.6~1.2 mm | 棕褐色, 有光泽 | 棕黄色荧光 | 纹理不甚明显 | 细纵纹 |
| 地肤子(去皮) | 倒卵形, 扁平, 稍有光泽 | 长1.5~2.0 mm, 宽1.2~1.7 mm | 黑褐色 | 黄、红、黑色相间的荧光 | 纵纹不甚明显 | 细密条状网纹隐约可见 |
| 荆芥果 | 扁长圆形, 几三棱状 | 长约1.7 mm, 宽约1 mm | 棕色或棕褐色, 略有光泽 | 绿棕色荧光较弱 | 点状细密网纹不甚明显 | 点状细密网纹 |

取车前子及其混淆品,调整种脐或柱基等部位角度,使其特征面向上,再照“2.1”项下操作,观察各样品种可见光下:



紫外光下:

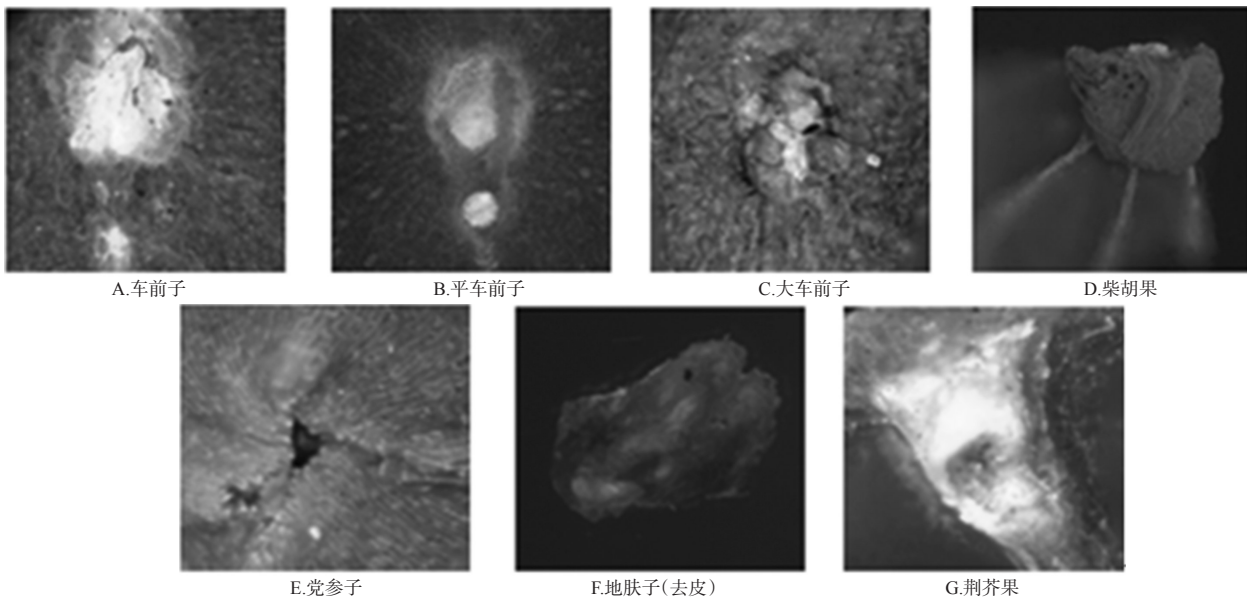


图3 车前子及其混淆品的种脐特征对比图(×150)

Fig 3 Charts of the umbilical cord characteristics of *Plantaginis Semen* and its adulterants(×150)

表2 车前子及其混淆品的种脐特征对比结果

Tab 2 Comparison result of the umbilical cord characteristics of *Plantaginis Semen* and its adulterants

| 品名 | 位置 | 形状 | 颜色 | |
|---------|--------|-------------|--------|-----------|
| | | | 可见光下 | 紫外光下 |
| 车前子 | 腹面中央 | 阔椭圆形,凹入 | 灰白色或棕色 | 强烈的蓝绿色荧光 |
| 平车前子 | 腹面中央 | 近圆形,脐点及合点凹入 | 灰白色或棕色 | 强烈的蓝白色荧光 |
| 大车前子 | 腹面中央 | 椭圆形,脐点及合点凹入 | 灰白色或棕色 | 强烈的橙色荧光 |
| 柴胡果 | 果柄位于一端 | 柱基扁盘形 | 褐色 | 浅棕色荧光微弱 |
| 党参子 | 种子一端 | 类三角形,孔洞状 | 棕色 | 棕黄色荧光 |
| 地肤子(去皮) | 种子一端 | 类长圆形,微凹入 | 棕黑色 | 红、黑相间的荧光 |
| 荆芥果 | 种子一端 | 类圆形,凹窝状 | 灰白色 | 强烈的浅黄绿色荧光 |

脐的形状、颜色、所在位置等特征差异。车前子及其混淆品的种脐特征图见图3,对比结果见表2。

由图3和表2可知,正品车前子、大车前子以及混淆品大车前子的种脐均位于腹面中央,多呈近圆形或凹入;而其余混淆品的种脐则位于一端,形状各有不同。在可见光下观察,正品车前子和平车前子以及混淆品大车前子的种脐均呈灰白色或棕色,而其余混淆品种脐颜色多呈棕色或棕黑色;在紫外光下,正品车前子和平车前子具有强烈偏蓝色荧光,而上述混淆品荧光弱或荧光颜色不同。可见,通过种脐的位置、形状、颜色及荧光强度等差异可以有效区分车前子及其混淆品。

2.3 切面特征

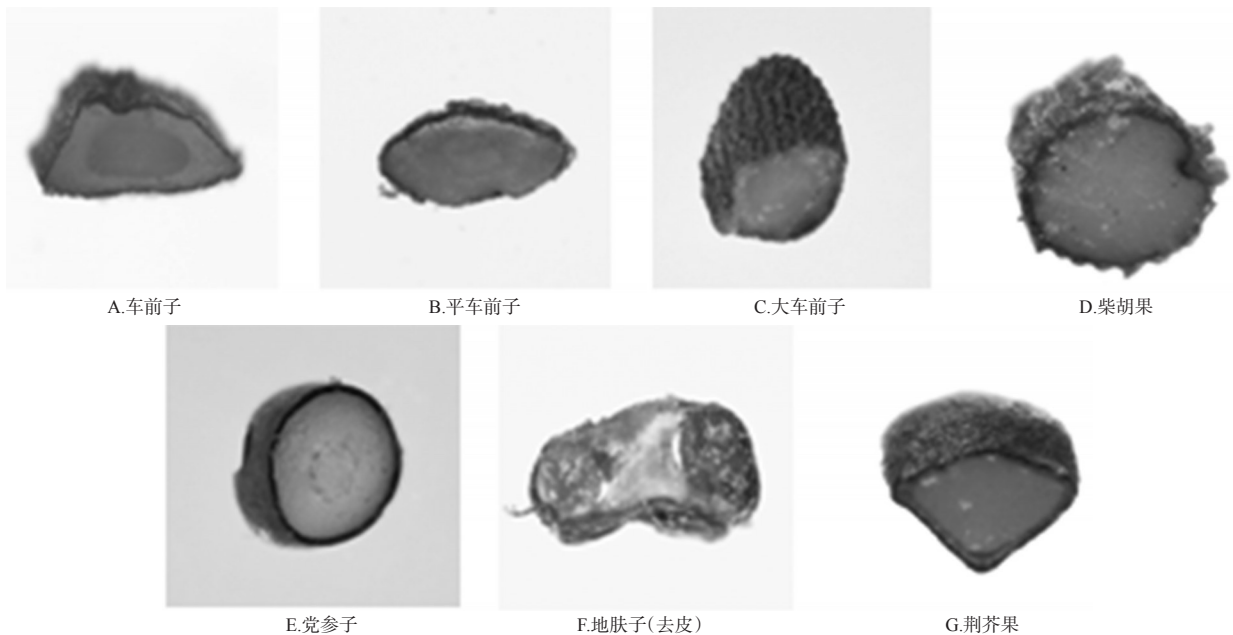
取车前子及其混淆品,将样品横剖和纵剖,再照

“2.1”方法操作,观察并拍摄其横、纵切面特征。车前子及其混淆品的横、纵切面特征图分别见图4、图5,对比结果见表3。

果见表3。

由图4、图5和表3可见,正品车前子、大车前子以及

可见光下:



紫外光下:

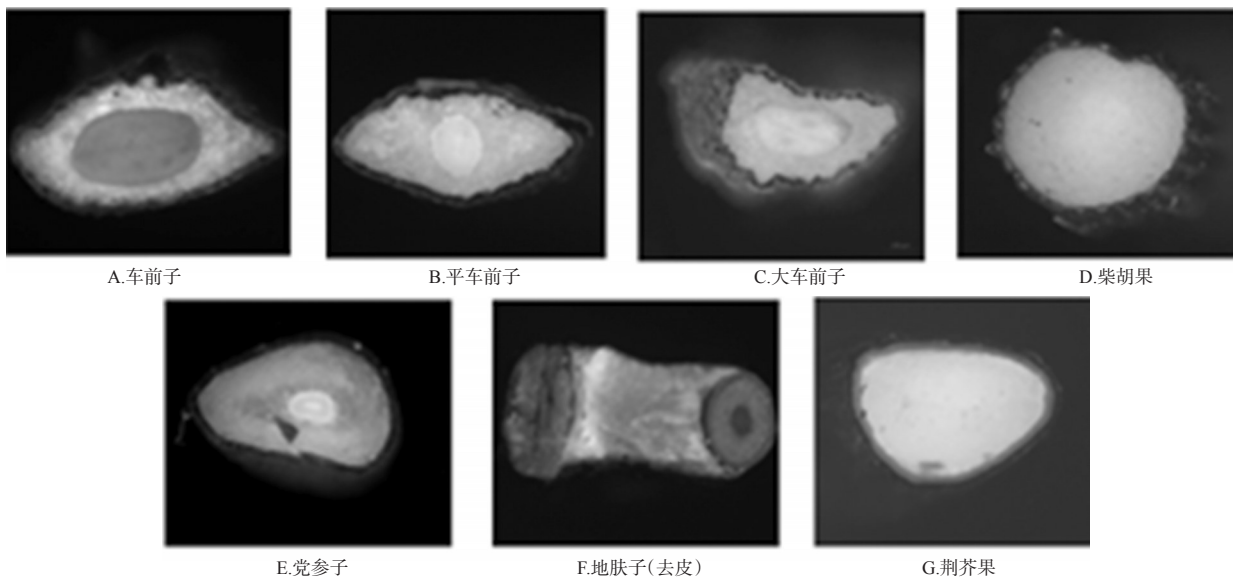


图4 车前子与其混淆品横切面特征观察图(×50)

Fig 4 Charts transverse section characteristics of *Plantaginis Semen* and its adulterants(×50)

混淆品大车前子的胚均直生其中,子叶背腹向排列;混淆品柴胡果、党参子、荆芥果的胚细小,地肤子(去皮)具红色荧光的胚呈环形,与正品区别甚大。

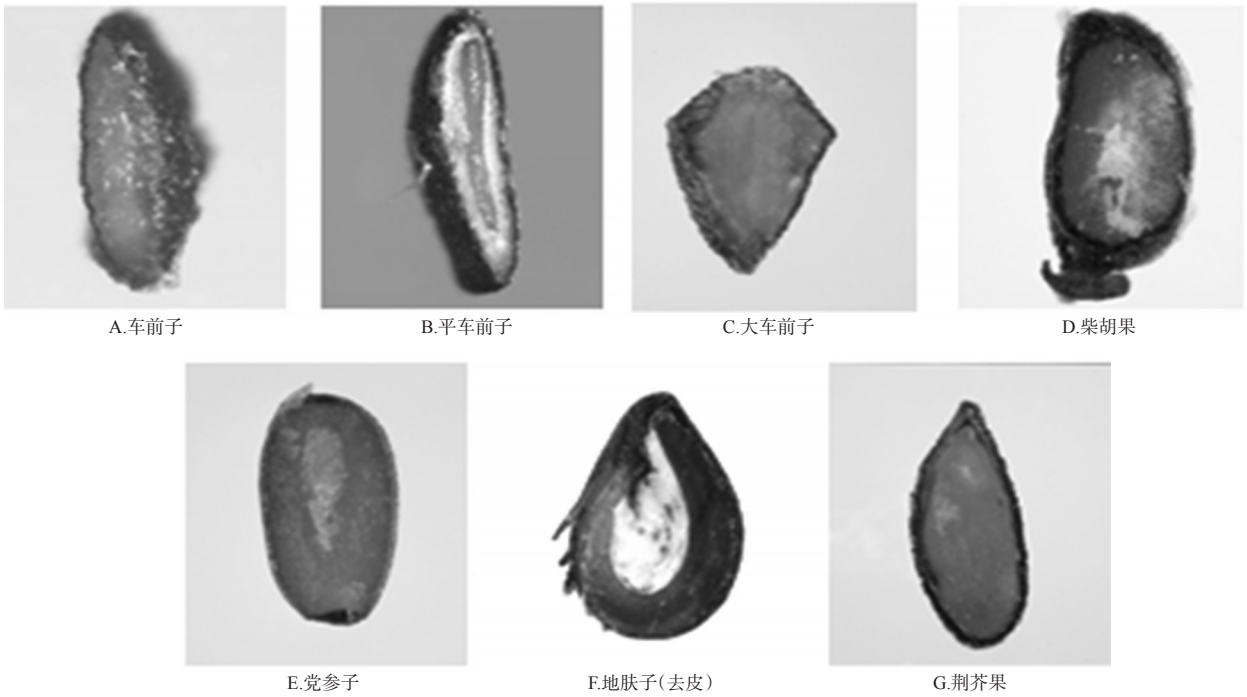
3 讨论

车前子具有清热利尿、渗湿通淋、明目、祛痰之功效,而混淆品与之作用不同,一旦混入其中不仅削弱了车前子的功效,有的甚至会造成不良后果,有效识别车前子真伪,可避免此类事件发生。荧光图像不仅具有形态学特征,还具有荧光的颜色与强度的优势特征,二者结合更有助于准确鉴定。因其具有不破坏或少破坏样

品形态、试验用量少、快速、准确、环保等优点,且与可见光相比,信息量更大、特征性更强,可作为一种新的方法广泛应用于中药材的鉴定中。由于荧光强度随照射时间延长而逐渐减弱,因此检验时应及时拍摄照片,记录观察结果。由于样品底部形态多为圆形或具棱角,观察和拍摄时较难调整方向,故将样品沾少许凡士林或融化的蜡固定其方向。

本研究采用微观特征荧光鉴别方法对药典记载的正品车前子(车前子和平车前子)以及5种常见的混淆品进行鉴定,发现两者在整体表面特征、种脐特征以及切

可见光下:



紫外光下:

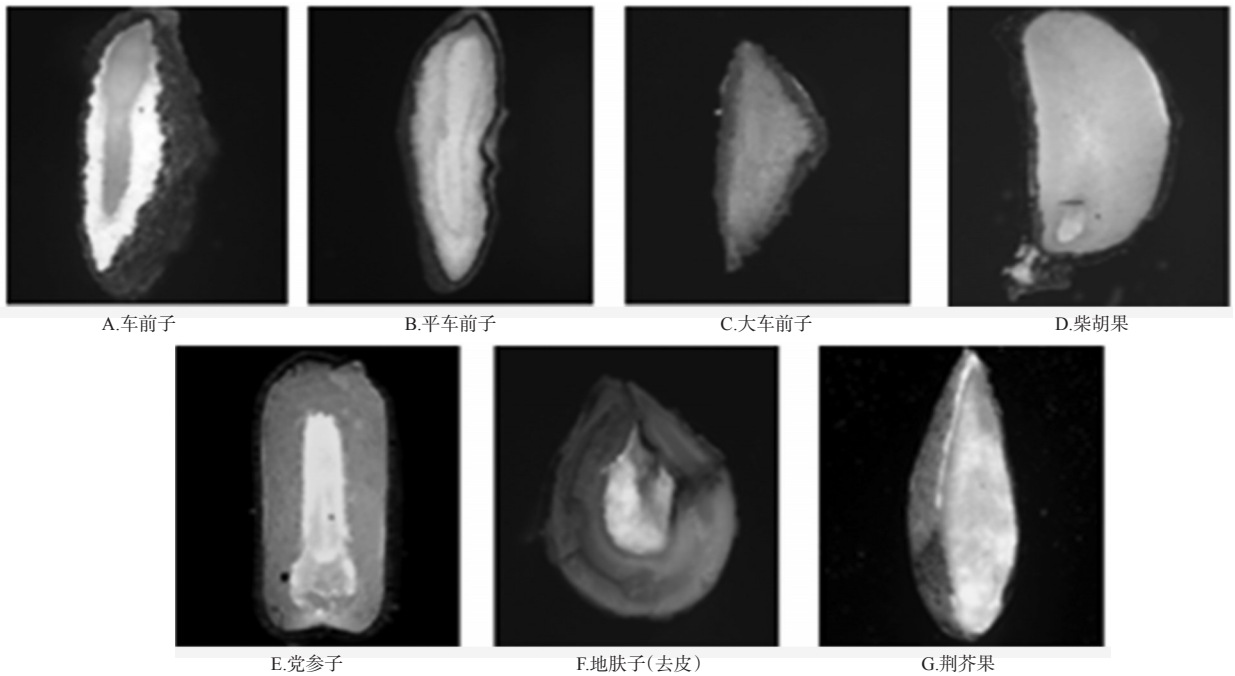


图5 车前子与其混淆品纵切面特征观察图(×80)

Fig 5 Charts of longitudinal section characteristics of Plantaginis Semen and its adulterants(×80)

表3 车前子及其混淆品的切面特征对比结果

Tab 3 Comparison result of the section characteristics of Plantaginis Semen and its adulterants

| 品名 | 纵切 | 横切 | 颜色 | |
|------|---------------|-------------------------------------|------|-------|
| | | | 可见光下 | 紫外光下 |
| 车前子 | 胚直生其中,子叶背腹向排列 | 胚椭圆形 | 淡棕色 | 蓝白色荧光 |
| 平车前子 | 胚直生其中,子叶背腹向排列 | 胚近圆形 | 淡棕黄色 | 蓝绿色荧光 |
| 大车前子 | 胚直生其中,子叶背腹向排列 | 胚椭圆形 | 淡棕色 | 绿蓝色荧光 |
| 柴胡果 | 胚小型,着生基部一端 | 每棱槽有油管3个,少见4个,合生面4个。胚乳占大部分,不见小型基生的胚 | 棕色 | 蓝绿色荧光 |

续表3

Continued tab 3

| 品名 | 纵切 | 横切 | 颜色 | |
|---------|--------------|------------------------|-----------------|-----------------|
| | | | 可见光下 | 紫外光下 |
| 党参子 | 胚细小,直生其中 | 胚乳包埋着胚,胚位于中心,占横切面的一小部分 | 浅棕色至棕色 | 蓝绿色荧光 |
| 地肤子(去皮) | 胚环形,胚乳块状 | 胚位于两侧 | 胚呈黄绿色至绿色,胚乳呈类白色 | 胚呈红色荧光,胚乳呈蓝绿色荧光 |
| 荆芥果 | 无胚乳,胚直生,胚根细小 | 胚充满果实 | 浅棕色 | 蓝白色荧光 |

炒紫苏子标准汤剂的质量标准研究^Δ

李燕^{1*}, 刘聪², 王丽军², 胡昌江², 李文兵², 许润春^{1#} (1. 成都中医药大学药学院, 成都 611137; 2. 四川新绿色药业科技发展有限公司, 成都 611900)

中图分类号 R283.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0671-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.19

摘要 目的: 制备炒紫苏子标准汤剂, 并进行质量标准研究。方法: 依照标准汤剂的制备要求, 制备17批炒紫苏子标准汤剂, 计算出膏率。采用高效液相色谱(HPLC)法对炒紫苏子标准汤剂中迷迭香酸进行定量分析[色谱柱为Agilent 5 TC-C₁₈(2), 流动相为甲醇-0.1%甲酸溶液(40:60, V/V), 检测波长为330 nm, 流速为1.0 mL/min, 柱温为30 ℃, 进样量为5 μL], 并计算其转移率。建立17批炒紫苏子标准汤剂的HPLC指纹图谱, 利用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)软件对指纹图谱进行分析, 并通过对比共有峰的保留时间对色谱峰进行指认。结果: 17批炒紫苏子标准汤剂的出膏率为5.55%~9.75%; 迷迭香酸的含量为0.44%~1.58%, 平均含量为1.08%; 迷迭香酸的转移率为18.31%~34.32%, 平均转移率为25.42%。在17批炒紫苏子标准汤剂HPLC指纹图谱中, 共确定了11个共有峰, 相似度均高于0.95; 并指认出了其中5个共有色谱峰, 分别为咖啡酸(峰3)、木犀草苷(峰5)、迷迭香酸(峰8)、木犀草素(峰9)和芹菜素(峰10)。结论: 建立了炒紫苏子标准汤剂的质量控制方法, 可为炒紫苏子配方颗粒及相关制剂质量标准的制订提供参考。

关键词 炒紫苏子; 标准汤剂; 高效液相色谱法; 指纹图谱; 迷迭香酸; 转移率; 出膏率

Study on Quality Standard of Fried *Perilla frutescens* Seed Standard Decoction

LI Yan¹, LIU Cong², WANG Lijun², HU Changjiang², LI Wenbing², XU Runchun¹ (1. College of Pharmacy, Chengdu University of TCM, Chengdu 611137, China; 2. Sichuan New Green Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd, Chengdu 611900, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To prepare standard decoction of fried *Perilla frutescens* seed and study the quality standard. METHODS: According to the preparation requirements of standard decoction, 17 batches of standard decoction of fried *P. frutescens* seed were prepared, and the yield of paste was calculated. HPLC method was used for quantitative analysis of rosmarinic acid in standard decoction of fried *P. frutescens* seed. The determination was performed on Agilent 5 TC-C₁₈(2) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% formic acid solution (40:60, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was

面特征三个方面均存在差异, 可对其进行鉴别。

参考文献

- [1] 顾观光. 神农本草经[M]. 3版. 杨鹏举, 校注. 北京: 学苑出版社, 2007: 47-48.
- [2] 谢明, 杨爽爽, 王亮亮. 中药车前子的研究进展[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(3): 474-476.
- [3] 郑太坤, 田中俊弘, 康廷国. 中国车前研究[M]. 沈阳: 辽宁科学出版社, 1993: 140.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 68-69.
- [5] 蔡少青, 王璇. 常用中药材品种整理和质量研究(北方编): 第6册[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 2003: 307.
- [6] 李冲冲, 龚苏晓, 许浚, 等. 车前子化学成分与药理作用研究进展及质量标志物预测分析[J]. 中草药, 2018, 49(6):

1233-1246.

- [7] 郭丹, 陈娜娜. 高效毛细管电泳结合PCR法鉴别南葶苈子与车前子[J]. 中国药房, 2010, 21(3): 232-233.
- [8] 李映平, 贺清源, 文芳, 等. 平车前子及其伪品的比较鉴别[J]. 湖南中医学院学报, 2001, 21(2): 28-29.
- [9] 倪福禄, 赵艳, 霍旺. 车前子人工掺伪品的鉴别[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(6): 667-668.
- [10] 塔娜, 营艳艳, 马亚琴. 车前子及其4种混淆品的鉴别[J]. 包头医学, 2000, 24(2): 31.
- [11] 马逾英, 卢晓琳, 翟萌. 几种中药材及其混伪品的微性状对比鉴别[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(8): 1161-1164.
- [12] 梁瑞红, 秦淑英. 车前子真伪鉴别[J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(8): 563-564.
- [13] 陈瑛, 孙昌高, 巫金华, 等. 植物药种子手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1989: 388, 434.
- [14] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志: 第70卷[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 324, 332.

Δ 基金项目: 四川省战略性新兴产业计划项目(No.12XXCP0010)

* 硕士研究生。研究方向: 中药炮制与制剂。电话: 028-83705888。

E-mail: 3205418910@qq.com

通信作者: 副教授, 博士。研究方向: 中药炮制与制剂。电话: 028-61800231。E-mail: 3205418910@qq.com

(收稿日期: 2018-11-14 修回日期: 2019-01-02)

(编辑: 林静)