

· 质量评价 ·

基于国家药品评价性抽验的鹅不食草质量问题分析

刘杰, 过立农, 马双成, 郑健*, 咎珂* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 通过国家药品评价性抽验工作, 对常用中药材鹅不食草的质量进行考察, 分析影响鹅不食草质量的主要问题及对策, 为监管部门提供技术支持, 保障公众用药安全有效。**方法:** 从全国29个省(市、自治区)的生产和流通领域抽取鹅不食草样品, 按照《中华人民共和国药典》2015年版一部进行检验, 并采用分子生物学技术进行了探索性研究。**结果:** 本次抽验的鹅不食草样品共计126批次, 按现行质量标准检验合格116批, 不合格10批, 均为杂质项不合格; 经探索性研究鉴定, 发现正品符合药典规定, 掺杂的杂质主要为“白鳞莎草”和“阿拉伯婆婆纳”。**结论:** 鹅不食草样品的总体质量状况为“一般”, 存在的问题主要为杂质问题。

关键词: 鹅不食草; 法定检验; 质量分析; 探索性研究

中图分类号: R95; R282; R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)03-0325-05
doi:10.16153/j.1002-7777.2020.03.012

Analysis of Quality Problems of *Centipeda minima* Based on National Drug Evaluation Surveillance

Liu Jie, Guo Linong, Ma Shuangcheng, Zheng Jian*, Zan Ke* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: Through the national drug evaluation sampling test, the quality of *Centipeda minima*, the commonly used Chinese medicinal materials were studied, and the main problems and countermeasures affecting the quality of *Centipeda minima* were analyzed. Technical support was provided for the regulatory authorities and the safety and effectiveness for public using were ensured. **Methods:** According to the current pharmacopeia standard of *Centipeda minima*, the quality inspection and data analysis were carried out to evaluate the quality of *Centipeda minima* which were sampled from 29 provinces in China. Moreover, molecular biology techniques were employed to identify adulteration. **Results:** 126 batches of samples collected nationwide were tested, among which 116 batches were qualified while impurities of 10 batches failed to meet the standards. In exploratory research, the qualified samples were in accordance with the regulations, while the impurities were identified to be *Cyperus nipponicus* Franch. et Savat. and *Veronica persica* Poir. **Conclusion:** The overall quality of *C. minima* samples was "medium". The main problem was impurity.

Keywords: *Centipeda minima*; statutory examine; quality analysis; exploratory research

基金项目: 科技部国家科技重大专项(民口)课题重大新药创制“中药组分资源库及产业公共技术服务平台建设”(编号 2018ZX09735-006)

作者简介: 刘杰, Tel: (010) 67095711; E-mail: 775052109@qq.com

通信作者: 郑健, Tel: (010) 67095739; E-mail: bjzj825@163.com

咎珂, Tel: (010) 67095739; E-mail: 6206310@qq.com

鹅不食草为菊科植物石胡荽属植物鹅不食草 *Centipeda minima* (L.) A. Br. et Aschers. 的干燥全草, 味辛、性温, 归肺经, 具有发散风寒、通鼻窍、止咳的功效, 用于风寒头痛, 咳嗽痰多, 鼻塞不通, 鼻渊流涕^[1]。产于我国东北、华北、华中、华南、西南等地^[2]。鹅不食草始载于南唐《食性本草》^[3], 《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 1977年版开始收载, 为较常用中药材, 在部分少数民族中做药用。在苗药中称锐鸡片 (Reib Jib Nghad), 全草用于鼻塞不通, 头痛, 百日咳。在傣药中称为亚稀汉, 全株治感冒鼻塞, 急慢性鼻炎。在佤族药中全草用于跌打损伤, 感冒, 百日咳, 风湿关节痛等。在景颇族药中称“Qangm Azo Mvan”, 治疗感冒鼻塞, 急慢性鼻炎, 慢性支气管炎, 风湿关节痛。在傈僳族药中称“雅汉乃莫”, 全草治疗感冒, 喉痹。土家药中称“翁死席”, 主治伤寒, 咳嗽, 白口疮, 小儿疳积。

据文献报道, 鹅不食草中含有黄酮、苯丙素、倍半萜等类化学成分^[4-12]。现代药理学研究表明, 鹅不食草的水提物具有抗氧化和抗炎活性^[13]。在临床用于治疗鼻炎、百日咳、结石症、外科、头痛、面瘫、平喘、痢疾等均有良好疗效^[14-17]。

鹅不食草现行标准为《中国药典》2015年版一部。根据国家药品评价性抽验的要求, 中国食品药品检定研究院在全国范围内开展了鹅不食草的抽

验, 抽取全国药品流通领域的样品126批, 按现行标准开展检验。本文系统总结了鹅不食草的质量问题, 并进行了探索性研究, 以期为保障鹅不食草的质量提供更合理的依据。

1 抽验情况

本次专项共抽取除香港、澳门、台湾地区外21个省份、4个自治区、4个直辖市共29个省级行政区的药材和饮片共126批样品, 其中医疗机构抽取20批, 经营企业106批。

鹅不食草按《中国药典》2015年版一部标准检验126批, 符合规定116批, 合格率92%, 不合格10批, 不合格率8%, 不合格项目为【检查】项杂质超过限度。

2 合格样品分析

2.1 性状鉴别

药典规定“本品缠结成团(为饮片): 须根纤细, 淡黄色。茎细, 多分枝; 质脆, 易折断, 断面黄白色。叶小, 近无柄; 叶片多皱缩、破碎, 完整者展平后呈匙形, 表面灰绿色或棕褐色, 边缘有3~5个锯齿。头状花序黄色或黄褐色。气微香, 久嗅有刺激感, 味苦、微辛”。鹅不食草的性状鉴别要点一是头状花序, 二是叶片展开后边缘有3~5个锯齿, 如图1所示。现行标准中性状描述专属性强, 能够鉴别正品药材。

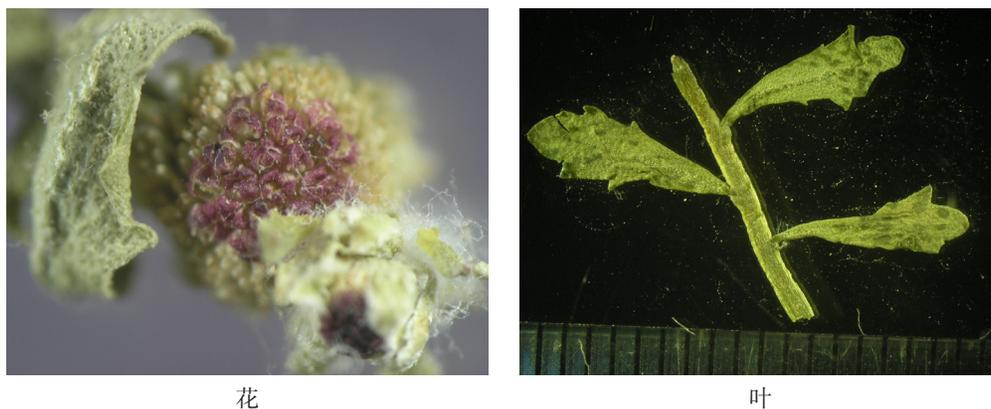


图1 鹅不食草的性状特征图

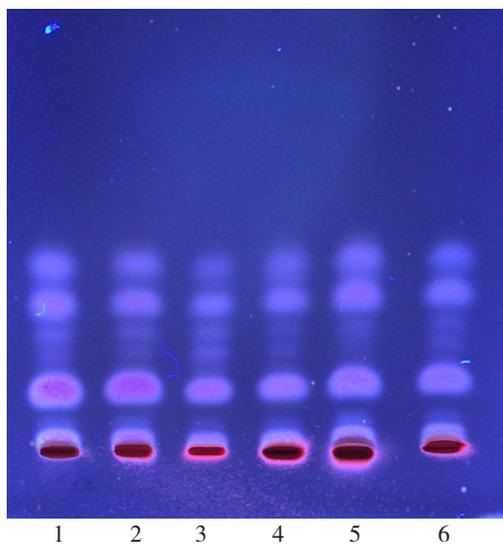
2.2 薄层鉴别

按照现行药典标准试验, 取本品粉末1 g, 加二氯甲烷20 mL, 超声处理30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加甲醇2 mL使溶解, 作为供试品溶液。

另取鹅不食草对照药材1 g, 同法制成对照药材溶液。按照薄层色谱法试验, 分别吸取上述2种溶液各2 μ L, 分别点于同一硅胶G薄层板上, 以石油醚(60~90 $^{\circ}$ C)-二氯甲烷(3:1)为展开剂, 展

开,取出,晾干,喷以10%硫酸乙醇溶液,110℃加热至斑点显色清晰,置紫外光灯(365 nm)下检

视,结果如图2所示。现行标准中薄层斑点清晰,和对照药材比较一致性较好,能够起到鉴别作用。



1. 鹅不食草对照药材; 2~6. 鹅不食草样品。

图2 鹅不食草薄层色谱图

3 不合格样品分析: 分子生物学方法鉴定鹅不食草及其中的杂草

现行标准中规定杂质不超过2%, 10批不合格样品中杂质为8%~30%, 平均为15%。这些杂质超标样品中存在较多的杂草。

按照《中国药典》附录中“中药材DNA条形码分子鉴定法指导原则”对鹅不食草建立基于核糖体DNA第二内部转录间隔区(ITS2)为主体条形码序列的方法体系, 包括供试品处理、DNA提取、DNA条形码序列PCR扩增、电泳检测和序列测定、序列拼装及结果判定。现拟通过分子生物学DNA条形码技术鉴定鹅不食草正品以及部分批次含有的杂质物种。

3.1 仪器与材料

PCR仪(ABI VERITI); 分析天平(Mettler AB135-S); MM400球磨机(德国Retsch公司); 纯水仪(美国Millipore公司); Nano Value微量紫外分光光度计; 电泳仪EPS-301(美国Amersham公司); 全自动凝胶成像系统(英国Syngene公司)。

植物基因组DNA提取试剂盒(Plant Genomic DNA Kit, TIANGEN); 2×Taq Master Mix缓冲液(GK8006, GENEray); ExRed(ZS203-1, 庄盟生物); 琼脂糖(50002, Lonza); 引物(上海捷

瑞生物工程有限公司合成), ITS2引物(ITS2F: 5'-ATGCCGATACTTGGTGTGAAT-3'; ITS3R: 5'-GACG CTCTCCAGACTACAAT-3')。

3.2 模板DNA制备

供试品平行取样2份, 每份约20 mg, 按照DNA提取试剂盒说明书进行操作。采用微量紫外分光光度计对所得DNA进行定量测定。

3.3 PCR反应体系的制备

20 μL反应体系: 2×Taq Master Mix缓冲液: 10 μL; 引物: 上下游引物各0.4 μL; DNA模板: 3 μL; 灭菌超纯水: 6.2 μL; 阴性对照为无模板DNA的反应体系。

3.4 PCR扩增

以4000 rpm离心10 s后, 将PCR管插入PCR仪中, 进行如下反应: 95℃ 4 min, 95℃ 30 s, 55℃ 30 s; 72℃ 1 min; 72℃ 7 min; 共35个循环。

3.5 琼脂糖凝胶电泳检测

50×TAE电泳缓冲液的配制: 取242 g Tris碱, 57.1 mL冰醋酸, 37.2 g EDTA-Na₂·2H₂O, 加入适量去离子水, 充分搅拌溶解, 定容至1000 mL, 作为贮存液。进行凝胶电泳时稀释50倍成工作液。

1.5%琼脂糖凝胶的制备: 称取0.6 g琼脂糖, 加入40 mL 1×TAE电泳缓冲液, 微波炉中火加热煮沸3次至琼脂糖全部融化, 摇匀, 冷却至65℃左

右加入显色剂ExRed (1:10000), 充分混匀, 小心地倒入内槽板上, 使胶液缓慢展开, 直到整个玻璃板表面形成均匀胶层, 室温下静置直至凝胶完全凝固, 垂直轻拔梳子, 将凝胶及内槽放入电泳槽中, 添加1×TAE电泳缓冲液至刚没过胶板为止。

加样: 在Parafilm上将3 μL 扩增产物用移液器分别将样品加入胶板的样品槽内。

电泳: 加样后的凝胶板立即进行电泳, 电压5 V·cm⁻¹。当溴酚蓝移动到距离胶板下沿约2 cm处时, 停止电泳。

凝胶成像: 用凝胶成像系统拍照并保存结果。

3.6 扩增产物测序

将电泳结果显示为单一明亮条带的扩增产物进行测序。将测序结果用Codencode 软件进行拼接, 并将拼接好的序列于Genbank上进行比对分析。

鹅不食草样品的ITS2序列与Genbank上的鹅不食草序列高度一致, 不存在变异位点; 而2批杂质与鹅不食草的ITS2序列相比差异较大, 因此, 可以通过ITS2序列鉴别鹅不食草及其杂质。

将鹅不食草的ITS2序列在Genbank上进行比对, 得到比对结果为鹅不食草的基原植物菊科Compositae石胡荽属*Centipeda* 石胡荽*Centipeda Minima* (L.) A. Br. et Aschers.。杂质的ITS2序列均不能与石胡荽聚到一起, 与Genbank的比对结果分别为莎草科莎草属白鳞莎草*Cyperus Nipponicus* Franch. et Savat.和玄参科婆婆纳属阿拉伯婆婆纳*Veronica Persica* Poir.。

鹅不食草与2种杂质白鳞莎草和阿拉伯婆婆纳

的ITS2序列信息如下所示:

鹅不食草*Centipeda Minima*: CGCATCACGTCCGCCCCACCAACCATTCCCTTTAGGGATTTGTGTGATGGGGCGGAGATTGGTCTCCCGTGCCTTTGGTGGTTGGCGAAAATAAGAGTCCCCTTTGACGGACA-CA-CGGCTAGTGGTGGTTGATAAGACCCTCGTCTGTGTCTGTGTTTGGAGTCATAAGGGAAGACCTCTTAGATACCCCAACGTGTTGTCTTTTGATGATGCTTCGATCG

白鳞莎草*Cyperus Nipponicus*: AAGCCCATCAACGCTCGGTACCCGACCGCACGCGGACAGTGGCCCTCCGAGCCGCACGGGCACGGCGGGCTGAAGCCGAGGCCGTGCACCGCGTCCGGAGCGGCAAGTGGTGGGCTACAGCGCATGCCGACCCCGACCCGCGTCCACACCCGGCCCTAACGACCCACGACGAGGAGCCGTCGCGGACGTGCGACGCCTTCGGACCG

阿拉伯婆婆纳*Veronica Persica*: CGCATCGCGTCGCCCCCTCCAAAATCCCTAGGGATCTTGGAGCGGGAGCGGAAATTGGTCTCCCGTGCCTCCGGGCTCGTGGCCGGCCTAAATTAGATCCTGCATCGACGGA TGCCTCGACCACTGGTGTGAAAACTCTCTTGTGTCGAGCTGCACGTGCTTGTAGGCATCGACCA AACCACCGGCGCTTCGCGTGCCTACGACCG

鹅不食草匍匐生长于地面, 并且较细小, 常和杂草伴生。药材及饮片加工时未挑拣干净, 有10批次杂质超标较多。鹅不食草中存在的两种主要杂质: 一是莎草科莎草属白鳞莎草*Cyperus Nipponicus* Franch. et Savat.的地上部分; 二是玄参科婆婆纳属植物阿拉伯婆婆纳*Veronica Persica* Poir.的地上部分(如图3所示)。



A. 白鳞莎草



B. 阿拉伯婆婆纳

图3 鹅不食草中存在的杂草

4 总结和建议

通过本次专项抽验工作,鹅不食草的基原基本符合药典规定,但也发现较多批次鹅不食草饮片存在杂质现象,有些批次杂质所占比例在10%以上,个别批次杂质高达30%。通过分子生物学技术鉴定,正品符合药典规定,将混入的杂质鉴定为“白鳞莎草”和“阿拉伯婆婆纳”。

白鳞莎草产于江苏、河北和山西等省,为杂草,未见药用记载。阿拉伯婆婆纳分布于华东、华中及贵州、云南、西藏东部及新疆(伊宁)的广大地区,为归化的路边及荒野杂草,较少作药用。据报道,阿拉伯婆婆纳有一定的药用疗效,味苦、辛、咸、平,具有解热毒的功效,主治肾虚,风湿和疟疾。由于性味、功效和鹅不食草不同,混入较多的比例,会导致改变药材疗效,影响用药安全。

这2种杂质的地区分布和鹅不食草基本一致。由于鹅不食草药材较细小,推测是采收时混入,加工拣选不仔细,导致的药材质量偏低甚至会影响药材疗效,采收加工时应注意剔除杂草,保证药材质量和用药安全。此次鹅不食草总体质量评价为“一般”。

针对鹅不食草中部分批次杂质较多的问题,建议将评价抽验中发现的质量问题及时反馈给各生产企业。各生产企业应该加强对鹅不食草药材生产原料的监控,减少杂质的混入,保证产品的质量。监管部门应加强对鹅不食草生产、加工的监管,对市场情况进行跟踪,保障公众的用药安全和有效。

参考文献:

[1] 中国药典:一部[S]. 2015: 347, 637, 915, 1448, 1688.
[2] 石铸,傅国勋. 中国植物志:第76卷 第1分册[M]. 北京:科学出版社,1983:132.
[3] 张自强,田磊,邱斌,等. 鹅不食草药材的质量研究[J]. 中国医院用药评价与分析,2016,16(11):1462-1466.
[4] 管珂,谢艳,过立农,等. 鹅不食草HPLC特征图谱和7个成分含量测定[J]. 药物分析杂志,2018,38(1):151-157.
[5] 林远灿,高明. 鹅不食草的化学成分及药理研究进展

[J]. 浙江中医药大学学报,2011,35(2):303-304.

- [6] 蒲首丞,郭远强,高文远. 鹅不食草化学成分的研究[J]. 中草药,2009,40(3):363-365.
[7] 周娇娇,毕志明,黄炎,等. 鹅不食草的化学成分[J]. 药学与临床研究,2013,21(2):133-134.
[8] Liang HX, Bao FK, Dong XP, et al. Two New Antibacterial Sesquiterpenoids from *Centipeda Minima*[J]. Chemistry & Biodiversity, 2007, 4(12):2810-2816.
[9] Taylor RS, Towers GH. Antibacterial Constituents of the Nepalese Medicinal Herb, *Centipeda Minima*[J]. Phytochemistry, 1997, 47(4):631-634.
[10] Ding LF, Liu Y, Liang HX, et al. Two New Terpene Glucosides and Antitumor Agents from *Centipeda Minima*[J]. Journal of Asian Natural Products Research, 2009, 11(7):732-736.
[11] 刘宇,杨艳芳,刘红兵,等. 鹅不食草的化学成分及生物活性研究进展[J]. 湖北中医杂志,2005,(5):52-53.
[12] Su MX, Li YL, Chung HY, et al. 2 β -(isobutyryloxy) Floridenalin, A Sesquiterpene Lactone Isolated from the Medicinal Plant *Centipeda Minima*, Induces Apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma CNE Cells[J]. Molecules, 2009, 14(6):2135-2146.
[13] Huang SS, Chiu CS, Lin TH, et al. Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Aqueous Extract of *Centipeda Minima*[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 147(2):395-405.
[14] 张舒娜,张亚玉. 鹅不食草的临床应用及药理研究进展[J]. 吉林农业,2015,(19):76-77.
[15] 陈强,周春权,朱贲峰,等. 鹅不食草挥发油平喘作用的实验研究[J]. 中国现代应用药学,2010,27(6):473-476.
[16] 刘玉艳. 鹅不食草乙酸乙酯部位抗肿瘤活性成分的研究[D]. 武汉:湖北中医药大学,2010.
[17] 刘志刚,余洪猛,文三立,等. 鹅不食草挥发油治疗过敏性鼻炎作用机理的研究[J]. 中国中药杂志,2005,(4):53-55.

(收稿日期 2019年4月9日 编辑 范玉明)