

## · 巴西草药研究专题 ·

基于“二维特征鉴别法”的巴西草药  
*GENGIBRE* 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 对巴西草药 *GENGIBRE* 进行真伪鉴别。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 *GENGIBRE* 的基原,并测定其 6-姜辣素的含量,对样品进行遗传学与化学两方面的鉴别。结果 通过 DNA 条形码初步鉴定巴西草药 *GENGIBRE* 为芸香科植物,且与芸香科吴茱萸植物相似度最高,相似度范围为 97%~99%;巴西草药 *GENGIBRE* 中 6-姜辣素的含量远低于中国干姜,分别为 1.12 mg/g 和 7.61 mg/g。结论 本试验应用“二维特征鉴别法”,在遗传学和化学两方面均证明所用巴西草药 *GENGIBRE* 相对于中国干姜是伪品。该方法在对未知样品进行某品种的定向真伪鉴别方面具有潜在的应用价值。

【关键词】 巴西草药 干姜; 特征图谱; DNA 条形码; 6-姜辣素

【中图分类号】 R284 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.012

Research on authentication of Brazilian herb *GENGIBRE* 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, machanghua60@sina.com.cn

【Abstract】 Objective To establish a method for identifying the authenticity of Brazil herb *GENGIBRE*. Methods “Two dimensional feature identification method”, that is, the DNA barcoding technology combined with HPLC, the method was used to identify the botanical origin of Brazil herb *GENGIBRE* and detect the content of 6-gingerol in it. Results Preliminary identification of the Brazil herb *TANCHAGEM* with DNA barcoding method showed it was belong to Rutaceae and the similarity range between *TANCHAGEM* and *Fructus evodiae* is 97%~99%. The content of 6-gingerol in Brazil *GENGIBRE* was far below that in Chinese ginger, respectively 1.12mg/g and 7.61mg/g. Conclusion In this study, we applied the “two-dimensional feature identification method” to show that the Brazilian herbal *GENGIBRE* is counterfeit goods respect to Chinese ginger in genetics and chemistry The method has potential application value in the identification of a variety of unknown samples.

【Keywords】 Brazilian herb; *Zingiberis rhizoma*; Characteristic patterns; DNA barcoding; 6-Gingerol

干姜为姜科植物 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥

根茎<sup>[1]</sup>, 收载于 2010 年版《中华人民共和国药典》(一部), 在中国及巴西均是药食两用的常用药材, 具有温中散寒, 回阳通脉, 温肺化饮等功效, 可用于脘腹冷痛, 呕吐泄泻, 肢冷脉微, 寒饮喘咳。根据《葡汉词典》<sup>[2]</sup>, 巴西草药 *GENGIBRE* 在葡萄牙语中意为姜, 在国外作为调味品及辛香料被广泛使用, 与中国干姜的食用价值非常类似。为扩大中国干姜的药用资源, 本文拟从基因鉴别与化学成分鉴别相结合的角度对巴西草药 *GENGIBRE* 进行真伪鉴别及品种鉴定。

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)

作者介绍: 徐文英(1988-), 女, 2012 级硕士研究生。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

DNA 条形码技术是目前中药真伪鉴别及准确物种鉴定可靠的技术和方法,本研究拟对以巴西草药 *GENGIBRE* 的 ITS 序列进行 DNA 测序,作为基因鉴别结果。此外,中药干姜中所含 6-姜辣素 (6-Gingerol) 为其辛辣物质,具有强心、降血压、降血糖、降血脂、抗氧化、抗炎止痛等广泛的药理作用,其含量直接影响干姜的品质和药效。因此,选用 6-姜辣素为指标对两者进行化学成分鉴别。通过巴西草药 *GENGIBRE* 与中国干姜中 6-姜辣素的含量差异,结合两者的 DNA 条形码匹配度结果,为巴西草药 *GENGIBRE* 的品质鉴定及扩大中国干姜的药用资源提供理论依据<sup>[3-11]</sup>。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

药材:巴西草药 *GENGIBRE* 3 份(巴西隆城市市场,样品的凭证标本保存于北京中医药大学标本室)、中国干姜(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姜科植物姜 *Zingiber officinale* Rosc. 的干燥根茎)、6-姜辣素(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)、TProfessiona 型 PCR 扩增仪(德国 Biometra 公司,批号:20092237)、ContigExpress 软件。

岛津 LC-20AT 液相色谱仪(日本岛津公司)、水浴锅、粉碎机(型号:FW-100,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)、XBrige C18 色谱柱(150 mm×4.6 mm,5 μm,美国 Waters 公司)、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)。

## 2 方法与结果

采用 DNA 条形码技术和 HPLC 技术对巴西草药 *GENGIBRE* 进行真伪鉴别分析。即先根据样品的遗传信息确定其基源,结合指标性成分的含量高低或存在与否,相互印证得出结论。

### 2.1 DNA 条形码分析

2.1.1 DNA 提取 样品经乙醇消毒后,取每份样品加液氮研磨成细粉,用博迈德 DNA 提取试剂盒提取,按照说明书提取总 DNA,取 5 μL 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳。

2.1.2 ITS 序列的扩增 采用扩增 ITS 序列的通用引物,ITS 上游引物 P1:5'-AGAAGTCGTAACAAG-GTTTCCGTAGG-3';ITS 下游引物 P4:5'-TCCTCCGCT-TATTGATATGC-3'。扩增反应在 PCR 扩增仪上进行,50 μL 反应体系中含模板 2.5 μL,Tap Mix 酶 25 μL,引物 P1 2.5 μL,引物 P4 2.5 μL。扩增程序为:94℃ 预变性 5 分钟;94℃ 变性 50 秒;55℃ 退火 50 秒;72℃ 延伸 1 分钟;35 个循环,最后 72℃ 延伸 10 分钟。

2.1.3 测序 PCR 产物在紫外灯下从 1% 的琼脂糖凝胶上进行切胶,由上海生工生物工程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。PCR 产物电泳结果如图 1 所示,PCR 产物电泳在 750 bp 左右出现单一、清晰且明亮的条带。3 份样品的测序峰图良好,测序结果一致,截取 ITS 片段后选择一条序列用于后续分析。



K:空白;1~2:巴西草药 *GENGIBRE*;Marker:对照品

图1 PCR 产物电泳结果

2.1.4 序列分析 利用 contig1 软件对测序获得的正、反向序列进行拼接,根据 BLAST 所获相似度最高物种的 ITS 序列边界,截取待鉴定物种的 ITS 序列,对截取后待鉴定样品的 ITS 序列进行检索,综合考虑 Score 值、Coverage 值、evalue 值,初步确定相似度最高的物种为待鉴定样品的基源。结果如图 2 所示。图 2 表明,样品与芸香科吴茱萸植物相似度最高,相似度范围为 97% ~ 99%,因此初步鉴定该样品来自芸香科吴茱萸 *Tetradium ruticarpum*。

### 2.2 HPLC 法分析

2.2.1 对照品及供试品溶液的制备 对照品溶液制备:取 6-姜辣素对照品,精密称定,配制成 0.1014 mg/mL 的对照品溶液,使用前 0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得。

## 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
	<a href="#">Tetradium ruticarpum from China: Beijing 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and i</a>					1284	1284	99%	0.0	99%	<a href="#">EF432810.1</a>
	<a href="#">Tetradium ruticarpum from China: Jiangsu 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and</a>					1280	1280	99%	0.0	99%	<a href="#">EF432809.1</a>
	<a href="#">Tetradium ruticarpum from China: Shandong 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, ar</a>					1279	1279	99%	0.0	99%	<a href="#">EF432814.1</a>
	<a href="#">Tetradium ruticarpum from China: Fujian 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and in</a>					1273	1273	99%	0.0	99%	<a href="#">EF432812.1</a>
	<a href="#">Tetradium ruticarpum from China: Guangdong 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i</a>					1271	1271	99%	0.0	99%	<a href="#">EF432811.1</a>
	<a href="#">Tetradium ruticarpum from China: Guangdong 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, i</a>					1267	1267	99%	0.0	99%	<a href="#">EF432813.1</a>
	<a href="#">Linum usitatissimum 26S ribosomal RNA gene, 26S-18S ribosomal RNA intergenic spacer, 18S ribosomal RNA gene, internal transcribed spacer 1,</a>					1184	1270	99%	0.0	99%	<a href="#">EU307117.1</a>

图 2 巴西样品 *GENGIBRE* 的 ITS 序列 BLAST 结果

表 1 中国干姜 6-姜辣素的加样回收率结果

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	0.4201	3.194	3.161	6.564	102.8	103.5	2.34
2	0.3900	2.966	2.964	6.315	106.5		
3	0.4019	3.056	2.964	6.423	105.1		
4	0.3854	2.931	2.964	5.828	99.43		
5	0.4139	3.147	3.161	6.492	103.1		
6	0.4301	3.270	3.260	6.820	104.3		

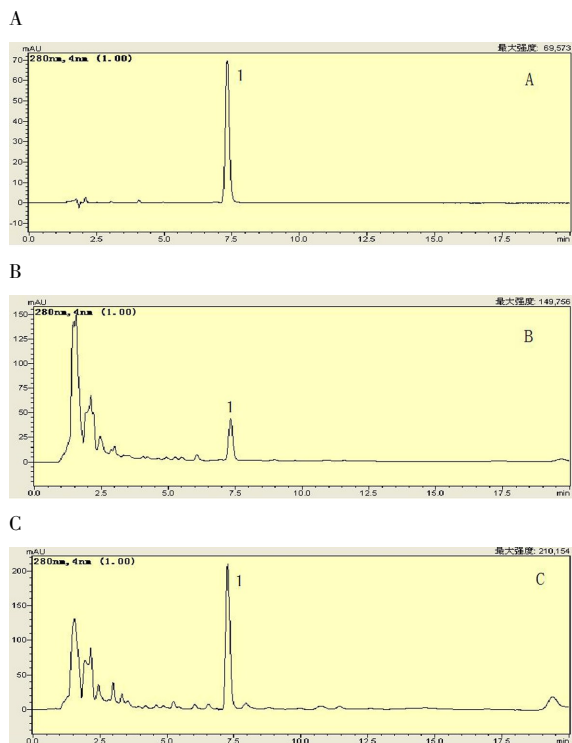
A: 对照品; B: 巴西草药 *GENGIBRE* 样品;  
C: 中国干姜样品(“1”: 6-姜辣素)

图 3 对照品溶液及各供试品溶液的 HPLC 图谱

供试品溶液制备: 取各样品粉末 0.8 g (粉碎机粉碎, 过 80 目筛), 置 50 mL 锥形瓶中, 准确移取甲醇 25 mL 加入, 准确称量, 水浴加热回流 30 分钟, 放冷至常温, 甲醇补重, 摇匀, 过滤, 续滤液 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 即得。

2.2.2 色谱条件 色谱柱: XBrige C<sub>18</sub> 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 5 μm, 美国 Waters 公司), 流动相: 0~20 分钟: 乙腈-水 (45:55), 流速: 1.0 mL/分钟, 进样量: 10 μL, 柱温: 30℃, 检测波长: 280 nm。

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及各样品供试溶液 10 μL, 按上述色谱条件进样分析, 各色谱图见图 3。如图所示, 测定方法专属性好, 待测成分与其他成分分离度大于 1.5, 且其他成分对待测成分测定无干扰。

2.2.4 线性关系考察 精密吸取“2.2.1”项下对照品溶液 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, 记录峰面积。线性方程为  $Y=737357X-34852$ ,  $R^2$  为 0.9999, 结果表明 6-姜辣素在 0.1014~4.056 μg 质量范围内线性关系良好。

2.2.5 精密度考察 精密称定中国干姜样品 0.8 g, 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, 连续进样 6 次, 每次进样 10 μL, 记录峰面积。结果显示, RSD 为 0.45%, 表明本法精密度良好。

2.2.6 稳定性考察 精密称定中国干姜样品 0.8 g, 按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液, 分别于室温放置 0 小时、2 小时、4 小时、6 小时、8 小时, 按“2.2.2”项下色谱条件进行测定, 记录峰面积。结果显示, RSD 为 1.07%, 表明本法稳定性良好。



2.2.7 重现性考察 精密称定中国干姜样品 0.8 g,一式 6 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 RSD 值。结果显示,RSD 为 1.05%,表明本法重复性良好。

2.2.8 加样回收率实验 取 6 份中国干姜样品,每份约 0.4 g,精密称定,分别精密加入一定量的 6-姜辣素标准溶液,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,6-姜辣素的平均回收率为 103.5%,RSD 为 2.34%,表明本法含量测定结果良好。结果见表 1。

### 2.3 6-姜辣素的含量测定结果

分别取巴西草药 *GENGIBRE*、中国干姜约 0.8g,精密称定,一式 3 份,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,并按“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,巴西草药、中国干姜中 6-姜辣素含量分别为 0.112% 和 0.759%。结果见表 2。

表 2 巴西草药 *GENGIBRE*、中国干姜中 6-姜辣素的含量( $n=3$ )

样品编号	6-姜辣素含量(%)
<i>GENGIBRE</i> -1	0.1126±0.0007
<i>GENGIBRE</i> -2	0.1135±0.0009
<i>GENGIBRE</i> -3	0.1122±0.0007
中国干姜-1	0.7605±0.0005
中国干姜-2	0.7542±0.0014
中国干姜-3	0.7671±0.0009
中国干姜-4	0.7587±0.0007
中国干姜-5	0.7529±0.0016
中国干姜-6	0.7601±0.0007

## 3 讨论

本实验采用“二维特征鉴别法”,对未知巴西草药 *GENGIBRE* 进行以中国干姜为标准的定向真伪鉴别。其一借助中药 DNA 条形码技术,对样本进行基原判别;其二利用 HPLC 技术对样品与定向鉴别品种中指标性成分进行含量测定。最终将所得判别结果与含量测定结果进行相互对比,综合评判样品真伪。由 DNA 条形码技术结果可知巴西草药 *GENGIBRE* 与芸香科植物吴茱萸相似度最高,相似度范围在 97%~99%,因此初步鉴定该样品来自芸香科吴茱萸 *Tetradium ruticarpum*。由 HPLC 法测定干姜中活性成分 6-姜辣素含量结果可知,两者均含

有 6-姜辣素,含量分别为 0.112% 和 0.761%。巴西样品 *GENGIBRE* 中 6-姜辣素含量远远低于 2010 年版《中华人民共和国药典》(一部)规定标准 0.60%,而中国干姜样品品质良好。综合两者结果可知,仅从化学成分角度进行真伪鉴别易出现假阳性,而仅从基因角度鉴别无法得知样品品质。因此,本实验利用两种方法结合比较,从而对未知样品进行“真伪优劣”的全面鉴别。

另外,本实验对巴西药草 *GENGIBRE* 中 6-姜辣素含量测定时出现假阳性结果,可能是由于吴茱萸的炮制方法中包含姜制法。因此,在进行干姜的真伪鉴别时,若干姜样品粉末中掺杂姜制吴茱萸粉末,则仅依据 HPLC 图谱中 6-姜辣素峰的存在无法判定未知样品是否为干姜,还需要额外的判别指标进行印证。本文采用的“二维特征鉴别法”为中药的质量控制、资源普查、新品种选育等方面的研究提供了新的思路,具有重要的现实意义。

## 参 考 文 献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(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] 陈洁艳,黄芳,羊超波,等. 高效液相色谱法测定生姜中的有效成分 6-姜辣素[J]. 科技创新导报,2015,(5):146.
- [4] 张宏武,安培坤. 生姜炮制品种及其临床应用刍议[J]. 西部中医药,2015,28(4):24-26.
- [5] 龙全江,徐雪琴. 干姜化学成分、药理作用及加工炮制研究文献分析[J]. 现代中药研究与实践,2015,29(1):82-83.
- [6] 邓仙梅,吴燕妮,王淑美,等. 正交试验优选干姜中姜辣素的提取工艺[J]. 中医学报,2015,30(1):83-85.
- [7] Maranon JA, de los Santos L, Lozano C, et al. HPLC-DAD selective method for ginger root powder and extracts naseastop as standardized not mutagenic ginger extract[J]. Planta Medica, 2014,80(10):832-832.
- [8] Yudthavorasit Soparat, Wongravee Kanet, Leepipatpiboon Natchanun. Characteristic fingerprint based on gingerol derivative analysis for discrimination of ginger (*Zingiber officinale*) according to geographical origin using HPLC-DAD combined with chemometrics[J]. Food Chemistry, 2014(158):101-111.
- [9] 白英鸽,梁光义,高源,等. HPLC 法测定比较人參四逆汤传统汤剂,复方颗粒剂和配方颗粒剂中 6-姜辣素含量[J]. 贵阳中医学院学报,2014,36(3):1-5.
- [10] 陈艳,周冬翠,张梅. 三种方法提取生姜有效部位群并测定 6-姜辣素含量[J]. 中国药师,2015,17(7):1099-11002.
- [11] 刘雯,刘佳乐,黄亮,等. HPLC 法测定生姜提取液中 6-姜酚含量的研究[J]. 广东化工,2014,41(17):169-170.

(收稿日期: 2015-08-22)

(本文编辑: 董历华)