

應用ITS序列鑑定茵陳蒿藥材及其製劑

李蕙君 謝詠筌 蔡佳芬 陳惠芳

食品藥物管理署 研究檢驗組

摘 要

茵陳蒿藥材基原為菊科植物濱蒿(*Artemisia scoparia*)或茵陳蒿(*Artemisia capillaris*)之乾燥地上部分。然而因為外觀型態相近，茵陳蒿與青蒿藥材(原植物黃花蒿 *Artemisia annua*)容易彼此誤用；而牛至(*Origanum vulgare* L.)藥材則因為別名為北茵陳、土茵陳，市面上也容易出現同名異物的混淆情況。為避免藥材使用錯誤而影響療效，本研究利用internal transcribed spacer (ITS)序列差異性，設計特異性的引子開發PCR-DNA定序之檢驗方法。價購市面上茵陳蒿及其常見之誤用品藥材總計4種品項36件藥材及38件製劑檢體進行試驗，研究結果證明此方法確實可有效地鑑定茵陳蒿及其誤用品之藥材基原，亦可應用於複方製劑之檢驗。

關鍵詞：茵陳蒿、ITS、Nested PCR-DNA定序

前 言

由於中藥材來自天然資源，可能因為外型類似、名稱相近或地方用藥習慣不同而出現誤用品、混淆品或代用品，導致影響藥效與安全。茵陳蒿藥材依「臺灣中藥典」記載⁽¹⁾正品基原為菊科(Compositae)植物濱蒿(*Artemisia scoparia*)或茵陳蒿(*Artemisia capillaris*)之乾燥地上部分。依照採收季節不同，春季採收幼苗習稱「綿茵陳」，秋季採割帶花蕾的植株則稱為「茵陳蒿」。

傳統典籍中記載茵陳蒿味微苦辛寒，有利濕退黃、清熱瀉火的功能，與澤瀉、白朮、茯苓、豬苓、桂枝同用，治療濕熱黃疸、身目發黃，如茵陳五苓散；與人參、防風、白朮、羌活、苦參、澤瀉、葛根、升麻、蒼朮、豬苓、黃芩、當歸身、知母、甘草同用，治療濕熱所

致的周身肢節腫痛、肩背沉重，如當歸拈痛湯。而在現代醫學的研究上，茵陳蒿萃取物或所含特定成分具有降低血壓⁽²⁾、抗B型肝炎病毒⁽³⁾、增強胰島素作用⁽⁴⁾、抑制肝臟的脂肪形成⁽⁵⁾、抗發炎和退熱⁽⁶⁾、抗氧化⁽⁷⁾、抗微生物⁽⁸⁾等藥理活性。

目前已發表的相關文獻中，雖有利用隨機複製多型性DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)技術⁽⁹⁾、多套式聚合酵素鏈鎖反應(multiplex PCR)技術^(10,11)來針對蒿屬植物品系進行鑑別，但其研究僅針對蒿屬植物，無法應用於常見混淆誤用品牛至，亦無法應用於製劑上。為增加茵陳蒿基原鑑別方法之適用性，提高檢驗的靈敏度以確保民眾用藥安全，本研究開發茵陳蒿及其常見誤用品鑑別方法，並可應用於藥材及製劑之檢驗。

材料及方法

一、材料收集

- (一)食藥署標本館對照標準藥材：濱蒿(O-2-4-07)、茵陳蒿(O-2-4-03)、黃花蒿(O-2-4-05)、奇蒿(O-2-4-02)、艾葉(C-3-5-06)、牛至(D-1-5-01)。
- (二)藥材檢體：共36件，含綿茵陳、茵陳蒿、青蒿及牛至藥材4個品項。
- (三)單方製劑：共12件，含綿茵陳、茵陳蒿、青蒿及牛至藥材4個品項。
- (四)複方製劑：共26件，含5種茵陳蒿及1種青蒿複方製劑。

二、試藥

- (一)一般試藥：lysis buffer [含100 mM三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl, Amresco, USA), pH 8.0、100 mM乙二胺四乙酸二鈉(EDTA, Amresco, USA)、1%十二烷基肌氨酸鈉(N-lauroyl sarcosine sodium salt, Sigma, USA)及1 mg/mL蛋白酶K (Proteinase K, GeneMark, Taiwan)]。phenol: chloroform: isoamyl alcohol = 25: 24: 1及chloroform: isoamyl alcohol = 24: 1，購自Amresco, USA。十六烷基三甲基溴化銨(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide; Cetrimonium Bromide, CTAB)，購自BDH, England。醋酸鈉、氯化鈉及異丙醇(Isopropanol)購自Merck, Germany。
- (二)純化套組：GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit購自GE healthcare, USA。DNA聚合反應試劑(PCR Master Mix 5X)及100 bp ladder marker購自GeneMark, Taiwan。ExoSAP-IT®套組購自USB Corporation, USA。BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit購自Applied Biosystems, USA。

- (三)引子：ITS引子對18F1 (GTGAA CCTGC GGAAG GATC)、18F2 (CTGCG GAAGG ATCAT TGTCG)及28R (CCGCC TGACC TGRGG TC)；蒿屬植物引子對Asp1F0 (CCTGC AAAGC AGAAC GACC)及Asp1R1 (GGCAC GAAAC AAAAG ACGAG)；牛至引子對OvF1 (TCTTC GGGTC ACGTC TTGC)及OvR1 (CACGA CTACG AGAGA CATTG)；18S rRNA通用性引子對18SrRNAF1 (AACGG CTACC ACATC CAAGG)及18SrRNAR1 (CCGAA GGCCA ACACA ATAGG)⁽¹²⁾，均購自PURIGO Biotechnology, Taiwan。

三、儀器設備

- (一)迷你電泳及鑄膠器 (Mupid-ex U, ADVANCE, Japan)
- (二)聚合酶連鎖反應器(PC-320, ASTEC, Japan)
- (三)影像分析系統(ImageQuant 300, GE Healthcare, USA)
- (四)自動定序儀(3130 Genetic Analyzer, ABI, Japan)

四、DNA萃取與純化

依照呂康祖等人2005年發表之萃取方法⁽¹³⁾進行，將檢體磨碎，稱取檢體100 mg置於2 mL微量離心管中，加入1 mL之lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 1% N-lauroylsarcosine sodium salt, and 1 mg/mL proteinase K)，56°C水浴1小時。加入與溶液等體積之phenol: chloroform: isoamyl alcohol (25: 24: 1, v/v/v)，混合萃取，以13,000 × g離心5分鐘。離心後取水層，加入65°C預熱的十六烷基三甲基溴化銨-氯化鈉溶液(10% CTAB in 0.7 M 氯化鈉)，混合後置於65°C水浴15分鐘。加入等體積chloroform: isoamyl alcohol (24: 1, v/v)，混合萃取，以13,000 × g離心5分鐘。離心後

取水層，加入0.7倍體積之異丙醇及0.1倍體積之3 M醋酸鈉溶液，以13,000 × g離心5分鐘。離心後倒去上清液，使沉澱物風乾後，加入50 - 100 μL無菌水溶解。DNA溶液再以PCR DNA and Gel Band Purification Kit純化後供PCR反應使用。

五、PCR及nested PCR反應與電泳

(一)蒿屬植物引子對PCR反應

取適量藥材檢體DNA溶液作模板，以25 μM Asp1F0、Asp1R1引子對各0.5 μL，加入DNA聚合反應試劑進行PCR擴增反應，條件為94°C 30秒、58°C 30秒、72°C 30秒共35週期。

(二)牛至引子對PCR反應

取適量藥材檢體DNA溶液作模板，以25 μM OvF1、OvR1引子對各0.5 μL，加入DNA聚合反應試劑進行PCR擴增反應，條件為94°C 30秒，58°C 30秒，72°C 30秒共35週期。

(三)蒿屬植物nested PCR反應

取適量製劑檢體 DNA溶液作模板，以25 μM 18F2、28R引子對各0.5 μL，加入DNA聚合反應試劑進行第一次PCR擴增反應，條件為94°C 30秒，60°C 30秒，72°C 30秒，共30週期。取第一次PCR產物2 μL作模板，繼以25 μM Asp1F0、Asp1R1引子對各0.5 μL，加入DNA聚合反應試劑進行第二次PCR擴增反應，條件為94°C 30秒，58°C 30秒，72°C 30秒共30週期。

(四)牛至nested PCR反應

取適量製劑檢體 DNA溶液作模板，以25 μM 18F2、28R引子對各0.5 μL，加入DNA聚合反應試劑進行第一次PCR擴增反應，條件為94°C 30秒，60°C 30秒，72°C 30秒，共30週期。取第一次PCR產物2 μL作模板，繼以25 μM OvF1、OvR1引子對各0.5 μL，加入DNA聚合反應試劑進行第

二次PCR擴增反應，條件為94°C 30秒，58°C 30秒，72°C 30秒共30週期。

(五)電泳試驗

PCR反應完成後取擴增產物5 μL與染劑(EZ-vision DNA dye 6X)混合，以2%瓊脂膠體進行電泳分析，以ImageQuant 300影像系統觀察結果。

六、DNA定序與序列分析

將PCR產物以Exo-SAP IT套組純化，再以BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit定序反應後，置入96孔盤以3130 Genetic Analyzer自動定序儀作DNA序列分析。所得定序結果利用美國國家衛生院GenBank資料庫與分析軟體進行序列比對。

結果與討論

本研究收集食藥署標本館之濱蒿、茵陳蒿及相關誤用對照藥材如青蒿、牛至、奇蒿、艾葉等先取得其ITS序列，再收集美國國家衛生院之GenBank資料庫相關物種序列進行比對，分析茵陳蒿及相關誤用藥材之ITS序列差異比較(如圖一)，設計針對蒿屬植物(以Asp代表)引子對Asp1F0-Asp1R1與牛至(以Ov代表)引子對OvF1-OvR1。PCR條件優化後之測試產物電泳結果如圖二所示，以Asp引子對放大後可得約572鹼基對之產物，以Ov引子對放大可得約450鹼基對之產物。擴增產物純化後以定序儀進行雙向定序，得到該檢體的定序結果，與GenBank資料庫收集序列及標本館對照藥材定序序列進行比對後得到鑑定結果。

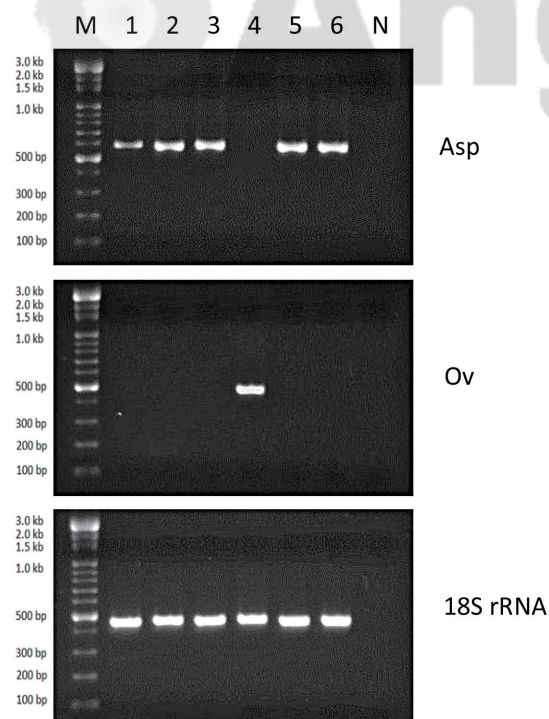
本研究價購藥材檢體包含綿茵陳、茵陳蒿、青蒿與北茵陳共計36件，藥材檢體鑑定結果如表一。分析其鑑定結果，市售藥材中綿茵陳誤用情況較少，9件中僅有1件外觀特別細碎的檢體檢出艾的DNA序列；8件茵陳蒿藥材中有3件為正品茵陳蒿，但有3件檢出

應用ITS序列鑑定茵陳蒿藥材及其製劑

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.306b)

[illegible]

圖一、茵陳蒿相關藥材ITS序列比較
淺灰色底色表示Asp1F0- Asp1R1引子對位置；深灰色底色表示OvF1- OvR1引子對位置



圖二、茵陳蒿及其相關混淆品藥材之PCR鑑別條件測試

分別使用以下引子對放大: Asp為蒿屬物種引子對(Asp1F0-Asp1R1)、Ov為牛至引子對(OvF1-OvR1)、18S rRNA為通用性引子對(18S rRNAF1-18S rRNAR1)

M: 100bp DNA ladder marker, Lane 1: 濱蒿, Lane 2: 茵陳蒿, Lane 3: 青蒿, Lane 4: 牛至, Lane 5: 奇蒿, Lane 6: 艾葉, N: 空白對照組(negative control)

青蒿與牛至序列, 2件檢出野艾蒿(*Artemisia lavandulifolia*)與牛至序列; 而16件青蒿藥材中則有9件鑑定出青蒿, 但有7件檢出茵陳蒿序列(包含3件來自青草店的蚊仔煙莖枝樣品)。此外, 標示北茵陳藥材雖然均檢測出牛至序列, 但仍有2件混有野艾蒿、1件混有青蒿的情形。結果顯示, 標示為茵陳蒿的藥材摻混誤用率高達62.5%, 標示為青蒿的藥材誤用率則約為43.8%, 誤用率都相當高。不過細分藥材檢體來源時則可發現, 誤混用集中在中藥房與青草

店藥材。其中在青草店購買青蒿時, 容易買到另外標示蚊仔煙之莖枝狀樣品, 此與青草店慣用名稱與中藥行不同有關。由於許多藥材都有名稱類似混誤用的問題, 使用時更需要特別注意。

單方製劑檢體的鑑定結果如表二, 茵陳蒿、綿茵陳與青蒿單方製劑鑑定結果均使用正確的藥材基原, 如同中藥廠藥材檢體之鑑定結果。3件北茵陳單方製劑有2件檢出牛至序列, 但分別混有艾與茵陳蒿序列, 另1件則誤用青蒿。含茵陳蒿或青蒿之複方製劑檢體鑑定結果如表三。在23件茵陳蒿複方製劑中, 14件均檢出茵陳蒿序列, 但有3件同時混有牛至序列與1件同時混有地椒(*Thymus quinquecostatus*)序列; 另有2件同時檢出野艾蒿與牛至序列、2件為誤用青蒿、而1件檢體無蒿屬或牛至擴增產物。茵陳蒿複方製劑之摻混誤用率約為39.1%。而3件使用青蒿之複方製劑中1件為正品青蒿序列, 但有2件檢出茵陳蒿, 其中1件同時檢出地椒序列。

其中地椒為牛至同屬近緣植物, ITS序列與牛至之相似度也高達93%。而檢出地椒序列的2件複方檢體來源相同且製造日期相近, 推測可能來自同一批原料, 惟複方製劑組成複雜, 無法由現有資料確知是由哪一藥材誤混用的結果。

根據利用本研究建立的Nested PCR-DNA定序方法進行市售品之調查結果, 無論是在藥材或製劑檢體中茵陳蒿、青蒿和牛至藥材經常彼此混淆誤用, 特別是在青草店及中藥房誤用比率相當高, 可能需要加強相關業者之用藥專業知識宣導與檢查監督。此外, 在牛至藥材檢體中可觀察到常有檢出其他蒿屬植物序列的情形, 從藥材外觀上就能發現還有很多其他植物枝葉參雜其中, 雖然可能由於藥材採收工序不敷成本而未經撿選剔除, 但過多摻雜物質仍有影響藥效的疑慮與增重之嫌。藥材摻混誤用不但影響藥品品質, 更可能造成療效差異而危害

應用ITS序列鑑定茵陳蒿藥材及其製劑

表一、茵陳蒿相關藥材檢體PCR-DNA定序方法鑑定結果

藥材名稱	檢體編碼	藥材來源	Asp引子對PCR-定序鑑定結果	Ov引子對PCR-定序鑑定結果
綿茵陳	AcS_CSZ	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcS_SC	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcS_SCT	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcS_SF	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcS_SH	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcS_CFT	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcS_CSH	中藥房	茵陳蒿	- ^a
	AcS_HB	中藥房	茵陳蒿	- ^a
	AcS_QY	中藥房	艾	- ^a
茵陳蒿	AcF_CFT	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcF_CSZ	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcF_SF	中藥廠	茵陳蒿	- ^a
	AcF_CSH	中藥房	青蒿	牛至
	AcF_LAT	中藥房	青蒿	牛至
	AcF_QY	中藥房	野艾蒿	牛至
	AcF_SS	中藥房	野艾蒿	牛至
	AcF_ZY	中藥房	青蒿	牛至
青蒿	Aa_CFT	中藥廠	青蒿	- ^a
	Aa_HS	中藥廠	青蒿	- ^a
	Aa_SC	中藥廠	青蒿	- ^a
	Aa_SC02	中藥廠	青蒿	- ^a
	Aa_SF	中藥廠	青蒿	- ^a
	Aa_CSH	中藥房	青蒿	- ^a
	Aa_HB	中藥房	茵陳蒿	- ^a
	Aa_HC	中藥房	茵陳蒿	- ^a
	Aa_KL	中藥房	青蒿	- ^a
	Aa_LAT	中藥房	青蒿	- ^a
	Aa_ZY	中藥房	茵陳蒿	- ^a
	Aa_SS	青草店	茵陳蒿	- ^a
	Aa_DA	青草店	茵陳蒿	- ^a
	Aa_SY	青草店	茵陳蒿	- ^a
	Aa_TS	青草店	青蒿	- ^a
	Aa_YS	青草店	茵陳蒿	- ^a
北茵陳	Ov_SC	中藥廠	野艾蒿	牛至
	Ov_SF	中藥廠	野艾蒿	牛至
	Ov_HB	中藥房	青蒿	牛至

^a “-” 表示進行PCR反應無擴增產物

表二、單方製劑檢體Nested PCR-定序方法鑑定結果

單方製劑 名稱	檢體編碼	Asp引子對 Nested PCR- 定序鑑定結果	Ov引子對 Nested PCR- 定序鑑定結果
綿茵陳	AcS-S-CSZ	茵陳蒿	- ^a
	AcS-S-SC	茵陳蒿	- ^a
	AcS-S-SF	茵陳蒿	- ^a
茵陳蒿	AcF-S-CSZ	茵陳蒿	- ^a
	AcF-S-KP	茵陳蒿	- ^a
青蒿	Aa-S-CSZ	青蒿	- ^a
	Aa-S-KP	青蒿	- ^a
	Aa-S-SC	青蒿	- ^a
	Aa-S-SF	青蒿	- ^a
北茵陳	Ov-S-KP	艾葉	牛至
	Ov-S-SC	茵陳蒿	牛至
	Ov-S-SF	青蒿	- ^a

a. “-” 表示進行Nested PCR反應無擴增產物

民眾健康，針對茵陳蒿藥材目前混誤用狀況，仍待後續管理宣導措施，以保障用藥安全及國民健康。

參考文獻

1. 行政院衛生署臺灣中藥典編修小組。2013。臺灣中藥典。第二版。208頁，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北。
2. Cho, J.Y., Park, K.H., Hwang, do.Y., Chanmuang, S. and *et al.* 2015. Antihypertensive Effects of Artemisia scoparia Waldst in Spontaneously Hypertensive Rats and Identification of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitors. *Molecules*. 20(11): 19789-19804.
3. Geng, C.A., Huang, X.Y., Chen, X.L., Ma, Y.B. and *et al.* 2015. Three new anti-HBV active constituents from the traditional Chinese herb of Yin-Chen (*Artemisia scoparia*). *J Ethnopharmacol*. 176: 109-117.
4. Richard, A.J., Fuller, S., Fedorcenco, V., Beyl, R. and *et al.* 2014. Artemisia scoparia enhances adipocyte development and endocrine function in vitro and enhances insulin action in vivo. *PLoS One*. 9(6): e98897.
5. Wang, Z.Q., Zhang, X.H., Yu, Y., Tipton, R.C. and *et al.* 2013. Artemisia scoparia extract attenuates non-alcoholic fatty liver disease in diet-induced obesity mice by enhancing hepatic insulin and AMPK signaling independently of FGF21 pathway. *Metabolism*. 62(9): 1239-1249.
6. Habib, M., Waheed, I. 2013. Evaluation of anti-nociceptive, anti-inflammatory and antipyretic activities of Artemisia scoparia hydro-methanolic extract. *J Ethnopharmacol*. 145(1): 18-24.
7. Singh, H.P., Kaur, S., Mittal, S., Batish, D.R. and *et al.* 2010. In vitro screening of essential oil from young and mature leaves of Artemisia scoparia compared to its major constituents for free radical scavenging activity. *Food Chem Toxicol*. 48(4): 1040-1044.
8. Cha, J.D., Jeong, M.R., Jeong, S.I., Moon, S.E. and *et al.* 2005. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of Artemisia scoparia and A. capillaris. *Planta Med*. 71(2): 186-190.
9. Lee, M.Y., Doh, E.J., Park, C.H., Kim, Y.H. and *et al.* 2006. Development of SCAR marker for discrimination of Artemisia princeps and A. argyi from other Artemisia herbs. *Biol Pharm Bull*. 29(4): 629-633.
10. Lee, M.Y., Doh, E.J., Kim, E.S., Kim, Y.W. and *et al.* 2008. Application of the multiplex PCR method for discrimination of Artemisia iwayomogi from other Artemisia herbs. *Biol Pharm Bull*. 31(4): 685-690.

表三、複方製劑檢體Nested PCR-定序方法鑑定結果

製劑種類	方劑名稱	檢體編碼	Asp引子對Nested PCR- 定序鑑定結果	Ov引子對Nested PCR- 定序鑑定結果
茵陳蒿製劑	甘露飲	A-CFT	茵陳蒿	- ^a
		A-CSZ	茵陳蒿	- ^a
		A-CY	茵陳蒿	牛至
		A-SC	茵陳蒿	- ^a
		A-SCT	- ^a	- ^a
		A-SF	茵陳蒿	- ^a
		A-STT	茵陳蒿	- ^a
茵陳蒿製劑	甘露消毒丹	B-CSZ	青蒿	- ^a
		B-KD	青蒿	- ^a
		B-KP	野艾蒿	牛至
		B-SC	茵陳蒿	地椒
		B-SF	茵陳蒿	牛至
		B-STT	野艾蒿	牛至
茵陳蒿製劑	茵陳蒿湯	C-SC	茵陳蒿	- ^a
		C-SF	茵陳蒿	- ^a
		C-STT	茵陳蒿	- ^a
茵陳蒿製劑	當歸拈痛湯	D-CSZ	茵陳蒿	牛至
		D-SC	茵陳蒿	- ^a
		D-SF	茵陳蒿	- ^a
		D-STT	茵陳蒿	- ^a
茵陳蒿製劑	茵陳五苓散	F-CSZ	茵陳蒿	- ^a
		F-SF	茵陳蒿	- ^a
		F-STT	茵陳蒿	- ^a
青蒿製劑	秦艽鱉甲湯	E-SC	茵陳蒿	地椒
		E-SF	茵陳蒿	- ^a
		E-STT	青蒿	- ^a

a. “-” 表示進行Nested PCR反應無擴增產物

11. Doh, E.J., Paek, S.H., Lee, G., Lee, M.Y. and *et al.* 2016. Application of Partial Internal Transcribed Spacer Sequences for the Discrimination of *Artemisia capillaris* from Other *Artemisia* Species. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2016: 7043436.

12. Lin, J. J., Fleming, R., Kuo, J., Matthews, B.F. and *et al.* 2000. Detection of Plant Genes Using a Rapid, Nonorganic DNA Purification Method. *Bio Techniques.* 28(2): 346-350

13. Lu, K.T., Cheng, H.Y., Lo, C.F., Chang, H.C. and *et al.* 2005. Identification of

Saposhinkoviae Radix in concentrated Chinese
medicine preparations by nested PCR and

DNA sequencing methods. J. Food Drug Anal.
13(3): 219-224.

Identification of Artemisiae Scopariae Herba and its Preparations Based on ITS Sequence by Nested PCR-DNA Sequencing Method

HUI-CHUN LEE, YUNG-CHUAN HSIEH, CHIA-FEN TSAI
AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Artemisiae scopariae herba is the dried aerial part of *Artemisia scoparia* Waldst. or *Artemisia capillaris* Thunb. However, it is often confused with other Artemisia species because of their similar outward appearances. It is also confused with *Origanum vulgare* L. because the latter has similar common names. To prevent the misuse of the herb, specific primers for nested-PCR were designed based on their internal transcribed spacer (ITS) sequences, and amplified products were sequenced for the authentication. In this study, 36 samples of raw herbs and 38 traditional Chinese medicine (TCM) preparations of artemisiae scopariae herba were analysed. The results showed that the nested PCR-DNA sequencing method was useful for the identification of artemisiae scopariae herba in the raw material form and in TCM preparations.

Key words: artemisiae scopariae herba, internal transcribed spacer (ITS), nested PCR-DNA sequencing