

利用Nested PCR-DNA定序方法鑑定秦艽藥材及其製劑成分

呂康祖 徐曉玫 羅吉方 林哲輝

第三組

摘要

秦艽 *Gentianae Macrophyllae Radix* 為秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、麻花秦艽 *Gentiana straminea* Maxim.、粗莖秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 或小秦艽 *Gentiana dahurica* Fisch. 的乾燥根，各種秦艽藥材外觀、鏡檢等物理方法上常不容易區分，在這次的研究中，將應用Nested PCR-DNA定序方法做藥材基原上的鑑定，同時對秦艽製劑中所使用的藥材作鑑別。以本局秦艽標準品internal transcribed spacer (ITS) DNA序列作為比對標準，向中藥廠及藥房價購秦艽藥材及製劑檢體，DNA萃取是以修正後的傳統有機萃取方法，配合純化套組，以取得純化之DNA，再應用Nested PCR擴增藥材成分的ITS片段後定序，比對秦艽標準品及GenBank的序列，以取得鑑定結果。結果顯示20件藥材檢體中有6件外觀、組織鏡檢方法鑑別的結果不同，而11件製劑檢體中，7件使用小秦艽、2件使用粗莖秦艽、2件使用麻花秦艽及1件使用 *Gentiana triflora*。本研究方法可協助外觀、鏡檢方法鑑別秦艽藥材，同時可鑑定秦艽製劑中所使用之藥材基原。

關鍵詞：秦艽、Nested PCR、DNA定序、鑑定

前言

秦艽在中華中藥典上並未收載，根據《中國藥典》2000年版記載，秦艽為龍膽科龍膽屬多年生草本植物秦艽 *Gentiana macrophylla* Pall.、麻花秦艽 *Gentiana straminea* Maxim.、粗莖秦艽 *Gentiana crassicaulis* Duthie ex Burk. 或小秦艽 *Gentiana dahurica* Fisch. 的乾燥根。前三種按性狀不同分別習稱「秦艽」和「麻花艽」，後一種習稱「小秦艽」。主產於中國甘肅、陝西、內蒙古、四川等地。春、秋二季採挖，曬乾，去蘆頭，切片用。

秦艽始載於《神農本草經》，列為中品，其藥效在典籍上的記載，有《本經》：「主寒熱邪氣，寒濕風痺，肢節痛，下水，利小便。」而在《本草綱目》記載：「手足不遂，黃疸，煩渴之病須之，取其去陽明之濕熱也。陽明有濕，則身體酸痛燦熱，有熱則日晡潮熱骨蒸。」方劑上的使用有：治療風寒濕痺，肢節疼痛發涼，遇寒即

發，與天麻、羌活、當歸、川芎等配伍的秦艽天麻湯，骨蒸潮熱時，與知母、地骨皮、鱉甲等同用的秦艽鱉甲湯等。現代醫學的研究上，秦艽在預防類風濕性關節炎⁽¹⁾及肝損傷的抑制⁽²⁾等方面，有相關的研究論文發表。

中國大陸所生產的秦艽種類繁多，除了《中國藥典》2000年版記載的三種秦艽外，還有許多同屬的近緣植物也被當地拿來用做民間用藥，如分布在四川、雲南、西藏各地的粗莖龍膽 (*G. crassicaulis* Duthie ex Burkill)，西藏、雲南等地的西藏龍膽 (*G. tibetica* King) 等等，而在GenBank資料庫裏，標記基因的序列相同，而以不同學名的情形，例如 *G. olivieri* 與 *G. kaufmanniana* 在 internal transcribed spacer (ITS) 的DNA序列就完全一致，這顯示同一種植物的外型特徵在適應不同生長環境下會有所改變，以致有著不同的命名，而其基因序列卻是顯示應為同一種植物。本研究即在建立秦艽基因層面的鑑別方法，同時可以用

於鑑定在中藥製劑中所用的秦艽種類，確保藥材使用的正確性。

材料與方法

一、材料

(一)檢體

1. 藥材：共21件，包括標準品粗莖秦艽1件，購自製技中心，保存於本組中藥材標本室，標本編號B-2-C02，及選自市售秦艽藥材鑑別研究計畫採購秦艽之藥材20件，已經過外觀與組織切片鑑定(該計畫結果已發表於2008年調查研究年報⁽³⁾)。
2. 製劑：共12件，包括1件秦艽單方製劑，11件複方製劑。

(二)試藥

1. 一般化學藥品：購自Sigma (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.)、Merck (Merck, Darmstadt, Germany)、Amresco (Ohio, U.S.A.)。
2. PCR純化套組：GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit購自GE Healthcare (Buckinghamshire, UK)。
3. DNA聚合反應試劑：PCR Master Mix 5X (Taq polymerase 1.25U, dNTP 200 μ M, reaction buffer)購自GeneMark (Bio Basic, Canada)。
4. 引子：購自百力(臺灣)，鑑別秦艽檢體之引子為PCR時用GmF (5'-CGATT CCTGCTAAGCAGACG-3')、GmR (5'-TCGTGGCAGGCGTCGTGA-3')，Nested PCR用GmF1 (5'-TTCGGGAY-GAGGGAAACCA-3')及GmR1 (5'-CRAC-GCTTGCATTAGGGTCA-3', R=A/G)，秦艽藥材僅需做PCR，不需進行Nested PCR。
5. 瓊脂膠體：Agarose B Low EEO購自Gene Mark (Bio Basic, Canada)。
6. 100 bps ladder marker及6倍載入膠片緩衝液：GeneMark (Bio Basic, Canada)。

(三)器材

1. 迷你電泳槽及鑄膠器(Mupid II, Cosmo Bio,

Chuo-Ku, Tokyo, Japan)。

2. 聚合酶連鎖反應器(Gradient Palm-cycler, Corbett Research Co., Australia and Astec PC320, Astec株式會社, Japan)。
3. 影像系統(ImageQuant 300, GE Healthcare, UK)。

二、方法

(一)DNA萃取與純化

DNA萃取與純化方法是依照本局已發表的論文“Identification of Saposhinkoviae Radix in Concentrated Chinese Medicine Preparations by Nested PCR and DNA Sequencing Methods”⁽⁴⁾的方法進行，將檢體藥材及製劑檢體磨碎或切碎，秤取100 mg置於2 mL微量離心管中搗碎，加入1 mL之lysis buffer (100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 1% N-lauroyl sarcosine 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12000 \times g離心5分鐘。離心後取水層，加入65°C預熱的CTAB-NaCl溶液(10% hexadecyltrimethylammonium bromide in 0.7 M NaCl)，使CTAB濃度大於1%，加入NaCl溶液使濃度大於0.7 M，混合後置於65°C水浴15分鐘，加入等體積之chloroform : isoamyl alcohol (24 : 1; v/v)，混合萃取，以12000 \times g離心5分鐘。離心後取水層，加入0.7倍體積之isopropanol及1/10倍體積之3 M sodium acetate_(aq)，以12000 \times 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 μ L之無菌水溶解。以PCR純化套組純化檢體DNA後，DNA溶液供PCR與Nested PCR之用。

(二)PCR與Nested PCR

藥材部分取2 μ L DNA溶液作模板，25 μ M primer GmF、GmR各1 μ L進行PCR，條件為94°C/30 sec，58°C/30 sec，72°C/30 sec共40 cycles。

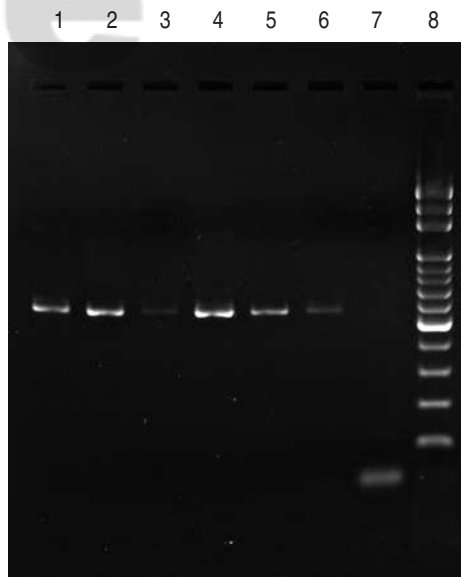
製劑部分取1 μL DNA溶液作模板，25 μM primer GmF、GmR各0.5 μL 進行PCR，條件為94°C/30 sec，59°C/30 sec，72°C/30 sec共30 cycles。取第一次PCR產物取1 μL 作模板，25 μM primer GmF1、GmR2各0.5 μL 進行Nested PCR，條件為94°C/30 sec，61°C/30 sec，72°C/30 sec共30 cycles。

(三)電泳與定序分析

取PCR產物5 μL ，與6倍載入膠片緩衝液1 μL 混合，置入1.8 %瓊脂膠體，在電泳槽(+)極端加入0.5 μL 10 mg/mL ethidium bromide後，進行電泳，電泳條件100V、30分鐘，以影像系統觀察，確認PCR結果，並拍攝影像。PCR結果確認後，委託明欣(台北，台灣)進行DNA定序，將定序結果與美國國家衛生院之GenBank資料庫進行序列比對，得到鑑定結果。

結果與討論

本局目前有的秦艽標準品為粗莖秦艽 *Gentiana crassicaulis* (B-2-C-02)，另外有一件小秦艽 *G. dahuria* 藥材是經過同仁以外觀及組織鏡檢確認，這兩件檢體再經過與GenBank的DNA序列比對確認基原。本次研究，秦艽藥材部分是與品市售秦艽藥材鑑別研究計畫合作，提供該研究計畫基因分析法的方法與鑑定結果，以對照組織鏡檢鑑定方法。使用的引子是根據標準品序列及GenBank中 *Gentiana* 屬植物ITS序列來設計，PCR的結果如圖一所示。藥材檢體因為DNA單純並且抽取所DNA量多，無不同種DNA互相干擾之虞，僅需進行PCR即可獲得結果。所有秦艽藥材檢體均能夠以設計的引子GmF、GmR，經PCR產生接近600 bps大小的DNA片段產物，更進一步將這些PCR產物進行定序分析，再與標準品序列與GenBank序列資料比對，可以得到DNA序列鑑定的結果，如表一所示，20件藥材檢體中，有12件藥材檢體為 *G. crassicaulis*、2件麻花秦艽 *G. straminea*、3件 *G. dahuria*、2件澤庫秦艽 *G. zekuensis* 及1件天山龍膽 *G. tianschanica*，其中澤庫秦艽 *G. zekuensis* (GenBank accession No.: GI 89275325)



圖一、檢驗秦艽藥材之 PCR 結果電泳

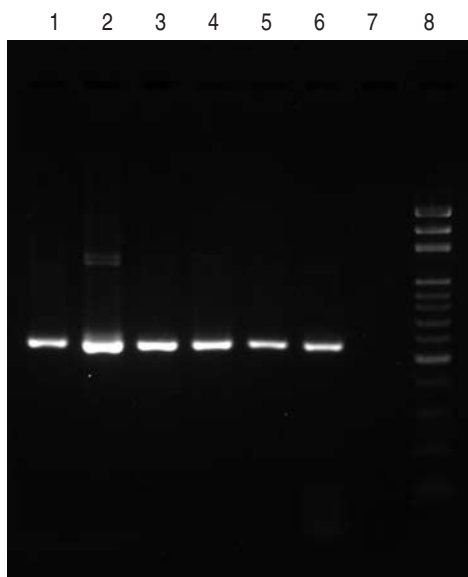
Lane 1: 37-6, Lane 2: 37-8, Lane 3: 37-9, Lane 4: B-1, Lane 5: B-5,

的序列與 *G. officinalis* (GenBank accession No.: GI 89275308) 僅有1個鹽基的差異，而與大葉秦艽 *G. macrophylla* (GenBank accession No.: GI 89275321) 也只有2個鹽基上的差異，天山龍膽 *G. Tianschanica* (GenBank accession No.: GI 89275319) 的序列與 *G. Olivieri* (GenBank accession No.: GI 89275317)、*G. Kaufmanniana* (GenBank accession No.: GI 89275314) 也僅有1個鹽基的差異，這些有著不同命名，而DNA序列十分相似的植物，顯示彼此的親緣性十分接近，外觀上的差異使得它們有著不同的名稱，仔細區分下，或可歸類為變種。

藥材檢體PCR-DNA定序方法鑑定結果與鏡檢方法相較，藥廠藥材與中藥房藥材檢體共有6件是不相符合(表一所示)，其中澤庫秦艽與天山龍膽的外觀型態與組織特徵較少有文獻記載，很可能因此而被歸納判斷為麻花秦艽，但是在DNA序列的層面上，麻花秦艽與澤庫秦艽、天山龍膽都有相當的差異，另外對於有3件DNA序列鑑定為小秦艽，而外觀及組織鏡檢鑑定為粗莖秦艽、麻花秦艽的藥材檢體，原因可能與藥材植物的

表一、秦艽藥材檢體PCR-DNA定序方法與外觀及組織鏡檢鑑定方法鑑定結果

編號	來源	PCR-DNA定序	外觀及組織鏡檢鑑定
37-1	中藥廠	<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
37-2		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
37-3		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
37-4		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
37-6		<i>Gentiana straminea</i>	<i>Gentiana straminea</i>
37-8		<i>Gentiana zekuenis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
37-9		<i>Gentiana tianschanica</i>	<i>Gentiana straminea</i>
37-11		<i>Gentiana dahuria</i>	<i>Gentiana straminea</i>
37-13		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
37-14		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
B-1	中藥房	<i>Gentiana zekuenis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
B-5		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
B-6		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
B-7		<i>Gentiana straminea</i>	<i>Gentiana straminea</i>
B-8		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
B-9		<i>Gentiana dahuria</i>	<i>Gentiana straminea</i>
B-11		<i>Gentiana dahuria</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
B-12		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
B-14		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>
B-16		<i>Gentiana crassicaulis</i>	<i>Gentiana crassicaulis</i>



圖二、檢驗秦艽製劑中秦艽成分之 Nested PCR 結果電泳

Lane 1: Gm1B, Lane 2: Gm2D, Lane 3: Gm3A, Lane 4: Gm4B, Lane 5: Gm4C, Lane 6: Gm5A, Lane 7: blank (no template), Lane 8: 100 bps ladder maker

phenotype受到環境影響，而出現非特異性的性狀，導致外觀與組織鏡檢結果上的認知差異，而產生PCR-DNA定序方法鑑定結果有所差異的情形。

製劑部分，為避免藥材間的互相干擾及提高PCR的專一性，需運用兩組引子GmF、GmR與GmF1、GmR1，對製劑檢體所抽取的DNA進行Nested PCR，再將Nested PCR產物進行電泳，結果如圖二所示，所有製劑檢體DNA片段皆可被擴增序列，將所有Nested PCR產物進行DNA定序，所得序列經過分析比對，鑑定的結果如表二，其中比較特別的是檢體Gm4B，Gm4B序列和GenBank *Gentiana triflora* (GenBank accession No.: GI 89275329)最相近，但仍有7個鹼基的差異，是屬於同屬植物誤用的情形，Gm4B序列表示如圖三。11件製劑檢體中，檢出2件含有*G. crassicaulis*、2件含*G. straminea*、7件含*G. dahuria*及1件含*Gentiana triflora*。含有秦艽藥材常用、常見的5種方劑，都納入本次研究之中，顯示本研究的Nested PCR-DNA定序方法確實可應用於鑑定中藥製劑中秦艽藥材之成分。

表二、秦艽製劑檢體Nested PCR-DNA定序方法鑑定結果

藥劑名	鑑定結果	
GmB	秦艽	<i>Gentiana straminea</i>
Gm1A	秦艽鱉甲散	<i>Gentiana straminea</i>
Gm1B	秦艽鱉甲散	<i>Gentiana dahuria</i>
Gm2A	大秦艽湯	<i>Gentiana dahuria</i>
Gm2B	大秦艽湯	<i>Gentiana dahuria</i>
Gm2D	大秦艽湯	<i>Gentiana dahuria</i>
Gm3A	八仙湯	<i>Gentiana crassicaulis</i>
Gm4A	三痹湯	<i>Gentiana dahuria</i>
Gm4B	三痹湯	<i>Gentiana triflora</i> (-7)*
Gm4C	三痹湯	<i>Gentiana crassicaulis</i>
Gm4D	三痹湯	<i>Gentiana dahuria</i>
Gm5A	消痔丸	<i>Gentiana dahuria</i>

*括號內數字表示檢體DNA序列與GenBank序列資料的相似度有差異的鹼基數

G. triflora Gm4B	1	TTCGGGACGAGGGAAACCACGGACCGATGCCCGAGCATGGCGTCGACCACCGGTCGCTCT.....	60
G. triflora Gm4B	61	GTCGTGCAAACAACCAACCCCGGGCGCAGAAACCGCCAAGGAAAACGAAAAAAGGATGGT.....	120
G. triflora Gm4B	121	CCTGCCTCCCGTCGTGCCGTACGCGGTGTGCACGGGGGGATCACGGGCGCCTAAAGAAAC	180
G. triflora Gm4B	181	AAAAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCGAACT	240
G. triflora Gm4B	241	GCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGC	300
G. triflora Gm4B	301	GCCCGAAGCCATTAGGCCGAGGGCACGTCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCC	360
G. triflora Gm4B	361	CAACACCGTGCATGAAACATTGCCGGTTGTCCGAGGGGCGGATATTGGCTTCCCGTGCTTA.....	420
G. triflora Gm4B	421	CGGTGCGGCTGGCCTAAATGCAAGTCCCTTGCACGACACGACGACAAGTGGTGGTGA	480
G. triflora Gm4B	481	TTGCCTCAACTAAGGTGCTGTTCGCGGTTTGCCTCGGATGAGGTGACTTCCATGACCA.....T.....	540
G. triflora Gm4B	540	CTAATGCACGCGTCGA.....	

圖三、秦艽製劑檢體 Gm4B 定序所得 ITS 序列 (序列長度 579 bps) 與 GenBank GI 89275329 *Gentiana triflora* 序列比較

結 論

針對上市的中藥製劑，除上市前的查驗登記，一直沒有其他對於上市後藥品的檢驗管理機制，Nested PCR-DNA定序方法研究如果能夠切實應用於上市流通的中藥製劑的檢驗，將使中藥製劑裡藥材使用的正確性能夠獲得重視與保障，也能夠使發生藥效問題的中藥製劑，確認其中成分問題，使中藥的使用發揮最大藥效並確保其安全性，而民眾的健康更可以得到進一步的保障。

參考文獻

1. Yu, F., Li, R. and Wang, R. 2004. Inhibitory effects of the *Gentiana macrophylla* (Gentianaceae) extract on rheumatoid arthritis of rats. J Ethno-

pharmacol. 95: 77-81.

2. Kondo, Y., Takano, F. and Hojo, H. 1994. Suppression of chemically and immunologically induced hepatic injuries by gentiopicoside in mice. *Planta Med.* 60: 414-416.
3. 徐雅慧、陳佩儀、陳文惠、劉芳淑、羅吉方、林哲輝。2008。市售秦艽藥材之鑑別。藥物食品檢驗局調查研究年報，26: 137-152。
4. Lu, K. T., Lo, C. F., Chang, H. C. and Lin, J. H. 2005. Identification of *Saposhinkoviae Radix* in concentrated Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods. *J. Food and Drug Analysis.* 13: 219-224.

Identification of Gentianae Macrophyllae Radix and Its Preparations by Nested PCR and DNA Sequencing Method

KANG-TSU LU, HSIAO-MEI HSU, CHI-FANG LO AND JER-HUEI LIN

Pharmacognosy Division

ABSTRACT

Gentianae Macrophyllae Radix (秦艽) is the dried root of *Gentiana macrophylla* Pall., *G. straminea* Maxim., *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. or *G. dahurica* Fisch. It is difficult to differentiate these raw materials by morphological examination and micrography. In this study, we applied a Nested PCR and DNA sequencing method to discriminate among these raw materials of Gentianae Macrophyllae Radix and to identify these herbs in Chinese medicine preparations. The internal transcribed spacer (ITS) sequences of 18S-26S ribosomal DNA from the authentic Gentianae Macrophyllae Radix were used as standards. Samples were purchased from Chinese medicine pharmaceutical factories and local traditional Chinese herbal pharmacies. Samples of raw materials were previously identified by morphological examination and micrography. The total DNA were extracted by organic solutions and purified using a commercial kit. The ITS sequence data deduced from Nested PCR following by DNA sequencing were compared with standards and GenBank database for further identification of the origin of Gentianae Macrophyllae Radix in samples. The results obtained from morphological examination and micrography were different those from Nested PCR-DNA sequencing method in six samples of raw materials. The origin of Gentianae Macrophyllae Radix were identified as *G. dahurica* component present in seven samples, *G. crassicaulis* in two, *G. straminea* in two and *G. triflora* in one. Our methods can be applied both for the identification of raw materials of Gentianae Macrophyllae Radix and its presence in Chinese medicine preparations.

Key words: Gentianae Macrophyllae Radix, ITS, nested PCR, DNA sequencing