

# 應用Nested PCR-DNA定序方法鑑定桂皮藥材及其製劑

呂康祖 謝詠荃 李蕙君 劉宜祝 施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

## 摘要

依據「中華中藥典」記載，桂皮為樟科Lauraceae植物肉桂*Cinnamomum cassia* Blume之乾燥樹皮，常見的誤用品為陰香 *C. burmannii*。研究中利用trnL片段為DNA標記，建立Nested PCR-DNA定序方法鑑別桂皮及肉桂製劑。結果顯示，總計30件桂皮藥材及33件桂皮及肉桂製劑檢體中，均鑑定出檢體基原為*C. cassia*，並且在18種複方製劑中，可不受干擾地鑑別桂皮或肉桂基原。

**關鍵詞：**桂皮、肉桂、Nested PCR、DNA定序、鑑定

## 前言

TFDA自前開發Nested PCR-DNA定序方法鑑別中藥製劑之藥材基原以來，已解決數十種藥材及誤用藥材在製劑中難以鑑別的問題，本篇將以桂皮為主題進行研究，建立桂皮(肉桂)及其製劑的鑑別方法。過去桂皮藥材所使用的基原眾多，今多以樟科植物肉桂之乾燥樹皮為桂皮藥材，也有肉桂藥材即桂皮藥材的說法。依據「中華中藥典」記載，本品為樟科Lauraceae植物肉桂*Cinnamomum cassia* Blume (*C. aromaticum*)之乾燥樹皮。主要生產於中國廣東、廣西、福建、雲南等省。性狀為圓筒形或半圓筒形之卷曲皮片，外面灰棕色或棕色，往往附有少量之栓皮，內面呈現棕色或淡紅棕色。具強烈之芳香，味香辛而略澀。桂皮有補火助陽、散寒止痛及活血通經的功能，故常用於治療陽痿、宮冷、陽虛眩暈、虛寒吐瀉、經閉、痛經等症。在方劑的使用上，與當歸、川芎、芍藥、白朮、熟地黃、茯苓、龍眼肉、甘草同用，治療血虛眩暈、發熱自汗，如益血力；與當歸、白芍、茯苓、白朮、澤瀉、川

芎、人參、甘草同用，治療貧血、下腹痛、腰痛、月經不順、頭痛，如人參當芎散。

桂皮在現代醫學的研究相當多，其萃取物發表於論文的藥理作用有：治療糖尿病<sup>(1-5)</sup>、抗發炎<sup>(6)</sup>、抗氧化<sup>(7,8)</sup>、血小板抗凝集活性<sup>(9)</sup>、抗腫瘤<sup>(10-12)</sup>、誘導血管新生<sup>(13)</sup>、抑制酪氨酸酶活性<sup>(14,15)</sup>、護胃<sup>(16,17)</sup>、抗菌<sup>(18,19)</sup>、殺蟲<sup>(20,21)</sup>、抗蟻<sup>(22,23)</sup>、抗過敏<sup>(24)</sup>、抗微生物活性<sup>(25,26)</sup>等等。

近年來，中國大陸衛生部已在商品肉桂中發現兩種混淆品<sup>(27)</sup>，一種為陰香*Cinnamomum burmannii* Blume的乾燥樹皮，本品在廣西民間又稱假肉桂、山玉桂、野桂皮，曾在河南、廣西等省區市場發現混充肉桂銷售。另一種為柴桂*Cinnamomum tamala* (Buch-Ham.) Nees et Eberm.的乾燥樹皮，本品在雲南民間又稱官桂、辣樹皮、大粗辣皮，近年來流入浙江松陽、廣西南寧、賓陽等地誤充肉桂銷售。因同屬之植物在形態上非常相似，不易辨別，為確保用藥之正確性，防止誤用品影響療效與安全，故本研究以建立Nested PCR-DNA定序方法建立藥材及製劑桂皮基原鑑別方法。

## 材料與方法

### 一、材料

#### (一)檢體

1. 藥材檢體為30件，皆為桂皮藥材，分別收集自TFDA標本室、大陸參訪採集、查驗登記及品質監測計畫。
2. 製劑檢體共33件，包括桂皮製劑6件(1種單方及4種複方)及肉桂製劑27件(1種單方及14種複方)。

#### (二)試藥

1. 一般化學藥品：購自Sigma (St. Louis, MO, USA)、Merck (Darmstadt, Germany)、Amresco (Ohio, USA)
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  $\mu$ M, reaction buffer)購自GeneMark (Bio Basic, Canada)
4. 引子：購自百力(臺灣)：Cc-trnLF (CTTGGTTGGATTGAGCCTTG)、Cc-trnLR (AGTCGACGGATTTCCCCT)、Cc-trnLF2 (CTGTTTT CAGAAAACAAGGG)及Cc-trnLR2 (CACTGAATATTCGATTCT TC)
5. 瓊脂膠體：Agarose B Low EEO購自GENEMARK (Bio Basic, Canada)
6. 100 bp ladder marker：購自GeneMark (Bio Basic, Canada)
7. EZ-Vision kit：購自Amresco (Ohio, USA)
8. Exo-SAP IT kit：購自USB (Cleveland, Ohio, USA)
9. BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit：購自Applied Biosystems (Foster, CA, USA)
10. BigDye Xterminator Kit：購自Applied Biosystems (Foster, CA, USA)

#### (三)儀器設備

1. 迷你電泳槽及鑄膠器(Mupid II, Cosmo, Japan)
2. 聚合擦連鎖反應器(Gradient Palm-cycler, Corbett, Australia and PC320, Astec, Japan)
3. 影像系統(ImageQuant 300, GE, UK)
4. 自動定序儀(3130 Genetic Analyzer, ABI, USA)

### 二、方法

#### (一)DNA萃取與純化

DNA萃取與純化方法是依照TFDA於2007年發表的方法<sup>(28)</sup>進行，簡要敘述如後，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，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 x 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 x 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<sub>(aq)</sub>，以12000 x g離心5分鐘。離心後倒去上清液，使沉澱物風乾，再加入50-100  $\mu$ L之無菌水溶解。以PCR純化套組純化檢體DNA後，DNA溶液供Nested PCR之用。

#### (二)Nested PCR

藥材及製劑均取依上述(一)步驟純化之4  $\mu$ L DNA溶液作模板，25  $\mu$ M primer Cc-trnLF、Cc-trnLR 各1  $\mu$ L進行第一次PCR，條件為94°C-30 sec，55°C-30 sec，72°C-30 sec，共30 cycles。取第一次PCR產物4  $\mu$ L作模板，25  $\mu$ M primer Cc-trnLF2、Cc-trnR2各1  $\mu$ L進行第

二次PCR，PCR條件為94°C-30 sec，48°C-30 sec，72°C-30 sec，共30 cycles。

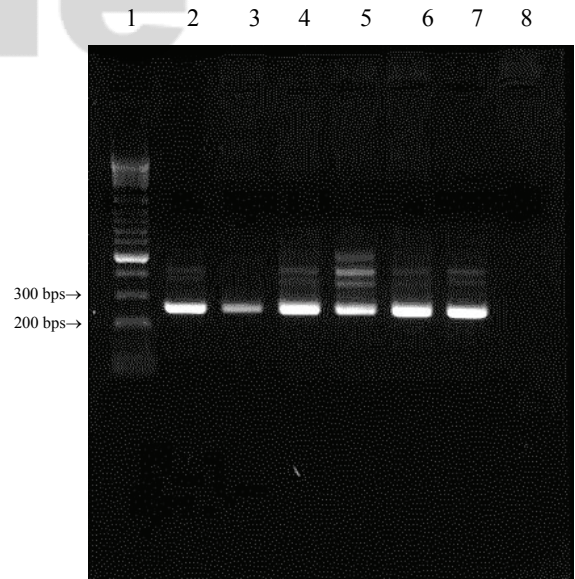
### (三)電泳與定序分析

取Nested PCR產物5 μL，與EZ-Vision kit 1 μL混合，置入1.8 %瓊脂膠體，進行電泳，電泳條件100 V、30分鐘，以影像系統觀察，確認Nested PCR結果，並拍攝影像。結果確認後，以Exo-SAP IT kit純化，純化後，以BigDye Terminator v 3.1 cycle sequencing Kit做定序反應，再以BigDye Xterminator Kit作螢光物質除去之純化(以上套組操作步驟依套組說明)，之後置入96孔盤，以自動定序儀作DNA序列分析，所得定序結果與美國國家衛生院之GenBank資料庫進行序列比對，製劑部分同時與標準藥材的定序結果比對，得到鑑定結果。

## 結果與討論

桂皮藥材30件收集自TFDA標本室、大陸參訪採集、查驗登記及品質監測計畫，經磨粉後，抽取檢體之total DNA，再進行DNA標記的篩選，嘗試以葉綠體rbcL、matK、trnHf-psb3A及核糖體ITS (Internal transcribe spacer) DNA序列的共通性引子(universal primers)進行PCR擴增，但是並無足夠供定序分析的DNA片段被擴增產生。

因此，再至GenBank資料庫查詢Cinnamomum屬植物序列資料，篩選出trnL可能合適作為DNA標記，trnL亦為藥用植物常用的DNA標記之一<sup>(29)</sup>，故嘗試用於本研究，收集該屬植物在GenBank中之資料進行分析整理，設計對Cinnamomum屬植物trnL專一之primer組進行測試。先以桂皮藥材為試驗標的，經過多組引子交互配合的試驗，篩選出以Cc-trnLF、Cc-trnLR及Cc-trnLF2、Cc-trnLR2兩對引子對進行Nested PCR時，擴增的PCR產物，可供定序分析之用。Nested PCR的產物電泳結果(圖一)，長度約268bps，經序列分析後，序列大致相同(圖二)，與GenBank的序列資料比對，可判定物種皆為*C. cassia*，但是在序列bp203，卻出現有不同的差異，桂皮藥材30件中G有1件，T/G 8件，T 21



圖一、桂皮藥材及製劑nested PCR結果電泳  
Lane 1:100bp ladder marker, Lane 2:CcB5, Lane 3:CcB6, Lane 4:CcB10, Lane 5:Co3-2, Lane 6:CcB1A, Lane 7: CcP4B, Lane 8: Blank (no template); Lane 2~5為藥材檢體，Lane 6~7為製劑檢體

```

1                                     60
CTGTTTTTCAG AAAACAAGGG TTCAGAAAGC GAGAACCAAA AAAAGGATAG GTGCAGAGAC

61                                     120
TCAAAGGAAG CTGTTCTAAC GAATGGAGTT GATTAACATT GGTATAGGAA TCCTTCTATC

121                                    180
GAAATTCAG AAAGGATGAC CCTATCCTAT ATACGTACTG AAATATCAAA CAATTAATCA

181                                    240
CGATCCGATT CCGTATTTTT TTTATATGAA AAATGGAAGA ATTCTTGTA ATCGATTCCA

241
AATTGAAGGA AGAATCGAAT ATTCAGTG
  
```

圖二、桂皮藥材及製劑trnL片段定序結果

件，序列不同的bp203鹼基列示於表一，GenBank的序列資料中*C. cassia*之bp203為G，此段trnL序列與誤用藥材陰香*C. burmannii*的序列(GenBank Accession number: AB040087.1)差異(表二)。至於文獻中所提到另一種誤用藥材柴桂*C. tamala*，在本研究中並未收集到柴桂檢體可供DNA序列分析，在GenBank資料庫亦缺其trnL的序列資料，並

表一、桂皮藥材檢體與bp 203鹼基表

編碼	藥材標示名稱	藥材來源	bp203
CcB	桂皮	查驗登記留樣藥材	T/G
CcB1	桂皮	TFDA標本室 (B-2-2-6)	T
CcB3	桂皮	TFDA標本室 (B-2-2-8)	T
CcB4	桂皮	TFDA標本室 (J-6-B-4)	T/G
CcB5	桂皮	大陸參訪採集	G
CcB6	桂皮	查驗登記留樣藥材	T
CcB7	桂皮	查驗登記留樣藥材	T
CcB8	桂皮	查驗登記留樣藥材	T
CcB9	桂皮	查驗登記留樣藥材	T/G
CcB10	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T/G
CcB11	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T/G
CcB12	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB13	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB14	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB15	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB16	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB17	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB18	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T/G
CcB19	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB20	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T/G
CcB21	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB22	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB23	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB24	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB25	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T/G
CcB26	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB27	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB28	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB29	桂皮	品質監測計畫購買藥材	T
CcB30	桂皮	查驗登記留樣藥材	T

表二、GenBank中*Cinnamomum cassia*、*C. burmannii* 及桂皮藥材檢體序列差異位置

	bp192	bp203	bp228
<i>Cinnamomum cassia</i>	G	G	T
<i>C. burmannii</i>	G	T	G
桂皮藥材	G	G or T or T/G	T

表三、桂皮及肉桂製劑檢體與bp 203鹼基表

編碼*	製劑品名	bp203
CcBA	桂皮	T/G
CcBC	桂皮	T
CcB1A	胃舒寧	T
CcB2A	益血力	T/G
CcB4B	漢方胃腸藥	T/G
CcB5B	人參當芍散	T/G
CcP3A	胃苓散	T
CcP3B	胃苓湯	T/G
CcP4A	養心湯	T
CcP4B	養心湯	T/G
CcP5A	右歸丸	T
CcP5B	右歸丸	T/G
CcP6A	蘇子降氣湯	T
CcP7A	濟生腎氣丸	T
CcP7B	濟生腎氣丸	T/G
CcP7C	濟生腎氣丸	T
CcP8A	十六味流氣飲	T
CcP9B	十全大補湯	T/G
CcP10A	少腹逐瘀湯	T
CcP10B	少腹逐瘀湯	T/G
CcP11A	三痹湯	T
CcP11B	三痹湯	T
CcP12A	安中散	T
CcP12B	安中散	T/G
CcP13A	芍藥湯	T
CcP14A	過期飲	T
CcP14B	過期飲	T
CcP15A	健胃散	T

\*編碼開頭“CcB”者為桂皮製劑，“CcP”為肉桂製劑

且於檢體中未發現可疑序列，無法於本次研究中一併探討。

查詢*Cinnamomum*屬植物在GenBank的DNA序列資料，現有的DNA maker中，包括ITS、rbcL等等，序列都十分近似，種與種之間，相差僅1-2 base，甚至有無法區分的情形，這也導致篩選鑑別桂皮藥材的困難度，最後是以trnL的部分片段，兼具區別桂皮及其誤用藥材，以及可擴增足

夠供定序分析的DNA片段的二種特性，作為本研究中所使用的DNA maker，而未如過去採用ITS作為鑑別依據。

至於在序列bp203出現有不同base的差異，這在以往的研究中，已有多次出現的情形，例如蒙古黃耆及膜莢黃耆<sup>(30)</sup>，在以ITS為DNA maker上，這樣的差異來自種以下的差異，如亞種、變種或混種，但此次以trnL為標記，這樣不同base差異的情形，是否一樣代表種以下如亞種、變種或混種的差異，這需要更多研究數據或參考資料的佐證，才能確定。

在製劑上，研究中同時測試了桂皮製劑及肉桂製劑共33件檢體，包括桂皮製劑6件及肉桂製劑27件，所得之trnL序列與藥材部分所得結果相符，皆在bp203位置出現base T或T/G的差異(表三)，可確認33件製劑檢體所含桂皮或肉桂藥材基原皆為 *C. cassia*，本次研究中測試的製劑種類達20種方劑，包括2種單方及18種複方，顯示本研究所建立之方法可在多種藥材成分的干擾下，專一地鑑定製劑中所含之桂皮或肉桂藥材。

## 結 論

研究結果顯示，桂皮藥材的使用，不論是市售藥材或是製劑使用的藥材，都使用了正確的藥材基原 *C. cassia*，但是發現在序列位置bp203的差異，其造成原因是否和ITS一樣為種以下的變異所致，仍需多方面收集不同產地來源的檢體，進行分析，才能得到確切的實證。

## 參考文獻

1. Chen, L., Sun, P., Wang, T., Chen, K., Jia, Q., Wang, H. and Li, Y. 2012. Diverse Mechanisms of Antidiabetic Effects of the Different Procyanidin Oligomer Types of Two Different Cinnamon Species on db/db Mice. *J. Agric. Food Chem.* 60: 9144-9150.
2. Lu, Z., Jia, Q., Wang, R., Wu, X., Wu, Y., Huang, C. and Li, Y. 2011. Hypoglycemic activities of A- and B-type procyanidin oligomer-rich extracts from different Cinnamon barks. *Phytomedicine* 18: 298-302.
3. Jitomir, J. and Willoughby, D.S. 2009. Cassia cinnamon for the attenuation of glucose intolerance and insulin resistance resulting from sleep loss. *J. Med. Food.* 12: 467-472.
4. Kirkham, S., Akilen, R., Sharma, S. and Tsiami, A. 2009. The potential of cinnamon to reduce blood glucose levels in patients with type 2 diabetes and insulin resistance. *Diabetes Obes. Metab.* 11: 1100-1113.
5. Suppapitporn, S., Kanpaksi, N. and Suppapitporn, S. 2006. The effect of cinnamon cassia powder in type 2 diabetes mellitus. *J. Med. Assoc. Thai.* 89: S200-S205.
6. Yu, T., Lee, S., Yang, W. S., Jang, H. J., Lee Y. J., Kim, T. W., Kim, S. Y., Lee, J. and Cho, J. Y. 2012. The ability of an ethanol extract of *Cinnamomum cassia* to inhibit Src and spleen tyrosine kinase activity contributes to its anti-inflammatory action. *J. Ethnopharmacol.* 139: 566-573.
7. Yang, C. H., Li, R. X. and Chuang, L. Y. 2012. Antioxidant activity of various parts of *Cinnamomum cassia* extracted with different extraction methods. *Molecules.* 17: 7294-7304.
8. Lin, C. C., Wu, S. J. and Chang, C. H. and Ng, L.T. 2003. Antioxidant activity of *Cinnamomum cassia*. *Phytother. Res.* 17: 726-730.
9. Kim, S. Y., Koo, Y. K., Koo, J. Y., Ngoc, T. M., Kang, S. S., Bae, K., Kim, Y. S. and Yun-Choi, H. S. 2010. Platelet anti-aggregation activities of compounds from *Cinnamomum cassia*. *J. Med. Food.* 13: 1069-1074.
10. Kwon, H. K., Hwang, J. S., So, J. S., Lee, C. G., Sahoo, A., Ryu, J. H., Jeon, W. K., Ko, B. S., Im, C. R., Lee, S. H., Park, Z. Y. and Im, S. H. 2010. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NF kappa B and AP1. *BMC Cancer* 10: 392.
11. Moon, E. Y., Lee, M. R., Wang, A. G., Lee, J. H., Kim, H. C., Kim, H. M., Kim, J. M., Kwon,

- B. M. and Yu, D. Y. 2006. Delayed occurrence of H-ras 12V-induced hepatocellular carcinoma with long-term treatment with cinnamaldehydes. *Eur. J. Pharmacol.* 530: 270-275.
12. Kwon, B. M., Lee, S. H., Choi, S. U., Park, S. H., Lee, C. O., Cho, Y. K., Sung, N. D. and Bok, S. H. 1998. Synthesis and in vitro cytotoxicity of cinnamaldehydes to human solid tumor cells. *Arch. Pharm. Res.* 21: 147-152.
13. Choim, D. Y., Baek, Y. H., Huh, J. E., Ko, J. M., Woo, H. and Lee, J. D., Park, D. S. 2009. Stimulatory effect of *Cinnamomum cassia* and cinnamic acid on angiogenesis through up-regulation of VEGF and Flk-1/KDR expression. *Int. Immunopharmacol.* 9: 959-967.
14. Ngoc, T. M., Lee, I., Hado, T., Kim, H., Min, B. and Bae, K. 2009. Tyrosinase-inhibitory constituents from the twigs of *Cinnamomum cassia*. *J. Nat. Prod.* 72: 1205-1208.
15. Kong, Y. H., Jo, Y. O., Cho, C. W., Son, D., Park, S., Rho, J. and Choi, S. Y. 2008. Inhibitory effects of cinnamic acid on melanin biosynthesis in skin. *Biol. Pharm. Bull.* 31: 946-948.
16. Jung, J., Lee, J. H., Bae, K. H. and Jeong, C. S. 2011. Anti-gastric actions of eugenol and cinnamic acid isolated from *Cinnamomi Ramulus*. *Yakugaku Zasshi* 131: 1103-1110.
17. Lim, C. S., Kim, E. Y., Lee, H. S., Soh, Y., Sohn, Y., Kim, S. Y., Sohn, N. W., Jung, H. S. and Kim, Y. B. 2010. Protective effects of *Cinnamomum cassia* Blume in the fibrogenesis of activated HSC-T6 cells and dimethylnitrosamine-induced acute liver injury in SD rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74: 477-483.
18. Oussalah, M., Caillet, S. and Lacroix, M. 2006. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* 69: 1046-1055.
19. Lee, H. S. and Ahn, Y. J. 1998. Growth-inhibiting effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 46: 8-12.
20. Kim, H. K., Yun, Y. K. and Ahn, Y. J. 2008. Fumigant toxicity of cassia bark and cassia and cinnamon oil compounds to *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Exp. Appl. Acarol.* 44: 1-9.
21. Park, I. K., Lee, H. S., Lee, S. G., Park, J. D. and Ahn, Y. J. 2000. Insecticidal and fumigant activities of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials against *Mechoris ursulus* (Coleoptera: attelabidae). *J. Agric. Food Chem.* 48: 2528-2531.
22. Na, Y. E., Kim, S. I., Bang, H. S., Kim, B. S. and Ahn, Y. J. 2011. Fumigant toxicity of cassia and cinnamon oils and cinnamaldehyde and structurally related compounds to *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet. Parasitol.* 178: 324-329.
23. Kim, S. I., Kim, H. K., Koh, Y. Y., Clark, J. M. and Ahn, Y. J. 2006. Toxicity of spray and fumigant products containing cassia oil to *Dermatophagoides farinae* and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae). *Pest. Manag. Sci.* 62: 768-774.
24. Sung, Y. Y., Yoon, T., Jang, J. Y., Park, S. J., Jeong, G. H. and Kim, H. K. 2011. Inhibitory effects of *Cinnamomum cassia* extract on atopic dermatitis-like skin lesions induced by mite antigen in NC/Nga mice. *J. Ethnopharmacol.* 133: 621-628.
25. Ooi, L. S., Li, Y., Kam, S. L., Wang, H., Wong, E. Y. and Ooi, V. E. 2006. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am. J. Chin. Med.* 34: 511-522.
26. Mau, J., Chen, C. and Hsieh, P. 2001.

- Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and corni fructus. *J. Agric. Food Chem.* 49: 183-188.
27. 中華人民共和國衛生部藥政管理局。2000。現代實用本草下冊。127頁。人民衛生出版社，北京。
28. Lu, K. T., Cheng, H. Y., Lo, C. F., Chang, H. C. and Lin, J. H. 2007. Discriminating between *Achyranthis Bidentatae Radix* and *Cyathulae Radix* in Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods. *Planta Med.* 73: 1322-1326.
29. Sucher, N. J. and Carles, M. C. 2008. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta Med.* 74: 603-623.
30. Lu, K. T., Lee, H. C., Liu, F.S., Lo, C. F. and Lin, J. H. 2009. Discriminating *Astragali Radix* from *Hedysarum Radix* in Chinese medicine preparations using nested PCR and DNA sequencing methods. *J. Food Drug Anal.* 17: 380-385.

## Establishment of Nested PCR-DNA Sequencing Method for the Identification of Cinnamomi Cortex and Its Preparations

KANG-TSU LU, YUNG-CHUAN HSIEH, HUI-CHUN LEE, YI-CHU LIU AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Division of Reserch and Analysis, FDA

### ABSTRACT

Cinnamomi Cortex is the dried bark of *Cinnamomum cassia* Blume. The bark are easily confused with the dried bark of *C. burmannii*. In this study, trnL was used as DNA marker and Nested PCR-DNA sequencing method was applied to authenticate Cinnamomi Cortex and its preparations. The results showed that 30 samples of raw materials were identified as Cinnamomi Cortex and 33 preparations contained Cinnamomi Cortex. This method was successfully applied to 18 formulae of Chinese medicinal preparations.

Key words: Cinnamomi Cortex, ITS, nested PCR, DNA sequencing