

應用ITS序列鑑定麻黃藥材及其製劑

李蕙君 謝詠筌 呂康祖 蔡佳芬 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

麻黃基原為麻黃科Ephedraceae植物草麻黃*Ephedra sinica* Stapf、中麻黃*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey.及木賊麻黃*Ephedra equisetina* Bge.之乾燥草質莖，本研究以ITS (internal transcribed spacer) 片段序列作為基因標記，設計對Ephedra屬專一之引子組進行Nested PCR-DNA定序，建立藥材及製劑之麻黃基原鑑別方法。收集食品藥物管理署標本室收藏及查驗登記留樣合計31件藥材，實驗結果呈現2種不同序列，其中27件藥材檢體與草麻黃*Ephedra sinica*序列完全符合，而另外4件檢體與*Ephedra equisetina*有99%的序列相似度，應為木賊麻黃。在製劑鑑定方法的建立上，麻黃製劑檢體共有18件，其鑑定結果均為*E. sinica*。結果顯示，本研究建立以Nested PCR-DNA定序方法在藥材或多種不同複方製劑中均可專一地鑑別麻黃基原。

關鍵詞：麻黃、ITS、Nested PCR-DNA定序

前言

根據「臺灣中藥典」記載，麻黃基原為麻黃科Ephedraceae植物草麻黃*Ephedra sinica* Stapf、中麻黃*Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey.及木賊麻黃*Ephedra equisetina* Bge.之乾燥草質莖。主產於中國內蒙、遼寧、河北、山西、河南、陝西、甘肅等地。味辛，性溫，有發汗散寒、宣肺平喘，利水消腫之功能。在方劑的使用上，與半夏、白芍、細辛、炙甘草、乾薑、桂枝、五味子同用，主治外感風寒，如小青龍湯；與防風、甘草、桂枝、黃芩、防己、杏仁、大棗、川芎、生薑、白芍、炮附子、人參同用，治療顏面神經麻痺，麻木眩暈，如小續命湯。麻黃萃取物或所含特定成分具有抗肥胖⁽¹⁾、調控黑色素生合成⁽²⁾、抗微生物⁽³⁾、抗過敏性氣喘⁽⁴⁾、止咳作用⁽⁵⁾、抗腫瘤⁽⁶⁾、抑制高血糖⁽⁷⁾的效果。

麻黃類藥材在外觀形態上非常相似，均呈

細長圓柱形。草麻黃少分枝，直徑1-2 mm，觸之微有粗糙感。中麻黃多分枝，直徑1.5-3 mm，有粗糙感。木賊麻黃較多分枝，直徑1-1.5 mm，無粗糙感。目前已知的文獻資料雖有針對部分麻黃品系進行基因序列鑑別，但多僅適用於藥材，無法用於相關製劑⁽⁸⁻¹⁰⁾。為了解市面上麻黃之使用情形及其基原，本研究建立藥材及製劑麻黃基原鑑別方法，供為用藥參考。

材料及方法

一、材料收集

- (一)麻黃藥材：共31件，包含衛生福利部食品藥物管理署標本室21件及查驗登記留樣藥材10件。
- (二)麻黃製劑：共18件，包含9種複方製劑。

二、試藥

(一)一般試藥：lysis buffer[含100 mM三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl, BDH, 美國), pH 8.0、100 mM乙二胺四乙酸二鈉(EDTA, BDH, 美國)、1%十二烷基肌氨酸鈉(N-lauroyl sarcosine sodium salt, Sigma, 美國)及1 mg/mL 蛋白酶 K]。phenol: chloroform: isoamyl alcohol = 25:24:1 及chloroform: isoamyl alcohol = 24:1, 購自Amresco, 美國。Isopropanol購自Merck, 德國。Agarose B low EEO購自GeneMark, 臺灣。

(二)純化套組：GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit購自GE healthcare, 美國。DNA聚合反應試劑(PCR Master Mix 5X)、100 bps ladder marker及6X TBE buffer購自 GeneMark, 臺灣。USB[®] ExoSAP-IT[®] 套組購自 Affymetrix, 美國。BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit購自ABI Prism, 日本。

(三)引子：EsF2 (CCCCT ATCTA TGGTC CTCCG)、EsR2 (CGTTG CCAGA TTGCT TCCTT)、EsF3 (GGCGC TATTT CCTTT CCTAC)及EsR3 (GTACT CCCGC CCTCT TTG), 購自臺灣百力生物科技股份有限公司。

三、儀器設備

(一)迷你電泳及鑄膠器 (Mupid-exU, ADVANCE, 日本)

(二)聚合酶連鎖反應器(PC-320, ASTEC, 日本)

(三)影像分析系統(ImageQuant 300, GE Healthcare, 美國)

(四)自動定序儀(3130 Genetic Analyzer, ABI, 日本)

四、DNA萃取與純化

依照食品藥物管理署發表之萃取方法⁽¹¹⁾

進行，將檢體磨碎，秤取檢體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12000 x g離心5分鐘。離心後取水層100 µL, 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12000 x 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12000 x 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反應與電泳

取適量藥材或製劑檢體DNA溶液作模板，以25 µM EsF2、EsR2引子對各0.5 µL, 加入DNA聚合反應試劑(PCR Master Mix 5X)進行第一次PCR擴增反應，條件為94°C 30秒、58°C 30秒、72°C 30秒共30週期。繼以25 µM EsF3、EsR3引子對進行第二次PCR擴增反應，條件為94°C 30秒、57°C 30秒、72°C 30秒共30週期。反應完成後取PCR產物5 µL與染劑(EZ-vision DNA dye 6X)混合，以1.8 %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(NCBI)資料庫與分析軟體進行序列比對。

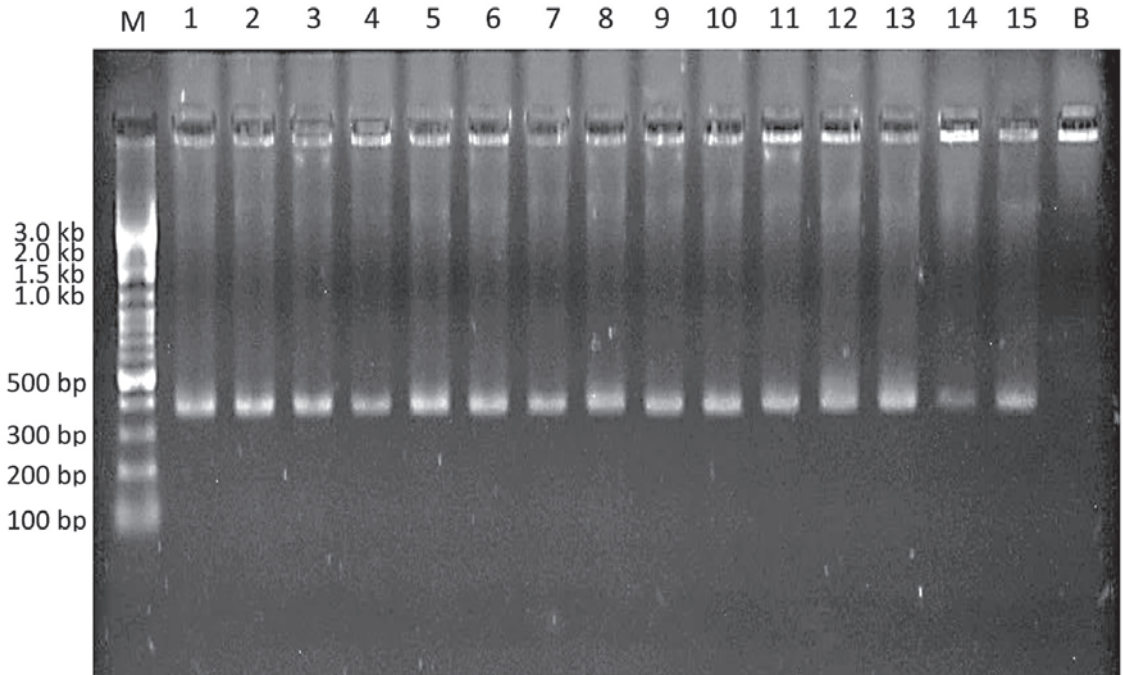
結果與討論

以麻黃藥材ITS之定序結果及GenBank資料庫裡Ephedra屬植物的ITS序列資料為依據，設計對Ephedra屬專一之引子對，經多組引子交互配合測試，篩選出EsF2-EsR2及EsF3-EsR3兩對引子對供麻黃Nested PCR鑑別方法使用，PCR產物序列長度約為353 bp，Nested PCR產物電泳結果如圖一所示，藥材及製劑檢體均可適用。將產物片段進行定序反應、序列分析與比對，藥材鑑別結果如表一。在31件藥材檢體中，27件檢體定序結果與GenBank上*E. sinica*序列相符，其餘4件檢體EsS16、EsS19、EsS23及EsS27之序列與GenBank上*E. equisetina*序列有99%相似度，僅在其序列118處由鹼基C

取代；另外檢體EsS23在序列位置147處由鹼基T取代，序列比對結果如圖二。18件製劑檢體鑑別結果均為*E. sinica*，如表二所示。

本次所收集不論是麻黃藥材或製劑檢體，雖然檢體上標示可能不同，但定序結果均屬於正確的麻黃基原，顯示Nested PCR鑑定方法對於麻黃鑑別之重要性。惟麻黃基原包含草麻黃、中麻黃及木賊麻黃3種，但定序結果大多為草麻黃，推測可能因為草麻黃在市場上流通量最大，或者臺灣藥材市場的主要來源類似。

本研究所建立Nested PCR-DNA定序方法可應用於市面流通之中藥品的麻黃基原鑑別，使製劑中麻黃藥材使用的正確性獲得重視與保障，對於提升中草藥品質管控極有助益，亦能維護國民健康與保障用藥安全。



圖一、麻黃藥材及製劑Nested PCR產物電泳結果

Lane M: 100bp ladder marker, Lane 1: EsS1, Lane 2: EsS5, Lane 3: EsS7, Lane 4: EsS8, Lane 5: EsS9, Lane 6: EsS10, Lane 7: EsS13, Lane 8: EsS15, Lane 9: EsS23, Lane 10: EsS27, Lane 11: EsS2A, Lane 12: EsS3C, Lane 13: EsS4B, Lane 14: EsS5A, Lane 15: EsS9C, Lane B: Blank (no template), Lane 1-10: raw material samples, Lane 11-15: preparation samples

表一、麻黃藥材檢體Nested PCR-DNA定序方法鑑定結果

編碼	藥材標示	鑑定結果	編碼	藥材標示	鑑定結果
EsS1	麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS17	麻黃(貳)	<i>E. sinica</i>
EsS2	麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS18	麻黃(參)	<i>E. sinica</i>
EsS3	麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS19	麻黃(肆)	<i>E. equisetina</i> (118-C ^a)
EsS4	麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS20	麻黃(伍)	<i>E. sinica</i>
EsS5	麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS21	麻黃(陸)	<i>E. sinica</i>
EsS6	麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS22	麻黃	<i>E. sinica</i>
EsS7	中麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS23	麻黃	<i>E. equisetina</i> (118-C ^a ,147-T ^b)
EsS8	泡麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS24	麻黃	<i>E. sinica</i>
EsS9	直麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS25	麻黃	<i>E. sinica</i>
EsS10	麻黃(齋)	<i>E. sinica</i>	EsS26	麻黃	<i>E. sinica</i>
EsS11	麻黃(齋)	<i>E. sinica</i>	EsS27	麻黃	<i>E. equisetina</i> (118-C ^a)
EsS12	中麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS28	麻黃	<i>E. sinica</i>
EsS13	中麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS29	麻黃	<i>E. sinica</i>
EsS14	麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS30	麻黃	<i>E. sinica</i>
EsS15	草麻黃	<i>E. sinica</i>	EsS31	麻黃	<i>E. sinica</i>
EsS16	麻黃(壹)	<i>E. equisetina</i> (118-C ^a)			

a. “118-C”表示在DNA序列118位置的鹼基被取代為“C”

b. “147-T”表示在DNA序列147位置的鹼基被取代為“T”

表二、麻黃製劑檢體Nested PCR-DNA定序方法鑑定結果

編碼	製劑名稱	廠商代號	鑑定結果	編碼	製劑名稱	廠商代號	鑑定結果
EsS1A	雙解散	I	<i>E. sinica</i>	EsS5B	三黃石膏湯	II	<i>E. sinica</i>
EsS1B	雙解散	II	<i>E. sinica</i>	EsS6A	防風通聖散	I	<i>E. sinica</i>
EsS2A	五積散	I	<i>E. sinica</i>	EsS6B	防風通聖散	II	<i>E. sinica</i>
EsS2B	五積散	II	<i>E. sinica</i>	EsS7A	射干麻黃湯	I	<i>E. sinica</i>
EsS3A	小青龍湯	I	<i>E. sinica</i>	EsS8A	桂枝芍藥知母湯	I	<i>E. sinica</i>
EsS3C	小青龍湯	III	<i>E. sinica</i>	EsS8B	桂枝芍藥知母湯	II	<i>E. sinica</i>
EsS4A	小續命湯	I	<i>E. sinica</i>	EsS8C	桂枝芍藥知母湯	III	<i>E. sinica</i>
EsS4B	小續命湯	II	<i>E. sinica</i>	EsS9A	麻黃附子細辛湯	I	<i>E. sinica</i>
EsS5A	三黃石膏湯	I	<i>E. sinica</i>	EsS9C	麻黃附子細辛湯	III	<i>E. sinica</i>

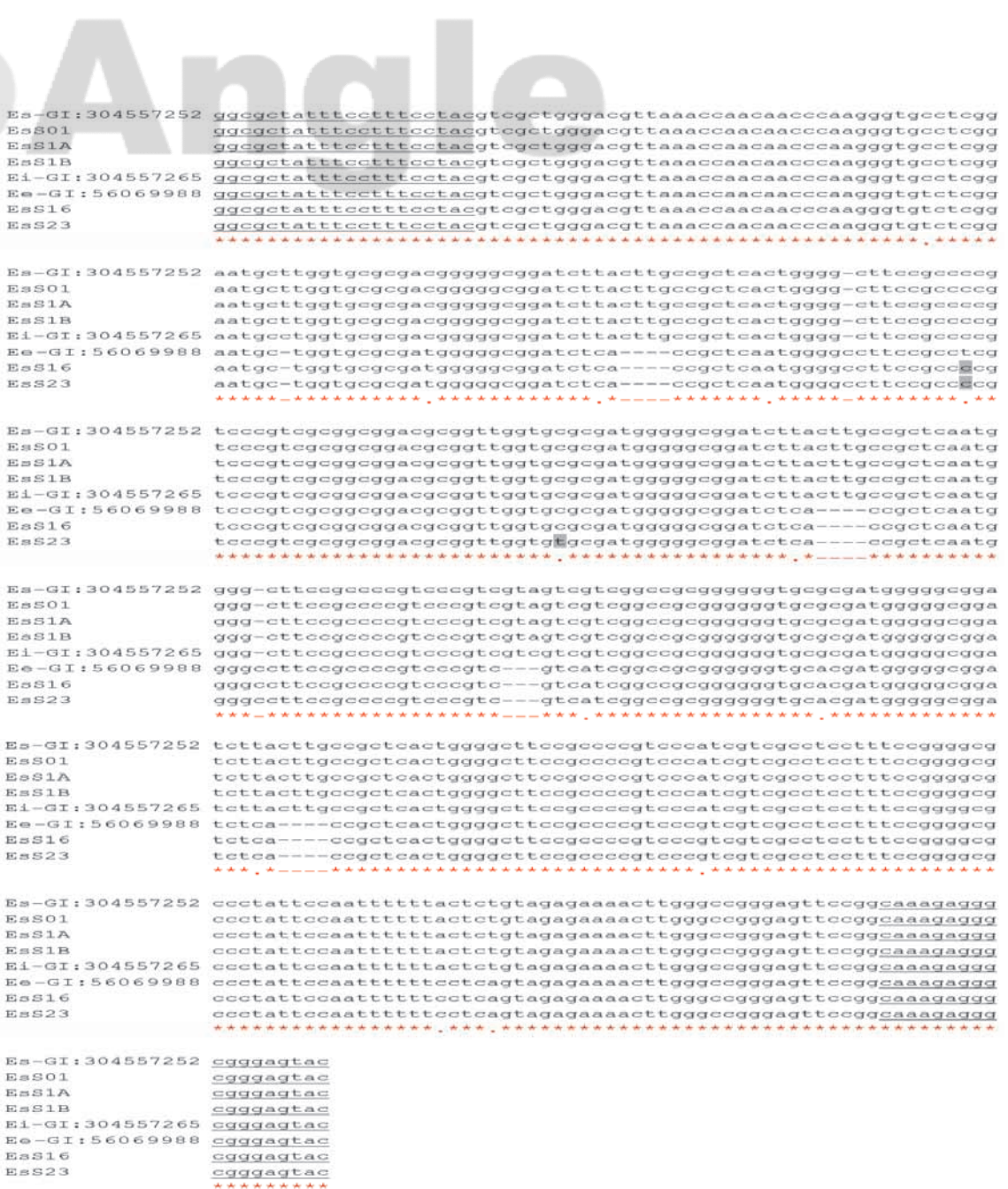
參考文獻

1. Kim, B. S., Song, M. Y. and Kim, H. 2014. The anti-obesity effect of *Ephedra sinica* through modulation of gut microbiota in obese Korean women. *J Ethnopharmacol.* 152(3): 532-539.

2. Yeom, G. G., Min, S. and Kim, S. Y. 2014. 2,3,5,6-Tetramethylpyrazine of *Ephedra sinica* regulates melanogenesis and inflammation in a UVA-induced melanoma/keratinocytes co-culture system. *Int Immunopharmacol.* 18(2): 262-269.

3. Zang, X., Shang, M. and Xu, F. and *et al.*

應用ITS序列鑑定麻黃藥材及其製劑



圖二、麻黃檢體序列比對結果

EsS01、EsS16、EsS23為麻黃藥材檢體，EsS1A、EsS1B為麻黃製劑檢體
Es-GI:304557252為GenBank草麻黃序列，Ei-GI: 304557265為GenBank中麻黃序列，
Ee-GI: 56069988為GenBank木賊麻黃序列，ggcgctatttcctttcctac為EsF3引子序列之位置，
caaagagggcgggagttac為EsR3引子序列互補配對之位置

- 「|」灰底標示為與GenBank GI: 56069988木賊麻黃序列鹼基差異之位置
- 「*」代表比對的序列中為相同鹼基之位置
- 「-」代表比對的序列中有出現gap之位置
- 「•」代表比對的序列中出現鹼基差異之位置

2013. A-type proanthocyanidins from the stems of *Ephedra sinica* (Ephedraceae) and their antimicrobial activities. *Molecules*. 18(5): 5172-5189.
4. Liu, Y.G., Luo, J.B. 2007 Effects of among compositions of Herba Ephedrae decoction on genic xpression of 5-lipoxygenase activating protein, IL-4 and leukotriene C4 in asthmatic mice. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 32(3): 246-249.
 5. Minamizawa, K., Goto, H. and Shimada, Y. and *et al.* 2006. Effects of eppikahangeto, a Kampo formula, and Ephedrae herba against citric acid-induced laryngeal cough in guinea pigs. *J Pharmacol Sci*. 101(2): 118-125.
 6. Nam, N.H., Lee, C.W. and Hong, D.H. and *et al.* 2003. Antiinvasive, antiangiogenic and antitumour activity of *Ephedra sinica* extract. *Phytother Res*. 17(1): 70-76.
 7. Xiu, L.M., Miura, A.B. and Yamamoto, K. and *et al.* 2001. Pancreatic islet regeneration by ephedrine in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Am J Chin Med*. 29(3-4): 493-500.
 8. Pang, X., Song, J. and Xu, H. and *et al.* 2012. Using ITS2 barcode to identify ephedrae herba. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 37(8): 1118-1121.
 9. Kitani, Y., Zhu, S. and Batkhuu, J. and *et al.* 2011. Genetic diversity of *Ephedra* plants in Mongolia inferred from internal transcribed spacer sequence of nuclear ribosomal DNA. *Biol Pharm Bull*. 34(5): 717-726.
 10. Long, C., Kakiuchi, N. and Takahashi, A. and *et al.* 2004. Phylogenetic analysis of the DNA sequence of the non-coding region of nuclear ribosomal DNA and chloroplast of *Ephedra* plants in China. *Planta Medica*. 70(11): 1080-1084.
 11. Lu, K. T., 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 Ephedrae Herba and Its Preparations by PCR-amplified ITS Region Sequencing Method

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

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Ephedrae Herba consists of the dried stem or aerial part of three specific Ephedrae species, namely *Ephedra sinica* Stapf, *Ephedra intermedia* Schrenk et C. A. Mey. and *Ephedra equisetina* Bge. This study aimed on the development of a nested polymerase chain reaction (Nested PCR) and DNA sequencing method for the identification of genuine Ephedrae Herba. The concept of this method was to amplify internal transcribed spacer (ITS) regions by Nested PCR and then the PCR products were analyzed by auto-sequencer. The established method was applied to a survey of 31 herbs and 18 Chinese medicine preparations. The results showed that 27 and 4 herbal samples were identified as *Ephedra sinica* and *Ephedra equisetina*, respectively. The 18 Chinese medicine preparations were found all belong to species of *Ephedra sinica*. This method is selective for the identification of Ephedrae Herba in forms of herb and its Chinese medicine preparations.

Key words: ephedrae herba, ITS, nested PCR and DNA sequencing