

枸骨葉及其常見混淆品之鑑定

謝詠荃 溫彩玉 謝嘉芸 李蕙君 林雅姿 黃守潔 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

枸骨葉係冬青科(Aquifoliaceae)植物枸骨(*Ilex cornuta*)的乾燥葉，具有清熱養陰、益腎、平肝等功效，用於治療肺癆咯血、頭暈目眩等症狀。枸骨葉藥材的商品名稱為「功勞葉」，因與十大功勞名稱相似，市售產品常出現與冬青科冬青屬(*Ilex*)或十大功勞屬(*Mahonia*)兩大類植物混淆使用之情事。由於枸骨葉俗名眾多，加上歷代醫藥典籍收載差異及各地用藥習慣不同等因素，如有混淆使用可能會影響療效或甚至對使用者產生潛在的健康風險。因此，準確地區分中草藥正確基原及其混淆品對於其產品的安全性和品質控制至關重要。本研究收集枸骨及其常見混淆品包括細葉十大功勞(*M. fortunei*)、闊葉十大功勞(*M. bealei*)、十大功勞(*M. japonica*)以及阿里山十大功勞(*M. oiwakensis*)等5種乾燥葉片對照材料，分別就性狀、組織顯微鏡檢及DNA核酸序列等多層面開發鑑別方法，並將其應用於13件市售品之鑑定。研究結果顯示，13件市售功勞葉中10件為枸骨(76.9%)，3件為闊葉十大功勞(23.1%)。本研究開發建立鑑別枸骨葉及其常見混淆品有效的檢測技術，可提供作為物種鑑定及藥材品質管控參考，有助於保障用藥安全。

關鍵詞：枸骨葉、十大功勞屬、外觀性狀、組織顯微鏡檢、DNA核酸序列

前 言

枸骨葉藥材為我國傳統藥物，具有悠久使用歷史，其商品名稱為「功勞葉」，然而本草典籍及各地方多有同名異物或同物異名之情形，且混淆品外觀近似，使得藥材混誤用問題屢見不鮮；為避免這種情況發生，準確鑑別中草藥實屬重要。依據中華人民共和國藥典⁽¹⁾記載，枸骨葉係冬青科植物枸骨(*Ilex cornuta*)的乾燥葉，具有清熱養陰、益腎、平肝等功效，用於治療肺癆咯血、頭暈目眩等症狀。然而枸骨俗名、別名眾多，如老虎刺、鳥不宿、八角刺、貓兒刺、十大功勞^(2,3)、大葉茶、苦丁

茶、聖誕樹⁽⁴⁾等，其中十大功勞做為枸骨俗名首見於清代張璐《本經逢源》中，後續趙學敏所著《本草綱目拾遺》收錄之十大功勞亦是指冬青科植物枸骨，直至清代吳其濬《植物名實圖考》一書將枸骨與十大功勞分開收載，述明十大功勞包括細葉十大功勞(*Mahonia fortunei*)及闊葉十大功勞(*Mahonia bealei*)^(5,6)。而十大功勞屬植物全球約有100餘種，主要分布於中美、北美及東南亞地區，臺灣原生種分別為十大功勞(*Mahonia japonica*)及阿里山十大功勞(*Mahonia oiwakensis*)，全株均可入藥，且不同部位，如其葉部、果實、根部及樹皮等部位分別具有不同療效，因而廣為民間保健與醫療所

需⁽⁷⁾。此外，十大功勞的複葉在販售時已處理為小葉形態，與枸骨葉更加類似，且葉片形態之商品經過乾燥後易捲縮變形，以致不易區別外觀特徵。但枸骨和十大功勞是屬於不同科屬的植物，其化學成分差異較大，臨床上不應相互代替使用⁽⁸⁾。有鑑於上述原因，本研究收集枸骨及其常見混淆品包括細葉十大功勞、闊葉十大功勞、十大功勞以及阿里山十大功勞等5種乾燥葉片對照材料，分別就性狀、組織顯微鏡檢及DNA (Deoxyribonucleic acid) 核酸序列等多層面開發鑑定方法，方法間相互搭配運用更為可靠，並將其應用於市售品檢驗，開發建立有效的物種檢測技術，可協助提升中草藥品質管控效率，確保用藥的安全性和有效性。

材料及方法

一、材料

(一)乾燥葉片對照材料：枸骨7件、細葉十大功勞6件、闊葉十大功勞1件、十大功勞7件及阿里山十大功勞5件，共計26件。

(二)市售功勞葉：分別來自中藥房12件及中藥批發商1件，共計13件檢體。

二、試藥與試劑

(一)一般化學藥品

OCT膠(LEICA, Germany)、Ethanol (台灣菸酒, Taiwan)、Safranin (Fluka, USA)、Fast green (Wako, Japan)、Xylene (Lab-Scan, Ireland)、Absolute alcohol、Canada balsam、Hydrogen peroxide、Glacial acetic acid (Merck, Germany)。1M Tris-HCl [Tris (hydroxymethyl) aminomethane hydrochloride] buffer、0.5M EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) solution、Proteinase K (Thermo Fisher Scientific, USA)、*N*-Lauroylsarcosine sodium salt、Phenol: Chloroform: Isoamyl alcohol mixture

(25:24:1, v/v/v)、Chloroform: Isoamyl alcohol (24:1, v/v)、Isopropanol (Sigma-Aldrich, USA)、Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (BDH, England)、Sodium chloride、Agarose (Amresco, USA)。

(二)試劑

GFX™ DNA and gel band purification kit (GE healthcare, USA)、Fast-Run taq master mix 5X、100 bp DNA ladder marker (Protech Technology, Taiwan)、EZ-Vision two DNA dye as loading buffer、TBE buffer (Amresco, USA)。Qubit dsDNA HS assay kit、ExoSAP-IT PCR product cleanup reagent、POP-7 polymer、BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit、BigDye xterminator kit、Running buffer (Thermo Fisher Scientific, USA)。

(三)試液

1. 溶解液(Lysis buffer)：Double distilled water 600 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、0.5M EDTA solution 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、1M Tris-HCl buffers 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 、10% *N*-Lauroylsarcosine sodium salt solution 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 及Proteinase K 1 mg/mL。
2. CTAB-NaCl溶液:Sodium chloride (NaCl) 4.1 g溶於80 mL 水中，加入Hexadecyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 10 g，混合攪拌均勻加熱至65°C，使CTAB完全溶解，加水至100 mL。

三、儀器設備

- (一)數位顯微鏡(VHX-6000, Keyence, Japan)。
- (二)冷凍切片機(CryoStar NX50 System OP, Thermo Fisher Scientific, USA)。
- (三)光學顯微鏡(BX51, Olympus, Japan)附影像處理裝置(Microscope digital camera DP74)。

(四)藥材研磨機(Tube mill control, IKA, Germany)。

(五)精密天平(XS205, Mettler Toledo, Swiss)。

(六)恆溫加熱槽(MC-01N, Major Science, Taiwan)。

(七)離心機(Heraeus Biofuge pico, Germany)。

(八)核酸濃度螢光測定儀(Qubit 4 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, USA)。

(九)聚合酶連鎖反應器(Astec PC320, Astec, Japan)。

(十)電泳槽及鑄膠器(Mupid-exU, Advance, Japan)。

(十一)影像系統(GelDoc Go Imaging System, Bio-Rad, USA)。

(十二)定序儀(3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)。

四、實驗方法

(一)生藥鑑別

1. 性狀檢查

運用數位顯微鏡檢視檢體外觀葉尖、葉基、葉面、葉背及葉緣。

2. 組織鏡檢

檢體先修剪裁切成適當大小，經潤溼後以OCT膠包埋，冷凍切片後再依序以Safranin和Fast green進行二重染色、乙醇脫水、二甲苯澄清，封片後以顯微鏡檢視。

3. 解離鏡檢

將檢體置於裝有30%過氧化氫：水：無水乙酸(1:4:5, v/v/v)混合液之固定瓶，蓋緊瓶口放置於約50℃烘箱內，解離至檢體為半透明狀或略帶白色，以水沖洗三次，每次間隔約兩小時，用探針挑出已解離之材料置於載玻片上，以顯微鏡檢視。

(二)分子生物技術鑑別

1. DNA萃取與純化

檢體以粉碎機研磨成細粉，稱取檢體粉末100 mg置於2 mL微量離心管，依照呂等人(2005)⁽⁹⁾發表之萃取方法進行。再利用GFX™ DNA and gel band purification kit套組進行DNA純化，操作步驟依套組說明，溶洗出檢體總基因組DNA (Genomic DNA)溶液，利用核酸濃度螢光測定儀測定樣品溶液核酸濃度，提供調整聚合酶連鎖反應之DNA模板量與擴增循環次數使用。

2. 聚合酶連鎖反應(Polymerase chain reaction, PCR)

取0.2 mL PCR反應管並依照表一配製PCR反應溶液，依序加入無菌純水、Fast-Run taq master mix (5X)、引子及模板DNA溶液，混合均勻後將反應管移入聚合酶連鎖反應器，依據引子對參照表二設定反應條件後進行PCR擴增。為確保DNA萃取品質以及排除因未知抑制因素而造成的PCR偽陰性結果，需另外針對樣品DNA的18S ribosomal RNA基因，以通用性引子對18SrRNAF1-18SrRNAR1⁽¹⁰⁾進行內部對照基因試驗(Internal control)。

3. 膠片電泳

取PCR反應產物5 μL與EZ-Vision 1 μL進行混合後，置入2%瓊脂膠體(Agarose gel)，進行電泳，電泳條件100 V、35分

表一、PCR反應溶液之配製

溶液名稱	添加量(μL)
25 μM引子F (Forward primer)	0.5
25 μM引子R (Reverse primer)	0.5
Fast-Run taq master mix (5X)	10.0
模板DNA	2.0
無菌純水	37.0
總體積	50.0

表二、引子序列與PCR反應條件

引子名稱	引子序列 5'→3'	基因區段	PCR反應條件		
內部對照組					
18SrRNAF1	AACGGCTACCACATCCAAGG	18S rRNA	94℃	2 min	} 30 cycles
			94℃	30 sec	
18SrRNAR1	CCGAAGGCCAACACAATAGG		55℃	30 sec	
			72℃	30 sec	
			72℃	5 min	
特異性PCR					
liF6	GTAGACCCGGCGWACTTGTTA	ITS	94℃	2 min	} 35 cycles
			94℃	30 sec	
liR5	AGAGGTCTTTCAACCACCACTTG		60℃	30 sec	
			72℃	30 sec	
			72℃	5 min	
MpF2	CTCACATCTCACAATAAGCA	psbA-trnH	94℃	2 min	} 30 cycles
			94℃	30 sec	
MpR2	CCCTAACAGATAAGATAACAG		48℃	30 sec	
			72℃	30 sec	
			72℃	5 min	

鐘，再以影像系統觀察確認PCR增幅結果，並拍攝影像。

4. 定序試驗與序列比對分析

將PCR擴增產物以ExoSAP-IT套組純化，純化後以BigDye terminator v3.1 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產品標示執行)，之後置入96孔盤，以ABI 3130定序儀將純化後產物進行正向(Forward)與反向(Reverse)雙向定序分析。將定序所取得之序列資訊，利用BLAST (Basic local alignment search tool, BLAST)搜索工具與GenBank 資料庫收載序列比對相似程度以鑑定物種種類。

結果與討論

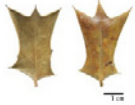
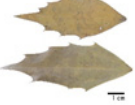
一、生藥鑑別方法

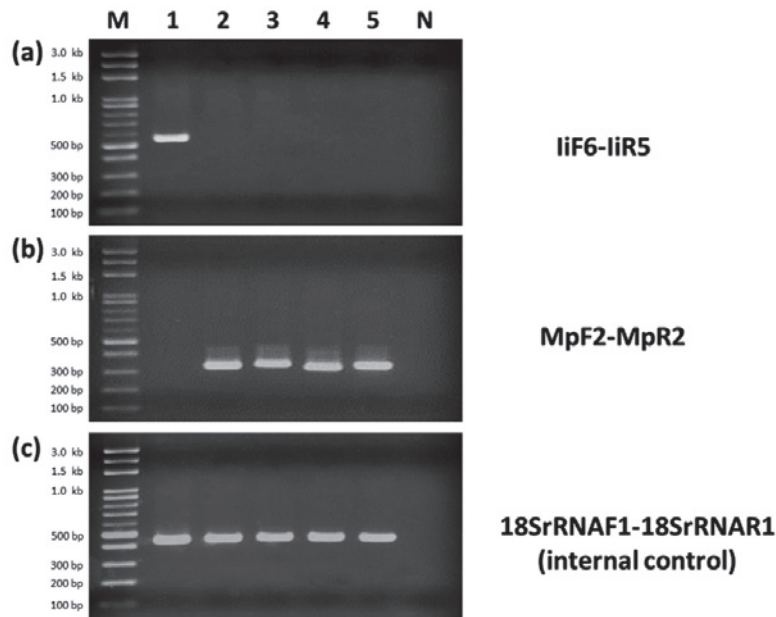
枸骨葉與其他4種混淆品物種在性狀上，可藉由葉片之葉柄有無、葉形、葉基以及葉緣2側刺鋸齒數目等形態特徵來區別(表三)；而葉中脈組織切片則可由中脈維管束形態、柵狀組織是否通過中脈及草酸鈣結晶型式來鑑別(表四)；在葉片解離鏡檢則可經由上表皮細胞表面觀、導管型式及草酸鈣結晶型式進行鑑別(表五)。本研究針對5種對照材料建立生藥物種特徵檢索表，如表六所示。

二、分子生物鑑別方法

藉由物種間序列的差異性，篩選出適合鑑別目標物種之DNA標記；在ITS區段序列針

表三、枸骨及其常見混淆品之性狀特徵比較表

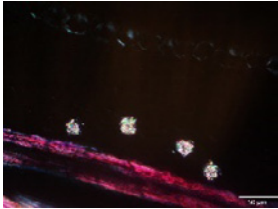
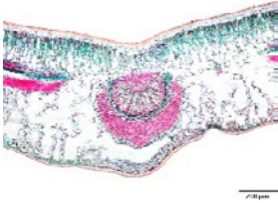
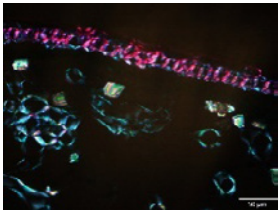
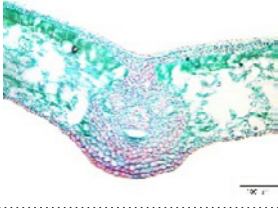
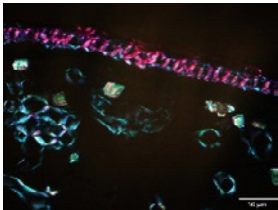
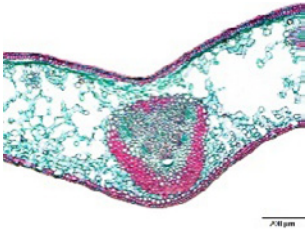
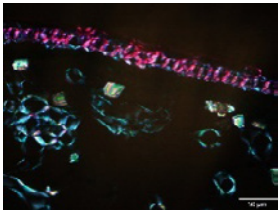
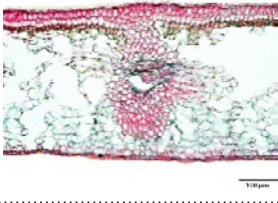
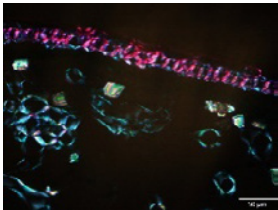
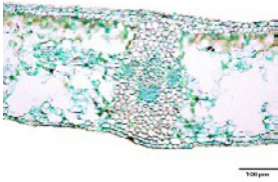
物種	枸骨	細葉十大功勞	闊葉十大功勞	十大功勞	阿里山十大功勞
葉柄	短柄	無柄	無柄	無柄	無柄
葉形	圓矩長方形 	披針形 	長卵形 	卵形 	披針形 
葉尖	漸尖	銳尖	漸尖	銳尖	漸尖
葉基	圓鈍或近截形	楔形	楔形或圓形、心形偏斜	心形偏斜	圓鈍
葉片	革質	革質	革質	革質	革質
單邊葉緣	1-3個硬刺	5-10刺鋸齒	2-6刺鋸齒	2-7刺鋸齒	2-9刺鋸齒



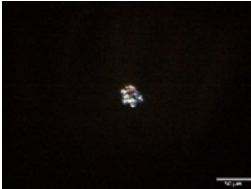
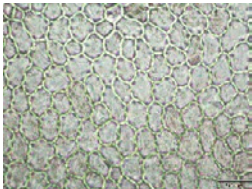
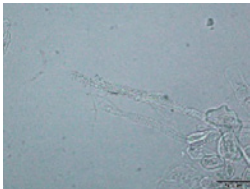
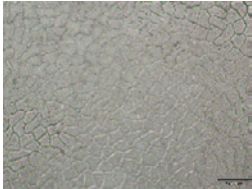
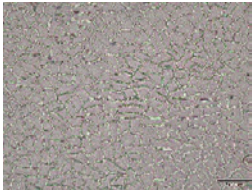
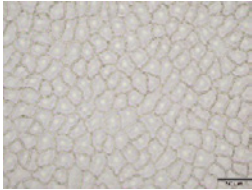
圖一、枸骨及其常見混淆品之特異性引子對PCR擴增產物電泳圖
使用之引子對標示於右方：

- (a) liF6-liR5為冬青屬ITS區間序列特異性引子對
 - (b) MpF2-MpR2為十大功勞屬*psbA-trnH*間隔區序列特異性引子對
 - (c) 18SrRNAF1-18SrRNAR1為18S ribosomal RNA通用性引子對
- Lane M: 100 bp DNA ladder marker,
Lane 1: 枸骨, Lane 2: 細葉十大功勞, Lane 3: 闊葉十大功勞,
Lane 4: 十大功勞, Lane 5: 阿里山十大功勞,
Lane N: 空白對照組(No template control)

表四、枸骨及其常見混淆品之葉中脈組織切片特徵比較表

物種	特徵	柵狀細胞	草酸鈣結晶	中脈維管束	下表面
枸骨	通過中脈		草酸鈣簇晶	1大型 維管束，U形	凸起
					
細葉 十大功勞	不通過中脈		無	3個 橢圓形	凸起
					
闊葉 十大功勞	通過中脈		草酸鈣方晶	5個 橢圓形	微凸起
					
十大 功勞	不通過中脈		無	1個 橢圓形	無凸起
					
阿里山 十大功勞	不通過中脈		無	3個 橢圓形	無凸起
					

表五、枸骨及其常見混淆品之葉片解離特徵比較表

物種	特徵	結晶	上表皮細胞 表面觀	氣孔	厚壁細胞	導管
枸骨		草酸鈣簇晶	不規則圓矩形	不定式	類方形	螺旋紋
						
細葉 十大功勞		無結晶	多角不規則形	不定式	骨形	螺旋紋
						
闊葉 十大功勞		草酸鈣方晶	微波浪不規則形	不定式	骨形	階紋
						
十大 功勞		無結晶	微波浪不規則形	不定式	骨形	網紋/螺旋紋
						
阿里山 十大功勞		無結晶	呈波浪狀彎曲	不定式	骨形	螺旋紋
						

對冬青屬枸骨物種設計IiF6-IiR5特異性引子對，而在*psbA-trnH*間隔區序列針對4個十大功勞屬物種(細葉十大功勞、闊葉十大功勞、

十大功勞及阿里山十大功勞)設計MpF2-MpR2引子對，引子序列如表二所示。以5種對照材料之總基因組DNA為模板，分別進行上述兩

表六、枸骨及其常見混淆品之物種特徵檢索表

性狀特徵

1. 葉形圓矩長方形，葉革質，葉尖具1硬刺，基部圓形或近截形，葉緣每邊具1-3個硬刺 枸骨 *Ilex cornuta*
1. 葉形卵形至披針形，葉革質
 2. 葉披針形
 3. 葉基部圓鈍，葉緣每邊具2-9刺鋸齒 阿里山十大功勞 *Mahonia oiwakensis*
 3. 葉基部楔形，葉緣每邊具5-10刺鋸齒 細葉十大功勞 *M. fortunei*
 2. 葉卵形
 3. 葉基部楔形或圓形，有時心形，偏斜，葉緣每邊具2-6刺鋸齒 闊葉十大功勞 *M. bealei*
 3. 葉基部略呈心形，偏斜，葉緣每邊具2-7刺鋸齒 十大功勞 *M. japonica*

葉中脈組織特徵

1. 中脈維管束1個
 2. 中脈維管束大型，柵狀組織通過中脈，具草酸鈣簇晶 枸骨 *Ilex cornuta*
 2. 中脈維管束橢圓形，柵狀組織不通過中脈 十大功勞 *M. japonica*
1. 中脈維管束3或5個
 2. 中脈維管束3個，柵狀組織不通過中脈
 3. 葉上表面下木化纖維2列，葉下表面凸起 細葉十大功勞 *M. fortunei*
 3. 葉上表面下木化纖維1列，葉下表面無凸起 阿里山十大功勞 *M. oiwakensis*
 2. 中脈維管束5個，柵狀組織通過中脈，具草酸鈣方晶 闊葉十大功勞 *M. bealei*

葉片解離特徵

1. 具草酸鈣結晶
 2. 具草酸鈣簇晶 枸骨 *Ilex cornuta*
 2. 具草酸鈣方晶 闊葉十大功勞 *Mahonia bealei*
1. 不具草酸鈣結晶
 2. 上表皮細胞表面呈多角不規則形 細葉十大功勞 *M. fortunei*
 2. 上表皮細胞表面呈波浪狀或微波浪狀
 3. 導管主為網紋及螺旋紋導管 十大功勞 *M. japonica*
 3. 導管主為螺旋紋導管 阿里山十大功勞 *M. oiwakensis*

組引子對之PCR擴增，其電泳分析結果如圖 一。將各自物種之PCR擴增產物進行定序分

>枸骨 *Ilex cornuta* (549bp)

GTAGACCCGGGGAAGTTGTTAAAAATATGCGTG66GGTTTGAGAGGGGGTGC6CGAGCCGCCCAACACACTCCCCAGCCCGCTCG6GATTG6CTTGC6
TTCCCTTAGCGGGGACGCGGCCAAGCTCCCGACACGAAACCCGCGCGCTGTCTGC6CCAGGAGCAATAACTGAAAGGGCTGGCTCCCGGTGTCCCGTTG
GCGGGGTGCAGGGAGGCAATTTGATCTTTTGAATCTAAACGACTCTCGGCAAGGATATGCTCGGCTCTGCGATCGATGAGGAGCGTACGCAAAATGCGA
TAGTTGGTGTGAATTTGCAAGATCCCGTGAACCATCGAGTTTGTGAACGCAAGTTGCGCCCAAGGCCATTAGGCTAAGGGGACGCTGCTGCTGGGCGTCAAG
CATCCGCTGCGGACCAACCCCAATGCCAGCCGAGATTTGCGGGAGTTTGGGGGCGGAAATTTGGCTCCCGTTCAAGACGTCGCGCGTTGGCCCAAAAA
TGAATTCTTGACGATGGAGTCAGCAAGGTGGTGGTTGAAAGACCTCT

>細葉十大功勞 *Mahonia fortunei* (344bp)

CTCACATCTCACAATAAGCAATTTTCGTTTTCTTTCTTATTCTATGCAACTTAAGTCAAAAAGCATTACTACAACATAAACTATAGCGGGGTTTTTAA
TTTTGAATTTCTGGATTTTCATACITTTTTGTTTTGTGTAAGTTATTGCTCTACTCTAAATGTAATTTCTAGATTTTCTCAAAATCTTTAAATTTGTTCTTC
CTACTTCCTAAGGGTTTAAAGTTTTTAAATAAAAGTAAATATATATATATATTTTGTAGAACCAAGATTACATATTCTATTATTTTCTATAG
AAGTAGAAAAATTTTAAATTTTCTGTTATCTTATCTGTTAGGG

>闊葉十大功勞 *Mahonia bealei* (354bp)

CTCACATCTCACAATAAGCAATTTTCGTTTTCTTTCTTATTCTATGCAACTTAAGTCAAAAAGCATTACTACAACATAAACTATAGCGGGGTTTTTCA
TTTTGAATTTCTGGATTTTCATACITTTTTGTTTTGTGTAAGTTATTGCTCTACTCTAAATGTAATTTCTAGATTTTCTCAAAATCTTTAAATTTGTTCTTC
CTACTTCCTAAGGGTTTAAAGTTTTTAAATAAAAGTAAATATATATATATATTTTGTAGAACCAAGATTACATATTCTATTATTTCTATAG
TTTTCTATAGAGTAGAAAAATTTTAAATTTTCTGTTATCTTATCTGTTAGGG

>十大功勞 *Mahonia japonica* (337bp)

CTCACATCTCACAATAAGCAATTTTCGTTTTCTTTCTTATTCTATGCAACTTAAGTCAAAAAGCATTACTACAACATAAACTATAGCGGGGTTTTTAAATTTG
AATTTGGAATTTCTGGATTTTCATACITTTTTGTTTTGTGTAAGTTATTGCTCTACTCTAAATGTAATTTCTAGATTTTCTCAAAATCTTTAAATTTGTTCTTC
TCATAAGGGTTTAAAGTTTTTAAATAAAATATATATATATATTTTGTAGAACCAAGATTACATATTCTATTATTTCTATAGAGTAGA
TAAATTTTAAATTTTCTGTTATCTTATCTGTTAGGG

>阿里山十大功勞 *Mahonia oiwakensis* (357bp)

CTCACATCTCACAATAAGCAATTTTCGTTTTCTTTCTTATTCTATGCAACTTAAGTCAAAAAGCATTACTACAACATAAACTATAGCGGGGTTTTTCA
TTTTGAATTTCTGGATTTTCATACITTTTTGTTTTGTGTAAGTTATTGCTCTACTCTAAATGTAATTTCTAGATTTTCTCAAAATCTTTAAATTTGTTCTTC
CTACTTCCTAAGGGTTTAAAGTTTTTAAATAAAAGTAAATATATATATATTTTGTAGAACCAAGATTACATATTCTATTATTTCTATAGAGTAGA
TCTATATCTATAGAGTAGAAAAATTTTAAATTTTCTGTTATCTTATCTGTTAGGG

圖二、枸骨及其常見混淆品之特異性引子對擴增片段序列

析結果如圖二，枸骨之擴增產物序列長度為549 bp (Base pairs, bp)，而十大功勞屬各物種序列片段大小為：細葉十大功勞為344 bp、闊葉十大功勞為354 bp、十大功勞為337 bp及阿里山十大功勞為357 bp，將取得之序列資訊再與GenBank資料庫所收載之對照物種序列進行比對，作為鑑別其物種的分類依據。經由上述結果得知，研究中所建立之特異性PCR-DNA定序方法(Specific PCR and DNA sequencing methods)沒有出現非特異性的擴增，且增幅產物皆符合預期大小，顯示所開發之兩組特異性引子對具有良好的特異性與擴增效率，可應用於此5個目標物種之偵測及鑑定。

三、市售品檢驗結果

13件市售功勞葉經生藥鑑別與特異性PCR-DNA定序方法進行鑑定，鑑別結果其中10件為枸骨(76.9%)、3件為闊葉十大功勞(23.1%)，兩種鑑別方法分析結果皆一致。由此可知市售品的使用上的確有枸骨葉與小葉科十大功勞屬的植物混淆誤用情形，顯示本研究建立的鑑別方法可實際應用於枸骨葉藥材商業產品之摻假檢測。

結 論

本研究從傳統形態學和分類學找出性狀差異，並將葉片性狀及組織切片與解離的顯微鏡檢驗結果統整為比較表及檢索表模式以提供比對基準，建立生藥鑑別法；另結合分子生物技術建立特異性引子對，以PCR反應擴增核酸片段並經過定序確認物種，提供科學認證的鑑識方法，可有效正確區別枸骨葉藥材的真偽，作為品質控管及基原鑑定之依據，自源頭把關中

藥原料之正確性，進而守護用藥安全。

參考文獻

1. 國家藥典委員會。2020。中華人民共和國藥典。2020年版。87，261頁，中國醫藥科技出版社，北京。
2. 蕭培根。2002。新編中藥志第三卷。469-473頁，化學工業出版社，北京。
3. 王存琴、何丹。2016。枸骨的化學成分及藥理活性研究進展。包頭醫學院學報，32(08): 160-162。
4. 左文健、梅文莉、曾艷波、王輝等。2011。枸骨的化學成分和藥理活性研究進展。安徽農業科學，39(27): 16560-16562。
5. 陸維承。2007。枸骨葉和十大功勞葉考辨。中華中醫藥學刊，25(01): 168-169。
6. 李維林、郭榮麟、傅暉、鄭漢臣等。2003。苦丁茶、功勞葉和枸骨的本草考證。中藥材，26(08): 595-598。
7. 蕭育賢。2007。台灣產十大功勞屬族群之化學成分與遺傳多樣性分析。國立嘉義大學森林暨自然資源學系碩士論文。1-68。
8. 陸維承。1999。功勞葉品種調查及鑑別。時珍國醫國藥，10(12): 913。
9. 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.
10. Lin, J.J., Fleming, R., Kuo, J. and *et al.* 2000. Detection of plant genes using a rapid, nonorganic DNA purification method. *Biotechniques.* 28(2): 346-350.

Authentication of *Ilicis Cornutae* Folium and its adulterants

YUNG-CHUAN HSIEH, TSAI-YU WEN, CHIA-YUN HSIEH, HUI-CHUN LEE, YA-TZE LIN, SHOU-CHIEH HUANG, SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Ilex cornuta (family Aquifoliaceae) is a widely-used traditional Chinese medicine (TCM). Its dried leave was named *Ilicis Cornutae* Folium (Gouguye), trade name “Gong-lao-ye”. Because the Chinese name of *Ilex* and *Mahonia* are similar, both of them are sold as “Gong-lao-ye” in the market. The various common name, different documentation in the ancient pharmacopoeia books, and the different usage habits in various regions seems to cause this misused situation. Misusage may reduce the therapeutic efficacy or even pose potential health risk to the users. Therefore, species authentication is very important for the safety and quality control of herbal medicines. In this study, five standard raw materials of *I. cornuta*, *M. fortunei*, *M. bealei*, *M. japonica*, *M. oiwakensis* were collected for method development, and 13 “Gong-lao-ye” raw material samples were used for method application. The results showed that 10 out of 13 (76.9%) were *I. cornuta* and 3 out of 13 (23.1%) were *M. bealei*. The new method combined morphological characteristics, histological microscopy and deoxyribonucleic acid sequences for discrimination of *I. cornuta* and its adulterants, and could be an efficient tool for regulation and quality control on commercial herbal market, as well as to ensure drug safety.

Key words: *Ilex cornuta*, *Mahonia*, Morphological characteristics, Histological microscopy, Deoxyribonucleic acid sequences