

應用ITS序列鑑定天南星藥材及其製劑

李蕙君 謝詠荃 蔡佳芬 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

天南星藥材基原為天南星科植物中，異葉天南星(*Arisaema heterophyllum*)、天南星(*Arisaema erubescens*)或東北天南星(*Arisaema amurense*)之乾燥塊莖。由於本身具有毒性，為避免藥材汙染或誤用造成之健康危害，本研究選擇以internal transcribed spacer (ITS)序列作為基因標記，設計天南星專一性引子組，並利用Nested PCR繼以DNA定序法進行基原鑑別。測試所收集之天南星及其誤用品藥材(含7個品種總計36件藥材)以及4件複方製劑檢體，結果證明此方法不但能有效地應用於未經炮製或各種炮製方法處理後的藥材，亦可應用於複方製劑之檢驗。

關鍵詞：天南星、ITS、Nested PCR-DNA定序

前 言

依「臺灣中藥典」記載⁽¹⁾，天南星為天南星科(Araceae)植物中的異葉天南星(*Arisaema heterophyllum*)、天南星(*Arisaema erubescens*) Schott或東北天南星(*Arisaema amurense*)三個品種之乾燥塊莖。傳統典籍記載天南星味苦辛而性溫，有祛風定驚、化痰散結的功能，用於治療中風、口眼歪斜、半身不遂、癲癇、破傷風等等症狀，常用方劑則如「上中下通用痛風丸」與黃柏、蒼朮、神麴、川芎、桃仁、龍膽、防己、白芷、羌活、威靈仙、桂枝、紅花同用，用於治療痛風、全身關節疼痛，或「二朮湯」中與白朮、黃芩、生薑、茯苓、羌活、甘草、蒼朮、陳皮、半夏、香附、威靈仙同用，用於治療濕痰橫行經絡、雙臂疼痛。而近代實驗也證實天南星萃取物或所含特定成分具有抗腫瘤⁽²⁾、減少神經毒性⁽³⁾、殺線蟲⁽⁴⁾等藥理活性。天南星雖為常用中藥，然而其全株有

毒，若與之接觸會造成皮膚搔癢，服用過量中毒則會口腔黏膜糜爛、咽喉有燒灼感、口舌麻木腫大，亦會造成運動神經系統末梢麻痺呼吸困難而致死，故對於陰虛燥痰者及孕婦禁止服用⁽⁵⁾。為避免毒性傷害，市面流通藥材大多經過炮製，以減低毒性並增加療效。常見的天南星依炮製方法不同有以下兩種：以生薑、白矾 $[Al_2(SO_4)_3]$ 及甘草等炮製的「制南星」，及以牛膽汁制過的「膽南星」。

天南星藥材與多種誤用品外型相似，炮製過程又增加了鑑別的困難度，更不用說是與多種藥材共同煎煮並經過各式製成步驟之複方製劑。早期有石林春等人之研究⁽⁶⁾，在天南星基原及其混偽品以性狀鑑定、顯微鑑定、High Performance Capillary Electrophoresis (HPCE) 鑑定、近紅外光譜鑑定及Polyacrylamide Gel electrophoresis (PAGE) 鑑定均有其侷限性下，針對部分天南星品系的植株葉片與塊莖藥材進行ITS2基因序列鑑別之探討。然而天南星為常

用於複方製劑中的藥材，為提高檢驗的靈敏度以確保民眾用藥安全，本研究開發天南星及其誤用品鑑別方法，並可將之應用於製劑之檢驗。

材料及方法

一、材料收集

- (一)天南星藥材：共36件，含天南星及其誤用品藥材7個品種。
- (二)天南星製劑：共4件，包含2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, Amresco,美國)，pH 8.0、100 mM乙二胺四乙酸二鈉(EDTA, Amresco, USA)、1%十二烷基肌氨酸鹽(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,美國。十六烷基三甲基溴化銨(CTAB)，購自BDH, UK。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,美國。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：天南星鑑別用nested PCR引子對：APF0 (ACTYG YGAAC GGTTG ACC)、APR0 (RTTCT CTCCG ATGAY TGGGT TC)、ArF1 (GAACG GTTGA CCCCT

GCCA)及ArR1 (CGATG ASCAT CGTCC ACCAC TC)；18S rRNA放大用引子對18SrRNAF1 (AACGG CTACC ACATC CAAGG)及18SrRNAR1 (CCGAA GGCCA ACACA ATAGG)⁽⁷⁾，均購自百力生物科技股份有限公司，臺灣。

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⁽⁸⁾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反應與電泳

取適量藥材或製劑檢體DNA溶液作模板，以25 μ M APF0、APR0引子對各0.5 μ L，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、55°C 30秒、72°C 30秒共30週期。繼以25 μ M ArF1、ArR1引子對進行第二次PCR擴增反應，條件為94°C 30秒、58°C 30秒、72°C 30秒共30週期。反應完成後取PCR產物5 μ L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GenBank資料庫與分析軟體進行序列比對。

結果與討論

本次研究收集有來自本署標本館之天南星(*Arisaema erubescens*)、異葉天南星(*Arisaema heterophyllum*)及相關誤用藥材如虎掌南星(*Pinellia pedatisecta*)、申跋(*Arisaema ringens*)、象南星(*Arisaema elephas*)、臺灣姑婆芋(*Alocasia cucullata*)等藥材，取得其ITS序列再與GenBank資料庫收載之天南星科相關物種序列進行比較(如圖一)，依此設計針對天南星科植物與虎掌南星之APF0-APR0及ArF1-ArR1兩組引子對。Nested PCR方法以天南星及相關誤用品測試結果如圖二，天南星與申跋可得約556鹼基對之PCR放大產物，虎掌南星可得約為616鹼基對產物，而姑婆芋非放大標的亦無放大產物，可見此方法可精準用於天南星及虎

掌南星上。測試其餘未確認基原之天南星藥材及製劑檢體，部分結果如圖三所示，顯示本方法可進一步應用於經不同炮製方法處理之天南星藥材或含天南星的複方製劑中，且不受製劑中其他藥材成分的干擾，大幅增加天南星基原鑑別方法之適用性。

所有藥材檢體定序鑑別結果如表一，其中標示天南星或其炮製品之27件檢體經鑑定後，23件屬天南星正確基原；其餘4件檢體經鑑定序列與GenBank資料庫比對後為Araceae屬植物，其ITS序列與已知物種僅有約90-93%相似度，推測應是誤用同屬但ITS序列未經收載之物種。而複方製劑檢體共4件之定序結果皆為天南星(*A. erubescens*)，如表二。此外比對定序所得之天南星ITS序列，結果可見雖同為天南星但彼此間序列變異較大，大致可分為兩個群組：(1) Ae-1群(與GenBank gi: 343404292相似度較高)，包含檢體ram03、ram05、ram08、ram10、ram11、ram13、ram15、ram17、ram18、ram19、ram22、ram25、ram26、ram27、ram29、rap1、rap3及rap4共18件，與(2) Ae-2群(與GenBank gi: 93062886相似度較高)，包含另外9件定序為天南星之檢體。此現象與早期研究⁽⁶⁾中所描述「天南星(*A. erubescens*)種內變異較明顯」十分相似。

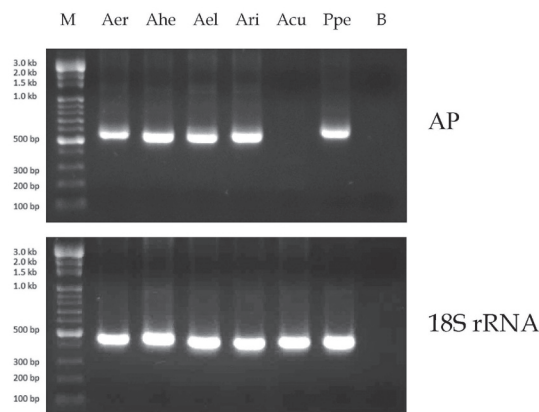
中華人民共和國藥典早已將DNA條形碼分子鑑定方法作為藥典規範，中草藥DNA基原鑑定是目前趨勢。目前國內中藥材大多仰賴進口，此天南星分子生物技術基原鑑定方法對於中藥的品質管理與民眾用藥安全應有相當大的助益。

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。37-38頁，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北。
2. Chen, G., Xu, J., Miao, X. and et al. 2012.

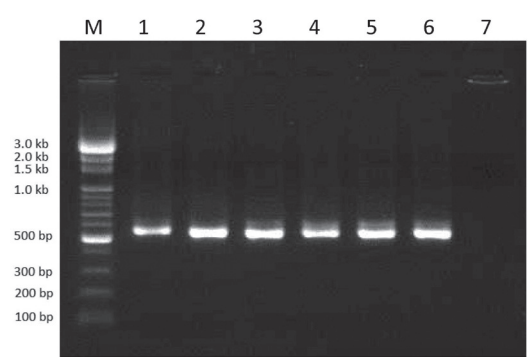
圖一、天南星相關藥材ITS序列比較(序列來源：GenBank)

Ae：天南星(*Arisaema erubescens*)，Aa：東北天南星(*Arisaema amurense*)，Ar：由拔(*Arisaema ringens*)，Ah：異葉天南星(*Arisaema heterophyllum*)，Pp：掌葉半夏(*Pinellia pedatisecta*)，Ao：姑婆芋(*Alocasia odora*)。「*」代表鹼基相同位置、「-」代表出現gap位置、「•」代表鹼基差異位置。其中灰底標示為引子對位置



圖二、以天南星及其相關誤用品測試天南星鑑別條件

AP以APF0-APR0及ArF1-ArR1引子對放大；
18S rRNA以18S rRNAF1-18S rRNAR1通用引子對放大
Lane M: 100bp ladder marker, Aer：天南星(*Arisaema erubescens*), Ahe：異葉天南星(*Arisaema heterophyllum*), Ael：象南星(*Arisaema elephas*), Ari：申跋(*Arisaema ringens*), Acu：台灣姑婆芋(*Alocasia cucullata*), Ppe：虎掌南星(*Pinellia pedatisecta*), B: Blank (no template)



圖三、天南星藥材及製劑Nested PCR產物電泳結果

Lane M: 100bp ladder marker
Lane 2: Aer (天南星)
Lane 3: ram08 (制南星)
Lane 4: ram22 (膽南星)
Lane 6: rap1 (二朮湯)
Lane 7: rap4 (上中下通用痛風丸)
Lane 8: Blank (no template)

表一、天南星藥材檢體Nested PCR-DNA定序方法鑑定結果

編碼	標示	鑑定結果	編碼	標示	鑑定結果
ram03	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram18	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram04	天南星	<i>Arisaema</i> spp.1 ^a	ram19	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram05	天南星(一把傘)	<i>Arisaema erubescens</i>	ram20	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram06	天南星	<i>Arisaema</i> spp.2 ^b	ram21	天南星	<i>Arisaema</i> spp.3 ^c
ram07	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram22	膽南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram08	天南星(制南星)	<i>Arisaema erubescens</i>	ram23	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram09	天南星(一把傘)	<i>Arisaema erubescens</i>	ram24	天南星	<i>Arisaema</i> spp.2 ^b
ram10	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram25	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram11	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram26	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram12	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram27	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram13	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram28	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram14	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram29	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>
ram15	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram30	毛筆天南星	<i>Arisaema</i> spp.3 ^c
ram16	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram32	申跋	<i>Arisaema ringens</i>
ram17	天南星	<i>Arisaema erubescens</i>	ram33	虎掌南星	<i>Arisaema</i> spp.1 ^a

a. “*Arisaema* spp.1 ”表示序列比對結果與*A. wattii*相似度為93%
b. “*Arisaema* spp.2 ”表示序列比對結果與*A. thunbergii*相似度為93%
c. “*Arisaema* spp.3 ”表示序列比對結果與*A. thunbergii*相似度為90%

表二、天南星製劑檢體Nested PCR-DNA定序方法
鑑定結果

編碼	製劑	鑑定結果
rap1	二朮湯	<i>Arisaema erubescens</i>
rap2	二朮湯	<i>Arisaema erubescens</i>
rap3	上中下通用痛風丸	<i>Arisaema erubescens</i>
rap4	上中下通用痛風丸	<i>Arisaema erubescens</i>

Characterization and antitumor activities of the water-soluble polysaccharide from Rhizoma Arisaematis. Carbohydr Polym. 90(1): 67-72.

3. Huang, C.F., Yang, R.S., Liu, S.H. and *et al.* 2011. Evidence for improved neuropharmacological efficacy and decreased neurotoxicity in mice with traditional processing of Rhizoma Arisaematis. Am J Chin Med. 39(5): 981-998.
4. Du, S.S., Zhang, H.M., Bai, C.Q. and *et al.* 2011. Nematocidal flavone-C-glycosides against the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) from *Arisaema erubescens* tubers.

Molecules. 16(6): 5079-5086.

5. 楊榮森、蕭水銀等。2006。天南星嚴重毒性的評估-發展科學方法測定生製及炮製天南星之藥效、毒性及安全劑量(2-2)。中醫藥年報，1: 285-316。
6. Shi, L.C., Chen, J., Xiang, L. and *et al.* 2014. DNA barcoding identification between arisaematis rhizoma and its adulterants based on ITS2 sequences. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 39(12): 2176-2179.
7. Lin, J. J., Fleming, R., Kuo, J. and *et al.* 2000. Detection of Plant Genes Using a Rapid, Nonorganic DNA Purification Method. Bio Techniques. 28(2): 346-350.
8. Lu, K.T., Lo, C.F., Chang, H.C. and *et al.* 2005. Identification of Saposinkoviae Radix in concentrated Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods. J. Food Drug Anal. 13(3): 219-224.

Identification of *Arisaematis rhizoma* and Its Preparations by Nested PCR-amplified ITS Region Sequencing Method

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

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Arisaematis rhizoma is the dried tuber of three Araceae species, namely *Arisaema erubescens* (Wall.) Schott, *Arisaema heterophyllum* Blume and *Arisaema amurense* Maxim. To avoid misusing this toxic material, a nested PCR-DNA sequencing method for the identification of raw materials, refining materials or preparations of *arisaematis rhizome* was developed based on the sequence of internal transcribed spacer (ITS) region. In this study we analyzed 36 herbal samples of 7 species and 4 traditional Chinese Medicine (TCM) preparations, and the results showed this method provides effective and accurate identification of *arisaematis rhizome*.

Key words: *Arisaematis rhizoma*, internal transcribed spacer (ITS), nested PCR-DNA sequencing