

利用Nested PCR-DNA定序方法鑑定酸棗仁藥材及其製劑

李蕙君 謝詠筌 呂康祖 劉宜祝 施養志 羅吉方

食品藥物管理局研究檢驗組

摘 要

酸棗仁基原為鼠李科(Rhamnaceae)植物酸棗[*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou]之乾燥成熟種子，常與外觀相似的滇棗仁(*Ziziphus mauritiana* Lam.)發生混用情形，本研究分析酸棗仁及滇棗仁ITS (Internal transcribed spacer)序列，建立酸棗仁藥材PCR-DNA定序方法、酸棗仁製劑Nested PCR-DNA定序方法，及Multiplex PCR快速篩選鑑別方法。結果顯示，50件藥材檢體中有24件檢出滇棗仁之DNA序列，其中4件未檢出酸棗仁序列，其餘20件為兩者混用；17件製劑檢體中則有11件混用滇棗仁。

關鍵詞：酸棗仁、Nested PCR-DNA定序、Multiplex PCR

前 言

依據「中華中藥典」⁽¹⁾記載，酸棗仁(*Ziziphi Spinosae Semen*)基原為鼠李科(Rhamnaceae)植物酸棗*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou之乾燥成熟種子。酸棗仁主要產於中國河北、陝西與遼寧，秋末冬初採收成熟果實，收集種子並曬乾。種子扁圓形或扁橢圓形，表面紫紅色或紫褐色，平滑而有光澤，平坦面有隆起縱線紋，種皮硬脆，常有破碎或裂紋。味甘酸，性平，入心、脾、肝、膽經，最早載於「神農本草經」，有養肝、寧心、安神及斂汗功效，故常用於治療虛煩不眠、驚悸怔忡及煩渴虛汗等⁽²⁾。現代醫學研究則顯示，酸棗仁萃取物或所含特定成分具有鎮靜安眠⁽³⁻⁶⁾、保護神經細胞之損傷⁽⁷⁾、抗焦慮作用^(8,9)、免疫調控功能⁽¹⁰⁾等藥理作用。

鼠李科棗屬下植物約有170種⁽¹¹⁾，由於商業性大量栽培，其栽培品系亦多。依據大陸近年抽樣調查結果，約有50%酸棗仁市售品混有誤用品滇棗仁(*Ziziphus mauritiana* Lam.)。滇棗仁種子扁圓近桃形，表面棕黃色且平坦面無縱線紋，然而外

形與酸棗仁不易區分，故欲建立分子生物鑑別方法以確保酸棗仁藥材之正確性。

材料及方法

一、檢體收集

自本局標本室取得酸棗仁及滇棗仁對照藥材各1件，中藥廠及北中南各地中藥房收購市售酸棗仁藥材共50件；另選含酸棗仁之方劑11種(包括單方1種及複方10種)，共取得17件檢體。

二、DNA萃取與純化

依照本局發表之萃取方法⁽¹²⁾，將藥材磨碎、製劑檢體之丸劑切碎而膠囊劑製劑倒出膠囊內容物，秤取檢體100 mg加入1 mL之lysis buffer (含100 mM三羥甲基氨基甲烷(Tris-HCl, BDH), pH 8.0、100 mM乙二胺四乙酸二鈉(EDTA, BDH)、1%十二烷基肌氨酸鈉(N-lauroyl sarcosine sodium salt, Sigma)及1 mg/mL蛋白酶K 56°C水浴1小時。加入1 mL苯酚-氯仿-異戊醇混合液(phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1, Amresco)混合，以12000 xg 離心5分鐘後取水層，加入150 µL 65°C

預熱的十六烷基三甲基溴化銨(hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB)-氯化鈉溶液(10% CTAB in 0.7 M 氯化鈉), 及200 μ L 0.7 M氯化鈉溶液, 混合後置於65°C水浴15分鐘。加入等體積氯仿-異戊醇混合液(chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1, Amresco)以12000 $\times$ g離心5分鐘。吸取水層, 加入0.7倍體積之異丙醇(isopropanol, Merck)及0.1倍體積之3 M醋酸鈉溶液, 12000 $\times$ g離心5分鐘。風乾沉澱物後回溶於100 μ L無菌水。DNA溶液再以GFX PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (GE healthcare, UK)純化後供PCR反應使用。

三、PCR反應與電泳

PCR反應所用引子如表一, 其中酸棗仁檢測用引子為ZjsF1與ZjsR1, 而滇棗仁為ZmF1與ZmR1, 引子皆購自臺灣百力生物科技股份有限公司。藥材檢體PCR反應取0.4 μ L藥材檢體DNA溶液、25 μ M引子溶液各0.2 μ L及4 μ L DNA聚合反應試劑(PCR Master Mix 5X, GeneMark), 補無菌水使總體積為20 μ L, PCR反應條件為94°C 2分鐘後, 繼以94°C 30秒、58°C 30秒、72°C 30秒共30週期, 最後72°C 5分鐘。

製劑檢體則取DNA溶液0.8-1.6 μ L做模板, 25 μ M ZjF1及28R⁽¹³⁾引子溶液各0.2 μ L進行PCR, 擴增條件為94°C 30秒、63°C 30秒、72°C 30秒共30週期。取第一次PCR之產物0.8 μ L做模板, 再依上述酸棗仁及滇棗仁藥材檢測條件進行第二次PCR反應。

藥材檢體Multiplex PCR條件除所用引子對為

ZjsF1、ZjsR1、ZmF1與ZmR1各0.1 μ L外, 其餘與PCR反應條件相同; 製劑檢體則先進行製劑檢體PCR之第一次PCR反應後再進行Multiplex PCR反應。

擴增反應完成後, 取產物5 μ L與追蹤染劑(6X loading dye, GeneMark)混合, 以1.8%瓊脂膠體100V進行25分鐘電泳分析, 並以ImageQuant 300影像系統觀察反應結果。

四、DNA定序與序列分析

將PCR產物以Exo-SAP IT套組純化, 依Big-Dye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit做定序反應, 再以BigDye Xterminator Kit除去螢光物質, 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, 製劑部分則同時與標準藥材的定序結果比對。

結果與討論

一、酸棗仁鑑別方法之建立

將標本室酸棗仁及購自大陸的滇棗仁檢體, 分別利用通用引子對針對rbcL (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit)、matK (Maturase K)及ITS (internal transcribed spacer)序列擴增定序, 並收集NCBI GenBank之相關序列進行比對, 結果顯示ITS序列較適宜用來區別二者, 其序列差異如圖一。由於種子類藥材容易摻混, 為了偵測摻混情形並確保PCR產物品質足以定序, 在ITS兩者差異區段內分別設計酸棗仁及滇棗仁專一性引子對(標示於圖一), 經測試各得大小介於500-600鹼基對及300-400鹼基對之間的產物可供定序分析(圖二)。

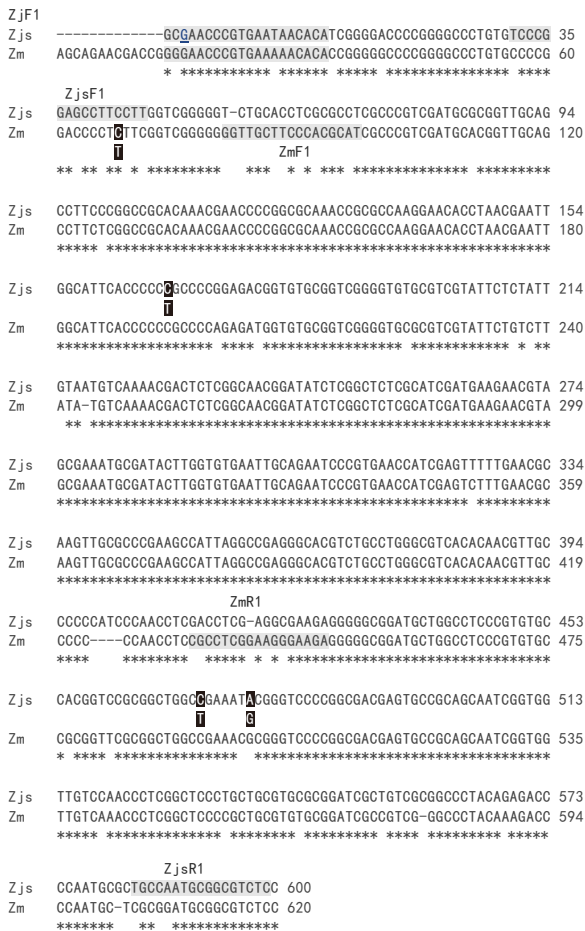
二、檢體鑑別結果

分析50件藥材檢體之序列, 可發現共有24件藥材檢體檢出滇棗仁藥材序列, 其中有4件為滇棗仁, 其餘皆為兩者混用(表二)。17件製劑檢體以Nested-PCR測試結果列示於表三, 共11件檢體混用滇棗仁, 可見無論藥材或製劑誤用情形均相當

表一、酸棗仁與滇棗仁鑑別用引子列表

引子名稱	序列	標的序列	預計產物長度
ZjsF1	TCCCGGAGCCTTCCTTGG	ITS	569 bp
ZjsR1	GAGACGCCGCATTGGCAG		
ZmF1	GGTTGCATCCCACGCATC	ITS	368 bp
ZmR1	CTCTTCCCTTCCGAGGCG		
ZjF1	GCGAACCCGTGAAWAACACA	ITS	638 bp
28R ⁽¹³⁾	CCGCTGACCTGRGGTC		

W=A/T R=A/G



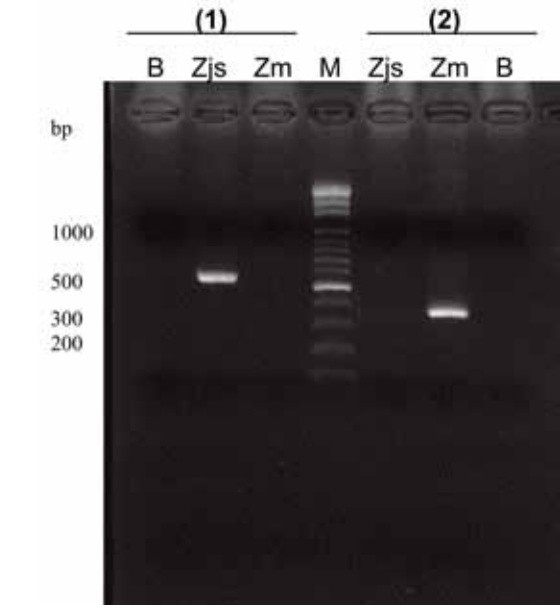
圖一、酸棗仁(Zjs)及滇棗仁(Zm) ITS序列比對
灰色標示處為引子位置。反白標示處有2種定序
結果，酸棗仁3個位置依序為C或T、C或T及A或
G，而滇棗仁為C或T

嚴重。

另外，整理酸棗仁及滇棗仁之ITS序列，發現其中酸棗仁序列有3個位置而滇棗仁序列在1個位置上，出現兩種定序結果且比例相當。酸棗仁3個位置出現的鹼基依序為C或T、C或T及A或G，而滇棗仁為C或T，分別以反白標示於圖一。推測可能是因為ITS序列為核基因體序列，兩套基因組序列不完全相同而出現兩種定序結果。

三、Multiplex PCR鑑別方法之建立

為增加酸棗仁檢測速度，以不同比例體積混



圖二、酸棗仁及滇棗仁之鑑別PCR測試結果電泳圖
(1)使用酸棗仁引子對, (2)使用滇棗仁引子對
M: 100 bp ladder marker ; Zjs: 酸棗仁 ; Zm: 滇
棗仁 ; B: blank (no template)

表二、酸棗仁藥材檢體之鑑別結果

藥材 編碼	來源	定序結果
ZjM01	本局標本 室酸棗仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM02		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM03		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM04		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM05		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM06		<i>Z. mauritiana</i>
ZjM07		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM08	中藥廠	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM09		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM10		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM11		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM12		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM13		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM14		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM15		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>

表二、酸棗仁藥材檢體之鑑別結果(續)

藥材 編碼	來源	定序結果
ZjM16	中藥廠	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM17		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM18		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM19		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM20		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM21	北部 中藥房	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM22		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM23		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM24		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM25		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM26	中部 中藥房	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM27		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM28		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM29		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM30		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM31	南部中藥房	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM32		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM33		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM34		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM35		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM36		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM37		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM38		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM39		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM40		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM41		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM42		<i>Z. mauritiana</i>
ZjM43		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM44		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM45		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM46		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM47		<i>Z. mauritiana</i>
ZjM48		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM49		<i>Z. mauritiana</i>
ZjM50		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM51	大陸滇棗仁	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
Zm01		<i>Z. mauritiana</i>

表三、酸棗仁製劑檢體之鑑別結果

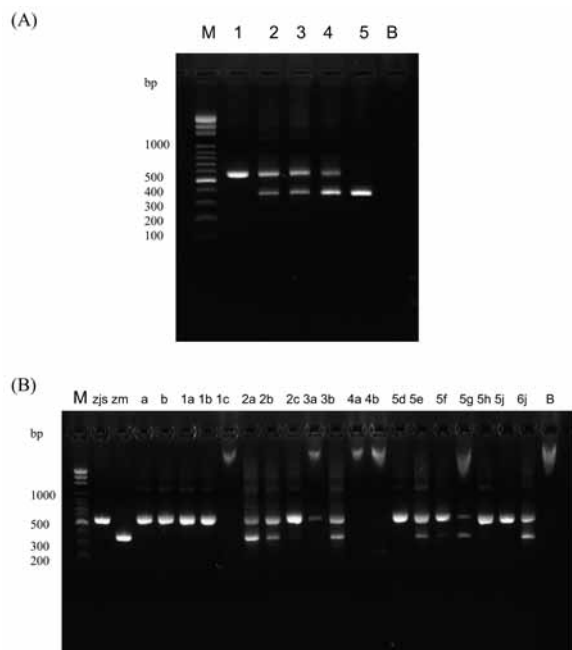
藥材 編碼	製劑名稱	定序結果
ZjMA	酸棗仁 (單方)	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjMB		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM1A	養心湯	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM1B		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM1C		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM2A	天王 補心丹	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM2B		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM2C		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM3A	歸脾湯	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM3B		<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM5D	聰明 益智丸*	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM5E	人蔘 安腦丸	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM5F	揚山安神 養腦丸*	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM5G	天王 保心寧**	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM5H	爽腦丸**	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>
ZjM5I	天王 安腦丸**	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i>
ZjM6J	廣東真好眠 (濃縮膠囊)	<i>Z. jujuba</i> var. <i>spinosa</i> + <i>Z. mauritiana</i>

*製劑成分相同 **製劑成分相同

合之藥材DNA溶液，測試同時使用酸棗仁及滇棗仁專一性引子對進行Multiplex PCR之效果，並以製劑檢體經一次PCR放大之產物進行試驗，結果如圖三，顯示此方法可應用於酸棗仁及滇棗仁混合之檢體外，亦可用於製劑檢體之檢測。

參考文獻

1. 行政院衛生署中華中藥典中藥集編修小組。2004。中華中藥典。第176頁。行政院衛生署，台北市。
2. 蕭培根。2002。新編中藥志第二卷。第648-653頁。化學工業出版社，北京。
3. Li, Y., Wang, R., Chen, M., Wang, Z. and Bi, K. 2001. Pharmacodynamics study of suanzaoren



圖三、酸棗仁Multiplex PCR結果電泳圖

(A)藥材測試結果

M: 100 bp ladder marker ; 1. 酸棗仁 ; 2. 75% 酸棗仁+25%滇棗仁 ; 3. 50%酸棗仁+50%滇棗仁 ; 4. 25%酸棗仁+75%滇棗仁 ; 5. 滇棗仁 ; B: blank (no template)

(B)編號ZjmA-Zjm6J製劑檢體測試結果

M: 100 bp ladder marker ; Zjs: 酸棗仁 ; Zm: 滇棗仁 ; B: blank (no template)

decoction extracted by different technological process. Zhong Yao Cai 24(12): 884-885.

4. Zhang, S. J., Chen, Z. X., Lin, Y. W., Cheng, Y. H., Liu, S. L. and Wang, C. J. 2007. Clinical observation of modified Suan Zao Ren decoction on insomnia of chronic hepatitis B patients. Zhong Yao Cai 30(11): 1482-1484.
5. Cao, J. X., Zhang, Q. Y., Cui, S. Y., Cui, X. Y., Zhang, J., Zhang, Y. H., Bai, Y. J. and Zhao, Y. Y. 2010. Hypnotic effect of jujubosides from Semen Ziziphi Spinosae. J. Ethnopharmacol. 130(1): 163-166.
6. Fang, X. S., Hao, J. F., Zhou, H. Y., Zhu, L. X., Wang, J. H. and Song, F. Q. 2010. Pharmacological studies on the sedative-hypnotic effect of Semen Ziziphi spinosae (Suanzaoren) and Radix et Rhizoma Salviae miltiorrhizae (Danshen) extracts and the synergistic effect of their combinations. Phytomedicine 17(1): 75-80.
7. Park, J. H., Lee, H. J., Koh, S. B., Ban, J. Y. and Seong, Y. H. 2004. Protection of NMDA-induced neuronal cell damage by methanol extract of zizyphi spinosi semen in cultured rat cerebellar granule cells. J. Ethnopharmacol. 95(1): 39-45.
8. Rong, C. L., Dai, Y. X. and Cui, Y. 2008. Effects of Semen Ziziphi Spinosae on the anxiety behavior of the yin deficiency mice. Zhong Yao Cai 31(11): 1703-1705.
9. Wang, L. E., Cui, X. Y., Cui, S. Y., Cao, J. X., Zhang, J., Zhang, Y. H., Zhang, Q. Y., Bai, Y. J. and Zhao, Y. Y. 2010. Potentiating effect of spinosin, a C-glycoside flavonoid of Semen Ziziphi spinosae, on pentobarbital-induced sleep may be related to postsynaptic 5-HT (1A) receptors. Phytomedicine 17(6): 404-409.
10. Xie, J., Guo, L., Pang, G., Wu, X. and Zhang, M. 2011. Modulation effect of Semen Ziziphi Spinosae extracts on IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ in mouse serum. Nat. Prod. Res. 25(4): 464-467.
11. Islam, M. B. and Simmons, M. P. 2006. A thorny dilemma: testing alternative intrageneric classifications within *Ziziphus* (Rhamnaceae). Syst. Botany 31(4): 826-842.
12. 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 Drug Anal. 13: 219-224.
13. 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.

Identification of Jujube Seed and Its Preparations by Nested PCR and DNA Sequencing Method

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

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

Jujube seed (*Ziziphi Spinosae Semen*), the dried seeds of *Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa* (Bunge) Hu ex H. F. Chou, are often confused with those of *Ziziphus mauritiana* Lam. for their similar appearance. By comparing the sequence information of the internal transcribed spacer (ITS), we designed the specific primer set for each species, and established a nested PCR method for their preparations. Through DNA sequencing, *Z. mauritiana* was detected in 24 of 50 raw material samples and 11 of 17 preparation samples, and most of those samples contained mixtures of 2 species. These primer sets could also be used in multiplex PCR for rapid detection.

Key words: *Ziziphi Spinosae Semen*, ITS, nested PCR, DNA sequencing, multiplex PCR