

黃芩藥材及其製劑Nested PCR-DNA定序鑑定方法之建立

呂康祖 謝詠筌 劉芳淑 羅吉方 林哲輝

研究檢驗組

摘要

黃芩為*Scutellaria baicalensis* Georgi之乾燥根，為中藥常用藥材，然而因為生長環境不同，藥材外觀差異大，難以確認是否為正確藥材，因此，研究中將應用Nested PCR-DNA定序方法鑑別黃芩藥材的真偽，並建立製劑中黃芩藥材的檢驗鑑別方法。利用GenBank中ITS (internal transcribed spacer)序列資料設計引子組合，用以進行Nested PCR，再分析比對檢體經擴增後的ITS序列作為鑑定依據。結果顯示，黃芩藥材69件藥材檢體中，出現2種DNA序列，其中11件的序列較其他58件鑑定為*Scutellaria baicalensis*的序列多出1個鹽基。收集黃芩製劑檢體46件為24種方劑，在不同藥材組合的方劑中，可用建立之Nested PCR-DNA定序方法確認黃芩藥材基原，而不受其他藥材成分的干擾，確認本方法的專一性。

關鍵詞：黃芩、Nested PCR、DNA定序、鑑定

前言

中華中藥典記載黃芩為唇形科Labiatae植物黃芩*Scutellaria baicalensis* Georgi之乾燥根。又名腐腸、子芩、宿芩、條芩。主產於東北、華北、山西、河南、陝西、內蒙古等地。藥材外觀呈圓錐形，扭曲，長8~30 cm，直徑1~4 cm，表面棕黃色或深黃色，有稀疏的疣狀細根痕，頂有莖痕或殘留的莖基，上部較粗糙，有扭曲的縱皺或不規則的網紋，下部有順紋和細皺。質硬而脆，易折斷，斷面黃色，中間紅棕色，因目前有野生種及栽培種之分，外觀差異大，不易鑑別。

在現代醫學的研究上，黃芩具有抗氧化⁽¹⁾、抗發炎⁽¹⁻²⁾、抑制腫瘤細胞生長⁽³⁾、抑制前列腺癌細胞表現⁽⁴⁾、保護神經細胞⁽⁵⁻⁶⁾、抗病毒⁽⁷⁾、抗動脈粥狀硬化⁽⁸⁾、調控抗病毒之免疫力⁽⁹⁾、抑制肝損傷⁽¹⁰⁾、幫助子宮放鬆預防早產⁽¹¹⁾、延遲胃排空⁽¹²⁾之效果，及作為多形膠質母細胞瘤的抗癌劑與化學治療藥劑的輔助用藥⁽¹³⁾。

以基因序列作為藥材鑑定的依據，較之於物

理、化學等屬於生物外表型(Phenotype)的鑑別憑藉，有著不受生長環境影響、穩定及不易變異等優點，近來使用生藥的各個國家，如日本、韓國及中國大陸等等，無不極力投入研究，以最近發行的中華人民共和國藥典2010版而言，就已有部分生物性藥材的DNA序列登載，作為藥材標準。本研究即是藉由分析特定DNA標記的DNA序列作為鑑別藥材的依據，同時以此DNA序列再進一步研發藥材製劑的鑑別檢驗方法，期能應用於中藥檢驗，未來更可供我國中藥典修正時的參考依據。

材料與方法

一、材料

(一)檢體

1. 藥材一共69件，包括52件市售品調查及品質監測計畫購買藥材，11件廠商留樣藥材，1件查驗登記藥材，5件本局標本室收藏藥材。

2. 製劑一共46件，包括2件單方製劑及44件複方製劑。

(二)試藥

1. 一般化學藥品：購自Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.)、Merck (Darmstadt, Germany)、Amresco (Ohio, U.S.A.)
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 μ M, reaction buffer)購自GENEMARK (Bio Basic, Canada)。
4. 引子：購自百力(臺灣)，SbF (5'-GA AACCTGCGAAAGCAGA-3')、SbR4 (5'-GAACGGACGACGCCTTG-3')、SbF2 (5'-CGGAAYGCGCCAAGGA -3', Y=T/C)、SbR5 (5'-GACAGCACGCGAGTTG-3')。
5. 瓊脂膠體：Agarose B Low EEO購自GENEMARK (Bio Basic, Canada)。
6. 100 bp ladder marker及6倍載入膠片緩衝液：GENEMARK (Bio Basic, Canada)。
7. Exo-SAP IT套組：購自USB (Cleveland, Ohio, U.S.A.)。
8. BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing Kit：購自Applied Biosystems (Foster, CA, U.S.A.)。
9. BigDye Xterminator Kit：購自Applied Biosystems (Foster, CA, U.S.A.)。

(三)器材

1. 迷你電泳槽及鑄膠器(Mupid II, Cosmo Bio, Chuo-Ku, Tokyo, Japan)。
2. 聚合酶連鎖反應器(Gradient Palm-cycler, Corbett Research Co., Australia and Astec PC320, Astec株式會社, Japan)。
3. 影像系統(ImageQuant 300, GE Healthcare, UK)。
4. 自動定序儀(3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, U.S.A.)。

二、方法

(一)DNA萃取與純化

DNA萃取與純化方法是依照已發表論文“Discriminating between *Achyranthis Bidentatae* Radix and *Cyathulae* Radix in Chinese medicine preparations by nested PCR and DNA sequencing methods.”⁽¹⁴⁾的方法進行，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_(aq)，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 μ 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

藥材或製劑檢體皆取萃取與純化的DNA溶液1-2 μ L作模板，25 μ M primer SbF、SbR4各0.5 μ L進行PCR，條件為94°C-30 sec，57°C-30 sec，72°C-30 sec共25 cycles。取第一次PCR產物1 μ L作模板，25 μ M primer SbF2、SbR5各0.5 μ L進行PCR，條件為94°C-30 sec，57°C-30 sec，72°C-30 sec共25 cycles。

(三)電泳與定序分析

取Nested PCR產物5 μ L，與6倍載入膠片緩衝液1 μ L混合，置入1.8 %瓊脂膠體，在電泳槽(+)極端加入0.5 μ L 10 mg/mL ethidium

bromide後，進行電泳，電泳條件100V、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

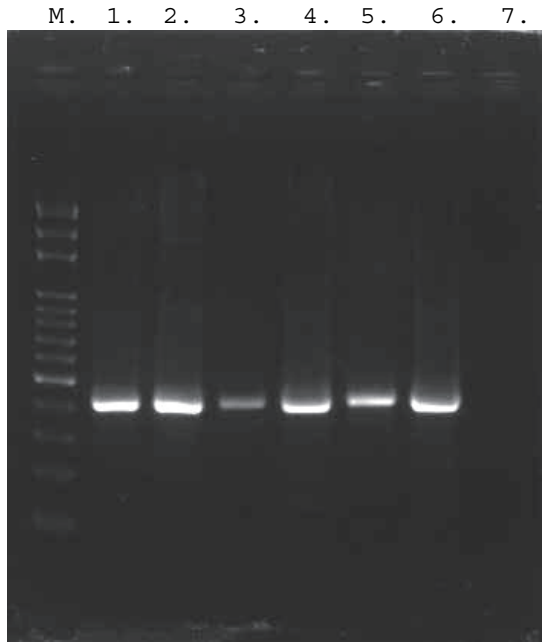
藥材的定序結果比對，得到鑑定結果。

結果與討論

選擇黃芩做研究標的，主要是因為黃芩藥材的外觀差異大，較不易確認是否為誤用藥材，必須建立可以有效確認區別真偽藥材的方法。實驗收集藥材多是以品質監測計畫的藥材為主，另有購買製劑檢體時，向廠商取得的製劑留樣藥材、查驗登記時難以鑑別的藥材以及本組標本室標本藥材，所有檢體列示於表一。

表一、黃芩藥材檢體與鑑定結果

編號	藥材來源	鑑定結果	編號	藥材來源	鑑定結果
23-1	計畫購買	<i>S. baicalensis</i>	23-45	計畫購買	<i>S. baicalensis</i>
23-3		<i>S. baicalensis</i>	23-46		<i>S. baicalensis</i>
23-4		<i>S. baicalensis</i>	23-47		<i>S. baicalensis</i>
23-5		<i>S. baicalensis</i>	23-48		<i>S. baicalensis</i>
23-6		<i>S. baicalensis</i>	23-49		<i>S. baicalensis</i> (+1)
23-7		<i>S. baicalensis</i>	23-50		<i>S. baicalensis</i>
23-9		<i>S. baicalensis</i>	23-51		<i>S. baicalensis</i>
23-10		<i>S. baicalensis</i>	23-52		<i>S. baicalensis</i>
23-11		<i>S. baicalensis</i>	23-53		<i>S. baicalensis</i>
23-12		<i>S. baicalensis</i>	23-54		<i>S. baicalensis</i> (+1)
23-13		<i>S. baicalensis</i>	23-55		<i>S. baicalensis</i>
23-14		<i>S. baicalensis</i>	23-56		<i>S. baicalensis</i>
23-16		<i>S. baicalensis</i> (+1)	23-57		<i>S. baicalensis</i>
23-17		<i>S. baicalensis</i> (+1)	23-58		<i>S. baicalensis</i>
23-18		<i>S. baicalensis</i>	23-59		<i>S. baicalensis</i>
23-19		<i>S. baicalensis</i>	23-60		<i>S. baicalensis</i>
23-20		<i>S. baicalensis</i>	23-61		<i>S. baicalensis</i>
23-21		<i>S. baicalensis</i>	23-62	黃芩野生	<i>S. baicalensis</i> (+1)
23-22		<i>S. baicalensis</i>	23-63	黃芩栽培	<i>S. baicalensis</i>
23-23		<i>S. baicalensis</i>	23-64	內蒙黃芩	<i>S. baicalensis</i> (+1)
23-24		<i>S. baicalensis</i>	Sb1	留樣藥材	<i>S. baicalensis</i>
23-25		<i>S. baicalensis</i> (+1)	Sb2		<i>S. baicalensis</i>
23-27		<i>S. baicalensis</i> (+1)	Sb3		<i>S. baicalensis</i>
23-28		<i>S. baicalensis</i>	Sb4		<i>S. baicalensis</i>
23-29		<i>S. baicalensis</i>	Sb5		<i>S. baicalensis</i>
23-30		<i>S. baicalensis</i>	Sb7		<i>S. baicalensis</i>
23-31		<i>S. baicalensis</i>	Sb8		<i>S. baicalensis</i>
23-32		<i>S. baicalensis</i>	Sb9		<i>S. baicalensis</i>
23-33		<i>S. baicalensis</i>	Sb10		<i>S. baicalensis</i>
23-39		<i>S. baicalensis</i> (+1)	Sb11		<i>S. baicalensis</i>
23-40		<i>S. baicalensis</i>	Sb12		<i>S. baicalensis</i>
23-41		<i>S. baicalensis</i>	Sb13	大陸標本	<i>S. baicalensis</i> (+1)
23-42		<i>S. baicalensis</i>	Sb14	藥技中心	<i>S. baicalensis</i> (+1)
23-43		<i>S. baicalensis</i>	Sb15	查驗登記	<i>S. baicalensis</i>
23-44		<i>S. baicalensis</i>			



圖一、黃芩藥材 Nested PCR 結果電泳

M: 100bp ladder marker, Lane 1: 23-1, Lane 2: 23-3, Lane 3: 23-4, Lane 4: 23-5, Lane 5: 23-7, Lane 6: 23-9, Lane 7: blank (no template)

Primer組設計是以GenBank中*S. baicalensis*的ITS序列資料為依據，對於*S. baicalensis*物種作專一性的設計，研究中同時設計多組引子進行組合，為配合Nested PCR的2次PCR及引子位置前後排列的特性，引子進行組合試驗時，必需同時注意組合與排列順序，以便達到最佳的PCR效果及專一性。而鑑別上，亦是以ITS序列作為DNA標記，經由比對檢體DNA標記與GenBank序列資料的相似性，作為鑑別的結果。

藥材抽取DNA後即進行Nested PCR的專一性擴增，檢體Nested PCR產物的電泳結果顯示(如圖一)，所有藥材檢體均能利用此一primer組，擴增出約416 bp長度的DNA片段。再將此DNA片段進行定序反應、序列分析與比對，在69件藥材檢體中，呈現2種DNA序列，詳細的序列與比較如圖二。兩種序列中，其中一種與GenBank中的*S. baicalensis*序列完全相符，而另外一種則多出了1個鹽基，這樣的檢體有11件，亦列示如表一。因黃芩有野生與栽培種之分，是否結果與之有關聯性，限於檢體量與檢體背景資訊，難以逕下定

<i>S. baicalensis</i> (+1)	1	CGGAATGCGCCAAGGAAAACAAAAGAGATCGTCCCCCTCCGTGCGTCCCGTCCGCGGA	60
<i>S. baicalensis</i>	1	CGGAATGCGCCAAGGAAAACAAAAGAGATCGTCCCCCTCCGTGCGTCCCGTCCGCGGA	60
<i>S. baicalensis</i> (+1)	61	GCACGCGCGGGGTGGGTCGGGCGTCCATCGAATGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATAT	120
<i>S. baicalensis</i>	61	GCACGCGCGGGGTGGGTCGGGCGTCCATCGAATGTCATAACGACTCTCGGCAACGGATAT	120
<i>S. baicalensis</i> (+1)	121	CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGTACGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA	180
<i>S. baicalensis</i>	121	CTCGGCTCTCGCATCGATGAAGAAGTACGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGCAGAA	180
<i>S. baicalensis</i> (+1)	181	TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCA	240
<i>S. baicalensis</i>	181	TCCCGTGAACCATCGAGTCTTTGAACGCAAGTTGCGCCCGAAGCCATCAGGCCGAGGGCA	240
<i>S. baicalensis</i> (+1)	241	CGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCTCGCACCGCCTCGAGCGGTGCCGT	300
<i>S. baicalensis</i>	241	CGCCTGCCTGGGCGTCACGCATCGCGTCGCCCCCTCGCACCGCCTCGAGCGGTGCCGT	300
<i>S. baicalensis</i> (+1)	301	GTGGGGGGGCGGAGATTGGCCCCCGTGCGCCCCGGCGCGCGGCCGCCAAATGCGAT	360
<i>S. baicalensis</i>	301	GTGGGGGGGCGGAGATTGGCCCCCGTGCGCCCCGGCGCGCGGCCGCCAAATGCGAT	359
<i>S. baicalensis</i> (+1)	361	CCCCGGCGACGCACGCCCCGACAAGTGGTGGTGTTCCTCAACTCGCGTGTGTC	417
<i>S. baicalensis</i>	360	CCCCGGCGACGCACGCCCCGACAAGTGGTGGTGTTCCTCAACTCGCGTGTGTC	416

圖二、黃芩藥材定序所得序列，兩種序列分別以 *S. baicalensis* 與 *S. baicalensis*(+1) 表示，序列差異位置則以反白表示

表二、24種含黃芩藥材之方劑

方劑名			
龍膽瀉肝湯	甘露消毒丹	普濟消毒飲	雙解散
九味羌活湯	辛夷清肺湯	黃連解毒湯	定喘湯
三黃瀉心湯	防風通聖散	當歸六黃湯	小續命湯
大秦朮湯	柴胡清肝湯	當歸拈痛湯	天麻鉤藤飲
小續命湯	柴葛解肌湯	葛根黃連黃芩湯	杏蘇飲(幼科)
半夏瀉心湯	洗肝明目湯	潤腸湯	普濟消毒飲

論。

就以上的結果而言，得到兩個結論，一是確認黃芩藥材實際上存在有兩種不同序列，相差僅1個鹽基，就以ITS為DNA標記的植物物種鑑別來看此一差異，有可能為分類上“種”內的差異，如變種或亞種等。二是確認了primer組的可用性，可將此primer組應用於製劑中黃芩藥材的鑑別。

含有黃芩藥材成分的中藥製劑甚多，本研究採購了國內2家著名中藥廠所生產的中藥製劑共46件做為檢體，除了黃芩單方製劑外，還包括24種方劑(如表二)，以確認本研究採用的方法可應用在這24種不同藥材組合的方劑上，並能夠專一準確地確認其中黃芩成分。僅選擇國內2家著名中藥廠所生產的中藥製劑作為檢體，原因有三，其一是這部分的實驗目的在於確認所研發之方法，是否適用於各種不同藥材組成的各種方劑，所以必須確保取得的製劑檢體中所使用各種藥材的正確性，因此參考歷年查驗登記送驗等相關紀錄，選擇這兩家藥廠，其次也需要廠商提供檢體同批製劑的留樣藥材，以確認研發之方法在製劑上的鑑定結果，必須與留樣藥材的鑑定結果相符，其三是對於製劑檢驗方法，這一部分的研究目的並非市場產品的品質調查，過多不同廠家的製劑檢體，反而會使實驗主題模糊，徒增實驗的複雜度而浪費人力與物力。

製劑檢體同樣地抽出DNA後，以應用於黃芩藥材的primer組進行Nested PCR，所有製劑檢體均能擴增出單一，且長度與藥材檢體Nested PCR產物相同的DNA片段。再進一步進行定序分析與比對鑑別，所得的結果顯示全部製劑檢體所含黃芩藥材均為*S. baicalensis*，再將此一結果與藥廠留樣

藥材的鑑別結果比較，兩者的結果也相互吻合。實驗結果確認本研究的Nested PCR與DNA定序方法，應用於鑑定中藥製劑中黃芩藥材的可用性與正確性。

結 論

分析同種藥材間DNA標記序列的微小差異，在藥材數量及背景資料足夠的狀況下，或許可以做為判斷藥材產地的依據。而在不同外觀差異的黃芩藥材，應用Nested PCR與DNA定序方法的序列分析比對，可以進一步確認藥材的正確性，區別混淆及誤用藥材，更可應用於查驗登記檢驗及藥廠藥材品管。另外，對於含有黃芩藥材的中藥製劑，應用在研究中所建立的Nested PCR與DNA定序方法，可以確認其所含黃芩成分，未來將可做為製劑品質管理及上市後藥品監測之用。

參考文獻

1. Huang, W. H., Lee, A. R. and Yang, C. H. 2006. Antioxidative and anti-inflammatory activities of polyhydroxyflavonoids of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Biosci. Biotechnol. Biochem. 70: 2371-2380.
2. Yoon, S. B., Lee, Y. J., Park, S. K., Kim, H. C., Bae, H., Kim, H. M., Ko, S. G., Choi, H. Y., Oh, M. S. and Park, W. 2009. Anti-inflammatory effects of *Scutellaria baicalensis* water extract on LPS-activated RAW 264.7 macrophages. J. Ethnopharmacol. 125: 286-290.
3. Ye, F., Xui, L., Yi, J., Zhang, W. and Zhang, D. Y. 2002. Anticancer activity of *Scutellaria*

- baicalensis* and its potential mechanism. J. Altern. Complement Med. 8: 567-572.
4. Chan, F. L., Choi, H. L., Chen, Z. Y., Chan, P. S. and Huang, Y. 2000. Induction of apoptosis in prostate cancer cell lines by a flavonoid, baicalin. Cancer Lett. 160: 219-228.
 5. Mu, X., He, G., Cheng, Y., Li, X., Xu, B. and Du, G. 2009. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. Pharmacol. Biochem. Behav. 92: 642-648.
 6. Heo, H., Shin, Y., Cho, W., Choi, Y., Kim, H. and Kwon, Y. K. 2009. Memory improvement in ibotenic acid induced model rats by extracts of *Scutellaria baicalensis*. J. Ethnopharmacol. 122: 20-27.
 7. Nagai, T., Suzuki, Y., Tomimori, T. and Yamada, H. 1995. Antiviral activity of plant flavonoid, 5,7,4'-trihydroxy-8-methoxyflavone, from the roots of *Scutellaria baicalensis* against influenza A (H3N2) and B viruses. Biol. Pharm. Bull. 18: 295-299.
 8. Broncel, M. 2007. Antiatherosclerotic properties of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi. Wiad. Lek. 60: 294-297.
 9. Błach-Olszewska, Z., Jatczak, B., Rak, A., Lorenc, M., Gulanowski, B., Drobna, A. and Lamer-Zarawska, E. 2008. Production of cytokines and stimulation of resistance to viral infection in human leukocytes by *Scutellaria baicalensis* flavones. J. Interferon Cytokine Res. 28: 571-581.
 10. Zhao, Y., Li, H., Gao, Z., Gong, Y. and Xu, H. 2006. Effects of flavonoids extracted from *Scutellaria baicalensis* Georgi on hemin-nitrite- H_2O_2 induced liver injury. Eur. J. Pharmacol. 536: 192-199.
 11. Shih, H. C., Hsu, C. S. and Yang, L. L. 2009. In vitro study of the tocolytic effect of oroxylin A from *Scutellaria baicalensis* root. J. Biomed. Sci. 16: 27.
 12. Mehendale, S., Aung, H., Wang, C. Z., Tong, R., Foo, A., Xie, J. T., Yuan, C. S. 2007. *Scutellaria baicalensis* and a constituent flavonoid, baicalein, attenuate ritonavir-induced gastrointestinal side-effects. J. Pharm. Pharmacol. 59: 1567-1572.
 13. Scheck, A. C., Perry, K., Hank, N. C. and Clark, W. D. 2006. Anticancer activity of extracts derived from the mature roots of *Scutellaria baicalensis* on human malignant brain tumor cells. BMC Complement Altern. Med. 6: 27.
 14. 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.

Establish of Nested PCR-DNA Sequencing Method for the Identification of *Scutellariae Radix* and Its Chinese Medicine Preparations

KANG-TSU LU, YUNG-CHUAN HSIEH, FANG-SU LIU,
CHI-FANG LO AND JER-HUEI LIN

Division of Research and Analysis

ABSTRACT

Scutellariae Radix, the dried root of *Scutellaria baicalensis* Georgi, is widely used in Chinese medicine preparations. Due to various growth environments, *Scutellariae Radix* is difficult to authenticate by its externals. In this study, a nested polymerase chain reaction (nested PCR) followed by DNA sequencing method was developed and employed to identify the authentic *Scutellariae Radix* and to detect its presence in Chinese medicine preparations. Using the sequence of the internal transcribed spacer (ITS) obtained from GenBank, we designed the primer sets for nested PCR to amplify the ITS fragments of samples. The revealed sequences were compared with GenBank databases. Fifty eight out of 69 raw material samples tested were identified as *S. baicalensis*, while 11 samples had sequences with one more base than that of *S. baicalensis*. Authentic *Scutellariae Radix* in 46 preparation samples of 24 formulas could be identified specifically by the established nested PCR-DNA sequencing methods.

Key words: *Scutellariae Radix*, ITS, nested PCR, DNA sequencing