

利用複合式PCR鑑定倒地蜈蚣藥材及其混淆品

謝詠筌 謝嘉芸 李蕙君 林雅姿 黃守潔 曾素香 王德原

衛生福利部食品藥物管理署研究檢驗組

摘 要

倒地蜈蚣藥材係瓶爾小草科Ophioglossaceae植物錫蘭七指蕨*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook.之乾燥根及根莖，是臺灣民間常用中藥。因其具有解熱消炎作用，長期以來被民間傳統醫學廣泛應用。隨著中草藥產品的開發和棲息地的破壞，在許多國家錫蘭七指蕨已被列為瀕危物種，可能導致市場上以其他物種替換或代用的機率提升。另外，由於各地區用藥習慣不同以及名稱相似等原因，倒地蜈蚣藥材之常見混淆品包含地蜈蚣*Torenia concolor* Lindl.與多羽節肢蕨*Arthromeris mairei* (Brause) Ching等2個物種。為避免錯誤識別造成之不當使用，建立準確且快速的鑑定方法刻不容緩。近年來分子鑑定方法已被廣泛運用成為識別中草藥品種的有力工具，本研究利用DNA序列差異開發複合式PCR檢測方法，錫蘭七指蕨、地蜈蚣及多羽節肢蕨之特異性擴增產物分別為118、183及93鹼基對(base pair, bp)，並經凝膠電泳分離的片段大小來區分倒地蜈蚣藥材及其混淆品，此檢測技術可辨識倒地蜈蚣藥材真偽，並應用於中草藥品質管控，以維護用藥安全。

關鍵詞：複合式PCR、倒地蜈蚣、錫蘭七指蕨、地蜈蚣、多羽節肢蕨

前 言

依據臺灣中藥典記載倒地蜈蚣為瓶爾小草科Ophioglossaceae植物錫蘭七指蕨*Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook.之乾燥根及根莖⁽¹⁾，是七指蕨屬中唯一的物種。其性涼、味苦微甘，具有清熱解毒之功效，係民間珍貴的蕨類藥用植物。而其地下肉質根莖匍匐橫走，形似蜈蚣，於臺灣中藥零售商所販賣之商品名稱包括「倒地蜈蚣」、「地蜈蚣」或「釘地蜈蚣」…等。近代研究顯示，錫蘭七指蕨之萃取物具有保肝^(2,3)、抗氧化^(4,5)、抗發炎⁽⁶⁾、黑色素生成抑制活性⁽⁷⁾、免疫調節⁽⁸⁾、神經保護⁽⁹⁾、抗糖尿病⁽¹⁰⁾、改善脂肪肝^(11,12)及

抗癌⁽¹³⁾等多樣的藥理活性，藥用價值高。隨著中草藥產品的日益普及導致對其原料需求增加，錫蘭七指蕨在臺灣、印度、中國和菲律賓等許多國家其野生植物已被列為重點保護之瀕危物種⁽¹⁴⁻¹⁷⁾，稀缺情況也因而增加市場上出現其他物種替換或代用的機率。另外，於網路資訊查找倒地蜈蚣時經常會出現玄參科Scrophulariaceae植物地蜈蚣*Torenia concolor* Lindl.可能造成誤導；而中國食品藥品檢定研究院所販售之「地蜈蚣」國家藥品標準物質實為水龍骨科Polypodiaceae植物多羽節肢蕨*Arthromeris mairei* (Brause) Ching，顯示市面販售及流通的產品標示名稱非常相似，容易產生混淆。有鑑於不同植物其傳統用途及化學成分

藥理活性全然不同，應留意可能出現同名異物之情況。

正確辨識藥材物種是中草藥品質管控的重要前提，近代研究利用DNA序列在物種層級進行準確分類並檢測摻假，已成為鑑定中草藥的常用技術^(18,19)；而倒地蜈蚣大多數以乾燥根莖形式販售，經過高溫烘乾可能導致其DNA發生降解，此外植物所含有的二次代謝物亦會干擾核酸萃取與純化，皆可能進而影響降低PCR擴增效率⁽²⁰⁾。然而微基因條碼(mini-DNA barcode)為短片段具有容易增幅的特性，極適合應用於高度加工之產品，該分析技術已成功輔助博物館的古老標本^(21,22)、膳食補充品⁽²³⁻²⁵⁾以及動植物加工製品^(26,27)等溯源鑑定。本研究擬開發複合式PCR同步擴增檢測3組微基因條碼來分辨倒地蜈蚣藥材(錫蘭七指蕨)及其混淆品(地蜈蚣與多羽節肢蕨)，針對低品質核酸樣本以及多物種摻混之情況，運用分子生物技術開發同步鑑定倒地蜈蚣藥材及其混淆品之科學化鑑別方法，期望能應用於中藥檢驗及品質管控，以確保用藥安全。

材料及方法

一、材料

- (一)對照材料：衛生福利部食品藥物管理署標本室錫蘭七指蕨(黑骨) E-2-3-03、錫蘭七指蕨(紅骨) E-2-3-06、地蜈蚣E-2-3-04以及價購中國食品藥品檢定研究院「地蜈蚣」國家藥品標準物質AMN01，共4件。
- (二)市售地蜈蚣類藥材：分別價購自中藥房16件及青草店1件，編號DWG01至DWG17，共計17件。
- (三)市售製劑：地蜈蚣濃縮散1件及倒地蜈蚣濃縮細粒2件，編號DWGSP1至DWGSP3，共3件單方製劑，皆購自中藥廠。

二、試藥與試劑

(一)一般化學藥品

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 (Protech Technology, Taiwan)、Primer (PURIGO Biotechnology, Taiwan)、25/100 bp Mixed DNA Ladder (Bioneer, Korea)、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 $\mu\text{L/mL}$ 、0.5M EDTA solution 200 $\mu\text{L/mL}$ 、1M Tris-HCl buffers 100 $\mu\text{L/mL}$ 、10% *N*-Lauroylsarcosine sodium salt solution 100 $\mu\text{L/mL}$ 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℃，使CTAB完全溶解，加水至100 mL。

三、儀器設備

- (一)藥材粉碎機(Tube Mill Control, IKA, Germany)。
- (二)精密天平(PB153S, Mettler Toledo, Swiss)。
- (三)恆溫加熱槽(MC-01N, Major Science, Taiwan)。
- (四)離心機(Biofuge pico, Heraeus, Germany)。
- (五)核酸濃度螢光測定儀(Qubit 4 Fluorometer, Thermo Fisher Scientific, USA)。
- (六)聚合酶連鎖反應器(Astec PC320, Astec, Japan)。
- (七)電泳槽及鑄膠器(Mupid-exU, Advance, Japan)。
- (八)影像系統(GelDoc Go Imaging System, Bio-Rad, USA)。
- (九)定序儀(3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA)。

四、DNA萃取與純化

藥材以粉碎機研磨成細粉，稱取100 mg 檢體粉末，參考Lu *et al.* (2005)萃取流程⁽²⁸⁾，再利用GFX™ DNA and gel band purification kit套組進行DNA純化，其操作步驟依套組說明，溶洗出檢體之基因體DNA (Genomic DNA)

溶液，再利用核酸濃度螢光測定儀測定樣品溶液核酸濃度，以提供調整聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)之模板量與擴增循環次數使用。

五、特異性引子對設計

查找蒐集GenBank資料庫之目標物種相關序列資料，利用MAFFT (Multiple Alignment using Fast Fourier Transform) version 7軟體進行多序列比對分析，依據個別物種核酸序列之種間差異設計特異性引子對，引子序列及其預期擴增產物大小如表一所示。

六、複合式PCR (Multiplex Polymerase Chain Reaction)

取適量檢體之基因體DNA溶液作為模板，加入引子溶液25 μM HZmkF2及HZmkR2各0.25 μL、25 μM TCrps16F1及TCrps16R1各0.45 μL、25 μM AMmkF2及AMmkR1各0.20 μL，再加入5 μL DNA聚合反應試劑，添加無菌蒸餾水使總體積為25 μL，進行Multiplex PCR反應。反應條件為起始變性溫度94℃ 2分鐘，擴增條件為94℃ 30秒、58℃ 30秒、72℃ 30秒共40週期，最後延展溫度72℃ 5分鐘。

七、膠片電泳試驗

取5 μL複合式PCR擴增產物與1 μL EZ-Vision Two DNA Dye as Loading Buffer進行

表一、特異性引子對序列以及預期產物片段大小

目標物種	Primer sequences (5'→3')	基因區段	預期產物片段大小 (base pair, bp)
錫蘭七指蕨 <i>Helminthostachys zeylanica</i>	HZmkF2: GATATGAGTGGATGGAACGGT HZmkR2: CTGGATGAAGATAATAAGGGAC	<i>matK</i>	118 bp
地蜈蚣 <i>Torenia concolor</i>	TCrps16F1: GTTTGATTAGACGGAAGTTC TCrps16R1: TCGATCCCGAAGAGAAGGA	<i>rps16</i>	183 bp
多羽節肢蕨 <i>Arthromeris mairei</i>	AMmkF2: CAAATCAGCCTGGGTGTG AMmkR1: GTCGAAGCACTGTAATATAAGGA	<i>matK</i>	93 bp

混合，再將混合液注入3.5%瓊脂膠片孔洞；另取DNA分子量標記物質25/100 bp DNA ladder marker注入膠片其他孔洞，作為DNA條帶大小位置判別依據。電泳條件為電壓100 伏特、50分鐘，利用影像系統觀察確認複合式PCR擴增結果，並拍攝影像。

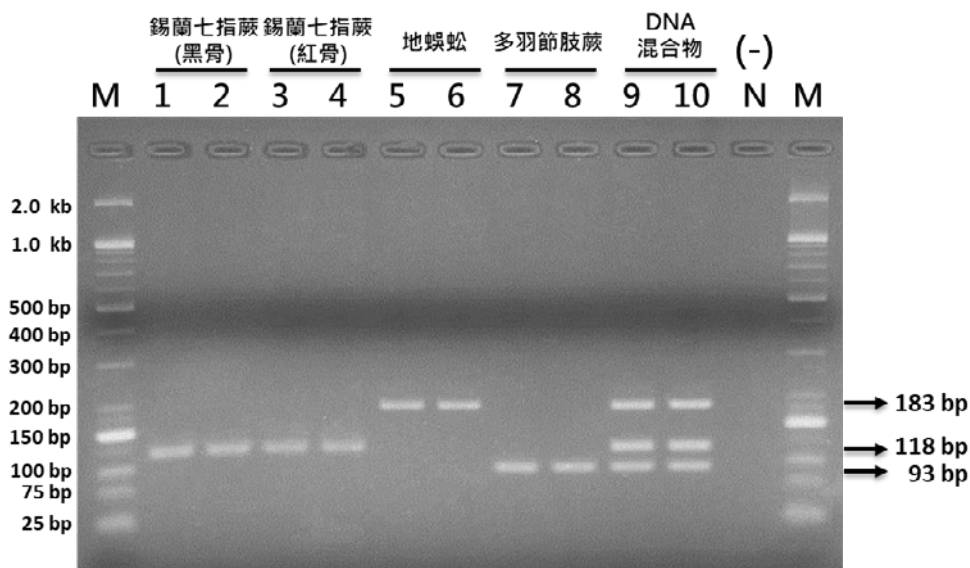
八、DNA定序試驗

將PCR擴增產物以Exo-SAP IT PCR cleanup reagent進行純化，再以BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit及BigDye Xterminator Purification Kit進行定序反應與純化，再將純化後的產物置入96-well microplate，以定序儀進行雙向定序分析，其定序結果與美國國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI) GenBank資料庫進行序列比對，得到鑑定結果。

結果與討論

為開發可同步鑑定倒地蜈蚣藥材及其混淆品等3個目標物種的鑑定方法，且能運用於低品質的核酸樣本，研究中針對短片段設計3組特異性引子對HZmkF2/HZmkR2、TCrps16F1/TCrps16R1及AMmkF2/AMmkR1以建立複合式PCR，預期錫蘭七指蕨、地蜈蚣及多羽節肢蕨分別可產生118 bp (base pair, bp)、183 bp及93 bp之不同長度的核酸片段，列示於表一。

將4個對照材料基因體DNA及3個目標物種DNA混合物進行複合式PCR反應，測試其特異性，試驗結果均符合預期，可以觀察到個別目標物種特定的擴增條帶(如圖一)，於電泳膠片上可明顯區分，擴增穩定且具再現性。而DNA混合物溶液的檢測結果表明，此試驗可同時擴增3個目標區段，且未有干擾情



圖一、複合式PCR之特異性分析(Specificity assay)

M: 25/100 bp DNA ladder marker, Lane 1、2: 錫蘭七指蕨(黑骨), Lane 3、4: 錫蘭七指蕨(紅骨), Lane 5、6: 地蜈蚣, Lane 7、8: 多羽節肢蕨, Lane 9、10: 錫蘭七指蕨: 地蜈蚣: 多羽節肢蕨(1:1:1) DNA混合物(10 ng/ μ L+10 ng/ μ L+10 ng/ μ L), N: Non-template control

況，顯示引子對之間具有良好的相容性，能夠有效對於特定基因片段進行增幅放大。接著再將各組引子對擴增的特異性產物進行定序試驗，可得到3組微基因條碼，如圖二所示，可透過BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)進行序列相似度分析比對，確認物種身分。再使用4個對照材料基因體DNA及3個目標物種的DNA混合物之系列稀釋液進行複合式PCR之靈敏度分析(Sensitivity Assay)，採用10倍遞減稀釋，其濃度範圍由高到低依序為10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL與1 pg/μL；其測試結果表明，在單物種中可檢測之最低DNA濃度為10 pg/μL [圖三(a)、圖三(b)、圖三(c)、圖三(d)]，而在多物種DNA混合物的情況下可檢測之最低DNA濃度為100 pg/μL，如圖三(e)所示，顯示此方法具有低檢測極限，可適用於較低濃度的基因體DNA樣品。另，由圖三(e)可見地蜈蚣之偵測極限較

錫蘭七指蕨及多羽節肢蕨為高之情況，推測其可能原因是3個物種基因體DNA同時競爭PCR反應試劑，而地蜈蚣的片段長度較其他2個物種長，其相較於短的片段比較不容易被擴增所致。

將20件市售檢體(17件地蜈蚣類藥材及3件倒地蜈蚣單方製劑)進行複合式PCR以評估檢測方法之適用性，試驗結果顯示20件市售品均檢出錫蘭七指蕨，如表二所示，其中經過濃縮萃取已失去原有藥材外觀的3件製劑檢體，雖然鑑別難度提高，但亦可利用本研究所建立之複合式PCR分析方法克服性狀辨識的侷限性，精準鑑別出製劑中所含之倒地蜈蚣藥材物種。藉由以上試驗，可驗證該方法能實際應用於商業樣本的識別，並未受到樣品類型限制且具有良好的特異性。此外，觀察市售17件藥材檢體之包裝標示可發現各商家的名稱標示混亂，僅3件標示「倒地蜈蚣」，2件標示「釘地蜈

>錫蘭七指蕨 *Helminthostachys zeylanica* (118 bp)

G A T A T G A G T G G A T G G A A C G G T A C T C G A T C C A T T C A T T C G A
T T C C T C T C T T T A T G G A G G A C A A G T T C C T C C A T T C T A A T C A
C A T A C T G G A T T T G A A A G T C C C T T A T T A T C T T C A T C C A G

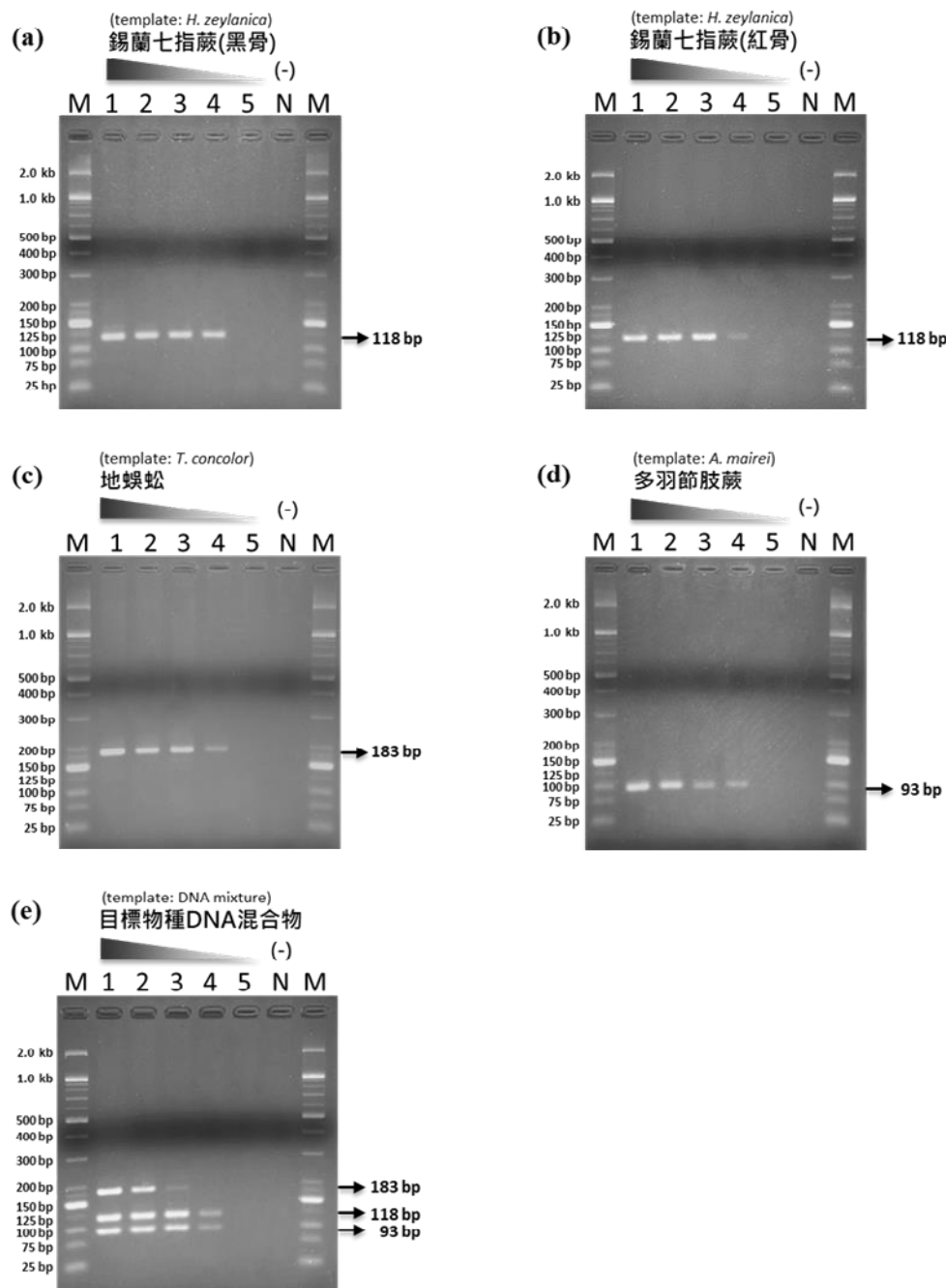
>地蜈蚣 *Torenia concolor* (183 bp)

G T T T G A T T A G A C G G A A G T T C A T A A A A A C T T C C G C T T T C T
T T A A A G A T T C T G A A C A G T T C C T G T G G G T T G A G C C C C T T T
T T C A A G G A A A T A C A G A A T A A C G G G A A C A T T T A A A T A A G T T
T G A T T C T T C A T G G G A T C A T A A A C C C C A C G C T T C G A A G A T
C T T T T C C T T C T C T T C G G G A T C G A

>多羽節肢蕨 *Arthromeris mairei* (93 bp)

C A A A T C A G C C T G G G T T G T G T T A A C A G A T G A T G A T A T A T T G
A A C A G A T T T G G G A A A A T C T G G A A T A T T T T A T C C T T A T A T T
A C A G T G C T T C G A C

圖二、錫蘭七指蕨、地蜈蚣以及多羽節肢蕨之微基因條碼(mini-DNA barcodes)



圖三、複合式PCR靈敏度分析(Sensitivity assay)
a.錫蘭七指蕨(黑骨)、b.錫蘭七指蕨(紅骨)、c.地蜈蚣、d.多羽節肢蕨、e.目標物種DNA混合物
M: 25/100 bp DNA ladder marker, Lane 1: 10 ng/ μ L, Lane 2: 1 ng/ μ L,
Lane 3: 0.1 ng/ μ L (100 pg/ μ L), Lane 4: 0.01 ng/ μ L (10 pg/ μ L),
Lane 5: 0.001 ng/ μ L (1 pg/ μ L), N: Non-template control

表二、市售品之複合式PCR物種鑑別結果

檢體編碼	檢體標示名稱	來源	複合式PCR物種鑑定結果
DWG01	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG02	倒地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG03	倒地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG04	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG05	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG06	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG07	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG08	釘地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG09	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG10	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG11	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG12	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG13	倒地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG14	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG15	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG16	地蜈蚣	中藥行	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWG17	釘地蜈蚣	青草店	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWGSP1	"地蜈蚣"濃縮散	中藥廠	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWGSP2	"倒地蜈蚣"濃縮細粒	中藥廠	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>
DWGSP3	"倒地蜈蚣"濃縮細粒	中藥廠	錫蘭七指蕨 <i>H. zeylanica</i>

蚣」，其他12件均標示「地蜈蚣」；而在單方製劑中亦有1件為「地蜈蚣濃縮散」，容易造成混淆，因此仍需落實藥材源頭管控進行品種確認，以保障用藥安全。

綜上所述，此分子生物技術物種鑑別方法能同時識別多個目標物種，可節省試驗花費的時間與試劑成本，提升檢驗效率，且僅使用必要的分子實驗室設備易於執行實施，提供一種快速且高效的物種鑑定技術，可應用於辨識倒地蜈蚣藥材之真偽。

參考文獻

1. 衛生福利部臺灣中藥典第四版編修委員。2021。臺灣中藥典。第四版。233頁，衛生福利部。臺北市。
2. Suja, S.R., Latha, P.G., Pushpangadan, P. and Rajasekharan, S. 2004. Evaluation of hepatoprotective effects of *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook against carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. *J Ethnopharmacol.* 92(1): 61-66.
3. Wu, K.C., Ho, Y.L., Kuo, Y.H., Huang, S.S. and *et al.* 2018. Hepatoprotective Effect of Ugonin M, A *Helminthostachys zeylanica* Constituent, on Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury in Mice. *Molecules.* 23(10): 2420.
4. Huang, Y.L., Yeh, P.Y., Shen, C.C. and Chen, C.C. 2003. Antioxidant flavonoids from the rhizomes of *Helminthostachys zeylanica*.

- Phytochemistry. 64(7): 1277-1283.
5. Wong, J.Y., Matanjun, P., Ooi, Y.B.H. and Chia, K. F. 2014. Evaluation of Antioxidant Activities in Relation to Total Phenolics and Flavonoids Content of Selected Malaysian Wild Edible Plants by Multivariate Analysis. *International Journal of Food Properties*. 17(8): 1763-1778.
 6. Su, L.H., Li, Y.P., Li H.M., Dai, W.F. and *et al.* 2016. Anti-inflammatory Prenylated Flavonoids from *Helminthostachys zeylanica*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 64(5): 497-501.
 7. Yamauchi, K., Mitsunaga, T., Itakura, Y. and Batubara, I. 2015. Extracellular melanogenesis inhibitory activity and the structure-activity relationships of ugonins from *Helminthostachys zeylanica* roots. *Fitoterapia*. 104: 69-74.
 8. Chen, C.Y., Liaw, C.C., Chen, Y.H., Chang, W.Y. and *et al.* 2014. A novel immunomodulatory effect of ugonin U in human neutrophils via stimulation of phospholipase C. *Free Radic Biol Med*. 72: 222-231.
 9. Yang, C.M., Yang, S.H., Lee, T.H., Fang, J.Y. and *et al.* 2016. Evaluation of Anti-Inflammatory Effects of *Helminthostachys zeylanica* Extracts via Inhibiting Bradykinin-Induced MMP-9 Expression in Brain Astrocytes. *Mol Neurobiol*. 53(9): 5995-6005.
 10. Ridhasya, F. E., Teruna, H. Y., Hendra, R. and Almuradani, M. 2019. Natural Antidiabetic of Tunjuk Langit (*Helminthostachys zeylanica*) Rhizome Extracts. *Pharmacology and Clinical Pharmacy Research*. 4(3).
 11. Chang, T.C., Chiang, H., Lai, Y.H., Huang, Y.L. and *et al.* 2019. *Helminthostachys zeylanica* alleviates hepatic steatosis and insulin resistance in diet-induced obese mice. *BMC Complement Altern Med*. 19(1): 368.
 12. 張廷禎。2021。錫蘭七指蕨萃取物及其主成分Ugonin J改善非酒精性脂肪肝和代謝症候群以及其新藥開發的潛力。臺北醫學大學醫學生物科技博士論文，1-98。
 13. Tsai, M.M., Lin, H.C., Yu, M.C., Lin, W.J. and *et al.* 2021. Anticancer Effects of *Helminthostachys zeylanica* Ethyl acetate Extracts on Human Gastric Cancer Cells through Downregulation of the TNF- α -activated COX-2-cPLA2-PGE2 Pathway. *J Cancer*. 12(23): 7052-7068.
 14. 臺灣植物紅皮書編輯委員會。2017。2017臺灣維管束植物紅皮書名錄。13，行政院農業委員會特有生物研究保育中心，南投縣。
 15. Bharali, P., Nikhangju, S., Tag, H., Das, A.K. and *et al.* 2017. Notes on *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook. - an endangered less known fern-ally from Arunachal Pradesh in NE India. *Pleione*. 11(1): 25-28.
 16. 國家林業和草原局農業農村部。2021。國家重點保護野生植物名錄。[http://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2021-09/09/content_5636409.htm]。
 17. Coritico, F.P and Amoroso, V.B. 2020. Threatened lycophytes and ferns in four Protected Areas of Mindanao, Philippines. *Nature Conservation Research*. 5(4): 78-88.
 18. Sucher, N.J and Carles, M.C. 2008. Genome-based approaches to the authentication of medicinal plants. *Planta Med*. 74(6): 603-623.
 19. Ichim, M.C. 2019. The DNA-Based Authentication of Commercial Herbal Products Reveals Their Globally Widespread Adulteration. *Front Pharmacol*. 10: 1227.
 20. Heubl G. 2010. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by

- molecular biological techniques. *Planta Med.* 76(17): 1963-1974.
21. Shokralla, S., Zhou, X., Janzen, D.H., Hallwachs, W. and *et al.* 2011. Pyrosequencing for mini-barcoding of fresh and old museum specimens. *PLoS One.* 6(7): e21252.
 22. Velasco-Cuervo, S.M., Aguirre-Ramirez, E., Gallo-Franco, J.J., González Obando, R. and *et al.* 2018. Saving DNA from museum specimens: The success of DNA mini-barcodes in haplotype reconstruction in the genus *Anastrepha* (Diptera: Tephritidae). *J Adv Res.* 16: 123-134.
 23. Little, D.P. and Jeanson, M. L. 2013. DNA barcode authentication of saw palmetto herbal dietary supplements. *Sci Rep.* 3: 3518.
 24. Little, D.P. 2014. Authentication of *Ginkgo biloba* herbal dietary supplements using DNA barcoding. *Genome.* 57(9): 513-516.
 25. Paradiso, L. and Little, D.P. 2021. Authentication of garlic (*Allium sativum* L.) supplements using a trnL^{UAA} mini-barcode. *Genome.* 64(11): 1021-1028.
 26. Labrador, K., Agmata, A., Palermo, J.D., Follante, J. and *et al.* 2019. Authentication of processed Philippine sardine products using Hotshot DNA extraction and minibarcode amplification. *Food Control.* 98: 150-155.
 27. Yang, X., Yu X., Zhang X., Guo, H. and *et al.* 2022. Development of Mini-Barcode Based on Chloroplast Genome and Its Application in Metabarcoding Molecular Identification of Chinese Medicinal Material *Radix Paeoniae Rubra* (Chishao). *Front Plant Sci.* 13: 819822.
 28. 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(3): 219-224.

Authentication of Dao-Di-U-Gon Medicinal Materials and Its Adulterants Using Multiplex Polymerase Chain Reaction

YUNG-CHUAN HSIEH, 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, MOHW

ABSTRACT

The root and rhizome of *Helminthostachys zeylanica* (L.) Hook. (Ophioglossaceae) is a Chinese medicine named “Dao-Di-U-Gon” in Taiwan. It has antipyretic and antiphlogistic effects and has been widely used as folk medicine for a long time. However, with the herbal product development and habitat destruction, *H. zeylanica* has thus been listed as an endangered species in many countries. Therefore, it may prompt the replacement or substitution with other species in the market. *Torenia concolor* Lindl. and *Arthromeris mairei* (Brause) Ching are commonly confusing species due to similar aliases and different medication habits. It is urgent to establish an accurate and rapid identification method to avoid medication errors. In recent years, molecular authentication methods have been widely employed as a powerful tool for the species identification of herbal products. In this study, multiplex PCR was developed for distinguish Dao-Di-U-Gon medicinal materials from its adulterants based on DNA sequence variation. The lengths of the specific amplicons were 118 bp for *H. zeylanica*, 183 bp for *T. concolor*, and 93 bp for *A. mairei*, which could be easily differentiated as three herbal origins by gel electrophoresis. This detection technique can be applied on traditional Chinese medicine (TCM) quality control, thus contributing to medication safety.

Key words: Multiplex PCR 、 Dao-Di-U-Gon 、 *Helminthostachys zeylanica* 、 *Torenia concolor* 、 *Arthromeris mairei*