

利用Nested PCR-DNA定序方法鑑定肉蓯蓉藥材基原

謝詠笙 李蕙君 林雅姿 蔡佳芬 王德原

食品藥物管理署 研究檢驗組

摘 要

依據臺灣中藥典規範肉蓯蓉藥材應使用列當科植物肉蓯蓉 *Cistanche deserticola* Y. C. Ma 或管花肉蓯蓉 *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight 之帶鱗葉的乾燥肉質莖。由於各地區用藥習慣不同及外型相似等原因常出現同名異物或同物異名的情況，為避免藥材誤用影響到用藥安全與有效性，本研究從DNA層面確認肉蓯蓉藥材之基原正確性。收集來自各地共計40件藥材與14件製劑檢體，利用肉蓯蓉藥材正品基原之葉綠體 *psbA-trnH* 基因間隔區(chloroplast *psbA-trnH* intergenic spacer)的序列差異設計特異性引子對，以Nested PCR (Nested polymerase chain reaction)反應續以DNA定序方法進行基原鑑別。肉蓯蓉Nested PCR反應產物經膠片電泳分析可得約252鹼基對(base pair)之產物，管花肉蓯蓉Nested PCR反應產物可得約386鹼基對之產物，利用電泳擴增片段大小可初步區分肉蓯蓉與管花肉蓯蓉，續以DNA定序確認物種。檢體測試結果證明本方法能專一地鑑定出藥材與製劑是否使用正確基原的肉蓯蓉藥材，期能應用在中藥檢驗及品質管控上，以保障用藥安全及國民健康。

關鍵詞：肉蓯蓉、*psbA-trnH*、Nested PCR、DNA定序

前 言

肉蓯蓉始載於神農本草經，列為上品。《本草匯言》云：肉蓯蓉，養命門，滋腎氣，補精血之藥也。男子丹元虛冷而陽道久沉，婦人沖任失調而陰氣不治，此乃平補之劑，溫而不熱，補而不峻、暖而不燥，滑而不泄，固有從容知名⁽¹⁾。依「臺灣中藥典」規範肉蓯蓉(*Cistanches Herba*)正品藥材基原為列當科(*Orobanchaceae*)植物肉蓯蓉(*Cistanche deserticola* Y. C. Ma)或管花肉蓯蓉(*Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight)帶鱗葉的乾燥肉質莖⁽²⁾，又稱作蓯蓉、甜大芸，主要分布於內蒙古、陝西、甘肅、寧夏、青海、新疆等地，又有「沙漠人參」之美譽。

在方劑的使用上，肉蓯蓉與香附、生地黃、杜仲、陳皮、青皮、白芍、烏藥、海螵蛸、川芎、小茴香、黃芩、延胡索、當歸同用，治療月經不調、痛經，如調經丸；與山藥、巴戟天、熟地黃、小茴香、大棗、茯苓、山茱萸、牛膝、楮實子、杜仲、石菖蒲、遠志、五味子、枸杞子同用，治療腰膝痠軟、失眠健忘、眩暈倦怠，如還少丹；與人參、茯神、牛膝、當歸、鹿茸、熟地、桂心、菟絲子、白芍、山藥、炙甘草、陳皮、小茴香、白朮、枸杞子、黃耆、巴戟天同用，治療元氣不足、腰痛耳鳴、形體瘦弱，如參茸固本丸。在現代醫學的研究上，肉蓯蓉萃取物已發表於論文上的藥理活性有抗發炎⁽³⁾、降低膽固醇⁽⁴⁾、抗氧化^(5,6)、減少骨質流失與增強骨質形

成^(7,8)、增強記憶^(9,10)、抗肝纖維化^(11,12)、增強腸道吸收⁽¹³⁾、預防高血糖和治療低血脂作用⁽¹⁴⁾等。

肉蓯蓉具有極高的藥用價值，是中國傳統的名貴中藥材，其性甘、鹹，溫。補腎陽，益精血，潤腸通便，用於男子陽痿，女子不孕，帶下，血崩，腰膝冷痛，血枯便秘。然而由於各地區用藥習慣不同以及外型相似等原因常出現同名異物或同物異名的情況，若再經過炮製加工過後就更加難以外觀進行辨識，此般藥材誤用情形可能會影響到用藥安全與有效性。肉蓯蓉常見混淆誤用品種有列當科的鹽生肉蓯蓉(*Cistanche salsa*)、沙蓯蓉(*Cistanche sinensis*)、草蓯蓉(*Boschniakia rossia*)及鎖陽科的鎖陽(*Cynomorium songaricum*)等，本研究欲從DNA層面了解市場上肉蓯蓉之基原與使用情形，故建立藥材與製劑之肉蓯蓉基原鑑別方法，以確保民眾用藥安全。

材料及方法

一、材料

- (一)食品藥物管理署標本室收藏對照標準藥材：肉蓯蓉(H-3-2-06)、管花肉蓯蓉(H-3-2-08)、沙蓯蓉(E-1-4-03)、草蓯蓉(H-3-3-03)及鎖陽(B-1-2-02)。
- (二)中國藥品生物製品檢定所之標準藥材粉末共3件，含1件肉蓯蓉(CD01)及2件管花肉蓯蓉(CT01、CT06)。
- (三)藥材檢體：共40件，含肉蓯蓉、管花肉蓯蓉、鹽生肉蓯蓉、草蓯蓉及鎖陽5個品項。
- (四)製劑檢體：共14件，含單方製劑2件、複方製劑12件。

二、試藥

- (一)一般試藥：溶解緩衝液含100 mM三羧甲

基氨基甲烷(Tris-HCl)(Amresco, USA)、100 mM 乙二胺四乙酸二鈉(EDTA)(Amresco, USA)、1%十二烷基肌氨酸鈉(N-lauroyl sarcosine sodium salt)(Sigma, USA)及1 mg/mL蛋白酶K (Proteinase K)(Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA)。苯酚-氯仿-異戊醇溶液(phenol : chloroform : isoamyl alcohol = 25 : 24 : 1, v/v/v)及氯仿-異戊醇溶液(chloroform : isoamyl alcohol = 24 : 1, v/v)(Sigma, USA)。十六烷基三甲基溴化銨(Hexadecyl trimethyl ammonium Bromide ; Cetrimonium Bromide, CTAB)(BDH, England)。醋酸鈉及氯化鈉(Amresco, USA)。異丙醇(Sigma, USA)。

- (二)試劑套組：GFX DNA and Gel Band Purification Kit購自GE healthcare, USA。DNA聚合反應試劑Fast-Run Taq Master Mix及DNA ladder marker (Protech Technology, Taiwan)。Exo-SAP IT PCR Product Cleanup Reagent、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit及BigDye Xterminator Purification Kit (Thermo Fisher SCIENTIFIC, USA)。
- (三)引子：*psbA-trnH*區間序列共用性引子對PAF (GTTAT GCATG AACGT AATGC TC)⁽¹⁵⁾、ctHR1 (ACAAT CCATT SCCTT AATCC)；核糖體基因內轉錄間隔區(ribosomal DNA Internal transcribed spacer, ITS)序列共用性引子對ITS5a (CCTTA TCATT TAGAG GAAGG AG)⁽¹⁶⁾、ITS4 (TCCTC CGCTT ATTGA TATGC)⁽¹⁶⁾；18S ribosomal RNA共用性引子對：18SrRNAF1 (AACGG CTACC ACATC CAAGG)⁽¹⁷⁾、18SrRNAR1 (CCGAA GGCCA ACACA ATAGG)⁽¹⁷⁾；肉蓯蓉Nested PCR引子對：C1F1(TAKAC CTAGC CSCTA TTG)、C1R1(TAATY CMCTT GGGTA CATC)、C2F3(TATCA

AGCMA GAGGG RTTAT TGC)及
C2R3(ACMTC CGCCC CTTAC TTTWT)
(Quality: Express, PURIGO Biotechnology,
Taiwan)。

三、儀器設備

- (一)加熱型乾浴器(MC-01N, Major Science, USA)
- (二)迷你電泳及鑄膠器(Mupid-exU, ADVANCE, Japan)
- (三)超微量核酸定量光譜儀(NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific, USA)
- (四)聚合酶連鎖反應器(PC-320, ASTEC, Japan)
- (五)影像分析系統(ImageQuant 300, GE Healthcare, USA)
- (六)自動定序儀(3130 Genetic Analyzer, ABI, Japan)

四、DNA萃取與純化

依照前食品藥物檢驗局呂康祖等人2005年發表之萃取方法⁽¹⁸⁾進行，將樣品藥材及製劑檢體磨碎或切碎，稱取100 mg置於2 mL微量離心管中，加入1 mL溶解緩衝液(100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 1%十二烷基肌氨酸鈉溶液及1 mg/mL 蛋白酶K)，置於56°C加熱60分鐘。再加入與溶液等體積之苯酚-氯仿-異戊醇(25:24:1)溶液，混合萃取，以13000 rpm離心5分鐘。離心後取水層，加入5 M氯化鈉溶液與十六烷基三甲基溴化銨-氯化鈉溶液(10% CTAB in 0.7 M NaCl)，混合後置於65°C加熱15分鐘，再加入等體積之氯仿-異戊醇(24:1)溶液混合萃取，以13000 rpm離心5分鐘。離心後取水層，加入異丙醇與3 M醋酸鈉溶液，以13000 rpm離心5分鐘。離心後去除上清液，使沉澱物風乾後，加入100 µL之無菌水溶解。再以GFX DNA and Gel Band Purification Kit套組純化，步驟依套組說明，最後加入50

µL Elution buffer溶洗出總基因組DNA (total genomic DNA)溶液，以超微量核酸定量光譜儀(NanoDrop ND-1000)測定DNA溶液之純度和濃度，經稀釋其DNA濃度為20 ng/µL供PCR (polymerase chain reaction)擴增反應使用。

五、PCR、Nested PCR反應

(一)PAF-cthR1共用性引子對PCR反應

取2 µL檢體總基因組DNA溶液作為模板，加入25 µM PAF、ctHR1引子對溶液各0.5 µL，再加入10 µL DNA聚合反應試劑，添加無菌蒸餾水使總體積為50 µL，進行PCR擴增。PCR反應條件為起始變性溫度94°C 2分鐘，擴增條件為94°C 30秒、50°C 30秒、72°C 30秒共45週期。最後延展溫度72°C 5分鐘。

(二)ITS5a-ITS4共用性引子對PCR反應

取2 µL檢體總基因組DNA溶液作為模板，加入25 µM ITS5a、ITS4引子對溶液各0.5 µL，再加入10 µL DNA聚合反應試劑，添加無菌蒸餾水使總體積為50 µL，進行PCR擴增。PCR反應條件為起始變性溫度94°C 2分鐘，擴增條件為94°C 30秒、50°C 30秒、72°C 30秒共45週期。最後延展溫度72°C 5分鐘。

(三)18S ribosomal RNA共用性引子對PCR反應

取2 µL檢體總基因組DNA溶液作為模板，加入25 µM 18SrRNAF1、18SrRNAR1引子對溶液各0.5 µL，再加入10 µL DNA聚合反應試劑，添加無菌蒸餾水使總體積為50 µL，進行PCR擴增。PCR反應條件為起始變性溫度94°C 2分鐘，擴增條件為94°C 30秒、55°C 30秒、72°C 30秒共40週期，最後延展溫度72°C 5分鐘。

(四)肉蓯蓉Nested PCR反應

取2 µL檢體總基因組DNA溶液作為模板，加入25 µM C1F1、C1R1引子對溶液各0.5 µL，再加入10 µL DNA聚合反應試

劑，添加無菌蒸餾水使總體積為50 μ L，進行PCR擴增。PCR 反應條件為起始變性溫度94℃2分鐘，擴增條件為94℃30秒、48℃30秒、72℃30秒共35週期，最後延展溫度72℃5分鐘；再取第一次PCR產物2 μ L作為模板，加入C2F3、C2R3引子對溶液各0.5 μ L，再加入10 μ L DNA聚合反應試劑，添加無菌蒸餾水使總體積為50 μ L，進行PCR擴增。PCR 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35週期，最後延展溫度72℃5分鐘。

六、電泳與定序分析

(一)膠體電泳

取PCR反應產物5 μ L與EZ-Vision 1 μ L混合，置入2%瓊脂膠體，進行電泳，電泳條件100 V、35分鐘，以影像系統觀察確認PCR擴增結果，並拍攝影像。

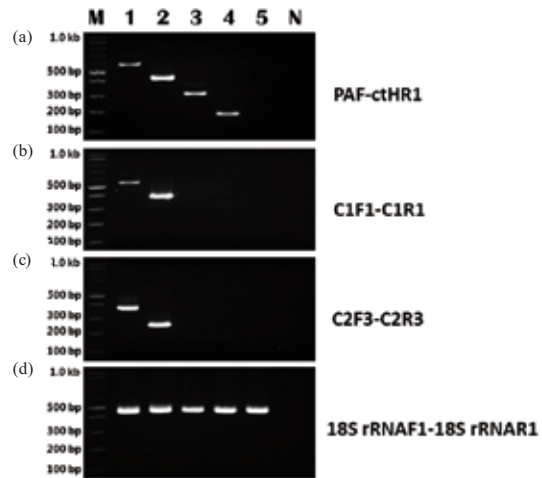
(二)定序分析

確認擴增結果後將PCR反應產物以Exo-SAP IT 試劑純化，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孔盤，以ABI 3130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）之GenBank資料庫進行序列比對，得到鑑定結果。

結果與討論

由於比較GenBank資料庫肉蓯蓉與常見混偽品物種之序列資料後，發現其葉綠體之*psbA-trnH*基因間隔區間序列具有顯著差異，故本研究選擇此區間作為鑑別之DNA標記片段。首先利用本署標本室管花肉蓯蓉(H-3-2-

08)、肉蓯蓉(H-3-2-06)、沙蓯蓉(E-1-4-03)、草蓯蓉(H-3-3-03)與鎖陽(B-1-2-02)等5個品種之對照標準藥材，針對*psbA-trnH*區間序列以PAF-ctHR1引子對進行PCR擴增反應，其產物電泳結果如圖一所示，其產物片段大小依序為管花肉蓯蓉(H-3-2-08)為574鹼基對、肉蓯蓉(H-3-2-06)為446鹼基對、沙蓯蓉(E-1-4-03)為312鹼基對及草蓯蓉(H-3-3-03)為183鹼基對，分別取得其*psbA-trnH*序列資訊並與資料庫收載之物種序列進行比對如圖二所示。另外由於PAF-ctHR1引子對不適合鎖陽物種序列擴增，改以ITS共用引子對ITS5a-ITS4進行物種



圖一、肉蓯蓉及其常見誤用品物種之PCR擴增產物電泳圖

使用之引子對標示於右方：

(a) PAF-ctHR1為*psbA-trnH*區間序列共用性引子對

(b) C1F1-C1R1為Nested PCR第1st PCR引子對

(c) C2F3-C2R3為Nested PCR第2nd PCR引子對

(d) 18S rRNA F1-18S rRNA R1為18S ribosomal RNA通用性引子對

M: 100bp DNA ladder marker

Lane 1: H-3-2-08 (管花肉蓯蓉), Lane 2: H-3-2-06 (肉蓯蓉)

Lane 3: E-1-4-03 (沙蓯蓉), Lane 4: H-3-3-03 (草蓯蓉)

Lane 5: B-1-2-02 (鎖陽)

N: negative control (空白對照組)

CLUSTAL format alignment by MAFFT (v7.310)

[illegible]

Q23 →

FJ194374_Cde	aaaaatcttaaaatattaaggagtaataaattctttctgttctatcaag-caagagggtatttgcctcttatttt-----attggtaatatgtttataaaaaataagtaaaaaa
H-3-2-06_Cde	aaaaatcttaaaatattaaggagtaataaattctttctgttctatcaag-caagagggtatttgcctcttatttt-----attggtaatatgtttataaaaaataagtaaaaaa
FJ194378_Csa	aaaaatcttaaaatattaaggagtaataaattctttctgttctatcaaaccaaragggtatttgcctcttwtttt-----ttgggtagtattgttataaaaaaaaggtataaaa
FJ194383_Ctu	tataattataataataaaggagtaataaactctttctgttctatcaag-caagagggttatttgcctcttatttttaattaaattagtagtattgttcagaaaaataagtaaaaaa
H-3-2-08_Ctu	tataattataataataaaggagtaataaactctttctgttctatcaag-caagagggttatttgcctcttatttttaattaaattagtagtattgttcagaaaaataagtaaaaaa
FJ194380_Csi	atatattttttatttatatcgattatttagtatcttttagtagtattgtga-cttgtctagaccttttttttctatga-----tttaaaaa-----taaaaaagattataaaaaaa
E-1-4-03_Csi	atatattttttatttatatcgattatttagtatcttttagtagtattgtga-cttgtctagaccttttttttctatga-----tttaaaaa-----taaaaaagattataaaaaaa
FJ194367_Bro	-----
H-3-3-03_Bro	-----

```

FJ914374_Cde      ttctttttaaaggggtaattataaattgagtcctattctttctgtctttataaatttttttattcttgtt-----aaaaggttgggaaatttgaaa-----
H-3-2-06_Cde     ttctttttaaaggggtaattataaattgagtcctattctttctgtctttataa-ttttttattcttgtt-----aaaaggttgggaaatttgaaa-----
FJ914378_Csa      ttctttttaaaggggtaattataaattgagtcctattctttctgtctttataa-ttttttattcttgtta-----aaaaggttgggaaatttgaaa-----
FJ914383_Ctu      ttatttcttaaggggtaattataaattgagttattcttctgtctgtataa-tttataatttttttttaattattataaaacagtagaattttaaaacttcccaacctttgacaa
H-3-2-08_Ctu      ttatttcttaaggggtaattataaattgagttattcttctgtctgtataa-tttataatttttttttaattattataaaacagtagaattttaaaacttcccaacctttgacaa
FJ914380_Csi      ttttttccctcttttcccttaattt-----tttttttagtaattgta-----
E-1-4-03_Csi      ttttttccctcttttcccttaattt-----tttttttagtaattgta-----
FJ914367_Bro      -----ttgtg-----
H-3-3-03_Bro      -----ttgtg-----
                  * *

```

```

FJ914374_Cde -----ttatacttgttttttttctttccatattaaaaaaatt
H-3-2-06_Cde -----ttatacttgttttttttctttccatattaaaaaaatt
FJ914378_Csa -----ttatacttgttttttttctttccatttataaaaaaaatt
FJ914383_Ctu gaaatataatgattgaaaaaaaaaagaatatctacgttatatacaggctgtaacagatcgtaatgagatgttogaatttaactctttgtcttacaattttttatagtaataatt
H-3-2-08_Ctu gaaatataatgattgaaaaaaaaaagaatatctacgttatatacaggctgtaacagatcgtaatgagatgttogaatttaactctttgtcttacaattttttatagtaataatt
FJ914380_Csi -----
E-1-4-03_Csi -----
FJ914367_Bro -----
H-3-3-03_Bro -----

```

圖二、肉蓯蓉及其常見誤用品物種 $psbA-trnH$ 序列比對及引子位置

Cde: *Cistanche deserticola*, Ctu: *Cistanche tubulosa*.

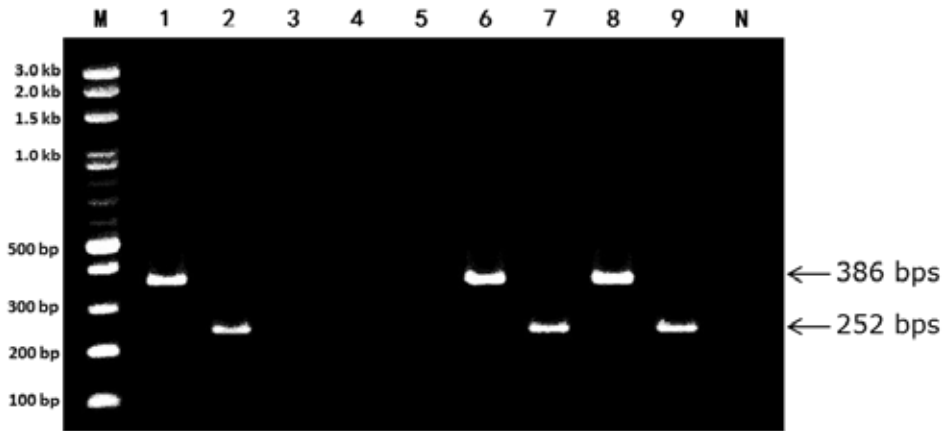
Csa: *Cistanche salsa*, Csi: *Cistanche sinensis*, Bro: *Boschniakia rossica*

[takacctagccsctattg]為C1F1引子序列之位置

taatcmttgqgtacatc 為 C1R1 引子序列互補配對之位置

tatcaagcmagagggrttattgc 為C2F3引子序列之位置

acmtccgccccttactttwt 為C2R3引子序列互補配對之位置



圖三、Nested PCR擴增反應產物之膠片電泳圖

M: 100bp DNA ladder marker

Lane 1: H-3-2-08 (管花肉蓯蓉), Lane 2: H-3-2-06 (肉蓯蓉)

Lane 3: E-1-4-03 (沙蓯蓉), Lane 4: H-3-3-03 (草蓯蓉)

Lane 5: B-1-2-02 (鎖陽)

Lane 6:藥材檢體(CH33), Lane 7:藥材檢體(CH28)

Lane 8:製劑檢體(ChPA4), Lane 9:製劑檢體(ChPC1)

N: negative control (空白對照組)

基原確認，鎖陽(B-1-2-02)定序結果與NCBI資料庫收載HQ222981鎖陽物種序列之相似度為100%。

針對*psbA-trnH*區間序列之肉蓯蓉正品基原序列設計兩組專一性引子對C1F1-C1R1與C2F3-C2R3(引子序列位置如圖二)，並以對照藥材進行PCR鑑別條件測試，其擴增產物電泳結果如圖一。從電泳結果得知Nested PCR之兩組引子對均僅專一性地針對肉蓯蓉正品基原進行擴增。利用此鑑別條件進行計畫檢體之試驗，肉蓯蓉可得約252鹼基對之產物，管花肉蓯蓉可得約386鹼基對之產物，從擴增片段大小差異可初步區分肉蓯蓉與管花肉蓯蓉，如圖三所示；將Nested PCR擴增產物進行純化後以DNA定序儀進行雙向定序，所得之序列與資料庫收載序列進行比對確認物種鑑別結果。而3件購自中國藥品生物製品檢定所之標準藥材粉末以本研究所建立的Nested PCR-DNA定序方法進行試驗，其基原鑑定結果皆與其所標示

的物種名稱相符。

以Nested PCR-DNA定序方法分析本研究中收集之5個品種共計40件的藥材檢體，在31件標示肉蓯蓉或管花肉蓯蓉的藥材中檢出20件肉蓯蓉及10件管花肉蓯蓉，1件無擴增產物；而3件標示鹽生肉蓯蓉、4件標示草蓯蓉與2件標示鎖陽檢體理論上非引子對標的，其擴增反應結果均如預期未檢出肉蓯蓉產物片段。藥材檢體之Nested PCR-DNA定序鑑別結果如表一所示。

而在14件製劑檢體中，Nested PCR-DNA定序試驗後共有11件檢出肉蓯蓉，1件檢出管花肉蓯蓉，僅檢體CHSP1與ChPA6未能檢出，鑑別結果如表二所示。

檢體測試結果顯示，無論是炮製切片藥材或是經過濃縮加工的顆粒散劑或丸狀之製劑檢體，以本研究所建立的Nested PCR-DNA定序方法皆可避免其他物質成分干擾，專一地鑑定藥材與製劑是否使用正確肉蓯蓉基原。而依本

表一、藥材檢體Nested PCR-DNA定序鑑別結果

編碼	檢體標示名稱	檢體來源	鑑別結果
CH01	肉蓯蓉	中藥房	- ^a
CH02	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH03	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH04	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH05	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH06	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH07	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH08	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH09	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH10	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH11	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH12	管花肉蓯蓉	本署標本室	管花肉蓯蓉
CH13	管花肉蓯蓉	本署標本室	管花肉蓯蓉
CH14	鹽生肉蓯蓉	中國大陸地區價購	- ^a
CH15	荒漠肉蓯蓉	本署標本室	肉蓯蓉
CH16	肉蓯蓉	中國大陸地區價購	管花肉蓯蓉
CH17	肉蓯蓉	本署標本室	肉蓯蓉
CH18	管花肉蓯蓉	藥廠	管花肉蓯蓉
CH19	肉蓯蓉	藥廠	肉蓯蓉
CH20	肉蓯蓉	藥廠	管花肉蓯蓉
CH21	肉蓯蓉	藥廠	肉蓯蓉
CH22	管花肉蓯蓉	藥廠	管花肉蓯蓉
CH23	管花肉蓯蓉	中藥零售商	肉蓯蓉
CH24	鹽生肉蓯蓉	中藥零售商	- ^a
CH25	蒙古肉蓯蓉	中藥零售商	肉蓯蓉
CH26	肉蓯蓉	中藥零售商	肉蓯蓉
CH27	肉蓯蓉	藥廠	管花肉蓯蓉
CH28	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH29	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH30	肉蓯蓉	中藥房	肉蓯蓉
CH31	肉蓯蓉	藥廠	管花肉蓯蓉
CH32	管花肉蓯蓉	藥廠	管花肉蓯蓉
CH33	管花肉蓯蓉	藥廠	管花肉蓯蓉
CH34	鹽生肉蓯蓉	中藥零售商	- ^a
BR01	草蓯蓉	本署標本室	- ^a
BR02	草蓯蓉	中國大陸地區價購	- ^a
BR03	草蓯蓉	中藥零售商	- ^a
BR04	草蓯蓉	中藥零售商	- ^a
CS01	鎖陽	本署標本室	- ^a
CS02	鎖陽	本署標本室	- ^a

a. 進行Nested PCR試驗無擴增產物

表二、製劑檢體Nested PCR-DNA定序鑑別結果

編碼	方劑名稱	鑑別結果
CHSP1	肉蓯蓉濃縮散	- ^a
CHSP2	肉蓯蓉濃縮細粒	肉蓯蓉
CHPA1	還少丹濃縮散	肉蓯蓉
CHPA2	還少丹濃縮散	肉蓯蓉
CHPA3	還少丹濃縮顆粒	肉蓯蓉
CHPA4	還少丹濃縮顆粒	管花肉蓯蓉
CHPA5	還少丹丸劑	肉蓯蓉
CHPA6	還少丸濃縮細粒	- ^a
CHPA7	還少丸丸劑	肉蓯蓉
CHPA8	還少丸丸劑	肉蓯蓉
CHPA9	還少丸丸劑	肉蓯蓉
CHPB1	調經丸濃縮細粒	肉蓯蓉
CHPC1	參茸固本丸丸劑	肉蓯蓉
CHPD1	延年回春丸丸劑	肉蓯蓉

^a 進行Nested PCR試驗無擴增產物

次實驗的鑑別結果，無論藥材或製劑使用正確率都達85%以上。隨著DNA Barcode鑑定方法發展，利用基因序列來鑑別物種基原是新的檢驗趨勢，為擴充鑑別檢驗效能，中藥物種基原分生鑑別方法實應逐步建立完備，以期能應用在檢驗及品質管理提升上，保障用藥的品質、療效及安全。

參考文獻

1. 張貴君。1993。常用中藥鑑定大全。第一版。341頁，黑龍江科學技術出版社，哈爾濱。
2. 行政院衛生署臺灣中藥典編修小組。2013。臺灣中藥典。第二版。208頁，行政院衛生署中醫藥委員會，臺北。
3. Lin, L.W., Hsieh, M.T., Tsai, F.H., Wang, W.H. and *et al.* 2002. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activity caused by *Cistanche deserticola* in rodents. *J Ethnopharmacol.*

- 83(3): 177-182.
4. Shimoda, H., Tanaka, J., Takahara, Y., Take-moto, K. and *et al.* 2009. The hypocholester-olemic effects of Cistanche tubulosa extract, a Chinese traditional crude medicine, in mice. *Am J Chin Med.* 37(6): 1125-1138.
5. Xiong, Q., Kadota, S., Tani, T. and Namba, T. 1996. Antioxidative effects of phenylethanoids from Cistanche deserticola. *Biol Pharm Bull.* 19(12): 1580-1585.
6. Zhang, W., Huang, J., Wang, W., Li, Q. and *et al.* 2016. Extraction, purification, character-ization and antioxidant activities of polysac-charides from Cistanche tubulosa. *Int J Biol Macromol.* 93(Pt A): 448-458.
7. Liang, H., Yu, F., Tong, Z. and Huang, Z. 2011. Effect of Cistanches Herba aqueous extract on bone loss in ovariectomized rat. *Int J Mol Sci.* 12(8): 5060-5069.
8. Li, T.M., Huang, H.C., Su, C.M., Ho, T.Y. and *et al.* 2012. Cistanche deserticola extract increases bone formation in osteoblasts. *J Pharm Pharmacol.* 64(6): 897-907.
9. Choi, J.G., Moon, M., Jeong, H.U., Kim, M.C. and *et al.* 2011. Cistanches Herba enhances learning and memory by inducing nerve growth factor. *Behav Brain Res.* 216(2): 652-658.
10. Peng, X.M., Gao, L., Huo, S.X., Liu, X.M. and *et al.* 2015. The Mechanism of Memory Enhancement of Acteoside (Verbascoside) in the Senescent Mouse Model Induced by a Combination of D-gal and AlCl₃. *Phytother Res.* 29(8): 1137-1144.
11. You, S.P., Zhao, J., Ma, L., Tudimat M. and *et al.* 2015. Preventive effects of phenylethanol glycosides from Cistanche tubulosa on bovine serum albumin-induced hepatic fibrosis in rats. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences.* 23: 52.
12. You, S.P., Ma, L., Zhao, J., Zhang S.L. and *et al.* 2016. Phenylethanol Glycosides from Cistanche tubulosa Suppress Hepatic Stellate Cell Activation and Block the Conduction of Signaling Pathways in TGF- β 1/smad as Potent-ial Anti-Hepatic Fibrosis Agents. *Molecules.* 21(1): 102.
13. Tanino, T., Nagai, N. and Funakami, Y. 2015. Phloridzin-sensitive transport of echinacoside and acteoside and altered intestinal absorp-tion route after application of Cistanche tubulosa extract. *J Pharm Pharmacol.* 67(10): 1457-1465.
14. Xiong, W.T., Gu, L., Wang, C., Sun, H.X. and *et al.* 2013. Anti-hyperglycemic and hypolip-idemic effects of Cistanche tubulosa in type 2 diabetic db/db mice. *J Ethnopharmacol.* 150(3): 935-945.
15. Sang, T., Crawford, D. J. and Stuessy, T. F. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticu-late evolution, and biogeography of Paeonia (Paeoniaceae). *Am. J. Bot.* 84(8): 1120.
16. Stanford, A.M., Harden, R. and Parks CR. 2000. Phylogeny and biogeography of Juglans (Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data. *Am J Bot.* 87(6): 872-882.
17. Lin, J. J., Fleming, R., Kuo, J., Matthews, B.F. and *et al.* 2000. Detection of Plant Genes Using a Rapid, Nonorganic DNA Purification Method. *Bio Techniques.* 28(2): 346-350.
18. Lu, K.T., Lo, C.F., Chang, H.C. and Lin J.H. 2005. Identification of Saposhinkoviae Radix in Concentrated Chinese Medicine Prepara-tions by Nested PCR and DNA Sequencing Methods. *J. Food Drug Anal.* 13(3): 219-224.

Identification of Cistanches Herba Based on *psbA-trnH* Intergenic Spacer Region Sequence by Nested PCR-DNA Sequencing Method

YUNG-CHUAN HSIEH, HUI-CHUN LEE, YA-TZE LIN, CHIA-FEN TSAI
AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Cistanches Herba is the dried succulent stem of *Cistanche deserticola* Y. C. Ma or *Cistanche tubulosa* (Schrenk) Wight in the family Orobanchaceae. The morphological similarities of other *Cistanche* species to Cistanches Herba has caused high chance of misidentification and misuse. For the purpose of detecting and avoiding material misusing, this study aimed on the correctness of Cistanches Herba from DNA level. Specific primers based on the differences of *psbA-trnH* (chloroplast *psbA-trnH* intergenic spacer) sequence were designed. Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) and DNA sequencing methods were developed. The developed methods were used for the Cistanches Herba identification. There were 40 raw herbs and 14 traditional Chinese medicine (TCM) preparations surveyed and analyzed in the study. The results showed that the gel electrophoresis for DNA fragment sizes of Nested PCR products was able to differentiate two herbal origins accurately. The Nested PCR amplified fragments for *C. deserticola* and *C. tubulosa* were 252 bps and 386 bps, respectively. Nested PCR-DNA sequencing method offered high selectivity and specificity for the rapid identification of Cistanches Herba. This study aimed to facilitate TCM quality control and protect public health.

Key words: Cistanches herba, *psbA-trnH*, Nested PCR-DNA sequencing