

Kvalitativna analiza rastlinskih vrst v zdravilnih čajnih mešanicah na osnovi restriksijske analize ITS regij

Qualitative analysis of individual herbal drugs in tea mixtures using restriction analysis of ITS regions

Petra Slanc, Sanja Brus, Borut Štrukelj

Povzetek

Zdravilne čaje uvrščamo med najstarejše farmacevtske pripravke. Proučevali smo grenki čaj, ki je sestavljen iz zeli tavžentrože (*Centaurea herba*), zeli rmana (*Millefolium herba*), korenine rumenega svišča (*Gentiana radix*), listov navadnega mrzličnika (*Menyanthes trifoliatae folium*) in listov poprove mete (*Mentha piperita folium*) ter čaj s pegastim badljem, ki je sestavljen iz plodu pegastega badlja (*Carduus marianus fructus*), korenine regrata (*Taraxacum radix*), plodu navadne kumine (*Carum fructus*) in listov poprove mete (*Mentha piperita folium*). Razvili smo metodo, s pomočjo katere je mogoče identificirati posamezne droge v čajni mešanici. Metoda je osnovana na pomnožitvi odseka jedrne ribosomalne DNA regije imenovane *internal transcribed spacers* (ITS) in njene restriksijske analize. Pomnožili smo ITS regiji posamezne droge, jima določili nukleotidno zaporedje ter na podlagi zaporedij izbrali kombinacijo restriksijskih endonukleaz, s pomočjo katerih smo določili značilen profil posamezne čajne mešanice.

Ključne besede: zdravilni čaji, nrDNA ITS, restriksijska analiza

Abstract

Herbal teas are one of the oldest and most used traditional preparations. We had studied bitter tea made of *Centaurea herba*, *Millefolium herba*, *Gentiana radix*, *Menyanthes trifoliatae folium*, *Mentha piperita folium*, and tea with milk thistle made of *Carduus marianus fructus*, *Taraxacum radix*, *Carum fructus* and *Mentha piperita folium*. In order to identify the constituent drugs, a method was established involving amplification of the internal transcribed spacers (ITS) region of nuclear ribosomal DNA on the basis of restriction analysis. ITS regions of individual drugs were amplified and sequenced. Restriction analysis was performed with selected restriction endonucleases to obtain specific profile for each tea.

Key words: herbal tea, nrDNA ITS, restriction analysis

1 Uvod

Uporaba zdravilnih čajev je ena glavnih komponent tradicionalne medicine. Njihova uporaba sega tisočletja v zgodovino, lahko bi celo trdili, da je stara kot človeštvo. V zadnjih desetletjih njihova uporaba narašča, kar pa je najverjetneje posledica vse večjega nagibanja prebivalstva razvitega sveta h komplementarnim metodam zdravljenja. Relativna priljubljenost se sicer razlikuje med državami, vendar pa je ocenjeno, da naj bi komplementarna zdravljenja uporabljalo od 20 % pa tja do 50 % populacije (1).

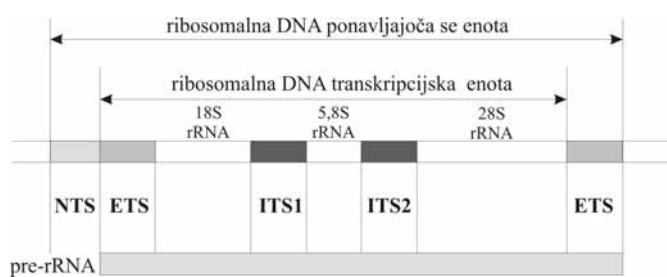
Zdravilni čaji so eni najstarejših galenskih pripravkov. Zanje je značilno, da jih sestavlja posamezna droga ali pa mešanica drog (2). Mešanice so pripravljene *in situ* v lekarnah ali pa industrijsko. Mešanico zdravilnih čajev sestavljajo različne droge, ki pa navadno

pripadajo isti indikacijski skupini. K tem t. i. glavnim drogam so navadno dodane tudi dopolnilne ter pomožne droge, ki dopolnjujejo delovanje glavnih drog, izboljšujejo organoleptične lastnosti, kot sta vonj in okus, pa tudi izgled same mešanice (2). Že dodobra uveljavljeno farmacevtsko pravilo je, da naj bi bili zdravilni čaji sestavljeni iz ne več kot sedmih drog. Predvsem v Nemčiji so za zdravilne čaje določena tudi pravila, ki zahtevajo, da naj čaj vsebuje vsaj 70 % sestavin, ki spadajo v skupino aktivnih komponent, kljub temu, da razmerja znotraj tega lahko variirajo (2). Poleg učinkov zdravilnih čajev, njihovih želenih in neželenih učinkov, pa je eden od pomembnejših kriterijev tudi njihova kakovost. Kakovost posameznih drog se je in se še vedno preverja na podlagi njihovega videza. Zelo pomemben prvi korak pri zagotavljanju kakovosti je preverjanje ustreznosti droge v smislu pravilne vrste, saj ne gre zanemariti

dr. Petra Slanc, mag. farm., Katedra za farmacevtsko biologijo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
Sanja Brus, Katedra za farmacevtsko biologijo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm., Katedra za farmacevtsko biologijo, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Aškerčeva 7, SI-1000 Ljubljana, Slovenija
in Odsek za biokemijo in molekularno biologijo, Inštitut Jožef Stefan, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana, Slovenija

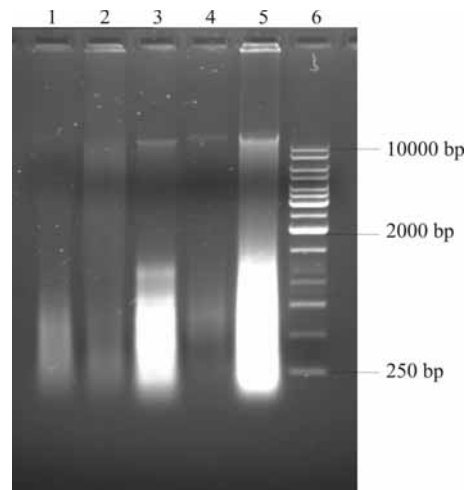
dejstva, da se lahko učinkovitost med vrstami tudi znotraj istega rodu, kot tudi drogami iste vrste bistveno razlikuje. Droge tako določamo na makroskopskem, mikroskopskem in fitokemijskem nivoju, kakor to določa Evropska farmakopeja (2). Določanje rastlinskih vrst v novejših izdelkih, kjer je navadno nativna struktura rastline uničena, je tako z vidika vizualizacije droge nemogoča. Med takšne izdelke spadajo izdelki, ki vsebujejo zmlate droge, tekoče ali suhe izvlečke, pa tudi izdelki, ki vsebujejo mešanico fino zmletih drog (3). V teh primerih je določanje vrste droge in njihovih potvorb z uporabo makroskopskih, kot tudi organoleptičnih metod nemogoče (3). V takšnih primerih je edini način identifikacije vrste uporaba molekulskih profilov, ki so značilni za posamezno vrsto. TLC predstavlja zelo pogosto, hitro in relativno cenovno ugodno metodo, s pomočjo katere lahko do neke mere določimo vrsto rastline. Na razpolago so tudi druge metode, kot so HPLC, MS in GC, vendar pa je pri teh metodah nepogrešljiva uporaba posameznih standardov. Kljub uporabi standardov pa se v določenih primerih izkaže, da tudi to ni zadosti za razlikovanje med posameznimi vrstami, saj so si kemijski profili med vrstami istega rodu ali podvrstami lahko na las podobni. Na molekulskem nivoju je vrste možno razlikovati tudi s pomočjo DNA profilov in sicer segmentov znotraj zapisa genov za ribosomalne RNA (rRNA) imenovanih *internal transcribed spacers* (ITS), vendar pa se teh tehnik do danes v širšem še ne uporablja (3).

ITS regiji znotraj zapisa za 18S in 28S jedrne ribosomalne DNA (rDNA) se uporabljata pri filogenetskih študijah (slika 1) (4). Regiji sta vrstno specifični. Zaporedja rDNA so zelo ohranjena in se med evkarionti ne razlikujejo dosti. Geni, ki kodirajo posamezne podenote rRNA (18S, 5,8S in 28S) se navadno nahajajo v tandemu, te pa se lahko ponovijo od sto do tisočkrat v genomu in predstavljajo približno 10% celotnega genoma (navadni repnjakovec – *Arabidopsis thaliana* 8%). Ker so rRNA visoko ohranjene jih lahko uporabimo kot sonde za *in situ* hibridizacijo tudi pri drugih vrstah. Z začetniki, ki so sidrani na ohranjenih zapisih 18S in 28S rRNA genov tako relativno lahko pomnožimo odsek, ki nosi zapis obeh ITS regiji kot tudi 5,8S rRNA.



Slika 1: Shematski prikaz genskega zapisa za rDNA. Zapis sestavlja NTS regija (nontranscribed spacer), dve ETS regiji (external transcribed spacer), dve ITS regiji (internal transcribed spacer) in geni za 18S rRNA, 5,8S rRNA in 28S rRNA.

Figure 1: Genetic region for rDNA. The region is built of NTS region (nontranscribed spacer), two ETS regions (external transcribed spacer), two ITS regions (internal transcribed spacer) and genes for 18S rRNA, 5,8S rRNA and 28S rRNA.



Slika 2: Genomska DNA izolirana iz posameznih vrst grenkega čaja. Žepki 1 *C. erythraea* (*C. tenuiflorum*); 2 *A. millefolium*; 3 *M. trifoliata*; 4 *G. lutea*; 5 *M. piperita*; 6 označevalec velikosti.

Figure 2: Genomic DNA isolated from individual herbal drugs in bitter tea. Lane 1 *C. erythraea* (*C. tenuiflorum*); 2 *A. millefolium*; 3 *M. trifoliata*; 4 *G. lutea*; 5 *M. piperita*; 6 molecular weight marker.

Odseke je možno pomnožiti tudi iz herbarijskih primerkov, v primerih, ko je DNA še v zadostni meri ohranjena. Poleg tega sta zapisa ITS regiji tudi nekodirajoča in sta se tekom evolucije spreminjala v takšni smeri, da je z določevanjem njihovega nukleotidnega zaporedja možno ločiti posamezno vrsto (4, 5).

V pričujočem članku smo ugotavljali možnosti uporabe restrikcijske analize za kvalitativno analizo sestave rastlinskih pripravkov. Analizirali smo sestavo dveh različnih čajnih mešanic, ki vsebujeta naslednje droge: Centaurii herba, Gentianae radix, Menthae piperitae folium, Millefolii herba, Menyanthidis trifoliatae folium ter Cardui mariae fructus, Taraxaci radix, Menthae piperitae folium in Carvi fructus. Z verižno reakcijo s polimerazo smo pomnožili izbrani odsek rDNA, mu določili nukleotidno zaporedje in ga nato razrezali z uporabo kombinacije restrikcijskih endonukleaz (*BsmBI*, *McsI*, *HaellI*, *XhoI* in *BsmI*, *NaeI*, *HincII*). Fragmente smo z uporabo gelske elektroforeze, ločili po velikosti in dobili profil, značilen za posamezno čajno mešanico. Ugotovili smo, da z dano metodo lahko potrdimo istovetnost rastlinskih vrst, prav tako pa tudi ločimo vrste v kompleksnih rastlinskih pripravkih, kot so čajne mešanice.

2 Materiali in metode

2.1 Čaji in posamezne droge

Grenki čaj sestavljen iz zeli tavžentrože (Centaurii herba), zeli rmana (Millefolii herba), korenine rumenega svišča (Gentianae radix), listov navadnega mrzličnika (Menyanthidis trifoliatae folium) in listov poprove mete (Menthae piperitae folium) ter čaj s pegastim badljem, ki je sestavljen iz plodu pegastega badlja (Cardui mariae fructus), korenine regrata (Taraxaci radix), plodu navadne kumine (Carvi fructus) in listov poprove mete (Menthae piperitae folium), kot tudi

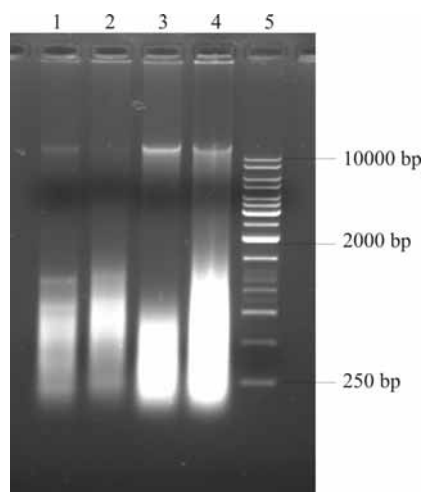
posamezne droge iz rastlinskih vrst navadne tavžentrože (*Centaureum erythraea* L.), navadnega rmana (*Achillea millefolium* L.), rumenega svišča (*Gentiana lutea* L.), navadnega mrzličnika (*Menyanthes trifoliata* L.), poprove mete (*Mentha x piperita* L.), pegastega badlja (*Silybum marianum* L.), navadnega regrata (*Taraxacum officinale* Weber) in navadne kumine (*Carum carvi* L.) smo pridobili na prostem trgu. Evidenčni vzorci so shranjeni na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo, Katedri za farmacevtsko biologijo.

2.2 Izolacija DNA

50-100 mg čaja ali posamezne droge smo zmleli v fin prah in izolirali DNA s pomočjo DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Nemčija) po proizvajalčevem protokolu. Kvaliteto in integriteto DNA smo potrdili z 0,8 % agarozno gelsko elektroforezo, 1h na 70 V in jo detektirali z etidijevim bromidom pod UV-lučjo (294 nm).

2.3 Pomnožitev ITS regij in določitev nukleotidnega zaporedja

ITS regije smo pomnožili v 25 µL reakcijskih raztopinah, ki so vsebovale 20 – 50 ng matrične DNA, 10 pmol posameznega začetnika in 12,5 µL PCR-Master Mix (Promega, USA). Začetnika ITS_F (5' AGAAAGTCGTAACAAGGTTCCGTAG 3') in ITS_R (5' TTTTCCTCCGCTCATTGATATGCTT 3') smo osnovali na podlagi nukleotidnih zaporedij 18S oziroma 28S genov rRNA navadnega repnjakovca. Pomnoževanje smo izvedli v Primus 96 Plus Cyclo (MWG Biotech, Germany), po programu: predenaturacija 1 min na 96°C; 35 ciklov 0,5 min na 96 °C, 0,5 min na 55 °C in 0,5 min na 72 °C; sledil je cikel 1 min elongacije na 72 °C. Fragmente smo subklonirali v pGEM T Easy Vector in jim določili nukleotidno zaporedje s pomočjo univerzalnih začetnikov prilegajočih na SP6 oziroma T7 promotor. Uporaba obeh začetnikov je omogočila potrditev zaporedja iz obeh smeri. Dobljena zaporedja smo potrdili z



Slika 3: Genomska DNA izolirana iz posameznih vrst čaja s pegastim badljem. Žepci 1 *S. marianum*; 2 *T. officinale*; 3 *C. carvi*; 4 *M. piperita*, 5 označevalec velikosti.

Figure 3: Genomic DNA isolated from individual herbal drugs in tea with milk thistle. Lane 1 *S. marianum*; 2 *T. officinale*; 3 *C. carvi*; 4 *M. piperita*, 5 molecular weight marker.

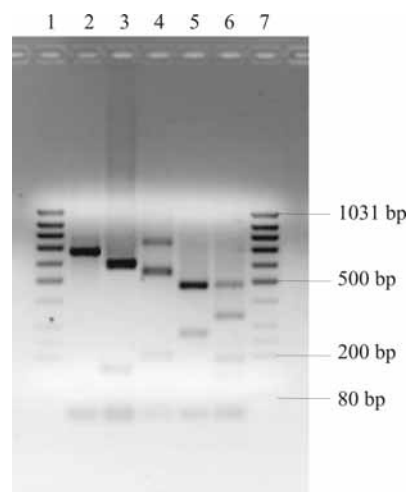
uporabo BLAST protokola na National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

2.4 Restriksijska analiza

Ustrezne restriksijske endonukleaze smo izbrali s pomočjo določenih nukleotidnih zaporedij z uporabo WebCutter programa (WebCutter 2.0, <http://www.firstmarket.com/cutter/cut2.html>). Glede na restriksijske karte smo izbrali *BsmBI*, *MscI*, *HaeII*, in *XhoI* (New England BioLabs, England) za grenki čaj ter *BsmI*, *HincII* in *NaeI* (New England BioLabs, England) za čaj s pegastim badljem. Ustreznost kandidatnih restriksijskih endonukleaz smo preverili z restrikcijo posameznih drog (slika 4, 6). Restrikcijo smo izvedli v *NebBuffer IV* pufru za grenki čaj in *NebBuffer II* pufru za čaj s pegastim badljem. Za restrikcijo 100 do 1000 ng DNA smo uporabili 3 enote posamezne restriksijske endonukleaze ter temperaturo po proizvajalčevem protokolu. Restrikcijo smo izvajali eno uro. V primeru restriksijske analize DNA izolirane in pomnožene iz čajne mešanice pa smo restrikcijo najprej izvajali dve uri z endonukleazami z nižjim temperaturnim optimumom, nato pa še dve uri z endonukleazami, ki so zahtevale višjo temperaturo. Restriksijske fragmente smo ločili s pomočjo 2 % agarozne gelske elektroforeze 1h na 100 V in jih detektirali z uporabo etidijevega bromida pod UV lučjo (294 nm).

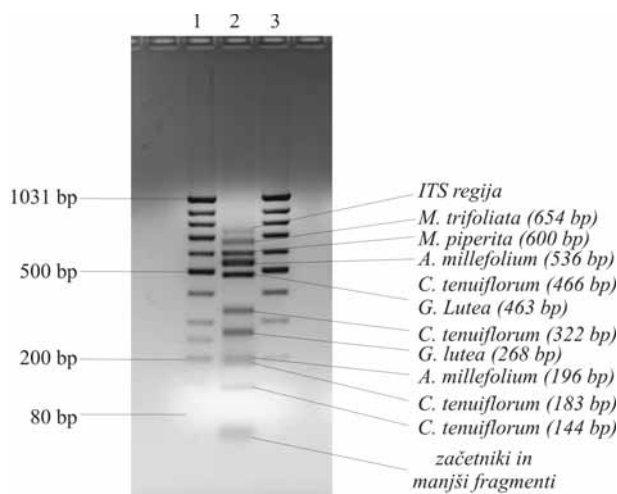
3 Rezultati in razprava

DNA smo izolirali iz obeh čajnih mešanic kot tudi posameznih drog. Kljub temu, da smo DNA izolirali, pa je bila ta relativno zelo razgrajena (slika 2, 3). Vzroke razgrajenosti lahko iščemo predvsem zaradi procesiranja drog. Visoke temperature v procesu sušenja in različni



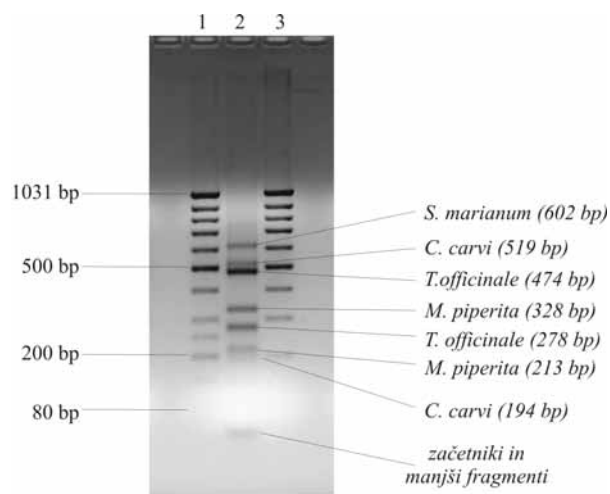
Slika 4: Restriksijska analiza posameznih drog v čajni mešanici grenkega čaja. Žepci 1 označevalec velikosti; 2 *M. trifoliata* (*XhoI*); 3 *M. piperita* (*BsmBI*); 4 *A. millefolium* (*MscI*); 5 *G. lutea* (*HaeII*); 6 *C. erythraea* (*C. tenuiflorum*) (*HaeII* in *XhoI*); 7 označevalec velikosti.

Figure 4: Restriction analysis of individual herbal drug in bitter tea. Lane 1 molecular weight marker; 2 *M. trifoliata* (*XhoI*); 3 *M. piperita* (*BsmBI*); 4 *A. millefolium* (*MscI*); 5 *G. lutea* (*HaeII*); 6 *C. erythraea* (*C. tenuiflorum*) (*HaeII* and *XhoI*); 7 molecular weight marker.



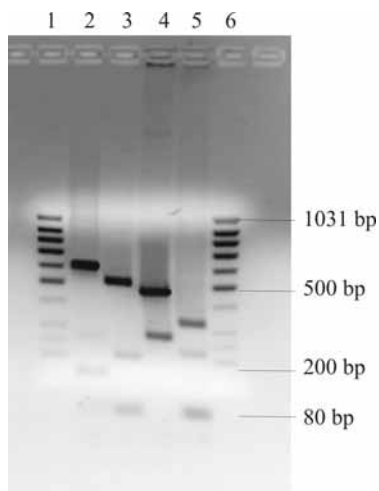
Slika 5: Restriksijska analiza grenkega čaja. Žepček 1 označevalec velikosti; 2 grenki čaj (*BsmBI*, *MscI*, *HaeIII* in *XhoI*); 3 označevalec velikosti.

Figure 5: Restriction analysis of bitter tea. Lane 1 molecular weight marker; 2 bitter tea (*BsmBI*, *MscI*, *HaeIII* and *XhoI*); 3 molecular weight marker.



Slika 7: Restriksijska analiza čaja s pegastim badljem. Žepček 1 označevalec velikosti; 2 čaj s pegastim badljem (*BsmI*, *NaeI* in *HincII*); 3 označevalec velikosti.

Figure 7: Restriction analysis of tea with milk thistle. Lane 1 molecular weight marker; 2 tea with milk thistle (*BsmI*, *NaeI* and *HincII*); 3 molecular weight marker.



Slika 6: Restriksijska analiza posameznih drog v čajni mešanici čaja s pegastim badljem. Žepček 1 označevalec velikosti; 2 *S. marianum* (*HincII*); 3 *C. carvi* (*BsmI*); 4 *T. officinale* (*BsmI*); 5 *M. piperita* (*BsmI* in *NaeI*); 6 označevalec velikosti.

Figure 6: Restriction analysis of individual herbal drug in tea with milk thistle. Lane 1 molecular weight marker; 2 *S. marianum* (*HincII*); 3 *C. carvi* (*BsmI*); 4 *T. officinale* (*BsmI*); 5 *M. piperita* (*BsmI* and *NaeI*); 6 molecular weight marker.

pogoji shranjevanja imajo za posledico razpad in razgradnjo celic, jeder in genske DNA. Prav tako smo pri pomnoževanju morali znižati koncentracijo matrične DNA na 1,5 ng/μL ali manj (6) in na ta način zmanjšati zaviralne učinke polifenolov, polisaharidov in drugih sekundarnih metabolitov, ki so v drogah prisotni v zelo visokih koncentracijah. Glede na podatke drugih študij se po lizi celic

polifenoli in polisaharidi zelo močno vežejo na DNA in poleg njene razgradnje (7) povzročijo tudi zaviranje polimeraze, s čimer je moteno pomnoževanje DNA oziroma druge encimske reakcije, nadaljnje analize izolirane DNA (8).

Nukleotidna zaporedja ITS regij rumenega svišča, navadnega rmana, pegastega badlja, navadnega regrata, navadne kumine in poprove mete so se visoko ujemale z zaporedij iz GeneBank podatkovne zbirke. Nukleotidno zaporedje tavžentrože pa se je ujemale z drugo vrsto in sicer ozkolistno tavžentrožo (*Centaureum tenuiflorum*), kar je potrdil tudi podrobnejši pregled morfoloških značilnosti droge. Glede na literaturne podatke so potvorbe tavžentrože sicer zelo redke, navadno z *Centaureum pulchellum* ali z nekaterimi podvrstami *Centaureum erythraea* subsp. *majus* Zeltner (2). Možna pa je tudi njihova zamenjava, še posebno, če so rastline mlade ali nizke rasti. Länger tako predlaga, da naj bi bile za farmakopejsko drogo Centaurii herba primerne vse vrste rodu *Centaureum*, ki imajo zadostno stopnjo grenkobe (ne manj kot 2000), saj do sedaj še ni bilo zabeleženih nobenih neželenih učinkov, ki bi bili posledica zamenjave drog (2). Podatkovno zbirko GeneBank smo tudi dopolnili s celotnim ITS zaporedjem za navadni mrzličnik (GeneBank accession number DQ276850).

Pred restriksijskim kartiranjem smo dobljena zaporedja tudi primerjali z zaporedji pridobljenimi za posamezno vrsto iz podatkovne zbirke GeneBank, kajti v določenih primerih se lahko zgodi, da pride do določenih odstopanj znotraj vrste (9, 10). Variacije smo označili in izbrali restriksijske endonukleaze na mestih, ki so se ujemale. Glede na izbrane endonukleaze smo izbrali tudi restriksijski pufer in pogoje restrikcije. Pri uporabi večjega števila restriksijskih endonukleaz le redko lahko zadostimo optimalno delovanje vseh encimov. V primeru grenkega čaja smo izbrali *NebBuffer IV*, kjer imajo vsi encimi 100 % aktivnost, vendar ne pri enaki temperaturi inkubacije, saj *BsmBI* zahteva, kar 18 °C višjo temperaturo kot ostali encimi. V primeru čaja

s pegastim badljem pa *NebBuffer II*, kjer imata *BsmI* in *HincII* 100 % aktivnost, *Nael* pa 75 %, poleg tega zahteva *BsmI* 28 °C višjo temperaturo. Kljub številnim poskusom, nam tako v popolnosti vseh ITS regij v grenkem čaju ni uspelo povsem razrezati, vendar pa samo dejstvo ne vpliva na končni rezultat analize. Restriksijska analiza posameznih drog grenkega čaja je potrdila vse pričakovane fragmente (slika 4). Pri restrikciji navadnega mrzličnika je opazen fragment, ki ustreza celotni ITS regiji z velikostjo 758 bp, fragment z velikostjo 645 bp in fragment z velikostjo 104 bp; fragmenta poprove mete sta po svoji velikosti enaka 600 bp in 132 bp; fragmenta navadnega rmana 536 bp in 196 bp, na sliki pa je moč opaziti tudi liso, ki ustreza celotni ITS regiji 742 bp; na sliki sta vidna fragmenta rumenega svišča 268 in 463 bp; fragment tavžentrože 466 bp je prisoten zaradi nepopolne cepitve na področju ITS2 regije med fragmentom 322 bp in 144 bp, poleg omenjene lise pa so opazni tudi fragmenti 322 bp, 183 bp, 144 bp, ostali pričakovani fragmenti z velikostjo 49 bp, 19 bp in 15 bp se najverjetneje nahajajo skupaj s preostanki začetnikov in morebitnimi dimeri začetnikov. Preostanki začetnikov so vidni tudi pri vseh ostalih vrstah, kot lise z najmanjšo velikostjo. Omenjeni fragmenti so dobro vidni tudi na sliki restriksijske analize čajne mešanice grenkega čaja z izjemo fragmentov 132 bp, ki pripada poprovi meti in fragmentu 104 bp, ki pripada navadnemu mrzličniku, zaradi preintenzivne lise nanašalnega barvila (slika 5). Prav tako je tudi restriksijska analiza posameznih drog čaja s pegastim badljem potrdila vse pričakovane fragmente (slika 6). Pri restrikciji pegastega badlja sta vidna fragmenta z velikostjo 602 bp in 142 bp; fragmenta navadne kumine 519 bp in 194 bp; fragmenta navadnega regrata 474 bp in 278 bp; fragmenti poprove mete 328 bp, 213 bp in 137 bp, podobno kot pri tavžentroži pa se fragment 54 bp najverjetneje nahaja skupaj z presežnimi začetniki, ki jih je moč opaziti tudi pri navadni kumini. Tudi pri restriksijski analizi čajne mešanice čaja s pegastim badljem smo potrdili vse zgoraj omenjene lise (slika 7). Enako kot pri grenkem čaju, pa zaradi preintenzivne lise nanašalnega barvila ni moč opaziti dveh fragmentov in sicer, 142 bp velikega fragmenta pegastega badlja in 137 bp velikega fragmenta poprove mete.

4 Sklep

Na osnovi naše študije lahko sklepamo, da je restriksijska analiza relativno hitra, kvalitativna metoda, vendar pa smo ugotovili, da je za izdelavo profila potrebno zagotoviti precejšno količino DNA, da je s tem omogočena vizualizacija vseh fragmentov ter predhodnje

določanje nukleotidnega zaporedja posamezne komponente v mešanici, še posebej v primerih, ko je možna lahka potvorba ali pa zamenjava drog. Kljub temu pa je vseeno potrebno izpostaviti dejstvo, da smo razvili metodo, ki omogoča identifikacijo posamezne vrste na nivoju njihovih molekularskih lastnosti v dveh kompleksnih mešanicah zdravilnih čajev in še enkrat potrdili uporabnost ITS regij kot molekularnega orodja za potrjevanje istovetnosti vrst.

5 Literatura

1. Fisher P in Ward A. Complementary medicine in Europe. *BMJ* 1994; 309:107-111.
2. Bisset NG, Wichtl M. General part. In: Bisset NG, Wichtl M (eds), 2nd Edition. *Herbal Dugs and Phytopharmaceuticals, a Handbook for Practice on a Scientific Basis with References to German Commission E Monographs*, Medpharm Stuttgart, (2001): 11-40.
3. Wills RBH, Bone K, Morgan M. Herbal products: active constituents, modes of action and quality control. *Nutr Res Rev* 2000; 13: 47-77.
4. Baldwin BG, Sanderson MJ, Porter JM, Wojciechowski MF, Campbell CS, Donoghue MJ. The ITS Region of Nuclear Ribosomal DNA - a Valuable Source of Evidence On Angiosperm Phylogeny. *Ann Mo Bot Gard* 1995; 82: 247-277.
5. Jackson RB, Moore LA, Hoffmann WA, Pockman WT, Linder CR. Ecosystem rooting depth determined with caves and DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11387-11392.
6. Slanc P, Ravnikar M, Štrukelj B. Identification of individual herbal drugs in tea mixtures using restriction analysis of ITS DNA and real-time PCR. *Pharmazie* in press.
7. John ME. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenols. *Nuc Acids Res* 1992; 20: 2381.
8. Pirttilä AM, Hirsikorpi M, Kämäräinen T, Jaakola L, Hohtola A. DAN isolation methods for medicinal and aromatic plants. *Plant Mol Biol Reporter* 2001; 19: 273a-f.
9. Campbell CS, Wojciechowski MF, Baldwin BG, Alice LA, Donoghue MJ. Persistent nuclear ribosomal DNA sequence polymorphism in the *Amelanchier* agamic complex (Rosaceae). *Mol Biol Evol* 1997; 14: 81-90.
10. Kita Y, Ito M. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Aconitum* subgenus *Aconitum* (Ranunculaceae), with special reference to extensive polymorphism in individual plants. *Plant System Evol* 2000; 225: 1-13.