

行政院衛生署及所屬機關出國報告  
(出國類別：其它)

赴美國參加  
「2004年天然物研究國際研討會」

服務機關：行政院衛生署藥物食品檢驗局  
出國人 職稱：薦任技士  
姓名：徐雅慧  
出國地區：美國  
出國期間：2004年7月30至8月6日  
報告日期：2004年11月2日

Jo/  
CO9304115

系統識別號:C09304115

公務出國報告提要

頁數: 16 含附件: 否

報告名稱:

赴美國參加[2004年天然物研究國際研討會]

主辦機關:

行政院衛生署藥物食品檢驗局

聯絡人/電話:

陳婉麗/02-26531300

出國人員:

徐雅慧 行政院衛生署藥物食品檢驗局 第三組 技士

出國類別: 其他

出國地區: 美國

出國期間: 民國 93 年 07 月 30 日 - 民國 93 年 08 月 06 日

報告日期: 民國 93 年 11 月 02 日

分類號/目: J0/綜合(醫藥類) J0/綜合(醫藥類)

關鍵詞: 天然物研究國際研討會,美國,中草藥

內容摘要: 「2004 天然物研究國際研討會 (International Congress on Nature Product Research)」是由美國生藥學會、法國生藥研究組織、藥用植物研究學會及歐洲植物化學學會聯合舉辦，為了解歐美各國生藥學之檢驗研究現況與方向，提升本局中草藥檢驗之水準，並發表本組之研究成果「應用液相層析串聯式質譜儀分析細辛藥材中馬兜鈴酸之含量」，而參加該研討會。本次研討會參與人員近千人，專題演講 33 篇，口頭報告論文 49 篇，壁報論文 591 篇。參加研討會後，除瞭解到各國對中草藥研究之重視與研究多樣性外，另國際間對於中草藥之規劃與管理，也可供本局參考，使國內中藥之管理更為完善。

本文電子檔已上傳至出國報告資訊網

## 摘 要

「2004 天然物研究國際研討會 (International Congress on Nature Product Research)」是由美國生藥學會 (American Society of Pharmacognosy ; ASP)、法國生藥研究組織 (Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie ; AFERP)、藥用植物研究學會 (Society for Medicinal Plant Research; GA)及歐洲植物化學學會 (Phytochemical Society of Europe ; PSE) 聯合舉辦，為了解歐美各國生藥學之檢驗研究現況與方向，提升本局中草藥檢驗之水準，並發表研究成果「應用液相層析串聯式質譜儀分析細辛藥材中馬兜鈴酸之含量」，本局特派職參加該研討會，以期從中獲得相關新知與技術。本次研討會參與人員近千人，專題演講 33 篇，口頭報告論文 49 篇，壁報論文 591 篇。參加這次研討會除瞭解到各國對中草藥研究之重視與研究多樣性外，另國際間對於中草藥之規劃與管理，也可供本局參考，使國內中藥之管理更為完善。

# 目 次

目 的.....	1
天然物研究國際研討會內容	
一、會程簡介.....	2
二、內容摘要.....	3
三、與三組業務相關之壁報論文.....	8
心 得.....	14
建 議.....	16
附 錄	
「應用液相層析串聯式質譜儀分析細辛藥材中馬兜鈴酸之含量」壁報 論文.....	17

## 目 的

一年一度在美國所舉行之美國生藥學會年度會議，今年特別結合歐洲之中草藥相關學會，擴大舉行「2004 年天然物研究國際研討會 (International Congress on Nature Product Research)」。此消息去年即公布於美國生藥學會網站，本局三組從事中藥之檢驗與管理，對於國際間中藥資訊非常注意，故希望能藉由參與國際性會議，取得最新中草藥訊息，並了解國際間各國生藥學之檢驗研究現況與方向，於是去年即積極規劃參加該研討會，以期了解美國與歐洲國家之中草藥相關訊息，並提升中草藥檢驗之水準。此外，三組今年初即規劃「應用液相層析串聯式質譜儀分析細辛藥材中馬兜鈴酸之含量」研究計畫之執行，以期將研究成果發表於該研討會，俾讓國外了解本局之檢驗能力，並進行學術、技術之交流。

「2004 年天然物研究國際研討會」是由美國生藥學會 (American Society of Pharmacognosy ; ASP)、法國生藥研究組織 (Association Francophone pour l'Enseignement et la Recherche en Pharmacognosie ; AFERP)、藥用植物研究學會 (Society for Medicinal Plant Research ; GA) 及歐洲植物化學學會 (Phytochemical Society of Europe ; PSE) 聯合舉辦，此次假美國亞歷桑那州鳳凰城舉行，可說是北美洲、歐洲國家共同參與的大型研討會。今年的議題特別著重傳統生藥學，並欲提升已漸式微之傳統生藥學，因此會程中特別規劃「生藥學專題討論會」，邀請多位學者作系統性之演講，本組希望能藉由參與此會議，從中獲得生藥學之相關新知，並冀從中學習新的技術及觀念。另外尚有生合成、中草藥、沙漠與海洋植物之研討會，皆是與中草藥相關之研究。藉由會程之參與，得以瞭解中草藥研究之廣泛與多樣性，並從中得知目前中草藥研究之趨勢。

## 天然物研究國際研討會內容

「2004 天然物研究國際研討會」舉辦期間為 2004 年 7 月 31 日至 8 月 4 日，為期 5 天，假美國亞歷桑那州鳳凰城 Westin Kierland Resort & Spa 之會議廳舉辦。參與學者涵蓋歐、美各國人士，參加人員近千人，會期間總共發表專題演講 33 篇，口頭報告論文 49 篇，壁報論文 591 篇。

### 一、會程簡介

#### 7 月 31 日－傳統生藥學討論會

傳統生藥學討論會，內容涵蓋廣泛，包含生藥學之歷史、現況、技術、生藥之品質管制、產品研發與臨床試驗。共邀請 12 位學者針對上述議題專題演講。

#### 8 月 1 日－Structure-based biosynthesis symposium 與論文報告

上午安排 4 場與生合成相關之演講，下午則安排口頭報告論文與壁報論文。口頭報告論文分為三個主題同時進行，分別為生合成、中藥製劑與天然物之生物活性共 21 篇。壁報論文之主題為「Analysis and herbal drug / Nutraceuticals」共 187 篇，內容包含中草藥之藥理活性、鑑別與成分分析等。本組參與之壁報論文「應用液相層析串聯式質譜儀分析細辛藥材中馬兜鈴酸之含量」亦於當日張貼，並與會場之各國人員共同分享與交流。

#### 8 月 2 日－Herbal symposium 與壁報論文

當天安排了 6 場演講，內容包括歐盟生藥製劑現今狀態、生藥與藥品交互作用、臨床試驗與植物性賀爾蒙等等。壁報論文之發表則分為上、下午兩梯次，其主題分別為

「 Biotechnology, Biosynthesis, Biological assays, Phytochemistry and Pharmacology 」等主題所張貼之壁報共 193 篇與「 Synthesis, Isolation and Structure elucidation 」等主題所張貼之壁報共 210 篇。

8 月 3 日 – Sand and sea symposium

當天安排 5 場演講，內容包含地中海沙漠植物化學、墨西哥藥用沙漠植物、海洋天然物之應用、研發藥用海洋生物之重要性等等。

8 月 4 日 – 口頭報告論文

口頭報告論文分為三個主題同時進行，分別為海洋生物/細菌之分離與合成、生物技術與天然物篩選與其他類共 27 篇。

## 二、內容摘要

### 1. 傳統生藥學之重要性

生藥學 (pharmacognosy) 是由 pharmakon (藥物) 與 gnosis (知識) 兩字合併而來。生藥學是藥學中的一門學問，主要是研究用於當作藥品之天然物，其中涵蓋植物、動物與礦物。因為早期藥品都是來自動、植、礦物三界，所以鑑定與評價其品質是很重要的，但隨著有機合成的發展，藥學課程也增加臨床課程，使得生藥學漸不受重視，甚至沒有生藥學這門課程。早期生藥學是指藥用品之外觀與解剖構造 (morphology and anatomy of drug) 之研究，爾後漸進到植物化學的研究。在過去研究中，從天然物中發現許多可用於治療疾病之藥物，如 opium alkaloids (morphine, codeine)，digitalis glycosides (digitoxin, digoxin)，steroidal sapogenins (diosgenin – 口服避孕藥來源和局部抗發炎物質)，vinca alkaloids (抗癌藥)，Taxol (治療乳癌) 和 Artemisinin (由

青蒿 *Artemisia annua* 而來；治療瘧疾)等。

隨著技術發展，藥理學、藥學、分子生物學、生物技術等紛紛應用於生藥學之研究，以期找出新的藥物，是以一些傳統生藥學技術反而漸被忽略，如顯微鏡學。顯微鏡學對於藥物之鑑別、純度、品質評估仍是相當有用之技術，Dr. Sabine Glasl 就針對顯微鏡學搭配薄層層析法 (TLC) 來說明傳統生藥學法仍舊是一項有價值的技術，如① 錦葵 *Malva sylvestris* 中摻偽曼陀羅 *Datura stramonium* 可以以顯微鏡學配合薄層層析法確定。② 車前草 *Plantaginis Herba* 中摻偽毛地黃 *Digitalis lanata* 葉可用薄層層析法檢測 aucubin 之分量。③ 當歸 *Angelica sinensis* 中摻偽圓葉當歸 *Levisticum officinale* 可用顯微鏡學來辨別，但薄層層析法無法區別；需用到 HPLC 檢測。④ 粉防己 *Stephania tetrandra* 中摻偽廣防己 *Aristolochia fangchi* 可用顯微鏡學、薄層層析法辨別，但因馬兜鈴酸之關係，通常都會用 HPLC/MS 確認。由上述眾多例子可知，有些藥品之鑑定使用顯微鏡學即可。

顯微鏡學可說是一種便宜、快速、可信賴的方法，且適用於未確知成分之生藥鑑別。但目前這方面之人才相當缺乏，一方面是因為較枯燥，且需要長時間累積經驗才會具相當能力，另一方面是學校的藥學課程相當多，生藥學就被忽略了，而造成具有傳統生藥學鑑別能力的人才短少。目前美國大學內生藥學的教師背景，以植物學家居多，生藥學者次之，藥學背景者最少，故建議各學校應加重生藥學之教育，並重視人才之培訓，才不致使研究生藥學之人才斷層！

## 2. 生藥學之復甦---現代生藥學



隨著對天然物有興趣的人增加，研究策略的改變，使得生藥學變成一種尋求新的有效成分、並探討其作用機制的科學，用於研發新藥或預防治療用之食品，稱之為現代生藥學 (modern pharmacognosy)。現代生藥學是多方性科學，包含植物學、植物化學、植物分析、藥學、分子生物學等之應用。Dr. Lars Bohlin 舉了以下例子，例如箭毒 (Arrow poisons)，先分離成分，再利用 bioassay 找出有效之生物鹼，接著利用生物合成方式合成所需之有效成分；或者利用 bioassay 方式篩選抗發炎物質，如 cox-2 抑制劑...等等。由目前發表論文的趨勢看來，bioassay 已漸漸占相當比例。

Dr. Hildebert Wagner 指出現代生藥學應致力於建立標準化之生藥製劑，並確保其有效性與安全性。也就是利用化學或分子生物學篩選有效的植物萃取物，並將萃取物標準化，以利臨床人員使用，進行毒理、安全性評估。他並舉了以下幾個臨床例子：① 評估 Hypericum extract (900mg) 抗憂鬱效果，對照組為 imipramine (75/150mg)。② Iberogast® 含有 9 種植物萃取物，目前已用於腸胃疾病。

另外，Dr. Hildebert Wagner 認為未來需要繼續努力之目標為①生藥製劑之標準化，如小青龍湯 Sho-Seiryu-to (TJ-19) 利用 3D HPLC fingerprint 來標準化產品。②藥物協調作用之探討，如 Gingolide A+B mixture 之協調作用。③新藥發展，如貓爪草 *Uncaria tomentosa* 可能用於癌症、抗發炎；蔓越莓 *Vaccinium macrocarpon* 可用於尿道感染；天竺葵 *Pelargonium sidoides* 用於慢性支氣管炎等。

### 3. 中草藥之品質管制

生藥之化學成分含量、比例與分佈情形均會受環境、採收、處理而影響，故每批生藥製劑產品應做好品質管制。一般生藥製劑產品最主要課題是安全(是否毒害物質，如馬兜鈴酸)、品質與有效(穩定、標準、質佳)。Dr. Ikhlas Khan 指出在品質方面，應要進行以下評估：①物理評估；如正確之基原(外觀、基因檢測)與使用部位。②定性定量；如分析有效成分或指標成分之含量。③污染物之檢測；如微生物、農藥殘留、化學物質等之檢測。④安定性試驗。⑤儲存。

Dr. Samuel W. Page 指出目前有超過 70 個國家使用中草藥，但不同國家之定義、名稱、用法皆有差異，為整合相關資料，World Health Organization (WHO) 出版了 WHO Traditional Medicine Strategy 2002-2004，為一技術性指導方針，以期確保中草藥安全、有效與品質。

另 Dr. Joesph. M. Betz 指出，若要確保中草藥之品質，分析方法之研發是很重要的。原料藥之成分含量會受產地、氣候、採收所影響，故中草藥成品之含量也會受到影響，是以良好之分析方法應是經過確效、多個實驗室測試過，證明該方法是準確、精密與穩定。美國 National Institutes of Health (NIH) 中，負責中草藥研究之單位是 National Center for Complementary and Alternative Medicine (NCCAM)，曾於 2003 年七月公布「Policy Announcement on the Quality of Natural Products」為中草藥品管之指導方針。文中提到中草藥產品應有①化學圖譜；如活性成分或指標成分圖譜。②污染源測試；如微生物、農藥、有毒物質、黴菌、藥品等。③體外試驗確認是易消化的。若產品要進一步進

行臨床試驗，則須注意下列事項：①來源植物之正確性，可提供正確植物名，產地、採收時間、藥用部位、採收或鑑定者。②含量測定；如活性成分或指標成分之測定。③確認產品從試驗開始到結束其品質是穩定的。④批次間之再現性，短期、長期之安定性。⑤污染源測試；如重金屬、有機或無機污染等。

#### 4. 臨床試驗

在美國，中草藥產品是屬於膳食補充品，但業者也可提出申請成為植物性藥品 (botanical drug)。兩者差異在膳食補充品只能宣稱維持身體健康，但植物性藥品卻可用於宣稱「治療、預防疾病或相關症狀」。中草藥產品若要成為植物性藥品，必須先申請「研究中新藥查驗登記 (investigational new drug application; IND)」，爾後經過臨床試驗確認其安全性、療效評估後，才進行新藥上市申請 (new drug application; NDA) 之流程，成為植物性藥品。Dr. Marilyn Barrett 指出若中草藥產品要進行臨床試驗，須詳述中草藥產品的特性，應包括植物名、使用部位、鑑定方法 (植物、化學)、產品製備過程、產品化學圖譜、劑型、投與方式，最好還有生體可用率。相關資料可參照他所著之「The Handbook of Clinically Tested Herbal Remedies」或 American Herbal Pharmacopoeia® 所出版之「American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium」。

「The Handbook of Clinically Tested Herbal Remedies」這本書共收集了 30 種草藥，10 個複方製劑，160 個市售產品，360 個臨床研究。本書另提供臨床研究所需之試驗，也包含中草藥基本資料，如規定、規格、特性、生體可用率、效用、安全性等等。

「American Herbal Pharmacopoeia and Therapeutic Compendium」目前已出版 18 種中草藥之著作，其內容詳述中草藥名字（生藥名、屬名、定義、俗名）、歷史、鑑別（植物外觀鑑別、巨觀特徵、微觀特徵）、來源與處理（採集、栽培、乾燥、處理、貯存、摻雜物、製備）、成分、分析方法（Spot test, TLC/HPTLC, HPLC）、療效（藥物動力學、藥效動力學、藥效、作用、功用、劑量）、安全性（副作用、注意事項、交互作用、致突變性、毒性、致癌性、懷孕與泌乳者注意事項、藥劑過量之反應）與國際間情形等。到 2004 年 5 月 7 日止，在美國約有 167 個 INDs 案件，但尚未有 1 個被核准之 NDA。

#### 5. 中草藥之農藥殘留

在中草藥農藥殘留量管制方面，「WHO monographs on selected medicinal plants」中明確規定 aldrin 與 dieldrin 不得超過 0.05 mg/kg。Dr. A.J. Vlietinck 指出歐洲國家對於中草藥之農藥殘留量尚未管制，目前先針對歐洲藥典公佈之方法與項目進行中草藥農藥殘留量之評估，再行訂定規格。2002 年版歐洲藥典內農藥殘留量管制之農藥主要為有機氯劑 (organochloride)、有機磷劑 (organophosphorus) 與除蟲菊酯 (pyrethroid) 三大類，共計 34 種品項。

### 三、與三組業務相關之壁報論文

#### 1. 中藥指紋圖譜

\* GC/MS fingerprint profiling of *Iostephane heterophylla* roots and quantitative analysis of xanthorrhizol in an alcoholic extract. (Maria Isabel Aguilar et al.)

- \* Rapid and easy identification of the adulterant *Illicium anisatum* L. (白花八角) in the power of *I. verum* Hook. F. (八角茴香) (Srinivas V. Pullela et al.)
- \* Characterization of Radix Astragali (黃耆) by LC/APCI/MS. (Chun-Tao Che et al.)
- \* Marker profiling of triphala—an Ayurvedic formulation used in Indian system of medicine. (Sujay Rai et al.)
- \* Qualitative and quantitative evaluation of citrus bioflavonoids in citrus fruit and extracts used as nutraceuticals. (Amitabh Chandra et al.)
- \* HPLC Chromatographic fingerprint of ASHMI, a Chinese herbal formular against allergy asthma. (Xiu-Min Li et al.)

## 2.顯微鏡學之組織鑑別

- \* Microscopic differentiation between *Aristolochia* species and *Akebia trifoliata* (白木通), *Clematis armandii* (川木通), *C. chinensis* (威靈仙) and *Stephania tetrandra* (粉防己) (Reinhard Laenger et al.)
- \* Authentication of *Stephania tetrandra* S. Moor (粉防己) and its toxic adulterant *Aristolochia fangchi* Wu. (廣防己) using microscopy. (Vaishali C. Joshi et al.)
- \* Macroscopic and microscopic authentication of *Illicium verum* Hook. F. (八角茴香) and its adulterant *Illicium anisatum* L. (白花八角) (Vaishali C. Joshi et al.)
- \* Authentication of *Ephedra* species (麻黃屬) from old world and new world. (Vaishali C. Joshi et al.)

## 3.DNA 鑑定基原

- \* Sequence analysis of nuclear ribosomal ITS to develop molecular markers for a herbal medicine, Dang Gui (當歸) (Ho-Young Choi et al.)
- \* Characterization of medicinal Zingibraceae (薑科) using ISSR. (David R. Gang et al.)
- \* Molecular differentiation of *Astragalus radix* (黃耆) sequence characterized amplified region analysis. (T.-H. Annie Liu et al.)
- \* The use of polymerase chain reaction (PCR) for the identification of *Ephedra* (麻黃) in dietary supplements. (Natascha Techen et al.)
- \* Phylogenetic relationships in *Pimpinella* (茴香屬) (Umbelliferae) based on essential oil analysis and nuclear and chloroplast sequence. (Ikhlas A. Khan et al.)
- \* Molecular authentication of the herb *Radix Stemonae* (百部). (Ka-Yee Law et al.)
- \* Molecular and chemical authentication of *Saussurea lappa* Clark (廣木香), an endangered Chinese medicinal material. (P.C. Shaw et al.)

#### 4. 馬兜鈴酸相關研究

##### 4-1. 定量分析

- \* Qualitative determination of aristolochic acids in *Aristolochia* plants and in commercial products by HPLC-UV-ESI/MS methods (Feng Wei et al.)

方法：HPLC-UV-ESI/MS

指標成分：Aristolochic acid A, Aristolochic acid B,

Aristolochic acid C, Aristolochic acid D,  
7-OH Aristolochic acid A, Aristolic acid.

檢體：廣防己、青木香、關木通、馬兜鈴、天仙藤、細辛  
及相關製劑

結果：藥材方面，廣防己、青木香、天仙藤均含此 6 種  
指標成分。關木通與馬兜鈴不含 Aristolic acid，其  
餘 5 種均有。細辛僅含馬兜鈴酸 A。

\* Where is aristolochic acid in herbal products ? (Steven  
Dentali et al.)

方法：HPLC (AA-I  $LOD = 0.08\text{mg/mL}$ , AA-II  $LOD =$   
 $0.10\text{mg/mL}$ ), HPTLC

指標成分：Aristolochic acid I, Aristolochic acid II

檢體：市售製劑

結果：32 件製劑中 5 件測出馬兜鈴酸。

\* Determination of aristolochic acid in Asari Herba by liquid  
chromatography / tandem mass spectrometry (Ya-Hui Hsu  
et al.)

方法：HPLC/MS/MS (AA-I  $LOD = 2\text{ng/mL}$ , AA-II  $LOD =$   
 $2.8\text{ng/mL}$ )

指標成分：Aristolochic acid I, Aristolochic acid II

檢體：細辛

結果：20 件細辛中，11 件為東北細辛，9 件為華細辛，  
均含有馬兜鈴酸 I。馬兜鈴酸 I 含量分布以葉最  
高，葉柄次之，根莖與根最低。根、根莖與葉水  
抽出物之馬兜鈴酸量，約為 70% 醇抽出物之四

分之一，葉柄水抽出物之馬兜鈴酸量，約為 70 % 醇抽出物之二分之一。

#### 4-2.顯微鏡學之組織鑑別

\* Microscopic differentiation between *Aristolochia* species and *Akebia trifoliata*, *Clematis armandii*, *C. chinensis* and *Stephania tetrandra* (Reinhard Laenger et al.)

方法：顯微鏡鏡檢

檢體：關木通、廣防己、白木通、川木通、威靈仙、粉防己

結果：關木通與廣防己組織中具有簇晶，可與其餘四種藥材做區分。

\* Authentication of *Stephania tetrandra* S. Moor and its toxic adulterant *Aristolochia fangchi* Wu. using microscopy. (Vaishali C. Joshi et al.)

方法：顯微鏡鏡檢

檢體：廣防己、粉防己

結果：廣防己組織中具有簇晶，藉此特徵區別。

#### 4-3.藥理

\* Herbal products from the internet : evaluation of nephrotoxicity and aristolochic acid content. (Premalatha Balachandran et al.)

方法：HPLC, nature red assay

指標成分：Aristolochic acid I, Aristolochic acid II

細胞株：LLC-PK1 cell line

檢體：市售製劑

結果：25 件市售品中，四分之一具細胞毒性 ( $IC_{50}=100$ )



$\mu\text{g/mL}$ )，其中 2 件含有馬兜鈴酸 I 與 II。超過 4 件以上檢體雖測出馬兜鈴酸，但卻不具細胞毒性。結果顯示馬兜鈴酸與細胞毒性不具相關性，可能是製劑中其它成分影響細胞存活。

\* Structure-activity relationships of aristolochic acid analogues. Toxicity in culture renal tubular epithelial cells. (Premalatha Balachandran et al.)

方法：nature red assay, caspase 3-activity assay

指標成分：22 種由馬兜鈴科分離出來之馬兜鈴酸衍生物

細胞株：LLC-PK1 cell line

結果：馬兜鈴酸 I 毒性最強，依序為馬兜鈴酸 II、馬兜鈴酸 VIIIa、馬兜鈴酸 Ia，其餘不具細胞毒性。另馬兜鈴酸可能參預 caspase 而造成細胞凋亡。

## 心得

- 一、中草藥漸受到各國重視，相關研究增多，但會中學者指出傳統生藥學技術，漸受忽略，相較其他技術，有人才缺乏、斷層的情形，呼籲應注重生藥學人才培訓。除此之外，也提到研究者對於取得非本國產之中草藥標準藥材亦有困難。國外學者所遭遇之這些問題，同樣存在於國內研究中藥之學界。本局三組為解決這些困境，近年來致力於尋找各種管道收集標準藥材並整理之，充實藥材標本，使得標本室之藥材漸趨完備；另基原鑑定的工作也持續進行中，除利用傳統生藥學技術鑑定藥材外，也陸續建立 DNA 基原鑑定之技術，近一、二年來更將藥材鑑別研究成果集結成書，並舉辦藥材真偽鑑別研習會。此舉除希望提升中藥廠品管人員辨識中藥真、偽之能力，進而提高中藥之品質外，另一方面也希望藥材鑑別研究成果能供學者業界參考，並藉此喚起對生藥學之重視。
- 二、本次除參加會程外，還發表三組研究成果「應用液相層析串聯式質譜儀分析細辛藥材中馬兜鈴酸之含量」。馬兜鈴酸仍是中草藥界的熱門話題，在壁報論文中就有 6 篇探討與分析馬兜鈴酸，其中還是以本局的 LC/MS/MS 方法最為敏感。在觀看與會者之壁報論文後，瞭解到中草藥研究方向之多樣性，開闊了對中草藥研究之視野。但單就中草藥成分分析技術這方面，深覺本局已具備相當水準。
- 三、目前歐美國家將中草藥歸於膳食補充品管理，但因體認到中草藥與食品的不同，為確保安全性，其規範日後將趨於嚴格。歐美國

家對於中草藥的管理，特別是會中提到中草藥品質管制方面之觀念，可供本局參考。中草藥之品質管制會程中提到很多，但均是概括性陳述。三組歷年來已持續進行中藥品質管制之相關研究，在物理性評估方面，如藥材基原、乾燥減重、醇抽提物、水抽提物、酸不溶性灰分等，已完成背景值評估並持續監控中；含量測定方面，對於有指標成分之中藥材成分分析，也有進行研究；至於漸受重視之中草藥污染物問題，今年正針對中藥材之重金屬與農藥殘留進行背景值評估。三組之研究導向均參考國際趨勢，以期研究結果能作為相關單位訂定規格之依據，又能符合國際需求。

四、很榮幸能代表藥物食品檢驗局第三組參加這國際研討會，在五天會程中，參與大會所安排之演講與壁報論文，所得受益匪淺。除看到國際間對中草藥之研究新知、期許、願景外，也深覺國內擁有悠久中藥歷史背景之優勢，更應好好運用、發揚。最後，在此感謝局長、組長、科長給予這次機會，並感謝三組同仁之通力配合，協以各項實驗之幫忙，使得研究計畫能順利推動並如期完成。在此僅對所有長官與同仁獻上深深感謝之意，並誠摯希望三組同仁皆能夠有機會參與此等國際盛事，學習新知，增進國際視野，俾使本國之中藥研究與管理能與國際世界接軌，為中藥學研究持續開創新知。

## 建 議

- 一、中藥產品若要發揮最大效用，最首要之根本就是中藥材基原必須正確。中藥材之基原鑑定工作要順利執行，取得對照用標準藥材為首要之務。三組之中藥標本室已收集許多藥材標本，然卻仍有遺珠之憾。台灣中藥材多從大陸進口，希望三組能持續並拓展取得道地藥材之管道，充實藥材標本。
- 二、品質管制方面，除例行物理性評估外，應儘速建立、研發中藥製劑的化學圖譜（如活性成分或指標成分），並輔導廠商標準化產品，藉此規範並提升中藥製劑的品質。在中藥材、製劑污染物評估方面，如農藥殘留、重金屬等，也應在評估後，提供相關單位訂定規範，以期符合國際標準。
- 三、誠摯希望局裏能提供更多機會，使同仁皆有機會參與中草藥相關之國際會議，使資訊得以交流，並增進國際視野，使我國中藥檢驗水準與管理能與國際接軌。

## Determination of aristolochic acid in Asari Herba by liquid chromatography / tandem mass spectrometry

Ya-Hui Hsu, Chi-Fang Lo, Ling Lai, Mu-Chuan Tseng, Shuo-Hung Hsiao and Jer-Huei Lin\*  
Bureau of Food and Drug Analysis, Department of Health, Executive Yuan,  
161-2 Kunyang St., Nangang, Taipei 115, Taiwan ( R.O.C. )

### Introduction

Aristolochic acid (AA) is a known nephrotoxin and potential carcinogen found in *Aristolochia* spp., *Bragantia* spp. and *Asarum* spp.. Products containing AA probably cause renal damage or renal failure. When Chinese herbs nephropathy was reported, *Aristolochia fangchi* Wu, *A. debilis* Sieb. et Zucc., *A. manshuriensis* Kom., *A. conferta* Bge. and their preparations had been prohibited in Taiwan. However, other herbs belong to Aristolochiaceae family may also contain AA. Asari herba is one of them and had been reported as contained trace aristolochic acid I.

Asari herba ("Xixin" in Chinese) is one of the most important crude drugs in Chinese herbal medicines. It contains such properties as antipyretic, anti-inflammatory and analgesic activities. Xixin could be used in Taiwan only when its manufacturing process followed the regulations: the used part must be roots and rhizomes; grind powder of Xixin cannot be added to product directly; only water extraction of Xixin can be used for medicinal purposes; finished product must be detected by HPLC/UV to ensure it free of AA before marketing; the HPLC/UV assay method for AA is based on The Japanese Pharmacopoeia (XIV).

Even though those preparations were under control, it was not clear whether the trace AA amount in the water extraction of roots and rhizomes were under HPLC/UV detected limitation. So far, the distribution of AA in whole plants has not been evaluated yet. Therefore, the present study was conducted to analyze the amount of AA by LC/MS/MS, which was more sensitive and accurate method that could evaluate the amount of AA in roots, rhizomes, petioles and leaves of Asari herba by 70% methanol and water extraction.

### Materials and Methods

#### Sample preparation

Twenty of Asari herba were randomly sampled and identified the botanical origin by microscopic exams. Each of them was subsequently divided into four parts, including roots, rhizomes, petioles and leaves (Figure 1).

The sample (2.5g) was extracted with 70% methanol or water thrice (40mL, 30mL, 30mL) by sonication for 20 min, respectively. Combined all extracts and evaporated the solvent to dryness. Then the residue was dissolved with 70% methanol containing 0.1 µg/mL Piromidic acid internal standard, 2.5mL for roots or rhizomes and 10mL for petioles or leaves, respectively.

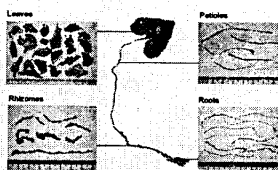


Figure 1 : Four parts of Asari herba

#### Calibration curve preparation

A mixture of AA-I (40%) and AA-II (56%), purchased from Sigma, was used as the standard. A series of eight standards with concentrations of AA-I of 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 and 5µg/mL ( with the corresponding concentration of AA-II being 0.014, 0.028, 0.07, 0.14, 0.7, 1.4, 2.8 and 7µg/mL) were prepared as calibration solutions, each containing 0.1 µg/mL Piromidic acid internal standard. The calibration curve was obtained from the plot of concentration versus peak area ratio of standard to internal standard.

#### HPLC/MS/MS condition

HPLC : Water 2690 Alliance LC & 996 PDA with an automatic liquid sampler and an injector system

Tandem mass spectrometer : Micromass Quattro Ultima LC/MS/MS

Data processing system: MassLynx NT Quattro Data Acquisition

Library for mass spectrum searching: NLF03/LM, a library created by Division 3 of BFDA

BAS Bee™ syringe pump: Bioanalytical system Inc.

#### HPLC condition

Column : Zorbax Extend – C18 ( 2.1 X 150mm, 5µm)

Mobile phase : CH<sub>3</sub>CN : 0.1% HCOOH (containing 0.1% NH<sub>4</sub>OAc) = 35 : 65

Flow rate : 0.3 ml/min

Photodiode array : 251 nm

Injection volume : 20 µL (split ratio : 1/1)

Running time : 25 min

#### MS/MS mode

Positive ion electrospray (ESI<sup>+</sup>) analysis was performed and multiple reaction monitoring (MRM) method was used for quantification. The conditions were shown in Table 1 and Table 2.

Table 1 : Parameters of daughter ion scan for aristolochic acids in the LC/MS/MS analysis

Parameter	AA-I	AA-II	Piromidic acid
Selection precursor ion (m/z)	359	329	289
Carrier flow (mL/min)	0.3	0.3	0.3
Capillary (kV)	3	3	3
Cone (V)	20	20	40
Collision (eV) : Argon	10	12	20
Source Temp (°C)	120	120	120
Desolvation Temp (°C)	350	350	350
Scan range (m/z)	200-400	200-400	200-400

#### Precision and accuracy tests

All calibration curves of AA-I were constructed prior to the experiments with correlation values of at least 0.9995. The intra- and inter-day assay for AA-I were assayed at 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2 and 5 µg/mL on the same day and on 6 sequential days, respectively. Accuracy (%Bias) =  $[(C_{\text{found}} - C_{\text{nominal}}) / C_{\text{nominal}}] \times 100$ .

#### Recovery tests

Three different amounts of AA-I were added to samples and prepared as described in sample preparation. Each spiked solution contains final concentrations of 0.2, 1, 2 µg/mL of AA-I.

## Results and Discussion

#### Identification of botanical origins of samples

The botanical origins of Asari herba are *Asarum heterotropoides* Fr. var. *mandshuricum* (Maxim) Kitag, *A. sieboldii* Miq. or *A. sieboldii* Miq. var. *seoulense* Nakai (Aristolochiaceae). Twenty samples of Asari herba were identified by pharmacognostical exams in this study. The result showed that 11 of them were *A. heterotropoides* Fr. var. *mandshuricum*, and the remainders were *A. sieboldii*.

#### Chromatograms of aristolochic acids

In this study, 0.1% ammonium acetate was added in the mobile phase to increase the ionization efficiency. High abundance  $[M+NH_4]^+$  ion fragment of AA-I at m/z 359 and AA-II at m/z 329 occurred in the mass 1 spectrum (Figure 2) and had been selected to precursor ion for the MS/MS analysis. The tandem mass spectra of the  $[M+NH_4]^+$  ions of AA-I and AA-II were shown in Figure 3. The  $[(M+NH_4)-NH_2-44]^+$  ions of AA-I at m/z 298 and AA-II at m/z 268 were used for quantification. The detection limit of AA-I and AA-II were 2.0 and 2.8 ng/mL, respectively.

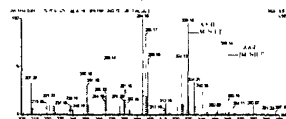


Figure 2: Mass 1 spectrum of a full mass scan from m/z 200 to 400, showing considerable  $[M+NH_4]^+$  ions of AA-I at m/z 359 and AA-II at m/z 329.

Table 2 Parameters of MRM set for quantitative analysis of aristolochic acids

Parameter Compounds	Precursor ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Dwell (sec)	Cone (vol)	Collision (eV)
AA-I	359	298	0.25	20	10
AA-II	329	268	0.25	20	12
Promidic acid	289	271	0.25	40	20

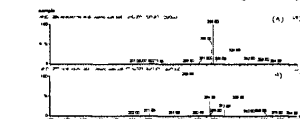


Figure 3: Tandem mass spectra of the  $[M+NH_4]^+$  ions of (A) AA-I and (B) AA-II. (Precursor ions at m/z 359 and 329, respectively). Distinctive peaks of de-carbon dioxide molecular ions of AA-I at m/z 298 and AA-II at m/z 268 were observed.

#### Precision, accuracy and recovery

The intra-day and inter-day precisions showed a coefficient of variation ranging from 0.27 to 20.57% and 0.20 to 19.03%, respectively. In addition, the bias ranging from -8.48 to 14.33% was obtained. The recoveries in different spiked dose ranged from 99 to 109%.

#### The amount of Aristolochic acid I in Asari herba

The LC/UV and MRM chromatograms of selected representative example were shown in Figure 4. AA was not determined in LC/UV but can be detected by LC/MS/MS. AA-II was not detected in samples and AA-I was further confirmed by NLF03LM library database. The amount of AA-I in each part of Asari herba were shown in Table 3.

Table 3: The amount of aristolochic acid I in each part of Asari Herba by 70% methanol and water extraction

Samples	Portion	Concentration (ppm)							
		Roots		Rhizomes		Petioles		Leaves	
		Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD	Range	Mean ± SD
<i>A. heterotropoides</i> Fr. var. <i>mandshuricum</i> (n=11)									
	70% methanol extract	0.82-2.90	1.36±0.78	0.41-4.89	2.14±1.51	2.34-18.41	7.59±4.40	8.01-63.78	18.23±14.23
	H <sub>2</sub> O extract	0.08-1.34	0.37±0.40	0.08-1.87	0.61±0.89	0.78-8.34	3.98±2.71	0.68-8.29	3.00±2.62
	H <sub>2</sub> O / 70% methanol		0.27		0.28		0.48		0.16
<i>A. sieboldii</i> (n=9)									
	70% methanol extract	0.48-1.70	1.07±0.40	0.19-3.87	1.21±1.07	1.89-14.08	8.08±3.81	11.10-89.78	38.01±32.04
	H <sub>2</sub> O extract	0.03-0.88	0.28±0.18	0.04-0.97	0.28±0.29	1.26-12.19	4.38±3.82	0.93-40.42	10.38±13.84
	H <sub>2</sub> O / 70% methanol		0.26		0.21		0.54		0.27
Total samples (n=20)									
	70% methanol extract	0.48-2.90	1.23±0.64	0.19-4.89	1.72±1.38	1.89-18.41	7.81±4.04	8.01-88.78	27.13±25.31
	H <sub>2</sub> O extract	0.03-1.34	0.33±0.32	0.04-1.87	0.48±0.50	0.78-12.19	3.98±3.09	0.68-40.42	8.32±9.75
	H <sub>2</sub> O / 70% methanol		0.27		0.28		0.51		0.23

## Conclusion

Asari herba contained AA-I but AA-II was not detected in those samples. Leaves contained higher amount of AA-I than roots and rhizomes had. Therefore, roots and rhizomes instead of the whole plants for medicinal usage indeed reduced the uptake of AA.

Furthermore, most of Chinese herbal preparations were prepared by water extraction in Taiwan. We predict that AA-I existed in herbal preparations containing Asari herba may be much less than 0.5ppm when manufacturing process followed the regulations. The amount of AA in Chinese herbal preparations containing Asari herba is under investigation.

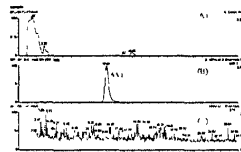


Figure 4: Chromatograms of sample. (A) LC-UV chromatogram. (B) MRM chromatogram of AA-I (m/z: 359>298) (C) MRM chromatogram of AA-II (m/z: 329>268)