

中國醫藥大學中國藥學研究所藥學碩士論文

組別：植物化學組 編號：ICPS-M307

指導教授：張永勳 教授

論文題目

應用液相層析串聯式質譜鑑定中藥製劑
中防己類藥材之研究

**Application of LC/MS/MS on the identification of the Fangchi
species in Traditional Chinese Medicines**

研究生：曾木全

中國醫藥大學中國藥學研究所
中華民國 95 年 5 月 27 日

謝 誌

本論文承蒙張憲昌博士協助新鮮採集木防己原植物藥材，以及提供文中各標準藥材之鑑定，使實驗得以順利進行，在此致十二萬分之謝意。

本論文亦承蒙所長張永勳博士之指導，提供真正對中藥學術界有意義之研究題目，以所長認知過去市場上所用之防己大多數為廣防己，反而粉防己較為少用，因此廣防己在市場上一定有龐大的囤貨，當衛生主管機關作出禁用廣防己之決定時，未見有廠商退運或申請銷毀，則原本龐大廣防己藥材的囤貨將流向何處？合理之懷疑，是否摻雜於粉防己或其他防己中以消化囤貨。少量之摻雜，一般以 HPLC 分析法之感度是很難檢出馬兜鈴酸，但若以液相層析串聯式質譜分析法則不難檢出，因此囑我在這主題上以液相層析串聯式質譜分析法研究四種防己之鑑別法，尤其製成中藥製劑後，摻雜問題之鑑定。

研究過程中，一度因未能找到正確之漢防己而實驗中斷，所幸所長即時由日本購得真品，使實驗得以繼續完成，在此致一併致謝。

在此仍要感謝組長林哲輝博士，除了提供分析技術之諮詢外，尚支持我在職進修之機會，在此亦要向林組長致十二萬分之謝意。

研究生 曾木全 鞠躬

2006.05.27

目 錄 page

謝 誌	I
目 錄	II
表 目 錄	IV
圖 目 錄	V
中文摘要	X
英文摘要	X II
第一章 前 言	1
第二章 材料與方法	
一、材 料	6
二、儀 器 及 裝 置	7
三、方 法	8
1. 標準藥材鑑定---考證與切片鏡檢	
1-1：粉防己	8
1-2：廣防己	9
1-3：木防己	10
1-4：漢防己	11
2. 藥材之薄層層析並與藥材指標成分比對	21
3. 標準藥材之液相層析串聯式指紋質譜圖庫之建檔	21
4. 指紋質譜圖庫適用性探討	26
5. 再現性評估(Reproducibility)	29
6. 最低檢出量(LOD)	29
7. 案例分析	29
四、結果與討論	30
1. 粉防己之液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜建立	30

2. 木防己之液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜建立-----	40
3. 漢防己之液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜建立-----	47
4. 廣防己之液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜建立-----	52
5. 質譜圖庫建檔之所見-----	60
6. 四種藥材之快速篩檢試驗-----	61
7. 指紋質譜圖庫之比對-----	65
8. 其他藥材之干擾之探討---防己藥材空白試驗-----	71
9. 指紋質譜圖庫比對再現性探討-----	72
10. 最低檢出量(LOD)之探討-----	73
11. 指紋質譜圖之應用及市售品之調查研究-----	76
12. 不明藥材之調查-----	92
13. 四種防己藥材成分之異同-----	96
五、結論-----	99
六、參考文獻-----	104

表 目 錄

page

Tab. 1:	The parameters of LC/MS1 scanning -----	23
Tab. 2:	The compositions of TCM preparation in market and its fangchi species labeled -----	28
Tab. 3:	The Herb identity macro- method and MRM macro-method of <i>Stephania tetrandra</i> herb-----	38
Tab. 4:	The Herb identity macro- method and MRM macro-method of <i>Cocculus trilobus</i> herb-----	45
Tab. 5:	The Herb identity macro- method and MRM macro-method of <i>Sinomenium acutum</i> herb-----	51
Tab. 6:	The Herb identity macro- method and MRM macro-method of <i>Aristolochia fangchi</i> herb-----	55
Tab. 7:	The parameters of Aristolochic acid I& II analysis-----	59
Tab. 8:	Fangchi herbal MRM pre-screen macro-method -----	61
Tab. 9:	The matching quality of daughter ion spectrum during reproducibility test-----	74
Tab.10:	The Limit of detection in single herb and model TCM-----	76
Tab.11:	The identified results of TCM & herb by LC/MS/MS fingerprint-----	78
Tab.12	Chemical structure collection-----	102

圖 目 錄

page

Fig. 1:	Fenfangchi (A), Guangfangchi (B), Mufangchi(C) and Hanfangchi (D) are extremely similar in their appearance---	5
Fig. 2:	The appearance of Micromass Quattro Ultima LC/MS/MS-	7
Fig. 3 :	The plant macromorphology of <i>Stephania tetrandra</i> S. Moore -----	13
Fig. 4 :	The microscopic observation and histologic biopsy of <i>Stephania tetrandra</i> herb (x 40) -----	14
Fig. 5 :	The plant macromorphology of <i>Aristolochia fangchi</i> Wu ---	15
Fig. 6 :	The microscopic observation and histologic biopsy of <i>Aristolochia fangchi</i> herb (x 40) -----	16
Fig. 7 :	The plant macromorphology of <i>Cocculus trilobus</i> D C .-----	17
Fig. 8 :	The microscopic observation and histologic biopsy of <i>Cocculus trilobus</i> herb (x 40) -----	18
Fig.9 :	The plant macromorphology of <i>Sinomenium acutum</i> Rehd. et Wi l s .-----	19
Fig 10 :	The microscopic observation and histologic biopsy of <i>Sinomenium acutum</i> herb -----	20
Fig.11:	TLC pattern of 4 Fangchi herb vs reference standard-----	20
Fig.12 :	The mechanism of MS 1 scan and obtained MS1 spectrum -----	22
Fig.13:	The mechanism of daughter ion scan and obtained daughter ion spectrum-----	24
Fig.14:	The mechanism of MRM scan and obtained MRM/TIC chromatography-----	25
Fig.15:	The TIC of ESI+/MS 1 scan and ESI+/MS 1 spectrums of <i>Stephania tetrandra</i> herb extract -----	32
Fig.16:	The ESI- m/z 191 daughter ion scan and the library search result-----	33
Fig.17:	The daughter ion spectrums of selected fragments in <i>Stephania tetrandra</i> herb -----	35
Fig.18:	The chromatogram of <i>Stephania</i> MRM screen scan -----	38

Fig.19:	The daughter ion spectrums of tetradraine standard-----	39
Fig.20 :	The UV spectrums of tetradraine and Fangchinoline-----	39
Fig.21:	The TIC of ESI+/MS 1 scan and ESI+/MS 1 spectrums of <i>Cocculus trilobus</i> herb extract -----	41
Fig.22:	The daughter ion spectrums of selected fragments in <i>Cocculus trilobus</i> herb -----	42
Fig.23 :	The chromatogram of <i>Cocculus</i> MRM screen scan -----	45
Fig.24:	The ESI+/MS 1 spectrums of <i>Sinomenium acutum</i> herb extract-----	46
Fig.25:	The daughter ion spectrums of selected fragments in <i>Sinomenium acutum</i> herb -----	45
Fig.26:	The daughter ion spectrums of Sinomenine standard-----	50
Fig.27:	The chromatogram of <i>Sinomenium</i> MRM screen scan -----	51
Fig.28:	The ESI+/MS 1 spectrums of <i>Aristolochia fangchi</i> herb extract-----	53
Fig.29:	The daughter ion spectrums of selected fragments in <i>Aristolochia fangchi</i> herb-----	55
Fig.30:	The chromatogram of <i>Aristolochia</i> MRM screen scan -----	56
Fig.31:	The ESI+/MS 1 spectrums of Aristolochic acid I & II standard -----	57
Fig.32:	The daughter ions spectrums of Aristolochic acid I (a) & II (b) standard-----	58
Fig.33:	The UV spectrums of Aristolochic acid I & II standard-----	58
Fig.34:	Quantitative analysis of Aristolochic acid I & II by LC/MS/MS-----	60
Fig.35:	The pattern of Fangchi herbal MRM pre-screen macro- method scanning and the sample had been found that contained both of <i>Stephania tetrandra</i> and <i>Sinomenium</i> <i>acutum</i> herb-----	62
Fig.36:	Double check of <i>Sinomenium</i> in <i>Stephania tetrandra</i> dry extract and found that the <i>Sinomenium</i> was non-detected---	63
Fig.37:	The pattern of Fangchi herbal MRM pre-screen macro- method scanning and the sample had been found that contained <i>Sinomenium acutum</i> herb-----	64
Fig.38:	The library search results of model sample preparations contained standard <i>Stephania tetrandra</i> herb-----	66
Fig.39:	The library search results of model sample preparations	

	contained standard <i>Cocculus trilobus</i> herb-----	68
Fig.40:	The library search results of model sample preparations contained standard <i>Sinomenium acutum</i> herb -----	70
Fig.41:	The library search results of model sample preparations contained standard <i>Aristolochia fangchi</i> herb-----	71
Fig.42:	MRM pre-screen macro-method scanning for Fangchi herbal blank preparation-----	72
Fig.43:	<i>Aristolochia Fangchi</i> herbal identity macro-method double check scanning for blank preparation-----	73
Fig.44:	The DOL test for model Fangi-Jii-Hwang-Chi-Tang contains <i>Stephania tetrandra</i> herb is 50mg/10mL in concentration-----	75
Fig.45:	The DOL test for raw materials extract contains <i>Stephania tetrandra</i> herb is 50mg/10mL in concentration-----	75
Fig.46:	Unknown sample look like <i>Stephania tetrandra</i> suspiciously and sent for identification-----	77
Fig.47:	Unknown sample labeled as <i>Cocculus</i> herb and sent for identification-----	77
Fig.48:	Fangchi herbal MRM pre-screen macro-method scanning and the result of <i>Aristolochia fangchi</i> was detected-----	79
Fig.49:	The MRM chromatograms of Fangchi dry extracted preparation and the tested result of containing <i>Stephania tetrandra</i> herb and suspect adulterated small portions of <i>Sinomenium acutum</i> herb-----	80
Fig.50:	The double check of ESI+D342 and ESI+D330 chromato grams of Fangchi dry extracted preparation and the tested result of containing <i>Stephania tetrandra</i> herb but <i>Sinomenium acutum</i> herb had no detected -----	81
Fig.51:	The MRM chromatograms of Han-Fangchi dry extracted preparation and the tested result of containing <i>Stephania tetrandra</i> herb, was different from the formula label of <i>Sinomenium acutum</i> -----	81
Fig.52:	The MRM chromatograms of Sheau-Shiuh-Ming-Tang (小 續命湯濃縮顆粒) dry extracted preparation and the tested result of containing <i>Sinomenium acutum</i> herb and adulterated portions of <i>Aristolochia fangchi</i> (Formula label : <i>Sinomenium acutum</i>)-----	82

Fig.53:	The double check of Sheau-Shiuh-Ming-Tang (小續命湯濃縮顆粒) dry extracted preparation contained aristolochic acid and Sinomenine by LC/MS/MS-----	84
Fig.54:	The MRM chromatograms of Fangchi-Hwang- Chi-Tang (防己黃耆湯濃縮散) dry extracted preparation and double checked result of containing <i>Sinomenium acutum</i> herb (Formula label : <i>Stephania tetrandra</i>)-----	85
Fig.55:	The MRM chromatograms of Fangchi-Hwang-Chi- Tang (防己黃耆湯濃縮散) dry extracted preparation and the tested result of containing <i>Stephania tetrandra</i> herb and adulterated portions of <i>Aristolochia fangchi</i> (Formula label : <i>Sinomenium acutum</i>)-----	86
Fig.56:	The double check of Fangchi-Hwang-Chi-Tang (防己黃耆湯濃縮散) dry extracted preparation contained Sinomenine by LC/MS/MS-----	87
Fig.57:	The MRM chromatograms of Tong-Yonq-Tonq-Feng- Wan (通用痛風丸濃縮散) dry extracted preparation and the tested result of containing <i>Sinomenium acutum</i> herb and <i>Stephania tetrandra</i> (Formula label : Fangchi)-----	88
Fig.58:	The MRM chromatography of Tong-Yonq-Tonq-Feng- Wan (通用痛風丸) pill preparation and the tested result of containing <i>Aristolochia fangchi</i> (Formula label : Fangchi)	89
Fig.59:	The double check of Tong-Yonq-Tonq-Feng-Wan (通用痛風丸) pill preparation contained aristolochic acid I & II by LC/MS/MS-----	90
Fig.60:	The double check of Fangchi-Hwang-Chi-Tang (防己黃耆湯濃縮散) dry extracted preparation contained aristolochic acid I by LC/MS/MS-----	91
Fig.61:	The MRM chromatography of Muh-Fangchi-Tang (木防己湯濃縮散) dry extracted preparation and the tested result of containing none of the 4 kinds of Fangchi herb (Formula label : <i>Cocculus</i>)-----	93
Fig.62:	The appearance of unknown sample had been adulterated in Muh-Fangchi-Tang (木防己湯濃縮散) dry extracted preparation as <i>Cocculus</i> herb-----	93

Fig.63:	The apparence of <i>Coculus sarmentosus</i> (華南木防己)-----	94
Fig.64:	The comparsion of ESI ⁺ /MS1 TIC (upper) and PDA chromatogram (below) among <i>Erycibe obtusifolia</i> , unknown sample and <i>Coculus sarmentosus</i> -----	95
Fig.65:	The difference of ES ⁺ D342 spectrum between 4 species Fangchi herb-----	98
Fig.66:	The difference of ESI ⁺ D314 spectrum between 4 species Fangchi herb-----	98



摘 要

為了鑑中藥製劑中經常被混淆誤用之防己類(Fangchi herb)藥材，包括防己科(Menispermaceae)植物，粉防己(*Stephania tetrandra* S. Moore)、木防己 *Cocculus trilobus* D C .、漢防己 *Sinomenium acutum* Rehd. et Wi l s 及馬兜鈴科(Aristolochiaceae)植物廣防己(*Aristolochia fangchi* Wu)、。本研究報告係嘗試應用液相層析串聯式質譜分析法(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC/MS/MS)製作四種標準藥材之指紋質譜圖庫(Mass Fingerprint Database)，供搜尋比對之用。

首先經由搜集藥材或新鮮採集、並經組織切片及指標成分比對以確立標準藥材後，配置標準藥材溶液，進行液相層析串聯式質譜分析。分離管柱為 Cosmosil 5C₁₈-AR, 4.6 x 150 mm。移動相溶媒系為 methanol : acetonitrile: 各含 0.1% w/v 之 formic acid 及 ammonium acetate 混合水溶液 (17:17:66)，流速：0.5 mL/min (1:1 分流)，毛細管電壓(source capillary voltage)為 3 kV，以線性錐口電壓變化(cone voltage ramp)之質譜分析條件進行正離子電灑法第一段全質譜掃描 (positive ion electrospray ionization MS 1 scan)，獲得第一段全掃描質譜圖(MS 1 spectrum)。由該質譜圖中選取較大、明顯、穩定之離子裂片作為源頭離子(precursor ions)，以固定 3 kV 及 60V 之毛細管電壓與錐口電壓(cone voltage)再進行子代離子掃描 (daughter ion scan)，調整碰撞能量(argon collision energy)使產生穩定明顯之鑑定離子 (confirmation ion) 及定量離子 (quantitative ion)，獲得子代離子掃描質譜圖(daughter ion spectrum)，並將此質譜圖，連同儀器分析參數，一併鍵入質譜圖庫中。

為檢驗單一藥材或複方製劑中是否含防己藥材，分別編輯四種防己藥材鑑定試驗之巨集指令(fangchi herb identity macro-method)。對所配製之四種防己黃耆湯模擬處方之再現性測試(reproducibility test)中，同日內

(Intraday)及異日間(Interday)之比對相似性(matching quality)均能符合 80% 以上，因此本分析法之藥材鑑定結果可靠。

為增加儀器掃描之靈敏度，另選定四種防己藥材之親代及生成子代配對離子裂片，進行多重離子裂解監控 (MRM, multiple reaction monitoring) 分析，能一次掃描數個管道所匯集成之 MRM 巨集指令分析法(MRM screen macro-method)，用以摒除複雜天然成分之干擾，提升離子峰之 S/N 比使掃描結果更容易判定。另擇取上述四種藥材中各兩個主要管道整合成 MRM 預篩檢試驗(MRM pre-screen macro-method)，用以快速預篩檢上述四種易混淆防己藥材。當欲檢測之初，先以 MRM pre-screen macro-method 篩檢，獲得初步之結果，再以各別防己藥材之 MRM screen macro-method 及 fangchi herb identity macro-method 重行分析，並比對子代離子質譜圖，即可獲致確切之檢出結果。

應用上述研究成果檢測隨機取樣市售防己藥材及標示含防己之中藥製劑共 20 件，標示不清楚者 8 件，檢出發現標示藥材與檢出藥材不符者有 13 件，真的如同古籍記載一般的混淆誤用。廣防己雖已禁用，但檢出率仍高達 22.2%。由上述結果觀之，LC/MS/MS 指紋質譜圖分析法確實能有效的分辨中藥製劑中所用防己之種類。

關鍵詞：防己藥材偽鑑定、粉防己、漢防己、木防己、廣防己、青藤、液相層析串聯式質譜分析法、電灑法、子代離子掃描、指紋圖譜分析、質譜圖庫、巨集指令、青藤鹼、木防己鹼、粉防己鹼、防己諾林鹼、輪環藤酚鹼、木蘭花鹼

Application of LC/MS/MS on the identification of the Fangchi species in Traditional Chinese Medicines

Mu-Chuan Tseng

Graduate Institute of Chinese Pharmaceutical Sciences, China Medical University
91 Hsueh-Shih Rd, North Section, Taichung City 404, Taiwan

Abstract

In the ancient book literature, Fenfangchi (粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore, Menispermaceae), Mufangchi (木防己 *Cocculus trilobus* D C., Menispermaceae), Guangfangchi (廣防己 *Aristolochia fangchi* Wu., Aristolochiaceae), Hanfangchi (漢防己 *Sinomenium acutum* Rehd. et Wils., Menispermaceae) are all called Fangchi in TCM. Especially Guangfangchi and Fenfangchi are extremely similar in their appearance. Therefore, they are frequently misused. Guangfangchi contained aristolochic acid. It is concerned with Chinese Herb Nephropathy that give rise to the world to pay much attention to the misuse of TCM.

This paper introduces a newly developed method of applying liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) on the identification of the Fangchi species in Traditional Chinese Medicines. Analyses were carried out using a high performance liquid chromatograph interfaced to a tri-quadrupole mass spectrometer and a photodiode array detector through a PEEK tube by the split ratio as 1:1. Chromatographic separation was performed on a C18 column (Cosmosil 5-C18, 150 x 4.6 mm, i.d., 5 μ m) under an isocratic elution of a mixed solvent system in a composition of each 17% of methanol and acetonitrile and 66% of mixed aqueous solutions that contained 0.1% of ammonium acetate and 0.1% of formic acid at a flow rate of 0.5 mL/min. The source temperature and the desolvation temperature was

set at 120°C and 350°C, respectively. A full UV spectrum was scanned from 200 to 350 nm.

This study attempts to fabricate Mass Fingerprint Database of four species of standard raw materials of Fangchi by LC/MS/MS for library searching. First, established standard raw material by the way of collection, microscopic examination and contrast their index ingredients. Then carry on creating the LC/MS/MS database process via MS 1 scanning, daughter ion scanning and MRM scanning. In order to examine what species of fangchi exist in Kampo medicines or TCM, we edited four kinds of Fangchic herb identity macro-method, for screening the daughter ion spectrum of selected fragments and compared with the LC/MS/MS Fingerprint Database. We also edited four kinds of MRM screen macro-method and MRM pre-screen macro-method for enhancing the signal peak and rapidly screen the sample. By this macro-method, we processed the reproducibility test of Fang-Jii-Hwang-chi-Tang (防己黃耆湯) model sample, and the result of the average matching quality of Intraday is 86.9%, SD is between 2.2~6.0. The Interday is 86.2%, SD is between 2.2~7.9. Both of the intraday and interday test are more than the basic demand of matching quality (80%). This result indicate that this analytic method is reliable.

Apply the analysis method, Examining 20 kinds of random sampling materials ; including 2 raw materials, 17 Kampo medicines, and the another one is TCM pill that comes from 7 different manufactory and 1 traditional pill manufactory.

The results supported that there is 1 sample contain Guangfangji that labeled fangji herb. One labeled Mufangchi but detected none of four fangchies. 13 of 18 preparations contain Fenfangchi but one adulterated Guangfangchi and another one adulterated Hanfangchi. There are 4 samples contain Hanfangchi but 1 of 4 adulterated the Guangfangchi. There were

22.2% of the tested sample Containing aristolochic acid. Thus it can be seen that although Guangfangchi is forbidden by law but still use in marketplace. There are none of Mufangchi was detected even labeled. This shows that the origin of Mufangchi is uncertainly, The government organization should take account of pharmaceutical preparation permission.

According to the result of this research , the use of Fangchi chaos as that was described in traditional herb literature. From modern phytochemistry research, we know that the four materials of different Fangchis diverse. We ought to take more seriously about that diverse materials contain different ingredient that will lead to different effect and should apply to different sickness.

Key word: *Stephania tetrandra*, *Sinomenium acutum*, *Cocculus trilobus*, *Aristolochia fangchi*, LC/MS/MS, Electrospray, Mass fingerprint, MRM (Multiple Reaction Monitoring), Herb identity macro-method , MRM screen macro-method, MRM pre-screen macro-method tetrandrine, fangchinoline, trilobine, isotrilobine, magnoflorine, cyclanoline

前 言

由「防已、防已、防己之種種問題及其相關生藥製劑之應用」一文⁽¹⁾中對防己之考證稱本經原載為「防已」，而後《名醫別錄》、《神農本草經集注》、《新修本草》、《嘉祐本草》、《四聲本草》、《圖經本草》、《本草拾遺》、《雷公炮炙論》、《肘後方》、《初虞世方》等晉、唐、宋諸家本草及臨床家均以「防已」為名。至李時珍之《本草綱目》（AD 1578 年）問世後本草中始有「防己」之名出現，而後在清乾隆初期汪昂之《本草備要》中更有「已」「己」並出之現象，至民國復刻之《本草綱目》則已然由「防已」衍變成「防己」。究竟防已、漢防已、木防已是否是否屬同一基原植物，確有詳加考證之必要。

防已在《神農本草經》一書中之別名一名「解離」，此正如《名醫別錄》所云：「文如車輻理解者良，生漢中（陝西、南鄭）川谷二月八月採根」，故從古以來「漢防已」即為最被推崇之上品，唯至唐《新修本草》云：「防已中出漢中者作車輻解黃實而香，其青白虛軟者名木防已，都不任用，陶謂之佳者蓋未見漢中者爾。」而《嘉祐本草》引用《藥性論云》：「漢防已君味苦有小毒，能治濕風口面喎斜手足痿散留痰主肺氣嗽喘。」又云「木防已使...」從此導致日後防已分別成「漢防已」與「木防已」並因對其基原植物未作明確之交代，而歷代本草中更因缺乏明確之說明以致在大陸上顯得非常紛亂，唯至最近從《神農本經會通》（此書之書稿成於 1485 年前後，刊行于明萬曆四十四年（AD 1617 年）一書中發現如是之記載：「防已君也...採根陰乾。去皮用文如車輻理解者良，要心花文黃色。漢防已，君，木防已，使，即根苗之名...」。若照這種說法，則「漢防已」與「木防已」乃指同一基原植物之「根」與地上部之「苗」，此說就頗與《神

農本草經》所記載之「防己」回歸於一致。不過今所謂之漢中防己即異葉兜鈴⁽²⁾ *Aristolochia heterophylla* Hemsl. 之根莖⁽⁴⁾，實際上缺乏市場性，又非防己科植物，是產地吻合，因此言其為本草經之正條品，似稍有牽強之感。防己植物亦分布於本省中北部低海拔之山地。臺灣之傳統式生藥店中，今已將其根部稱為「倒地拱」而不稱為防己，並當防己使用。粉防己主產於浙江、安徽而浙江產者主銷華北及華東⁽³⁾。此種防己從其性味似與《本草綱目》《名醫別錄》和《藥性論》所云之防己相關，又從《本草綱目》「石解」之別名與本植物在杭州產地稱為石蟾蜍，其根又有車輻理解之紋連想，故被當作防己不無有其理由存在。防己始載於《神農本草經》列為中品，為古代常用之中藥材之一。另由唐陳藏器《本草拾遺》曰：「治風用木防己，治水用漢防己」。以上古籍論述出現「漢防己」與「木防己」之名稱，但並未對其基原植物作明確之交代，而歷代本草中更因缺乏明確之說明，以致使用上顯得非常紛亂。直到明萬曆年間《神農本草經會通》一書中記載：「防己君也...採根陰乾。去皮用文如車輻理解者良，要心花文黃色。漢防己，君，木防己，使，即根苗之名...」。據此一說，則「漢防己」與「木防己」乃指同一基原植物之「根」與地上部之「苗」。至於廣防己(*Aristolochia fangchi* Wu)之飲片外觀為維管束放射狀排列，正與古籍載：「文如車輻理解者良」幾分相似，若無組織形態學之基本常識，定難辨其真偽(Fig.1)。由於古代缺乏植物分類學之概念，更無顯微鏡等科學儀器之鑑定，因此不同年代之不同醫方古籍記載多種品名相近之藥材，諸如粉防己、漢防己、木防己、廣防己、漢中防己等均未經考證、鑑定就都當作防己混淆使用，這些藥材之基原之種名、屬名均不同⁽⁴⁾，甚至於科名亦差異很大，其所含療效成分不同，當然治病之適用性也會不同。

因防己藥材具利水消腫滲濕作用⁽⁵⁾，常用做減肥用途而長期使用。西元 1993 年，比利時醫師 Vanherweghem 在 Lancet 雜誌上發表一篇文章⁽⁶⁾，指出在比利時有許多位婦女因服用了含防己的減肥藥而造成腎衰竭的病例，其特徵是腎間質細胞廣泛性纖維化、腎小管萎縮，而且很快就腎衰竭，他把這種現象稱為中草藥腎病（Chinese Herbs Nephropathy； CHN）。1994 年證實比利時所進口之粉防己實際上為含馬兜鈴酸之廣防己⁽⁷⁾，廣防己所引發腎病變，引起全世界廣泛之討論，在台灣亦有類似病例之報導。衛生署於 2000 年公告⁽⁸⁾：「馬兜鈴酸長期服用會造成腎衰竭現象」，2001 年再公告：「馬兜鈴酸中藥材為中醫師處方用藥」。因此引起中醫界對馬兜鈴酸造成之副作用有所瞭解與重視。2003 年衛生署再依據藥事法第 48 條及 76 條規定完成全面禁用含馬兜鈴酸的中藥材及其製劑之公告。因此廣防己、青木香、關木通、馬兜鈴、天仙藤等含馬兜鈴酸之中藥材均不得使用。但以過去廣防己之偌大之市場，存貨未見退運或銷毀，是否混雜在粉防己或其他外觀相似之飲片藥材中，繼續販售使用，就不得而知，因此亟需建立客觀精確之辨識方法，以維護消費大眾用藥之安全。

當今中國大陸將粉防己（*Stephania tetrandra* S. Moore）之根以防己之名收載於中國藥典⁽⁹⁾中，也就是說，粉防己即是防己之正品。由於中藥知識大都源於師徒傳承，以及所謂道地藥材之地域行，以至防己之混淆誤用情形嚴重，引起廣泛之重視，因此各種辨識藥材真偽、成分分析法，例如切片鏡檢⁽¹⁰⁻¹²⁾、薄層層析分析（TLC）⁽¹⁰⁾、高效液相層析（HPLC）分析^(13,14)、HPLC 指紋圖譜（fingerprint）分析⁽¹⁵⁾、紫外譜線鑑別法（UV）⁽¹⁶⁾、氣相層析質譜分析法（GC/MS）⁽¹⁴⁾、甚至於中藥二維相關紅外光譜（two dimension IR）鑒定法等⁽¹⁷⁾，琳琅滿目地發表於期刊雜誌中。據筆者多年之中西藥檢驗經驗，切片鏡檢適用於植物藥材之比

對，若作成製劑(濃縮製劑、液劑、丸劑、粉末等)則難以鑑別；TLC 分析法雖為最常用最簡便之比對方法，但因所展開之薄層層析圖譜作觀察，常因呈現多數斑點之重疊與模糊而使相似度之判定顯得太主觀與不肯定；HPLC 成分分析，若無對照標準品，光靠波峰滯留時間相同是尚無法判定成分相同，縱使加掛光二極體紫外光吸收檢測器(Photodiarray detector；PDA)，能顯示紫外線吸收光譜圖(UV spectrum)，但植物分化過程產生許多類緣成分，具有相似之紫外線吸收光譜圖⁽¹⁶⁾，亦難判定成分之異同；至於 HPLC 指紋圖譜分析，則因植物天然成分複雜，且藥材成分常因採收季節、植物藥用部位、炮製方法等之不同，而影響其內所含成分比例之不同⁽¹⁸⁾，其所獲致之指紋圖譜很難有再現性可言；GC/MS 分析法最大之優點為所獲得之質譜圖可與市售套裝質譜圖庫(Library)例如 Wiley、Nist、PMW 等作搜尋比對，或許可比對出成分名稱，唯 GC/MS 分析法亦有許多限制⁽¹⁹⁾，例如分子量太大(大於 m/z 500)者、極性高、無法氣化之成分，大多數之植物成分例如生物鹼(alkaloids)、黃酮類(flavones)、醣質(sugars, polysaccharides)等皆屬於這類成分，因此鑑定功能性不足；至於中藥二維相關紅外光譜鑒定法⁽¹⁷⁾，屬於新興檢驗技術，筆者未曾觸及，唯由專書中瞭解，係未經分離直接測定二維相關紅外光譜，至於其如何克服成分濃度間之差異，含水量之干擾等問題，所衍生再現性之問題。然而液相層析串聯式質譜分析法⁽²⁰⁻²³⁾ (liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LC/MS/MS)則結合 LC 之分離及離子源(ion source)之離子化，以及四極棒之帶電離子裂片(m/z)之選擇進入，接續以不同裂解條件作碰撞，產生各種不同強度之離子裂片組合成之質譜圖，就如指紋般之特異性，可供搜尋比對之用。同時 LC/MS/MS 之分析一次可同時監控多種成分，更能確定檢出結果。

本研究報告則主要以液相層析串聯式質譜分析法探討粉防己、漢防己、木防己、廣防己等易誤用藥材，建立上述藥材之指紋圖譜圖庫供電腦自動搜尋比對之用，並將研究成果應用於藥材或製劑中之鑑定。

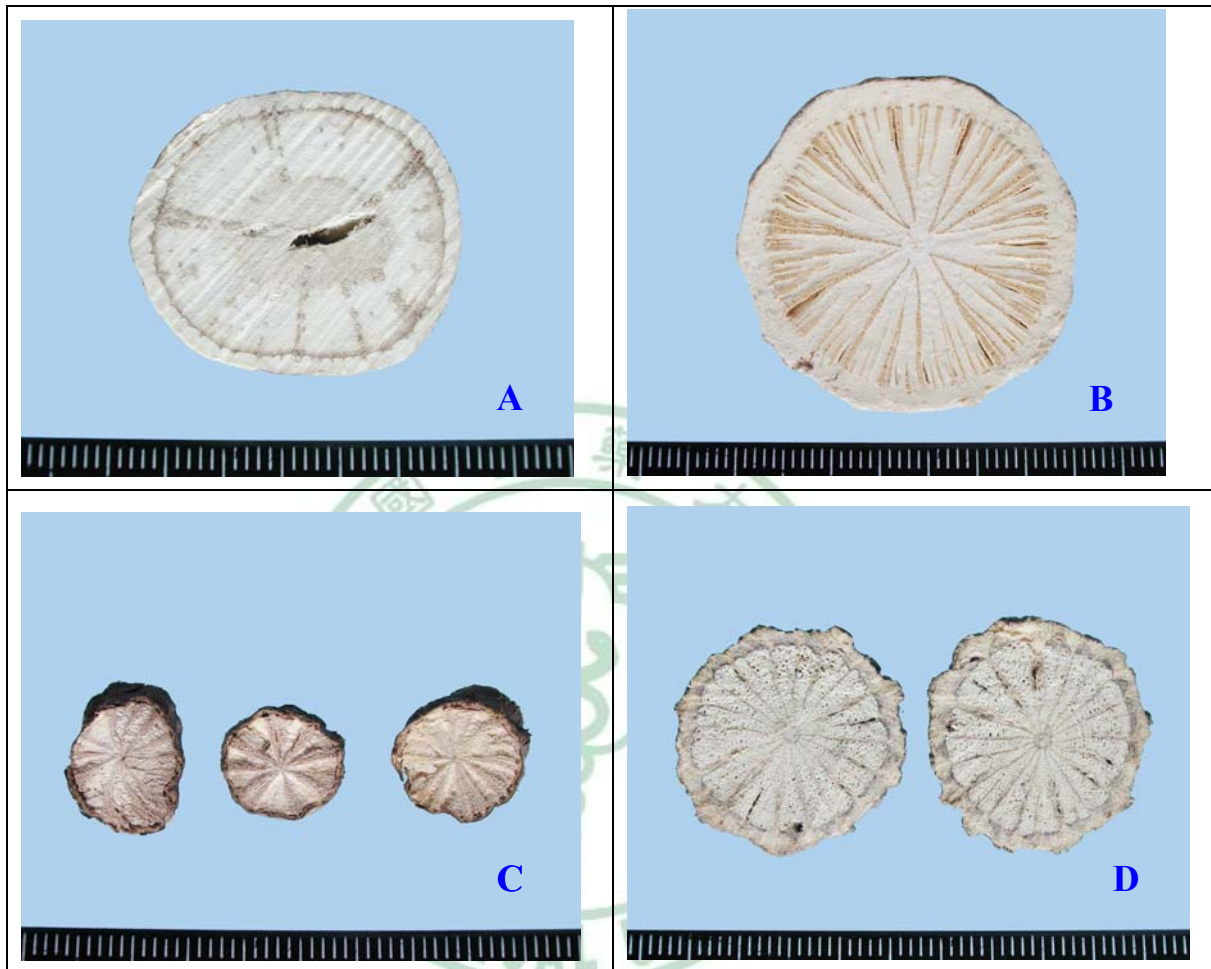


Fig.1: Fenfangchi (A), Guangfangchi (B), Mufangchi(C) and Hanfangchi (D) are extremely similar in their appearance.

材 料 與 方 法

一、材料：

1. 對照用標準品：tetrandrine, aristolochic acid(I 40%, II 56%), sinomenine 對照用標準品，均購自 Sigma 公司 (St. Louis, USA)。
2. 標準藥材：粉防己(*Stephania tetrandra*)，廣防己(*Aristolochia fangchi*)。以上藥材由張憲昌博士鑑定後提供，木防己(*Cocculus trilobus*) 由張憲昌博士由彰化採集新鮮植物陰乾使用。漢防己(*Sinomenium acutum*)，為指導教授張永勳博士由日本津村藥廠 (Herbarium of Tsumura & Co.)購得(採自日本茨城縣真壁町加波山西斜面)並經鑑定後使用。
3. 防己模擬處方：防己黃耆湯(原方出自：金匱要略)
組成比例：
防己 1.0 黃耆 1.0 白朮 0.75 甘草 0.5 生姜 0.5 大棗 0.5
其中防己以上述易混淆品分別配製模擬方劑，以上藥材由行政院衛生署藥物食品檢驗局標準藥材室提供。
4. 隨機取樣市售製劑包括防己單方濃縮製劑 3 件種，防己黃耆湯濃縮製劑 7 件，小續命湯濃縮製劑 3 件，通用痛風丸濃縮製劑 2 件種，木防己湯濃縮製劑 2 件，通用痛風丸傳統丸劑 1 件，標示防己及木防己之藥材各 1 件，總共 20 件。
5. 試藥：甲醇 (Labscan 公司, Ireland) 及乙氫 (BDH laboratory, England) 均為 LC 級。蟻酸(formic acid)、醋酸銨(ammonium acetate)、醋酸(acetic acid)均為特級試藥。
6. 萃取溶媒: 70% 甲醇(300mL 甲醇加純水定容成 1000mL)
7. 層析板： Silica gel 60 F254(25 TLC aluminum sheets 20 x 20cm , MERCK, Germany)
8. Dragendoff's spray reagent: 混合次硝酸鉍(Bismuth subnitrite)

2g, 醋酸 25mL, 純水 100mL(A 液); 碘化鉀(KI) 40g 溶於純水 100mL(B 液), 臨用前 A 液 B 液等量混合。

9. Vanillin / H₂SO₄ spray reagent: 取 Vanillin 0.5g 加入濃硫酸及乙醇 4:1 混合液 100 mL 中。

二、儀器及裝置：

串聯式質譜儀：Micromass Quattro Ultima LC/MS/MS (Fig.2)

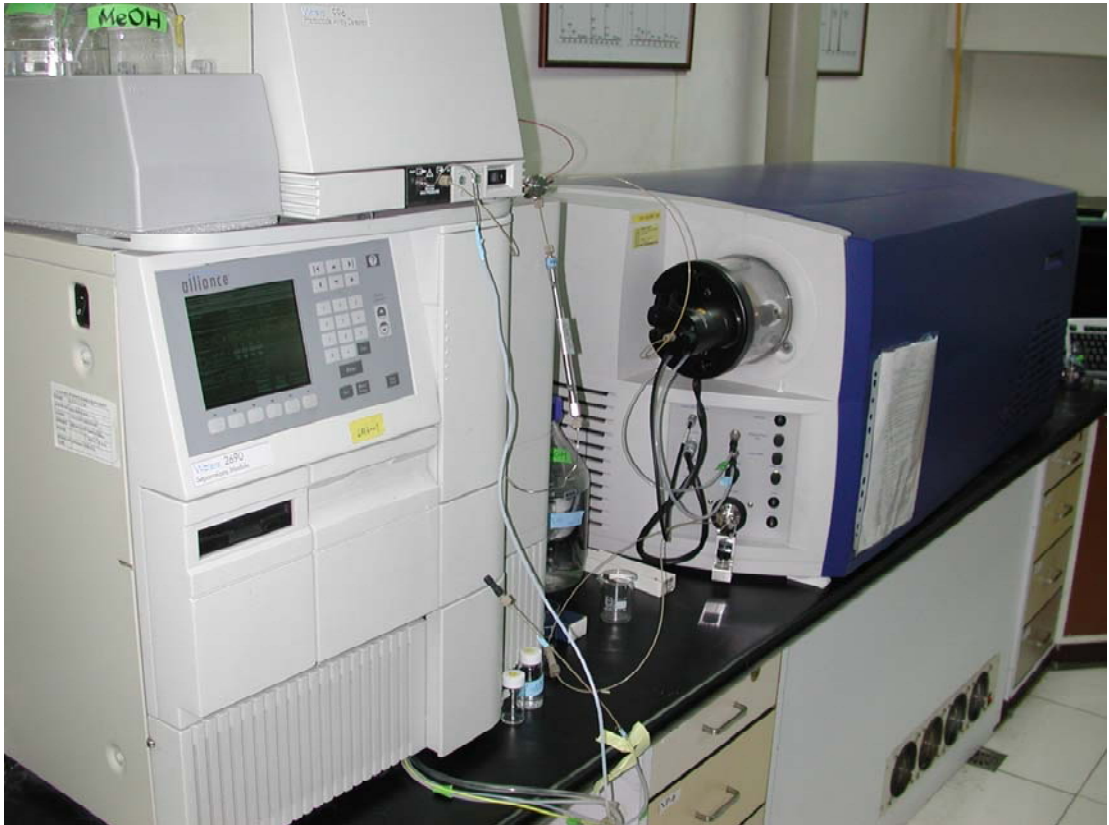


Fig. 2: The appearance of Micromass Quattro Ultima LC/MS/MS
2.液相層析儀：Waters 2690 Alliance LC & 996 PDA with

Automatic Liquid Sampler and Injector

3.數據處理軟體：MassLynx NT Quattro Data Acquisition

4.電腦質譜資料圖庫：行政院衛生署藥物食品檢驗局所建立之電腦質譜資料圖庫(NLFD3/LM：Library Database created by Division 3 of BFDA on LC/MS/MS analysis)。

5.顯微鏡

三、方法

1. 標準藥材鑑定----考證與切片鏡檢：搜集來之藥材經切片鏡檢，並與文獻記載^(3,4,11,12)之性狀及組織特徵作比對，確定為真品，才進行液相層析串聯式質譜指紋圖譜分析與建檔。

1-1：粉防己：本品為防己科（Menispermaceae）植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 之根或根莖（Fig.3），又稱之為石蟾蜍《中藥大辭典》、瓜防己《本草原始》、漢防己《儒門事親》等。粉防己之名稱在歷代之本草鮮少記載，但在梁代陶弘景曰：“今出宜都、建平大而青白虛軟者良”，宜都、建平則為湖北西北部及四川之東南部，又無“內黑文如車輻解”之記載，應非馬兜鈴科植物，此為粉防己最早之記載。另在本草原始之漢防己下附有瓜防己圖，極像粉防己之斜切飲片藥材。明代《品匯精要》謂防己以根大而有粉者良，應指粉防己無誤。

【性狀】本品根剖切成呈不規則圓柱形、半圓柱形、塊狀或塊片狀，多少彎曲，彎曲處有橫溝而呈結節狀瘤塊樣，彎區處有縊縮之橫溝，長約5~15 cm，直徑約2~6 cm。未刮去栓皮者表面灰棕色，粗糙且多細皺，具橫向突起皮孔。去栓皮者，表面灰白色，較平滑。可見殘留灰褐色栓皮。質重而堅脆，易折，具粉質。橫斷面灰白色至灰黃色，有排列較稀疏的放射狀紋理，具淺棕色維管束，呈放射狀紋理，紋如車輪。氣微，味苦。主產於浙江、安徽、江西、湖北等地，集散於漢口，故又名為漢防己，是為名稱混淆原因之一。粉防己含粉防己鹼(tetrandrine)、防己諾林鹼(fangchinoline)、小檗胺(berbamine)、輪環藤酚鹼(cyclanoline)、二甲基粉防己鹼(dimethyltetrandrine)、氧防己鹼(oxofangchirine)、防己斯任鹼(stephanthrine)及小檗胺(berbamine)等，均屬異喹啉生物鹼(isoquinoline alkaloids)。主治效能為利尿消腫、祛風止痛。用於水腫腳氣、小便不利、風濕痺痛、濕疹瘡毒、高血壓

症⁽⁴⁾。其化學結構可參閱 (Tab.12)。

【組織】粉防己根之橫切面組織圖：(Fig.4)

1. 皮層極薄，木栓細胞10~20 餘層，呈切線性延伸。
2. 韌皮部外緣有單個或2~3 個成群石細胞或厚壁纖維散生。韌皮部薄壁細胞中含有許多草酸鈣結晶，除單晶以外，尚有柱狀晶、砂晶，澱粉粒。
3. 木質部放射狀排列，導管徑約50~70 μm ，具有厚膜填充部。導管周圍有纖維性假導管、木質部纖維、薄壁細胞，均木質化。

1-2.廣防己：本品為馬兜鈴科 (Aristolochiaceae) 植物廣防己(*Aristolochia fangchi* Wu.)之根 (Fig.5)。防己始載於《本經》：“一名解離，生川谷”，《別錄》云：“文如車輻理解者良，生漢中，二月八月採根陰乾”。《范子計然》云：“防己出漢中旬陽”，吳普曰：“木防己一名解離，一名解燕……如葛藤，蔓延如芎，白根，外黃似桔梗，內黑文如車輻解，二月、八月、十月採根”。由此可見，最早使用之防己，又名木防己，一名解離，產於漢中，用根，具有內黑文如車輻解之特徵，應非防己科之 *Cocculus* 屬之木防己。由此觀之，此防己應屬馬兜鈴科植物漢中防己，又稱異葉馬兜鈴(*Aristolochia heterophylla* Hemsl.)，因未取得異葉馬兜鈴藥材之正品，且在台灣市場以廣防己 *Aristolochia fangchi* Wu. 為多見，因此本研究報告乃以廣防己為研究之主體。

【性狀】本品呈圓柱形或多少彎曲，彎曲處有橫溝，直徑約2~6 cm，一般約3 cm。外觀灰褐色，並覆有栓皮，栓皮粗糙多縱皺紋 (Fig.5)。有時栓皮部份或全部刮除。除去粗皮者呈淡黃色，較光滑。橫斷面為灰白色至淺棕黃色，無粉質。具細而較密的放射紋，從髓部射出一維管束數多，二次維管束在形成層附近成短條放射狀排列，為灰褐色維管束與類白色髓線相間排列而成。順維管束方向，易成片剝下，質

地堅硬，不易折斷。無臭，味微苦而澀。廣防己含馬兜鈴酸 I 及 II (aristolochic acid)⁽⁴⁾、馬兜鈴酸內環酯 (aristololactam)、木蘭花鹼 (magnoflorine)、 β -sitosterol、allantoin，其化學結構可參閱 (Tab.12)。效能為祛風止痛、清熱利水，主治濕熱身痛、下肢水腫、小便不利、腳氣腫痛。主產於廣東、廣西，又因極像粉防己，故名廣防己，此為外觀上之混淆。

【組織】廣防己根之橫切面組織圖：(Fig.6)

1. 栓皮特別明顯發達，為數十層木栓細胞組成。
2. 栓內層為薄壁細胞，內含草酸鈣簇晶與澱粉粒，內側有石細胞群大致成環狀排列，缺乏韌皮纖維。
3. 二次皮層及木質部射出之髓線含有多量的澱粉粒和少量的草酸鈣結晶。
4. 維管束放射狀排列。
5. 韌皮部射線寬廣，篩管皺縮，有少數石細胞散生。
6. 木質部射線寬，導管較大，旁有木纖維束，壁較厚。
7. 中心為異形複合維管束，髓由薄壁細胞及少數厚壁細胞所組成。

1-3:木防己:本品為防己科(Menispermaceae)植物木防己 *Cocculus trilobus* D C .之根或根莖 (Fig.7)。

【性狀】本品略呈疙瘩狀突起之不完整彎曲之圓柱形，直徑約 1.5~3 cm。

外表灰褐色，有深淺不等彎曲縱溝及橫皺，具支根之痕跡及部份皮層剝落而露出黃白色木質部。質地堅硬，不易折斷，不具粉質。橫斷面皮層很窄，約 1.2 mm，約佔半徑 1 / 7，呈淡灰黃色。木質部寬廣排列整齊具放射狀紋理。斷面呈暗褐色，徑約 1.5~3 cm，皮層狹窄易脫落，木質部約 12 束，排列整齊，可見導管小孔，灰白色放射狀導管與暗褐色髓線呈放射狀排列。木射線寬廣，中心有之髓線（菊花心）。(Fig.8) 味微苦。木防己含木防己鹼 (trilobine)、異木防己鹼 (isotrilobine)、木蘭花鹼 (magnoflorine)、木防己胺 (trilobamine)、去甲

毛木防己鹼(normenisarine)、毛木防己鹼(menisarine)、表千金藤鹼(epi-stephanine)、木防己賓鹼(coclobine)、mufangchinoline $C_{14}H_{21}N_{14}O_{11}$ 、thunbergin $C_{20}H_{14}O_9$ 等成分，其化學結構可參閱 (Tab.12)。效能為祛風除濕、通經活絡、解毒消腫，主治風濕痺痛、小便淋痛、閉經、跌打損傷、咽喉腫痛、瘡瘍腫毒、溼疹、毒蛇咬傷。主產於陝西、甘肅、四川、貴州等地，台灣亦有產，唯一般以草藥使用。

【組織】木防己根之橫切面組織圖：(Fig.8)

1. 栓皮下皮層很薄，為薄壁細胞所組成，內含很多砂晶與小板狀晶。
2. 維管束鞘為薄膜性石細胞環繞韌皮部外側，韌皮部具癒合組織，缺韌皮纖維。
3. 木質部導管及薄壁細胞均木化，導管徑約 $300\mu m$ ，假導管徑約 $18\mu m$ 。放射狀狹窄之導管群穿過，質較堅硬，不易折斷。
4. 髓全部厚膜化。

1-4：漢防己：本品為防己科 (Menispermaceae) 植物漢防己 *Sinomenium acutum* Rehd. et Wils. 之根或根莖 (Fig.9)。又名為青藤，據仇良棟⁽¹¹⁾ 在日本考證結果發現日本所用防己即為青藤，日本多數文獻以此稱為「漢防己」。

【性狀】本品為屈曲不整圓柱形，直徑約 $0.5\sim 2\text{ cm}$ ，外表覆蓋栓皮層，呈灰褐色，粗糙具細皺，具疣狀皮孔突起。質硬不易折斷，不具粉質。橫斷面灰黃色至灰棕色，皮部窄，僅佔半徑 $1/6$ 。維管束約可見導管小孔。灰褐色維管束與黑褐色之髓線呈放射狀紋理。髓線較維管束為窄，每一維管束外側各有一條淡色弧狀線（中柱鞘纖維）相互連結成波狀環。中央為黃白色之圓心髓，UV366下照射下呈淡藍色之螢光。味苦。青藤(漢防己)則含青藤鹼(sinomenine)、青風藤鹼(sinoacutine)、尖防己鹼(acutumine)、N-去甲尖防己鹼

(N-acutumidine)、白蘭花鹼(michelalbine)、光千金藤鹼(stepharine)、雙青藤鹼(disinomenine)、異青藤鹼(isosinomenine)、木蘭花鹼(magnoflorine)等成分，

【組織】漢防己根之橫切面組織圖：(Fig.10)

1. 一次皮層，由類圓形薄壁細胞組成，散存少數木化的厚壁纖維及石細胞。皮層薄壁細胞含有針晶。
2. 韌皮部外有維管束鞘（中柱鞘纖維），具厚壁細胞，其內側常有2~3列石細胞，排列於每一維管束之外側，而此部分常和髓線之石細胞相連而成環。篩管外部有癒合韌皮組織，篩管下為韌皮部薄壁細胞，有束間形成層。
3. 木質部有導管、薄壁細胞及纖維，導管徑約40~150 μm ，呈階梯狀排列，導管具填充物。
4. 髓線為薄壁細胞，多少破裂。有髓。中央部分細胞較周圍者為大。外圍為厚壁細胞；中央為薄壁細胞，含有針晶。
，其化學結構可參閱 (Tab.12)。



Fig. 3: The plant macromorphology of *Stephania tetrandra* S. Moore

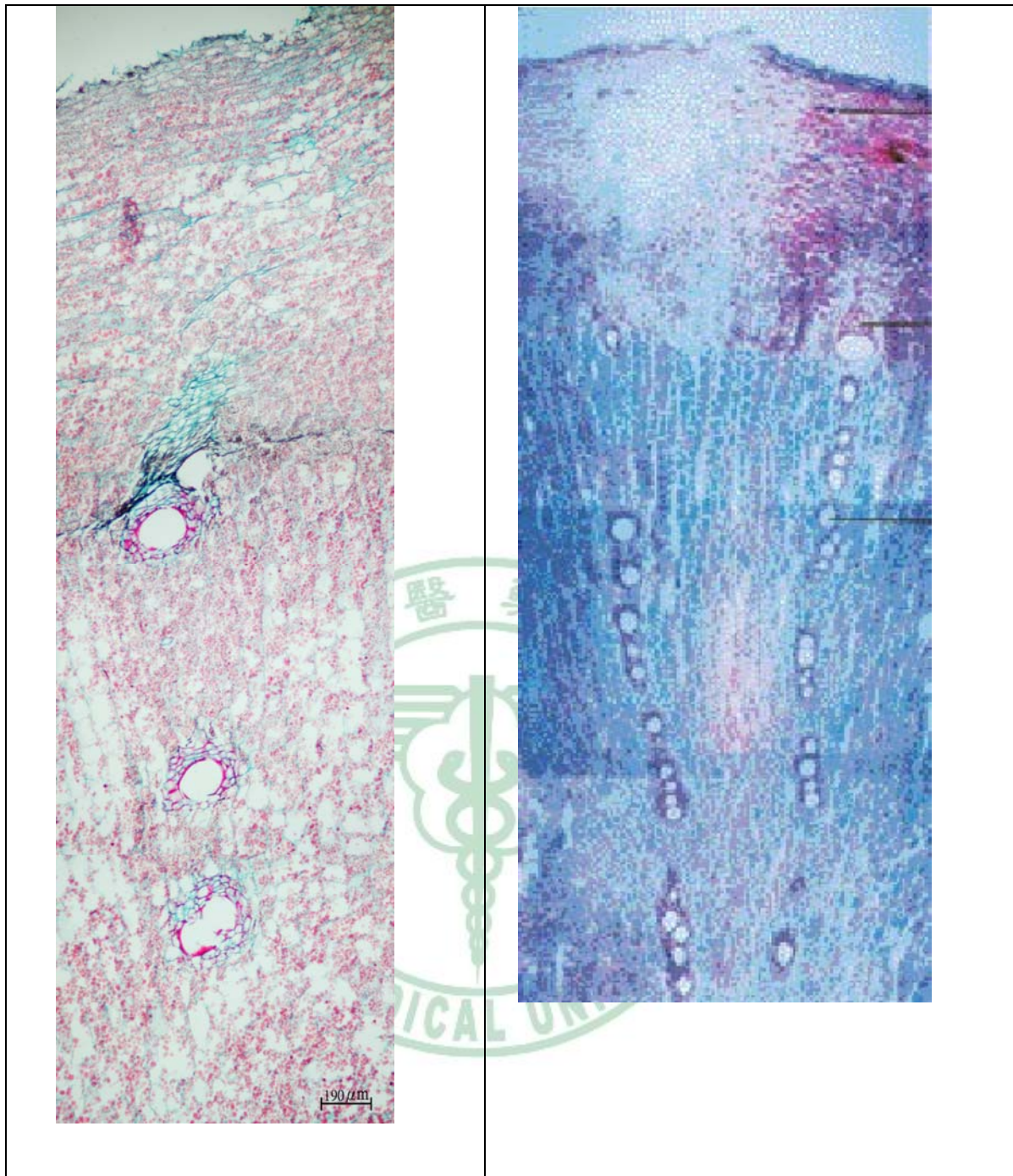


Fig.4 : The microscopic observation and histologic biopsy of *Stephania tetrandra* herb (x 40)



Fig.5: The plant macromorphology of *Aristolochia fangchi* Wu.

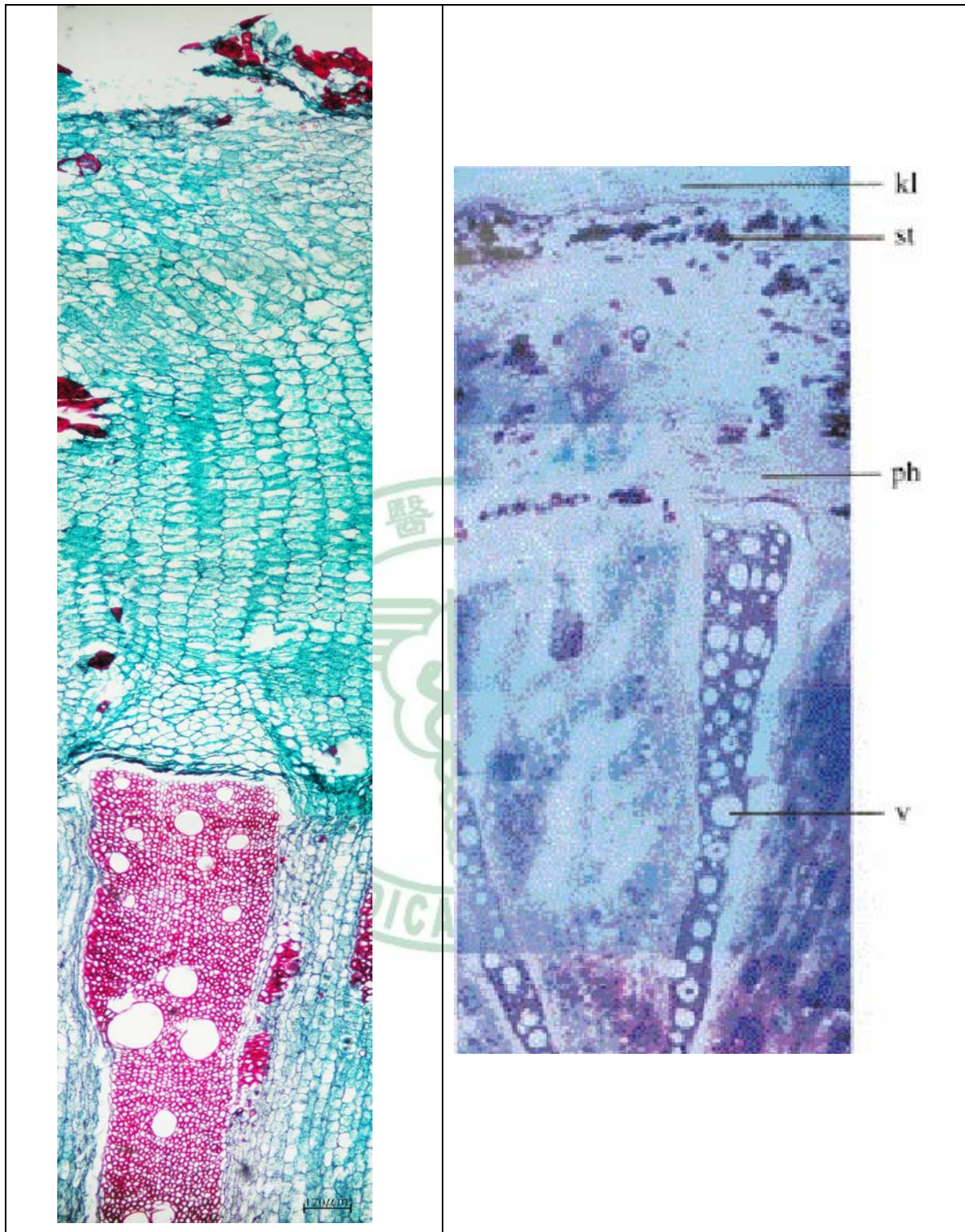


Fig.6 : The microscopic observation and histologic biopsy of *Aristolochia fangchi* herb (x 40)

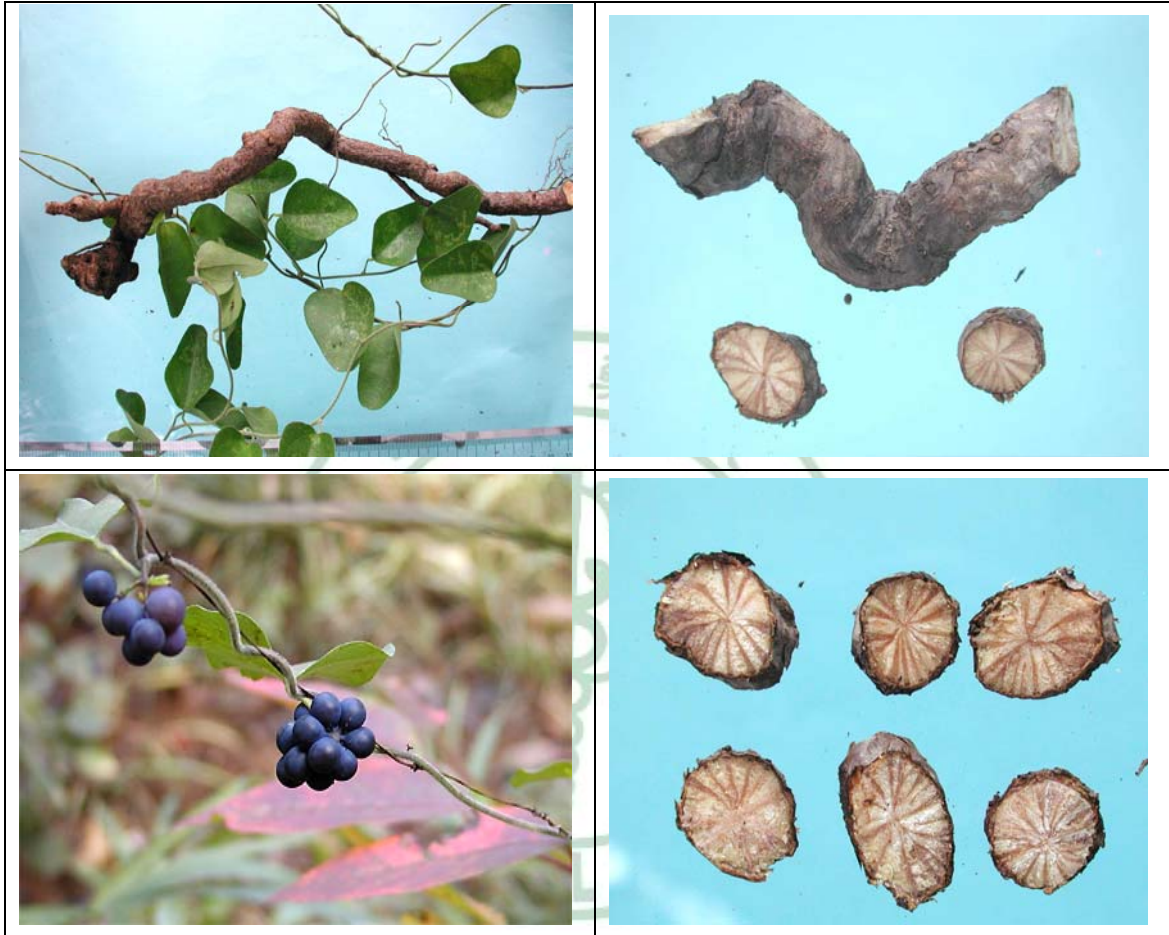


Fig.7 : The plant macromorphology of *Cocculus trilobus* D C .

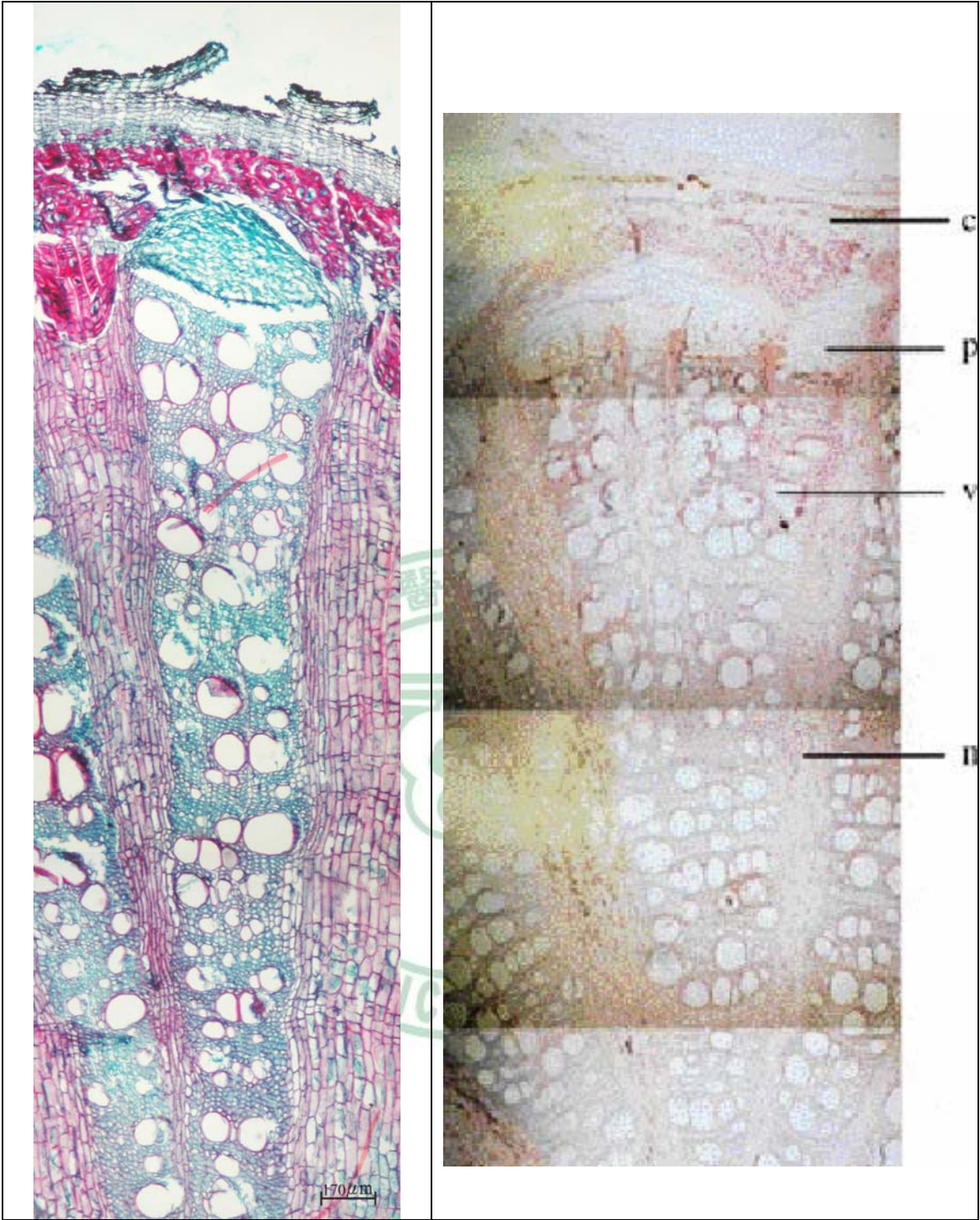


Fig.8 : The microscopic observation and histologic biopsy of *Cocculus trilobus* herb (x 40)



Fig.9 : The plant macromorphology of *Sinomenium acutum* Rehd. et Wils .

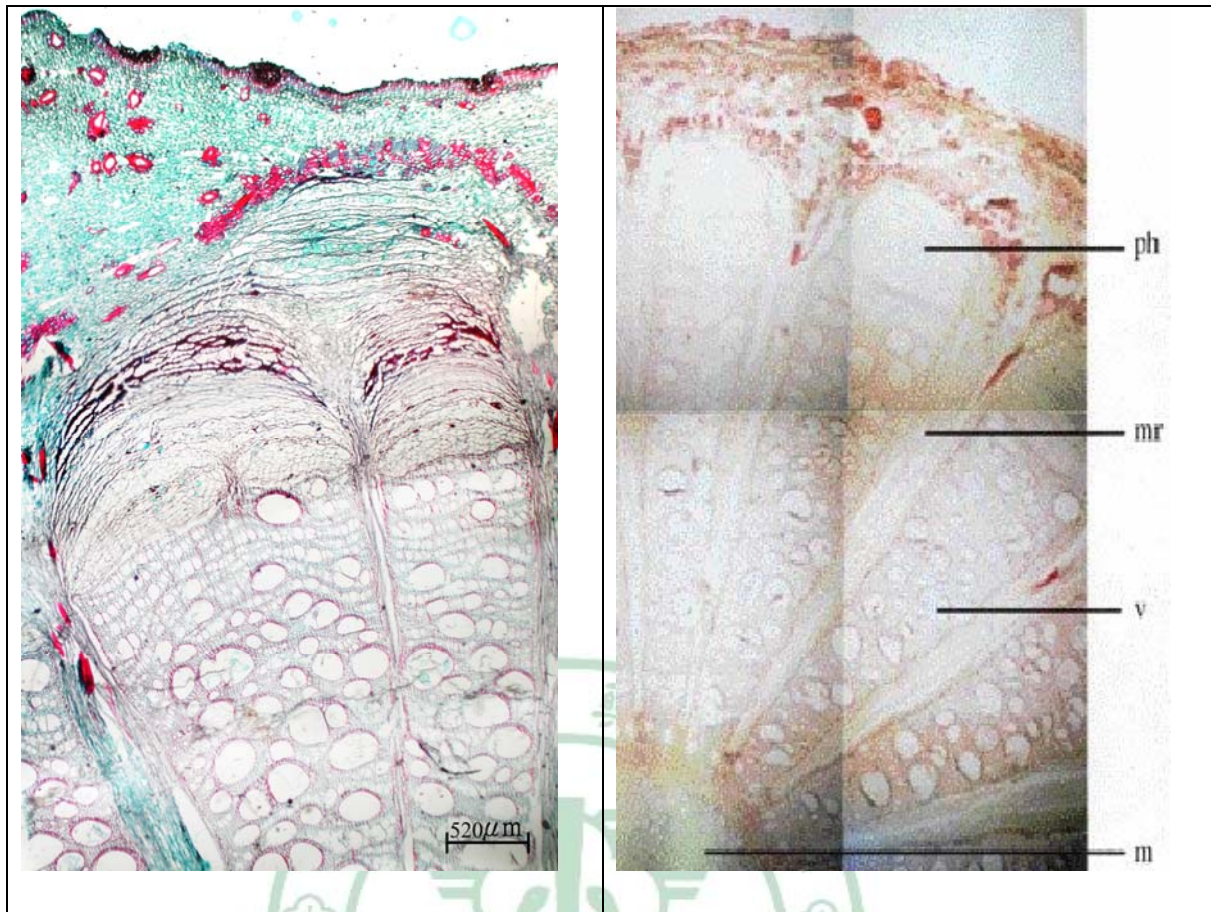


Fig 10: The microscopic observation and histologic biopsy of *Sinomenium acutum* herb

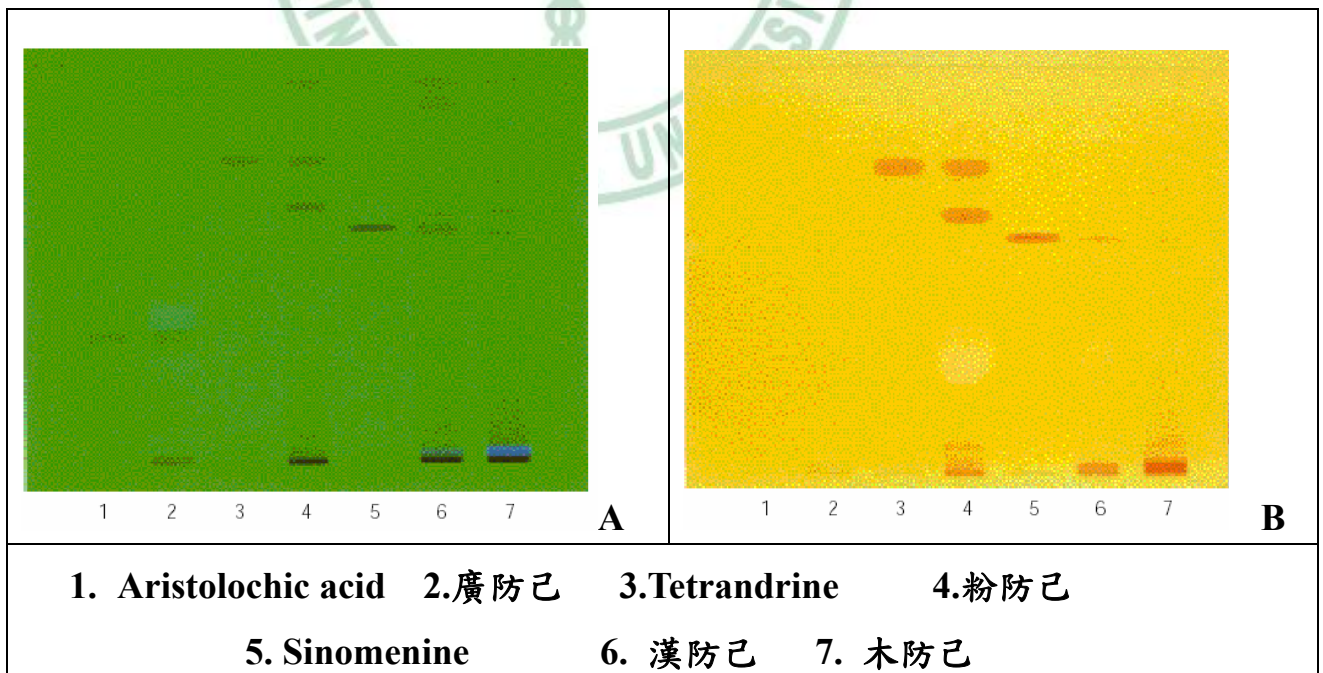


Fig. 11: TLC pattern of 4 Fangchi herb vs reference standard

2. 藥材之薄層層析並與藥材指標成分比對⁽¹⁰⁾

2-1. 對照標準品溶液之調製：取對照標準品 aristolochic acid、sinomenine、tetrandrine 各2 mg，分別加入甲醇，定容至10 ml，供作對照標準品溶液。

2-2. 檢液之調製：取廣防己、粉防己、漢防己、木防己檢體生藥粉末各2.5 g，分別加入乙醇10 ml，超音波振盪1小時，過濾，濃縮後定容至10 ml，供作檢液。

2-3. 薄層層析條件

† 層析板：Silica gel 60 F254

† 展開溶媒：乙酸乙酯：甲醇：氨水（8:1:1）

† 點注量：各10 µl

† 展開距離：10 cm

† 檢出方法：置於U.V. 254 nm下檢視(Fig.11A)。

† 噴Dragendoff's spray reagent後檢視。(Fig.11B)。

† 噴Vanillin/sulfuric acid spray reagent，置於U.V. 366nm下檢視

3. 標準藥材之液相層析串聯式指紋質譜圖庫(LC/MS/MS database)之建檔

3-1. 檢品溶液配製：各取上述經鑑定之標準藥材粉末 1.0 g，分別以兩次 10 mL 之 70% MeOH 萃取，以濾紙過濾，收集濾液，置於減壓濃縮裝置中濃縮到接近乾，以 70% MeOH 溶解殘渣，並定容成 10 mL 供作檢品溶液。

3-2. 正離子電灑法第一段全質譜掃描 (ESI+/MS 1 scan)^(20~21)：取上述 3-1 之檢品溶液，依下列表一之儀器參數設定液相層析串聯式質譜儀，待溶媒系平衡後，開始進行正離子電灑法第一段全質譜掃描分析 (Fig.12)。質譜儀之毛細管電壓設定為 3.0 kV，錐口電壓設定為線性上升(ramp)，離子源溫度 (source temperature) 為 120°C、溶媒揮散溫度 (desolvation temperature) 為 350°C；液相層析儀之分離管柱

(column) 為 Cosmosil 5-C₁₈, 4.6 x150mm, 5 μ m, mobil phase 為 methanol : acetonitrile: 0.1% ammonium acetate + 0.1% formic acid mixed aqueous solution (17:17: 66), 流速為 0.5mL/ min, photodiode array 掃描範圍為 200 ~350nm, 待溶媒系穩定平衡後, 注入 10 μ L 之上述 2-2 之檢品溶液, 並以 1:1 之比例分流(split)。各藥材分別獲得第一段全質譜掃描圖 (MS 1 scan total ion current, MS 1/TIC) (Fig.12A), 並經解析每個明顯波峰, 獲得數張第一段全掃描質譜圖(MS 1 spectrum) (Fig.12B)。

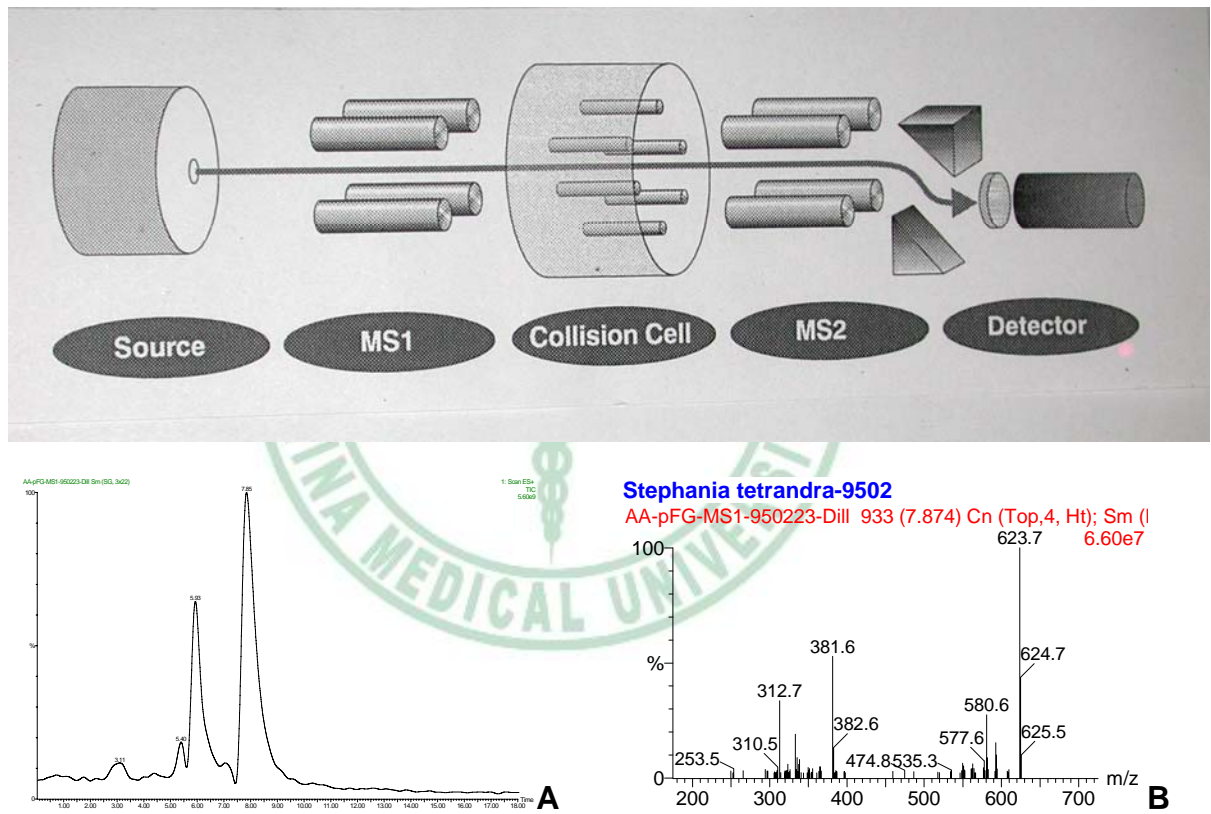


Fig.12 : The mechanism of MS 1 scan and obtained MS1 spectrum

Tab.1 : The parameters of LC/MS1 scanning

Function 1: Mass analysis	
Instrument:	QUATTROULTIMA LC/MS/MS
Ionization mode:	ESI+ MS1 Scan
Capillary Voltage:	3.0 kV
Cone Voltage (V):	Ramp
Collision Energy:	5 eV
Cone temperature:	120 °C
Desolvation temperature:	350 °C
Function 2: HPLC analysis	
Waters Alliance 2695 HPLC Pump	
Column: Cosmosil 5-C18, 4.6 x150mm, 5um	
Mobil phase: MeOH:AcCN:Buffer solution=(17:17:66)	
* Buffer solution= 0.1%NH4AC+ 0.1%HCOOH aqueous solution	
Flow rate :	0.5 ml/min
Injection volume:	10 uL
Acquire Time	0 ~20(mins)
Function type:	Diode Array
Wave length range (nm) :	200 to 350

3-3. 子代離子掃描 (ESI+Daughter ion scan)⁽²²⁾:取上述 3-2 第一段全質譜掃描,獲得各較大波峰之質譜圖中之主要裂片,或疑似藥材指標成分之有意義之裂片[M+1]⁺予以進行子代離子掃描。開始先以一般子代離子質譜分析條件分析,即以毛細管電壓:碰撞能量:進樣圓錐口電壓 (cone voltage/ collision energy/ capillary voltage)為 60/20/3 進行分析,檢視其獲得之子代離子質譜圖(daughter ion spectrum) (Fig.13B),

親代離子(parent ion 或稱源頭離子 precursor ion)與最大離子裂片斷(basal peak)之比值須大於 1/10~1，若未能獲得該比值，則調整碰撞能量，重行分析，祈使質譜圖獲得穩定明顯之鑑定離子裂片群組，並予以載入質譜圖庫(LC/MS/MS database)中，俾便於日後之搜尋比對之用 (Fig.17,22,25,29)。

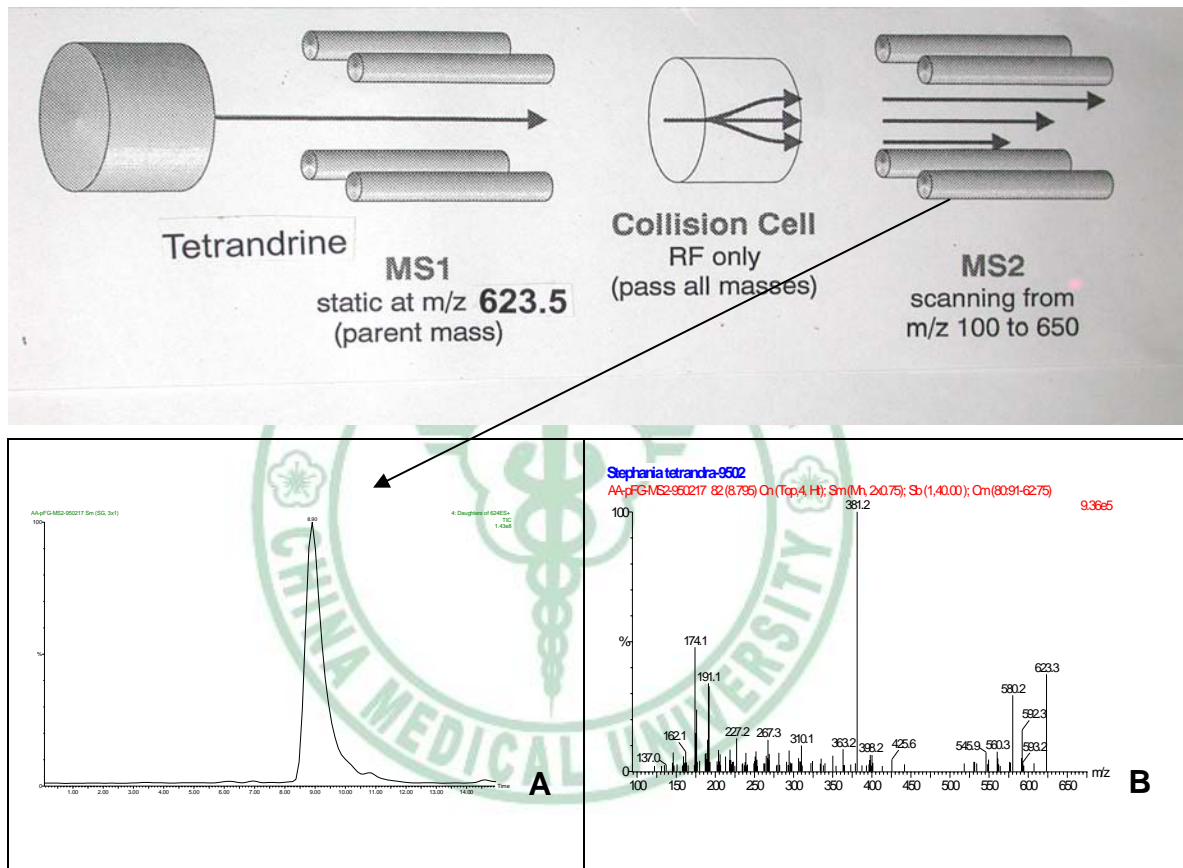


Fig.13: The mechanism of daughter ion scan and obtained daughter ion spectrum

3-4. 編輯各別藥材鑑定試驗巨集指令 (fangchi herb identity macro-method)：綜合上述分析結果，經過歸納後，每個藥材選定 5~7 個親代離子，每個親代離子之子代離子質譜分析稱之為一個管道 (Channel)⁽²²⁾，將這些多重管道(5~7 channels)之儀器分析參數集合製作成儀器分析指令，存入電腦中以執行分析，將可獲得數張子代離子質

譜圖(daughter ion spectrum) (Fig.13B)，並與標準質譜圖庫作比對。因中藥成分複雜，為摒除其他成分之干擾，提高分析之感度，另編輯各藥材選定藥材之親代離子裂片及子代離子裂片所配對成限制性分析之巨集指令，以進行多重離子裂解監控分析⁽²²⁾ (MRM, Multiple Reaction Monitoring)，稱之為各別藥材 MRM 鑑定試驗之巨集指令 (MRM screen macro-method) (Fig.14)。例如粉防己中 tetrandrine 以 m/z 623.5 為親代離子裂解獲得 m/z 381.4 之子代離子裂片符合該條件者才予以記錄，簡記為 m/z 623.5>381.4，是為 MRM/TIC 圖。唯該圖無法與標準質譜圖庫作比對，主要檢視各管道波峰滯留時間與標準藥材是否相符，以及相符管道數之百分比，做為 MRM 比對相似性 (MRM Matching quality) 評估量化之表示法。

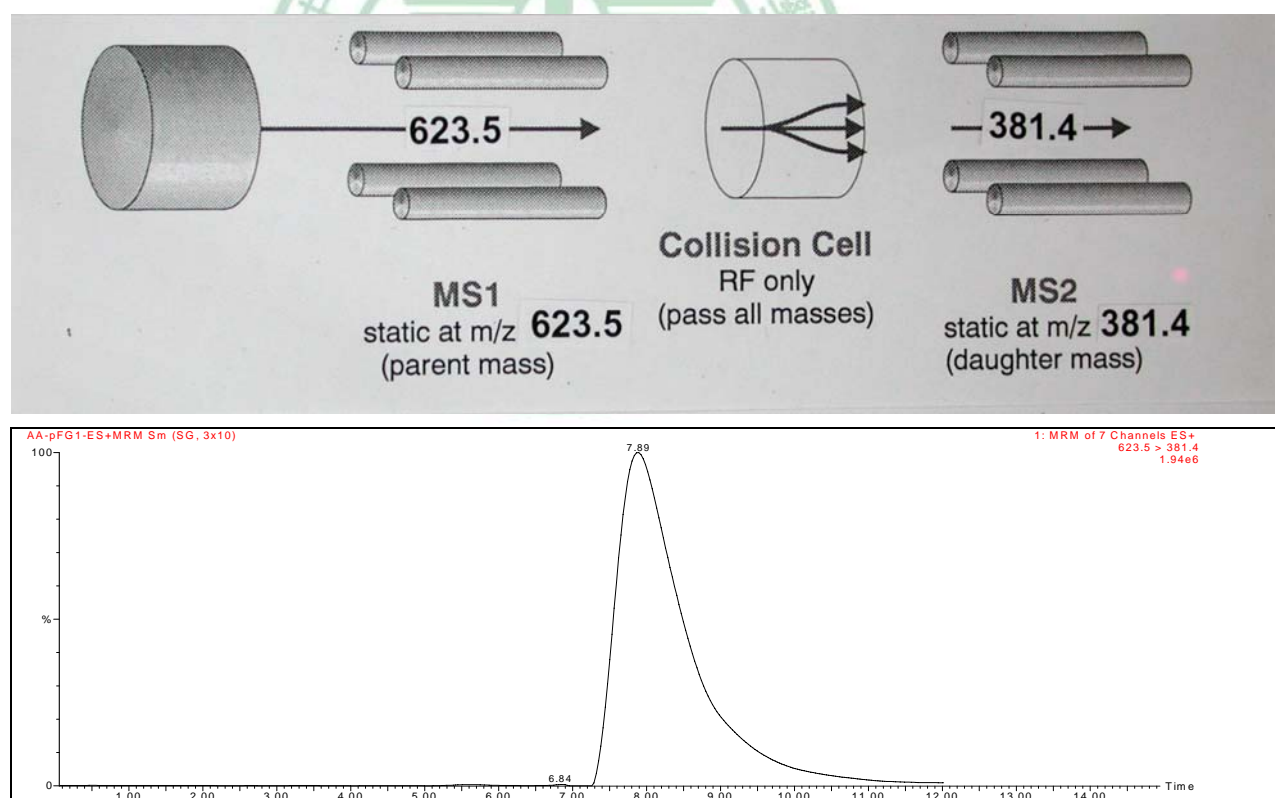


Fig.14: The mechanism of MRM scan and obtained MRM/TIC chromatography

3-5.編輯易混淆防己藥材之 MRM 預篩檢試驗(MRM pre-screen macro-

method)：為同時快速掃描易混淆防己各藥材，選定各藥材之指標成分或 1~2 個親代離子作為篩檢之標的，集成 7 管道進行多重離子裂解監控，例如粉防己選定 tetrandrine 及 fangchinoline (m/z 623.5 及 m/z 609.5)，廣防己選定 m/z 625.3，木防己選定 m/z 652.4 及 m/z 577.4，漢防己選定 sinomenine (m/z 330.4)及 m/z 522.4 之離子裂片。彙集上述各管道之儀器分析參數集合製作成 MRM 預篩檢試驗巨集指令(Tab.8)，存入電腦中，當欲進行中藥製劑中是否含防己藥材或淆防品時，先以 MRM pre-screen macro- method 分析方式篩檢，檢視 MRM 之 TIC 圖，若出現明顯之波峰，疑似檢出何種防己，再另以上述 3-4 之特定藥材之 fangchi herb identity macro-method 及 MRM screen macro-method 重行分析(Tab.3~6)，比對子代離子質譜圖或呈現藥材相似性百分比。

4. 指紋質譜圖庫適用性探討

4-1.含防己藥材之模擬處方配製：選自古籍《金匱要略》所載--防己黃耆湯，其組成比例為防己 1.0 黃耆 1.0 白朮 0.75 甘草 0.5 生姜 0.5 大棗 0.5，主治風濕，關節炎，多汗症，肥胖症，腎炎，陰囊水腫，下肢浮腫，月經不順等功效，也用於減肥之用途。配製上述處方時，分別以粉防己(*Stephania tetrandra* S. Moore)，漢防己(*Sinomenium acutum* Rehd. et Wils.)，木防己(*Cocculus trilobus* D C.)，廣防己(*Aristolochia fangchi* Wu)取代方中之防己，加入其餘五味藥材，研成粉末以備用。

4-2.模擬處方溶液配製：稱取 4.25 g(相當於防己 1 g)之上述粉末，如同上述 3-1 所載方法萃取、過濾定容成 10 mL 供作檢品溶液。

4-3.另配製防己藥材空白試驗檢體：依防己黃耆湯之處方配製，唯不加防己藥材，並如同 3-1 所載方法萃取、過濾定容成 10 mL 供作空白

檢品溶液。用以瞭解其餘五味藥材或儀器系統是否造成干擾。

4-4. 搜集市售防己藥材或含防己之中藥製劑予以分析，統計藥材之誤用率。

4-4-1. 藥材檢品溶液配製：取藥材粉末 1.0 g，如同 3-1 之配製法以 10 mL 之 70% 甲醇萃取，過濾，收集濾液，再以 70% 甲醇定容成 10mL，即為檢品溶液。

4-4-2. 中藥製劑檢品溶液配製：取相當於防己標示量 1g 之中藥製劑粉末或剪碎之小片，先以少許之純水濕潤，再如同 3-1 之配製法以兩次 10 mL 之 70% 甲醇萃取兩次，過濾，收集濾液，減壓濃縮成約 3 mL，再以 5 mL 甲醇溶解，濾除沉澱物，再以 70% 甲醇定容成 10mL 即為檢品溶液。

4-4-3. 依上述 3-5 所載篩檢儀器分析巨集指令，先以 MRM 預篩檢試驗 (MRM pre-screen macro-method) 分析方式篩檢，檢視 MRM 之 TIC 圖，若出現明顯之波峰，疑似檢出何種防己，再另以上述 3-4 之特定藥材之 Fangchi herb identity macro-method 及 MRM screen macro-method 重行分析，比對子代離子質譜圖或呈現藥材相似性百分比。

Tab. 2 : The compositions of TCM preparation in market and its fangchi species labeled

檢體編號	檢體名稱	處方藥材標示	檢體全處方
FG-1 ^a	防己 粉末(濃縮散)	粉防己	粉防己
FG-2 ^b	防己 濃縮散	防己	防己
FG-3 ^c	漢防己 濃縮粉	漢防己	漢防己
FGHT-1 ^a	防己黃耆湯濃縮顆粒	粉防己	粉防己 黃耆 白朮 甘草 生薑 大棗
FGHT-2 ^a	防己黃耆湯濃縮顆粒	粉防己	粉防己 黃耆 白朮 甘草 生薑 大棗
FGHT-3 ^b	防己黃耆湯濃縮散	粉防己	粉防己 黃耆 白朮 甘草 生薑 大棗
FGHT-4 ^d	防己黃耆湯濃縮顆粒	漢防己	漢防己 黃耆 白朮 甘草 生薑 大棗
FGHT-5 ^e	防己黃耆湯濃縮顆散	漢防己	漢防己 黃耆 白朮 甘草 生薑 大棗
FGHT-6 ^c	防己黃耆湯濃縮顆粒	防己	防己 黃耆 白朮 甘草 生薑 大棗
FGHT-7 ^f	防己黃耆湯濃縮散	防己	防己 黃耆 白朮 甘草 生薑 大棗
FGST-1 ^c	小續命湯濃縮顆粒	防己	防己 麻黃 甘草 人參 生薑 川芎 杏仁 白芍 防風 大棗 炮附子 黃芩 桂枝
FGST-2 ^e	小續命湯濃縮顆粒	漢防己	漢防己 麻黃 甘草 人參 生薑 川芎 杏仁 白 芍 防風 大棗 炮附子 黃芩 桂枝
FGST-3 ^a	小續命湯濃縮顆粒	防己	粉防己 麻黃 甘草 人參 生薑 川芎 杏仁 白 芍 防風 大棗 炮附子 黃芩 桂枝
FGU-1 ^a	通用痛風丸濃縮顆粒	粉防己	粉防己 天南星 蒼朮 黃柏 川芎 白芷 神麴 桃仁 羌活 威靈仙 桂枝 紅花 龍膽
FGU-2 ^b	通用痛風丸濃縮散	防己	防己 天南星 蒼朮 黃柏 川芎 白芷 神麴 桃 仁 羌活 威靈仙 桂枝 紅花 龍膽
FGU-3 ^g	通用痛風丸	防己	防己 天南星 蒼朮 黃柏 川芎 白芷 神麴 桃 仁 羌活 威靈仙 桂枝 紅花 龍膽
FGMT-1 ^b	木防己湯濃縮散	木防己	木防己 石膏 桂枝 人參
FGMT-2 ^a	木防己湯濃縮顆粒	木防己	粉防己 石膏 桂枝 人參
Herb-1	標示木防己藥材	木防己	木防己
Herb-2	疑似廣防己藥材	防己	防己

5. 再現性評估(Reproducibility)：

取模擬處方溶液以同日內 (interday)進行五次之 Fangchi herbal identity macro-method 分析；另進行異日間(intraday)連續五天每日各進行一次之 Fangchi herbal identity macro-method 分析，將所獲得子代離子質譜圖與所建立之指紋質譜圖庫 (LC/MS/MS Fingerprint Database)作比對，matching quality 需 80% 以上(Tab. 9)。

6. 最低檢出量(LOD)：

取上述 3-1.之標準藥材溶液以 70%甲醇，予以稀釋 2、5、10、20、50 倍後(相當於含防己藥材 0.5、0.2、0.1、0.05、0.02g)，再依 3-5 之各藥材之 Fangchi herbal identity macro-method 及 MRM screen macro- method，檢視各稀釋濃度所呈現波峰對雜訊比(S/N)需大於 3 以上，至於子代離子掃描之質譜圖與電腦質譜圖庫之比對相似性需 80% 以上。

7. 案例分析——指紋質譜圖之應用(Application of LC/MS/MS Fingerprint)：

搜集市售疑似廣防己藥材及疑似木防己藥材各一件，以及標示含防己之單方或複方中藥製劑 18 件，予以進行各項分析，檢視其 daughter ion spectrum，並與 LC/MS/MS Fingerprint Database 比對，探討市售中藥製劑防己藥材之使用情形。

7-1.藥材檢品溶液配製：取藥材粉末 1.0 g，以 70%甲醇 10 mL 萃取，過濾，收集濾液，再定容成 10 mL，即為檢品溶液。

7-2.中藥製劑檢品溶液配製：取中藥製劑相當於防己 1 g 之粉末，以少許之純水濕潤，再以兩次 10 mL 之 70%甲醇萃取兩次，過濾，收集濾液，減壓濃縮成約 3 mL，加 5 mL 甲醇溶解，濾除沉澱物，再以 70%甲醇定容成 10 mL 即為檢品溶液。

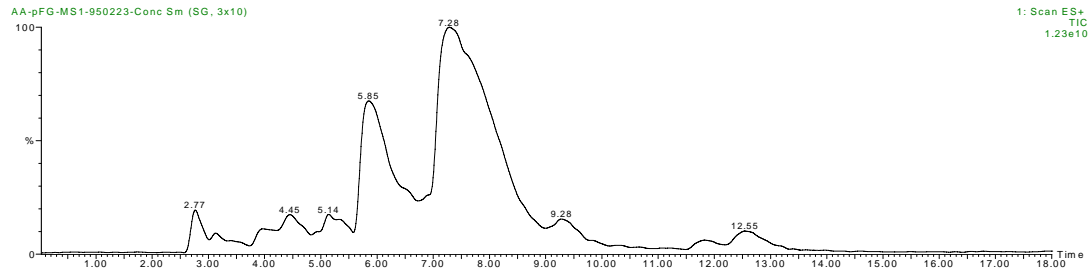
- 7-3.依下列 Tab.8 所載防己藥材 MRM 預篩檢試驗(MRM pre-screen macro-method)，進行多重離子裂解監控 (MRM) 掃描分析，檢視 MRM 之 TIC 圖，是否出現表中何種防己之波峰，則另以各別防己藥材鑑定試驗之巨集指令(Fangchi herbal identity macro-method)重行分析(Tab.3~6)，並與電腦質譜圖庫比對，將可獲知檢出結果。若有疑似檢出廣防己，則以 Journal of Food and Drug Analysis 中所載 Analyzing Aristolochic acids in Chinese Herbal Preparations Using LC/MS/MS, 2005, (13)之分析條件⁽²⁵⁾(Tab.7)予以分析，並比對子代離子質譜圖、離子峰滯留時間及 UV 圖譜(Fig.32)。
- 7-4. 分析統計檢出結果(Tab.11)，以及探討目前國內防己使用情形。
- 7-5. 異常案件之調查研究。



四、結果與討論

1. 粉防己之液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜建立

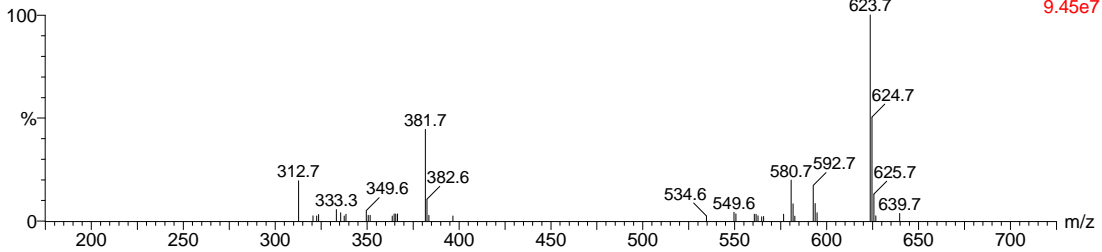
- 1-1. 粉防己藥材經切片染色後顯微鏡下觀察(Fig.4)，與文獻資料⁽²⁻⁵⁾比對，以及與粉防己之指標成分 tetrandrine 作 TLC 比對結果(Fig.11)相符，確立其基原為 *Stephania tetrandra*，以此作為標準藥材(Fig.3)，進行液相層析串聯式指紋質譜圖之建檔，以及模擬處方配製。
- 1-2. 進行液相層析串聯式指紋質譜圖之建檔過程中之 HPLC 分析條件：分離管柱為 Cosmosil 5C₁₈-AR, 4.6 x 150 mm。移動相溶媒系為 methanol : acetonitrile : 各含 0.1% w/v 之 formic acid 及 ammonium acetate 混合水溶液(17:17:66)，流速：0.5 mL/min (1:1 分流)，該分析條件乃參考文獻⁽²⁴⁾中「對利用高效液相層析質譜儀檢測粉防己之三各主要活性成分(tetrandrine, fangchinoline, cyclanoline)」一文中所評估之移動相溶媒系以 acetonitrile 及 0.1% w/v 之 formic acid 為最佳組合，以及參考文獻中對 aristolochic acid 定性定量⁽²⁶⁻²⁸⁾時應用之移動相溶媒系，以及常用於分析中藥或食品摻加 sildenafil 西藥成分之移動相溶媒系⁽²⁹⁾，並予以部份修改，以適合四種防己於 20 分鐘以內溜出鑑別性之成分之移動相溶媒系，作為後續各藥材之分析，祈使比對過程之一致性。又因中草藥成分複雜，不明成分尚佔多數，無法一一調整適合各成分之毛細管電壓(capillary voltage)及錐口電壓(cone voltage)等質譜儀器參數作分析，權以常設(儀器 default 值)之毛細管電壓為 3 kV 及線性錐口電壓變化(cone voltage ramp)作為質譜分析條件。
- 1-3. 標準藥材離子裂片之選擇(Principle of fragment selection)：以粉防己為例，標準藥材萃取溶液經正離子電灑法第一段全掃描質譜分析(ESI+MS1)結果，經扣除基線之干擾裂片，其中正離子全掃描質譜圖所獲得之 TIC 圖有數支明顯之離子峰(Fig.15)，每支離子峰之全質譜



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS1-950223-Conc 858 (7.242) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (844:1030-607:809)

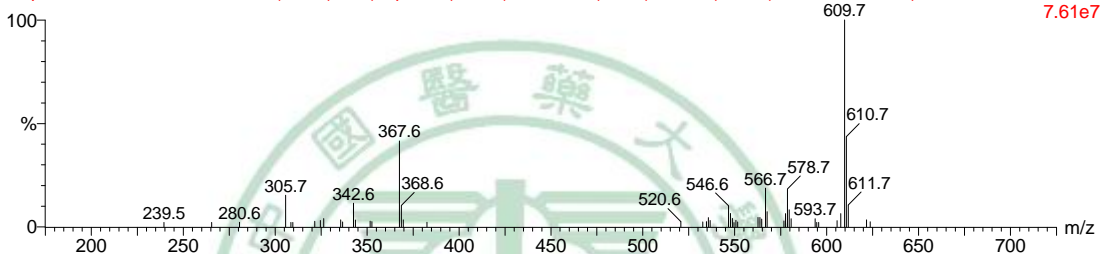
1: Scan ES+
9.45e7



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS1-950223-Conc 700 (5.910) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (671:773-178:292)

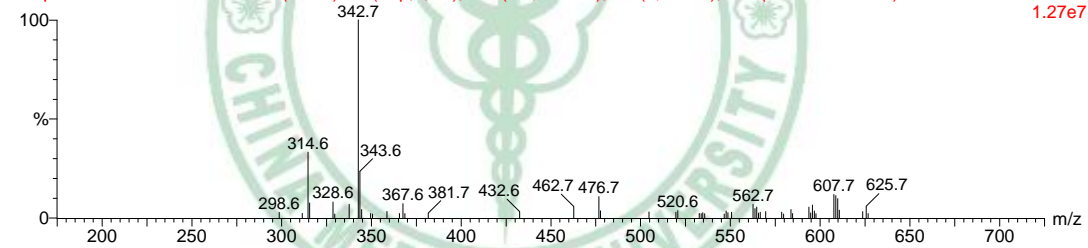
1: Scan ES+
7.61e7



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS1-950223-Conc 326 (2.757) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (322:663-75:263)

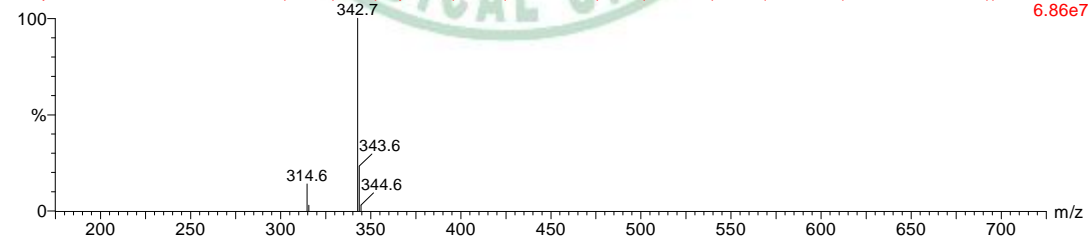
1: Scan ES+
1.27e7



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS1-950223-Conc 682 (5.758) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (616:682-(693:781+518:599))

6.86e7



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS1-950223-Conc 858 (7.242) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (681:905-(510:653+971:1090))

3.27e7

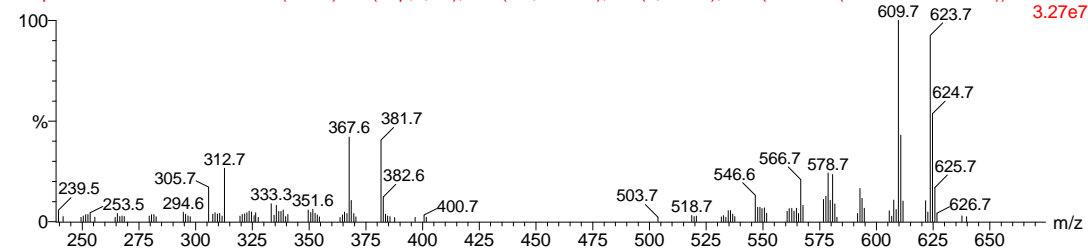


Fig.15 : The TIC of ESI+/MS 1 scan and ESI+/MS 1 spectrums of *Stephania tetrandra* herb extract

圖中選取 m/z 305.4, 312.8, 314.4, 333.1, 342.4, 609.4, 623.5 等離子強度(abundance)較大者作為親代離子(parent ion)，予以進行正離子電灑法子代離子質譜分析(ESI+ Daughter ion scan)。

1-4. 粉防己之負離子電灑法第一段全掃描質譜分析(ESI⁻/MS1) 所獲得 TIC 圖之離子強度，較 ESI⁺/MS1 所獲得 TIC 圖離子強度為低，且未見 tetrandrine 指標成分之負離子電灑法分析中理論上應能看到之 m/z 621(M-H)⁻，因此於用於製作指紋圖譜，則較缺鑑別性。因此建立粉防己之指紋圖譜，乃以正離子質譜圖為主。但於 ESI⁻/MS1 之質譜圖中有明顯之 m/z 191 負離子裂片，以 m/z 191 為源頭離子進行負離子子代離子質譜分析(ESI-D191)，經與 NLFD3 LC/MS/MS library database 比對結果為檸檬酸(citric acid) (Fig.16)，經查文獻^(2,4)證實粉防己含有豐富之檸檬酸，由此觀之，間接證實液相層析串聯式質譜指紋圖譜分析法之可行性。

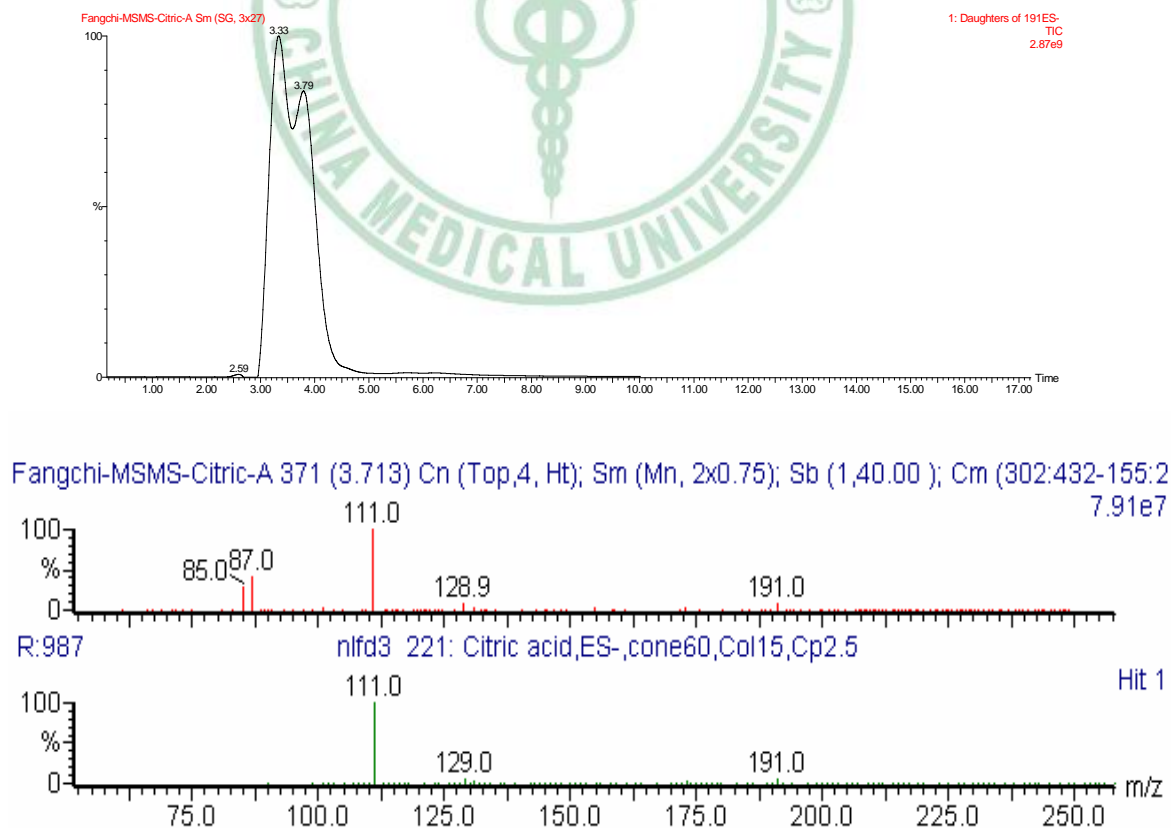
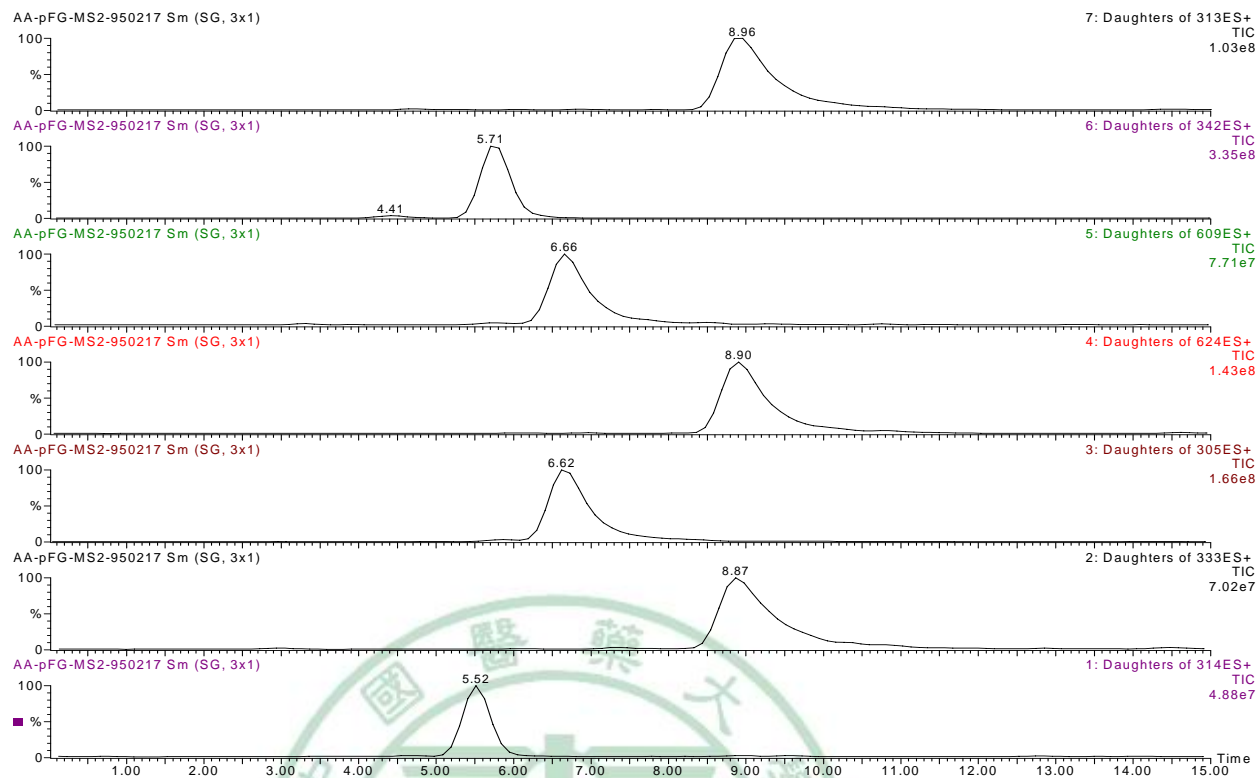


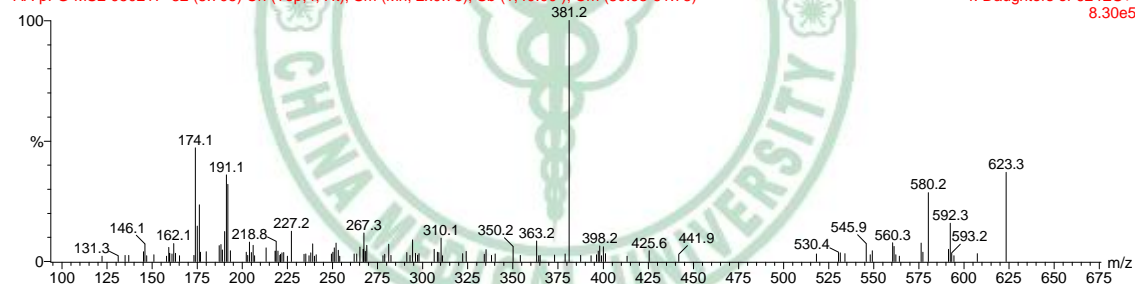
Fig- 16: The ESI⁻ m/z 191 daughter ion scan and the library search result



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS2-950217 82 (8.795) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (80:93-61:73)

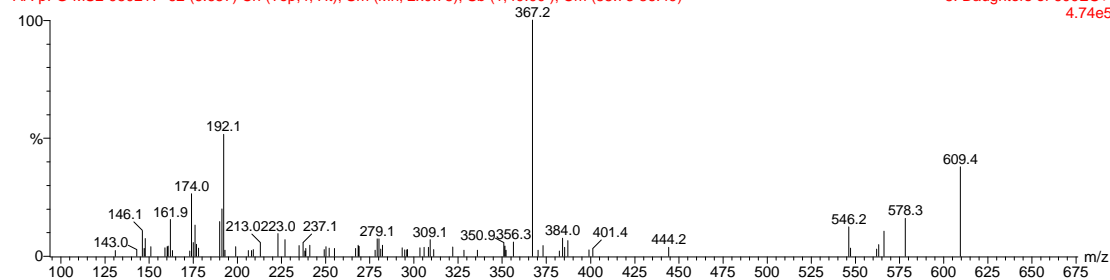
4: Daughters of 624ES+ 8.30e5



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS2-950217 62 (6.657) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (58:73-36:49)

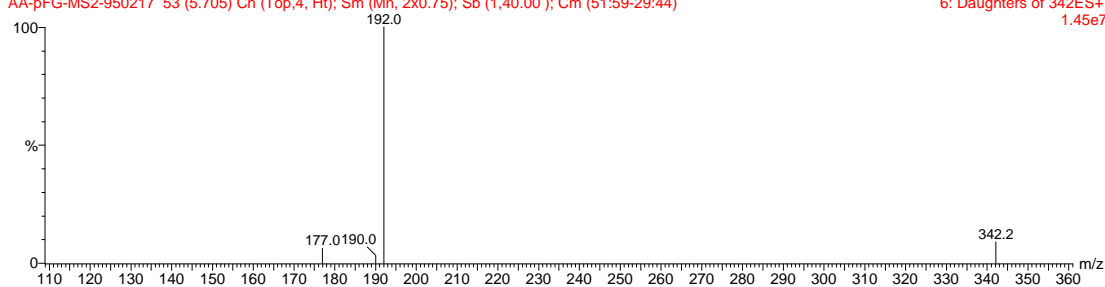
5: Daughters of 609ES+ 4.74e5



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS2-950217 53 (5.705) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (51:59-29:44)

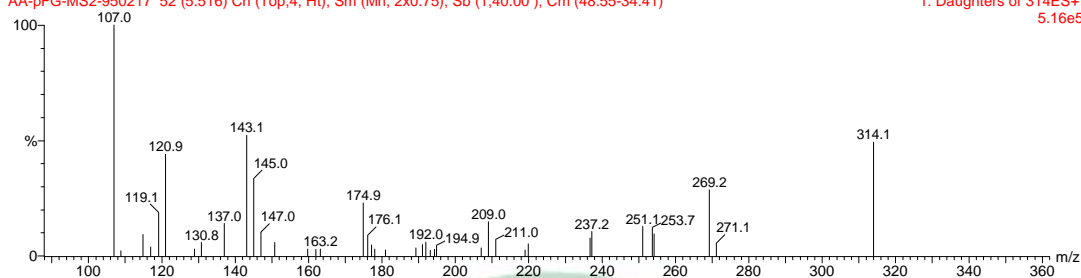
6: Daughters of 342ES+
1.45e7



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS2-950217 52 (5.516) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (48:55-34:41)

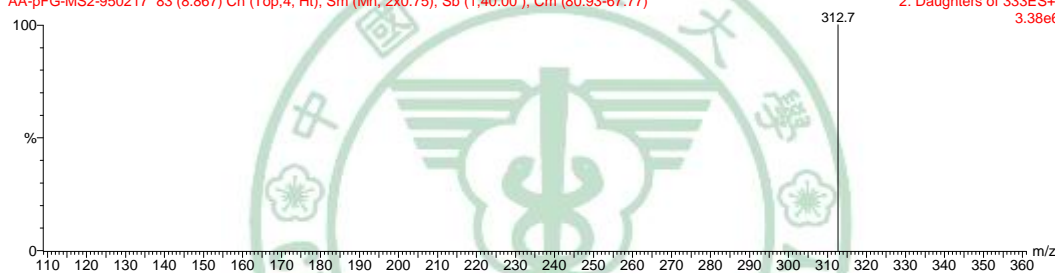
1: Daughters of 314ES+
5.16e5



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS2-950217 83 (8.867) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (80:93-67:77)

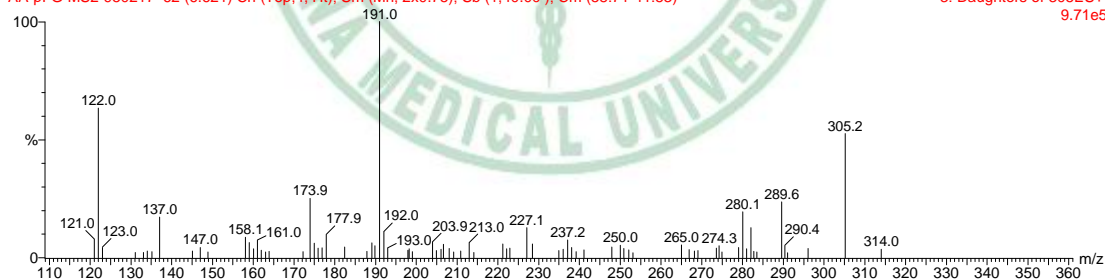
2: Daughters of 333ES+
3.38e6



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS2-950217 62 (6.621) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (58:71-41:53)

3: Daughters of 305ES+
9.71e5



Stephania tetrandra-9502

AA-pFG-MS2-950217 82 (8.850) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (79:97-56:72)

7: Daughters of 313ES+
2.60e5

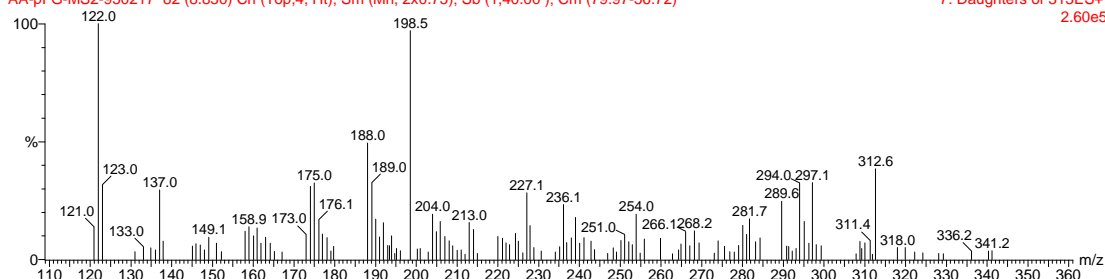


Fig.17 :The daughter ion spectrums of selected fragments in *Stephania tetrandra* herb

1-5. 子代離子質譜圖製作：製作過程，援用 ES⁺/MS1 所設定之毛細管電壓為 3 kV，錐口電壓設定為固定 60V，進行分析各別選定源頭離子之子代離子質譜掃描，適時調整 collision energy，使獲得典型之子代離子質譜圖(Fig.17)，並將子代離子質譜圖連同儀器分析之參數建入質譜圖庫中。

1-6. 檢視其獲得之子代離子質譜圖，源頭離子與獲得之最大離子裂片斷(based peak)之比值一般均能介於 1~ 1/10 之間，唯獨所選定之 m/z 333 則甚易裂解成 m/z 312.7(圖譜記載為 m/z 313)之單一裂片，且其離子峰滯留時間(RT)與 m/z 312.7 之子代離子質譜離子峰相同，約 8.9 分鐘(Fig.18)，因此兩者應屬類緣成分，m/z 333 為 m/z 313 之不安定之前趨物。另就 ES+D623.5, ES+D312.8, ES+D333.1 三者之 RT 相同，應同源於 m/z 623.5 離子裂片，且 ES+D312.8 應為帶兩個電核(z=2)之離子裂片，此推論正與文獻⁽²⁴⁾所言為[M+2H]⁺²裂片之結論不謀而合，ES+D 333.1 則為 m/z 623.5 之降解離子裂片；同理 ES+D609.4 與 ES+D305.4 為同源離子裂片，後者應為 fangchi-noline 之[M+2H]⁺²之裂片(z=2)。

另就 m/z 314 與 m/z 342 而言，兩者離子峰滯留時間(RT)相同，約 5.6 分鐘，但兩者裂解之代離子質譜圖並無相關性，因此難推定兩者具有類緣關係。由文獻記載粉防己^(4,13)含 cyclanoline (C₂₀H₂₄NO₄, M.W. 342)，因屬於四級銨，本身即帶一個電核，因此 m/z 342 即可能是 cyclanoline [M]⁺之分子離子裂片。

粉防己之指標成分為 tetrandrine(C₃₈H₄₂N₂O₆, MW. 622) 及 fangchinoline (C₃₇H₄₀N₂O₆, MW. 608)，在 ESI⁺/MS 1 中有明顯之 m/z 623 及 m/z 609 [M+H]⁺離子裂片，經與 tetrandrine 對照標準品(Fig.19)比對結果相符。m/z 623 與 m/z 609 之 daughter ion spectrum 主要子代離子裂片均相差 14 個 amu，正好符合 fangchinoline 結構(Tab.12)中之一

phenolic-OH group 經 methylation 而得 tetrandrine 之證據。經查本分析過程所獲得 fangchinoline 之子代離子質譜圖，與文獻⁽²⁴⁾ 用 fangchinoline 標準品所建立之子代離子質譜圖則相似。因此雖未取得 fangchinoline 對照標準品仍可確認 m/z 609 即為 fangchinoline，更間接證實取得藥材之正確性，以及用 LC/MS/MS 分析法鑑定粉防己藥材獲得初步之可行性。

1-7.編輯粉防己鑑定試驗巨集指令(Herb identity macro-method)：綜合上述分析結果，每個選定源頭離子之子代離子質譜掃描稱之為一個管道(channel)，簡記為 ES+Dxxx，粉防己設定 7 個管道，將此 7 個管道之儀器分析參數集合製作成儀器分析指令，存入電腦中以執行分析(Tab.3)，一次同時掃描 7 個管道，檢液中若存在有選定之 m/z 源頭離子，且適合儀器分析參數者，將有離子峰出現，經扣除基線處理，將獲得該選定源頭離子之子代離子質譜圖(daughter ion spectrum)，並與標準質譜圖庫作比對，並顯示比對相似度(matching quality)，以百分比表示(%) (Fig.17)。

1-8.編輯粉防己 MRM 掃描巨集指令：因中藥成分複雜，為摒除其他成分之干擾，提高分析之感度，另編輯粉防己藥材之親代離子裂片與子代離子裂片之配對分析之巨集指令，以進行多重離子裂解監控分析(MRM, Multiple Reaction Monitoring)，稱之為 MRM 掃描巨集指令(MRM screen macro-method)。以 tetrandrine 之 ES+D623.5 為例，分析該管道時，儀器僅允許 m/z 為 623.5 之源頭離子進入，經碰撞裂解獲得 m/z 381.4 之子代離子裂片者才予以記錄，簡記為 m/z 623.5>381.4 (Fig.18)，是為 MRM/TIC 圖，因此粉防己之 MRM screen macro-method 也有 7 個管道，由 Fig.18 顯示幾乎是單一波峰，確實有效排除其他干擾物質，頗具專一性。唯該圖無法與標準質譜圖庫作比對，主要檢視各管道波峰滯留時間與標準藥材是否相符，以及相符管道數之百分

比，做為 MRM 比對相似性(MRM Matching quality) 評估量化之表示法。本分析法亦可比對紫外線吸收光圖譜，tetrandrine 與 fangchinoline 於 240 及 280nm 均有最大吸收(Fig.20)。

Tab.3 The *Stephania* identity macro-method and MRM screen macro-method

CH	Precursor Ion(m/z)	Analytic Parameter#	Major Fragments (m/z)	MRM Ion pair (m/z)	Max-RT (min)
1	ES+D623.5	60/38/3	381, 623, 174, 580	623.5>381.3	8.9
2	ES+D609.4	60/38/3	367, 609, 192, 578	609.4>367.3	6.7
3	ES+D342.4	60/25/3	192, 342, 177	342.4>192.1	5.7
4	ES+D333.1	60/ 5/3	313	333.1>312.8	8.9
5	ES+D314.4	60/25/3	107, 314, 269, 143	314.4>107.1	5.5
6	ES+D312.8	60/20/3	199, 122, 313, 297	312.8>198.6	8.9
7	ES+D305.4	60/18/3	191, 122, 290, 174	305.4>191.1	6.7

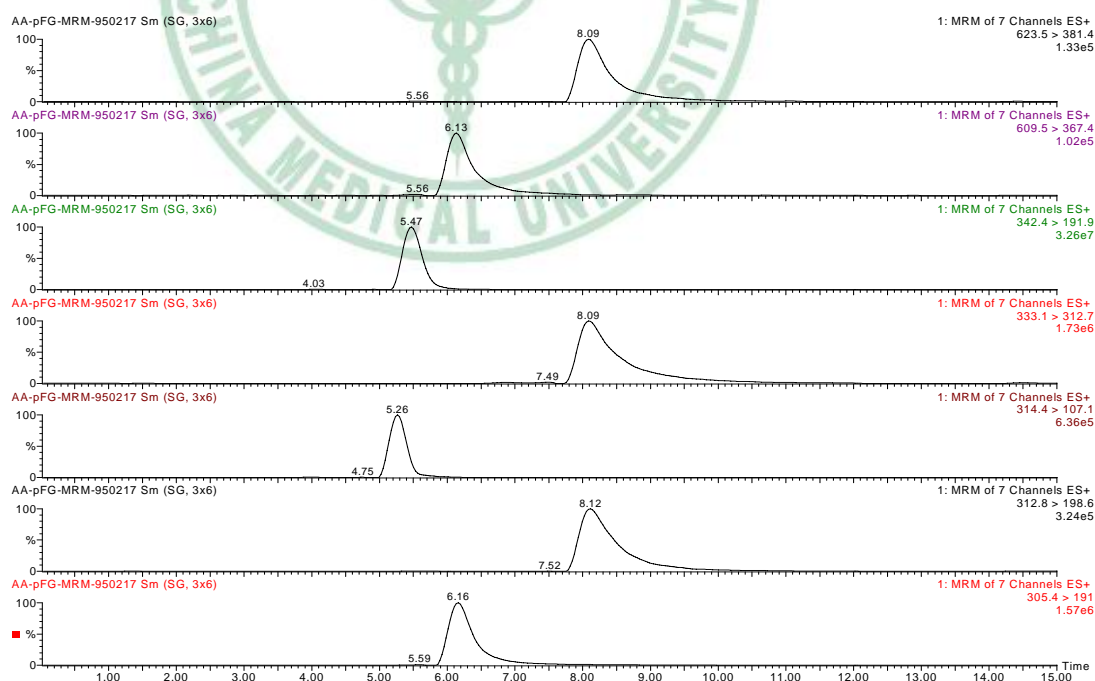


Fig.18 : The chromatogram of *Stephania* MRM screen scan

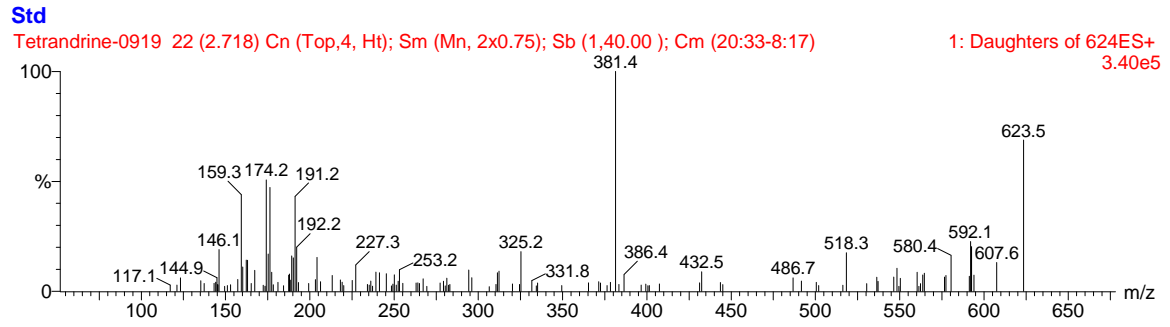


Fig.19 :The daughter ion spectrums of tetrandrine standard

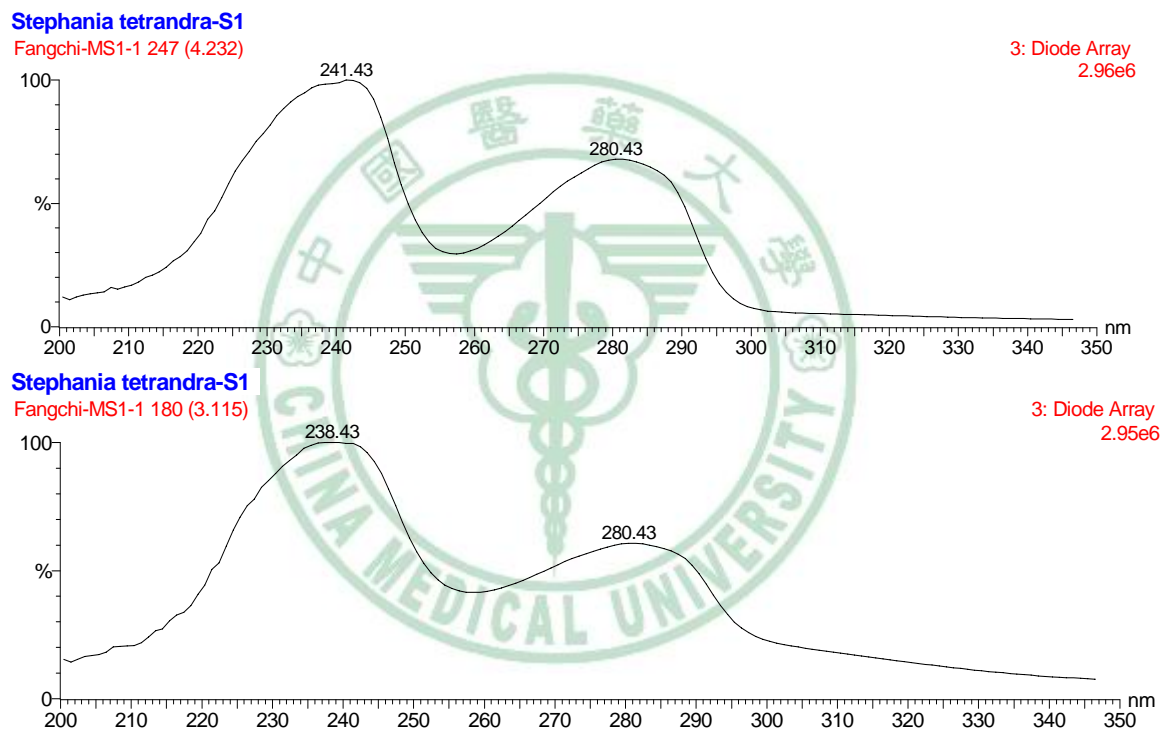


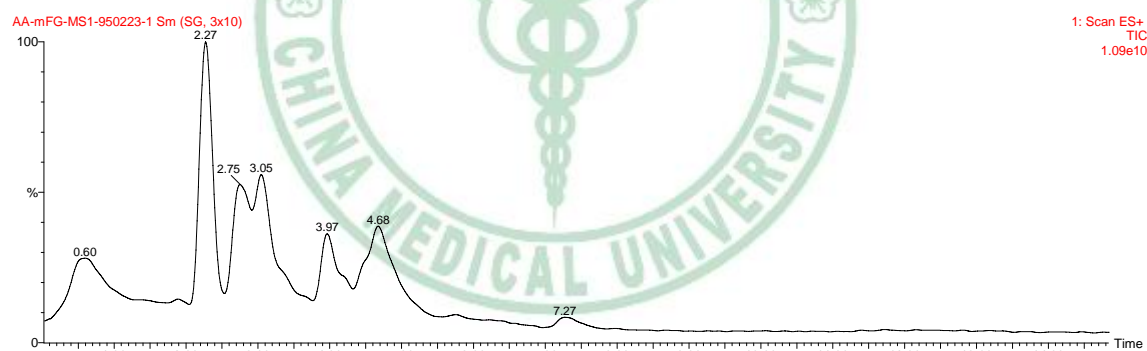
Fig.20 :The UV spectrums of tetrandrine and fangchinoline

2. 木防己之液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜建立

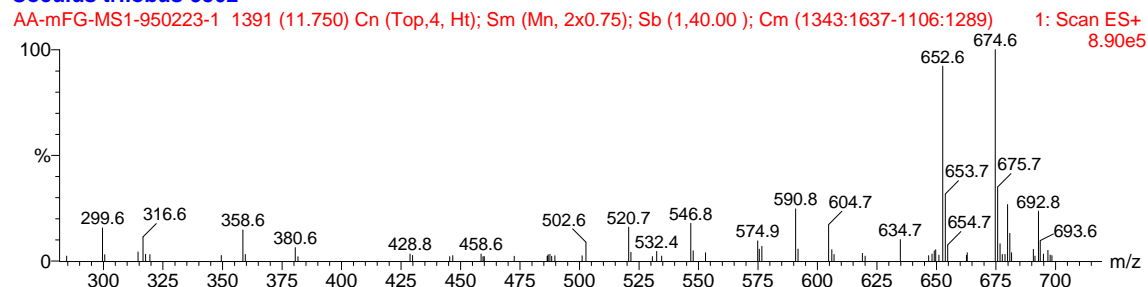
2-1. 木防己藥材係新鮮採集而得(Fig.7)，其基原可確定為 *Cocculus*

trilobus，複經切片染色後顯微鏡下觀察(Fig.8)，與文獻資料^(11,12)比對相符，以此作為標準藥材，進行液相層析串聯式指紋質譜圖之建檔，以及模擬處方配製。

2-2. 以木防己標準藥材萃取溶液經正離子電灑法第一段全掃描質譜分析(ES+/MS1)結果(Fig.21)觀察，其全掃描質譜圖所獲得之TIC圖有數支明顯之離子峰，經扣除基線之干擾裂片，獲得數張離子峰之全質譜圖(MS1 spectrum)(Fig.21)，由其中選取 m/z 314, 334, 342, 418, 564 及 652 等離子強度(abundance)較大之離子裂片為源頭離子，用以進行正離子電灑法子代離子質譜分析(ESI⁺ daughter ion scan)。



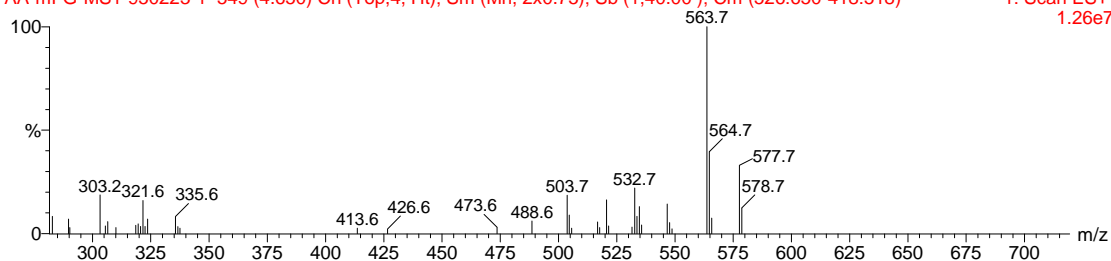
Cocculus trilobus-9502



Cocculus trilobus-9502

AA-mFG-MS1-950223-1 549 (4.650) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (526:650-418:518)

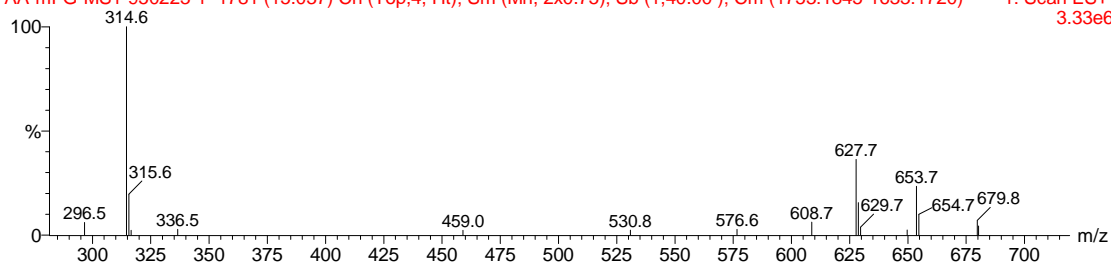
1: Scan ES+
1.26e7



Cocculus trilobus-9502

AA-mFG-MS1-950223-1 1781 (15.037) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (1753:1845-1633:1720)

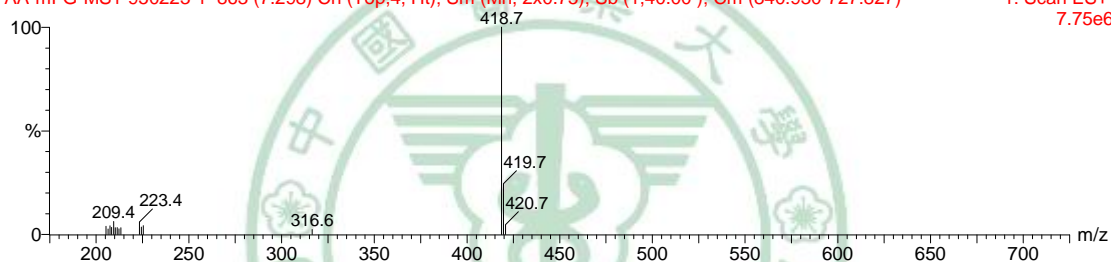
1: Scan ES+
3.33e6



Cocculus trilobus-9502

AA-mFG-MS1-950223-1 863 (7.298) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (840:930-727:827)

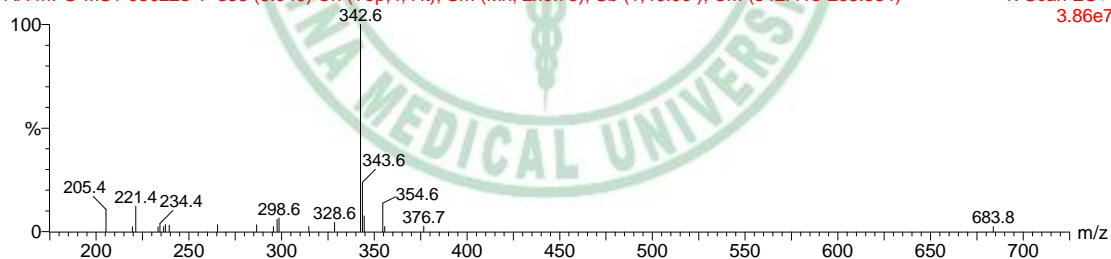
1: Scan ES+
7.75e6



Cocculus trilobus-9502

AA-mFG-MS1-950223-1 358 (3.040) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (342:415-265:334)

1: Scan ES+
3.86e7



Cocculus trilobus-9502

AA-mFG-MS1-950223-1 358 (3.040) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (301:362-179:245)

1: Scan ES+
3.17e7

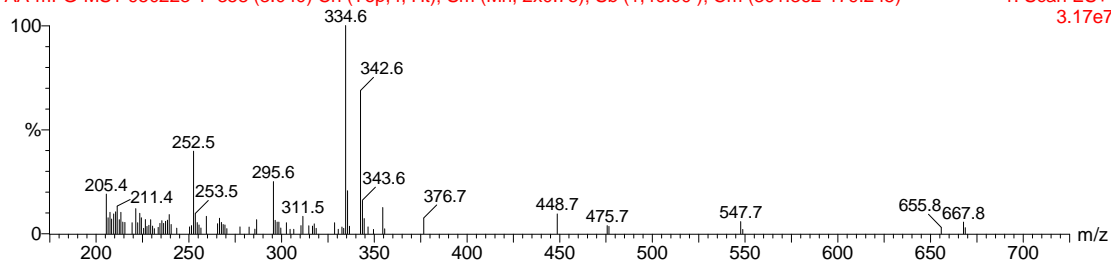


Fig.21 : The TIC of ESI+/MS 1 scan and ESI⁺/MS 1 spectrums of *Cocculus trilobus* herb extract

2-3. 木防己子代離子質譜圖製作：如同粉防己子代離子質譜圖製作過程，毛細管電壓設定為 3 kV，錐口電壓(cone voltage) 設定為固定 60V，進行分析各別選定源頭離子之子代離子質譜掃描，適時調整 collision energy，使獲得典型之子代離子質譜圖(Fig.23)，並將子代離子質譜圖連同儀器分析之參數建入質譜圖庫(LC/ MS/MS Finger print Database)中。檢視所獲得之子代離子質譜圖，源頭離子與獲得之最大離子裂片斷(based peak)之比值均能介於 1~ 1/10 之間。

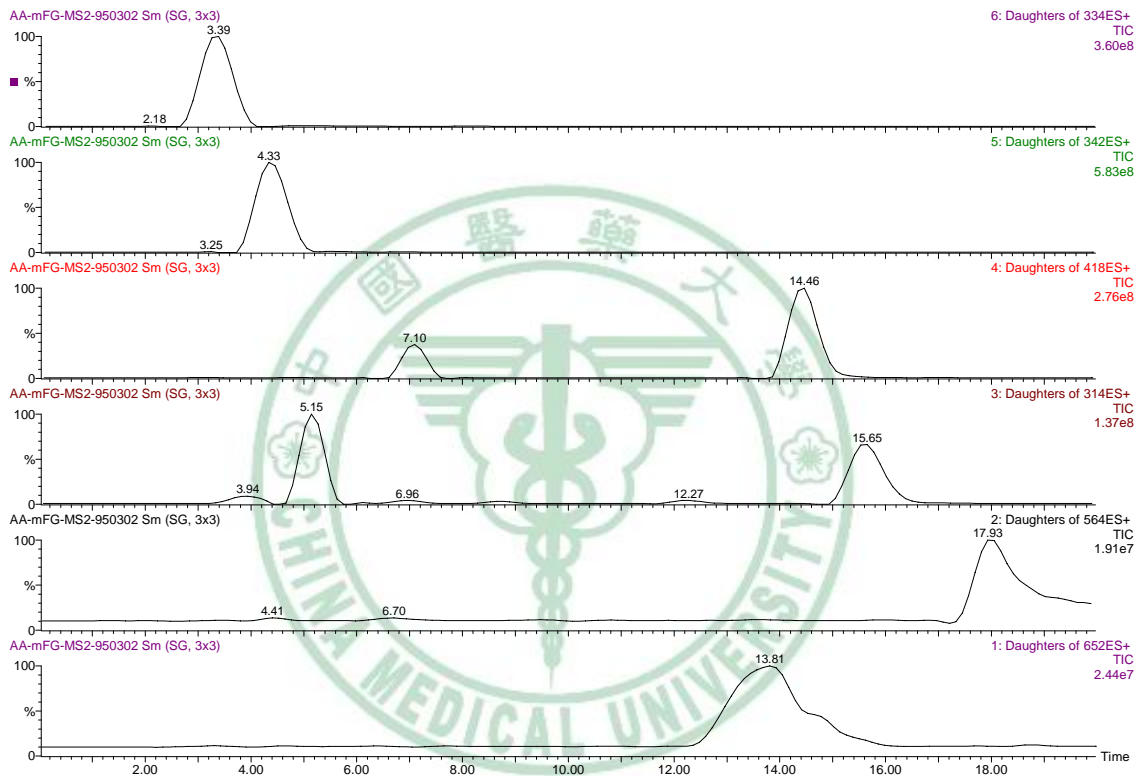
由文獻記載木防己⁽⁴⁾之指標成分為 trilobine($C_{35}H_{34}N_2O_5$, MW: 562)、isotrilobine($C_{36}H_{36}N_2O_5$, MW 576)，在 MS 1 中有明顯之 m/z 563 及 m/z 577 離子裂片，因未購得 trilobine 及 isotrilobine 之對照標準品，是否為該兩成分之 $[M+H]^+$ 離子裂片則不得證實，唯該兩裂片屬於木防己 MS1 之主要離子裂片之一，可用作木防己鑑別之依據。另在 MS 1 中有明顯之 m/z 652 及 m/z 674 離子裂片，前者為分子離子 $[M+H]^+$ 較穩定，可供選擇為鑑定標的離子裂片，後者為加鈉分子離子 $[M+Na]^+$ ，較不穩定，故不取。

另發現木防己也有 m/z 342 裂片，但其裂解獲得之子代離子質譜圖與粉防己者不同(Fig.64)，離子峰滯留時間亦不同，經查文獻，木防己含 magnoflorine($C_{20}H_{24}NO_4$, M.W. 342)，與粉防己之 cyclanoline ($C_{20}H_{24}NO_4$, M.W. 342)同屬於同分異構物(Tab.12)，也具有四級銨結構，本身即帶一個電核，因此 m/z 342 即可能是 magnoflorine 之分子離子裂片 $[M]^+$ 。利用該特性可用於區別粉防己與其他防己。

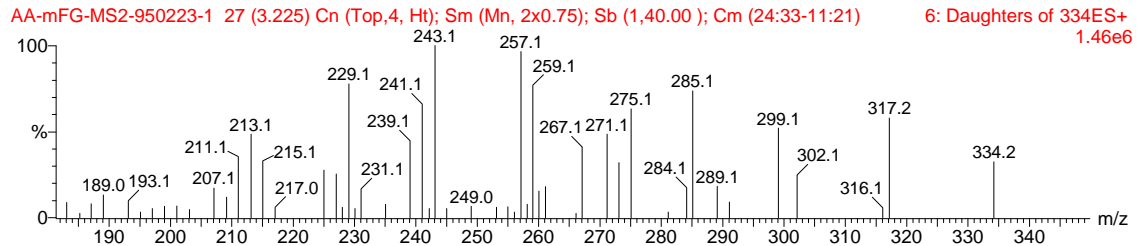
由文獻發現許多植物均含 magnoflorine 成分，因此 magnoflorine 難作木防己唯一證據，因此藥材之預篩檢試驗(Fangchi herbal MRM pre-screen macro-method)中不取，僅於防己藥材鑑定試驗之巨集指令(Fangchi herbal identity macro-method)及防己藥材 MRM 巨集指令

(Fangchi herbal MRM screen macro-method)中作各別防己鑑定參考。

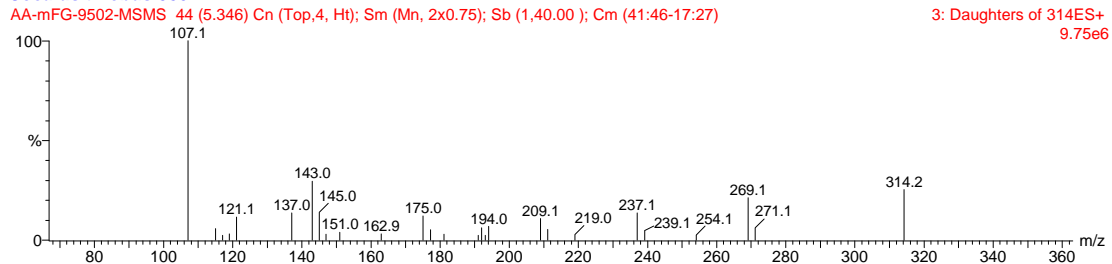
另就 ESI+D418 與 ESI+D314 圖中均有兩支明顯之離子峰，彼此間之滯留時間相差許多，經解析其子代離子質譜圖發現兩者不同，因此可推斷兩者為相同分子量之不同化合物，均可用之於木防己藥材鑑別之標的成分，但在研本究報告中，簡化取其中較大且穩定出現者作標的成分。



Cocculus trilobus-9502



Cocculus trilobus-9501



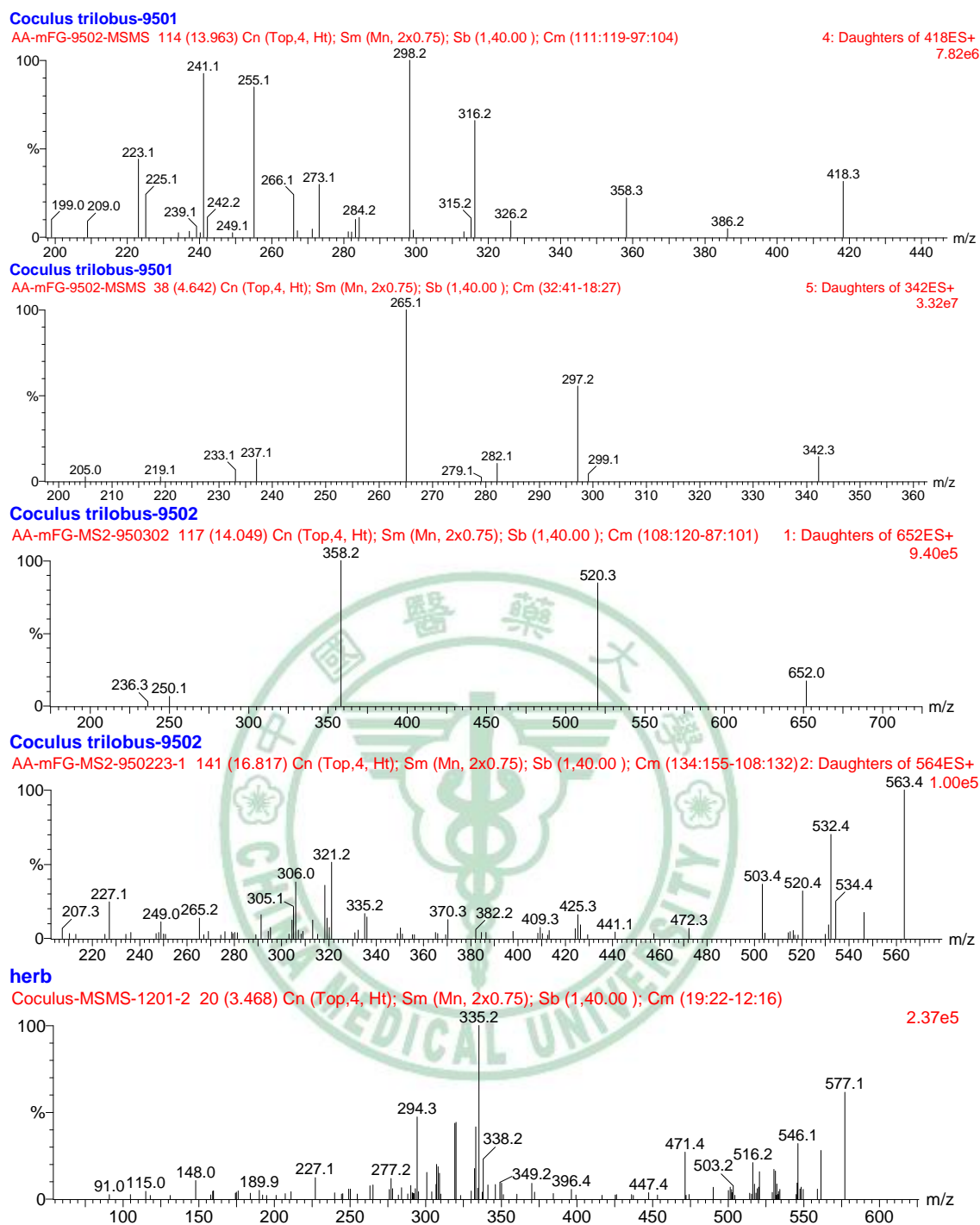


Fig.22 :The daughter ion spectrums of selected fragments in *Cocculus trilobus* herb

2-4.編輯木防己鑑定試驗巨集指令(*Cocculus* identity macro-method)：綜合木防己七個選定源頭離子之子代離子質譜掃描儀器分析參數集合製作成儀器分析指令(Tab.4)，存入電腦中以執行分析，一次同時掃描7個管道，可獲得該選定源頭離子之子代離子質譜圖，並與標準質譜圖庫作比對，並顯示比對相似度。

2-5.編輯木防己MRM掃描巨集指令(*Cocculus* MRM screen macro-method)：為摒除其他成分之干擾，提高分析之感度，另編輯木防己藥材之親代離子裂片與子代離子裂片之配對分析之巨集指令(Tab.4)，以進行多重離子裂解監控分析 (Fig.23)，稱之為MRM掃描巨集指令。

Tab. 4 : The *Cocculus* identity macro-method and MRM screen macro-method

CH	Precursor Ion(m/z)	Analytic parameter	Major Fragments (m/z)	MRM Ion pair (m/z)	Max-RT (Min)
1	ES+D652.4	60/18/3	358, 520, 250, 299	652.4>358.3	12.1
2	ES+D577.6	60/38/3	308, 333,561,577	577.6>561.3	14.4
3	ES+D418.4	60/16/3	298, 241, 255, 418	418.4>298.2	12.4
4	ES+D342.4	60/22/3	265, 297, 342, 282	342.1>265.1	4.4
5	ES+D334.2	60/16/3	257, 243, 285, 334	334.2>285.0	3.3
6	ES+D314.4	60/25/3	107, 314, 143, 269	314.4>107.1	5.0
7	ES+D563.4	60/35/3	212, 242, 284, 330	563.4>532.4	15.1

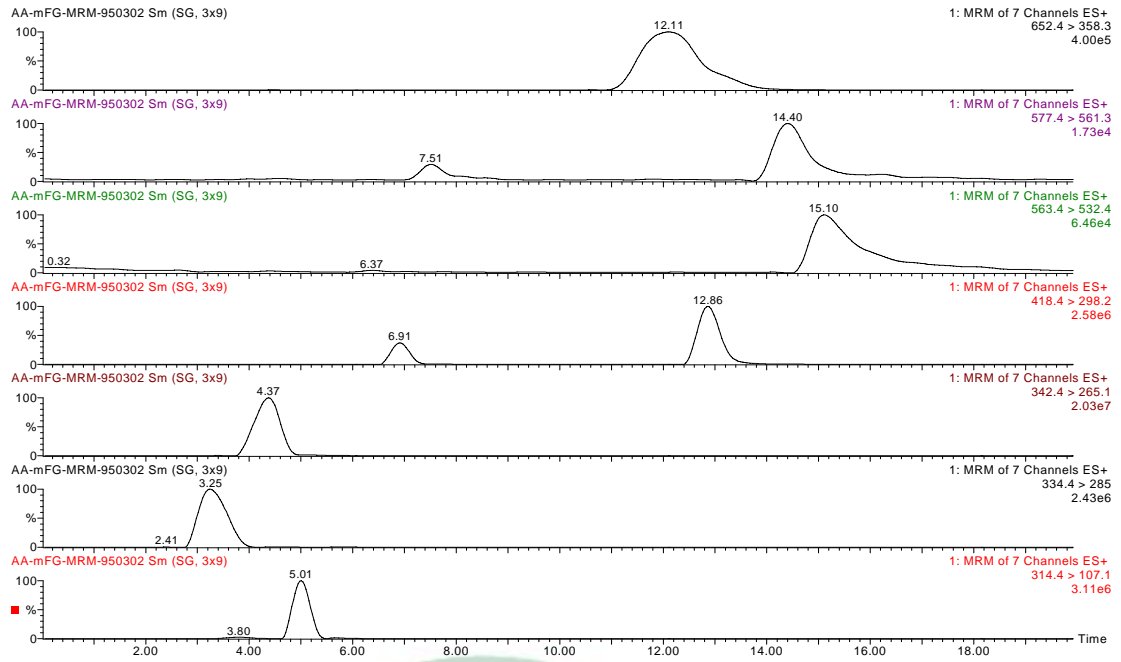
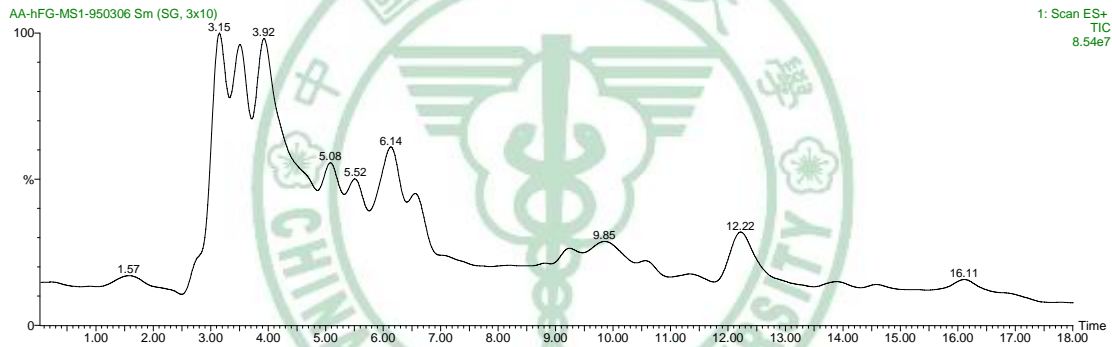
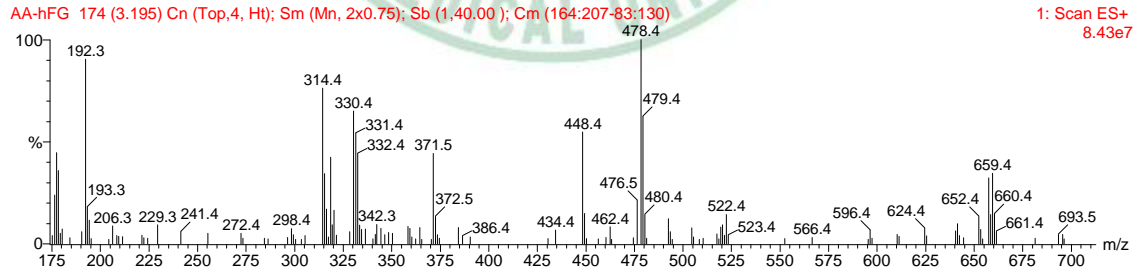


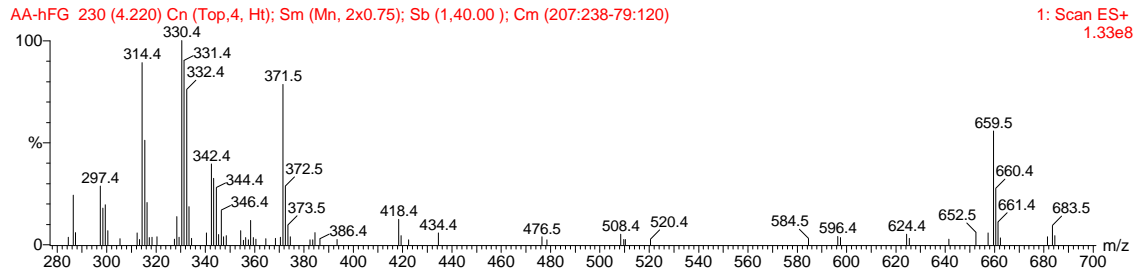
Fig.23 : The chromatogram of Cocculus MRM screen scan



Sinomenium acutumn-9501



Sinomenium acutumn-9501



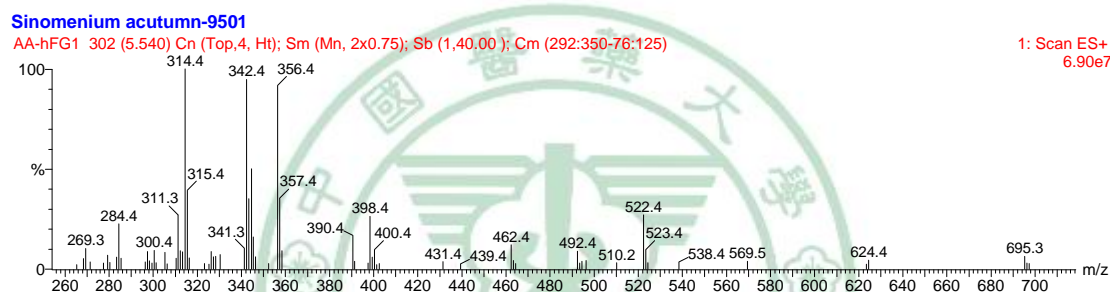
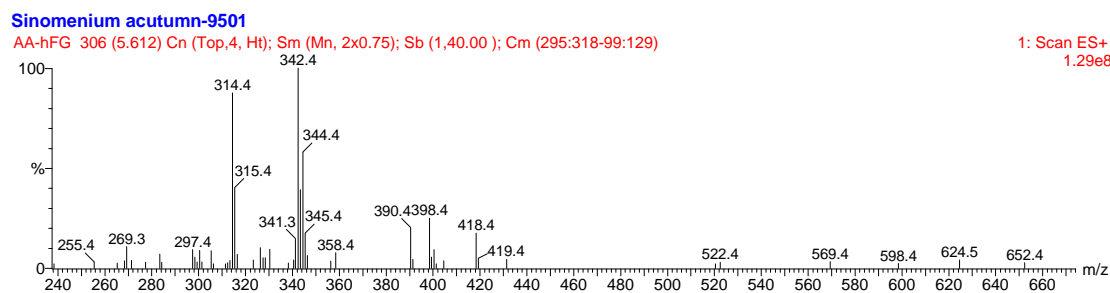
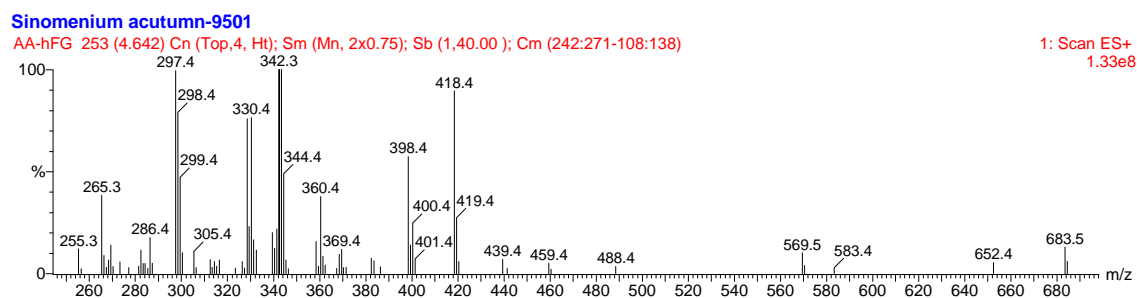


Fig.24 : The ESI⁺/MS 1 spectrums of *Sinomenium acutumn* herb extract

3. 漢防己之液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜建立

3-1. 日本多數文獻所稱「漢防己」即為青藤，為防己科 (Menispermaceae)

植物漢防己 *Sinomenium acutumn* Rehd. et Wils. 之根或根莖。因此由日本價購而得(Fig.9)，其一為原植物之藤莖，另一為切成小塊之粗碎片(邊長約 4 mm 之立方體)，並經張永勳所長及張憲昌博士鑑定，再經切片染色後顯微鏡下觀察(Fig.10) 與文獻資料^(4, 11) 比對，以及萃取液經 TLC 分析與 Sinomenine 對照標準品比對均相符(Fig.11)，其基原可確定為 *Sinomenium acutumn*，以此作為標準藥材，進行液相層析串聯式指紋質譜圖之建檔，以及模擬處方配製。

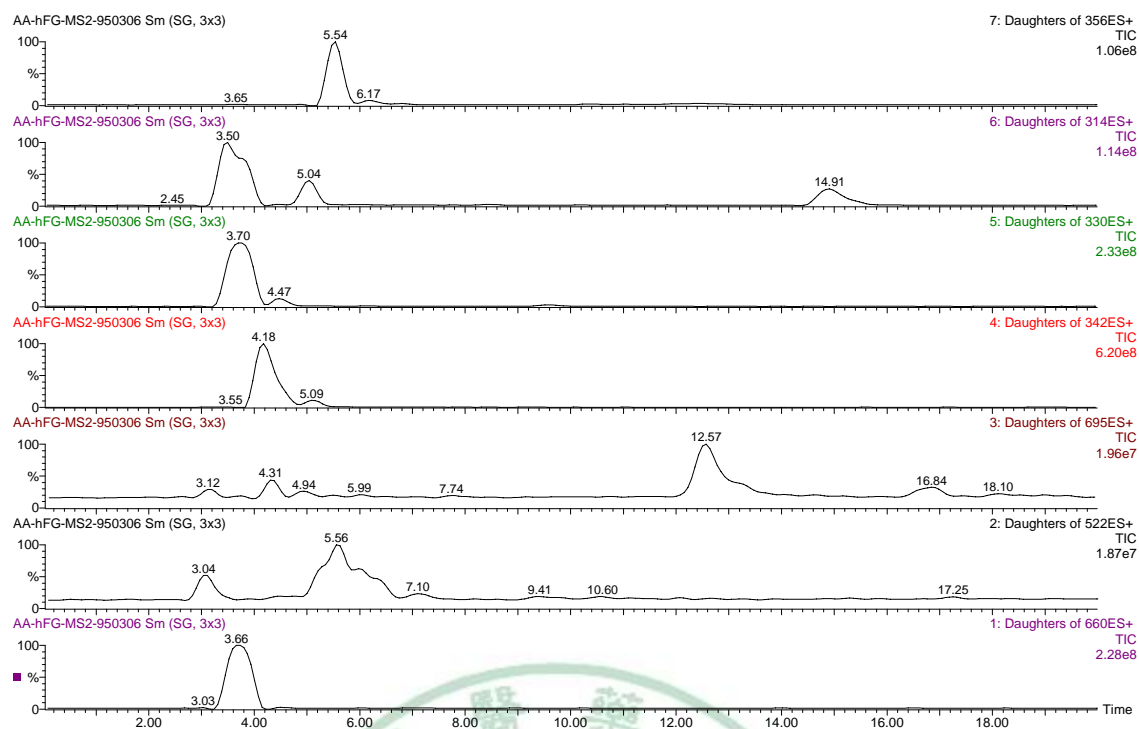
3-2. 以漢防己標準藥材萃取溶液經正離子電灑法第一段全掃描質譜分析

結果觀察，其全掃描質譜圖所獲得之 TIC 圖有數支明顯之離子峰，

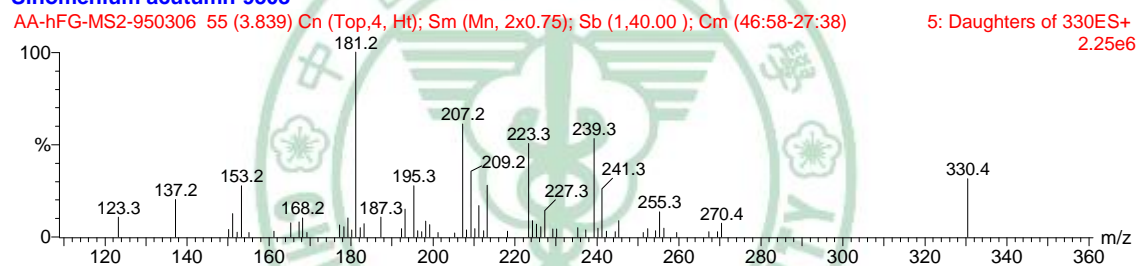
經扣除基線之干擾裂片，獲得數張離子峰之第一段全質譜圖(MS1 spectrum) (Fig.24)，由其中選取 m/z 314, 330, 342, 356, 522, 652 及 660 等離子強度(abundance)較大之離子裂片為源頭離子，用以進行正離子電灑法子代離子質譜分析(ESI^+ Daughter ion scan)。

3-3.子代離子質譜圖製作：製作過程，援用 $ES^+/MS1$ 所設定之毛細管電壓為 3 kV，錐口電壓(Cone voltage) 設定為固定 60V，進行分析各別選定源頭離子之子代離子質譜掃描，適時調整 collision energy，使獲得典型之子代離子質譜圖(Fig, 25)，並將子代離子質譜圖連同儀器分析之參數建入質譜圖庫(LC/ MS/MS Fingerprint Database)中。綜合漢防己六個選定源頭離子之子代離子質譜掃描儀器分析參數集合製作成儀器分析指令(Tab.5)，存入電腦中以執行分析，一次同時掃描 6 個管道，可獲得該選定源頭離子之子代離子質譜圖，並與標準質譜圖庫作比對，並顯示比對相似度。為摒除其他成分之干擾，提高分析之敏感度，另編輯漢防己藥材之親代離子裂片與子代離子裂片之配對分析之巨集指令(Tab.5)，以進行多重離子裂解監控分析 (Fig.27)，稱之為漢防己 MRM 掃描巨集指令(MRM screen macro-method)。

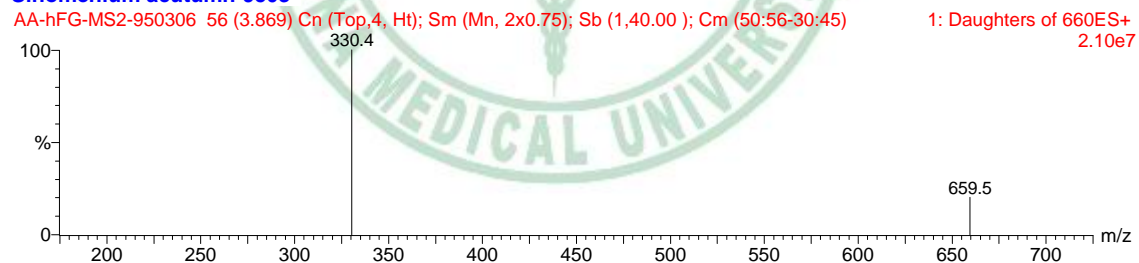
由以上之子代離子質譜圖觀之， ESI^+D600 與 ESI^+D330 之離子峰滯留時間同為 3.7 分鐘，且 ESI^+D660 裂解獲得之主要裂片為 m/z 330， m/z 660 裂解所須之碰撞能量(collision energy)為 10eV，而 m/z 330 則須 30 eV，足見 m/z 330 結構較 m/z 660 安定，且 m/z 660 恰為 m/z 330 之雙倍質量，因此 m/z 660 應為 m/z 330 之雙聚合物(Dimer)。由文獻資料顯示青藤(漢防己)含青藤鹼 Sinomenine($C_{19}H_{23}NO_4$ MW : 329)，在 MS 1 中有明顯之 m/z 330 為 $[M+H]^+$ 離子裂片，且其子代離子質譜圖與 Sinomenine 完全相同(Fig.26)，足見藥材之正確性。



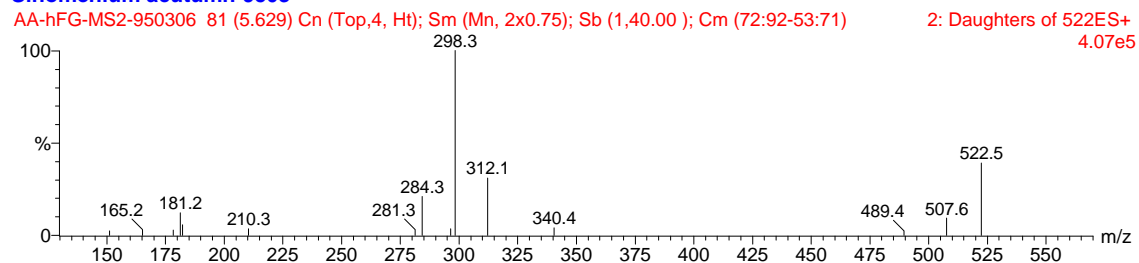
Sinomenium acutum-9503



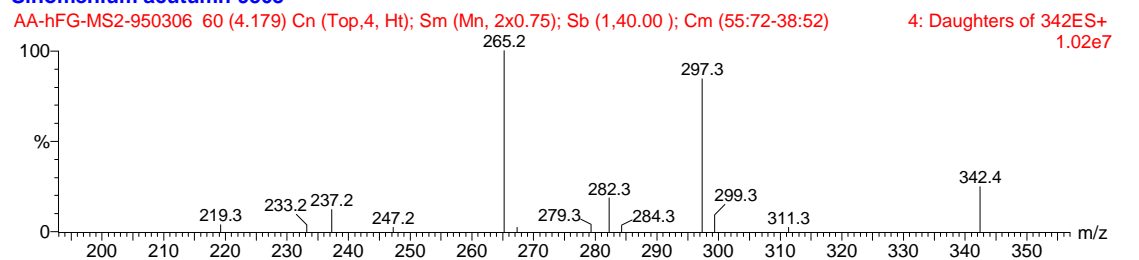
Sinomenium acutum-9503



Sinomenium acutum-9503



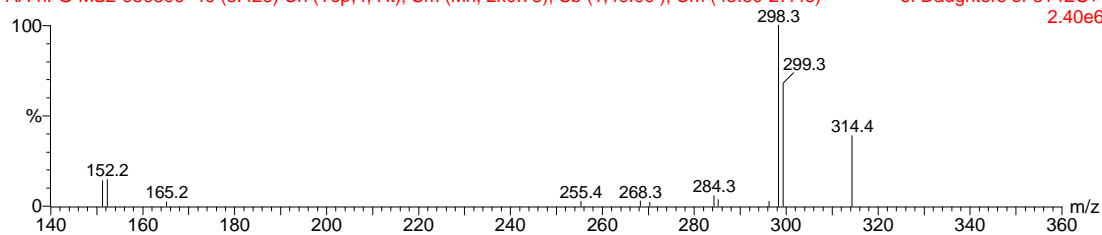
Sinomenium acutum-9503



Sinomenium acutum-9503

AA-hFG-MS2-950306 49 (3.429) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (43:60-27:45)

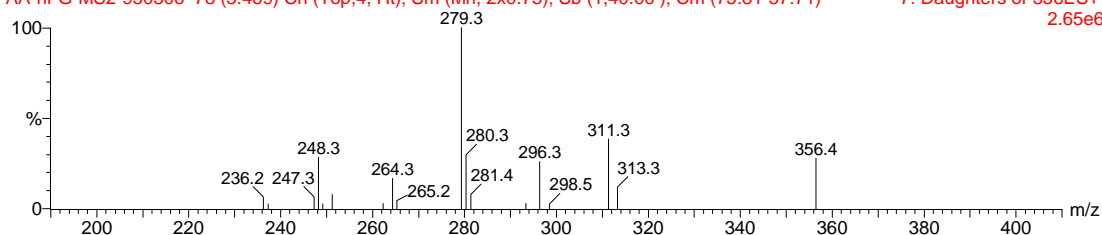
6: Daughters of 314ES+
2.40e6



Sinomenium acutum-9503

AA-hFG-MS2-950306 78 (5.469) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (75:81-57:71)

7: Daughters of 356ES+
2.65e6



Sinomenium acutum-9503

AA-hFG-MS2-950306 180 (12.571) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (175:197-149:167)

3: Daughters of 695ES+
2.21e5

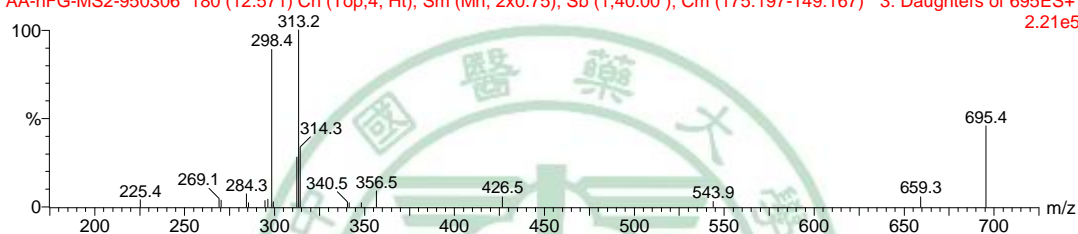


Fig.25 :The daughter ion spectrums of selected fragments in *Sinomenium acutum* herb

70/30/2.8

SINOMENINE-ES+D330-1 1 (1.171)

Daughters of 330ES+
1.01e9

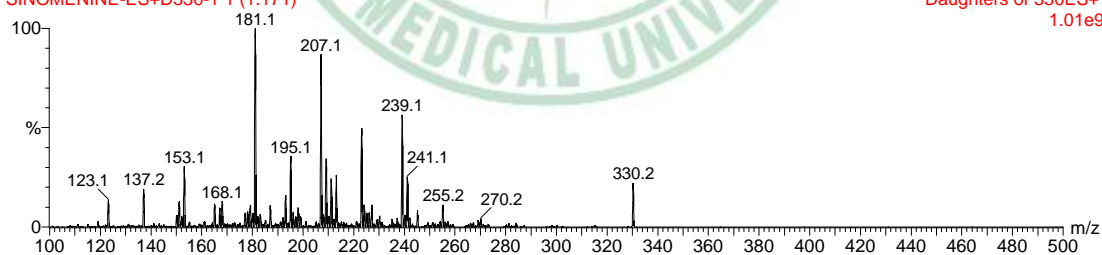


Fig.26 :The daughter ion spectrums of Sinomenine standard

Tab. 5: The *Sinomenium* identity macro-method and MRM screen macro-method

CH	Precursor Ion(m/z)	Analytic Parameter#	Major Fragments (m/z)	MRM Ion pair (m/z)	Max-RT (min)
1	ES+D659.5	60/12/3	330, 659,	659.4>330.2	3.7
2	ES+D522.4	60/30/3	298, 522, 284, 506	522.4>298.4	5.6
3	ES+D356.4	60/25/3	279, 296, 248, 356	356.4>279.2	5.5
4	ES+D342.4	60/22/3	265, 297, 282, 342,	342.4>265.1	4.2
5	ES+D330.4	60/30/3	181, 207, 239, 330	330.4>239.2	3.9
6	ES+D314.4	60/25/3	298, 299, 314, 151	314.4>298.2	3.7
7	ES+D695.3	60/38/3	313, 298, 695, 488	695.3 >313.1	12.4

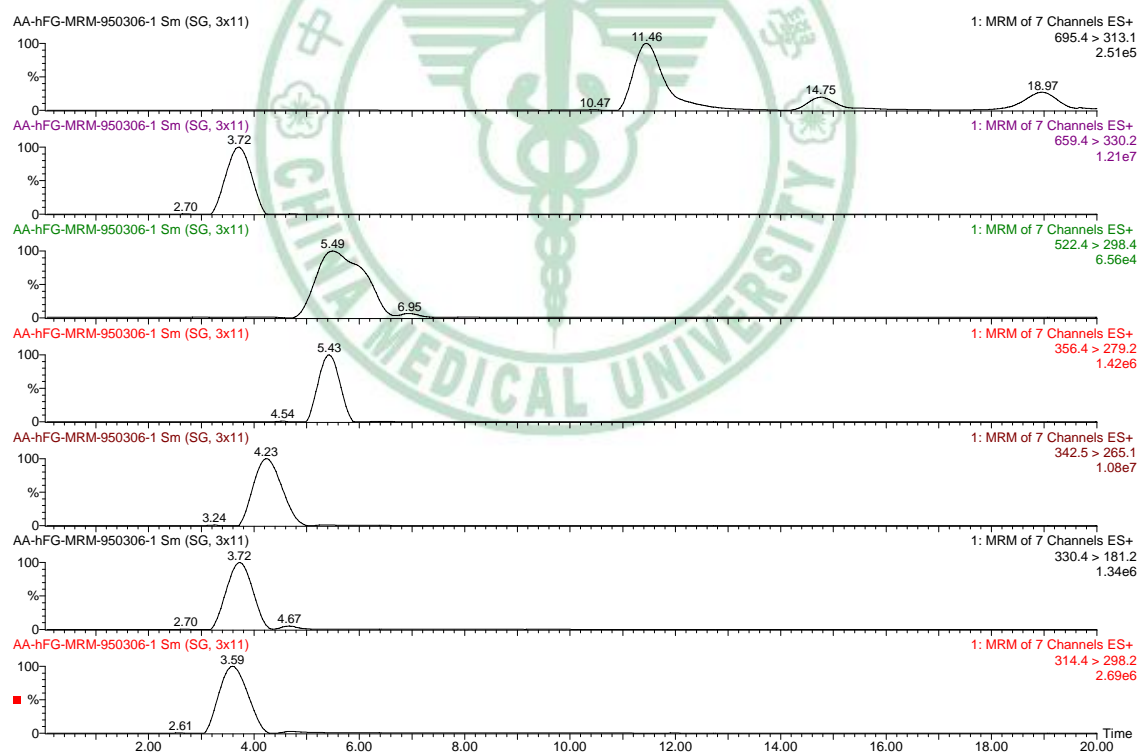


Fig. 27 : The chromatogram of *Sinomenium* MRM screen scan

4. 廣防己之液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜建立

4-1. 廣防己藥材係由行政院衛生署藥物食品檢驗局標準藥材室取得

(Fig.5)，經張憲昌博士鑑定，及與 aristolochic acid 指標成分以 TLC 比對正確後使用，其基原可確定為 *Aristolochia fangchi*，複經切片染色後顯微鏡下觀察(Fig.6)，與文獻資料^(3,5)比對相符，以此作為標準藥材，進行液相層析串聯式指紋質譜圖之建檔，以及模擬處方配製。

4-2. 以廣防己標準藥材萃取溶液經正離子電灑法第一段全掃描質譜分析 (ESI+/MS1)結果觀察，其全掃描質譜圖所獲得之 TIC 圖(Fig.28)有數支明顯之離子峰，經扣除基線之干擾裂片，獲得數張離子峰之全質譜圖(MS1 spectrum) (Fig.28)，由其中選取 m/z 314, 328, 342, 625 及 647 等離子強度(abundance)較大之離子裂片為源頭離子，用以進行正離子電灑法子代離子質譜分析。

4-3.子代離子質譜圖製作：製作過程，援用 ES+/MS1 所設定之毛細管電壓為 3 kV，錐口電壓(cone voltage) 設定為固定 60V，進行分析各別選定源頭離子之子代離子質譜掃描，適時調整 collision energy，使獲得典型之子代離子質譜圖(Fig. 29)，並將子代離子質譜圖連同儀器分析之參數建入質譜圖庫(LC/MS/MS fingerprint database)中。綜合廣防己五個選定源頭離子之子代離子質譜掃描儀器分析參數集合製作成儀器分析指令(Tab.6)，存入電腦中以執行分析，一次同時掃描 5 個管道，可獲得該選定源頭離子之子代離子質譜圖，並與標準質譜圖庫作比對，並顯示比對相似度。為摒除其他成分之干擾，提高分析之感度，另編輯廣防己藥材之親代離子裂片與子代離子裂片之配對分析之巨集指令(Tab.6)，以進行多重離子裂解監控分析 (Fig.30)，稱之為廣防己 MRM 掃描巨集指令(MRM screen macro-method)。

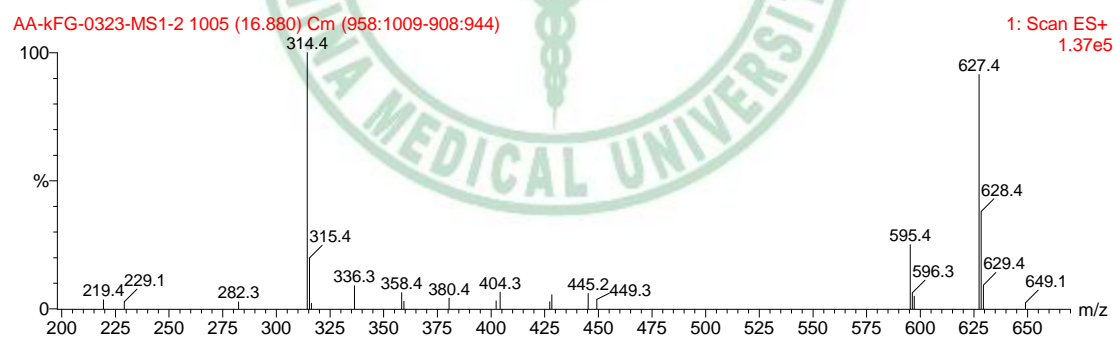
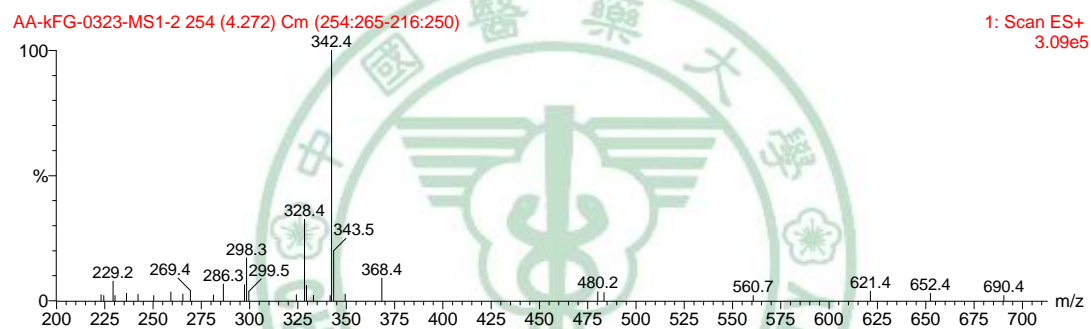
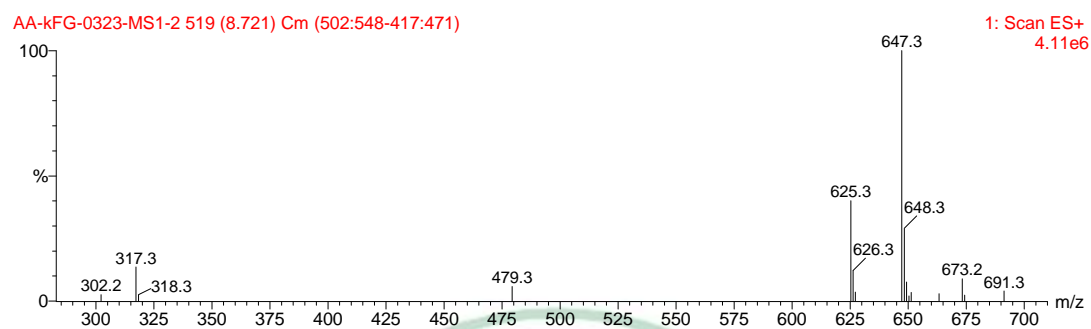
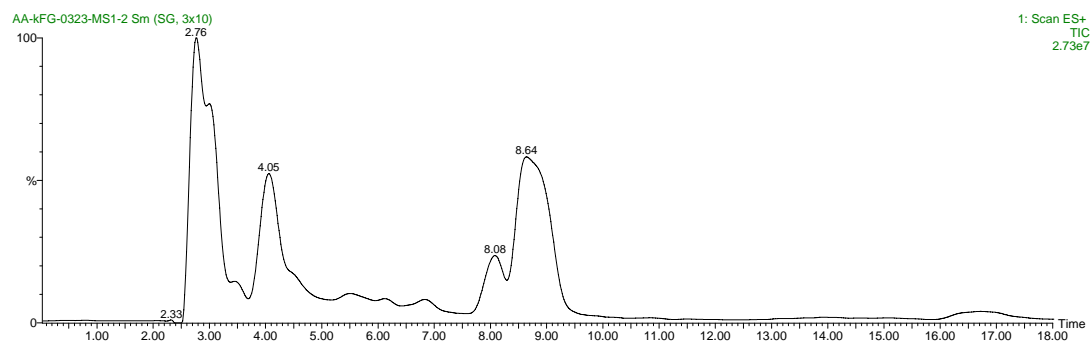
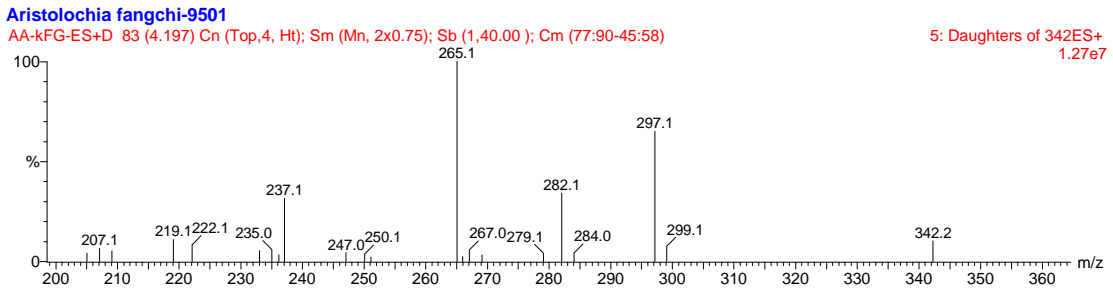
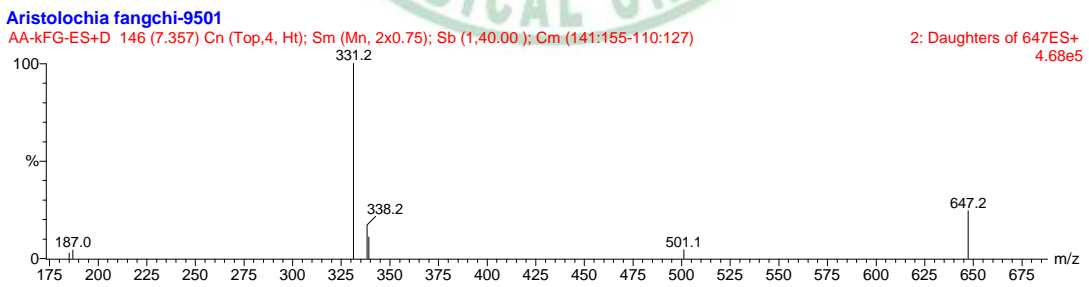
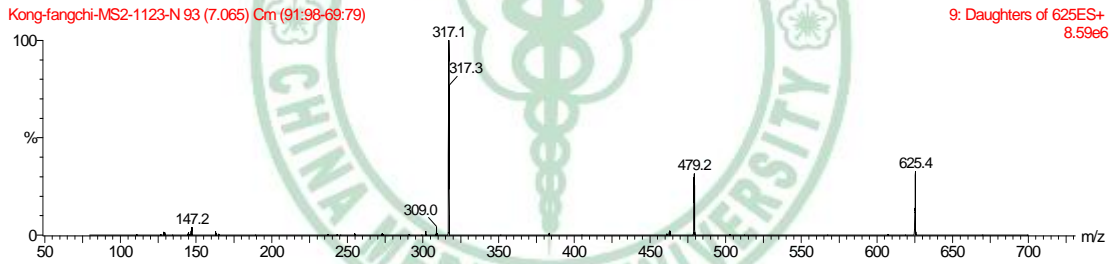
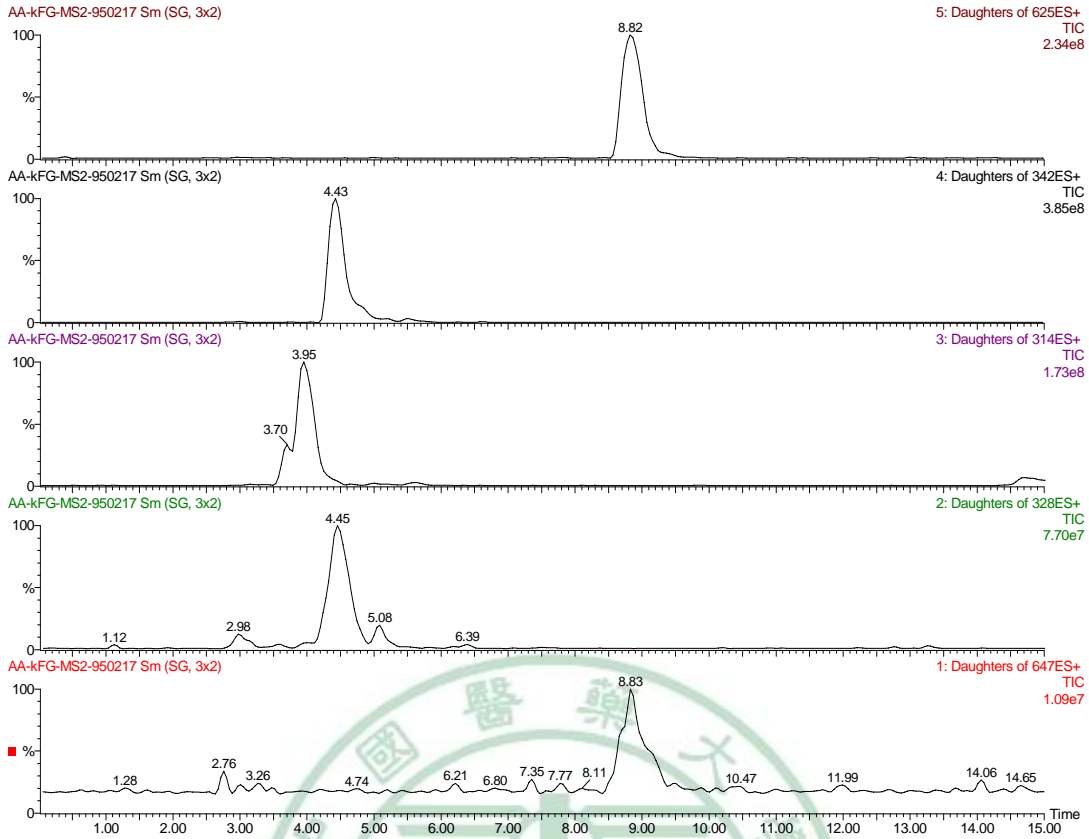


Fig.28 : The ESI⁺/MS 1 spectrums of *Aristolochia fangchi* herb extract



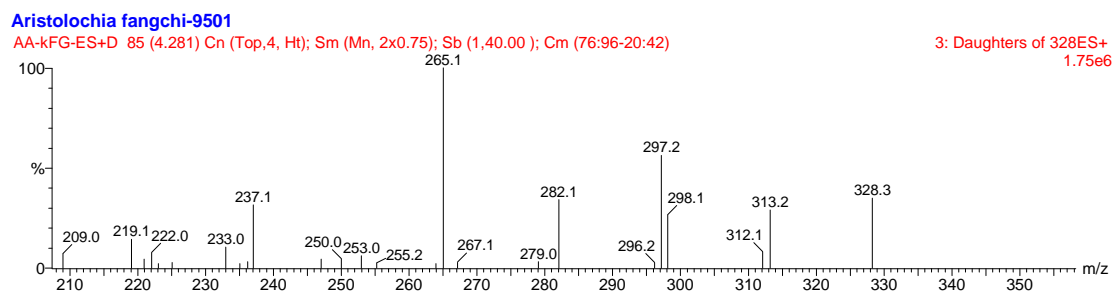
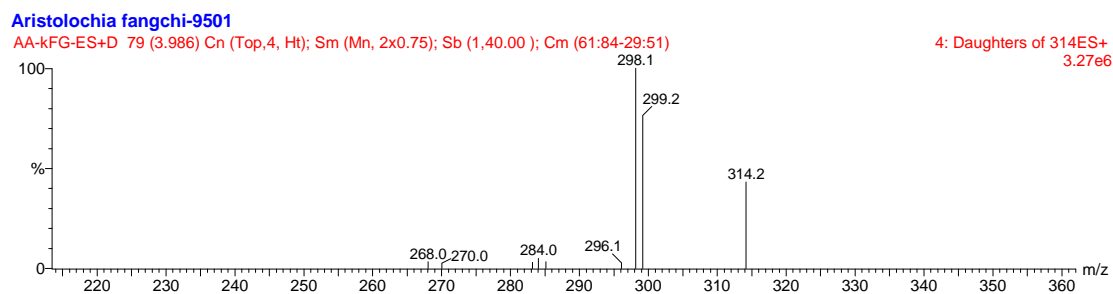


Fig.29 :The MS/MS spectrums of selected fragments in *Aristolochia fangchi* herb

由以上之子代離子質譜圖觀之，ESI⁺D625 與 ESI⁺D647 之離子峰滯留時間同為 8.8 分鐘，於 MS1 spectrum 中 m/z 647 之離子強度大於 m/z 625，但於子代離子質譜圖中 m/z 647 呈現較弱之離子峰，該現象可能是 m/z 647 為 m/z 625 之加鈉離子裂片[M+Na]⁺，於系統中含鈉離子濃度均會影響其離子強度，因此本指紋圖譜分析法中乃以 ESI⁺D625 為主，以 ESI⁺D647 為輔。

Tab. 6: The *Aristolochia* identity macro-method and MRM screen macro-method

CH	Precursor Ion(m/z)	Analytic Parameter#	Major Fragments (m/z)	MRM Ion pair (m/z)	Max-RT (min)
1	ES+D647.3	60/35/3	331, 647, 338, 501	647.3>331.2	8.8
2	ES+D625.3	60/10/3	317, 625, 479,	625.3>316.9	8.8
3	ES+D342.4	60/25/3	265, 297, 282, 342	342.4>265.1	4.4
4	ES+D314.4	60/25/3	298, 299, 314, 151	314.4>298.1	3.9
5	ES+D328.4	60/ 23/3	265, 297, 282, 328	328.4>265.1	4.4

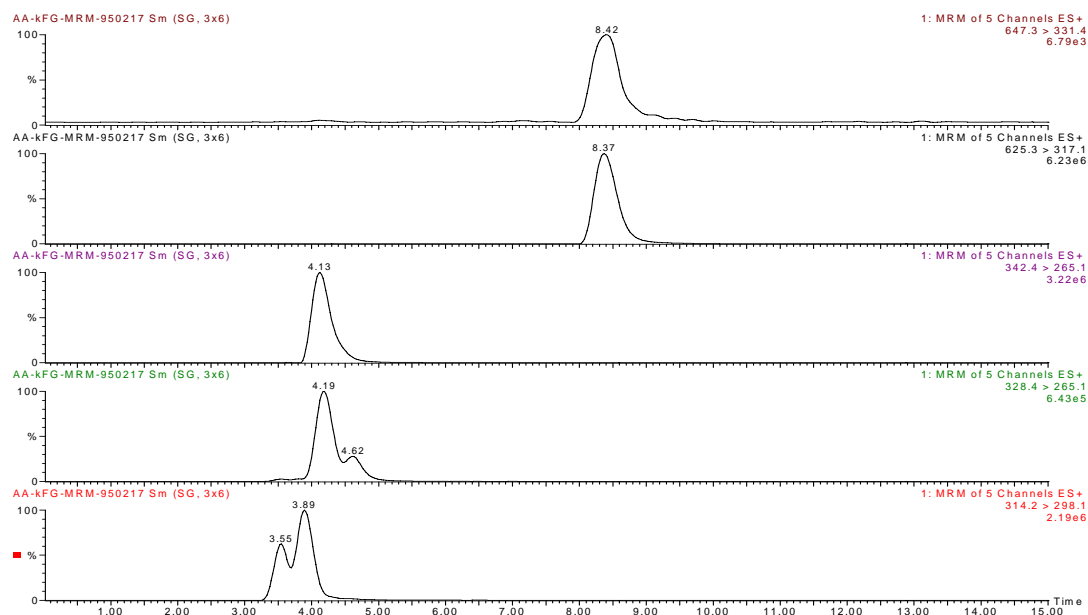


Fig.30 : The chromatogram of *Aristolochia* MRM screen scan

4-4. 廣防己之指標成分為 Aristolochic acid I & II (C₁₇H₁₁NO₇, MW:341 及 C₁₆H₉NO₆, MW: 311)，因屬於 nitrophenanthrene carboxylic acid 衍生物，雖然於本分析法中未出現 Aristolochic acid I 之[M+H]⁺離子裂片，但有出現廣防己 m/z 625 及 647 特異離子裂片可供作廣防己之鑑別。另一出現 m/z 342 為漢防己，木防己及廣防己 3 種藥材均有出現之共同成分，由 m/z 342 之子代離子掃描之質譜圖(Fig.69)，證實非 Aristolochic acid I 之[M+H]⁺離子裂片。廣防己之 ES+D328 與 ES+D342 之 RT 相同,部分子代離子裂片也相同，因此 m/z 328 為由 m/z 342 裂解而得。

4-5. Aristolochic acid 在本分析條件下，無法在設定之 20 分鐘分析時間流出，因此所設定之 macro-method 中未將 aristolochic acid 列為分析標的成分，若在本分析法中檢出疑似含廣防己藥材，由於在我國已禁用含 aristolochic acid 藥材，有檢出則列屬偽藥，因此需另用其他不同檢驗方法慎重複驗，Tab.7 為研究生本人所開發之馬兜鈴酸定性定量之方法，並發表刊登於 Journal of Food and Drug Analysis⁽¹⁷⁾ (藥檢局 藥物食品分析期刊)，Analysis of Aristolochic Acids in the Chinese Herbal Preparations by LC/ MS/MS, (13) pp125-131。其中以 m/z 359 ([M+NH₄]⁺ ions)作為 Aristolochic acid

-I(簡稱 AA- I) & AA-II 之源頭離子，以 m/z 329 ($[M+NH_4]^+$ ions) 作為 Aristolochic acid -II(簡稱 AA- II) 之源頭離子(Fig.31)，以進行子代離子掃描。該兩分析法最大之區別在於 column 之選擇，AA-I、AA-II 在 Zorbox Extend-C₁₈, 150 *2.1 mm id., 5 μ column 中之 retention time 分別為 12.6 及 9.3 分鐘。當進行市售含防己藥材之單方或複方中藥製劑鑑定時，若疑似含廣防己藥材，則予以進行 AA- I & AA-II 之分析再確認，比對 m/z 359 & m/z D329 之子代離子質譜圖(Fig.32)。亦可同時比對紫外線吸收光圖譜，AA- I & AA-II 之紫外線吸收光圖譜可清楚的分辨 (Fig.33)。該 AA- I & AA-II 之定性分析方法，以子代離子質譜掃描為之，其最低檢測量(LOD)為 100 ppb (S/N=3)，可清楚的比對質譜圖。AA- I & AA-II 之定量分析方法，以 MRM 分析法為之，其最低檢測量(LOQ)為 2 ppb (S/N=3)，檢測方法非常靈敏。(Fig.34)

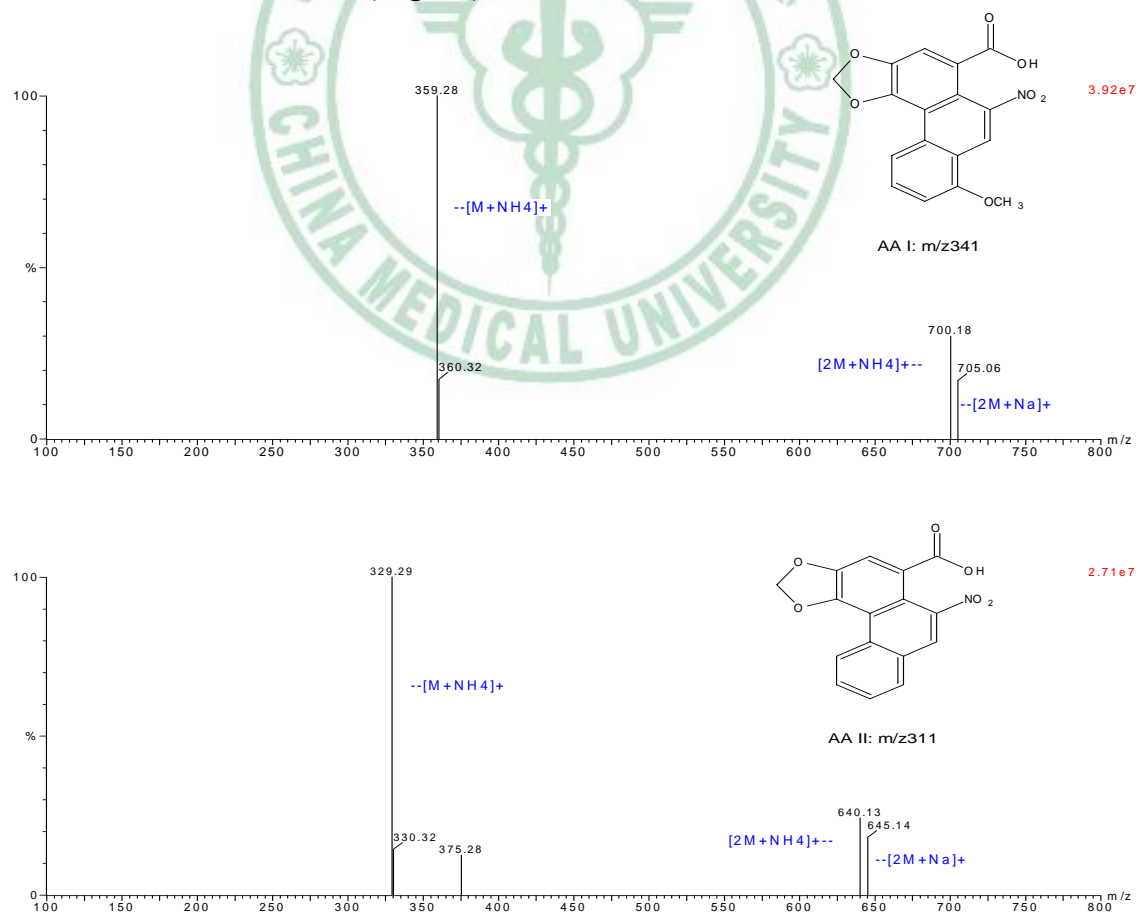


Fig.31 : The ESI⁺/MS 1 spectrums of Aristolochic acid I & II standard

sample

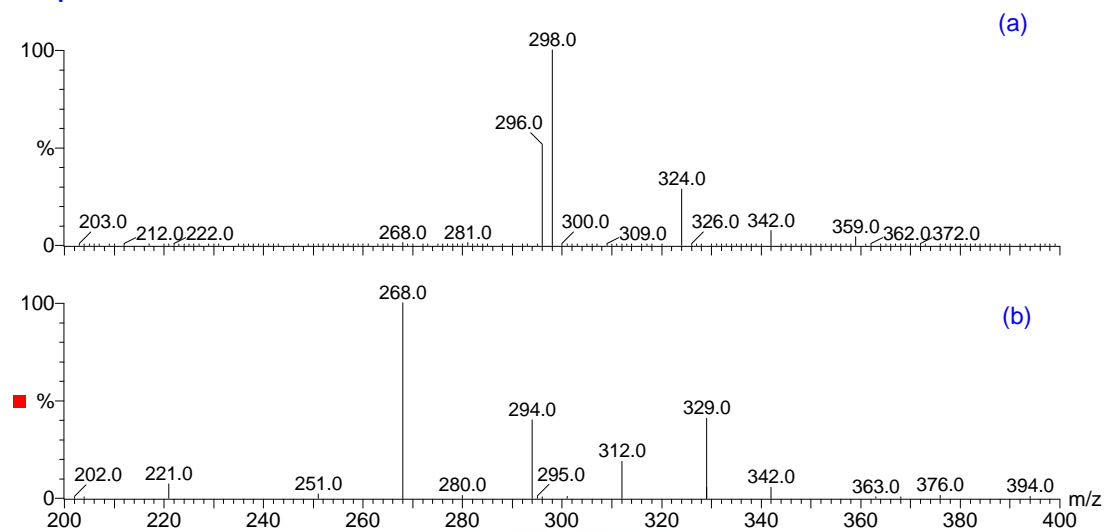


Fig.32 : The daughter ions spectrums of Aristolochic acid I (a) & II (b) standard

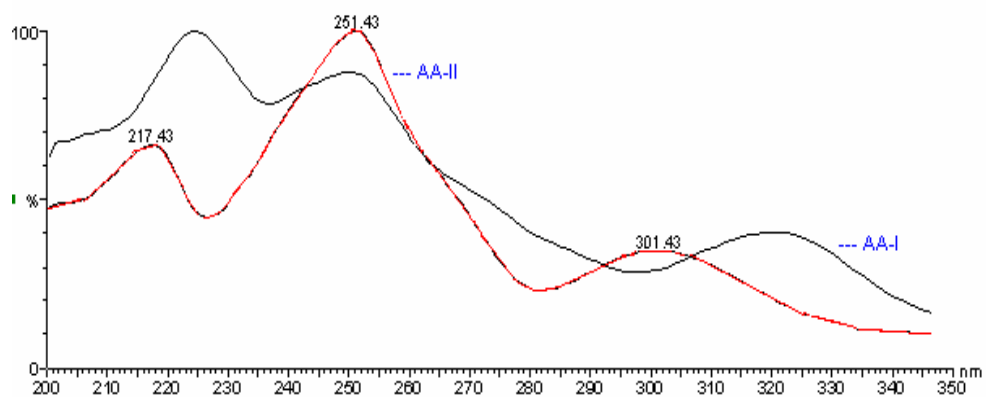


Fig.33 : The UV spectrums of Aristolochic acid I & II standard

Tab. 7: The parameters of Aristolochic acid I& II analysis

<p>1. Micromass Quattro Ultima LC/MS/MS</p> <p>2. Waters 2690 Alliance LC & 996 PDA with Automatic Liquid Sampler and Injector</p> <p>3. MassLynx NT Quattro Data Acquisition</p> <p>4. Library : NLFD3/LM</p> <p>5. MRM analysis--Quantitative</p> <p>AA-I : m/z 359>298 (20/12/2.5)</p> <p>AA-II: m.z 329>268 (20/10/2.5)</p> <p>IS : m/z 289>271 (40/20/2.5)</p> <p>6. Daughter ion scan-- Qualification</p> <p>AA-I : ES+D359</p> <p>AA-II: ES+D329</p>	<p>7.calibration range</p> <p>AA-I : 0.02 ~16.00 µg/mL</p> <p>AA-II: 0.028 ~ 22.40 µg/mL</p> <p>8.HPLC condition</p> <p>Column: Zorbox Extend-C18, 150 *2.1 mm id., 5µm</p> <p>Mobile phase: AcCN:Buffer= 35:65</p> <p>Buffer: 0.1%HCOOH + 0.1% NH4Ac (PH=3.6)</p> <p>Flow rate: 0.3 mL/min</p> <p>Injection volumn: 20 µL</p> <p>Internal standard: Piromidic acid 0.1µg/mL</p> <p>Running time: 25mins</p> <p>Photodioarray range: 200~350nm</p>
---	--

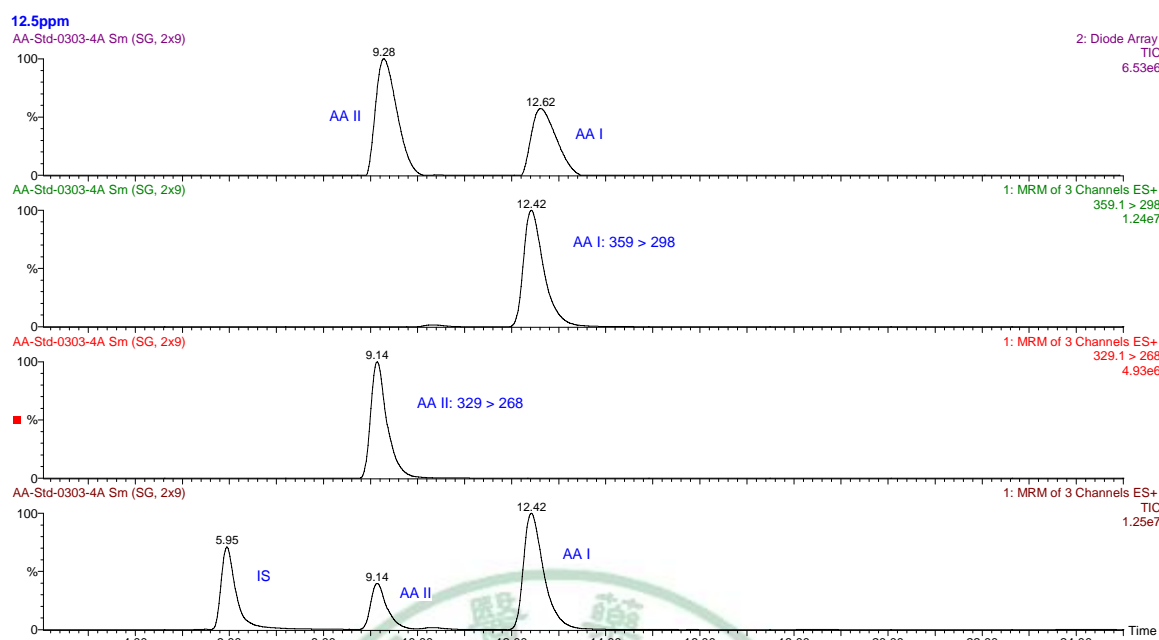


Fig.34 : Quantitative analysis of Aristolochic acid I & II by LC/MS/MS
LOQ:100ppb(ESI+D) LOQ: 2ppb(MRM) S/N=3

5. 質譜圖庫建檔之所見：

5-1. ESI+/MS 1 之 TIC 圖中之每一個離子峰不一定是單一成分，也有可能
 是多種成分重疊。質譜圖中較大之離子裂片，應屬最穩定或含量較高
 之離子裂片，選此裂片進行 daughter ion scan 分析。daughter ion
 spectrum 可視為單一成分之指紋，再配合 Retention time 及 UV
 spectrum，可作為中藥材鑑定之最有力證據。

5-2. 由四種藥材之 ESI+/MS 1 TIC 圖中獲得有若干含量較高或 abundance
 較大之離子裂片，例如 m/z 206, 225, 244 等離子裂片均存在於四種藥
 材中，本研究過程並未明瞭其為何種成分，但應屬於植物共有成分，
 因此不用作四種藥材之鑑定指標成分。

5-3. 本研究報告所用儀器為 Micromass Quattro Ultima tandem mass，非屬
 於高解析度之儀器，依儀器規格掃描所設定之 m/z 之精確度 ± 0.5
 amu ，因此實際進入六極棒打(Hexapole)之 m/z 離子峰之幅寬為 $1amu$ ，
 例如 tetrandrine 設定 m/z 623.5，實際進入 Hexapole 為 m/z 623~ 624，

儀器之 TIC 圖中則採四捨五入法，以整數呈現，因此 tetrandrine 顯示 m/z 624。

6. 四種藥材之預篩檢試驗(Fangchi herbal pre-screen macro-method)：

於四種藥材 MRM 巨集指令(Fangchi herbal MRM screen macro-method)中各藥材選取一~二個管道，整合成 MRM 預篩檢分析法如下表(Tab. 8)，執行此分析條件，可一次同時鑑別四種易混淆防己藥材，將初步之結果，再配合進行 Fangchi herbal identity macro-method 作各別藥材之子代離子質譜圖比對。例如下列案例，由 Fangchi herbal MRM screen macro-method scanning (Fig.35)之 TIC 圖中得知該檢體主要檢出粉防己(623.5>381.4 及 609.5>367.4 兩 channel 均有明顯的離子峰)，但亦疑似檢出漢防己(330.4>239.2 及 522.4>298.1 兩 channel 均有不強的離子峰)，經漢防己 Fangchi herbal identity macro-method 複驗結果 (Fig.36)，發現 ES+D624 比對出 tetrandrine，而 ES+D330 子代離子質譜圖經比對之結果非 sinomenine。由此可知，MRM 所呈現之離子峰若有不強的離子峰乃需經 Fangchi herbal identity macro-method 複驗後才作判定。

Tab. 8 : Fangchi herbal MRM pre-screen macro-method

Herb	MRM Ion pair (m/z)	RT (mins)	Herb	MRM Ion pair (m/z)	RT (mins)
粉防己	623.5>381.4	7.4	木防己	563.4>532.4	15.1
	609.5>367.4	6.1		652.4>358.2	13.2
廣防己	625.3>316.9	8.0	漢防己	330.4>239.2	3.9
				522.4>298.1	5.7

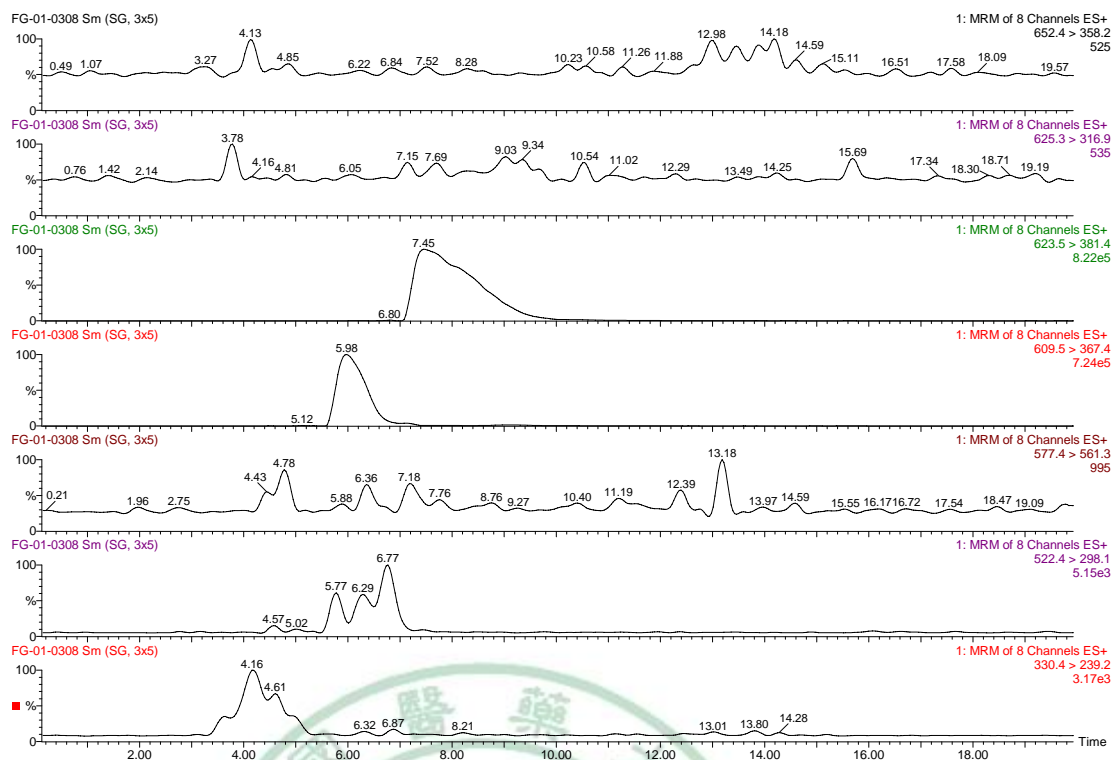


Fig.35 : The pattern of Fangchi herbal MRM pre-screen macro-method scanning and the sample had been found that contained both of *Stephania tetrandra* and *Sinomenium acutum* herb

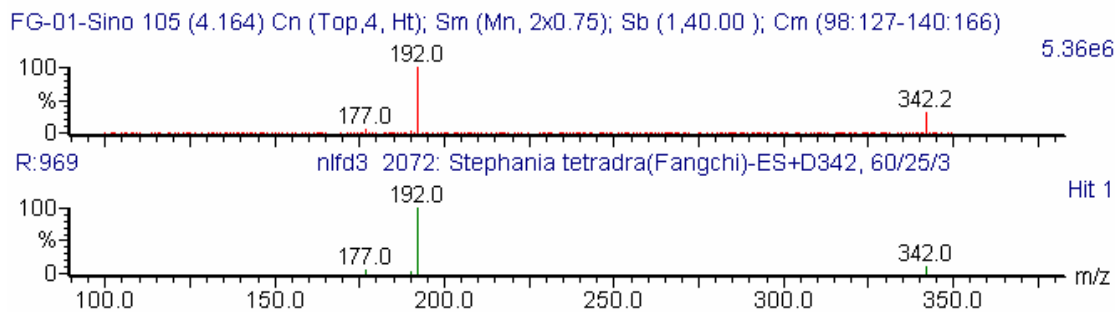
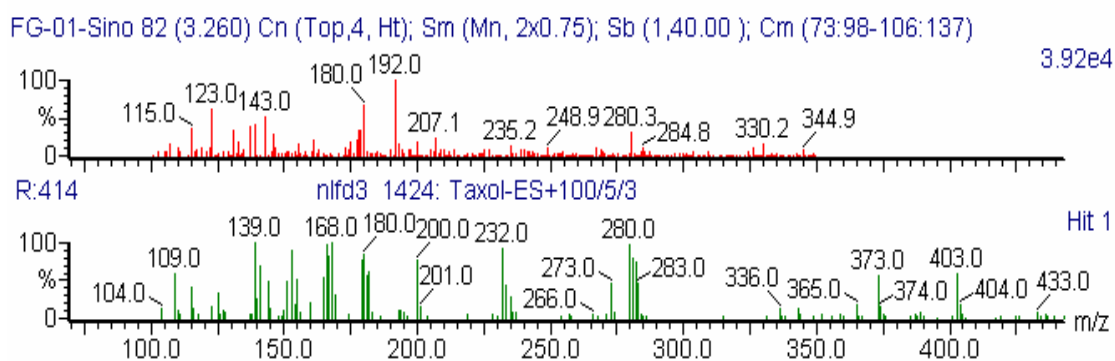
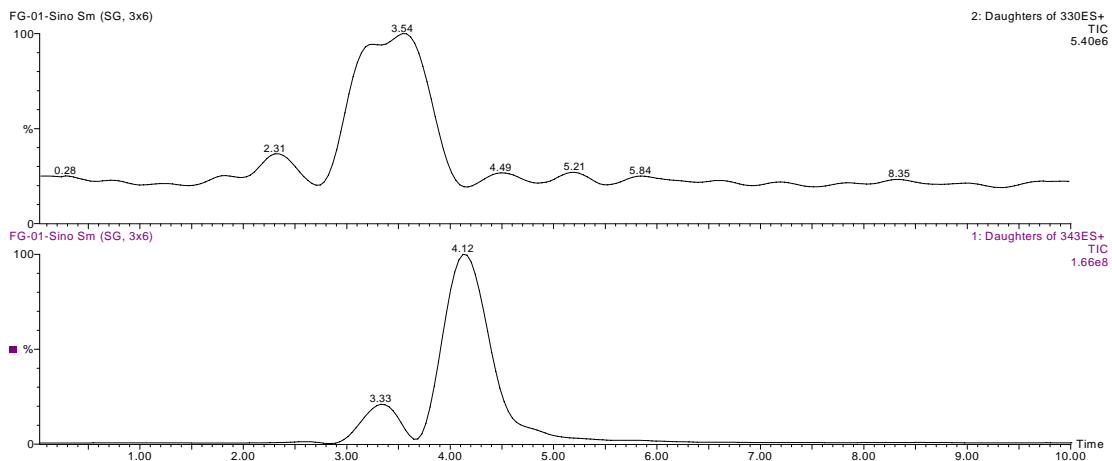


Fig.36 : Double check of *Sinomenium* in *Stephania tetrandra* dry extract and found that the *Sinomenium* was non-detected

另一案例檢體則檢出漢防己(Fig.37)，其 MRM/TIC 圖中之 330.4> 239.2 及 522.4>298.1 兩 channel 均有很強的離子峰，經 Fangchi herbal identity macro-method 複驗結果，含有 sinomenine。

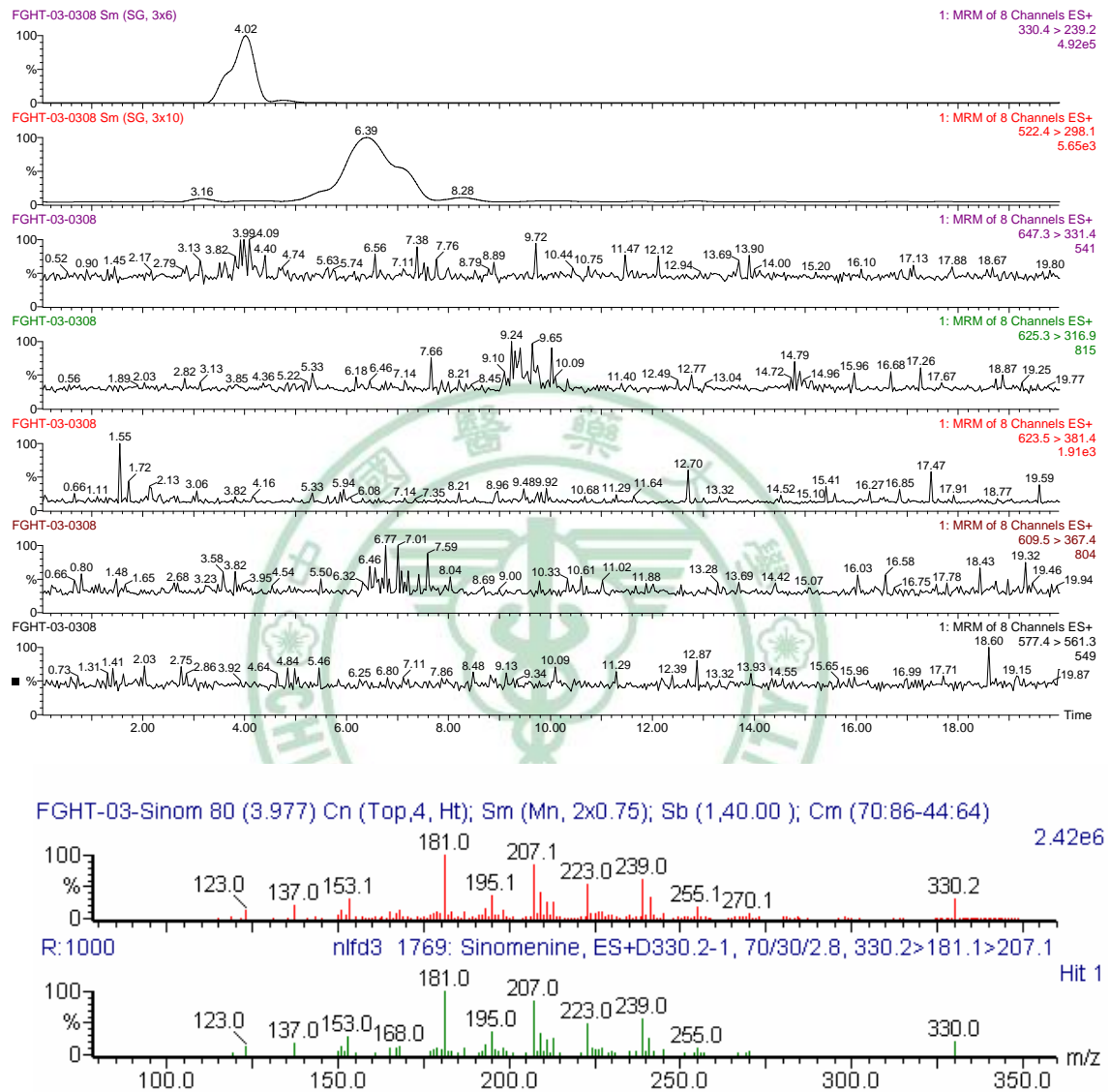
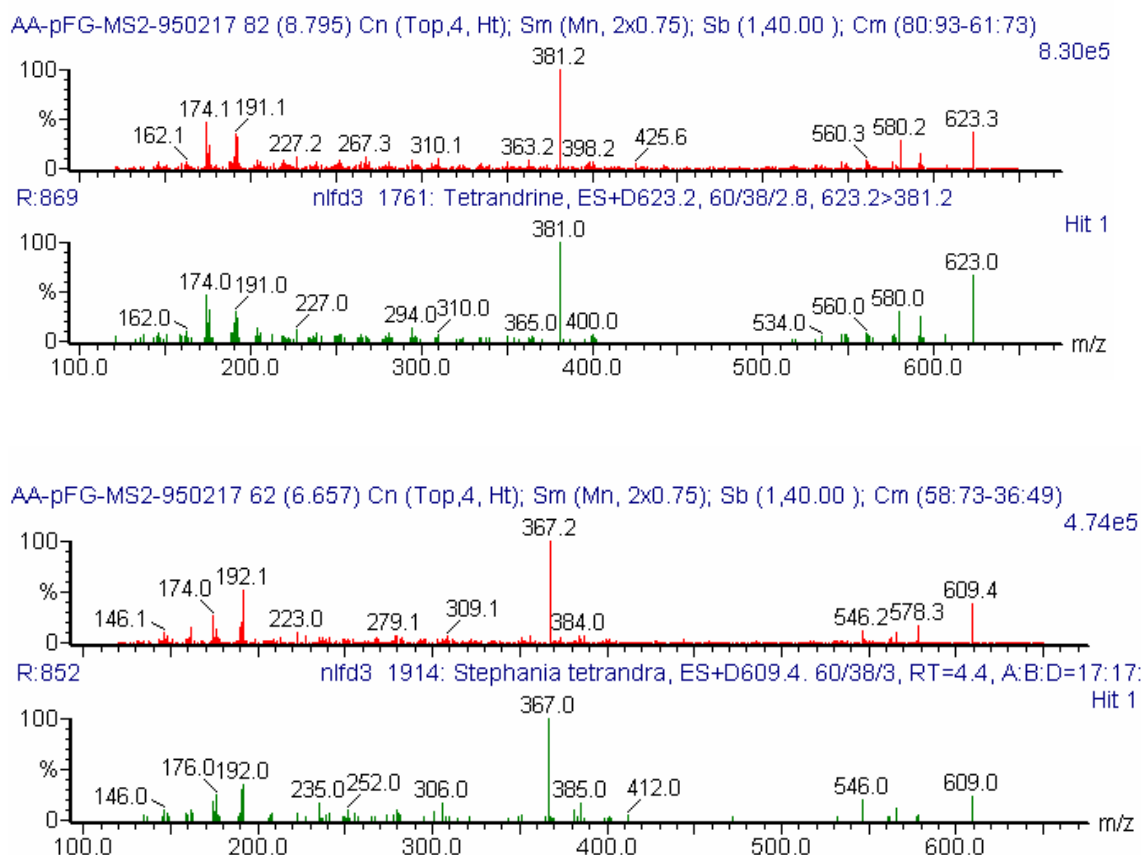


Fig. 37: The pattern of Fangchi herbal MRM pre-screen macro-method scanning and the sample had been found that contained *Sinomenium acutum* herb

7. 指紋質譜圖庫之比對

指紋質譜圖庫用於子代離子質譜圖比對結果如以下電腦圖顯示 (Fig.38~41)。以下各圖中，上圖為實測之子代離子質譜圖，下圖為指紋質譜圖庫之(LC/MS/MS Fingerprint Database)標準子代離子質譜圖，其中記載成分名稱、掃描模式(ES+)、選定之源頭離子裂片(m/z 623.2)、分析條件(60/38/2.8= cone voltage/ collision energy/ source capillary voltage)、MRM 配對離子選擇(623.2>381.2)，以及比對結果之比對相似度 (matching quality, R:869)。由配製模擬處方檢品溶液以防己藥材鑑定試驗之巨集指令分析，所獲得之子代離子質譜圖與所建立之指紋質譜圖庫(LC/ MS/MS finger print Database) 比對結果均 800%以上(如下圖)，由此顯示液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜分析法於防己黃耆湯中鑑定防己之種類未受其他藥材成分之干擾。



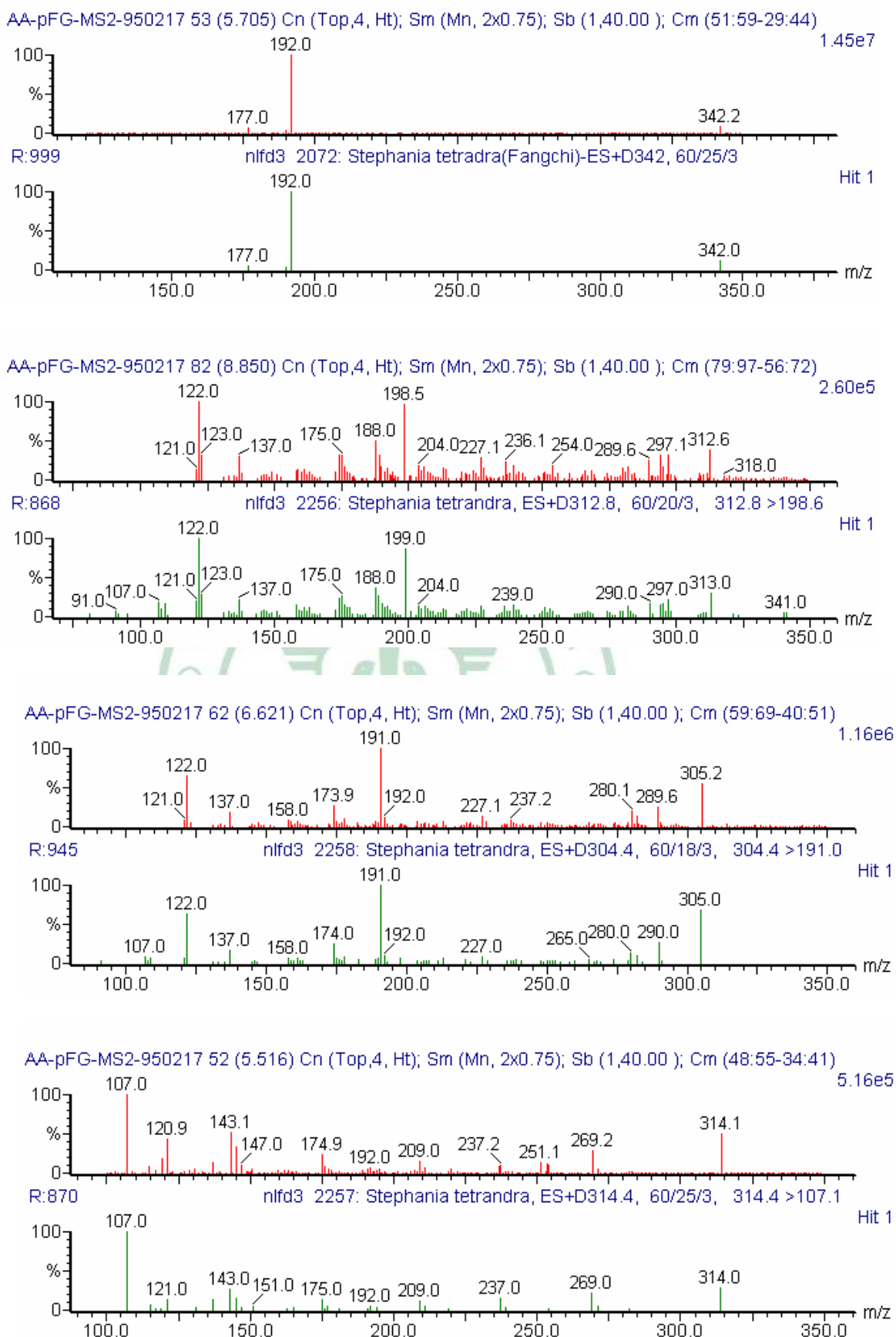
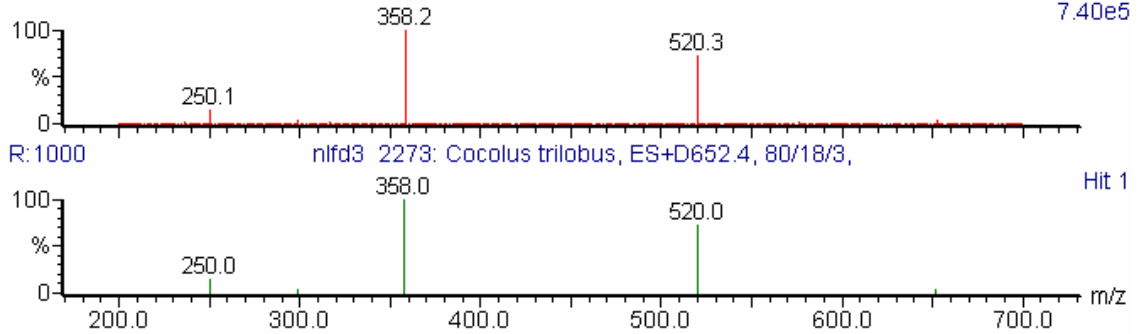
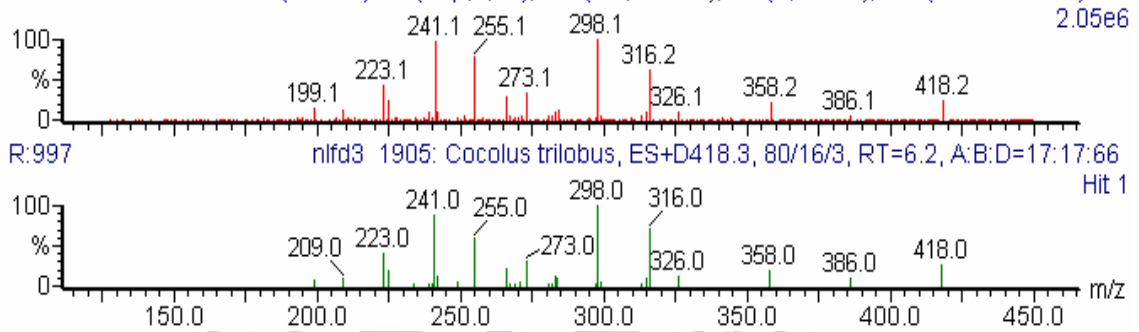


Fig.38: The library search results of model sample preparations contained *Stephania tetrandra* herb

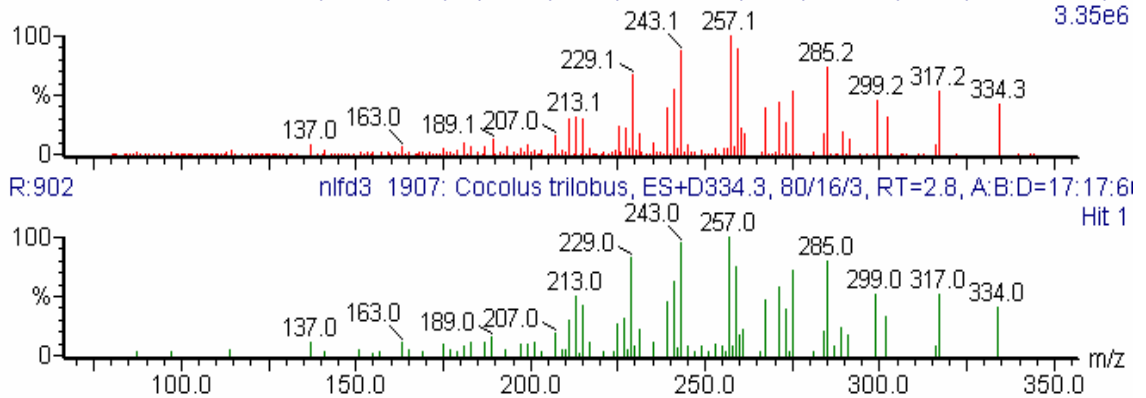
AA-mFG-MS2-950217 79 (9.628) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (75:96-51:67)



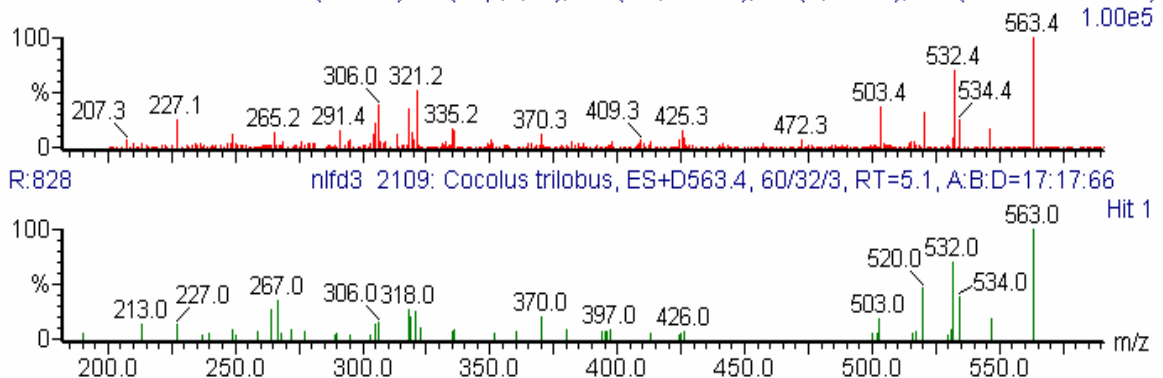
AA-mFG-MS2-950217 97 (11.875) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (93:102-78:89)



Cocolus-trilobus-U2-MS3 24 (2.835) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (23:27-15:20)



AA-mFG-MS2-950223-1 141 (16.817) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (134:155-108:132)



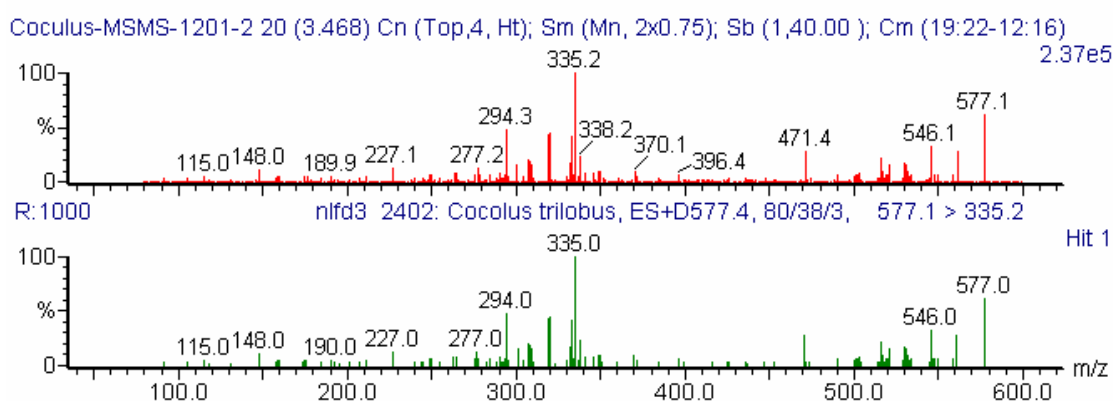
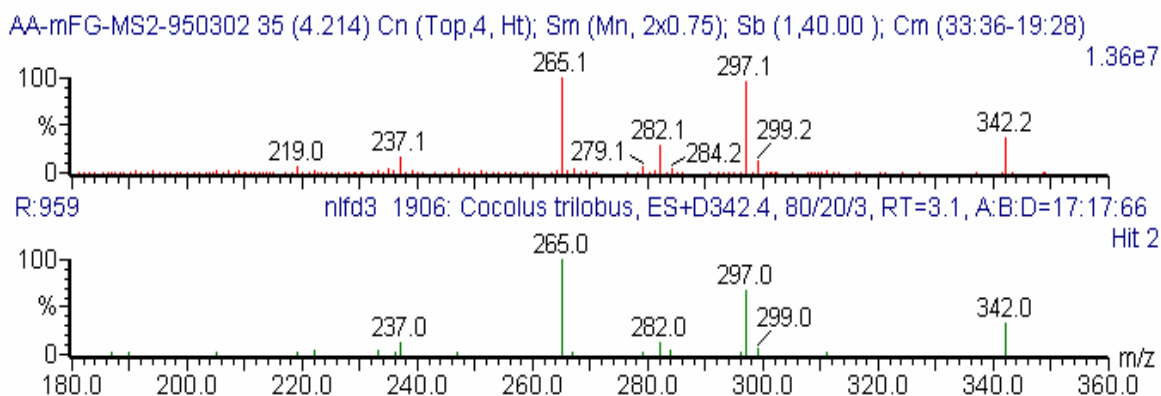
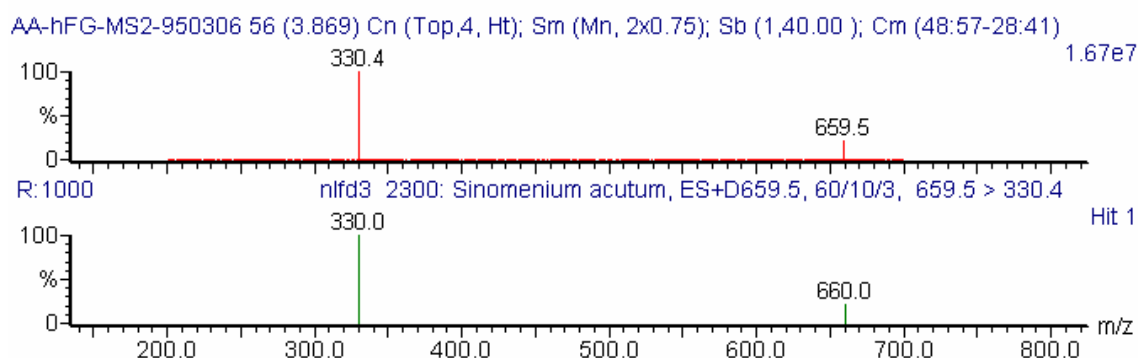
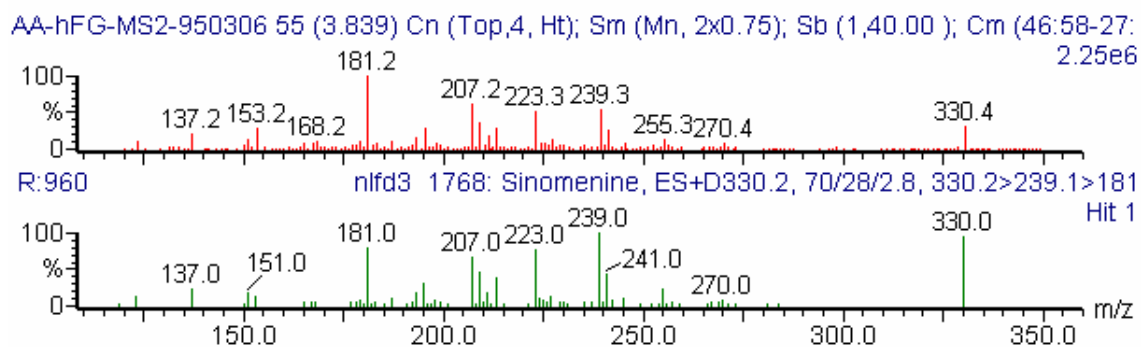
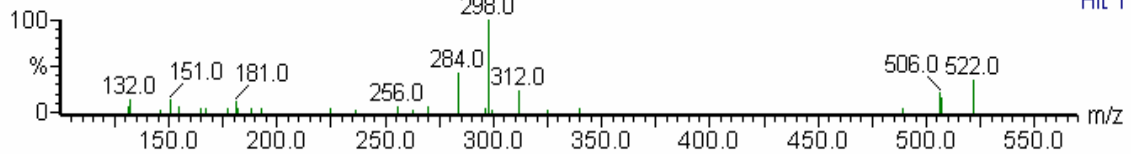
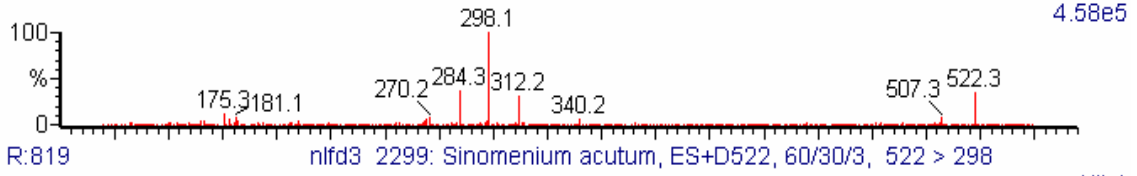


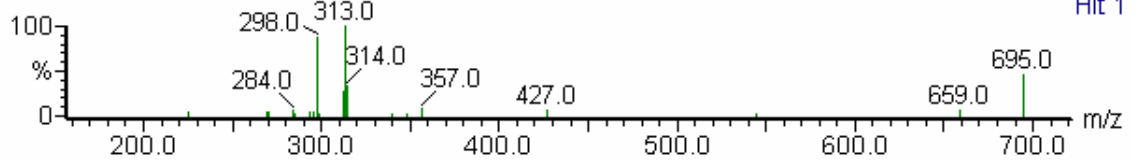
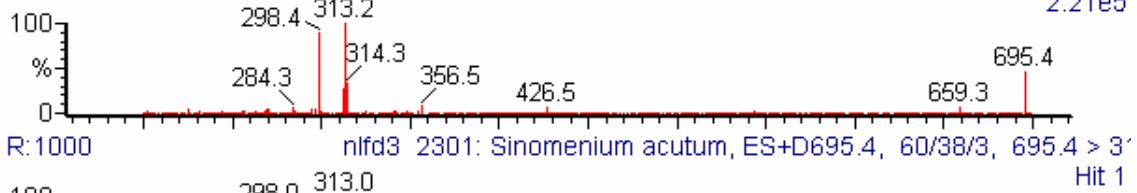
Fig.39 : The library search results of model sample preparations contained *Cocculus trilobus* herb



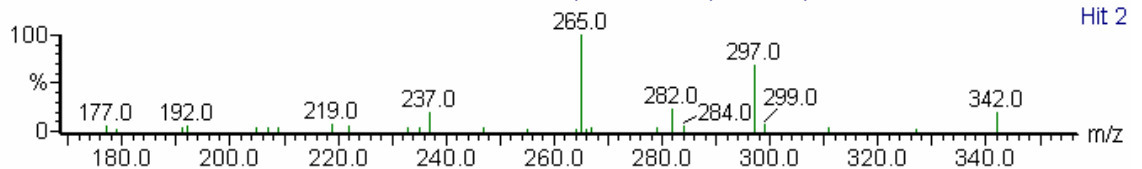
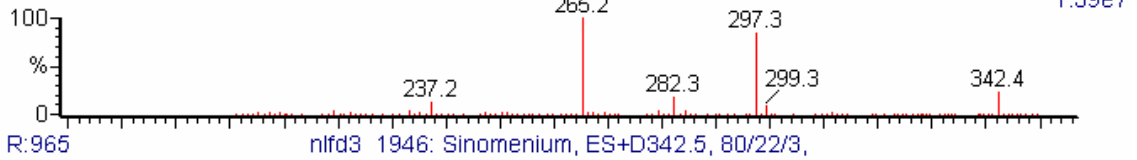
AA-hFG-MS2-950217 72 (4.963) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (68:84-13:38) 4.58e5



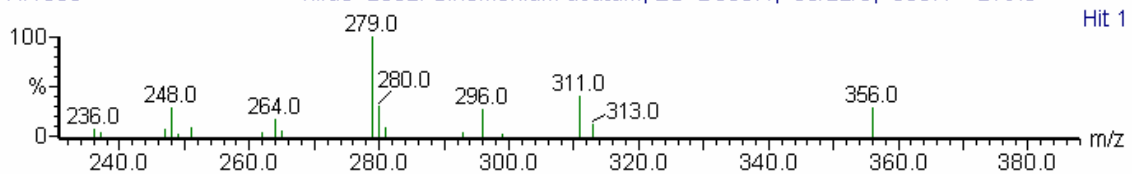
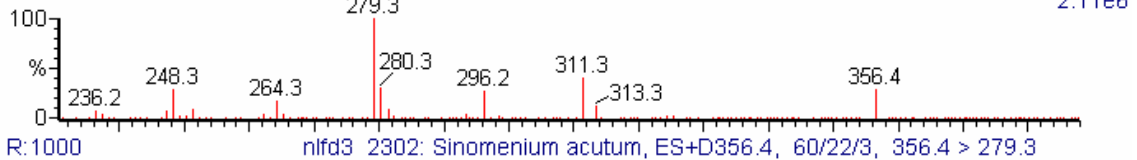
AA-hFG-MS2-950306 180 (12.571) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (175:19) 2.21e5



AA-hFG-MS2-950306 60 (4.179) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (56:68-40:54) 1.39e7



AA-hFG-MS2-950306 78 (5.469) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (74:82-67:74) 2.11e6



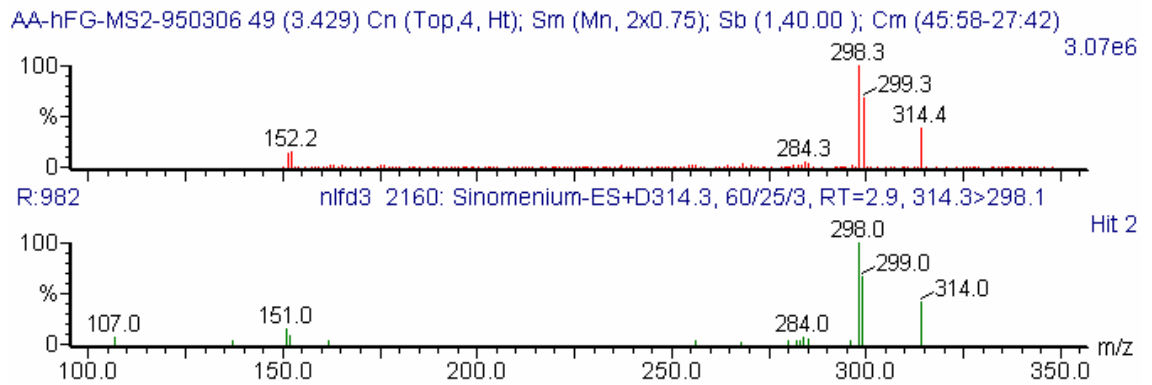
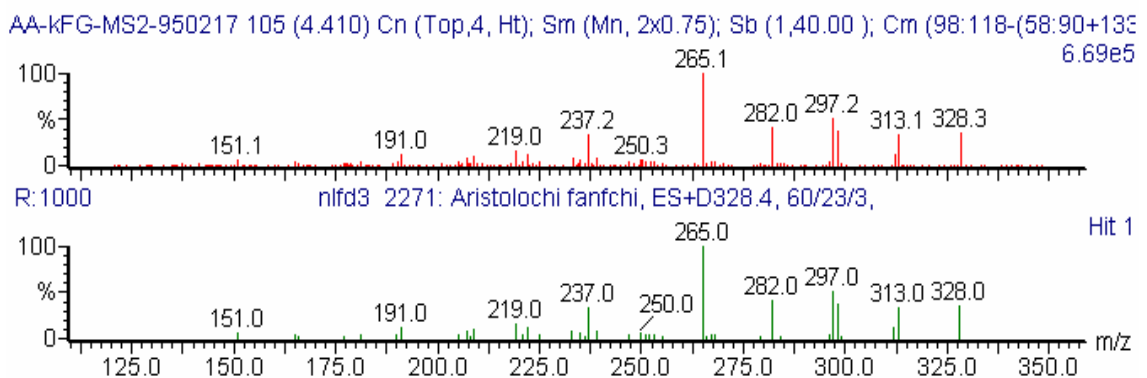
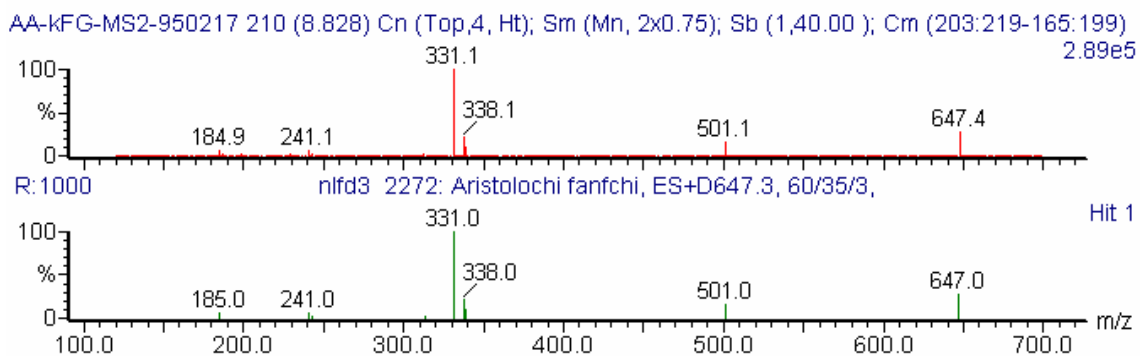
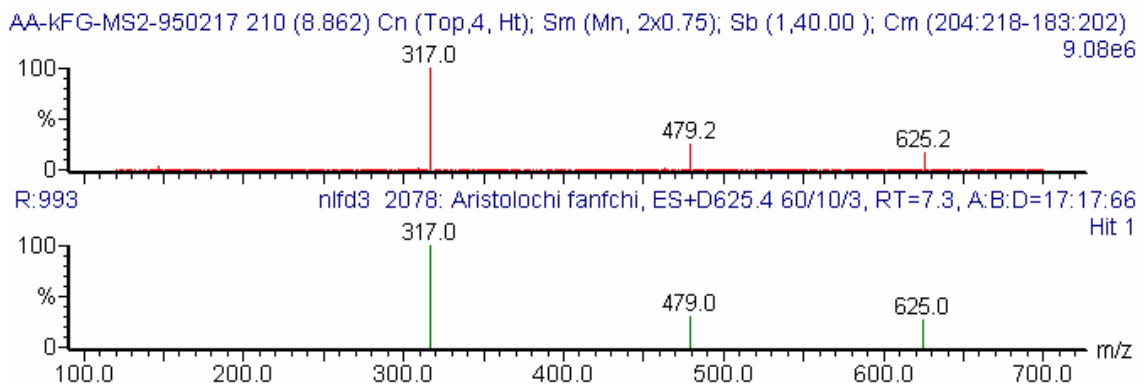


Fig.40 : The library search results of model sample preparations contained standard *Sinomenium acutum* herb



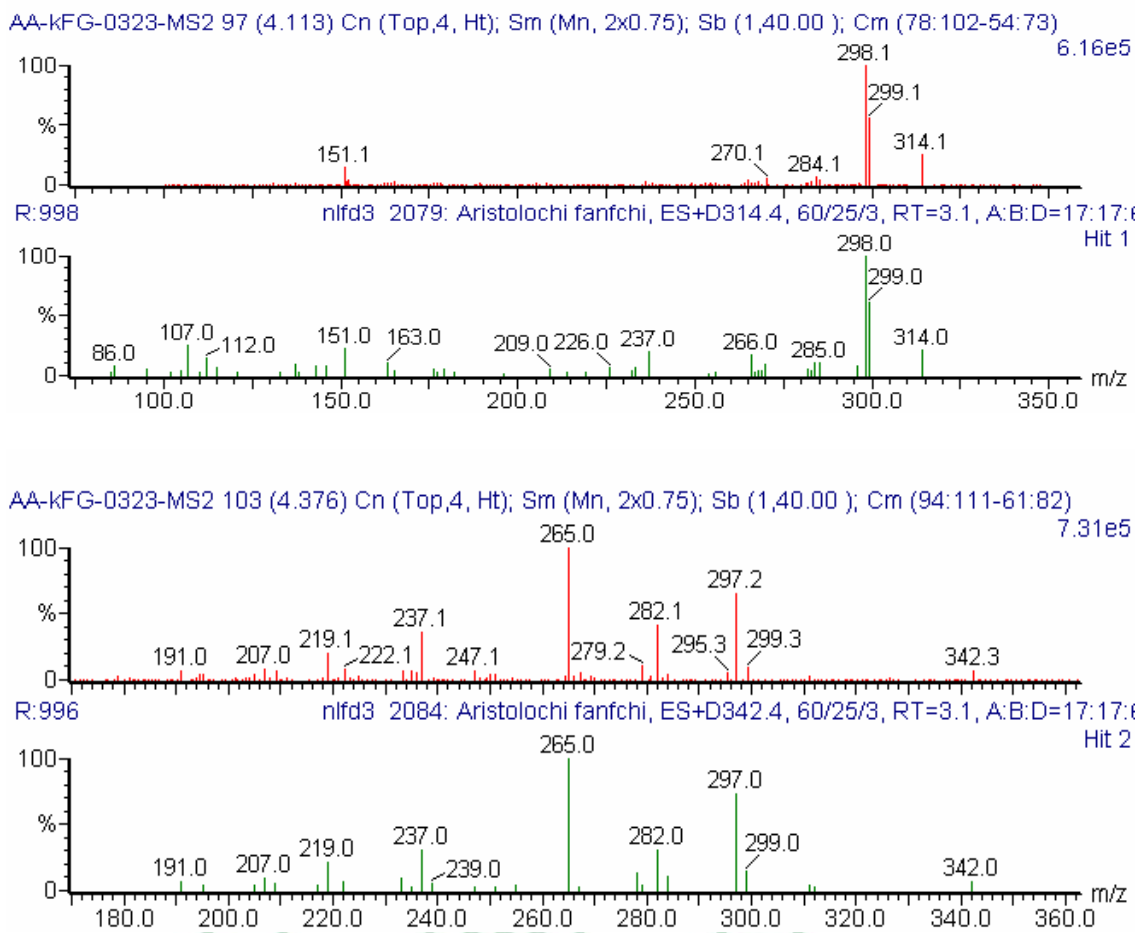


Fig.41 : The library search results of model sample preparations contained standard *Aristolochia fangchi* herb

8. 其他藥材干擾之探討---防己藥材空白試驗

由配製防己藥材空白試驗檢體溶液，經以藥材之 MRM 預篩檢試驗(MRM pre-screen macro-method) 分析發現 MRM/TIC 圖(Fig.42) 中 m/z 625 > 316.9 之管道有明顯之離子峰出現。復以廣防己藥材鑑定試驗之巨集指令(Aristolochia Fangchi herbal identity macro-method)分析發現 ESI+/TIC 圖中(Fig.44)，除 ESI+D342 外，均未有明顯之離子峰出現，尤其 ESI+D625 (廣防己之指標質譜圖)，只出現雜訊，沒有明顯之離子峰。雖然有出現 ESI+D 342 質譜圖，但 m/z 342 為多種植物之共通成分，無法用以作判定之依據，不致對出結果有所影響。如下圖之子代離子掃描質譜 TIC 圖中，雖偶有不明顯之離子峰出現，

但經質譜圖庫搜尋比對結果均未出現防己之比對結果，此現象顯示植物天然成分複雜，相同分子量之成分無可避免，雖然生成同值之源頭 m/z 分子裂片，若分子結構不同，所獲致之子代離子質譜圖會不同，因此液相層析串聯式質譜分析指紋圖譜分析法之鑑別性相當精確。

由以上可知，防己黃耆湯對防己藥材之鑑定並未受其他藥材之干擾，檢出結果是精確而具專一性。

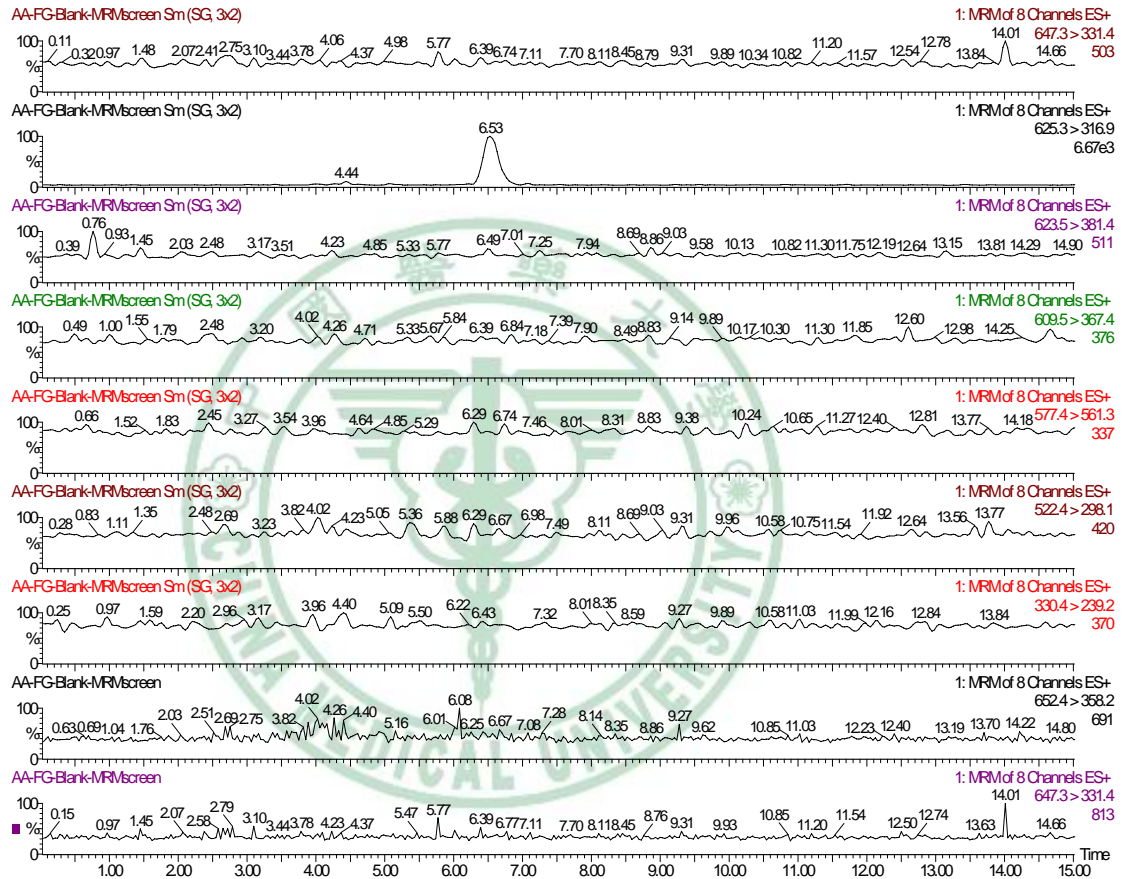


Fig.42 : MRM pre-screen macro-method for Fangchi herbal blank preparation

9. 指紋質譜圖庫比對再現性探討:

由配製之四種防己黃耆湯之模擬處方之 Reproducibility test 中 Intraday 之 matching quality 平均為 86.9 %，至少在 82.8% 以上，SD 介於 2.2~6.0； Interday 之 matching quality 平均為 86.2%，至少在 81.7% 以上，SD 介於 2.2~7.9 之間 (Tab.9)。由此顯示本分析法各成分之比對再現性佳，matching quality 亦均能符合 80% 以上之基本

要求，因此藥材鑑定結果可靠。

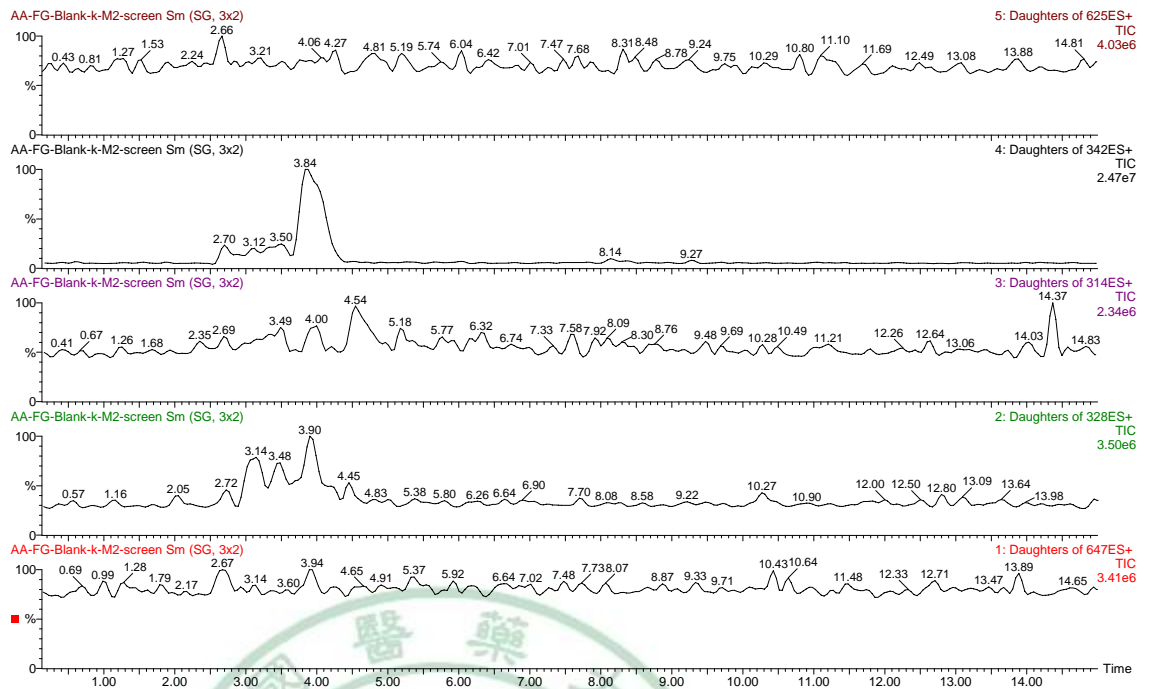


Fig.43: Aristolochia Fangchi herbal identity macro-method double check scanning for blank preparation

10.最低檢出量(LOD)之探討：

由 Tab.10 之 LOD 結果顯示，MRM 鑑定具較高之靈敏度，但無法比對子代離子質譜圖(Fig.44，45)，Daughter ion scan 則需較高濃度之藥材，依上述方法萃成 10mL 之檢液，其優點為可搜集源頭離子 (precursor ion)所裂解之所有離子裂片，再與 LC/MS/MS Fingerprint Database 作比對，檢出結果更切確。

文中 LOD 之意義為只要稱取製劑中相當於粉防己藥材量有 50 mg 以上，而單一藥材則只需 20 mg 以上即可在 MRM screen 中呈現明顯之離子峰；欲比對子代離子質譜圖則需 200 與 100 mg 之藥材即能檢出。由此可之，LC/MS/MS 質譜指紋分析法不失為中藥材極佳之鑑定方法。

Tab. 9 :The matching quality of daughter ion spectrum during reproducibility test

Fangchi specie in model sample	Daughter ion scan (m/z)	Intraday	Interday
		Matching quality Mean(%) \pm SD	Matching quality Mean(%) \pm SD
ST	ES+D623.5	91.3 \pm 6.0	91.5 \pm 7.9
	ES+D609.4	91.8 \pm 2.5	88.2 \pm 5.5
	ES+D342.4	85.7 \pm 3.0	87.5 \pm 5.3
	ES+D333.1	85.5 \pm 4.3	88.8 \pm 5.7
	ES+D314.4	86.7 \pm 3.9	83.6 \pm 4.4
	ES+D312.8	87.7 \pm 4.0	84.9 \pm 4.0
	ES+D305.4	90.7 \pm 3.2	85.8 \pm 5.3
AF	ES+D647.3	82.8 \pm 2.9	84.6 \pm 5.3
	ES+D625.3	89.5 \pm 5.0	87.2 \pm 5.4
	ES+D342.4	88.7 \pm 3.3	86.5 \pm 4.4
	ES+D314.4	84.2 \pm 2.7	84.0 \pm 4.0
	ES+D328.4	85.1 \pm 3.6	84.4 \pm 2.2
CT	ES+D652.4	84.5 \pm 3.9	86.3 \pm 3.4
	ES+D577.4	82.9 \pm 2.3	81.7 \pm 4.1
	ES+D418.4	85.5 \pm 5.6	85.1 \pm 3.7
	ES+D342.4	85.0 \pm 2.6	82.6 \pm 4.9
	ES+D334.2	86.3 \pm 5.7	88.2 \pm 5.2
	ES+D314.4	84.9 \pm 4.3	84.6 \pm 4.6
	ES+D563.4	86.6 \pm 3.1	89.4 \pm 5.5
SA	ES+D659.5	84.7 \pm 3.3	84.6 \pm 3.3
	ES+D522.4	83.6 \pm 2.6	85.6 \pm 3.9
	ES+D356.4	84.1 \pm 2.2	82.7 \pm 5.0
	ES+D342.4	93.3 \pm 3.9	93.6 \pm 5.3
	ES+D330.4	95.9 \pm 2.4	90.2 \pm 2.4
	ES+D314.4	85.7 \pm 4.5	82.5 \pm 4.7
Mean		86.9%	86.2%
Minimum		82.8%	81.7%
Maximum		95.9%	93.6%

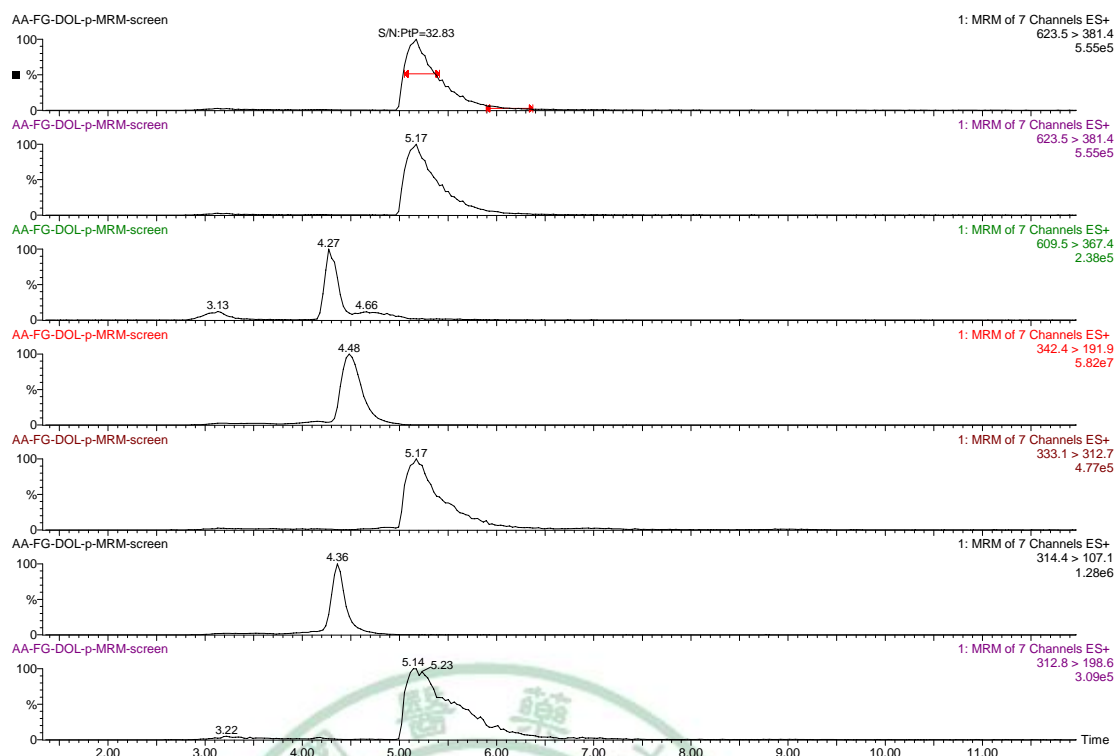


Fig.44 : The LOD test for model Fangji-Jii-Hwang-Chi-Tang contains *Stephania tetrandra herb* is 50mg/10mL in concentration

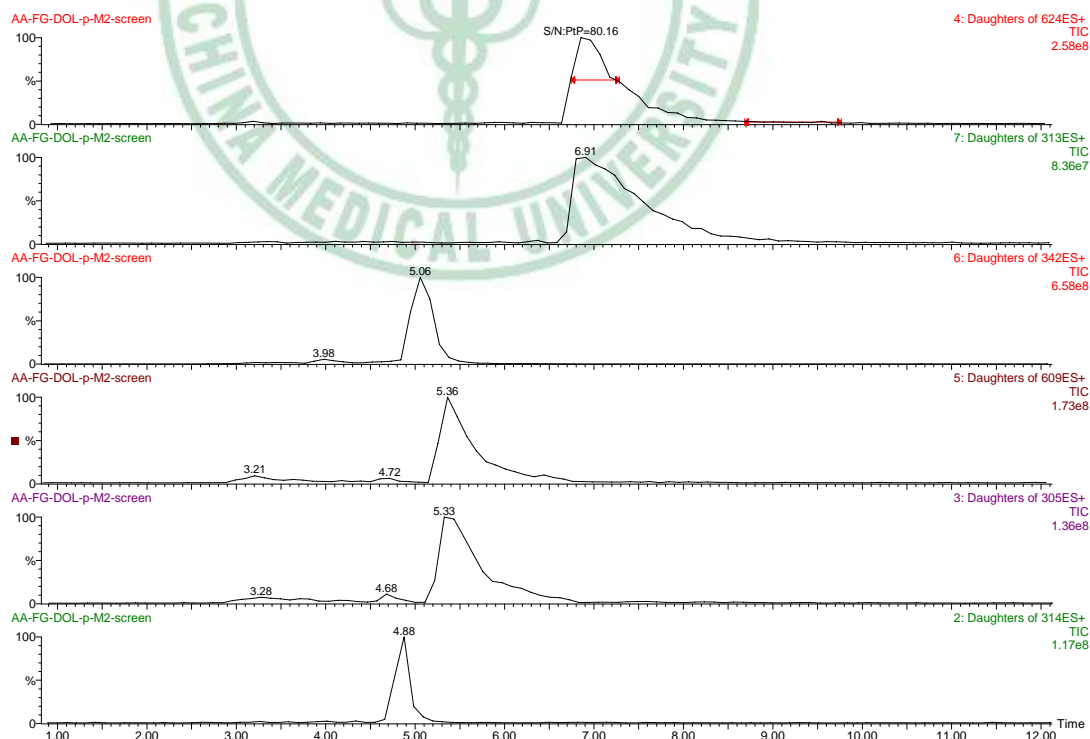


Fig.45 : The LOD test for raw materials extract contains *Stephania tetrandra herb* is 50mg/10mL in concentration

Tab.10: The Limit of detection in single herb and model TCM

檢出 藥材最低 含量(g)	標準藥材檢品溶液		模擬處方溶液	
	Daughter ion scan	MRM scan	Daughter ion scan	MRM scan
粉防己	0.1	0.02	0.2	0.05
廣防己	0.5	0.1	0.5	0.1
木防己	0.2	0.1	0.5	0.1
漢防己	0.2	0.05	0.5	0.1

11. 指紋質譜圖之應用及市售品之調查研究

11-1. 檢體檢出結果：隨機取樣市售製劑包括防己單方濃縮製劑 3 件種，防己黃耆湯濃縮製劑 7 件，小續命湯濃縮製劑 3 件，通用痛風丸濃縮製劑 2 件種，木防己湯濃縮製劑 2 件，通用痛風丸傳統丸劑 1 件，標示防己及木防己之藥材各 1 件，總共 20 件(Tab.2)。經 LC/MS/MS 指紋分析法予以分析(Fig.52~62)結果如 Tab.11。

18 件複方製劑檢體中檢出粉防己有 13 件，顯示台灣市場仍以粉防己為主，但其中 1 件摻雜廣防己，有 1 件摻雜漢防己；檢出漢防己者有 4 件，但其中 1 件摻雜廣防己；18 件中有 1 件單獨檢出廣防己及 3 件摻雜廣防己，總共 4 件檢出廣防己，佔 22.2%。由此可知，廣防己雖已禁用，但仍然充斥市場中。木防己則全然未檢出，雖然有木防己湯但均未使用木防己，足見木防己藥材之基源不確定性高，中藥衛生主管機關於核准該方劑，應予重視與規範。由於古籍對漢防己名稱之混淆，標示漢防己而檢出粉防己者有 2 件，兩者主成分不同，其主治效能應為不同，已不宜再混淆誤用，這些藥效之差異，值得探討。

11-2. 製造廠使用原料之差異性：就廠別觀之，e 廠之產品以檢出漢防己為主，但部份摻雜廣防己，b 廠單方製劑檢出粉防己，但複方製劑雖標示粉防己，但防己黃耆湯則檢出漢防己，其使用藥材原料之選擇值得去探討。a 廠之木防己湯非使用木防己，標示粉防己，亦

檢出粉防己。b 廠之木防己湯標示木防己，但未檢出該四種防己藥材之任何一種。d 廠之防己黃耆湯標示漢防己，但檢出粉防己。c 廠之漢防己單方製劑則檢出粉防己，足見各廠對藥材基源認知之不一致性。另有一件傳統劑廠生產之傳統丸劑---通用痛風丸，檢出廣防己，究係故意出清原料或是仍然不明含馬兜鈴酸藥材之毒性與禁令。誠有加強輔導之必要。



Fig.46 :Unknown sample look like *Stephania tetrandra* suspiciously and sent for identification



Fig.47 :Unknown sample labeled as Cocculus herb and sent for identification

Tab.11: The results of LC/MS/MS fingerprint examination

檢體 編號	檢體名稱	檢出結果				處方 (藥材) 標示
		粉防己	廣防己	木防己	漢防己	
FG-1 ^a	防己 粉末(濃縮散)	♣	-	-	-	粉防己
FGHT-1 ^a	防己黃耆湯濃縮顆粒	♣	-	-	-	粉防己
FGHT-2 ^a	防己黃耆湯濃縮顆粒	♣	-	-	-	粉防己
FGST-3 ^a	小續命湯濃縮顆粒	♣	-	-	-	防己
FGU-1 ^a	通用痛風丸濃縮顆粒	♣	-	-	-	粉防己
FGMT-2 ^a	木防己湯濃縮顆粒	♣	-	-	-	粉防己
FG-2 ^b	防己 濃縮散	♣	-	-	-	防己
FGHT-3 ^b	防己黃耆湯濃縮散	-	-	-	◆	粉防己
FGU-2 ^b	通用痛風丸濃縮散	♣	-	-	◆	防己
FGMT-1 ^b	木防己湯濃縮散	-	-	-	-	木防己
FG-3 ^c	漢防己 濃縮散	♣	-	-	-	漢防己
FGHT-6 ^c	防己黃耆湯濃縮顆粒	♣	-	-	-	防己
FGST-1 ^c	小續命湯濃縮顆粒	♣	-	-	-	防己
FGHT-4 ^d	防己黃耆湯濃縮顆粒	♣	♥	-	-	漢防己
FGHT-5 ^e	防己黃耆湯濃縮顆粒	-	-	-	◆	漢防己
FGST-2 ^e	小續命湯濃縮顆粒	-	♥	-	◆	漢防己
FGHT-7 ^f	防己黃耆湯濃縮散	♣	♥	-	-	防己
FGU-3 ^g	通用痛風丸	-	♥	-	-	防己
Herb-1	標示木防己藥材	-	-	-	-	木防己
Herb-2	疑似廣防己藥材	-	♥	-	-	防己

註: 1. a~f 分別代表 6 家濃縮製劑製造廠, 其中 g 為傳統丸劑廠

2. “♣” 為檢出粉防己 “♥” 為檢出廣防己 “◆” 為檢出漢防己 “-” 為未檢出藥材,

11-3.上述檢出結果，若有疑似檢出廣防己，則以文獻中之分析條件⁽²⁵⁾重行分析，檢測 aristolochic acid I & II，並比對子代離子質譜圖、離子峰滯留時間及UV 圖譜等 (Fig.57, 63)。另於MRM 中之 330.4>239.2 與 522.4>298.1 channel 有明顯之離子峰者為疑似檢出漢防己 (Sinomenium)藥材，則以漢防己之 Fangchi herbal identity macro-method 重行分析，比對子代離子質譜圖，獲致更確切之結果。

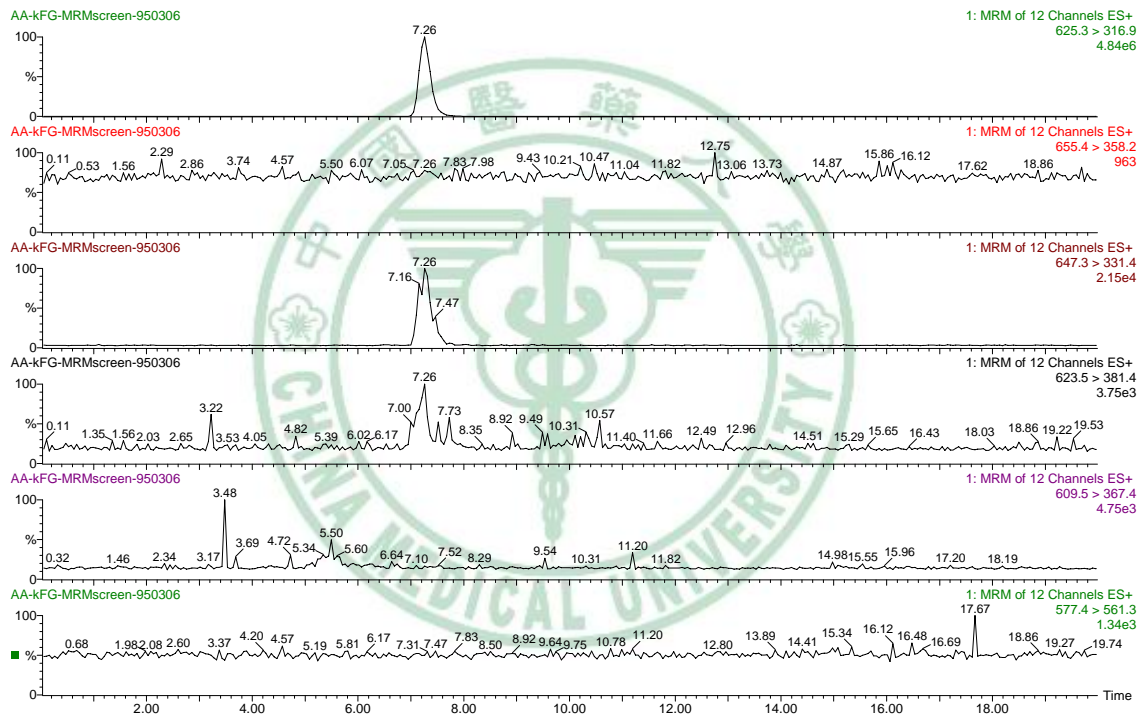


Fig.48 : Fangchi herbal MRM pre-screen macro-method scanning and the result of Aristolochia fangchi was detected

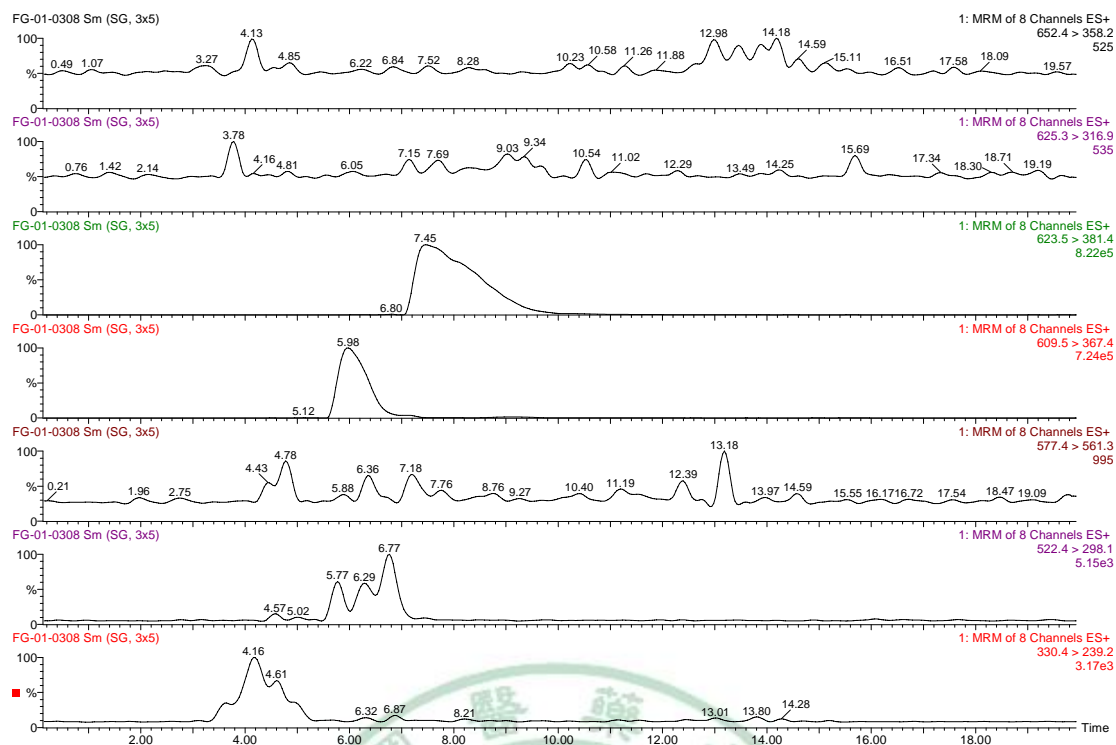
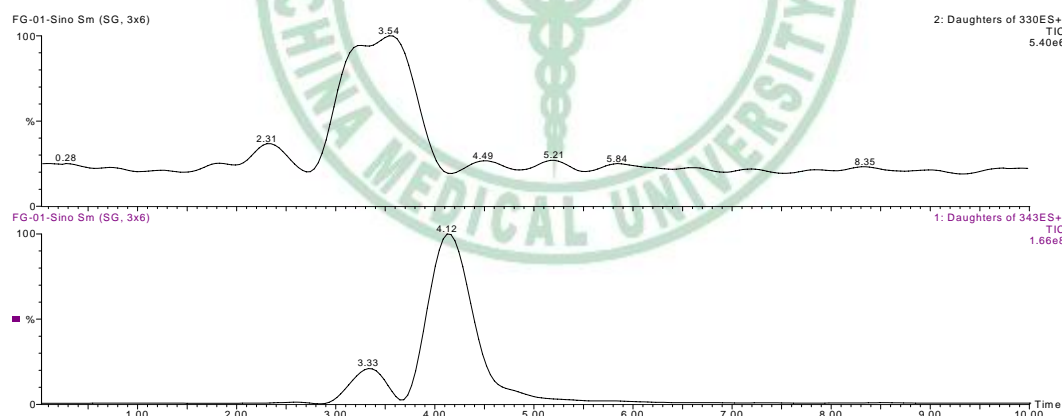
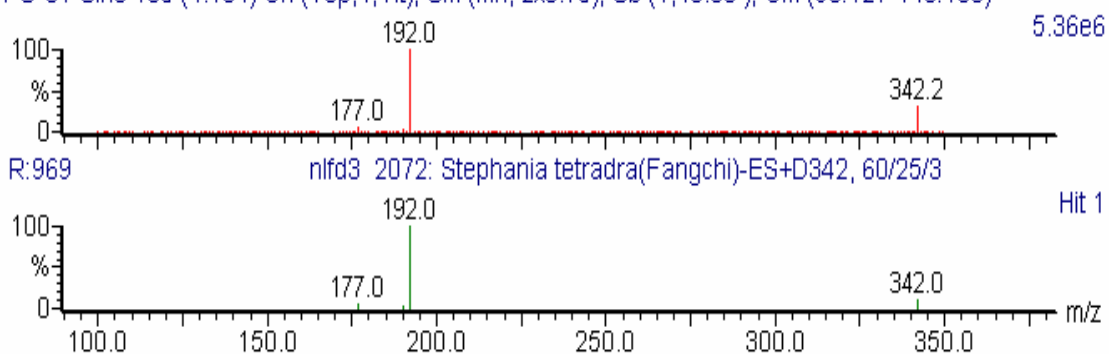


Fig.49: The MRM chromatograms of Fangchi dry extracted preparation and the tested result of containing *Stephania tetrandra* herb and suspect adulterated small portions of *Sinomenium acutum* herb



FG-01-Sino 105 (4.164) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (98:127-140:166)



FG-01-Sino 82 (3.260) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (73:98-106:137)

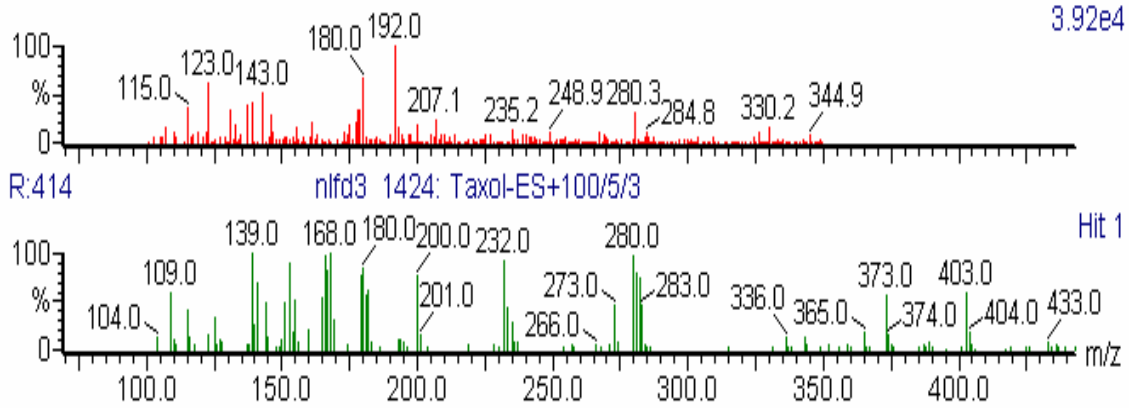


Fig.50: The double check of ES+D342 and ES+D330 chromatograms of Fangchi dry extracted preparation (防己 濃縮散) and the tested result of containing *Stephania tetrandra* herb but *Sinomenium acutum* herb had no detected

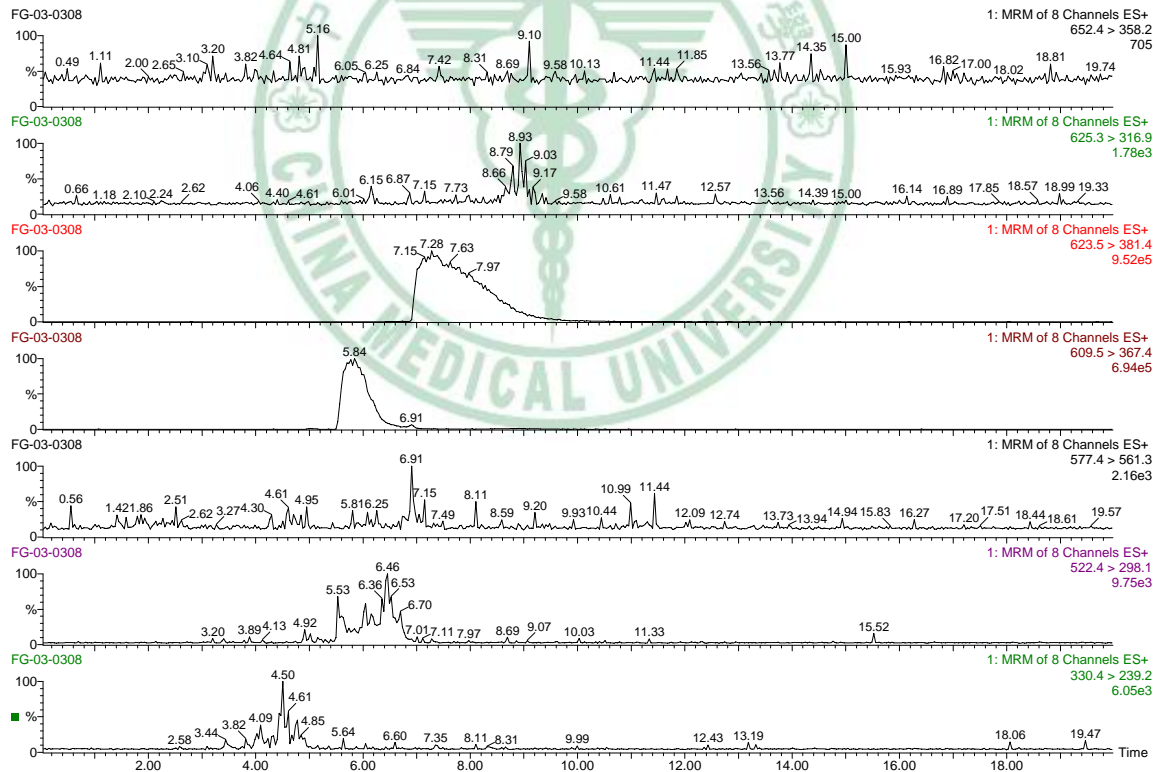


Fig.51: The MRM chromatograms of Han-Fangchi dry extracted preparation (漢防己 濃縮散) and the tested result of containing *Stephania tetrandra* herb, was different from the formula label of *Sinomenium acutum*

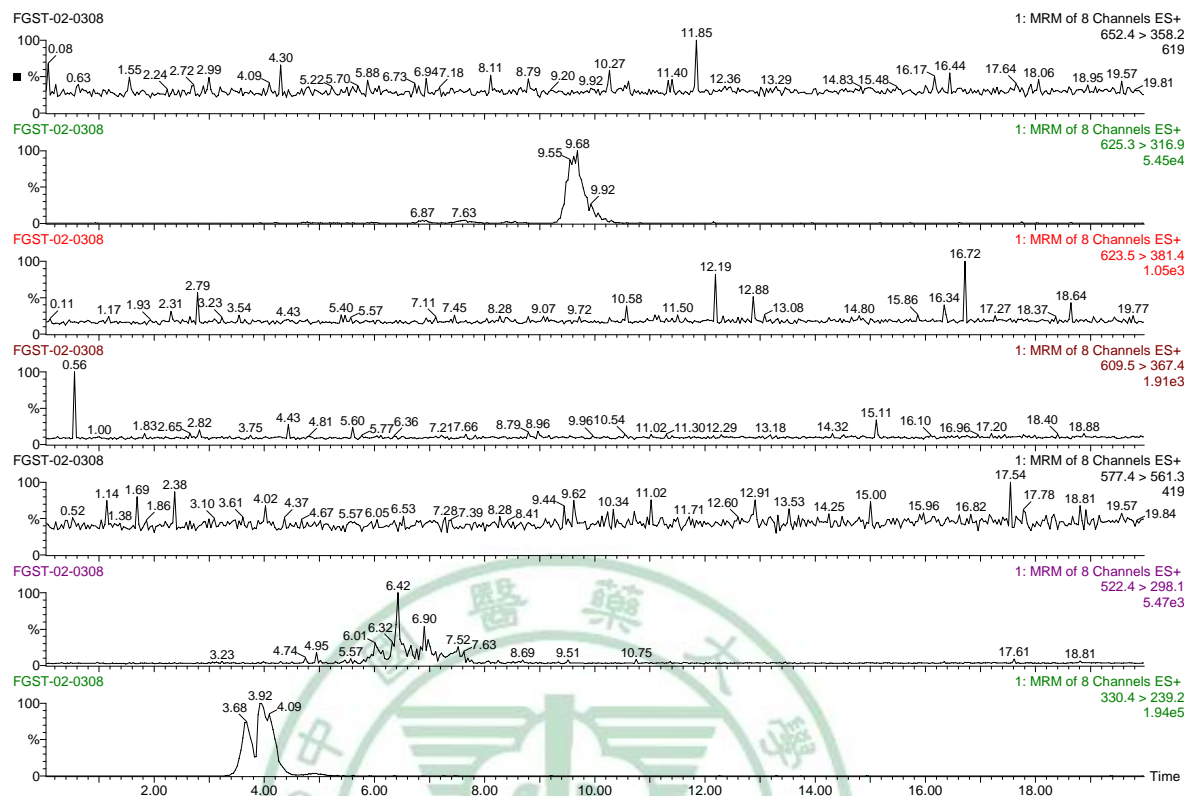
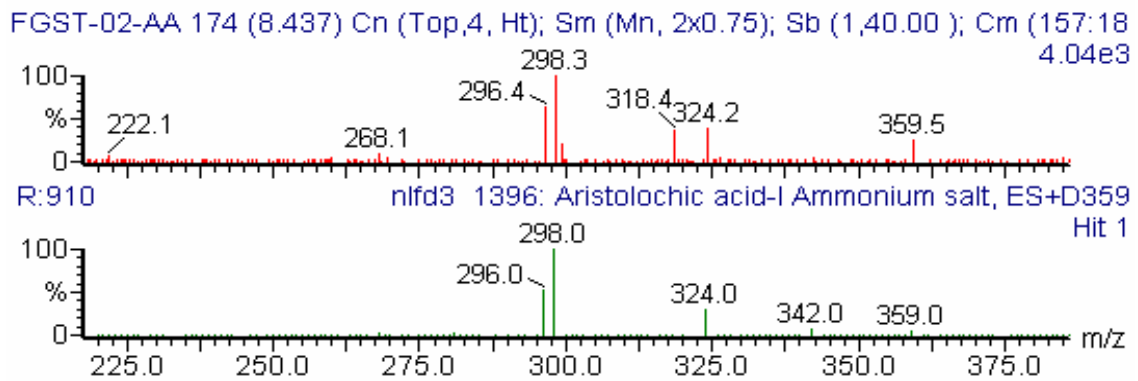
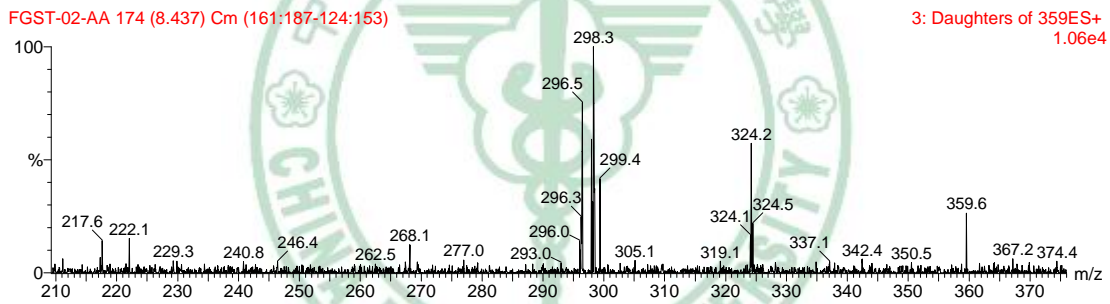
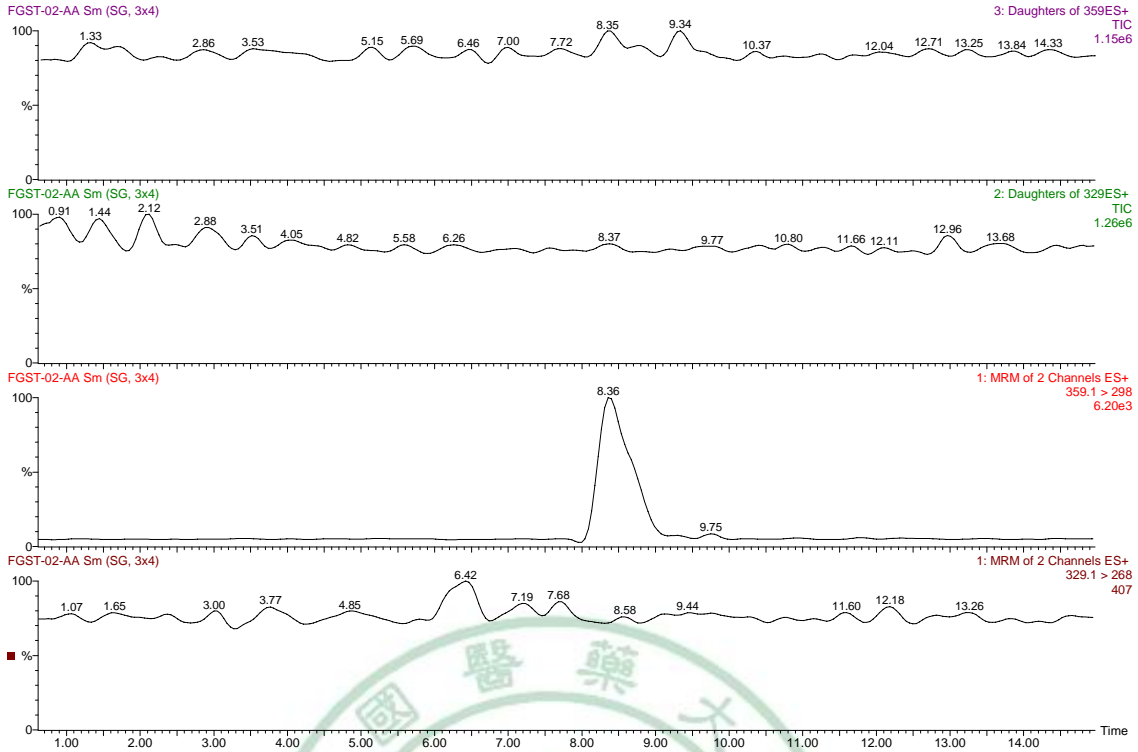


Fig.52 :The MRM chromatograms of Sheau-Shiuh-Ming-Tang (小續命湯 濃縮顆粒) dry extracted preparation and the tested result of containing *Sinomenium acutum* herb and adulterated portions of *Aristolochia fangchi* (Formula label : *Sinomenium acutum*)



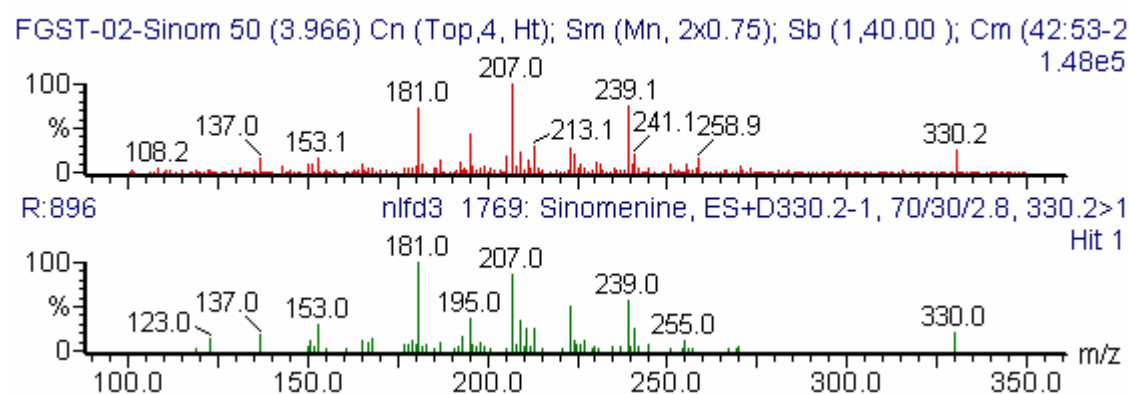
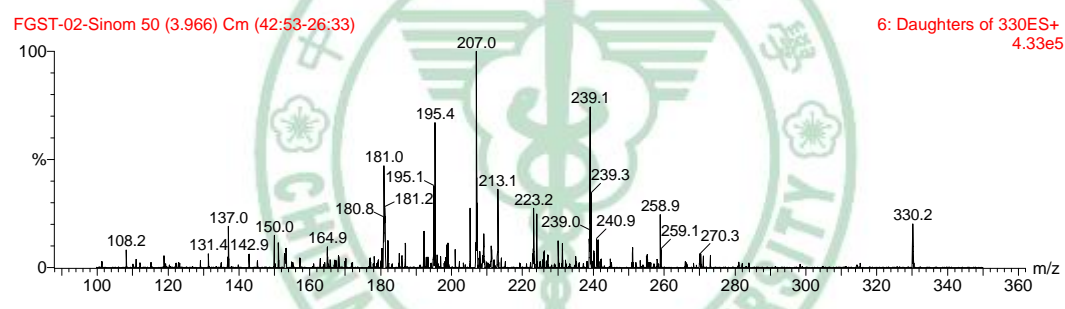
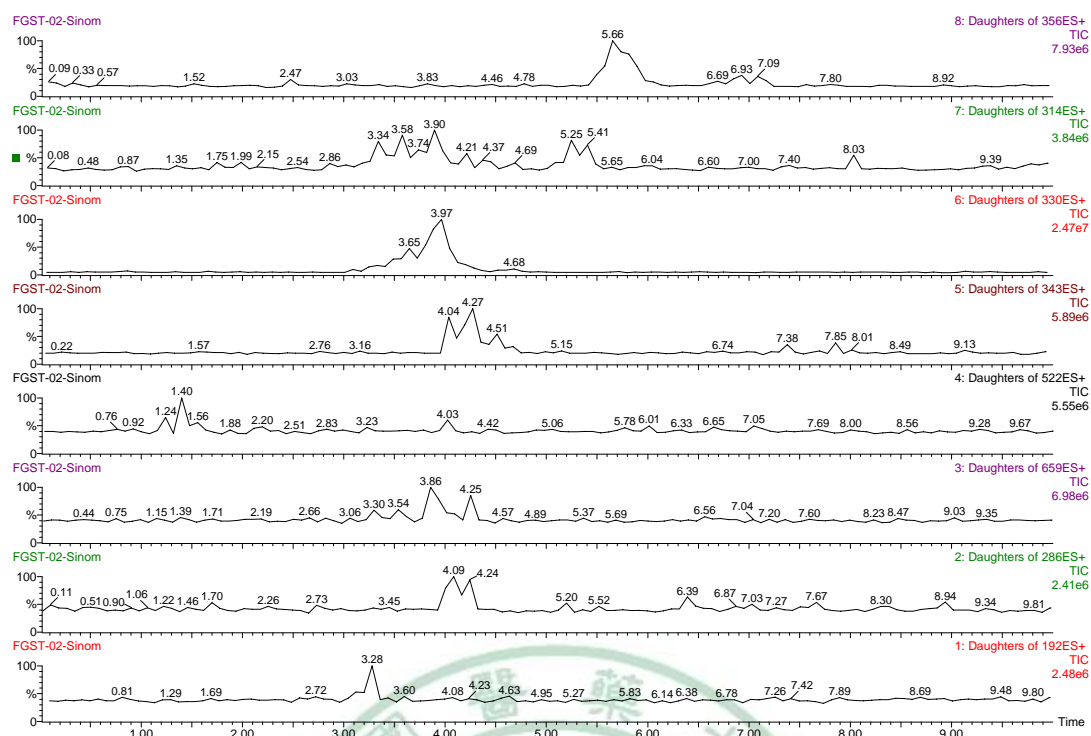


Fig.53 :The double check of Sheau-Shiuh-Ming-Tang (小續命湯濃縮顆粒) dry extracted preparation contained aristolochic acid and Sinomenine by LC/MS/MS

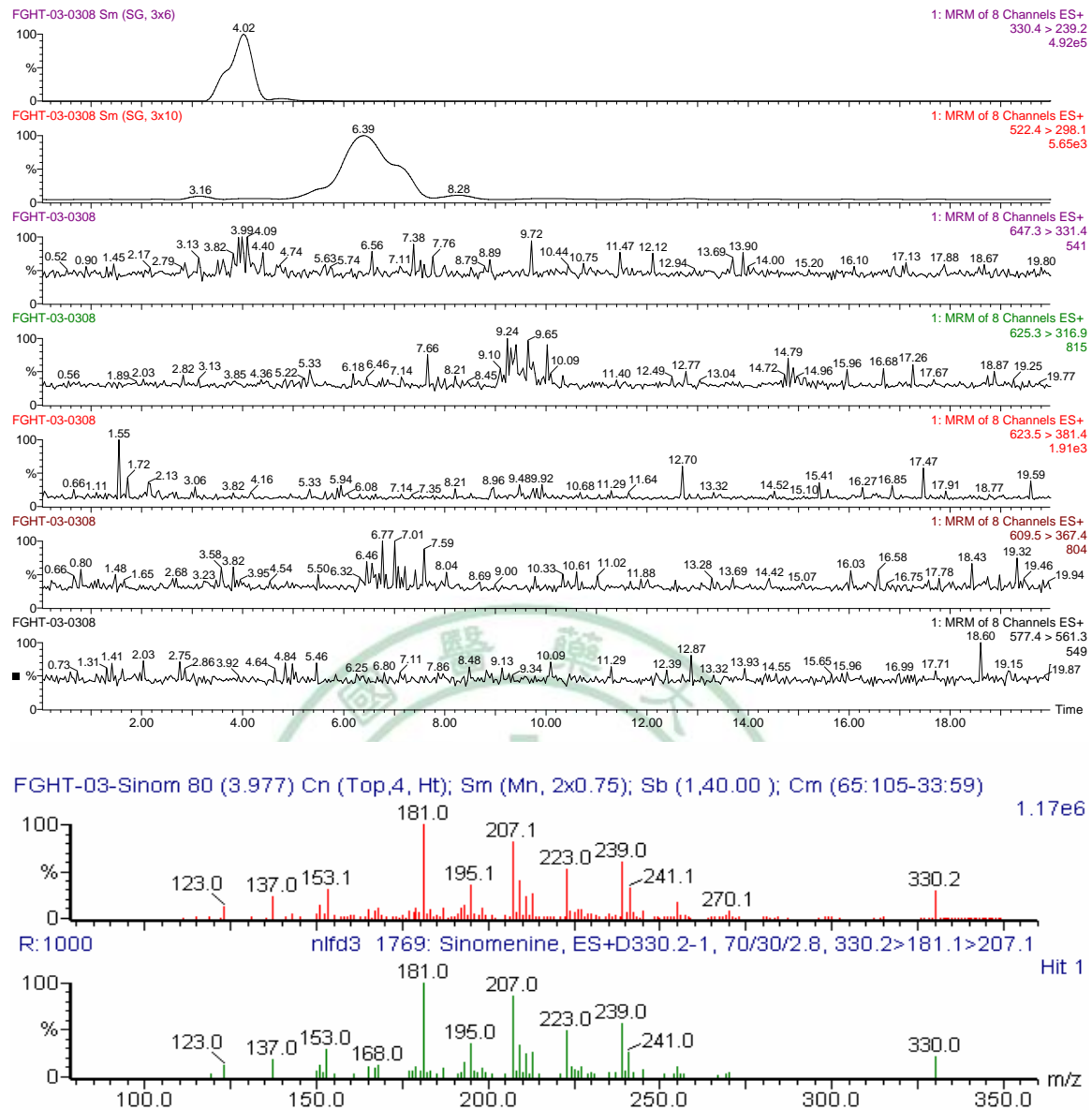


Fig.54: The MRM chromatograms of Fangchi-Hwang- Chi-Tang (防己黃耆湯濃縮散) dry extracted preparation and double checked result of containing *Sinomenium acutum* herb (Formula label : *Stephania tetrandra*)

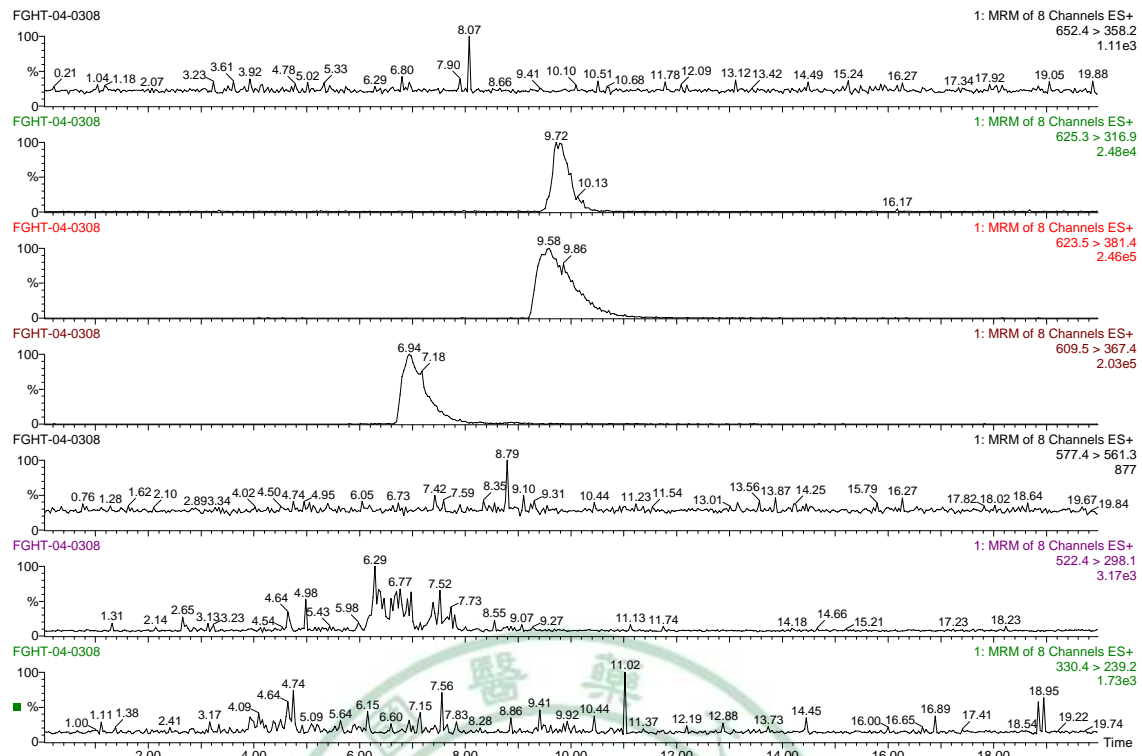
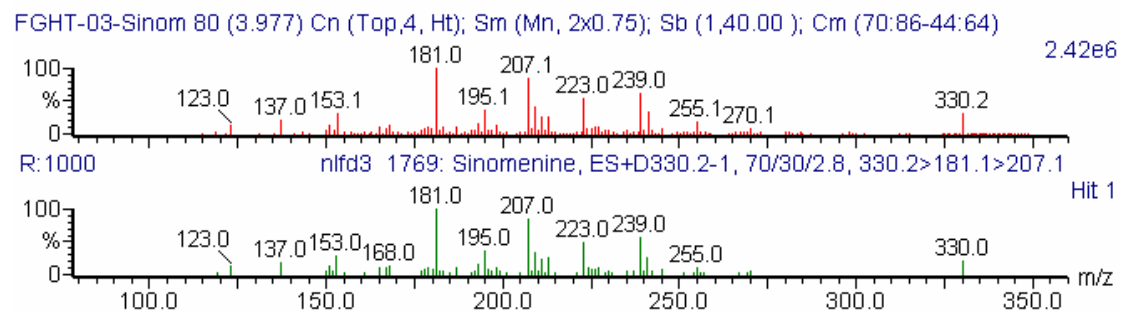
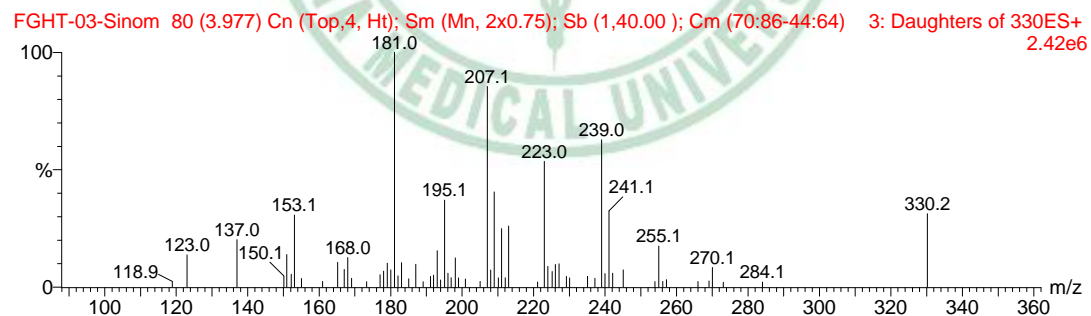
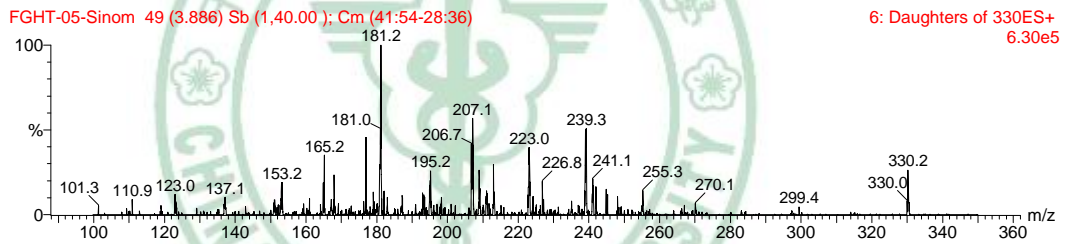
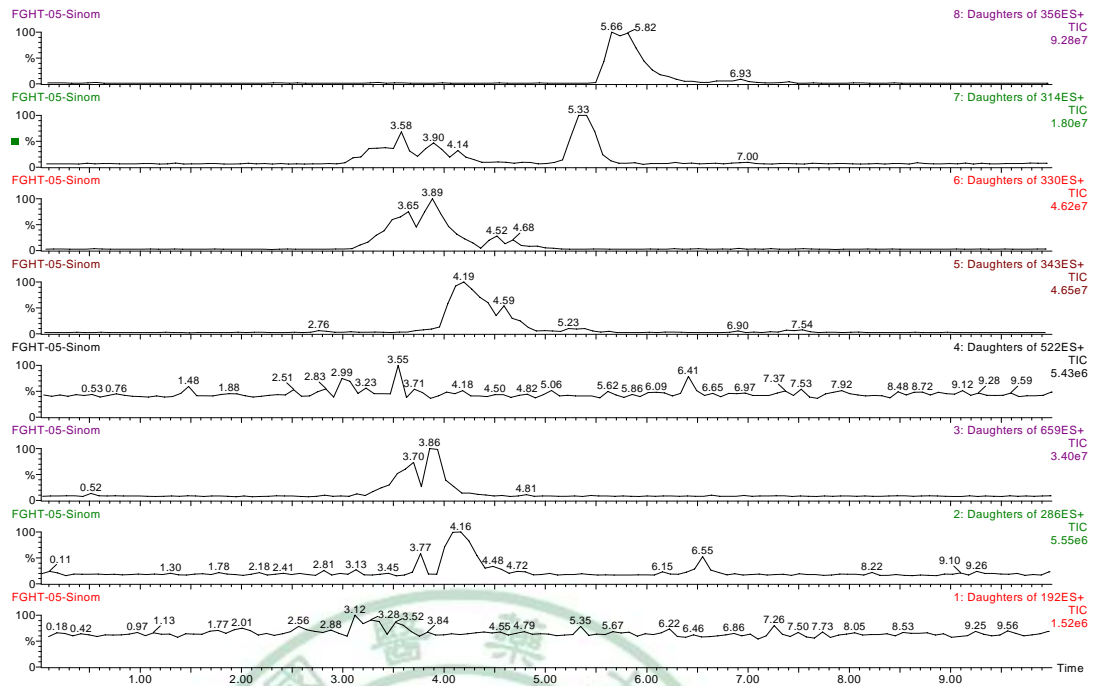


Fig.55: The MRM chromatograms of Fangchi-Hwang-Chi-Tang (防己黃耆湯濃縮散) dry extracted preparation and the tested result of containing *Stephania tetrandra* herb and adulterated portions of *Aristolochia fangchi* (Formula label : *Sinomenium acutum*)





FGHT-05-Sinom 49 (3.886) Cn (Top,4, Ht); Sm (Mn, 2x0.75); Sb (1,40.00); Cm (41:54-2 2.76e5



R:995 nlfcd3 1769: Sinomenine, ES+D330.2-1, 70/30/2.8, 330.2>1 Hit 1

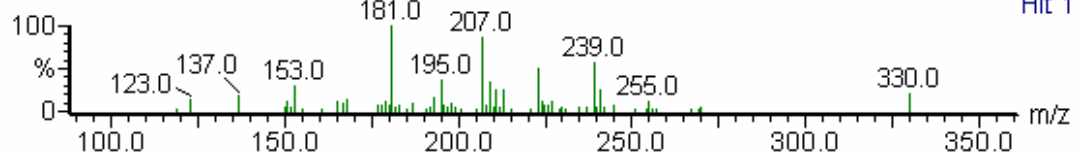


Fig.56 :The double check of Fangchi-Hwang-Chi-Tang (防己黃耆湯濃縮散) dry extracted preparation contained Sinomenine by LC/MS/MS

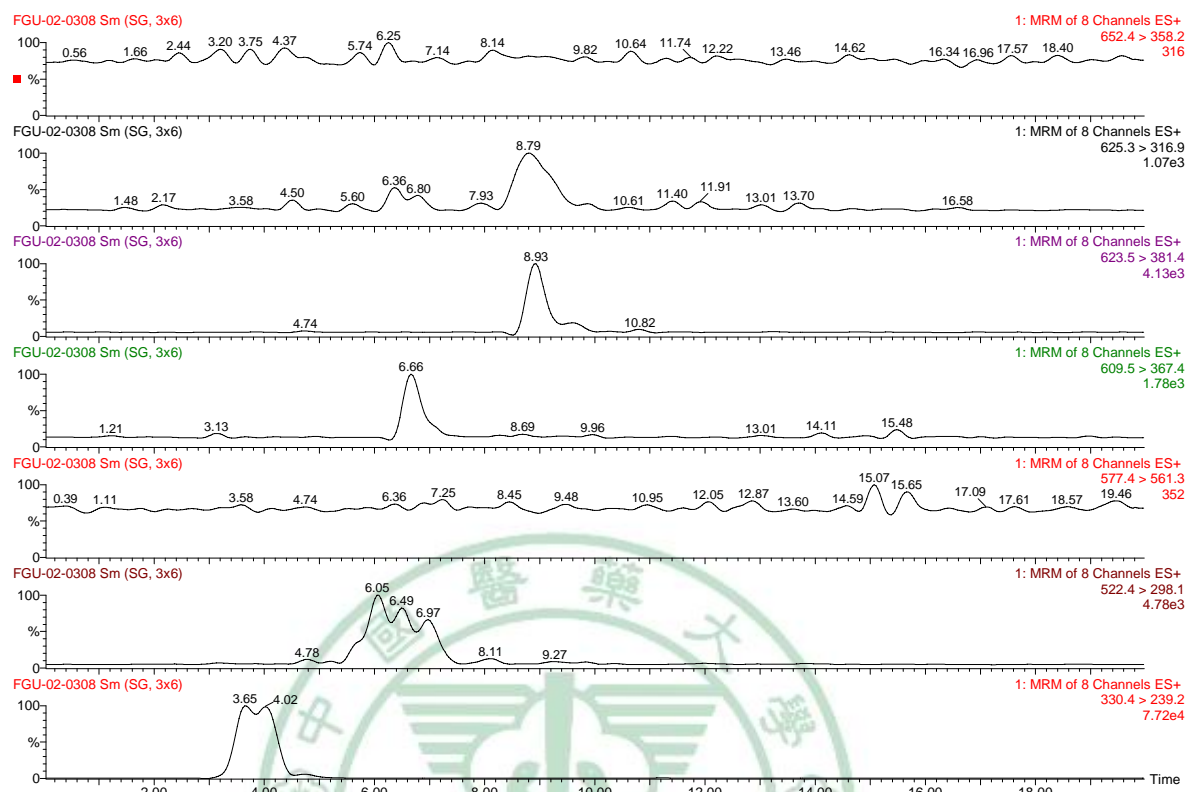


Fig.57 :The MRM chromatograms of Tong-Yonq-Tonq-Feng-Wan (通用痛風丸濃縮散) dry extracted preparation and the tested result of containing *Sinomenium acutum* herb and *Stephania tetrandra* (Formula label : Fangchi)

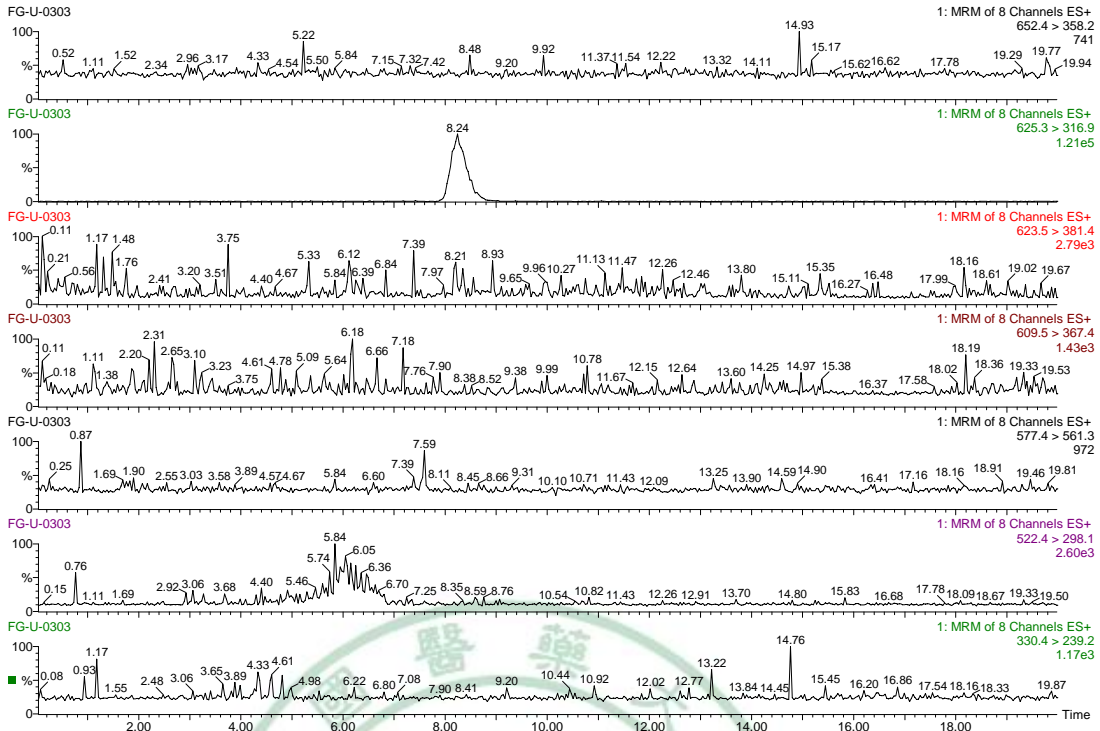
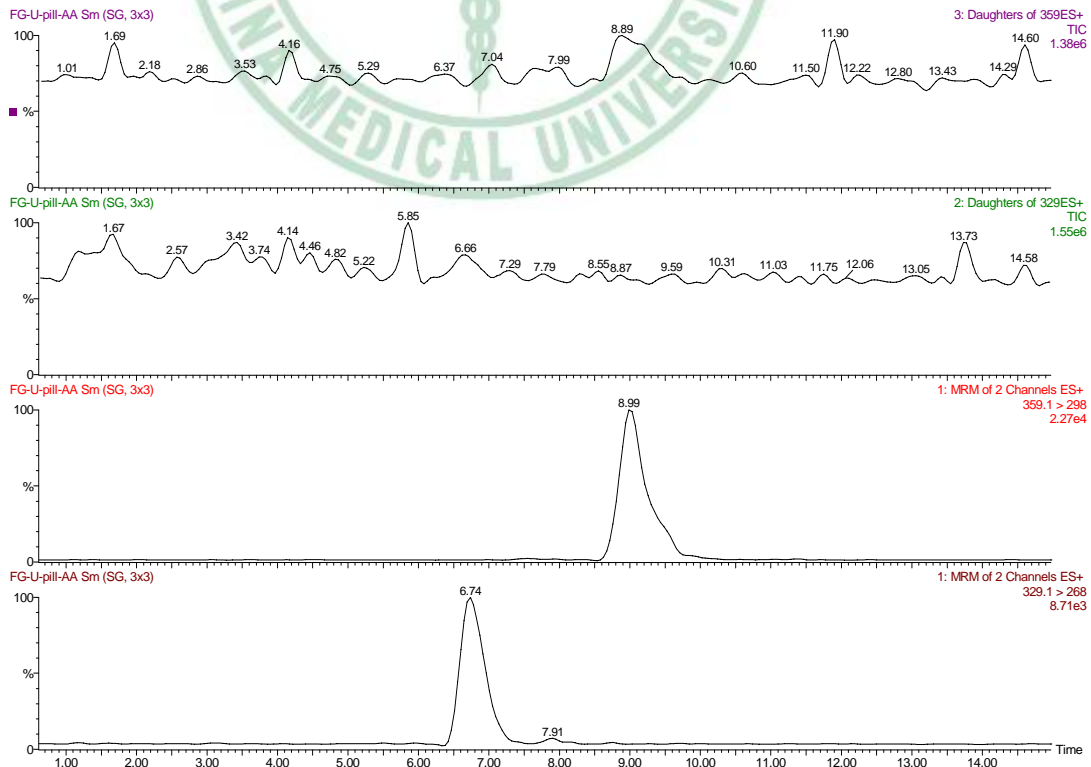


Fig.58 :The MRM chromatograms of Tong-Yonq-Tonq-Feng-Wan (通用痛風丸) pill preparation and the tested result of containing *Aristolochia fangchi* (Formula label : Fangchi)



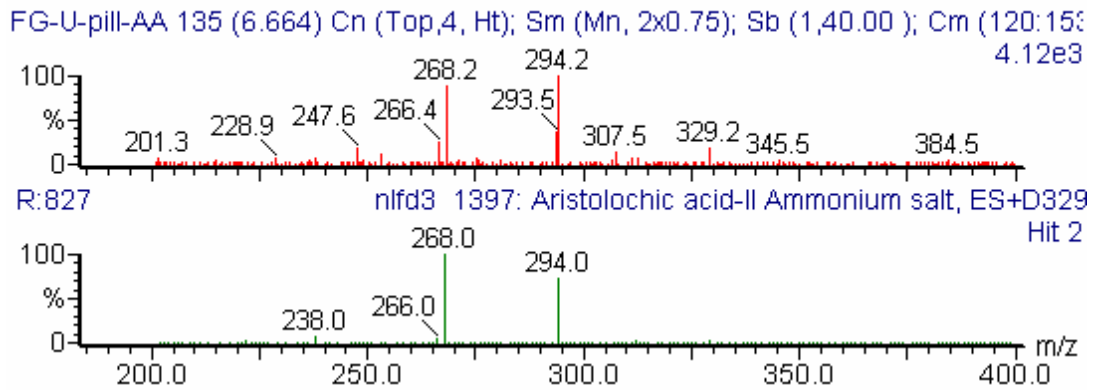
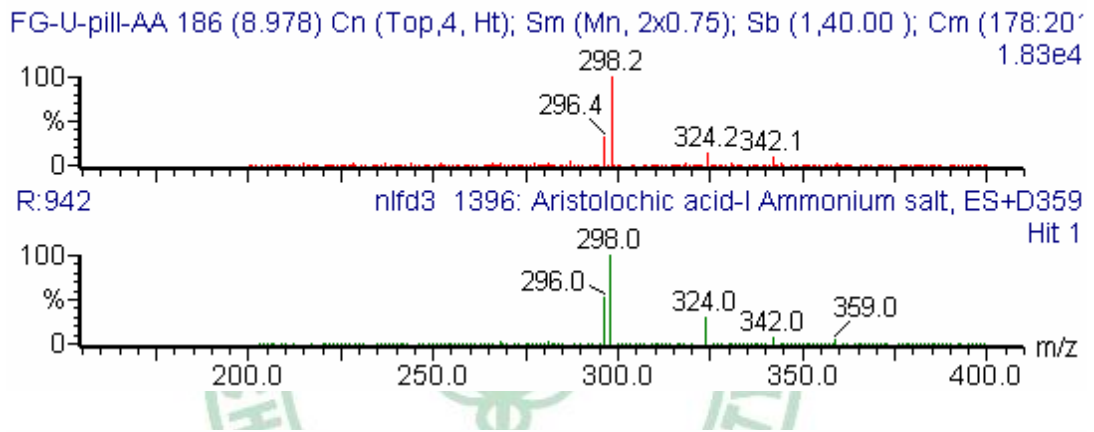
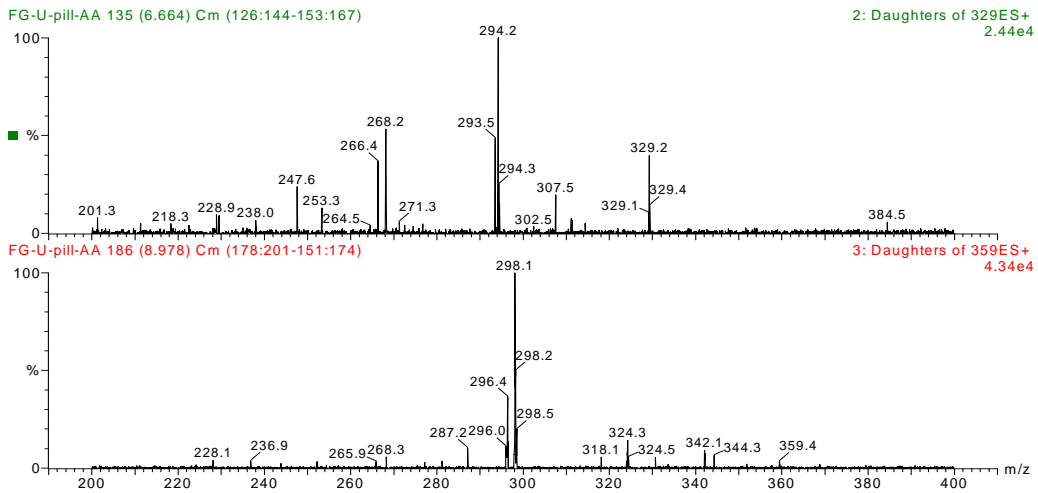


Fig.59 :The double check of Tong-Yonq-Tonq-Feng-Wan (通用痛風丸) pill preparation contained aristolochic acid I & II by LC/MS/MS

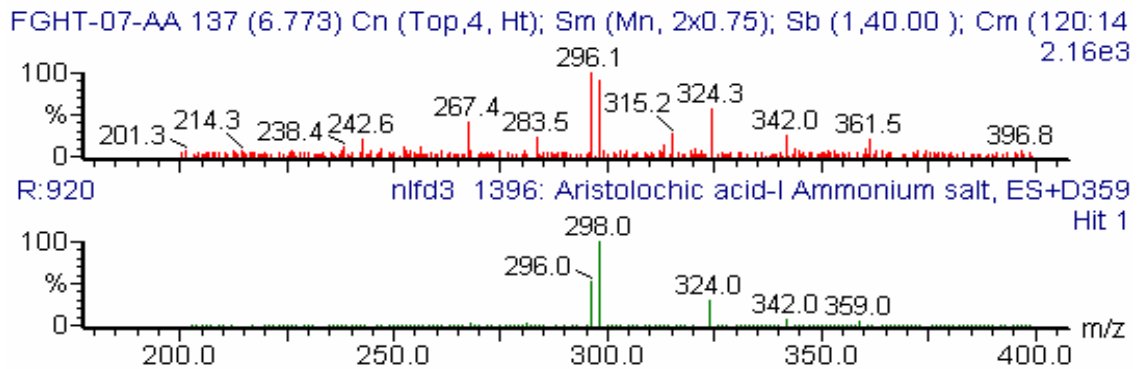
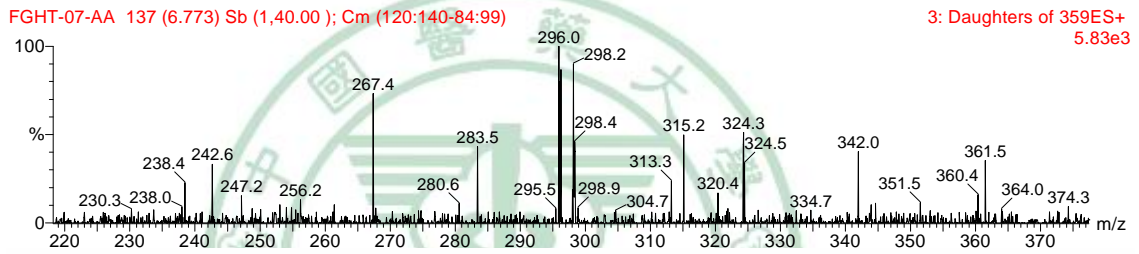
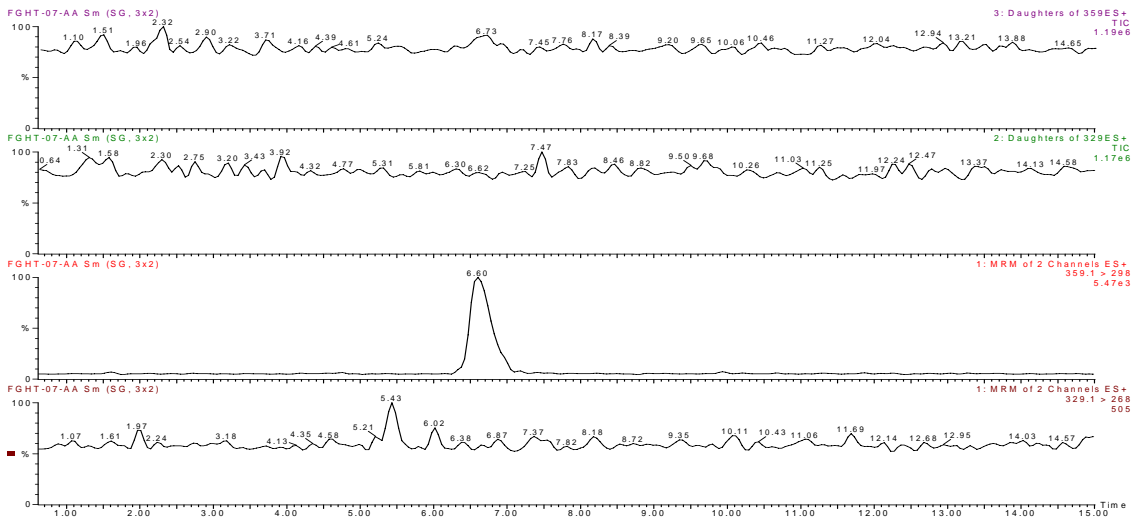


Fig.60 :The double check of Fangchi-Hwang-Chi-Tang (防己黃耆湯濃縮散) dry extracted preparation contained aristolochic acid I by LC/MS/MS

12. 不明藥材之調查：

上述 b 廠之木防己湯標示木防己，既未檢出該四種防己藥材之任何壹種，因市場之同名異物甚多，為瞭解所用何種木防己，經與廠方連繫，所獲得之答案為「華南木防己」，經查文獻資料^(12,30)，華南木防己屬於防己科(Menispermaceae)植物之 *Cocculus sarmentosus* (Lour) Diels，別名為鐵牛入石(Fig.63)、小鐵牛、牛入石、毛木防己、匐莖木防己等，台灣全境低海拔山區均有產。其根及莖含木防己鹼(trilobine)、異木防己鹼(isotrilobine)、毛木防己鹼(menisarine)等成分，幾乎與木防己(*Cocculus trilobus* D C.)相同，但於液相層析串聯式質譜分析法中均未檢出木防己指標成分之子代離子質譜圖(無 m/z 563.4 之 $[M+H]^+$ 離子裂片)，遂請原廠寄送該製品之木防己原料(Fig.61)供比對，經如同上述防己建檔分析方法，進行 ESI+/MS1 及防己藥材鑑定試驗之巨集指令(Fangchi herbal identity macro- method)，防己藥材 MRM 巨集指令(Fangchi herbal MRM macro- method)結果均與木防己或其他防己藥材不相符，因此決非是防己科(Menispermaceae) *Cocculus* 屬之植物。再經與文獻記載^(30,31)比對發現可能為旋花科(Convolvulaceae)之丁公藤(*Erycibe obtusifolia* Benth.)，經取丁公藤之標準藥材之萃取液，進行 ESI+/MS1 掃瞄分析結果，兩者之 TIC 圖及 MS1 spectrum 均相符(Fig.62)，因此該不明藥材應為丁公藤。由此案例得知液相層析串聯式質譜指紋圖譜分析法亦可適用其他中藥材之分析比對。



Fig.61 :The MRM chromatograms of Muh-Fangchi-Tang (木防己湯濃縮散) dry extracted preparation and the tested result of containing none of the 4 kinds of Fangchi herb (Formula label : *Cocculus*)



**Fig.62 :The appearance of unknown sample had been adulter- ated in
Muh-Fangchi-Tang (木防己湯濃縮散) dry extracted preparation as
Coculus herb**



Fig.63: The apparence of *Coculus sarmentosus*(華南木防己)

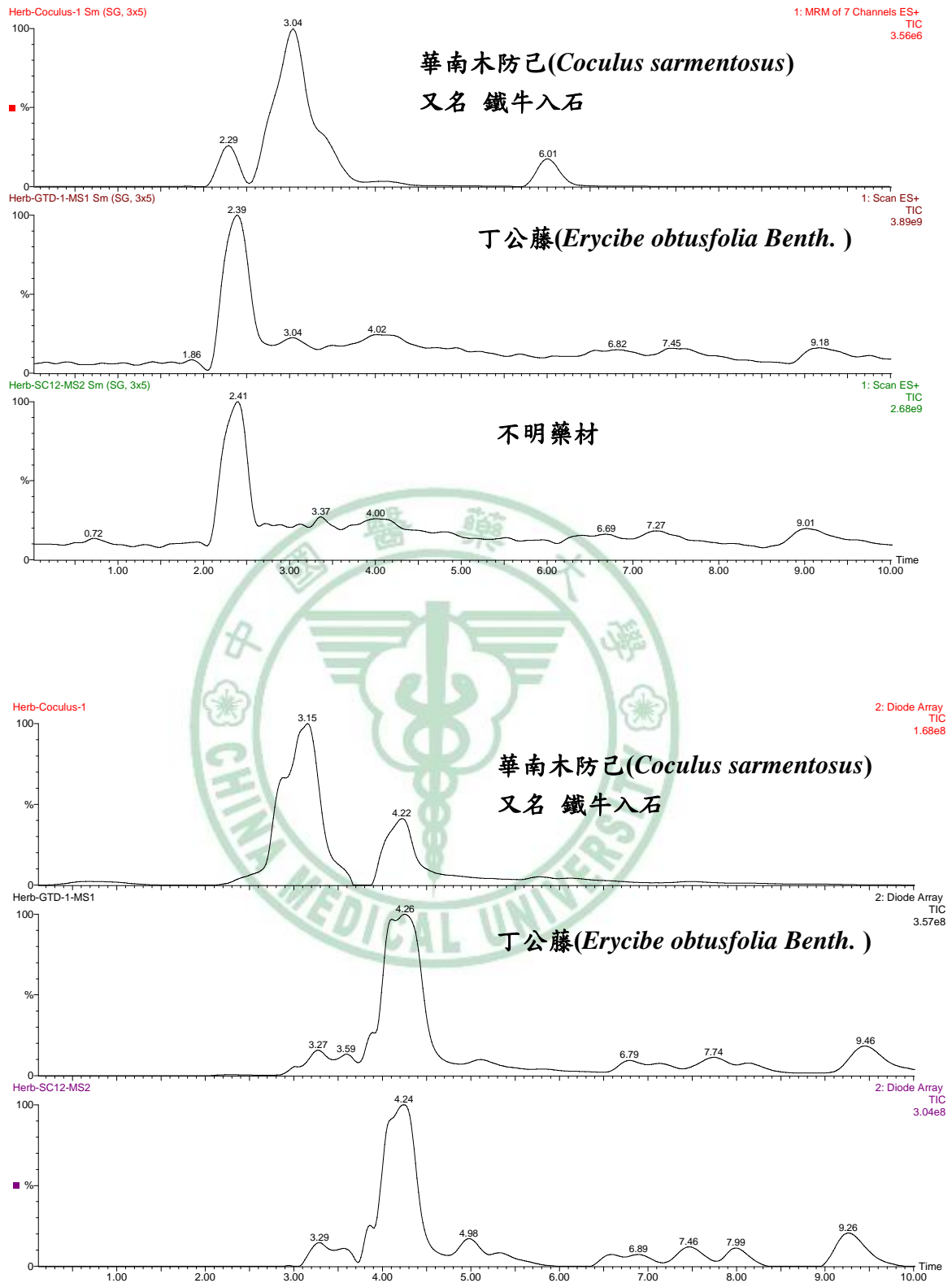


Fig.64: The comparison of ESI+/MS1 TIC (upper) and PDA chromatogram (below) among *Erycibe obtusifolia*, unknown sample and *Coculus sarmentosus*

13. 四種防己藥材成分之異同

13-1. 依據中外藥用植物文獻考察結果，防己藥材主要基源為防己科 (Menispermaceae) 植物及馬兜鈴科 (Aristolochiaceae) 植物，其中使用較廣者為防己科植物「粉防己」 (*Stephania tetrandra* S. Moore) 之根或根莖，又名為「石蟾蜍」或「漢防己」；另一為馬兜鈴科植物「廣防己」 *Aristolochia fangchi* Wu. 之根莖，其藥材又名為「木防己」。但據多位學者考證結果「漢防己」其實為防己科植物「漢防己」 (*Sinomenium acutum* Rehd. et Wils.) 之根或根莖，又名為「青藤」，據仇良棟⁽¹¹⁾ 在日本考證結果發現日本所用防己即為「青藤」，而日本多數文獻以此稱為「漢防己」。然而「木防己」應為防己科植物「木防己」 (*Cocculus trilobus* DC.) 之根或根莖，由此可之，藥材名稱已嚴重之混淆，誤用則在所難免。

13-2. 漢防己主成分 Sinomenine 之 structure 與 morphine, codeine 之基本架構相似，僅在 side-chain 之部份結構不同 (Tab.12)，漢防己之止痛效果表現優異，是否與化學結構之 SAR 相關，是否如同 morphine 具有成癮性，均值得另闢專題研究。

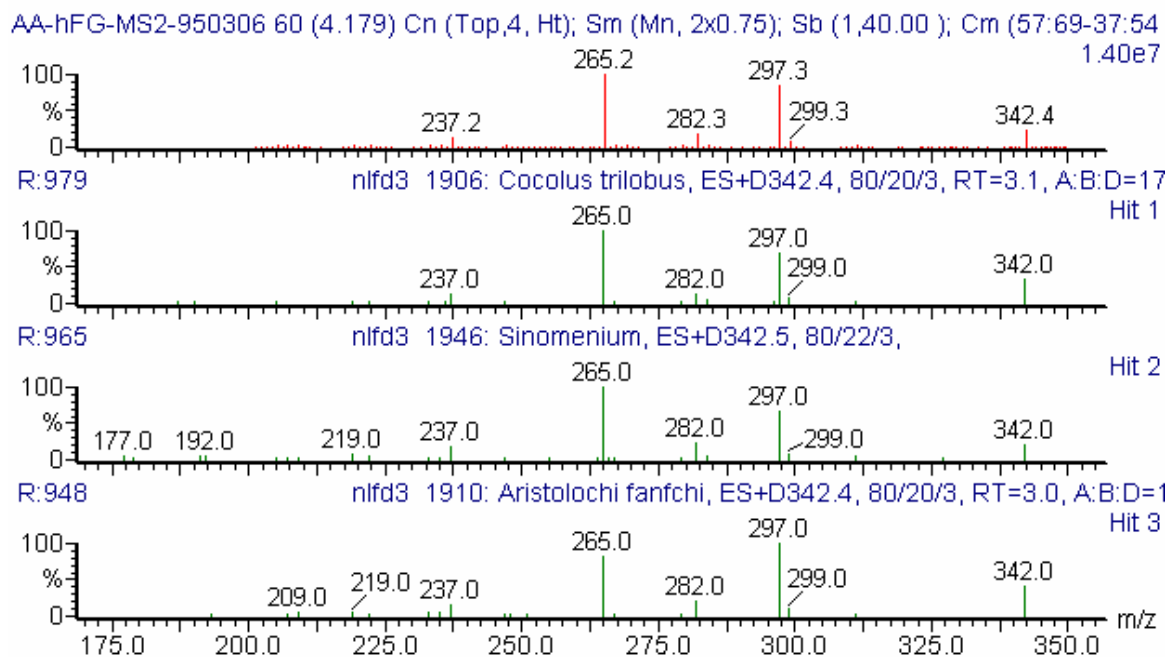
13-3. ESI+/MS 1 之 TIC 圖中之每一個離子峰不一定是單一成分，也有可能是多種成分重疊。質譜圖中較大之離子裂片，應屬最穩定或含量較高之離子裂片，選此裂片進行 daughter ion scan 分析。daughter ion spectrum 可視為單一成分之指紋，再配合 Retention time 及 UV spectrum，可作為中藥材鑑定之最有力證據。

13-4. 由四種藥材之 ESI+/MS 1 TIC 圖中獲得有若干含量較高或 abundance 較大之離子裂片，例如 m/z 206, 225, 244 等離子裂片均存在於四種藥材中，屬於植物共有成分，因此不用作四種藥材之鑑定指標成分

13-5. m/z 342 為四種防己均存在之穩定明顯之離子裂片，其中除粉防己外，其他三種防己均有相同之子代離子質譜圖 (ES+D342)，其主要裂

片為 m/z 265, 297, 282, 342，離子峰滯留時間約為 4.1 分鐘。由文獻計記載廣防己、木防己及漢防己均含 magnoflorine ($C_{20}H_{24}NO_4$, MW. 342) 成分，為四級銨結構，因此 m/z 342 疑似為 magnoflorine 之 $[M]^+$ 分子離子裂片；而粉防己之 ES+D342 主要裂片為 m/z 192, 342, 177，離子峰滯留時間約為 5.7 分鐘。顯然兩者不同。經查文獻^(2,4)粉防己含 cyclanoline ($C_{20}H_{24}NO_4$, MW.342)，亦為四級銨結構，因此 m/z 342 疑似為 cyclanoline 之 $[M]^+$ 分子離子裂片，該兩成分屬於同分異構物(Tab.12)，但子代離子質譜圖與離子峰滯留時間均不同，因此 ES+D 342 質譜圖可作為防己種類之判定證據。

13-6. 四種防己均有 m/z 314 之離子裂片，其中粉防己、木防己及漢防己於 RT=5.2 分鐘處有離子峰，其主要裂片為 m/z 107, 314, 143, 269, 121, 174；廣防己及漢防己於 RT=3.9 分鐘處有離子峰，其主要裂片為 m/z 298, 299, 314, 151, 284；木防己及漢防己於 RT=15 分鐘處有離子峰，其主要裂片為 m/z 177, 145, 121 等。子代離子質譜圖及離子峰滯留時間相同者應為相同成分，由此可由共同成分之異同，判定防己之種類。



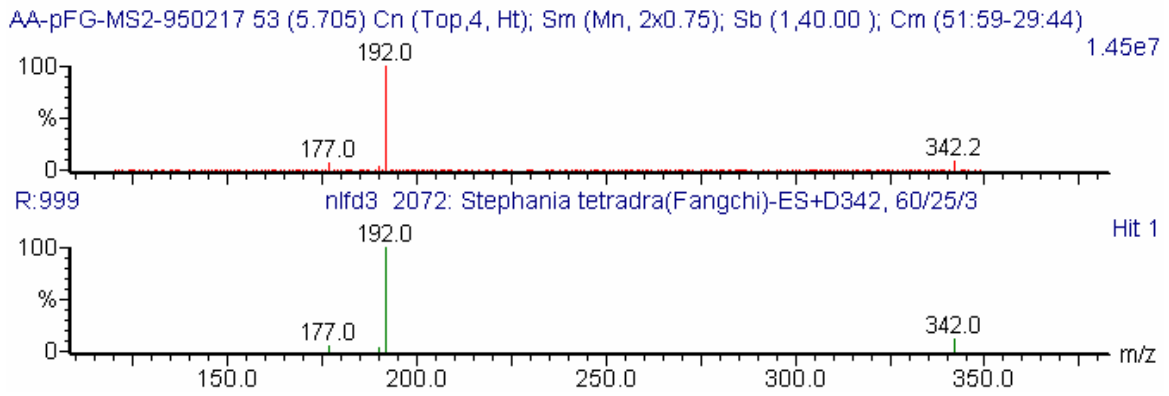


Fig.65 : The comparison of ES⁺D342 spectrum among 4 type Fangchi herb

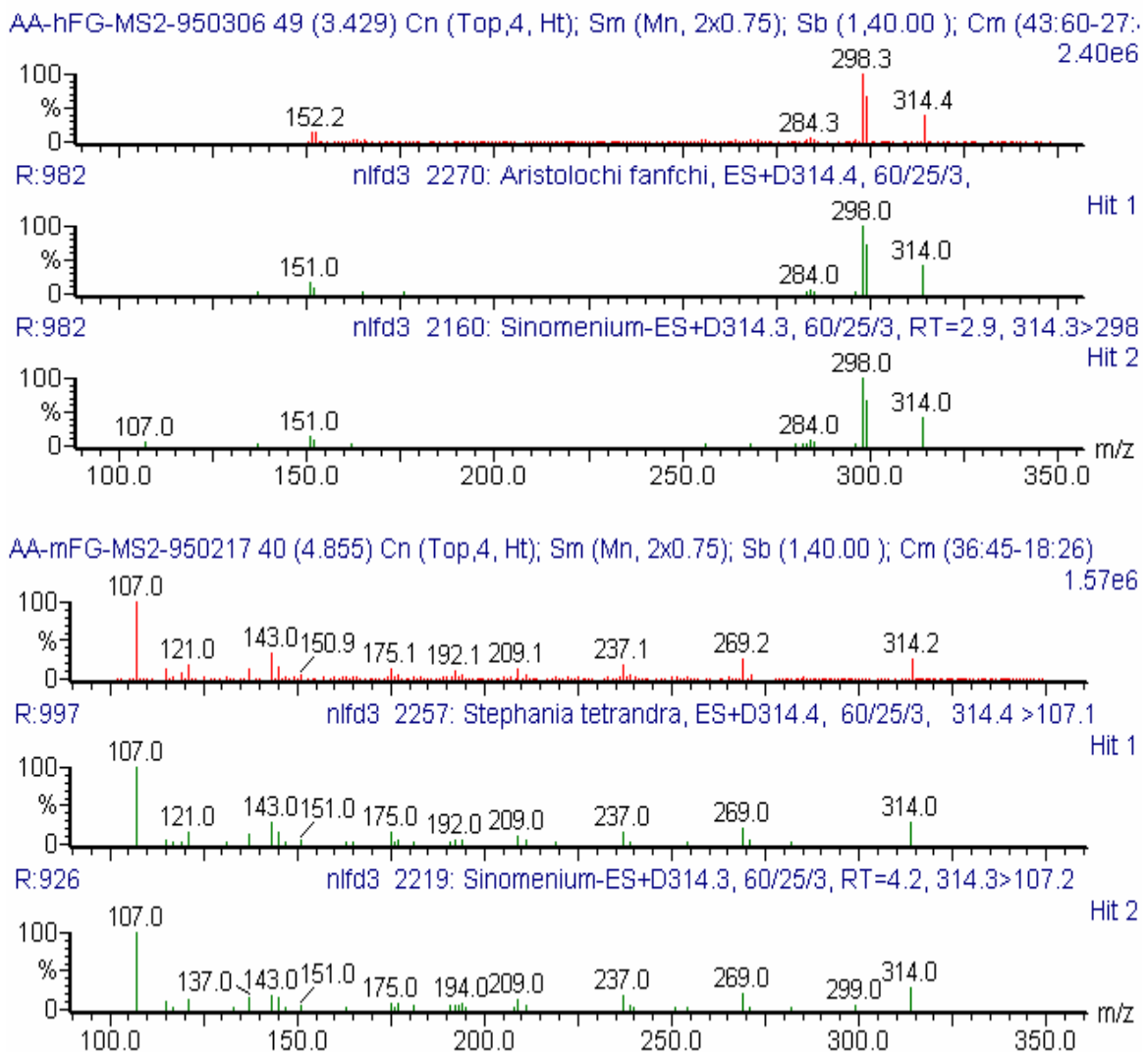


Fig.66 : The comparison of ESI⁺D314 spectrum among 4 species Fangchi herb

五、結 論

1. 中藥種類繁多，來源複雜，既有同名異物、同物異名、一藥多名，也有來源不同、地區習慣用藥之不同等普遍現象，這些存在的因素均不利中草藥長期之發展，因此中藥極需結合高科技之檢驗方法，建立一種客觀、快捷、精確之鑑定方法，液相層析串聯式質譜分析法即是其中最理想之檢驗方法之一。
2. 由以上之市售調查結果發現，防己之使用真的如同古籍文獻中記載般之混亂，每家製造廠對防己基源認知差異極大，粉防己、漢防己名稱之糾葛不清，木防己之替代品有許多，常有地域性之基源，以至很難有一致性之基源。四種防己之主成分差異極大，治病效能應也不同，因此建請中藥主管機關應明確規範方劑統一之藥名與基源，核準之治病效能應與所用防己種類相符，方能保障消費大眾用藥之安全。
3. 正確指紋圖譜建檔，影響日後之比對正確與否，因此標準藥材之確立尤其重要，本文標準藥材均經專家鑑定後，並切片與文獻比對，兼進行 TLC 分析與藥材指標成分作比對，正確後才用以作為指紋圖譜建檔。本文初始之實驗設計鑑定藥材涵蓋與粉防己飲片藥材極為相像之茶茱萸科(Icacinaceae)植物瘤枝微花藤(*Iodea sequinii* (Hevl.) Rehder)、小果微花藤(*Iodea ovalis* Bl. Var. *vitiginaceae* (Hance) Gapnep.) 以及馬兜鈴科 (Aristolochiaceae) 植物漢中防己(*Aristolochia heterophylla* Hemsl.)，又稱之為異葉馬兜鈴等藥材，唯因尚未取得標準藥材而作罷，待有該三種標準藥材時，將與一併建檔。
4. 欲進行中藥製劑中防己指紋圖譜比對，應先進行藥材之 MRM 預篩檢試驗(MRM pre-screen macro-method)，檢視其中可能含防己種類後，再進行防己藥材 MRM 巨集指令(Fangchi herbal MRM screen macro-method)

或防己藥材鑑定試驗之巨集指令(Fangchi herbal identity macro-method)分析，獲得之子代離子質譜圖，與 LC/MS /MS 指紋質譜圖庫作比對，將可獲致確切之結果。Fangchi herbal MRM screen macro-method 分析為選擇性的監測親代及子代配對離子裂片，可屏除其他離子之干擾，提升各 channel 之靈敏度。同時可比對各管道波峰滯留時間(peak maxima retention time)與標準藥材是否相符，其鑑定結果均有數據之佐證，因此可謂是最客觀之檢驗方法。

5. 藥材內成分常因採收季節、炮製方法、使用部位等之不同，其所含成分均有些差異，不同批之藥材亦難完全相同，因此藥材鑑定結果以藥材比對相似度(Herbal similarity)之百分比作表示較符合實際。

6. 由本研究中發現 LC/MS/MS 指紋圖譜分析法應用之優勢如下：

6-1. 中藥材內容成分複雜，未知成分尚多，又鮮能取得對照標準品，若以 HPLC 鑑定則需與標準品比對 retention time (RT)，甚至於需以標準添加方式證實該波峰無誤，若無標準品之比對，兩個 RT 相同之波峰，則難判斷其是否為相同成分之波峰。但 LC/MS/MS 指紋圖譜分析法，可藉由標準藥材指紋質譜圖之建檔後，再進行鑑定藥材多種成分之子代質譜圖分析，並與指紋質譜圖譜庫作比對，即可獲致確切之檢結果，因此未必完全瞭解其中植物成分，亦無需對照標準品比對仍然可以鑑定。

6-2. 傳統中藥材之鑑定常以 HPLC 分析法進行藥材比對，其先決條件為：

6-2-1. LC 幫浦精密性及穩定性需維持最佳狀況，幫浦輸出移動相之流速穩定，才能維持波峰滯留時間之一致性。

6-2-2. 分析所用管柱之理論板數需維持一定，才能獲得前後一致之波型以方便比對。但一般分離管柱常隨使用時間之累積而理論板數遞減，均不利分析再現性。

6-2-3. 對某些 UV 波段無吸收或在儀器設定偵測之波長無吸收之成分則無

比對機會，難以正確比對藥材。LC/MS/MS 指紋圖譜分析法主要比對指紋質譜圖譜，因此較無上述之顧慮。

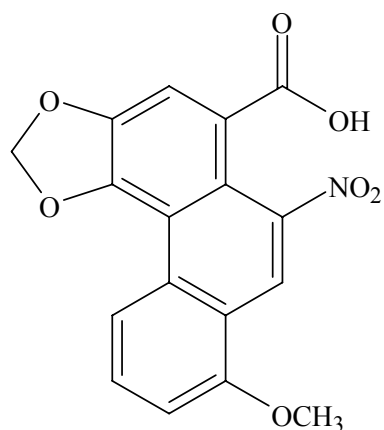
6-3.植物於代謝分化過程中，產生許多化學結構相近成分或類緣成分，其 UV 圖譜均極為相似，即使應用 PDA detector 亦難以分辨，且植物於代謝分化時段不同，生成一次或二次代謝產物之濃度不同，均造成 HPLC 指紋圖譜波型大小起伏之變化，均影響比對之相似性。

6-4.天然植物成分複雜，欲分離其中成分常需使用含 Buffer 或 Ion pair 之移動相以促進分離效果，因此分析時間常超過 1 小時；然而 LC/MS/MS 以監控離子裂片之質核比(m/z)方式分析，只要化學結構及 m/z 不同，則無相互干擾之虞，因此成分間無需很好之分離，既省時又精確。本分析法中移動相為 0.5mL/min，分析時間 20 分鐘內即可完成，比一般 HPLC 消耗溶媒大為減少，符合環保之要求。

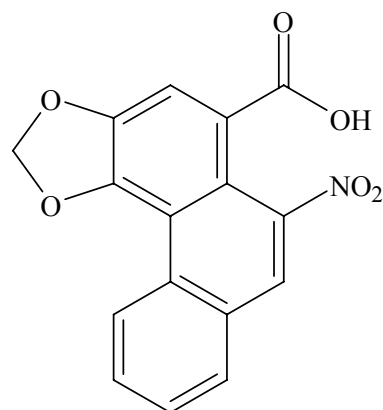
6-5.LC/MS/MS 指紋圖譜分析，其比對圖譜為分子裂解後搜集所有之分子裂片之集合圖譜，除鏡像異構物(enantiomorph)外，只要分子化學結構不同者，均有不同之質譜圖，再配合 LC 之分離，因此較無干擾之虞。

7. 由上述市售中藥製劑之調查研究發現，當今藥廠之品管人員對於防己藥材基源辨識能力應予加強，政府對廣防己既已禁用，藥品製造業者，更應謹慎，別讓過去庫存之廣防己混雜於其它防己中，作好原料把關，既可直接維護本身藥廠之商譽，亦可間接保護消費者之健康。

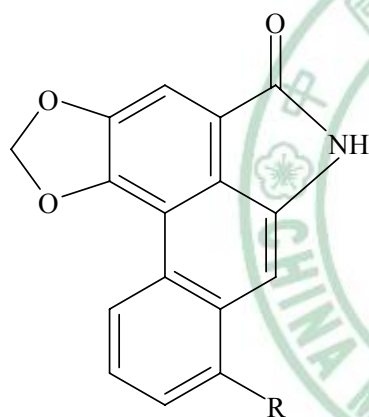
Tab.12: The chemical structure information of fangchi herb



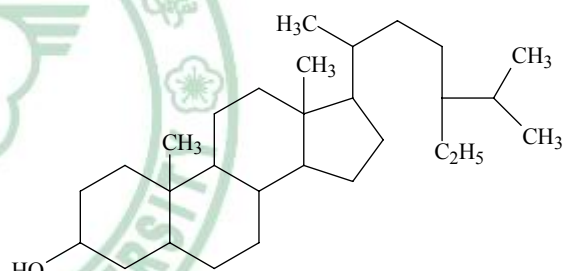
Aristolochic acid I
C₁₇H₁₁NO₇ 341.3



Aristolochic acid II
C₁₆H₉NO₆ 341.3

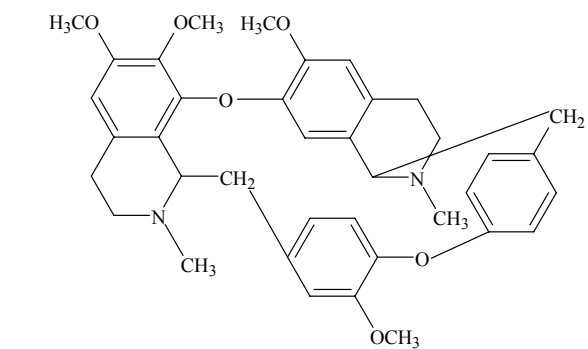


Aristolactam I: R=OCH₃, II: R=H

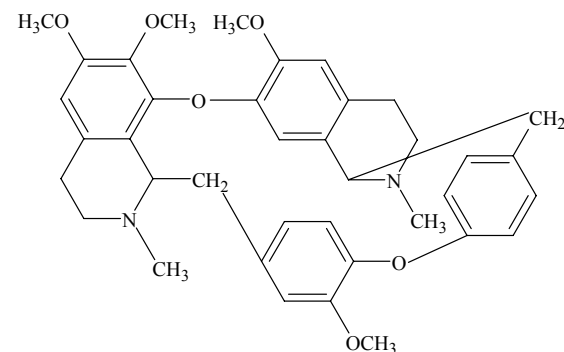


β -sitosterol C₂₉H₅₂O 416.1

C



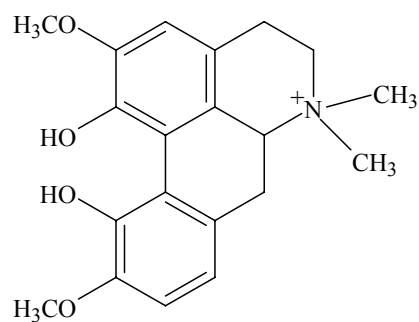
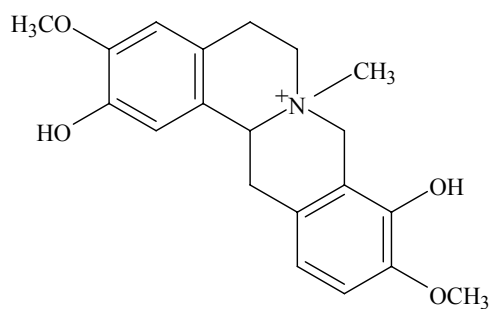
tetrandrine C₃₈H₄₂N₂O₆ 622.7



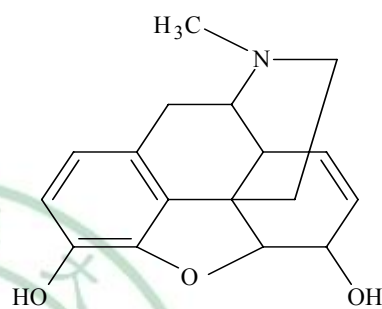
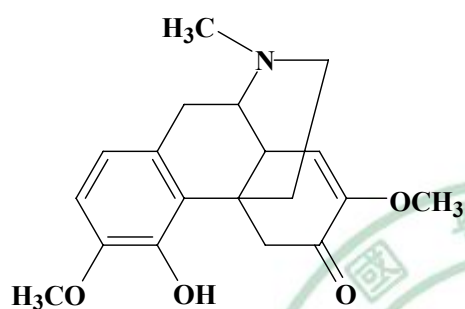
Fangchinoline C₃₇H₄₀N₂O₆ 608.7

E

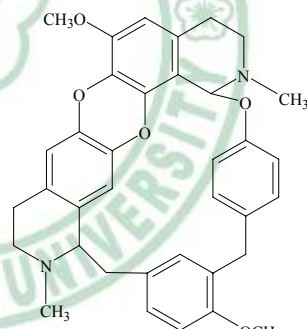
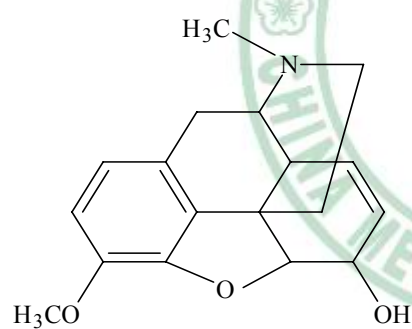
F



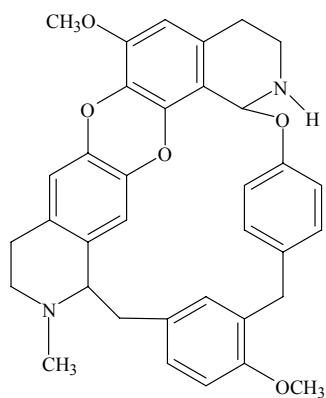
cyclanoline $C_{20}H_{24}NO_4$ 342.4 **G** Magnoflorine $C_{20}H_{24}NO_4$ 342.4 **H**



sinomenine $C_{19}H_{23}NO_4$ 329.4 **I** morphine $C_{17}H_{19}NO_3$ 285.3 **J**



codeine $C_{18}H_{21}NO_3$ 299.4 **K** Isotrilobine $C_{36}H_{36}N_2O_5$ 576.6 **L**



trilobine $C_{35}H_{34}N_2O_5$ 562.6 **M**

參 考 文 獻

1. 賴榮祥，防已、防己、防己之種種問題及其相關生藥製劑之應用，文華國際生藥研究所；台中縣豐原市，<http://www.ohayoo.com.tw/>
2. 中華本草，國家中醫藥管理局，中華本草編委會，上海科學技術出版社，p301。pp3-347-349, pp3-470-475
3. 中國藥品生物製品檢定所、廣東省藥品檢驗所，中國中藥材真偽鑒別圖典 2，1997，廣東科技出版社。
4. 新編中藥大辭典，新文豐出版公司
5. 謝宗萬，中藥材品種論述(上冊)，1990，科學技術出版社，上海，2nd edition，p236。
6. Vanherweghem JL, et al., Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women associated with slimming regimen including Chinese herbs, *Lancet* 1993; 34: 387-391.
7. Pena JM, Borrás M, Ramos J, Motolius J. Rapid progressive interstitial renal failure due to a chronic intake of a herb (*Aristolochia pistolochia*) infusion. *Nephrologie, Dialysis, Transplantation* 1996; 11: 1359-60
8. 行政院衛生署中醫藥委員會 89.8.3. 衛署中會會藥字第 89007192 號公告(2000 年)
9. 中華人民共和國藥典 2005 年版第一部，國家藥典委員會，化學工業出版社，北京，p101

10. 張憲昌、徐雅慧、賴齡、黃坤森及林哲輝，中藥檢驗方法專輯(十二) 易混淆及誤用藥材之鑑別(I)，2000，行政院衛生署藥物食品檢驗局 pp112~124
11. 仇良棟，實用中藥彩色圖解辭典，1997，廣東科技出版社
12. 潘學田，現代實用本草，1997，中華人民共和國衛生部藥政管理局、中國藥品生物製品檢定所，人民出版社，pp375-381。
13. 歐明、林勵、李衍文，簡明中藥成分手冊，2003，中醫藥科技出版社， pp157~163
14. 常新全、丁麗霞，中藥活性成分分析手冊(上)，2002，學苑出版社，北京，pp961-963
15. 劉訓紅，王玉璽等，中藥材光譜鑑別，2001，第二軍醫大學出版社， p211
16. 袁久榮，中藥鑑別紫外譜線組法及應用，人民衛生出版社，北京，1999
17. 孫素琴、周群、秦竹著，中藥二維相關紅外光譜鑒定圖集，2003，化工出版社，
18. 邱年永、張光雄，原色臺灣藥用植物圖鑑(5)，1998，台北南天書局， p71
19. K.Pfleger, H.H. Maurer, A. Weber, 1992, Mass spectral and GC data of drugs, Poisons, Pesticides, Pollutants and their Metabolites, second, revised and enlarged edition part 1,2,3
20. 譚仁祥，孟筆才，陳道峰，焦慶才，2002，科學出版社，北京，p277-286
21. 肖樹雄，林偉忠，中藥現代檢驗新技術，2003，羊城晚報出版社，

廣州，pp89-91

22. Liyu Yang, Thierry D. Mann, David Little, Ning Wu, Robert P. Clement, and Patrick J. Rudewicz, 2001, Evaluation of a Four-Channel Multiplexed Electrospray Triple Quadrupole Mass Spectrometer for the Simultaneous Validation of LC/MS/MS Methods in Four Different Preclinical Matrixes, 73, pp1740-1747
23. G.C. Kite, M.A. Yule, C. Leon, M.S.J. Simmonds, Detecting aristolochic acids in herbal remedies by liquid chromatography/serial mass spectrometry, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2002; 16: pp 585- 590
24. 黃鈺婷，利用高效液相層析質譜儀檢測粉防己之三各主要活性成分，2003，中國文化大學應用化學研究所博士論文
25. Chiu-Yu Huang, Mu-Chuan Tseng and Jer-Huri Lin, Analyzing Aristolochic acids in Chinese Herbal Preparations Using LC/MS/MS, 2005, Journal of Food and Drug Analysis, (13), p125-131
26. K. Hashimoto, M. Higuchi, B. Makino, I. Sakakibara, M. Kubo, Y. Komatsu, M. Maruno, M. Okada, Quantitative analysis of aristolochic acids, toxic compounds, contained in some medicinal plants, 1999, Journal of Ethnopharmacology, 64, pp185-189
27. T.T. Jong, M.R. Lee, S.S. Hsiao, J.L. Hsai, T.S. Wu, S.T. Chiang, S.Q. Cai, Analysis of aristolochic acid in nine sources of Xixin, a traditional Chinese medicine, by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/tandem mass spectrometry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2003; 33: 831-837

28. Jia Lung Tsai, Determination of aristolochic acid, the trace toxin in Chinese herb Xixin (Asarum spices) by liquid chromatography-mass spectrometry, a Master' thesis of Department of Chemistry of National Chung Hsing University, 2001
29. Mu-Chuan Tseng, Jer-Huei Lin. 2002, Determination of Sildenafil Citrate Adulterated in a Dietary Supplement Capsule by LC/MS/MS, Journal of Food and Drug Analysis 10: 112–119. (in English)
30. 臺灣植物誌第二版編輯委員會，臺灣植物誌，1996，國立臺灣大學植物系，臺北，pp591~593
31. 杜貴友，方文賢，有毒中藥現代研究與合理應用，2003，人民衛生出版社，北京，p469

