

編號：CCMP96-RD-044

# 含馬兜鈴酸藥材其單位製劑與複方製劑於 動物實驗之毒性研究

李水盛

臺灣大學藥物研究中心

## 摘 要

本計畫之主要目的在探討含馬兜鈴酸之中藥單方與複方之肝腎毒性，研究單方為馬兜鈴，複方為補肺阿膠湯，透過血清生化值及臨床表徵了解含馬兜鈴酸之中藥單方與複方是否與馬兜鈴酸一樣會造成動物之肝腎毒性。

在急性毒性測試中，我們觀察餵食這些藥材所造成之臨床表徵，血液、尿液生化值之變化與器官組織病理之改變，以作為肝、腎毒性之指標。而在化學成分及代謝物分析方面，為準確控制中藥材的給予量，本研究以 HPLC-UV 定量實驗藥材中之 aristolochic acid I (AAI) 及 aristolochic acid II (AAII)。

由不同劑量餵食結果顯示，以口服 7.5 mg/kg aristolochic acid 的劑量於鼯鼠可使血清值 BUN 及 Cre 明顯升高並具有統計上的差異，故作為測試藥材之動物模式。HPLC 定量結果顯示馬兜鈴中藥粉末中 AAI 及 AAII 的含量分別為 26.8 及 1.6  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ，以馬兜鈴中藥粉末 (*Aristolochia contorta*) 310 到 2236 mg/kg (相當於 aristolochic acid I 含量為 8.32 到 60mg/kg) 口服給予 Balb/c 小鼠的結果，處理組體重明顯下降，但在 BUN 及 Creatinine 的數值並未上升，顯示在此劑量下之馬兜鈴並不會引起腎毒性。複方毒性試驗以給予小鼠補肺阿膠湯(含馬兜鈴及不含馬兜鈴)劑量為 2 g/kg 及 4 g/kg 進行測試(相當於 aristolochic acid I 含量為 7.5, 15 mg/kg)，在 12 天的處理之下，餵食補肺阿膠湯組之 BUN 出現低於對照組的現象，creatinine 亦未能呈現具腎毒性之變化；GPT 的部分，餵食補肺阿膠湯組出現據統計意義的上升，但因 GTP 的變化只發生於少數天數，因此馬兜鈴單方與複方藥材之肝毒性仍需進一步釐清。

關鍵詞：中藥性腎病變、馬兜鈴酸、肝腎毒性、化學及代謝分析

Number: CCMP96-RD-044

# Investigation of the Animal Toxicity of Medicinal Herbs and Compound Remedy Containing Aristolochic Acid

Shoei-Sheng Lee

Drug Research Center, College of Medicine, National Taiwan University,  
Taiwan

## ABSTRACT

### Aim:

The main purpose of this project is to study the liver and nephrotoxicity of *Aristolochia contorta* (Ma-Do-Ling) and the compound remedy containing Aristolochiaceae herb, Bu-Fe-Ya-Gia-Tong. The subacute toxicity was assessed by their ability to create changes in the clinical signs, blood and urine chemistry and gross anatomic examination after oral administration of the crude extract of the selected medicinal herbs. In order to accurately control the amount of herbs given to study animals. HPLC-UV was used to quantitatively determination of aristolochic acid I and aristolochic acid II in study herbs. From the results of this study, we wish to understand better whether the herbal medicine of Aristolochiaceae will poss the same toxicity as aristolochic acid and provide safety information for not only educational but also for regulatory purpose.

### Method:

HPLC-UV was used to quantitatively determination of aristolochic acid I and aristolochic acid II in *Aristolochia contorta* (Ma-Do-Ling) and the compound remedy containing Aristolochiaceae herb Bu-Fe-Ya-Gia-Tong.

The subacute toxicity was assessed by their ability to create changes in the clinical signs, blood and urine chemistry and gross anatomic examination after oral administration of the crude extract of the selected medicinal herbs. Since the biotransformation of aristolochic acid is affected by the expression levels and activities of several enzymes, including CYP1A1, CYP1A2, and NQO1, we quantitatively analyzed the amounts of the aforementioned enzymes present in the cytosolic fractions of rat liver and kidney of the experimental animals.

## Results & Discussion:

BALB/c mice fed with 7.5 mg/kg aristolochic acid displayed significant increase of BUN and Creatinine, therefore it was adapted as our animal models for toxicological test. *Aristolochia contorta* (Ma-Do-Ling) contained aristolochic acid I and aristolochic acid II 24.2 and 2.0  $\mu\text{g mg}^{-1}$  respectively by quantitative HPLC measurement. The results of oral fed *Aristolochia contorta* of 310 to 2236 mg/kg (equivalent of aristolochic acid I of 8.32 mg/kg to 60 mg/kg) to Balb/c mice revealed no change in BUN and Creatinine. Therefore this dosing is not considered renal toxic. The results of oral fed Bu-Fe-Ya-Gia-Tong of 2 g/kg and 4 g/kg (equivalent of aristolochic acid I of 7.5 to 15 mg/kg) also revealed no change in BUN and Creatinine. GPT increased slightly in *Aristolochia contorta* and Bu-Fe-Ya-Gia-Tong fed groups. However, the GPT increase only occurred in a few days and the liver toxicity of *Aristolochia contorta* and Bu-Fe-Ya-Gia-Tong should be further investigated.

Keywords: Chinese herbs nephropathy, aristolochic acid, chemical analysis

## 壹、前言

雖然已有許多關於馬兜鈴酸之研究，如腎毒性、致基因毒性和致癌性等，但卻鮮少人去研究經常被使用之馬兜鈴科中藥材或含馬兜鈴科藥材複方的毒性，本計畫比較並探討馬兜鈴科植物馬兜鈴以及含馬兜鈴之複方藥材補肺阿膠湯之肝腎毒性。在毒性測試中，我們將觀察餵食這些藥材所造成之臨床表徵，血液、尿液生化值之變化與器官組織病理之改變，以作為肝、腎毒性之指標。為準確控制中藥材的給予量，本研究以 HPLC-UV 定量實驗藥材中之 aristolochic acid I 及 aristolochic acid II。

## 貳、材料與方法

### 一、材料與方法

Aristolochic acids (Aristolochic acid I & II mixture; 90.9%AAI & 5.7%AAII) 購自 Acros organics (Geel, Belgium)。馬兜鈴、補肺阿膠湯由中醫藥委員會計畫專案委託藥廠製造。甲酸銨 (ammonium formate)、醋酸銨 (ammonium acetate) 購自 Fluka Chemicals。甲醇 (methanol, MeOH)、乙腈 (acetonitrile, ACN) 購自 Mallinckrodt (Phillipsburg, NJ, USA) (Chromatography grade)，光譜級 (Chromatography grade) 甲醇、四氫呋喃 (tetrahydrofuran, THF) 購自 Merck (Darmstadt, Germany)。質譜級 (MS grade) 甲醇、乙腈購自 J.T. baker (Phillipsburg, NJ)。甲酸 (formic acid) 購自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO.)、乙酸 (acetic acid) 購自 Merck (Darmstadt, Germany)，去離子水取自 barnsted/ thermolyne 純水製造系統 (Dubuque, IO, USA)。層析移動相使用濾膜為 GH Polypro (47mm 0.2  $\mu\text{m}$ )，樣品於使用前均經 0.22  $\mu\text{m}$  PVDF 濾膜 (Millipore, Bedford, MA, USA) 過濾。動物採自台灣大學醫學院附設醫院動物繁殖中心 BALB/c mice。

### 二、動物試驗及樣品收集

動物在實驗期間於籠內正常攝食及給水，馬兜鈴酸溶於 corn oil 給予實驗動物，給藥劑量列於分次報告中，每週最後一天的尿液進行尿蛋白檢驗，實驗結束後以眼窩採血並摘取腎臟及肝臟部份以福馬林及液態氮急速冷凍法分別保存，並送至中興大學進行組織切片及判讀，臟器秤重並觀察肉眼病變。每日秤量體重記錄。

收取的尿液記錄尿量，以 3000 rpm, 15 min 離心後取上清液。上清液以 150 mM sodium azide 560  $\mu\text{l}$ : 40  $\mu\text{l}$  混合後儲存於微量離心管保存於 -80 度冰箱。採血之前先以乙醚麻醉小鼠，後以眼窩採血方式採血 0.4ml。血液經離

心取得血清後利用乾式生化分析儀(FUJIFILM DRI-CHEM 3500s)測量 BUN、Creatinine 等數值，剩餘血清保存於-80 度冰箱備用。

### 三、動物肝、腎中CYP1A1、CYP1A2及NQO1定量分析

將取自實驗動物，以液態氮急速冷凍法保存之腎臟及肝臟部份在冰上解凍、並秤重記錄後，以phosphate-buffer saline (PBS, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, and 1.4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)沖洗兩次，加入含有0.5 mM DTT及0.1 mM PMSF之RIPA lysis buffer (0.5 mL lysis buffer per 0.1 g wet tissue, 25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 1% Sodium deoxycholate, and 0.1% SDS)均質之。均質後之組織在4°C下以10,000 xg離心30分鐘，取上清液作為cytosol fraction。

將前述之 cytosolic portion 以 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis 進行分離，並以適當抗體進行免疫顯色。所使用的一級抗體為 goat anti-NQO1 polyclonal antibody (sc-16464, Santa Cruz)、goat anti-cytochrome P450 1A1 polyclonal antibody (sc-9828, Santa Cruz)、及 sheep anti-cytochrome P450 1A2 polyclonal antibody (AB1249, Chemicon)。

### 四、萃取藥材樣品

本實驗以 methanol 為萃取溶媒，含馬鈴酸製劑所採取之萃取步驟如下：取 10 ml methanol 加入 0.2 g 製劑，以超音波萃取 10 分鐘後將萃出液倒出，再加入 10 ml methanol 再次萃取，共萃取 3 次。合併過濾後之萃出液後以減壓濃縮將溶媒移除，取適量以光譜級 methanol 溶解，以此為檢品溶液。

### 五、HPLC 及 LC/MS/MS 系統

#### (一) 4.1 HPLC-photo diode array

HPLC系統使用LC-10AT dual pumps (Shimadzu, Kyoto, Japan) 搭配 SPD-M 10A UV/VIS photodiode-array detector (Shimadzu, Kyoto, Japan) 及 Rheodyne 7725i 5 µl injection loop (Cotati, CA, USA)，資料處理系統為 Class-LC10 High Performance Liquid Chromatography data system (Shimadzu, Kyoto, Japan) 載於 Pentium II 400 PC Compatible Computer所使用的分析管柱為 Luna 5µ C<sub>18</sub> column, 250 × 4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)。

#### (二) 4.2 液相層析連接三段式四極棒串聯式質譜儀 (UPLC-Triple Quadrupole Mass Spectrometer)

UPLC-Triple Quadrupole Mass Spectrometer所使用之極至液相層析系統為 Waters Acquity Ultra Performance Liquid chromatography (Waters, Technologies, MA, USA)，配有 Binary solvent manager pump及恆溫自動進樣器與層析管柱恆溫箱。三段式四極棒串聯式質譜儀為 Quattro Micro triple quadrupole mass

spectrometer (Micromass, Waters), 搭配電灑游離 (ESI) 介面及大氣壓化學游離 (APCI) 介面。

## 六、代謝體分析

將取樣後之尿液樣品於 30 分內以 3,000 rpm 離心 15 分鐘，取上清液加入 Sodium azide (Riedel-de Haën) 使其最終濃度為 10 mM，並將樣品貯存於 -80 °C。

樣品分析前先於室溫下回溫，取 500  $\mu$ L 樣品加入 250  $\mu$ L, 0.2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH 7.4) 及 75  $\mu$ L of sodium 3-trimethylsilyl-(2,2,3,3- $^2\text{H}_4$ )-1-propionate (TSP) in  $\text{D}_2\text{O}$  (最終濃度 0.1 mg/mL)，之後取 825  $\mu$ L 加入 NMR tube。

### (一) NMR 分析

本研究所採用的  $^1\text{H}$  NMR 為 Bruker Avance 600 spectrometer (Bruker Biospin, Germany)，偵測 program 如下：

One-dimensional  $^1\text{H}$  NMR spectra were acquired using a standard NOESYPR1D pulse sequence (recycle delay- $90^\circ$ - $t_1$ - $90^\circ$ - $t_m$ - $90^\circ$ -acquisition; XWIN-NMR3.5) with a recycle delay time of 2 s, and a mixing time of 150 ms; The  $90^\circ$  pulse length was adjusted to  $\sim 12.5\mu\text{s}$  at -1dB and  $t_1$  was set to  $3\mu\text{s}$ , which provided an acquisition time of 2.72s. For each sample, 128 free induction decays (FID) were collected using 32k data points within 10 ppm, and the total data collecting time was 11s. Then FIDs were multiplied by an exponential weighting function corresponding to a line broadening of 0.3 Hz, and the data were zero-filled to 64 k data points. The peak picking result and peak intensity were determined using Bruker Xwinmr3.5 automatic peak picking protocol.

### (二) 資料分析

將檢品的圖譜去除  $\text{H}_2\text{O}$  訊號 (peak) 的區域 (4.5 到 5.0 ppm) 並將全數 150 個訊號依照 0.04 ppm 分割成小區塊 (bin)。所有已分隔成小區塊的初始數據取對數值後再和其他檢品的小區塊數據對應形成一點 (plot)。如果一個檢品所有的數據點 (data point) 相較之下是高於其他檢品的點 (高於定性線上 (identity line))，此時建議將數據在進行統計分析前先做一個正規化的校正。在進行數據校正時需要考慮到校正後計量的數據 (Quantiles normalized data)，平均比例的數據 (Mean scaling data) 及完整平均比率的數據 (Robust mean scaling data)，同時須挑選所有檢品中完整且可信賴的平均位移 (Robust mean shift) 來計算檢品濃度的平均值。

## 參、結果

### 一、口服重複餵食之動物毒性分析

本部份實驗之目的在以馬兜鈴酸來測試其動物之毒性，並依其結果來決定日後實驗所使用之動物模式及劑量。目前所得之結果摘要如下；

- (一)由於本研究所採用之含馬兜鈴酸製劑(補肺阿膠湯及馬兜鈴)中之 aristolochic acid I 及 aristolochic acid II 含量比例差異甚大(表一)，為模擬實驗藥材中 aristolochic acid I 及 aristolochic acid II 之比例，因此動物實驗之標準品採用 Acros 公司所生產的特定批次 aristolochic acids mixture (90.9% for aristolochic acid I and 5.7% for aristolochic acid II)。
- (二)鼯鼠 (Balb/c) 對所使用的馬兜鈴酸 (90.9%AAI & 5.7%AAII) 較大鼠 (Wistar) 為敏感。在 4mg/day 以及 8mg/day 處理下，不論雄性或雌性大鼠皆未產生明顯之腎或肝毒性。血清 BUN, Creatinine, GOT, GPT 含量皆未因馬兜鈴酸的處理而升高，尿蛋白亦無變化。僅於病理切片檢驗下有 1 隻看到腎臟有些微傷害。
- (三)在體重部份，同血清變化，在大鼠看不到明顯變化。在鼯鼠部份，則不論是口服 2.5, 5, 7.5 mg/kg 或腹腔注射 2.5 mg/kg 的劑量，皆看到馬兜鈴酸處理的動物之體重有明顯下降。
- (四)比較腹腔注射與口服馬兜鈴酸之結果，顯示腹腔注射所造成之腎毒性，不論在血清變化或病理組織病變，皆比口服來得嚴重。以目前所使用的劑量及處理時間，並未看到肝毒性之產生。
- (五)由不同劑量餵食結果顯示，以口服 7.5 mg/kg 的劑量於鼯鼠應可作為測試藥材之動物模式。
- (六)從實驗結果中可以觀察到 CYP1A1 及 CYP1A2 在餵食馬兜鈴酸標準品(aristolochic acids mixture, 90.9% aristolochic acid I and 5.7% aristolochic acid II)之大鼠(Wistar rat)的肝及腎中均有明顯而均一之表現；至於 NQO1，雖然在肝中有明顯表現，在腎中的表現量卻有偏低的情形。而在小鼠(BALB/c) 的肝及腎中，不論有無餵食馬兜鈴酸，CYP1A1 的表現均很明顯(CYP1A2 之實驗仍在進行中)，而且沒有因為馬兜鈴酸劑量之不同而有顯著改變，這個結果和在大鼠中的情形一致。NQO1 在肝中表現的情形亦與大鼠結果一致，但是在腎中，NQO1 的表現量原本偏低，卻在投與馬兜鈴酸之後有明顯(隨劑量)增高的情形。
- (七)以馬兜鈴(Aristolochia contora) 310 mg/kg(相當於 aristolochic acid I 含量為 8.32 mg/kg)口服給予 Balb/c 小鼠的結果，處理組體重明顯

下降，但在 BUN 及 Creatinine 的數值方面並未看到與口服純品馬兜鈴酸 7.5mg/kg 相似的上升現象，顯示在此劑量下之馬兜鈴並不會引起腎毒性。有趣的是在 GPT 方面看到處理組的升高現象，是否代表肝臟之損壞，則有待進一步探討。

- (八)進一步上升馬兜鈴粉末的餵食劑量給予小鼠，包括 559, 1118, 2236 mg/kg，(相當於 aristolochic acid I 含量為 15, 30, 60 mg/kg)。餵食馬兜鈴粉末小鼠之血清值 creatinine 與對照組相似，BUN 在第三天 559 mg/kg 組有略上升，但其後又出現有統計意義的下降；GPT 在第七天 2236 mg/kg 組有上升且具有統計差異，但這些變化在第十天之後便不明顯。馬兜鈴粉末餵食實驗之腎毒性未若肝毒性明顯，與給予馬兜鈴酸標準品的處理相比較，大幅提高馬兜鈴粉末餵食，其腎毒性皆不明顯，但在肝毒性的部分隨著處理時間的拉長，可以看到一些毒性現象。
- (九)複方毒性試驗以給予小鼠補肺阿膠湯(含馬兜鈴及不含馬兜鈴)劑量為 2 g/kg 及 4 g/kg 進行測試(相當於 aristolochic acid I 含量為 7.5, 15 mg/kg)，在 12 天的處理之下，血清生化部份，餵食補肺阿膠湯組之 BUN 出現低於對照組的現象，creatinine 亦未能呈現具腎毒性之變化；GPT 的部分，餵食補肺阿膠湯組在第五天及第七天含出現據統計意義的上升，但之後的採血點各組與對照組間則無差異。
- (十)餵食補肺阿膠湯小鼠的血清生化值結果與餵食馬兜鈴單方之結果相近，未能觀察到腎毒性的產生，但對於肝毒性的指數可觀察到具有統計意義的變化，但因 GTP 之上升只發生於少數天數，因此馬兜鈴單方與複方藥材之肝毒性仍需進一步釐清。

分次動物毒性實驗結果如下：

(一)馬兜鈴酸對雄性大鼠之毒性

1. 體重的部分，餵藥組不論高低劑量皆較控制組低但並無統計上之差異。在飲食攝取方面，處理組亦較控制組為低。另外飲水量也有偏高的趨勢。高劑量組三隻大鼠裡有兩隻尿量明顯偏多。除部份飼料消耗量外，大多數數據都沒有統計上的差異。
2. 血清數值 BUN 在第三天略可看出有上升的趨勢，但對照組及實驗組的趨勢都相同且皆落在正常值內，creatinine、GPT 的數值則沒有明顯變化。
3. 尿蛋白部分控制組與處理組間亦無明顯差異。
4. 於第七天犧牲紀錄臟器重量後，發現腎臟在馬兜鈴酸處理組別皆較控制組輕，並具統計上之差異。

5. 以肉眼觀察病變，僅在高劑量處理組發現一隻外觀顏色有異，經組織切片後發現高劑量組有一隻具明顯腎毒性。

總結在此劑量處理下，並未造成雄性大鼠明顯之腎毒性及肝毒性。

## (二) 馬兜鈴酸對雌性大鼠之毒性

1. 體重的部分，實驗進行中高劑量餵藥組有較控制組減輕的趨勢，換算成百分比後從 day 3 開始隨處理藥物的時間增加而體重減輕並與控制組有明顯差異並達統計意義，低劑量組則不明顯。
2. 在飲食攝取方面，處理組較控制組為低，且有統計上之差異，另外飲水量方面則看不出太明顯的差異，高劑量組三隻大鼠裡有一隻尿量明顯偏多，但整體而言數據沒有統計上的差異。
3. 血清數值 BUN 在處理藥物前兩天有較 control 組低的現象，且第二天在高劑量組有出現統計上的意義，從第三天開始則可看出有上升的趨勢，但數值皆落在正常值內，creatinine 的數值則一直沒有明顯變化，第五天以不同機器檢測的結果 (D5II) 也與我們測得的數值相近，creatinine 雖測得數值較高但仍與對照組相近。
4. 尿蛋白部分在第零天及第五天皆有禁食的情況下數值較未禁食的時候測得的尿蛋白為低。除了高劑量的尿蛋白量在第二天較低之後逐天升高，至第五天明顯高於對照組且有統計上差異。另一處理組則無此現象。

於第五天犧牲後紀錄之臟器重量可發現肝臟及腎臟的重量皆與對照組相似，另外肉眼初步觀察無顯著異狀。組織切片報告顯示 8 mg/day 的處理組別皆有程度不一的腎病變，肝臟部分則沒有出現異狀。

## (三) 腹腔注射馬兜鈴酸對小鼠之毒性

1. 在體重方面，實驗進行至第二週時處理組部分有明顯體重減輕的現象，且隨著處理時間增加有持續降低的趨勢。
2. 血清數值 BUN 在第五天的檢測開始出現具上升，並在第二週持續升高；Cre 則於第三天較對照組低，其後在第五天出現具統計意義的上升，並維持至第二週，GOT 及 GPT 的檢測上則沒有看到與對照組有明顯的差異。
3. 尿蛋白部分，在兩週的實驗過程中並未見到明顯差異。

於實驗兩週後進行的犧牲可見處理組的臟器重量皆較對照組輕，組織切片的報告也顯示給予馬兜鈴酸 2.5 mg/kg 組別的腎臟有程度不一的病變現象，肝臟部分則沒有出現異狀。

#### (四) 口服馬兜鈴酸對小鼠之毒性

1. 此次實驗過程馬兜鈴酸組的體重依舊有越來越輕的趨勢，並於第一週後陸續出現死亡，死亡的小鼠於前一天出現發抖及活動力不佳等狀況，皆採其臟器進行檢驗。
2. 於第一週(給藥五天後)即可見血清值(BUN 及 Cre)具統計意義的上升，但這個現象在第一週之後並不像前一次以 IP 方式給藥那樣持續下去，再延長一週的實驗雖然 Cre 的數值偏高，但皆因組內有一隻的值特別高的緣故，並無統計上的差異，加測 GOT/GPT 的結果僅在第 9 天看到馬兜鈴酸組的 GPT 有統計意義的上升。
3. 此次尿蛋白於第二週及第三週處理馬兜鈴酸組有升高的現象且有統計上的差異。與上次實驗相比之下，初步推測與實驗期延長致使體內劑量累積相關。
4. 組織切片判讀的結果，連續三週處理馬兜鈴酸未中途死亡的 6 隻皆出現程度不一的腎臟傷害，實驗前兩週死亡的三隻小鼠則未見肝腎功能的傷害，但在第三週開始因狀況不好而犧牲的七號有嚴重的腎臟損傷。此次的腎臟傷害程度與前次腹腔注射比較顯得較輕微，肝臟部分同樣沒有出現病理方面的變化。

#### (五) 口服馬兜鈴酸不同劑量對小鼠之毒性

1. 本次以口服方式給予三種不同劑量的馬兜鈴酸(2.5, 5, 7.5 mg/kg)予小鼠，實驗結果在血清值 BUN 及 Cre 方面於 7.5 mg/kg 組別自第五天起開始有明顯升高趨勢並具有統計上的差異，此現象在上次實驗中亦曾出現過。
2. 尿液蛋白的樣品每組六隻兩兩一籠於代謝籠內收集 16 小時，記有對照組及 5, 7.5 mg/kg 三個組別。由結果可看出在 5mg/kg 劑量組於第一週後有升高的趨勢，但沒有統計上的差異，7.5 mg/kg 組別的尿蛋白值則在第二週出現具統計意義的上升。
3. 本次實驗過程馬兜鈴酸處理組的體重較無先前下降的那樣明顯，但在第二週於 5 及 7.5 mg/kg 仍具有統計意義的降低。
4. 此次實驗於第十天 7.5 mg/kg 組別一隻死亡，死後摘取器官保存，其餘兩個餵藥組則無死亡的現象。
5. 在經過三次小鼠口服馬兜鈴酸實驗之後，目前看來於 7.5 mg/kg 這個劑量處理之下有類似於 IP 方式 2.5 mg/kg 的效果，血清值方面也有隨著處理時間增加而上升的趨勢；相較 2.5 mg/kg 及 5 mg/kg 處理的組別，雖然組織切片的結果都有腎臟的傷害出現，但 7.5 mg/kg 組有較為明顯的血清生化數據供實驗進行之參

考，這些實驗結果將供後續實驗的設計及劑量設定一個參考的依據。

6. 組織切片的結果在三個不同處理劑量之下皆出現程度不一的腎臟傷害，這結果與之前幾次口服試驗所做的組織切片相符，顯示在三個劑量的處理同樣時間都有造成腎臟傷害，但在 7.5 mg/kg 劑量下的血清值較其他兩個劑量在實驗中提供更好的判斷依據。

#### (六) 口服馬兜鈴對小鼠之毒性

1. 本次以小鼠(BALB/c)進行實驗，馬兜鈴藥粉以二次水溶之並以管餵方式給藥。藥物劑量依照給予純品 AAI 7.5 mg/kg 的方式計算出馬兜鈴含同樣成分(AAI 7.5 mg/kg)該給予的量，以期達到與給予純品相似的毒性現象。在預計進行兩週的處理之下，觀察到兩週的藥物處理之下並沒有造成血清值 BUN 及 Cre 的明顯變化；唯一的變化發生在第 12 天，處理組的 BUN 及 Cre 有較對照組低的現象，再給予一個星期的藥物處理之後依然沒有發現血清值的變化。GPT 方面則有較明顯的趨勢存在，於第二週可見血清值 GPT 有上升的現象，這個現象一值維持著，除了第 19 天因組內差異較大外，第 16 天及 21 天皆具有統計上的意義。
2. 本次將收集的小鼠尿液作多項的分析。小鼠每隻一籠，於代謝籠內收集 24 小時尿液，先禁食 8 小時後再予以自由飲食，以減少因給予食物所造成收集尿液之困難；並於一週的最末一次禁食十六小時收尿做多項的尿液檢測。在尿蛋白方面，由於實驗前對照組的尿液蛋白量較處理組為高，因此這個項目的參考價值不大。在其他的尿液檢測項目發現實驗前的處理組其尿液 PH 值偏酸性並在兩個組別的 Leukocyte、Nitrite 有部分陽性反應，其餘項目皆呈現陰性反應，實驗第一週及第二週(數據未列出)至結束後的尿液測試兩組則有著極高的相似性。
3. 此次實驗過程中處理馬兜鈴 310 mg/kg 的小鼠體重於第二天開始就有較對照組輕的現象，給藥五天之後的休息之後，其體重又有回復的情況。接著第二週的處理後處理組的體重又有明顯的減輕，由於之前給予純品馬兜鈴酸的實驗中血清值 BUN 及 Cre 的上升與體重的下降相關，所以第二週之後每天給藥，使處理組的體重減輕持續下去。
5. 在實驗中又有進行一次的馬兜鈴酸成分分析，其馬兜鈴酸成分(AAI 26.839 mg/g, AII 1.638 mg/g)成分較前一次的為高，所以此次實驗的馬兜鈴含 AAI 的量約為 8.32 mg/kg。

### (七) 口服不同劑量馬兜鈴對小鼠之毒性

1. 本次採用馬兜鈴三個劑量處理小鼠，分別為 559, 1118, 2236 mg/kg，馬兜鈴酸 AAI 含量在 559, 1118, 2236 mg 中分別為 15, 30, 60 mg。處理兩週後其體重並無明顯變化，559 mg/kg 組的體重略較其他組高，血清值 creatinine 與對照組相似，BUN 在第三天 559 mg/kg 組有略上升，但在第五天及第七天則下降且有統計差異，第 12 及第 14 天三個劑量的檢測值於對照組均有統計意義的下降；GPT 在第七天 2236 mg/kg 組有上升且具有統計差異，但這些變化在第十天之後便不明顯，因此將實驗再延長一週，持續觀察三個劑量下的血清值變化。
2. 在第三週的持續給藥之下，三個劑量組的體重依然相近，血清值 Creatinine 無顯著變化，BUN 在第 18 天三個劑量較對照組低且有統計差異，但到了第 21 天 2236 mg/kg 組看起來有升高但並沒有統計上的差異。GPT 部分在第 21 天 1118、2236 mg/kg 組分別有統計意義的升高，約為對照組的二至三倍。
3. 在第三週犧牲時，四組的臟器濕重並無顯著差異。實驗中對照組死亡動物一隻，死因判定為籠內打鬥致死，與試驗物質或試驗操作無關。1118 mg/kg 組死亡動物一隻。2236 mg/kg 組的三隻動物出現虛弱，其中在 2236 mg/kg 組一隻老鼠於死亡時立即採血做血清值測量，其 Cre (2.0)及 GPT (242)數值皆高。
4. 在兩次的馬兜鈴實驗中可以發現，在原先預計出現的腎臟方面的傷害似乎未若肝臟部分來得明顯，且需長時間處理才看得到一些毒性現象，與純品的處理相比較，儘管口服含 AAI 劑量相同或是更高，其腎毒性皆未如給予純品的影響來得明顯，但在肝毒性的部分隨著處理時間的拉長，可以看到一些毒性現象。

### (八) 口服不同劑量補肺阿膠湯對小鼠之毒性

1. 本次實驗以補肺阿膠湯分別含馬兜鈴及不含馬兜鈴劑量為 2g/kg 及 4g/kg 給予 Balb/c 小鼠，在目前 12 天的處理之下，觀察到的體重趨勢為相似，但因含馬兜鈴及不含馬兜鈴 4g/kg 組一開始的體重即低於對照組，故相同趨勢之下兩組的體重維持比對照組低的現象。
2. 血清生化部份，在 BUN 第 3、5、7、10 天的採血點除了不含馬兜鈴 2g/kg 之外皆出現給藥組低於對照組的現象，Cre 在五個採血點含馬兜鈴 4g/kg 組都有較對照組低的現象，但僅在第 10 天出統計上的意義；GPT 的部分第五天及第七天含馬兜鈴及不含

馬兜鈴 4g/kg 組出現據統計意義的上升，但之後的採血點各組與對照組間則無差異。

3. 在補肺阿膠湯與馬兜鈴的實驗部分大約可看出的現象是血清值 BUN 都有低於對照組的現象，Cre 則略低於或與對照組相似，GPT 則是在處理約一周間有一些趨勢在，但之後卻又消失。

## 二、化學成分分析

### (一)開發 HPLC-UV 分析方法:

Aristolochic acid I 及 aristolochic acid II 帶有一個 carboxylic acid 官能基，其 pKa 分別為 3.3 及 3.2。若在逆相層析模式 (reversed-phase) 下使用鹼性的移動相，較容易形成拖尾峰 (tailing peak)，因此文獻中大多數的分析方法皆採用酸性緩衝液配合有機溶媒作為移動相，然而，亦有文獻使用鹼性緩衝溶液作為移動相以降低分析時間 (Lee *et al.*, 2001)，本研究以 Chan 等人所建立的 HPLC 條件為起始條件進行分析，由於該條件在製劑中之解析度不佳，我們須調整其沖提模式。經過 ACN 比例及 buffer pH 最適化後所得到之移動相組成為 0.7% acetic acid 及 acetonitrile 組成，57:43(v/v)，所使用之分析管柱為 Luna 5 $\mu$  C<sub>18</sub> column, 250  $\times$  4.6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)，Figure 1 為在最適化條件下所得到的 aristolochic acid 標準品分析圖譜，補肺阿膠湯粗萃物和馬兜鈴粗萃物的層析圖譜顯示於 Figure 2，在最適化條件下，在該條件下 aristolochic acid I 及 aristolochic acid II 可以與方劑中的其他成分分離。

### (二)定量動物實驗藥材中 aristolochic acid I、aristolochic acid II 成份

本研究所採用之馬兜鈴酸標準品是由半製備型 HPLC 純化得到之 aristolochic acid I 及 aristolochic acid II 配製而成，再取適量經序列稀釋至所需濃度。HPLC 分析方法之分析時間精密度測試結果顯示，本分析方法對 Aristolochic acid I 及 Aristolochic acid I 之一日內精密度 RSD < 0.24%，異日間之再現性 RSD < 0.97%。峰面積之分析方法精密度測試結果表示於 Table 1。線性濃度測試範圍為 5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> 至 100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>，Aristolochic acid I 及 Aristolochic acid I 之檢量線表示於 Figure 3 (以峰面積求得)，二檢量線之回歸係數為 0.999。取補肺阿膠湯之甲醇萃出物，配製成濃度為 40000 ppm 之檢品溶液；馬兜鈴之甲醇萃出物，配製成濃度為 7500 ppm 之檢品溶液，以最適化層析條件進行分析，所得層析圖示於 Figure 2，以滯留時間、UV 光譜等方法與標準品層析圖進行比對，發現補肺阿膠湯及馬兜鈴檢品溶液中皆含有 aristolochic acid I 及 aristolochic

acid II。在最佳層析條件下，將兩者之檢品溶液連續進行三次分析，經由各個檢量線方程式，求出檢品溶液中所含 aristolochic acid I 及 aristolochic acid II 之濃度，再計算其於製劑中之含量百分率，結果見 Table 2。

### (三)開發 UPLC/MS/MS 分析條件

#### 3.1 分析方法之建立

分析方法之開發，包括找尋分析物於質譜儀中最適合之母離子的找尋，層析條件的最適化，質譜儀中最適合之子離子的找尋，以及質譜條件的最適化。

母離子找尋部分，依文獻記載，AAI 及 AAI 分子於正離子模式下在水相溶液中易形成四級銨鍵合物離子  $[M+NH_4^+]$ 。本研究將樣溶於不同溶液，測試正負離子模式下之訊號，發現 AAI 以及 AAI 於正離子模式下分別有  $m/z$  為 359  $[AAI+NH_4^+]$  以及  $m/z$  為 329  $[AAI+NH_4^+]$  之較強離子峰，於負離子模式下形成之負離子  $[M-H]$  訊號顯著弱於正離子模式下之離子訊號。故於母離子的找尋中，決定將  $m/z=359$  及  $m/z=329$  分別作為 AAI 及 AAI 之母離子訊號。

由於分析物 AAI 與 AAI 結構中具有可解離的-COOH 基團，而 AAI 與 AAI 之酸解離常數 (pKa) 分別為 AAI: 3.2-3.4, AAI: 3.3-3.5, 考慮分析物於逆相層析管柱中之滯留能力，將層析條件使用之動相水溶液酸鹼值調整為酸性，以維持良好的選擇性及解析度。再分別探討不同種類之緩衝溶液組成、有機相溶劑、流速、緩衝溶液酸鹼值等條件，決定最適合之液相層析條件，並且比較不同離子源介面下分析物的訊號強度。本實驗選取由 AAI 母離子 ( $m/z=359$ ) 撞擊後產生之碎片離子 ( $m/z=298$ )，與 AAI 母離子 ( $m/z=329$ ) 撞擊後產生之碎片離子 ( $m/z=268$ ) 作為定量分析時偵測之離子峰訊號。再對質譜儀中相關參數進行最適化，以獲得最強之離子訊號。

#### 3.2 層析條件之選取

Kite 等人曾比較過於不同酸鹼值環境中含有 1% 醋酸、0.1% 醋酸銨等水相溶液對於 AAI 與 AAI 離子訊號的影響 (Kite *et al.*, 2002), Chan 等人亦曾比較過含 0.2% 醋酸、含 0.2% 醋酸及 1mM 醋酸銨水溶液下 AAI 與 AAI 訊號 (Chan *et al.*, 2003)。本研究於 ESI 介面下，以 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  速率直接進樣 (infusion) 於質譜儀中，比較於正離子模式下使用甲醇、甲醇含 1% 醋酸、甲醇含 10mM 醋酸銨為樣品間質時之正離子訊號，以及於負離子模式下使用甲醇、

甲醇含 1% 氫水為樣品間質時之負離子訊號。實驗結果顯示正離子模式之訊號強度明顯優於負離子模式中分析物去質子化 (deprotonation) 之訊號強度，且使用含有四級銨離子之醋酸銨水溶液加入樣品間質中，能增加【M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>】峰訊號，提供最好的訊號強度，故選取正離子模式下含有四級銨離子之水相溶液，進行層析方法開發。

### 3.2.1 緩衝溶液之選取

由母離子選取時所得結果，含四級銨鹽之水相溶液對於【M+NH<sub>4</sub><sup>+</sup>】訊號有增強的作用，在考慮使用含有四級銨鹽水溶液作為緩衝溶液條件下，分別比較調整為酸性之 10 mM 醋酸銨 (ammonium acetate) 與 10 mM 甲酸銨 (ammonium formate)，並使用甲醇為有機相的層析條件下之離子訊號強度，結果顯示使用甲酸銨為水相緩衝溶液所得之訊號強度優於醋酸銨 (Figure 4)，因而最後選取 10 mM 甲酸銨作為移動相之緩衝水溶液。

### 3.2.2 有機相溶劑之選取

使用 10 mM 甲酸銨，流速 0.3 ml/min 條件下，分別比較使用甲醇及乙腈作為層析移動相中有機相對於離子化程度的影響。結果顯示，使用乙腈作為沖提的有機相能獲得較佳之離子訊號強度，故選取乙腈作為層析條件之有機相 (Figure 5)。

### 3.2.3 緩衝水溶液之酸鹼值

由於 AAI 與 AAI 結構中具有可解離的-COOH 基團，AAI 與 AAI 之酸解離常數 (pKa) 分別為 AAI: 3.2-3.4, AAI: 3.3-3.5，考慮分析物於逆相層析管柱中之滯留能力，將層析條件使用之動相水溶液酸鹼值調整為酸性，以維持良好的選擇性及解析度。為避免基質效應(matrix effect)影響 UPLC-MS/MS 系統中定量準確度，酸鹼值以分析植物萃出物時所能夠提供的選擇性為考量，使用乙腈以及 10mM 甲酸銨水溶液，流速為 0.3 ml/min 條件下，比較 pH 3.0、pH 4.0，以及 pH 5.0 梯度沖提模式條件於 UPLC-UV 系統中之分離效果。實驗結果顯示，使用 pH 3.0 的緩衝溶液能夠提供最好的選擇性，使其與植物中其他成分於 10 分鐘內達成基線分離 (Figure 6)。最適化移動相及梯度沖提模式設定為 10 mM 甲酸銨，pH 3.0 (溶液 A) 及乙腈(溶液 B)，0-2 min: 34%B, 2-10.5 min: 34%-36%B。

### 3.2.4 層析條件使用之流速

於 ESI 介面下，比較於流速 0.3 ml/min 以及流速 0.4 ml/min 下之離子訊號強度。由於流速對於 ESI 介面下的離子化效率有直

接的影響，一般於 ESI 介面下，層析條件的流速多半不超過 0.3-0.4 ml/min。實驗結果顯示，流速為 0.3 ml/min 條件下，分析物離子化程度較佳，有較強的離子訊號，故使用 0.3 ml/min 作為層析條件所使用之流速。

### 3.3 質譜儀參數之最適化

針對兩分析物個別母離子 (AAI:  $m/z=359$ , AAI:  $m/z=329$ ) 進行子離子掃描 (daughter ion scan)，選取出訊號最強之子離子分別為 AAI:  $359 \rightarrow 298$  ( $298: [M+H-CO_2^+]$ )、AAI:  $329 \rightarrow 268$  ( $268: [M+H-CO_2^+]$ )，將之選為定量分析時鎖定之子離子訊號，進行質譜儀參數之最適化。各參數之探討，於最適化後層析條件下進行，並利用選擇反應監測模式 (selected reaction monitoring, SRM) 下監測碎片離子的訊號，比較分析峰下積分面積之大小值，選取最佳之質譜儀條件。

#### 3.3.1 離子源之選取

使用上節選取之移動相，分別於 0.3 ml/min 及 0.5 ml/min 動相流速下，比較 ESI 以及 APCI 訊號強度。實驗結果顯示，於本系統與條件下，ESI 之離子訊號明顯大於 APCI 下之離子訊號 (Figure 7)，因而本實驗以 ESI 離子介面進行質譜儀參數調整與條件選取。

##### (1) 樣品錐電壓 (cone voltage, V)

樣品錐施加電壓可使得帶電荷的分析物離子受庫倫力吸引而進入樣品錐。於最適化液相層析條件下，比較不同之樣品錐電壓對於離子訊號強度的影響，對於 AAI 與 AAI，分別以 15V、20V、25V 進行選取。比較結果如圖 (Figure 8) 所示，調整樣品錐電壓對於 AAI 離子訊號影響較不顯著，其中以 20V 條件下離子訊號最強，然對於 AAI 離子訊號，20V 則相較於 15V、25V 有明顯較強的訊號，因而在樣品錐電壓的選擇上，AAI 與 AAI 均選取 20V。

##### (2) 毛細管高電壓 (capillary voltage, kV)

於離子源中央之不銹鋼毛細管施加一高電壓可使分析物分子受電場作用而帶電。依可選擇之範圍，分別比較毛細管高電壓對於樣品離子訊號強度之影響。對 AAI 以及 AAI 分別以 2.8 kV、3.0 kV、3.2 kV 進行選取。對於 AAI 與 AAI，當毛細管高電壓於 3.0 kV 時，均有最好的訊號，因而在毛細管高電壓部分，選擇 3.0 kV 為最適條件。

#### 3.3.4 撞擊能量 (collision energy, eV)

施予撞擊能量能使母離子進入撞擊室後，受到高能量氬氣的

撞擊，進而斷裂為子離子碎片。於子離子找尋的過程中得知，當撞擊能量加至 20 eV 時，AAI 與 AAI 之母離子出現由於能量過高而被完全碎裂的現象，進而使 SRM 模式下所偵測之子離子訊號亦開始減弱。因而在撞擊能量的選取上，分別嘗試於 8eV、10eV 與 12eV 下之訊號強度。實驗結果顯示，AAI 之訊號於 10eV 達到最大值，而 AAI 之訊號則於 12eV 達到最大值，再嘗試對 AAI 增加碰撞能量至 15eV 時，其訊號明顯下降。因而在撞擊能量的選取上，分別選取 AAI 為 12eV，AAI 為 10eV。

### 3.3.5 去溶劑氣體溫度 (desolvation temperature, °C)

使用去溶劑氣體氮氣於離子源中不銹鋼毛細管的外圍加溫，能使大部分溶劑因受熱而揮發，促進分析物的霧化。依照適合溫度範圍，分別於 350°C、400°C、450°C、500°C 下，比較 AAI 及 AAI 之離子訊號強度。結果顯示，隨著去溶劑氣體溫度的上升，離子訊號有增強的趨勢，然而當溫度達 500°C 時，AAI 之訊號無顯著提升，但 AAI 之訊號則有些微下降，同時考慮過高溫度可能引起之分析物熱不穩定以及高溫對於儀器離子源可能構成壽命減損，最後選取 450°C 作為 AAI 與 AAI 之去溶劑氣體溫度條件。

### 3.3.6 離子源溫度 (ion source temperature, °C)

於離子源至樣品錐之間加溫，能使未由高溫之去溶劑氣體霧化的分析物，再進一步地被完整霧化，依據合適溫度範圍，分別比較於 80°C、100°C 以及 120°C 下之分析物離子訊號。實驗結果顯示，隨著離子源溫度的減弱，訊號有增強的趨勢，至 80°C 達到最大值，尤其對於 AAI，於 80°C 有較明顯之改良現象，因而將離子源溫度設定於 80°C。

### 3.3.7 去溶劑氣體流速 (desolvation temperature, °C)

去溶劑之氣體流速取決於溶液移動相的流速，能夠改善移動相溶液的霧化情形。依適合流速範圍，分別比較去溶劑氣體流速於 800L/hr、900L/hr、1000L/hr、1100L/hr 條件下之分析物訊號。結果顯示，隨著去溶劑氣體流速的增加，離子的訊號強度亦有改善的趨勢，最後選取最大值 1100L/hr 作為去溶劑氣體流速條件。

### 3.3.8 離子源至樣品錐之間距離

離子源及樣品錐之間距離同為影響離子訊號強度的參數之一。調整離子源至樣品錐之間的距離分別為 3 mm、4 mm 與 5 mm，比較其訊號強弱。結果顯示，當其距離調整為 5 mm 時，AAI 與 AAI 之離子訊號均大幅地下降，顯示調整離子源與樣品錐間距離，能得到較佳的訊號，最後選取提供最佳訊號之 4 mm 作為離子源及樣

品錐間距離。(Figure 9)

### 3.4 最佳分析條件

綜合層析儀與質譜儀各參數的調整，本實驗條件設定為A:pH 3.0, 10 mM 甲酸銨水溶液，B：乙腈，流速 0.3 ml/min，梯度沖提模式為：0-2 min, 34%B, 2-10.5min, 34%-36%B。進樣量為 5  $\mu$ l，分析物於 10 分鐘內達基線分離。

質譜儀條件部分，採用電噴霧游離 (ESI) 介面搭配正離子模式 (positive mode)。並且以選擇反應監測模式 (selected reaction monitoring, SRM) 偵測特定母離子 (parent ion) 及進行碰撞後產生之子離子 (daughter ion)，藉此對分析物進行定量分析。而質譜最佳參數則為：樣品錐電壓 (cone voltage) 分別為 AAI: 20V, AAII: 20V，碰撞室能量 (collision energy) 分別為 AAI: 12eV, AAII: 10eV，毛細管高電壓 (capillary voltage): 3.0kV，萃取錐電壓 (extractor voltage): 3.0V，RF Lens voltage: 0.0V；離子源溫度 (ion source temperature): 80°C，去溶劑氣體溫度 (desolvation gas temperature): 450°C；去溶劑氣體流速 (desolvation gas flow): 1100 L/hr，樣品錐氣體流速 (cone gas flow): 50 L/ml，離子源與樣品錐間距離: 4 mm。碰撞室氣體流速: 0.13 nL/min；LM Resolution 1: 13.0，HM Resolution 1: 13.0，Ion Energy 1: 1.0，Entrance: 1，Exit: 1，LM Resolution 2: 13.0，HM Resolution 2: 13.0，Ion Energy 2: 1.0，Multiplier: 50，最適化條件下所得之質譜層析圖顯示於 Figure 10。

本研究使用 UPLC-MS/MS 建立一套快速、準確且靈敏的分析方法，使得 AA I、AA II 能夠於 10 分鐘內達完整的基線分離，可應用於含馬兜鈴酸類藥材及動物血清中 AA I 及 AA II 的定量分析。

就分離上的效率而言，本分析方法所需分析時間為 10 分鐘以內。相較於前人的研究，使用 LC/MS 以及 LC/UV 等對馬兜鈴類藥材進行定量的分析方法，大多需時至少 11 分鐘至 60 分鐘以上不等，本分析方法對於此類藥材能夠提供較為迅速的分析；在靈敏度方面，經層析條件及質譜參數最適化之後，對於 AA I 及 AA II 本分析方法分別提供達 0.14 ng/ml 及 0.26 ng/ml 的偵測極限。與我們所能蒐集之所有 LC/MS/MS 研究相比，文獻方法分別能提供 AA I 2 ng/ml ~ 0.25  $\mu$ g/ml 不等及 AA II 2.8 ng/ml ~ 15  $\mu$ g/ml 不等的偵測極限，本分析方法的靈敏度優於目前文獻中之方法約 10 倍 (Kite *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003; Yuan *et al.*, 2007)。

本研究原規劃將所開發的 LC/MS/MS 分析方法應用於大鼠血液中 AAI 及 AA II 之濃度分析，然因於實際研究中發現大鼠對馬兜鈴酸腎毒性不明顯，動物模式改用鼯鼠，而鼯鼠體型小採血量不足，故此部分之實驗改採尿液，用代謝體研究方法分析。

### 三、代謝體分析 (metabolomics analysis)

代謝體學(Metabolomics)是一種最新研究方法，它可以動態的分析細胞、組織所產生的代謝物，並且可以同步監控數百或數千個代謝所產生的微小分子，體液中不同代謝物的濃度改變可指出藥物對不同部位的毒性。目前代謝體研究最主要的分析工具為 NMR 及 MS：NMR 具有樣品前處理簡單及再現性高的優點；MS 具有高靈敏度、高解析度的優點，但需要有較複雜的樣品前處理及開發分析條件。本研究首先採用高磁場 NMR 分析大鼠及小鼠尿液，將所得到的 NMR 圖譜進行數值處理，採 PCA 分析，找尋分群指標成分。

Figure 11 顯示給予不同劑量馬兜鈴酸之雌性大鼠尿液 PCA 圖，可看出給藥後第一天之分群指標並不明顯，Figure 12 顯示經過多次給予馬兜鈴酸後不同組別之大鼠尿液代謝物組成逐漸有差異，這些差異很可能是因為其腎毒性所造成的，Table 3 顯示造成分群之 NMR 訊號，推測其可能的化學成分顯示於 Table 4，這些化學成分與文獻中腎毒性之生物指標相符(Zhang *et al.* 2006; Lens *et al.*, 2005)。

由於大鼠之血清生化值變化不明顯，因此將動物模式改為鼯鼠，由於鼯鼠之尿液較少，部分採尿點無法獲得足夠之樣品進行分析。給予鼯鼠不同劑量馬兜鈴酸標準品在不同天所得之 PCA 圖表示於 Figure 13，結果顯示，給藥第三天後尿液中代謝物組成即發生明顯之變化，相較於血清生化值在第五天起發生變化提早了兩天。

取餵食馬兜鈴粉末鼯鼠尿液進行代謝體分析，當給藥劑量至 2236 mg/kg (相當於 aristolochic acid I 含量為 60 mg/kg)時，於給藥後第 8 天尿液代謝物組成與控制組有明顯差異，給藥 10 天後，1118, 2236 mg/kg (相當於 aristolochic acid I 含量為 30, 60 mg/kg)兩組之尿液代謝體組成皆與控制組發生差異，造成差異的指標成分目前正在分析中。

### 四、動物肝及腎中 CYP1A1、CYP1A2 及 NQO1 定量分析

文獻指出有許多酵素[包括 CYP450 isozymes 如 CYP1A1、CYP1A2、NADPH:CYP reductases，peroxidase 如 prostaglandin H synthase (cyclooxygenase)，以及一些 cytosolic nitroreductases 如 DT-diaphorase (NQO1) 及 xanthine oxidase 等]都具有活化馬兜鈴酸的能力(Arlt *et al.*, 2002; Stiborová *et al.*, 2003; Stiborová *et al.*, 2005a)。Stiborová 等人曾提出假說，認為 NQO1 為在人類的肝和腎中負責馬兜鈴酸之活化的主要酵素之一(Stiborová *et al.*,

2003; Stiborová *et al.*, 2005b), 而CYP1A1、CYP1A2對馬兜鈴酸在肝中之活化也扮演著相當的角色(Stiborová *et al.*, 2005a)。為此在本計畫中, 我們取實驗動物肝及腎之cytosolic fraction, 針對前述三種主要參與活化的酵素(CYP1A1、CYP1A2及NQO1)利用SDS-PAGE及Western blotting進行定量分析, 觀察其表現量與腎毒性之相關性。

到目前為止, 我們所檢測的樣本來源均為單一餵食馬兜鈴酸、並進行肝、腎急毒性及亞急毒性試驗的實驗動物, 主要以Wistar大鼠為主。但是因為aristolochic acids mixture (90.9% aristolochic acid I and 5.7% aristolochic acid II)對大鼠所產生的腎毒性並不明顯, 所以僅進行了定性分析。定量分析部分則將在檢測完毒性反應較明顯的小鼠樣本後再行進行。

從實驗結果中可以觀察到 CYP1A1 及 CYP1A2 在餵食馬兜鈴酸 (aristolochic acids mixture, 90.9% aristolochic acid I and 5.7% aristolochic acid II)之大鼠(Wistar rat)的肝及腎中均有明顯而均一之表現; 至於 NQO1, 雖然在肝中有明顯表現, 在腎中的表現量卻有偏低的情形(Fig 15)。而在小鼠(BALB/c)的肝及腎中, 不論有無餵食馬兜鈴酸, CYP1A1的表現均很明顯(CYP1A2之實驗仍在進行中), 而且沒有因為馬兜鈴酸劑量之不同而有顯著改變, 這個結果和在大鼠中的情形一致。NQO1在肝中表現的情形亦與大鼠結果一致, 但是在腎中, NQO1的表現量原本偏低, 卻在投與馬兜鈴酸之後有明顯(隨劑量)增高的情形(Fig 16)。

在本計畫中發現在投與劑量下, 馬兜鈴酸對大鼠並無明顯肝腎毒性, 但是對小鼠之毒性反應(尤其是腎毒性)則較為明顯。Stiborová等人曾提出假說, 認為NQO1為在人類的肝和腎中負責馬兜鈴酸之活化的主要酵素之一, 我們的實驗結果指出NQO1在小鼠腎中的表現量似乎與其腎毒性有所相關, 為這個假說提供了一些實驗依據。

## 肆、結論與建議

由不同劑量餵食結果顯示，以口服 7.5 mg/kg aristolochic acid 的劑量於鼯鼠可使血清值 BUN 及 Cre 明顯升高並具有統計上的差異，故作為測試藥材之動物模式。HPLC 定量結果顯示馬兜鈴中藥粉末中 AAI 及 AAI 的含量分別為 26.8 及 1.6  $\mu\text{g mg}^{-1}$ ，補肺阿膠湯中 AAI 及 AAI 的含量分別為 3.7 及 0.2  $\mu\text{g mg}^{-1}$ 。以馬兜鈴中藥粉末(*Aristolochia contorta*) 310 到 2236 mg/kg (相當於 aristolochic acid I 含量為 8.32 到 60 mg/kg) 口服給予 Balb/c 小鼠的結果，處理組體重明顯下降，但在 BUN 及 Creatinine 的數值並未上升，顯示在此劑量下之馬兜鈴並不會引起腎毒性。複方毒性試驗以給予小鼠補肺阿膠湯(含馬兜鈴及不含馬兜鈴)劑量為 2 g/kg 及 4 g/kg 進行測試(相當於 aristolochic acid I 含量為 7.5, 15 mg/kg)，在 12 天的處理之下，餵食補肺阿膠湯組之 BUN 出現低於對照組的現象，creatinine 亦未能呈現具腎毒性之變化；GPT 的部分，餵食補肺阿膠湯組出現據統計意義的上升，但因 GTP 的變化只發生於少數天數，因此馬兜鈴單方與複方藥材之肝毒性仍需進一步研究。

本研究結果顯示餵食馬兜鈴酸標準品與餵食含馬兜鈴酸單方與複方藥材之腎毒性有差異，造成差異的因素仍有待釐清。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會計畫編號 CCMP96-RD-044 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 伍、參考文獻

1. Arlt, V.M., Stiborová, M., Schmeiser, H.H., Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review, *Mutagenesis*, 17, 265-277, 2002.
2. Chan S. -A., Chen M. -J., Liu T. -Y., Fuh M. -R., Deng J. -F., Wuc M. -L., Hsieh S. -J., Determination of aristolochic acids in medicinal plant and herbal product by liquid chromatography-electrospray-/ion trap mass spectrometry, *Talanta*, 60, 679-685, 2003.
3. Lee M. -C., Tsao Chi. -H., Iou. S. -C. , Chuang W.-C., Sheu S.-J., Analysis of aristolochic acids in herbal medicines by LC/UV and LC/MS, *J. Sep. Sci.*, 26, 818-822, 2003.
4. Lee, T.Y., Wu, M.L., Deng, J.F., Hwang, D.F., High-performance liquid chromatographic determination for aristolochic acid in medicinal plants and slimming products, *J. Chromatogr. B*, 766, 169-174, 2001.
5. Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopkova, K., Markova, V., Lankova, M., Kumstyrova, T., Wiessler, M., Schmeiser, H.H., Human cytosolic enzymes involved in the metabolic activation of carcinogenic aristolochic acid: evidence for reductive activation by human NAD(P)H:quinone oxidoreductase, *Carcinogenesis*, 24, 1695-703, 2003.
6. Stiborová, M., Sopko, B., Hodek, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Hudecek, J. The binding of aristolochic acid I to the active site of human cytochromes P450 1A1 and 1A2 explains their potential to reductively activate this human carcinogen, *Cancer Letters*, 229, 193-204, 2005a.
7. Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H., Human hepatic and renal microsomes, Cytochromes P450 1A1/2, NADPH:Cytochrome P450 reductase and prostaglandin H synthase mediate the formation of aristolochic acid-DNA adducts found in patients with urothelial cancer, *Int. J. Cancer*, 113, 189-197, 2005b.
8. Yuan J.B., Nie L.H., Zeng D.Y., Luod X.B., Tang F., Ding L., Liu Q., Guo M.L., Yao S.Z., Simultaneous determination of nine aristolochic acid analogues in medicinal plants and preparations by high-performance liquid chromatography, *Talanta*, 73, 644-650, 2007.
9. Kite G.C., Yule M.A., Leon C., Simmonds M.S.J., Detecting aristolochic

acids in herbal remedies by liquid chromatography /serial mass spectrometry, Rapid commun. Mass Spectrom. , 16, 585-590 (2002).

10. Zhang X., Wu H., Liao P., Li X., Ni J., Pei F., NMR-based metabonomic study on the subacute toxicity of aristolochic acid in rats, Food Chem Toxicology., 2006, 44:1006-1014.

陸、圖、表

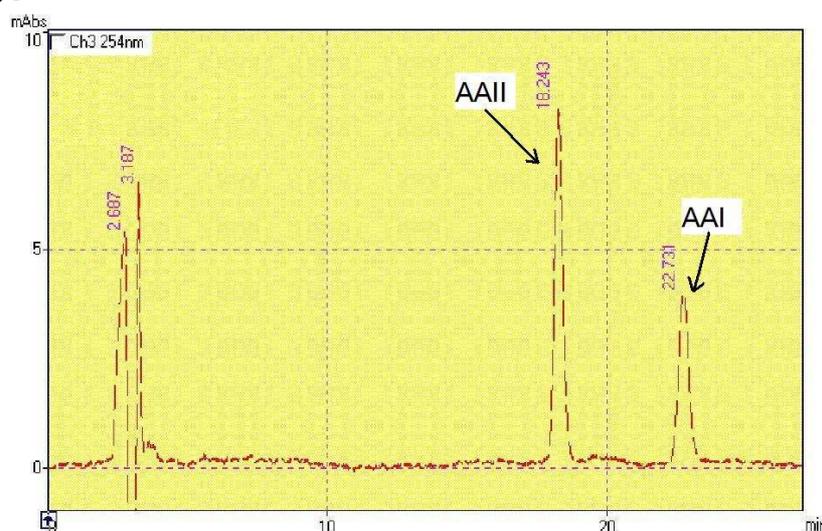


Figure 1 Chromatograms of the aristolochic acid standards (A). Mobile phase: 0.7 % acetic acid /ACN (57:43, v/v); Stationary phase: Luna 5 $\mu$  C<sub>18</sub> column, 250  $\times$  4.6 mm, temp., ambient; 1 ml/min; UV detection, 254 nm; 5  $\mu$ l sample.

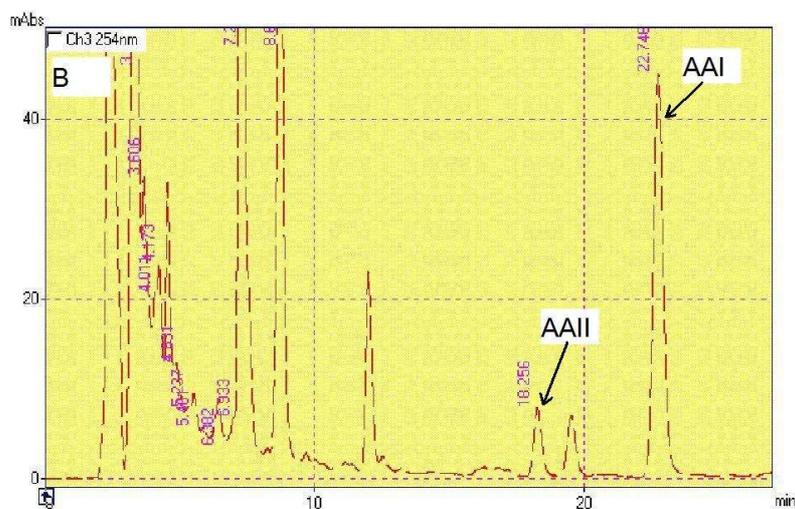
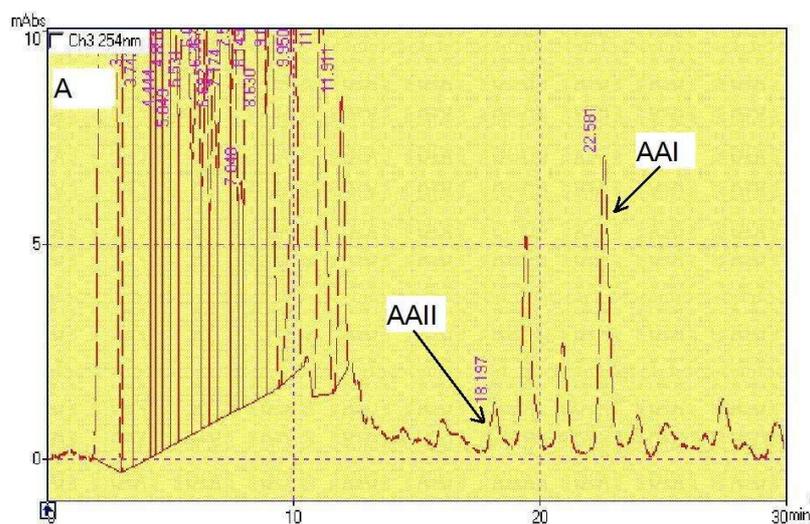


Figure 2 Chromatograms of crude extract of 補肺阿膠湯 (A) and 馬兜鈴(B). Mobile phase: 0.7 % acetic acid /ACN (57:43, v/v); Stationary phase: Luna 5 $\mu$  C<sub>18</sub> column, 250  $\times$  4.6 mm, temp., ambient; 1 ml/min; UV detection, 254 nm; 5  $\mu$ l sample.

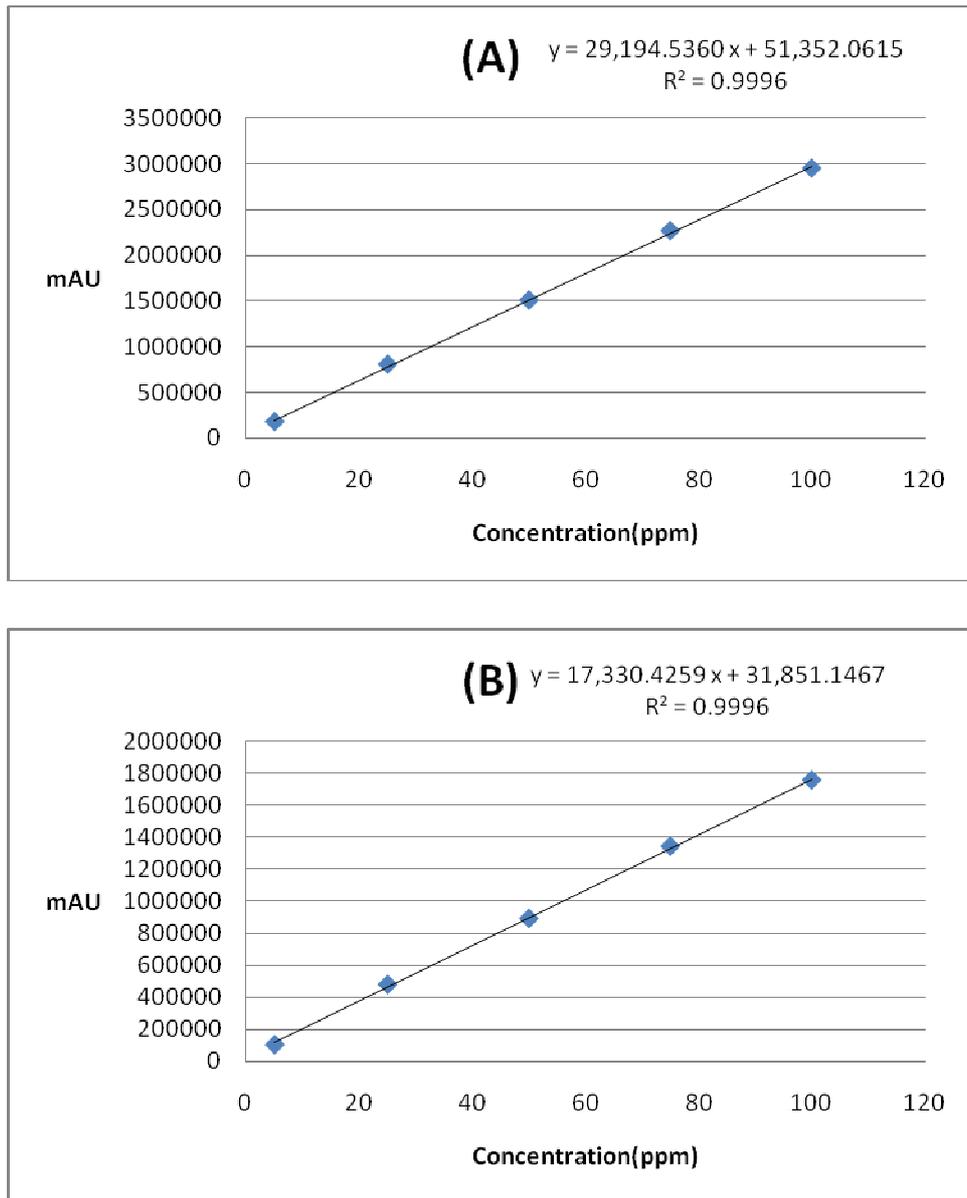


Figure 3 Calibration curves of aristolochic acid I (A) and aristolochic acid II (B).

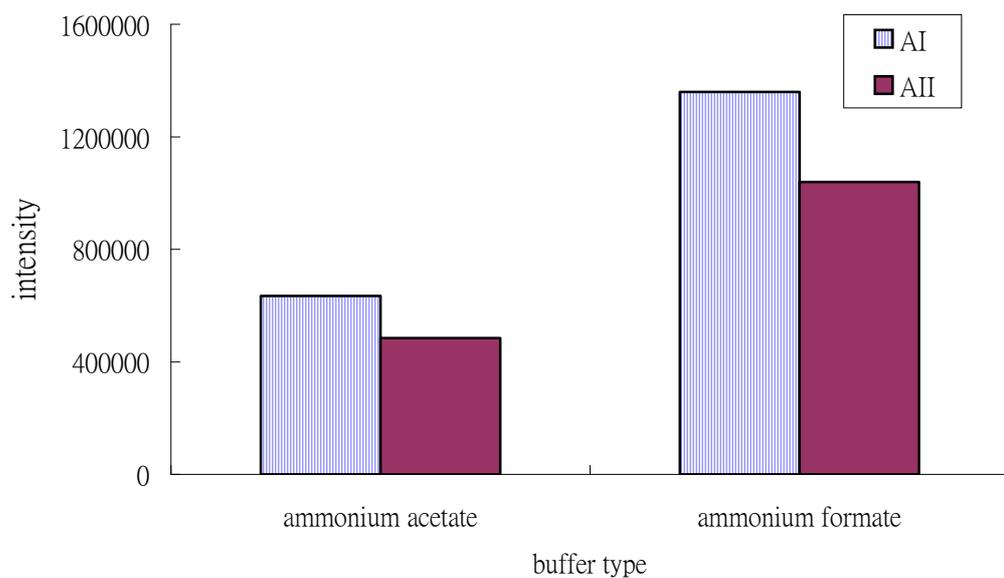


Figure 4 Comparison of signal intensities under using ammonium acetate and ammonium formate as the mobile phase buffer in (+) ESI MS measurement.

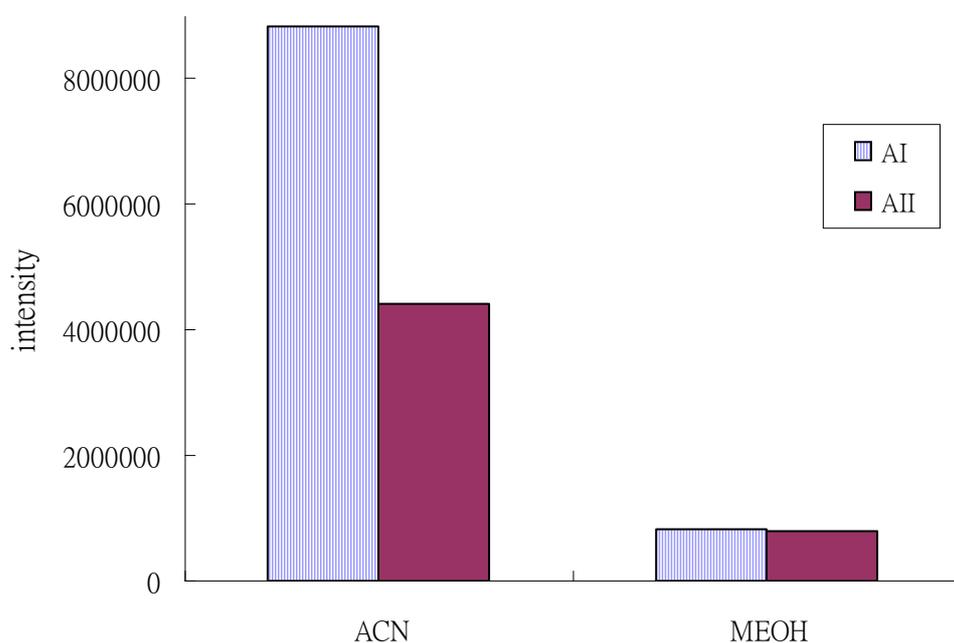


Figure 5 Comparison of signal intensities using different organic solvents as mobile phase in (+) ESI MS measurement .

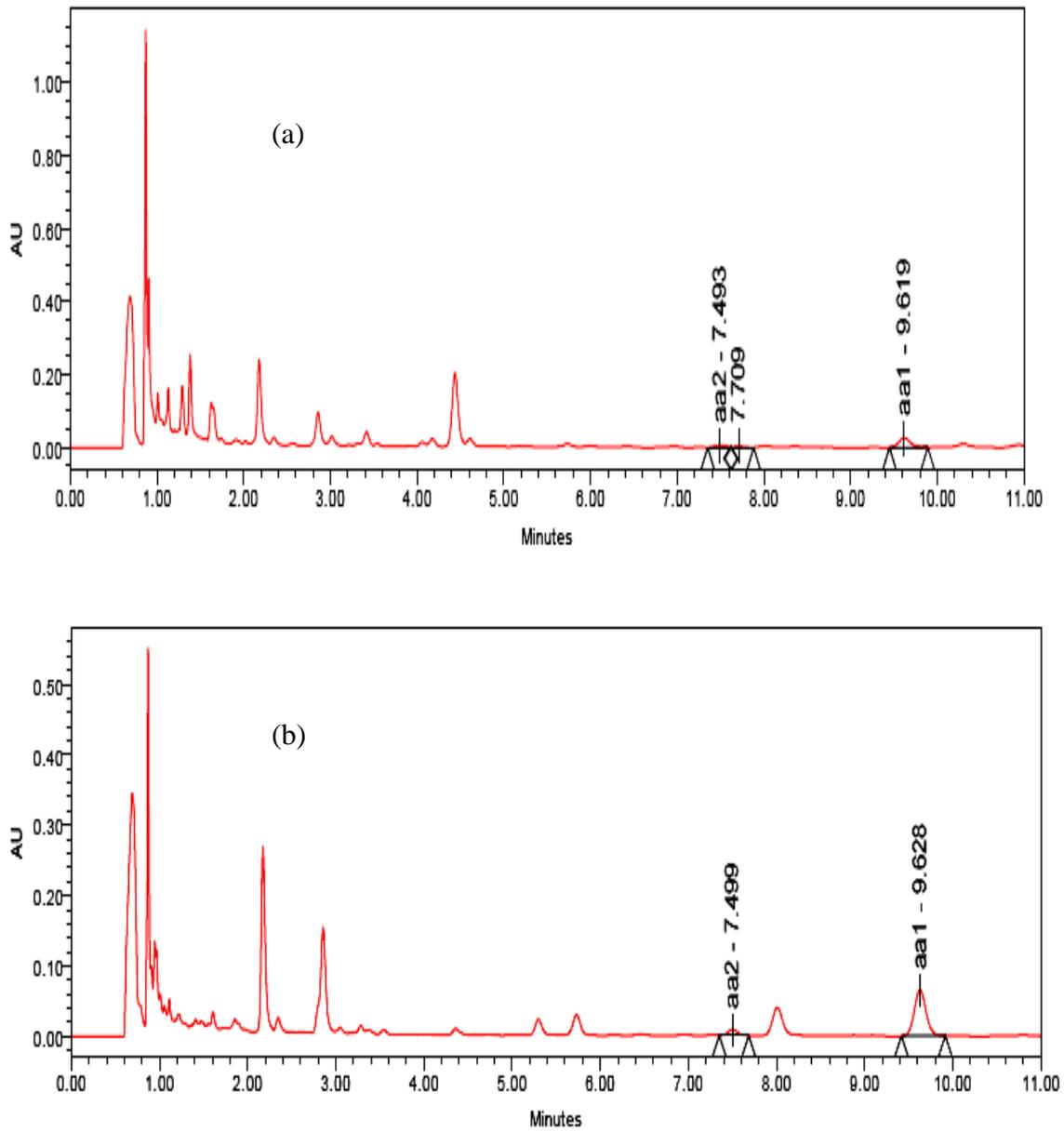


Figure 6 UPLC-UV chromatograms of (a) bu-fei-a-jiau-tang and (b) ma-dou-ling obtained under optimized conditions. Chromatographic conditions: A: pH 3.0, 10 mM ammonium formate, B: ACN. Gradient profile: 0-2min: 34%B, 2-10.5 min: 34%-36%B, 10.5-10.6min: 36%-100%B, 10.6-16.9 min: 100% B, 16.9-17.0 min, 17.0min-20.0min: 34%B. Flow rate: 0.3ml/min. UV: 254nm, injection: 5.0 $\mu$ l.

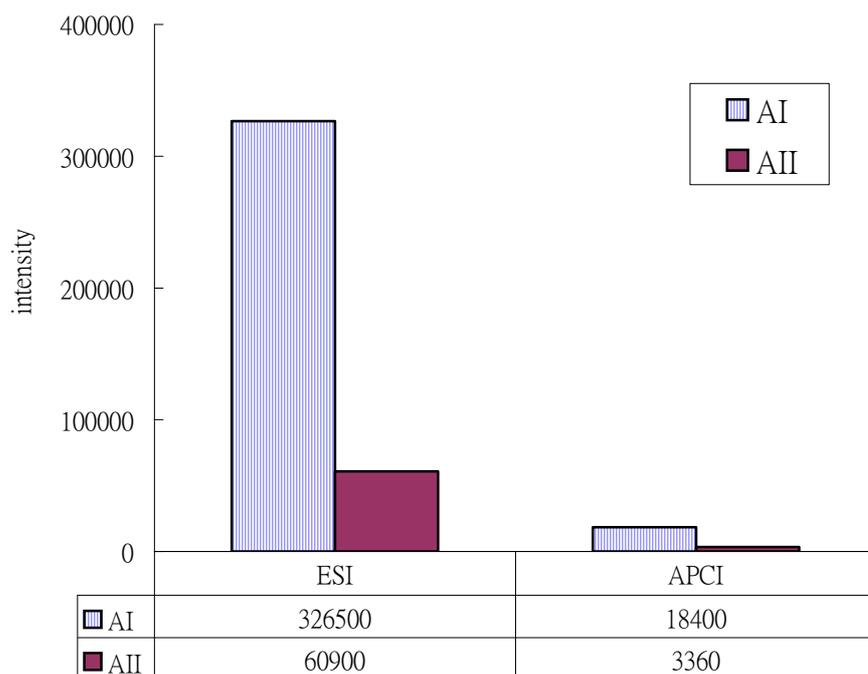


Figure 7 Comparison of peak areas of AAI and AII obtained in (+) ESI and (+) APCI MS measurement.

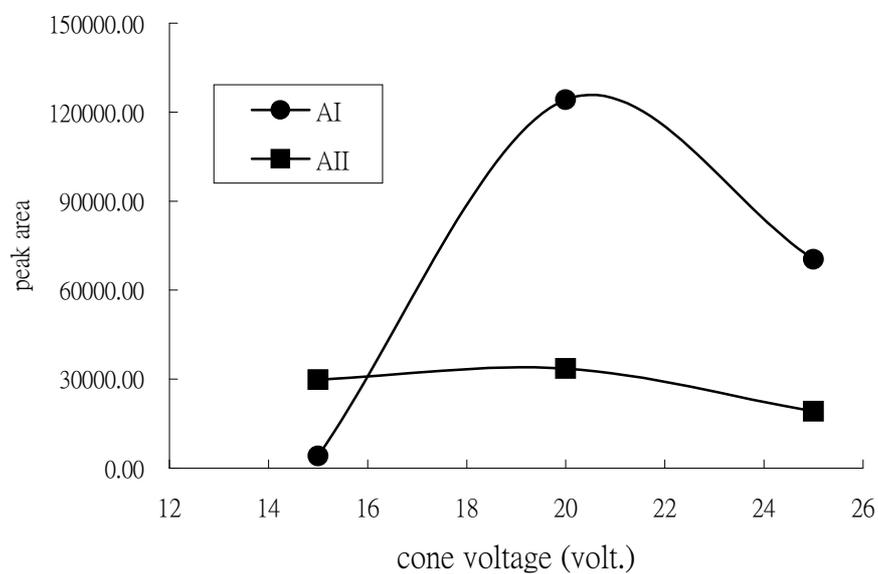


Figure 8 Effect of cone voltages on peak areas of AAI and AII in (+) ESI MS measurement.

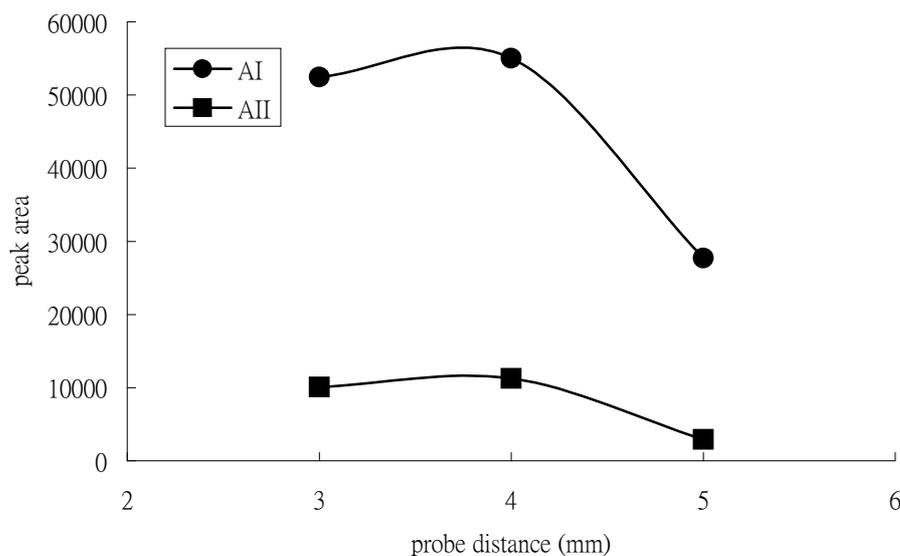


Figure 9 Effect of probe distance on peak areas of AAI and AII in (+) ESI MS measurement.

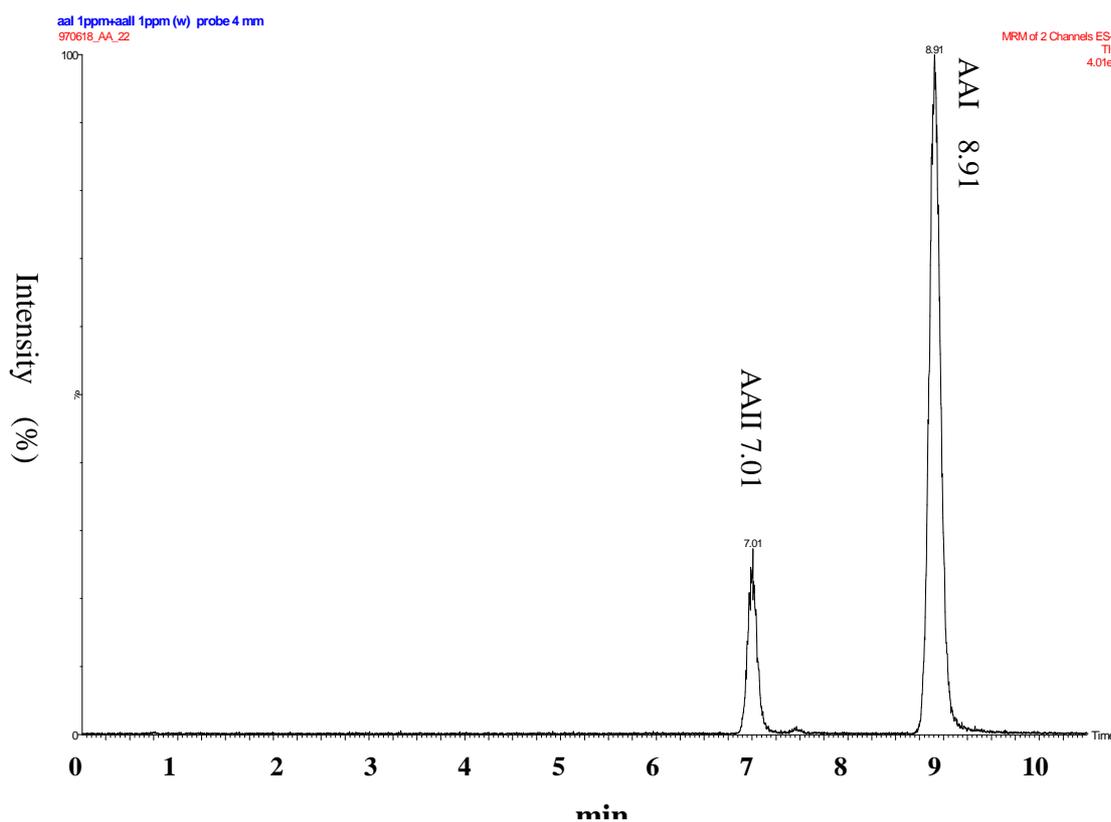


Figure 10 UPLC-MS/MS chromatogram (SRM) of AA I and AA II obtained under optimum conditions. UPLC-MS/MS conditions. Chromatographic conditions: A: pH3.0, 10mM ammonium formate, B: ACN. 0-2min: 34%B, 2-10.5 min: 34%-36%B. Flow rate: 0.3ml/min. MS conditions: cone voltage: 20V, capillary voltage:3.0 kV, collision energy: AAI:12eV, AAI:10eV, ion source temperature:80°C, desolvation temperature:450°C, desolvation gas flow:1100L/hr, cone gas flow: 50L/hr, probe distance: 4mm.

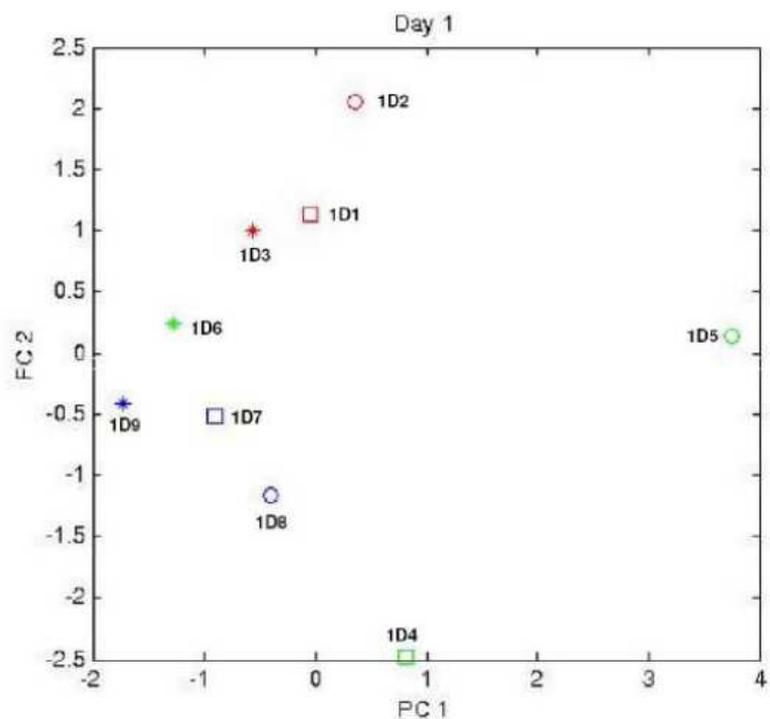


Figure 11 PCA score plot of NMR spectrum of 9 rat urine samples at day 1 after AA standard treatment.

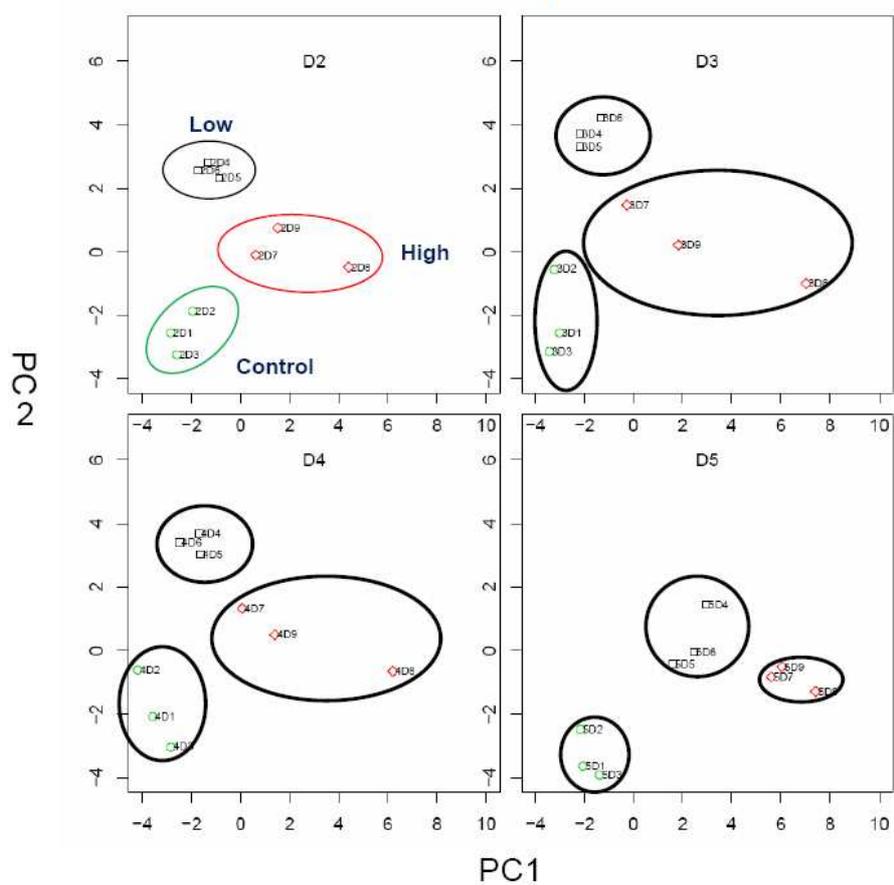


Figure 12 PCA score plot of NMR spectrum of 9 rat urine samples at day 2 to day 5 after AA treatment.

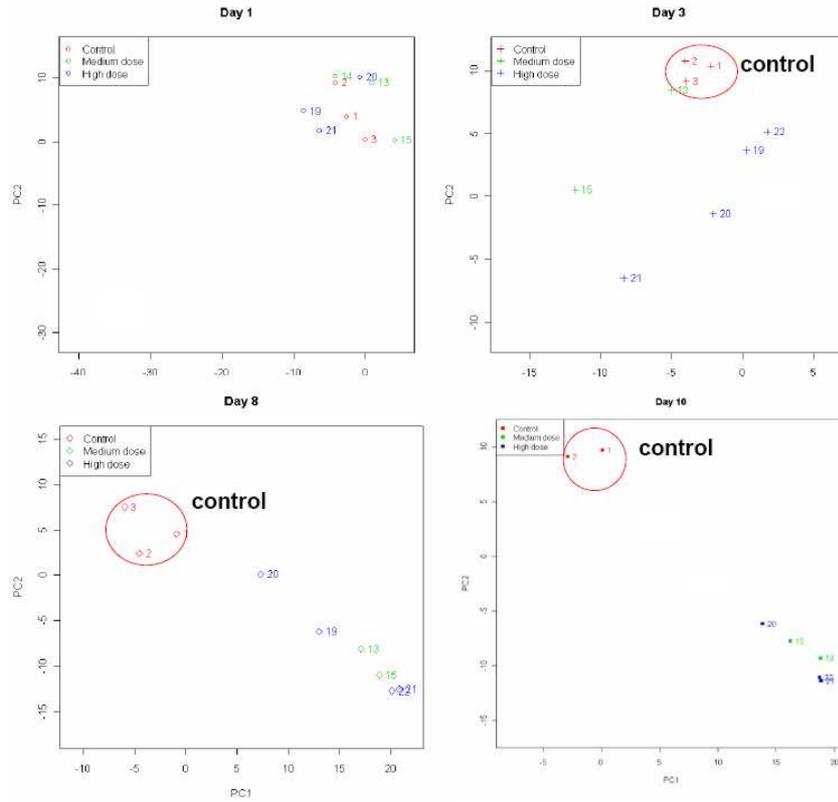


Figure 13 PCA score plot of NMR spectrum of mice urine samples at day 1 to day 10 after AA treatment.

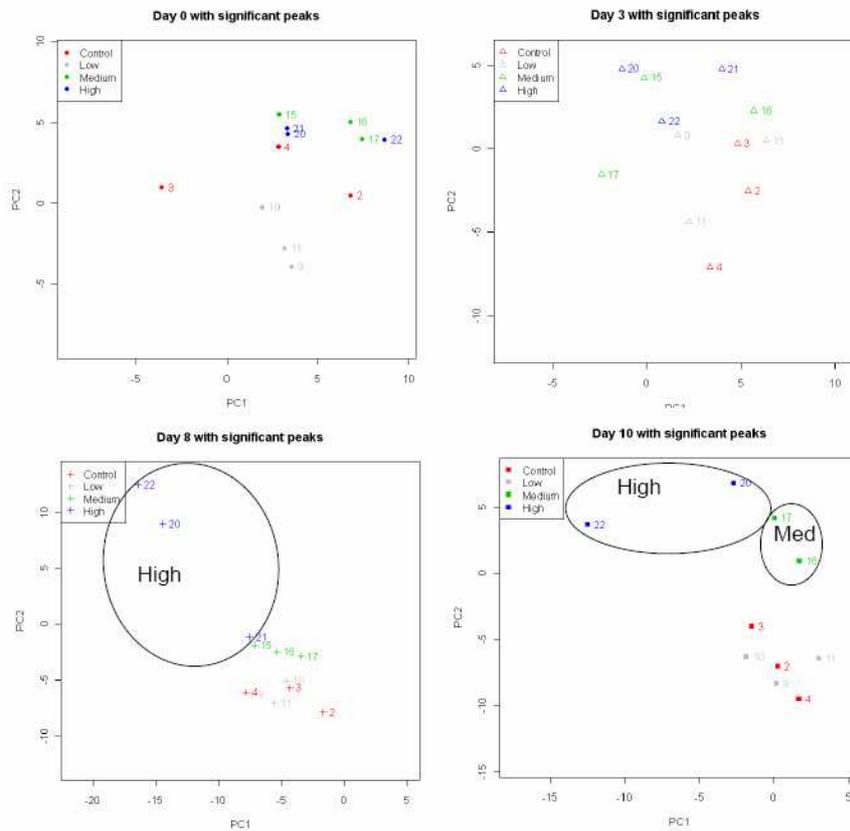


Figure 14 PCA score plot of NMR spectrum of mice urine samples at day 0 to day 10 after *Aristolochia contorta* treatment.

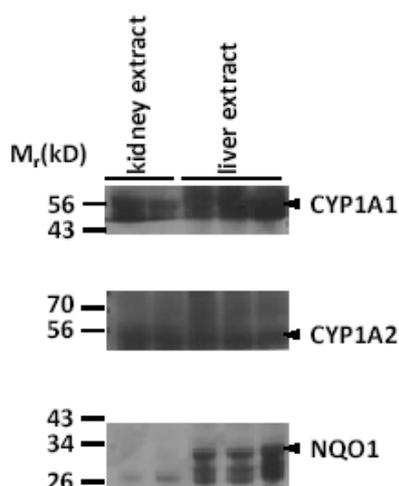


Figure 15 Expression of CYP1A1, CYP1A2, and NQO1 in the liver and kidney of rats treated with aristolochic acids mixture. Protein extracts from homogenized tissues were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using either the anti-cytochrome P450 1A1 polyclonal antibody (sc-9828, Santa Cruz), anti-cytochrome P450 1A2 polyclonal antibody (AB1249, Chemicon), or anti-NQO1 polyclonal antibody (sc-16464, Santa Cruz).

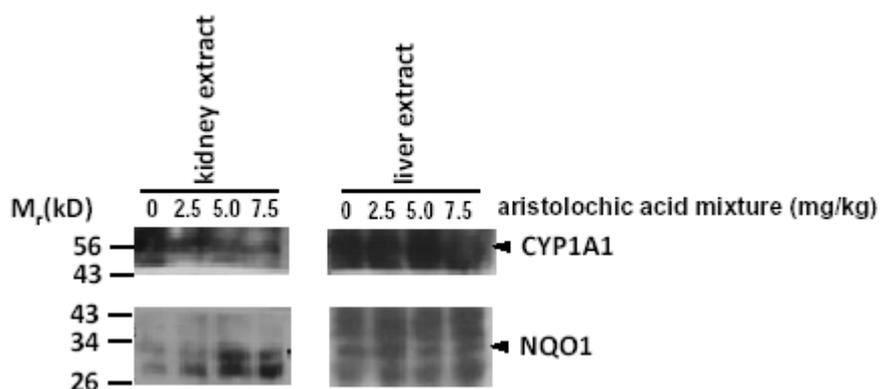


Figure16 Expression of CYP1A1, CYP1A2, and NQO1 in the liver and kidney of mice treated with aristolochic acids mixture. Protein extracts from homogenized tissues were separated by 10% SDS-PAGE and analyzed by Western blotting using either the anti-cytochrome P450 1A1 polyclonal antibody (sc-9828, Santa Cruz), anti-cytochrome P450 1A2 polyclonal antibody (AB1249, Chemicon), or anti-NQO1 polyclonal antibody (sc-16464, Santa Cruz).

Table 1 Intraday precision and interday reproducibility of peak area for AAI and AAI of HPLC method.

Conc	Intraday precision (% RSD)		Interday reproducibility (% RSD)	
	AAI	AAII	AAI	AAII
5 $\mu$ g/ml	4.23	2.94	1.92	2.01
50 $\mu$ g/ml	1.12	0.96	1.28	1.62
100 $\mu$ g/ml	2.04	1.93	3.69	3.93

Table 2 Contents of AAI and AAI in preparations containing AAs.

Compounds	補肺阿膠湯( $\mu$ g $mg^{-1}$ )	馬兜鈴( $\mu$ g $mg^{-1}$ )
aristolochic acid I	3.749	26.839
aristolochic acid II	0.169	1.638

Table 3 34 peaks in urine samples significantly different between group 1 and 3 at day 5

ppm	p value	rank(34)	ppm	p value	rank(34)
0.96	0.026989893	26	3.72	0.001025426	5
1.28	0.018496001	20	3.76	0.000737163	3
1.76	0.003989003	8	6.72	0.008358383	14
1.8	0.045127244	32	6.88	0.020929284	21
1.88	0.030939305	28	7.2	0.025886107	25
1.96	0.006199618	12	7.24	0.006326223	13
2	0.034027113	29	7.32	0.023294434	22
2.04	0.000871499	4	7.4	0.036595317	31
2.28	0.048822945	34	7.44	0.046850044	33
2.36	0.009898769	16	7.48	0.003982053	7
2.4	0.017640085	19	7.52	0.000671998	2
2.6	0.003887738	6	7.56	0.005237988	10
2.76	0.02379303	23	7.6	0.016311661	18
3.12	0.029426248	27	7.84	0.025729419	24
3.16	0.009895902	15	7.88	0.005624164	11
3.44	0.014161552	17	7.92	0.035122285	30
3.68	0.000656347	1	8.48	0.00499013	9

Table 4 Postulated chemical contributed to the classification

ppm	Chemicals
1.36	Lactate
1.76	Ethylmalonic acid
1.88	<u>Acetate</u>
3.72	<u>Glucose</u>
4.04	<u>Creatinine</u>
4.16	Lactate
7.52	Kynurenic acid
7.6	Kynurenic acid
7.88	Hippuric acid
7.92	Kynurenic acid

