

MC-Transaction on Biotechnology, 2011, Vol. 3, No. 1, e2

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

# Quantitative Analysis and Mass-Spectra Explanation for Diterpenoid Glycoside Atractyloside (ATR) in Traditional Chinese Herbs

陳良宇<sup>1\*</sup>、陳智祥<sup>2</sup>、李慶國<sup>3</sup>

1. 銘傳大學健康科技學院生物科技學系(中華民國 台灣 桃園)
2. 金車股份有限公司(中華民國 台灣 中壢)
3. 台北醫學大學生物藥學所(中華民國 台灣 台北)

## 中文摘要

現今以草本植物來治療疾病的情形十分普遍，這些草本植物有相當程度的藥用成分，但是同時含有毒性物質的情形也十分普遍，往往因食用不當導致中毒的情形屢見不鮮，例如服用含馬兜鈴酸之中藥而引起腎衰竭，因此了解這些植物中生理毒性風險的成份含量與發展便利可靠的檢測技術，是非常重要的課題。針對白朮 (*Atractylodes macrocephala*)、蒼朮 (*Atractylodes lancea*) 等常用中藥，對於毒性成分—diterpenoid glycoside atractyloside (ATR) 進行含量分析。樣品經水萃取後，酸化過夜後，以乙酸乙酯萃取出 ATR 成分，再以 TMSI 及 pyridine 衍生之後，以 GC-MSD 進行分析。ATR 衍生物之層析分離及質譜碎片被鑑定與解釋。定量結果顯示，蒼朮中 ATR 含量為 8980 ppm，白朮中 ATR 含量為 9230 ppm，另外也針對咖啡豆進行比對分析，發現微量 ATR 於咖啡豆。

關鍵字：*Atractylodes macrocephala*、*Atractylodes lancea*、attractyloside、GC/MSD

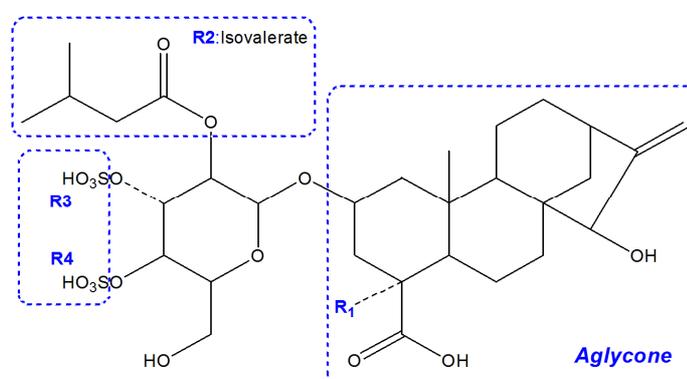
通訊作者：陳良宇[[loknath@mail.mcu.edu.tw](mailto:loknath@mail.mcu.edu.tw)]

收稿：2011-3-2 接受：2011-4-2

## 前 言

現今以草本植物來治療疾病的情形十分普遍，這些草本植物有相當程度的藥用成分，但是同時含有毒性物質的情形也十分普遍，往往因食用不當導致中毒的情形屢見不鮮，例如服用含馬兜鈴酸之中藥而引起腎衰竭，因此了解這些植物中所含之潛在毒性成份的含量與發展便利可靠的檢測技術，是非常重要的課題。

atractylosides (ATR) 是一群二萜類糖苷物質 (diterpenoid glycoside)，早在 200 年前就已有中毒記載出現，例如非洲及地中海地區，因攝食特定草藥(如 *Callilepis laureola*, *Atractylis gummifera* 等)，而產生抽筋、昏迷甚至死亡等症狀。ATR 最先由 *A. gummifera* 被發現並分離出來<sup>[1]</sup>，常見的東方傳統中藥，如四君子湯、十全大補湯中的白朮；平胃散中的蒼朮及蒼耳子，也有發現 ATR 的存在。近幾年來則陸續發現 ATR 類似物存在於其他天然植物中，包括 *A. gummifer* 中發現的 carboxy-ATR 以及由咖啡豆發現的 atractyligenin 等衍生物質<sup>[2, 3]</sup>，由於這些 ATR 類物質毒性不一，以 carboxy-ATR 毒性為最強，主要是抑制肝臟、腎臟、心臟粒線體膜上的氧化磷酸化反應，嚴重時造成肝、腎壞死，甚至死亡。因此對於常食用中藥的人而言，蒼朮、白朮等，常見於中草藥方中植物性基材的 ATR 含量評估，日益重要<sup>[4]</sup>。



	R1	R2	R3	R4
Atractyloside	-H	-COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>
Carboxyatractyloside	-COOH	-COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	-SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>
Atractyloside derivatives found in fresh and roasted coffee beans	-H	-COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-H	-H
	-H	-COCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>11</sub>	-H

圖一、ATR 與 ATR 類物質之化學結構。

由於 ATR 之分子量較大，以標準品 (atractyloside potassium, 蒼朮甘鉀) 為例，分子量為 803，而在樣品中之 ATR 類似物之分子量更大 (圖一)，定性上的困難來自多樣的類似物與複雜結構，常導致分離及鑑別不易。因此早期之分析方法多以 FAB-MS 及 FD-MS 等技術進行分析<sup>[4, 5]</sup>，甚至以 LC-MS-MS 進行分析<sup>[3]</sup>，雖然質譜技術作為檢測器提供高度可靠的鑑別資訊，然而複雜的前端游離技術及昂貴的儀器，對於一般的毒理及檢驗工作並不適用。考量一般毒理與檢驗實驗室之儀器設備，本研究參考 Laurens *et al.*之方法，將 ATR 衍生化後再以氣相層析質譜儀分

析<sup>[6]</sup>。

蒼朮為菊科植物茅蒼朮(*A. lancea* (THUNB.) DC.)及北蒼朮(*A. chinensis* (DC.) Koidz.)等同屬近緣植物之乾燥根莖，依產地可分為茅蒼朮(南蒼朮)與北蒼朮，南蒼朮分布華中、華北各地。北蒼朮分布東北，華中及內蒙。依其主要活性成份的研究了解，茅蒼朮含蒼朮醇(hinesol)，桉葉醇(eudesmol)，欖香醇(elemol)，芹子烯( $\beta$ -selinene)，蒼朮夫喃煙，羥氧基蒼朮酮等倍半帖類。東北蒼朮含蒼朮酮(atractylone)，北蒼朮含蒼朮酮。蒼朮之藥理作用有：一、利尿作用；二、降血糖；三、中樞抑制作用；四、抗潰瘍作用。白朮為 *atractylodes ovata* A.P.等同屬近緣植物之乾燥根莖，白朮之根莖含 atractylone 及 eudesmol，白朮之藥理作用主要為：一、利尿作用；二、降血糖<sup>[1]</sup>。

由於各地區之草藥研究往往只針對當地草本植物為對象，目前有關 ATR 的藥理、毒理與含量研究也多集中於歐、美、日等先進國家，對於傳統中藥中大量使用之蒼朮等藥材的研究僅有少數，同時也沒有確切定量數據，而國內對於蒼朮等中草藥中研究更付之闕如，因此本研究針對蒼朮、白朮進行 ATR 的定量分析，以期建立監測之定量資料庫及維護國人使用傳統草藥之安全健康。

## 材料與方法

### 藥品與試劑

乙酸乙酯、甲醇(HPLC級)，比啉(dry grade)來自 Merck Co.。蒼朮苷鉀(atractyloside potassium)、衍生劑 tri-methyl silyl-imidazole (TMSI)、內標準品 androstane 及 5 $\alpha$ -cholestane 購自 Sigma。

### 樣品

蒼朮及白朮購自台灣一般中藥店市售之乾燥材料，烘焙過之咖啡豆則為金車公司所提供。

### 分析樣品的製備

參考 Laurens 等人之方法<sup>[6]</sup>，取蒼朮等樣品 10 克，以 100 ml 去離子水煮沸 15 分鐘後，過濾後以去離子水定量至 100 ml。取樣品濾液或 ATR 標準品 1 ml，加入 2 ml 2N 鹽酸進行酸化水解，靜置過夜後，再以 10 ml 乙酸乙酯萃取，萃取液以氮氣吹乾後，轉移於 2ml 之樣品瓶中並以氮氣保存密封。隨後加入 200  $\mu$ l TMSI 及 200  $\mu$ l pyridine 衍生劑，於 100 $^{\circ}$ C 下衍生反應 2 小時。

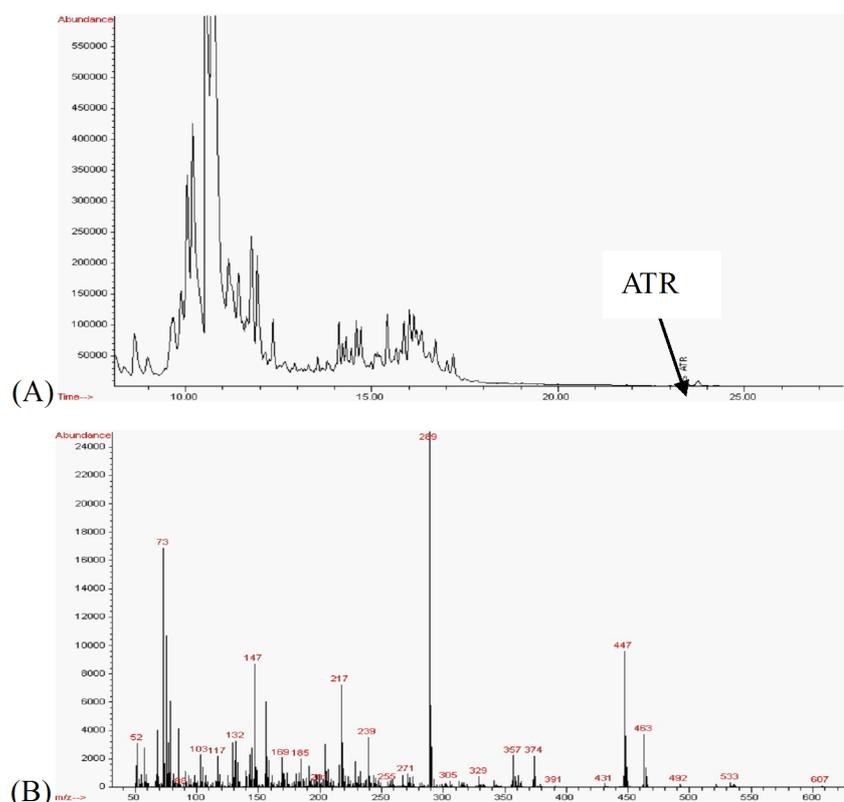
## GC-MS 的分析條件

使用 Agilent HP6890 氣相層析儀附 Agilent HP5973 質譜儀進行分析，管柱為 J & W Scientific，DB-1MS (30m × 250 μm，膜厚 0.25 μm)。樣品注入量：2 μl，注射埠溫度：250°C、不分流，載留氣體流速：1.0 ml/min。烘箱溫度：初溫 210°C 維持 3 分鐘，雖後以 10°C/分鐘速率增溫至 270°C，接著以 30°C/分鐘速率再增溫至 310°C，停留 15 分鐘。質譜離子監測：主要特徵離子  $m/z = 289$  (base ion fragment)，次要特徵離子  $m/z = 447$ 、217、463。

## 結果與討論

### 一、分析方法的驗證

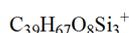
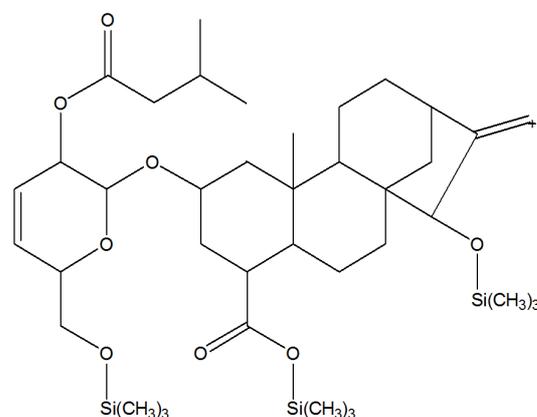
如圖二所示，ATR 標準品與蒼朮的總離子層析圖標準品(A)與樣品 ATR 之 TMS 衍生物質譜圖(B)，ATR 滯留時間為 23.5 分鐘。相當的滯留時間與高相似度之特徵質譜圖，證實以 TMSI 衍生後分析 ATR 為可行之方式。



圖二 (A)蒼朮總離子層析圖(TIC)及(B)蒼朮質譜圖。

比對 ATR 之化學結構式來判斷質譜圖之碎片，TMS 衍生後之 ATR 如圖三，由右

側二帖結構來看，只有兩個位置可供衍生，若從左側糖與氧鍵結斷裂，則可能會出現  $m/z=463$  及  $m/z=390$  的離子片段，若由右側二帖與氧鍵結斷裂則可能會出現  $m/z=447$  及  $m/z=374$  之離子片段。由質譜圖可看出  $m/z=463$ 、 $447$ 、 $374$  皆有出現，但傾向以 2 個位置皆有 TMS 衍生，右側二帖與氧鍵斷裂為多。



Exact Mass: 747.41

$m/e$ : 747.41 (100.0%), 748.42 (44.7%), 749.42 (18.1%), 748.41 (15.2%), 749.41 (10.9%), 750.41 (5.4%), 750.42 (4.2%), 751.42 (1.6%)

	右側二帖與氧鍵斷裂		左側與氧鍵結斷裂	
	糖苷離子片段	二帖離子片段	糖苷離子片段	二帖離子片段
+4TMS	467	-	451	-
+3TMS	378	-	362	-
+2TMS	289	447	273	463
+1TMS	200	374	184	390

圖三、TMS 衍生後之 ATR 與碎片離子簡表。

從左側糖苷結構來看，則有 4 個位置可供衍生，若從左側糖與氧鍵結斷裂，則會出現  $m/z=451$ 、 $362$ 、 $273$ 、 $184$  等離子碎片，若由右側二帖與氧鍵結斷裂則可能會出現  $m/z=467$ 、 $378$ 、 $289$ 、 $200$  等離子片段，由質譜圖可看出僅有  $m/z=289$  的離子片段出現，顯示衍生反應傾向僅 2 個位置有 TMS 衍生，右側二帖與氧鍵斷裂佔多數。此一推論與 Laurens 等人之研究有所不同<sup>[6]</sup>，詳細情形仍待更多研究來證實。

## 二、定量分析

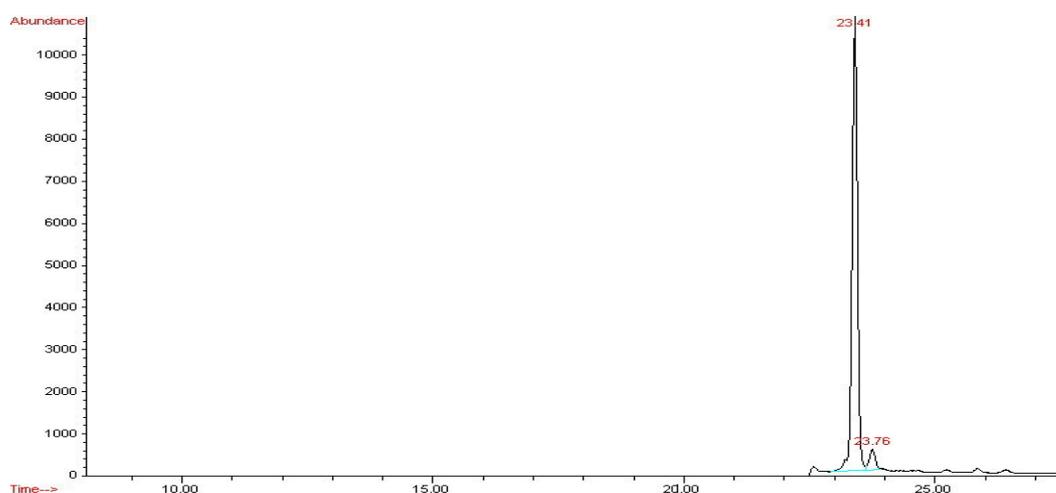
根據 Laurens 等人之方法<sup>[6]</sup>，使用 androstane 為內標，總分析時間為 72 分鐘，其中 androstane 之滯留時間為 14.71 分鐘，ATR 滯留時間為 58.85 分鐘；由於分析

時間過長，經修改升溫條件後，androstane 之滯留時間為 9.5 分鐘，ATR 滯留時間為 23.5 分鐘，但是內部標準品解析度不佳。由於 androstane 會進行 TMS 衍生反應，定量上受衍生效率影響，故使其擔任樣品製備與衍生之參考指標，另以不經衍生反應之 5 $\alpha$ -cholestane，作為定量之內部標準品，滯留時間為 11.5 分鐘。然而受到樣品基材之植物固醇干擾解析度不佳，減低 androstane 與 5 $\alpha$ -cholestane 作為標準品之定量目的效果。由於同時適合定量與定性之內部標準品不易尋找，因此仍是以外部標準品之工作曲線進行定量，適合之內部標準品需進一步再尋找。

表一、藥材中 ATR 之定量分析結果

樣品	ATR 含量 (ppm)
蒼朮 (N=2)	8980 $\pm$ 15
白朮 (N=3)	9230 $\pm$ 13

另外，以選擇性離子監測 (Selected Ion Monitoring, SIM) 之質譜檢測技術可以提高偵測與定量之靈敏度，同時可移除 TIC 中大部分非目標物之離子片段降低干擾，因此選擇以 SIM 中  $m/z = 289$  之離子峰進行定量分析。



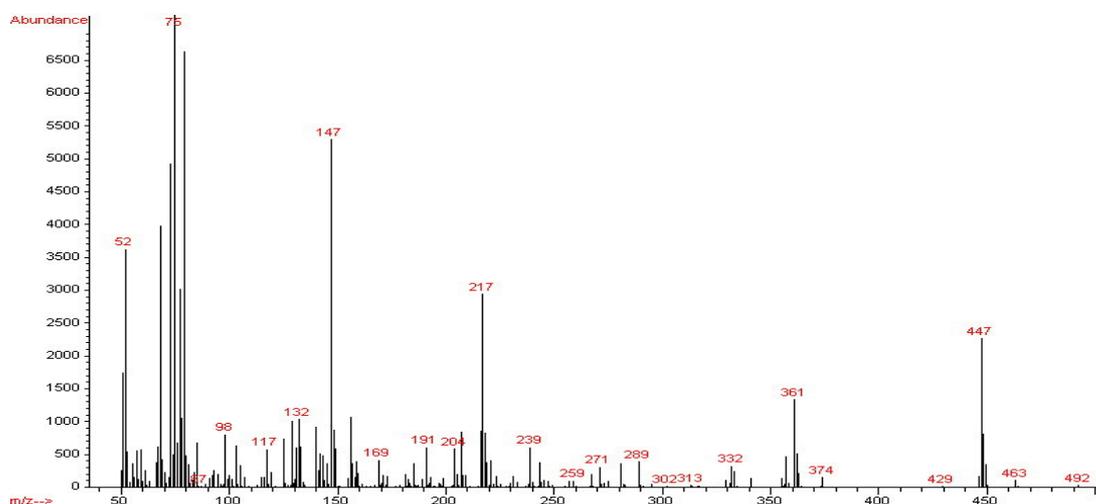
圖四、蒼朮層析圖 (SIM)。

蒼朮中 ATR 之 SIM 層析圖如圖四，本研究中之各樣品之偵測極限為三倍之訊雜比 (S/N)，蒼朮及白朮分別為 2 ppm 及 4 ppm，咖啡豆為 23 ppm 皆優於 Laurens 等人的研究中胃液之 LOD 為 42 ppm [6]，其差異應是受到基材複雜性的影響。本研究之各樣品的 ATR 含量如表二，回顧相關文獻，目前並無蒼朮及白朮之 ATR 定量數據可比較，咖啡豆則因豆種不而有所差異。Maier 等人於 1978 年之研究發現，Arabica 熟豆之 ATR 含量為 17.5~32 ppm 之間，遠低於本研究之 1060 ppm。推測本研究較高 ATR 含量的數據可能是因：1. 近幾年來分析檢測技術之改進，偵測

的靈敏度與穩定度提高，可驗出之 ATR 含量自然較多；2. 分析方式不同，衍生時 ATR 類物質同調化導致。早期研究（約 30 年前）指出 Robusta 熟豆並無 ATR 含量可檢出，僅存於 Arabica 豆種中，因儀器、分析方法的進步與改良，本研究發現 Robusta 熟豆仍有 151 ppm 之 ATR 存在，也進一步證明本分析技術應用於 ATR 等微量毒物分析之優勢與便利性<sup>[5]</sup>。

### 三、ATR 衍生異構物

由於層析圖中可以發現，ATR 旁邊出現一個成分 (ATR\*)，由圖五之質譜圖判斷，ATR\* 也有 ATR 標準品之主要特徵離子 ( $m/z=447$ 、 $217$ )，但出現另一離子  $m/z=361$ ，顯示兩者有所差異。當進行衍生反應時，ATR\* 之量在衍生溫度低 ( $60^{\circ}\text{C}$ ) 較溫度高 ( $100^{\circ}\text{C}$ ) 時為高，顯示高溫時有利於 ATR 之生成。而質譜圖兩者差異之特徵離子分別為  $m/z=289$  與  $m/z=361$ ，由表二可看出，當糖苷結構上衍生 3 個 TMS，再由左側與氧鍵結斷裂時，可能產生  $m/a=362$  之離子片段，因此推斷可能因為 ATR 結構造成衍生異構物，多數為 2 個 TMS 衍生之結構，再由右側二帖與氧鍵結斷裂；少數則形成 3 個 TMS 衍生之結構，由左側與氧鍵結斷裂時，造成滯留時間有些許差異，這和 Laurens 等人<sup>[6]</sup>的研究中的 ATR 質譜離子片段推論有所不同，然而他們並未提到此 ATR\* 物質（雖然由文獻層析圖中也可看出有此一物質存在），因此詳細情形仍待研究。



圖五、ATR\* 之質譜圖。

## 結 論

本研究針對植物中之毒性物質 ATR，利用衍生化後，配合氣相質譜儀進行分析，可以有效檢驗出植物中 ATR 含量，並利用質譜圖加以驗證。對於中藥植物中 ATR 含量之監測提供一有效、快速及精確的分析方法。

## 參考文獻

- [1] Ludwig H, Obermann H, Spitteller G: Atractyligenin-ein wesentlicher Bestandteil gerosteter Kaffeebohnen. Chem Ber 1974, 107:2409-2411.
- [2] Obermann H and Spitteller G: Die Strukturen der "Kaffee-Atractyloside". Chem Ber 1976, 109:3450-3461.
- [3] Gaillard Y, Pepin G: Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B 1999, 733:181-229.
- [4] L Yahara S, Higashi T, Iwaki K, Nohara T, Marubayashi N, Ueda I, Kohda H, Goto K, Izumi H, Nuno M, Katsuki S, Isoda S, Satake M: Studies on the constituents of *Atractylodes lancea*. Chem Pharm Bull 1989, 37:2995-3000.
- [5] Obatomi DK and Bach PH: Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside atractyloside. Food Chem Toxicol 1998, 36:335-346.
- [6] Laurens JB, Bekker LC, Steenkamp V, Stewart MJ: Gas chromatographic-mass spectrometric confirmation of atractyloside in a patient poisoned with *Calliilepis laureola*. J Chromatogr B 2001, 765:127-133.

# Quantitative Analysis and Mass-Spectra Explanation for Diterpenoid Glycoside Atractyloside (ATR) in Traditional Chinese Herbs

Liang-Yu Chen<sup>1\*</sup>、Chi-Xiang Chen<sup>2</sup>、Chin-Kuo Lee<sup>3</sup>

1. Department Biotechnology, School of Health Technology, Ming-Chuan University, (Taoyuan, Taiwan, R.O.C.)
2. King-Car Food Industrial Corp., (Chung-Li, Taiwan, R.O.C.)
3. Graduate Institute of Pharmacognosy, College of Pharmacy, Taipei Medical University, (Taipei, Taiwan, R.O.C.)

## Abstract

Today, the ethnopharmacology is popular to treat disease, the herbs were used as considerable medicinal ingredients, but also the case with toxic substances is often due to improper poisoning, such as taking aristolochic acid caused kidney failure. Toxic risk evaluation of these plants in physiology is a very important issue to be facilitated by the reliable analytical method. Atractyloside (ATR) is one of a group of diterpenoid glycosides. The interest for these compounds was stimulated by the high toxicity of both glucosides, responsible of many deadly poisoning in past time. ATR occurs naturally in many *Asteraceae* plants, which are used as herbal medicines in Orient. The dried root of *A. macrocephala* and *A. lancea* are important crude drugs used in herbal medicine. ATR components were acidized and extracted from samples, then after the TMSI and pyridine derivatives for GC-MSD analysis. The ionic fragments in mass spectra were identified for TMS derivatives of ATR. The quantitative results showed that the ATR contents of 8980 ppm and 9230 ppm were detected in *A. macrocephala* and *A. lancea*, respectively. Others, the rare ATR was found in coffee beans for comparing.

Keyword: *Atractylodes macrocephala*, *Atractylodes lancea*, atractyloside, GC/MSD

Corresponding author: Liang-Yu Chen [ loknath@mail.mcu.edu.tw ]

Received 2 March 2011/Accepted 2 April 2011

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.