

濃縮中藥品質管制之研究III

台北醫學院藥學研究所・生藥學科

顏焜熒・楊玲玲

前言

傳統之中國醫藥，日受各國醫療界之矚目，而中藥藥劑之應用也日益普及，爲了確保國民健康及用藥安全，現行之中藥，有待現代科學方法加以分析，並建立一品質標準化之規格。

中藥方劑爲中醫師臨床用於治病之主要藥物，由於工商社會之演變，人們生活形態的不同，昔日的丸、膏、丹、散逐漸被濃縮中藥劑型所取代，尤其近年來政府試辦公、勞保中醫院均限定以濃縮科學中藥爲主，飲片爲輔，七十五年科技顧問會議，衛生署鑑於中藥的成分，品質不均一，會影響中藥之療效及安全性，乃以中藥及方劑品質管制之研究爲未來研究重點之一。七十九年國建會更以中藥爲未來科學重點研究之一，中藥標準方及高品質、安全之中藥製劑更是今後推展全民健保之製藥目標。

然而由於單一藥材之薄層分析如日本藥局方上及藥檢局出版之中藥材檢定法上都有記載可供參考。而處方製劑由於構成藥物之種類繁多，成分之間相互干擾致使分析工作屢遭困難；另作成分鑑別，時常因標準品成分難入手，以致不能作比對及定性、定量，此二工作正困擾著一般中藥製劑之業者及中藥檢驗單位，有鑑於此本委員乃擬將中藥界常用之中藥方劑，配合中醫師臨床常用中藥之調查，以各藥材之主成分爲標準，利用薄層色層分析或高速液相層析(HPLC)法作定性及定量分析。

有鑑於此，中醫藥委員會爲配合國家政令之推動，本年度乃進行濃縮中藥方劑之品質管制。期間發一簡單、快速、經濟之分析法；以爲確保中藥製劑品質均一及有效之依據、參考；並期可解決目前製藥界面臨中藥品管之困難。

本研究分別進行常用中藥材——槐花及葛根，利用高速液相層析法(HPLC)進行含有中藥方劑之品質管制。全文分爲二部份，第一部份爲槐花、除槐花之指標成分 Rutin 加以分離精製外，槐花在臨床上依炮製方法之不同而療效互異，本部分以探討各種不同炮製對其指標成分 Rutin 之變化，以及

常用中藥方劑中 Rutin 之定量。

第二部份爲葛根，除由葛根中單離、精製其指標成分 Puerarin 外，並定量常用含葛根方劑之 Puerarin 量。

Part I

槐 花

Sophorae Flos

(*Sophora japonica* L.)

前 言

槐花爲豆科(Leguminosae)植物槐 (*Sophora japonica* L.) 之乾燥花蕾。主要含有成分flavonoid、saponins、fatty acids等。

槐花收載於神農本草經木部上品，具清熱、涼血、止血，爲治療痔、腸、子宮炎症狀之出血及吐血、鼻血、喘血等症。並且常被用於高血壓、中風、腦溢血、血壓異常亢進及出血症等之預防及治療。槐花生用：清肝明目。炒黃：涼血。炒焦：增加止血效果。炒炭：止血。常含槐花之方劑有槐花湯、槐花散。

本實驗以 Rutin 爲指標成分測定，運用高速液相層析儀 (HPLC) 進行槐花中藥方劑之 Rutin 之定量。

Summary

A method for the determination of rutin in Sophorae Flos containing Chinese medicinal prescriptions were established by using high-performance liquid chromatography

實驗材料及方法

1. 中藥材

(1). 槐花

槐花爲豆科 (Leguminosae) 植物槐樹 (*Sophora japonica* L.) 之乾燥花蕾，由台北市生藥市場購入 3 公斤，揀去花梗及雜質後，淨重 2.91 公斤；供下列檢體之調製用。

(2). 青皮

爲芸香科 (Rutaceae) 植物福橘 (*Citrus tangerina* Hort.) 之未成熟果皮。

(3). 荊芥穗

爲唇形科 (Labiatae) 植物荊芥 (*Schizonepeta tenuifolia* Briquet) 之花穗。

(4). 蒲黃

爲香蒲科 (Typhaceae) 植物長苞香蒲 (*Typha angustata* Bory et Chaub) 的花粉。

(5). 薑

爲薑科 (Zingiberaceae) 植物薑 (*Zingiber officinale* Roscoe) 的乾燥根莖。

(6). 中藥方劑之調劑

Rx: 槐花湯 (出典: 張潔古方)

Rx: 槐花散 (出典: 證治準繩方)

槐花	13g
青皮	13g
荊芥穗	13g

槐花	26g
蒲黃	13g
薑	0.26g

(7). 藥材之抽取製備

依處方比例稱取藥材，以十倍量的水煮沸，加熱迴流一小時，趁熱過濾，抽取兩次，合併濾液，減壓濃縮，經冷凍乾燥後，經稱其量，存放於低溫冰櫃中保存備用。

2. 芸香甘標準品標準品之抽取，分離與精製

(1). 抽取與分離

槐花經粉碎，以十倍量甲醇，於 40℃ 水浴上迴流抽取兩次，趁熱過濾，合併濾液，於減壓下濃縮至十分之一體積量，經 Sephadex LH-20 柱狀層析，以甲醇為移動相，沖洗流析，可得 R-I 粗結晶。

(2). 精製

R-I 粗結晶經水再結晶除去雜質後，再溶於甲醇中，經由製備級 HPLC (Shimadzu LC-8A) 純化精製，即得純化物 (R-I)。

(如 Chart 1)

(3). Rutin 準品製備級 HPLC 精製之條件

Apparatus : Shimadzu LC-8A

Column : Shim-pack prep-ODS (20 mm id x 25 cm)

Detector : Shimadzu SPD-6AV UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC

DETECTOR (λ : 255 nm) 15 min

Mobile phase : 90% MeOH / H₂O = 50/50 —————> 80/20

Flow rate : 15 ml/min

Temperature : Room temperature

R-I

黃綠色針狀結晶。

(a) m.p: 190~192℃

(b) FAB-MS(m/z): 609(M⁻¹)

(c) IR ν max cm⁻¹ (KBr):

3500~3000 (Broad -OH)

2937 (Saturated -CH)

1653 (C=O)

1598 (C-O)

(d) H-NMR (300 MHz, MeOH-d₄, δ)

1.10(3H,d,J=6.0Hz,Rha H-6)

3.22~3.79(11H,m,Glu,Rha 11H)

4.49(d,J=2.3 Hz)

4.56(s)

5.07(1H,J=7.3 Hz)

6.19(1H,d,J=2.4 Hz,H-6)

6.37(1H,d,J=2.4 Hz,H-8)

6.86(1H,d,J=8.4 Hz,H-5')

7.62(2H,m,H-2',6')

槐花 (Sophora japonica L.)
 | extd. $\bar{c}$ MeOH 2x
 |
 MeOH ext.
 MeOH | Sephadex LH 20 column
 ↓ (repeated)
 Rutin crude crystal
 H₂O | recrystallization
 ↓
 90% MeOH / H₂O | preparative HPLC
 15min | ODS column
 ≈50/50 → 80/20 ↓
 Rutin

Chart 1 : Rutin標準品之製備

3. 藥材之炮製

(1). 遵古炮製法

本檢體係遵照一般傳統炮製方法，製成下列四種炮製品：

- (a) 炒黃：槐花花蕾 100 公克，以文火炒 3 分鐘，並不停攪拌至檢體表面呈黃色均勻為度。
- (b) 炒焦：槐花花蕾 100 公克，以文火炒 6 分鐘，並不停攪拌至檢體表面呈微焦均勻為度。
- (c) 炒炭：槐花花蕾 100 公克，以文火炒 15分鐘，並不停攪拌，使傳熱均勻，炒至檢體表面全黑為止。（* 注意取出撥開，內部仍呈黃色）
- (d) 醋製：槐花花蕾 100 公克，噴以 3 % 醋酸 17 毫升，攪拌均勻，以文火炒至乾燥為止。

4. 濃縮製劑之製備

精稱各檢體，經銅臼粉碎後，過40號篩，加10倍量的水煮沸，加熱迴流一小時，趁熱過濾，抽取兩次，合併濾液，減壓濃縮，經冷凍乾燥後，精稱其量，存放於-20℃冰櫃中保存備用

5. 水份含量之測定

經粉碎過 40 號篩之檢體，在配製檢測溶液前，同時精稱適量檢體，利用 KARL-FISCHER 水份測定儀，測定水含量。

6. HPLC 製備與分析定量之條件

Rutin 成分之定量分析

(1). 標準品溶液之配製

精稱芸香苷於 25°C BUCHI TO-50 真空乾燥機，減壓乾燥 24 小時後。精稱 5.0 mg 於 10 ml 之定量瓶中，以甲醇稀釋至定容，成為 0.5 mg/ml 之儲備溶液，再稀釋成 0.1，0.05，0.025，0.005，及 0.001 mg/ml 五種不同之溶度，各以 10 μ l (n = 6) 定量注入 HPLC 分析，結果以 peak area 和濃度關係之線性迴歸方程式，製作標準檢量線。

(2). 試料溶液之調製

槐花花蕾用銅臼粉碎，經乾燥除去水分後，並經 40 號篩。傳統與改良式炮製品均以同法處理。

精稱各檢體粉末 5.0 mg，加甲醇溶液至 25 ml，於超音波振盪 30 分鐘抽取。經離心機 (4000 r.p.m.，10 分鐘) 離心後，再經 0.45 μ m millipore filter 過濾，濾液於定量瓶正確加至 25 ml 即為試料溶液。

(3). Rutin 標準品之分析定量條件

Apparatus : Shimadzu LC-9A

Column : Lichrosort RP-18 (5 μ m , 4 x 250 mm)

Detector : Shimadzu SPD-6AV UV-VIS SPECTROPHOTOMETRIC
DETECTOR (λ : 255 nm)

Mobile phase : CH₃ CN : H₂O (0.06% H₃PO₄) 18.4 : 81.6

Flow rate : 15 ml/min

Temperature : Room temperature

(4). Rutin 之定量

$$\text{試料中芸香苷之含量 \%} = \frac{W_s}{W_t} \times \frac{H_t}{H_s} \times 100$$

Wt : 試料之稱取量 (mg)

Ws : 芸香苷標準品之稱取量 (mg)

Ht : 試料溶液芸香苷之 peak area

Hs : 標準品溶液芸香苷之 peak area

(5). Rutin 標準檢量線之製作

Rutin 標準品溶液 0.1，0.05，0.025，0.005 及 0.001 mg/ml 五種不同濃度，以 10 μ l 定量注入 HPLC 中，根據 peak area 和濃度關係之迴歸方程式製成標準檢量線。

Table-1 : 芸香甘濃度與 HPLC 所檢測 peak area 之關係

Concentration (mg/ml)	peak area	mean $\pm$ sd	cv(%)
0.001	11262	11704.8 $\pm$ 649.4	5.549
	12557		
	12325		
	10656		
	11963		
	11466		
0.005	61286	64984.7 $\pm$ 2472.9	3.805
	64590		
	65123		
	62917		
	68457		
	67535		
0.025	328370	334978.5 $\pm$ 13080.2	3.905
	320759		
	320438		
	355051		
	337658		
	347595		
0.05	639196	646520.5 $\pm$ 18034.8	2.790
	631146		
	624394		
	667414		
	673470		
	643503		
0.1	1264936	1345449.5 $\pm$ 59587.9	4.429
	1268788		
	1367003		
	1352288		
	1401443		
	1418239		

$$Y = 1.34222 \times 10^7 X - 5.1558 \times 10^3 \quad (r^2 = 0.9996)$$

STANDARD CURVE OF RUTIN

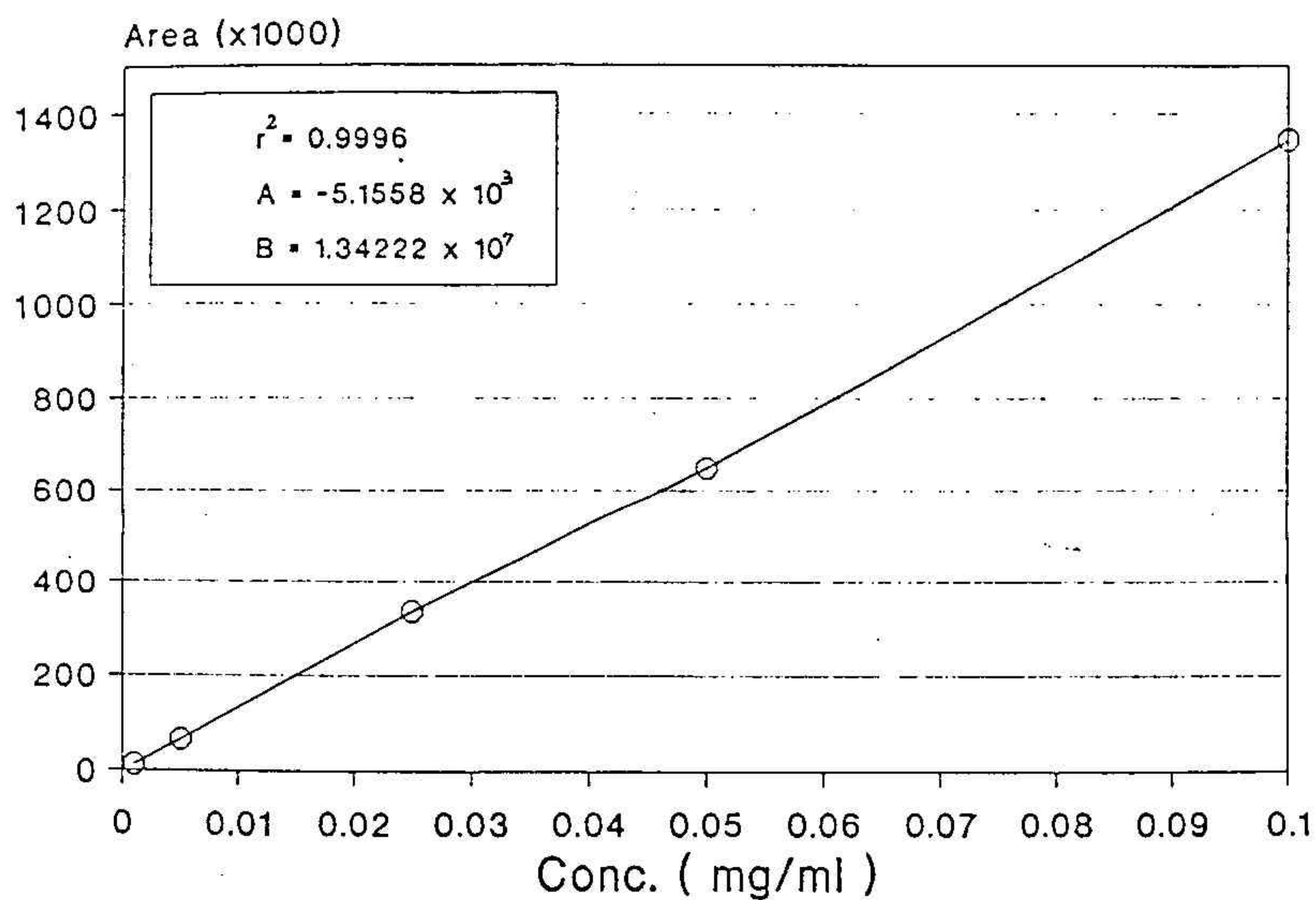


Fig-1 : Rutin 之標準檢量線

7、精確性試驗

1.日間精確性試驗

芸香苷標準品不同的三種濃度 0.05, 0.005, 及 0.001 mg/ml 於不同日, 以 10 μ l 定量注入 HPLC 中 (n = 5), 比照標準檢量線之標定方式, 操作五次, 得五次數據, 計算每一個濃度的數據平均值, 標準偏差, 以及分散係數。

2.日內精確性試驗

芸香苷標準品不同的三種濃度 0.05, 0.005, 及 0.001 mg/ml 於同一日不同時間, 以 10 μ l 定量注入 HPLC 中, 比照標準檢量線之標定方式, 三種不同濃度各有六次定量分析, 計算每一個濃度的六個數據之平均值, 標準偏差, 以及分散係數。

結果與討論

1. 分析方法

- (1) 高效液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography , HPLC) 爲目前被廣泛使用的一種精確優良的分析方法，它的操作簡便，分離效果良好，再現性佳，且定量準確，因此本實驗採用 HPLC 進行分析定量芸香苷在槐花炮製過程中的含量變化。(Fig.2-7)
- (2) 檢測方式則採用目前檢測類黃酮類 (Flavonoid) 最普遍使用靈敏度佳，且穩定性良好，可測紫外光 (Ultraviolet) 吸收光譜的 UV 檢測器。先利用 UV 掃描器找出芸香苷在 UV 各波長的最大吸收，決定使用波長 259 nm 爲檢測波長。
- (3) 爲確保定量的準確性，本實驗同時採用目前新發展的 Photodiode Array UV-VIS 檢測器，利用預先記憶的芸香苷光譜圖 (Spectrum) 和欲檢測的層析圖之 peak 比對，作相似性試驗 (Similarity test) 以確定純度。(Fig.8-13)

2. 標準品之純度

根據薄層層析法(TLC)及高效液相層析法(HPLC)配合Photodiode Array UV-VIS檢測器，確定芸香苷標準品之純度。

(a) TLC

Sample: rutin(dissolved in LC grade MeOH)

Plate: Silica gel 60 F254

Mobile phase: EtOAc : Formic acid : Glacial acetic acid
: H₂O = 100 : 11 : 11 : 27

UV: 254nm

在層析片(plate)上僅呈現一點。(R_f= 0.52)

(b) HPLC

Sample: rutin(dissolved in LC grade MeOH)

Apparatus: Shimadzu LC-9A

Column: Lichrosort RP-18 (5μm, 4×250nm)

Detector: SPD-M6A PHOTODIODE ARRAY UV-VIS DETECTOR.

Mobile phase: CH₃CN:H₂O(0.06% H₃PO₄)=18.4:81.6

Flow rate: 1ml/min

Temperature: Room temperature

在層析層上爲單純一peak，並利用Photodiode Array UV-VIS檢測器，做此 peak之純度(Purity test)確定純度。

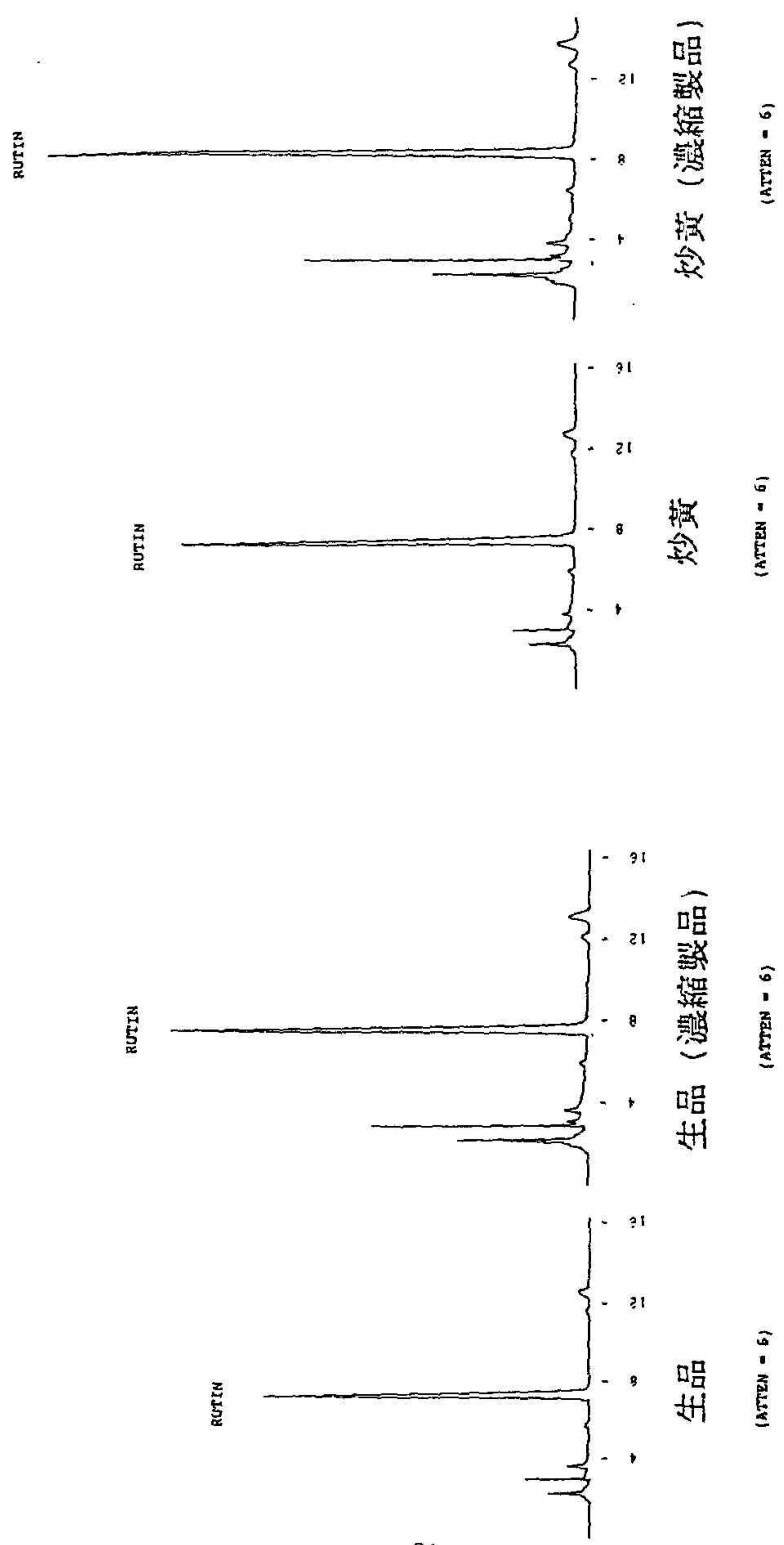


Fig-2, : 槐花生品之層析圖 (一)

Fig-3, : 炒黃槐花之層析圖

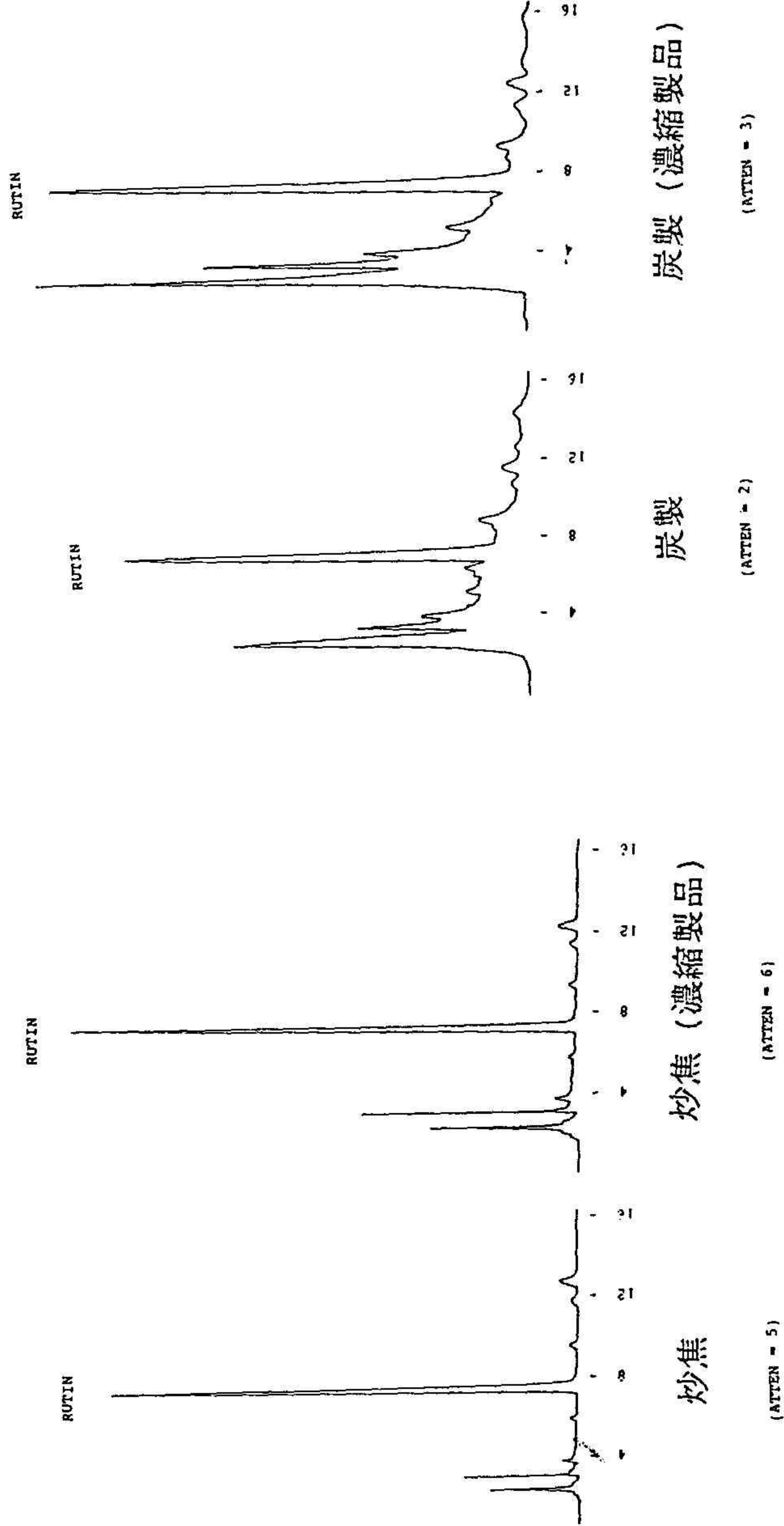


Fig-4' : 炒焦槐花之層析圖

Fig-5 : 炒炭槐花之層析圖

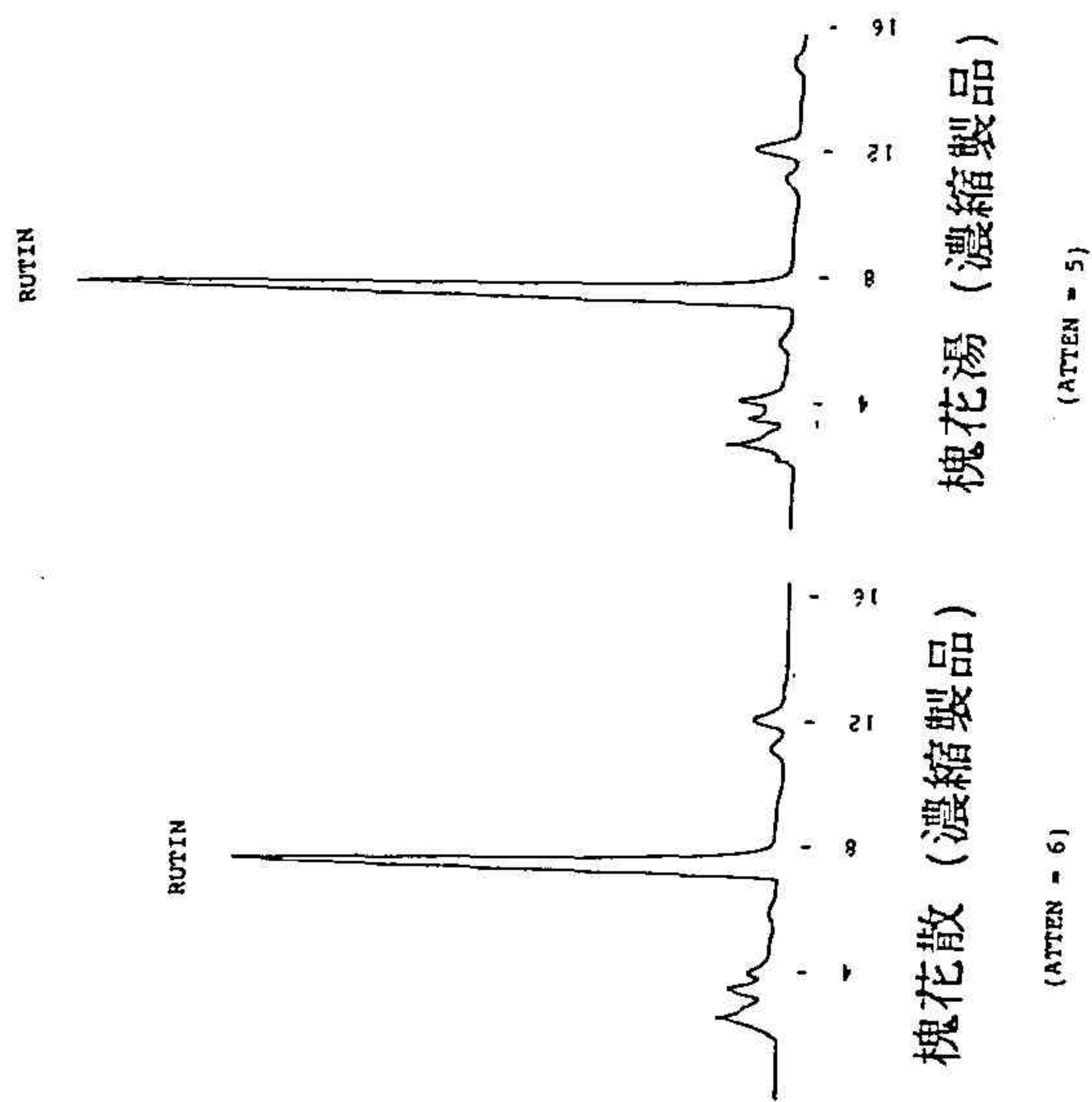
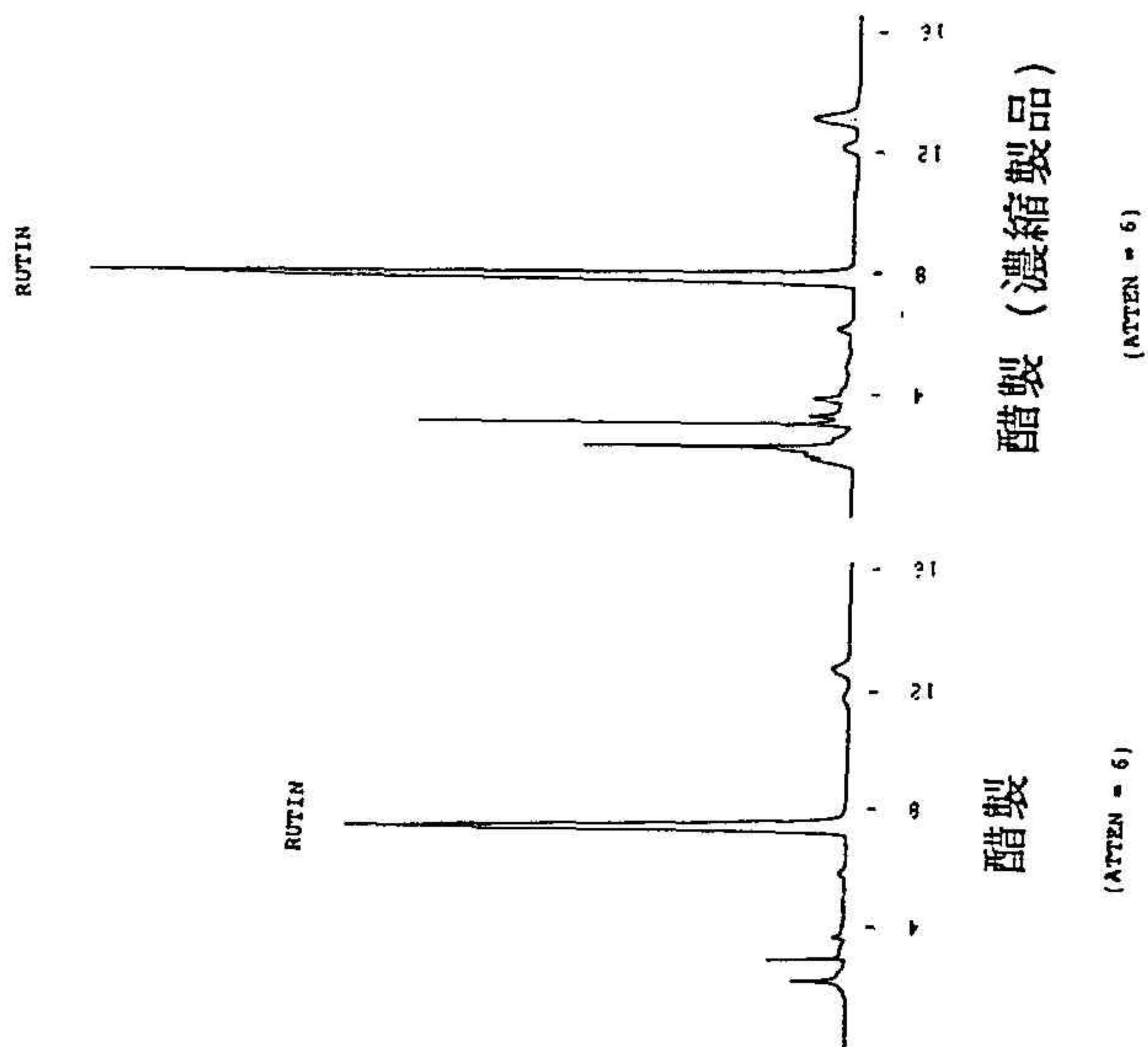


Fig-6 : 醋製槐花之層析圖

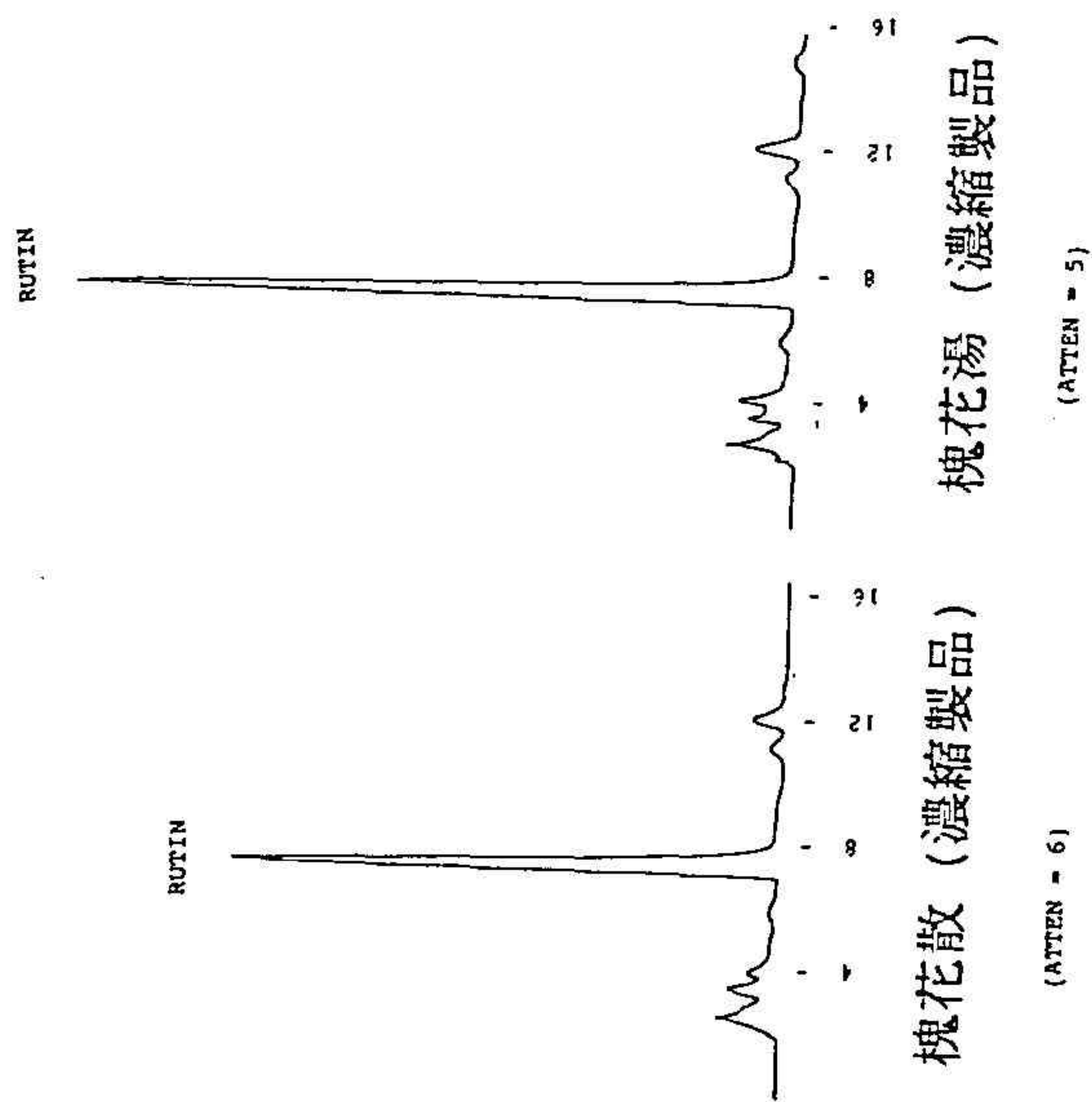
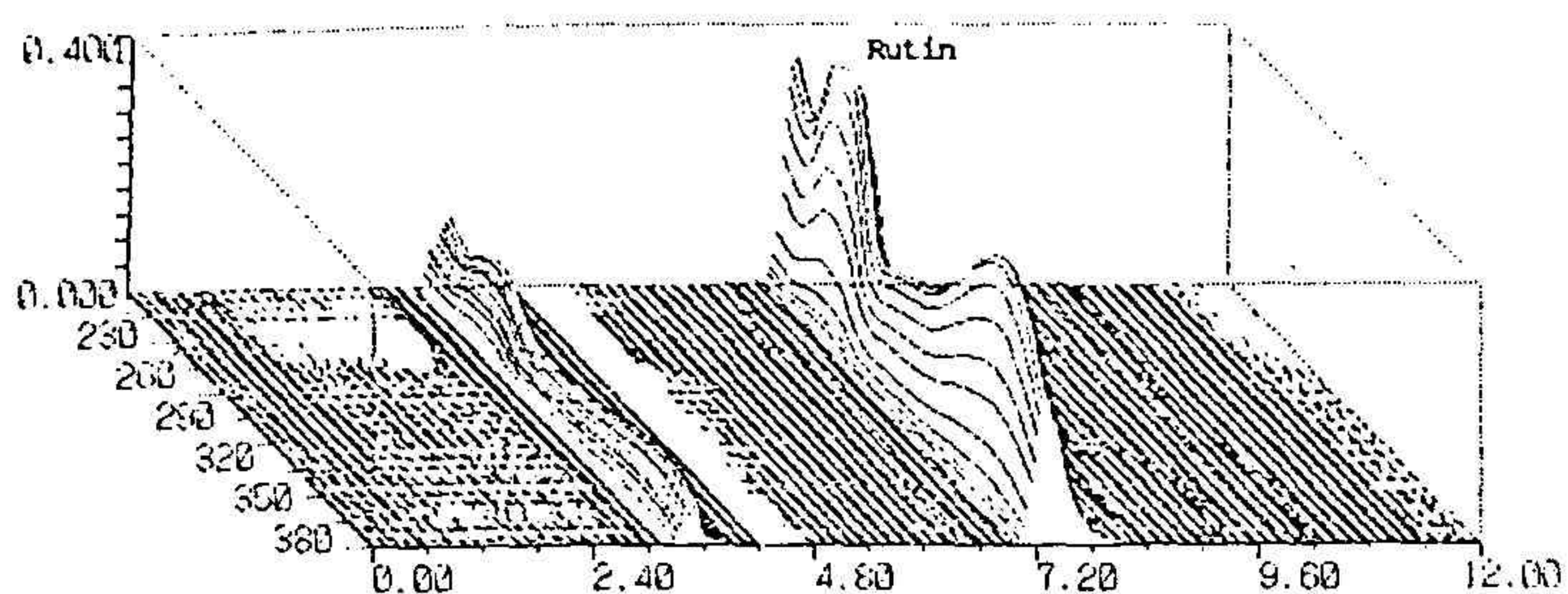


Fig-7 : 槐花湯及槐花散之層析圖 (一)

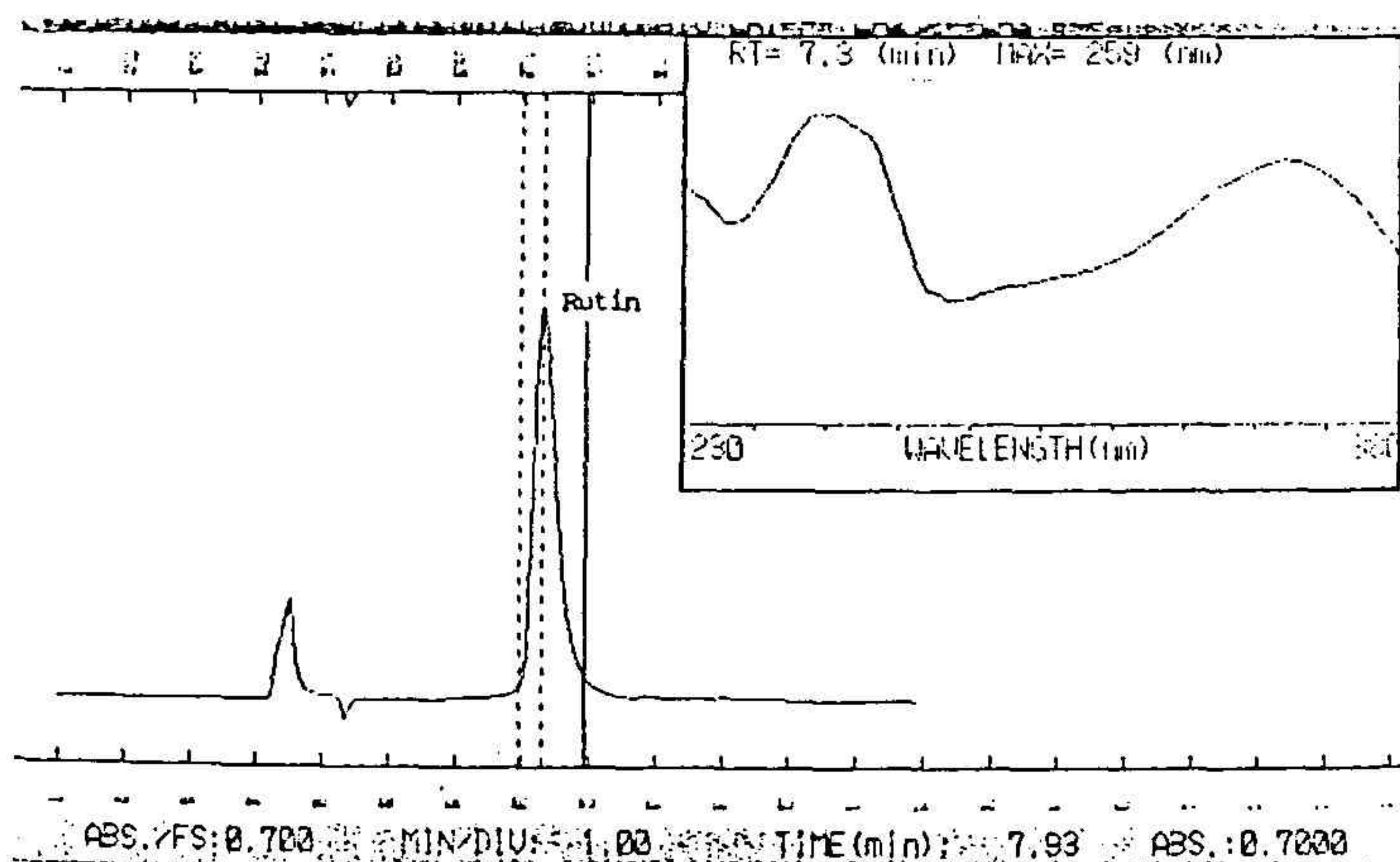
FILE NAME: 062414



WAVELENGTH (nm) : 230.00 TIME (min) : 0.00 POSITION ---

Rutin 之三度空間層析圖

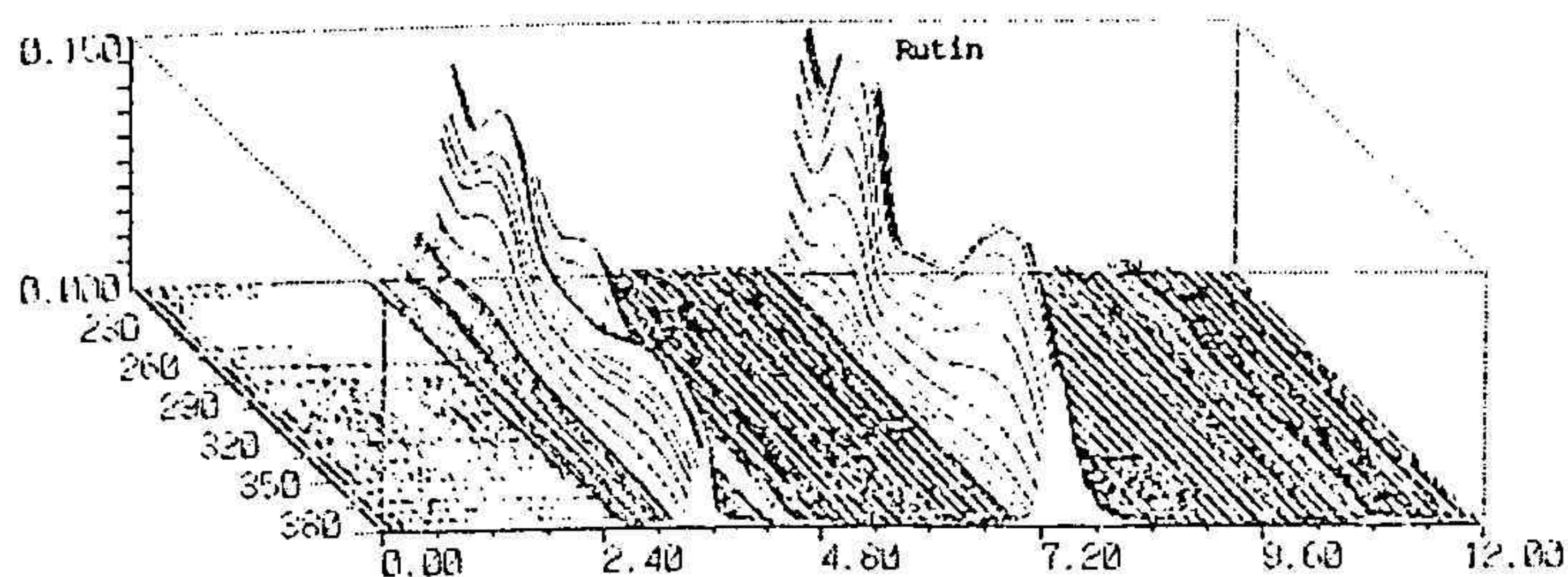
fig-8 : Rutin 之三度空間層析圖



Rutin 之層析圖

Fig-9 : Rutin 之層析圖

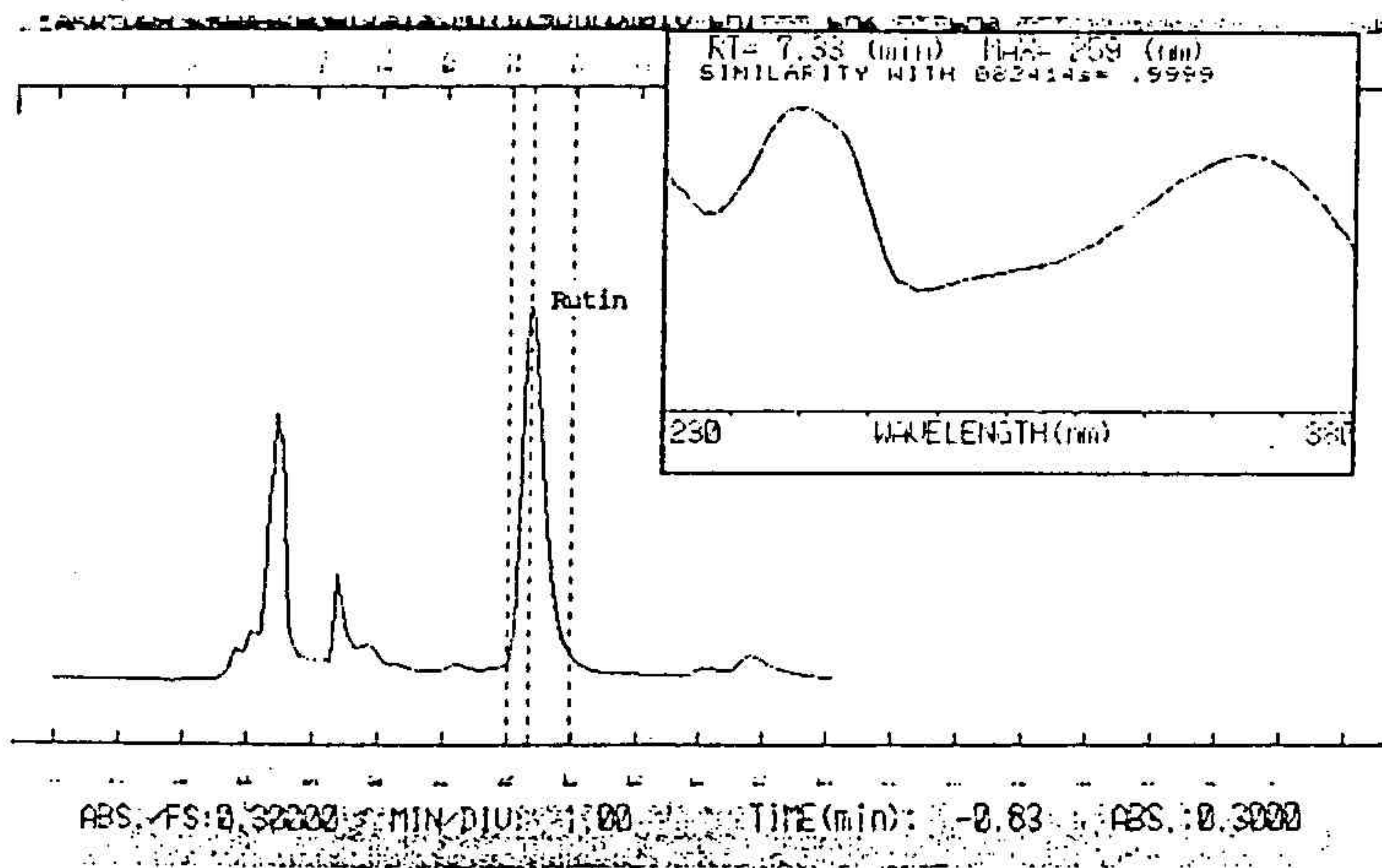
FILE NAME: 082411



WAVELENGTH (nm): 230.00 TIME (min): 0.00 POSITION ---

槐花之三度空間層析圖

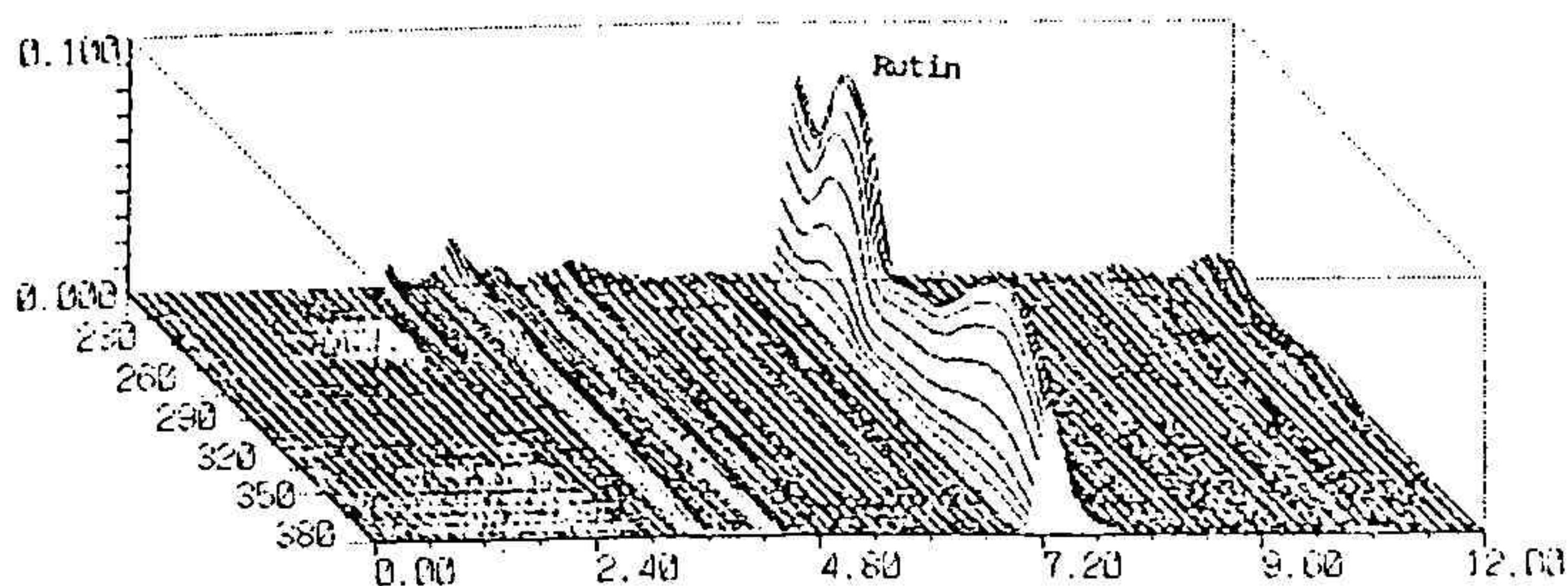
Fig-10 : 槐花之三度空間層析圖



槐花之層析圖

Fig-11 : 槐花之層析圖 (二)

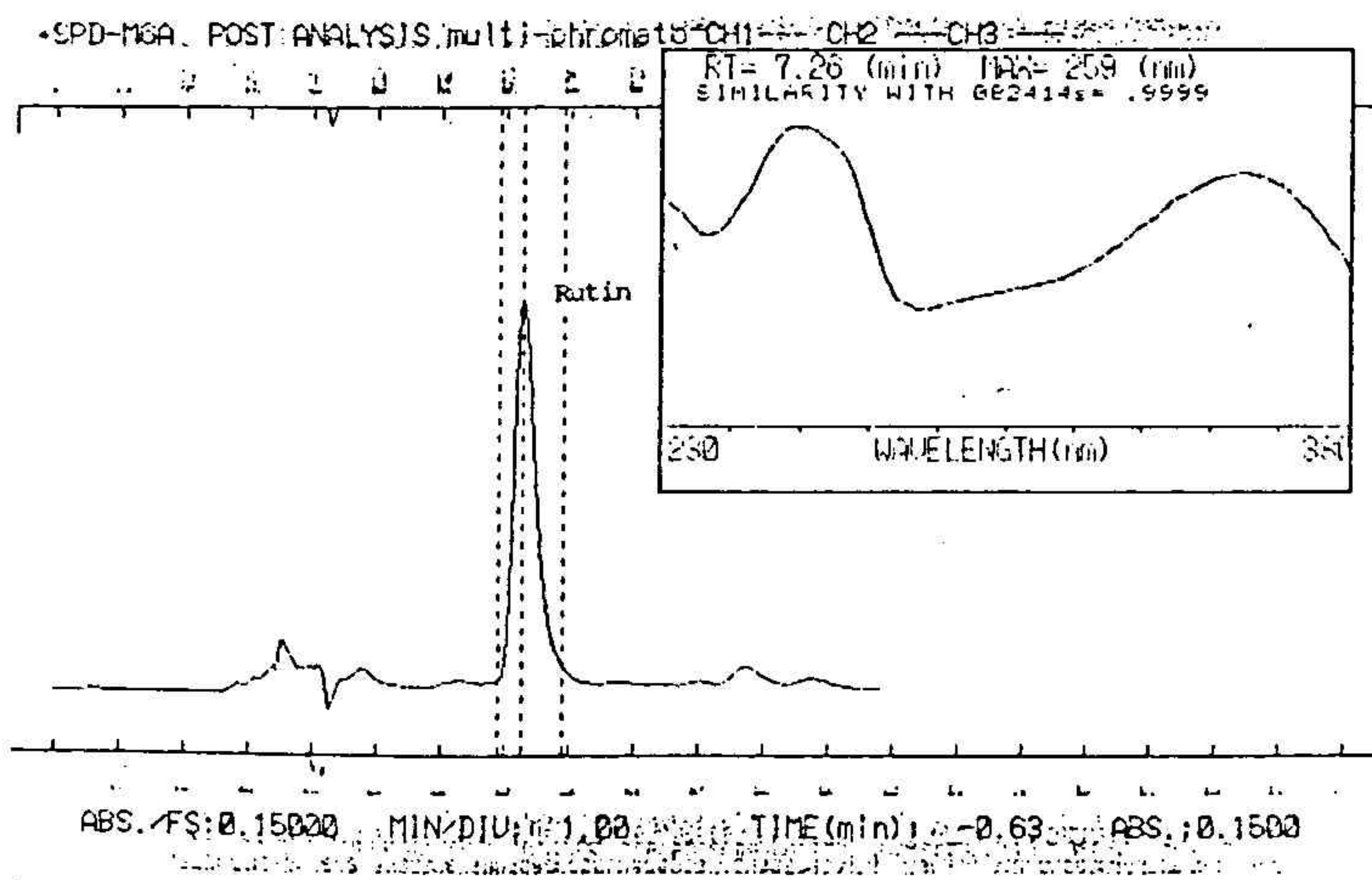
FILE NAME: 082407



WAVE POSITION --- TIME (min): 0.00 WAVELENGTH (nm): 259.00

槐花湯之三度空間層析圖

Fig-12 : 槐花湯之三度空間層析圖



槐花湯之層析圖

Fig-13 : 槐花湯之層析圖 (二)

3. 抽出溶媒

抽出溶媒則分別用不同溶媒抽提，將槐花花蕾以銅白粉碎過 40 號篩，精稱 5.0 mg，分別以不同溶媒加至 25 ml，於超音波振盪 20 分鐘抽取。經離心機（4000 r.p.m.，10 分鐘）離心後，再經 0.45 μ m millipore filter 過濾，濾液於定量瓶正確加至 25 ml 即為檢測溶液，取此溶液，各以 10 μ l（ $n = 3$ ）定量注入 HPLC 分析結果。將抽出率加以比較（如 Table 2. 所示），結果以甲醇抽取率最高，因此本研究之定量抽出均用甲醇為抽出溶媒。 Fig-14

Table-2：不同溶媒對槐花中芸香苷抽出率之比較

Solvent	Area	n	Ratio (max. 100) %
H ₂ O	15385.0	3	2.8
50% MeOH	416111.6	3	75.7
MeOH	549830.3	3	100.0
50% EtOH	389829.6	3	70.9
EtOH	249073.3	3	45.3
Acetone	55533.0	3	10.1

4. 分析定量法之精確性探討

定量精確性之探討以不同日（Interday）及同日不同時（Intraday）的芸香苷標準品溶液進行定量分析，為評估分析定量方法的精確性。Table 3. 及 Table 4. 之結果發現不同日的三種不同濃度之分散係數（C.V.）分別是 8.135%，3.285%，2.702%，在同日不同時的三種不同濃度之分散係數分別是 3.936%，3.503%，及 2.113%，分散係數皆小於 10% 以下，因此具有良好之精確性。

Fig-14 : 不同溶媒對槐花生品之Rutin抽取率之比較

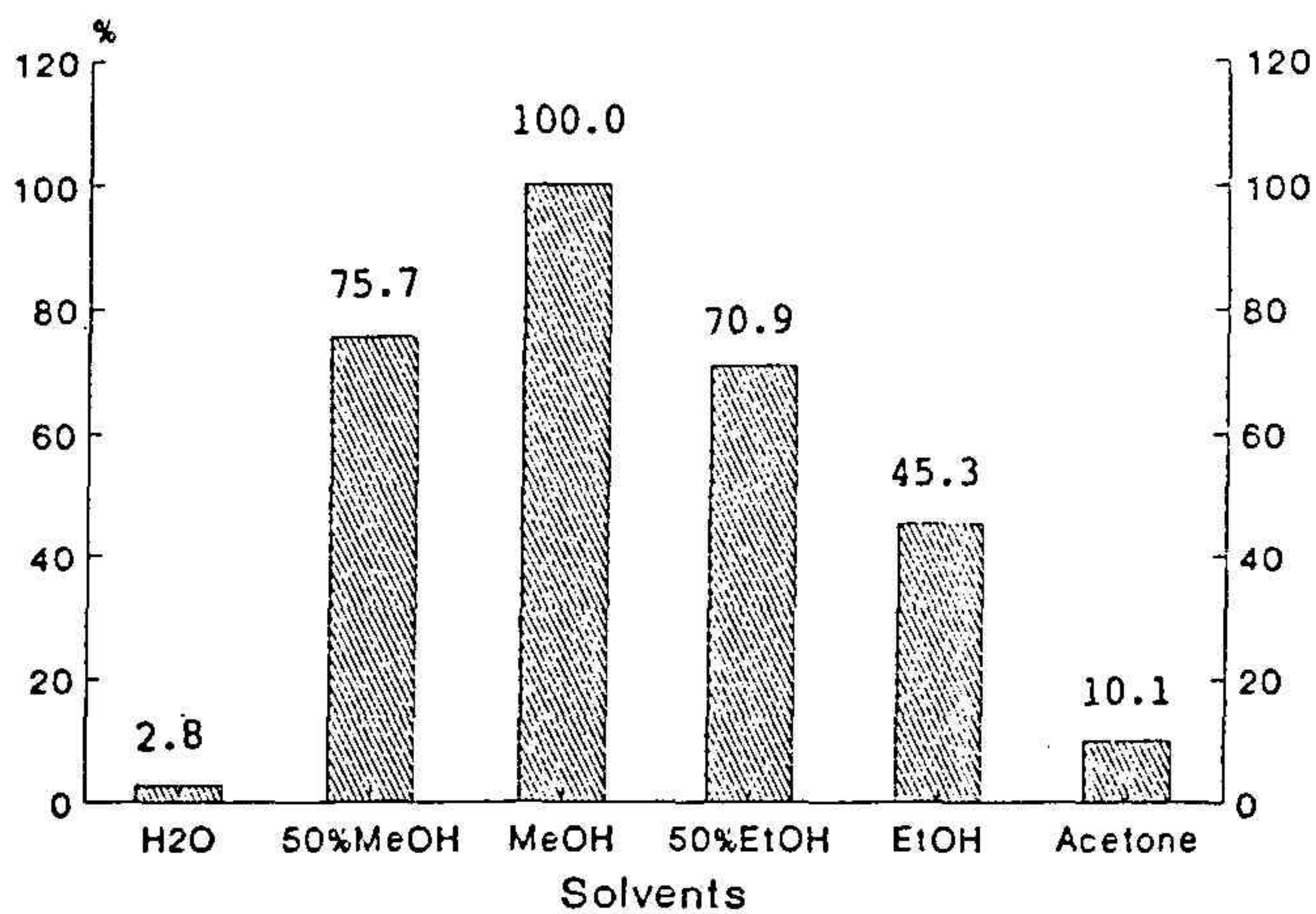


Table-3 : Interday precision test for rutin

Conc. (mg/ml)	Area	Mean $\pm$ sd	CV (%)
0.001	9919	11150.0 $\pm$ 907.1	8.135
	11232		
	10352		
	12296		
	11951		
0.005	61479	61496.4 $\pm$ 2020.1	3.285
	61303		
	60546		
	59012		
	65142		
0.05	629433	643049.2 $\pm$ 17372.8	2.702
	671501		
	654755		
	626249		
	633308		

Table-4 : Intraday precision test for rutin

Conc. (mg/ml)	Area	Mean $\pm$ sd	CV (%)
0.001	11535	11501.4 $\pm$ 452.7	3.936
	11911		
	12076		
	10930		
	11055		
0.005	59997	63454.0 $\pm$ 2222.5	3.503
	61835		
	66002		
	64250		
	65186		
0.05	625229	616707.2 $\pm$ 13033.5	2.113
	604634		
	599984		
	635382		
	618307		

6. 濃縮製劑之產率

臨床醫師用藥，由於社會之變遷，同時為配合全民健康保險之推動，濃縮中藥製劑已為調劑藥。本研究各炮製檢體之抽取率

Table-5 傳統炮製法之產率

檢體	炮製前淨重 (g)	炮製後淨重 (g)	產率 (%)
炒黃	100.0	92.8	92.8
炒黃	100.0	81.6	81.6
炒黃	100.0	71.8	71.8
醋製	100.0	89.6	89.6

Table-6 : 槐花炮製檢體熱水抽提產率

檢體	炮製前淨重 (g)	炮製後淨重 (g)	產率 (%)
生品	50.0	21.61	43.22
炒黃	50.0	18.90	37.80
炒焦	50.0	19.86	39.72
炒炭	50.0	12.73	25.46
醋製	50.0	21.16	42.32

7. 水份含量之檢測

各檢體由於製備過程均易吸少部份之水份，因此欲進行含量測定，應先進行水份含量之檢測，方能進行正確的定量，其定量法採用 Karl-Fischer 水份測定儀，其結果如表 Table -7: 及 Table :8: 所示。

Table-7 : 槐花炮製檢體水份含量

檢體	水份含量 (%)			平均值	±	標準偏差	分散係數 (%)
生品	8.5064	7.8374	7.9573	8.0992	±	0.2918	3.6028
炒黃	7.9829	8.0109	8.3253	8.1064	±	0.1552	1.9145
炒焦	9.0112	9.5476	9.1151	9.2246	±	0.2323	2.5183
炒炭	8.9273	9.1166	8.9334	8.9924	±	0.0878	0.9764
醋製	6.9218	6.7325	6.5935	6.7493	±	0.1346	1.9943

Table-8 : 槐花濃縮製品水份含量

檢體	水份含量 (%)			平均值	± 標準偏差	分散係數(%)
生品	5.8309	6.2767	6.3538	6.1538	± 0.2305	3.7457
炒黃	5.3974	5.4613	5.8218	5.5602	± 0.1868	3.3596
炒焦	6.2999	6.4897	6.6931	6.4942	± 0.1606	2.4729
炒炭	4.5304	4.5352	4.6212	4.5623	± 0.0047	0.9140
醋製	6.2584	6.2760	6.1987	6.2444	± 0.0331	0.5301

8. 芸香苷之含量測定

(1) 槐花及其炮製品依檢測溶液之調製，配製成 0.2 mg/ml，利用微量注射器，以 10 μ l 定量注入 HPLC 中，根據結果計算平均值、標準偏差及分散係數。若檢測結果低於檢量線檢測濃度，則檢測溶液之濃度調整為 0.4 mg/ml。結果如 Table 9 及 Table 10 所示。
根據結果發現分散係數皆低於 10%，而且大都在 5% 以下。

Table-9 : 槐花炮製檢體芸香苷含量

檢體	面積					平均值	± 標準偏差	分散係數(%)
生品	586096	548669	521182	570012	554465	556084.8	± 21773.7	3.92
炒黃	613045	590664	592270	616259	621465	608140.6	± 11416.0	1.88
炒焦	520260	542452	488403	538913	509366	519878.8	± 19865.8	3.82
炒炭	9735	8346	7685	8544	8073	8476.6	± 692.1	8.16
醋製	558718	587254	613931	573882	639177	594592.4	± 28745.5	4.83

Table-10 : 槐花炮製濃縮製品芸香苷含量測定

檢體	面積					平均值	± 標準偏差	分散係數(%)
生品	882863	898180	885842	903243	911576	896340.8	± 10723.9	1.20
炒黃	1070317	1130475	1049132	1049555	977850	1055465.0	± 48879.9	4.63
炒焦	723736	759219	801542	779219	733648	759472.8	± 28649.0	3.77
炒炭	105704	104464	107057	103887	95366	103295.6	± 4112.0	3.98
醋製	803546	813827	863022	826531	785420	818469.2	± 26024.8	3.18

(2) 根據所計算出的 peak area 平均值，配合標準檢量線計算出每個檢體中芸香苷的含量（即含量 A），再利用原先測出各檢體的水份含量，計算各檢體在水份扣除情況下，芸香苷的實際含量（即含量 B），結果如 Table 11 及 Table 12 所示。其中：

$$(a) \text{ 含量 A (含水份槐花檢體之芸香苷含量)}$$

$$\text{平均面積換算所得之濃度 (mg/ml)}$$

$$= \frac{\quad}{\text{檢體溶液之濃度 (0.2 mg/ml)}} \times 100\%$$

$$(b) \text{ 含量 B (扣除水份槐花檢體之芸香苷含量)}$$

$$\text{含量 A}$$

$$= \frac{\quad}{(1 - \text{水份含量百分比})}$$

Table-11：槐花炮製檢體中芸香苷之含量

檢體	平均面積	含量 A (%)	1-水份含量百分比	含量 B (%)
生品	556084.8	20.19	0.9190	22.75
炒黃	608140.6	22.85	0.9189	24.86
炒焦	519878.8	19.56	0.9078	21.55
炒炭	8476.6	0.51	0.9101	0.56
醋製	594592.4	22.35	0.9325	23.96

Table-12 槐花濃縮製品中芸香苷之含量

檢體	平均面積	含量 A (%)	1-水份含量百分比	含量 B (%)
生品	866340.8	33.59	0.9385	35.79
炒黃	1055465.0	39.51	0.9444	41.84
炒焦	759472.8	28.49	0.9351	30.46
炒炭	103295.6	4.04	0.9544	4.23
醋製	818469.2	30.68	0.9376	32.72

9. 槐花相關方劑之檢測

利用 HPLC 配合 Photodiode array 檢測器，並由相似性測試結果，槐花湯及槐花散經檢測其濃縮製品中芸香苷之含量，由 Table 13發現槐花湯為 27.44 %，而槐花散為 35.69 %。此項結果與原處方中槐花各佔1/3 及 2/3 之比例不同，可能是芸香苷於熱水之抽取程度不同所致。

Table-13 : 槐花方劑濃縮製品中芸香苷之含量

檢體	平均面積	含量 A (%)	1-水份含量百分比	含量 B (%)
槐花湯	674477.8	25.32	0.9216	27.44
槐花散	873127.4	32.72	0.9167	35.69

Part II

葛 根

Puerariae Radix

(*Pueraria lobata* Ohwi.)

前言

葛根爲豆科植物 *Pueraria lobata* Ohwi. 除去周皮之根，主要含有澱粉 10~14%，isoflavonoid-daidzin，daidzein，puerarin，puerarin-7-xyloside等¹ 及Kokonein puerarol，芳香族配醣體 pueroside A、B。

葛根爲中藥中有名之解熱，鎮痛，消炎，生津止瀉藥材，於『神農本草經』中列爲草部中品。臨床上用於發熱惡寒、頭痛感冒、扁桃腺炎等初期症及蕁麻疹 (Urticaria)、化膿性疾症、蓄膿症、肩胛痠痛等初期症狀最常用之中藥處方——『葛根湯』中之主藥。其他常用含葛根之方劑有『葛根黃連黃芩湯』、『升麻葛根湯』、『葛根湯』、『葛根黃芩湯』、『葛根解肌湯』、『柴葛解肌湯』。

葛根之抗 choline 作用物質爲 daidzein、daidzin² 及 puerarin³，本報告特以 puerarin 爲指標成分測定，運用高速液相層析法 (HPLC) 進行葛根中藥方劑之 puerarin 之定量。

Summary

A method for the determination of puerarin in *Puerariae Radix* containing Chinese medicinal prescriptions were established by using high-performance liquid chromatography

實驗材料及方法

一、中藥材料

Name	Original Scitific Name	Name
升麻	<i>Cimicifuga dahurica</i> Maximowicz	Ranunculaceae 毛茛科
葛根	<i>Pueraria lobata</i> Ohwi	Leguminosae 豆科
山梔	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	Rubiaceae 茜草科
白芍	<i>Paeonia lactiflora</i> Pallas	Paeoniaceae 牡丹科
柴胡	<i>Bupleurum chinense</i> De Candolle	Umbelliferae 繖形科
黃芩	<i>Scutellaria baicalensis</i> Gerorgi	Labiatae 唇形科
黃連	<i>Coptis chinensis</i> Franch.	Ranunculaceae 毛茛科
木通	<i>Clematis armandi</i> Franch.	Ranunculaceae 毛茛科
麻黃	<i>Ephedra sinica</i> Stapf	Ephedraceae 麻黃科
桂枝	<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	Lauraceae 樟科
生薑	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae 薑科
大棗	<i>Zizyphus jujuba</i> Miller	Rhamnaceae 鼠李科
羌活	<i>Notopterygium incisum</i> Ting	Umbelliferae 繖形科
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> A. De Candolle	Campanulaceae 桔梗科
白芷	<i>Angelica dahurica</i> (Fisch.) Benth. et. Hook.	Umbelliferae 繖形科
(炙)甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisher	Leguminosae 豆科
五味子	<i>Schisandra chinensis</i> Baillon	Schisandraceae 松藤科

試藥： MeOH

50% MeOH

70% MeOH

75% MeOH

H₂O

Acetonitrile

裝置： Shimadzu LC-9A

SPD-M6A Photodiode Array UV-VIS Detector

SPD-M6A UV-VIS Spectrophotometric Detector

C-R6A Chromatopac

Acer 910 Computer

減壓濃縮機(Buchi Rotavapor)

超音波振盪器(Branson 3200)

Ultraviolet Light

離心機(Eppendorf Centrifuge 5415C)

電動天平(Libor Aeu-210)

水浴鍋(Yamato Water Bath BS-20)

二. 含葛根處方之調劑：

下列處方依醫方集解中之出典，調劑一日之劑量。

處方一、『升麻葛根湯』（出典：醫宗金鑑）

中藥名	用量(錢)	生藥名(拉丁名)
升麻	1.00	Cimicifugae Rhizoma
葛根	1.00	Puerariae Radix
山梔	1.00	Gardeniae Fructus
白芍	1.00	Paeoniae Radix
柴胡	1.00	Bupleuri Radix
黃芩	1.00	Scutellariae Radix
黃連	0.50	Coptidis Rhizoma
木通	0.50	Hocquartiae Caulis
炙甘草	0.50	Glycyrrhizae Radix

處方二、『葛根黃連黃芩湯』（出典：傷寒論方）

中藥名	用量(錢)	生藥名(拉丁名)
葛根	8.00	Puerariae Radix
黃芩	3.00	Scutellariae Radix
黃連	3.00	Coptidis Rhizoma
炙甘草	2.00	Glycyrrhizae Radix

處方三、『葛根湯』（出典：傷寒金匱方）

中藥名	用量(錢)	生藥名(拉丁名)
葛根	4.00	Puerariae Radix
白芍	2.00	Paeoniae Radix
炙甘草	2.00	Glycyrrhizae Radix
麻黃	3.00	Ephedrae Herba
桂枝	2.00	Cinnamoni Ramulus
生薑	3.00	Zingiberis Rhizoma
大棗	12枚	Zizyphi Fructus

處方四、『葛根黃芩湯』（出典：証治準繩方）

中藥名	用量(錢)	生藥名(拉丁名)
葛根	2.00	Puerariae Radix
芍藥	1.00	Paeoniae Radix
黃芩	2.00	Scutellariae Radix
黃連	1.00	Coptidis Rhizoma
石膏	1.00	Gypsum Fibrosum
五味子	11粒	Schisandrae Fructus
炙甘草	0.50	Glycyrrhizae Radix

處方五、『葛根解肌湯』 (出典：沈氏尊生書方)

中藥名	用量(錢)	生藥名(拉丁名)
葛根	3.00	Puerariae Radix
黃芩	2.00	Scutellariae Radix
麻黃	0.50	Ephedrae Herba
桂枝	1.00	Cinnamoni Ramulus
赤芍	1.50	Paeoniae Radix (Rubra)
炙甘草	0.80	Glycyrrhizae Radix

處方六、『柴葛解肌湯』 (出典：陶華方)

中藥名	用量(錢)	生藥名(拉丁名)
葛根	1.00	Puerariae Radix
芍藥	1.00	Paeoniae Radix
柴胡	1.00	Bupleuri Radix
黃芩	1.00	Scutellariae Radix
石膏	1.00	Gypsum Fibrosum
桔梗	1.00	Platycodi Radix
羌活	1.00	Notopterygii Rhizoma
白芷	1.00	Angelicae Dahuricae Radix
炙甘草	0.50	Glycyrrhizae Radix

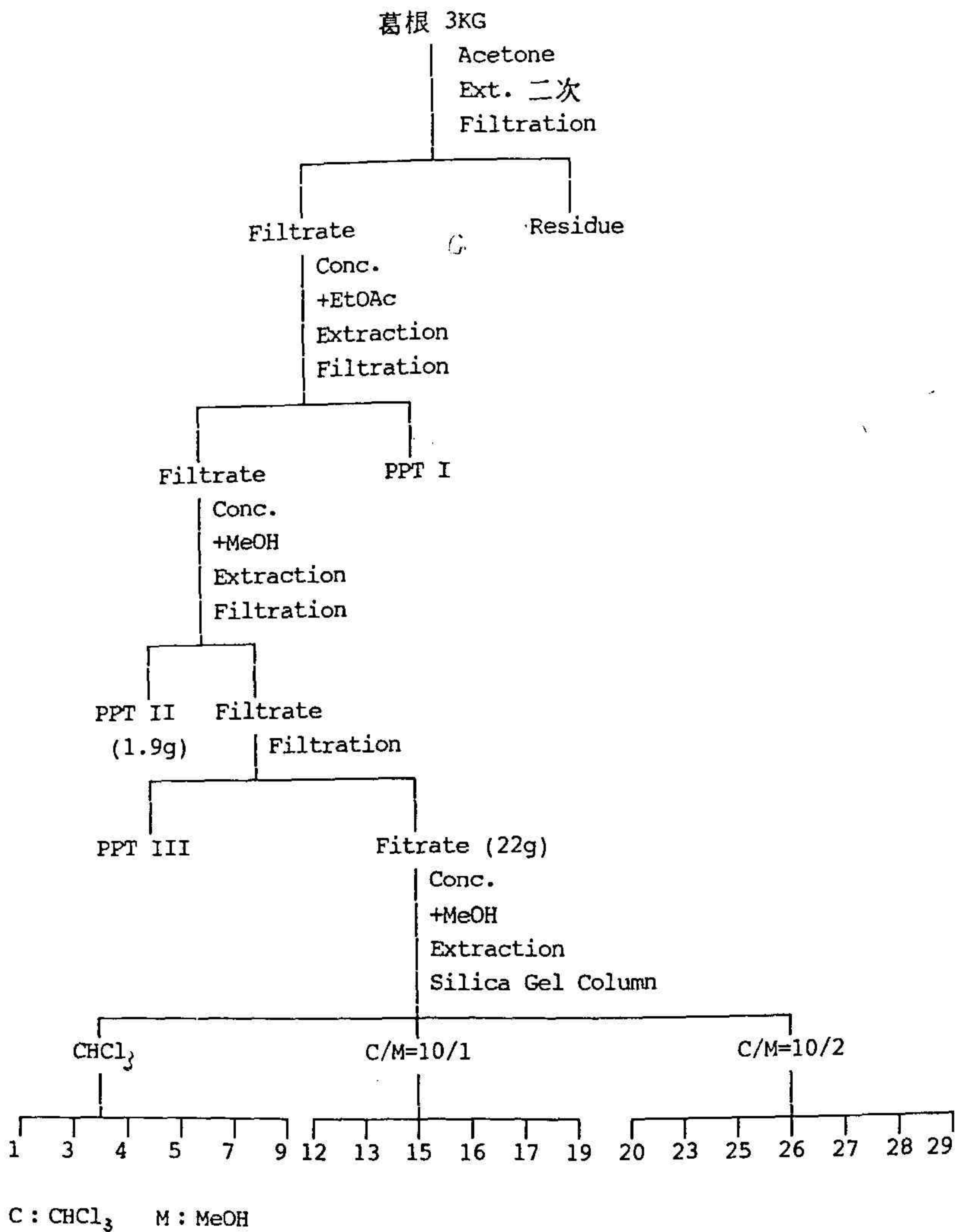
三. Puerarin 之抽取、分離、精製法

葛根3公斤，依Chart I之流程抽取，再經Column Chromatography分離再結晶精製後，得白色針狀結晶--P-1，P-1與Puerarin混合、mp不下降。比較 I.R. 與 NMR 之圖譜與 Puerarin 一致，所以確定 P-1 為 Puerarin。

Puerarin 純度試驗

經HPLC、TLC分析：HPLC 為single peak、TLC one spot

Chart I: 葛根中Puerarin之抽取



四. 高速液體色層分析：

(1) 條件：

檢出器：Shimadzu LC-9A

Column：RP-18 4 * 125mm(5um)

temp：25

Inj. Vol：10ul

M. Phase：10% Acetonitrile/H₂O

Flow Rate：0.8ml/min

Detector：SPD-M6A、UV-251nm

Recorder：C-R6A

Slope：1500

Chart Speed：1 cm/min

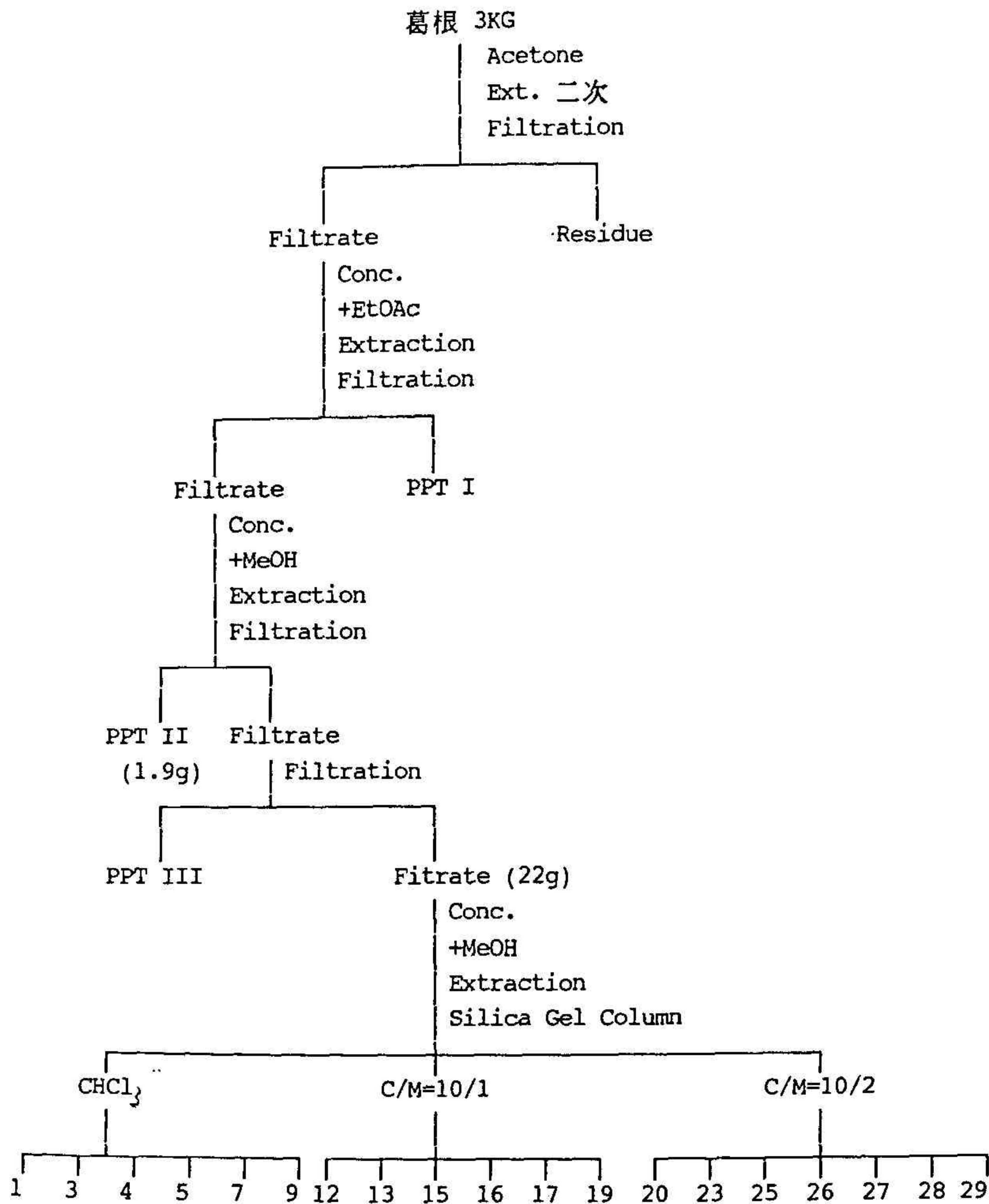
Attenuation：7

(2) HPLC 之定量法：

試料溶液之製作：

1. 精稱 Powder 1 g
2. 置 tube 中
3. 加 10 ml solvent
4. 70°C 20min 超音波振盪
5. 趁熱過濾至容積瓶
6. 加 solvent 至 10 ml
7. 離心 (或置 vial 中 離心)
8. 取上清液置 vial
9. 經 0.45um mem. filter 過濾
10. inj. 至 L.C.

Chart I: 葛根中Puerarin之抽取



C : CHCl₃ M : MeOH

四. 高速液體色層分析：

(1) 條件：

檢出器：Shimadzu LC-9A

Column：RP-18 4 * 125mm(5um)

temp：25

Inj. Vol：10ul

M. Phase：10% Acetonitrile/H₂O

Flow Rate：0.8ml/min

Detector：SPD-M6A 、UV-251nm

Recorder：C-R6A

Slope：1500

Chart Speed：1 cm/min

Attenuation：7

(2) HPLC 之定量法：

試料溶液之製作：

1. 精稱 Powder 1 g
2. 置 tube 中
3. 加 10 ml solvent
4. 70°C 20min 超音波振盪
5. 趁熱過濾至容積瓶
6. 加 solvent 至 10 ml
7. 離心 (或置 vial 中 離心)
8. 取上清液置 vial
9. 經 0.45um mem. filter 過濾
10. inj. 至 L.C.

結果與討論：

一. 葛根中 Puerarin 抽出法之探討

(1) 抽出溶劑之比較

葛根用粉碎機粉碎，過40#篩後，以10倍體積之溶劑於有栓試管中抽取，以70℃、超音波振盪抽取20分鐘，趁熱過濾於10ml容積瓶中，經高速離心及過濾膜過濾，以作為檢測液。

抽取溶劑包括MeOH、50%MeOH、70% MeOH、75%MeOH、H₂O等，比較各種不同溶劑之抽取率。結果如下表：(Fig. 1)

Solvent	抽取率(Peak Area)
MeOH	4124766
50%MeOH	6376159
70%MeOH	7017247
75%MeOH	11214900
H ₂ O	4064766

(2) 抽出時間之比較

由以上實驗之結果得知75%MeOH抽取率最高，因此進一步測定抽出時間和Puerarin抽出量有密切的關係。以與(1)相同之抽出條件，以抽取5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min、45 min、50 min作為檢測液。打入HPLC之量為10ul。以上述 HPLC Puerarin 定量條件測定其抽取率，結果如下：(Fig. 2)

min	Peak Area
5	6740388
10	8844141
15	10785804
20	10795718
25	10871044
30	11357480
35	12044818
40	11233381
45	10184291
50	9709679

(3) 檢量線之作成(絕對檢量線)

取標準品共六種濃度：0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml、0.025mg/ml、0.01mg/ml

L.C.條件同上，結果如 Fig 3 所示

二. 含葛根方劑中Puerarin之定量

各方劑中 Puerarin 之含量如 Table 1 所示。

各方劑之三度空間圖如 Fig 4~Fig 9 所示。

References

- 1) T.Murakami, Y.Nishikawa, T.Ando: Chem Pharm. Bull. (Tokyo), 8, 688 (1960)
- 2). 柴田承二、村上孝夫、西川嘉廣；日本藥學雜誌，79，757 (1959)
- 3). 柴田承二、村上孝夫、西川嘉廣；Chem Pharma Bull (Tokyo) 1，134 (1959)

結果與討論：

一. 葛根中 Puerarin 抽出法之探討

(1) 抽出溶劑之比較

葛根用粉碎機粉碎，過40#篩後，以10倍體積之溶劑於有栓試管中抽取，以70℃、超音波振盪抽取20分鐘，趁熱過濾於10ml容積瓶中，經高速離心及過濾膜過濾，以作為檢測液。

抽取溶劑包括MeOH、50%MeOH、70% MeOH、75%MeOH、H₂O等，比較各種不同溶劑之抽取率。結果如下表：(Fig. 1)

Solvent	抽取率(Peak Area)
MeOH	4124766
50%MeOH	6376159
70%MeOH	7017247
75%MeOH	11214900
H ₂ O	4064766

(2) 抽出時間之比較

由以上實驗之結果得知75%MeOH抽取率最高，因此進一步測定抽出時間和Puerarin抽出量有密切的關係。以與(1)相同之抽出條件，以抽取5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min、35 min、40 min、45 min、50 min作為檢測液。打入HPLC之量為10ul。以上述 HPLC Puerarin 定量條件測定其抽取率，結果如下：(Fig. 2)

min	Peak Area
5	6740388
10	8844141
15	10785804
20	10795718
25	10871044
30	11357480
35	12044818
40	11233381
45	10184291
50	9709679

(3) 檢量線之作成(絕對檢量線)

取標準品共六種濃度：0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.1mg/ml、0.05mg/ml、0.025mg/ml、0.01mg/ml

L.C.條件同上，結果如 Fig 3 所示

二. 含葛根方劑中Puerarin之定量

各方劑中 Puerarin 之含量如 Table 1 所示。

各方劑之三度空間圖如 Fig 4~Fig 9 所示。

References

- 1) T.Murakami, Y.Nishikawa, T.Ando: Chem Pharm. Bull. (Tokyo), 8, 688 (1960)
- 2). 柴田承二、村上孝夫、西川嘉廣；日本藥學雜誌，79，757 (1959)
- 3). 柴田承二、村上孝夫、西川嘉廣；Chem Pharma Bull (Tokyo) 1，134 (1959)

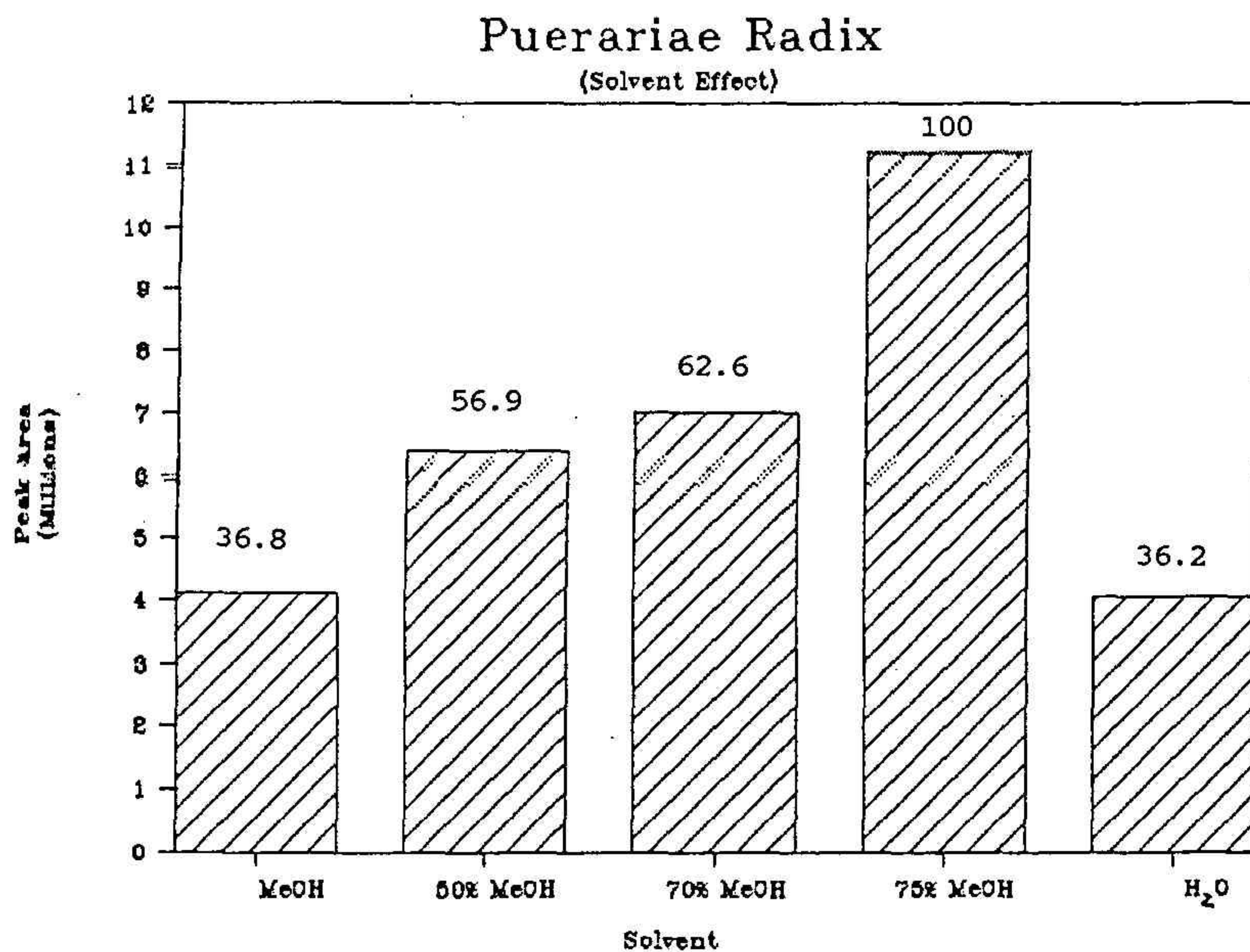


Fig 1. 葛根中 Puerarin 之定量：不同溶劑之粹取效果 (%)

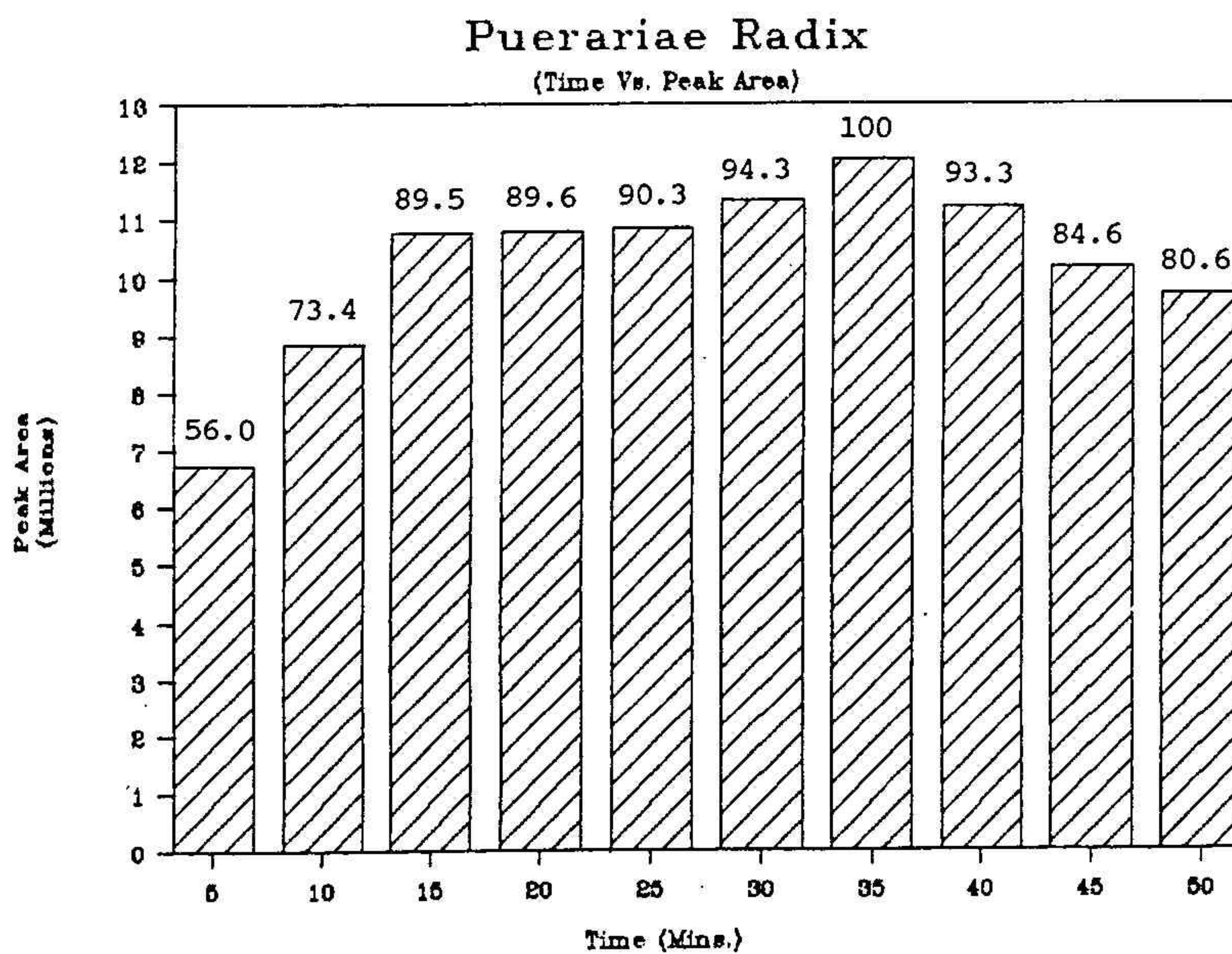


Fig 2. 葛根中 Puerarin 之定量：不同時間之粹取效果(%)

Calibration Curve (88.6.19)

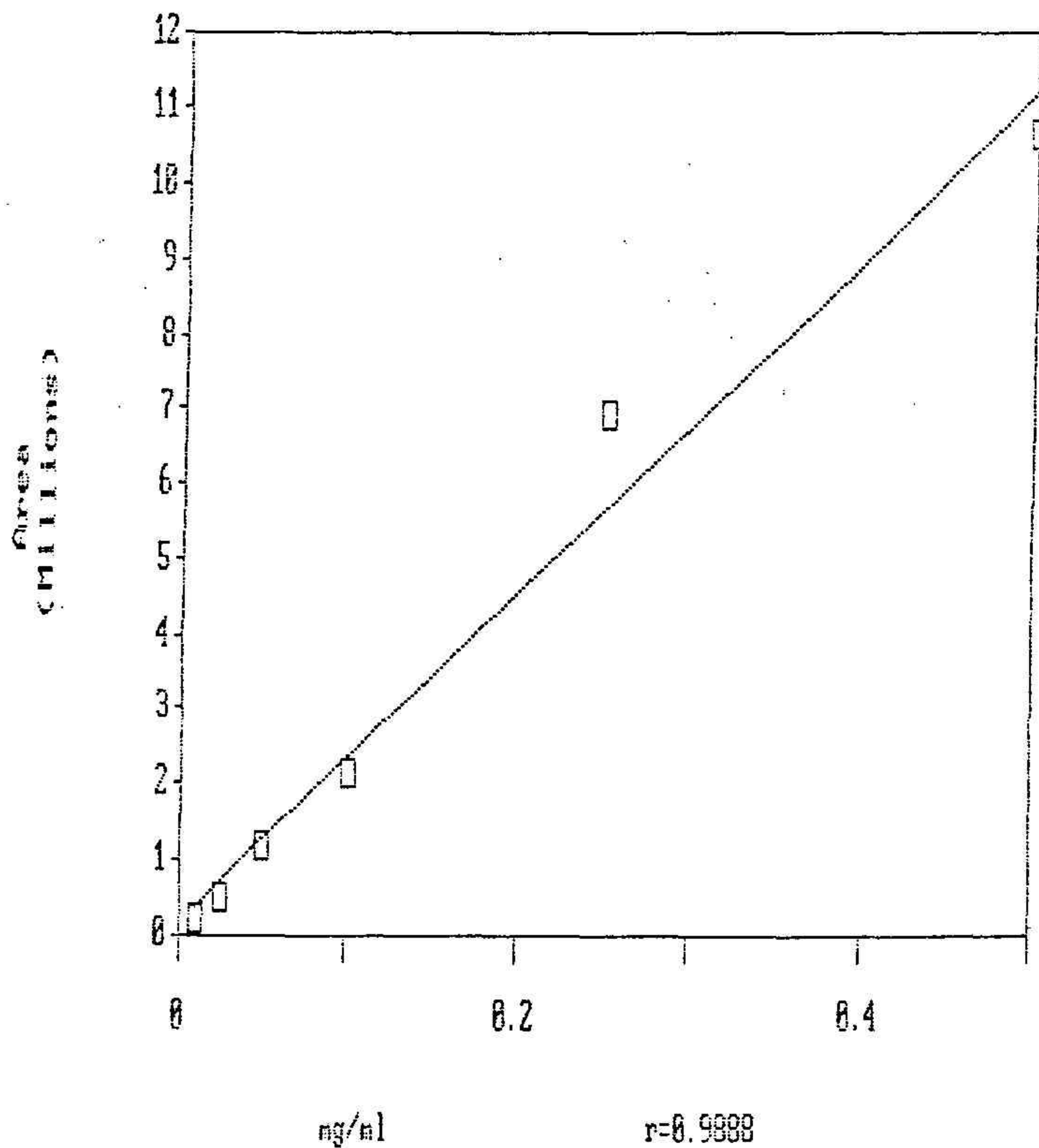


Fig 3. 葛根中 Puerarin 之定量：檢量線之製作

Table 1. 含葛根方劑中Puerarin之含量(%)

方 劑 名	理 論 值(%)	實 際 值(%)
升 麻 葛 根 湯	5.20	4.50
葛 根 黃 連 黃 芩 湯	19.40	20.40
葛 根 湯	9.00	8.10
葛 根 黃 芩 湯	9.80	10.80
葛 根 解 肌 湯	13.80	12.80
柴 葛 解 肌 湯	4.70	4.70

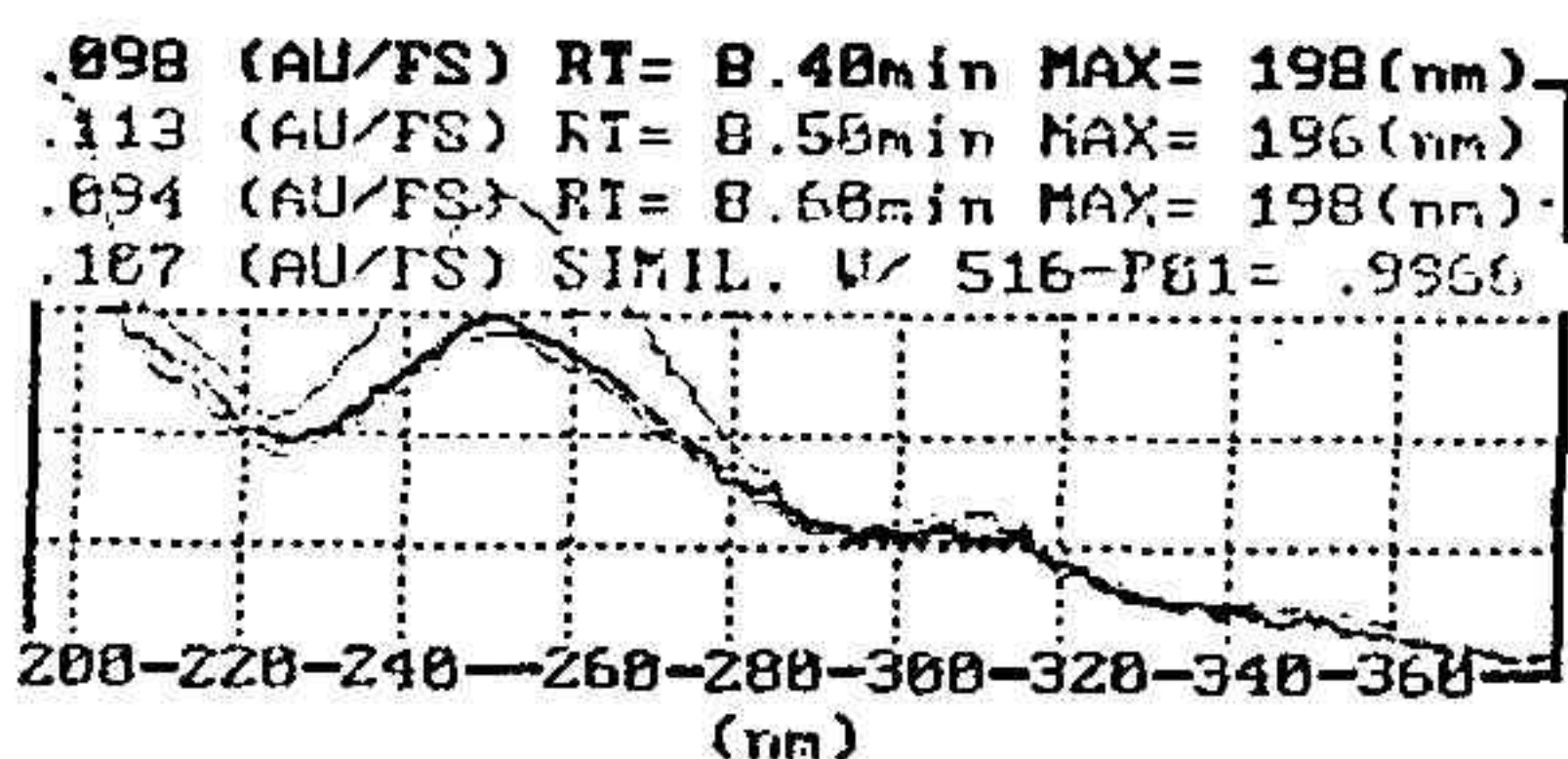
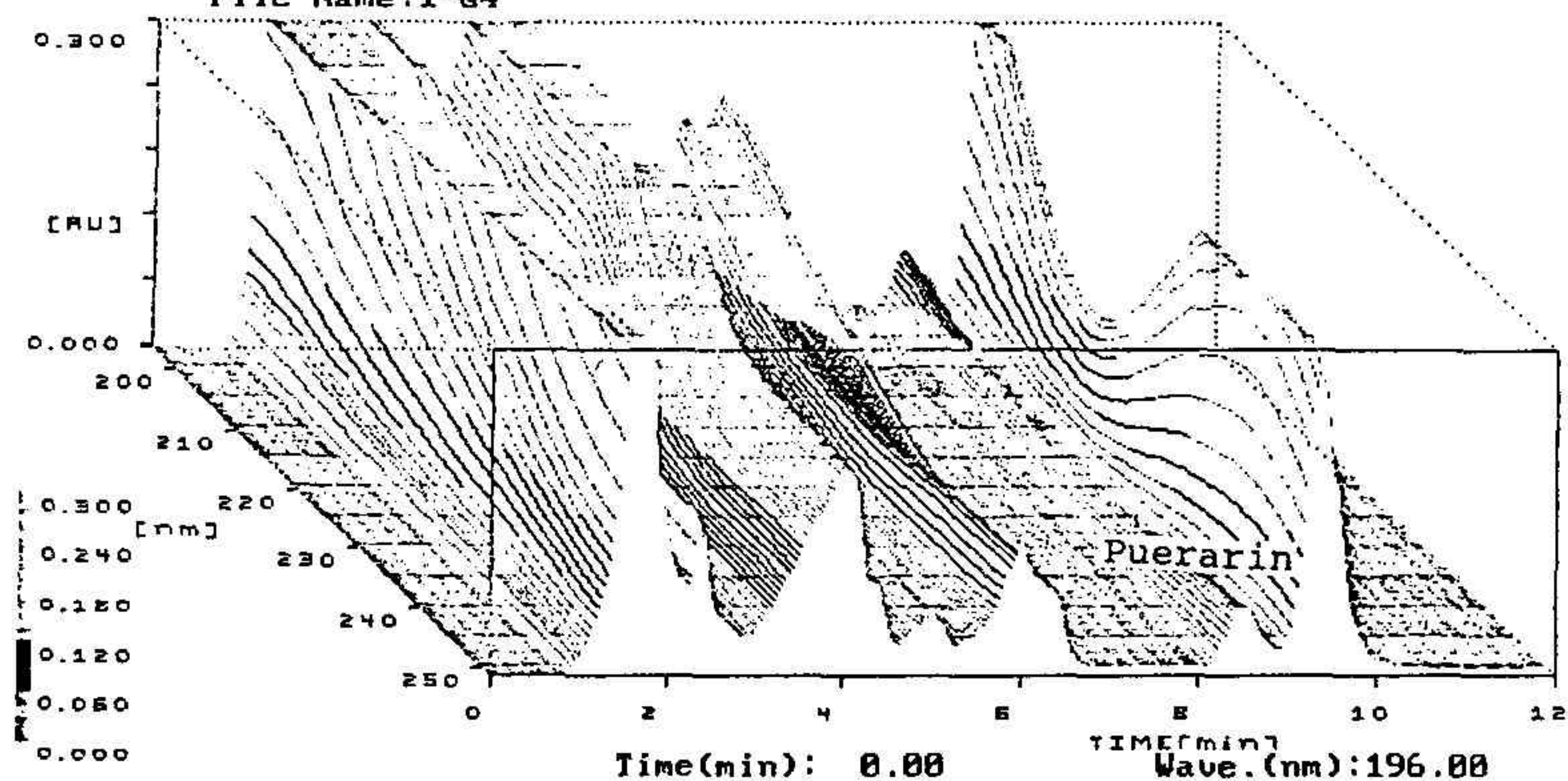


Fig 4. 方劑一：升麻葛根湯之三度空間圖

*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram
File Name:2-G4

'HOME' ->Page2

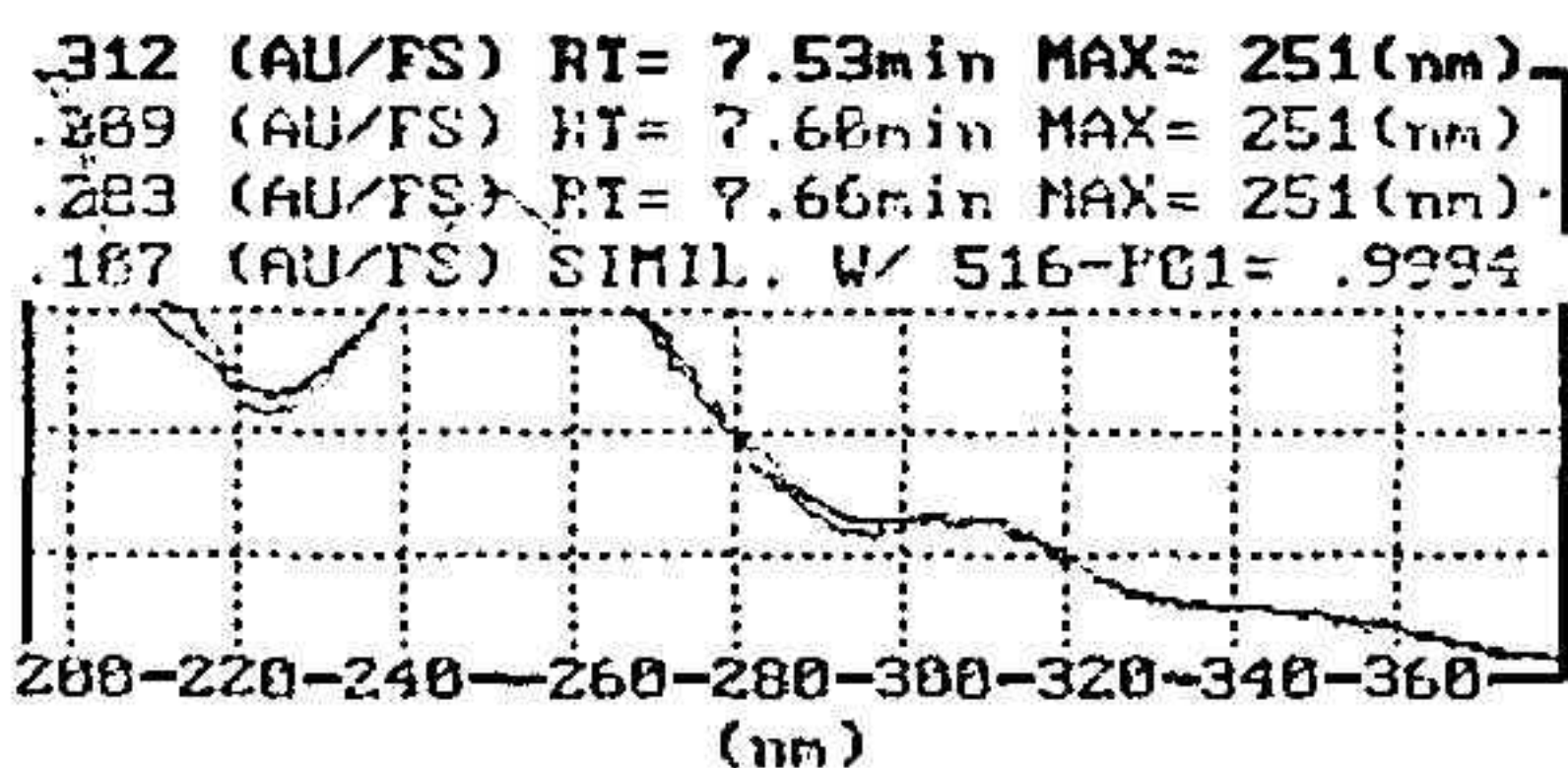
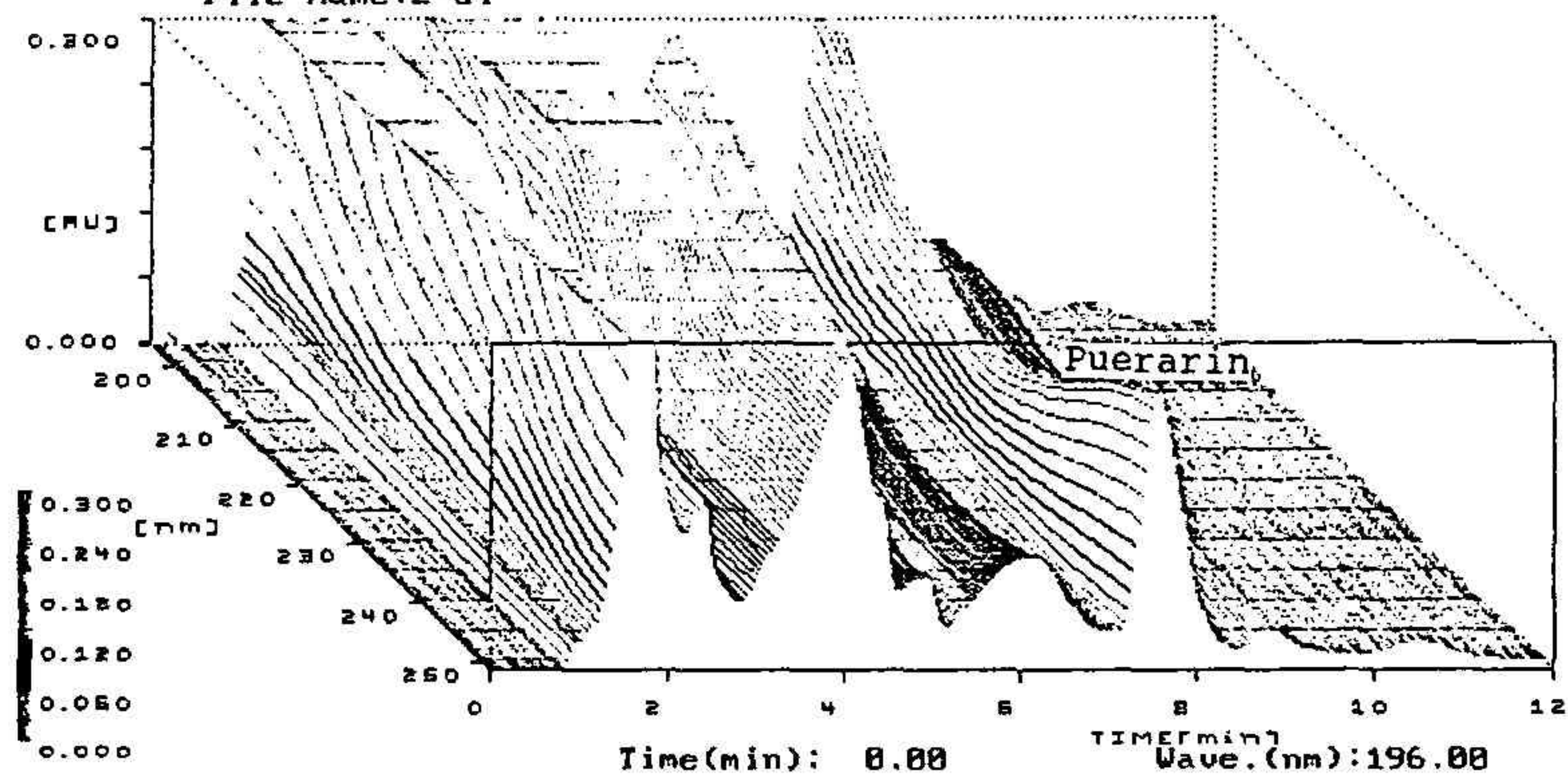


Fig 5. 方劑二：葛根黃連黃芩湯之三度空間圖

*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram
File Name:3-G4

'HOME' ->Page2

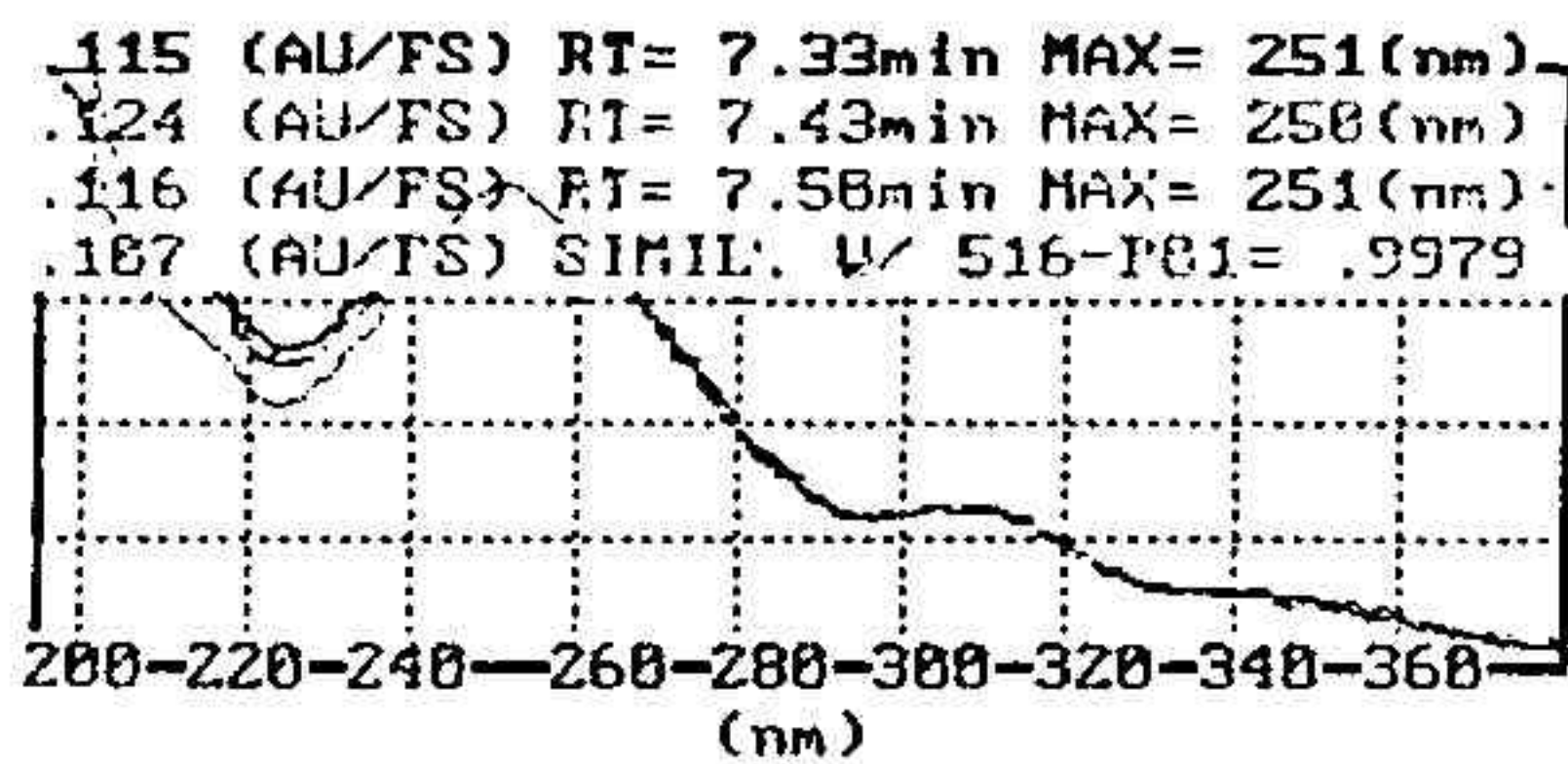
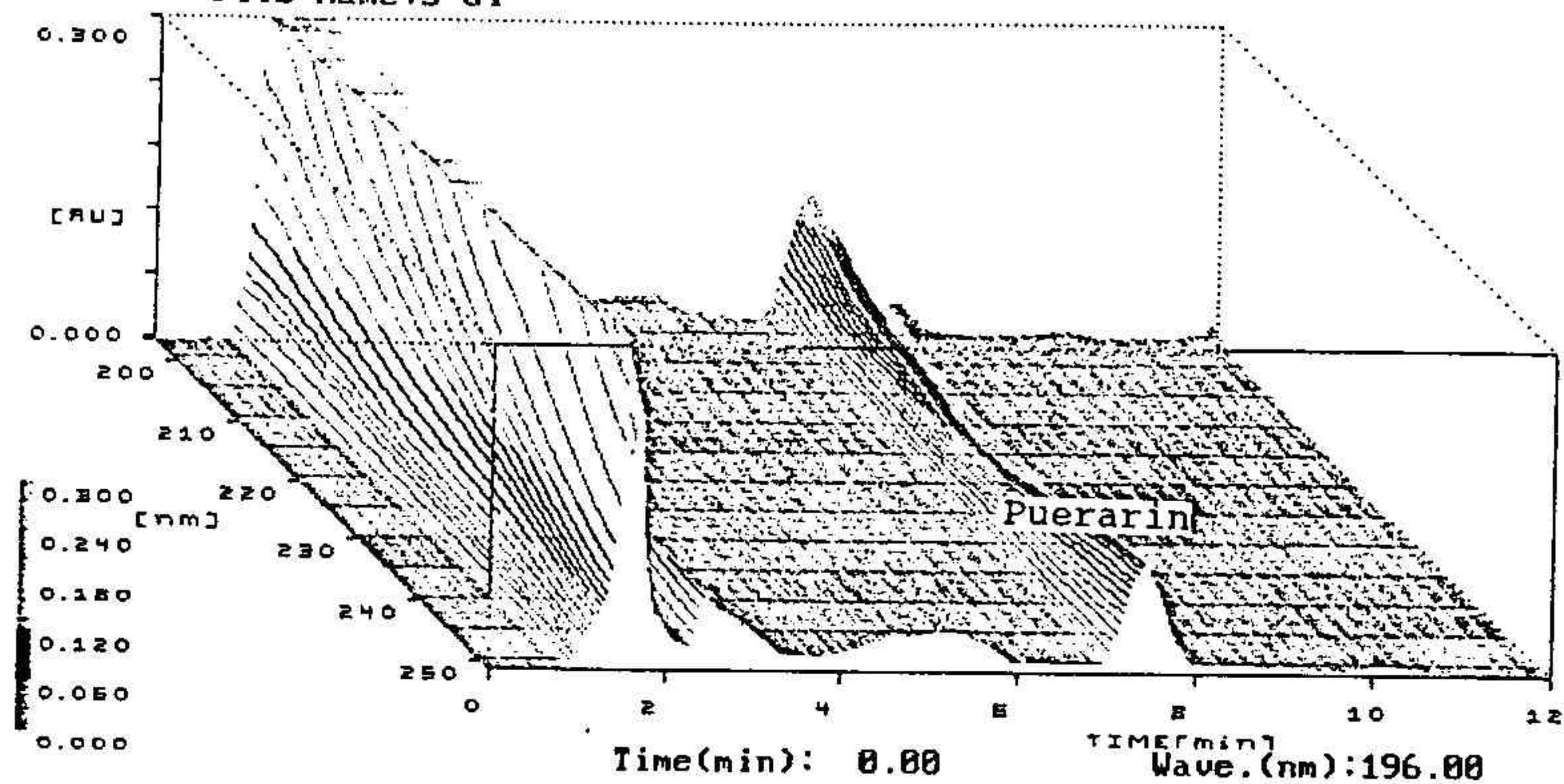


Fig 6. 方劑三：葛根湯之三度空間圖

*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram
File Name:4-G4

'HOME' ->Page2

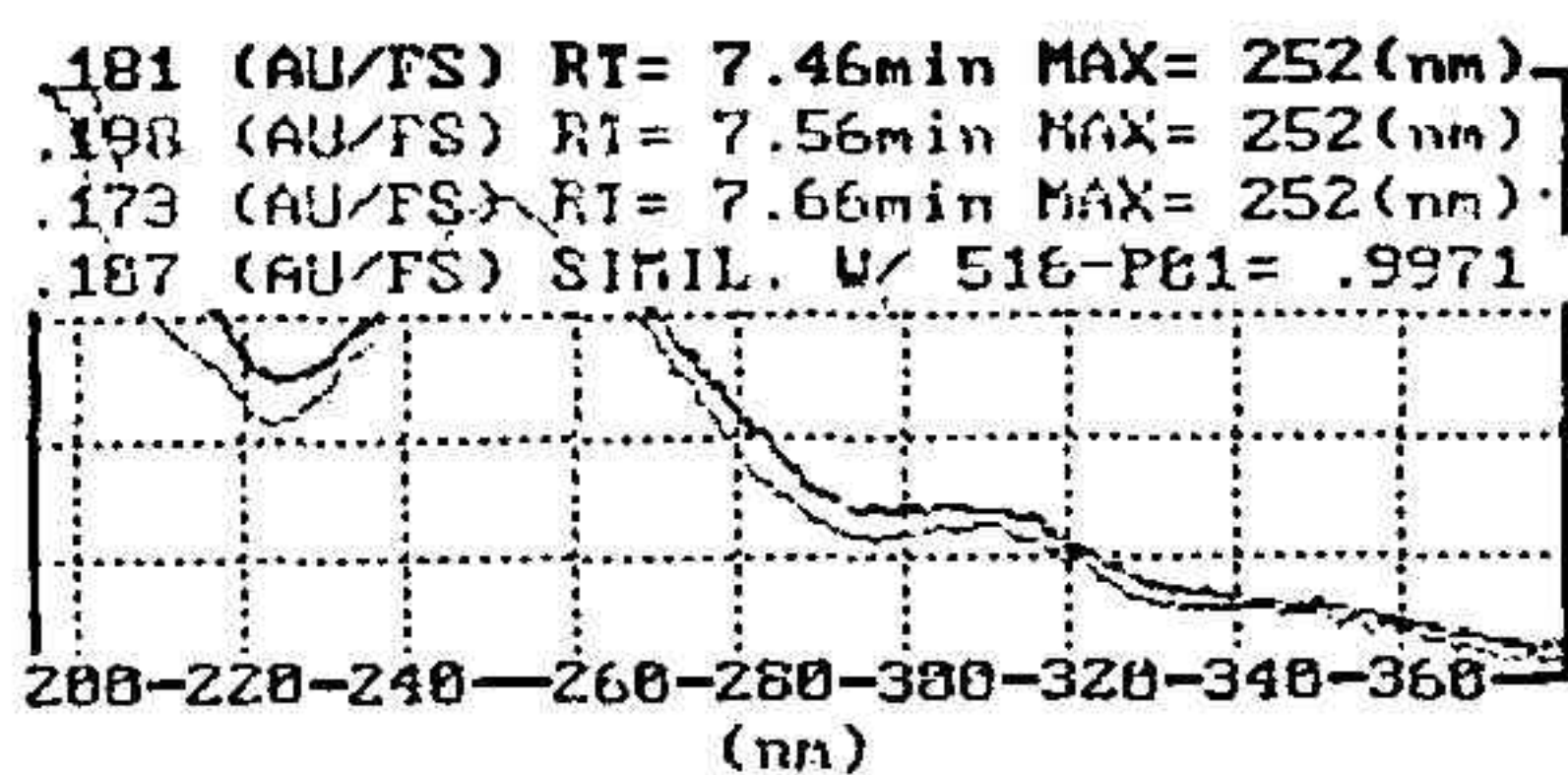
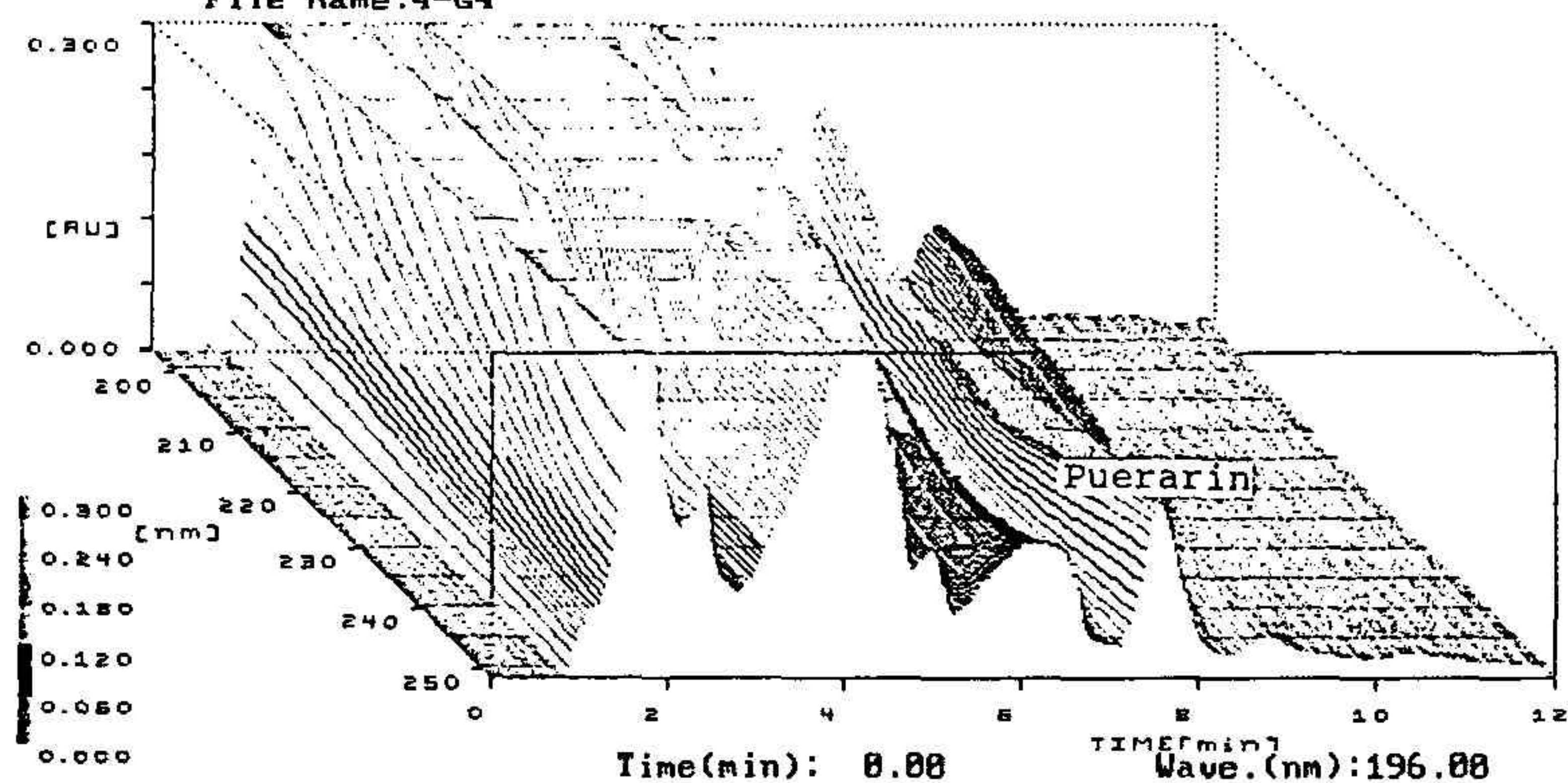


Fig 7. 方劑四：葛根黃芩湯之三度空間圖

*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram
File Name: 5-G4

'HOME' -> Page2

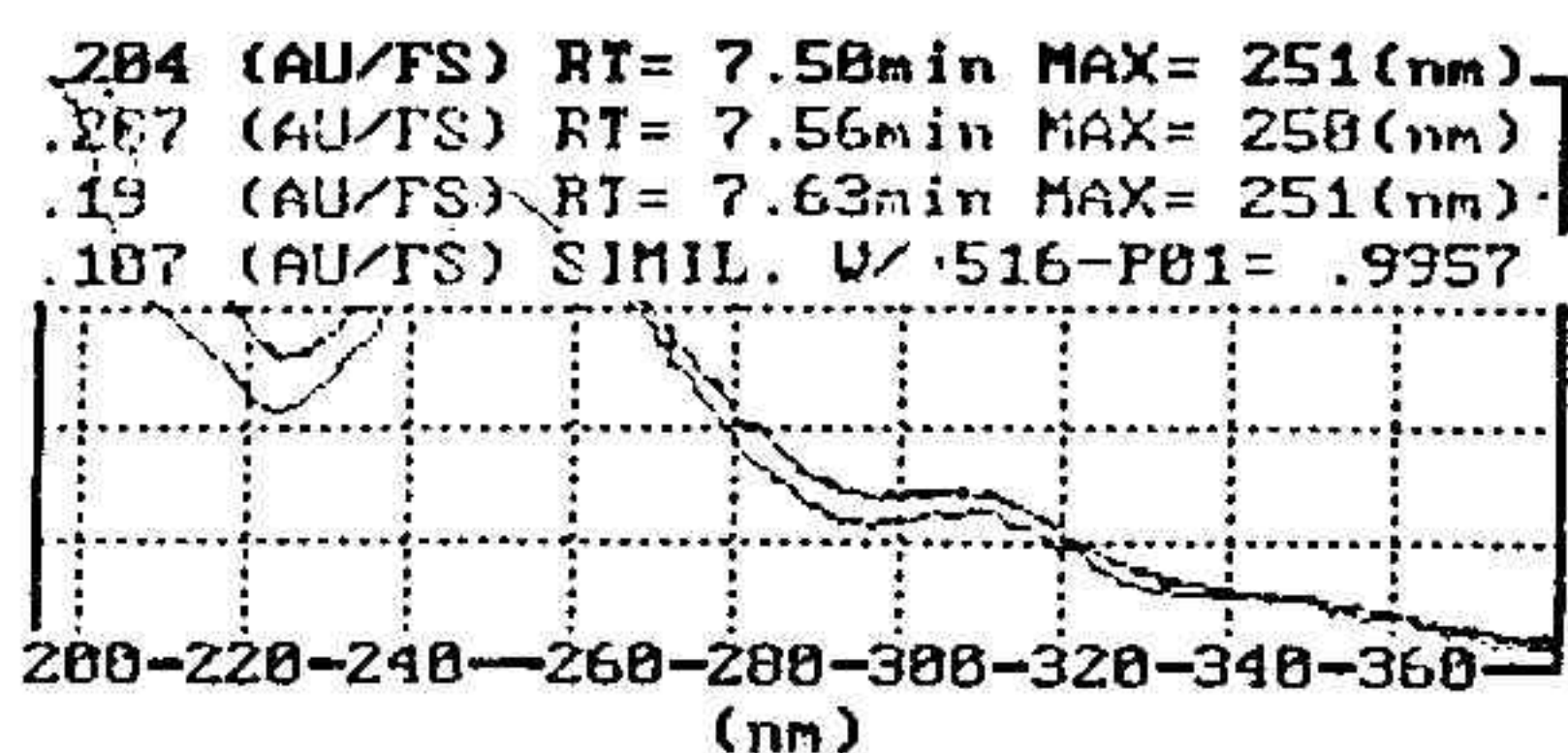
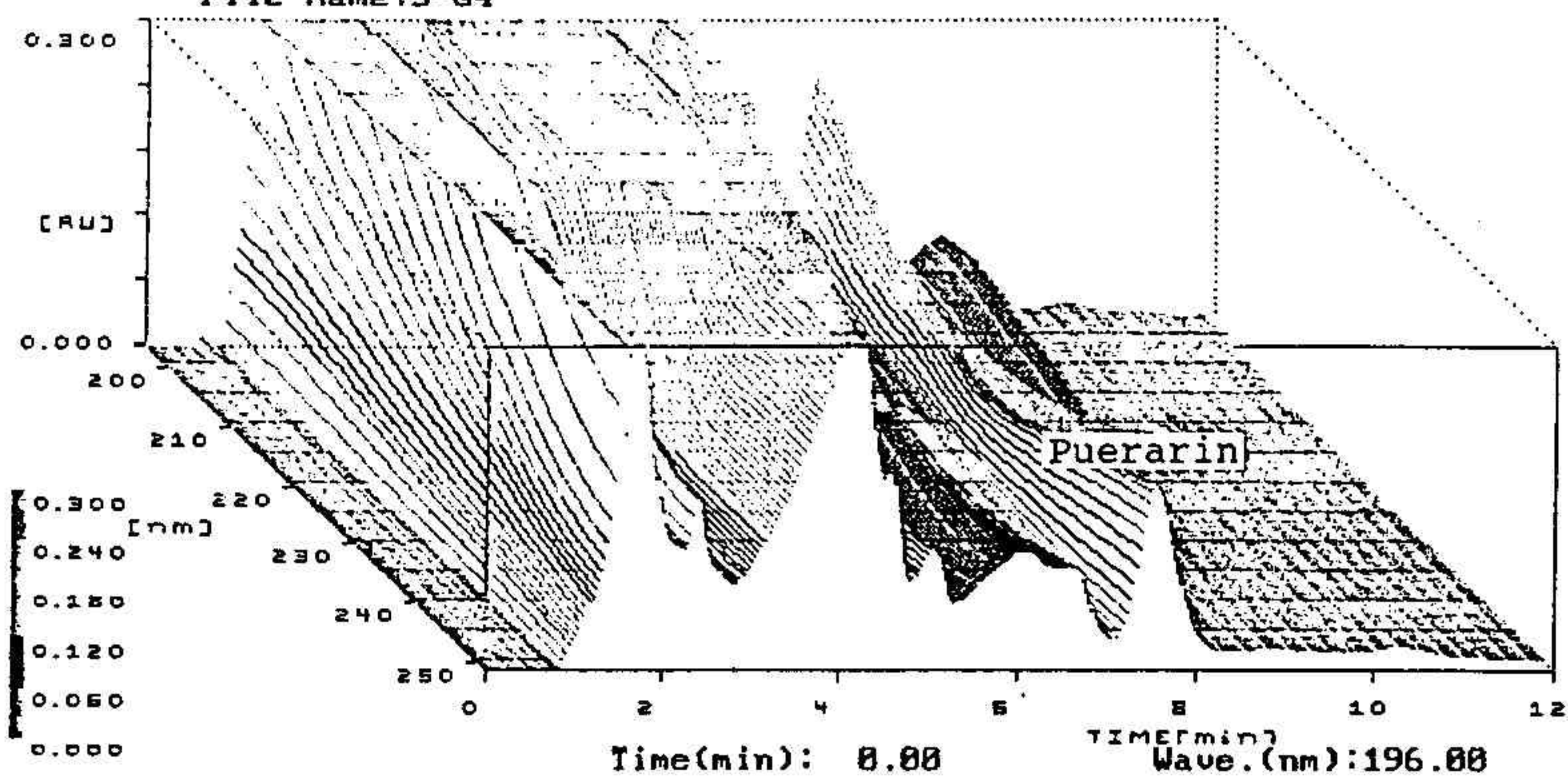
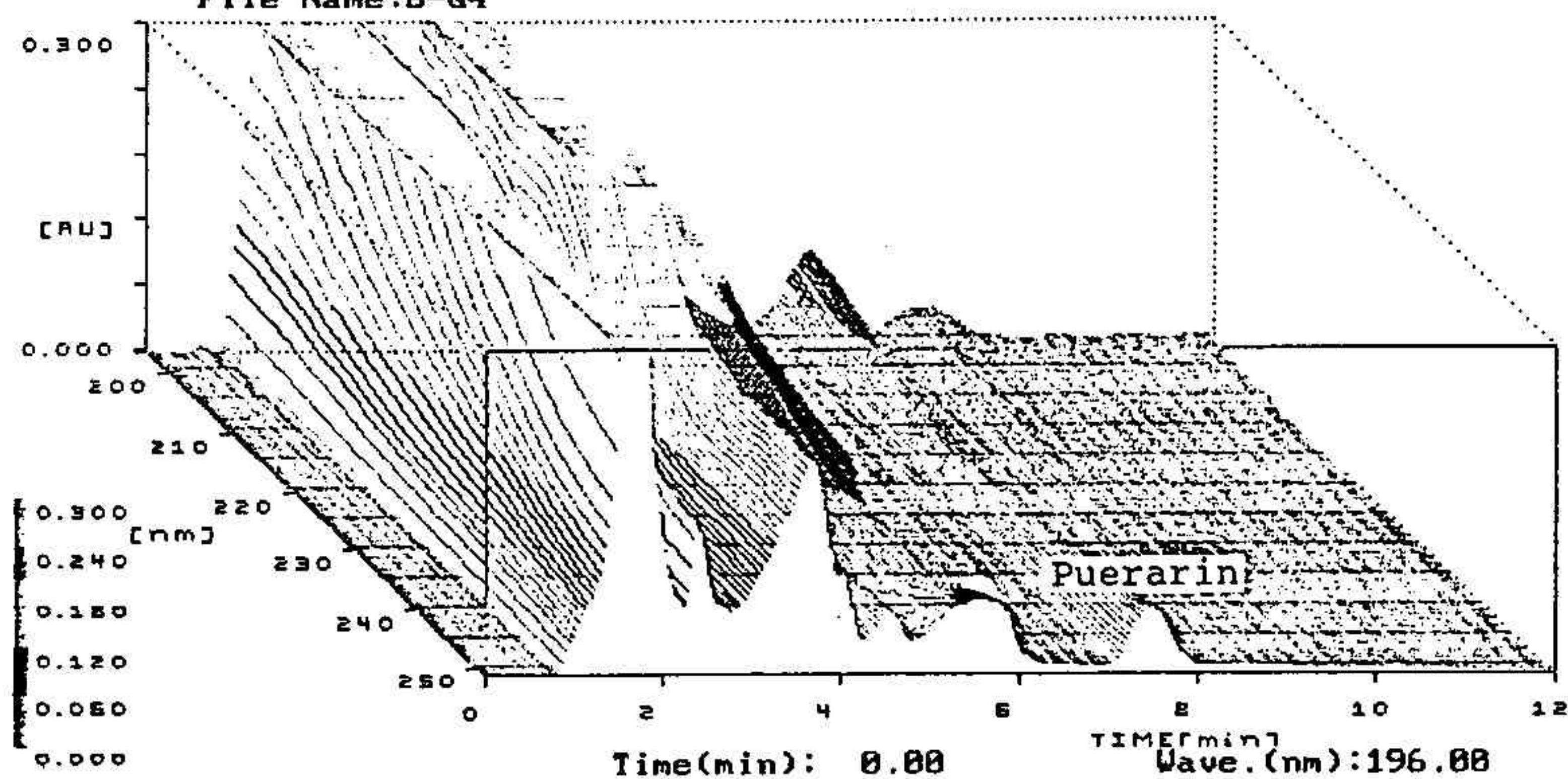


Fig 8. 方劑五：葛根解肌湯之三度空間圖

*SPD-M6A POST ANALYSIS 3-Dimensional Chromatogram
File Name:6-G4

'HOME' ->Page2



.111 (AU/FS) RT= 7.43min MAX= 196(nm)
.113 (AU/FS) RT= 7.50min MAX= 196(nm)
.155 (AU/FS) RT= 7.56min MAX= 196(nm)
.167 (AU/FS) SIMIL. V/ 516-P01= .9952

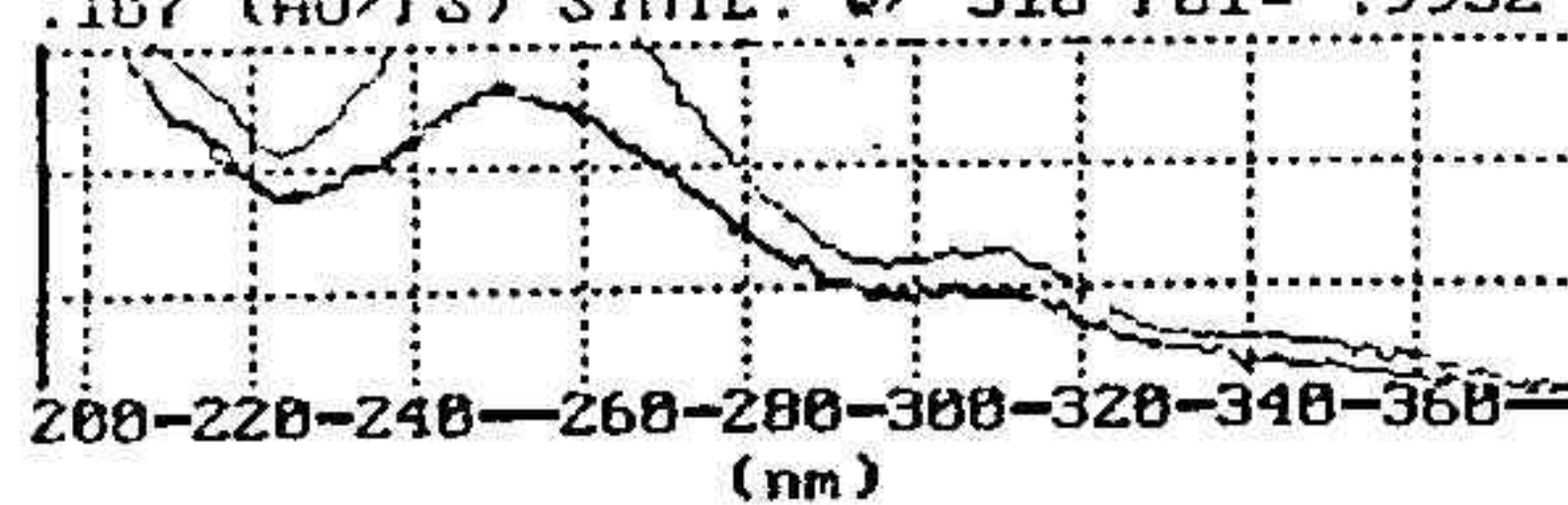


Fig 9. 方劑六：柴葛解肌湯之三度空間圖