

編號：CCMP95-TP-012

中草藥標準品 (Ferulic Acid、Ligustilide) 之研究與開發及檢驗技術之研究 (二)

劉崇喜

大仁科技大學

摘 要

當歸為繖形科植物 *Angelica sinensis* (Oliver) Diels 的乾燥根，為重要而常用的中藥材之一，具有抗發炎、平喘、抗血栓、補血與保護肝臟等功效。當歸製成製劑時，其成分藁本內酯 (ligustilide) 容易消失。研究中將當歸進行 n-hexane 萃取、純化之藁本內酯 (ligustilide)，並將當歸進行 TLC 及 HPLC 之分析鑑定。另外，採用「當歸補血湯」方劑進行指標成分分析及安定性試驗，利用苛刻之溫、濕或光線條件誘導分解，並追蹤且檢出其主要分解成分，訂定當歸標準品之 process standard，並制定其檢驗之標準作業程式 (SOP)。此外，並匯集各項中草藥標準品之相關品質控管資料，提供衛生署對相關政策之擬定與推動之參考。在成立諮議小組方面：本研究組已陸續舉行四次座談會，針對現代化科學研究方法等相關議題進行研討。本計劃研究成果將提供全國中藥標準品之藥材選用及炮製方法之科學依據，建立當歸之品質管控規範，進而促進此藥材及相關製劑之現代科學化與國際化。

關鍵詞：當歸、藁本內酯、當歸補血湯、安定性試驗、標準作業程式

Number: CCMP95-TP-012

Research on the Development and the Analysis of Ferulic Acid and Ligustilide, the Chinese Herbal Standards (2)

Shoring-shii Liou

Tajen University

ABSTRACT

Dang-Gui, the dried root of *Angelica sinensis* (Umbelliferae), is one of the important Chinese herbs. Formulations of Dang-Gui were used mainly for the treatment of inflammation, asthma, thrombosis, and gynecopathy and liver disorders. However, ligustilide, one of the constituents of Dang-Gui, is easily evaporated during processing. Thus, the research was going to isolate ligustilide from Dang-Gui and further purify. Furthermore, Dang-Gui was analysis and identified by TLC and HPLC. In addition to analysis the marker constituents of Danggui Buxue Tang, the stability testing of the preparation was performed by several conditions different in temperature, humidity and light, to establish the standard operating procedure and the process standard of the Chinese herbs. Moreover, data related with standards and quality control of Chinese herbals was collected in the research, which could be helpful in the establishment of the related policy by Department of Health, Executive Yuan (Taiwan, R.O.C.). Actually, symposium supported by the research associated with the quality control and promotion of the modernization in Chinese medicine was hold for four times. Thus, results from the research could be provided a basis for the processing and the quality control of Chinese herbs. Additionally, the results could promote Chinese medicine not only to be scientific but also be international.

Keywords: *Angelica sinensis*, ligustilide, Danggui Buxue Tang, stability testing
standard operating procedure

壹、前言

傳統的中國藥材乃是五千年來經驗及知識所累積下來的資產，不管是中藥藥材或中藥製劑之應用，均日益增加，且近年來大眾消費者對中醫藥常識的普及，以及對中藥保健問題的重視以及保障消費者呼籲日高，使得中醫藥問題很快的受到社會大眾的重視，而為了確保中醫藥品的有效性及安全性，近年來政府對中醫藥醫療之推廣不遺餘力，如中醫醫院之設立，中醫勞保業務之推展，以達到品質保證的目標。

民國 84 年 3 月 1 日起政府開辦全民健保之醫療政策，中藥之使用數量急遽增加。中藥因為其藥性溫和、副作用小，而且對於人體慢性疾病及西醫束手無策的各類疑難雜症療效顯著，因此廣受到一般民眾的歡迎，而能在現代醫學潮流中長久屹立不搖。而且只有傳統中藥會研究到歸經、君臣佐使之學，對於現代藥學或藥理學之探討則尚不充分明瞭，以致於中藥的有效成分尚不能完全掌握清楚，而且因中藥藥材會因為基源、產地、生長年數、栽培方法、採收季節、炮製方法等等的不一樣，而使得在品質上有很大的差異而難以去掌控，導致中藥產業面臨製程、品管及研發新藥，甚至法規的制訂上的種種困難，其產品則始終僅被西洋各國視為健康食品而不易以藥物形態打入國際市場，無法提高其應有之附加價值，殊屬可惜。

雖然中藥之有效成分還未能完全明瞭與掌握，近年來選擇藥材中某些成分作為含量測定之指標，作為藥材、製程與製劑的品管手法，定量製劑中之指標成分，以保證其品質之化學相等性的可行性，逐漸為業者所接受，因此欲提升中藥製劑之品質，除了適當管制藥材基源外，盡速建立精密且能量化的指標成分分析方法及其適當的儲存條件和時間來達到從藥材、製程到製劑的品質管理，應是我國中藥科學化工作的當務之急，因此指標成分的標準品在推動中藥廠實施品質管理提升中藥品質，就顯得格外重要。

中藥材之真偽及其品質之優劣，往往影響療效，為了確保國民健康及用藥安全，建立中藥品管體系是當前急務。然而中藥之品質管制受中藥材基源，產地及中藥化學成分複雜性之限制，品管工作甚為艱難，在完整的品管方法尚未建立之前，利用薄層層析法⁽¹⁻⁸⁾，或高效液相層析法⁽⁹⁻¹⁶⁾，與指標成分對照，不失為一種準確性頗高之檢驗方法。

生長地點分佈在甘肅、四川、雲南、陝西、貴州、湖北等地，類似藥材有日本產的大和當歸 (*Angelica.actiloba* Kitagawa)、北海當歸

(*Angelica.actiloba* Kitagawa var.*sugiyamae* Hikino) 及韓國產的 *A.koreana* Max⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。然而，台灣在當歸〔*Angelica sinensis* (Oliv.)〕的使用上以四川、甘肅為多，品質上亦更為優良。故本計劃之實行，委託金寶安貿易公司進行市場調查，由於四川當歸價格較高，目前台灣進口甘肅地區之當歸在甘肅省大量種植，故採用甘肅生產之當歸為計畫執行之主要研究藥材。

當歸使用部位為乾燥根。當歸藥材辨識：主根大，根頭肥大，身長，支根少，外皮金黃棕色，肉質飽滿有粉質，斷面黃白色，氣濃香，味甜為佳。主根短小，支根多，氣味較弱及斷面紅棕色次之⁽²⁰⁾。

貳、材料與方法

一、收集其他國家相關文獻參考資料，開發各類檢驗方法以提供中草藥當歸正確品種確認

基原鑑定一：組織切片。

切片儀器：滑手冷凍切片機。

檢驗流程：

- (一) 取材：一般材料大小，以不大於 $0.6 \times 0.6 \times 6\text{cm}^3$ 為宜。(依需要再調整)
- (二) 埋蠟 (embedding)
- (三) 修蠟塊及切片
- (四) 展片 (張貼切片)
- (五) 染色、脫水 (依講義上之方法進行之)
- (六) 封片，鏡檢
- (七) 相關書籍資料之比對

基原鑑定二：薄層層析鑑定 (TLC) ⁽⁵⁾

(一) 當歸

Standard : ferulic acid ⁽²¹⁾

薄層層析條件：

1. 層析板：Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, 0.2mm)
2. 點注量：10 μ l
3. Lanes：
 - (1) ferulic acid
 - (2) ferulic acid+當歸萃取液
 - (3) 當歸萃取液
4. 展開距離：10cm

5. 展開溶媒： $\text{C}_6\text{H}_6 / \text{CHCl}_3 / \text{CH}_3\text{OH} = 2:2:0.6$

6. 檢出方法：UV 254nm

Standard : Ligustilide ⁽²¹⁾

薄層層析條件：

1. 層析板：Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, 0.2mm)

2. 點注量：10 μ l

3. Lanes：

(1) Ligustilide

(2) Ligustilide + 當歸萃取液

(3) 當歸萃取液

4. 展開溶媒： $\text{CHCl}_3 : \text{n-Hexan} = 4:1$

5. 檢出方法：UV 366nm

(二) 黃耆

Standard : Astragaloside IV ⁽²¹⁾

薄層層析條件：

1. 層析板：Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, 0.2mm)

2. 點注量：10 μ l

3. Lanes：

(1) Astragaloside IV

(2) Astragaloside IV + 黃耆萃取液

(3) 黃耆萃取液

4. 展開溶媒：甲苯：乙酸乙酯、甲醇（4：2：1）

5. 檢出方法：UV 366nm

二、自行製備藥方—當歸補血湯

傳統中藥方劑--當歸補血湯，是金元時代李東垣所創造的益氣補血方劑，其組成為黃耆和當歸兩味藥以 5：1 組成^(22, 23)。(圖

二十二)

三、藥方—當歸補血湯之成分分析^(21, 24-25)

以薄層層析法 (Thin Layer Chromatography, TLC) 和高效液相層析 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 進行藥方—當歸補血湯的藥方分析。

(一) 薄層層析法 (Thin Layer Chromatography, TLC)

當歸補血湯—當歸

1. 層析板：Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, 0.2mm)
2. 點注量：10 μ l
3. Lanes：
 - (1) 當歸甲醇抽出液
 - (2) 當歸補血湯
 - (3) 當歸補血湯去除當歸之溶液
4. 展開距離：10cm
5. 展開溶媒：甲苯：丙酮 (4：1)
6. 檢出方法：碘薰

當歸補血湯—黃耆

1. 層析板：Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, 0.2mm)
2. 點注量：10 μ l
3. Lanes：
 - (1) 黃耆甲醇抽出液
 - (2) 當歸補血湯
 - (3) 當歸補血湯去除黃耆之溶液
4. 展開距離：10cm
5. 展開溶媒：甲苯：乙酸乙酯、甲醇 (4：2：1)
6. 檢出方法：UV 366nm

(二) 高效液相層析 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

當歸 (Ferulic acid)

1. Column : 250×4.6mm 5μHypers[®] ODS

2. Mobil phase : A 溶液 : B 溶液 (72 : 28)

A 溶液 : 0.05%磷酸

B 溶液 : Methanol

3. Injection vol. : 20μL

4. Flow rate : 1.0ml/min

5. Detector / wavelength : UV / 320nm

當歸 (Ligustilide)

1. Column : 250×4.6mm 5μHypers[®] ODS

2. Mobil phase : A 溶液 : Acetonitrile

B 溶液 : 10mM Ammonium Formate

40% A increasing to 80% A over 20 minutes

3. Injection vol. : 0.2μL

4. Flow rate : 0.5ml/min

5. Detector / wavelength : UV / 254nm

四、進行中藥材當歸的萃取

(一) 中藥材擬購自藥材行，本研究會在確認各藥材後，進行相關的藥材基原鑑定，以藥材之外觀鑑定及薄層層析鑑定 (TLC) 來確認藥材基原。

(二) 藥材先經粉碎—當歸乾燥根 10 公斤，經粉碎後，以正己烷 20 公升萃取 5 次，分別過濾、減壓濃縮，得正己烷抽出物。抽出物保存於冷凍箱 (零下 15℃) 中備用。

五、進行指標成分、藁本內酯 (ligustilide) 之分離、純化

取少量正己烷抽出物，點樣在矽膠薄層層析片上，利用兩種溶媒系統展開後觀察，經由初步薄層色層分析檢查結果，顯示正己烷抽出物含有大量的揮發油。因此由正己烷抽出物進行指標成分之分離工作。

藁本內酯的分離、純化：將正己烷抽出物分批放入矽膠管柱（70-230 孔篩）層析分離，依用正己烷沖提，在正己烷溶媒系統沖出部分以 TLC 檢查發現含有強烈藍螢光點。合併濃縮後，再放入矽膠管柱層析（230-400 孔篩）純化，以正己烷沖提，得到此部分的成分以 NMR 光譜數據來鑑定確認此部份為藁本內酯，因為藁本內酯種類很多，也可以 NMR、MS、IR 等光譜數據來鑑定確認各種異構物，會呈交 98% 的指標成分藁本內酯（ligustilide）3 克給行政院衛生署。

六、完成部份中草藥標準品之標準作業程式

依照本計劃所擬定的研究方法，訂定其標準作業程式，以供參考使用。

七、準備執行安定性試驗確保藥品有效性及安全性

利用苛刻的溫濕度或光線條件，誘導分解，追蹤且檢出其主要分解成分。

八、進行指標成分藁本內酯（ligustilide）之鑑定

（一）藁本內酯 TLC 分析條件

在默克公司之矽膠薄層層析片上將藁本內酯指標成分的樣品溶液以毛細管點樣，藁本內酯以四氯化碳：二甲苯：氯仿：正己烷（4：3：2：0.5，v/v）溶媒系統展開⁽²⁷⁾，在紫外燈下觀察，藁本內酯在波長 366nm 下呈強烈藍色螢光點，而阿魏酸在波長 254nm 下呈紫色點。

（二）藁本內酯之 HPLC 分析條件

藁本內酯為當歸根揮發油之主成分，文獻上以高效液相層析法⁽²⁸⁾定量，本研究採用分離管柱：150mmx4.6mm 5 μ Hypers[®] ODS，Mobile phase：甲醇：水：乙腈（33：46：21）、Flow rate：1.0ml/min、UV detection：275nm，並以積分儀記錄 HPLC 圖譜及積分各峰面積。

九、中草藥當歸標準品之 process standard (過程標準作業程式，包括純化、標定、安定性試驗、貯存條件) 之訂定

依照本計劃所擬定的研究方法，訂定其標準作業程式，以供參考使用。

十、中草藥當歸標準品之標準作業程式 (SOP) 之訂定

依照本計劃所擬定的研究方法，訂定其當歸標準品藁本內酯 (ligustilide) 標準作業程式，以供參考使用。

十一、在執行安定性試驗 (虐待試驗) 過程中，必須利用苛刻的溫濕度或光線條件，誘導分解，追蹤且檢出其主要分解成分，並制定其檢驗之 SOP

(一) 藁本內酯 (ligustilide) 的安定性試驗

根據文獻報導⁽²⁷⁾，藁本內酯在空氣中容易分解，如點樣在薄層層析板上，室溫下也只能維持 2 小時內穩定，超過 2 小時則藁本內酯的含量逐漸降低，點樣量越大，變化越顯著。為比較藁本內酯在空氣中與低溫保存下的分解情形，本研究利用高效液相層析儀分析藁本內酯的含量。稱取 10mg 的藁本內酯溶於 250 μ l 的正己烷中，參考行政院衛生署 94 年 3 月 31 日所公告的藥品安定性試驗基準⁽²⁹⁾，其儲存條件為 $-20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\% \text{RH}$ 、 $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\% \text{RH}$ 情況下進行試驗及 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\% \text{RH}$ 情況下進行虐待試驗，於固定時間間隔，各取 10 μ l 注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較溫度對安定性之影響，並制定其檢驗之 SOP。

(二) 當歸補血湯中藁本內酯 (ligustilide) 的安定性試驗

根據文獻報導⁽²⁷⁾，藁本內酯在空氣中容易分解，如點樣在薄層層析板上，室溫下也只能維持 2 小時內穩定，超過 2 小時則藁本內酯的含量逐漸降低，點樣量越大，變化越顯著。為比較藁本內酯在空氣中與低溫保存下的分解情形，本研究利用高效液相層析儀分析藁本內酯的含量。稱取 10mg 的藁本內酯溶於 250 μ l 的正己烷中，參考行政院衛生署 94 年 3 月 31 日所公告的藥品安定性試驗基準⁽²⁹⁾，其儲存條件為 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\% \text{RH}$ 及 $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\% \text{RH}$ 情況下進行試驗及 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $75\% \pm 5\% \text{RH}$ 情況下進行虐待試驗，於固定時間間隔，

各取 10 μ l 注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較時間對安定性之影響，並制定其檢驗之 SOP。

十二、匯集各項有效之中草藥標準品之相關品質控管資料，協助衛生署相關政策之擬定，供行政院衛生署政策推動

提升中藥製劑之品質，其品質管制是最重要的項目之一，所以匯集中草藥當歸的標準品，藁本內酯 (ligustilide) 的相關資料，以利於品質的控管。

十三、諮議小組定期召開會議，就研究成果進行討論

設立諮議小組組長一位即為主持人，其他協同主持人也為諮詢小組成員且另外再聘諮議小組成員，其背景專長為藥學領域、藥物分析等領域的專家學者所組成的諮議小組，主要為就研究成果進行討論分析。

參、結果

一、收集其他國家相關文獻參考資料，開發各類檢驗方法以提供中草藥當歸正確品種確認

基原判定：精選當歸之基原進行初步以鏡檢（包括組織切片之鑑別）及 TLC 判定當歸〔*Angelica sinensis* (oliver) Diels〕藥材之基原，進一步使用 HPLC 測定之⁽²⁶⁾。

(一) 外觀

當歸根軸及主根粗短，其下端參差地生有十餘個粗細，長短相似之支根，有時再分出細根，全體略呈馬尾狀，全長約 15~25 cm，根頭直徑約 0.5~1cm，外表黃棕色至焦棕色，表面有不規則的縱皺紋，本品乾燥時質堅硬，但易吸潮變軟而帶韌性⁽¹⁸⁾。見圖一。

(二) 組織切片判定

如圖二~四可見當歸組織中含有栓皮層、皮、皮層、油室、導管、澱粉粒等。經由藥檢局之基源鑑定⁽²⁶⁾相關書籍比對即可確定本計劃中使用之當歸之基源正確。

(三) 薄層層析鑑定 (TLC)

結果如圖五~七顯示，遵照行政院衛生署食品藥物檢驗局所出版之中藥檢測方法（五）之分析方法呈現。

二、自行製備藥方於南部 GMP 中藥廠進行一當歸補血湯(圖二十三)

製造標準程式：

(一) 稱量工程

1. 填寫「工程內容卡」並將識別證一起放置於門上壓克力板內。
2. 稱量前應先清潔欲使用磅秤及核對原料是否正確。
3. 依機械操作說明操作機械，先查看磅秤指針是否歸零。
4. 確認劑室溫濕度是否在標準製劑範圍內並記錄之，若一切正常即繼續進行下一步驟。
5. 倉管人員將所需製劑原料送至緩衝室並先行離開後，製劑人員

再出緩衝區領取原料，並回到秤量室秤重，而後再將「原料秤量卡」黏貼於原料的外袋上。

6. 將所有已秤量好的原料置於同一容器內，並於容器外黏貼「內容物標示卡」。
7. 秤量作業完成後，請主管核對再通知下一工程進行。
8. 將使用後的機械清潔並於機械上張貼「機械清潔卡」，而原來貼在機械上的上一批機械清潔卡撕下來貼於批次內的「機械清潔卡黏貼表」，之後請主管核對之。
9. 離開工作劑室時，要將門上壓克力板內的工程內容卡黏貼至批次內的「工程內容卡黏貼表」上。

(二) 萃取濃縮工程

1. 填寫工程內容卡並將識別證一起放置於門上壓克力板內。
2. 秤量前應先清潔欲使用機械及核對原料是否正確。
3. 依機械操作說明操作機械。先將欲使用磅秤的電源插上並試運轉機械，查看機械是否運作正常。
4. 確認劑室溫濕度是否在標準製劑範圍內並記錄之，若一切正常即繼續進行下一步驟。
5. 作業人員將所需製劑原料一一置入萃取濃縮機內萃取，並加入足以蓋過藥材的 RO 水，進行萃取工程。
6. 將已萃取完成的萃取液移入濃縮桶內，依萃取液液量及欲濃縮倍數設定真空壓力、濃縮時間，繼續進行下一步驟～濃縮。
7. 將所有已萃取濃縮完成的浸膏置於容器內，並於容器外黏貼「內容物標示卡」。
8. 萃取濃縮作業完成後，請主管核對再通知下一工程進行。
9. 將使用後的機械清潔並於機械上張貼「機械清潔卡」，而原來貼在機械上的上一機械清潔卡撕下來貼於批次內的「機械清潔卡黏貼表」，之後請主管核對之。
10. 離開工作劑室時，要將門上壓克力板內的工程內容卡黏貼至批次內的「工程內容卡黏貼表」上。

(三) 噴霧造粒工程

- 1.填寫「工程內容卡」並將識別證一起放置於門上壓克力板內。
- 2.噴霧造粒前應先清潔欲使用機械及核對原料是否正確。
- 3.依機械操作說明操作機械。先將欲使用機械電源插上並試運轉機械，查看機械是否運作正常。
- 4.確認劑室溫濕度是否在標準製劑範圍內並記錄之，若一切正常則請主管核對後即繼續進行下一步驟。
- 5.將萃取濃縮之浸膏與賦型劑一同置入噴霧造粒機進料桶中，設定時間、溫度、風門壓力、噴霧壓力，進行噴霧造粒工程。
- 6.噴霧造粒完成後，通知現場品管人員將噴霧完成之細粒抽樣測其水份含量，確認符合標準值內，並請主管核對。
- 7.確認合格後，作業員即可將噴霧完成之細粒置於容器內，並於容器外黏貼「內容物標示卡」。
- 8.將使用後的機械清潔並於機械上張貼「機械清潔卡」，而原來貼在機械上的上一批機械清潔卡撕下來貼於批次內的「機械清潔卡黏貼表」，之後請主管核對之。
- 9.離開工作劑室時，要將門上壓克力板內的工程內容卡黏貼至批次內的「工程內容卡黏貼表」上。
- 10.半成品送至半成品室後，現場品管員應立即通知品管人員進行半成品-抽樣、抽驗作業。
- 11.品管人員完成抽驗作業後，確定產品品質符合標準，則將容器外黏貼的單據換貼「半成品-放行單」並堆置於半成品室「合格區」，再通知製造部門繼續進行下一工程。
- 12.作業完成後，請主管核對並通知進行下一工程。

三、藥方—當歸補血湯的藥方分析（GMP 中藥廠中進行）

（一）乾燥減重

YL-3 數字顯示型紅外線水分計：按 on/off 鍵開機，出現 0.00g 後將試料均勻鋪放在試料皿內，移動燈罩對準試料皿。連續按「MODE」「SAMPLE」「PRINT」鍵一下，使其顯示 100.0%後，再按「ZERO」鍵歸零，顯示 0.0%。調節溫度，從後面調節螺左右轉動，配合溫度計控制在合適的乾燥溫度，再按加熱開關，待試料恆重時，再讀取含水量。此乾燥減重不得超過 13.1%。

(二) 總灰分

先將古氏坩堝，於 550°C，於乾燥器內放冷，稱量。精確稱取本品 2g，先在電爐上燃燒至無煙為止，移至 450°C 之焚化爐內焚化四小時，然後置於矽膠乾燥器內，冷卻至室溫精確稱重，最後計算灰分之百分率，不得超過 8%。

(三) 酸不溶性灰分

將上述熾灼所得之總灰分，加稀鹽酸（10%）25ml，煮沸五分鐘。用已知重量之古氏坩堝及無灰濾紙過濾，濾渣以熱水洗淨後，熾灼三小時。於乾燥器內放冷，稱定其重量，並計算檢品含酸不溶性灰分之百分率。不得超過 3%。

(四) 稀醇抽提物

先將蒸發皿以 105°C 乾燥一小時，於乾燥器內放冷，稱量。取檢品約 2g，精確稱定，置有玻璃塞之三角錐瓶中，加稀乙醇約 70ml，每隔三十分鐘加以振搖一次，浸漬八小時，靜置十六小時後，以相當 No2 之孔隙濾器自然式過濾。三角錐瓶用稀乙醇洗滌，並將洗液通過濾器洗滌殘渣而與濾液合併，直至全量達 100ml 為止。分取濾液 50ml，置已知重量之蒸發皿中，於水浴器上蒸乾，於 105°C 乾燥四小時，然後計算檢品所含稀乙醇抽提物之百分率。稀醇抽提物之百分率不得低於 32%。

稀醇抽提物 (%) = (1 / 試料重) × 乾燥殘渣重量 × 2 × 100%

(五) 水抽提物

按照上項稀醇抽提物測定法，以水抽提測定，水抽提物之百分率不得低於 34%。

(六) 重金屬

1. 檢品溶液：取檢品 1g 於已知重量之坩鍋中，加適量硫酸使檢品潤濕，用小火熾灼至充分碳化無煙。再加硝酸 2ml 及硫酸 5 滴，小心加熱至不再生白煙，然後於 500~600°C 熾灼至碳分完全消失。取出坩鍋於乾燥器中放冷後加 2ml 稀鹽酸，置水鍋中蒸發至乾，殘渣加鹽酸 3 滴潤濕，再加熱水 10ml 加熱 2 分鐘。加 phenolphthalein T.S 1 滴再加氨試液至溶液呈微紅色。然後再加稀醋酸 2ml，必要時過濾之。坩堝及濾器用水 10ml 洗淨，洗液及濾液合併置納氏管內，加適量之水使成 50ml 混合均勻。

2. 對照溶液：將硝酸 2ml，硫酸 5 滴，稀鹽酸 2ml 置水鍋中蒸發至乾，殘渣加鹽酸 3 滴潤濕，再加熱水 10ml 加熱 2 分鐘。加 phenolphthalein T.S 1 滴再加氨試液至溶液呈微紅色。然後再加 10% 稀醋酸 2ml，必要時過濾之。坩堝及濾器用水 10ml 洗淨，洗液及濾液合併置納氏管內取標準液加入之（定 100ppm 須取鉛標準液 10ml，加水至 50ml）。
 3. 檢查法：檢品溶液與對照液各加硫化鈉試液 1 滴混勻靜置 5 分鐘，然後將兩管並立於白紙上，由管口向下檢視之，檢品溶液所呈之顏色不得較對照品溶液之顏色深。
 4. 結果：檢品溶液顏色不可深於標準液（本品之重金屬應低 100ppm）。
 5. 鉛標準液配製法：取硝酸鉛 159.8mg 溶於稀硝酸（1：100）100ml 中，加水稀釋至 1000ml，精確量取 10ml；加水稀釋至 100ml 即得（本品需用前配製）。本品之重金屬應低於 100ppm。
- (1) 外觀：褐色粉末
 - (2) 平均重量：506mg/粒
 - (3) 重量差異：標示重量 $\pm 10\%$
 - (4) 乾燥減重：3.5%（規格：13.1%以下）
 - (5) 總灰分：3.065%（規格：8%以下）
 - (6) 酸不溶性灰分：0.205%（規格：3%以下）
 - (7) 稀醇抽提物：39.21%（規格：不得低於 32%）
 - (8) 水抽提物：40.16%（規格：不得低於 34%）
 - (9) 重金屬：適（規格：100ppm 以下）
 - (10) 鑑別：薄層層析法

a. 黃耆 b. 當歸

鑑別—薄層層析法

a. 黃耆

結果：如圖八對照藥材溶液與檢液於 R_f 值約 0.52 處有藍白色螢光斑點而對照空白溶液則無。

b. 當歸

結果：如圖九對照藥材溶液與檢液於 R_f 值約 0.21 處有褐色色點而對照空白溶液則無。

鑑別—高效液相層析

當歸補血湯之高效液相層析方面，就指標成分阿魏酸 (Ferulic acid) 和藁本內酯 (ligustilide) 進行鑑別分析。由圖十和圖十一即可評估出當歸補血湯中確實含有指標成分阿魏酸 (Ferulic acid) 和藁本內酯 (ligustilide)，經由高效液相層析的分析檢驗確定所使用的方劑當歸補血湯無誤。

四、進行中藥材當歸的萃取

藥材先經粉碎—當歸乾燥根 10 公斤，經粉碎後，以正己烷 20 公升萃取 5 次，過濾、減壓濃縮，得到正己烷抽出物。10 公斤的當歸乾燥根，可得到 456g 的正己烷層的抽出物，產率為 4.56%，將所得的抽出物保存於冷凍箱（零下 20℃）中備用。

產率計算：產率(%)=實際重量／理論重量 x100%

$$\begin{aligned}\text{產率}(\%) &= 456\text{g}/10000\text{g} \times 100\% \\ &= 4.56\%\end{aligned}$$

五、進行指標成分、藁本內酯 (ligustilide) 之分離、純化

上述當歸的萃取後，放入矽膠管柱層析 (230-400 孔篩) 純化，以正己烷沖提，得到此部分的成分以 ^{13}C -NMR、 ^1H -NMR 光譜數據來鑑定確認此部份為藁本內酯。成功分離純化當歸成分中之藁本內酯，並於附錄圖十二和圖十三之核磁共振圖譜證明並確立其結構。

六、完成部份中草藥標準品之標準作業程式

成功分離純化當歸成分中之藁本內酯，並於附錄圖十二和圖十三之核磁共振圖譜證明並確立其結構。（圖二十四）

七、執行安定性試驗確保藥品有效性及安全性

當歸補血湯的安定性試驗的檢驗項目有九項，就以下的項目進行當歸補血湯近六個月來分別其儲存條件為 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/75\% \pm 5\%\text{RH}$ 和 $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/75\% \pm 5\%\text{RH}$ 情況下進行試驗及 $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}/75\% \pm 5\%\text{RH}$ 情況下進行虐待試驗的安定性試驗的檢測，就外觀檢測部分為褐色粉

末、平均重量約為 506mg/粒、重量差異為標示重量 $\pm 10\%$ 、乾燥減重檢驗規格為 13.1%以下，在六個月中分別在三個不同儲存溫度，其安定性試驗的檢測項目乾燥減重，其檢驗結果數值約為 5.3%（如表一）、總灰分檢驗規格為 8%以下，在六個月中分別在三個不同儲存溫度，其安定性試驗的檢測項目總灰分，其檢驗結果數值約為 3.0%（如表一）、酸不溶性灰分檢驗規格為 3%以下，在六個月中分別在三個不同儲存溫度，其安定性試驗的檢測項目酸不溶性灰分，其檢驗結果數值約為 0.14%（如表一）、稀醇抽提物檢驗規格為不得低於 32%，在六個月中分別在三個不同儲存溫度，其安定性試驗的檢測項目稀醇抽提物，其檢驗結果數值約為 41.3%（如表一）、水抽提物檢驗規格為不得低於 34%，在六個月中分別在三個不同儲存溫度，其安定性試驗的檢測項目水抽提物，其檢驗結果數值約為 46.5%（如表一）及在六個月中分別在三個不同儲存溫度，高效液相層析鑑別法（如圖十四—圖十六），由以上的檢驗方法檢測當歸補血湯的安定性試驗，檢測結果皆在規格範圍內。

八、進行指標成分藁本內酯（ligustilide）之鑑定

藁本內酯在薄層層析法中的分析條件，藁本內酯以四氯化碳：二甲苯：氯仿：正己烷（4：3：2：0.5，v/v）溶媒系統展開，在紫外燈下觀察，藁本內酯在波長 366nm 下呈強烈藍色螢光點，如圖十七。藁本內酯之高效液相層析分析條件，本研究採用分離管柱：150mm \times 4.6mm 5 μ Hypers[®] ODS，Mobile phase：甲醇：水：乙腈（33：46：21）、Flow rate：1.0ml/min、UV detection：275nm，並以積分儀記錄高效液相層析圖譜及積分各峰面積，如圖十八。

九、中草藥當歸標準品之 process standard（過程標準作業程式，包括純化、標定、安定性試驗、貯存條件）之訂定

中草藥當歸標準品藁本內酯（ligustilide）的純化、標定、安定性試驗、貯存條件過程標準作業程式之訂定，在藁本內酯（ligustilide）的純化部份將正己烷抽出物分批放入矽膠管柱（70-230 孔篩）層析分離，依用正己烷沖提，在正己烷溶媒系統沖出部分以 TLC 檢查發現含有強烈藍螢光點，如圖十七。合併濃縮後，再放入矽膠管柱層析（230-400 孔篩）進行純化步驟；在藁本內酯（ligustilide）的標定部份，以正己烷沖提，所得到此部分的成分以 NMR 光譜數據來鑑定確認此部份為藁本內酯，如圖十二及圖十三；在藁本內酯（ligustilide）

的安定性試驗部份，本研究利用高效液相層析儀分析藁本內酯的含量，稱取 10mg 的藁本內酯溶於 250 μ l 的正己烷中，其儲存條件為 -20 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C/75% \pm 5%RH、4 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C/75% \pm 5%RH 情況下進行試驗及 25 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C/75% \pm 5%RH 情況下進行虐待試驗，於固定時間，每次間隔時間為 30 分鐘，各取 10 μ l 注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較溫度對安定性之影響，如圖十九-圖二十一。在藁本內酯 (ligustilide) 的貯存條件部份，由虐待試驗結果可知藁本內酯 (ligustilide) 的最佳貯存條件為 -4 $^{\circ}$ C 冷凍庫中保存。

中草藥當歸標準品藁本內酯 (ligustilide) 之標準作業程式 (SOP) 之訂定。

藁本內酯 (ligustilide) 製造標準程式：

(一) 目的

當歸做成製劑時，因為藁本內酯 (ligustilide) 此種指標成分為易揮發物質，會因為時間和溫度的影響而降解消失，為了穩定品質，建立完善的標準，進而開發與制定中草藥當歸標準品之標準作業程式 (SOP)，並執行安定性試驗，且制定其檢驗的標準作業程式 (SOP)，以確保中草藥標準品的品質管控，進而促進中藥現代化。

(二) 製造標準程式

1. 原料當歸藥材鑑別

- (1) 性狀：五官辨視法，當歸根軸及主根粗短，其下端參差地生有十餘個粗細，長短相似之支根，有時再分出細根，全體略呈馬尾狀，全長約 15~25cm，根頭直徑約 0.5~1cm，外表黃棕色至焦棕色，表面有不規則的縱皺紋，本品乾燥時質堅硬，但易吸潮變軟而帶韌性。
- (2) 組織切片：組織切片，以顯微鏡觀察。當歸組織中含有栓皮層、皮、皮層、油室、導管、澱粉粒等。經由藥檢局之基源鑑定相關書籍比對即可確定本計畫中使用之當歸之基原正確。
- (3) 薄層層析法：取當歸粗粉約 0.3g，加乙醇 5mL，以超音波震盪 5min，過濾，濾液為檢品溶液。另取藁本內酯 (ligustilide) 對照品，加乙醇使溶解，製成 1mg/mL 溶液，

為對照品溶液。取上述兩種溶液各 5mL，分別點於 Silica gel F254 TLC 板 (Merck Art. No. 5554)，以四氯化碳：二甲苯：氯仿：正己烷 (4：3：2：0.5，v/v) 為移動相，展開，取出晾乾，於 UV 366nm 檢視。

2. 藁本內酯 (ligustilide) 含量測定

高效液相層析

- (1) Shimadzu LC10AT，UV 檢測器，Shimadzu CR6A 積分儀；以甲醇：水：乙腈 (33：46：21)，流速為 2mL/min，以 150mm×4.6mm 5μHypers[®] ODS 為分析管柱。偵測波長為 275nm；分析樣品量 10μL。
- (2) 檢品溶液之配製與測定：精確稱取當歸檢品 1.0g，加入最佳抽提溶媒至 10mL，以超音波震盪 60min 後，過濾後再以 0.45μm 之 FP Vericel (PVDF) 濾膜過濾，濾液供作檢液，以高效液相層析儀進行定量分析。

3. 淨選加工製程

- (1) 淨選加工前應先確認場地是否清潔及核對原料是否正確。
- (2) 將當歸挑選洗淨。
- (3) 淨選加工作業完成後，秤重重量為 10kg 進行下一製程。

4. 乾燥製程

- (1) 將淨選完好之原料均勻平鋪於乾燥盤內，移入烘箱進行乾燥工程。
- (2) 完成後則將原料移至另一容器內，秤重重量為 9.84kg。
- (3) 乾燥作業完成後進行下一製程。

5. 粉碎製程

- (1) 將藥材當歸置入粉碎機內粉碎。
- (2) 將完成之藥材置於同一容器內，秤重重量為 9.45kg。
- (3) 粉碎工程作業完成後進行下一製程。

6. 萃取製程

- (1) 作業人員將所需製劑原料當歸乾燥根 9.45kg 加入正己烷 20

公升萃取，進行超音波萃取工程，溫度控制在 25℃，此步驟重覆 5 次。將五次所得的萃取液統一收集，以繼續進行下一步驟。

(2) 將經過五次萃取完成的萃取液置於容器內。

(3) 萃取作業完成後下一製程進行。

7. 過濾工程

(1) 將萃取液進行過濾，過濾後置於同一個容器內。

(2) 作業完成後進行下一製程。

8. 濃縮製程

(1) 將已過濾之當歸萃取液置入濃縮機內，溫度控制在 60℃，濃縮至呈黏稠狀，將所得的抽出物保存於冷凍箱（零下 20℃）中備用，並計算產率是否符合標準值，若產率有異常情形，則須報請製造主管處理，並詳載處置情形於批次內。秤重浸膏重量為 1,824mg，產率為 1.93%。

產率計算：產率(%)=實際重量／理論重量 x100%

$$\begin{aligned}\text{產率}(\%) &= 1,824\text{mg} / 9,450,000\text{mg} \times 100\% \\ &= 0.0019\%\end{aligned}$$

(2) 濃縮工程作業完成後再進行下一製程。

9. 藁本內酯 (ligustilide) 分離純化

藁本內酯 (ligustilide) 之減壓沸點於文獻中並無記載，真空分段蒸餾法係考量其分子結構後所擬之策略，採用真空分段蒸餾對於藁本內酯 (ligustilide) 之分離純化，是一種較佳之選擇。本法經濟、快速，所獲得之藁本內酯 (ligustilide) 之質與量均不輸給管柱層析法。

取濃縮物 912mg 進行真空分段蒸餾，於 b.p.145-155℃ (0.03 mmHg)，獲得藁本內酯 (ligustilide) 黃色液體 34.2mg，產率為 3.75%，與標準品比對，相對純度為 98.04%。另再取濃縮物 912mg 進行管柱層析純化，得藁本內酯 (ligustilide) 16.2g，產率為 1.77%，純度 97.83%。

項目	真空分段蒸餾	管柱層析
產率	80-91%	72-80%
溶媒	不用	大量溶媒
時間	一天	七天
環保	污染小	大量廢液
純度	98.04%	97.83%
設備	蒸餾裝置+真空抽氣機+抽氣管	玻璃管柱+分段收集器
操作	簡單	略需訓練

產率計算：產率(%)=實際重量／理論重量 x100%

10. 藁本內酯 (ligustilide) 結構鑑定

UV：與標準品比對是否一致。

^{13}C -NMR：進行結構鑑定。

^1H -NMR：進行結構鑑定。

11. 藁本內酯 (ligustilide) 指標成份安定性測試

將指標成份藁本內酯 (ligustilide) 液狀及與正己烷溶媒所形成之 1000ppm 溶液於 $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 及 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下之經時變化，記錄於固定時間，每次間隔時間為 30 分鐘，各取 10 μl 檢測溶液注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較溫度對安定性之含量變化影響。

安定性試驗：

樣品之貯存：

(1) 將製備完成之樣品及純抽提物置於濕度 (75%RH) 及 3 種溫度 ($-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 及 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) 所組成的 3 種貯存環境中避光儲存。並分別於貯存第 0 分鐘 (貯存前)，且於固定時間，每次間隔時間為 30 分鐘，各取 10 μl 檢測溶液注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較溫度對安定性之影響。

(2) 安定性實驗數據資料分析：

藁本內酯 (ligustilide) 安定性試驗製程以進行高效液相層析，分析在不同溫度下藁本內酯 (ligustilide) 的含量變化，以比較溫度對安定性之影響，由藁本內酯

(ligustilide) 安定性試驗結果可知，在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 時，藁本內酯 (ligustilide) 在 30 分鐘內即會降解變性；在 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 時，藁本內酯 (ligustilide) 也是在 30 分鐘內即會降解變性；而在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 中，在實驗期 4 小時內皆無降解變性的情形產生，由此即可知藁本內酯 (ligustilide) 最佳貯存條件為 $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 中。

十、在執行安定性試驗（虐待試驗）過程中，必須利用苛刻的溫濕度或光線條件，誘導分解，追蹤且檢出其主要分解成分，並制定其檢驗之 SOP

藁本內酯 (ligustilide) 的安定性試驗（虐待試驗）根據文獻報導，藁本內酯在空氣中容易分解，如點樣在薄層層析板上，室溫下也只能維持 2 小時內穩定，超過 2 小時則藁本內酯的含量逐漸降低，點樣量越大，變化越顯著。為比較藁本內酯在空氣中與低溫保存下的分解情形，本研究利用高效液相層析儀分析藁本內酯的含量。稱取 10mg 的藁本內酯溶於 250 μl 的正己烷中，參考行政院衛生署 94 年 3 月 31 日所公告的藥品安定性試驗基準，其儲存條件為 $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\%\pm 5\%\text{RH}$ 、 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\%\pm 5\%\text{RH}$ 情況下進行試驗及 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}/75\%\pm 5\%\text{RH}$ 情況下進行虐待試驗，於固定時間，每次間隔時間為 30 分鐘，各取 10 μl 注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較溫度對安定性之影響，如圖十九-圖二十一。

（一）藁本內酯 (ligustilide) 安定性試驗製程過程標準作業程式之訂定

1. 將已完成之半製品秤量，秤取藁本內酯 (ligustilide) 30 μg ，加入正己烷定容至 30mL，作為安定性檢測溶液。
2. 將安定性檢測溶液分裝成 24 瓶。
3. 藁本內酯 (ligustilide) 安定性試驗製程，分別將八瓶安定檢測溶液置於 $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ；八瓶安定性檢測溶液置於 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ；八瓶安定性檢測溶液置於 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，進行安定性試驗。
4. 於固定時間，每次間隔時間為 30 分鐘，各取 10 μl 檢測溶液注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較溫度對安定性之影響。

（二）當歸補血湯中藁本內酯 (ligustilide) 的安定性試驗

根據文獻報導，藁本內酯在空氣中容易分解，如點樣在薄層層析板上，室溫下也只能維持 2 小時內穩定，超過 2 小時則藁本內酯的含量逐漸降低，點樣量越大，變化越顯著。為比較藁本內酯在空氣中與低溫保存下的分解情形，本研究利用氣相層析儀分析藁本內酯的含量。稱取 10mg 的藁本內酯溶於 250 μ l 的正己烷中，參考行政院衛生署 94 年 3 月 31 日所公告的藥品安定性試驗基準，其儲存條件為 25 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C/75% \pm 5%RH 和 30 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C/75% \pm 5%RH 情況下進行試驗及 40 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C/75% \pm 5%RH 情況下進行虐待試驗，於固定時間，每次間隔時間為一、三及六個月，各取 10 μ l 注入 HPLC 管柱中分析當歸補血湯中藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較時間對安定性之影響，如圖十四—圖十六。

(三) 當歸補血湯中藁本內酯 (ligustilide) 的安定性試驗製程過程標準作業程式之訂定

1. 將已完成之當歸補血湯，分別將三瓶安定檢測溶液置於 25 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C；三瓶安定性檢測溶液置於 30 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C；三瓶安定性檢測溶液置於 40 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C，進行安定性試驗。
2. 於固定時間，每次間隔時間為一、三及六個月，拿放置在三個不同溫度的當歸補血湯，各秤取當歸補血湯 1g，加入正己烷定容置 10ml，取檢測溶液注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較溫度對安定性之影響。

十一、匯集各項有效之中草藥標準品之相關品質控管資料，協助衛生署相關政策之擬定，供行政院衛生署政策推動

提升中藥製劑之品質，其品質管制是最重要的項目之一，所以匯集中草藥當歸的標準品，藁本內酯 (ligustilide) 的相關資料，以利於品質的控管。如附錄一。

十二、成立諮議小組，定期召開會議，就研究成果進行討論

成立諮議小組，主要成員劉淑芳、張文德、張永勳、周良穎、李威著、等人第一次會議於中華民國 95 年 11 月 08 日舉行，會議內容就現代化科學化研究方法對安定性實驗過程、利用苛刻的溫溼度或光線條件，檢出主要成分，相關議題研討。附錄二。

第二次會議訂於中華民國 95 年 11 月 19 日舉行，就現代化科學研究方法對安定性實驗過程，複方中當歸四逆湯、四物湯、歸脾湯中當歸之藁本內酯，對苛刻的溫溼度或光線條件，檢出主要分解成分，相關議題研討。此成分研究資料顯示，其超級不安定，不是適用作安定性之檢測，但純研究看看或許也無妨。附錄三。

第三次會議中華民國 95 年 12 月 03 日，就現代化科學研究方法對安定性實驗過程，複方中當十全大補湯、八珍湯、聖愈湯中當歸之藁本內酯，對苛刻的溫溼度或光線條件，檢出主要分解成分。附錄四。

第四次會議訂於中華民國 96 年 10 月 24 日舉行，會議內容就現代化科學研究方法對安定性實驗過程，複方中當歸四逆湯、四物湯、歸脾湯中當歸之藁本內酯，其最佳的儲存條件為何，就此部分進行安定性試驗。附錄五。

肆、討論

當歸為繖形科植物 *Angelica sinensis* (Oliver) Diels 的乾燥根，為重要的中藥材之一，做成製劑主要用於抗發炎、平喘、抗血栓、補血與保護肝臟等。為了推動中草藥標準品之研究與開發，開發各類檢驗方法以提供中草藥正確品種確認，當歸做成製劑時，因為藁本內酯 (ligustilide) 此種指標成分為易揮發物質，會因為時間和溫度的影響而降解消失，為了穩定品質，建立完善的標準，進而開發與制定中草藥當歸標準品之標準作業程式 (SOP)，並執行安定性試驗，由研究結果顯示藁本內酯 (ligustilide) 其最佳的儲存條件為：將所得的藁本內酯 (ligustilide) 保存於冷凍箱 (零下 20℃) 中，且制定其檢驗的標準作業程式 (SOP)，以確保中草藥標準品的品質管控進而促進中藥現代化。

伍、結論與建議

指標成分目前多數自國外進口，不但價格昂貴且訂購費時，甚或買來的指標成分標準品有些純度不足無法使用，或者缺貨無法買到等諸多問題，嚴重地耽誤中藥之檢驗工作，因此長遠來看，國內應自行製備中藥之指標成分，才能達到自給自足之境界。不論是單味藥或方劑中之當歸的品質管制，藁本內酯 (ligustilide) 為指標成分，根據廠商的目錄，藁本內酯雖然可自國外申購，但是價格卻相當的昂貴，因此指標成分之製備為刻不容緩之工作。

藁本內酯 (ligustilide) 之抽提溶媒採用正己烷，較之其他抽提溶媒之抽提率高。本研究採用真空分段蒸餾法，將藁本內酯 (ligustilide) 以低壓低溫之方式蒸餾而獲得，較之傳統之管注層析法，有快、省、量大及低污染之優點，且純度高，不需特殊操作技術及設備。

指標成份藁本內酯 (ligustilide) 液狀及與正己烷溶媒所形成之 1000ppm 溶液於 $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 及 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 下之經時變化，記錄於固定時間，每次間隔時間為 30 分鐘，各取 10 μl 檢測溶液注入 HPLC 管柱中分析藁本內酯 (ligustilide) 含量，以比較溫度對安定性之含量變化影響，由藁本內酯 (ligustilide) 安定性試驗結果可知，在 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 時，藁本內酯 (ligustilide) 在 30 分鐘內即會降解變性；在 $4^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 時，藁本內酯 (ligustilide) 也是在 30 分鐘內即會降解變性；而在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 中，在實驗期 4 小時內皆無降解變性的情形產生，由此即可知藁本內酯 (ligustilide) 最佳貯存條件為 $-20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 中。

根據廠商的目錄，藁本內酯國外申購，藁本內酯 (ligustilide) 5mg 價格為 12,000 元相當的昂貴，本計劃所製成的藁本內酯 3.42g 價格為 55,350 元，跟國外申購相較下便宜很多。

為了穩定中藥品質，確保中藥標準品製備時品質的有效管控，需各別對中藥標準品藁本內酯 (ligustilide) 訂定其標準作業程式，過程標準作業套裝程式含純化、標定、安定性試驗、貯存條件之訂定，進而建立完善的標準促進中藥現代化及統一的標準規格，而使得提升品質和中藥製劑的評價，且匯集各項有效之中草藥標準品之相關品質控管資料，協助衛生署相關政策之擬定，供衛生署政策推動。

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 CCMP95-TP-012 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 中藥檢驗方法專輯（一），行政院衛生署藥物食品檢驗局（1988）。
2. 中藥檢驗方法專輯（二），行政院衛生署藥物食品檢驗局（1989）。
3. 中藥檢驗方法專輯（三），行政院衛生署藥物食品檢驗局（1991）。
4. 中藥檢驗方法專輯（四），行政院衛生署藥物食品檢驗局（1992）。
5. 中藥檢驗方法專輯（五），行政院衛生署藥物食品檢驗局（1994）。
6. 中藥檢驗方法專輯（六），行政院衛生署藥物食品檢驗局（1994）。
7. 中藥檢驗方法專輯（七），行政院衛生署藥物食品檢驗局（1995）。
8. 張光雄：中藥方劑之定性與定量研究，明通醫藥雜誌社（1994）。
9. 林雲蓮、陳介甫：台灣市售中藥 HPLC 圖譜之鑑定，行政院衛生署八十年度研究報告。
10. 孫慈悌、李佩端：中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十年度研究（DOH80-50c）。
11. 孫慈悌、李佩端：中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十年度研究（DOH81-TD-062c）。
12. 孫慈悌、李佩端：中藥製劑化學成分之定量研究，行政院衛生署八十年度研究（DOH82-TD-014c）。
13. 程亦妮、許順吉：中藥方劑三黃及大黃黃連瀉心湯中黃連成分之定量研究。
中醫藥雜誌 1992；3(2)：23-32。
14. 許順吉、吳碩傳、梁丕偉、陳鴻仁、呂瓊芳：中藥製劑化學成份之定量研究，行政院衛生署八十三年度研究報告（DOH83-CM-012b）。
15. 孫慈悌、李佩端、徐素蘭、許馨娥、許嘉茹：中藥製劑化學成份之定量研究，行政院衛生署八十三年度研究報告（DOH83-CM-012c）。
16. 孫慈悌、吳吳龍、吳銀祝：中藥製劑化學成份之定量研究，行政院衛生署八十三年度研究報告（DOH83-CM-012d）。
17. 新編中藥大辭典上、中、下，新文豐出版公司。
18. 張賢哲、蔡貴花：中藥炮製學。中國醫學院印行。
19. 葉定江、張世臣：中藥炮製學。中醫藥學高級。

20. 中藥大辭典上、中、下，新文豐出版公司。
21. 林宜信主編：中藥對照用指用標成份物理化學資料彙編。行政院衛生署中醫藥委員會。臺北，2002。
22. 陳榮福編著：中藥藥理學。國立中國醫藥研究所出版，1991，69。
23. 何志峰譯：和漢藥物學。國立中國醫藥研究所出版，1992，110。
24. 林茂等：當歸化學成分的研究。藥學學報 1979；14(10)：529。
25. 李家仁：中國當歸化學成分的研究，中草藥 1983；14(8)：377。
26. 林宜信主編：台灣市售中藥材真偽及代用品圖集。行政院衛生署中醫藥委員會。臺北，2002。
27. 呂瑞綿、何麗一、方洪鉅、張秀琴：當歸和歐當歸中藁本內酯的薄層掃描測定法。藥學學報 1980；15(6)：371。
28. 野呂征男、久田陽一、奧田和代、川村智子、石川育子、久井英二、田中俊弘：pharmacognostical Studies of Angelicae Radix (1) phthalide Content of wild Angelica Strains。生藥學雜誌 1989；43(1)：55。
29. 行政院衛生署，民國 94 年 04 月 01 日，衛署藥字第 0940310335 號公告：藥品安定性試驗基準。

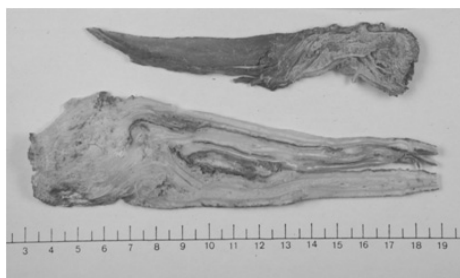
柒、圖表

表一 當歸補血湯的安定性試驗

檢測項目	安定性試驗		
	溫度		
	25℃	30℃	40℃
乾燥減重			
當月	5.1±1.4%	5.3±1.8%	5.3±1.7%
第一個月	5.1±1.6%	5.4±1.2%	5.3±1.6%
第二個月	5.1±1.2%	5.1±1.5%	5.3±1.8%
第三個月	5.3±1.8%	5.3±1.9%	5.2±1.5%
第六個月	5.2±1.4%	5.1±1.6%	5.2±1.7%
總灰分			
當月	3.1±1.4%	3.2±1.6%	3.1±1.9%
第一個月	3.1±1.4%	3.1±1.8%	3.4±1.6%
第二個月	3.0±1.9%	3.1±1.7%	3.3±1.7%
第三個月	3.1±1.2%	3.1±1.8%	3.2±1.6%
第六個月	3.2±1.6%	3.2±1.8%	3.2±1.2%
酸不溶性灰分			
當月	0.14±1.4%	0.13±1.7%	0.15±1.6%
第一個月	0.13±1.6%	0.15±1.6%	0.13±1.6%
第二個月	0.14±1.9%	0.14±1.5%	0.12±1.1%
第三個月	0.12±1.8%	0.12±1.9%	0.15±1.5%
第六個月	0.15±1.9%	0.14±1.8%	0.13±1.4%
稀醇抽提物			
當月	41.3±1.6%	41.2±1.8%	41.4±1.7%
第一個月	41.4±1.6%	41.3±1.2%	41.4±1.6%
第二個月	41.5±1.3%	41.3±1.5%	41.4±1.8%
第三個月	41.3±1.8%	41.6±1.7%	41.4±1.9%
第六個月	41.4±1.2%	41.5±1.3%	41.3±1.7%
水抽提物			
當月	46.5±1.9%	46.6±1.6%	46.4±1.7%
第一個月	46.4±1.6%	46.5±1.7%	46.5±1.6%
第二個月	46.3±1.5%	46.4±1.5%	46.5±1.9%
第三個月	46.3±1.6%	46.4±1.1%	46.4±1.5%
第六個月	46.4±1.4%	46.3±1.8%	46.5±1.7%

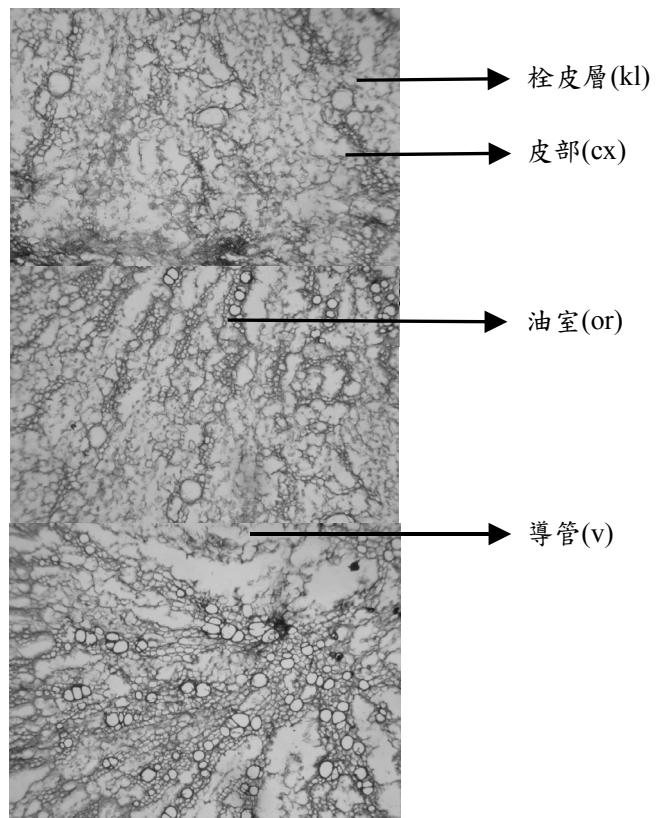


當歸乾燥根

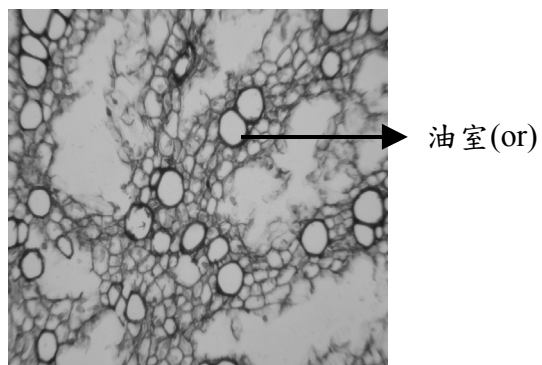


當歸飲片

圖一 當歸外觀鑑定

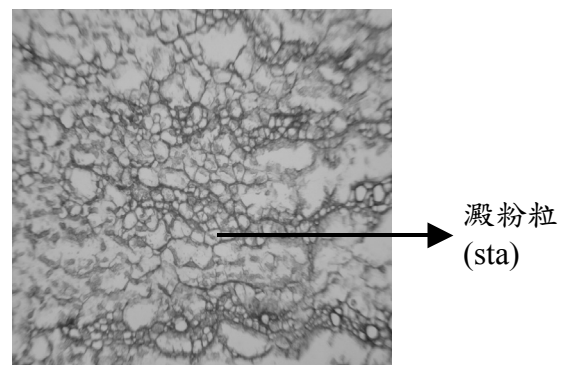


圖二 當歸組織切片圖



當歸組織切片 (40x)

圖三 當歸組織切片圖



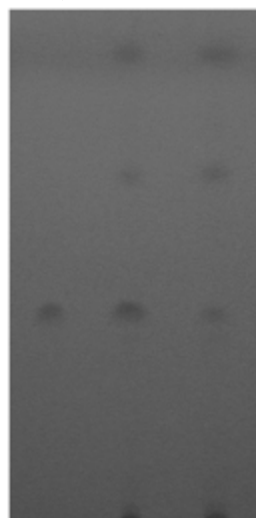
當歸組織切片 (40x)

圖四 當歸組織切片圖

當歸 (Ferulic acid) 之薄層層析條件

- (a)層析板：Silica gel 60 F₂₅₄
- (b)點注量：10μl
- (c)展開距離：10cm
- (d)展開溶媒：C₆H₆ / CHCl₃ / CH₃OH
2 : 2 : 06
- (e)檢出方法：UV 254nm
- (f)結果：Ferulic acid 與當歸萃取液加 Ferulic acid
及當歸萃取液於 R_f 值 0.42 處有暗色斑點

當歸 (Ferulic acid)



R_f 值：0.42

1 2 3

Lane1 : Ferulic acid

Lane2 : Ferulic acid + 當歸萃取液

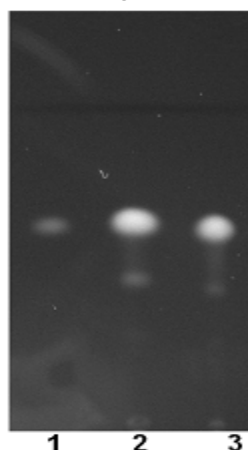
Lane3 : 當歸萃取液

圖五 當歸—Ferulic acid 薄層層析圖

當歸 (Ligustilide) 之薄層層析條件

- (a)層析板：Silica gel 60 F₂₅₄
- (b)點注量：10μl
- (c)展開距離：10cm
- (d)展開溶媒：CHCl₃ / n-Hexan
4 : 1
- (e)檢出方法：UV 366nm
- (f)結果：Ligustilide 與當歸萃取液加 Ligustilide 及
當歸萃取液於 R_f 值 0.51 處有藍白色螢光斑點

當歸 (Ligustilide)



R_f 值：0.51

1 2 3

Lane1 : Ligustilide

Lane2 : Ligustilide + 當歸萃取液

Lane3 : 當歸萃取液

圖六 當歸—Ligustilide 薄層層析圖

黃耆 (Astragaloside IV) 之薄層層析條件

(a)層析板：Silica gel 60 F₂₅₄

(b)點注量：10μl

(c)展開距離：10cm

(d)展開溶媒：Toluene / Ethyl acetate / Methanol

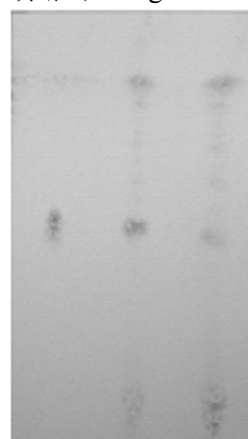
4 : 2 : 1

(e)檢出方法：UV 366nm

(f)結果：Astragaloside IV 與黃耆萃取液加

Astragaloside IV 及黃耆萃取液於 R_f 值 0.49 處有桃紅色斑點

黃耆 (Astragaloside IV)



R_f 值：0.49

1 2 3

Lane1：Astragaloside IV

Lane2：Astragaloside IV + 黃耆萃取液

Lane3：黃耆萃取液

圖七 黃耆—Astragaloside IV 薄層層析圖

當歸補血湯—當歸之薄層層析條件

(a)層析板：Silica gel 60 F₂₅₄

(b)點注量：10μl

(c)展開距離：10cm

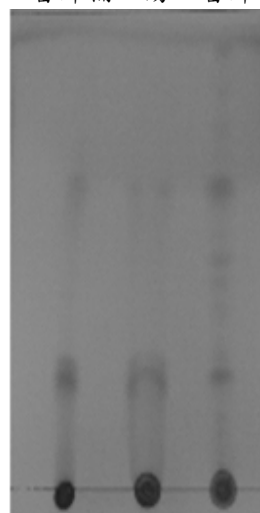
(d)展開溶媒：Toluene / Acetone

4 : 1

(e)檢出方法：碘薰

(f)結果：對照藥材溶液與檢液於 R_f 值 0.21 處有黃色斑點

當歸補血湯—當歸



R_f 值：0.21

1 2 3

Lane1：當歸甲醇抽出液

Lane2：當歸補血湯

Lane3：當歸補血湯去除當歸之溶液

圖八 當歸補血湯—當歸薄層層析圖

當歸補血湯—黃耆之薄層層析條件

(a)層析板：Silica gel 60 F₂₅₄

(b)點注量：10μl

(c)展開距離：10cm

(d)展開溶媒：Toluene / Ethyl acetate / Methanol

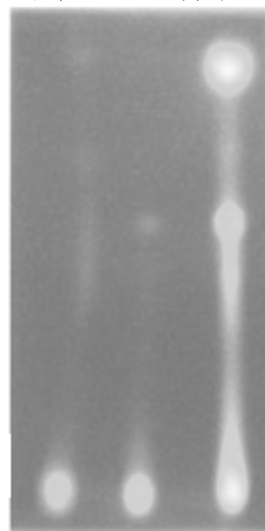
4 : 2 : 1

(e)檢出方法：碘薰

(f)結果：黃耆萃取物與當歸補血湯於 R_f 值 0.52

處有藍色斑點

當歸補血湯—黃耆



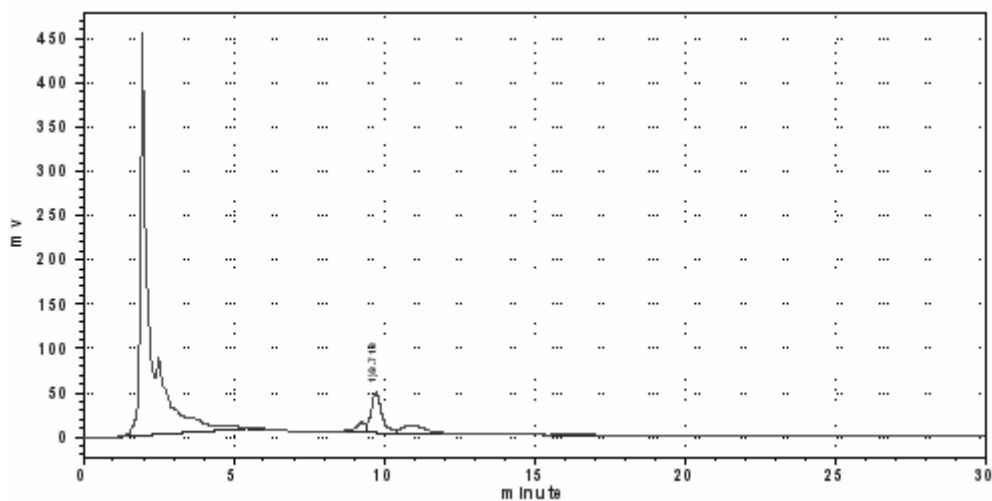
R_f 值：0.52

Lane1：黃耆甲醇抽出液

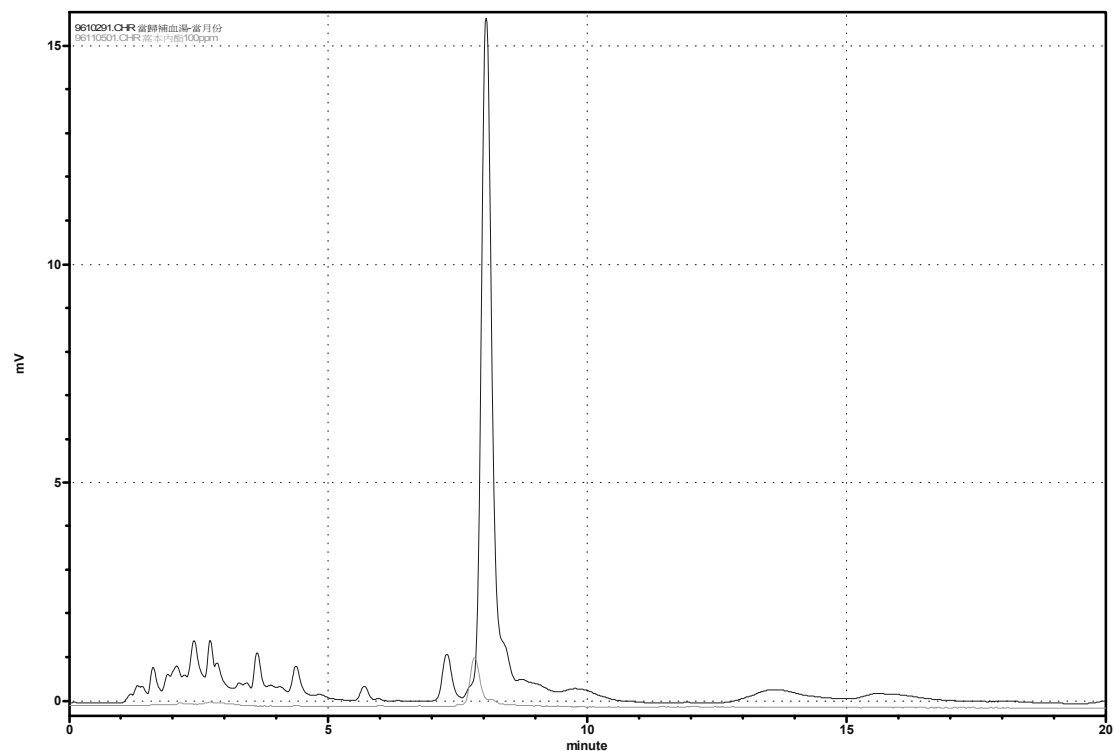
Lane2：當歸補血湯

Lane3：當歸補血湯去除黃耆之溶液

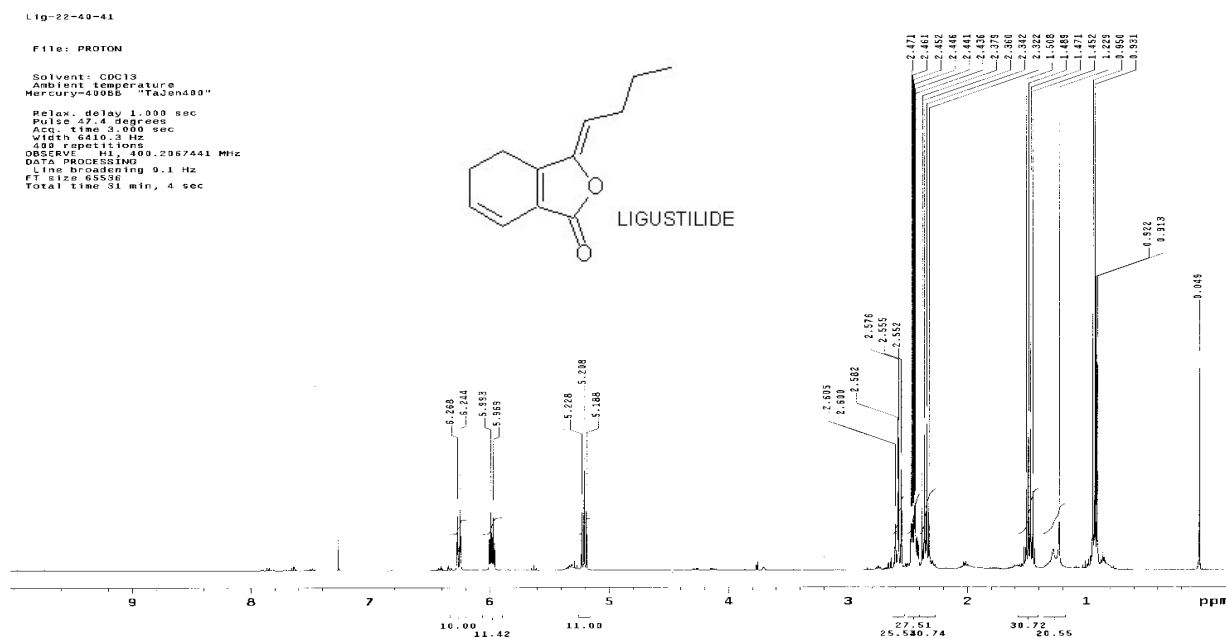
圖九 當歸補血湯—黃耆薄層層析圖



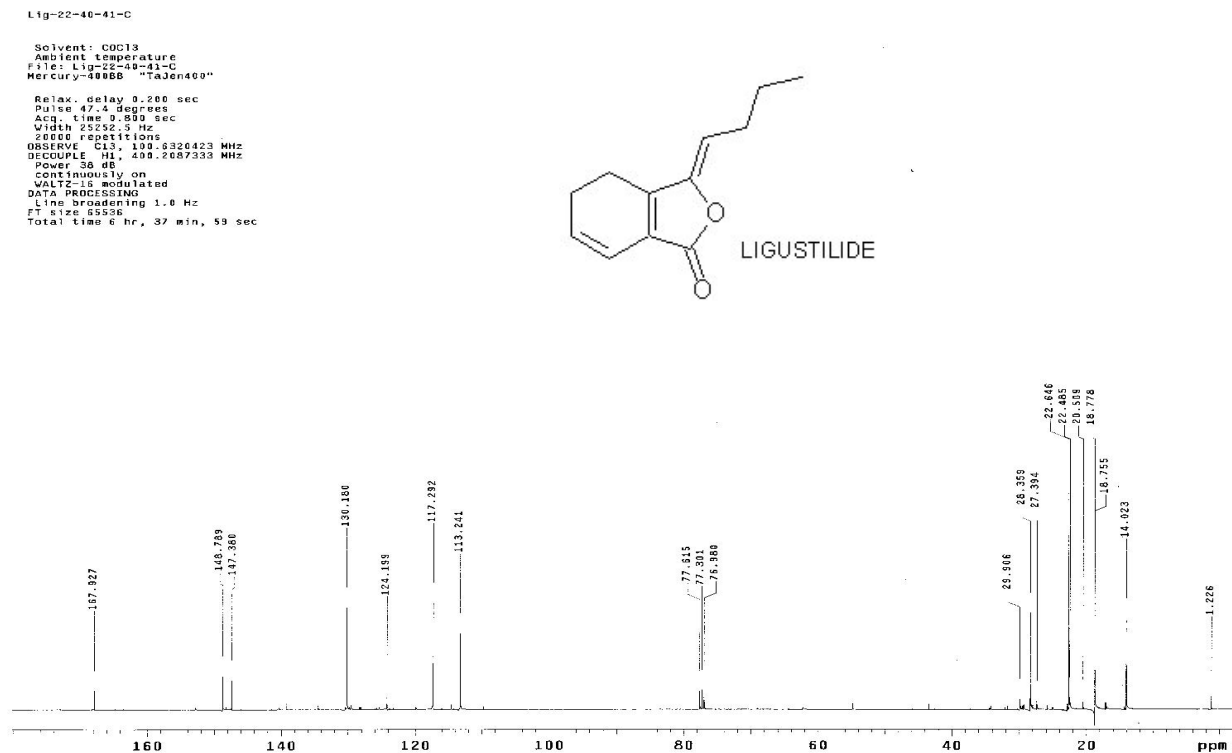
圖十 當歸補血湯中指標成分阿魏酸（Ferulic acid）的高效液相層析圖



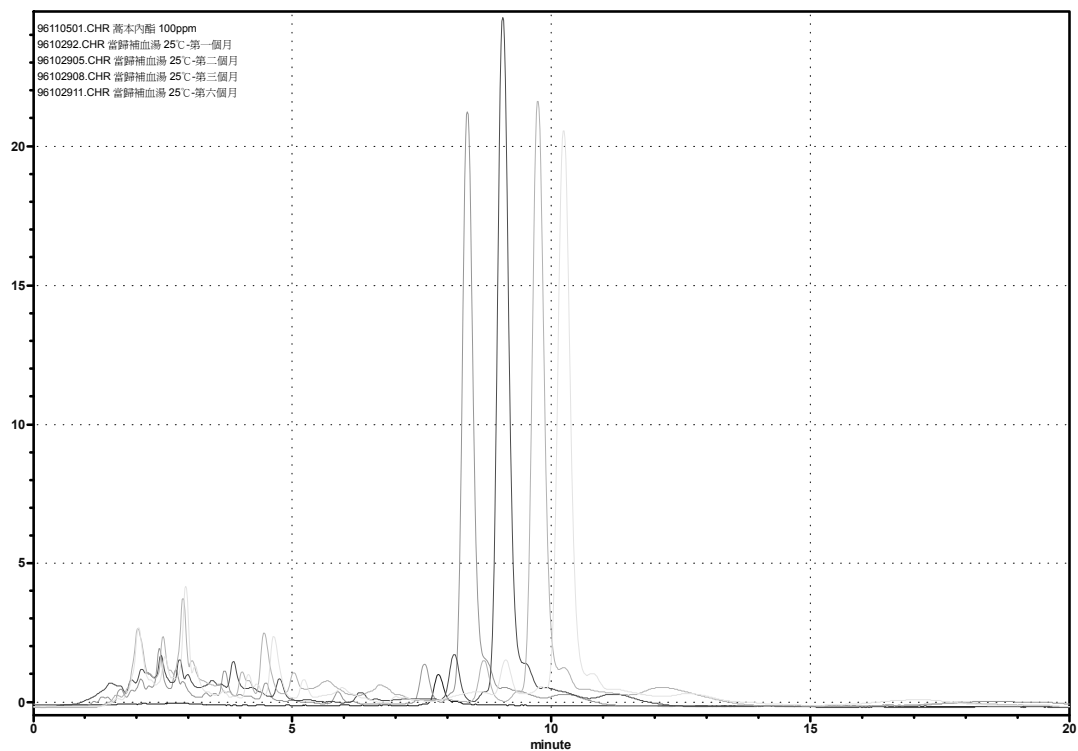
圖十一 當歸補血湯中指標成分藁本內酯 (ligustilide) 的高效液相層析圖



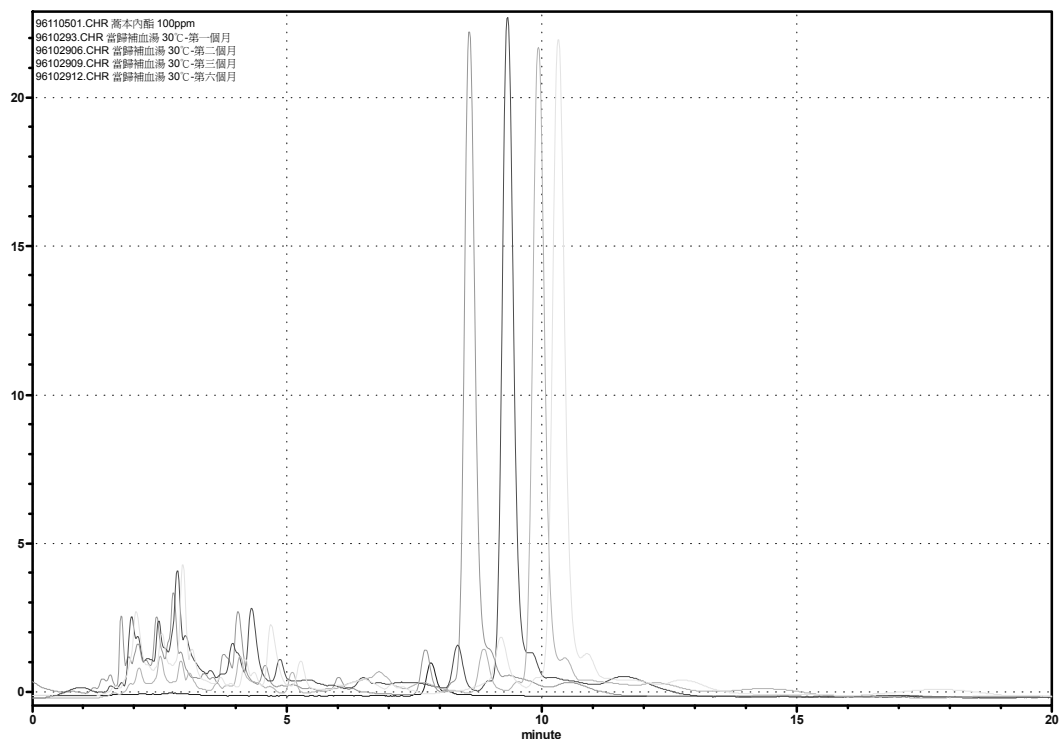
圖十二 藁本內酯之核磁共振圖譜 (^1H -NMR)



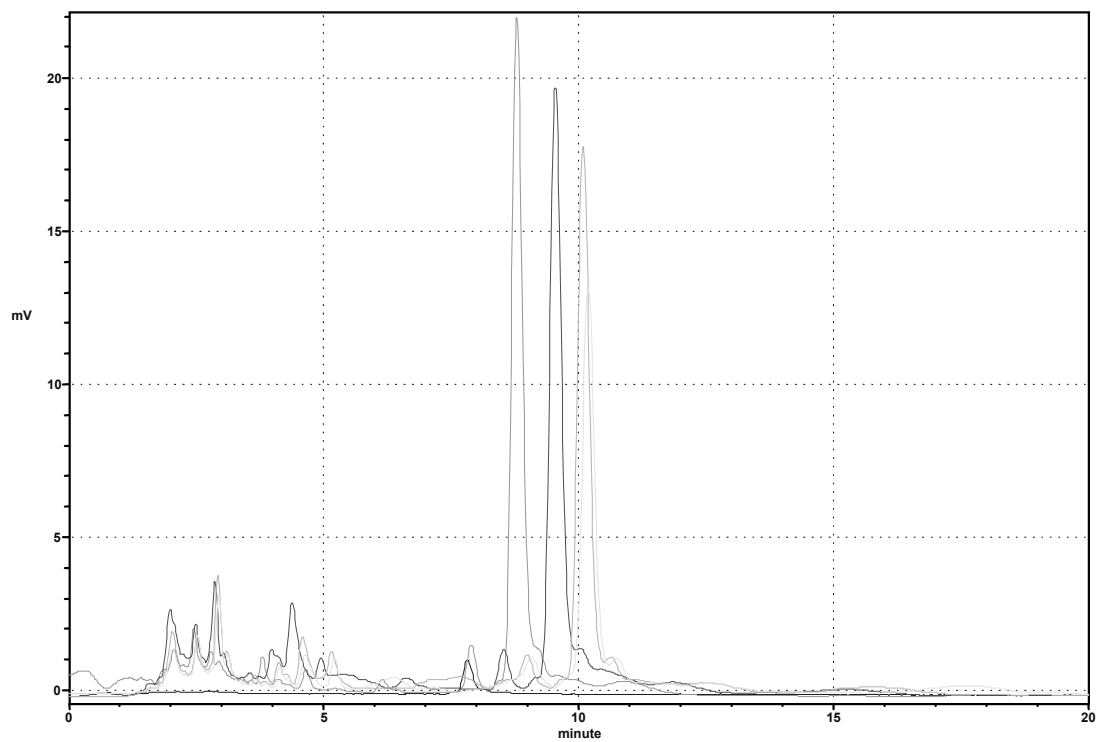
圖十三 藁本內酯之核磁共振圖譜 (^{13}C -NMR)



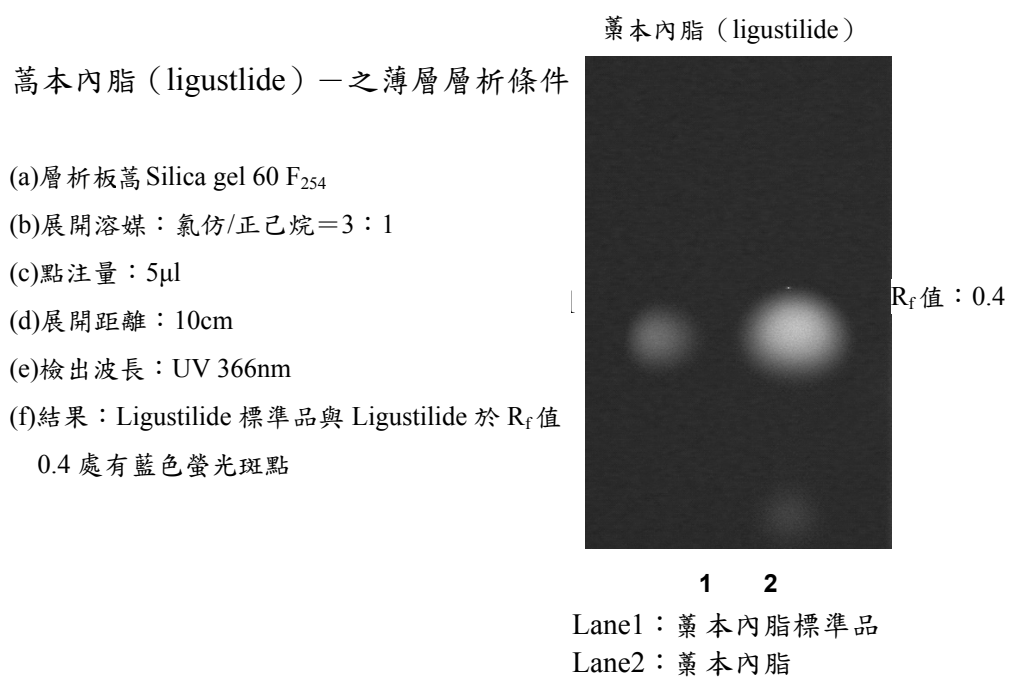
圖十四 當歸補血湯在六個月中分別在 25°C 的儲存溫度其指標成分藁本內酯 (ligustilide) 高效液相層析圖



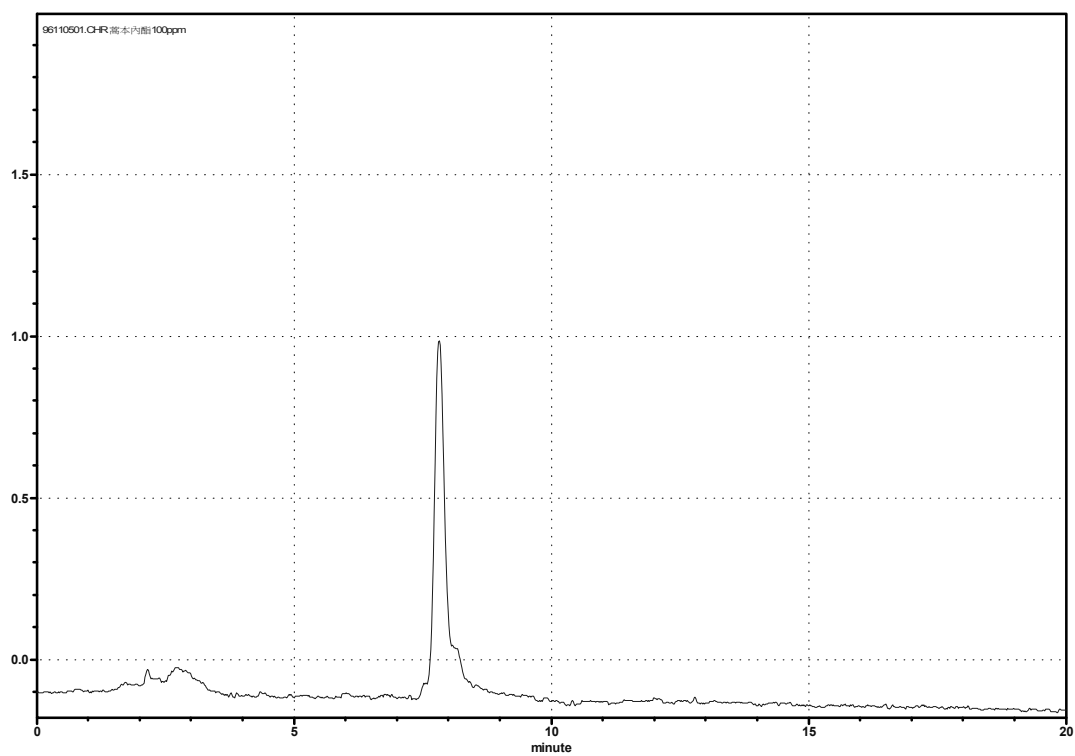
圖十五 當歸補血湯在六個月中分別在 30°C 的儲存溫度其指標成分藁本內酯 (ligustilide) 高效液相層析圖



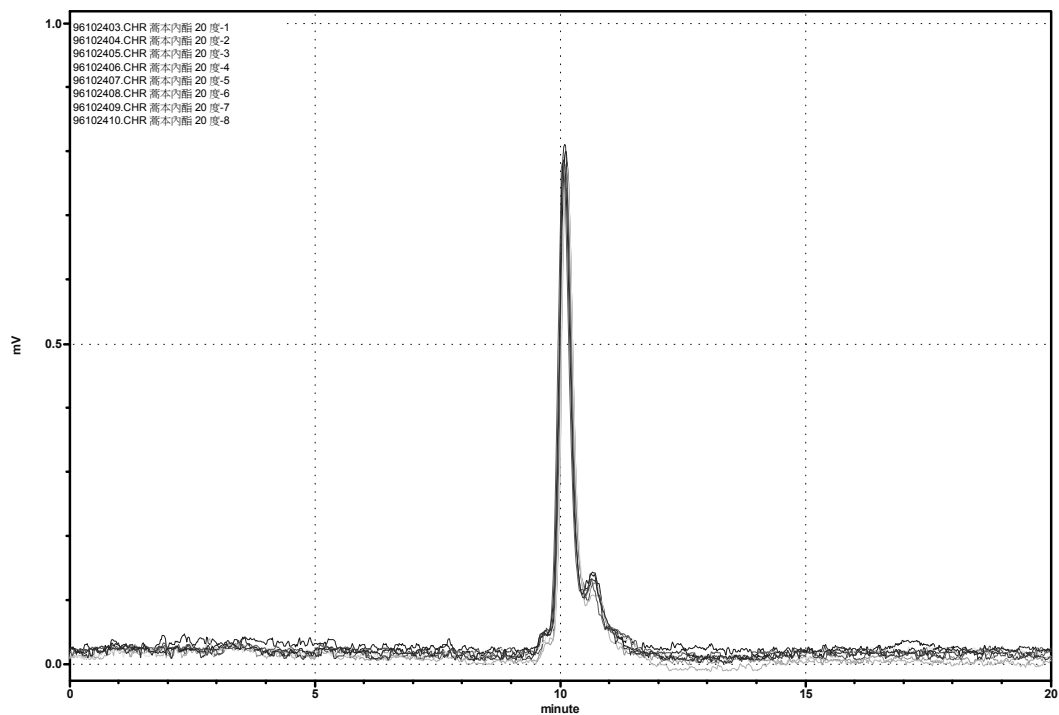
圖十六 當歸補血湯在六個月中分別在 40°C 的儲存溫度其指標成分藁本內酯 (ligustilide) 高效液相層析圖



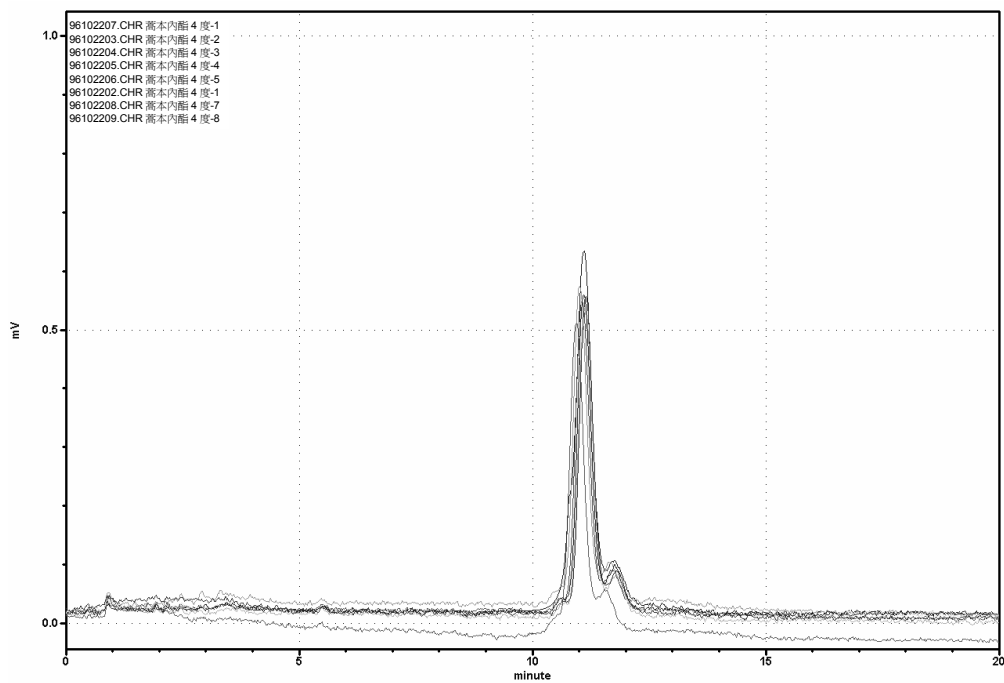
圖十七 藁本內酯 (ligustilide) 薄層層析層析圖



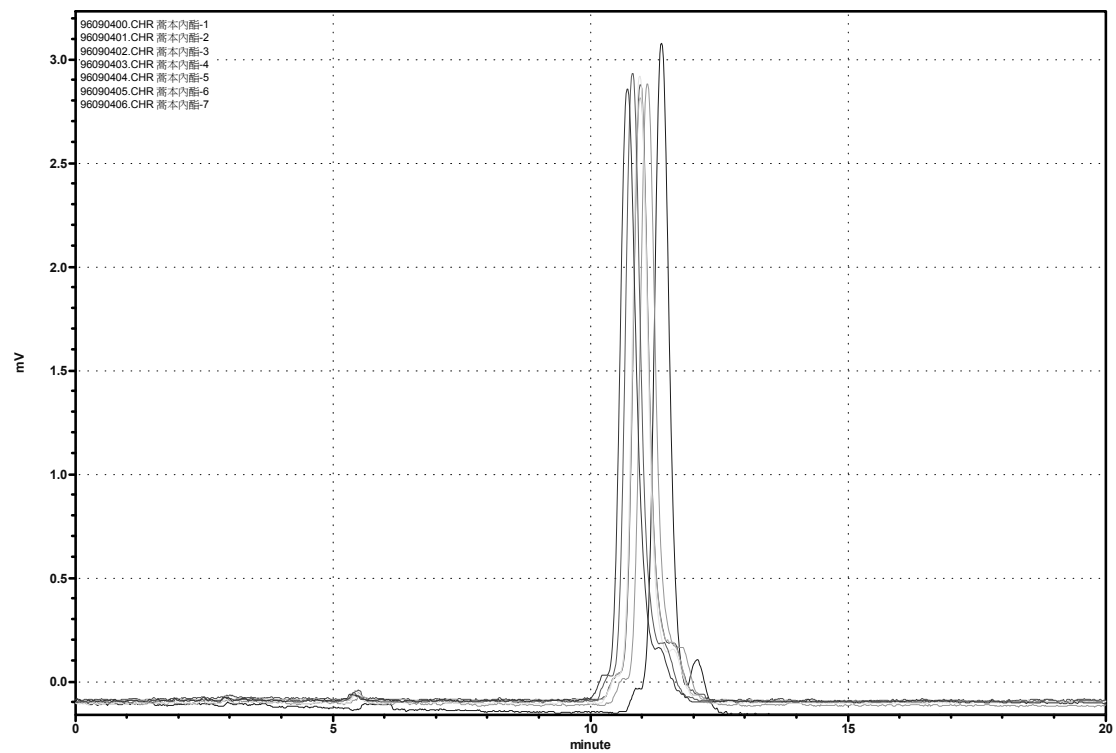
圖十八 藁本內酯 (ligustilide) 高效液相層析圖



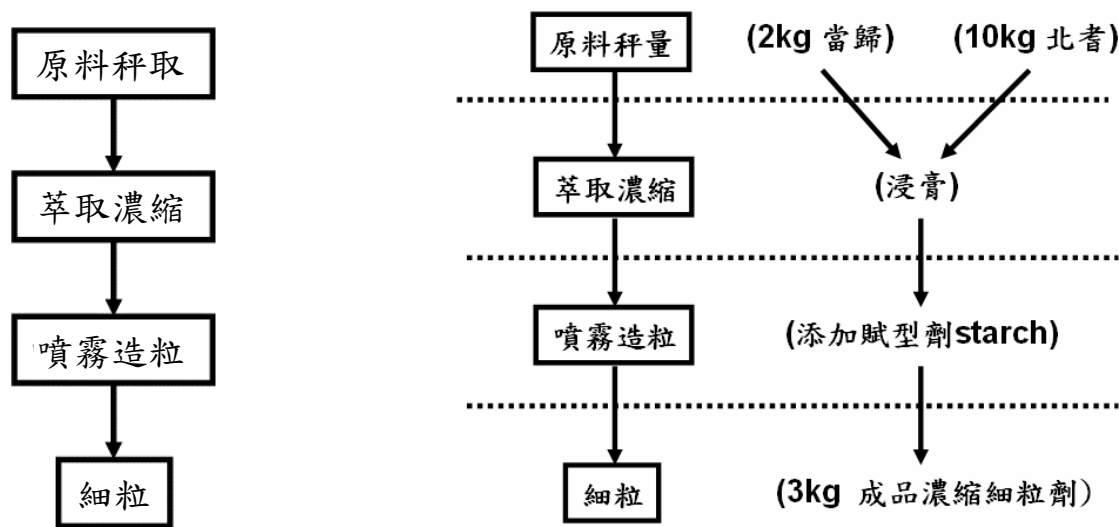
圖十九 藁本內酯 (ligustilide) 在 -20°C 安定性試驗之高效液相層析圖



圖二十 藁本內酯 (ligustilide) 在 4°C 安定性試驗之高效液相層析圖

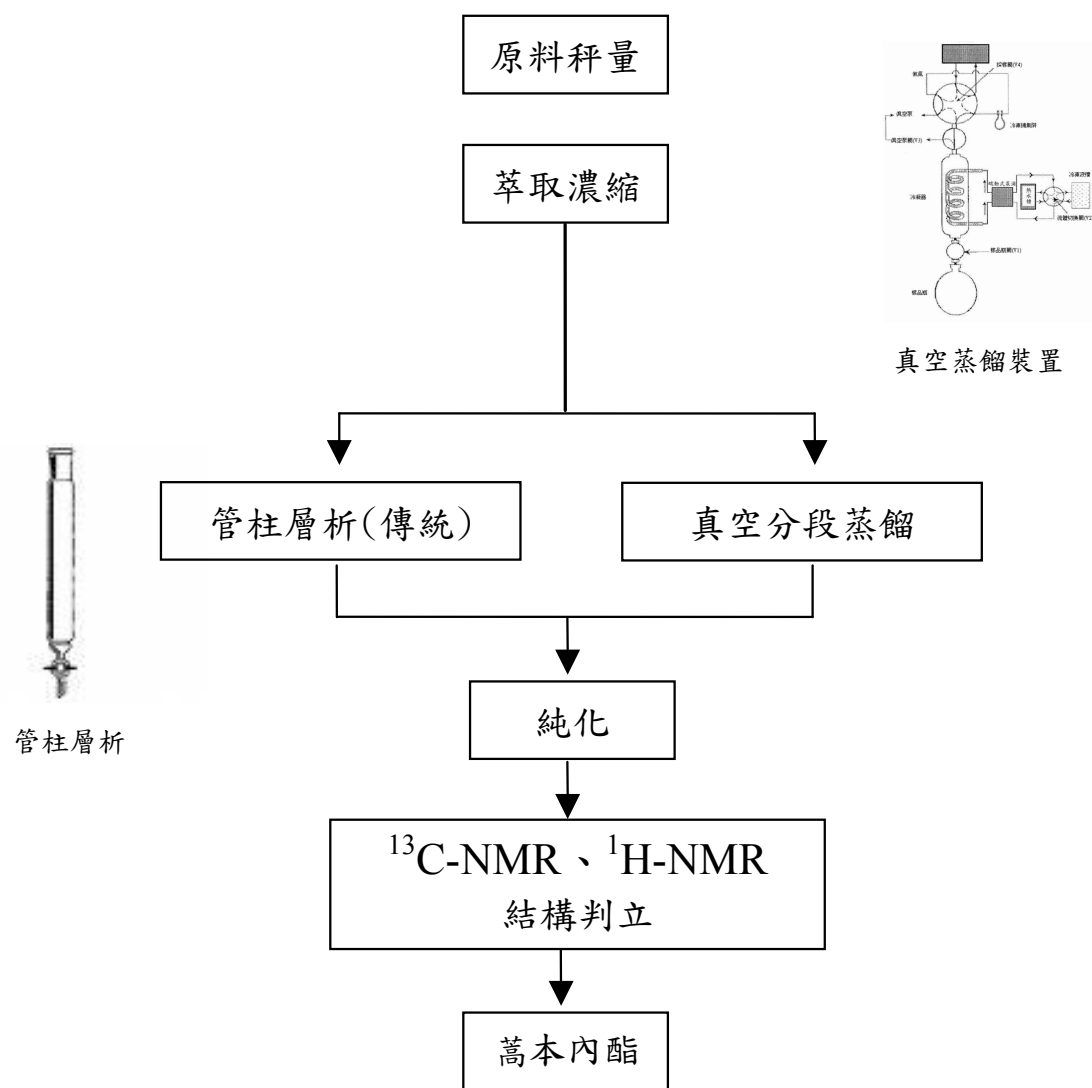


圖二十一 黨本內酯（ligustilide）在 25℃ 安定性試驗之高效液相層析圖



圖二十二 當歸補血湯作業流程

圖二十三 當歸補血湯製造標準程式



圖二十四 標準品之標準作業程序

附錄一



JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

Journal of Chromatography A, 810 (1998) 71–79

Liquid chromatographic–electrospray mass spectrometric study of the phthalides of *Angelica sinensis* and chemical changes of Z-ligustilide

Long-Ze Lin*, Xian-Guo He, Li-Zhi Lian, Wayne King, Jerry Elliott

Research Laboratory of Natural Products Chemistry, East Earth Herb Inc., 4091 W. 11th Avenue, Eugene, OR 97402, USA

Received 14 October 1997; received in revised form 25 February 1998; accepted 9 March 1998

Abstract

High-performance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry has been applied to analyze the chemical constituents of Danggui (the rhizome of *Angelica sinensis*) and to study chemical changes of Z-ligustilide. Twelve phthalides were unambiguously identified as senkyunolide I (**3**), senkyunolide H (**4**), sedanenolide (**8**), butylphthalide (**9**), E-ligustilide (**13**), Z-ligustilide (**14**), Z-butylidenephthalide (**15**), Z,Z'-6.8',7.3'-diligustilide (**16**), angelicide (**17**), levistolide A (**18**), Z-ligustilide dimer E-232 (**19**) and Z,Z'-3.3',8.8'-diligustilide (**20**) in Danggui extract. The existence of 12 other phthalides (**2**, **5–7**, **11**, **12**, **22–27**), ferulic acid (**1**) and coniferyl ferulate (**10**) in Danggui extract has also been demonstrated. Phthalides **3**, **4**, **16–18** and **20** were determined to be the products from chemical change of Z-ligustilide. This is the first report of the existence of 16 compounds (**2–8**, **10–12**, **20**, **22–25** and **27**) in Danggui extract. © 1998 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *Angelica sinensis*; Danggui; Ligustilide; Phthalides; Coniferyl ferulate

1. Introduction

The rhizome of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels (Umbelliferae), known as Danggui in Chinese, is one of the most important traditional Chinese medicines, used for tonifying the blood and treating female irregular menstruation and amenorrhoea. It is also used for treatment of anemia, hypertension, chronic bronchitis, asthma, rheumatism and cardiovascular diseases [1–5]. Over 70 compounds, such as, phthalides, terpenes, aromatic compounds, etc., have been isolated and identified from Danggui [3–10]. Its

main essential component, Z-ligustilide (**14**), other phthalides and ferulic acid (**1**) are thought to be the biologically active components of Danggui [3,5,6]. For this study high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–mass spectrometry (HPLC–ESP–MS) demonstrated the existence of more than 30 phthalides in Danggui. Eighteen phthalides, along with coniferyl ferulate (**10**), were isolated during this study. Their structures are listed in Fig. 1a,b.

Z-Ligustilide (**14**) is a volatile and unstable liquid compound, which can be changed to other phthalides through oxidation, isomerization, dimerization, etc., [11–17]. Z-Ligustilide (**14**) has been also found to exist together with its derivatives in a number of

*Corresponding author.

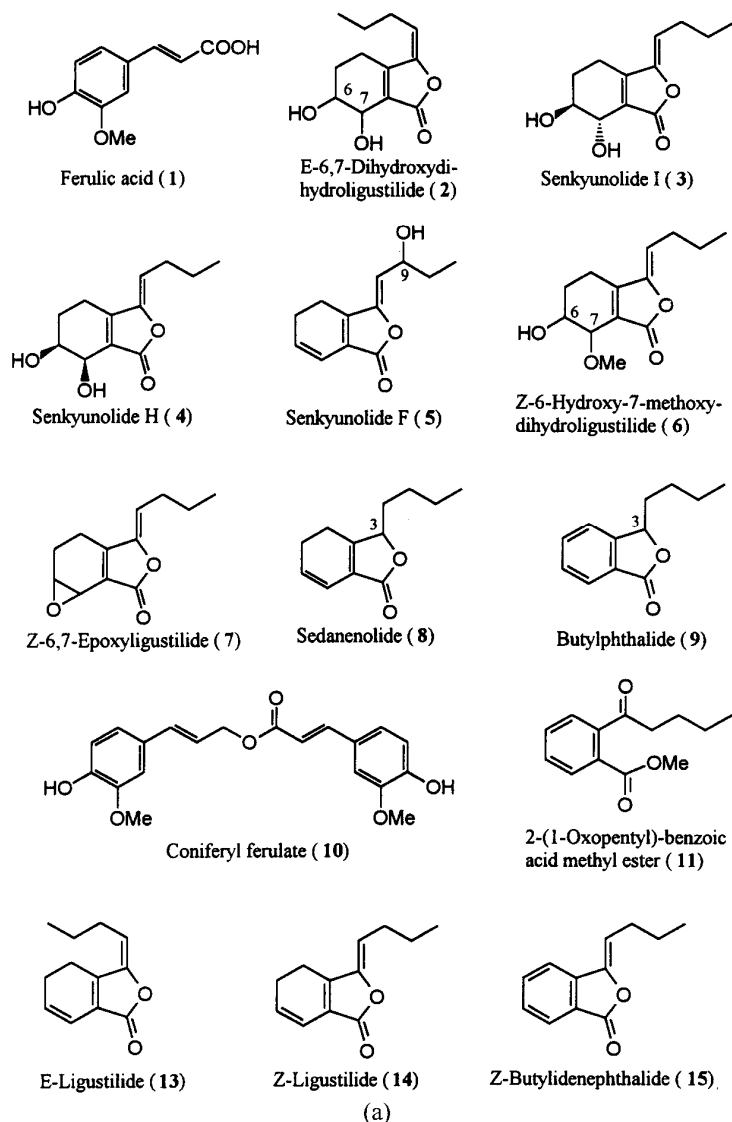


Fig. 1. (a,b) The phthalides and related compounds in Danggui extract.

plants of Umbelliferae [12–25]. These phthalides are also considered to be the biologically active components which are present in several important medicinal herbs, such as the roots of *Ligusticum wallichii* [12], *L. chuangxiong* [18], *L. porteri* [21], *Levisticum officinale* (lovage) [23] and *Cnidium*

officinale [15,24]. In order to monitor the quality of these important herbs and their drug products, it is important to have a rapid, direct and accurate method for the analysis of these components. Some phthalides have been analyzed by gas chromatography (GC)–MS [8–10,19,25] and LC–UV [11,26–

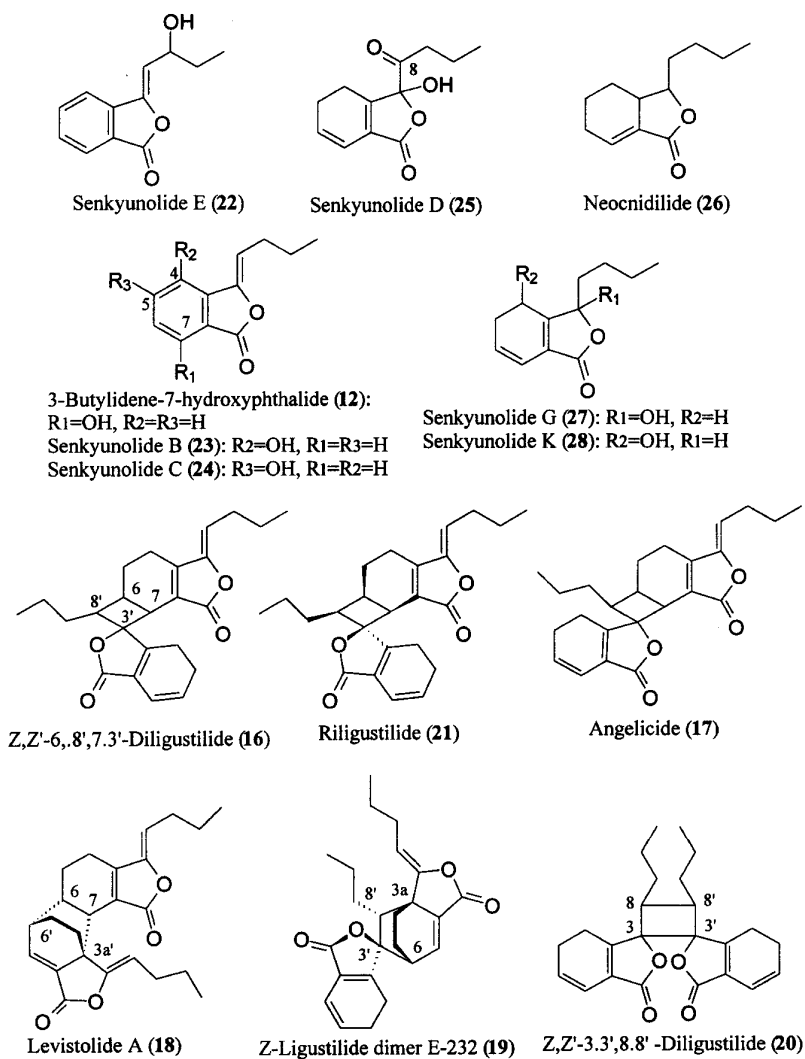


Fig. 1. (continued)

31]. Since some phthalides, for example Z-ligustilide, decompose rapidly at high temperature, GC is not capable of detecting such unstable compounds [11]. In addition to this, LC–UV could not identify most peaks in Danggui extract. This is the first report to use LC–ESP–MS for identification of the phthalides in Danggui and the main products from chemical changes of **14**.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

An HP 1090 Series II LC system (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) with photodiode array detection set at 270 nm was coupled to an HP 5989 B quadrupole mass spectrometer. UV spectra were

obtained by scanning from 200 nm to 500 nm. For chromatography a Waters Symmetry C₁₈ column (5 μ m, 150 \times 2.1 mm) with a Sentry guard column (Symmetry C₁₈, 5 μ m, 20 \times 3.9 mm) was used. The mobile phase consisted of (A) water (0.25% HAc) and (B) methanol using a linear gradient of 35–100% B in 40 min, and 100–35% B in 40–42 min. The flow-rate was set at 0.2 ml/min, and the oven temperature was set at 45°C. The ESP-MS spectra were acquired in the positive ion mode, using an electrospray interface Model HP 59987 A. The temperature of the drying gas (N₂) was 350°C, at a gas flow-rate of 40 ml/min, and a nebulizing pressure (N₂) of $5.5 \cdot 10^5$ Pa (80 p.s.i.). The LC system was directly connected to mass spectrometer without stream splitting.

2.2. Solvents and chemicals

HPLC grade water and methanol (VWR, Seattle, WA, USA) were used for HPLC analysis. Reagent grade chloroform, ethanol, hexane and acetone (VWR) were used for extraction and separation. The sorbent for column chromatography was silica gel 60 (>0.063 mm, E. Merck, Darmstadt, Germany). For preparative thin-layer chromatography (TLC) normal-phase TLC plates (silica gel 60 F₂₅₄, 0.5 mm thickness, 20 \times 20 cm) and reversed-phase TLC plates (RP-18, F₂₅₄, 0.25 mm thickness, 20 \times 20 cm) (E. Merck) were used.

2.3. Plant material and sample preparation

2.3.1. Extraction of ground Danggui

Danggui was purchased from Asia Natural Products (San Francisco, CA, USA). At room temperature, 0.2 g of ground Danggui was extracted with 10 ml of methanol using sonication for 10 min. The extract was filtered through a 0.45 μ m nylon acrodisc 13 filter (Gelman, Ann Arbor, MI, USA). Additionally, a 10- μ l volume of the extract was injected onto the analytical column for analysis.

2.3.2. Preparative TLC of Danggui extract

A ca. 500- μ l volume of ethanol extract of Danggui (5 g) was separated by preparative TLC (one normal-phase plate, hexane–acetone, 7:3, v/v), and the eight zones founded on the TLC plate could be

visualized under UV light 254 nm. Each zone was scraped from the plate, and extracted with methanol. Z-Ligustilide (**14**) and Z-butylidenephthalide (**15**) are mainly in the first zone ($R_F=0.7$). The so-called DQSP-B fraction consists of zones 2–8 in 20 ml of methanol, which contains only a small portion of **14**.

2.3.3. Light stressing of Z-ligustilide (**14**)

Oily **14** (10 mg, 95% purity, containing 5% of **15**) was put into a white glass vial, the vial was capped, and held at room temperature for three days with contact to some direct sunlight. In addition to this, 5 mg was dissolved in 5 ml of methanol (sample 1) for LC–ESP-MS analysis.

An additional amount of oily **14** (10 mg) was treated in the same way, but omitting any contact with direct sunlight (sample 2).

2.4. Isolation of standard compounds

Phthalide standards have been isolated from Danggui in the following way: powdered Danggui (3 kg) was extracted with chloroform (3 \times 6 l) and the chloroform extract (120 g) was partitioned between hexane and methanol. The methanol part (50 g) was repeatedly subjected to silica gel column chromatography and preparative TLC to yield 18 phthalides. The solvents for column and normal-phase TLC were hexane–acetone (9:1 to 5:5, v/v, for column; 8:2, 7:3 or 6:4, v/v, for TLC); solvents for reversed-phase TLC were methanol–water (7:3 or 8:2, v/v). The purity of each isolate was checked by both HPLC and TLC, and the identity was confirmed on comparison of NMR data [proton and carbon NMR spectra, taken in CDCl₃ solution with Bruker AM-400 NMR instrument, using trimethylsilyl (TMS) as internal standard] with published data [3,5,6,13–18,22,24,32]. The detailed separation procedure will be reported in near future.

The isolated phthalides are **2**, **3**, **4**, **5**, **6**, **7**, **8**, **9**, **11**, **12**, **13**, **14**, **15**, **16**, **17**, **18**, **19**, and **20**.

Sedanenolide (**8**) may also represent its 3-*S* stereoisomer, senkyunolide, which has the same NMR data [24] as that of **8**. Butylidenephthalide (**9**) may also represent its 3-*S* stereoisomer. Z,Z'-6,8',7,3'-Diligustilide (**16**) represents a mixture of the stereoisomers, and also includes riligustilide (**21**) [6,32]. Z,Z'-3,3',8,8'-Diligustilide (**20**) seems to be a new

compound, a stereoisomer of angelicolide [16,17]. Z-6-Hydroxy-7-methoxydihydrologustilide (**6**) is also a new compound.

Ferulic acid (**1**) and coniferyl ferulate (**10**) [15] were also isolated from the extract, and identified in the same manner.

A reference methanol solution (10 ml) contained **1** (2 mg), **2** (1 mg), **3** (1 mg), **4** (1 mg), **5** (1 mg), **6** (1 mg), **7** (1 mg), **8** (0.2 mg), **9** (0.2 mg), **10** (0.4 mg), **11** (2 mg), **12** (2 mg), **13** (0.2 mg), **14** (1 mg), **15** (1.4 mg), **16** (0.5 mg), **17** (1.5 mg), **18** (1 mg), **19** (0.5 mg) and **20** (0.4 mg).

3. Results and discussion

3.1. LC-ESP-MS analysis of phthalide standards

Eighteen phthalides, i.e., **2–9**, **11–20**, as well as, **1** and **10** were chromatographed in order to determine their retention times (t_R), UV and MS data for

comparison with the chromatograms of the plant extract and other samples. Their LC-UV and total ion chromatograms are shown in Fig. 2. Their t_R , $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ and UV λ_{max} values are shown in Table 1.

Table 1 shows that although the isomers of each group have the same mass and similar UV data, they showed differences in t_R . They basically can be distinguished by their different retention times. As a result, it appears possible to enable their identification in Danggui extract.

3.2. LC-ESP-MS of Danggui extract and DQSP-B fraction

The LC-UV and total ion chromatograms of the methanol extract of Danggui are shown in Fig. 3.

The retention time (t_R), $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, UV λ_{max} values and the identification for individual peaks are listed in Table 2. Based on these data, 14 peaks were identified as **1** (P1; P was used to

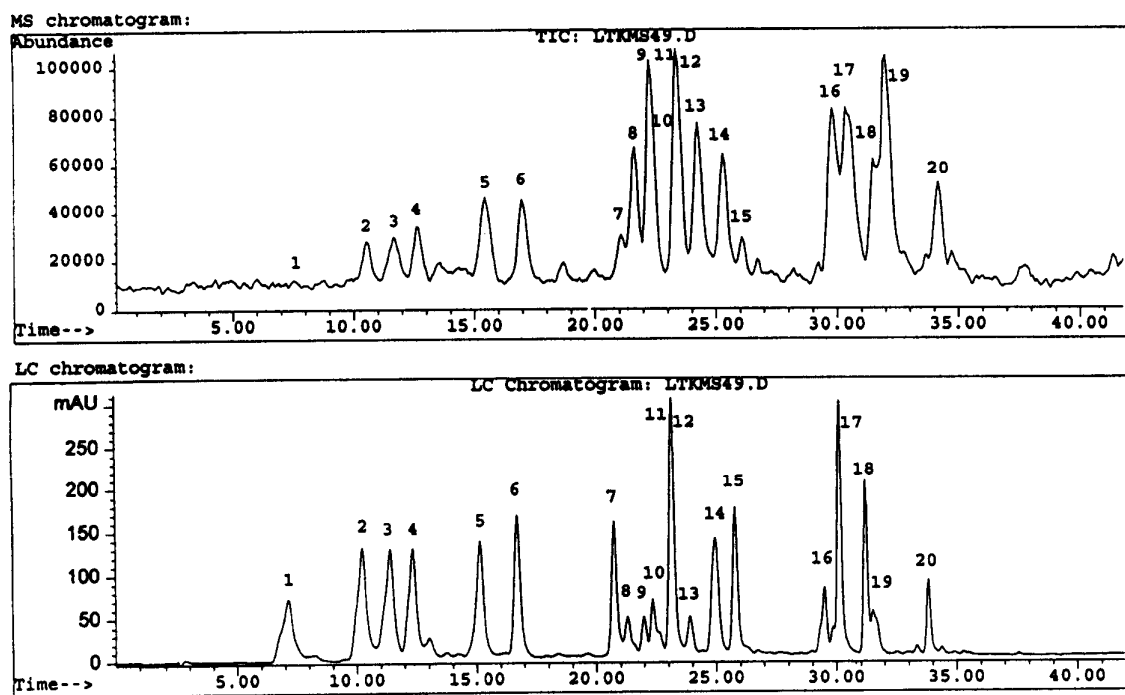


Fig. 2. Simultaneous LC-UV and LC-ESP-MS chromatograms of the Danggui standard compounds. Chromatographic conditions are described in Section 2. The t_R value, MS and UV λ_{max} of each compound are listed in Table 1.

Table 1

Retention time (t_R) value, $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, other MS ions, UV λ_{max} of the standard compounds

Peak No.	Compound	t_R (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M+Na]^+$ (m/z)	Other ions (m/z)	λ_{max} (nm)
1	Ferulic acid (1)	7.1	195 ^a	—	—	295sh, 322
2	<i>E</i> -6,7-Dihydroxydihydrologustilide (2)	10.2	225	247	207	277
3	Senkyunolide I (3)	11.4	225	247	207	277
4	Senkyunolide H (4)	12.3	225	247	207	277
5	Senkyunolide F (5)	15.2	207	229	189	270, 296, 322
6	<i>Z</i> -6-Hydroxy-7-methoxydihydrologustilide (6)	16.7	239	261	207	277
7	<i>Z</i> -6,7-Epoxylogustilide (7)	20.8	207	229	—	277
8	Sedanenolide (8)	21.4	193	215	—	277
9	Butylphthalide (9)	22.0	191	213	—	270
10	Coniferyl ferulate (10)	22.4	—	379 ^a	—	272, 298, 320
11	2-(1-Oxypentyl)-benzoic acid methyl ester (11)	23.2	221	243	189	230, 276
12	3-Butylidene-7-hydroxyphthalide (12)	23.2	205	227	—	285, 335
13	<i>E</i> -Ligustilide (13)	24.0	191	213	—	270, 322
14	<i>Z</i> -Ligustilide (14)	25.0	191	213	—	270, 322
15	<i>Z</i> -Butylidenephthalide (15)	25.9	189	211	—	270sh, 313
16	<i>Z,Z'</i> -6.8',7.3'-Diligustilide (16)	29.6	381	403	191	283
17	Angelicide (17)	30.2	381	403	191	283
18	Levistolide A (18)	31.3	381	403	191	276
19	<i>Z</i> -Ligustilide dimer E-232 (19)	31.6	381	403	191	279
20	<i>Z,Z'</i> -3.3',8.8'-Diligustilide (20)	33.9	381	403	191	296

^a Ferulic acid and coniferyl ferulate showed only a poor response.

represent peak in the text), **3** (P2), **4** (P3), **8** (P4), **9** (P5), **10** (P6), **13** (P7), **14** (P8), **15** (P9), **16** (P10), **17** (P11), **18** (P-13), **19** (P14) and **20** (P15) based on their t_R , $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, other ions and UV λ_{max} values in the comparison with the data of our isolated standards. Only peak 12 was unidentified.

Because of the instability of *Z*-ligustilide (**14**) and some other phthalides, the sample preparation and HPLC analytical conditions have been strictly controlled to avoid any detectable degradation of the phthalides during the performance. Furthermore, we have analyzed fresh Danggui, which showed the same detectable phthalides. The only difference between the two Danggui samples is the relative ratios among these phthalides. This fact indicated that the phthalides in Table 2 should be the original compounds of Danggui, not artifacts.

The major component (**14**) comprised more than 60% of the total amount of the phthalides. Other phthalides appeared as very minor peaks. In order to detect these minute components, the DQSP-B fraction was subjected to LC-ESP-MS analysis and the t_R , $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$, UV λ_{max} values and identification of each of the additional peaks were made.

Five of them were identified as stereoisomer of **3** and **4**, **5**, **22**, **7** and **12**, respectively. Peaks 14–17 appear to be unidentified dimers of **14** (chromatograms not shown).

In the same way, analyses of some of other fractions from the column and TLC separation detected the existence of eight other phthalide monomers and at least five other dimers. Using the UV and $[M+H]^+$ or $[M+Na]^+$ data, five monomers could be tentatively identified as senkyunolide B (**23**), senkyunolide C (**24**), senkyunolide D (**25**), neocnidilide (**26**) (or its isomers), senkyunolide G (**27**) [or senkyunolide K (**28**)]. Another three monomers could be identified as **2**, **6** and **11**.

As shown in Tables 1 and 2, although ESP-MS is a rather soft ionization method, it usually showed protonated molecular ions as strong peaks. However, some phthalides still showed some fragments in higher intensity than these of their $[M+H]^+$ and $[M+Na]^+$. So, it is difficult to establish the molecular mass only based on these mass spectra. Therefore, it is better to identify them by direct comparison to the ESP-MS spectra from the standards.

Ferulic acid (**1**) and coniferyl ferulate (**10**) showed

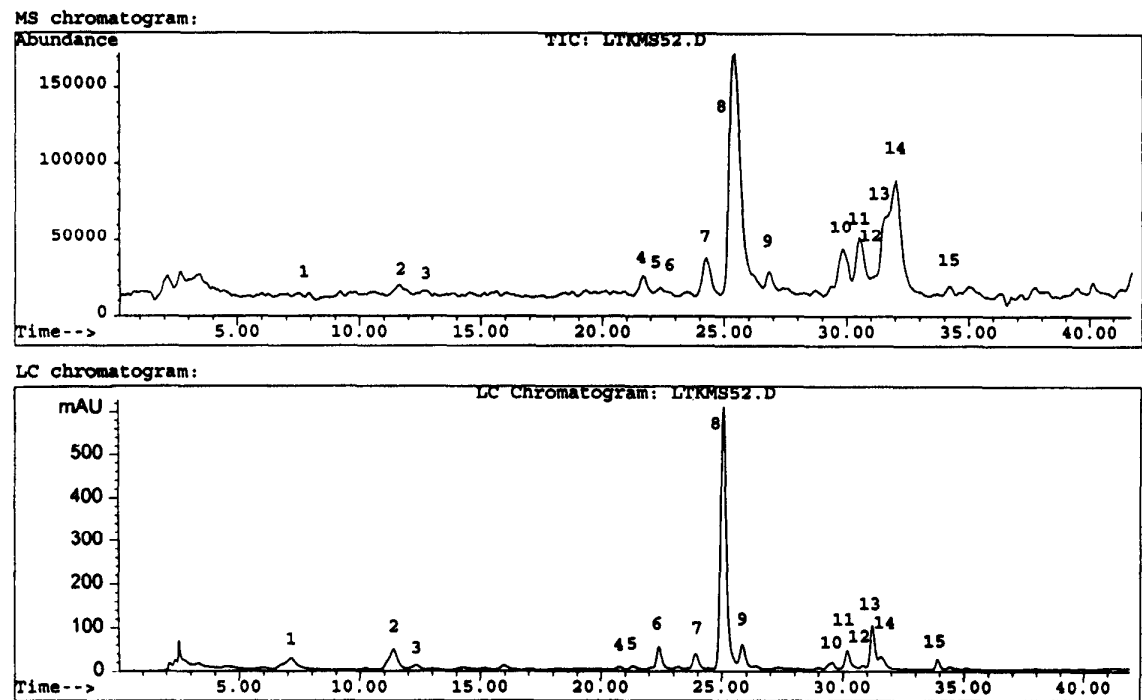


Fig. 3. Simultaneous LC–UV and LC–ESP–MS chromatograms of a Danggui extract. Chromatographic conditions are described in Section 2. Peak assignments are listed in Table 2.

Table 2
Peak assignment for the analysis of the methanol extract of Danggui

Peak No.	t_R (min)	$[M+H]^+$ (m/z)	$[M+Na]^+$ (m/z)	Other ions (m/z)	λ_{max} (nm)	Identification
1	7.1	195	–	–	295sh, 322	Ferulic acid (1)
2	11.4	225	247	207	277	Senkyunolide I (3)
3	12.3	225	247	207	277	Senkyunolide H (4)
4	21.4	193	215	–	277	Sedanolide (8)
5	22.0	191	213	–	270	Butylphthalide (9)
6	22.4	–	379	–	272, 298, 320	Coniferyl ferulate (10)
7	24.0	191	213	–	270, 322	<i>E</i> -Ligustilide (13)
8	25.0	191	213	–	270, 322	<i>Z</i> -Ligustilide (14)
9	25.9	189	211	–	270sh, 313	<i>Z</i> -Butylidenephthalide (15)
10	29.6	381	403	191	283	<i>Z,Z'</i> -6,8',7,3'-Diligustilide (16)
11	30.2	381	403	191	283	Angelicide (17)
12	31.1	381	403	191	283	Unknown
13	31.3	381	403	191	276	Levistolide A (18)
14	31.6	381	403	191	279	<i>Z</i> -Ligustilide dimer E-232 (19)
15	33.9	381	403	191	296	<i>Z,Z'</i> -3,3',8,8'-Diligustilide (20)

a very low response under this LC–MS condition. It could be suggested that they have different physico-chemical properties compared to the phthalides since they do not have phthalide (or partially hydrogenated phthalide) group. They could be identified only based on the retention time and UV data, in comparison with those of their standards.

This study was the one that enabled to determine the existence of compounds **2–8**, **10–12**, **20**, **22**, **23**, **24**, **25** and **27** (or **28**) in Danggui extract.

It was observed during the study that even when the sample vials were tightly closed to prevent evaporation losses, **14** was gradually lost during storage of Danggui and purified products under normal conditions. Some derivatives were formed. This fact led to the identification of the reaction products of **14**.

Four major produced phthalides of sample 1 were identified as the dimers **16**, **17**, **18**, and **20** based on the direct comparison of their t_R , $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ and UV λ_{max} values with these of the standards. Among the six unidentified peaks, one of them may be a Z-ligustilide oxidation compound, the others should be the isomers from Z-ligustilide dimer (chromatograms not shown).

In the same way, analysis of Z-ligustilide reaction sample 2 found that **3** and **4** were the main products.

The results show that Z-ligustilide (**14**) mainly produced its dimers with only a trace amount of its normal oxidation products, for example **3** and **4**, when it is exposed to direct sunlight. This fact suggests that the exposure of **14** (or Danggui, or its product) to direct sunlight seems to be one of the conditions for the dimerization of **14**. Some of the reaction mechanism may be similar to the postulated biogenetic method for the naturally occurring dimers **18** and **21** [13]. However, under normal, non-sun exposed conditions, normal oxidation products of **14**, such as **3** and **4**, have been mainly produced, which might follow the same path as the postulated biosynthetic method for **3**, **4** and **7** [13].

This study showed that LC–ESP-MS was a powerful tool for the rapid and reliable analysis of the constituents of plants, plant extracts and their chemical change products utilizing a relatively small amount of material. The result from LC–ESP-MS provides important information for the further phyto-chemical studies and quality control of the pro-

duction process of Danggui. Use of LC–MS for the identification of phthalide isomers still needed comparison with the standards, which was time-consuming. LC–MS–MS can provide more information about the fragmentation of each compound [33,34], thus offering more chance for direct identification. However, combined techniques, such as LC–MS (or LC–MS–MS) and LC–NMR, will be more powerful for on-line identification of the compounds directly within the crude extracts [33,34].

Acknowledgements

The authors would like to thank all employees of East Earth Herb for their encouragement and support of this study.

References

- [1] W. Tang, G.F. Eisenbrand, Chinese Drugs of Plant Origin, Springer-Verlag, Berlin, 1992, pp. 118–122.
- [2] Pharmacopoeia of the People's Republic of China (English Edition), Guangdong Science and Technology Press, Guangzhou, 1988, pp. 106–107.
- [3] M. Lin, C.-D. Zhu, Q.-M. Sun, Q.-C. Fang, Acta Pharm. Sin. 14 (CA:92: 177412m) (1977) 529.
- [4] Y.-Z. Chen, H.-D. Zhang, N.-Y. Chen, T.-Z. Zhao, M.-T. Wang, Kexue Tongbao 29 (CA: 102: 3197e) (1984) 560.
- [5] P.-M. Hou, C.-M. Lee, T.F. Choang, K.-Y. Chui, H.N.C. Wong, Phytochemistry 29 (1990) 1189.
- [6] T. Kanita, F. Tsutsui, M. Matsuda, A. Yamashita, N. Kozaka, S. Sekida, M. Satake, Jpn. Kokai Tokyo Koho, JP 09 077666 (1997); CA: 126: 334370m.
- [7] Y.-Z. Chen, H.-Q. Li, N.-Y. Chen, X.-Y. Ma, Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexueban 21 (CA: 104:85822c) (1985) 130.
- [8] N.X. Dung, L.D. Cu, L.D. Moi, P.A. Leclercq, J. Essent. Oil Res. 8 (1996) 503.
- [9] Y.-Z. Chen, N.-Y. Chen, X.-Y. Ma, H.-Q. Lin, Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao 5 (CA:100:188755k) (1984) 125.
- [10] Y.-Z. Chen, Z.-X. Duan, H.-D. Zhang, J.-Y. Tao, Y.-P. Ruan, Q.-B. Mei, S. Liu, Q.-D. Tian, F.-X. Xie, Y.-F. Yu, Lanzhou Daxue Xuebao, Ziran Kexuebao 20 (CA:101:147812d) (1984) 158.
- [11] M.J. Gijbels, J.J.C. Scheffer, A.B. Svendsen, Chromatographia 15 (1982) 358.
- [12] M. Kobayashi, H. Mitsuhashi, Chem. Pharm. Bull. 35 (1987) 4789.
- [13] M. Kaoudji, F.D. Pachtere, C. Pouget, A.J. Chulia, S. Lavaitte, J. Nat. Prod. 49 (1986) 872.
- [14] T. Tsuchida, M. Kobayashi, K. Kaneko, H. Mitsuhashi, Chem. Pharm. Bull. 35 (1987) 4460.

- [15] M. Kobayashi, M. Fujita, H. Mitsuhashi, *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987) 1427.
- [16] S.K. Banerjee, B.D. Gupta, W.S. Sheldrick, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* (1984) 888.
- [17] S.K. Banerjee, B.D. Gupta, W.S. Sheldrick, G. Höfle, *Liebigs Ann. Chem.* (1982) 699.
- [18] T. Naito, Y. Ikeya, M. Okada, H. Mitsuhashi, M. Maruno, *Phytochemistry* 41 (1996) 233.
- [19] P.N. Kaul, G.R. Mallavarapu, R.P. Chamoli, *Planta Med.* 62 (1996) 80.
- [20] Z.-W. Li, Q. Zhang, *Yaowu Fenxi Zazhi* 13 (CA:119:210861) (1993) 187.
- [21] G. Delgado, R.G. Reza-Garduna, R.A. Toscano, R. Bye, E. Linares, *Heterocycles* 27 (1988) 1305.
- [22] M. Maruhashi, K. Hanada, K. Mizogami, A. Nsgakura, *Jpn. Kokai Tokyo Koho.*, JP04334378 (1992); CA: 118: 240924c.
- [23] M.J.M. Gijbels, J.J.C. Scheffer, A.B. Svendsen, *Planta Med.* 44 (1982) 207.
- [24] T. Naito, Y. Iketani, T. Yamaguchi, H. Hiroshi, *Jpn. Kokai Tokyo Koho*, JP 05247022 (1993); CA: 120: 173452.
- [25] G.-X. Rao, X.-J. Yu, H.-D. Sun, *Acta Bot. Yunnanica* 13 (CA: 115:78697) (1991) 85.
- [26] S.J. Shen, Y.S. Ho, Y.P. Chen, H.Y. Hsu, *Planta Med.* 53 (1987) 377.
- [27] N. Kikuchi, H.-L. Lay, T. Tanaabe, T. Mike, *Acta Chromatogr.* 1 (1992) 23.
- [28] T. Naito, M. Sakata, Y. Ikeya, Y. Ichiro, M. Okada, *Nat. Med.* 49 (1995) 425.
- [29] J.-L. Zhang, X.-F. He, Z.-H. Zhou, *Yaoxue Xuebao* 31 (CA: 126: 115121) (1996) 622.
- [30] S. Segebrecht, H. Schilcher, *Planta Med.* 55 (1989) 572.
- [31] C.-W. Mo, S.-J. Sheu, *Chin. Pharm. J. (Taipei)* 46 (1994) 155.
- [32] T. Naito, T. Katsuhara, K. Niitsu, Y. Ikeya, M. Okada, H. Mitsuhashi, *Heterocycles* 32 (1991) 2433.
- [33] J.-L. Wolfender, S. Rodriguez, K. Hostettmann, W. Hiller, *Phytochem. Anal.* 8 (1997) 97.
- [34] K. Hostettmann, J.-L. Wolfender, S. Rodrigues, *Planta Med.* 63 (1997) 2.

附錄二

食品与发酵工业 Food and Fermentation Industries

高效液相色谱法同时测定五加皮保健酒中的3种特征成分

陈青俊 秦志荣 许荣年 鲍忠定

(浙江省轻工业研究所, 杭州, 310009)

摘要 建立了用高效液相色谱法测定五加皮保健酒中丁香酚、藁本内酯、对甲氧基桂皮酸乙酯含量的方法,并对五加皮保健酒样品进行了检测。采用石油醚-乙醚提取法进行样品前处理,在以 CH_3OH -0.02 mol/L 醋酸铵水溶液为流动相作梯度洗脱、 C_{18} 柱分离、流速为1.0 mL/min、检测波长为280 nm的条件下,丁香酚在18.0~180.0 $\mu\text{g/mL}$,藁本内酯在25.0~250.0 $\mu\text{g/mL}$,对甲氧基桂皮酸乙酯在15.0~150.0 $\mu\text{g/mL}$ 范围内峰面积和其浓度成良好的线性关系。3者平均回收率均在95%以上。各样品之间的3种特征成分含量有较大差异。

关键词 高效液相色谱法,五加皮保健酒,丁香酚,藁本内酯,对甲氧基桂皮酸乙酯

中药药酒在我国有悠久的饮用历史。五加皮保健酒以五加皮、肉桂、丁香、当归、栀子等20几种中草药为原料,以蒸馏酒为酒基浸泡,经勾兑调味而成。其中丁香酚(EGL)、藁本内酯(LGD)和对甲氧基桂皮酸乙酯(EMC)是五加皮保健酒的特征成分的一部分。丁香酚具有消除自由基,解热抗炎,促进表皮吸收等作用;藁本内酯能松弛气管平滑肌,对血管平滑肌有解痉作用;对甲氧基桂皮酸乙酯具有增强巨噬细胞活性和激活细胞免疫作用。文中首次报道了应用反相高效液相色谱法对若干厂家生产的五加皮保健酒产品样品中丁香酚、藁本内酯和对甲氧基桂皮酸乙酯含量的测定。

1 材料与方 法

1.1 主要仪器

BECKMAN 125 二元溶剂泵, BECKMAN 168 二极管阵列检测器, 32Karat 色谱数据处理系统。Büchi Rotavapor R-200 旋转蒸发器。SHIMADZU AX200 电子分析天平。

1.2 试 剂

丁香酚(EGL)、对甲氧基桂皮酸乙酯(LGD)标准品由中国药品生物制品检定所提供。藁本内酯(EMC)为自制,经气相色谱面积归一法测定含量为98.6%。甲醇为色谱纯,其

他试剂均为分析纯。

1.3 实验材料

选用6个生产厂家(A~F)生产的10个五加皮保健酒样品(1[#]~10[#])。其中样品号1[#]~4[#]为A厂家同一品种不同批次的产品,其余为不同厂家或不同品种的产品。

1.4 色谱条件

流动相: 甲醇(A液)+0.02 mol/L 醋酸铵水溶液(B液)。洗脱梯度: 0 min, B液40%; 0~30 min, B液40%→75%; 30~34 min, B液75%→100%; 34~40 min, B液100%; 40~42 min, B液100%→40%; 50 min 结束。

色谱柱: ODS- C_{18} 柱(美国 BECKMAN 公司, 4.6 mm i.d. × 250 mm, 5 μm); 柱温: 室温; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 进样量: 20 μL 。

1.5 标准溶液配制

依次准确称取丁香酚(EGL)、藁本内酯(LGD)、对甲氧基桂皮酸乙酯(EMC)标准品分别置于3个100 mL容量瓶中,以甲醇溶解并定容至刻度,配成单组分的标准储备液。用甲醇稀释配制不同浓度的混合标准溶液。

1.6 样品前处理

吸取酒样50.0 mL,用75 mL和50 mL石油醚依次萃取2次,再用75 mL和50 mL乙醚

第一作者: 学士, 工程师。

收稿时间: 2003-07-01

(104) 2004 Vol. 30 No. 1 (Total 193)

依次萃取,合并所有石油醚和乙醚萃取液,置于45℃水浴真空旋转蒸发,蒸干溶剂,用甲醇定容至5.0 mL,经0.45 μm膜过滤,接取少量试液供分析用。

2 结果与分析

2.1 检测波长

用二极管阵列检测器对丁香酚(EGL)、藁本内酯(LGD)、对甲氧基桂皮酸乙酯(EMC)的标准品溶液在200~360 nm之间进行扫描,3种组分的特征吸收波长分别为丁香酚205、228、280 nm;藁本内酯219、280、330 nm;对甲氧基桂皮酸乙酯228、310 nm(见图1)。综合灵敏度 and 基线,选择280 nm作为这3种成分的紫外检测波长。

2.2 色谱分离效果

经过调整和优化洗脱梯度条件,在确定的色谱分析条件下,标准溶液和经过前处理的样

液中的待测成分得到了良好的分离。丁香酚的保留时间为19.7 min,藁本内酯28.6 min,对甲氧基桂皮酸乙酯29.8 min。标准品和样品色谱图见图2和图3。

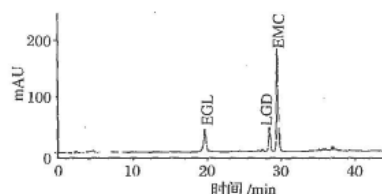


图2 混合标准品色谱图

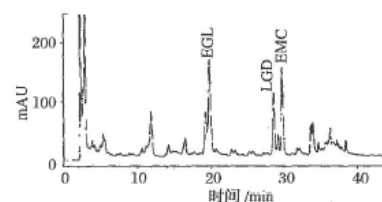


图3 样品色谱图

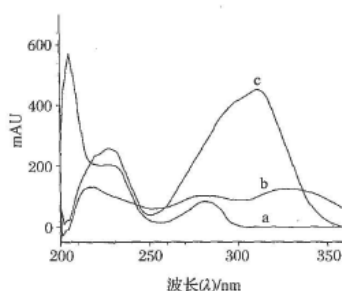


图1 各组分紫外扫描图

a-丁香酚, b-藁本内酯, c-对甲氧基桂皮酸乙酯

2.3 标准曲线和检出限

在1.4所述色谱条件下,依次分析配制成的3种组分,5个水平浓度的标准溶液(丁香酚:18.0, 36.0, 72.0, 108.0, 180.0 μg/mL;藁本内酯:25.0, 50.0, 100.0, 150.0, 250.0 μg/mL;对甲氧基桂皮酸乙酯:15.0, 30.0, 60.0, 90.0, 150.0 μg/mL),以色谱峰面积(y)与试液浓度(x)绘制标准工作曲线,各组分的检出限按照信噪比为3进行计算。实验结果反映,各组分在各自的浓度范围内呈良好的线性关系(见表1)。

表1 各组分线性方程和检出限

组分	线性方程	线性范围/μg·mL ⁻¹	相关系数	检出限/μg·mL ⁻¹
EGL	$y = 27241x - 16665$	18.0~180.0	0.9997	0.5
LGD	$y = 14206x + 12993$	25.0~250.0	0.9996	0.7
EMC	$y = 100129x - 25289$	15.0~150.0	0.9996	0.1

2.4 重现性和回收率实验

在模拟空白酒样(体积分数为38%的酒精,11%蔗糖溶液)和已知其中EGL、LGD、EMC含量的五加皮酒样品中精密加入一定量的标准品溶液,按照实验方法进行前处理和测定,平行5次对方法的重现性和回收率进行考

察,结果列于表2。结果表明,本方法的重现性良好,3种组分的RSD均在2%之内。3种组分的平均回收率均在95%以上。

2.5 实际样品测定

表3中比较了6个不同生产厂家生产的10个五加皮保健酒样品中3种特征成分的含量。

分析与检测

表2 EGL、LGD、EMC的精密度和平均回收率

组分	初始量 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	加入量 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	检出量 $/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	RSD /%	平均回收率 /%
EGL	0.0	5.5	5.36 ± 0.05	0.93	97.5
LGD	0.0	5.0	4.91 ± 0.06	1.22	98.2
EMC	0.0	2.5	2.39 ± 0.04	1.67	95.6
EGL	7.8	5.5	13.19 ± 0.17	1.29	98.0
LGD	14.4	10.0	24.19 ± 0.23	0.95	97.9
EMC	7.1	5.0	11.86 ± 0.14	1.18	98.0

表3 实际样品检测结果 mg/L

生产 厂家	样品号	丁香酚 (EGL)	藜本内酯 (LGD)	对甲氧基桂皮酸 乙酯(EMC)
A	1 [#]	7.8	14.4	7.1
	2 [#]	8.7	16.6	11.5
	3 [#]	9.1	18.2	13.9
	4 [#]	10.0	16.1	14.2
B	5 [#]	5.0	10.7	9.5
C	6 [#]	4.8	1.9	0.2
D	7 [#]	6.0	3.8	0.9
E	8 [#]	6.3	2.5	2.3
F	9 [#]	18.1	8.5	1.9
	10 [#]	12.9	4.1	0.3

从表2反映出,不同厂家或不同品种的五加皮保健酒中丁香酚、藜本内酯、对甲氧基桂皮酸乙酯3种特征成分的含量变化较大,但同一厂家生产的同一品种不同批次五加皮保健酒中3种特征成分虽存在一定波动,但相对稳定。

3 结 论

(1)文中建立的同时测定五加皮保健酒中的丁香酚(EGL)、藜本内酯(LGD)、对甲氧基桂皮酸乙酯(EMC)含量的方法,有较好的精密度和回收率,色谱峰有较好的分离度。

(2)五加皮保健酒中的这3种特征成分的含量在不同厂家产品或不同批次之间差距显著,但在同一厂家同一品种不同批次的产品中相对稳定。

(3)五加皮保健酒中这3种特征成分的检出为五加皮保健酒的生理功效提供了科学依据,并促进了这一传统中药药酒的质量标准制定以及提高质量控制水平。

参 考 文 献

- 1 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(第一部)[M]. 北京:化学工业出版社, 2000
- 2 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 1986
- 3 黄伟晖, 宋纯清. 当归的化学和药理学研究进展[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 147~151
- 4 赵 阳, 张 纯, 郭 澄等. 高效液相色谱法测定苏合香丸中丁香酚的含量[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(3): 175~177
- 5 郑云燕, 傅剑云, 夏 勇等. 五加皮保健酒的急性和制突试验[J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15(1): 13

Simultaneous Determination of Three Feature Components in Wujiapi Healthcare Wine by High Performance Liquid Chromatography

Chen Qingjun Qin Zhirong Xu Rongnian Bao Zhongding

(Zhejiang Institute of Light Industry, Hangzhou, 310009)

ABSTRACT A high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of eugenol, ligustilide and ethyl *p*-methoxycinnamate in wujiapi healthcare wine is reported. Wine samples were pretreated with petroleum-ether extraction, then analyzed on a C_{18} column, using a flow rate of 1.0 mL/min and gradient elution with mixture of CH_3OH -0.02mol/L NH_4Ac as mobile phase. The fractions were detected at 280 nm. There was a good linear relationship between the ratios of peak area to concentration within the range of 18.0~180.0 μg /mL eugenol, 25.0~250.0 μg /mL ligustilide and 15.0~150.0 μg /mL ethyl *p*-methoxycinnamate. The recovery of standards was greater than or equal to 95%. The results indicated that these three components varied significantly between wine samples.

Key words high performance liquid chromatography, wujiapi healthcare wine, eugenol, ligustilide, ethyl *p*-methoxycinnamate

附錄三 第一次會議於中華民國95年11月08日



附錄四：第二次會議於中華民國 95 年 11 月 19 日



附錄五：第三次會議中華民國 95 年 12 月 03 日



附錄六：第四次會議於中華民國 96 年 10 月 24 日



附錄七

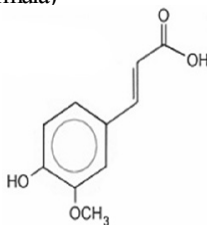
行政院衛生署中醫藥委員會中藥材指標成分物理化學資料表

指標成分名稱： ferulic acid

I. 植物來源 (Origins)

中文名 (Chinese name)	當歸
學名 (scientific name)	<i>Angelica sinensis</i> (oliver) Diels
使用部位 (used part)	乾燥根
其他植物來源 (others)	川芎、升麻、木賊

II. 基本資料 (General Information)

1. 化合物名稱 (Name of Compound)				
其它名稱 (Other name)		NA		
化學名 (IUPAC)		3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid		
結構類別 (Classification & Type)		NA		
2. 結構式與分子量 (Structure Formulas and Molecular Weight)				
分子式(Molecular formula)		<div>結構式 (Structural formula)</div> 		
C ₁₀ H ₁₀ O ₄				
分子量(Molecular weight)				
194.19				
3. 物理化學性狀 (Physical and Chemical Properties)				
常溫形狀(State of Matter)		粉末	顏色(Color)	白色
比重(d_4^{20}) *			氣味(Odor)	無特殊味道
熔點(Melting point) *			(n_D^t)*	
沸點(Boiling point) *			燃點(Flash point) *	

註：“*” 指不適用時可不填寫。

續上頁 3. 物理化學性狀資料

可溶於 (Soluble in)			
$[\alpha]_D^t$	NA		
碘價* (Iodine value)		酸價* (Acid value)	
鹼價* (Saponification value)			

註：“*” 指不適用時可不填寫。

III. 層析法資料 (Chromatographic Data)

<input type="checkbox"/> HPLC	附件	<input type="checkbox"/> GLC	附件	<input type="checkbox"/> GC	附件
<input checked="" type="checkbox"/> TLC	附件	<input type="checkbox"/>	附件	<input type="checkbox"/>	附件

IV. 儲存條件 (Storage Condition)

溫度 (temp)	30°C、35°C、40°C	濕度 (humidity) *	
儲存容器 (container)*		厭氧性 (vacuum) *	

註：“*” 若需特別條件貯存時，請務必填寫。

附件

TLC			
Rf Value	0.47		
展開溶劑 (Solvent system)	Toluene : Acetone		
薄層板 (Plate type/Product no.)	25TLC aluminium sheets	儀器廠牌型號 (Instrument)	Merck Silica gel 60F ₂₅₄
檢品濃度 (Sample conc.)		點注體積 (Spotting vol.)	10 μ l
檢測法 (Detection/Color)	UV 燈		

附錄八

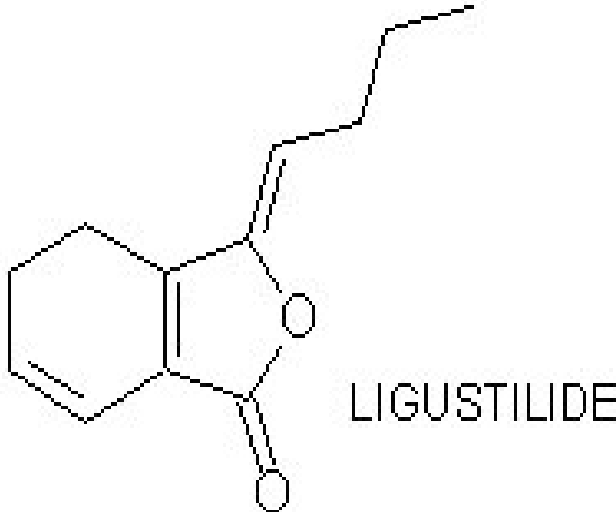
行政院衛生署中醫藥委員會中藥材指標成分物理化學資料表

指標成分名稱： ligustilide

I. 植物來源 (Origins)

中文名 (Chinese name)	當歸
學名 (scientific name)	<i>Angelica sinensis</i> (oliver)Diels
使用部位 (used part)	乾燥根
其他植物來源 (others)	NA

II. 基本資料 (General Information)

1. 化合物名稱 (Name of Compound)				
其它名稱 (Other name)		NA		
化學名 (IUPAC)		NA		
結構類別(Classification & Type)		NA		
2. 結構式與分子量 (Structure Formulas and Molecular Weight)				
分子式(Molecular formula)		<div></div>		
C ₁₂ H ₁₄ O ₂				
分子量(Molecular weight)				
288				
3. 物理化學性狀 (Physical and Chemical Properties)				
常溫形狀(State of Matter)		黃色粉末	顏色(Color)	黃色粉末
比重(<i>d</i> ₄ ²⁰) *			氣味(Odor)	
熔點(Melting point) *			(<i>n</i> _D ^t) *	
沸點(Boiling point) *			燃點(Flash point) *	

註：“*” 指不適用時可不填寫。

續上頁 3. 物理化學性狀資料

可溶於 (Soluble in)			
$[\alpha]_D^{25}$			
碘價* (Iodine value)		酸價* (Acid value)	
鹼價* (Saponification value)			

註：“*” 指不適用時可不填寫。

III. 層析法資料 (Chromatographic Data)

<input type="checkbox"/> HPLC	附件	<input type="checkbox"/> GLC	附件	<input type="checkbox"/> GC	附件
<input checked="" type="checkbox"/> TLC	附件	<input type="checkbox"/>	附件	<input type="checkbox"/>	附件

IV. 儲存條件 (Storage Condition)

溫度 (temp)	30°C、35°C、40°C	濕度 (humidity)*	
儲存容器 (container)*		厭氧 性 (vacuum))*	

註：“*” 若需特別條件貯存時，請務必填寫。

附件

TLC		附圖	
Rf Value	0 · 4		
展開溶劑 (Solvent system)	CHLOROFORM : n-HEXANE		
薄層板 (Plate type/Product no.)	25TLC aluminium sheets	儀器廠牌型號 (Instrument)	Merck Silica gel 60F ₂₅₄
檢品濃度 (Sample conc.)		點注體積 (Spotting vol.)	
檢測法 (Detection/Color)	UV 燈		

附錄九

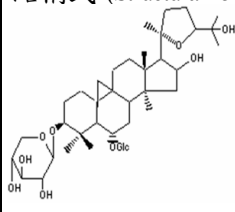
行政院衛生署中醫藥委員會中藥材指標成分物理化學資料表

指標成分名稱： Astragaloside IV

I. 植物來源 (Origins)

中文名 (Chinese name)	黃耆
學名 (scientific name)	<i>Astragalus mongholicus</i> Bge
使用部位 (used part)	乾燥根
其他植物來源 (others)	

II. 基本資料 (General Information)

1. 化合物名稱 (Name of Compound)			
其它名稱 (Other name)			
化學名 (IUPAC)			
結構類別(Classification & Type)			
2. 結構式與分子量 (Structure Formulas and Molecular Weight)			
分子式(Molecular formula)	<div>結構式 (Structural formula)</div> 		
C ₄₁ H ₆₈ O ₁₄			
分子量(Molecular weight)			
784			
3. 物理化學性狀 (Physical and Chemical Properties)			
常溫形狀(State of Matter)	粉末	顏色(Color)	白色
比重(<i>d</i> ₄ ²⁰) *		氣味(Odor)	無味
熔點(Melting point) *		(<i>n</i> _D ^t) *	
沸點(Boiling point) *		燃點(Flash point) *	

註：“*” 指不適用時可不填寫。

續上頁 3. 物理化學性狀資料

可溶於 (Soluble in)			
$[\alpha]_D^t$			
碘價* (Iodine value)		酸價* (Acid value)	
鹼價* (Saponification value)			

註：“*” 指不適用時可不填寫。

III. 層析法資料 (Chromatographic Data)

<input type="checkbox"/> HPLC	附件	<input type="checkbox"/> GLC	附件	<input type="checkbox"/> GC	附件
<input checked="" type="checkbox"/> TLC	附件	<input type="checkbox"/>	附件	<input type="checkbox"/>	附件

IV. 儲存條件 (Storage Condition)

溫度 (temp)	30°C、35°C、40°C	濕度 (humidity) *		
儲存容器 (container)*		厭氧性 (vacuum) *		

註：“*” 若需特別條件貯存時，請務必填寫。

附件

TLC 附圖			
Rf Value	0 · 4 5		
展開溶劑 (Solvent system)	TOLUENE : ETHANOL		
薄層板 (Plate type/Product no.)	25TLC aluminium sheets	儀器廠牌型號 (Instrument)	Merck Silica gel 60F ₂₅₄
檢品濃度 (Sample conc.)		點注體積 (Spotting vol.)	
檢測法 (Detection/Color)	UV 燈		