

編號：CCMP88-RD-O48

中藥之化學鑑定研究-麻黃、黃柏、人參之 基原辨識

Study on the identification of Chinese herbal drugs by LC analysis

許順吉

國立台灣師範大學

摘要

本文第一章以高效能液相層析 (HPLC) 及毛細管電泳 (CE) 兩種方法，分析含麻黃及黃柏製劑的關鍵化學成分比例，用為推斷基源的依據。HPLC 與 CE 同屬液相分離技術，遵循不同分離機裡，都有多種分離模式，在中藥分析上有互補的作用。

麻黃有草麻黃、中麻黃、木賊麻黃及雙穗麻黃等不同品種，均含 ephedrine、pseudoephedrine、methylephedrine、norephedrine 和 noredorphedrine 等生物鹼成分。抽樣分析顯示，市售麻黃大都來自草麻黃與中麻黃，該二藥材可用 ephedrine 與 pseudoephedrine 的比值來分辨。麻黃製劑用 CE 分析時，以 isoleucine 的鹼性溶液做運送液，用 HPLC 分析時，以 SDS 的磷酸溶液為沖提液，可分別在 8 及 40 分鐘內完成。ephedrine 與 pseudoephedrine 的比值，在草麻黃大於 1，在中麻黃則小於 1。

黃柏有關黃柏、川黃柏、本黃柏及日本黃柏等品種，含有 berberine、palmatine、jatrorrhizine、phellodendrine 及 magnoflorine 等成分。台灣市面上的黃柏製劑主要來自關黃柏及本黃柏，整理歸納兩藥材的資料發現，它們主要的差異在 berberine 與 palmatine 的比值。黃柏製劑用 CE 分析時，以醋酸鈉溶液為運送液，用 HPLC 分析時，以 SDS 的醋酸溶液為沖提液，可分別在 9 及 35 分鐘內完成。berberine 與 palmatine 的比值，在關黃柏約 0.7~5，在本黃柏則大於 18。

人參藥材主要含有系列的人參皂素，有多種分析方法，1994 年本實驗室開發一可同時定量十二成分的 HPLC 方法，應用在製劑時，因受到其他成分的干擾，效果不彰。本文第二章就在開發理想的人參製劑分析方法，以分辨該等製劑的原料係用白參（紅參）抑或參鬚。

篩檢市售樣品，結果顯示，人參製劑常用或常混雜價廉又有較高 ginsenoside Rb₁ 的參鬚，以取代正確的白參或紅參，參鬚與白參最易區分處在 ginsenoside Rg₁ 與 Re 的比值，該值在白參（紅參）大於 1.7，在參鬚介於 0.3 至 0.8 之間。人參皂素屬微量成分，本實驗利用不同的固相萃取材質（C8，C18，HLB）及不同極性的沖提液去除一些干擾物質，來達到準確測量的目標，並提高偵測極限至 5.42ng。經前處理手續，再用磷酸二氫鉀溶液為沖提液，以 HPLC 分析，可順利完成四君子湯、歸脾湯、麥門冬湯的定量；補中益氣湯由於組成藥材干擾頗大，須減少分析量，才可達到預期目標。

關鍵詞：麻黃，黃柏，人參，基原之化學辨識

Abstract

The first chapter of this report applied high-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) to the analysis of Ephedra Herba and Phellodendri Cortex preparations for the ratios of their key chemical constituent that are to be used as a basis for the judgment of their sources. Both HPLC and CE belong to the same liquid chromatographic technology, but they follow different separation models which supplement each other and are suitable for the analysis of Chinese herbal drugs.

The ephedra species include *Ephedra sinica*, *E. intermedia*, *E. equisetina* and *E. distachya*, which all contain the alkaloids such as ephedrine, pseudoephedrine, methylephedrine, methylpseudoephedrine, norphedrine and norpseudoephedrine. Analyses of samples taken from commercial products showed that most ephedra products were made from *E. sinica* and *E. intermedia*. The two species can be discriminated with their ephedrine to pseudoephedrine ratios. In analyzing ephedra products with CE, alkaline isoeucine solution was used as carrier, and with HPLC, phosphate solution containing SDS was used as eluent. Both methods could accomplish the analysis within 8 and 40 min, respectively. The ephedrine to pseudoephedrine ratios is greater than unit for *E. sinica* and less than unit for *E. intermedia*.

For phellodendron, there are four species and contain berberine, palmatine, jatrorrhizine, phellodrine and magnoflorine as their active components. Commercial article of this herb come chiefly from the Chinese phellodendron and Taiwanese phellodendron. Arranging and summarizing the data for the two

source, we found that their difference lied chiefly in the berberine to palmatine ratio. In analyzing phellodendron products with the CE method, sodium acetate solution was used as the carrier and with the HPLC method, SDS-acetic acid solution was the eluent. They could accomplish the analysis within 9 and 35min, respectively. The berberine to palmatine ratio was 0.7-5 for the former and more than 18 for the latter.

Ginseng contains chiefly a series of ginseng saponins which can be analyzed with a plurality of methods. In 1994, We developed an HPLC method that could simultaneously determine 12 constituents. However, when it was applied to the analysis of ginseng preparation, it was subject to interference from other herbs and did not work well. The second chapter of this report dealt with the development of an ideal analytic method for ginseng preparations for identifying whether it was white or red ginseng or ginseng root-hairs from which the preparations were made.

Screening of commercial samples showed that ginseng preparations were mostly made from or adulterated with ginseng root-hairs that are low priced and abound in ginsenoside Rb1 and were therefore often used in place of white or red ginseng. The easiest way to discriminate ginseng root hairs from white ginseng is by the ratio of the ginsenoside Rg1 to Re ratio. The ratio was greater than 1.7 for white or red ginseng and between 0.3 - 0.8 for ginseng root hairs. Ginseng saponins are trace components. This study used different solid phase extracting materials (C8, C18, HLB) and different polarity eluents to eliminate some interfering substances to thereby achieve accurate assay purposes and promote the detectable limit to 5.42 ng. With pretreatment and using potassium dihydrogenphosphate as the eluent for analysis on HPLC, we were able to accomplish assays for Major Four Herb Combination, Ginseng and Longan Combination and Ophiopogon Combination. Whereas, Ginseng and Astragalus Combination had sever interference, and should require reduction of assay quantity in order to achieve the expected goal.

Keywords: Ephedrae Herba, Phellodendri Cortex, Ginseng Radix, Species identified by chemical analysis.

第一章 麻黃、黃柏藥材及製劑之高效能液相層析和毛細管電泳分析

I. 1 緒論

I. 1-1 前言

麻黃為麻黃科植物的乾燥地上莖[1]，目前市售樣品以草麻黃(*Ephedra sinica* Stapf)與中麻黃(*E. intermedia* Schrent)兩種居多，我們曾用生物鹼成分 ephedrine (E)，pseudoephedrine (PE)，methyl ephedrine (ME)，methyl pseudoephedrine (MPE)，norephedrine (NE)，及 norpseudoephedrine (NPE) 等的含量及比例來判別其基原[2]，發現前者的 $E/PE > 1$ ， $ME/MPE > 10$ ， $NE/NPE > 0.4$ ，而後者為 $E/PE < 0.3$ ， $ME/MPE \sim 1$ ， $NE/NPE < 0.4$ ，其中 E 與 PE 的比例最具代表性，本研究擬再收集更多的中及草麻黃樣品，驗證以 E/PE 比例作為基原判別的正確性與再現性，並用之於單方及以該藥材為君藥的複方製劑之鑑定。

黃柏為芸香科植物的乾燥樹皮[3]，市售樣品主要是川黃柏(*Phellodendron chinense* Schneid)或關黃柏(*P. amurense* Ruprecht)，偶而可見台灣黃柏(*P. wilsonii* Hayata et Kanehira)，後者被認為品質優良是少數值得在台灣栽種有經濟價值的藥用植物；我們用毛細管電泳測定 berberine，palmatine，jatrorrhizine，phellodendrine 和 magnoflorine 等生物鹼的含量[4]，發現台灣黃柏的 berberine 為川或關黃柏的六倍，但 magnoflorine 僅為後者的三分之一，生物鹼總含量前者平均在 41-42 mg/g 而後者僅 15-16 mg/g，應可作為分辨的依據。川黃柏與關黃柏的化學成分含量與比例，幾乎完全相同，只能由外觀性狀判別：川黃柏易折斷斷面深黃，關黃柏易折斷而斷面黃綠。現在中藥品質分析仍以高效能液相層析儀最為普遍，因此，本研究擬嘗試改用 HPLC，並用波峰相對面積 (peak-area ratio) 評估，避免取得標準品的困難，然後應用於單方與複方製劑。

中藥藥材的基原雖陸續有用 DNA 鑑定的報導，但仍以組織切片顯微鏡檢驗為主要方法，該方法不但費時又費力，不能適用於不規則切片與萃取液，也不能檢驗製劑成品，對檢驗機關的基原鑑別有很大的限制，無法確實掌握市售製劑的原藥材品種。本研究擬利用過去研究所獲得的結論，首先檢查過去所建立的準則，能否應用於藥材 70% 甲醇萃取液，然後再看看水煎煮液有沒有相同的特性 HPLC 圖紋：若有，則將其應用於單方與複方製劑；若沒有，則再略加修飾以選取適當組成成分與該藥成分比值，作為本研究的新指標基準，然後進行單方及複方製劑的篩檢。再複方製劑中，能夠明確清楚檢測出特性成分的圖紋，可能需要進行系列前處理手續，前處理所用的材料及方法將於系統研究。

本研究的目的是配合中藥管理的需要，建立便捷藥材基原鑑定法，並進依步能應用單方及複方製劑的基原判別。

I.1-2 高效能液相層析 (HPLC)

所謂層析 (chromatography) 是一樣品分配於一移動相 (氣體或液體) 和伊固定相 (液體或固體) 間的分析方法。層析技術始於 1930 年德國化學家 M. Twett 利用粉筆管柱 (chalk column) 分離綠葉色素[5]。在此之後，1940 年代發現了不同溶質在液體分配現象 (liquid partition) [6]；1950 年代氣相分析 (gas chromatography, GC) [7] 及薄層層析 (thin-layer chromatography, TLC) 技術出現[8]

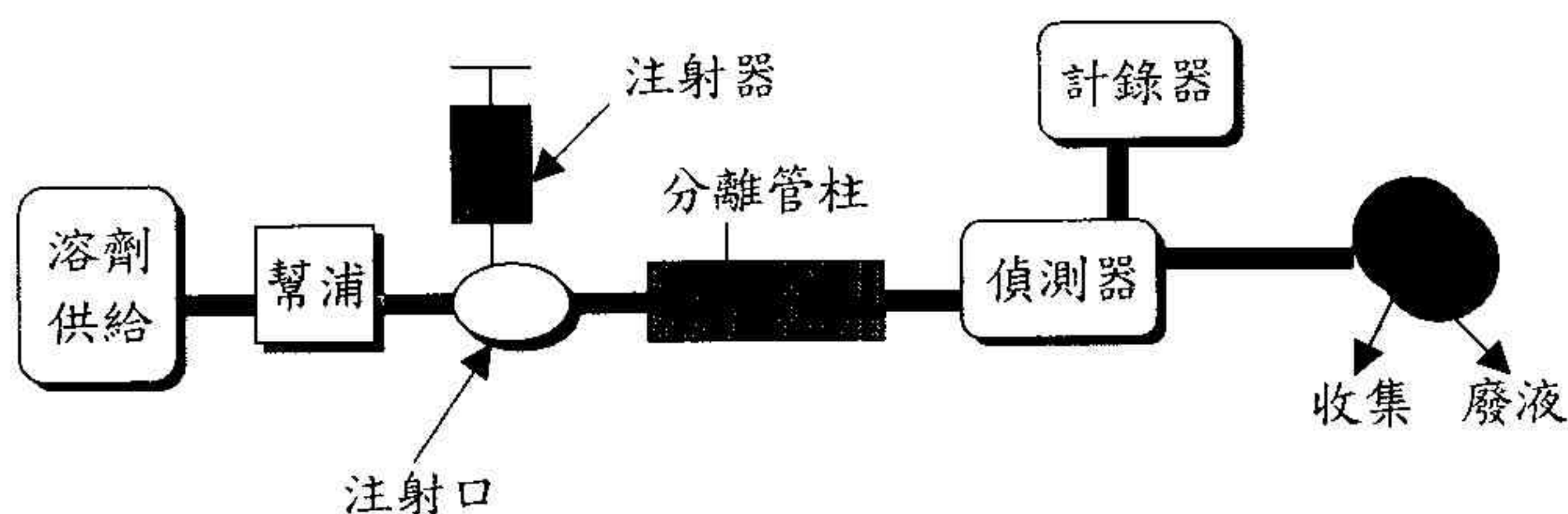


圖 I-1.2 高效能液相層析儀組成圖

1962 年 GC 正式商業化使用，該儀器具有迅速、分離度高、操作方便、高感度檢測記號、自動紀錄及分離管柱可連續使用等優點。1967 年，科學家們進一步利用 GC 的特點發展高速層析 (high speed chromatography)，由於其分離管柱可連續使用，樣品導入簡便，並以高精度的幫浦作移動相輸入源，嚴密控制流速，因此再現性佳，細小粒子為填充劑分離效果好，逐漸受分析界的重視。該儀器曾經稱作 high pressure liquid chromatography[9]，現在均以 high-performance liquid chromatography (高效能液相層析) 名之，而 HPLC 已成為今日分析上有利的工具。

I.1-3 毛細管電泳 (CE)

電泳是電介質中帶電粒子在電場作用下以不同速度相電荷相反方向移動的現象，利用這種現象對某些化學成分進行分離分析的技術，稱為電泳技術。

電泳作為一種分析工具出現，已有近百年的歷史，但真正被視為有重要意義的技術，則是在 1937 年由瑞典科學家 Arne Tiselius[10] 首先提出的，後來，

由於 Tiselius 對電泳技術發展和應用的傑出貢獻，使他成為 1948 年諾貝爾化學獎的得主。

傳統電泳最大的問題是難以克服兩端的高電壓所引起的電介質離子流的自熱，或稱焦耳熱，這種焦耳熱會引起載板從中心到兩側或管子內徑向的黏度梯度或速度梯度，導致區帶展寬，降低效率，這種影響會隨電場強度的增加而迅速加劇，因此大大限制了高電壓的使用，當然就難以加快整個過程的速度。毛細管電泳和傳統電泳的最大區別，就在於前者設法是電泳過程在散熱效率極高的毛細管內進行，所以可引入高的電場強度，全面改善分離效果。

1967 年 Hjerten [11] 最先提出在高電場，直徑為 3 mm 的毛細管中做自由溶液的區帶電泳 (capillary zone electrophoresis, CZE)。1974 年 Virtanen [12] 提出用 200–500 μm 內徑的毛細管做電泳分離。而再目前所談及的那種細管徑毛細管內實現電泳的最初工作是 Jorgenson 和 Lukacs [13,14] 在 1981 年首先提出，當時，他們使用了 75 μm 內徑的玻璃毛細管柱，用螢光偵測器作線上 (on line) 檢測，同時他們還就分離原理、高電場和小內徑對高效的決定性影響等問題進行了討論。1984 年 Terabe 等引入了毛細管電泳的一個重要的分支，即以各組成成分 (特別是中性粒子) 在毛細管內的膠束緩衝溶液間的分配為基礎的膠束電動力學毛細管層析 (micellar electrokinetic capillary chromatography, MECC or MEKC) [15]。1987 年 Hjerten [16] 把傳統的等電聚焦過程移到毛細管內進行，提出了毛細管等電聚焦 (capillary isoelectric focusing, CIEF)。同年，Cohen 和 Karger [17] 發表了毛細管凝膠電泳 (capillary gel electrophoresis, CGE) 論文。1988 年，Rose 和 Jorgenson [18] 首先提出了毛細管電泳作微量製備的可能性，提取了 50 微微莫耳的蛋白質和太。

和傳統電泳相比，毛細管電泳最主要特點有三：一是高效能，二是快速，三是微量。在毛細管區帶電泳中，柱效一般為每米幾十萬理論板數，高的可達每米百萬以上，而在凝膠電泳中這一指標竟能達到幾百萬甚至上千萬。商品儀器的操作已可全部自動化，毛細管電泳的最低偵測極限可達 10^{-13} – 10^{-15} 莫耳之間，樣品用量僅為 nl 而已。

毛細管電泳和高效能液相層析 (HPLC) 一樣同是液相分離技術，他們遵循不同的分離機理，都有許多的分離模式，因此在很大程度上 CE 與 HPLC 呈現互補，但無論從效率、速度、樣品用量和成本來說，毛細管電泳都顯示了一定的優勢。與 HPLC 相比，毛細管電泳的柱效更高，速度更快，同時，他幾乎不消耗溶劑。而樣品用量僅為 HPLC 的幾百分之一，CE 沒有幫浦輸送系統，因此成本相對要低，改變操作模式和緩衝液的成份，毛細管電泳有很大的選擇性，可以根據不同的分子性質 (諸如大小、電荷數、疏水性等) 對極廣泛的對象進行有效的分離，相比之下，為達到類似目的，HPLC 要消耗許多價值昂貴的管柱和溶劑。

毛細管電泳分離原理是因泳流速度 (electrophoresis mobility) 的差異造成離子物種在毛細管緩衝液中有不同的移動速度。在固定 PH 值下，溶質大小和電荷的差異是造成分離的原因。現今一般所用的毛細管均為管壁表面含有矽醇基團 (silanol groups) 的融溶石英管 (fused silica tube)，這些矽醇基團在電泳介質中可被離子化。融溶石英管壁和電泳介質間的作用力包含三層：待負電的石英表面 (在 PH>2 時)，不可移動層 (stern layer) 和鄰石英表面朝陰極移動的陽離子擴散層。這種陽離子移動導致整體溶液流向陰極，此種現象稱為電滲流 (electroosmotic or electroendosmotic flow)。同時存在的泳流與滲流，造成陽離子先流出再來中性粒子最後陰離子流出而可達到分離。

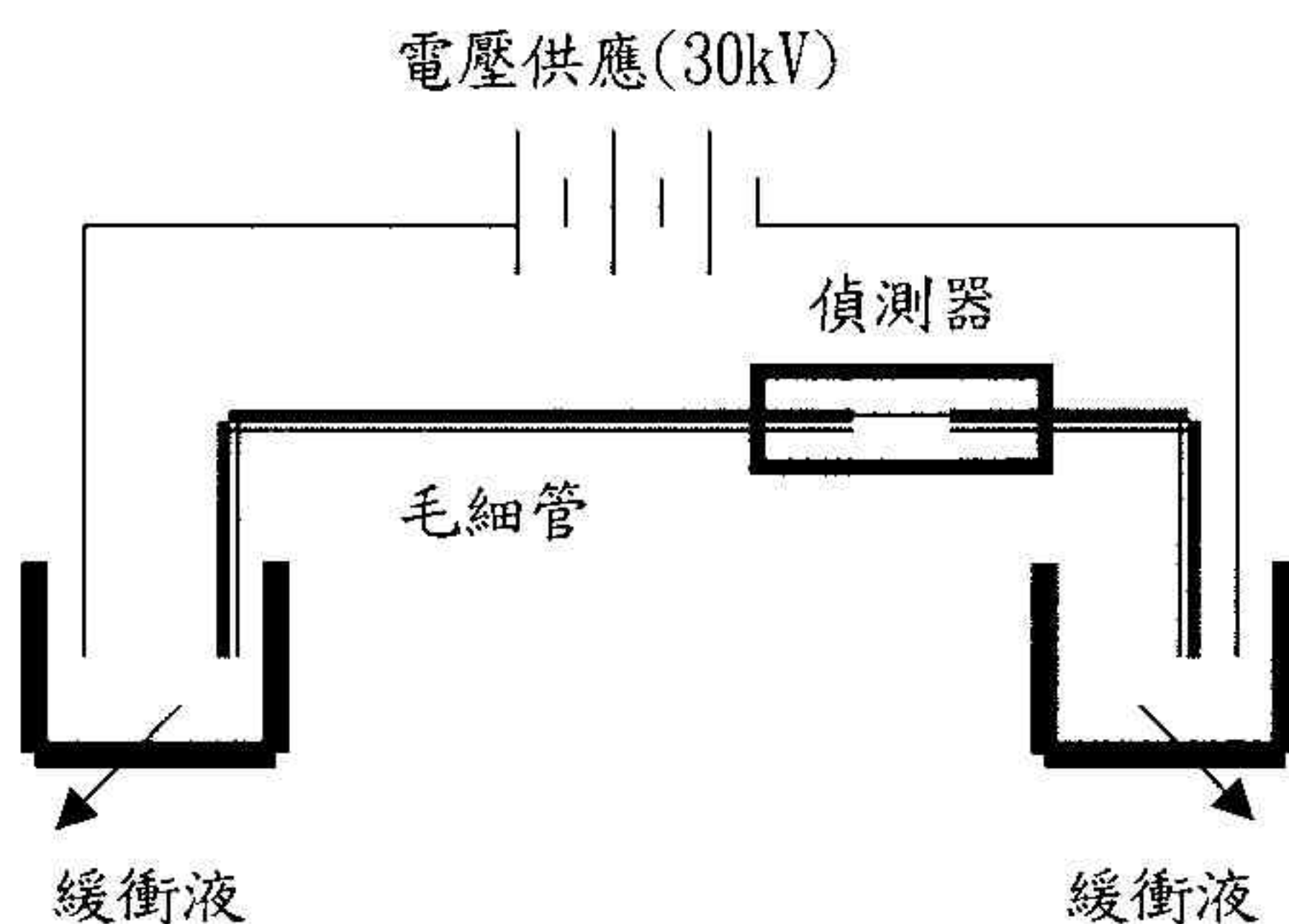


圖 I.1-3 毛細管電泳基本裝置

本研究將借 HPLC 與 CE 進行麻黃與黃柏製劑的基原鑑別研究。

I.2 實驗部分

I.2-1 麻黃

I.2-1-1 實驗試藥

氫氧化鋇、氨水、磷酸、benzyltriethylammonium chloride 和標準品 norpseudoephedrine hydrochloride 為德國 Merk 試藥。標準品 ephedrinehydrochloride、pseudoedrine hydrochloride、methylephedrine、methylephedrine、methylpseudoephedrine 和 nor-ephedrine

hydrochloride 為美國 Aldrich 試藥。

I.2-1-2 實驗儀器

1、毛細管電泳 (CE)

毛細管電泳系統:Waters Quanta 4000

毛細管:60 cm × 75 μm I.D. uncoated

偵測器: on-line UV detector at 185 nm

數據處理: 訊華 CHEM 軟體

2、高效能液相層析 (HPLC)

高效能液相層析儀: HP1050

管柱: ODS-80TM

幫浦系統: Isocratic

偵測器: UV detector at 214 nm

I.2-1-3 毛細管電泳之分析條件

Buffer: 0.02M isoleucine 和 0.005M 氫氧化鋇之溶液 (以氨水調至 PH=10.0)

Voltage: 28kV

Injection mode: 10 sec hydrostatic

I.2-1-4 配置標準溶液和製作檢量線

秤取 0.4884g ephedrine-HCl、0.4884g pseudoephedrine-HCl、0.0800g methylephedrine、0.0400g methylpseudoephedrine、0.0497 norephedrine-HCl 和 0.0993g norpseudoephedrine-HCl 以 50%乙醇配成 500ml 溶液，為標準溶液，其濃度分別如下：ephedrine，800ug/ml；methylephedrine，160 ug/ml；methylpseudoephedrine，80 ug/ml；norephedrine，80 ug/ml；nor-pseudoephedrine，160 ug/ml。

分別取標準溶液 0.5，1.0，2.5，5.0，10.0，25.0，45.0ml，各加入 5.0 ml 內標準品溶液，以 50%乙醇配置成 50ml 標準樣品溶液。依選定的分析條件，分別以毛細管電泳分析，製作檢量線。

I.2-1-5 麻黃製劑之定量分析

將濃縮麻黃製劑粉末，取 0.500g，以 5ml 50%乙醇在室溫攪拌 30 分鐘，萃取四次，濾液加入 2.5ml 內標準品溶液，以 50%乙醇配置成 25ml 檢液，經 0.45 μm 過濾器過濾後，直接以毛細管電泳定量。

I.2-1-6 HPLC 分析條件

Buffer: H₂O : SDS : H₃PO₄ : CH₃CN (600 ml : 6 g : 1 ml : 400 ml)

Flow rate: 1 ml/min

Time: 40 min.

Post run : 10 min.

I.2-2 黃柏

I.2-2-1 實驗試藥

Berberine chloride 為美國 Sigma 試藥，醋酸鈉購自日本 Osaka，brucine 和醋酸為德國 Merck 試藥。palmatine 和 magnoflorine

分離自有關黃柏，jatrorrhizine 從黃蓮分得。Phellodendrine 為必安研究所贈送。Berberrubine 係 berberine chloride 在 150°C 加熱 30 分鐘再純化而得。甲醇和氬甲烷為 HPLC 級試藥。

I.2-2-2 實驗儀器

1、毛細管電泳 (CE)

毛細管電泳系統：Waters Quanta 4000

毛細管：50 cm × 50 μm I.D. uncoated

偵測器：on-line UV detector at 280 nm

數據處理：訊華 CHEM 軟體

2、高效能液相層析 (HPLC)

高效能液相層析儀：Waters

管柱：5C₁₈-MS

幫浦系統：Gradient

偵測器：UV detector at 270 nm

I.2-2-3 毛細管電泳分析條件

Buffer：50% 的 0.5M 醋酸鈉溶液（以醋酸調至 PH=4.6）和 50% 的氬甲烷

Voltage：15 KV

Injection mode：15 sec hydrostatic

Run time：9 min

I.2-2-4 配置標準溶液和製作檢量線

秤取 194.0 mg berberine chloride，68.0 mg palmatine iodide，13.8 mg jatrorrhizine iodide，16.6 mg berberrubine chloride，11.0 mg phellodendrine chloride 和 27.4 mg magnoflorine iodide，以 70% 甲醇配置成 100ml 溶液，為標準溶液，其濃度分別為：berberine，1500 ug/ml；palmatine，500 ug/ml；jatrorrhizine，100 ug/ml；berberrubine，150ug/ml；phell-odendrine，100 ug/ml；magnoflorine，200 ug/ml。

取 1.000g brucine，以 70% 甲醇配成 500ml 溶液，溶度為 2mg/ml，做為內標準溶液。

分別取標準溶液 0.5，1.0，2.5，5.0，10.0，15.0，20.0 ml，各加入

2.5ml 內標準溶液，以 70% 甲醇配置成 25ml 標準樣品溶液。依選定的分析條件，分別以毛細管電泳分析，製作檢量線。

I.2-2-5 黃柏藥材的定量分析

取濃縮黃柏製劑、日本黃柏、關黃柏、上中下通用痛風丸（含關黃柏）、上中下通用痛風丸（含本黃柏），分別以粉碎機粉碎成均勻粉末，各秤取 0.500g，各以 7.5ml 70% 甲醇室溫攪拌 30 分鐘，萃取三次，濾液加入 2.5ml 內標準液，以 70% 甲醇配成 25ml 檢液，經 0.45 μ m 過濾器過濾後，直接以毛細管電泳定量。

I.2-2-6 HPLC 分析條件

Buffer : A : Buffer/CH₃CN=60/40 (Buffer = 50 mM CH₃COONa+2 % CH₃COOH +5 mM SDS)

B : H₂O:CH₃CN:CH₃OH
(100 : 450 : 450)

Flow rate : 1 ml/min

Gradient table :

| Time | A | B | C | D |
|---------|-----|----|---|---|
| Initial | 100 | 0 | 0 | 0 |
| 20 | 65 | 35 | 0 | 0 |
| 40 | 65 | 35 | 0 | 0 |

Time : 35 min.

Post run : 15 min.

I.3 結果與討論

I.3-1 麻黃

I.3.1-1 指標的選擇與分析條件的探討

我們在測定一些含麻黃製劑後，發現檢液絕大多數只存在著 ephedrine 和 pseudoephedrine。事實上，這兩化合物是現在以 HPLC 方法評估麻黃製劑的指標化合物。因此，若可找一個更簡單方法，雖然僅能將 ephedrine 和 pseudoephedrine 分好，但能縮短分析時間，並能應用於許多不同的麻黃製劑，應甚具實用價值。「19」

我們曾試用 HPLC 來分析麻黃成分，結果發現用 u-Bondapak C18 和 phenyl column（每支都是 3.9mm*15cm）串聯，以銨鹽溶液（以 0.003M ammonium dihydrogen phosphate 和 0.003M ammonium chloride 組成，並用磷酸調 PH

至 2.8) 當沖提液，能將六個麻黃鹼分的很好。然而這條件不能直接用在麻黃的水萃取液或乙醇/水萃取液，因萃取液中有其他成分干擾，所以需將萃取液以 6N 氫氧化鈉中和，再用乙醚萃取，濃縮後，萃取物用甲醇配成檢液，如此可得到不受干擾的層析圖。然而這方法並不適用含量少的藥材，因為甲基麻黃素的訊號會受溶劑甲醇訊號干擾。

而在毛細管電泳方面，我們發現，0.005M 氫氧化鉍和 0.02M isoleucine 溶液，以氨水調製 PH=10.0 之緩衝溶液可產生最佳的分離效果，其以這種方法所做的電泳圖譜中的六個已知麻黃鹼的分離效果很好。其移動時間分別為：內標準品，4.1 分；甲基偽麻黃素，5.3 分；麻黃素，6.7 分；甲基麻黃素，7.8 分；去甲基偽麻黃素，8.0 分；去甲基麻黃素，8.7 分。其所有成分的分離皆可在 10 分鐘內完成。

I.3-1-2 檢量線的製作

- 1、如前實驗部分 II-1-4 所述，將配置好的標準樣品溶液注入毛細管電泳分析。其中 ephedrine 所用的濃度分別為 8, 16, 40, 80, 160, 400, 720 ug/ml，以所得的波峰面積與內標準波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖，可得 ephedrine 之檢量線為 $y=0.0193x+0.106$ ($r=0.9997$)。
- 2、如前實驗部分 II-1-4 所述。其中 pseudoephedrine 所用的濃度分別為 8, 16, 40, 60, 80, 160, 400, 720 ug/ml，以所得的波峰面積與內標準波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖，可得 pseudoephedrine 之檢量線為 $y=0.0160x+0.178$ ($r=0.9983$)。
- 3、如前實驗部分 II-1-4 所述。其中 methylephedrine 所用的濃度分別為 1.6, 3.2, 8, 16, 32, 80, 144 ug/ml，以所得的波峰面積與內標準波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖，可得 methylephedrine 之檢量線為 $y=0.0215x+0.018$ ($r=0.9993$)。
- 4、如前實驗部分 II-1-4 所述。其中 methylpseudoephedrine 所用的濃度分別為 0.8, 1.6, 4, 16, 40, 72 ug/ml，以所得的波峰面積與內標準波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖，可得 methylpseudoephedrine 之檢量線為 $y=0.0162x+0.004$ ($r=0.9989$)。
- 5、如前實驗部分 II-1-4 所述。其中 norephedrine 所用的濃度分別為 0.8, 1.6, 4, 16, 40, 72 ug/ml，以所得的波峰面積與內標準波峰面積之比值對濃度(ug/ml)作圖，可得 norephedrine 之檢量線為 $y=0.0286x+0.017$ ($r=0.9991$)。
- 6、如前實驗部分 II-1-4 所述。其中 norpseudoephedrine 所用的濃度分別為 1.6, 3.2, 8, 16, 32, 80, 144 ug/ml，以所得的波峰面積與內標準波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖，可得 norpseudoephedrine 之

檢量線為 $y=0.0256x+0.015$ ($r=0.9995$)。

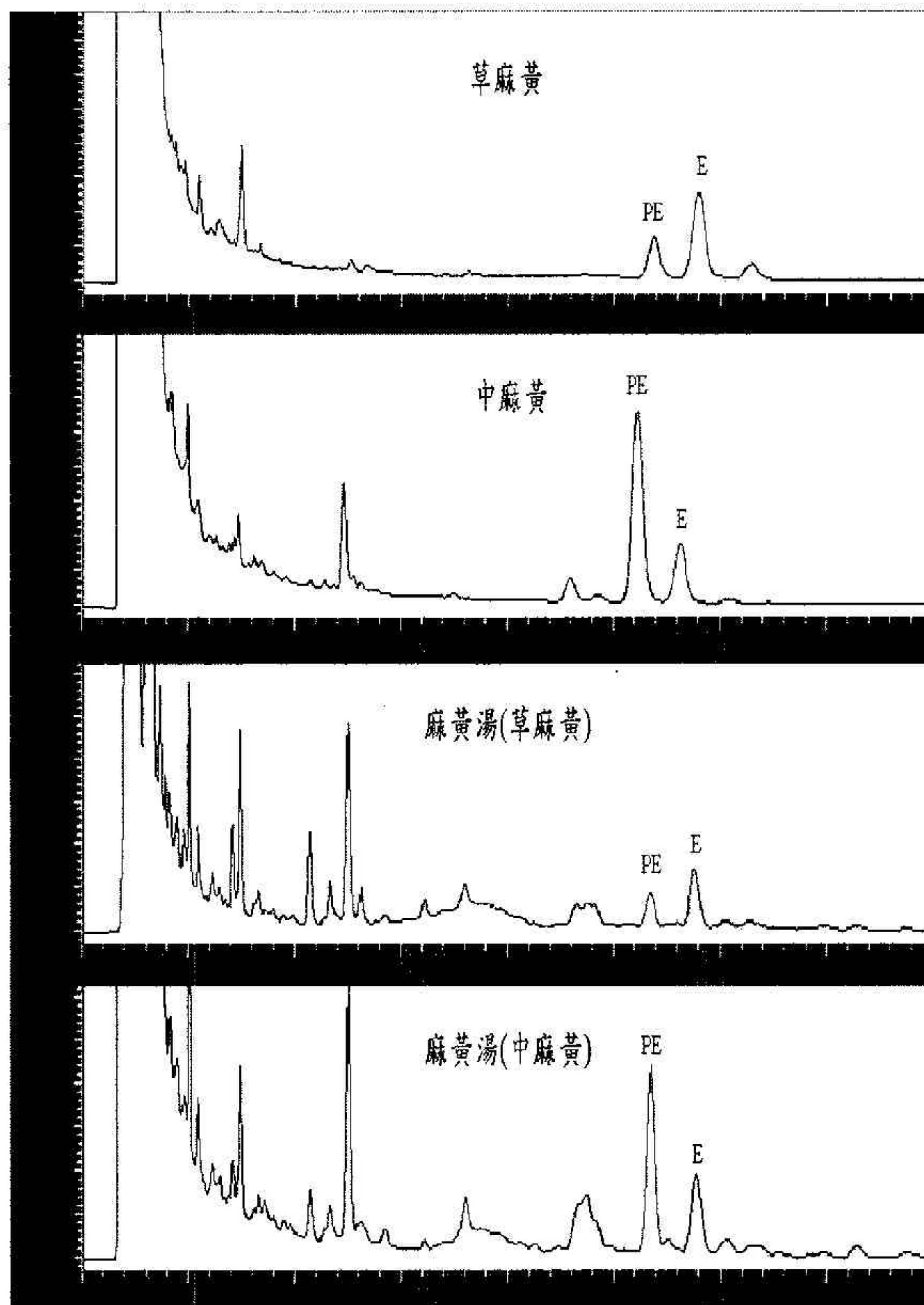


圖 I-1.1 麻黃樣品的高效能液相層析 (HPLC) 圖譜

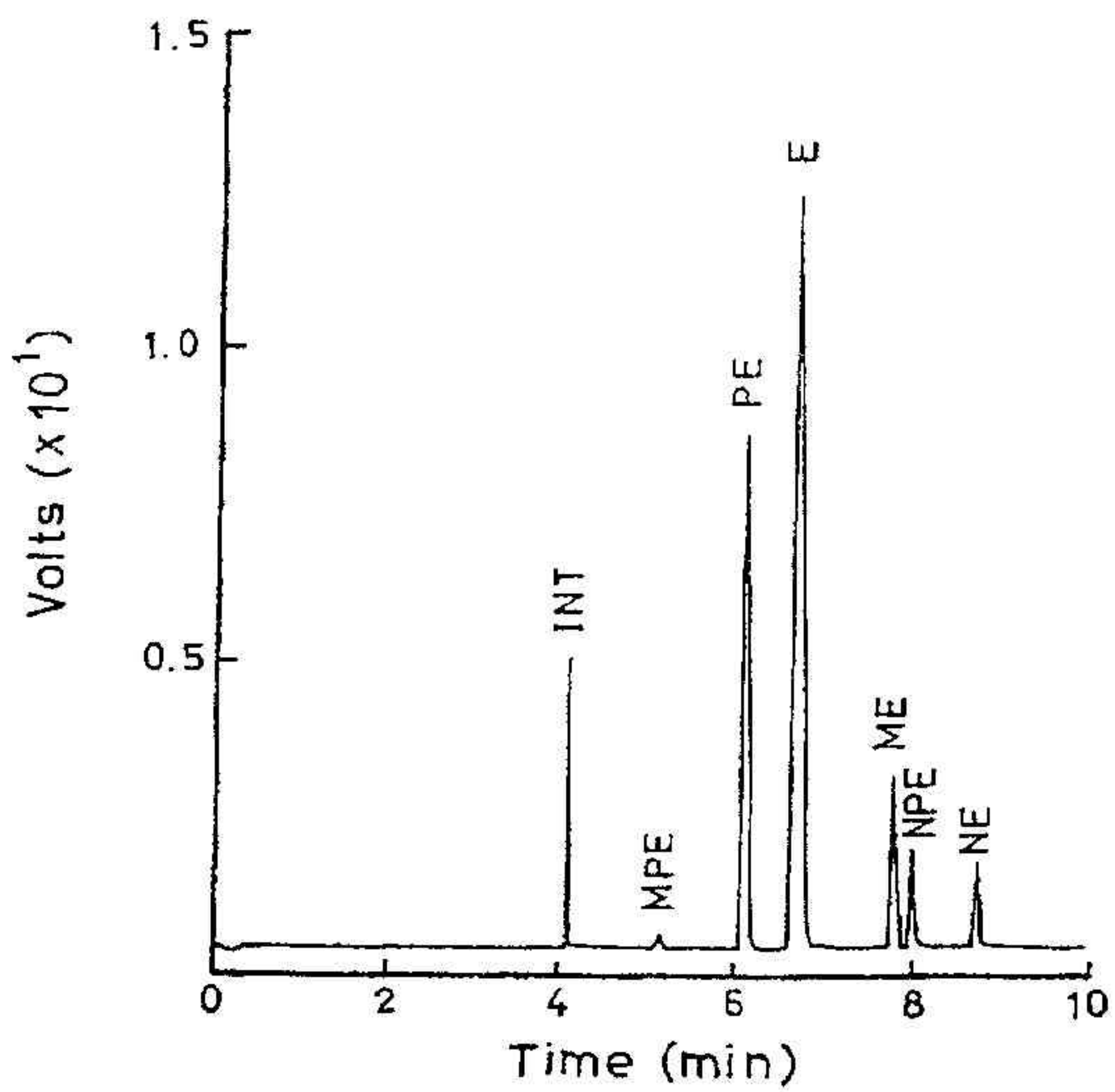


圖 I-1.2 濃縮麻黃製劑之電泳 (CE) 圖譜

表 I-1.1 麻黃樣品之生物鹼的含量 (mg/g)

| 樣品 | ephedrine | pseudoephedrine | 總量 | ephedrine/pseudoephedrine |
|--------------|-----------|-----------------|-------|---------------------------|
| 草麻黃 | 1.037 | 0.502 | 1.539 | 2.066 |
| 中麻黃 | 0.167 | 0.878 | 1.045 | 0.190 |
| 麻黃湯 (草麻黃) | 3.213 | 0.902 | 4.115 | 3.562 |
| 麻黃湯 (中麻黃) | 1.310 | 2.848 | 4.158 | 0.460 |

本研究曾對草麻黃及中麻黃藥材作過分析統計，結果(%)如下：草麻黃(n=8), ephedrine 0.933 ± 0.353 , pseudoephedrine 0.456 ± 0.226 , E/PE=2.0; 中麻黃(n=6), ephedrine 0.173 ± 0.075 , pseudoephedrine 0.894 ± 0.333 , E/PE=0.2。

I.3-2 黃柏

I.3-2-1 指標的選擇與分析條件的探討

測定一些含黃柏的製劑，發現檢液中存在的主要吸收峰是 berberine 和 palmatine。事實上，這三個化合物之一是現在以 HPLC 評估黃柏製劑品質的指標物。因此，有必要去找到一個更簡單的方法，他雖然只可以將 berberine 和 palmatine 分好，但可以縮短分析時間，並能應用於許多不同的製劑。「20」

在毛細管電泳的部分，從四級銨生物鹼的分析得知，羧基離子對生物鹼中帶正電的氮是很好的配對離子，而有機修飾劑（甲醇或氫甲烷）能使波峰更尖銳，分離效果更好。於是，試著用醋酸鈉溶液和甲醇（或氫甲烷）來配緩衝溶液更好，經一系列的實驗發現 50%的 0.2M 醋酸鈉溶液和 50%的氫甲烷配置的緩衝液能在八分鐘內將 berberine 和 palmatine 分離的很好。其移動的時間分別為：內標準品，6.2 分；berberine，6.6 分；palmatine，7.0 分。

I.3-2-2 檢量線的製作

1、如前實驗部分 II-2-4 所述，將配置好的標準溶液注入毛細管電泳分析。其中 berberine 所用的濃度分別為 30, 60, 150, 300, 600, 900, 1200ug/ml，以所得的波峰面積與內標準品之波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖，可得 berberine 之檢量線為 $y=0.01235x+0.071$ ($r=0.9999$)。

- 2、如前實驗部分 II-2-4 所述。其中 palmatine 所用的濃度分別為 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400 ug/ml, 以所得的波峰面積與內標準品之波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖, 可得 palmatine 之檢量線為 $y=0.01496x+0.016$ ($r=0.9999$)。
- 3、如前實驗部分 II-2-4 所述。其中 jatrorrhizine 所用的濃度分別為 2, 4, 10, 20, 40, 60, 80 ug/ml, 以所得的波峰面積與內標準品之波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖, 可得 jatrorrhizine 之檢量線為 $y=0.02164x+0.005$ ($r=0.9999$)。
- 4、如前實驗部分 II-2-4 所述。其中 berberrubine 所用的濃度分別為 3、6、15、30、60、90、120 ug/ml, 以所得的波峰面積與內標準品之波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖, 可得 berberrubine 之檢量線為 $y=0.01584x+0.003$ ($r=0.9999$)。
- 5、如前實驗部分 II-2-4 所述。其中 phellodendrine 所用的濃度分別為 2, 4, 10, 20, 40, 60, 80 ug/ml, 以所得的波峰面積與內標準品之波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖, 可得 phellodendrine 之檢量線為 $y=0.0064x-0.011$ ($r=0.9997$)。
- 6、如前實驗部分 II-2-4 所述。其中 magnoflorine 所用的濃度分別為 4, 8, 20, 40, 80, 120, 160 ug/ml, 以所得的波峰面積與內標準品之波峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖, 可得 magnoflorine 之檢量線為 $y=0.00496x+0.011$ ($r=0.9997$)。

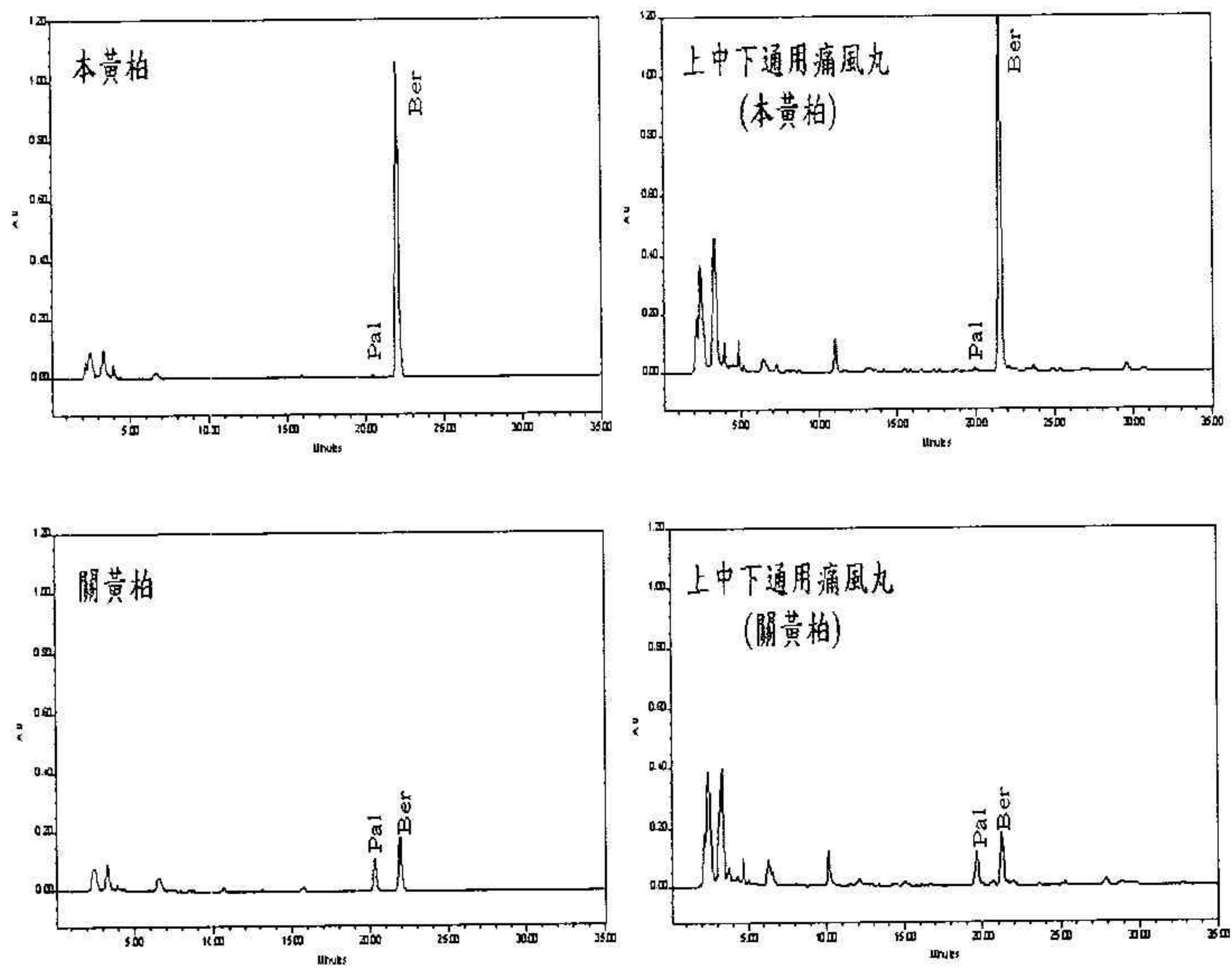


圖 I-2.1 黃柏樣品之高效能液相層析 (HPLC) 圖譜

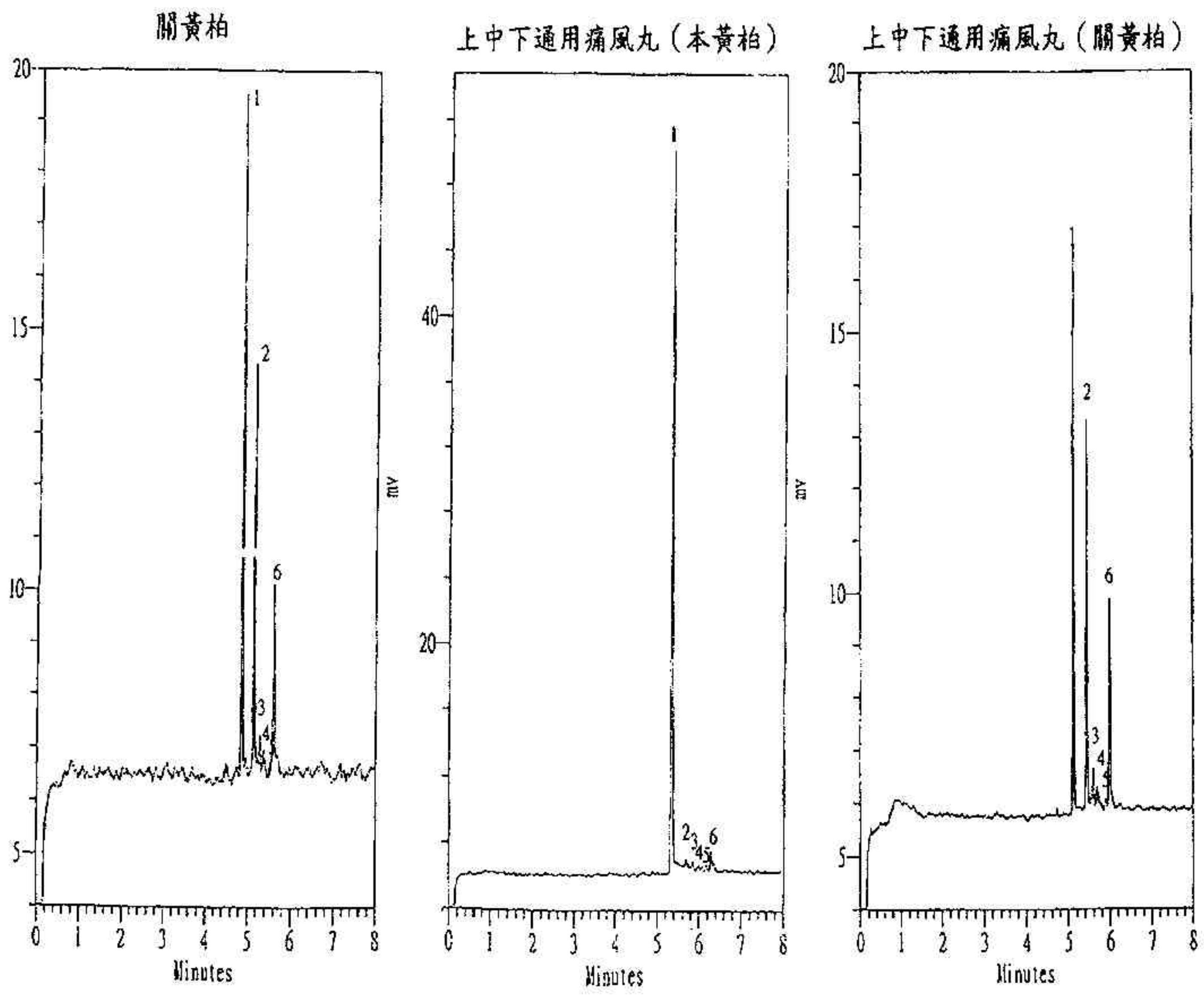


圖 I-2.2 黃柏樣品之毛細管電泳 (CE) 圖譜之一

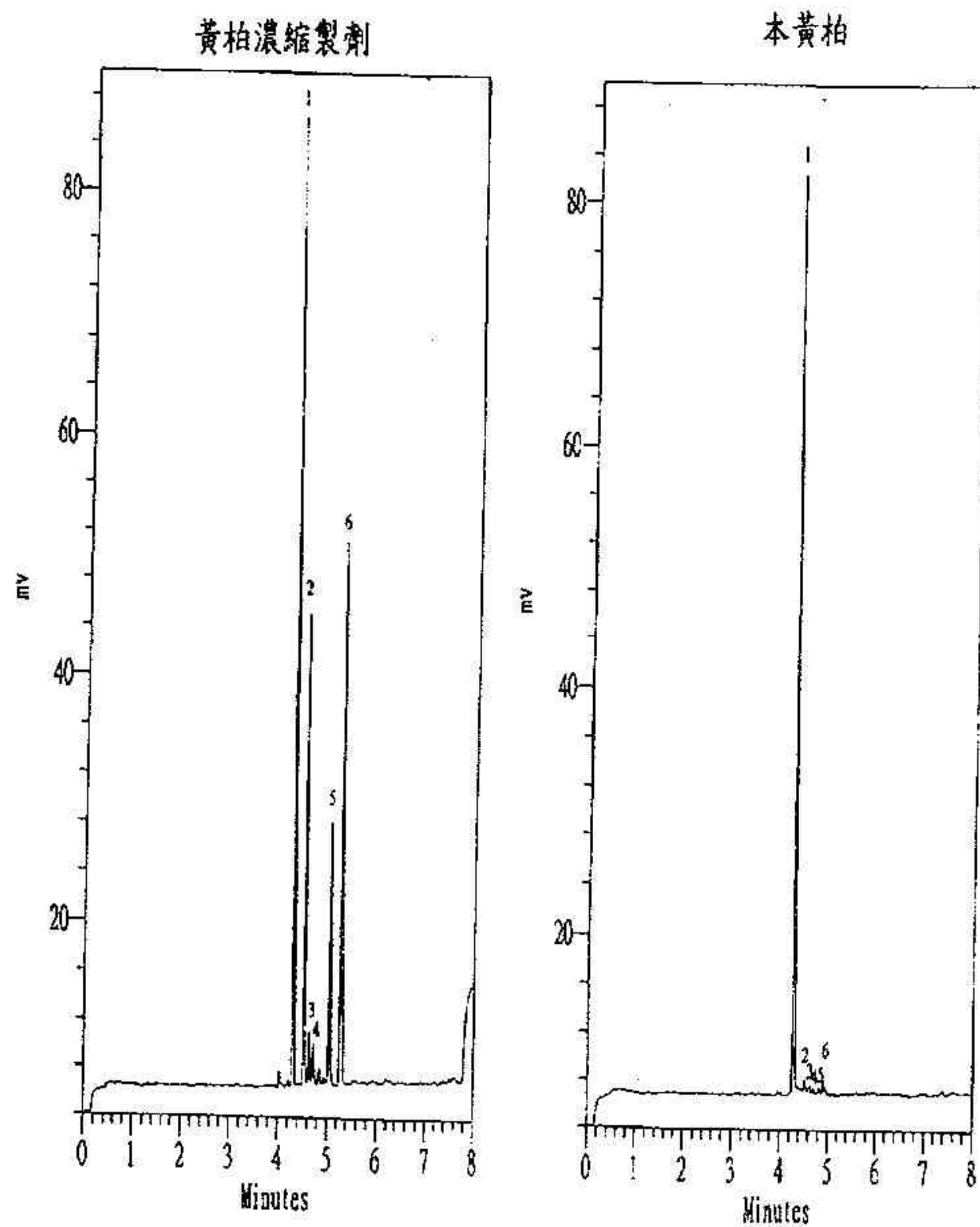


圖 I-2.2 黃柏樣品之毛細管電泳 (CE) 圖譜之二

表 I-2.1 黃柏樣品的生物鹼含量(mg/ml)

| 藥材與方劑 | BER | PAL | JAT | PHE | MAG | Total | Ber/Pal |
|--------------------|-----|-----|------|-----|-----|-------|---------|
| 黃柏濃縮製劑 | 0.9 | 0.2 | 0.1 | 0.4 | 1.4 | 3 | 4.5 |
| 日本黃柏 | 3.8 | 0.3 | 0.3 | 1.0 | 1.3 | 6.7 | 12.7 |
| 關黃柏 | 0.7 | 0.3 | 0.05 | 0.2 | 0.5 | 1.75 | 2.3 |
| 上中下通用痛風丸 (日本黃柏) | 8.0 | 0.8 | 0.6 | 1.1 | 2.7 | 13.2 | 10.0 |
| 上中下通用痛風丸 (關黃柏) | 1.7 | 0.8 | 0.3 | 1.2 | 0.8 | 4.8 | 2.0 |

表 I-2.2 黃柏樣品生物鹼在各樣品中占的比例(%)

| 藥材與方劑 | BER | PAL | JAT | PHE | MAG | Ber/Pal |
|--------------------|------|------|-----|------|------|---------|
| 黃柏濃縮製劑 | 30.0 | 6.7 | 3.3 | 13.3 | 46.7 | 4.5 |
| 日本黃柏 | 56.7 | 4.5 | 4.5 | 14.9 | 19.4 | 12.6 |
| 關黃柏 | 40.0 | 17.1 | 2.9 | 11.4 | 57.1 | 2.4 |
| 上中下通用痛風丸 (日本黃柏) | 60.6 | 6.1 | 4.5 | 8.3 | 20.5 | 9.9 |
| 上中下通用痛風丸 (關黃柏) | 35.4 | 16.7 | 6.3 | 25 | 16.7 | 2.1 |

本研究曾對各品種黃柏藥材之 berberine 及 palmatine 作過分析，結果(mg/g)如下：川黃柏(n=14)，berberine 5.7 ± 2.8 ，palmatine 3.4 ± 2.0 ，Ber/Pal=1.7；關黃柏(n=4)，berberine 6.2 ± 2.6 ，palmatine 3.3 ± 1.3 ，Ber/Pal=1.9；本黃柏(n=7)，berberine 35.2 ± 6.8 ，palmatine 0.8 ± 0.7 ，Ber/Pal=44；日本黃柏(n=7)，berberine 31.7 ± 6.6 ，palmatine 1.9 ± 1.4 ，Ber/Pal=16.6。

I.4 參考文獻

1. 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌，簡明藥材學，P. 31，新醫藥出版社，台北(1985)
2. Y. M. Liu, S. J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang and Y. P. Chen, *Planta Med.*, (1993) 59, 376
3. 同 ref. 1, p117.
4. Y. M. Liu, S. J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang and Y. P. Chen, *Planta Med.*, (1993) 59, 557
5. M. Twett, *Proc. Warsaw Soc. Nat. Sci. Biol.*, (1903) 14, 6
6. A. J. P. Martin and R. L. M. Synge, *Biochem. J.*, (1941) 35, 1358
7. A. T. James and A. J. P. Martin, *Analyst*, (1952) 77, 915
8. E. Stahl, *Cemiker-Ztg.*, (1958) 92, 27c
9. J. F. K. Huber and J. A. R. J. Hulaman, *Anal. chim. Acta*, (1967) 38, 305
10. A. Tiselius, *Trans. Faraday Soc.*, (1937) 33, 524
11. S. Hjerten, *Chromatogr. Rev.*, (1967) 9, 122
12. R. Virtanen, *Acta Polytech. Scand.*, (1974) 123, 1
13. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, (1981) 53, 1298

14. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *Science*, (1983) 222, 266
15. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya and T. Ando, *Anal. Chem.*, (1984) 56, 111
16. S. Hjerten, J. L. Liao and K. Yao, *J. Chromatogr.*, (1987) 387, 127
17. A. Cohen and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, (1987) 397, 409
18. D. J. Rose and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, (1988) 60, 642

第二章 人參製劑之前處理與高效液相層析

II. 1 緒論

II. 1-1 前言

人參為常用中藥之一，始載神農本草經，列為上品。因根如人形而得名。人參的根直接乾燥者為白參，經蒸煮再乾燥者為紅參，其根部末端為參鬚，並有野生及栽培二大類。自古在我國用以補肺隆以益五臟之津液、安精神、定魂魄止驚悸、開心智、明目、除邪氣。藥理研究顯示其有強壯、興奮神經系統、強心、增強性機能、降低血糖、抗利尿、促進消化吸收及新陳代謝、抗過敏等作用[1]。

實驗發現人參約主要藥理活性成分為系列的人參皂素 (ginsenoside)，至目前為止已有超過數十種人參皂素陸續被發表。在此我們針對主要的十二種人參皂素，ginsenosideRb1(1)、Rb2(2)、Rc(3)、Rd(4)、Re(5)、Rf(6)、Rg1(7)、Rg2(8)、Ro(9)和 malonylginsenosideRb1(10)、Rb2 (11)、Re(12)來進行定量研究。

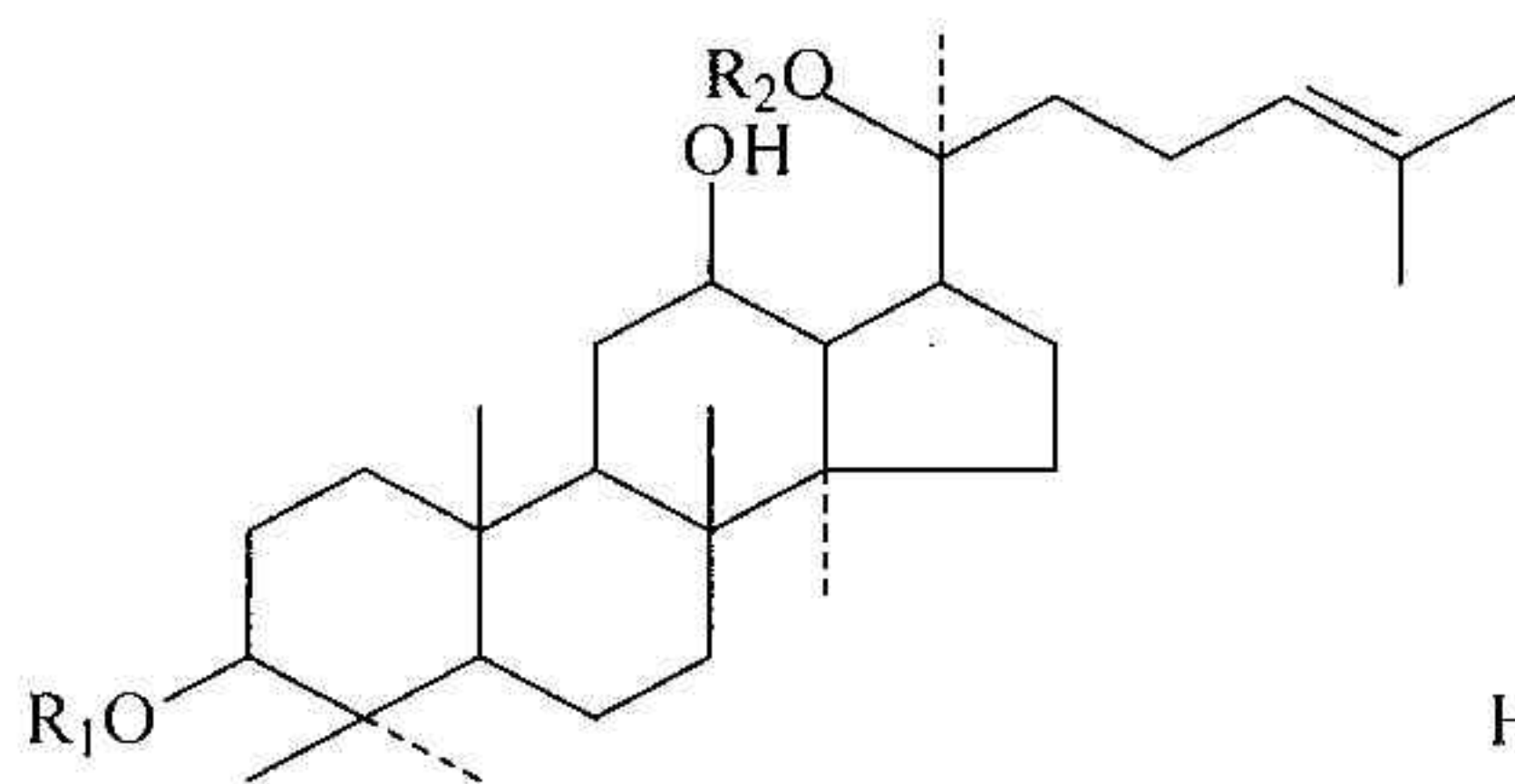
人參皂素含量的測定，在過去的十五年中有許多正相或逆相的高效能液相層析方法(HPLC)相繼發表[2-7]，然而這些方法均無法理想地同時定量超過六種成分。1988年 H. Yamaguchi 等人曾以 NH₂ 管柱在 70 分鐘內定量前述的十二種主要的人參皂素，但其中的 Rf 與 Rg1，Rc 與 mRb1，Rb2 與 mRb1 等各組化合物無法有效完全分離[8]。另外，所有前述的方法在分析前均需對人參樣品做很繁瑣的前處理。

而在 1994 年 W. C. Chuang[9]利用逆相高效能液相層析發展一種直接、快速，在 45 分鐘內可同時定量十二種主要的人參皂素的方法，萃取液不需前處理，可直接分析，方便又可減少誤差。並對流動相的組成與管柱的選擇作一系統探討。

但將此方法應用在以人參為君藥的方劑之中，則因為其他藥材的干擾之下，在定量與定性上發生困難；因此欲解決此干擾，則必須在樣品之前處理步驟做一番改善。經參考有關人參之前處理步驟，在 1986 年 Pietta[10]便在前處理指出

無論是 Extrelut Method 之方法過於浪費時間；而純化的方式亦不易，便選擇固相萃取之技術 (SPE)。

從 1986 年至今，有關固相萃取之技術 (SPE) 及材質開發亦漸趨完備，因此本實驗將此應用於人參方劑上，就其材質方面的選擇及沖提比例作探討，亦改善其譜圖之解析度，在定量及定性上增進其靈敏度。



20-S-Protanaxadiol (R1=R2=H)

1、Rb₁: R1= D-Glc(β1-2)D-Glc-

R2= D-Glc(β1-6)D-Glc-

2、Rb₂: R1= D-Glc(β1-2)D-Glc-

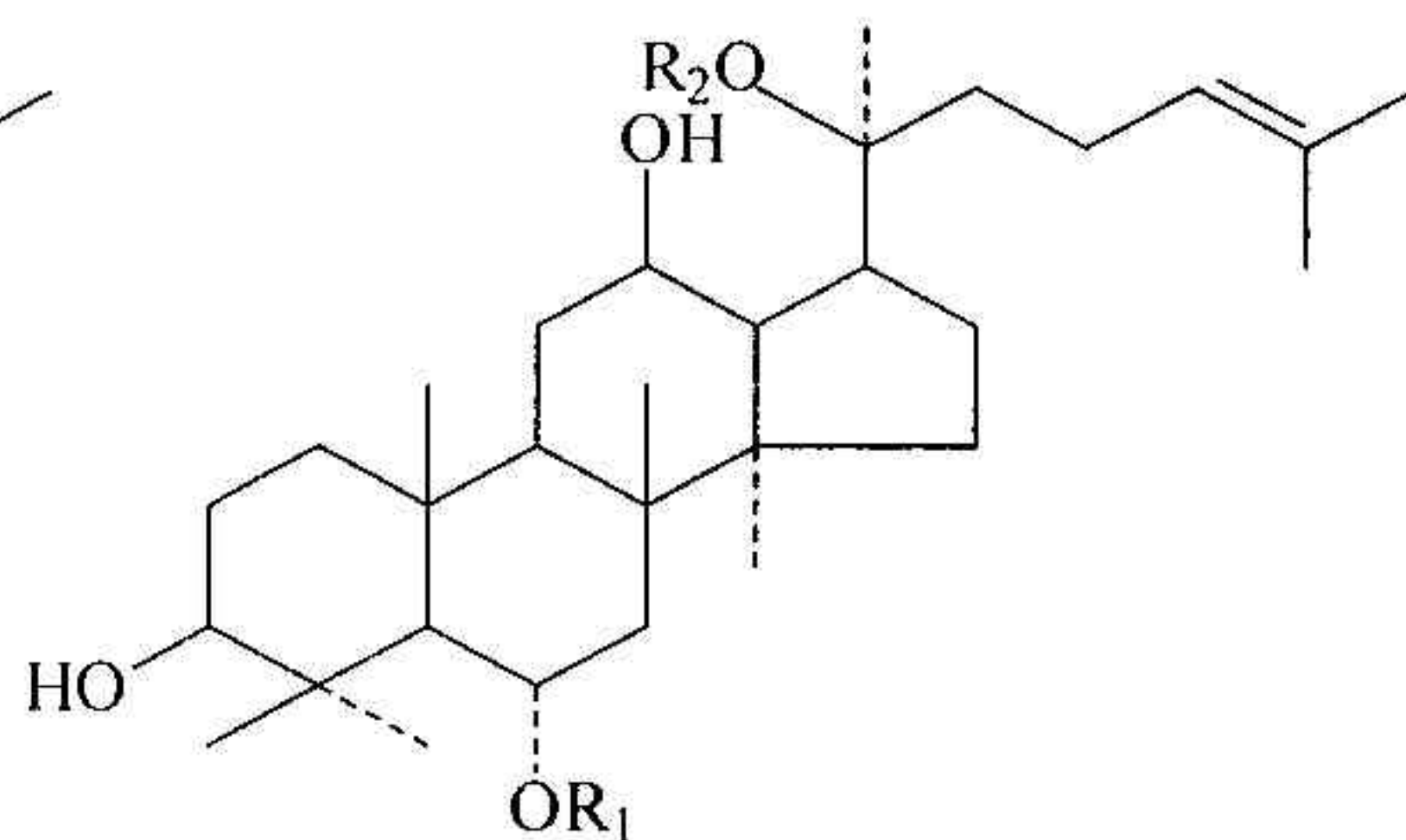
R2= L-Ata(pyr)(α1-6)D-Glc-

3、Rc : R1=D-Glc(β1-2)D-Glc-

R2= L-Ata(fur)(α1-6)D-Glc-

4、Rd : R1= D-Glc(β1-2)D-Glc-

R2= D-Glc-



20-S-Protanaxatriol (R1=R2=H)

5、Re: R1=L-Rha(α1-2)D-Glc-

R2=D-Glc-

6、Rf: R1= D-Glc(β1-2)D-Glc-

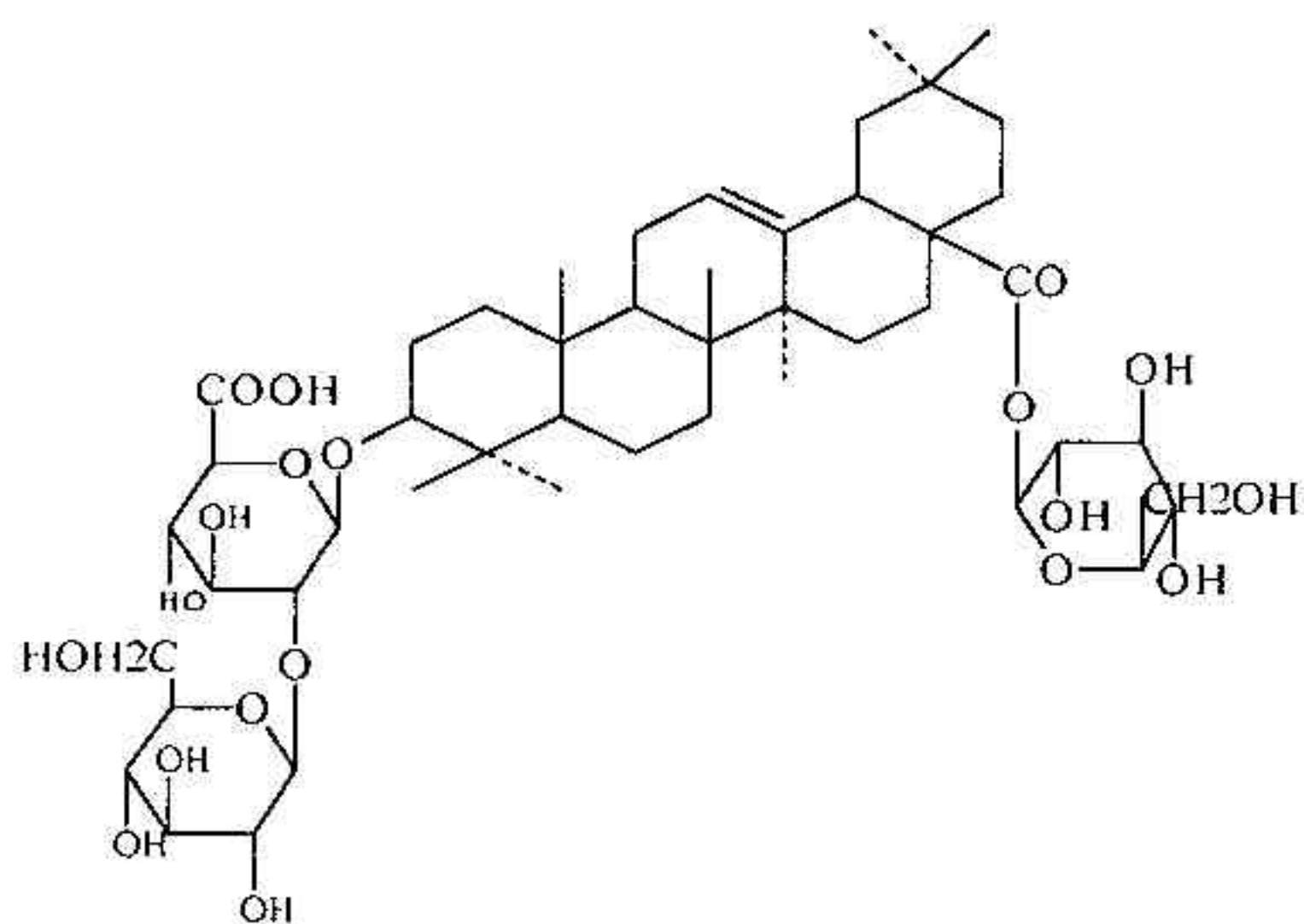
R2=H-

7、Rg₁:R1= D-Glc-

R2= D-Glc-

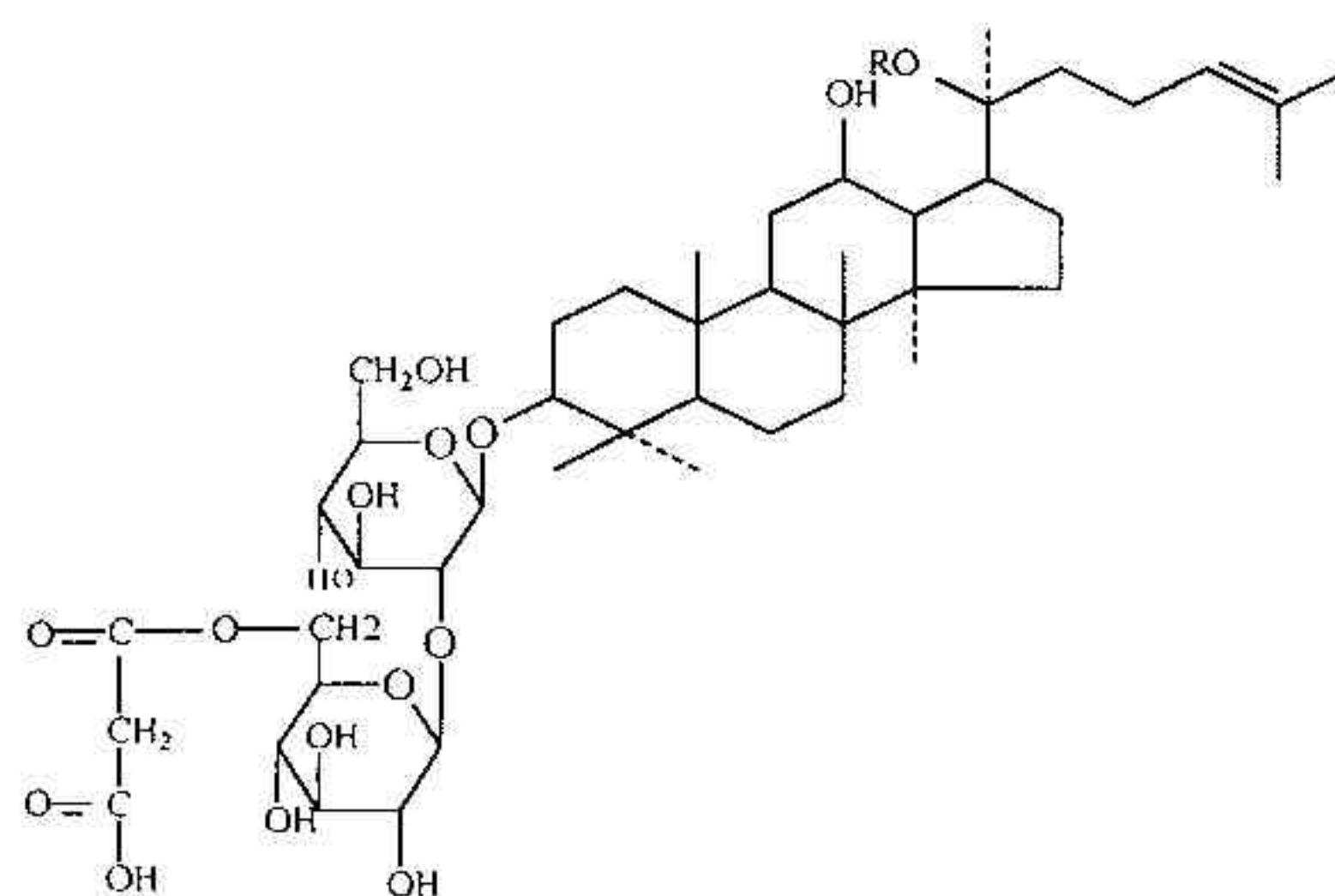
8、Rg₂:R1=L-Rha(α1-2)D-Glc-

R2=H-



Oleanolic acid

9、Ro



Malonylginsenoside

10、mRb₁: R= D-Glc(β1-6)D-Glc-

11、mRb₂: R= L-Ata(pyr)(α1-6)D-Glc-

12, mRc: R= L-Ata(fur)(α 1-6)D-Glc-

人參之成份結構圖

※黑體部份為本實驗之分析物

II.1-2 固相萃取技術

分離與鑑定是分析化學中兩大重要步驟，而樣品的處理技術，將影響這兩個步驟之成敗，尤其現在分析所欲解決的問題，均為含有複雜基質(matrix)的樣品。如何由樣品中將待測之分析物萃出，以免因複雜基質的干擾，增加分離步驟之困擾，並提高鑑定偵測之靈敏度。因此樣品之前處理步驟，可以說是影響分析成敗之重要關鍵。近來微量分析的發展已由改善分析儀器方面轉變至樣品備製(sample preparation)方面。傳統的樣品處理，包含樣品溶解，純化和利用溶劑的液相-液相萃取，但於液相-液相萃取(liquid-liquid extraction, LLE)時，需使用大量有機溶液，不但將危害操作者健康，亦因廢棄溶劑之處理，增加分析費用，並需使用大量之玻璃製品，且不易與其他分析儀器連線形成自動化，最大缺點則是對於複雜的實際樣品處理過程中，常因樣品含有界面活性劑，於萃取過程中產生泡沫而影響萃取效果。固相萃取技術(solid-phase extraction, SPE)則改善了這些缺點。

固相萃取法最早發表於1970中期年代文獻上[11]，當時主要是為改善液相-液相萃取法所難以避免的介質干擾(matrix interference)以及分析物需要濃縮的問題。因一般固相萃取法是由固相吸附物質將分析物吸附而通過不純物，或藉由之後的沖洗(wash)步驟將不純物沖出，所得萃取液其干擾物較液相-液相萃取法所得為少；吸附後再以少量的沖提液沖提(elute)所吸附住之待測物部分，如此便提高了分析物的濃度，不似液相-液相萃取法需用真空濃縮機或氮氣吹乾法濃縮萃取液，易造成分析物之流失。一般液相-液相萃取法的溶劑使用量大，易造成環境上的污染，固相萃取法則改善了這項缺點，其溶劑的使用量通常在數毫升左右，比起液相-液相萃取法少了很多；固相萃取法的回收率，除非在特殊物質的干擾下，通常高於液相-液相萃取法。固相萃取法由於具有純化、濃縮、操作方便、溶劑使用少、可快速處理樣品、回收率高、裝備簡單、不需特別的實驗室才能擁有、也不需什麼特殊的技術等優點，因此利用固相萃取法於微量物質之萃取已相當普遍化。故針對固相萃取法之發展過程，原理及應用做一簡單介紹，以供對微量樣品前處理技術有興趣者之參考。

固相萃取技術之發展史

固相萃取技術是由傳統的層析(chromatography)觀念演進而得，層析是利用中間物質與分析物間吸附親和力不同而分離，"層析"一詞最早是Tswett於1906年提出，其利用碳酸鈣吸附植物的色素，再以乙醚作沖提動相通過填充管柱而分離不同色素，此即為目前所稱的正相(normal phase)分離。在1930年代砂石

(silica), 礬土(lumina), Florisil, Kieselguhr 和矽藻土(diatomaceous earth) 常被用作正相分離的固相吸附劑, 亦即目前所稱的正相固相萃取(normal-phase SPE)。一直到 1950, Howard 和 Martin 利用非極性的固定相, 從極性溶劑中吸附非極性化合物。如利用 dichlorodimethylsilane 與 silica 作用, 修飾 silica 表面為非極性, 此種技巧, 即目前所稱的逆相層析(reversed-phase chromatography)。XAD 樹脂合成後, 於 1972 被填充於小管柱(cartridge)(圖 a) [11], 臨床化學家利用此來萃取生物體液(biological fluids)中之藥物, 當時此種濃縮小管柱名為 Brinkman, 表示固相萃取技術最早應用之商業產品。最早生產可拋棄針筒式管柱是 BioRad 公司(圖 a)。其填充物為離子交換(ion-exchange)物質。1978 年 Waters 公司則以一種能產生均勻流速的特殊輻射壓縮技術, 大量生產一商品名為 Sep-Pak 管柱, 用以濃縮純化微量的溶質, 填充 C-18 為逆相 SPE 管柱, 矽石(silica)為正相 SPE 管柱。

Analytichem 公司(現為 Varian)則重新改造 Jet-tube 形狀, 並生產 C-18 為吸附劑之管柱。Manhattan 儀器公司則生產一系列品名為 Tox-Elut, Clin-Elut 和 Chem-Elut 管柱。J. T. Baker 公司在 1982 年亦生產一系列管柱。事實上, 固相萃取(solid-phase extraction)這個名詞也是由 J. T. Baker 公司 Zief 等人所提出, 目前則一直沿用此名稱。

因此, 1980 年代以後固相萃取技術被廣泛用於複雜樣品中微量物質濃縮及純化, 尤其是以混合相為固相, 用於血液或尿液中違禁藥物之純化 [12]。1989 年 3M 公司則開發出一種內含 8-12cm 填充物質的碟狀形(disks)(圖 a), 用於大量體積之樣品, 碟狀其大小可由 4mm 到 90mm, 廣泛應用於環境及藥物分析時水樣品中微量物質之濃縮純化。1992 年, Supelco 公司由 SPE 技術演進, 推出另一萃取技術, 固相微萃取(solid-phase microextraction) [13], 其原理亦是利用固相吸附劑萃取分析物, 其與 SPE 最大差異是不需用溶劑沖提, 可直接利用熱脫附方式將被吸附劑吸附之分析物脫附進入 GC, 或 GC/MS 直接分析。SPE 技術目前已發展至能與 GC 或 HPLC 連線。各家廠商除了致力於各種分析儀器自動連線外, 並開發新的填充物質, 以擴展 SPE 應用之領域。[14]

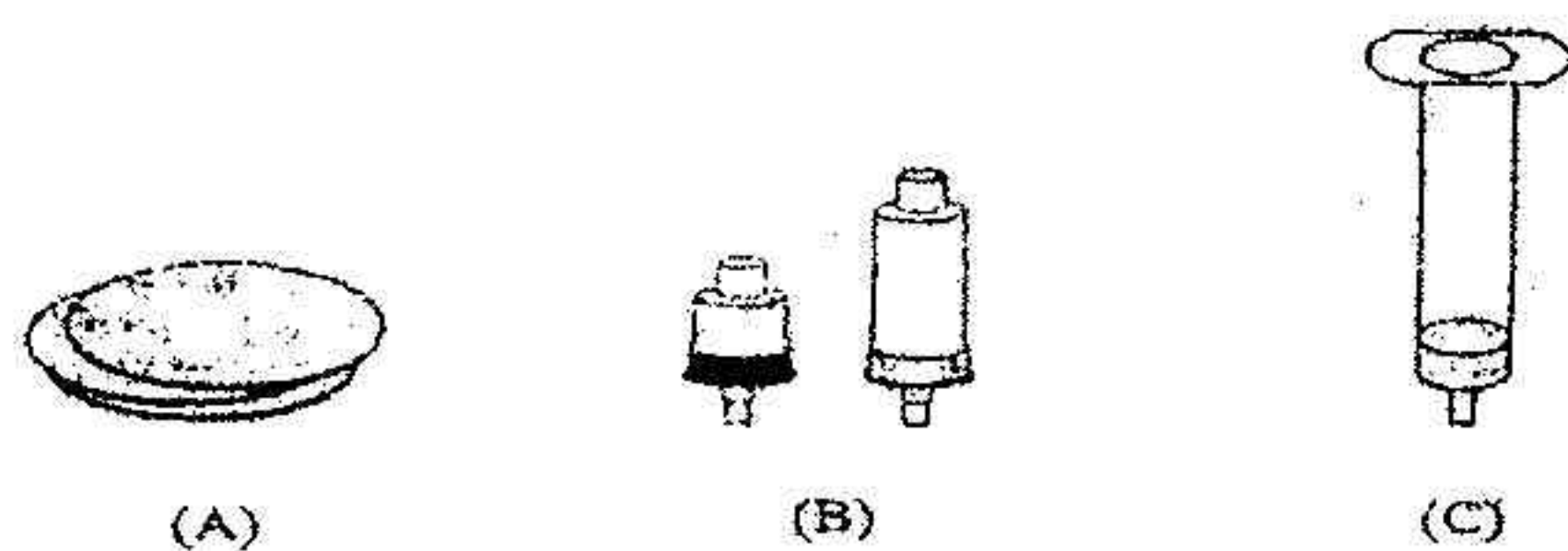


圖 a 固相萃取管柱形狀 (A) 碟狀形 (B) 小管柱 (C) 針筒式管柱

固相萃取技術之發展史

| | |
|------|--|
| 1906 | "層析"一詞最早由 Tswett 提出 |
| 1930 | 正相固相萃取應用於液相層析技術 |
| 1941 | 分配層析技術 |
| 1950 | 逆相層析技術，廣泛使用木炭為吸附固相 |
| 1960 | 合成鏈結吸附固相 |
| 1968 | 發展聚合物吸附固相 |
| 1973 | Gilpin 與 Burke 兩人發展 chlorosilane 鏈結吸附固相，並應用於液相層析技術 |
| 1974 | Junk 等人利用 XAD 樹脂分析水樣中之微量有機污染物 |
| 1975 | C-18 逆相萃取廣泛應用於 HPLC |
| 1975 | "微量濃縮"一詞被提出 |
| 1978 | Waters 公司正式生產 Spe-Pak 管柱 |
| 1979 | Analytichem 公司生產 C-18 針筒式管柱 |
| 1980 | 固相萃取裝置自動化 |
| 1982 | J. T. Baker 公司 Zief 等人提出固相萃取這個名詞 |
| 1985 | 固相萃取技術被廣泛應用並發展出新的固相萃取管柱 |
| 1989 | 3M 公司開發出碟形狀固相吸附物質 |
| 1992 | Supleco 公司以 SPE 技術為基礎，推出固相微萃取技術 |
| 1993 | 各廠商致力發展 SPE 與各種分析儀器自動連線 |
| 1995 | 發展至能與 HPLC 連線之 SPE 技術 |
| 1996 | 自動化固相微萃取裝置與 SPE-GC 連線裝置應用於例行分析 |

吸附及分離原理

固相萃取技術是包含液相與固相的一種物理萃取程序，主要是利用固相對所欲偵測之分析物其吸附力比對溶劑強。因此當樣品溶液通過填充管柱時，分析物被吸附濃縮在固相表面上，而其他成分則流經管柱。因此所選擇使用的固定相可以純化和濃縮某一特定的分析物。SPE 與 HPLC 最大不同，則 HPLC 用連續性移動相(mobile phase)沖提，而 SPE 則用適當的溶劑將被固定相所吸附的分析物沖出，因此利用吸附相將分析物自溶液中分離(isolate)出來，當被沖提出來時，分析物某濃度和純度則提高很多。一般固相萃取法其操作步驟如圖 b 所示 [14]，將一含有欲分析物之溶液(通常為水溶液)藉由一外力(例如真空系統，或由外用氣體加壓)使溶液通過一固相(Phase or sorbent)部份，藉由此固相和溶劑的分配

(partition)或固相本身的吸附(adsorption)作用而將，分析物滯留，以和其他物質分開。後以適當的溶劑沖洗(wash)吸附相以除去不純物，最後再以適當的溶劑或是混合溶劑沖提(elute)固相，所得溶液可直接以氣相析儀(GC)或液相層析儀(LC)分析或是再做進一步的處理。另有利用固相吸附不純物而將欲分析物流出的方法，但較不常見，進行單一管柱之處理，考慮利用如圖 b 所示的四種方式即可。

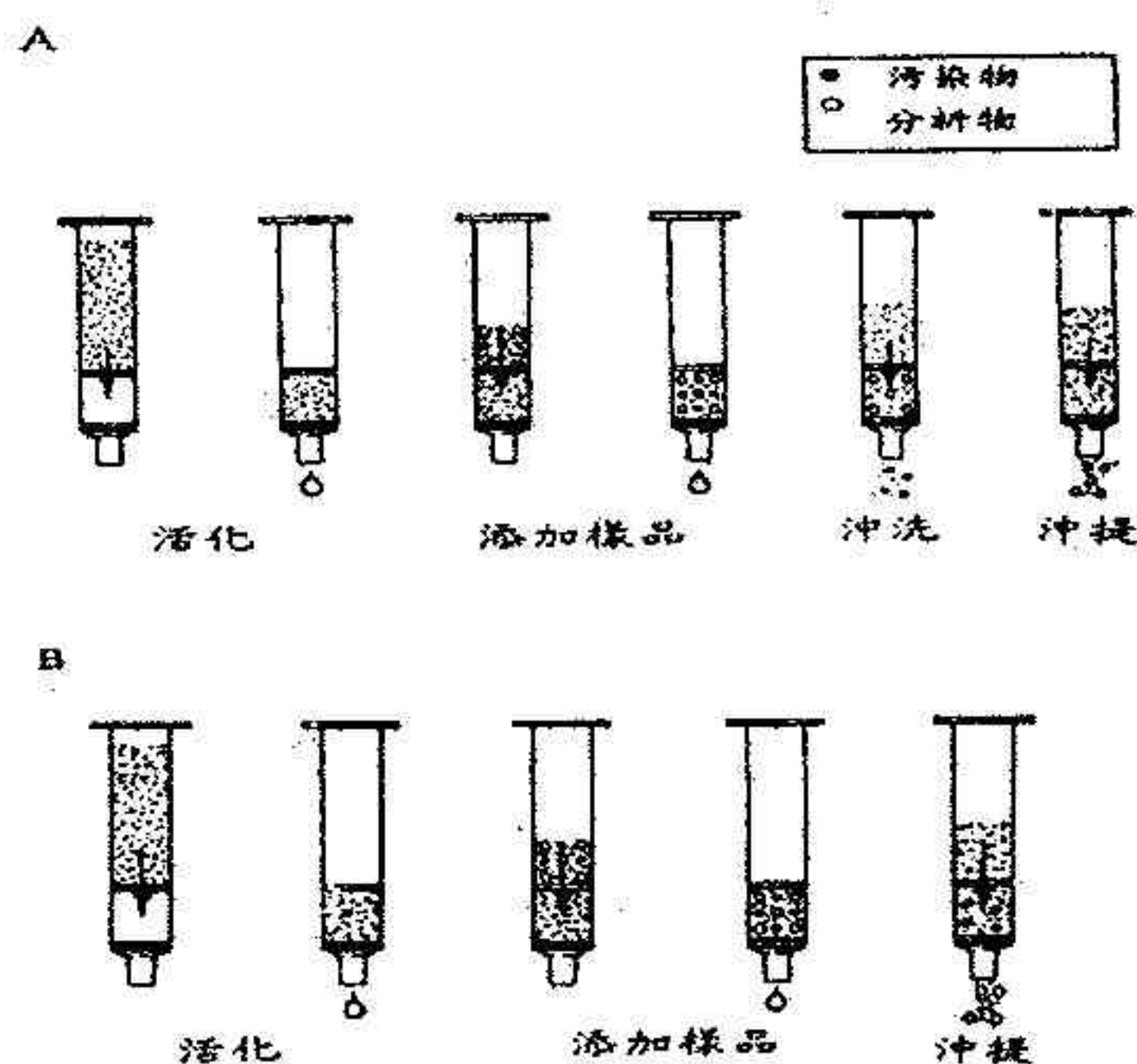


圖 b 固相萃取層析圖 (A) 吸附劑吸附分析物使污染物流出
(B) 吸附劑吸附污染物使分析物沖提出管柱

欲使用固相萃取法處理樣品時，可依照下列五個步驟進行之：

(一) 選擇適當的固相萃取管柱(SPE cartridge)

一固相萃取管柱其結構可分為三個部份，如圖 C 所示 [14]:

1. 管柱管體(cartridge body)

最普遍的 SPE 管體部份是由血清級(serologi-calgrade)的聚丙烯(Polypropylene)所製成之 Syringe-like 圓桶狀管柱，其一端是突出接頭，用以連接在真空裝置上。管體大小可分為 1mL、3mL 及 6ml 三種。

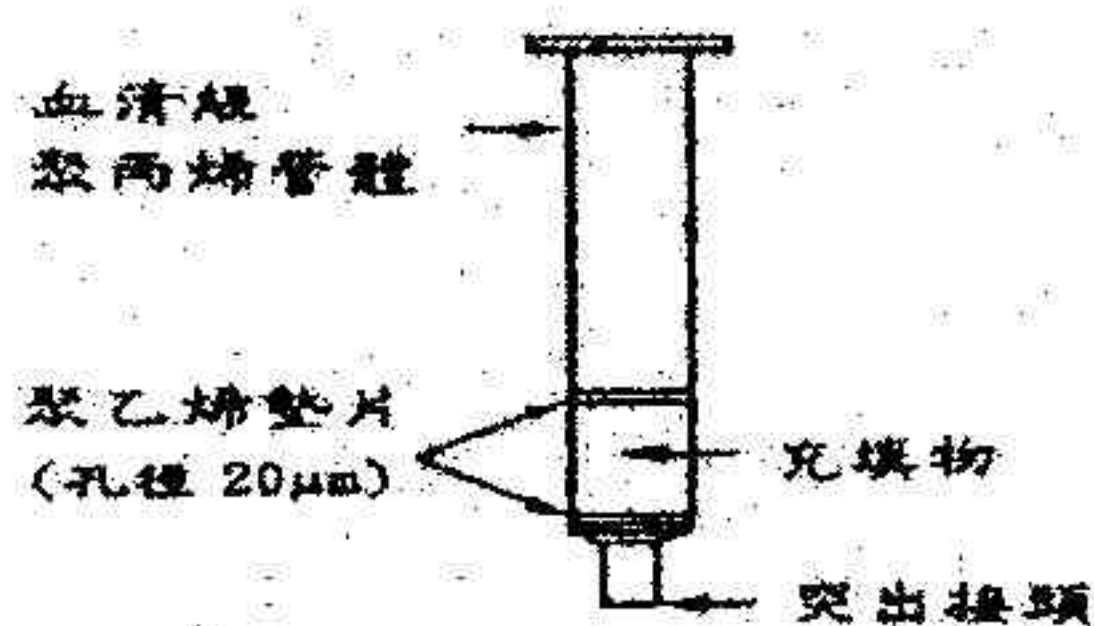


圖 C 固相萃取管柱構造圖

2. 墊片 (frits)

墊片的作用在於固定住固相部份以及當作微粒子過濾器 (Particulate filter)，其材質通常為聚乙烯 (Polyethylene) 所製成的圓體物。

3. 固相 (Phase or sorbent)

這部份乃是整個固相萃取法中最主要的部份。其充填物為 silica based 之物質，未經活化 (condition) 的初始物為不規則形狀， $40\ \mu\text{m}$ 之 silica 粒子，粒子間細孔 (Pore) 為 60A，不同的矽烷化合物其官能基是附在 silica 粒子之易接近區 (accessible area)，不同官能基對固相之密度及層析特性 (chromatographic characteristics) 有不同的影響。另有數種 silica-based 之固相也常被使用。

固相之層析特性會強烈地影響樣品是否滯留在固相內以及滯留的強度。固相之選擇是由欲萃取出之分析物、介質之組成以及樣品所溶之溶劑三個因素來決定；充填固相的重量比較常見約有 100、200、500 以及 1000mg 四種。若樣品所在的溶液成分太多、太複雜或是樣品的濃度太高時應使用充填量較多的固相萃取管以得到足夠的樣品量。此固相因其性質可區分成四類。即正相 (normal phase)、逆相 (reverse phase)、離子交換相 (ion exchange phase) 以及吸附相 (adsorption phase)。正相萃取管主要是由極性較強的官能基所組成的，通常是在萃取非水溶液中，中極性至高極性的樣品；逆相萃取管其充填物極性較弱，常萃取水中低極性至中極性的樣品；離子交換相主要是藉由離子吸引力滯留樣品，其以 pH 值、離子強度以及相對離子強度三個因子來決定其所滯留住的樣品；吸附相則是無特殊官能基所充填的固相，此相通常是萃取非極性樣品中的極性物質，其所吸附的物質由其充填物質決定。

(二) 活化 (condition) 固相萃取管柱：

在萃取樣品前，必須先活化 (condition) 管柱內之固相。活化的目的在於去除固相內之雜質以及製造吸附樣品的環境。

(三) 裝填樣品 (sample loading)

此步驟在於如何將樣品滯留於固相上，並且和溶劑中其他物質分離。裝填的溶液通常藉由吸量管 (volumetric pipette) 或微量吸管 (micropipette) 直接置入管柱中，或是經由一儲存管 (reservoir) 後再滴入管柱中。至於溶液所需之量，1mL 的固相萃取管其溶液不可超過 1mL；3mL 的管柱則由 1mL 至 250mL 均可；6mL 的管柱則是 1mL 至數升。此步驟需注意的是溶解樣品的溶劑其極性 (對固相而言) 不可太強，太強會造成樣品和溶劑一起流出而無法滯留在固相上。一般溶劑於固相萃取中相對極性的強弱大

小則如表所示。

(四)沖洗(wash or rinse)

沖洗的目的在於去除裝填樣品後所殘留在固相的不純物質。沖洗的溶劑需注意的是儘可能使用極性較大之溶劑，但以不致將樣品沖提出為原則，通常是選用極性略強或相同於溶解樣品的溶劑；其使用量是每 100mg 之固相以 0.5-0.8mL 之沖洗溶劑沖洗之，但使用量以不超過萃取管柱的大小為佳。此步驟不是很重要，可忽略之，但於萃取過程中加上此步驟會使層析固譜較單純且可延長層析管柱的壽命。

(五)沖提(elute)

沖提是將滯留在固相中的樣品以適當的溶劑沖洗出，所使用的溶劑仍會影響沖提結果，溶劑極性太大別會連不純物一起沖出，進而影響層析固結果，甚至影響判定；溶劑極性太小則溶劑使用量便增加，如此一來就無法達到了固相萃取法使用少量溶劑的優點。沖提液可分數次沖提，其回收率會較一次沖提完的結果好些；沖提出之溶液可直接注入儀器內分析、再濃縮後溶於其他溶劑之中或是再經過其他步驟處理之。至於以何種溶劑較適合，可由實驗中或文獻上得知。

溶劑於固相萃取中相對極性大小

| 正相 | 溶劑強度 | 逆相 |
|---------------------------------|------|---------------------------------|
| Hexane | 弱 | Water |
| Iso-octane | | Methanol |
| Toluene | | LPA |
| Chloroform | | Acetonitrile |
| CH ₂ Cl ₂ | | Acetone |
| Tetrahydrofuran | | Ethylacetate |
| ethyl ether | | Ethylether |
| ethyl acetate | | Tetrahydrofuran |
| acetone | | CH ₂ Cl ₂ |
| acetonitrile | | Chloroform |
| IPA | | Toluene |
| Methanol | | iso-octane |
| Water | 強 | hexane |

II. 2 實驗部份

II. 2-1 藥品與儀器

(1) 實驗試藥

Ginsenoside Rb1、Rg1、Re 及磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogenphosphate) 購自 Nacalai tesque (Kyoto, 日本)。水經 Milli-Q system 純化 (Millipore, KY, 美國)。甲醇和氬甲烷為 far-UV 級溶劑購自 BDH (英國)。人參樣品購自臺北市迪化街。四君子湯為順天堂藥廠之基準方。

(2) 實驗儀器

高效液相層析儀 (HPLC) : HP1100

pump : HP1100

注射器 : Autosampler

流動相控制器 : HP1100

偵測器 : HP1100-photodiode array

資料處理器 : HP ChemStation for LC (Rev. A. 04.02, Hewlett Packard 1990-1996)

Extraction Cartridges : (1) BondElut-C8 (10cc, 500mg, VARIAN)

(2) OASIS -HLB (3cc, 60mg, Waters)

(3) Sep-Pak Cartridge-C18 (Waters)

Vac Elut Vacuum Manifold : Waters

II. 2-2 HPLC 分析條件的選擇

精稱四君子湯方劑 2.5 g, 加入 40ml H₂O 超音波萃取 15min, 然後以 40°C 水浴振盪 20min, 最後離心 3500 rpm; 15min, 取澄清液經過前處理之步驟, 經 No. 1 濾紙過濾, 作為檢液, 注入 20 μL 於 HPLC 中分析。

精稱粉碎後的人參藥材 0.5 g, 加入 20ml H₂O 超音波萃取 15min, 然後以 40°C 水浴振盪 20min, 最後離心, 3500 rpm; 15min, 取澄清液經過前處理之步驟, 經 No. 1 濾紙過濾, 作為檢液, 注入 20 μL 於 HPLC 中分析。

前置管柱 : Lichrospher RP-18 endcapped (5 μm, 4.0 I.D. × 10 mm, Merk)

分離管柱 : Cosmosil 5C18-MS (5 μm, 4.6 I.D. × 250 mm, Nacalai)

流動相 : (A) KH₂PO₄ = 2.72g/1000ml

(B) CH₃CN

(C) H₂O

(D) MeOH

梯度沖提程式：

| 時間(min) | 流速(ml/min) | %A | %B | %C | %D |
|---------|------------|----|----|----|----|
| 0 | 1 | 80 | 20 | 0 | 0 |
| 20 | 1 | 75 | 25 | 0 | 0 |
| 40 | 1 | 65 | 35 | 0 | 0 |
| 50 | 1 | 0 | 45 | 55 | 0 |
| 65 | 1 | 0 | 80 | 20 | 0 |
| 70 | 1 | 0 | 20 | 80 | 0 |

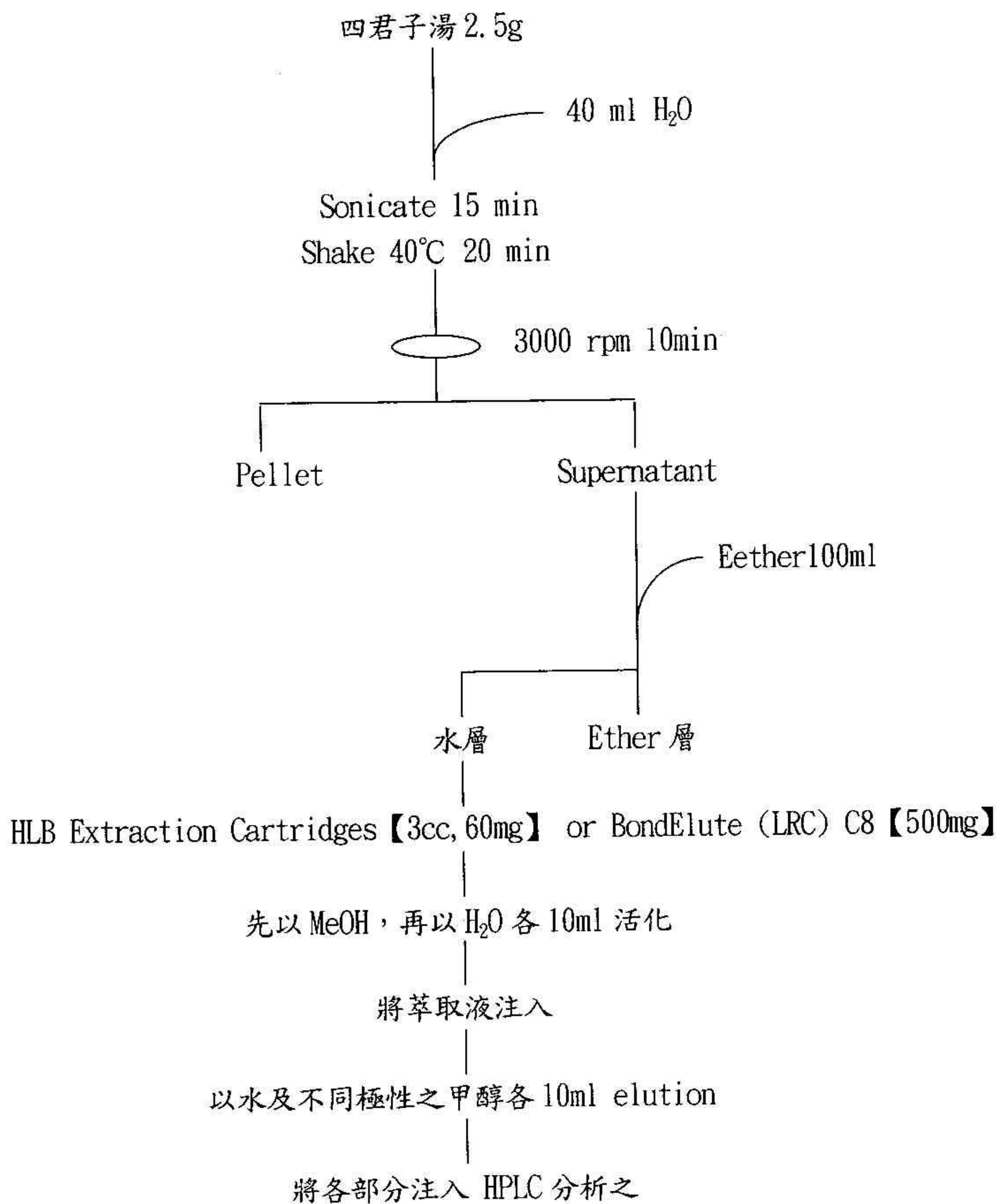
偵測波長：203nm

II. 2-3 製劑檢液之製備

(1) 不同固相萃取材質的比較

首先選擇 HLB 及 C8 兩種不同固相的材質，進行前處理的步驟，以梯度沖提程式進行分析，各組重覆二次注射。

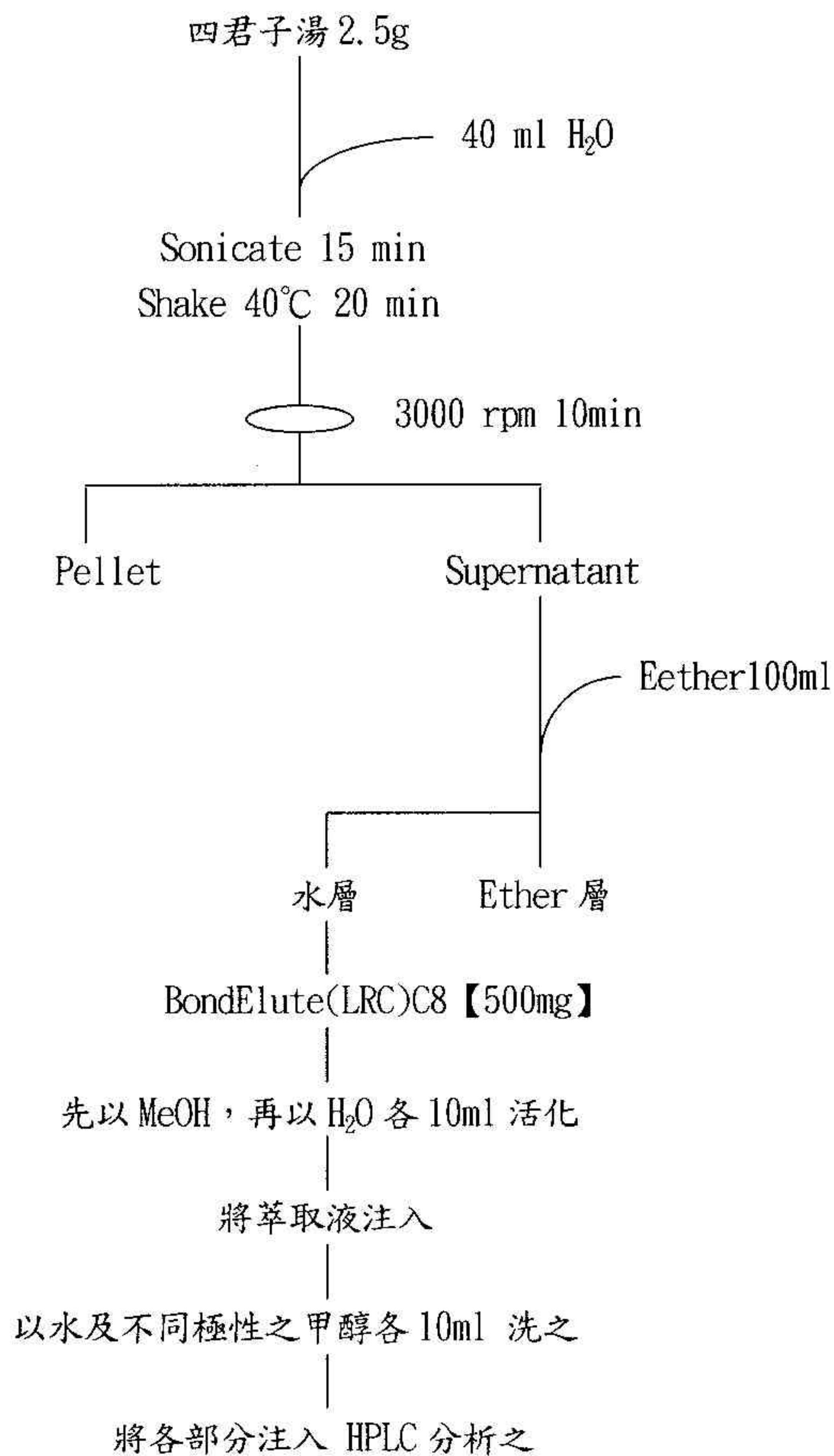
實驗流程圖：



(2) 四君子湯不同沖提溶劑的比較

選擇上述所得之最佳固相萃取材質 C8，進行 7 種不同極性的甲醇沖提，以以梯度沖提程式進行分析，各組重覆二次注射。

實驗流程圖：



(3)由紅參探討前處理過程

選擇最佳材質及最佳沖提比例，以梯度沖提程式進行分析，各組重覆二次注射。

(4)比較方劑(四君子湯)處理之前後比較

選擇最佳材質及最佳沖提比例，以梯度沖提程式進行分析。

II.2-3 配製標準品溶液及製作檢量線

精稱 ginsenoside Rb1、Rg1、Re 各 3.1、3.1、2.6mg，以 70% 乙醇配成 50ml 溶液，為標準溶液，取 10ml 稀釋成 20ml，注入 20 μ L 於 HPLC 中分析，製作檢量線。

II.2-4 分析條件適用性之評估

(1)偵測極限(Detection limit)

逐步稀釋標準品溶液，注入偵測，直到 signal/noise=3/1 以下，計算注射量。

(2)再現性(Reproducibility)

精稱粉碎後的人參藥材 0.5 g，以 20ml H₂O 超音波 15min，40°C 振盪 20min，離心，經 No.1 濾紙過濾，作為檢液，注入 20 μ L 於 HPLC 中分析。同一天內重覆七次 (intraday)，不同天內重覆七次。

(3)回收率(Recovery)

取人參 1g，以 20ml H₂O 超音波 15min，40°C 振盪 20min，離心，取 10ml 放入 20ml 定量瓶中，加入 Rg1、Re、Rb1 標準品，定容至 20ml，然後經前處理之步驟，經 No.1 濾紙過濾，作為檢液，注入 HPLC 中分析。

II.3 結果與討論

II.3-1 分析條件之探討

(1)不同固相萃取材質的比較

表 II-1 四君子湯在 C8 材質下各成份含量(mg/g, n=2)

| 沖提 溶劑 | | Load | H ₂ O | 30% | 50% | 70% | 100% |
|----------|-------------|------|------------------|-----|--------|--------|------|
| Rg1 | 1st | 0 | 0 | - | 2.5622 | 0 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | - | 2.5771 | 0 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | - | 2.5697 | 0 | 0 |
| Re | 1st | 0 | 0 | - | 3.4289 | 0 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | - | 3.4335 | 0 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | - | 3.4312 | 0 | 0 |
| Rb1 | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.5778 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.5996 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.5887 | 0 |
| Rc | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.1081 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.0863 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.0972 | 0 |
| Rb2 | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.0210 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | 2.9917 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | 3.0063 | 0 |
| Rd | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.7513 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.7856 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.7684 | 0 |

-:表微量 0

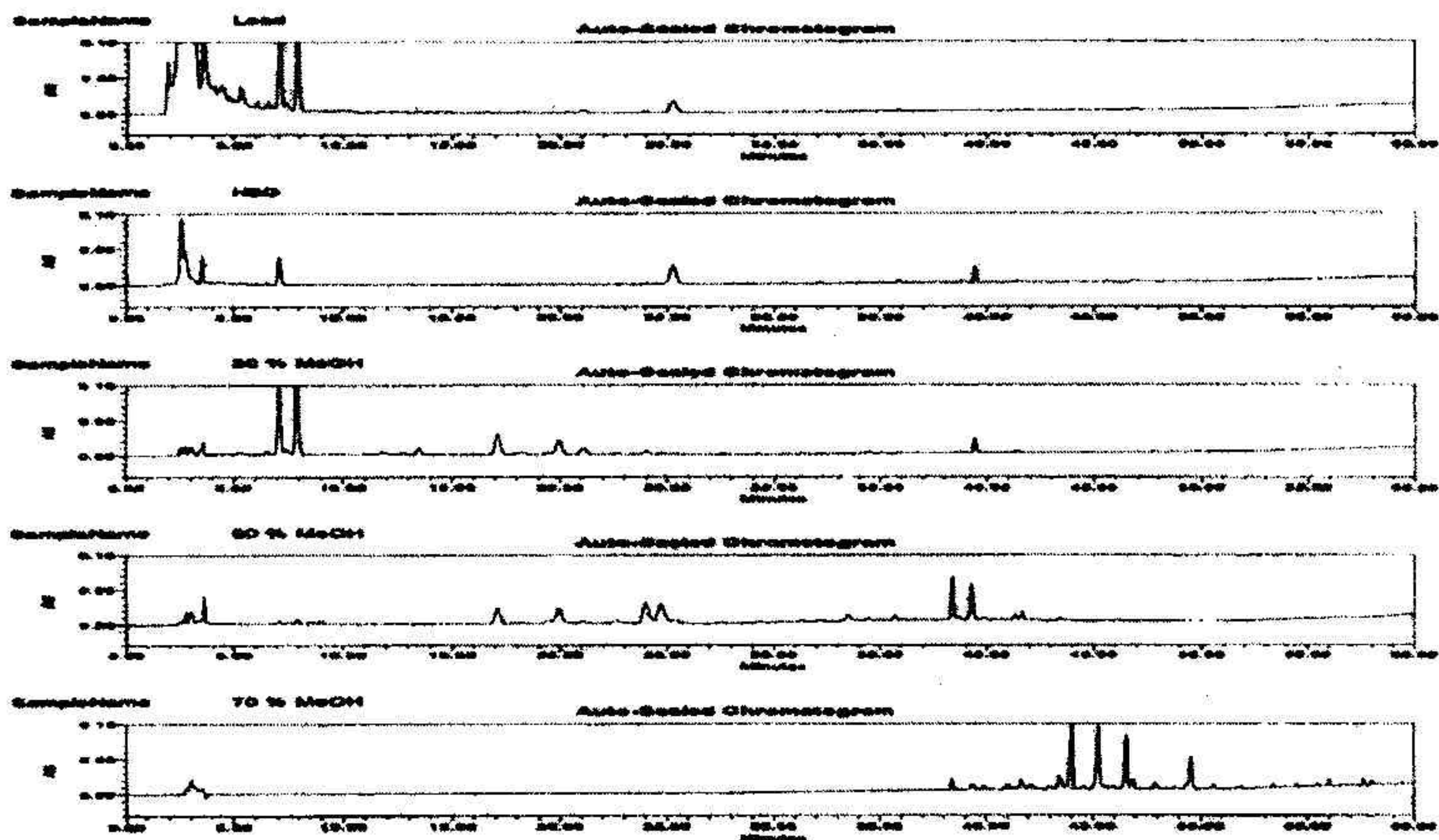


圖 II-1 四君子湯在 C8 材質下之層析圖

表 II-2 四君子湯在 HLB 材質下各成份含量(mg/g, n=2)

| 沖提 溶劑 | | Load | H ₂ O | 30% | 50% | 70% | 100% |
|----------|-------------|--------|------------------|--------|--------|--------|------|
| Rg1 | 1st | 0.6333 | 0 | 0.2886 | 0 | - | 0 |
| | 2nd | 0.6357 | 0 | 0.4085 | 0 | - | 0 |
| | Mean | 0.6345 | 0 | 0.3486 | 0 | - | 0 |
| Re | 1st | 0.5473 | 0 | 0.4140 | 0 | - | 0 |
| | 2nd | 0.5804 | 0 | 0.5784 | 0 | - | 0 |
| | Mean | 0.5639 | 0 | 0.4962 | 0 | - | 0 |
| Rb1 | 1st | 0 | 0 | 0.5852 | 2.5555 | 1.4684 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0.7657 | 2.6422 | 1.2241 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0.6755 | 2.5989 | 1.3463 | 0 |
| Rc | 1st | 0 | 0 | 0.3490 | 2.1060 | 1.5223 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0.4276 | 2.2042 | 1.0787 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0.3883 | 2.1551 | 1.3005 | 0 |
| Rb2 | 1st | 0 | 0 | 0.2400 | 1.4394 | 1.0340 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0.3113 | 1.5147 | 1.0787 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0.2757 | 1.4770 | 1.0564 | 0 |
| Rd | 1st | 0 | 0 | - | 0.8116 | 0.9251 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | - | 0.7570 | 0.9166 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | - | 0.0627 | 0.9209 | 0 |

-:表微量

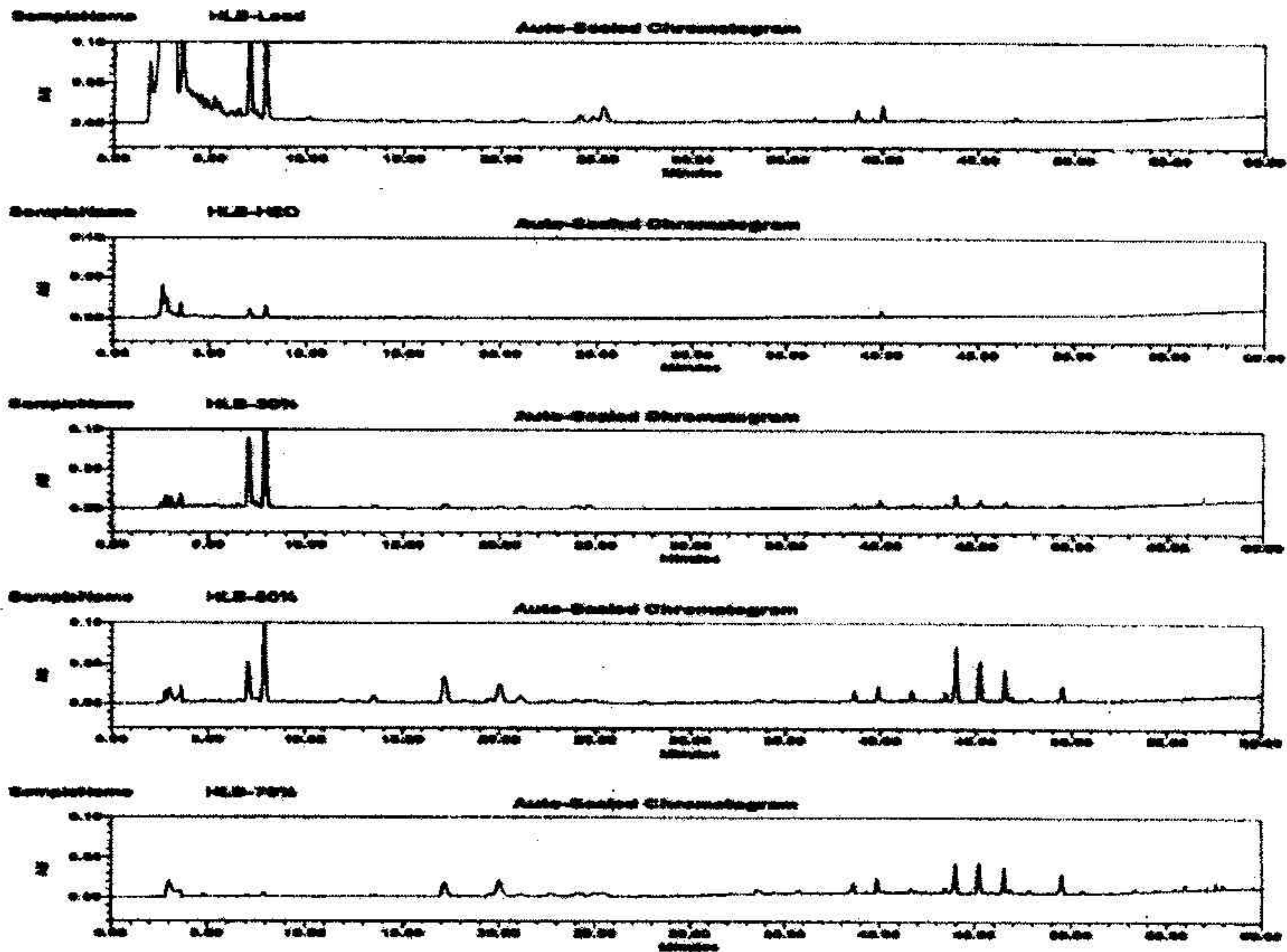


圖 II-2 四君子湯在 HLB 材質下之層析圖

在材質選擇方面，使用 HLB 和 C8，發現 HLB 在 30% MeOH 下 Rg1、Re 即被沖提出，但 Rb1, Rc, Rb2, Rd 卻從 30% ~70% 皆陸續被沖提出，而 C8 可明顯分為兩群，在 50%MeOH 下 Rg1、Re 可以完全沖提出，而 70%MeOH 下另一群 Rb1, Rc, Rb2, Rd 一起沖提出，但最後選擇 C8 的原因有三：

- 一、在於人參皂素與此材質之間作用較好，因為在 Load 的時候 Rg1、Re 在 HLB 材質中則析出；但在 C8 中則析出及損失率較少。
- 二、由不同沖提比例下的積分面積比較下，在相同的萃取液下，發現 HLB 較 C8 的含量來的少，故選擇 C8 為固相萃取的材質。
- 三、且由表中亦可發現 C8 較 HLB 的另一個優點，及其沖洗溶劑的比例較高；則可以洗去更多的化合物。

在利用固相萃取的優點上，其具有濃縮的效果，因為原本的待測液 40ml，但通過固相萃取其濃縮至 10ml，因可增強訊號；不似液相萃取必須要在迴旋濃縮，浪費時間及更多的損耗。

(2) 四君子湯不同沖提溶劑的比較

表-II-3 四君子湯在 C8 材質及不同沖提溶劑下各成份含量(mg/g, n=2)

| 沖提 溶劑 人參 皂素 | | Load | H ₂ O | 10% | 20% | 30% | 40% | 50% | 60% | 70% | 100% |
|----------------------|------|------|------------------|-----|-----|-----|--------|--------|--------|--------|------|
| | | Rg1 | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 4.8688 | 1.0939 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 3.7779 | 1.1334 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 4.3234 | 1.0864 | 0 | 0 | 0 |
| Re | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 4.4690 | 1.8628 | 0 | 0 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 3.5696 | 1.8611 | 0 | 0 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | - | 3.7572 | 1.8620 | 0 | 0 | 0 |
| Rb1 | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7.6224 | 0.6255 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7.5103 | 0.7452 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7.5674 | 0.6854 | 0 |
| Rc | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6.2716 | 0.8121 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6.2945 | 0.7700 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6.2831 | 0.7910 | 0 |
| Rb2 | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.0408 | 1.2496 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.0164 | 1.2509 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4.0286 | 1.2502 | 0 |
| Rd | 1st | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.3970 | 2.0618 | 0 |
| | 2nd | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.3360 | 1.9101 | 0 |
| | Mean | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.3665 | 1.9860 | 0 |

-:表微量

在此實驗中，對乙醚萃取的量，作一番探討，發現若是用 50ml 乙醚萃取兩次，則發生不易與水層分層之現象，故乙醚層仍有許多的人參皂素出現，所以必須以 100ml 乙醚萃取。再者若用 100ml 乙醚萃取兩次，則可洗去更多低極性化合物，但是因為乙醚萃取兩次的量太多，導致水層的極性因此改變，而通過固相萃取材質時，與材質無法完全吸附，因此造成量的損失。最後乙醚最佳容量為 100ml 萃取一次。

在本實驗中，利用四君子湯方劑的理由，在於人參佔整個方劑含量約為 1/3.375 之外，再者因為其他藥材(白朮、茯苓)對於人參的干擾性較少，所以現階段目標則先以四君子湯為分析方劑，進由推廣至其他方劑中。

由圖中可知，四君子湯中干擾人參的藥材，主要為甘草，且由乙醚萃取，可以除去許多低極性的化合物，及許多其他干擾物。且發現欲分析的六個人參皂素不會在乙醚層出現，與文獻中所提相符合，並且發現乙醚層除去許多六個人參皂素相疊之干擾物質。

在甘草中之指標成分 Glycyrrhizin，除了可用乙醚去除外，在 Load 過程及水沖提下亦可去除。在用不同極性的甲醇，亦可洗去 Rg1、Re、Rb1、Rc、Rb2、Rd 旁邊的相近極性的化合物，且由圖可知，其沖洗極性最多可至 30% MeOH；而六個人參皂素在 70% MeOH 即可完全析出。人參皂素沖提的先後順序為 Rg、Re、Rb、Rc、Rb2、Rd，且通常 Rg、Re 為其一組一起沖提出；Rb、Rc、Rb2、Rd 為另一組。

由此實驗中可確定前處理過程中之步驟：

方劑萃取液，經 SPE-C8 材質，其先經過活化步驟，再以 20%、30% 甲醇洗去干擾物，最後以 70% 甲醇將分析物沖提出，即可直接以 HPLC 分析。

(3) 由紅參探討前處理過程

由於人參分析，不經 SPE 前處理步驟，直接以其萃取液即可以作準確定量分析，因此藉由人參比較其經過 SPE 前處理步驟，定量之結果分析。

在這次的實驗中，使用 C8 為前處理的材質，其沖提溶劑分別為 H₂O、20%MeOH、30% MeOH，人參皂素最後以 70% MeOH 沖提出。但實驗結果發現 Rg1、Re 竟然在 loading 及 H₂O 沖提下而析出。這樣的結果竟與前面的實驗相衝突，當我們比較這兩次的結果時，可以發現最大的不同點在於用乙醚萃取後所靜置的時間。前者超過半天以上的時間；而這次的流程則是萃取完後立刻以固相萃取處理之，因為乙醚會改變其水層之極性而不易與 C8 材質吸附的完全；因而造成損失率嚴重。

因此必須考量時間的效益，故利用與 C8 相似鍵結的材質；且其極性較低的 C18 來作實驗，則因為其極性較低，則由於乙醚干擾而改變極性的水層則易吸附住，便可以改善 C8 的缺點，且加速分析縮短時間。

選擇 C18 為其最佳材質，利用人參來探討其可能損失人參皂素的過程，其發現除了人參皂素含量較 C8 更接近原萃取液之含量；且人參皂素利用乙醚萃取只會萃出低極性的化合物，而人參皂素不會在此過程中有相當大的損失，且在 Load 及水的沖提下皆不會造成其人參皂素有任何的損失率。且利用 C18 材質比較是否使用乙醚所造成的影響，發現乙醚不會干擾其結果。

※人參經過 C8、C18 兩種不同之 SPE 之比較
 (前處理的含量-未前處理的含量)*100%

| 未前處理的含量) | C8 | C18 |
|----------|-----|------|
| Rg1 | 15% | 5% |
| Re | 12% | 4% |
| Ro | 2% | -5% |
| Rb1 | 28% | -15% |
| Rc | 21% | -11% |
| Rb2 | 10% | -15% |
| Rd | 5% | -11% |

※比較 C18 前處理過程受乙醚之影響

| 小紅參萃取定量 | Rg1 | Re | Rb1 | Rc | Rb2 | Rd |
|---------|------|------|------|------|------|------|
| (mg/g) | 2.14 | 2.41 | 3.01 | 4.06 | 1.88 | 1.36 |

C18 前處理過程(包含乙醚)

| | Rg1 | Re | Rb1 | Rc | Rb2 | Rd |
|--|------|------|------|------|------|------|
| (mg/g) | 2.49 | 2.82 | 3.65 | 4.13 | 1.99 | 1.32 |
| $\frac{\text{(前處理的含量-未前處理的含量)}}{\text{未前處理的含量}}$ | 0.16 | 0.17 | 0.21 | 0.02 | - | - |
| | | | | | 0.06 | 0.02 |

C18 前處理過程(不包含乙醚)

| | Rg1 | Re | Rb1 | Rc | Rb2 | Rd |
|--|------|-------|------|------|------|------|
| (mg/g) | 2.18 | 2.03 | 3.14 | 4.13 | 1.99 | 1.32 |
| $\frac{\text{(前處理的含量-未前處理的含量)}}{\text{未前處理的含量}}$ | 0.01 | -0.16 | 0.04 | 0.02 | - | - |
| | | | | | 0.16 | 0.14 |

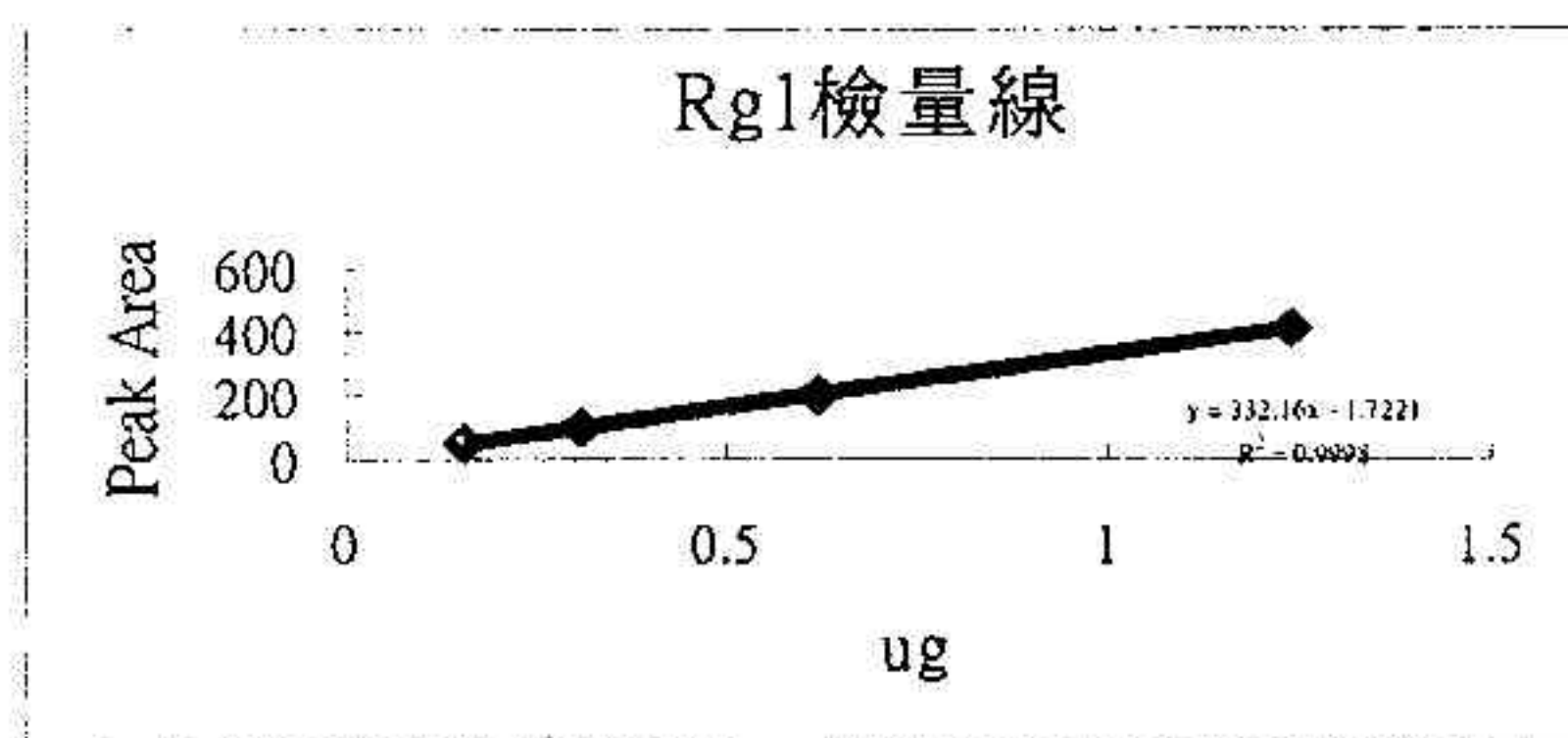
II. 3-2 檢量線之製作

依實驗部份所述，以吸收峰面積(Y)與注射濃度(X, ug)之關係，作圖得檢量線為：

Rg1 :

| | ug | Peak Area |
|----|-------|-----------|
| #1 | 1.24 | 411.334 |
| #2 | 0.62 | 202.003 |
| #3 | 0.31 | 99.671 |
| #4 | 0.155 | 52.381 |

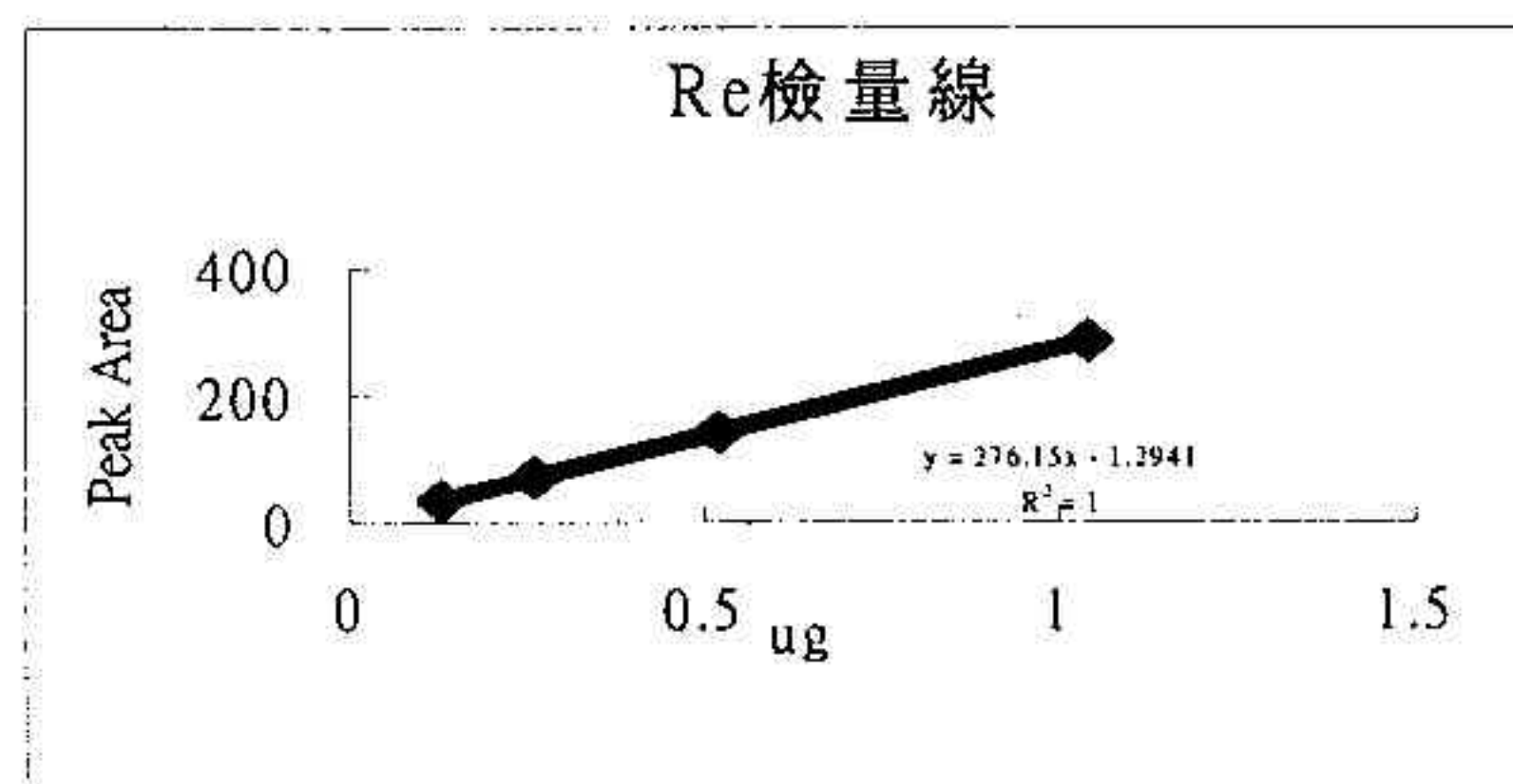
$$Y=332.16X-1.7221(r=0.9998)$$



Re :

| | ug | Peak Area |
|----|------|-----------|
| #1 | 1.04 | 286.121 |
| #2 | 0.52 | 141.770 |
| #3 | 0.26 | 70.554 |
| #4 | 0.13 | 34.867 |

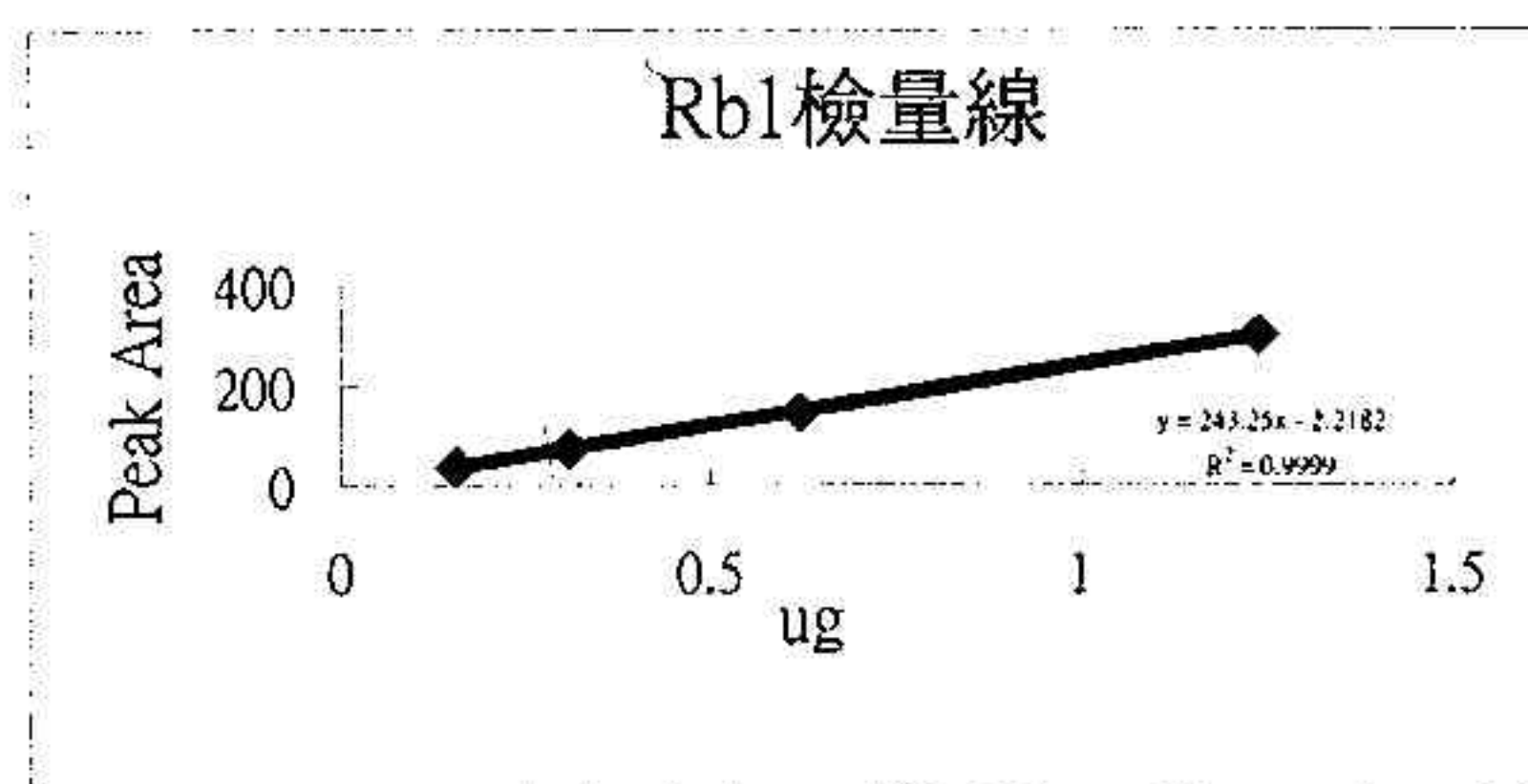
$$Y=276.15X-1.2941(r=1)$$



Rb1 :

| | ug | Peak Area |
|----|-------|-----------|
| #1 | 1.24 | 299.982 |
| #2 | 0.62 | 147.410 |
| #3 | 0.31 | 72.775 |
| #4 | 0.155 | 36.520 |

$$Y=243.25X-2.2182(r=0.9999)$$



線性範圍為 0.155-1.24 μg ，r 為線性迴歸參數(regression coefficient)

II. 3-3 分析條件適用之評估

(1) 偵測極限(Detection limit)

在先前的 HPLC 偵測人參皂素的方法中，大部分的偵測波長為設定在 203nm，偵測極限約為 5 μg 。亦有人將偵測波長為設定在 198 nm，其偵測

極限約為 $0.2 \mu\text{g}$ ，其吸收強度增加。但由於低波長則較不穩定，本實驗中故將偵測波長為設定在 203nm ，偵測極限約為 5.42ng (訊號/雜訊=3/1)。

(2) 再現性(Reproducibility)

| 成分 | Intraday | | Interday | |
|-----|----------|--------|----------|--------|
| | Ratio | RSD(%) | Ratio | RSD(%) |
| Rg1 | 0.14 | 1.59 | 0.83 | 3.23 |
| Re | 0.16 | 0.72 | 0.70 | 5.62 |
| Rb1 | 0.19 | 1.63 | 0.40 | 4.56 |
| Rc | 0.20 | 3.81 | 0.42 | 5.95 |
| Rb2 | 0.19 | 0.83 | 0.42 | 5.84 |
| Rd | 0.17 | 1.20 | 0.36 | 4.94 |

(3) 回收率(Recovery)

| 成分 | 添加量 | 回收率 |
|-----|-------|---------|
| Rb1 | 0.3mg | 97.81% |
| Re | 0.3mg | 111.85% |
| Rg1 | 0.5mg | 109.32% |

III. 3-4 製劑分析

當我們確立前處理條件後，便取四種不同的方劑來實驗，首先我們可以發現到，當我們固定以 $2.5\text{g} / 40\text{ml}$ 水萃取，然後以乙醚處理，會發現經過一段時間，補中益氣湯此方劑會出現懸浮物，所以必須縮短時間處理之。

且可以發現到這些以人參為方劑，都含有甘草，並且可以乙醚及水將之沖提，且甘草的含量訊號亦高，所以沖提的量可以再增加，將之完全沖提出。

而另一個須改善的問題，雖然都是 2.5g 的方劑，但是在 condition 的步驟中，除了四君子湯方劑外，其他方劑似乎有阻塞的現象，由此可知克數不是影響的關鍵，而是其他非人參藥材之複雜干擾性，所以該如何決定方劑的量；在未來是另一個探討。

此外在這個實驗中，僅只探討材質及不同極性的沖提液，而另一個探討的關鍵，則是再改變不同之 pH 值，則可以擴大沖提的範圍，因為在方劑中的 matrix 干擾性高，而沖提液不再是僅有極性的改變；而必須有其他之變化，即沖提液之 pH 值。

本研究曾收集白參、紅參、參鬚樣品進行分析，發現所有人參藥材之 ginsenoside Rg1 與 Re 不須前處理，即可順利測定，其結果(mg/g)如下：白參(n=10)，Rg1 3.84 ± 1.46 ，Re 2.28 ± 0.96 ，Rg1/Re=1.7，Rb1 4.56 ± 1.66 ；紅參(n=5)，Rg1 4.12 ± 0.43 ，Re 1.96 ± 0.50 ，Rg1/Re=2.1，Rb1 6.96 ± 2.13 ；參鬚(n=4)，Rg1 3.97 ± 0.89 ，Re 7.13 ± 2.63 ，Rg1/Re=0.6，Rb1 12.18 ± 2.65 。

SampleName 麥門冬湯

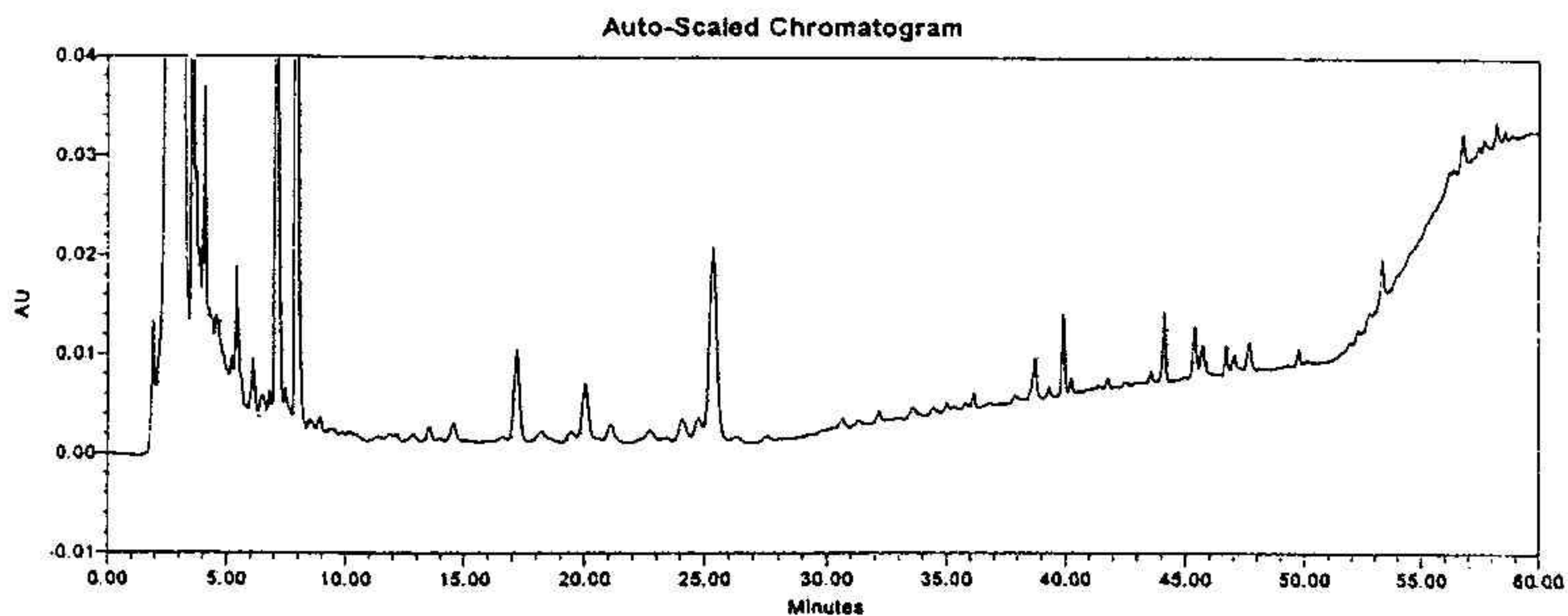


圖 II-5-1 麥門冬湯方劑譜圖

SampleName 麥門冬乙醚層

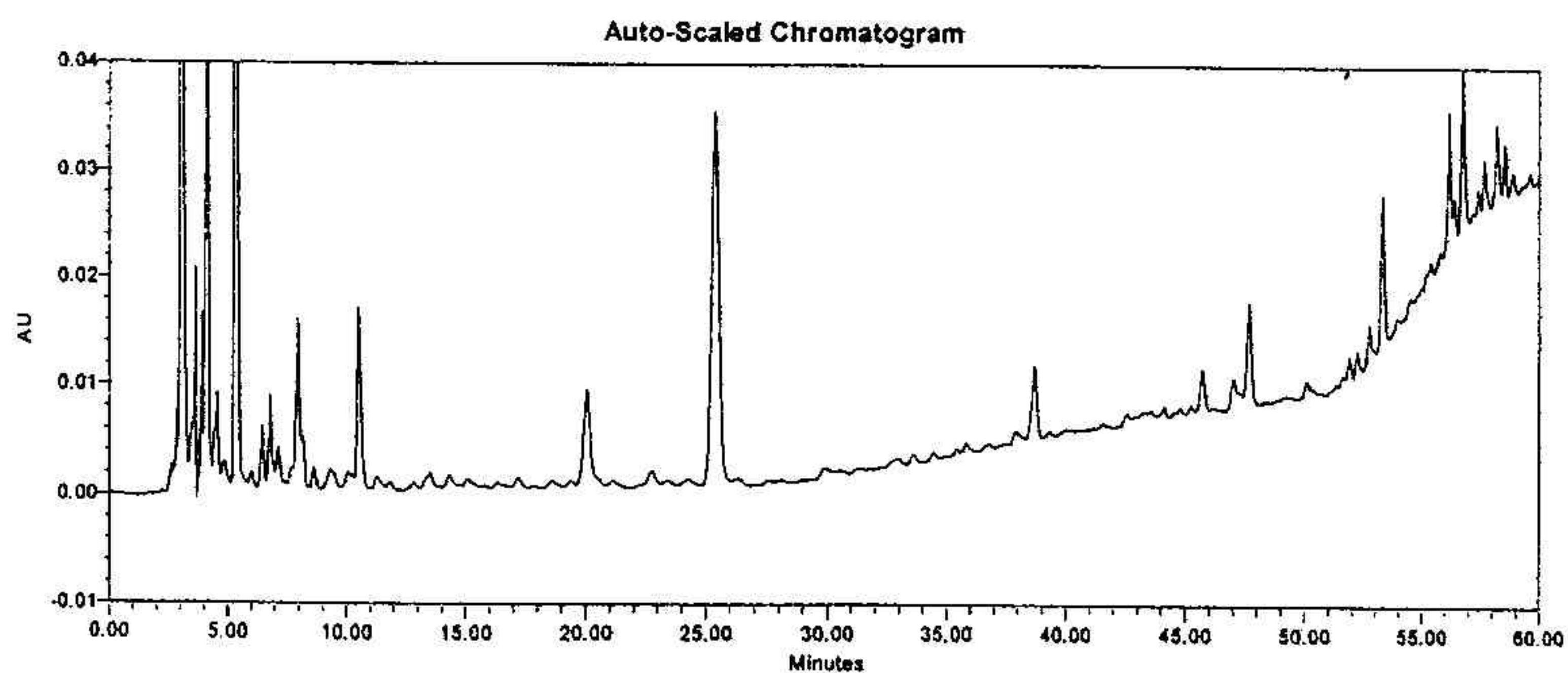


圖 II-5-2 麥門冬湯方劑乙醚層譜圖

SampleName 麥門冬前處理

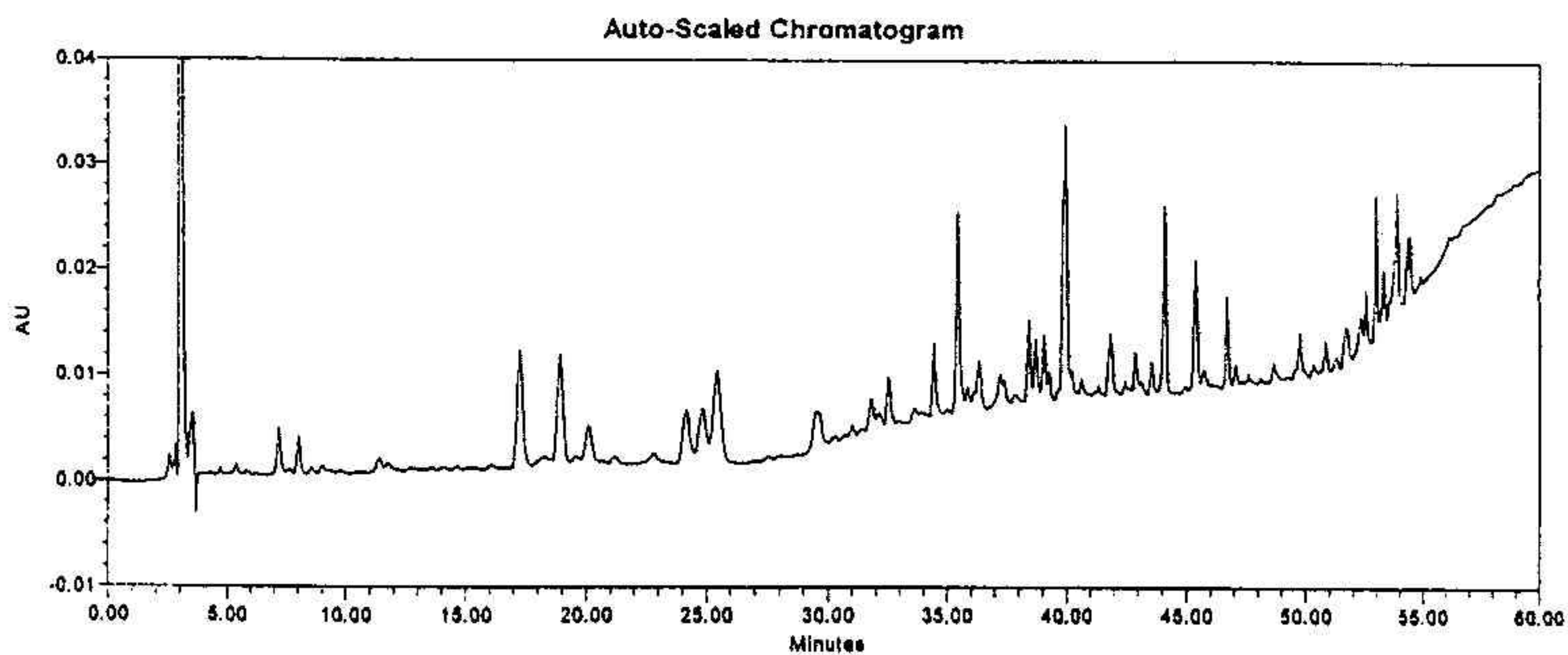


圖-II-5-3 麥門冬湯方劑經前處理譜圖

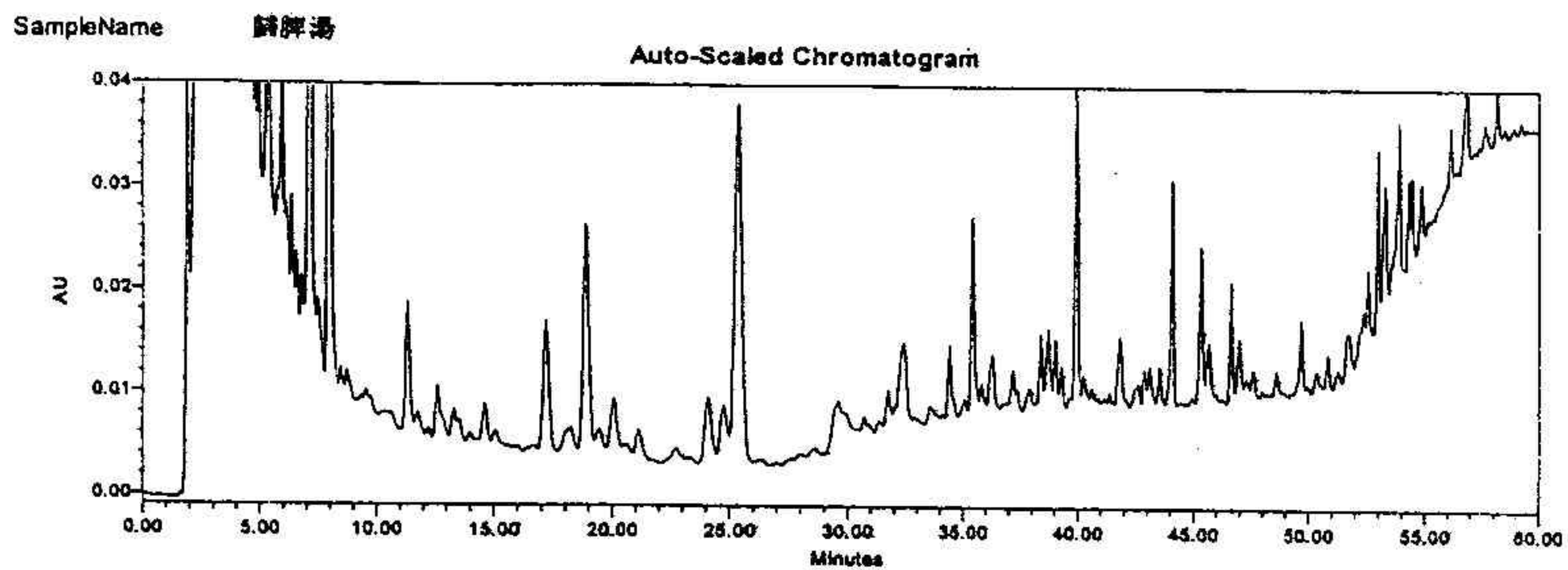


圖 II-4-1 歸脾湯方劑譜圖

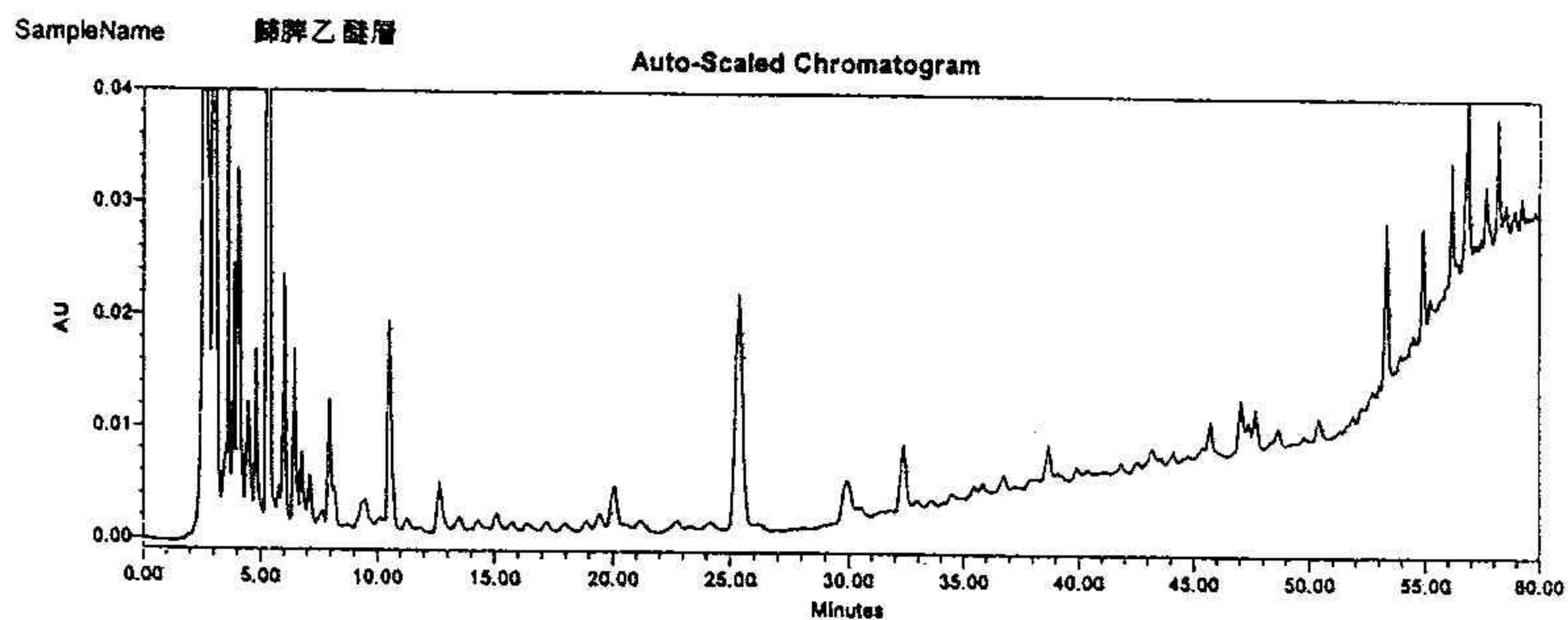


圖 II-4-2 歸脾湯方劑乙醚層譜圖

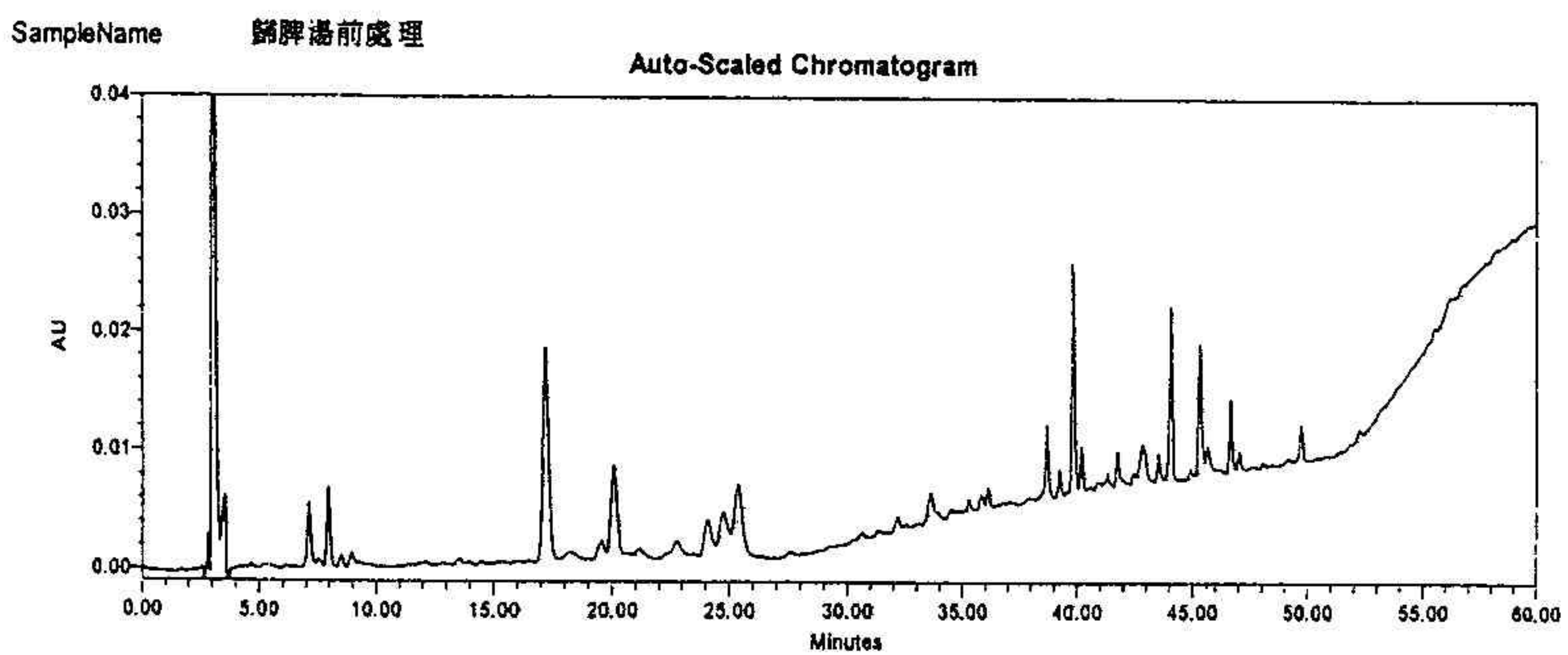


圖 II-4-3 歸脾湯方劑經前處理譜圖

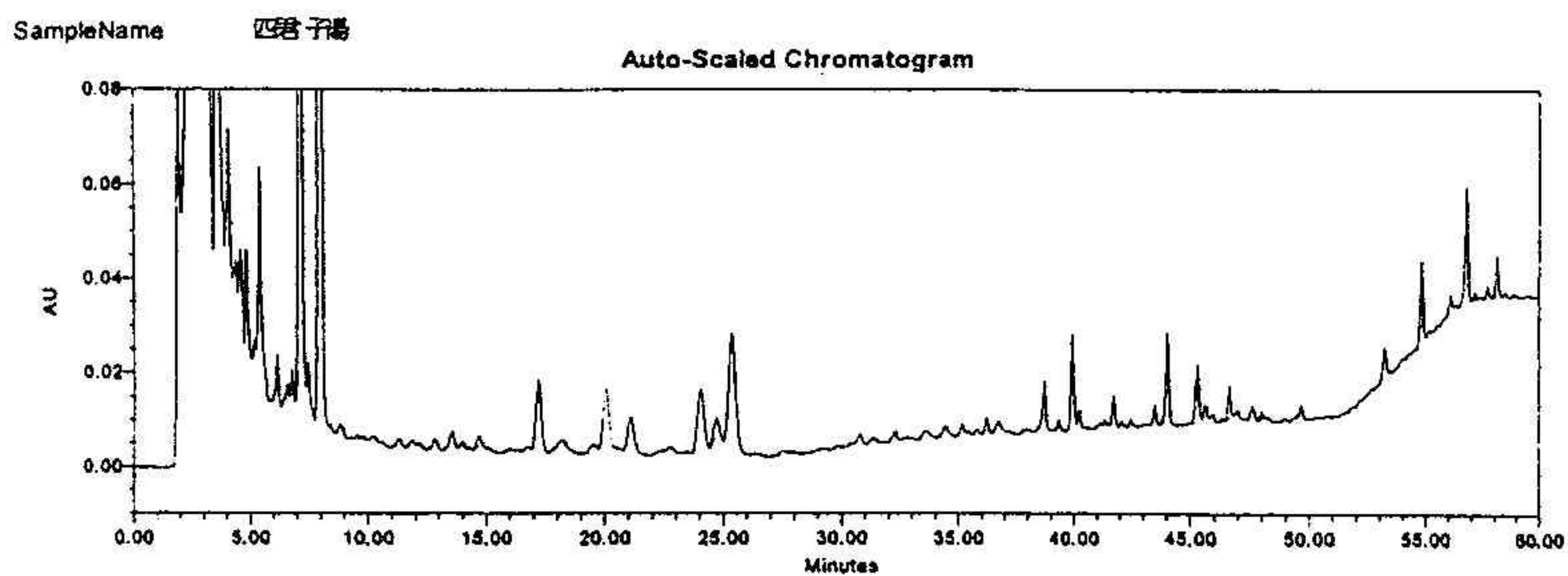


圖 II-3-1 四君子湯方劑譜圖

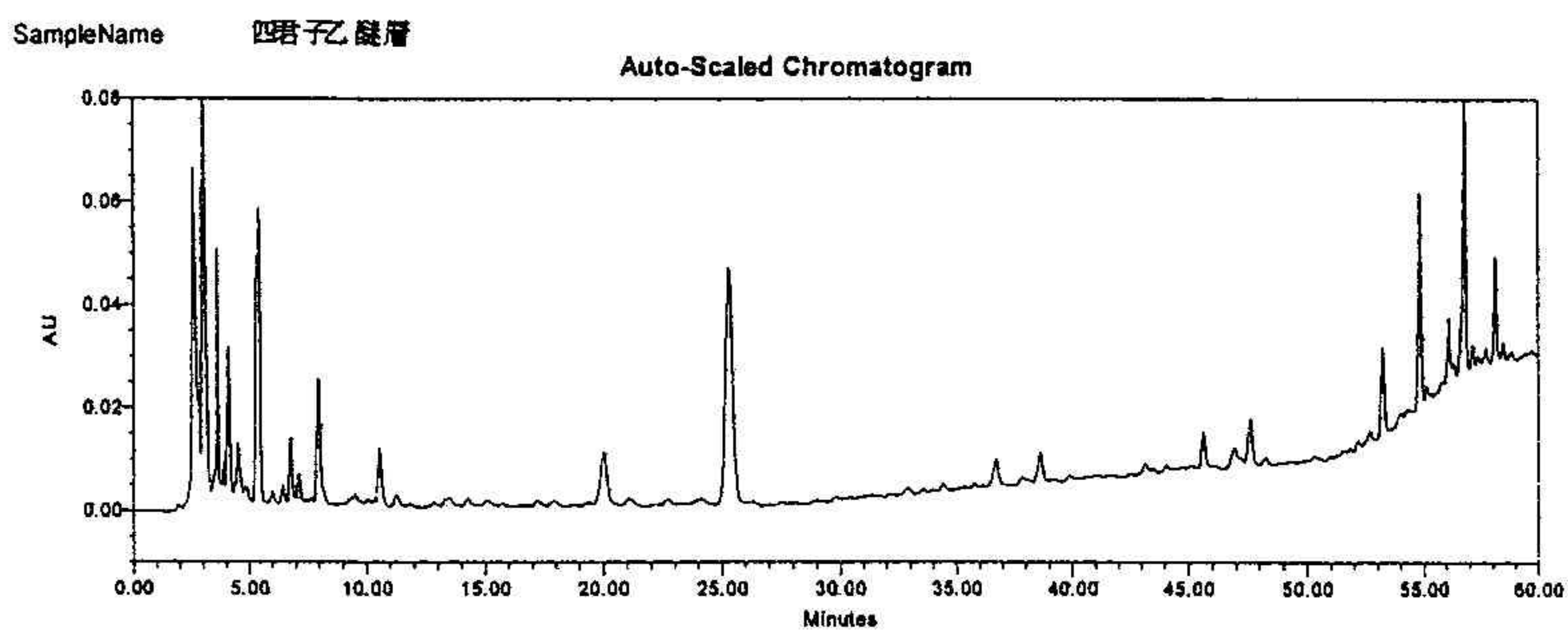


圖 II-3-2 四君子湯方劑乙醚層譜圖

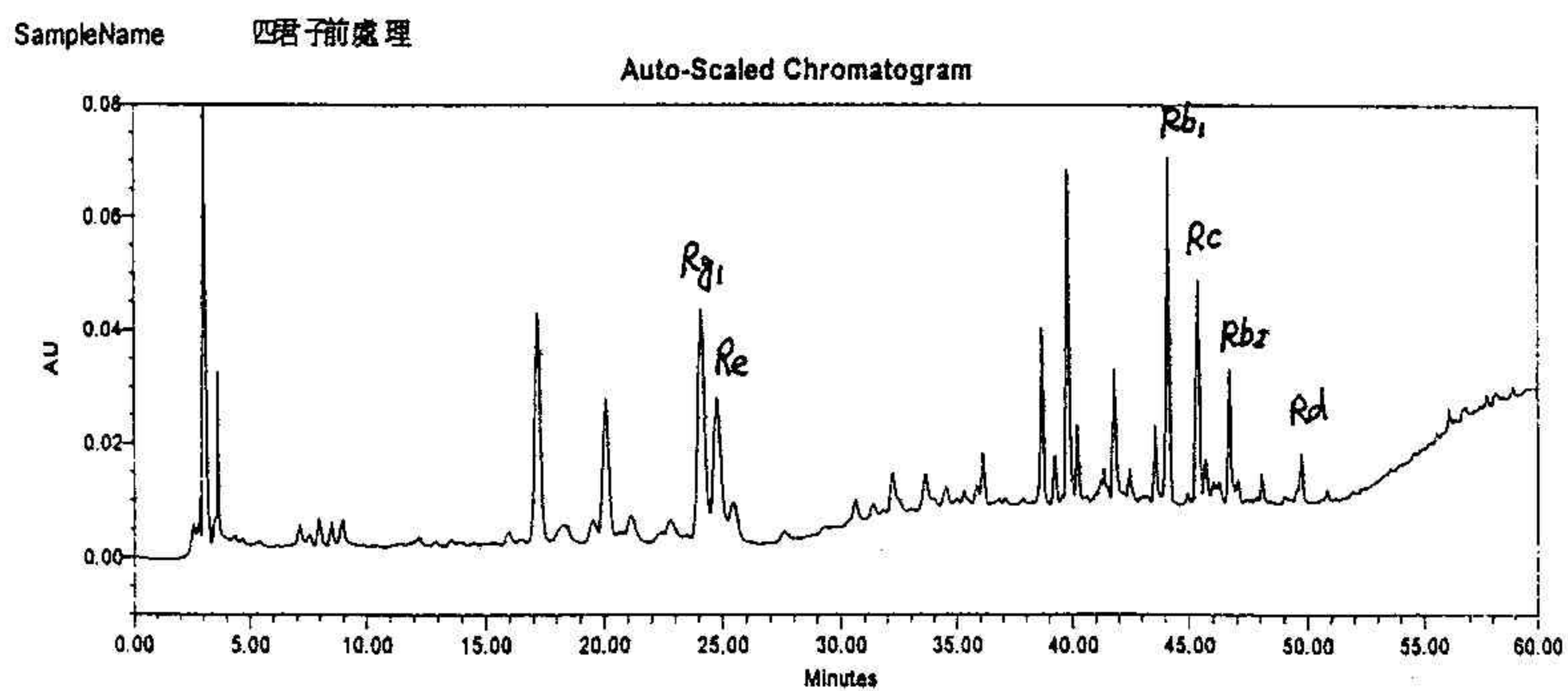


圖 II-3-3 四君子湯方劑經前處理譜圖

結論與建議：

不同基原的同名藥材常有不同的醫療目標，因此確定選用地道藥材是中藥品質控管的第一要務。原料藥材的基原可以用組織鏡檢和 DNA 比對來判別，但這些方法卻都不適用於民眾服用最直接的煎煮液或製劑。本研究結果顯示，麻黃、黃柏、人參藥材的基原在複方成藥中亦可辨識：草麻黃(*Ephedra sinica* Stapf)用於發汗解表，中麻黃(*E. intermedia* Schrenk et Meyer)用於抗炎利水，兩者可用 ephedrine 與 pseudoephedrine 的比值來鑑別，其值在草麻黃大於 1，中麻黃小於 1；台灣黃柏(*Phellodendron wilsonii* Hayata et Kanehira)向為生藥界視為品質優良的本土藥材，價格遠高於大陸產的關黃柏(*P. amurense* Ruprecht)川黃柏(*P. chinense* Schneid.)，我們用 berberine 與 palmatine 的比值來判別，本黃柏大於 18，日本黃柏(*P. amurense* Rupr. Var. *sachalinense* Fr. Schm.)大於 16，唯本黃柏的 magnoflorine 含量很少，關黃柏在 0.7 至 5 之間；紅參白參(*Panax ginseng* C. A. Meyer)溫補價昂，參鬚涼補價廉，實驗結果顯示它們的成分含量與比例有很大的不同，將含人參製劑的粗萃液，經簡單前處理，可以明確測定 ginsenoside Rg1 與 Re 比值的差異，紅參白參大於 1.7，參鬚介於 0.3 至 0.8 之間。

中藥科學化與現代化是二十一世紀國內生技製藥的重點發展目標，後者著重開發新藥，前者在使中藥規格化標準化。中藥的標準化，除要嚴格控管原料藥材外，也應有客觀的成品控管方法。目前指標成分的定量與 fingerprint 的比對定性是普遍被接受的方式，但中藥成分複雜變因太多，很難有兩批成藥具有相同的指紋圖譜，因此，整體圖紋類似且重點波峰確定，應是科學化中藥品質控管的基本要求。本研究結果，以兩個特定波峰比例確認用藥的正確性，或可予以推廣。

| | | | |
|------|---|---------------------------------------|---|
| ● 麻黃 | $\frac{\text{ephedrine}}{\text{pseudoephedrine}} = R$ | $R > 1$ $R < 1$ | <i>E. sinica</i> <i>E. intermedia</i> |
| ● 黃柏 | $\frac{\text{berberine}}{\text{palmatine}} = R$ | $R > 18$ $R > 16$ $0.7 < R < 5$ | <i>P. wilsonii</i> <i>P. amurense</i> var. <i>sachalinense</i> <i>P. amurense</i> or <i>P. chinense</i> |
| ● 人參 | $\frac{\text{ginsenoside Rg1}}{\text{Re}} = R$ | $R > 1.7$ $0.3 < R < 0.8$ | red or white ginseng ginseng root-hairs |

II.4 參考文獻：

- [1] 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌，"簡明藥材學"，P. 407、P461，新醫藥出版社，臺北，1985。

- [2] Kitagawa, T. Taniyama, T. Hayashi and M. Yoshikawa, *Chem. Pharm. Bull.*, (1983) 31, 3353
- [3] P. Pietta, P. Mauri and A. Rava, *J. Chromatogr.*, (1986) 256, 212
- [4] H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Matsushima, M. Tomoda and N. Takai, *J. Chromatogr.*, (1987) 24, 517
- [5] H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Matsushima, M. Tomoda and N. Takai, *J. Chromatogr.*, (1990) 507, 327
- [6] T.G. Peterson and B. Palmqvist, *J. Chromatogr.*, (1990) 504, 139
- [7] H. Kanazawa, Y. Nagata, Y. Matsushima, M. Tomoda and N. Takai, *J. Chromatogr.*, (1991) 537, 469
- [8] H. Yamaguchi, R. Kasai, H. Matura, O. Tanaka and T. Fuwa, *Chem. Pharm. Bull.*, (1988) 36, 3468
- [9] W.C. Chuang and S. J. Sheu, *J. Chromatogr. A*, (1994) 685, 243
- [10] P. Pitta, P. Mauri and A. Rava. *J. Chromatogr.*, (1986) 256, 212
- [11] Arthur. C. L. ; Potter, D.W. ; Buchholz, K. D. ; Motlagh, S. ; Pawliszyn, J. Solid-phase microextraction for the direct analysis of water: Theory and practice, LC-GC., (1992) 110, 656-661
- [12] Liska, I. *J. Chromatogr. A*, (1993) 655, 163
- [13] SUPERCO Chromatography Products., (1998) 33
- [14] CHEMISTRY (THE CHINESE CHEM. SOC. TAIPEI) Dec., (1998) 56, 319

