

利用毛細管電泳定量中藥製劑成分(三) Determination of the contents in Chinese herbal preparations by capillary electrophoresis (3)

許順吉

國立台灣師範大學化學系

摘要

高效液相層析(HPLC)及毛細管電泳(CE)是目前最常用來定量中藥指標成份的分析方法。本研究以這兩種儀器，分析含半夏、吳茱萸、麻黃及防己的方劑，及芍藥湯製劑，並比較這兩種方法的優劣。

十一件含半夏方劑的 guanosine 含量，以磷酸鹽溶液沖提，用 HPLC 分析，一小時可完成；以 borate 為緩衝溶液用 CE 分析，只需時間十二分鐘。應用於市售製劑，HPLC 可分析七製劑，CE 可分析九製劑，其餘解析度不太理想。

兩件含吳茱萸方劑的 dehydroevodiamine 含量，以磷酸鹽沖提，用 HPLC 分析，分析時間四十五分鐘；以磷酸二氫鈉為緩衝溶液，用 CE 分析，需時六分鐘。兩方法用於市售製劑，效果良好。

十一件含麻黃方劑的 ephedrine 含量，以含 SDS 的磷酸溶液沖提，用 HPLC 分析，耗時五十分鐘；以 valine 的氫水溶液遷送，用 CE 分析，需時四分鐘。後者可順利用於十一市售製劑，前者有兩製劑分析效果不太理想。

以含 SDS 的酒石酸水溶液沖提，用 HPLC 分析小續命湯(含防己)中的 sinomenine 含量，需時六十五分鐘；以含 malic acid 磷酸二氫鈉溶液遷送，用 CE 分析該方劑，需時七分鐘。

芍藥湯由芍藥、黃芩、大黃、黃連、肉桂、木香、當歸及檳榔

等藥材煎煮而得，其組成成分，可順利用 HPLC 及 CE 分析，前者以磷酸鹽為沖提液，後者以硼酸鹽及 SC 為緩衝液。

關鍵詞：CE，HPLC，中藥製劑，guanosine，dehydroevodiamine，ephedrine，sinomenine，芍藥湯。

ABSTRACT

High-performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) are currently the most commonly used analysis methods for assaying the marker substances in Chinese herb drugs. In this study the two methods were used to analyze the preparations containing *Pinelliae Tuber*, *Evodiae Fructus*, *Ephedrae Herba* and *Stephaniae Radix*.

Fourteen samples of Chinese herb formulas containing *Pinelliae Tuber* were assayed for their guanosine contents, using phosphate eluent in the HPLC analysis completed within one hour, and using borate buffer in the CE method taking only 12 minutes. Among the preparations, HPLC can analyze eight, and CE, nine. The other preparations came out with poor resolution.

Two evodia-containing herbal preparations were tested for their dehydroevodiamine contents, using phosphate eluent in the HPLC method. The analysis took 45 minutes. While sodium dihydrophosphate buffer solution was used in the CE method to take only six minutes. Both methods gave satisfactory results.

Eleven ephedra-containing herbal preparations were tested for the ephedrine content, using SDS-phosphate solution as the eluent in HPLC method, which took 50 minutes. Whereas valine-ammonia solution was used in the CE method which took only 4 minutes. The latter could successfully analyze eleven commercial herbal preparations, while the former could analyze only nine.

With the SDS-tartaric acid water solution as the eluent in the HPLC method for analyzing the herbal formula Hsiao-hsu-ming-tang (Ma-huang and Peony Combination), it took 65 minutes. Alternatively, CE, using malic acid and sodium dihydrophosphate solution for analyzing the same formula, took only seven minutes.

Shao-yao-tang (Peony Combination) is composed of *Paeoniae Radix*, *Scutellariae Radix*, *Rhubarb Rhizoma*, *Cinnamomi Cortex*, *Saussureae Radix*, *Angelicae Radix* and *Arecae Fructus*, and can be easily analyzed with HPLC and CE methods. The former uses phosphate as eluent and the latter uses boric acid and SC as a buffer.

Key words: CE, HPLC, Chinese herbal preparation, guanosine, dehydroevodiamine, ephedrine, sinomenine, Shao-yao-tang.

壹、前言

中藥是我國固有文化的一部份，來自千百年來的臨床診斷經驗，近年來經由化學、藥學及藥理學家的積極研究，獲得不少確切詮釋，也有甚多新發現，使中藥的應用價值更受肯定。

中藥材來自天然植物，由於基源、產地、生長年數、栽培方法、採收日期及加工處理過程的不同，而會有品質上的差異。傳統上以外觀來判定品質優劣，缺乏客觀科學數據評估，而常有謬誤，確實的定量分析是目前努力的途徑。

本研究利用現有分析方法中較適宜於分析中藥的高效能液相層析儀 (high-performance liquid chromatography; HPLC) 及毛細管電泳分析儀 (capillary electrophoresis; CE) 來作為分析儀器。高效能液相層析法 (HPLC) 及毛細管電泳 (CE) 分析法中各有其優缺點，若能夠充分發揮它們的分析特點，將使中藥分析更易落實。

貳、含半夏方劑中 guanosine 之定量分析

半夏為常用中藥材之一，神農本草經列為下品，因初夏收成，故名。其來源為天南星科植物(Araceae)半夏(Pinellia ternate Breitenbach)的乾燥塊莖。

1987年鹿野美弘等人從半夏藥材中分離出 guanosine(GS)，經 HPLC 測試後，發現其適合作為分析中藥半夏製劑的指標成分[2]。它們的化學結構見圖 2-1。

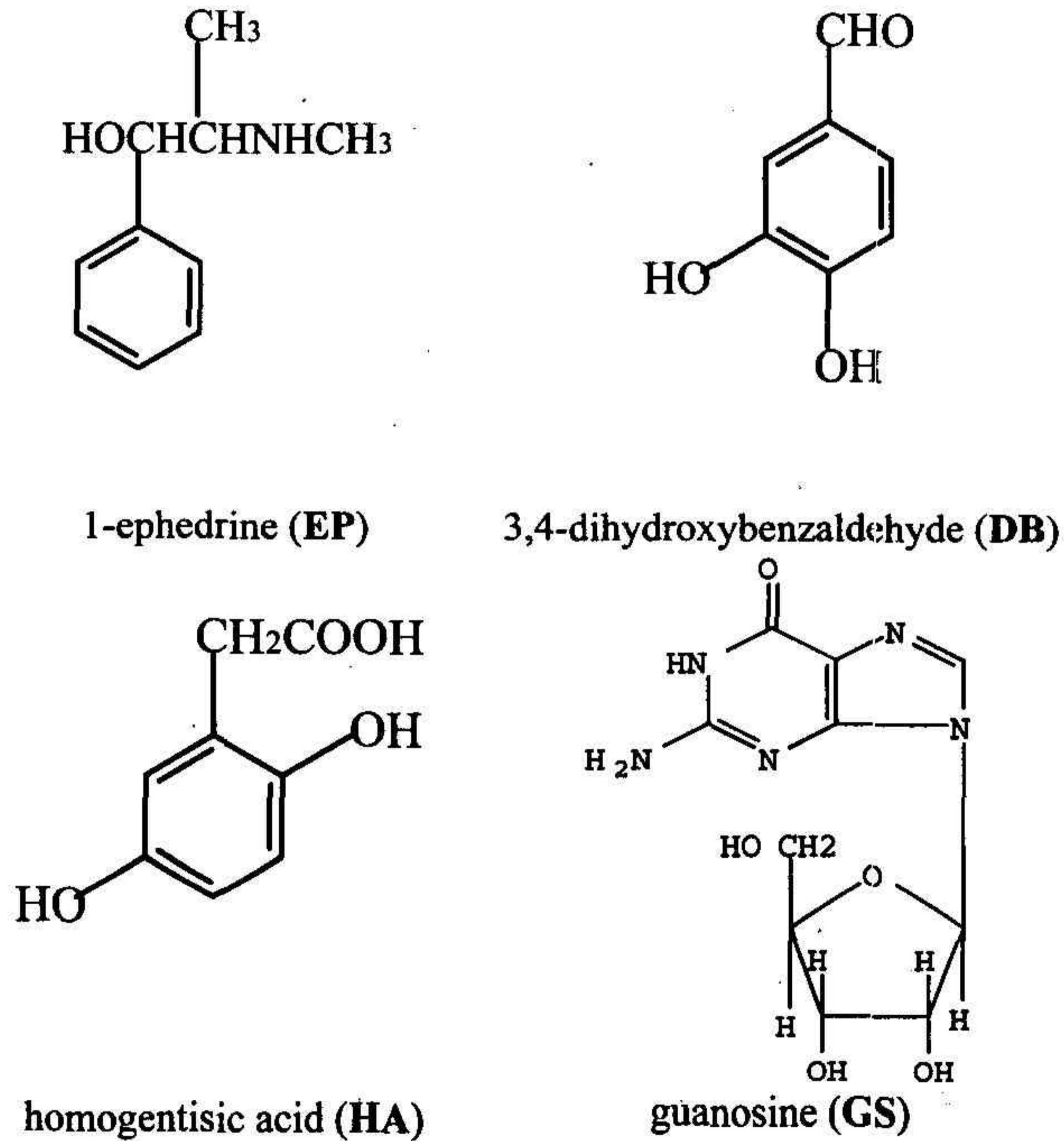


圖 2-1 半夏之成分結構圖

第1節 高效能液相層析

2-1-1 實驗部份

2-1-1.1 實驗試藥

guanosine (GS)購自 Merck(Darmstadt, Germany)。3,4-Dihydroxybenzyl-aldehyde(DB)購自 Aldrich(Milwaukee, WIS, USA)；而磷酸二氫鉀(sodium dihydrogenphosphate)及來自 Kanto(Tokyo, Japan)。磷酸購自和光製藥。水經 Milli-Q System 純化 (Millipore, Bedford, MA, 美國)。甲醇為和氣甲烷為 Far-UV 級 (Mallinckrodt, KY, 美國)。

2-1-1.2 實驗儀器

高效液相層析儀 (HPLC)

泵：Applied Biosystem 400 Solvent Delivery System

注入閥：Applied Biosystem 491 Dynamic Mixer/Injector

偵測器：Applied Biosystem 1000s Diode Array Detector

積分器：SIC Chromatocorder II

2-1-2.3 HPLC 分析條件

分離管柱：Capcellpak C18 SG-120 (Shiseido, Tokyo, 日本)

流動相：(A) 10mM KH_2PO_4 以 H_3PO_4 調至 pH=2.6

(B) Buffer A : CH_3CN : CH_3OH
= 5 : 2 : 3

梯度沖提程式：

時間(min)	流速(mL/min)	A %	B %	curve
initial	0.6	100	0	*
20	0.6	85	15	linear
30	0.6	70	30	linear
35	0.6	65	35	linear
40	0.6	65	35	linear
50	0.6	50	50	linear
60	0.6	50	50	linear

偵測波長： 210 nm

2-1-1.4 標準品檢量線的製備

(1) 內標準品溶液

精稱 61.6 mg 的 3,4-Dihydroxybenzaldehyde (DB) 溶於 50% 乙醇中，以量瓶配製成 50 mL，作為內標準品溶液。

(2) 標準品溶液

精稱 6.8 mg guanosine 溶於 50% 乙醇中，以量瓶配成 100 mL 溶液，作為標準溶液。

(3) 檢量線

以吸量管分別吸取標準溶液 15 mL, 10 mL, 5mL, 1 mL, 0.5 mL，各加入內標準品溶液 3,4-Dihydroxybenzaldehyde 1 mL，以 50% 乙醇稀釋至 25 mL，以上述之最佳分析條件，注入 10 μ L，各注入兩次，取其平均值製作檢量線。

2-1-1.5 再現性

取母液 10 mL 於量瓶中，加入 1 mL 內標準品溶液，以 50% 乙

醇稀釋至 25 mL，作為定量之檢液；同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

2-1-1.6 回收率

精稱 2 g 半夏粉末，以 50 % 乙醇 7ml 作為萃取溶劑，在室溫下迴流攪拌萃取 15 分鐘，離心，如此重覆三次，將所得之萃取液，分別各加入標準品母液 0.5 mL，再加入內標準品溶液 1 mL，以量瓶稀釋至 25 mL，以 0.45 μ m 濾紙過濾作為檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

2-1-1.7 半夏藥材定量分析

精稱 2 g 半夏粉末，以 7 mL 50 % 乙醇在室溫下迴流攪拌萃取 15 分鐘，離心，重覆三次，三次萃取液合併，加入 1mL 內標準品溶液，以量瓶稀釋至 25 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

2-1-1.8 相關方劑定量分析

精稱中藥方劑 1g、1.5g、2.0g，以 7 mL 50% 乙醇溶液在室溫下回流攪拌萃取 15 分鐘，離心，重覆三次，全部的萃取液集中後，加入內標準品溶液 1 mL，以 50% 乙醇稀釋至 25 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

2-1-2 結果與討論

2-1-2.1 檢量線的製備

依實驗部分 2-1-1.4 所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值 (y) 與注射濃度 (x，mg/mL) 之關係，作圖得檢量線為：

$$\text{guanosine} : y = 0.0516x + 0.0138 \quad (r = 0.9999)$$

線性範圍：1.36-40.8 μ g/mL

2-1-2.2 分析條件之適宜性評估

(1) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注射六次(intraday)及不同天總計重複六次(interday)。分別以峰線面積比值(波峰面積/內標準品面積, Ar, Peak-area ratio)及遷移時間計算其相對標準偏差(RSD)，見表 2-1。

表 2-1 guanosine 再現性

化合物	RSD(%)			
	Intraday		Interday	
	Ar	Mt	Ar	Mt
guanosine	1.61	1.43	1.81	0.77

(2) 回收率

在已知成分含量的藥材中添加各成分純品，結果如表 2-2。顯示本方法之準確性極佳。

表 2-2 guanosine 回收率

化合物	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
guanosine	96	93	96.9

2-1-2.3 半夏藥材定量分析

依實驗部份 2-1-1.7 所述，求 guanosine 平均值。
定量結果為：22.102 (0.025 ($\mu\text{g/g}$))。

2-1-2.4 相關方劑定量分析

取方劑樣品萃取液，重覆定量三次，求 guanosine 平均值($\mu\text{g/g}$)

(表 2-3)。

此七種方劑之名稱及藥材組成如下：

1. 養心湯：半夏 4.0，黃耆 4.0，茯苓 4.0，茯神 4.0，川芎 4.0，當歸 4.0，人參 1.0，柏子仁 1.0，肉桂 1.0，五味子 1.0，遠志 1.0，炙甘草 0.5，酸棗仁 1.0。
2. 小青龍湯：半夏 6.0，麻黃 3.0，芍藥 3.0，甘草 3.0，桂枝 3.0，乾薑 3.0，細辛 3.0，五味子 3.0。
3. 治濁固本丸：半夏 1.0，蓮鬚 2.0，黃連 2.0，黃柏 1.0，益智仁 1.0，砂仁 1.0，茯苓 1.0，豬苓 2.0，甘草 3.0。
4. 鉤藤散：半夏 3.0，鉤藤 3.0，橘皮 3.0，防風 2.0，菊花 2.0，石膏 5.0，麥門冬 3.0，茯苓 3.0，人參 2.0，甘草 1.0，生薑 1.0。
5. 五積散：半夏 2.0，茯苓 2.0，白朮 2.0，陳皮 2.0，蒼朮 2.0，當歸 1.2，芍藥 1.2，白芷 1.2，乾薑 1.2，大棗 1.2，枳殼 1.2，桂枝 1.2，甘草 1.2，川芎 1.2，厚朴 1.2，桔梗 1.2，麻黃 1.2，生薑 1.2。
6. 小陷胸湯：黃連 1.5，半夏 6.0，瓜蒌仁 3.0。
7. 藿香正氣散：大腹皮 3，伏苓 3，白芷 3，紫蘇葉 3，陳皮 2，桔梗 2，白朮 2，厚朴 2，半夏 2，炙甘草 1，藿香 3，生薑 3，大棗 1。

表 2-3 相關方劑定量分析

方劑名稱	guanosine
養心湯	57.07±0.020
小青龍湯	190.44±0.024
治濁固本丸	103.29±0.036
鉤藤散	69.23±0.156
五積散	97.69±0.233
小陷胸湯	76.77±0.165
藿香正氣散	38.43±0.160

參蘇飲、六君子湯、竹葉石膏湯及金肺草散等用該分析方法，guanosine 與其它成分部份重疊，無法準確定量。在計算各製劑之 guanosine 含量時，均曾配製空白液圖譜比對。

第二節 毛細管電泳

2-2-1 實驗部分

2-2-1.1 實驗藥品

guanosine (GS)及內標準品 benzyltriethylammonium chloride 購自 Merck(Darmstadt, Germany)。Homogentisic acid (HA)購自 Sigma(St. Louis, MO, USA)。3,4-Dihydroxybenzaldehyde (DB)及 1-ephedrine (EP)購自 Aldrich(Milwaukee, WIS, USA)；而磷酸二氫鈉(sodium dihydrogenphosphate)及氫氧化鈉(sodium hydroxide)來自 Kanto(Tokyo, Japan)。硼酸鈉(sodium borate)為 Nacalai Tesque(Kyoto, Japan)試藥。甲醇(methanol)和氫甲烷(acetonitrile)為 Mallinckrodt(Paris, KY, USA)的 LC 級試藥，酒精(95% ethanol)購自台灣省菸酒公費局。配製樣品及緩衝溶液的去離子水(deionized water)取自 Milli-Q system(Millipore, Bedford, MA, USA)。

2-2-1.2 實驗儀器

- (1) 毛細管電泳系統：Waters Quanta 4000
毛細管：70cm × 75 μm I.D. uncoated (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)，至偵測器 62.5cm。
數據處理：訊華 SISC 層析儀數據處理系統
- (2) 酸鹼測定儀(pH meter)：Suntex SP-2200
- (3) 高速離心機：Hettich Universal，其轉盤為 10mL × 12
- (4) 超音波振盪器：Elma Transsonic Digital

2-2-1.3 最佳分析條件

Buffer : 20mM Na₂B₄O₇ 以 1N 氫氧化鈉水溶液調至 pH=9.65

Run Time : 12 min

Voltage : 20KV

Injection mode : 3 sec hydrostatic

Temperature : 25.0-26.0 °C

Pre-wash : 0.1N NaOH 2min , H₂O 2 min , Buffer 2 min

Post-wash : 0.1N NaOH 4 min , H₂O 4 min

Detection wavelength : 210 nm (定量 EP)

254m (定量 GS、DB、HA)

2-2-1.4 緩衝溶液條件的選擇

(1) 不同硼酸鈉濃度的探討

分別配製不同濃度的硼酸鈉緩衝溶液，其濃度為 5、10、15、20、25 mM，以探討硼酸鈉濃度對半夏成分分離的影響，各濃度重覆操作兩次。

(2) 不同酸鹼值的探討

以適宜的硼酸鈉濃度，加入不同量的 1N 氫氧化鈉溶液配製不同酸鹼度的緩衝溶液，其 pH 值範圍由 9.26 至 9.96，各溶液重覆操作兩次。

2-2-1.5 配製標準品溶液及製作檢量線

(1) 內標準品溶液

稱取 1.8248 g 的 benzyltriethylammonium chloride 溶於 25 mL 的 50% 乙醇溶液，做為內標準品溶液(IS)。

(2) 標準品

稱取 1-ephedrine (EP) 20.2 mg，3,4-dihydroxybenzaldehyde (DB) 15.1 mg，guanosine (GS) 3.5 mg 和 homogentisic acid (HA) 50.0 mg，以 50% 乙醇水溶液配成 25 mL 標準品母液。

(3) 檢量線

分別取母液 0.2、0.5、1、2、5、8 mL 於量瓶中，各加入 0.5 mL 內標準品溶液，以 50% 乙醇水溶液配成 10 mL 標準品溶液。以 3-1-2.1 之最佳分析條件，各濃度重複兩次注射，取其平均值製作檢量線。

2-2-1.6 分析條件之適宜性評估

(1) 再現性(Reproducibility)

取母液 1 mL 於量瓶中，加入 0.5 mL 內標準品溶液，以 50% 乙醇水溶液稀釋至 10 mL，作為定量之檢液；同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

(2) 回收率(Recovery)

精稱 2.0 克半夏粉末，以 4 mL 50% 乙醇溶液在室溫下攪拌萃取 30 分鐘，離心，重覆兩次，全部的萃取液集中後，加入 0.5 mL 的標準品母液，再加入內標準品 0.1 mL，以 50% 乙醇稀釋至 10 mL，經 0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為兩次注射之平均分析結果。

(3) 偵測極限(Detection limit)

逐步稀釋標準品溶液，注入偵測，直到 $\text{signal/noise} = 3/1$ 以下，計算注入量及其濃度。

2-2-1.7 藥材之定量分析

精稱 2.0 克半夏粉末，以 4 mL 50% 乙醇溶液在室溫下攪拌萃取 30 分鐘，離心，重覆兩次，全部的萃取液集中後，加入內標準品 0.1

mL，以 50% 乙醇稀釋至 10 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

2-2-1.8 相關方劑之定量分析

精稱中藥製劑各 0.5 克，以 3 mL 50% 乙醇溶液在室溫下攪拌萃取 30 分鐘，離心，重覆三次，全部的萃取液集中後，加入內標準品 0.5 mL，以 50% 乙醇稀釋至 10 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

2-2-2 結果與討論

2-2-2.1 分析條件之探討

實驗進行之初，欲使分析物在低 pH 值時質子化，故將分析物溶於磷酸溶液中，並以不同濃度的磷酸二氫鈉加入磷酸溶液調整 pH 值做為酸性緩衝溶液，但低 pH 值時毛細管表面也可能質子化，因此所得之分離結果都不理想，且再現性不佳，故改採 pKa 為 9.24 之硼酸鈉，嘗試在鹼性條件下分析，並進一步考慮硼酸鹽的適當濃度。

選定適宜的硼酸鹽濃度後，加入氫氧化鈉溶液調整 pH 值來改變化合物上所帶的電荷數，造成其淌度不同。

在最佳的分析條件下：硼酸鹽濃度 20mM，並以氫氧化鈉溶液將 pH 值調至 9.65。可分離 EP、DB、GS、HA 四種成份。在本小節中將探討硼酸鹽濃度及酸鹼值的效應。

(1) 硼酸鹽濃度的影響

為探討硼酸鹽濃度的影響，配製了濃度由 5 至 25 mM 之間的緩衝溶液，其濃度與各成分的遷移時間關係見圖 2-9。當硼酸鹽濃度升高時，各成分的遷移時間都增加，尤其是 DB、GS 和 HA 所受影響較明顯。此現象的主因是由於硼酸鹽的濃度升高，同時提高了 pH 值，HA 的羧基及 DB 與 HA 的酚基容易去氫化(deprotonation)，使其對硼酸鹽濃度的變化較敏感。

由表 2-4 可知，硼酸鈉濃度 15mM 以上時，各化合物之間的解析度(resolution)皆大於 1.5，表示兩吸收峰已達基線分離(baseline resolution)；而 20mM 時，DB 與 GS 之解析度提高至 10.73，故選擇 20mM 為最佳的鹽類濃度。

表 2-4 不同硼酸鹽濃度時化合物間的解析度

硼酸鈉濃度 (mM)	Resolution	
	GS/DB	DB/HA
5	5.77	1.21
10	7.78	1.46
15	9.05	2.17
20	10.73	2.08
25	9.90	2.57

但在藥材中，GS 與相鄰峰之間解析度仍小於 1.5，因此需再加入氫氧化鈉溶液調整 pH 值，以達到良好的分離效果。

(2) 酸鹼值的影響

由於緩衝溶液的酸鹼值，會改變各成分的電荷量，進而影響分離結果，所以在 20 mM 的硼酸鹽濃度下，加入不同量的氫氧化鈉溶液，以探討不同 pH 值的效應，見圖 2-10。當 pH 值由 9.22 增加至 10.04 時，GS、DB 及 HA 其遷移時間的順序分別由 GS/ DB/ HA (pH 值 9.21-9.41 (變為 DB/ GS/ HA (pH 值 9.41-9.84(，最後為 DB/ HA/ GS (pH 值 10.04(。整體來看，pH 值升高，使各成分的遷移時間都增加，其中以 GS 受酸鹼度影響最大。

由表 2-5 可見，pH 值 9.22、9.41、9.65 及 10.04 皆能得到好的分離效果。然而 pH 值 9.65 時，在藥材中 GS 與相鄰峰有最佳的解析度，分別為 1.57 及 2.61；其理論板數 (theoretical plate) 為 290988，拖尾係

數 (tailing factor) 為 0.99。所以在 20mM 的硼酸鹽濃度下，以氫氧化鈉溶液將緩衝溶液 pH 值調節至 9.65 是最佳條件。

表 2-5 不同 pH 值時化合物間的解析度

pH 值	Resolution	
	GS/DB 或 *DB/HA	DB/HA 或 *GS/DB
9.22	10.7	2.08
9.41	4.24	4.63
9.56	0.54	*7.16
9.65	1.69	*6.04
9.84	6.06	*0.75
10.04	*4.52	*3.76

2-2-2.2 檢量線之製作

依實驗部分 2-2-1.5 所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值 (y) 與注射濃度 (x, mg/ml) 之關係，作圖得檢量線為：

$$EP : y = 0.2379x + 0.0047 \quad (r = 0.9998)$$

線性範圍：16.16-646.40 μ g/ml

$$DB : y = 14.26x + 0.1684 \quad (r = 0.9999)$$

線性範圍：12.08-483.20 μ g/ml

$$GS : y = 25.259x + 0.0857 \quad (r = 0.9999)$$

線性範圍：2.80-112.00 μ g/ml

$$HA : y = 39.852x + 0.3943 \quad (r = 0.9990)$$

線性範圍：20.08-803.20 μ g/ml

2-2-2.3 分析條件之適宜性評估

(1) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注射六次(intraday)及不同天總計重複六次(interday)。分別以峰線面積比值(波峰面積/內標準品面積, Ar, Peak-area ratio)及遷移時間計算其相對標準偏差(RSD)，見表 2-6。其同一天峰線面積比值的相對標準偏差在 2.59-3.94(之間，遷移時間的相對標準偏差在 0.27-1.62(之間；其不同天峰線面積比值的相對標準偏差在 2.47-4.37(之間，遷移時間的相對標準偏差在 0.88-1.91(之間。

表 2-6 分析條件之再現性評估

化合物	RSD(%)			
	Intraday		Interday	
	Ar	Mt	Ar	Mt
EP	2.71	0.27	3.15	0.88
DB	2.59	1.46	3.81	0.94
GS	3.43	1.04	2.47	1.91
HA	3.94	1.62	4.37	1.01

(2)回收率

在已知成分含量的藥材中添加各成分純品，結果如表 2-7。各成分之回收率在 97.1-103.6 (之間，顯示本方法之準確性極佳。

表 2-7 回收率之測試結果

化合物	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
EP	404	394	97.5
DB	302	296	98.0
GS	70	68	97.1
HA	502	520	103.6

(3) 偵測極限

逐步稀釋標準品溶液，以毛細管電泳偵測，直到 $\text{signal/noise}=3/1$ 以下，分別計算各化合物之偵測量在 $0.7\text{-}8.08(\text{g/ml})$ 之間(injection volume: 5.1nl)，如表 2-8 所示。

表 2-8 半夏指標成分之偵測極限 (S/N=3)

2- 化合物		EP	DB	GS	HA
2- 偵測極限	ng	0.041	0.006	0.004	0.005
	$\mu\text{g/ml}$	8.08	1.208	0.700	1.004

2.4 藥材樣品之分析

取半夏之樣品三份，各重覆定量三次，求各成分平均值。定量結果為：EP 低於偵測極限；DB 低於偵測極限；GS， $27.3 (0.01 \mu\text{g/g})$ (平均值 (標準差； $n=3$))；HA 低於偵測極限。

2-2-2.5 相關製劑之定量分析

取九種市售製劑樣品萃取液，重覆定量三次，求各成分平均值 (mg/g) (表 2-9)，因 EP、DB 和 HA 在藥材中含量太低，故在製劑定量上只分析 GS 之含量。層析圖見圖 2-13、14、15、16、17、18、19、20、21。

此九種方劑之名稱及藥材組成如 2-1-2.4 所示。

表 2-9 含半夏製劑之定量結果(mean (SD, mg/g , $n=3$))

方劑名稱	GS
養心湯	0.20(0.008)
參蘇飲	0.10(0.003)
小青龍湯	0.18(0.009)

竹葉石膏湯	0.05(0.007)
六君子湯	0.16(0.017)
治濁固本丸	0.09(0.009)
金沸草散	0.07(0.008)
鉤藤散	低於偵測極限
五積散	低於偵測極限

第三節 HPLC 與 CE 之比較

2-3-1 分析時間

以本實驗來看，CE 的分析時間（12 分鐘）較 HPLC（60 分鐘）來的短；雖然 HPLC 定量較為標準，但 CE 分析方法的使用較為省時。

2-3-2 偵測波長與基線穩定性

由於基線的穩定對定量的影響相當大，因此如何避免基線的漂移為分析方法須考量的要素。CE 的緩衝溶液，多為無機鹽類，有機溶劑的添加不如 HPLC 方法中那麼必要，且因無正逆相之差異，有機溶劑的範圍限制更小。

在 HPLC 方法中，甲醇的添加使基線產生漂移的現象。

2-3-3 分析效率

分析效率可由 guanosine 吸收峰的理论板數顯示，如表 2-10。

表 2-10 guanosine 吸收峰理论板數

製劑	CE	HPLC
養心湯	33562	19975
小青龍湯	54289	7744
小陷胸湯	*	45796

鉤藤散	216783	24624
五積散	204304	18023
參蘇飲	91559	*
六君子湯	94048	*
竹葉石膏湯	211600	*
治濁固本丸	99015	12844
金沸草散	117873	*
藿香正氣散	*	44100

*表示解析度不佳，無法正確計算其含量。

2-3-4 結論

CE和HPLC同為有效的分析方法，但各有其優缺點，HPLC軟硬體技術以成熟，但耗費成本高，CE的缺點在於：（1）再現性較差；（2）樣品極限濃度較高；（3）梯度沖提方法尚未發展成熟，優點在於：（1）管柱的個別差異較小；（2）分析時間短；（3）分析物範圍較大；（4）分離模式選擇性大；（5）分析成本較低；（6）廢液量少；（7）理論板數較高。結合兩者的優點，中藥分析方法的開發空間，將會更為寬廣。

參、含吳茱萸方劑中 dehydroevodiamine 之定量分析

吳茱萸始錄於神農本草經收列為中品，此藥材因以吳地所產者為好，故名之。另有別名為吳萸、吳楸、川薑、搜筵、辟邪翁、藥茱萸、九日三官、左力等[4-6]。其基源為芸香科 (Rutaceae) 植物吳茱萸的未成熟果實。所含 dehydroevodiamine 可以增強子宮收縮[7]，降低血壓，及使心動徐緩，抗心律不整[8, 9]等作用，其化學結構式如圖 3-1 所示。

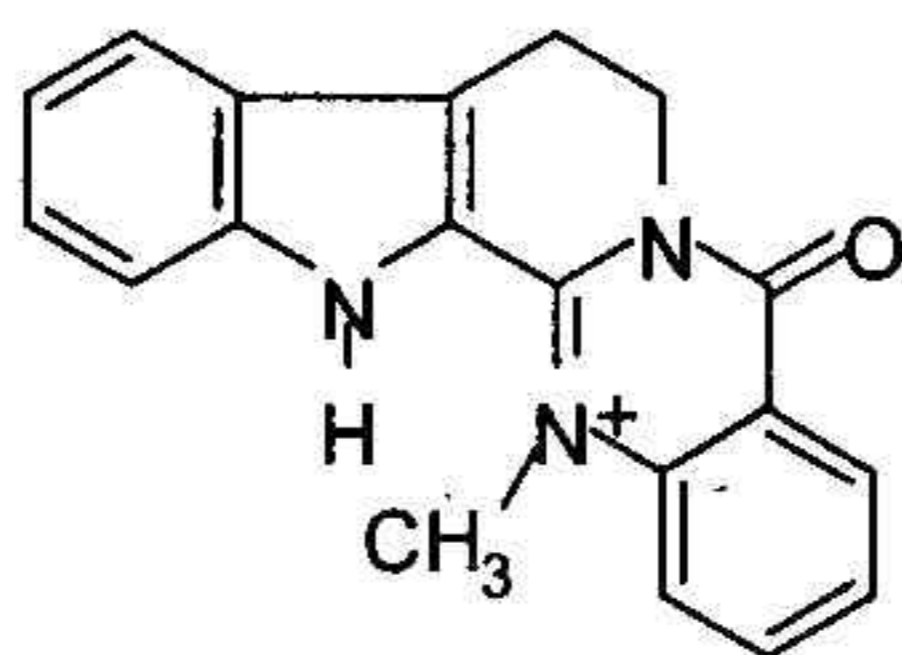


圖 3-1 dehydroevodiamine 之化學結構式

第一節 高效能液相層析

3-1-1 實驗部份

3-1-1.1 實驗試藥

標準品 (dehydroevodiamine) 自行分離自吳茱萸藥材，並經 IR, PMR, CMR 和 MS 等光譜比對文獻確認。醋酸鈉 (sodium acetate) 和醋酸 (acetic acid) 購自 Merck (Darmstadt, 德國)。肉桂酸 (cinnamic acid) 購自 Aldrich (Milwaukee, 美國) 水經 Milli-Q System 純化 (Millipore, Bedford, MA, 美國)。甲醇為和氬甲烷為 Far-UV 級 (Mallinckrodt, KY, 美國)。

3-1-1.2 實驗儀器

如 2-1-1.2 所示。

3-1-1.3 HPLC 分析條件

分離管柱：Capcellpak C18 SG-120 (Shiseido, Tokyo, 日本)

流動相：(A) 醋酸：醋酸鈉：二乙基胺：水：氬甲烷
= 12mL : 2.4g : 1mL : 800mL : 187mL

(B) H₂O : CH₃CN : CH₃OH
= 100mL : 450mL : 450mL

梯度沖提程式：

時間(min)	流速(mL/min)	A %	B %	curve
initial	1.0	100	0	*
15	1.0	30	70	linear
22	1.0	30	70	linear
25	1.0	0	100	linear
45	1.0	0	100	linear

偵測波長： 254 nm

3-1-1.4 標準品檢量線的製備

(1) 內標準品溶液

精稱 50.2 mg 的 cinnamic acid 溶於甲醇中，以量瓶配製成 50 mL，作為內標準品溶液。

(2) 標準品溶液

精稱 50.6 mg Dehydroevodiamine 溶於甲醇中，以量瓶配成 50 mL 溶液，作為標準溶液。

(3) 檢量線

以吸量管分別吸取標準溶液 20 mL, 6 mL, 4 mL, 3 mL, 2 mL，各加入內標準品 cinnamic acid 溶液 1 mL，以甲醇稀釋至 25 mL，以上述之最佳分析條件，注入 10 μ L，各注入兩次，取其平均值製作檢量線。

3-1-1.5 再現性

取母液 20 mL 於量瓶中，加入 1 mL 內標準品溶液，以甲醇稀釋至 25 mL，作為定量之檢液；同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

3-1-1.6 回收率

精稱 0.25 g 吳茱萸粉末，以 70 % 甲醇 7ml 作為萃取溶劑，在室溫下迴流攪拌萃取 15 分鐘，離心，如此重覆三次，將所得之萃取液，加入標準品 6.0 mg，再加入內標準品溶液 1 mL，以量瓶稀釋至 25 mL，以 0.45 μ m 濾紙過濾作為檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

3-1-1.7 吳茱萸藥材定量分析

精稱 0.25 g 吳茱萸粉末，以 7 mL 70 % 甲醇在室溫下迴流攪拌萃取 15 分鐘，離心，重覆三次，三次萃取液合併，加入內標準品溶液 1mL，以量瓶稀釋至 25 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

3-1-1.8 相關方劑定量分析

精稱中藥方劑各 1g，以 7 mL 70% 甲醇溶液在室溫下回流攪拌萃取 15 分鐘，離心，重覆三次，全部的萃取液集中後，加入內標準品 1 mL，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

3-1-2 結果與討論

3-1-2.1 檢量線的製備

依實驗部分 3-1-1.4 所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值 (y) 與注射濃度 (x, mg/mL) 之關係，作圖得檢量線為：

$$\text{Dehydroevodiamine} : y = 5.9814x + 0.2988 \quad (r = 0.9994)$$

線性範圍：0.08096-0.8096 mg/mL

3-1-2.2 分析條件之適宜性評估

(1) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注

射六次(intraday)及不同天總計重複六次(interday)。分別以峰線面積比值(波峰面積/內標準品面積, Ar, Peak-area ratio)及遷移時間計算其相對標準偏差(RSD), 見表 3-1。

表 3-1 dehydroevodiamine 再現性

化合物	RSD(%)			
	Intraday		Interday	
	Ar	Mt	Ar	Mt
dehydroevodiamine	0.48	0.99	2.37	0.91

(2) 回收率

在已知成分含量的藥材中添加各成分純品, 結果如表 3-2。顯示本方法之準確性極佳。

表 3-2 dehydroevoduamine 回收率

化合物	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
dehydroevodiamine	9000	8938	99.3

3-1-2.3 吳茱萸藥材定量分析

依實驗部份 3-1-1.7 所述, 求 dehydroevodiamine 平均值。定量結果為: 24.90 (0.001 mg/g)。

3-1-2.4 相關方劑定量分析

取兩種市售方劑樣品之萃取液, 重覆定量三次, 求 dehydroevodiamine 平均值(mg/g)(表 3-3)。

此兩種方劑之名稱及藥材組成如下:

1. 吳茱萸湯: 吳茱萸 4.0, 人蔘 3.0, 生薑 6.0, 大棗 3.0。
2. 雞鳴散: 檳榔 4.0, 桔梗 2.5, 木瓜 3.0, 蘇葉 1.0, 生薑 3.0, 吳

茱萸1.0，橘皮2.5。

表3-3 相關方劑定量分析

方劑名稱	dehydroevodiamine
吳茱萸湯	5.81±0.006
雞鳴散	1.995±0.007

第二節 毛細管電泳

3-2-1 實驗部份

3-2-1.1 實驗藥品

標準品 (dehydroevodiamine) 自行分離自吳茱萸藥材，並經 IR, PMR, CMR 和 MS 等光譜比對文獻確認 [10]及內標準品 benzyltriethylammonium chloride 購自 Merck(Darmstadt, Germany)。磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogenphosphate) 來自 Kanto(Tokyo, Japan)。甲醇 (methanol)和 氫甲烷(acetonitrile) 為 Mallinckrodt(Paris, KY, USA) 的 LC 級試藥。配製樣品及緩衝溶液的去離子水(deionized water)取自 Milli-Q system(Millipore, Bedford, MA, USA)。

3-2-1.2 實驗儀器

如 2-2-1.2 所示。

3-2-1.3 最佳分析條件

Buffer : 90% 40mM NaH₂PO₄ and 10% CH₃CN

Run Time : 6 min

Voltage : 20KV

Injection mode : 2 sec hydrostatic

Temperature : 25.0-26.0°C

Pre-wash : 0.1N NaOH 2min , H₂O 2 min , Buffer 2 min

Post-wash : 0.1N NaOH₄ min , H₂O 4 min

Detection wavelength : 254 nm

3-2-1.4

配製標準品溶液及製作檢量線

(1) 內標準品溶液

稱取 1.0118 g 的 benzyltriethylammonium chloride 溶於 50 mL 的 70% 甲醇溶液，做為內標準品溶液(IS)。

(2) 標準品母液。

稱取 dehydroevodiamine 42.3 mg，以 70% 甲醇配成 10 mL 標準品母液。

(3) 檢量線

分別取母液 0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、2.5 mL 於量瓶中，各加入 0.4 mL 內標準品溶液，以 70% 甲醇水溶液配成 5 mL 標準品溶液。以 3-1-2.1 之最佳分析條件，各濃度重複兩次注射，取其平均值製作檢量線。

3-2-1.5 分析條件之適宜性評估

(1) 再現性(Reproducibility)

取母液 1 mL 於量瓶中，加入 0.4 mL 內標準品溶液，以 70% 甲醇溶液稀釋至 5 mL，作為定量之檢液；同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

(2) 回收率(Recovery)

精稱 0.5 克吳茱萸粉末，以 7 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取 30 分鐘，離心，取澄清液，重覆三次，全部的萃取液集中後，加入 1.5 mL 的標準品母液，再加入內標準品 2.0 mL，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為兩次注射之平均分析結果。

(3) 偵測極限(Detection limit)

逐步稀釋標準品溶液，注入偵測，直到 $\text{signal/noise} = 3/1$ 以下，計算注入量及其濃度。

3-2-1.6 藥材之定量分析

精稱0.5克吳茱萸粉末，以 7 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取30分鐘，離心，取澄清液，重覆三次，全部的萃取液集中後，加入內標準品2.0 mL，以 70% 甲醇稀釋至25 mL，經0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為兩次注射之平均分析結果。

3-2-1.7 相關製劑之定量分析

精稱中藥製劑吳茱萸湯1克，雞鳴散2.5克，分別以 7 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取30分鐘，離心，取澄清液，重覆三次，全部的萃取液集中後，加入內標準品2.0 mL，以 70% 甲醇稀釋至25 mL，經0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為兩次注射之平均分析結果。

3-2-2 結果與討論

3-2-2.1 檢量線之製作

依實驗部分 3-2-1.4 所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值 (y) 與注射濃度 (x, mg/ml) 之關係，作圖得檢量線為：

$$y = 8.518x - 0.0815 \quad (r = 0.9991)$$

線性範圍：0.2115-2.115 $\mu\text{g/mL}$

3-2-2.2 分析條件之適宜性評估

(1) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複

注射六次(intraday)及不同天總計重複六次(interday)。分別以峰線面積比值(波峰面積/內標準品面積, Ar, Peak-area ratio)及遷移時間計算其相對標準偏差(RSD)，見表 3-4。

表 3-4 分析條件之再現性評估

化合物	RSD(%)			
	Intraday		Interday	
	Ar	Mt	Ar	Mt
dehydroevodiamine	1.82	0.72	4.95	2.01

(2) 回收率

在已知成分含量的藥材中添加各成分純品，結果如表 3-5。

表 3-5 回收率之測試結果

化合物	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
Dehydroevodiamine	300	289	96.3

(3) 偵測極限

逐步稀釋標準品溶液，以毛細管電泳偵測，直到 signal/noise=3/1 以下，計算化合物之偵測量在 8.46 (g/mL)。

3-2-2.3 藥材樣品之分析

取吳茱萸之樣品三份，各重覆定量三次，求各成分平均值。定量結果為： 25.53 ± 0.03 mg/g (平均值 (標準差 mg/g；n=3))。

3-2-2.4 相關製劑之定量分析

取兩種市售製劑樣品之萃取液，重覆定量三次，求各成分平均值(mg/g)(表 3-6)。

此兩種方劑之名稱及藥材組成如下 3-1-2.4 所示。

表 3-6 含吳茱萸製劑其定量結果(mean± SD, mg/g, n=3)

方劑名稱	dehydroevodiamine
吳茱萸湯	5.95(0.004)
雞鳴散	2.4(0.006)

第三節 HPLC 與 CE 之比較

3-3-1 分析時間

以本實驗來看，CE 的分析時間（6 分鐘）較 HPLC（45 分鐘）來的短；雖然 HPLC 定量較為標準，但 CE 分析方法的使用較為省時。

3-3-2 偵測波長與基線穩定性

由於基線的穩定對定量的影響相當大，因此如何避免基線的漂移為分析方法須考量的要素。CE 的緩衝溶液，多為無機鹽類，有機溶劑的添加不如 HPLC 方法中那麼必要，且因無正逆相之差異，有機溶劑的範圍限制更小。

在 HPLC 方法中，甲醇的添加使基線產生漂移的現象。

3-3-3 分析效率

分析效率可由 dehydroevodiamine 吸收峰的理论板數顯示，如表 3-7。

表 3-7 dehydroevodiamine 吸收峰理論板數

製劑	CE	HPLC
吳茱萸湯	326887	4956
雞鳴散	222280	7033

3-3-4 結論

CE和HPLC同為有效的分析方法，但各有其優缺點，HPLC軟硬體技術以成熟，但耗費成本高，CE的缺點在於：（1）再現性較差；（2）樣品極限濃度較高；（3）梯度沖提方法尚未發展成熟，優點在於：（1）管柱的個別差異較小；（2）分析時間短；（3）分析物範圍較大；（4）分離模式選擇性大；（5）分析成本較低；（6）廢液量少；（7）理論板數較高。結合兩者的優點，中藥分析方法的開發空間，將會更為寬廣。

肆、含麻黃方劑ephedrine之定量分析

麻黃為常用中藥材之一，始載於神農本草經，列為中品。自古在我國用作發汗、解熱、鎮咳、治喘良藥[10]。現在西藥上是製造麻黃素鹽酸鹽（ephedrine-HCl）之重要來源[11]。麻黃的名稱，據李時珍推測，可能因味麻色黃的緣故。麻黃之來源主要為麻黃科（Ephedraceae）植物，草麻黃（*Ephedra sinica* Stapf）、木賊麻黃（*E. equisetina* Bunge）及其他含有麻黃鹼（ephedrine）之麻黃屬植物的地上部份。其中麻黃鹼含量是品質控制的指標。其化學結構式如圖4-1。

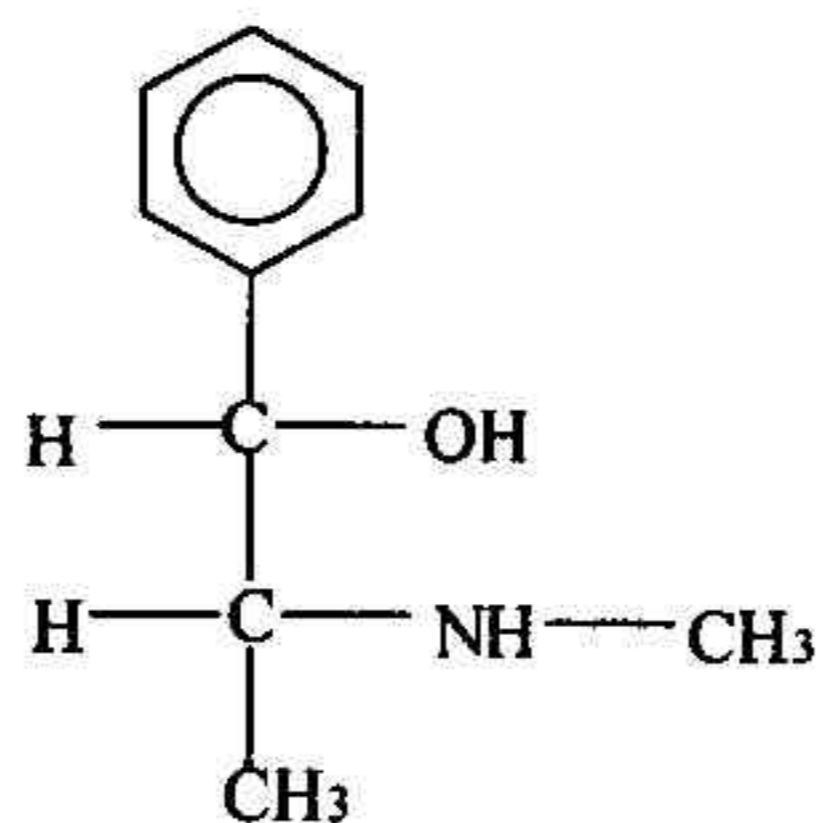


圖 4-1 麻黃素之化學結構式

第一節 高效能液相層析

4-1-1 實驗部份

4-1-1.1 實驗試藥

1-ephedrine (EP)購自 Aldrich(Milwaukee, WIS, USA)。內標準品 benzyltriethylammonium chloride購自 Merck(Darmstadt, Germany)。磷酸購自和光製藥。SDS購自 SIGMA。水經 Milli-Q System 純化 (Millipore, Bedford, MA, 美國)。甲醇為和氣甲烷為 Far-UV 級 (Mallinckrodt, KY, 美國)。

4-1-1.2 實驗儀器

如 2-1-1.2 所示。

4-1-2.3 HPLC 分析條件

分離管柱：Inertsil ODS-2, 5 μ m, 4.6 \times 250 mm

流動相：(A) H₂O : CH₃CN : SDS : H₃PO₄

= 550 mL : 450 mL : 6g : 1 mL

(B) CH₃OH : H₂O

= 500 mL : 500 mL

梯度沖提程式：

時間(min)	流速(mL/min)	A %	B %	curve
initial	1.0	100	0	*
40	1.0	100	0	linear
45	1.0	5	95	linear
50	1.0	5	95	linear

偵測波長：214 nm

4-1-1.4 標準品檢量線的製備

(1) 內標準品溶液

精稱 100 mg 的 benzyltriethylammonium chloride 溶於 70% 甲醇中，以量瓶配製成 100 mL，作為內標準品溶液。

(2) 標準品溶液

精稱 30.0 mg ephedrine 溶於 70% 甲醇中，以量瓶配成 50 mL 溶液，作為標準品溶液。

(3) 檢量線

以吸量管分別吸取標準溶液 8 mL, 5 mL, 2.5 mL, 1 mL, 0.5 mL，各加入內標準品 benzyltriethylammonium chloride 溶液 2.5 mL，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，以上述之最佳分析條件，注入 10 μ L，各注入三次，取其平均值製作檢量線。

4-1-1.5 再現性

取母液 10 mL 於量瓶中，加入 2.5 mL 內標準品溶液，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，作為定量之檢液；同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

4-1-1.6 回收率

精稱 0.06 g 麻黃粉末，以 70% 甲醇 20 mL 作為萃取溶劑，在室溫下迴流攪拌萃取 15 分鐘，再以 40°C 迴流攪拌萃取 20 分鐘，將所得之萃取液，加入標準品母液 0.5 mL，再加入內標準品溶液 2.5 mL，以量瓶稀釋至 25 mL，以 0.45 μ m 濾紙過濾作為檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

4-1-1.7 麻黃藥材定量分析

精稱 0.06 g 麻黃粉末，以 20 mL 70% 甲醇在室溫下迴流攪拌萃取 15 分鐘，再以 40°C 迴流攪拌萃取 20 分鐘，加入 2.5 mL 內標準品溶液，以量瓶稀釋至 25 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

4-1-1.8 相關方劑定量分析

精稱中藥方劑 1.0 g，以 20 mL 70% 甲醇溶液在室溫下回流攪拌萃取 15 分鐘，再以 40°C 迴流攪拌萃取 20 分鐘，加入內標準品溶液 2.5 mL，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，經 0.45 (m 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

4-1-2 結果與討論

4-1-2.1 檢量線的製備

依實驗部分 4-1-1.4 所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值 (y) 與注射濃度 (x, mg/mL) 之關係，作圖得檢量線為：

$$\text{ephedrine} : y = 7.2064x + 0.0307 \quad (r = 0.9999)$$

線性範圍：0.012-0.192 mg/mL

4-1-2.2 分析條件之適宜性評估

(1) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注射六次 (intraday) 及不同天總計重複六次 (interday)。分別以峰線面積比值(波峰面積/內標準品面積, Ar, Peak-area ratio)及遷移時間計算其相對標準偏差 (RSD)，見表 4-1。

表 4-1 ephedrine 再現性

化合物	RSD(%)			
	Intraday		Interday	
	Ar	Mt	Ar	Mt
Ephedrine	0.5748	1.9969	1.3696	2.0990

(2) 回收率

在已知成分含量的藥材中添加各成分純品，結果如表 4-2。顯示本方法之準確性極佳。

表 4-2 ephedrine 回收率

化合物	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
Ephedrine	300	288	96

4-1-2.3 麻黃藥材定量分析

依實驗部份 4-1-1.7 所述，求 ephedrine 平均值。

定量結果為：11.06 (0.636 ($\mu\text{g/g}$))。

4-1-2.4 相關方劑定量分析

取方劑樣品萃取液，重覆定量三次，求 ephedrine 平均值($\mu\text{g/g}$)(表 4-3)。

十一種方劑之名稱及藥材組成如下：

1. 五積散：茯苓 2.0，半夏 2.0，芍藥 1.2，白芷 1.2，乾薑 1.2，大棗 1.2，枳殼 1.2，白朮 2.0，蒼朮 2.0，川芎 1.2，桂枝 1.2，甘草 1.2，陳皮 2.0，當歸 1.2，厚朴 1.2，桔梗 1.2，麻黃 1.2，生薑 1.2。
2. 小青龍湯：半夏 6.0，麻黃 3.0，芍藥 3.0，甘草 3.0，桂枝 3.0，乾薑 3.0，細辛 3.0，五味子 3.0。
3. 定喘湯：麻黃 3.0，半夏 3.0，桑白皮 1.8，杏仁 1.8，蘇子 1.8，白果 4.8，款冬花 3.0，甘草 0.6。
4. 麻黃湯：麻黃 5.0，桂枝 4.0，杏仁 5.0，甘草 1.5。
5. 小續命湯：防風 4.5，人參 3.0，甘草 3.0，杏仁 3.0，麻黃 3.0，芍藥 3.0，附子 1.5，防己 3.0，桂枝 3.0，川芎 3.0，生薑 9.0。
6. 葛根湯：葛根 8.0，芍藥 3.0，乾生薑 1.0，麻黃 4.0，大棗 4.0，

桂枝3.0，甘草2.0。

7. 麻杏甘石湯：麻黃4.0，杏仁4.0，甘草2.0，石膏10.0。
8. 麻杏蕙甘湯：麻黃4.0，杏仁3.0，甘草2.0，蕙苡仁10.0。
9. 麻黃附子細辛湯：麻黃4.0，細辛3.0，附子0.5~1.0。
10. 烏藥順氣散：烏藥2.5，麻黃2.5，陳皮2.5，枳殼2.0，白殭蠶2.5，乾薑2.5，桔梗2.5，川芎2.5，白芷1.5，甘草1.5。
11. 華蓋散：麻黃4.0，杏仁4.0，甘草1.0，桑白皮2.0，茯苓5.0，蘇子2.0，陳皮2.0。

表4-3 相關方劑定量分析

方劑名稱	Ephedrine
五積散	39.56(0.509)
小青龍湯	64.42(0.678)
定喘湯	42.26(2.206)
麻黃湯	無法有效分離*
小續命湯	無法有效分離*
葛根湯	70.88(0.566)
麻杏甘石湯	122.2(0.141)
麻杏蕙甘湯	52.33(0.141)
麻黃附子細辛湯	121.43(0.989)
烏藥順氣散	51.55(1.910)
華蓋散	86.72(0.128)

*Resolution 不佳，與其他成分部份重疊。

第二節 毛細管電泳

4-2-1 實驗部分

4-2-1.1 實驗藥品

1-ephedrine (EP)購自 Aldrich (Milwaukee, WIS, USA)。內標準品

benzyltriethylammonium chloride購自 Merck(Darmstadt, Germany)。
Valine購自 Merck(Darmstadt, Germany)。氨水購自 Nacalai Tesque。
甲醇(methanol)為 Mallinckrodt(Paris, KY, USA) 的LC級試藥。配製樣
品及緩衝溶液的去離子水 (deionized water)取自 Milli-Q
system(Millipore, Bedford, MA, USA)。

4-2-1.2 實驗儀器

如 2-2-1.2 所示。

4-2-1.3 最佳分析條件

Buffer : 10.0 mM Valine 以氨水調至 pH=10.00

Run Time : 4 min.

Voltage : 20KV

Injection mode : 5 sec hydrostatic

Temperature : 24.0-25.0 °C

Pre-wash : 0.1N NaOH 3min , H₂O 3 min , Buffer 3 min

Post-wash : 0.1N NaOH 5 min , H₂O 5 min

Detection wavelength : 185 nm

4-2-1.4 配製標準品溶液及製作檢量線

(1) 內標準品溶液

精稱 100 mg 的 benzyltriethylammonium chloride 溶於 70%
甲醇中，以量瓶配製成 100 mL，作為內標準品溶液。

(2) 標準品溶液

精稱 30.0 mg ephedrine 溶於 70% 甲醇中，以量瓶配成 50
mL 溶液，作為標準品溶液。

(3) 檢量線

以吸量管分別吸取標準溶液 8 mL, 5 mL, 2.5 mL, 1 mL, 0.5
mL，各加入內標準品 benzyltriethylammonium chloride 溶液

2.5 mL，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，以 4-2-1.3 之最佳分析條件，重複注射三次，取其平均值製作檢量線。

4-2-1.5 分析條件之適宜性評估

(2) 再現性(Reproducibility)

取母液 5 mL 於量瓶中，加入 2.5 mL 內標準品溶液，以 70% 甲醇水溶液稀釋至 25 mL，作為定量之檢液；同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

(3) 回收率(Recovery)

精稱 0.06 克麻黃粉末，以 20 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取 15 分鐘，再以 40°C 攪拌萃取 20 分鐘，將萃取液集中，加入 2.5 mL 的標準品母液，再加入內標準品 2.5 mL，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，經 0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

(4) 偵測極限(Detection limit)

逐步稀釋標準品溶液，注入偵測，直到 $\text{signal/noise} = 3/1$ 以下，計算注入量及其濃度。

4-2-1.6 藥材之定量分析

精稱 0.06 克麻黃粉末，以 20 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取 15 分鐘，再以 40°C 攪拌萃取 20 分鐘，將萃取液集中，加入內標準品 2.5 mL，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，經 0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

4-2-1.7 相關方劑之定量分析

精稱中藥製劑各 1.0 克，以 20 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取 15 分鐘，再以 40°C 攪拌萃取 20 分鐘，將萃取液集中，加入內標準品 2.5 mL，以 70% 甲醇稀釋至 25 mL，經 0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

4-2-2 結果與討論

4-2-2.1 檢量線之製作

依實驗部分 4-2-1.4 所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值 (y) 與注射濃度 (x, mg/mL) 之關係，作圖得檢量線為：

$$EP : y = 9.889x + 0.0351 \quad (r = 0.9993)$$

線性範圍：0.12-0.192 mg/mL

4-2-1.2 分析條件之適宜性評估

(2) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注射六次 (intraday) 及不同天總計重複六次 (interday)。分別以峰線面積比值 (波峰面積/內標準品面積, Ar, Peak-area ratio) 及遷移時間計算其相對標準偏差 (RSD)，見表 4-4。

表 4-4 分析條件之再現性評估

化合物	RSD(%)			
	Intraday		Interday	
	Ar	Mt	Ar	Mt
EP	1.67	0.69	2.32	2.09

(2) 回收率

在已知成分含量的藥材中添加各成分純品，結果如表 4-5。回收率為，顯示本方法之準確性極佳。

表 4-5 回收率之測試結果

化合物	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
EP	300	293	97.6

(3) 偵測極限

逐步稀釋標準品溶液，以毛細管電泳偵測，直到 $\text{signal/noise}=3/1$ 以下，計算化合物之偵測量為，如表 4-6 所示。

表 4-6 EP之偵測極限 (S/N = 3)

化合物	EP
偵測極限 (g/ml)	12.0

4-2-2.3 藥材樣品之分析

取麻黃之樣品，重覆定量三次，求EP平均值。定量結果為：

EP：16.97 (0.008 $\mu\text{g/g}$ (平均值 (標準差 $\mu\text{g/g}$; n=3))。

4-2-2.4 相關製劑之定量分析

取十一種市售製劑樣品萃取液，重覆定量三次，求EP平均值($\mu\text{g/g}$)(表 4-7)。

此十一種製劑之名稱及藥材組成如 4-1-2.4。

表 4-7 相關方劑定量分析

方劑名稱	Ephedrine
五積散	38.36(0.127)
小青龍湯	63.01(0.555)
定喘湯	51.33(0.205)
麻黃湯	60.40(1.669)
小續命湯	17.99(0.869)
葛根湯	80.22(0.319)

麻杏甘石湯	111.62(1.110)
麻杏蕙甘湯	57.29(0.869)
麻黃附子細辛湯	92.62(0.749)
烏藥順氣散	55.50(0.417)
華蓋散	90.87(2.049)

第三節 HPLC與CE之比較

4-3-1 分析時間

以本實驗來看，CE的分析時間（4分鐘）較HPLC（50分鐘）來的短；雖然HPLC定量較為標準，但CE分析方法的使用較為省時。

4-3-2 偵測波長與基線穩定性

由於基線的穩定對定量的影響相當大，因此如何避免基線的漂移為分析方法須考量的要素。CE的緩衝溶液，多為無機鹽類，有機溶劑的添加不如HPLC方法中那麼必要，且因無正逆相之差異，有機溶劑的範圍限制更小。

在HPLC方法中，甲醇的添加使基線產生漂移的現象。

4-3-3 分析效率

分析效率可由ephedrine吸收峰的理论板數顯示，如表4-8。

表 4-8 ephedrine 吸收峰理論板數

製劑	CE	HPLC
麻黃湯	232326	*
小青龍湯	247207	5672
葛根湯	215323	3463

麻杏甘石湯	139253	5761
麻杏蕙甘湯	84894	9541
麻黃附子細辛湯	125321	8975
五積散	182310	9889
烏藥順氣散	199425	9427
定喘湯	137803	6273
小續命湯	289043	*
華蓋散	243280	6348

*：表示無法有效分離

4-3-4 結論

CE和HPLC同為有效的分析方法，但各有其優缺點，HPLC軟硬體技術以成熟，但耗費成本高，CE的缺點在於：（1）再現性較差；（2）樣品極限濃度較高；（3）梯度沖提方法尚未發展成熟，優點在於：（1）管柱的個別差異較小；（2）分析時間短；（3）分析物範圍較大；（4）分離模式選擇性大；（5）分析成本較低；（6）廢液量少；（7）理論板數較高。結合兩者的優點，中藥分析方法的開發空間，將會更為寬廣。

伍、含防己方劑 sinomenine 之定量分析

防己為常用中藥材之一，神農本草經列為中品，據中藥典所記載的功用係利水、瀉下焦血分濕熱，主治水腫、風腫、淋病、小便不利、風濕痺痛、腳氣濕腫、手足攣痛等。已知防己含有多種生物鹼，其中 sinomenine 有鎮痛降血壓等作用[12]。化學結構式如圖 5-1。但該成份以日防己居多。

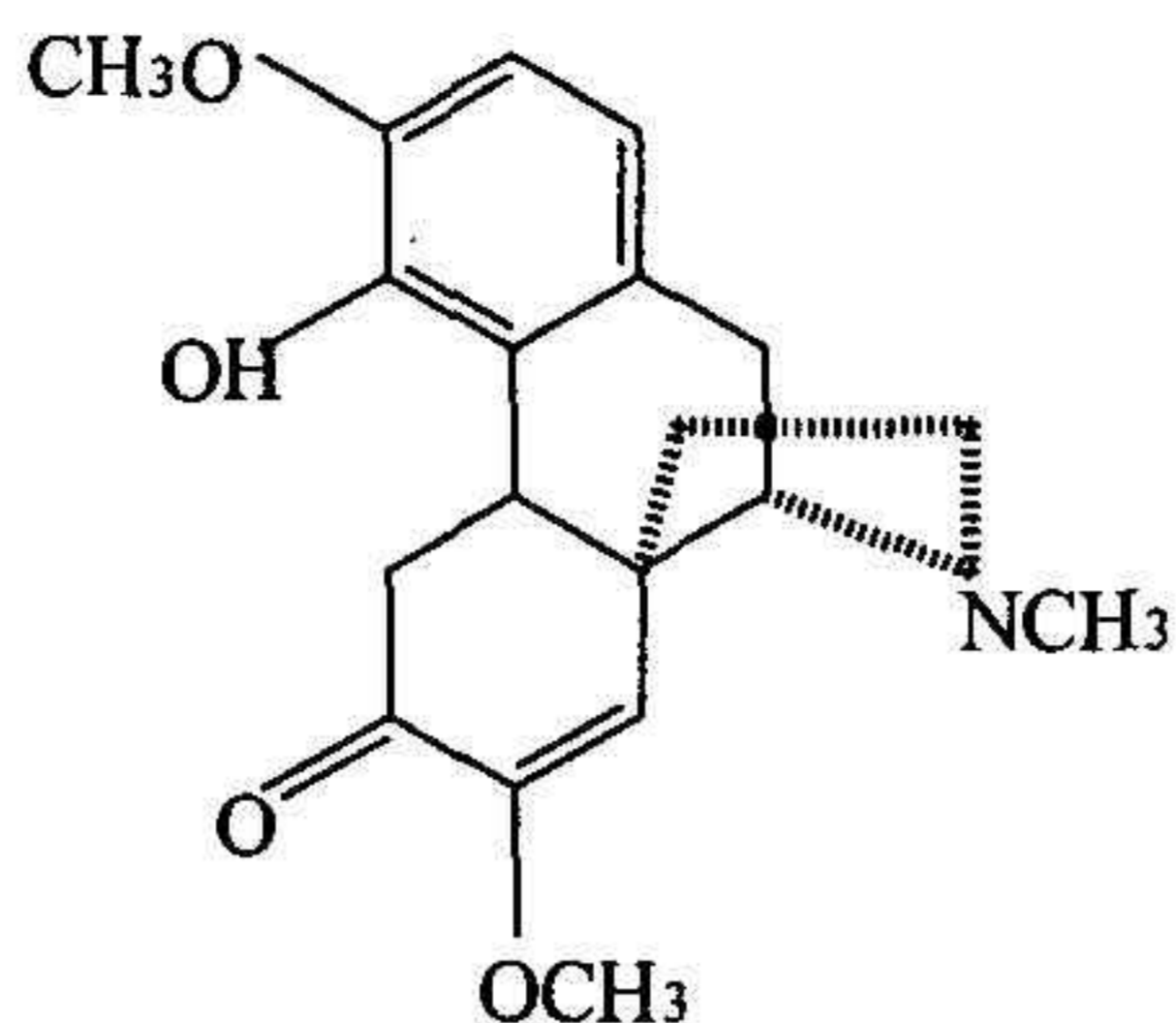


圖 5-1 sinomenine 之化學結構式

第一節 高效能液相層析

5-1-1 實驗部份

5-1-1.1 實驗試藥

標準品 (sinomenine) 購自米山藥品工業。SDS 購自 SIGMA。酒石酸購自和光製藥。水經 Milli-Q System 純化 (Millipore, Bedford, MA, 美國)。甲醇為和氬甲烷為 Far-UV 級 (Mallinckrodt, KY, 美國)。

5-1-1.2 實驗儀器

如 2-1-1.2 所示。

5-1-1.3 HPLC 分析條件

分離管柱：

流動相：(A) 水：氬甲烷：SDS：酒石酸
 = 680mL：320mL：2g：0.5g

(B) H₂O：CH₃OH
 = 500mL：500mL

梯度沖提程式：

時間(min)	流速(mL/min)	A %	B %	curve
initial	1.0	100	0	*
55	1.0	100	0	linear
60	1.0	5	95	linear
65	1.0	5	95	linear

偵測波長：260 nm

5-1-1.4 標準品檢量線的製備

(1) 內標準品溶液

精稱 265.0 mg 的 benzyltriethylammonium chloride 溶於水中，以量瓶配成 25 mL 溶液，作為內標準品溶液。

(2) 標準品溶液

精稱 5.2 mg sinomenine 溶於 70% 甲醇中，以量瓶配成 10 mL 溶液，作為標準品溶液。

(3) 檢量線

以吸量管分別吸取標準溶液 0.6 mL, 0.8 mL, 1.0 mL, 1.2 mL, 1.4 mL, 1.8 mL，各加入內標準品 benzyltriethylammonium chloride 溶液 0.8 mL，以 70% 甲醇稀釋至 5 mL，以上述之最佳分析條件，注入 10 μ L，各注入兩次，取其平均值製作檢量線。

5-1-1.5 再現性

取標準液 1.4 mL 於量瓶中，加入 0.8 mL 內標準品溶液，以 70% 甲醇稀釋至 5 mL，作為定量之檢液；同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

5-1-1.6 回收率

精稱 0.5 g 防己粉末，以 70 % 甲醇 10 mL 作為萃取溶劑，在室

溫下迴流攪拌萃取 30 分鐘，重覆三次，將所得之萃取液，以迴旋濃縮儀濃縮至乾，以 0.1N HCl 3 mL 溶解，加入標準品溶液 0.4 mL，再加入內標準品溶液 0.8 mL，以量瓶稀釋至 5 mL，以 0.45 μ m 濾紙過濾作為檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

5-1-1.7 防己藥材定量分析

精稱 0.5 g 防己粉末，以 10 mL 70 % 甲醇在室溫下迴流攪拌萃取 30 分鐘，重覆三次，將所得之萃取液，以迴旋濃縮儀濃縮至乾，再以 0.1N HCl 3 mL 溶解，加入內標準品溶液 0.8 mL，以量瓶稀釋至 5 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

5-1-1.8 相關方劑定量分析

精稱中藥方劑小續命湯 2.0 g，以 10 mL 70% 甲醇溶液在室溫下回流攪拌萃取 30 分鐘，重覆三次，將萃取液以迴旋濃縮儀濃縮至乾，再以 0.1 N HCl 3mL 溶解，加入內標準品 0.8 mL，以 70% 甲醇稀釋至 5 mL，經 0.45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

5-1-2 結果與討論

5-1-2.1 檢量線的製備

依實驗部分 5-1-1.4 所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值 (y) 與注射濃度 (x, mg/mL) 之關係，作圖得檢量線為：

$$\text{sinomenine} : y = 6.4591x + 0.0573 \quad (r = 0.9999)$$

線性範圍：0.0624-0.1872mg/mL

5-1-2.2 分析條件之適宜性評估

(1) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重

複注射六次 (intraday) 及不同天總計重複六次 (interday)。分別以峰線面積比值 (波峰面積/內標準品面積, Ar, Peak-area ratio) 及遷移時間計算其相對標準偏差 (RSD), 見表 5-1。

表 5-1 sinomenine 再現性

化合物	RSD(%)			
	Intraday		Interday	
	Ar	Mt	Ar	Mt
Sinomenine	0.9488	0.5978	1.0406	1.1024

(2) 回收率

在已知成分含量的藥材中添加成分純品, 結果如表 5-2。顯示本方法之準確性極佳。

表 5-2 sinomenine 回收率

化合物	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
Sinomenine	208	199	95.6

5-1-2.3 防己藥材定量分析

依實驗部份 5-1-1.7 所述, 求 sinomenine 平均值。定量結果為: 75.25 (0.054 mg/g)。

5-1-2.4 相關方劑定量分析

取市售方劑樣品之萃取液, 重覆定量三次, 求 sinomenine 平均

值(mg/g)(表 5-3)。

此方劑之名稱及藥材組成如下：

小續命湯：防風 4.5，人參 3.0，甘草 3.0，杏仁 3.0，麻黃 3.0，黃芩 3.0，芍藥 3.0，附子 1.5，防己 3.0，桂枝 3.0，川穹 3.0，生薑 9.0。

表5-3 相關方劑定量分析

方劑名稱	Sinomenine
小續命湯	低於偵測極限*

*量極微，無法計算。

第二節 毛細管電泳

5-2-1 實驗部份

5-2-1.1 實驗藥品

標準品 (sinomenine) 購自米山製藥工業。內標準品 benzyltriethylammonium chloride 購自 Merck(Darmstadt, Germany)。鹽酸購自 ACROS。磷酸氫二鈉購自林純藥工業。Maleic acid 購自和光製藥。甲醇(methanol)和氫甲烷(acetonitrile) 為 Mallinckrodt(Paris, KY, USA) 的 LC 級試藥。配製樣品及緩衝溶液的去離子水(deionized water) 取自 Milli-Q system(Millipore, Bedford, MA, USA)。

5-2-1.2 實驗儀器

如 2-2-1.2 所示。毛細管長 80cm。

5-2-1.3 最佳分析條件

Buffer : 25mM Na_2HPO_4 and 4mM Maleic acid and 5% CH_3CN

Run Time : 7 min

Voltage : 20 KV

Injection mode : 5 sec hydrostatic

Temperature : 24.0-25.0°C

Pre-wash : 0.1N NaOH 3 min , H₂O 3 min , Buffer 3 min

Post-wash : 0.1N NaOH 5 min , H₂O 5 min

Detection wavelength : 254 nm

5-2-1.4 配製標準品溶液及製作檢量線

(1) 內標準品溶液

稱取 265.0 mg 的 benzyltriethylammonium chloride 溶於 25 mL 的水溶液，做為內標準品溶液 (IS)。

(2) 標準品母液。

稱取 sinomenine 5.2 mg，以 70% 甲醇配成 10 mL 標準品母液。

(3) 檢量線

分別取母液 0.4、0.6、0.8、1.0、1.4、1.8 mL 於量瓶中，各加入 0.8 mL 內標準品溶液，以 70% 甲醇水溶液配成 5 mL 標準品溶液。以 5-1-2.1 之最佳分析條件，各濃度重複三次注射，取其平均值製作檢量線。

5-2-1.5 分析條件之適宜性評估

(2) 再現性(Reproducibility)

取母液 1 mL 於量瓶中，加入 0.8 mL 內標準品溶液，以 70% 甲醇溶液稀釋至 5 mL，作為定量之檢液；同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

(3) 回收率(Recovery)

精稱 0.5 克防己粉末，以 10 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取 30 分鐘，重覆三次，將萃取液迴旋濃縮至乾，再以 0.1N HCl 3 mL 溶解，加入 0.4 mL 的標準品母液，再加入內標準品

0.8 mL，以 70% 甲醇稀釋至 5 mL，經 0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

(4) 偵測極限(Detection limit)

逐步稀釋標準品溶液，注入偵測，直到 $\text{signal/noise} = 3/1$ 以下，計算注入量及其濃度。

5-2-1.6 藥材之定量分析

精稱 0.5 克防己粉末，以 10 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取 30 分鐘，重覆三次，將萃取液迴旋濃縮至乾，再以 0.1 N HCl 3 mL 溶解，以 70% 甲醇稀釋至 5 mL，經 0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

5-2-1.7 相關製劑之定量分析

精稱中藥製劑小續命湯 2.0 克，分別以 10 mL 70% 甲醇溶液在室溫下攪拌萃取 30 分鐘，重覆三次，將萃取液迴旋濃縮至乾，再以 0.1N HCl 3 mL 溶解，加入內標準品 0.8 mL，以 70% 甲醇稀釋至 5 mL，經 0.45 μm 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為三次注射之平均分析結果。

5-2-1 結果與討論

5-2-2.1 檢量線之製作

依實驗部分 5-2-1.4 所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值 (y) 與注射濃度 (x, mg/ml) 之關係，作圖得檢量線為：

$$\text{sinomenine} : y = 10.703x - 0.0029 \quad (r = 0.9991)$$

$$\text{線性範圍} : 0.0416 - 0.1872 \text{ mg/mL}$$

5-2-2.2 分析條件之適宜性評估

(2) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注射六次(intraday)及不同天總計重複六次(interday)。分別以峰線面積比值(波峰面積/內標準品面積, Ar, Peak-area ratio)及遷移時間計算其相對標準偏差(RSD)，見表 5-4。

表 5-4 分析條件之再現性評估

化合物	RSD(%)			
	Intraday		Interday	
	Ar	Mt	Ar	t
sinomenine	0.68	0.92	2.38	1.78

(2) 回收率

在已知成分含量的藥材中添加各成分純品，結果如表 5-5。

表 5-5 回收率之測試結果

化合物	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
sinomenine	208	201	96.6

(3) 偵測極限

逐步稀釋標準品溶液，以毛細管電泳偵測，直到 signal/noise=3/1 以下，計算化合物之偵測量在 7.8 (g/mL)。

5-2-2.3 藥材樣品之分析

取防己之樣品，重覆定量三次，求 sinomenine 平均值。定量結果為：75.25 (0.054 mg/g (平均值 (標準差 mg/g ; n=3))。

5-2-2.4 相關製劑之定量分析

取市售製劑小續命湯樣品之萃取液，重覆定量三次，求 sinomenine 平均值(mg/g)(表 5-6)。

表 5-6 含防己製劑其定量結果(mean \pm SD, mg/g, n=3)

方劑名稱	Sinomenine
小續命湯	低於偵測極限*

*量極微，無法計算。

第三節 HPLC 與 CE 之比較

5-3-1 分析時間

以本實驗來看，CE 的分析時間（7 分鐘）較 HPLC（65 分鐘）來的短；雖然 HPLC 定量較為標準，但 CE 分析方法的使用較為省時。

5-3-2 偵測波長與基線穩定性

由於基線的穩定對定量的影響相當大，因此如何避免基線的漂移為分析方法須考量的要素。CE 的緩衝溶液，多為無機鹽類，有機溶劑的添加不如 HPLC 方法中那麼必要，且因無正逆相之差異，有機溶劑的範圍限制更小。

在 HPLC 方法中，甲醇的添加使基線產生漂移的現象。

5-3-3 分析效率

分析效率可由 sinomenine 吸收峰的理论板數顯示，如表 5-7。

表 5-7 sinomenine 吸收峰理論板數

製劑	CE	HPLC
小續命湯	低於偵測極限	低於偵測極限

3-3-4 結論

CE和HPLC同為有效的分析方法，但各有其優缺點，HPLC軟硬體技術以成熟，但耗費成本高，CE的缺點在於：（1）再現性較差；（2）樣品極限濃度較高；（3）梯度沖提方法尚未發展成熟，優點在於：（1）管柱的個別差異較小；（2）分析時間短；（3）分析物範圍較大；（4）分離模式選擇性大；（5）分析成本較低；（6）廢液量少；（7）理論板數較高。結合兩者的優點，中藥分析方法的開發空間，將會更為寬廣。

陸、芍藥湯之定量分析

芍藥湯收載於證治準繩中，等於香連丸、三黃瀉心湯、芍藥甘草湯之合劑。由芍藥、黃芩、大黃、肉桂、甘草、檳榔、木香、當歸及黃連組成[13]。

6-1. 芍藥湯之毛細管電泳分析

6-1-1.1 實驗藥品

Albiflorin (AF)及 paeoniflorin (PAF)，分離自白芍。黃芩的指標成分 wogonin 7-O-glucuronide (WG)，oroxylin A 7-O-glucuronide (OG)，wogonin (W)，和 oroxylin A (O)，分離自黃芩藥材。上述標準品經紅外線光譜儀(IR)、核磁共振儀(¹H-NMR、¹³C-NMR)及質譜儀(Mass)鑑定。Coptisine(COP)，sennoside A(SA)，sennoside B(SB)，和 baicalin (BG)購自 Yoneyama (Osaka,Japan)。Berberine (BER)，palmatine (PAL)及界面活性劑 sodium cholate (SC)及 sodium dodecyl sulfate (SDS) 購自

Sigma (St. Louis, MO, USA)。Glycyrrhizin (GLY) 購自 Kasei (Tokyo, Japan)。Cinnamic acid (CA) 及內標準品 naringin hydrate (IS) 為 Aldrich (Milwaukee, WI, USA) 試藥。硼酸鈉 (sodium borate)，氨水 (ammonia solution, 28%) 為 Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) 試藥。磷酸二氫鈉 (sodium dihydrogenphosphate) 購自 Kanto (Tokyo, Japan)。甲醇 (methanol) 和 氫甲烷 (acetonitrile) 為 LC 級試藥 Mallinckrodt (Paris, KY, USA)。配製樣品及緩衝溶液的去離子水 (deionized water) 係經 Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA) 純化。

6-1-1.2 實驗儀器

毛細管電泳系統：Hewlett Packard (HP3D CE)

酸鹼測定儀 (pH meter)：Suntex SP-2200

離心機：Hettich Universal，其轉盤為 10 ml × 12

6-1-1.3 分析條件

毛細管長度及內徑：110 cm × 75 μm I.D. (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)，至偵測器 101.5 cm。

樣品注射模式：以壓力 50 mbar 注射去離子水 2 秒，緊接著以壓力 50 mbar 注射樣品 2 秒。

操作電壓：20KV (定壓)，由正極到負極。

溫度：25°C

偵測波長：230 nm 及 275 nm。

最佳分析條件：緩衝溶液為 20mM Na₂B₄O₇，40 mM SC，並在每次分析前以 50mbar 注入氫甲烷 15 秒 (為 G-MEKC 技術)，總分析時間為 70 min。

毛細管沖洗模式：每天實驗開始時，以 0.5 M NaOH 5 分鐘，0.1 M NaOH 5 分鐘，去離子水 5 分鐘以及緩衝溶液 5 分鐘沖洗毛細管，並於分析前以 50mbar 壓力注入氫甲烷 15 秒，再進行電泳分離。在每次樣品分析後，沖洗毛細管以 0.1 M NaOH 3 分鐘，去離子水 3 分鐘。

6-1-2 結果與討論

6-1-2-2.1 檢量線

以吸收峰面積與內標準品面積之比值(y) 與注射濃度 (x , mg/ml) 之關係，作圖得檢量線為：

$$\text{COP} : y = 2.1324x + 0.0718 \quad (r = 0.9986)$$

線性範圍：0.033-0.164 mg/ml

$$\text{BER} : y = 3.1453x + 0.3339 \quad (r = 0.9969)$$

線性範圍：0.090-0.904 mg/ml

$$\text{EPI} : y = 0.9995x + 0.0308 \quad (r = 0.9969)$$

線性範圍：0.027-0.272 mg/ml

$$\text{PAL} : y = 0.7986x + 0.0034 \quad (r = 0.9999)$$

線性範圍：0.050-0.504 mg/ml

$$\text{SA} : y = 4.7675x + 0.0057 \quad (r = 0.9992)$$

線性範圍：0.0096-0.0963 mg/ml

$$\text{AF} : y = 9.4841x + 0.0078 \quad (r = 0.9995)$$

線性範圍：0.024-0.240 mg/ml

$$\text{PF} : y = 5.5501x - 0.1022 \quad (r = 0.9971)$$

線性範圍：0.070-0.696 mg/ml

$$\text{O} : y = 20.051x - 0.0052 \quad (r = 0.9999)$$

線性範圍：0.016-0.160 mg/ml

$$\text{W} : y = 11.175x + 0.0166 \quad (r = 1.0000)$$

線性範圍：0.053-0.528 mg/ml

$$\text{SB} : y = 4.3833x + 0.1651 \quad (r = 0.9997)$$

線性範圍：0.0060-0.0620 mg/ml

$$\text{BG} : y = 3.5514x - 0.0057 \quad (r = 0.9979)$$

線性範圍：0.280-2.800 mg/ml

$$\text{OG} : y = 3.9918x + 0.0423 \quad (r = 0.9997)$$

線性範圍：0.035-0.352 mg/ml

$$\text{WG} : y = 2.8816x + 0.0619 \quad (r = 0.9996)$$

線性範圍：0.062-0.624 mg/ml

RH : $y = 2.2344x + 0.1274$ ($r = 0.9976$)

線性範圍 : 0.010-0.096 mg/ml

B : $y = 16.526x - 0.4136$ ($r = 0.9995$)

線性範圍 : 0.039-0.392 mg/ml

GLY : $y = 2.3313x + 0.0941$ ($r = 0.9995$)

線性範圍 : 0.009-0.088 mg/ml

CA : $y = 1.2321x + 0.0439$ ($r = 0.9987$)

線性範圍 : 0.052-0.520mg/ml

6-1-2.3 回收率與再現性

(1) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注射六次(intraday)及不同天總計重複六次(interday)。分別以吸收峰面積及遷移時間計算其相對標準偏差(RSD)，如下表6-1所示:

表6-1 芍藥湯之回收率及再現性評估

表6-1 芍藥湯之回收率及再現性評估

化合物	回收率 (%)	再現性			
		Intraday RSD(%)		Interday RSD(%)	
		相對 面積	遷移 時間	相對 面積	遷移 時間
COP	98.6	1.03	1.35	1.12	1.27
BER	99.8	1.05	1.42	1.14	1.57
EPI	96.7	1.12	1.33	1.23	1.29
PAL	98.3	0.95	1.25	1.05	1.33
SA	98.1	0.98	1.02	1.04	1.14
AF	101.2	1.56	1.63	1.75	1.88
PF	100.8	1.63	1.74	1.88	1.95
O	99.2	1.02	1.15	1.23	1.34
W	99.6	1.13	1.22	1.25	1.48
SB	98.3	0.99	1.03	1.19	1.28
BG	97.9	1.15	1.21	1.21	1.39
OG	96.8	1.63	1.89	1.94	2.03
WG	95.6	1.22	1.36	1.53	1.57
RH	95.1	1.89	1.96	1.97	2.13
B	98.6	0.96	1.03	1.21	1.25
GLY	96.1	1.56	1.67	1.85	1.96
CA	95.8	1.75	1.88	1.95	2.11

一般而言，再現性(RSD%)只要小於2，就屬再現性良好之實驗，此次實驗中，由表6-1中數據可看出下列趨勢：

(A) 面積的再現性比遷移時間的再現性還好，因為實驗運用了g-MEKC的技術，在電泳分離時，易因第一第二分析緩衝溶液的擴散，造成EOF時間的些微移動，進而使各成份的遷移時間有所變動，故影響再現性。

- (B) 依照往常的實驗，intra-day 的再現性多比 inter-day 要佳，但在此次實驗中，因 g-MEKC 技術的運用，兩種緩衝溶液的混合結果不易預知，intra-day 的再現性與 inter-day 所差無幾，每次分析結果與前次分析結果皆稍有出入，與實驗是否是當天內進行關係不大。
- (C) 因分析時間長達 70 分鐘，毛細管內的緩衝溶液，易因焦耳熱及與毛細管的吸附而改變黏度，造成分析時間超過 50 分鐘後，即出現基線不穩、雜訊過多、或是吸收峰過關的現象；因此，50 分鐘後的 B、GLY、CA 之 RSD(%) 皆大於 2，再現性較差。

(2) 回收率

在已知成分含量的方劑中添加各成分純品，結果如表 6-1。除了 EPI、OG、WG、RH、GLY 和 CA 之外，各成分回收率均在 97% 以上；由於 EPI 和 RH 為各成分中，拖尾現象較為明顯的吸收峰，因此在積分方面，較容易造成計算的誤差，OG 及 WG 解析度為 1.85，兩個吸收峰很接近，一添加純品則易有重疊現象，不易判別。至於，GLY 及 CA 則因分析時間較長，基線不穩，容易造成積分的誤差。

6-1-2.3 製劑樣品之分析

取芍藥湯之樣品三份，各重覆定量三次，求各成分平均值。定量結果為：COP，1.206 (0.031；BER，5.751 (0.318；EPI，1.199 (0.186；PAL，3.297 (0.419；SA，0.284 (0.139；AF，1.217 (0.124；PF，4.803 (0.419；O，0.157 (0.130；W，0.346 (0.128；SB，0.392 (0.08；BG，5.822 (0.521；OG，2.418 (0.334；WG，3.284 (0.355；RH，0.672 (0.135；B，1.362 (0.214；GLY，0.487 (0.206；CA，0.983 (0.152 mg/g (mean (SD，n=3)。

6-2. 芍藥湯之高效液相層析

6-2-1 實驗部份

6-2-1.1 實驗藥品

Gallic acid (GA) 及 benzoic acid (BA) 購自 Merck (Darmstadt, Germany)。Pentagalloylglucose (PG)、benzoylalbiflorin (BAF) 和 oxypaeoniflorin (OPF)，分離自白芍。Aleo-emodin (AEM) 及 emodin (EM) 購自 Yoneyama (Osaka Japan)。Columbamine (COL) 及 jatrorrhizin (JAR) 分離自黃連根條。磷酸二氫鉀 (potassium dihydrogenphosphate) 購自 Kanto (Tokyo, Japan)。內標準品 naringin hydrate 為 Aldrich (Milwaukee, WIS, USA) 試藥。甲醇 (methanol) 和 氫甲烷 (acetonitrile) 為 LC 級試藥 Mallinckrodt (Paris, KY, USA)。配製樣品及流動相的去離子水 (deionized water) 取自 Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA)。

6-2-1.2 實驗儀器

泵：Shimadzu LC-10AD 兩個

注射器：Rheodyne Type 7125 (20 l loop)

流動相控制器：Shimadzu CBM-10A communication bus module

偵測器：Shimadzu SPD-M10A photodiode array detector

資料處理器：Shimadzu CLASS-LC10

宏碁 486 DX2-66 電腦

酸鹼測定儀 (pH meter)：Suntex SP-2200

離心機：Hettich Universal，其轉盤為 10 ml×12

6-2-1.3 分析條件

前置管柱：Nova-Pak silica (Millipore, Milford, MA, USA)

分離管柱：Cosmosil 5C18-MS, 5 m, 25cm×4.6mm (Nacalai tesque, Kyoto, Japan)

流動相：(A) 30mM 之磷酸二氫鉀，以 0.01% 磷酸調至 pH=3.25

(B) H₂O/CH₃CN = 20/80 (V/V)

梯度沖提程式：

表 6-2 芍藥湯分析方法之梯度沖提程式

時間(min)	流速 (ml/min)	A%	B%	Curve
initial	0.9	95	5	
5	0.9	78	22	linear
18	0.9	75	25	linear
25	0.9	70	30	linear
35	0.9	65	35	linear
40	0.9	60	40	linear
45	0.9	45	55	linear
55	0.9	40	60	linear
60	0.9	0	100	linear
70	0.9	0	100	linear

分析時間：70 分鐘。

偵測波長：

230 nm (定量 GA, SB, PF, FA, BA, IS, COL, COP, JAR, EPI, PAL, BER, CA, BAF, RH, EM)

275 nm (定量 OPF, AF, SA, PG, BG, B, OG, WG, GLY, AEM, W, O)

6-2-2.1 檢量線

以吸收峰面積與內標準品面積之比值(y) 與各成分濃度 (x, mg/ml) 之關係，作圖得檢量線為：

$$\text{GA} : y = 9.1241x - 0.0213 \quad (r = 0.9996)$$

線性範圍：0.0045-0.0456 mg/ml

OPF : $y = 5.1437 x + 0.0362$ ($r = 0.9999$)
線性範圍 : 0.0061-0.0608 mg/ml

AF : $y = 3.6992 x - 0.0087$ ($r = 0.9998$)
線性範圍 : 0.0062-0.0624 mg/ml

SB : $y = 7.1245 x + 0.0034$ ($r = 0.9999$)
線性範圍 : 0.0062-0.0624 mg/ml

PF : $y = 5.1275 x + 0.0047$ ($r = 0.9997$)
線性範圍 : 0.0696-0.6961 mg/ml

FA : $y = 4.2263x - 0.0175$ ($r = 0.9996$)
線性範圍 : 0.0150-0.1496 mg/ml

SA : $y = 9.6451x - 0.0242$ ($r = 0.9996$)
線性範圍 : 0.0098-0.0984 mg/ml

PG : $y = 10.143 x + 0.0432$ ($r = 0.9999$)
線性範圍 : 0.0121-0.1208 mg/ml

BA : $y = 19.799 x + 0.0245$ ($r = 1.0000$)
線性範圍 : 0.0054-0.0544mg/ml

BG : $y = 25.1170 x - 0.0171$ ($r = 0.9997$)
線性範圍 : 0.0522-0.5224 mg/ml

COL : $y = 12.7710x - 0.0237$ ($r = 0.9999$)
線性範圍 : 0.0058-0.0576 mg/ml

COP : $y = 13.9270 x + 0.0163$ ($r = 0.9997$)
線性範圍 : 0.0082-0.0824 mg/ml

JAR : $y = 9.0626 x - 0.0169$ ($r = 0.9998$)
線性範圍 : 0.0134-0.1344 mg/ml

EPI : $y = 7.0464 x + 0.0284$ ($r = 0.9996$)
線性範圍 : 0.0100-0.1000 mg/ml

OG : $y = 23.2920 x - 0.0236$ ($r = 0.9998$)
線性範圍 : 0.0161-0.1608 mg/ml

WG : $y = 13.6480 x + 0.0091$ ($r = 0.9997$)
線性範圍 : 0.0362-0.3624 mg/ml

PAL : $y = 26.6780 x + 0.0239$ ($r = 0.9998$)

線性範圍：0.0050-0.0504 mg/ml
BER : $y = 13.4610x - 0.0221$ ($r = 0.9999$)
 線性範圍：0.0405-0.4048 mg/ml
CA : $y = 16.5470x - 0.0151$ ($r = 0.9998$)
 線性範圍：0.0086-0.0864 mg/ml
BAF : $y = 8.8741x - 0.0111$ ($r = 0.9997$)
 線性範圍：0.0071-0.0712 mg/ml
GLY : $y = 11.4460x + 0.0191$ ($r = 0.9999$)
 線性範圍：0.0101-0.1008 mg/ml
B : $y = 38.8510x + 0.0861$ ($r = 0.9998$)
 線性範圍：0.0110-0.1104 mg/ml
RH : $y = 12.7780x + 0.0165$ ($r = 0.9999$)
 線性範圍：0.0085-0.0848 mg/ml
AEM : $y = 23.6430x - 0.0652$ ($r = 0.9997$)
 線性範圍：0.0083-0.0832 mg/ml
W : $y = 46.7620x + 0.0065$ ($r = 0.9998$)
 線性範圍：0.0086-0.0856 mg/ml
O : $y = 37.6770x - 0.0223$ ($r = 1.0000$)
 線性範圍：0.0084-0.0841 mg/ml
EM : $y = 12.8720x - 0.0121$ ($r = 0.9998$)
 線性範圍：0.0084-0.0841 mg/ml

6-2-2.2 回收率及再現性

(1) 再現性

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注射六次(intraday)及不同天總計重複六次(interday)。分別以吸收峰面積及遷移時間計算其相對標準偏差(RSD, %)，見表 6-3。GA 帶有一個羧基及三個羥基，對微量酸鹼值誤差最為敏感，因此 RSD 值偏高。PG 共含五個醣基，易因酸鹼值或溫度等控制變因的誤差而造成結構的改變，且因其吸收峰較寬，因此滯留時間變動較大，RSD 值較高。

在此分析條件中，黃連生物鹼的解析度皆於1.61-2.32之間，分離狀況尚可接受。但因COL、COP、JAR、EPI吸收峰較寬，進行再現性實驗時，易因管柱成份殘留或其他變因些微誤差，造成四個吸收峰之再現性不佳。

(2) 回收率

在已知成分含量的芍藥湯製劑粉末中添加各成分純品，結果如表 6-3。各成分回收率在95.3-103.1% 之間。

(3) 偵測極限

逐步稀釋標準品溶液，注入偵測，直到 signal/noise = 3/1 以下；本分析方法的偵測極限，見表 6-4。樣品注入量為 10.0 μl ，而 flow cell = 10 mm。

表 6-3 芍藥湯分析條件之回收率及再現性評估

化合物	回收率 (%)	再現性			
		Intraday RSD(%)		Interday RSD(%)	
		面積	遷移 時間	面積	遷移 時間
GA	98.6	1.82	1.85	2.53	2.45
OPF	99.2	0.81	0.73	1.98	0.89
AF	100.3	1.32	1.31	1.18	1.46
SB	100.9	2.23	1.81	2.32	2.07
PF	101.6	1.56	1.58	2.08	1.67
FA	98.1	1.42	1.24	2.15	1.86
SA	97.7	1.82	1.67	2.23	1.95
PG	98.4	2.32	1.74	2.43	2.15
BA	95.3	1.64	1.27	1.83	1.72
BG	99.7	1.18	0.87	1.51	1.45
COL	97.8	2.43	2.01	2.65	2.18
COP	102.3	2.22	1.92	2.98	2.45
JAR	98.5	2.62	2.37	3.56	2.52

EPI	98.3	2.28	1.84	2.42	1.95
OG	100.1	0.94	0.61	1.25	1.14
WG	97.1	0.22	0.64	0.74	0.78
PAL	98.3	1.52	1.18	1.64	1.43
BER	99.6	1.14	0.85	1.78	1.23
CA	101.5	1.45	1.26	2.62	1.85
BAF	103.1	0.38	0.84	0.76	0.92
GLY	99.2	1.38	1.23	2.31	1.74
B	97.2	1.24	1.16	1.93	1.38
RH	96.5	1.12	0.86	1.91	1.63
AEM	97.1	1.83	1.26	2.58	2.07
W	99.1	1.33	1.88	1.65	1.24
O	102.5	1.37	1.93	1.66	2.27
EM	102.9	1.36	1.25	2.52	2.19

表6-4 芍藥湯指標成分之偵測極限 (S/N=3)

偵測 極限	GA	OPF	AF	SB	PF	FA	SA	PG	BA	BG
ng	1.14	1.56	2.18	0.95	2.21	0.36	1.02	2.36	2.01	1.81
μg/ml	0.11	0.16	0.22	0.10	0.22	0.04	0.10	0.24	0.20	0.18
	COL	COP	JAR	EPI	OG	WG	PAL	BER	CA	
ng	1.88	1.64	1.82	1.58	1.36	1.78	1.36	1.26	0.63	
μg/ml	0.19	0.16	0.18	0.16	0.14	0.18	0.14	0.13	0.06	

	BAF	GLY	B	RH	W	O	EM
ng	2.85	1.21	0.95	1.21	0.59	0.82	0.93
$\mu\text{g/ml}$	0.29	0.12	0.10	0.12	0.06	0.08	0.09

6-2-2.3 製劑藥品之分析

取芍藥湯之樣品三份，各重覆定量三次，求各成分平均值。定量結果為：GA，0.51 (0.02)；OPF，0.46 (0.04)；AF，1.36 (0.21)；SB，0.36 (0.02)；PF，4.67 (0.31)；FA，0.52 (0.05)；SA，0.28 (0.03)；PG，1.88 (0.08)；BA，0.32 (0.02)；BG，6.14 (0.35)；COL，0.36 (0.14)；COP，1.19 (0.16)；JAR，0.45 (0.14)；EPI，1.13 (0.12)；OG，2.36 (0.22)；PAL，0.27 (0.03)；WG，3.28 (0.25)；BER，5.66 (0.24)；CA，0.25 (0.03)；BAF，0.21 (0.02)；GLY，0.44 (0.02)；B，1.34 (0.17)；RH，0.68 (0.05)；AEM，0.38 (0.03)；W，0.35 (0.04)；O，0.28 (0.03)；EM，0.27 (0.02) mg/g (平均值 (標準差，mg/g；n=3))。

柒、參考文獻

- [1] 劉接寶、洪禎徽，《彩色中藥大典》，56-59頁，益大書局出版社，臺北，1988。
- [2] 鹿野美弘，Shoyakugaku Zasshi，42 (4) (1987)282。
- [3] 黃明星，國立台灣師範大學化學研究所碩士論文，臺北，1991。
- [4] 小泉榮次郎，“和漢藥考”，p.492，古亭書局，台北 (1969)。
- [5] 張鴻銘，張蘭昌，“中藥大辭典”，p.89，昭人出版社，台北 (1980)。
- [6] 陳存仁，“中國醫學大辭典”，p.578，世界書局，台北

(1979)。

- [7] 柯逢時，艾晟，“經史証類大觀本草”，p.361，正言出版社，台南（1977）。
- [8] Y. Asahina, J.pharm.Soc.Japan, 503, 1 (1924); Chem Abstr. 18, 1667 (1924).
- [9] Y. Asahina and T.Ohta, J. Pharm. Soc. Japan 530, 293 (1926) ; Chem. Abstr. 21, 2134 (1927).
- [10] 中國生草藥研究發展中心：現代本草中國醫藥學，pp.1051-1055，啟業書局，台北（1974）
- [11] 顏焜熒：常用中藥之藥理，II, p.6, 國立中國醫藥研究所，台北（1970）
- [12] 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌，《簡明藥材學》，541-542頁，新醫藥出版社，臺北，1985。
- [13] 許鴻源、許照信，《常用漢方劑圖解》，331-337頁，新醫藥出版社，臺北，1985。

捌、綜合結論與建議

1. 三年計畫執行結果顯示，將HPLC與CE技術應用於中藥分析，各有優劣點，兩儀器搭配使用，對中藥製劑定量的實施有利。
2. HPLC軟硬體技術發展成熟，為中藥分析的主流儀器，尤其是用於全譜圖（定性分析）及非離子型指標成分的定量更適當。
3. 用HPLC分析離子型指標成分，通常需要加入鹽類以配置高離子強度的緩衝溶液，加入配對離子(counter ion)以形成離子對。但該等化合物除對管柱的壽命有很大影響外，要達成系統平衡，還須用較長的時間及較嚴苛的條件，是用HPLC分析中藥的不利處。
4. CE一般理論板數高，分析時間短，解析度佳，檢液及緩衝溶液用量少，是CE用於中藥分析的優異點。

5. 非離子型指標成分經用MEKC才能分析，一般而言，這類化合物用CE分析遠劣於HPLC。
6. 離子型指標成分，諸如本計劃執行的bernerine, ephedrine, sinomenine, guanosine及dehydroevodiamine則以CZE分析為佳。建議中藥日常大量分析含這些成分的製劑時，可用CE分析。

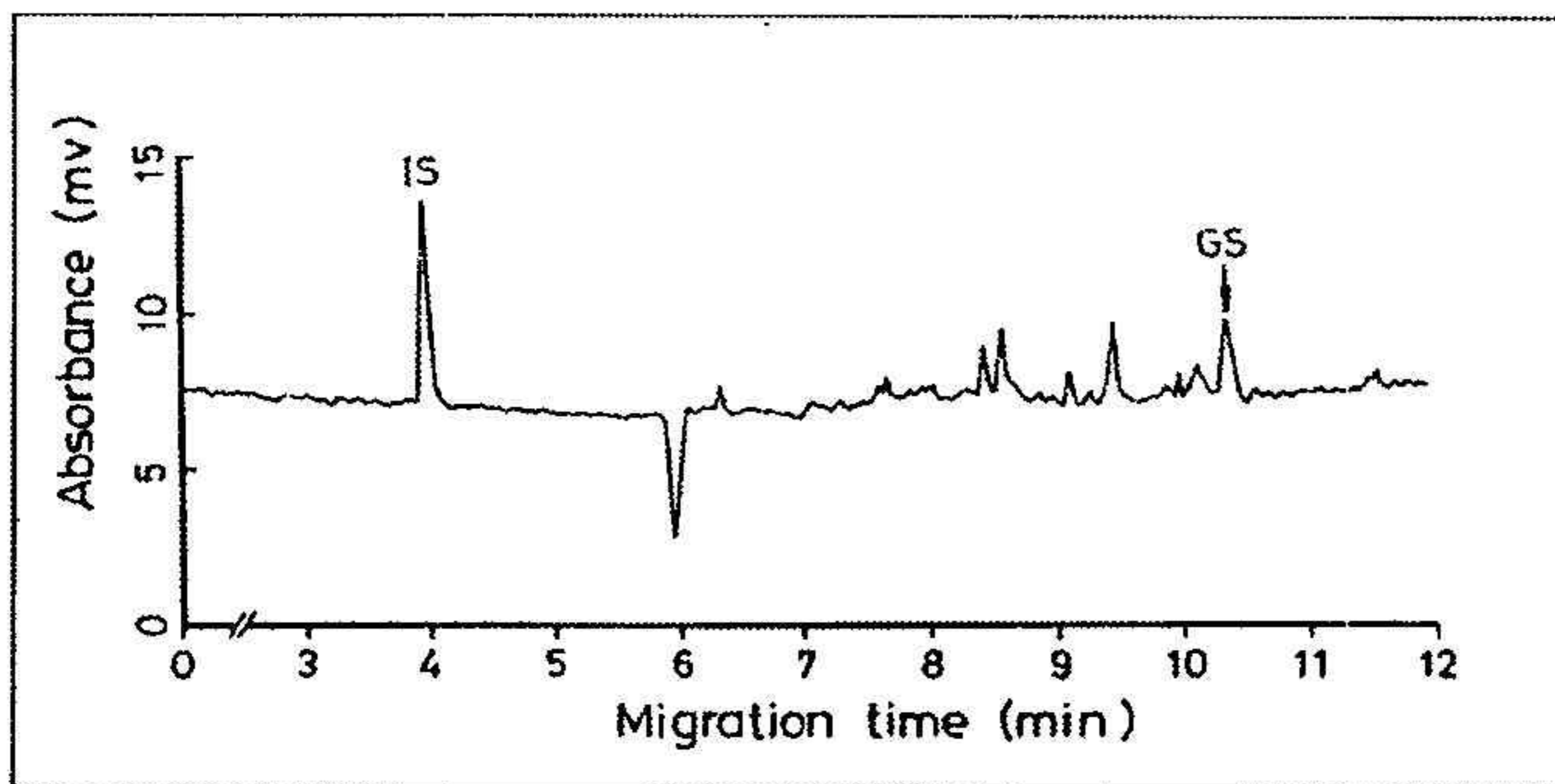


圖 1 市售養心湯之電泳圖譜

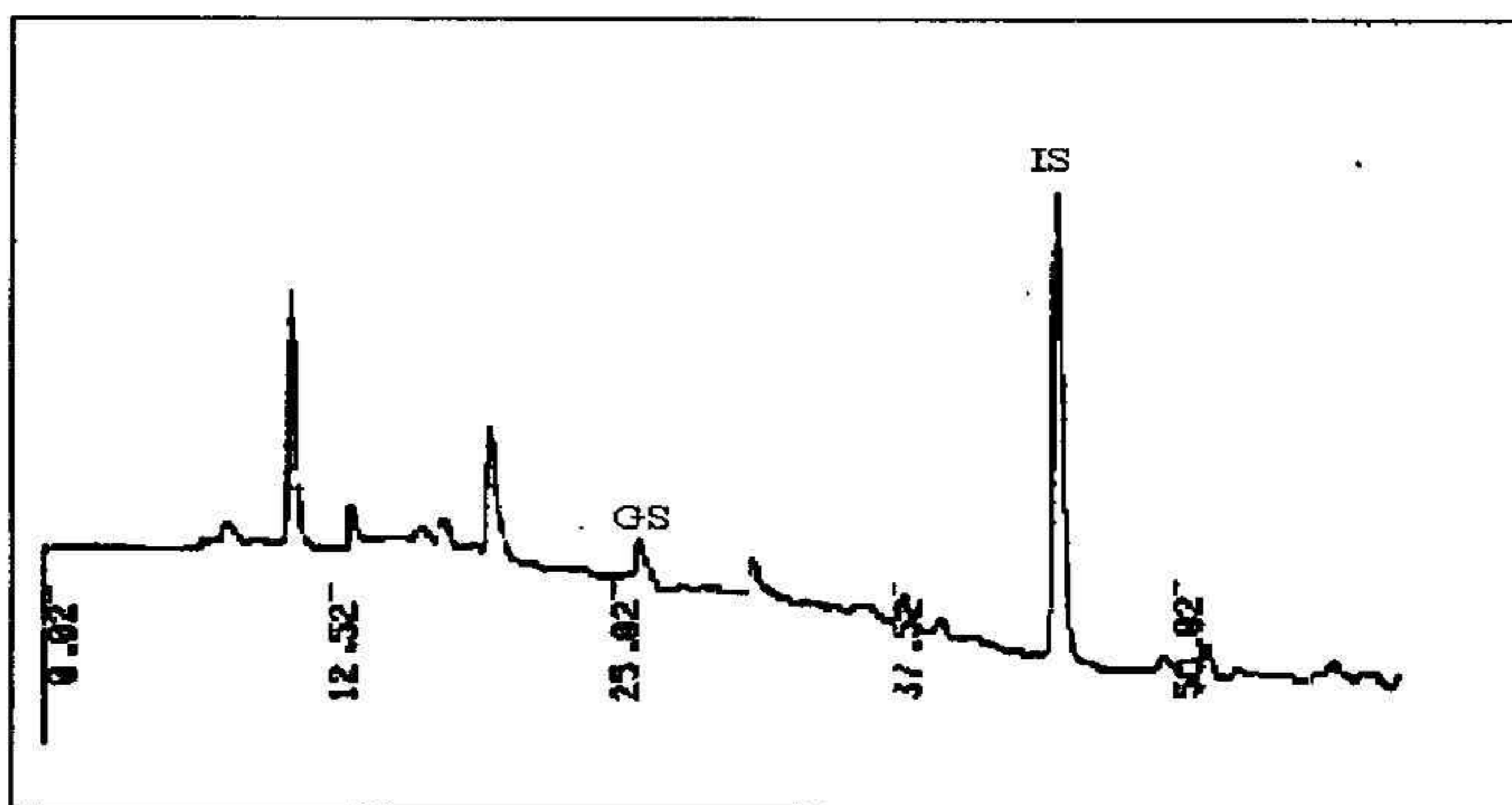


圖 2 養心湯之HPLC層析圖

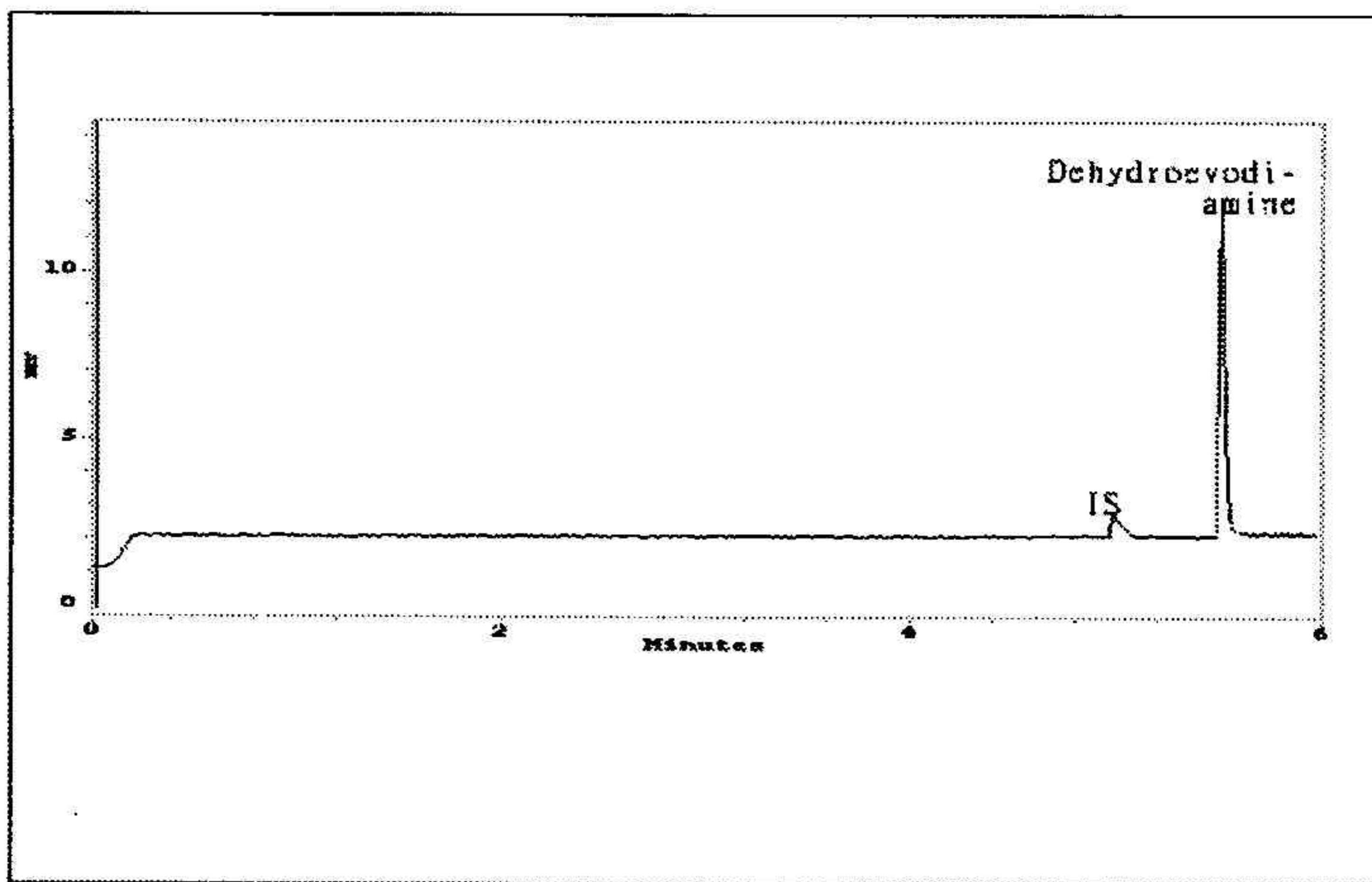


圖 3 吳茱萸湯之CE層析圖

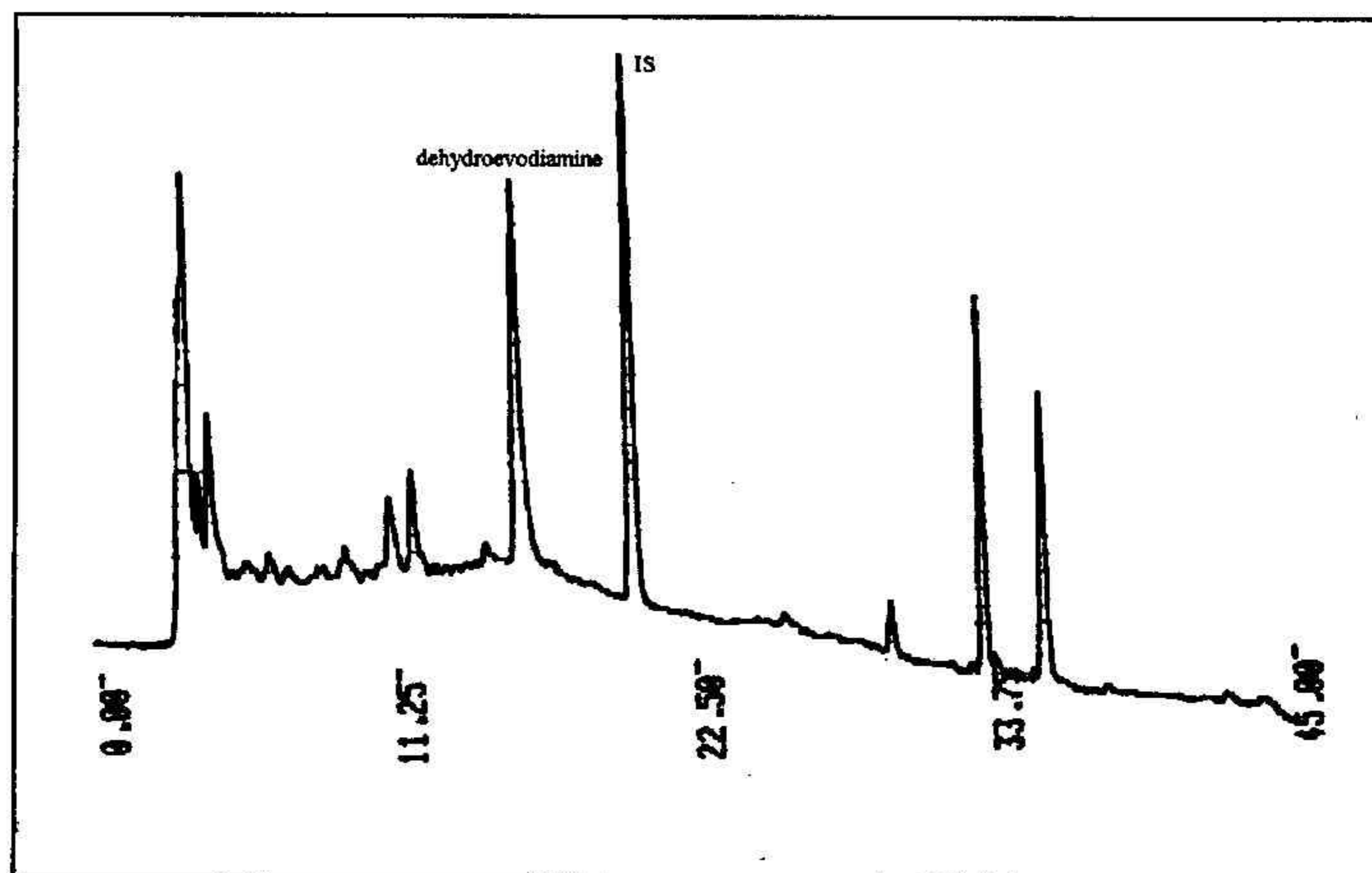


圖 4 吳茱萸湯之HPLC層析圖

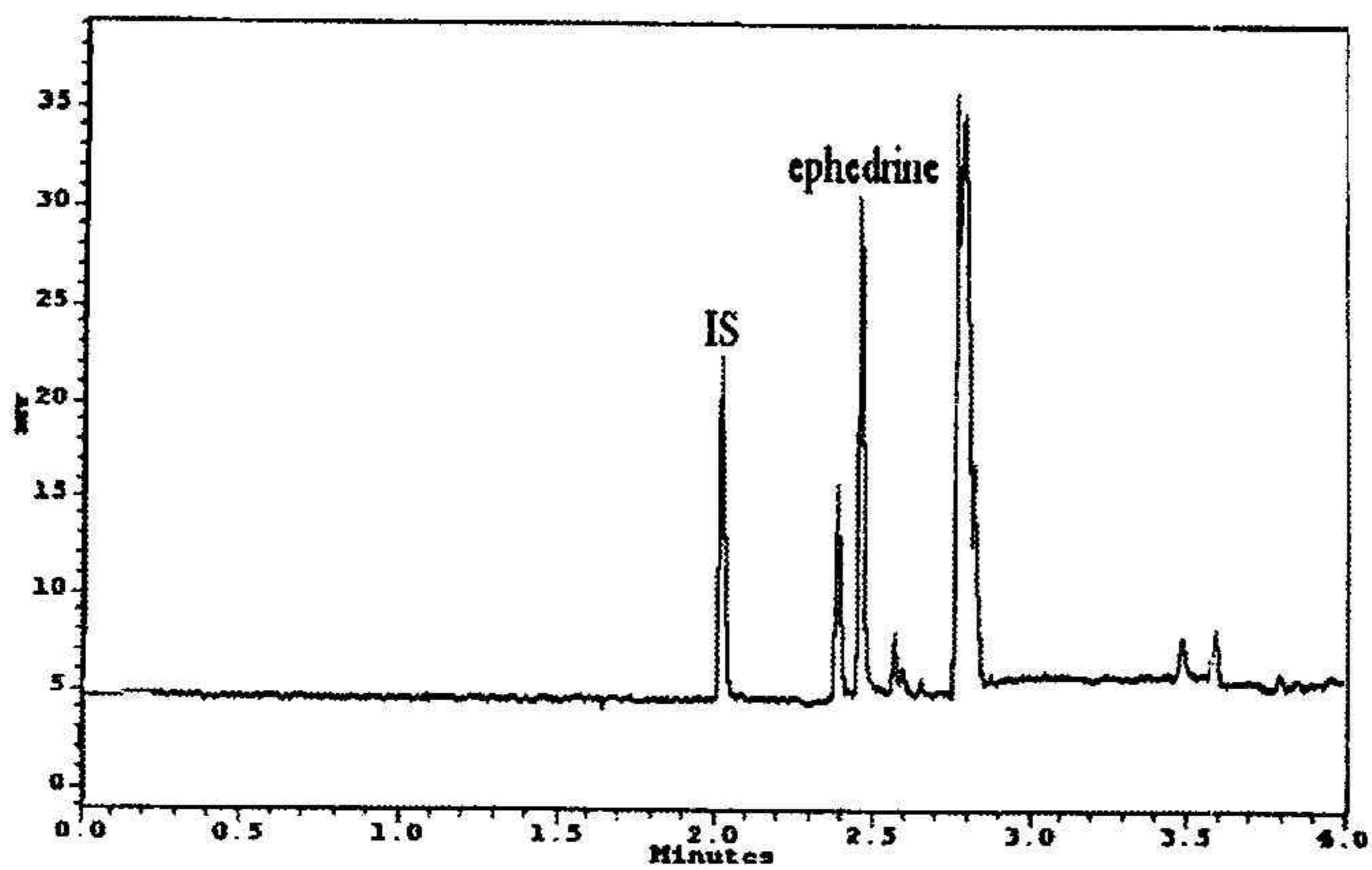


圖 5 麻杏甘石湯之CE層析圖

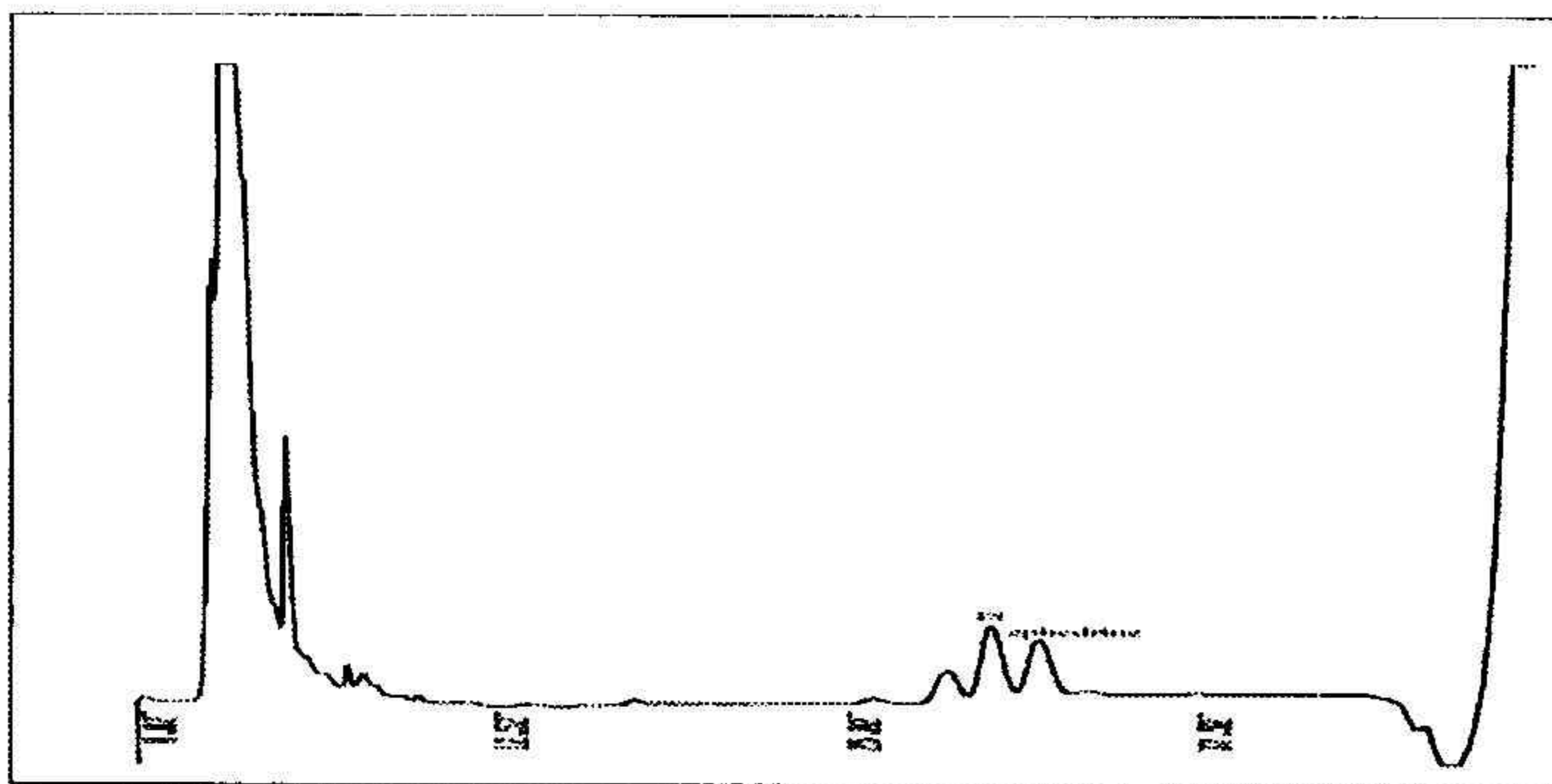


圖 6 麻杏甘石湯之HPLC層析圖

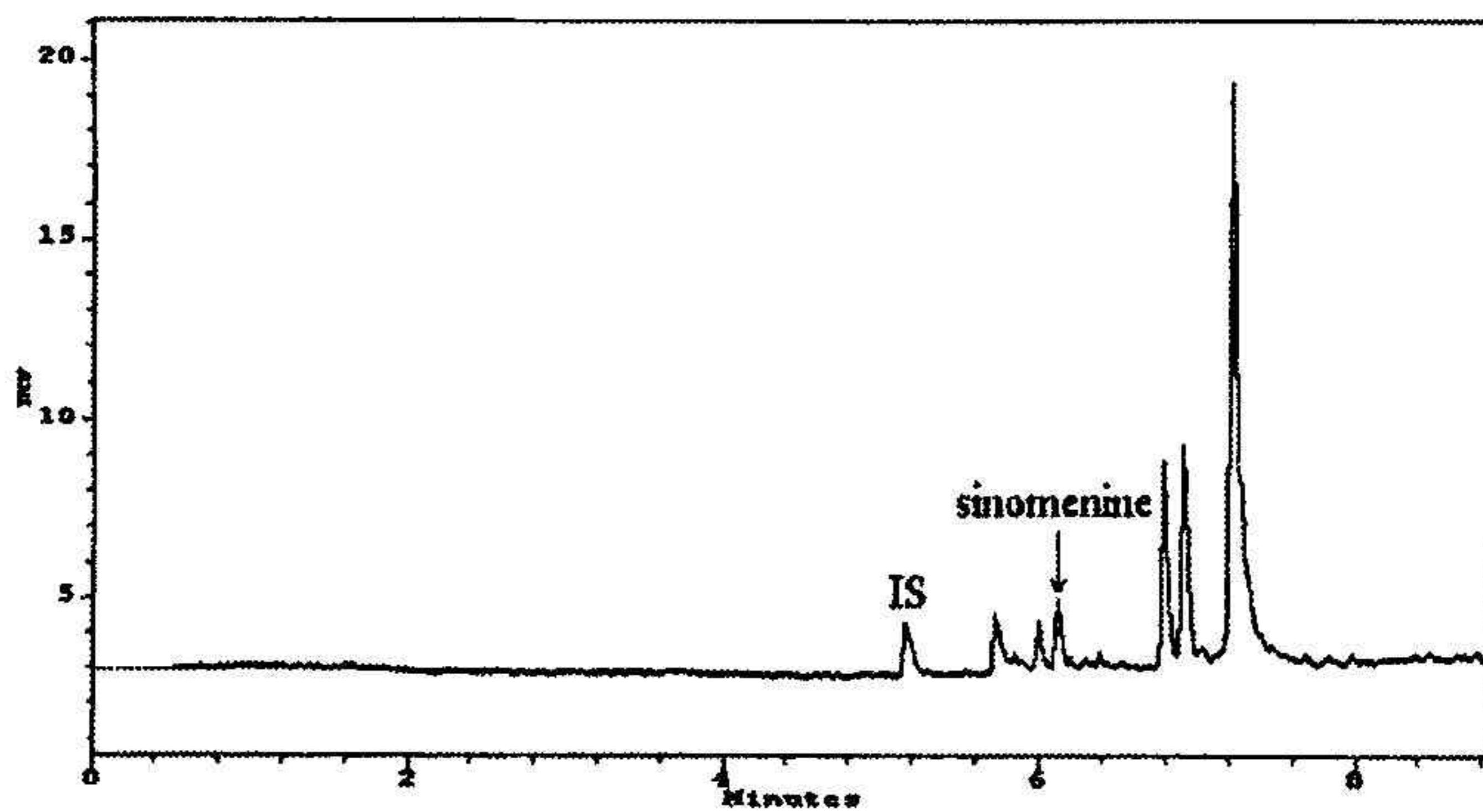


圖 7 防己之CE層析圖

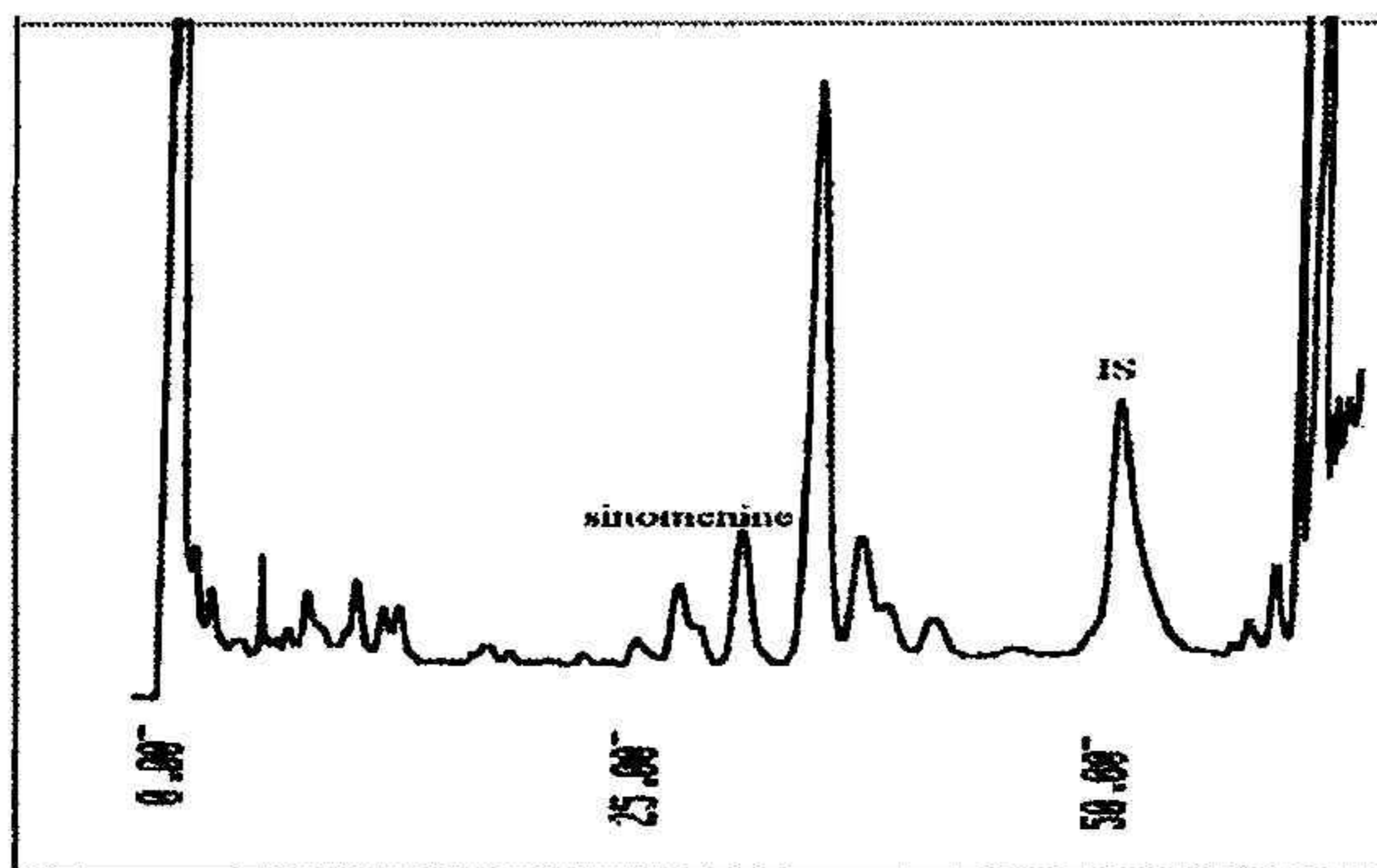


圖 8 防己之HPLC層析圖

