

利用毛細管電泳定量中藥製劑成分（二）

國立台灣師範大學

許順吉

摘 要

毛細管電泳(CE)是最近新發展出來的分析工具，具有高效、快速、選擇性佳的特性。為解決高效能液相層析(HPLC)在中藥高極性成分分析上的困難，本研究乃以毛細管電泳技術定量含黃連黃柏的中藥製劑，並用毛細管電泳及高效液相層析儀分析疏肝湯，效果良好。

用 50% 的 0.2M 醋酸鈉溶液和 50% 的氘甲烷可在八分鐘內分別分析二十三種含黃連黃柏製劑之 coptisine、berberine 和 palmatine，其回收率在 98.0-101.9% 之間，相對標準偏差是 0.96-1.50% (intraday) 和 2.22-2.68% (interday)。

由於毛細管電泳的高選擇性，藉著使用三種不同的分析條件可以分析出疏肝湯中的十八個化合物。在 MECC 中可同時分析 paeoniflorine, benzoic acid, neohesperidin, hesperidin, naringin, ligustilide, butylidenephthalide, umbelliferone；在 CZE 中分析 dehydroevodiamine, coptisine, berberine, epiberberine, columbamine, jatrorrhizine, palmatine；而以逆電滲流毛細管區帶電泳(reversed electroosmotic CZE)分析 nicotinic acid, caffeic acid 和 ferulic acid 三個成分。其分析時間分別為 MECC：40 分鐘；standard CZE：30 分鐘；reversed EOF CZE：11 分鐘。

利用分析吳茱萸黃連藥對之醋酸/醋酸鈉沖提系統，及新開發的磷酸/磷酸鉀沖提系統來分析此方劑，高效能液相層析儀共計可定量疏肝湯中二十四個成分，分析時間前者為 60 分鐘後者為 100 分鐘。

關鍵詞：毛細管電泳、高效液相層析、中藥製劑、疏肝湯

ABSTRACT

Capillary electrophoresis (CE) is a recently developed analytical instrument which possess the features of high efficiency, short analysis time and high selectivity. In order to overcome the difficulties of HPLC in analyzing high polar components of Chinese herbal drug, the techniques of capillary electrophoresis have been applied to accomplish the determination of berberine in 23 Chinese herbal preparations. The contents of components in Shu-kan-tang has also been determined by CE and HPLC.

A buffer solution of 0.2M sodium acetate solution-acetonitrile (1:1) was used to determine the contents of coptisine, berberine and palmatine in 23 Coptidis Rhizoma-and/or Phellodendri Cortex-containing Chinese medicinal preparations within 8 min. The recoveries of these three alkaloids were 98.0-101.9%. The relative standard deviations were 0.96-1.50% (intraday) and 2.22-2.68% (interday).

Eighteen components in Shu-kan-tang were separated by combining three different analytical methods. The MECC method was applied to analyze paeoniflorine, benzoic acid, neoheperidin, hesperidin, naringin, ligustilide, butylidenephthalide and umbelliferone in 40 min; CZE technique was used to determine coptisine, dehydroevodiamine, berberine, epiberberine, columbamine, jatrorrhizine, palmatine in coptis in 30 min; and reversed EOF CZE was used to analyzed nicotinic acid, caffeic acid and ferulic acid in 11 min.

Meanwhile, 13 compounds of its 24 components can be determined by the method for analyzing coptis-evodia herb couple, and 18 compounds of its 24 components can be assayed by a LC method using gradient solvent system that contained phosphate buffer. The running times were 60 min for the former and 100 mi. for the latter.

Keywords: capillary electrophoresis, high-performance liquid chromatography, Chinese herbal preparations, Shu-kan-tang.

第一章 含黃連黃柏製劑之定量研究

第一節 緒言

黃連、黃柏為常用中藥，有清熱燥濕、瀉火解毒功效[1、2]。黃連主要含有 coptisine, berberine 和 palmatine [3]，而黃柏不含 coptisine，主要含有 berberine 和 palmatine [4]。它們單獨或合併與其他藥材配合煎煮，構成多種重要的補養、表裡、和解、理血、瀉火和收澀製劑 [5]。目前評估含黃連和/或黃柏製劑品質的最好方法，是用高效能液相層析儀 (HPLC) 測定 coptisine, berberine 或 palmatine 之含量[6]。然而，由於中藥製劑的成分複雜，用 HPLC 分析時間過長（約30分鐘），生物鹼類的吸收信號易受干擾，且三成分中通常只能測定出一個成分的含量，另外，分析管柱極易受到污染，非常不易清洗。針對這些缺點，我們嘗試利用 CE 新方法以改進之。

第二節 實驗部份

I-2-1 藥品與儀器

(1) 實驗試藥

Berberine chloride 為美國 Sigma 試藥，coptisinechloride 為日本 Nacalai 試藥，醋酸鈉為日本 Osaka 試藥，Palmatine 自黃連分離得到[4]，Methyltriphenyl-phosphonium iodide 由 triphenyl phosphine 和 methyl iodide 反應得到 [7]。甲醇和氬甲烷都是 HPLC 級溶劑。含黃連和/或黃柏製劑購自台北中藥行。

(2) 實驗儀器

毛細管電泳系統：Waters Quanta 4000

毛細管：80 cm x 75 μ m I.D. uncoated

偵測器：on-line UV detector at 254 nm

數據處理：訊華 CHEM 軟體

I-2-2 分析條件

Buffer：50% 的氬甲烷和 50% 的 0.2 M 醋酸鈉溶液

Voltage：25 KV

Injection mode：10 sec hydrostatic (10cm)

Run time：8 min

Temperature：24.5-25.0°C

I-2-3 配製標準溶液及製作檢量線

稱取 51.7 mg berberine chloride、20.4 mg palmatine iodide 和 8.9 mg coptisine chloride，以 70 % 甲醇配成 50ml，為標準溶液。其濃度分

別為：berberine, 800 ug/ml, palmatine, 300ug/ml, coptisine, 160ug/ml。取0.6g之methyltriphenylphosphonium iodide 以70% 甲醇配成 100ml, 作為內標準品溶液, 其濃度為 6.0 mg/ml。分別取標準溶液0.2, 0.5, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0, 8.0ml, 各加入1.0ml 內標準品溶液, 以 70% 甲醇配成10ml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-2-4 含黃連和/或黃柏製劑之萃取液配製及定量

購買 12 種含黃連製劑, 5 種含黃柏製劑及 6 種含黃連黃柏製劑, 各稱取 0.500g, 各以 3ml 70% 甲醇室溫攪拌 30 分鐘, 萃取 3 次, 濾液加入 1.0ml 內標準品溶液, 以 70% 甲醇配成10ml 檢液, 經 0.45um過濾器過濾後, 直接以毛細管電泳定量。

I-2-5 配製測定回收率之溶液

將 0.160 mg coptisine、0.800mg berberine 和0.300 mg palmatine, 0.400mg coptisine、2.00mg berberine 和 0.750mg palmatine 分別加入0.5g 之黃連解毒湯和紫陷湯中, 計算回收率。

第三節 結果與討論

I-3-1 分析條件之探討

在分析黃連和黃柏藥材時, 發現醋酸鈉溶液和有機溶劑 (甲醇或氬甲烷) 之混合液對四級銨生物鹼 (就黃連而言, 它們是coptisine、berberine、epiberberine、palmatine、columbamine、berberastine、jatrorrhizine 和 magnoflorine; 對黃柏而言, 它們是berberine、palmatine、jatrorrhizine、magnoflorine 和 phellodendrine) 有很好的分離效果。然而, 在測定一些含黃連和/或黃柏製劑後, 發現檢液中存在的主要吸收峰是 coptisine、berberine 和palmatine。事實上, 這三個化合物之一是現在以 HPLC 方法評估含黃連和/或黃柏製劑品質的指標物[6]。因此, 有必要去找一個更簡單的方法, 它雖然只可將coptisine、berberine和palmatine分好, 但可縮短分析時間, 並能應用於許多不同的製劑。

從四級銨生物鹼的分析中得知, 羧基離子對生物鹼中帶正電的氮是很好的配對離子, 而有機溶劑 (甲醇或氬甲烷) 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 (或氬甲烷) 來配緩衝溶液。經一系列實驗後發現 50% 的 0.2M 醋酸鈉溶液和 50% 的氬甲烷配成之緩衝溶液能在八分鐘內將coptisine、berberine和palmatine 分離得很好。用較低濃度 (0.1M) 的醋酸鈉溶液, 吸收峰有重疊的現象, 而較低濃度 (40%、30%、20% 和10%) 的氬甲烷, 分離效果不佳。在本實驗中, 氬甲烷的效果要比甲醇好。

所以本實驗之緩衝溶液是選擇 50% 的 0.2M 醋酸鈉溶液和 50% 的氬甲烷。圖 I-1 是此條件下之電泳圖譜, 顯示 coptisine、berberine 和

palmatine 之分離

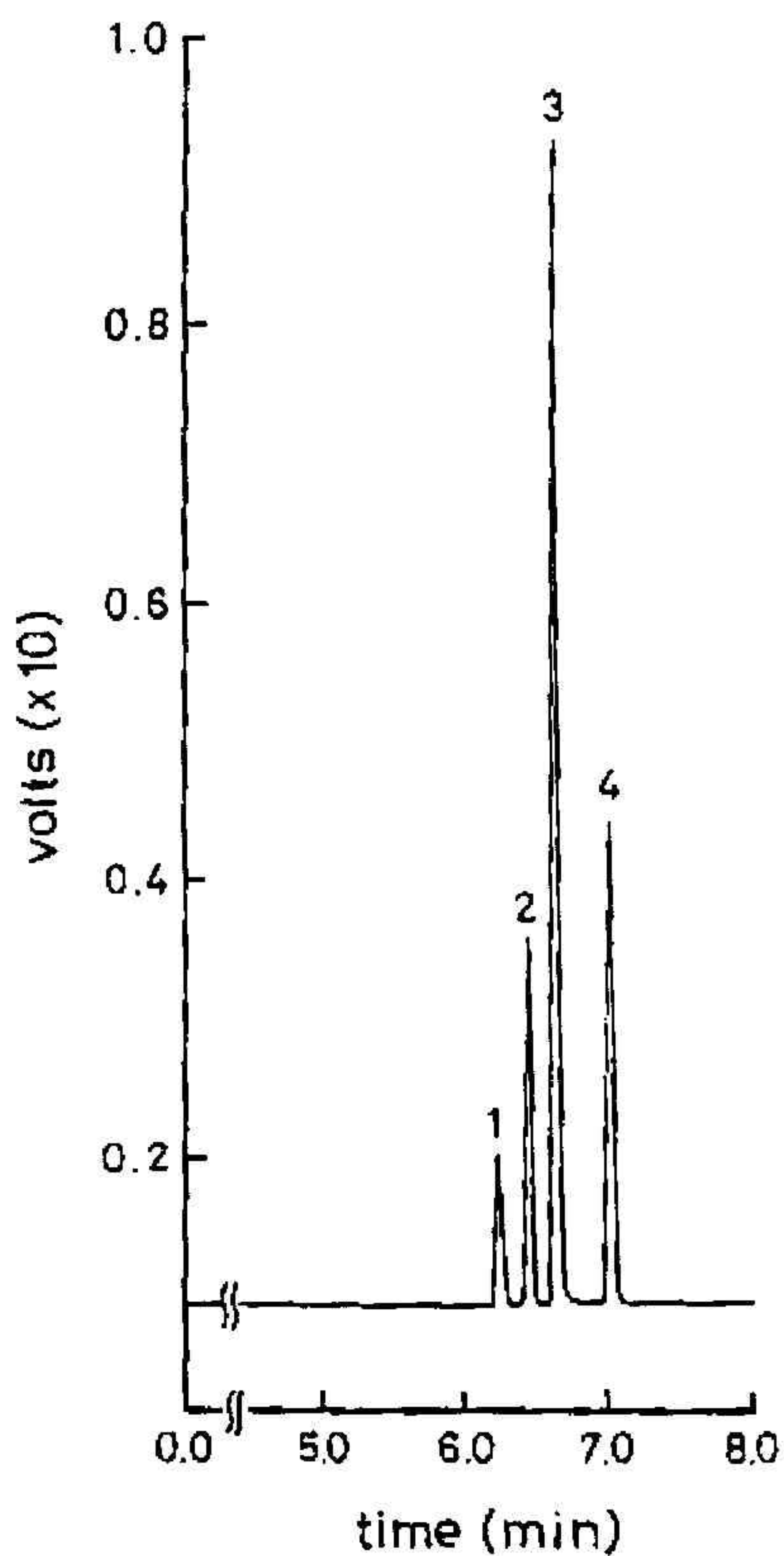
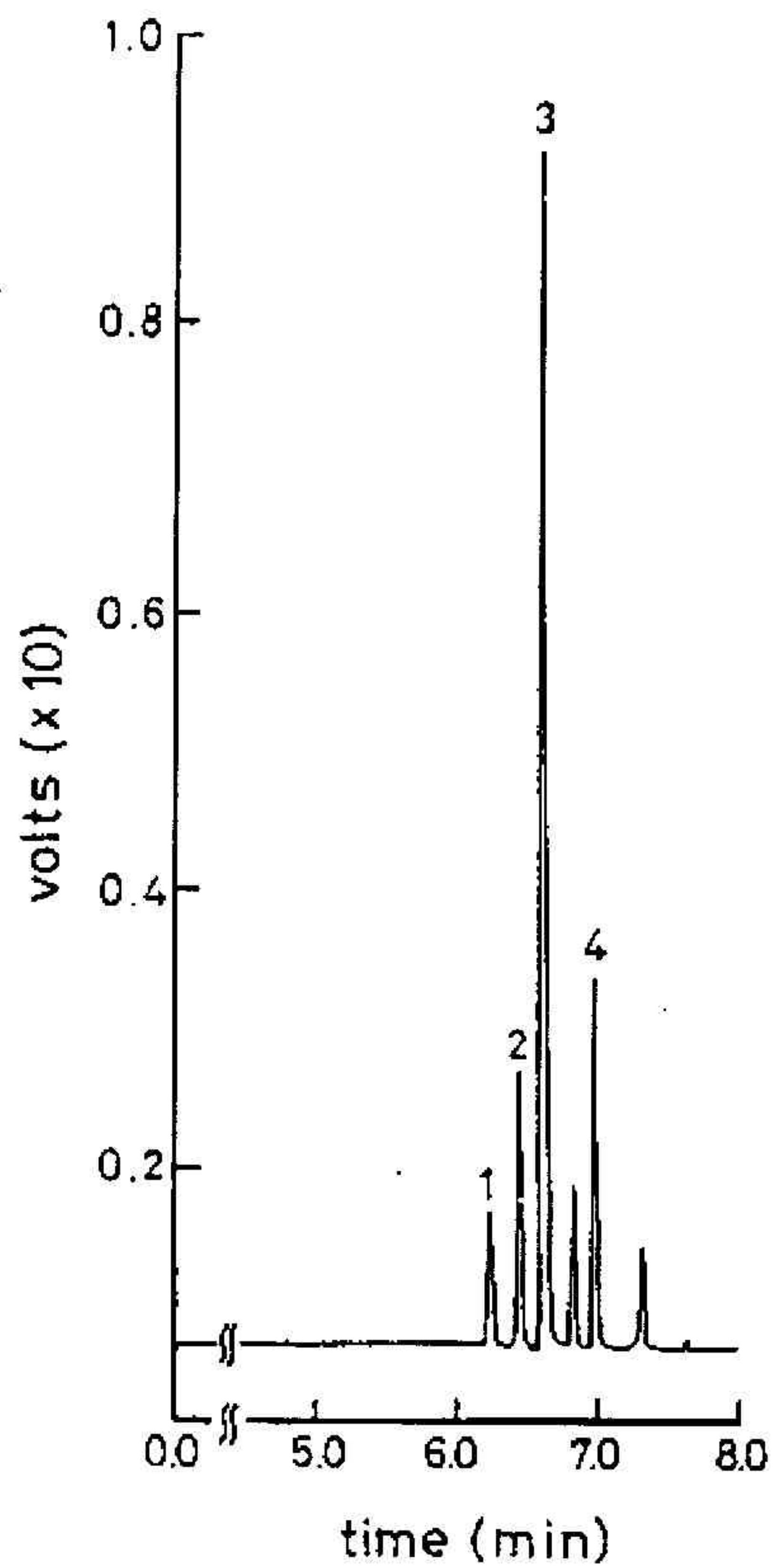
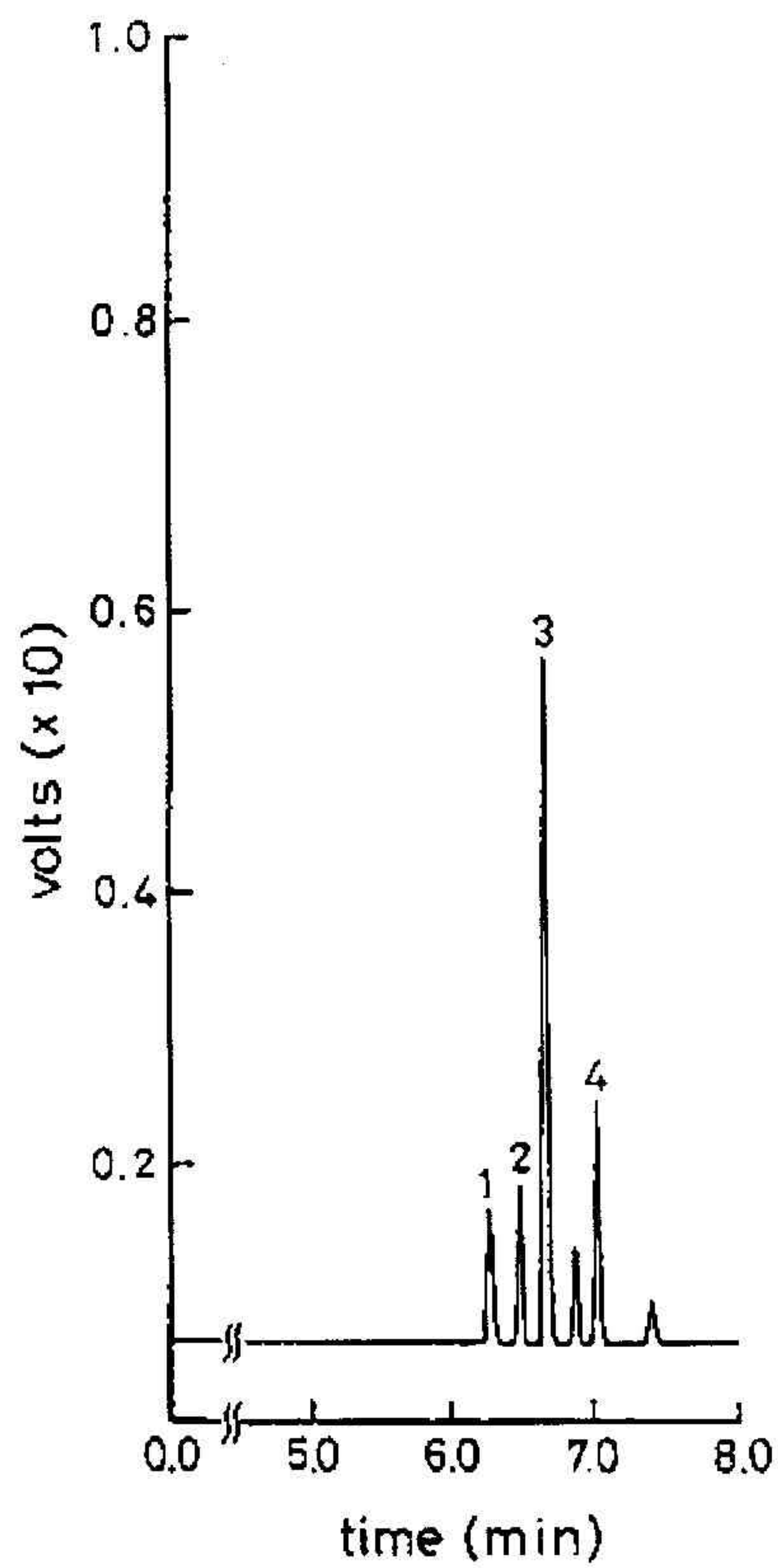


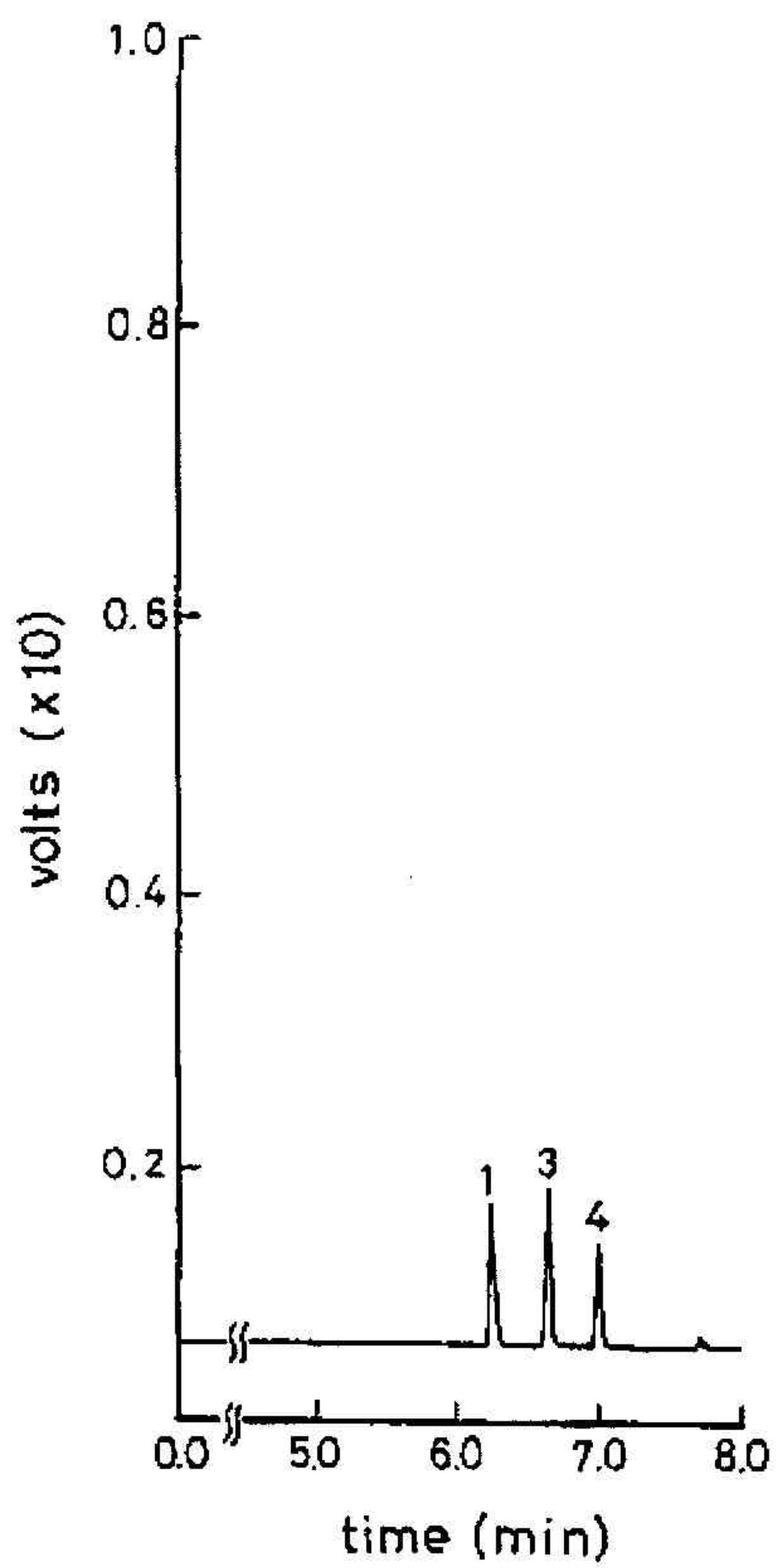
圖 I-1 Coptisine、berberine 和 palmatine 混合物之電泳圖
譜。1: 內標準品(methyltriphenylphosphonium iodide), 0.600mg/ml;
2: coptisine, 0.048mg/ml; 3 ; berberine, 0.240 mg/ml; 4:
palmatine, 0.090mg/ml。



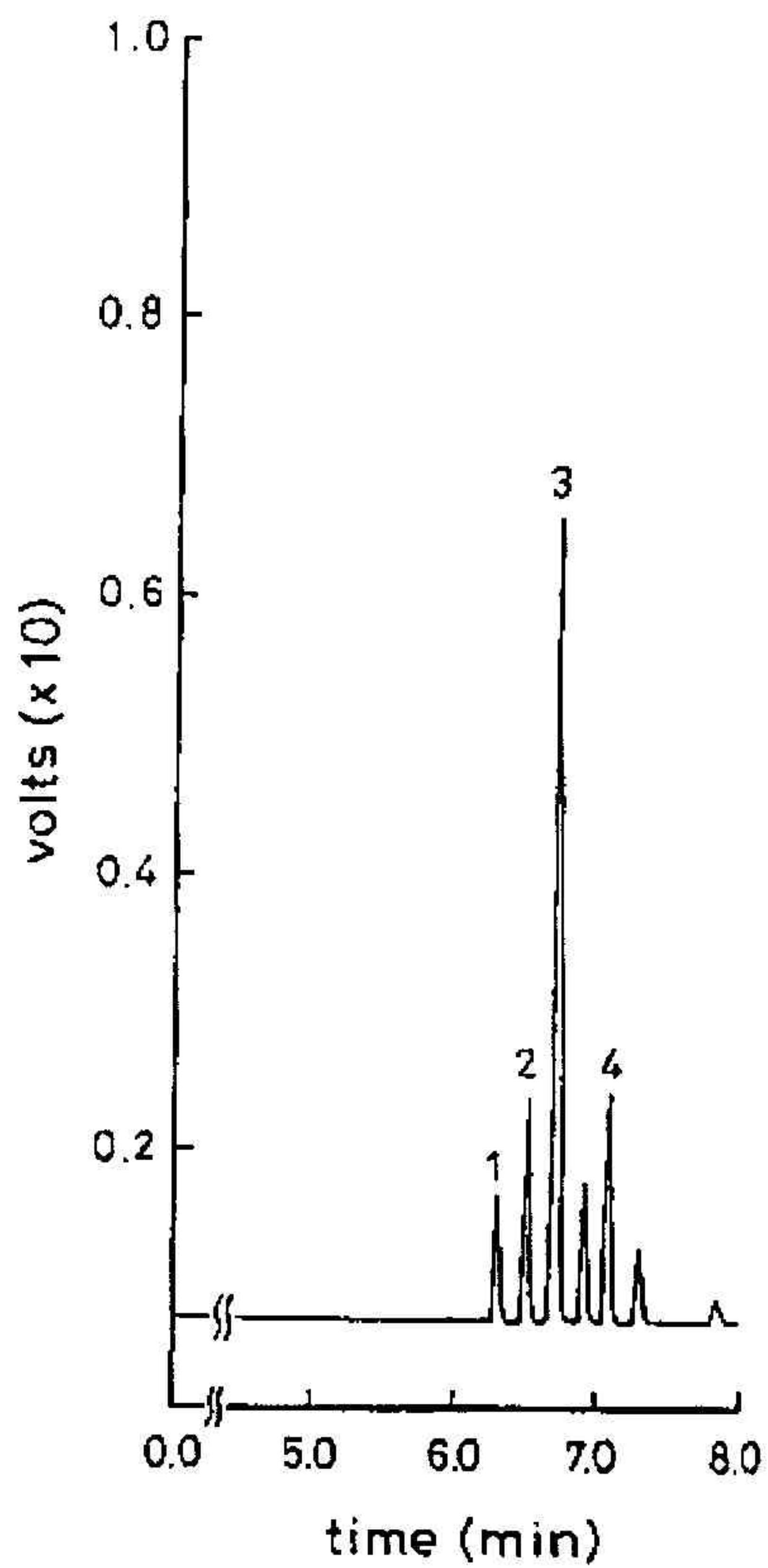
圖I-2 黃連湯之電泳圖譜。化合物代號同圖I-1。



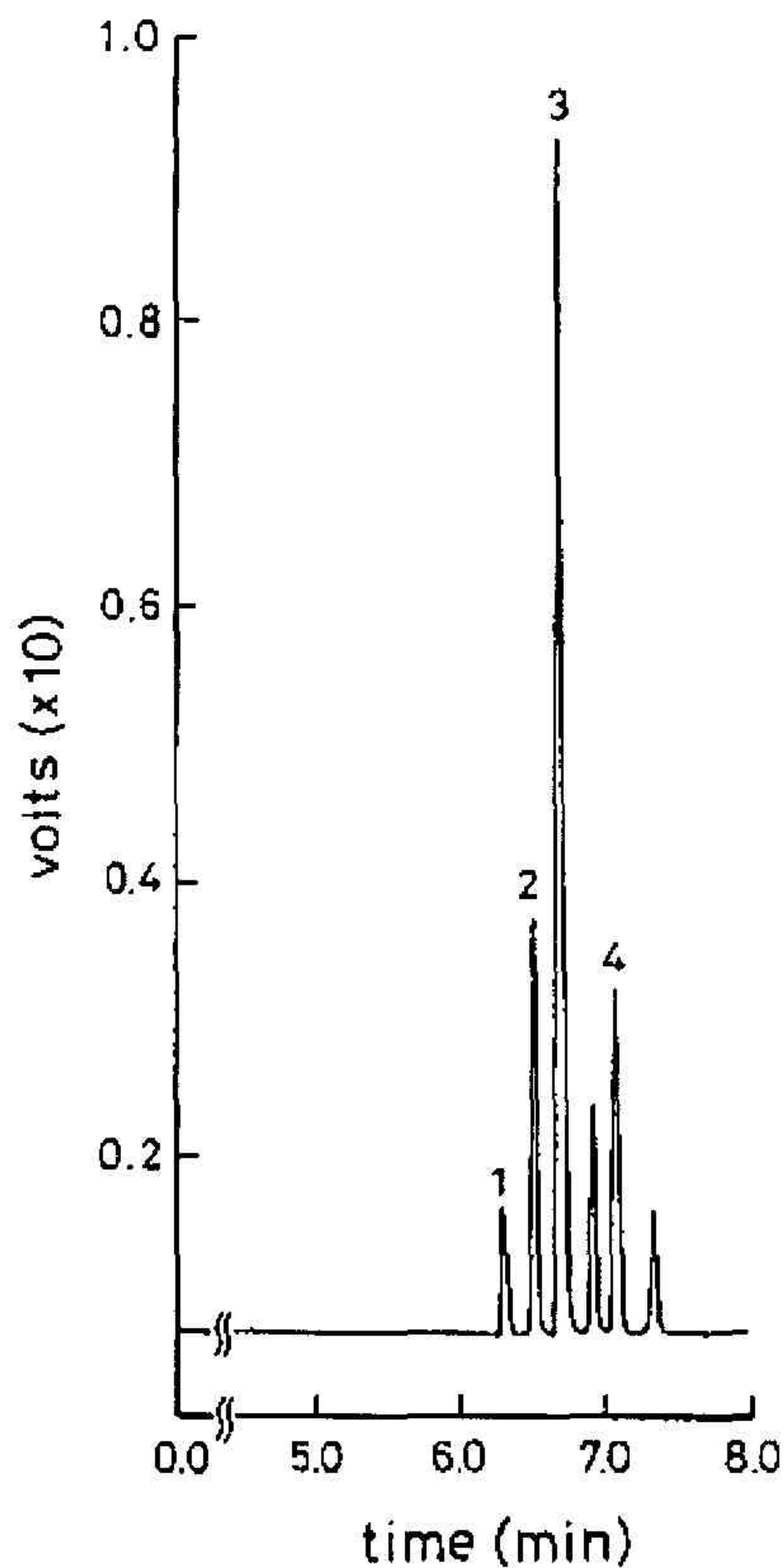
圖I-3 普濟消毒飲之電泳圖譜。化合物代號同圖 I-1。



圖I-4 益氣聰明湯之電泳圖譜。化合物代號同圖I-1。



圖I-5 柴胡清肝湯之電泳圖譜。化合物代號同圖I-1。



圖I-6 治濁固本丸之電泳圖譜。化合物代號同圖I-1。

情形良好。其移動時間分別為；內標準品，6.2分；coptisine，6.4分；berberine，6.6分；palmatine，7.0分。各吸收峰之理論板數在 14—21 萬間。當以製劑之甲醇/水萃取液直接分析時，不論是含黃連製劑（如圖I-2、圖I-3）、含黃柏製劑（如圖I-4）或含黃連黃柏製劑（如圖I-5、圖I-6），結果都和純品一樣的好，每支吸收峰都無干擾，表示此條件相當理想。

I-3-2 檢量線之製作

1. 如前實驗部分 I-2-3 所述，將配製好之標準樣品溶液注入毛細管電泳分析。其中 coptisine 所用之濃度分別為 3.2, 8, 16, 48, 112, 128 ug/ml，以所得之面積與內標準品之被峰面積之比值對濃度 (ug/ml) 作圖，可得 coptisine 之檢量線為 $y=0.0308x+0.005$ ($r=0.9998$)

2. 如前實驗部分 I-2-3 所述。其中 berberine 所用之濃度分別為 16, 40, 80, 240, 400, 560, 640 ug/ml 以所得之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 $y=0.032x-0.031$ ($r=0.9999$)。

3. 如前實驗部分 I-2-3 所述。其中 palmatine 所用之濃度分別為 6, 15, 30, 90, 150, 210, 240 ug/ml，以所得之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 $y=0.0334x-0.004$ ($r=0.9999$)。

I-3-3 系統適用性測試

本方法之再現性(相對標準偏差)，以黃連湯萃取液六次重覆性分析之峰線而積比值計算，對 coptisine 為 0.96% (intra-day) 和 2.56% (inter-day)，對 berberine 為 1.50% (intra-day) 和 2.68% (inter-day)，對 palmatine 為 1.12% (intra-day) 和 2.22% (inter-day)。Coptisine、berberine 和 palmatine 標準品對不同製劑添加，以測定回收率，結果如表 I-1 所示。Coptisine 之回收率是 98.1-101.9%，berberine 之回收率是 98.0-100.4%，而 palmatine 之回收率是 99.7-101.0%。所有這四支峰線(內標準品、coptisine、berberine 和 palmatine) 之拖尾係數都非常接近壹。

表I-1 不同製劑之coptisine、berberine和palmatine回收率

製劑	生物鹼	加入量(μg)	測定量(μg)	回收率(%)
黃連解毒湯	coptisine	157	98.1	
		400	405	101.3
	berberine	798	99.8	
		2000	1959	98.0
	palmatine	303	101.0	
		750	748	99.7
柴陷湯	coptisine	163	101.9	
		400	401	100.3
	berberine	802	100.3	
		2000	2007	100.4
	palmatine	299	99.7	
		750	755	100.7

I-3-4 製劑中 coptisine、berberine 和 palmatine 之定量

12種含黃連製劑、5種含黃柏製劑和6種含黃連黃柏製劑之萃取液，在選定之條件下，經毛細管電泳分析後，計算 coptisine、berberine 和 palmatine 之含量，結果如表I-2、表I-3和表I-4所示。從個別黃連黃柏藥材分析，可推知這些製劑所選用的黃連藥材是屬川連或雅連，為黃連品質中較優者，而黃柏藥材則是屬川黃柏或關黃柏，為黃柏品種中較差者。中藥方劑中常有黃連黃柏併用的情形，因為兩者皆以 berberine 為最高含量的組成成分，而黃連之生物鹼又遠高於黃柏，因此現在有關的品質評價方法並無法分辨是否確已添加黃柏。已知黃連的 coptisine 含量大多低於 palmatine，而黃柏則只有 palmatine 不含 coptisine，因此從兩者的比例或可看出其差異。表I-2和表I-4數據顯示，只含黃連的方劑，coptisine 大多低於 palmatine，而同時加入黃連黃柏者，則 palmatine 多於 coptisine。此似乎可作為推斷方劑中是否同時含有黃連、黃柏，或是只有黃連存在的參考。

從 23 個 CE 圖中可看出，不同製劑萃取物之欲測波峰都不受干擾，顯示本毛細管電泳方法非常適於含黃連和黃柏製劑中 coptisine、berberine 和 palmatine 之定量。再者，本分析方法不需前處理，可自動送樣，而且能在十分鐘之內，以完全洗淨之毛細管柱，作下一個注射分析。所以，它更適於大量樣品和藥物品質管制之用。

表 I-2 含黃連製劑中coptisine、berberine和palmatine之含量 (mg/g)

樣品含量	coptisine	berberine	palmatine	總量
1. 柴陷湯	0.71	2.45	0.80	3.96
2. 清胃散	0.90	3.43	1.02	5.35
3. 清咽利膈湯	0.52	2.18	0.58	3.28
4. 黃連湯	1.81	6.52	1.69	10.02
5. 葛根黃連黃芩湯	2.84	8.80	2.77	14.41
6. 半夏瀉心湯	0.56	1.84	0.41	2.81
7. 半夏六君子湯	1.32	4.10	1.17	6.59
8. 普濟消毒飲	0.95	3.60	1.06	5.61
9. 三黃瀉心湯	2.21	8.99	3.06	14.26
10. 芍藥湯	0.81	3.57	0.95	5.33
11. 天王補心丹	0.61	2.19	0.62	3.42
12. 滋腎明目湯	0.85	3.15	0.80	4.80

表 I-3 含黃柏製劑中 berberine和palmatine之含量 (mg/g)

樣品含量	berberine	palamatine	總量
13. 知檠八味丸	0.42	0.24	0.66
14. 益氣聰明湯	0.61	0.35	0.96
15. 敗毒散	0.25	0.15	0.40
16. 半夏白朮天麻湯	0.25	0.11	0.36
17. 滋陰降火湯	0.51	0.24	0.75

表 I-4 含黃連黃柏製劑中 coptisine、berberine 和 palmatine 之含量 (mg/g)

樣品含量	coptisine	berberine	palmatine	總量
18. 柴胡清肝湯	0.62	2.92	0.91	4.45
19. 治濁固本丸	1.03	5.51	1.43	7.97
20. 黃連解毒湯	1.44	3.38	2.19	7.01
21. 白頭翁湯	4.42	17.79	5.30	27.51
22. 三黃石膏湯	1.32	4.16	1.34	6.82
23. 溫清飲	0.85	3.39	0.86	5.10

上述部分方劑之berberin成分確認，曾經由仔細比對基準方的檢液與相對應空白液圖譜手續。

第二章 應用毛細管電泳於中藥製劑疏肝湯之定量研究

第一節 緒言

疏肝湯收載於萬病回春之膏痛門，適用於左脅腹痛、肋間神經痛、跌打脅痛、胰臟炎等症狀。本方當歸、芍藥補血；桃仁、紅花逐瘀血，枳殼、青皮破氣，黃連清涼心熱，吳茱萸散寒止痛[8]。

處方

柴胡5.0	當歸5.0	桃仁 3.0
芍藥3.0	青皮3.0	川芎 3.0
枳殼2.0	黃連1.0	紅花 1.0
吳茱萸 0.5		

各藥材之主要成分歸納如下：

柴胡：saikosaponin a, b, c, d

當歸、川芎：ligustilide, n-butylidenephthalide, umbelliferone
n-butylphthalide, ferulic acid, nicotinic acid, caffeic acid

桃仁：amygdalin

芍藥：paeoniflorie, gallic acid, benzoic acid

青皮、枳殼：neohesperidin, hesperidin, naringin

黃連：coptisine, berberine, epiberberine, palmatine, columbamine, jatrorrhizine

紅花：safflor yellow

吳茱萸：dehydroevodiamine, evodiamine, rutaecarpine

至目前為止，本實驗室利用MECC方法已成功分離三黃瀉心湯[9]、小承氣湯[9]、乙字湯[10]及芍藥湯[11]等方劑。本研究修正了黃連吳茱萸藥對的MECC條件而成功的分離出含此藥對成分的疏肝湯中八個已知成分－芍藥的 paeoniflorine (1)，benzoic acid(7)，青皮、枳殼的neohesperidin (2)， hesperidin(3)，naringin(4)，當歸、川芎的ligustilide (5)，butylidenephthalide (6)，當歸的 umbelliferone (8)及陳皮的兩未知成分-X 和Y，配合藥封的CZE條件來分離疏肝湯中七個四級銨鹽生物鹼成分－吳茱萸的dehydroevodimine(10)，黃連的coptisine(9)，berberine(11)，epiberberine(12)，columbamine(13)，jatrorrhizine(14)，palmatine (15)。

本實驗室曾經以逆電滲流毛細管區帶電泳(reversed electroosmotic CZE)成功的分離八個aromatic acid[12]，經由此條件的運作則可同時分析疏肝湯中的 nicotinic acid(16)，caffeic acid (17)和 ferulic acid (18)等三個成分。本研究藉由這三種不同的 CE 條件，能夠分

析出疏肝湯中的十八個成分的含量，進而評估此分析方法之適宜性。

第二節 實驗部份

II-2-1 實驗儀器

(1)毛細管電泳系統: Spectra Phoresis 1000

毛細管: (1)MECC、standard CZE 90cm X 75um ID. uncoated

(2)reversed EOF CZE:70cm X 75um ID. uncoated

數據處理: Spectra Phoresis 1000

II-2-2 分析條件

II-2-2.1 MECC

Buffer: 70mM SDS 及12mM Na₂B₄O₇ 的緩衝溶液和20% 的CH₃CN
及20% 的CH₃OH(60:20:20, V/V/V)

Run time: 40 min

Voltage: 30 kV

Injection mode: 9 sec hydrostatic

Temperature: 30.0 °C

Post-wash:buffer 5 min, 0.5N NaOH 5 min, 0.1 N NaOH 5 min及
H₂O 5 min Detection wavelength: 220 nm

II-2-2.2 CZE

II-2-2.2(a) standard CZE

Buffer: 90%的50mM maleic acid及40mM NaH₂PO₄緩衝溶液
10%CH₃CN

Run Time: 30.0 min

Voltage: 25 kV

Injection mode: 9 sec hydrostatic

Temperature: 30.0 °C

Post-wash: 0.1N NaOH 5 min, H₂O 5 min

Detection wavelength: 255 nm

II-2-2.2(b) reversed EOF CZE

Buffer: 10mM LTAC、2mM NaH₂PO₄及8mM Na₂B₄O₇、緩衝溶
30%CH₃CN

Runtime: 11 min

Voltage: 30kV

Injection mode: 9 sec hydrostatic

Temperatuure: 30.0 °C

Post-wash: 0.1N NaOH 5 min, H₂O 5 min
Detection wavelength: 210 nm

第三節 結果與討論

II-3-1 分析條件的選擇

II-3-1.1 MECC

參考分析黃連吳茱萸藥對的方法，以 40mM SDS，20mM NaH₂PO₄ 及 9mM Na₂B₄O₇ 的緩衝溶液和 40%的 CH₃CN 來分離疏肝湯的萃取液。結果發現在此條件下 SDS 對於化合物 1-8 無法有效地形成膠束，因而在接近 EOF 處出現(Migration time: 1-8 為 12.06-13.28 而 EOF 為 11.44)，使得此八個化合物彼此間相互的重疊，這些成分除了 2、3 及 4 具有可解離的酚基外，其餘皆為中性的化合物。在此情形下，可以有列三種的解決方式：

(一)增加 SDS 的濃度，以期形成較強的膠束使中性的化合物有較長的遷移時間。

(二)改變緩衝溶液中有機修飾劑的比例，藉由減少有機修飾劑減低對膠束的破壞來維持膠束的穩定。

(三)提高緩衝溶液的 pH 值，以增加酚基的去質子化，增長 2-4 的遷移時間。

起初固定 pH 值為 7.39 (20mM NaH₂PO₄，9mM Na₂B₄O₇)及氬甲烷比例為 40%，依次增加 SDS 濃度(40-80mM)以觀察 SDS 對分離效果的影響。由實驗得知，當 SDS 濃度逐漸增加時，所有中性化合物的遷移時間皆隨之增加，而逐漸地將 5-X 及 6-Y 這二組吸收峰群分離(此時 5 和 X 重疊，6 和 Y 重疊)，其解析度(R_s)分別為：40mM SDS: 0.20；50mM SDS: 0.29；60 mM SDS: 0.36；70mM SDS: 1.05；80mM SDS: 1.80。在 80mM SDS 濃度時，5-X 及 6-Y 這二組吸收峰群有最佳的分離效果，顯示 SDS 與這些化合物在此濃度下已有較強的膠束形成。此時改變 SDS 的濃度對改善 2、3、4 的分離效率影響不大。從結果中可發現，在 40%CH₃CN 的有機修飾劑濃度下，須要較高的 SDS 濃度來形成較強的膠束，然而 5 和 X 以及 6 和 Y 仍相互重疊。因此，選擇在膠束已較為形成的高 SDS 濃度下(80mM)來改變緩衝溶液中的有機修飾劑比例，藉以達到分離的效果。

II-3-1.1(a) 有機修飾劑(甲醇/氬甲烷)濃度的影響

為了能夠有效地維持膠束的穩定結構，開始時首先降低氬甲烷在緩衝溶液中的濃度，結果發現在 30%CH₃CN 的緩衝溶液下低極性化合物 5、6、X 及 Y 會與 SDS 產生較強的膠束而增加其遷移時間，

但此時 5 與 X 以及 6 與 Y 仍互相重疊一起，而且有較寬吸收峰。當加入 20%CH₃CN 時，5、6、X 與 Y 這四個化合物則令完全的重疊一起，而且基線相當不穩定，顯然在高 SDS 濃度的緩衝溶液下，高比例的有機修飾劑濃度是必要的。

由實驗中發現，改變甲醇在有機修飾劑中的比例能夠有效的分離 5-X 及 6-Y 二組吸收峰群。為探討甲醇在有機修飾劑中的不同比例對化合物分離的影響，分別固定 80mM SDS、20mM NaH₂PO₄、9mM Na₂B₄O₇ 的緩衝溶液濃度及 40% 的有機修飾劑濃度，依序增加甲醇對氘甲烷的比例(CH₃OH/CH₃CN 的比例分別為 0/40、5/35、10/30、20/20 及 25/15)，可以看出在不同的 CH₃OH/CH₃CN 比例下各成份的遷移時間。將不同的 CH₃OH/CH₃CN 比例對遷移時間作圖，當逐漸增加甲醇對氘甲烷的比例時，中性化合物的遷移時間明顯的增加，而且有效地改善 5-X 及 6-Y 這二組吸收峰群的解析度(R_s5-X；R_s6-Y)。推測氘甲烷本身對膠束破壞的能力要比甲醇來得大，因此當 CH₃OH/CH₃CN 比例逐漸地增加時，膠束的形成就較全為氘甲烷作為有機修飾劑時要來得容易，如此對於極性相當低的精油類化合物則有較佳的分離效果。不過，有機修飾劑若全換成甲醇時，則由於較強膠束的形成而使得化合物 5、6、X 及 Y 的遷移時間已超過 50 min，因此仍選擇甲醇與氘甲烷的混合液為有機修飾劑。當 CH₃OH/CH₃CN>20/20 時即有較佳的解析度，但在 CH₃OH/CH₃CN=20/20 時有最短的分析時間，因此選擇 20%CH₃OH 及 20%CH₃CN 的有機修飾劑濃度。但此時 2、3 及 4 卻互相的重疊一起。

II-3-1.1(b) 酸鹼值的影響

酸鹼值對這些化合物的影響，乃將緩衝溶液之 SDS 濃度(80mM)及 CH₃CN 和 CH₃OH 含量之百分比(20%和 20%V/V)固定，配製各種不同 pH 值[20mM NaH₂PO₄+9mM Na₂B₄O₇ (pH 7.39)、15mM NaH₂PO₄+9mM Na₂B₄O₇ (pH 8.05)、10mM NaH₂PO₄+9mM Na₂B₄O₇ (pH 8.61)、5mM NaH₂PO₄+9mM Na₂B₄O₇ (pH 8.99)、9mM Na₂B₄O₇ (pH 9.22)、10mM Na₂B₄O₇ (pH 9.23)、11mM Na₂B₄O₇(pH 9.24)、12mM Na₂B₄O₇ (pH 9.25)及 13mM Na₂B₄O₇ (pH9.26)]之溶液，酸鹼值範圍由 7.39 至 9.26，可得到在不同 pH 值下各成分的遷移時間。將 pH 值對遷移時間作圖，發現當逐漸增加 pH 值時，對於 2、3、4、7、8 等四個化合物的遷移時間也會相對的增加，顯然地受到酚基(2、3、4 及 8)或羧基(7)去質子化的影響。當 pH 值逐漸增加時，化合物本身帶有的負電荷增加，使得遷移時間亦隨之增加。由圖中可見，當 pH 值=9.25 時即有最佳的分離效果，因此選擇 pH 9.25 (12 mM Na₂B₄O₇)條件。

II-3-1.1(c) SDS 濃度的影響

前面提到，當 SDS 濃度逐漸增加時，所有中性化合物的遷移時間也隨之增加。然而，由於在高 CH₃CN 比例(40%CH₃CN 下對於膠束的破壞情形甚為嚴重，在改變 SDS 濃度時對各成分之間影響程度並不明顯，所以在此以 20%CH₃OH 及 20%CH₃CN 的有機修飾劑濃度下再進一步的對 SDS 濃度的影響進行探討。

固定 pH 值為 9.25(12mM Na₂B₄O₇)及甲醇和氬甲烷的比例(各 20%)，配製四個不同 SDS 濃度的緩衝溶液，探討 SDS 對分離效果的影響。將不同 SDS 濃度對遷移時間作圖，就可看出，當 SDS 濃度逐漸增加時，所有化合物的遷移時間也明顯的增加，且各成分即亦有不錯的分離效果，顯然在 20%CH₃OH20%CH₃CN 濃度下，SDS 與中性化合物形成較強的膠束而有利於對低極性物質的分離。對兩相鄰峰 6 及 X 而言，SDS 濃度的增加有助於改善兩者間之解析度，其值分別如下：60mM SDS:0.82；70mM SDS:1.67；80mM SDS:2.81；90mM SDS:3.60。數據顯示當 SDS 濃度>70mM 時即有相當好的分離效果，但在 70mM 時有最短的分析時間，因此選擇 70mM SDS 濃度。

綜合以上的結果，選擇電解液包含 60%的緩衝溶液(70mM SDS，12 mM Na₂B₄O₇)及 20%氬甲烷和 20%甲醇為最佳的 MECC 分析條件。各成分之遷移時間分別為：1, 18.89 min；2, 22.58 min；3, 23.46 min；4, 24.31 min；5, 26.68 min；X, 28.41 min；6, 28.92 min；Y, 29.73 min；7, 34.28 min；8, 29.31。此時對於四級銨鹼生物鹼 9-15 由於受 SDS 的影響而與 EOF 重疊，而對於 aromatic acid 16-19 則由於羧基的去質子化而在 35 min 之後出現 (benzoic acid 除外)。

II-3-1.2 CZE

II-3-1.2(a) standard CZE

黃連吳茱萸藥對中的四級銨鹼生物鹼成分可藉由 maleic acid 添加至磷酸鹽的緩衝溶液中達到不錯的分離效果，而且以此條件(90% 50mM maleic acid 及 40mM NaH₂PO₄ 緩衝溶液和 10%的 CH₃CN)應用至疏肝湯中亦能完全的分離而不受疏肝湯其餘成分的影響，因此選擇此條件來做為定量疏肝湯中四級銨鹽生物鹼的分析條件。以此條件分析各成分之遷移時間分別為：9, 23.61 min；10, 23.99min；11, 25.06 min；12, 26.38 min；13, 27.06 min；14, 27.46 min；15, 27.72 min。

II-3-1.2(b) reversed EOF CZE

一般分析 aromatic acid 若選擇在弱鹼緩衝溶液下使其解離，

則去質子化的 aromatic acid 會在陽離子與中性分子之後，通過 UV 偵測，這是標準的毛細管區帶電泳(CZE)法。若在緩衝溶液中加入陽離子界面活性劑，可改變毛細管壁的電性，進而改變電滲流方向，此時去質子化的 aromatic acid 會首先通過 UV 偵測，節省分析時間，這就是所謂的 reversed EOF CZE。

本實驗室曾經以 reversed EOF CZE 方法成功的分離川芎和當歸中之 aromatic acid，其最大的優點在於縮短了對 aromatic acid 的分析時間。當然，我們亦可在 MECC 的條件下同時分析疏肝湯中的 aromatic acid 成分，然而必需相對的增加分析的時間，而此增加的分析時間往往已多於以兩個條件定量的時間，因此最後選擇以分析條件 10mM LTAC、2mM NaH₂PO₄ 及 8mM Na₂B₄O₇ 緩衝溶液和 30%的 CH₃CN 來定量疏肝湯中的 aromatic acid [12]。以此條件分析各成分之遷移時間分別為:16, 8.02 min; 17, 8.61 min; 18, 8.88 min。

由於方劑的組成成分複雜，欲以單一的條件來分析多數的成分實屬不易，而由於毛細管電泳本身針於化合物有極佳的選擇性，可以藉由條件的選擇來分析不同特性的化合物，因此本研究藉由 MECC 的方法來分離疏肝湯中性的低極性成分；藉由 standard CZE 的條件來分離帶正價的四級銨鹽生物鹼；最後再以 reversed EOF CZE 的條件來分離其有羧基的 aromatic acid。

II-3-2 檢量線之製作

計算各成分波峰面積與內標準品波峰面積之比值，然後以濃度對波峰面積比值作圖，可得各成分之檢量線(y: peak-area ratio;x:ug/ml)為:

Paeoniflorin	$y=0.110x+0.044$ ($r=0.9993$)
Neohesperidin	$y=0.061x+0.005$ ($r=0.9986$)
Hesperidin	$y=0.061x+0.005$ ($r=0.9985$)
Naringin	$y=0.064x+0.006$ ($r=0.9985$)
Ligustilide	$y=0.108x-0.034$ ($r=0.9989$)
Butylidenephthalide	$y=0.272x-0.018$ ($r=0.9992$)
Benzoic acid	$y=2.919x+0.007$ ($r=0.9987$)
Umbelliferone	$y=0.048x+0.002$ ($r=0.9982$)
Coptisine	$y=1.562 \times 10^5 x - 1.386$ ($r=0.9956$)
Dehydroevodiamine	$y=4.178 \times 10^4 x - 0.273$ ($r=0.9993$)
Berberine	$y=1.503 \times 10^5 x - 1.326$ ($r=0.9952$)
Epiberberine	$y=1.533 \times 10^5 x - 0.474$ ($r=0.9963$)
Columbamine	$y=1.510 \times 10^5 x - 0.474$ ($r=0.9962$)
Jatrorrhizine	$y=1.505 \times 10^5 x - 0.467$ ($r=0.9963$)

Palmatine	$y=1.442 \times 10^5 x - 0.445$ ($r=0.9960$)
Nicotinic acid	$y=0.050x+0.149$ ($r=0.9983$)
Ferulic acid	$y=0.075x+0.111$ ($r=0.9991$)
Caffeic acid	$y=0.037x+0.083$ ($r=0.9981$)

II-3-3 系統適用性測試

II-3-3.1 再現性(Reproducibility)

將疏肝湯萃取液在 MECC 條件下作六次重複分析之峰線面積比值(波峰面積/內標準品面積, Ar, peak-area ratio)計算。其同一天的相對標準偏差(intra-day RSD)在 1.05%-2.04%之間；不同天的相對標準偏差(inter-day RSD)在 2.16%-4.24%之間。

II-3-3.2 偵測極限(Detection limit)

逐步稀釋標準品溶液,以毛細管電泳偵測直至 signal/noise=3/1 以下,分別計算各化合物之偵測量在 0.08-1.36ug/ml 之間(injection volum:36nl)。

II-3-3.3 回收率(Recovery)

在已知成分含量的藥材中添加各成分標準品,測試結果在 MECC 條件下,回收率在 95.12%-103.57%。疏肝湯之定量分析將配製好之疏肝湯檢液注入毛細管電泳中,分別以 CZE 及 MECC 分析。計算各成分之含量,結果如表 II-1 所示。而對於 X 及 Y 兩未確定結構的成分以其相對於內標準品一之面積比分別為:(1)70%CH₃OH 萃取液:3.54 及 2.36;(2)煎煮液:0.65 及 0.32。

表 II-1 疏肝湯中各成分之含量((mg/g; 平均值±S. D., n=3)

化合物	含量(mg±S. D.)	
	萃取液(70%CH ₃ OH)	煎煮液
Paeoniflorine	1.63±0.23	1.45±0.86
Neohesperidin	8.87±0.10	9.23±0.96
Hesperidin	7.58±0.31	7.53±0.50
Naringin	5.32±0.26	6.88±0.70
Ligustilide	1.39±0.06	0.24±0.02
Butylidenephthalide	0.54±0.09	0.04±0.06
Benzoic acid	0.06±0.02	0.05±0.01
Umbelliferone	0.53±0.08	0.46±0.05
Coptisine	0.80±0.19	0.59±0.09
Dehydroevodiamine	0.63±0.09	0.55±0.12
Berberine	2.08±0.13	0.82±0.12
Epiberberine	0.36±0.05	0.23±0.09
Columbamine	0.51±0.03	0.23±0.08
Jatrorrhizine	0.51±0.08	0.21±0.04
Palmitine	0.66±0.03	0.29±0.06
Nicotinic acid	0.04±0.01	0.01±0.01
Caffeic acid	0.14±0.02	0.06±0.01
Ferulic acid	0.24±0.04	0.22±0.04

第三章 中藥製劑疏肝湯之 HPLC 分析

第一節 緒言

疏肝湯收載於萬病回春之脅痛門，主治屬於肝積血之左脅下痛；或因怒傷氣，或因跌撲內挫所致，而左脅下作痛，且左腹直筋緊張，並有抵抗壓痛者，用之有效。

本實驗欲定量分析之各藥材成分茲列於下：

芍藥：gallic acid(1), Paeoniflorin(2)

枳殼：umbelliferone(3), naringin(5), hesperidin(6), neohesperidin (7), X(14), y(16) (x, y 為未確認之成分)

青皮：umbelliferone(3), naringin(5), hesperidin (6), neohesperidin(7), X(14), y(16)

當歸：ferulic acid(4), ligustilide(18), n-butylidenephthalide(19)

川 芎 : ferulic acid(4), ligustilide(18), n-butylidenephthalide(19)

黃連 : epiberberine(8), jatrorrhizine(9), coptisine(10), palmatine(12), berberine(13)

吳 茱 萸 : dehydroevodiamine(11), evodiamine(15), rutaecarpine(17), 1-methyl-2-nonyl-4(1H)-quinolone(20), 1-methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone (21), evocarpine(22), 1-methyl-2-[(6Z, 9Z)-6, 9-penta-decadienyl]-4(1H)-quinolone(23), dihydroevocarpine (24)

第二節 實驗部份

III-2-1 HPLC 分析條件

疏肝湯中因含有吳茱萸及黃連兩藥材，故我們將分析吳茱萸-黃連藥對之分析方法(醋酸/醋酸鈉沖提系統)應用於此方劑的分離。此外，我們又以本實驗室分析芍藥的 HPLC 條件(磷酸/磷酸鉀沖提系統)為依據，經修飾後亦應用於此方劑的分離。茲將此二沖提系統表列如下：

☆醋酸/醋酸鈉沖提系統(以下簡稱沖提系統 Ac)

Pump A: buffer* : CH₃CN = 80 : 2。

Pump B: H₂O : MeOH = 10 : 90 (V/V)

* buffer = (50mM NaOAc +0.25% AcOH, V/V) / H₂O。

表 III-1 梯度沖提程式 Ac :

time(min)	flow-rate(ml/min)	A %	B %	curve
initial	0.85	100	0	*
20	0.85	85	15	linear
25	0.85	55	45	linear
30	0.85	40	60	linear
35	0.85	15	85	linear
50	0.85	0	100	linear
60	0.85	0	100	linear
65	0.85	100	0	linear

偵測波長: 250, 280 nm。

☆ 磷酸/磷酸鉀沖提系統(以下簡稱沖提系統 P)

Pump A: buffer* : CH₃CN = 95 : 5

Pump B: H₂O : MeOH : MeCN = 20 : 10 : 70 (V/V)

* buffer = (50mM KH₂PO₄ + 0.10% H₃PO₄, V/V) / H₂O

表 III-2 梯度沖提程式 P :

time(min)	flow-rate(ml/min)	A %	B %	curve
initial	0.80	95	5	*
30	0.80	80	20	linear
40	0.80	75	25	linear
55	0.80	40	60	linear
65	0.80	20	80	linear
80	0.80	0	100	linear
100	0.80	0	100	linear
105	0.80	95	5	linear

偵測波長: 250, 280 nm.

III-2-2 沖提系統 P 中的沖提液 B 不同甲醇/氘甲烷比例分析條件探討

精稱 26.5 克的疏肝湯方劑粗末，加入 10 倍量的 70% 甲醇，於 40°C 振盪 30 分鐘，將萃取液過濾並清洗濾渣後，把所收集的濾液以 70% 甲醇稀釋至 500 mL。取此 70% 甲醇溶液 30 ml，加入內標準品溶液 1ml，以 70% 由醇溶液稀釋至 100ml 作為檢液分別以沖提系統 P 及沖提系統 Ac 進行定量。每次注入 20 μ l，注射兩次，計算其平均值以定量之。

第三節 結果與討論

III-3-1 HPLC 分析條件

將疏肝湯檢液經 III-2-1 所述之兩沖提系統測試後發現，沖提系統 Ac 能分析者大多屬於吳茱萸、黃連兩藥材的成分，分別是黃連的 8, 9, 10, 12, 13, 吳茱萸的 11, 20, 21, 22, 23, 24, 及枳殼、青皮的 5 和 7。由層析圖可看出成分 2 和 4 出現之處的基線不平，經 photodiode array UV 光譜比對得知兩者與一些未確認之成分擠在一起，因此純度較低(成分 2 之純度為 0.9303，成分 4 之純度為 0.8740)；成分 3 和 6 則分別無法與其旁之未確認成分完全分離。至於成分 1 (有機酸)則因醋酸/醋酸鈉沖提系統之 pH 值(pH=5.0)不夠低，使其在管柱中無法作適當的滯留而太早沖提出來，導致與溶劑吸收峰重疊；成分 14-19 則與梯度漂移波峰(gradient drift)重疊。為了能定量有機酸及吳茱萸、黃連以外更多之藥材成分，我們改以較低 pH 值之磷酸/磷酸鉀沖提系統來分析此方劑。

沖提系統 P 可分析之成分有芍藥的 1, 2, 枳殼、青皮的 3, 5, 6, 14, 16, 當歸、川芎的 4, 18, 19, 黃連的 12, 13, 吳茱萸的 15, 17, 21, 22, 23, 24; 沖提系統 P 中無法分離者有枳殼、青皮的 7, 黃連的 8-10, 吳茱萸的 11 和 20。

沖提系統 Ac 和沖提系統 P 雖均可分析成分 2, 5, 12, 13, 21, 22, 23, 24, 但因分析吳茱萸-黃連藥對時之沖提系統 Ac 適用於成分 12, 13, 21, 22, 23, 24 之評估及檢量線之製作都已完成, 故由沖提系統 Ac 來定量分析成分 12, 13, 21, 22, 23, 24 及沖提系統 P 無法其析的成分 7, 8, 9, 10, 11, 20; 沖提系統 P 則定是分析 1, 2, 3, 4, 5, 6, 14, 15, 16, 17, 18, 19 各成分。茲就由 photodiode array 作 UV 光譜圖來確認由沖提系統 P 分析之各成分及由沖提系統 Ac 分析之成分 7 的純度。

III-3-2 沖提系統 P 中的沖提液 B 不同甲醇/氬甲烷比例之分析條件探討

此沖提系統 P 乃摹擬本實驗室分析芍藥之 HPLC 條件而來, 經適當調整梯度沖提程式後發現, 改變沖提液 B 中的有機修飾劑比例對成分 14-19 之分離有明顯之影響。

當 MeOH/MeCN = 0/80 時(如芍藥條件), 成分 15 和 16 及成分 18 和 19 無法完全分開 (R_s 15/16=1.03 及 R_s 18/19=0.91)。當 MeOH/MeCN = 20/60 時, 從波長 250nm 來偵測, 吸收峰 15 與其旁之未確認吸收峰重疊, 且成分 16 和 17 恰與梯度漂移波峰重疊; 若從波長 280 nm 來偵測, 則可看出吸收峰 16 和 17 無法完全分開 (R_s 16/17=0.89)。MeOH/MeCN = 40/40 時, 成分 14 和 15 沒完全分開 (R_s 14/15=0.83), 吸收峰 16 和 17 則重疊。唯當 MeOH/MeCN = 10/70 時, 成分 14-19 均有良好之分離。故在此實驗我們選擇 MeOH/MeCN = 10/70 作為沖提液 B 中之有機修飾劑。從這整個實驗我們亦發現, 當甲醇/氬甲烷之比例愈大成分 18 和 19 就分得愈開; 相反地, 當甲醇/氬甲烷之比例愈小, 成分 12 和 13 就分得愈開。

III-3-3 標準品檢量線之製作

以內標準品法，求得各化合物注射量與吸收峰面積之關係，作圖所得檢量線如下：(X: mg/mL; Y: peak-area ratio)

化合物	檢 量 線	回歸係數
1	$Y=102.93X-0.0052$	0.9997
2	$Y=16.76X-0.1296$	0.9998
3	$Y=9.30X-0.0583$	0.9996
4	$Y=34.92X+0.0189$	0.9997
5	$Y=1.68X-0.0014$	0.9999
6	$Y=2.57X-0.0061$	0.9998
7	$\Delta Y=1.82X+0.0008$	0.9999
15	$Y=25.63X+0.0970$	1.0000
17	$Y=34.88X+0.0652$	0.9999
18	$Y=16.04X-0.0044$	0.9999
19	$Y=20.31X-0.0062$	0.9996

△ 由沖提系統 Ac 所製作而得。

III-3-4 分析條件適用性之評估

III-3-4.1 再現性 (Reproducibility)

以沖提系統 P 之條件對疏肝湯檢液同一天內連續重複六次注射 (intra-day)，不同天總計總重複六次 (inter-day)，發現再現性良好，前者在 0.56 - 2.16% 之間，後者在 0.67 - 2.26% 之間。

III-3-4.2 回收率 (Recovery)

在已知成分含量的疏肝湯中添加由沖提系統 P 定量之成分純品，其回收率在 98.06-101.58 之間。

III-3-4.3 偵測極限

各成分的偵測極限 在 0.23 - 1.73 ng 之間。

III-3-5 疏肝湯之定量分析

在此實驗中我們欲定量之疏肝湯成分共有二十四個，其分別由兩個沖提系統來完成，即沖提系統 P 與沖提系統 Ac。成分 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 17, 18, 19 由沖提系統 P 來定量；而成分 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 20, 21, 22, 23, 24 則由沖提系統 Ac 來定量。由於成分 14 和 16 為未知物故無法定量，我們僅以吸收峰面積比值表示其量大小。在此

我們以 UV-250 nm 作為偵測波長，定量結果如表 III-3。

表 III-3 疏肝湯定量結果 (mean±SD, n=2)

化合物	標準湯劑 (mg/g)	70%甲醇萃取液 (mg/g)
1	0.022±0.001	0.042±0.002
2	1.500±0.042	1.715±0.005
3	0.604±0.001	0.627±0.020
4	0.148±0.016	0.258±0.006
5	9.251±0.129	11.023±0.019
6	9.800±0.082	9.930±0.035
7	8.879±0.150	9.126±0.176
8	0.115±0.006	0.411±0.007
9	0.337±0.001	0.515±0.002
10	0.205±0.013	0.712±0.015
11	0.523±0.010	1.607±0.032
12	0.533±0.003	1.237±0.012
13	1.067±0.003	3.706±0.023
15	0.114±0.006	0.785±0.021
17	0.052±0.001	0.323±0.010
18	0.214±0.013	1.365±0.018
19	-	0.537±0.000
20	0.023±0.000	0.039±0.002
21	-	0.070±0.005
22	0.021±0.005	0.335±0.004
23	0.067±0.000	0.168±0.008
24	0.051±0.000	0.152±0.000
14 ◇	0.138±0.001	◇ 0.414±0.003
16 ◇	0.039±0.000	◇ 0.239±0.002

-:表其量在偵測極限以下; ◇:指 peak-area ratio。

References :

1. 許鴻源，陳玉盤，許順吉，許照信，陳建志，張憲昌："簡明藥材學"，pp. 112 - 113，新醫藥出版社，台北，1985。
2. 同參考資料 1，pp. 117 - 118。

3. M. Tomita and S. Kura, J. Pharm. Soc. Jpn., 76, 1425(1956)。
4. M. Tomita and J. Kunitomo, Yakugaku Zasshi, 78, 1444 (1958)。
5. 黃三元："醫方集解新編"，pp. 1-10, 八德教育文化出版社，台北(1987)。
6. T. Misaki, K. Sagara, M. Ojima, S. Kakizawa, T. Oshima and H. Yoshizawa, Chem. Pharm. Bull., 30, 3540 (1982)。
7. H. E. Baumgarten: "Organic Syntheses", Collective Volume V, P. 751, John Wiley & Sons, Inc., New York (1973)。
8. 許鴻源，許照信，"常用漢方方劑圖解"，p 346，新醫藥出版社，台北，1985。
9. 呂瓊芳，"中藥製劑分析方法之開發研究-杏仁、三黃瀉心湯及小承氣湯製劑"，碩士論文，國立台灣師範大學化學研究所，台北，1994。
10. 陳鴻仁，"中藥製劑分析方法之開發研究-甘草，當歸，大黃及乙字湯製劑"，碩士論文，國立台灣師範大學化學研究所，台北，1994。
11. 李桂蘭，"黃芩黃連藥對及相關製劑之 CE、HPLC 研究方法之開發研究-甘草、當歸、大黃及乙字湯製劑"，碩士論文，國立台灣師範大學化學研究所，台北，1995。
12. Y. M. Liu and S. J. Sheu, J. Chromatogr., 663, 239 (1994)。

