

編號：CCMP94-RD-050

中醫藥與感染症疾病之基因體研究- 基因體調控抗感染中草藥研發 與其成分/品管標準建立

吳永昌 教授
高雄醫學大學 天然藥物研究所

摘要

研究目的

本研究計畫擬利用先前所獲得之純化合物及劃分層分別進行三黃瀉心湯肝炎治療藥效評估及其 SNP 之分析及相關資料庫之建立。其中藉由活性引導分離法評估快速、精確的獲得具有特殊生物活性之 fractions，並利用特殊的分離流程，獲得更具藥效意義之成份，進而可透過結合基因體 SNP 分析與歸納，釐清傳統中草藥之原理，提高傳統中藥之產值。另外，亦期望進而純化其中特殊化學成份，以做為新藥開發之來源。同時，利用高效能液相層析儀建立中草藥基源資料庫(指紋圖)，進行藥材品質的管制，以及針對具有特殊活性之成份研究其分離的程序，以進行縮短時程(新製程)技術的開發，建立新藥開發模式。此外本研究群亦希望藉此尋找其最佳的分析條件，以作為其品質管制上之標準。同時配合活性劃分層確定其分析方法與品管標準。而三黃瀉心湯具有抗 LPS 的引起的發炎作用。因此，本計畫以 Toll-like receptor 4 (TLR4) 基因的 SNP，來模擬肝炎機制。

研究方法

本計畫以三黃瀉心湯及其所含三種單味生藥：大黃、黃芩與黃連，利用活性導引分離法希望藉此找出具有活性的複方 fractions 與 pure compounds。初步的檢測中發現，在抗氧化活性方面：三黃瀉心湯的初萃層之清除 DPPH 自由基的能力為 α -tocopherol 的兩倍以及在細胞毒殺活性方面對於人類肝癌細胞(Hep 3B、Hep G2)具有意義作

用。此外，本實驗亦以高效能液相層析儀建立三黃瀉心湯及其活性劃分層之品質的管制方法與標準。本實驗選擇了 emodin, rhein 和 chrysophanol 作為定量之標的物，分別以階梯式和連續式方式進行分析。爾後，以 Toll-like receptor 4 (TLR4) 基因的 SNP，來模擬肝炎機制。

結果與討論

配合活性導引分離方法與刪去法，完成複方與三種單方之傳統製程萃取物。確定各單味藥材與複方之最佳分析條件，並進行其定性與定量之分析，並且完成了各單方與活性層之指紋分析圖，確定和建立了指標成分分析。在此後的模擬肝炎機制發現有些 NCBI dbSNP 的 SNP 在台灣並不存在，如 rs4986790 (Asp299Gly), rs11536887, rs11536865, rs10818073...等。或是有些 SNP 頻率不同於台灣族群，如 rs11536889 在 NCBI dbSNP 中 G:C= 0.878:0.122，而台灣則是約為 G:C=0.69:0.31。因此，許多規劃的 SNP genotyping 需要進一步修正，以合乎需求。

關鍵詞：三黃瀉心湯，大黃，黃芩，黃連，定性定量分析，SNP

編號：CCMP94-RD-050

Chinese Genomic Medicine-R&D of Anti-infection Chinese Genomic Medicine and the standard establishment of their constituents/quality control

Professor Yang-Chang Wu
Kaohsiung Medical University, Graduate Institute of Natural Products

ABSTRACT

Aim

This research was aim to develop and build up the databank and evaluate the treatment of San Huang Xie Xin Tang(SHXXT) and the analysis of SNP for hepatitis. By using the bioactivity-directed fractionation, we can rapidly and exactly find out the active fractions and pure compounds from SHXXT and then combined with genomic pathway in SNP analytic in order to increase the output value of traditional Chinese medicine. Furthermore, it can also use as new pharmaceutical preparation in the future and try to discover differential technological innovation. Besides, we setup the analytical method of SHXXT and its fractions, as well as the qualification for quality control. All of the analytic data may use for quality control of the traditional Chinese medicine or herbs in the future. In addition, the SHXXT is known to be anti-inflammation. Here, the SNP role of toll-like receptor 4 (TLR4) was used to mimic the mechanism for hepatitis.

Method

By using the bioactivity-directed fractionation, we would like to find out the active fractions and pure compounds from San Huang Xie Xin Tang (SHXXT) and its three composed Chinese medicine, including *Rheum palmatum*, *Scutellaria baicalensis* and *Coptis chinensis*. From the screening of the bioassay, the Ethyl Acetate fraction showed the best significant antioxidant activity, its potency was two folds higher than vitamin E (α -tocopherol). Besides, the crude extracts also have shown

cytotoxicity toward liver cancer cells (Hep 3B and Hep G2). Furthermore, the analysis of SHXXT and its fractions also finished. Emodin, rhein and chrysophanol were selected for the quantitative analysis. Afterthat, the SNP role of toll-like receptor 4 (TLR4) was used to mimic the mechanism for hepatitis.

Results & Discussion

By using the bioactivity-directed fractionation, we finished the preparation of crude extracts and each fractions. SHXXT extracts and each fractions were analyzed by HPLC. Further more, the bioassay also shown good antioxidant activity and cytotoxicity to the cancer cell lines. During the research, we found that some SNP in NCBI dbSNP are not existed in Taiwanese, e.g., rs4986790 (Asp299Gly), rs11536887, rs11536865, rs10818073 and so forth. Sometimes, SNP frequency is different between NCBI dbSNP and Taiwanese, e.g., rs11536889 in NCBI dbSNP and Taiwanese for G:C= 0.878:0.122, and G:C=0.69:0.31, respectively. Therefore, some SNP selection within TLR4 has to modify to fit the need for pharmacogenomics of SHXXT.

Keywords : San Huang Xie Xin Tang , Rheum , Scutellaria , Coptis , qualitative and quantitative analysis , SNP

壹、前言

雖然現代醫學日新月異，科技進步神速，然而文明病之肆虐，全球世人對於中（草）藥的仰賴與需求卻與日俱增。此一趨勢，說明了中國傳統醫藥之優越性，可見未來隱藏著巨大的市場與經濟效益。生物科技為產業界明日之星，而中草藥之現代化、科學化，進而能於國際上發揚光大，實為當前之重要課題。

在先前的研究中我們發現三黃瀉心湯及其所含三種單味生藥：大黃、黃芩與黃連對於心血管疾病、腎功能疾病、與癌症等疾患具有不錯的活性；其中其對於抗發炎與敗血症更具有極佳的作用。因此本計畫擬進一步探討三黃瀉心湯之複方、單方及其活性劃分層對於肝癌細胞之藥理評估，並進一步藉由基因體學的角度研究其相關的基因變化，以建立新藥開發的新模式於技術平台。其次，本計畫亦希望建立三黃瀉心湯之複方、單方及其活性劃分層的分析方法與品管標準，作為中藥現代化與未來政府推動中藥cGMP之依據。最後，我們更計畫將所獲得之成果透過與產業合作進行量化，以提昇我國產業於世界醫藥市場之競爭力。

本計畫除在於建立三黃瀉心湯之複方、單方及其活性劃分層的分析方法與品管標準外。以三黃瀉心湯及其所含三種單味生藥：大黃、黃芩與黃連作為發展單複方藥物之範例，並以肝炎與肝癌為治療標的進行中藥新藥開發。而本計畫完成，將可建立完整之三黃瀉心湯之分析方法及品管標準，並結合中藥新藥開發、中醫辯證與SNP（單核酸多型性，Single Nucleotide Polymorphism）等基因體學技術，建立一個良好的研究模式，此更可為中藥之科學化提供另一方面的佐證。對於學術研發水準與製藥工業之研發能力必能有重要之發展與突破。

本計畫分為兩個部分，第一部分著重於方劑與單方之改良及中草藥成分/品管，第二部分著重於SNP檢體之取得、SNP基因體研究及基因體相關藥效評估。在此茲將研究項目分述如下：

1. 第一部分：方劑與單方之改良及中草藥成分/品管：(高雄醫學大學吳永昌教授、張芳榮副教授)：

第一年負責進行中草藥之複方及單方成份藥材、萃取、分離，除做為提供新藥開發藥效活性評估所需之樣品。並以高效能液相層析儀建立三黃瀉心湯及其活性劃分層之品質的管制方法與標準。第二、三年則針對具有特殊活性之成份進行新製程的開發。開發的方式以傳統方之萃取物為標準品，配合目前實驗室所開發的新流程，以活性導引分

離的方法，單複方之開發並重的方式，達成藥物開發之目標。並研究其活性成分結構，以解開作用之機轉。

2. 第二部分: SNP基因體研究 (高雄醫學大學 張學偉助理教授)

本計畫以肝炎 (hepatitis) 為例子，從基因體、細胞訊號傳遞與病人檢體的生化值的層次來探討中醫藥「三黃瀉心湯」(San-Huang-Xie-Xin-Tang; SHXT) 的藥物基因體學。所以，本計畫的主旨以 SNP 為基礎：即單核型 (haplotype) 與連鎖不平衡 (linkage-disequilibrium; LD)，來作肝炎有關基因的相關性研究。而三黃瀉心湯具有抗LPS的引起的發炎作用。因此，本計畫以LPS刺激有關的Toll-like receptor 4 (TLR4) 下游訊號傳遞與cytokines作為研究的標的，來模擬肝炎機制。由於審查委員之意見希望加入Microarray對HuH-1, KIM-1, HLF等細胞基因表現之影響，本研究室中原有HepG2及Hep3B兩種肝癌細胞，在Yokoo等人發表的文章當中Hepatology, Vol. 40, No. 3, 609-617 (2004)，除提到上述HuH-1等細胞外，亦提及HepG2及Hep3B，本研究將試著引入HuH-1, KIM-1, HLF等細胞進行Alpha fetoprotein (AFP) 相關之研究，例如HuH-1為AFP-producing liver cancer cells、HLF為AFP-nonproducing liver cancer cells之特性，並探討三黃瀉心湯萃取物對這些肝癌細胞的影響。

貳、材料與方法

本研究計畫擬利用先前所獲得之純化合物及劃分層分別進行三黃瀉心湯肝炎治療藥效評估及其 SNP 之分析集相關資料庫之建立。其中藉由活性引導分離法評估快速、精確的獲得具有特殊生物活性之 fractions，並利用特殊的分離流程，獲得更具藥效意義之成份，進而可透過結合基因體 SNP 分析與歸納，釐清傳統中草藥之原理，提高傳統中藥之產值。另外，我們亦期望進而純化其中特殊化學成份，以做為新藥開發之來源。同時，利用高效能液相層析儀建立中草藥基源資料庫 (指紋圖)，以進行藥材品質的管制。以及針對具有特殊活性之成份研究其分離的程序，以進行縮短時程 (新製程) 技術的開發，建立新藥開發模式。此外本研究群亦希望藉由本實驗室先前所得到之純化合物，及市售之標準品，根據尋找其最佳的分析條件，進而比對其複方及單味藥材之萃取物所得之層析圖找出最適合之指標成分，以作為其品質管制上之標準。同時亦配合活性劃分層確定其分析方法與品

管標準。

●植物藥材

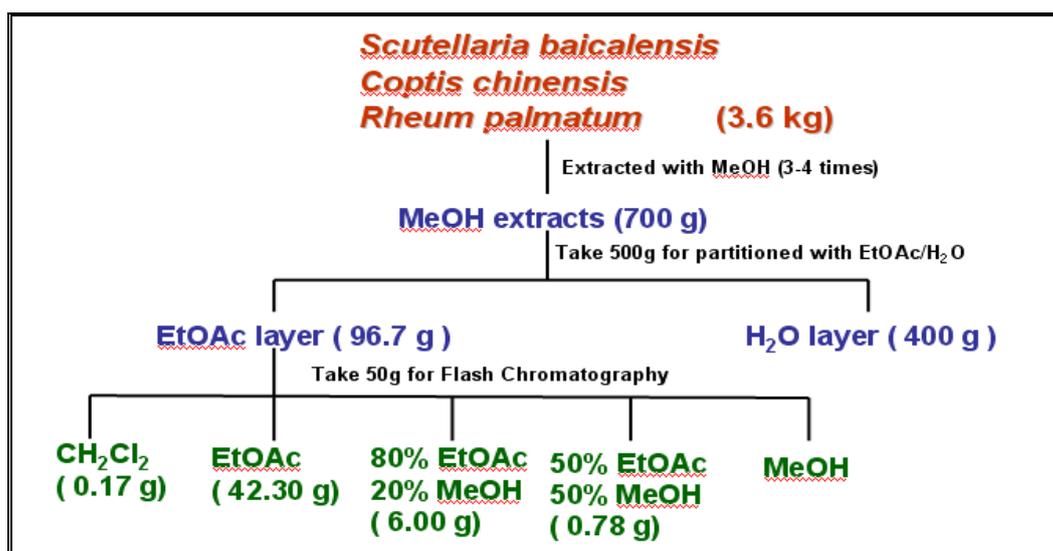
三黃瀉心湯 (San huang xie xin tang) 複方組成為大黃、黃連和黃芩，組成比例為 2：1：1。三種單味生藥如下：

1. 黃芩 *Scutellaria baicalensis*
2. 大黃 *Rheum palmatum*
3. 黃連 *Coptis chinensis*

上述植物有國內某知名生物科技有限公司所提供，並經由該公司以特有之顯微鏡檢方式確認藥材基原。

●製備流程

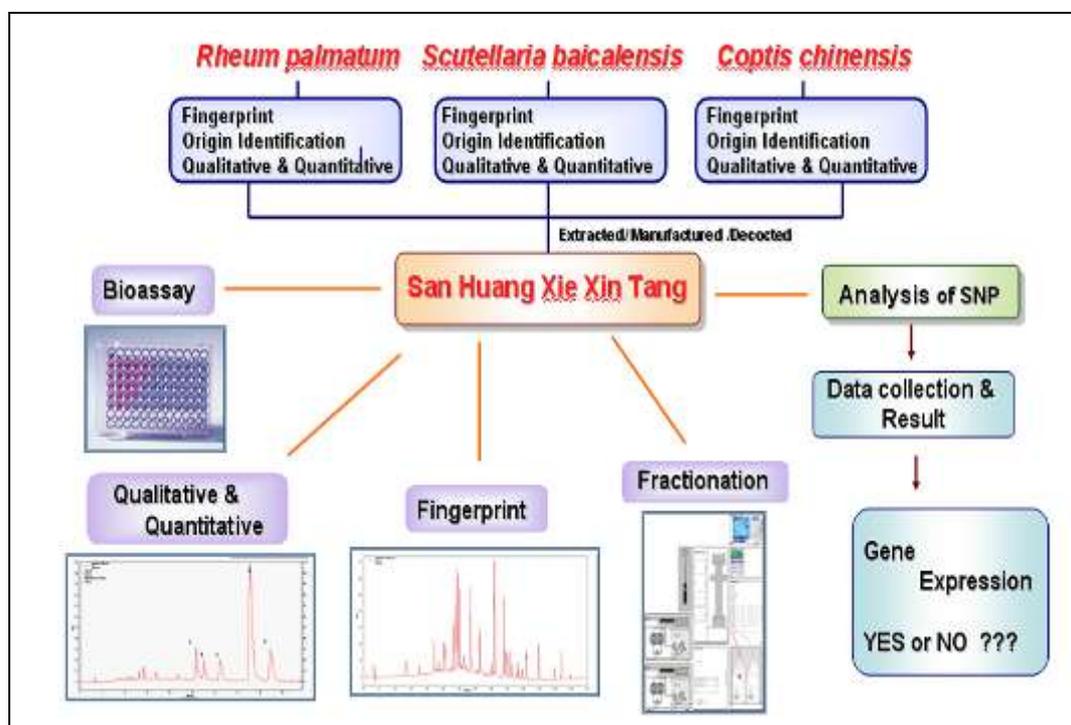
此次實驗中所使用的三黃瀉心湯 (掌葉大黃：黃芩：黃連) 藥方比例遵照古方，將大黃、黃芩和黃連以 2 比 1 比 1 的方式，共 3.6 公斤，以甲醇連續冷浸萃取三次。抽取液經減壓濃縮後，以水和乙酸乙酯分配萃取，分別收集乙酸乙酯層和水層。之後，將分配萃取得到的乙酸乙酯層利用快速管柱色層分析 (Flash column chromatography) 法，正向和逆向矽膠管柱層析 (Normal & reverse phase silica gel)、分子篩 (Sephadex LH-20) 等材質為固定相，配合有機溶媒沖提，及高效能液相層析分析儀 (HPLC) 等儀器，進行成分分離與純化。



●實驗流程設計

針對前言所述的中草藥必須現代化，且要研制出更有科學根據、療效好、副作用小、在防病治病上具有特色的創新中藥，因此本研究試圖從最初的步驟開始進行，透過利用現代化分離科技、圖譜分析，藉由生物活性導引分離方式（bioactivity-guided fractionation）的分離以尋找有效活性層並探討其活性成分，朝著瞭解活性層之組成與活性成份關係。此外，也希望針對三黃瀉心湯在定性和定量分析上建立一套完整的分析條件和方法，並藉此建立三黃瀉心湯中草藥基原資料庫（指紋圖），加強藥材品質管制。同時，擬利用純化合物及劃分層分別進行三黃瀉心湯肝炎治療藥效評估及其 SNP 之分析集相關資料庫之建立。此外，該些特殊生物活性之 fractions 或成份亦可進一步透過結合基因體 SNP 分析與歸納，釐清傳統中草藥之原理，提高傳統中藥之產值。

因此，為了盡量達到上述的敘述目的，三黃瀉心湯將會同時朝不同的方向進行研究，除了各單方植物和三黃粗萃物的指紋圖譜的建立之外，還會以活性導引分離法同時進行劃分層的分離。另一方面，三黃粗萃物部分則會朝著 SNP 的分析方向進行。因此，此次實驗的流程設計如下圖所示：



●指紋圖定性定量分析條件設定

MeOH-H₂O 和 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) -MeOH-H₂O。使用的管柱為 Mightysil[®] 分析用 Column (Analytical:5×250 mm)。管柱內流速設定為 1.0 mL/min，波長設定在 254 nm。此外，所使用的梯度層析法 (linear gradient model) 有二，分別為：

模式一：連續式梯度

有機相 Methanol (A)，水相為 0.1% TFA-H₂O (B)，沖提方式為 0-60 分鐘時，A 由 0 % 增加至 100 %，而 B 由 100 % 降 0 %。

模式二：階梯式梯度

有機相 Methanol (A)，水相為 0.1% TFA-H₂O (B)，沖提方式以 60 分鐘為一循環，在 0.01 分鐘至 5.00 分鐘，A 由 0 % 增加至 33 %、在 5.00 至 45.00 分鐘間，A 的比率保持不變，維持在 33 %、在 45.00 至 60.00 分鐘內，A 由 33 % 漸進遞升至 50 %、70 %、85 % 和 100 %。

在定量的部分則分別針對三黃瀉心湯、大黃和黃連進行化合物的定量分析。根據規定中藥品的定量規範分別選取了兩種以上的化合物進行標定。根據各個分析的結果進行比對和對照，藉此判斷 HPLC 中個波峰吸收訊號分別屬於那一個生藥，進而探討各個藥材間的不同與差異性和變化以及複方中主要吸收表現等等，希望訂出一個簡易有效率的指紋圖。

●SNP 基因體研究

遺傳因素在常見疾病，例如高血壓、糖尿病、氣喘、及自體免疫疾病中扮演重要角色。因此，為了探討相關遺傳因素，本計劃希望藉由基因定位方法來找尋相關之致病基因。其中又以 SNP (single nucleotide polymorphism) 最為常見，期望可以進一步探討疾病之遺傳風險因素和人類族群之遷徙，並藉由 SNP 的高頻度分布進行相關分析，觀察是否帶有某些特定 SNP 的人，對於藥物會有特定的反應。此外，也可找出可能的致病基因。

根據過去的經驗療法以及臨床治療顯示，傳統中草藥的治療常因體質差異而有不同處方或療效。在近幾年的研究發現這種體質差異性會反映在 SNP 上的證據也逐漸增加。而許許多多偏向於西醫藥物基因體學的眾多基因的 SNP 數據，均可作為中醫藥走向基因體醫學的捷徑。其中，中醫藥特有的辨證論治分型，更可將治療用藥與其療效分類，使得中醫藥的個人化醫學 (體質) 更加精緻。

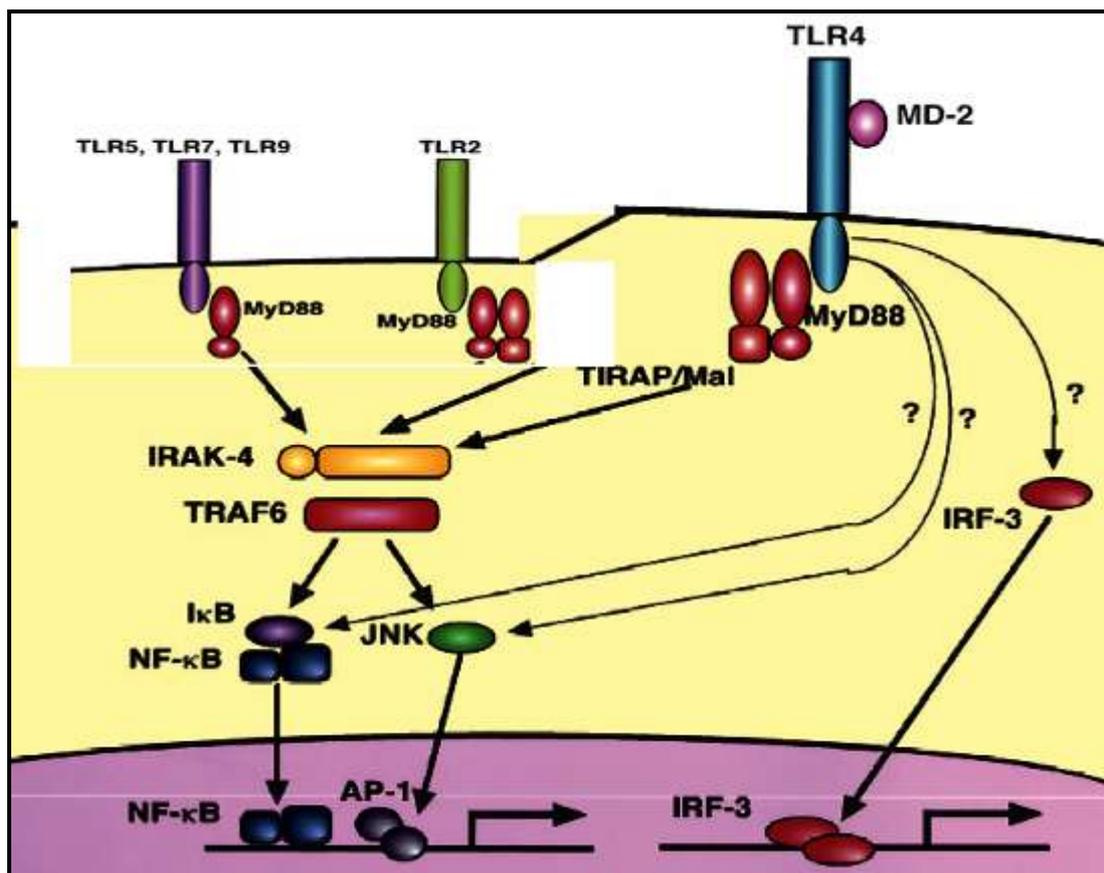
三黃瀉心湯具有抗 LPS 的引起的發炎作用。而炎細胞的活化和內

毒素有所關聯，內毒素可刺激 TLR4 受體，導致 NF- κ B 增加的現象。本計畫希望以 LPS 刺激有關的 Toll-like receptor 4 (TLR4) 下游訊號傳遞，來模擬肝炎機制。因此，在此部分擬著重於 SNP 檢體之取得、SNP 基因體研究及基因體相關藥效評估。並藉此瞭解中醫（辨證論治分型）與基因表現之關係及中藥（複方或單方）對基因表現效應，在臨床使用上的療效相關性（即中醫藥的藥物基因體學研究）。藉此建立中醫理論之實證基礎，加速中醫藥之現代化。因此，藉由肝炎的中醫藥的藥物基因體研究，可以作為將來其他中醫藥治療的藥物基因體研究平台。

在最初的計畫是以 LPS 刺激有關的 Toll-like receptor 4 (TLR4) 下游訊號傳遞與 cytokines 作為研究的標的，來模擬肝炎機制。分析三大類基因的 SNP 包括如下：

- 一、由 LPS 刺激後經由 Toll-like receptor 4 (TLR4) \rightarrow TIRAP、MyD88 \rightarrow IRAK、TRAF6 \rightarrow JNK \rightarrow AP-1 \rightarrow 發炎和 cytokine 釋放的相關基因 SNP 分析。以及 TLR4 \rightarrow TIRAP、MyD88 \rightarrow IRAK、TRAF6 \rightarrow IKK \rightarrow NF- κ B \rightarrow 發炎、cytokine 釋放或調控 antiapoptosis gene 的相關基因 SNP 分析。
- 二、由 LPS 刺激後經由 Toll-like receptor 4 (TLR4) \rightarrow TRAM、TRIF \rightarrow PKR \rightarrow 影響 apoptosis 或 INF-inducible genes 的相關基因 SNP 分析。
- 三、臨床上常測定的 cytokine，如 TNF- α 、TNFRSF5、TNF- β 、INF- γ 、IL-6、IL-8、IL-10 與 TGF- β 1 等。

而這三大類 SNP 的藥物基因體學分析，後來因為礙於經費問題因此略為修改和刪減。爾後在整理中發現該三大類的藥物基因路徑和 Toll-like receptor 4 (TLR4) 有所關聯，且為起始點開端，因此把目標鎖定在 TLR4 上，希望藉此觀察是否帶有某些特定 SNP 的人對於藥物的特定反應以及探討可 genotypes 的差異性和可能的致病基因。



參、結果

1.配合活性導引分離方法與刪去法，完成複方與三種單方之傳統製程萃取物。以活性導引法與刪去法檢測之結果如下：

The IC₅₀ value of scavenging DPPH and SOD-like activity from SHXXT extract

	IC ₅₀ value (μg/mL)	
	DPPH	SOD
Methanol extract	22.39±0.58	≥100
EtOAc layer	5.94±0.16	18.35±0.16
CH ₂ Cl ₂ fr.	≥100	≥100
EtOAc fr.	6.70 ±0.20	17.33±0.03
80% EtOAc/20% MeOH fr.	12.61±0.40	32.06±2.54
50% EtOAc/50% MeOH fr.	-	≥100
MeOH fr.	-	≥100
Water layer	26.28±0.90	≥100
α-tocopherol	11.39 ± 0.41	-
catechin	5.25 ± 0.13	22.99 ± 1.68

此次研究中在初步的篩選的部分是以抗氧化為主要活性導向，因此針對三黃瀉心湯的粗萃取物進行抗氧化的篩選，初步結果粗萃取物活性劃分層作用高達維他命 C 的兩倍以上，因而進一步做更深入的研究。此外也將上述排列組合模式之結果進行細胞毒殺活性測試，包括了人類肝癌細胞 (Hep 3B、HepG2)、人類肺癌細胞 (A549) 和人類乳癌細胞 (MCF 7、MDA-MB-231)，希望藉此探討彼此間的改變。

除了各粗萃層之外，亦將單方植物等進行了活性的檢測。希望得到的結果可以和 SNP 分析結果相互對應探討出一個結果此外，也會針對定量部分中化合物含量上的差異性去探討其和活性結果間之關係。

首先在 DPPH radical scavenging activity 活性篩選結果方面，對照組使用的是 (\pm) - α -tocopherol, IC_{50} value = 13.22 ± 0.20 ($\mu\text{g/mL}$)。針對了大黃、黃芩和黃連進行檢測，如以下表格：

Sample	IC_{50} value ($\mu\text{g/mL}$)
1. <i>Rheum palmatum</i> 掌葉大黃	32.20 ± 0.83
2. <i>Scutellaria baicalensis</i> 黃芩	39.88 ± 1.02
3. <i>Coptis chinensis</i> 黃連	> 1000

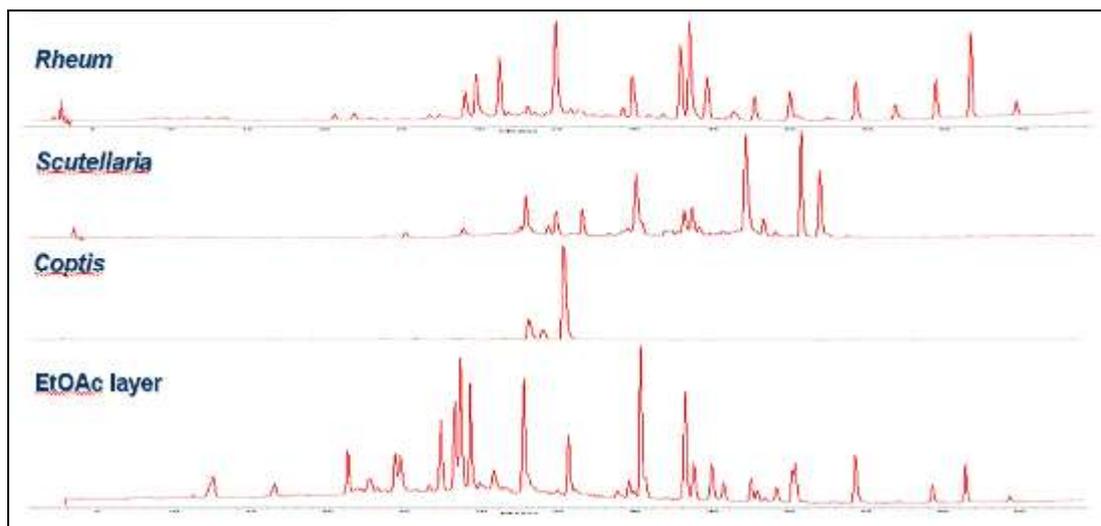
在前文也提及了三黃瀉心湯及其部份劃分層對於細胞毒殺作用有效。在初步篩選結果中，單方植物中僅黃連較具活性；在三黃瀉心湯複方萃取物中幾乎沒有細胞毒殺作用；在各個劃分層中，50% EtOAc : 50% MeOH 分離之 fraction 較具活性作用。詳細數據結果可以參閱下表：

Cell lines	liver cancer		lung cancer	breast cancer	
	Hep G2	Hep 3B	A549	MDA-MB-231	MCF 7
	IC_{50} $\mu\text{g/mL}$				
黃連	42.61	22.62	26.72	51.63	49.31
Water layer	-	52.45	-		-
80% EtOAc 20% MeOH	-	53.99	-		-
50% EtOAc 50% MeOH	44.02	20.95	20.25	56.08	30.00

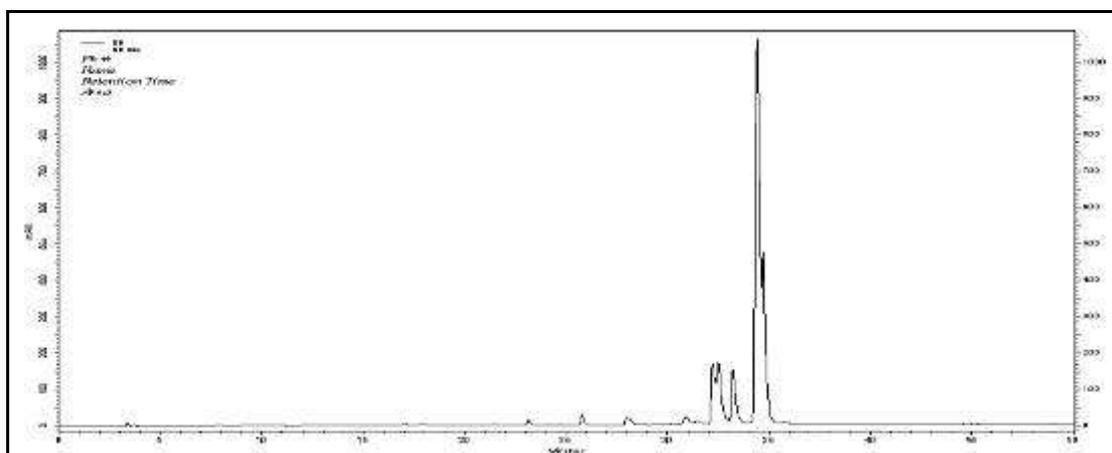
2. 此次研究中所使用於定性和定量分析之化合物共有 24 個；其中 8 個是標準品，16 個是分離自三黃瀉心湯複方的化合物。

分離自三黃瀉心湯複方的化合物 (共 16 個)	標準品 (共 8 個)
Chrysophanol (6) Torachryson-8- <i>O</i> -glucoside (7) 6-Hydroxymusizin-8- <i>O</i> -glucoside (8) Pulmatin (9) Chrysophanein (10) 1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosyl-emodin (11) (+)-Catechin (12) (-)-Epicatechin-3- <i>O</i> -galloyl ester (13) Lindleyin (14) 4-(4'-Hydroxyphenyl)butan-2-one-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside (15) Resveratrololide (16) Baicalein (17) 5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavone (18) 5,6,7-Trihydroxy-2'-methoxyflavone (19) Emodin (20) Aloe-emodin (21)	Berberine Berbine Coptisine Palmitine Sennoside A & B Wogonin Rhein

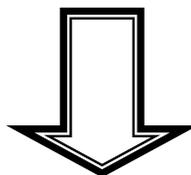
3. 在分析部分，確定了各單味藥材與複方之最佳分析條件，並進行其定性與定量之分析。流動相的使用則有 MeOH-H₂O 以及 MeOH-0.1% TFA- H₂O 混合溶媒兩種系統，其中以後者所得到的三黃瀉心湯指紋圖譜效果較佳，且作為中藥定性和定量的標準層析圖而言，可以得到更好的生藥和製劑品質以及品管的要求和訴求。此外，分析中使用了梯度層析法 (linear gradient model) 進行了各單方與活性層之指紋分析圖，而梯度層析法則有兩種，分別是連續式梯度和階梯式梯度。下圖則是使用了連續式梯度層析法進行分析之結果，由上而下為大黃、黃芩、黃連和乙算乙酯層。

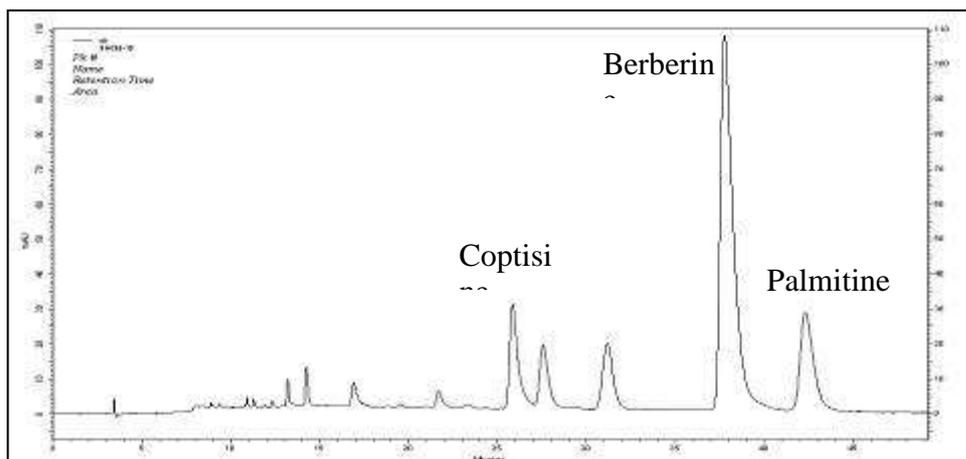


而從上圖可以得知，黃連於連續式梯度層析法之下，明顯可以得知有 5 根吸收波峰幾乎集中於 33-36 分鐘之間，波峰和波峰間並沒有完全拉開，因此不能更進一步進行定性定量的分析。為了達到完全分離的效果而改用階梯式。結果也確如預測階梯式梯度模式層析法對於黃連和生物鹼的指紋圖譜分析結果較佳，分離度明顯符合定量分析要求。如下圖所示：



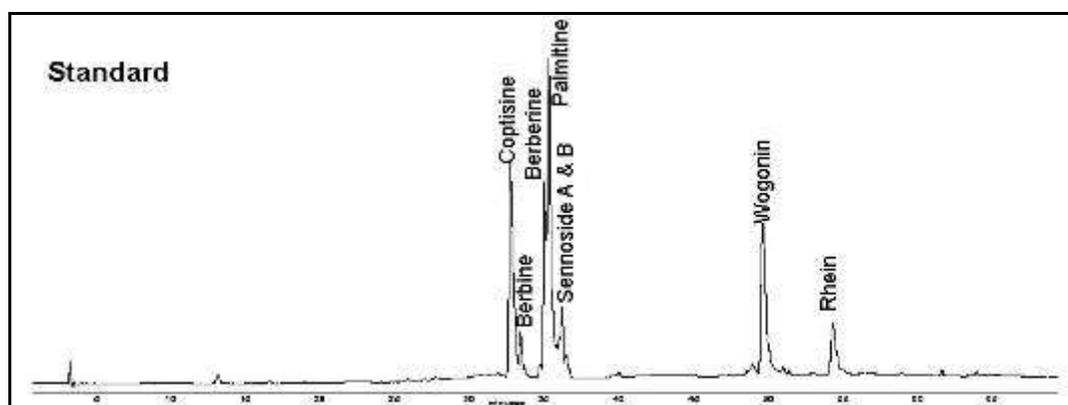
黃連--連續式梯度層析圖





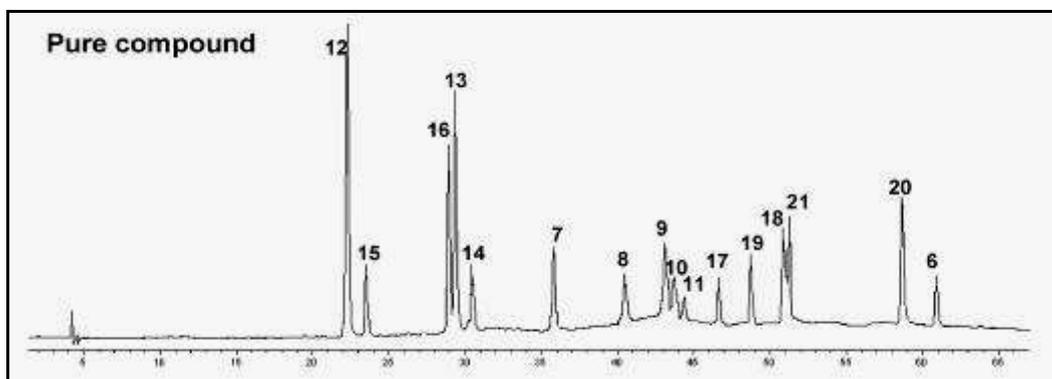
黃連--階梯式梯度層析圖

4. 依照活性導引分離法進行特定活性劃分層之藥效評估與 SNP 分析之結果，進行活性劃分層分離與純化，其後以開發活性分部為主要之工作。提供萃取物或純化合物，進行其藥效評估與 SNP 分析研究。另一方面努力研究藥物之 lead compound，尋找藥物化學核心之研究目標。在此研究的過程之中，我們亦將致力於古方之改良，重新詮釋中草藥複方之新定義、新組合與新應用。
5. 完成各單味藥材與複方定性與定量之分析，並確定其指標成分。定性的部分，進行定性分析包括了：八個標準品和十六個分離自三黃瀉心湯的純化合物的定性分析。在分析條件不變的情況之下針對 8 個標準品進行定性分析，建立標準品層析指紋圖。先各別進行定性分析後確定每個化合物的 HPLC 滯留時間，之後再彼此混合進行一次分析。透過滯留時間比對，得到結果如下圖和表格所示：



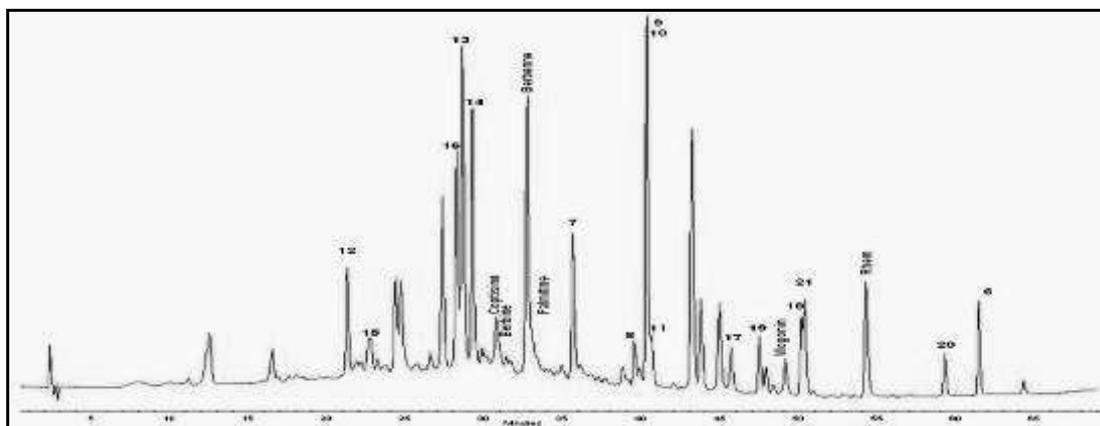
Peak name	滯留時間 Rt (min)
Berberine	34.00
Berbine	32.50
Coptisine	32.00
Palmitine	34.50
Sennoside A & B	35.00
Wogonin	48.53
Rhein	54.00

同樣的，在分析條件保持不變情況下針對 16 個分離自三黃瀉心湯的純化合物分別進行單一和混合的定性分析，建立層析指紋圖。之後透過滯留時間的比對，可以得到結果如下圖和表格所示：

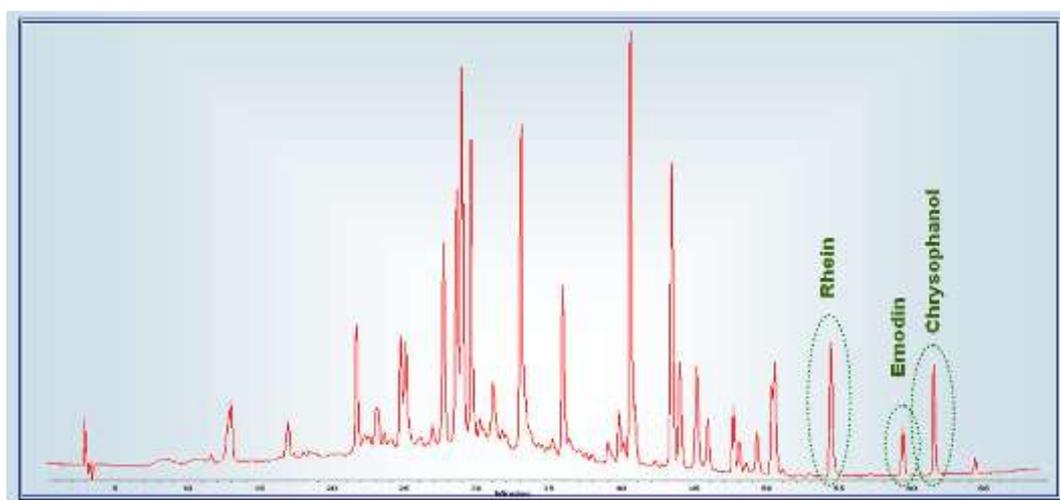


Sample Name	Rt (min)
Chrysophanol (6)	61.35
Torachryson-8- <i>O</i> -glucoside (7)	36.02
6-Hydroxymusizin-8- <i>O</i> -glucoside (8)	40.85
Pulmatin (9)	43.00
Chrysophanein (10)	43.27
1- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranosyl-emodin (11)	44.03
(+)-Catechin (12)	22.05
(-)-Epicatechin-3- <i>O</i> -galloyl ester (13)	29.00
Lindleyin (14)	30.29
4-(4'-Hydroxyphenyl)butan-2-one-4'- <i>O</i> - β - <i>D</i> -glucopyranoside (15)	23.56
Resveratrol (16)	28.31
Baicalein (17)	46.00
5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavone (18)	50.57
5,6,7-Trihydroxy-2'-methoxyflavone (19)	49.05
Emodin (20)	58.57
Aloe-emodin (21)	51.02

此外，透過標準品和純化合物層析指紋圖的建立，可以分別將它們和粗萃物進行定性分析。利用滯留時間的比對可以確定各粗萃物中波峰的代表意義，結果如下圖所示。但是，在進行比對之前必須先進行一次內標實驗，可以同時確認各化合物的波峰以及滯留時間差。



6. 在定量的部分則分別針對三黃瀉心湯、大黃和黃連進行化合物的定量分析。根據規定中藥品的定量規範，分別選取了兩種以上的化合物進行標定。因此，在活性層的定型定量分析方面選擇了三個指標成分—rhein, emodin 和 chrysophanol，分別如圖所示。此外，每一個化合物都是以 $n=6$ 的方式進行線性回歸的計算。經由計算後所得之結果皆符合 $r^2 = 0.999$ 的最低要求【此部份之線性回歸相關數據請參閱『柒、圖表』】，且由得到的 HPLC 指紋圖可以發現複方中具有上述標訂之化合物。同時也可以藉此推斷出各個 fractions 中的含量。



7.SNP 基因研究

根據過去的經驗療法以及臨床治療顯示，傳統中草藥的治療常因體質差異而有不同處方或療效。三黃瀉心湯具有抗 LPS 的引起的發炎作用。因此，本計畫以 Toll-like receptor 4 (TLR4) 基因的 SNP 來模擬肝炎機制，而此部分原因也在材料與方法中解釋了何以採用 TLR4 genotype 為 SNP 分析之目標。即使從 NCBI database 可以很輕易的獲得與 TLR4 genotype 相關的 SNP 數據或者是結果。但是，這裡存在一個決定性的差異，即這個 genotype 的結果是否會因為人種、族群或者是生活環境的不同而有所差異。這一點是可以確定的，但是中間的差異性到底有多大，藉此去驗證這些資訊在台灣的情形對於本土的研究很有幫助，甚至是對於台灣族群的基因平台分析或中醫藥的藥物基因體分析而言是必須的。

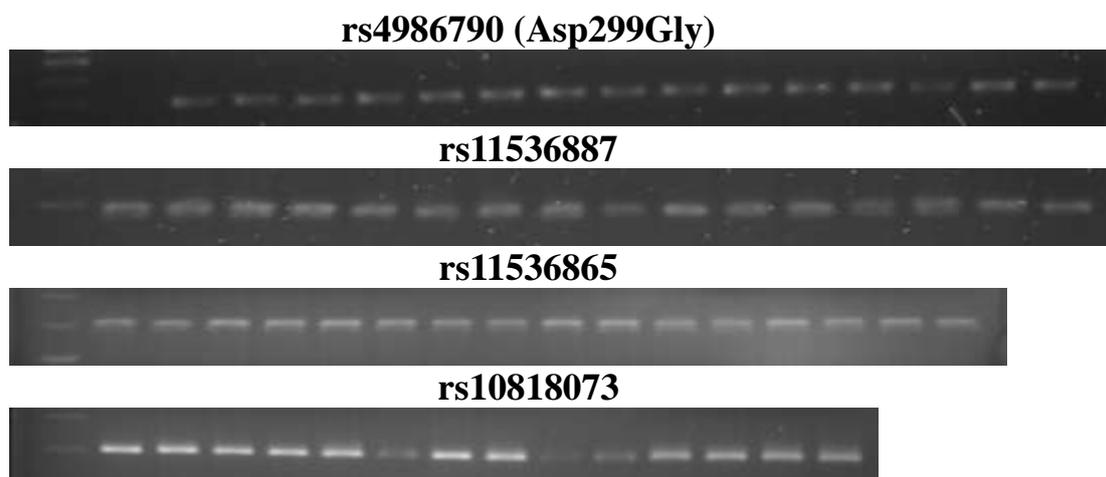
在此次研究中，共選取了 5 種 genotype 進行 SNP 分析，並發現部分的 genotype 在台灣並不存在，如 rs4986790 (Asp299Gly)，rs11536887，rs11536865，rs10818073...等。或是有些 SNP 頻率不同於台灣族群，如 rs11536889 在 NCBI dbSNP 中 G : C = 0.878 : 0.122，而台灣則是約為 G : C = 0.69 : 0.31。因此，許多規劃的 SNP genotyping 需要進一步修正，以合乎需求。根據 NCBI 檢索結果顯示，和 TLR4 genotype 相關之基因定序已經有 90 組。其中，人種以及各民族相關的 SNP genotyping 則是遲至今年初才得以確實。當初計畫申請時，與漢人相關的 SNP genotyping 並沒有完全被解析。下圖所列即 NCBI 2006 年最新版本。

The screenshot displays the NCBI dbSNP search results for TLR4. The search criteria are set to 'for TLR4' and 'Limits: chromosome 9'. The results show 90 items, with the first three items listed:

- 1: [rs16906079](#) [*Homo sapiens*]
ATTACCTGAGTATTTTTCTAATCTG[A/G]CCAATCTAGAGCACTTGGACCTTTC
- 2: [rs12378184](#) [*Homo sapiens*]
tttgtacaaccatgctttatggcagc[A/T]ttattcacaatagctaaacgtgtggc
- 3: [rs12377632](#) [*Homo sapiens*]

Each entry includes a checkbox, the SNP ID, the species name, the nucleotide sequence with the variant site highlighted, and a set of tool buttons (MapView, GeneView, SeqView, No 3D, No OMM).

在眾多的 dbSNP 中，選取了其中的五種進行了 SNP 分析。研究發現，其中四種在台灣並不存在，分別為 rs4986790 (Asp299Gly)，rs11536887，rs11536865 和 rs10818073。下圖是以 PCR-RFLP (polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism) 方式得知基因定序結果。



下圖是 NCBI 2006 年所發表的 rs4986790 genotype 最新相關資料，其中亦包括了亞洲種族，CHINESE (CHN) 的資料。SNP 分析結果基因型以 A/A type 為主，而此部分和我們研究結果相仿。

refSNP ID: rs4986790						Allele						
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)						Variation Class: SNP: single nucleotide polymorphism						
Molecule Type: Genomic						Alleles: A/G						
Created/Updated in build: 111/123						Ancestral Allele: Not available						
Map to Genome Build: 36.1												
ss#	Population	Individual Group	Sample (2N)	Founder (N)	Source	A/A	A/G	HWP	A	G	Het. +/-std err	
ss15546670	HapMap-CEU	European	120	60	TG	0.923	0.067	1.000	0.967	0.033		
	HapMap-HCB	Asian	90	45	TG	1.000			1.000			
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	60	TG	0.923	0.067	1.000	0.967	0.033		
ss16214287	D-0	African American	48	24	TG	0.708	0.292	0.439	0.854	0.146		
	E-0	European	40	20	TG	0.900	0.100	1.000	0.950	0.050		
	E-1	European	6	3	TG	1.000			1.000			
ss23565642	AFD EUR PANEL	European	48	24	TG	0.917	0.083	1.000	0.958	0.042		
	AFD AFR PANEL	African American	46	23	TG	0.696	0.304	0.403	0.848	0.152		
	AFD CHN PANEL	Asian	48	24	TG	1.000			1.000			
ss5586919	P1		204	102	000001907349	GF	0.912	0.088	0.635	0.956	0.044	
	CAUC1		62	31	0000007152558	GF	0.935	0.065	1.000	0.967	0.033	
	AFR1		48	24	0000004768372	GF	0.833	0.167	0.752	0.917	0.083	
	HISP1		46	23	0000004768372	GF	0.915	0.087	1.000	0.958	0.042	
	PAC1		48	24	0000005960465	GF	0.958	0.042	1.000	0.979	0.021	
	Total Samples			974	487		0.910	0.090		0.955	0.045	0.016 +/-0.12%

下圖是 rs11536887 在 NCBI 2006 年的最新相關資料，亞洲種族的基因結果和我們研究結果相仿，也是以 A/A 為主。

refSNP ID: rs11536887						Allele						
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)						Variation Class: SNP: single nucleotide polymorphism						
Molecule Type: Genomic						Alleles: A/G						
Created/Updated in build: 120/123						Ancestral Allele: Not available						
Map to Genome Build: 36.1												

Population Diversity												
ss#	Sample Ascertainment					Genotypes				Alleles		
	Population	Individual Group	Sample (2N)	Founder (N)	Source	A/A	A/G	G/G	HWP	A	G	Het. +/-std err
ss16214296 D-0	D-0	African American	48	24	IG	0.917	0.042	0.042	0.003	0.938	0.062	
	E-0	European	40	20	IG	1.000				1.000		
	E-1	European	6	3	IG	1.000				1.000		
	HapMap-CEU	European	120	60	IG	1.000				1.000		
	HapMap-HCB	Asian	90	45	IG	1.000				1.000		
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	60	IG	0.833	0.167		0.527	0.917	0.083	
ss23565706 AFD EUR PANEL	AFD EUR PANEL	European	48	24	IG	1.000				1.000		
	AFD AFR PANEL	African American	46	23	IG	0.913	0.043	0.043	0.003	0.935	0.065	
	AFD CHN PANEL	Asian	48	24	IG	1.000				1.000		
Total Samples			566	283		0.951	0.042	0.007		0.972	0.028	0.055--0.150

下圖是 rs11536865 於 NCBI 2006 年的最新相關資料，亞洲種族

的基因結果與我們研究結果相仿，也是以 G/G 為主。

refSNP ID: rs11536865						Allele					
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)						Variation Class: SNP: single nucleotide polymorphism					
Molecule Type: Genomic						Alleles: C/G					
Created/Updated in build: 120/120						Ancestral Allele: Not available					
Map to Genome Build: 36.1											

Population Diversity											
ss#	Sample Ascertainment					Genotypes			Alleles		
	Population	Individual Group	Sample (2N)	Founder (N)	Source	C/G	G/G	HWP	C	G	Het. +/-std err
ss16214243	D-0	African American	46	23	IG	0.130	0.870	0.752	0.065	0.935	
	E-0	European	38	19	IG		1.000			1.000	
	E-1	European	6	3	IG		1.000			1.000	
	HapMap-CEU	European	120	60	IG		1.000			1.000	
	HapMap-HCB	Asian	90	45	IG		1.000			1.000	
	HapMap-JPT	Asian	88	44	IG		1.000			1.000	
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	60	IG	0.317	0.683	0.150	0.158	0.842	
Total Samples			508	254		0.087	0.913		0.043	0.957	0.083 +/- 0.106

下圖是 rs10818073 在 NCBI 2006 年的最新相關資料，其中亞洲

種族部份 HAN-CHINESE (HapMap-HCB) 的基因結果和我們研究結果相仿，genotypes 為 C/C。

refSNP ID: rs10818073						Allele					
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)						Variation Class: SNP: single nucleotide polymorphism					
Molecule Type: Genomic						Alleles: C/T					
Created/Updated in build: 120/120						Ancestral Allele: Not available					
Map to Genome Build: 36.1											

Population Diversity											
ss#	Sample Ascertainment					Genotypes			Alleles		
	Population	Individual Group	Sample (2N)	Founder (N)	Source	C/C	C/T	HWP	C	T	Het. +/-std err
ss18822096	HapMap-CEU	European	120	60	IG	0.933	0.067	1.000	0.967	0.033	
	HapMap-HCB	Asian	90	45	IG	1.000			1.000		
	HapMap-JPT	Asian	88	44	IG	1.000			1.000		
	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	60	IG	0.967	0.033	1.000	0.983	0.017	
Total Samples			418	209		0.971	0.029		0.986	0.014	0.028 ± 0.115

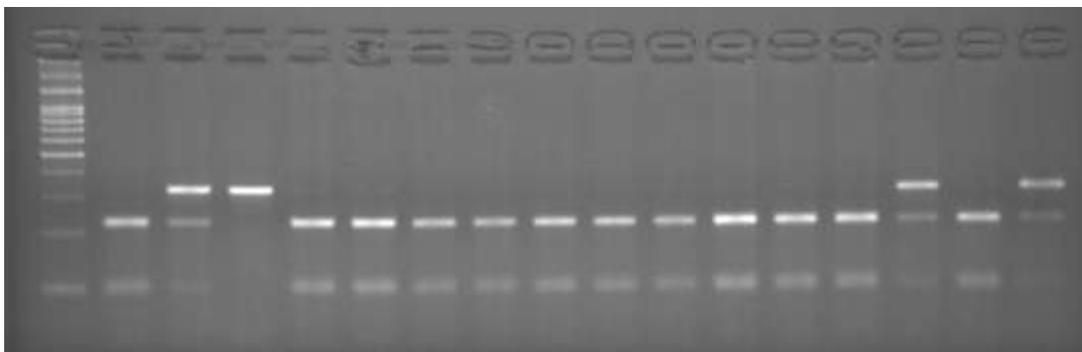
上述四種 TLR4 genotypes : rs4986790 (Asp299Gly)，rs11536887，rs11536865 和 rs10818073 進行了 SNP 分析的結果顯示彼此之間並沒有差異性，分別為 A/A、A/A、G/G 和 C/C。而透過 PCR-RFLP 研究結果的顯示和 NCBI database 所公佈的結果相同，並且驗證了這些資訊的正確性。

在前半段的研究已經提及了此次實驗中選取了五種 TLR4 genotypes 進行了 SNP 分析。透過 PCR-RFLP 方式得知其中 rs11536889

是唯一有差異性的結果。下圖即為該 genotype 的結果。

rs11536889 RFLP genotype

G/G C/G C/C G/G C/G G/G C/G



因此，將 rs11536889 此一 genotype 進行了 SNP 的分析。而根據 NCBI 在 2006 年所公佈的 TLR4 genotype 結果顯示也可以知道此一 genotype 是亞洲人種中有差異性的一類。而下圖即為 rs11536889 結果，其中亞洲種族部份 HAN-CHINESE (HapMap-HCB) 在樣品數 45 個之下呈現的結果是 genotypes 為 C/C : C/G : G/G 為 0.067 : 0.289 : 0.664，而 G/C 則是為 0.789 : 0.211。

refSNP ID: rs11536889						Allele					
Organism: human (<i>Homo sapiens</i>)						Variation Class: SNP: single nucleotide polymorphism					
Molecule Type: Genomic						Alleles: C/G					
Created/Updated in build: 120/123						Ancestral Allele: Not available					
Map to Genome Build: 36.1											

Population Diversity												
ss#	Sample Ascertainment					Genotypes				Alleles		
	Population	Individual Group	Sample (2N)	Founder (N)	Source	C/C	C/G	G/G	HWP	C	G	Het. +/-std err
ss16214299	D_B	African American	48	24	IG	0.083	0.917	1.000	0.042	0.958		
	E_O	European	40	20	IG	0.150	0.850	0.752	0.075	0.925		
	E_I	European	6	3	IG	0.667	0.333		0.333	0.667		
	HapMap-CEU	European	120	60	IG	0.250	0.750	0.273	0.125	0.875		
	HapMap-HCB	Asian	90	45	IG	0.067	0.289	0.644	0.409	0.211	0.789	
	HapMap-JPT	Asian	84	42	IG	0.071	0.357	0.571	1.000	0.250	0.750	
ss24078772	HapMap-YRI	Sub-Saharan African	120	60	IG			1.000		1.000		
	AFD EUR PANEL	European	48	24	IG	0.208	0.792	0.584	0.104	0.896		
	AFD AFR PANEL	African American	46	23	IG	0.087	0.913	1.000	0.043	0.957		
	AFD CHN PANEL	Asian	48	24	IG	0.042	0.333	0.625	1.000	0.208	0.792	
Total Samples			650	325		0.022	0.300	0.778		0.122	0.878	0.214+-0.247

Genotype for TLR4 related SNPs in normal controls.

	rs4986790		rs11536889		rs11536887		rs11536865		rs10818073
A/A	100%	C/C	21%	A/A	100%	C/C	0%	C/C	100%
A/G	0%	C/G	20%	A/G	0%	C/G	0%	C/T	0
G/G	0%	G/G	59%	G/G	0%	G/G	100%	T/T	0
A allele	100%	C allele	31%	A allele	100%	C allele	0%	C allele	100%
G allele	0%	G allele	69%	G allele	0%	G allele	100%	T allele	0%

	Sample (n)								
A/A	20	C/C	20	A/A	20	C/C	0	C/C	20
A/G	0	C/G	19	A/G	0	C/G	0	C/T	0
G/G	0	G/G	59	G/G	0	G/G	20	T/T	0
Sum	20	Sum	95	Sum	20	Sum	20	Sum	20

上圖是本次研究中針對 rs11536889 genotype 所進行的 SNP 分析。根據試驗所顯示的分析結果卻和 NSBI database 於今年所公佈的有所差異。NCBI 在 45 個樣品之下的結果為 C/C : C/G : G/G 為 0.067 : 0.289 : 0.664，而 G/C 則是為 0.789 : 0.211。但是本次研究中的樣品數為 95，實驗結果為 C/C : C/G : G/G 為 0.21 : 0.20 : 0.59，而 G/C 則是為 0.69 : 0.31。因此可以發現雖然貴為亞洲種族，但是 SNP 頻率卻顯示出台灣族群的不同。若進一步和同為亞洲人種的大和民族相比，即是數據上有所接近但是 genotype 上的不同和差異性還是存在著。

總結，NCBI datase的SNP並不可完全視為Taiwanese SNP，其數據不完全一致但具參考意義。此外，其中所存在的差異性和結果可以確定的是會因為人種、族群或者是生活環境的不同而有所差異。但彼此之間的差異性到底有多大，藉此去驗證這些資訊在台灣的情形對於本土的研究是很有幫助且重要的。如此次的研究結果顯示，所挑選的5種TLR4 genotype中，其四是不存在的，而唯一存在的rs11536889 genotype卻和NCBI dbSNP中所公佈的HAN-CHINESE (HapMap-HCB) 有部分差異。NCBI的結果是G:C= 0.878:0.122，而研究結果顯示台灣群族約為G:C=0.69:0.31，且實驗中所取的樣品數還是NCBI的兩倍以上。上述不存在於台灣群族的SNP genotype，如rs4986790 (Asp299Gly)，rs11536887，rs11536865，rs10818073...等則可以做為日後分析的導向和參考，甚至是台灣群族的基因資料庫等等。

當然，這些規劃的SNP genotyping亦需要進一步修正，以合乎需

求。這也包括了檢體部份的獲得，若有則可繼續更深入探討和研究。

肆、討論

1. 化學部份之研究已經成功完成，從中分離得到數十個化合物。
2. 分析方面，成功建立三黃瀉心湯之成分分析以及指紋圖譜。但是本實驗希望以複方形式進行分離和探討，整體考量和思考模式以複方為基準，因此並不考慮先針對各單方植物進行分離，而後再進行定性和定量的分析的模式。除此之外，文獻檢索過程中發現許多分析方法和條件偏重於使用 buffer 和 salt，因此本實驗希望使用單純的溶媒進行定性和定量的分析。同時，相較於三黃瀉心湯中單方生藥藥材的大黃、黃芩和黃連，三黃瀉心湯複方甚少進行定性定量的分析。所以，本次實驗也希望為三黃瀉心湯複方建立一套完整的分析條件和方法。
3. 定性分析中完成了 8 種標準品和 16 個從三黃瀉心湯中分離得到的化合物進行定性分析，建立指紋圖譜。而在定量分析的結果中則針對了三黃瀉心湯中的 rhein、emodin 和 chrysophanol 進行了定量分析。而黃連部分則是定出了當中的三支 peak 是為 palmitine、coptisine 和 berberine。
4. 在生物活性研究上，三黃瀉心湯在抗氧化活性方面，其 EtOAc layer 和 EtOAc fraction 的活性是 α -tocopherol 的兩倍。此外，推測抗氧化活性結果可能和 rhein、emodin 和 chrysophanol 三者間的含量有關係。
5. 在基因體部分由於檢體的取得不易，因此成果並沒有很顯著。但是我們研究結果也發現了不同之處，如有些 NCBI dbSNP 的 SNP 在台灣並不存在，如 rs4986790 (Asp299Gly)，rs11536887，rs11536865，rs10818073... 等。上述不存在於台灣群族的 SNP genotype 則可以做為日後分析的導向和參考，甚至是台灣群族的基因資料庫等等。或是有些 SNP 頻率不同於台灣族群，如唯一存在的 rs11536889 genotype 和 NCBI dbSNP 中所公佈的 HAN-CHINESE 有部分差異。NCBI 的結果是 G:C=0.878:0.122，而研究結果顯示台灣群族約為 G:C=0.69:0.31，且實驗中所取的樣品數還是 NCBI 的兩倍以上。因此，NCBI datase 的 SNP 並不可完全視為 Taiwanese SNP，且其中所存在的差異性和結果可以會因為人種、族群或者是生活環境的不同而有所差異。但彼此之間的差異性到底有多大，藉此去驗證這些資訊在台灣的情形對於本土

的研究是很有幫助且重要的。這些規劃的 SNP genotyping 亦需要進一步修正，以合乎需求。若檢體部份的獲得可以更順利，則可繼續更深入探討和研究

伍、結論與建議

1. 希望藉由上述結果更進一步建立三黃瀉心湯中其他成份的定量分析，並建立更完整的三黃瀉心湯中草藥基源資料庫(指紋圖)，加強藥材品質管制，包括了台灣所含黃芩屬和黃連屬的植物。
2. 透過進行更多不同類型活性測試，配合更多化合物的定量結果去探討出真正活性指標成分和更精確的排列組合模式。
3. 此次 SNP 分析部份的結果發現了部份 Taiwanese SNP 與所謂的亞洲族群有所差異。首先，亞洲人種的含括範圍太廣泛了，雖然彼此歸為黃種人，但是當中還可以細分成各大民族或人種，彼此之間的 genotype 一定是有所差異。例如 NCBI database 中的亞洲族群的大和民族和漢族其彼此間的 SNP 分析結果也不盡然相同。因此，台灣群族的 genotype 或許尤其特別或者不同之處，但是彼此之間的差異性到底有多大，藉此去驗證這些資訊在台灣的情形對於本土的研究是很有幫助且重要的。

陸、參考文獻

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會(計畫編號:CCMP94-RD-050)提供經費贊助，使本計劃得以順利完成，特此誌謝。

Nonaka Gen-Ichiro, Nishioka Itsuo, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 1983, 31(5), 1652-1658.

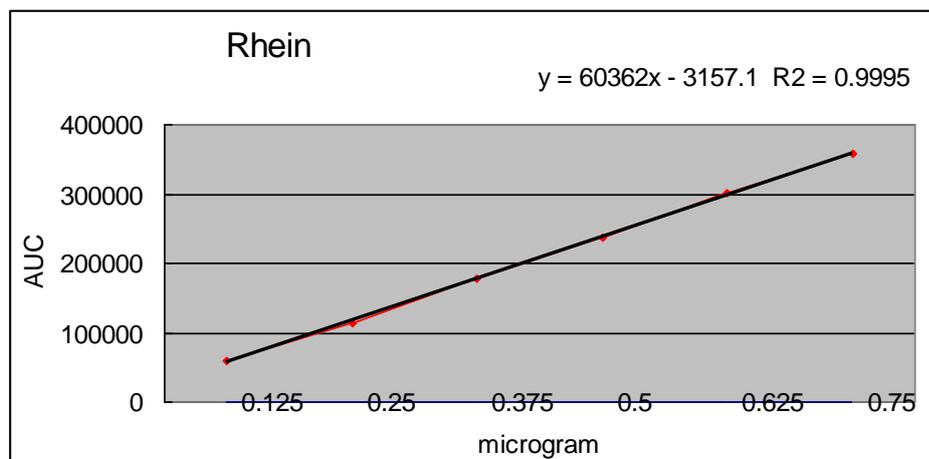
Ermias Dagne, Wolfgang Steglich, *Phytochemistry*, 1984, 23(8), 1729-1731.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

柒、圖、表

- Rhein 之線性迴歸結果圖、6 重複定量結果數據以及線性回歸方程式

1. 線性迴歸結果圖表



2. 6 重複定量結果數據

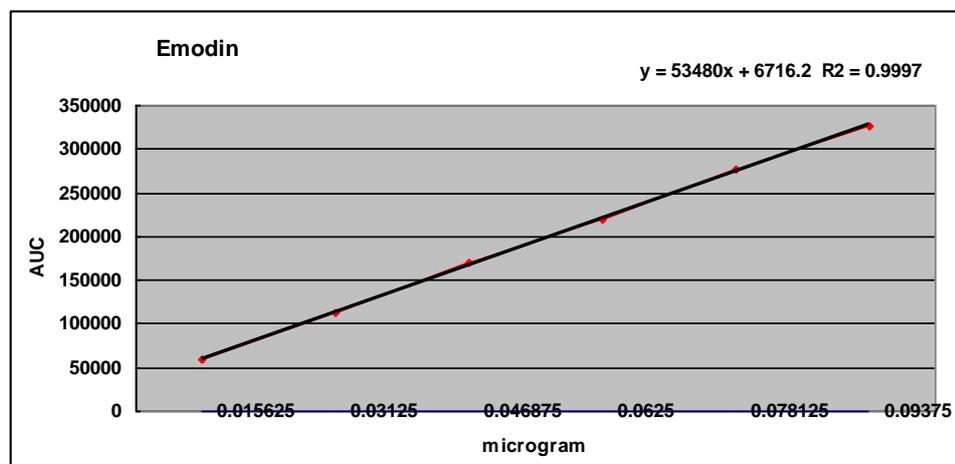
	0.125(μg)	0.250 (μg)	0.375 (μg)	0.50 (μg)	0.625 (μg)	0.750 (μg)
Rep-1	60175	112062	174239	234334	294521	357264
Rep-2	61574	115900	176566	239073	307225	361203
Rep-3	59975	112324	176070	239229	301095	355151
Rep-4	61124	115884	177062	239325	299417	364241
Rep-5	60031	112986	176300	238944	301914	356380
Rep-6	59777	114933	179954	237710	300184	357758
Mean	60443.1	114015.7	176699.8	238104.2	300728.1	358668.7
RSD	1.2031	1.6762	1.0542	0.8138	1.3653	0.9487

3. 6 重複線性回歸方程式

	線性回歸方程式	R ²
Rep-1	Y = 59798X - 3859.2	0.9994
Rep-2	Y = 60989X - 3205.9	0.9990
Rep-3	Y = 60153X - 3227.9	0.9991
Rep-4	Y = 60813X - 3335.9	0.9995
Rep-5	Y = 60319X - 3358.1	0.9992
Rep-6	Y = 60098X - 1955.4	0.9997
Mean	Y = 60362X - 3157.1	0.9995

- Emodin 之線性迴歸結果圖、6 重複定量結果數據以及線性回歸方程式

1. 線性迴歸結果圖表



2. 6 重複定量結果數據

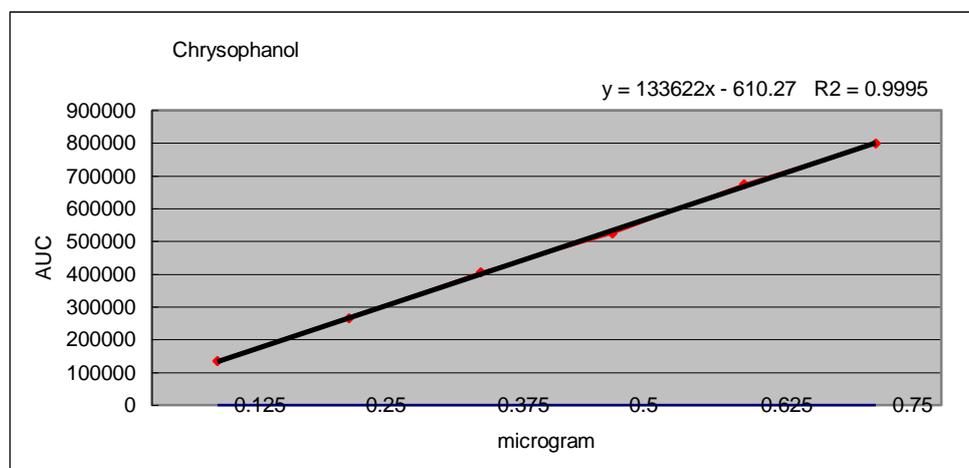
	0.015625 (μg)	0.03125 (μg)	0.046875 (μg)	0.06250 (μg)	0.078125 (μg)	0.09375 (μg)
Rep-1	58577	113492	168968	218671	271699	327466
Rep-2	59874	111005	173063	219566	273970	327044
Rep-3	60714	113047	169518	221031	279654	325257
Rep-4	60021	114092	168045	218671	280002	325466
Rep-5	57711	112124	168441	220017	272970	324014
Rep-6	58073	115304	167518	222131	275998	324033
Mean	59162.1	113178.2	169260.1	220016.2	276217.6	325549.2
RSD	2.0405	1.3285	1.1756	0.6207	1.0750	0.4484

3. 6 重複線性回歸方程式

	線性回歸方程式	R^2
Rep-1	$Y = 53651X + 5868.6$	0.9998
Rep-2	$Y = 53464X + 6962.2$	0.9991
Rep-3	$Y = 53544X + 7465.3$	0.9993
Rep-4	$Y = 53588X + 6824.7$	0.9992
Rep-5	$Y = 53304X + 5983.3$	0.9997
Rep-6	$Y = 53328X + 7193.3$	0.9995
Mean	$Y = 53480X + 6716.2$	0.9997

● Chrysophanol 之線性迴歸結果圖、6 重複定量結果數據以及線性迴歸方程式

1. 線性迴歸結果圖表



2. 6 重複定量結果數據

	0.125(μg)	0.250 (μg)	0.375 (μg)	0.50 (μg)	0.625(μg)	0.750 (μg)
Rep-1	133274	261210	406190	526415	666860	800548
Rep-2	137111	265784	405559	525464	678284	793126
Rep-3	130714	269240	407855	522287	671469	800154
Rep-4	131980	266928	410594	527632	668853	806795
Rep-5	130748	260298	399937	525253	685623	806938
Rep-6	137778	267154	400138	522257	674642	789281
mean	133601.3	265103.2	405046.8	524886.3	674290.6	799476.2
RSD	1.981674	1.440188	1.049962	0.417521	1.021548	0.893471

3. 6 重複線性迴歸方程式

	線性迴歸方程式	R^2
Rep-1	$Y = 133530X - 1605.0$	0.9996
Rep-2	$Y = 132499X + 3806.7$	0.9991
Rep-3	$Y = 133381X + 121.27$	0.9993
Rep-4	$Y = 134197X - 891.80$	0.9995
Rep-5	$Y = 136635X - 10091$	0.9990
Rep-6	$Y = 131489X + 4998.5$	0.9992
Mean	$Y = 133622X - 610.27$	0.9995

附件五

行政院衛生署中醫藥委員會中藥材指標成分物理化學資料表
 指標成分名稱：Emodin

I. 植物來源 (Origins)

中文名 (Chinese name)	大黃
學名 (scientific name)	<i>Rheum palmatum</i>
使用部位 (used part)	根莖部
其他植物來源 (others)	

II. 基本資料 (General Information)

1. 化合物名稱 (Name of Compound)				
其它名稱 (Other name)		Emodin		
化學名 (IUPAC)				
結構類別		(Classification & type) Anthraquinone types		
2. 結構式與分子量 (Structure Formulas and Molecular Weight)				
分子式 (Molecular formula)	結構式 (Structural formula)			
$C_{15}H_{10}O_5$				
分子量 (Molecular weight)				270
3. 物理化學性狀 (Physical and Chemical Properties)				
常溫形狀 (State of Matter)	針狀晶體	顏色 (Color)	橘色	
比重 d_4^{20} *		氣味 (Odor)		
熔點 (Melting point) *	262-264°C	* (n_D^t)		
沸點 (Boiling point) *		燃點 (Flash point) *		

註：“*” 指不適用時可不填寫。

續上頁 3. 物理化學性狀資料....

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

註：“*” 指不適用時可不必填寫。

III. 光譜資料 (Spectral Data)

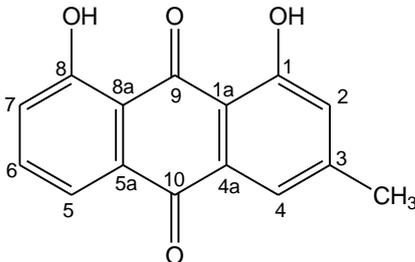
<p>1. 紫外線光譜(UV)</p>	<p style="text-align: right;">附圖：</p>
<p>2. 紅外線光譜(IR)</p>	<p style="text-align: right;">附圖：</p>
<p>3. 質譜 (MS)</p>	<p style="text-align: right;">附圖：</p>

指標成分名稱：Chrysophanol

I. 植物來源 (Origins)

中文名 (Chinese name)	大黃
學名 (scientific name)	<i>Rheum palmatum</i>
使用部位 (used part)	根莖部
其他植物來源 (others)	

II. 基本資料 (General Information)

1. 化合物名稱 (Name of Compound)			
其它名稱 (Other name) Chrysophanol			
化學名 (IUPAC)			
結構類別 (Classification & Type) Anthraquinone types			
2. 結構式與分子量 (Structure Formulas and Molecular Weight)			
分子式 (Molecular formula)	結構式 (Structural formula)		
$C_{15}H_{10}O_4$			
分子量 (Molecular weight)			
254			
3. 物理化學性狀 (Physical and Chemical Properties)			
常溫形狀 (State of Matter)	針狀結晶	顏色 (Color)	黃色
比重 (d_4^{20}) *		氣味 (Odor)	
熔點 (Melting point) *	192-194°C	* (n_D^t)	
沸點 (Boiling point) *		燃點 (Flash point) *	

註：“*” 指不適用時可不填寫。

續上頁 3. 物理化學性狀資料....

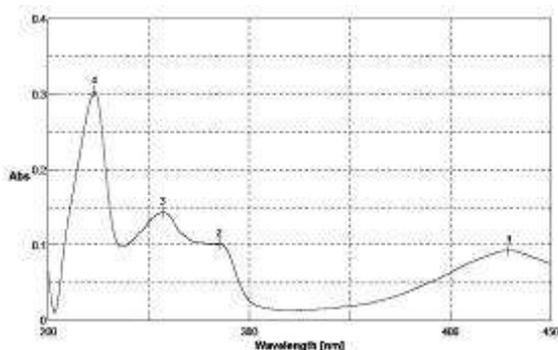
可溶於 (Soluble in)			
$[\alpha]_D^{25}$			
碘價* (Iodine value)		酸價* (Acid value)	
鹼價* (Saponification value)			

註：“*”指不適用時可不必填寫。

III. 光譜資料 (Spectral Data)

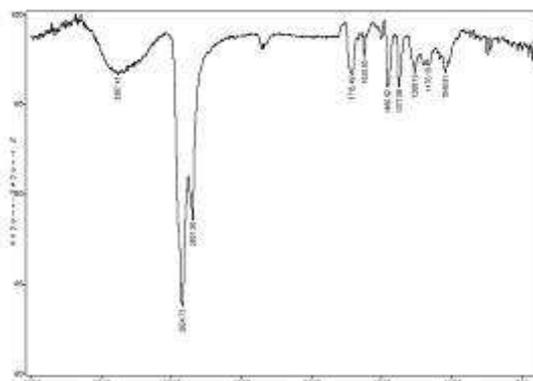
1. 紫外線光譜 (UV)

附圖：



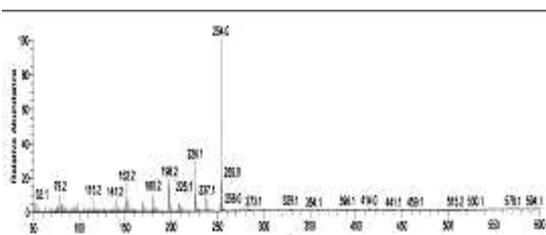
2. 紅外線光譜 (IR)

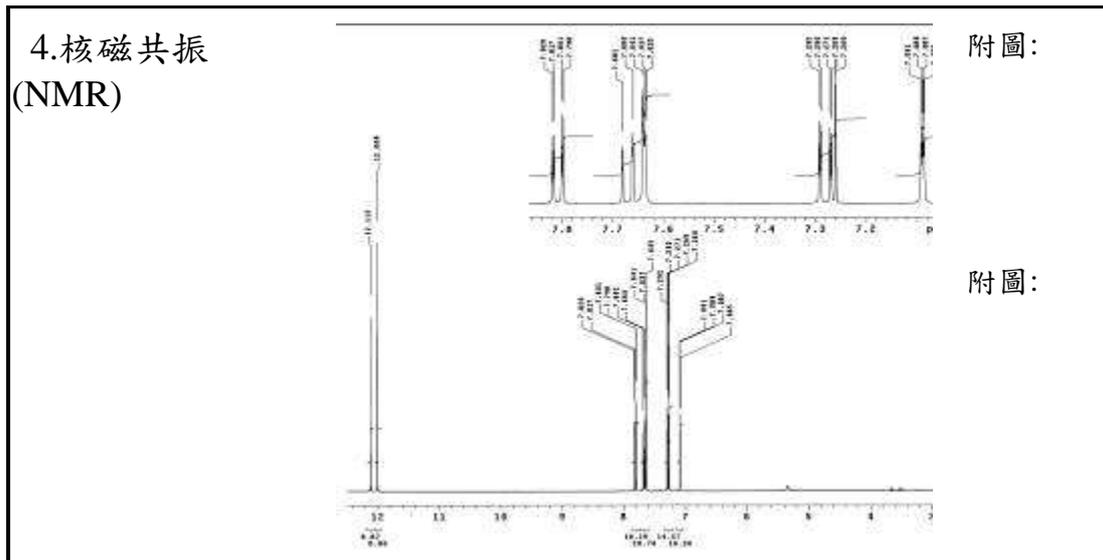
附圖：



3. 質譜 (MS)

附圖：





註：各光譜資料應列明條件資料如符號、單位、溶劑等。

IV.層析法資料 (Chromatographic Data)

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

V.儲存條件 (Storage Condition)

溫度 (temp)	濕度 (humidity)*		
儲存容器 (container)*	厭氧性 (vacuum)*		

註：“*” 若需特別條件貯存時，請務必填寫。

附件

HPLC			
附圖			
儀器廠牌型號 (Instrument)	Shimadzu diode array detector SPM-M10Avp		
	Shimadzu liquid chromatograph pump LC-10ATvp		
	Shimadzu degasser & mixer DGU-14A & FCV-10ALvp		
	Shimadzu system controller SCL-10Avp		
Shimadzu auto injector SIL-10ADvp			
偵測器 (Detector)	Shimadzu diode array detector SPM-M10Avp		
管柱規格 (Column type)	Mightysil [®] 分析用 Column (Analytical:5×250 mm)		
充填劑 (Column packing)		管柱溫度 (Column temp.)	常溫
移動相 (Mobile phase)	MeOH-H ₂ O 和 0.1% TFA (trifluoroacetic acid) -MeOH-H ₂ O	流速 (Flow rate)	1.0 mL/min
注入體積 (Injection vol.)	20μl	內標準 (Internal standard)	
檢品溶媒 (Dissolving solvent)	MeOH	偵測器波長 (Detector wavelength)	254 nm
滯留時間 (Retention time)	60 mins	流速 (Flow rate)	1.0 mL/min
純度 (Purity)			

註：HPLC 分析之試驗方法請參考下列事項：

1. 所分離得到之對照用標準品，試驗前能經常溫或矽膠及 24 小時減壓乾燥。
2. 分離管柱移動相之選擇，以檢液 1 mg/ml 之濃度，注入量為 20μl，檢測波長以最大吸收波長為原則 ($E_{1cm}^{1\%}$)。
3. 檢測出之感度，以前述檢品溶液之 1/100 濃度，注入 HPLC 分析，其波峰交度以整個 scale 之 10% 為原則。
4. 記錄時間以主波峰 t_R 之 2~3 倍為原則。
5. 對照用標準品純度希達 99.0% 之相對純度。