

編號：CCMP94-RD-008

中藥材 HPLC 檢測方法之研究

賴宏亮

國立屏東科技大學

摘 要

本計畫丁香、山茱萸、山梔子、杏仁、防己、防風、黃芩、黃連、橘紅及龍膽等 10 種藥材為研究對象，開發高效液相層析(HPLC)方法。丁香以 eugenol 為指標成分，山茱萸以 loganin 為指標成分，山梔子以 geniposide 為指標成分，杏仁以 amygdalin 為指標成分，防己以 tetrandrine 為指標成分，防風以 5-O-methylvisamminol 為指標成分，黃芩以 baicalin、baicalein、wogonin 為指標成分，黃連以 berberine、coptisine、palmatine、berberrubine 為指標成分，橘紅以 hesperidin、nobiletin、tangeretin 為指標成分，龍膽以 gentiopicroside、swertiamarin 為指標成分，開發各藥材之 HPLC 分析方法，可達到各藥材品質管制之目的。這 10 種方劑之 HPLC 分析方法經確效試驗之驗證，得到安定且值得信賴之定量法，建立檢驗標準，達到品質管制之目的。

關鍵詞：丁香、山茱萸、山梔子、杏仁、防己、防風、黃芩、黃連、橘紅、龍膽

Number: CCMP94-RD-008

Studies on the Analysis Method in Chinese Herbal Medicine by HPLC

Hornng-Liang Lay

National Pingtung University of Science & Technology

ABSTRACT

This project, we selected Chinese herbal medicines, Caryophylli Flos, Corni Fructus, Gardeniae Fructus, Armeniacae Semen, Stephaniae Tetrandrae Radix, Ledebouriellae Radix, Scutellariae Radix, Coptidis Rhizoma, Citri Exocarpium Rubrum, and Gentianae Scabrae Radix for model drugs to develop analytic HPLC techniques. Eugenol in Caryophylli Flos, loganin in Corni Fructus, geniposide in Gardeniae Fructus, amygdalin in Armeniacae Semen, tetrandrine in Stephaniae Tetrandrae Radix, 5-O-methylvisamminol in Ledebouriellae Radix, baicalin, baicalein, wogonin in Scutellariae Radix, berberine, coptisine, palmatine, berberrubine in Coptidis Rhizoma, hesperidin, nobiletin, tangeretin in Citri Exocarpium Rubrum, gentiopicroside, swertiamarin in Gentianae Scabrae Radix were used as indicator components to analyze multi-components simultaneously by HPLC. The analytic HPLC methods described above have been confirmed to be reliable for quantification. These methods can also be used to establish standards for quality control to ensure the accuracy and efficiency in Chinese herbal medicine.

Keywords : Caryophylli Flos, Corni Fructus, Gardeniae Fructus, Armeniacae Semen, Stephaniae Tetrandrae Radix, Ledebouriellae Radix, Scutellariae Radix, Coptidis Rhizoma, Citri Exocarpium Rubrum, Gentianae Scabrae Radix

壹、前言

近年來中草藥的風潮席捲全球，根據世界衛生組織統計，全世界約有 40 億人使用中草藥，且估計中草藥的開發在 10 年內將在世界上全面興起。去年全球中草藥市場規模已突破 200 億美元，各區域佔有率中，排名最高為歐洲佔 41%、北美洲佔 22% 次之、第三為日本及其他國家佔 14%、中國大陸則為 3%，並且每年以 10% 幅度快速成長，國內的相關市場約 150-250 億元新台幣⁽¹⁾。造成全球重視中草藥開發的主要因為各國法令明確，明定管理機制，讓有意參與投資的廠商依法可循，加速產業發展。中草藥為我國傳統醫學之用藥，經歷數千年而不衰，是非常重要的文化資源，值得加以發揚光大，台灣應趁全世界的中草藥市場正大幅成長中，且西方世界剛剛起步之時，將中草藥科學化，是切入全球醫藥市場之大好良機。

行政院召開第三次生物技術策略 (SRB) 會議提出三個議題，其中包括「中草藥研究開發規劃」，此規劃係基於中草藥開發為國內推動生物技術產業之獨特利基，因此延續第二次會議議題「中藥發展策略」⁽²⁾，更提出具體發展計畫。在第四次生物技術策略 (SRB) 會議中亦有相關之議題「中草藥研發及市場之國際化」。由以上顯現政府對中草藥長期發展之重視程度且不遺餘力。此外，中醫藥委員會在「研發中草藥的步驟與展望」⁽³⁾中，亦希望將臺灣發展成中草藥科技島，繼電子業後，期待中草藥帶動臺灣產業開創國際市場的另一片天空。

產品之優劣取決於品質與有效性，在「研發中草藥的步驟與展望」第一項亦指出「提昇與管控中草藥的品質」，要推動中草藥，最先決條件要提昇與管控中草藥的品質，一旦中草藥品質參差不齊，就會影響到療效。然而生物之多樣性，包含物種多樣性、遺傳多樣性和生態多樣性，而中草藥也不例外，就單一中草藥而言，其產地、品種、栽培方法、採收期、採收部位及炮製方法的不同，其所含成分的種類及含量亦有所不同。以山藥 (*Dioscorea* spp.) 為例，全世界之薯蕷科植物約有 650 種，主要分佈於溫、熱帶地區約 250 種⁽⁴⁻⁶⁾。臺灣在花蓮、台東、南投、雲林、嘉義、屏東及台北縣均有栽培山藥，共有 14 種及 5 變種，而以田薯 (*D. alata* L.)、紫田薯 (*D. alata* L. var. *purpurea* (Roxb.) M. Pouch)、長薯 (*D. batatas* Decne)、黃藥 (*D. bulbifera* L.)、基隆山藥 (*D. japonica* Thunb. Var. *pseudojaponica* (Hay.) Yamamoto) 及恆春山藥 (*D.*

doryophora Hance) 為主⁽⁷⁾。筆者研究室的同仁曾赴恆春半島採集野生恆春山藥，範圍包括恆春鎮、滿洲鄉、車城鄉、牡丹鄉和獅子鄉等各鄉鎮十八個村落，共採集 50 個樣本，並從中挑選 40 個具代表性之樣本，在屏東科技大學進行田間試驗栽培觀察，結果發現 40 個樣本在葉部外觀性狀的表現有極大的差異，以 RAPD 法分析及以 allantoin、adenosine 等成分為指標進行品質分析亦呈現多樣化之結果。這樣多元化的結果是造成中草藥藥材容易誤用混用及品質差異相當大的主要因素。因此必需以精密的分析儀器設備，針對常用中藥材開發定性與定量分析方法，以瞭解品質之差異性。

本計畫將以行政院衛生署中醫藥委員會公告九十四年度中藥品質管制研究類徵求研究重點項目之“誤用混用藥材品項”中選擇丁香、山茱萸、山梔子、杏仁、防己、防風、黃芩、黃連、橘紅及龍膽等 10 種藥材，進行開發各種指標成分之高效液相層析 (HPLC) 分析方法，並經確效試驗之驗證，得到安定且值得信賴之定量法，建立檢驗標準，為品質評價提供科學依據，以確保藥材原料或產品之正確性及有效性，並提供一較完整可行之參考資料。

貳、材料與方法

一、材料

(一) 藥材之收集

從行政院衛生署中醫藥委員會公告九十四年度中藥品質管制研究類徵求研究重點項目之“誤用混用藥材品項”中選擇丁香、山茱萸、山梔子、杏仁、防己、防風、黃芩、黃連、橘紅及龍膽等 10 種藥材為研究對象。將至全省北、中、南之藥材市場進行上述 10 種藥材之採購收集，每種藥材至少收集 20 種以上之樣本數。

(二) 指標成分及內部標準物質

1. 丁香：eugenol (內標 Propyl paraben)
2. 山茱萸：loganin (內標 Thymol)
3. 山梔子：geniposide (內標 Thymol)
4. 杏仁：amygdalin (內標 Thymol)
5. 防己：tetrandrine, sinomenine, aristolochic acid, 但本研究以粉防己為主，tetrandrine 為粉防己之特有成分，因此本研究之報告僅使用 tetrandrine 當指標成分。其餘 sinomenine, aristolochic acid 各為漢防己及廣防己之特有成分，在本研究中應用藥材基原之篩選 (內標 3,4-Dihydroxybenzaldehyde)
6. 防風：5-O-methylvisamminol (內標 Rutin)
7. 黃芩：baicalin, baicalein, wogonin (內標 Propyl paraben)
8. 黃連：berberine, coptisine, palmatine, berberrubine (內標 3,4-Dihydroxybenzaldehyde)
9. 橘紅：hesperidin, nobiletin, tangeretin (內標 Naphthalene)
10. 龍膽：gentiopicroside, swertiamarin (內標 Thymol)

(三) 試藥及溶媒

95% Ethanol (公賣局)、超純水 (18MΩ, Millipore)、Acetonitrile (LC 級)、Methanol (LC 級)、Phosphoric acid (特級)、0.45 μm 濾膜 (Millipore)、95% ethanol 等。

二、HPLC 分析方法

(一) 藥材檢品溶液之製備

稱取丁香、山茱萸、山梔子、杏仁、防己、防風、黃芩、黃連、橘紅及龍膽等 10 種藥材各 2g，加 methanol 100mL 進行迴流萃取，萃取時間為 3 小時。萃取後利用布氏漏斗以 No.2 濾紙過濾，再經濃縮後定容於 5mL，並添加適量內部標準品溶液，再經 0.45μm 濾膜過濾後，供作 HPLC 定量之檢品溶液。

(二) 分析方法之建立^(8,9)

1. 高效液相層析儀系統配備

- (1) 高效液相層析儀：Hitachi 系統
- (2) Autosampler L-7200
- (3) UV/Vis Detector L-7420
- (4) Pump L-7100
- (5) Interface D-7000
- (6) Data analysis：Computer control

2. 以 HPLC 來分離樣品，循以下步驟來求得適當的分離條件：

- (1) 按所要分析之樣品的特性，來選擇所要的層析模式、偵測器及偵測波長。
- (2) 決定最初的操作條件。
- (3) 進行第一次的操作條件。

- (4) 由實驗所得的層析圖，判斷改進分離結果所需改變的條件。
- (5) 以改變後的條件，進行再一次的實驗。
- (6) 重複步驟(4)及(5)，直到求得最佳結果。
- (7) 決定高效液相層析條件包括固定相之層析管柱種類及長度、移動相溶媒系統、流速、檢測器波長及注入量等。

3. Calibration curve 之建立^(8,9)

精確量取各藥材對照標準品並添加適量之 70% methanol 稀釋調配成一系列不同濃度標準品溶液，其配製之溶液分述如下：

- (1) 丁香：Eugenol: 51.25、102.5、205.0、410.0、820.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (2) 山茱萸：Loganin: 26.25、52.5、105.0、210.0、420.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (3) 山梔子：Geniposide: 18.75、37.5、75.0、150.0、300.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (4) 杏仁：Amygdalin: 18.75、37.5、75.0、150.0、300.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (5) 防己：Tetrandrine: 25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (6) 防風：5-O-methylvisamminol: 12.5、25.0、50.0、100.0、200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (7) 黃芩：
 - a. Baicalin: 22.50、45.0、90.0、180.0、360.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
 - b. Baicalein: 25.0、50.0、100.0、200.0、400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
 - c. Wogonin: 1.00、2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (8) 黃連：
 - a. Berberrubine: 8.13、16.25、32.5、65.0、130.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
 - b. Coptisine: 5.00、10.0、20.0、40.0、80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
 - c. Berberine: 4.06、8.13、16.25、32.5、65.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
 - d. Palmatine: 5.31、10.63、21.25、42.5、85.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (9) 橘紅：

a. Hesperidin: 6.25、12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。b. Nobiletin: 3.75、7.5、15.0、30.0、60.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。c. Tangertin: 在 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

(10) 龍膽

a. Gentiopicroside: 18.75、37.5、75.0、150.0、300.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。b. Swertiamarin: 3.12、6.25、12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

上述各藥材之標準品溶液皆添加適量內部標準品，並經 0.45 μm 濾膜過濾後，供製作標準曲線之溶液，各取 20 μL 注入 HPLC 進行分析，以標準品與內部標準品各波峰面積比為 Y 軸及標準品之濃度為 X 軸，繪圖製作檢量線，並求得標準曲線之線性回歸方程式 ($y=ax+b$) 及相關係數 (γ)。

4. 分析方法之確效試驗 (validation) ^(8,9)

(1) 同日內 (intra-day)、異日內 (inter-day)

取上述配製完成之檢量線各標準品溶液低、中、高三種濃度，同一濃之標準品溶液分別於 24 小時內及每 24 小時間隔以循環方式分析三次，並分別計算同濃度檢品所得之對照標準品面積比之平均值、標準偏差及變異係數。

5. 回收率 (recovery)

(1) 取檢品溶液 1.5mL，分別添加三種不同濃度 (分別為低濃度 C_l 、中濃度 C_m 、高濃度 C_h) 之指標成分標準品溶液，且每一濃度均重複操作三組，添加適量之標準品，經 0.45 μm 過濾膜過濾，以供 HPLC 分析，分別所得之濃度各為 C_1 - C_3 。

(2) 分析未添加標準品溶液之標準湯劑之指標成分濃度 C_0 。

(3) 依所求得之檢量線推算，求分析所得指標成分含量為添加入之百分率。

參、結果

一、丁香之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column : Inertsil 5 ODS-2 , 4.6 I.D.×250mm 。
2. 移動相 : water 及 acetonitrile (各以磷酸調其 pH 值為 2.8) 進行梯度沖提 , 沖提程式如表一 。
3. 注入量 : 20 μ L 。
4. 流速 : 1mL/min 。
5. 檢出波長 : UV250nm 。

(二) HPLC 之分離

由層析圖一所示 , Eugenol 之滯留時間為 14.43 分、內部標準物質 Propyl paraben 之滯留時間為 12.09 分 , 各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍 , 在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾 , 均有良好分離效果 。

(三) 確效試驗

表二-三為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。Eugenol 在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果 , CV 值有均小於 5% , 再現性良好(表二) 。 Recovery 檢測則在 80.45-94.78%之間 , 具有良好的回收率 (表三) 。

(四) 檢量線之製作

Eugenol : 在 51.25-820.00 μ g/mL 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0028x+0.0105$ ($r=0.9999$, $n=3$) 。

Eugenol 之檢量線均可得到良好的直線關係 , 並可求出 Eugenol 濃度及含量 。

(五) 丁香之定量結果

定量結果顯示 Eugenol 在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍為 $6,284.67 \pm 0.30$ - $8,196.29 \pm 3.81 \mu\text{g/g}$ ，差異約 1.3 倍(表四)。

二、防風之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column：Inertsil 5 ODS-2，4.6 I.D.×250mm。
2. 移動相：water 及 acetonitrile (各以磷酸調其 pH 值為 2.8) 進行梯度沖提，沖提程式如表五。
3. 注入量：20 μL 。
4. 流速：1mL/min。
5. 檢出波長：UV250nm。

(二) HPLC 之分離

由層析圖二所示，5-O-methylvisamminol 之滯留時間為 15.52 分、內部標準物質 Rutin 之滯留時間為 9.47 分，各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍，在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果。

(三) 確效試驗

表六-七為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。5-O-methylvisamminol 在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，CV 值有均小於 5%，再現性良好(表六)。Recovery 檢測則在 83.45-96.78%之間，具有良好的回收率(表七)。

(四) 檢量線之製作

5-O-methylvisamminol：在 12.5-200.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0288x+0.0208$ ($r=0.9999$, $n=3$)。

5-O-methylvisamminol 之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出 5-O-methylvisamminol 濃度及含量。

(五) 防風之定量結果

定量結果顯示 5-O-methylvisamminol 在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍為 407.41 ± 3.27 - $1,997.02 \pm 4.05$ $\mu\text{g/g}$ ，差異約 4.90 倍(表八)。

三、黃芩之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column : Inertsil 5 ODS-2 , 4.6 I.D.×250mm 。
2. 移動相 : 10%及 50% acetonitrile (各以磷酸調其 pH 值為 2.8) 進行梯度沖提，沖提程式如表九。
3. 注入量 : 20 μL 。
4. 流速 : 1mL/min 。
5. 檢出波長 : UV240nm 。

(二) HPLC 之分離

由層析圖三所示，Baicalin 之滯留時間為 6.77 分、Baicalein 之滯留時間為 20.45 分、Wogonin 之滯留時間為 25.81 分、內部標準物質 Propyl paraben 之滯留時間為 33.26 分，各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍，在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果。

(三) 確效試驗

表十-十一為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。三個指標成分在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，CV 值有均小於 5%，再現性良好 (表十)。Recovery 檢測則在 84.68-99.54%之間，具有良好的回收率 (表十一)。

(四) 檢量線之製作

Baicalin：在 22.5-360.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0109x+0.0035$ ($r=1.0000$, $n=3$)。

Baicalein：在 25.0-400.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0196x-0.0693$ ($r=0.9999$, $n=3$)。

Wogonin：在 1.0-16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.1785x-0.001$ ($r=0.9998$, $n=3$)。

三個指標成分之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出三個指標成分濃度及含量。

(五) 黃芩之定量結果

定量結果顯示 Baicalin、Baicalein 及 Wogonin 等三種指標成分在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍分別為 $15,059.61\pm 2.45$ - $40,386.67\pm 2.99\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $8,503.71\pm 4.78$ - $20,573.65\pm 0.81\mu\text{g}/\text{g}$ 、 546.03 ± 0.68 - $208.01\pm 1.57\mu\text{g}/\text{g}$ ，其差異範圍分別為 2.68 倍、2.42 倍及 2.63 倍（表十二-十四）。

四、龍膽草之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column：Inertsil 5 ODS-2，4.6 I.D. \times 250mm。
2. 移動相：5%及 100% acetonitrile（各以磷酸調其 pH 值為 2.8）進行梯度沖提，沖提程式如表十五。
3. 注入量：20 μL 。
4. 流速：1mL/min。
5. 檢出波長：UV240nm。

(二) HPLC 之分離

由層析圖四所示，Swertiamarin 之滯留時間為 14.96 分、

Gentiopicroside 之滯留時間為 20.28 分、內部標準物質 Thymol 之滯留時間為 32.59 分，各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍，在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果。

(三) 確效試驗

表十六-十七為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。二個指標成分在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，CV 值有均小於 5%，再現性良好（表十六）。Recovery 檢測則在 87.29-96.74% 之間，具有良好的回收率（表十七）。

(四) 檢量線之製作

Gentiopicroside：在 18.75-300.0 μ g/mL 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0107x+0.0061$ ($r=1.0000$, $n=3$)

Swertiamarin：在 3.13-50.0 μ g/mL 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0278x+0.0132$ ($r=1.0000$, $n=3$)

二個指標成分之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出二個指標成分濃度及含量。

(五) 龍膽草之定量結果

定量結果顯示 Gentiopicroside 及 Swertiamarin 等二種指標成分在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍分別為 6791.55 ± 0.96 - 39249.50 ± 1.52 μ g/g、 204.62 ± 4.29 - 1986.66 ± 2.60 μ g/g，其差異範圍分別為 3.84 倍、5.79 倍及 9.71 倍（表十八-十九）。

五、山梔子之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column：Inertsil 5 ODS-2，4.6 I.D.×250mm。
2. 移動相：20%及 100% acetonitrile（各以磷酸調其 pH 值為 2.8）進行梯度沖提，沖提程式如表二十。
3. 注入量：20 μ L。

4. 流速：1mL/min。

5. 檢出波長：UV220nm。

(二) HPLC 之分離

由層析圖五所示，Geniposide 之滯留時間為 4.94 分、內部標準物質 Thymol 之滯留時間為 22.67 分，各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍，在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果。

(三) 確效試驗

表二十一-二十二為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。Geniposide 在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，CV 值有均小於 5%，再現性良好（表二十一）。Recovery 檢測則在 89.74-98.48% 之間，具有良好的回收率（表二十二）。

(四) 檢量線之製作

Geniposide：在 18.75-300.0 μ g/mL 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0428x+0.0615$ ($r=0.999$, $n=3$)

Geniposide 之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出 Geniposide 濃度及含量。

(五) 山梔子之定量結果

定量結果顯示 Geniposide 在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍為 $22,990.02\pm 1.80$ - $50,902.80\pm 0.84$ μ g/g，差異約 2.21 倍（表二十三）。

六、山茱萸之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column：Inertsil 5 ODS-2，4.6 I.D.×250mm。

2. 移動相：10%及 100% acetonitrile（各以磷酸調其 pH 值為 2.8）

進行梯度沖提，沖提程式如表二十四。

3. 注入量：20 μ L。

4. 流速：1mL/min。

5. 檢出波長：UV240nm。

(二) HPLC 之分離

由層析圖六所示，Loganin 之滯留時間為 13.11 分、內部標準物質 Thymol 之滯留時間為 25.46 分，各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍，在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果。

(三) 確效試驗

表二十五-二十六為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。Loganin 在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，CV 值有均小於 5%，再現性良好（表二十五）。Recovery 檢測則在 92.00-110.00%之間，具有良好的回收率（表二十六）。

(四) 檢量線之製作

Loganin：在 26.25-420 μ g/mL 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0186x-0.0018$ ($r=1.0000$, $n=3$)。

Loganin 之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出 Loganin 濃度及含量。

(五) 山茱萸之定量結果

定量結果顯示 Loganin 在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍為 $2,727.00\pm 0.59$ - $4,883.42\pm 1.16$ μ g/g，差異約 1.79 倍（表二十七）。

七、杏仁之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column : Inertsil 5 ODS-2 , 4.6 I.D.×250mm 。
2. 移動相 : 10%及 60% acetonitrile (各以磷酸調其 pH 值為 2.8) 進行梯度沖提 , 沖提程式如表二十八 。
3. 注入量 : 20 μ L 。
4. 流速 : 1mL/min 。
5. 檢出波長 : UV220nm 。

(二) HPLC 之分離

由層析圖七所示 , Amygdalin 之滯留時間為 8.34 分、內部標準物質 Thymol 之滯留時間為 28.29 分 , 各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍 , 在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾 , 均有良好分離效果 。

(三) 確效試驗

表二十九-三十為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。Amygdalin 在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果 , CV 值有均小於 5% , 再現性良好 (表二十九) 。 Recovery 檢測則在 89.74-98.48% 之間 , 具有良好的回收率 (表三十) 。

(四) 檢量線之製作

Amygdalin : 在 18.75-300.0 μ g/mL 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0127x+0.0257$ ($r=0.9996$, $n=3$) 。

Amygdalin 之檢量線均可得到良好的直線關係 , 並可求出 Amygdalin 濃度及含量 。

(五) 杏仁之定量結果

定量結果顯示 Amygdalin 在 20 種不同來源之樣本數間 , 其含量範圍為 224.47 ± 0.85 - $2,864.68\pm 0.40$ μ g/g , 差異約 12.76 倍 (表三十一) 。

八、防己之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column：Inertsil 5 ODS-2，4.6 I.D.×250mm。
2. 移動相：water 及 acetonitrile (各以磷酸調其 pH 值為 2.8) 進行梯度沖提，沖提程式如表三十二。
3. 注入量：20 μ L。
4. 流速：1mL/min。
5. 檢出波長：UV230nm。

(二) HPLC 之分離

由層析圖八所示，Tetrandrine 之滯留時間為 26.89 分、內部標準物質 3,4-Dihydroxybenzaldehyde 之滯留時間為 12.89 分，各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍，在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果。

(三) 確效試驗

表三十三-三十四為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。Tetrandrine 在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，CV 值有均小於 5%，再現性良好 (表三十三)。Recovery 檢測則在 91.55-98.36% 之間，具有良好的回收率 (表三十四)。

(四) 檢量線之製作

Tetrandrine：在 25.0-400.0 μ g/mL 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0057x+0.0402$ ($r=0.9997$, $n=3$)。

Tetrandrine 之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出 Tetrandrine 濃度及含量。

(五) 防己之定量結果

定量結果顯示 Tetrandrine 在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍為 2365.23 ± 0.23 - $5138.52 \pm 0.94 \mu\text{g/g}$ ，差異約 2.17 倍（表三十五）。

九、黃連之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column：Inertsil 5 ODS-2，4.6 I.D.×250mm。
2. 移動相：10% 及 60% acetonitrile（各以磷酸調其 pH 值為 2.8）進行梯度沖提，沖提程式如表三十六。
3. 注入量：20 μL 。
4. 流速：1mL/min。
5. 檢出波長：UV260nm。

(二) HPLC 之分離

由層析圖九所示，Berberrubine 之滯留時間為 28.77 分、Coptisine 之滯留時間為 45.48 分、Berberine 之滯留時間為 60.03 分、Palmatine 之滯留時間為 63.42 分、內部標準物質 3,4-Dihydroxybenzaldehyde 之滯留時間為 13.08 分，各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍，在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果。

(三) 確效試驗

表三十七-三十八為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。四個指標成分在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，CV 值有均小於 5%，再現性良好（表三十七）。Recovery 檢測則在 90.38-102.73% 之間，具有良好的回收率（表三十八）。

(四) 檢量線之製作

Berberrubine：在 8.13-130.0 $\mu\text{g/mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0081x-0.0046$ ($r=0.9998$, $n=3$)。

Coptisine：在 5.0-80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0166x-0.0223$ ($r=0.9999$, $n=3$)。

Berberine：在 4.06-65.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0251x-0.0147$ ($r=0.9996$, $n=3$)。

Palmitine：在 5.31-85.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0245x-0.0138$ ($r=0.9998$, $n=3$)。

四個指標成分之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出四個指標成分濃度及含量。

(五) 黃連之定量結果

定量結果顯示 Berberrubine、Coptisine、Berberine 及 Palmitine 等四種指標成分在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍為分別為 $1,197.06\pm 0.28$ - $3,185.22\pm 0.24\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $3,996.74\pm 2.45$ - $9,944.47\pm 1.20\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $14,698.95\pm 1.35$ - $30,178.57\pm 3.18\mu\text{g}/\text{g}$ 、 $3,859.47\pm 1.28$ - $7,894.72\pm 2.36\mu\text{g}/\text{g}$ ，其差異範圍分別為 2.66 倍、2.49 倍、2.05 倍及 2.05 倍（表三十九-四十二）。

十、橘紅之 HPLC 分析

(一) 分析條件

1. Column：Inertsil 5 ODS-2, 4.6 I.D.×250mm。
2. 移動相：20%及 80% acetonitrile（各以磷酸調其 pH 值為 2.8）進行梯度沖提，沖提程式如表四十三。
3. 注入量：20 μL 。
4. 流速：1mL/min。
5. 檢出波長：UV250nm。

(二) HPLC 之分離

由層析圖十所示，Hesperidin 之滯留時間為 17.55 分、Nobiletin 之滯留時間為 31.85 分、Tangeretin 之滯留時間為 39.63

分、內部標準物質 Naphthalene 之滯留時間為 48.89 分，各指標成分之波峰純度經 Photodiode array (PDA) detector 確認均達到可接受範圍，在此分離條件下各成分之波峰未受到方劑中其他成分干擾，均有良好分離效果。

(三) 確效試驗

表四十四-四十五為 intra-day、inter-day 及 recovery 之確效試驗結果。三個指標成分在低、中、高濃度之 intra-day 及 inter-day 檢測結果，CV 值有均小於 5%，再現性良好(表四十四)。Recovery 檢測則在 87.65-98.76%之間，具有良好的回收率(表四十五)。

(四) 檢量線之製作

Hesperidin：在 6.25-100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.007x+0.0099$ ($r=0.9995$, $n=3$)

Nobiletin：在 3.75-60.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.1033x-0.0404$ ($r=0.9998$, $n=3$)

Tangeretin：在 2.5-40.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度範圍標準曲線方程式為 $y=0.0685x-0.0188$ ($r=0.999$, $n=3$)

三個指標成分之檢量線均可得到良好的直線關係，並可求出三個指標成分濃度及含量。

(五) 橘紅之定量結果

定量結果顯示 Hesperidin、Nobiletin 及 Tangeretin 等三種指標成分在 20 種不同來源之樣本數間，其含量範圍為分別為 3842.06 ± 0.94 - $14769.17\pm 1.27\mu\text{g}/\text{g}$ 、 307.41 ± 1.29 - $681.20\pm 1.42\mu\text{g}/\text{g}$ 、 79.92 ± 4.59 - $257.44\pm 4.18\mu\text{g}/\text{g}$ ，其差異範圍分別為 3.84 倍、2.22 倍及 3.22 倍(表四十六-四十八)。

肆、討論

- 一、丁香以 eugenol 為指標成分，山茱萸以 loganin 為指標成分，山梔子以 eniposide 為指標成分，杏仁以 amygdalin 為指標成分，防己以 tetrandrine 為指標成分，防風以 5-O-methylvisamminol 為指標成分，黃芩以 baicalin、baicalein、wogonin 為指標成分，黃連以 berberine、coptisine、palmatine、berberrubine 為指標成分，橘紅以 hesperidin、nobiletin、tangeretin 為指標成分，龍膽以 gentiopicroside、swertiamarin 為指標成分，開發各藥材之 HPLC 分析方法，可達到各藥材品質管制之目的。
- 二、HPLC 分析方法之 intra-day、inter-day、recovery 等確效試驗，其準確度及再現性良好。
- 三、完成各指標成分檢量線之製作，經回歸統計分析均可得到良好的直線性及相關系數。
- 四、完成 10 種藥材各 20 種不同來源樣品之定量分析。

伍、結論與建議

- 一、本研究共開發丁香、山茱萸、山梔子、杏仁、防己、防風、黃芩、黃連、橘紅及龍膽等 10 種藥材之 HPLC 分析方法。
- 二、10 種藥材之 HPLC 分析方法皆經同日間 (inter-day)、異日間 (intra-day) 及回收率 (recovery) 等確效試驗之驗證，為安定性、再現性良好且值得信賴之多指標成分同時定量分析技術，可減少藥材或製劑的分析時間並提高定量之效率，達到品質管制之目的。
- 三、10 種藥材全省北、中、南收集的樣品經 HPLC 定量分析調查結果，丁香之 Eugenol 含量範圍為 $6,284.67 \pm 0.30$ - $8,196.29 \pm 3.81$ $\mu\text{g/g}$ ，差異約 1.3 倍；防風之 5-O-methylvisamminol 含量範圍為 407.41 ± 3.27 - $1,997.02 \pm 4.05$ $\mu\text{g/g}$ ，差異約 4.90 倍；黃芩之 Baicalin、Baicalein 及 Wogonin 等三種指標成分含量範圍為分別為 $15,059.61 \pm 2.45$ - $40,386.67 \pm 2.99$ $\mu\text{g/g}$ 、 $8,503.71 \pm 4.78$ - $20,573.65 \pm 0.81$ $\mu\text{g/g}$ 、 208.01 ± 1.57 - 546.03 ± 0.68 $\mu\text{g/g}$ ，其差異範圍分別為 2.68 倍、2.42 倍及 2.63 倍；龍膽草之 Gentiopicroside 及 Swertiamarin 等二種指標含量範圍為分別為 $6,791.55 \pm 0.96$ - $39,249.50 \pm 1.52$ $\mu\text{g/g}$ 、 204.62 ± 4.29 - $1,986.66 \pm 2.60$ $\mu\text{g/g}$ ，其差異範圍分別為 5.79 倍及 9.71 倍；山梔子之 Geniposide 含量範圍為 $22,990.02 \pm 1.80$ - $50,902.80 \pm 0.84$ $\mu\text{g/g}$ ，差異約 2.21 倍；山茱萸之 Loganin 含量範圍為 $2,727.00 \pm 0.59$ - $4,883.42 \pm 1.16$ $\mu\text{g/g}$ ，差異約 1.79 倍；杏仁之 Amygdalin 含量範圍為 224.47 ± 0.85 - $2,864.68 \pm 0.40$ $\mu\text{g/g}$ ，差異約 12.76 倍；防己之 Tetrandrine 含量範圍為 2365.23 ± 0.23 - 5138.52 ± 0.94 $\mu\text{g/g}$ ，差異約 2.17 倍；黃連之 Berberrubine、Coptisine、Berberine 及 Palmatine 含量範圍為分別為 $1,197.06 \pm 0.28$ - $3,185.22 \pm 0.24$ $\mu\text{g/g}$ 、 $3,996.74 \pm 2.45$ - $9,944.47 \pm 1.20$ $\mu\text{g/g}$ 、 $14,698.95 \pm 1.35$ - $30,178.57 \pm 3.18$ $\mu\text{g/g}$ 、 $3,859.47 \pm 1.28$ - $7,894.72 \pm 2.36$ $\mu\text{g/g}$ ，其差異範圍分別為 2.66 倍、2.49 倍、2.05 倍及 2.05 倍；橘紅之 Hesperidin、Nobiletin 及 Tangeretin 等三種指標成分含量範圍為分別為 3842.06 ± 0.94 - 14769.17 ± 1.27 $\mu\text{g/g}$ 、 307.41 ± 1.29 - 681.20 ± 1.42 $\mu\text{g/g}$ 、 79.92 ± 4.59 - 257.44 ± 4.18 $\mu\text{g/g}$ ，其差異範圍分別為 3.84 倍、2.22 倍及 3.22 倍。其中以杏仁之 Amygdalin 含量差異最大達 12.76 倍，其次為龍膽之含量，建議這二種藥材須再做深入的研究。

- 四、由於指標成分種類不足，在 HPLC 層析圖中尚有些波峰無法分析，建議配合指標成分供應中心的成立，多開發指標成分的種類，以利分析之開發。

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-008 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

陸、參考文獻

1. 2001 科技產業現況與市場趨勢研討會－生物技術及製藥產業、食品產業。
2. 中醫藥委員會，2005，臺灣中醫藥發展策略與成果：行政院衛生署中醫藥委員會成立 10 週年紀念特輯。
3. 中醫藥委員會，2004，臺灣中醫藥願景－行政院衛生署中醫藥委員會簡介(93 年版)。
4. 甘偉松，1986，藥用植物學，國立中國醫藥研究所，p.627-635。
5. 許鴻源，1980，中藥材之研究，新醫藥出版社，p.180-181。
6. 許鴻源，1985，簡明藥材學，新醫藥出版社，p.405-406。
7. 木村康一、東丈夫、名越規郎、那琦，1965，台灣產山藥的概要，生藥學雜誌 19：69。
8. 原田正敏，1989，繁用生藥之成分定量，廣川書店。
9. 高效液相層析儀 (HPLC)、氣相層析儀 (GC) 之應用與實習講義，1995，財團法人製藥工業技術發展中心。

柒、圖表

表一 丁香移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	60	40
15	1.0	50	50
20	1.0	0	100
25	1.0	60	40

A: H₂O (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 100% acetonitrile.

表二 丁香分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration (μg/mL)	mean±S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Eugenol	820.00	819.12±0.32(0.04)	822.78±1.01(0.12)
	205.00	206.36±0.34(0.16)	206.23±0.74(0.36)
	51.25	51.38±1.94(3.78)	51.40±1.77(3.44)

表三 丁香分析方法之添加試驗

Compound	Concentration (μg/mL)	Rrecovery
		mean±S.D (R.S.D)
Eugenol	820.00	94.78±2.32(2.54)
	205.00	85.66±4.21(4.91)
	51.25	80.45±2.54(3.15)

表四 丁香 Eugenol 之定量分析

Sample No.	Eugenol	Sample No.	Eugenol
1	7988.81±5.06	11	6284.67±0.30
2	8196.29±3.81	12	6628.95±0.26
3	7661.37±3.52	13	7229.68±2.74
4	7373.69±0.47	14	7243.16±0.63
5	7673.26±2.47	15	7511.79±1.52
6	7735.36±1.50	16	6943.42±2.43
7	7539.35±1.14	17	6487.42±2.66
8	5936.48±0.55	18	6982.63±0.70
9	6329.99±0.39	19	7018.56±4.27
10	6329.00±0.27	20	7460.44±1.44

表五 防風移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	81	19
15	1.0	81	19
16	1.0	10	90
30	1.0	81	19
35	1.0	81	19

A: H₂O (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 100% acetonitrile.

表六 防風分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	mean±S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
5-O-methylvi-samminol	200.00	199.67±0.17(0.09)	202.20±0.15(0.74)
	50.00	79.74±0.21(0.42)	50.40±0.19(0.38)
	12.5	12.09±0.19(1.57)	12.20±0.52(4.26)

表七 防風分析方法之添加試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	Rrecovery
		mean±S.D (R.S.D)
5-O-methylvi-samminol	200.00	96.78±3.32(3.43)
	50.00	95.66±4.51(4.71)
	12.5	83.45±3.44(4.12)

表八 防風 5-O-methylvisamminol 之定量分析

Sample No.	5-O-methylvisamminol	Sample No.	5-O-methylvisamminol
1	1813.84±2.20	11	725.36±0.08
2	833.31±5.47	12	941.61±4.57
3	1997.02±4.05	13	888.44±1.52
4	1663.06±7.32	14	1736.74±5.79
5	1245.43±6.66	15	1229.07±0.38
6	1740.43±1.83	16	1052.53±2.71
7	1868.69±5.38	17	407.41±3.27
8	1107.79±5.99	18	411.53±3.89
9	1091.49±4.45	19	589.41±1.73
10	946.85±2.60	20	1103.59±4.80

表九 黃芩移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	55	45
15	1.0	55	45
20	1.0	30	70
30	1.0	30	70
35	1.0	10	90
40	1.0	10	90
47	1.0	0	100
55	1.0	0	100

A: 10% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 50% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

表十 黃芩分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	mean \pm S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Baicalin	360.00	359.28 \pm 0.76(0.04)	358.81 \pm 1.19(0.33)
	90.00	90.35 \pm 0.21(0.23)	91.23 \pm 1.09(1.19)
	22.50	20.47 \pm 0.84(4.10)	21.56 \pm 0.68(3.15)
Baicalein	400.00	398.89 \pm 0.44(0.11)	398.74 \pm 0.72(0.18)
	100.00	99.75 \pm 0.63(0.63)	100.67 \pm 0.33(0.33)
	25.00	24.64 \pm 0.52(2.11)	24.79 \pm 0.14(0.56)
Wogonin	16.00	15.87 \pm 0.23(1.45)	15.82 \pm 0.01(0.06)
	4.00	3.96 \pm 0.11(2.80)	3.91 \pm 0.29(4.41)
	1.00	0.97 \pm 0.07(4.21)	1.13 \pm 0.09(4.96)

表十一 黃芩分析方法之添加試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Rrecovery
		mean \pm S.D (R.S.D)
Baicalin	360.00	99.54 \pm 4.16(4.18)
	90.00	91.21 \pm 3.75(0.04)
	22.50	84.68 \pm 2.96(3.50)
Baicalein	400.00	97.12 \pm 3.36(3.46)
	100.00	95.87 \pm 3.47(3.62)
	25.00	90.25 \pm 2.14(2.37)
Wogonin	16.00	98.47 \pm 3.33(3.38)
	4.00	94.65 \pm 3.88(4.10)
	1.00	91.45 \pm 1.44(4.57)

表十二 黃芩 Baicalin 之定量分析

Sample No.	Baicalin	Sample No.	Baicalin
1	20774.97±2.59	11	31423.22±2.33
2	17370.84±1.98	12	35947.46±5.04
3	30955.87±1.55	13	31943.98±1.17
4	27824.5±5.03	14	20900.05±2.44
5	23264.16±0.15	15	32721.32±1.05
6	15059.61±2.45	16	40386.67±2.99
7	21083.71±1.23	17	24219.06±1.12
8	20095.80±1.97	18	30542.03±3.43
9	26116.24±2.17	19	30600.40±5.06
10	26303.01±4.16	20	27620.15±4.27

表十三 黃芩 Baicalein 之定量分析

Sample No.	Baicalein	Sample No.	Baicalein
1	16572.28±4.38	11	12553.34±1.69
2	20573.65±0.81	12	10434.49±2.40
3	16811.62±1.62	13	18744.69±0.39
4	12818.97±3.90	14	12045.79±3.93
5	8503.71±4.78	15	14627.88±4.88
6	15147.66±1.95	16	13831.03±1.44
7	15954.7±1.80	17	18852.79±2.02
8	14458.73±1.24	18	20223.41±2.12
9	17871.42±0.90	19	20222.30±2.78
10	15648.37±4.74	20	18616.60±3.04

表十四 黃芩 wogonin 之定量分析

Sample No.	Wogonin	Sample No.	Wogonin
1	429.13±3.58	11	407.81±0.89
2	520.97±0.22	12	292.16±2.97
3	465.82±1.59	13	546.03±0.68
4	292.26±3.70	14	499.55±2.51
5	276.35±4.29	15	380.74±2.61
6	459.06±2.35	16	333.31±3.58
7	108.01±1.57	17	352.12±1.13
8	333.87±4.27	18	542.11±1.64
9	430.41±1.57	19	512.50±1.94
10	486.71±4.79	20	512.90±2.64

表十五 龍膽草移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	94	6
10	1.0	94	6
20	1.0	88	12
30	1.0	0	100
35	1.0	0	100
40	1.0	94	6
50	1.0	94	6

A: 5% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 100% acetonitrile.

表十六 龍膽草分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	mean±S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Gentiopicroside	300.00	299.70±1.92(0.64)	301.23±2.11(0.70)
	75.00	75.41±0.34(0.45)	75.31±0.24(0.32)
	18.75	18.37±0.22(0.20)	19.02±0.33(1.74)
Swertiamarin	50.00	49.99±0.18(0.37)	50.38±0.63(1.26)
	12.50	12.47±0.08(0.61)	12.73±0.10(0.81)
	3.125	3.09±0.13(4.28)	3.27±0.04(1.34)

表十七 龍膽草分析方法之添加試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Rrecovery
		mean \pm S.D (R.S.D)
Gentiopicroside	300.00	96.74 \pm 3.16(3.72)
	75.00	93.22 \pm 4.75(2.10)
	18.75	91.58 \pm 5.06(5.53)
Swertiamarin	50.00	95.16 \pm 3.84(4.04)
	12.50	90.37 \pm 3.48(3.85)
	3.125	87.29 \pm 4.28(4.91)

表十八 龍膽草 Gentiopicroside 之定量分析

Sample No.	Gentiopicroside	Sample No.	Gentiopicroside
1	31054.31 \pm 2.00	11	32228.43 \pm 0.05
2	17990.11 \pm 4.23	12	19615.52 \pm 0.26
3	23608.10 \pm 1.50	13	18442.01 \pm 0.55
4	22083.53 \pm 0.51	14	10368.09 \pm 0.28
5	18498.59 \pm 0.43	15	13586.55 \pm 0.63
6	6791.55 \pm 0.96	16	17107.76 \pm 0.03
7	19274.74 \pm 1.37	17	26029.45 \pm 2.35
8	32405.51 \pm 3.44	18	18685.18 \pm 1.81
9	39249.50 \pm 1.52	19	18147.87 \pm 0.15
10	29001.71 \pm 0.52	20	31913.34 \pm 0.51

表十九 龍膽草 Swertiamarin 之定量分析

Sample No.	Swertiamarin	Sample No.	Swertiamarin
1	1187.78 \pm 3.53	11	292.35 \pm 2.88
2	365.66 \pm 4.59	12	167.32 \pm 0.24
3	391.52 \pm 2.77	13	391.33 \pm 0.68
4	298.23 \pm 2.72	14	204.62 \pm 4.29
5	167.07 \pm 2.03	15	798.52 \pm 3.70
6	263.49 \pm 2.27	16	205.43 \pm 0.82
7	1986.66 \pm 2.60	17	1466.66 \pm 2.07
8	1713.28 \pm 1.01	18	--
9	1342.01 \pm 1.04	19	--
10	1075.73 \pm 1.54	20	--

表二十 山梔子移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	96	4
10	1.0	96	4
15	1.0	50	50
20	1.0	0	100
25	1.0	0	100
30	1.0	96	4
35	1.0	96	4

A: 20% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 100% acetonitrile.

表二十一 山梔子分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	mean±S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Geniposide	300.00	299.70±2.33(0.74)	300.28±1.76(0.59)
	75.00	75.41±0.34(0.45)	75.86±1.39(1.83)
	18.75	18.37±0.33(1.80)	19.33±0.64(3.31)

表二十二 山梔子分析方法之添加試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	Rrecovery
		mean±S.D (R.S.D)
Geniposide	300.00	98.48±4.13(4.19)
	75.00	90.38±4.88(5.39)
	18.75	89.74±3.60(4.01)

表二十三 山梔子 Geniposide 之定量分析

Sample No.	Geniposide	Sample No.	Geniposide
1	40990.77±2.82	11	25709.99±0.50
2	27043.46±4.02	12	22990.02±1.80
3	23985.71±5.29	13	30041.67±2.51
4	27686.57±5.82	14	25524.79±3.12
5	27385.02±1.08	15	26120.33±1.66
6	26624.06±0.16	16	27787.13±1.66
7	50902.80±3.21	17	38937.71±2.35
8	38392.72±1.10	18	40702.06±2.04
9	26746.00±1.02	19	25852.21±0.97
10	24273.68±2.58	20	25367.12±2.03

表二十四 山茱萸移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	97	3
10	1.0	97	3
20	1.0	20	80
30	1.0	5	95
35	1.0	5	95
40	1.0		97
50	1.0	97	3

A: 10% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 100% acetonitrile.

表二十五 山茱萸分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	mean±S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Loganin	420.00	419.00±1.33(0.32)	420.69±1.39(0.33)
	105.00	104.27±1.59(1.52)	105.96±1.99(1.88)
	26.25	25.50±0.28(1.10)	25.56±0.11(0.43)

表二十六 山茱萸分析方法之添加試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Rrecovery
		mean \pm S.D (R.S.D)
Loganin	420.00	92.00 \pm 3.02(3.28)
	105.00	105.00 \pm 3.85(3.67)
	26.25	110.00 \pm 4.58(4.16)

表二十七 山茱萸 Loganin 之定量分析

Sample No.	Loganin	Sample No.	Loganin
1	4687.51 \pm 0.95	11	4246.68 \pm 3.01
2	3825.44 \pm 4.81	12	4476.76 \pm 0.31
3	4439.00 \pm 2.25	13	4334.87 \pm 0.83
4	3697.97 \pm 1.66	14	3689.52 \pm 2.24
5	4010.58 \pm 1.63	15	4740.31 \pm 2.86
6	3846.77 \pm 0.57	16	3795.90 \pm 3.66
7	2658.83 \pm 0.87	17	3411.86 \pm 1.64
8	3420.96 \pm 0.68	18	4054.41 \pm 0.31
9	4127.35 \pm 0.73	19	2727.00 \pm 0.59
10	4883.42 \pm 1.16	20	3397.38 \pm 4.31

表二十八 杏仁移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	94	6
15	1.0	45	55
16	1.0	5	95
30	1.0	5	95
35	1.0	94	6
45	1.0	94	6

A: 10% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 60% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

表二十九 杏仁分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	mean \pm S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Amygdalin	300.00	301.01 \pm 2.77(0.92)	299.17 \pm 2.66(0.89)
	75.00	75.57 \pm 0.55(0.73)	75.13 \pm 0.14(0.19)
	18.75	18.66 \pm 0.24(1.26)	17.23 \pm 0.09(0.51)

表三十 杏仁分析方法之添加試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Rrecovery
		mean \pm S.D (R.S.D)
Amygdalin	300.00	95.77 \pm 3.03(3.16)
	75.00	102.18 \pm 4.56(4.46)
	18.75	92.15 \pm 2.00(2.17)

表三十一 杏仁 Amygdalin 之定量分析

Sample No.	Amygdalin	Sample No.	Amygdalin
1	296.86 \pm 0.56	11	224.47 \pm 0.85
2	2077.50 \pm 0.15	12	387.94 \pm 0.81
3	1066.58 \pm 0.10	13	424.18 \pm 1.44
4	1354.57 \pm 0.26	14	826.32 \pm 3.03
5	2864.68 \pm 0.40	15	2057.30 \pm 1.02
6	1285.15 \pm 0.36	16	910.56 \pm 0.07
7	225.12 \pm 3.00	17	2224.07 \pm 0.18
8	1883.10 \pm 0.30	18	321.32 \pm 0.69
9	1287.93 \pm 0.95	19	353.84 \pm 1.33
10	731.07 \pm 0.42	20	765.64 \pm 0.89

表三十二 防己移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	90	10
20	1.0	85	15
25	1.0	80	20
30	1.0	5	95
35	1.0	5	95
40	1.0	90	10
45	1.0	90	10

A: H₂O (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 100% acetonitrile.

表三十三 防己分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	mean±S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Tetrandrine	400.00	399.68±2.78(0.57)	401.81±3.42(0.85)
	100.00	101.76±0.46(0.46)	102.03±0.95(0.93)
	25.00	24.21±0.12(0.51)	24.51±0.28(1.16)

表三十四 防己分析方法之添加試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	Rrecovery
		mean±S.D (R.S.D)
Tetrandrine	400.00	98.36±3.83(3.89)
	100.00	96.17±3.40(3.54)
	25.00	91.55±3.82(4.17)

表三十五 防己 Tetrandrine 之定量分析

Sample No.	Tetrandrine	Sample No.	Tetrandrine
1	3510.66±3.79	11	4883.35±0.39
2	3688.08±2.61	12	4387.88±4.89
3	3713.88±0.82	13	3515.89±4.52
4	3557.97±0.91	14	3283.29±0.23
5	3773.94±0.62	15	3255.74±3.02
6	3743.59±0.59	16	3453.06±2.76
7	2423.39±0.06	17	3283.02±0.93
8	2498.98±1.02	18	3502.89±2.81
9	2365.23±0.23	19	-
10	5138.52±0.94	20	-

表三十六 黃連移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	99	1
35	1.0	99	1
40	1.0	90	10
60	1.0	90	10
65	1.0	99	1
70	1.0	99	1

A: 10% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 60% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

表三十七 黃連分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	mean \pm S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Berberrubine	65.00	65.06 \pm 0.03(0.05)	65.41 \pm 1.32(2.02)
	16.25	16.09 \pm 0.10(0.62)	16.285 \pm 0.39(2.39)
	4.063	4.125 \pm 0.05(1.19)	4.25 \pm 0.16(3.76)
Coptisine	80.00	79.72 \pm 1.13(1.42)	80.39 \pm 1.12(1.39)
	20.00	19.82 \pm 0.02(0.10)	20.52 \pm 0.36(1.76)
	5.00	4.94 \pm 0.03(0.61)	5.11 \pm 0.05(1.01)
Berberine	65.00	65.03 \pm 0.45(0.69)	65.86 \pm 0.71(1.08)
	16.25	16.17 \pm 0.05(0.31)	16.28 \pm 0.28(1.74)
	4.063	4.06 \pm 0.45(1.16)	4.33 \pm 0.07(1.57)
Palmatine	85.00	85.15 \pm 0.48(0.56)	85.39 \pm 0.73(0.86)
	21.25	21.21 \pm 0.08(0.36)	21.73 \pm 0.24(1.11)
	5.313	5.67 \pm 0.07(1.26)	5.86 \pm 0.08(1.38)

表三十八 黃連分析方法之添加試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Rrecovery
		mean \pm S.D (R.S.D)
Berberrubine	65.00	97.81 \pm 4.56(4.66)
	16.25	94.27 \pm 2.89(3.07)
	4.063	90.38 \pm 2.84(3.14)
Coptisine	80.00	95.78 \pm 2.74(2.86)
	20.00	91.11 \pm 3.89(4.27)
	5.00	90.07 \pm 2.95(3.28)
Berberine	65.00	95.56 \pm 2.55(2.67)
	16.25	93.21 \pm 2.96(3.18)
	4.063	89.35 \pm 4.26(4.77)
Palmatine	85.00	102.73 \pm 3.23(3.14)
	21.25	95.13 \pm 3.88(4.08)
	5.31	86.63 \pm 3.63(4.19)

表三十九 黃連 Berberrubine 之定量分析

Sample No.	Berberrubine	Sample No.	Berberrubine
1	654.86±2.09	11	693.74±0.33
2	740.35±2.51	12	933.49±3.29
3	1166.09±3.70	13	1602.50±0.24
4	1500.48±2.27	14	1102.77±0.80
5	602.25±33.3	15	774.30±1.42
6	1116.62±2.26	16	113.34±1.81
7	893.15±0.54	17	762.44±3.95
8	878.54±0.48	18	1095.70±0.24
9	831.26±1.17	19	1030.10±3.18
10	773.73±1.55	20	695.38±2.48

表四十 Coptisine 之定量結果

Sample No.	Coptisine	Sample No.	Coptisine
1	6076.94±1.27	11	6429.70±2.10
2	5782.80±3.34	12	9286.44±1.68
3	9840.73±3.58	13	9944.47±1.20
4	9710.17±2.57	14	6450.99±0.68
5	4434.34±1.61	15	6864.35±3.32
6	6871.21±2.04	16	5913.24±2.15
7	7539.49±1.24	17	4380.63±2.81
8	6671.23±1.01	18	6497.90±0.28
9	7258.05±1.86	19	7124.62±2.23
10	6035.88±1.92	20	3996.74±2.45

表四十一 黃連 Berberine 之定量結果

Sample No.	Berberine	Sample No.	Berberine
1	20830.19±2.22	11	30178.57±3.18
2	19106.35±3.36	12	29685.16±1.00
3	29601.54±1.23	13	21409.63±2.64
4	29527.3 ±1.99	14	20005.16±4.10
5	15001.01±2.17	15	15995.62±3.35
6	24625.67±1.74	16	21058.07±4.01
7	19646.51±1.30	17	14698.95±1.35
8	24068.21±2.89	18	29312.79±2.05
9	18369.52±1.79	19	23447.40±2.59
10	23225.81±1.74	20	17814.86±3.12

表四十二 黃連 Palmatine 之定量結果

Sample No.	Palmatine	Sample No.	Palmatine
1	5343.18±1.07	11	7362.06±0.37
2	4841.37±2.20	12	7325.29±1.96
3	7622.93±0.71	13	5536.27±4.56
4	7571.59±0.41	14	5540.82±1.07
5	3859.47±1.28	15	4979.53±1.61
6	5817.60±1.28	16	4343.13±4.50
7	5817.60±1.16	17	5177.00±0.13
8	6113.17±0.49	18	5980.25±2.37
9	5044.79±1.78	19	3890.88±3.71
10	6263.70±2.30	20	7894.72±2.36

表四十三 橘紅移動相之梯度沖提程式

Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
0	1.0	100	0
15	1.0	100	0
16	1.0	60	40
40	1.0	60	40
45	1.0	0	100
50	1.0	0	100
55	1.0	100	0

A: 20% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

B: 80% acetonitrile. (adjusted to pH 2.8 with phosphoric acid).

表四十四 橘紅分析方法之同日間及異日間試驗

Compound	Concentration (µg/mL)	mean±S.D (R.S.D)	
		intra-day (n=3)	inter-day (n=4)
Hesperidin	100.00	100.99±0.27(0.27)	101.25±1.33(1.31)
	25.00	24.26±0.10(0.41)	25.31±0.26(1.01)
	6.25	7.26±0.07(0.92)	6.83±0.05(0.76)
Nobiletin	60.00	59.43±0.49(0.82)	60.33±1.04(1.73)
	15.00	15.06±0.06(0.41)	15.22±0.17(1.11)
	3.75	3.57±0.06(1.65)	3.96±0.04(0.92)
Tangertin	40.00	39.87±0.27(0.67)	40.81±0.49(1.21)
	10.00	10.10±0.04(0.44)	10.28±0.21(2.09)
	2.45	2.45±0.04()	2.60±0.03(1.22)

表四十五 橘紅分析方法之添加試驗

Compound	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Rrecovery
		mean \pm S.D (R.S.D)
Hesperidin	100.00	97.38 \pm 3.97(4.08)
	25.00	95.11 \pm 3.62(3.81)
	6.25	89.36 \pm 3.35(3.75)
Nobiletin	60.00	98.22 \pm 3.95(4.02)
	15.00	93.43 \pm 3.11(3.33)
	3.75	94.56 \pm 2.71(2.87)
Tangertin	40.00	98.59 \pm 2.84(2.89)
	10.00	90.49 \pm 3.29(3.45)
	2.45	85.62 \pm 4.02(4.44)

表四十六 橘紅 Hesperidin 之定量分析

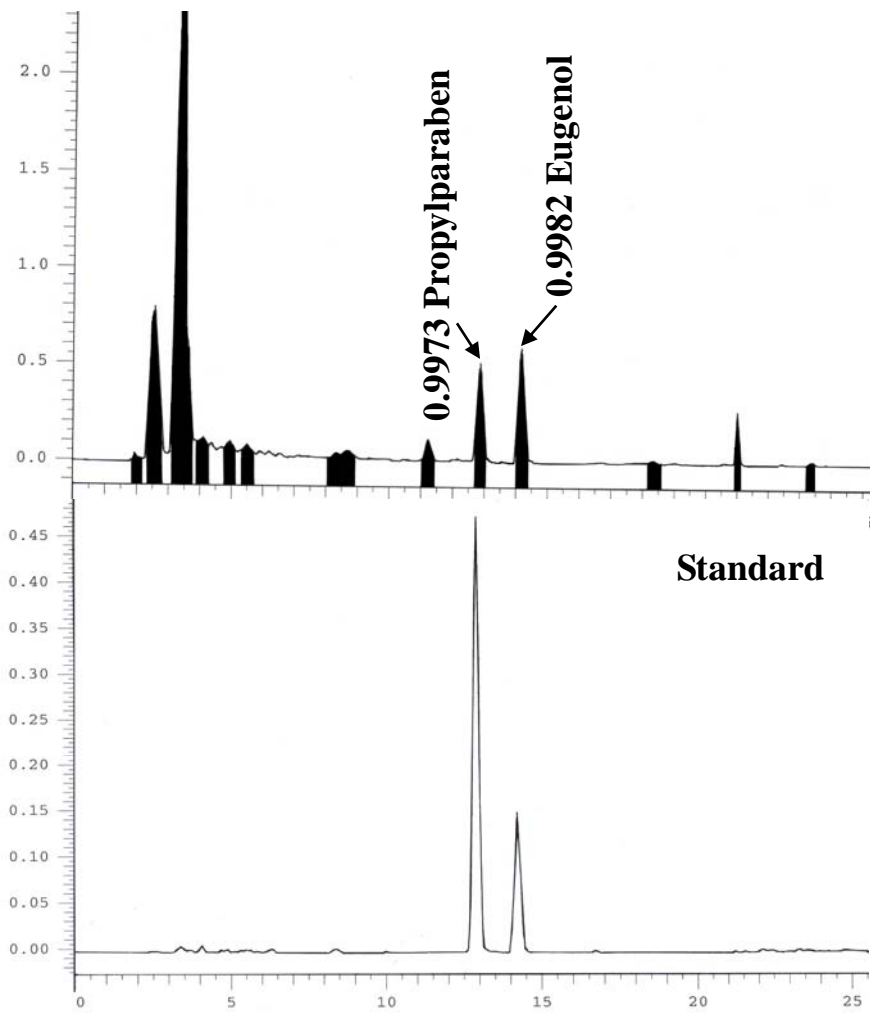
Sample No.	Hesperidin	Sample No.	Hesperidin
1	5986.82 \pm 2.45	11	5808.50 \pm 3.01
2	5033.67 \pm 3.59	12	14769.17 \pm 1.27
3	6443.54 \pm 0.46	13	9170.43 \pm 1.55
4	4397.42 \pm 4.03	14	12427.2 \pm 1.98
5	6434.02 \pm 0.91	15	12743.07 \pm 2.94
6	5524.19 \pm 0.43	16	6504.33 \pm 1.22
7	7545.58 \pm 1.47	17	11941.96 \pm 0.33
8	6461.30 \pm 2.27	18	3842.06 \pm 0.94
9	9333.84 \pm 2.44	19	7409.88 \pm 1.43
10	9218.78 \pm 0.48	20	7200.90 \pm 1.15

表四十七 橘紅 Nobiletin 之定量分析

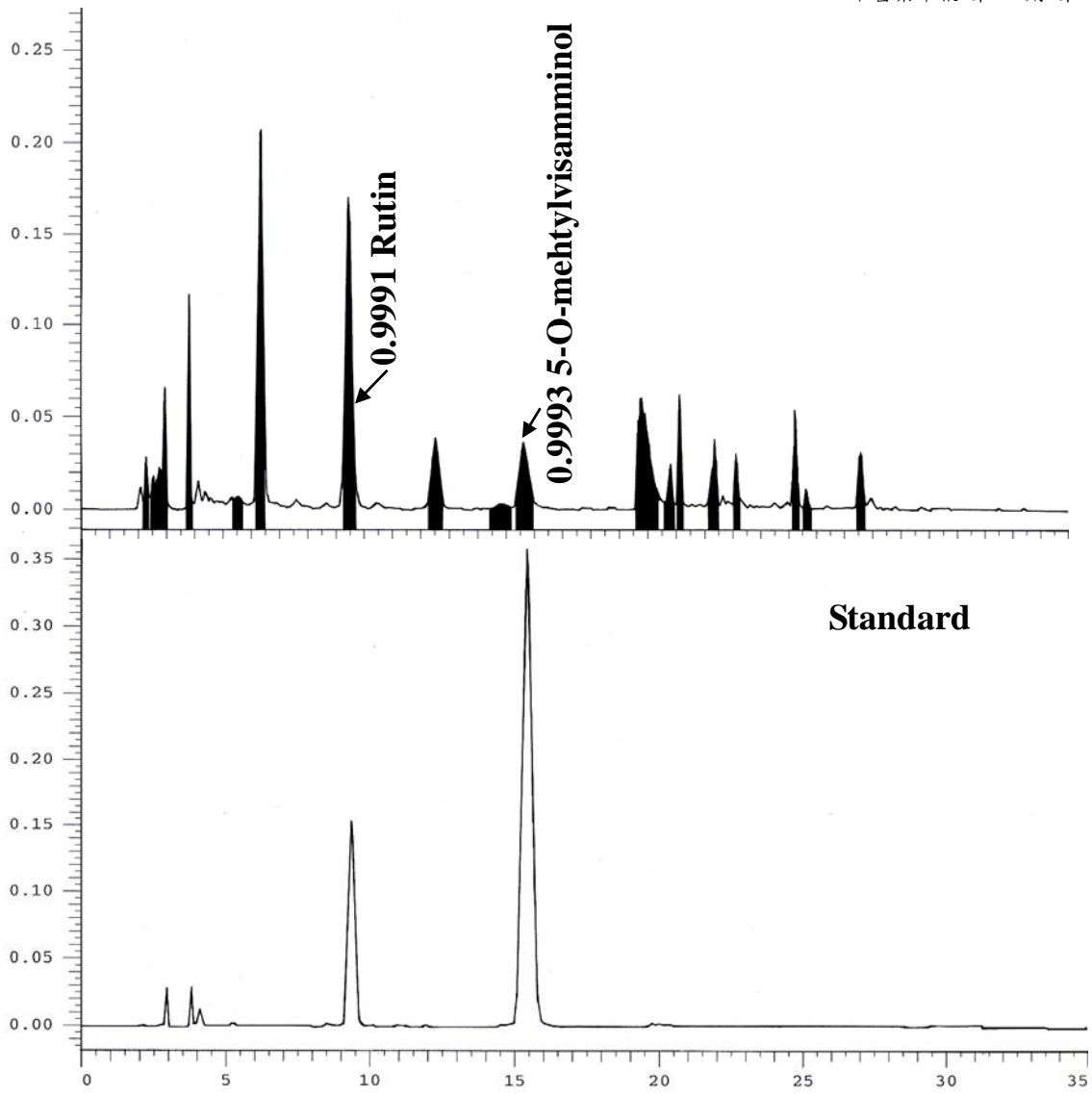
Sample No.	Nobiletin	Sample No.	Nobiletin
1	5731.22±4.32	11	5017.75±1.33
2	3986.10±4.91	12	6043.50±2.03
3	4631.66±3.03	13	3992.63±1.04
4	3074.08±1.29	14	6066.40±0.16
5	5493.86±1.65	15	6567.26±4.57
6	6508.53±3.28	16	6305.26±2.80
7	6676.05±1.22	17	5850.41±4.10
8	4750.07±1.70	18	4045.17±1.11
9	4958.08±3.01	19	5688.85±4.14
10	5606.12±4.54	20	5857.48±1.28

表四十八 橘紅 Tangertin 之定量分析

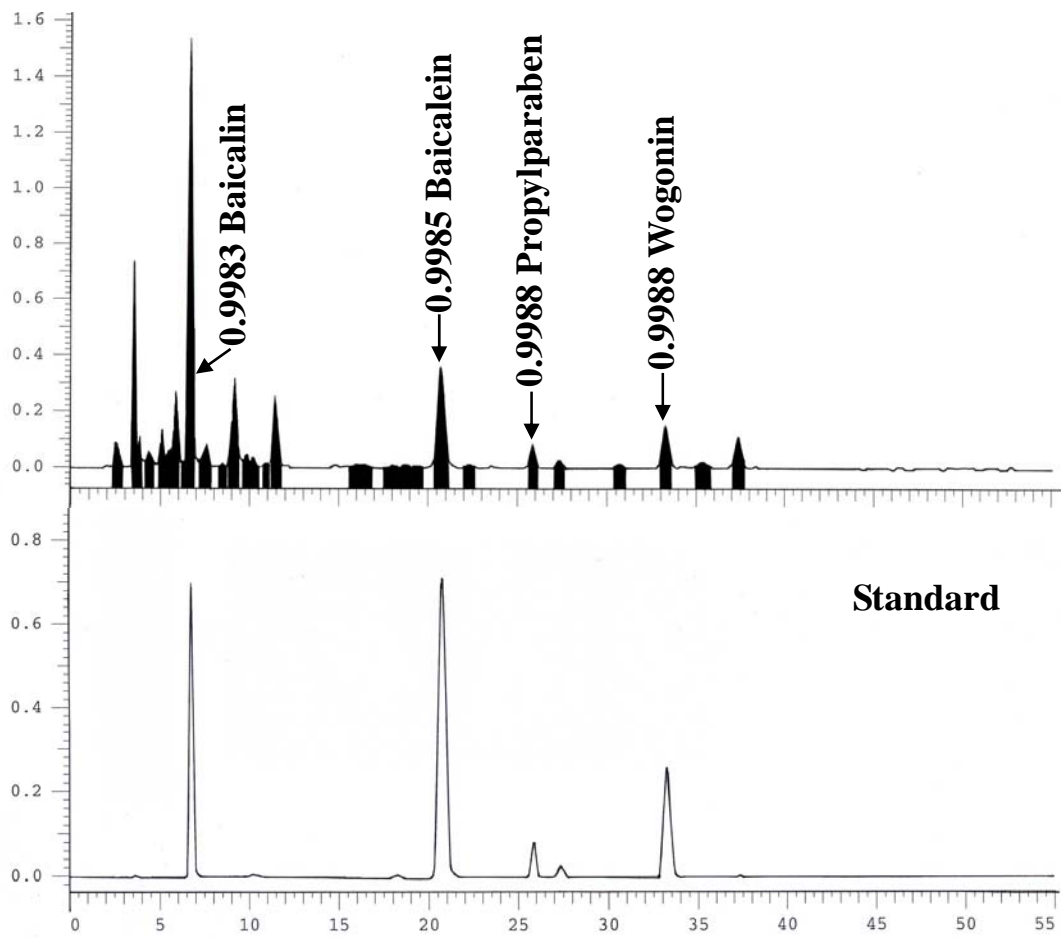
Sample No.	Tangertin	Sample No.	Tangertin
1	902.22±4.67	11	1051.00±0.72
2	1162.99±5.06	12	1556.84±0.97
3	799.21±4.59	13	1111.40±0.55
4	1206.80±1.59	14	872.72±0.62
5	1314.23±1.24	15	1141.67±0.55
6	1046.95±3.51	16	961.63±2.00
7	1090.91±0.33	17	1527.77±0.37
8	2574.40±3.18	18	846.20±0.49
9	808.80±3.20	19	1445.88±1.30
10	936.31±1.61	20	1034.95±0.83



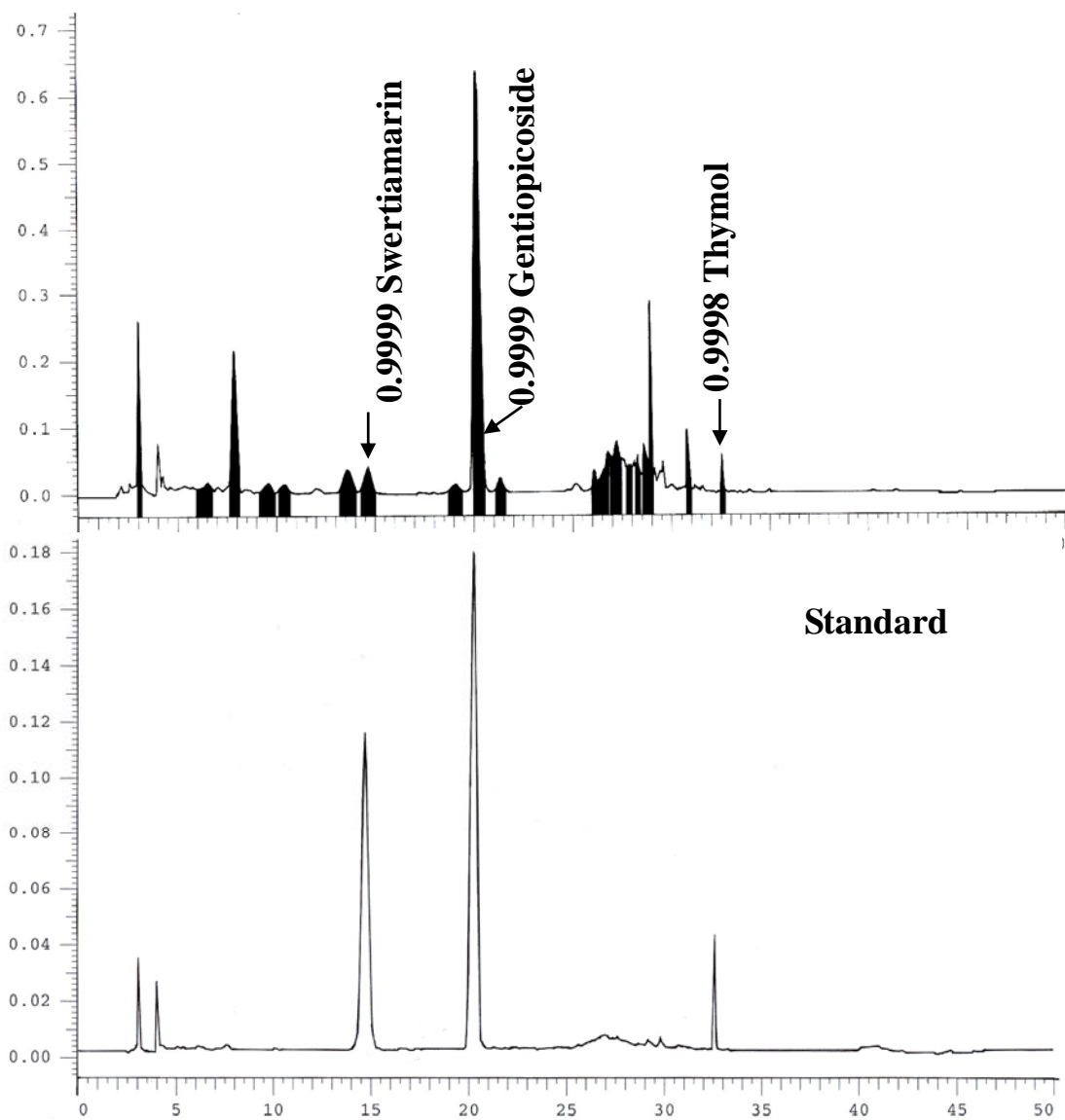
圖一 丁香之 HPLC 層析圖譜



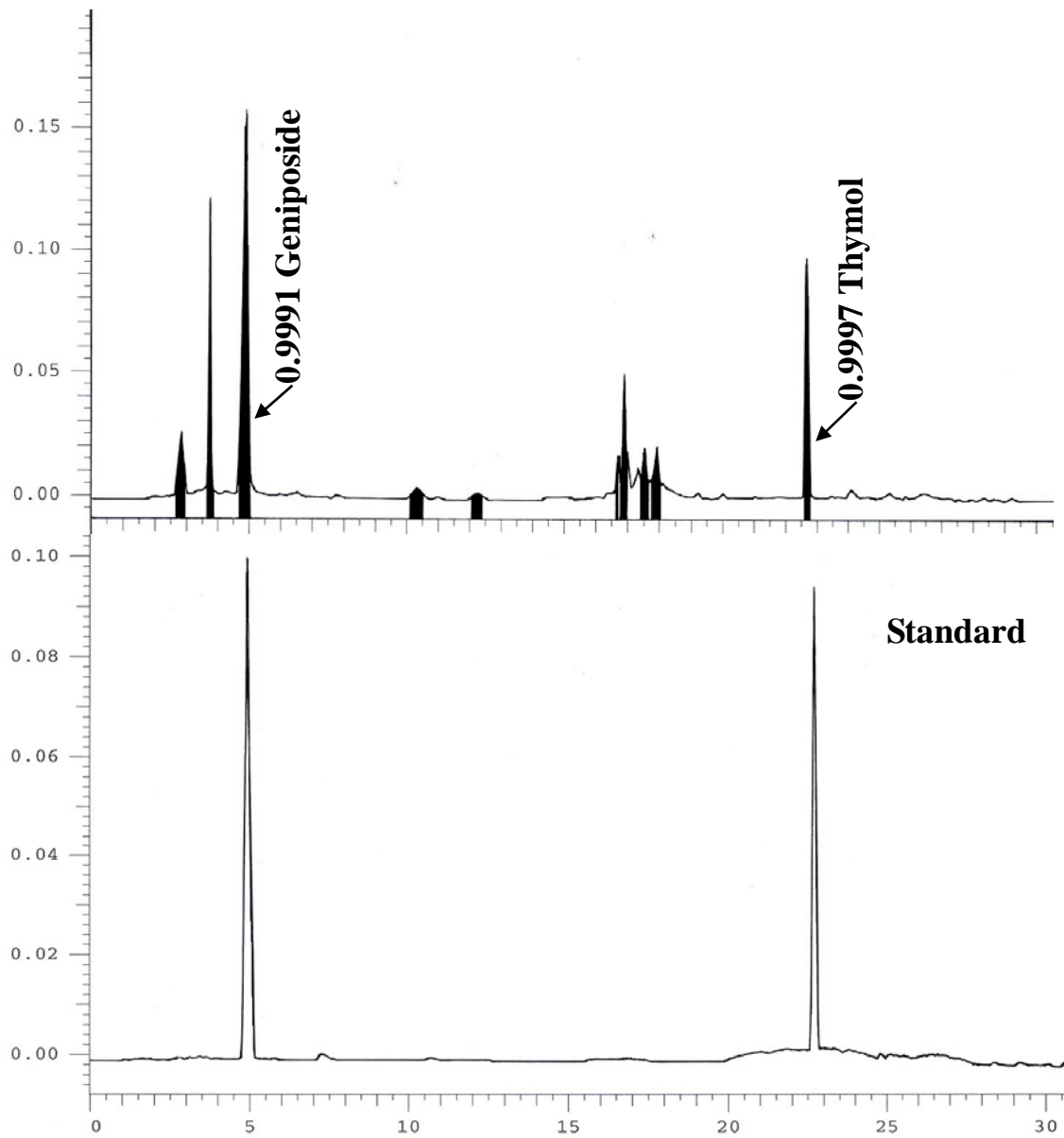
圖二 防風之 HPLC 層析圖譜



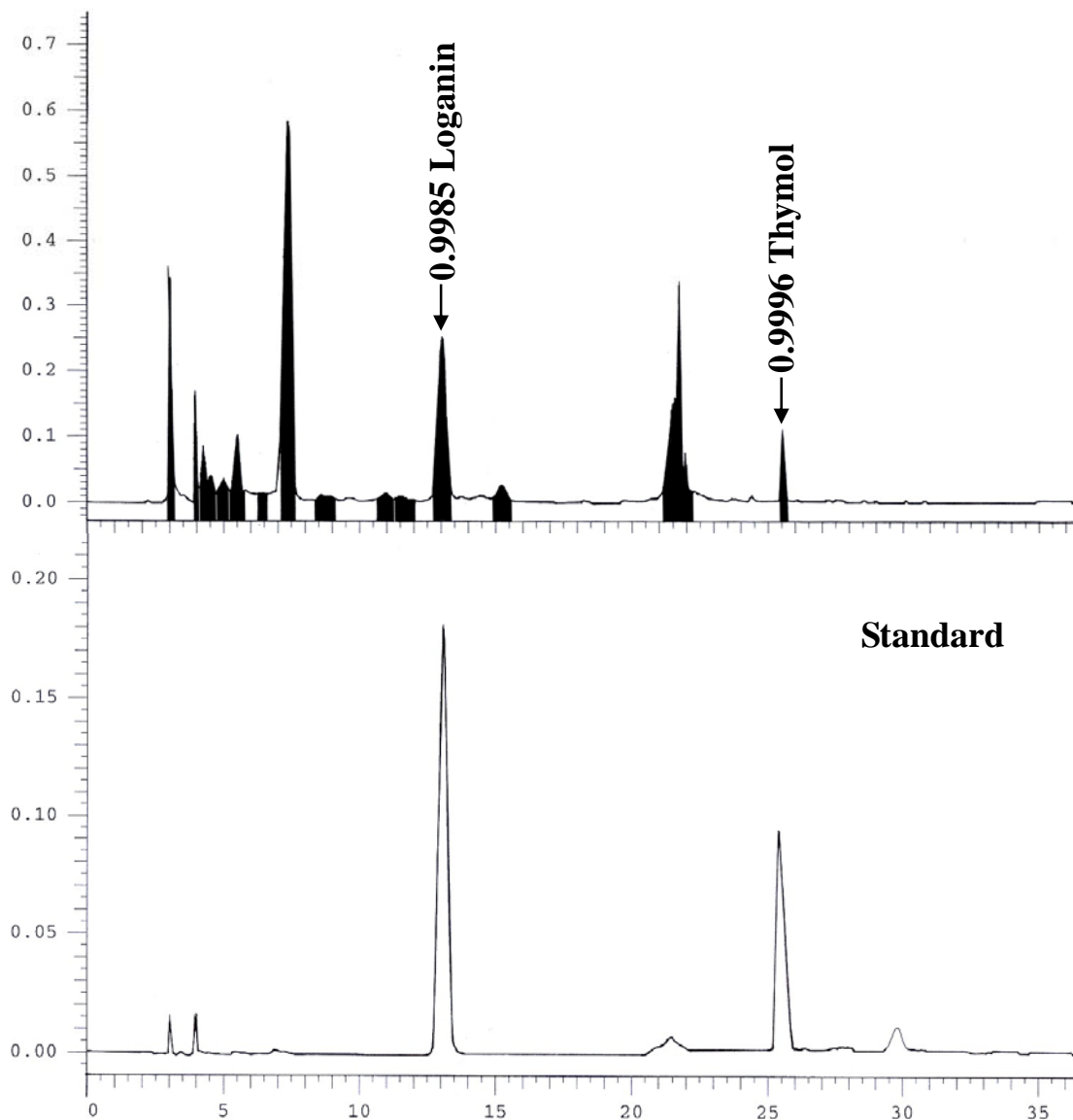
圖三 黃芩之 HPLC 層析圖譜



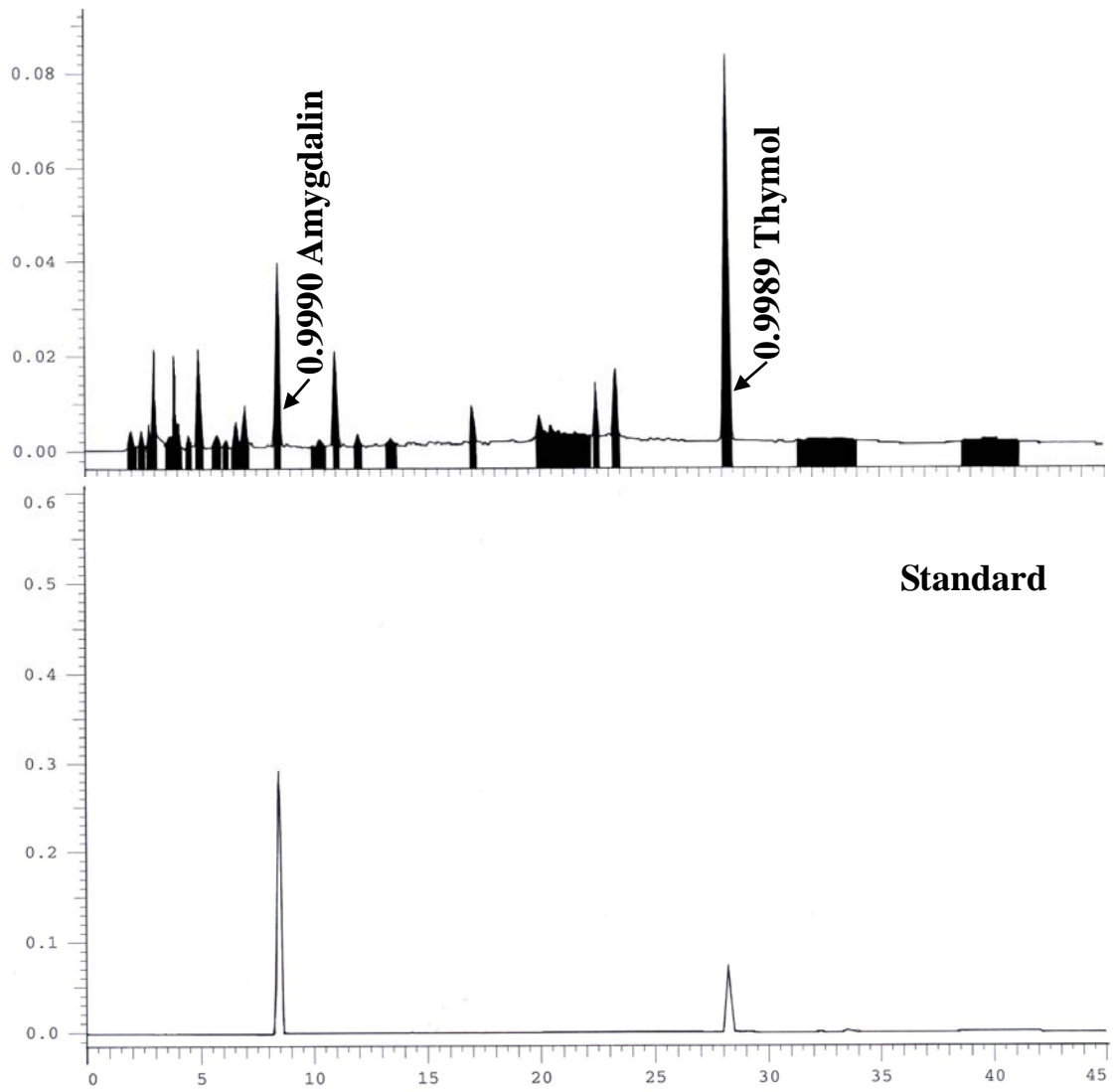
圖四 龍膽之 HPLC 層析圖譜



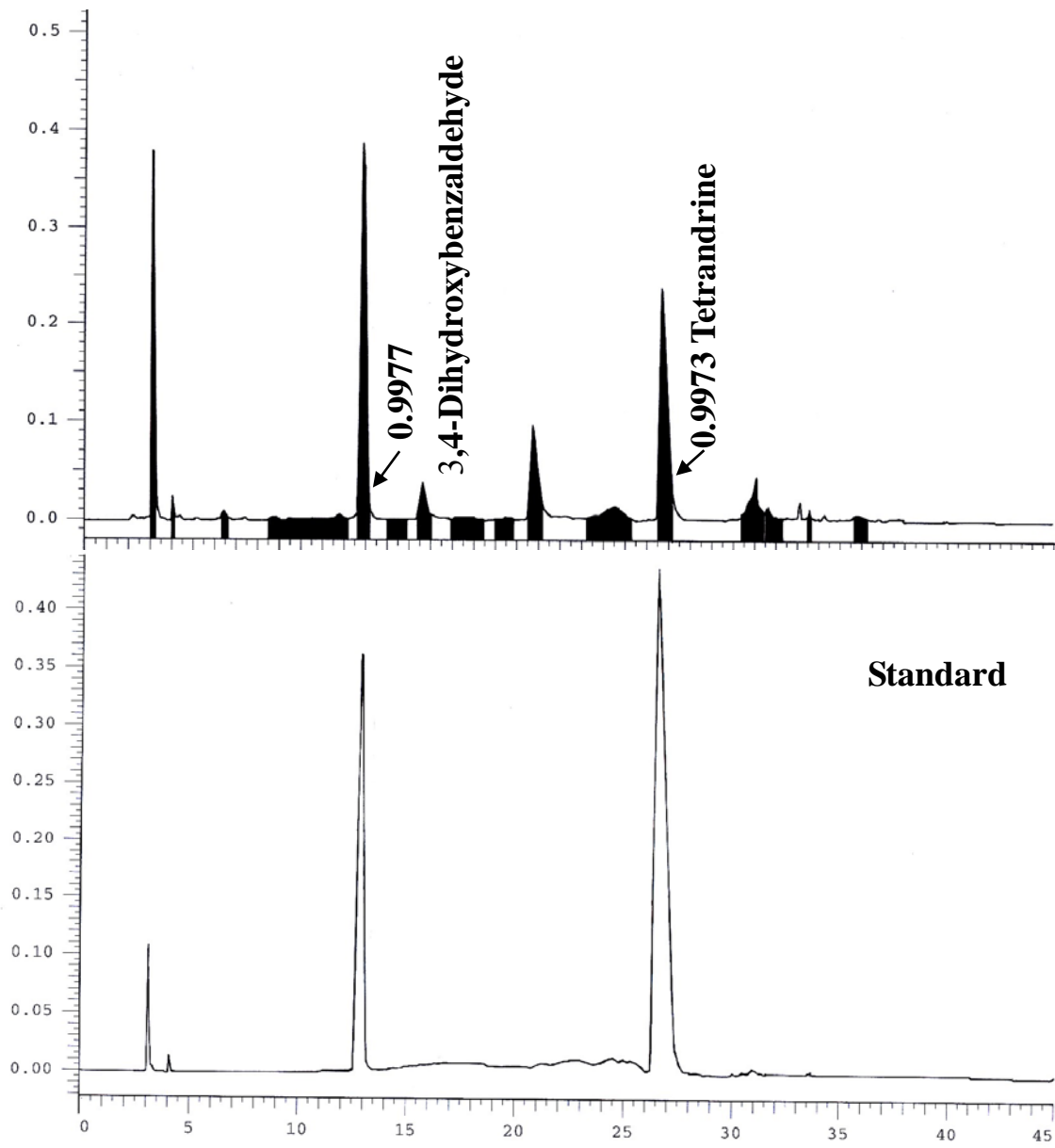
圖五 山梔子之 HPLC 層析圖譜



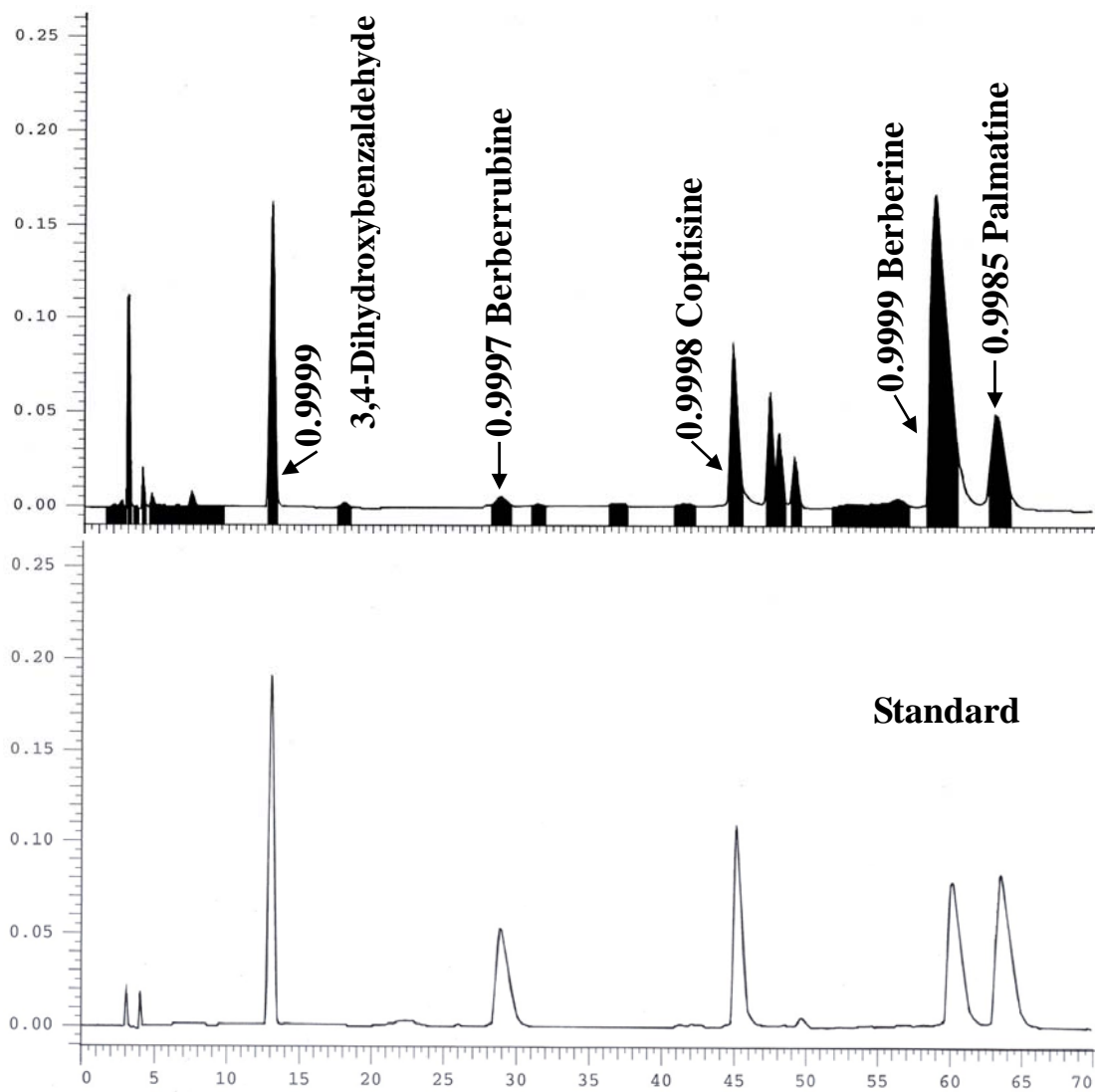
圖六 山茱萸之 HPLC 層析圖譜



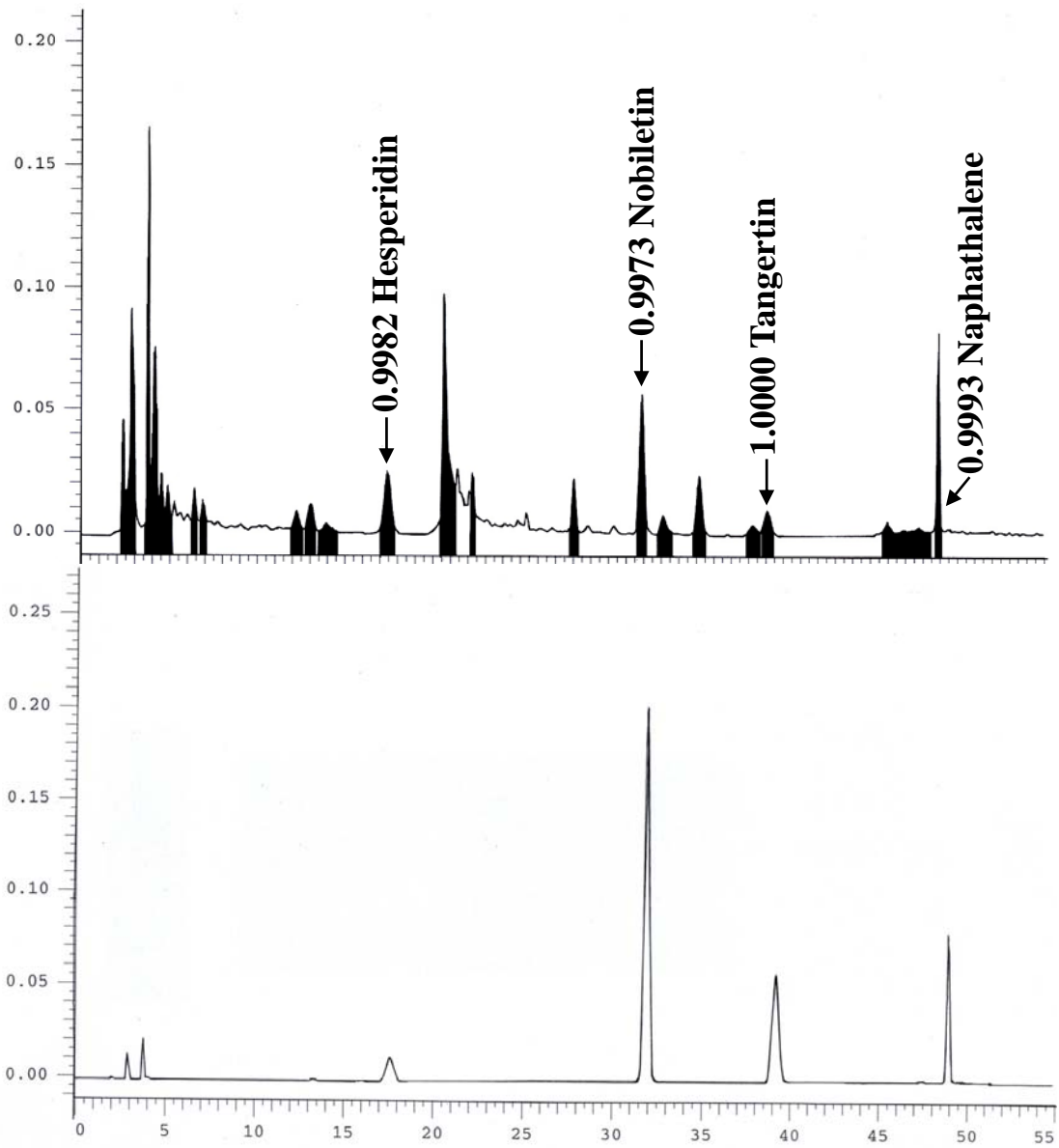
圖七 杏仁之 HPLC 層析圖譜



圖八 防己之 HPLC 層析圖譜



圖九 黃連之 HPLC 層析圖譜



圖十 橘紅之 HPLC 層析圖譜

