

計畫編號：CCMP89-RD-041

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

中藥之化學鑑定研究--芍藥、黃連、吳茱萸之
基原辨識

委託研究報告

計畫委託機關：國立台灣師範大學

計畫主持人：許順吉

研究人員：江慧玉、洪英傑、陳文陸、黃文盈

執行期間：88年7月1日至89年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見

計畫編號：CCMP89-RD-041

各機關研究計畫基本資料庫之計畫編號：

行政院衛生署八十九年度科技研究發展計畫

中藥之化學鑑定研究--芍藥、黃連、吳茱萸之
基原辨識

委託研究報告

計畫委託機關：國立台灣師範大學

計畫主持人：許順吉

研究人員：江慧玉、洪英傑、陳文陸、黃文盈

執行期間：88年7月1日至89年12月31日

編號：CCMP89-RD-041

行政院衛生署中醫藥委員會八十九年度

委託研究計畫成果報告

中藥之化學鑑定研究-芍藥、黃連、吳茱萸之
基原辨識

執行機構：國立台灣師範大學

計畫主持人：許順吉

研究人員：江慧玉、洪英傑、陳文陸、黃文盈

執行期限：88年7月1日至89年12月31日

目 錄

中文摘要	1
英文摘要	2
第一章 緒論	
第一節 前言	4
第二節 參考文獻	7
第二章 含芍藥製劑之毛細管電泳分析	
第一節 前言	9
第二節 實驗部分	11
第三節 結果討論	12
第三章 含芍藥製劑之高效液相層析	
第一節 基原確認	21
第二節 高效液相層析之分析條件及自製樣品分析	22
第三節 市售含芍藥製劑之分析	23
第四章 含黃連製劑之高效液相層析	
第一節 前言	33
第二節 基原辨識	35
第三節 市售含黃連製劑之分析	36

第五章 吳茱萸藥材成分之比較

第一節 前言	-----42
第二節 實驗部分	-----48
第三節 結果討論	-----53
第四節 參考文獻	-----71

第六章 吳茱萸成分之安定性探討

第一節 前言	-----75
第二節 實驗部分	-----76
第三節 結果討論	-----78

第七章 芍藥成分之安定性探討

第一節 前言	-----93
第二節 安定性之研究	-----95
第三節 實驗部分	-----96
第四節 參考文獻	-----115

第八章 結論與建議-----117

中藥之化學鑑定研究—芍藥、黃連、吳茱萸之基原辨識

許順吉

國立台灣師範大學化學系

白芍屬補血藥，有補血、緩急止痛功能；赤芍屬活血祛瘀藥，具清熱、涼血、活血祛瘀功效。醫藥書籍記載，桂枝茯苓丸應該用赤芍、芍藥甘草湯應該用白芍，可知使用正確原料藥材，是對症下藥的先決條件。本研究用 Cosmosil 5C₁₈-MS 管柱，以磷酸鹽溶液配合氬甲烷、甲醇等有機溶劑為沖提液，進行分析，結果顯示 albiflorine 與 paeoniflorine 的比值是兩者的分辨點，赤芍幾近於 0，白芍可以明顯看到 albiflorine 的存在，此法最重要的是可應用於藥材、單方與複方。CE 也可用為檢測工具。本研究篩驗含白芍製劑 14 方，含赤芍製劑 3 方。

日本漢方限用日連，中華藥典則用川連、雅連，近來日本厚生省開始檢討兩者應用於製劑有無差異。我們用 ODS-80TM 管柱，醋酸鹽與氬甲烷沖提液分析，可以明確看出兩者的 finger-print 差異。日連不含 epiberberine，川連則有 berberine 的七分之一量，CE 更適合於該等生物鹼的判別。本方法應用於藥材、單方、複方製劑的基原辨識，皆無困難。本研究篩驗含黃連製劑 10 方。

古籍記述吳茱萸藥材「開口者良、閉口者悶」，長期服用閉口者，可能引起胸悶的副作用。本研究以 Cosmosil 5C₁₈-MS 管柱，醋酸鹽、氬甲烷及甲醇沖提液分離，用其藥理活性成分 evodiamine 及 dehydroevodiamine 分辨之，開口者 evodiamine 較多，閉口者反之，可實際應用於市售品的檢測。本研究篩驗市售吳茱萸湯濃縮製劑。

藥材主要組成成分的安定性亦經測定，一般而言，都隨時間增加而遞減，但看不出有明顯的規則性。本研究針對吳茱萸及芍藥藥材作系列檢討。

CCMP89-RD-041

Study on the identification of Chinese herbal drugs by chemical analysis

Shuenn-Jyi Sheu

Department of Chemistry , National Taiwan Normal University

White peony is a hemopoietic drug capable of supplementing blood, alleviating urgency and arresting pain, while red peony belongs to the category of blood enlivening drugs capable of clearing heat, cooling blood, enlivening blood and removing stagnant blood. From the medical literature, the herbal formula Cinnamon and Hoelen Combination should contain red peony as component, and the formula Peony and Licorice Combination should contain white peony. Thus, the use of correct drug materials is a prerequisite in the practice of "prescribe according to symptom complex". This study employed Cosmosil 5 C₁₈-MS column and used phosphate salt solution together with acetonitrile and methanol as eluent in the analysis of the herbs. The result shows that the distinction between the two herbs lies in the albiflorine to paeoniflorine ratio, which is almost zero in red peony; whereas albiflorine is found to exist markedly in white peony. The most important with this method is its application to the analysis of simple herbs and herb formulas. CE may also be used as an analyzing device. This study analyzed 14 formulas containing white peony and 3 formulas containing red peony.

Traditional Chinese medicine practiced in Japan is required to use Japanese coptis for this herb itself, but the Chinese Pharmacopoeia includes Szechuan coptis and Ya coptis. Currently the Japan Health Ministry began to investigate to see if there are any differences between herbal preparations from the two kinds of coptis. We used ODS-80TM column and acetate salts and acetonitrile as eluent and found differences between the finger prints of the two kinds of herbs. The Japanese coptis does not contain epiberberine, which, nevertheless, occupies one seventh of the content of berberine in Szechuan coptis. CE is even more suitable for analysis of these alkaloids. The method presented herewith can be applied without difficulty to the identification of botanical sources for herbal drug materials, simple herbs and herbal formulas. This study tested ten samples of coptis preparations.

Ancient medical texts record, "the open-mouth articles are good in

depression. This study used Cosmosil 5 C₁₈-MS column and acetate salt, acetonitrile and methanol as eluent for separation, and discriminated the two varieties by the pharmacologically active constituents evodiamine and dehydroevodiamine. As a result, the open-mouth article contains more evodiamine and the contrary is true with the closed-mouth article. This feature can be applied to the test of commercial articles. This study applied this method to the analysis of xxx samples of Evodia Combination extract preparations.

The shelf lives of the chief constituents in herb drug materials were also tested, and, generally speaking, they are reduced with time, but without any observable regularity. This study made a series of investigations on the drug materials evodia and peony.

第一章 緒論

第一節 前言

中藥為我國寶貴的文化資產，是先民歷經千百年智慧與經驗累積的結晶，曾對我民族健康做出重大貢獻，現仍被國人普遍採用。但中藥原料來自天然的動植物，其品質受基原、產地、天候、栽培條件、生長年限、採收季節等因素影響甚大；在這些變因中又以基原影響尤其重大。中國幅員廣大，相同名稱的藥材常來自不同基原的植物，因此市售樣品極為複雜，目前主要都用生藥顯微鏡檢來鑑定，最近也有一些 DNA/PCR 的報導，不過不論那一種方法都不能應用於經過煎煮的單方與複方製劑之檢驗。我們曾經利用植物的高效液相層析圖譜之特定吸收圖紋，精確地判定植物的基原，迅速便捷。不過這些方法都要借用六或六個以上指標成分作為判別的指標，一則標準品取得不易，二則在複方製劑中一些成分易相重疊干擾，因此有必要研究如何簡化，使能落實於日常的基原判別作業。

麻黃為麻黃科植物的乾燥地上莖[1]，目前市售樣品以草麻黃(*Ephedra sinica* Stapf)與中麻黃(*E. intermedia* Schrent)兩種居多，定量結果發現前者 $E/PE > 1$ ， $ME/MPE > 10$ ， $NE/NPE > 0.4$ ，而後者為 $E/PE < 0.3$ ， $ME/MPE \sim 1$ ， $NE/NPE < 0.4$ [2]。

黃柏為芸香科植物的乾燥樹皮[3]，市售樣品主要是川黃柏(*Phellodendron chinense* Schneid)或關黃柏(*P. amurense* Ruprecht)，偶而可見台灣黃柏(*P. wilsonii* Hayata et Kanehira)，後者被認為品質優良是少數值得在台灣栽種有經濟價值的藥用植物，分析結果發現台灣黃柏的 berberine 為川或關黃柏的六倍，但 magnoflorine 僅為後者的三分之一，生物鹼總含量前者平均在 41-42mg/g 而後者僅 15-16mg/g，應可做為分辨的依據[4]。

人參為五加科植物的乾燥根[5]，普遍用在中藥處方的是高麗參 *Panax ginseng* C. A. Meyer，有白參與參鬚之分，一般認為前者溫補、後者涼補[6]，定量結果發現總人參皂素及 Rb1，均以參鬚為多，參鬚的總人參皂素為白參的 2.6 倍，Rb1 為 2.5 倍，但 Rg1 卻只有 0.9 倍。Rb1 有溶血及鎮靜中樞神經作用，Rg1 有抗溶血及興奮中樞神經作用，相互拮抗；Rg1/Rb1 在人參的比值是 1.83；但在

參類是 0.4，極易分辨[7]。

芍藥是毛茛科植物的乾燥根，分白芍與赤芍，明李時珍認為開白花者是白芍，開紅花者是赤芍；現在一般認為去皮為白芍，帶皮者為赤芍[8]。我們的實驗數據顯示，赤芍是 *Peonia vitchii* Lynch, 白芍是 *P. lactiflora* Pall. (= *P. albiflora* Pall.)，分屬兩不同品種，與去不去皮無關，只是白芍的藥效成分以內心居多，赤芍則以外皮居多，因此前者去皮後者帶皮。兩者最大的分辨點在 albiflorin 與 oxypaeoniflorin 的比值，白芍的 AF/OPE 約在 2-7 之間，而赤芍比值約在 0-0.3 間，另外，白芍無 paeonol[9]，極易分辨。

黃連是毛茛科植物的乾燥根莖[10]，日連(*Coptidis japonica* (Thunb) Makino)沒有 epiberberine 和 berberastine, 極易與川連(*C. chinense* Franch) 或雅連(*C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao)分隔開來[11]。

吳茱萸為芸香科植物吳茱萸未成熟的乾燥果實，有吳茱萸(*Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.) 及石虎(*E. officinalis* Dode)[12]。但市售品均混有吳茱萸與石虎兩種藥材，不過這兩種樣品的成分含量與比例幾乎完全一樣，但子房分開為五室(開口)與子房不分開(閉口)的樣品則有明顯不同[13]。古籍記載閉口者不宜[14, 15]。實驗數據顯示，兩者最主要的差別在兩 flavonoids 的含量及 evodiamine, rutaecarpine, evocarpine 三者的含量；flavonoids 以閉口者多，後三成分以開口者多。

同名不同品種的植物藥材，其成分含量與相對比例，常有很大差異，因此療效也自應有不同。自古"地道藥材"就被列為品質管制的最重要項目，但查相關規定發現，只要載於中藥典籍的品種均可採用，因此，一般只用 ephedrine 評鑑麻黃，用 berberine 評估黃連、黃柏，用 ginsenoside Rb₁ 評定人參，用 paeoniflorin 評價芍藥，用 evodiamine 評量吳茱萸。但由於品種的不同，這項品質管制或有不足，例如草麻黃與中麻黃均為可用的麻黃藥材，但前者以 ephedrine 居多，後者以 pseudoephedrine 居多，已知 ephedrine 與 pseudoephedrine 的藥理作用相反，顯然何時用草麻黃、何時用中麻黃應有區隔(日本規定解表的麻黃製劑之 ephedrine 應多於 pseudoephedrine)；典籍只列

人參，但實驗結果顯示參鬚的 Rb1 為白參的數倍，若只測定 Rb1 含量，顯然會與人參的傳統品質評定標準不相符合，我們發現很多市售產品標示白參但都以參鬚替代；黃連與黃柏分屬兩種藥材有不同的醫療目標，但各有若干品種，只以 berberine 評定其優劣，顯然會有偏差，芍藥、吳茱萸、葛根、黃芩也有相同情形。因此，本研究的目的是希望借助一次的定量分析，完成品質管制與基原推估兩件事。

本計畫第一年以高效能液相層析 (HPLC) 及毛細管電泳 (CE) 兩種方法，分析含麻黃及黃柏製劑的關鍵化學成分比例，用為推斷基源的依據。HPLC 與 CE 同屬液相分離技術，遵循不同分離機裡，都有多種分離模式，在中藥分析上有互補的作用。[16]

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

黃柏有關黃柏、川黃柏、本黃柏及日本黃柏等品種，含有 berberine、palmatine、jatrorrhizine、phellodendrine 及 magnoflorine 等成分。台灣市面上的黃柏製劑主要來自關黃柏及本黃柏，整理歸納兩藥材的資料發現，它們主要的差異在 berberine 與 palmatine 的比值。黃柏製劑用 CE 分析時，以醋酸鈉溶液為運送液，用 HPLC 分析時，以 SDS 的醋酸溶液為沖提液，可分別在 9 及 35 分鐘內完成。berberine 與 palmatine 的比值，在關黃柏約 1~3，在本黃柏則大於 18。

人參藥材主要含有系列的人參皂素，有多種分析方法，1994 年本實驗室開發可同時定量十二成分的 HPLC 方法，應用在製劑時，因受到其他成分的干擾，效果不彰。因此，本計畫第一年另外開發理想的人參製劑分析方法，以分辨該等

製劑的原料係用白參(紅參)、參鬚、抑或粉光參。

篩檢市售樣品，結果顯示，人參製劑常用或常混雜價廉又有較高 ginsenoside Rb₁ 的參鬚，以取代正確的白參或紅參，參鬚與白參最易區分處在 ginsenoside Rg₁ 與 Rb 的比值，該值在白參(紅參)大於 1.8，在參鬚介於 0.3 至 0.8 之間，在粉光參則小於 0.15。人參皂素屬微量成分，本實驗利用不同的固相萃取材質(C8, C18, HLB)及不同極性的沖提液去除一些干擾物質，來達到準確測量的目標，並提高偵測極限至 5.42ng。經前處理手續，再用磷酸二氫鉀溶液為沖提液，以 HPLC 分析，可順利完成四君子湯、歸脾湯、參門冬湯的定量；補中益氣湯由於組成藥材干擾頗大，須減少分析量，才可達到預期目標。

目前，不論國內外對於中藥製劑的品質評估，均規定每一處方僅需定量兩指標成分，依此原則，由藥檢局第三組溫組長統合的研究團隊(藥檢局第三組溫國慶組長，國防醫學院藥學系吳午龍教授，台灣師大化學系許順吉教授，中國醫藥學院藥學系李佩端教授及台灣必安研究所陳玉盤所長)已完成兩百餘處方的分析方法開發，並已編輯成冊，分送各界參考。不過這些分析方法中，都不預期也不能檢測出所用原料藥材的基原，本研究結果可充作這方面的補強工作，應有互補及連貫性。

第二節 參考文獻

1. 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌，簡明藥材學，P.31，新醫藥出版社，台北(1985)
2. Y. M. Liu, S. J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang and Y. P. Chen, *Planta Med.*, 59, 376(1993)
3. 同 ref.1, p117.
4. Y. M. Liu, S. J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang and Y. P. Chen, *Planta Med.*, 59, 557(1993)
5. 同 ref.1, p407.
6. 許鴻源，中藥材之研究，pp.71-72，新醫藥出版社，台北(1980)
7. W. C. Chuang, S. K. Wu, S.J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang and Y. P. Chen, *Planta Med.*, 61, 459(1995)
8. 同 ref.1. p421
9. W. C. Chuang, W.C. Lin, S. J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang and Y. P. Chen, *Planta Med.*, 62, 347(1996)

10. 同 ref.1, p113
11. Y. M. Liu, S. J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang and Y. P. Chen, *Phytochem. Anal.*, 5, 256(1994).
12. 同 ref.1. p288
13. W. C. Chuang, S. J. Sheu, S. H. Chiou, H. C. Chang and Y. P. Chen, *Planta Med.*, 65,567(1999).
14. 小泉榮次郎，和漢藥考，p.492,古亭書局，台北(1969)
15. 許鴻源，中藥之炮炙，p.333, 新醫藥出版社，台北(1980)
16. 行政院衛生署中醫藥委員會八十八年度委託研究計畫成果報告，CCMP

88-RD-048，民國 88 年 6 月 30 日

第二章 含芍藥製劑之毛細管電泳分析

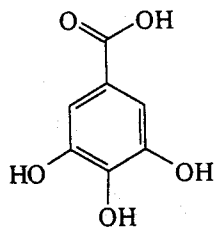
第一節 前言

芍藥為毛茛科之多年生草本植物，兼具觀賞以及藥用用途。據記載，本品屬 *Paeonia albiflora* var. *trichocarpa* Bunge 及其近緣植物的根，原產於西伯利亞之宿根草。葉為二回三出複葉，小葉橢圓形或披針形，有光澤。初夏開大朵五瓣花，有白、紅、紫數種顏色，中國大陸各地均植之，四川、安徽、浙江等地出產尤多，日本亦有種植。

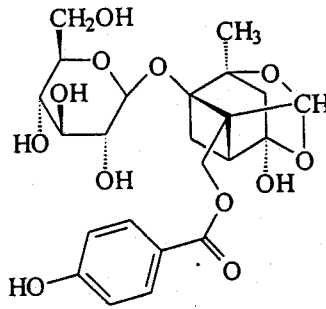
芍藥(*Paeoniae Radix*)分為兩類：一為白芍 *P. lactiflora* Pall. (= *P. albiflora* Pall.)，一為赤芍 *Paeonia vitchii* Lynch，市售白芍表面淡紅棕色或粉白色，平坦或有明顯的縱皺及鬚根痕，質堅實而重，不易折斷，斷面不甚平坦呈灰白色或微帶棕色。在藥理方面，白芍性微寒，有柔肝止痛、養血斂陰、消散惡血及利尿等功效，主治胸腹脅肋疼痛，瀉痢、月經不調、陰虛發熱、四肢掣急。赤芍表面粗糙，具粗而且深的縱皺紋，外皮容易脫落，顯出白色或淡棕色的皮層，質硬且脆，容易折斷。主要功效為清熱、涼血、祛瘀、止痛以及利尿等，主治堅積、血痺、疝癖、腸血、消腫、目赤、月經不調、瘀滯以及腹痛等症。

芍藥的主要的化學成分有：Gallic acid(GA)、benzoic acid(BA)、paeonol(PN)、oxypaeoniflorin(OPF)、albiflorin(AF)、paeoniflorin(PF)、pentagalloylglucose(PG)、Benzoylalbiflorin(BAF)。化學結構如次頁所示。

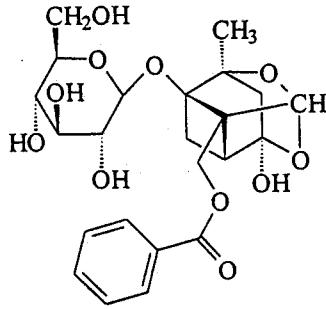
本研究擬採毛細管電泳 MEKC 分析方法，定量出 AF 與 PF，並比較其在白芍和赤芍中成分比例上的不同。



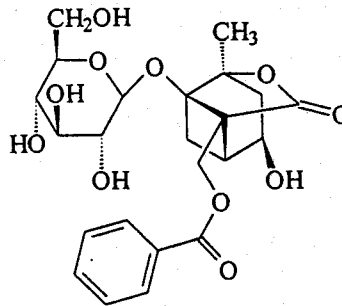
Gallic acid (GA)



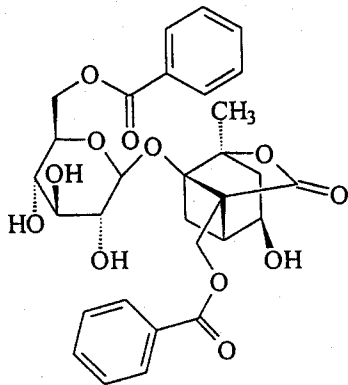
Oxypaeoniflorin (OPF)



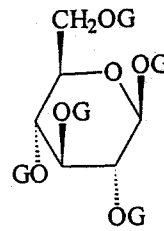
Paeoniflorin (PF)



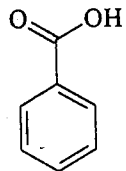
Albiflorin (AF)



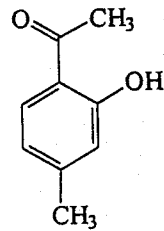
Benzoylalbiflorin (BAF)



G= galloyl
Pentagalloylglucose (PG)



Benzoic acid (BA)



Paeonol (PN)

第二節 實驗部份

2-2-1 藥品與儀器

2-2-1.1 實驗藥品

白芍粉末樣品。界面活性劑 sodium cholate (SC) 購自Sigma (St. Louis, MO, USA)；而硼酸鈉(sodium borate)及氨水(ammonia solution, 28%) 為 Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) 試藥。內標準品 naringinhydrate 為 Aldrich (Milwaukee, WIS, USA) 試藥。乙醇(methanol) 和 氮甲烷(acetonitrile) 為 LC 級試藥 Mallinckrodt (Paris, KY, USA)。配製樣品及緩衝溶液的去離子水 (deionized water)取自 Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA)。

2-2-1.2 實驗儀器

8毛細管電泳系統：Waners Quant 4000

酸鹼測定儀(pH meter)：Suntex SP-2200

離心機：Hettich Universal，其轉盤為10 mLx 12

2-2-2 分析條件

2-2-2.1 最佳分析條件

毛細管長度及內徑：100 cm x 75 μ m I.D. (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA)，至偵測器92.4cm。

樣品注射模式：以100mBar 的壓力注射樣品 1.2 秒。

操作電壓：20KV(定壓)，由正極到負極。

溫度：24.2~26 $^{\circ}$ C

偵測波長：254 nm

CZE 分析條件：緩衝溶液為 15 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 以氨水調至 pH=9.8；分析時間 40 min。

MEKC 分析條件：緩衝溶液為 90% 的 15 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ，50 mM SC 溶液(以 NaOH 調至 pH=9.8)；分析時間 40min。

毛細管沖洗模式：實驗開始前，以 0.1 M NaOH 4 分鐘、去離子水 4 分鐘以及緩衝溶液 4 分鐘沖洗毛細管。在每次樣品分析後，以 0.1 M NaOH 5 分鐘。去離子水 5 分鐘沖洗毛細管。

2-2-3 藥材之定量分析

精稱 3.0 克芍藥粉末，以 50% 乙醇溶液 6 ml 作為萃取溶劑，熱迴流攪拌萃取 10 分鐘，冷卻後離心，重覆三次，將此萃取液中加入內標準品 2.5 ml，以 50% 乙醇稀釋至 25ml，經 No.1 濾紙過濾，作為定量之檢液；每次定量值，為兩次注射之平均分析結果。

第三節 結果討論

2-3-1 分析條件之探討

在本實驗進行之初，是以 1990 年，Honda 等人所使用的 CZE 條件—100mM 硼酸鹽緩衝溶液[40]，為尋找最佳分析條件的起點；但由於高鹽類濃度，會使操作電流提高，產生焦耳熱並加速擴散效應，造成理論板數的降低，以及基線飄動 (baseline fluctuation) 的現象。所以適當的硼酸鹽濃度，為第一個考量因素。在選定了適宜的硼酸鹽濃度後，對於此條件下無法分離的成分，企圖以酸鹼值的變化來改善化合物上所帶的電荷數，造成其淌度的不同，以達分離的目的。然而，

在這些嘗試後所得的 CZE 條件，只能使其中五種成分(OPF、PN、BA、PG 及 GA)順利地分離，而其他結構相似的 PF、AF 和 BAF 則在同一遷移時間出現。因此，為分離此八種成分，進一步開發 MEKC 條件是必要的。

由於界面活性劑對中性物質以及相似結構化合物有高的選擇性，不同的界面活性劑：sodium dodecyl sulfate (SDS)、 γ -cyclodextrin (γ -CD)、 β -cyclodextrin (β -CD) 及 sodium cholate (SC) 皆被試以分離 PF、AF 和 BAF，惟 β -CD 及 SC 對分析有改善的現象，但 β -CD 溶解度低(≤ 16 mM)，容易產生雜訊 (spike)。因此在 MEKC 條件的選擇中，SC 被選擇為界面活性劑。

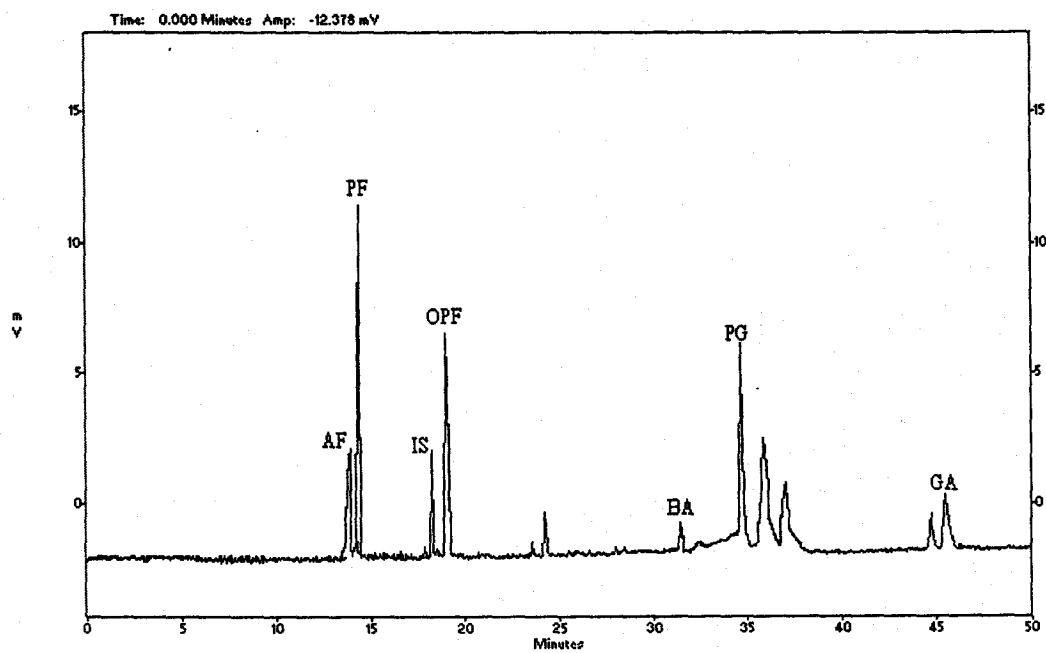
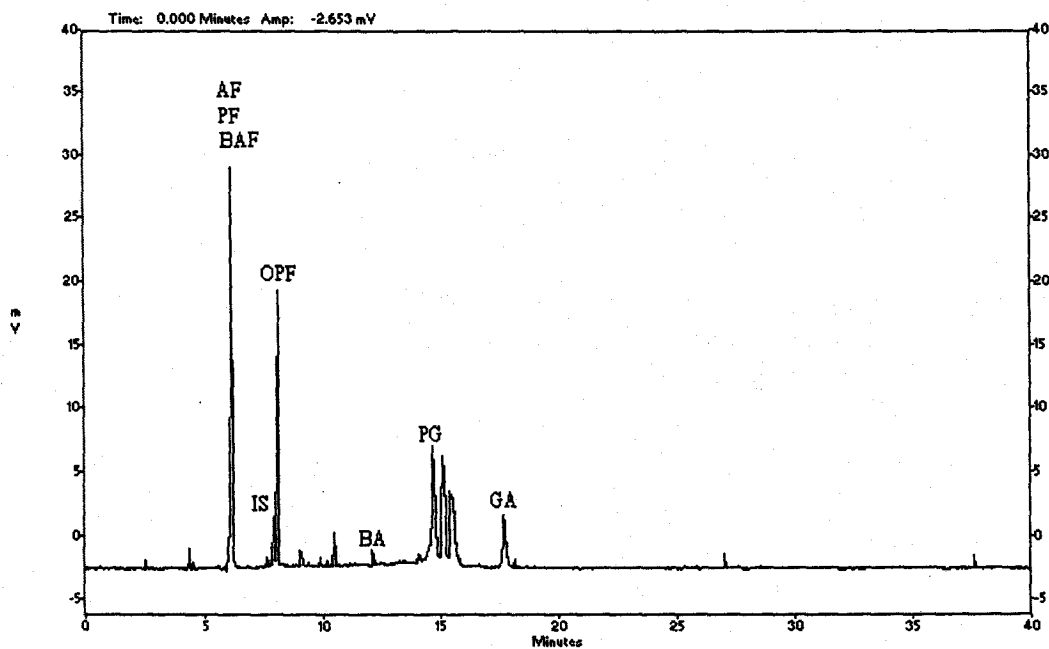
當樣品帶在毛細管中移動時，若樣品帶與周圍緩衝溶液的電導度 (conductivity) 不同，會造成吸收峰的變形。當樣品帶的電導度比緩衝溶液低，吸收峰的前緣會較尖銳而末端擴散，造成拖尾現象 (tailing)。因此本實驗所採注射模式—先注入樣品再注入水—是為改變電導度以減低拖尾現象。

2-3-1.1 CZE部分

在最佳的CZE的條件下：硼酸鹽濃度 15 mM 並以氨水將 pH 值調至9.80，可分離 PN、OPF、BA、PG 和 GA 五種成分，但 BAF、PF 和AF 仍無法成功地分離開來。

2-3-1.2 MEKC部分

由於 CZE 方法的限制，MEKC 分析方法開發主要係針對 CZE 中無法分離的 BAF、PF 和AF 三種結構相似的成分。在此方法中，利用 SC 為界面活性劑。為了得到更好的分析效率，加入了有機修飾劑—甲醇，以提高理論板數。所得的最佳條件：90%的 15 mM $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 及 50 mM SC 水溶液(以氨水調至 pH=9.8)與 10% 的甲醇，順利地分離了 AF、PF、BAF、OPF 和 PN。



芍藥材萃取液之電泳圖譜

(上圖) CZE 之電泳圖譜 (下圖) MEKC 之電泳圖譜

2-3-2 藥材藥品之分析

取芍藥之樣品三份，各重複定量三次，AF、PF 之成分平均值：

AF : 5.49 ± 0.12 (mg/g)

PF : 16.70 ± 0.38 (mg/g)

其他成分：

OPF : 0.06 ± 0.04 (mg/g)

BA : 0.02 ± 0.01 (mg/g)

PG : 2.04 ± 0.09 (mg/g)

GA : 0.29 ± 0.01 (mg/g)

第四節 相關製劑之定量分析

取六種市售製劑樣品之萃取液，重複定量三次，求各 AF、PF 之平均值
討論白芍與紅芍製劑之間的不同。

此六種方劑之名稱以及藥材組成如下：

*白芍

1. 桃紅四物湯

桃紅 5.0 紅花 2.5 當歸 5.0 川芎 2.5 白芍 5.0 熟地黃 5.0

2. 百合固金湯

百合 4.0 白芍 3.0 當歸 4.0 貝母 3.0 甘草 1.5 地黃 4.0 麥門東 6.0 玄參 3.0 桔梗 2.0

3. 柴葛解肌湯

柴胡 4.0 葛根 4.0 羌活 2.0 白芷 2.0 黃芩 3.0 芍藥 3.0 桔梗 2.0 石膏 5.0 甘草 2.0 大棗 2.0 乾生薑 1.0

4. 荊芥連翹湯

荊芥 2.0 連翹 2.0 防風 2.0 當歸 2.0 川芎 2.0 白芍 2.0 柴胡 2.0 枳殼 2.0 黃芩 2.0 山梔 2.0 甘草 1.0 白芷 2.0 桔梗 2.0

5. 五積散

茯苓 2.0 半夏 2.0 芍藥 1.2 白芷 1.2 乾薑 1.2 大棗 1.2 白朮 2.0 蒼朮 2.0 川芎 1.2 枳殼 1.2 桂枝 1.2 甘草 1.2 陳皮 2.0 當歸 1.2 厚朴 1.2 桔梗 1.2 麻黃 1.2 生薑 1.2

*赤芍

1. 血府逐瘀湯

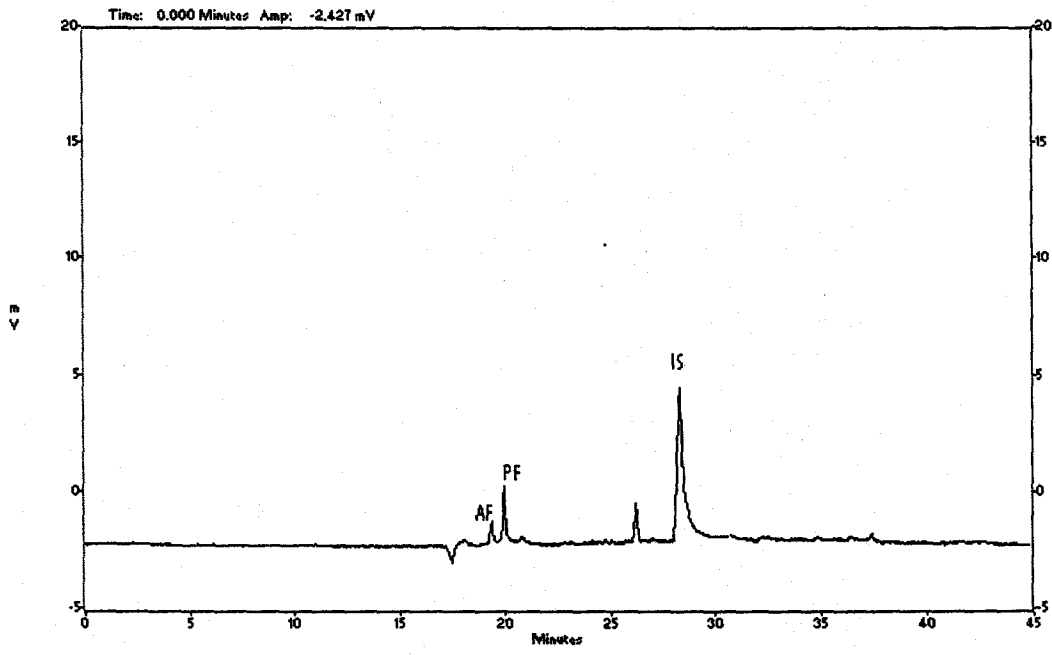
當歸 2.4 枳殼 1.6 桔梗 1.2 紅花 2.4 生地黃 2.4 甘草 0.8 桃仁 3.2 柴胡 0.8 牛膝 2.4 赤芍 1.6 川芎 1.2

2. 補陽還五湯

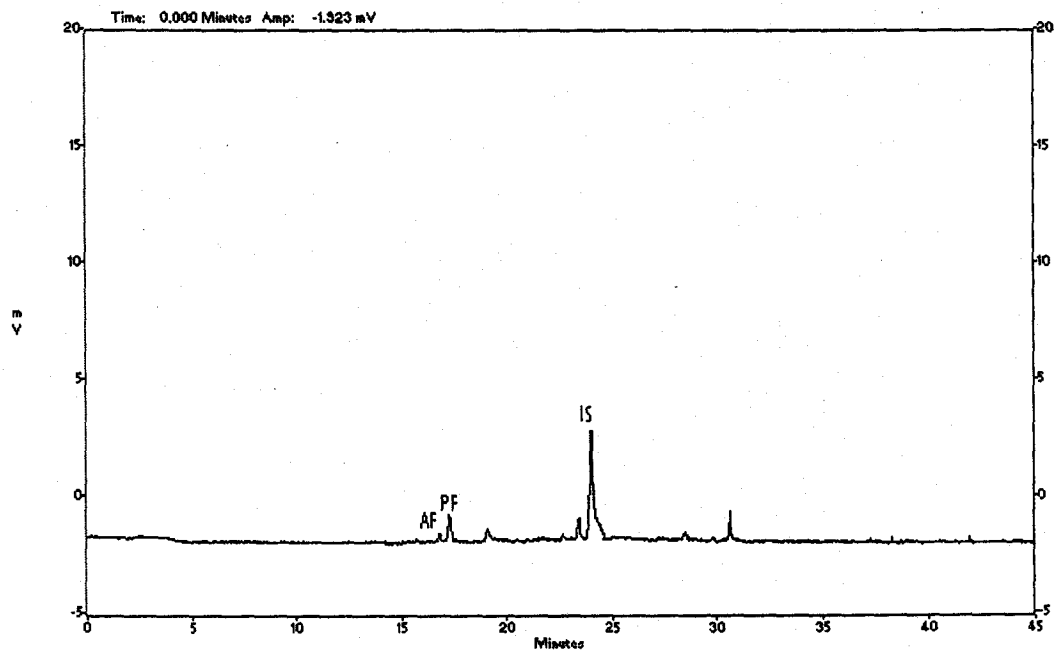
黃耆 6.7 赤芍 4.0 川芎 4.0 紅花 2.7 當歸 4.0 地龍 2.7 桃仁 2.7

3. 五淋散

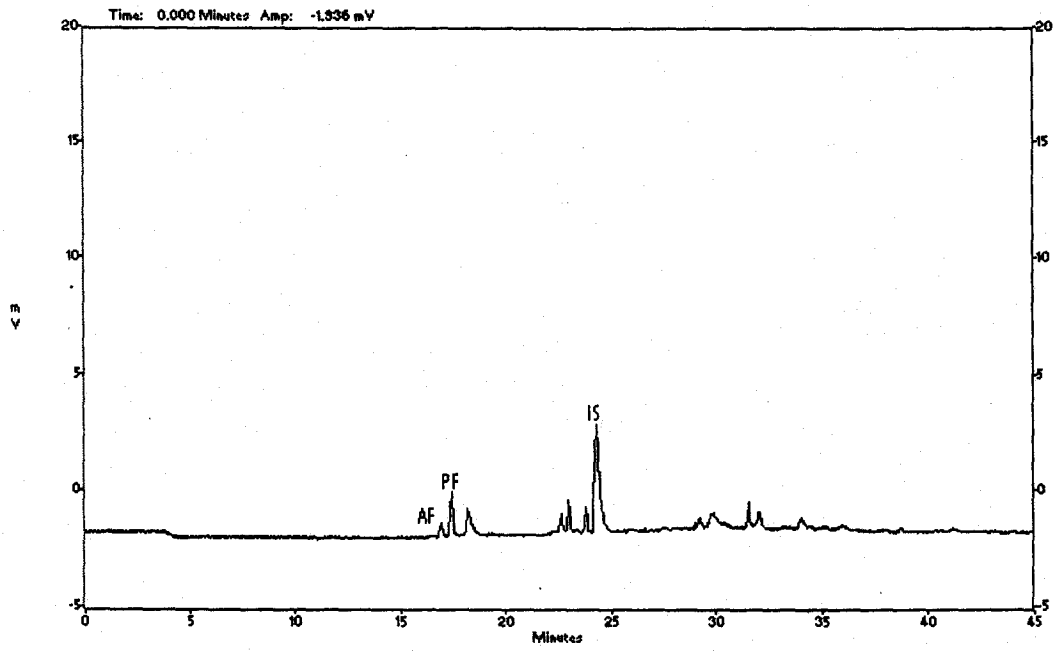
茯苓 6.0 赤芍 2.0 當歸 3.0 山梔 2.0 甘草 3.0 黃芩 3.0



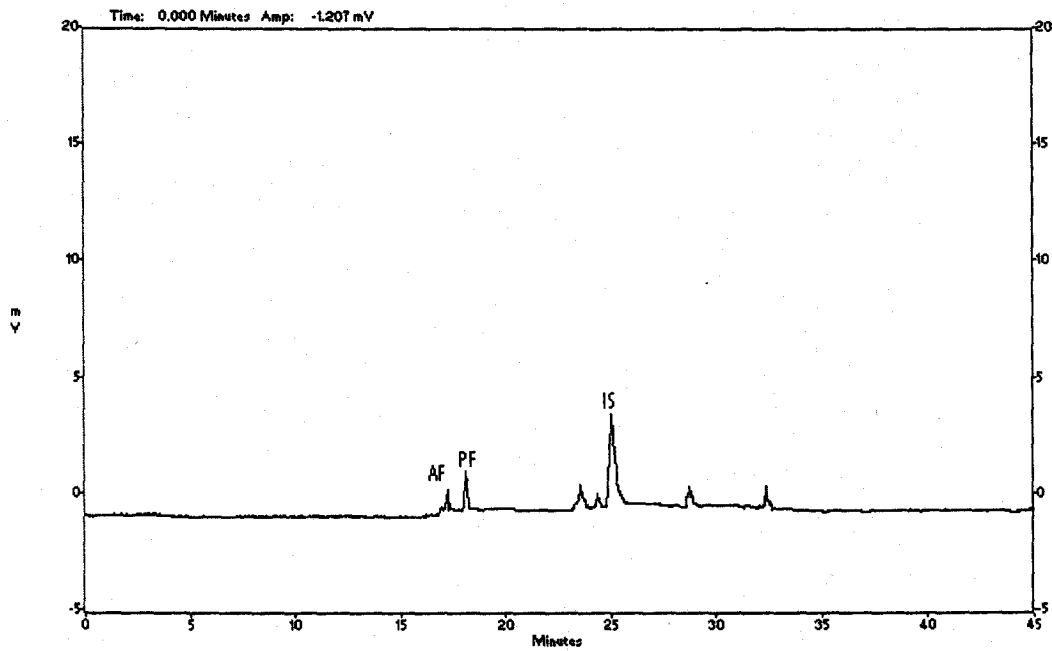
市售桃紅四物湯之層析圖



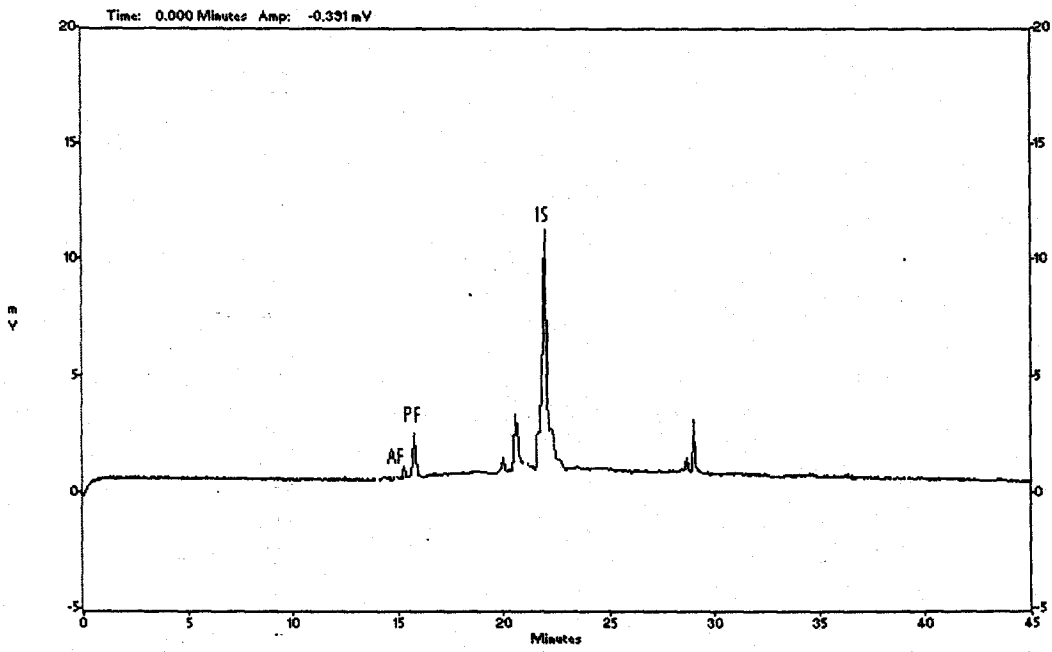
市售百合固金湯之層析圖



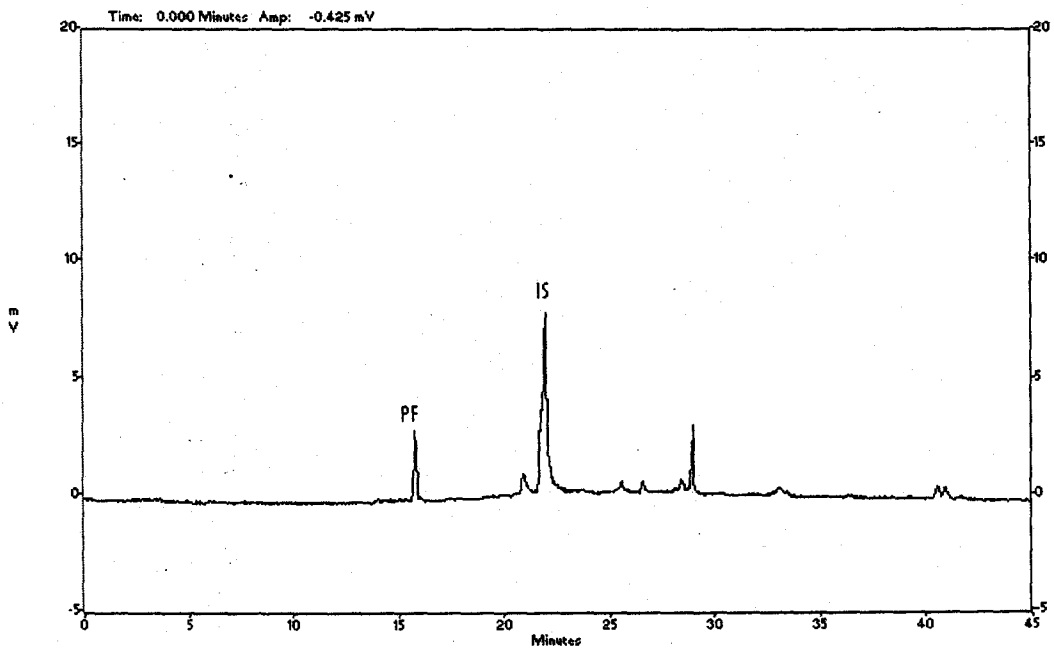
市售柴葛解肌湯之層析圖



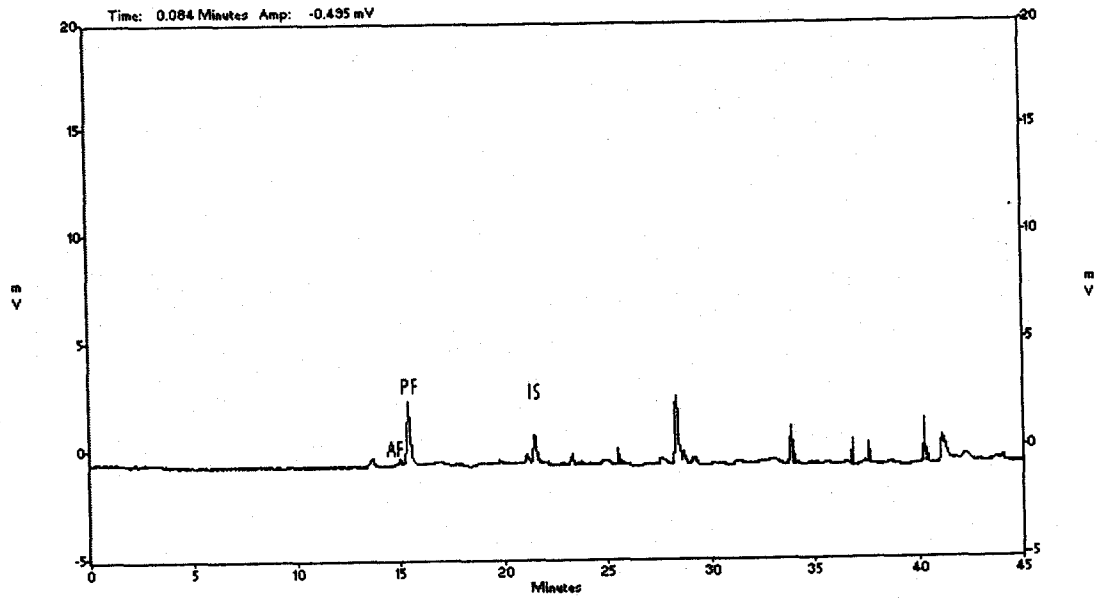
市售荊芥連翹湯之層析圖



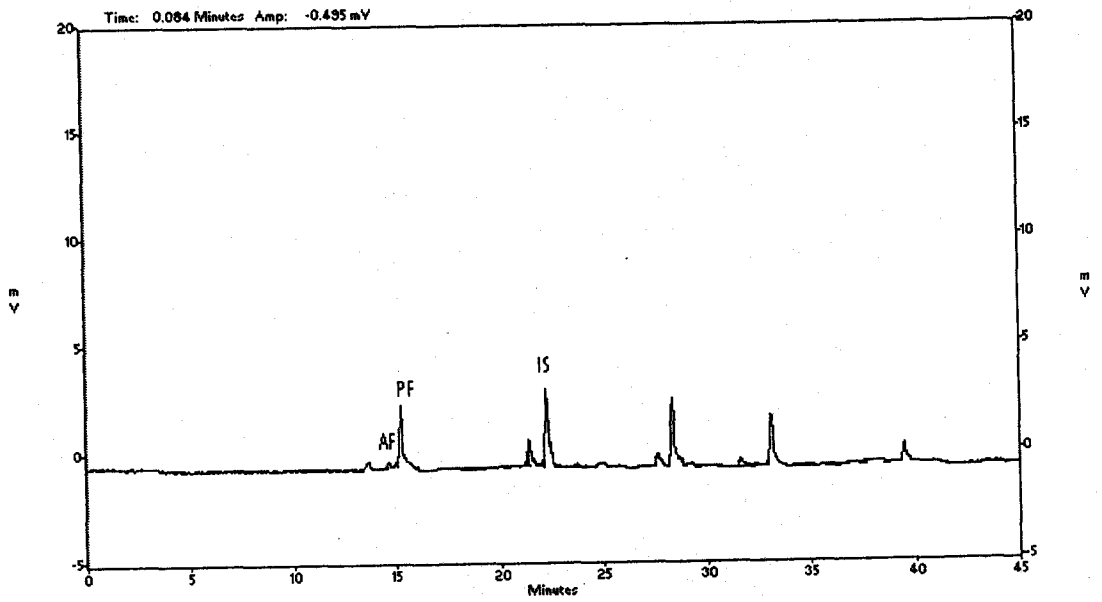
市售五積散之層析圖



市售血府逐瘀湯之層析圖



市售補陽還五湯之層析圖

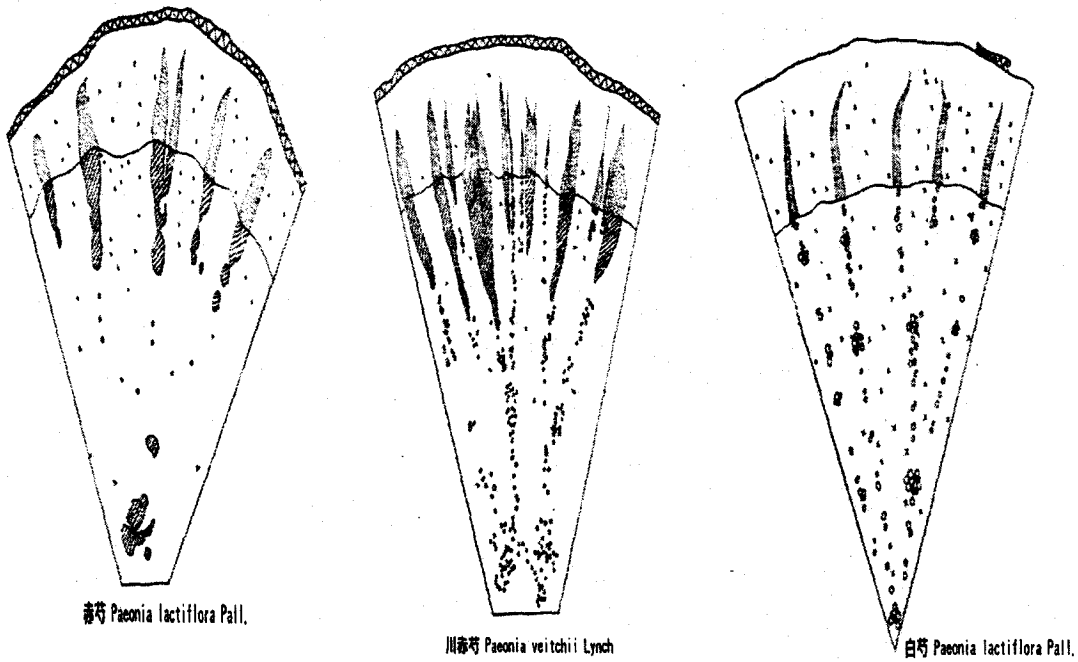


市售五淋散之層析圖

第三章 含芍藥製劑之高效液相層析

第一節 基原確認

取赤芍、川赤芍、白芍樣品，經財團法人必安研究所研究員鄭昌明先生組織切片、顯微鏡檢，如下圖：



經與文獻記載資料比對無誤。

第二節 高效液相層析之分析條件及自製樣品分析

一.HPLC 之分析條件：

Buffer : A : H₂O : KH₂PO₄ : 10%H₃PO₄ (1000 ml : 2.72 g : 1 ml)

B : CH₃CN

C : H₂O

D : CH₃OH

Column: Cosmosil 5C₁₈-MS :

Pump system : Gradient , 如右

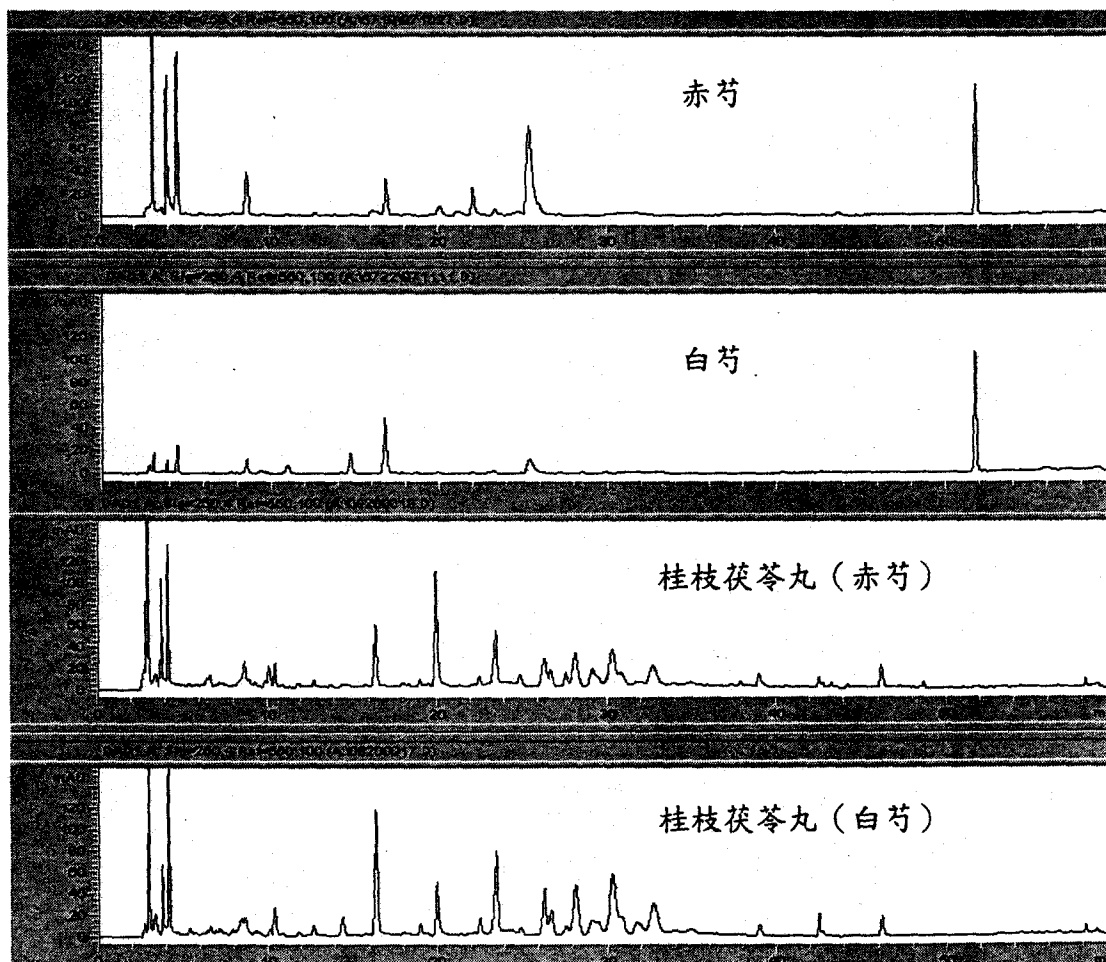
Flow rate : 1 ml/min

Time : 60 min.

Post run : 15 min.

Wavelength : 250 nm

Time	A	B	C	D
Initial	90	10	0	0
20	75	25	0	0
40	65	35	0	0
55	0	80	20	0
60	0	10	90	0



第三節 市售含芍藥製劑之分析

一. 市售含芍藥製劑如下：

A. 白芍

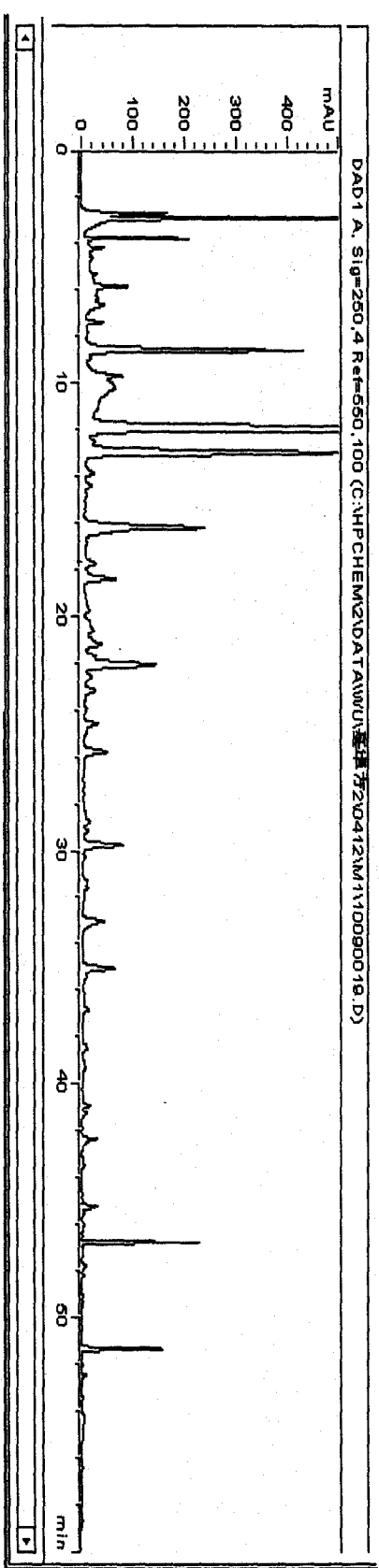
- | | |
|------------|-----------|
| 1. 升麻葛根湯 | 8. 黃耆建中湯 |
| 2. 四逆散 | 9. 溫清飲 |
| 3. 拖裏消毒飲 | 10. 溫經湯 |
| 4. 芍歸膠艾湯 | 11. 當歸四逆湯 |
| 5. 桂枝芍藥知母湯 | 12. 當歸飲子 |
| 6. 桂枝茯苓丸 | 13. 聖愈湯 |
| 7. 柴胡桂枝湯 | 14. 薏苡仁湯 |

B. 赤芍

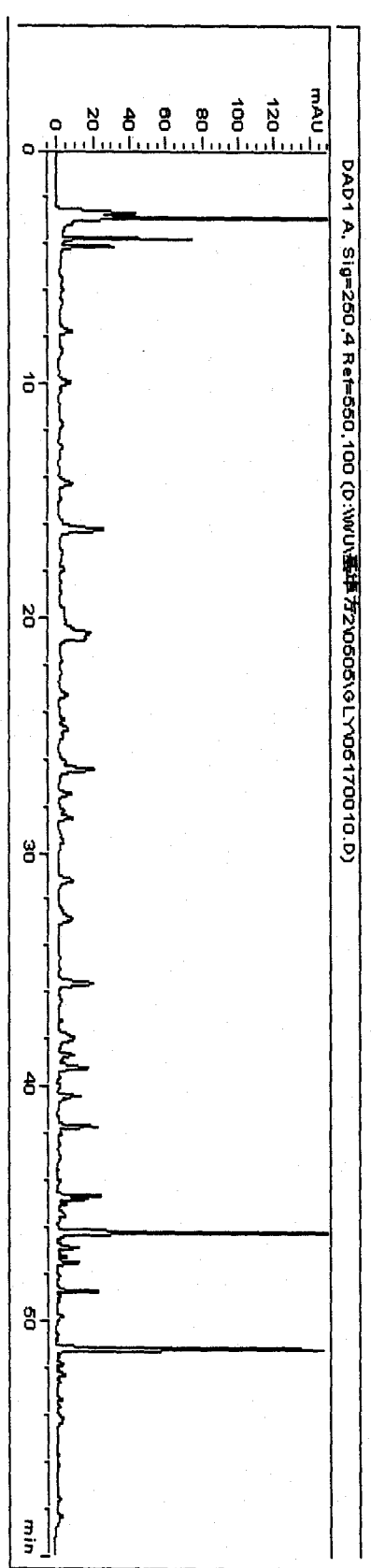
- | | |
|----------|----------|
| 1. 血府逐瘀湯 | 3. 補陽還五湯 |
| 2. 消痔丸 | |

二. 自製製劑之層析圖譜如下分列：

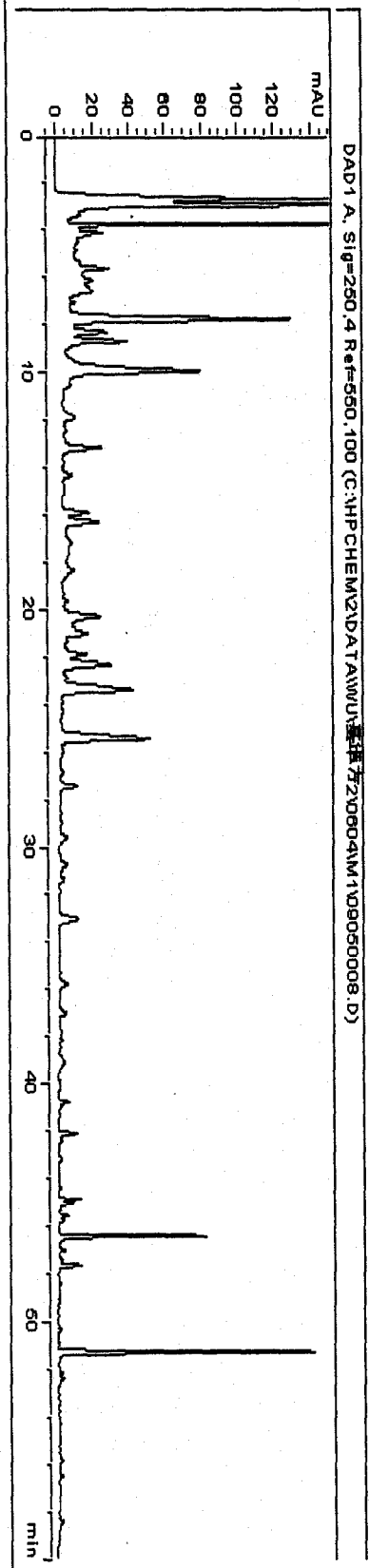
1. 升麻葛根湯



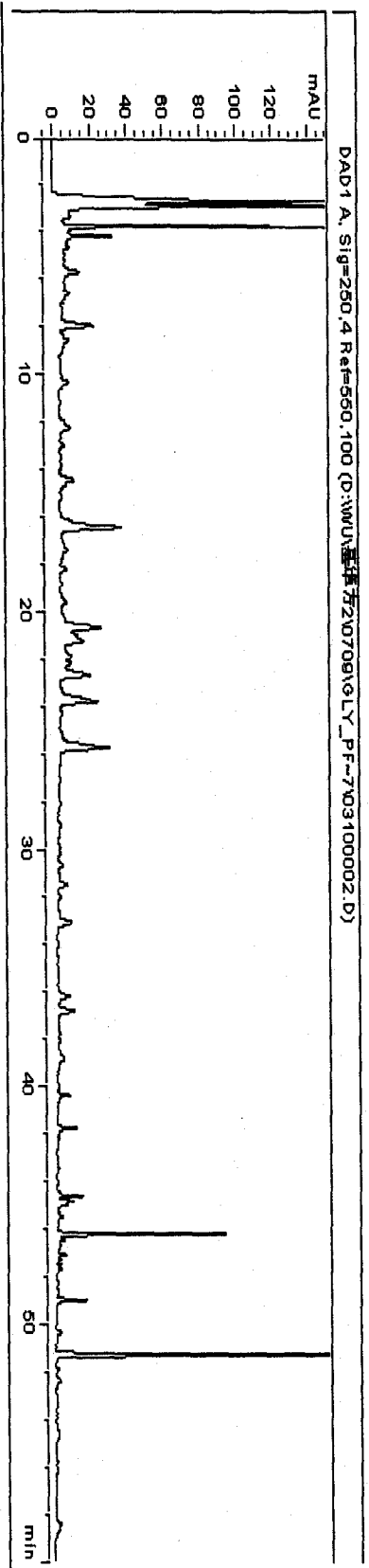
2. 四逆散



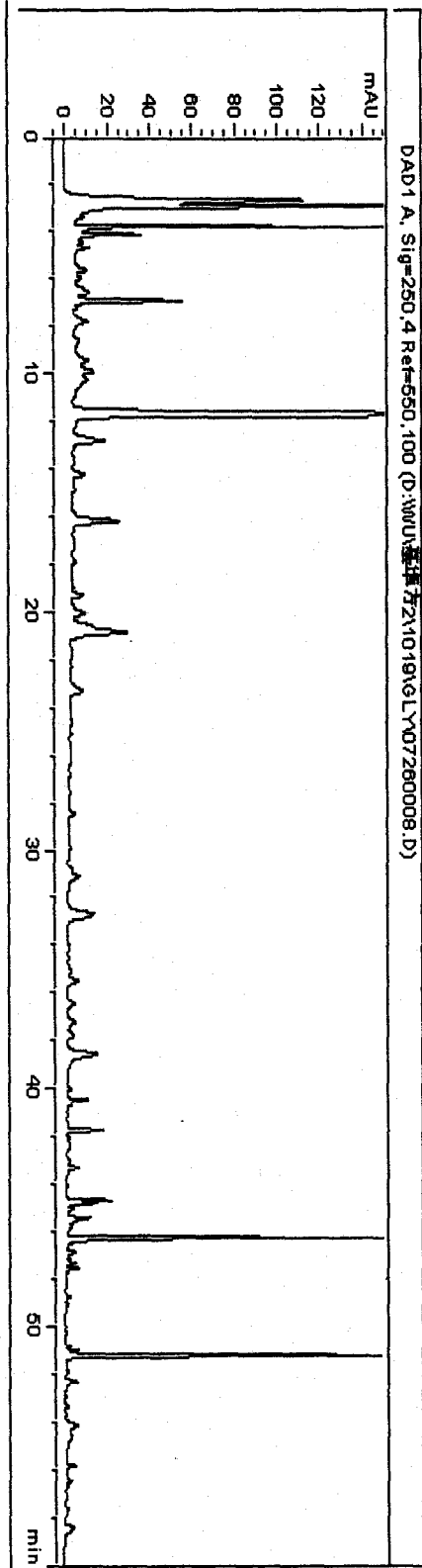
3. 拖裏消毒散



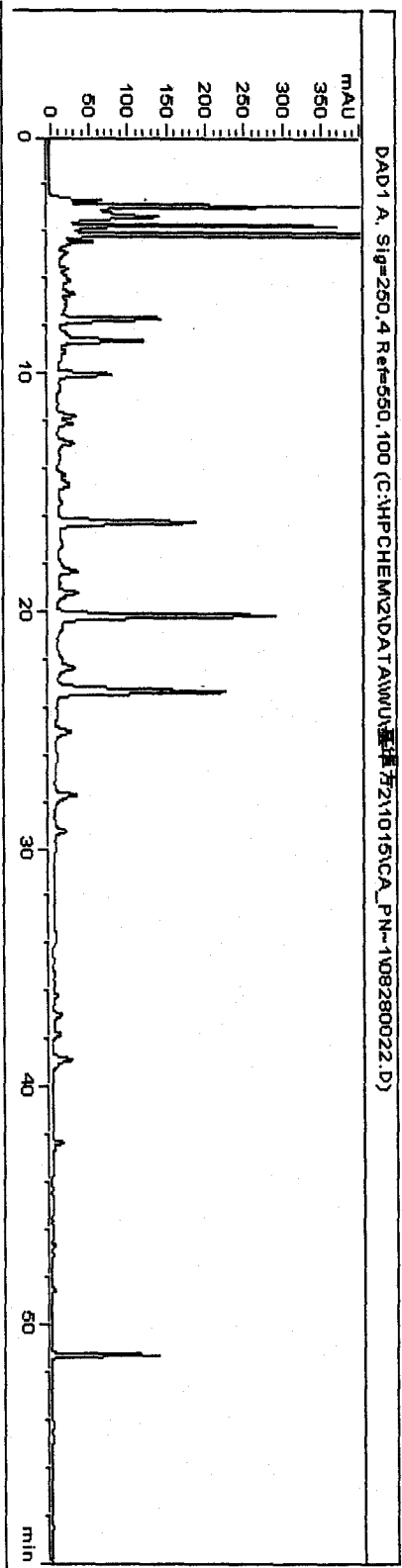
4. 芍歸膠艾湯



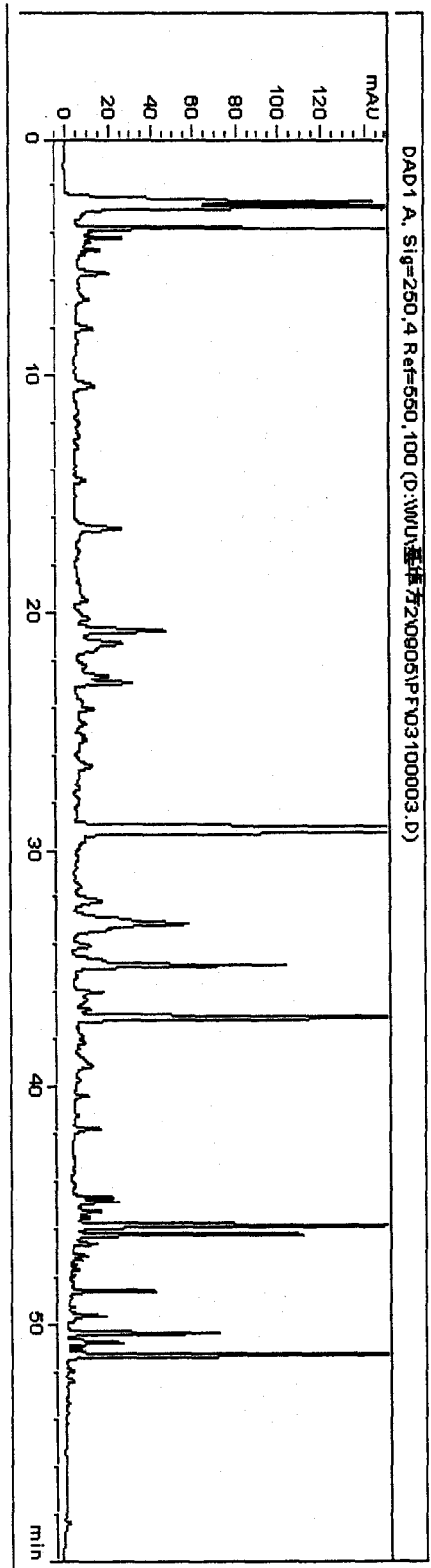
5. 桂枝芍藥知母湯



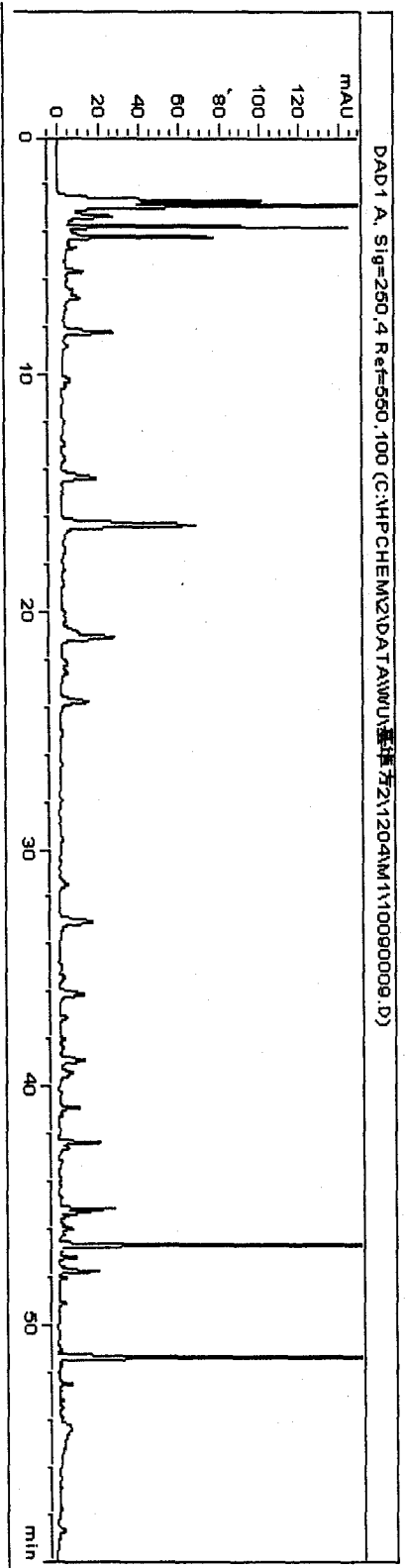
6. 桂枝茯苓丸



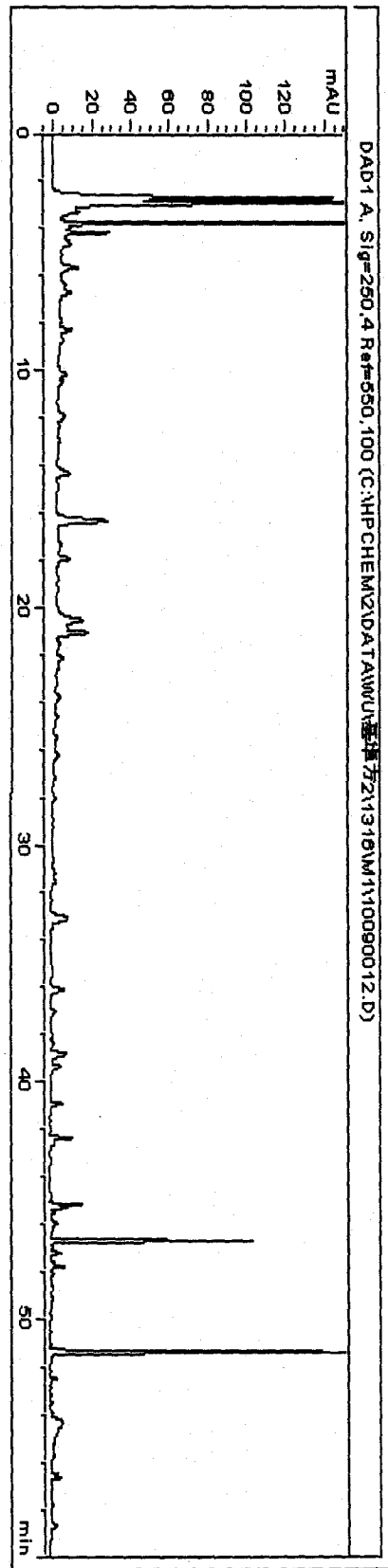
7. 柴胡桂枝湯



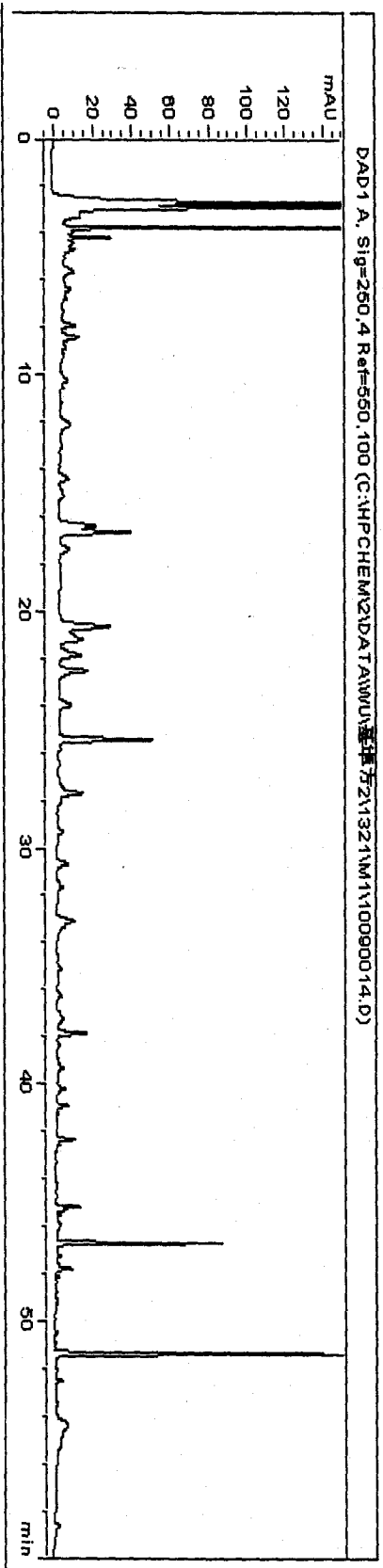
8. 黃耆建中湯



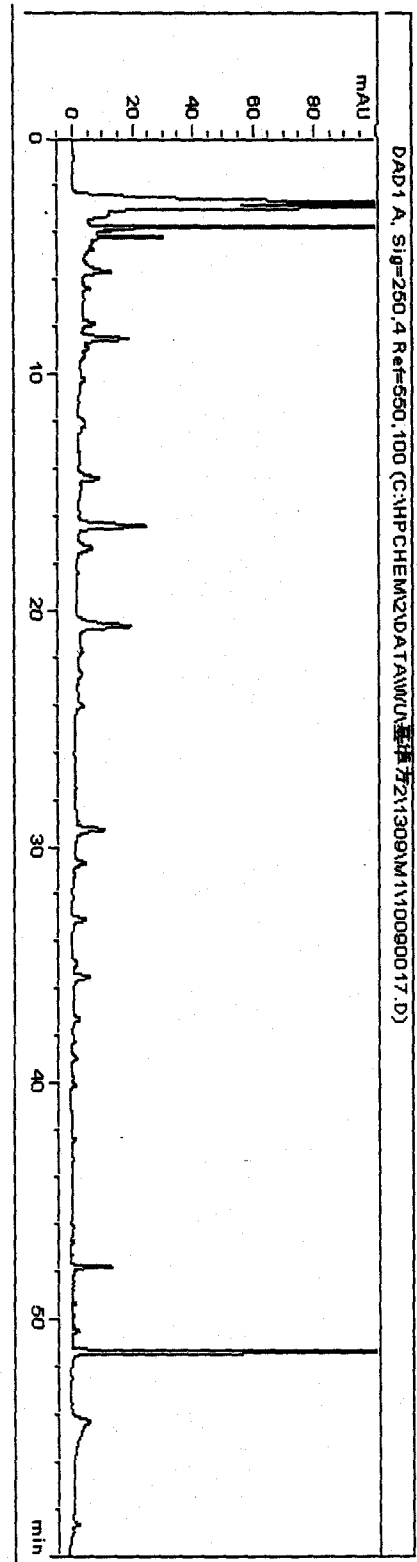
11. 當歸四逆湯



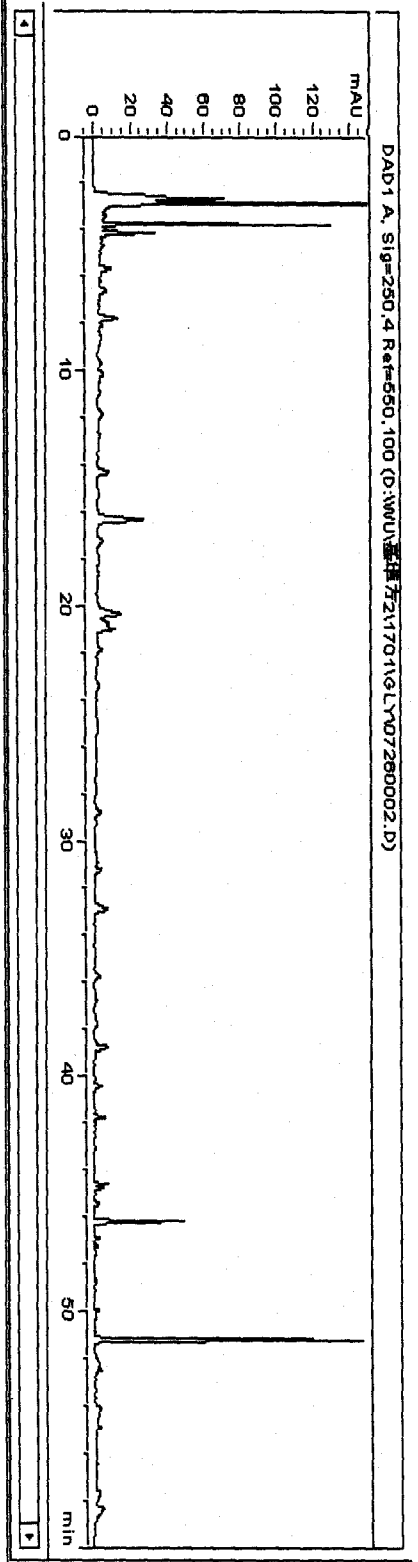
12. 當歸飲子



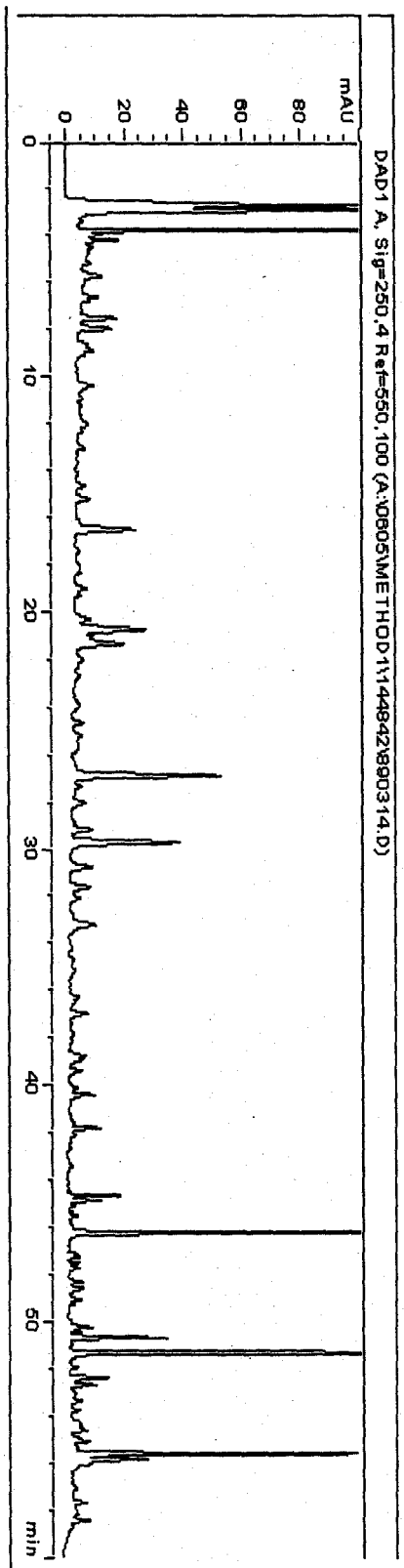
13. 聖愈湯



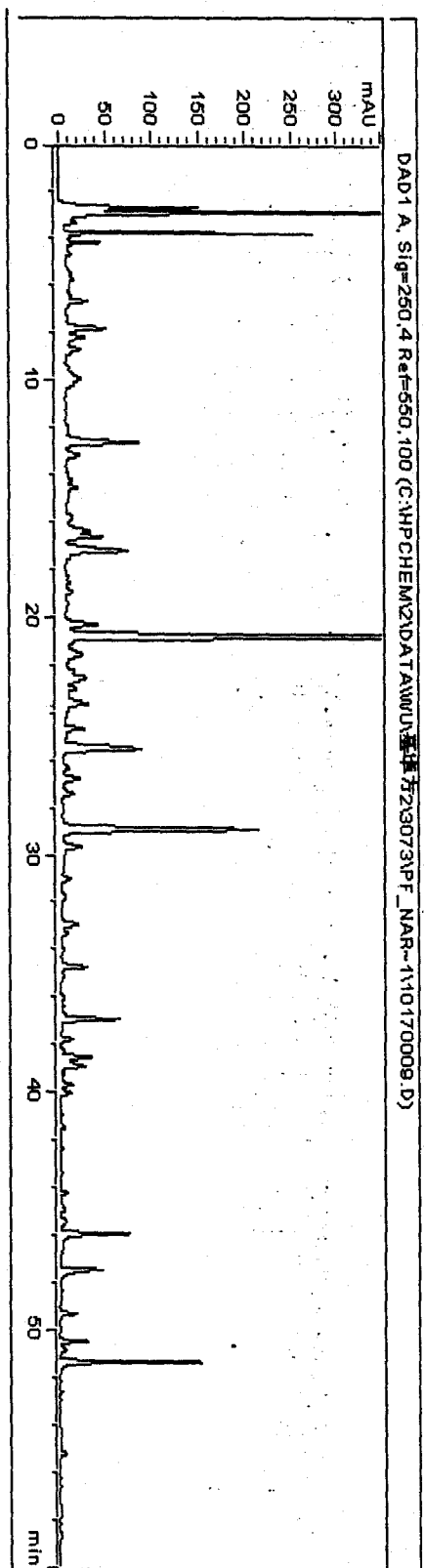
14. 薏苡仁湯



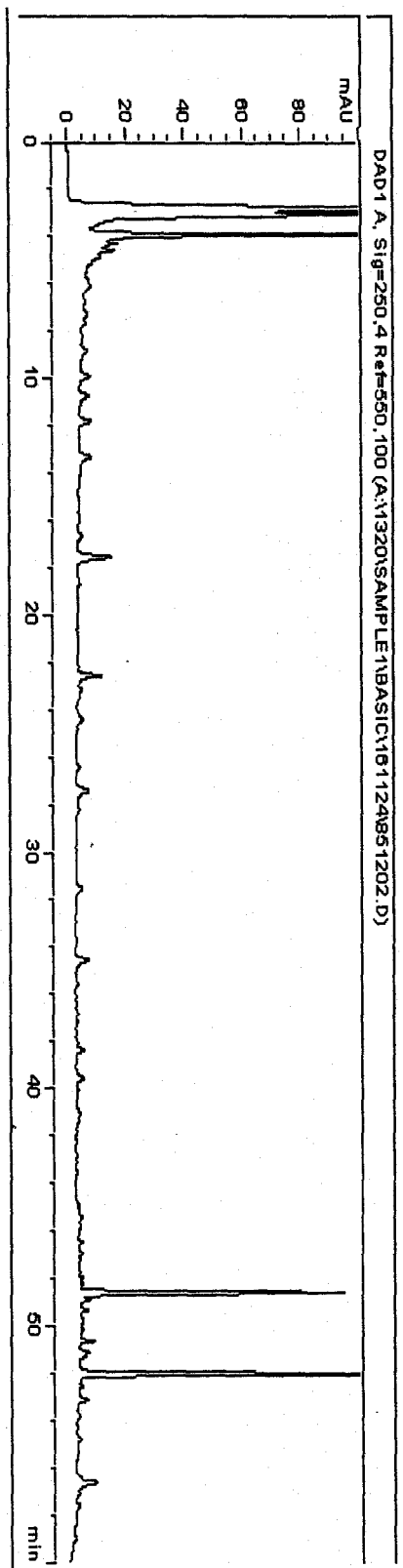
1. 血府逐瘀湯



2. 消痔丸



3.補陽還五湯



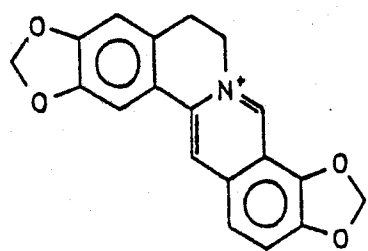
第四章 含黃連製劑之高效液相層析

第一節 前言

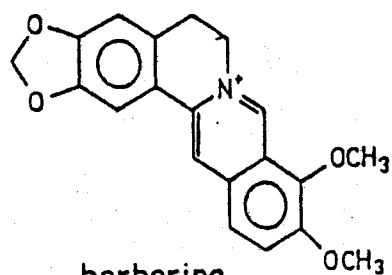
黃連為常用的中藥，神農本草經列為上品，因其根『連珠而色黃』，故名。古人經驗多認為黃連能治痢疾及多種炎性症狀。在使用上，中醫用於清熱燥濕、瀉火解毒，主治熱盛心煩、疲滿、消渴、熱痢腹痛、裡急後重、吐血、目赤、腫傷、口舌生瘡等症。然而在西醫使用上主要作為苦味健胃劑。其主要來源為毛茛科 (Ranunculaceae) 植物乾燥根莖，如：

- (1) 川連 (Coptis chinensis Franch);
- (2) 雲連 (C. teetoides C.Y Cheng);
- (3) 日連 (C. japonia (Thunb.) Makino)。

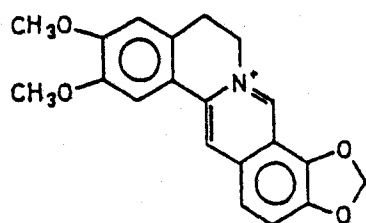
有關黃連成分之研究，始於 1886 年日本研究者發現黃連含有 3-7% 之生物鹼，目前已知其主要成分有 berberine, palmatine, coptisine, epiberberine, jatrorrhizine, columbamine, berberastine 和 magnoflorine 等。這些生物鹼的結構如下：



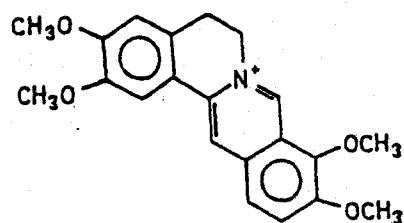
coptisine



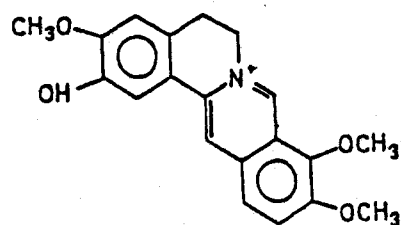
berberine



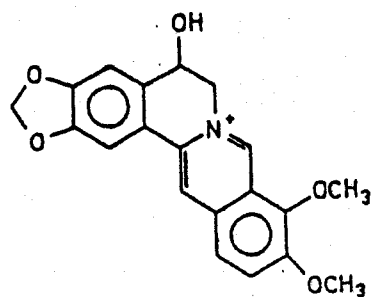
epiberberine



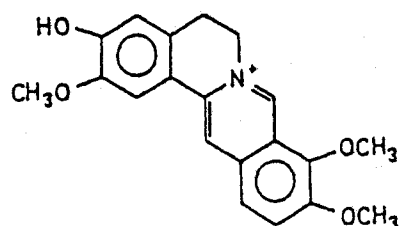
palmatine



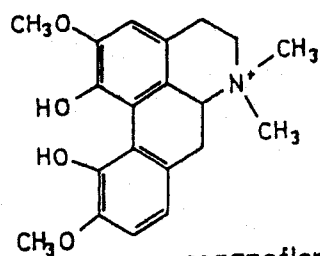
columbamine



berberastine



jatrorrhizine

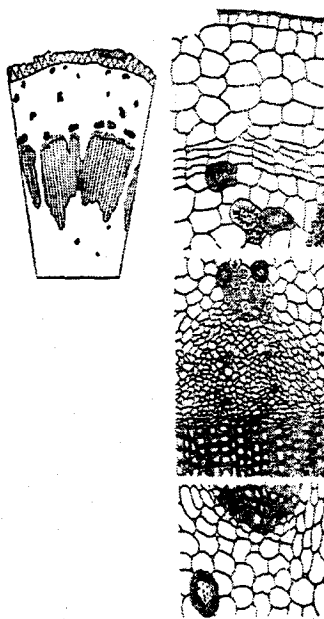


magnoflorine

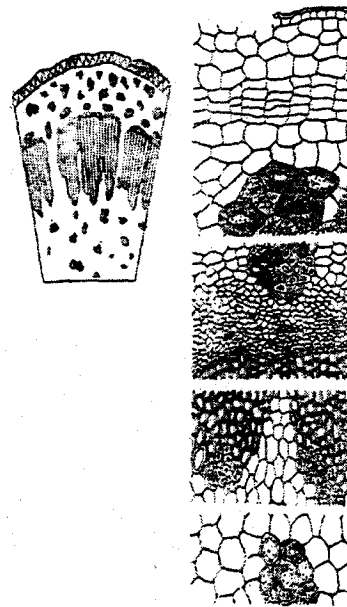
1962年 Haginiwa 等人探討 berberine 類生物鹼的藥理作用，發現 berberine, palmatine, jatrorrhizine 等均有抗癌作用，其中以 berberine 作用最強。1971年 Sawada 等人用管柱色層分析從日連分離出 berberine、palmatine、jatrorrhizine 及 coptisine 並作抗菌測試，發現均有抗微生物活性，而以 coptisine 對抗金黃葡萄球菌之活性最強。另外，在1964年 Chang 等人則發現 magoflorine 有降血壓作用。

第二節 基原辨識

取川連、日連樣品，經財團法人必安研究所研究員鄭昌明先生組織切片、顯微鏡檢，如下圖：



川連 *Coptis chinensis* Franch



日連 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao

第三節 市售含黃連製劑分析

一.HPLC 之分析條件：

Buffer：50 mM CH₃COONa+2 % CH₃COOH

Column：ODS-80TM

Pump system：Isocratic (Buffer/CH₃CN=70/30)

Flow rate：0.85 ml/min

Time：60 min.

Post run：15 min.

Wavelength：270 nm

二.含黃連製劑如下：

1. 三黃瀉心湯

2. 芍藥湯

3. 柴陷湯

4. 普濟消毒飲

5. 黃連上清丸

6. 黃連湯

7. 溫清飲

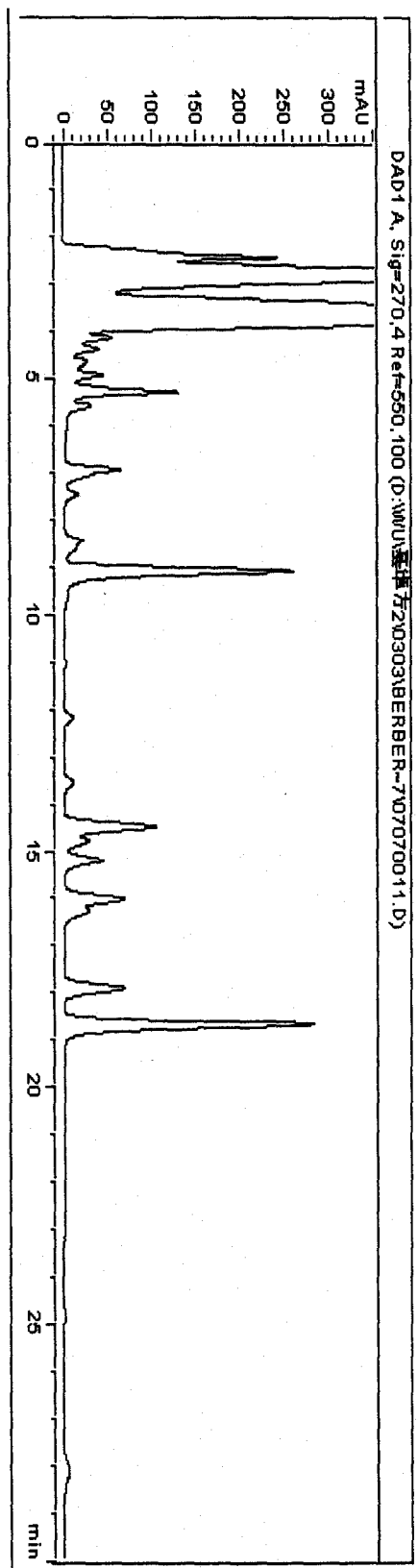
8. 葛根黃連黃芩湯

9. 清上防風湯

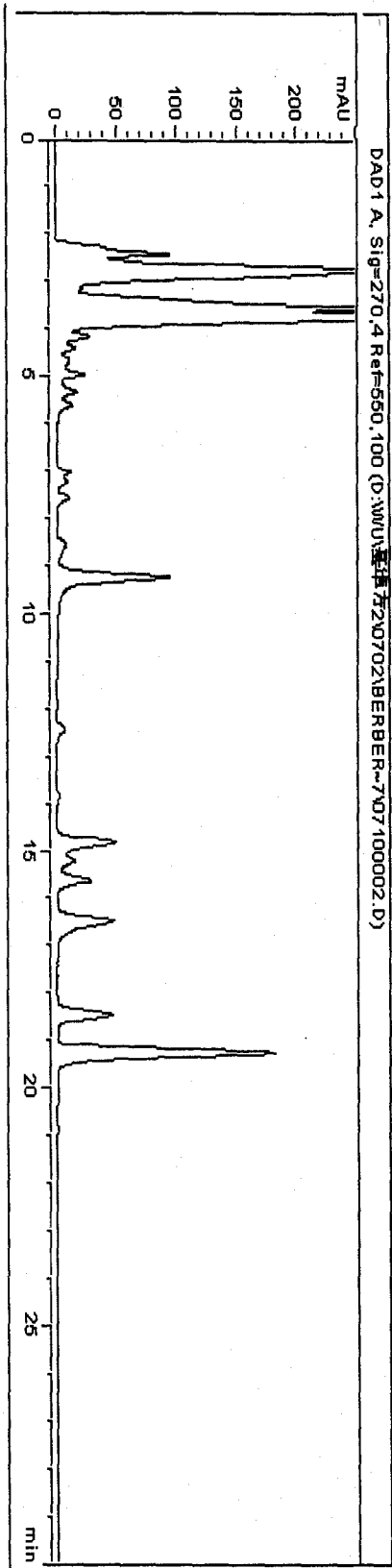
10. 黃連解毒湯

三.自製製劑之層析圖譜如下分列：

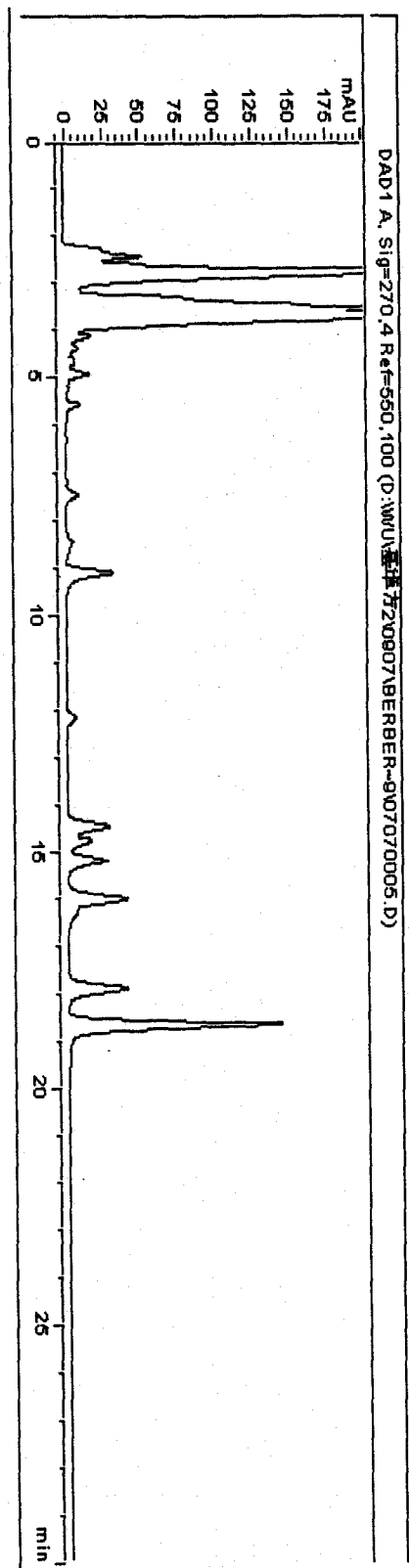
1. 三黃瀉心湯



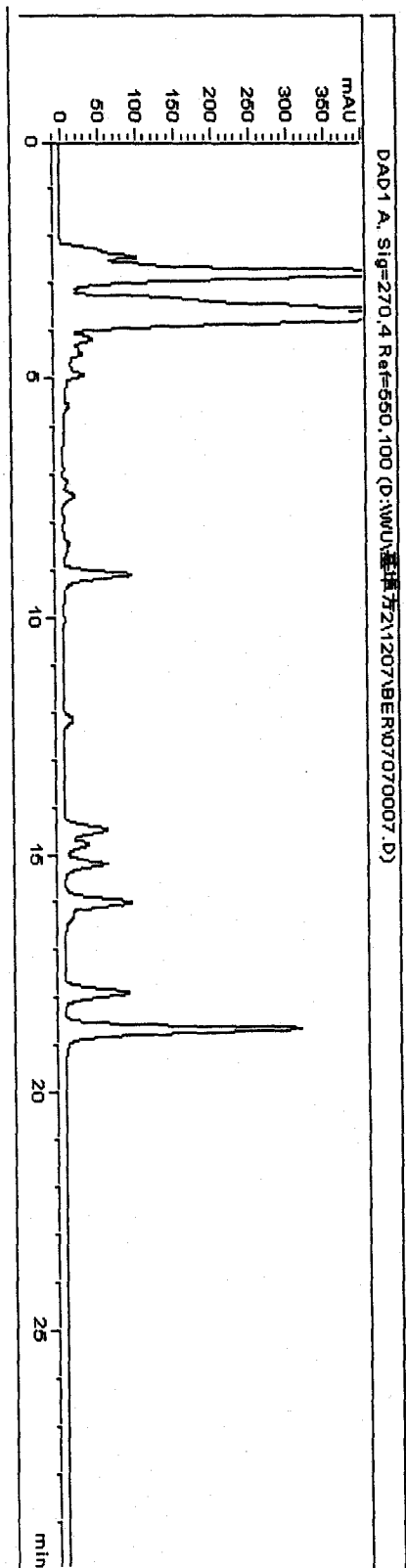
2. 芍藥湯



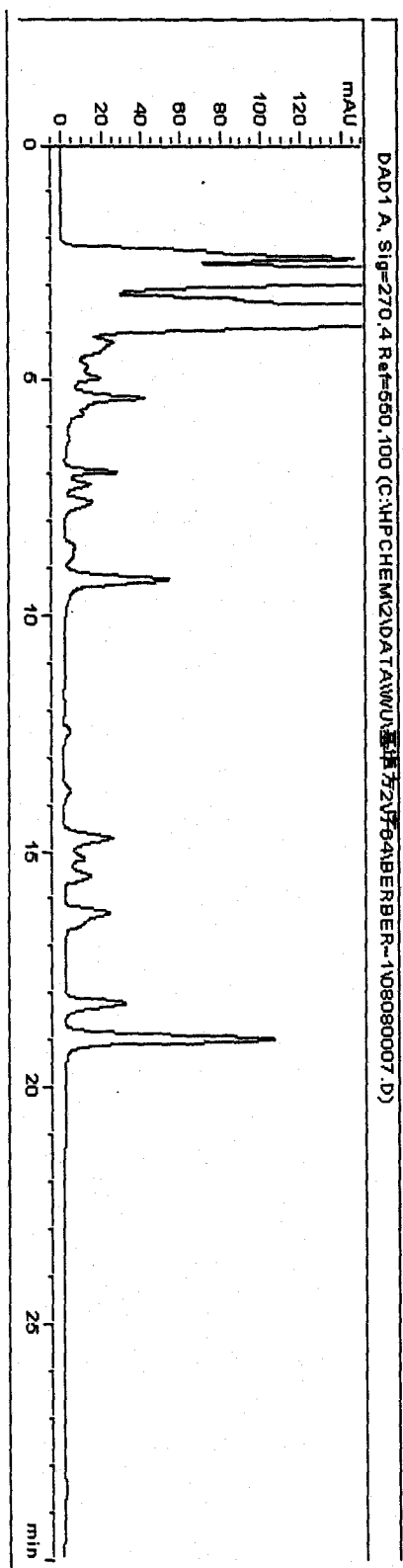
3. 柴陷湯



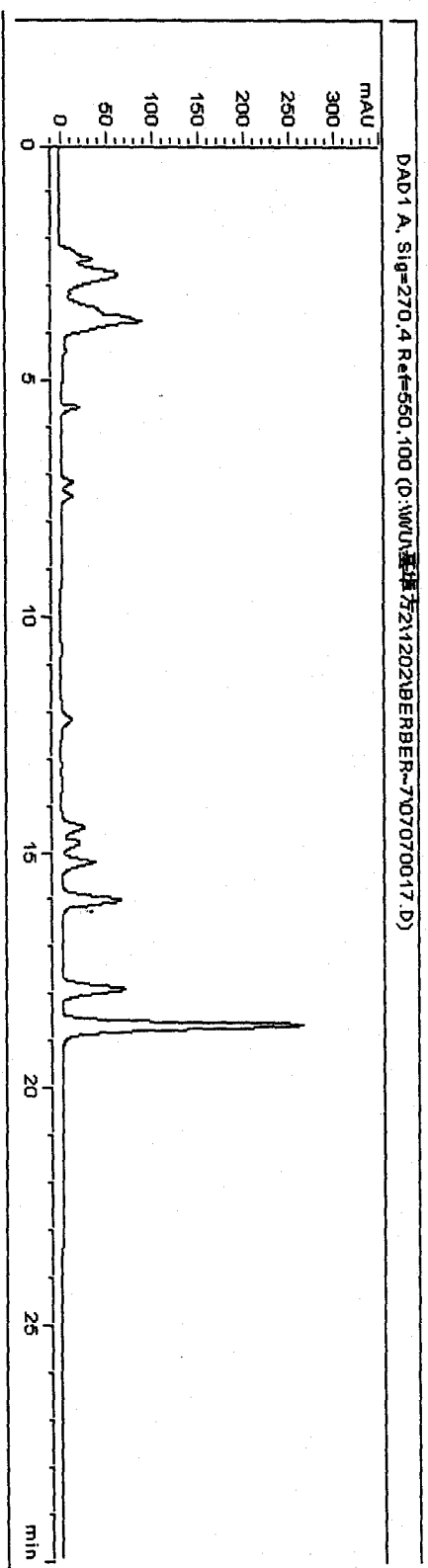
4. 普濟消毒飲



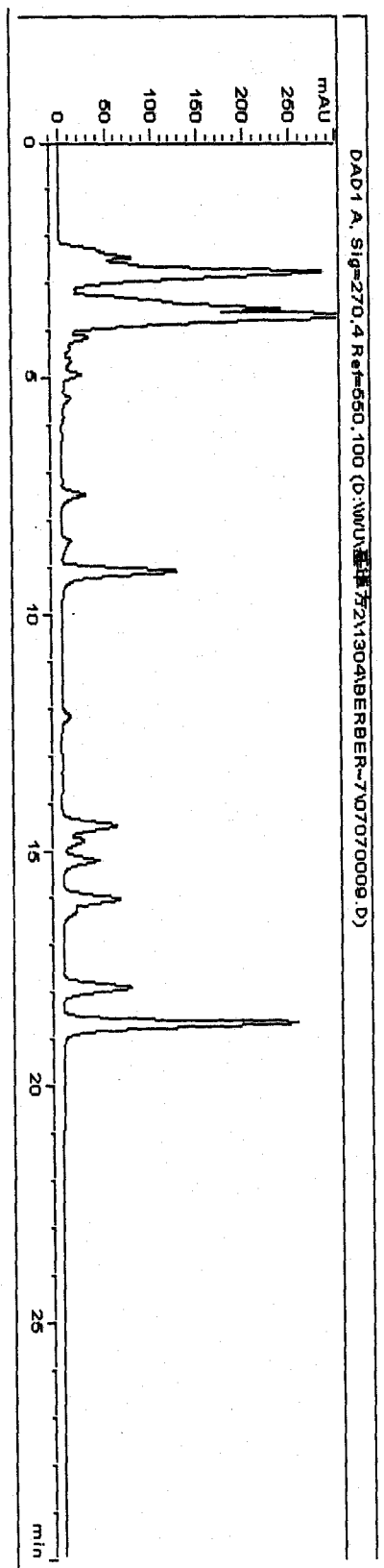
5. 黄連上清丸



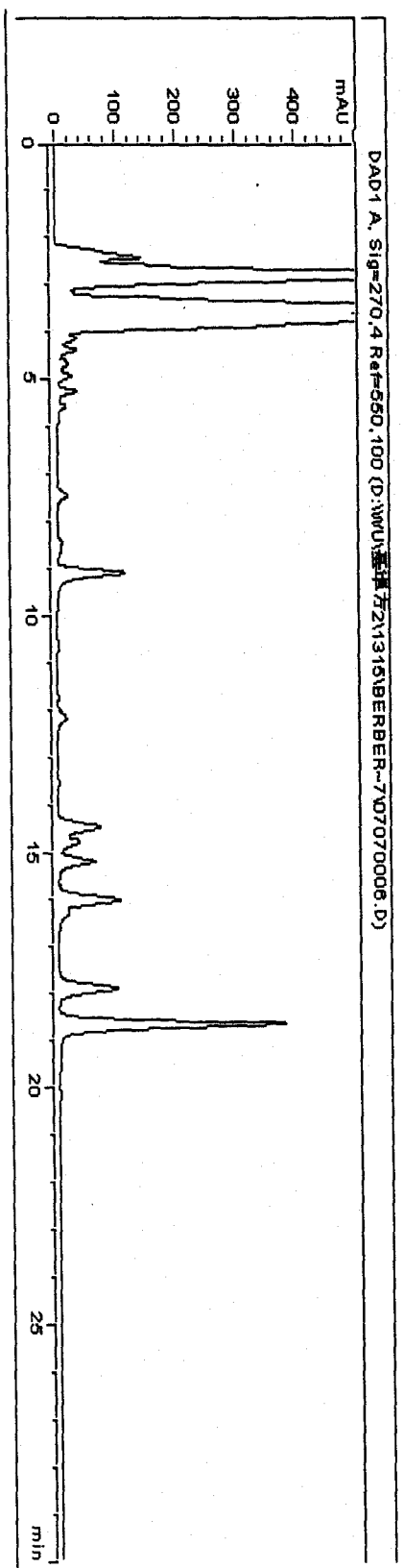
6. 黄連湯



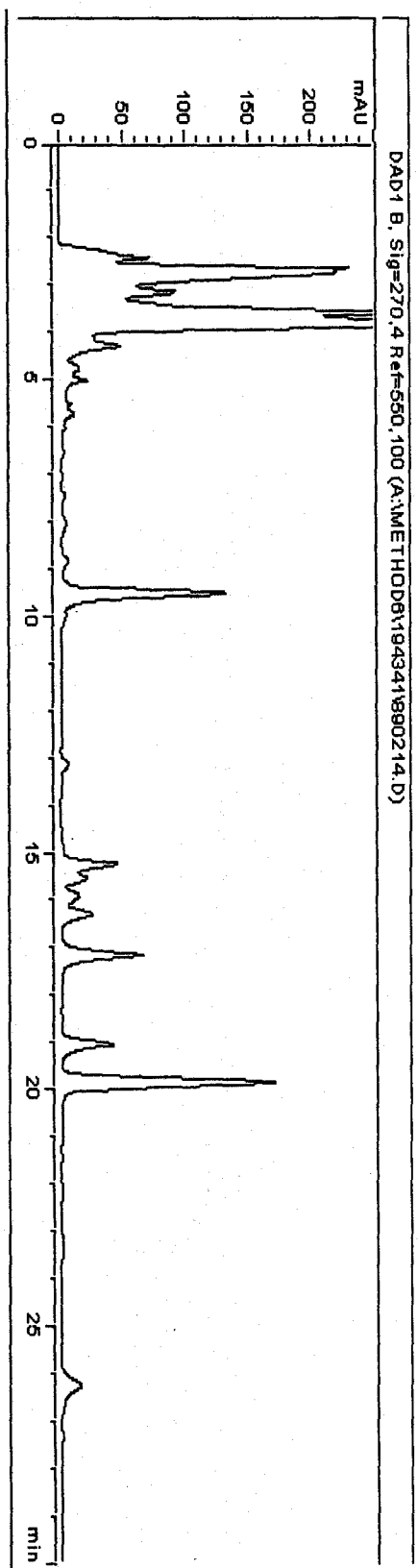
7. 溫清飲



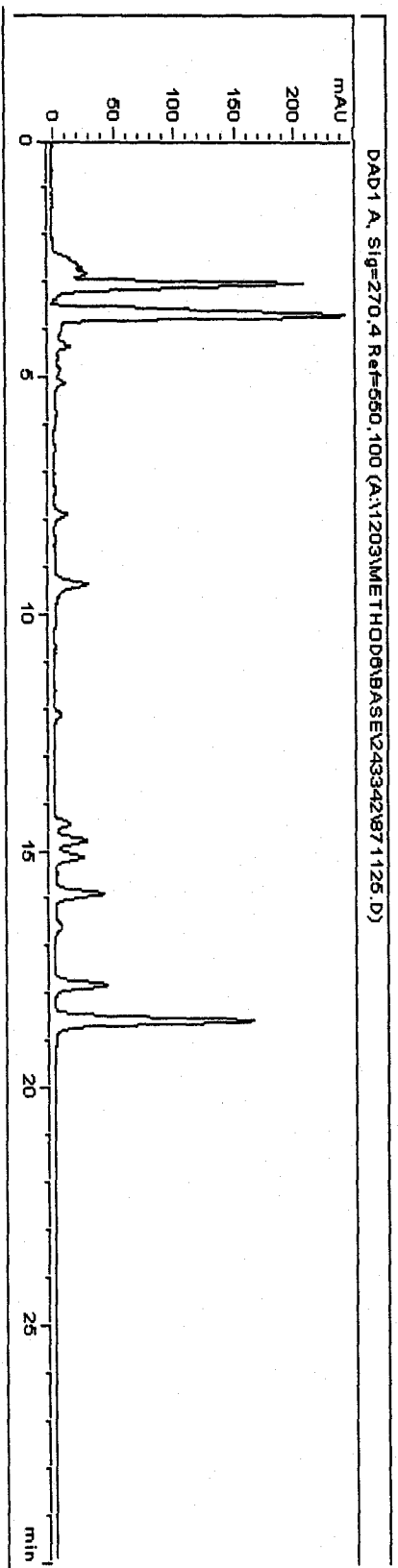
8. 葛根黃連黃芩湯



9. 清上防風湯



10. 黃連解毒湯



第五章 吳茱萸藥材之比較

第一節 前言

吳茱萸始錄於神農本草經收列為中品，此藥材因以吳地所產者為好，故名之[1]。另有別名為吳萸、吳楸、川薑、搜筵、辟邪翁、藥茱萸、九日三官、左力等[2-4]。其基源為芸香科(Rutaceae)植物吳茱萸的未成熟果實，包括：

- (1). 吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.
- (2). 石虎 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *officinalis* (Dode) Huang (= *E. officinalis* Dode)
- (3). 毛脈吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. var. *bodinieri* (Dode)

生產於貴州、廣西、湖南、雲南、陝西、浙江、四川等地。

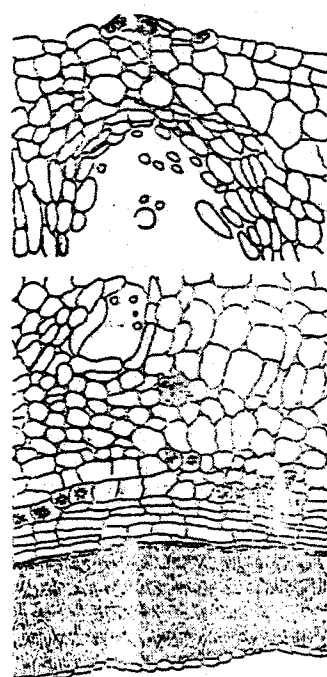
至於稱為茱萸的則是自朝鮮半島至華北所分布的 *E. darielli* Hemsley，但此植物並不作為生藥使用[3-5]。

吳茱萸果實的乾燥蒴果成五稜形扁球形，直徑為 2-5 公分，高約 1.5-3.0 公分。表面為綠色或綠褐色，粗糙、有細皺紋及油室；頂平，中間有凹窩及五條裂縫，有時在裂縫中央有突起的柱頭殘存，基部有花萼及果柄，果柄方圓形長 3 公厘，棕綠色，密佈毛茸。橫切面有子房五室，每室內有心皮跟種子 1-2 枚，種子卵圓形、黑色、有光澤。花期為 6-8 月，果期為 9-10 月，採收期宜為 8-10 月，果實呈茶綠色而心皮尚未分離時採收，以色綠、

飽滿者為佳。香氣濃烈，味苦微辛辣，曬乾時則成黑色。若成熟時果實會呈紫紅色，表面有腺點[3]。本草圖經中記載古時之習俗於九月九日上九重陽之時，登高飲菊花酒佩戴茱萸囊可避災解厄[6]。王維有詩云：「獨在異鄉為異客，每逢佳節倍思親，遙知兄弟登高處，遍插茱萸少一人」。吳茱萸原植物及其果實及顯微鏡檢圖如下：



圖 5-1-1 吳茱萸原植物



吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.

圖 5-1-3 吳茱萸顯微鏡檢圖

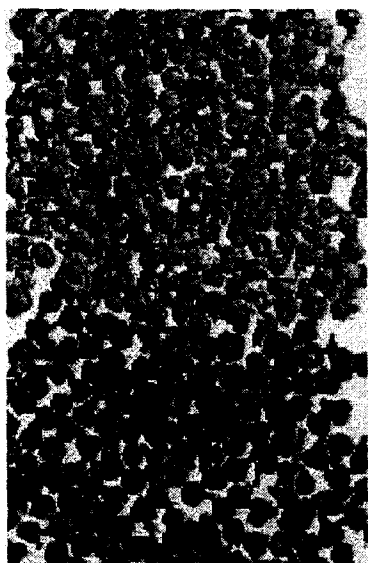


圖 5-1-2 吳茱萸果實

自 1915 年起，即陸續有吳茱萸相關文獻的發表，其化學成分有低極性的精油類物質、苦味素、黃酮類及其主要藥理活性的一些中高極性的生物鹼[13-32]。1989 年，Y. Kano 等人以 HPLC 定量分析 Evodiamine、Hydroxyevodiamine、Rutaecarpine、1-Methyl-2- [(z)-6-undecenyl]-4(1H)-quinolone、Evocarpine 及 Dihydroevocarpine 等 7 個成分，但需時 130 分鐘。1993 年，本實驗室莊武璋學長分別以 HPLC 及 CE 定量吳茱萸單方之八種生物鹼及複方製劑之含量 [33]，又於 1994 年利用 HPLC 梯度沖提方式，發展出一種可在 45 分鐘內成功地定量 Carboxyevodiamine、Dehydroevodiamine、Evodiamine、Rutaecarpine、Evocarpine 等六個生物鹼的方法[34]。1996 年，Z. Song 等人以逆相 HPLC 方法分析定量 Evodiamine 及 Rutaecarpine[35]；T Y. Wang 等人同樣以逆相 HPLC 方法定量分析 Evodiamine 及 Rutaecarpine，並改善前處理方法[36]。同年，本實驗室李明宗學長利用毛細管電泳之 MEKC 及 CZE 方式成功地分離吳茱萸中十個生物鹼成分[37]；而莊武璋學長更是發展出一快速的方法，可在 45 分鐘內定量藥材中十二個生物鹼成分[38]。1997 年，S S.Kang 等人從吳茱萸果實中分離出 cacticin、limocitrin 3-O-b-D-galacto- pyranoside、hyperin、diosmin 等四種 flavonoids[39]。同年，Y. Tang 研究吳茱萸之化學組成，分離出 9 個 Indole alkaloids 及 1 個 aromatic amine，並且首次分離出 b-carboline[40]。1997 ~1998 年間，J X.Wu 等人作了一系列以 70% 甲醇溶液為萃取溶劑，研究吳茱萸萃取液及其生物鹼成分之抗疼痛活性 Anti-nociceptive activities[41-43]。1999 年，D M. Zhao 等人以 RP-HPLC 方法分析不同組合之吳茱萸煎劑中 Evodiamine 與 Rutaecarpine 之含量。[44]

根據歷代文獻的記載，吳茱萸味辛、苦、性大熱而有小毒，歸肝、胃、

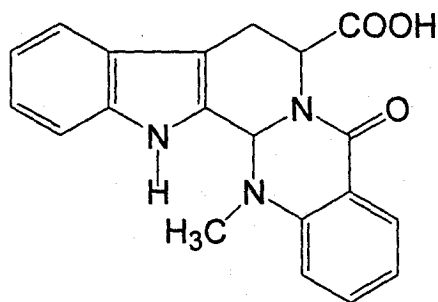
腎經，屬溫裡祛寒藥[1]。主溫中散寒、下氣止痛、燥濕解鬱，治嘔逆吞酸、厥陰頭痛、臟寒吐瀉、腕腹脹痛、腳氣疝氣、口瘡潰瘍、濕疹、黃水瘡等[3]。另吳茱萸為六陳之一，以陳久者為貴，有中國產與日本產兩種，中國產實小，香氣薄，日本產實大，香氣厚，藥用則以中國產者為良[2]。有關吳茱萸的藥理研究甚多，歸納其作用如下：

- (1).驅蟲作用：吳茱萸的乙醇抽出物在試管內能抑制豬蛔蟲作用，對蚯蚓、水蛭亦有效[3]。
- (2).抗菌作用：在試管內可抑制皮膚真菌。吳茱萸煎劑對霍亂弧菌較強抑制效力[3]。
- (3).鎮痛作用：乙醇抽出物 Evodiamine 及 Rutaecarpine 具有血壓上升、呼吸促進、鎮痛、輕度體溫上升，血液促進等作用。[5,10,11]。
- (4).子宮收縮作用：Rutaecarpine 有較強的子宮收縮作用
- (5).Dehydroevodiamine 可以增強子宮收縮[7]，降低血壓，使心動徐緩，抗心律不整[8-9]。
- (6).其他：Rutaecarpine 分解物 Rutamine 能促進子宮強烈收縮；Evodiamine 分解物 β -indolethylamine 有促進陣痛，興奮中樞神經及止血作用；5-methoxy-N-dimethyl-tryptamine 有幻覺作用；Synephrine 則具有與腎上腺素相似性的作用。

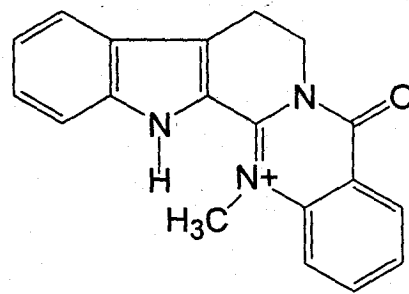
中醫有所謂『藥性有偏』之說，乃指藥物的產地和採集時期對於療效有著密切關係。李東垣曾說：「凡諸草木昆蟲，產之有地、根葉花實、採之有時，失其地則性味少異，失其時則氣味不全。」1967年，Y. Hirso 等人分析定量7~10月採集之吳茱萸果實之苦味素，結果發現7~8月時，

L-monin 為其主成分，8~9 月為 Rutaevin 及 Evodol，9~10 月則為 Rutaevin。

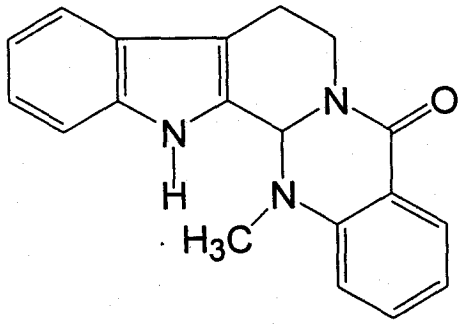
1979 年 S. Takagi 等人定量 Synephrine 成分，發現未成熟時之量遠高於成熟之後[12]。本實驗室莊武璋學長曾針對吳茱萸中 carboxyevodiamine、dehydroevodiamine、evodiamine、rutaecarpine、evocarpine 和 dihydro-evocarpine 等六個具藥理活性之生物鹼成分進行定量研究，發現以開口、色黑、氣味濃烈辛辣者藥效成分含量較高。在後續的研究中，發現市售品均混有吳茱萸與石虎兩種藥材，不過這兩種樣品的成分含量與比例幾乎完全一致。但是子房分開為五室（開口）與子房不分开（閉口）的樣品則有明顯不同。本研究擬以過去研究所得之最佳分析方法，探討同一批藥材中開口吳茱萸與閉口吳茱萸在生物鹼成分上的差異，並比較不同性狀中 Synephrine 之比例，進而建立辨別吳茱萸藥效之準則，同時對於單方及複方製劑進行安定性試驗，以探究指標成分的安定性。這些生物鹼成分之結構如圖 5-1-4：



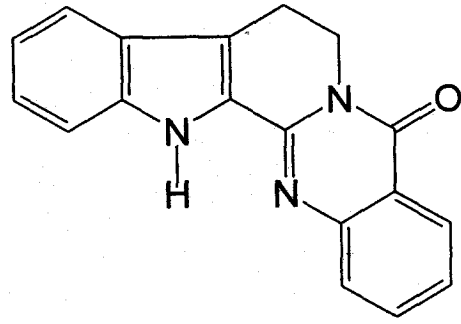
1, Carboxyevodiamine, (CE)



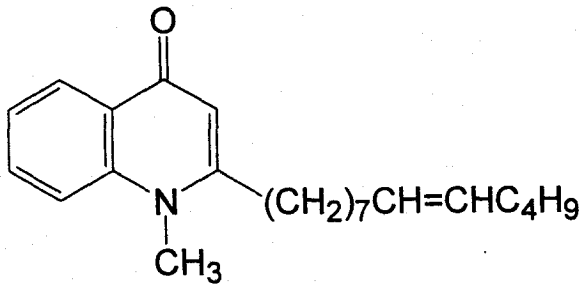
2, Dehydroevodiamine, (DE)



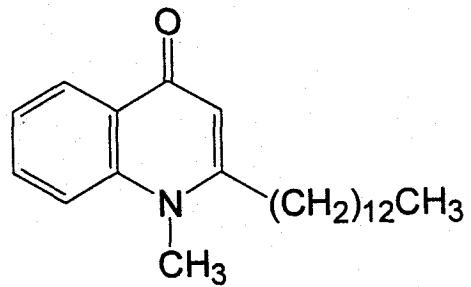
3, Evodiamine, (E)



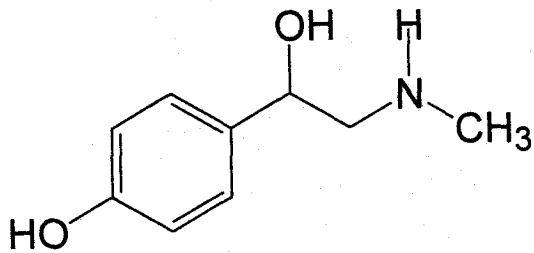
4, Rutaecarpine, (RC)



5, Evocarpine, (EC)



6, Dihydroevodiamine, (DhE)



7, Synephrine, (S)

圖5-1-4 吳茱萸中七種生物鹼化合物之化學結構式

第二節 實驗部分

5-2-1 實驗藥品與儀器

5-2-1.1 實驗試藥

標準品 Dehydroevodiamine 及 Evodiamine 購自 Nacalai tesque (Kyoto, 日本)。標準品 Synephrine 購自 Sigma (St.Louis, MO, 美國)。醋酸鈉 (sodium acetate) 和醋酸 (acetic acid) 購自 Merck (Darmstadt, 德國)。肉桂酸 (cinnamic acid) 購自 Aldrich (Milwaukee, 美國)。水經 Milli-Q System 純化 (Millipore, Bedford, MA, 美國)。甲醇 (Methanol) 和氘甲烷 (Acetonitrile) 為 Far-UV 級 (Mallinckrodt, KY, 美國)。吳茱萸樣品購自台北市迪化街及必安研究所。

5-2-1.2 實驗儀器

(1) 離心機：Hettich Universal 其轉盤為 10mL × 12

(2) 酸鹼測定儀 (pH meter)：Suntex SP-2200

(3) 迴旋濃縮儀 (Rotavapor)：Buchi RE 111

(4) 高效液相層析儀 (HPLC)

泵：Shimadzu LC-6AD 兩個

注入閥：Rheodyne Type 7125 (20- μ L loop)

流動相控制器：Shimadzu SLC-6B system controller

偵測器：Shimadzu SPD-M6A photodiode Array UV-VIS Detector

資料處理器：Shimadzu CLASS-M10A

宏碁 486DX2-66 電腦

5-2-2 HPLC 分析條件

5-2-2.1 方法 I

精稱 0.3g 吳茱萸粉末，以7毫升之70% 甲醇溶液加熱迴流攪拌萃取15分鐘，離心，重複三次，將所得萃取液以定量瓶稀釋至50毫升，經45 μ m 濾膜過濾後，作為條件選擇之檢液。每次10 μ L注入於HPLC中予以分析。

前置管柱： μ -Bondapak C18 (Millipore, MA, 美國)

分離管柱：Cosmosil 5C18-MS, 5 μ m, 25cm \times 4.6mm

(Nacalai tesque, Kyoto, 日本)

流動相：(A) buffer / CH₃CN = 80 / 20 (V/V)

buffer = 30mM NaOAc + 1.25% HOAc

(B) H₂O / CH₃CN / CH₃OH / AcOH = 10/45/45/0.25

偵測波長：250 nm

分析時間：50 分鐘

平衡時間：15 分鐘

梯度沖提程式：

時間 (min)	流速 (mL/min)	A %	B %	curve
initial	1.0	100	0	*
15	1.0	30	70	linear
22	1.0	30	70	linear
25	1.0	0	100	linear
40	1.0	0	100	linear
50	1.0	100	0	linear

5-2-2.2 方法 II

精稱0.5g吳茱萸粉末，以7毫升之70% 甲醇溶液於室溫下超音波震盪15分鐘，離心，重複三次，將所得萃取液以定量瓶稀釋至50毫升，經45 μ m濾膜過濾後，作為條件選擇之檢液。每次10 μ L注入於HPLC中予以分析。

前置管柱： μ -Bondapak C18 (Millipore, MA, 美國)

分離管柱：Cosmosil 5C18-MS, 5 μ m, 25cm \times 4.6mm

(Nacalai tesque, Kyoto, 日本)

流動相：(A) H₂O : SDS : H₃PO₄ = 1000 : 0.2g : 1ml

(B) CH₃CN

偵測波長：280 nm

分析時間：45 分鐘

平衡時間：15 分鐘

梯度沖提程式：

時間 (min)	流速 (mL/min)	A %	B %	curve
initial	1.0	90	10	*
5	1.0	80	20	linear
15	1.0	50	50	linear
25	1.0	0	100	linear
30	1.0	90	10	linear
45	1.0	90	10	linear

5-2-3 標準品檢量線的製備

5-2-3.1 內標準品溶液

精稱 0.10 g 的 cinnamic acid 溶於甲醇中，以量瓶配製成 100 mL，作為內標準品溶液。

5-2-3.2 標準品母液

精稱 27.0 mg Dehydroevodiamine 及 10.1mg Evodiamine 溶於70% 甲醇溶液中，以量瓶配成 25 mL 溶液，作為標準品母液。

5-2-3.3 檢量線

以吸量管分別吸取標準溶液12 mL、7mL、2mL、1mL、0.4 mL，各加入內標準品 cinnamic acid 溶液 0.4 mL，以甲醇稀釋至 20 mL，以上述之最佳分析條件，注入 10 μ L，各注入兩次，取其平均值製作檢量線。

5-2-4 分析條件適用性評估

5-2-4.1 再現性 (Reproducibility)

精稱0.3g吳茱萸粉末，以7毫升之70% 甲醇溶液作為萃取溶劑，加熱迴流攪拌萃取15分鐘，離心，如此重複三次，將所得萃取液，加入內標準品溶液1毫升，以定量瓶稀釋至50毫升，經45 μ m濾膜過濾作為檢液。每次注

入10 μ L於HPLC中。同一天內重複六次 (intraday)，不同天總計重複六次 (interday)。

5-2-4.2 回收率 (Recovery)

精稱 0.30 g 吳茱萸粉末，以 70 % 甲醇 7ml 作為萃取溶劑，加熱迴流攪拌萃取 15 分鐘，離心，如此重覆三次，將所得之萃取液，加入標準品母液 4.0 ml、1.85 ml，再加入內標準品溶液 1 mL，以量瓶稀釋至 50 mL，以 45 μ m 濾紙過濾作為檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

5-2-4.3 偵測極限 (Detection limit)

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

5-2-5 吳茱萸藥材定量分析

5-2-5.1 藥材成熟度不同之比較

吳茱萸藥材經仔細揀選後分為 A：開口、子房成花狀；B：閉口、渾圓成球狀兩類，如圖1-2-1。精稱粉碎之吳茱萸粉末各 0.3 g，以 7 mL 70 % 甲醇在室溫下迴流攪拌萃取 15 分鐘，離心，重覆三次，三次萃取液合併，加入內標準品溶液 1mL，以量瓶稀釋至 50 mL，經 45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

5-2-5.2 藥材採收期不同之比較

由必安研究所鑑定過之正道地吳茱萸，依其外觀顏色差異分成 G：綠色。B：黑色兩類。精稱粉碎後吳茱萸粉末各 0.3 g，以 7 mL 70% 甲醇在室溫下迴流攪拌萃取 15 分鐘，離心，重覆三次，三次萃取液合併，加入內標準品溶液 1 mL，以量瓶稀釋至 50 mL，經 45 μ m 濾紙過濾，作為定量之檢液，每次以 10 μ L 注入，注射三次，取其平均值進行計算。

第三節 結果與討論

5-3-1 分析條件之探討

本研究室莊武璋學長曾針對吳茱萸中 carboxyevodiamine、dehydroevodiamine、evodiamine、rutaecarpine、evocarpine 和 dihydroevocarpine 等六個具藥理活性之生物鹼成分進行定量研究[33]；在其後的博士論文中更是分離定量十二個生物鹼成分，作為市售樣品定量之準則[38]。在本研究中擬以過去分析吳茱萸藥材之方法，重複操作檢驗其再現性及準確性，以最少指標成分之定量結果，作為市售吳茱萸藥材之藥效辨別準則。

依實驗 5-2-2.1 所述，將市售藥材揀選分成開口、閉口不同性狀，分開萃取，每次取檢液 10 μ L 注入 HPLC 中，以分析方法 I 分離層析藥材之成分。如圖 5-3-1。

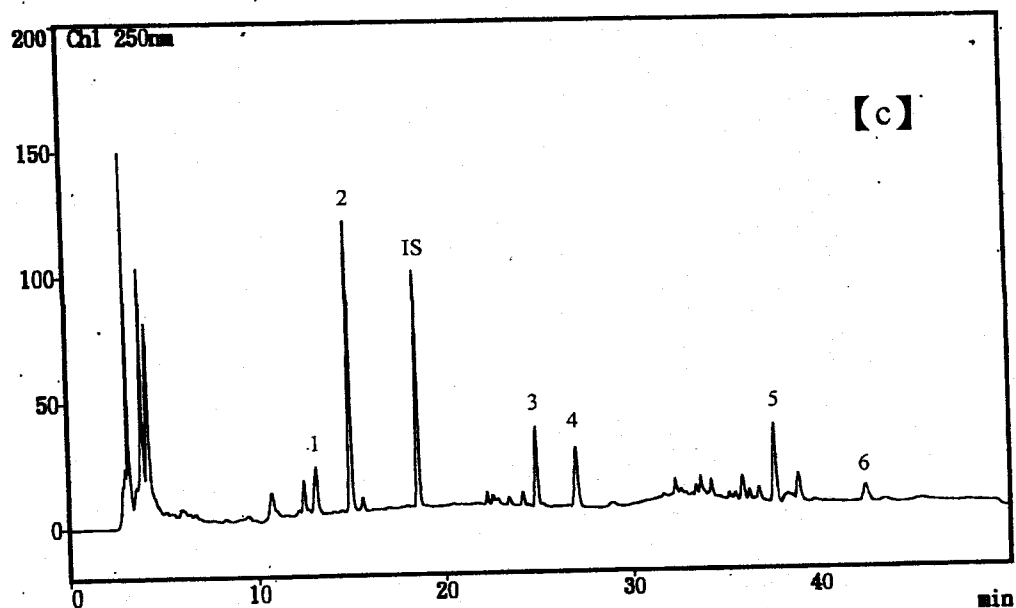
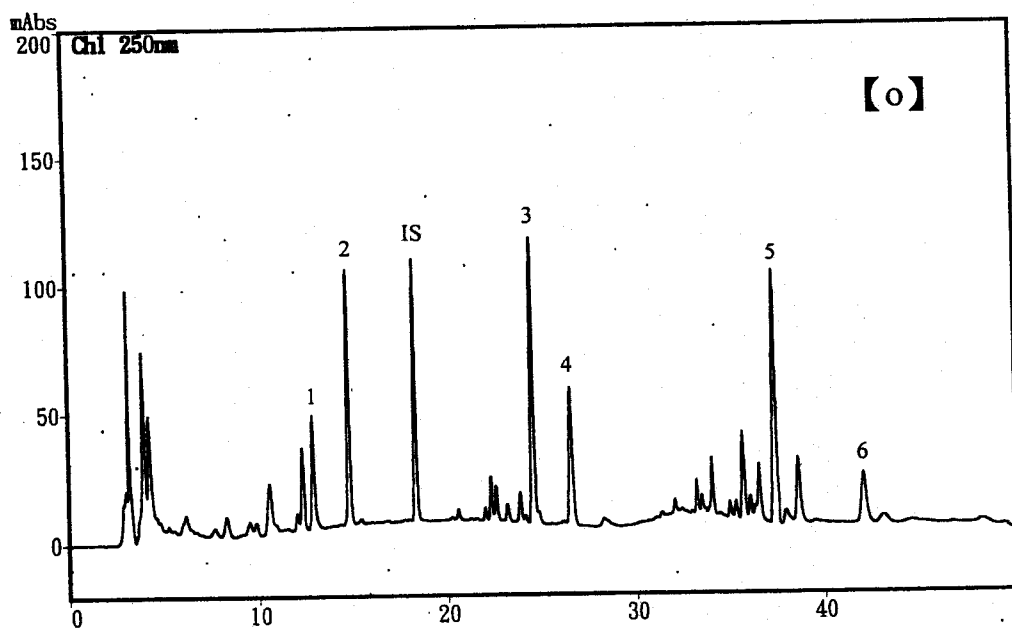


圖 5-3-1 吳茱萸藥材 HPLC 層析圖

【O】開口吳茱萸；【C】閉口吳茱萸。

1,caroxyevodiamine；2,dehydroevodiamine；

3,evodiamine；4,rutaecarpine；5,evocarpine；

6,dihydroevocarpine；IS,cinnamic acid

隋孫思邈認為”閉口有毒”，所以另以分析方法Ⅱ比較開口及閉口中 Synephrine (S) 含量之差異，以瞭解開口及閉口吳茱萸間”藥性有偏”究竟是因其alkaloids或是synephrine的關係。同實驗5-2-2.2所述，利用分析方法Ⅱ分離定量synephrine，其層析圖譜如圖5-3-2所示。

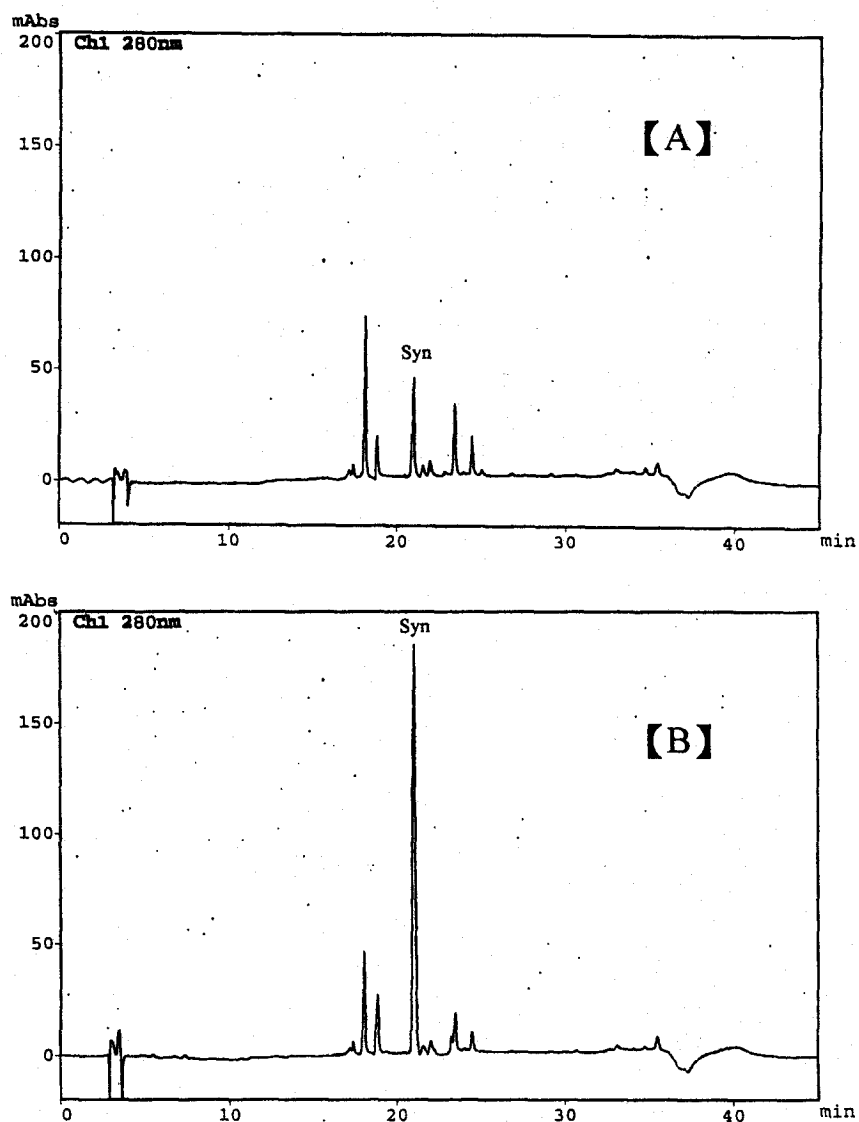


圖 5-3-2 吳茱萸藥材中 synephrine 之 HPLC 層析圖
【A】藥材層析圖；
【B】藥材 + synephrine standard 之 spiking test

方劑吳茱萸湯中含有人參、大棗及生薑，是一溫肝暖胃、散寒止嘔之劑。同樣的分析方法應用於吳茱萸方劑上，確認此分析方法是否適用於複方製劑的篩驗。由必安研究所所提供之吳茱萸湯（方劑）30公克，每次稱取0.3克粉末，依實驗5-2-2.1方法 I 所述，進行HPLC分析，並於後進行複方安定性試驗。

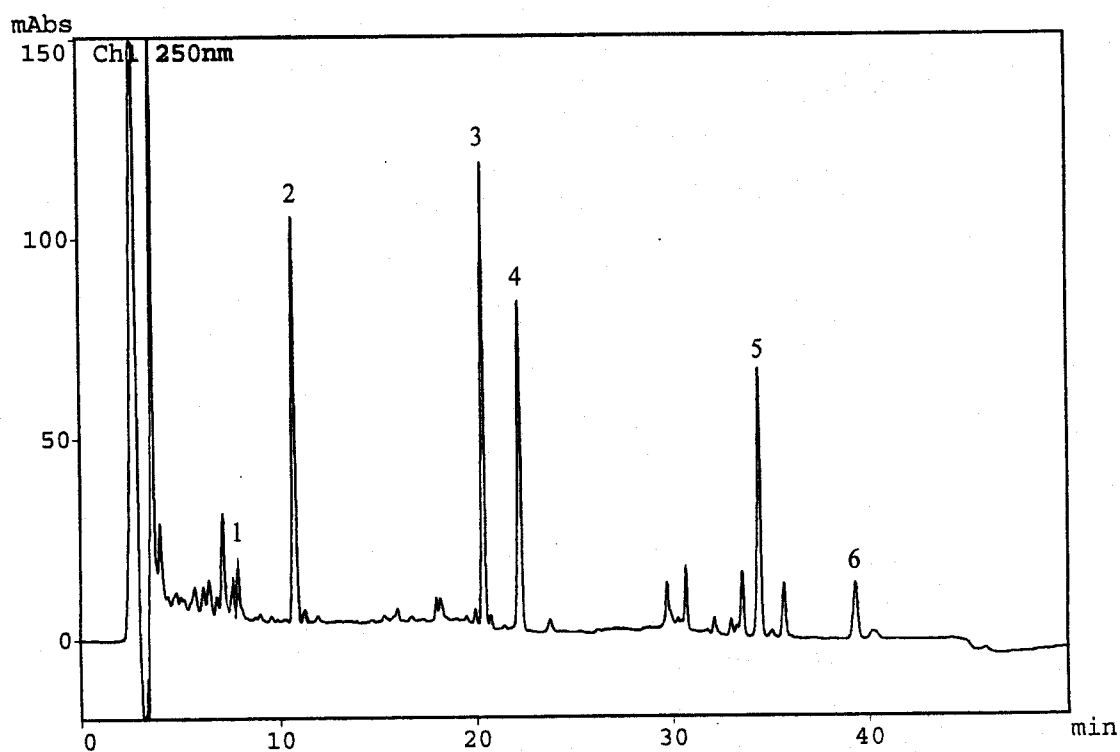


圖 5-3-3 方劑吳茱萸湯之 HPLC 層析

5-3-2 標準品檢量線之製作

依實驗部分5-2-3.3所述，以吸收峰面積與內標準品面積之比值(y)與注射濃度(x, mg/ml)之關係，作圖得檢量線為：

Dehydroevodiamine : $y=7.6267 x +0.0883$ $R^2=0.9997$

Evodiamine : $y=11.649 x +0.0515$ $R^2=0.9994$

5-3-3 分析條件之適宜性

5-3-3.1 再現性(Reproducibility)

以最佳的分析條件對各化合物進行定量，同一天內連續重複注射六次 (intraday)及不同天總計重複六次(interday)。並標出其相對標準偏差(RSD)，見表 5-3-1。

表 5-3.1 分析條件再現性評估

化合物	Intraday Capacity factor (n=6,mean± SD)	RSD(%)	Interday Capacity factor (n=6,mean± SD)	RSD(%)
1	2.03± 0.01	0.27	2.07± 0.03	1.39
2	3.09± 0.01	0.27	3.10± 0.02	0.73
3	6.07± 0.03	0.41	6.07± 0.05	0.79
4	6.56± 0.03	0.42	6.56± 0.06	0.85
5	10.37± 0.04	0.40	10.36± 0.08	0.73
6	11.39± 0.04	0.37	11.42± 0.09	0.78

5-3-3.2 回收率(Recovery)

在已知成分含量的藥材中添加各成分純品，結果如表 5-3-2。顯示本方法之準確性極佳。

表 5-3.2 Dehydroevodiamine 與 Evodiamine 之回收率

化合物	藥材(mg)	加入量(mg)	總量(mg)	偵測量(mg)	回收率(%)
DE	20.76	4.37	25.12	25.25	100.50
E	5.68	0.91	6.58	6.55	99.53

5-3-3.3 偵測極限(Detection limit)

將 Dehydroevodiamine 及 Evodiamine 之標準品溶液逐步稀釋，以最佳分析條件測至 S/N 約為 3。結果如下：

表 5-3.3 Dehydroevodiamine 與 Evodiamine 之偵測極限

	DE	E
偵測極限(ng)	0.17	0.08

5-3-4 吳茱萸藥材定量分析

在第一節中曾提及書中記載之吳茱萸性狀[3]，橫切面有子房5室，每室有心皮及種子1-2枚，卵圓形，黑色有光澤，果實呈茶綠色而心皮尚未分離時採收，以色綠飽滿者為佳。因此購買市售吳茱萸共十四批，其外觀、色澤、顆粒大小如表5-3.4。依實驗部份5-2-5.1所述，將每批藥材揀選出開口及閉口兩類，以HPLC分析方法I進行Carboxyevodiamine (CE)、Dehydroevodiamine (DE)、Evodiamine (E)、Rutaecarpine (RC)、Evocarpine (EC) 和 Dihydroevocarpine (DhE) 六個生物鹼的定量分析，歸納以最少指標成分來判斷基原。隋孫思邈認為“閉口有毒”，所以另以分析方法II比較開口及閉口中Synephrine (S) 含量的差異，作為推斷依據。整理結果如表5-3.5~5-3.11。討論結果如下分述：

5-3-4.1 藥材成熟度之比較

分析市售吳茱萸藥材中六個生物鹼含量如表5-3.5及表5-3.6所示，DE及EC含量較多，E、RC較為一致，而以CE及DhE含量最少，若以同一藥材比較：開口吳茱萸中E、RC、EC及DhE之含量均大於閉口吳茱萸。

【1】從各生物鹼之含量比（表5-3.7、表5-3.8）發現：除W14之外，DE/E幾乎都在0.588~1.938之間；RC/E均在0.696~1.338之間；而EC/E與EC/DhE均大於1。由此可知，在開口吳茱萸中DE、E與RC含量較為一致，而以EC含量為最多。在閉口吳茱萸中以DE及EC含量較

大，在比例上來說 DE/E 、 EC/E 及 RC/E 比值都比開口來的大，顯示在閉口吳茱萸中 E 的成分含量較少。至於 W14 為何例外將於後比較藥材採收期時再做說明。

【2】利用 DE 及 E 之檢量線代換成含量重量比時，比較同批藥材，我們可從表 5-3.9【A】中得到：開口吳茱萸之 DE/E 值 (0.6~16.8) 均小於閉口吳茱萸之 DE/E 值 (1.6~37.5)。但加其含量會發現開口中 ($DE+E$) 多於閉口，如表 5-3.10。

【3】仔細比較開口吳茱萸及閉口吳茱萸之 DE/E 值，除了 W14 外，開口之 DE/E 值皆落於 0.6~2.5 之間，而從閉口吳茱萸的 DE/E 值來觀察似乎有其規則性：將其按含量多寡排序，可發現顆粒較大、色澤較黑的樣品其 DE/E 值小於顆粒小、色澤偏綠的樣品，如表 5-3.9【B】所示。

【4】表 5-3.11 為吳茱萸藥材開口與閉口中 synephrine (S) 之含量比較。由柱狀圖可看出：閉口吳茱萸的 S 均大於開口吳茱萸中的 S 含量，其比值均大於 1 以上。

表 5-3.4 市售吳茱萸外觀性狀之整理 (n=14)

	開口		閉口	
	外觀、性徵	顆粒大小 直徑(mm)	外觀、性徵	顆粒大小 直徑(mm)
W1 (開口多)	開花(五瓣花) 棕黑偏綠色果實	5.0	閉合球狀 棕黑偏綠色果實	2.5
W2 (開口多)	開花(五瓣花) 棕色偏黑果實	4.0	閉合球狀 棕色偏黑果實	2.5
W3 (開口多)	開花(五瓣花) 棕黑色果實	5.0	閉合球狀 棕黑色果實	3.0
W4 (開口多)	開花(五瓣花) 棕黑色果實	5.1	閉合球狀 棕黑色果實	2.0
W5 (開口多)	開花(五瓣花) 棕黑色果實	5.0	閉合球狀 棕黑色果實	3.0
W6 (開口多)	五瓣、未完全裂開之 棕黑色果實	4.0	閉合球狀 棕黑色果實	2.5
W7 (閉口多)	開花(五瓣花) 棕綠色果實	4.0	閉合球狀 棕綠色果實	2.3
W8 (閉口多)	開花(五瓣花) 棕色果實	4.5	閉合球狀 棕色果實	2.2
W9 (開口多)	成株含枝骨 (五瓣花) 棕黑色果實	4.5	閉合球狀 棕黑色果實	2.5
W10 (開口多)	成花(五瓣花) 偏棕色果實	5.3	閉合球狀 棕黑色果實	4.2

W11 (開口多)	開花(五瓣花) 黑色果實	4.0	閉合球狀 黑色果實	2.4
W12 (開口多)	開花(五瓣花) 棕黑色果實	4.0	閉合球狀 棕黑色果實	2.0
W13 (開口多)	開花(五瓣花) 偏黑色果實	4.4	閉合球狀 棕黑色果實	2.0
W14 (閉口多)	花開較小 (四瓣居多) 棕色果實	2.2	粒小閉合球狀 (上有瓣紋) 偏棕綠色果實	1.6

註：在揀選吳茱萸時，其揀選的標準以開口最大、呈五花瓣狀為主；而閉口者以完全緊閉、呈球狀形為主。從外觀上來看開口及閉口是完全可區別的兩種不同性狀。此外，個別藥材之間在外觀、色澤、大小上亦有所差異，有關性狀與含量間之關係將於後詳細討論之。

表 5-3.5 開口吳茛菪生物鹼定量結果 (peak area ratio, n=14)

Open	CE	DE	E	RC	EC	DhE
W1	0.726	1.574	0.812	0.981	2.277	0.562
W2	0.588	1.214	1.235	1.167	2.993	0.815
W3	0.485	1.001	1.003	0.854	1.442	0.717
W4	0.727	1.296	0.890	0.931	2.805	0.828
W5	0.886	1.698	1.253	1.341	3.129	0.889
W6	0.682	1.121	1.156	0.973	1.962	0.515
W7	0.390	1.228	0.937	0.652	1.572	0.421
W8	1.143	1.884	1.360	1.372	3.056	0.760
W9	0.796	2.059	1.235	1.291	2.161	0.462
W10	0.330	0.952	0.702	0.668	1.845	0.447
W11	0.331	0.829	1.409	1.684	1.954	0.861
W12	0.380	1.090	1.042	1.342	1.958	0.480
W13	0.128	1.001	0.689	0.922	2.477	0.659
W14	0.342	1.638	0.142	0.557	0.851	0.246

表 5-3.6 閉口吳茛菪生物鹼定量結果 (peak area ratio, n=14)

Close	CE	DE	E	RC	EC	DhE
W1	0.508	1.481	0.692	0.919	1.622	0.371
W2	0.457	1.144	0.701	0.809	1.779	0.394
W3	0.324	1.021	0.696	0.777	0.956	0.453
W4	0.490	1.157	0.400	0.708	1.314	0.391
W5	0.570	1.219	0.745	0.915	1.626	0.462
W6	0.417	0.983	0.555	0.658	1.301	0.346
W7	0.154	1.429	0.173	0.339	0.443	0.167
W8	0.448	1.512	0.230	0.531	0.909	0.286
W9	1.015	1.954	0.995	0.998	1.902	0.324
W10	0.611	0.938	0.687	0.656	1.757	0.434
W11	0.128	0.422	0.222	0.560	1.005	0.352
W12	0.127	0.669	0.178	0.441	0.708	0.245
W13	0.033	0.593	0.126	0.461	0.836	0.262
W14	0.084	1.021	0.053	0.344	0.434	0.133

表 5-3.7 開口吳茱萸中各生物鹼之比值 (peak area ratio,n=14)

Open	DE/E	EC/E	EC/DhE	RC/E
W1	1.938	2.804	4.049	1.209
W2	0.983	2.423	3.674	0.944
W3	0.998	1.438	2.010	0.851
W4	1.455	3.151	3.389	1.045
W5	1.355	2.497	3.520	1.070
W6	0.970	1.698	3.807	0.842
W7	1.310	1.677	3.735	0.696
W8	1.385	2.246	4.020	1.009
W9	1.667	1.750	4.676	1.045
W10	1.356	2.628	4.123	0.952
W11	0.588	1.387	2.271	1.195
W12	1.045	1.878	4.077	1.288
W13	1.453	3.595	3.757	1.338
W14	11.567	6.012	3.459	3.936
Ave*.	1.269	2.244	3.624	1.037

表 5-3.8 閉口吳茱萸中各生物鹼之比值 (peak area ratio,n=14)

Close	DE/E	EC/E	EC/DhE	RC/E
W1	2.141	1.764	4.372	1.329
W2	1.632	2.200	4.509	1.154
W3	1.465	1.230	2.109	1.116
W4	2.889	1.855	3.361	1.769
W5	1.637	1.777	3.517	1.229
W6	1.772	1.978	3.762	1.186
W7	8.260	1.304	2.653	1.962
W8	6.567	1.714	3.185	2.305
W9	1.964	1.912	5.875	1.003
W10	1.366	2.677	4.044	1.056
W11	1.903	1.794	2.854	2.529
W12	3.750	1.607	2.884	2.468
W13	4.724	1.815	3.191	3.668
W14	19.129	1.262	3.259	6.447
Ave.*	3.082	1.817	3.563	1.744

* : Ave : W1~W13 之平均

表 5-3.9 【A】：吳茱萸開口及閉口之 Dehe / Evo 比較 (mg/ml)

	Open	Close
W10	1.661	1.672
W3	1.217	1.808
W2	1.214	2.034
W5	1.711	2.046
W11	0.699	2.176
W6	1.192	2.196
W9	2.127	2.509
W1	2.460	2.720
W4	1.819	3.687
W12	1.284	4.828
W13	1.790	6.315
W8	1.756	8.906
W7	1.629	11.541
W14	16.806	37.507

表 5-3.9 【B】：閉口吳茱萸 Dehe / Evo 與性狀間的關係

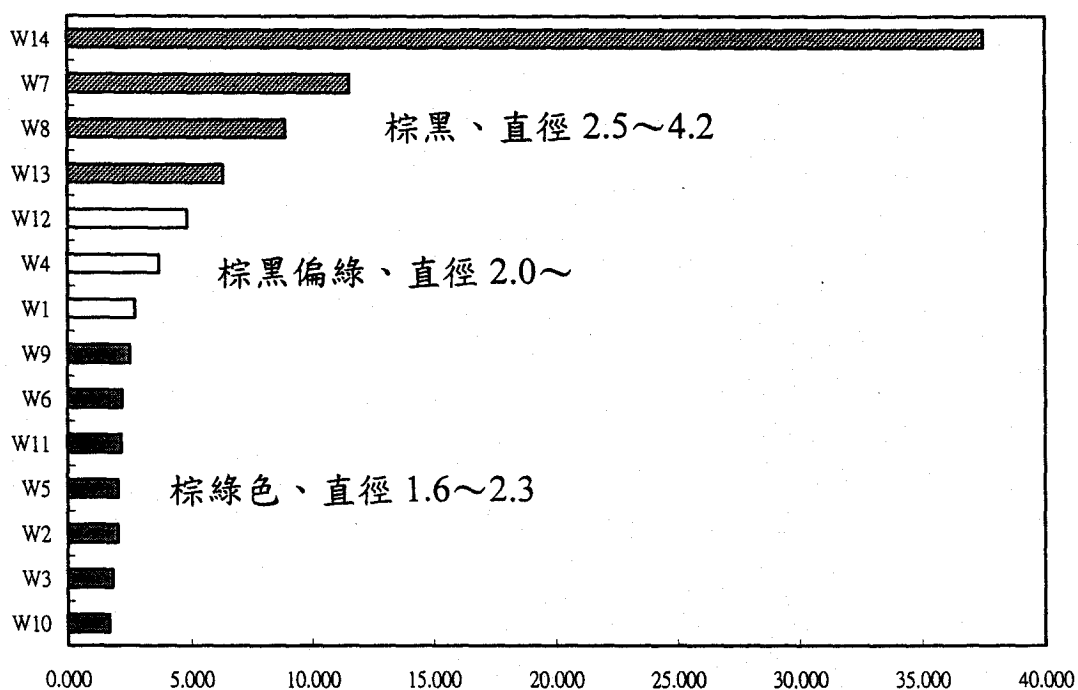
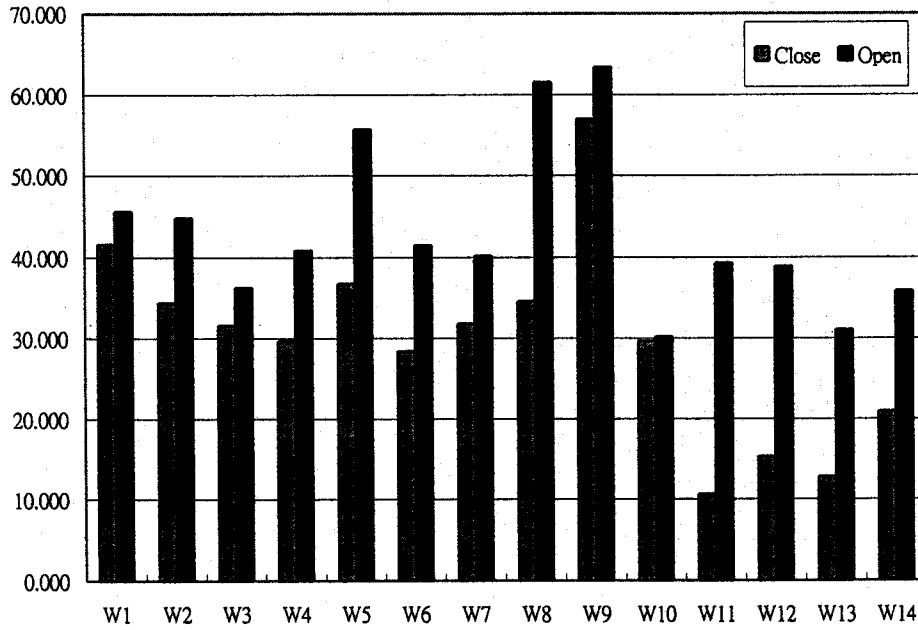


表 5-3.10 吳茱萸開口及閉口 (DE+E) 含量比較 (mg/g)



Syneprine

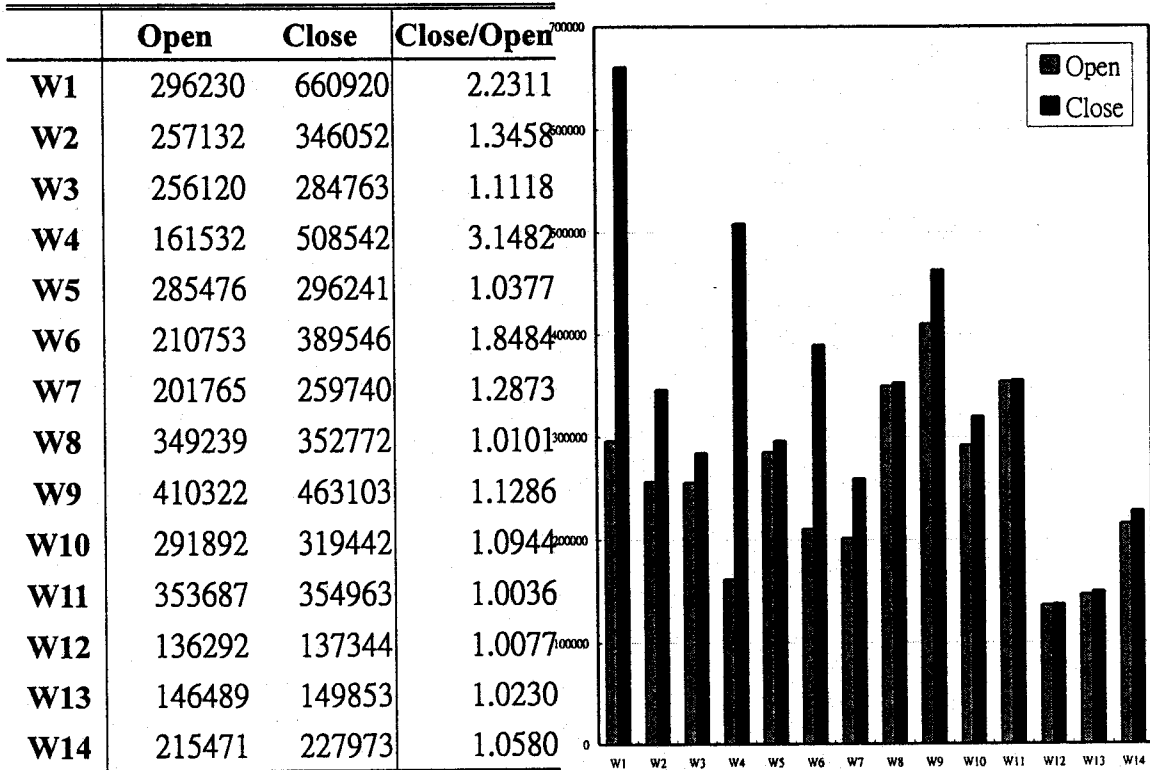


表 5-3.11 吳茱萸中 synephrine 之定量結果
分析方法 II，如實驗 5-2-2.2 所述

由上列各點討論歸納得知：(一)從不同批藥材整體來說：由於市售吳茱萸藥材均混有石虎樣品，而且這兩種樣品的成分含量與比例幾乎一致，在樣品外觀上為開口及閉口果實之混合，所以針對不同性狀做比較。開口樣品的藥效成分含量大於閉口樣品，而且以色黑、顆粒大，成花狀者為佳，此與莊武璋學長所歸納之結果一致；此外原本要以六個指標成分作為判斷基準的原則，已可簡化由 DE/E 比值、及 S 含量比三個主要指標成分作為標準。(二)從不同性狀來看：開口吳茱萸中各生物鹼成分的含量大略一致；而閉口吳茱萸中的含量有極大的差異，我們可以由外觀、色澤加以區別：顆粒渾圓、色澤黑的樣品其 Dehydroevodiamine 與 Evodiamine 含量較少，而顆粒較小、色澤偏綠的果實是藥效成分含量較多者。推測當果實成熟後其藥效成分含量會逐漸衰減，因此色黑膨鬆的吳茱萸果實中所含的藥效成分較低，此也符合了過去研究的結論。

5-3-4.2 藥材採收期之比較

由必安研究所鑑定過之正道地吳茱萸，依其外觀顏色差異分成綠色 (G) 及黑色 (B) 兩類。依實驗 5-2-5.2 所述進行 HPLC 分析。其圖譜如圖 5-3-4 所示。

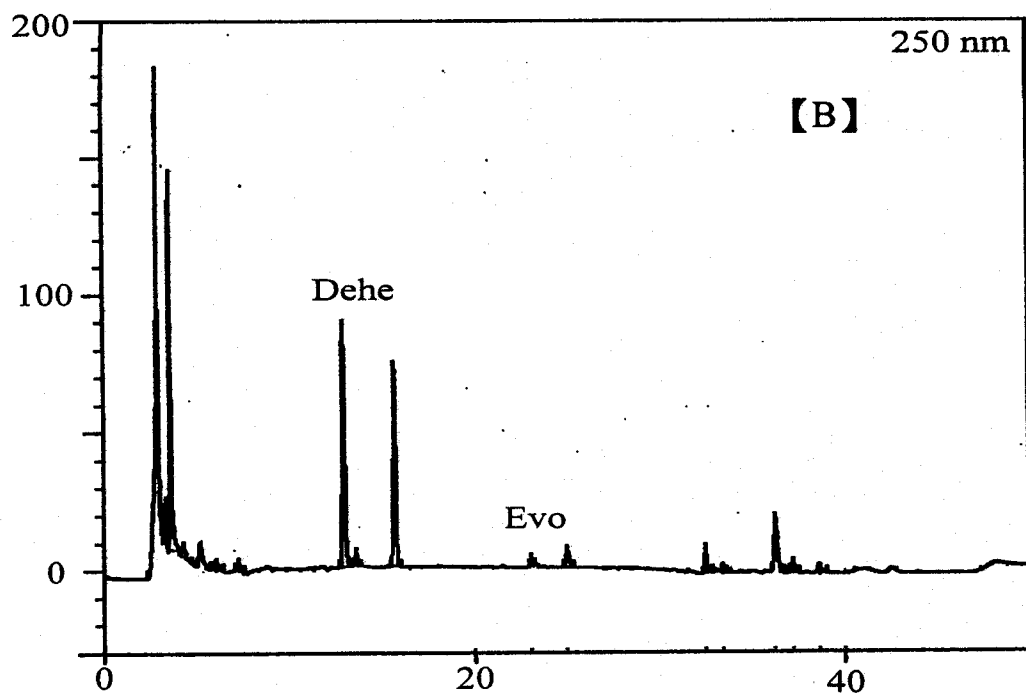
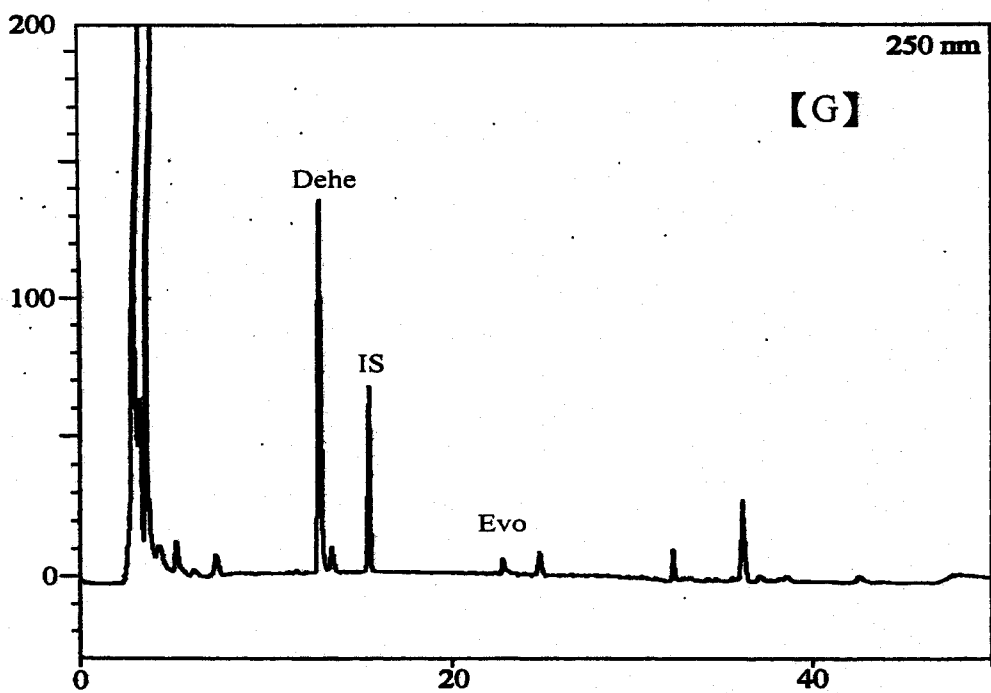


圖 5-3-4 正道地吳茱萸之 HPLC 層析圖

【G】色綠、粒小渾圓之吳茱萸樣品 【B】色黑、粒小渾圓之吳茱萸樣品
 分析方法 I，如實驗 5-2-2.1 所述

由圖譜可看出：綠色吳茱萸中 Dehydroevodiamine 及 Evodiamine 的含量較黑色吳茱萸為多，而其他生物鹼成分相對減少許多，所以定量吳茱萸主要兩項指標成分 DE 及 E，得到結果如表 5-3.12。

表 5-3.12 正道地吳茱萸之定量結果

mg/g	DE	E	ToTal
Green	56.145	1.291	57.436
Black	29.685	0.150	29.835

在市售十四批吳茱萸藥材中，W14 的 DE 含量較多，因此其 DE/E 值遠大於其他十三批樣品。從表 5-3.4 吳茱萸外觀性狀描述：此批吳茱萸藥材的果實極小，閉口顆粒直徑約 1.6 cm 與正道地吳茱萸的大小差不多，色澤不深略偏棕綠色，因此推測 W14 此批藥材應與正道地吳茱萸品種相似，見圖 5-3-6。經組織切片（圖 5-3-5）



吳茱萸 *Evodia rutaecarpa* (Juss.) Benth.

鑑定，此批正道地吳茱萸產自浙江，

圖 5-3-5 吳茱萸組織切片圖

顆粒小、渾圓成球狀，幾乎以閉口果

實為主，所以特別揀選外觀不同色澤的兩批樣品，經過 HPLC 分析後發現結論與原市售十四批藥材的結果吻合。中藥大辭典中記載吳茱萸花期為 6—8 月，果期為 9—10 月，採收宜 8—10 月，果實呈茶綠色，而心皮未分離

時採收，以色綠、飽滿者為佳，果實曬乾則成黑色，藥效逐漸減退。因此採收吳茱萸果實以8—10月色澤茶綠者為佳。

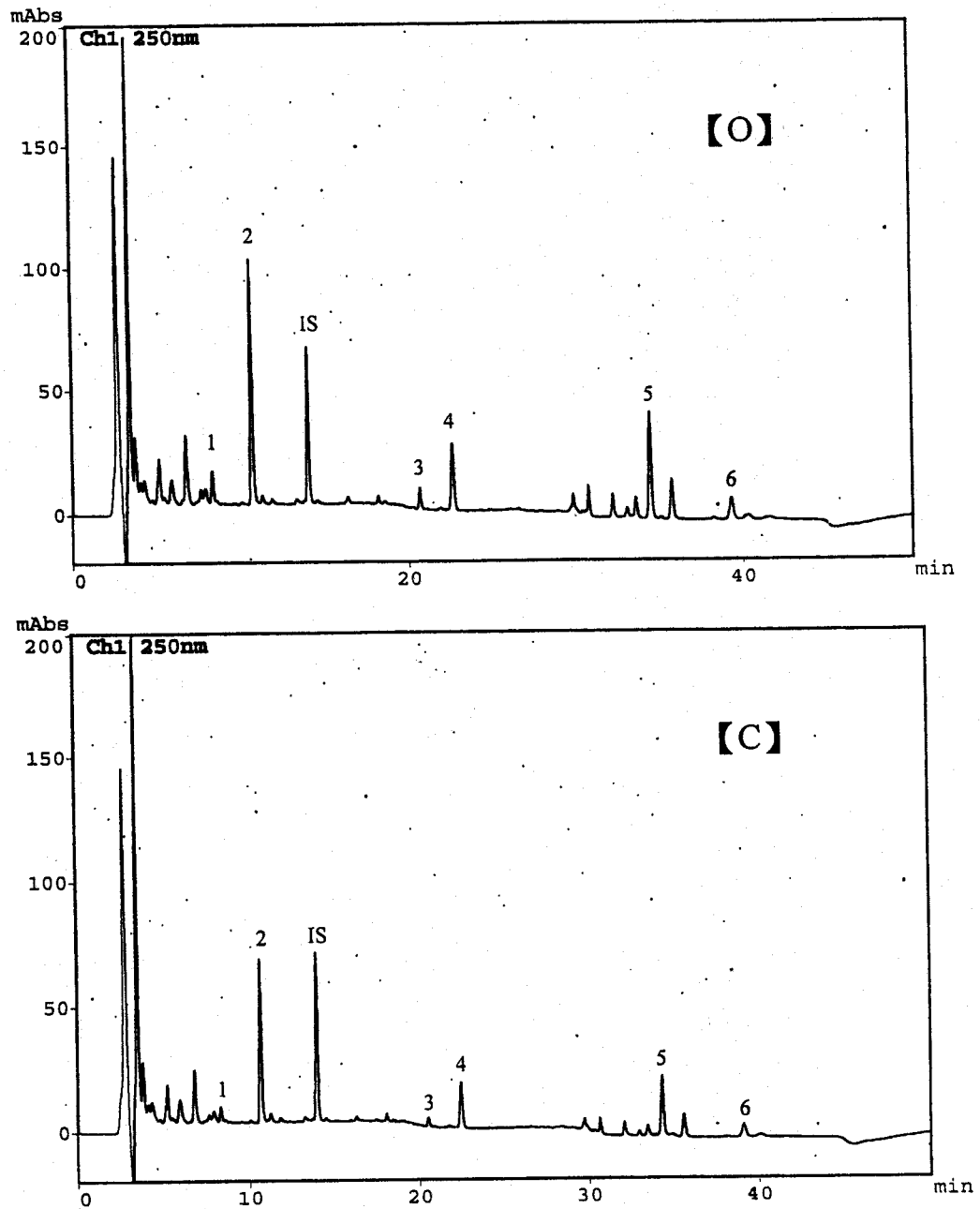


圖 5-3-5 W14 樣品之 HPLC 層析圖

【O】開口吳茱萸；【C】閉口吳茱萸

分析方法 I，如實驗 5-2-2.1 所述

第四節 參考文獻

1. 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、張憲昌，”簡明藥材學”，新醫藥出版社，台北，1985，p.288。
2. 小泉榮次郎，”和漢藥考”，古亭書局，台北，1969，p.492。
3. 張鴻銘，張蘭昌，”中醫大辭典”，昭人出版社，台北，1980，p.89。
4. 陳存仁，”中國醫藥大辭典”，世界書局，台北，1979，p.578。
5. 陳榮福、顏焜榮，”中藥藥理學”，國立中國醫藥研究所，台北 1991，p.296
6. 柯逢時、艾晟，”經史證類大觀本草”，正言出版社，台南，1977，p.361
7. Y. Asahina and T. Ohta, *Ber.* 1928, 61B, 319 ; *Chem. Abstr.* 1928,22, 1777
8. C. Schopl and H. Steuer, *Ibid.*, 1948,24 ; *Chem. Abstr.* 1948, 42, 2602
9. Y. Kano, M. Yasuda, K. Saito and K. Komatsu, *Shoyakugaku Zasshi*,1989,43,339
10. 盧宏民、陳石中，”本草藥性大辭典”，五洲出版社，台北，1984，p.201
11. Y. Pho, J. Jung, K. Ko and D. Han, *Taehan Yakrihak Chapchi*, 1980,16,57 ;
Chem. Abstr. 1980, 93, 179704c
12. S. Takagi, T. Konoshita, M. Sameshima, T. Akiyama S. Kobayashi and U. Sankawa, *Shoyakugaku Zasshi*,1979,33,30
13. Y. Asahina, *J Pharm. Soc. Japan*, 1924,503,1 ; *Chem. Abstr.*, 1924,18,1667
14. Y. Asahina and T.Ohta, *J Pharm. Soc. Japan*,1926,530
293 ; *Chem. Abstr.*, 1927,21,2134
15. A.Chatterjee, S. Bose and C. Ghosh, *Tetrahedron*,1959, 7,257
16. K. W. Gopinath, T. R. Govindachari and U. Ramadas Rao, *Tetrahedron*,

1960,8,293

17. I. J. Pachter and G. Suld, *J. Org. Chem.*, **1960**,**25**,1680
18. T. Nakasato, S. Asada and K. Marui, *Yakagaku Zasshi*, **1962**,**82**,619
19. R. Tschesche and W. Werner, *Tetrahedron*, **1967**,**23**,1873
20. T. Kamikado, C. F. Chang, S. Murakoshi, A. Sakurai and S. Tamura, *Agric. Biol. Chem.*,**1976**,**40**,605 ; *Chem. Abstr.*,**1976**
84,180446r
21. A. Ling Chen and K. K. Chen, *J. Am. Pharm. Assoc.*,**1933**,**22**,
716 ; *Chem. Abstr.***1933**,**27**,5151
22. T. Akiyama, T. Konoshita, U. Sankawa and S. Shibata, *Shoyakugaku Zasshi*,
1979,**33**,30
23. B. Danieli, G. Lesma and G. Palmisano, *Experientia*, **1979**,**35**,156
24. Y. Ashina and K. Kashiwaki, *J Pharm. Soc. Japan*,**1921**,**405**,
1293 ; *Chem. Abstr.*,**1922**,**16**,607
25. J. H. Chu, *Science Record*, **1951**,**4**,279 ; *Chem Abstr.*,**1952**,**46**,
1589a
26. Y. Hirose, *Chem. Pharm. Bull.*,**1963**,**11**,535
27. G. Kurono, Y. Nishikawa, S. Miyano and S. Aburano, *Chem. Pharm. Bull.*,**1967**,**20**,126
28. Y. Hirose, K. Kondo, H. Arita and A. Fujita, *Shoyakugaku Zasshi*, **1967**,**21**,126
29. D. L. Dreyer, *J. Org. Chem.*,**1967**,**32**,3442
30. T. Sugimoto, T. Miyase, M. Kuroyanagi and A. Uene, *Chem. Pharm. Bull.*,**1988**,**36**,4453

31. J. Grimshaw and E. Lamer-Zarawaka, *Phytochemistry*, **1975**, *14*,
838 ; *Chem. Abstr.*, **1975**, *83*, 75388e
32. K. Tayama and S. Ikemoto, *Igaku to Seibutsugaku*, **1981**, *103*, 553
; *Chem. Abstr.*, **1982**, *96*, 214341
33. 莊武璋, "吳茱萸藥材及製劑藥效成分之定量研究", 碩士論文, 國立台灣
師範大學化學研究所, 台北, **1993**
34. W. C. Chuang and S. J. Sheu, *Chin. Pharm. J.*, **1994**, *46*, 89
35. Qiaogeng Zhou, Zhe Song and Shiwang Zhou, *Zhongguo Yaoke Daxue
Xuebao*, **1996**, *27*(9), 537-539
36. Tianyong Wang. and Wenyuan Yang, *Fenxi Ceshi Xuebao*, **1996**,
15(3) 60-62
37. M. C. Lee, W. C. Chuang and S. J. Sheu, "Determination of the alkaloids in
Evodia fructus by capillary electrophoresis" *J. Chromatogr., A*,
1996, *755*(1), 113-119
38. 莊武璋, "中藥成分高效能液相層析研究", 博士論文, 國立台灣師範大
學化學研究所, 台北, **1996**
39. S.S.Kang, B.H.Um, J.S.Kim, and B.t.Ahn, "Isolation of flavonoids from
Evodiae Fructus" *Saengyak Hakhoech* **1997**, *28*(1), 9-14
40. Y. Tang, X. Feng and L. Huang, "Studies on chemical constituents of Evodia
rutaecarpa (Juss) Benth" *J. Chin. Pharm. Sci.*, **1997**,
6(2), 65-69
41. H. Matsuda, J. X. Wu, T. Tanaka, M. Iinuma and M. Kubo, "Antinociceptive
activities of 70% methanol extract of Evodiae Fructus (fruit of Evodia

rutaecarpa var. bodinieri) and its alkaloidal components." *Biol. Pharm.*

Bull.,1997,20(3),243-248

- 42.H. Matsuda, M. Yoshikawa, Y. Ido, H. Kuwazima, T. Tanaka, M. Iinuma and M. Kubo,"Anti-allergic activities of 70% methanol extract of *Evodiae Fructus* (fruit of *Evodia rutaecarpa* var. *bodinieri*) and its components." *Nat.*

Med.,1998,52(6),470-476

43. H. Matsuda, M. Yoshikawa, M. Iinuma and M. Kubo," Antinociceptive and anti-inflammatory activities of limonin isolated from the fruits of *Evodia rutarcarpa* var. *bodinieri*." *Planta Med.*,1998,64(4),339-342

- 44.D.Zhao, Y. Zhang and K. Bi,"Determination of evodiamine and rutaecarpine in different combinations of the Wuzhuyu decoction by RP-HPLC." *Yaowu Fenxi*

Zazhi,1999,19(1),16-19

第六章 吳茱萸成分之安定性探討

第一節、前言

由前節的實驗結果可知，吳茱萸藥材是在果實尚未完全成熟時採收，由於個別差異，同株植物的果實即有不同的成熟度，不同株的植物差異更大。李東垣曾說：「凡諸草木昆蟲，產之有地、根葉花實、採之有時，失其地則性味少異，失其時則氣味不全。」由於藥材會因產地氣候、採收時期的差異，使其中所含的藥效成分略有不同；本實驗室莊武璋學長曾討論吳茱萸藥材中，去氫吳茱萸鹼（Dehydroevodiamine）及吳茱萸次鹼（Rutaecarpine）在藥材炮炙過程中，含量與溫度變化的關係。所以藥材保存的方式、濕度、溫度、時間都需注意，以維持藥材品質穩定。據此，本研究選用同一批藥材，揀選開口及閉口不同性狀之吳茱萸，分成兩組，在不同溫度狀況下【50°C、室溫】，檢測其成分含量隨時間的變化情形。同樣地對藥材方劑（吳茱萸湯）進行安定性實驗。實驗時間維持約兩個月，期能利用定量結果探討藥材品質與儲存環境及時間上之相關性。

第二節、實驗部分

6-2-1 實驗藥材

6-2-1.1 吳茱萸藥材

同一批藥材中，揀選開口與閉口兩種不同性狀之樣品，分成兩組。每組中，開口吳茱萸及閉口吳茱萸分裝成每 1 公克之小包裝，共 30 包。

6-2-1.2 吳茱萸湯

由必安研究所提供的錫箔真空包裝之方劑（已粉碎），分裝成每 1 公克之小包裝，共 30 包。

6-2-2 藥材檢液配製

分別稱取藥材及方劑粉末 0.5 公克，各自加入 7 毫升之 70% 甲醇溶液，在室溫下超音波震盪 15 分鐘，離心，如此重複操作三次，將所得之萃取液，加入 1 毫升內標溶液（cinnamic acid）以定量瓶中稀釋至 50 毫升，經 45um 濾膜過濾作為檢液，每次以 10 μ l 注入，注射兩次，取平均值定量之。

6-2-3 實驗系統狀況

實驗條件選擇兩種不同溫度系統，一為室溫下、另一則控制在 50°C 下的高溫下。每隔一段週期時間取出，如 6-2-2 節所述藥品檢液配製，進行定量分析，如表 6-2-1。

表 6-2-1 安定性實驗進行系統

狀況	室溫下	50°C 烘箱中	
樣品處理	樣品不密封 維持與外界流通	樣品不密封 維持與外界流通	
樣品放置環境	乾燥箱	50°C 烘箱	
實驗進行時間	每隔一星期檢測一次， 共計七週	藥材	方劑
		分別於第 6、12、 24、48、120 小 時檢測	分別於第 1、 6、12、24、48 小時檢測

第三節、結果與討論

6-3-1 藥材與方劑在外觀上的變化

由於高溫系統下，化學成分的穩定性降低，而且容易破壞原植物之組織結構，所以臆測在 50°C 烘箱中，藥材及方劑的藥效活性會變動較大。從外觀檢測，原吳茱萸藥材粉碎後，其粉末的顏色與原果實相去不遠，呈現棕黑色的粉末狀。在室溫下乾燥箱中的藥材樣品沒有什麼明顯的改變；然而，置放於 50°C 烘箱中的藥材，經過約 24 小時之後顏色漸深，顆粒較為酥脆，容易粉碎。而吳茱萸方劑的粉末為鮮豔的亮黃色，於室溫下的樣品沒有什麼外觀上的變化，但是在烘箱中的方劑粉末漸漸焦黑，結成一個個硬塊，而且萃取液顏色變淡。因此考慮這樣的變化可能與樣品中的水分蒸發有關，此外，方劑中摻有大棗成分，在加熱過程中其醣類成分分解，使粉末濕潤而結塊。至於成分含量的變化則進行定量分析檢測之。茲將樣品隨時間的外觀變化列表如下：

表 6-3-1 樣品外觀的變化情形

吳茱萸藥材		吳茱萸方劑	
室溫下	50°C 烘箱中	室溫下	50°C 烘箱中
置放於乾燥箱中，沒有什麼明顯的改變	置放時間越久，樣品顏色漸深，顆粒愈加膨鬆酥脆	置放於乾燥箱中，沒有什麼明顯的改變	置放時間越久，粉末漸漸焦黑，黏膩成塊狀

6-3-2 藥材與方劑在成分含量上的變化

6-3-2.1 藥材在成分含量上的變化

由第一章的結果歸納可得：吳茱萸藥材中以 Dehydroevodiamine、Evodiamine、Rutaecarpine、Evocarpine 為主要指標成分，其成分含量較多，適合用來當作檢測樣品安定性之依據。在莊武璋學長的研究中曾提到：Dehydroevodiamine 與 Rutaecarpine 在加熱過程中會有相互消長的關係。在本研究中分開探討開口吳茱萸、閉口吳茱萸中成份含量之變化，發現開口吳茱萸樣品中 Dehydroevodiamine 與 Rutaecarpine 的確互為消長關係，符合先前研究的結論。而 Evodiamine 與 Evocarpine 不論在開口樣品或是閉口樣品中呈現一致的變化趨勢。表 6-3-2 及表 6-3-3 說明四個指標成分在室溫下、高溫烘箱下的含量變化，而各變化趨勢的關係將分點討論如下：

(1) 室溫下：

存放於室溫乾燥箱中的吳茱萸藥材，每隔一週進行成分定量分析，由於時間長達七星期，因此較能客觀看出指標成分的變化。由圖 6-3-1 在開口吳茱萸中，Evodiamine (E)、Rutaecarpine (RC) 及 Evocarpine (EC) 的增減趨勢幾乎一致，惟 Dehydroevodiamine(DE)的變化較為遲緩，在前五週內含量變動不大，約第五週開始有明顯的衰變現象；此外從第三週開始，E 與 DE 的變化速率幾乎一致，我們可以從 DE/E 的比值觀察出來，如圖 6-3-3。在閉口吳茱萸中，Evodiamine (E)、Rutaecarpine (RC) 及 Evocarpine (EC)

的變化趨勢不再相同了，但是我們可以發現 Evodiamine 及 Dehydroevodiamine 的趨勢變化幾乎一模一樣，從 DE/E 的比值可知 Evodiamine 及 Dehydroevodiamine 以緩慢且穩定的速率減少著，如圖 6-3-4。

綜合上述，可得以下幾點結論：

- 【1】 不論是開口吳茱萸或是閉口吳茱萸中，Rutaecarpine (RC) 及 Evocarpine (EC) 的變化極為不規則，由於此條件狀況屬於開放系統，在與外界保持流通的情形下所受變因較多且複雜，包括溫度、濕度等無法隨時保持一致，或有來自空氣中的懸浮物附著，因此對所有成分而言較難得到一致的結果。
- 【2】 Evodiamine 及 Dehydroevodiamine 在一開始的 1 至 2 週內變化較為激烈，約莫第三週開始即以穩定之速率緩慢遞減著，其衰變速率幾乎為一定值。
- 【3】 觀察開口吳茱萸與閉口吳茱萸之 DE/E 比值趨勢曲線，兩者幾乎如出一轍皆以一定的比例存在著，可見吳茱萸藥材的保存可在一般環境中達成，雖然其衰變速率緩慢，但是仍是等注意保存場地之乾燥性及適溫性。

表 6-3-2 開口吳茱萸及閉口吳茱萸藥材成分相對含量(室溫下)

weeks	Open				Close			
	DE	E	RC	EC	DE	E	RC	EC
1	1.214	1.235	1.167	2.993	1.021	0.696	0.771	0.956
2	1.176	1.680	1.472	2.888	1.192	0.841	1.026	1.728
3	1.333	0.718	0.734	2.122	1.051	0.633	0.777	1.671
4	1.397	0.883	1.316	2.458	0.886	0.562	1.006	1.103
5	1.377	0.887	1.367	2.441	0.894	0.567	1.048	1.104
6	0.988	0.628	0.768	1.628	0.833	0.523	0.972	1.017
7	0.934	0.615	1.063	1.740	0.838	0.533	1.281	1.102

表 6-3-3 開口吳茱萸及閉口吳茱萸藥材成分相對含量(50°C烘箱中)

Hours	Open				Close			
	DE	E	RC	EC	DE	E	RC	EC
6	0.931	1.151	0.726	1.030	1.185	0.306	0.280	0.286
12	1.069	0.915	0.597	1.078	1.099	0.212	0.242	0.256
24	1.061	1.109	0.742	1.183	1.307	0.249	0.292	0.288
48	1.098	0.924	0.617	1.038	1.006	0.287	0.301	0.309
120	0.564	0.274	0.224	0.365	1.720	0.255	0.244	0.278

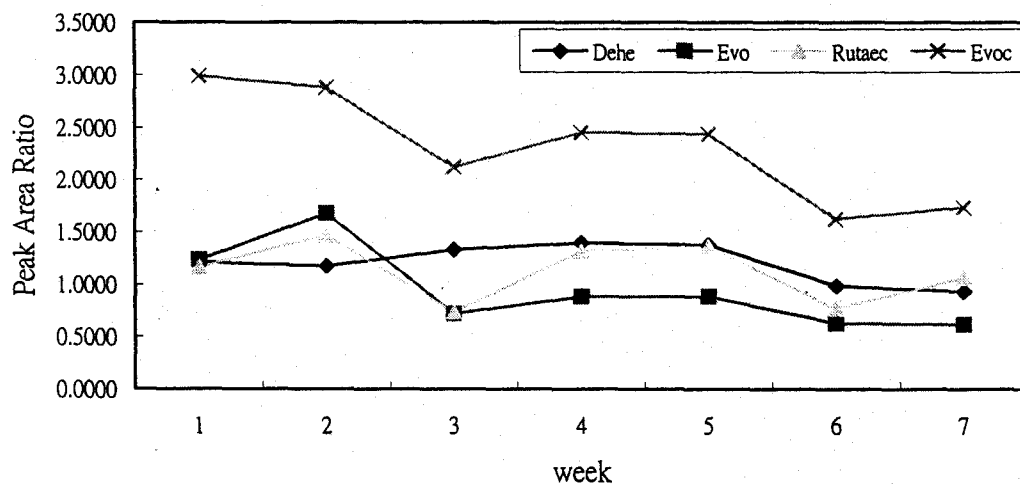


圖 6-3-1 開口吳茱萸於室溫下的安定性實驗

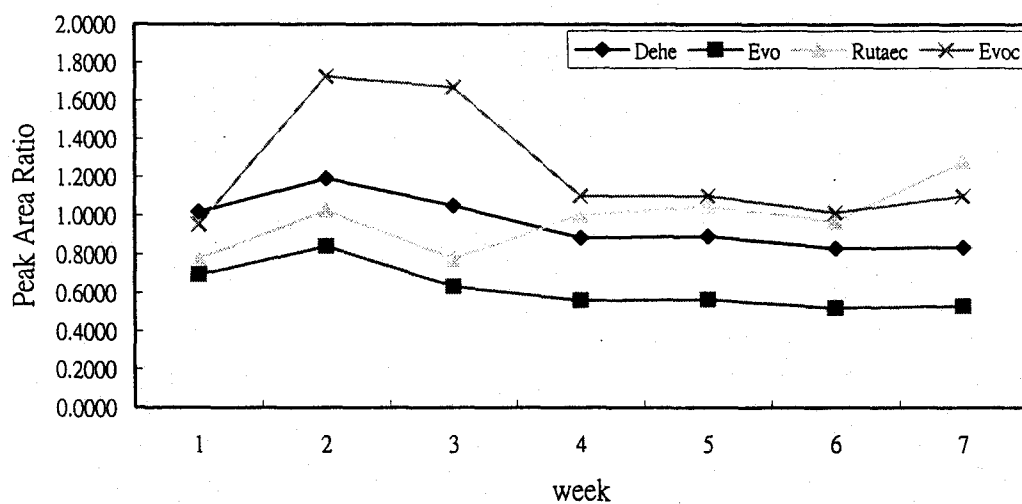


圖 6-3-2 閉口吳茱萸於室溫下的安定性實驗

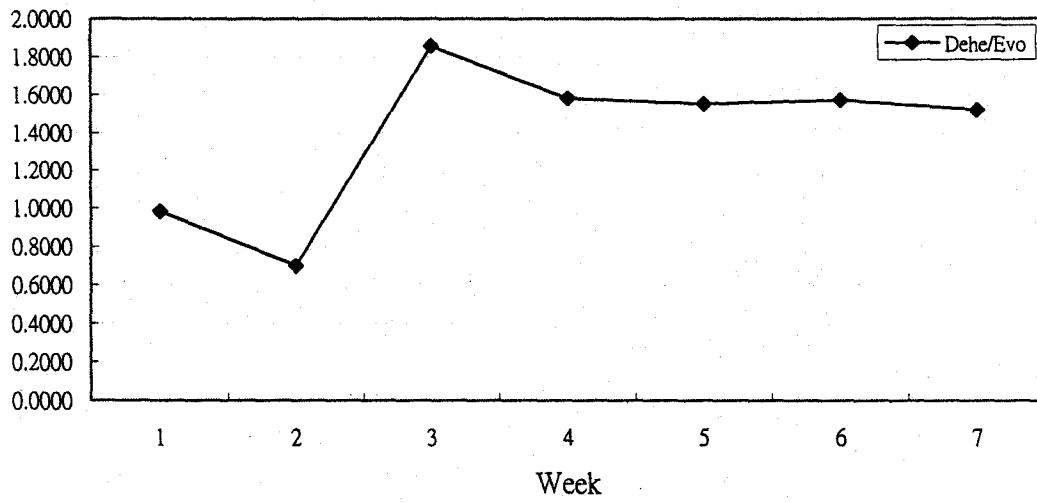


圖 6-3-3 開口吳茱萸於室溫下 DE/E 的趨勢曲線

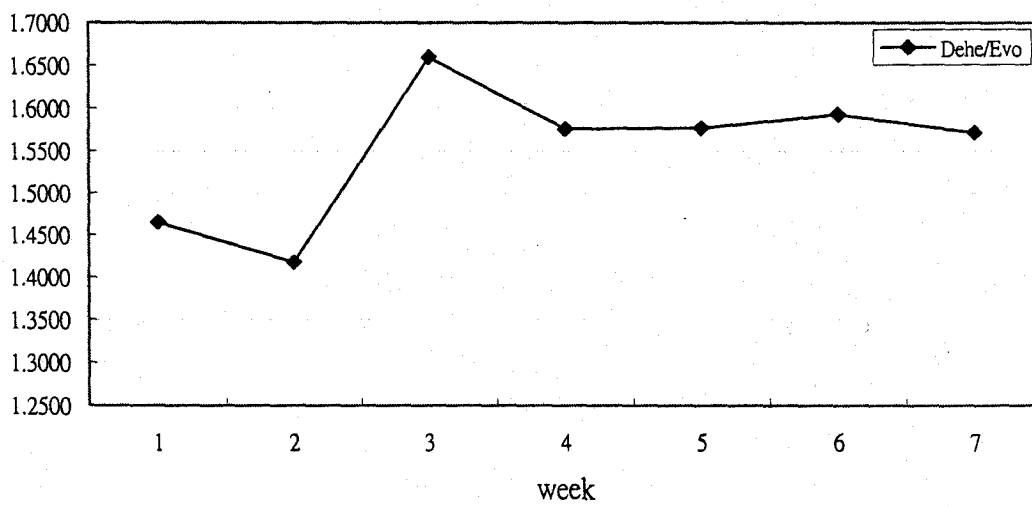


圖 6-3-4 閉口吳茱萸於室溫下 DE/E 的趨勢曲線

(2) 50°C 烘箱中：

如前節所述，置放於烘箱中的吳茱萸樣品會因果實中水分的蒸發而變的膨鬆、酥脆。由圖 6-3-5，此批開口吳茱萸藥材以 Evodiamine (E) 為多，加熱六小時之後 E 仍是最大量的成分，再經過六小時之後，Evodiamine (E) 與 Rutaecarpine (RC) 均衰減，而 Dehydroevodiamine (DE) 及 Evocarpine (EC) 反而有增加的趨勢，約 24 小時之後，各成分均呈衰減現象。我們可以發現：E、RC 與 EC 的含量變化幾乎一致，唯有 DE 較為例外，而且 DE 及 RC 的變化趨勢幾乎是相反的，這個結果符合過去研究的結論，不但如此 DE 及 E 也有相互消長的關係，考慮 DE/E 的比值可得一漸增的曲線，可知 E 衰減的速率遠大於 DE，如圖 6-3-7 所示。圖 6-3-6 為同批藥材中 DE 含量遠大於其他成分的閉口吳茱萸，其四個成分 E、RC、EC 與 DE 的變化趨勢都很接近，尤其是 E、RC 與 EC 在 24 小時之後幾乎沒有變化，從 DE/E 的比值來看會有向下減少的趨勢，這表示 DE 的衰減速率較快，在 E 的緩慢變化下使 DE/E 比值越來越小，如圖 6-3-8。

綜合上述，可得以下幾點結論：

- 【1】 開口吳茱萸及閉口吳茱萸在高溫度的環境中有著不同的變化趨勢，兩者在加熱 6 至 24 小時的過程中，各成分均有不規則的增減情形，而在 24 小時之後，四種指標成分均以穩定速率向下衰減。在 6-3-1 中曾經提到：置放於烘箱中 24 小時之後，吳茱萸果實會變的膨鬆酥脆，在此過程中水分逐漸蒸發，吳茱萸果實組織變的不穩定，所以才產生指標成分之不規則變化，24 小時之後藥材中之水分已大略蒸

發待盡，此時成分含量的變化趨向一穩定狀態，衰減速率幾乎固定。

【2】 在開口吳茱萸中 DE 及 RC 的變化互有消長的情形，其 DE/RC 比值漸小，與炮炙過程中藥材加熱的結果一致。

【3】 開口吳茱萸及閉口吳茱萸中 DE 與 E 的衰減速率恰為相反。在開口吳茱萸中以 E 的衰減速率較快，所以 DE/E 比值為一上升曲線；在閉口吳茱萸中 DE 的衰減速率較快，所得的 DE/E 比值呈現一遞減的趨勢。

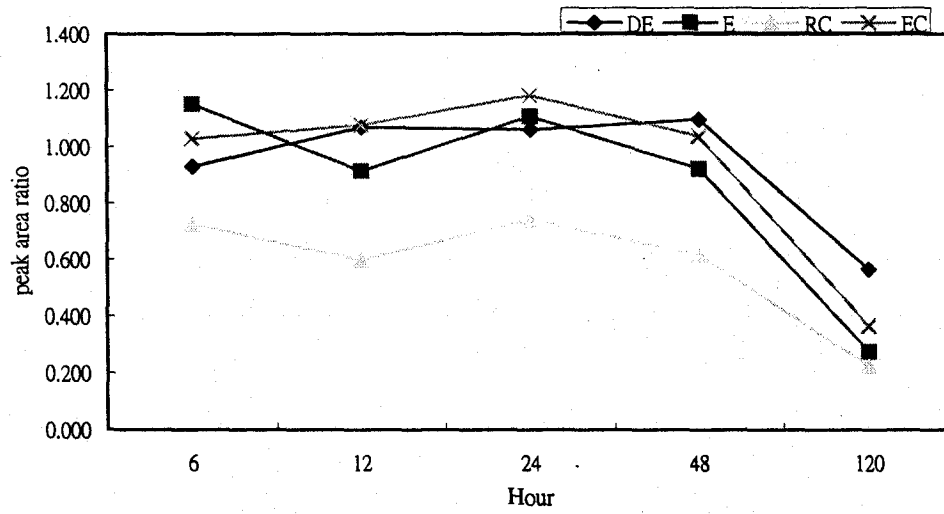


圖 6-3-5 開口吳茱萸於 50°C 烘箱中之安定性實驗

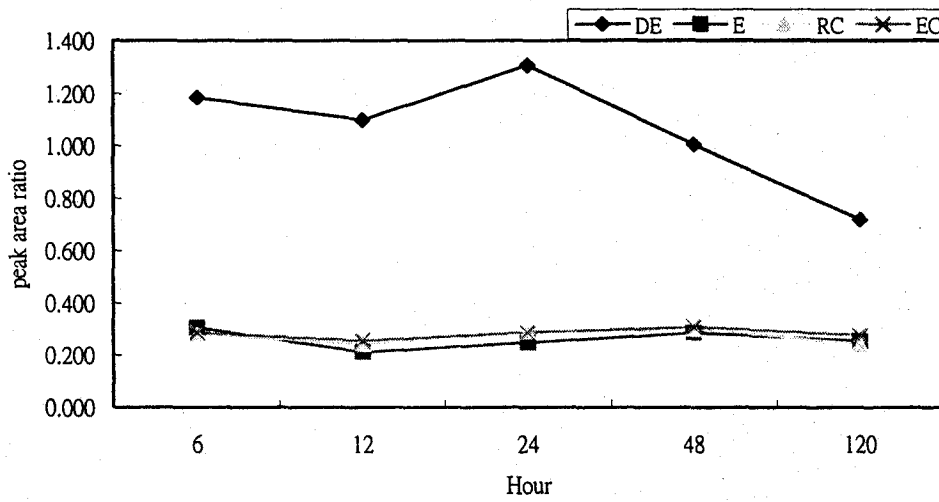


圖 6-3-6 閉口吳茱萸於 50°C 烘箱中之安定性實驗

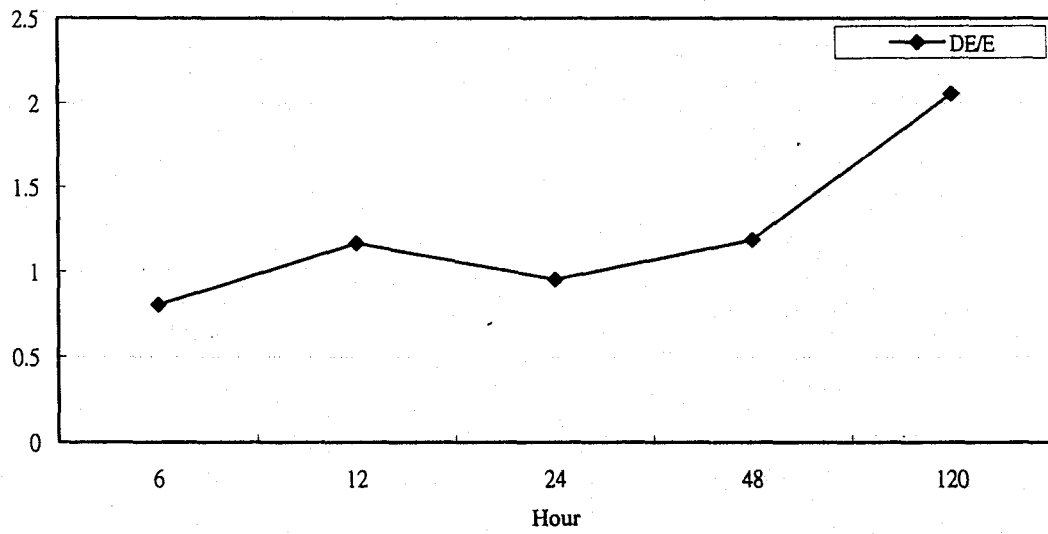


圖 6-3-7 開口吳茱萸於 50°C 烘箱中 DE/E 的趨勢曲線

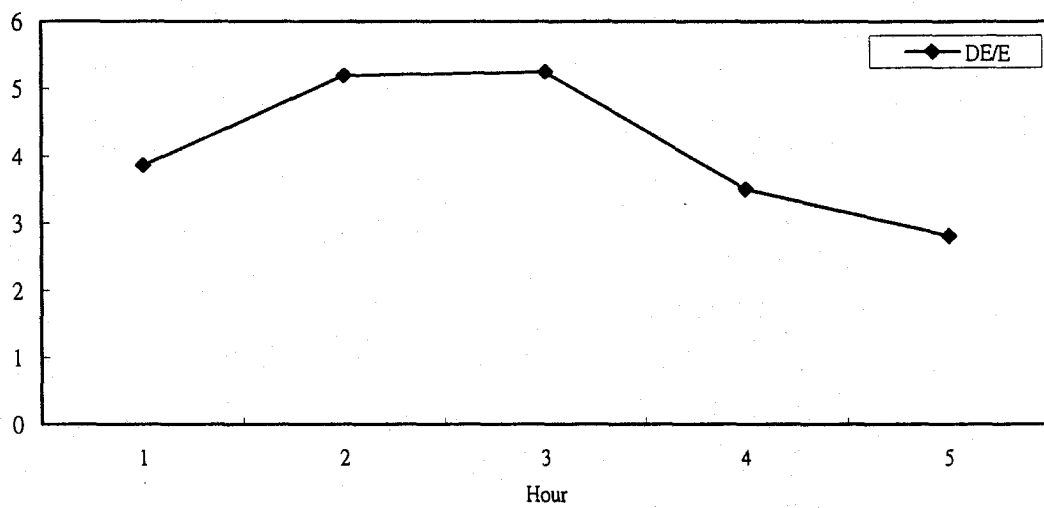


圖 6-3-8 閉口吳茱萸於 50°C 烘箱中 DE/E 的趨勢曲線

6-3-2.2 方劑在成分含量上的變化

吳茱萸湯中含有吳茱萸、人參、大棗、生薑等藥材，由於此方中以吳茱萸為君藥，所以推測其安定性實驗的結果應與藥材單方相似。置放於烘箱中之吳茱萸湯粉末，其外觀顏色隨時間加長而漸深，定量結果顯示：Dehydroevodiamine 及 Evodiamine 的含量逐漸減少，但在常溫條件下卻有著不規則的變化。其成分含量列於表 6-3-4 及表 6-3-5 中，而各變化趨勢的關係將分點討論於後：

(1) 室溫下：

吳茱萸湯方劑置放於室溫乾燥箱中的趨勢變化如圖 6-3-9。

由於方劑中成分較為複雜，而且並未區別吳茱萸開口與閉口的差別，因此由此趨勢圖可觀察混合不同性狀之吳茱萸的安定性如何。從圖 6-3-9，Dehydroevodiamine 與 Evodiamine 呈不規則性變化，此應是混和開口及閉口不同性狀之結果。至於 Rutaecarpine 則有遞增的現象，Evocarpine 的變化較為平緩。此樣品中 DE/E 比值之趨勢曲線不規則，無法確認該方劑樣品中以何種性狀的吳茱萸為多，圖 6-3-10。此條件屬於開放系統與外界流通，其變因繁多難以控制，再加上方劑本身的複雜性，因此較難有規則性的結果。

表 6-3-4 吳茱萸湯成分相對含量(室溫下)

吳茱萸湯				
weeks	DE	E	RC	EC
1	0.983	0.845	0.590	0.477
2	1.066	0.851	0.655	0.643
3	0.959	0.820	0.717	0.633
4	1.026	0.856	0.800	0.632
5	1.006	0.863	0.853	0.635

表 6-3-5 吳茱萸湯成分相對含量(50°C烘箱中)

吳茱萸湯				
hour	DE	E	RC	EC
1	1.188	0.897	0.793	0.752
2	0.805	0.598	0.525	0.526
3	0.773	0.564	0.521	0.537
4	0.685	0.486	0.729	0.648
5	0.659	0.449	0.643	0.547

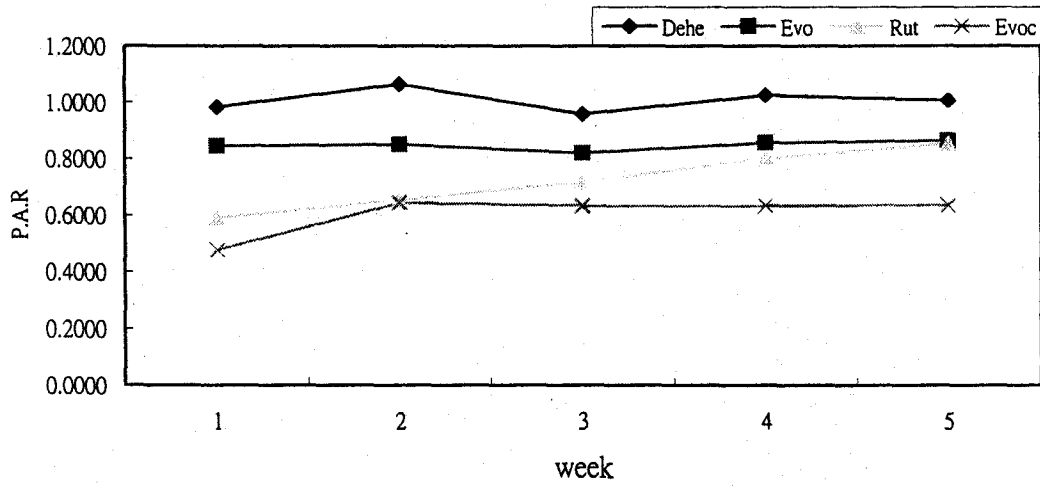


圖 6-3-9 吳茱萸湯方劑於室溫下之安定性

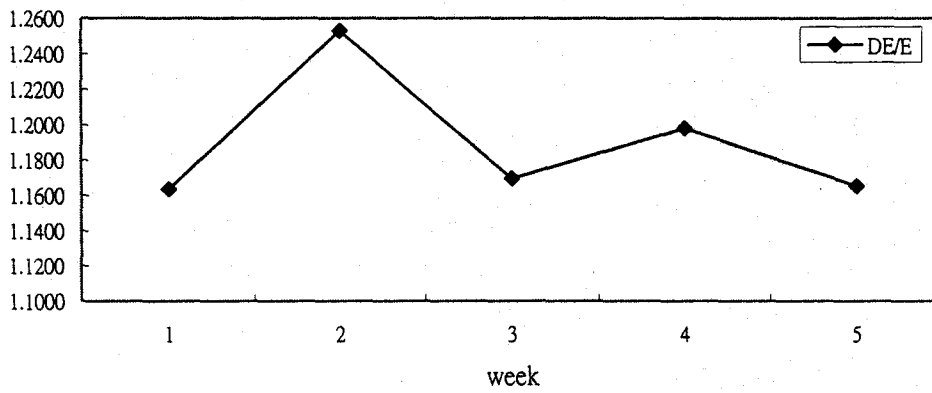


圖 6-3-10 吳茱萸湯方劑於室溫下 DE/E 的趨勢曲線

(2) 50°C烘箱中：

在高溫系統中，吳茱萸方劑成分含量的變化較為明顯，如圖 6-3-11 所示。Dehydroevodiamine 與 Evodiamine 放置於烘箱中六小時即發生急速衰變，在六小時之後遞減速率趨於緩和。Rutaecarpine 與 Evocarpine 之變化趨勢相同，同樣地在 1~6 小時內快速減少，爾後成分含量的增加應是不穩定狀態所造成。在 6-3-1 節中曾提及方劑置於 50°C 烘箱中時間越久，粉末外觀顏色越漸焦黑，除了水分的蒸發之外，吳茱萸湯組成藥材中之大棗含有醣類物質，在高溫下逐漸分解使樣品粉末濕潤結塊，其成分結構亦受影響。比對 DE/E 比值之趨勢曲線（圖 6-3-12），其遞增的形式與開口吳茱萸在高溫下的趨勢相似（圖 6-3-7），由此可推知該吳茱萸方劑中以開口性狀的吳茱萸為多。

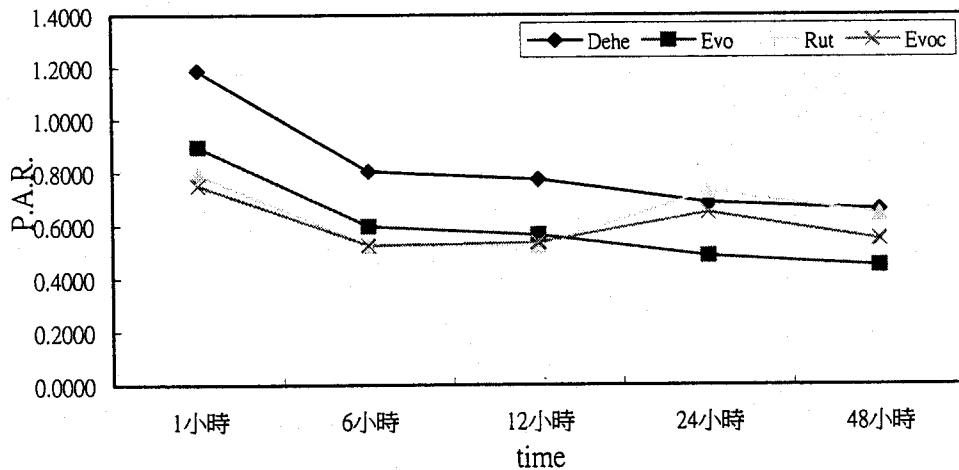


圖 6-3-11 吳茱萸湯方劑於 50°C 烘箱中之安定

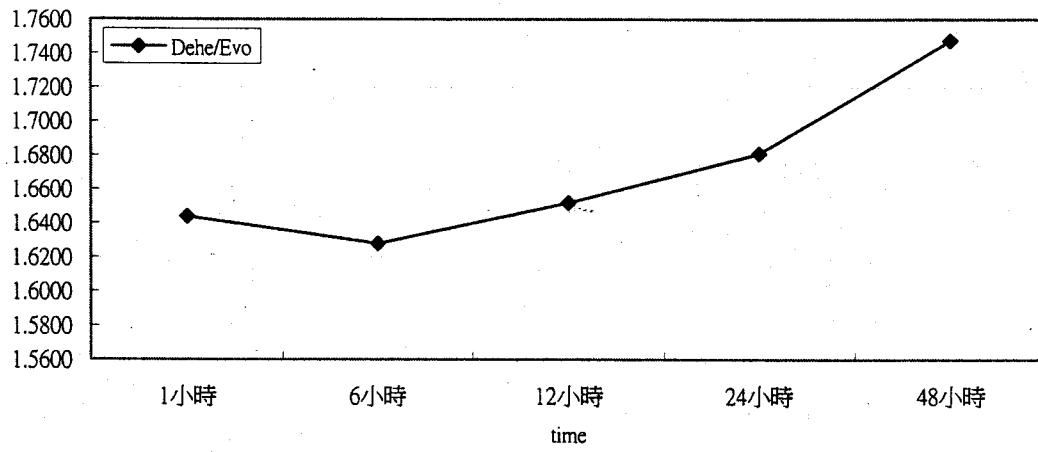


圖 6-3-12 吳茱萸湯方劑於 50°C 烘箱中 DE/E 的趨勢曲線

第七章 芍藥成分之安定性探討

第一節 前言

所謂層析 (chromatography) 是一樣品分配於一移動相 (氣體或液體) 和一固定相 (液體或固體) 間的分析方法。層析技術始於1930年德國化學家M. Twett 利用粉筆管柱 (chalk column) 分離綠葉色素[1]。在此之後，1941年Martin和Synge (獲諾貝爾獎) [2]研究液體分配現象 (liquid partition); 1950年代氣相層析 (gas chromatography, GC) [3]及薄層層析 (thin-layer chromatography, TLC) 技術出現[4]。1962年GC正式商業化使用，該儀器具有迅速、分離度高、操作簡便、高感度檢出信號、自動記錄及分離管柱可連續使用等優點。1967年，Huber和Hulsman進一步利用GC的特點發展高速層析 (high speed chromatography)，雖貴但分離管柱可連續使用，以高精度的泵作移動相輸入源，嚴密控制流速，因此再現性佳，樣品導入簡便，使用細小粒子為填充劑分離效果好，逐漸受分析界的重視。該儀器曾經稱作high pressure liquid chromatography[5]，現在均以high-performance liquid chromatography, HPLC (高效液相層析) 名之，而HPLC已成為今日分析上的有力工具。

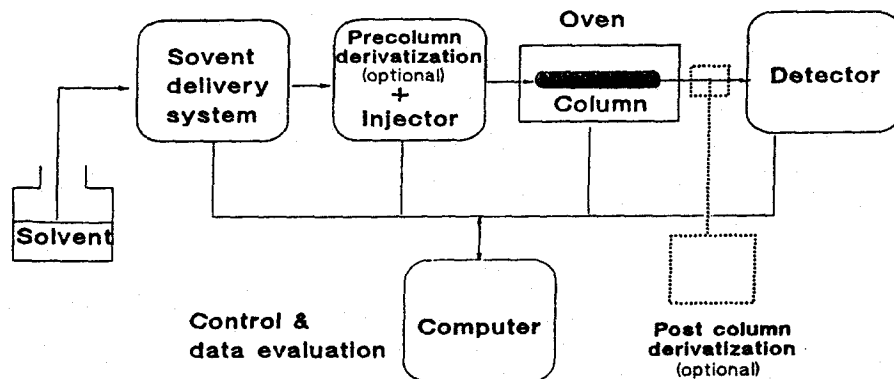
高效液相層析法之所以能在七十年代獲得迅速的發展和廣泛的應用，除了各種高效層析填料的發展之外，儀器和實驗裝置的發展也是一個極為重要的因素。一般而言，HPLC的發展大約經歷了三個階段。

第一階段從六十年代末到七十年代初實驗室試製階段。在此期間，許多研製填料的實驗室使用了工業上用的一些設備，如小流量往復柱塞泵，結合自製的層析柱、檢測器裝配而成的簡單的實驗裝置，用以驗證填料的性能和作一些應用試驗，儀器還處於不成型、不完善的初級階段。

第二階段從 1971-1975年，這是儀器的研製和生產蓬勃發展的階段。人們都

在探索高效液相層析儀中各關鍵組件的最佳設計和實現這種方案的方法和途徑。其中以高壓輸液泵為例，就先後出現了往復柱塞泵、氣動泵和注射柱塞泵三種類型。檢測器也是如此，除了紫外線檢測器 (Ultra-violet detector, UV) 在單波長的基礎上逐漸發展了多波長、連續可變波長之外，其它類型的檢測器如折射光度計 (Refractive Index detector, RI)、螢光 (Fluorescence detector) 和電化學 (Electro-chemical detector) 等檢測器也相繼出現，不僅在種類和數量上大幅增加，而且在性能和品質上也有很大的提高。

第三階段自1975年之後，儀器的改進工作主要集中在降低柱外效應，研製新型的檢測器和提高自動化水準等方面。由於微處理機的引入，使高效液相層析儀的面貌煥然一新，儀器的自動化程度大為提高，層析過程的參數如流速、柱溫、梯度沖提中濃度變化等設定，只須在鍵盤上輸入，便在微處理機的控制，不需操作者的介入，自動進行層析分離過程和打印輸出結果。光二極陣列檢測器 (Photodiode array detector) 可以同時記錄沖提物的全波長資料，各沖提物的完整光譜，既可儲存又能重現，可用於組分的鑑定及純度測定。近年來又發展出與質譜儀 (Mass Spectrometer, MS) 的互相銜接，可以獲得有關組成化合物的分子量及結構方面的資料。然而無論何種機型，基本上均由如圖7-1-1所示的幾個部份組成。



第二節 安定性之研究

一般而言，中藥材因基源、產地、生長年數、栽培方法、採收日期及加工處理過程的不同，往往在品質上有很大的差異。傳統認為「諸藥所生，皆有境界」、「凡用藥，必須則洲土所宜者，則藥力具有之有據」的想法，養成了沿襲數千年來評鑑藥材時極為強調的「地道藥材」的觀念。地道藥材真正的意義應包括：(1) 來源相同，種源一致；(2) 採收季節正確；(3) 藥物部位適當；(4) 合乎規定的泡炙方法。然而並非表示非地道藥材不可入藥，如果有科學的鑑定方法來評估其藥效，仍可以代用。評估中藥品質應以科學方法為主，可從四方面著手：

- (一) 植物解剖學：從組織切片資料歸納品種之異同。
- (二) 化學定性分析：對化學成分進行單離，以質譜儀(MS)、核磁共振光譜(NMR)等技術鑑定結構，並了解其物理特性。
- (三) 化學定量分析：針對藥材中之藥理活性成分，進行定量分析。
- (四) 藥理試驗：針對藥材中各成分之藥理活性，進行測試。

由於傳統中藥具有藥性溫和、低毒性的特點，近年來已廣為應用並正式納入健保給付範圍。免煎煮之中藥科學製劑(或濃縮中藥)上市，使得中藥服用上更為方便。然而為確保中藥品質水準，建立一套藥物品質管之分析方法成為刻不容緩的課題，願作芍藥與葛根之安定性研究，有助於中藥科學化之研究。

第三節 實驗部分

一、緒論

1-1 芍藥簡介

芍藥在神農本草經中列為中品，為毛茛科(Ranunculaceae)之多年草本植物，兼具觀賞及藥用之用途。日本藥局之記載，本品係屬於 *Paeonia albiflora* Palls var. *trichocarpa* Bunge 及其近緣植物的根。芍藥分為二類：[6]

(1) 白芍 *Paeonia albiflora* Pall

(2) 赤芍又分三種，一為草芍藥 *Paeonia obovata* Maxim，別名山芍藥。二為川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch，別名毛果赤芍。三為真芍 *Paeonia lactiflora* Pallas。

但據清水藤太郎氏稱[7]，本藥材連皮生乾之根色帶淡褐，不去皮乾燥者為赤芍，去皮者為白芍。白芍為多年生草本[8]，高50~80cm。莖直立，光滑無毛。花甚大，多為白毛、粉紅色或紅色，花期5~7月。根肥大，通常呈圓柱型或略呈紡錘型。表面淡紅棕色或粉白色，平坦，質堅實而重，不易折斷。主產浙江、安徽、四川等地。浙江產者，商品稱為杭白芍，品質最佳；安徽產者稱為亳白芍，產量最大；四川產者名川白芍，又名中江芍。草芍藥高40~70cm[9]，莖直立，光滑無毛。花單生於莖頂，為粉紅色，花期5~6月。主產地分佈黑龍江、河北、遼寧、吉林等東北各省。根肥大，有分枝，外皮棕紅色。川赤芍高50~80cm，莖圓柱型，有時略帶紫色，光滑無毛。花朵為紅色，花期6~7月。根圓柱型，單一或分歧，外皮灰褐色。主產地為四川、雲南、山西等地。兩種赤芍根的表面均粗糙，具粗且深的縱皺紋，手搓之則外皮易脫落，顯出白色或淡棕色的內層。質硬而脆，易折斷。有刺激性的味道。芍藥之主成份 paeoniflorin 係在1969年由日本東京大學柴田承二教授等人，從芍藥中分離、純化，並確立結構式。[10]後來，柴田教授等發現 *Paeonia* 屬植物，多少皆含有此種成分。日本朝比奈泰彥博士，則從芍藥中分離出 benzoic acid 結晶。1972年 Kaneda 等人確定 paeoniflorin 及

一系列含量較少的相關化合物 albiflorin, oxypaeoniflorin, 及 benzoylpaeoniflorin 的絕對立體組態。[11]

1980 年 Makato 等人從白芍中分離出六個 gallotannin(Penta-, hexa-, hepta-, octa-, nona-, and decagalloylglucose)成份。[12]次年 Mineo 等人從白芍中分離出 paeoniflorigenone。[13]1982 年 Makato 用 HPLC 測定白芍的各成分含量, 發現 paeoniflorin 佔 1.73-4.82%, albiflorin 佔 0.02-2.18%, 而 oxypaeoniflorin 僅有 0.08-0.35%。1983 年 Huiying 等人從赤芍根中分離出二種單帖類化合物(Z)-1s, 5R)- β -pinen-10-yl β -vicianoside(I)及 lactiflorin(II)。1985 年 Toshimitsu 等人從白芍根中分離出三種新的單帖類化合物: 分別為 paeonilactone-A(I), -B(II), -(III)。[14]1989 年 Kang 從芍藥根中分離出單帖類化合物 galloypaeoniflorin。1990 年 Susumu 等人用毛細管電泳法(capillary zone electrophoresis), 分析芍藥萃取物 paeoniflorin、oxypaeoniflorin 和 gallic acid, 並將得到結果與 HPLC 分析方法相互比較。同年中國大陸應用 HPLC 分析 14 個傳統成藥中 paeoniflorin 約含量。[15]1992 年 Keiichi 使用超臨界萃取方法測定 paeoniflorin 及 albiflorin 在芍藥中的含量。此外, 芍藥亦含有 paeonin, 牡丹酚(paeonol), 精油, 脂肪油, 及糖。[16]根據文獻記載, [17]白芍味酸、苦, 性微寒。有柔肝止痛, 養血斂陰, 緩急止痛, 消散惡血, 利尿等之功效。主治腹痛、月經不調, 四肢攣急, 為鎮痙、鎮痛, 通經藥。赤芍味苦, 性微寒。主要功能為清熱、涼血、活血、祛瘀、止痛。主治月經不調、瘀滯腹痛、腹痛協痛等症。

綜合芍藥的藥理試驗結果, 計有下列各種作用:

(1) 解痙作用

芍藥浸出液對兔離體的腸管有興奮作用, 高濃度則有抑制或解痙作用。paeoniflorin 對老鼠的離體腸管和胃的運動及子宮平滑肌的收縮有抑制作用。

[18]

(2) 對循環系統的作用

paeoniflorin 可使狗冠狀血流量增加, 效力為罌粟鹼的 1/20, 亞硝酸甘油

的 1/250，並能增加犬後肢血流量，其效力為罌粟鹼的 1/100，亞硝酸甘油的 1/4500。當 paeoniflorin 分解為 debenzoyl paeoniflorin 和 benzoic acid 時，其藥理作用即消失。[18]

(3) 鎮痛下鎮靜作用

用醋酸注射於老鼠腹腔，以身體扭動做為疼痛的指標，發現 paeoniflorin 有顯著的鎮痛效果。paeoniflorin 並能延長 hexobarbital 對老鼠的睡眠時間。[19]

(4) 抗炎作用

paeoniflorin 有弱的抗炎作用，對角義菜膠(carrageenin)及旋糖酐(dextran or α -chymotrypsin)引起的老鼠後腳爪浮腫有抑制作用。

(5) 抗潰瘍作用

paeoniflorin 能抑制胃液分泌，預防老鼠緊張性潰瘍病的發生。[20]

(6) 抗菌作用

白芍對金黃色葡萄球菌、志賀氏痢疾桿菌有顯著的抑菌作用；而赤芍可抑制病菌、黃色葡萄球菌的作用。[20]

(7) 抗真菌作用

白芍對腹股溝表皮癬菌等多種皮膚真菌，有不同程度的抑制作用。[20]

(8) 抗病毒作用

白芍及赤芍的萃取液均有抑制病毒作用[20]

(9) 解熱作用

paeoniflorin 可降低老鼠的正常體溫。[20]

(10) 治療貧血

白芍可以改善兔子由於失血而導致的貧血現象。[21]

(11) 抗凝血作用

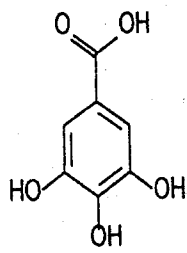
赤芍水萃取物可以治療鬱血，有抗血液凝集的效用。[22]

(12) 其他

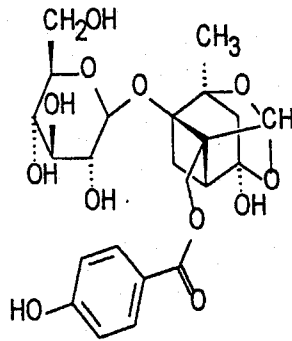
兔子口服赤芍煎劑，血糖可暫時升高，以 0.5-1 小時到達高峰

，旋即下降，至5—6小時後恢復正常。[23]

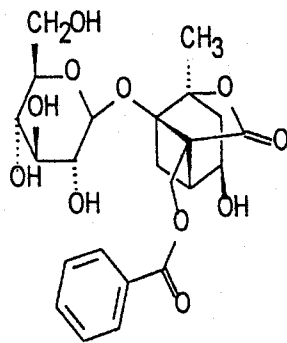
一般而言，芍藥因具緩解作用，可為緩和鎮痛劑，是以成為婦人科疾病的代表處方-「當歸芍藥散」中之主要成份，主治貧血、月經痛、神經衰弱症等。並為「葛根湯」、「大柴胡湯」、「溫經湯」、「芍藥甘草湯」、「四物湯」處方中不可缺少之藥材。中藥材品質的優劣，隨藥材的品種、產地、採收季節、生長年數、儲存時間、加工方法等不同而異。傳統上以藥材的外觀、氣味、產地、基源是其好壞，缺乏科學數據的證明。本研究利用高效能液相層析儀分析比較藥材中 gallic acid、oxypaeoniflorin、albiflorin、paeoniflorin、benzoic acid 及 paeonol 等成份的多寡，作為品質評估的參考。



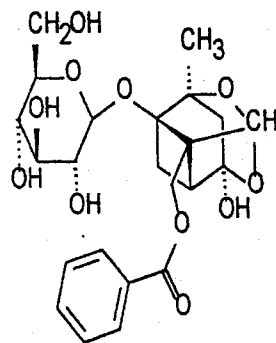
Gallic Acid (GA)



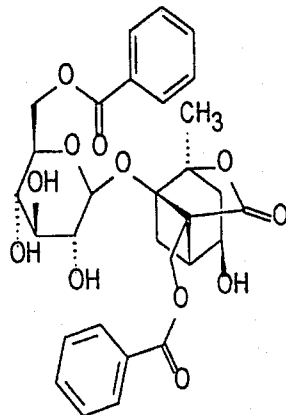
Oxypaeoniflorin (OPF)



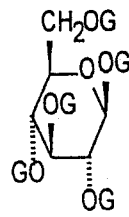
Albiflorin (AF)



Paeoniflorin (PF)

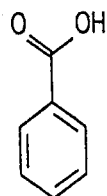


Benzoylalbiflorin (BAF)

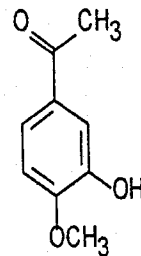


G = galloyl

Pentagalloylglucose (PG)



Benzoic Acid (BA)



Paeonol (PN)

芍藥之成份結構圖

二、實驗部分

7-1 藥品與儀器

7-1.1 藥品

Methanol, Acetonitrile: FISIONS LC 級

95% Ethanol: 台灣省菸酒公賣局

水: Millipore Milli-Q Reagent Water System 純化

磷酸二氫鉀: Nacalai tesque

7-1.2 儀器

超音波震盪儀: Elma Transsonic Digital

離心機: Hettich Universal, 其轉盤為 10 mL × 12

液相層析泵: Waters 510 × 2

注射閥: Waters U6K

流動相控制器: Waters 990 automated gradient controller

偵測器: Shimadzu SPD-M10AVP photodiode array detector

資料處理器: Shimadzu CLASS-LC10

宏碁 pentium-166 電腦

液相層析分析條件

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

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

三、檢量線與 UV 圖

1-1 標準品檢量線之製備

:

(1) 內標準品溶液：

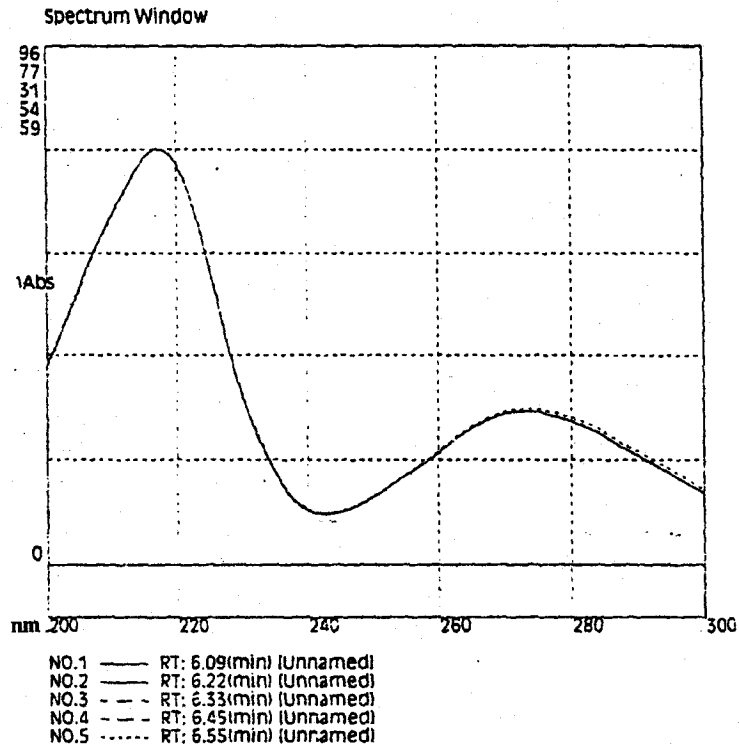
精秤 0.1g 之 caffeic acid 溶於 50% 乙醇溶液中，以量瓶配製成 50ml，作為內標準品溶液。

(2) 標準溶液：

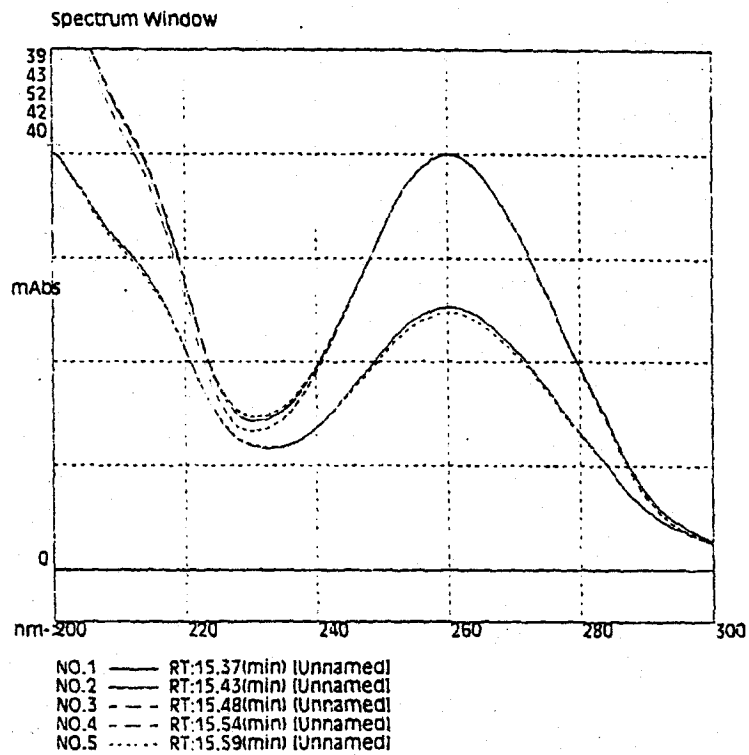
精秤 5.7mg gallic acid, 42.3mg oxypaeoniflorin, 26.8mg albiflorin, 92.4mg paeoflorin, 6.0mg benzoic acid, 28mg pentagalloylglucose, 16.7mg benzoylalbiflorin 溶於 50% 乙醇溶液中，以量瓶配成 50ml，作為標準品溶液。

(3) 檢量線與 UV 圖：

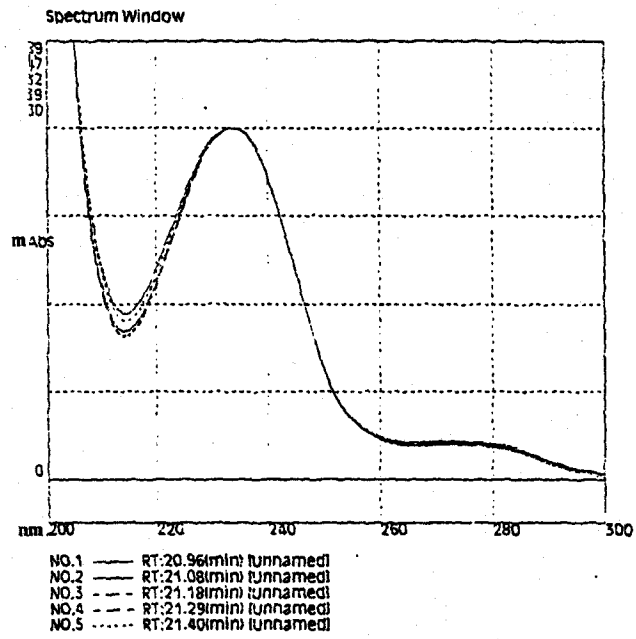
以吸量管分別吸取標準溶液 12ml, 8ml, 6ml, 4ml, 2ml, 1ml, 0.5ml, 0.2ml, 各加入內標準品 caffeic acid 溶液 2.5ml, 以 50% 乙醇溶液稀釋至 25ml, 以最佳分析條件注入 20ul, 重複注射兩次, 取平均值做檢量線。



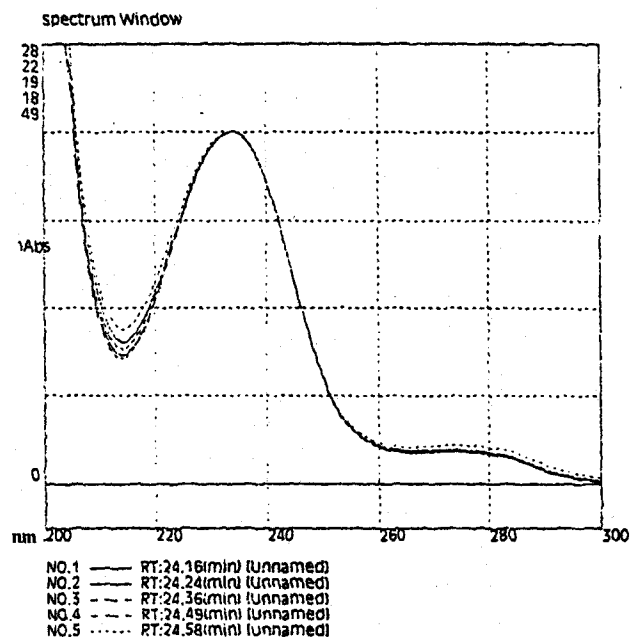
gallic acid 之 photodiode array UV 光譜圖



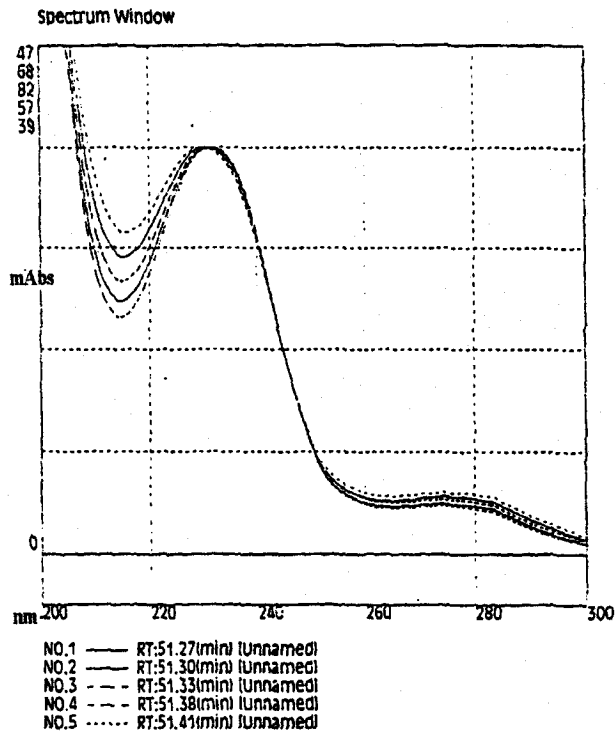
oxypaeoniflorin 之 photo diode array UV 光譜圖



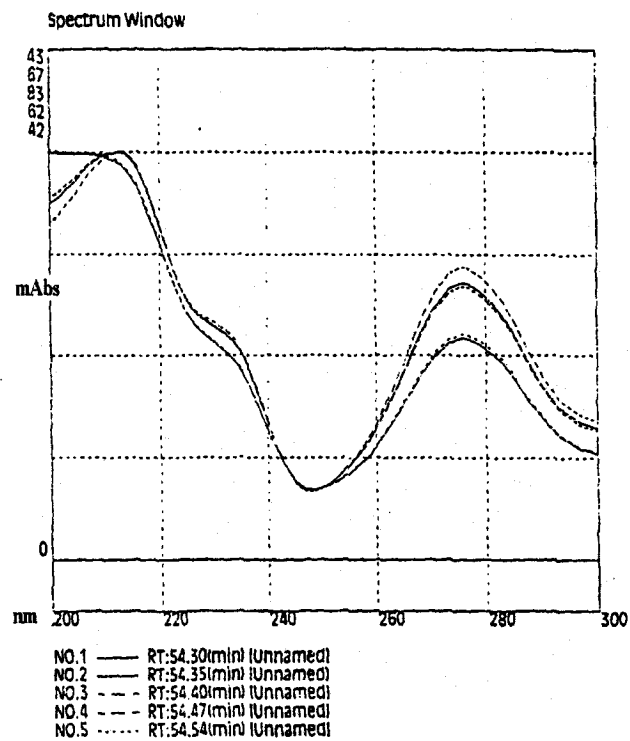
albiflorin 之 photodiode array UV 光譜圖



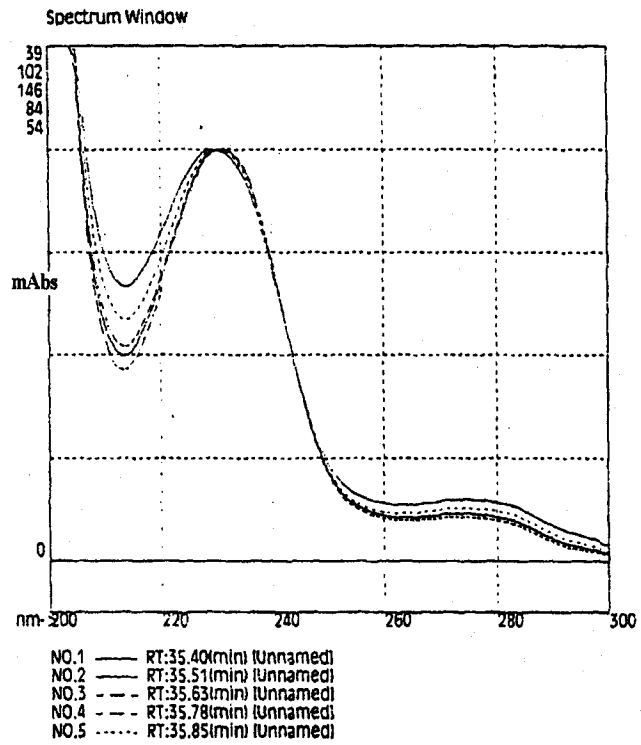
paeoniflorin 之 photodiode array UV 光譜圖



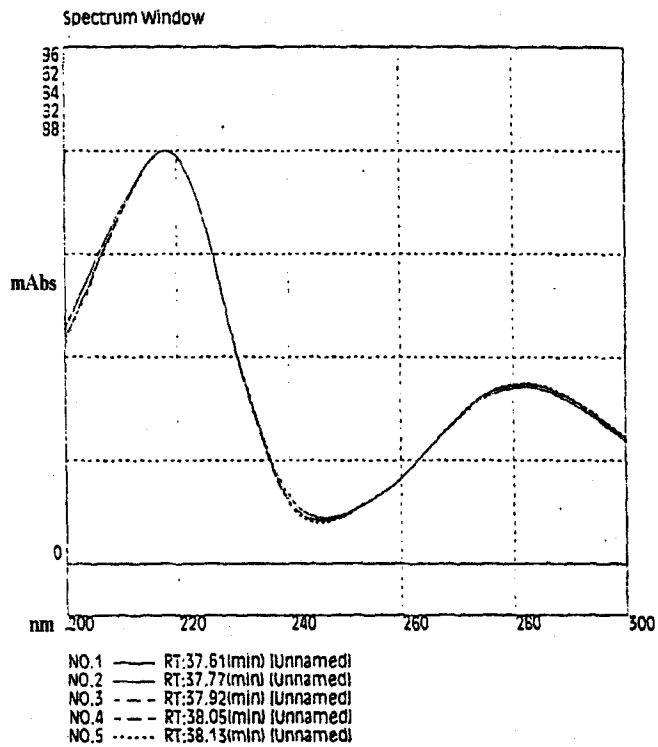
benzoylbiflorin 之 photodiode array UV 光譜圖



paeonol 之 photodiode array UV 光譜圖



benzoic acid 之 photodiode array UV 光譜圖



pentagalloylglucose 之 photodiode array

UV 光譜圖

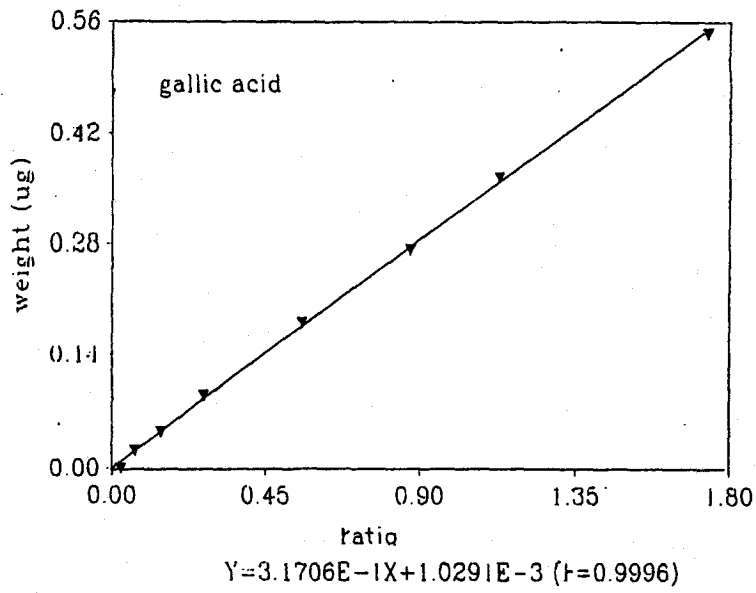


圖 III-3.1 gallic acid 之檢量線

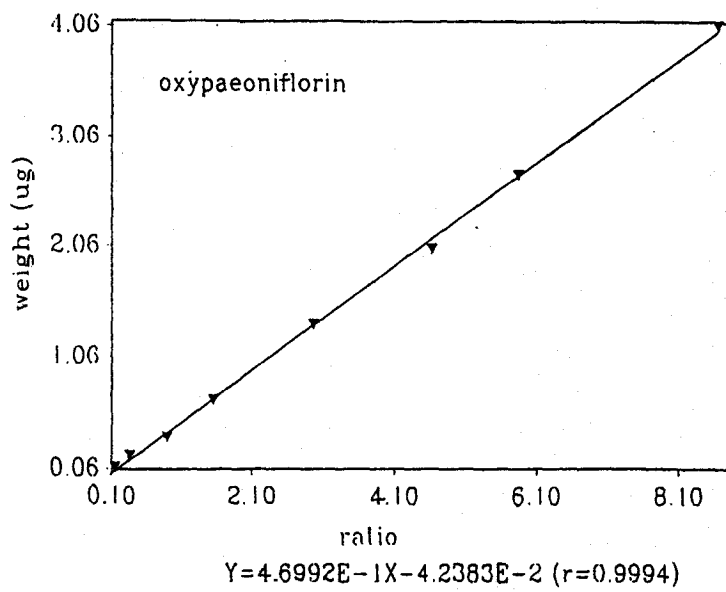


圖 III-3.2 oxypaeoniflorin 之檢量線

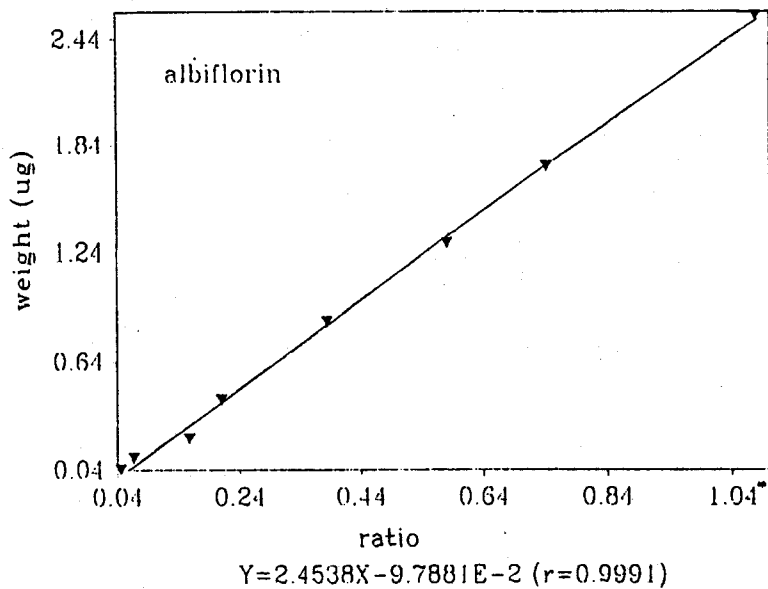


圖 III-3.3 albiflorin 之檢量線

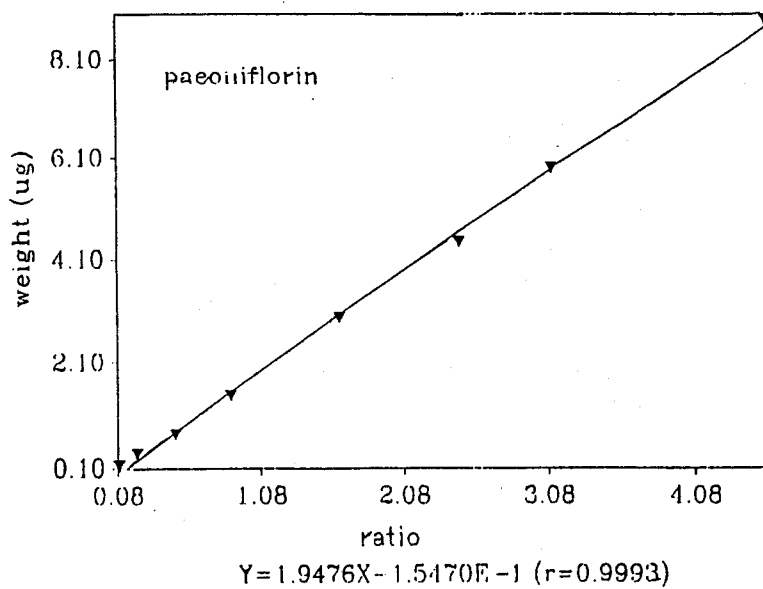


圖 III-3.4 paeoniflorin 之檢量線

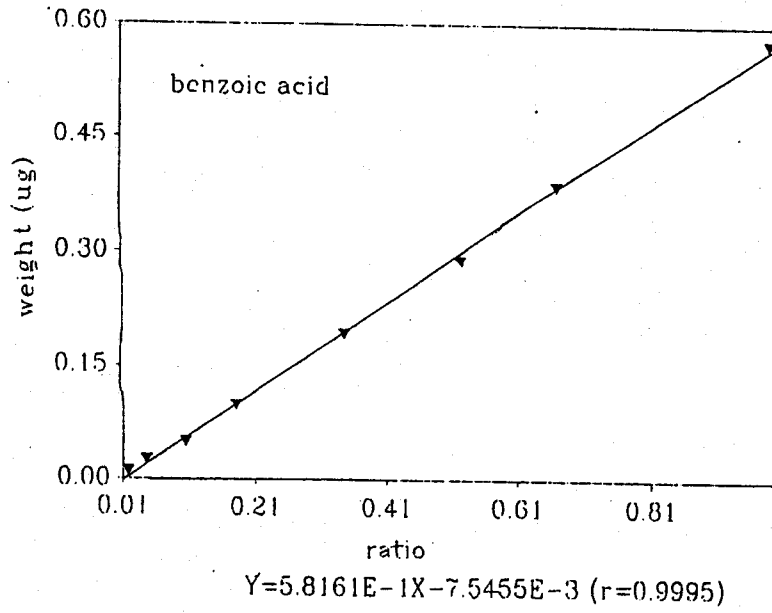


圖 III-3.5 benzoic acid 之檢量線

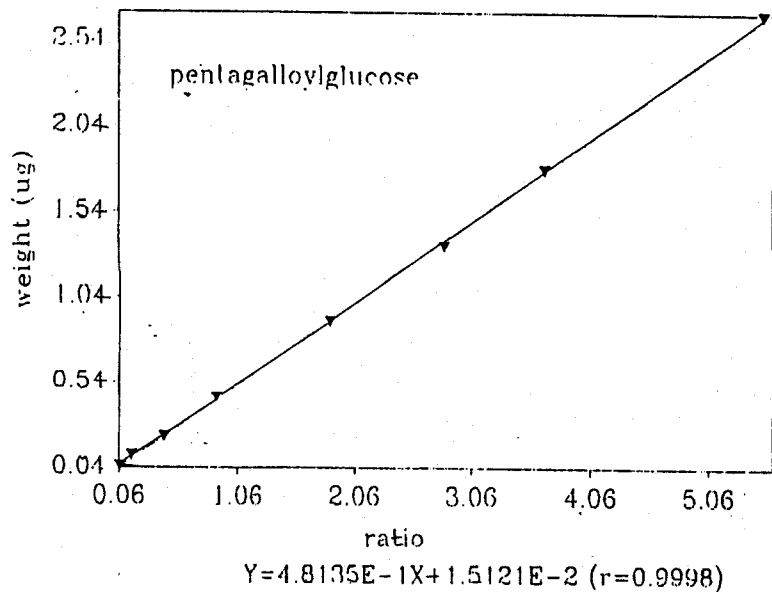


圖 III.3.6 pentagalloylglucose 之檢量線

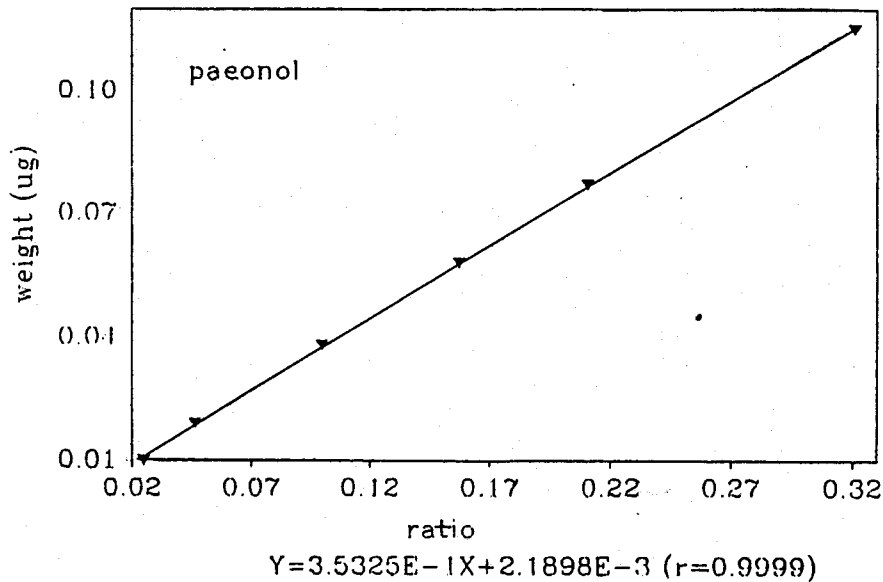


圖 III-3.7 paeonol 之檢量線

四、芍藥之安定性

(1)精稱 0.5g 的芍藥粉末數份，分別置於 37°C、45°C 及 55°C 的乾燥箱中，每三天取出一份樣品進行分析。此三個溫度各七批，七批、十批藥材（先將芍藥粉末分配好再置於乾燥箱中，最主要是考慮在設定的溫度下，會有一定量的水分会流失，若不先進行分配，則水分的流失量會造成很嚴重的定量誤差。為了將散失的水分散失的因素排除，因此採用先將藥材分配好的方式。）

(2)分析條件：

- 精稱1克芍藥，以70%甲醇20 mL作為萃取溶劑，攪拌30分鐘，離心過濾，重覆三次後集中全部的萃取液，經0.45 μ m過濾器過濾，作為檢液每次注入10 μ l；每次定量值，為兩次注射之平均分析結果。

- 流動相：

(A) KH_2PO_4 1.36g /10% H_3PO_4 / H_2O 500ml

(B) CH_3CN / CH_3OH = 80 /20 (v/v)

分析時間：60分鐘。

偵測波長：254nm

- 梯度沖提程式：

Time(min)	流速 (ml/min)	A%	B%	curve
Initial	1.0	90	10	linear
10	1.0	85	15	linear
20	1.0	80	20	linear
25	1.0	75	25	linear
30	1.0	70	30	linear
40	1.0	65	35	linear
50	1.0	0	100	linear
60	1.0	90	10	linear

- 所得層析圖如下：

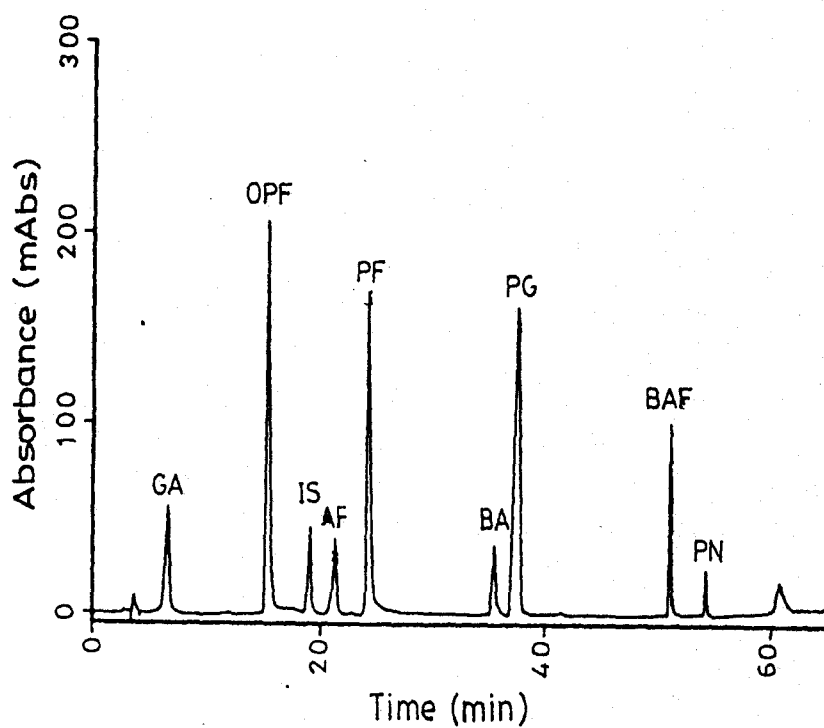


圖 III-2.6 標準品混合層析圖

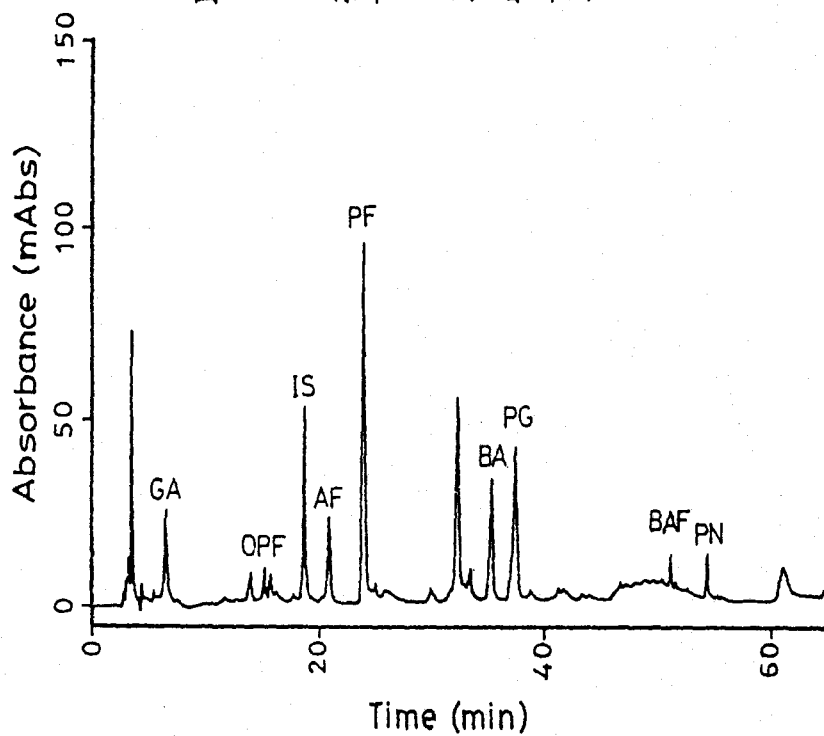


圖 III-2.7 白芍藥材層析圖

五、芍藥安定性之結果與討論：

(1) 本實驗針對芍藥的 gallic acid、oxypaeoniflorin、albiflorin、paeoniflorin、benzoic acid 及 paeonol 等成份的含量隨保存時間的變化來作探討。

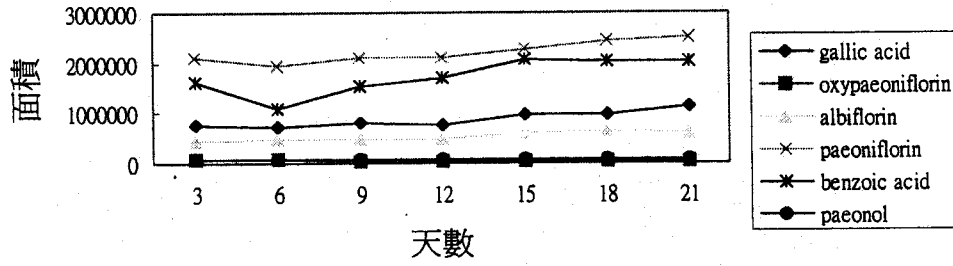
(2) 在 37°C 的實驗中我們發現各成分含量的變化並不趨於一致性。在加熱六天內，benzoic acid 的變化率較大，其餘各成分的變化率不大。

(3) 在 45°C 的實驗中我們發現，當加熱十二至二十一天時，benzoic acid、paeonol 及 paeoniflorin 成分的變化率較不尋常，且成分含量降低，但有一些未知成分的吸收峰出現，此可能為加熱過程中這些成分轉變成其他的物質。而這些物質的吸收峰會與藥材成分之吸收峰有重疊而造成定量上的誤差，然而由於各成分的變化量明顯，就算這些未知的吸收峰造成干擾，所影響的比例較小。

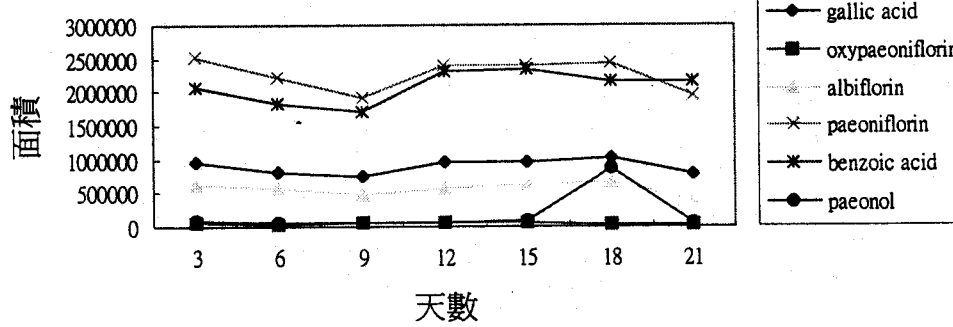
(4) 在 55°C 的實驗中我們發現，benzoic acid 及 aeoniflorin 成分的變化更急遽，其餘各成分的變化率不大。而 benzoic acid 成分的變化率較不尋常，此可能為加熱過程中這個成分中所含物質會因加熱時間不同而產生不同的變化。

(5) 比較 37°C、45°C 及 55°C 芍藥安定性的實驗發現，芍藥中 benzoic acid 及 aeoniflorin 成分的含量受溫度的影響很大，且溫度越高、時間越久其變化量也越大。整體觀察其變化的趨勢可知，加熱六天之後是變化最急遽的時刻，由此可知，若以加熱的方式來處理芍藥時，時間不宜超過六天。

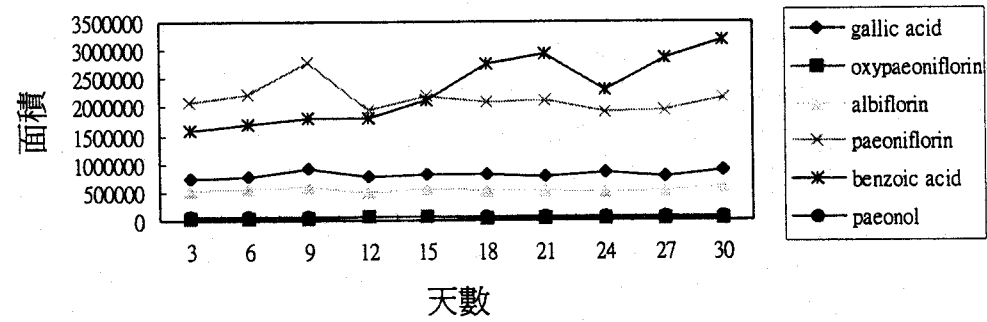
芍藥37°C之安定性



芍藥45°C之安定性



芍藥55°C之安定性



第四節 參考文獻

- [1] 許鴻源，「中藥材之研究」，第 311-313 頁，新醫藥出版社，台北，1980。
- [2] 許鴻源、陳玉盤、許順吉、許照信、陳建志、陳憲昌，「簡明藥材學」，第 78-81 頁，新醫藥出版社，台北，1985。
- [3] 徐國露、何宏賢、徐珞姍、金蓉鸞，「中國藥材學」，第 1074-1079 頁，中國醫藥科技出版社，北京，1996。
- [4] 黃泰康，「常用中藥成分與藥理手冊」，第 1315-1323 頁，中國醫藥科技出版社，北京，1994。
- [5] 劉飛白，「中國藥材集解」，第 205-208 頁，五洲出版社，台北，1984。
- [6] 顏焜熒，「常用中醫之藥理」，第 19-21 頁，中國醫藥研究所，台北，1970。
- [7] 同 ref 1，第 7-10 頁。
- [8] 張蘭昌，「中藥大辭典」，第 1161-1172 頁，昭人出版社，台北，1980。
- [9] 同 ref 3，第 1705-1710 頁。
- [10] N. Aimi, M. Inaba, M. Watanabe and S. Shibate, *Tetrahedron*, 25, 1825-38(1969).
- [11] N. Kaneda, Y. Iitaka and S. Shibate, *Tetrahedron*, 28, 4309-17(1972).
- [12] N. Makoto, Y. Takashi, N. Genichiro and N. Itsuo. *chem. Pharm. Bull.*, 20, 2850-2(1980).
- [13] S. Mineo, H. Toshimitsu, M. Naokata, K. Ikuko, K. Masayasu, K. Fumiyuki, N. Hiroshi, I. Yoichi and S. Ushio, *Tetrahedron Lett.*, 22, 3069-70(1981).

- [14] N. Naokata and Y. Takashi, Hokkaidoritsu Eisei Kenkyushoho
, 32, 60-1(1982); Chem. Abs., 100, 215592p(1982).
- [15] H. Lang, S. Li and X. Liang, Yaoxue Xuebao, 18, 551-2
(1983); Chem. Abs., 100, 82714f(1983).
- [16] H. Toshimitsu, S. Takako, S. Mineo, A. Munehisa, M.
Naokata, K. Masayasu, M. Satoka and K. Tohru,
Tetrahedron Lett., 26, 3699-702(1985).
- [17] S. S. Kang, K. H. Shin and H. J. Chi, Saengyak Hakhoecki
, 20, 48-9(1989); Chem. Abs., 111, 160062k(1989.)
- [18] H. Susumu, S. Kenji, K. Mayumi, M. Akiko and K. Kazuaki
, J. Chromatogr., 515, 653-8(1990).
- [19] Z. Li, S. Liu, P. Guo and S. Yang, Yaowu Fenxi Zaxhi,
10, 331-3(1990); Chem. Abs., 114, 88789v(1990).
- [20] S. Keiichi, M. Mitsuhiro, M. Tadao, S. Kazuhiko and M.
Taku, Shoyakugaku Zasshi, 46, 9-13(1992).
- [21] T. Keijiro and H. Masatoshi, Yakugaku Zasshi, 89, 893-8(1969).
- [22] T. Keijiro and H. Masatoshi, ibid., 89, 879-86(1969).
- [23] T. Keijiro and H. Masatoshi, ibid., 89, 887-92(1969).

第八章 結論與建議

不同基原的同名藥材常有不同的醫療目的，因此確定選用地道藥材是中醫品質控管的第一要務。原料藥材的基原可以用組織鏡檢和DNA比對來判別，但這些方法卻都不適用於民眾服用最直接的煎煮液或製劑。本研究結果顯示，常用芍藥、黃連、吳茱萸藥材的基原或成熟度在複方製劑中亦可明確辨識：赤芍 (*Peaonia vitthii* Lynch) 是活血祛瘀藥，白芍 (*Peaonia lactiflora* Pall. = *P. albiflora* Pall.) 是補血藥，赤芍幾乎看不到 albiflorine 的存在，白芍有明顯吸收峰；日連 (*Coptidia japonica* Makino) 用於日本漢方藥，川連 (*C. chinenses* Franch) 和雅連 (*C. deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao) 為中華藥典正品，日連看不到 epiberberine，川連雅連存在顯著；吳茱萸因成熟度的不同而分開口與閉口兩類樣品，一般認為開口者品質較佳，分析結果顯示，開口者 evodiamine 之含量高於 dehydroevodiamine，閉口者反之。

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

芍藥	$\frac{\text{Albiflorine}}{\text{paeoniflorine}} = R$	$R \approx 0$ 赤芍
		$R \neq 0$ 白芍

