

高效液相層析法應用於中藥方劑之多成分同時分析技術之開發

屏東科技大學 農園生產系 副教授 賴宏亮

分機：6345 layhl@mail.npust.edu.tw

中藥產品之優劣取決於品質與有效性，要推動中草藥之發展，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。行政院衛生署公告自民國九十年元月一日起，申請葛根湯、小青龍湯、加味逍遙散、桂枝湯、甘露飲、麻杏甘石湯、補中益氣湯、六味地黃丸、黃連解毒湯、獨活寄生湯等十方濃縮製劑，於民國九十二年二月一日起再公告增加知柏地黃丸、龍膽瀉肝湯、辛夷清肺湯、血府逐瘀湯、杞菊地黃丸、消風散、清心蓮子飲、四逆散、定喘湯、柴葛解肌湯等十個方劑，另在95年8月23日公告「增列炙甘草湯、八味地黃丸、川芎茶調散、逍遙散、藿香正氣散、香砂六君子湯、荊防敗毒散、疏經活血湯、止嗽散、濟生腎氣丸、防風通聖散、二陳湯、六君子湯等13個方劑，上述各濃縮製劑之國產及輸入新案藥品查驗登記及藥品許可證有效期間展延時，應依附件「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」檢附相關資料辦理，未能檢附該項資料者，新案無法獲准查驗登記，藥品許可證有效期限不得展延。「中藥濃縮製劑制訂指標成分定量法及規格注意事項」中，規定每一處方中應選擇來自不同原料藥之二種以上指標成分予以定量，目前雖只公告上述葛根湯等33個方劑須作指標成分之定量，但這是將來中草藥發展之必然趨勢。

因此，本研究室致力於開發各種不同方劑及不同劑型之HPLC成分分析方法。首先利用各種不同分離材質(如silica gel、sephadex LH-20等)之管柱層析法(column chromatography)，或製備型薄層層析法(thin layer chromatography)進行指標成分之單離純化及結構式鑑定，同時開發各種指標成分HPLC分析方法，並經同日間(inter-day)、異日間(intra-day)及回收率(recovery)等確效試驗之驗證，開發安定性、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，提高定量之效率，並建立標準操作程序(SOP)及檢驗標準，達到品質管制之目的，以確保醫療用製劑之有效性及安全性。過去曾發表相關方劑之開發HPLC分析方法成果，舉例分述如下：

① 平胃散中多成分同時分析之研究

以平胃散為模式藥，使用HPLC進行其濃縮製劑之多成分同時分析之研究。開發出甘草中glycyrrhizin，陳皮中hesperidin，nobiletin，3',4',3,5,6,7,8-heptamethoxyflavone，5-hydroxy-3',4',6,7,8-pentamethoxyflavone，tangeretin及厚樸中honokiol，magnonol等八種指標成分之多成分同時定量分析方法。各種市售濃縮製劑抽出之試料通過保持在30°C恒溫之HPLC層析管(Inertsil ODS-80A 5 μm, 4.6 mm I.D.×250 mm)，移動相採用20%及70% acetonitrile，進行梯度沖提法，流速為1.0 mL/min，檢測波長依滯留時間的不同，分別設定0~19 min為275 nm；19~80 min為250 nm。



2 紫雲膏中多成分同時分析研究

以傳統中藥軟膏製劑之紫雲膏為研究材料，進行HPLC之成分分析，開發出紫草中shikonin，deoxyshikonin， β,β -dimethylacrylshikonin，acetylshikonin及當歸中ferulic acid等五種指標成分之多成分同時定量分析方法。紫草、當歸等藥材經麻油萃取後，添加黃蠟製成之紫雲膏成品，以n-hexane及methanol二種溶媒，進行分配層析並取methanol層為HPLC分析之樣品。HPLC分析條件之固定相為Inertsil ODS-2, 4.6 mm I.D.×250 mm，溫度設定為30°C，移動相採用methanol、acetonitrile及2% acetic acid之混和溶液，進行梯度沖提法，流速為1.0 mL/min，檢測波長依滯留時間的不同，分別設定0~25 min為325 nm；25~58.5 min為525 nm；58.5~62 min為440 nm；62~80 min為525 nm。

3 金門龍鳳藥酒之成分分析及品質管制之研究

以常用藥酒製劑之金門龍鳳酒為研究材料，進行HPLC之成分分析，開發出五味子中gomisin A，schizandrin、山茱萸中loganin、肉桂中cinnamic acid，cinnamaldehyde及當歸中scopoletin，ferulic acid等七種指標成分之多成分同時定量分析方法。金門龍鳳酒之檢品溶液，通過保持在30°C恒溫之HPLC層析管(Inertsil ODS-2, 4.6 mm I.D.×250 mm)，移動相為20%及70% acetonitrile之混和溶液，進行梯度沖提法，流速為1.0mL/min，檢測波長設定250 nm。

5 液相層析法對萬應膏貼劑中十種成分之同時分析研究

在外用製劑中常用之萬應膏貼劑為研究材料，進行HPLC之成分分析，開發出肉桂中cinnamic acid、cinnamaldehyde、白芷及羌活中isoimperatorin、當歸中ferulic acid、芍藥中paeoniflorin、甘草中glycyrrhizin、元參中harpagoside及大黃中emodin，sennoside A，sennoside B等十種指標成分之多成分同時定量分析方法。同時以水性基劑及油性基劑等不同製程，探討對萬應膏品質之影響。萬應膏之檢品溶液，通過保持在30°C恒溫之HPLC層析管(Inertsil ODS-2, 4.6 mm i.d.×250 mm)，移動相採用20%及70% acetonitrile之混合溶液，進行梯度沖提法，流速為1.0 mL/min，檢測波長設定250 nm。

4 液相層析法對鼻良湯製劑中九種成分之同時分析研究

以鼻良湯為研究材料，進行HPLC之成分分析，開發出川芎中ferulic acid、芍藥中paeoniflorin、甘草中glycyrrhizin、肉桂中cinnamic acid，cinnamaldehyde、葛根中puerarin，daidzin及黃芩中baicalin，baicalein等九種指標成分同時定量分析方法。鼻良湯之檢品溶液，通過保持在30°C恒溫之HPLC層析管(Inertsil ODS-2, 4.6 mm I.D.×250 mm)，移動相為20%，50%及90% acetonitrile之混和溶液，並用磷酸調整pH值為3.0，進行梯度沖提法，流速為1.0mL/min，檢測波長設定230 nm。

6 液相層析法對如意金黃散貼劑中九種成分之同時分析研究

以如意金黃散貼劑為研究材料，進行HPLC之成分分析，開發出黃柏中berberine、薑黃中curcumin、獨活中imperatorin、厚朴中magnolol、陳皮中hesperidin、甘草中glycyrrhizin、及大黃中emodin，sennoside A，sennoside B等九種指標成分之多成分同時定量分析方法。同時以水性基劑及油性基劑等不同製程之貼片，探討對如意金黃散品質之影響。如意金黃散之檢品溶液，通過保持在30°C恒溫之HPLC層析管(Inertsil ODS-2, 4.6 mm I.D.×250 mm)，移動相為20%及70% acetonitrile之混和溶液，進行梯度沖提法，流速為1.0mL/min，檢測波長依滯留時間的不同，分別設定0~72min為250nm、72~105min設定為250 nm、105~145min設定為220 nm。

參考文獻

1. Horng-Liang Lay, Chien-Chih Chen. 2000. Simultaneous Analysis of Eight Components in "Pin-Wei-San" by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 23: 1439-1450.
2. Horng-Liang Lay, I-Jen Shih, Chih-Ho Yeh, Chwan-Fwu Lin and J-Wen Liang. 2000. Simultaneous Determination of Five Constituents in "Tzyy-Yun-Gau" Medicine by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* 8: 304-308.
3. Horng-Liang Lay, Shio-Chyn Huang, Chia-Chi Chen and Tian-Shung Wu. 2002. Studies on the component analysis and quality control in tonic wine preparation of King-Mon-Long-Fong-Jyo. *Journal of Food and Drug Analysis* 11: 201-208.
4. Horng-Liang Lay, Chia-Chi Chen and Shu-Tuan Chiang. 2004. Simultaneous Analysis of Nine Components in "Byi-Liang-Tang" Preparation by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* 12: 115-119.
5. Horng-Liang Lay, Chia-Chi Chen, Shio-Chyn Huang, Thau-Ming Cham, and Tian-Shung Wu. 2005. Simultaneous Analysis of Ten Components in patch preparation of Wan-Yin-Gau by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis* 13:118-124.
6. Horng-Liang Lay, Chia-Chi Chen, Shio-Chyn Huang, Thau-Ming Cham, Tian-Shung Wu, I-Hsin Lin. 2010. Simultaneous Analysis of Nine Components in Patch Preparation of Ru-Yi-Jin-Huang-San by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Natural Medicines* 64: 194-202.