

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

毛細管電層析之應用研究

Study of Capillary Electrochromatography

計畫編號：NSC 88-2113-M-009-002

執行期限：87年8月1日至88年10月31日

主持人：謝有容

執行機構：國立交通大學應用化學系

E-mail:yzhsieh@cc.nctu.edu.tw

一、中文摘要

毛細管電泳之微胞電動層析方法具有毛細管電泳的高分離效率、高解析度及短分析時間，同時提高對中性及疏水性化合物的分析能力，將毛細管電泳分析中移動率很接近之化合物，利用其疏水性不同而分離。

本計劃應用微胞電動層析方法分析七種中藥複方，包括柴胡桂枝湯、小柴胡湯、真武湯、四逆湯、苓桂朮甘湯、苓薑朮甘湯、小半夏加茯苓湯，並分析鑑定市售之科學中藥。

關鍵詞：毛細管電泳、微胞電動層析

Abstract

The techniques of micellar electrokinetic chromatography for analyzing seven traditional Chinese medicinal preparations were developed under this study. In order to have a better understanding how different experimental setups affect separation performance; various pH, SDS and buffer concentrations were examined. The analytes were successfully separated at the optimized

separation conditions.

Keywords: Capillary electrophoresis, Micellar electrokinetic chromatography

二、利用微胞電動層析方法分析柴胡桂枝湯與小柴胡湯

(一) 目的

『柴胡桂枝湯』與『小柴胡湯』為中藥複方中極常使用之湯劑，根據日本研究中國醫藥之最大團體—東洋醫學會於1990年對日本西醫師中研究漢方者作問卷調查所公布的結果，「頻用製劑」一項中指出小柴胡湯與柴胡桂枝湯分別為(第一)及(第八)常用之中藥湯劑。

小柴胡湯主要由柴胡、半夏、生薑、黃芩、大棗、人蔘、甘草等七種單味藥材所組成，初見於傷寒論及金匱要略，為治療傷寒少陽病的主方，其功用為和解少陽、扶正祛邪，以現代醫學觀點解釋，則小柴胡湯主治感冒、支氣管炎、肋膜炎、傷寒發熱、心煩微嘔、食慾不振等症狀。

柴胡桂枝湯為小柴胡湯與桂枝湯之合方，在張仲景所著之傷寒論與金匱要略中均有收載，在藥材成份組成上除了小柴胡

湯所含之七味藥材外，另加有桂枝與芍藥，因此在效用與小柴胡湯也有相似之處。柴胡桂枝湯主治傷寒發熱、懼寒症、支節痠煩、微嘔、心腹卒痛等症狀。

本研究發展一微胞電動層析方法同時測定柴胡桂枝湯與小柴胡湯中九種藥材的十二種分析物，並探討各種分離條件對分析物移動行為的影響。此外也探討不同的萃取條件及不同廠牌的濃縮中藥中分析物含量的差異。

(二) 結果與討論

(1) 分析波長的選擇

本研究綜合十二種分析物的 UV 光譜吸收資料，並考慮 UV 光譜在波長 200 nm 以下時背景訊號較大等因素，我們將偵測器的偵測波長設在 200 nm 及 250 nm 以進行毛細管電泳實驗。

(2) pH 值對分析物移動行為的影響

因柴胡皂苷 A、芍藥苷、薑辣素及桂皮醛等四種分析物在 pH = 8.2~10.0 未添加任何修飾劑的條件下，其移動速度和電滲流相近，無法得到任何分離效果，因此在探討 pH 值對分析物移動行為的影響時，我們在不同 pH 值的緩衝溶液中添加 10 mM SDS，以期能將五種分析物分離，如此可充分的觀察各分析物受 pH 值變化影響的結果。芍藥苷、黃芩素及與尿黑素等三種分析物在 pH = 9.3 至 pH = 10.0 的範圍之間，電泳速率明顯的加快，原因應是此三種分析物在 pH \geq 9.3 的環境中解離度變大，帶電荷數目增加，因此電泳速率較快。另外，漢黃芩素在 pH = 8.0 至 pH = 9.3 的環境中，其電泳速率有隨 pH 值增加而持續減小的現象，而薑辣素的行為表現與漢黃芩素分析物相似。除以上五種分析物，其餘七種分析物在不同 pH 值環境下，移動速率均無明顯改變。根據實驗的結果，我們選擇了 pH=8.0 及 pH=9.3 兩個條件同時進行下一步驟的實驗。

(3) SDS 濃度對分離的影響

在 pH=9.3 的實驗條件下，添加不同濃度 SDS 會影響各分析物分離的結果，芍藥苷、黃芩素、漢黃芩素及桂皮醛等四種分析物的移動時間隨著 SDS 濃度的增加而增加，顯示 SDS 微胞與這四種分析物之間的作用力會隨著界面活性劑濃度的增加而加大。薑辣素、人蔘皂苷 Rg1、柴胡皂苷 A 等三種分析物在低 SDS 濃度條件下可分離成三支獨立的波峰，但隨 SDS 濃度的增加，彼此移動時間的差距逐漸減少，當 SDS 濃度達 40mM 時，薑辣素與人蔘皂苷 Rg1 的移動時間已互相重疊，而 SDS 濃度達 60mM 以上時，三種分析物的移動時間更已完全一致。據此推測柴胡皂苷 A 分子與 SDS 微胞間的作用力固定且為三種分析物中較強者，而薑辣素、人蔘皂苷 Rg1 和 SDS 微胞之間的作用力則會隨 SDS 濃度增加而加強，最後所受作用力與柴胡皂苷分子近似而有相同的移動時間。

在 pH = 8.0 的條件下，受 SDS 濃度增加的影響，各分析物之移動時間的變化趨勢與在 pH=9.3 環境下的結果相似，所不同者為漢黃芩素在 pH = 8.0 的環境中時，隨 SDS 濃度的增加，與薑辣素、人蔘皂苷 Rg1、柴胡皂苷 A 等分析物彼此間的解析度即不斷降低，至 SDS 濃度 40 mM 時四種分析物的波峰訊號已相互重疊而不可分。芍藥苷的移動時間明顯隨 SDS 濃度增加而變大，因此可增加 SDS 濃度以改善芍藥移動時間與電滲流訊號太接近的情況；但增加 SDS 濃度同時也會降低某些分析物之間的解析度。最後，我們挑選 pH = 9.3、SDS 10 mM 的條件作為尋求最適化分離條件的基礎。

(4) 緩衝溶液濃度對分離的影響

緩衝溶液濃度的高低可影響電滲流速度的大小，當緩衝溶液濃度高時，因則塔電位降低使電滲流速度變慢，造成各分析物移動速度受電滲流影響程度降低，因此

各分析物之間電泳速率的差異可更加突顯，使彼此移動時間的差距加大，當緩衝溶液濃度達 36 mM 時，已可完全分離分析物。

(5) 最適化分離條件

考慮十二種分析物分離時間長短及各分析物間的解析度，最後我們選擇 pH = 9.3, 10 mM SDS、36 mM Borax-NaOH 緩衝溶液的條件作為最適化分離條件。十二種分析物可在 13 分鐘內可被適當分離，且分析物移動時間之相對標準偏差皆低於 0.55%，各分析物檢量線之相關係數均大於 0.996，而偵測極限則介於 0.88 至 28.70 $\mu\text{g/ml}$ 之間(S/N=3)。此結果顯示本實驗所建立之 MEKC 方法具有高精密度，高解析度及快速分析之優點，因此本研究將以此條件進行濃縮中藥湯劑之分析。

(6) 實際樣品的萃取與特定成份的測定

在本研究中，利用超音波振盪以乙醇水溶液(70/30)直接萃取實際樣品，經過濾並濃縮至乾後以乙醇水溶液(70/30)溶解、稀釋至適當濃度後即可直接注入毛細管分離，方法簡單快速，並可避免分析物的流失。柴胡桂枝湯經過萃取、過濾、濃縮、注射之後的電泳層析圖，圖中缺少桂枝酸或桂皮醛、尿黑素之特徵吸收峰，原因可能是實際樣品中含量太少所造成的結果。十二種中藥成份的回收率與相對標準偏差，其中黃芩苷、柴胡皂苷 A 及尿黑素等三種分析物之回收率略嫌偏低，其餘分析物之回收率則都在 80% 以上，各分析物回收率之相對標準偏差值皆小於 4.7%。不同品牌的濃縮中藥湯劑在相同分析物的含量上有相當的差異，此結果可能是由於藥材來源、製程、配方中藥材比例不同等等差異所造成，由此更能體認品質管制對於濃縮科學中藥的重要性。

(三) 結論

同時測定中藥複方中每一藥材的指標

成份是相當不容易的，此不僅是因為中藥湯劑本身基質的複雜性，不同藥材的指標成份濃度差異過大時亦會對指標成份的萃取造成障礙。本研究利用含 10 mM SDS 的硼酸鹽緩衝溶液所建立的 MEKC 方法，可以在短時間內同時分析柴胡桂枝湯及小柴胡湯中之指標成份，搭配相當簡單的萃取步驟便可應用於柴胡桂枝湯及小柴胡湯中藥的研究與品質管制。

三、利用環糊精修飾微胞電動層析法(CD-MEKC)分析真武湯、四逆湯、苓桂朮甘湯、苓薑朮甘湯、小半夏加茯苓湯

(一) 目的

真武湯、四逆湯、苓薑朮甘湯、苓桂朮甘湯與小半夏加茯苓湯等五種常用複方，組成藥材較少但成份部分重複，共由生薑(乾薑)、甘草、白朮、附子、茯苓、芍藥、桂枝、半夏等八味藥材分別組成。本研究之目的地為建立一 CD-MEKC 方法，可同時適用於此五種中藥複方八個指標成份之定性與定量的分析方法。並對緩衝溶液之 pH 值、SDS、 γ -CD 濃度對分析物移動行為之影響進行討論，並探討不同萃取溶劑之萃取效率，最後以此建立之 CD-MEKC 方法分析不同的科學中藥湯劑。

(二) 結果與討論

(1) 分析波長的選擇

本研究所選定之八種分析物，最大吸收均接近 200 nm，而甘草酸最大吸收波長則在 256 nm，因此在尋求最適化分離條件時，偵測波長設定為 200 nm；當實際樣品進行定量分析時，偵測波長則設定在 200 nm 及 256 nm。

(2) pH 值及 SDS 濃度對分析物分離的影響

由於在實驗之 pH 值範圍內，使用純粹 CZE 並不能完全將八種藥物成份與電滲流

的訊號分離，因此我們在緩衝溶液中分別預先加入特定濃度之界面活性劑，將所有分析物和電滲流訊號分開，然後再進行 pH 值變化對分析物分離情況影響的探討。在考量適當的解析度及分離時間等前提下，我們選擇 pH = 9.0 的條件進行下一步驟的實驗。

八種分析物在 pH=9.0 的環境下，與不同濃度 SDS 作用的移動時間變化趨勢顯示出尿黑素、桂枝酸與甘草酸三種分析物在不同 SDS 濃度的環境下，其移動時間僅有少許變化。芍藥、桂皮醛、薑辣素、蒼朮素與烏頭鹼等五種成份的移動行為均因 SDS 的加入而明顯改變，移動時間大幅延長，其中又以蒼朮素與烏頭鹼兩者的移動行為變化較為特異，但大致上皆是與分析物的厭水性質有關。在考慮分析物分離時間長短的前提下，我們選擇 pH = 9.0、SDS 40 mM 的條件作為進一步改善分析物分離的基礎。

(3) 環糊精對分析物分離的影響

未衍生的環糊精因不帶電荷，不受電場作用，因此與電滲流有相同的移動速度，若分析物與環糊精形成主客複合體，則分析物在環糊精的作用下也會向電滲流的波峰位置靠近，因此帶負電荷的分析物若受環糊精作用將可縮短其移動時間。為將蒼朮素與烏頭鹼分離，我們嘗試在緩衝溶液中分別添加環糊精(CD)，以瞭解環糊精對此兩種分析物分離的影響，實驗結果顯示添加 5 mM γ -CD 時，蒼朮素與烏頭鹼已經分離並且不會對薑辣素造成干擾，而桂枝酸和尿黑素之間的解析度仍相當好，因此最後我們選擇 pH=9.0、SDS 40 mM、 γ -CD 5 mM 的條件做為最適化分離條件。

(4) 最適化分離條件

在最適化分離條件下，八種分析物的分離電泳圖譜均有相當好的解析度。八種中藥指標成份分析物在 11 分鐘內可被適當分離，且各分析物移動時間之再現性均非

常的好，其移動時間的相對標準偏差皆低於 0.27%。檢量線之相關係數均大於 0.996，而偵測極限則介於 1.41 至 17.34 $\mu\text{g/ml}$ 之間(S/N=3)。此結果顯示本實驗所建立之 CD-MEKC 方法具有高精密度、高解析度及快速分析之優點，因此本研究將以此最適化分離條件進行濃縮中藥複方湯劑之分析。

(5) 實際樣品的萃取與特定成份的測定

在本研究中，實際樣品的萃取是利用超音波振盪的方式進行，萃取之溶劑為乙醇水溶液(70/30)。經萃取、過濾、減壓濃縮至乾等步驟後，再以乙醇水溶液(70/30)溶解固態萃出物並稀釋至適當濃度後即可直接注入毛細管進行分離，方法簡單快速，並可避免分析物的流失。真武湯實際樣品的電泳層析圖中可清楚測定出的指標成份為芍藥與薑辣素，另外蒼朮素與烏頭鹼因受基質干擾而無法確認。

本研究八種中藥指標成份的回收率與相對標準偏差，其中桂枝酸之回收率略嫌偏低(77.04%)，其餘分析物之回收率則都在 80%~108%之間，各分析物回收率之相對標準偏差值皆小於 4.3%。回收率實驗的進行是以分析物標準品分次添加於濃縮小半夏加茯苓湯中，以萃取實際樣品之步驟重複萃取後再進行毛細管電泳分離並定量，至於添加量則取先前經分析測得濃縮小半夏加茯苓湯中所含分析物的含量為依據。

實際樣品中各分析物的含量與相對標準偏差，其中蒼朮素與烏頭鹼因受基質干擾而難以確認因此無法定量。由表 6. 可看出不同品牌的濃縮中藥湯劑在相同分析物的含量上有相當的差異，如不同品牌之四逆湯所含薑辣素含量可相差近 6 倍，此結果可能是由於藥材來源、製程、配方中藥材比例不同等等差異所造成。由表 9. 看出相對標準偏差範圍介於 1.43%~6.06%，這種變化可能是因濃縮中藥粉末本身均勻性不足，或是實際樣品不同的基質所造成的結果。

(三) 結論

本研究發展一環糊精修飾微胞電動層析方法，進行真武湯、四逆湯、苓桂朮甘湯、苓薑朮甘湯、小半夏加茯苓湯等五種中藥複方中指標成份之分析。利用包含 40 mM SDS 及 5 mM γ -CD 的硼酸鹽之緩衝溶液，可在 11 分鐘內將這些分析物完全分離。整體而言，微胞電動層析法適用於分析這五種中藥複方，並可應用於這些中藥的研究與科學中藥的品質管制。