

玄參藥材中高極性成分之分離及高效 液相層析定量研究

林哲輝 顧祐瑞 黃韻笙 顏芳玫 溫國慶 *黃文鴻

行政院衛生署藥物食品檢驗局

*陽明大學 衛生福利研究所

摘 要

本研究選擇玄參藥材中高極性，可使用高效液相層析分析，在紫外線波長278nm具有吸收之成分，探討分離新方法。分離純化而得之2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranoside (SN-A)，harpagoside(SN-B)及cinnamic acid(SN-C)三成分作為指標成分，利用高效液相層析儀探討其定量方法，並調查市售玄參藥材之指標成分含量。

高效液相層析法使用逆相層析管柱(Cosmosil 5C₁₈-AR)，移動相為乙腈及1.0%醋酸溶液，採線性梯度沖提[15:85 $\rightarrow$ 27:73 (44 min)]，以SN-A(20 $\sim$ 150 μ g/ml)，B(5 $\sim$ 50 μ g/ml)及C(20 $\sim$ 200 μ g/ml)做為對照用標準品。其線性迴歸方程式及相關係數(r)分別為SN-A: $Y=14.58X+11.25$ ($r=0.9907$)；SN-B: $Y=2.26X-0.40$ ($r=0.9994$)；SN-C: $Y=14.12X-29.28$ ($r=0.9981$)，均呈良好線性關係。三種指標成分之回收率，均在100 $\pm$ 4%之內。同日内及異日間相對標準偏差試驗，其同日内為0.93 $\sim$ 1.01%，異日間為0.28 $\sim$ 1.97%，顯示高效液相層析法用於玄參指標成分之分析，具良好之再現性及準確性。

測定市售玄參藥材中三種指標成分之含量。結果SN-A之含量平均為0.30%(0.05% $\sim$ 1.71%)，含量高低相差34倍；SN-B之含量平均為0.06%(未檢出 $\sim$ 0.17%)；SN-C之含量平均為0.25%(0.06% $\sim$ 0.53%)，含量高低相差9倍。顯見各成分之含量分布範圍甚大，以SN-A相差34倍最高，而有一件藥材未檢測出SN-B成分。

關鍵詞：玄參，指標成分分離，哈巴俄苷，高效液相層析。

前 言

玄參(*Scrophulariae Radix*)，別名元參、黑參，係玄參科(*Scrophulariaceae*)植物玄參(*Scrophularia ningpoensis*)或北玄參(*S. buergeriana*)的乾燥根。神農本草經列入中品，性微寒，味苦鹹，其功能為滋陰降火，除煩止渴，利咽喉，潤燥滑腸，治咽喉腫痛、癰腫，亦有用作滋養藥^(1,2,3)。口服玄參之煎劑對狗之腎型

高血壓有降壓作用；此外玄參亦有抗菌、降血糖及解熱等藥理作用之報告⁽²⁾。

有關玄參成分之研究已有多篇報告，所分離之成分，如由 *S. buergeriana* 分離出harpagoside及harpagide⁽⁵⁾；由 *S. ningpoensis* 亦分離出harpagoside，harpagide^(6,7)以及其他成分如2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-

glucopyranoside⁽⁶⁾, ningpogenin, ningpogenin A, ningpogenin B, aucubin及6-O-methylcatalpol⁽⁷⁾等;由類緣植物*S. ilwensis*分離出iridoid, 如karsoside, scropolioside D及其他成分如phenylpropanoid glycoside(angoroside C), flavonoid(querctin-3-O-rutinoside, kaempferol-3-O-rutinoside)⁽⁸⁾;由*S. spicata*分離出scrospioside A、B, harpagoside及p-methoxycinnamic acid⁽⁹⁾。有關其品質鑑定早期使用呈色反應(環烯醚萜苷反應)及薄層層析法^(2,4)。後來有Guillerault報告⁽¹⁰⁾應用高效液相層析法,分析*Harpagophytum procumbens*植物及其市售萃取物中之harpagide、harpagoside及8-p-coumaroyl harpagide等成分。惟有關玄參中成分之含量分析則尚無報告。

本研究選擇玄參藥材中極性高,可用紫外線波長278nm偵測之成分,探討分離新方法並確認成分之結構,並以分離純化而得之2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranoside, harpagoside及cinnamic acid(以下各簡稱為SN-A、B及C)三成分作為指標成分,探討以高效液相層析儀定量此三成分之檢測條件,並測定市售玄參藥材之成分含量,以了解其品質。

材料與方法

一、材料

玄參(*Scrophulariae Radix*) 2.0kg,購於台北市。另外市售玄參23件,各約40g,分別購於台灣北、中、南部及大陸四川、湖南等地區。此等23件玄參藥材事先經台灣必安研究所張憲昌博士鑑定,確定其基原均為*Scrophularia ningpoensis*植物之乾燥根。

二、儀器

本實驗中之紫外線分光光度計使用Hitachi U-3210 Double-beam UV/VIS Spectrophotometer。核磁共振光譜儀使用 Bruker AM-300 WB FT-NMR spectrophotometer。Fast atom bombardment mass spectra (FAB-MS)以 JOEL JMS-HX 110 mass spectrometer 測定。中壓液相層析儀使用 Büchi B-685 Medium pressure liquid chromatography (MPLC)。高效液相層析儀使用 Waters 600E HPLC Pump 連接 Waters 486 UV

Detector,層析管為Cosmosil 5C₁₈-AR 150 $\times$ 4.6mm I.D.,流速為 1.0 mL/min,波長為278nm,移動相為乙腈及1.0%醋酸溶液[15:85 $\rightarrow$ 27:73(44min)]。

三、標準品及溶媒

對照標準品SN-A及SN-B為自玄參藥材分離純化而得,純度各為96.3%及97.1%以上。trans-cinnamic acid(code.090-15, Nacalai, Japan), 內部標準品 sorbic acid(S.1626, Sigma, USA)。分離用之甲醇、氯仿及丙酮均係分析級溶劑;分析用之乙腈、醋酸及甲醇均係HPLC級。

四、管柱層析用之膠質

管柱層析使用 Diaion HP-20(日本 Mitsubishi公司), Cosmosil 75C₁₈-OPN(37-70 μ m, 日本 Nacalai公司), silica gel(18-32 μ m, Eurochrom公司)等膠質。

五、實驗方法

(一)指標成分之分離

玄參飲片(2kg)剪碎後,以30% acetone(合計25L),80 $^{\circ}$ C水浴加熱迴流一小時,抽取四次,過濾後,濾液合併減壓濃縮,濃縮液(13.7L)流經Diaion HP-20(500g)層析管柱,並以少量水洗,吸著物以甲醇沖提,沖提液濃縮後,再以同樣膠質400g進行管柱層析分離,以water-methanol(1:0 $\rightarrow$ 0:1)沖提,得三個fraction(Fr.I, II, III),Fr.I利用MPLC分離,使用silica gel管柱,以chloroform-methanol(9:1 $\rightarrow$ 7:3)沖提,得到SN-A;Fr.II亦以MPLC分離,利用silica gel管柱,以chloroform-methanol(1:0 $\rightarrow$ 3:1)沖提,得到SN-B及A;Fr. III部分,利用活性碳管柱層析,以methanol-chloroform(17:3 $\rightarrow$ 0:1)沖提,再用Cosmosil管柱層析,以water-methanol(1:1 $\rightarrow$ 3:7)沖提,最後再用silica gel管柱層析純化,以chloroform-methanol(1:0 $\rightarrow$ 4:1)沖提,得到SN-C。其中SN-A及SN-B之純度各為96.3%及97.1%;產量及產率分別為3.805g(0.190%)及2.519g(0.126%)。

各化合物之性質及光譜數據如下:

SN-A【2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranoside】為白色無晶形粉末。UV $\lambda_{\text{max}}^{\text{Etot}}$

nm : 331, 287。FAB-MS(Neg.) : m/z 783[M-H]⁻。 ¹H-NMR(CD₃OD) δ : 7.66、6.37 (each 1H, d, J=15.9Hz, olefinic H)、6.75、7.20(each 1H, d, J=1.8Hz)、7.08、6.69(each 1H, dd, J= 1.8, 8.1Hz)、6.82、6.81(each 1H, d, J=8.1Hz)(two pairs of ABX type H)、5.19(1H, br.s.)、4.38(1H, d, J=8.1Hz)、4.23(1H, d, J=8.1Hz) (anomeric H of sugar)、2.82(2H, t, J=7.2 Hz, methylene H)、1.10 (3H,d, J=6.3Hz, rha. H-6)。 ¹³C-NMR(CD₃OD) δ : 18.5(rha C-6)、56.4、56.5(-OMe)、64.3、66.7、69.0、69.4、70.4、72.0、72.1、72.3、72.4、73.7、74.0、74.9、76.1、81.4(sugar)、102.9(glc C-1)、104.1 (rha C- 1)、105.0(ara C-1)、36.5、70.5、111.09、112.9、115.1、116.5、117.1、121.2、124.4、127.6、133.2、147.4、147.5、148.1、149.4、150.8(feruloyl and 3-OH-4-OCH₃-phenylethyl C)、168.2(feruloyl -COO-)。

SN-B(harpagoside)為白色無晶形粉末。UV λ_{max}^{E_{OH}} nm : 278。FAB-MS(Neg.) : m/z 493[M-H]⁻。 ¹H-NMR(CD₃OD) δ : 7.66、6.50(each 1H, d, J=15.9Hz, olefinic H)、7.58(2H, m)、7.39(3H, m) (cinnamoyl H)、6.40(1H, d, J=6.4Hz, H-3)、6.17(1H, s, H-1)、4.93(1H, dd, J=1.6, 6.6 Hz, glc H-4)、4.62(1H, d, J=8.0Hz, glc H-1)、2.93(1H, s, H-9)、2.27(1H, d, J=15.2Hz, H-7)、2.01(1H, dd, J=4.4, 15.2Hz, H-7)、1.53(3H, s, CH₃) ; ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 94.66(C-1)、143.91(C-3)、106.90(C-4)、73.42 (C-5)、77.69(C-6)、46.22(C-7)、88.76(C-8)、55.64 (C-9)、22.66(C-10)、100.02(glc C-1)、74.57(glc C-2)、78.15(glc C-3)、71.79(glc C-4)、78.15(glc C-5)、63.02(glc C-6)、168.69(C=O)、120.15(C-α)、146.08(C-β)、135.78 (arom. C-1)、130.01(arom. C-2)、129.20(arom. C-3)、131.47 (arom. C-4)、129.20(arom. C- 5)、130.01(arom. C-6)。

SN-C(cinnamic acid)為白色結晶。

UV λ_{max}^{E_{OH}} nm : 267, 221。 ¹H-NMR(CDC13) δ : 6.45(1H, d, J=16.1Hz, H-α)、7.77(1H, d, J= 16.1Hz, H-β)、7.54(2H, m, arom. C-2,6)、7.39(3H, m, arom. C-3, 4, 5)。

(二)參藥材中指標成分之定量方法

1.萃取條件之探討

將藥材剪碎後，減壓乾燥四小時(40℃)，分別取約1.0g精確稱定，以水及30, 50,

75, 100%甲醇、乙醇、丙酮等溶媒各25ml，用加熱迴流(100℃, 30min)及超音波振盪(40℃, 30min)二種方法萃取，萃取液過濾後以HPLC分析三種指標成分之相對含量。

2.檢液之製備

藥材剪碎後減壓乾燥四小時(40℃)，分別精稱約2.0g，置入圓底燒瓶中，加入30%acetone 25ml，水浴加熱迴流萃取30分鐘後過濾，共萃取三次，濾液合併，並加入適量之內部標準品sorbic acid溶液，並定容至100ml，使內部標準品之濃度為0.99μg/ml，供HPLC分析。

3.標準品溶液之配製

精確稱取對照用標準品SN-A, SN-B, SN-C及適量的內部標準品sorbic acid，以70%甲醇稀釋調配成一系列濃度。SN-A依序為20、50、100及150μg/ml；SN-B依序為5、12.5、25及50μg/ml；SN-C依序為20、50、100及150μg/ml；內部標準品sorbic acid為0.99μg/ml。

4.檢量線之製作

分別取不同濃度之標準品溶液注入高效液相層析儀分析。以各標準品與內部標準品波峰面積比為Y軸，標準品之濃度為X軸，作圖畫檢量線並求出線性迴歸方程式及相關係數。

5.添加回收試驗

取已知指標成分含量之檢液三份，分別加入三種不同量之標準溶液，使每份檢液中添加之濃度依序為SN-A為5.5、11.0及13.2μg/ml；SN-B為1.0、2.0及3.0μg/ml；SN-C為5.0、10.0及12.0μg/ml，以HPLC分析，求其添加回收率。

6.同日內及異日間精密度試驗

選擇於對照標準品檢量線之範圍內 (SN-A 100.0μg/ml, SN-B 25.0μg/ml及 SN-C 100.0μg/ml) 之對照標準品溶液，於同一日及不同的五天重覆注入HPLC分析各五次，將所得之數據(peak area ratio)計算相對標準偏差。

7.儀器偵測極限試驗

將三種指標成分各種濃度之標準品溶液，以HPLC分析，經測試結果，以三倍於指標成分和雜訊之波峰高度比的最小濃度視為儀器偵測極限。

結果與討論

一、指標成分之分離及構造決定

由玄參分離得到之三種成分，其中SN-A之¹H-NMR圖譜如實驗部分所述數據呈現二組ABX型之aromatic H，一組trans olefinic H，一組ethylene H，及三個糖之anomeric H之吸收訊號，此與2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranoside極為相似，而其negative FAB-MS圖譜在m/z 783顯示[M-H]⁻之尖峰，顯示兩者之分子量相同。經與文獻⁽⁶⁾記載之¹³C-NMR數據比對完全吻合而確認其構造。

SN-B之negative FAB-MS圖譜在m/z 493顯示[M-H]⁻之尖峰，在m/z 147出現cinnamoyl基之[M-H]⁻之尖峰。¹H-NMR及¹³C-NMR光譜經與文獻記載harpagoside之光譜數據比較完全一致^(6,7,9)，而確認其結構。SN-C之¹H-NMR光譜呈現trans olefinic H於 δ 6.45(1H, d, J=16.1Hz)、7.77(1H, d, J=16.1Hz)，各為 α 及 β 之proton；又 δ 7.39(3H, m)及7.54(2H, m)則為aromatic H之訊號，本成分與標準品直接比較而確認其為cinnamic acid。

玄參中成分之分離，Qian之報告⁽⁷⁾，係用96、80及70%之ethanol加熱迴流萃取，萃取液減壓濃縮後用celite管柱層析分離，先以n-hexane-dichloromethane沖提後，再以dichloromethane-methanol沖提得親水部分，再分別用silica gel及MCI管柱層析，以dichloromethane-methanol-water及60% methanol沖提而得harpagoside (產率0.0092%)。Kajimoto之報告⁽⁶⁾，用methanol萃取，萃取液以正丁醇振盪萃取，正丁醇層用silica gel(依序以hexane-acetone, ethylacetate-methanol, chloroform-methanol, chloroform-methanol-water沖提)，Sephadex LH-20(以methanol沖提)及Bondapak C₁₈(以60% methanol沖提)等管柱分離純化，而得2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl(1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranoside(即SN-A)及harpagoside。

本研究用30%之acetone加熱迴流萃取(如討論項二)，萃取液減壓濃縮除去acetone後，再用Diaion HP-20管柱層析兩次後，得到Fr.I、

Table 1. The relative extraction ratio of the marker substances (SN-A, B and C) in *Scrophulariae Radix*

Solvent	SN-A(%)		SN-B(%)		SN-C(%)	
	reflux	ultrasonic	reflux	ultrasonic	reflux	ultrasonic
Water	63.1	71.2	45.1	59.4	78.4	70.4
30%Methanol	78.5	81.8	76.2	84.1	73.8	77.7
50%Methanol	79.4	78.4	67.9	73.2	77.7	77.7
75%Methanol	66.9	69.1	59.9	56.2	91.1	81.8
100%Methanol	46.2	41.1	49.5	37.7	76.4	56.8
30%Ethanol	98.3	68.6	100.0	63.6	82.1	82.5
50%Ethanol	81.8	80.2	71.0	69.7	89.2	81.1
75%Ethanol	75.9	38.0	72.0	34.5	88.6	28.2
100%Ethanol	89.1	3.3	20.3	8.8	47.2	22.1
30%Acetone	100.0	63.4	86.0	53.4	79.1	80.1
50%Acetone	45.6	71.9	44.5	68.8	90.4	100.0
75%Acetone	40.1	30.4	51.4	43.7	79.1	80.2
100%Acetone	1.3	0.8	4.7	2.7	21.8	15.0

SN-A: 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranoside

SN-B: harpagoside

SN-C: cinnamic acid

II及III三個fraction，其中Fr.I利用MPLC分離，以silica gel管柱層析而得到SN-A，產量1.294g。Fr.II亦使用MPLC分離，以silica gel管柱層析而得到SN-A及SN-B，產量分別為2.511g及2.519g。本法共得SN-A 3.805g，SN-B 2.519g，其產率分別為0.190%及0.126%，其中harpagoside (SN-B)之產率比Qian報告之0.0092%高出13倍之多，與市售玄參藥材之含量較為接近。

二、萃取條件之探討

玄參藥材置於各種溶媒中，利用加熱迴流及超音波振盪萃取下，探討三種指標成分之相對萃取量，如表一所示，其中SN-A以30% acetone為溶媒，加熱迴流法萃取，可得到最高之萃取率，視之為100%，其次為30% ethanol為溶媒，以加熱迴流法萃取得98.3%。SN-B以30% ethanol為溶媒，加熱迴流法萃取，可得到最高之萃取率，視之為100%，其次為30% acetone為溶媒，以加熱迴流法萃取得86.0%。SN-C，以50% acetone為溶媒超音波振盪法萃取，可得到最高之萃取率，視之為100%，其次為75% methanol為溶媒加熱迴流法萃取得91.1%，以30% acetone為溶媒，加熱迴流法萃取得79.1%。

綜合上述結果，選擇30% acetone為溶媒，以加熱迴流法萃取，可同時萃取三種指標成分，萃取液之濃縮過程只需除去acetone，水

層通過Diaion HP-20之管柱吸著，再以methanol沖提洗出，可減少濃縮時間及避免濃縮過程之分解。

三、玄參藥材中指標成分定量方法

玄參藥材如材料與方法部份[五.(二).1.]所

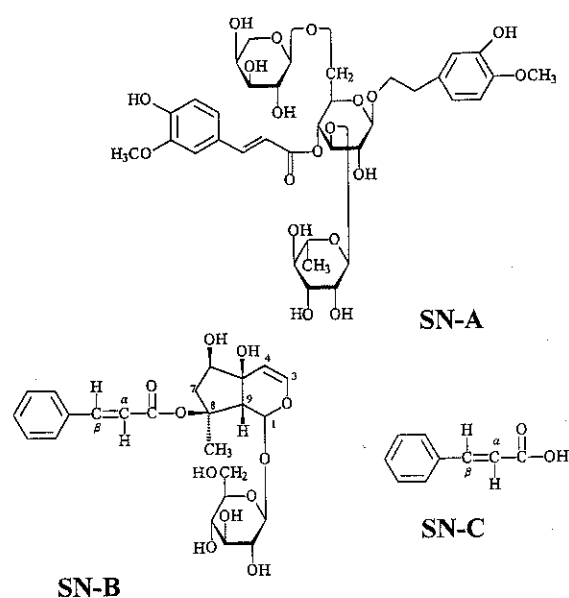


Figure 1. Structures of 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranoside(SN-A), harpagoside(SN-B) and cinnamic acid(SN-C).

Table 2. Recoveries of SN-A, B and C in *Scrophulariae Radix*

Marker Substance	Amount added(μ g/ml)	Amount measured(μ g/ml)	Recovery (%)	Mean $\pm$ S.D.* (%)	R.S.D. (%)
SN-A	5.5	5.28	95.92	100.47 $\pm$ 3.23	3.21
	11.0	11.27	102.47		
	13.2	13.60	103.03		
SN-B	5.0	4.94	98.83	98.49 $\pm$ 2.62	2.66
	10.0	10.15	101.51		
	12.0	11.42	95.13		
SN-C	1.0	0.97	96.81	96.15 $\pm$ 4.39	4.56
	2.0	2.02	101.17		
	3.0	2.71	90.48		

*Sample Size n=3

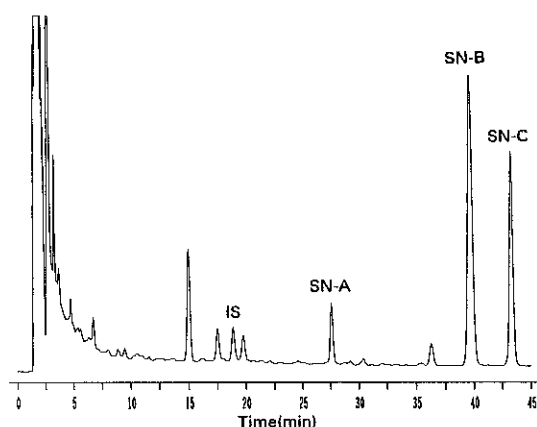


Figure 2. Chromatogram of *Scrophulariae Radix* extracted by 30% acetone. IS for internal standard (sorbic acid).

述檢液製備方法處理後，以HPLC分析。高效液相層析法使用逆相層析管柱(Cosmosil 5C₁₈-AR)，移動相為乙腈及1.0%醋酸溶液，採44分鐘線性梯度沖提，高效液相層析圖譜如圖二所示，各成分分離情況良好；三成分之紫外線最大吸收分別為SN-A 287nm，SN-B 278nm及SN-C 267nm，故波長設定278nm，以使SN-B成分得到最大之波峰，並使SN-A及SN-C得以

兼顧。三種指標成分之滯留時間分別在27.6min(SN-A)，39.7min(SN-B)及43.3min(SN-C)，均呈現良好的之分離狀況。本實驗所採用之內部標準品為sorbic acid，其出現之滯留時間為18.6min；而玄參藥材於此處並無訊號出現，故為一合適之內部標準品。

以SN-A，B及C為對照用標準品作檢量線，其線性迴歸方程式及相關係數(r)分別為SN-A： $Y=14.58X+11.25$ ($r=0.9907$)；SN-B： $Y=2.26X-0.40$ ($r=0.9994$)；SN-C： $Y=14.12X-29.28$ ($r=0.9981$)。其結果顯示SN-A在濃度20-150 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內；SN-B在濃度5-50 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內及SN-C在濃度20-200 $\mu\text{g/ml}$ 範圍內均呈良好線性關係。三種指標成分之儀器偵測極限值依序為SN-A 0.25 $\mu\text{g/ml}$ ，SN-B 0.02 $\mu\text{g/ml}$ 及SN-C 0.01 $\mu\text{g/ml}$ 。

三種指標成分之添加回收率(如表二)均在 $100\pm 4\%$ 之內。同日內及異日間相對標準偏差試驗(如表三)，其同日內為0.93-1.01%，異日間為0.28-1.97%，顯示高效液相層析法用於玄參指標成分之分析，具良好之再現性及準確性。

將市售玄參藥材之指標成分定量，係依前

Table 3. Intraday and interday analytical precisions of SN-A, B and C

Marker substance	Peak area of marker substance / peak area of sorbic acid		Mean $\pm$ S.D. (R.S.D., %)	
	intraday	interday	intraday	interday
SN-A (100 $\mu\text{g/ml}$)	5.517	5.523	5.549 $\pm$ 0.054 (0.97)	5.557 $\pm$ 0.109 (1.97)
	5.526	5.472		
	5.647	5.770		
	5.561	5.539		
	5.494	5.482		
SN-B (25 $\mu\text{g/ml}$)	10.914	11.020	11.007 $\pm$ 0.103 (0.93)	10.976 $\pm$ 0.030 (0.28)
	10.950	10.932		
	11.179	10.962		
	11.071	10.969		
	10.920	10.998		
SN-C (100 $\mu\text{g/ml}$)	9.163	9.292	9.263 $\pm$ 0.093 (1.01)	9.254 $\pm$ 0.046 (0.50)
	9.208	9.205		
	9.417	9.240		
	9.320	9.209		
	9.205	9.322		

Table 4. The content of marker substances (SN-A, B and C) in commercial *Scrophulariae Radix*

Sample	SN-A (Mean $\pm$ S.D.*, %)	SN-B (Mean $\pm$ S.D.*, %)	SN-C (Mean $\pm$ S.D.*, %)
1	0.2769 $\pm$ 0.0044	0.0347 $\pm$ 0.0008	0.4586 $\pm$ 0.0110
2	0.2237 $\pm$ 0.0063	0.0226 $\pm$ 0.0007	0.1735 $\pm$ 0.0113
3	0.3669 $\pm$ 0.0066	0.0999 $\pm$ 0.0025	0.1777 $\pm$ 0.0077
4	0.0531 $\pm$ 0.0027	0.0162 $\pm$ 0.0011	0.0580 $\pm$ 0.0026
5	0.2278 $\pm$ 0.0020	ND	0.3412 $\pm$ 0.0053
6	0.2898 $\pm$ 0.0084	0.0506 $\pm$ 0.0020	0.3146 $\pm$ 0.0218
7	0.2937 $\pm$ 0.0086	0.0625 $\pm$ 0.0022	0.1186 $\pm$ 0.0100
8	0.2701 $\pm$ 0.0093	0.1747 $\pm$ 0.1184	0.0788 $\pm$ 0.1350
9	0.2323 $\pm$ 0.0006	0.0306 $\pm$ 0.0006	0.3601 $\pm$ 0.0040
10	0.2736 $\pm$ 0.0047	0.1005 $\pm$ 0.0011	0.2176 $\pm$ 0.0038
11	0.2431 $\pm$ 0.0022	0.0691 $\pm$ 0.0006	0.4948 $\pm$ 0.0072
12	1.7098 $\pm$ 0.0526	0.1553 $\pm$ 0.0965	0.1428 $\pm$ 0.1371
13	0.2128 $\pm$ 0.0013	0.0342 $\pm$ 0.0006	0.3106 $\pm$ 0.0061
14	0.1759 $\pm$ 0.0008	0.1367 $\pm$ 0.0004	0.3326 $\pm$ 0.0028
15	0.2298 $\pm$ 0.0038	0.0621 $\pm$ 0.0016	0.3165 $\pm$ 0.0103
16	0.3076 $\pm$ 0.0037	0.0499 $\pm$ 0.0006	0.5346 $\pm$ 0.0135
17	0.2746 $\pm$ 0.0045	0.0786 $\pm$ 0.0019	0.2756 $\pm$ 0.0115
18	0.2920 $\pm$ 0.0020	0.0674 $\pm$ 0.0003	0.2131 $\pm$ 0.0044
19	0.1204 $\pm$ 0.0020	0.0151 $\pm$ 0.0003	0.3243 $\pm$ 0.0070
20	0.2123 $\pm$ 0.0018	0.0792 $\pm$ 0.0014	0.3558 $\pm$ 0.0069
21	0.2081 $\pm$ 0.0075	0.0617 $\pm$ 0.0808	0.1184 $\pm$ 0.2556
22	0.1895 $\pm$ 0.1144	0.0100 $\pm$ 0.0299	0.0788 $\pm$ 0.1199
23	0.2035 $\pm$ 0.0521	0.0062 $\pm$ 0.0504	0.0833 $\pm$ 0.3778
24	0.3698 $\pm$ 0.0772	0.1376 $\pm$ 0.1015	0.1718 $\pm$ 0.2549
Range	0.0531 ~ 1.7098	ND ~ 0.1747	0.0580 ~ 0.5346
Mean $\pm$ S.D.	0.3024 $\pm$ 0.3012	0.0648 $\pm$ 0.0476	0.2522 $\pm$ 0.1339

*Sample Size n=3

ND: Not detected

述之方法所得之檢液，利用已建立之高效液相層析法分析各玄參藥材中指標成分SN-A，SN-B及SN-C之含量百分比，其結果如表四。其中SN-A之含量，平均為0.30%，以檢體12(1.71%)為最高而檢體4(0.05%)為最低，相差34倍；SN-B之含量，平均為0.06%，以檢體8(0.17%)

為最高而檢體23則未檢出，最低檢出量為0.02 μ g/ml；SN-C之含量，平均為0.25%，以檢體16(0.53%)為最高而檢體4(0.06%)為最低，相差9倍。顯見各藥材中指標成分之含量分布範圍甚廣，以SN-A相差34倍最多，而SN-B(harpagoside)則有一藥材未檢測出此成分。

本研究建立玄參藥材中針對三種指標成分之迅速且經濟之分離法，並建立一個高效液相層析法來作玄參之指標成分分離過程之確認及藥材中上述成分之定性及定量分析，藉以瞭解玄參藥材之品質，由前述種種結果顯示此分析法效果良好。

誌 謝

本研究承行政院衛生署國家衛生研究院之經費支持(計畫編號：DOH83-HR-307)，得以完成，特此誌謝。台灣必安研究所張憲昌博士協助鑑定藥材，謹申謝忱。

參考文獻

- 1.1987.中國藥材學.pp.645-647.啟業書局.台北.
- 2.顏焜熒.1980.原色中藥飲片圖鑑.pp.53-54.台北南天書局有限公司.台北.
- 3.難波恆雄.1980.原色和漢藥圖鑑(上).pp.57-58.保育社.大阪.日本.
- 4.劉訓紅,王玉璽,房克慧,李泉. 1989. 中藥材薄層色譜鑑別. p. 178. 天津科學技術出版社.天津.
- 5.Kitagawa, I., Nishimura, T., Takei, M. and Yosioka, I. 1967. On the Iridoid Constituent Isolated from the Roots of *Scrophularia buergeriana* Miq. Chem. Pharm. Bull.13(8):1254-1256.
- 6.Kajimoto, T.,Hidaka, M., Shoyama, K. and Nohara, T. 1989. Iridoids from *Scrophularia ningpoensis*. Phytochem. 28(10): 2701-2704.
- 7.Qian, J., Hunkler, D. and Rimpler, H. 1992. Iridoid-related Aglycone and its Glycosides from *Scrophularia ningpoensis*. Phytochem. 31(3): 905-911.
- 8.Calis, I., Zor, M., Basaran, A. A., Wright, A. D. and Sticher, O. 1993. Karsoside and Scropolioside D, Two New Iridoid Glycosides from *Scrophularia ilwensis*. J. Nat. Prod. 56(4): 606-609.
- 9.Zhang, W. J., et al. 1991. Iridoidal Glycosides from *Scrophularia spicata*. Acta Botanica Yunnanica. 14(4):437-441.
- 10.Guillerault, L., Ollivier, E., Elias, R. and Balansard, G. 1994. Determination of Harpagide, 8-para-Coumaroyl Harpagide, and Harpagoside by High Performance Liquid Chromatography in *Harpagophytum procumbens* Drugs and in a Commercial Extract. J. Liq. Chromatogr. 17(13): 2951-2960.

Isolation and Determination by HPLC of Polar Constituents from *Scrophularia ningpoensis*

JER-HUEI LIN, YOE-RAY KU, YUHN-SHENG HUANG, FANG-MEIR YARN,
KUO-CHING WEN AND *WENG-FONG HUANG

National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan
161-2, Kuen Yang Street, Nankang, Taipei, Taiwan, R.O.C

*Graduate Institute of Health & Welfare Policy, National Yang-Ming University,
Shih-Pai, Taipei 11221, Taiwan, R.O.C

ABSTRACT

Three polar constituents, 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethyl 1-O-[α -L-arabinopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)]-feruloyl(1 $\rightarrow$ 4)]- α -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopyranoside(SN-A), harpagoside(SN-B) and cinnamic acid(SN-C) have been isolated from *Scrophularia ningpoensis* by a modified isolation method. These constituents were used as marker substances for quality analysis of *Scrophulariae Radix*. In this study we have also developed a high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of above marker substances in *Scrophulariae Radix*. This performance was done by using a gradient elution with a solution of ace-

tonitrile in 1.0% acetic acid on a ODS column.

The linear calibration ranges were SN-A 20-150 μ g/ml ($r=0.9907$), SN-B 5-50 μ g/ml ($r=0.9994$) and SN-C 20-200 μ g/ml ($r=0.9981$). Recoveries were SN-A $100.47 \pm 3.23\%$, SN-B $98.49 \pm 2.62\%$ and SN-C $96.15 \pm 4.39\%$. The relative standard deviations of three marker substances for intraday and interday analyses were 0.93-1.01% and 0.28-1.97%. The contents of three marker substances in 24 crude drugs of *Scrophulariae Radix* were SN-A 0.05%~1.71%, SN-B non detected~0.17%, and SN-C 0.06%~0.53%, respectively.

Key words : *Scrophulariae Radix*, *Scrophularia ningpoensis*, harpagoside, HPLC.