

# 中草藥化學指紋圖譜分析技術之建立與應用

撰文/古源翎

建立中草藥化學指紋圖譜分析技術的目的，主要是基於藥物鑑定與品質管制的需求。傳統中藥的藥材來源包含礦物、動物與植物等天然物，而其中以植物藥占多數。近年來，天然藥物範疇於廣納民間藥與西方草藥之後，逐漸形成「中草藥」這一名詞。本文無意針對藥物的來源與屬性進行名詞定義，僅就工作上所經常接觸到關於「中草藥化學指紋圖譜」的分析技術加以說明，並以植物性藥材為討論範圍。

藥物所產生的藥效係來自於其所含的化學物質，對於一般西藥來說，大多數的有效成分是以單一化合物為主，其化學成分確定，品管與鑑定方法也能以此為目標而確立。中草藥的情況就複雜得多，既是天然物，以植物藥為例，無論使用的是根、莖、葉、花、果實、種子…哪一個部位，都可能因為栽培環境、採收季節與生長年份而影響到其中的眾多化學成分。雖然天然物的化學成分研究已經有相當的基礎，但藥材中所含的化學成分太多，要釐清到底哪一些才是真正發揮藥效的主角，目前還很困難。況且，單一藥材或甚至單一成分也經常不是只有單一作用。故現今大多數的中草藥，都非以其所含一個或少數特定成分當作其有效成分，在此特殊情況下，對於藥材本身以及其產品，也就不容易建立藥物鑑定與品質管制的標準。

引進「指紋」的概念，當然是要具備「專一性」與「特异性」。也就是說，我們希望能建立一套方

法，無論是用什麼技術，只要能把各個中草藥藥材的特徵找出來，以便作為分析鑑別的依據，都是可以採行的方法。傳統的藥材鑑別與品質管制大多是由其外觀辨識，聞其氣味、觀其顏色，進一步者有應用植物組織上的特徵，以組織切片或粉末進行顯微鏡檢，區分藥材到底來自何種植物。但是當藥材因為加工處理、研磨粉碎後外觀已無法辨識，或是加熱蒸煮，甚至萃取成浸膏狀，則傳統鑑別方法就很難派上用場。如果以分析藥材中的化學成分為目標，常用的分析方法如(1)色層分析法：如 TLC、HPLC、CE 等；(2)光譜分析法：如 UV、IR、Near-IR 等；(3)其他：X-ray、NMR、GC-MS、LC-MS 等，都可以用來建立中草藥的「指紋圖譜」。

當然，隨著分子生物技術的進步，以 DNA 序列的分析技術，直接觀察生物遺傳物質的特徵，一樣能用來建立藥材的鑑別標準，例如以 ITS 序列 (Internal transcribed spacer) 做為藥材基原鑑定的方法就已經被應用。然而，此技術雖能準確區別藥材間基原的異同，有利於建立藥材種源基因資料庫，卻不一定能直接反映其中化學成分的變化。因為，相同的藥材生長在不同地方，成分還是會有差異；有時候，不同基原的藥材卻可能含有相同的化學成分，例如，屬於瓜科 (Cucurbitaceae) 的絞股蘭 (*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino) 與五加科 (Araliaceae) 的人參 (*Panax ginseng* C. A. Meyer)，雖然物種基原差異極大，卻含有若干相同

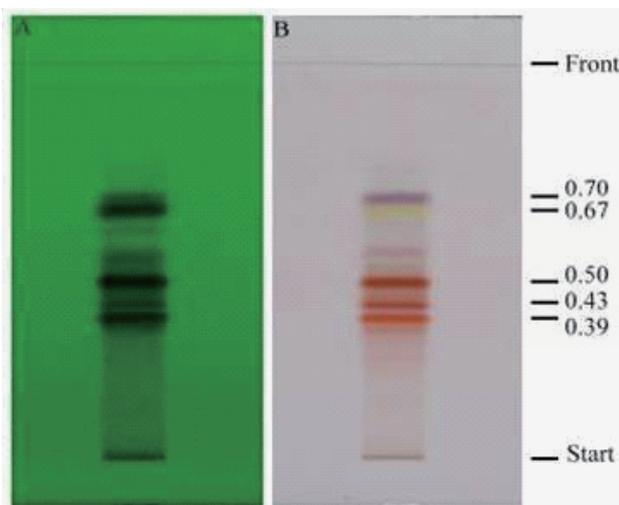
的人參皂苷成分。因此，到底要選擇哪一種技術來建立中草藥的「指紋圖譜」，應該是要視需求來決定的，並沒有任何一種方法能夠面面俱到。

現今應用最廣的中草藥化學指紋圖譜分析方法應屬色層分析法。其中，以薄層層析法 (TLC) 進行中草藥的化學成分分析，是較早開始發展的一項技術 (見圖一)。利用塗佈了矽膠微粒的薄片為固定相，將藥材萃取物點注其上，並以特定溶媒系統當移動相進行分離，直立擺放的薄片下端浸入溶媒，溶媒藉由矽膠微粒的毛細現象由下往上移動，可將萃取物中的各成分在薄片上展開，由於各成分本身特性的差異，其與固定相及移動相之間親合力的拉鋸，會將成分帶動到特定的位置 (計算特定成分移動距離與溶媒展開距離的比值，稱為  $R_f$  值)，改變固定相材質或移動相溶媒的組成比例，都會影響各成分的  $R_f$  值。指標成分可以與藥材萃取物一同點注在同一片 TLC 上展開做為對照，並應用各種呈色方法 (如噴灑顯色劑)，或在不同波長的光線下 (如可見光、254 nm、366 nm 等)，檢視具備不同物化特性的物質。此一技術的設備材料較容易取得，價格低廉，操作快速簡便，技術門檻較低，已普遍應用在中草藥化學成分的分析上。然而，當藥材萃取

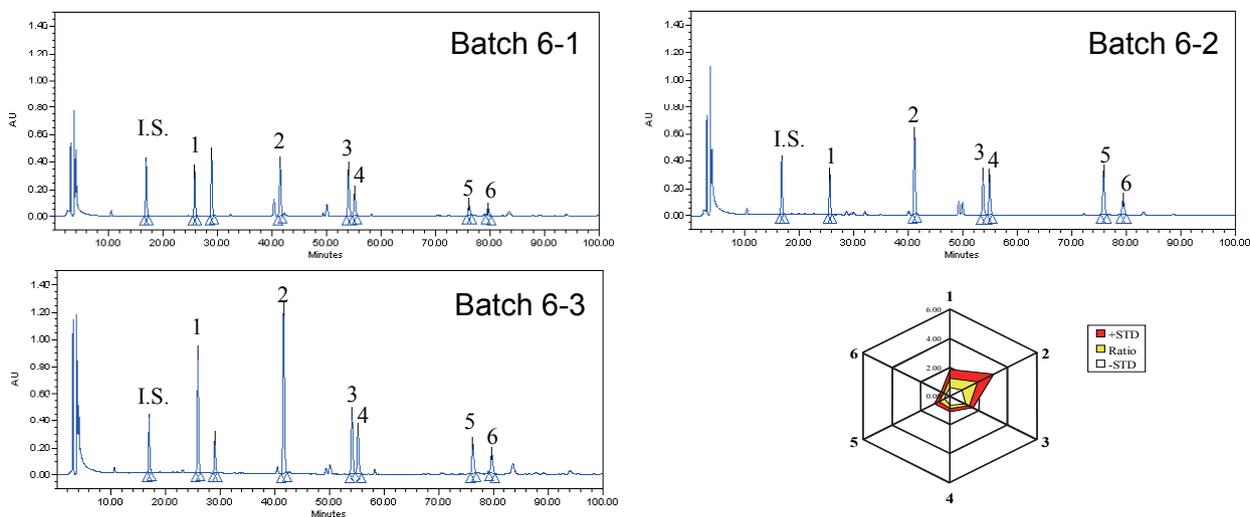
物的成分太複雜時，一張 TLC 片所能呈現的資訊就會受到很大的限制。

近年來，高效液相層析儀 (HPLC) 已發展成熟，並廣泛應用於各種化學分析的場合。HPLC 的分析能力強，再現性良好，系統穩定性高，樣品及溶媒的使用量少，偵測器 (detector) 型式選擇多 (如 UV、photodiode array、RI、ELSD...等)，很適合用來建立中草藥化學指紋圖譜。HPLC 的基本原理仍應用一般液相層析 (LC) 的觀念，以分析管柱為固定相，選擇適當溶媒系統為移動相，於管柱前端注入少量萃取液即可開始進行分析。現今模組化設計的機器已整合了自動進樣系統 (autosampler)、溶媒輸送系統 (pump) 及偵測器，並以電腦進行控制、監測與數據分析、記錄，實在非常便利。

實務上，要以 HPLC 技術建立一種藥材的化學指紋圖譜時，以取樣代表性的需求來看，通常會先廣泛蒐集多個來源的藥材樣本，並加以編號。藥材經適度粉碎後，用一種標準化的萃取方法以溶媒進行萃取，並視需要酌量濃縮萃取液後進行分析。採用標準化的萃取方法，可節省摸索最佳萃取條件的時間及成本，也方便與其他的藥材做比對。然而，因溶解度的差異，不同極性的溶媒會萃取出不同的化學成分，因此，若要考慮對不同藥材所含化學成分的特性做調整，自然也是可行的。比較各批次藥材的分析結果，會發現其中可能有些異同之處，由滯留時間 (retention time) 及波峰 (peak) 資訊 (如 UV 分析圖)，就可以看出不同來源各批次藥材之間，有哪些成分相同、哪些成分不同。挑選出各批次所共有的若干波峰，將各個波峰編號標記，這些化合物即可視為該藥材的特徵性物質，並未因來自不同採集批次或不同產地的藥材而消失，具備「化學指紋」的意義 (如圖二中所標示 Peak 1 ~ 6)。再以藥材所含特定指標成分或以添加內標準品 (internal standard) 的方式，製作檢量線並進行定量分析，則可進一步觀察各共有成分之間相對含量的差異，並製作成雷達圖，作為參考標準 (見圖二)。



圖一 某中草藥樣品之TLC層析圖



圖二 某中草藥6批樣品中3批之HPLC指紋圖譜及雷達圖

日後若有另外取得的該藥材樣品，便可參照前述方式進行分析，比較各共有成分之間的關係，既可視之為基原鑑定的方法之一，也可做為品質管制的依據。此法比起用單一指標成分作為品質管制依據的方法，又更加貼近對藥材總體化學物質的評價，並提供較為宏觀的標準。

以 HPLC 為基礎，搭配其他類型的儀器進行串聯，以提高分析效率與鑑定能力，也是近年來高階分析應用儀器技術開發的趨勢。例如，整合質譜儀成為 LC-MS/MS，整合核磁共振儀成為 LC-NMR 等，都是中草藥成分分析的利器。更有以毛細管電泳 (CE) 取代前述聯用的 HPLC，用於微量樣品的分析。這類儀器可以只用少許的分析樣品，少量的溶媒，即可同步取得足夠的資訊以進行化學分析及結構鑑定，若再搭配各項自動化的設備，則更能節省人工操作的時間及成本，快速精確的完成指定的工作。由於能提供相當有用的化學資訊，可預期這類新穎技術將可能成為未來中草藥化學指紋圖譜應用的標準。不過，也正因為技術新穎，相對而言，應用的門檻也較高，特別是資料的研判及解析更是需要高度的專業知識，非一般操作人員可勝任。將

來如能以此等技術逐步建立化合物的相關資料庫，並克服不同機器之間，因不同運作條件所產生數據上的些微差異，或許能藉由電腦協助分析並判讀資料，促進高階技術的普及化與廣泛應用。

自民國 91 年起，財團法人醫藥工業技術發展中心（藥技中心）接受經濟部經費補助，執行藥材檢測技術發展計畫，其中一項研究工作，便是將多批次的藥材以 HPLC 進行分析，並建立其化學指紋圖譜及雷達圖，至今已陸續建立三百多筆藥材的資料，並彙整成為「台灣中草藥網」（網址 <http://www.tcmp.com.tw>）資料庫中的一部份，其中亦有與財團法人工業技術研究院（工研院）生醫所合作建立 300 種藥材的 ITS 序列可供比對。該網站之中草藥資料庫還包括藥材的原植物照片、基原、性狀、組織切片、藥材鑑別、化學成分、專利資料等豐富的內容。為推動中草藥產業升級與研發技術精進，並使一般大眾也能了解相關的知識，該網站中，除分析方法與儀器設定條件等若干進階文件之外，大多數的資訊都是免費提供瀏覽閱讀的，歡迎讀者多加利用。

從法規面來看，我國對於中藥的品質管制，最早是要求以 TLC 進行分析，近年來更已逐步採用 HPLC 分析，要求廠商對於數十種已公告的中藥方劑產品，須以處方中不同藥材共 2 種（或以上）指標成分進行 HPLC 定量。在新藥研發的法規要求方面，97 年 2 月 5 日行政院衛生署公告的「中藥新藥臨床試驗基準」附件「中藥新藥臨床試驗化學製造與管制技術性資料查檢表」中，亦規定每種藥材至少一個合理的指標成分須進行定量分析，並須完成產品的色層分析指紋圖譜或光譜分析指紋圖譜。美國 FDA 於 2000 年 8 月公告之「植物藥產品審查準則草案」及 2004 年公告之「Guidance for Industry Botanical Drug Products」，則採取較為開放的觀點，並未規定指標成分定量分析。對於已有人體使用經驗的植物藥產品而言，FDA 可以接受植物藥品

的有效化學成分不清楚，進一步的純化亦非必須，化學分析或指紋圖譜非為有效成分的指標，而主要視之為品質一致性的依據。德國 Schwabe 公司以指紋圖譜技術管制其銀杏製劑產品的品質，即為一成功應用的實例。

要以單純的分析方法，建立中草藥複雜化學成分的品質標準，是相當困難的。「化學指紋圖譜」的概念已經是比較客觀而宏觀的方法，技術上可行且困難度並不高。不過，這些方法提供的畢竟只是「化學」的資訊，而非「藥效」的資訊。如何將這兩端的距離拉近，讓中草藥的藥效也成為品質評估的標準之一，無疑是未來中草藥研究領域中更大的挑戰。

AgBio

古源翎 財團法人醫藥工業技術發展中心 天然藥物組 組長  
兼任天然藥物研發處 代理處長

