

黃耆 ASTRAGALI RADIX

黃耆 MI	2
一、藥材採購及鑑定	2
二、藥材性狀描述 (圖 1)	2
三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)	2
四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3)	2
黃耆(藥材)HPLC-ELSD	8
一、材料	8
二、儀器及層析管柱	8
三、實驗藥品及試劑來源	8
四、方法	8
五、結果	12
黃耆(飲片)HPLC-ELSD	23
一、材料	23
二、儀器及層析管柱	23
三、實驗藥品及試劑來源	23
四、方法	23
五、結果	26
黃耆(藥材+飲片)TLC	31
一、方法	31
二、萃法選擇及濃度測試	32
三、溶媒系統選擇	33
四、觀察方式選擇	35
五、十批黃耆樣品檢測	36
六、十批黃耆飲片樣品檢測	38

黃耆 MI

一、藥材採購及鑑定

收集 10 批來自全臺北、中、南、東各地不同通路之中藥販賣業或中藥製造業的藥材樣品，確認所收集之藥材為膜莢黃耆的乾燥根。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：黃耆

生藥名：ASTRAGALI RADIX

英文名：Astragalus Root

基原：本品為豆科 Leguminosae 植物膜莢黃耆 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 之乾燥根。

採收加工：春、秋二季採挖，除去鬚根及根頭，曬乾。

藥材性狀：本品為圓柱形，少有分枝，略扭曲，上粗下細。表面灰黃色、黃棕色至淡褐色，縱皺紋較深，略呈溝狀，質硬，較難折斷，堅實有粉性；折斷面纖維性甚強，呈毛狀；皮部黃白色，有放射狀彎曲的裂隙，較疏鬆；木質部淡黃色至棕黃色，有菊花心，有多少不等的放射狀彎曲的裂隙。氣微，味微甜，嚼之有豆腥味。

飲片性狀：本品飲片為橢圓形或長形斜片，外表黃白色至淡棕色，可見縱皺紋；切面淡黃白色，具放射狀紋理及裂隙。氣微，味微甜，嚼之有豆腥味。

生長分佈：多年生草本植物。耐旱，不喜濕，有較強的耐寒能力。生長於向陽山坡或灌叢邊緣，也可見於河邊砂質地或平地草原。主產於黑龍江、吉林、內蒙古、河北等地。花期 6~7 月，果期 8~9 月。

三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)

1. 木栓層為數列木栓細胞。
2. 栓內層為 3~5 列厚角細胞。
3. 韌皮射線外側常彎曲，常有裂隙。
4. 纖維成束，壁厚，多木化。
5. 近栓內層可見石細胞。
6. 形成層成環，明顯。
7. 木質部導管單個散在或數個相聚。
8. 導管間有木纖維。

四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3)

1. 本品粉末為黃白色。

2. 纖維成束或散離，壁厚，表面有縱裂紋，兩端常斷裂，偏光顯微鏡下呈多彩狀。
3. 導管大小不一，多無色或淡黃色，為有緣紋孔導管。
4. 澱粉粒多單粒或數個聚集的複粒，呈類圓形。臍點為點狀、人字狀、裂縫狀或三叉狀，層紋不明顯，偏光顯微鏡下呈黑十字狀。



圖 1A 黃耆藥材圖



圖 1B 黃耆飲片圖

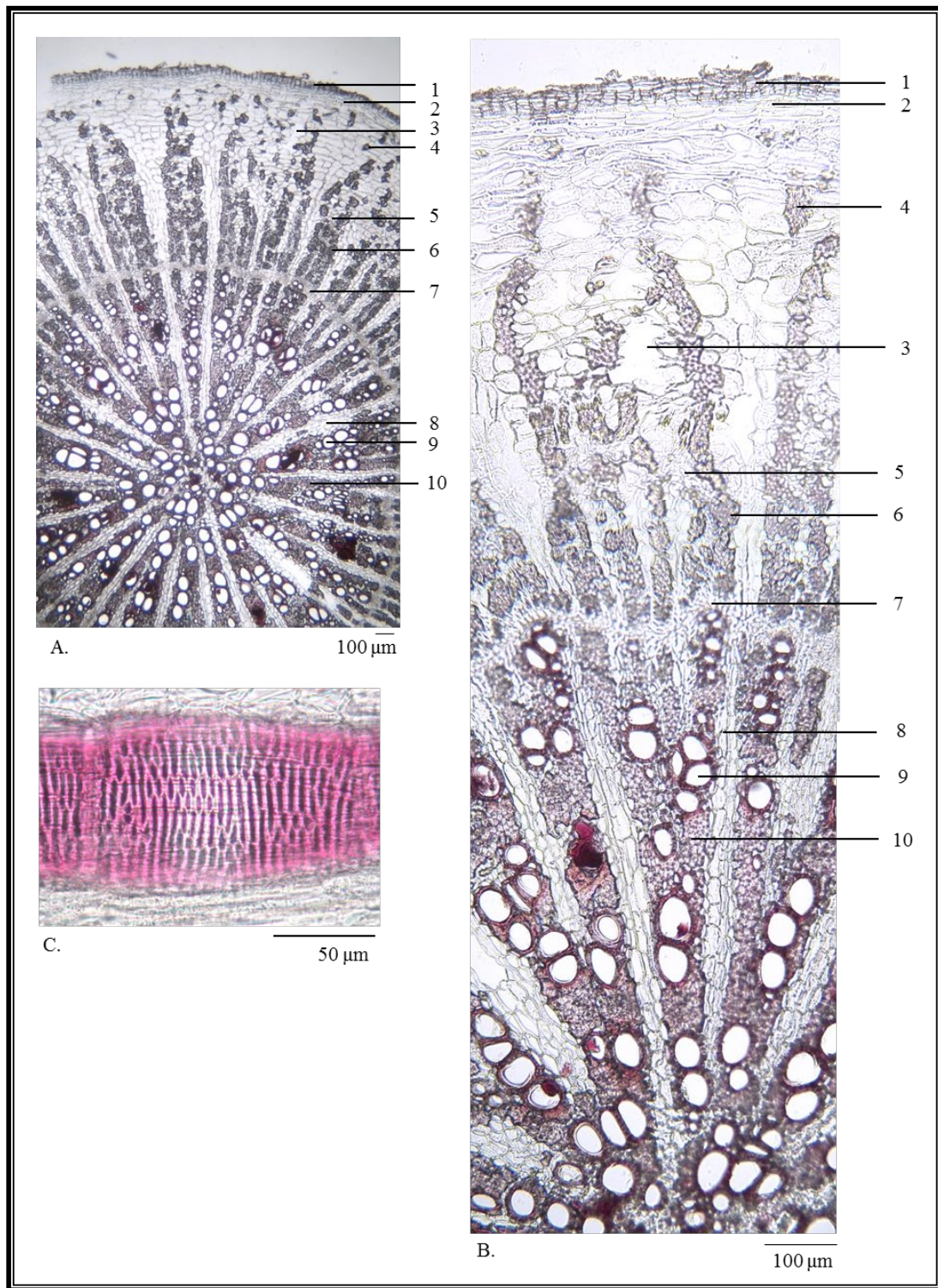


圖 2 黃耆橫切面顯微特徵圖

A.橫切面圖 B.橫切面放大圖 C.網紋導管

1.木栓層 2.栓內層 3.裂隙 4.石細胞 5.韌皮部 6.韌皮纖維 7.形成層 8.木質部 9.導管 10.木纖維

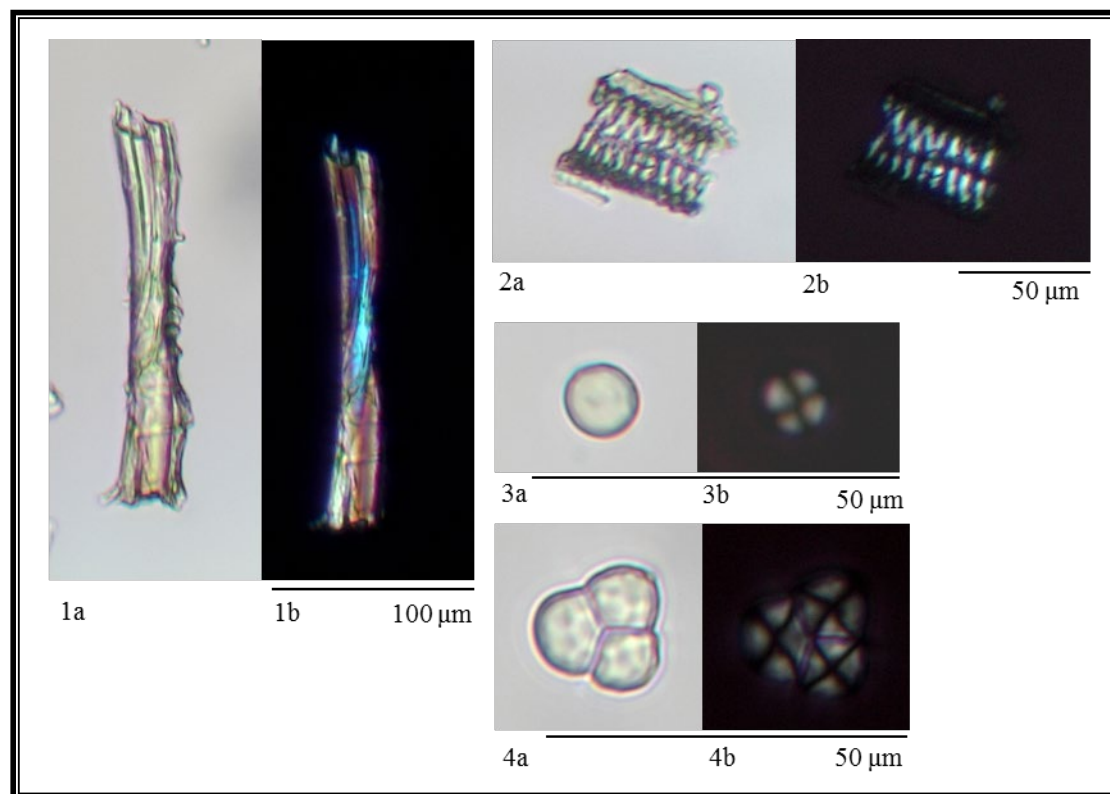


圖 3 黃耆粉末顯微特徵圖

a.光學顯微鏡下特徵 b.偏光顯微鏡下特徵

1.纖維 2.有緣紋孔導管 3.澱粉粒單粒 4.澱粉粒複粒

參考文獻

1. 衛生福利部臺灣中藥典第三版編輯工作小組編纂(2018)。臺灣中藥典第三版。台北市：衛生福利部。358~359 頁。
2. 張永勳、何玉玲等編輯(2009)。中藥彩色圖鑑。台北：行政院衛生署中醫藥委員會。162 頁。
3. 張永勳、何玉玲總編輯(2013)。台灣中藥典圖鑑。台北：衛生福利部。244~245 頁。
4. 張賢哲、蔡貴花編著(2010)。中藥炮製學。台中：中國醫藥大學。225~229 頁。
5. 中國藥品生物製品檢定所、廣東省藥品檢驗所編著(2011)。中國中藥材真偽鑑別圖典 2：常用根及根莖藥材分冊。廣東：廣東科技出版社。219~225 頁。
6. 中華人民共和國香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部編製(2005)。香港中藥材標準第一冊。香港：香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部。50~60 頁。
7. 肖培根等編輯(2001)。新編中藥志第一卷。北京：化學工業出版社。876~893 頁。
8. 徐國鈞、何宏賢、徐珞珊、金蓉鸞等編輯(1996)。中國藥材學上冊。北京：中國醫藥科技出版社。230~236 頁。
9. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會編輯(1999)。中華本草第 4 冊。上海：上海科學技術出版社。341 頁。
10. 國家藥典委員會編輯(2009)。中華人民共和國藥典中藥材顯微鑑別彩色圖鑑。北京：人民衛生出版社。372~373 頁。
11. 國家藥典委員會編輯(2015)。中華人民共和國藥典 2010 年版一部。北京：中國醫藥科技出版社。302~303 頁。
12. 趙中振、陳虎彪等編著(2010)。常用中藥材鑑別圖典。香港：萬里機構·萬里書店。174~175 頁。
13. 趙中振、陳虎彪編著(2016)。中藥顯微鑑定圖典。福州：海峽出版發行集團·福建科學技術出版社。186~187 頁。

黃耆(藥材)HPLC-ELSD

一、材料

購自於臺灣各地中藥店黃耆藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Agilent 1260 series，包含 Degasser G1316A、QuatPump G1311B、Sampler G1329B、DAD G1315D、ELSD G4260B；層析管柱 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)

(二) UPLC 儀器及層析管柱

Waters AcQuity Ultra Performance LC，包含 Binary Solvent Manager、Sample Manager、PDA Detector、ELSD Detector；層析管柱 Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

甲醇(99.9%)和乙腈(99.9%)購自於 Merck；氨水(25%) 購自於友和貿易股份有限公司。

(二) 標準品

標準品黃耆甲苷(Astragaloside IV) 來自於中醫藥司，純度 98/%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取條件評估

取本品粉末 2 份，每份準確稱取 1.0 g，1 份置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 4%濃氨試液的 80%甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時，另外 1 份置於 50 mL 離心管，準確加入 4%濃氨試液的 80%甲醇 50 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 1 小時，冷卻後分別以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加 4%濃氨試液的 80%甲醇至刻度，轉移至 100 mL 濃縮瓶，減壓濃縮至乾，濃縮物溶於 80%甲醇，並移入 10 mL 之容量瓶中，加 80%甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，即得。每針 10 μL 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以所測得每克重量之標準品黃耆甲苷最大波峰面積為最佳黃耆萃取溶媒。

(二) 最佳萃取時間評估

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網) 3 份，每份準確稱取 1.0 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 4%濃氨試液的 80%甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時、2 小時、3 小時，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加 4%濃氨試液的 80%甲醇至刻度，轉移至 100 mL 濃縮瓶，濃

縮機減壓蒸乾，濃縮物溶於 80% 甲醇，並移入 10 mL 容量瓶中，加 80% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，即得。每針 10 μL 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以測得標準品黃耆甲苷最大波峰面積為最佳黃耆萃取時間。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取標準品黃耆甲苷 1.0 mg，加 1 mL 甲醇製成每 1 mL 含 1000 μg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 製成對照標準品溶液。

(四) 檢品溶液

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 4% 濃氨試液的 80% 甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加 4% 濃氨試液的 80% 甲醇至刻度，轉移至 100 mL 濃縮瓶，減壓濃縮至乾，濃縮物溶於 80% 甲醇，並移入 10 mL 容量瓶中，加 80% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，即得。

(五) 測定法

分別準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 μL ，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中黃耆甲苷的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取黃耆甲苷標準品儲備液適量(1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以甲醇稀釋成含黃耆甲苷分別為 500、250、200、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積 $\log$ 值(y 軸)和標準品質量 $\log$ 值(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y = ax + b$ 與相關係數 R^2 。

(七) 精密度試驗

以黃耆甲苷濃度為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以黃耆甲苷的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性：取同一批市售黃耆粉末，依黃耆檢品溶液製備方法平行製備 5 份黃耆檢品溶液，進樣測定，以黃耆甲苷的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售黃耆粉末，依黃耆檢品溶液製備方法製備黃耆檢

品溶液，分別在 0、2、4、8、24 小時進樣測定，以黃耆甲苷的含量為指標，求出相對標準差。

(九) 偵測極限與定量極限試驗

1. 偵測極限(Limit of Detection, LOD)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 3:1$ 時之濃度，作為偵測極限估計值。
2. 定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(十) 添加回收率試驗

取已知黃耆甲苷含量的黃耆粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，分別加入 1 mL 的黃耆甲苷溶液(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，並按檢品溶液製備方法操作測定。

(十一) HPLC 分析條件

1. 層析管：Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm)
2. 流速：1.0 mL/min
3. 蒸發光散射檢測器檢測(ELSD)：漂移管溫度 60 $^{\circ}\text{C}$ ，霧化器溫度 70 $^{\circ}\text{C}$
4. 霧化氣(N_2)流速：1.6 L/min
5. 管柱溫度：35 $^{\circ}\text{C}$
6. 注入量：10 μL
7. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	34	66
20	34	66

(十二) 臺灣市售黃耆含量測定

取 10 批市售黃耆藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品黃耆甲苷的百分比含量。

(十三) 黃耆檢品之 UPLC 分析條件

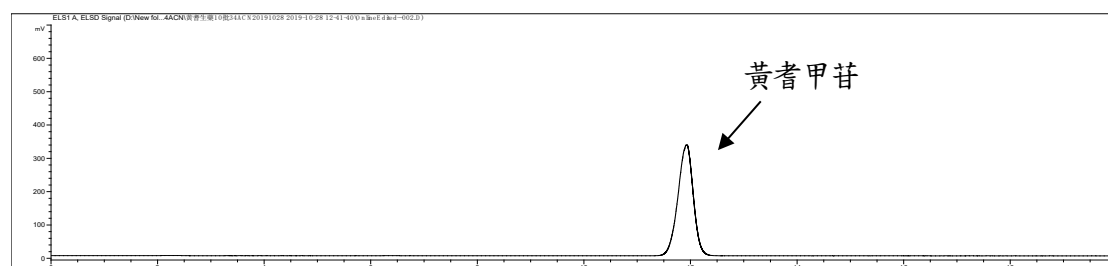
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m)
2. 流速：0.4 mL/min
3. 蒸發光散射檢測器檢測(ELSD)：漂移管溫度 60 °C，霧化器溫度 70 °C
4. 霧化氣(N₂)流速：1.6 L/min
5. 管柱溫度：35 °C
6. 注入量：1 μ L
7. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	34	66
10	34	66

五、結果

(一) 黃耆甲苷之 HPLC 層析

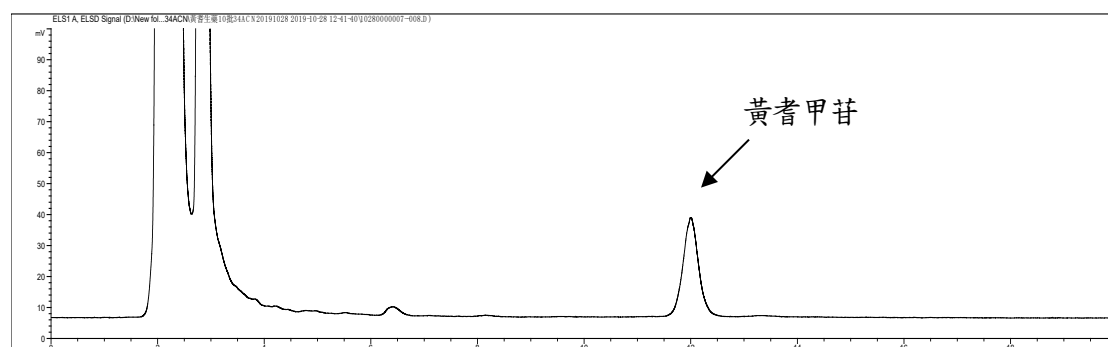
於滯留時間 11.9 分鐘處顯示黃耆甲苷標準品波峰(圖一)。



圖一、黃耆甲苷標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售黃耆檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 12.0 分鐘處顯示黃耆檢品中黃耆甲苷波峰(圖二)。分離率(R)為 11.3，托尾因子(T)為 1.04，均在系統適用性要求內。



圖二、市售黃耆檢品之 HPLC 層析圖

表一、黃耆甲苷之分離率與托尾因子

	黃耆甲苷
分離率	11.3
托尾因子	1.04

(三) 最佳萃取條件評估

以 4%濃氨試液的 80%甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時條件下，比較超音波振盪處理 1 小時條件下，每克藥材重量所得黃耆甲苷的波峰面積較大，顯示加熱迴流 1 小時條件為較佳萃取條件。

表二、不同條件萃取比較

萃取條件	黃耆甲苷波峰面積	最佳萃取
加熱迴流 1 小時	508	√
超音波振盪處理 1 小時	346	

(四) 最佳萃取時間評估

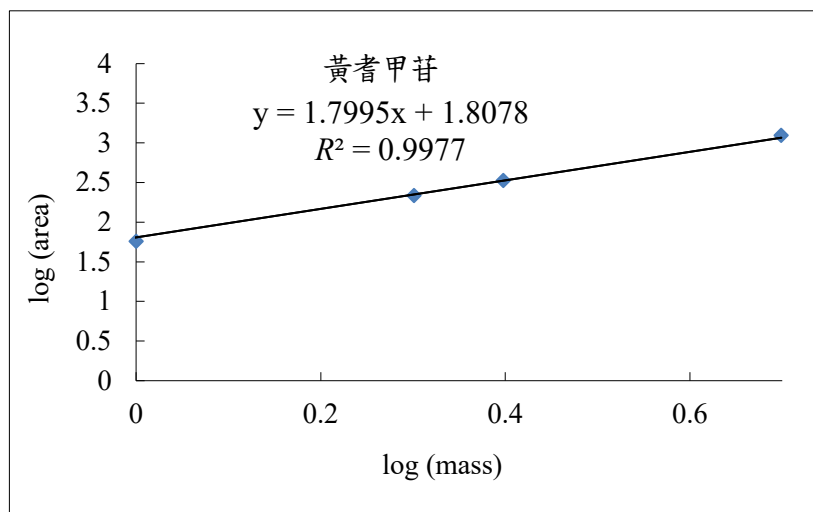
結果顯示萃取 1 小時基本上已將黃耆甲苷萃取完全，萃取 1 小時是最佳萃取時間。

表三、黃耆檢品萃取時間評估

加熱迴流 1 小時	黃耆甲苷波峰面積(mAU)
1 小時	530
2 小時	518
3 小時	244

(五) 標準品黃耆甲苷檢量線

經不同濃度黃耆甲苷(x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 1.7995x + 1.8078$ ， $R^2 = 0.9977$ ，顯示質量在 1.0–5.0 μg 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、黃耆甲苷之檢量線圖

表四、黃耆甲苷之檢量線方程式

對照標準品	質量(μg)	線性回歸方程式	R^2
黃耆甲苷	1.0–5.0	$y = 1.7995x + 1.8078$	0.9977

(六) 精密度試驗

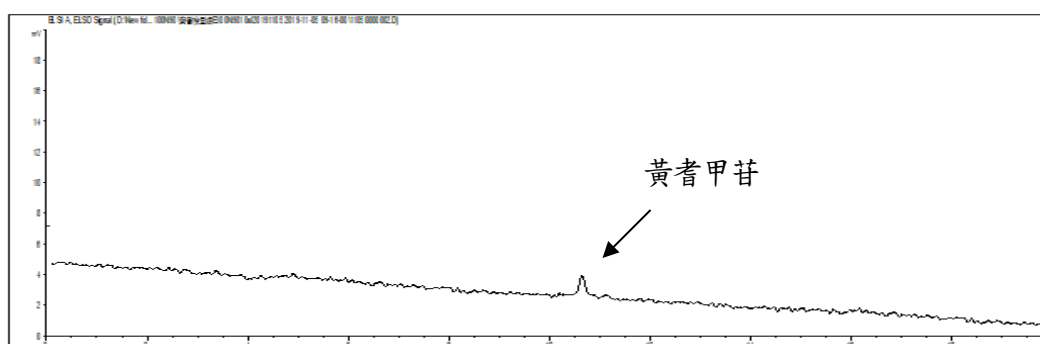
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，黃耆甲苷精密度之相對標準差為 0.51%，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

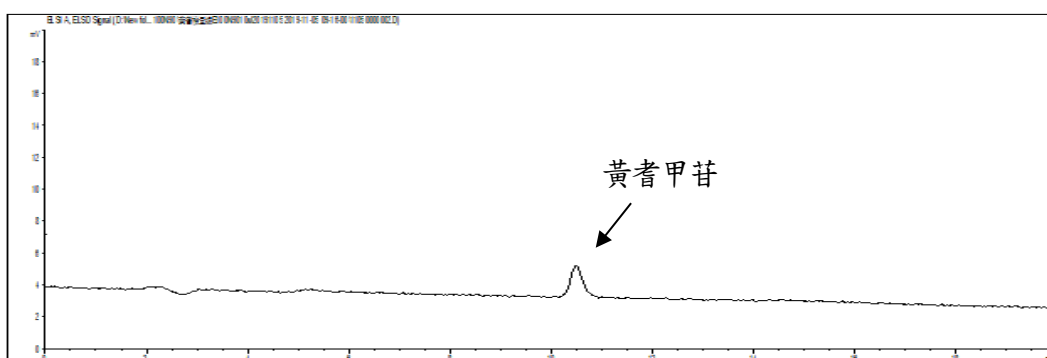
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，黃耆甲苷重複性之相對標準差為 1.47%，在系統適用性要求內。黃耆甲苷在 24 小時內穩定，穩定性相對標準差為 0.97%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

黃耆甲苷偵測極限為 10 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 20 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、黃耆甲苷之偵測極限層析圖



圖五、黃耆甲苷之定量極限層析圖

表五、各項檢驗分析

檢測項目		黃耆甲苷	
		濃度	R.S.D. (%)
精密度	(n=5)	100 $\mu\text{g/mL}$	0.51
重複性	(n=5)	檢品溶液(No.8)	1.47
穩定性	(n=5)	檢品溶液(No.8)	0.97
偵測極限	(n=1)	10 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限	(n=1)	20 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 添加回收率試驗

黃耆甲苷平均添加回收率為 94.5%，相對標準偏差為 1.58%。

表六、黃耆甲苷添加回收率試驗

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率(%)	平均回收率 (%)	R.S.D. (%)
1	0.5	0.22	0.20	0.405	92.50	94.50	1.58
2	0.5	0.22	0.20	0.413	96.50		
3	0.5	0.22	0.20	0.407	93.50		
4	0.5	0.22	0.20	0.411	95.50		
5	0.5	0.22	0.20	0.409	94.50		

(十) 臺灣市售黃耆含量測定

10 批黃耆藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，黃耆甲苷的含量在 0.124–0.360%。建議黃耆藥材所含黃耆甲苷不得少於 0.04%。理論板數按黃耆甲苷波峰計算應不低於 5000 (實際值為 8500)。

表七、臺灣市售黃耆檢品之黃耆甲苷含量

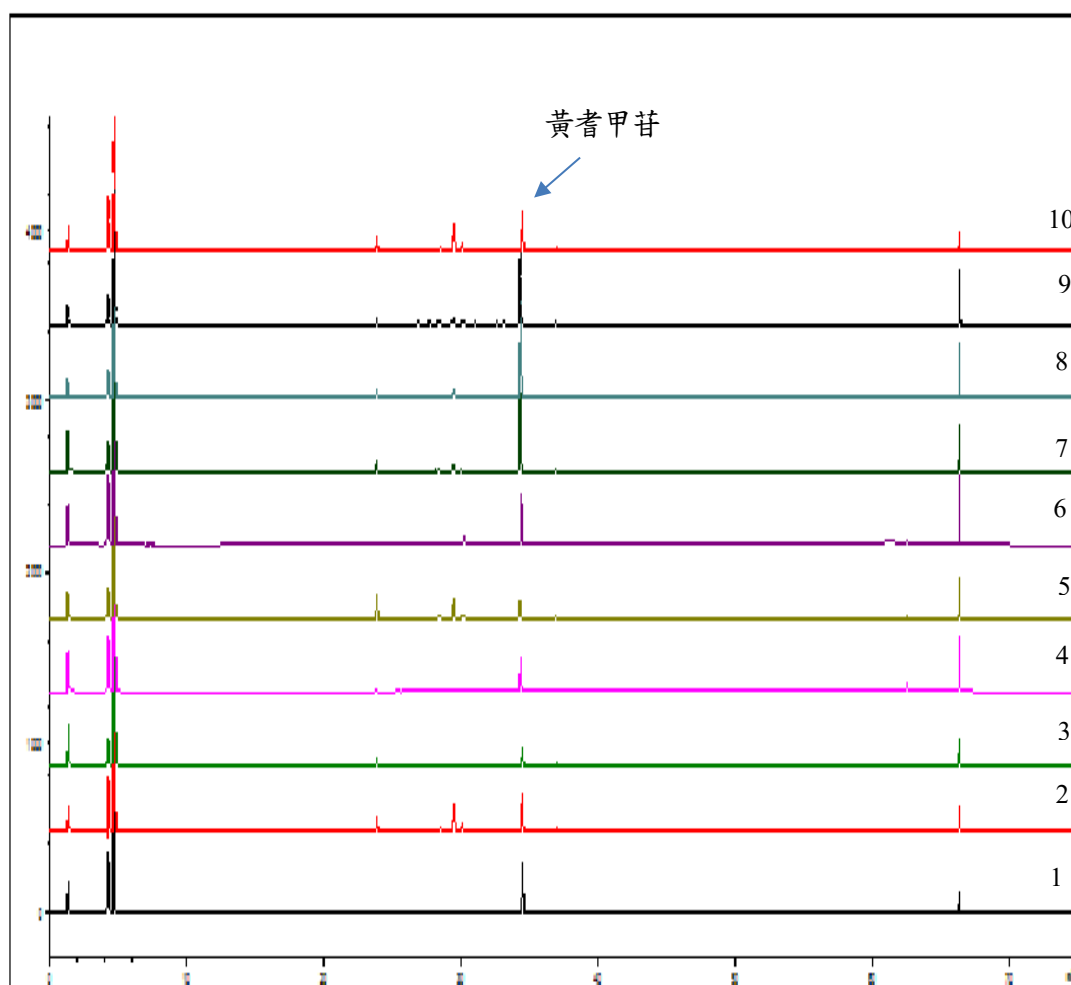
藥材編號(No.)	黃耆甲苷含量(%)
1 (ND)	0.316
2 (NDA)	0.267
3 (NDB)	0.207
4 (NDC)	0.216
5 (NDD)	0.360
6 (NDE)	0.262
7 (NE)	0.241
8 (NS)	0.124
9 (SA)	0.253
10 (SU)	0.275
平均值±S.D.	0.252±0.063

(十一) 黃耆藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售人參檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 流速：1.0 mL/min
3. 蒸發光散射檢測器檢測(ELSD)：漂移管溫度 60 $^{\circ}$ C，霧化器溫度 70 $^{\circ}$ C
4. 霧化氣(N₂)流速：1.6 L/min
5. 管柱溫度：35 $^{\circ}$ C
6. 注入量：10 μ L
7. 移動相：

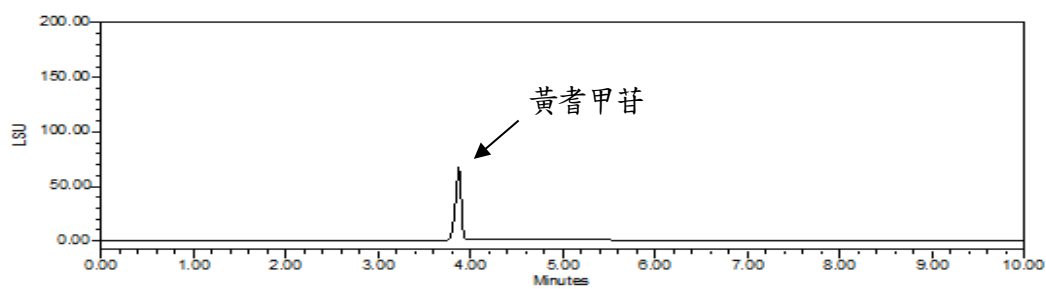
時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	0	100
10	0	100
45	60	0
60	60	0



圖六、10 批黃耆藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品黃耆甲苷之 UPLC 層析

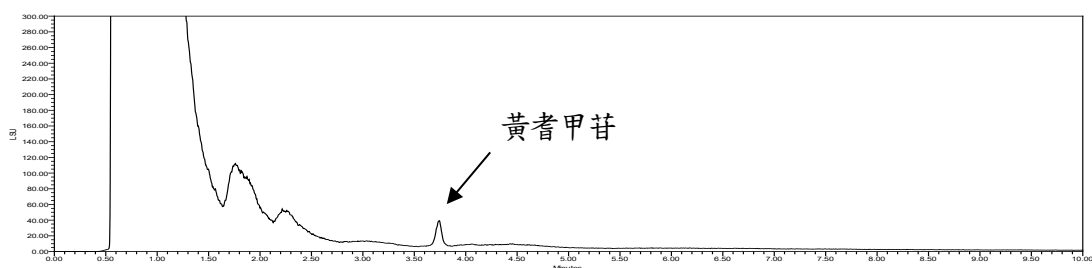
於滯留時間 3.87 分鐘處顯示黃耆甲苷標準品波峰(圖七)。



圖七、黃耆甲苷標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售黃耆檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 3.67 分鐘處顯示黃耆檢品中黃耆甲苷波峰(圖八)。

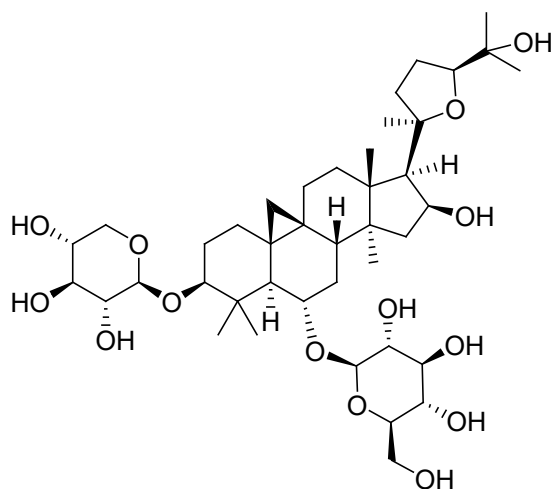


圖八、市售黃耆檢品之 UPLC 層析圖

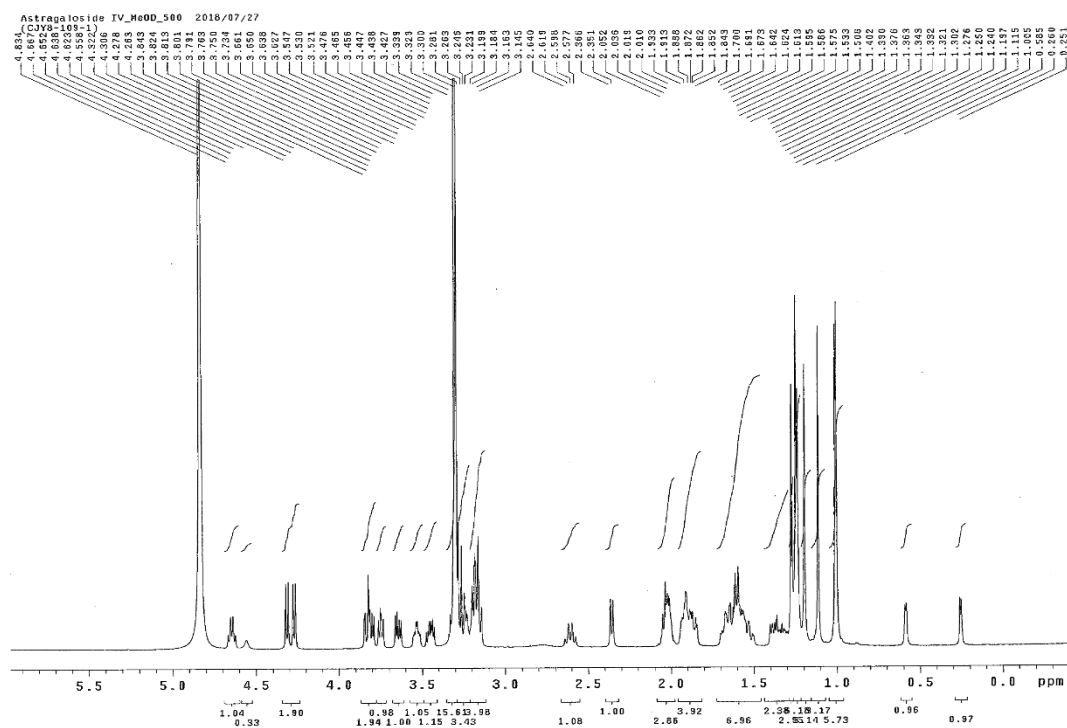
(十四) 黃耆甲苷的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{41}H_{68}O_{14}$ ；分子量：784.98；熔點：294–295°C；白色固體。

(十五) 黃耆甲苷的結構

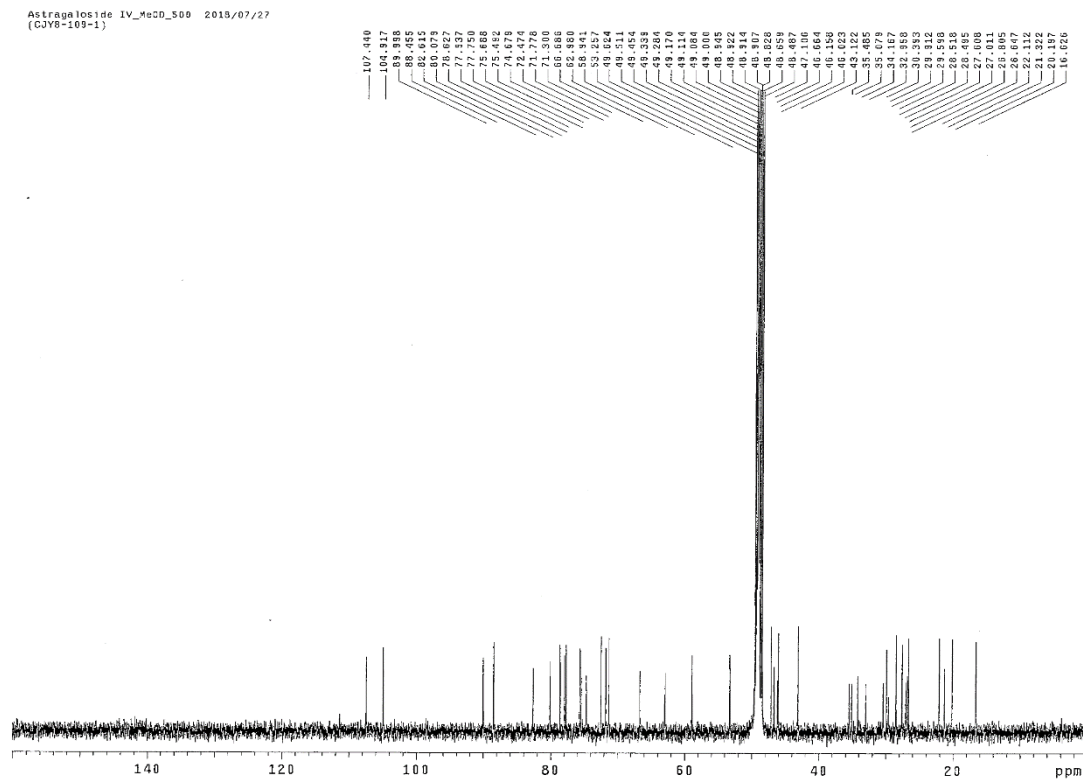


(十六) 黃耆甲苷的 ^1H NMR 圖譜



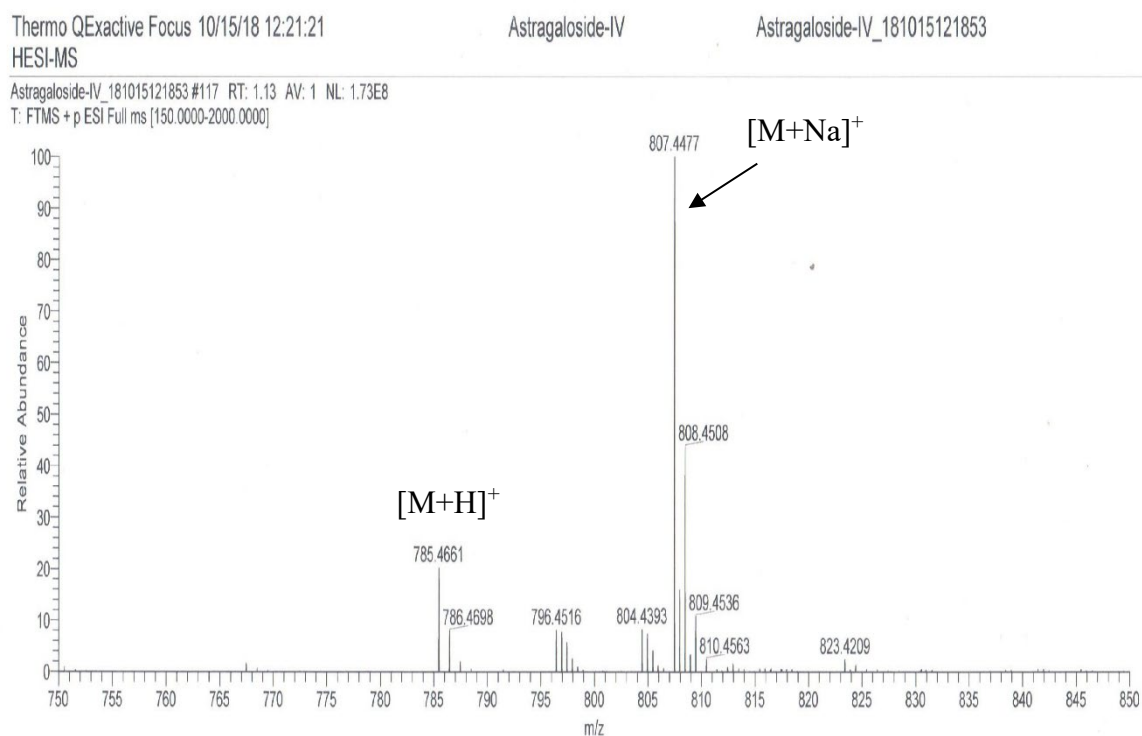
圖九、黃耆甲苷的 ^1H NMR 圖譜(CD_3OD)

(十七) 黃耆甲苷的 ^{13}C NMR 圖譜



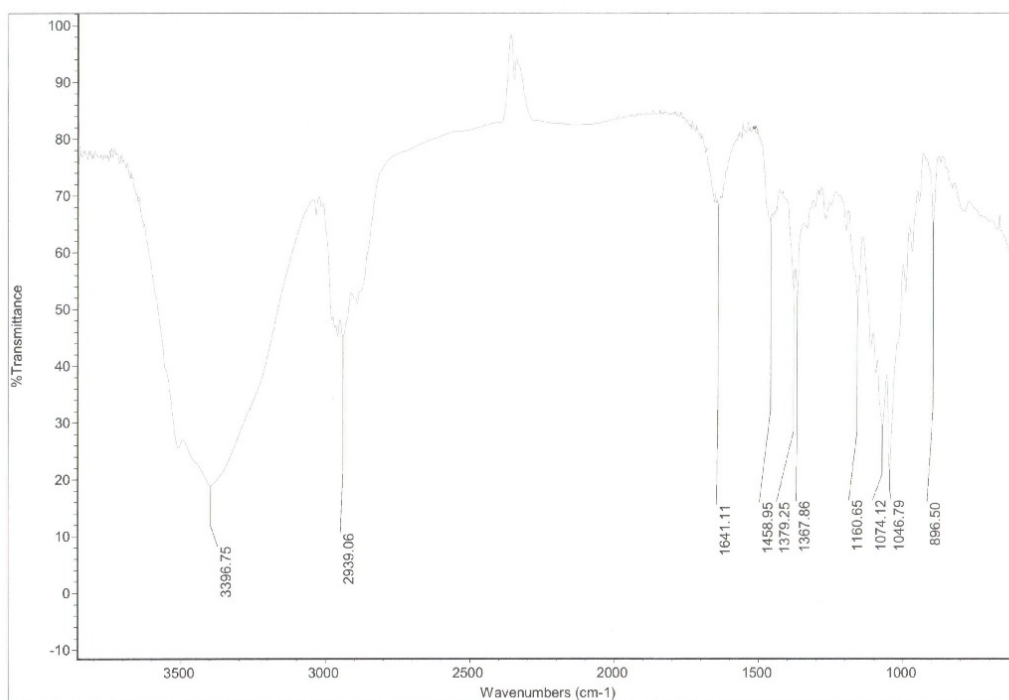
圖十、黃耆甲苷的 ^{13}C NMR 圖譜(CD_3OD)

(十八) 黃耆甲苷的 ESI-MS 圖譜



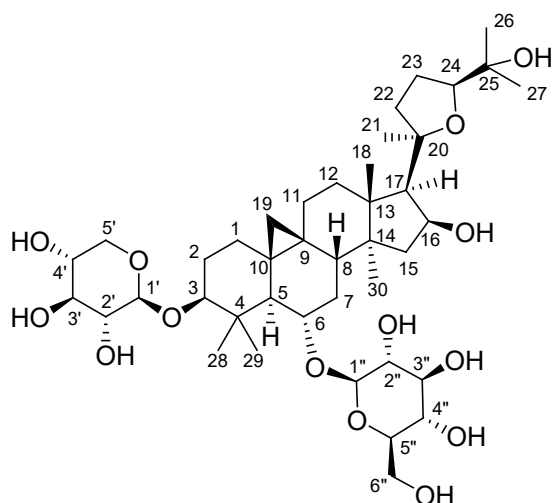
圖十一、黃耆甲苷的 ESI-MS 圖譜

(十九) 黃耆甲苷的 FTIR 圖譜



圖十二、黃耆甲苷的 FTIR 圖譜

(二十) 黃耆甲苷的氫、碳化學位移



黃耆甲苷

表八、黃耆甲苷的氫、碳化學位移(CD₃OD)^a

position	δ_H (500 MHz)	δ_C (125 MHz)
1	1.22–1.25 (m), 1.51–1.58 (m)	33.0
2	1.62–1.68 (m), 1.87–1.93 (m)	30.4
3	3.18–3.21 (m)	90.0
4	-	43.1
5	1.60 (d, 9.0)	53.3
6	3.51–3.55 (m)	80.1
7	1.87–1.93 (m), 2.61 (q, 10.5)	35.1
8	1.84–1.86 (m)	46.7
9	-	22.1
10	-	29.9
11	1.87–1.93 (m), 2.01–2.05 (m)	27.0
12	1.60–1.70 (m)	34.2
13	-	47.1
14	-	46.0
15	1.38 (dd, 13.0, 6.0), 2.01–2.05 (m)	46.2
16	4.62–4.67 (m)	74.7
17	2.36 (d, 7.5)	58.9
18	1.24 (s)	21.3
19	0.26 (d, 4.5), 0.59 (d, 4.5)	29.6
20	-	88.5
21	1.20 (s)	28.5
22	1.64–1.70 (m), 2.58–2.64 (m)	35.5

23	1.87–1.93 (m), 2.01–2.05 (m)	26.8
24	3.75 (dd, 8.0, 6.5)	82.6
25	-	72.5
26	1.12 (s)	26.6
27	1.25 (s)	27.6
28	1.28 (s)	28.5
29	1.01 (s)	16.6
30	1.01 (s)	20.2
1'	4.27 (d, 7.5)	107.4
2'	3.14–3.20 (m)	75.7*
3'	3.23–3.28 (m)	77.9 [#]
4'	3.43–3.48 (m)	71.3
5'	3.14–3.18 (m), 3.81 (dd, 11.0, 5.0)	66.7
1''	4.31 (d, 8.0)	104.9
2''	3.14–3.20 (m)	75.5*
3''	3.23–3.28 (m)	77.8 [#]
4''	3.23–3.28 (m)	71.8
5''	3.28–3.34 (m)	78.6 [#]
6''	3.64 (dd, 11.5, 5.5), 3.83 (dd, 11.5, 5.0)	63.0

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm. *[#]interchangeable.

附錄 I、定量濃度及百分含量計算

用標準品的波峰面積與溶液中相應質量的 log 值作圖，進行線性迴歸分析得斜率與截距。

(1)按下列公式計算溶液中待測成分的質量 log 值(log(mass))：

$$A = \frac{I - b}{m}$$

其中

A：待測成分質量 log 值 (log(mass))

I：檢品中待測成分之波峰面積 log 值 (log (area))

b：檢量線的 y 軸截距

m：檢量線的斜率

(2)計算溶液中待測成分的質量 (反 log(mass))： $W_{(s)} = 10^A$

(3)按下列公式計算樣品中待測成分的百分含量

$$C = \frac{W_{(s)} \times 100}{1000 W} \times 100\%$$

其中

C：待測成分含量(%)

$W_{(s)}$ ：檢品質量(反 log 值)

D：稀釋倍數

V 倍數：定容體積(μL)/ 注入量(μL)

W：藥材重(mg)

黃耆(飲片)HPLC-ELSD

一、材料

購自於臺灣各地中藥店黃耆飲片藥材共 13 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Agilent 1260 series，包含 Degasser G1316A、QuatPump G1311B、Sampler G1329B、DAD G1315D、ELSD G4260B；層析管柱 Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)

(二) UPLC 儀器及層析管柱

Waters AcQuity Ultra Performance LC，包含 Binary Solvent Manager、Sampler Manager、PDA Detector、ELSD Detector；層析管柱 Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

甲醇(99.9%)和乙腈(99.9%)購自於 Merck；氨水(25%) 購自於友和貿易股份有限公司。

(二) 標準品

標準品黃耆甲苷(Astragaloside IV) 來自於中醫藥司，純度 98/%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒評估

黃耆飲片最佳萃取溶媒同黃耆藥材。

(二) 最佳萃取時間評估

黃耆飲片最佳萃取次數同黃耆藥材。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取標準品黃耆甲苷 1.0 mg，加 1 mL 甲醇製成每 1 mL 含 1000 μg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 100 μg/mL 製成對照標準品溶液。

(四) 檢品溶液

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 4%濃氨試液的 80%甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 量瓶中，加 4%濃氨試液的 80%甲醇至刻度，轉移至 100 mL 濃縮瓶，減壓濃縮至乾，濃縮物溶於 80%甲醇，

並轉移入至 10 mL 容量瓶，加 80% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，即得。

(五) 測定法

分別準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 μL ，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中黃耆甲苷的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取黃耆甲苷標準品儲備液適量(1000 $\mu\text{g/mL}$)，以甲醇稀釋成含黃耆甲苷分別為 500、250、200、100 $\mu\text{g/mL}$ 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積 $\log$ 值(y 軸)和標準品質量 $\log$ 值(x 軸)進行線性回歸，並求得檢量線之方程式 $y = ax + b$ 與相關係數 R^2 。

(七) 精密度試驗

以黃耆甲苷濃度為 100 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以黃耆甲苷的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性：取同一批市售黃耆飲片粉末，依黃耆飲片檢品溶液製備方法平行製備五份黃耆檢品溶液，進樣測定，以黃耆甲苷的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售黃耆飲片粉末，依黃耆飲片檢品溶液製備方法製備黃耆檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以黃耆甲苷的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(九) 偵測極限與定量極限試驗

1. 偵測極限(Limit of Detection, LOD)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 3:1$ 時之濃度，作為偵測極限估計值。
2. 定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)：將已知濃度之標準品溶液不斷稀釋，並以訊號雜訊比為 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(十) 添加回收率試驗

取已知黃耆甲苷含量的黃耆飲片粉末 5 份，每份準確稱取各約 0.5 g，分別加入 1 mL 的黃耆甲苷溶液(500 $\mu\text{g/mL}$)，並按檢品溶液製備方法操作測定。

(十一) HPLC 分析條件

1. 層析管：Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 流速：1.0 mL/min
3. 蒸發光散射檢測器檢測(ELSD)：漂移管溫度 60 °C，霧化器溫度 70 °C
4. 霧化氣(N₂)流速：1.6 L/min
5. 管柱溫度：35 °C
6. 注入量：10 μL
7. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	34	66
20	34	66

(十二) 臺灣市售黃耆飲片含量測定

取 10 批市售黃耆飲片依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品黃耆甲苷的百分含量。

(十三) 黃耆檢品之 UPLC 層析條件

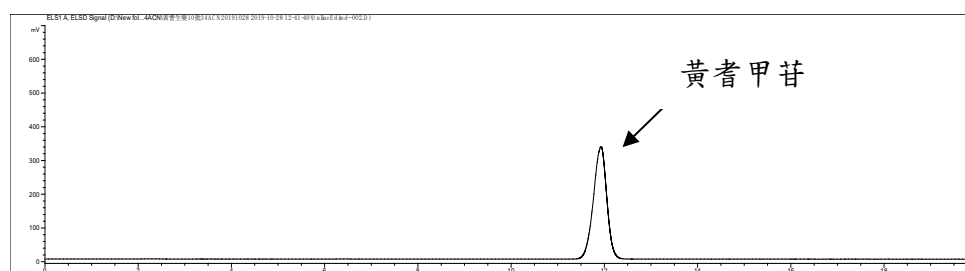
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 流速：0.4 mL/min
3. 蒸發光散射檢測器檢測(ELSD)：漂移管溫度 60 °C，霧化器溫度 70 °C
4. 霧化氣(N₂)流速：1.6 L/min
5. 管柱溫度：35 °C
6. 注入量：1 μL
7. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	34	66
10	34	66

五、結果

(一) 標準品黃耆甲苷之 HPLC 層析

於滯留時間 11.9 分鐘處顯示黃耆甲苷標準品波峰(圖一)。

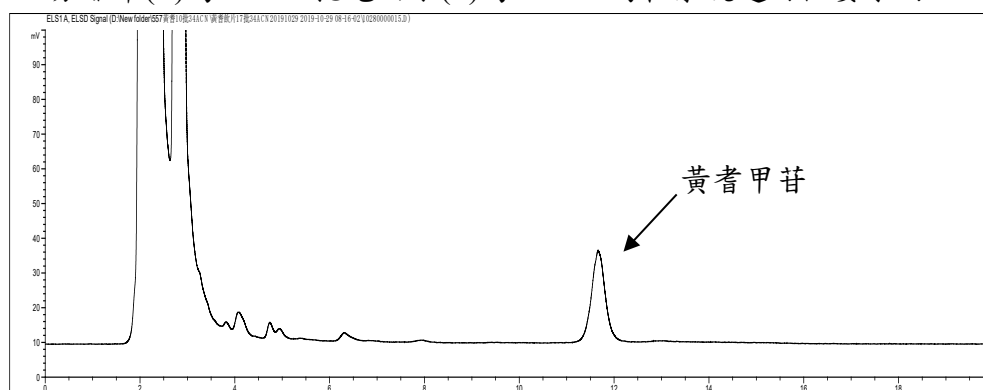


圖一、黃耆甲苷標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售黃耆飲片檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 11.7 分鐘處顯示黃耆飲片檢品中黃耆甲苷波峰(圖二)。

分離率(R)為 11.8，托尾因子(T)為 1.03，均在系統適用性要求內。



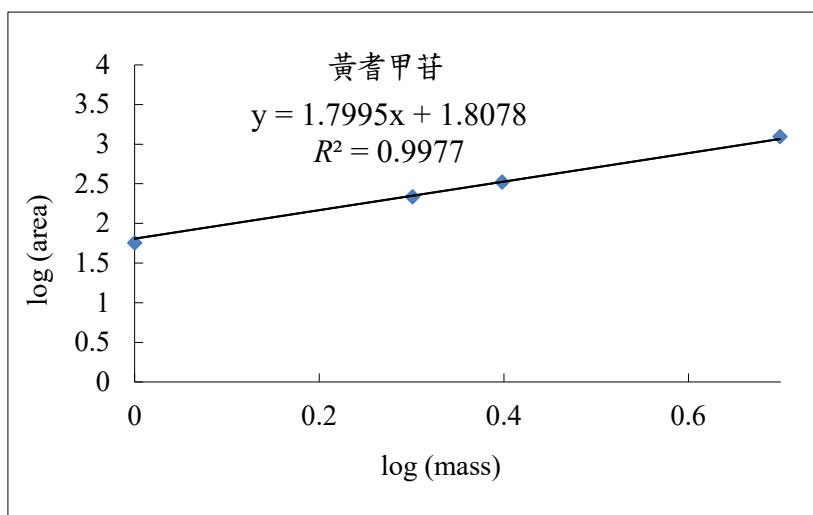
圖二、市售黃耆飲片檢品之 HPLC 層析圖

表一、黃耆甲苷之分離率與托尾因子

	黃耆甲苷
分離率	11.8
托尾因子	1.03

(三) 標準品黃耆甲苷檢量線

經不同質量黃耆甲苷 $\log$ 值(x)對各自層析波峰面積 $\log$ 值(y)所得到的檢量線方程式為 $y = 1.7995x + 1.8078$ ， $R^2 = 0.9977$ ，顯示質量在 1.0–5.0 μg 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、黃耆甲苷之檢量線圖

表二、黃耆甲苷之檢量線方程式

對照標準品	質量(μg)	線性回歸方程式	R^2
黃耆甲苷	1.0–5.0	$y = 1.7995x + 1.8078$	0.9977

(六) 精密度試驗

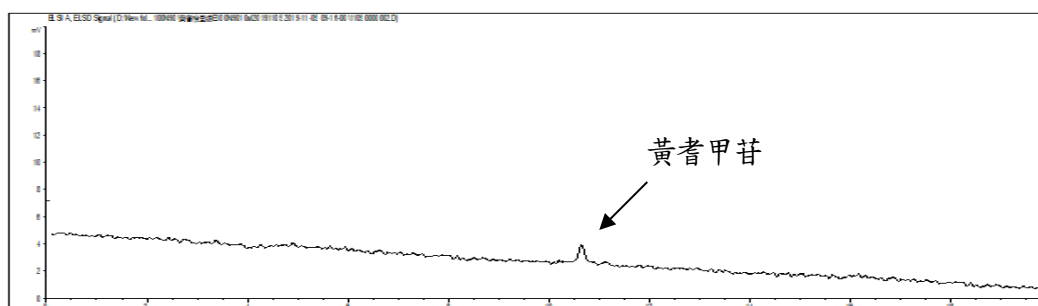
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，黃耆甲苷精密度之相對標準差為 0.51 %，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

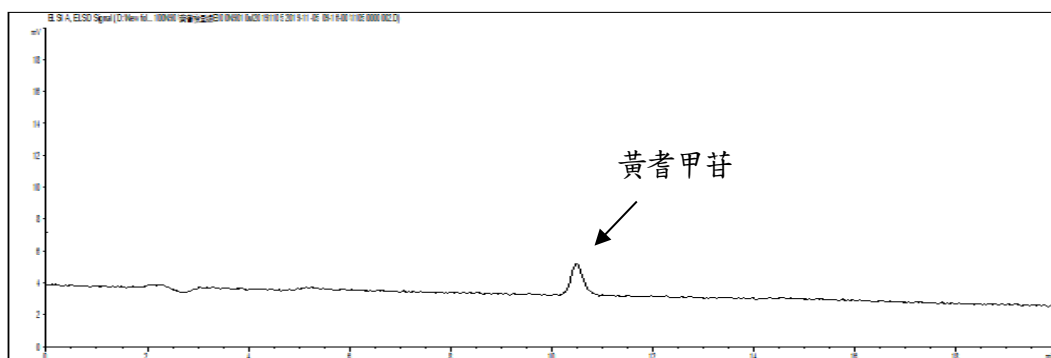
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，黃耆甲苷重複性之相對標準差為 2.01%，在系統適用性要求內。黃耆甲苷在 24 小時內穩定，相對標準差為 1.05%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

黃耆甲苷偵測極限為 10 μg/mL (圖四)，定量極限為 20 μg/mL (圖五)。



圖四、黃耆甲苷之偵測極限層析圖



圖五、黃耆甲苷之定量極限層析圖

表三、各項檢驗分析

檢測項目	黃耆甲苷	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	100 µg/mL	0.51
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.6)	2.01
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.6)	1.05
偵測極限 (n=3)	10 µg/mL	-
定量極限 (n=3)	20 µg/mL	-

(九) 添加回收率試驗

黃耆甲苷平均添加回收率為 97.9%，相對標準偏差為 0.41%。

表四、黃耆甲苷添加回收率

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg)	加入量 (mg)	測得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	R.S.D. (%)
1	0.5	0.50	0.50	0.991	98.20	97.88	0.41
2	0.5	0.50	0.50	0.987	97.40		
3	0.5	0.50	0.50	0.989	97.80		
4	0.5	0.50	0.50	0.992	98.4		
5	0.5	0.50	0.50	0.988	97.60		

(十) 臺灣市售黃耆飲片含量測定

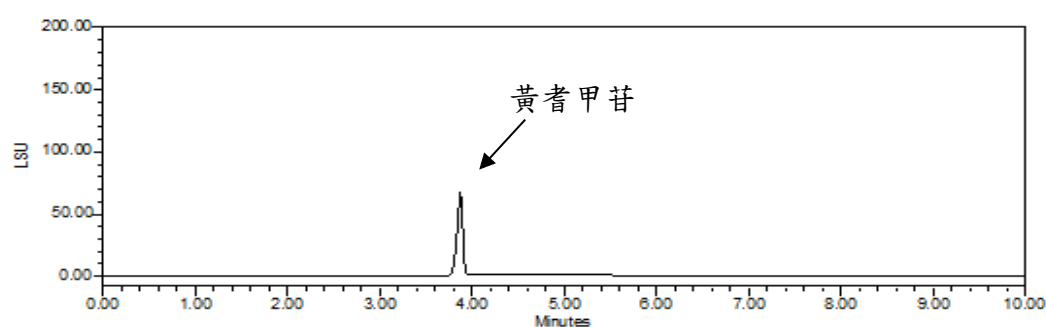
10 批黃耆飲片之含量測定結果(乾燥品) 如表四所示，黃耆甲苷含量為 0.088–0.325%。建議黃耆飲片指標成分黃耆甲苷的含量不得少於 0.04%。理論板數按黃耆甲苷波峰計算應不低於 5000 (實際值為 7800)。

表五、臺灣市售黃耆飲片檢品之黃耆甲苷含量

藥材編號(No.)	黃耆甲苷含量(%)	藥材編號(No.)	黃耆甲苷含量(%)
1 (NFB)	0.088	8 (SGC)	0.159
2 (NFC)	0.156	9 (SGD)	0.154
3 (NR)	0.153	10 (SU)	0.325
4 (SA)	0.252	11 (NSTP)	0.149
5 (SG)	0.208	12 (NKOD)	0.166
6 (SGA)	0.188	13 (SCSZ)	0.096
7 (SGB)	0.171	平均值±S.D.	0.174±0.062

(十二) 標準品黃耆甲苷之 UPLC 層析

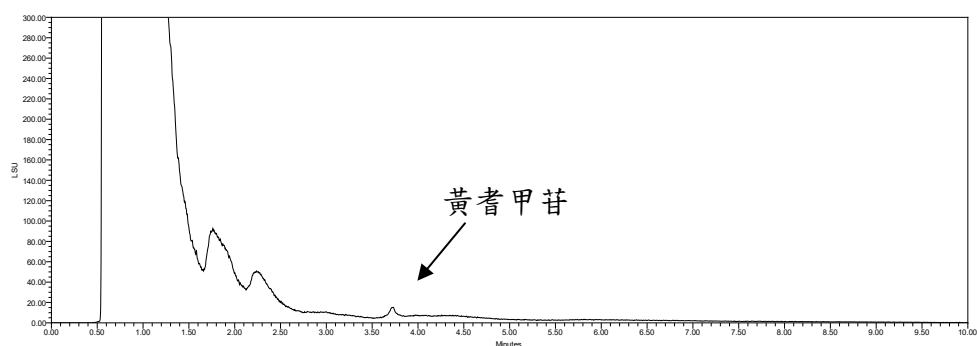
於滯留時間 3.87 分鐘處顯示黃耆甲苷標準品波峰(圖六)。



圖六、黃耆甲苷標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售黃耆飲片檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 3.71 分鐘處顯示黃耆飲片檢品中黃耆甲苷波峰(圖七)。



圖七、市售黃耆飲片檢品之 UPLC 層析圖

附錄 I、定量濃度及百分含量計算

用標準品的波峰面積與溶液中相應質量的 log 值作圖，進行線性迴歸分析得斜率與截距。

(1)按下列公式計算溶液中待測成分的質量 log 值(log(mass))：

$$A = \frac{I - b}{m}$$

其中

A：待測成分質量 log 值 (log(mass))

I：檢品中待測成分之波峰面積 log 值 (log (area))

b：檢量線的 y 軸截距

m：檢量線的斜率

(2)計算溶液中待測成分的質量 (反 log(mass))： $W_{(s)} = 10^A$

(3)按下列公式計算樣品中待測成分的百分含量

$$C = \frac{W_{(s)} \times 100}{1000 W} \times 100\%$$

其中

C：待測成分含量(%)

$W_{(s)}$ ：檢品質量(反 log 值)

D：稀釋倍數

V 倍數：定容體積(μL)/ 注入量(μL)

W：藥材重(mg)

黃耆(藥材+飲片)TLC

生藥名：ASTRAGALI RADIX

英文名：Astragalus Root

基 原：本品為豆科 Leguminosae 植物蒙古黃耆 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge var. *mongholicus* (Bunge) P.K.Hsiao 或膜莢黃耆 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge 之乾燥根。

一、方法

- (一) 檢 品 溶 液 **【萃取方法 1】(修飾臺灣中藥典第三版 2018)**
——取本品粉末 1.0 g，加 75% 甲醇 15 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，作為檢品溶液。
【萃取方法 2】(臺灣中藥典第三版 2018) ✓
——取本品粉末 1.0 g，加 甲醇 15 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，作為檢品溶液。
- (二) 對照標準品
溶 液 取黃耆甲苷(Astragaloside IV)對照標準品，加 甲醇製成每 1 mL 含 1.0 mg 的溶液，作為對照標準品溶液。
- (三) 薄層板 HPTLC silica gel 60 F₂₅₄，10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm
- (四) 展開劑 **【展開劑 1】(修飾臺灣中藥典第三版 2018) ✓**
——正丁醇：乙醇：32% 氨水 (5：1：2)
【展開劑 2】(自行開發 1)
——乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)
【展開劑 3】(自行開發 2)
——正丁醇：冰醋酸：水 (5：1：1)
【展開劑 4】(臺灣中藥典第三版 2018)
——正丁醇：乙醇：4N 氨水 (5：1：2) (取上層液)
- (五) 展開槽 10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm
- (六) 展開 展開槽預先平衡 15 分鐘，上行展開，展開距離 8 cm。
- (七) 顯色&檢視 以 10% 硫酸/乙醇試液(H₂SO₄/EtOH TS)噴霧後，105 °C 加熱至條帶顯色清晰，於主波長 365 nm 之紫外燈照射下檢視。

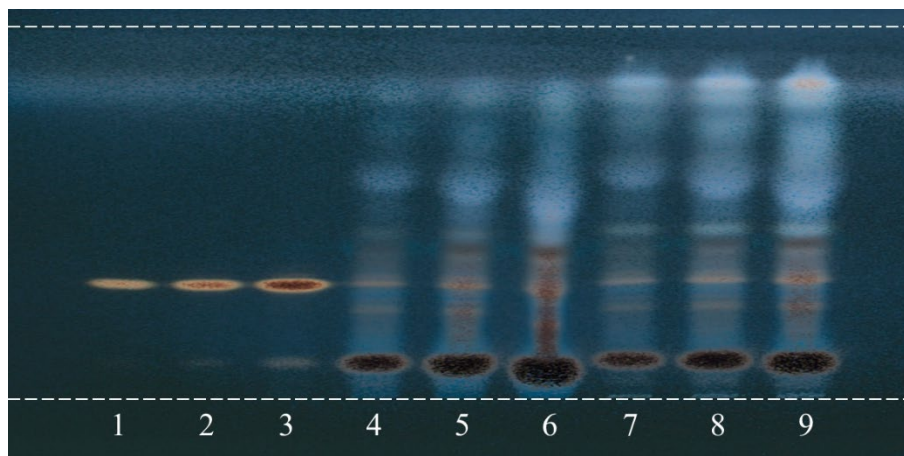
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：108/05/16

相對溼度(RH)：68%

溫度(RT)：25 °C

【展開劑 1】 (臺灣中藥典第三版 2018)——正丁醇：乙醇：32%氨水 (5：1：2)



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	黃耆甲苷(1.0 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 1【萃取方法 1】	5, 10, 20 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 1【萃取方法 2】	5, 10, 20 μ L

建議萃法：2 種萃法之檢品溶液中皆有分離與檢出標準品黃耆甲苷，故維持臺灣中藥典萃法【萃取方法 2】。

建議點注量：黃耆甲苷標準品溶液 1 μ L，檢品溶液【萃取方法 2】10 μ L。

三、溶媒系統選擇

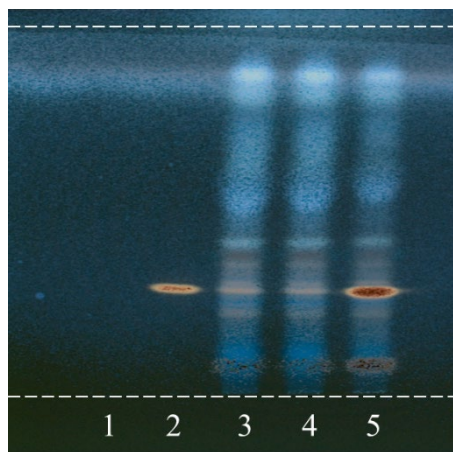
實驗日期：108/05/21

相對溼度(RH)：45%

溫度(RT)：25 °C

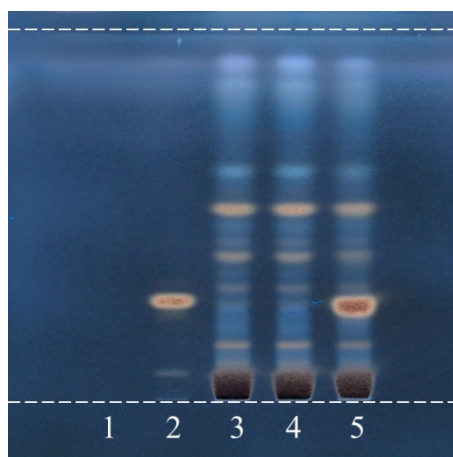
【展開劑 1】 (臺灣中藥典第三版 2018)——正丁醇：乙醇：32%氨水 (5：1：2) ✓

【萃取方法 2】 (臺灣中藥典第三版 2018)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出(黃耆甲苷 R_f 值為 0.28)



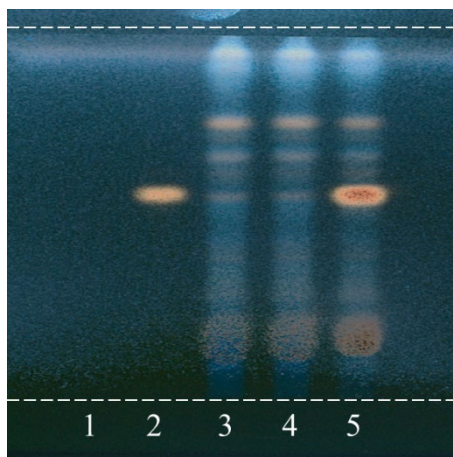
【展開劑 2】 (自行開發 1)——乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)

【萃取方法 2】 (臺灣中藥典第三版 2018)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出(黃耆甲苷 R_f 值為 0.26)



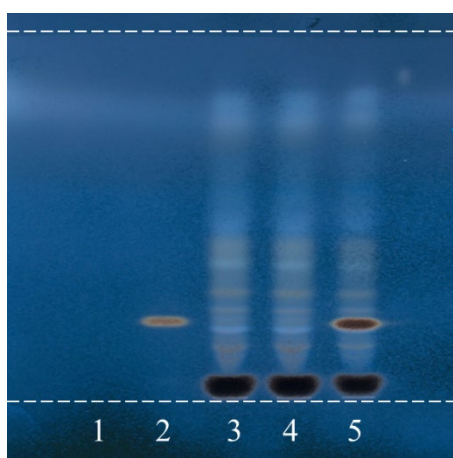
【展開劑 3】 (自行開發 2)——正丁醇：冰乙酸：水 (5：1：1)

【萃取方法 2】 (臺灣中藥典第三版 2018)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出(黃耆甲苷 R_f 值為 0.55)



展開劑 4】 (臺灣中藥典第三版 2018)——正丁醇：乙醇：4N 氨水 (5：1：2)(取上層液)

【萃取方法 2】 (臺灣中藥典第三版 2018)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出(黃耆甲苷 R_f 值為 0.21)



1：Blank

2：黃耆甲苷

3，4：檢品溶液 1

5：Spike

建議溶媒系統：以臺灣中藥典第三版 2018 萃取方式，比較四種展開劑，以修飾臺灣中藥典第三版 2018 之溶媒系統【展開劑 1】展開，黃耆甲苷之條帶較明顯。

四、觀察方式選擇

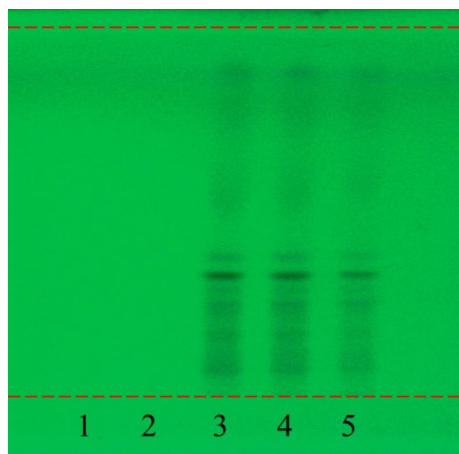
實驗日期：108/05/21

相對溼度(RH)：45%

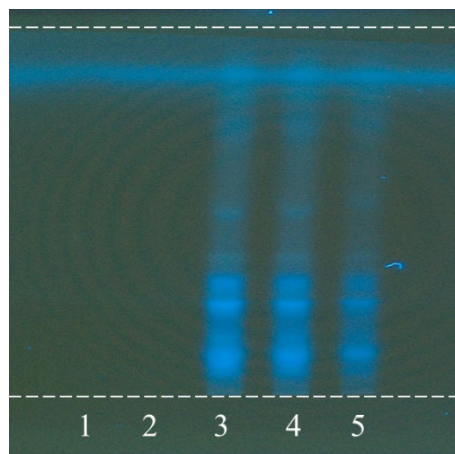
溫度(RT)：25 °C

【展開劑 1】(臺灣中藥典第三版 2018)——正丁醇：乙醇：32%氨水 (5：1：2)

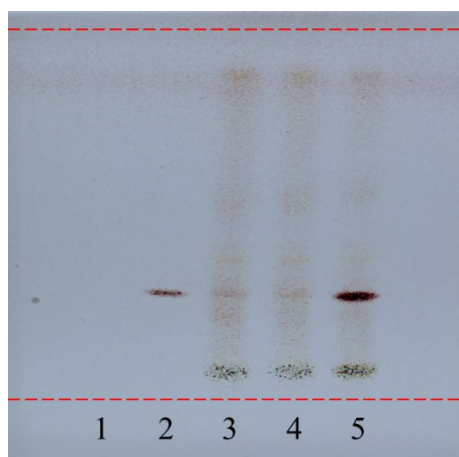
【萃取方法 2】(臺灣中藥典第三版 2018)－HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



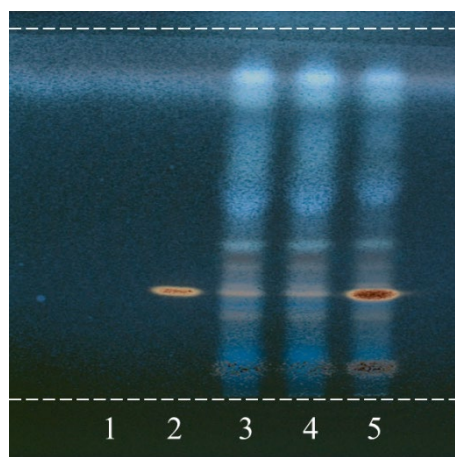
【萃取方法 2】(臺灣中藥典第三版 2018)－HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 2】(臺灣中藥典第三版 2018)－HPTLC 顯色/可見光檢出



【萃取方法 2】(臺灣中藥典第三版 2018)－HPTLC 顯色/紫外光(365 nm)檢出✓



1：Blank

2：黃耆甲苷

3，4：檢品溶液 1

5：Spike

建議觀察方式：經 10%硫酸/乙醇顯色後，於紫外光(365 nm)檢視較其他觀察方式有較多明顯之條帶及黃耆甲苷標準品斑點。

五、十批黃耆樣品檢測

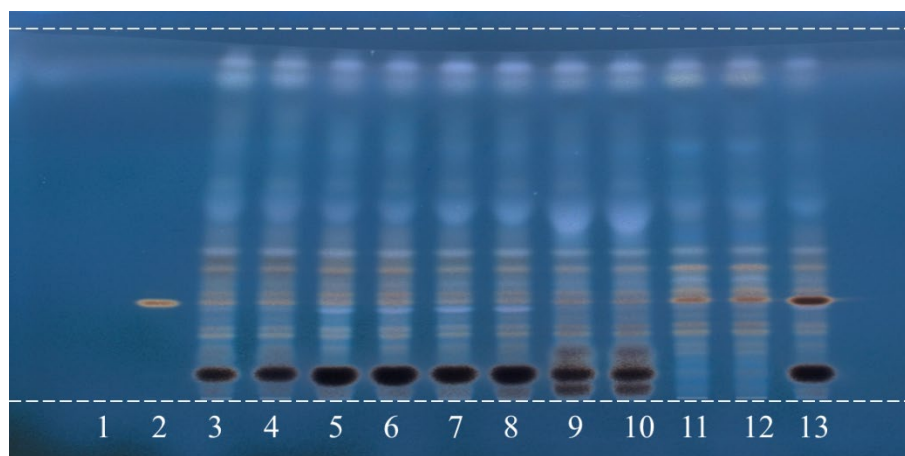
實驗日期：108/05/22

相對溼度(RH)：54%

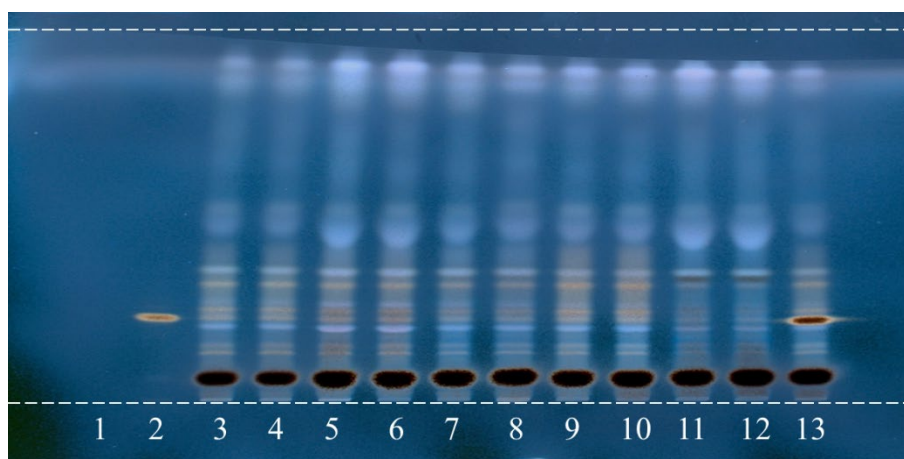
溫度(RT)：24 °C

【展開劑 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) ——正丁醇：乙醇：32%氨水 (5：1：2)

【萃取方法 2】 (臺灣中藥典第三版 2018) ——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	黃耆甲苷(1.0 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 1 (ND)
5 , 6	檢品溶液 2 (NDA)
7 , 8	檢品溶液 3 (NDB)
9 , 10	檢品溶液 4 (NDC)
11 , 12	檢品溶液 5 (NDD)
13	Spike (檢品溶液 1)



1	Blank
2	黃耆甲苷(1.0 mg/mL)
3, 4	檢品溶液 6 (NDE)
5, 6	檢品溶液 7 (NE)
7, 8	檢品溶液 8 (NS)
9, 10	檢品溶液 9 (SA)
11, 12	檢品溶液 10 (SU)
13	Spike (檢品溶液 1)

結論與建議：以臺灣中藥典第三版之【萃取方法 2】方式，以修飾臺灣中藥典第三版 2018 之【展開劑 1】分離與檢出黃耆甲苷較佳，以 10%硫酸乙醇顯色後，於紫外光(365 nm)下檢視較佳。

六、十批黃耆飲片樣品檢測

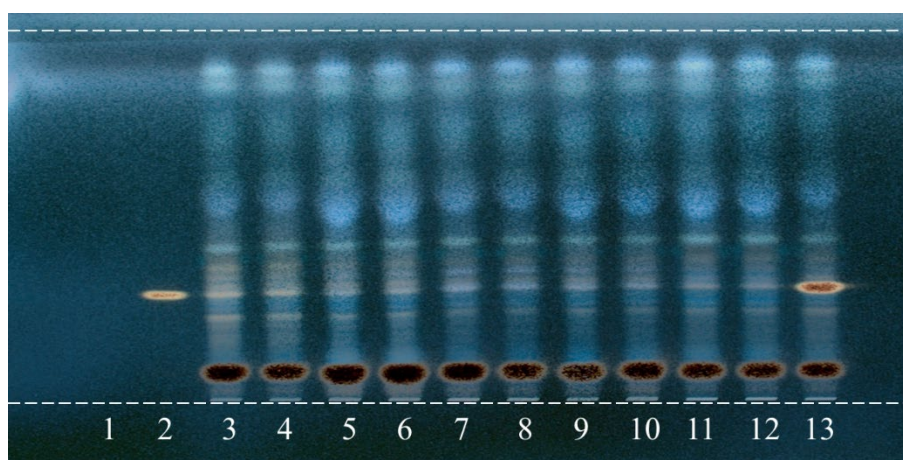
實驗日期：108/05/23

相對溼度(RH)：63%

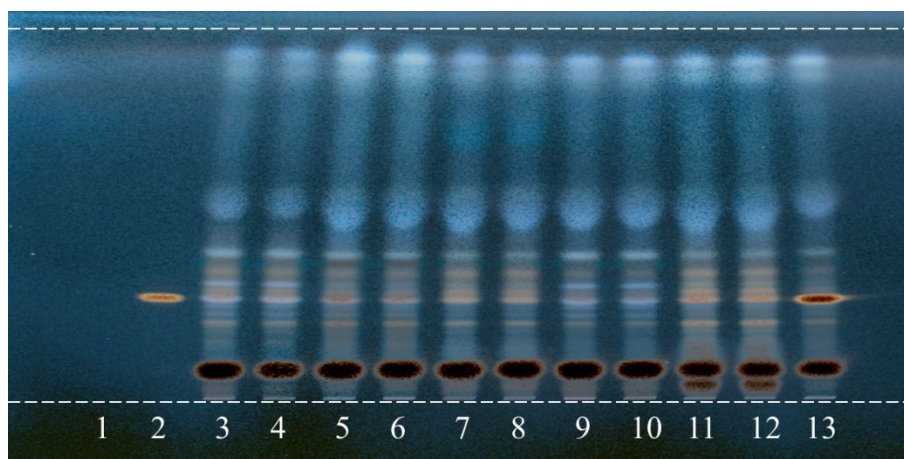
溫度(RT)：25 °C

【展開劑 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) ——正丁醇：乙醇：32%氨水 (5：1：2)

【萃取方法 2】 (臺灣中藥典第三版 2018) ——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	黃耆甲苷(1.0 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 1 (NFB)
5 , 6	檢品溶液 2 (NFC)
7 , 8	檢品溶液 3 (NR)
9 , 10	檢品溶液 4 (SA)
11 , 12	檢品溶液 5 (SG)
13	Spike (檢品溶液 7)



1	Blank
2	黃耆甲苷(1.0 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 6 (SGA)
5 , 6	檢品溶液 7 (SGB)
7 , 8	檢品溶液 8 (SGC)
9 , 10	檢品溶液 9 (SGD)
11 , 12	檢品溶液 10 (SU)
13	Spike (檢品溶液 7)

結論與建議：飲片鑑別同藥材。