

車前子

(PLANTAGINIS SEMEN)

車前子 MI

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).....	3

車前子(藥材)HPLC(毛蕊花糖苷)

一、材料.....	7
二、儀器及層析管柱.....	7
三、實驗藥品及試劑來源.....	7
四、方法.....	7
五、結果.....	11

車前子(藥材)HPLC(京尼平苷酸)

一、材料.....	21
二、儀器及層析管柱.....	21
三、實驗藥品及試劑來源.....	21
四、方法.....	21
五、結果.....	25

車前子(藥材)TLC

一、方法.....	34
二、萃法選擇及濃度測試.....	35
三、溶媒系統選擇.....	36
四、觀察方式選擇.....	39
五、十批車前子藥材樣品檢測.....	40

車前子

(PLANTAGINIS SEMEN)

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車前的乾燥成熟種子。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：車前子

生藥名：PLANTAGINIS SEMEN

英文名：Plantago Seed

基原：本品為車前科 Plantaginaceae 植物車前 *Plantago asiatica* L.之乾燥成熟種子。

採收加工：果實成熟後剪取果穗，曬乾，搓下種子，篩去雜質及泥砂後即得。

藥材性狀：本品呈橢圓形或不規則長圓形，稍扁，長 1.1~2.1 mm，寬 0.6~1.2 mm，粒稍大，表面棕褐色或紫黑色，放大觀察可見平行突起的波狀條紋明顯，紋理略呈網狀，背面較平坦，腹面隆起，腹面中央有凹下之淡黃色種臍，氣味微，嚼之帶黏液性。

生長分佈：多年生草本植物，喜溫暖潮濕、日照充足之地，對土壤要求不嚴，耐旱、耐寒、耐貧脊。常見於路旁、河邊、坡地等。花期 6~9 月，果期 7~10 月。中國及臺灣各地皆有產。

三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)

1. 種皮表皮分為兩層，外層為黏液層，內層為色素層。
2. 黏液層細胞壁極薄，遇水膨脹融化。
3. 色素層呈多角形或略方形，含棕色色素，背面色素層細胞呈切向延長，腹面色素層細胞呈徑向延長。
4. 胚乳細胞，約 3~5 列，略呈橢圓形或類圓形，內含糊粉粒及脂肪油。
5. 子葉細胞排列整齊，略呈圓形，含有糊粉粒及脂肪油。

四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3)

1. 本品粉末深黃棕色。
2. 種皮表皮細胞斷面觀呈類方形或類長方形，壁薄；表面觀呈類長方形，長 $25\sim75\ \mu\text{m}$ ，直徑 $3\sim18\ \mu\text{m}$ 。
3. 胚乳細胞壁厚，呈多角形或類圓形，胞腔內富含糊粉粒及脂肪油。
4. 子葉細胞呈類圓形或類橢圓形，內含糊粉粒及脂肪油。

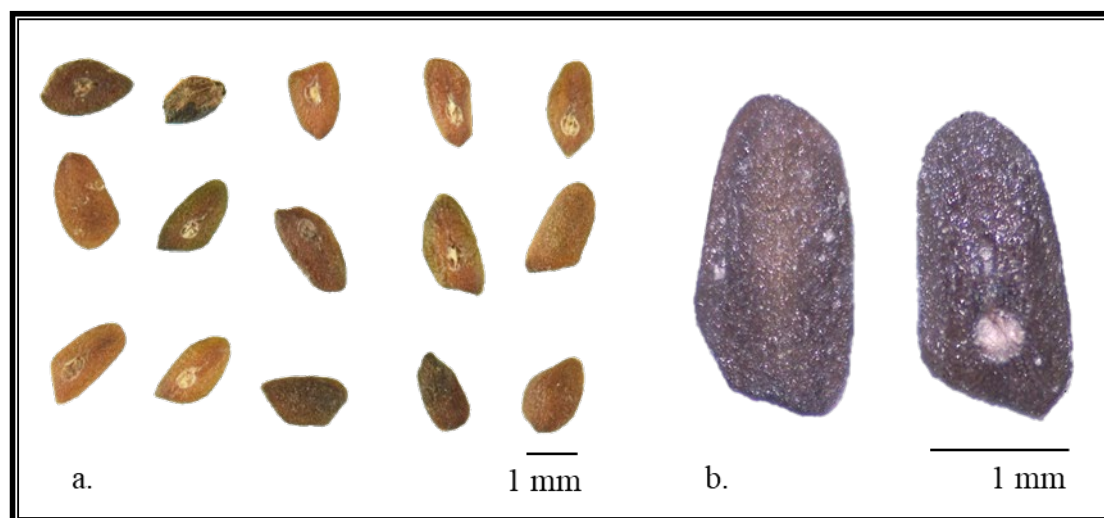


圖 1 車前子藥材圖

a. 藥材圖 b. 藥材放大圖

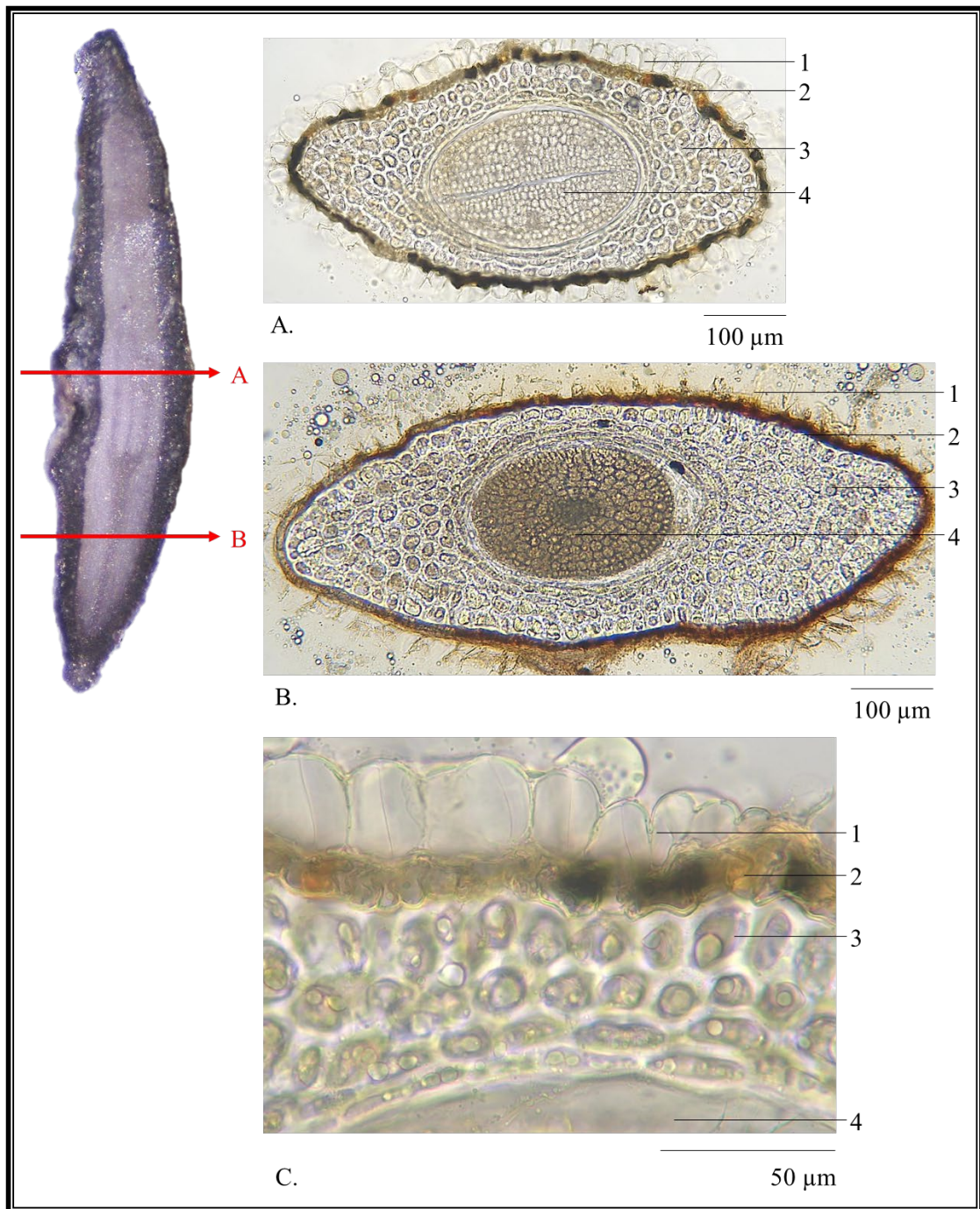


圖 2 車前子橫切面顯微特徵圖

A.橫切面(子葉) B.橫切面(胚) C.橫切面放大圖

1.黏液層(種皮外表皮) 2.色素層(種皮內表皮) 3.胚乳細胞 4.子葉細胞

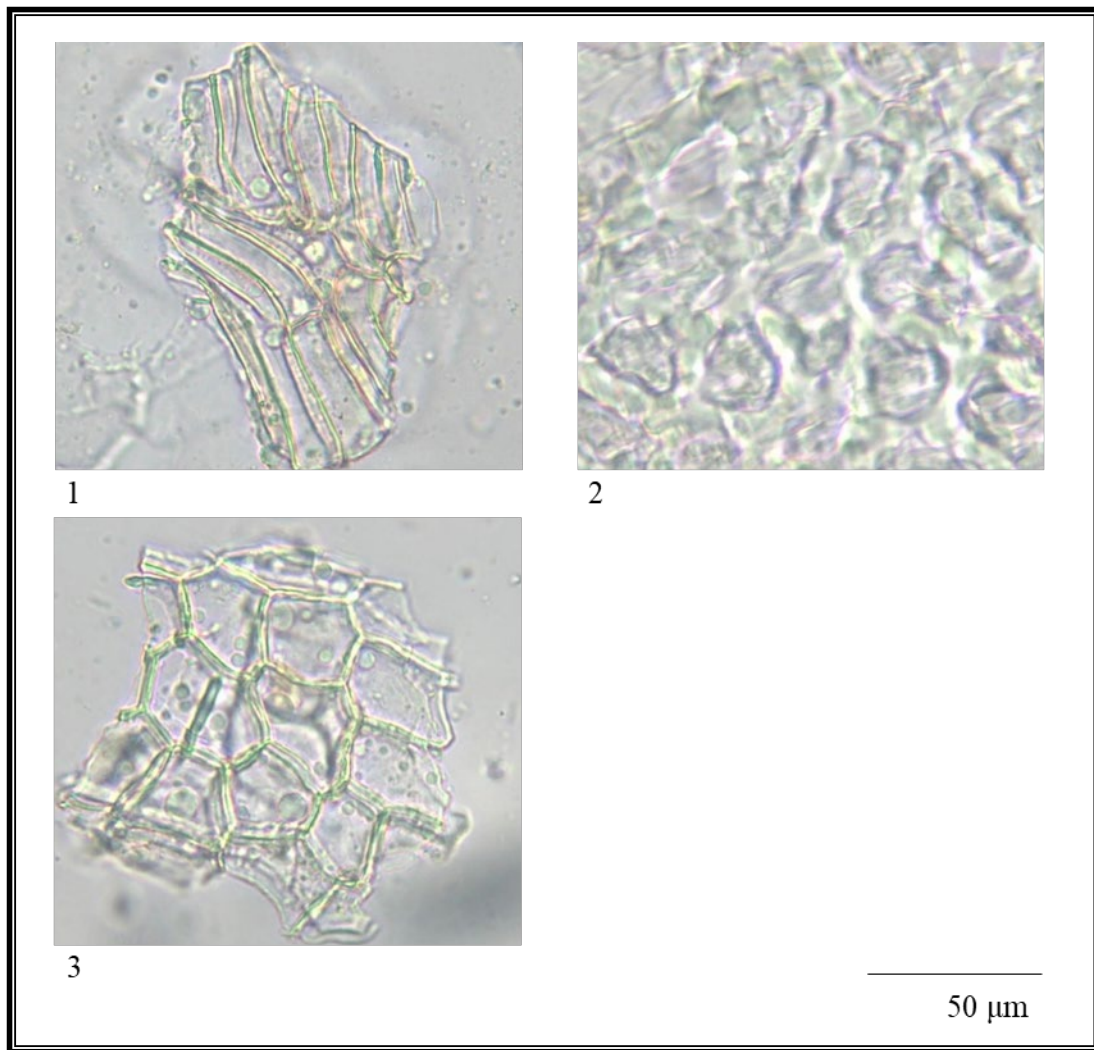


圖 3 車前子粉末顯微特徵圖

1.種皮表皮細胞 2.胚乳細胞 3.子葉細胞

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。167 頁。
2. 行政院衛生署中醫藥委員會編(1999)。中藥材品質管制：組織型態學鑑定。台北市：行政院衛生署中醫藥委員。449~450 頁。
3. 戴新民(1987)。現代本草中國藥材學下冊。啟業書局。1032 頁。
4. 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(2012)。香港中藥材標準第五冊。香港：香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部。308~311 頁。
5. 肖培根等編輯(2002)。新編中藥志第二卷。北京：化學工業出版社。136~143 頁。
6. 陳士林、林余霖主編(2013)。中藥飲片標準圖鑑。福州：海峽出版發行集團·福建科學技術出版社。119~120 頁。
7. 國家藥典委員會編輯(2020)。中華人民共和國藥典 2020 年版一部。北京：中國醫藥科技出版社。69~70 頁。
8. 趙中振、陳虎彪主編(2016)。中藥顯微鑑定圖典。福建科學技術出版社。324~325 頁。
9. 范崔生主編(1995)。中藥採收鑑別應用全書。江西科學技術出版社。456~457 頁。
10. 蔡少青、王璇主編(2003)。常用中藥材品種整理和質量研究第六冊。北京大學醫學出版社。274~298 頁。

車前子(PLANTAGINIS SEMEN)

一、材料

購自於臺灣各地中藥店車前子藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Shimadzu LC-2040C 3D，包含 Quaternary pump、Autosampler、Thermostatted column compartment、Diode-Array Detector；層析管柱 COSMOSIL 5C₁₈ AR-II-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；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(HPLC grade)購自於 Merck；醋酸購自於 Merck。

(二) 標準品

標準品毛蕊花糖苷(Verbascoside)，購自於普思生物科技股份有限公司，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 50 mL 離心管中，準確加入 60% 甲醇 50 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘；1 份置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 60% 甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時，以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加入溶媒至刻度，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毛蕊花糖苷最大波峰面積為最佳車前子萃取條件。

(二) 最佳萃取時間評估

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)4 份，每份準確稱取 1.0 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 60% 甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時、2 小時、3 小時、4 小時，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加入 60% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μ m)，即得。每針 10 μ L 注入 HPLC，並選出最佳萃取時間。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取標準品毛蕊花糖苷 5.0 mg，加 10 mL 的 60% 甲醇製成每 1 mL 含毛蕊花糖苷 500 μ g 的標準品儲備溶液，並以 60% 甲醇稀釋至 100 μ g/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 60% 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，加入 60% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μ m)，即得。

(五) 測定法

分別準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 μ L，注入 HPLC，測定，用標準曲線分別計算溶液中毛蕊花糖苷的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取毛蕊花糖苷標準品儲備溶液適量(500 μ g/mL)，以 60% 甲醇稀釋成含毛蕊花糖苷分別為 250、125、100、50、20、10 μ g/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μ L 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用標準品之波峰面積(y 軸)和標準品之濃度(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

以毛蕊花糖苷為 100 μ g/mL 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以毛蕊花糖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：取同一批市售車前子藥材粉末，依車前子藥材檢品溶液製備方法平行製備 5 份車前子檢品溶液，進樣測定，以毛蕊花糖苷的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售車前子藥材粉末，依車前子藥材檢品溶液製備方法製備車前子檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以毛蕊花糖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 Quantification, 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

取已知毛蕊花糖苷含量的車前子藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 0.2 g，分別加入毛蕊花糖苷 1.2 mg，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：COSMOSIL 5C₁₈ AR-II-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 330 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.5%乙酸(v/v, %)
0	35	65
40	35	65

(十二) 臺灣市售車前子藥材含量測定

取 10 批市售車前子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 公式計算樣品毛蕊花糖苷的百分含量。

(十三) 車前子檢品之 UPLC 層析條件

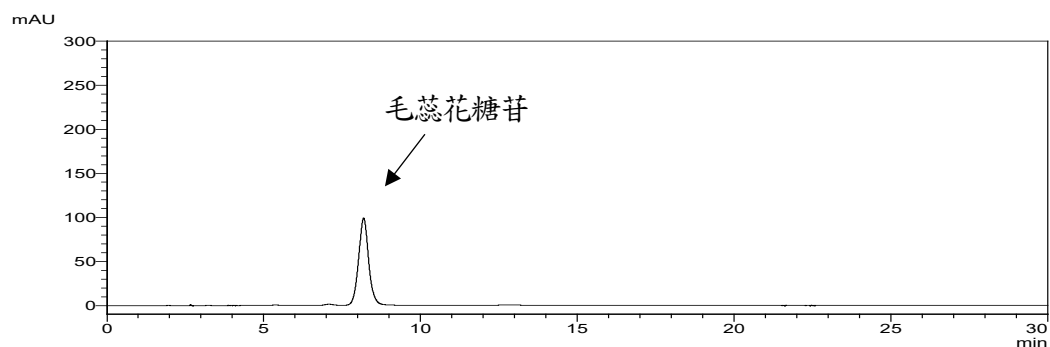
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m)
2. 檢測波長：UV 330 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μ L
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.5%乙酸(v/v, %)
0	35	65
10	35	65

五、結果

(一) 標準品毛蕊花糖苷之 HPLC 層析

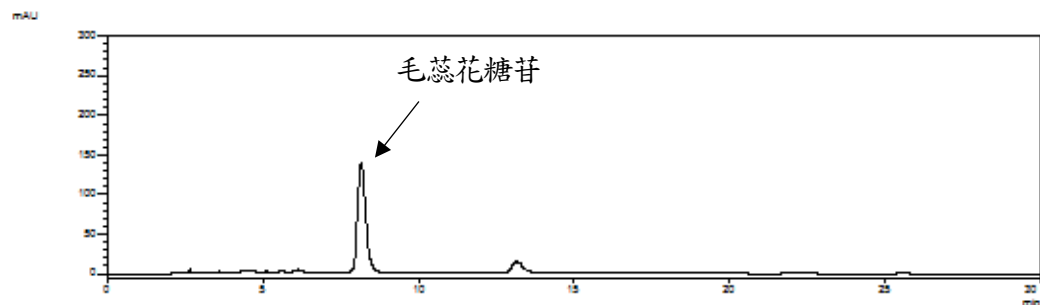
於滯留時間 8.18 分鐘處顯示毛蕊花糖苷標準品波峰(圖一)。



圖一、毛蕊花糖苷標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售車前子藥材檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 8.15 分鐘處顯示車前子藥材檢品中毛蕊花糖苷波峰(圖二)。
毛蕊花糖苷分離率(R)為 4.54, 拖尾因子(T)為 1.08, 均在系統適用性要求內。



圖二、市售車前子藥材檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取條件評估

加熱迴流處理 1 小時條件下，每克藥材重量所得毛蕊花糖苷的波峰面積最大，顯示加熱迴流處理 1 小時為最佳萃取條件。

表一、不同條件萃取比較

條件	毛蕊花糖苷 波峰面積	最佳萃取
加熱迴流 1 小時	2501969	√
超音波振盪 30 分鐘	1014004	

(四) 最佳萃取時間評估

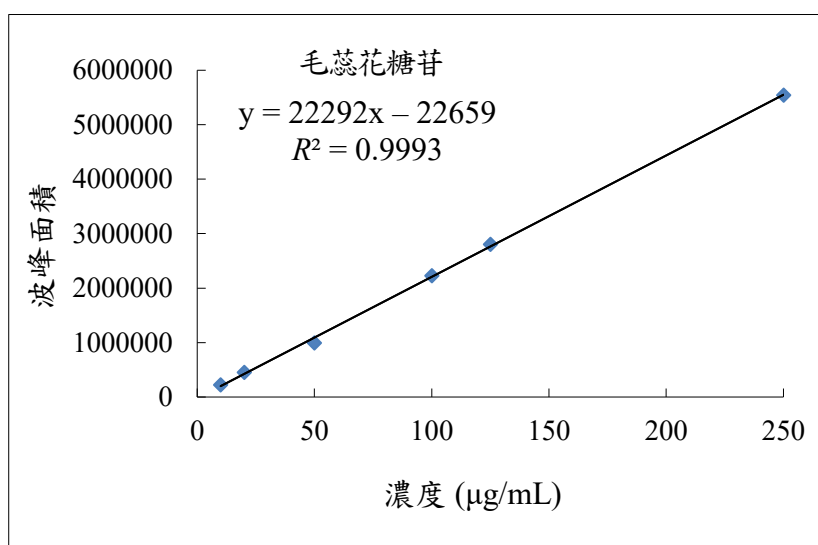
結果顯示萃取 1 小時所得毛蕊花糖苷的波峰面積最大，基本上已將毛蕊花糖苷萃取完全，因此選擇萃取 1 小時是最佳萃取時間。

表二、車前子藥材檢品萃取時間評估

加熱迴流	毛蕊花糖苷波峰面積
1 小時	2679017
2 小時	2655435
3 小時	2632149
4 小時	2543160

(五) 標準品毛蕊花糖苷檢量線

經不同濃度毛蕊花糖苷(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 $y = 22292x - 22659$ ， $R^2 = 0.9993$ ，顯示濃度在 10–250 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、毛蕊花糖苷之檢量線圖

表三、毛蕊花糖苷之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
毛蕊花糖苷	10–250	$y = 22292x - 22659$	0.9993

(六) 精密度試驗

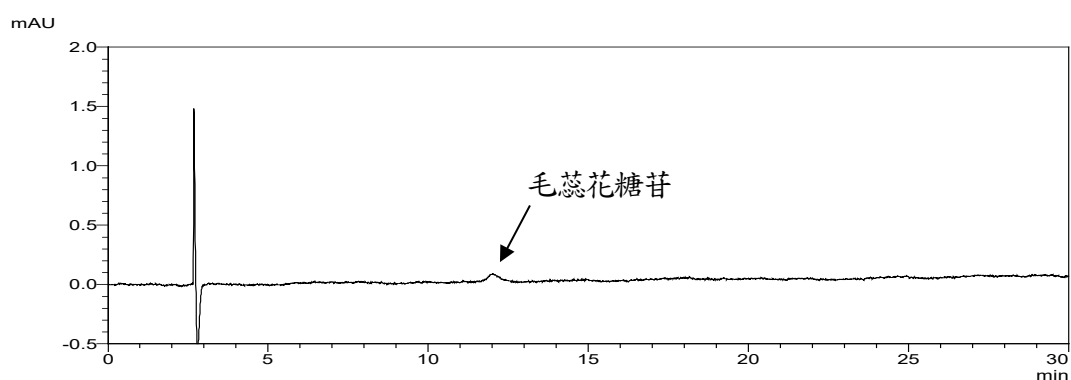
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，毛蕊花糖苷精密度之相對標準差為 0.13%，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

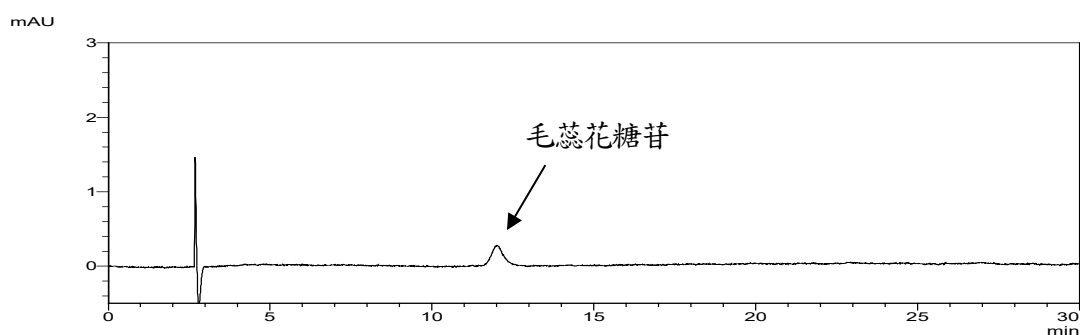
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，毛蕊花糖苷重複性之相對標準差為 0.51%，在系統適用性要求內。毛蕊花糖苷在 24 小時內穩定，穩定性之相對標準為 0.19%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

毛蕊花糖苷偵測極限為 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、毛蕊花糖苷之偵測極限層析圖



圖五、毛蕊花糖苷之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	毛蕊花糖苷	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	100 $\mu\text{g/mL}$	0.13
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.9)	0.51
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.9)	0.19
偵測極限 (n=3)	0.05 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=3)	0.1 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 添加回收率試驗

毛蕊花糖苷平均添加回收率為 94.4%，相對標準偏差為 1.60%。

表五、毛蕊花糖苷添加回收率

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	0.20	1.0378	1.2	2.1443	92.21	94.40	1.60
2	0.20	1.0378	1.2	2.1634	93.08		
3	0.20	1.0378	1.2	2.1837	95.49		
4	0.20	1.0378	1.2	2.1711	94.44		
5	0.20	1.0378	1.2	2.1904	96.05		

(十) 臺灣市售車前子藥材含量測定

10 批車前子藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，毛蕊花糖苷的含量為 0.426–0.654%，建議車前子藥材指標成分毛蕊花糖苷的含量不得少於 0.4%。理論板數按毛蕊花糖苷波峰計算應不低於 3000 (實際值為 4913)。

表六、臺灣市售車前子藥材檢品之毛蕊花糖苷的含量

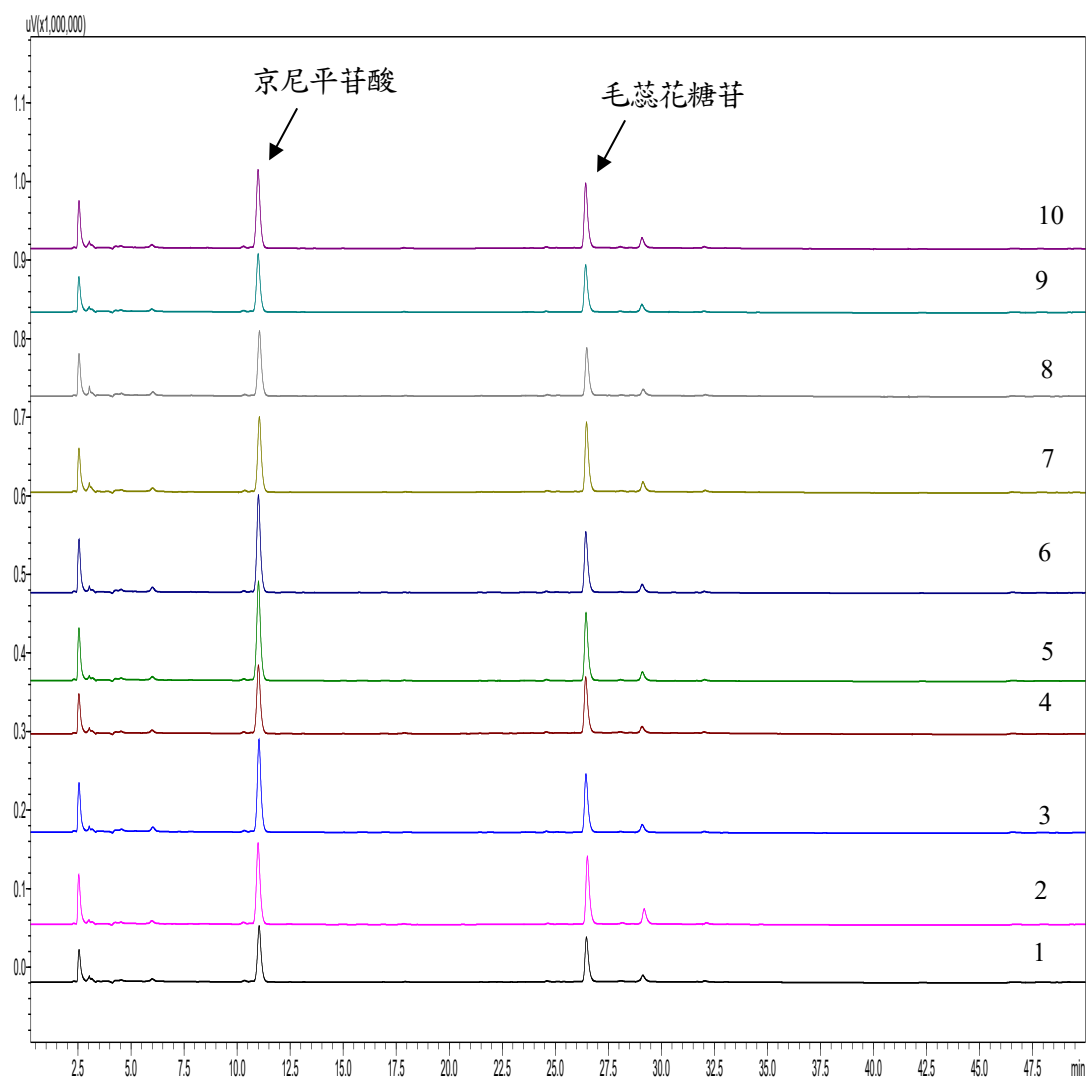
藥材編號(No.)	毛蕊花糖苷含量(%)
1 (ND)	0.426
2 (NF)	0.654
3 (NH)	0.556
4 (NJ)	0.534
5 (NS)	0.651
6 (CB)	0.576
7 (SB)	0.655
8 (SGA)	0.449
9 (SUA)	0.441
10 (SU2-A)	0.614
平均值±S.D.	0.556±0.091

(十一) 車前子藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售車前子藥材檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：COSMOSIL 5C₁₈ AR-II-C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 330 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}$ C
5. 注入量：10 μ L
6. 移動相：

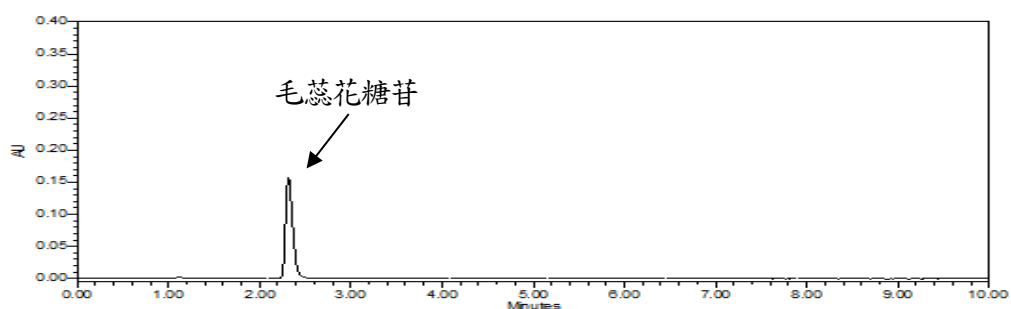
時間(min)	甲醇(%)	0.5%乙酸(v/v, %)
0	5	95
40	60	40
50	95	5



圖六.、10 批車前子藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品毛蕊花糖苷之 UPLC 層析

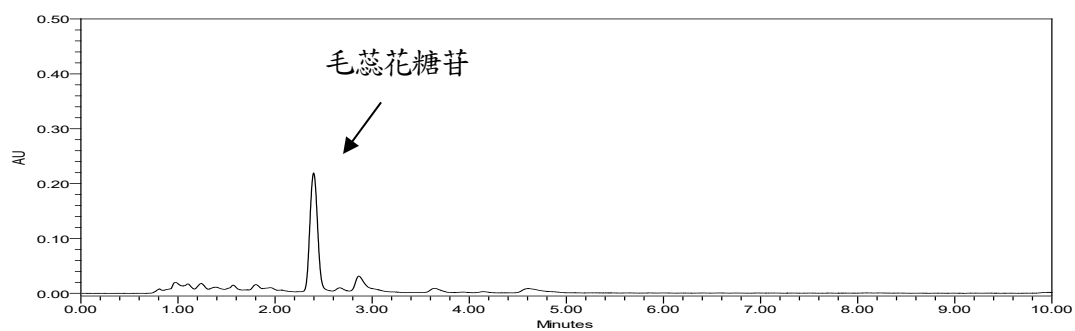
於滯留時間 2.31 顯示毛蕊花糖苷標準品的波峰(圖七)。



圖七、毛蕊花糖苷標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售車前子藥材檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.39 車前子藥材檢品中毛蕊花糖苷的波峰(圖八)。

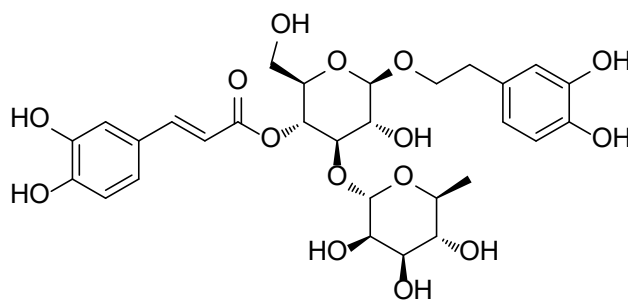


圖八、市售車前子藥材檢品之 UPLC 層析圖

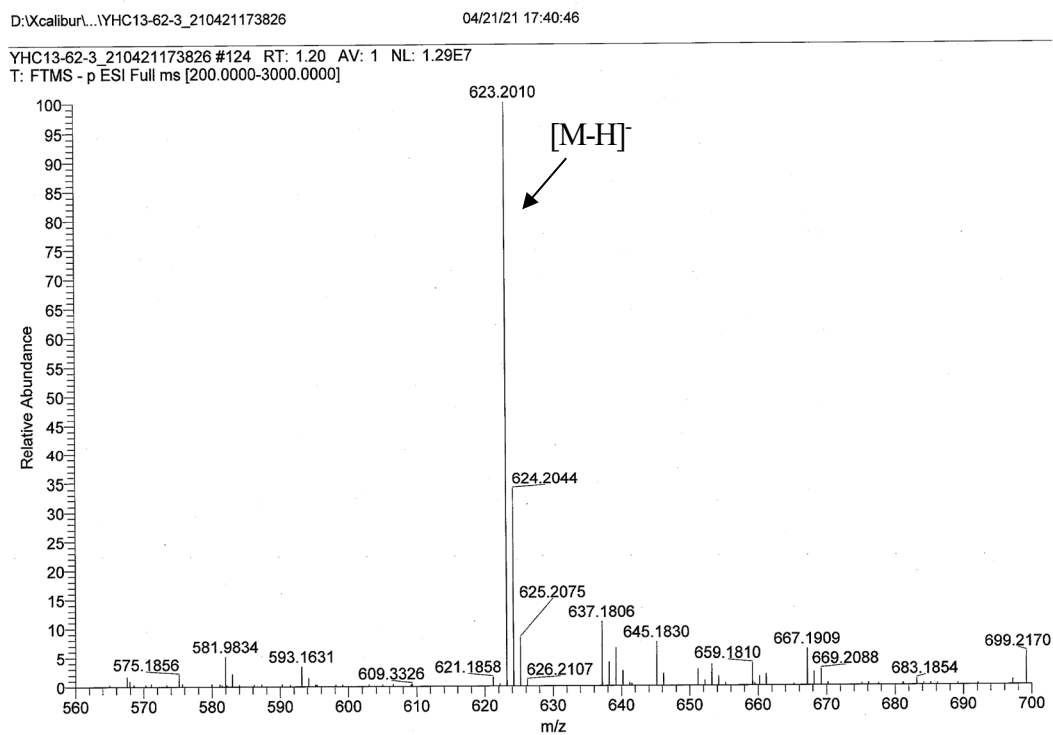
(十四) 毛蕊花糖苷的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{29}H_{36}O_{15}$ ；分子量：624.6；熔點：142–144 °C；白色粉末。

(十五) 毛蕊花糖苷的結構

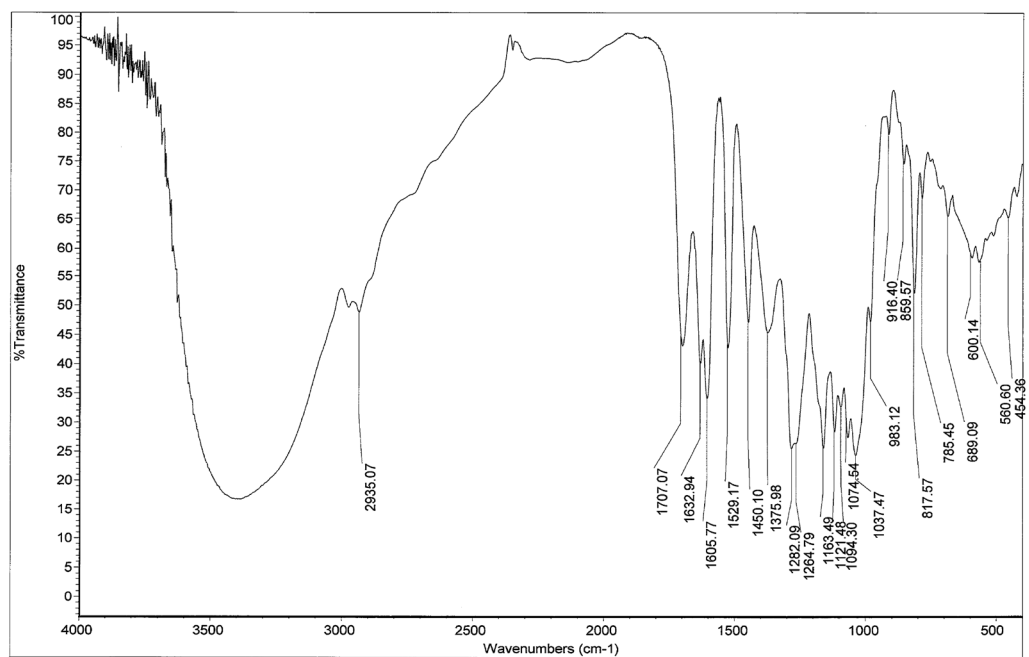


(十八) 毛蕊花糖苷的 ESI-MS 圖譜



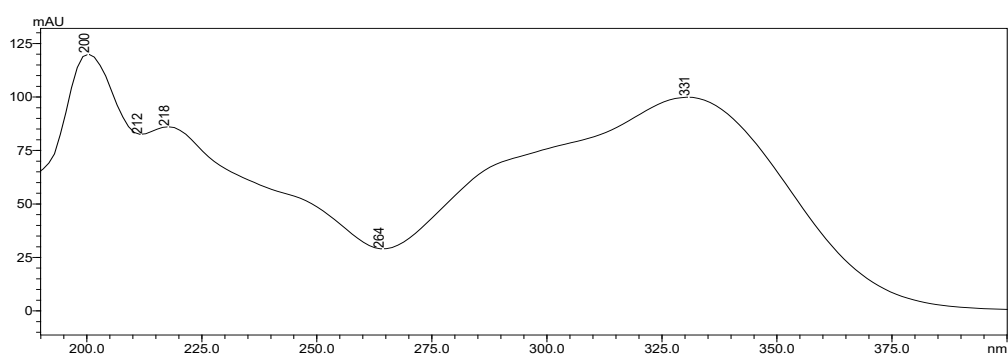
圖十一、毛蕊花糖苷的 ESI-MS 圖譜

(十九) 毛蕊花糖苷的 FTIR 圖譜



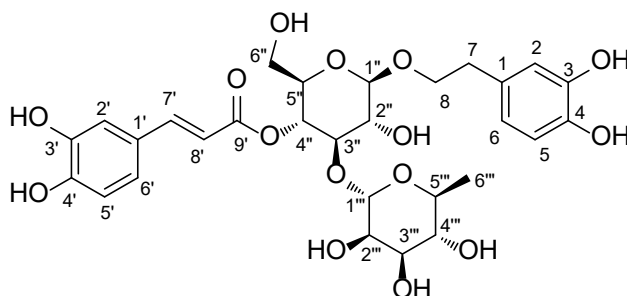
圖十二、毛蕊花糖苷的 FTIR 圖譜

(二十) 毛蕊花糖苷的 UV 圖譜



圖十三、毛蕊花糖苷的 UV 圖譜

(二十一) 毛蕊花糖苷的氫、碳化學位移



毛蕊花糖苷

表七、毛蕊花糖苷的氫、碳化學位移(CD₃OD)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	-	131.5
2	6.69 (d, 2.4)	117.1
3	-	146.1
4	-	144.7
5	6.67 (d, 8.4)	116.3
6	6.56 (dd, 8.4, 2.4)	121.3
7	2.77–2.81 (m)	36.6
8	3.70–3.74 (m), 4.02–4.04 (m)	72.3
1'	-	127.7
2'	7.05 (d, 2.4)	115.2
3'	-	146.9
4'	-	149.8
5'	6.77 (d, 8.4)	116.5
6'	6.95 (dd, 8.4, 2.4)	123.2
7'	7.58 (d, 16.2)	148.0
8'	6.27 (d, 16.2)	114.7
9'	-	168.3

1''	4.37 (d, 8.4)	104.2
2''	3.37–3.40 (m)	76.2
3''	3.81 (t, 9.0)	81.7
4''	4.91 (t, 9.0)	70.6
5''	3.50–3.55 (m)	76.0
6''	3.50–3.55 (m), 3.60–3.63 (m)	62.4
1'''	5.18 (d, 1.8)	103.0
2'''	3.90–3.92 (m)	72.4
3'''	3.55–3.58 (m)	72.0
4'''	3.28 (t, 9.0)	73.8
5'''	3.55–3.58 (m)	70.4
6'''	1.08 (d, 6.0)	18.5

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

車前子(PLANTAGINIS SEMEN)

一、材料

購自於臺灣各地中藥店車前子藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Shimadzu LC-2040C 3D，包含 Quaternary pump、Autosampler、Thermostatted column compartment、Diode-Array Detector；層析管柱 COSMOSIL 5C₁₈ AR-II-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；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(HPLC grade)購自於 Merck；醋酸購自於 Merck。

(二) 標準品

標準品京尼平苷酸(Geniposidic acid)，購自於普思生物科技股份有限公司，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 50 mL 離心管中，準確加入 60% 甲醇 50 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘；1 份置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 60% 甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時，以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加入溶媒至刻度，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京尼平苷酸最大波峰面積為最佳車前子萃取條件。

(二) 最佳萃取時間評估

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)4 份，每份準確稱取 1.0 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 60% 甲醇 50 mL，加熱迴流 1 小時、2 小時、3 小時、4 小時，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加入 60% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.22 μm)，即得。每針 10 μL 注入 HPLC，並選出最佳萃取時間。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取標準品京尼平苷酸 5.0 mg，加 10 mL 的 60% 甲醇製成每 1 mL 含京尼平苷酸 500 μg 的標準品儲備溶液，並以 60% 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 60% 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，加入 60% 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，用標準曲線分別計算溶液中京尼平苷酸的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取京尼平苷酸標準品儲備溶液適量(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以 60% 甲醇稀釋成含京尼平苷酸分別為 250、125、100、50、25、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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(y 軸)和標準品之濃度(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

以京尼平苷酸為 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以京尼平苷酸的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性：取同一批市售車前子藥材粉末，依車前子藥材檢品溶液製備方法平行製備 5 份車前子檢品溶液，進樣測定，以京尼平苷酸的含量(%)為指標，求出相對標準差。

2. 穩定性：取同一批市售車前子藥材粉末，依車前子藥材檢品溶液製備方法製備車前子檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以京尼平苷酸的波峰面積為指標，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 Quantification, 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

取已知京尼平苷酸含量的車前子藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 0.2 g，分別加入京尼平苷酸 1.3 mg，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：COSMOSIL 5C₁₈ AR-II-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 254 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.5%乙酸(v/v, %)
0	5	95
40	60	40
50	95	5

(十二) 臺灣市售車前子藥材含量測定

取 10 批市售車前子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 公式計算樣品京尼平苷酸的百分含量。

(十三) 車前子檢品之 UPLC 層析條件

1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：UV 254 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL

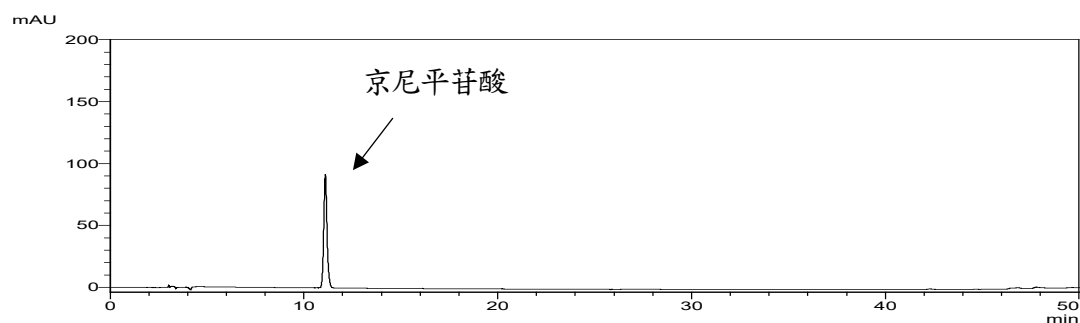
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.5%乙酸(v/v, %)
0	5	95
8	60	40
10	95	5

五、結果

(一) 標準品京尼平苷酸之 HPLC 層析

於滯留時間 11.10 分鐘處顯示京尼平苷酸標準品波峰(圖一)。

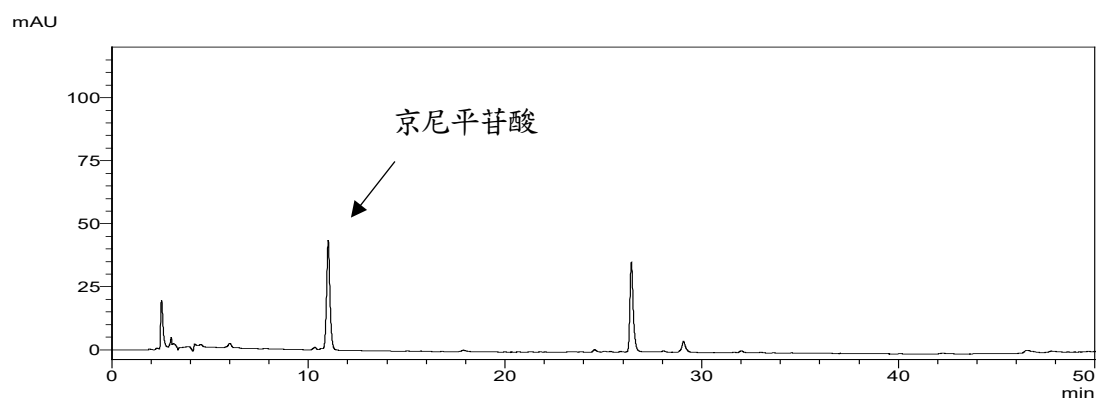


圖一、京尼平苷酸標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售車前子藥材檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 11.01 分鐘處顯示車前子藥材檢品中京尼平苷酸波峰(圖二)。

京尼平苷酸分離率(R)為 2.27, 拖尾因子(T)為 1.01, 均在系統適用性要求內。



圖二、市售車前子藥材檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取條件評估

加熱迴流處理 1 小時條件下, 每克藥材重量所得京尼平苷酸的波峰面積最大, 顯示加熱迴流處理 1 小時為最佳萃取條件。

表一、不同條件萃取比較

條件	京尼平苷酸波峰面積	最佳萃取
超音波振盪 30 分鐘	911759	
加熱迴流 1 小時	995563	√

(四) 最佳萃取時間評估

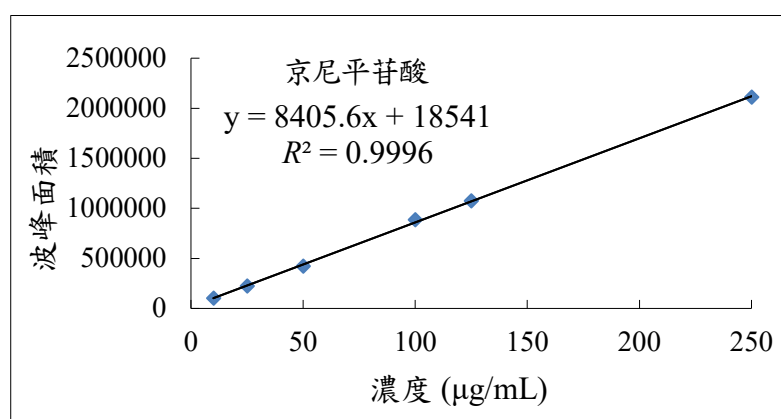
結果顯示萃取 1 小時所得京尼平苷酸的波峰面積最大，基本上已將京尼平苷酸萃取完全，因此選擇萃取 1 小時是最佳萃取時間。

表二、車前子藥材檢品萃取時間評估

加熱迴流	京尼平苷酸波峰面積
1 小時	1125803
2 小時	1124781
3 小時	1103788
4 小時	1065279

(五) 標準品京尼平苷酸檢量線

經不同濃度京尼平苷酸(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 $y = 8405.6x + 18541$ ， $R^2 = 0.9996$ ，顯示濃度在 10–250 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、京尼平苷酸之檢量線圖

表三、京尼平苷酸之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
京尼平苷酸	10–250	$y = 8405.6x + 18541$	0.9996

(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，京尼平苷酸精密度之相對標準差為 0.04%，在系統適用性要求內。

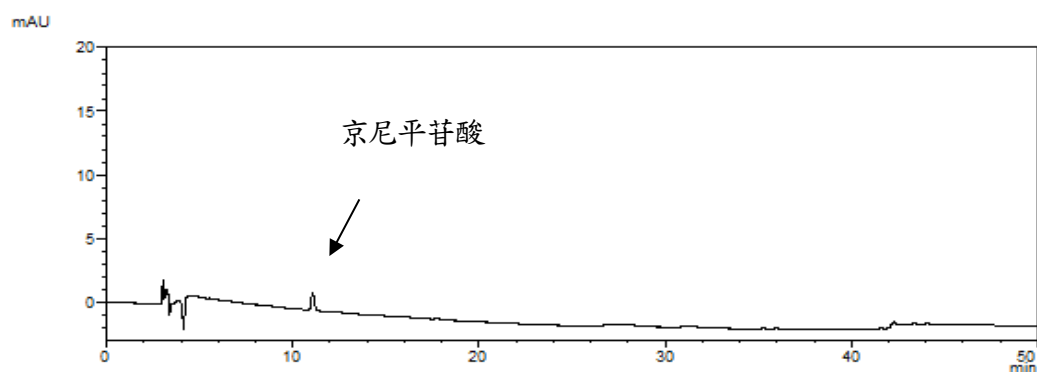
(七) 重複性與穩定性試驗

實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，京尼平苷酸重複性之相對標準差為 1.25%，在系統適用性要求內。京尼平苷酸在 24 小時內

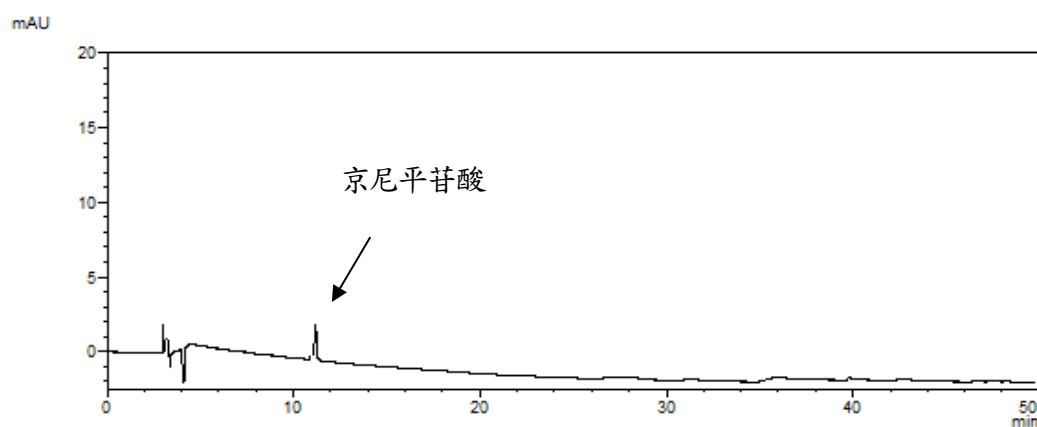
穩定，穩定性之相對標準為 0.36%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

京尼平苷酸偵測極限為 0.1 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、京尼平苷酸之偵測極限層析圖



圖五、京尼平苷酸之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	京尼平苷酸	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	100 $\mu\text{g/mL}$	0.04
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.8)	1.25
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.8)	0.36
偵測極限 (n=3)	0.1 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=3)	0.5 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 添加回收率試驗

京尼平苷酸平均添加回收率為 94.5%，相對標準偏差為 1.29%。

表五、京尼平苷酸添加回收率

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	0.20	1.3704	1.3	2.5746	92.63	94.49	1.29
2	0.20	1.3704	1.3	2.6126	95.56		
3	0.20	1.3704	1.3	2.6127	95.56		
4	0.20	1.3704	1.3	2.5937	94.10		
5	0.20	1.3704	1.3	2.6000	94.58		

(十) 臺灣市售車前子藥材含量測定

10 批車前子藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，京尼平苷酸的含量為 0.585–1.068%，建議車前子藥材指標成分京尼平苷酸的含量不得少於 0.5%。理論板數按京尼平苷酸波峰計算應不低於 5000 (實際值為 21754)。

表六、臺灣市售車前子藥材檢品之京尼平苷酸的含量

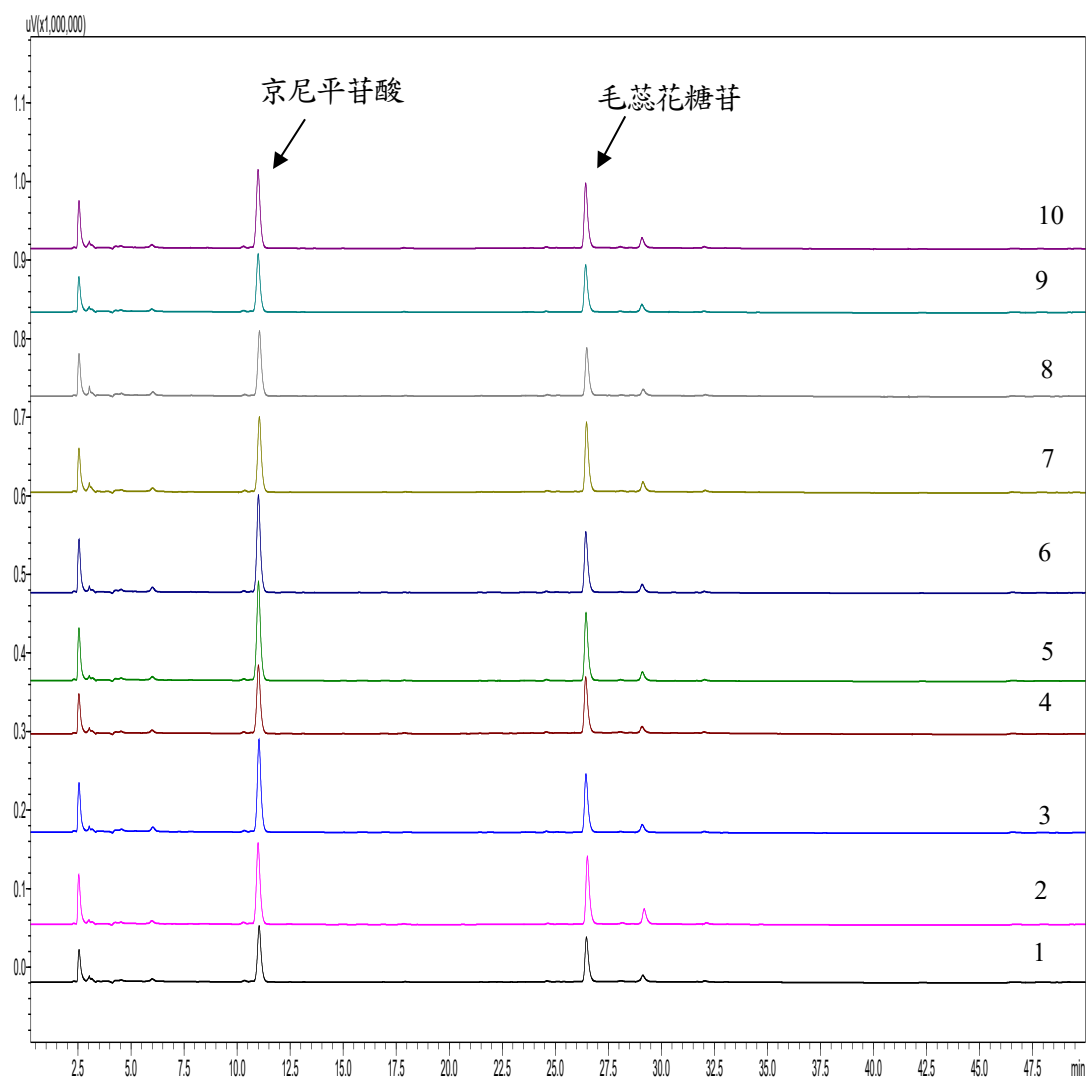
藥材編號(No.)	京尼平苷酸含量(%)
1 (ND)	0.585
2 (NF)	0.868
3 (NH)	0.971
4 (NJ)	0.722
5 (NS)	1.068
6 (CB)	1.022
7 (SB)	0.812
8 (SGA)	0.688
9 (SUA)	0.616
10 (SU2-A)	0.845
平均值±S.D.	0.820±0.167

(十一) 車前子藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售車前子藥材檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：COSMOSIL 5C₁₈ AR-II-C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 254 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}$ C
5. 注入量：10 μ L
6. 移動相：

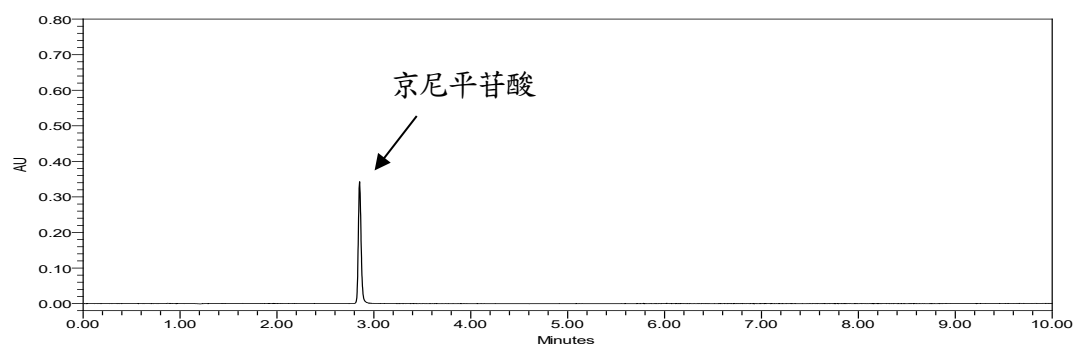
時間(min)	甲醇(%)	0.5%乙酸(v/v, %)
0	5	95
40	60	40
50	95	5



圖六.、10 批車前子藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品京尼平苷酸之 UPLC 層析

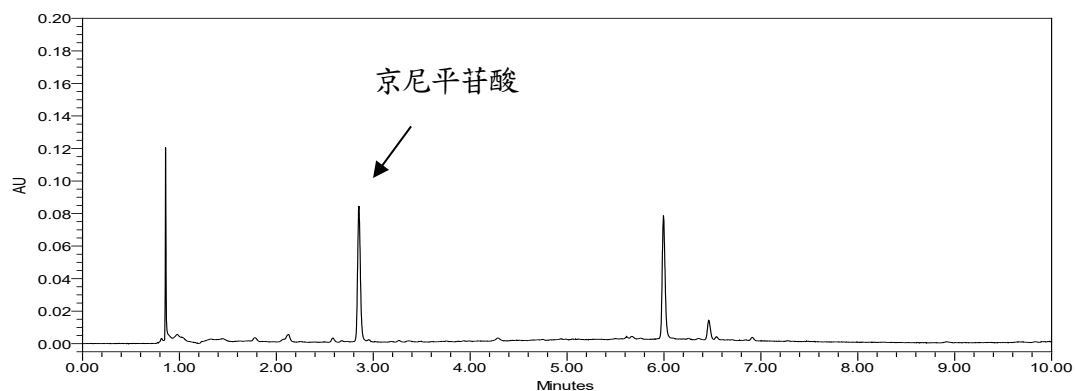
於滯留時間 2.85 顯示京尼平苷酸標準品的波峰(圖七)。



圖七、京尼平苷酸標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售車前子藥材檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.85 車前子藥材檢品中京尼平苷酸的波峰(圖八)。

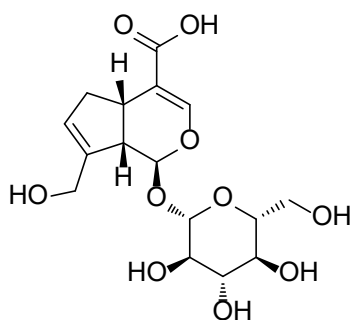


圖八、市售車前子藥材檢品之 UPLC 層析圖

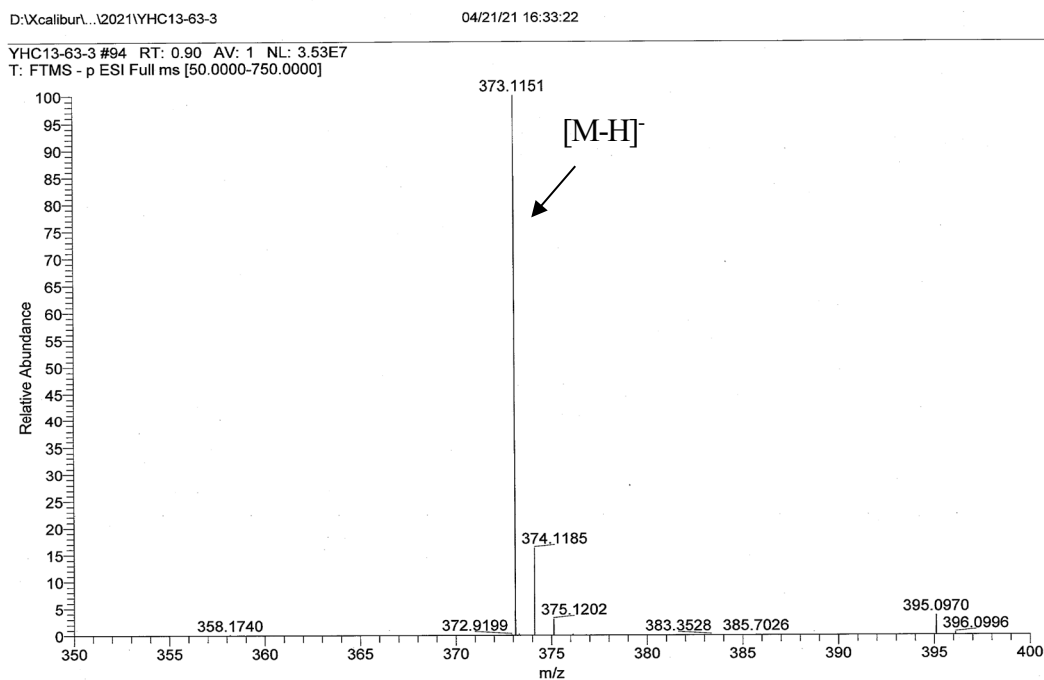
(十四) 京尼平苷酸的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{16}H_{22}O_{10}$ ；分子量：374.3；熔點：138–140 °C；白色粉末。

(十五) 京尼平苷酸的結構

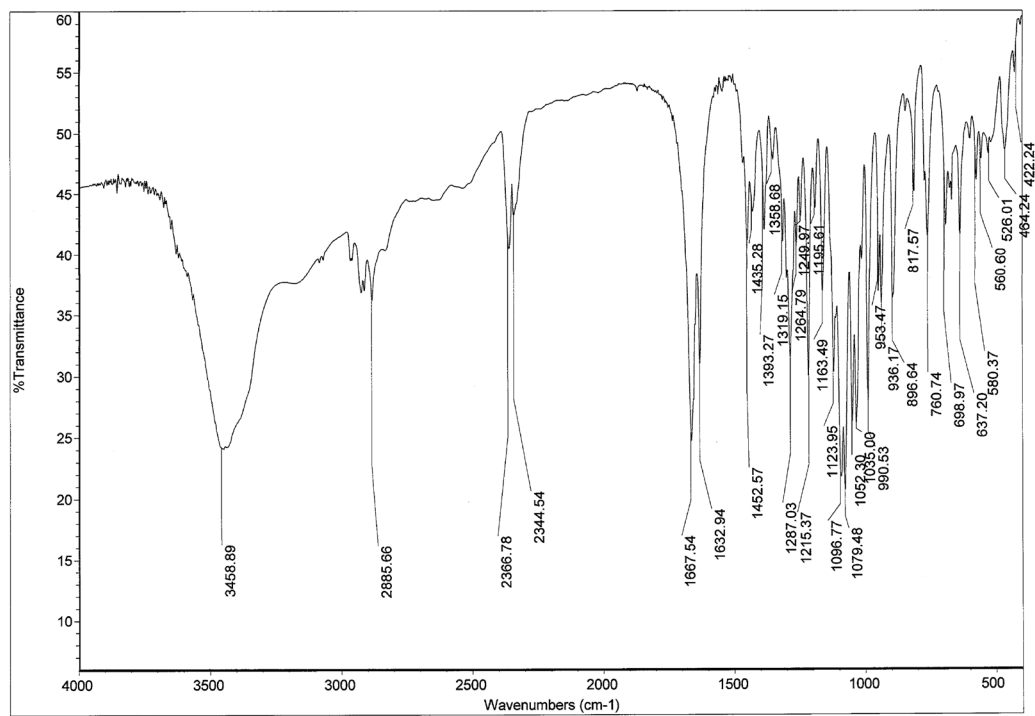


(十八) 京尼平甘酸的 ESI-MS 圖譜



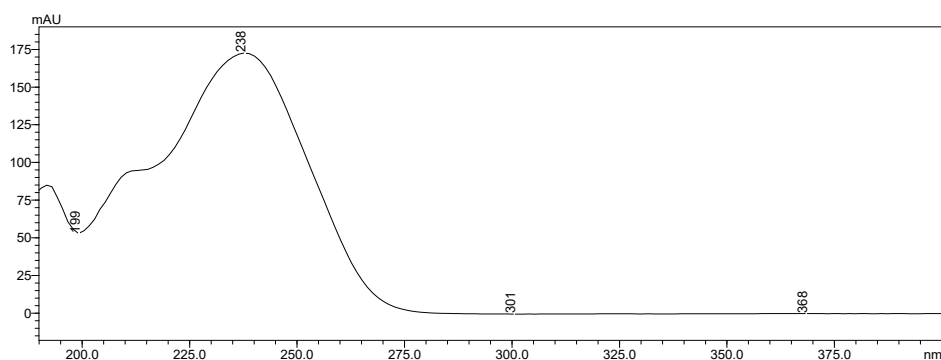
圖十一、京尼平甘酸的 ESI-MS 圖譜

(十九) 京尼平甘酸的 FTIR 圖譜



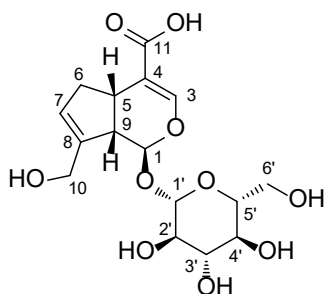
圖十二、京尼平甘酸的 FTIR 圖譜

(二十) 京尼平苷酸的 UV 圖譜



圖十三、京尼平苷酸的 UV 圖譜

(二十一) 京尼平苷酸的氫、碳化學位移



京尼平苷酸

表七、京尼平苷酸氫、碳化學位移(CD₃OD)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	5.15 (d, 7.8)	98.2
3	7.49 (d, 1.2)	153.2
4	-	112.9
5	3.14–3.18 (m)	36.7
6	2.07–2.12 (m), 2.80–2.84 (m)	39.7
7	5.78 (br s)	128.4
8	-	144.9
9	2.70 (d, 7.8)	47.0
10	4.17 (dd, 14.4, 1.8), 4.30 (d, 14.4)	61.5
11	-	171.0
1'	4.70 (d, 7.8)	100.3
2'	3.21 (dd, 9.0, 7.8)	74.9
3'	3.36–3.38 (m)	77.9
4'	3.26–3.28 (m)	71.6
5'	3.26–3.28 (m)	78.4
6'	3.60–3.65 (m), 3.84–3.86 (m)	62.7

^a(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

車前子

生藥名：PLANTAGINIS SEMEN

英文名：Plantago Seed

基 原：本品為車前科 Cornaceae 植物車前 *Plantago asiatica* L.之乾燥成熟種子。

一、方法

- (一) 檢品溶液 **【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》✓**
——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。
【萃取方法 2】《中華人民共和國藥典 2020》
——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 2 mL 使之溶解，作為檢品溶液。
【萃取方法 3】《香港中藥材標準第五冊》
——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波振盪 15 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。。
- (二) 對照標準品
溶 液 取毛蕊花糖苷(Verbascoside)、京尼平苷酸(Geniposidic acid)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】《臺灣中藥典第四版 2021》**，《香港中藥材標準第五冊》
——乙酸乙酯：無水乙酸：甲酸：水 (8：1：1：2)
【展開劑 2】《中華人民共和國藥典 2020》
——乙酸乙酯：甲醇：甲酸：水 (18：2：1.5：1)
【展開劑 3】(自行開發)✓
——乙酸乙酯：甲醇：甲酸：水 (18：2：1：1)
- (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 風乾後，置於主波長 254 nm 之紫外燈照射下檢視之，或以香莢蘭醛-硫酸試液(Vanillin-H₂SO₄ TS)噴霧後，105 °C加熱至條帶顯色清晰，於可見光照射下檢視之。

二、萃法選擇及濃度測試

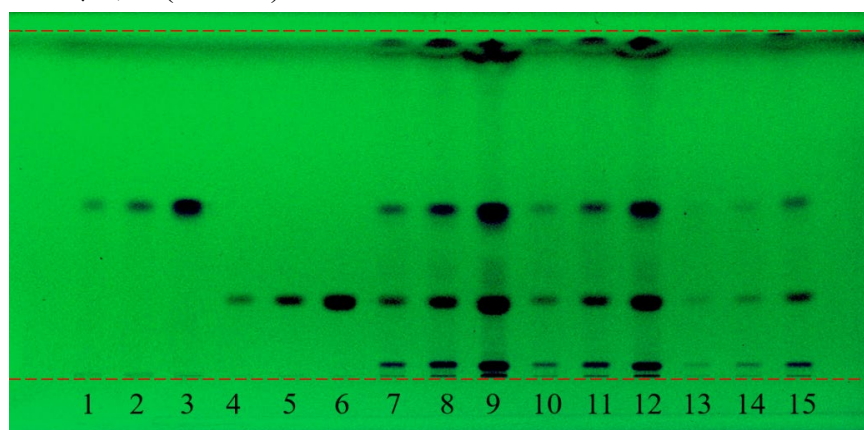
實驗日期：110/05/14

相對溼度(RH)：53%

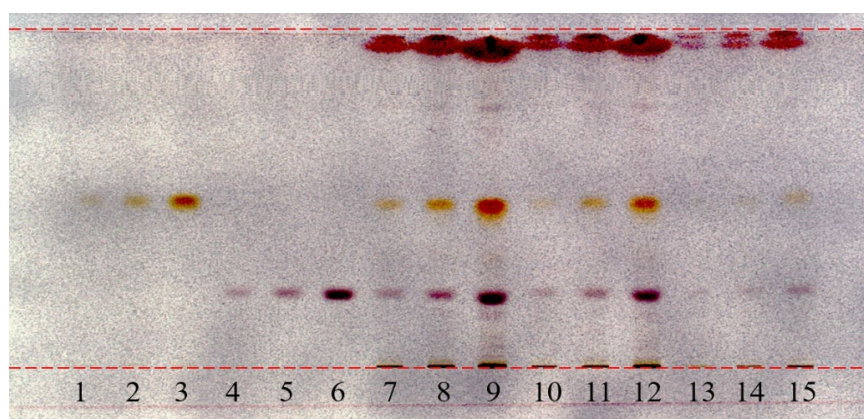
溫度(RT)：25.2 °C

【展開劑 3】(自行開發)——乙酸乙酯：甲醇：甲酸：水 (18：2：1：1)

——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



——HPTLC 香莢蘭醛-硫酸試液顯色後可見光檢出



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	毛蕊花糖苷(1.0 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	京尼平苷酸(1.0 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 3【萃取方法 1】	1, 2, 5 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 3【萃取方法 2】	1, 2, 5 μ L
13, 14, 15	檢品溶液 3【萃取方法 3】	1, 2, 5 μ L

建議萃法：3 種萃法之檢品溶液中皆有分離與檢出毛蕊花糖苷與京尼平苷酸，因濃度適中，故維持臺灣中藥典【萃取方法 1】。

建議點注量：毛蕊花糖苷 2 μ L，京尼平苷酸 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 1】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

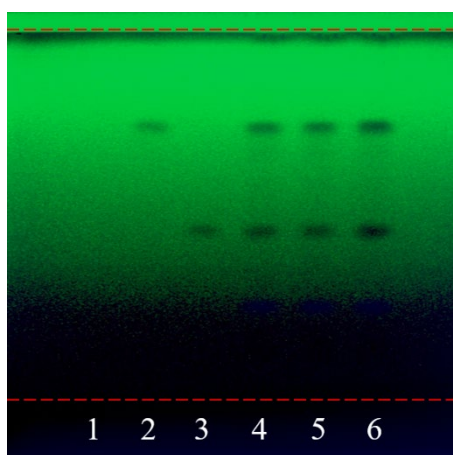
實驗日期：110/05/14

相對溼度(RH)：53%

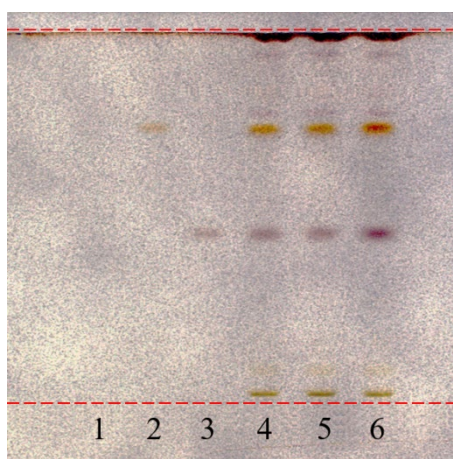
溫度(RT)：25.2 °C

【展開劑 1】《臺灣中藥典第四版 2021》，《香港中藥材標準第五冊》——乙酸乙酯：水：甲酸：無水乙酸 (8：2：1：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(毛蕊花糖苷 R_f 值為 0.74，京尼平苷酸 R_f 值為 0.46)

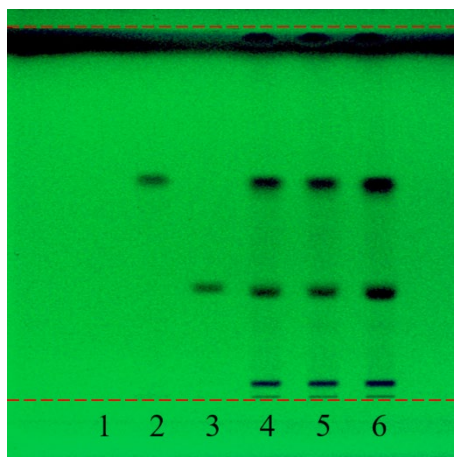


【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——HPTLC 香莢蘭醛—硫酸試液顯色後可見光檢出(毛蕊花糖苷 R_f 值為 0.74，京尼平苷酸 R_f 值為 0.46)

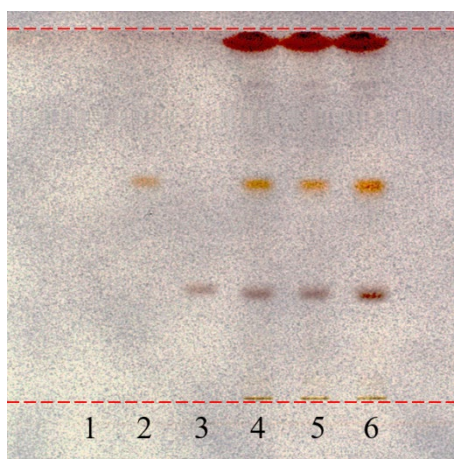


【展開劑 2】《中華人民共和國藥典 2020》——乙酸乙酯：甲醇：甲酸：水 (18：2：1.5：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(毛蕊花糖苷 R_f 值為 0.59，京尼平苷酸 R_f 值為 0.29)

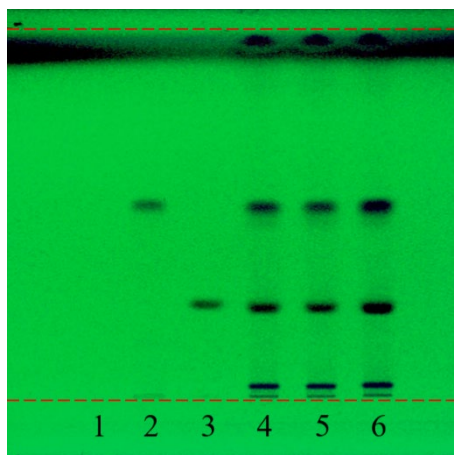


【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——HPTLC 香莢蘭醛-硫酸試液顯色後可見光檢出(毛蕊花糖苷 R_f 值為 0.59，京尼平苷酸 R_f 值為 0.29)

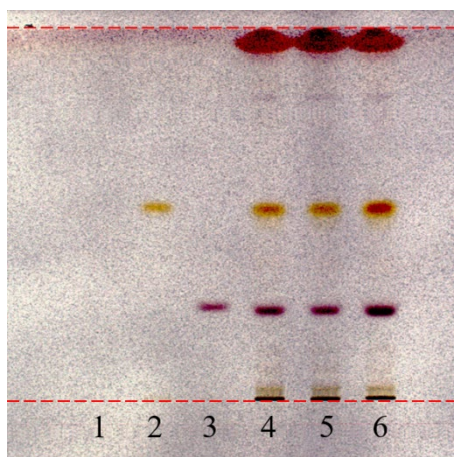


【展開劑 3】(自行開發)——乙酸乙酯：甲醇：甲酸：水 (18：2：1：1) ✓

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(毛蕊花糖苷 R_f 值為 0.51，京尼平苷酸 R_f 值為 0.25)



【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——HPTLC 香莢蘭醛—硫酸試液顯色後可見光檢出(毛蕊花糖苷 R_f 值為 0.51，京尼平苷酸 R_f 值為 0.25)



1：Blank

4，5：檢品溶液 3

2：毛蕊花糖苷

6：Spike

3：京尼平苷酸

建議溶媒系統：以【萃取方法 1】方式，三種展開劑皆可從檢品溶液中分離與檢出毛蕊花糖苷與京尼平苷酸，因 R_f 值適中，故採用自行開發之【展開劑 3】。

四、觀察方式選擇

實驗日期：110/05/14

相對溼度(RH)：53%

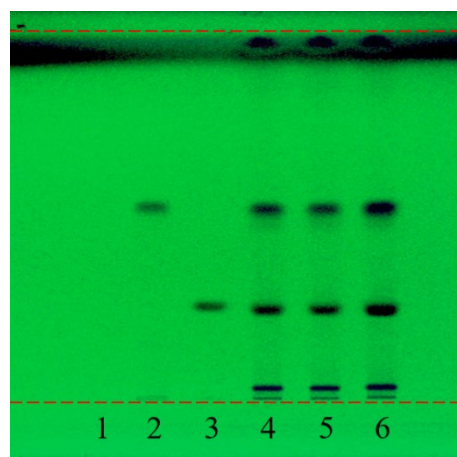
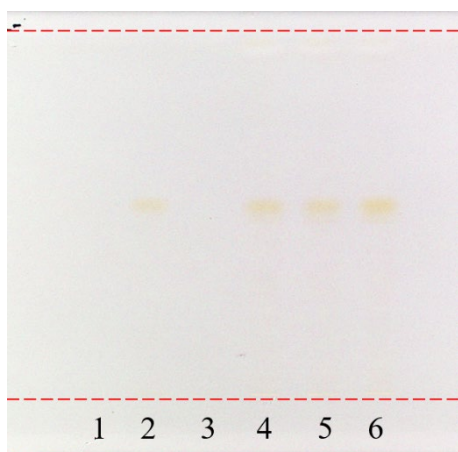
溫度(RT)：25.2 °C

【展開劑 3】(自行開發)——乙酸乙酯：甲醇：甲酸：水 (18：2：1：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》—HPTLC 可見光檢出

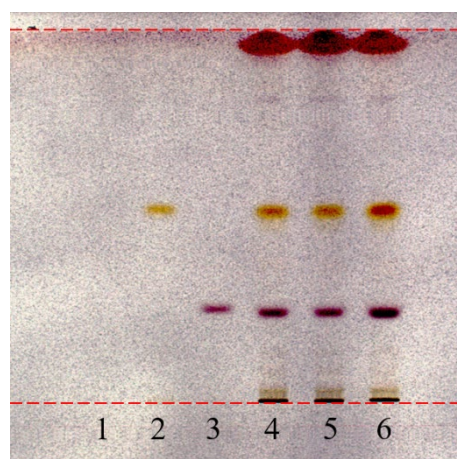
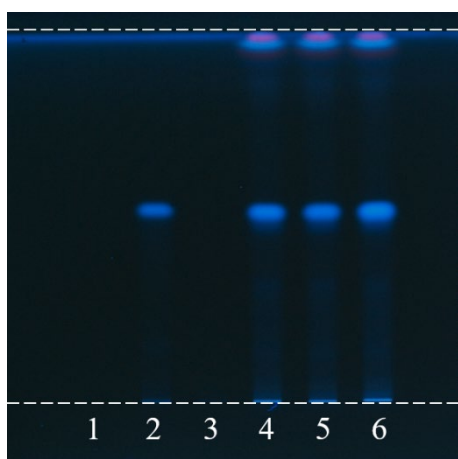
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》—HPTLC 紫外光(254 nm)檢出

✓



【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》—HPTLC 紫外光(365 nm)檢出

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》—HPTLC 香莢蘭醛-硫酸試液顯色後可見光檢出✓



1：Blank

4，5：檢品溶液 3

2：毛蕊花糖苷

6：Spike

3：京尼平苷酸

建議觀察方式：以紫外光(254 nm)檢視及香莢蘭醛-硫酸試液顯色後可見光檢出，顯示有較明顯分離之條帶。

五、十批車前子藥材樣品檢測

實驗日期：110/01/20

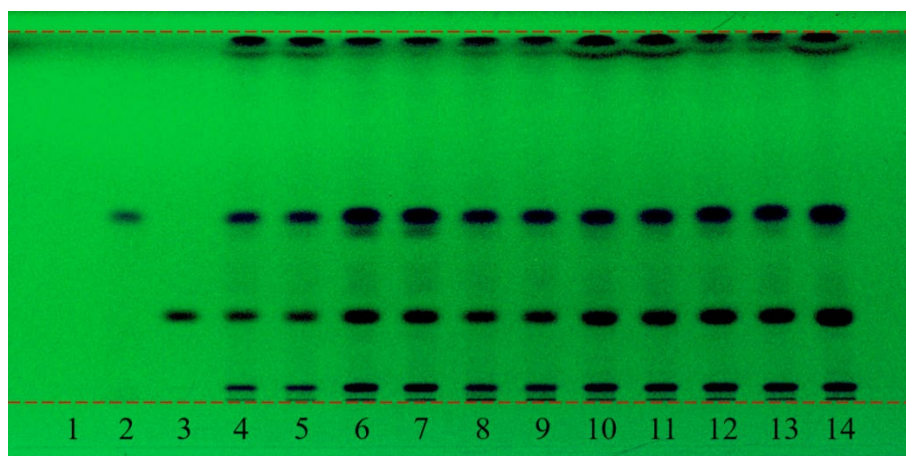
相對溼度(RH)：48%

溫度(RT)：22.3 °C

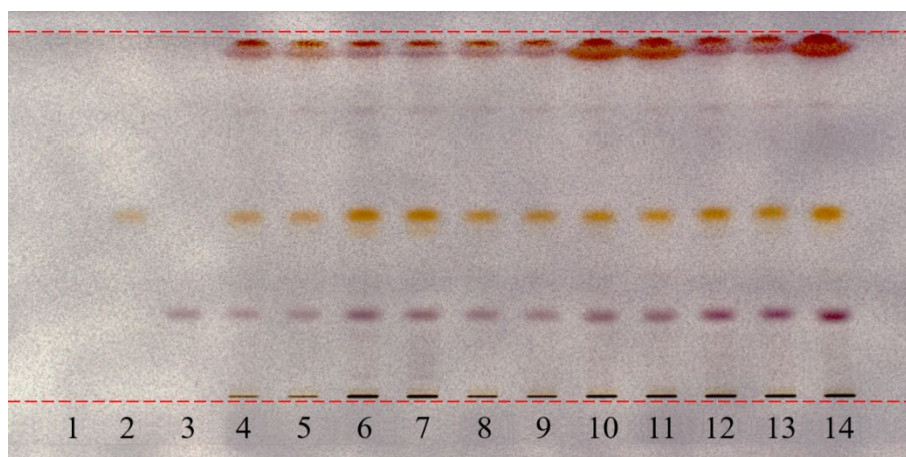
【展開劑 3】(自行開發)——乙酸乙酯：甲醇：甲酸：水 (18：2：1：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——HPTLC

(1) 紫外光(254 nm)檢出



(2) 香莢蘭醛/硫酸試液顯色後可見光檢出

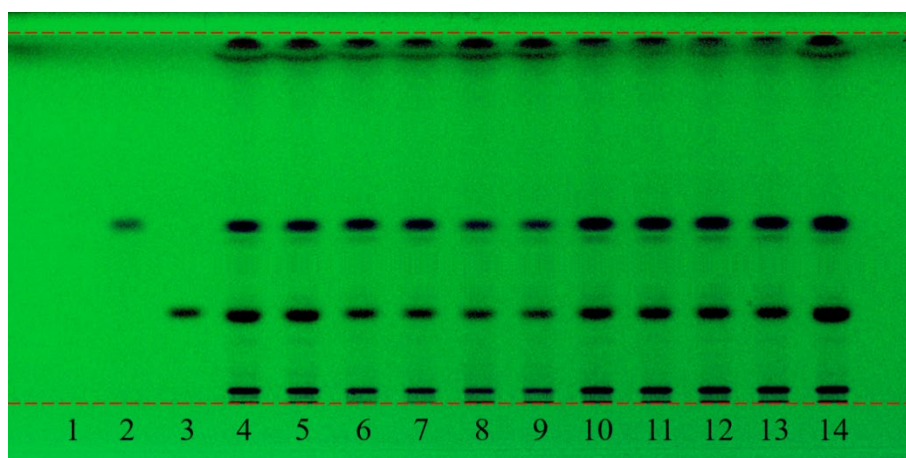


1	Blank	8, 9	檢品溶液 3 (NH)
2	毛蕊花糖苷 (1.0 mg/mL)	10, 11	檢品溶液 4 (NJ)
3	京尼平苷酸(1.0 mg/mL)	12, 13	檢品溶液 5 (NS)
4, 5	檢品溶液 1 (ND)	14	Spike (檢品溶液 3)
6, 7	檢品溶液 2 (NF)		

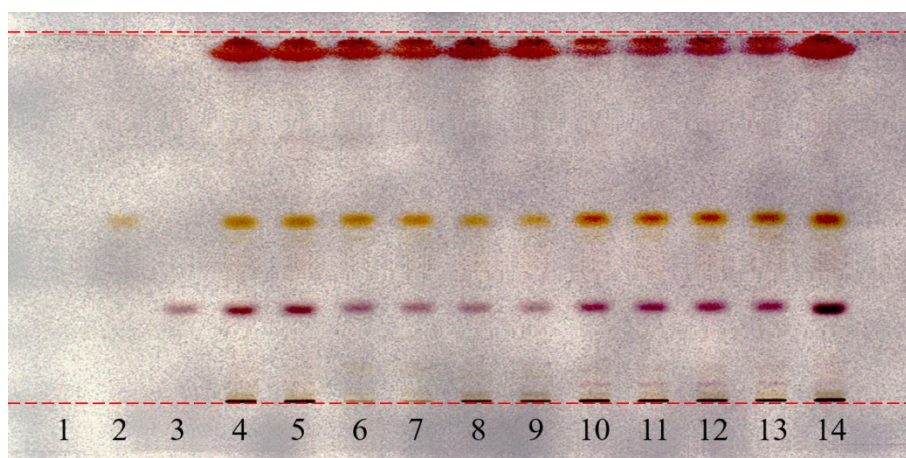
【展開劑 3】(自行開發)——乙酸乙酯：甲醇：甲酸：水 (18：2：1：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——HPTLC

(1) 紫外光(254 nm)檢出



(2) 香莢蘭醛-硫酸試液顯色後可見光檢出



1	Blank	8, 9	檢品溶液 8 (SGA)
2	毛蕊花糖苷 (1.0 mg/mL)	10, 11	檢品溶液 9 (SU2A)
3	京尼平苷酸(1.0 mg/mL)	12, 13	檢品溶液 10 (SUA)
4, 5	檢品溶液 6 (CB)	14	Spike (檢品溶液 3)
6, 7	檢品溶液 7 (SB)		

結論與建議：以【萃取方法 1】及【展開劑 4】方式，顯示分離與檢出毛蕊花糖苷與京尼平苷酸效果較佳，以紫外光(254 nm)及莢蘭醛-硫酸試液顯色後可見光下檢視較佳。