

桔梗 PLATYCODONIS RADIX

桔梗 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)	3
桔梗(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
桔梗(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
桔梗(藥材+飲片)TLC	30
一、方法	30
二、萃法選擇及濃度測試	31
三、溶媒系統選擇	32
四、觀察方式選擇	34
五、十批桔梗樣品檢測	35
六、十批桔梗飲片樣品檢測	37

桔梗 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桔梗的乾燥根。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：桔梗

生藥名：PLATYCODONIS RADIX

英文名：Platycodon Root

基原：桔梗科 Campanulaceae 植物桔梗 *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A.DC. 的乾燥根。

採收加工：春、秋兩季採挖，去除鬚根，刮去外皮或不去皮，乾燥。

藥材性狀：本藥材為桔梗的乾燥根。根呈圓柱形或長紡錘形，下部漸細，略扭曲，偶有分枝，長 6~20 cm，直徑 0.5~2 cm。有的頂端有較短的根莖（蘆頭），其上有數個半月形的莖痕。表面白色或淡黃色，不去外皮的表面黃棕色至灰棕色，全體有不規則縱皺及溝紋，並有橫向皮孔樣的疤痕。質硬脆，易折斷，折斷面不平坦，可見放射狀裂隙，皮部類白色，形成層環棕色，木質部淡黃色。氣微，味微甜後稍苦。

飲片性狀：本品呈橢圓形斜切片或不規則厚片。外皮多已除去或偶有殘留。切面皮部類白色，較窄；形成層環紋明顯，棕色；木部寬，淡黃色有較多裂隙。氣微，味微甜後苦。

生長分佈：多年生草本植物，株高 40~90 cm。喜溫和涼爽氣候，生於向陽坡草叢或灌叢下，花期 7~9 月，果期 8~11 月。分布於黑龍江、吉林、遼寧、內蒙古東部、河北、山西、河南、山東、江蘇、安徽、浙江、江西、湖北、湖南、廣東、香港、廣西、貴州、雲南、四川、甘肅南部及陝西南部。朝鮮半島、日本、俄羅斯遠東和東西伯利亞地區的南部有分布。藥材產於全國。

三、藥材組織顯微鑑別(圖 2)

1. 未去外皮者可見木栓細胞多層，細胞中含細小草酸鈣方晶或針晶。
2. 皮層窄，常見裂隙。
3. 韌皮部寬廣，乳管群散在，壁略厚，內含顆粒狀黃棕色物質。
4. 乳管群為數個多角形或橢圓形厚壁性的乳管組成。
5. 形成層連續成環。
6. 木質部導管單個散在或數個相聚，呈放射狀排列。
7. 導管以階紋為主。

四、藥材粉末顯微鑑別(圖 3)

1. 本品粉末黃白色。
2. 乳管常互相連結成網狀，內含暗棕色顆粒狀物質。
3. 偶見木栓細胞，多角形、類長方形或類方形。
4. 可見階紋導管。
5. 菊糖多見，呈扇形或類圓形，具不規則紋理；偏光顯微鏡下呈亮白色。



圖 1A 桔梗藥材圖



圖 1B 桔梗飲片藥材圖

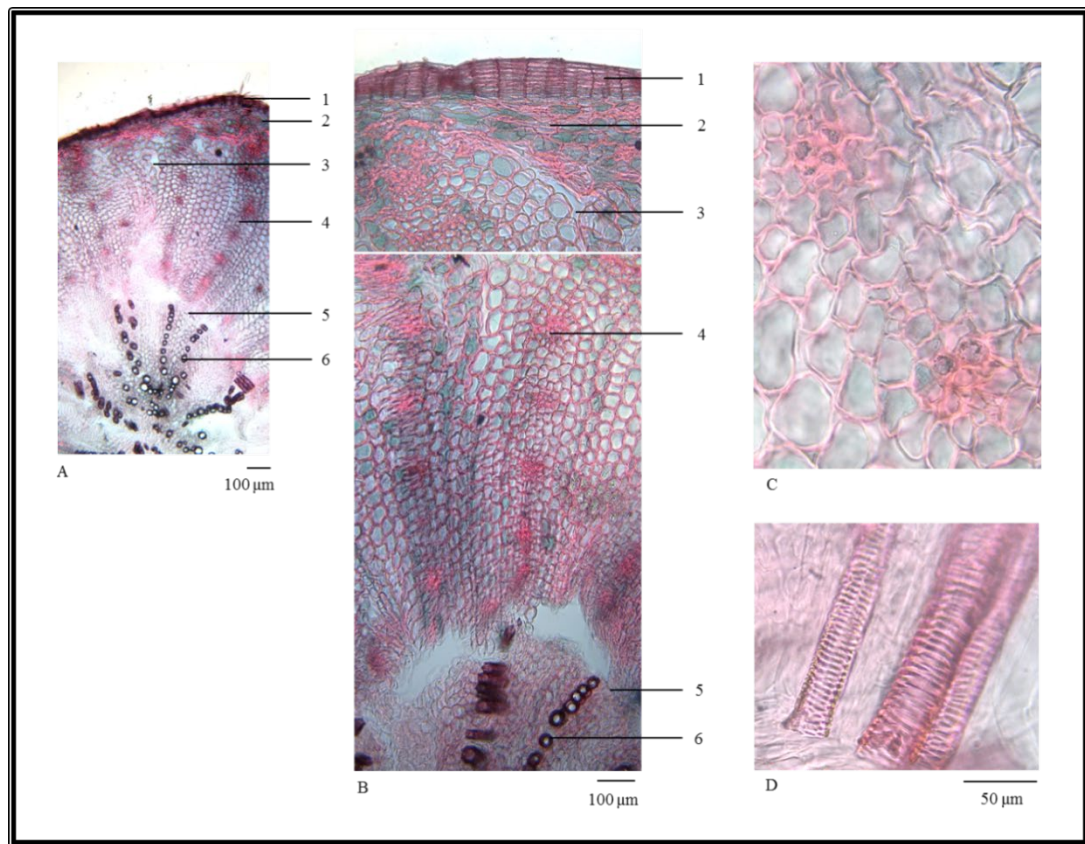


圖 2 桔梗橫切面顯微特徵圖

A.橫切面圖 B.橫切面放大圖 C.乳管群 D.導管

1.木栓細胞 2.皮層 3.裂隙 4.韌皮部 5.形成層 6.木質部

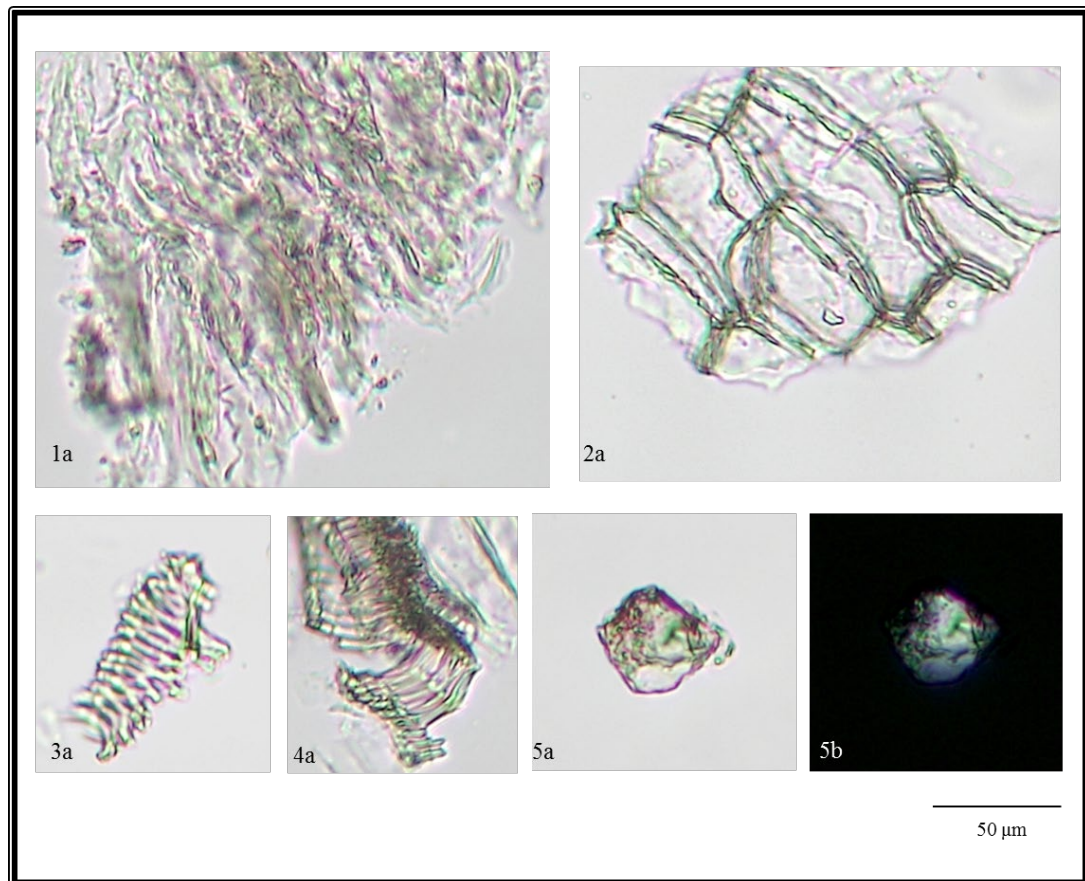


圖 3 桔梗粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 乳汁管 2. 木栓細胞 3. 網紋導管 4. 階紋導管 5. 菊糖

參考文獻

1. 行政院衛生署中華藥典中藥集編修小組編輯 (2004)。中華中藥典第一版。台北市：行政院衛生署。123 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。123 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。175 頁。
4. 張賢哲、蔡貴花編著 (2010)。中藥炮製學。台中：中國醫藥大學。210~2111 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。193~194 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)。香港中藥材標準第二冊。香港：香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部。194~202 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。766~770 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。446~450 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 7 冊。上海：上海科學技術出版社。622~627 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。343 頁。
11. 國家藥典委員會編輯 (2010)。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。259~260 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。60 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。166~167 頁。

桔梗(藥材)HPLC-ELSD

一、材料

購自於臺灣各地中藥店桔梗藥材共 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、Sampler Manager、PDA Detector、ELSD Detector；層析管柱 Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

乙腈(99.9%)購自於 Sigma-Aldrich；乙醇(95%)購自於國韶實業有限公司；甲醇(HPLC grade)購自於 Merck。

(二) 標準品

標準品桔梗皂苷 E (Platycoside E)，購自於普思生物科技股份有限公司，純度 98%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒評估

取本品粉末七份，每份準確稱取 1.0 g，置 50 mL 離心管中，準確加入甲醇、75%甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇、60%乙醇、水各 50 mL，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 10 分鐘(約 4000 × g)，以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50mL 容量瓶中，加溶媒至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, 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桔梗皂苷 E 最大波峰面積為最佳桔梗萃取溶媒。

(二) 最佳萃取次數評估

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g，置 50 mL 離心管中，準確加入 75%甲醇 50 mL，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 10 分鐘(約 4000 × g)，以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 50 mL 容量瓶中，加 75%甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μm)，即得。每針 10 μL 注入 HPLC，殘渣部分重複上述方法多次

萃取、進樣，直到指標成分被萃取完全，並選出最佳萃取次數。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取標準品桔梗皂苷 E 2.0 mg，加 1.0 mL 的 75% 甲醇製成每 1 mL 含桔梗皂苷 E 2000 μg 的標準品儲備溶液，並以 75% 甲醇稀釋至 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 50 mL 離心管中，準確加入 75% 甲醇 50 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘；離心 10 分鐘(約 5000 $\times g$)，以 No. 1 濾紙過濾，取濾液。殘渣部分重複提取 1 次，合併濾液濃縮至乾，殘渣用 75% 甲醇使之溶解，轉移 5 mL 容量瓶中，加入 75% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, 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桔梗皂苷 E 的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取桔梗皂苷 E 標準品儲備溶液適量(2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以 75% 甲醇稀釋成含桔梗皂苷 E 分別為 1600、800、400、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

以桔梗皂苷 E 為 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以桔梗皂苷 E 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：取同一批市售桔梗藥材粉末，依桔梗藥材檢品溶液製備方法平行製備 5 份桔梗檢品溶液，進樣測定，以桔梗皂苷 E 的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售桔梗藥材粉末，依桔梗藥材檢品溶液製備方法製備桔梗檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以桔梗皂苷 E 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

取已知桔梗皂苷E含量的桔梗藥材粉末5份，每份準確稱取約0.5 g，分別加入1 mL的桔梗皂苷E溶液(1.0 mg/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 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 °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 μ L
7. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	20	80
25	25	75
35	25	75

(十二) 臺灣市售桔梗藥材含量測定

取10批市售桔梗藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各10 μ L連續3針注入HPLC，所得平均波峰面積依附錄I公式計算樣品桔梗皂苷E的百分含量。

(十三) 桔梗檢品之 UPLC 層析條件

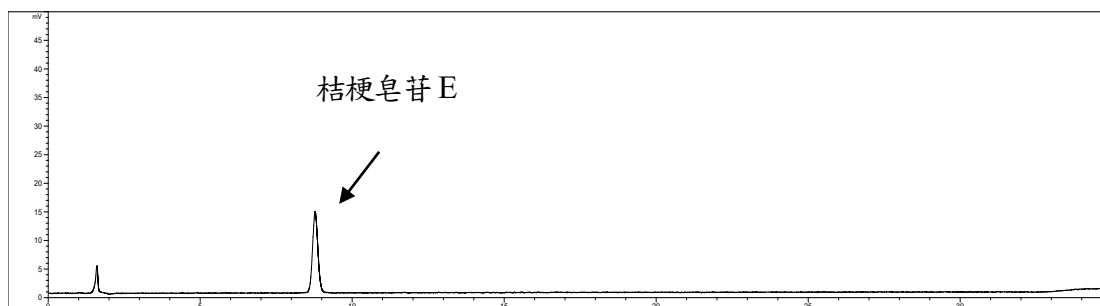
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m)。
2. 流速：0.4 mL/min
3. 蒸發光散射檢測器檢測(ELSD)：漂移管溫度 60 °C，霧化器溫度 70 °C
4. 霧化氣(N₂)流速：1.6 L/min
5. 管柱溫度：35 °C
6. 注入量：1 μ L
7. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	1	99
2	10	90
4	15	85
8	25	75
10	30	70
12	100	0

五、結果

(一) 標準品桔梗皂苷 E 之 HPLC 層析

於滯留時間 8.77 分鐘處顯示桔梗皂苷 E 標準品波峰(圖一)。

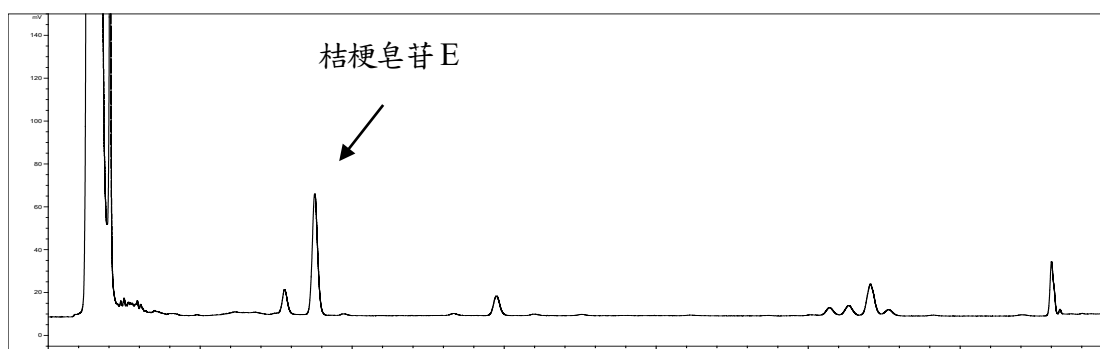


圖一、桔梗皂苷 E 標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售桔梗藥材檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 8.81 分鐘處顯示桔梗藥材檢品中桔梗皂苷 E 波峰(圖二)。

桔梗皂苷 E 分離率(R)為 3.01, 拖尾因子(T)為 0.99, 均在系統適用性要求內。



圖二、市售桔梗藥材檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取溶媒評估

以 75% 甲醇為溶媒時，每克藥材重量所得桔梗皂苷 E 的波峰面積最大，顯示 75% 甲醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	桔梗皂苷 E 波峰面積	最佳萃取
甲醇	522.1	
75% 甲醇	1203.5	√
50% 甲醇	510.2	
乙醇	56.4	
75% 乙醇	882.2	
50% 乙醇	725.0	
水	233.8	

(四) 最佳萃取次數評估

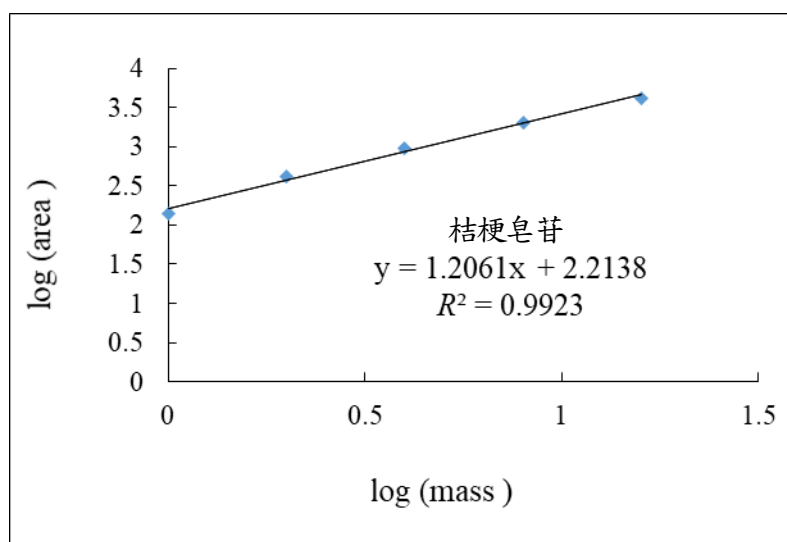
結果顯示萃取 2 次基本上已將桔梗皂苷 E 萃取完全(萃取率大於 98%)。

表二、桔梗檢品萃取次數評估

75% 甲醇萃取次數	桔梗皂苷 E 波峰面積
第 1 次	1289.5
第 2 次	205.2
第 3 次	36.9
第 4 次	N.D.

(五) 標準品桔梗皂苷 E 檢量線

經不同濃度桔梗皂苷 E(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 $y = 1.2061x + 2.2138$, $R^2 = 0.9923$, 顯示質量在 1.0–16 μg 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、桔梗皂苷 E 之檢量線圖

表三、桔梗皂苷 E 之檢量線方程式

對照標準品	質量(μg)	線性回歸方程式	R^2
桔梗皂苷 E	1.0–16	$y = 1.2061x + 2.2138$	0.9923

(六) 精密度試驗

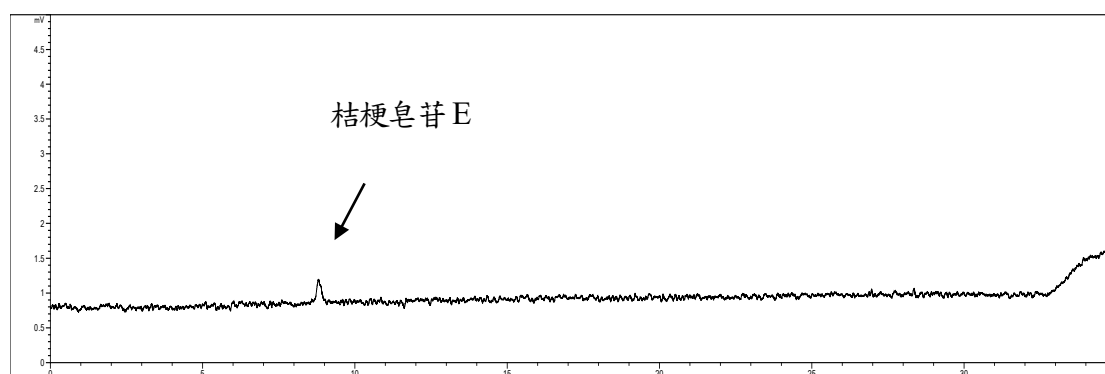
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，桔梗皂苷 E 精密度之相對標準差為 1.72%，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

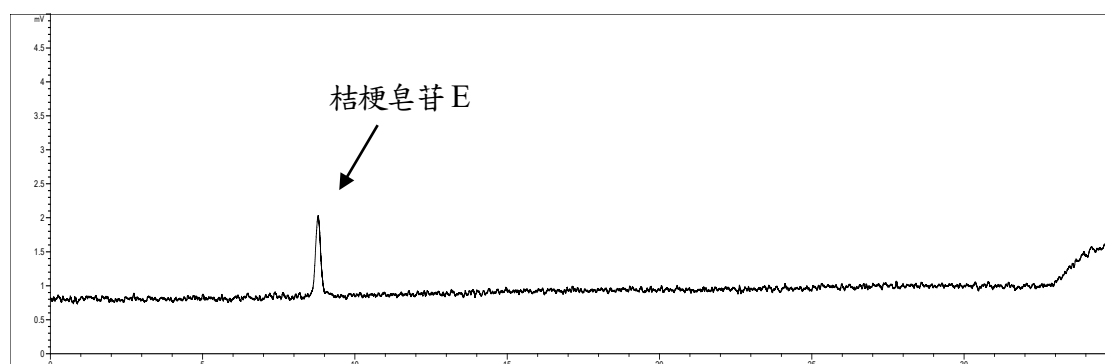
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，桔梗皂苷 E 重複性之相對標準差為 1.63%，在系統適用性要求內。桔梗皂苷 E 在 24 小時內穩定，穩定性之相對標準為 2.31%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

桔梗皂苷 E 偵測極限為 15 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 40 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、桔梗皂苷 E 之偵測極限層析圖



圖五、桔梗皂苷 E 之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	桔梗皂苷 E	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	200 $\mu\text{g/mL}$	1.72
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.8)	1.63
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.8)	2.31
偵測極限 (n=3)	15 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=3)	40 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 添加回收率試驗

桔梗皂苷E 平均添加回收率為 93.9%，相對標準偏差為 1.46%。

表五、桔梗皂苷E 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	0.50	1.127	1.0	2.066	93.90	93.86	1.46
2	0.50	1.127	1.0	2.056	92.90		
3	0.50	1.127	1.0	2.090	96.30		
4	0.50	1.127	1.0	2.053	92.60		
5	0.50	1.127	1.0	2.063	93.60		

(十) 臺灣市售桔梗藥材含量測定

10 批桔梗藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，桔梗皂苷E 的含量為 0.132–0.320%，建議桔梗藥材指標成分桔梗皂苷E 的含量不得少於0.1%。理論板數按桔梗皂苷E 波峰計算應不低於 5000 (實際值為 11000)。

表六、臺灣市售桔梗檢品之桔梗皂苷E 的含量

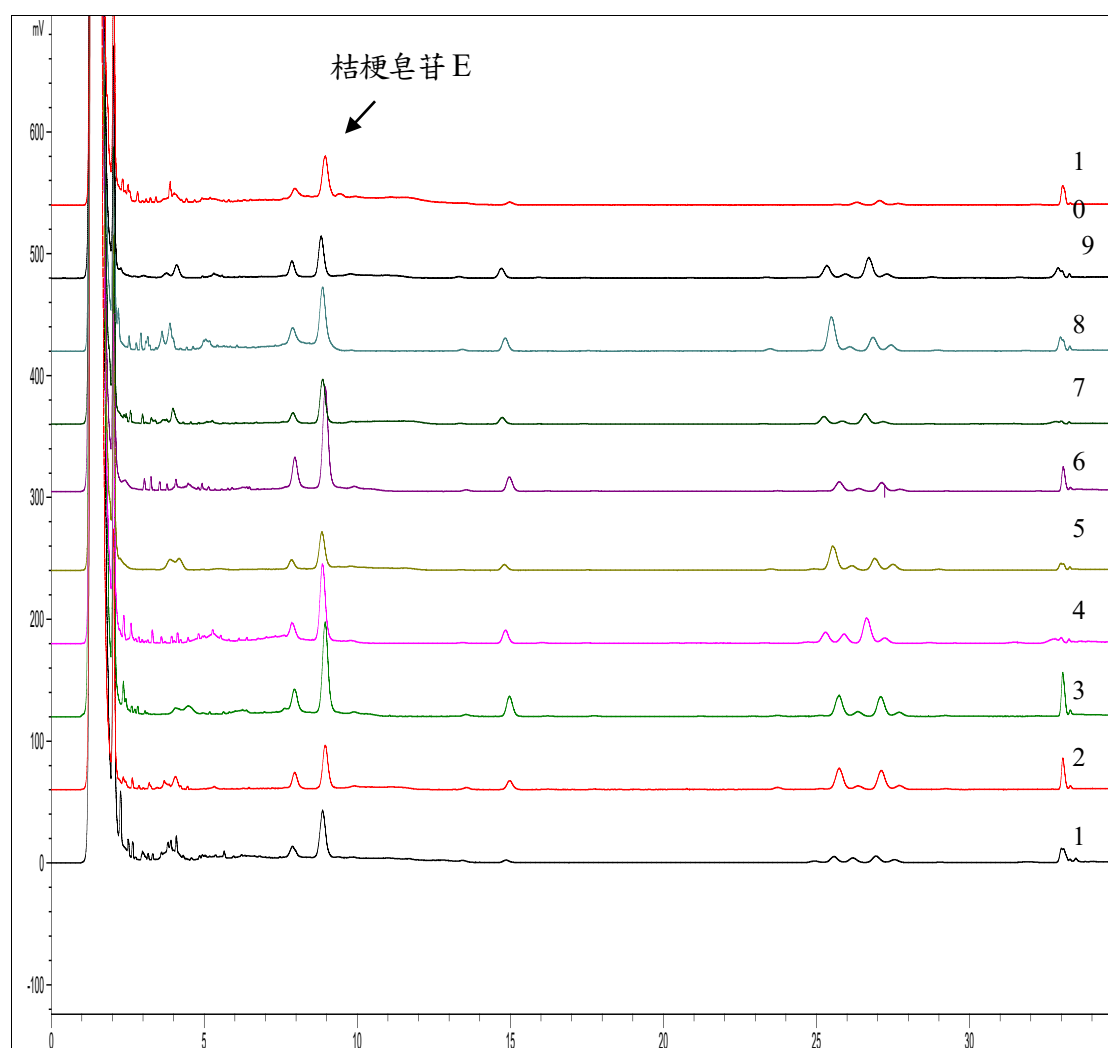
藥材編號(No.)	桔梗皂苷E 含量(%)
1 (ND1)	0.134
2 (ND2)	0.145
3 (NC)	0.289
4 (NI)	0.208
5 (NJ)	0.307
6 (NR)	0.320
7 (CA1)	0.132
8 (CA2)	0.261
9 (SJ)	0.182
10 (SU)	0.219
平均值±S.D.	0.215±0.065

(十一) 桔梗藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售桔梗藥材檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：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：

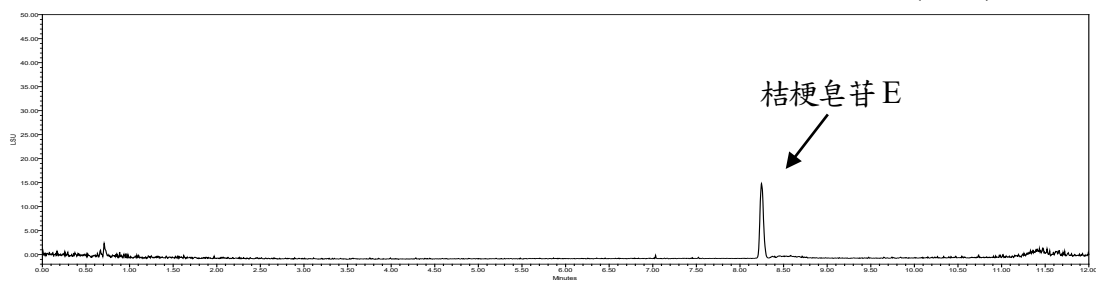
時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	20	80
25	25	75
35	25	75



圖六.、10 批桔梗藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品桔梗皂苷E之UPLC層析

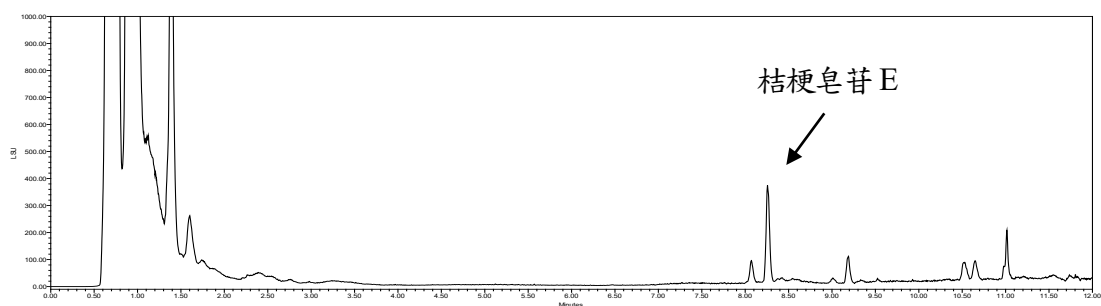
於滯留時間 8.25 分鐘處顯示桔梗皂苷E標準品的波峰(圖七)。



圖七、桔梗皂苷E標準品溶液之UPLC層析圖

(十三) 市售桔梗藥材檢品之UPLC層析

於滯留時間 8.25 分鐘處顯示桔梗藥材檢品中桔梗皂苷E的波峰(圖八)。

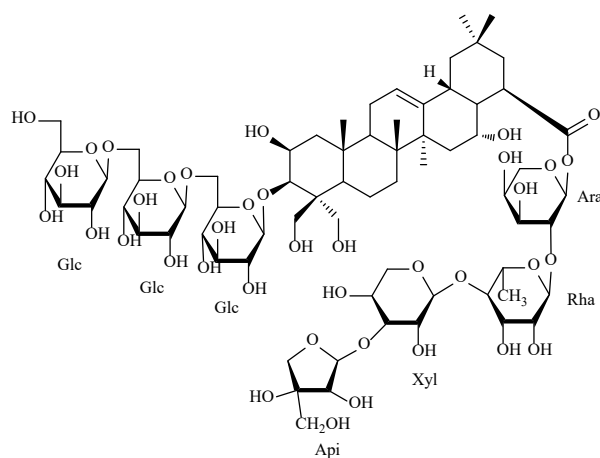


圖八、市售桔梗藥材檢品之UPLC層析圖

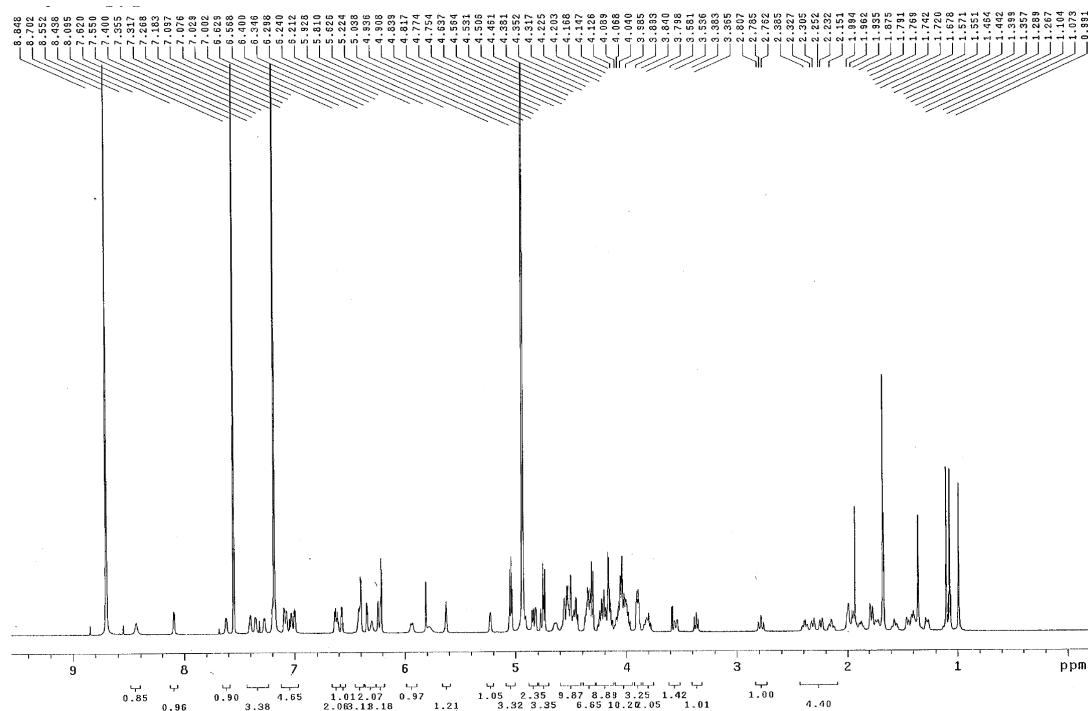
(十四) 桔梗皂苷E的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{69}H_{112}O_{38}$ ；分子量：1548.68；熔點：235–2237 °C；白色粉末。

(十五) 桔梗皂苷E的結構

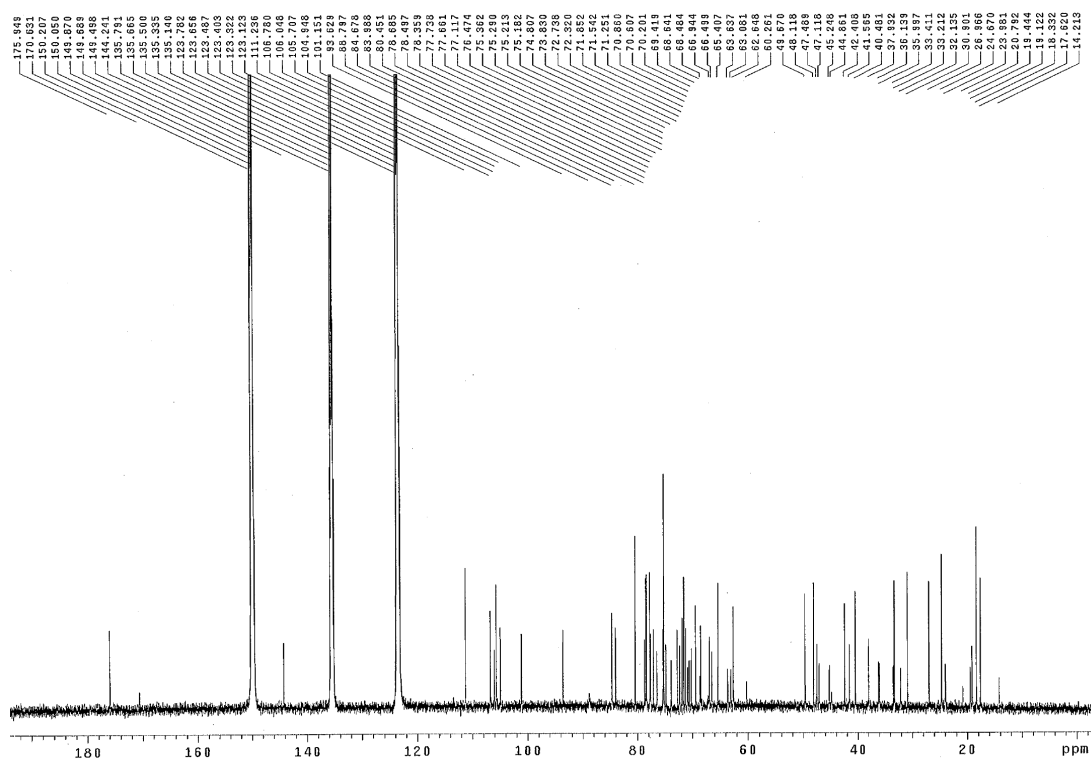


(十六) 桔梗皂苷 E 的 ^1H NMR 圖譜



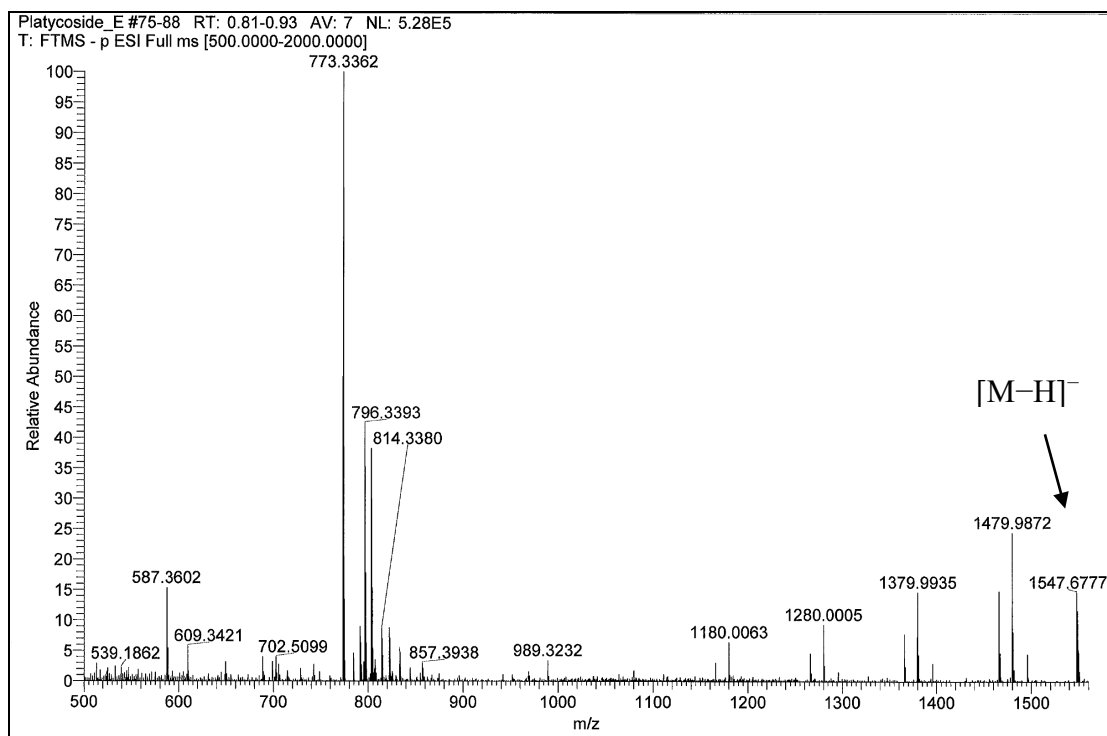
圖九、桔梗皂苷 E 的 ^1H NMR 圖譜($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

(十七) 桔梗皂苷 E 的 ^{13}C NMR 圖譜



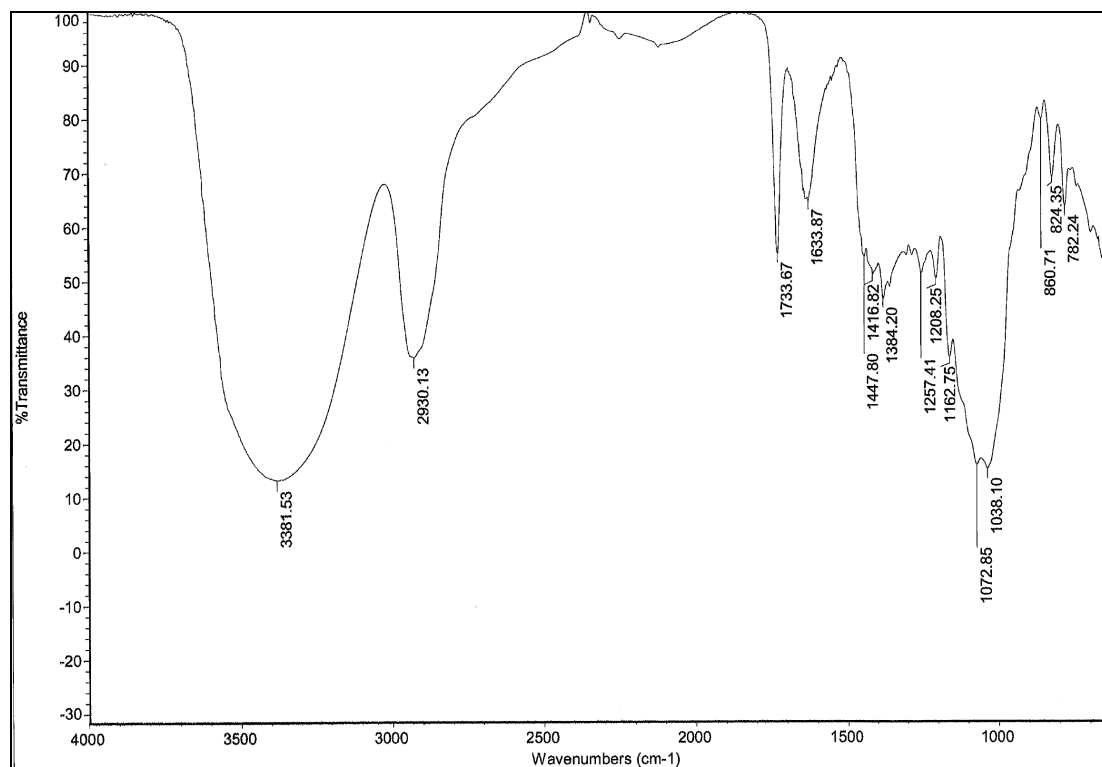
圖十、桔梗皂苷 E 的 ^{13}C NMR 圖譜($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)

(十八) 桔梗皂苷E的 ESI-MS 圖譜



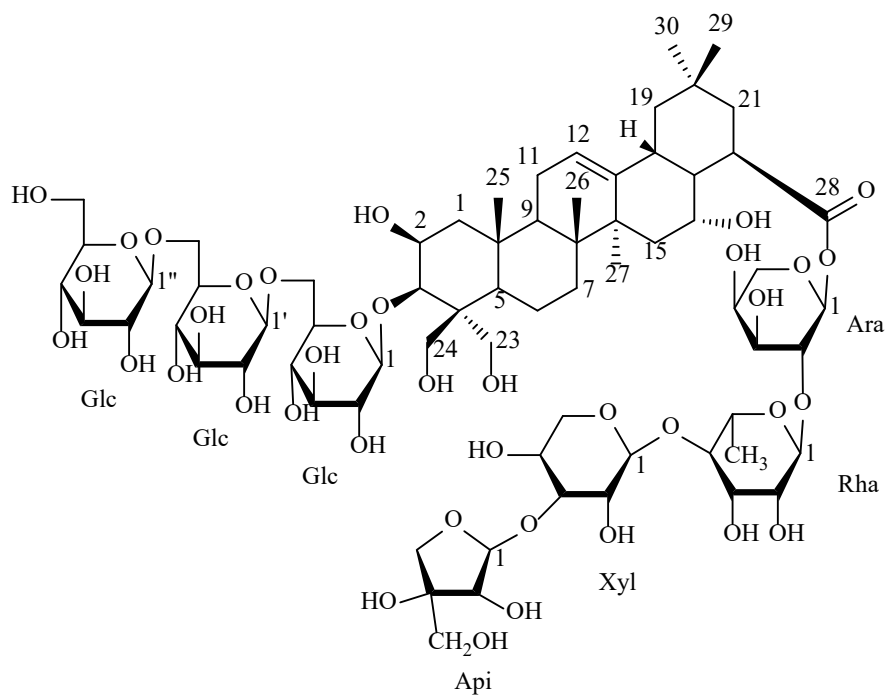
圖十一、桔梗皂苷E的 ESI-MS 圖譜

(十九) 桔梗皂苷E的 FTIR 圖譜



圖十二、桔梗皂苷E的 FTIR 圖譜

(二十) 桔梗皂苷E的氫、碳化學位移



桔梗皂苷 E

表七、桔梗皂苷E的氫、碳化學位移(C_5D_5N)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	1.86–1.90 (m), 1.94–1.96 (m)	45.2
2	4.32–4.36 (m)	68.5
3	4.48 (brs)	88.8
4	-	48.1
5	1.77 (brd, 13.2)	45.0
6	1.34–1.38 (m), 1.72 (d, 13.2)	19.4
7	1.44 (d, 13.2), 1.55–1.59 (m)	33.4
8	-	40.5
9	1.94–1.98 (m)	47.5
10		37.9
11	1.99–2.02 (m)	24.0
12	5.63 (brs)	123.1
13	-	144.2
14	-	42.4
15	1.77 (brd, 13.2), 2.23 (brd, 12.0)	36.1
16	5.22 (brs)	73.8
17	-	49.7

18	3.54 (dd, 14.4, 4.2)	41.6
19	1.40 (brd, 7.8), 2.76 (t, 14.4)	47.1
20	-	30.9
21	1.27 (brd, 13.2), 2.36 (td, 13.2, 4.8)	36.0
22	2.12 (td, 13.2, 4.8), 2.31 (brd, 13.2)	32.1
23	4.34–4.38 (m), 4.46–4.50 (m)	63.1
24	4.14–4.18 (m)	66.9
25	1.36 (s)	19.1
26	1.07 (s)	17.6
27	1.68 (s)	27.0
28	-	175.9
29	0.99 (s)	33.2
30	1.10 (s)	24.7
Glucose (inner)		
1	4.84 (d, 7.2)	106.0
2	4.04–4.08 (m)	74.8
3	4.07–4.10 (m)	78.7
4	4.20–4.26 (m)	71.5
5	4.13–4.16 (m)	76.5
6	3.78–3.82 (m), 5.03–5.05 (m)	70.9
Glucose (center)		
1'	4.74–4.77 (m)	104.9
2'	3.96–4.02 (m)	75.4
3'	4.18–4.23 (m)	78.4
4'	4.20–4.26 (m)	71.3
5'	3.99–4.03 (m)	77.1
6'	4.30–4.34 (m), 4.75–4.79 (m)	70.2
Glucose (terminal)		
1''	5.03–5.05 (m)	105.7
2''	3.96–4.02 (m)	75.3
3''	3.81–3.92 (m)	78.5
4''	3.81–3.92 (m)	72.3
5''	4.18–4.24 (m)	77.7
6''	4.34–4.38 (m), 4.46–4.50 (m)	62.6
Arabinose		
1	6.40 (d, 9.6)	93.6
2	4.53–4.56 (m)	75.2
3	4.44–4.48 (m)	70.6

4	4.33–4.37 (m)	66.5
5	3.81–3.92 (m), 4.44–4.48 (m)	63.6
Rhamnose		
1	5.81 (brs)	101.2
2	4.55–4.58 (m)	71.9
3	4.52–4.56 (m)	72.7
4	4.32–4.36 (m)	84.0
5	4.32–4.36 (m)	68.6
6	1.67 (s)	18.3
Xylose		
1	5.03–5.05 (m)	106.8
2	4.00–4.06 (m)	75.2
3	4.04–4.09 (m)	84.7
4	4.01–4.06 (m)	69.4
5	4.14–4.18 (m)	66.9
Apiose		
1	6.21 (d, 2.4)	111.2
2	4.82 (d, 2.4)	77.7
3	-	80.5
4	4.30–4.33 (m), 4.73–4.77 (m)	75.2
5	4.14–4.18 (m)	65.4

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

桔梗(飲片)HPLC-ELSD

一、材料

購自於臺灣各地中藥店桔梗飲片共 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、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

乙腈(99.9%)購自於 Sigma-Aldrich；乙醇(95%)購自於國韶實業有限公司；甲醇(HPLC grade)購自於 Merck。

(二) 標準品

標準品桔梗皂苷 E(Platycoside E)，購自於普思生物科技股份有限公司，純度 98%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒評估

桔梗飲片最佳萃取溶媒同桔梗藥材。

(二) 最佳萃取次數評估

桔梗飲片最佳萃取次數同桔梗藥材。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取標準品桔梗皂苷 E 2.0 mg，加 1.0 mL 的 75% 甲醇製成每 1 mL 含桔梗皂苷 E 2000 μg 的標準品儲備溶液，並以 75% 甲醇稀釋至 200 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 50 mL 離心管中，準確加入 75% 甲醇 50 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘；離心 10 分鐘(約 5000 xg)，以 No. 1 濾紙過濾，取濾液。殘渣部分重複提取 1 次，合併濾液濃縮至乾，殘渣用 75% 甲醇使之溶解，轉移 5 mL

容量瓶中，加入 75% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, 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桔梗皂苷 E 的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取桔梗皂苷 E 標準品儲備溶液適量(2000 $\mu\text{g/mL}$)，以 75% 甲醇稀釋成含桔梗皂苷 E 分別為 1600、800、400、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

以桔梗皂苷 E 為 200 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以桔梗皂苷 E 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

3. 重複性：取同一批市售桔梗飲片粉末，依桔梗飲片檢品溶液製備方法平行製備 5 份桔梗檢品溶液，進樣測定，以桔梗皂苷 E 的含量(%)為指標，求出相對標準差。
4. 穩定性：取同一批市售桔梗飲片粉末，依桔梗飲片檢品溶液製備方法製備桔梗檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以桔梗皂苷 E 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

取已知桔梗皂苷 E 含量的桔梗飲片粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，分別加入 1 mL 的桔梗皂苷 E 溶液(1.0 mg/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	20	80
25	25	75
35	25	75

(十二) 臺灣市售桔梗飲片含量測定

取 10 批市售桔梗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 公式計算樣品桔梗皂苷 E 的百分含量。

(十三) 桔梗飲片檢品之 UPLC 層析條件

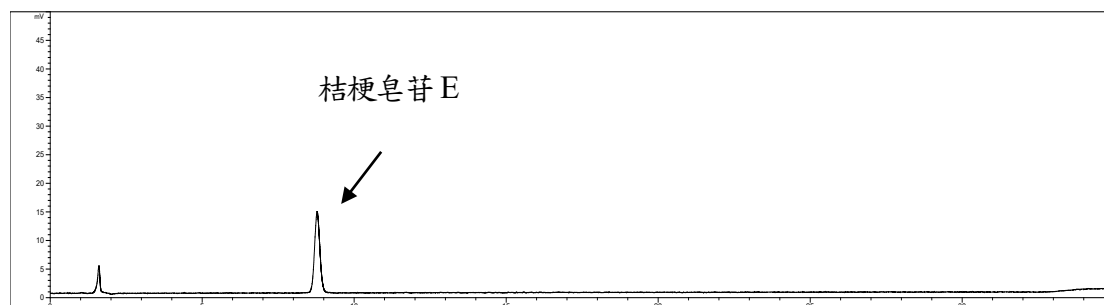
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)。
2. 流速：0.4 mL/min
3. 蒸發光散射檢測器檢測(ELSD)：漂移管溫度 60 °C，霧化器溫度 70 °C
4. 霧化氣(N₂)流速：1.6 L/min
5. 管柱溫度：35 °C
6. 注入量：1 μL
7. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	1	99
2	10	90
4	15	85
8	25	75
10	30	70
12	100	0

五、結果

(一) 標準品桔梗皂苷 E 之 HPLC 層析

於滯留時間 8.77 分鐘處顯示桔梗皂苷 E 標準品波峰(圖一)。

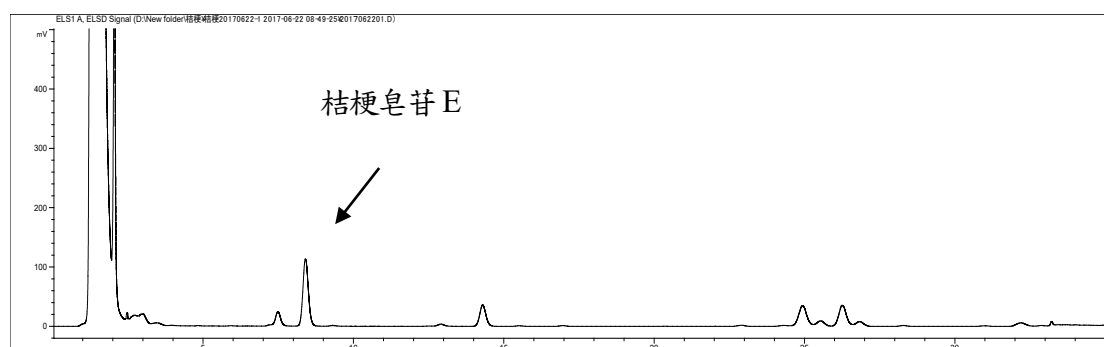


圖一、桔梗皂苷 E 標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售桔梗飲片檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 8.63 分鐘處顯示桔梗飲片檢品中桔梗皂苷 E 波峰(圖二)。

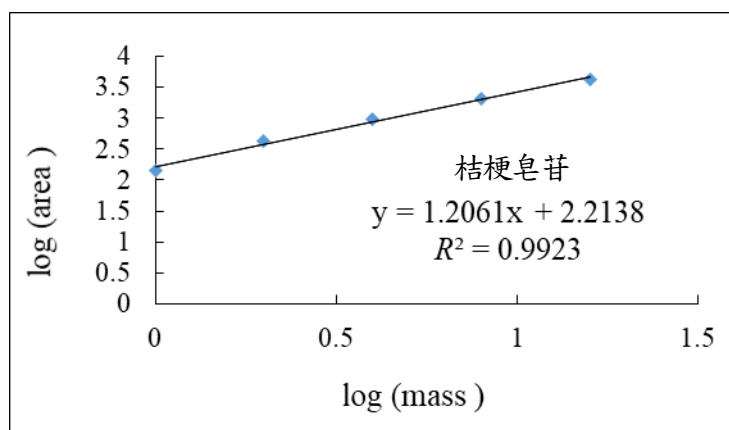
桔梗皂苷 E 分離率(R)為 2.85, 拖尾因子(T)為 1.02, 均在系統適用性要求內。



圖二、市售桔梗飲片檢品之 HPLC 層析圖

(三) 標準品桔梗皂苷 E 檢量線

經不同濃度桔梗皂苷 E(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 $y = 1.2061x + 2.2138$, $R^2 = 0.9923$, 顯示質量在 1.0–16 μg 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、桔梗皂苷 E 之檢量線圖

表一、桔梗皂苷 E 之檢量線方程式

對照標準品	質量(μg)	線性回歸方程式	R^2
桔梗皂苷 E	1.0–16	$y = 1.2061x + 2.2138$	0.9923

(四) 精密度試驗

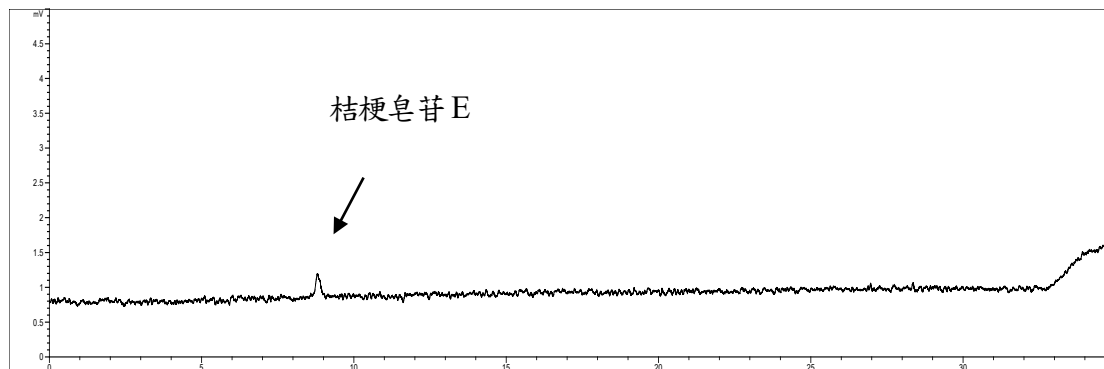
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，桔梗皂苷 E 精密度之相對標準差為 1.72%，在系統適用性要求內。

(五) 重複性與穩定性試驗

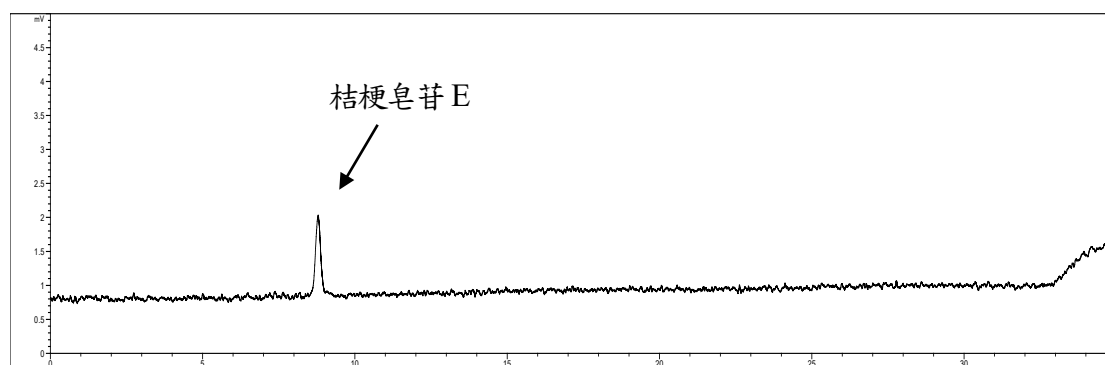
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，桔梗皂苷 E 重複性之相對標準差為 1.93%，在系統適用性要求內。桔梗皂苷 E 在 24 小時內穩定，穩定性之相對標準為 2.27%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(六) 偵測極限與定量極限試驗

桔梗皂苷 E 偵測極限為 15 μg/mL (圖四)，定量極限為 40 μg/mL (圖五)。



圖四、桔梗皂苷 E 之偵測極限層析圖



圖五、桔梗皂苷E之定量極限層析圖

表二、各項檢驗分析

檢測項目	桔梗皂苷 E	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	200 µg/mL	1.72
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.6)	1.93
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.6)	2.27
偵測極限 (n=3)	15 µg/mL	-
定量極限 (n=3)	40µg/mL	-

(七) 添加回收率試驗

桔梗皂苷E 平均添加回收率為 92.6%，相對標準偏差為 1.06%。

表三、桔梗皂苷E 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	0.50	0.928	1.0	1.847	91.90	92.58	1.06
2	0.50	0.928	1.0	1.869	94.10		
3	0.50	0.928	1.0	1.846	91.80		
4	0.50	0.928	1.0	1.846	91.80		
5	0.50	0.928	1.0	1.861	93.30		

(八) 臺灣市售桔梗飲片含量測定

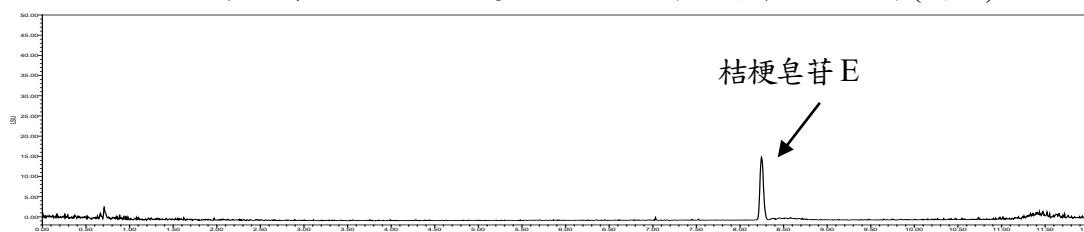
10 批桔梗飲片之含量測定結果(乾燥品)如表四所示，桔梗皂苷 E 的含量為 0.122–0.309%，建議桔梗飲片指標成分桔梗皂苷 E 的含量不得少於 0.1%。理論板數按桔梗皂苷 E 波峰計算應不低於 5000 (實際值為 10500)。

表四、臺灣市售桔梗飲片檢品之桔梗皂苷 E 的含量

藥材編號(No.)	桔梗皂苷 E 含量(%)
1 (NA-1)	0.122
2 (NA-2)	0.221
3 (NF)	0.309
4 (NI)	0.260
5 (NN)	0.204
6 (NY)	0.239
7 (CA1)	0.145
8 (CA2)	0.131
9 (SA)	0.133
10 (SE)	0.122
平均值±S.D.	0.189±0.067

(九) 標準品桔梗皂苷 E 之 UPLC 層析

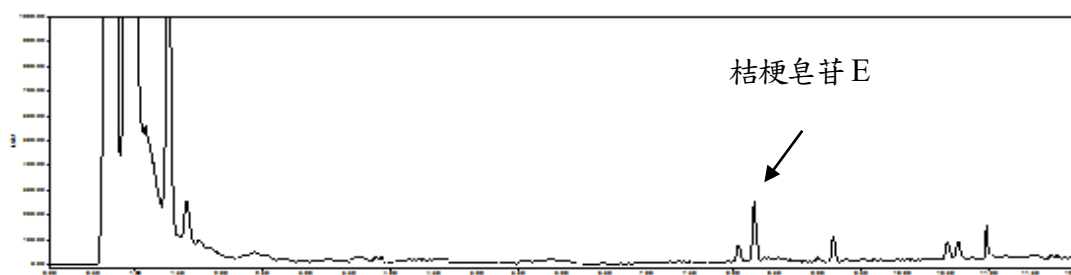
於滯留時間 8.25 分鐘處顯示桔梗皂苷 E 標準品的波峰(圖六)。



圖六、桔梗皂苷 E 標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十) 市售桔梗飲片檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 8.24 分鐘處顯示桔梗飲片檢品中桔梗皂苷 E 的波峰(圖七)。



圖七、市售桔梗飲片檢品之 UPLC 層析圖

桔梗(藥材+飲片)TLC

生藥名：PLATYCODI RADIX

英文名：Platycodon Root

基 原：本品為桔梗科 Campanulaceae 植物桔梗 *Platycodon grandiflorum* (Jacq.) A. DC.之乾燥根。

一、方法

(一) 檢 品 溶 液 **【萃取方法 1】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)**

——取本品粉末 1.0 g，加 7%硫酸乙醇：水(1：3)混合溶液 20 mL，加熱迴流 3 小時，待冷卻後用二氯甲烷振搖萃取 2 次，每次 20 mL，合併二氯甲烷層液，加水洗滌 2 次，每次 30 mL，棄水層液，二氯甲烷層液用無水硫酸鈉脫水，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】(修飾香港中藥材標準第二冊)

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 30 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加甲醇 3 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 3】(臺灣中藥典第三版 2018)✓

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 5 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 溶 液 取桔梗皂苷 E (Platycoside E)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含 0.2 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】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)**

——二氯甲烷：乙醚 (2：1)

【展開劑 2】(香港中藥材標準第二冊)

——二氯甲烷：甲醇：冰醋酸 (5：8：1)

【展開劑 3】(臺灣中藥典第三版 2018)✓

——乙酸乙酯：冰醋酸：甲酸：水 (3：1：1：1)

(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 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，於可見光下檢視。

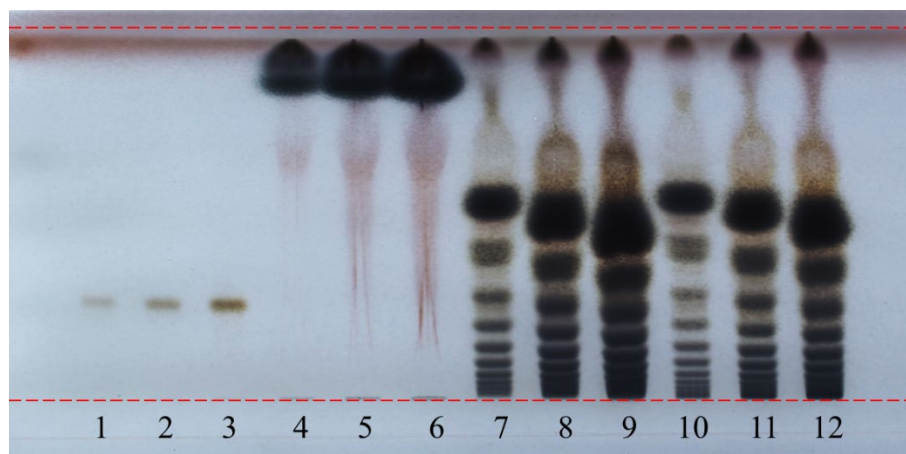
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：106/07/14

相對溼度(RH)：57%

溫度(RT)：25 °C

【展開劑3】 (臺灣中藥典第三版 2018)——乙酸乙酯：冰醋酸：甲酸：水 (3：1：1：1)



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	桔梗皂苷 E (0.2 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 2 【萃取方法 1】	2, 5, 8 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 2 【萃取方法 2】	2, 5, 8 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 2 【萃取方法 3】	2, 5, 8 μ L

建議萃法：唯【萃取方法 2】及【萃取方法 3】之檢品溶液中有分離與檢出標準品桔梗皂苷 E，而由於製備方法較簡便且快速，故選擇【萃取方法 3】。

建議點注量：桔梗皂苷 E 標準品溶液 1 μ L，檢品溶液【萃取方法 3】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

實驗日期：106/07/18

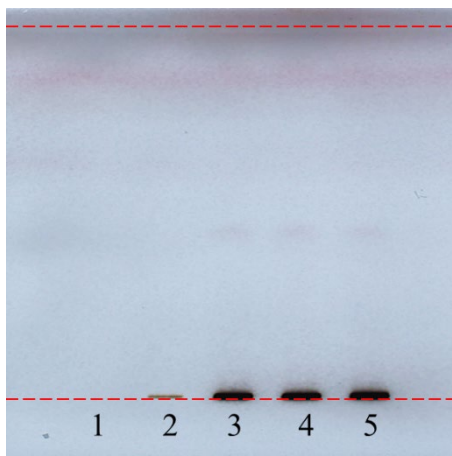
相對溼度(RH)：61%

溫度(RT)：25 °C

【展開劑 1】(修飾臺灣中藥典第二版 2013;修飾中華人民共和國藥典 2015)——

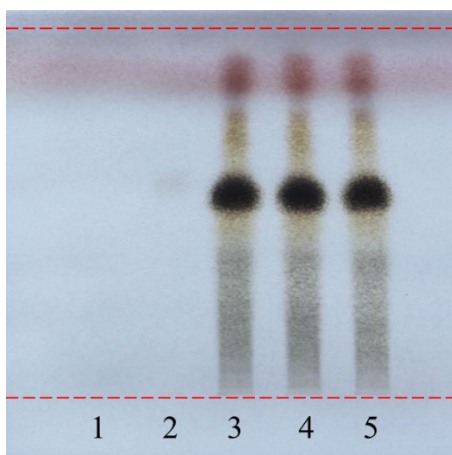
二氯甲烷：乙醚 (2：1)

【萃取方法 3】(自行開發)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後可見光檢出(桔梗皂苷 E R_f 值為 0)



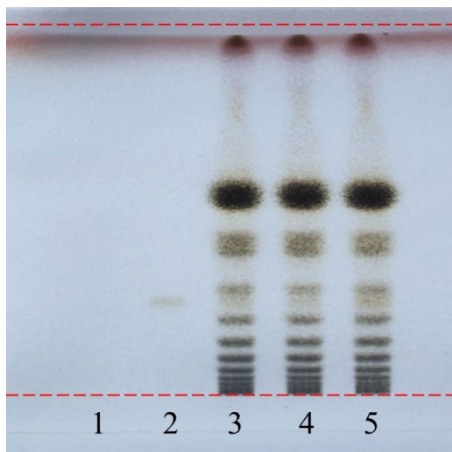
【展開劑 2】(香港中藥材標準第二冊)——二氯甲烷：甲醇：冰醋酸 (5：8：1)

【萃取方法 3】(自行開發)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後可見光檢出(桔梗皂苷 E R_f 值為 0.57)



【展開劑 3】(臺灣中藥典第三版 2018)——乙酸乙酯：冰醋酸：甲酸：水 (3：1：1：1) ✓

【萃取方法 3】(臺灣中藥典第三版 2018)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後可見光檢出(桔梗皂苷 E R_f 值為 0.25)



1：Blank

2：桔梗皂苷 E

3，4：檢品溶液 2

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 3】方式，唯【展開劑 2】及【展開劑 3】展開可從檢品溶液中分離與檢出桔梗皂苷 E，而由於分離效果較佳，且條帶顯示較多，故採用自行開發之【展開劑 3】。

四、觀察方式選擇

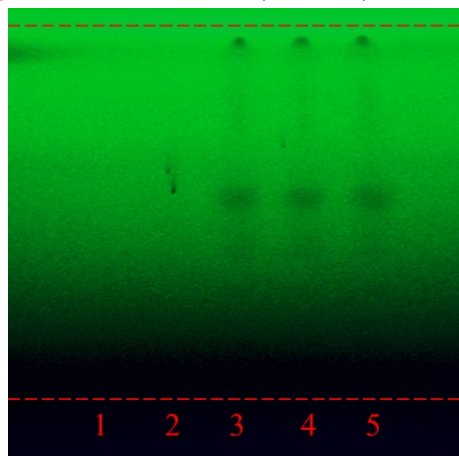
實驗日期：106/07/18

相對溼度(RH)：61%

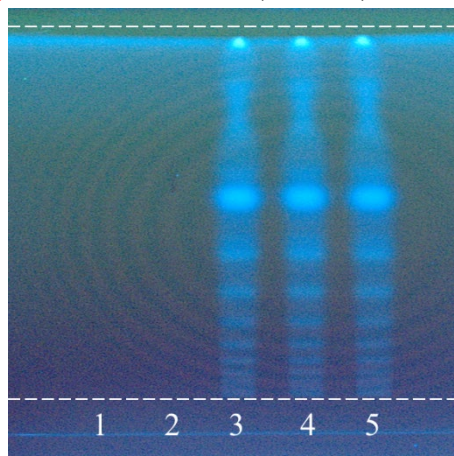
溫度(RT)：25 °C

【展開劑 3】 (臺灣中藥典第三版 2018)——乙酸乙酯：冰醋酸：甲酸：水 (3：1：1：1)

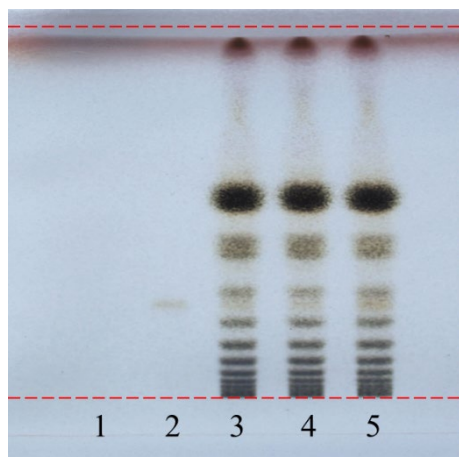
【萃取方法 3】 (臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



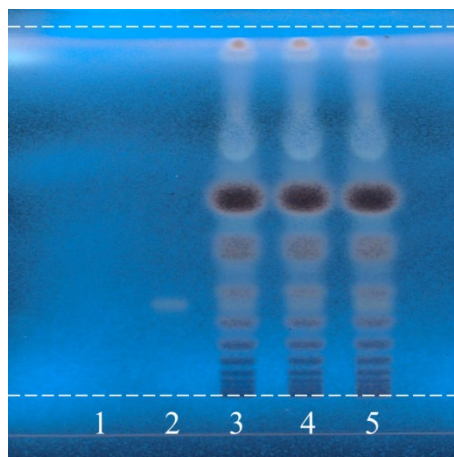
【萃取方法 3】 (臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 3】 (臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 顯色/可見光檢出✓



【萃取方法 3】 (臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 顯色/紫外光(365 nm)檢出



1：Blank

2：桔梗皂苷 E

3，4：檢品溶液 2

5：Spike

建議觀察方式：經 10%硫酸/乙醇顯色後，於可見光檢視較其他觀察方式有明顯之桔梗皂苷 E 標準品斑點。

五、十批桔梗樣品檢測

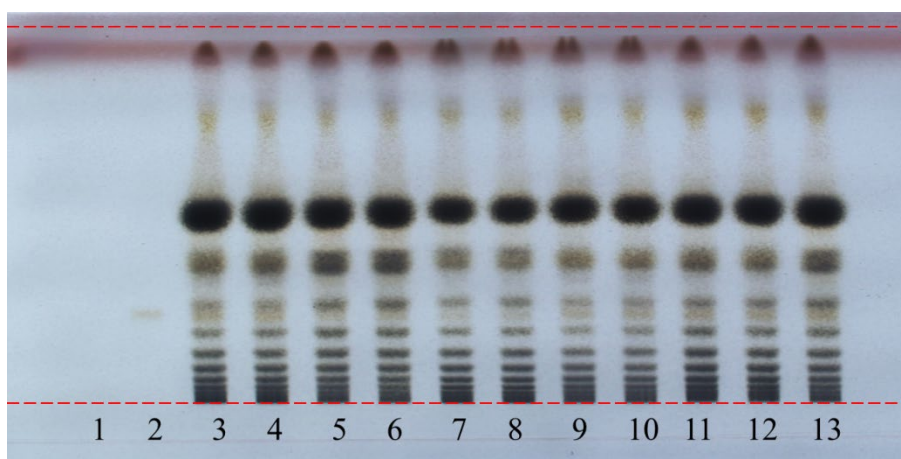
實驗日期：106/07/19

相對溼度(RH)：53%

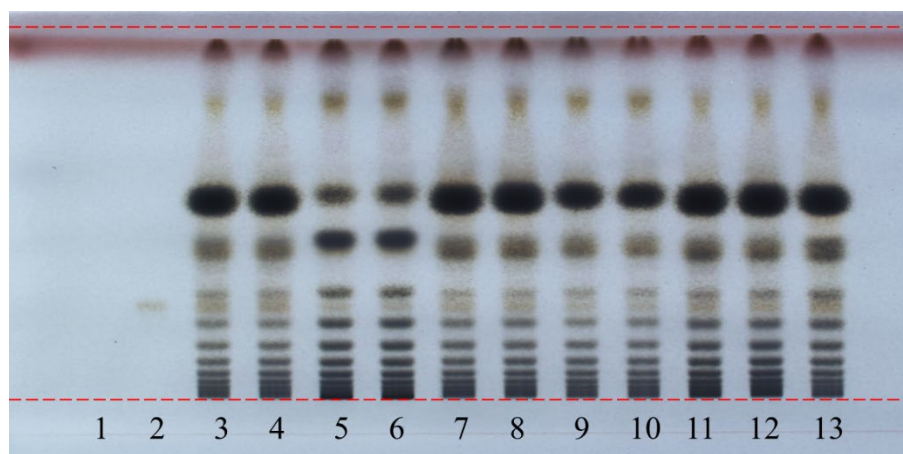
溫度(RT)：26 °C

【展開劑 3】 (臺灣中藥典第三版 2018) —— 乙酸乙酯：冰醋酸：甲酸：水 (3：1：1：1)

【萃取方法 3】(臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 10% 硫酸/乙醇顯色後可見光檢出



1	Blank
2	桔梗皂苷 E (0.2 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 1 (NC)
5 , 6	檢品溶液 2 (ND-1)
7 , 8	檢品溶液 3 (ND-2)
9 , 10	檢品溶液 4 (NI)
11 , 12	檢品溶液 5 (NJ)
13	Spike (檢品溶液 2)



1	Blank
2	桔梗皂苷 E (0.2 mg/mL)
3, 4	檢品溶液 6 (NR)
5, 6	檢品溶液 7 (CA-1)
7, 8	檢品溶液 8 (CA-2)
9, 10	檢品溶液 9 (SJ)
11, 12	檢品溶液 10 (SU)
13	Spike (檢品溶液 2)

結論與建議：以自行開發之【萃取方法 3】方式，並以自行開發之【展開劑 3】分離與檢出桔梗皂苷 E 較佳，以 10%硫酸/乙醇顯色後，於可見光下檢視較佳。

六、十批桔梗飲片樣品檢測

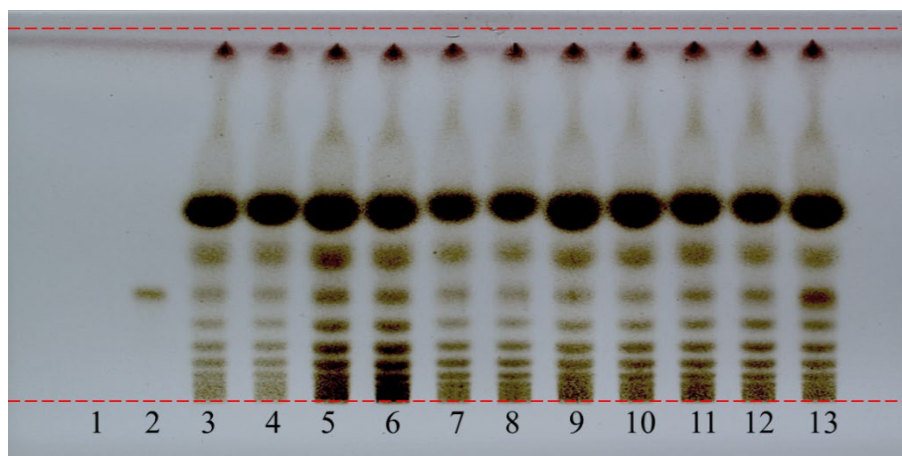
實驗日期：108/01/17

相對溼度(RH)：64%

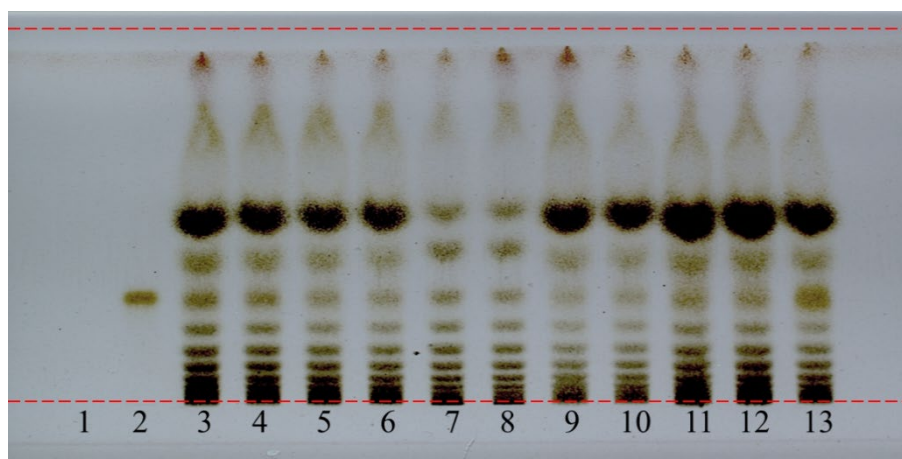
溫度(RT)：25 °C

【展開劑3】(臺灣中藥典第三版 2018)——乙酸乙酯：冰醋酸：甲酸：水 (3：1：1：1)

【萃取方法3】(臺灣中藥典第三版 2018)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後可見光檢出



1	Blank
2	桔梗皂苷 E (0.2 mg/mL)
3, 4	檢品溶液 1 (NF)
5, 6	檢品溶液 2 (NN)
7, 8	檢品溶液 3 (NA-1)
9, 10	檢品溶液 4 (NA-2)
11, 12	檢品溶液 5 (NI)
13	Spike (檢品溶液 4)



1	Blank
2	桔梗皂苷 E (0.2 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 6 (NY)
5 , 6	檢品溶液 7 (CA-1)
7 , 8	檢品溶液 8 (CA-2)
9 , 10	檢品溶液 9 (SA)
11 , 12	檢品溶液 10 (SE)
13	Spike (檢品溶液 4)

結論與建議：飲片鑑別同藥材。