

牛膝

(ACHYRANTHISBIDENTATAE RADIX)

牛膝 MI

一、藥材採購及鑑定	3
二、藥材性狀描述 (圖 1)	3
三、藥材組織顯微鑑別(圖 2).....	3
四、藥材粉末顯微鑑別(圖 3).....	4

牛膝 藥材 HPLC

一、材料	9
二、儀器及層析管柱	9
三、實驗藥品及試劑來源	9
四、方法	9
五、結果	13

牛膝 飲片 HPLC

一、材料	24
二、儀器及層析管柱	24
三、實驗藥品及試劑來源	24
四、方法	24
五、結果	27

牛膝 TLC

一、方法	32
二、萃取選擇及濃度測試	33
三、溶媒系統選擇	34
四、觀察方式選擇	35
五、十批牛膝藥材樣品檢測	36

六、十批牛膝飲片樣品檢測	38
--------------------	----

牛膝

(ACHYRANTHISBIDENTATAE RADIX)

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牛膝的乾燥根。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：牛膝

生藥名：ACHYRANTHIS BIDENTATAE RADIX

英文名：Twotooth Achyranthes Root

基原：莧科 *Amaranthaceae* 植物牛膝 *Achyranthes bidentate* Bl.之乾燥根。

「懷

牛膝」。

採收加工：冬季莖葉枯萎時採挖，除去鬚根及泥沙，捆成小把，曬至乾皺後，將頂端切齊，曬乾。

藥材性狀：本藥材為圓柱狀，表面呈土黃或淡棕色，具有細淺縱皺紋及橫長皮孔，質硬而脆易折斷，受潮則變軟。切面呈黃棕色，具點狀維管束，斷面中央有明顯黃白色木心，斷續排列成數圈，中心部維管束較大，具黏性。微有香氣，味微甜澀。

飲片性狀：本品多為斜切片，外表皮淡棕色，有微細的縱皺紋及橫長皮孔，質硬

脆，易折斷，受潮變軟。切面平坦，淡棕色或棕色，略呈角質樣而油

潤，中心維管束木部較大，黃白色，其週邊散有多數黃白色點狀維管

束，斷續排列成 2~4 輪，氣味微甜而稍苦澀。

生長分佈：多年生草本植物。花期 7~8 月，果期 9~11 月。栽培或野生於山野。

分佈於河南。山西、山東、江蘇、安徽、浙江、江西、湖南、湖北、

四川、雲南、貴州等地。主產河南。

三、藥材組織顯微鑑別(圖 2)

1. 木栓層為數列木栓細胞。
2. 皮層細胞數列，切向延長。
3. 維管束斷續排列成數輪；最外輪維管束較小，有時僅 1 至數個導管，

向內漸大。

4. 最外輪的形成層幾乎連接成環。
5. 木質部由導管及木纖維組成。
6. 中心木質部聚合成群。
7. 薄壁細胞含草酸鈣砂晶。

四、藥材粉末顯微鑑別(圖 3)

1. 本品粉末為灰白色。
2. 木纖維多成束，壁微增厚，紋孔稀疏，偏光顯微鏡下呈亮白色。
3. 木栓細胞呈類方形、類長方形、類圓形或多角形。
4. 草酸鈣砂晶散在薄壁細胞中，偏光顯微鏡下呈多彩狀。
5. 導管大小不一，主要為網紋及具緣紋孔導管。



圖 1A 牛膝藥材圖



圖 1B 牛膝飲片藥材圖

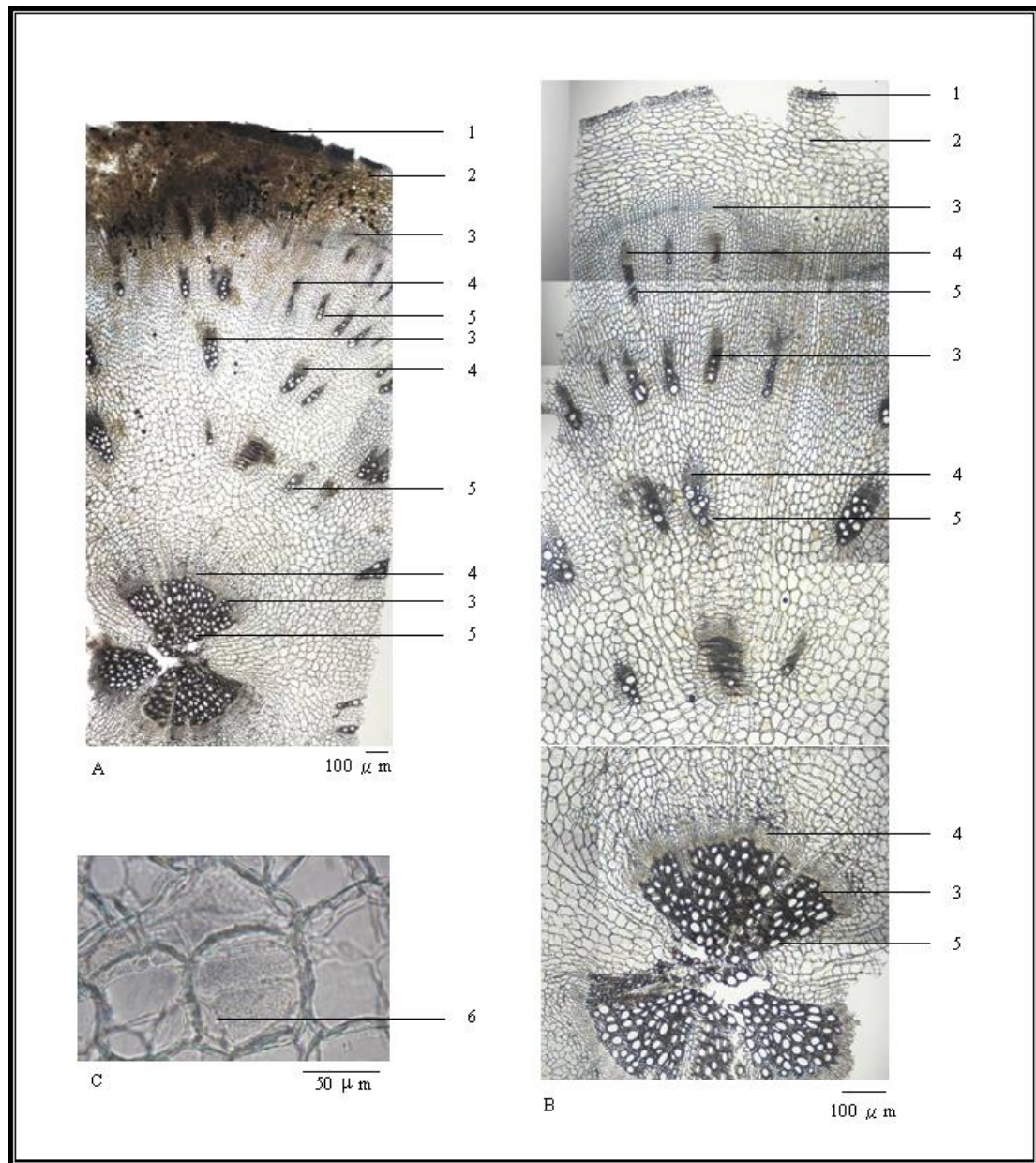


圖 2 牛膝橫切面顯微特徵圖

A.橫切面圖 B.橫切面放大圖 C.砂晶

1.木栓層 2. 皮層 3.形成層 4.韌皮部 5.木質部

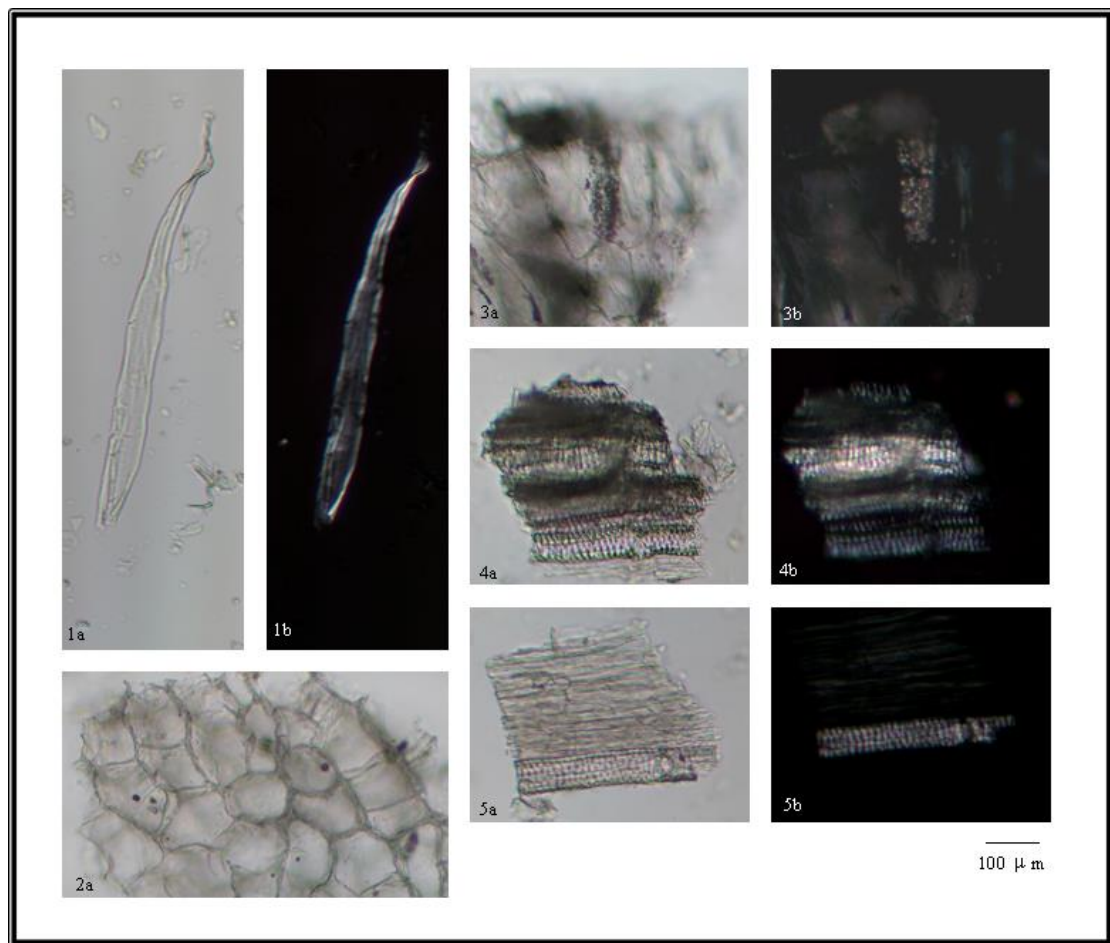


圖 3 牛膝粉末顯微特徵圖

a.光學顯微鏡下特徵 b.偏光顯微鏡下特徵

1.木纖維 2.木栓細胞 3.草酸鈣砂晶 4.具緣紋孔導管 5.網紋導管

參考文獻

1. 行政院衛生署中華藥典中藥集編修小組編輯 (2013)。中華中藥典第二版。台北市：行政院衛生署。51~52 頁。
2. 張永勳、何玉玲總編輯 (2013)。台灣中藥典圖鑑。台北：衛生福利部。48 頁。
3. 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。42~44 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 (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。64~72 頁。
5. 文瑞良主編 (2001)。中藥材彩色顯微圖鑑。北京：中國醫藥科技出版社。76 頁。
6. 肖培根等編輯 (2001)。新編中藥志第一卷。北京：化學工業出版社。194~200 頁。
7. 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。140~143 頁。
8. 國家中醫藥管理局《中華本草》編委會編輯 (1999)。中華本草第 2 冊。上海：上海科學技術出版社。830~836 頁。
9. 國家藥典委員會 (2009)。中華人民共和國藥典中藥材顯微鑒別彩色圖鑒。北京：人民衛生出版社。121 頁。
10. 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。67~68 頁。
11. 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。82 頁。
12. 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。56~57 頁。
13. 趙中振等編輯 (2005)。中藥顯微鑒別圖鑒。遼寧科學技術出版社。162~164 頁。

牛膝(ACHYRANTHIS BIDENTATAE RADIX)

一、材料

購自於臺灣各地中藥店牛膝藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Agilent 1100 series，包含 Degasser (G1379A)、Quat Pump (G1311A)、DAD (G1315B)、Autosampler (G1329A)、Column Oven H-650 (Chrom Tech, TNC.)；層析管柱 COSMOSIL 5C₁₈-AR-II 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；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%)購自於 Merck；乙晴(99.9%)購自於友和貿易股份有限公司。

(二) 標準品

標準品 β-蛻皮甾酮(β-Ecdysterone)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 6 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、95%乙醇、75%乙醇、50%乙醇各 10 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 5 分鐘(約 4000 × g)，以 No.1 濾紙過濾，取濾液轉移至 10 mL 之定量瓶中，加溶媒至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。每針 10 μL 注入 HPLC，以所測得每克重量之標準品 β-蛻皮甾酮最大峰面積為最佳牛膝萃取溶媒。

(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 10 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 5 分鐘(約 4000 × g)，以 No.1 濾紙過濾，取濾液轉移至 10 mL 之定量瓶中，加 75%甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 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 β -蛻皮甾酮 2.0 mg，加 10 mL 甲醇製成每 1 mL 含 β -蛻皮甾酮 200 μg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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，加入 75%甲醇 12.5 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 5 分鐘(約 $4000 \times g$)，以 No.1 濾紙過濾，取濾液，殘渣部分重複提取 1 次，合併濾液，轉移至 25 mL 之定量瓶中，加 75%甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。

(五) 測定法

分別準確吸取標準品溶液、檢品溶液各 10 μL 注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中 β -蛻皮甾酮的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取 β -蛻皮甾酮標準品儲備溶液適量(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，以甲醇稀釋製成含 β -蛻皮甾酮分別為 100、50、20、10、5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 β -蛻皮甾酮濃度為 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以 β -蛻皮甾酮的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性：取同一批市售牛膝粉末，依牛膝檢品溶液製備方法平行製備 5 份牛膝檢品溶液，進樣測定，以 β -蛻皮甾酮的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售牛膝粉末，依牛膝檢品溶液製備方法製備牛膝檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以 β -蛻皮甾酮的含量為指標，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 β -蛻皮甾酮含量的牛膝材料粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，分別加入 1 mL 的 β -蛻皮甾酮溶液(200 $\mu\text{g/mL}$)，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：COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 246 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：30 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	15	85
25	15	85
40	45	55
50	100	0

(十二) 臺灣市售牛膝含量測定

取 10 批市售牛膝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 β -蛻皮甾酮的百分含量。

(十三) UPLC 層析條件

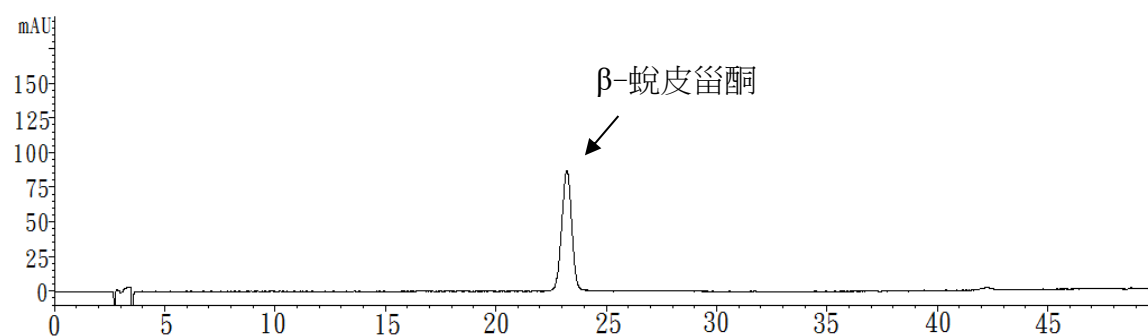
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：246 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	5	95
2	15	85
5	15	85
8	35	65
12	100	0

五、結果

(一) 標準品 β -蛻皮甾酮之 HPLC 層析

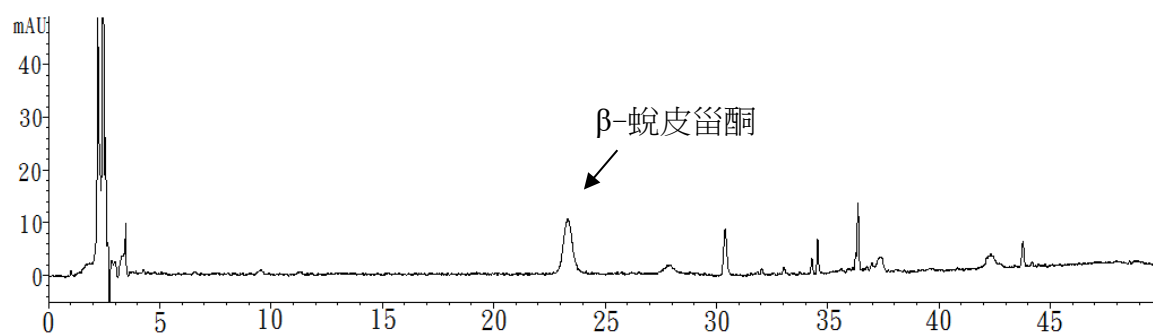
於滯留時間 23.1 分鐘處顯示 β -蛻皮甾酮標準品波峰(圖一)。



圖一、 β -蛻皮甾酮標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售牛膝檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 23.1 分鐘處顯示牛膝檢品中 β -蛻皮甾酮波峰(圖二)。分離率(R)為 9.7，托尾因子(T)為 1.01，均在系統適用性要求內。



圖二、市售牛膝檢品之 HPLC 層析圖

（三）最佳萃取溶媒開發

以 75% 甲醇為溶媒時，每克藥材重量所得 β -蛻皮甾酮的波峰面積最大，顯示 75% 甲醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	波峰面積	最佳萃取
甲醇	389.15	
75% 甲醇	427.96	√
50% 甲醇	410.81	
乙醇	175.57	
75% 乙醇	320.88	
50% 乙醇	384.59	

（四）最佳萃取次數評估

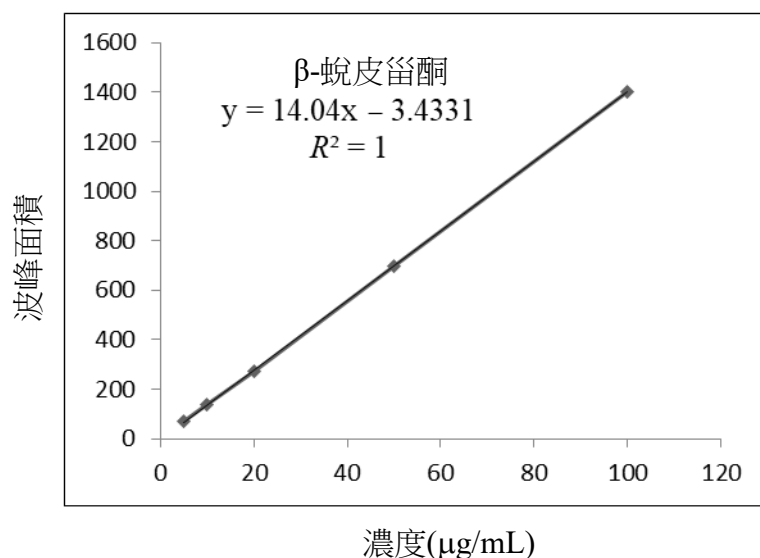
結果顯示萃取 2 次基本上已將 β -蛻皮甾酮萃取完全(萃取率大於 98%)。

表二、牛膝檢品萃取次數評估

75% 甲醇萃取次數	β -蛻皮甾酮波峰面積
第 1 次	461.4
第 2 次	188.8
第 3 次	N.D.

(五) 標準品 β -蛻皮甾酮檢量線

經不同濃度 β -蛻皮甾酮(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 $y = 14.04x - 3.4331$ ， $R^2 = 1$ ，顯示濃度在 5.0–100 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、 β -蛻皮甾酮之檢量線圖

表三、 β -蛻皮甾酮之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
β -蛻皮甾酮	5.0–100	$y = 14.04x - 3.4331$	1

(六) 精密度試驗

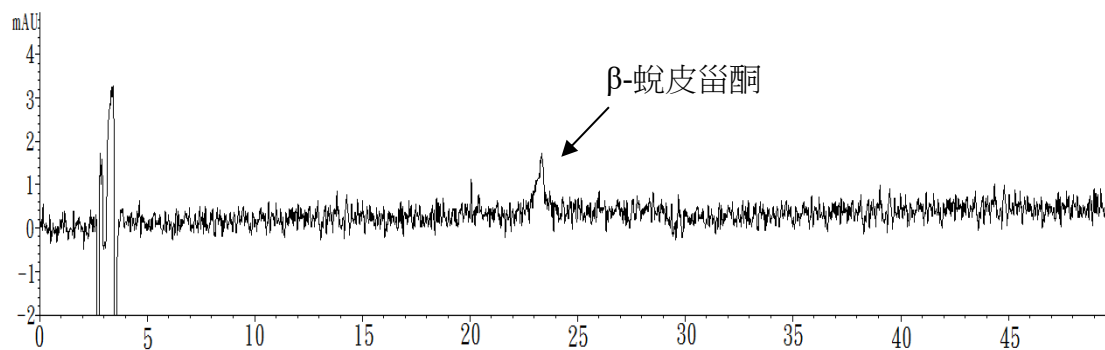
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好， β -蛻皮甾酮精密度之相對標準差為 0.50%，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

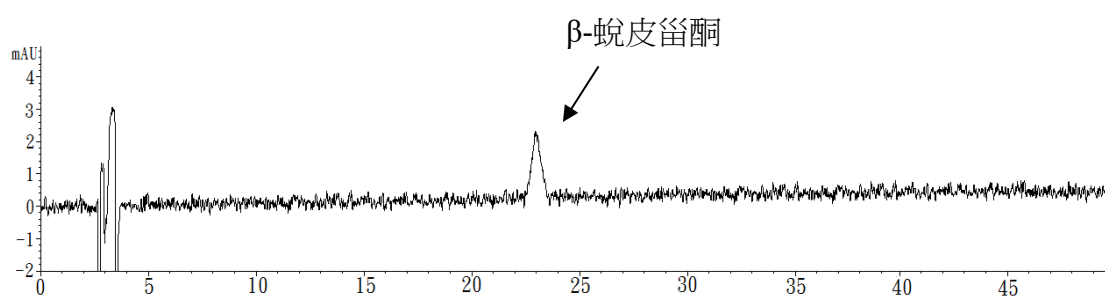
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好， β -蛻皮甾酮重複性之相對標準差為 1.57%，在系統適用性要求內。 β -蛻皮甾酮在 24 小時內穩定，穩定性相對標準差為 1.70%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

β -蛻皮甾酮偵測極限為 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、 β -蛻皮甾酮之偵測極限層析圖



圖五、 β -蛻皮甾酮之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	β -蛻皮甾酮	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	20 $\mu\text{g/mL}$	0.50
重複性 (n=5)	檢品溶液 (No.8)	1.57
穩定性 (n=6)	檢品溶液 (No.8)	1.70
偵測極限 (n=1)	2.5 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=1)	5.0 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 回收率試驗

β -蛻皮甾酮平均添加回收率為 96.6%，相對標準偏差為 1.83%。

表五、 β -蛻皮甾酮添加回收率試驗

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	0.501	0.209	0.200	0.407	99.0	96.60	1.83
2	0.500	0.209	0.200	0.396	93.5		
3	0.501	0.209	0.200	0.403	97.0		
4	0.501	0.209	0.200	0.403	97.0		
5	0.501	0.209	0.200	0.402	96.5		

(十) 臺灣市售牛膝含量測定

10 批牛膝藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示， β -蛻皮甾酮的含量為 0.043–0.063%。建議牛膝藥材指標成分 β -蛻皮甾酮的含量不得少於 0.03%。理論板數按 β -蛻皮甾酮波峰計算應不低於 5000 (實際值為 15000)。

表六、臺灣市售牛膝檢品之 β -蛻皮甾酮含量

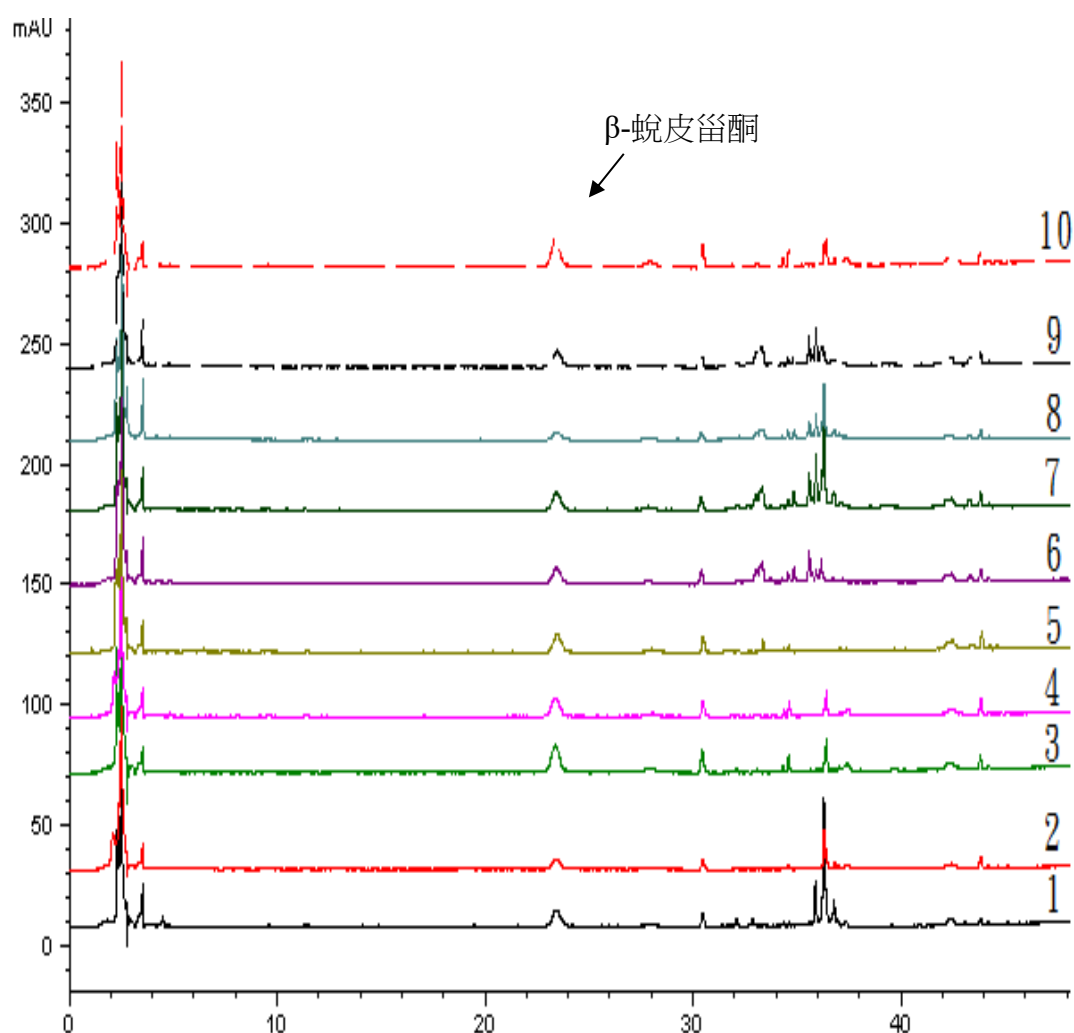
藥材編號(No.)	β -蛻皮甾酮含量(%)
1 (NF)	0.043
2 (NJ)	0.047
3 (NJ-1)	0.063
4 (NR)	0.060
5 (CD-1)	0.049
6 (SC)	0.055
7 (SE-1)	0.052
8 (SG)	0.048
9 (SL)	0.055
10 (SU)	0.057
平均值±S.D.	0.053±0.006

(十一) 牛膝藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售牛膝檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 246 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：30 $^{\circ}$ C
5. 注入量：10 μ L
6. 移動相：

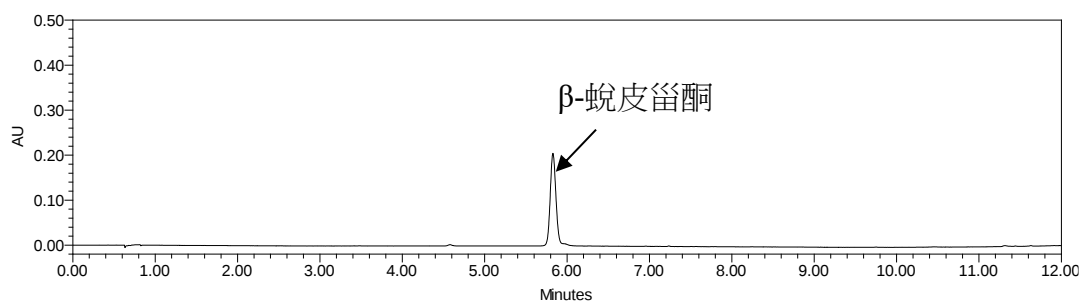
時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	15	85
25	15	85
40	45	55
50	100	0



圖六、10 批牛膝藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品 β -蜕皮甾酮之 UPLC 層析

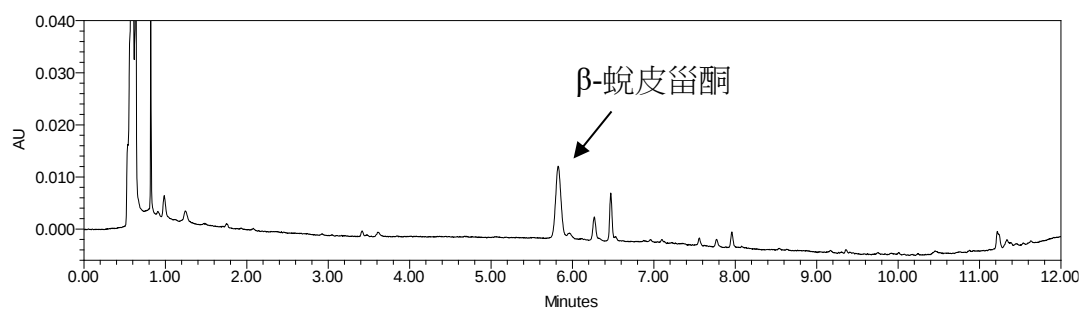
於滯留時間 5.82 分鐘處顯示 β -蜕皮甾酮標準品的波峰(圖七)。



圖七、 β -蜕皮甾酮標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售牛膝檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 5.82 分鐘處顯示牛膝檢品中 β -蜕皮甾酮的波峰(圖八)。

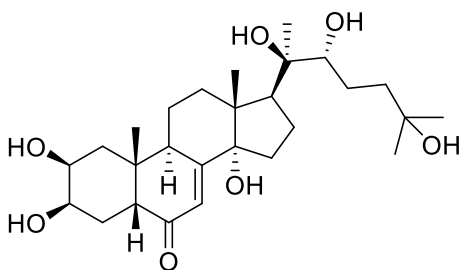


圖八、市售牛膝檢品之 UPLC 層析圖

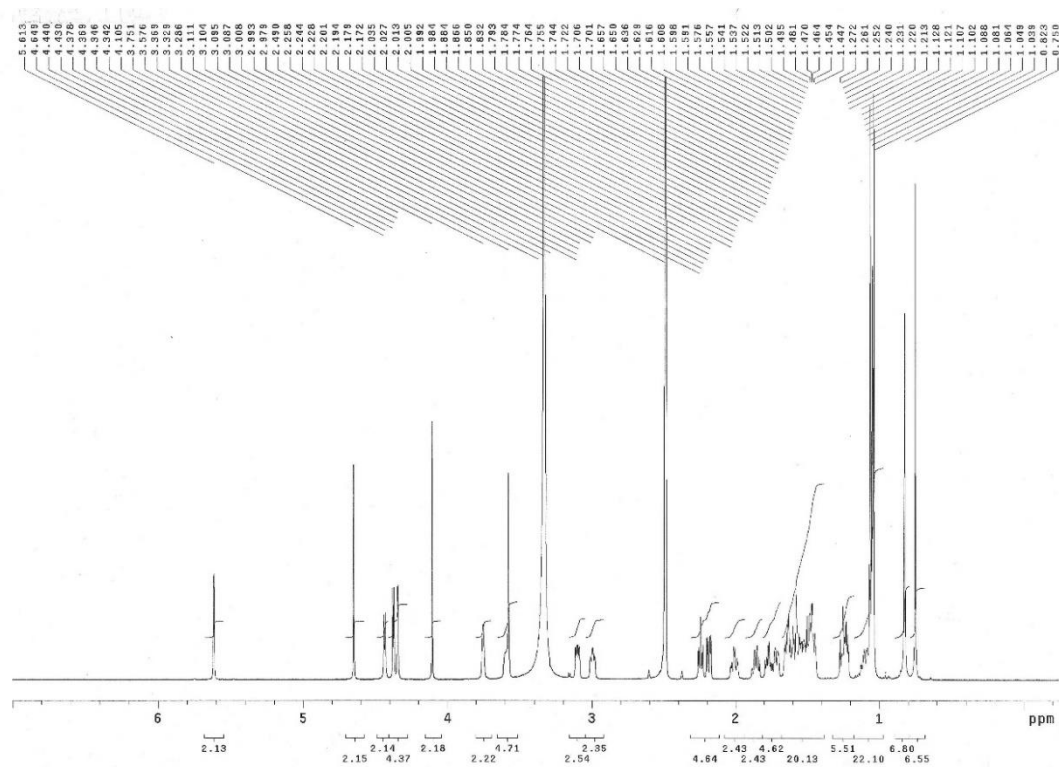
(十四) β -蜕皮甾酮的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{27}H_{44}O_7$ ；分子量：480.63；熔點：168–169 °C；白色粉狀。

(十五) β -蜕皮甾酮的結構

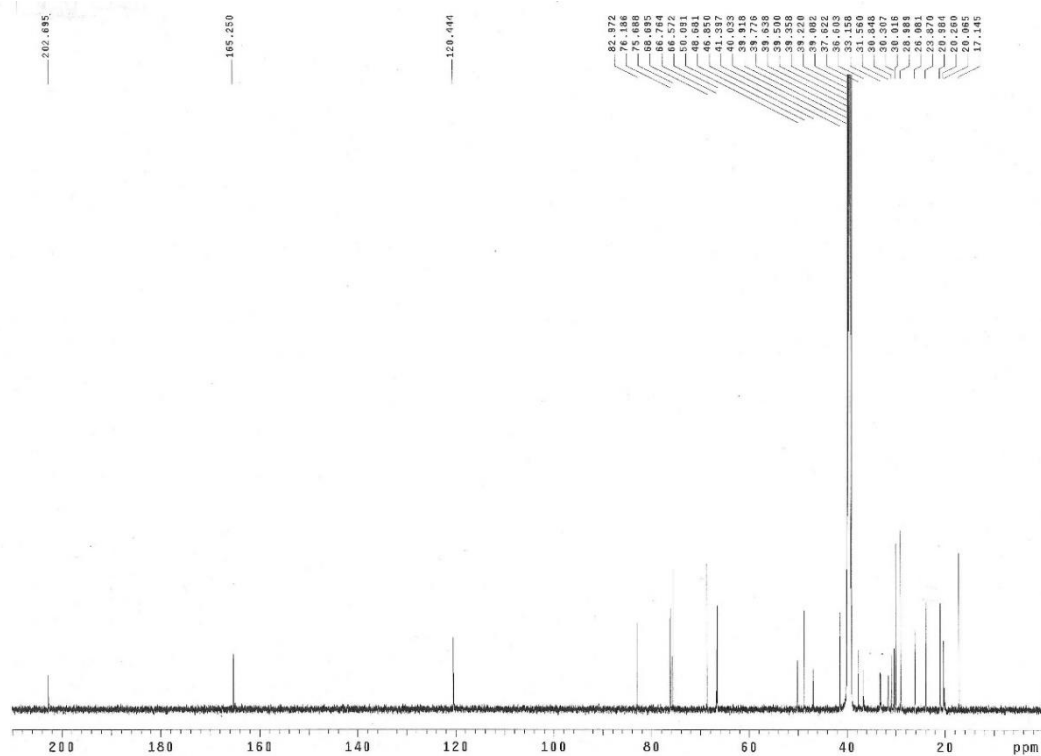


(十六) β -蜕皮甾酮的 ^1H NMR 圖譜



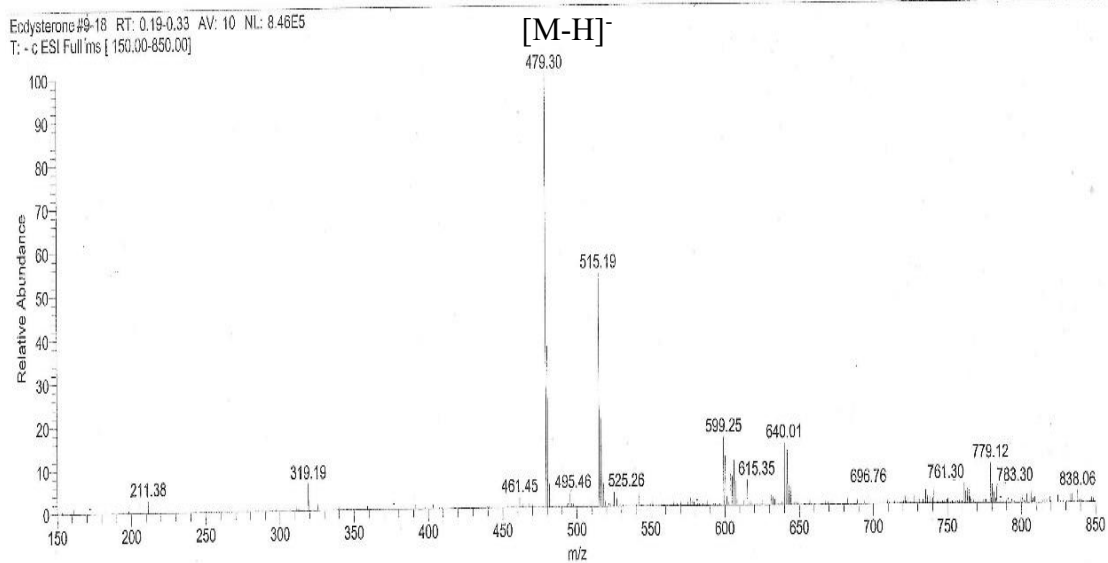
圖九、 β -蜕皮甾酮的 ^1H NMR 圖譜($\text{DMSO}-d_6$)

(十七) β -蜕皮甾酮的 ^{13}C NMR 圖譜



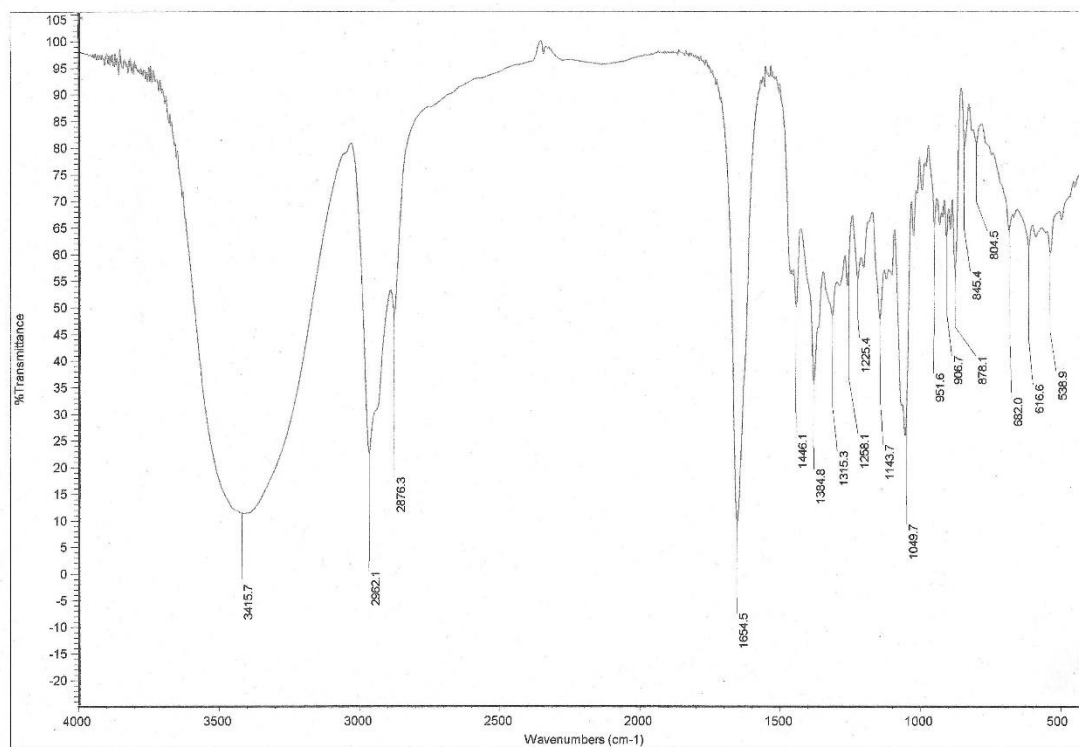
圖十、 β -蜕皮甾酮的 ^{13}C NMR 圖譜($\text{DMSO}-d_6$)

(十八) β -蜕皮甾酮的 ESI-MS 圖譜



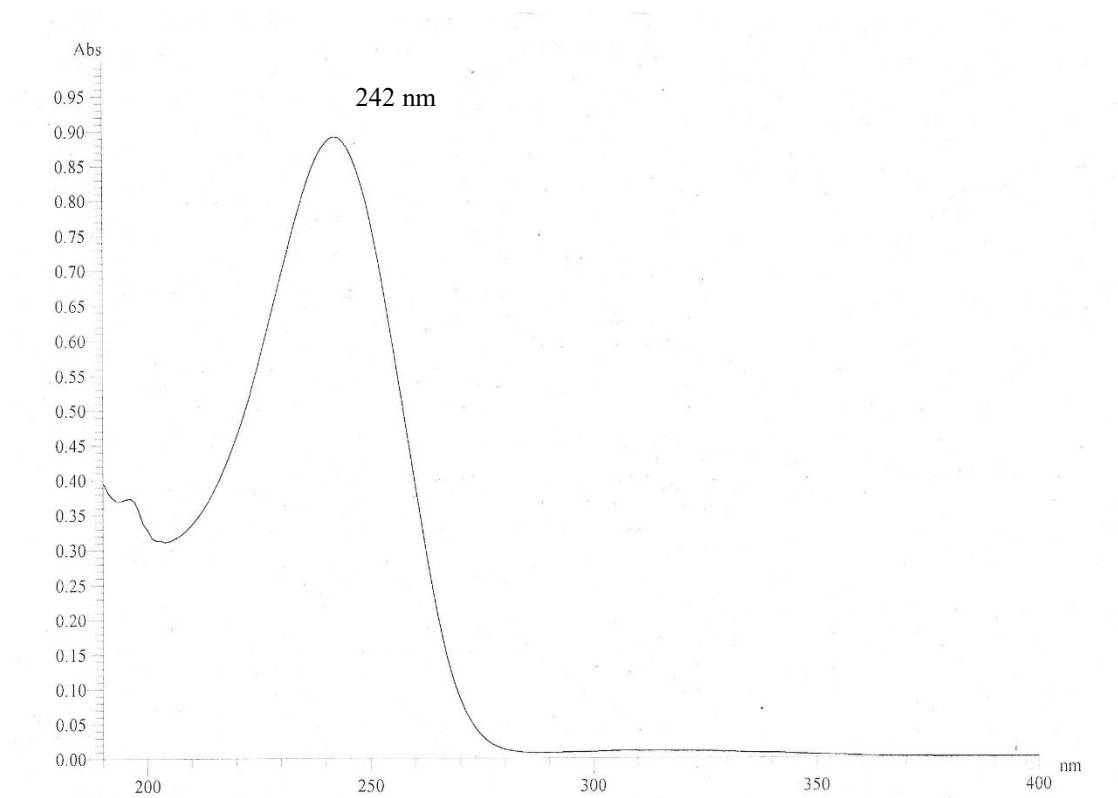
圖十一、 β -蜕皮甾酮的 ESI-MS 圖譜

(十九) β -蜕皮甾酮的 FTIR 圖譜



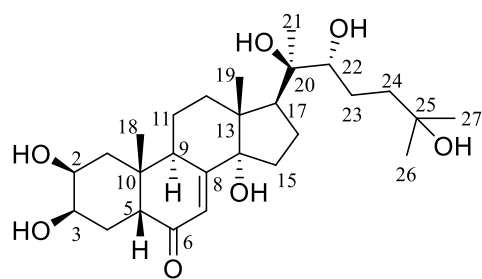
圖十二、 β -蜕皮甾酮的 FTIR 圖譜

(二十) β -蜕皮甾酮的 UV 圖譜



圖十三、 β -蜕皮甾酮的 UV 圖譜

(二十一) β -蜕皮甾酮的氫、碳化學位移



β -蜕皮甾酮

表七、β-蛻皮甾酮的氫、碳化學位移(DMSO-*d*₆)^a

position	δ _H (600 MHz)	δ _C (150 MHz)
1	1.26 (m), 1.57 (m)	36.6
2	3.58 (m)	66.8
3	3.75 (br s)	66.6
4	1.45 (m), 1.56 (m)	31.6
5	2.18 (dd, 4.2, 13.2)	50.1
6	-	202.7
7	5.61 (s)	120.4
8	--	165.3
9	2.99 (t, 8.4)	33.2
10	-	37.6
11	1.22 (m), 1.64 (m)	41.4
12	1.72 (m), 2.01 (m)	30.8
13	-	46.9
14	-	83.0
15	1.48 (m), 1.64 (m)	20.1
16	1.52 (m), 1.86 (m)	20.3
17	2.24 (t, 9.6)	48.7
18	0.82 (s)	23.9
19	0.75 (s)	17.1
20	-	75.7
21	1.05 (s)	21.0
22	3.10 (m)	76.2
23	1.11 (m), 1.45 (m)	26.1
24	1.47 (m), 1.77 (m)	30.3
25	-	68.7
26	1.04 (s) or 1.06 (s)	29.0
27	1.06 (s) or 1.04 (s)	30.0
2-OH	4.43 (d, 6.0)	-
3-OH	4.34 (d, 2.4)	-
22-OH	4.37 (d, 5.4)	-

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

牛膝飲片(ACHYRANTHIS BIDENTATAE RADIX)

一、材料

購自於臺灣各地中藥店牛膝飲片共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Agilent 1100 series，包含 Degasser (G1379A)、Quat Pump (G1311A)、DAD (G1315B)、Autosampler (G1329A)、Column Oven H-650 (Chrom Tech, TNC.)；層析管柱 COSMOSIL 5C₁₈-AR-II (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；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%)購自於 Merck；乙晴(99.9%)購自於友和貿易股份有限公司。

(二) 標準品

標準品 β-蛻皮甾酮(β-Ecdysterone)購自於普思生物科技股份有限公司，純度 98%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒開發

牛膝飲片最佳萃取溶媒同牛膝藥材。

(二) 最佳萃取次數評估

牛膝飲片最佳萃取次數同牛膝藥材。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取標準品 β-蛻皮甾酮 2.0 mg，加 10 mL 的甲醇製成每 1 mL 含 β-蛻皮甾酮 200 μg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 20 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，加入 75%甲醇 12.5 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，離心 5 分鐘(約 4000 × 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，轉移至 25 mL 之定量瓶中，加 75%甲醇至刻

度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 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 β -蛻皮甾酮的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取 β -蛻皮甾酮標準品儲備溶液適量(200 $\mu\text{g/mL}$)，以甲醇稀釋製成含 β -蛻皮甾酮分別為 100、50、20、10、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 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(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 β -蛻皮甾酮濃度為 20 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以 β -蛻皮甾酮的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性:取同一批市售牛膝飲片粉末，依牛膝飲片檢品溶液製備方法平行製備 5 份牛膝飲片檢品溶液，進樣測定，以 β -蛻皮甾酮的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性:取同一批市售牛膝飲片粉末，依牛膝飲片檢品溶液製備方法製備牛膝飲片檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以 β -蛻皮甾酮的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(九) 偵測極限與定量極限試驗

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；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 β -蛻皮甾酮含量的牛膝飲片粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，分別加入 1 mL 的 β -蛻皮甾酮溶液(200 $\mu\text{g/mL}$)，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：COSMOSIL 5C₁₈-AR-II Column (250 x 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 246 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：30 °C
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	15	85
25	15	85
40	45	55
50	100	0

(十二) 臺灣市售牛膝飲片含量測定

取 10 批市售牛膝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 β-甾皮甾酮的百分含量。

(十三) 牛膝飲片檢品之 UPLC 層析條件

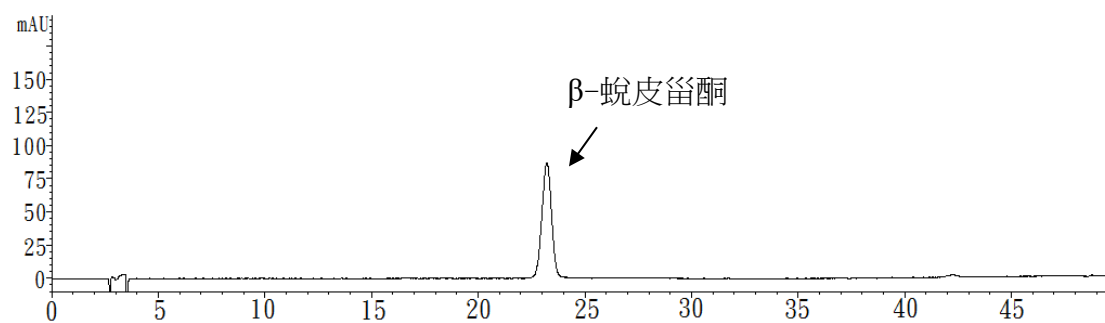
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：UV 246 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	5	95
2	15	85
5	15	85
8	35	65
12	100	0

五、結果

(一) 標準品 β -蛻皮甾酮之 HPLC 層析

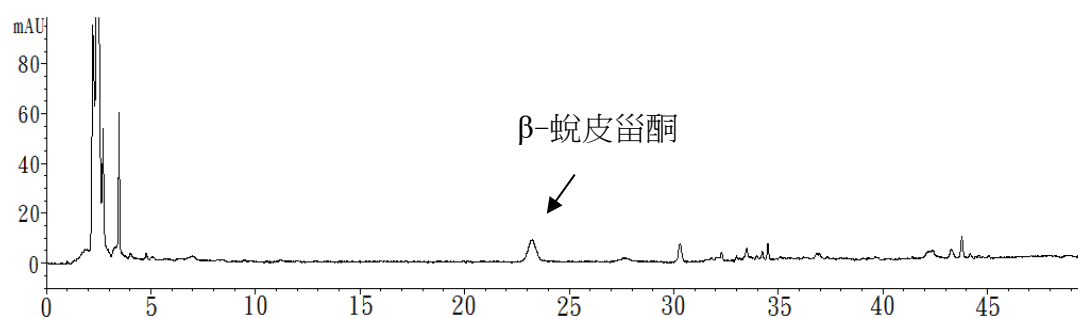
於滯留時間 23.1 分鐘處顯示 β -蛻皮甾酮標準品波峰(圖一)。



圖一、 β -蛻皮甾酮標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售牛膝飲片檢品之 HPLC 層析

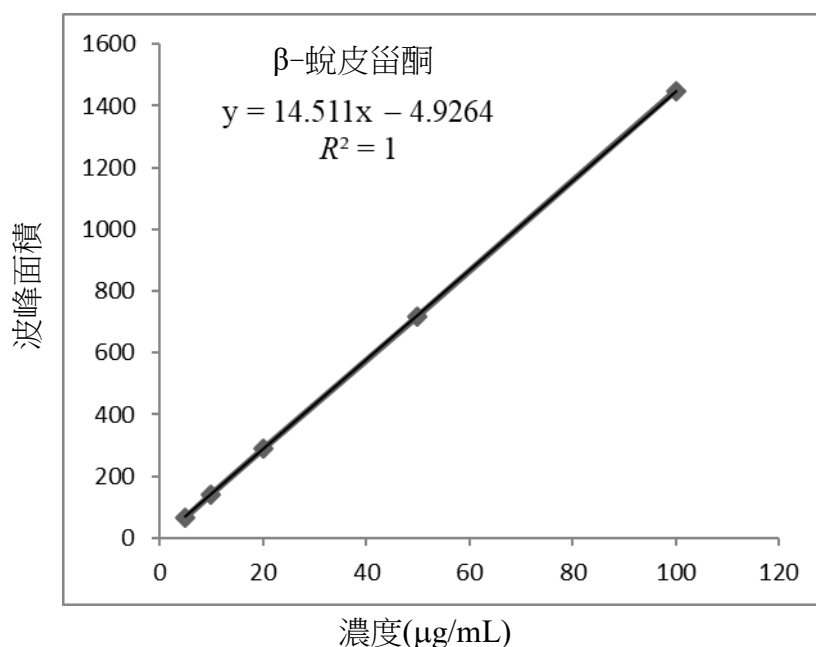
於滯留時間 23.0 分鐘處顯示牛膝飲片檢品中 β -蛻皮甾酮波峰(圖二)。分離率為 $R = 9.5$ ，托尾因子為 $T = 1.00$ ，均在系統適用性要求內。



圖二、市售牛膝飲片檢品之 HPLC 層析圖

(三) 標準品 β -蛻皮甾酮檢量線

經不同濃度 β -蛻皮甾酮(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 $y = 14.511x - 4.9264$ ， $R^2 = 1$ ，顯示濃度在 5.0–100 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、 β -蛻皮甾酮之檢量線圖

表一、 β -蛻皮甾酮之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
β -蛻皮甾酮	5.0–100	$y = 14.511x - 4.9264$	1

(四) 精密度與重複性試驗

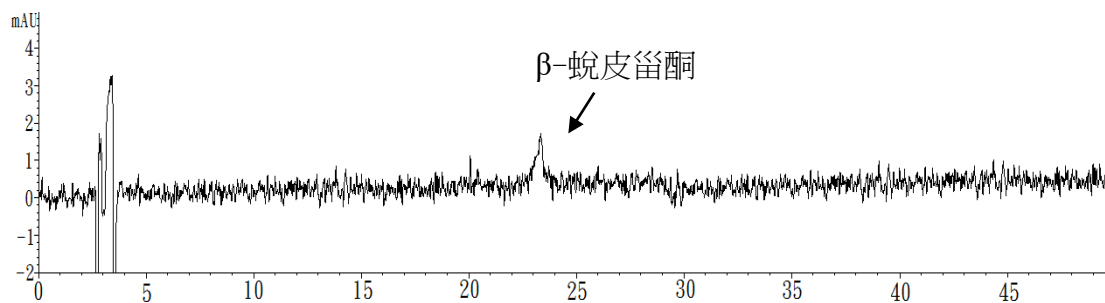
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好， β -蛻皮甾酮精密度之相對標準差為 0.48%，重複性之相對標準差為 1.52%，均在系統適用性要求內。

(五) 穩定性試驗

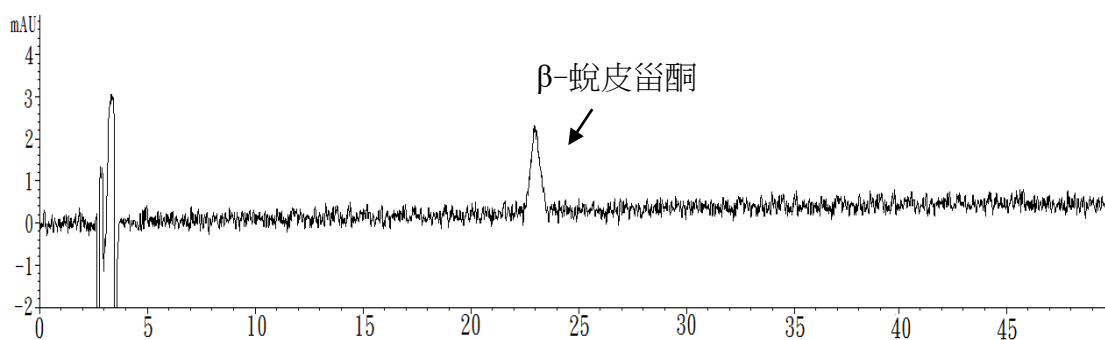
實驗結果顯示， β -蛻皮甾酮在 24 小時內穩定，穩定性相對標準差為 1.64%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(六) 偵測極限與定量極限試驗

β -蛻皮甾酮偵測極限(limit of detection, LOD)為 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限(limit of quantitation, LOQ)為 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、 β -蛻皮甾酮之 LOD 層析圖



圖五、 β -蛻皮甾酮之 LOQ 層析圖

表二、各項檢驗分析

檢測項目	β -蛻皮甾酮	
	濃度	R.S.D. (%)
準確度 (n=5)	20 $\mu\text{g/mL}$	0.48
精密度 (n=5)	檢品溶液(No.2)	1.52
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.2)	1.64
偵測極限 (n=1)	2.5 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=1)	5.0 $\mu\text{g/mL}$	-

(七) 添加回收率試驗

β -蛻皮甾酮平均添加回收率為 95.3%，相對標準偏差為 0.90%。

表三、 β -蛻皮甾酮添加回收率

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	0.501	0.210	0.20	0.398	94.0	95.30	0.90
2	0.500	0.210	0.20	0.401	95.5		
3	0.501	0.210	0.20	0.400	95.0		
4	0.501	0.210	0.20	0.403	96.5		
5	0.500	0.210	0.20	0.401	95.5		

(八) 臺灣市售牛膝飲片含量測定

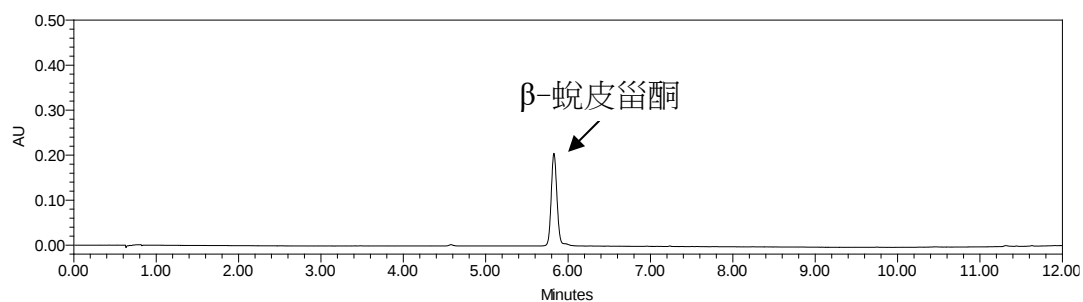
10 批牛膝飲片之含量測定結果(乾燥品)如表四所示， β -蛻皮甾酮的含量為 0.043–0.052%。建議牛膝飲片指標成分 β -蛻皮甾酮的含量不得少於 0.03 %。理論板數按 β -蛻皮甾酮波峰計算應不低於 5000 (實際值為 15000)。

表四、臺灣市售牛膝飲片檢品之 β -蛻皮甾酮含量

藥材編號(No.)	牛膝素含量(%)	藥材編號(No.)	牛膝素含量(%)
1 (NF-1)	0.043	6 (CD)	0.045
2 (NJ-2)	0.048	7 (SE)	0.049
3 (NN)	0.052	8 (SG-1)	0.050
4 (NR-1)	0.051	9 (SU-1)	0.049
5 (NQ)	0.049	10 (SL-1)	0.047

(九) 標準品 β -蛻皮甾酮之 UPLC 層析

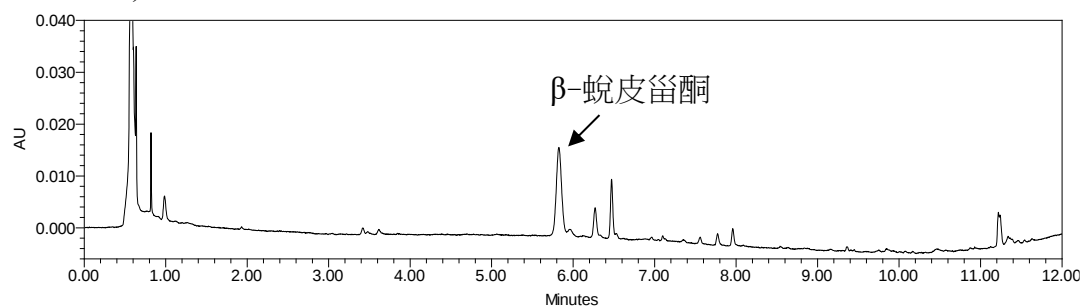
於滯留時間 5.82 分鐘處顯示 β -蛻皮甾酮標準品的波峰(圖六)



圖六、 β -蛻皮甾酮標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十) 市售牛膝飲片檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 5.82 分鐘顯示牛膝飲片檢品中 β -蛻皮甾酮的波峰(圖七)。



圖七、市售牛膝飲片檢品之 UPLC 層析圖

牛膝

生藥名：ACHYRANTHIS BIDENTATAE RADIX

英文名：Twotooth Achyranthes Root

基 原：本品為莧科 Amaranthaceae 植物牛膝 *Achyranthes bidentata* Blume 之乾燥根。習稱「懷牛膝」。

一、方法

- (一) 檢品溶液 **【萃取方法 1】(臺灣中藥典第三版 2018) ✓**
——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加甲醇 2 mL 使之溶解，作為檢品溶液。
【萃取方法 2】(自行開發)
——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加乙酸乙酯 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。
- (二) 對照標準品 取 β -蛻皮甾酮(β -Ecdysterone)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】(自行開發) ✓**
——乙酸乙酯：甲醇 (4：1)
- (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。

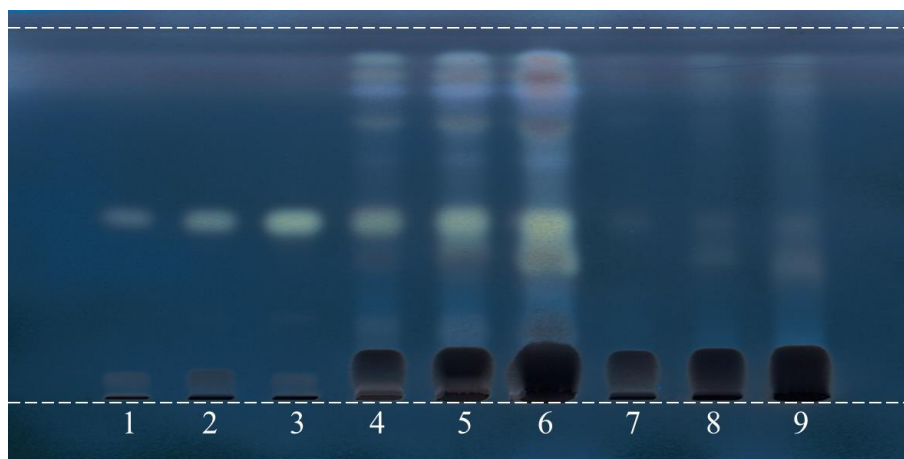
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：108/11/11

相對溼度(RH)：65%

溫度(RT)：18 °C

【展開劑 2】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲醇 (4：1)



編號	名稱	點注量
1，2，3	β -蛻皮甾酮(0.2 mg/mL)	1，2，5 μ L
4，5，6	檢品溶液 7【萃取方法 1】	1，2，5 μ L
7，8，9	檢品溶液 7【萃取方法 2】	1，2，5 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 β -蛻皮甾酮，而由於指標成分條帶顯示較明顯，故選擇【萃取方法 1】。

建議點注量： β -蛻皮甾酮標準品溶液 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 2】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

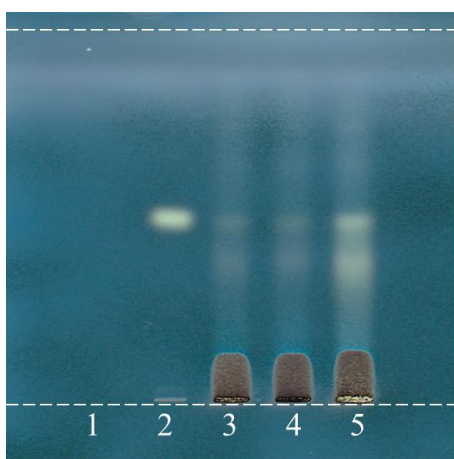
實驗日期：108/11/11

相對溼度(RH)：65%

溫度(RT)：18 °C

【展開劑 1】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲醇 (4：1)

【萃取方法 1】 (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(β -蛻皮甯酮 R_f 值為 0.49)



1：Blank

2： β -蛻皮甯酮

3，4：檢品溶液

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 1】方式，唯【展開劑 1】展開可從檢品溶液中分離與檢出 β -蛻皮甯酮，故採用自行開發之【展開劑 1】。

四、觀察方式選擇

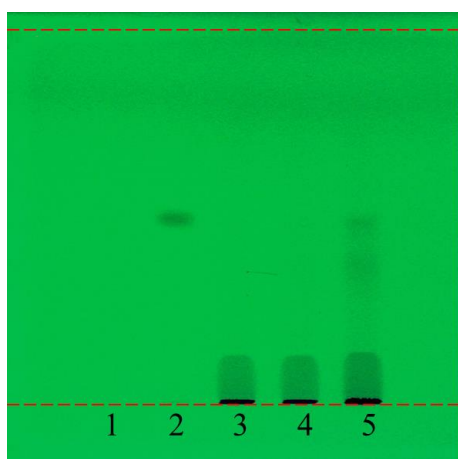
實驗日期：108/11/11

相對溼度(RH)：65%

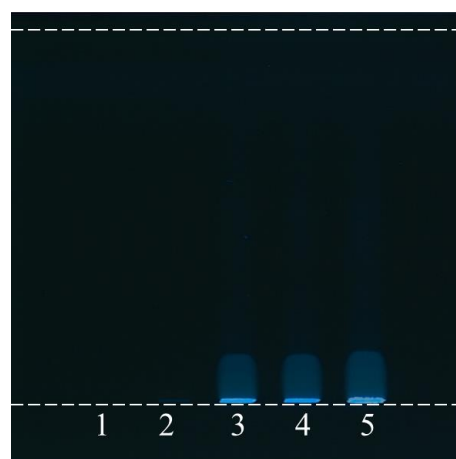
溫度(RT)：18 °C

【展開劑 1】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲醇 (4：1)

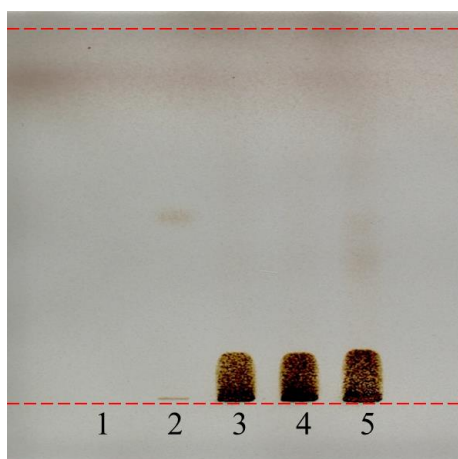
【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



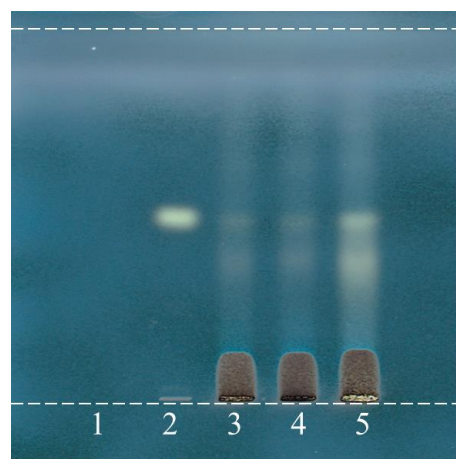
【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 顯色/可見光檢出



【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) — HPTLC 顯色/紫外光(365 nm)檢出✓



1：Blank

2：β-蛻皮甯酮

3，4：檢品溶液 7

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明顯之 β-蛻皮甯酮標準品斑點。

五、十批牛膝藥材樣品檢測

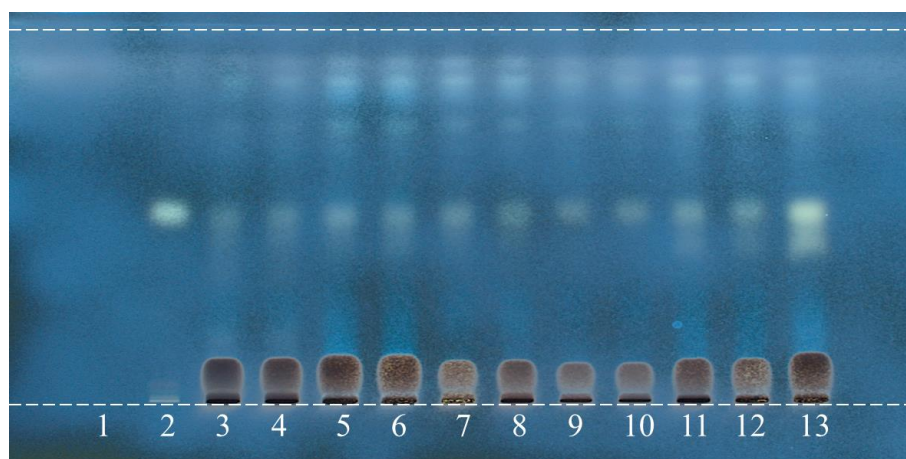
實驗日期：108/11/20

相對溼度(RH)：48%

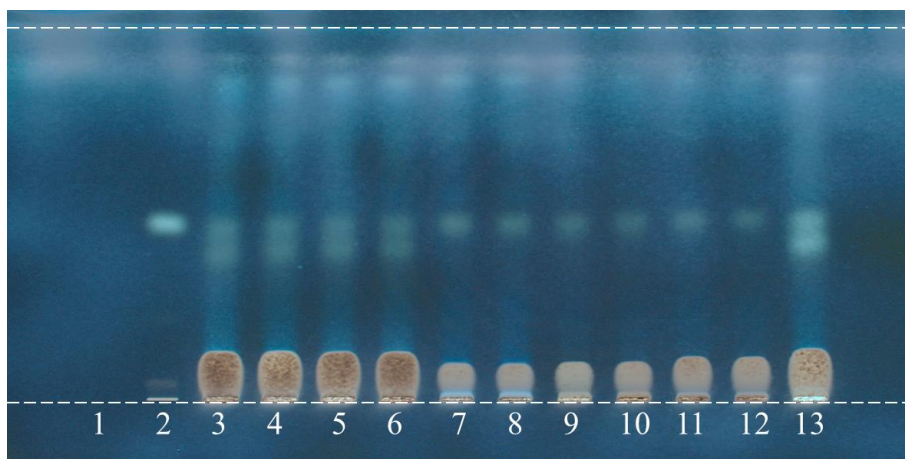
溫度(RT)：25 °C

【展開劑 1】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲醇 (4：1)

【萃取方法 1】(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	β -蜕皮甾酮(0.2 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 1 (NF)
5 , 6	檢品溶液 2 (NJ)
7 , 8	檢品溶液 3 (NJ-1)
9 , 10	檢品溶液 4 (NR)
11 , 12	檢品溶液 5 (CD)
13	Spike (檢品溶液 7)



1	Blank
2	β -蛻皮甾酮(0.2 mg/mL)
3, 4	檢品溶液 6 (SC)
5, 6	檢品溶液 7 (SE)
7, 8	檢品溶液 8 (SG)
9, 10	檢品溶液 9 (SL)
11, 12	檢品溶液 10 (SU)
13	Spike (檢品溶液 7)

結論與建議：以臺灣中藥典第三版之【萃取方法 1】方式，並以自行開發之【展開劑 1】分離與檢出 β -蛻皮甾酮較佳，以 10%硫酸乙醇顯色後，於紫外光(365 nm)下檢視較佳。

牛膝(飲片)

六、十批牛膝飲片樣品檢測

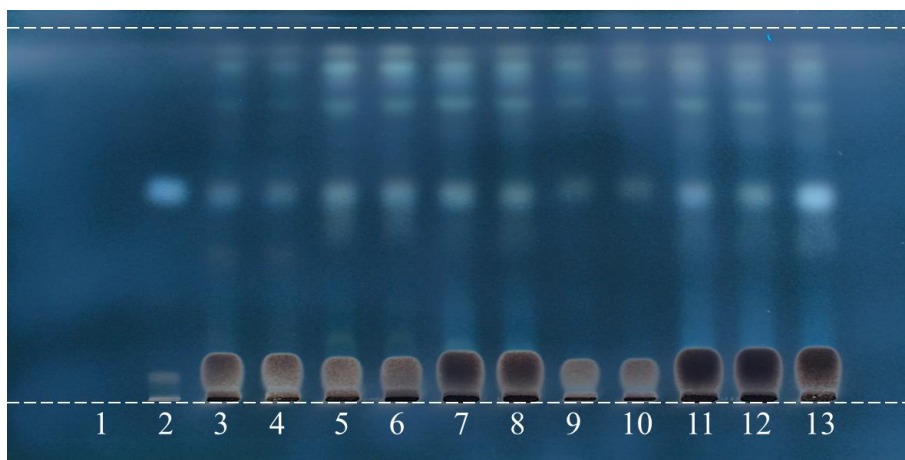
實驗日期：108/11/20

相對溼度(RH)：48%

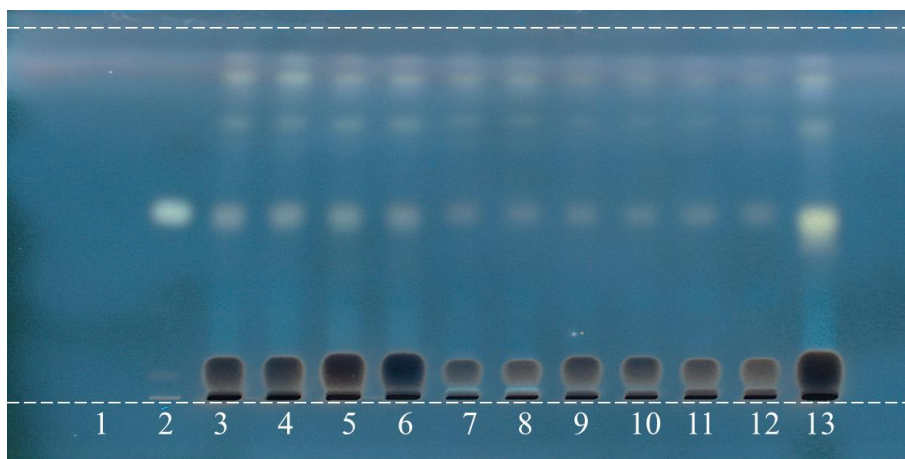
溫度(RT)：25 °C

【展開劑 1】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲醇 (4：1)

【萃取方法 1】(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	β -蛻皮甾酮(0.2 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 1 (NF)
5 , 6	檢品溶液 2 (NJ-2)
7 , 8	檢品溶液 3 (NN)
9 , 10	檢品溶液 4 (NR)
11 , 12	檢品溶液 5 (NQ)
13	Spike (檢品溶液 2)



1	Blank
2	β -蛻皮甾酮(0.2 mg/mL)
3 , 4	檢品溶液 6 (CD)
5 , 6	檢品溶液 7 (SE)
7 , 8	檢品溶液 8 (SG)
9 , 10	檢品溶液 9 (SU-1)
11 , 12	檢品溶液 10 (SL-1)
13	Spike (檢品溶液 2)

結論與建議：飲片鑑別同藥材。