

土茯苓

(SMILACIS GLABRAE RHIZOMA)

土茯苓 MI (藥材、飲片)	3
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
土茯苓 HPLC (藥材)	9
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	12
土茯苓 TLC (藥材)	22
一、方法	22
二、萃法選擇及濃度測試	23
三、溶媒系統選擇	24
四、觀察方式選擇	26
五、十批土茯苓藥材樣品檢測	27

土茯苓（目錄續）

土茯苓 HPLC（飲片）	29
一、材料	29
二、儀器及層析管柱	29
三、實驗藥品及試劑來源	29
四、方法	29
五、結果	32
土茯苓 TLC（飲片）	37
一、方法	37
二、萃法選擇及濃度測試	38
三、溶媒系統選擇	39
四、觀察方式選擇	41
五、十批土茯苓飲片樣品檢測	42

土茯苓 MI (藥材)

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土茯苓的乾燥根莖。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：土茯苓

生藥名：SMILACIS GLABRAE RHIZOMA

英文名：Smooth Greenbrier Rhizome

基原：本品為百合科 Liliaceae 植物光葉菝葜 *Smilax glabra* Roxb. 之乾燥根莖。

採收加工：夏、秋季採挖地下根莖，洗淨，除去鬚根及殘莖，曬乾。或趁新鮮時切成薄片，曬乾。

藥材性狀：本品呈不規則塊狀或略呈圓柱形，有結節狀突起。表面黃棕色或灰褐色，微有光澤，凹凸不平，有殘留堅硬的鬚根，上端具莖痕，有的外皮現不規則裂紋。質堅硬。氣微，味微甜、澀。

飲片性狀：本品已切成長圓形或不規則狀之薄片，厚 1~5 mm。邊緣不整齊，有時可見殘留鬚根痕。切面類白色至淡紅棕色或紅棕色，斷面不平坦，粉性，折斷時有粉塵飛揚，可見點狀或縱向分布的維管束及多數小亮點；以水濕潤後有黏滑感。氣微，味微甘、澀。

生長分佈：多年生攀緣狀灌木。喜溫暖濕潤氣候，耐乾旱和蔭蔽，砂質壤土或黏壤土可栽培。花期 7~11 月，果期 11~4 月。分布於台灣、中國長江流域以南、甘肅南部、海南島、雲南、越南等地；藥材主產於廣東、湖南、湖北、浙江、江西等地。

三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)

1. 下皮細胞 3~5 列，呈黃棕色，壁稍厚，木化，有的具壁孔。
2. 皮層細胞類圓形，散有黏液細胞，內含草酸鈣針晶束。
3. 中柱薄壁細胞徑向延長呈類圓形或橢圓形，維管束散生，為閉鎖並立型維管束，中心分布較密。
4. 韌皮部外側具韌皮纖維，多角形，壁厚，層紋明顯。
5. 木質部為 3~8 個較大的導管及數個小導管，大型導管直徑可達 150 μm ，導管呈多角形、類長方形。
6. 薄壁組織中含大量澱粉粒。

四、藥材粉末顯微鑑別（圖 3）

1. 本品粉末淡棕色。
2. 澱粉粒極多，單粒呈類圓形或類多角形，直徑 $15\sim 43\ \mu\text{m}$ ，臍點裂縫狀、三叉狀、十字狀、星狀或點狀，大粒層紋明顯；複粒由 2~4 分粒組成，偏光顯微鏡下呈現黑十字。
3. 大量草酸鈣針晶成束或散在，長 $40\sim 185\ \mu\text{m}$ ，偏光顯微鏡下呈多彩色。
4. 石細胞矩圓形、類方形、類多角形、長方形或類三角形，直徑 $25\sim 100\ \mu\text{m}$ ，壁厚 $8\sim 25\ \mu\text{m}$ ，有的厚薄不均勻，孔溝大多細密並分枝。另有深棕色石細胞，長條形，壁三面極厚。
5. 導管多為有緣孔紋導管，直徑約至 $48\ \mu\text{m}$ ，紋孔常橫向延長呈梯狀排列。



圖 1A 土茯苓藥材圖

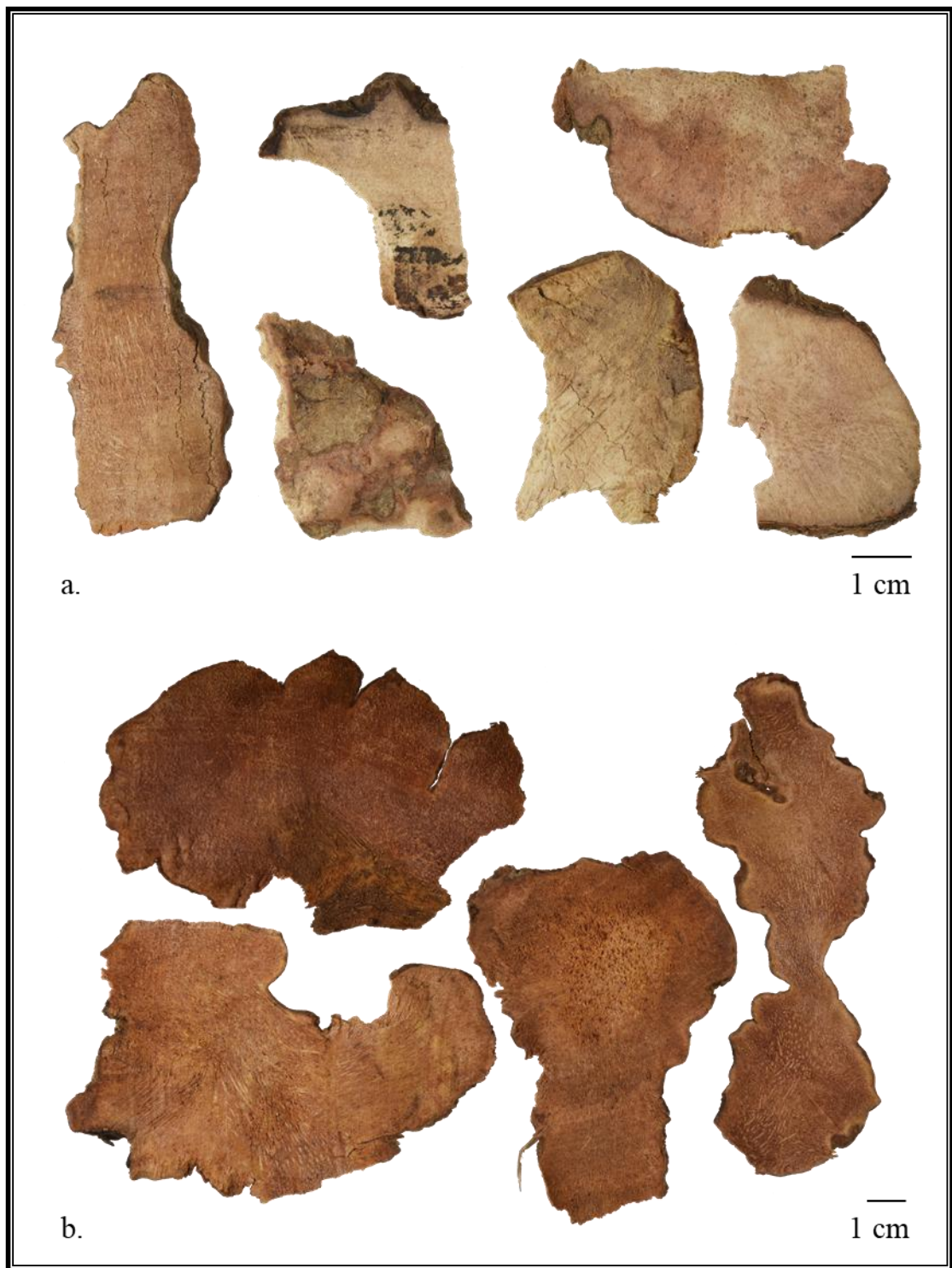


圖 1B 土茯苓飲片藥材圖

a.土茯苓(斷面類白色) b.土茯苓(斷面紅棕色)

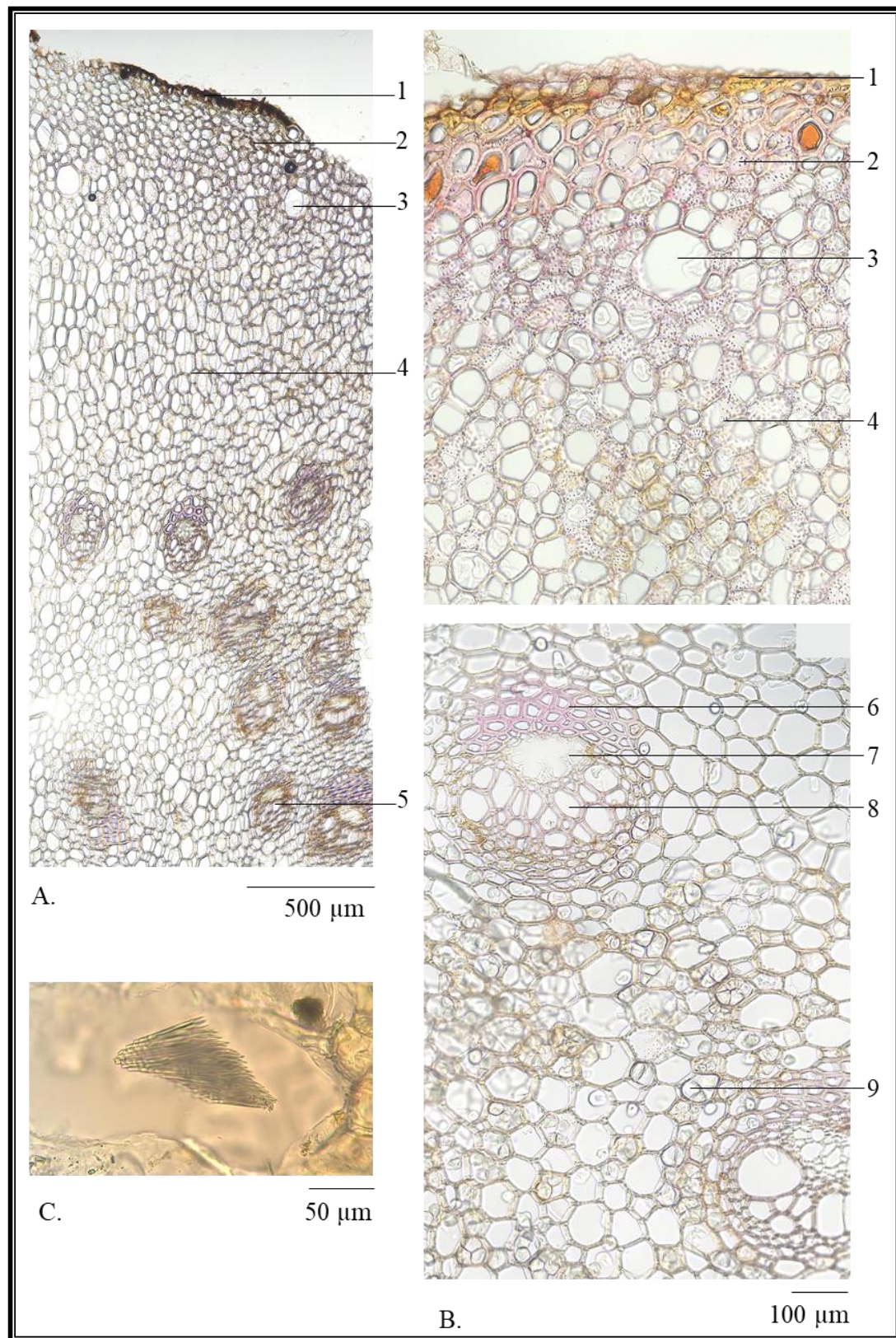


圖 2 土茯苓橫切面顯微特徵圖

A. 橫切面 B.橫切面放大圖 C.草酸鈣針晶束

1.石細胞 2.下皮細胞 3.黏液細胞 4.中柱薄壁細胞 5.維管束 6.韌皮纖維
7.韌皮部 8.導管 9.澱粉粒

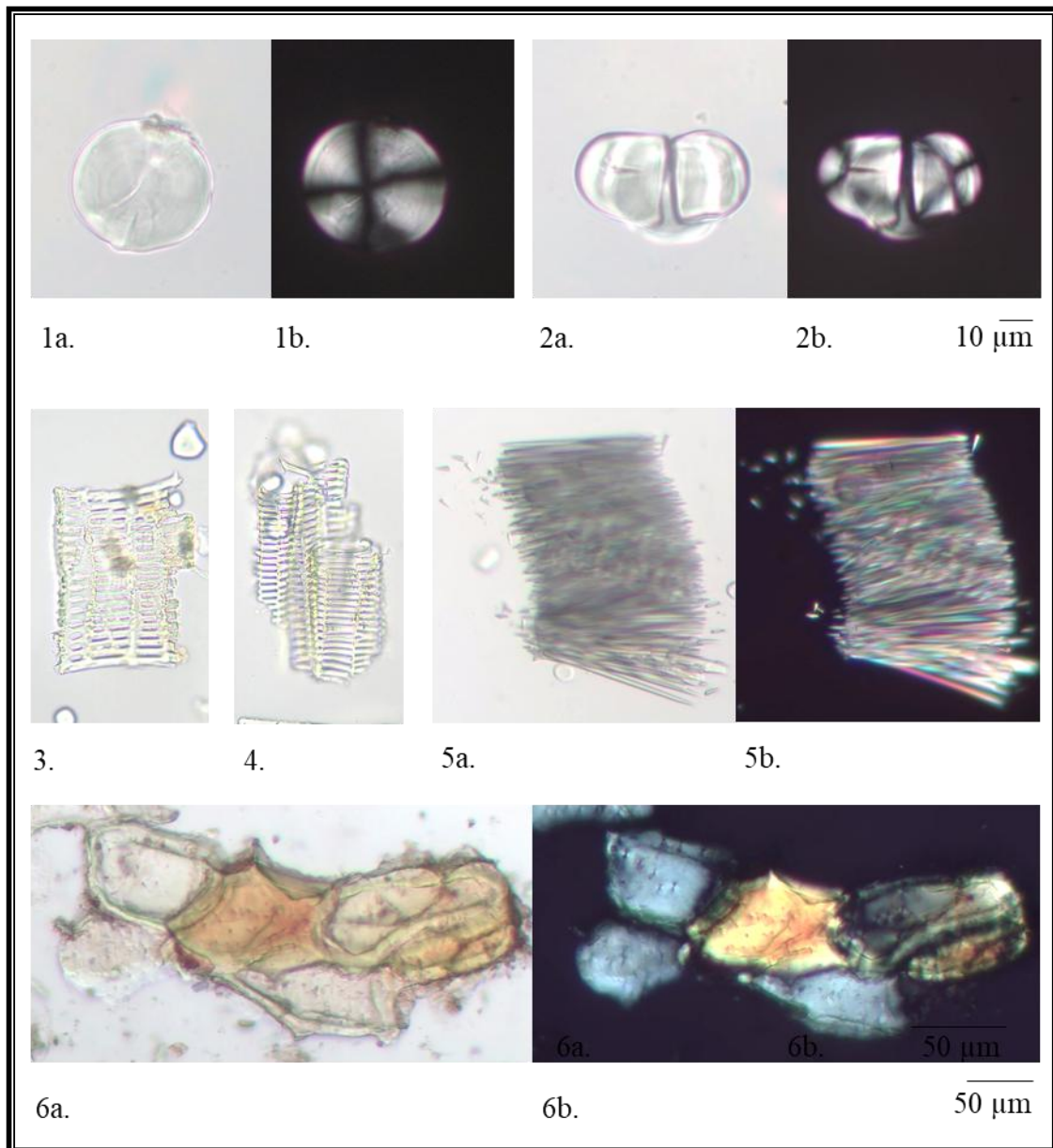


圖 3 土茯苓粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 單粒澱粉粒 2. 複粒澱粉粒 3. 有緣孔紋導管 4. 梯狀有緣孔紋導管 5. 草酸鈣針晶束 6. 石細胞

參考文獻

1. 衛生福利部臺灣中藥典第四版編輯工作小組(2021)。臺灣中藥典第四版。臺北市：衛生福利部。9~10 頁。
2. 張永勳、何玉鈴(主編)(2013)。臺灣中藥典圖鑑。臺北市：衛生福利部。7 頁。
3. 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(2012)。香港中藥材標準第四冊。香港：香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部。304~307 頁。
4. 肖培根(主編)(2001)。新編中藥志第一卷。北京：化學工業出版社。60~65 頁。
5. 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。25 頁。
6. 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。19 頁。
7. 任仁安主編(1986)。中藥鑑定學。上海科學技術出版社。224~225 頁。
8. 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。204~205 頁。
9. 徐國鈞、徐珞珊(主編)(1994)。常用中藥材品種整理和質量研究第二冊。福建科學技術出版社。506~514 頁。
10. 陳代賢、郭秋月(主編)(2012)。中藥真偽質量快速影像檢定(上冊)。北京：人民衛生出版社。24~29 頁。
11. 中國藥品生物製品檢定所、廣東省藥品檢驗所(1997)。中國中藥材真偽鑑別圖典 2。廣東科技出版社。4~6 頁。
12. 廣西壯族自治區藥品檢驗所(1992)。中藥材真偽鑑別圖鑑。廣西科學技術出版社。11~12 頁。
13. 張繼(主編)(2021)。中國中藥材及飲片真偽鑑別圖典第二冊。廣東科技出版社。8~11 頁。
14. 王滿恩、趙昌(主編)(2019)。飲片驗收經驗。山西科學技術出版社。25 頁。
15. 吳啟南、李萍(主編)(2020)。新編中國藥材學第五卷。中國醫藥科技出版社。30~32 頁。
16. 黃璐琦、詹志來、郭蘭萍(主編)(2019)。中藥材商品規格等級標準匯編(第二輯)。北京：中國中醫藥出版社。1012~1014 頁。
17. 江瑩真。「台灣市售土茯苓、萆薢、木通、防己藥材之調查研究」。碩士論文，中國醫藥大學中國藥學研究所，2005。<https://hdl.handle.net/11296/w86775>。

土茯苓(SMILACIS GLABRAE RHIZOMA)

一、材料

購置於臺灣各地中藥店土茯苓藥材共 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 Agilent ZORBAX SB-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; 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)購置於 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd; 乙酸購置於台灣默克有限公司。

(二) 對照標準品

落新婦苷(Astilbin)購置於普思生物科技公司, 純度 98%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒評估

取本品粉末 6 份, 每份準確稱取約 0.2 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、50%乙醇各 25 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 4000 × g), 以 No.1 濾紙過濾, 取濾液移入 25 mL 之容量瓶中, 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落新婦苷最大波峰面積為最佳土茯苓藥材萃取溶媒。

(二) 最佳萃取次數評估

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)約 0.2 g, 置 50 mL 離心管中, 準確加入 75%甲醇 25 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 4000 × g), 以 No.1 濾紙過濾, 取濾液移入 25 mL 之容量瓶中, 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,

直到落新婦苷被萃取完全，並選出最佳萃取次數。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取對照標準品落新婦苷 4.0mg，加 10 mL 的甲醇製成每 1 mL 含落新婦苷 400 μg 的對照標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至落新婦苷 80 $\mu\text{g/mL}$ 製成對照標準品溶液。

(四) 檢品溶液

準確稱取本品粉末(過 No.20 篩網)約 0.2 g，置 50 mL 離心管中，準確加入 75% 甲醇 25 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 $4000 \times g$)，以 No.1 濾紙過濾，殘渣部分重複提取 1 次，合併濾液，移入 50 mL 之容量瓶中，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土茯苓的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取落新婦苷對照標準品儲備液適量(400 $\mu\text{g/mL}$)，以甲醇稀釋成含落新婦苷分別為 400、200、100、80、40、20 $\mu\text{g/mL}$ 的對照標準品溶液。以上溶液各取 10 μL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用對照標準品之波峰面積(y 軸)和對照標準品之濃度(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

以落新婦苷為 80 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以落新婦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：取同一批市售土茯苓藥材粉末，依土茯苓藥材檢品溶液製備方法平行製備 5 份土茯苓藥材檢品溶液，進樣測定，以落新婦苷的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售土茯苓藥材粉末，依土茯苓藥材檢品溶液製備方法製備土茯苓藥材檢品溶液，分別在 0、2、4、8、24 小時進樣測定，以落新婦苷的含量為指標，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 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

取已知落新婦苷含量的土茯苓藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 0.1 g，分別加入落新婦苷 3.0 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：Agilent ZORBAX SB-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 291 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：10 μ L
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%乙酸(v/v, %)
0	35	65
35	35	65

(十二) 臺灣市售土茯苓藥材含量測定

取 10 批市售土茯苓藥材及 10 批市售土茯苓飲片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 公式計算樣品落新婦苷及落新婦苷 I 的百分比含量。

(十三) 土茯苓檢品之 UPLC 分析條件

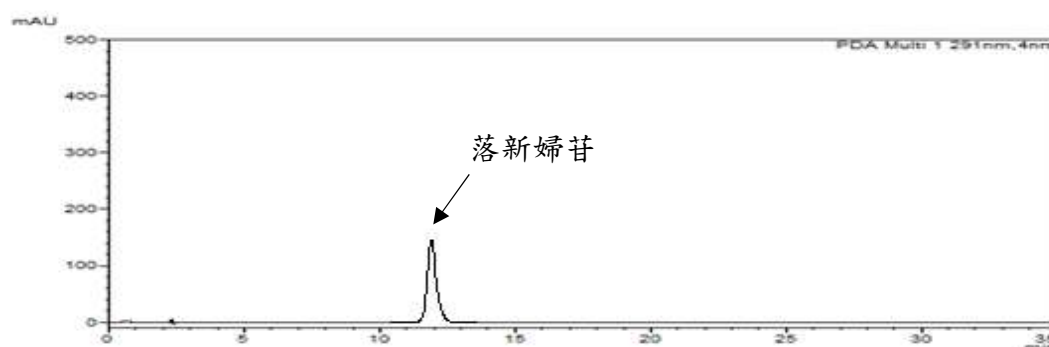
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m)
2. 檢測波長：UV 291 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μ L
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%乙酸(v/v, %)
0	35	65
10	35	65

五、結果

(一) 對照標準品落新婦苷之 HPLC 層析

於滯留時間 12.0 分鐘處顯示落新婦苷對照標準品波峰(圖一)。

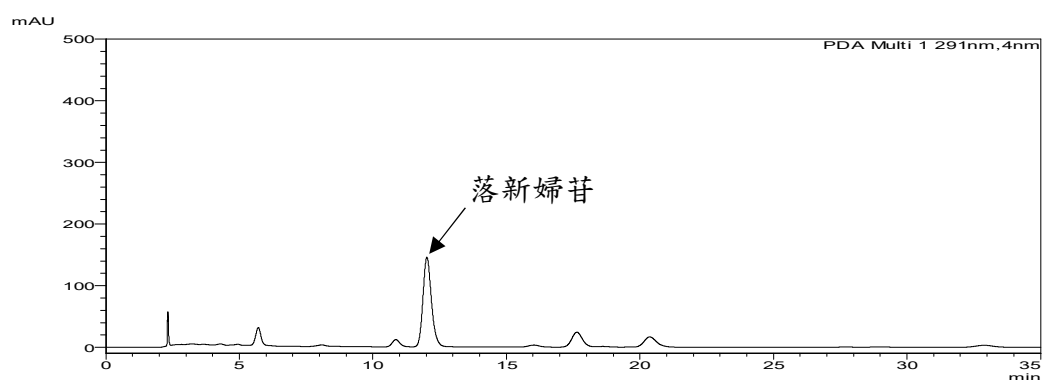


圖一、落新婦苷對照標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售土茯苓藥材檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 12.0 分鐘處顯示土茯苓藥材檢品中落新婦苷波峰(圖二)。

落新婦苷分離率(R)為 2.1，拖尾因子(T)為 1.0，均在系統適用性要求內。



圖二、市售土茯苓藥材檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取溶媒評估

以 75% 甲醇溶液為溶媒時，每克藥材重量所得落新婦苷的波峰面積最大，顯示 75% 甲醇溶液為最佳萃取溶媒(表一)。

表一、不同萃取溶媒評估

溶媒	落新婦苷波峰面積	最佳萃取
甲醇	4537997	
75% 甲醇	5002118	√
50% 甲醇	4901954	
乙醇	2585650	
75% 乙醇	4115497	
50% 乙醇	4927018	

(四) 最佳萃取次數評估

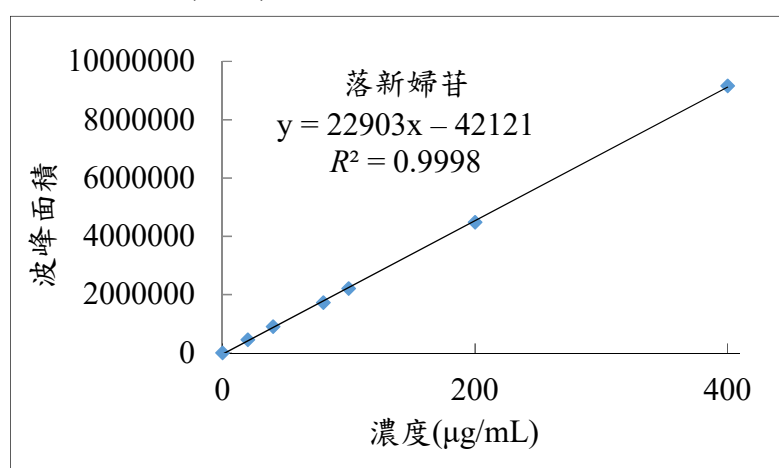
結果顯示萃取2次基本上已將落新婦苷萃取完全(萃取率大於98%)(表二)。

表二、土茯苓藥材檢品萃取次數評估

75%甲醇	落新婦苷 波峰面積
第 1 次	4384717
第 2 次	522821
第 3 次	52674
第 4 次	N.D.

(五) 對照標準品落新婦苷檢量線

經不同濃度落新婦苷(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 $y = 22903x - 42121$ ， $R^2 = 0.9998$ ，顯示濃度在 20–400 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、落新婦苷之檢量線圖

表三、落新婦苷之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
落新婦苷	20–400	$y = 22903x - 42121$	0.9998

(六) 精密度試驗

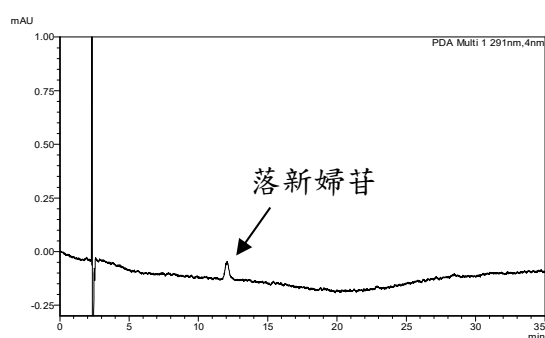
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，落新婦苷精密度之相對標準差為 1.17%，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

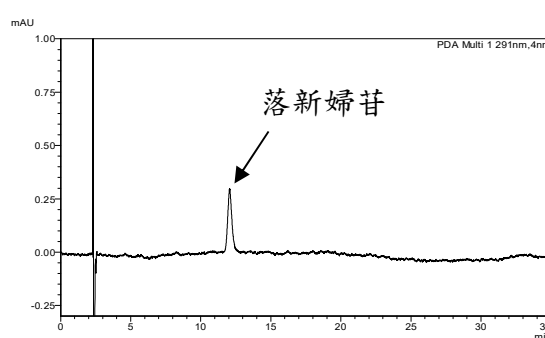
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，落新婦苷重複性之相對標準差為 0.98%，在系統適用性要求內。落新婦苷在 24 小時內穩定，穩定性相對標準差為 0.13%，變化差異小，若所有樣品分析都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

落新婦苷偵測極限為 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、落新婦苷之偵測極限層析圖



圖五、落新婦苷之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	落新婦苷	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	80 $\mu\text{g/mL}$	1.17
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.9)	0.98
穩定性 (n=5)	檢品溶液(No.9)	0.13
偵測極限 (n=1)	0.05 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=1)	0.25 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 添加回收率試驗

落新婦苷平均添加回收率為 86.9%，相對標準偏差為 0.39% (表五)。

表五、落新婦苷添加回收率

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	0.1002	3.0947	3.0	5.7005	86.86	86.9	0.39
2	0.1005	3.1039	3.0	5.7004	86.55		
3	0.1005	3.1039	3.0	5.7019	86.60		
4	0.1002	3.0947	3.0	5.7001	86.85		
5	0.1006	3.1070	3.0	5.7289	87.40		

(十) 臺灣市售土茯苓藥材含量測定

10 批土茯苓藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，落新婦苷的含量為 1.551–3.668%，建議土茯苓藥材指標成分落新婦苷的含量不得少於 0.45%。理論板數按落新婦苷波峰計算應不低於 5000 (實際值為 7080)。

表六、臺灣市售土茯苓藥材檢品之落新婦苷的含量

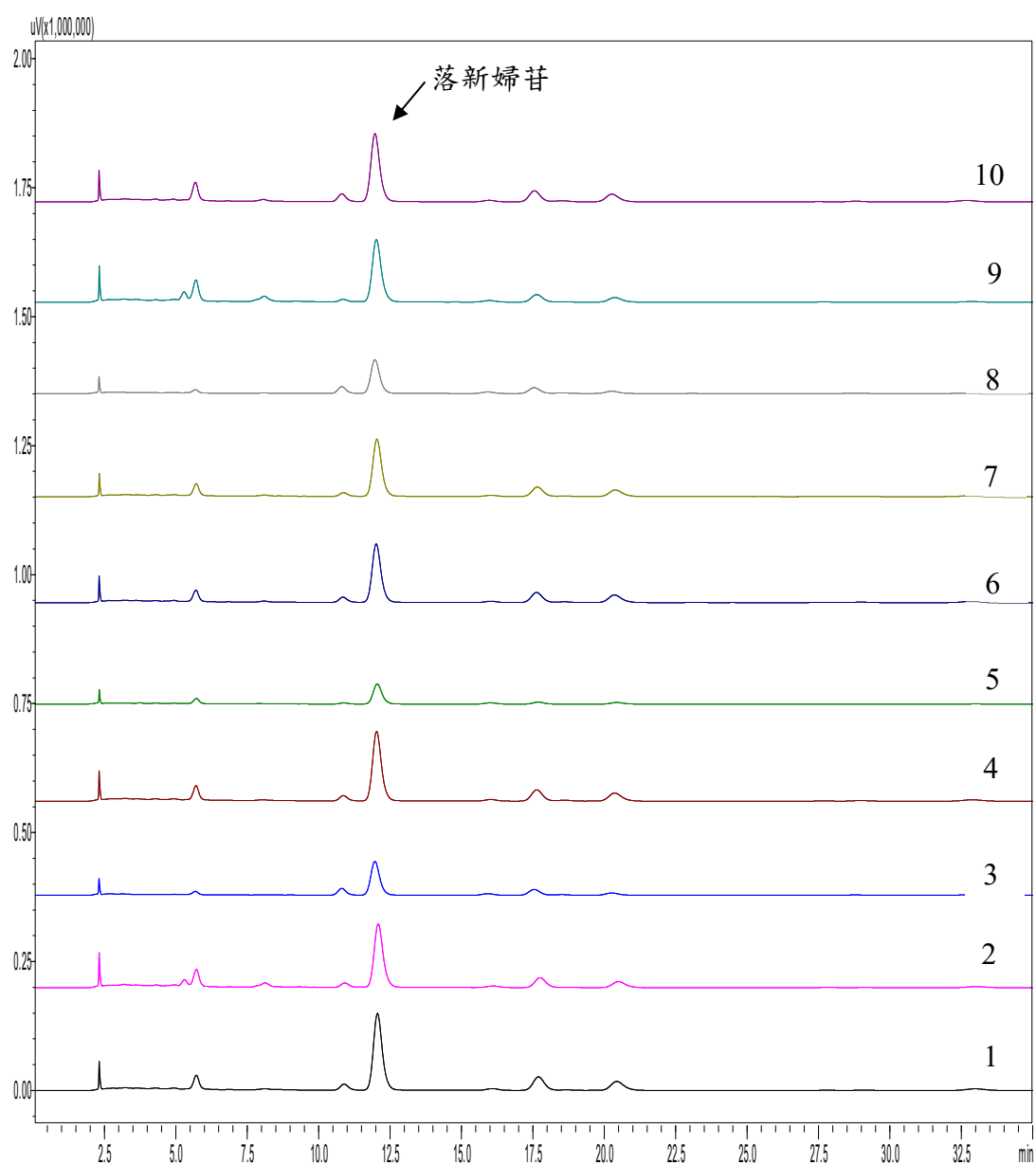
藥材編號(No.)	落新婦苷含量(%)
1 (NH)	3.103
2 (NX)	2.976
3 (NRA)	1.551
4 (NRB)	3.390
5 (NWC)	1.610
6 (CA)	3.668
7 (CB)	3.481
8 (SCA)	1.627
9 (SCB)	3.290
10 (SGA)	3.598
平均值±S.D.	2.829±0.876

(十一) 土茯苓藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售土茯苓藥材檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX SB-C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 291 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：

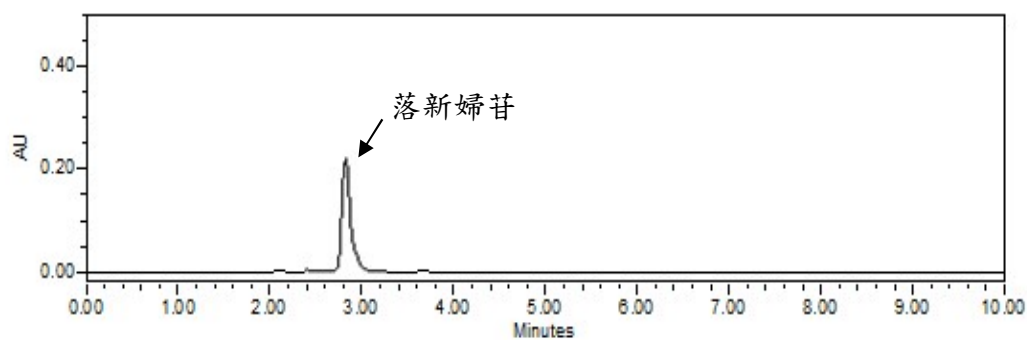
時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	35	65
35	35	65



圖六、10 批土茯苓藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 對照標準品落新婦苷之 UPLC 層析

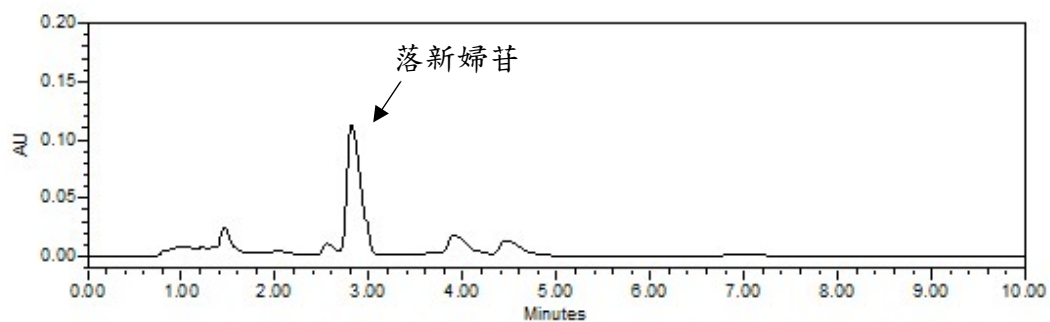
於滯留時間 2.81 分鐘處顯示落新婦苷對照標準品波峰(圖七)。



圖七、落新婦苷對照標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售土茯苓藥材檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.81 分鐘處顯示土茯苓藥材檢品中落新婦苷波峰(圖八)。

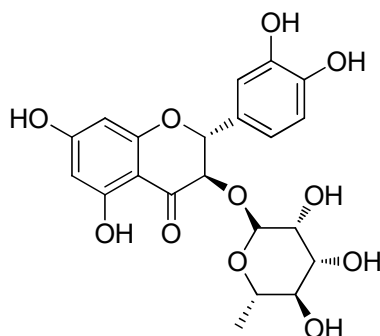


圖八、市售土茯苓藥材檢品之 UPLC 層析圖

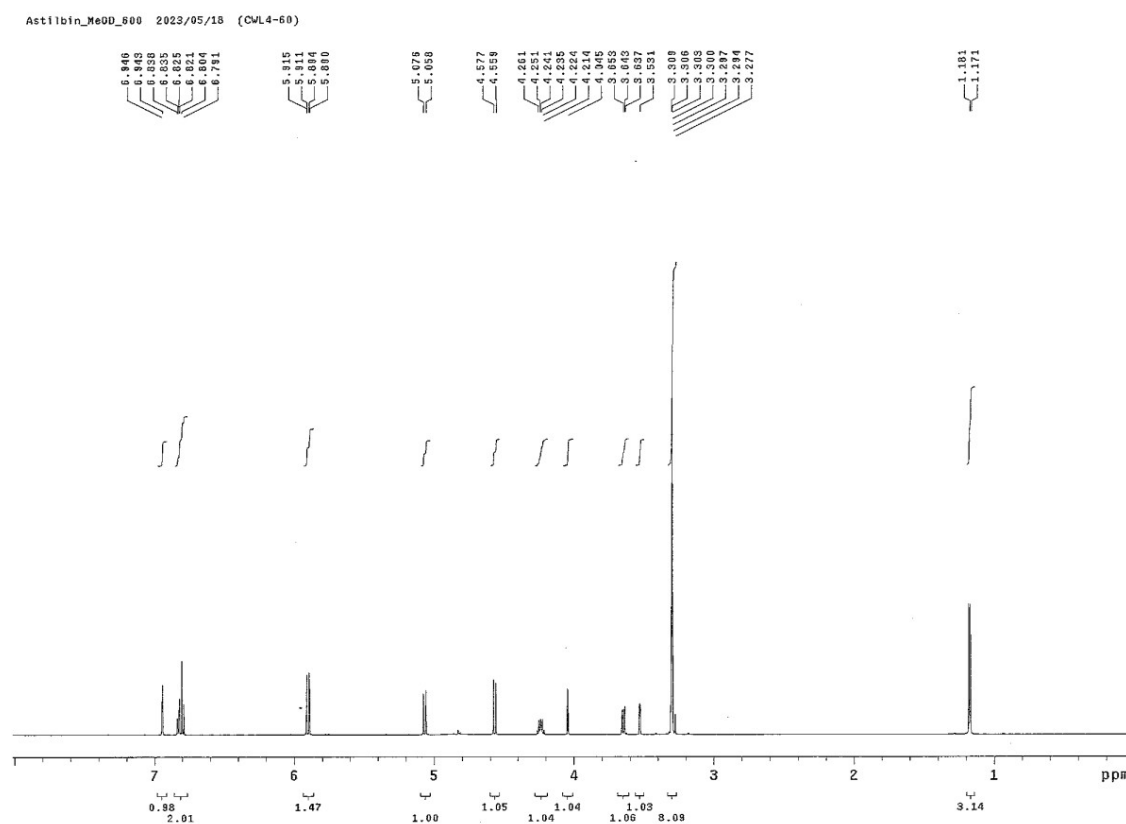
(十四) 落新婦苷的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{21}H_{22}O_{11}$ ；分子量：450.4；熔點：179–180 °C；白色結晶粉末。

(十五) 落新婦苷的結構

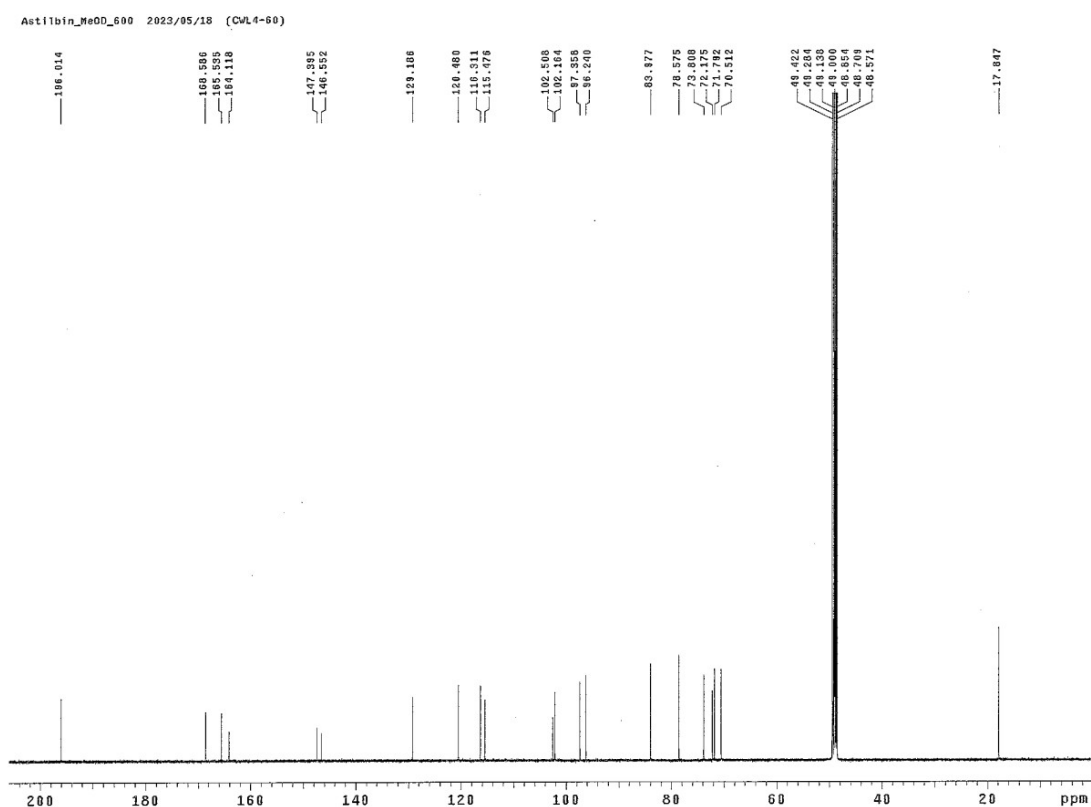


(十六) 落新婦苷的 1H NMR 圖譜



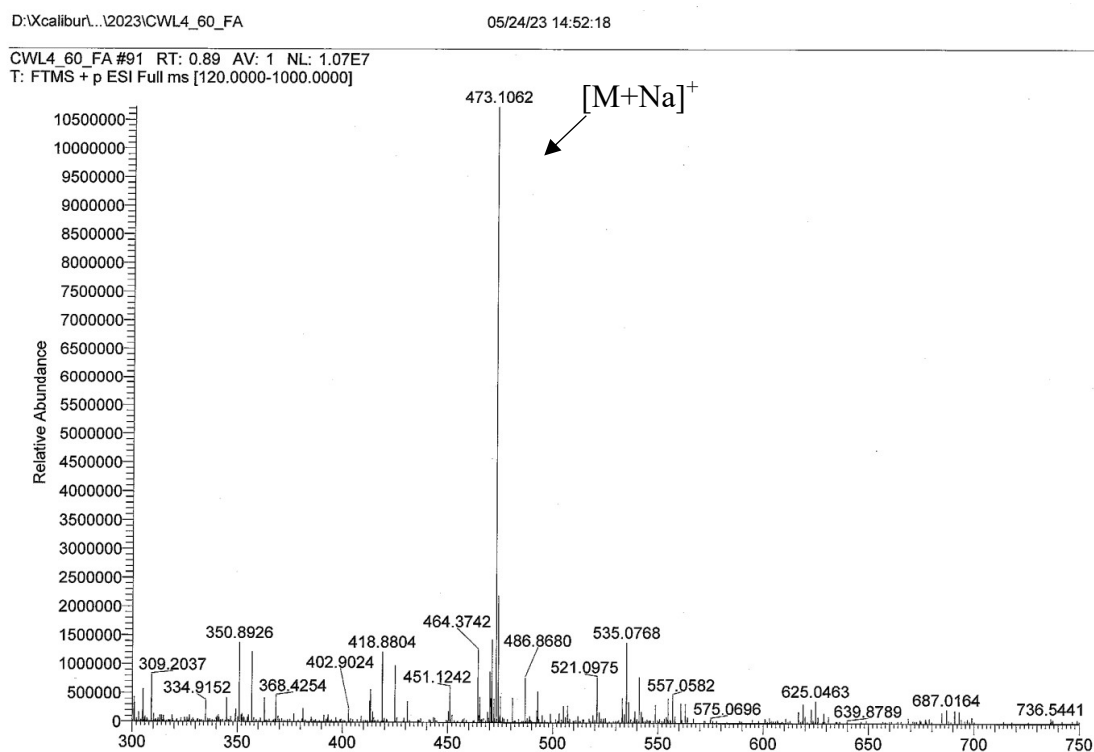
圖九、落新婦苷的 1H NMR 圖譜(CD_3OD)

(十七) 落新婦苷的 ^{13}C NMR 圖譜



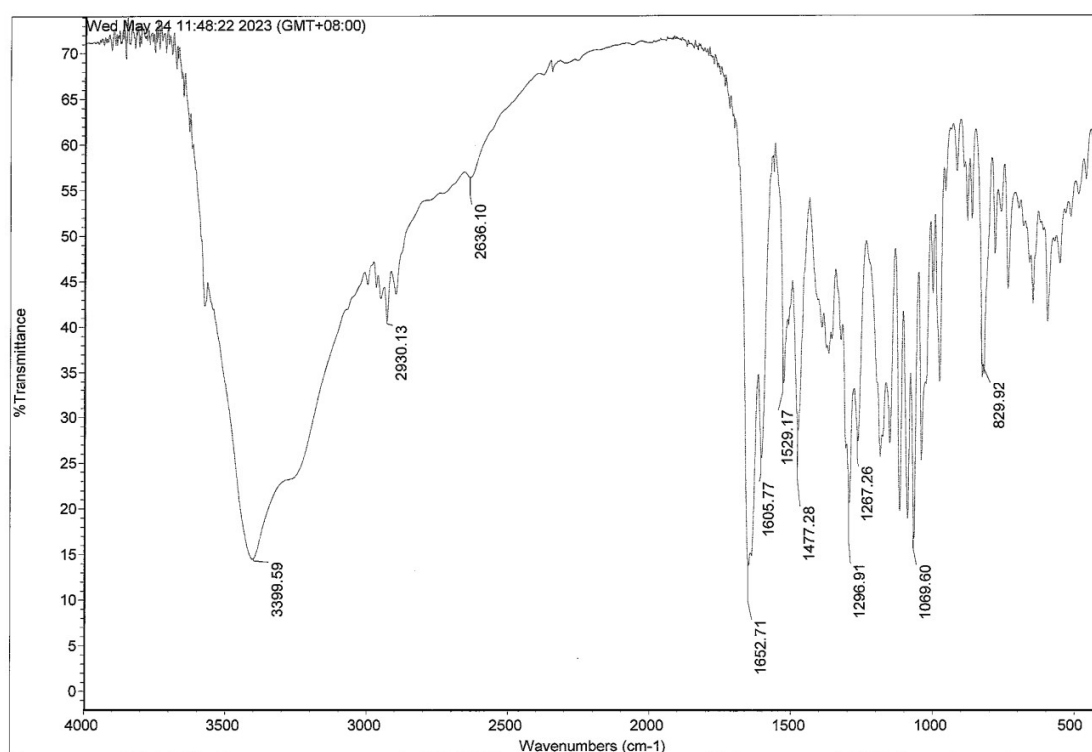
圖十、落新婦苷的 ^{13}C NMR 圖譜(CD_3OD)

(十八) 落新婦苷的 ESI-MS 圖譜



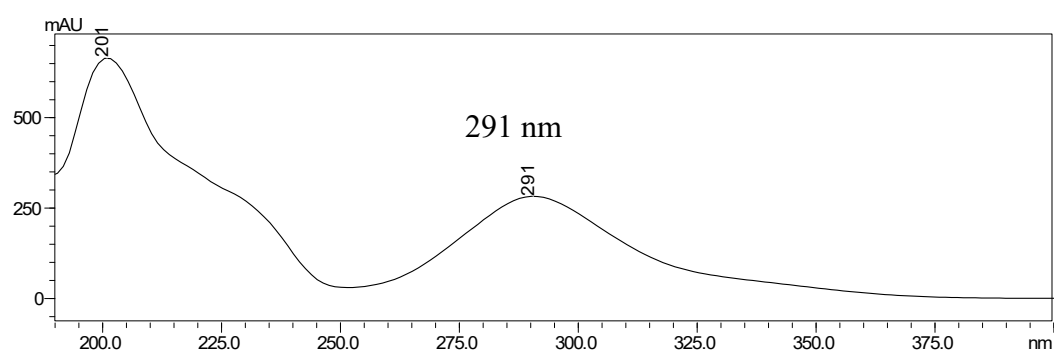
圖十一、落新婦苷的 ESI-MS 圖譜

(十九) 落新婦苷的 FTIR 圖譜



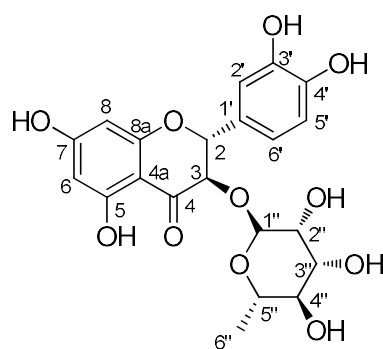
圖十二、落新婦苷的 FTIR 圖譜

(二十) 落新婦苷的 UV 圖譜



圖十三、落新婦苷的 UV 圖譜

(二十一) 落新婦苷的氫、碳化學位移



落新婦苷

表七、落新婦苷的氫、碳化學位移(CD₃OD)

position	δ_H (600 MHz) ^a	δ_C (150 MHz)
2	5.07 (d, 10.8)	84.0
3	4.57 (d, 10.8)	78.6
4	-	196.0
4a	-	102.5
5	-	165.5
6	5.91 (d, 2.4)	97.4
7	-	168.6
8	5.89 (d, 2.4)	96.2
8a	-	164.1
1'	-	129.2
2'	6.94 (d, 2.4)	115.5
3'	-	146.6
4'	-	147.4
5'	6.80 (d, 8.4)	116.3
6'	6.83 (dd, 8.4, 2.4)	120.5
1''	4.04 (d, 1.8)	102.2
2''	3.53 (dd, 3.0, 1.8)	71.8
3''	3.65 (dd, 9.0, 3.0)	72.2
4''	3.29–3.31 (m)	73.8
5''	4.21–4.26 (m)	70.5
6''	1.18 (d, 6.0)	17.8

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

土茯苓

生藥名：SMILACIS GLABRAE RHIZOMA

英文名：Smooth Greenbrier Rhizome

基 原：本品為百合科 Liliaceae 植物光葉菝葜 *Smilax glabra* Roxb.之乾燥根莖。

一、方法

(一) 檢 品 溶 液 【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》✓

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 20 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，取濾液，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】《香港中藥材標準第四冊》

——取本品粉末 0.5 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 取落新婦苷(Astilbin)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】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》

——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (13：32：9)

【展開劑 2】《香港中藥材標準第四冊》

——乙酸乙酯：甲酸：水 (10：1：0.8)

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》✓

——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

(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 2%三氯化鋁試液(AlCl₃/EtOH TS)噴霧後，置於紫外光 (365 nm)下檢視。

二、萃法選擇及濃度測試

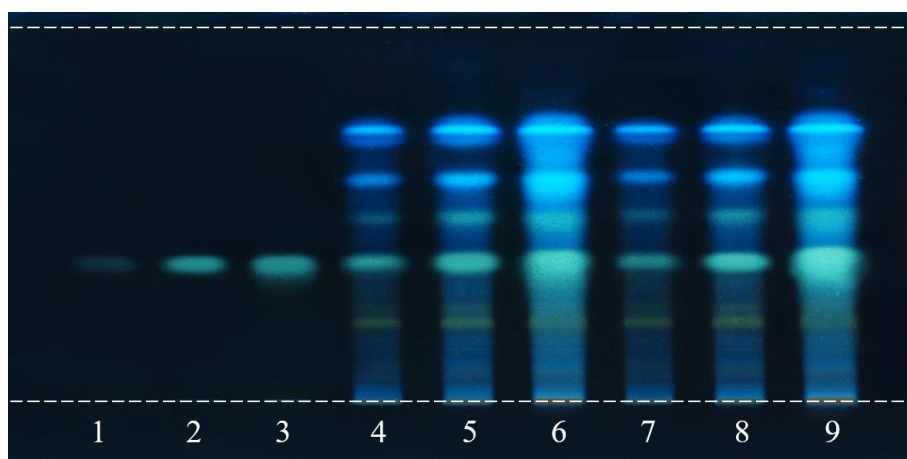
實驗日期：112/06/05

相對溼度(RH)：71%

溫度(RT)：24.1 °C

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

——HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	落新婦苷(0.2 mg/mL)	2, 5, 8 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 4【萃取方法 1】	1, 2, 5 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 4【萃取方法 2】	1, 2, 5 μ L

建議萃法：兩種萃取方法，檢品溶液中皆可分離與檢出落新婦苷，因濃度適中，故維持原臺灣中藥典【萃取方法 1】。

建議點注量：落新婦苷 5 μ L，檢品溶液【萃取方法 1】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

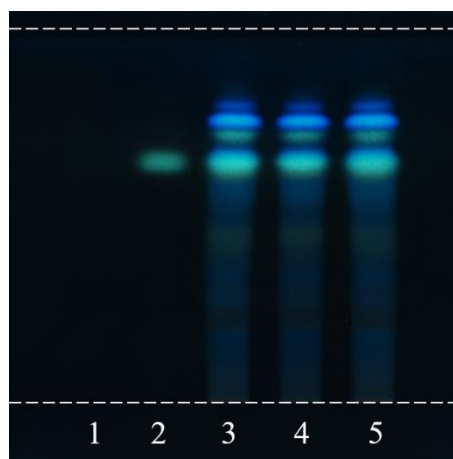
實驗日期：112/06/05

相對溼度(RH)：71%

溫度(RT)：24.1 °C

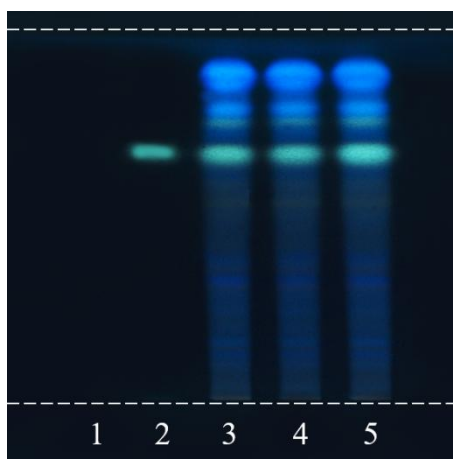
【展開劑 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (13：32：9)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
——HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出(落新婦苷 R_f 值為 0.72)



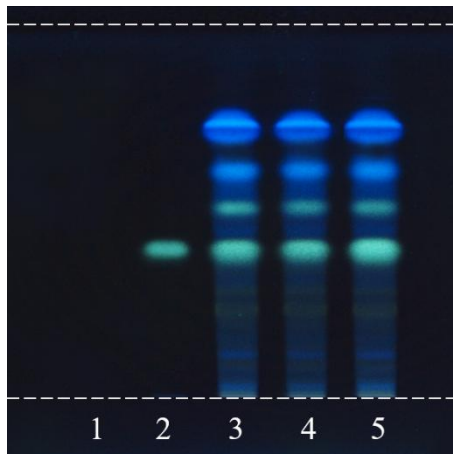
【展開劑 2】《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：水：甲酸 (10：0.8：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
——HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出(落新婦苷 R_f 值為 0.70)



【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)✓

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
——HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出(落新婦苷 R_f 值為 0.41)



- 1：Blank
- 2：落新婦苷
- 3，4：檢品溶液 4
- 5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 1】方式，以修飾香港中藥材標準【展開劑 3】展開，顯示落新婦苷的 R_f 值適中且分離佳，故採用【展開劑 3】。

四、觀察方式選擇

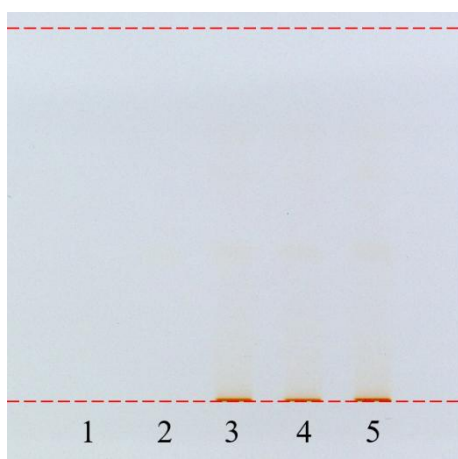
實驗日期：112/06/05

相對溼度(RH)：71%

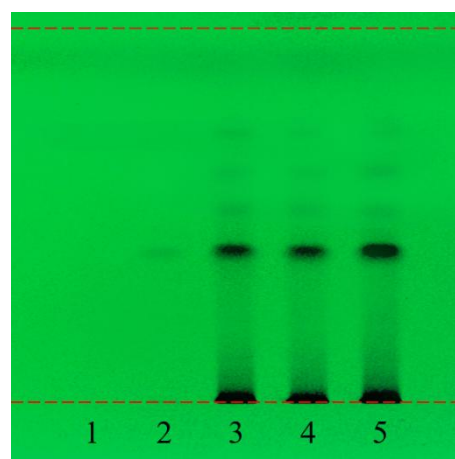
溫度(RT)：24.1 °C

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

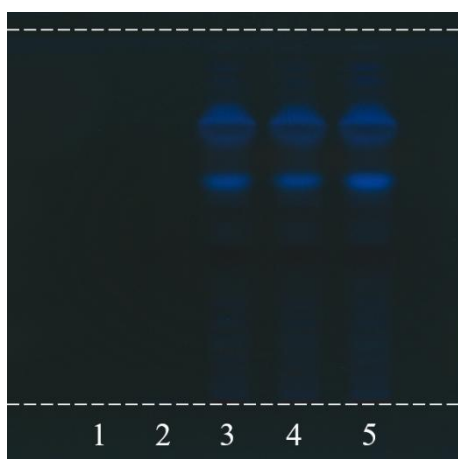
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 可見光檢出



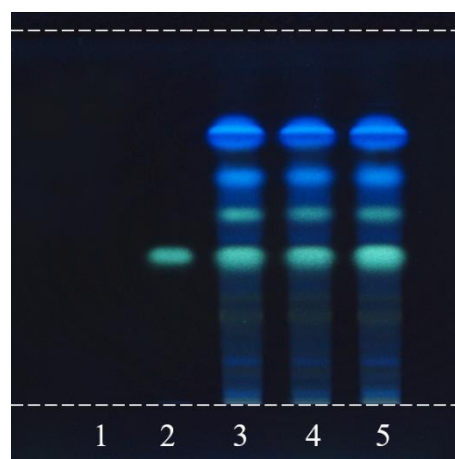
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出✓



1：Blank

3，4：檢品溶液 4

2：落新婦苷

5：Spike

建議觀察方式：以 2%三氯化鋁試液顯色後於紫外光(365 nm)，有較多且明顯分離之條帶。

五、十批土茯苓藥材樣品檢測

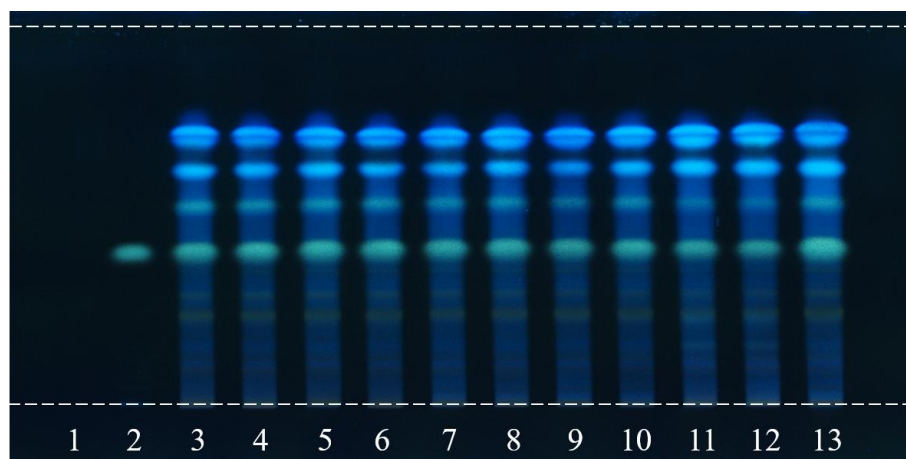
實驗日期：112/06/05

相對溼度(RH)：71%

溫度(RT)：24.1 °C

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

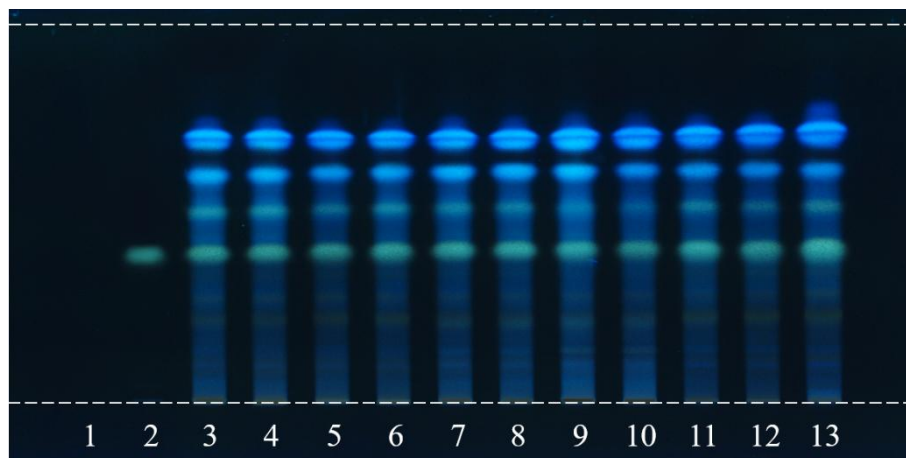
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 3 (NRB)
2	落新婦苷(0.2 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 4 (NWC)
3, 4	檢品溶液 1 (NH)	11, 12	檢品溶液 5 (NX)
5, 6	檢品溶液 2 (NRA)	13	Spike (檢品溶液 4)

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 2%三氯化鋁 C 顯色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 8 (SCA)
2	落新婦苷(0.2 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 9 (SCB)
3, 4	檢品溶液 6 (CA)	11, 12	檢品溶液 10 (SGA)
5, 6	檢品溶液 7 (CB)	13	Spike (檢品溶液 4)

結論與建議：以【萃取方法 1】及【展開劑 3】方式，分離與檢出落新婦苷較佳，以 2%三氯化鋁試液顯色後於紫外光(365 nm)檢視較佳。

土茯苓飲片(NEOPICRORHIZAE RHIZOMA)

一、材料

購置於臺灣各地中藥店土茯苓飲片共 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 Agilent ZORBAX SB-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; 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)購置於 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd; 乙酸購置於台灣默克有限公司。

(二) 對照標準品

落新婦苷(Astilbin)購置於普思生物科技公司, 純度 98%以上。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒評估

土茯苓飲片最佳萃取溶媒同土茯苓藥材。

(二) 最佳萃取次數評估

土茯苓飲片最佳萃取次數同土茯苓藥材。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取對照標準品落新婦苷 4.0mg, 加 10 mL 的甲醇製成每 1 mL 含落新婦苷 400 μg 的對照標準品儲備溶液, 並以甲醇稀釋至落新婦苷 80 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 No.20 篩網)約 0.2 g, 置 50 mL 離心管中, 準確加入 75%甲醇 25 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 $4000 \times g$)，以 No.1 濾紙過濾，取濾液。殘渣部分重複提取 1 次，合併濾液，移入 50 mL 之容量瓶中，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土茯苓的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取落新婦苷對照標準品儲備液適量(400 $\mu\text{g/mL}$)，以甲醇稀釋成含落新婦苷分別為 400、200、100、80、40、20 $\mu\text{g/mL}$ 的對照標準品溶液。以上溶液各取 10 μL 分別注入 HPLC 進行定量分析，利用對照標準品之波峰面積(y 軸)和對照標準品之濃度(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

以落新婦苷為 80 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以落新婦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：取同一批市售土茯苓飲片粉末，依土茯苓飲片檢品溶液製備方法平行製備 5 份土茯苓飲片檢品溶液，進樣測定，以落新婦苷的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售土茯苓飲片粉末，依土茯苓飲片檢品溶液製備方法製備土茯苓飲片檢品溶液，分別在 0、2、4、8、24 小時進樣測定，以落新婦苷的含量為指標，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 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

取已知落新婦苷含量的土茯苓飲片粉末 5 份，每份準確稱取約 0.1 g，分別加入落新婦苷 3.0 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：Agilent ZORBAX SB-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 291 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(%)	0.1%乙酸(v/v, %)
0	35	65
35	35	65

(十二) 臺灣市售土茯苓飲片含量測定

取 10 批市售土茯苓飲片及 10 批市售土茯苓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 公式計算樣品落新婦苷及落新婦苷 I 的百分比含量。

(十三) 土茯苓檢品之 UPLC 分析條件

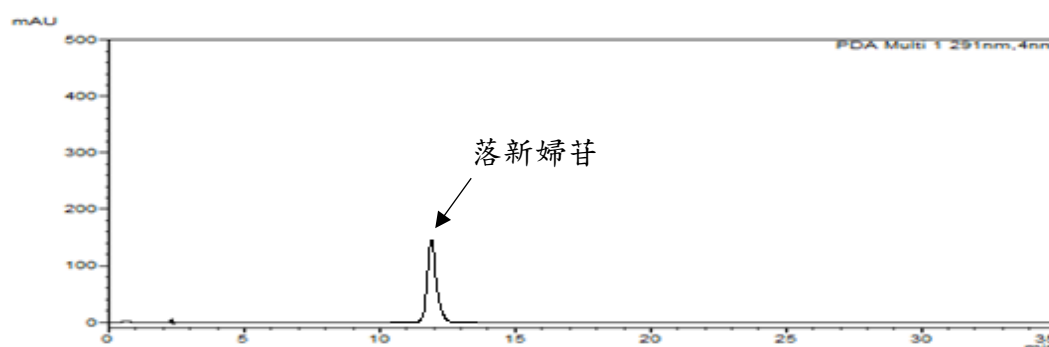
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：UV 291 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%乙酸(v/v, %)
0	35	65
10	35	65

五、結果

(一) 對照標準品落新婦苷之 HPLC 層析

於滯留時間 12.0 分鐘處顯示落新婦苷對照標準品波峰(圖一)。

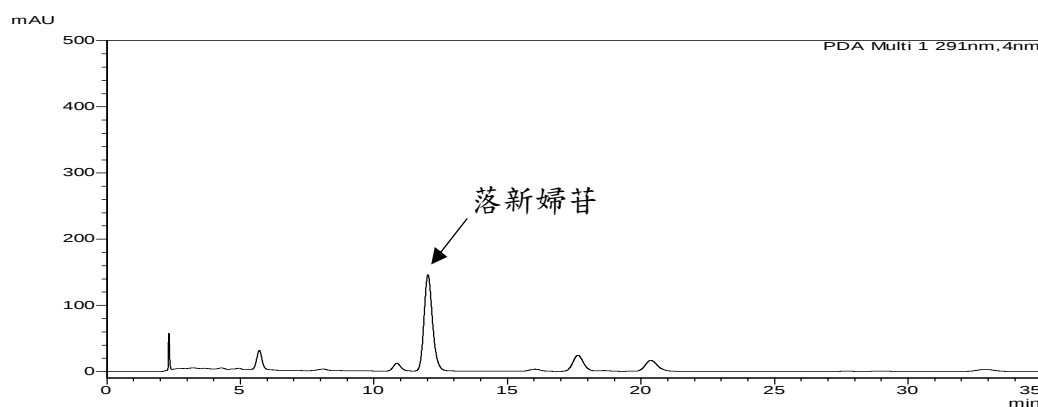


圖一、落新婦苷對照標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售土茯苓飲片檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 12.0 分鐘處顯示土茯苓飲片檢品中落新婦苷波峰(圖二)。

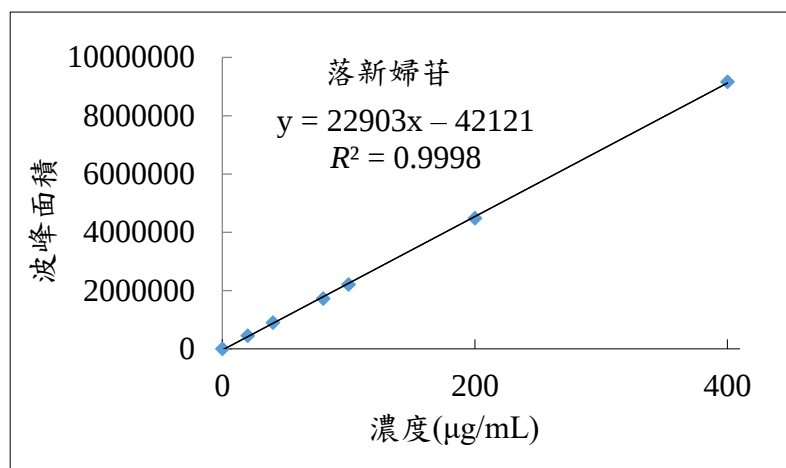
落新婦苷分離率(R)為 2.1，拖尾因子(T)為 1.0，均在系統適用性要求內。



圖二、市售土茯苓飲片檢品之 HPLC 層析圖

(三) 對照標準品落新婦苷檢量線

經不同濃度落新婦苷(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 $y = 22903x - 42121$ ， $R^2 = 0.9998$ ，顯示濃度在 20–400 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、落新婦苷之檢量線圖

表一、落新婦苷之檢量線方程式

對照標準品	濃度(µg/mL)	線性回歸方程式	R^2
落新婦苷	20–400	$y = 22903x - 42121$	0.9998

(四) 精密度試驗

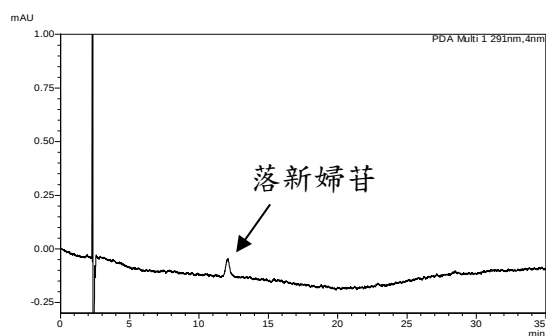
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，落新婦苷精密度之相對標準差為 1.17%，均在系統適用性要求內。

(五) 重複性與穩定性試驗

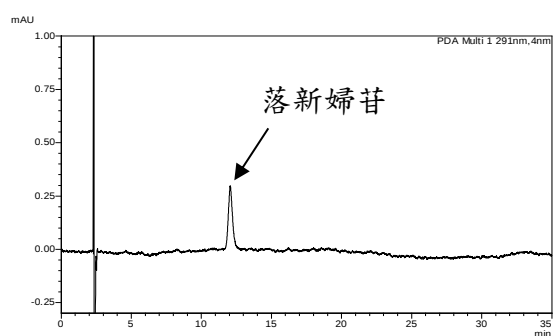
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，落新婦苷重複性之相對標準差為 1.53%，在系統適用性要求內。落新婦苷在 24 小時內穩定，穩定性相對標準差為 0.40%，變化差異小，若所有樣品分析都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(六) 偵測極限與定量極限試驗

落新婦苷偵測極限為 0.05 µg/mL(圖四)，定量極限為 0.25 µg/mL(圖五)。



圖四、落新婦苷之偵測極限層析圖



圖五、落新婦苷之定量極限層析圖

表二、各項檢驗分析

檢測項目	落新婦苷	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	80 µg/mL	1.17
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.8)	1.53
穩定性 (n=5)	檢品溶液(No.8)	0.40
偵測極限 (n=1)	0.05 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	0.25 µg/mL	-

(七) 添加回收率試驗

落新婦苷平均添加回收率為 89.2%，相對標準偏差為 2.89% (表二)。

表二、落新婦苷添加回收率

編號	飲片稱重 (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	0.1002	3.1422	3.0	5.7462	86.80	89.2	2.89
2	0.1004	3.1485	3.0	5.8846	91.20		
3	0.1004	3.1485	3.0	5.8571	90.29		
4	0.1002	3.1422	3.0	5.7239	86.06		
5	0.1004	3.1485	3.0	5.8963	91.59		

(八) 臺灣市售土茯苓飲片含量測定

10 批土茯苓飲片之含量測定結果(乾燥品)如表三所示，落新婦苷的含量為 2.816–4.014%。建議土茯苓飲片指標成分落新婦苷的含量不得少於 0.45%。理論板數按落新婦苷波峰計算應不低於 5000 (實際值為 6940)。

表三、臺灣市售土茯苓飲片檢品之落新婦苷的含量

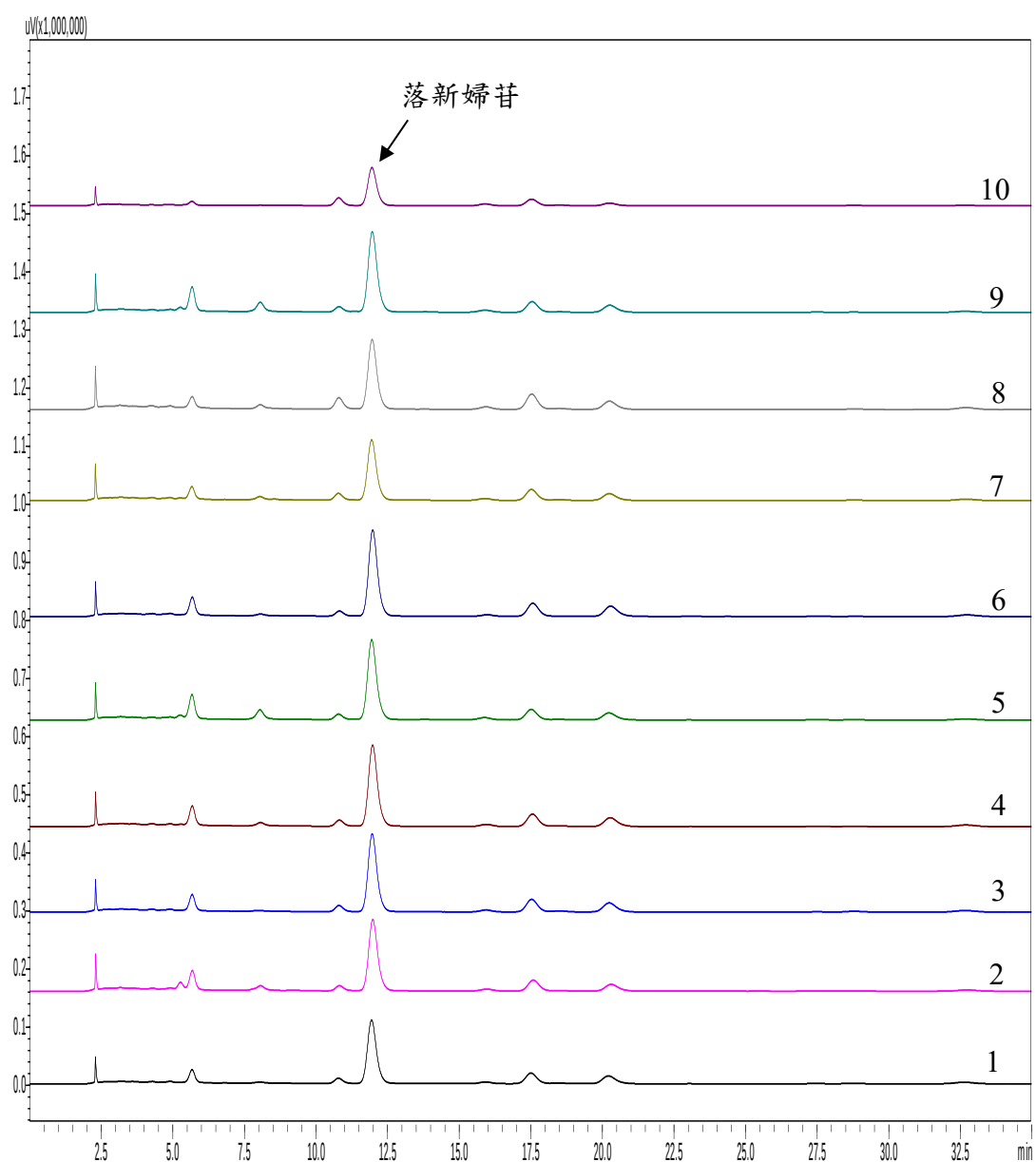
編號(No.)	落新婦苷含量(%)	編號(No.)	落新婦苷含量(%)
1 (NA)	3.017	6 (SK1)	4.014
2 (NC)	3.319	7 (SK3)	2.816
3 (NE)	3.672	8 (SUB)	3.238
4 (CA)	3.846	9 (SUC)	3.789
5 (CH)	3.784	10 (SUD)	3.020
平均值±S.D.	3.451±0.420		

(九) 土茯苓飲片之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售土茯苓飲片檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX SB-C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 291 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：

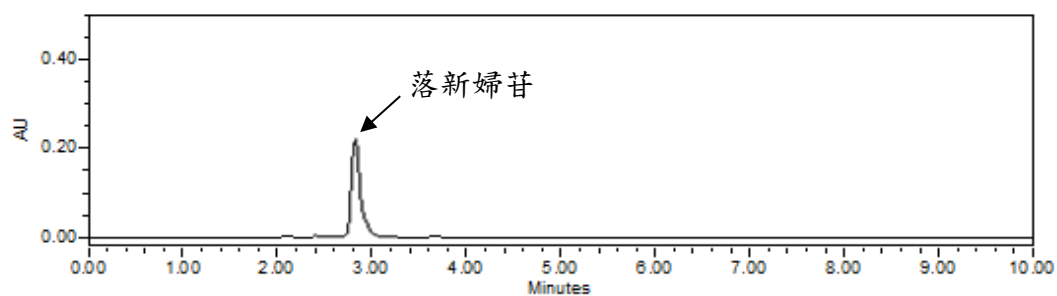
時間(min)	甲醇(%)	0.1%乙酸(%)
0	35	65
35	35	65



圖六、10 批土茯苓飲片之 HPLC 指紋圖譜

(十) 對照標準品落新婦苷之 UPLC 層析

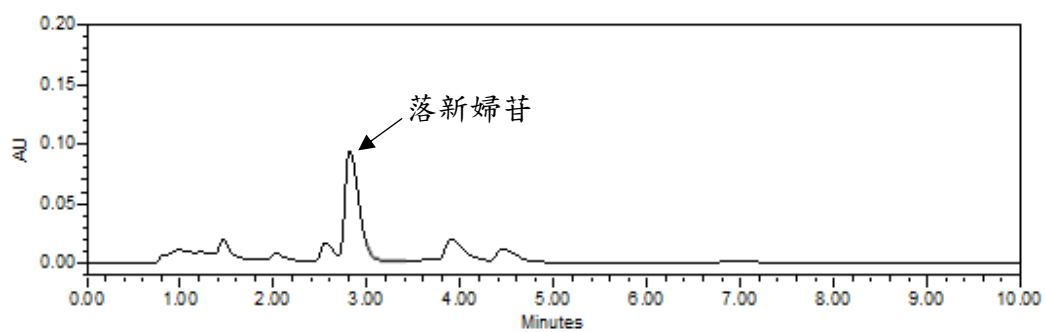
於滯留時間 2.81 分鐘處顯示落新婦苷對照標準品波峰(圖七)。



圖七、落新婦苷對照標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十一) 市售土茯苓飲片檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.81 分鐘處分別顯示土茯苓飲片檢品中落新婦苷波峰(圖八)。



圖八、市售土茯苓飲片檢品之 UPLC 層析圖

土茯苓飲片

生藥名：SMILACIS GLABRAE RHIZOMA

英文名：Smooth Greenbrier Rhizome

基 原：本品為百合科 Liliaceae 植物光葉菝葜 *Smilax glabra* Roxb.之乾燥根莖。

一、方法

(一) 檢 品 溶 液 【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》✓

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 20 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，取濾液，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】《香港中藥材標準第四冊》

——取本品粉末 0.5 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 取落新婦苷(Astilbin)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】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》

——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (13：32：9)

【展開劑 2】《香港中藥材標準第四冊》

——乙酸乙酯：甲酸：水 (10：1：0.8)

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》✓

——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

(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 2%三氯化鋁試液(AlCl₃/EtOH TS)噴霧後，置於紫外光 (365 nm)下檢視。

二、萃法選擇及濃度測試

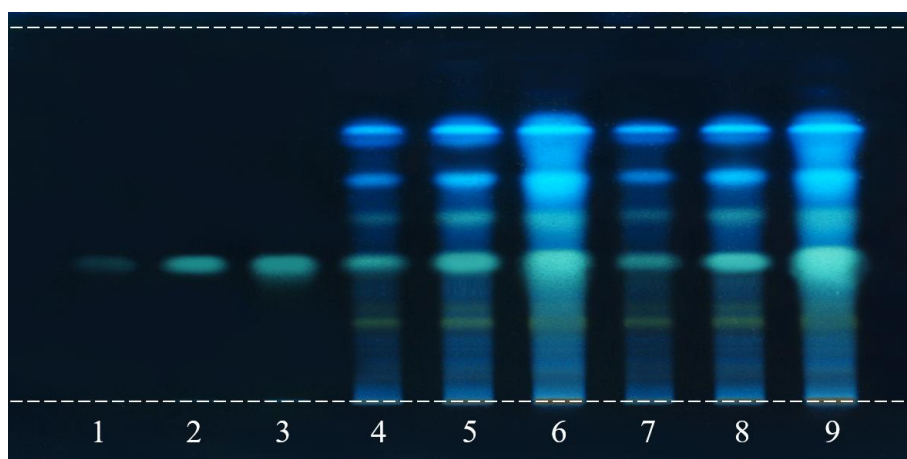
實驗日期：112/06/05

相對溼度(RH)：71%

溫度(RT)：24.1 °C

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

——HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	落新婦苷(0.2 mg/mL)	2, 5, 8 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 4【萃取方法 1】	1, 2, 5 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 4【萃取方法 2】	1, 2, 5 μ L

建議萃法：兩種萃取方法，檢品溶液中皆可分離與檢出落新婦苷，因濃度適中，故維持原臺灣中藥典【萃取方法 1】。

建議點注量：落新婦苷 5 μ L，檢品溶液【萃取方法 1】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

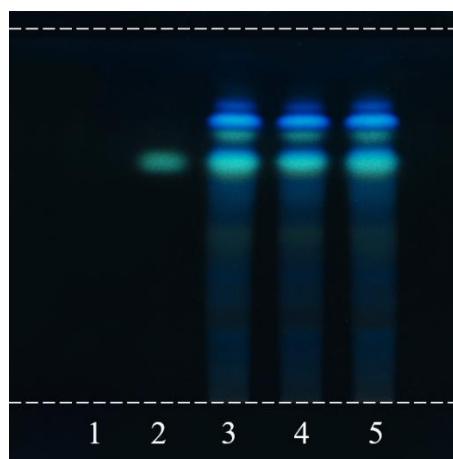
實驗日期：112/06/05

相對溼度(RH)：71%

溫度(RT)：24.1 °C

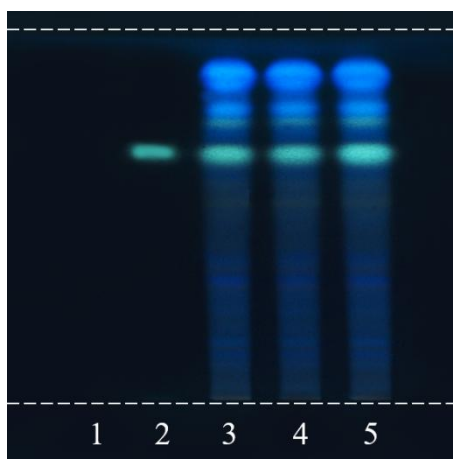
【展開劑 1】《臺灣中藥典第四版 2021》——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (13：32：9)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
——HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出(落新婦苷 R_f 值為 0.72)



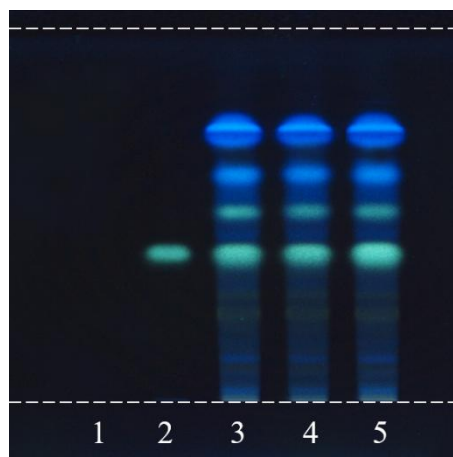
【展開劑 2】《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：水：甲酸 (10：0.8：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
——HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出(落新婦苷 R_f 值為 0.70)



【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)✓

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
——HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出(落新婦苷 R_f 值為 0.41)



1：Blank

2：落新婦苷

3，4：檢品溶液 4

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 1】方式，以修飾香港中藥材標準【展開劑 3】展開，顯示落新婦苷的 R_f 值適中，分離佳，故採用【展開劑 3】。

四、觀察方式選擇

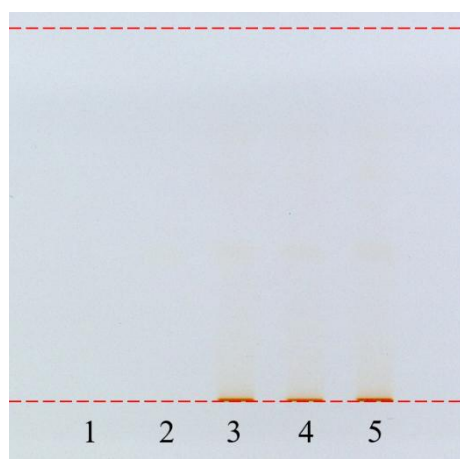
實驗日期：112/06/05

相對溼度(RH)：71%

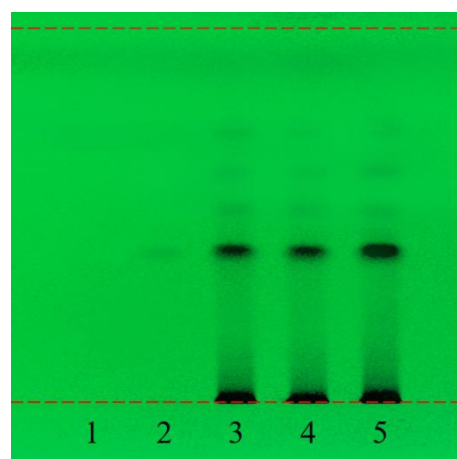
溫度(RT)：24.1 °C

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

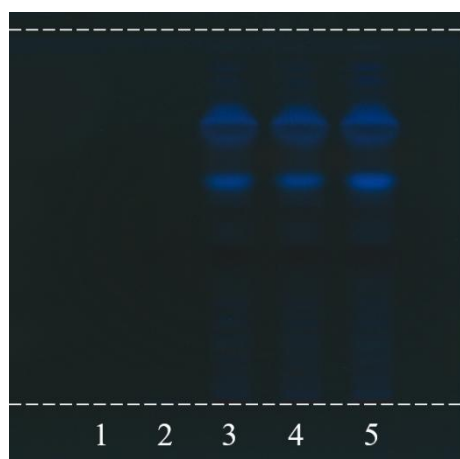
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 可見光檢出



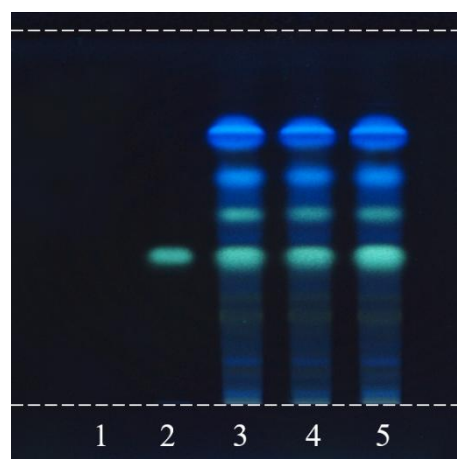
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出✓



1：Blank

3，4：檢品溶液 4

2：落新婦苷

5：Spike

建議觀察方式：以 2%三氯化鋁試液顯色後於紫外光(365 nm)，有較多且明顯分離之條帶。

五、十批土茯苓飲片樣品檢測

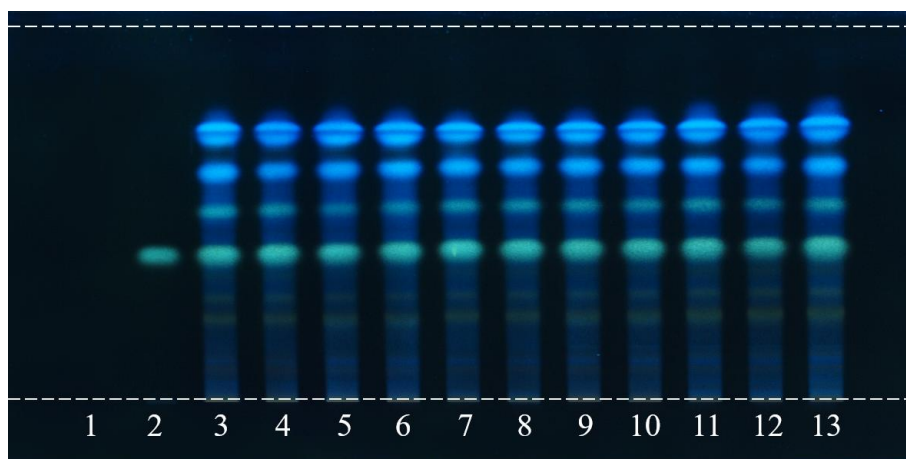
實驗日期：112/06/05

相對溼度(RH)：71%

溫度(RT)：24.1 °C

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

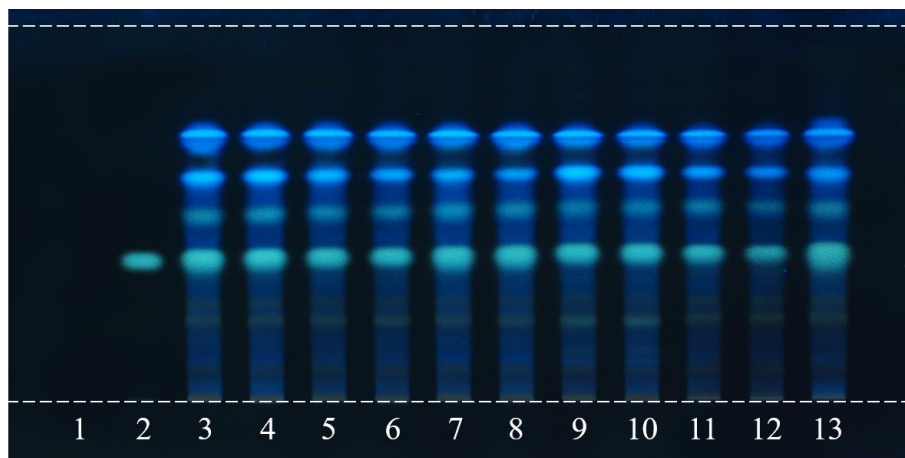
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 2%三氯化鋁試液顯色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 3 (NE)
2	落新婦苷(0.2 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 4 (CA)
3, 4	檢品溶液 1 (NA)	11, 12	檢品溶液 5 (CB)
5, 6	檢品溶液 2 (NC)	13	Spike (檢品溶液 4)

【展開劑 3】修飾《香港中藥材標準第四冊》——乙酸乙酯：甲酸：水 (15：0.5：0.5)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》
—HPTLC 2%三氯化鋁 C 顯色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 8 (SK3)
2	落新婦苷(0.2 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 9 (SUB)
3, 4	檢品溶液 6 (CH)	11, 12	檢品溶液 10 (SUC)
5, 6	檢品溶液 7 (SK1)	13	Spike (檢品溶液 4)

結論與建議：以【萃取方法 1】及【展開劑 3】方式，分離與檢出落新婦苷較佳，以 2%三氯化鋁試液顯色後於紫外光(365 nm)檢視較佳。