

防己

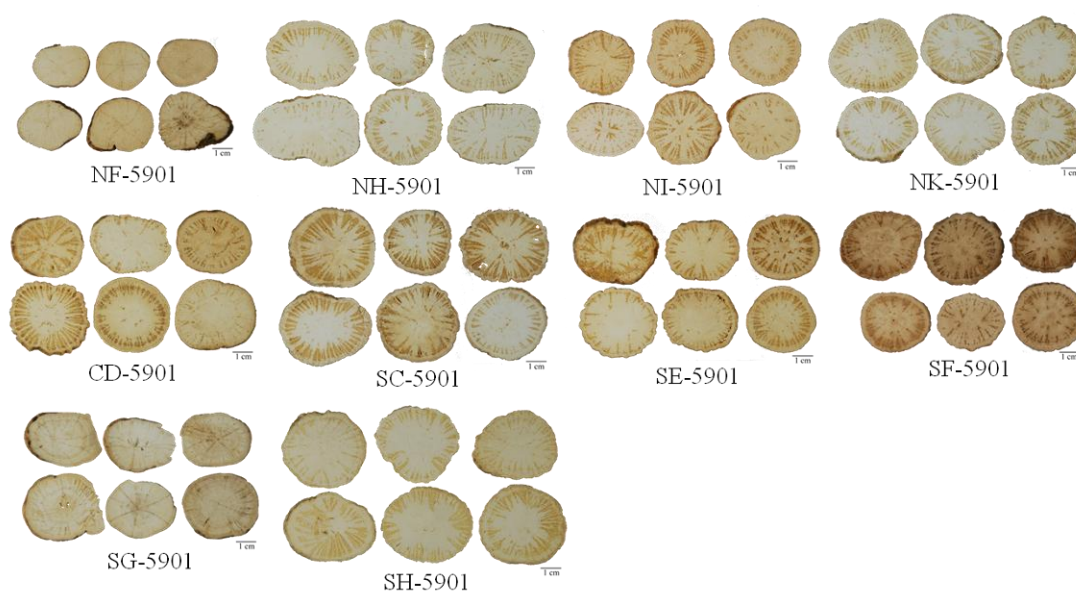
(STEPHANIAE TETRANDRAE RADIX)

防己 MI	2
一、形態	2
二、顯微	3
防己 HPLC	4
一、材料	4
二、儀器及層析管柱	4
三、實驗藥品及試劑來源	4
四、方法	4
五、結果	8
防己 TLC	17
二、溶媒系統選擇	18
三、觀察方式選擇	19
四、十家樣品檢測	20

防己

一、形態

本品為防己科(Menispermaceae)植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 之根或莖，切片形狀為不規則圓形薄片，直徑約 1.5-2.5 cm。外表栓皮呈黃棕色，粗糙狀且有皺紋。切面則呈黃白色，平坦，富有粉性，木部佔大部分，具淺棕色維管束，排列成放射狀紋理，紋如車輪。質重而堅脆，易折。氣微，味苦。

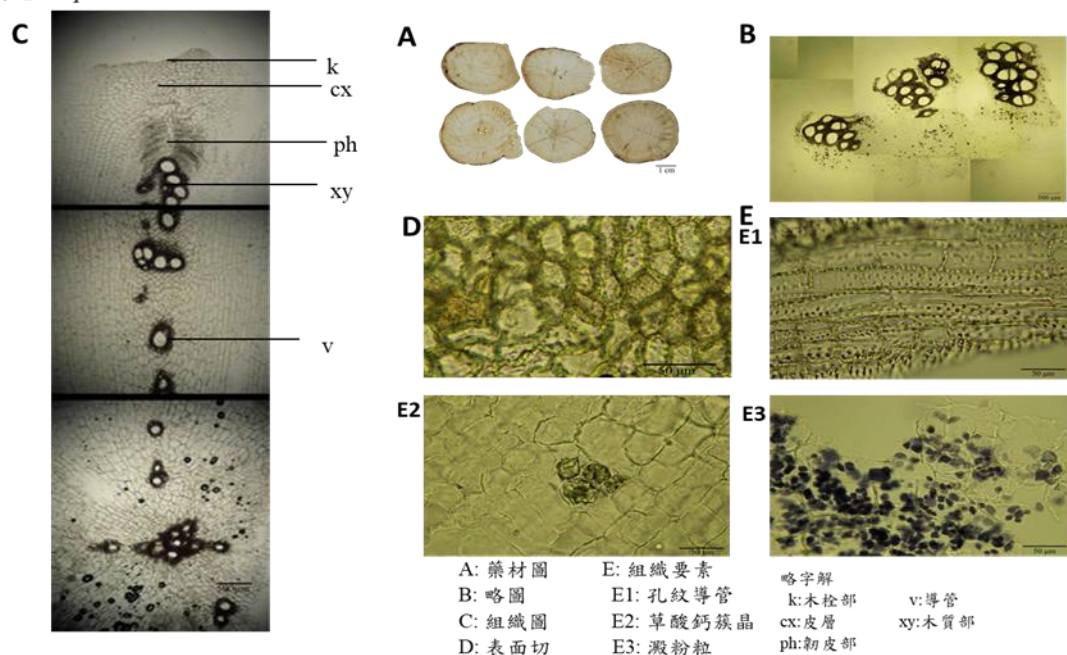


二、顯微

以顯微鏡檢視本品之橫切面，可見其木栓層大多已被除去。皮層狹窄，呈放線性延伸。韌皮部較皮層略寬，富含草酸鈣簇晶。形成層明顯。木質部比較寬，呈放射狀排列，導管多單個或4~5個成群，具有厚膜填充部，導管周圍有纖維性假導管、木質部纖維等，均已木化，導管多為孔紋導管。本品薄壁細胞紋孔大，且富含大量澱粉粒，單粒及複粒澱粉粒皆有。

SG-5901

防己 *Stephania tetrandra* S. Moore



防己 (*Stephaniae tetrandrae* Radix)

一、材料

購自於北中南東各地中藥店防己藥材共 10 家。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Waters 2695 Separation Module，包含 Waters 2996、Photodiode Array Detector；層析管柱 Cosmosil 5C₁₈-AR-II (250 x 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 Thermo Synchronis C₁₈ Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

Acetonitrile HPLC (Merck, Darmstadt, Germany)、Methyl alcohol HPLC (Merck, LiChrosolv Reag. Ph Eur)

(二) 標準品

標準品自行純化。標準品防己諾林鹼(Fangchinoline)，純度皆在 98% 以上。

四、方法

(一) 萃取溶媒開發

取本品粉末七份，每份精確稱定 0.5 g，置 50 mL 三角錐形瓶中，精密加入甲醇、75%甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇、50%乙醇、水各 12.5 mL，超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，以 125 mm 濾紙過濾至 25 mL 之定量瓶中，殘渣部分重複提取一次，合併濾液，加入溶媒至刻度，搖勻，過濾(Syringe filter, 0.22 μm)，取濾液，即得。每次取 5 μL 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以所測得每克重量之最大峰面積為最佳防己萃取溶媒。

(二) 萃取次數考察

取本品粉末約 0.5 g，精確稱定，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入 75%乙醇 12.5 mL，超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，以濾紙過濾至 25 mL 之定量瓶中，加 75%乙醇至刻度，搖勻，過濾 (Syringe filter, 0.22 μm)，取濾液，即得。每次取 5 μL 注入 HPLC，殘渣部分重複上述方法多次萃取、進樣，直到指標成份被萃取完全，並選出最佳萃取次數。

(三) 對照標準品溶液

精確秤取 Fangchinoline 5 mg，加 10 mL 的 100% 甲醇製成每 1 mL 含 0.5 mg (Fangchinoline) 的標準品儲備溶液。

(四) 檢品溶液

取本品粉末約 0.5 g，精確秤定，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入 75% 乙醇 12.5 mL 超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，以 125 mm 濾紙過濾至 25 mL 之定量瓶中，殘渣部分重複提取一次，合併濾液，加 75% 乙醇至刻度，搖勻，過濾(Syringe filter, 0.22 μ m)，取續濾液，即得。

(五) 測定法

分別精確吸取標準品溶液、檢品溶液 10 μ L，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中防己諾林鹼 (Fangchinoline) 的含量，即得。

(六) 檢量線

精確吸取防己諾林鹼(Fangchinoline)標準品儲備液適量(500 μ g/mL)，以 100% 甲醇稀釋成含防己諾林鹼 (Fangchinoline) 分別為 100 μ g/mL、50 μ g/mL、25 μ g/mL、10 μ g/mL、5 μ g/mL、2.5 μ g/mL 的標準品溶液。上述溶液各取 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

以防己諾林鹼 (Fangchinoline) 濃度為 2.5 μ g/mL 之標準品儲備液連續進樣五針，以防己諾林鹼 (Fangchinoline) 波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性：取同一家市售防己粉末，依防己檢品溶液製備方法平行製備五份防己檢品溶液，進樣測定，以防己諾林鹼 (Fangchinoline) 含量 (%) 為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一家市售防己粉末，精確稱取約 0.5 g，依防己檢品溶液製備方法製備防己檢品溶液，分別再 0、8、24 小時進樣測定，以防己諾林鹼 (Fangchinoline) 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) 同日間與異日間試驗

取 2.5、10、25 $\mu\text{g/mL}$ 之防己諾林鹼 (Fangchinoline)標準品溶液進行同日間測試(在 24 小時內每個濃度注射三次)與異日間測試(七天內注射三次，每次間隔 24 小時以上，每個濃度重複注射三次)，求其相對標準偏差值(%)以評估 HPLC 分析條件之穩定性與再現性。

(十一) 添加回收率試驗

取本品粉末約 0.5 g，精確稱定，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入 75% 乙醇 12.5 mL，超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz)30 分鐘，以濾紙過濾至 25 mL 之定量瓶中，加 75% 乙醇至刻度，搖勻，過濾(Syringe filter, 0.22 μm)，取 0.1 mL 濾液分別加入濃度為 25、50 及 100 $\mu\text{g/mL}$ 之標準品 0.1 mL 搖勻後，每次取 5 μL 注入 HPLC，每個檢測品進行三重複。

(十二) HPLC 分析條件

1. 層析管：Cosmosil 5C18-AR-II (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 280 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	0.1% formic acid (v/v) & 2 mM ammonium formate in Acetonitrile	0.1% formic acid (v/v) & 2 mM ammonium formate in H ₂ O
0	5	95
45	45	55
50	100	0

(十三) 臺灣市售防己含量測定

取十家市售防己檢品溶液各 5 μL 連續二針注入 HPLC，所得平均峰面積依公式計算樣品防己諾林鹼 (Fangchinoline)的百分含量。

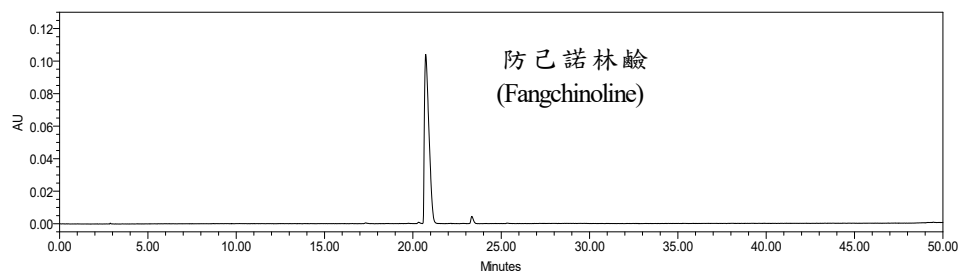
(十四) UPLC 分析條件

1. 層析管：Thermo Synchronis 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)	0.1% formic acid (% v/v) & 2 mM ammonium formate in Acetonitrile	0.1% formic acid (% v/v) & 2 mM ammonium formate in H ₂ O
0	5	95
10	45	55
12	100	0

五、結果

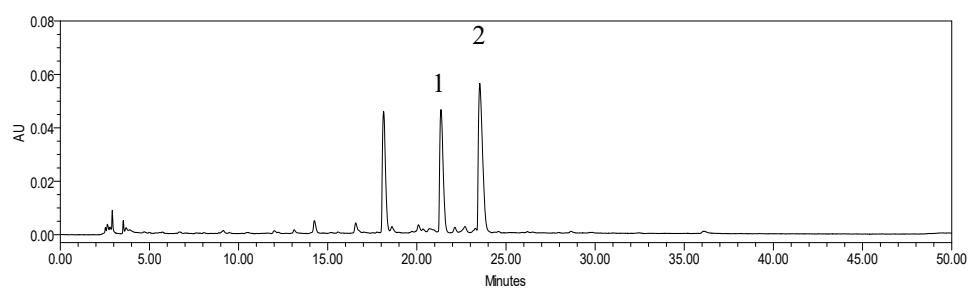
(一) 標準品防己諾林鹼 (Fangchinoline) 之 HPLC 層析



圖一、Fangchinoline 標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售防己檢品之 HPLC 層析圖

於滯留時間 21.3 分鐘處顯示防己諾林鹼(Fangchinoline, 1)標準品波峰。



圖二、市售防己檢品之 HPLC 層析圖

(三) 萃取溶媒開發

以 75%乙醇為溶媒時，每克重量所得的峰面積最大，顯示 75%乙醇為最佳萃取溶媒。

表一 不同溶媒萃取比較

溶媒	甲醇	75% 甲醇	50% 甲醇	水
Peak area	158272	238341	178189	28520
Rank (1=Best, 7=Worst)	5	2	4	7
溶媒	乙醇	75% 乙醇	50% 乙醇	
Peak area	33414	251302	204357	
Rank (1=Best, 7=Worst)	6	1	3	

(四) 萃取次數考察

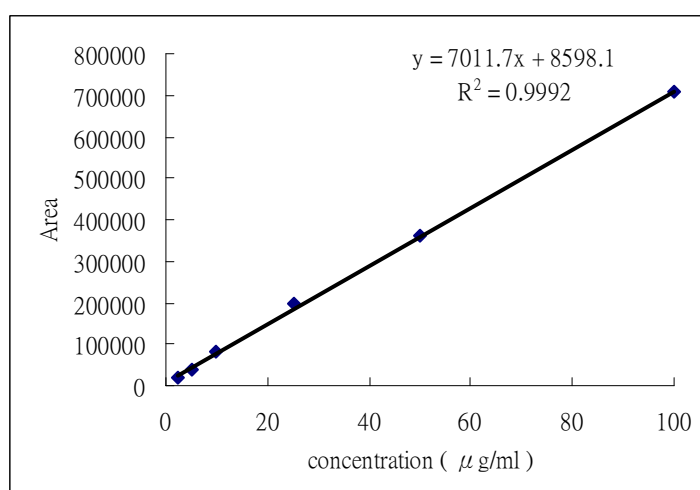
結果顯示萃取兩次基本上已將防己諾林鹼(Fangchinoline)萃取完全(萃取率大於 96%)

表二 防己檢品萃取次數考察

75%乙醇萃取次數	峰面積
第一次	257534
第二次	156446
第三次	16993

(五) 標準品檢量線

以建立之方法分析指標成分防己諾林鹼(Fangchinoline)(2.5~100.0 µg/ml)在其濃度範圍內，各自的線性迴歸方程式及相關係數(R^2)，呈現良好之線性關係。



圖三、Fangchinoline 之減量線圖

表三 防己諾林鹼(Fangchinoline)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
防己諾林鹼 (Fangchinoline)	2.5—100	$y = 701.17 x + 8598.1$	0.9992

(六) 再現性與精密度試驗

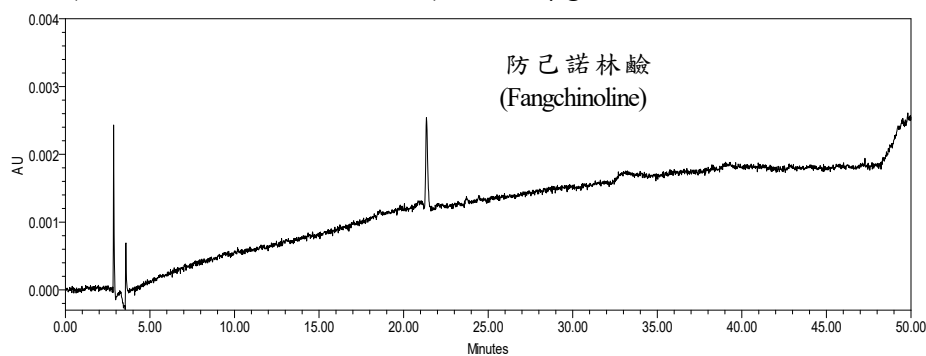
實驗結果(表四)顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，防己諾林鹼(Fangchinoline)精密度之相對標準差為 2.15%，再現性之相對標準差為 3.37%。

(七) 穩定性試驗

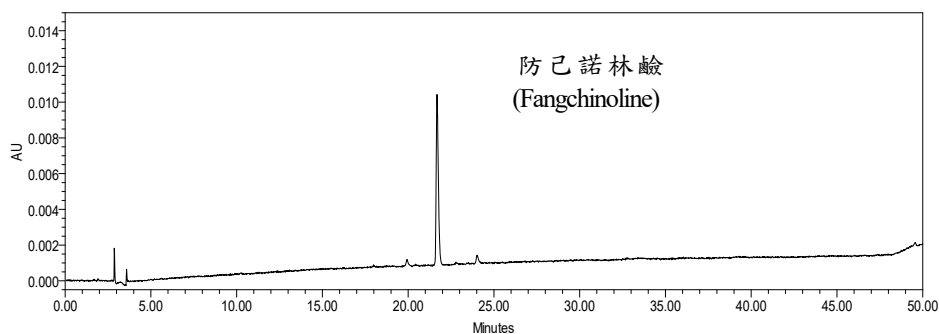
由實驗結果(表四)得知，防己諾林鹼(Fangchinoline)在 24 小時內穩定，相對標準差為 1.05 %，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

防己諾林鹼(Fangchinoline)偵測極限(Limit of Detection, LOD)為 1.0 $\mu\text{g/mL}$ ，定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)為 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。



圖四、防己諾林鹼(Fangchinoline)之 LOD 層析圖



圖五、防己諾林鹼(Fangchinoline)之 LOQ 層析圖

表四 各項檢驗分析

檢測項目	防己諾林鹼(Fangchinoline)	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	2.5 $\mu\text{g/mL}$	2.15
再線性 (n=5)	檢品溶液(NF)	3.37
穩定性 (n=3)	檢品溶液(NF)	1.05
偵測極限 (n=1)	1.0 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=1)	10.0 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 同日間與異日間試驗

由結果可以得知，防己諾林鹼(Fangchinoline)在檢量線之範圍濃度內同日間的相對標準差為 0.32–2.63%，變化差異小；異日間的相對標準差為 1.49–2.11%。

表五 防己諾林鹼(Fangchinoline)同日間與異日間試驗

對照標準 品	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	異日間 (n=9)		同日間 (n=3)	
		mean $\pm$ SD	RSD (%)	mean $\pm$ SD	RSD (%)
防己諾林鹼 (Fangchinoline)	2.5	20.11 $\pm$ 0.41	2.06	20.26 $\pm$ 0.53	2.63
	10	105.36 $\pm$ 1.57	1.49	106.68 $\pm$ 1.77	1.67
	25	281.40 $\pm$ 5.94	2.11	280.25 $\pm$ 0.91	0.32

(十) 添加回收率試驗

防己諾林鹼(Fangchinoline)回收率介於 90.33–95.00%，相對標準偏差 0.64–1.82%。

表六 防己諾林鹼(Fangchinoline)添加回收率試驗

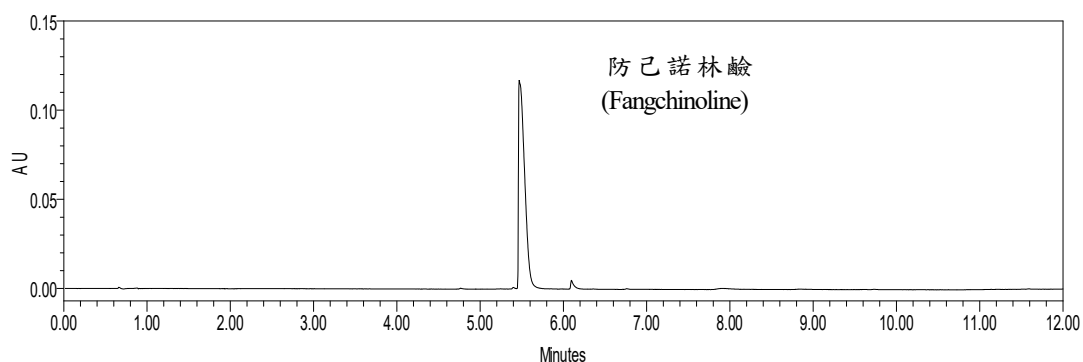
對照標準品	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	回收率(n=3)	
		mean $\pm$ SD	RSD (%)
防己諾林鹼 (Fangchinoline)	25	95 $\pm$ 1.73	1.82
	50	95.00 $\pm$ 1.00	1.05
	100	90.33 $\pm$ 0.58	0.64

(十一) 臺灣市售防己含量測定

表七 台灣市售防己成份含量

市售代號	Mean $\pm$ SD
NF	3.51 $\pm$ 0.06 (0.35%)
NJ	3.45 $\pm$ 0.03 (0.35%)
NQ	3.21 $\pm$ 0.02 (0.32%)
NR	3.48 $\pm$ 0.01 (0.35%)
CE	3.07 $\pm$ 0.04 (0.31%)
SF	0.45 $\pm$ 0.01 (0.05%)
SG	3.87 $\pm$ 0.05 (0.39%)
SL	3.79 $\pm$ 0.04 (0.38%)
SN	2.54 $\pm$ 0.03 (0.25%)
SO	2.94 $\pm$ 0.05 (0.29%)

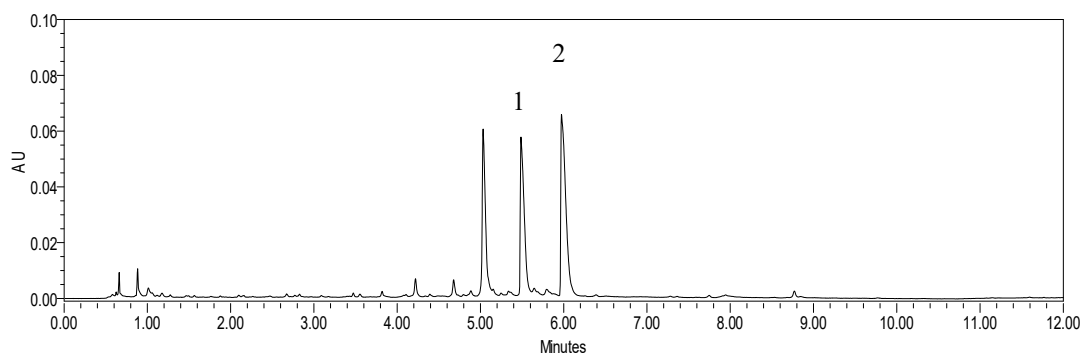
(十二) 標準品防己諾林鹼 (Fangchinoline) 之 UPLC 層析



圖六、Fangchinoline 標準品溶液之 UPLC 層析圖

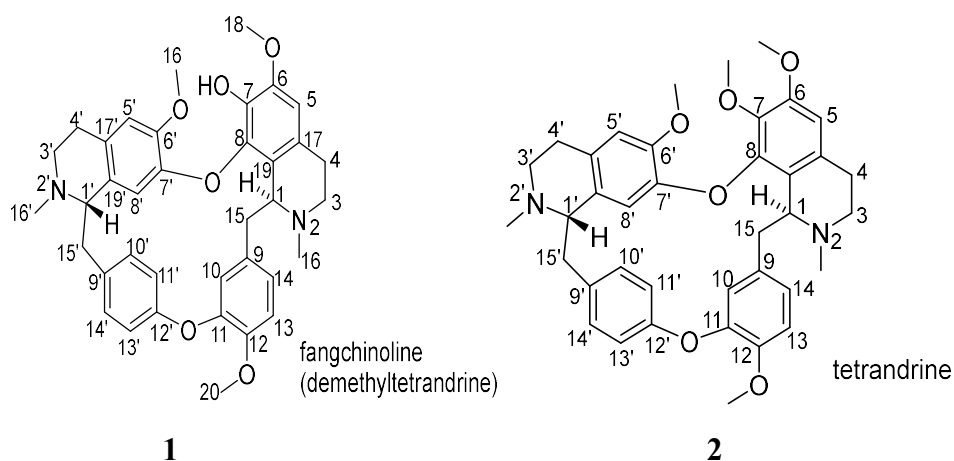
(十三) 市售防己檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 5.4 分鐘處顯示防己諾林鹼(Fangchinoline)標準品波峰。



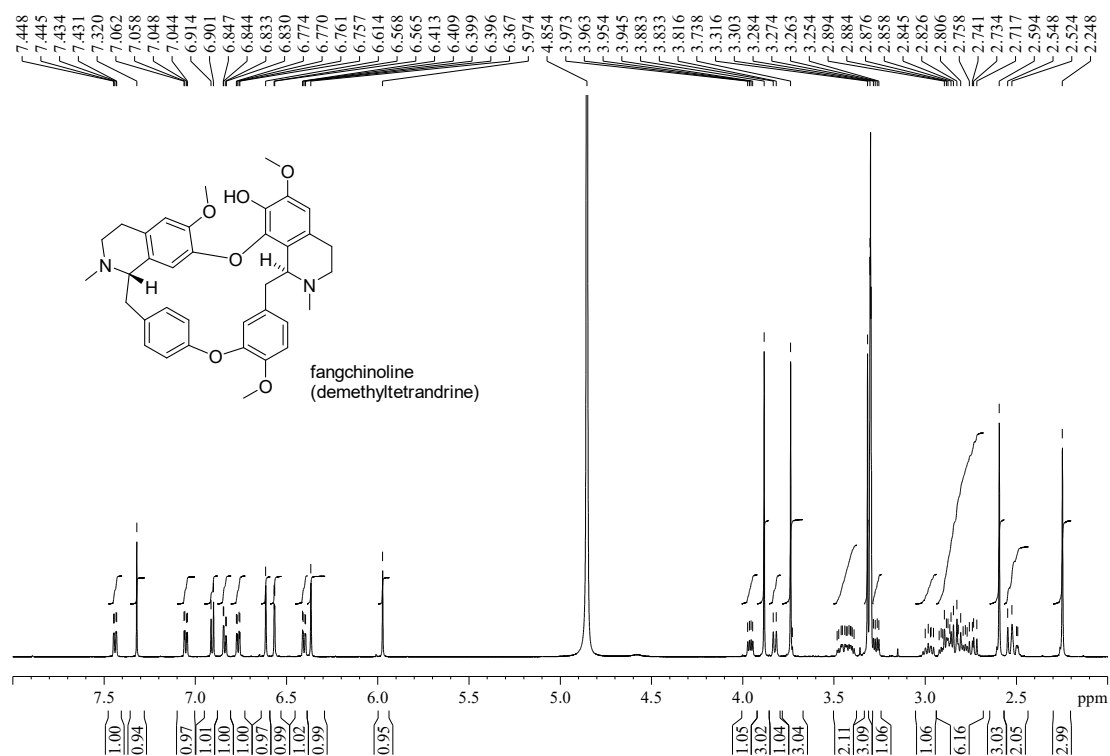
圖七、市售防己檢品之 UPLC 層析圖

(十四) 防己諾林鹼(Fangchinoline, **1**)與 tetrandrine (**2**)之結構



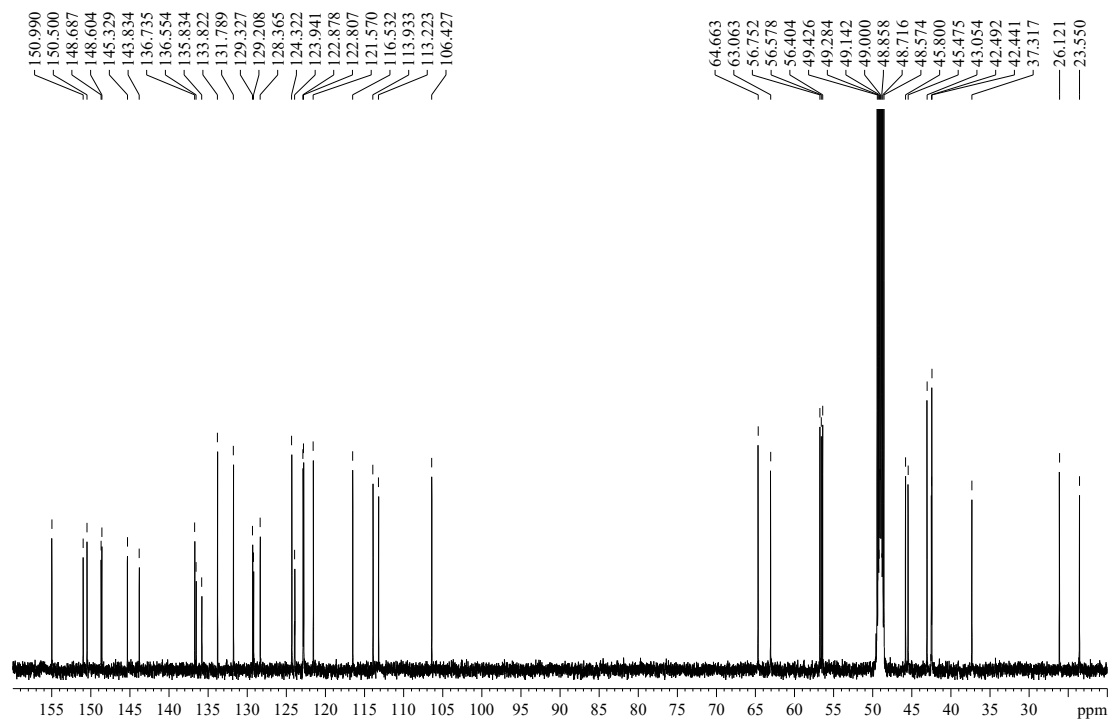
圖八、防己諾林鹼(Fangchinoline, **1**)與 tetrandrine (**2**)之結構

(十五) 防己諾林鹼(Fangchinoline)的 ^1H NMR 圖譜



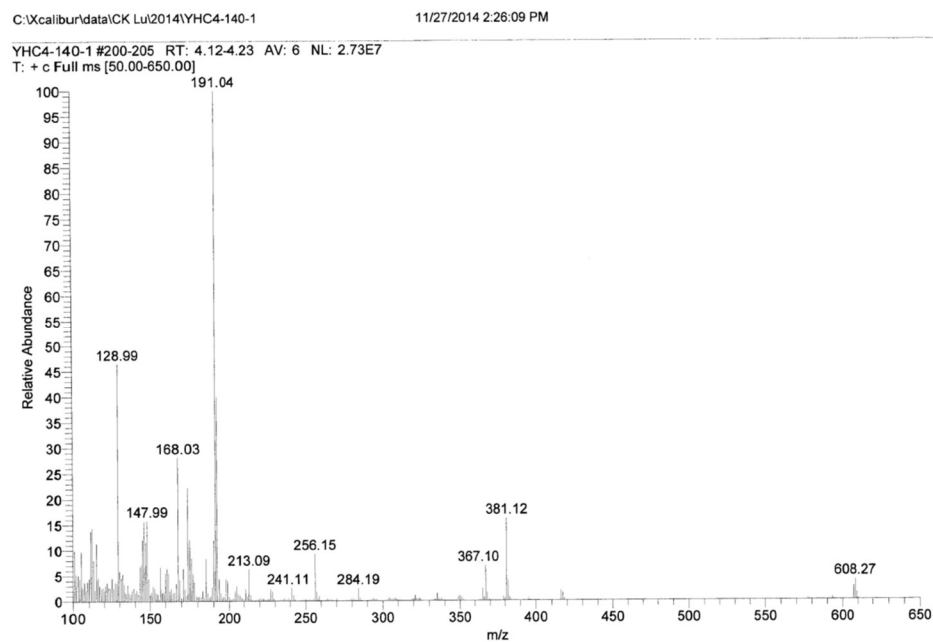
圖九、防己諾林鹼(Fangchinoline)的 ^1H NMR 圖譜

(十六) 防己諾林鹼(Fangchinoline)的 ^{13}C NMR 圖譜



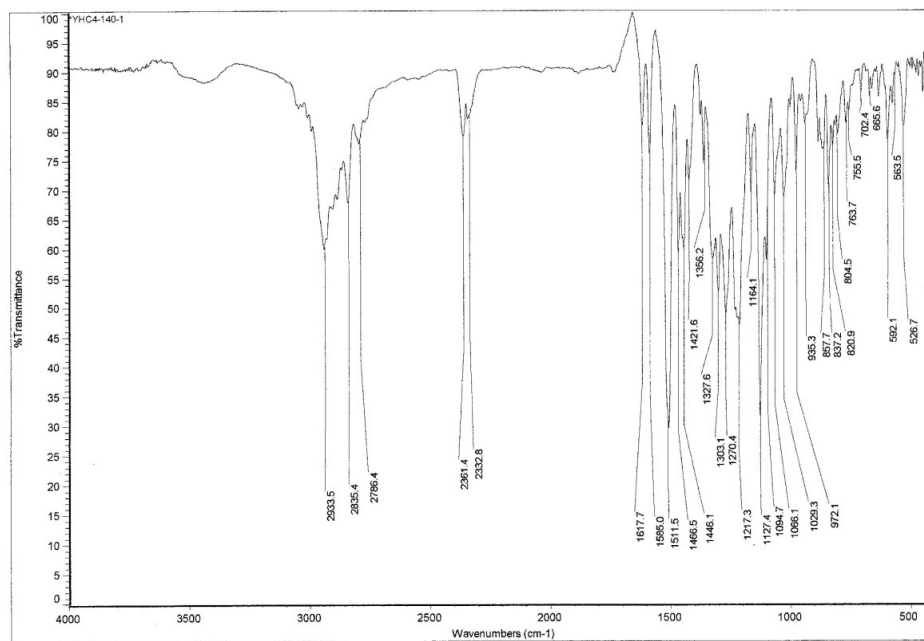
圖十、防己諾林鹼(Fangchinoline)的 ^{13}C NMR 圖譜

(十七) 防己諾林鹼(Fangchinoline)的 EI-MS 圖譜



圖十一、防己諾林鹼(Fangchinoline)的 EI-MS 圖譜

(十八) 防己諾林鹼(Fangchinoline)的 FTIR 圖譜

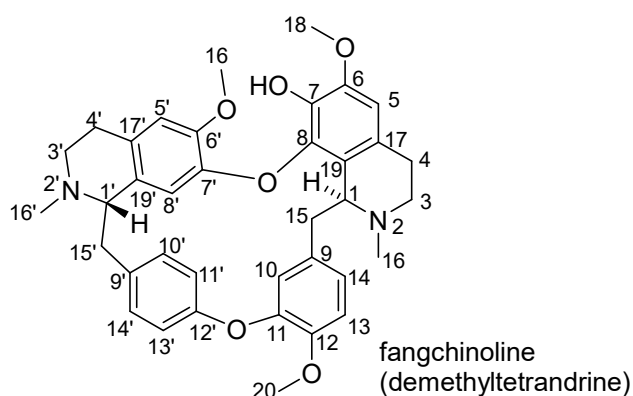


圖十二、防己諾林鹼(Fangchinoline)的 FTIR 圖譜

(十九) 防己諾林鹼(Fangchinoline)的分子式和分子量與熔點

分子式： $C_{37}H_{40}N_2O_6$ 分子量：608.29 熔點：237–239 °C(dec.)

(二十) 防己諾林鹼(Fangchinoline)化合物之氫、碳化學位移



表八 防己諾林鹼(Fangchinoline)化合物之氫、碳化學位移(DMSO-*d*₆)^a

No.	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)	No.	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	3.82 (d)	63.06	1'	3.96 (dd)	64.66
2	-	-	2'	-	-
3	2.79; 3.46	45.48	3'	2.88; 3.42	45.80
4	2.51 (dd) 2.90 (m)	23.55	4'	2.84 2.98	26.12
5	7.32 (s)	129.33	5'	6.62 (s)	113.93
6	-	150.99	6'	-	148.69
7	-	136.73	7'	-	143.83
8	-	148.60	8'	5.97 (s)	121.57
9	-	135.83	9'	-	136.55
10	6.57 (s)	116.53	10'	7.44 (dd)	131.79
11	-	150.50	11'	7.05 (dd)	122.81
12	-	145.33	12'	-	154.98
13	6.91 (d)	113.22	13'	6.77 (dd)	122.88
14	6.84 (dd)	124.32	14'	6.40 (dd)	133.82
15	2.54 (d) 2.73 (dd)	42.49	15'	2.83 3.27	37.32
16	2.60 (s)	42.44	16'	2.25 (s)	43.05
17	-	106.43	17'	-	128.36
18	3.32 (s)	56.40	18'	3.74 (s)	56.58
19	-	123.94	19'	-	129.21
20	3.88 (s)	56.75			

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

附錄 I 定量濃度及百分含量計算

用標準品的波峰面積與溶液中相應濃度($\mu\text{g/mL}$)作圖，進行線性迴歸分析得斜率與截距。按下列公式計算溶液中待測成分的濃度：

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

其中

A：待測成分濃度($\mu\text{g/mL}$)

I：檢品中待測成分之波峰面積

b：檢量線的斜率

按下列公式計算樣品中待測成分的百分含量

$$C = \frac{A \times D \times V}{1000 W} \times 100\%$$

其中

C：待測成分含量(%)

A：檢品濃度($\mu\text{g/mL}$)

D：稀釋倍數

V：定容體積(mL)

W：藥材重(mg)

防己

中文名：防己

生藥名：STEPHANIAE TETRANDRAE RADIX

英文名：Stephaniae Tetrandrae Root

基 原：本品為防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的乾燥根。秋季採挖，洗淨，除去粗皮，曬至半幹，切段，個大者再縱切，乾燥。

一、方法：

- (一) 檢品溶液 【萃取方法 1】(修改香港中藥材標準第四冊)
——取藥材粉末 1.0 g，加入 70% 乙醇 10 ml，超音波震盪 15 分鐘，過濾，加 70% 乙醇至 10 ml。
- (二) 對照標準品 取防己諾林鹼 (fangchinoline) 對照品，加甲醇製成每 1 mL 含 1 mg 的溶液，作為對照品溶液。
- (三) 薄層板 TLC silica gel 60 F₂₅₄，2 cm× 6.6 cm
HPTLC silica gel 60 F₂₅₄，10 cm× 10 cm
- (四) 展開劑 【展開劑 1】(中華人民共和國藥典 2010)
——三氯甲烷：丙酮：甲醇：5% 氨水 (6:1:1:0.1)
【展開劑 2】(自行開發)
——乙酸乙酯：甲醇：28% 氨水 (4:1:0.1)
- (五) 展開槽 20 cm× 20 cm
- (六) 展開 展開槽預先平衡 5 分鐘，上行展開。
- (七) 顯色&檢視 於紫外光 (254nm) 下檢視。

二、溶媒系統選擇：

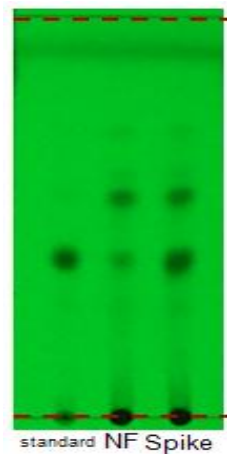
【展開劑 1】(中華人民共和國藥典 2010)——三氯甲烷：丙酮：甲醇：5%氨水
(6:1:1:0.1)

【萃取方法 1】 (修改香港中藥材標準)——TLC 紫外光(254nm)檢視



【展開劑 2】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲醇：28%氨水 (4:1:0.1)

【萃取方法 1】 (修改香港中藥材標準)——TLC 紫外光(254nm)檢視



standard：防己諾林鹼 (fangchinoline)

NF：Sample NF

Spike：Spike

以【萃取方法 1】萃取，採用自行開發之溶媒系統【展開劑 2】展開，其結果經【展開劑 1】比較：斑點 R_f 值較高，分離效果亦佳。

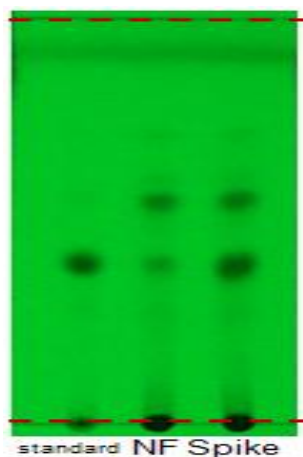
三、觀察方式選擇：

【展開劑 2】（自行開發）——乙酸乙酯：甲醇：28%氨水（4:1:0.1）

【萃取方法 1】(修改香港中藥材標準) 【萃取方法 1】(修改香港中藥材標準)

TLC 紫外光(254nm)檢出

TLC 紫外光(366nm)檢出



【萃取方法 1】(修改香港中藥材標準) 【萃取方法 1】(修改香港中藥材標準)

TLC 10%硫酸甲醇呈色/可見光檢出

TLC 10%硫酸甲醇呈色/紫外光(366nm)
檢出



standard：防己諾林鹼（fangchinoline）

NF：Sample NF

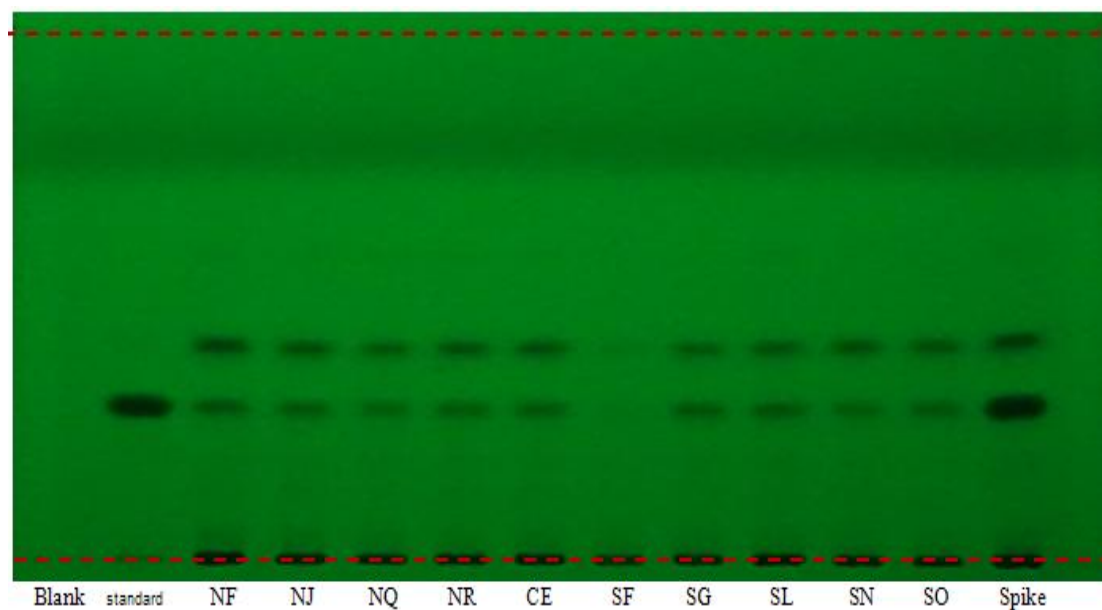
Spike：Spike

以【展開劑 2】(自行開發) 溶液展開，於紫外光（254nm）下檢出，顯示 1 個較明顯之成分主點。但經 10%硫酸甲醇呈色後在紫外光或可見光下檢出，比較未呈色成分主點顯示較不清楚，因此直接於紫外光（254nm）下檢出即可。

四、十家樣品檢測：

【展開劑 2】（自行開發）——乙酸乙酯：甲醇：28%氨水（4:1:0.1）

【萃取方法 1】（修改香港中藥材標準）——TLC 紫外光(254nm)檢出



Blank	Blank
standard	防己諾林鹼 (fangchinoline) (1 mg/mL)
NF	Sample NF
NJ	Sample NJ
NQ	Sample NQ
NR	Sample NR
CE	Sample CE
SF	Sample SF
SG	Sample SG
SL	Sample SL
SN	Sample SN
SO	Sample SO
Spike	Spike