

防風

(SAPOSHNIKOVIAE RADIX)

防風 MI	2
一、形態	2
二、顯微	2
防風 HPLC	3
一、材料	3
二、儀器及層析管柱	3
三、實驗藥品及試劑來源	3
四、方法	3
五、結果	6
防風 TLC	13
一、方法	13
二、萃法選擇及濃度測試	14
三、溶媒系統選擇	15
四、觀察方式選擇	17
五、十批樣品檢測	18

防風 MI

一、形態:

本品為繖形科 Umbelloferae 植物防風 *Saposhnikovia divaricata* (Trucz.) Schischkin.之根。根呈圓錐形或紡錘形，平直或稍彎曲，外皮表面灰棕色，粗糙，有多數縱皺紋，並有皮孔及點狀突起之細根痕。質鬆軟、體輕、易折斷。斷面不平滑，皮部淺棕色，有裂隙，木部淡黃色，髓線放射狀。氣特異、味微甘。

二、顯微

本品橫切面，木栓層由數層切線形延長的木栓細胞組成，淡黃色，壁薄、微木化。栓皮層多為類圓形之薄壁細胞組成，有多處破裂孔，散列多個分泌管，內含黃棕色滴狀物，周圍有分泌細胞圍繞。韌皮部寬大，髓線為長方形。木部廣闊，導管為孔紋導管。木部纖維呈放射狀排列，壁厚，多木化。



略字解

ep: 表皮
kl: 栓皮層
sec: 分泌細胞

cx: 皮層
mr: 髓線
v: 導管

防風 (*Saposhnikovia Radix*)

一、材料

購自於北中南各地中藥店防風藥材共 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 μ m)。

(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 (100 x 2.1 mm, 1.7 μ m)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

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

(二) 標準品

標準品購自友和。標準品升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)，純度在 98% 以上。

四、方法

(一) 對照標準品溶液

取標準品升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)精確稱定 0.6 mg，加 100% 甲醇定體積至 10 mL 製成每 1 mL 含 0.06 mg 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)。

(二) 檢品溶液

取本品粉末約 1 g，精確稱定，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入 100% 甲醇 10 mL，超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，以 125 mm No.1 濾紙過濾至 10 mL 之定量瓶中，加甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μ m)，即得。

(三) 測定法

分別精確吸取標準品溶液與檢品溶液 10 μ L，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的含量，即得。

(四) 檢量線

精確吸取升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)標準品儲備液適量 (60 $\mu\text{g/mL}$)，以 100% 甲醇溶液稀釋成含升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)分別為 30 $\mu\text{g/mL}$ 、15 $\mu\text{g/mL}$ 、7.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 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 。

(五) 精密度試驗

以升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)濃度為 30 $\mu\text{g/mL}$ 之標準品儲備液連續進樣五針，以升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)波峰面積為指標，求出相對標準差。

(六) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性:取同一家市售防風粉末，依防風檢品溶液製備方法平行製備 五份防風檢品溶液，進樣測定，以升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性:取同一家市售防風粉末，依防風檢品溶液製備方法製備防風檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的含量為指標，求出相對標準差。

(七) 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。

(八) 添加回收率試驗

取已知升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)含量的防風藥材粉末 0.2 g，精確稱定三份，分別加入 0.5 mg、1.0 mg、2 mg 的升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)，並按檢品溶液製備方法製備，每次取 10 μL 注入。

(九) HPLC 分析條件

1. 層析管：Cosmosil 5C18-AR-II (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：30 °C
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	Acetonitrile (% v/v)	H ₂ O (% v/v)
0	12	88
5	18	82
20	22	78

(十) 臺灣市售防風含量測定

取十家市售防風檢品溶液各 10 μL 注入 HPLC，每個檢測品各三重複，所得平均波峰面積依公式計算樣品升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的百分含量。

(十一) UPLC 分析條件

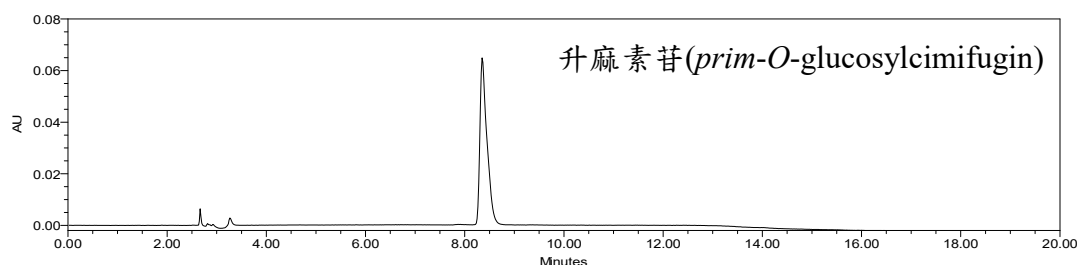
1. 層析管：Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：254 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	Acetonitrile (% v/v)	H ₂ O (% v/v)
0	12	88
1	18	82
6	22	72

五、結果

(一) 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)之 HPLC 層析

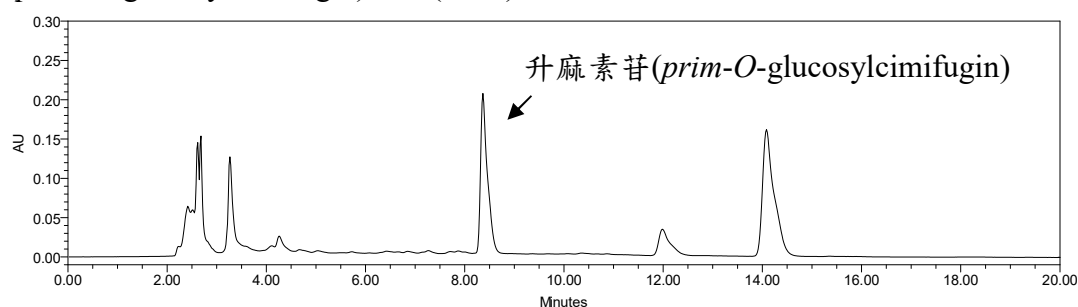
於滯留時間 8.36 分鐘處顯示升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)標準品波峰(圖一)。



圖一、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售防風檢品之 HPLC 層析

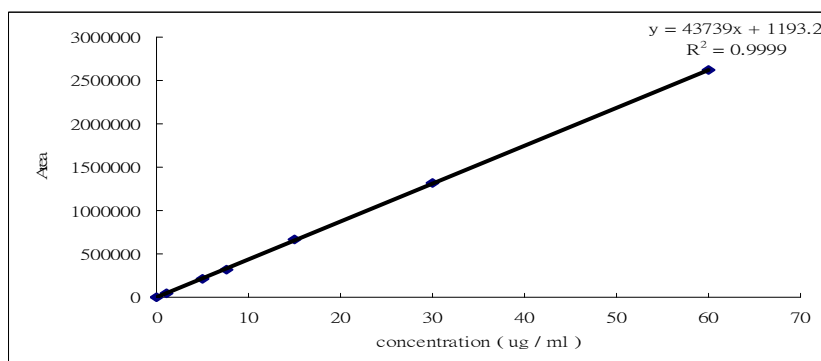
於滯留時間 8.37 分鐘處顯示防風檢品中升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)波峰(圖二)。



圖二、市售防風檢品之 HPLC 層析圖

(三) 標準品升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)檢量線

經不同濃度升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*) (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 $y = 43739x + 1193.2$, $R^2 = 0.9999$, 顯示濃度在 0.1–60 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)之檢量線圖

表一、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)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
升麻素苷 (<i>prim-O-glucosylcimifugin</i>)	0.1–60.0	$Y = 43739x + 1193.2$	0.9999

(四) 再現性與精密度試驗

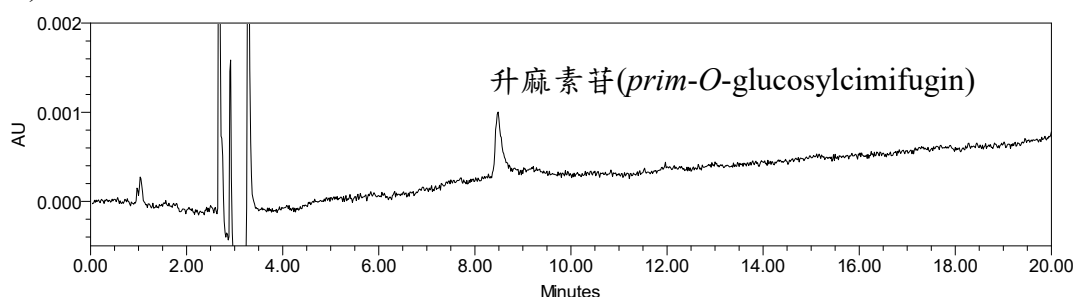
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)精密度之相對標準差為 0.25%，再現性之相對標準差為 3.23%，均在可接受的範圍以內。

(五) 穩定性試驗

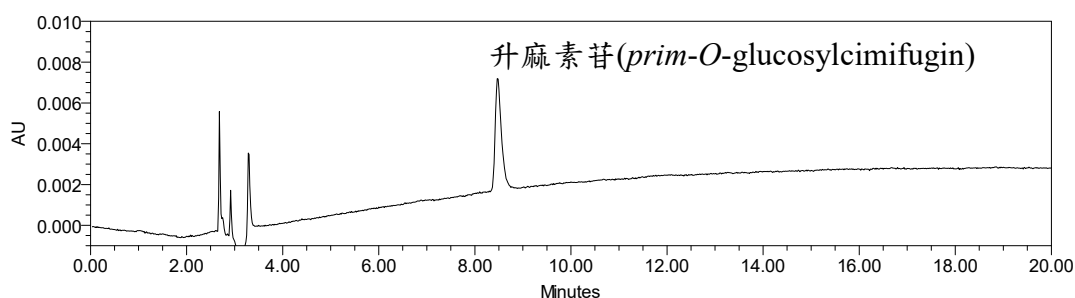
由結果可以得知，升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)在 24 小時內穩定，相對標準差為 3.09%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(六) 偵測極限與定量極限試驗

升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)偵測極限(Limit of Detection, LOD)為 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)為 1 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)LOD 層析圖



圖五、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)之 LOQ 層析圖

表二、各項檢驗分析

檢測項目	升 麻 素 苷 (<i>prim-O-glucosylcimifugin</i>)	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	30 µg/mL	0.25
再現性 (n=5)	檢品溶液 (No.3)	3.23
穩定性 (n=6)	檢品溶液 (No.3)	3.09
偵測極限 (n=1)	0.05 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	1 µg/mL	-

(七) 回收率試驗

升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)平均回收率 101.07%，相對標準偏差 3.58%。

表三、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)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(%)	RSD(%)
1	0.2	0.1030	0.50	0.6008	99.56	101.07	3.58
2	0.2	0.1030	1.00	1.1550	105.20		
3	0.2	0.1030	2.00	2.0720	98.45		

(八) 臺灣市售升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)含量測定

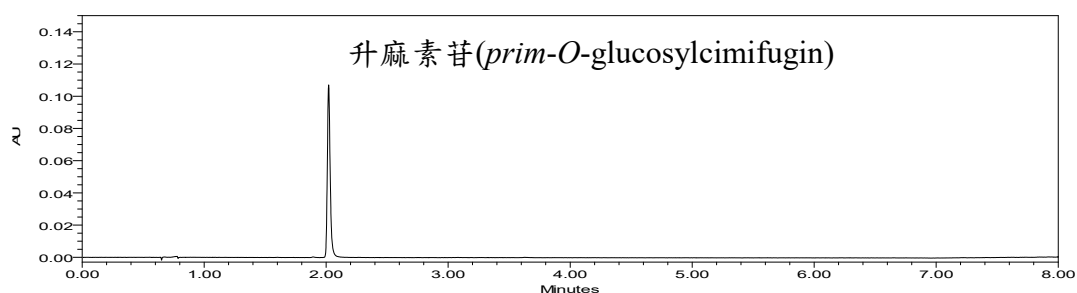
10 家防風藥材之含量測定結果(乾燥品)，藥材中升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的含量為 0.044–0.156%。

表四、臺灣市售防風檢品之升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)含量

中藥店編號 (No.)	升麻素苷 (<i>prim-O-glucosylcimifugin</i>) 含量(%)	中藥店編號 (No.)	升麻素苷 (<i>prim-O-glucosylcimifugin</i>) 含量(%)
1	0.044	6	0.065
2	0.056	7	0.066
3	0.066	8	0.156
4	0.047	9	0.049
5	0.096	10	0.101

(九) 標準品升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)之 UPLC 層析

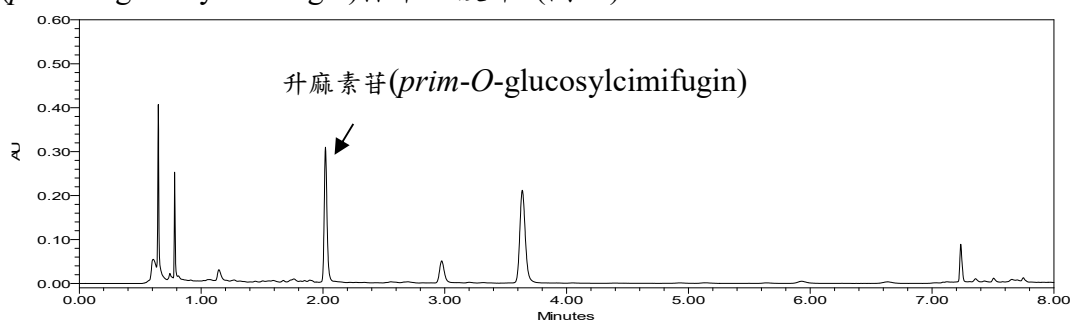
於滯留時間 2.02 分鐘處顯示升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)標準品波峰 (圖六)。



圖六、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十) 市售防風檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.02 分鐘處顯示市售防風檢品中升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)標準品波峰 (圖七)。

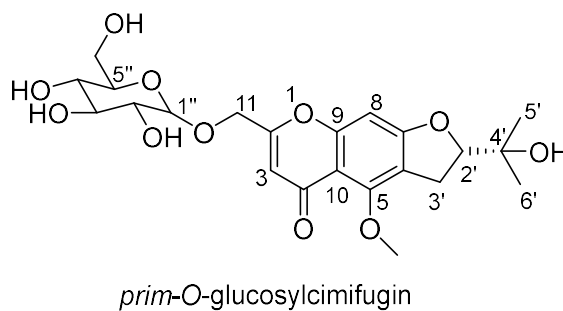


圖七、市售防風檢品之 UPLC 層析圖

(十一) 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的分子式、分子量與熔點

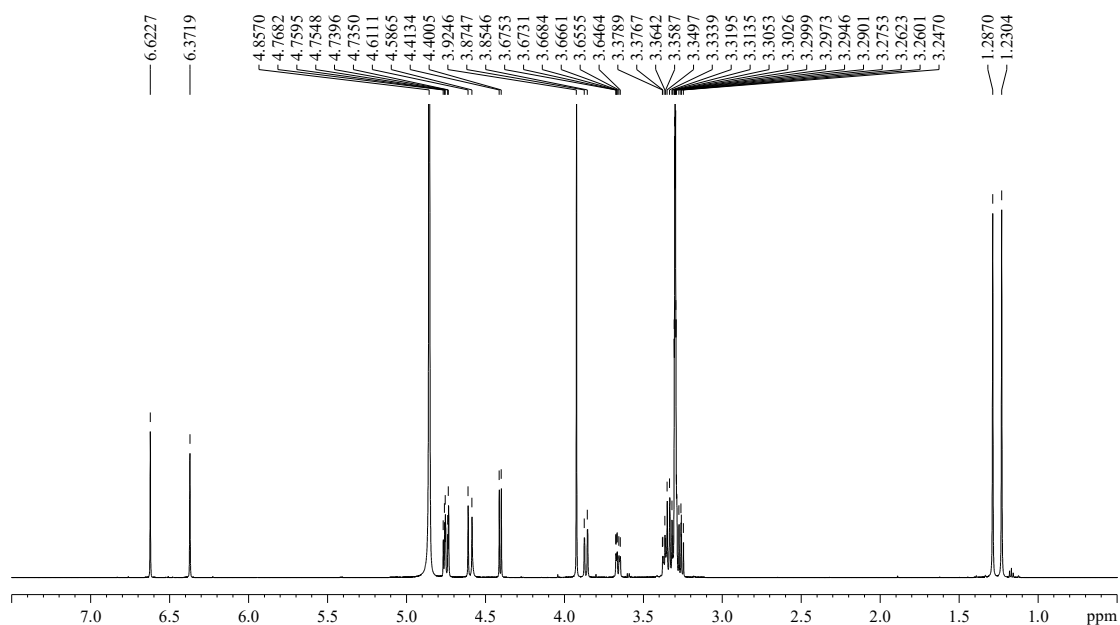
分子式: $C_{22}H_{28}O_{11}$ Mol. Wt.: 468 mp: 132–133°C

(十二) 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的結構



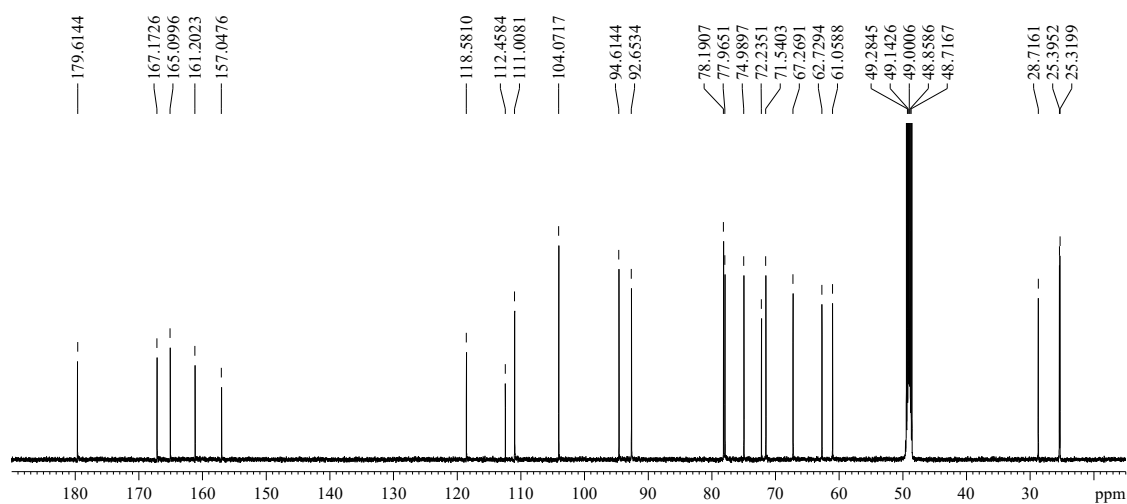
圖八、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的結構

(十三) 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的 ^1H NMR 圖譜



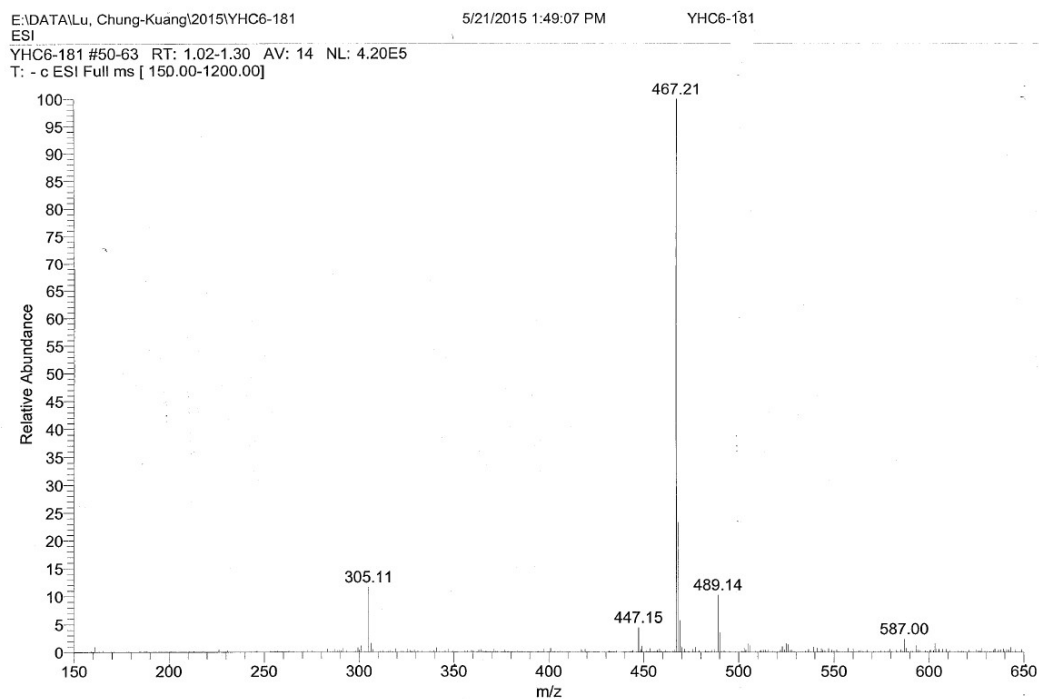
圖九、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的 ^1H NMR 圖譜(CD_3OD)

(十四) 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的 ^{13}C NMR 圖譜



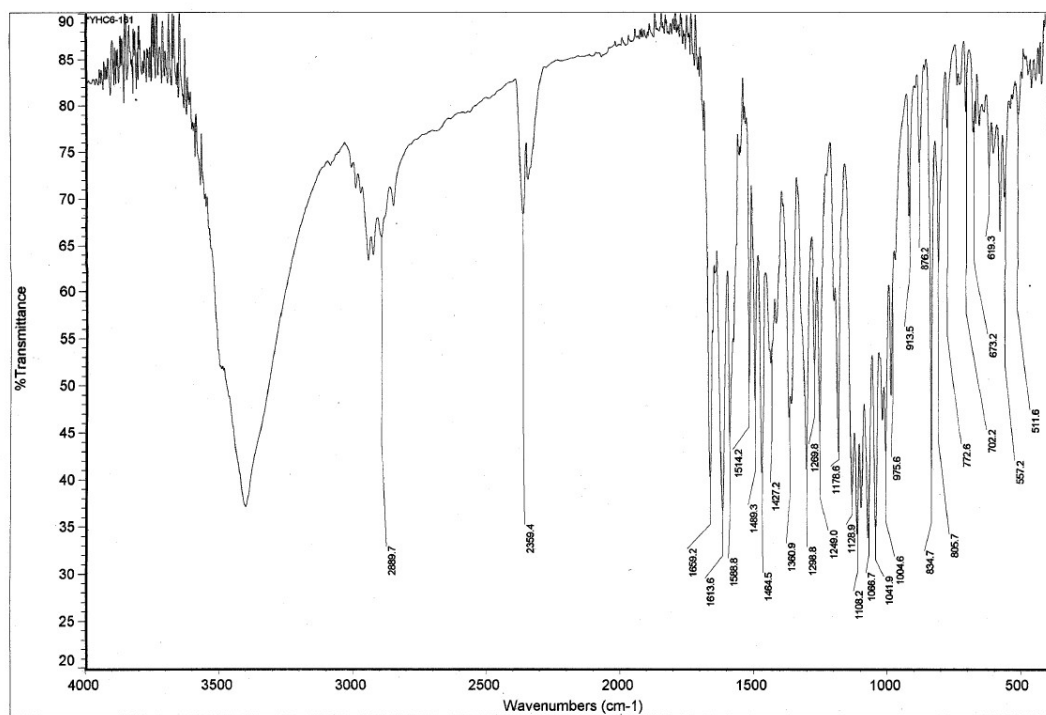
圖十、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的 ^{13}C NMR 圖譜(CD_3OD)

(十五) 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的 ESI-MS 圖譜



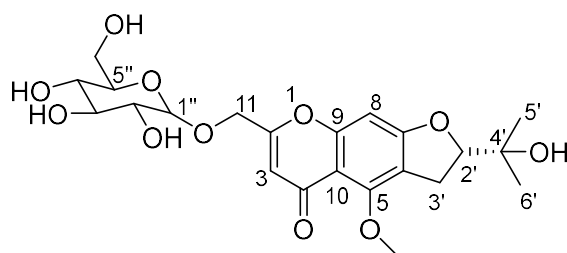
圖十一、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的 ESI-MS 圖譜

(十六) 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的 FTIR 圖譜



圖十二、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的 FTIR 圖譜

(十七) 升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)的氫、碳化學位移



prim-O-glucosylcimifugin

表五、升麻素苷(*prim-O-glucosylcimifugin*)氫、碳化學位移(CD₃OD)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	-	-
2	-	161.2
3	6.37 (s)	111.0
4	-	179.6
5	-	165.1
6	-	118.6
7	-	161.2
8	6.62 (s)	94.6
9	-	157.0
10	-	112.5
11	4.60 (d, 15.0) 4.75 (d, 15.0)	67.3
1'	-	-
2'	4.75 (dd, 9.1, 8.0)	92.7
3'	3.34 (m)	28.7
4'	-	72.2
5'	1.23 (s)	25.3
6'	1.29 (s)	25.4
1''	4.41 (d)	104.1
2''	3.26 (m)	75.0
3''	3.30 (m)	78.2
4''	3.29 (m)	71.5
5''	3.36 (m)	78.0
6''	3.66 (ddd, 12.1, 4.0, 1.2) 3.86 (d, 12.1)	62.7
5-OMe	3.92 (s)	61.1

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

防風

生藥名：SAPOSHNIKOVIAE RADIX

英文名：Saposhnikovia Root

基 原：本品為繖形科 Umbelliferae 植物防風 *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.之乾燥根。習稱「關防風」。

一、方法

- (一) 檢品溶液 **【萃取方法 1】(臺灣中藥典第二版 2013)**
——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 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】(修飾中華人民共和國藥典 2015) ✓
——取本品粉末 1.0 g，加丙酮 20 mL，超音波振盪 30 分鐘，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 3】(香港中藥材標準第二冊)
——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 20 mL，超音波振盪 30 分鐘，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。
- (二) 對照標準品
溶 液 取升麻素苷(Prim-O-glucosylcimifugin) 及 5-O-甲基維斯阿米醇苷(5-O-Methylvisammioside)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】(臺灣中藥典第二版 2013) ✓**
——乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)
【展開劑 2】(修飾中華人民共和國藥典 2015；香港中藥材標準第二冊)
——二氯甲烷：甲醇 (4：1)
【展開劑 3】(自行開發)
——乙酸乙酯：甲醇 (3：1)
- (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 於主波長 254 nm 之紫外燈照射下檢視。

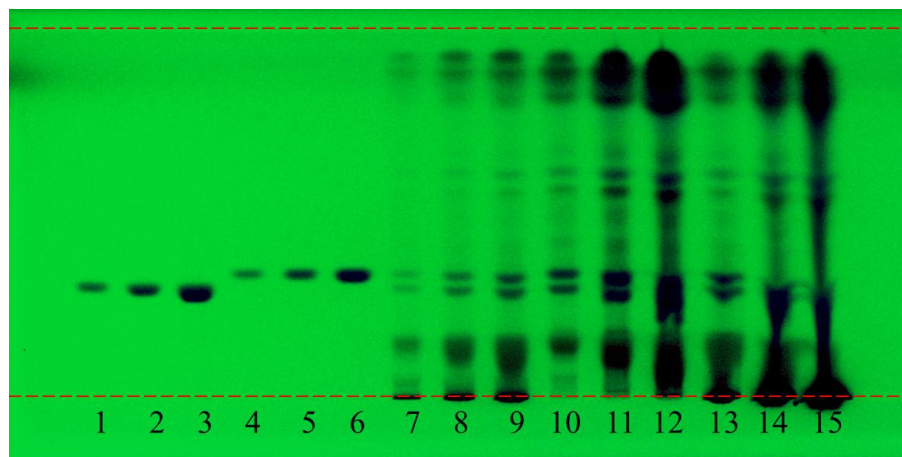
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：107/07/02

相對溼度(RH)：55%

溫度(RT)：26 °C

【展開劑 1】 (臺灣中藥典第二版 2013)——乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	升麻素苷(1.0 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	5-O-甲基維斯阿米醇苷(1.0 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 7【萃取方法 1】	2, 5, 8 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 7【萃取方法 2】	2, 5, 8 μ L
13, 14, 15	檢品溶液 7【萃取方法 3】	2, 5, 8 μ L

建議萃法：3 種萃法之檢品溶液中皆有分離與檢出標準品升麻素苷及 5-O-甲基維斯阿米醇苷，而由於指標成分條帶顯示較清楚，且無拖尾現象，故選擇【萃取方法 2】。

建議點注量：升麻素苷標準品溶液 1 μ L，5-O-甲基維斯阿米醇苷標準品溶液 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 2】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

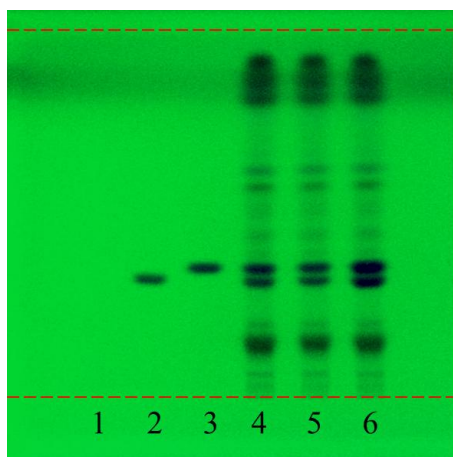
實驗日期：107/07/03

相對溼度(RH)：59%

溫度(RT)：24 °C

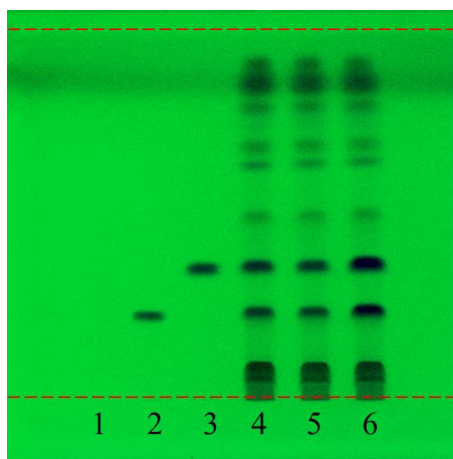
【展開劑 1】 (臺灣中藥典第二版 2013) —— 乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)

【萃取方法 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015) —— HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(升麻素苷 R_f 值為 0.32，5-*O*-甲基維斯阿米醇苷 R_f 值為 0.35)



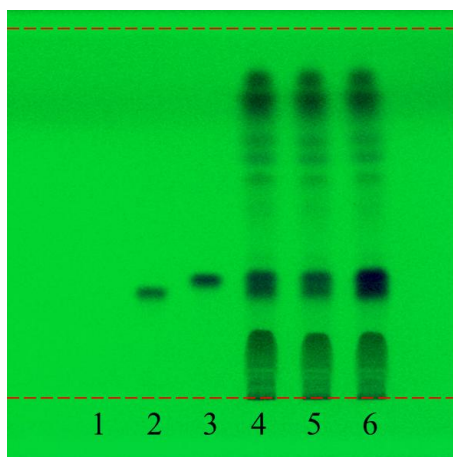
【展開劑 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015；香港中藥材標準第二冊) —— 二氯甲烷：甲醇 (4：1)

【萃取方法 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015) —— HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(升麻素苷 R_f 值為 0.22，5-*O*-甲基維斯阿米醇苷 R_f 值為 0.35)



【展開劑 3】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲醇 (3：1)

【萃取方法 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015) —— HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(升麻素苷 R_f 值為 0.28，5-*O*-甲基維斯阿米醇苷 R_f 值為 0.32)



1：Blank

2：升麻素苷

3：5-*O*-甲基維斯阿米醇苷

4，5：檢品溶液 7

6：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 2】方式，3 種展開劑展開皆可從檢品溶液中分離與檢出升麻素苷及 5-*O*-甲基維斯阿米醇苷，而由於條帶顯示較多，且支持臺灣藥典方法，採用臺灣中藥典第二版 2013 之【展開劑 1】。

四、觀察方式選擇

實驗日期：107/07/03

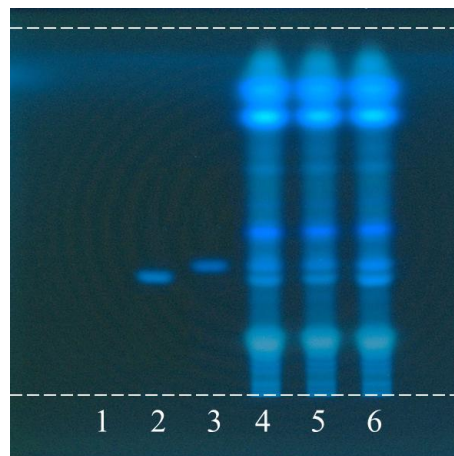
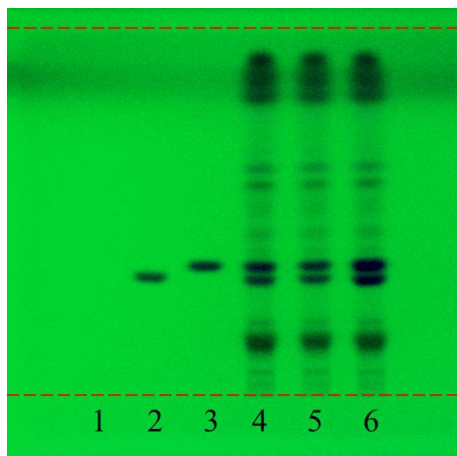
相對溼度(RH)：59%

溫度(RT)：24 °C

【展開劑 1】 (臺灣中藥典第二版 2013) — 乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)

【萃取方法 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015) — HPTLC 紫外光(254 nm) 檢出✓

【萃取方法 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015) — HPTLC 紫外光(365 nm) 檢出



1：Blank

2：升麻素苷

3：5-O-甲基維斯阿米醇苷

4，5：檢品溶液 7

6：Spike

建議觀察方式：於紫外光(254 nm)下顯示出較紫外光(365 nm)有明顯之升麻素苷及 5-O-甲基維斯阿米醇苷標準品斑點。

五、十批樣品檢測

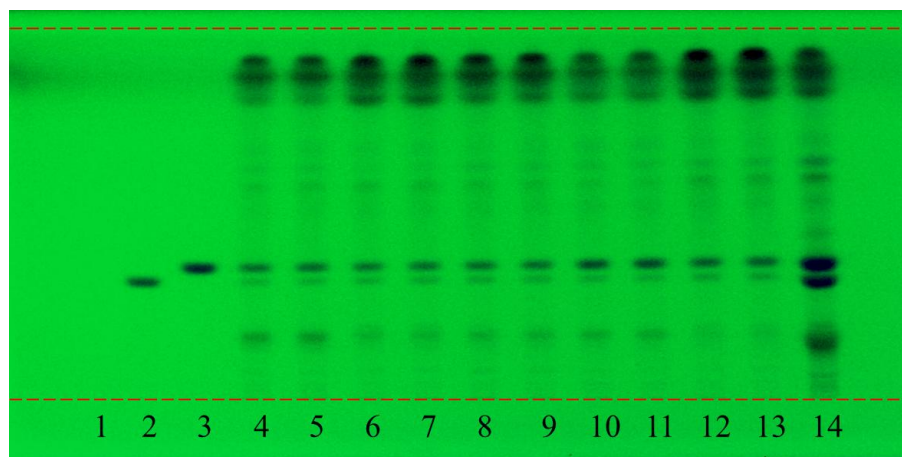
實驗日期：107/07/04

相對溼度(RH)：49%

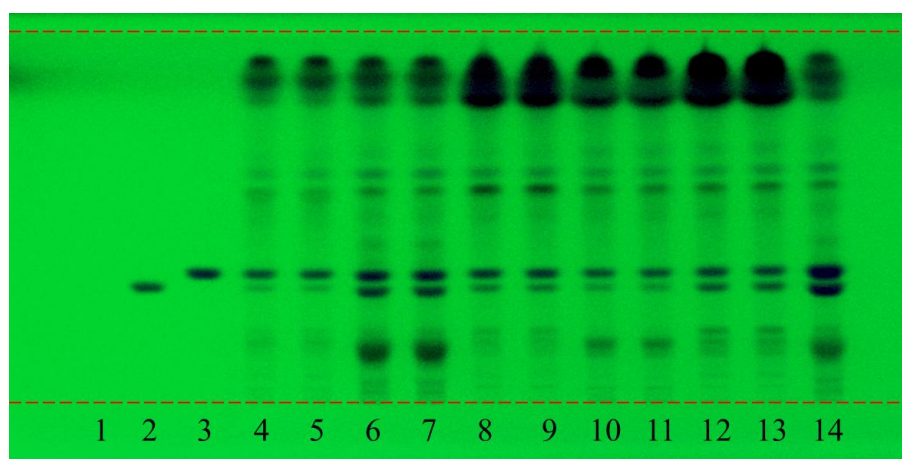
溫度(RT)：27 °C

【展開劑 1】 (臺灣中藥典第二版 2013) —— 乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)

【萃取方法 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015) —— HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



1	Blank
2	升麻素苷(1.0 mg/mL)
3	5-O-甲基維斯阿米醇苷(1.0 mg/mL)
4，5	檢品溶液 1 (NF)
6，7	檢品溶液 2 (NJ)
8，9	檢品溶液 3 (NN)
10，11	檢品溶液 4 (NR)
12，13	檢品溶液 5 (CE)
14	Spike (檢品溶液 7)



1	Blank
2	升麻素苷(1.0 mg/mL)
3	5-O-甲基維斯阿米醇苷(1.0 mg/mL)
4，5	檢品溶液 6 (SC)
6，7	檢品溶液 7 (SE)
8，9	檢品溶液 8 (SH)
10，11	檢品溶液 9 (SJ)
12，13	檢品溶液 10 (SL)
14	Spike (檢品溶液 7)

結論與建議：以修飾中華人民共和國藥典 2015 之【萃取方法 2】方式，並以臺灣中藥典第二版 2013 之【展開劑 1】分離與檢出升麻素苷及 5-O-甲基維斯阿米醇苷即可，於紫外光(254 nm)下檢視較佳。