

狗脊

(CIBOTII RHIZOMA)

狗脊 MI	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)	3
狗脊 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
狗脊 TLC (藥材)	21
一、方法	21
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	27
五、十批狗脊藥材樣品檢測	28

狗脊（目錄續）

狗脊 HPLC（飲片）	30
一、材料	30
二、儀器及層析管柱	30
三、實驗藥品及試劑來源	30
四、方法	30
五、結果	33
狗脊 TLC（飲片）	37
一、方法	37
二、萃法選擇及濃度測試	39
三、溶媒系統選擇	40
四、觀察方式選擇	43
五、十批狗脊飲片樣品檢測	44

狗脊 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金毛狗脊的乾燥根莖。

二、藥材性狀描述(圖 1)

藥材名：狗脊

生藥名：CIBOTII RHIZOMA

英文名：East Asian Tree Fern Rhizome

基原：本品為蚌殼蕨科 Dicksoniaceae 植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J.Sm.之乾燥根莖。

採收加工：秋、冬二季採挖，除去泥沙，乾燥；或去硬根、葉柄及絨毛，切厚片，曬乾，為「生狗脊片」；蒸後曬至近乾，切厚片，乾燥，為「熟狗脊片」。

藥材性狀：本品為不規則厚塊。表面呈棕色，被金黃色長柔毛。質堅硬，不易折斷，無臭，味微澀。

飲片性狀：本品已切成直徑約 3~8 cm、厚度 0.2~0.5 cm 的縱切片或斜切厚片，生狗脊片呈不規則長圓形，切面淺棕色，較平滑，近邊緣處有一條棕黃色凸起木質部環紋或條紋，近邊緣不整齊，偶有金黃色絨毛殘留及縱溝紋，質脆，易折斷，有粉性。熟狗脊片切面黑棕色，質堅硬，其他與生者相同。氣無，味淡。

生長分佈：多年生大型蕨類植物，高 2.5~3.0 m。喜溫暖、潮濕、陰蔽的環境，畏嚴寒，忌直射光照射。生於山腳溝邊或林下陰處酸性土壤。藥材主產於四川、福建、浙江；廣西、廣東、貴州、江西、湖北等地亦產。

三、藥材組織顯微鑑別(圖 2)

1. 表皮細胞 1~3 列，外殘存多數金黃色非腺毛。
2. 表皮內為棕黃色厚壁細胞 10 餘列。
3. 維管束為外韌型維管束，管狀中心柱，木質部排列成環，由管胞組成，其內外均有韌皮部及內皮層。
4. 皮層和髓皆由薄壁細胞組成，呈類圓形或不規則形，排列疏鬆，內含澱粉粒，有的含黃棕色色素塊。

四、藥材粉末顯微鑑別(圖 3)

1. 本品粉末深棕褐色。
2. 非腺毛金黃色或黃棕色，直徑 18~98 μm ，末端細胞漸尖，壁稍厚；中

部細胞壁薄，具篩網狀壁孔。

3. 厚壁細胞黃棕色，壁厚，壁孔明顯。
4. 內皮層細胞黃色至黃棕色，類方形或多角形，壁稍厚，微波狀彎曲。
5. 導管為階紋導管，直徑 30~98 μm 。
6. 澱粉粒極多，單粒卵形或橢圓形，直徑 6~53 μm ，臍點點狀、裂縫狀、人字形或 Y 字形，大粒者可見層紋；複粒少數，由 2~4 分粒組成。偏光顯微鏡下呈黑十字或 Y 字。
7. 糊化澱粉塊可見於熟狗脊中。



圖 1A 狗脊藥材圖



圖 1B 生狗脊飲片藥材圖



圖 1C 熟狗脊飲片藥材圖

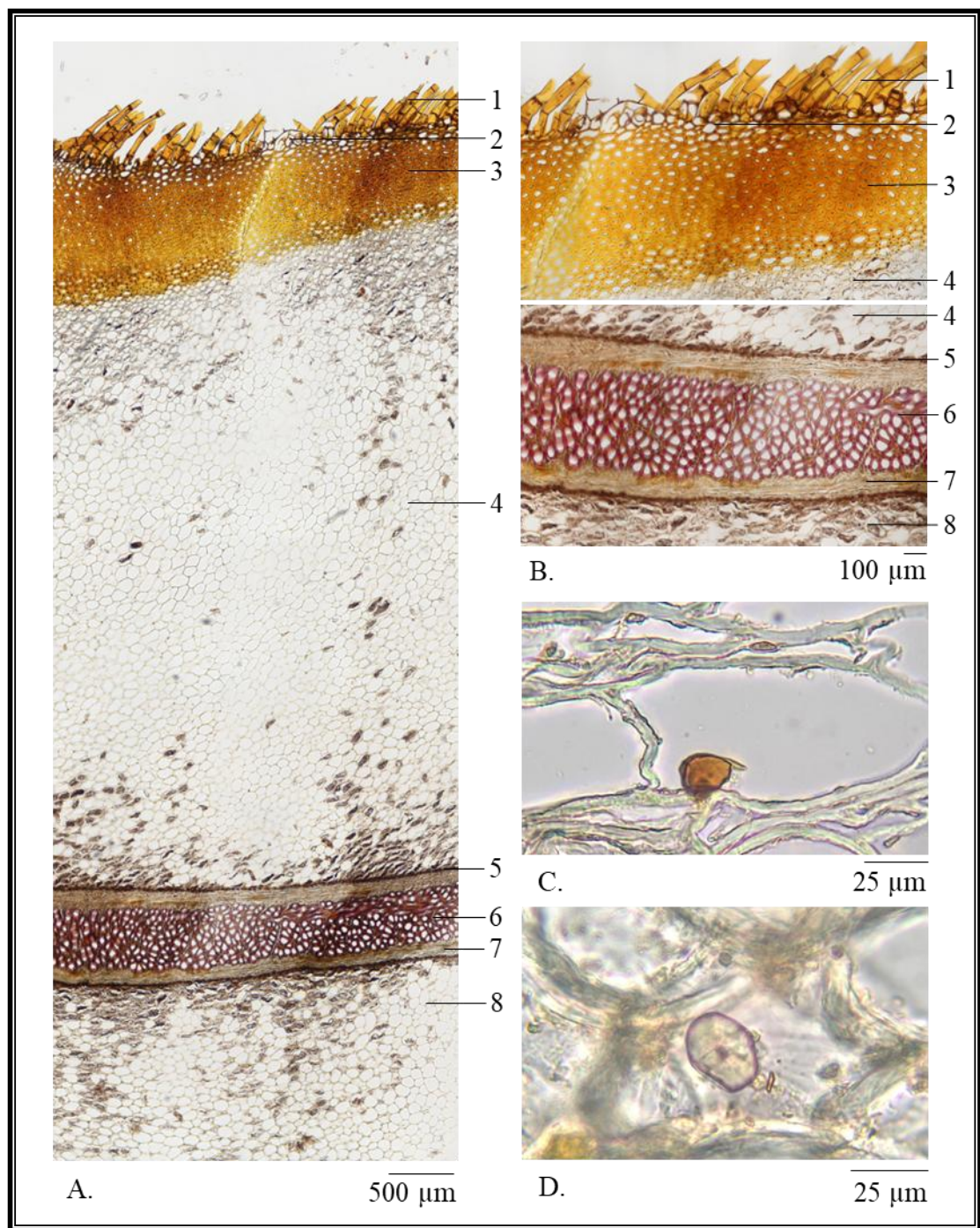


圖 2 熟狗脊橫切面顯微特徵圖

A.橫切面 B.橫切面放大圖 C.色素塊 D.澱粉粒

1.非腺毛 2.表皮 3.厚壁組織 4.皮層 5.內皮層 6.木質部 7.韌皮部 8.髓

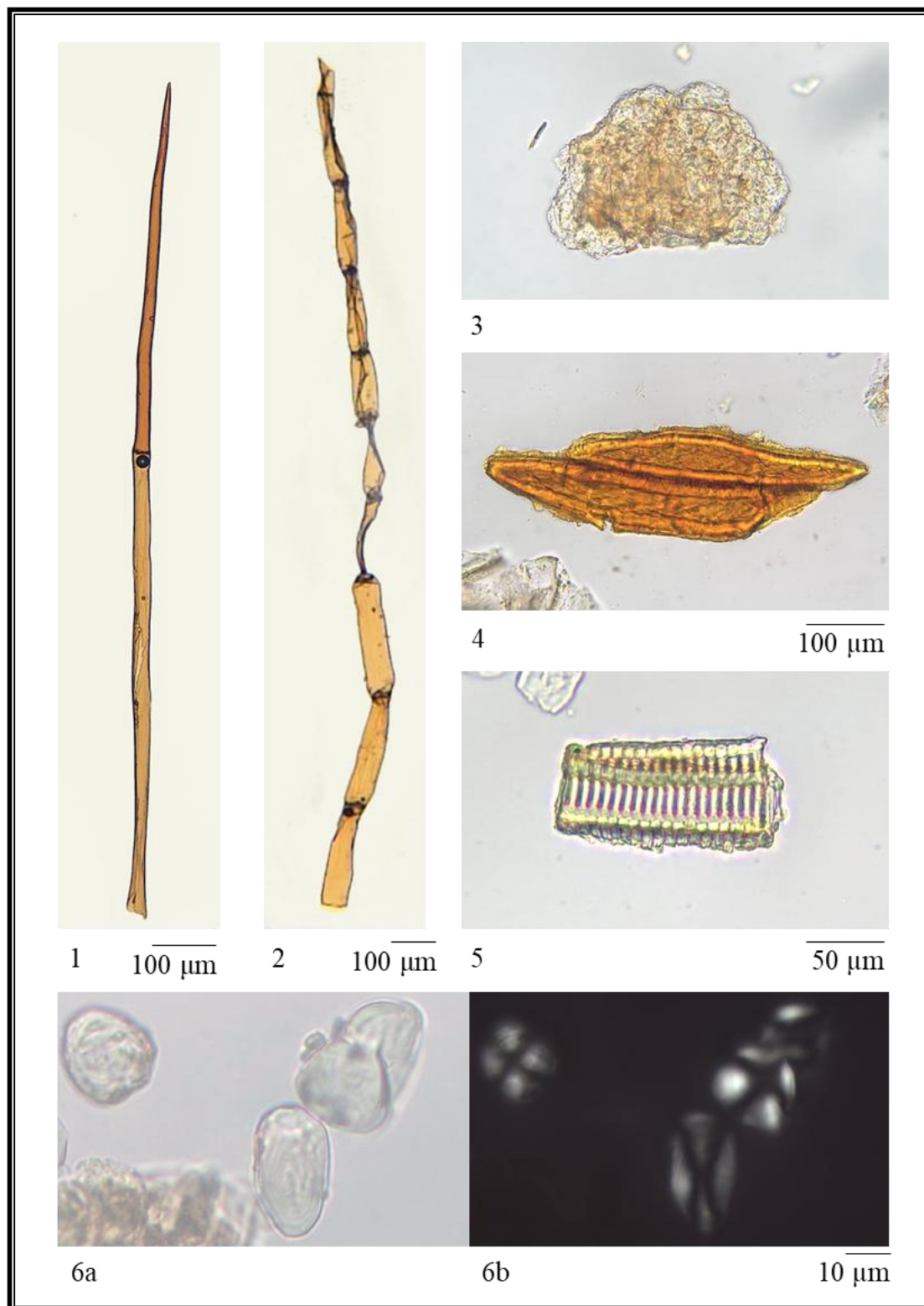


圖 3 熟狗脊粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 非腺毛(末端) 2. 非腺毛(基部) 3. 糊化澱粉塊(熟狗脊) 4. 厚壁細胞
5. 階紋導管 6. 澱粉粒

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。176~177頁。
2. 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(2020)。香港中藥材標準第五冊。香港：香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部。82~90頁。
3. 國家藥典委員會(2020)。中華人民共和國藥典 2020 版。北京：中國醫藥科技出版社。235 頁。
4. 行政院衛生署中醫藥委員會(1999)。中藥材品質管制-組織形態學鑑定。臺北市：衛生署中醫藥會。329~330 頁。
5. 中國科學院中國植物誌編輯委員會(1959)。中國植物誌第二卷。北京：科學出版社。197 頁。
6. 黃璐琦主編(2020)。新編中國藥材學第五卷。北京：中國醫藥科技出版社。236~240 頁。
7. 肖培根主編(2002)。新編中藥志第一卷。北京：化學工業出版社。611~614 頁。
8. 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。231~233 頁。

狗脊(CIBOTH RHIZOMA)

一、材料

購置於臺灣各地中藥店狗脊藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Waters 2695 Separation Module，包含 Waters 2998、Photodiode Array Detector；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 × 2.1 mm, 1.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

甲醇(HPLC grade)購置於永定科技有限公司。

(二) 標準品

原兒茶酸(Protocatechuic acid)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 7 份，每份準確稱取約 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、50%乙醇、甲醇：1%無水乙酸溶液(70：30)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 5000 × g)，以 No.1 濾紙過濾，取濾液移入 10 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原兒茶酸最大波峰面積為最佳狗脊藥材萃取溶媒。

(二) 最佳萃取次數評估

準確稱取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g，置 50 mL 離心管中，準確加入甲醇 25 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz)60 分鐘，離心 10 分鐘(約 5000 × g)，以 No.1 濾紙過濾，取濾液移入 25 mL 之容量瓶中，加甲醇至刻度，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，直到原兒茶酸被萃取完全，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原兒茶酸 1.0 mg，加 2 mL 甲醇製成每 1 mL 含原兒茶酸 500 µg/mL 的對照標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 5.0 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，準確加入甲醇 25 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 60 分鐘，離心 10 分鐘(約 5000 × 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，移入至 50 mL 之容量瓶中加甲醇至刻度，搖勻再過濾(syringe filter, PTFE 0.45 µm)，即得。

(五) 測定法

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原兒茶酸的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取原兒茶酸對照標準品儲備溶液(500 µg/mL)適量，以甲醇稀釋成含原兒茶酸分別為 100、50、20、10、5.0、2.0 µg/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

以原兒茶酸濃度為 5.0 µg/mL 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以原兒茶酸的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性：取同一批市售狗脊藥材粉末，依狗脊檢品溶液製備方法平行製備五份狗脊藥材檢品溶液，進樣測定，以原兒茶酸的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售狗脊藥材粉末，依狗脊檢品溶液製備方法製備狗脊藥材檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以原兒茶酸的波峰面積為指標，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 $\geq 3:1$ 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 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(十) 添加回收率試驗

取已知原兒茶酸含量的狗脊藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 0.25 g，分別加入 1 mL 的原兒茶酸溶液(30 $\mu\text{g/mL}$)，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：COSMOSIL5C₁₈-AR-II C18 Column (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：260 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)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	13	87
20	13	87

(十二) 臺灣市售狗脊藥材含量測定

取 10 批市售狗脊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 公式計算樣品原兒茶酸的百分比含量。

(十三) 狗脊藥材檢品之 UPLC 層析條件

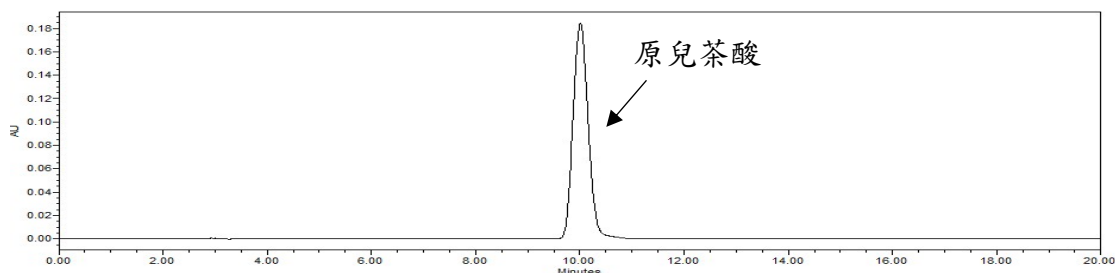
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC[®] BEH C18 Column (100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：260 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	13	87
10	13	87

五、結果

(一) 對照標準品原兒茶酸之 HPLC 層析

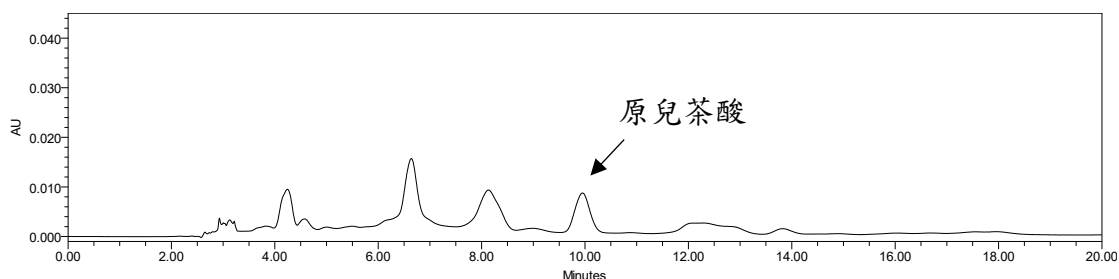
於滯留時間 9.96 分鐘處顯示原兒茶酸對照標準品波峰(圖一)。



圖一、原兒茶酸對照標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售狗脊藥材檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 9.96 分鐘顯示狗脊檢品中原兒茶酸的波峰，(圖二)。原兒茶酸之分離率(R)為 2.8，托尾因子(T)為 1.05，均在系統適用性要求內。



圖二、市售狗脊藥材檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取溶媒評估

以甲醇為溶媒時，每克藥材重量所得原兒茶酸的波峰面積最大，顯示甲醇溶液為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	原兒茶酸波峰面積	最佳萃取
甲醇	313280	√
75% 甲醇	300302	
50% 甲醇	159897	
乙醇	237788	
75% 乙醇	267467	
50% 乙醇	234288	
甲醇：1%無水乙酸溶液(70：30)	312201	

(四) 最佳萃取次數評估

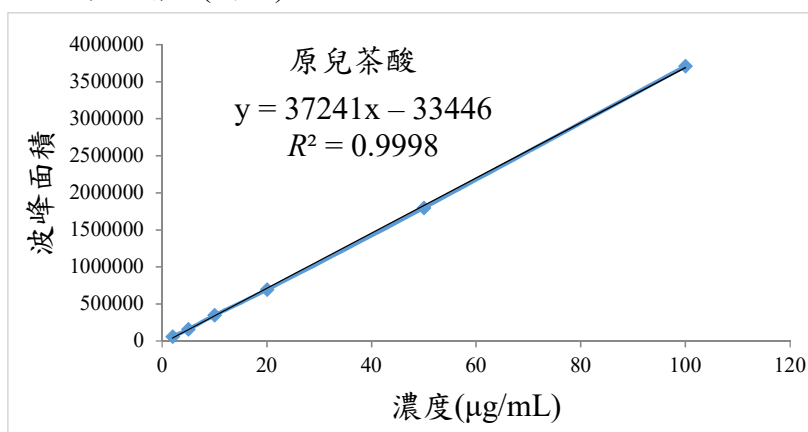
結果顯示萃取 2 次基本上已將原兒茶酸萃取完全(萃取率大於 98%)。

表二、狗脊藥材檢品萃取次數評估

甲醇	原兒茶酸波峰面積
第 1 次	313280
第 2 次	25085
第 3 次	N.D.

(五) 標準品原兒茶酸之檢量線

經不同濃度原兒茶酸(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 $y = 37241x - 33446$ ， $R^2 = 0.9998$ ，顯示濃度在 2.0–100 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、標準品原兒茶酸之檢量線圖

表三、原兒茶酸之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
原兒茶酸	2.0–100	$y = 37241x - 33446$	0.9998

(六) 精密度試驗

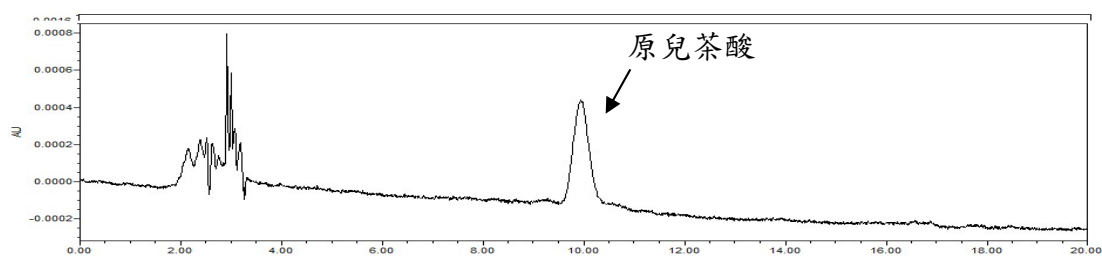
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，原兒茶酸精密度之相對標準差為 0.89 %，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

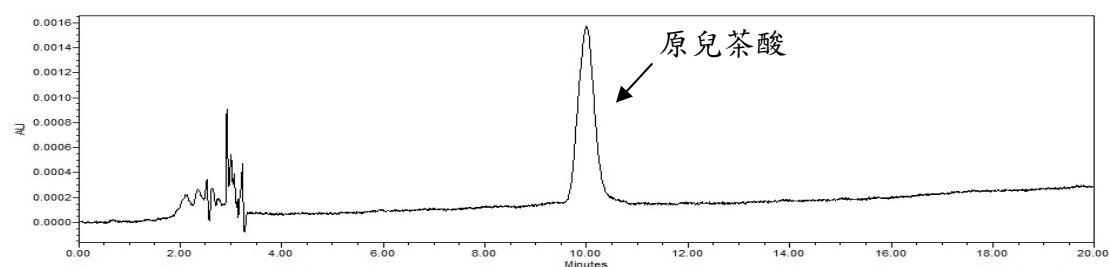
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，原兒茶酸重複性之相對標準差為 1.54 %，在系統適用性要求內。原兒茶酸在 24 小時內穩定，原兒茶酸穩定性之相對標準差為 0.58%，變化差異小，若所有樣品分析都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

原兒茶酸偵測極限為 0.2 µg/mL(圖四)，定量極限為 0.5 µg/mL(圖五)。



圖四、原兒茶酸之偵測極限層析圖



圖五、原兒茶酸之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	原兒茶酸	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	5.0 µg/mL	0.89
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.1)	1.54
穩定性 (n=5)	檢品溶液(No.1)	0.58
偵測極限 (n=1)	0.2 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	0.5 µg/mL	-

(九) 添加回收率試驗

原兒茶酸平均添加回收率為 97.2%，相對標準偏差為 1.94 % (表五)。

表五、原兒茶酸添加回收率

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	0.5002	0.0682	0.03	0.0977	98.3	97.20	1.94
2	0.5001	0.0682	0.03	0.0967	95.0		
3	0.5004	0.0682	0.03	0.0980	99.3		
4	0.4999	0.0681	0.03	0.0968	95.4		
5	0.5001	0.0682	0.03	0.0976	98.1		

(十) 臺灣市售狗脊藥材含量測定

10 批狗脊藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，原兒茶酸含量為 0.026–0.04%。建議狗脊藥材指標成分原兒茶酸的含量不得少於 0.02%。理論板數按原兒茶酸波峰計算均應不低於 3000 (實際值為 5384)。

表六、臺灣市售狗脊藥材檢品之原兒茶酸含量

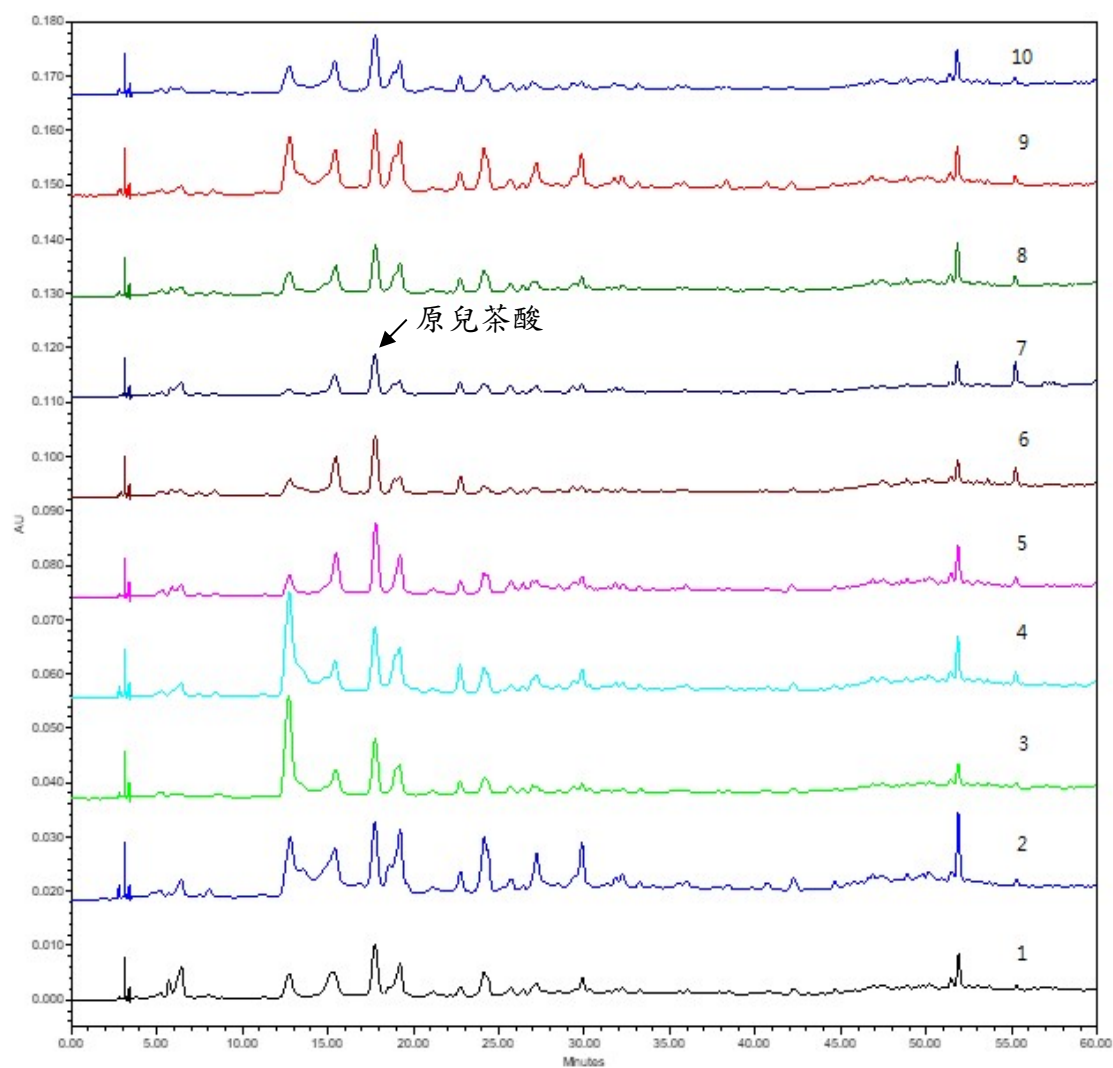
藥材編號(No.)	原兒茶酸含量(%)
1 (CA)	0.030
2 (CH)	0.040
3 (NF)	0.031
4 (NJ)	0.035
5 (NX)	0.035
6 (SGA)	0.034
7 (SGB)	0.026
8 (SGC)	0.026
9 (SUA)	0.032
10 (SUB)	0.033
平均值±S.D.	0.032±0.004

(十一) 狗脊藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售狗脊藥材檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：COSMOSIL5C₁₈-AR-II C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：260 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：

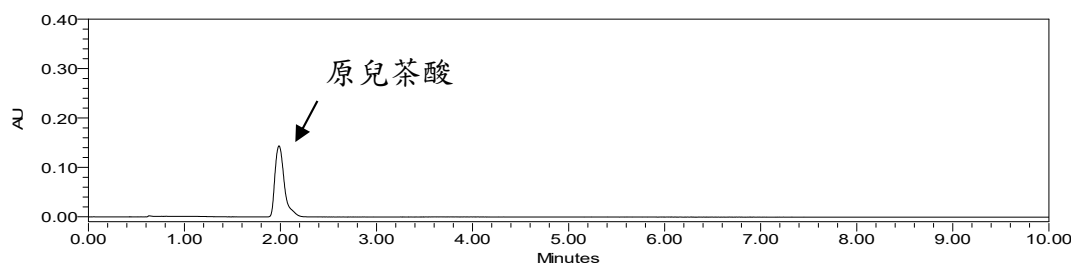
時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	5	95
10	5	95
25	20	80
40	30	70
60	70	30



圖六、10 批狗脊藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 對照標準品原兒茶酸之 UPLC 層析

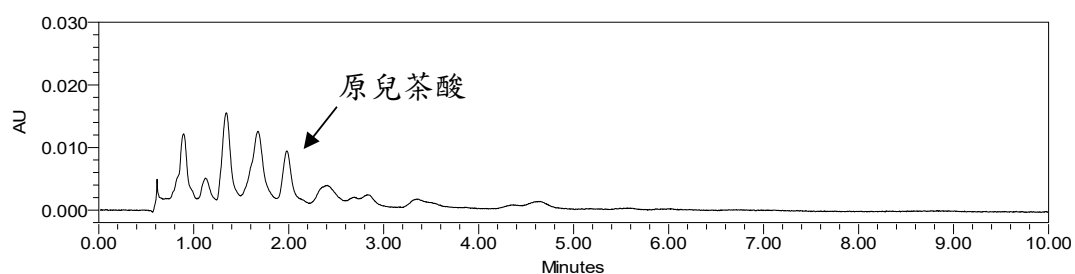
於滯留時間 1.98 分鐘顯示原兒茶酸對照標準品的波峰(圖七)。



圖七、原兒茶酸對照標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售狗脊藥材檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 1.98 分鐘顯示狗脊藥材檢品中原兒茶酸的波峰 (圖八)。

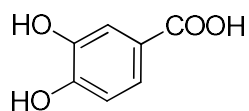


圖八、市售狗脊藥材檢品之 UPLC 層析圖

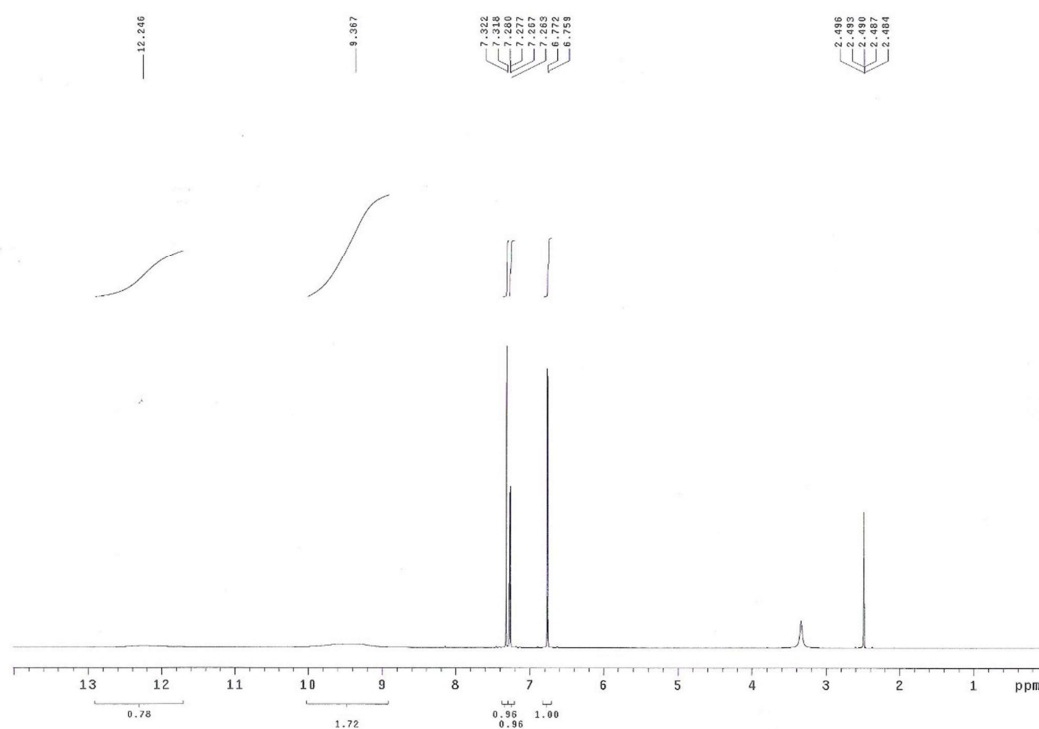
(十四) 原兒茶酸的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_7H_6O_4$ ；分子量：154.12；熔點：221–223 °C；白色固體。

(十五) 原兒茶酸的結構

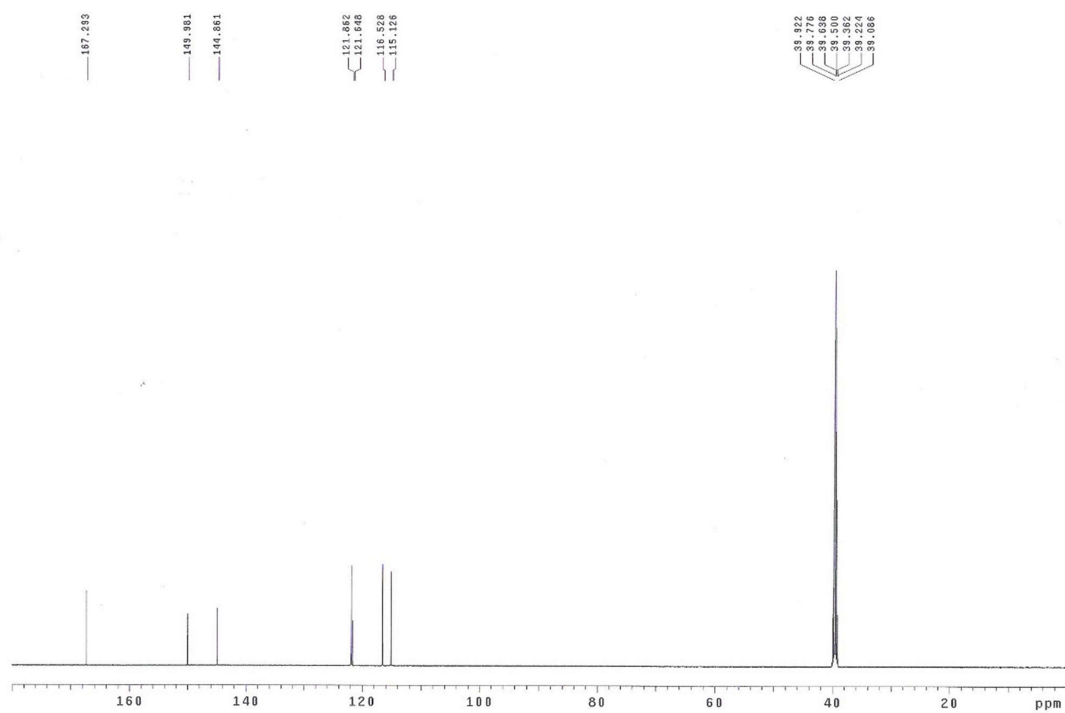


(十六) 原兒茶酸的 ^1H NMR 圖譜



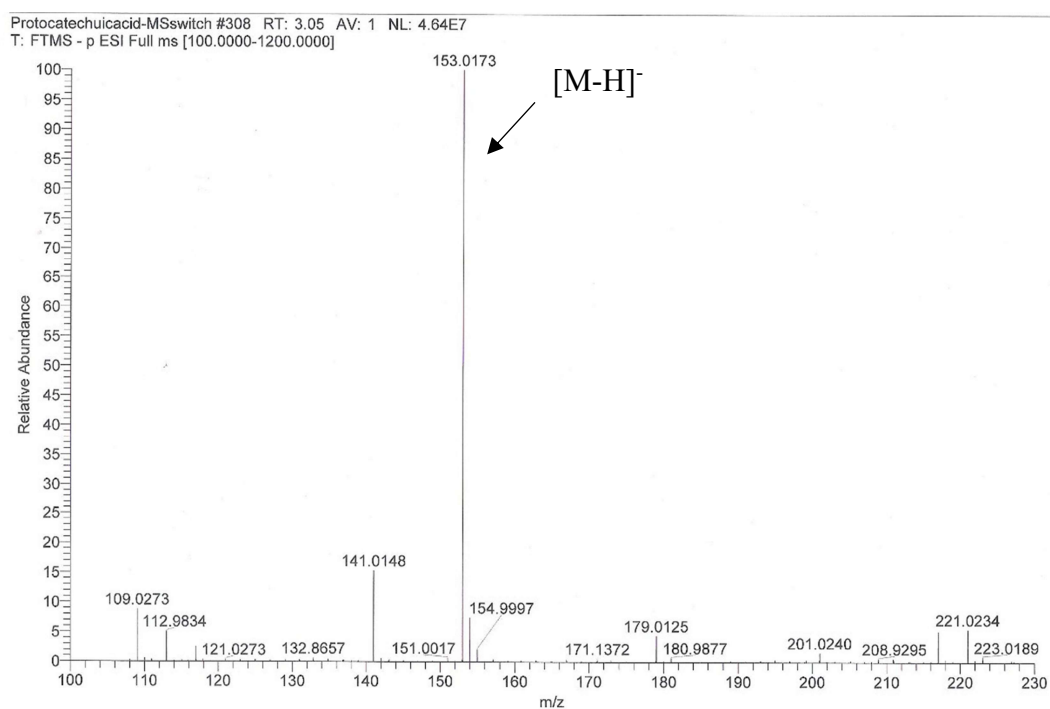
圖九、原兒茶酸的 ^1H NMR 圖譜($\text{DMSO}-d_6$)

(十七) 原兒茶酸的 ^{13}C NMR 圖譜



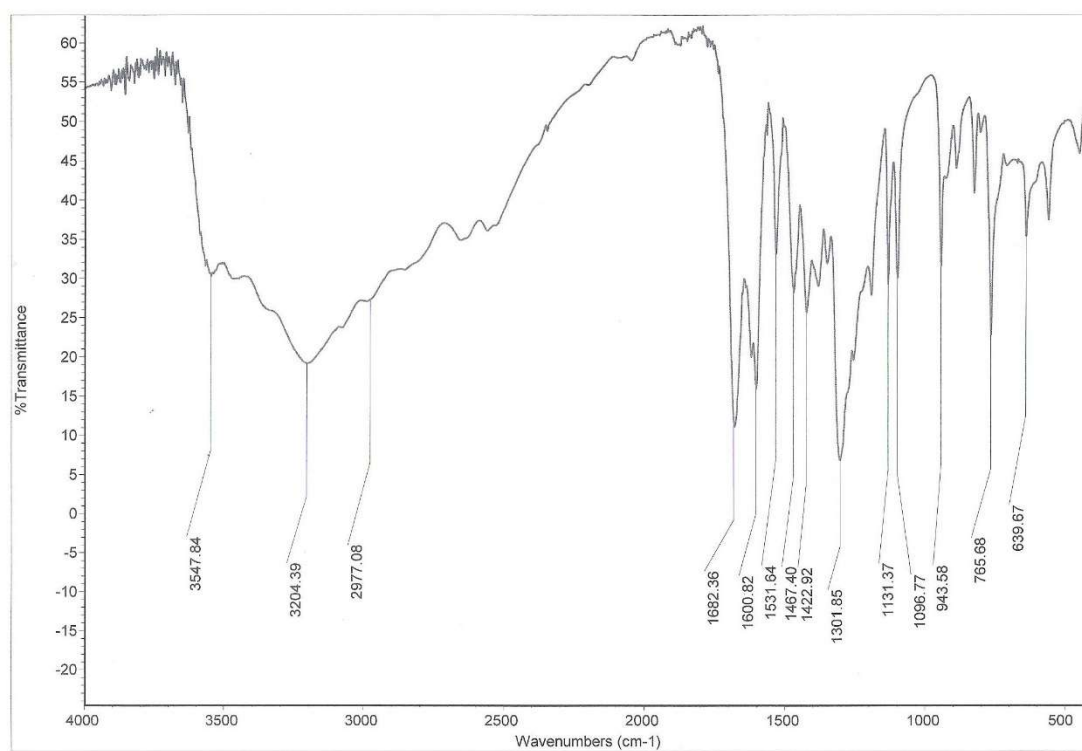
圖十、原兒茶酸的 ^{13}C NMR 圖譜($\text{DMSO}-d_6$)

(十八) 原兒茶酸的 ESI-MS 圖譜



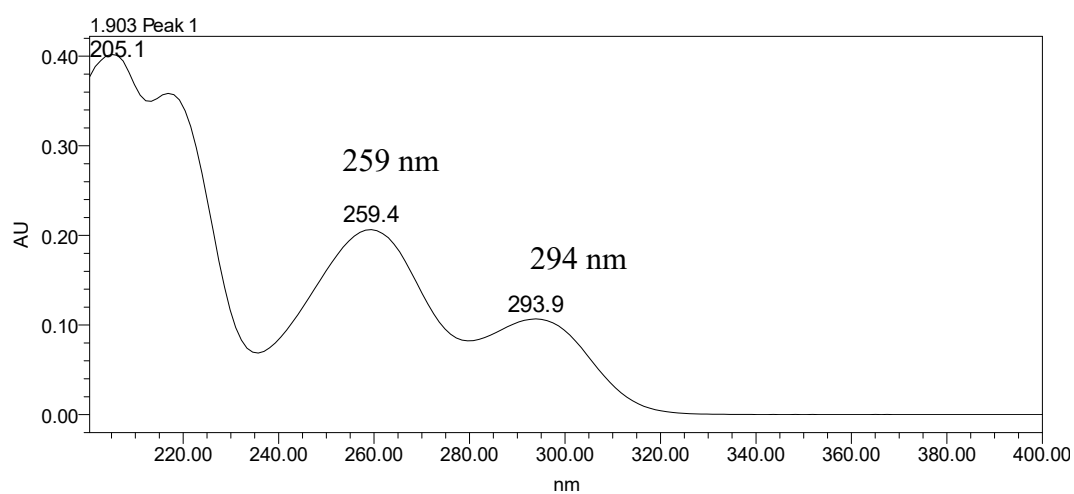
圖十一、原兒茶酸的 ESI-MS 圖譜

(十九) 原兒茶酸的 FTIR 圖譜



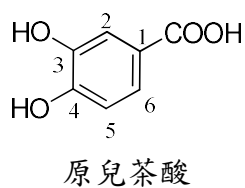
圖十二、原兒茶酸的 FTIR 圖譜

(二十) 原兒茶酸的 UV 圖譜



圖十三、原兒茶酸的 UV 圖譜

(二十一) 原兒茶酸的氫、碳化學位移



表七、原兒茶酸氫、碳化學位移(DMSO- d_6)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	-	121.6
2	7.32 (d, 2.4)	116.5
3	-	144.9
4	-	150.0
5	6.77(d, 8.4)	115.1
6	7.27 (dd, 8.4, 2.4)	121.9
COOH	-	167.3

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

狗脊

生藥名：CIBOTII RHIZOMA

英文名：East Asian Tree Fern Rhizome

基 原：本品為蚌殼蕨科 Dicksoniaceae 植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J.Sm.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》

——取本品粉末 2.0 g，加甲醇 40 mL，超音波振盪 1 小時，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】《中華人民共和國藥典 2020》

——取本品粉末 2.0 g，加甲醇 50 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 3】《香港中藥材標準第五冊》

——取本品粉末 2.0 g，加甲醇 50 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣溶於 30 mL 水和 22.4% (w/v) 鹽酸 5 mL，用乙醚振搖提取 3 次，每次 20 mL，合併乙醚提取液，蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 4】(自行開發)✓

——取本品粉末 2.0 g，加甲醇 40 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 取原兒茶酸(Protocatechuic acid)對照標準品，加甲醇製成每
溶 液 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】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》

——甲苯：二氯甲烷：乙酸乙酯：甲酸 (3：5：6：1)

【展開劑 2】《香港中藥材標準第五冊》

——正己烷：乙酸乙酯：無水乙酸 (5：5：0.1)

【展開劑 3】(自行開發)✓

——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

(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 風乾後，置於主波長 254 nm 之紫外燈照射下檢視。或以 5%

氯化鐵/乙醇試液($\text{FeCl}_3/\text{EtOH TS}$)噴霧後，105 °C加熱至條帶顯色清晰，於可見光照射下檢視之。

二、萃法選擇及濃度測試

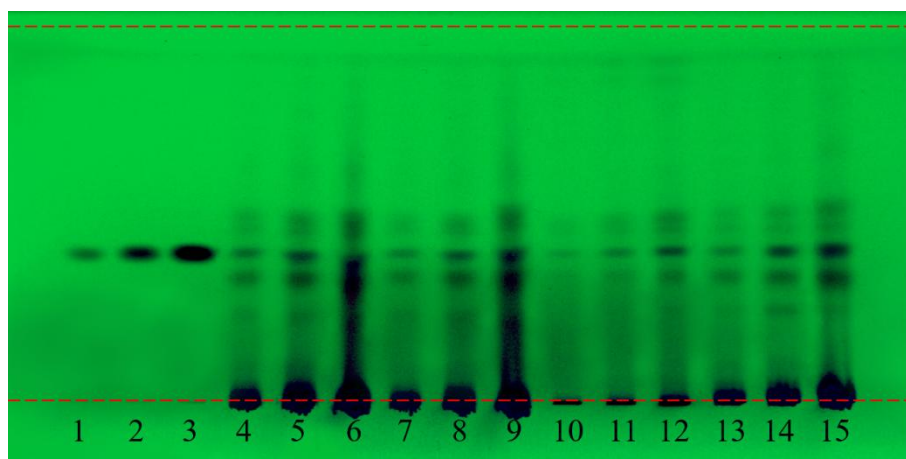
實驗日期：112/06/21

相對溼度(RH)：62%

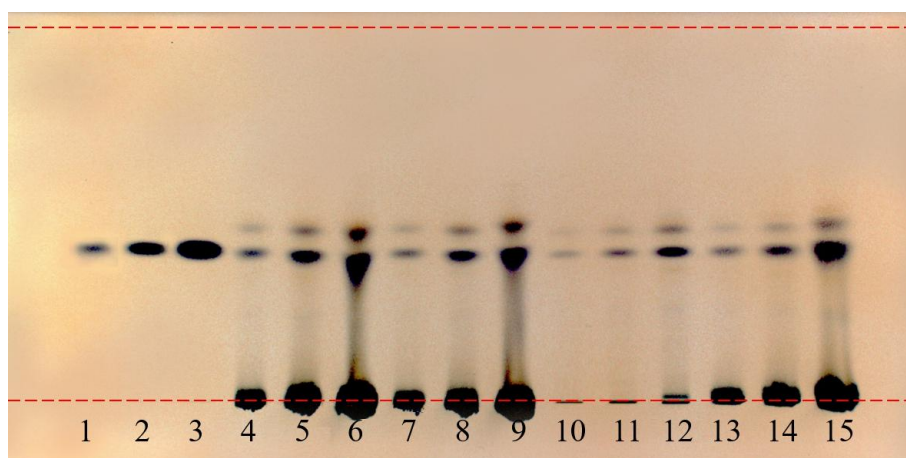
溫度(RT)：25.3 °C

【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



——HPTLC 5%三氯化鐵/乙醇顯色後可見光檢出



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	原兒茶酸(1.0 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 9【萃取方法 1】	1, 2, 5 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 9【萃取方法 2】	1, 2, 5 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 9【萃取方法 3】	1, 2, 5 μ L
13, 14, 15	檢品溶液 9【萃取方法 4】	1, 2, 5 μ L

建議萃法：四種萃取方法，檢品溶液中皆可分離與檢出原兒茶酸，因濃度適中，故採用自行開發之【萃取方法 4】。

建議點注量：原兒茶酸 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 4】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

實驗日期：112/06/21

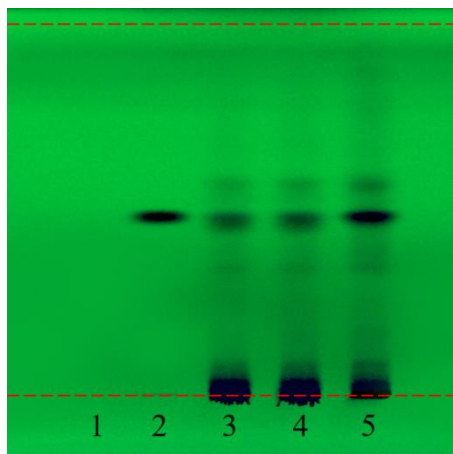
相對溼度(RH)：62%

溫度(RT)：25.3 °C

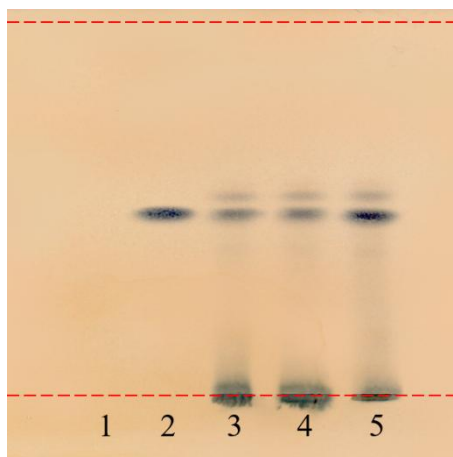
【展開劑 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》——甲苯：

二氯甲烷：乙酸乙酯：甲酸 (3：5：6：1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.52)

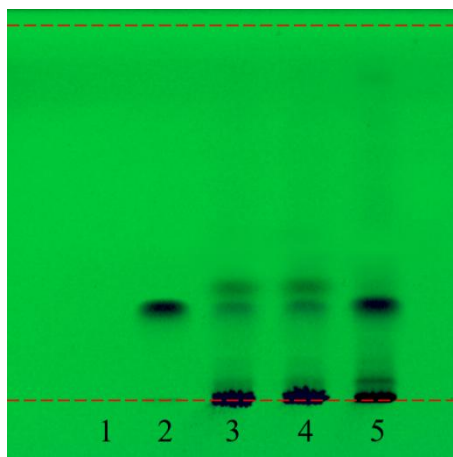


【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 5%三氯化鐵/乙醇顯色後可見光檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.52)

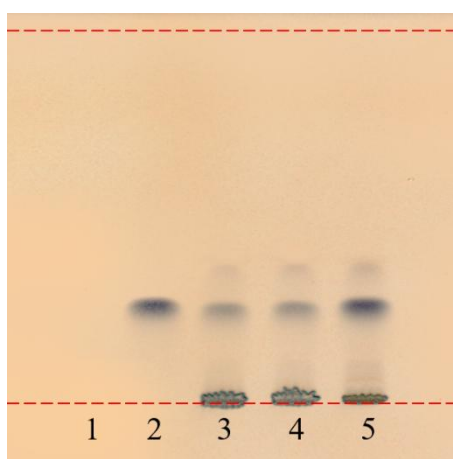


【展開劑 2】《香港中藥材標準第五冊》——正己烷：乙酸乙酯：無水乙酸 (5：5：0.1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.25)

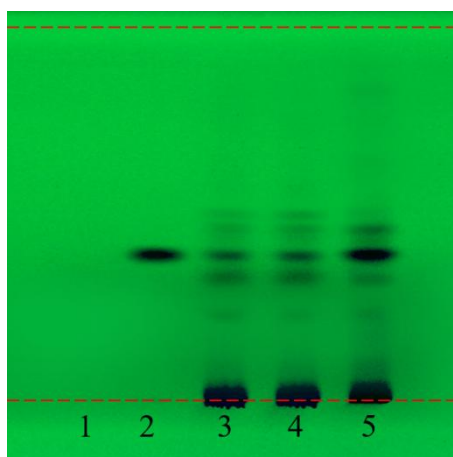


【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 5%三氯化鐵/乙醇顯色後可見光檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.25)

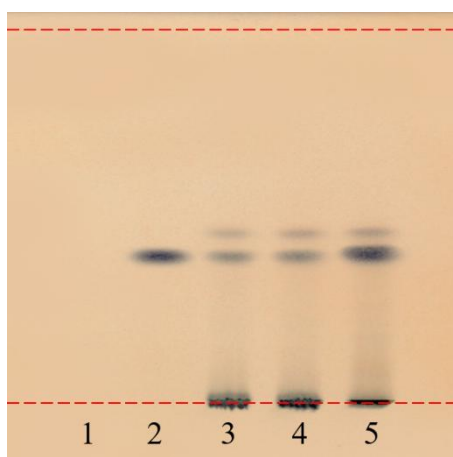


【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.41) ✓



【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 5%三氯化鐵/乙醇顯色後可見光檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.41) ✓



1：Blank

2：原兒茶酸

3，4：檢品溶液 9

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 4】方式，以自行開發之【展開劑 3】展開，顯示原兒茶酸的 R_f 值適中，分離佳，且沒有使用含氯溶媒，故採用【展開劑 3】。

四、觀察方式選擇

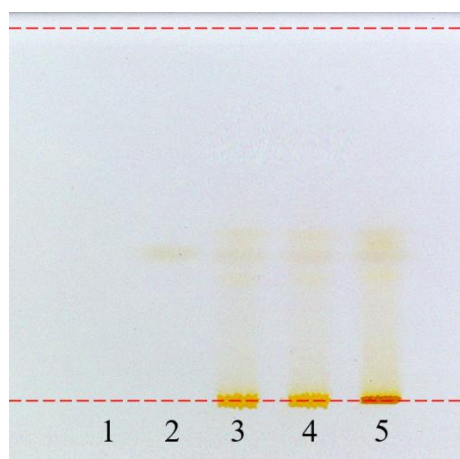
實驗日期：112/06/21

相對溼度(RH)：62%

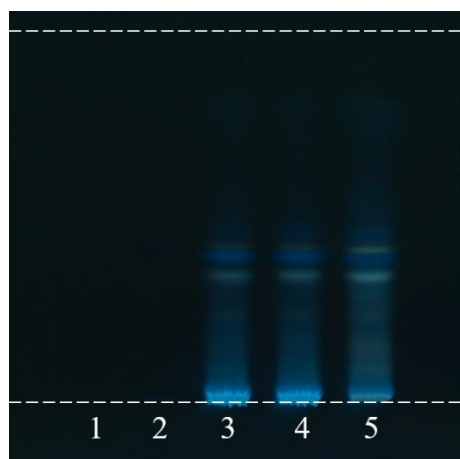
溫度(RT)：25.3 °C

【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

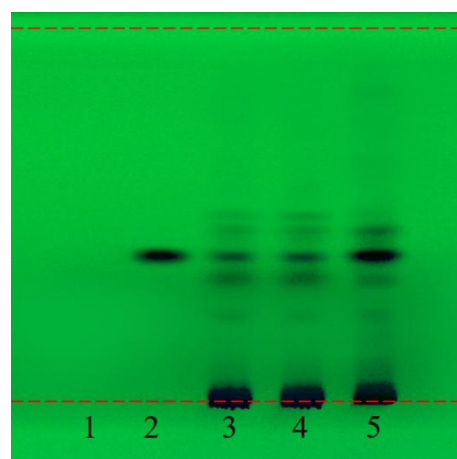
【萃取方法 4】(自行開發)—HPTLC 可
見光檢出



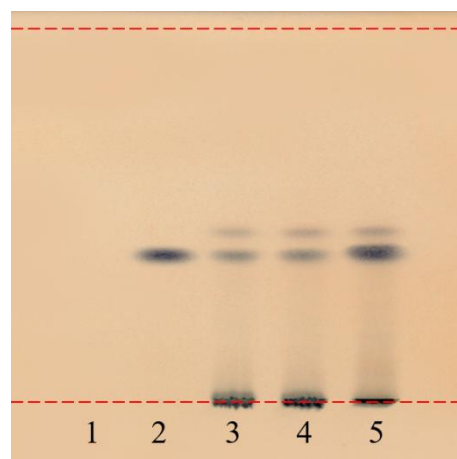
【萃取方法 4】(自行開發)—HPTLC 紫
外光(365 nm)檢出



【萃取方法 4】(自行開發)—HPTLC 紫
外光(254 nm)檢出✓



【萃取方法 4】(自行開發)—HPTLC
5%三氯化鋁/乙醇顯色後可見光檢出
✓



1：Blank

3，4：檢品溶液 9

2：原兒茶酸

5：Spike

建議觀察方式：於紫外光(254nm)下檢視或以 5%氯化鐵/乙醇試液顯色後，置於可見光下檢視，顯示有明顯分離之條帶。

五、十批狗脊藥材樣品檢測

實驗日期：112/06/21

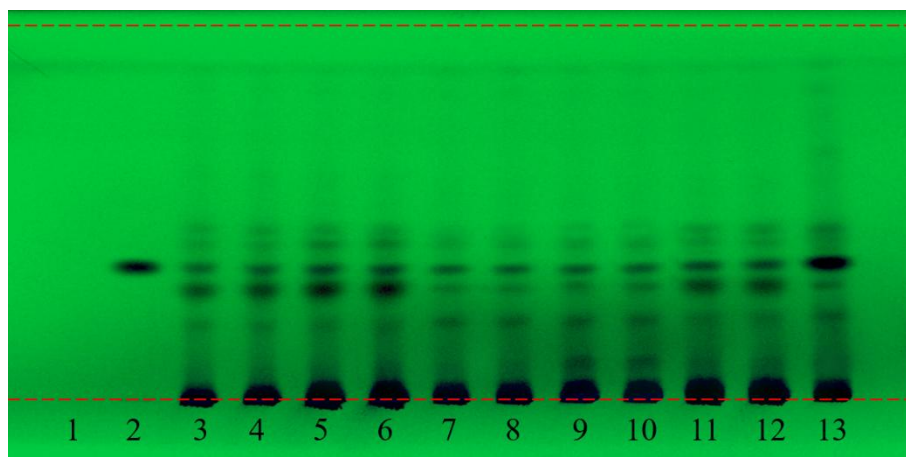
相對溼度(RH)：62%

溫度(RT)：25.3 °C

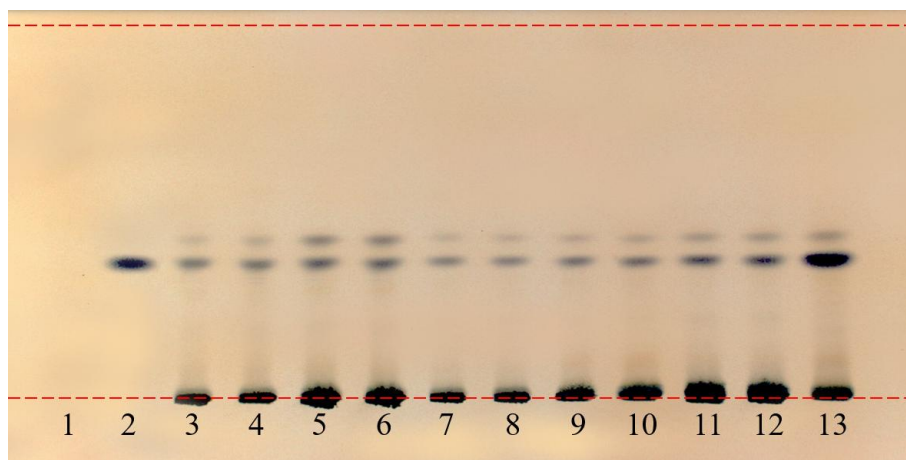
【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC

(1) 紫外光(254 nm)檢出



(2) 5%氯化鐵/乙醇試液顯色後可見光檢出

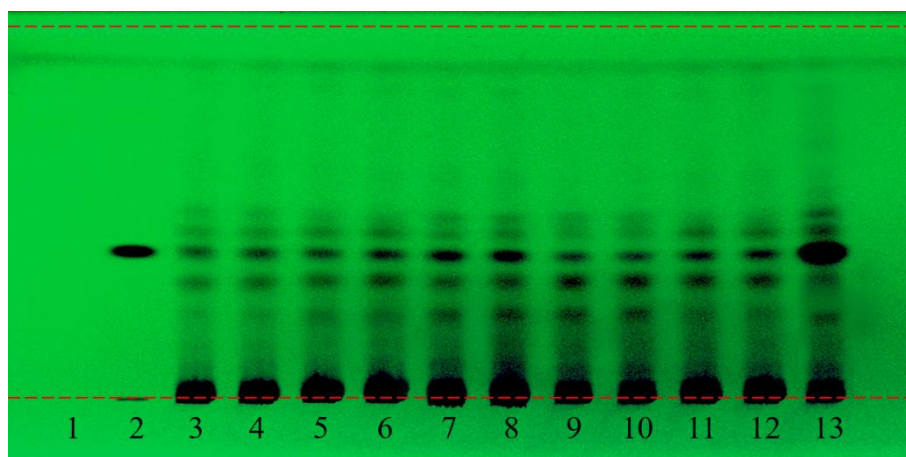


1	Blank	7, 8	檢品溶液 3 (NX)
2	原兒茶酸(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 4 (CA)
3, 4	檢品溶液 1 (NF)	11, 12	檢品溶液 5 (CH)
5, 6	檢品溶液 2 (NJ)	13	Spike (檢品溶液 9)

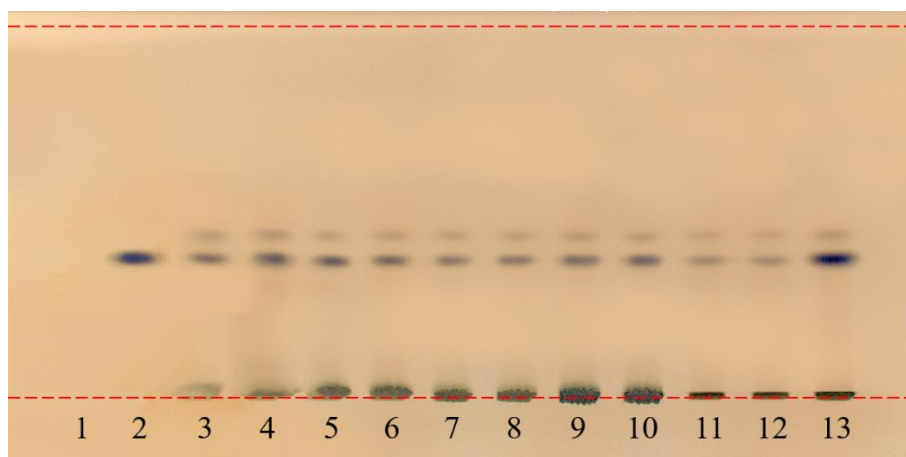
【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC

(1) 紫外光(254 nm)檢出



(2) 5%氯化鐵/乙醇試液顯色後可見光檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 8 (SGC)
2	原兒茶酸(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 9 (SUA)
3, 4	檢品溶液 6 (SGA)	11, 12	檢品溶液 10 (SUB)
5, 6	檢品溶液 7 (SGB)	13	Spike (檢品溶液 9)

結論與建議：以【萃取方法 4】方式及自行開發之【展開劑 3】分離與檢出原兒茶酸較佳，以紫外光(254nm)下檢視或以 5%氯化鐵/乙醇試液顯色後於可見光下檢視較佳。

狗脊飲片(CIBOTH RHIZOMA)

一、材料

購置於臺灣各地中藥店狗脊飲片共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Waters 2695 Separation Module，包含 Waters 2998、Photodiode Array Detector；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 × 2.1 mm, 1.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

甲醇(HPLC grade)購置於永定科技有限公司。

(二) 標準品

原兒茶酸(Protocatechuic acid)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

狗脊飲片萃取溶媒同狗脊藥材。

(二) 最佳萃取次數評估

狗脊飲片萃取次數同狗脊藥材。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取對照標準品原兒茶酸 1.0 mg，加 2 mL 甲醇製成每 1 mL 含原兒茶酸 500μg/mL 的對照標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 5.0 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，準確加入甲醇 25 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 60 分鐘，離心 10 分鐘(約 5000 × 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，移入至 50 mL 之容量瓶中加甲醇至刻度，搖勻再過濾

(syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。

(五) 測定法

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標準品原兒茶酸的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取原兒茶酸對照標準品儲備溶液(500 $\mu\text{g/mL}$)適量，以甲醇稀釋成含原兒茶酸分別為 100、50、20、10、5.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 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

以原兒茶酸濃度為 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以原兒茶酸的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性：取同一批市售狗脊飲片粉末，依狗脊飲片檢品溶液製備方法平行製備五份狗脊飲片檢品溶液，進樣測定，以原兒茶酸的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售狗脊飲片粉末，依狗脊飲片檢品溶液製備方法製備狗脊飲片檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以原兒茶酸的波峰面積為指標，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 $\geq 3:1$ 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 $\geq 10:1$ 時之濃度，作為定量極限估計值。

(十) 添加回收率試驗

取已知原兒茶酸含量的狗脊飲片粉末 5 份，每份準確稱取約 0.25 g，分別加入 1 mL 的原兒茶酸溶液(30 $\mu\text{g/mL}$)，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：COSMOSIL5C₁₈-AR-II C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：260 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35℃
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	13	87
20	13	87

(十二) 臺灣市售狗脊飲片含量測定

取 10 批市售狗脊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 公式計算樣品原兒茶酸的百分比含量。

(十三) 狗脊飲片檢品之 UPLC 層析條件

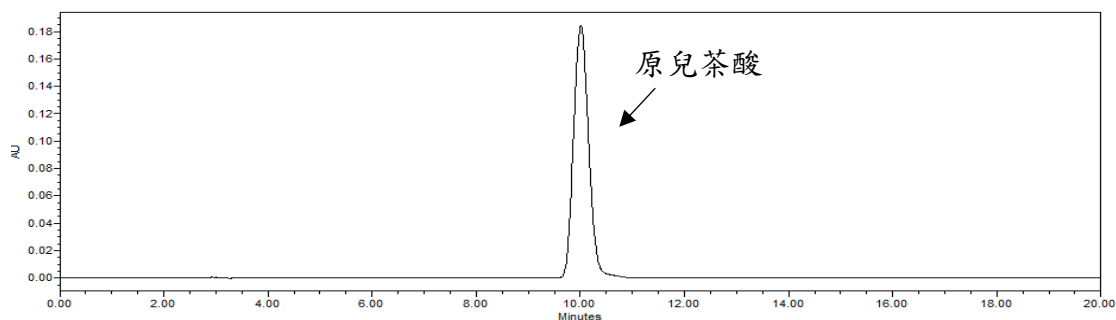
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：260 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	13	87
10	13	87

五、結果

(一) 對照標準品原兒茶酸之 HPLC 層析

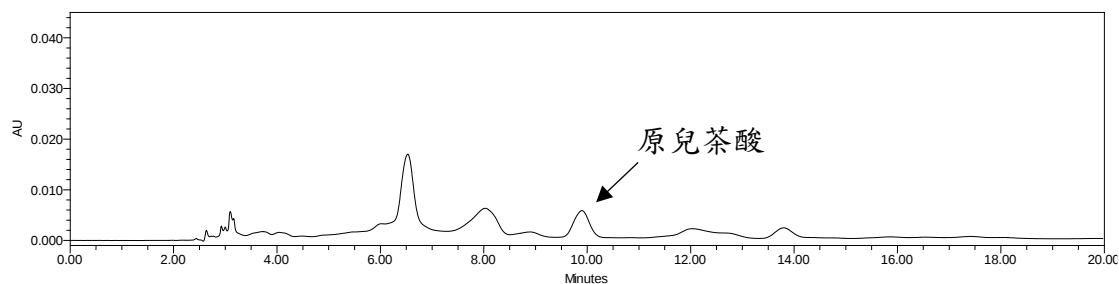
於滯留時間 9.96 分鐘處顯示原兒茶酸對照標準品波峰(圖一)。



圖一、原兒茶酸對照標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售狗脊飲片檢品之 HPLC 層析

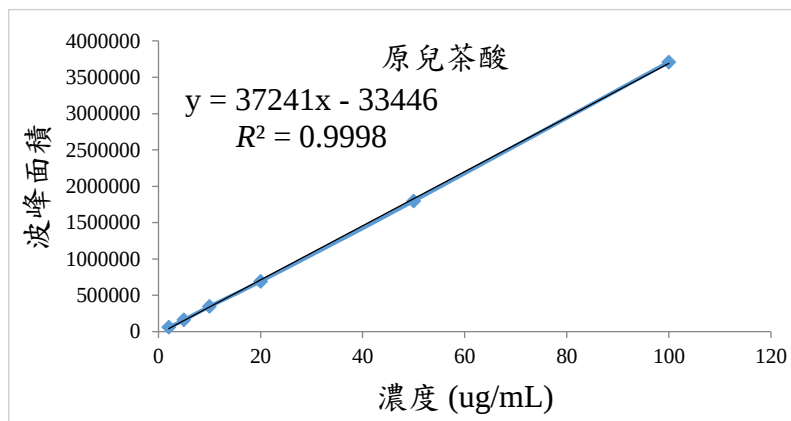
於滯留時間 9.96 分鐘顯示狗脊飲片檢品中原兒茶酸的波峰，(圖二)。原兒茶酸之分離率(R)為 2.57，托尾因子(T)為 1.0，均在系統適用性要求內。



圖二、市售狗脊飲片檢品之 HPLC 層析圖

(三) 標準品原兒茶酸之檢量線

經不同濃度原兒茶酸(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 $y = 37241x - 33446$ ， $R^2 = 0.9998$ ，顯示濃度在 2.0–100 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、標準品原兒茶酸之檢量線圖

表一、原兒茶酸之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
原兒茶酸	2.0–100	$y = 37241x - 33446$	0.9998

(四) 精密度試驗

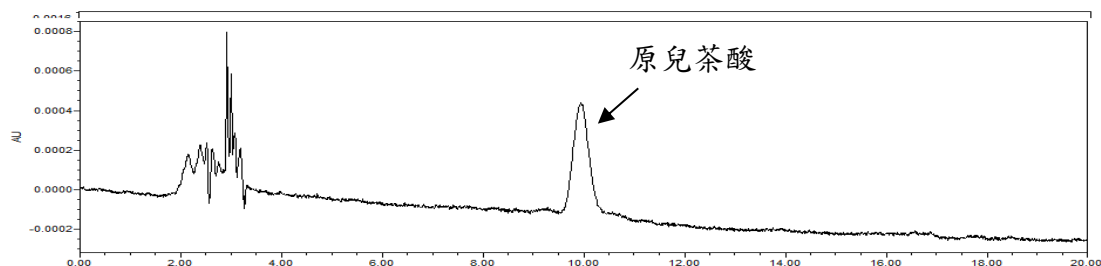
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，原兒茶酸精密度之相對標準差為 0.89 %，在系統適用性要求內。

(五) 重複性與穩定性試驗

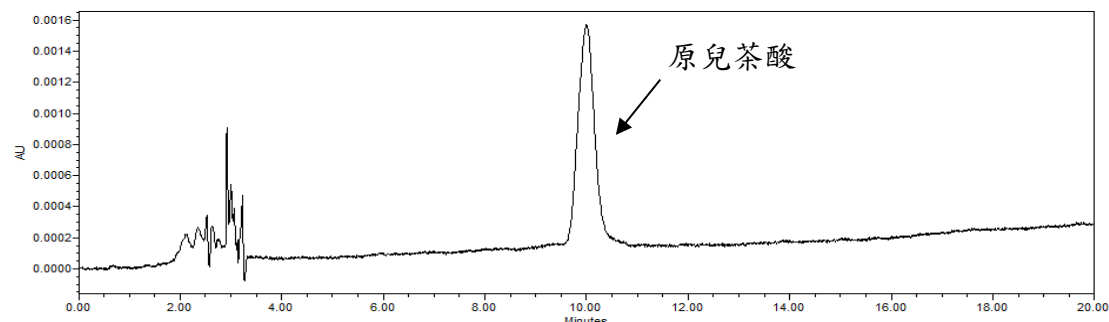
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，原兒茶酸重複性之相對標準差為 2.1 %，在系統適用性要求內。原兒茶酸在 24 小時內穩定，原兒茶酸穩定性之相對標準差為 1.4%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(六) 偵測極限與定量極限試驗

原兒茶酸偵測極限為 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、原兒茶酸之偵測極限層析圖



圖五、原兒茶酸之定量極限層析圖

表二、各項檢驗分析

檢測項目	原兒茶酸	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	5.0 µg/mL	0.89
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.1)	2.1
穩定性 (n=5)	檢品溶液(No.1)	1.4
偵測極限 (n=1)	0.2 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	0.5 µg/mL	-

(七) 添加回收率試驗

原兒茶酸平均添加回收率為 97.0%，相對標準偏差為 2.43 % (表三)。

表三、原兒茶酸添加回收率

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	0.5002	0.0619	0.03	0.0914	98.2	97.04	2.43
2	0.5001	0.0619	0.03	0.0904	95.0		
3	0.5004	0.0619	0.03	0.0915	98.7		
4	0.4999	0.0619	0.03	0.0901	94.1		
5	0.5001	0.0619	0.03	0.0917	99.3		

(八) 臺灣市售狗脊飲片含量測定

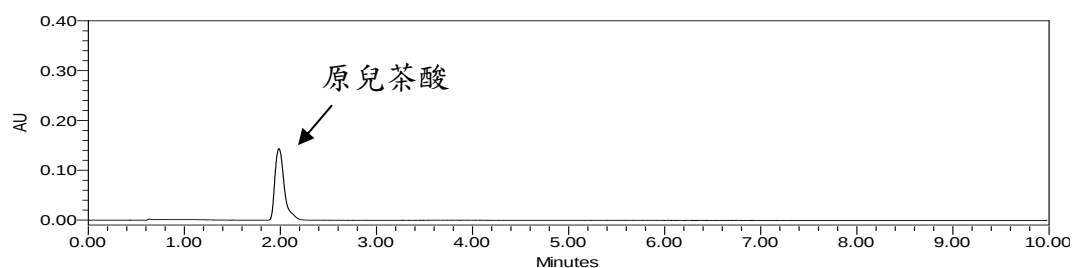
10 批狗脊飲片之含量測定結果(乾燥品)如表四所示，原兒茶酸含量為 0.022–0.031%。建議狗脊飲片指標成分原兒茶酸的含量不得少於 0.07%。理論板數按原兒茶酸波峰計算均應不低於 3000 (實際值為 5397)。

表四、臺灣市售狗脊飲片檢品之原兒茶酸含量

藥材編號 (No.)	原兒茶酸含量 (%)	藥材編號 (No.)	原兒茶酸含量 (%)
1 (CB)	0.022	6 (SCA)	0.024
2 (NC)	0.028	7 (SCB)	0.031
3 (NRA)	0.025	8 (SK2)	0.025
4 (NWB)	0.029	9 (SUC)	0.030
5 (NWD)	0.027	10 (SUD)	0.027
平均值±S.D.	0.027±0.003		

(九) 對照標準品原兒茶酸之 UPLC 層析

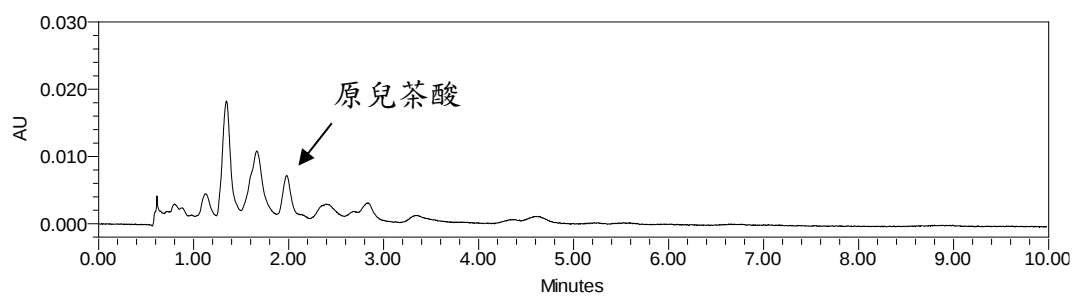
於滯留時間 1.98 分鐘顯示原兒茶酸對照標準品的波峰(圖六)。



圖六、原兒茶酸對照標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十) 市售狗脊飲片檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 1.99 分鐘顯示狗脊飲片檢品中原兒茶酸的波峰 (圖七)。



圖七、市售狗脊飲片檢品之 UPLC 層析圖

狗脊

生藥名：CIBOTII RHIZOMA

英文名：East Asian Tree Fern Rhizome

基 原：本品為蚌殼蕨科 Dicksoniaceae 植物金毛狗脊 *Cibotium barometz* (L.) J.Sm.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》

——取本品粉末 2.0 g，加甲醇 40 mL，超音波振盪 1 小時，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】《中華人民共和國藥典 2020》

——取本品粉末 2.0 g，加甲醇 50 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 3】《香港中藥材標準第五冊》

——取本品粉末 2.0 g，加甲醇 50 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣溶於 30 mL 水和 22.4% (w/v) 鹽酸 5 mL，用乙醚振搖提取 3 次，每次 20 mL，合併乙醚提取液，蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 4】(自行開發)✓

——取本品粉末 2.0 g，加甲醇 40 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加甲醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 取原兒茶酸(Protocatechuic acid)對照標準品，加甲醇製成每
溶 液 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】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》

——甲苯：二氯甲烷：乙酸乙酯：甲酸 (3：5：6：1)

【展開劑 2】《香港中藥材標準第五冊》

——正己烷：乙酸乙酯：無水乙酸 (5：5：0.1)

【展開劑 3】(自行開發)✓

——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

(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 風乾後，置於主波長 254 nm 之紫外燈照射下檢視。或以 5%

氯化鐵/乙醇試液($\text{FeCl}_3/\text{EtOH TS}$)噴霧後， $105\text{ }^\circ\text{C}$ 加熱至條帶顯色清晰，於可見光照射下檢視之。

二、萃法選擇及濃度測試

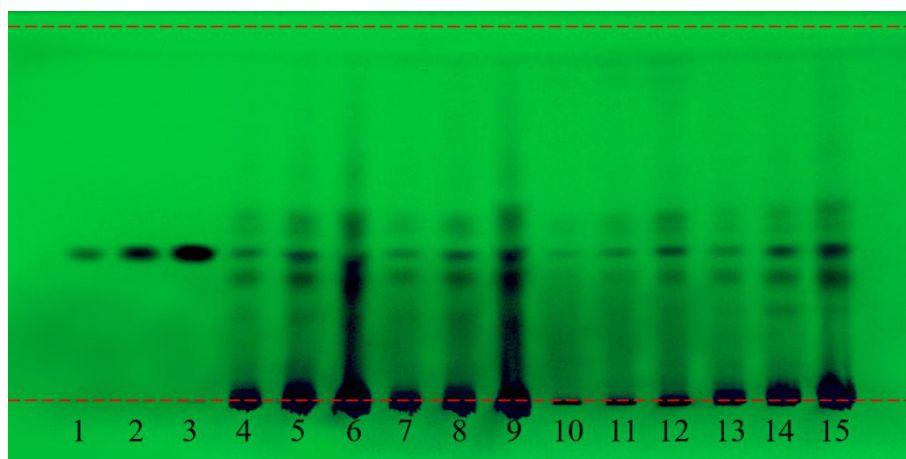
實驗日期：112/06/21

相對溼度(RH)：62%

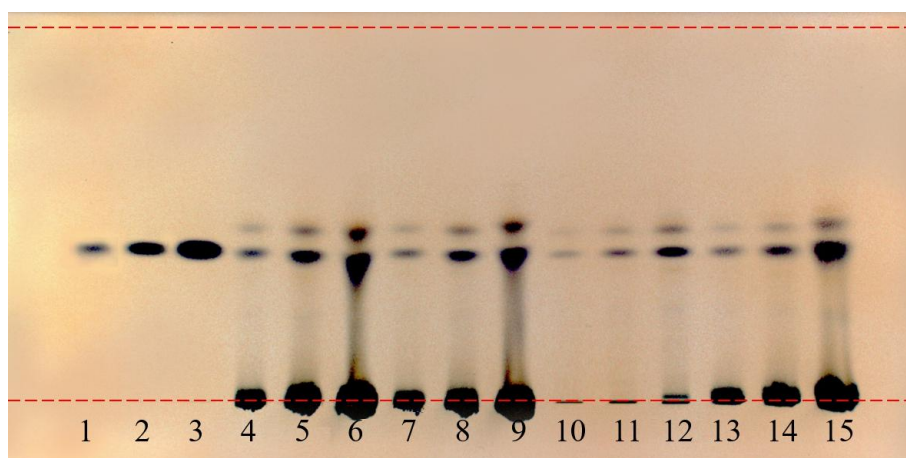
溫度(RT)：25.3 °C

【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



——HPTLC 5%三氯化鐵/乙醇顯色後可見光檢出



編號	名稱	點注量
1, 2, 3	原兒茶酸(1.0 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 8【萃取方法 1】	1, 2, 5 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 8【萃取方法 2】	1, 2, 5 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 8【萃取方法 3】	1, 2, 5 μ L
13, 14, 15	檢品溶液 8【萃取方法 4】	1, 2, 5 μ L

建議萃法：四種萃取方法，檢品溶液中皆可分離與檢出原兒茶酸，因濃度適中，故採用自行開發之【萃取方法 4】。

建議點注量：原兒茶酸 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 4】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

實驗日期：112/06/21

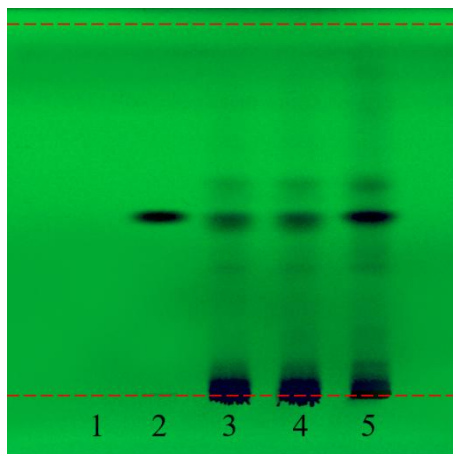
相對溼度(RH)：62%

溫度(RT)：25.3 °C

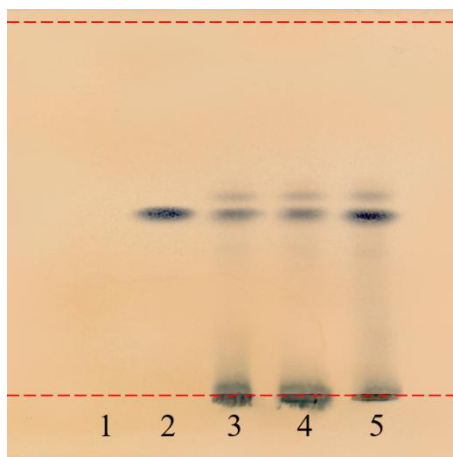
【展開劑 1】《臺灣中藥典第四版 2021》《中華人民共和國藥典 2020》——甲苯：

二氯甲烷：乙酸乙酯：甲酸 (3：5：6：1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.52)

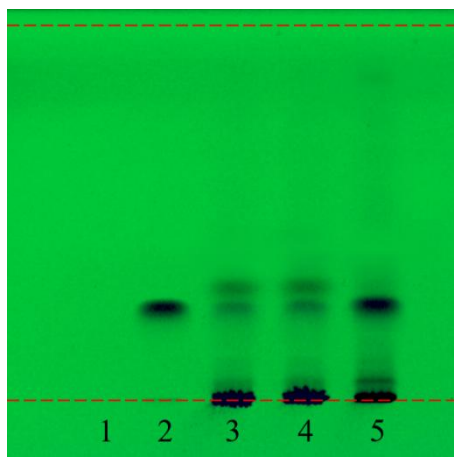


【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 5%三氯化鐵/乙醇顯色後可見光檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.52)

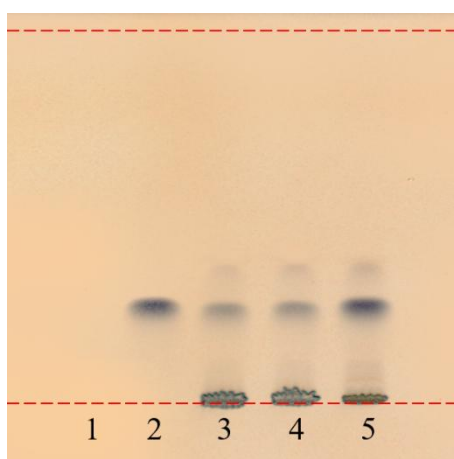


【展開劑 2】《香港中藥材標準第五冊》——正己烷：乙酸乙酯：無水乙酸 (5：5：0.1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.25)

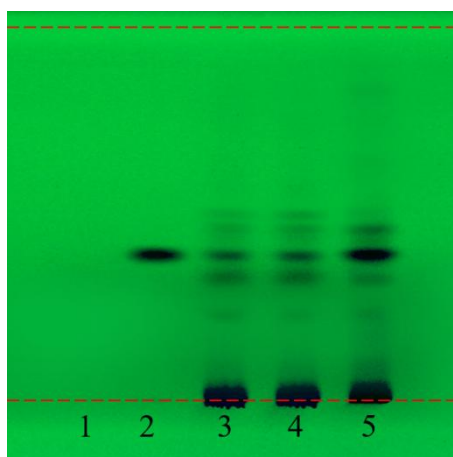


【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 5%三氯化鐵/乙醇顯色後可見光檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.25)

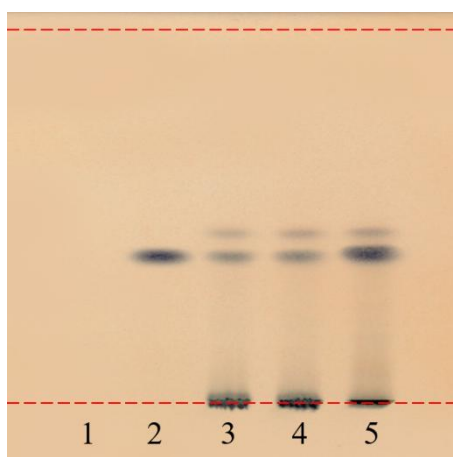


【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 紫外光(254 nm)檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.41) ✓



【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC 5%三氯化鐵/乙醇顯色後可見光檢出(原兒茶酸 R_f 值為 0.41) ✓



1：Blank

2：原兒茶酸

3，4：檢品溶液 8

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 4】方式，以自行開發之【展開劑 3】展開，顯示原兒茶酸的 R_f 值適中，分離佳，且沒有使用含氯溶媒，故採用【展開劑 3】。

四、觀察方式選擇

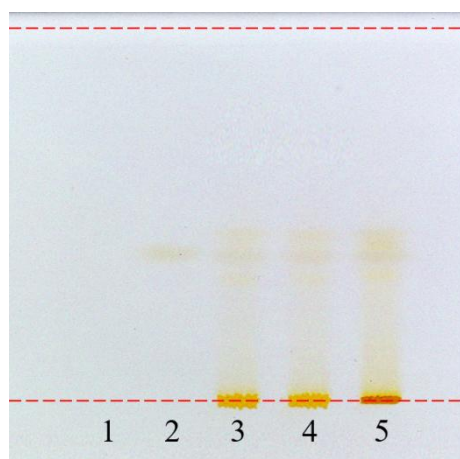
實驗日期：112/06/21

相對溼度(RH)：62%

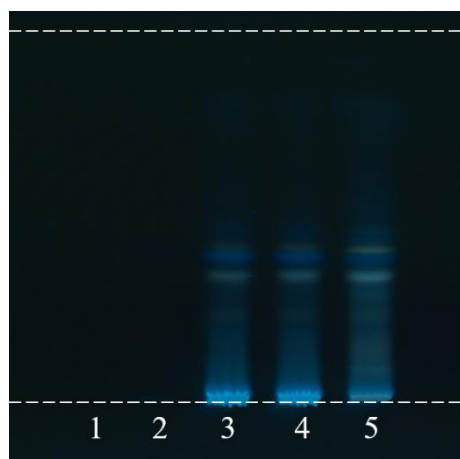
溫度(RT)：25.3 °C

【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

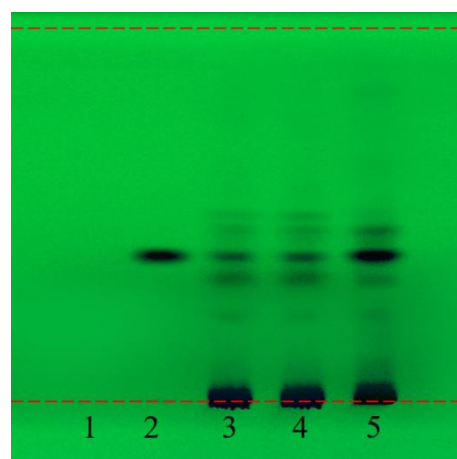
【萃取方法 4】(自行開發)－HPTLC 可
見光檢出



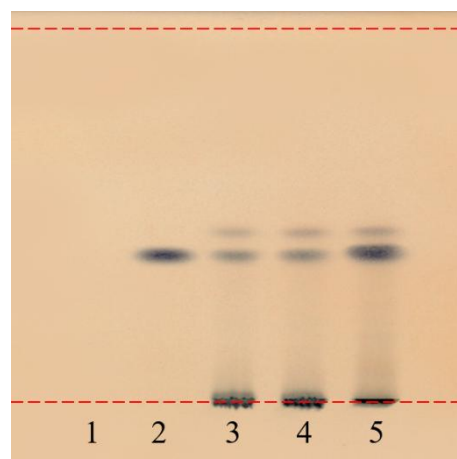
【萃取方法 4】(自行開發)－HPTLC 紫
外光(365 nm)檢出



【萃取方法 4】(自行開發)－HPTLC 紫
外光(254 nm)檢出✓



【萃取方法 4】(自行開發)－HPTLC
5%三氯化鋁/乙醇顯色後紫外光(365
nm)檢出✓



1：Blank

3，4：檢品溶液 8

2：原兒茶酸

5：Spike

建議觀察方式：於紫外光(254nm)下檢視或以 5%氯化鐵/乙醇試液顯色後，置於可見光下檢視，顯示有明顯分離之條帶。

五、十批狗脊飲片樣品檢測

實驗日期：112/06/21

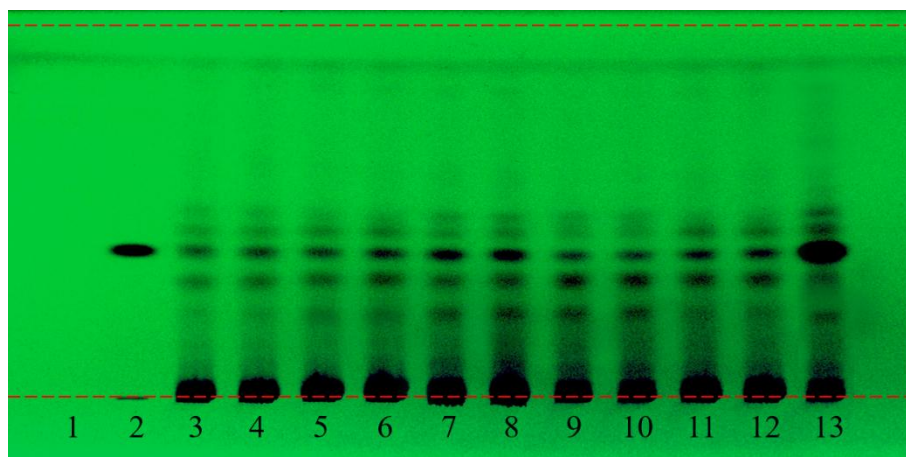
相對溼度(RH)：62%

溫度(RT)：25.3 °C

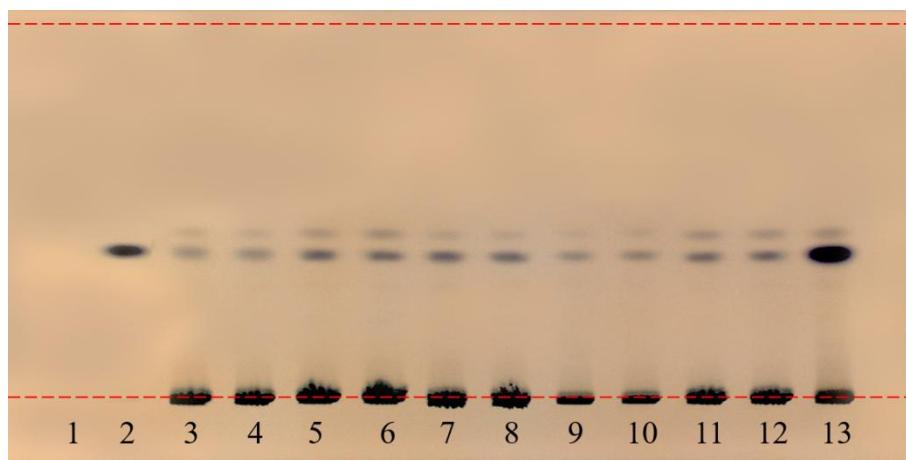
【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC

(1) 紫外光(254 nm)檢出



(2) 5%氯化鐵/乙醇試液顯色後可見光檢出

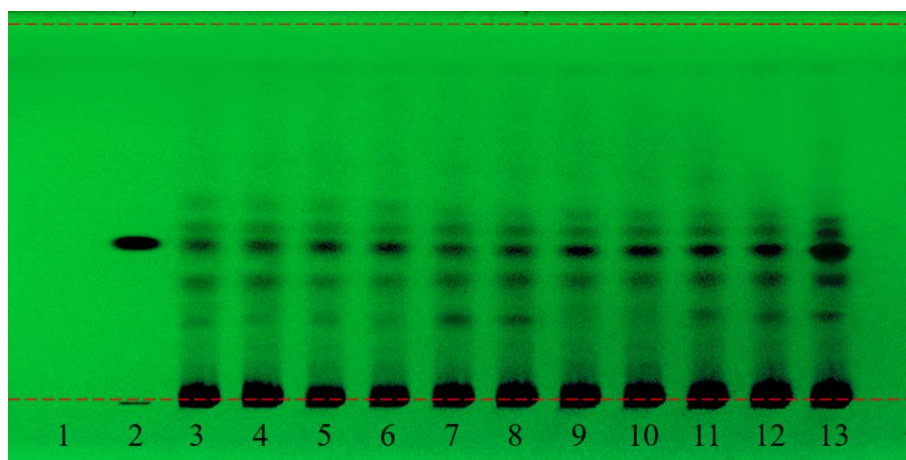


1	Blank	7, 8	檢品溶液 3 (NWB)
2	原兒茶酸(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 4 (NWD)
3, 4	檢品溶液 1 (NC)	11, 12	檢品溶液 5 (CB)
5, 6	檢品溶液 2 (NRA)	13	Spike (檢品溶液 8)

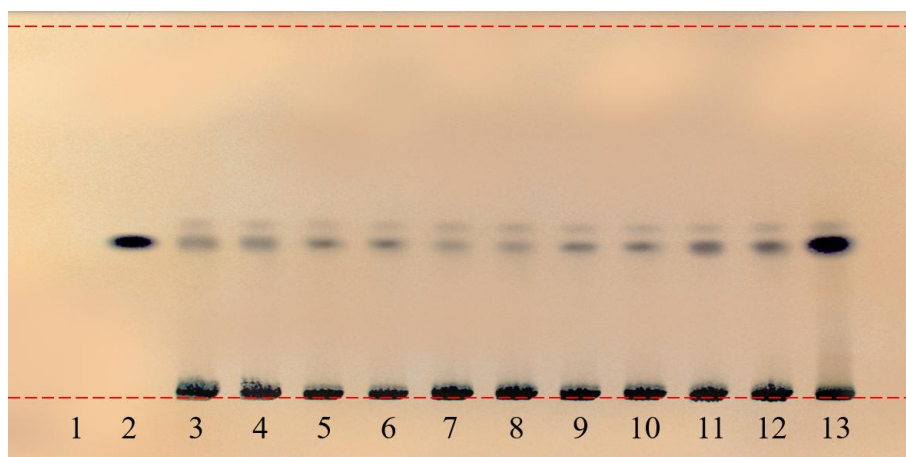
【展開劑 3】(自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲酸 (10：9：1)

【萃取方法 4】(自行開發)——HPTLC

(1) 紫外光(254 nm)檢出



(2) 5%氯化鐵/乙醇試液顯色後可見光檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 8 (SK2)
2	原兒茶酸(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 9 (SUC)
3, 4	檢品溶液 6 (SCA)	11, 12	檢品溶液 10 (SUD)
5, 6	檢品溶液 7 (SCB)	13	Spike (檢品溶液 8)

結論與建議：以【萃取方法 4】方式及自行開發之【展開劑 3】分離與檢出原兒茶酸較佳，以紫外光(254nm)下檢視或以 5%氯化鐵/乙醇試液顯色後於可見光下檢視較佳。