

## 紅耆

### (HEDYSARI RADIX)

#### 紅耆 MI

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

#### 紅耆 HPLC

|                  |    |
|------------------|----|
| 一、材料.....        | 8  |
| 二、儀器及層析管柱.....   | 8  |
| 三、實驗藥品及試劑來源..... | 8  |
| 四、方法.....        | 8  |
| 五、結果.....        | 12 |

#### 紅耆 TLC

|                   |    |
|-------------------|----|
| 一、方法.....         | 23 |
| 二、萃法選擇及濃度測試.....  | 24 |
| 三、溶媒系統選擇.....     | 25 |
| 四、觀察方式選擇.....     | 27 |
| 五、十批紅耆藥材樣品檢測..... | 28 |

## 紅耆

### (HEDYSARI 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紅耆的乾燥根。

#### 二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：紅耆

生藥名：HEDYSARI RADIX

英文名：Hedysarum Root

基原：本品為豆科 Leguminosae 植物多序岩黃耆 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz. 之乾燥根。

採收加工：春、秋二季採挖，除去鬚根和根頭，曬乾。

藥材性狀：本品藥材呈圓柱狀，長 10~50 cm，直徑 0.8~2.0 cm，分支少，表皮灰紅棕色，具縱皺紋及皮孔樣突起，栓皮易剝落，露出淺黃色皮部，質硬而韌。氣微，味微甜。

飲片性狀：本品飲片為斜切薄片，厚約 2~3 mm，斷面纖維性，富粉性，皮部黃白色，占面積的 1/3~1/2，形成層為棕色環，明顯，木質部淡黃棕色，斷面有放射狀紋理。氣微，味微甜。

生長分佈：多年生草本植物，主根粗大，生於山地石質山坡和灌木叢中及林緣等地。花期 6~8 月，果期 7~9 月。分佈於內蒙古、甘肅、寧夏及四川。藥材主要產於甘肅、四川等地。

#### 三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)

1. 木栓層為數列扁平細胞組成，淡黃色，有時已脫落。
2. 栓內層狹窄，部分細胞含草酸鈣方晶。
3. 皮層由薄壁細胞組成，細胞類方形或多角形，有明顯細胞間隙。
4. 石細胞單個散在或成群。
5. 韌皮部寬廣，纖維束多，周圍的細胞含草酸鈣方晶，直徑約 5~10  $\mu\text{m}$ ，形成結晶纖維，射線明顯；外側常有裂隙。
6. 形成層成環。
7. 木質部導管單個散在或數個成群，導管大，直徑可達 120  $\mu\text{m}$ 。
8. 木纖維壁厚，圍繞在導管旁，周圍常有草酸鈣方晶，直徑約 5~10  $\mu\text{m}$ ，形成結晶纖維。
9. 木射線為 3~8 個細胞寬。

10. 薄壁細胞充滿澱粉粒。

#### 四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3)

1. 本品粉末為黃棕色。
2. 澱粉粒較多，單粒類圓形或橢圓形，直徑約 20  $\mu\text{m}$ ，臍點點狀、裂縫狀或星狀，偏光顯微鏡下呈黑十字狀，複粒由 2~9 分粒組成。
3. 草酸鈣方晶眾多，散在或存在含晶細胞中，呈多角形、類方形或長方形，直徑約 5~10  $\mu\text{m}$ ，偏光顯微鏡下呈多彩狀。
4. 纖維眾多，多成束；偏光顯微鏡下呈亮黃白色。
5. 周圍細胞常含有草酸鈣方晶，形成結晶纖維，含晶細胞的細胞壁不均勻增厚；偏光顯微鏡下呈多彩狀或亮黃白色。
6. 導管大小不一，直徑可達 120  $\mu\text{m}$ ，主要為網紋、階紋及有緣孔紋導管。



圖 1A 紅耆藥材圖



圖 1B 紅耆飲片藥材圖

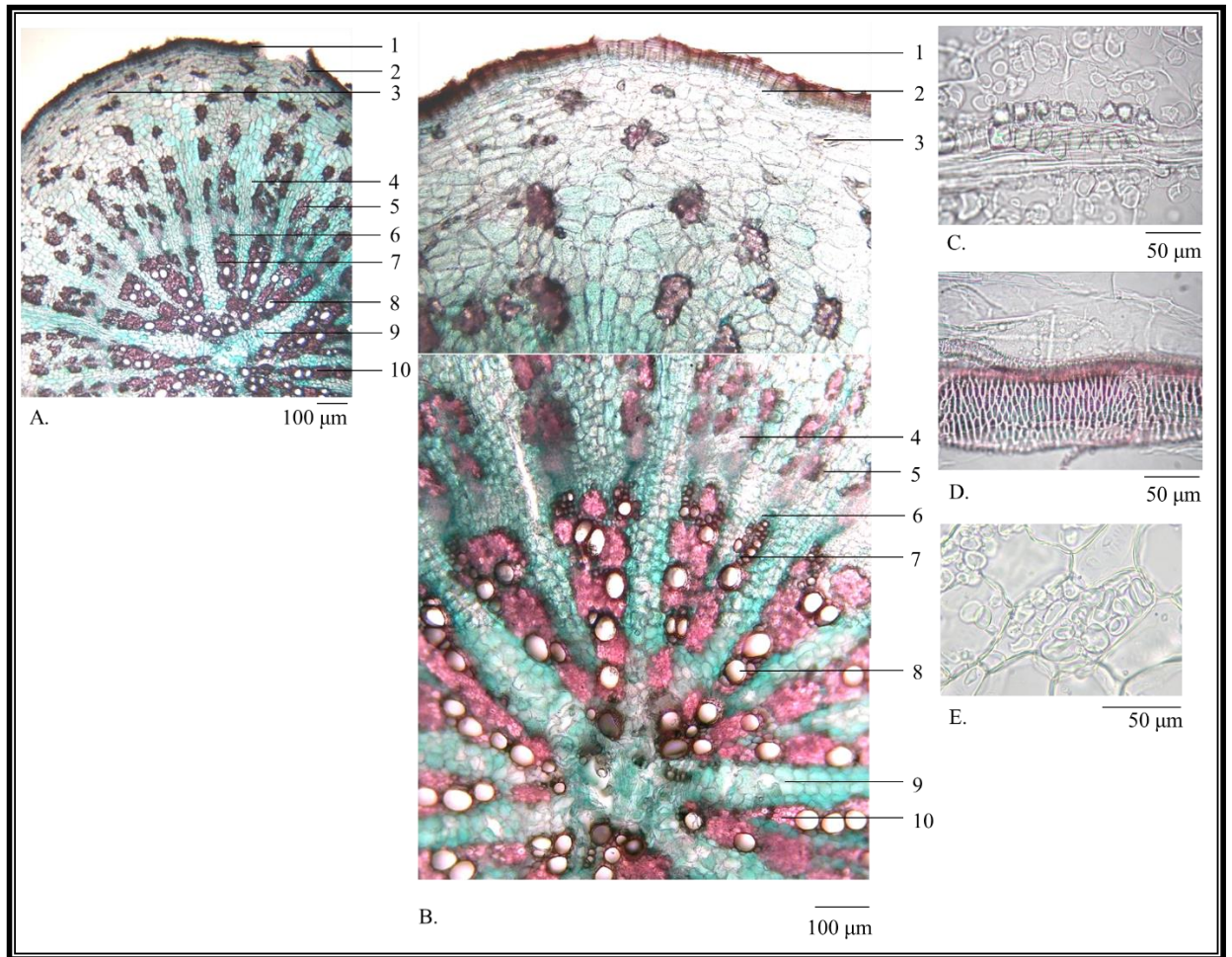


圖 2 紅耆橫切面顯微特徵圖

A.橫切面圖 B.橫切面放大圖 C.草酸鈣方晶及結晶纖維 D.網紋導管

E.澱粉粒

1.木栓層 2.栓內層 3.石細胞 4.韌皮部 5.韌皮纖維 6.形成層 7.木質部

8.導管 9.木射線 10.木纖維

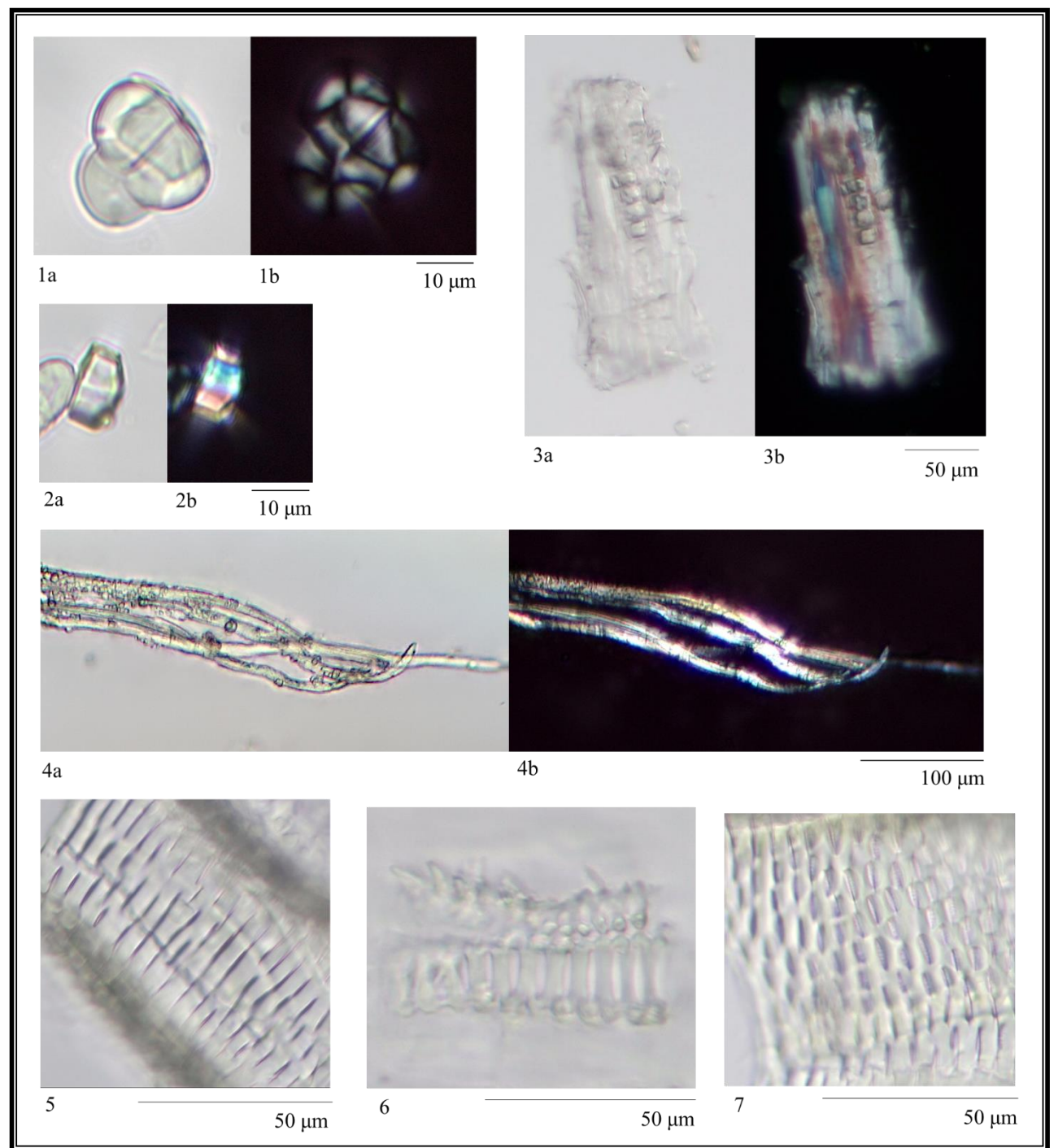


圖 3 紅耆粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 澱粉粒 2. 草酸鈣方晶與澱粉粒 3. 結晶纖維 4. 纖維束 5. 網紋導管 6. 階紋導管 7. 有緣孔紋導管

### 參考文獻

1. 衛生福利部臺灣中藥典第三版編輯工作小組編纂(2018)。臺灣中藥典第三版。台北市：衛生福利部。223 頁。
2. 張永勳、何玉鈴等編輯(2009)。中藥彩色圖鑑。台北：行政院衛生署中醫藥委員會。223-224 頁。
3. 張永勳、何玉鈴總編輯(2013)。台灣中藥典圖鑑。台北：衛生福利部。160 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)。香港中藥材標準第八冊。香港：香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部。161~172 頁。
5. 肖培根等編輯(2001)。新編中藥志第一卷。北京：化學工業出版社。477~480 頁。
6. 國家藥典委員會編輯(2009)。中華人民共和國藥典中藥材顯微鑑別彩色圖鑑。北京：人民衛生出版社。211~212 頁。
7. 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。159 頁。
8. 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。273~274 頁。
9. 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。145 頁。

## 紅耆(HEDYSARI RADIX)

### 一、材料

購自於臺灣各地中藥店紅耆藥材共 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、QuatPump G1311A、Autosampler G1329B、DAD G1315B；層析管柱 COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II Column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ 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 Column (100 x 2.1  $\mu$ m, 1.7  $\mu$ m)。

### 三、實驗藥品及試劑來源

#### (一) 試劑

乙腈(99.9%)購自於 Sigma-Aldrich Co.；甲醇(HPLC Grade)購自於 DUKSAN PURE CHEMICALS。

#### (二) 標準品

標準品芒柄花素(Formononetin)購自 普思生物科技股份有限公司，純度 98% 以上。

### 四、方法

#### (一) 最佳萃取溶媒與方法評估

取本品粉末 4 份，每份準確稱取 1.0 g，置 50 mL 離心管中，其中 2 份準確加入甲醇、75 % 甲醇各 20 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，另外 2 份同樣準確加入甲醇、75 % 甲醇各 20 mL，超音波振盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz，溫度 50 °C) 30 分鐘，取上清液過濾(Syringe filter, PTFE 0.45  $\mu$ m)，即得。每針 10  $\mu$ L 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以所測得之標準品芒柄花素最大波峰面積為最佳紅耆萃取溶媒。

#### (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，準確加甲醇 20 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 x g)。取上清液移入 25 mL 容量瓶中，加甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45  $\mu$ m)，即得。每針 10  $\mu$ L 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

準確稱取標準品芒柄花素 1.0 mg，加 1 mL 的甲醇製成每 1 mL 含芒柄花素 1000 µg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 10 µg/mL 製成芒柄花素對照標準品溶液。

### (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 20 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 x g)，取上清液，殘渣部分重複提取 1 次，合併濾液，濃縮至少量後，移入 25 mL 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，分別用標準曲線計算溶液中芒柄花素的含量，即得。

### (六) 檢量線

準確吸取芒柄花素標準品儲備溶液(1000 µg/mL)適量，以甲醇稀釋製成含芒柄花素分別為 50、20、15、10、5.0、2.0 µg/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

以芒柄花素濃度為 10 µg/mL 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，分別以芒柄花素的波峰面積為指標，求出相對標準差。

### (八) 重複性與穩定性試驗

1. 重複性：取同一批市售紅耆粉末，依紅耆檢品溶液製備方法平行製備 5 份紅耆檢品溶液，進樣測定，以芒柄花素的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售紅耆粉末，依紅耆檢品溶液製備方法製備紅耆檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以芒柄花素的波峰面積為指標，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

取已知芒柄花素含量的紅耆藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 0.50 g，分別加入 1 mL 的芒柄花素溶液(80  $\mu\text{g/mL}$ )，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 5C<sub>18</sub>-AR-II Column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ )
2. 檢測波長：UV 254 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：10  $\mu\text{L}$
6. 移動相：

| 時間(min) | 乙腈(%) | 水(%) |
|---------|-------|------|
| 0       | 20    | 80   |
| 10      | 30    | 70   |
| 20      | 50    | 50   |
| 25      | 100   | 0    |
| 30      | 100   | 0    |

(十二) 臺灣市售紅耆含量測定

取 10 批市售紅耆藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，各取 10  $\mu\text{L}$  連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品芒柄花素的百分含量。

(十三) 紅耆檢品之 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 254 nm

3. 流速：0.4 mL/min

4. 管柱溫度：25 °C

5. 注入量：1 μL

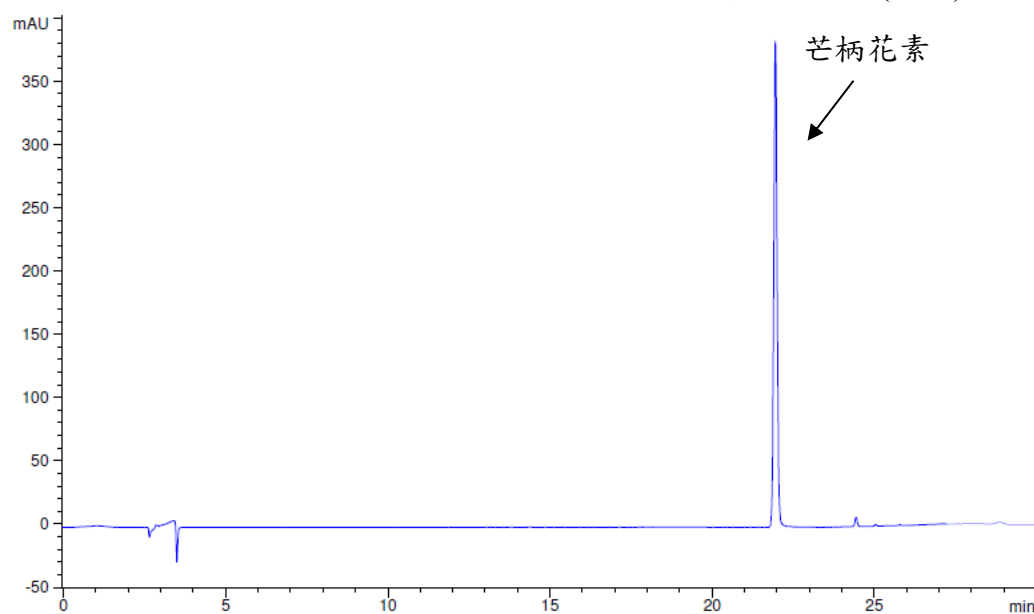
6. 移動相：

| 時間(min) | 乙腈(%) | 水(%) |
|---------|-------|------|
| 0       | 20    | 80   |
| 2       | 30    | 70   |
| 4       | 50    | 50   |
| 8       | 100   | 0    |

## 五、結果

### (一) 標準品芒柄花素之 HPLC 層析

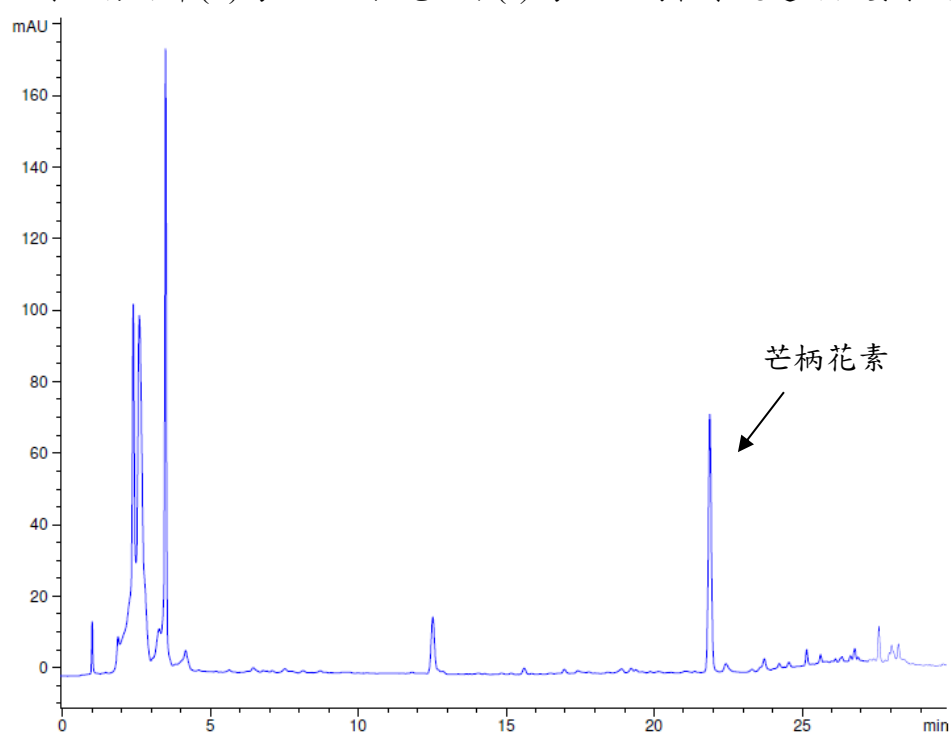
於滯留時間 21.9 分鐘處顯示芒柄花素標準品的波峰(圖一)。



圖一、芒柄花素標準品溶液之 HPLC 層析圖

### (二) 市售紅耆檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 21.9 分鐘顯示紅耆檢品中芒柄花素的波峰(圖二)，芒柄花素之分離率( $R$ )為 2.32，托尾因子( $T$ )為 1.04 均在系統適用性要求內。



圖二、市售紅耆檢品之 HPLC 層析圖

### (三) 最佳萃取溶媒評估

以甲醇為溶媒，室溫條件下超音波振盪處理，每克藥材重量所得芒柄花素的波峰面積最大，顯示甲醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒、方法萃取比較

| 溶媒              | 芒柄花素波峰面積 | 最佳萃取 |
|-----------------|----------|------|
| 甲醇              | 1489.0   | √    |
| 75% 甲醇          | 1127.4   |      |
| 甲醇、加熱 50 °C     | 1399.7   |      |
| 75% 甲醇、加熱 50 °C | 1239.6   |      |

### (四) 最佳萃取次數評估

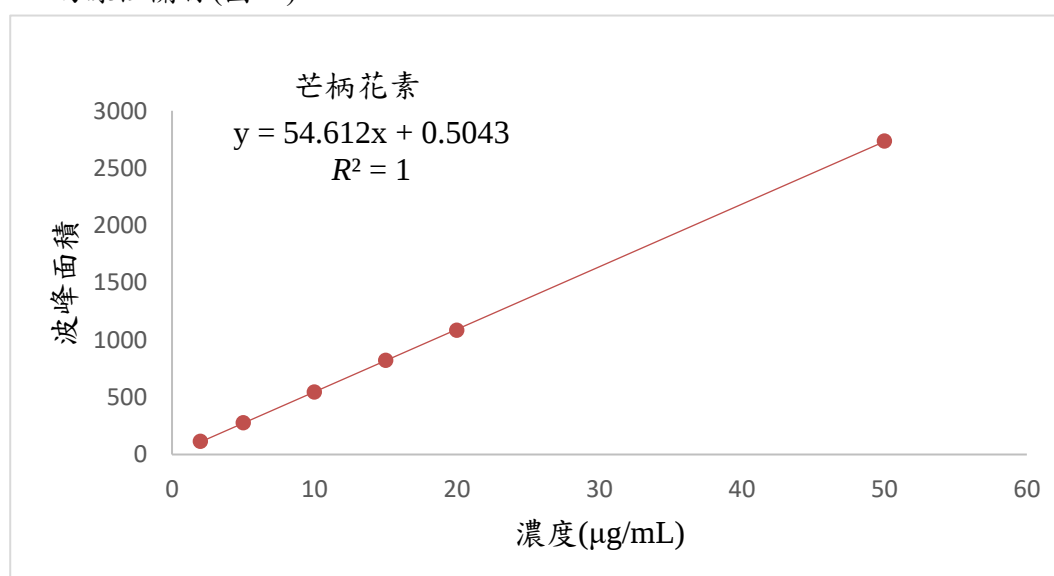
結果顯示萃取 2 次基本上已將芒柄花素萃取完全(萃取率大於 98%)。

表二、紅耆檢品萃取次數評估

| 甲醇萃取次數 | 芒柄花素波峰面積 |
|--------|----------|
| 第 1 次  | 951.4    |
| 第 2 次  | 116.8    |
| 第 3 次  | 19.8     |

### (五) 標準品芒柄花素檢量線

經不同濃度芒柄花素(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  $y = 54.612x + 0.5043$ ， $R^2 = 1$ ，顯示濃度在 2.0–50  $\mu\text{g/mL}$  有良好的線性關係(圖三)。



圖三、標準品芒柄花素檢量線圖

表三、芒柄花素之檢量線方程式

| 對照標準品 | 濃度( $\mu\text{g/mL}$ ) | 線性回歸方程式                | $R^2$ |
|-------|------------------------|------------------------|-------|
| 芒柄花素  | 2.0–50                 | $y = 54.612x + 0.5043$ | 1     |

#### (六) 精密度試驗

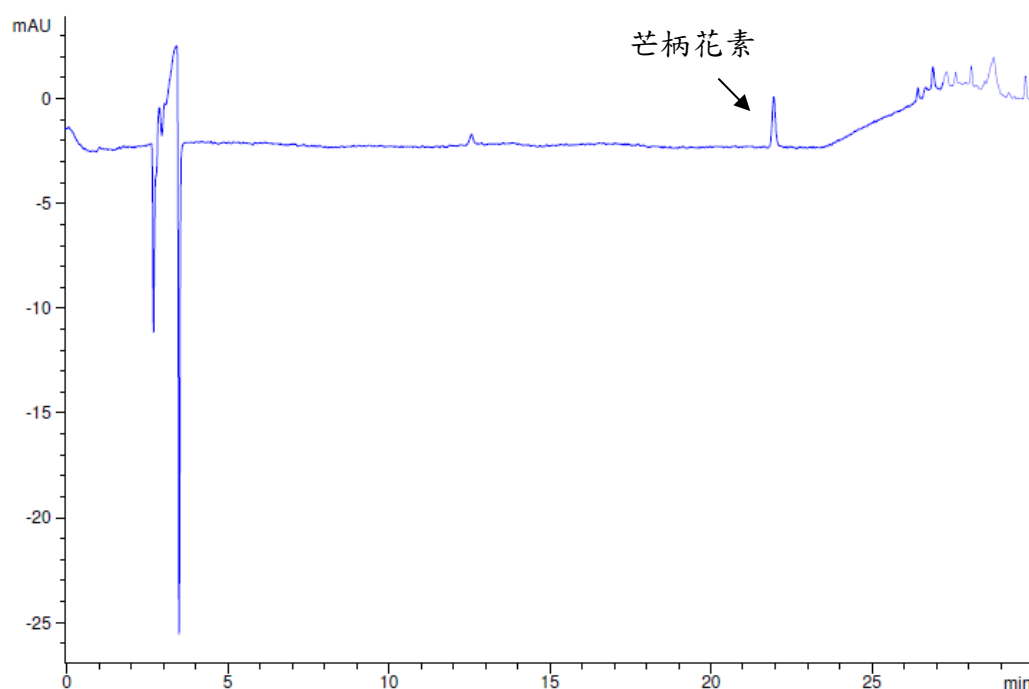
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，芒柄花素精密度之相對標準差為 0.37%，均在系統適用性要求內。

#### (七) 重複性與穩定性試驗

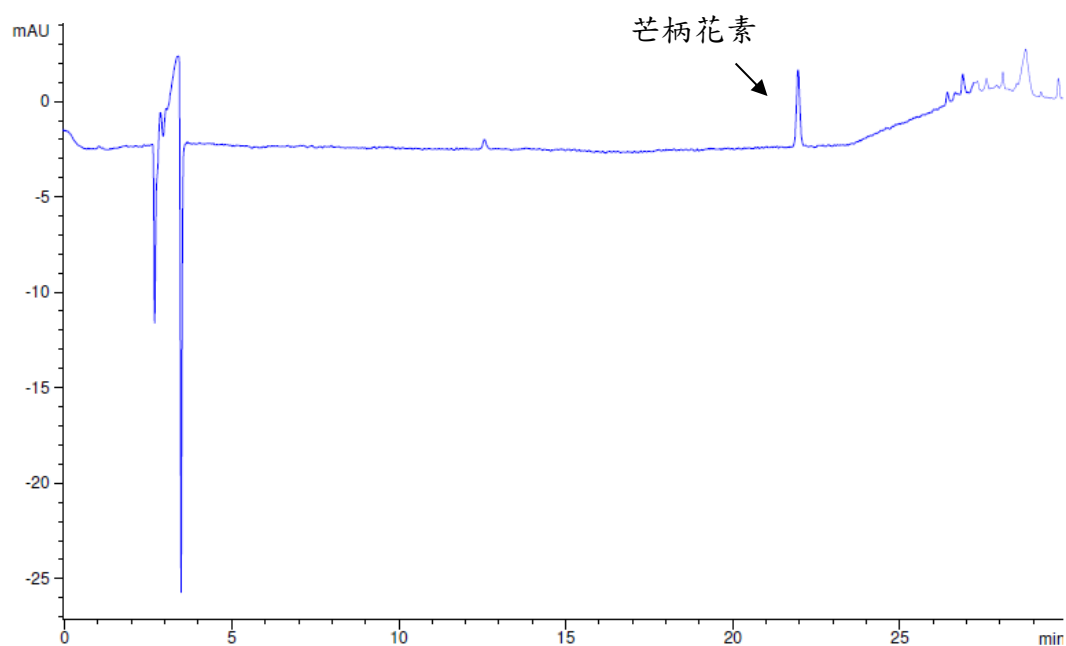
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，芒柄花素重複性之相對標準差為 2.34%，均在系統適用性要求內。芒柄花素在 24 小時內穩定，穩定性之相對標準差為 2.48%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

#### (八) 偵測極限與定量極限試驗

芒柄花素偵測極限為  $0.2 \mu\text{g/mL}$  (圖四)，芒柄花素定量極限為  $0.4 \mu\text{g/mL}$  (圖五)。



圖四、芒柄花素之偵測極限層析圖



圖五、芒柄花素之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

| 檢測項目       | 芒柄花素        |            |
|------------|-------------|------------|
|            | 濃度          | R.S.D. (%) |
| 精密度 (n=5)  | 10 µg/mL    | 0.37       |
| 重複性 (n=5)  | 檢品溶液(No.10) | 2.34       |
| 穩定性 (n=6)  | 檢品溶液(No.10) | 2.48       |
| 偵測極限 (n=1) | 0.2 µg/mL   | -          |
| 定量極限 (n=1) | 0.4 µg/mL   | -          |

#### (九) 添加回收率試驗

芒柄花素平均添加回收率為 101.7%，相對標準偏差為 3.63% (表五)。

表五、芒柄花素添加回收率

| 編號 | 藥材稱重(g)<br>(No. 10) | 含有量<br>(mg) | 加入量<br>(mg) | 測得量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | 平均回收率<br>(%) | R.S.D.<br>(%) |
|----|---------------------|-------------|-------------|-------------|------------|--------------|---------------|
| 1  | 0.508               | 0.090       | 0.80        | 0.173       | 104.4      | 101.71       | 3.63          |
| 2  | 0.501               | 0.088       | 0.80        | 0.167       | 98.5       |              |               |
| 3  | 0.506               | 0.089       | 0.80        | 0.173       | 104.6      |              |               |
| 4  | 0.502               | 0.088       | 0.80        | 0.172       | 104.2      |              |               |
| 5  | 0.508               | 0.090       | 0.80        | 0.167       | 96.9       |              |               |

(十) 臺灣市售紅耆含量測定

10 批紅耆藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，芒柄花素的含量為 0.015%–0.060%。建議紅耆藥材指標成分芒柄花素含量不得少於 0.015%。建議理論板數按芒柄花素波峰計算應不低於 5000 (實際值為 227441)。

表六、臺灣市售紅耆檢品之芒柄花素含量

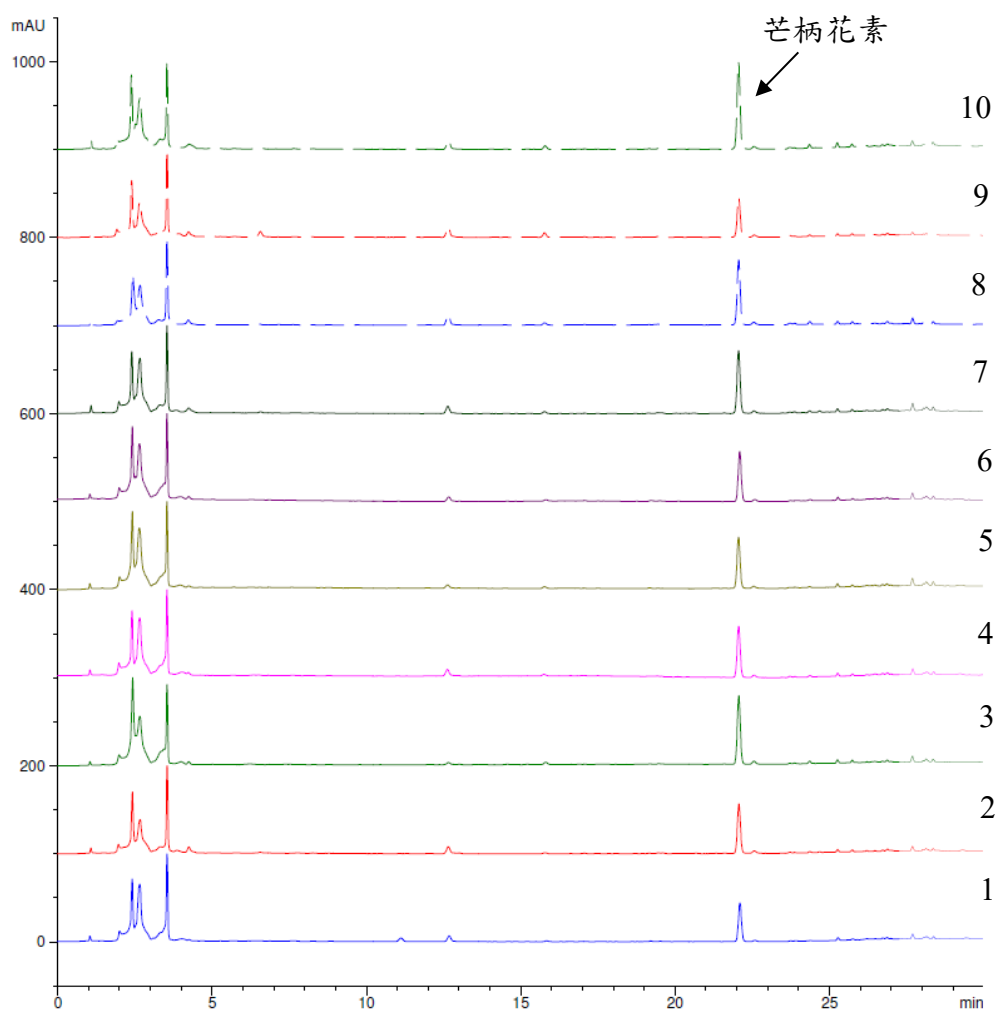
| 藥材編號(No.) | 芒柄花素含量(%)   |
|-----------|-------------|
| 1 (CA-1)  | 0.028       |
| 2 (CA)    | 0.022       |
| 3 (NR)    | 0.060       |
| 4 (NF)    | 0.026       |
| 5 (NN)    | 0.021       |
| 6 (SE)    | 0.020       |
| 7 (SG)    | 0.019       |
| 8 (SJ)    | 0.035       |
| 9 (CD)    | 0.023       |
| 10 (CA-2) | 0.015       |
| 平均值±S.D.  | 0.027±0.013 |

(十一) 紅耆藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售紅耆檢品溶液各 10  $\mu$ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II Column (250 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m)
2. 檢測波長：UV 254 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：10  $\mu$ L
6. 移動相：

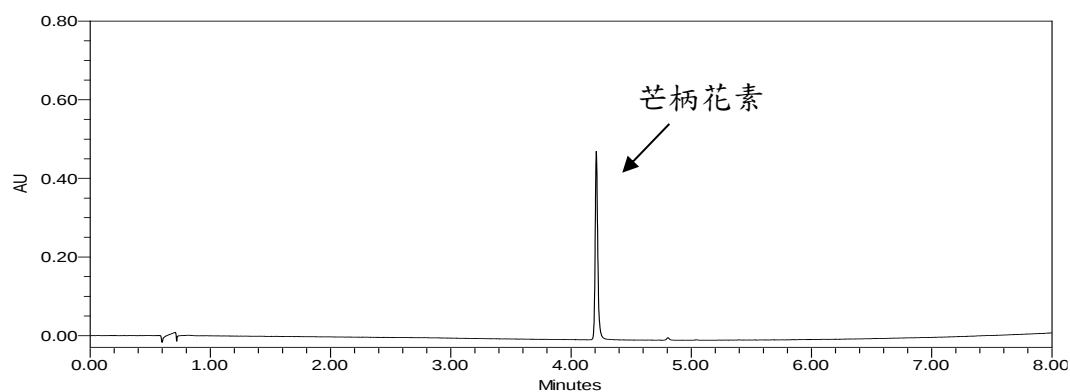
| 時間(min) | 乙腈(%) | 水(%) |
|---------|-------|------|
| 0       | 20    | 80   |
| 10      | 30    | 70   |
| 20      | 50    | 50   |
| 25      | 100   | 0    |
| 30      | 100   | 0    |



圖六、10 批紅耆藥材之 HPLC 指紋圖譜

## (十二) 標準品芒柄花素之 UPLC 層析

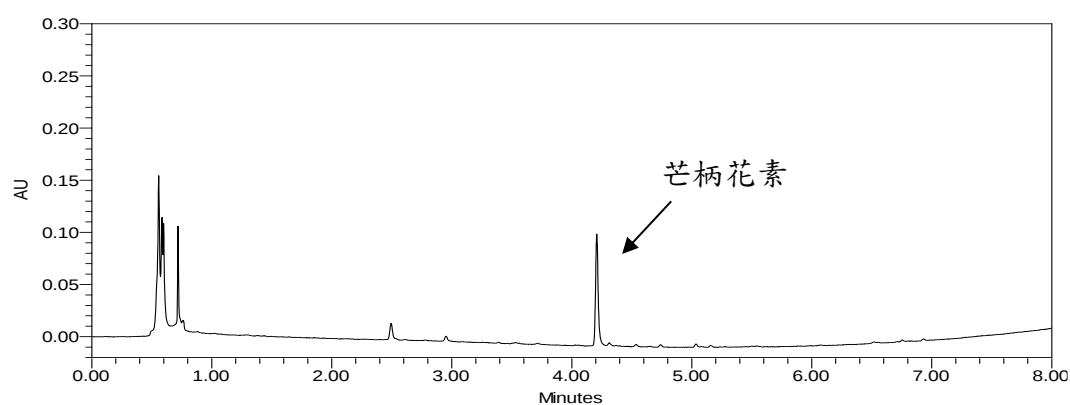
於滯留時間 4.2 分鐘處分別顯示芒柄花素標準品的波峰(圖七)。



圖七、芒柄花素標準品溶液之 UPLC 層析圖

## (十三) 市售紅耆檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 4.2 分鐘處分別顯示紅耆檢品中芒柄花素 (圖八)。

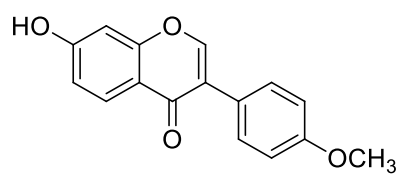


圖八、市售紅耆檢品之 UPLC 層析圖

## (十四) 芒柄花素的分子式、分子量與熔點

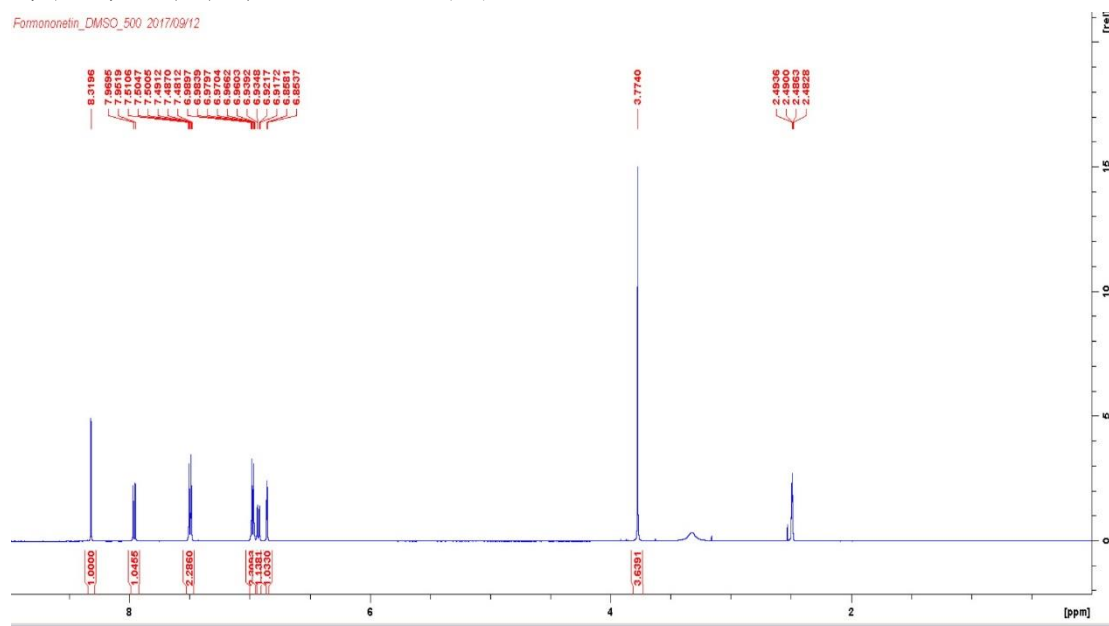
分子式： $C_{16}H_{12}O_4$ ；分子量：268.26；熔點：256–260 °C；白色固體。

## (十五) 芒柄花素的結構



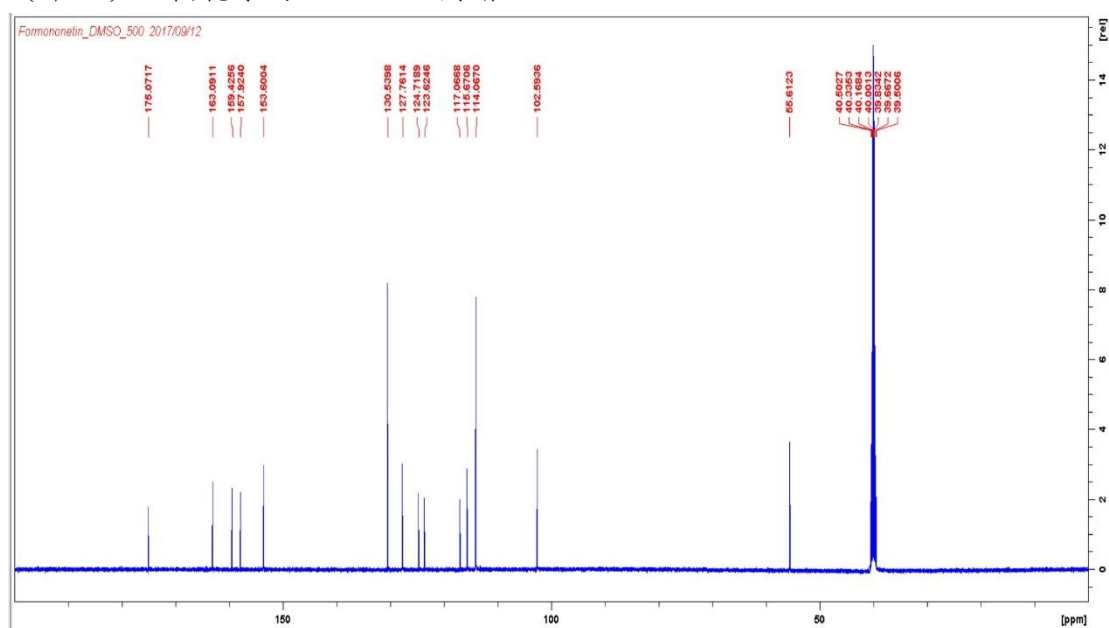
芒柄花素

## (十六) 芒柄花素的 $^1\text{H}$ NMR 圖譜



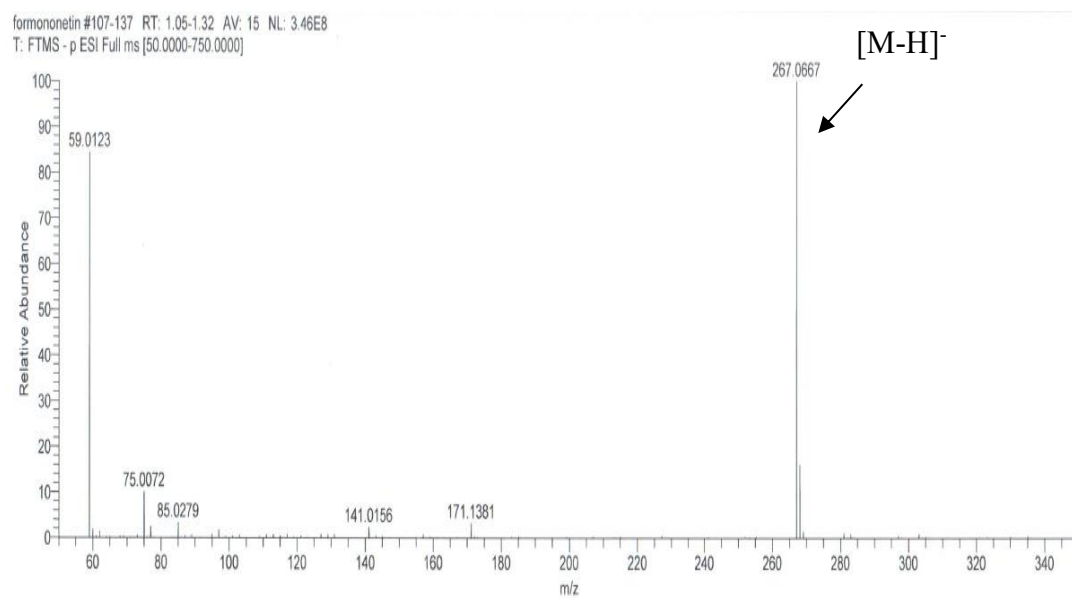
圖九、芒柄花素的  $^1\text{H}$  NMR 圖譜( $\text{DMSO}-d_6$ )

## (十七) 芒柄花素的 $^{13}\text{C}$ NMR 圖譜



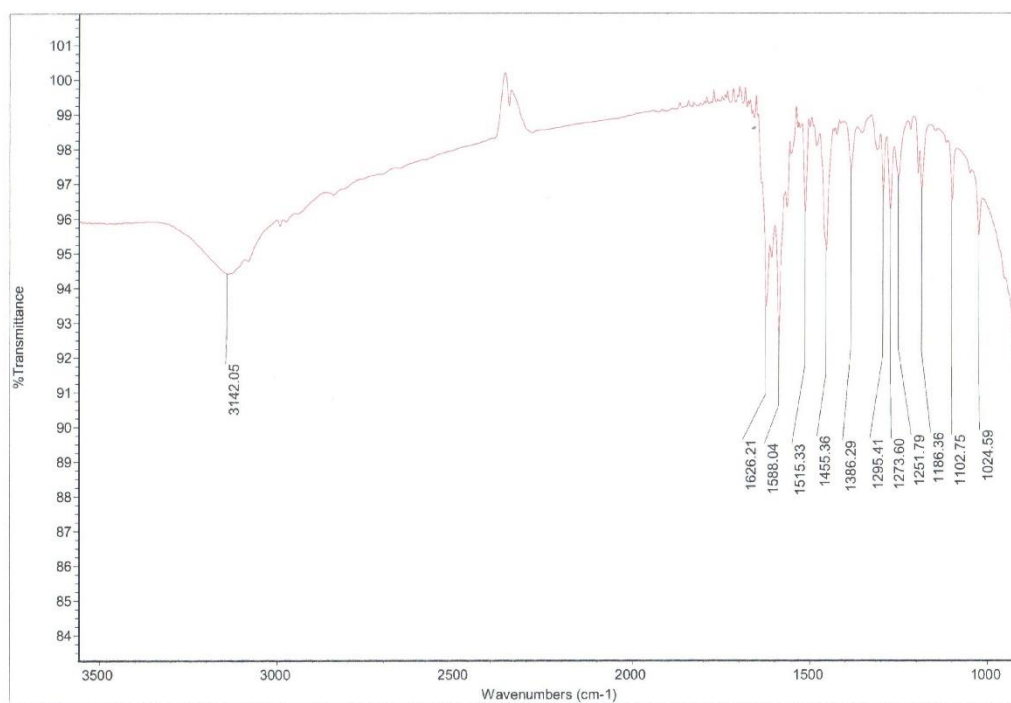
圖十、芒柄花素的  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜( $\text{DMSO}-d_6$ )

### (十八) 芒柄花素的 ESI-MS 圖譜



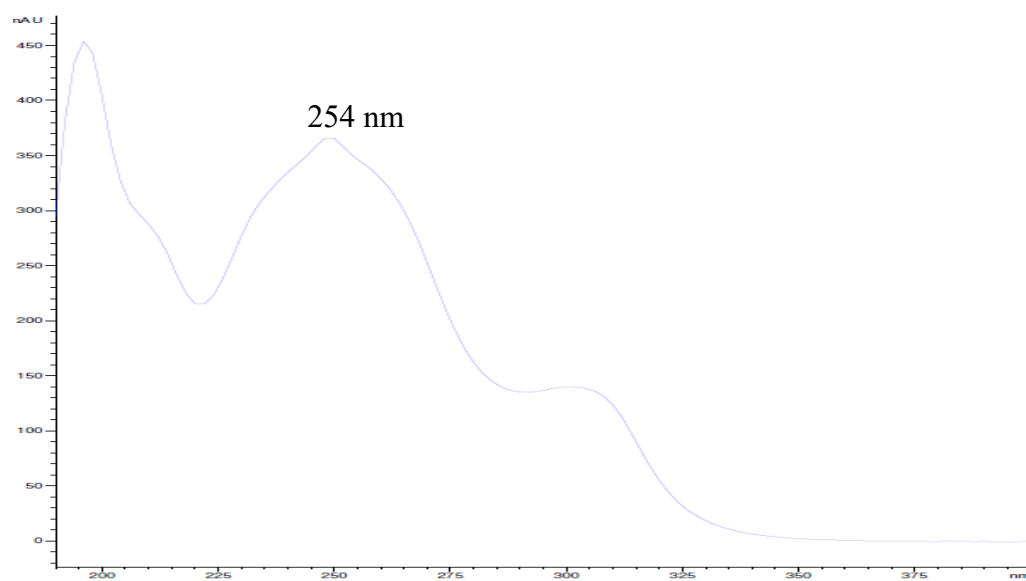
圖十一、芒柄花素的 ESI-MS 圖譜

### (十九) 芒柄花素的 FTIR 圖譜



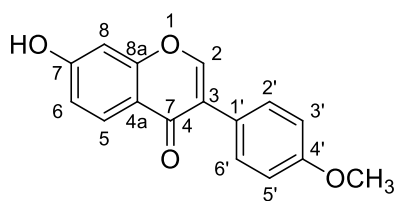
圖十二、芒柄花素的 FTIR 圖譜

(二十) 芒柄花素的 UV 圖譜



圖十三、芒柄花素的 UV 圖譜

(二十一) 芒柄花素的氫、碳化學位移



芒柄花素

表七、芒柄花素的氫、碳化學位移(CD<sub>3</sub>OD)<sup>a</sup>

| position            | $\delta_H$ (600 MHz) | $\delta_C$ (150 MHz) |
|---------------------|----------------------|----------------------|
| 2                   | 3.33 (s)             | 153.1                |
| 3                   | -                    | 123.1                |
| 4                   | -                    | 174.6                |
| 4a                  | -                    | 116.6                |
| 5                   | 7.96 (d, 8.4)        | 127.3                |
| 6                   | 6.93 (dd, 8.4, 2.4)  | 115.2                |
| 7                   | -                    | 162.5                |
| 8                   | 6.86 (d, 2.4)        | 102.1                |
| 8a                  | -                    | 157.4                |
| 1'                  | -                    | 124.2                |
| 2'                  | 7.50 (dd, 9.0, 3.0)  | 130.1                |
| 3'                  | 6.98 (dd, 9.0, 3.0)  | 113.6                |
| 4'                  | -                    | 158.9                |
| 5'                  | 6.98 (dd, 9.0, 3.0)  | 113.6                |
| 6'                  | 7.50 (dd, 9.0, 3.0)  | 130.1                |
| 7-OH                | 10.8 (s)             | -                    |
| 4'-OCH <sub>3</sub> | 3.78 (s)             | 55.1                 |

<sup>a</sup>(Multiplicity, *J* in Hz) in ppm.

## 紅耆

中文名：紅耆

生藥拉丁名：HEDYSARI RADIX

英文名：Hedysarum Root

基 原：本品為豆科 Leguminosae 植物多序岩黃耆 *Hedysarum polybotrys* Hand.-Mazz.之乾燥根。

### 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 2.0 g，加甲醇 15 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】(中華人民共和國藥典 2020)

——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，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】(香港中藥材標準第八冊)

——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 4 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

#### (二) 對照標準品 溶 液 取芒柄花素(Formononetin)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 F<sub>254</sub>，10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm

#### (四) 展 開 劑 【展開劑 1】(臺灣中藥典第三版 2018)

——二氯甲烷：甲醇：濃氨水 (12：4：1)

#### 【展開劑 2】(修飾中華人民共和國藥典 2020)

——二氯甲烷：丙酮 (15：1)

#### 【展開劑 3】(修飾香港中藥材標準第八冊)

——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (4：4：1.3)

#### 【展開劑 4】(自行開發) ✓

——正己烷：乙酸乙酯：甲醇：無水乙酸 (10：7：1：0.2)

#### (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 365 nm 之紫外燈照射下檢視。

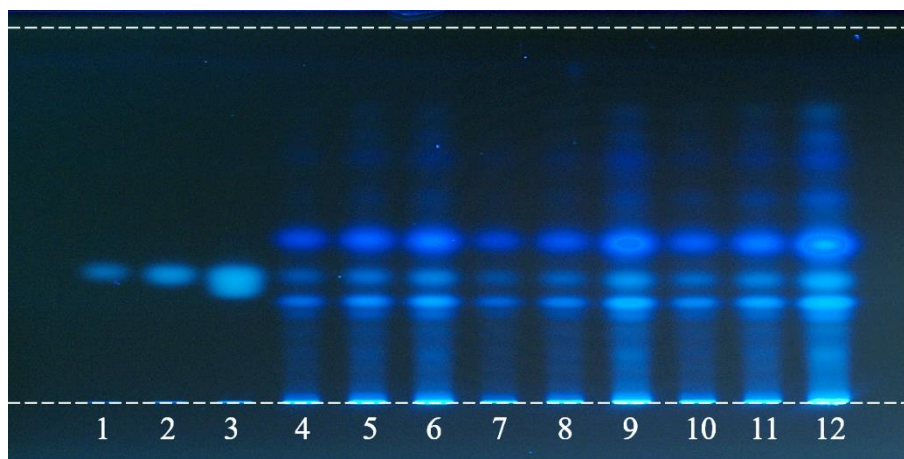
## 二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：109/09/24

相對溼度(RH)：65%

溫度(RT)：22.3 °C

【展開劑 4】 (自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲醇：無水乙酸 (10：7：1：0.2)



| 編號         | 名稱                             | 點注量             |
|------------|--------------------------------|-----------------|
| 1, 2, 3    | 芒柄花素(Formononetin) (1.0 mg/mL) | 1, 2, 5 $\mu$ L |
| 4, 5, 6    | 檢品溶液 1【萃取方法 1】                 | 1, 2, 5 $\mu$ L |
| 7, 8, 9    | 檢品溶液 1【萃取方法 2】                 | 1, 2, 5 $\mu$ L |
| 10, 11, 12 | 檢品溶液 1【萃取方法 3】                 | 1, 2, 5 $\mu$ 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芒柄花素，故採用臺灣中藥典萃取法【萃取方法 1】。

建議點注量：芒柄花素 1  $\mu$ L，檢品溶液【萃取方法 1】2  $\mu$ L。

### 三、溶媒系統選擇

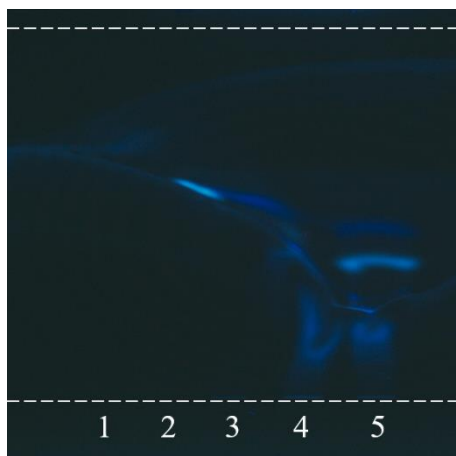
實驗日期：109/09/24

相對溼度(RH)：65%

溫度(RT)：22.3 °C

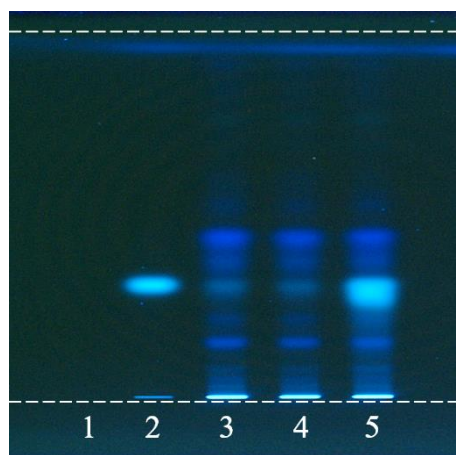
【展開劑 1】 (臺灣中藥典第三版 2018)——二氯甲烷：甲醇：濃氨水 (12：4：1)

【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) —— HPTLC 紫外光(365 nm)檢出(芒柄花素  $R_f$  值無法測定)



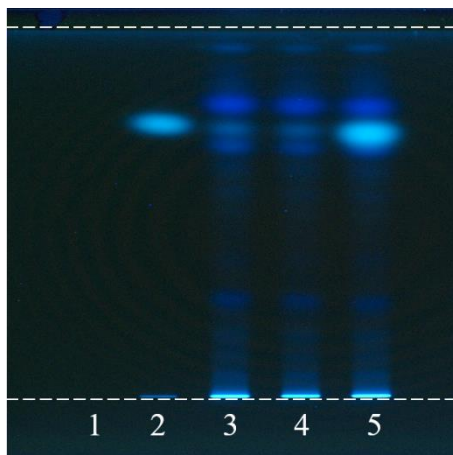
【展開劑 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015)——二氯甲烷：丙酮 (15：1)

【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) —— HPTLC 紫外光(365 nm)檢出(芒柄花素  $R_f$  值為 0.33)



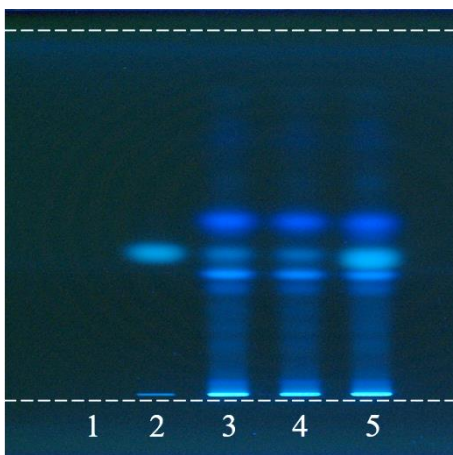
【展開劑 3】 (修飾香港中藥材標準第八冊)——正己烷：乙酸乙酯：甲醇 (4：4：1.3)

【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) —— HPTLC 紫外光(365 nm)檢出(芒柄花素  $R_f$  值為 0.79)



【展開劑 4】 (自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲醇：無水乙酸 (10：7：1：0.2) ✓

【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) —— HPTLC 紫外光(365 nm)檢出(芒柄花素  $R_f$  值為 0.42)



1：Blank

2：芒柄花素

3，4：檢品溶液 1

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 1】方式，由於指標成分  $R_f$  值較趨近於中間值，且無採用二氯甲烷，故採用自行開發之【展開劑 4】。

#### 四、觀察方式選擇

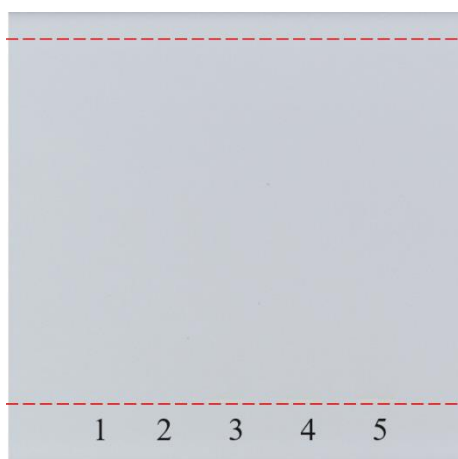
實驗日期：109/09/24

相對溼度(RH)：65%

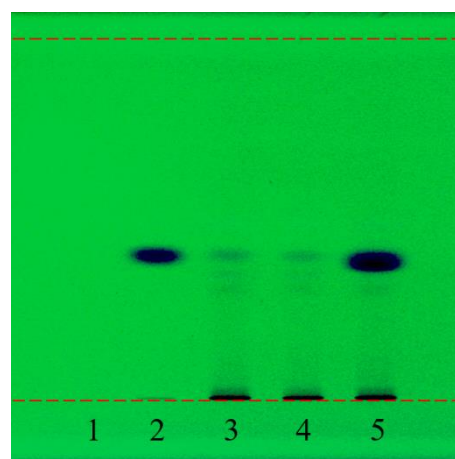
溫度(RT)：22.3 °C

【展開劑 4】 (自行開發)——正己烷：乙酸乙酯：甲醇：無水乙酸 (10：7：1：0.2)

【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) —HPTLC 可見光檢出

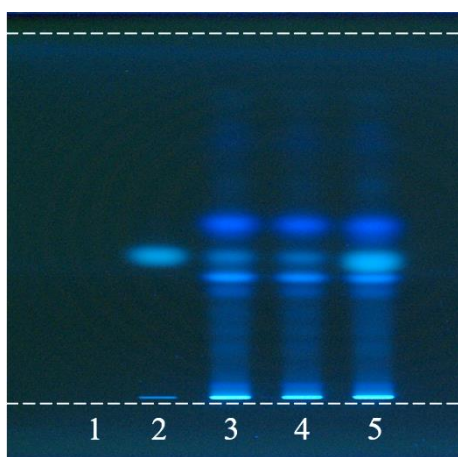


【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第三版 2018) —HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



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

✓



1：Blank

2：芒柄花素

3，4：檢品溶液 1

5：Spike

建議觀察方式：於紫外光(365 nm)下顯示出較紫外光(254 nm)有較多明顯之條帶及芒柄花素標準品斑點。

## 五、十批紅耆藥材樣品檢測

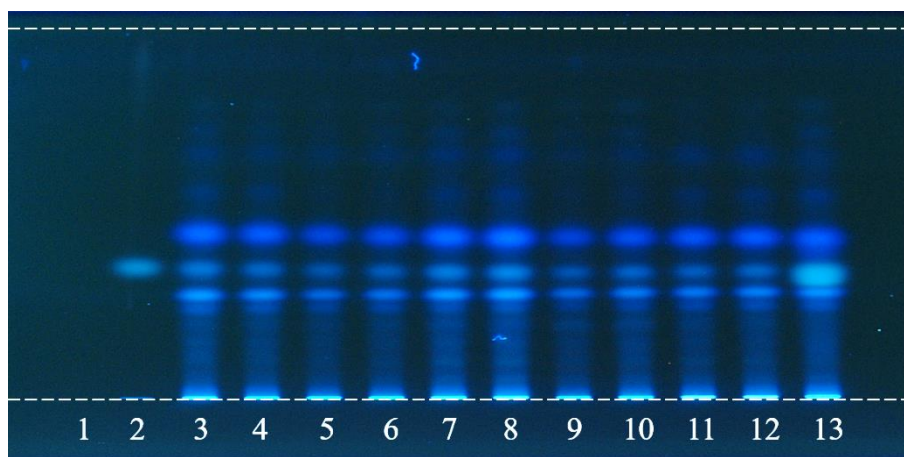
實驗日期：109/09/24

相對溼度(RH)：65%

溫度(RT)：22.3 °C

【展開劑 4】（自行開發）——正己烷：乙酸乙酯：甲醇：無水乙酸（10：7：1：0.2）

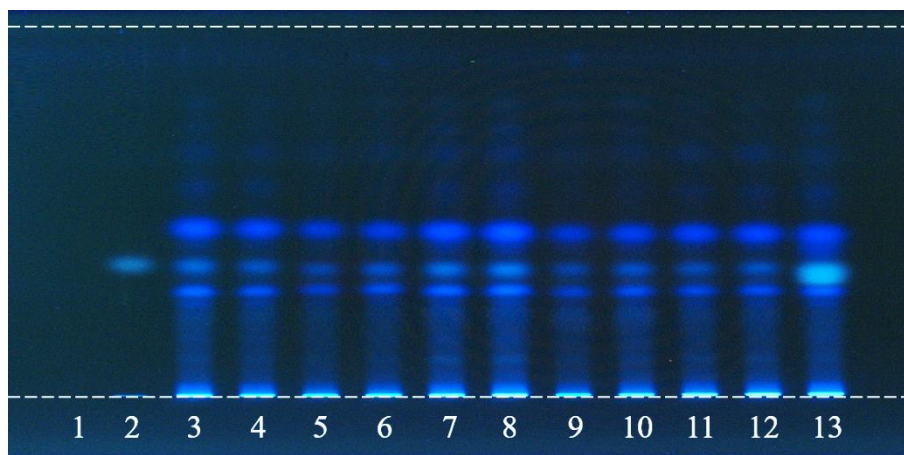
【萃取方法 1】（臺灣中藥典第三版 2018）— HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



|         |                 |
|---------|-----------------|
| 1       | Blank           |
| 2       | 芒柄花素(1.0 mg/mL) |
| 3 , 4   | 檢品溶液 1 (NF)     |
| 5 , 6   | 檢品溶液 2 (NN)     |
| 7 , 8   | 檢品溶液 3 (NR)     |
| 9 , 10  | 檢品溶液 4 (CA)     |
| 11 , 12 | 檢品溶液 5 (CA1)    |
| 13      | Spike (檢品溶液 1)  |

【展開劑 4】（自行開發）——正己烷：乙酸乙酯：甲醇：無水乙酸 (10：7：1：0.2)

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



|       |                 |
|-------|-----------------|
| 1     | Blank           |
| 2     | 芒柄花素(1.0 mg/mL) |
| 3，4   | 檢品溶液 6 (CD)     |
| 5，6   | 檢品溶液 7 (CA2)    |
| 7，8   | 檢品溶液 8 (SJ)     |
| 9，10  | 檢品溶液 9 (SE)     |
| 11，12 | 檢品溶液 10 (SG)    |
| 13    | Spike (檢品溶液 1)  |

結論與建議：以臺灣中藥典之【萃取方法 1】方式，以自行開發之【展開劑 4】分離與檢出芒柄花素較佳，於紫外光(365 nm)下檢視較佳。