

烏藥

(LINDERAE RADIX)

烏藥 MI	2
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）	2
烏藥 HPLC	6
一、材料	6
二、儀器及層析管柱	6
三、實驗藥品及試劑來源	6
四、方法	6
五、結果	12
烏藥 TLC	33
一、方法	33
二、萃法選擇及濃度測試	34
三、溶媒系統選擇	35
四、觀察方式選擇	36
五、十家樣品檢測	37

烏藥 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烏藥的乾燥塊根。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：烏藥

生藥名：LINDERAE RADIX

英文名：Combined Spicebush Root

基原：樟科 Lauraceae 植物烏藥 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm. 的乾燥塊根。

採收加工：全年均可採挖，除去細根，洗淨，直接曬乾，或趁新鮮切片曬乾。

藥材性狀：本藥材為烏藥的乾燥塊根。塊根呈紡錘狀，略彎曲，有的中部收縮成連珠狀，稱「烏藥珠」。表面黃棕色或黃褐色，有縱皺紋及稀疏的細根痕。質堅硬，不易折斷，切面厚約 0.2~2.5 mm，呈黃白色或淡黃棕色，中心有放射狀紋理，可見年輪環紋，中心顏色較深。氣香，味微苦、辛，有清涼感。

生長分佈：常綠灌木或小喬木，花期 3~4 月，果期 9~10 月。喜陽光充足，土壤肥沃處。生於向陽山坡灌木林中、山谷或疏林灌叢中。產於中國大陸的浙江、江西、福建、安徽、湖南、廣東、廣西等地區。臺灣、越南、菲律賓也有分布。

三、藥材組織顯微鑑別(圖 2)

1. 本品根之橫切面，木栓層為 4~10 列木栓細胞組成，細胞多數扁平，排列整齊，常多破裂。
2. 皮層狹窄，由數列橢圓形或不規則形的薄壁細胞組成，其中散有單個或數個成群的類橢圓形油細胞，內含油狀物。
3. 韌皮部常有油細胞散在。
4. 韌皮部與皮層薄壁細胞易破碎，形成空隙。
5. 形成層成環。
6. 木質部占根的絕大部分，年輪明顯。
7. 導管多單列或多列，呈類多角形或類圓形。
8. 木髓線寬 1~4 列細胞，由徑向延長的類長方形薄壁細胞構成，木化。
9. 薄壁細胞含大量澱粉粒，油滴及黃色樹脂塊。

四、藥材粉末顯微鑑別(圖 3)

1. 本品粉末黃白色。

2. 木纖維淡黃色，多成束，細長多碎斷，有單紋孔，胞腔含澱粉粒。偏光顯微鏡下呈亮白色至亮黃色。
3. 韌皮纖維近無色，類長梭形，常單個散在，直徑 13~30 μm ，壁極厚，微木化，胞腔狹細，孔溝不明顯。偏光顯微鏡下呈亮黃白色。
4. 有緣紋孔導管直徑 20~70 μm ，有緣紋孔排列緊密。
5. 髓線細胞呈類方形、類多角形，常數列重疊，紋孔排列緊密。
6. 澱粉粒甚多，單粒呈類球形、長圓形或卵圓形，直徑約 4~40 μm ，臍點呈叉狀、人字狀或裂縫狀；複粒由 2~5 分粒組成。偏光顯微鏡下單粒呈黑十字狀，複粒呈黑色網紋狀。

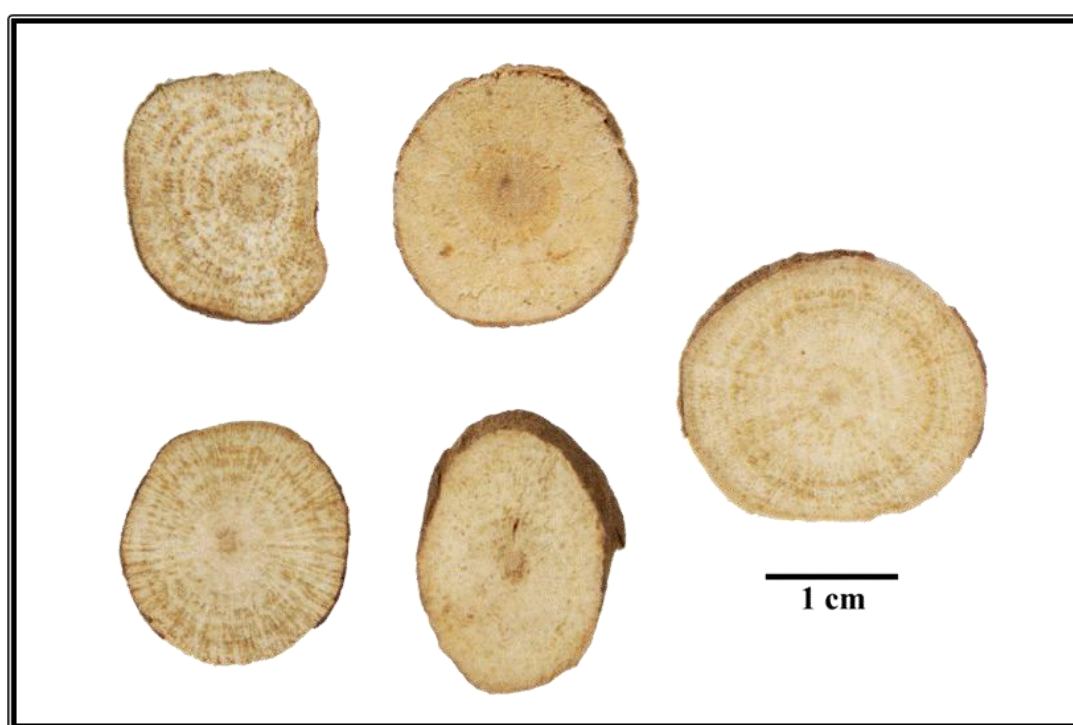


圖 1 烏藥藥材圖

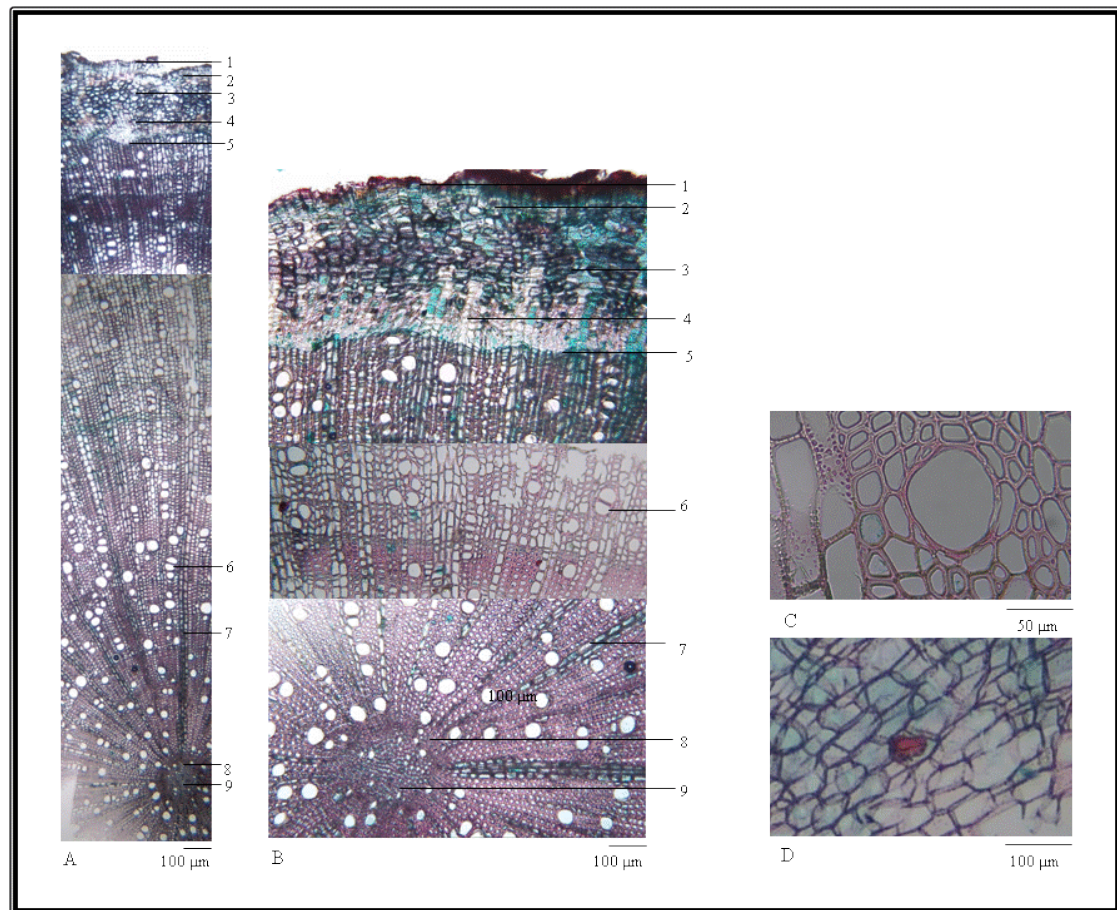


圖 2 烏藥橫切面顯微特徵圖

A.橫切面圖 B.橫切面放大圖 C.導管 D.油細胞

1.木栓層 2.油細胞 3.皮層 4.韌皮部 5.形成層 6.木質部 7.髓線
8.年輪 9.原生木部



圖 3 烏藥粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 木纖維 2. 韌皮纖維 3. 有緣紋孔導管 4. 髓線細胞 5. 澱粉粒單粒

6. 澱粉粒複粒

烏藥 (LINDERAE RADIX)

一、材料

購自於台灣各地中藥店烏藥藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Shimadzu SCL-10A VP、Diode Array Detector SPD-M10A VP、Column Oven CTO-10AS VP，層析管柱 Shiseido Capcell PAK 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、Sampler 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

乙腈(99.9%)購自於 Sigma-Aldrich；乙醇(99.5%)購自於島久藥品株式會社；甲醇(HPLC grade)購自於 Duksan Pure Chemicals Co., Ltd；三乙胺(99.0%)購自於益和；甲酸(99.0%)購自於 Merck；濃鹽酸(37%)購自於 Sigma-Aldrich。

(二) 標準品

烏藥醚內酯(Linderane)購自 Shanghai BS Bio-tech Co., Ltd. (China)，純度為 98%；去甲異波爾定(Norisoboldine)購自 Shanghai BS Bio-tech Co., Ltd. (China)，純度為 98%。

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒開發

標準品為烏藥醚內酯：

取本品粉末七份，每份精確稱定 1.0 g，置 100 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 25mL，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取得濾液搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μm)，即得。每針 10 μL 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以所測得每克重量之標準品烏藥醚內酯(Linderane)最大波峰面積為最佳烏藥萃取溶媒。

標準品為去甲異波爾定：

取本品粉末八份，每份精確稱定 1.0 g，置 100 mL 三角錐形瓶中，精確加入甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇、乙醇、75% 乙醇、50% 乙醇、水、0.5% 鹽酸與甲醇(1:2, v/v)各 25mL，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取得濾液搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μ m)，即得。每針 10 μ L 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以所測得每克重量之標準品去甲異波爾定(Norisoboldine)最大波峰面積為最佳烏藥萃取溶媒。

(二) 最佳萃取次數評估

標準品為烏藥醚內酯：

取本品粉末約 1.0 g (過第 20 號篩網)，精確稱定，置 100 mL 三角錐形瓶中，精確加入甲醇 25 mL，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，冷卻後以 No.1 濾紙過濾，濾液加甲醇定容至 25 mL，搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μ m)，取濾液，即得。每針 10 μ 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。

標準品為去甲異波爾定：

取本品粉末約 1.0 g (過第 20 號篩網)，精確稱定，置 100 mL 三角錐形瓶中，精確加入 0.5% 鹽酸與甲醇(1:2, v/v) 25 mL，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，冷卻後以 No.1 濾紙過濾，濾液加 0.5% 鹽酸與無水甲醇(1:2, v/v)定容至 25 mL，取得濾液搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μ m)，即得。每針 10 μ 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

標準品為烏藥醚內酯：

取標準品烏藥醚內酯(Linderane)精確稱定 1.0 mg，加 1 mL 的甲醇製成每 1 mL 含烏藥醚內酯(Linderane) 1000 μ g 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 50 μ g/mL 製成對照標準品溶液。

標準品為去甲異波爾定：

取標準品去甲異波爾定(Norisoboldine)精確稱定 1.0 mg，加 1 mL 的 0.5% 鹽酸與甲醇(1:2, v/v)，製成每 1 mL 含去甲異波爾定(Norisoboldine) 1000 μ g 的標準品儲備溶液，並以 0.5% 鹽酸與甲醇(1:2, v/v)稀釋至 200 μ g/mL 製成對照標準品溶液。

(四) 檢品溶液

標準品為烏藥醚內酯:

取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g, 精確稱定, 置 100 mL 三角錐形瓶中, 精確加入甲醇 25 mL, 超音波震盪處理(功率 300 W, 頻率 40 kHz) 30 分鐘, 以 No.1 濾紙過濾。殘渣部分重複提取 1 次, 合併濾液, 減壓濃縮至少量, 轉移至 25 mL 之定量瓶中, 加入溶媒至刻度, 搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μ m), 即得。

標準品為去甲異波爾定:

取本品粉末(過第 20 號篩網)約 1.0 g, 精確稱定, 置 100 mL 三角錐形瓶中, 精確加入 0.5% 鹽酸與甲醇 (1:2, v/v) 25 mL, 超音波震盪處理(功率 300 W, 頻率 40 kHz) 30 分鐘, 以 No.1 濾紙過濾。殘渣部分重複提取 1 次, 合併濾液, 減壓濃縮至少量, 轉移至 25 mL 之定量瓶中, 加入溶媒至刻度, 搖勻再過濾(Syringe filter, 0.22 μ m), 即得。

(五) 測定法

分別精確吸取標準品溶液及檢品溶液各 10 μ L, 注入 HPLC, 測定, 用標準曲線計算溶液中烏藥醚內酯(Linderane)及去甲異波爾定(Norisoboldine)的含量, 即得。

(六) 檢量線

標準品為烏藥醚內酯:

精確吸取烏藥醚內酯(Linderane)標準品儲備溶液適量(1000 μ g/mL), 以甲醇稀釋製成含烏藥醚內酯(Linderane)分別為 400、200、100、50、25 μ g/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 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 。

標準品為去甲異波爾定:

精確吸取去甲異波爾定(Norisoboldine)標準品儲備溶液適量(1000 μ g/mL), 以 0.5% 鹽酸與甲醇(1:2, v/v)稀釋製成含去甲異波爾定(Norisoboldine)分別為 800、400、200、100、50 μ g/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 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

標準品為烏藥醚內酯:

以烏藥醚內酯(Linderane)濃度為 50 μ g/mL 之標準品溶液連續進樣五

針，以烏藥醚內酯(Linderane)波峰面積為指標，求出相對標準差。

標準品為去甲異波爾定:

以去甲異波爾定(Norisoboldine)濃度為 200 µg/mL 之標準品儲溶液連續進樣五針，以去甲異波爾定(Norisoboldine)波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 再現性與穩定性試驗

標準品為烏藥醚內酯:

1. 再現性:取同一批市售烏藥粉末，依烏藥檢品溶液製備方法平行製備五份烏藥檢品溶液，進樣測定，以烏藥醚內酯(Linderane)含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性:取同一批市售烏藥粉末，依烏藥檢品溶液製備方法製備烏藥檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以烏藥醚內酯(Linderane)波峰面積為指標，求出相對標準差。

標準品為去甲異波爾定:

1. 再現性:取同一批市售烏藥粉末，依烏藥檢品溶液製備方法平行製備五份烏藥檢品溶液，進樣測定，以去甲異波爾定(Norisoboldine)含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性:取同一批市售烏藥粉末，依烏藥檢品溶液製備方法製備烏藥檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以去甲異波爾定(Norisoboldine)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

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) 添加回收率試驗

標準品為烏藥醚內酯:

取已知烏藥醚內酯(Linderane)含量的烏藥藥材粉末約 0.5 g，精確稱定五份，分別加入 1 mL 的烏藥醚內酯(Linderane)溶液(100 µg/mL)，並按檢品溶液製備方法操作測定。

標準品為去甲異波爾定:

取已知去甲異波爾定(Norisoboldine)含量的烏藥藥材粉末約 0.1 g，精

確稱定五份，分別加入 1 mL 的烏藥醚內酯(Linderane)溶液(400 µg/mL)，並按檢品溶液製備方法操作測定。

(十一) HPLC 分析條件

標準品為烏藥醚內酯(方法一):

1. 層析管：SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ Column (250 × 4.6 mm, 5 µm)
2. 檢測波長：UV 235 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)	乙腈(%)	水(%)
0	42	58
30	42	58
35	95	5
40	95	5
45	42	58
50	42	58

標準品為去甲異波爾定(方法二):

1. 層析管：SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ Column (250 × 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 °C
5. 注入量：10 µL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	0.1%三乙胺+0.5%甲酸(%, v/v)
0	10	90
15	20	80
25	20	80
35	10	90

0.1%三乙胺+0.5%甲酸(%, v/v)配置方法：

取 1000 mL 定量瓶加適量蒸餾水，以定量吸管分別吸取三乙胺(99.0%)溶液 1.0 mL 及 5.0 mL 甲酸(99.0%)緩慢延管壁加入，再加蒸餾水定量至 1000 mL。

(十二) 臺灣市售烏藥含量測定

標準品為烏藥醚內酯:

取十批市售烏藥藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μ L 連續三針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品烏藥醚內酯(Linderane)的百分含量。

標準品為去甲異波爾定:

取十批市售烏藥藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μ L 連續三針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品去甲異波爾定(Norisoboldine)的百分含量。

(十三) 烏藥檢品之 UPLC 層析條件

標準品為烏藥醚內酯(方法三):

1. 層析管：Thermo Synchronis C18 (100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)
2. 檢測波長：UV 235 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}$ C
5. 注入量：1 μ L
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	水(%)
0	42	58
4	42	58
6	95	5
8	95	5
10	100	0

標準品為去甲異波爾定(方法四):

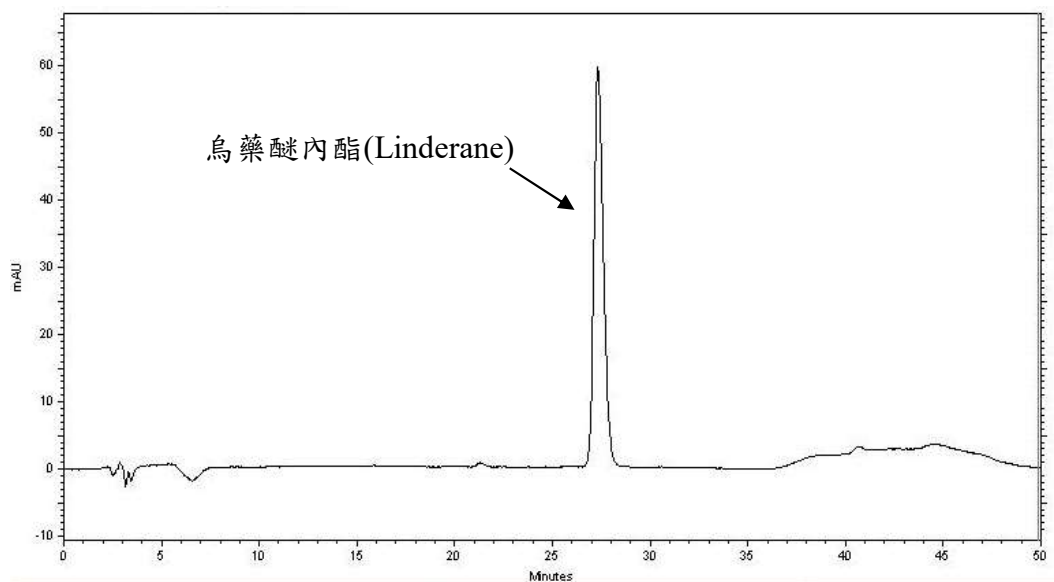
1. 層析管：Thermo Synchronis C18 (100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)
2. 檢測波長：UV 280 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 $^{\circ}$ C
5. 注入量：1 μ L
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%)	0.1%三乙胺+0.5%甲酸(%, v/v)
0	10	90
6	20	80
10	100	0

五、結果

(一) 標準品烏藥醚內酯(Linderane)之 HPLC 層析(方法一)

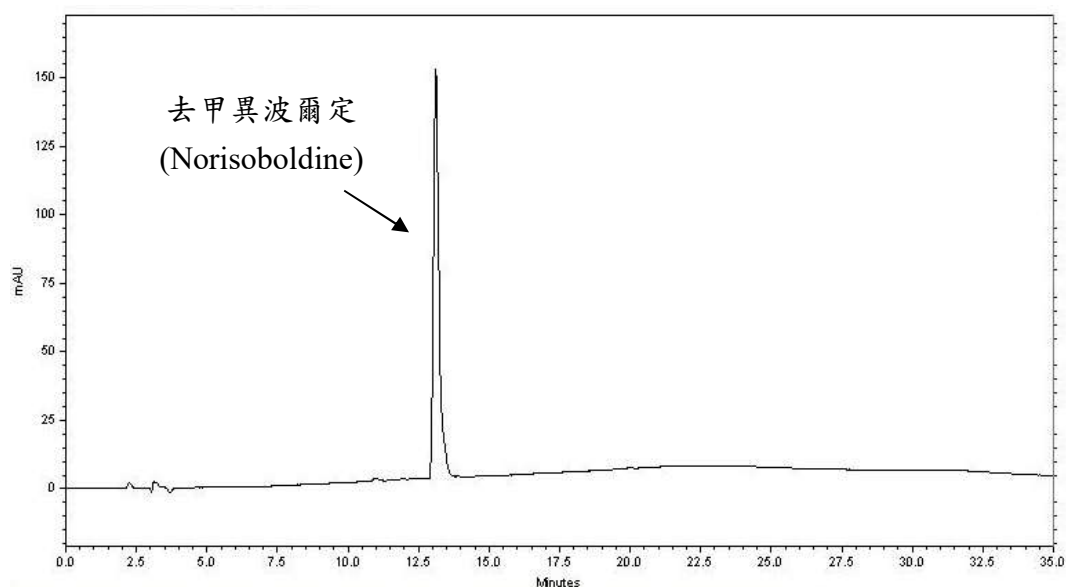
於滯留時間 27.3 分鐘處顯示烏藥醚內酯(Linderane)標準品波峰(圖一)。



圖一、烏藥醚內酯(Linderane)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 標準品去甲異波爾定(Norisoboldine)之 HPLC 層析(方法二)

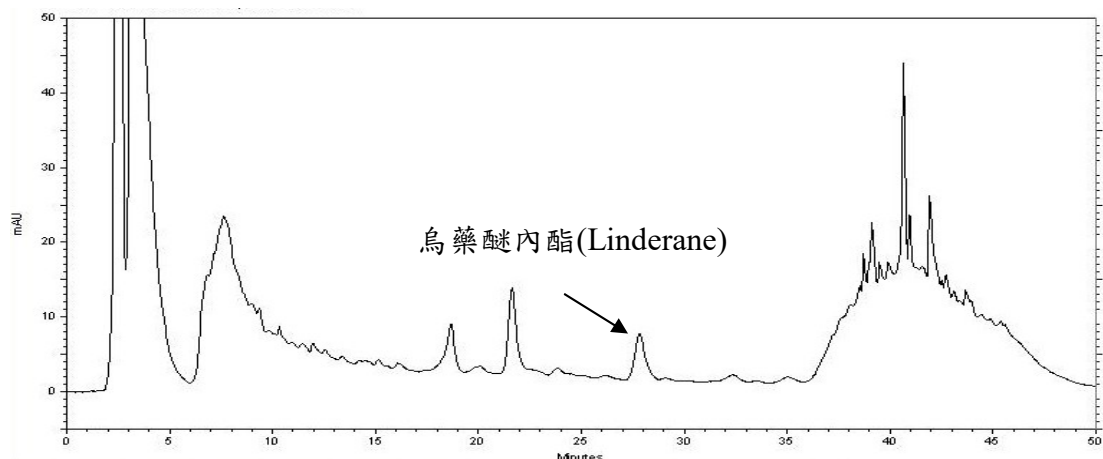
於滯留時間 13.1 分鐘處顯示去甲異波爾定(Norisoboldine)標準品波峰(圖二)。



圖二、去甲異波爾定(Norisoboldine)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(三) 市售烏藥檢品之 HPLC 層析(方法一)

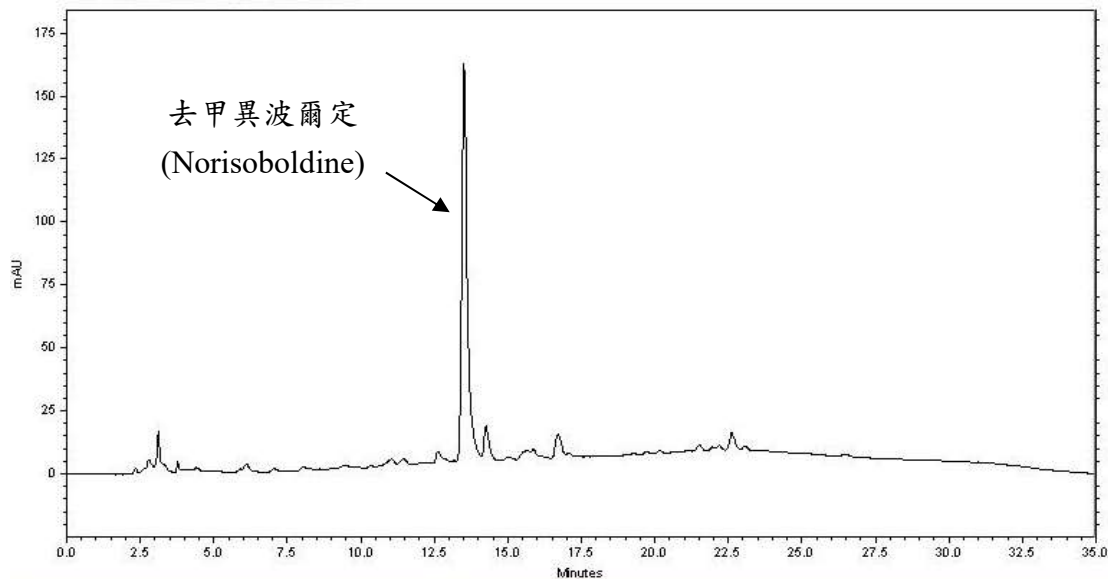
於滯留時間 27.5 分鐘處顯示烏藥檢品中烏藥醚內酯(Linderane)波峰(圖三)。分離率為 $R = 1.57$ ，托尾因子為 $T = 1.07$ ，均在系統適用性要求內。



圖三、市售烏藥檢品之 HPLC 層析圖

(四) 市售烏藥檢品之 HPLC 層析(方法二)

於滯留時間 13.3 分鐘處顯示烏藥檢品中去甲異波爾定(Norisoboldine)波峰(圖四)。分離率為 $R = 1.95$ ，托尾因子為 $T = 1.09$ ，均在系統適用性要求內。



圖四、市售烏藥檢品之 HPLC 層析圖

(五) 最佳萃取溶媒開發

標準品為烏藥醚內酯:

以甲醇為溶媒時，每克藥材重量所得烏藥醚內酯(Linderane)的波峰面積最大，顯示甲醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	波峰面積(mAU)	最佳萃取
甲醇	307742	√
75%甲醇	173787	
50%甲醇	140556	
乙醇	137680	
75%乙醇	155662	
50%乙醇	137600	
水	N.D.	

標準品為去甲異波爾定:

以 0.5%鹽酸與甲醇 (1:2, v/v)為溶媒時，每克藥材重量所得去甲異波爾定(Norisoboldine)的波峰面積最大，顯示 0.5%鹽酸與甲醇 (1:2, v/v)為最佳萃取溶媒。

表二、不同溶媒萃取比較

溶媒	波峰面積(mAU)	最佳萃取
甲醇	2360209	
75%甲醇	3203317	
50%甲醇	3194861	
乙醇	707497	
75%乙醇	3641819	
50%乙醇	3911134	
水	989739	
0.5%鹽酸與甲醇 (1:2, v/v)	4921105	√

(六) 最佳萃取次數評估

標準品為烏藥醚內酯:

結果顯示萃取兩次基本上已將烏藥醚內酯(Linderane)萃取完全(萃取率大於 98%)

表三、烏藥檢品中烏藥醚內酯(Linderane)萃取次數評估

甲醇萃取次數	烏藥醚內酯(Linderane)波峰面積
第一次	341142
第二次	63597
第三次	5587
第四次	N.D.

標準品為去甲異波爾定:

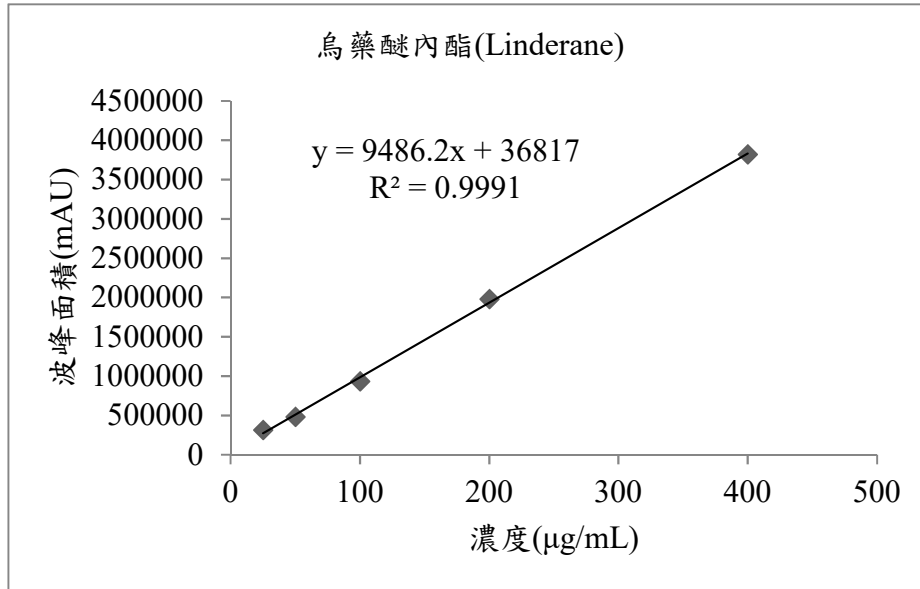
結果顯示萃取兩次基本上已將去甲異波爾定(Norisoboldine)萃取完全(萃取率大於 98%)

表四、烏藥檢品中去甲異波爾定(Norisoboldine)萃取次數評估

0.5%鹽酸與甲醇(1:2, v/v) 萃取次數	去甲異波爾定(Norisoboldine) 波峰面積
第一次	4917647
第二次	1887716
第三次	134067
第四次	N.D.

(五) 標準品烏藥醚內酯(Linderane)檢量線

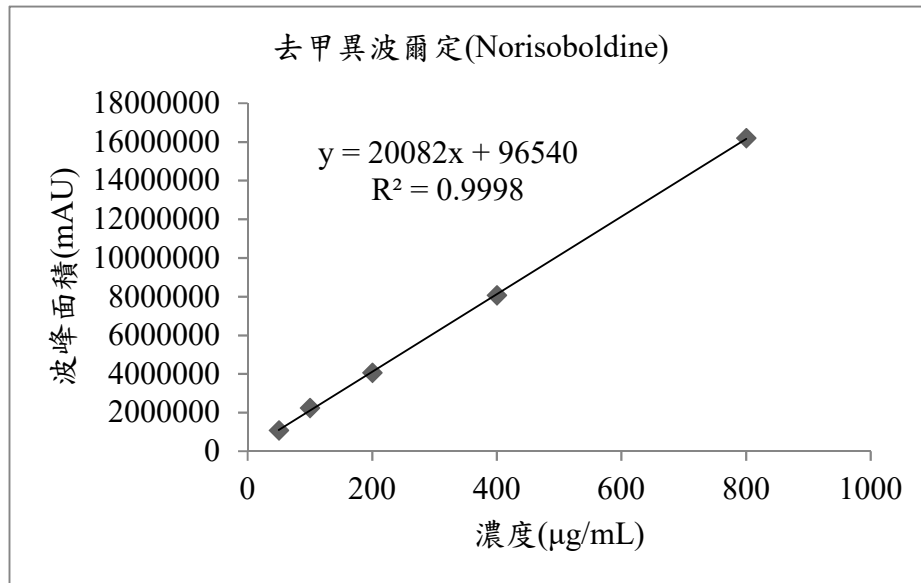
經不同濃度烏藥醚內酯(Linderane)(x)對各自層析波峰面積的反應值(y)所得到的檢量線方程式為： $y = 9486.2x + 36817$ ， $R^2 = 0.9991$ ，顯示濃度在 25–400 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖五)。



圖五、烏藥醚內酯(Linderane)之檢量線圖

標準品去甲異波爾定(Norisoboldine)檢量線

經不同濃度去甲異波爾定(Norisoboldine)(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： $y = 20082x + 96540$ ， $R^2 = 0.9998$ ，顯示濃度在 50–800 µg/mL 有良好的線性關係(圖六)。



圖六、去甲異波爾定(Norisoboldine)之檢量線圖

表五、烏藥醚內酯(Linderane)與去甲異波爾定(Norisoboldine)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
烏藥醚內酯 (Linderane)	25–400	$y = 9486.2 x + 36817$	0.9991
去甲異波爾定 (Norisoboldine)	50–800	$y = 20082 x + 96540$	0.9998

(六) 精密度與再現性試驗

標準品為烏藥醚內酯:

實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精確度良好，烏藥醚內酯(Linderane)精確度之相對標準差為 1.71%，再現性之相對標準差為 2.84%，均在系統適用性要求內。

標準品為去甲異波爾定:

實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精確度良好，去甲異波爾定(Norisoboldine)精確度之相對標準差為 2.46%，再現性之相對標準差為 2.88%，均在系統適用性要求內。

(七) 穩定性試驗

標準品為烏藥醚內酯:

由結果可以得知，烏藥醚內酯(Linderane)在 24 小時內穩定，相對標準差為 3.79%，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。

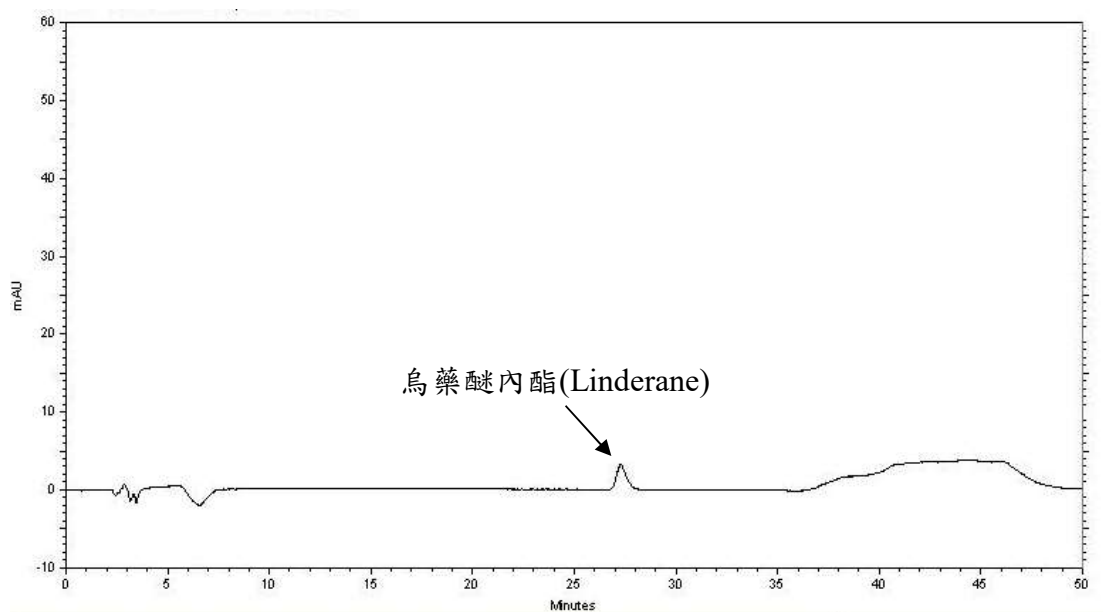
標準品為去甲異波爾定:

由結果可以得知，去甲異波爾定(Norisoboldine)在 24 小時內穩定，相對標準差為 2.17%，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。

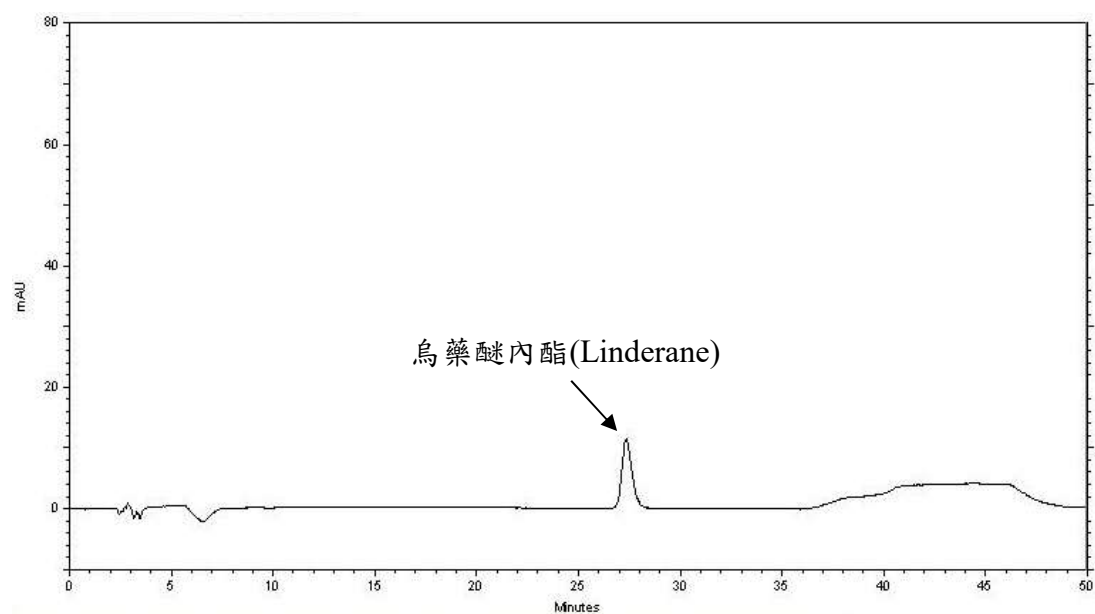
(八) 偵測極限與定量極限試驗

標準品為烏藥醚內酯:

烏藥醚內酯(Linderane)偵測極限(Limit of Detection, LOD)為 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (圖七)，定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)為 20 $\mu\text{g/mL}$ (圖八)。



圖七、烏藥醚內酯(Linderane)之 LOD 層析圖



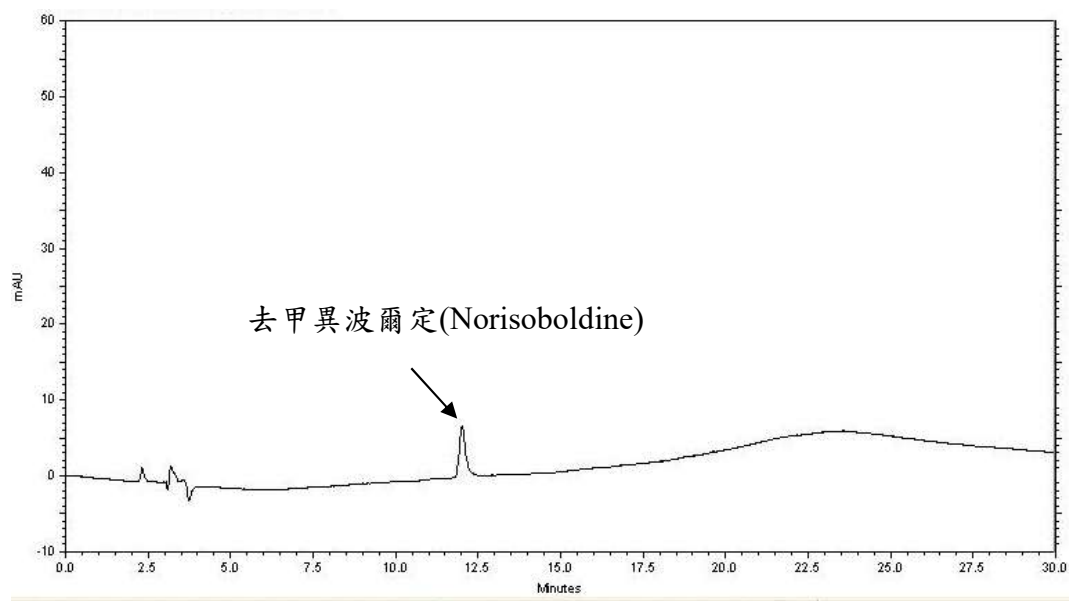
圖八、烏藥醚內酯(Linderane)之 LOQ 層析圖

表六、各項檢驗分析

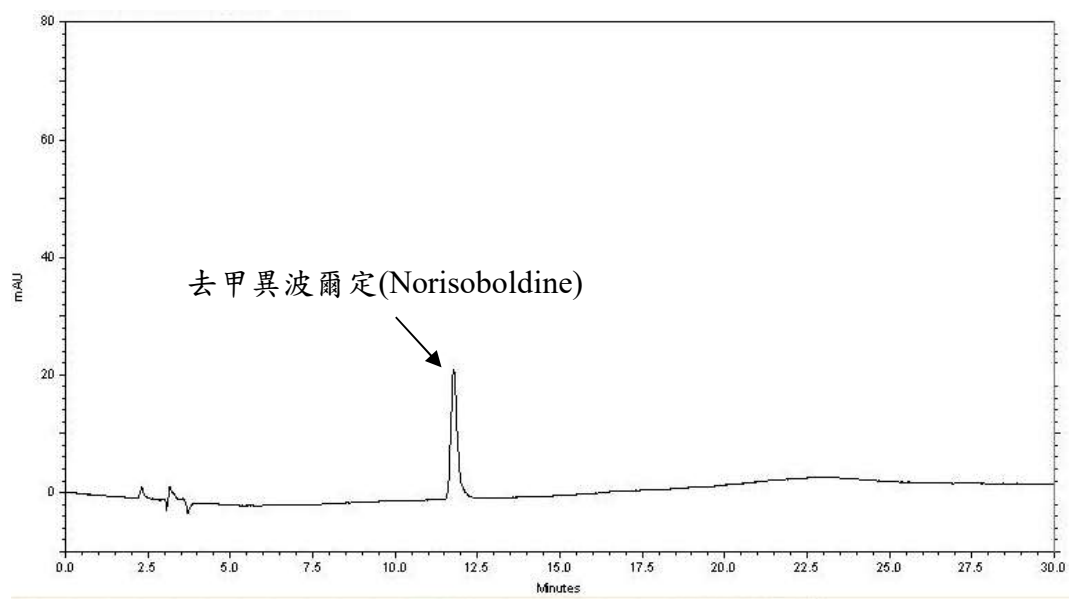
檢測項目	烏藥醚內酯(Linderane)	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	50 $\mu\text{g/mL}$	1.71
再現性 (n=5)	檢品溶液(No.3)	2.84
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.3)	3.79
偵測極限 (n=3)	5.0 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=3)	20 $\mu\text{g/mL}$	-

標準品為去甲異波爾定：

去甲異波爾定(Norisoboldine)偵測極限(Limit of Detection, LOD)為 5.0 $\mu\text{g/mL}$ (圖九)，定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)為 15 $\mu\text{g/mL}$ (圖十)。



圖九、去甲異波爾定(Norisoboldine)之 LOD 層析圖



圖十、去甲異波爾定(Norisoboldine)之 LOQ 層析圖

表七、各項檢驗分析

檢測項目	去甲異波爾定(Norisoboldine)	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	200 µg/mL	2.46
再現性 (n=5)	檢品溶液(No.4)	2.88
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.4)	2.17
偵測極限 (n=3)	5.0 µg/mL	-
定量極限 (n=3)	15 µg/mL	-

(九) 添加回收率試驗

添加烏藥醚內酯(Linderane)平均添加回收率 93.44%，相對標準偏差 2.40%。

表八、烏藥醚內酯(Linderane)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	0.5	0.093	0.1	0.186	96.39	93.44	2.40
2	0.5	0.096	0.1	0.180	91.72		
3	0.5	0.093	0.1	0.176	91.15		
4	0.5	0.089	0.1	0.180	95.12		
5	0.5	0.090	0.1	0.176	92.82		

添加去甲異波爾定(Norisoboldine)平均添加回收率 106.37%，相對標準偏差 1.50%。

表九、去甲異波爾定(Norisoboldine)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	0.1	0.361	0.4	0.825	108.39	106.37	1.50
2	0.1	0.357	0.4	0.815	107.65		
3	0.1	0.354	0.4	0.792	104.96		
4	0.1	0.360	0.4	0.797	104.86		
5	0.1	0.359	0.4	0.804	105.98		

(十) 台灣市售烏藥含量測定

10 批烏藥藥材之含量測定結果(乾燥品)如表十一所示，烏藥醚內酯(Linderane)的含量為 0.02–0.21%。建議烏藥藥材指標成分烏藥醚內酯(Linderane)的含量不得少於 0.07%。理論板數按烏藥醚內酯(Linderane)波峰計算應不低於 6000 (實際值為 14334)。

表十、台灣市售烏藥檢品之烏藥醚內酯(Linderane)含量

中藥店編號 (No.)	烏藥醚內酯(Linderane) 含量(%)	中藥店編號 (No.)	烏藥醚內酯(Linderane) 含量(%)
1 (NR)	0.057	6 (SO)	0.021
2 (NF)	0.076	7 (SE)	0.082
3 (NY)	0.104	8 (SJ)	0.088
4 (CA)	0.167	9 (SC)	0.096
5 (SA)	0.211	10 (SR)	0.058

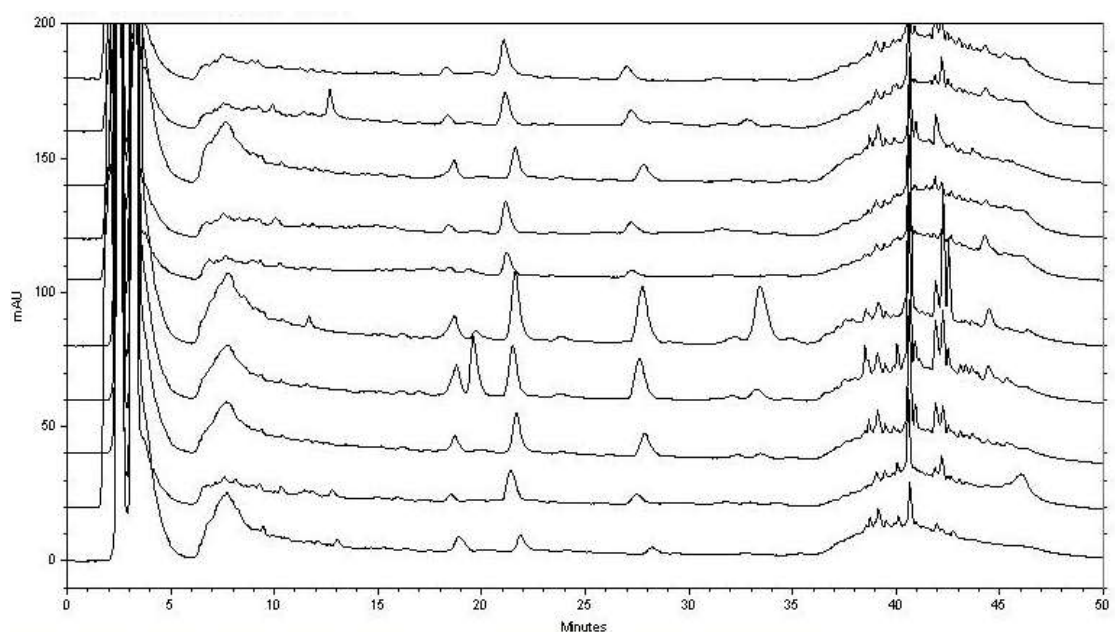
10 批烏藥藥材之含量測定結果(乾燥品)如表十二所示，去甲異波爾定(Norisoboldine)的含量為 0.36–0.82%。建議烏藥藥材指標成分去甲異波爾定(Norisoboldine)的含量不得少於 0.4%。理論板數按去甲異波爾定(Norisoboldine)波峰計算應不低於 8000 (實際值為 19470)。

表十一、台灣市售烏藥檢品之去甲異波爾定(Norisoboldine)含量

中藥店編號 (No.)	去甲異波爾定 (Norisoboldine) 含量(%)	中藥店編號 (No.)	去甲異波爾定 (Norisoboldine) 含量(%)
1 (NR)	0.357	6 (SO)	0.485
2 (NF)	0.633	7 (SE)	0.585
3 (NY)	0.580	8 (SJ)	0.563
4 (CA)	0.671	9 (SC)	0.598
5 (SA)	0.732	10 (SR)	0.815

(十一) 台灣 10 批市售烏藥藥材之 HPLC 層析(方法一)

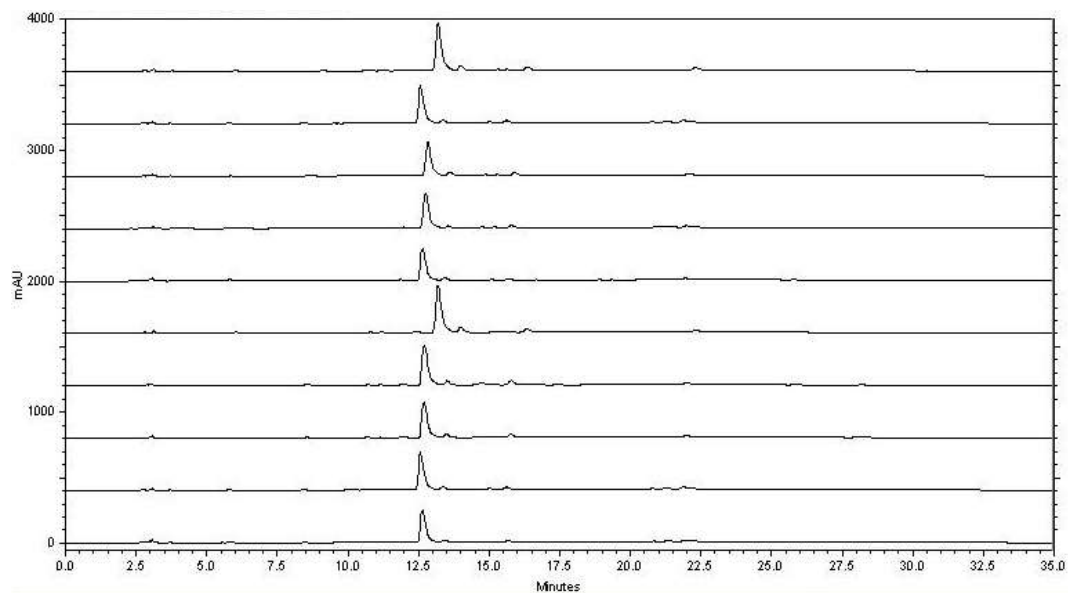
標準品為烏藥醚內酯:



圖十一、10 批烏藥藥材之 HPLC 層析圖

(十二) 台灣 10 批市售烏藥藥材之 HPLC 層析(方法二)

標準品為去甲異波爾定:

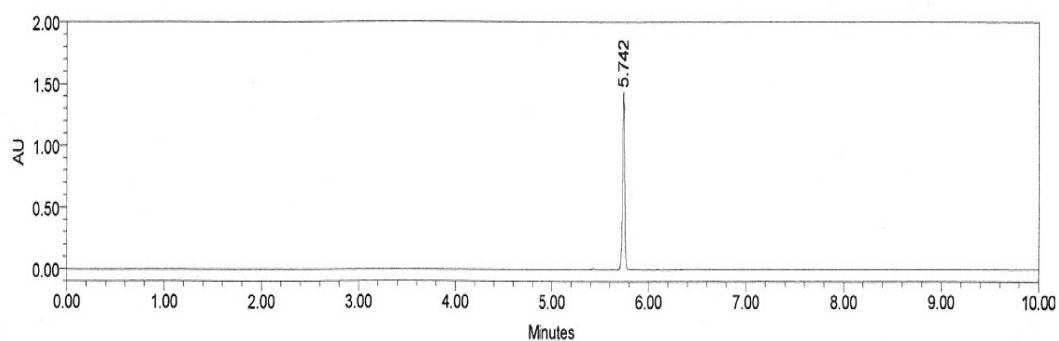


圖十二、10 批烏藥藥材之 HPLC 層析圖

(十三) 標準品烏藥醚內酯(Linderane)之 UPLC 層析(方法三)

於滯留時間 5.74 分鐘處顯示烏藥醚內酯(Linderane)標準品的波峰。

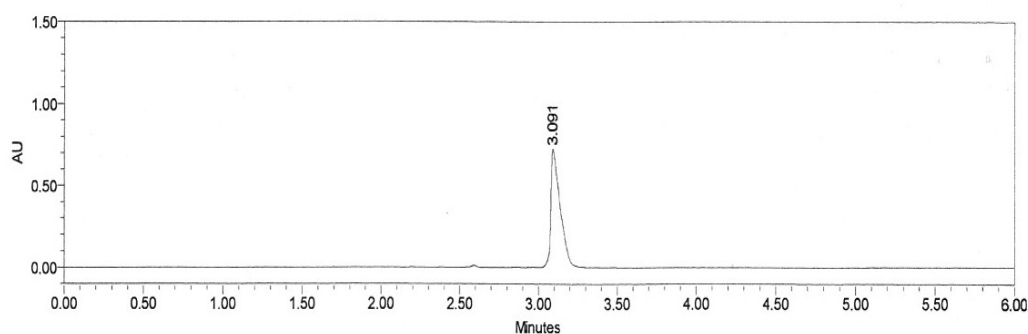
(圖十三)



圖十三、烏藥醚內酯(Linderane)標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十四) 標準品去甲異波爾定(Norisoboldine)之 UPLC 層析(方法四)

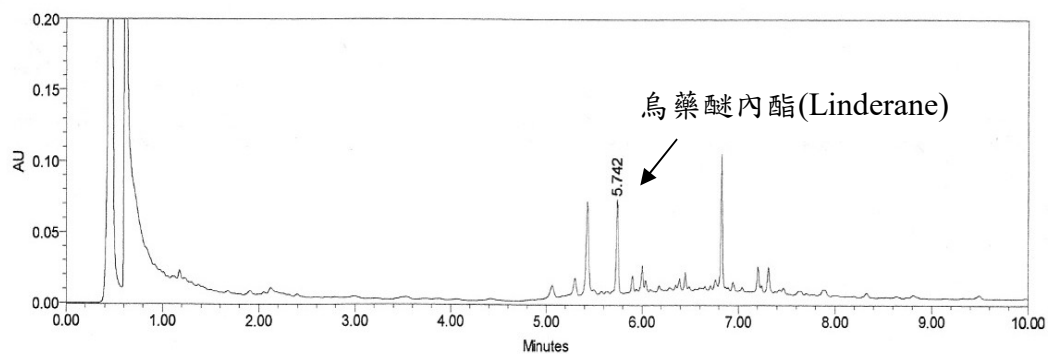
於滯留時間 3.09 分鐘處顯示去甲異波爾定(Norisoboldine)標準品的波峰。(圖十四)



圖十四、去甲異波爾定(Norisoboldine)標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十五) 市售烏藥檢品之 UPLC 層析(方法三)

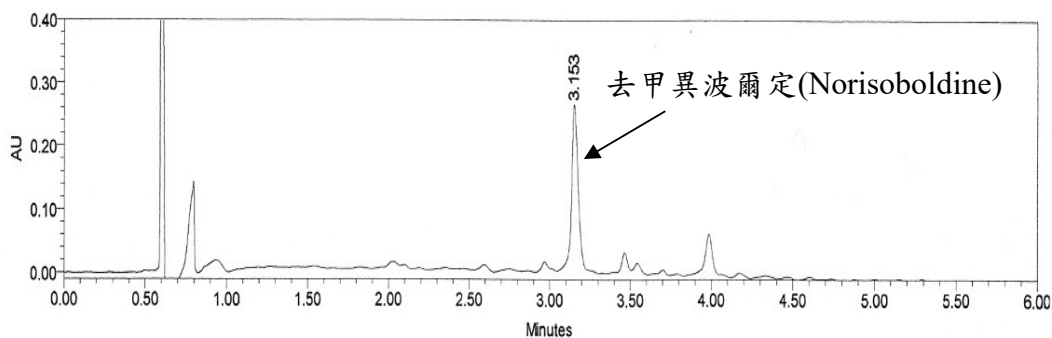
於滯留時間 5.742 分鐘處顯示烏藥檢品中烏藥醚內酯(Linderane)的波峰(圖十五)。



圖十五、市售烏藥檢品之 UPLC 層析圖

(十六) 市售烏藥檢品之 UPLC 層析(方法四)

於滯留時間 3.15 分鐘處顯示烏藥檢品中去甲異波爾定(Norisoboldine)的波峰(圖十六)。

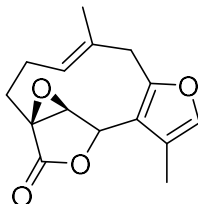


圖十六、市售烏藥檢品之 UPLC 層析圖

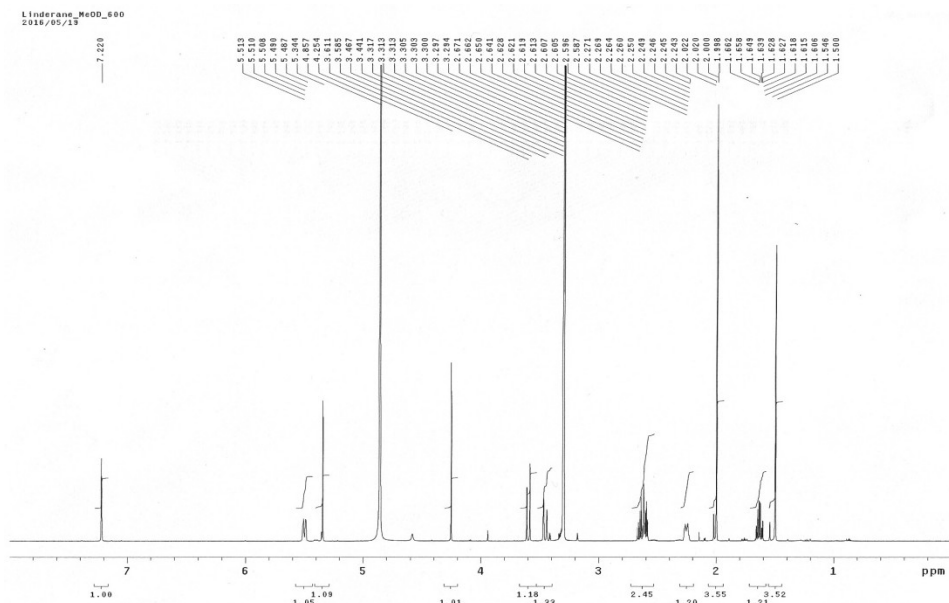
(十七) 烏藥醚內酯(Linderane)的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{15}H_{16}O_4$ ；Mol. Wt.: 260.28；mp: 185–186 °C；白色固體。

(十八) 烏藥醚內酯(Linderane)結構

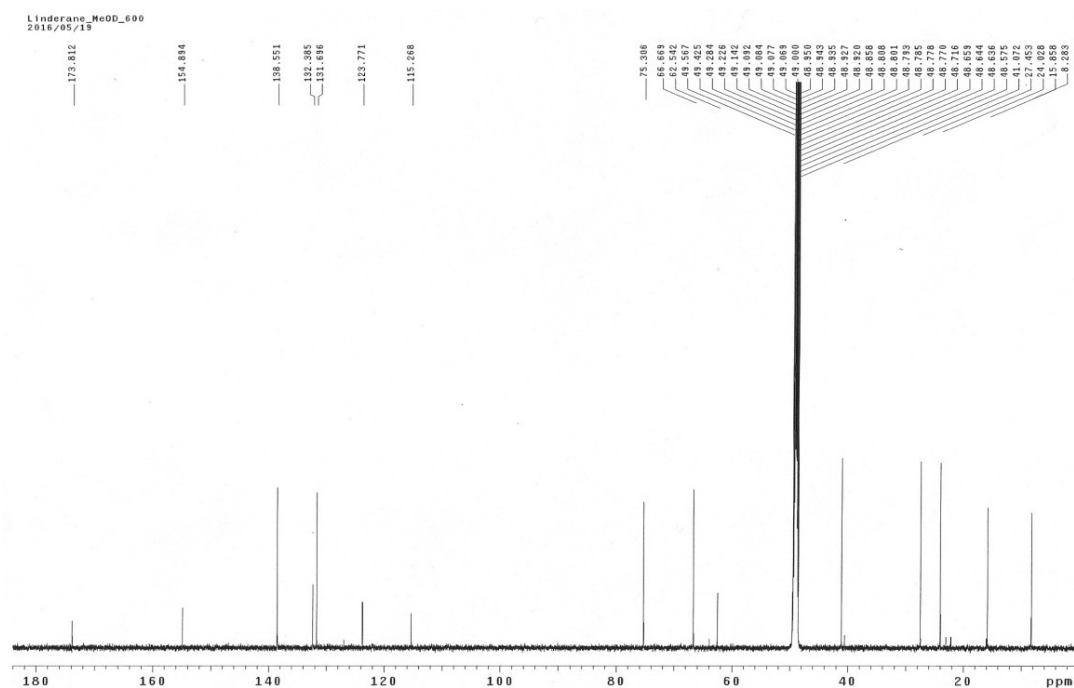


(十九) 烏藥醚內酯(Linderane) 1H NMR 圖譜



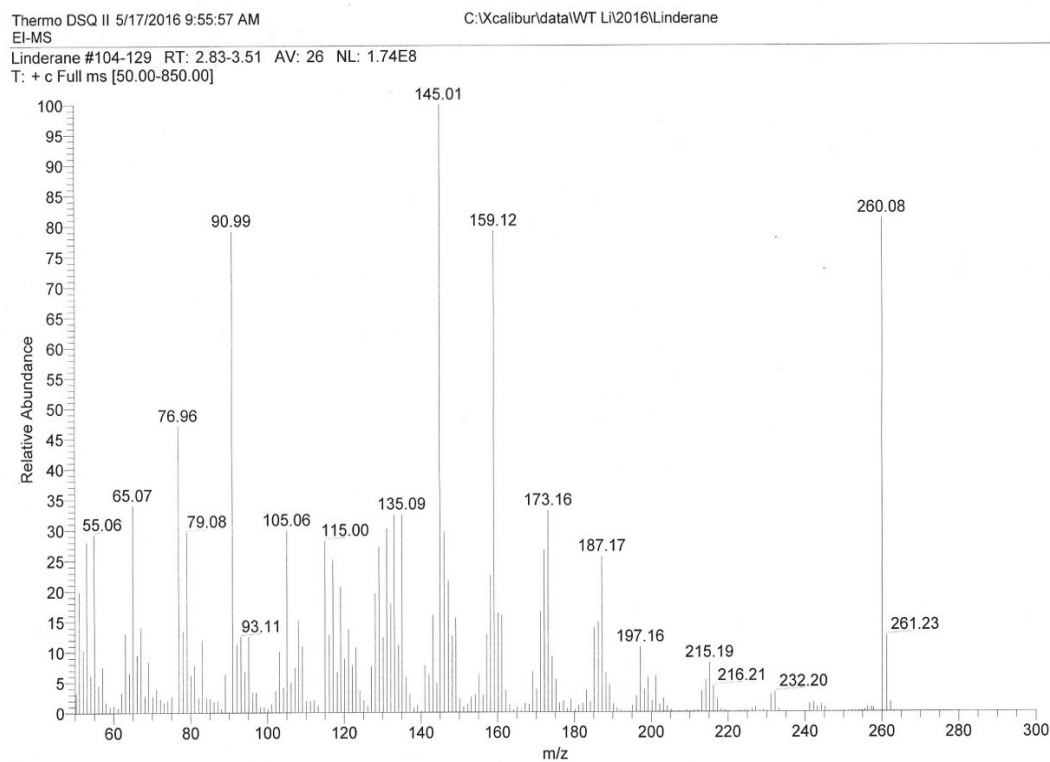
圖十七、烏藥醚內酯(Linderane)的 1H NMR 圖譜(CD_3OD)

(二十) 烏藥醚內酯(Linderane) ^{13}C NMR 圖譜



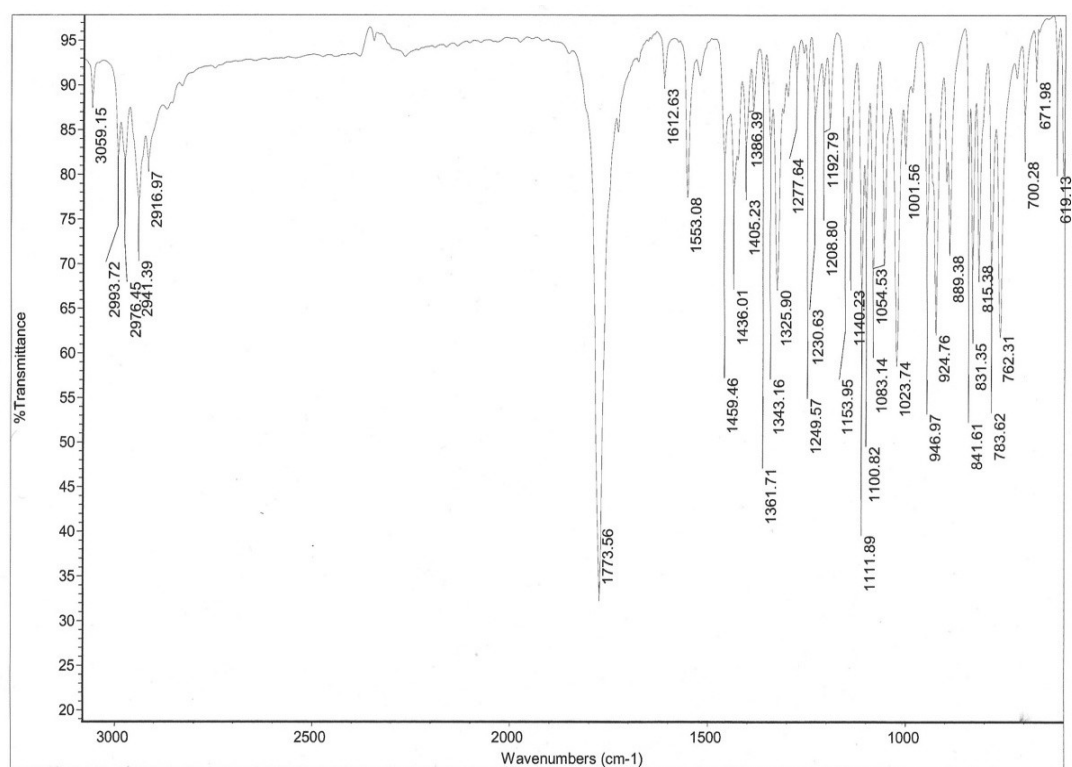
圖十八、烏藥醚內酯(Linderane)的 ^{13}C NMR 圖譜(CD_3OD)

(二十一) 烏藥醚內酯(Linderane) EI-MS 圖譜



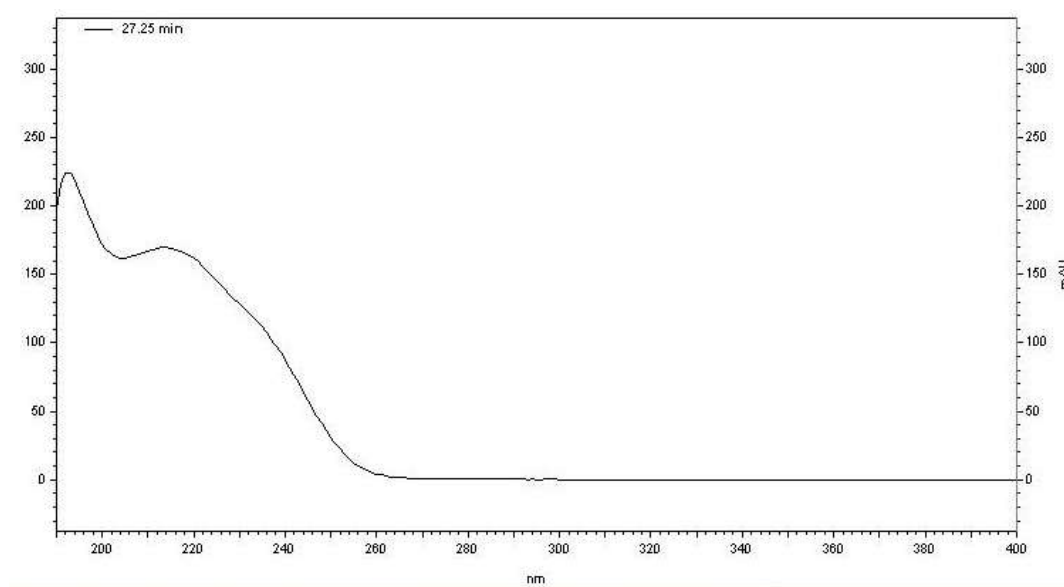
圖十九、烏藥醚內酯(Linderane)的 EI-MS 圖譜

(二十二) 烏藥醚內酯(Linderane)的 FTIR 圖譜



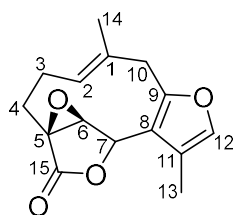
圖二十、烏藥醚內酯(Linderane)的 FTIR 圖譜

(二十三) 烏藥醚內酯(Linderane)的 UV 圖譜



圖二十一、烏藥醚內酯(Linderane)的 UV 圖譜

(二十四) 烏藥醚內酯(Linderane)氫、碳化學位移



烏藥醚內酯(Linderane)

表十二、烏藥醚內酯(Linderane)氫、碳化學位移(CD₃OD)^a

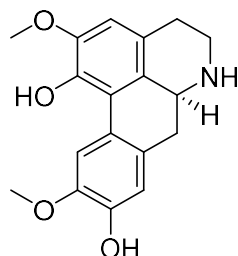
position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	-	132.4
2	5.51 (d,12.0)	131.7
3	2.67–2.58 (m)	24.0
4	2.27–2.43 (m)	27.5
4'	1.66–1.62 (m)	-
5	-	62.5
6	4.25 (s)	66.7
7	5.34 (s)	75.3
8	-	115.3
9	-	154.9
10	3.60 (d, 15.6)	41.1
10'	3.45 (d, 15.6)	-
11	-	123.8
12	7.22 (s)	138.6
13	2.00 (s)	8.3
14	1.50 (s)	15.9
15	-	173.8

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

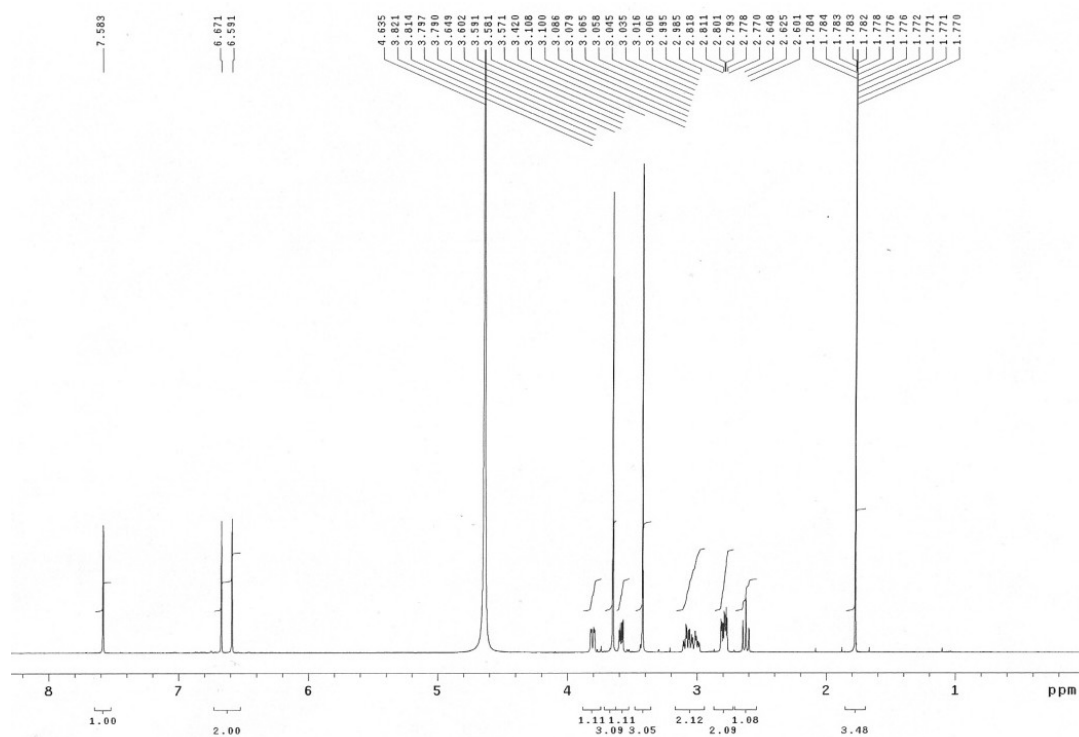
(二十五) 去甲異波爾定(Norisoboldine)的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{18}H_{19}NO_4$ ；Mol. Wt.: 313.35；mp: 195–196 °C；黃色固體。

(二十六) 去甲異波爾定(Norisoboldine)結構

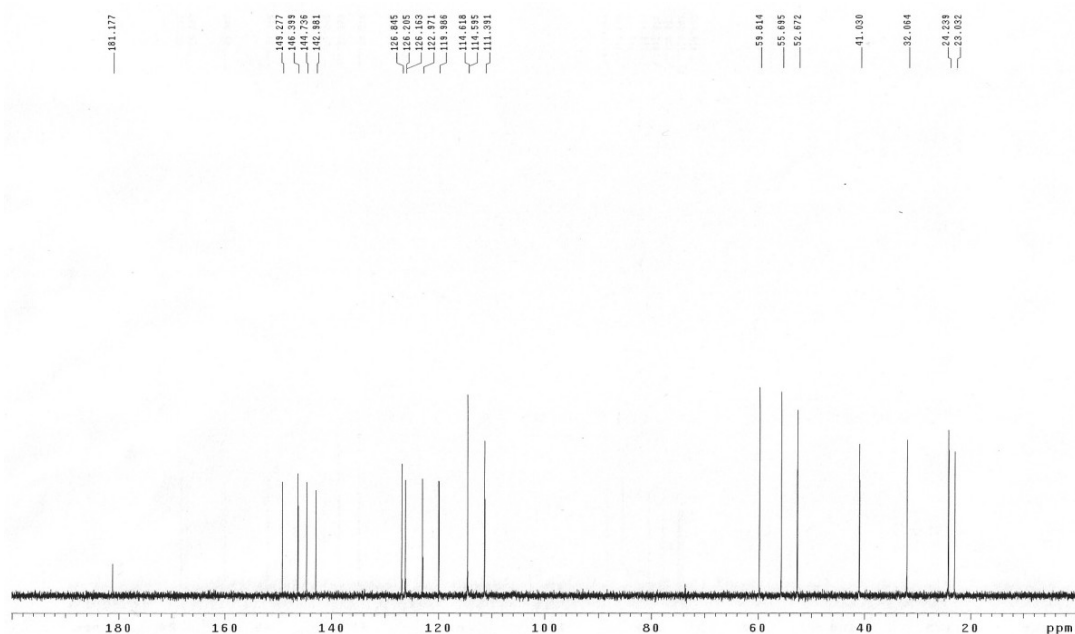


(二十七) 去甲異波爾定(Norisoboldine) 1H NMR 圖譜



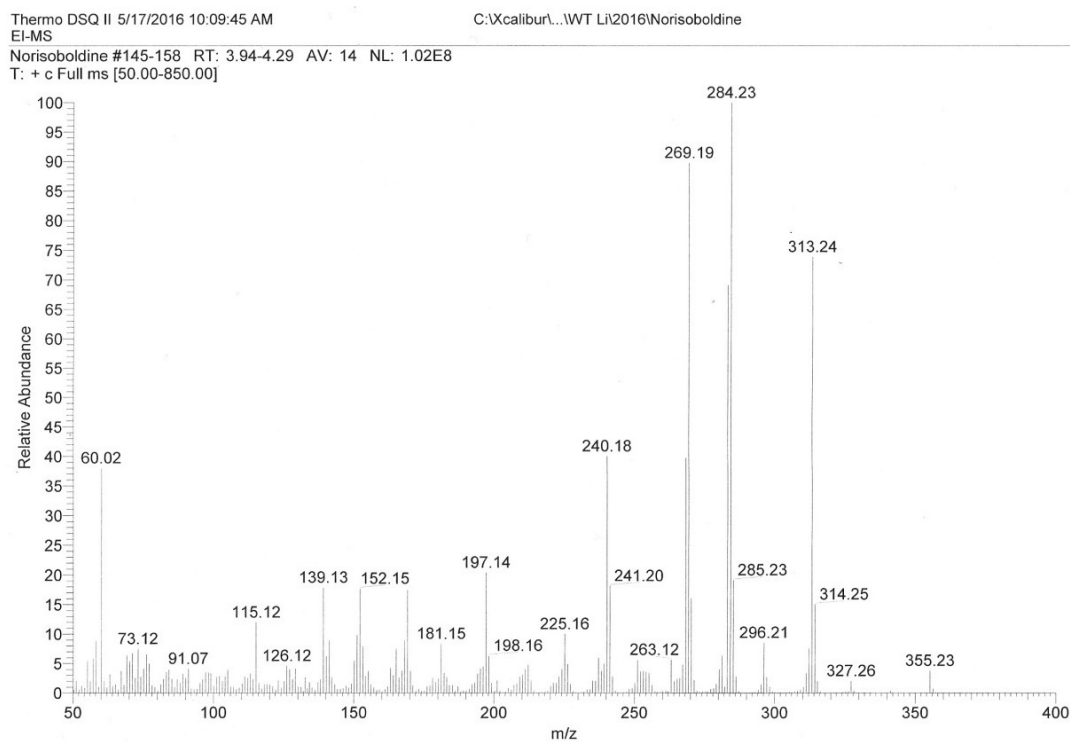
圖二十二、去甲異波爾定(Norisoboldine)的 1H NMR 圖譜(D_2O)

(二十八) 去甲異波爾定(Norisoboldine) ^{13}C NMR 圖譜



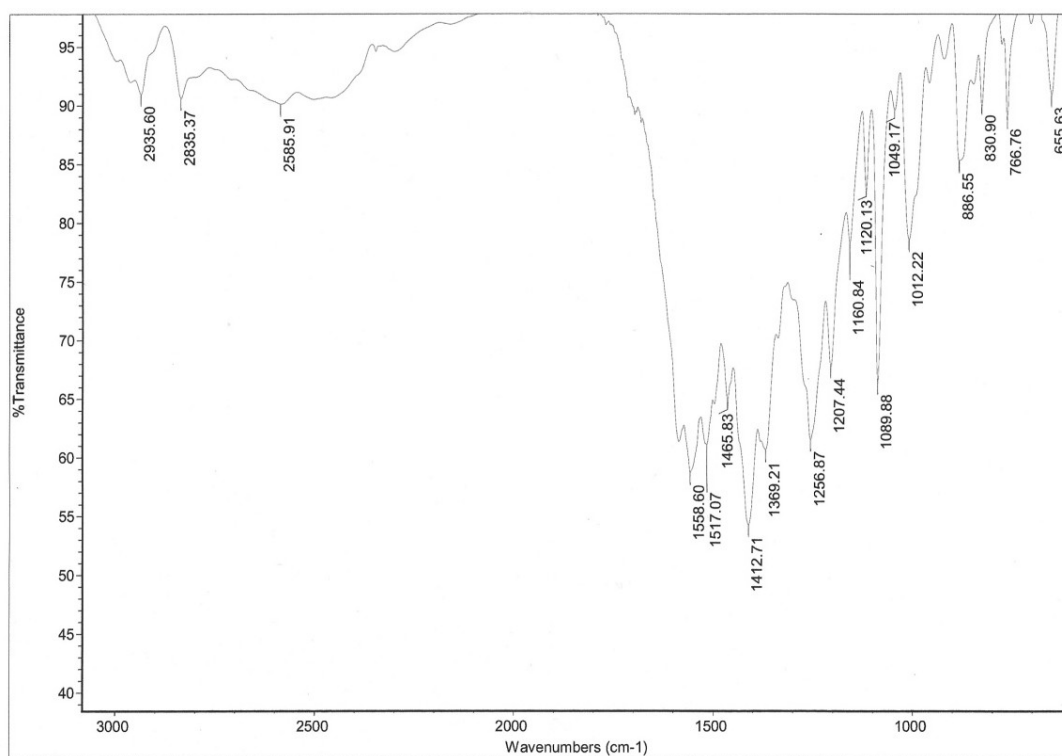
圖二十三、去甲異波爾定(Norisoboldine)的 ^{13}C NMR 圖譜(D_2O)

(二十九) 去甲異波爾定(Norisoboldine) EI-MS 圖譜



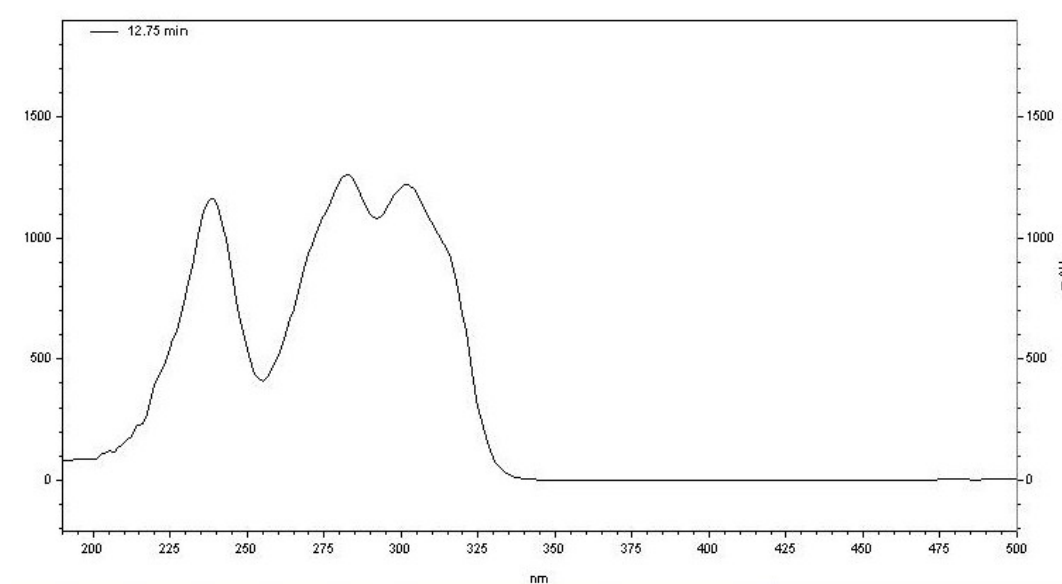
圖二十四、去甲異波爾定(Norisoboldine)的 EI-MS 圖譜

(三十) 去甲異波爾定(Norisoboldine)的 FTIR 圖譜



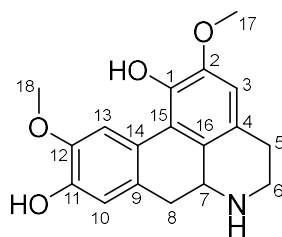
圖二十五、去甲異波爾定(Norisoboldine)的 FTIR 圖譜

(三十一) 去甲異波爾定(Norisoboldine)的 UV 圖譜



圖二十六、去甲異波爾定(Norisoboldine)的 UV 圖譜

(三十二) 去甲異波爾定(Norisoboldine)氫、碳化學位移



去甲異波爾定(Norisoboldine)

表十三、去甲異波爾定(Norisoboldine)氫、碳化學位移(D₂O)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	-	143.0
2	-	146.4
3	6.59 (s)	111.4
4	-	126.8
5	2.79 (m)	23.0
5'	2.63 (t, 14.4)	-
6	3.81 (dd, 14.4, 4.2)	41.0
6'	3.59 (dd, 14.4, 6.0)	-
7	3.10 (m)	52.7
8	3.05 (m)	41.0
8'	2.82 (m)	-
9	-	126.2
10	6.67 (s)	114.6
11	-	144.7
12	-	149.3
13	7.58 (s)	114.6
14	-	120.0
15	-	123.0
16	-	126.2
17	3.65 (s)	59.8
18	3.42 (s)	55.7

^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 y 軸截距

m：檢量線的斜率

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

按下列公式計算樣品中待測成分的百分含量

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)

烏藥

中文名：烏藥

生藥拉丁名：LINDERAE RADIX

英文名：Combined Spicebush Root

基 原：本品為樟科 Lauraceae 植物烏藥 *Lindera aggregata* (Sims) Kosterm.之乾燥塊根。全年均可採挖，除去細根，洗淨，直接曬乾；或趁鮮切片，曬乾。

一、方法

(一) 檢品溶液 **【萃取方法 1】(修飾臺灣中藥典第二版 2013；修飾中華人民共和國藥典 2015)**

——取本品粉末 1.0 g，加正己烷 30 mL，靜置 30 分鐘，超音波處理 10 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加乙酸乙酯 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

【萃取方法 2】(香港中藥材標準第六冊)

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 30 mL，超音波處理 40 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】(自行開發)✓

——取本品粉末 1.0 g，加乙酸乙酯 5 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 溶 液 取烏藥醚內酯(Linderane)對照標準品，加乙酸乙酯製成每 1 mL 含 0.1 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；中華人民共和國藥典 2015)**

——甲苯：乙酸乙酯 (15：1)

【展開劑 2】(香港中藥材標準第六冊)✓

——正己烷：乙酸乙酯 (5：1)

(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 以 10%硫酸乙醇試液(H₂SO₄/EtOH TS)噴霧後，105 °C 加熱至條帶顯色清晰，於主波長 365 nm 之紫外燈照射下檢視。

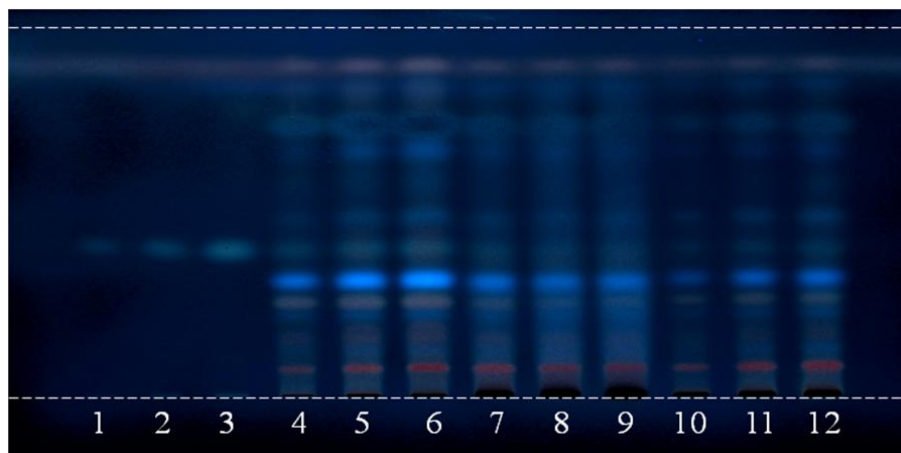
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：105/07/29

相對溼度(RH)：63%

溫度(RT)：27 °C

【展開劑 2】 (香港中藥材標準第六冊)——正己烷：乙酸乙酯 (5：1)



編號	名稱	含量
1, 2, 3	烏藥醚內酯(Linderane) (0.1 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	檢品溶液 2 【萃取方法 1】	2, 5, 8 μ L
7, 8, 9	檢品溶液 2 【萃取方法 2】	2, 5, 8 μ L
10, 11, 12	檢品溶液 2 【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烏藥醚內酯，而由於製備簡便且快速，故選擇【萃取方法 3】。

建議點注量：烏藥醚內酯(Linderane)標準品溶液 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 3】8 μ L。

三、溶媒系統選擇

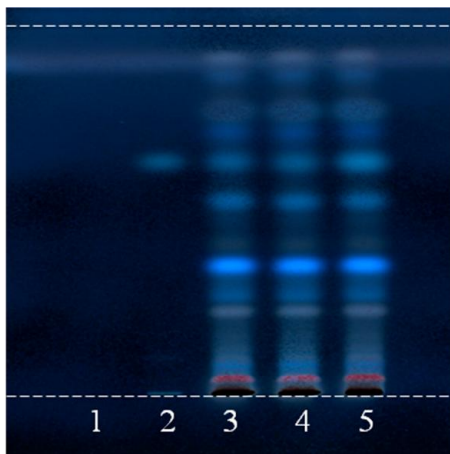
實驗日期：105/08/01

相對溼度(RH)：63%

溫度(RT)：28 °C

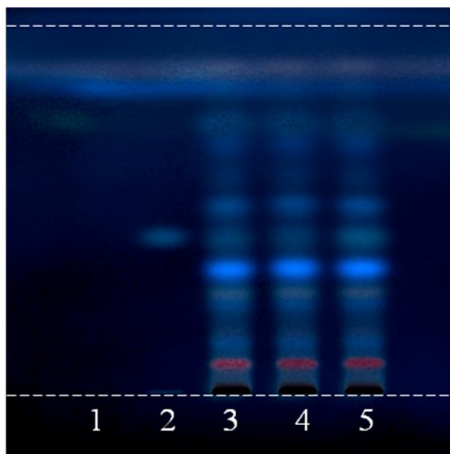
【展開劑 1】 (臺灣中藥典第二版 2013；中華人民共和國藥典 2015)——甲苯：乙酸乙酯 (15：1)

【萃取方法 3】(自行開發)——HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出 (烏藥醚內酯 R_f 值為 0.63)



【展開劑 2】 (香港中藥材標準第六冊)——正己烷：乙酸乙酯 (5：1)

【萃取方法 3】(自行開發)——HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出 (烏藥醚內酯 R_f 值為 0.42)



1：Blank

2：烏藥醚內酯(Linderane)

3，4：檢品溶液 2

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 3】方式，2 種展開劑展開皆可從檢品溶液中分離與檢出烏藥醚內酯，而由於所使用的溶劑較廣用，故採用香港中藥材標準第六冊之【展開劑 2】。

四、觀察方式選擇

實驗日期：105/08/01

相對溼度(RH)：63%

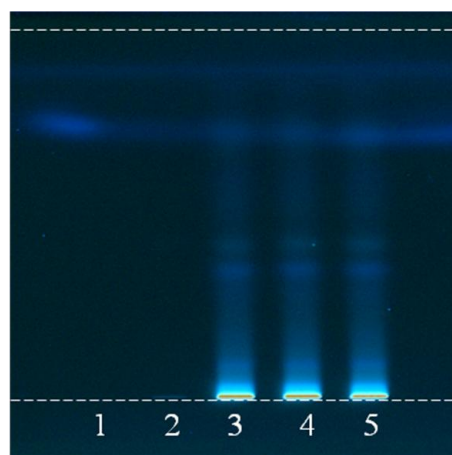
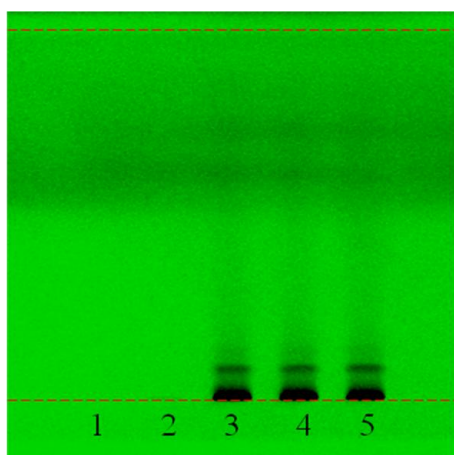
溫度(RT)：28 °C

【展開劑 2】 (香港中藥材標準第六冊) — 正己烷：乙酸乙酯 (5：1)

【萃取方法 3】 (自行開發) — HPTLC 【萃取方法 3】 (自行開發) — HPTLC

紫外光(254 nm)檢出

紫外光(365 nm)檢出

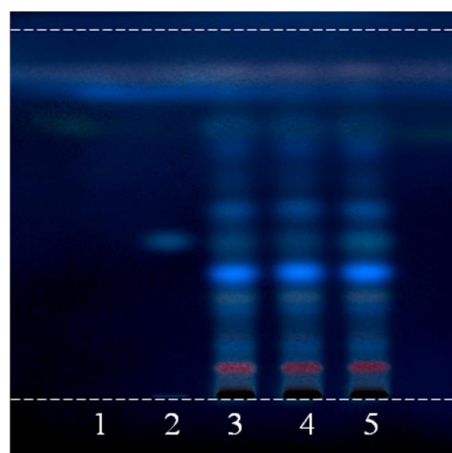
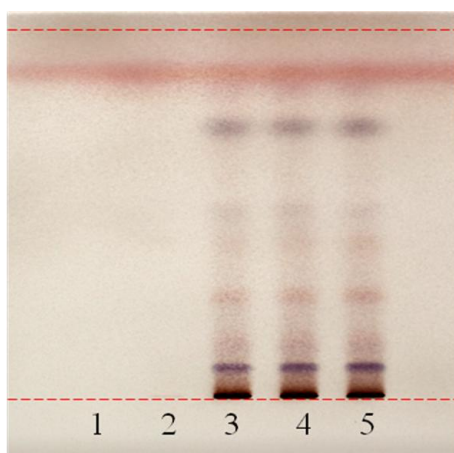


【萃取方法 3】 (自行開發) — HPTLC

呈色/可見光檢出

【萃取方法 3】 (自行開發) — HPTLC

呈色/紫外光(365 nm)檢出



1：Blank

2：烏藥醚內酯(Linderane)

3，4：檢品溶液 2

5：Spike

建議觀察方式：經 10%硫酸乙醇呈色後，於紫外光(365 nm)檢視較其他觀察方式有明顯之烏藥醚內酯(Linderane)標準品斑點。

五、十家樣品檢測

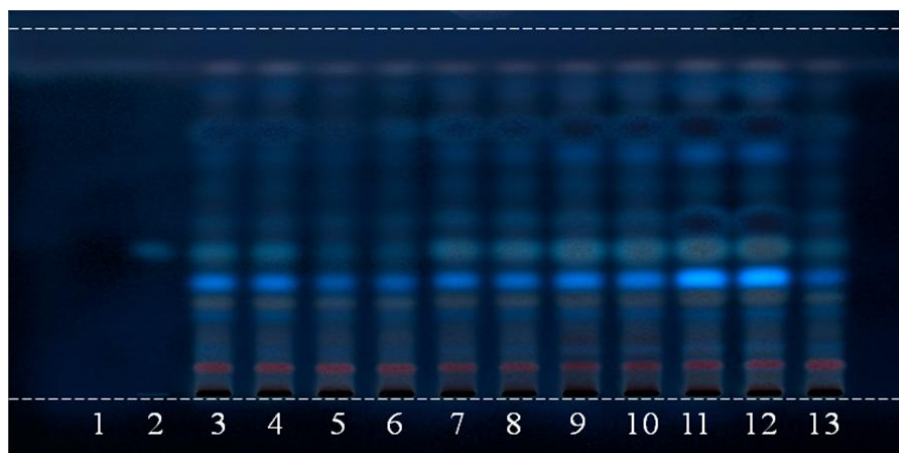
實驗日期：105/08/02

相對溼度(RH)：64%

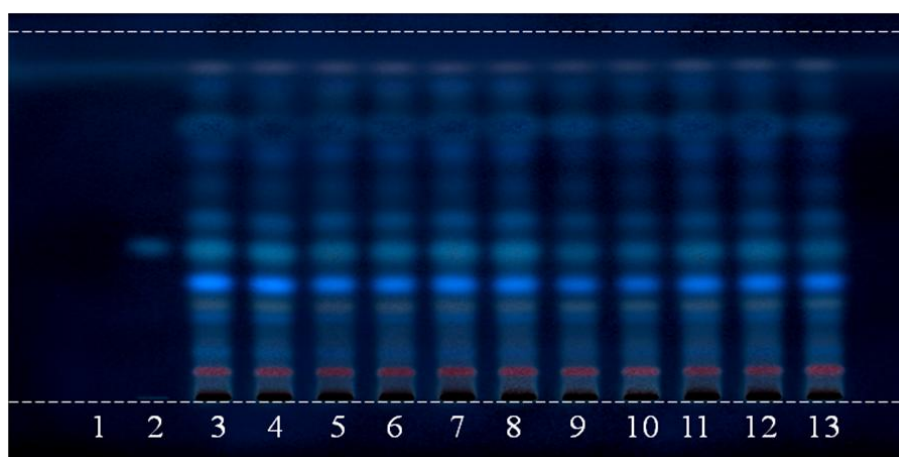
溫度(RT)：27 °C

【展開劑 2】 (香港中藥材標準第六冊)——正己烷：乙酸乙酯 (5：1)

【萃取方法 3】(自行開發)——HPTLC 10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	烏藥醚內酯(Linderane) (0.1 mg/mL)
3，4	檢品溶液 1 (NF)
5，6	檢品溶液 2 (NR)
7，8	檢品溶液 3 (NY)
9，10	檢品溶液 4 (CA)
11，12	檢品溶液 5 (SA)
13	Spike (檢品溶液 2)



1	Blank
2	烏藥醚內酯(Linderane) (0.1 mg/mL)
3, 4	檢品溶液 6 (SC)
5, 6	檢品溶液 7 (SE)
7, 8	檢品溶液 8 (SJ)
9, 10	檢品溶液 9 (SO)
11, 12	檢品溶液 10 (SR)
13	Spike (檢品溶液 2)

結論與建議：以自行開發之【萃取方法 3】方式，並以香港中藥材標準第六冊之【展開劑 2】分離與檢出烏藥醚內酯(Linderane)，使用溶劑較廣用，並以 10%硫酸乙醇顯色後，於紫外光(365 nm)下檢視較佳。