

敗醬

(PATRINIAE HERBA)

敗醬 MI	2
一、形態	2
二、顯微	2
敗醬 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	7
敗醬 TLC	13
一、方法	13
二、萃法選擇及濃度測試	14
三、觀察方式選擇	15
四、十家樣品檢測	16

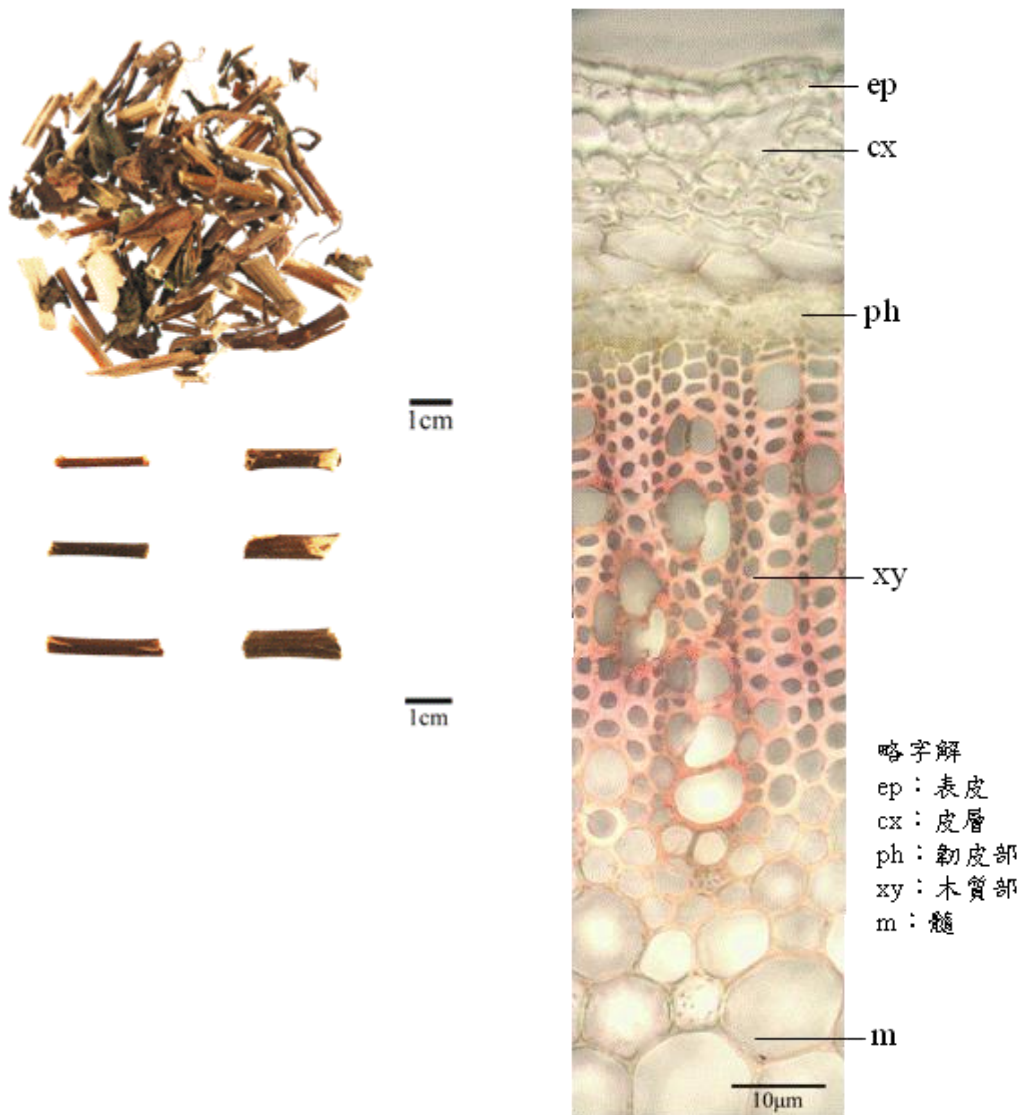
敗醬 MI

一、形態:

本品為敗醬科 Valerianaceae 植物白花敗醬 *Patrinia villosa* (Thunb) Juss.的全草。根莖為圓柱型，外表呈暗棕色，有細縱紋，斷面中心多為中空，質硬易斷。葉片乾燥皺縮而破碎，外表呈棕綠色。整株氣特異，味微苦。

二、顯微

本品橫切面呈圓形，外表皮細胞一列呈長方形，外壁增厚，可見非腺毛。皮部較窄，內皮層細胞呈類方形。韌皮部狹窄，形成層不明顯。木部導管散列，木部纖維組織發達，中心髓部寬廣。



敗醬 (*Patrinia scabiosaefolia*)

一、材料

購自於北中南東各地中藥店敗醬藥材共 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、Sampler G1329B、DAD G1315B；層析管柱 Cosmosil AR-II C₁₈ Column (250 x 4.6 mm, 5 μm)。

(二) UPLC 儀器及層析管柱

Agilent 1290 Infinity Series，包含 TCC G1316、Thermostat G1330B、Bin pump G4220A、Sampler G4226A、DAD G4212A；層析管柱 Poroshell 120 EC-C₁₈ (100 x 4.6 mm, 2.7 μm)。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

甲醇(99.9%)購自於 Mallinckrodt Baker. Inc.；醋酸(100%)購自於 Merck；
乙腈(99.9%)購自於景明化工。

(二) 標準品

綠原酸(Chlorogenic acid) 自行純化，純度在 98%以上。

四、方法

(一) 萃取溶媒開發

取本品粉末 4 份，每份精確稱定 1.0 g，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入甲醇、75% 甲醇、50% 甲醇、25% 甲醇各 25 mL，超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，放冷再稱定重量，用溶媒補足減少的重量，搖勻並以 No. 1 濾紙過濾，取得濾液，再過濾(Syringe filter, 0.45 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最大波峰面積為最佳敗醬萃取溶媒。

(二) 萃取次數考察

取本品粉末約 1.0 g，精確稱定，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入 50% 甲醇 25 mL，超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，放冷再稱定重量，用 50% 甲醇補足減少的重量，搖勻並以 No. 1 濾紙過濾再過濾(Syringe filter, 0.45 μm)，取濾液，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，並選出最佳萃取次數。

(三) 對照標準品溶液

取標準品綠原酸(Chlorogenic acid)精確稱定 1.0 mg，加 1 mL 的甲醇製成每 1 mL 含綠原酸(Chlorogenic acid) 1000 µg 的標準品儲備溶液。

(四) 檢品溶液

取本品粉末約 1.0 g，精確稱定，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入 50% 甲醇 25 mL，超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，以 No.1 濾紙過濾至 50 mL 之定量瓶中，殘渣部分重複提取一次，合併濾液，加 50% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, 0.45 µm)，取濾液，即得。

(五) 測定法

分別精確吸取標準品溶液、檢品溶液 10 µL，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中綠原酸(Chlorogenic acid)的含量，即得。

(六) 檢量線

精確吸取綠原酸(Chlorogenic acid)標準品儲備溶液適量(1000 µg/mL)，以甲醇稀釋製成含綠原酸(Chlorogenic acid)分別為 375 µg/mL、250 µg/mL、125 µg/mL、50.0 µg/mL、25.0 µg/mL、10.0 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

以綠原酸(Chlorogenic acid)濃度為 50 µg/mL 之標準品儲備液分別連續進樣五針，以綠原酸(Chlorogenic acid)的波峰面積為指標，求出相對標準差。

(八) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性：取同一批市售敗醬粉末，依敗醬檢品溶液製備方法平行製備五份敗醬檢品溶液，進樣測定，以綠原酸(Chlorogenic acid)的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售敗醬粉末，依敗醬檢品溶液製備方法製備敗醬檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以綠原酸(Chlorogenic acid)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

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

取已知綠原酸(Chlorogenic acid)含量的敗醬藥材粉末 0.5 g，精確稱定三份，分別加入約 0.5、1.0、2.0 mg 的綠原酸(Chlorogenic acid)，並按檢品溶液製備方法操作測定，每次取 10 μL 注入液相層析儀，每個檢測品進行三重複。

(十一) HPLC 分析條件

1. 層析管：Cosmosil AR-II C₁₈ Column (250 x 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 327 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：25 $^{\circ}\text{C}$
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%, v/v)	1%醋酸(%, v/v)
0	5	95
5	5	95
6	9	91
18	9	91
22	90	10
24	90	10
27	5	95
30	5	95

(十二) 臺灣市售敗醬含量測定

取十家市售敗醬藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，各取 10 μL 連續三針注入 HPLC 分析，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品綠原酸(Chlorogenic acid)的百分含量。

(十三) UPLC 分析條件

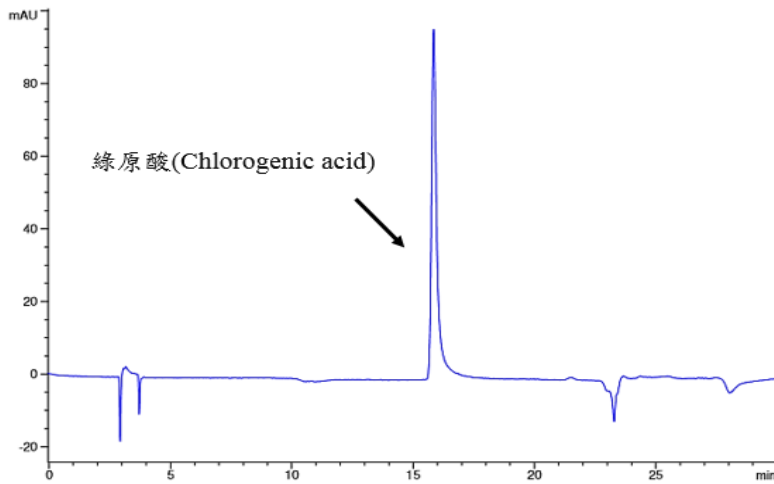
1. 層析管：Agilent Poroshell 120 EC-C18 (100 x 4.6 mm, 2.7 μ m)
2. 檢測波長：UV 327 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：25 $^{\circ}$ C
5. 注入量：2.0 μ L
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%, v/v)	1%醋酸(%, v/v)
0	5	95
3.0	5	95
3.6	9	91
10.8	9	91
13.2	90	10
14.4	90	10
16.2	5	95
18.0	5	95

五、結果

(一) 標準品綠原酸(Chlorogenic acid)之 HPLC 層析

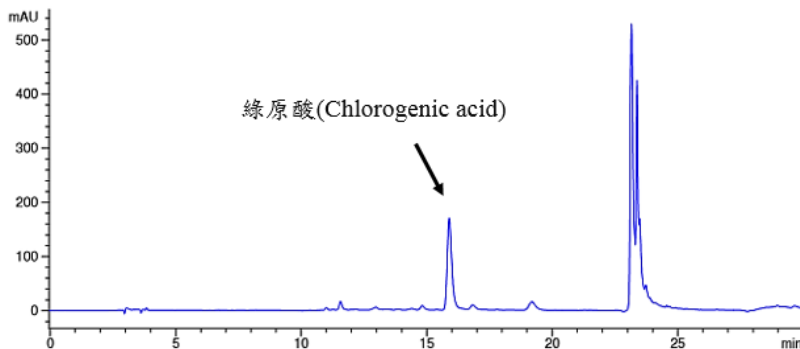
於滯留時間 15.8 分鐘處顯示綠原酸(Chlorogenic acid)標準品的波峰(圖一)。



圖一、綠原酸(Chlorogenic acid)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售敗醬檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 15.8 分鐘顯示敗醬檢品中綠原酸(Chlorogenic acid)的波峰(圖二)。



圖二、市售敗醬檢品之 HPLC 層析圖

(三) 萃取溶媒開發

以 50% 甲醇為溶媒時，每克藥材重量所得綠原酸(Chlorogenic acid)的峰面積最大，顯示 50% 甲醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	甲醇	75% 甲醇	50% 甲醇	25% 甲醇
波峰面積	1069.7	2346.0	2491.8	1318.1
Rank (1=Best, 4=Worst)	4	2	1	3

(四) 萃取次數考察

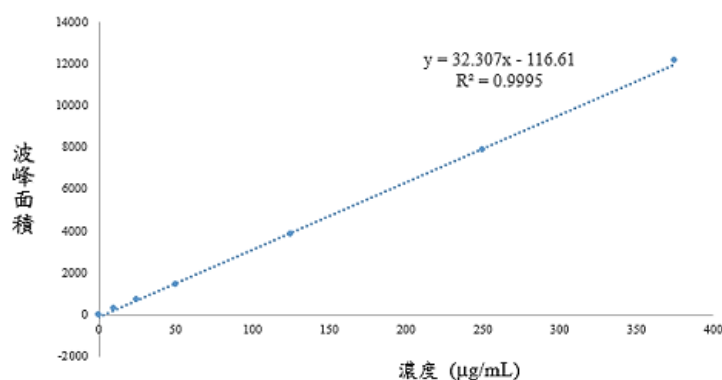
結果顯示萃取兩次基本上已將綠原酸(Chlorogenic acid)萃取完全(>99%)

表二、敗醬檢品萃取次數考察

50% 甲醇萃取次數	波峰面積
第一次	2222.2
第二次	212.5
第三次	27.1

(五) 標準品綠原酸(Chlorogenic acid)檢量線

經不同綠原酸(Chlorogenic acid) (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： $y = 32.307x - 116.61$ ， $R^2 = 0.9995$ ，顯示濃度在 10.0—375 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係



圖三、綠原酸(Chlorogenic acid)之檢量線圖

表三、綠原酸(Chlorogenic acid)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
綠原酸 (Chlorogenic acid)	10.0—375	$y = 32.307x - 116.61$	0.9995

(六) 再現性與精密度試驗

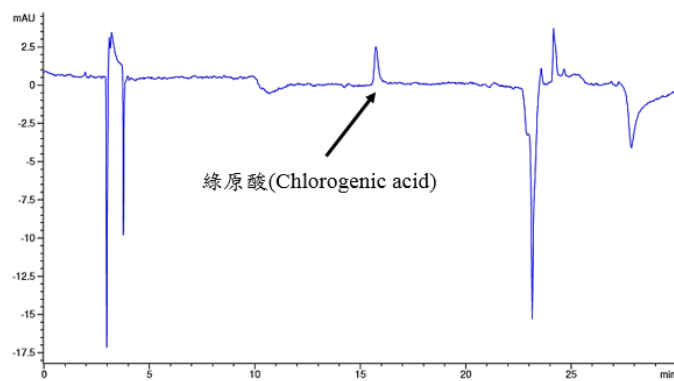
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，綠原酸(Chlorogenic acid)精密度之相對標準差為 1.06%，再現性之相對標準差為 1.54%，均在可接受的範圍以內。

(七) 穩定性試驗

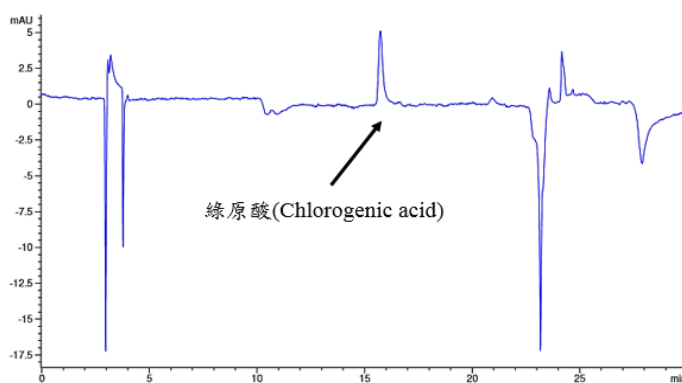
由結果可以得知綠原酸(Chlorogenic acid)在 24 小時內穩定性，相對標準差分別為 3.50%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

槲皮苷綠原酸(Chlorogenic acid)偵測極限(limit of detection, LOD)為 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限(limit of quantitation, LOQ)為 3.0 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、綠原酸(Chlorogenic acid)之 LOD 層析圖



圖五、綠原酸(Chlorogenic acid)之 LOQ 層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	綠原酸(Chlorogenic acid)	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	50.0 $\mu\text{g/mL}$	1.06
再現性 (n=5)	檢品溶液(No.5)	1.54
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.5)	3.50
偵測極限 (n=1)	1.0 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=1)	3.0 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 添加回收率試驗

添加綠原酸(Chlorogenic acid) 平均回收率 95.8%，相對標準偏差 6.09%

表五、綠原酸(Chlorogenic acid)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	0.50	1.17	0.5	1.673	101.7±10.6	95.8	6.09
2	0.50	1.17	1.0	2.120	95.5±5.87		
3	0.50	1.17	2.0	2.967	90.1±3.76		

(十) 台灣市售敗醬含量測定

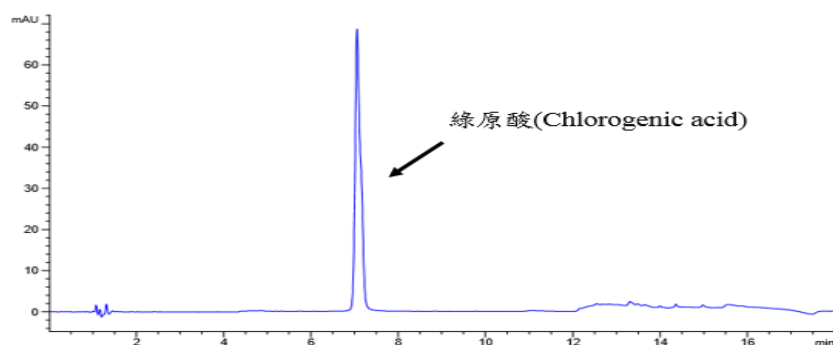
10 家敗醬藥材之含量測定結果。除了編號 1 的敗醬藥材綠原酸(Chlorogenic acid)的含量偏低以及編號 6 的敗醬藥材綠原酸(Chlorogenic acid)的含量偏高外，其餘 8 個藥材綠原酸(Chlorogenic acid)的含量為 0.19—0.30%。理論板數按綠原酸(Chlorogenic acid)計算應不低於 5000。

表六、台灣市售敗醬檢品之綠原酸(Chlorogenic acid)含量

中藥店編號 (No.)	綠原酸(Chlorogenic acid) 含量(%)	中藥店編號 (No.)	綠原酸(Chlorogenic acid) 含量(%)
1	0.12	6	0.52
2	0.30	7	0.22
3	0.19	8	0.23
4	0.20	9	0.21
5	0.25	10	0.19

(十一) 標準品綠原酸(Chlorogenic acid)之 UPLC 層析

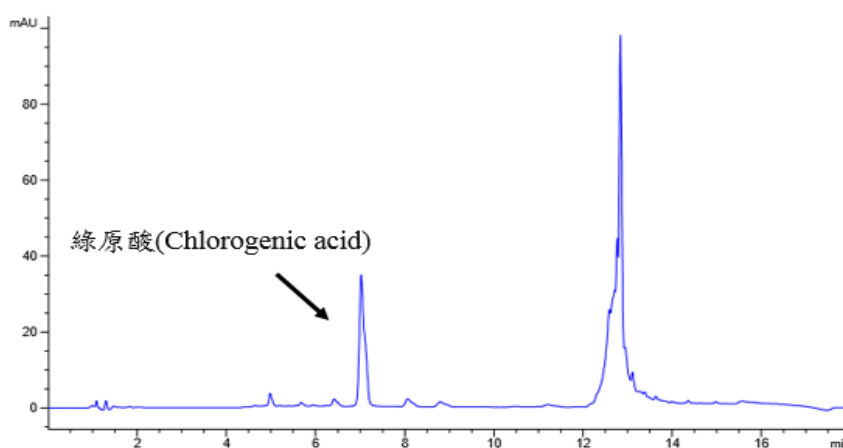
於滯留時間 7.0 分鐘處顯示綠原酸(Chlorogenic acid)標準品的波峰(圖六)。



圖六、綠原酸(Chlorogenic acid)標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十二) 市售敗醬檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 7.0 分鐘顯示綠原酸(Chlorogenic acid)的波峰(圖七)。

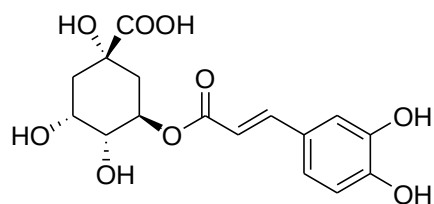


圖七、市售敗醬檢品之 UPLC 層析圖

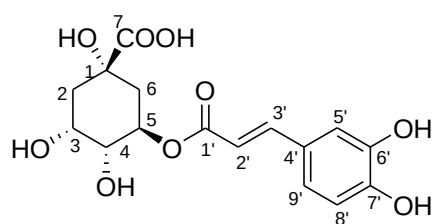
(十三) 綠原酸(Chlorogenic acid)的分子式、分子量與熔點

白色固體；分子式: $C_{16}H_{18}O_9$; Mol. Wt.: 354.3; mp: 190–191 °C

(十四) 綠原酸(Chlorogenic acid) 的結構



(二十) 綠原酸(Chlorogenic acid)的氫、碳化學位移



綠原酸(Chlorogenic acid)

表七、綠原酸(Chlorogenic acid)的氫、碳化學位移(DMSO-*d*₆)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1		73.4
2	1.77 (dd, 13.2, 7.8) 1.98—2.02 (m)	37.2
3	3.90—3.92 (m)	70.0
4	3.55 (dd, 7.2, 3.0)	70.3
5	5.04—5.07 (m)	70.9
6	1.93 (dd, 13.2, 3.6) 1.98—2.02 (m)	36.1
7		174.9
1'		165.7
2'	6.13 (d, 15.6)	114.2
3'	7.41 (d, 15.6)	144.9
4'		125.6
5'	5.34 (d, 1.2)	114.7
6'		145.5
7'		148.3
8'	6.75 (d, 8.4)	115.7
9'	6.97 (d, 8.4, 2.4)	121.3
1-OH	4.76 (brs)*	
3-OH	4.91 (brs)*	
4-OH	5.52 (brs)*	
6'-OH	9.13 (s)	
7'-OH	9.57 (s)	
COOH	12.4 (brs)	

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

敗醬

中文名：敗醬

生藥名：PATRINIAE HERBA

英文名：Patrinia herb

基 原：本品為敗醬草科植物黃花敗醬 *Patrinia scabiosaefolia* Fisch. ex Link.，
白花敗醬 *P. villosa* (Thunb.) Juss.，以根狀莖和根、全草入藥。根春秋季
節採挖，去掉莖葉洗淨，曬乾。全草夏秋採割，洗淨曬乾。

一、方法

(一) 檢品溶液 【萃取方法 1】(自行開發)

——取藥材粉末 1 g，加乙醇 10 mL，超音波震盪 30 分鐘，過濾，減壓濃縮至乾，加乙醇 1 mL 回溶，即為檢品溶液。【萃取方法 2】(自行開發)

——取藥材粉末 1 g，加 70%乙醇 10 mL，超音波震盪 30 分鐘。過濾，減壓濃縮至乾，加 70%乙醇 1 mL 回溶，即為檢品溶液。

【萃取方法 3】(自行開發)✓

——取藥材粉末 1 g，加 50%乙醇 10 mL，超音波震盪 30 分鐘。過濾，減壓濃縮至乾，加 50%乙醇 1 mL 回溶，即為檢品溶液。

(二) 對照標準品 取綠原酸 (Chlorogenic acid)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含 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】(自行開發)✓

——乙酸乙酯：甲酸：水 (4：1：1)

(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 於紫外光(366 nm)下檢視。

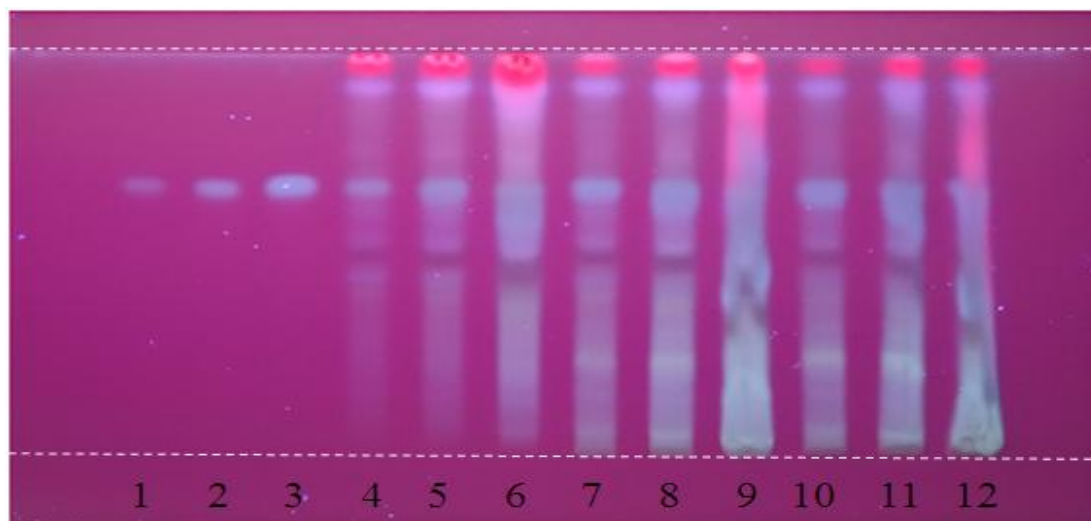
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：104/11/04

相對溼度(RH)：61%

溫度(RT)：26 °C

【展開劑 1】(自行開發)—— 乙酸乙酯：甲酸：水 (4：1：1)



編號	名稱	含量
1，2，3	綠原酸(Chlorogenic acid) (1 mg/mL)	1，2，5 μ L
4，5，6	SH Sample 【萃取方法 1】	1，2，5 μ L
7，8，9	SH Sample 【萃取方法 2】	1，2，5 μ L
10，11，12	SH Sample 【萃取方法 3】	1，2，5 μ L

建議萃法：3 種萃取方法檢品溶液中皆檢出綠原酸標準品，其中【萃取方法 2】與【萃取方法 3】較佳。

建議點注量：綠原酸(Chlorogenic acid)標準品溶液 2 μ L，【萃取方法 3】 1 μ L

三、觀察方式選擇

實驗日期：104/11/06

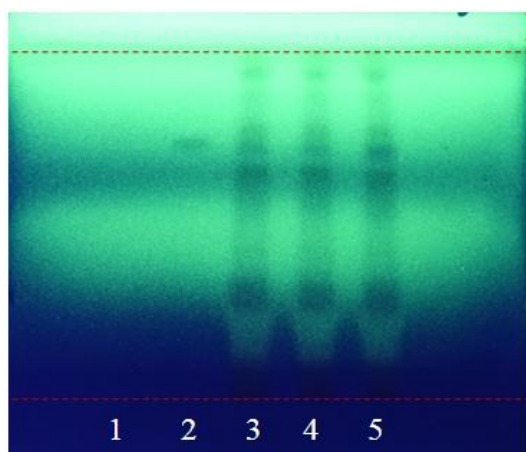
相對溼度(RH)：56%

溫度(RT)：27 °C

【展開劑 1】(自行開發)—— 乙酸乙酯：甲酸：水 (4：1：1)

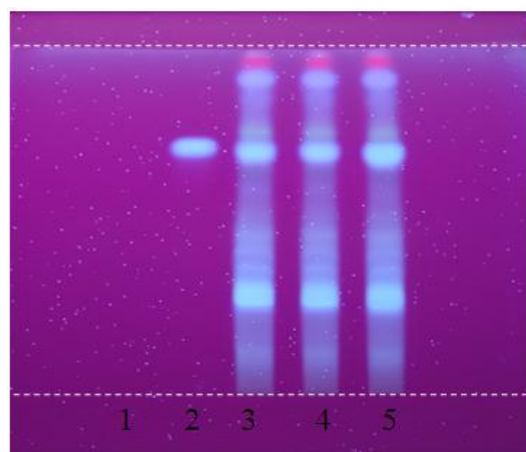
【萃取方法 3】(自行開發)——

TLC 紫外光(254 nm)檢出



【萃取方法 3】(自行開發)——

TLC 紫外光(366 nm)檢出



【萃取方法 3】(自行開發)——

TLC 2%三氯化鐵呈色/可見光 檢出



1：Blank

2：綠原酸(Chlorogenic acid)

3，4：NI Sample

5：Spike (NI Sample)

以【展開劑 1】(自行開發)—— 乙酸乙酯：甲酸：水 (4：1：1)展開下，於紫外光(366 nm)下檢出，顯示 1 個較明顯之成分斑點。但經 2%三氯化鐵呈色後在可見光下檢出，比較未呈色成分斑點顯示較不清楚，因此直接於紫外光(366 nm)下檢出即可。

四、十家樣品檢測：

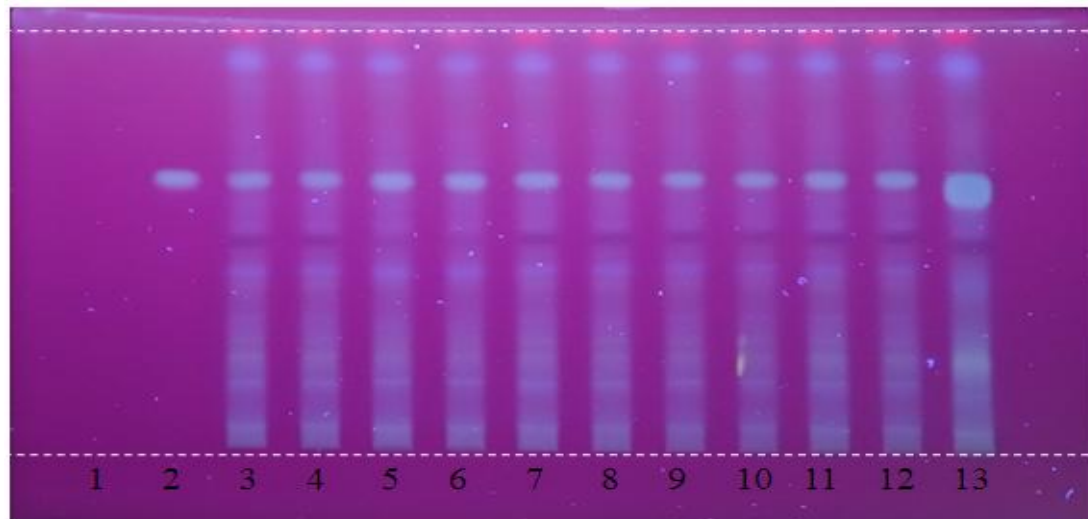
實驗日期：104/11/05

相對溼度(RH)：64%

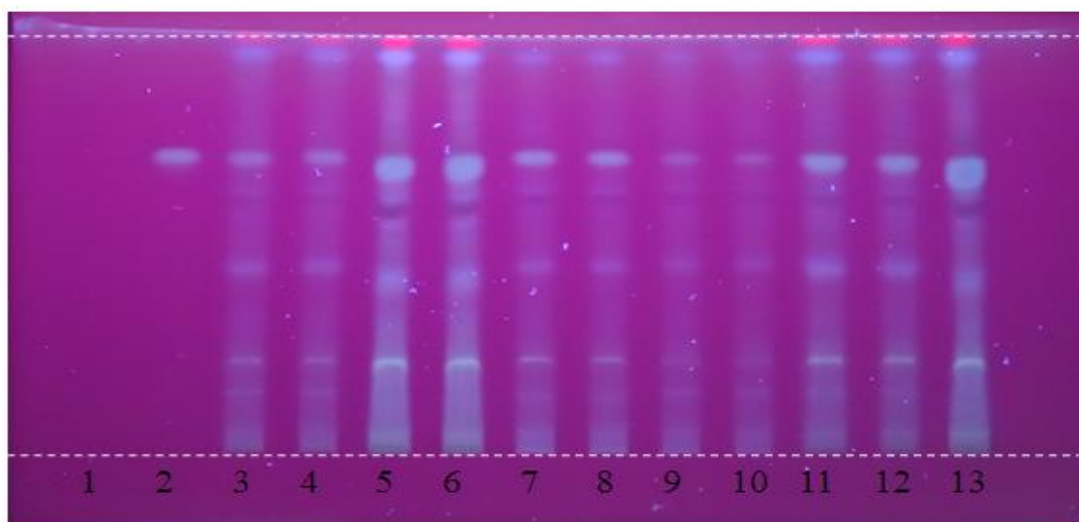
溫度(RT)：26 °C

【展開劑 1】(自行開發)—— 乙酸乙酯：甲酸：水 (4：1：1)

【萃取方法 3】(自行開發)—— 紫外光 (366nm) 下檢視。



1	Blank
2	綠原酸(Chlorogenic acid) (1 mg/mL)
3 , 4	NI Sample
5 , 6	NN Sample
7 , 8	NP Sample
9 , 10	NQ Sample
11 , 12	CE Sample
13	Spike (SH Sample)



1	Blank
2	綠原酸(Chlorogenic acid) (1 mg/mL)
3 , 4	SE Sample
5 , 6	SH Sample
7 , 8	SL Sample
9 , 10	SM Sample
11 , 12	SN Sample
13	Spike (SH Sample)