

牽牛子

(IPOMOEAE SEMEN (PHARBITIDIS SEMEN))

牽牛子 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）	3
牽牛子 HPLC（藥材）（1）	11
一、材料	11
二、儀器及層析管柱	11
三、實驗藥品及試劑來源	11
四、方法	11
五、結果	14
牽牛子 HPLC（藥材）（2）	23
一、材料	23
二、儀器及層析管柱	23
三、實驗藥品及試劑來源	23
四、方法	23
五、結果	26
牽牛子 TLC（藥材）	35
一、方法	35
二、萃法選擇及濃度測試	36
三、溶媒系統選擇	37
四、觀察方式選擇	39
五、十批白丑藥材樣品檢測	40
六、十批黑丑藥材樣品檢測	42

牽牛子

(IPOMOEAE SEMEN)

(PHARBITIDIS SEMEN)

一、藥材採購及鑑定

收集 20 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裂葉牽牛或圓葉牽牛的乾燥成熟種子。

二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：牽牛子

生藥名：PHARBITIDIS SEMEN

英文名：Pharbitis Seed

基原：本品為旋花科 Convolvulaceae 植物裂葉牽牛 *Ipomoea nil* (L.) Roth(*Pharbitis nil* (L.) Choisy)或圓葉牽牛 *Ipomoea purpurea* (L.) Roth(*Pharbitis purpurea* (L.) Voigt)之乾燥成熟種子。

採收加工：秋末果實成熟、果殼未開裂時採割植株，曬乾，打下種子，除去雜質。

藥材性狀：本品呈橘瓣狀或卵形，表面灰黑色（黑丑）或淡黃色（白丑），具三稜，長 4~8 mm，寬 3~5 mm，兩側稍平坦，背面弓狀隆起，正中有縱直凹溝。腹面有一稜線，稜線下端有一點狀種臍，微凹。種皮堅硬，皺縮。橫切面可見皺縮摺疊的淡黃色或黃綠色子葉。氣微，味微辛苦。

生長分佈：一年生纏繞草本植物。喜陽光充足，可耐高溫但不耐寒，適應性強，喜肥美疏鬆土壤，耐乾旱、耐鹽鹼。花期 7~8 月，果期 9~10 月。原產於熱帶美洲，現今中國各地及台灣皆有分布。藥材於中國各地均產。

三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)

1. 表皮細胞 1~2 列，類方形，種臍周圍之表皮細胞部分分化成單細胞非腺毛，長 30~250 μm 。
2. 表皮下方為 1 列扁小的下皮細胞。
3. 向內為種皮柵狀組織 2~3 列，呈類方形或長橢圓形，徑向延長，近外側有一光輝帶。

4. 營養層由數列細胞及黃棕色類廢細胞組成，呈類方形，切向延長，可見細小維管束。
5. 內胚乳細胞最外層為 1~2 列類方形細胞，壁稍厚。其餘胚乳細胞的壁均黏液化。
6. 子葉由類圓形或類方形薄壁細胞組成，薄壁組織中散有多數圓形的分泌腔，細胞內含糊粉粒及脂肪油滴，亦有草酸鈣簇晶，直徑 10~20 μm 。

四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3)

1. 本品粉末淡黃色。
2. 種皮表皮細胞較大，多破碎，表面觀形狀不規則，垂周壁波狀彎曲。
3. 下皮細胞，常與種皮表皮細胞連接，表面觀呈類長方形，排列較整齊，長 10~20 μm ，寬 5~10 μm 。
4. 種皮柵狀組織，側面觀由徑向延長的細胞排成 2~3 列，細胞呈類方形或長橢圓形，壁厚，部分包腔含黃棕色物質，最外側有一光輝帶；頂面觀類多角形，胞腔小，類圓形或扁圓形，孔溝不明顯。
5. 子葉細胞表面觀呈多角形、矩形，內含糊粉粒、脂肪油滴。
6. 可見草酸鈣簇晶，直徑 10~20 μm ，主要存在子葉的細胞間隙中。
7. 分泌腔呈類圓形、類橢圓形，內含油滴。
8. 偶見單細胞非腺毛。

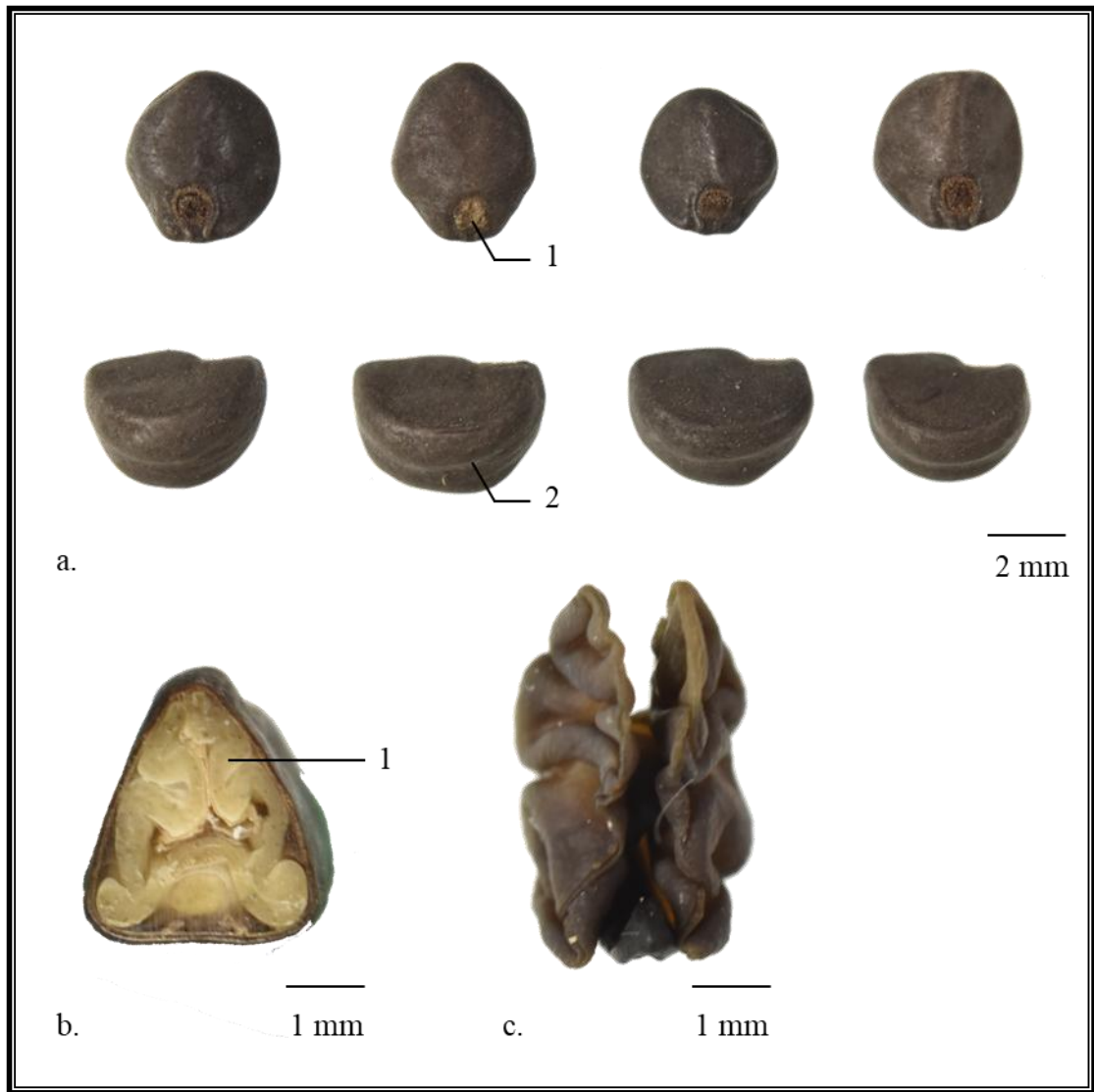


圖 1A 牽牛子(黑丑)藥材圖

a.藥材圖(1.種臍 2.縱溝) b.藥材橫切面圖(1.皺縮子葉) c.子葉

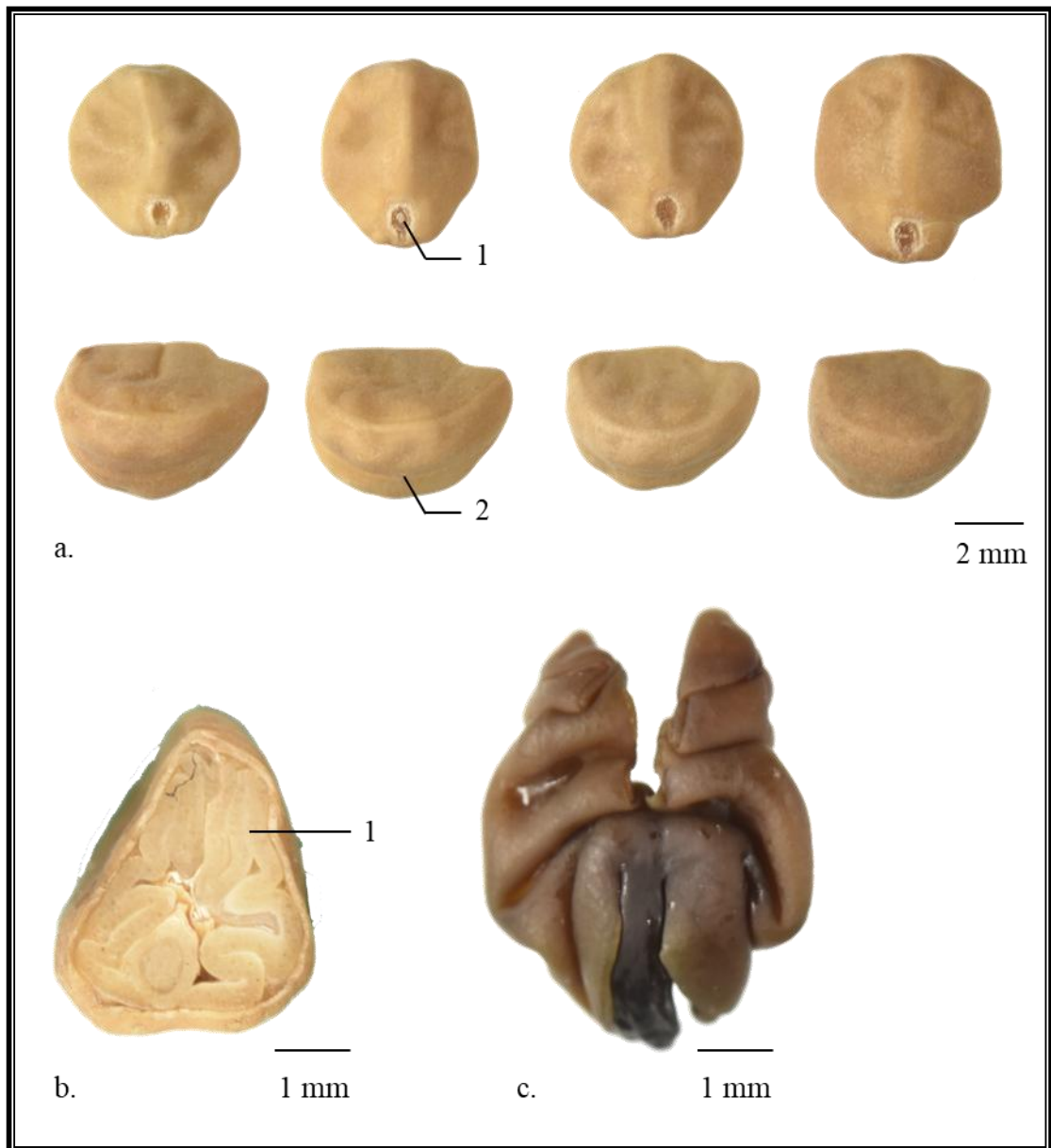


圖 1B 牽牛子(白丑)藥材圖

a.藥材圖(1.種臍 2.縱溝) b.藥材橫切面圖(1.皺縮子葉) c.子葉

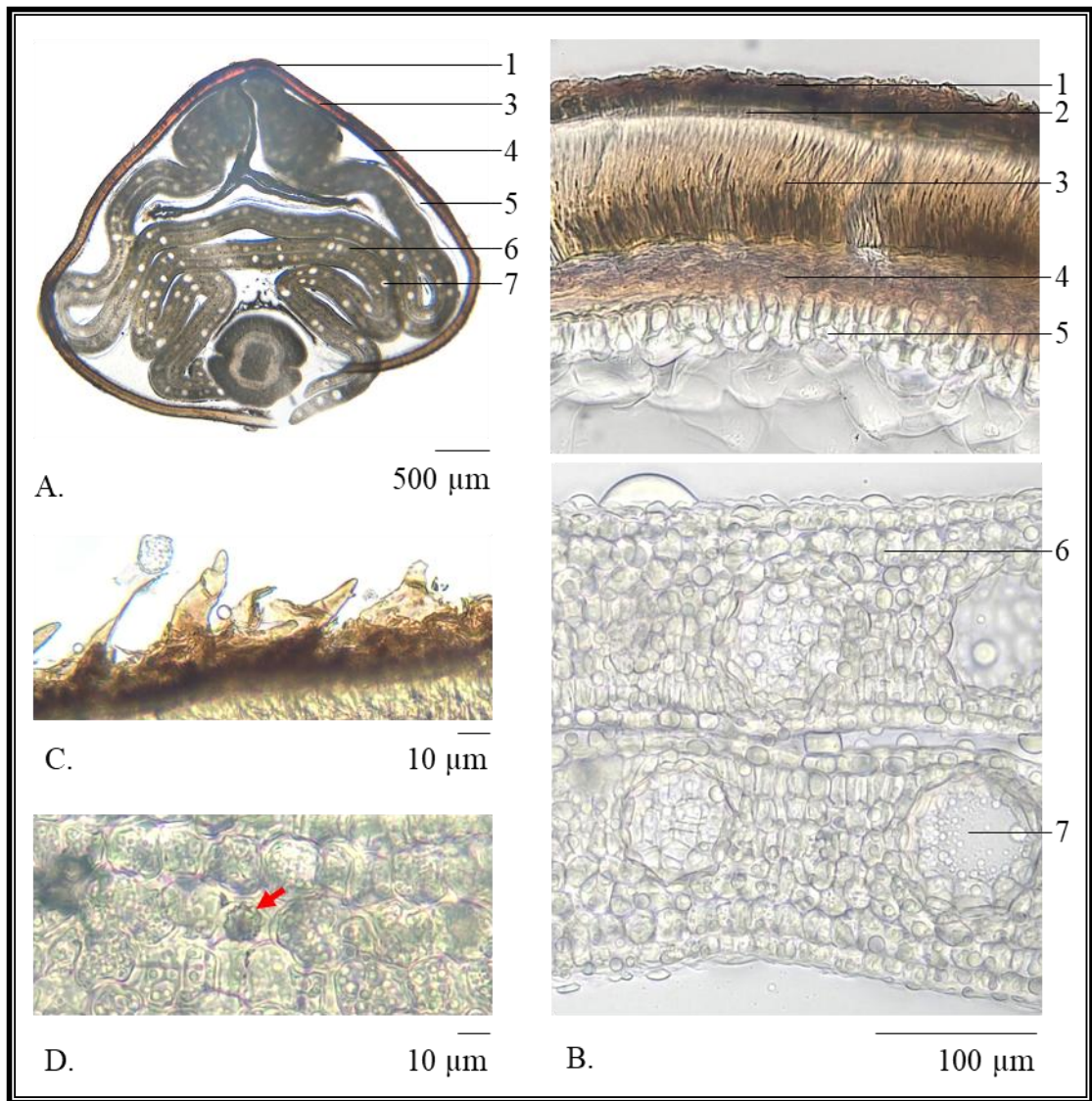


圖 2A 牽牛子(黑丑)橫切面顯微特徵圖

A.橫切面 B.橫切面放大圖 C.特化成非腺毛之表皮 D.草酸鈣簇晶

1.表皮細胞 2.下皮細胞 3.種皮柵狀細胞 4.營養層 5.內胚乳 6.子葉細胞

7.分泌腔

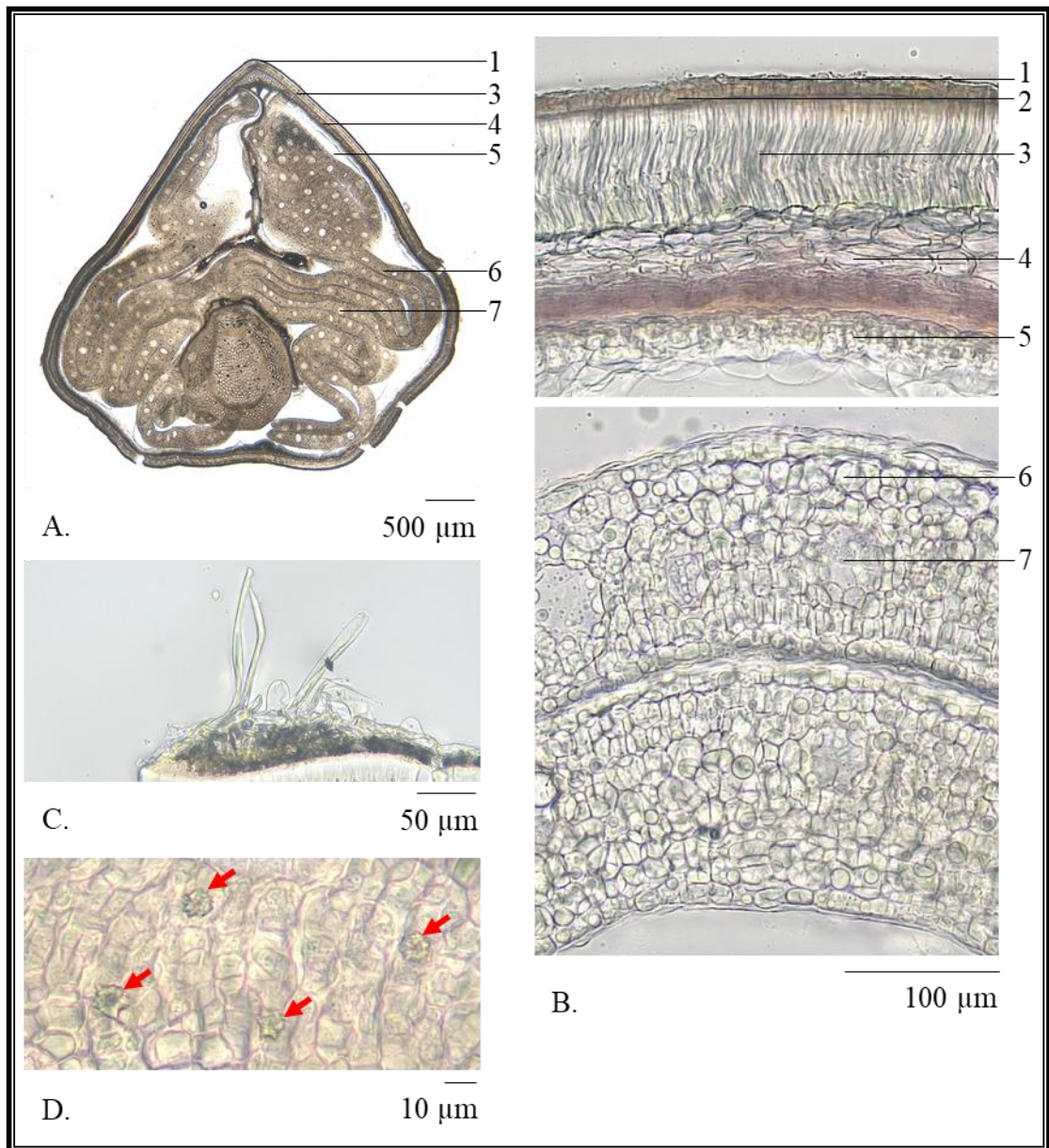


圖 2B 牽牛子(白丑)橫切面顯微特徵圖

A.橫切面 B.橫切面放大圖 C.特化成非腺毛之表皮 D.草酸鈣簇晶

1.表皮細胞 2.下皮細胞 3.種皮柵狀細胞 4.營養層 5.內胚乳 6.子葉細胞

7.分泌腔

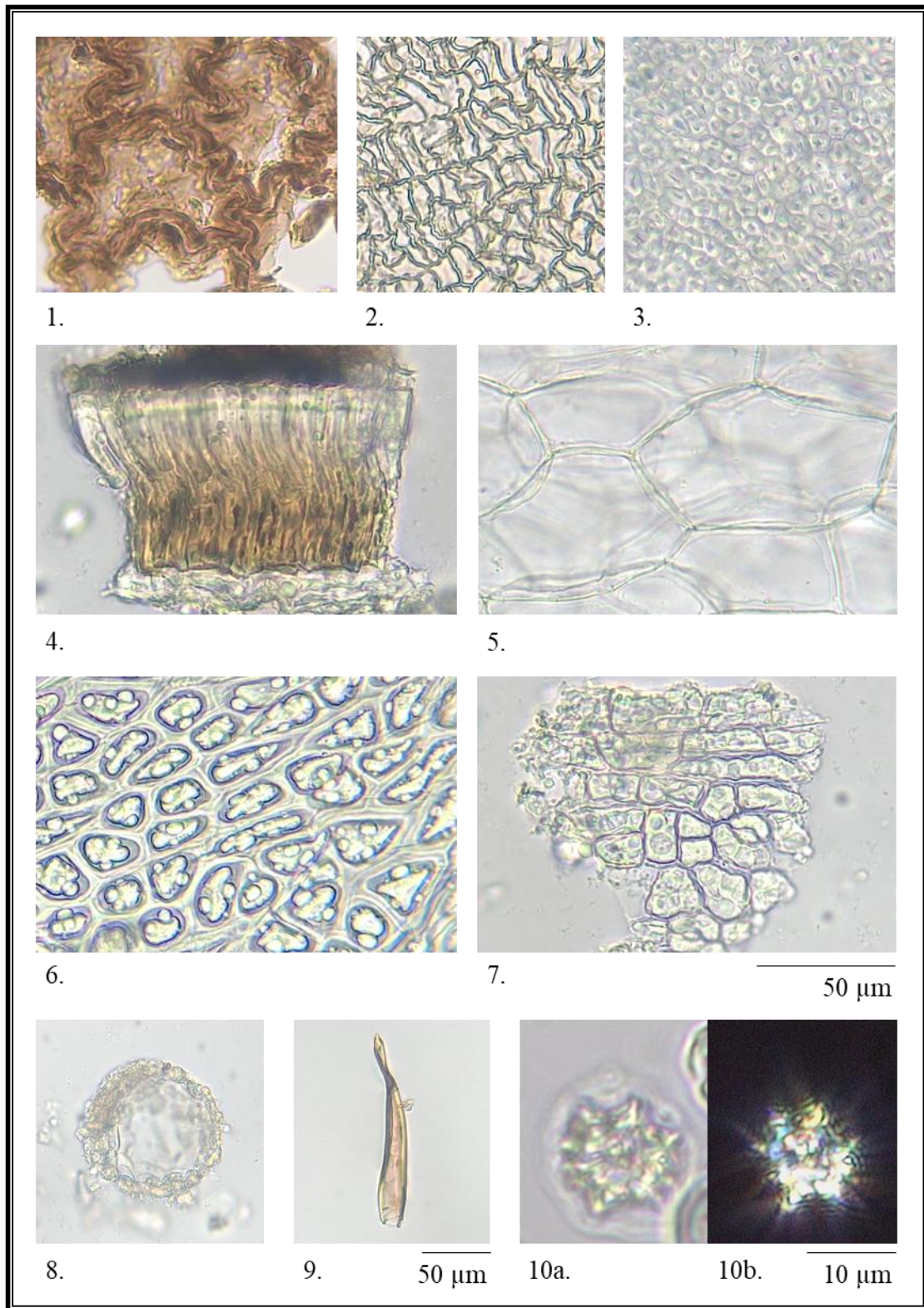


圖 3A 牽牛子(黑丑)粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 表皮細胞 2. 下皮細胞 3. 種皮柵狀細胞(頂面觀) 4. 種皮柵狀細胞(側面觀)
5. 營養層細胞 6. 內胚乳細胞 7. 子葉細胞 8. 分泌腔 9. 非腺毛
10. 草酸鈣簇晶

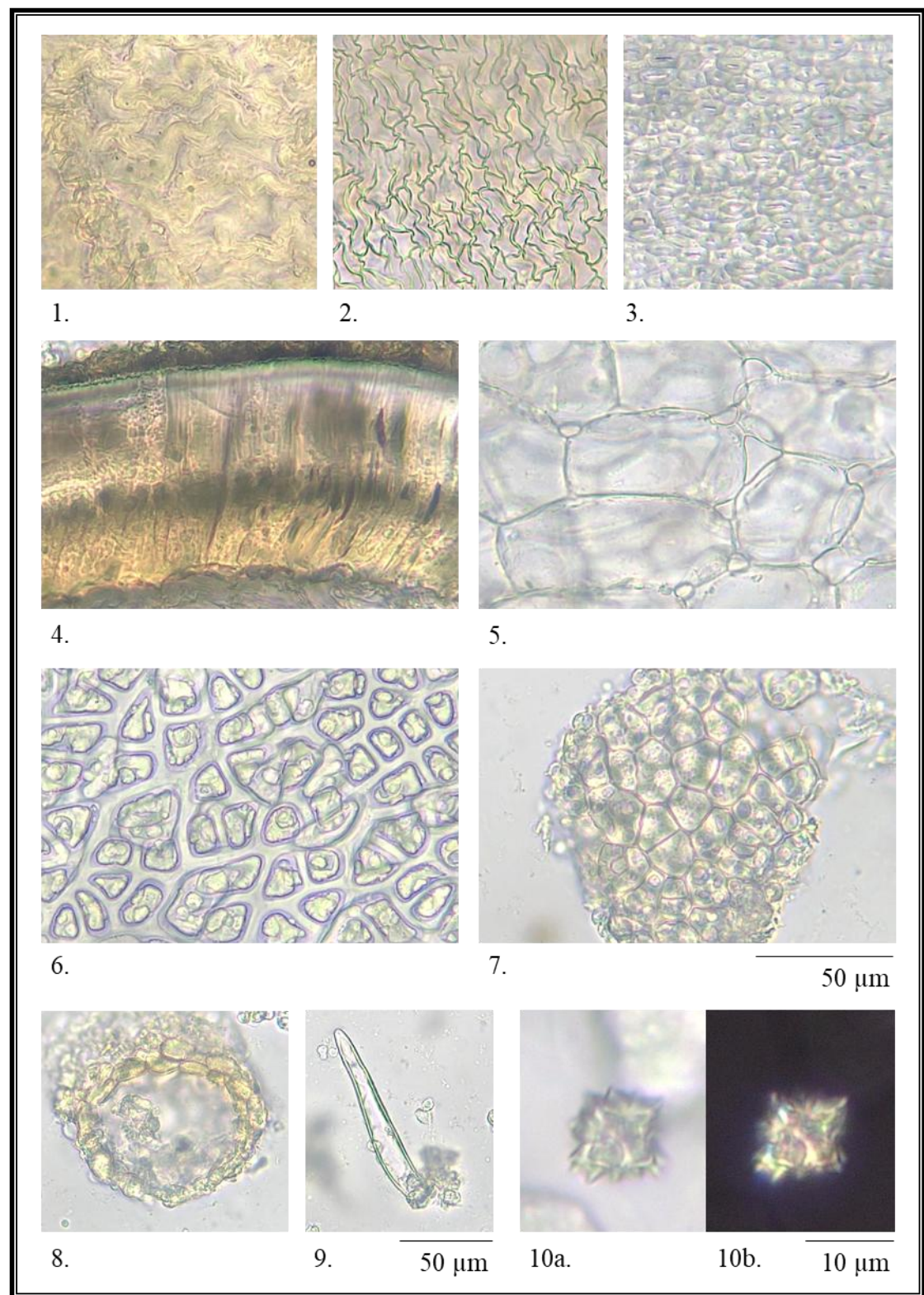


圖 3B 牽牛子(白丑)粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 表皮細胞 2. 下皮細胞 3. 種皮柵狀細胞(頂面觀) 4. 種皮柵狀細胞(側面觀)
5. 營養層細胞 6. 內胚乳細胞 7. 子葉細胞 8. 分泌腔 9. 非腺毛
10. 草酸鈣簇晶

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。台北市：衛生福利部。302 頁。
2. 張永勳、何玉鈴(主編)(2023)。臺灣中藥典圖鑑(第二版)。臺北市：衛生福利部，274 頁。
3. 鐘詩文(2018)。台灣原生植物全圖鑑第六卷。貓頭鷹出版。299~305 頁。
4. 中藥鑑別手冊編輯委員(1986)。中藥鑑別手冊。啟業書局。925~935 頁。
5. 國家藥典委員會(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。265 頁。
6. 肖培根(主編)(2002)。新編中藥志第二卷。北京：化學工業出版社。496~500 頁。
7. 屠鵬飛(主編)(2020)。新編中國藥材學第三卷。中國醫藥科技出版社。174~176 頁。
8. 蔡少青、李軍(主編)(2005)。常用中藥材品種整理和質量研究第五冊。北京大學醫學出版社。375~387 頁。
9. 范崔生(主編)(1995)。中藥採收鑑別應用全書。江西科學技術出版社。449~451 頁。
10. 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。459 頁。
11. 王滿恩、趙昌(主編)(2019)。飲片驗收經驗。山西科學技術出版社。433~434 頁。
12. 張繼(主編)(2021)。中國中藥材及飲片真偽鑑別圖典第三冊。廣東科技出版社。頁 219~221。
13. 艾鐵民(主編)(2022)。中國藥典中藥材及原植物志。北京：中國醫藥科技出版社。468~469 頁。
14. 黃璐琦(主編)(2018)。中國中藥材種子原色圖典。海峽出版發行集團·福建科學技術出版社。300~302 頁。
15. 石遵睿、李莎、李娟、詹志來、孫媛(2022)。牽牛子的本草考證。世界科學技術-中醫藥現代化，2022，24(2)：742~747。
16. 經典名方中牽牛子的本草考證。中國實驗方劑學雜誌，2024，30(6)：179~187。

白丑牽牛子 [IPOMOEAE SEMEN (PHARBITIDIS SEMEN)]

一、材料

購置於臺灣各地白丑牽牛子藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Waters e2695 Separation Module，包含 Waters 2998、PDA Detector；層析管柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Cloumn (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；磷酸(85%)購置於友和貿易有限公司。

(二) 對照標準品

咖啡酸(Caffeic acid)購置於友和貿易有限公司，純度 98.35%。CAS No:331-39-5

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒評估

取本品粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入甲醇、75%甲醇、50%甲醇、75%乙醇、50%乙醇各 25 mL，加熱迴流 30 分鐘，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 25 mL 之容量瓶中，加入溶媒至刻度。搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。每針 10 μL 注入 HPLC，以所測得進注量之咖啡酸最大波峰面積為最佳白丑牽牛子藥材萃取溶媒。

(二) 最佳萃取時間評估

準確稱取本品粉末 4 份(過第 20 號篩網)約 0.5 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 50%乙醇 25 mL，分別加熱迴流 30、60、90 及 120 分鐘，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 25 mL 之容量瓶中，加入 50%乙醇至刻度。搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。每針 10 μL 注入 HPLC，以所測得進注量之咖啡酸最大波峰面積為最佳白丑牽牛子藥材萃取時間。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取對照標準品咖啡酸 2.0 mg，加 10 mL 的甲醇製成每 1 mL 含咖啡酸 200 µg 的對照標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 10 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 0.5 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 50%乙醇 25 mL，加熱迴流 30 分鐘，冷卻後以 No.1 濾紙過濾，取濾液移入 25 mL 之容量瓶中，加 50%乙醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 µm)，即得。

(五) 測定法

分別準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 µL，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算檢品溶液中咖啡酸的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取咖啡酸對照標準品儲備溶液適量(200 µg/mL)，以甲醇稀釋成含咖啡酸分別為 50、25、10、5.0、1.0 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

以咖啡酸為 10 µg/mL 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以咖啡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：取同一批市售白丑牽牛子藥材粉末，依白丑牽牛子藥材檢品溶液製備方法平行製備 5 份白丑牽牛子藥材檢品溶液，進樣測定，以咖啡酸的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售白丑牽牛子藥材粉末，依白丑牽牛子藥材檢品溶液製備方法製備白丑牽牛子藥材檢品溶液，分別在 0、2、4、8、24 小時進樣測定，以咖啡酸的含量為指標，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 Quantification, 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

取已知咖啡酸含量的白丑牽牛子藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，分別加入 0.3 mg 的咖啡酸，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：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 323 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：10 μ L
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	25	75
30	25	75

(十二) 臺灣市售白丑牽牛子藥材含量測定

取 10 批市售白丑牽牛子藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μ L 連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品咖啡酸的百分比含量。

(十三) 白丑牽牛子檢品之 UPLC 分析條件

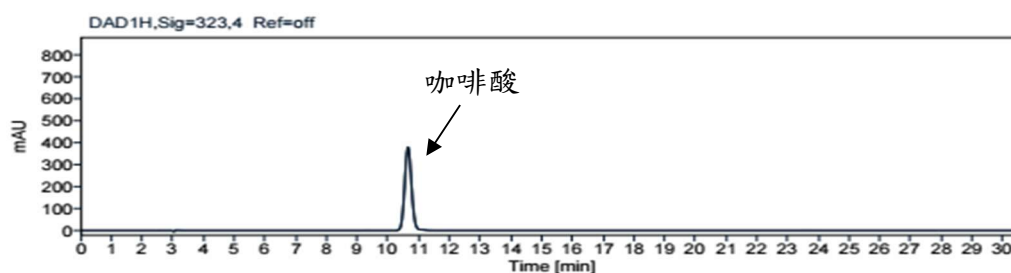
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 × 2.1 mm, 1.7 μ m)
2. 檢測波長：UV 323 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μ L
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	25	75
6	25	75

五、結果

(一) 對照標準品咖啡酸之 HPLC 層析

於滯留時間 10.6 分鐘處顯示咖啡酸對照標準品波峰(圖一)。

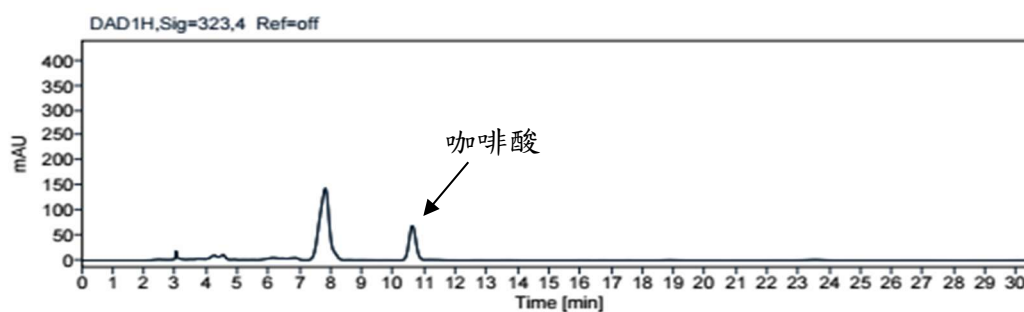


圖一、咖啡酸對照標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售白丑牽牛子藥材檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 10.6 分鐘處顯示白丑牽牛子藥材檢品中咖啡酸波峰(圖二)。

咖啡酸分離率(*R*)為 5.55，拖尾因子(*T*)為 1.05，均在系統適用性要求內。



圖二、市售白丑牽牛子藥材檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取溶媒評估

以 50%乙醇為溶媒時，以加熱迴流萃取方式，每克藥材重量所得咖啡酸的波峰面積最大，顯示 50%乙醇溶液為最佳萃取溶媒。

表一、不同萃取溶媒加熱迴流萃取評估

溶媒	咖啡酸波峰面積	最佳萃取
甲醇	747	
75%甲醇	828	
50%甲醇	834	
75%乙醇	844	
50%乙醇	891	√

(四) 最佳萃取時間評估

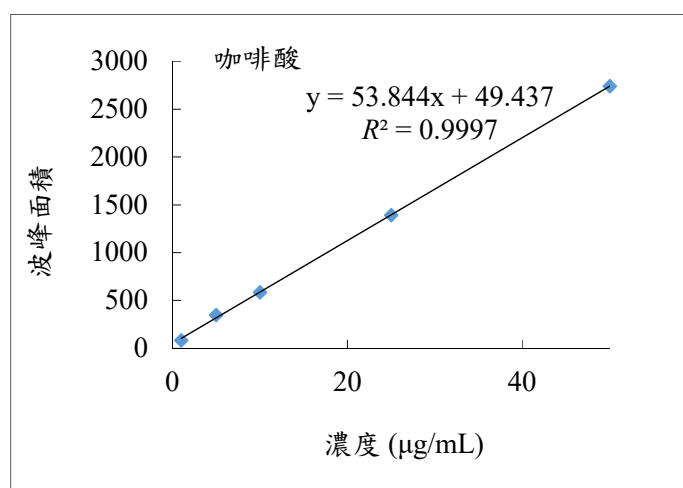
結果顯示加熱迴流萃取 30 分鐘，咖啡酸波峰面積最大，顯示加熱迴流萃取 30 分鐘為最佳萃取時間(表二)。

表二、白丑牽牛子藥材檢品萃取時間評估

甲醇	咖啡酸波峰面積	最佳萃取
加熱迴流 30 分鐘	1175	√
加熱迴流 60 分鐘	1059	
加熱迴流 90 分鐘	1032	
加熱迴流 120 分鐘	955	

(五) 對照標準品咖啡酸檢量線

經不同濃度咖啡酸(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 $y = 53.844x + 49.437$ ， $R^2 = 0.9997$ ，顯示濃度在 1.0–50 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、咖啡酸之檢量線圖

表三、咖啡酸之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
咖啡酸	1.0–50	$y = 53.844x + 49.437$	0.9997

(六) 精密度試驗

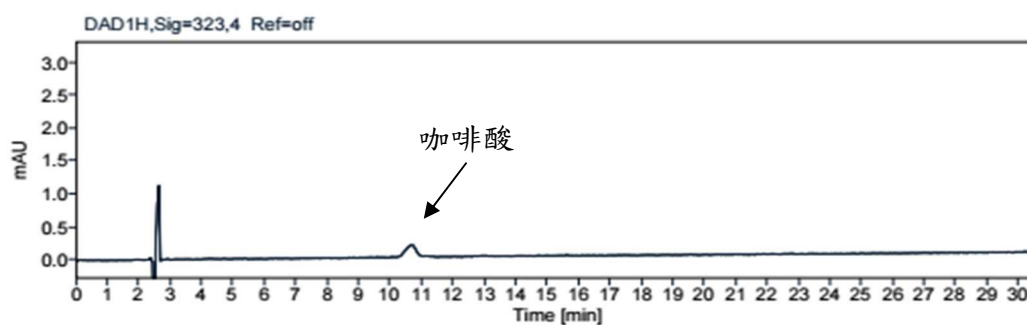
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，咖啡酸精密度之相對標準差為 0.07%，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

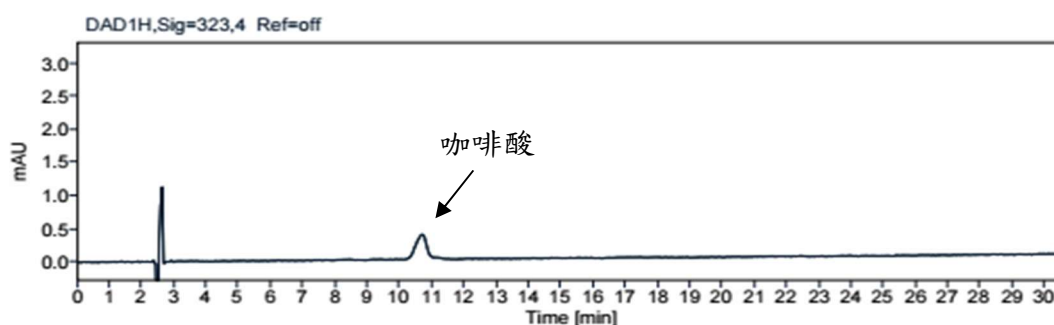
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，咖啡酸重複性之相對標準差為 2.37%，在系統適用性要求內。咖啡酸在 24 小時內穩定，穩定性相對標準差為 1.03%，變化差異小，若所有樣品分析都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

咖啡酸偵測極限為 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、咖啡酸之偵測極限層析圖



圖五、咖啡酸之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	咖啡酸	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	10 $\mu\text{g/mL}$	0.07
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.3)	2.37
穩定性 (n=5)	檢品溶液(No.3)	1.03
偵測極限 (n=1)	0.05 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=1)	0.20 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 添加回收率試驗

咖啡酸平均添加回收率為 92.4%，相對標準偏差為 3.38% (表五)。

表五、咖啡酸添加回收率

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	0.4996	0.4165	0.3	0.6975	93.67	92.4	3.38
2	0.4999	0.4168	0.3	0.6954	92.87		
3	0.5001	0.4169	0.3	0.6805	87.87		
4	0.5000	0.4168	0.3	0.6911	91.43		
5	0.5004	0.4172	0.3	0.7063	96.37		

(十) 臺灣市售白丑牽牛子藥材含量測定

10 批白丑牽牛子藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，咖啡酸的含量為 0.062–0.104%。建議白丑牽牛子藥材指標成分咖啡酸的含量不得少於 0.05%。理論板數按咖啡酸波峰計算應不低於 5000 (實際值為 10703)。

表六、臺灣市售白丑牽牛子藥材檢品之咖啡酸的含量

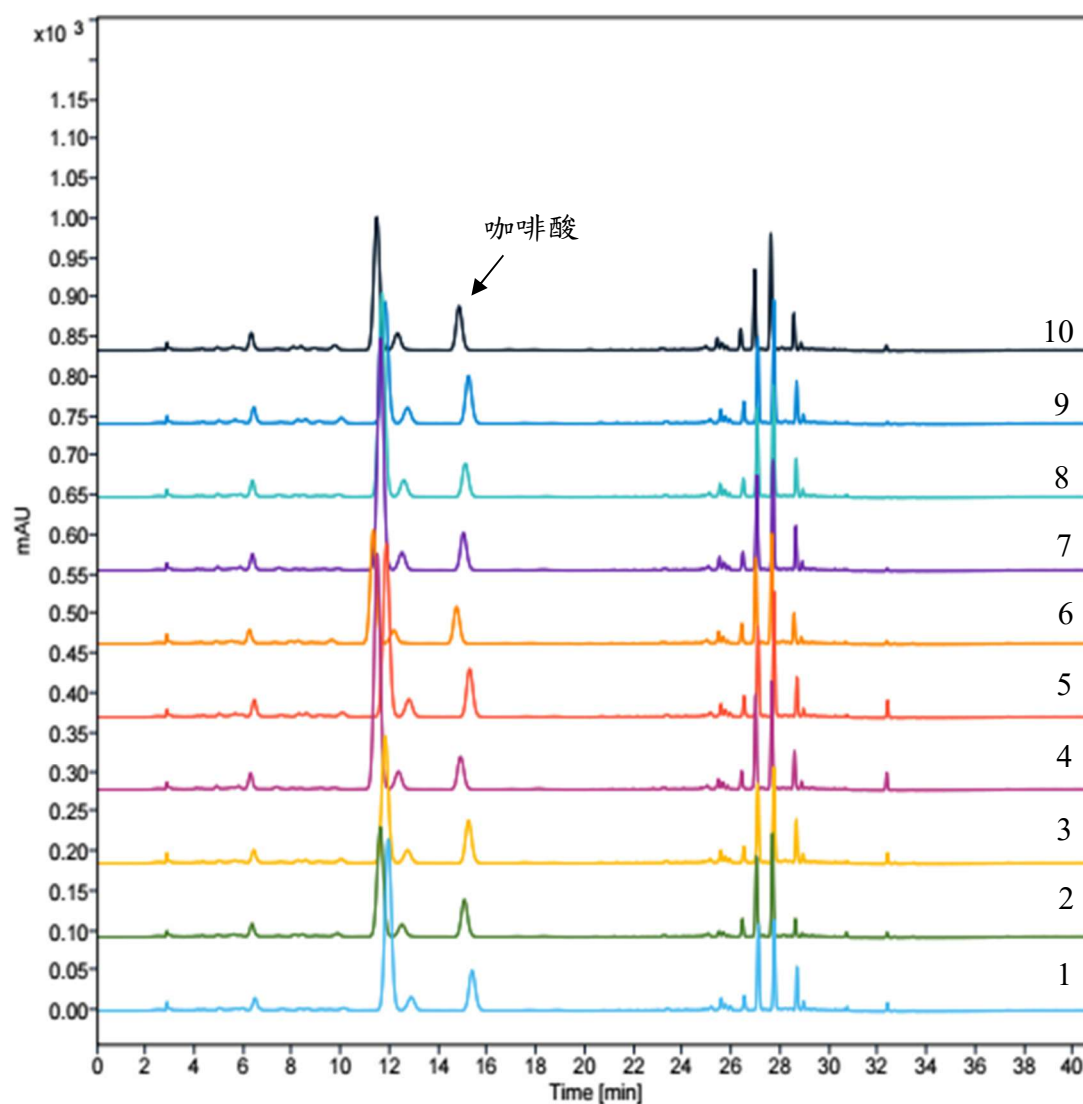
藥材編號 (No.)	咖啡酸含量 (%)	藥材編號 (No.)	咖啡酸含量 (%)
1 (NF-B)	0.083	6 (CH-B)	0.074
2 (NH-B)	0.076	7 (SK1-B)	0.076
3 (NJ-B)	0.062	8 (SUA)	0.068
4 (NRA2)	0.068	9 (SUC)	0.104
5 (CA-B)	0.100	10 (SUD)	0.088
平均值±S.D.	0.080±014		

(十一) 白丑牽牛子藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售白丑牽牛子藥材檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Cloumn (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 323 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：

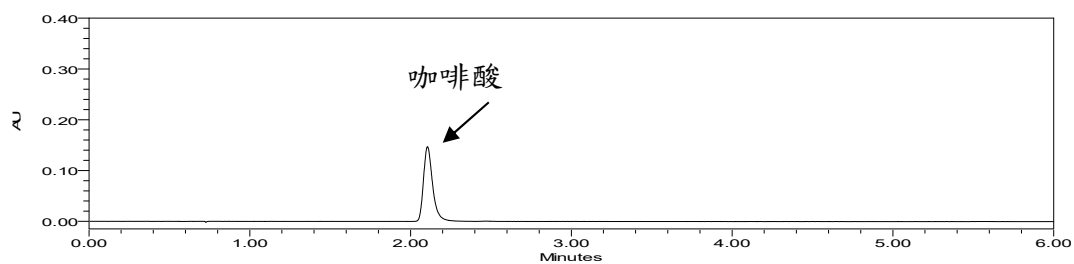
時間(min)	乙腈(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	10	90
15	10	90
25	30	70
40	100	0



圖六、10 批白丑牽牛子藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 對照標準品咖啡酸之 UPLC 層析

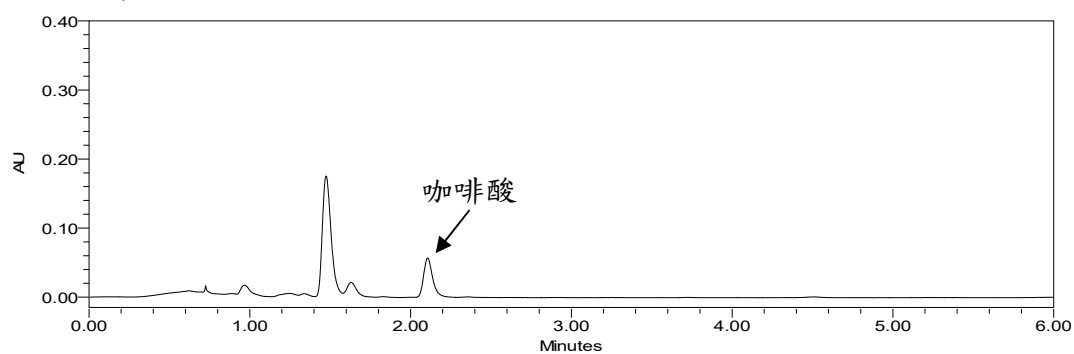
於滯留時間 2.11 分鐘處顯示咖啡酸對照標準品波峰(圖七)。



圖七、咖啡酸對照標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售白丑牽牛子藥材檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.11 分鐘處顯示白丑牽牛子藥材檢品中咖啡酸波峰(圖八)。

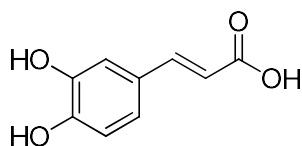


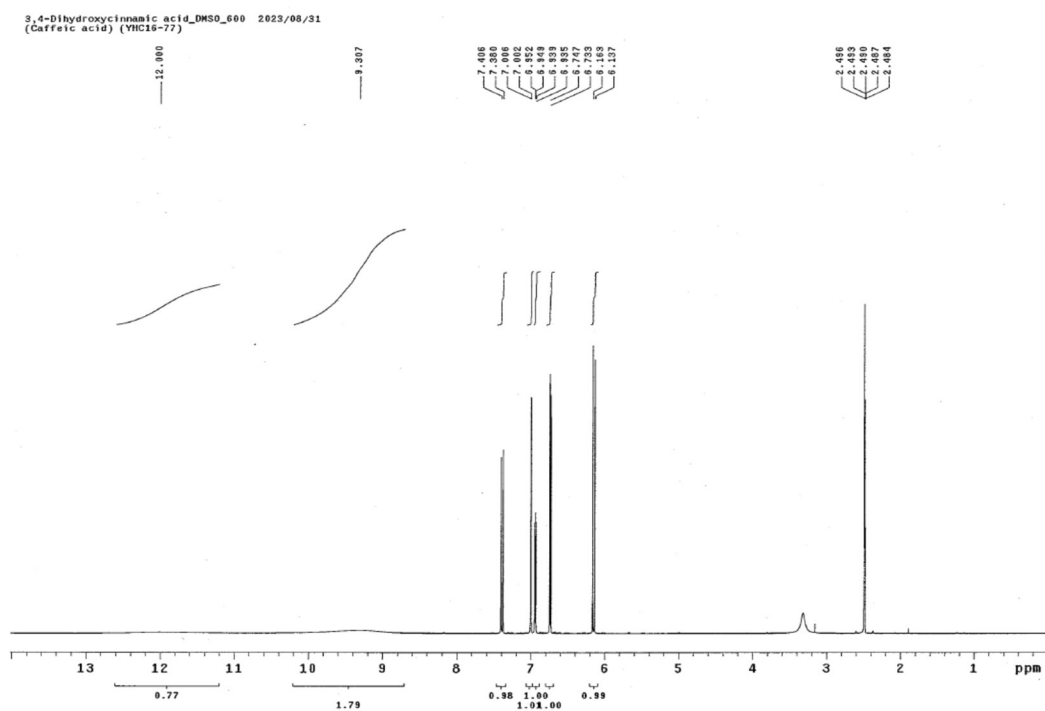
圖八、市售白丑牽牛子藥材檢品之 UPLC 層析圖

(十四) 咖啡酸的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_9H_8O_4$ ；分子量：180.1；熔點：224 °C；白色粉末。

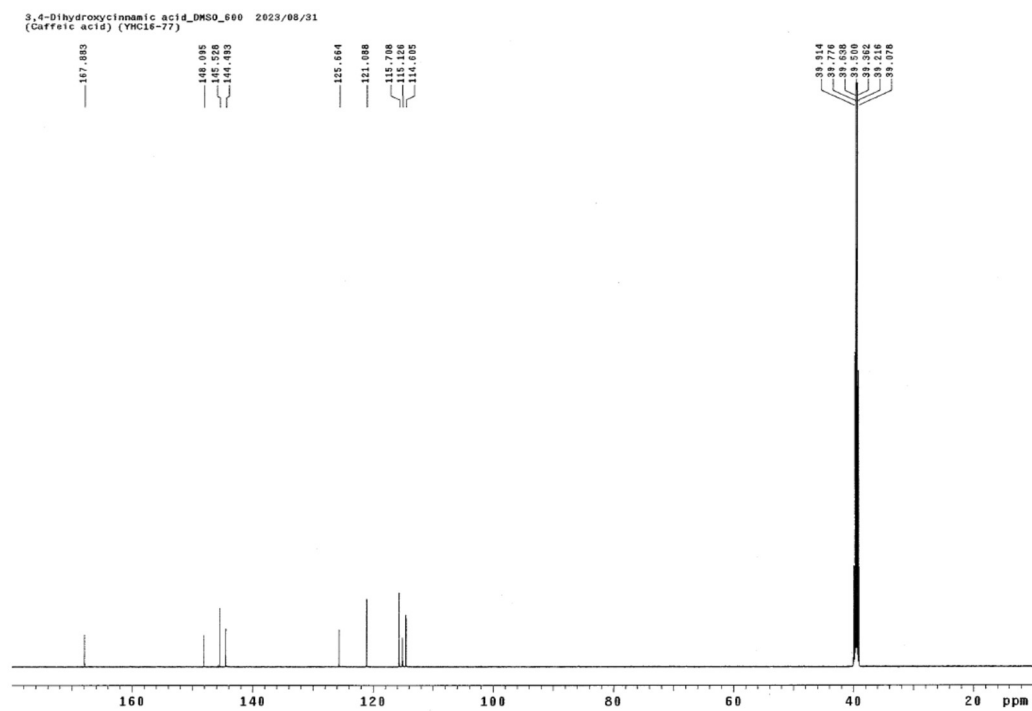
(十五) 咖啡酸的結構



(十六) 咖啡酸的 ^1H NMR 圖譜

圖九、咖啡酸的 ^1H NMR 圖譜($\text{DMSO}-d_6$)

(十七) 咖啡酸的 ^{13}C NMR 圖譜



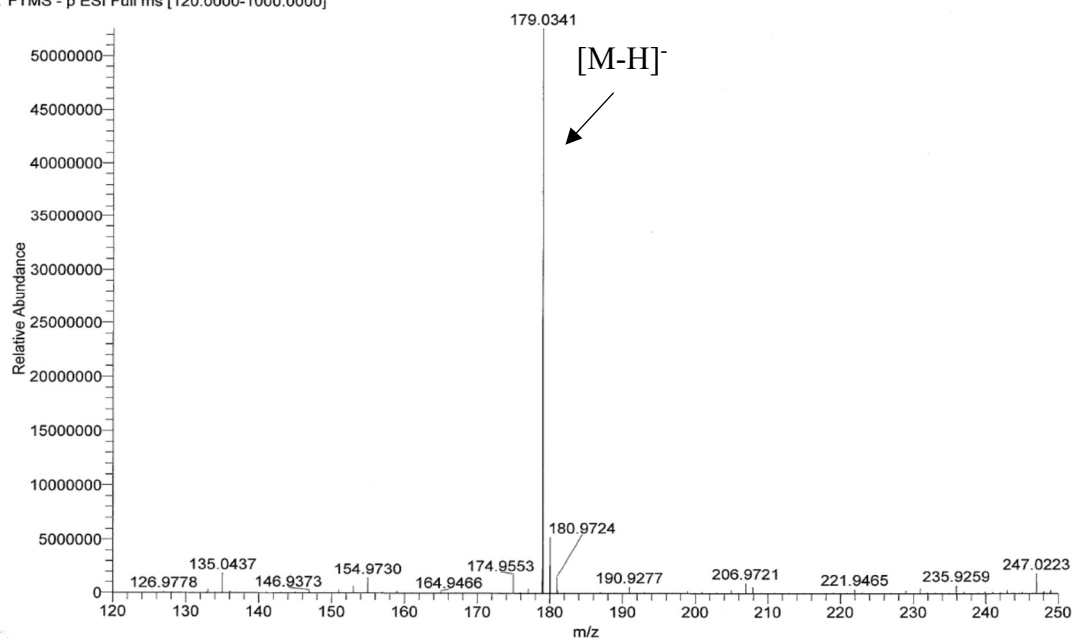
圖十、咖啡酸的 ^{13}C NMR 圖譜($\text{DMSO}-d_6$)

(十八) 咖啡酸的 ESI-MS 圖譜

D:\Xcalibur\...\YHC16_77_5_LC_neg

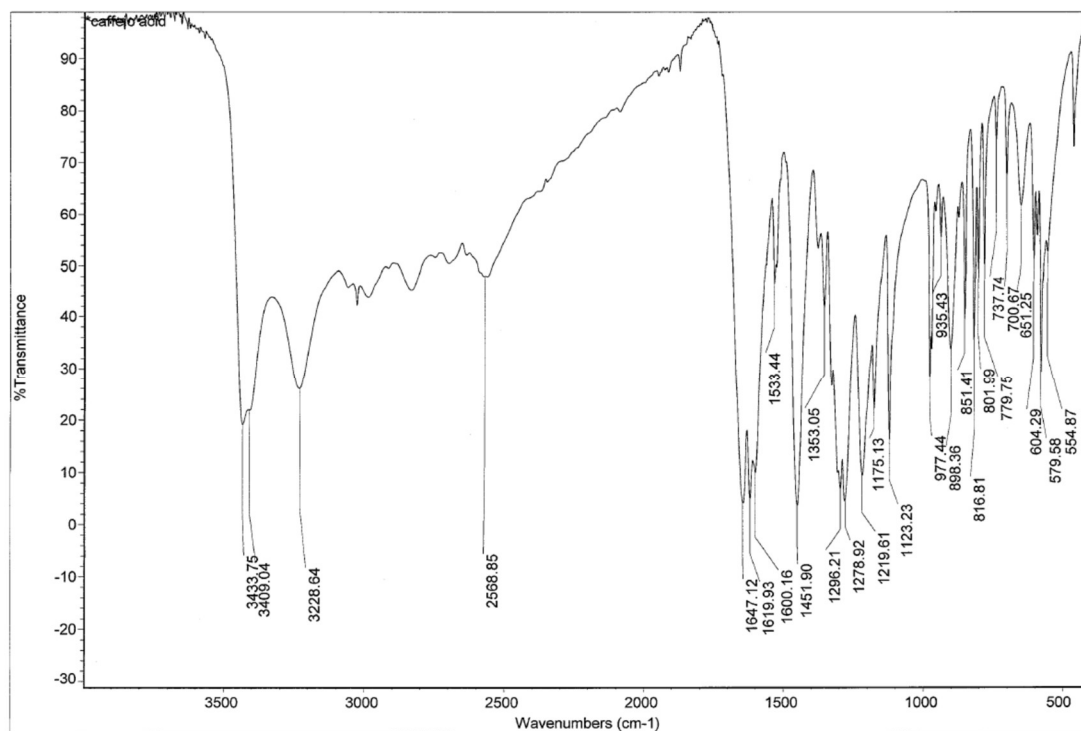
09/11/23 16:08:35

YHC16_77_5_LC_neg #902 RT: 5.72 AV: 1 NL: 5.26E7
T: FTMS - p ESI Full ms [120.0000-1000.0000]



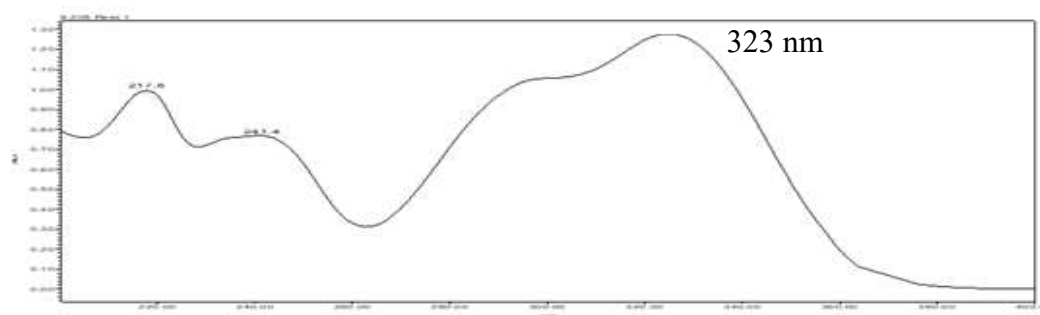
圖十一、咖啡酸的 ESI-MS 圖譜

(十九) 咖啡酸的 FTIR 圖譜



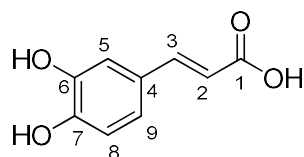
圖十二、咖啡酸的 FTIR 圖譜

(二十) 咖啡酸的 UV 圖譜



圖十三、咖啡酸的 UV 圖譜

(二十一) 咖啡酸的氫、碳化學位移



咖啡酸

表七、咖啡酸氫、碳化學位移(DMSO- d_6)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	-	167.9
2	6.15 (d, 15.6)	115.1
3	7.39 (d, 15.6)	144.5
4	-	125.7
5	7.00 (d, 2.4)	114.6
6	-	145.5
7	-	148.1
8	6.74 (d, 8.4)	115.7
9	6.94 (dd, 8.4, 2.4)	121.1

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

黑丑牽牛子 [IPOMOEAE SEMEN (PHARBITIDIS SEMEN)]

一、材料

購置於臺灣各地黑丑牽牛子藥材共 10 批。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Waters e2695 Separation Module，包含 Waters 2998、PDA Detector；層析管柱 Agilent ZORBAX Eclipse Plus 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、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；磷酸(85%)購置於友和貿易有限公司。

(二) 對照標準品

咖啡酸 (Caffeic acid) 購置於友和貿易有限公司，純度 98.35%。CAS No:331-39-5

四、方法

(一) 最佳萃取溶媒評估

取本品粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入甲醇、75%甲醇、50%甲醇、75%乙醇、50%乙醇各 25 mL，加熱迴流 30 分鐘，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 25 mL 之容量瓶中，加入溶媒至刻度。搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。每針 10 μL 注入 HPLC，以所測得進注量之咖啡酸最大波峰面積為最佳黑丑牽牛子藥材萃取溶媒。

(二) 最佳萃取時間評估

準確稱取本品粉末 4 份(過第 20 號篩網)約 0.5 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 50%乙醇 25 mL，分別加熱迴流 30、60、90 及 120 分鐘，冷卻後以 No. 1 濾紙過濾，取濾液移入 25 mL 之容量瓶中，加入 50%乙醇至刻度。搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。每針 10 μL 注入 HPLC，以所測得進注量之咖啡酸最大波峰面積為最佳黑丑牽牛子藥材萃取時間。

(三) 對照標準品溶液

準確稱取對照標準品咖啡酸 2.0 mg，加 10 mL 的甲醇製成每 1 mL 含咖啡酸 200 µg 的對照標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 10 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 0.5 g，置 100 mL 圓底瓶中，準確加入 50%乙醇 25 mL，加熱迴流 30 分鐘，冷卻後以 No.1 濾紙過濾，取濾液移入 25 mL 之容量瓶中，加 50%乙醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, PTFE 0.45 µm)，即得。

(五) 測定法

分別準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 µL，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算檢品溶液中咖啡酸的含量，即得。

(六) 檢量線

準確吸取咖啡酸對照標準品儲備溶液適量(200 µg/mL)，以甲醇稀釋成含咖啡酸分別為 50、25、10、5.0、1.0 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

以咖啡酸為 10 µg/mL 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以咖啡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：取同一批市售黑丑牽牛子藥材粉末，依黑丑牽牛子藥材檢品溶液製備方法平行製備 5 份黑丑牽牛子藥材檢品溶液，進樣測定，以咖啡酸的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售黑丑牽牛子藥材粉末，依黑丑牽牛子藥材檢品溶液製備方法製備黑丑牽牛子藥材檢品溶液，分別在 0、2、4、8、24 小時進樣測定，以咖啡酸的含量為指標，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 Quantification, 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

取已知咖啡酸含量的黑丑牽牛子藥材粉末 5 份，每份準確稱取約 0.5 g，分別加入 0.3 mg 的咖啡酸，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：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Cloumn (250 × 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 323 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：10 μ L
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	25	75
30	25	75

(十二) 臺灣市售黑丑牽牛子藥材含量測定

取 10 批市售黑丑牽牛子藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μ L 連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品咖啡酸的百分比含量。

(十三) 黑丑牽牛子檢品之 UPLC 分析條件

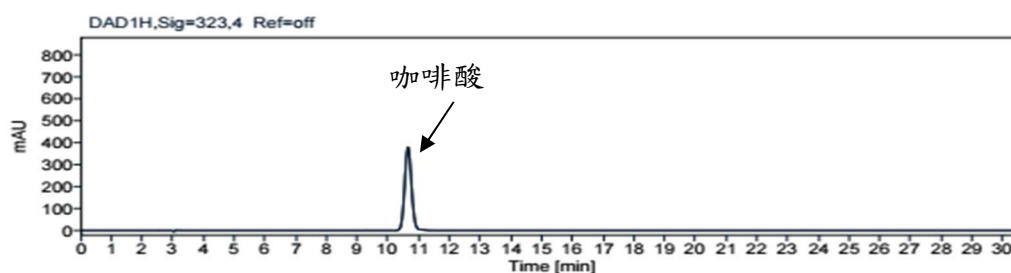
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC® BEH C18 Column (100 × 2.1 mm, 1.7 μ m)
2. 檢測波長：UV 323 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μ L
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	25	75
6	25	75

五、結果

(一) 對照標準品咖啡酸之 HPLC 層析

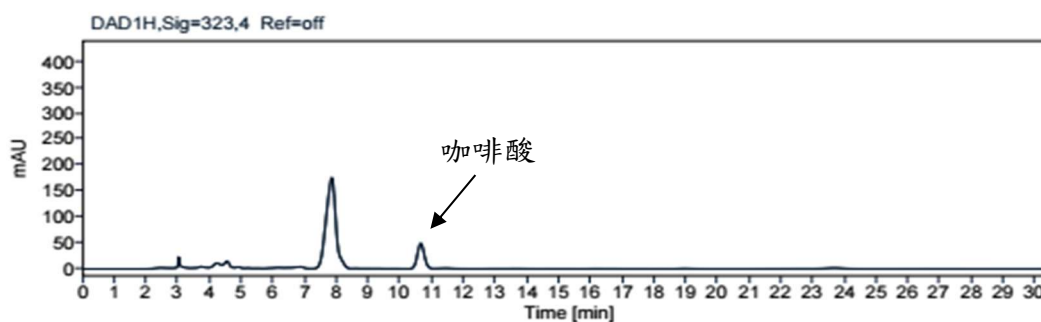
於滯留時間 10.6 分鐘處顯示咖啡酸對照標準品波峰(圖一)。



圖一、咖啡酸對照標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售黑丑牽牛子藥材檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 10.6 分鐘處顯示黑丑牽牛子藥材檢品中咖啡酸波峰(圖二)。
咖啡酸分離率(R)為 5.64，拖尾因子(T)為 1.05，均在系統適用性要求內。



圖二、市售黑丑牽牛子藥材檢品之 HPLC 層析圖

(三) 最佳萃取溶媒評估

以 50%乙醇為溶媒時，以加熱迴流萃取方式，每克藥材重量所得咖啡酸的波峰面積最大，顯示 50%乙醇溶液為最佳萃取溶媒。

表一、不同萃取溶媒加熱迴流萃取評估

溶媒	咖啡酸波峰面積	最佳萃取
甲醇	317	
75% 甲醇	323	
50% 甲醇	303	
75% 乙醇	320	
50% 乙醇	334	√

(四) 最佳萃取時間評估

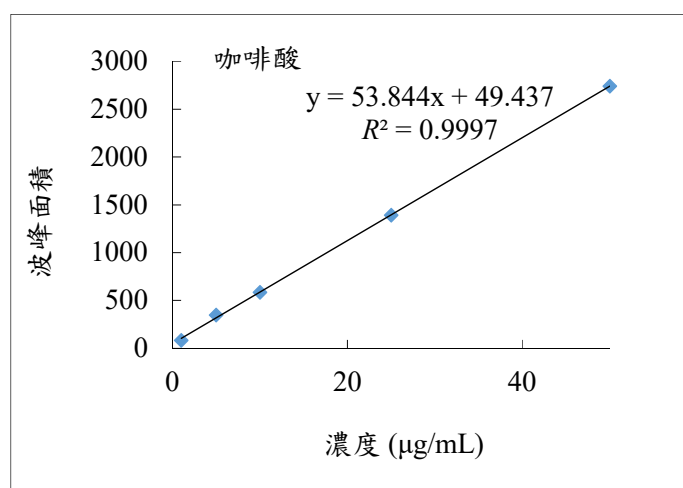
結果顯示加熱迴流萃取 30 分鐘，咖啡酸波峰面積最大，顯示加熱迴流萃取 30 分鐘為最佳萃取時間(表二)。

表二、黑丑牽牛子藥材檢品萃取時間評估

甲醇	咖啡酸波峰面積	最佳萃取
加熱迴流 30 分鐘	398	√
加熱迴流 60 分鐘	382	
加熱迴流 90 分鐘	362	
加熱迴流 120 分鐘	340	

(五) 對照標準品咖啡酸檢量線

經不同濃度咖啡酸(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 $y = 53.844x + 49.437$ ， $R^2 = 0.9997$ ，顯示濃度在 1.0–50 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、咖啡酸之檢量線圖

表三、咖啡酸之檢量線方程式

對照標準品	濃度($\mu\text{g/mL}$)	線性回歸方程式	R^2
咖啡酸	1.0–50	$y = 53.844x + 49.437$	0.9997

(六) 精密度試驗

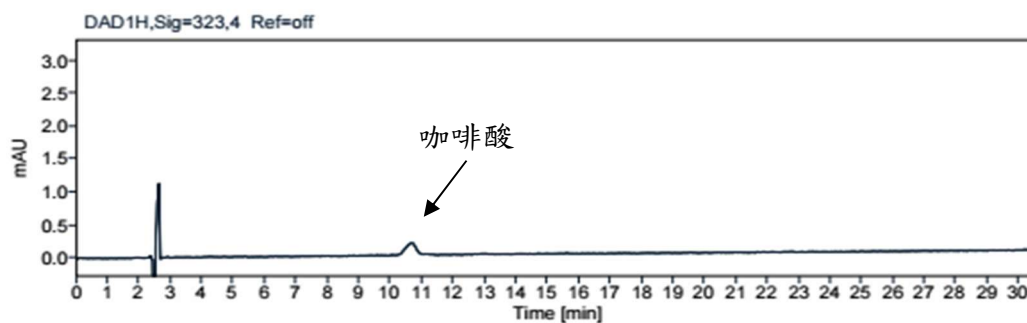
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，咖啡酸精密度之相對標準差為 0.07%，在系統適用性要求內。

(七) 重複性與穩定性試驗

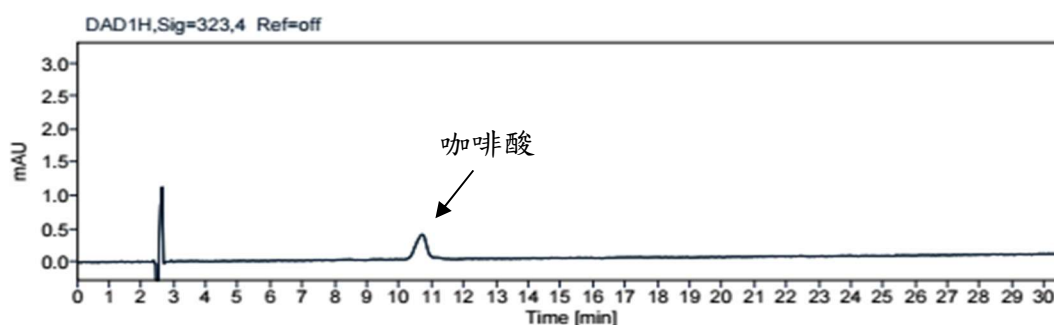
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，咖啡酸重複性之相對標準差為 2.08%，在系統適用性要求內。咖啡酸在 24 小時內穩定，穩定性相對標準差為 0.12%，變化差異小，若所有樣品分析都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

咖啡酸偵測極限為 0.05 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限為 0.2 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、咖啡酸之偵測極限層析圖



圖五、咖啡酸之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	咖啡酸	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	10 $\mu\text{g/mL}$	0.07
重複性 (n=5)	檢品溶液(No.5)	2.08
穩定性 (n=5)	檢品溶液(No.5)	0.12
偵測極限 (n=1)	0.05 $\mu\text{g/mL}$	-
定量極限 (n=1)	0.20 $\mu\text{g/mL}$	-

(九) 添加回收率試驗

咖啡酸平均添加回收率為 96.1%，相對標準偏差為 2.38% (表五)。

表五、咖啡酸添加回收率

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	0.5004	0.2986	0.3	0.5943	98.57	96.1	2.38
2	0.4997	0.2982	0.3	0.5819	94.57		
3	0.5002	0.2985	0.3	0.5911	97.53		
4	0.5004	0.2986	0.3	0.5897	97.03		
5	0.4999	0.2983	0.3	0.5773	93.00		

(十) 臺灣市售黑丑牽牛子藥材含量測定

10 批黑丑牽牛子藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，咖啡酸的含量為 0.060–0.095%。建議黑丑牽牛子藥材指標成分咖啡酸的含量不得少於 0.05%。理論板數按咖啡酸波峰計算應不低於 5000 (實際值為 11344)。

表六、臺灣市售黑丑牽牛子藥材檢品之咖啡酸的含量

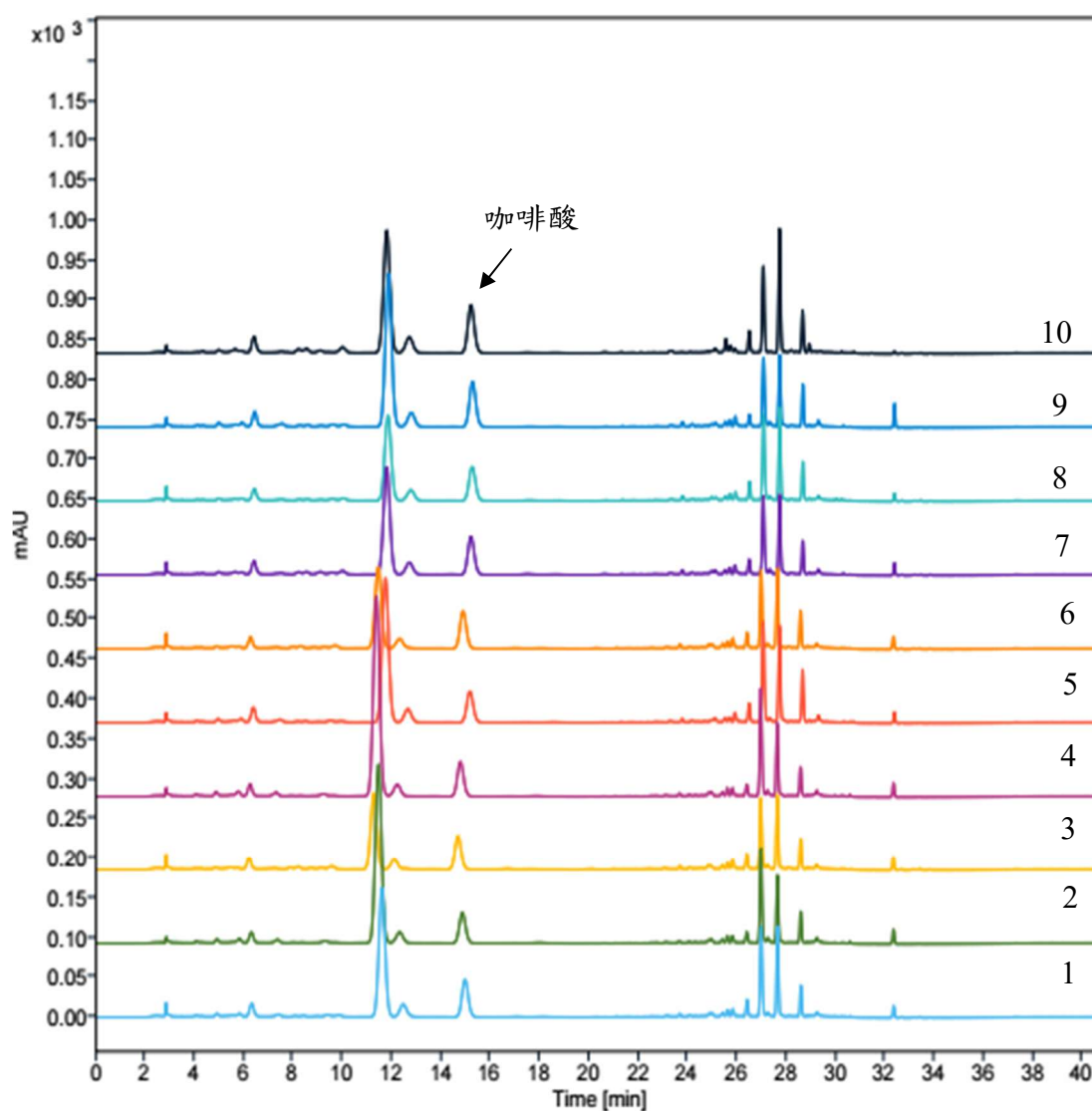
藥材編號 (No.)	咖啡酸含量 (%)	藥材編號 (No.)	咖啡酸含量 (%)
1 (NC-A)	0.074	6 (CE)	0.075
2 (NE-A)	0.060	7 (CH-A)	0.080
3 (NJ-A)	0.069	8 (SK1-A)	0.071
4 (NO)	0.069	9 (SK3-A)	0.094
5 (CB-A)	0.063	10 (SUB)	0.095
平均值±S.D.	0.075±0.012		

(十一) 黑丑牽牛子藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

取 10 批市售黑丑牽牛子藥材檢品溶液各 10 μ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 Cloumn (250 $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長：UV 323 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：

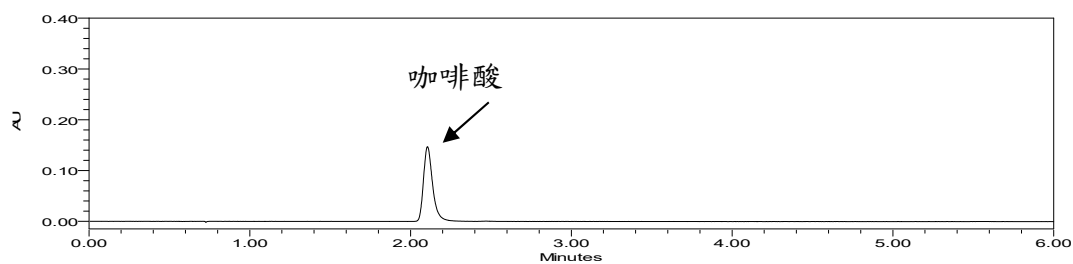
時間(min)	乙腈(%)	0.1%磷酸(v/v, %)
0	10	90
15	10	90
25	30	70
40	100	0



圖六、10 批黑丑牽牛子藥材之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 對照標準品咖啡酸之 UPLC 層析

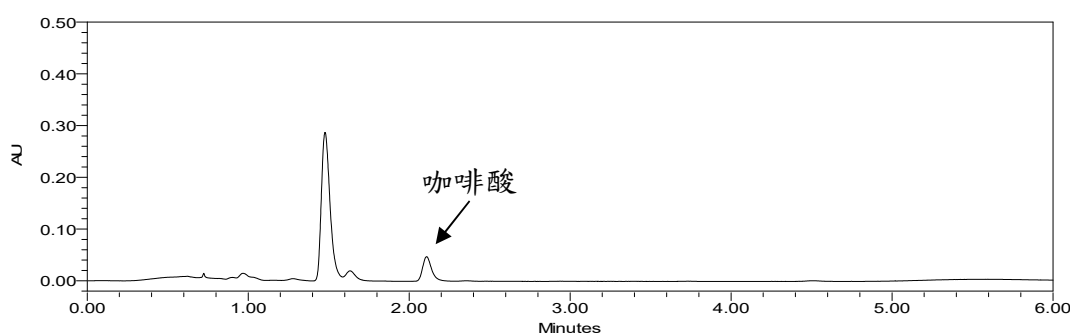
於滯留時間 2.11 分鐘處顯示咖啡酸對照標準品波峰(圖七)。



圖七、咖啡酸對照標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售黑丑牽牛子藥材檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.11 分鐘處顯示黑丑牽牛子藥材檢品中咖啡酸波峰(圖八)。

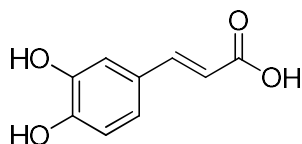


圖八、市售黑丑牽牛子藥材檢品之 UPLC 層析圖

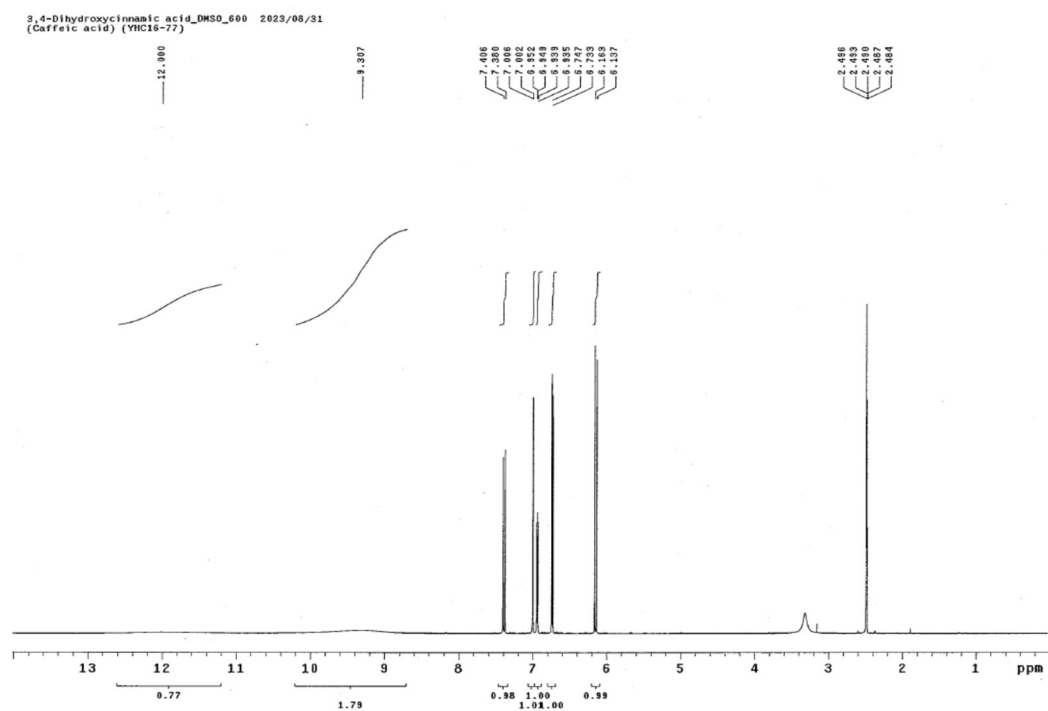
(十四) 咖啡酸的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_9H_8O_4$ ；分子量：180.1；熔點：224 °C；白色粉末。

(十五) 咖啡酸的結構

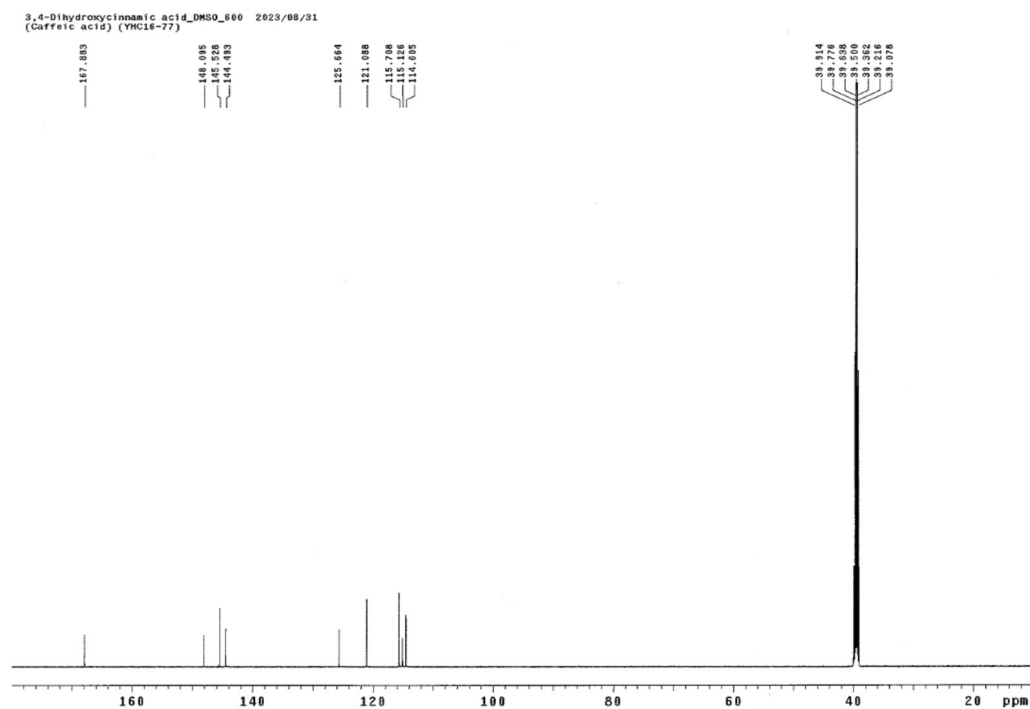


(十六) 咖啡酸的 ^1H NMR 圖譜



圖九、咖啡酸的 ^1H NMR 圖譜(DMSO- d_6)

(十七) 咖啡酸的 ^{13}C NMR 圖譜



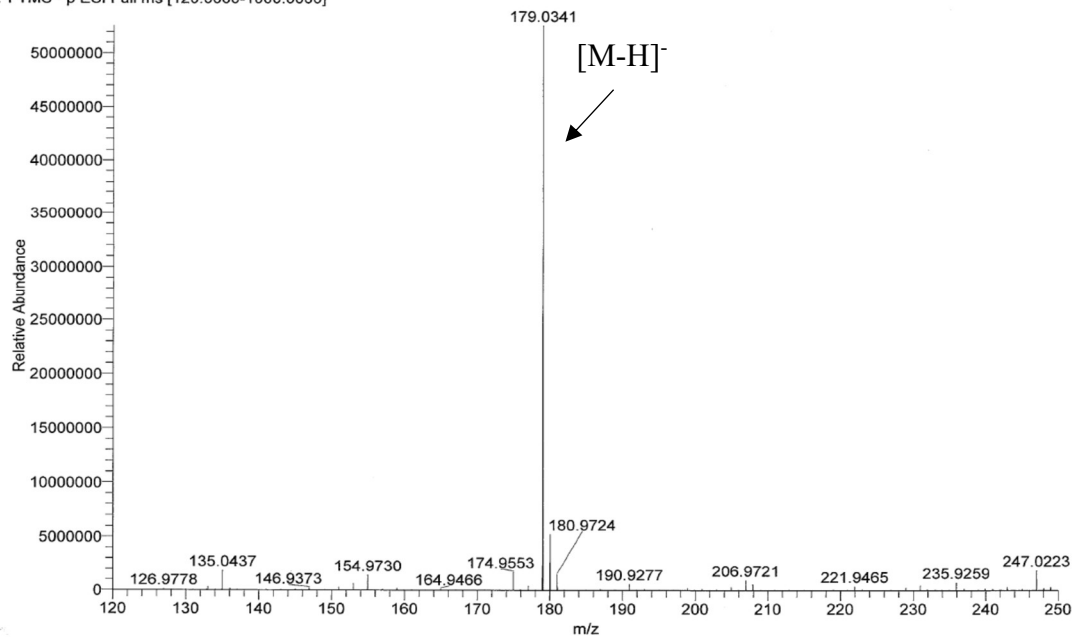
圖十、咖啡酸的 ^{13}C NMR 圖譜(DMSO- d_6)

(十八) 咖啡酸的 ESI-MS 圖譜

D:\Xcalibur\...\YHC16_77_5_LC_neg

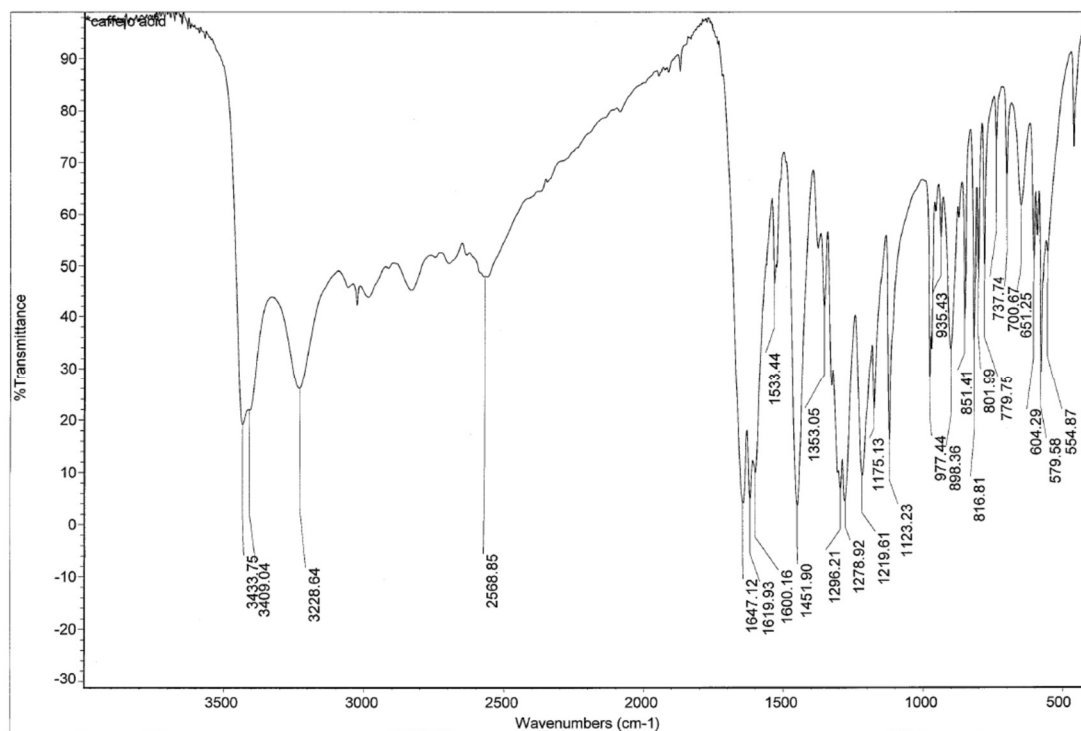
09/11/23 16:08:35

YHC16_77_5_LC_neg #902 RT: 5.72 AV: 1 NL: 5.26E7
T: FTMS - p ESI Full ms [120.0000-1000.0000]



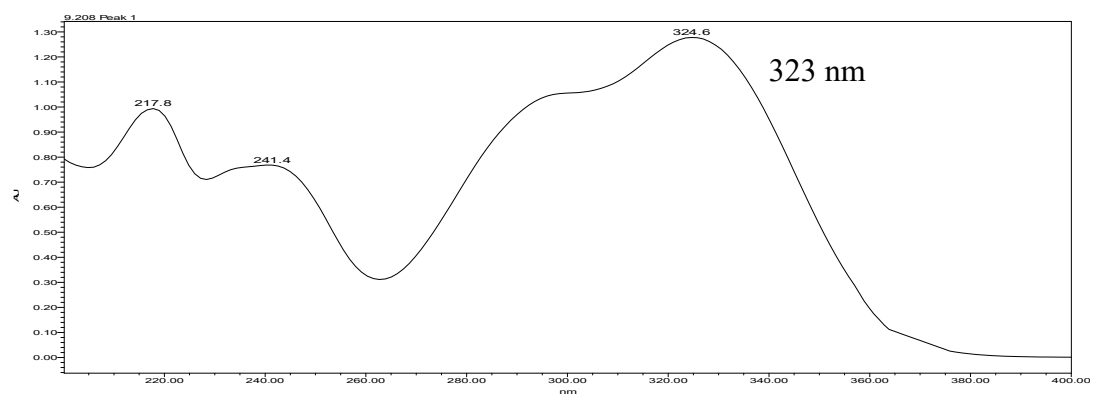
圖十一、咖啡酸的 ESI-MS 圖譜

(十九) 咖啡酸的 FTIR 圖譜



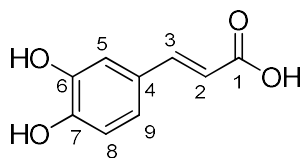
圖十二、咖啡酸的 FTIR 圖譜

(二十) 咖啡酸的 UV 圖譜



圖十三、咖啡酸的 UV 圖譜

(二十一) 咖啡酸的氫、碳化學位移



咖啡酸

表七、咖啡酸氫、碳化學位移(DMSO- d_6)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
1	-	167.9
2	6.15 (d, 15.6)	115.1
3	7.39 (d, 15.6)	144.5
4	-	125.7
5	7.00 (d, 2.4)	114.6
6	-	145.5
7	-	148.1
8	6.74 (d, 8.4)	115.7
9	6.94 (dd, 8.4, 2.4)	121.1

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

牽牛子

生藥名：IPOMOEAE SEMEN (PHARBITIDIS SEMEN)

英文名：Pharbitis Seed

基 原：本品為旋花科 Convolvulaceae 植物裂葉牽牛 *Ipomoea nil* (L.) Roth. 或圓葉牽牛 *Ipomoea purpurea* (L.) Roth. 之乾燥成熟種子。

一、方法

(一) 檢品溶液 【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》✓

——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】(自行開發)

——取本品粉末 1.0 g，加 75% 甲醇 10 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 取咖啡酸(Caffeic acid)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】《臺灣中藥典第四版》

——二氯甲烷：甲醇：甲酸 (23：4：1)

【展開劑 2】《中華人民共和國藥典 2020》

——二氯甲烷：甲醇：甲酸 (93：9：4)

【展開劑 3】(自行開發)✓

——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：1)

(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 風乾後，於紫外光(365 nm)照射下檢視之。

(八) Spike 配製 白丑，取採用建議萃取方法之檢品溶液 1，與對照標準品溶液(4：1)混合，點注量 10 μL。

黑丑，取採用建議萃取方法之檢品溶液 11，與對照標準品溶液(4：1)混合，點注量 10 μL。

二、萃法選擇及濃度測試

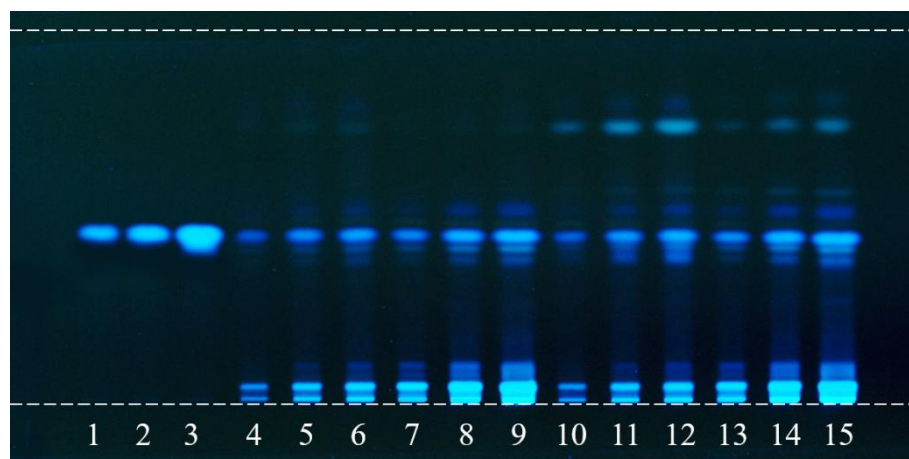
實驗日期：114/03/28

相對溼度(RH)：54%

溫度(RT)：24.3 °C

【展開劑 3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：1)

——HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



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

建議萃法：2 種萃法之檢品溶液中皆有分離與檢出咖啡酸，因濃度適中，有較多較明顯的斑點，故採用原《臺灣中藥典》之【萃取方法 1】。《中華人民共和國藥典》萃取方法，因萃取時間過長，且較繁雜，故未做測試，亦不採用。

建議點注量：咖啡酸 2 μ L，檢品溶液【萃取方法 1】白丑 8 μ L，黑丑 8 μ L。

三、溶媒系統選擇

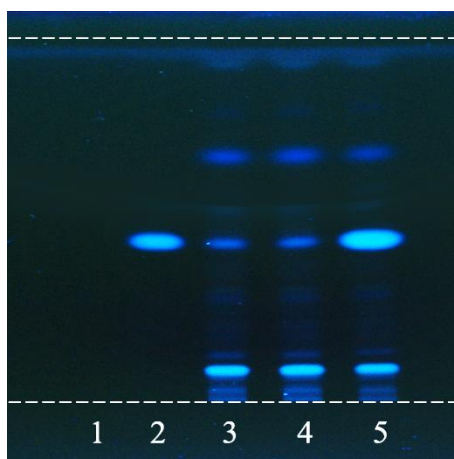
實驗日期：114/03/28

相對溼度(RH)：54%

溫度(RT)：24.3 °C

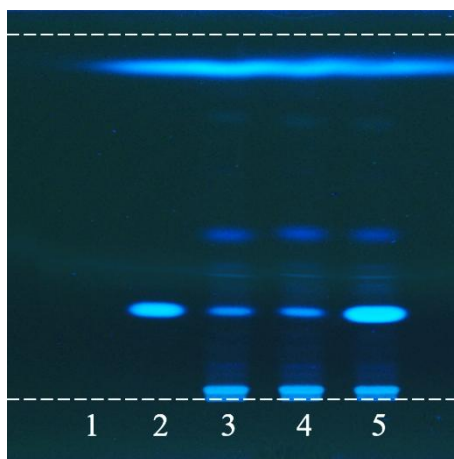
【展開劑 1】《臺灣中藥典第四版》——二氯甲烷：甲醇：甲酸 (23：4：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》——HPTLC 紫外光(365 nm)檢出(咖啡酸
 R_f 值為 0.42)



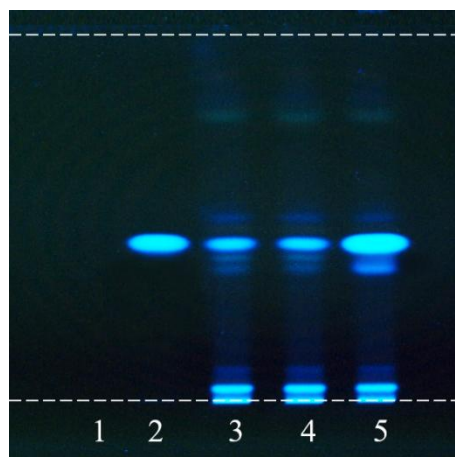
【展開劑 2】《中華人民共和國藥典 2020》——二氯甲烷：甲醇：甲酸 (93：4：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》——HPTLC 紫外光(365 nm)檢出(咖啡酸
 R_f 值為 0.26)



【展開劑 3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：1) ✓

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》——HPTLC 紫外光(365 nm)檢出(咖啡酸 R_f 值為 0.43)



1：Blank

2：咖啡酸

3，4：檢品溶液 1

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 1】方式，以自行開發之【展開劑 3】展開，顯示咖啡酸的 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：114/03/28

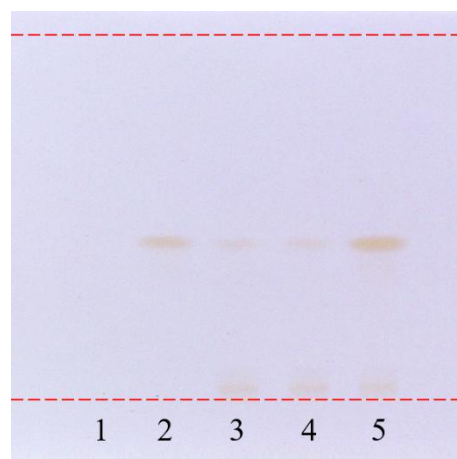
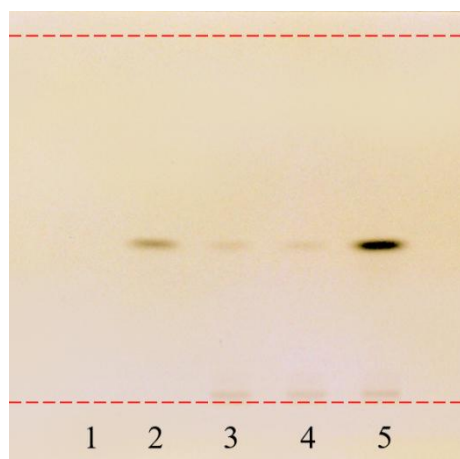
相對溼度(RH)：54%

溫度(RT)：24.3 °C

【展開劑 3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：1)

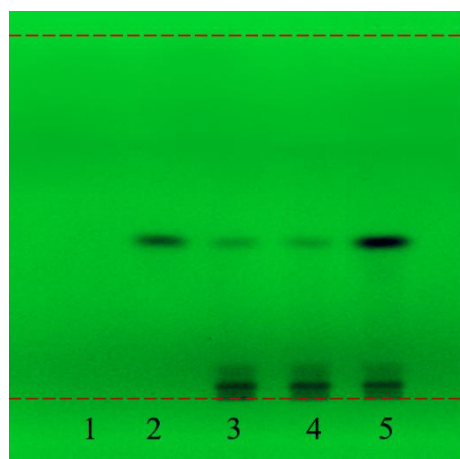
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》 【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》

— HPTLC 10%磷鉬酸/乙醇試液顯色 —HPTLC 可見光檢出
後可見光檢出



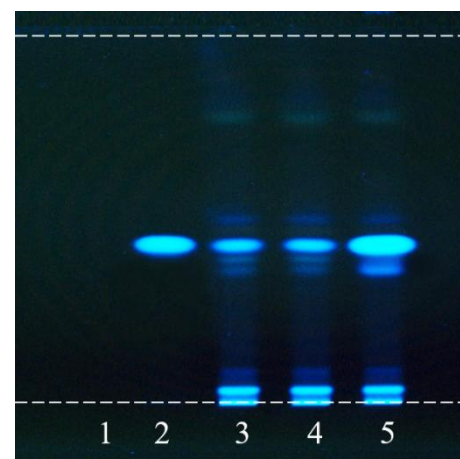
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》

—HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》

—HPTLC 紫外光(365 nm)檢出✓



1：Blank

2：咖啡酸

3，4：檢品溶液 1

5：Spike

建議觀察方式：以紫外光(365 nm)觀察，有較多較明顯之分離條帶。

五、十批白丑藥材樣品檢測

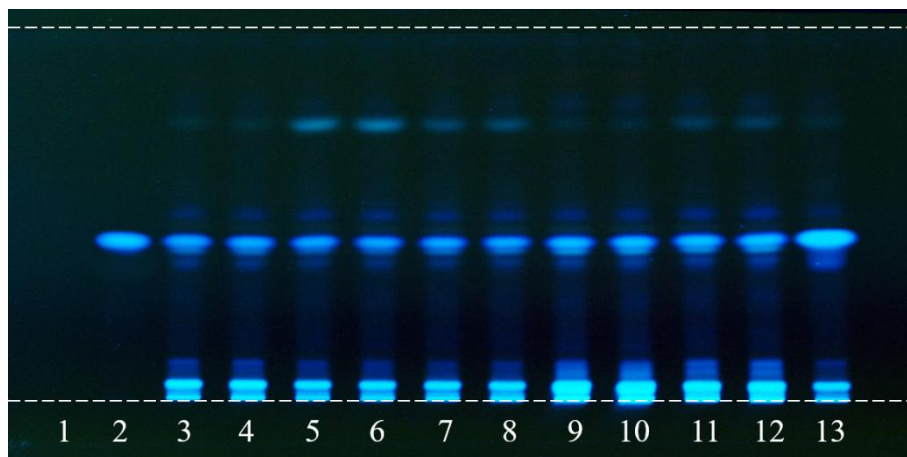
實驗日期：114/03/28

相對溼度(RH)：54%

溫度(RT)：24.3 °C

【展開劑 3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：1)

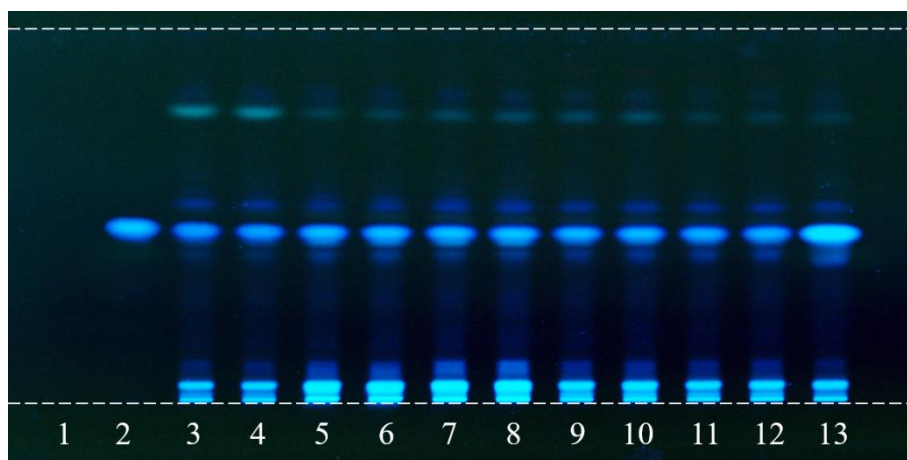
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》—HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



1	Blank	7，8	檢品溶液 3 (NJB)
2	咖啡酸(1.0 mg/mL)	9，10	檢品溶液 4 (NRA2)
3，4	檢品溶液 1 (NFB)	11，12	檢品溶液 5 (CAB)
5，6	檢品溶液 2 (NHB)	13	Spike (檢品溶液 1)

【展開劑 3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》—HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 8 (SUA)
2	咖啡酸(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 9 (SUC)
3, 4	檢品溶液 6 (CHB)	11, 12	檢品溶液 10 (SUD)
5, 6	檢品溶液 7 (SK1B)	13	Spike (檢品溶液 1)

六、十批黑丑藥材樣品檢測

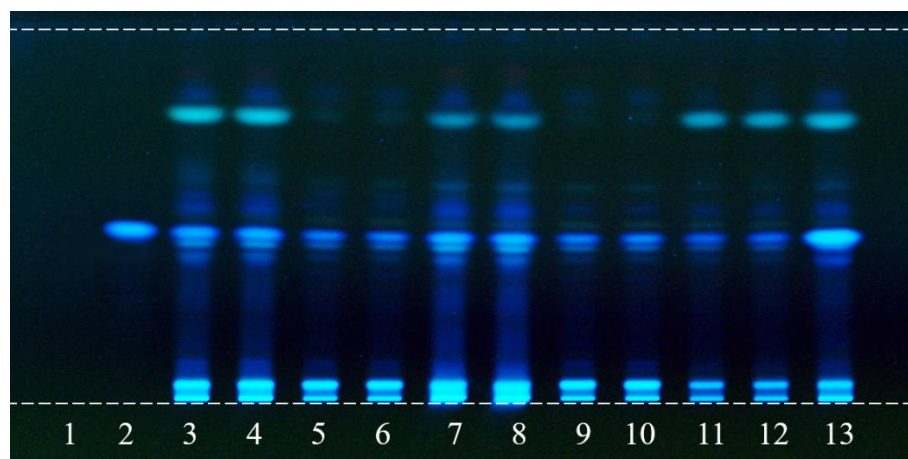
實驗日期：114/03/28

相對溼度(RH)：54%

溫度(RT)：24.3 °C

【展開劑 3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：1)

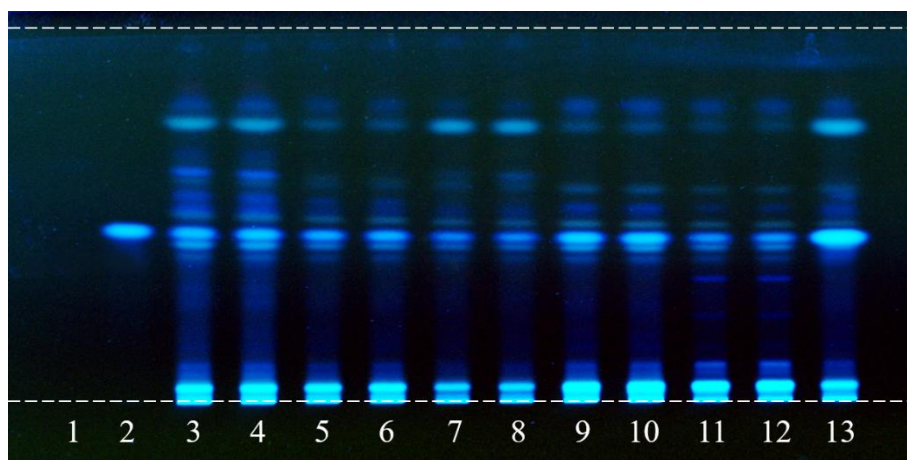
【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》—HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 13 (NJA)
2	咖啡酸(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 14 (NO)
3, 4	檢品溶液 11 (NCA)	11, 12	檢品溶液 15 (CBA)
5, 6	檢品溶液 12 (NEA)	13	Spike (檢品溶液 11)

【展開劑 3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (5：3：1)

【萃取方法 1】《臺灣中藥典第四版》—HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



1	Blank	7, 8	檢品溶液 18 (SK1A)
2	咖啡酸(1.0 mg/mL)	9, 10	檢品溶液 19 (SK3A)
3, 4	檢品溶液 16 (CE)	11, 12	檢品溶液 20 (SUB)
5, 6	檢品溶液 17 (CHA)	13	Spike (檢品溶液 11)

結論與建議：以【萃取方法 1】方式及自行開發之【展開劑 3】分離與檢出咖啡酸較佳，以紫外光(365 nm)檢視較佳。