

# 荷葉

## (NELUMBINIS FOLIUM)

|                   |    |
|-------------------|----|
| 荷葉 MI .....       | 2  |
| 一、形態 .....        | 2  |
| 二、顯微 .....        | 2  |
| 荷葉 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 .....        | 6  |
| 荷葉 TLC .....      | 15 |
| 一、方法 .....        | 15 |
| 二、萃法選擇及濃度測試 ..... | 16 |
| 三、觀察方式選擇 .....    | 17 |
| 四、十批樣品檢測 .....    | 18 |

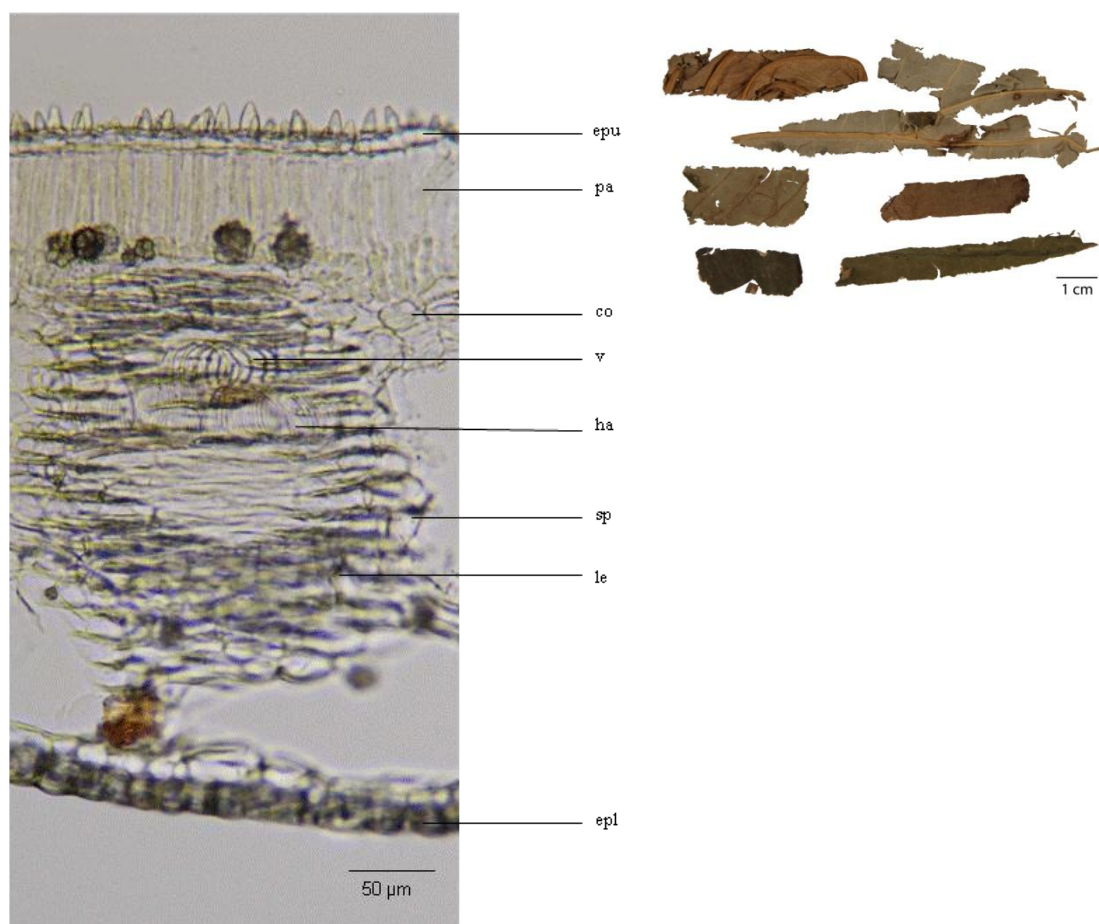
## 荷葉 MI

### 一、形態:

本品為睡蓮科 Nymphaeaceae 植物蓮 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的乾燥葉。常將乾燥荷葉折成半圓形或扇形，展開後呈類圓形，全緣或微波狀；整片荷葉約可見粗脈 18~22 條，由中心向四周呈放射狀散開，中心有突起的葉柄殘基。質脆，易破碎，市售品多呈不規則碎片狀。上表皮葉面深綠色或褐黃綠色，表面較粗糙；下表皮葉面淡黃綠色或灰黃棕色，較為光滑。有微香，味微苦。

### 二、顯微

本品葉橫切面。上表皮細胞多角形，外壁乳頭狀或短絨毛狀突起；氣孔不定式，副衛細胞 5~8 個。下表皮細胞垂周壁略波狀彎曲，有時可見連珠狀增厚。草酸鈣簇晶多見，直徑約至 40 $\mu$ m。



略字解

epu: 上表皮細胞  
pa: 柵狀細胞組織  
co: 海綿狀細胞  
v: 導管

ha: 木部  
Sp: 海綿狀組織  
le: 篩部  
epl: 下表皮細胞

## 荷葉 (Nelumbinis Folium)

### 一、材料

購自於北中南東各地中藥店荷葉藥材共 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：Zorbax SB-C<sub>18</sub> Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)。

#### (二) UPLC 儀器及層析管柱

Waters Acquith Ultra Performance LC，包含 Binary Solvent Manager、Sample Manager、PDA Detector；層析管柱 Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 × 2.1 mm, 1.7 μm)。

### 三、實驗藥品及試劑來源

#### (一) 試劑

甲醇 (99.9%) 購自於 Duksan Pure Chemicals；乙腈 (99.8%) 購自於 Mallinckrodt Baker Inc.。

#### (二) 標準品

荷葉鹼(Nuciferine)購自於廣翊公司，純度在 98%以上。

### 四、方法

#### (一) 萃取次數考察

取本品粉末約 0.5 g，精確稱定，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入甲醇 25 mL，超音波震盪處理(功率 200W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，放冷再稱定重量，用甲醇補足減少的重量，搖勻並以 No. 1 濾紙和 syringe filter (0.45 μm)分別過濾，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。

#### (二) 對照標準品溶液

取標準品荷葉鹼(Nuciferine)精確稱定 1.0 mg，加 10 mL 的甲醇製成每 1 mL 含荷葉鹼 100 μg 的標準品儲備溶液。

#### (三) 檢品溶液

取本品粉末約 0.5 g，精確稱定，置 50 mL 三角錐形瓶中，精確加入甲醇 25 mL，超音波震盪處理(功率 200W，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，

加甲醇至刻度，搖勻再過濾(syringe filter, 0.45  $\mu\text{m}$ )，取濾液，即得。

#### (四) 測定法

分別精確吸取標準品溶液、檢品溶液 10  $\mu\text{L}$ ，注入 HPLC 測定，用標準曲線計算溶液中荷葉鹼(Nuciferine)的含量，即得。

#### (五) 檢量線

精確吸取荷葉鹼(Nuciferine)標準品儲備溶液適量(100  $\mu\text{g/mL}$ )，以甲醇稀釋製成含荷葉鹼(Nuciferine)分別為 100、50.0、20.0、10.0、5.0  $\mu\text{g/mL}$  的標準品溶液。以上溶液各取 10  $\mu\text{L}$  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  $R^2$ 。

#### (六) 精密度試驗

以荷葉鹼(Nuciferine)濃度為 10.0  $\mu\text{g/mL}$  之標準品儲備液連續進樣五針，以荷葉鹼波峰面積為指標，求出相對標準差。

#### (七) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性：取同一批市售荷葉粉末，依荷葉檢品溶液製備方法平行製備五份荷葉檢品溶液，進樣測定，以荷葉鹼含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售荷葉粉末，依荷葉檢品溶液製備方法製備荷葉檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以荷葉鹼(Nuciferine)波峰面積為指標，求出相對標準差。

#### (八) 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。

#### (九) 添加回收率試驗

取已知荷葉鹼(Nuciferine)含量的荷葉藥材粉末約 0.25 g，精確稱定五份，分別加入 0.4 mL 的荷葉鹼(Nuciferine)溶液(1.0  $\text{mg/mL}$ )，並按檢品溶液製備方法操作測定。

(十) 臺灣市售荷葉中荷葉鹼(Nuciferine)含量測定 HPLC 分析條件

1. 層析管：Zorbax SB-C<sub>18</sub> Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 270 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

| 乙腈(%, v/v) | 水:三乙胺:冰醋酸(100:2.2:1.1) (%, v/v) |
|------------|---------------------------------|
| 32         | 68                              |

(十一) 臺灣市售荷葉含量測定

取十家市售荷葉藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續三針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品荷葉鹼(Nuciferine)的百分含量。

(十二) 臺灣市售荷葉 HPLC 指紋圖譜的建立

取十家市售荷葉檢品溶液各 10 μL 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Zorbax SB-C<sub>18</sub> Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 270 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

| 乙腈(%, v/v) | 水:三乙胺:冰醋酸(100:2.2:1.1) (%, v/v) |
|------------|---------------------------------|
| 32         | 68                              |

(十三) 荷葉檢品之 UPLC 層析條件

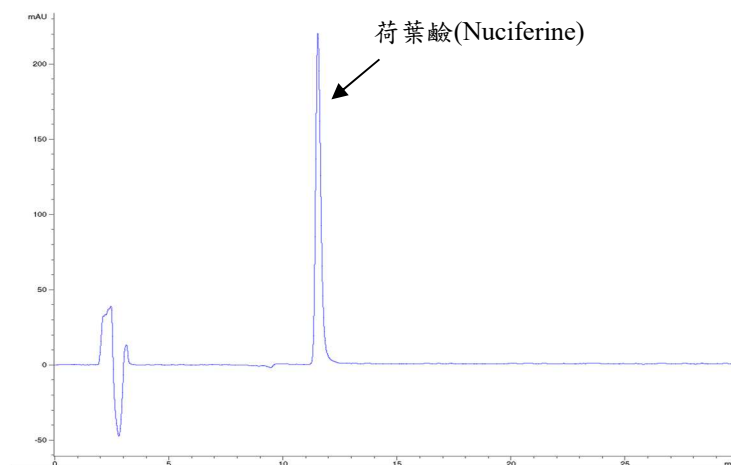
1. 層析管：Waters Acquity UPLC BEH C18 Column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：UV 270 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：25 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

| 乙腈(%, v/v) | 水:三乙胺:冰醋酸(100:2.2:1.1) (%, v/v) |
|------------|---------------------------------|
| 28         | 72                              |

## 五、結果

### (一) 標準品荷葉鹼(Nuciferine)之 HPLC 層析

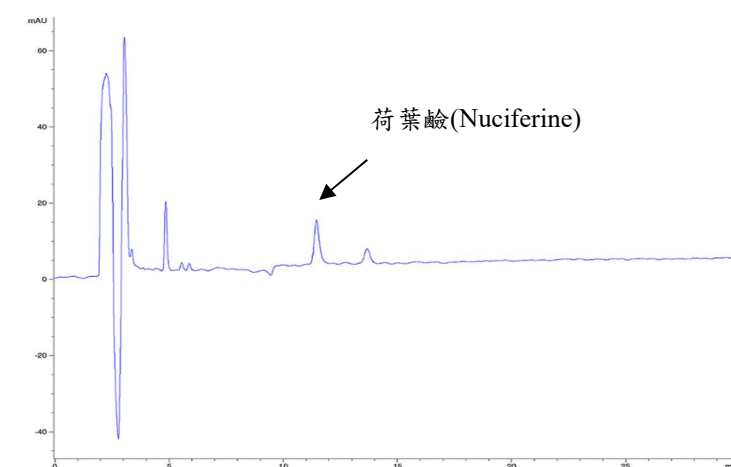
於滯留時間 11.7 分處顯示荷葉鹼(Nuciferine)標準品波峰(圖一)。



圖一、荷葉鹼(Nuciferine)標準品溶液之 HPLC 層析圖

### (二) 市售荷葉檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 11.7 分處顯示荷葉檢品中荷葉鹼(Nuciferine)波峰(圖二)。



圖二、市售荷葉檢品之 HPLC 層析圖

### (三) 萃取次數考察

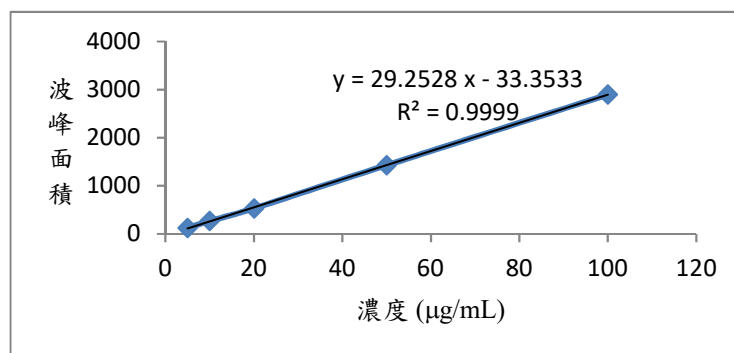
結果顯示萃取兩次基本上已將荷葉鹼(Nuciferine)萃取完全(>99%)。

表一、荷葉檢品萃取次數考察

| 甲醇萃取次數 | 波峰面積  |
|--------|-------|
| 第一次    | 350.6 |
| 第二次    | 47    |
| 第三次    | 0     |

#### (四) 標準品荷葉鹼(Nuciferine)檢量線

經不同濃度荷葉鹼(Nuciferine) (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： $y = 29.2528x - 33.3533$ ，顯示濃度在 5.0—100  $\mu\text{g/mL}$  有良好的線性關係(圖三)。



圖三、荷葉鹼(Nuciferine)之檢量線圖

表二、荷葉鹼之檢量線方程式

| 對照標準品               | 濃度( $\mu\text{g/mL}$ ) | 線性回歸方程式                  | $R^2$  |
|---------------------|------------------------|--------------------------|--------|
| 荷葉鹼<br>(Nuciferine) | 5.0—100                | $y = 29.2528x - 33.3533$ | 0.9999 |

#### (五) 精密度與再現性試驗

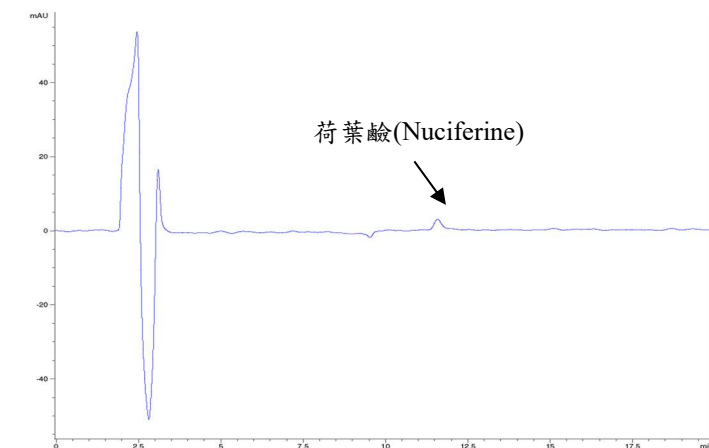
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，荷葉鹼(Nuciferine)精密度之相對標準差為 0.78%，再現性之相對標準差 1.12%，均在可接受的範圍以內。

#### (六) 穩定性試驗

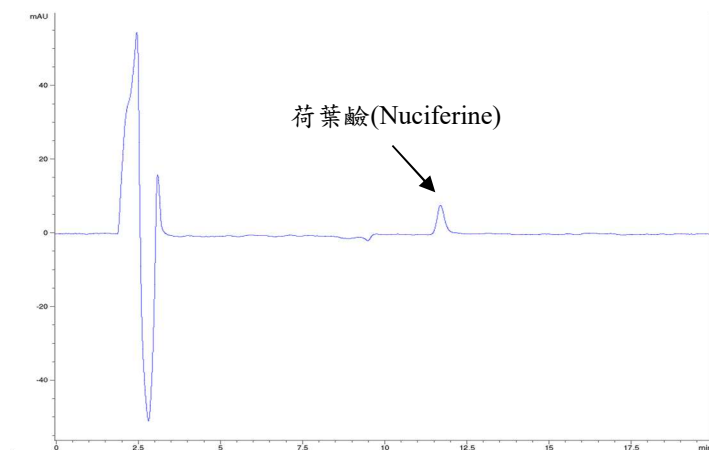
由結果可以得知，荷葉鹼(Nuciferine)在 24 小時內穩定，相對標準差為 1.01%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

#### (七) 偵測極限與定量極限試驗

荷葉鹼(Nuciferine)偵測極限(limit of detection, LOD)為 2.0  $\mu\text{g/mL}$  (圖四)，定量極限(limit of quantitation, LOQ)為 5.0  $\mu\text{g/mL}$  (圖五)。



圖四、荷葉鹼(Nuciferine)之 LOD 層析圖



圖五、荷葉鹼(Nuciferine)之 LOQ 層析圖

表三、各項檢驗分析

| 檢測項目       | 荷葉鹼(Nuciferine) |            |
|------------|-----------------|------------|
|            | 濃度              | R.S.D. (%) |
| 精密度 (n=5)  | 10.0 µg/mL      | 0.78       |
| 再現性 (n=5)  | 檢品溶液(No. 7)     | 1.12       |
| 穩定性 (n=6)  | 檢品溶液(No. 1)     | 1.01       |
| 偵測極限 (n=1) | 2.0 µg/mL       | -          |
| 定量極限 (n=1) | 5.0 µg/mL       | -          |

(八) 添加回收率試驗

添加荷葉鹼(Nuciferine)平均回收率 95.7 %，相對標準偏差 2.61 %。

表四、荷葉鹼(Nuciferine)添加回收率

| 編號 | 藥材稱重<br>(g) | 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  | 0.2506      | 0.441       | 0.4         | 0.818       | 93.0       | 95.68        | 2.61          |
| 2  | 0.2507      | 0.441       | 0.4         | 0.829       | 95.9       |              |               |
| 3  | 0.2508      | 0.441       | 0.4         | 0.841       | 98.9       |              |               |
| 4  | 0.2504      | 0.441       | 0.4         | 0.835       | 97.2       |              |               |
| 5  | 0.2507      | 0.441       | 0.4         | 0.819       | 93.4       |              |               |

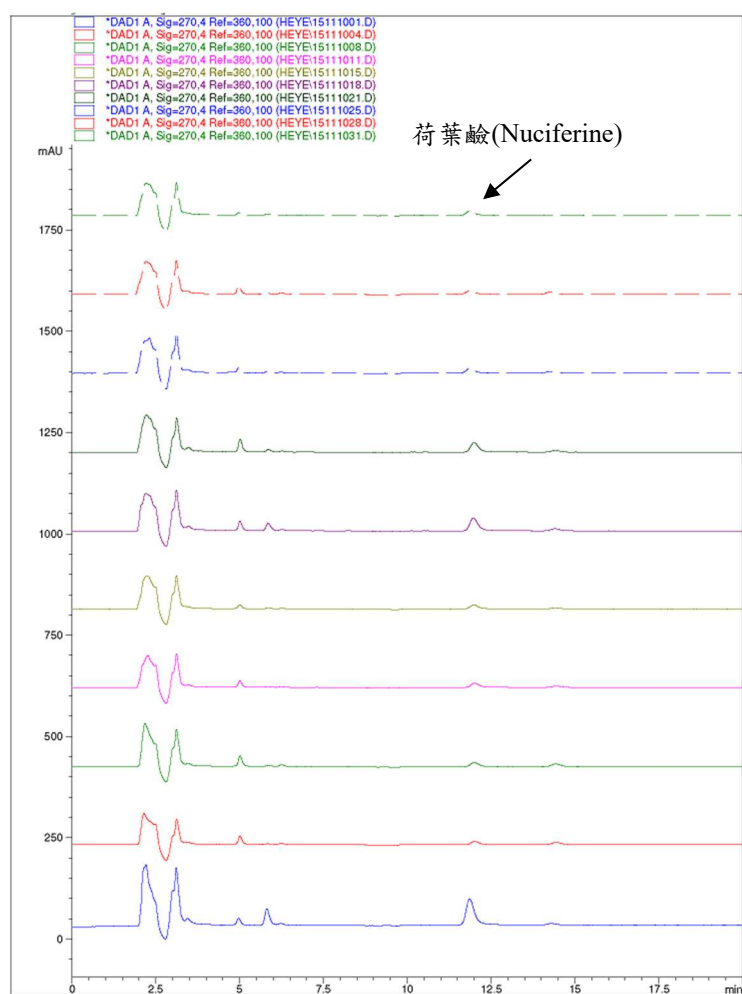
(九) 台灣市售荷葉含量測定

10 家荷葉藥材(乾燥品)之含量測定結果，除了編號 1 的荷葉藥材荷葉鹼(Nuciferine)的含量特別高(0.41%)，編號 6 和 7 的藥材荷葉鹼的含量在 0.18—0.20%以外，其餘 7 個藥材荷葉鹼的含量均在 0.05—0.08%之間。

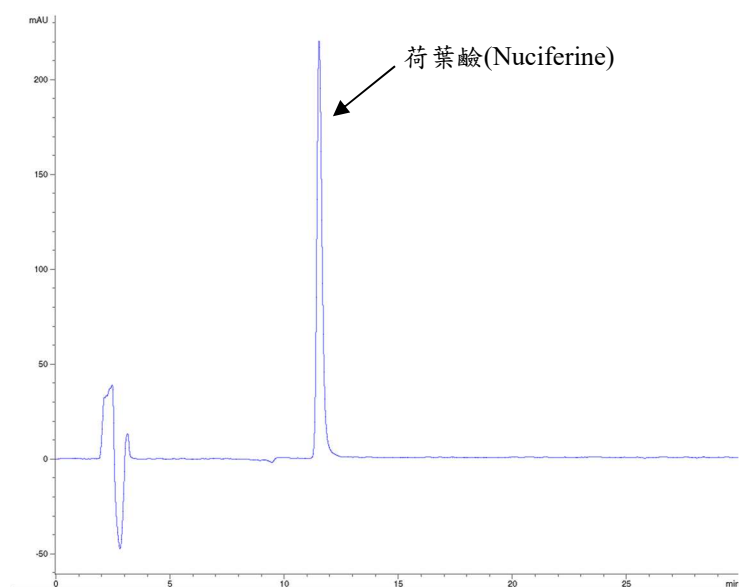
表五、台灣市售荷葉檢品之荷葉鹼(Nuciferine)含量

| 中藥店編號 | 荷葉鹼(Nuciferine)含量<br>(%) | 中藥店編號 | 荷葉鹼(Nuciferine)含量<br>(%) |
|-------|--------------------------|-------|--------------------------|
| 1     | 0.4069                   | 6     | 0.1999                   |
| 2     | 0.0570                   | 7     | 0.1793                   |
| 3     | 0.0711                   | 8     | 0.0779                   |
| 4     | 0.0723                   | 9     | 0.0633                   |
| 5     | 0.0704                   | 10    | 0.0765                   |

(十) 台灣市售荷葉 HPLC 指紋圖譜



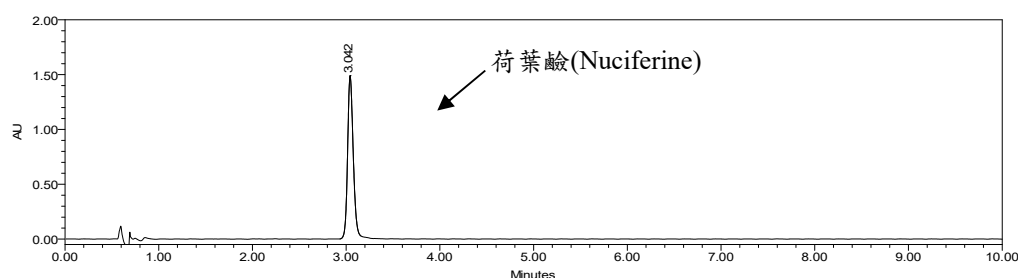
圖六、市售荷葉之 HPLC 指紋圖譜



圖七、荷葉鹼(Nuciferine)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(十一) 標準品荷葉鹼(Nuciferine)之 UPLC 層析

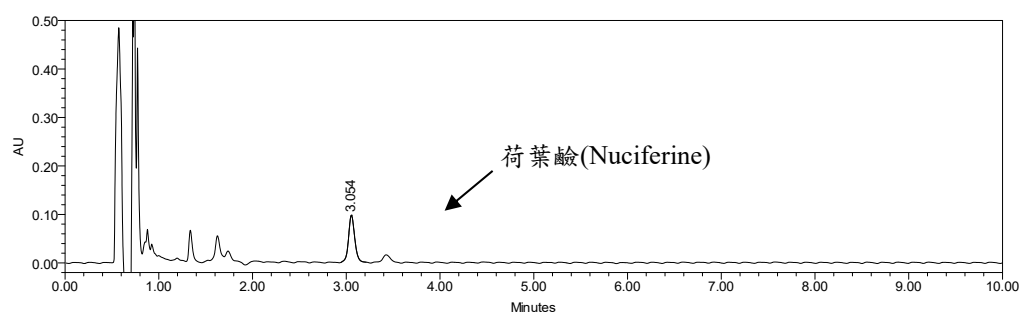
於滯留時間 3.04 分處顯示荷葉鹼(Nuciferine)標準品波峰(圖八)。



圖八、荷葉鹼標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十二) 市售荷葉檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 3.05 分處顯示荷葉檢品中荷葉鹼(Nuciferine)波峰(圖九)。

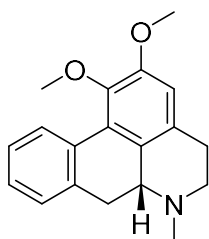


圖九、荷葉藥材之 UPLC 指紋圖譜

(十三) 荷葉鹼(Nuciferine)的分子式與分子量

分子式： $C_{19}H_{21}NO_2$ ；Mol. Wt.：295.38；熔點：162—163 °C

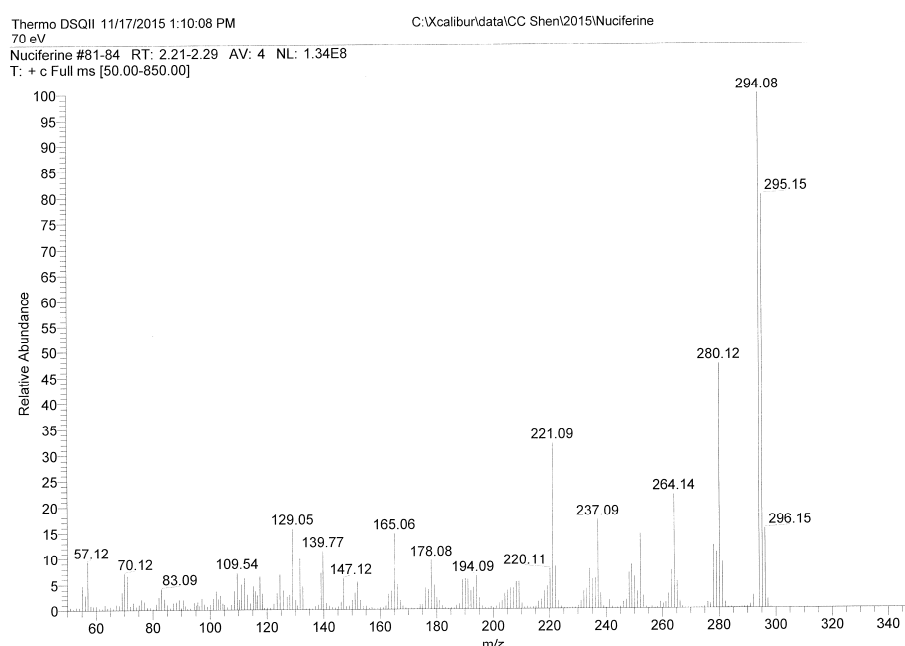
(十四) 荷葉鹼(Nuciferine)的結構



圖十、荷葉鹼(Nuciferine)之結構

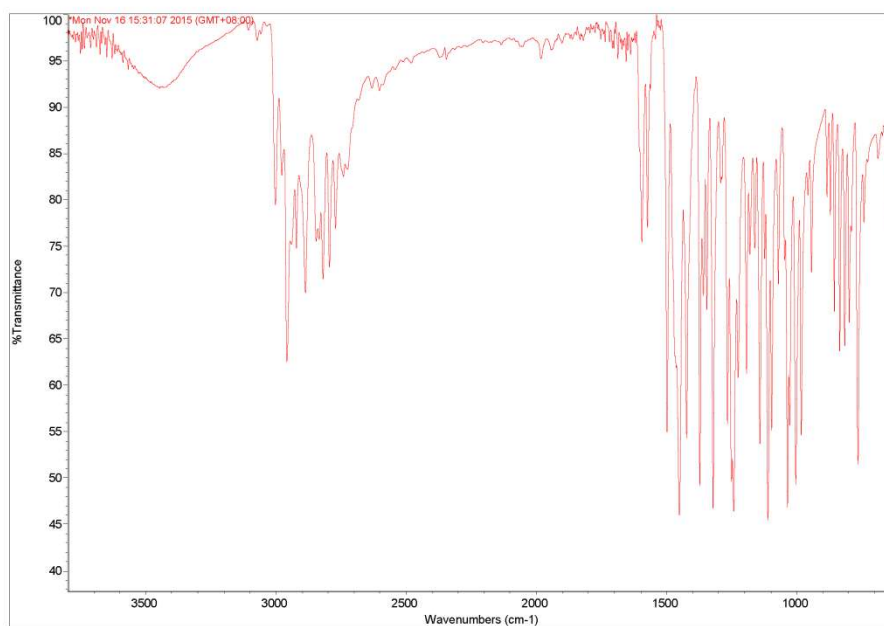


### (十七) 荷葉鹼(Nuciferine)的 EI-MS 圖譜



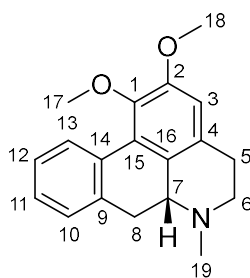
圖十三、荷葉鹼(Nuciferine)之 EI-MS 圖譜

### (十八) 荷葉鹼(Nuciferine)的 FTIR 圖譜



圖十四、荷葉鹼(Nuciferine)之 FTIR 圖譜

(十九) 荷葉鹼(Nuciferine)之氫、碳化學位移



表六、荷葉鹼(Nuciferine)之氫、碳化學位移( CDCl<sub>3</sub>)<sup>a</sup>

| position | $\delta_H$ (600 MHz)           | $\delta_C$ (150 MHz) |
|----------|--------------------------------|----------------------|
| 1        |                                | 145.11               |
| 2        |                                | 151.95               |
| 3        | 6.61 (s)                       | 111.23               |
| 4        |                                | 128.70               |
| 5        | $\alpha$ : 3.15 (m)            | 29.24                |
|          | $\beta$ : 2.66 (dd, 16.2, 1.8) |                      |
| 6        | $\alpha$ : 3.20 (m)            | 53.28                |
|          | $\beta$ : 2.49 (td, 12.0, 4.2) |                      |
| 7        | 3.00 (m)                       | 62.32                |
| 8        | $\alpha$ : 2.59 (t, 13.8)      | 35.12                |
|          | $\beta$ : 3.07 (dd, 13.8, 4.2) |                      |
| 9        |                                | 136.47               |
| 10       | 7.24 (br d, 6.6)               | 127.83               |
| 11       | 7.21 (td, 7.2, 1.2)            | 127.28               |
| 12       | 7.29 (m)                       | 126.97               |
| 13       | 8.34 (br d, 7.8)               | 128.30               |
| 14       |                                | 132.13               |
| 15       |                                | 126.86               |
| 16       |                                | 127.99               |
| 17       | 3.64 (s)                       | 60.21                |
| 18       | 3.87 (s)                       | 55.83                |
| 19       | 2.53 (s)                       | 44.00                |

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

## 荷葉

生藥名：NELUMBINIS FOLIUM

英文名：Lotus Leaf

基 原：本品為睡蓮科 Nymphaeaceae 植物蓮 *Nelumbo nucifera* Gaertn.之乾燥葉。

夏、秋二季採收，曬至七八成乾時，去除葉柄，折成半圓形或摺扇形，乾燥。

### 一、方法

#### (一) 檢品溶液 【萃取方法 1】(自行開發) ✓

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波處理 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，加甲醇 5 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。

#### 【萃取方法 3】(自行開發)

——取本品粉末 1.0 g，加甲醇 10 mL，超音波處理 30 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。

(二) 對照標準品 溶 液 取荷葉鹼(Nuciferine)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含 0.2 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】(自行開發) ✓

——乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)

(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 於主波長 254 nm 之紫外燈照射下檢視。

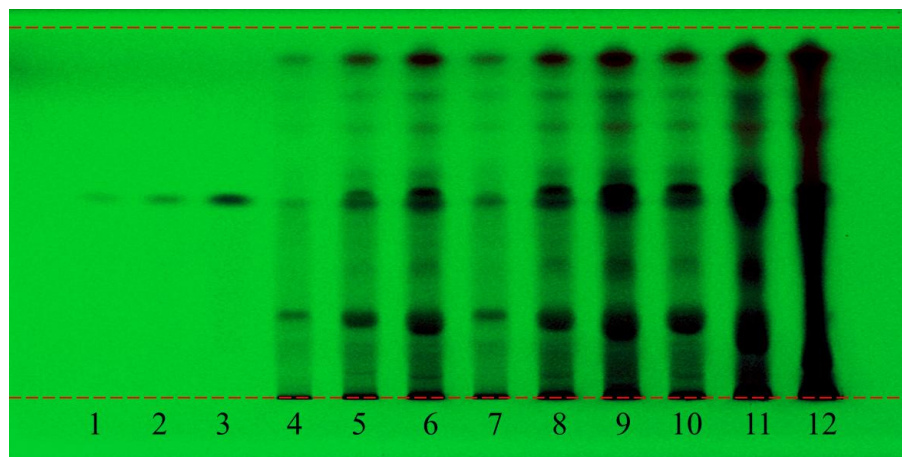
## 二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：107/04/20

相對溼度(RH)：59%

溫度(RT)：23 °C

【展開劑】（自行開發）——乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)



| 編號       | 名稱                          | 點注量           |
|----------|-----------------------------|---------------|
| 1，2，3    | 荷葉鹼(Nuciferine) (0.2 mg/mL) | 1，2，5 $\mu$ L |
| 4，5，6    | CA 檢品溶液【萃取方法 1】             | 2，5，8 $\mu$ L |
| 7，8，9    | CA 檢品溶液【萃取方法 2】             | 2，5，8 $\mu$ L |
| 10，11，12 | CA 檢品溶液【萃取方法 3】             | 2，5，8 $\mu$ 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荷葉鹼，而由於點片濃度較合適，故選擇【萃取方法 1】。

建議點注量：荷葉鹼(Nuciferine)標準品溶液 2  $\mu$ L，檢品溶液【萃取方法 1】5  $\mu$ L。

### 三、觀察方式選擇

實驗日期：107/04/24

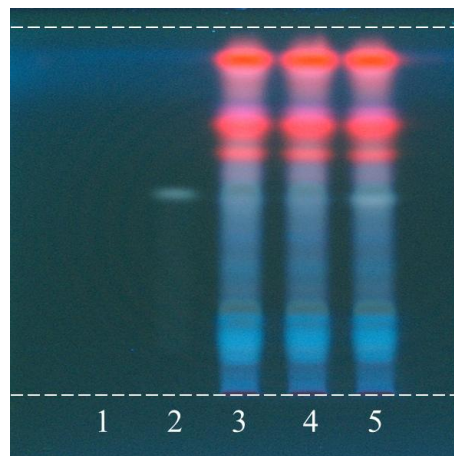
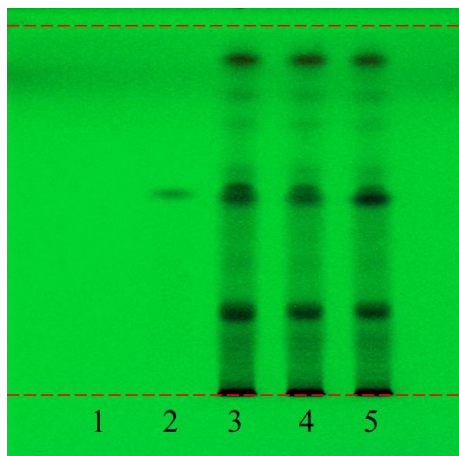
相對溼度(RH)：60%

溫度(RT)：26 °C

【展開劑】(自行開發)——乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)

【萃取方法 1】(自行開發) — HPTLC    【萃取方法 1】(自行開發) — HPTLC

紫外光(254 nm)檢出(荷葉鹼  $R_f$  值為 0.54) ✓    紫外光(365 nm)檢出



1：Blank

2：荷葉鹼(Nuciferine)

3，4：CA 檢品溶液

5：Spike

建議觀察方式：於紫外光(254 nm)下檢視檢品溶液之指紋圖譜，較紫外光(365 nm)有明顯之荷葉鹼(Nuciferine)標準品斑點。

#### 四、十批樣品檢測

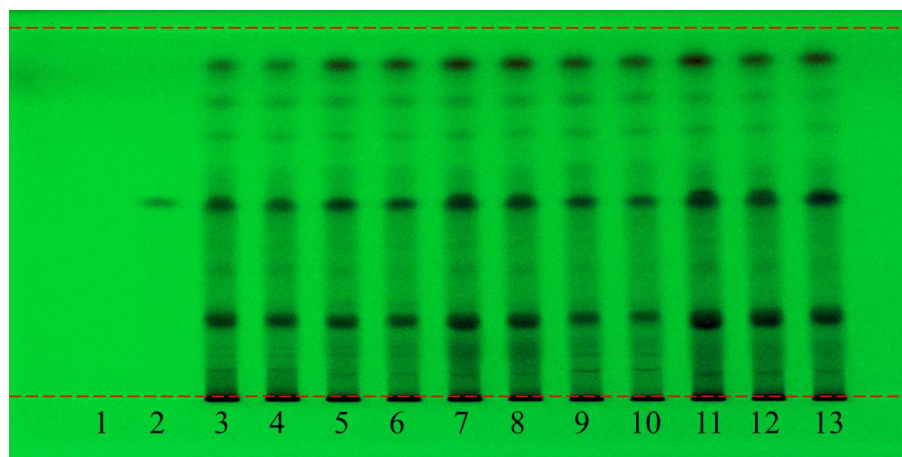
實驗日期：107/04/24

相對溼度(RH)：60%

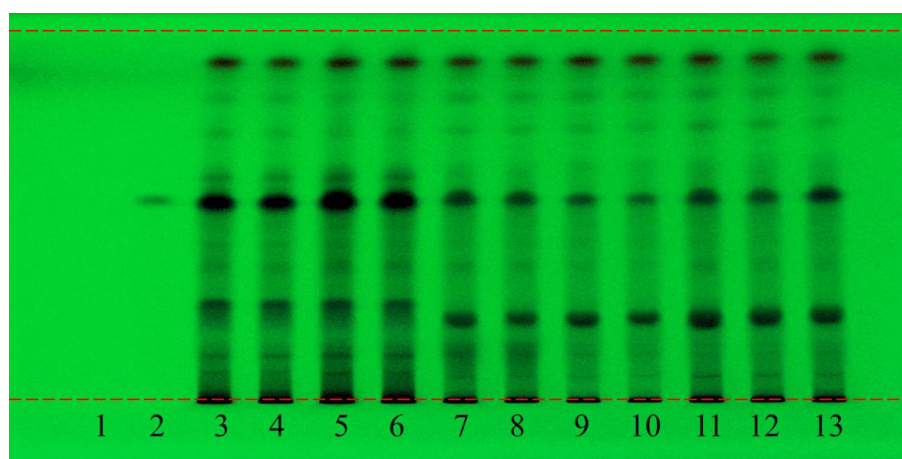
溫度(RT)：26 °C

【展開劑】(自行開發)——乙酸乙酯：甲醇：水 (10：2：1)

【萃取方法 1】(自行開發)－HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



|       |                             |
|-------|-----------------------------|
| 1     | Blank                       |
| 2     | 荷葉鹼(Nuciferine) (0.2 mg/mL) |
| 3，4   | NF 檢品溶液                     |
| 5，6   | NJ 檢品溶液                     |
| 7，8   | NN 檢品溶液                     |
| 9，10  | NR 檢品溶液                     |
| 11，12 | CA 檢品溶液                     |
| 13    | Spike (CA 檢品溶液)             |



|        |                             |
|--------|-----------------------------|
| 1      | Blank                       |
| 2      | 荷葉鹼(Nuciferine) (0.2 mg/mL) |
| 3, 4   | SC 檢品溶液                     |
| 5, 6   | SE 檢品溶液                     |
| 7, 8   | SG 檢品溶液                     |
| 9, 10  | SU-1 檢品溶液                   |
| 11, 12 | SU-2 檢品溶液                   |
| 13     | Spike (CA 檢品溶液)             |

結論與建議：以自行開發之【萃取方法 1】方式，並以自行開發之【展開劑】分離與檢出荷葉鹼(Nuciferine)，於紫外光(254 nm)下檢視較佳。