

槐花

(SOPHORAE FLOS)

槐花 MI	2
一、形態	2
二、顯微	2
槐花 HPLC	4
一、材料	4
二、儀器及層析管柱	4
三、實驗藥品及試劑來源	4
四、方法	4
五、結果	7
槐花 TLC	17
一、方法	17
二、萃法選擇及濃度測試	18
三、溶媒系統選擇	19
四、觀察方式選擇	20
五、十家樣品檢測	21

槐花

一、形態：

本品為豆科 Nymphaeaceae 植物槐花 *Sophora japonica* L. 乾燥的花，外型皺縮捲曲，花瓣多散落。完整者花萼呈鐘狀，先端 5 淺裂；花瓣共 5 片呈現黃白色，其中一片較大，近圓形，其餘 4 片為長圓形。雄蕊 10 個，其中 9 個基部連合。雌蕊呈圓柱形，彎曲。體輕，氣微，味微苦。如圖 3-1 所示。

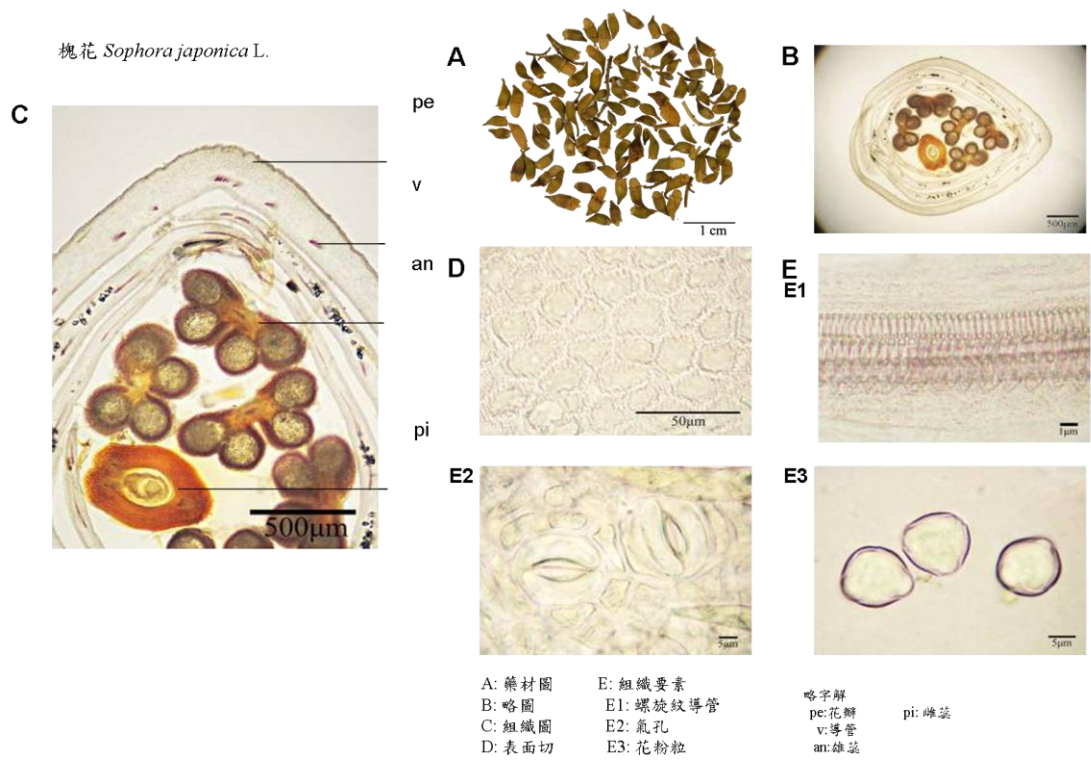
二、顯微：

本品橫切面，呈圓形或卵形。花冠表皮細胞呈多角形或不規則形，有細密彎曲的角質狀紋理，邊緣呈微波狀。萼片可見非腺毛及氣孔，草酸鈣方晶含量眾多，以成片形式存於萼片薄壁細胞中。花粉粒成類球形，外壁稍厚，表面光滑。如圖 3-2 所示。



圖 3-1 槐花形態圖

槐花 *Sophora japonica* L.



槐米 (Sophorae Immaturus Flos)

一、材料

購自於台灣各地中藥店槐米藥材共 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 Agilent ZORBAX SB C18 Column Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)。

(二) UPLC 儀器及層析管柱

AcQuity 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 Mallinckrodt Baker, Inc.；冰醋酸(100%)購自於 Merck；乙醇(95%)購自於景明化工。

(二) 標準品

芸香苷水合物(Rutin trihydrate)購自於 Alfa Aesar，純度在 97%以上。

四、方法

(一) 萃取溶媒開發

取本品粉末三份，每份精確稱定 0.1 g，置 125 mL 三角錐形瓶中，精確加入甲醇、75%甲醇、乙醇各 50 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，取得濾液搖勻再過濾(syringe filter, 0.45 μm)，即得。每針 10 μL 注入高效能液相層析儀(HPLC)，以所測得之標準品芸香苷(Rutin)最大波峰面積為最佳槐米萃取溶媒。

(二) 萃取次數考察

取本品粉末約 0.1 g (過 20 號篩網)，精確稱定，置 125 mL 三角錐形瓶中，精確加入甲醇 50 mL，稱定重量，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，冷卻後再稱定重量，以甲醇補足減失的重量，搖勻後以 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，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

取標準品芸香苷(Rutin)精確稱定 5.0 mg，加 9.2 mL 的甲醇製成每 1 mL 含芸香苷(Rutin) 500 µg 的標準品儲備溶液，並以甲醇稀釋至 100 µg/mL 製成對照標準品溶液。

(四) 檢品溶液

取本品粉末(過 20 號篩網)約 0.1 g，精確稱定，置 125 mL 錐形瓶中，精確加入甲醇 50 mL，稱定重量，超音波震盪處理(功率 300 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，冷卻後再稱定重量，以甲醇補足減失的重量，搖勻後以 No. 1 濾紙過濾，精確量取濾液 2 mL，置 10 mL 量瓶中，加甲醇至刻度，搖勻再過濾(syringe filter, 0.45 µm)，即得。

(五) 測定法

分別精確吸取對照標準品溶液(100 µg/mL)、檢品溶液 10 µL，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中芸香苷(Rutin)的含量，即得。

(六) 檢量線

精確吸取芸香苷(Rutin)標準品儲備溶液適量(500 µg/mL)，以甲醇稀釋製成含芸香苷(Rutin)分別為 250、200、100、50、25 和 10 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) 精確度試驗

以芸香苷(Rutin)濃度為 100 µg/mL 之對照標準品溶液連續進樣五針，以芸香苷(Rutin)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：取同一批市售槐米粉末，依槐米檢品溶液製備方法平行製備五份槐米檢品溶液，進樣測定，以芸香苷(Rutin)含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售槐米粉末，依槐米檢品溶液製備方法製備槐米檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以芸香苷(Rutin)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

取已知芸香苷(Rutin)含量的槐米藥材粉末約 0.05 g, 精確稱定五份, 分別加入 9.8 mg 芸香苷水合物(芸香苷含量 9.0 mg), 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: ZORBAX SB C18 Column (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m)
2. 檢測波長: 257 nm
3. 流速: 1.0 mL/min
4. 管柱溫度: 室溫
5. 注入量: 10 μ L
6. 移動相:

時間(min)	甲醇	1%冰醋酸(%, v/v)
0	28	72
20	28	72

(十二) 臺灣市售槐米含量測定

取十批市售槐米藥材依檢品溶液製備方法製備檢品溶液, 各取 10 μ L 連續三針注入 HPLC, 所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算樣品芸香苷(Rutin)的百分含量。

(十三) 槐米檢品之 UPLC 層析條件

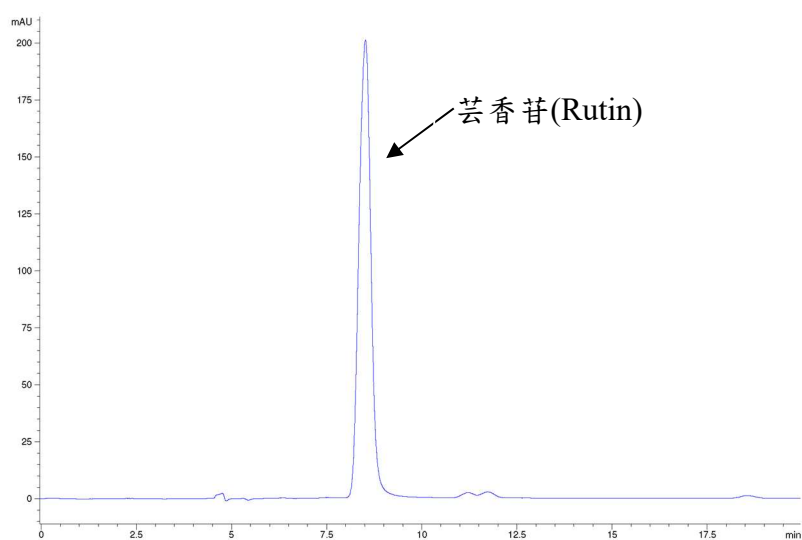
1. 層析管: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ (100 $\times$ 2.1 mm, 1.7 μ m)
2. 檢測波長: 257 nm
3. 流速: 0.4 mL/min
4. 管柱溫度: 25 $^{\circ}$ C
5. 注入量: 1.0 μ L
6. 移動相:

時間(min)	甲醇	1%冰醋酸(%, v/v)
0	32	68
10	32	68

五、結果

(一) 標準品芸香苷(Rutin)之 HPLC 層析

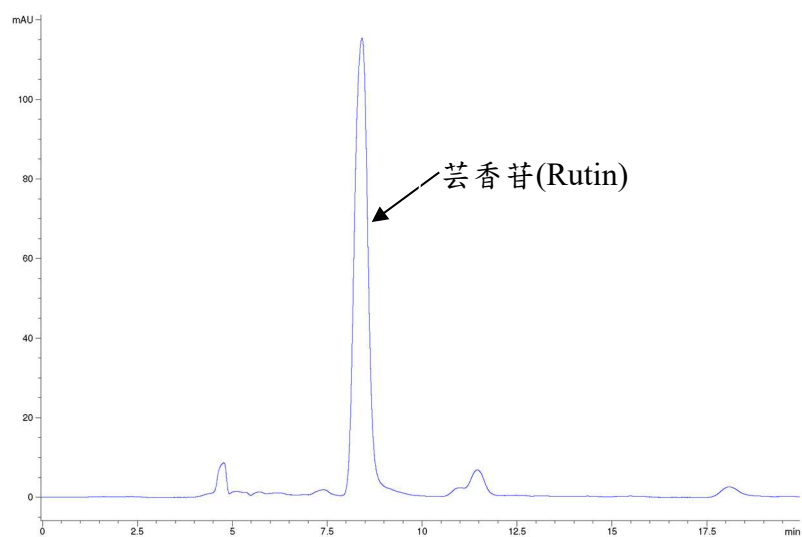
於滯留時間 8.5 分鐘處顯示芸香苷(Rutin)標準品波峰(圖一)。



圖一、芸香苷(Rutin)標準品溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售槐米檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 8.5 分鐘處顯示槐米檢品中芸香苷(Rutin)波峰(圖二)。
分離率為 $R = 7.91$ ，托尾因子為 $T = 1.01$ ，均在系統適用性要求內。



圖二、市售槐米檢品之 HPLC 層析圖

(三) 萃取溶媒開發

以 70% 甲醇為溶媒時，藥材所得芸香苷(Rutin)的波峰面積最大，但以甲醇為溶媒時，所得芸香苷(Rutin)的波峰面積亦與 70% 甲醇為溶媒時的波峰面積接近，故測定時均以甲醇為萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	波峰面積	最佳萃取
甲醇	13660.9	
70% 甲醇	14189.2	√
乙醇	5301.4	

(四) 萃取次數考察

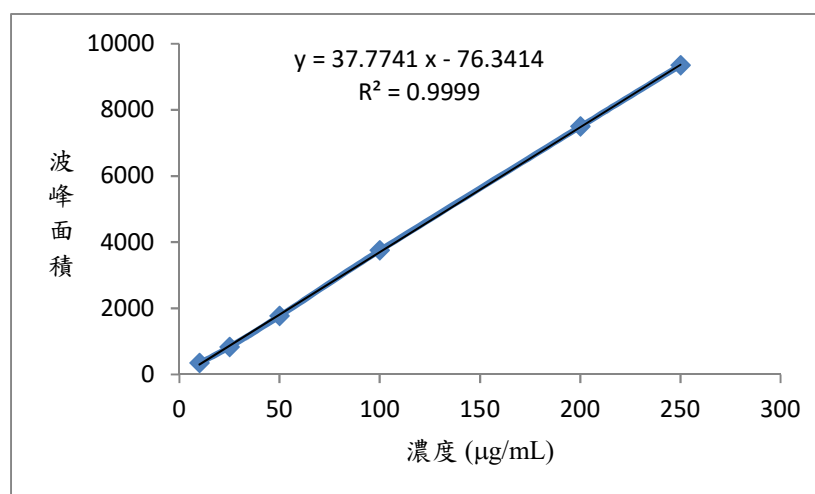
結果顯示萃取一次基本上已將芸香苷(Rutin)萃取完全(萃取率大於 99%)。

表二、槐米檢品萃取次數考察

甲醇萃取次數	芸香苷(Rutin)波峰面積
第一次	13660.9
第二次	N.D.

(五) 標準品芸香苷(Rutin)檢量線

經不同濃度芸香苷(Rutin)(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： $y = 37.7741x - 76.3414$ ， $R^2 = 0.9999$ ，顯示濃度在 10–250 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係(圖三)。



圖三、芸香苷(Rutin)之檢量線圖

表三、芸香苷(Rutin)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
芸香苷(Rutin)	10–250	$y = 37.7741x - 76.3414$	0.9999

(六) 精確度與再現性試驗

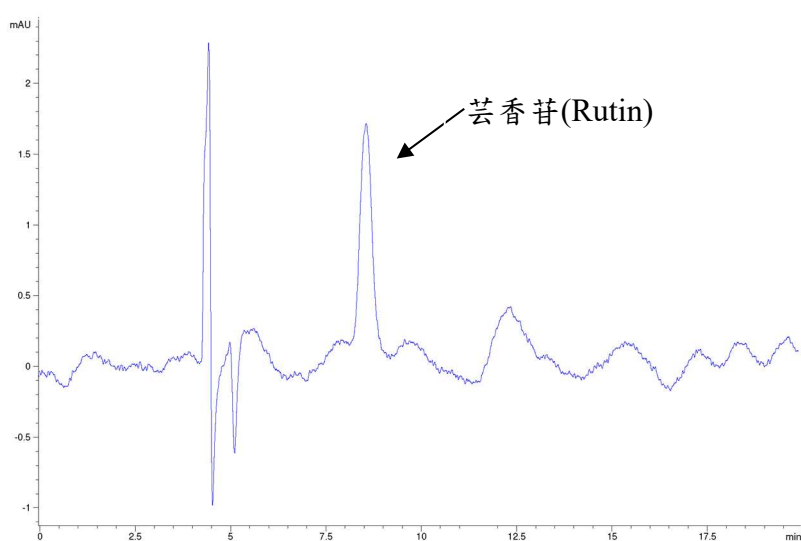
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精確度良好，芸香苷(Rutin)精確度之相對標準差為 0.77%，再現性之相對標準差為 2.44%，均在系統適用性要求內。

(七) 穩定性試驗

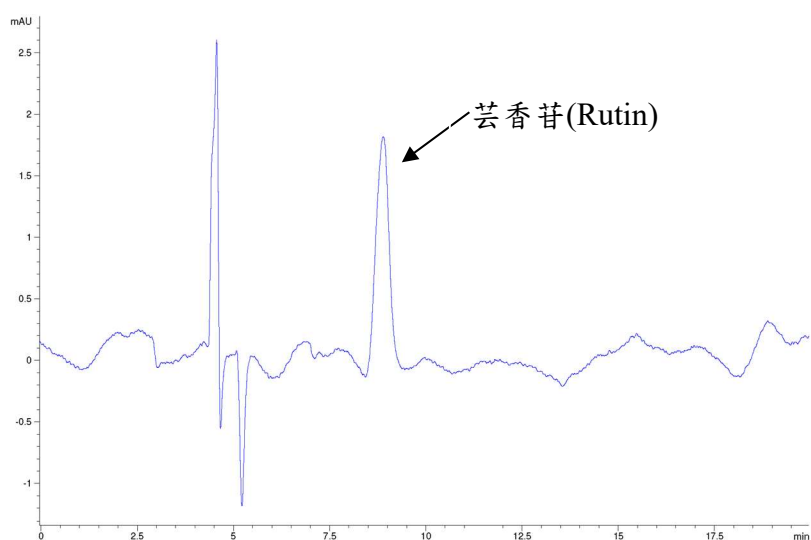
由結果可以得知，芸香苷(Rutin)在 24 小時內穩定，相對標準差為 1.38%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

芸香苷(Rutin)偵測極限(limit of detection, LOD)為 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (圖四)，定量極限(limit of quantitation, LOQ)為 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (圖五)。



圖四、芸香苷(Rutin)之 LOD 層析圖



圖五、芸香苷(Rutin)之 LOQ 層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	芸香苷(Rutin)	
	濃度	R.S.D. (%)
精確度 (n=5)	100 µg/mL	0.77
再現性 (n=5)	檢品溶液(No.5)	2.44
穩定性 (n=6)	檢品溶液(No.5)	1.38
偵測極限 (n=1)	0.5 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	1.0 µg/mL	-

(九) 添加回收率試驗

添加芸香苷(Rutin)平均回收率 95.6%，相對標準偏差 2.72%。

表五、芸香苷(Rutin)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	0.0497	9.393	9.0	17.966	95.3	95.6	2.72
2	0.0501	9.469	9.0	18.254	97.6		
3	0.0499	9.431	9.0	18.099	96.3		
4	0.0503	9.506	9.0	18.268	97.4		
5	0.0505	9.544	9.0	17.753	91.2		

(十) 台灣市售槐米含量測定

10 批槐米藥材之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，芸香苷(Rutin)的含量為 17-24%。建議槐米藥材指標成分芸香苷(Rutin)的含量不得少

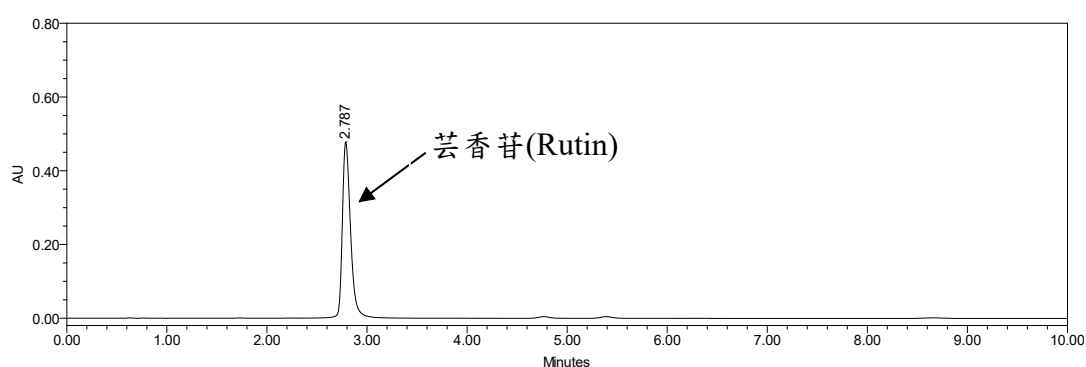
於 15%。理論板數按芸香苷(Rutin)波峰計算應不低於 1200 (實際值為 2400)。

表六、台灣市售槐米檢品之芸香苷(Rutin)含量

中藥材編號(No.)	芸香苷(Rutin)含量(%)	中藥材編號(No.)	芸香苷(Rutin)含量(%)
1 (CD)	18.3	6 (SA)	22.2
2 (NC)	20.0	7 (SC)	21.1
3 (NF)	17.2	8 (SE)	23.4
4 (NI)	19.3	9 (SF)	19.3
5 (NJ)	20.6	10 (SG)	23.8

(十一) 標準品芸香苷(Rutin)之 UPLC 層析

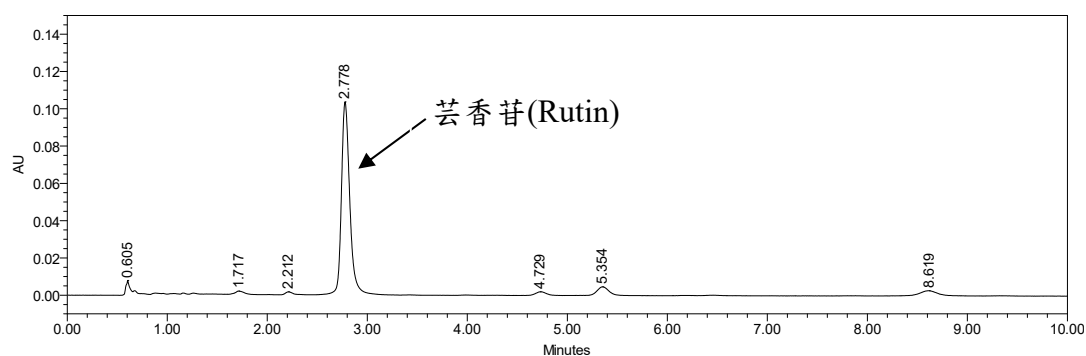
於滯留時間 2.79 分鐘處顯示芸香苷(Rutin)標準品的波峰(圖七)。



圖七、芸香苷(Rutin)標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十二) 市售槐米檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.78 分鐘顯示槐米檢品中芸香苷(Rutin)的波峰(圖八)。

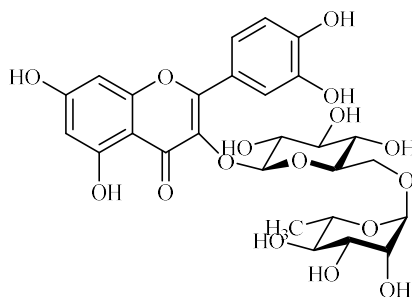


圖八、市售槐米檢品之 UPLC 層析圖

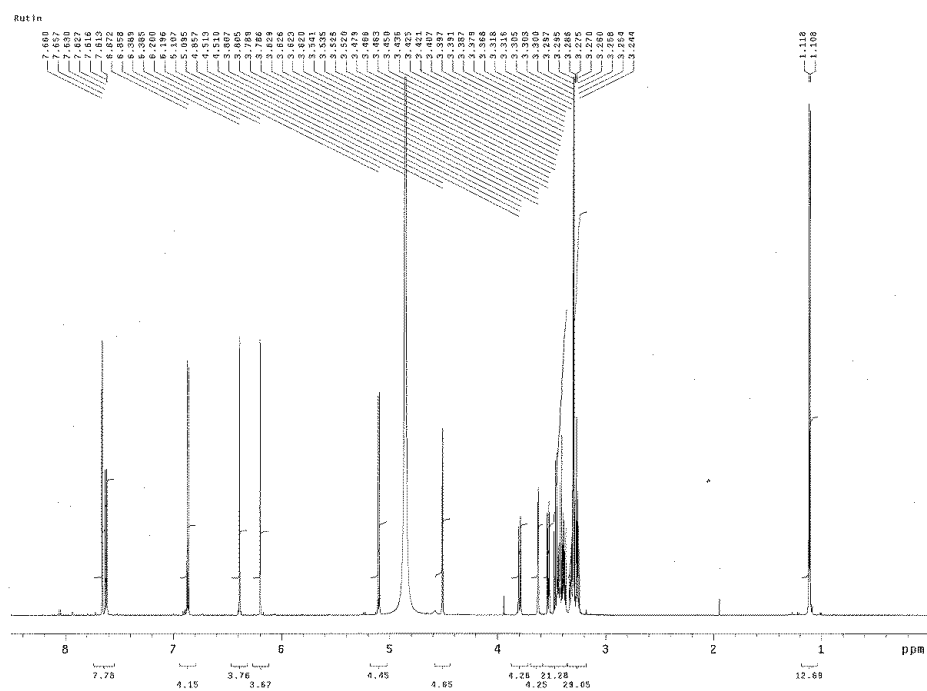
(十三) 芸香苷(Rutin)的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{27}H_{30}O_{16}$ ；分子量：610.52；熔點：194–196 °C。

(十四) 芸香苷(Rutin)的結構

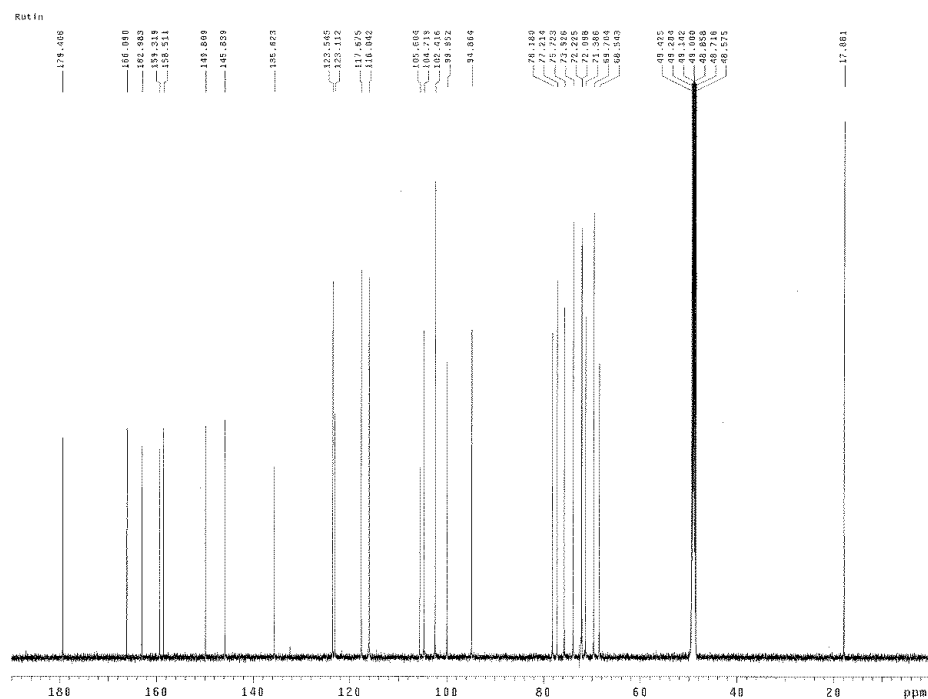


(十五) 芸香苷(Rutin)的 ^1H NMR 圖譜



圖九、芸香苷(Rutin)之 ^1H NMR 圖譜

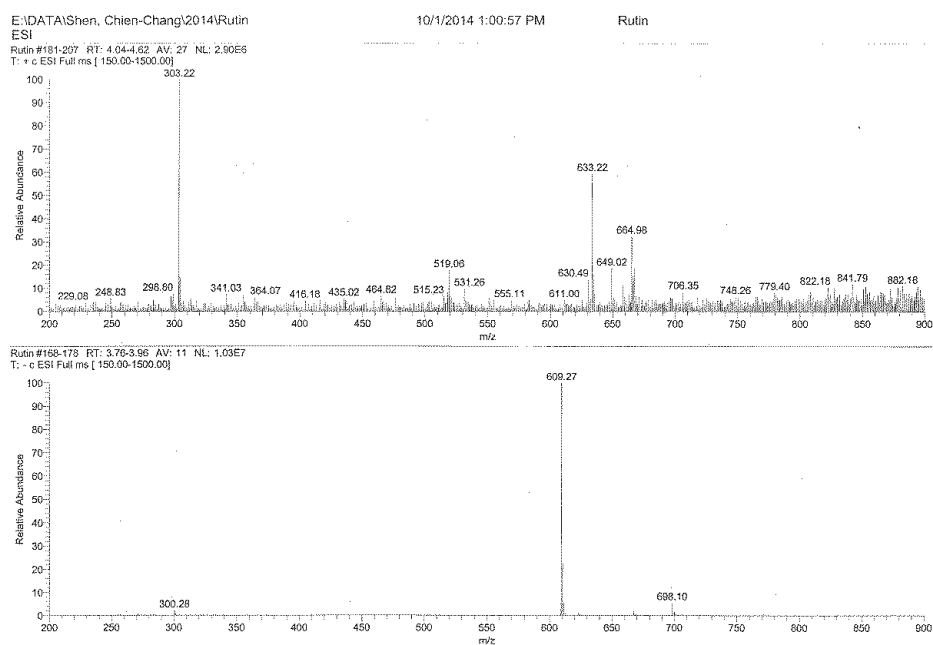
(十六) 芸香苷(Rutin)的 ^{13}C NMR 圖譜



圖十、芸香苷(Rutin)之 ^{13}C NMR 圖譜

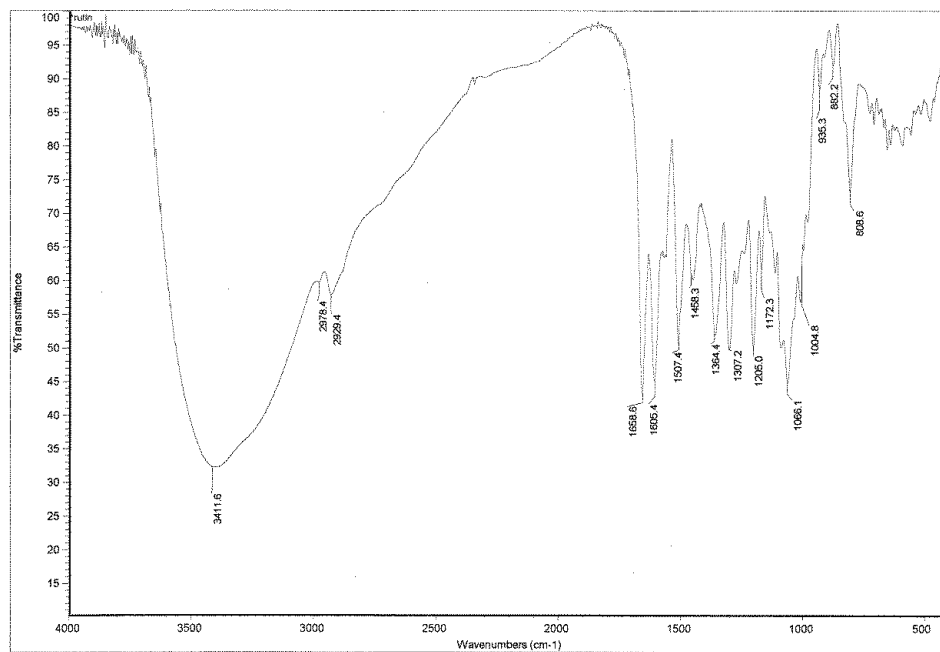
(十七) 芸香苷(Rutin)的 ESI-MS 圖譜

ESI-MS 圖譜中 m/z 633 和 -609 是分別來自 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 和 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 之訊號。



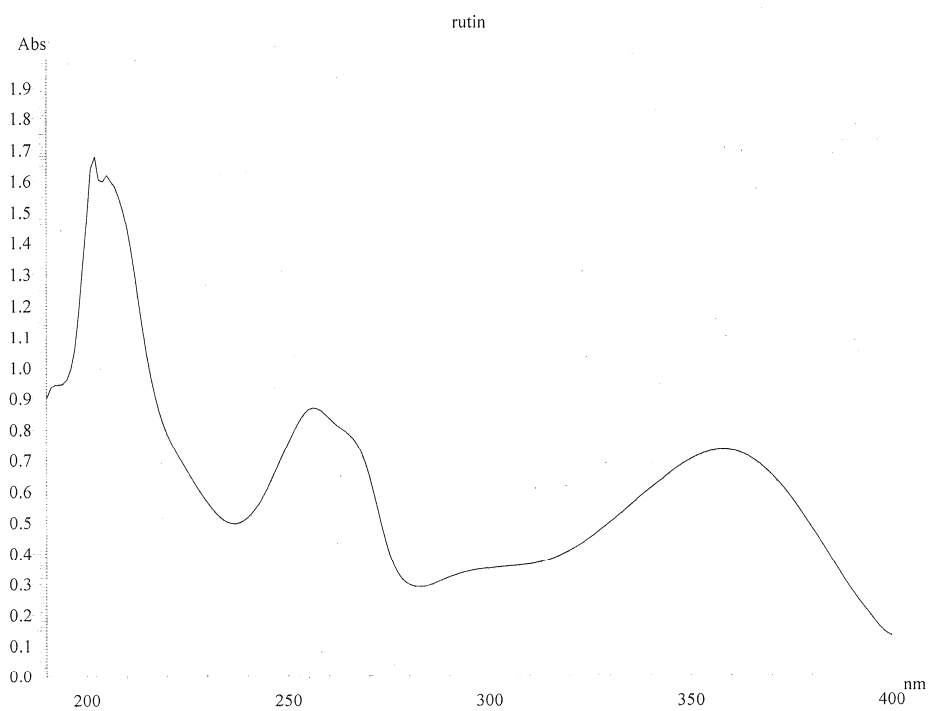
圖十一、芸香苷(Rutin)之 ESI-MS 圖譜

(十八) 芸香苷(Rutin)的 FTIR 圖譜



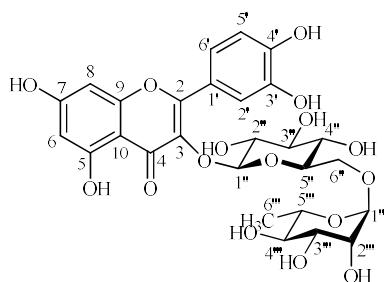
圖十二、芸香苷(Rutin)之 FTIR 圖譜

(十九) 芸香苷(Rutin)的 UV 圖譜



圖十三、芸香苷(Rutin)之 UV 圖譜

(二十) 芸香苷(Rutin)的氫、碳化學位移



表七、芸香苷(Rutin)之氫、碳化學位移(in CD₃OD)^a

position	δ_H (600 MHz)	δ_C (150 MHz)
2	-	158.50
3	-	135.62
4	-	179.39
5	-	162.97
6	6.20 (d, 2.4)	99.96
7	-	166.11
8	6.38 (d, 1.8)	94.88
9	-	159.31
10	-	105.59
1'	-	123.11
2'	7.66 (d, 1.8)	117.68
3'	-	145.83
4'	-	149.80
5'	6.86 (d, 8.4)	116.04
6'	7.62 (dd, 8.4, 2.4)	123.55
1''	5.10 (d, 7.8)	104.73
2''	3.47 (dd, 9.6, 7.8)	75.72
3''	3.41 (t, 8.4)	78.18
4''	3.26 (dd, 9.6, 9.0)	71.38
5''	3.32 (m)	77.20
6''	3.38 (dd, 10.8, 6.0)	68.54
	3.80 (dd, 10.8, 1.8)	
1'''	4.51 (d, 1.8)	102.41
2'''	3.63 (dd, 3.0, 1.8)	72.09
3'''	3.53 (dd, 9.6, 3.0)	72.23
4'''	3.27 (t, 9.6)	73.93
5'''	3.44 (m)	69.70
6'''	1.11 (d, 6.0)	17.88

^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)

槐花

中文名：槐花

生藥拉丁名：SOPHORAE FLOS

英文名：Japanese Pagoda Tree Flower

基 原：本品為豆科 Leguminosae 植物槐樹 *Sophora japonica* L.之乾燥花及花蕾。
夏季花開或花蕾形成時採收，及時乾燥，去除枝、梗及雜質。前者習稱槐花，後者習稱槐米。

一、方法

- (一) 檢 品 溶 液 **【萃取方法 1】(中華人民共和國藥典 2015)**
——取本品粉末 0.2 g，加甲醇 5 mL，密塞，振搖 10 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 0.1 g，加甲醇 10 mL，超音波處理 10 分鐘，過濾，取濾液作為檢品溶液。
- (二) 對照標準品 取芸香苷(Rutin)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 F₂₅₄，10 cm × 10 cm、20 cm × 10 cm
- (四) 展 開 劑 **【展開劑 1】(中華人民共和國藥典 2015)**
——乙酸乙酯：甲酸：水 (8：1：1)
【展開劑 2】(修飾中華人民共和國藥典 2015) ✓
——乙酸乙酯：甲酸：水 (5：1：1)
- (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。

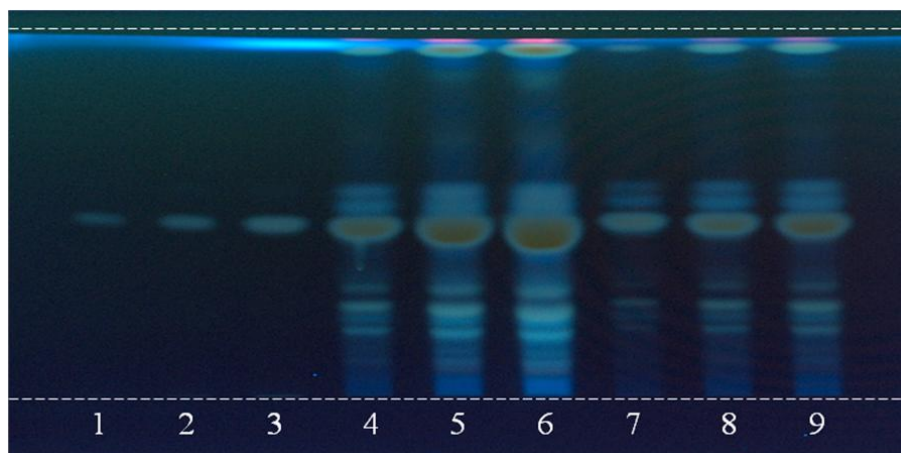
二、萃法選擇及濃度測試

實驗日期：105/09/20

相對溼度(RH)：58%

溫度(RT)：28 °C

【展開劑 2】 (修飾中華人民共和國藥典 2015)——乙酸乙酯：甲酸：水 (5：1：1)



編號	名稱	含量
1, 2, 3	芸香苷(Rutin) (0.2 mg/mL)	1, 2, 5 μ L
4, 5, 6	NC 檢品溶液【萃取方法 1】	2, 5, 8 μ L
7, 8, 9	NC 檢品溶液【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標準品芸香苷，但由於中華人民共和國藥典 2015 之【萃取方法 1】芸香苷濃度過高，而產生拖尾現象，故選擇【萃取方法 2】。

建議點注量：芸香苷(Rutin)標準品溶液 5 μ L，檢品溶液【萃取方法 2】2 μ L。

三、溶媒系統選擇

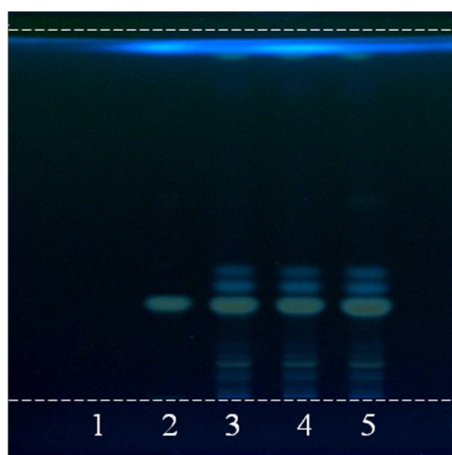
實驗日期：105/09/21

相對溼度(RH)：56%

溫度(RT)：28 °C

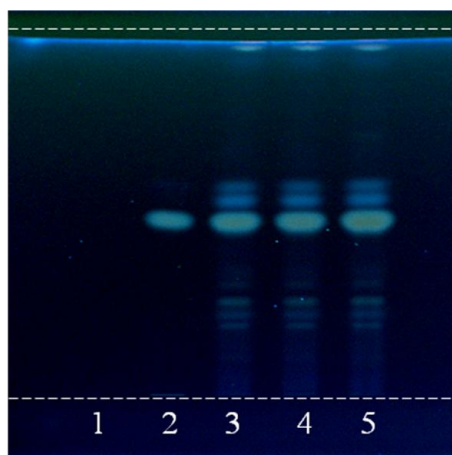
【展開劑 1】(中華人民共和國藥典 2015)——乙酸乙酯：甲酸：水 (8：1：1)

【萃取方法 2】(自行開發)—— HPTLC 紫外光(365 nm)檢出 (芸香苷 R_f 值為 0.25)



【展開劑 2】(修飾中華人民共和國藥典 2015)——乙酸乙酯：甲酸：水 (5：1：1)

【萃取方法 2】(自行開發)—— HPTLC 紫外光(365 nm)檢出 (芸香苷 R_f 值為 0.48)



1：Blank

2：芸香苷(Rutin)

3，4：NC 檢品溶液

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 2】方式，2 種展開劑展開皆可從檢品溶液中分離與檢出芸香苷，而由於條帶顯示較多，且 R_f 值趨近於中間，故採用修飾中華人民共和國藥典 2015 之【展開劑 2】。

四、觀察方式選擇

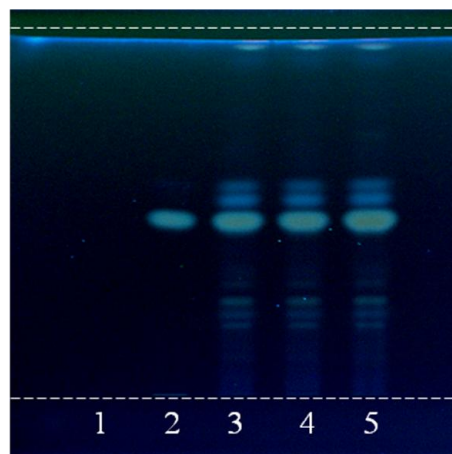
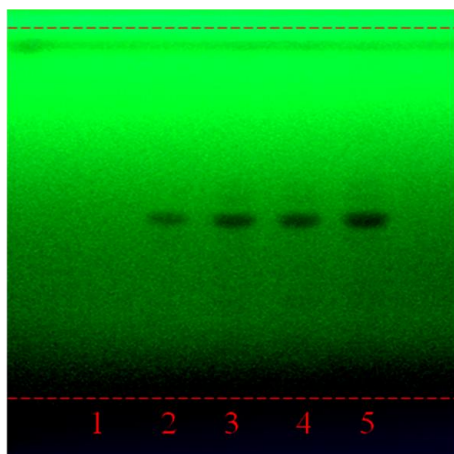
實驗日期：105/09/21

相對溼度(RH)：56%

溫度(RT)：28 °C

【展開劑 2】(修飾中華人民共和國藥典 2015)——乙酸乙酯：甲酸：水 (5：1：1)

【萃取方法 2】(自行開發) — HPTLC 【萃取方法 2】(自行開發) — HPTLC
紫外光(254 nm)檢出 紫外光(365 nm)檢出



1：Blank

2：芸香苷(Rutin)

3，4：NC 檢品溶液

5：Spike

建議觀察方式：於紫外光(365 nm)檢視較紫外光(254 nm)顯示出較多條帶，且有明顯之芸香苷(Rutin)標準品斑點。

五、十家樣品檢測

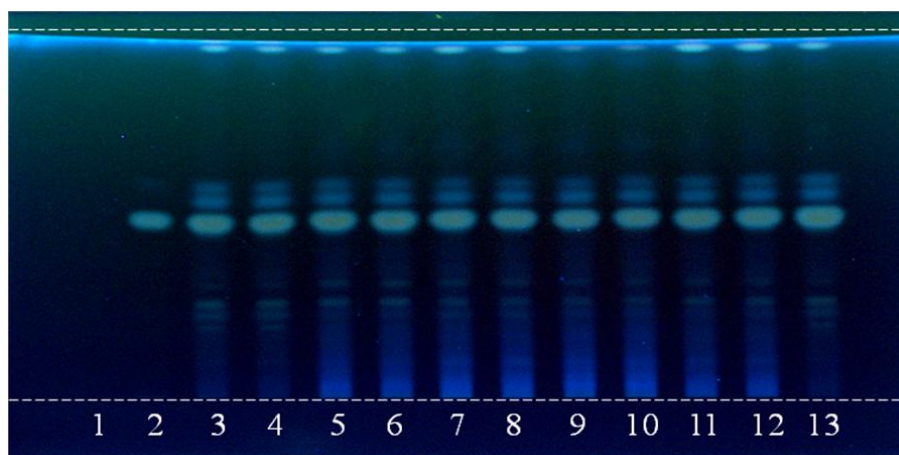
實驗日期：105/09/22

相對溼度(RH)：61%

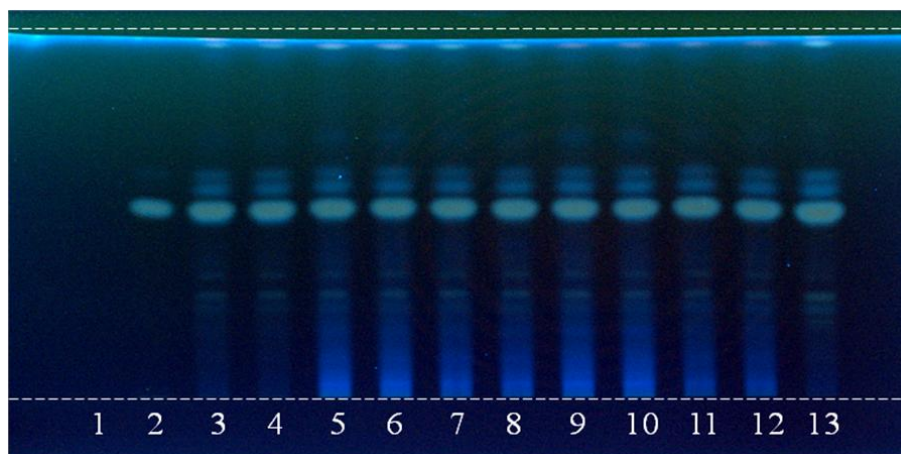
溫度(RT)：26 °C

【展開劑 2】(修飾中華人民共和國藥典 2015)——乙酸乙酯：甲酸：水 (5：1：1)

【萃取方法 2】(自行開發)——HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	芸香苷(Rutin) (0.2 mg/mL)
3, 4	NC 檢品溶液
5, 6	NF 檢品溶液
7, 8	NI 檢品溶液
9, 10	NJ 檢品溶液
11, 12	CD 檢品溶液
13	Spike (NC 檢品溶液)



1	Blank
2	芸香苷(Rutin) (0.2 mg/mL)
3, 4	SA 檢品溶液
5, 6	SC 檢品溶液
7, 8	SE 檢品溶液
9, 10	SF 檢品溶液
11, 12	SG 檢品溶液
13	Spike (NC 檢品溶液)

結論與建議：以自行開發之【萃取方法 2】方式，並以修飾中華人民共和國藥典 2015 之【展開劑 2】分離與檢出芸香苷(Rutin)較佳，於紫外光(365 nm)下檢視條帶顯示較多。