

穀精草

(ERIOCAULI FLOS)

穀精草 MI	2
一、形態	2
二、顯微	2
穀精草 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
穀精草 TLC	16
一、方法	16
二、濃度測試	17
三、溶媒系統選擇	18
四、觀察方式選擇	19
五、十家樣品檢測	20

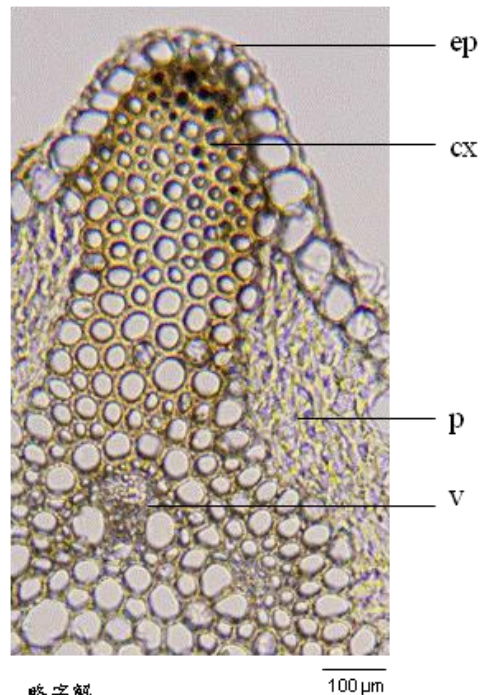
穀精草 MI

一、形態:

本品為穀精草科 Eriocaulaceae 植物穀精草 *Eriocaulon buergerianum* Koern. 的乾燥帶花莖的頭狀花序。整體呈淡黃棕色。頭狀花序呈半球形，直徑 4-5mm，底部有淡黃白色的膜質苞片層層緊密排列成盤狀的倒卵形，上部邊緣密生白色短毛，花序頂部灰白色。小花數十朵，灰白色，排列甚密，表面附有白色的細粉。用手搓碎花序後，可見多數黑色花藥及細小灰綠色未成熟的果實。花莖纖細，長短不一，直徑不及 1mm，表面淡黃綠色，有數條扭曲的稜線。質柔軟，不易折斷。氣微，味淡。

二、顯微

本品橫切面，花莖表皮細胞長方形，表面可見縱直角質層紋理；氣孔類長方形，保衛細胞長條形，與副衛細胞相平行。花莖通氣組織細胞呈類圓形或橢圓形，有的含細小草酸鈣棱晶或柱晶。腺毛頭部長橢圓形或長條形，1~4 細胞，頂端細胞較長，表面有細密網狀紋理。腺柄單細胞，細胞短。花粉粒類圓形，外壁具螺旋狀突起。



略字解

ep: 表皮細胞 p: 髓細胞
cx: 皮層 v: 導管

穀精草(Eriocauli Flos)

一、材料

購自於北中南東各地中藥店穀精草藥材共 10 家。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Hitachi L-7100，包含 Autosampler L-7200、DAD L-7455。層析管柱：Purospher® STAR RP-18 endcapped (5 µm) LichroCART® 150-4.6 mm。

(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：Purospher® STAR RP-18 endcapped (2 µm) LichroCART® 100-2.1 mm。

。

三、實驗藥品及試劑來源

(一) 試劑

醋酸(99.9%)購於景明化工；乙腈(HPLC grade)購於友和；乙醇(95%)購於國韶實業。

(二) 標準品

標準品：高車前素 7-O-葡萄糖苷(hispidulin 7-O-β-D-glucopyranoside)(1)，大陸 2010 年藥典沒有標準品，當代藥用植物典第四冊指出 hispidulin(化合物 1 之苷元)為代表性化合物之一，由台灣市售品發現黃酮類成分為其主要成分，其中又以化合物 1 為主成分，但是買不到化合物 1，因此自行分離，其結構經各種有機光譜確認，並與文獻資訊比對一致。

四、方法

(一) 萃取溶媒開發

1. 秤取 9 份，各 0.5 g 之市售穀精草粉末(經 60 mesh 過篩)，分別放入 20 mL 樣品瓶。
2. 分別加入 10 mL 的 95% EtOH, 80% EtOH, 50% EtOH, 25% EtOH 及 H₂O，超音波(40 kHz)震盪 30 min。
3. 使用 1 號濾紙過濾後將濾液減壓濃縮乾燥。
4. 加入 1 mL 80% MeOH 回溶樣品，經 0.45 µm nylon 濾膜過濾後取濾液進行 HPLC 分析。

(二) 萃取次數考察

1. 取穀精草粉末約 0.5 g 置 20 mL 樣品瓶中，加入 80%乙醇 20 mL，超音波震盪 30 min。
2. 使用 1 號濾紙過濾後，濾液再經 0.45 μm nylon 濾膜過濾後，取濾液進行 HPLC 分析。
3. 殘渣部分重複上述方法多次萃取、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 1 精確秤定 2.51 mg，加 1 mL 的 80%甲醇混合均勻，製成每 1 mL 含 2510 μg 的標準品儲備溶液。

(四) 檢品溶液

1. 秤取 0.5 g 穀精草粉末放入 20 mL 樣品瓶中，加入 20 mL 80% EtOH，超音波震盪 30 min。
2. 以 1 號濾紙過濾後將濾液收集於 50 mL 濃縮瓶中，殘渣再加入 20 mL 80% EtOH，超音波震盪 30 min。
3. 以 1 號濾紙過濾後將濾液收集於同一個 50 mL 濃縮瓶中減壓濃縮乾燥。
4. 加 10 mL 80% MeOH 到濃縮瓶中回溶萃取物，使用 0.45 μm nylon 濾膜過濾後取濾液進行 HPLC 分析。

(五) 測定法

分別精確吸取標準品溶液、檢品溶液 20 μL 進行 HPLC 分析後，經檢量線計算溶液中高車前素 7-O-葡萄糖苷(hispidulin 7-O- β -D-glucopyranoside)(1)含量，即得。

(六) 檢量線

取標準品 1 的儲備溶液，用 80% MeOH 連續稀釋成為每 1 mL 各別含 10, 50, 251, 502, 1004 μg 等不同濃度的標準品。以上溶液各取 20 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，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

以濃度為 502 $\mu\text{g/mL}$ 之標準品 1 稀釋液連續進樣 3 針，求出其波峰面積之相對標準差

(八) 再現性與穩定性試驗

1. 再現性：取同一家市售穀精草粉末，依檢品溶液製備方法平行製備 3 份檢

品溶液並進樣分析，以標準品 1 含量為指標，求出相對標準差

2. 穩定性：取同一家市售穀精草粉末 0.5 g，依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，分別於 0、8 和 24 小時取樣進行 HPLC 分析，以標準品 1 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) 同日間與異日間試驗

取濃度分別為 50, 502, 1004 $\mu\text{g/mL}$ 之標準品 1 稀釋液進行同日間測試(在 8 小時內每個濃度分析三次)與異日間測試(24 小時內分析三次)，求其相對標準偏差值。

(十一) 添加回收率試驗

取穀精草粉末約 0.5 g 三份，置 20 mL 樣品瓶中，精確加入三種不同濃度已溶解完全之標準品 1 溶液，隨後依檢品溶液製備方式製備出三份不同添加量之檢品溶液進行 HPLC 分析。

(十二) HPLC 分析條件

1. 層析管：Purospher® STAR RP-18 endcapped LichroCART® column (150 x 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 350 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：20 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%, v/v)	1%醋酸(%, v/v)
0	20	80
3	20	80
23	28	72
25	35	65
35	45	55
55	100	0
58	20	80
60	20	80

(十三) 臺灣市售穀精草含量測定

取 10 家市售穀精草檢品溶液各 20 μL 連續分析 3 次，所得平均波峰面積
依附錄 I 公式計算樣品中成分 1 的百分含量

(十四) UPLC 分析條件

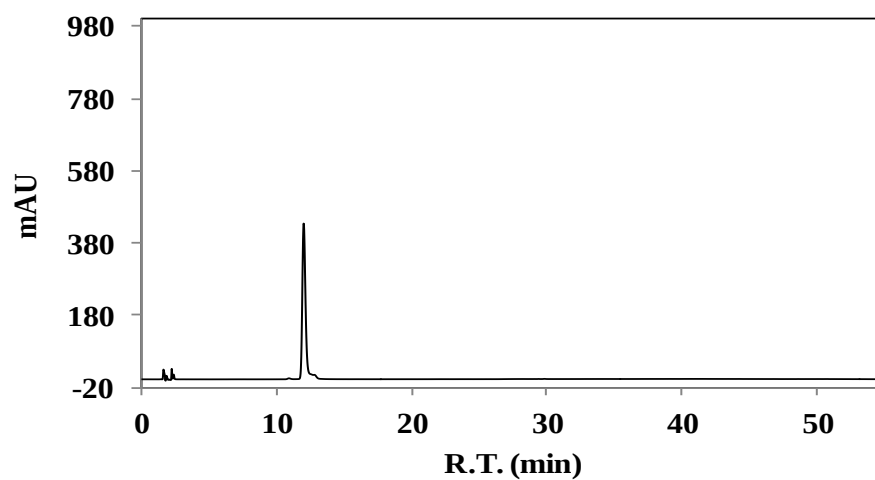
1. 層析管：Purospher® STAR RP-18 endcapped LichroCART® (100 x 2.1 mm, 2.0 μm)
2. 檢測波長：UV 350 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	乙腈(%, v/v)	1%醋酸(%, v/v)
0	20	80
1	20	80
4	28	72
5	38	65
7	45	55
11	100	0
14	100	0
15	20	80
18	20	80

五、結果

(一) 標準品 1 之 HPLC 層析

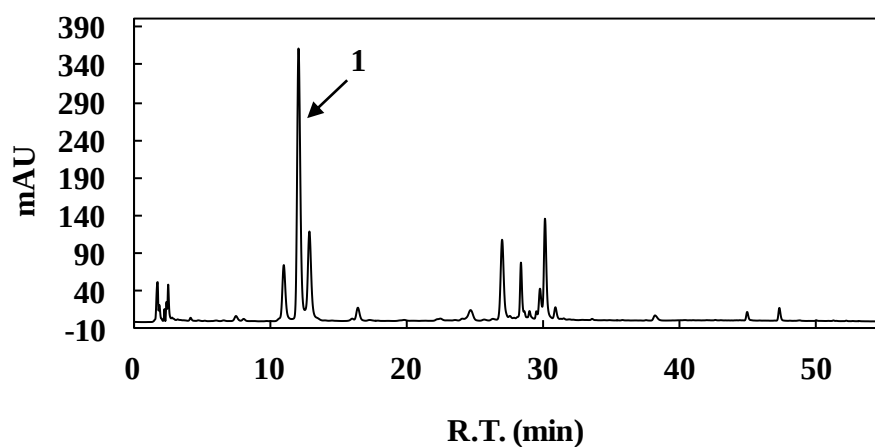
於滯留時間 11.8 分鐘處顯示標準品 1 的波峰。



圖一、標準品 1 溶液之 HPLC 層析圖

(二) 市售穀精草檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 12.0 分鐘處顯示穀精草檢品中標準品 1 的波峰。



圖二、市售穀精草檢品之 HPLC 層析圖

(三) 萃取溶媒開發

以 95%乙醇為溶媒時，對於化合物 1 來說，每克藥材重量所得的波峰面積雖然較大，但是就整體化合物萃出量而言較差，因此選擇以 80%乙醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

溶媒	EtOH	80% EtOH	50% EtOH	25% EtOH	H ₂ O
Compd 1 波峰面積	3871436	3456671	479712	ND	ND

(四) 萃取次數考察

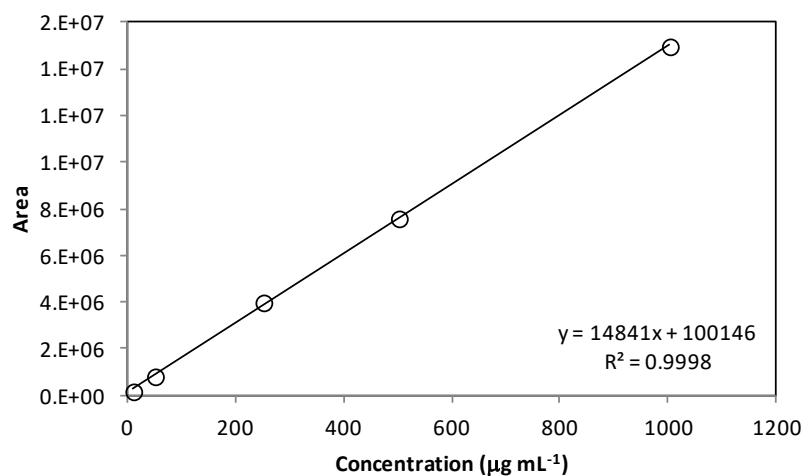
由表二結果顯示萃取 2 次萃取率約為 94%。

表二、穀精草檢品萃取次數考察

	波峰面積
第一次	917713
第二次	293187
第三次	119804

(五) 標準品 1 的檢量線

經不同濃度標準品 1 的(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： $y = 14841x + 100146$ ， $R^2 = 0.9998$ ，顯示濃度在 10—1004 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係。



圖三、標準品 1 之檢量線圖

表三、標準品 1 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
標準品 1	10—1004	$y = 14841x + 100146$	0.9998

(六) 再現性與精密度試驗

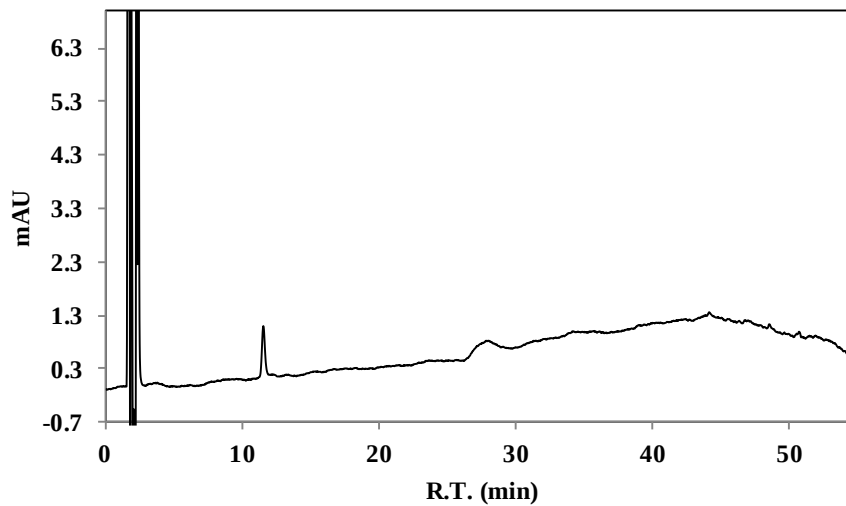
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，標準品 1 精密度之相對標準差為 0.98%，再現性之相對標準差為 4.56%，均在可接受的範圍以內。

(七) 穩定性試驗

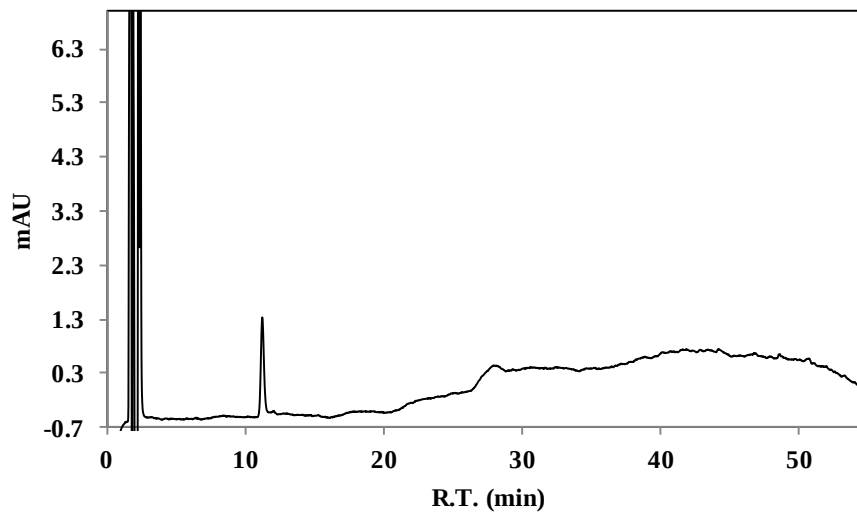
由結果可以得知，標準品 1 在 24 小時內穩定性，相對標準差為 0.22%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

標準品 1 偵測極限(limit of detection, LOD)為 0.35 $\mu\text{g/mL}$ ，定量極限(limit of quantitation, LOQ)為 0.70 $\mu\text{g/mL}$ 。



圖四、標準品 1 之 LOD 層析圖



圖五、標準品 1 之 LOQ 層析圖

表四、各項檢驗分析

檢測項目	標準品 1	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=3)	502 µg/mL	0.98
再現性 (n=3)	檢品溶液(CC)	4.56
穩定性 (n=3)	檢品溶液(CC)	0.22
偵測極限 (n=1)	0.35 µg/mL	-
定量極限 (n=1)	0.70 µg/mL	-

(九) 同日間與異日間試驗

由結果可以得知，標準品 1 在檢量線之範圍濃度內同日間的相對標準差為 0.74—2.19%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則幾乎無差異；異日間的相對標準差為 0.88—1.85%。

表五、標準品 1 同日間與異日間試驗

濃度(µg/mL)	同日間 (n=6)			異日間 (n=9)		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
50	49.20	0.54	1.10	49.45	0.60	1.22
502	504.17	11.05	2.19	505.86	9.35	1.85
1004	1008.70	7.49	0.74	1009.17	8.93	0.88

(十) 添加回收率試驗

標準品 1 平均回收率 101.65%，相對標準偏差 1.48%。

表六、標準品 1 添加回收率分析

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	0.507	1.639	2.80	4.64	106.87	101.65	1.48
2	0.505	1.636	1.40	3.05	100.81		
3	0.504	1.632	0.75	2.36	97.28		

(十一) 台灣市售穀精草含量測定

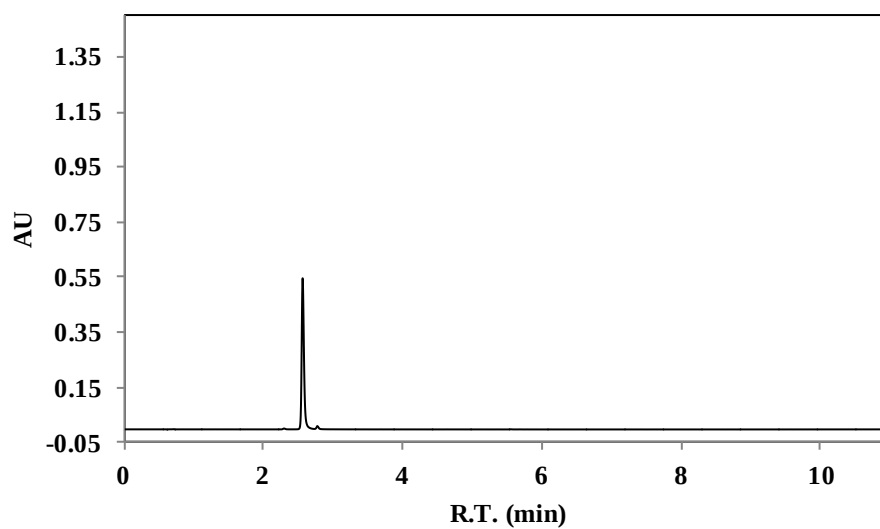
10 家穀精草藥材之含量測定結果，檢品之標準品 1 的含量介於 0.14—0.56%。

表七、台灣市售穀精草標準品 1 成分之含量

市售品代號	Mean±SD %
NN	0.44 ± 0.01
SC	0.34 ± 0.00
SE	0.32 ± 0.00
CC	0.30 ± 0.01
CD	0.42 ± 0.00
NJ	0.34 ± 0.00
NF	0.56 ± 0.00
NR	0.34 ± 0.01
SG	0.14 ± 0.00
SJ	0.41 ± 0.02
SQ	0.36 ± 0.00

(十二) 標準品 1 之 UPLC 層析

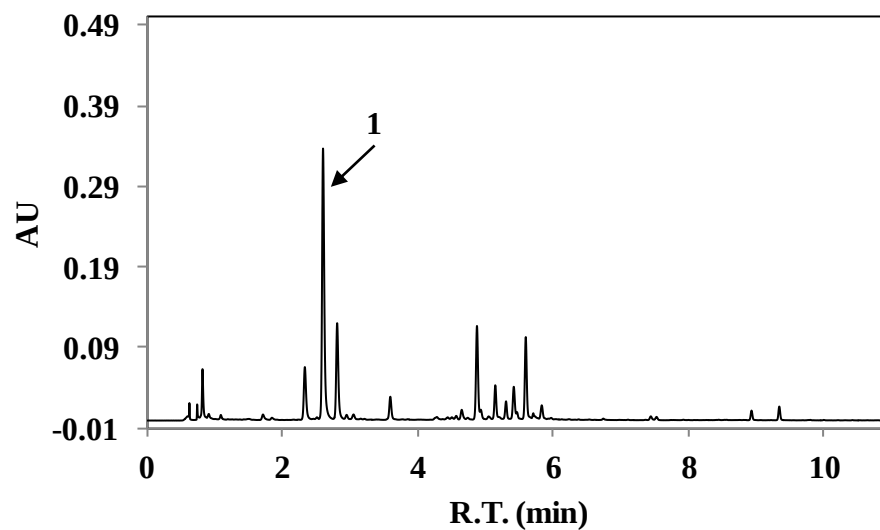
於滯留時間 2.5 分鐘處顯示標準品 1 的波峰。



圖六、標準品 1 溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售穀精草檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 2.61 分鐘處顯示穀精草檢品中標準品 1 的波峰。

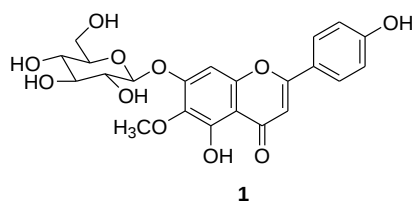


圖七、市售穀精草檢品之 UPLC 層析圖

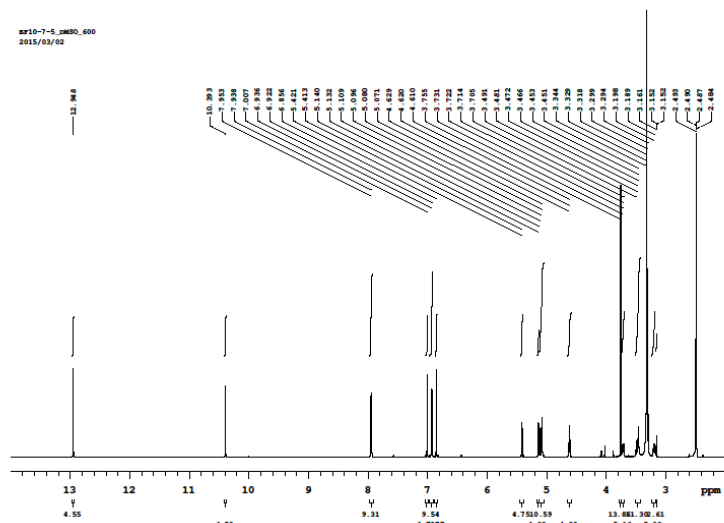
(十四) 標準品 1 的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{22}H_{22}O_{11}$ Mol. Wt.: 462 mp: 235—238 °C

(十五) 標準品 **1** 的結構

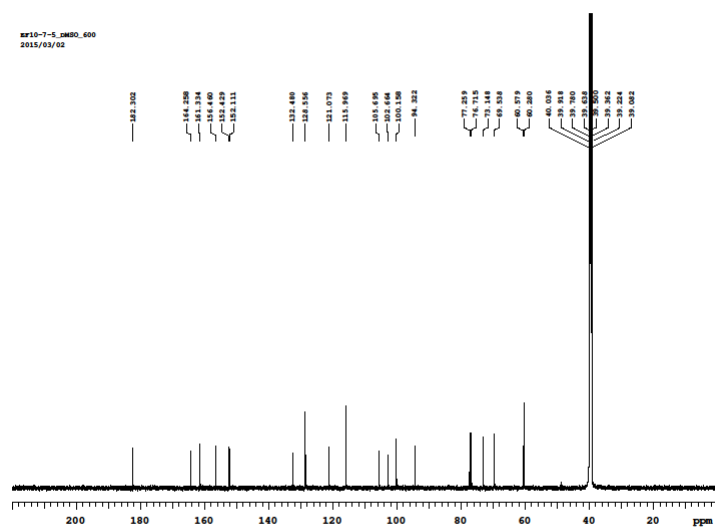


(十六) 標準品 **1** 的 ^1H NMR 圖譜



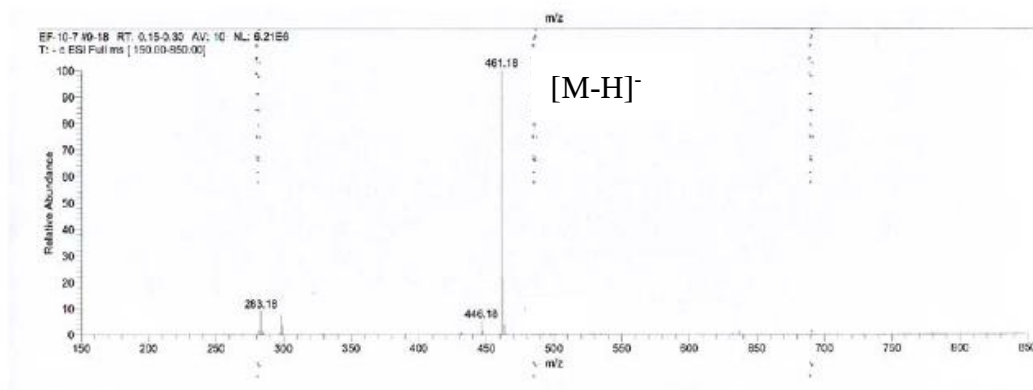
圖八、標準品 **1** 之 ^1H NMR 圖譜(DMSO- d_6)

(十七) 標準品 **1** 的 ^{13}C NMR 圖譜



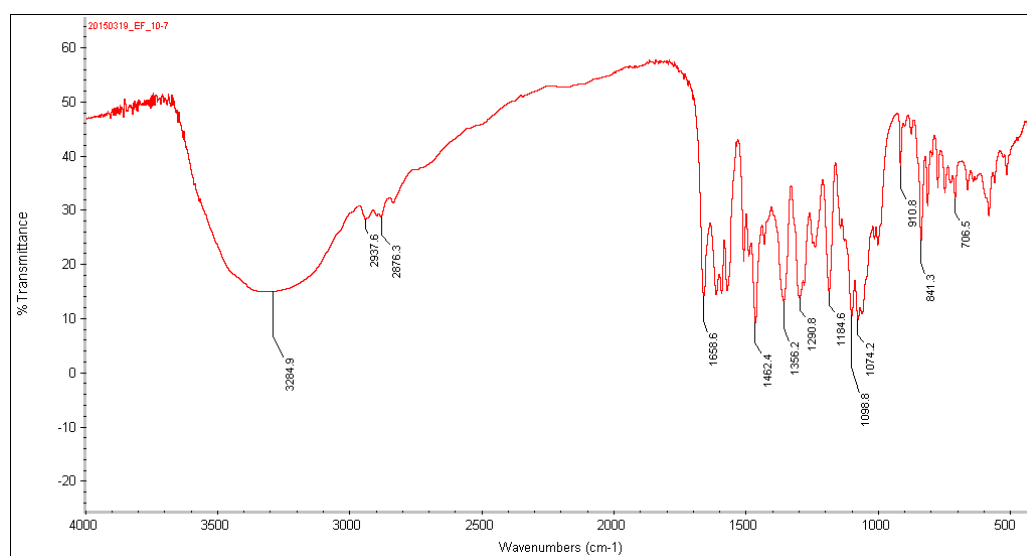
圖九、標準品 **1** 之 ^{13}C NMR 圖譜(DMSO- d_6)

(十八) 標準品 1 的 ESI-MS 圖譜



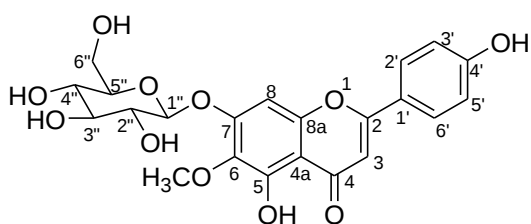
圖十、標準品 1 之 ESI-MS 圖譜

(十九) 標準品 1 的 FTIR 圖譜



圖十一、標準品 1 之 FTIR 圖譜

(二十) 標準品 1 的氫、碳化學位移



高車前素 7-*O*-葡萄糖苷(hispidulin 7-*O*-β-D-glucopyranoside)

表八、高車前素 7-*O*-葡萄糖苷(hispidulin 7-*O*-β-D-glucopyranoside)
的氫、碳化學位移(DMSO-*d*₆)^a

position	δ _H (600 MHz)	δ _C (150 MHz)
2		164.3
3	6.85 (s)	102.6
4		182.3
4a		105.7
5		152.4
6		132.5
7		156.5
8	7.01 (s)	94.3
8a		152.1
1'		121.0
2'	7.94 (d, 9.0)	128.5
3'	6.96 (d, 9.0)	116.0
4'		161.4
5'	6.96 (d, 9.0)	116.0
6'	7.94 (d, 9.0)	128.5
1''	5.10 (d, 7.2)	100.2
2''		73.2
3''		76.7
4''		69.5
5''		77.2
6''		60.6
6-OCH ₃	3.76 (s)	60.3
4'-OH	10.49 (s)	
5-OH	12.95 (br s)	

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

穀精草

中文名：穀精草

生藥拉丁名：ERIOCAULI FLOS

英文名：Buerger Pipewort Flower

基 原：本品為穀精草科 Eriocaulaceae 植物穀精草 *Eriocaulon buergerianum* Koern.之乾燥帶花梗之花序。秋季採收，將花序連同花莖拔出，曬乾。

一、方法

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

——取本品粉末 1.0 g，加乙醇 30 mL，超音波處理 30 分鐘，過濾，濾液蒸乾，殘渣加乙醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。

(二) 對照標準品 溶 液 取高車前素 7-O- β -葡萄糖甙(Hispidulin-O- β -glucoside)，加乙醇製成每 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】(臺灣中藥典第二版；中華人民共和國藥典 2015)**

——甲苯：丙酮 (10：0.6)

【展開劑 2】(自行開發)✓

——乙酸乙酯：甲酸：水 (19：1：1)

(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 浸於 10%硫酸乙醇試液，取出風乾後，150 °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。

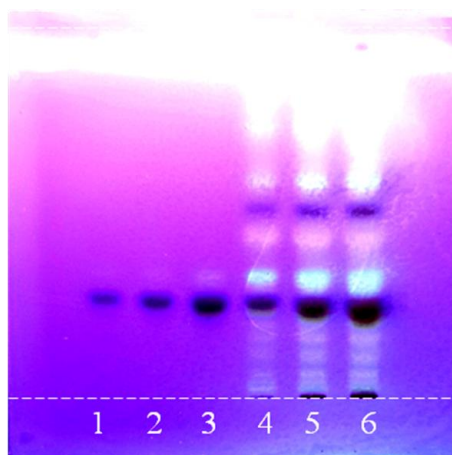
二、濃度測試

實驗日期：104/12/09

相對溼度(RH)：53%

溫度(RT)：26 °C

【展開劑 2】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲酸：水 (19：1：1)



編號	名稱	含量
1，2，3	高車前素 7-O-β-葡萄糖甙(Hispidulin 7-O-β-glucoside) (1 mg/mL)	1，2，5 μL
4，5，6	NF 檢品溶液【萃取方法 1】	2，5，8 μL

建議點注量：高車前素 7-O-β-葡萄糖甙(Hispidulin 7-O-β-glucoside)標準品溶液 1 μL，檢品溶液【萃取方法 1】 2 μL。

三、溶媒系統選擇

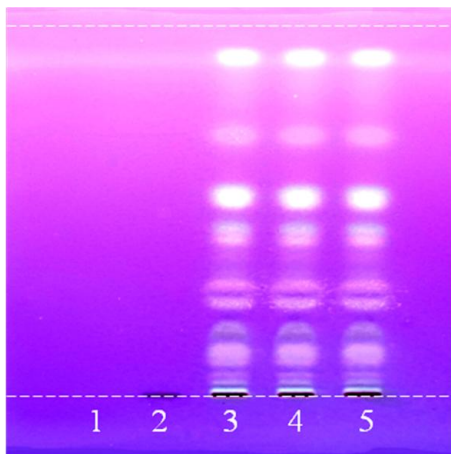
實驗日期：104/12/10

相對溼度(RH)：54%

溫度(RT)：27 °C

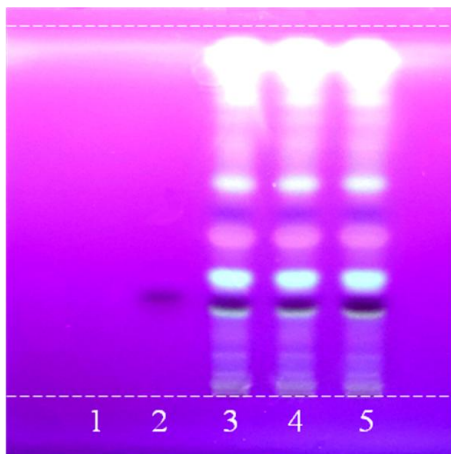
【展開劑 1】 (臺灣中藥典第二版；中華人民共和國藥典 2015) —— 甲苯：丙酮 (10：0.6)

【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第二版；中華人民共和國藥典 2015) —— HPTLC
10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出(高車前素 7-O-β-葡萄糖甙 R_f 值為 0)



【展開劑 2】 (自行開發) —— 乙酸乙酯：甲酸：水 (19：1：1)

【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第二版；中華人民共和國藥典 2015) —— HPTLC
10%硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出(高車前素 7-O-β-葡萄糖甙 R_f 值為 0.28)



1：Blank

2：高車前素 7-O-β-葡萄糖甙(Hispidulin 7-O-β-glucoside)

3，4：NF 檢品溶液

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法 1】方式，採用自行開發之【展開劑 2】較【展開劑 1】分離效果佳。

四、觀察方式選擇

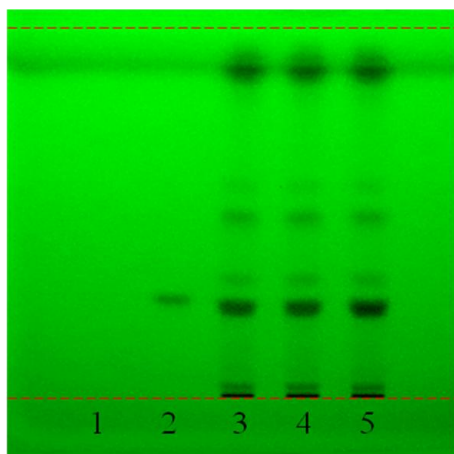
實驗日期：104/12/10

相對溼度(RH)：54%

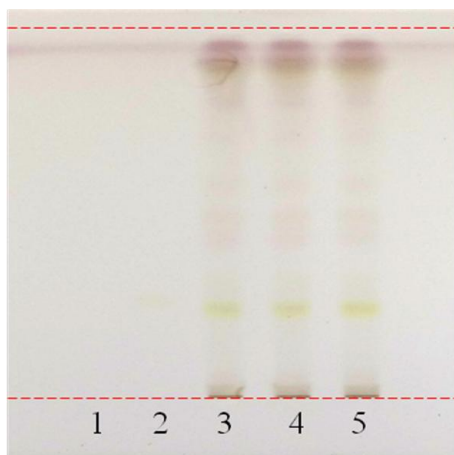
溫度(RT)：27 °C

【展開劑 2】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲酸：水 (19：1：1)

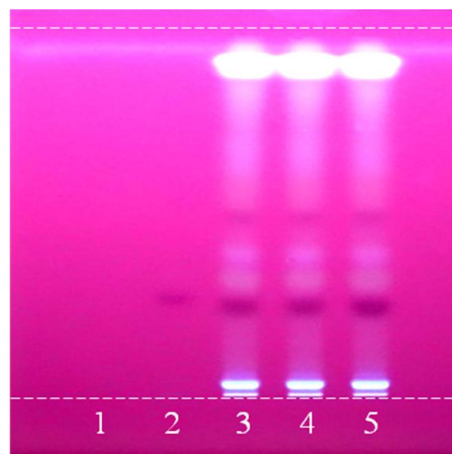
【萃取方法 1】(臺灣中藥典第二版；
中華人民共和國藥典 2015)－HPTLC
紫外光(254 nm)檢出



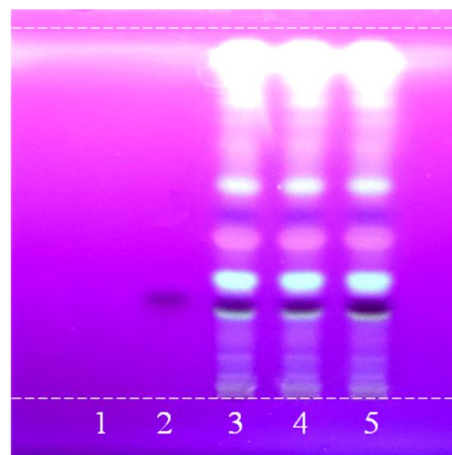
【萃取方法 1】(臺灣中藥典第二版；
中華人民共和國藥典 2015)－HPTLC
呈色/可見光檢出



【萃取方法 1】(臺灣中藥典第二版；
中華人民共和國藥典 2015)－HPTLC
紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 1】(臺灣中藥典第二版；
中華人民共和國藥典 2015)－HPTLC
呈色/紫外光(365 nm)檢出



1：Blank

2：高車前素 7-O-β-葡萄糖甙(Hispidulin 7-O-β-glucoside)

3，4：NF 檢品溶液

5：Spike

建議觀察方式：單以紫外光(254 nm 及 365 nm)檢視，高車前素 7-O-β-葡萄糖甙(Hispidulin 7-O-β-glucoside)標準品主點顯示皆不清楚，經 10%硫酸乙醇呈色後，於紫外光(365 nm)下顯示出明顯之成分主點。

五、十家樣品檢測

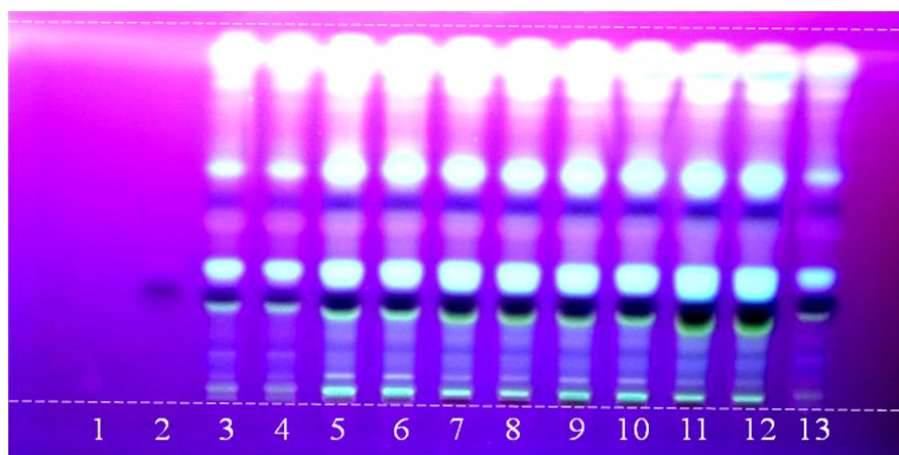
實驗日期：104/12/15

相對溼度(RH)：44%

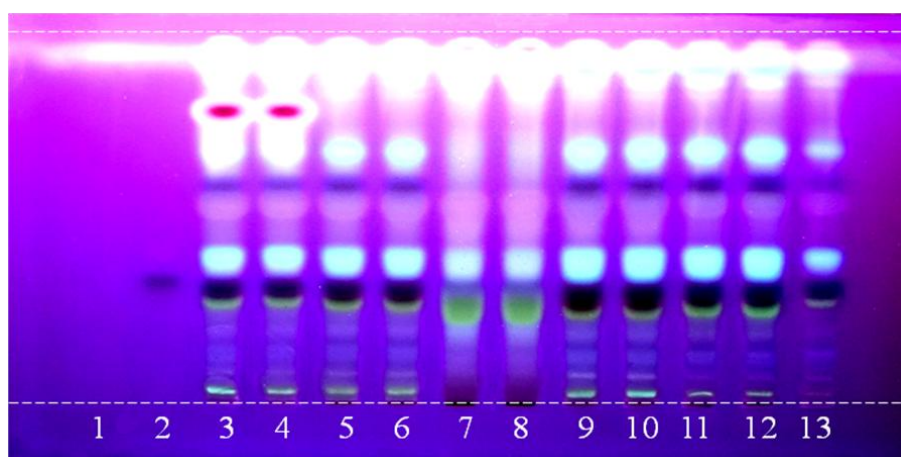
溫度(RT)：27 °C

【展開劑 2】 (自行開發)——乙酸乙酯：甲酸：水 (19：1：1)

【萃取方法 1】 (臺灣中藥典第二版；中華人民共和國藥典 2015) — HPTLC 10%
硫酸乙醇呈色後紫外光(365 nm)檢出



1	Blank
2	高車前素 7-O-β-葡萄糖甙(Hispidulin 7-O-β-glucoside) (1 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	CD 檢品溶液
13	Spike (NF 檢品溶液)



1	Blank
2	高車前素 7-O-β-葡萄糖甙(Hispidulin 7-O-β-glucoside) (1 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	SJ 檢品溶液
11, 12	SQ 檢品溶液
13	Spike (NF 檢品溶液)

結論與建議：以臺灣中藥典第二版及中華人民共和國藥典 2015 之【萃取方法 1】方式即可，並採用自行開發之【展開劑 2】才有分離出高車前素 7-O-β-葡萄糖甙(Hispidulin 7-O-β-glucoside)，需以 10%硫酸乙醇試液顯色後，以紫外光(365 nm)檢視。