

## 藁本

### (LIGUSTICI RHIZOMA ET RADIX)

#### 藁本 MI

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 一、藥材採購及鑑定.....        | 3 |
| 二、藥材性狀描述 (圖 1).....   | 3 |
| 三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)..... | 3 |
| 四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3)..... | 4 |

#### 藁本 藥材 HPLC

|                  |    |
|------------------|----|
| 一、材料.....        | 10 |
| 二、儀器及層析管柱.....   | 10 |
| 三、實驗藥品及試劑來源..... | 10 |
| 四、方法.....        | 10 |
| 五、結果.....        | 13 |

#### 藁本 飲片 HPLC

|                  |    |
|------------------|----|
| 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 |

#### 藁本 TLC

|                   |    |
|-------------------|----|
| 一、方法.....         | 32 |
| 二、萃法選擇及濃度測試.....  | 33 |
| 三、溶媒系統選擇.....     | 34 |
| 四、觀察方式選擇.....     | 36 |
| 五、十批藁本藥材樣品檢測..... | 37 |



# 藁本

## (LIGUSTICI RHIZOMA ET RADIX)

### 一、藥材採購及鑑定

收集 10 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藁本的乾燥根莖及根。

### 二、藥材性狀描述 (圖 1)

藥材名：藁本

生藥名：LIGUSTICI RHIZOMA ET RADIX

英文名：Jehol Ligusticum Rhizome and Root

基原：本品為繖形科 Umbelliferae 植物藁本 *Ligusticum sinense* Oliv. 之乾燥根莖及根。

採收加工：栽種 2~3 年，於春季發苗前或秋季莖葉枯萎後採挖，除去地上部及泥沙，乾燥即得。

藥材性狀：本品根莖呈不規則的結節狀圓柱形，有分枝，略彎曲。長 3~10 cm，直徑 1~3 cm，表面棕褐色，粗糙，皺縮，具不規則縱溝紋及環節。根多已去除而殘留多數根痕，少數留有殘根。上側有凹陷的莖基殘留，莖基圓形中空，其基部常具膨大的圓狀環節，側長出細根。下側有支根及鬚根。表皮易剝落，質硬易斷，斷面淡黃色，纖維狀。氣芳香，味辛、苦，微麻舌。

飲片性狀：本品飲片呈不規則厚片，表面棕褐色，具裂隙或孔洞，切面黃白色或淺棕色，形成層環明顯，呈棕色。氣芳香，味辛、苦，微麻舌。

生長分佈：多年生草本植物，高 1~2 m，喜涼爽濕潤氣候，耐寒、怕積水。花期 7~9 月，果期 9~10 月。主產於中國四川、甘肅、陝西、湖北等地。

### 三、藥材組織顯微鑑別 (圖 2)

根莖：

1. 表皮細胞多破裂，木栓層為 10~15 列木栓細胞，呈類方形，黃棕色。
2. 皮層細胞呈類方形或多角形，壁略厚。
3. 油室直徑 65~170  $\mu\text{m}$ ，散佈於皮層及韌皮部，內含黃棕色分泌物。
4. 形成層排列成環。
5. 木質部不發達，木質纖維多成束分佈，壁厚。
6. 髓線明顯，呈輻射狀，寬 6~12 列細胞排列組成。

7. 髓部大，有大量油室散佈。

根：

1. 木栓層為數列至 10 餘列木栓細胞，呈類方形，黃棕色。
2. 皮層較狹窄，由數列細胞組成，細胞扁平。
3. 韌皮部寬廣，有多數油室散佈其中。
4. 油室類圓形，直徑 55~170  $\mu\text{m}$ ，由分泌細胞組成，細胞呈扁橢圓形，內含黃棕色分泌物。
5. 形成層排列成環。
6. 木質部纖維多，大多成群。

#### 四、藥材粉末顯微鑑別 (圖 3)

1. 本品粉末灰棕色。
2. 木栓細胞，表面觀類多角形或類長方形，垂周壁厚，略彎曲。
3. 纖維多成束，偏光顯微鏡下呈亮白色至多彩色。
4. 石細胞少見，橢圓形、多角形或類方形，壁厚，紋孔明顯，偏光顯微鏡下呈亮黃色。
5. 草酸鈣簇晶少見，偏光顯微鏡下呈多彩色。
6. 導管主要為網紋導管及螺紋導管，偶可見階紋導管，直徑 10~40  $\mu\text{m}$ 。
7. 澱粉粒多為單粒，類圓形或橢圓形，臍點點狀、裂縫狀、人字狀或星狀，直徑約至 17  $\mu\text{m}$ ；複粒由 2~3 粒組成。偏光顯微鏡下呈黑十字。



圖 1A 藥本藥材圖



圖 1B 藥本飲片藥材圖

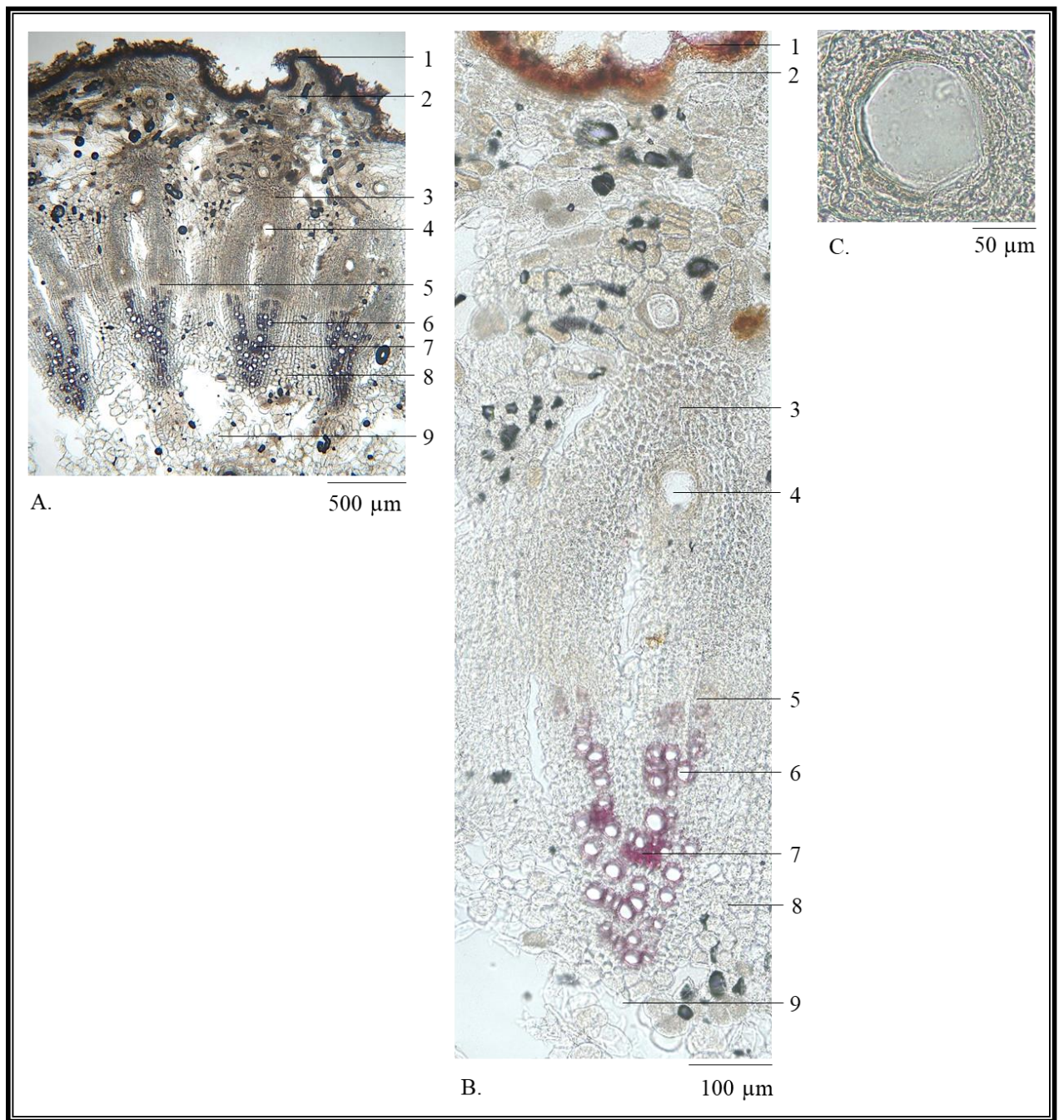


圖 2A 藁本根莖橫切面顯微特徵圖

A.橫切面圖 B.橫切面放大圖 C.油室

- 1.木栓層 2.皮層 3.韌皮部 4.油室 5.形成層 6.導管 7.木纖維 8.髓線
- 9.髓



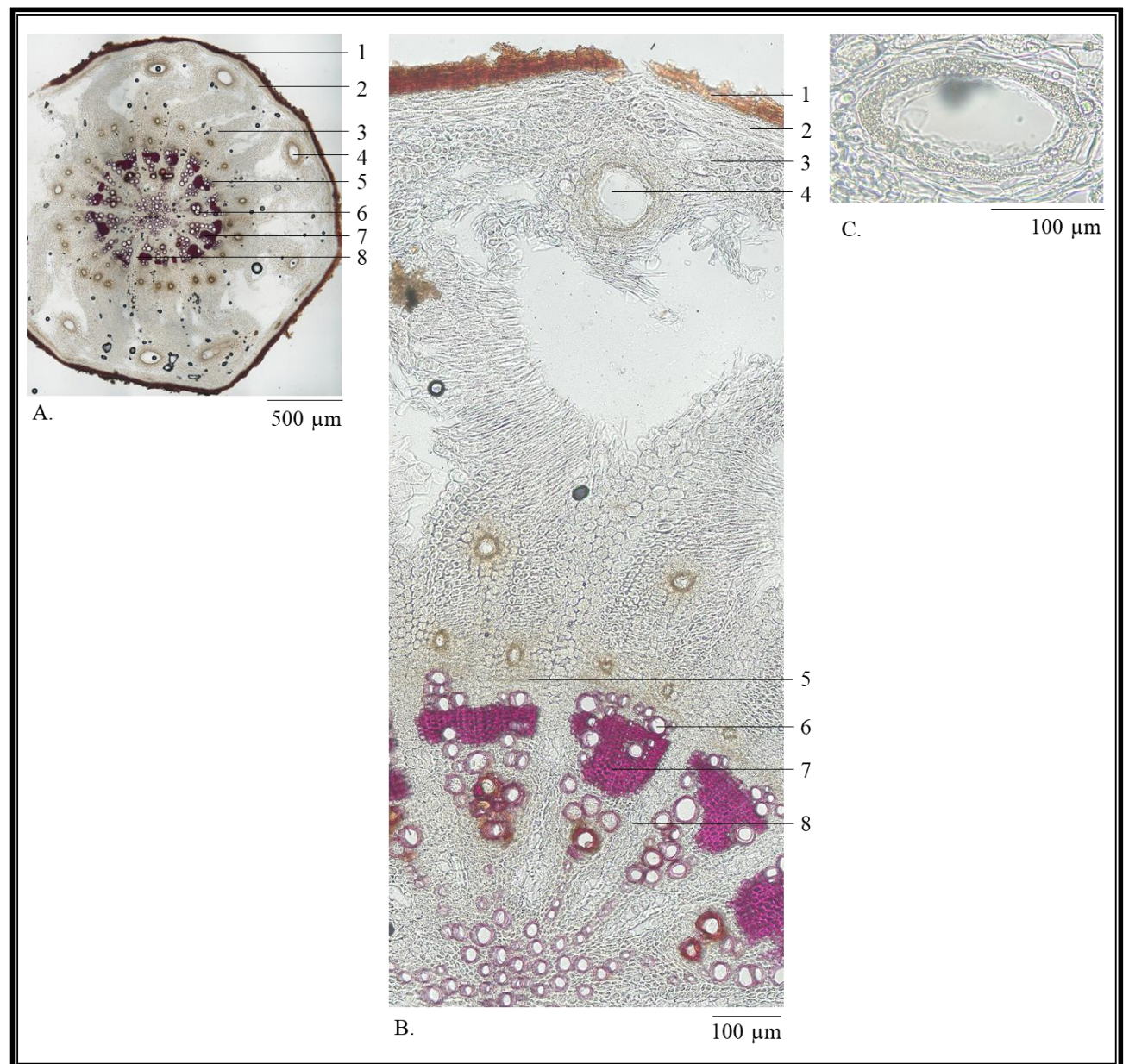


圖 2B 藁本根橫切面顯微特徵圖

A. 橫切面圖 B. 橫切面放大圖 C. 油室

1. 木栓層 2. 皮層 3. 韌皮部 4. 油室 5. 形成層 6. 導管 7. 木纖維 8. 髓線

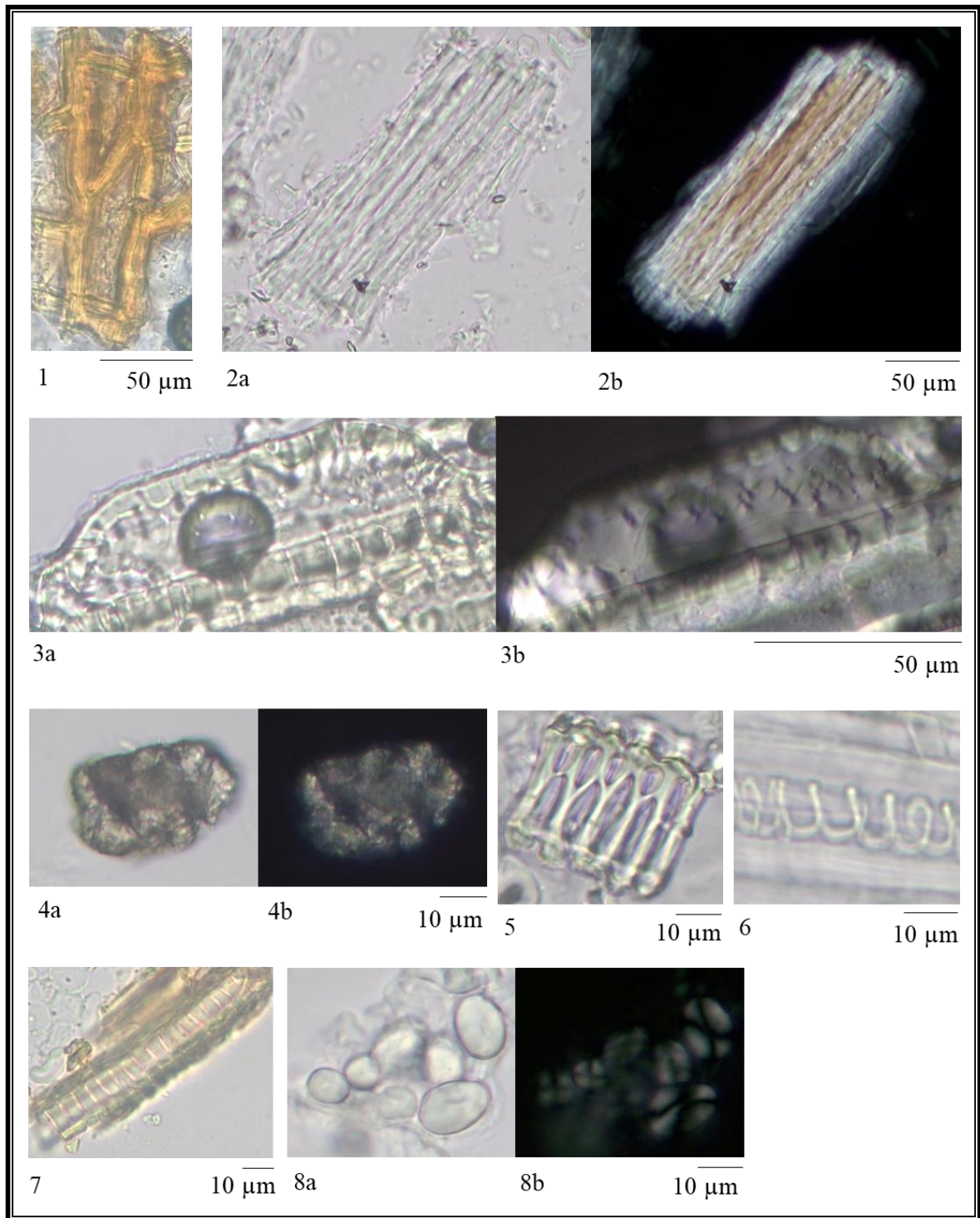


圖 3 薑本粉末顯微特徵圖

a. 光學顯微鏡下特徵 b. 偏光顯微鏡下特徵

1. 木栓細胞 2. 纖維束 3. 石細胞 4. 草酸鈣簇晶 5. 網紋導管 6. 螺旋導管 7. 階紋導管 8. 澱粉粒



### 參考文獻

1. 衛生福利部臺灣中藥典第三版編輯工作小組編纂(2018)。臺灣中藥典第三版。台北市：衛生福利部。432~434 頁。
2. 行政院衛生署中醫藥委員會編(1999)。中藥材品質管制：組織型態學鑑定。台北市：行政院衛生署中醫藥委員。291~292 頁。
3. 戴新民(1987)。現代本草中國藥材學上冊。啟業書局。610~611 頁。
4. 戴新民(1984)。中藥栽培法。啟業書局。117 頁。
5. 中華人民共和國香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部編製(2014)。香港中藥材標準第六冊。香港：香港特別行政區政府衛生署中醫藥事務部。483~491 頁。
6. 肖培根等編輯(2001)。新編中藥志第一卷。北京：化學工業出版社。1026~1033 頁。
7. 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。675~676 頁。
8. 國家藥典委員會編輯(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。397 頁。
9. 李家實主編(1993)。中藥鑑定學。貴州科技出版社。151~152 頁。
10. 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。108~109 頁。
11. 徐國鈞、徐珞珊主編(1997)。常用中草藥品種整理和質量研究第二冊。福建科學技術出版社。403~430。

## 藁本(LIGUSTICI RHIZOMA ET RADIX)

### 一、材料

購自於臺灣各地中藥店藁本藥材共 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 (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(99.9%)購自於 Mallinckrodt Baker Inc.；乙腈(99.9%)購自於 Sigma-Aldrich；乙醇(95%)購自於景明化工；乙酸(99.8%)購自於 J. T. Baker。

#### (二) 標準品

阿魏酸(Ferulic acid)來自於 Sigma，純度 98%以上。

### 四、方法

#### (一) 最佳萃取溶媒評估

取本品粉末 6 份，每份準確稱定 0.1 g，置 50 mL 離心管中，準確加入甲醇、75%甲醇、50%甲醇、乙醇、75%乙醇、50%乙醇各 10 mL，超音波振盪處理(功率 300W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，取上清液過濾(syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。每針 10 μL 注入高效液相層析儀(HPLC)，以所測得之標準品阿魏酸最大波峰面積為最佳藁本萃取溶媒。

#### (二) 最佳萃取次數評估

準確稱取本品粉末約 0.1 g，置 50 mL 離心管中，準確加入 50%甲醇 10 mL，超音波振盪處理(功率 300W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，取上清液過濾(syringe filter, PTFE 0.45 μm)，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

準確稱取標準品阿魏酸 1.0 mg，加 5 mL 50%甲醇製成每 1 mL 含阿

魏酸 200 µg 的標準品儲備溶液，並以 50% 甲醇稀釋至 5.0 µg/mL 製成對照標準品溶液。

#### (四) 檢品溶液

準確稱取本品粉末約 0.1 g，置 50 mL 離心管中，準確加入 50% 甲醇 10 mL，超音波振盪處理(功率 300W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，取上清液，殘渣部分重複提取 1 次，合併上清液，取上清液移入 25 mL 之容量瓶中，加 50% 甲醇至刻度，搖勻再過濾(syringe filter, PTFE 0.45 µm)，即得。

#### (五) 測定法

準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10 µL，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中標準品阿魏酸的含量，即得。

#### (六) 檢量線

準確吸取阿魏酸標準品儲備溶液(200 µg/mL)適量，以 50% 甲醇稀釋製成含阿魏酸分別為 20、15、10、5.0、2.0、1.0 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

以阿魏酸濃度為 5.0 µg/mL 之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以阿魏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：取同一批市售藁本粉末，依藁本檢品溶液製備方法平行製備五份藁本檢品溶液，進樣測定，以阿魏酸的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售藁本粉末，依藁本檢品溶液製備方法製備藁本檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以阿魏酸的波峰面積為指標，求出相對標準差。

#### (九) 偵測極限與定量極限試驗

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  $\geq 3:1$  時之濃度，作為偵測極限估計值。
2. 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  $\geq 10:1$  時之濃度，作為定量極限估計值。

(十) 添加回收率試驗

取已知阿魏酸含量的藁本粉末 5 份，每份準確稱取約 0.05 g，分別加入 1.0 mL 的阿魏酸溶液(0.1 mg/mL)，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 SB-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：320 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：

| 時間(min) | 甲醇(%) | 1%乙酸(v/v, %) |
|---------|-------|--------------|
| 0       | 35    | 65           |
| 20      | 35    | 65           |

(十二) 臺灣市售藁本含量測定

取 10 批市售藁本依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算檢品阿魏酸的百分含量。

(十三) 藁本檢品之 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：320 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：

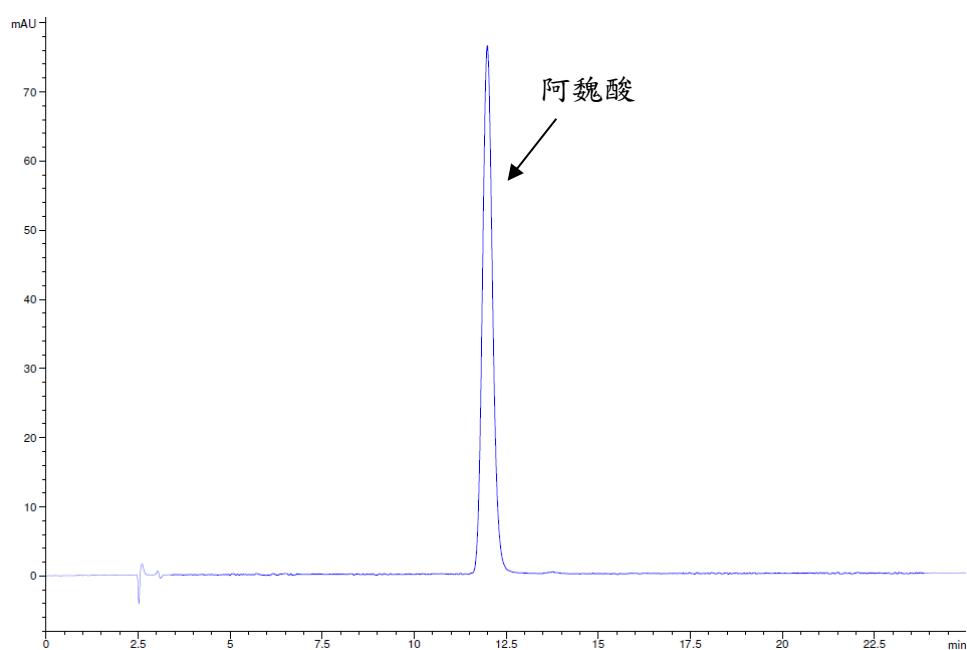
| 時間(min) | 甲醇(%) | 0.1%乙酸(v/v, %) |
|---------|-------|----------------|
| 0       | 35    | 65             |
| 10      | 35    | 65             |



## 五、結果

### (一) 標準品阿魏酸之 HPLC 層析

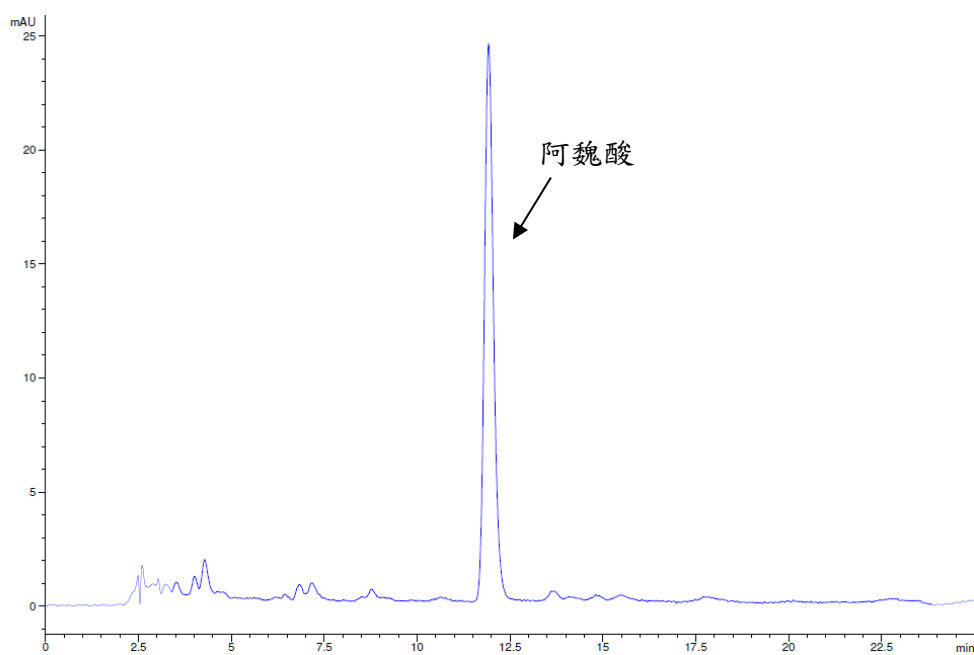
於滯留時間 11.96 分鐘處顯示阿魏酸標準品波峰(圖一)。



圖一、阿魏酸標準品溶液之 HPLC 層析圖

### (二) 市售藁本檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 11.96 分鐘顯示藁本檢品中阿魏酸的波峰(圖二)。阿魏酸之分離率( $R$ )為 22.8，托尾因子( $T$ )為 1.19，均在系統適用性要求內。



圖二、市售藁本檢品之 HPLC 層析圖

### (三) 最佳萃取溶媒評估

以 50% 甲醇為溶媒時，每克藥材重量所得阿魏酸的波峰面積最大，顯示 50% 甲醇為最佳萃取溶媒。

表一、不同溶媒萃取比較

| 溶媒     | 波峰面積 | 最佳萃取 |
|--------|------|------|
| 甲醇     | 788  |      |
| 75% 甲醇 | 1305 |      |
| 50% 甲醇 | 1506 | √    |
| 乙醇     | 563  |      |
| 75% 乙醇 | 1152 |      |
| 50% 乙醇 | 1402 |      |

### (四) 最佳萃取次數評估

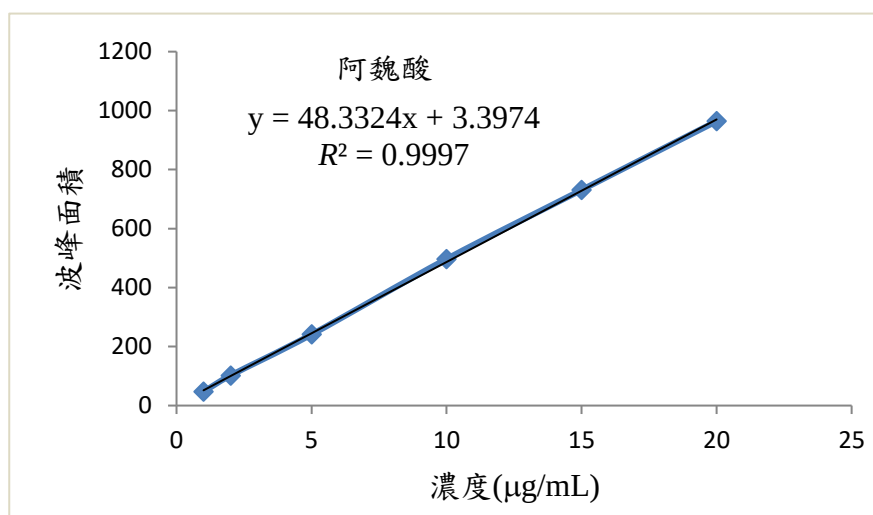
結果顯示萃取 2 次基本上已將阿魏酸萃取完全(萃取率大於 98%)。

表二、藁本檢品萃取次數評估

| 50% 甲醇萃取次數 | 阿魏酸波峰面積 |
|------------|---------|
| 第 1 次      | 1506    |
| 第 2 次      | 361     |
| 第 3 次      | N.D.    |

### (五) 標準品阿魏酸檢量線

經不同濃度阿魏酸(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  $y = 48.3324x + 3.3974$ ， $R^2 = 0.9997$ ，顯示濃度在 1.0–20  $\mu\text{g/mL}$  有良好的線性關係(圖三)。



圖三、標準品阿魏酸之檢量線圖

表三、阿魏酸之檢量線方程式

| 對照標準品 | 濃度( $\mu\text{g/mL}$ ) | 線性回歸方程式                 | $R^2$  |
|-------|------------------------|-------------------------|--------|
| 阿魏酸   | 1.0–20                 | $y = 48.3324x + 3.3974$ | 0.9997 |

#### (六) 精密度試驗

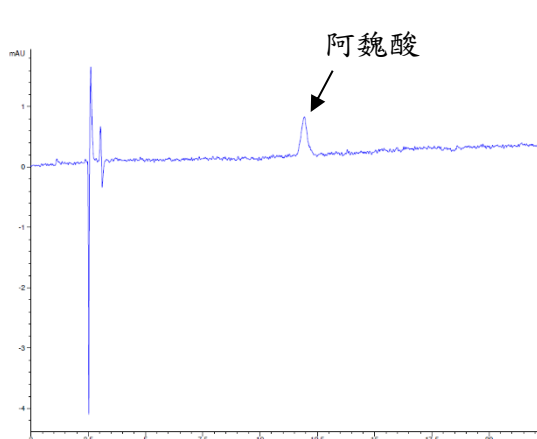
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，阿魏酸精密度之相對標準差為 0.29%，在系統適用性要求內。

#### (七) 重複性與穩定性試驗

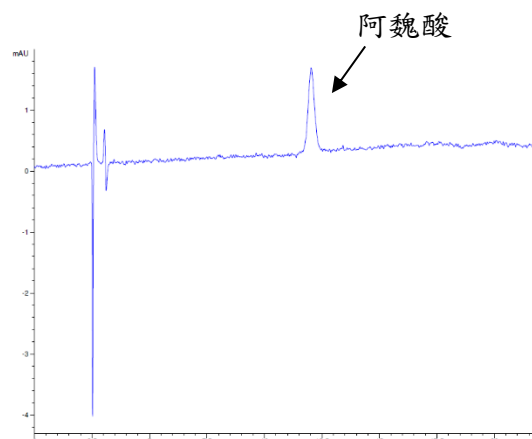
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，阿魏酸重複性之相對標準差為 0.55%，在系統適用性要求內。阿魏酸在 24 小時內穩定，穩定性之相對標準差為 1.94%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

#### (八) 偵測極限與定量極限試驗

阿魏酸偵測極限為 0.2  $\mu\text{g/mL}$  (圖四)，定量極限為 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (圖五)。



圖四、阿魏酸之偵測極限層析圖



圖五、阿魏酸之定量極限層析圖

表四、各項檢驗分析

| 檢測項目       | 濃度                   | R.S.D. (%) |
|------------|----------------------|------------|
| 精密度 (n=5)  | 5.0 $\mu\text{g/mL}$ | 0.29       |
| 重複性 (n=5)  | 檢品溶液(No. 10)         | 0.55       |
| 穩定性 (n=6)  | 檢品溶液(No. 10)         | 1.94       |
| 偵測極限 (n=1) | 0.2 $\mu\text{g/mL}$ | -          |
| 定量極限 (n=1) | 0.5 $\mu\text{g/mL}$ | -          |

(九) 添加回收率試驗

阿魏酸平均添加回收率為 96.8%，相對標準偏差為 1.93% (表五)。

表五、阿魏酸添加回收率

| 編號 | 藥材稱重(g)<br>(No. 1) | 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  | 0.0498             | 0.107       | 0.100       | 0.205       | 97.3       | 96.81        | 1.93          |
| 2  | 0.0502             | 0.108       | 0.100       | 0.205       | 96.5       |              |               |
| 3  | 0.0500             | 0.107       | 0.100       | 0.203       | 95.7       |              |               |
| 4  | 0.0499             | 0.107       | 0.100       | 0.202       | 94.8       |              |               |
| 5  | 0.0500             | 0.107       | 0.100       | 0.207       | 99.7       |              |               |

(十) 臺灣市售藥本含量測定

10 批藥本之含量測定結果(乾燥品)如表六所示，阿魏酸的含量為 0.12–0.35 %。建議藥本藥材指標成分阿魏酸的含量不得少於 0.05%。理論板數按阿魏酸波峰計算均應不低於 5000 (實際值為 12000)。

表六、臺灣市售藥本檢品之阿魏酸含量

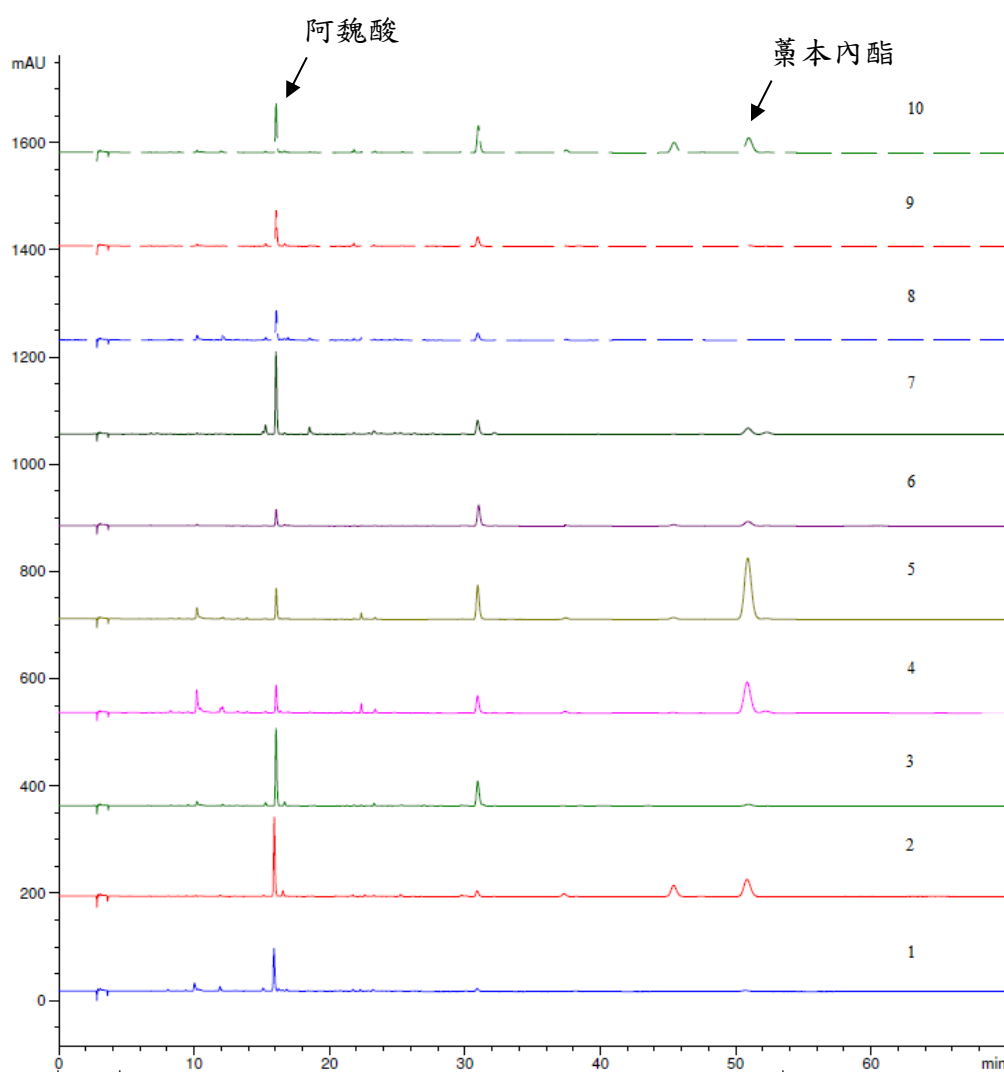
| 藥材編號(No.) | 阿魏酸含量(%)    |
|-----------|-------------|
| 1 (CAA)   | 0.12        |
| 2 (CAB)   | 0.26        |
| 3 (NR)    | 0.35        |
| 4 (SA)    | 0.15        |
| 5 (SAA)   | 0.20        |
| 6 (SAB)   | 0.14        |
| 7 (SG)    | 0.30        |
| 8 (SU2)   | 0.12        |
| 9 (SUA)   | 0.13        |
| 10 (SUD)  | 0.24        |
| 平均值±S.D.  | 0.20 ± 0.08 |

# (十一) 藁本藥材之 HPLC 指紋圖譜的建立

準確稱取 10 批市售藁本藥材檢品粉末各約 0.1 g，分別置 50 mL 離心管中，準確加入甲醇 10 mL，超音波振盪處理(功率 300W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，取上清液，過濾(syringe filter, PTFE 0.45  $\mu$ m)，即得指紋圖譜檢品溶液，取檢品溶液各 10  $\mu$ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX SB-C18 Column (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)
2. 檢測波長：320 nm
3. 管柱溫度：室溫
4. 流速：1.0 mL/min
5. 注入量：10  $\mu$ L
6. 移動相：

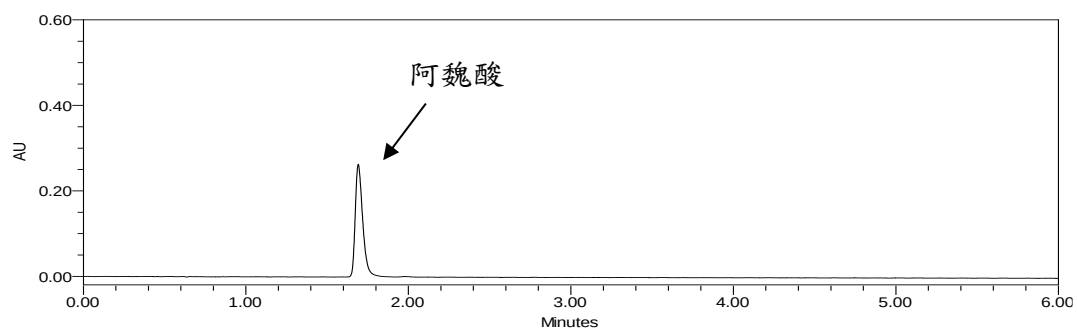
| 時間(min) | 乙腈(%) | 1%乙酸(v/v, %) |
|---------|-------|--------------|
| 0       | 5     | 95           |
| 15      | 30    | 70           |
| 20      | 45    | 55           |
| 70      | 45    | 55           |



圖六、10 批藁本之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品阿魏酸之 UPLC 層析

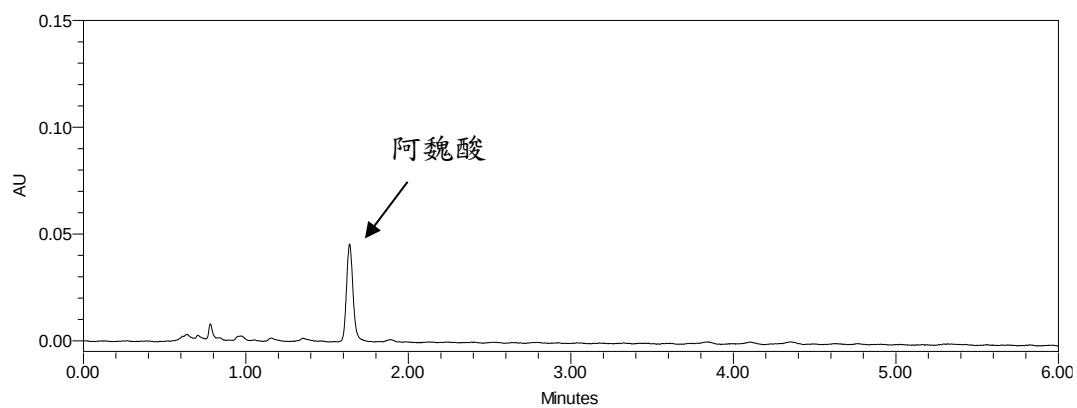
於滯留時間 1.69 分鐘顯示阿魏酸標準品的波峰(圖七)。



圖七、阿魏酸標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售藥本檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 1.64 分鐘顯示藥本檢品中阿魏酸的波峰(圖八)。



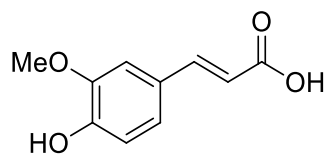
圖八、市售藥本檢品之 UPLC 層析圖



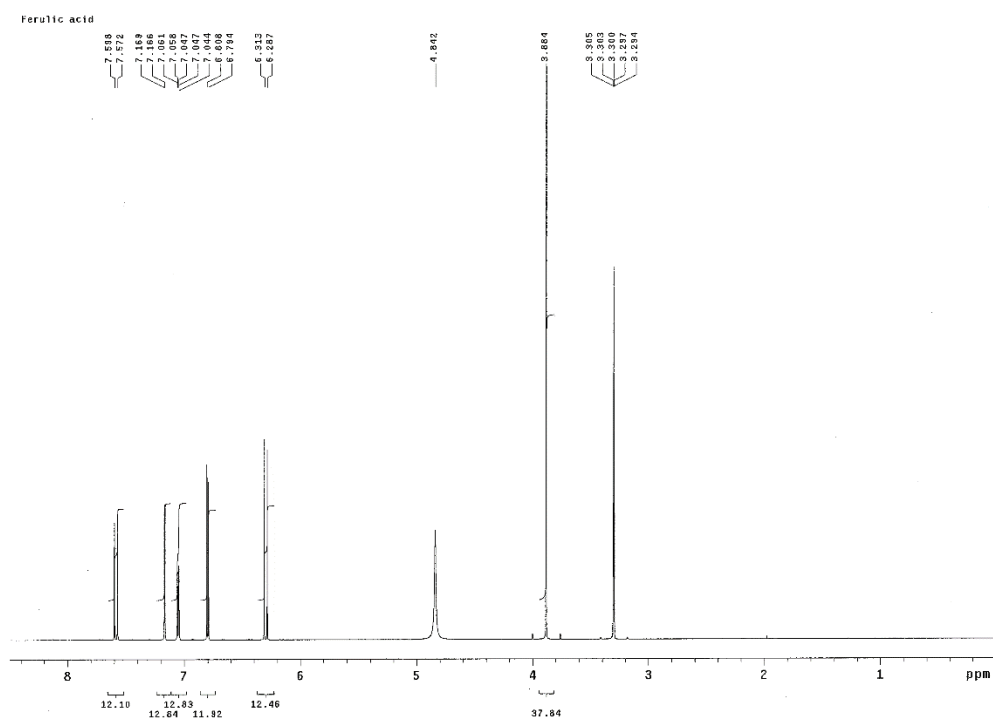
(十四) 阿魏酸的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{10}H_{10}O_4$ ；分子量：194.19；熔點：169–170 °C；白色固體。

(十五) 阿魏酸的結構

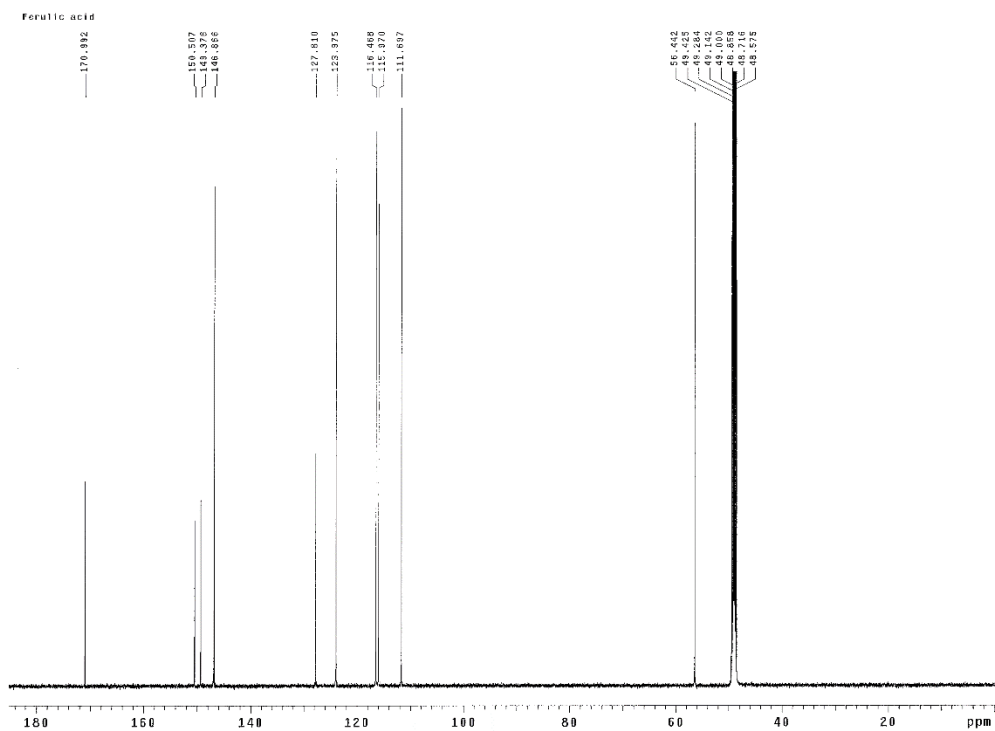


(十六) 阿魏酸的  $^1H$  NMR 圖譜



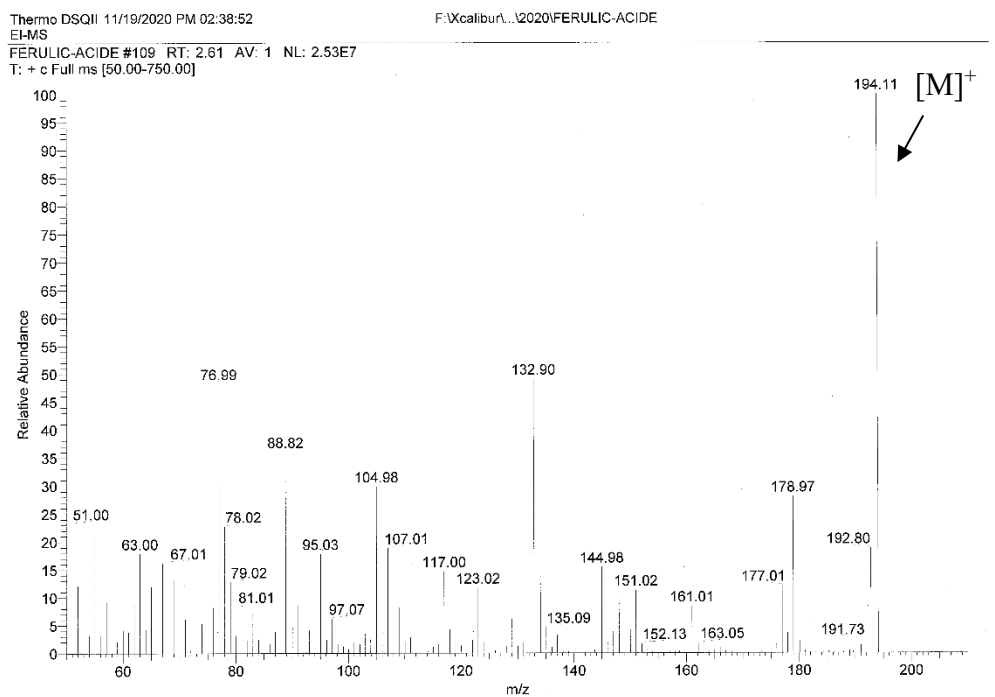
圖九、阿魏酸的  $^1H$  NMR 圖譜( $CD_3OD$ )

(十七) 阿魏酸的  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜



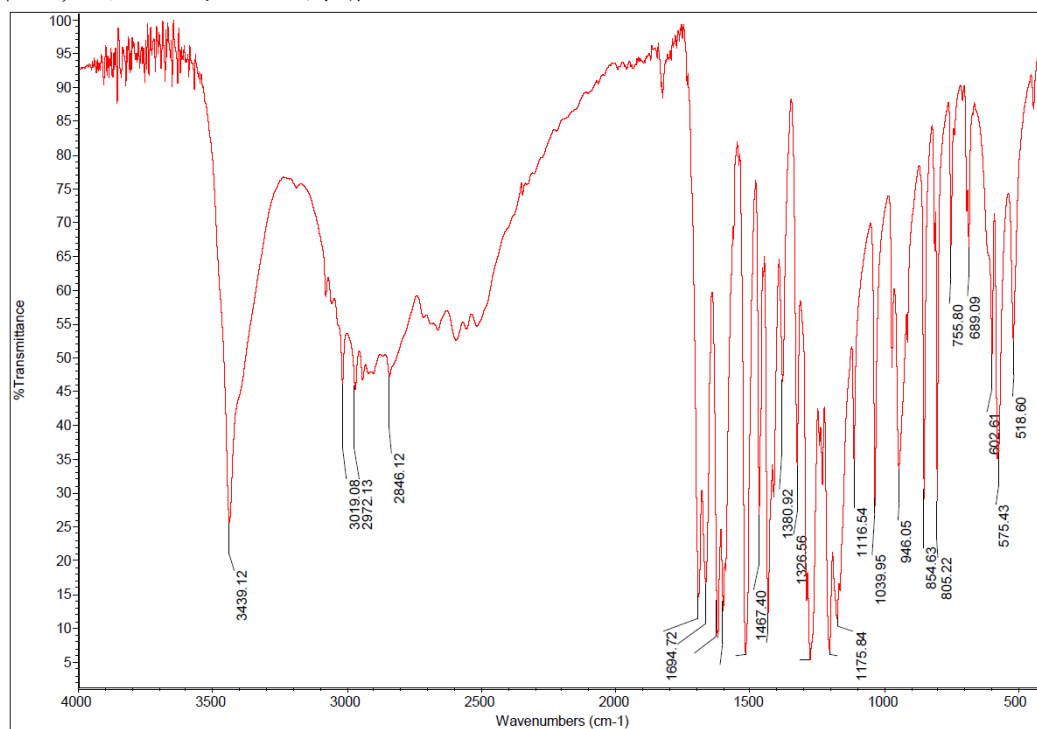
圖十、阿魏酸的  $^{13}\text{C}$  NMR 圖譜( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

(十八) 阿魏酸的 EI-MS 圖譜



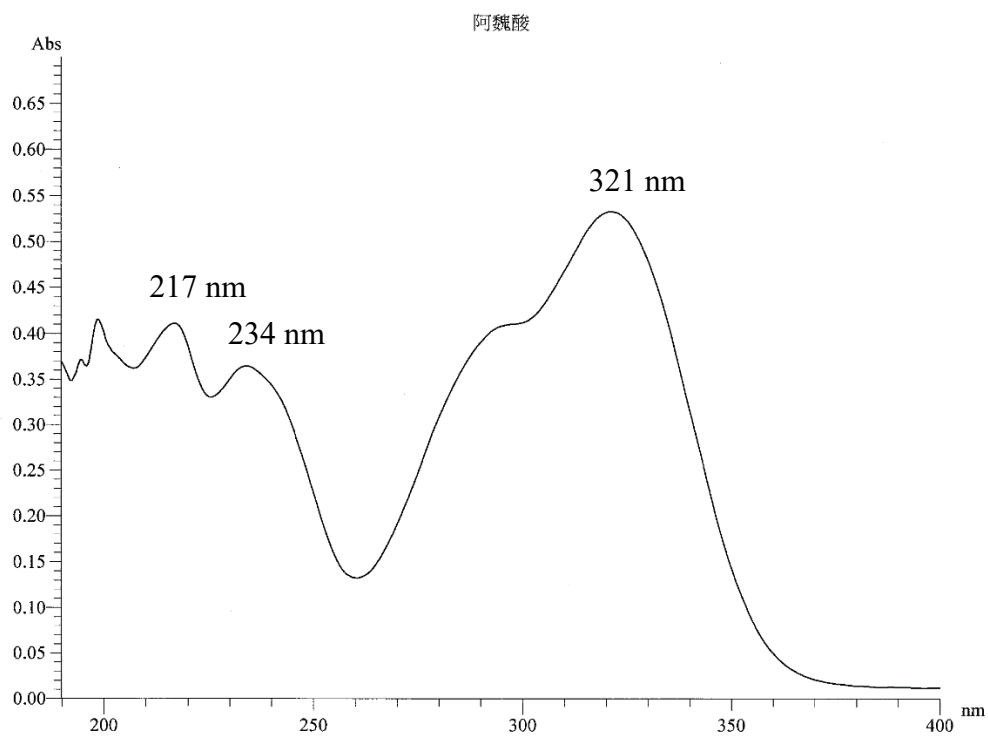
圖十一、阿魏酸的 EI-MS 圖譜

(十九) 阿魏酸的 FTIR 圖譜



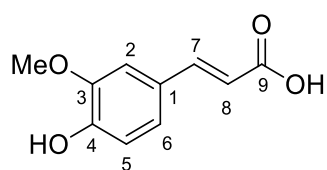
圖十二、阿魏酸的 FTIR 圖譜

(二十) 阿魏酸的 UV 圖譜



圖十三、阿魏酸的 UV 圖譜

(二十一) 阿魏酸的氫、碳化學位移



表七、阿魏酸的氫、碳化學位移(CD<sub>3</sub>OD)<sup>a</sup>

| position | $\delta_H$ (600 MHz) | $\delta_C$ (150 MHz) |
|----------|----------------------|----------------------|
| 1        | -                    | 127.81               |
| 2        | 7.17 (d, 1.8)        | 111.70               |
| 3        | -                    | 149.38               |
| 4        | -                    | 150.51               |
| 5        | 6.80 (d, 8.4)        | 116.47               |
| 6        | 7.05 (dd, 8.4, 1.8)  | 123.98               |
| 7        | 7.59 (d, 15.6)       | 146.87               |
| 8        | 6.30 (d, 15.6)       | 115.97               |
| 9        | -                    | 170.99               |
| 3-OMe    | 3.88 (s)             | 56.44                |

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

## 藁本飲片(LIGUSTICI RHIZOMA ET RADIX)

### 一、材料

購自於臺灣各地中藥店藁本飲片共 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 (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(99.9%)購自於 Mallinckrodt Baker Inc.；乙腈(99.9%)購自於 Sigma-Aldrich；乙醇(95%)購自於景明化工；乙酸(99.8%)購自於 J. T. Baker。

#### (二) 標準品

阿魏酸(Ferulic acid)來自於 Sigma，純度 98%以上。

### 四、方法

#### (一) 最佳萃取溶媒評估

藁本飲片最佳萃取溶媒同藁本藥材。

#### (二) 最佳萃取次數評估

藁本飲片最佳萃取次數同藁本藥材。

#### (三) 對照標準品溶液

準確稱取標準品阿魏酸水合物 1.0 mg，加 5 mL 50%甲醇製成每 1 mL 含阿魏酸 200 μg 的標準品儲備溶液，並以 50%甲醇稀釋至 5.0 μg/mL 製成對照標準品溶液。

#### (四) 檢品溶液

準確稱取本品粉末約 0.1 g，置 50 mL 離心管中，準確加入 50%甲醇 10 mL，超音波振盪處理(功率 300W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，取上清液，殘渣部分重複提取 1 次，合併上清液，取上清液移入 25 mL 之容量瓶中，加 50%甲醇至刻度，搖勻再過濾(syringe filter, PTFE 0.45 μm)，即得。

#### (五) 測定法

準確吸取對照標準品溶液、檢品溶液 10  $\mu\text{L}$ ，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中標準品阿魏酸的含量，即得。

#### (六) 檢量線

準確吸取阿魏酸標準品儲備溶液(200  $\mu\text{g/mL}$ )適量，以 50% 甲醇稀釋製成含阿魏酸分別為 20、15、10、5.0、2.0、1.0  $\mu\text{g/mL}$  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  $R^2$ 。

#### (七) 精密度試驗

以阿魏酸濃度為 5.0  $\mu\text{g/mL}$  之對照標準品溶液連續進樣 5 針，以阿魏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：取同一批市售藁本粉末，依藁本飲片檢品溶液製備方法平行製備五份藁本飲片檢品溶液，進樣測定，以阿魏酸的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性：取同一批市售藁本飲片粉末，依藁本飲片檢品溶液製備方法製備藁本飲片檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以阿魏酸的波峰面積為指標，求出相對標準差。

#### (九) 偵測極限與定量極限試驗

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  $\geq 3:1$  時之濃度，作為偵測極限估計值。
2. 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  $\geq 10:1$  時之濃度，作為定量極限估計值。

#### (十) 添加回收率試驗

取已知阿魏酸含量的藁本飲片粉末 5 份，每份準確稱取約 0.05 g，分別加入 0.7 mL 的阿魏酸溶液(0.1  $\text{mg/mL}$ )，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 SB-C18 Column (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：320 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：

| 時間(min) | 甲醇(%) | 1%乙酸(v/v, %) |
|---------|-------|--------------|
| 0       | 35    | 65           |
| 20      | 35    | 65           |

(十二) 臺灣市售藁本飲片含量測定

取 10 批市售藁本飲片依檢品溶液製備方法製備檢品溶液，取各 10 μL 連續 3 針注入 HPLC，所得平均波峰面積依附錄 I 公式計算檢品阿魏酸的百分含量。

(十三) 藁本飲片檢品之 UPLC 層析條件

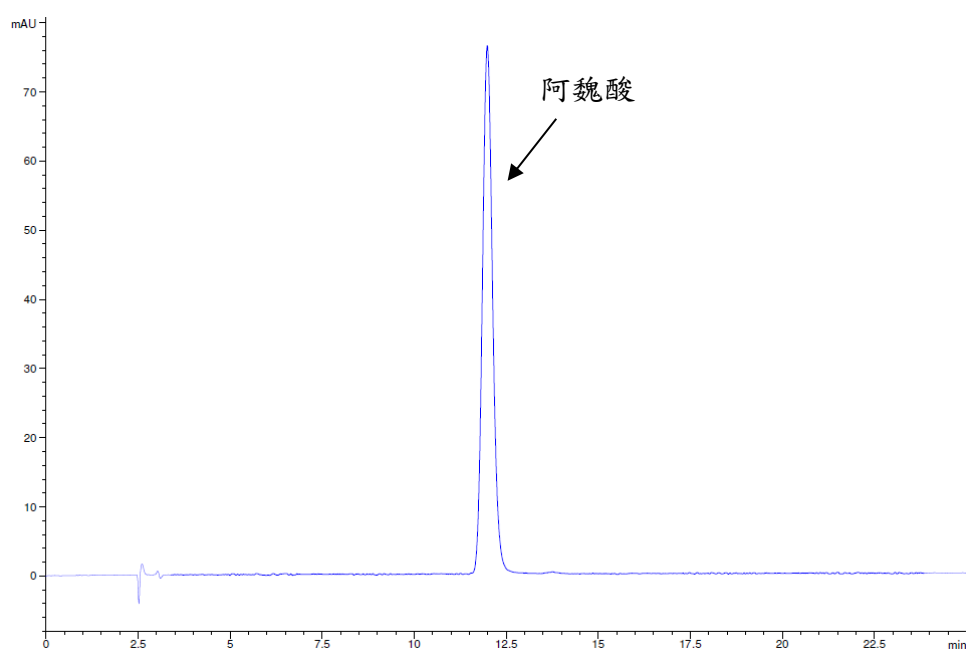
1. 層析管：Waters ACQUITY UPLC BEH C18 Column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：320 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：室溫
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

| 時間(min) | 甲醇(%) | 0.1%乙酸(v/v, %) |
|---------|-------|----------------|
| 0       | 35    | 65             |
| 10      | 35    | 65             |

## 五、結果

### (一) 標準品阿魏酸之 HPLC 層析

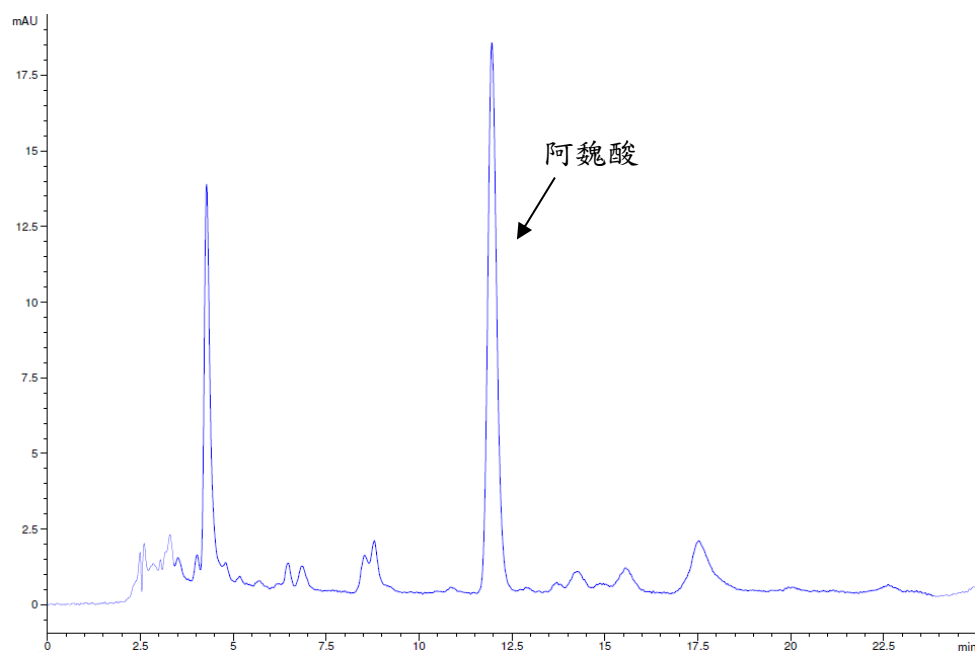
於滯留時間 11.96 分鐘處顯示阿魏酸標準品波峰(圖一)。



圖一、阿魏酸標準品溶液之 HPLC 層析圖

### (二) 市售藁本飲片檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 11.96 分鐘顯示藁本檢品中阿魏酸的波峰(圖二)。阿魏酸之分離率( $R$ )為 21.6，托尾因子( $T$ )為 1.19，均在系統適用性要求內。

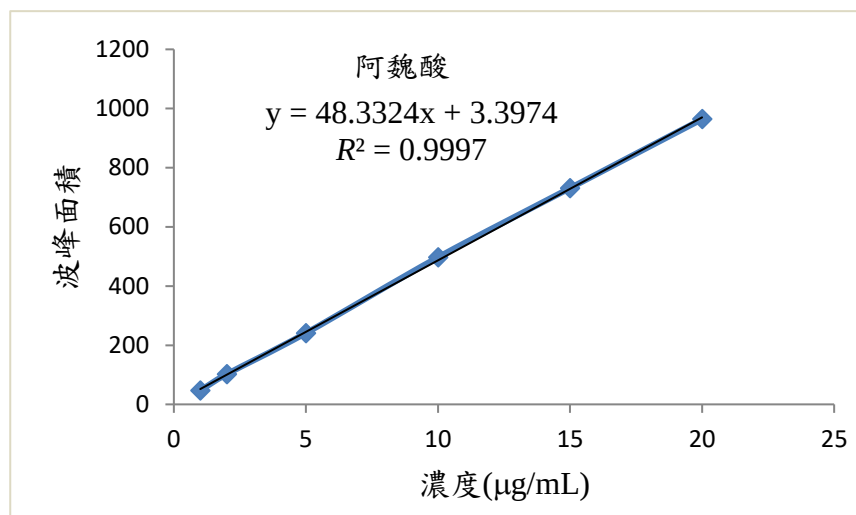


圖二、市售藁本飲片檢品之 HPLC 層析圖



### (三) 標準品阿魏酸檢量線

經不同濃度阿魏酸(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  $y = 48.3324x + 3.3974$ ， $R^2 = 0.9997$ ，顯示濃度在 1.0–20  $\mu\text{g/mL}$  有良好的線性關係(圖三)。



圖三、標準品阿魏酸之檢量線圖

表一、阿魏酸之檢量線方程式

| 對照標準品 | 濃度( $\mu\text{g/mL}$ ) | 線性回歸方程式                 | $R^2$  |
|-------|------------------------|-------------------------|--------|
| 阿魏酸   | 1.0–20                 | $y = 48.3324x + 3.3974$ | 0.9997 |

### (四) 精密度試驗

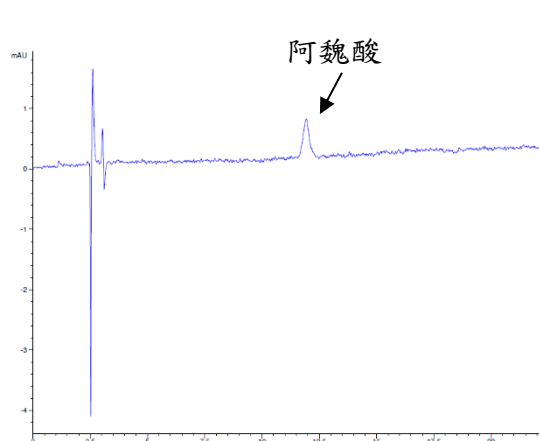
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，阿魏酸精密度之相對標準差為 0.29%，在系統適用性要求內。

### (五) 重複性與穩定性試驗

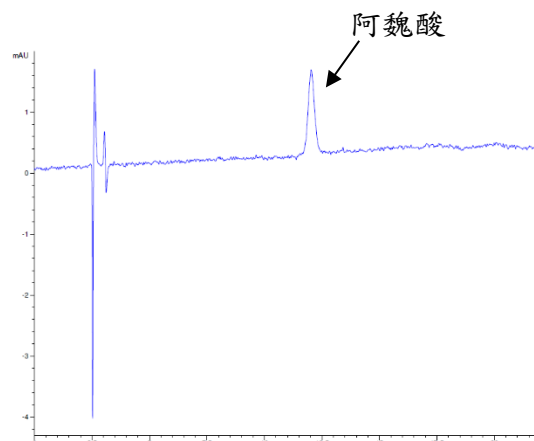
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的重複性良好，阿魏酸重複性之相對標準差為 0.48%，在系統適用性要求內。阿魏酸在 24 小時內穩定，穩定性之相對標準差為 2.05%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

#### (六) 偵測極限與定量極限試驗

阿魏酸偵測極限為 0.2  $\mu\text{g/mL}$  (圖四)，定量極限為 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (圖五)。



圖四、阿魏酸之偵測極限層析圖



圖五、阿魏酸之定量極限層析圖

表二、各項檢驗分析

| 檢測項目       | 濃度                   | R.S.D. (%) |
|------------|----------------------|------------|
| 精密度 (n=5)  | 5.0 $\mu\text{g/mL}$ | 0.29       |
| 重複性 (n=5)  | 檢品溶液(No. 1)          | 0.48       |
| 穩定性 (n=6)  | 檢品溶液(No. 1)          | 2.05       |
| 偵測極限 (n=1) | 0.2 $\mu\text{g/mL}$ | -          |
| 定量極限 (n=1) | 0.5 $\mu\text{g/mL}$ | -          |

#### (七) 添加回收率試驗

阿魏酸平均添加回收率為 98.1%，相對標準偏差為 1.74% (表三)。

表三、阿魏酸添加回收率

| 編號 | 藥材稱重(g)<br>(No. 1) | 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  | 0.0501             | 0.073       | 0.070       | 0.141       | 95.9       | 98.09        | 1.74          |
| 2  | 0.0499             | 0.073       | 0.070       | 0.143       | 98.9       |              |               |
| 3  | 0.0501             | 0.073       | 0.070       | 0.141       | 96.7       |              |               |
| 4  | 0.0500             | 0.073       | 0.070       | 0.143       | 99.2       |              |               |
| 5  | 0.0501             | 0.073       | 0.070       | 0.143       | 99.8       |              |               |

(八) 臺灣市售藁本飲片含量測定

10 批藁本飲片之含量測定結果(乾燥品)如表四所示，阿魏酸的含量為 0.14–0.29 %。建議藁本藥材指標成分阿魏酸的含量不得少於 0.05%。理論板數按阿魏酸波峰計算均應不低於 5000 (實際值為 12000)。

表四、臺灣市售藁本飲片檢品之阿魏酸含量

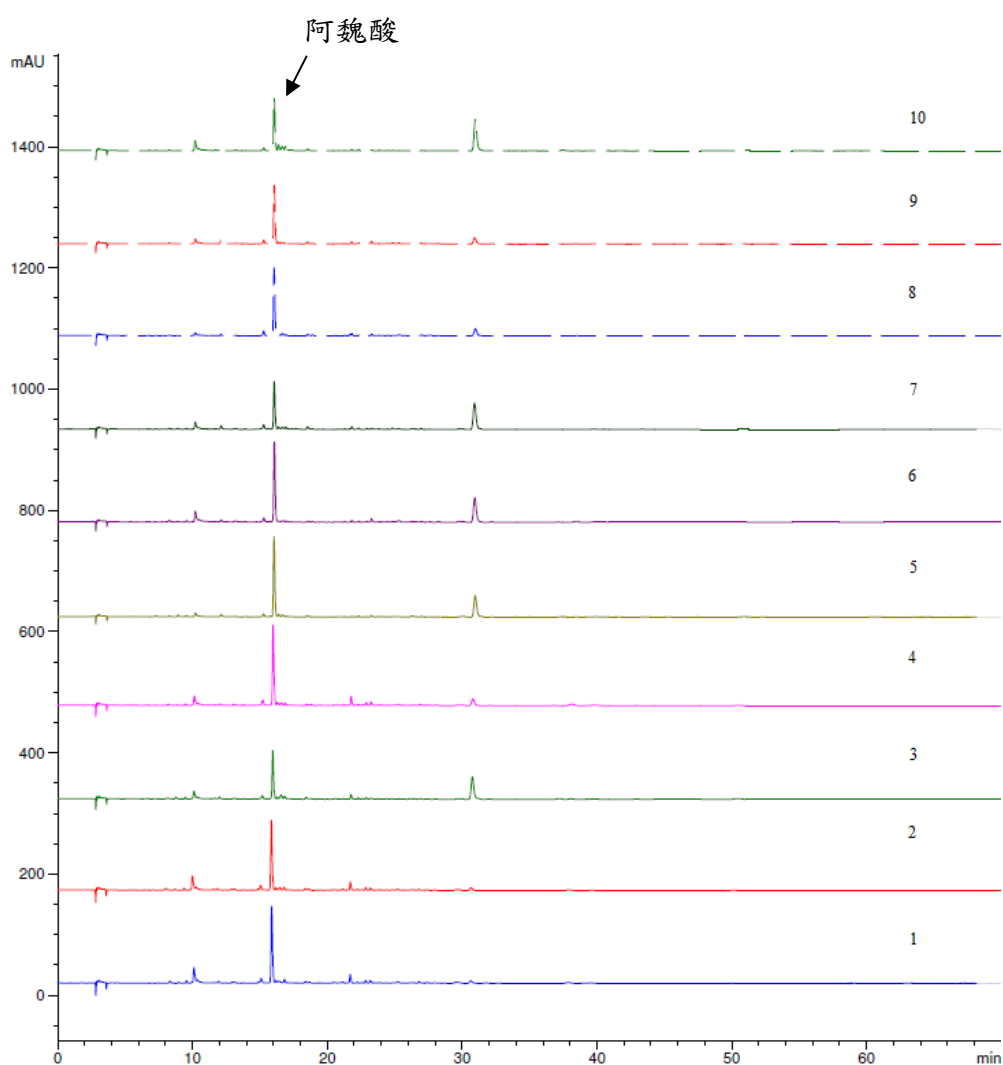
| 藥材編號(No.) | 阿魏酸含量(%)    |
|-----------|-------------|
| 1 (CA1)   | 0.16        |
| 2 (CA2)   | 0.15        |
| 3 (NC)    | 0.14        |
| 4 (NF)    | 0.17        |
| 5 (NJ)    | 0.23        |
| 6 (NJA)   | 0.29        |
| 7 (SC)    | 0.21        |
| 8 (SU1)   | 0.22        |
| 9 (SUB)   | 0.18        |
| 10 (SUC)  | 0.26        |
| 平均值±S.D.  | 0.20 ± 0.05 |

# (十一) 藁本飲片之 HPLC 指紋圖譜的建立

準確稱取 10 批市售藁本飲片檢品粉末約 0.1 g，置 50 mL 離心管中，準確加入甲醇 10 mL，超音波振盪處理(功率 300W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，取上清液，過濾(syringe filter, PTFE 0.45  $\mu$ m)，即得指紋圖譜檢品溶液，取溶液各 10  $\mu$ L 進樣，進行 HPLC 指紋圖譜的測定。

1. 層析管：Agilent ZORBAX SB-C18 Column (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m)
2. 檢測波長：320 nm
3. 管柱溫度：室溫
4. 流速：1.0 mL/min
5. 注入量：10  $\mu$ L
6. 移動相：

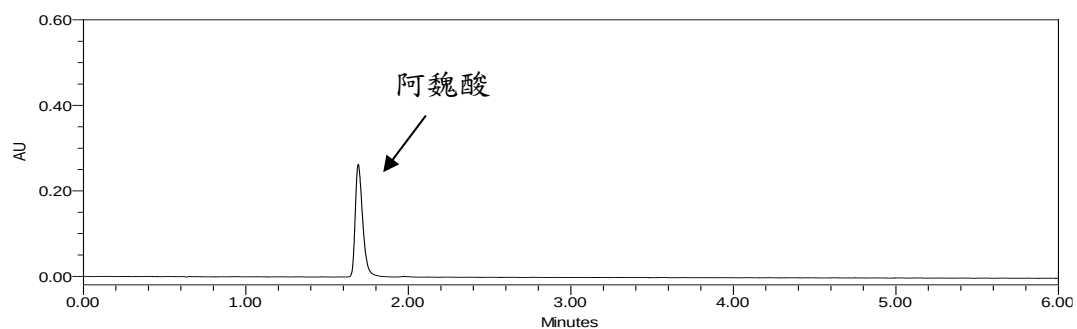
| 時間(min) | 乙腈(%) | 1%乙酸(v/v, %) |
|---------|-------|--------------|
| 0       | 5     | 95           |
| 15      | 30    | 70           |
| 20      | 45    | 55           |
| 70      | 45    | 55           |



圖六、10 批藁本飲片之 HPLC 指紋圖譜

(十二) 標準品阿魏酸之 UPLC 層析

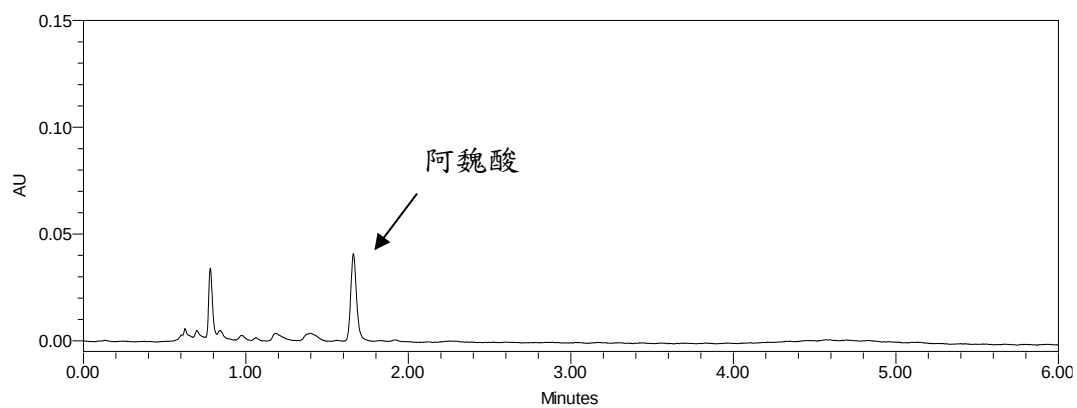
於滯留時間 1.69 分鐘顯示阿魏酸標準品的波峰(圖七)。



圖七、阿魏酸標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售藁本飲片檢品之 UPLC 層析

於滯留時間 1.66 分鐘顯示藁本飲片檢品中阿魏酸的波峰(圖八)。



圖八、市售藁本飲片檢品之 UPLC 層析圖

## 藁本

中文名：藁本

生藥名：LIGUSTICI RHIZOMA ET RADIX

英文名：Jehol Ligusticum Rhizome and Root

基 原：本品為繖形科 Umbelliferae 植物藁本 *Ligusticum sinense* Oliv.之乾燥根莖及根。

### 一、方法

- (一) 檢 品 溶 液   【萃取方法 1】(臺灣中藥典第三版 2018；中華人民共和國藥典 2020)  
——取本品粉末 1.0 g，加乙醇 10 mL，加熱迴流 30 分鐘，放冷後過濾，取濾液作為檢品溶液。  
【萃取方法 2】(香港中藥材標準第六冊) ✓  
——取本品粉末 1.0 g，加乙醇 10 mL，超音波振盪 30 分鐘，過濾，濾液濃縮至乾，殘渣加乙醇 1 mL 使之溶解，作為檢品溶液。  
【萃取方法 3】(自行開發)  
——取本品粉末 1.0 g，加乙醇 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   取阿魏酸(Ferulic acid)對照標準品，加甲醇製成每 1 mL 含  
溶           液   0.5 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 1】(臺灣中藥典第三版 2018；中華人民共和國藥典 2020)  
——正己烷：乙酸乙酯(7：3)  
【展開劑 2】(香港中藥材標準第六冊)  
——正己烷：乙酸乙酯：無水乙酸 (6：3：0.4)  
【展開劑 3】(自行開發) ✓  
——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：1)
- (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   以 10%硫酸乙醇試液(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/EtOH TS)噴霧後，105℃加熱至條帶清晰，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

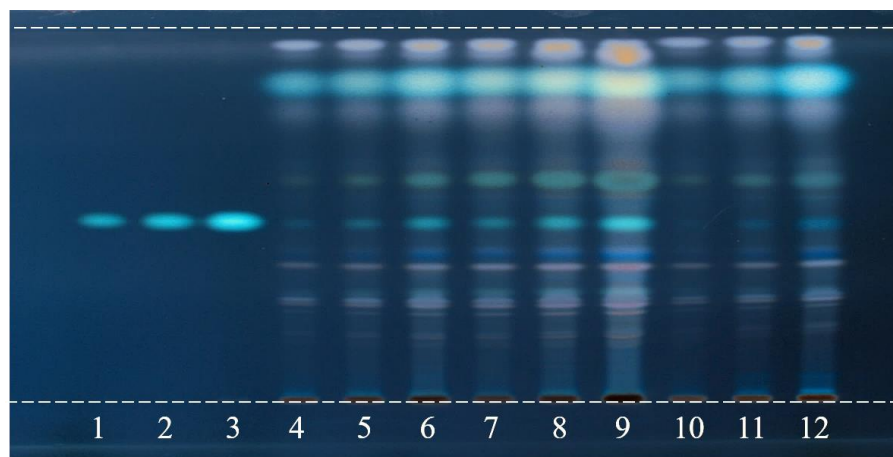
實驗日期：109/11/17

相對溼度(RH)：53%

溫度(RT)：22.6 °C

【展開劑 3】 (自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：1)

—HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出



| 編號         | 名稱              | 含量              |
|------------|-----------------|-----------------|
| 1, 2, 3    | 阿魏酸(0.5 mg/mL)  | 1, 2, 5 $\mu$ L |
| 4, 5, 6    | 檢品溶液 5 【萃取方法 1】 | 1, 2, 5 $\mu$ L |
| 7, 8, 9    | 檢品溶液 5 【萃取方法 2】 | 1, 2, 5 $\mu$ L |
| 10, 11, 12 | 檢品溶液 5 【萃取方法 3】 | 1, 2, 5 $\mu$ 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阿魏酸，依【萃取方法 2】方式，顯示條帶清晰，濃度適中，故採用【萃取方法 2】。

建議點注量：阿魏酸 2  $\mu$ L，檢品溶液【萃取方法 2】2  $\mu$ L。

### 三、溶媒系統選擇

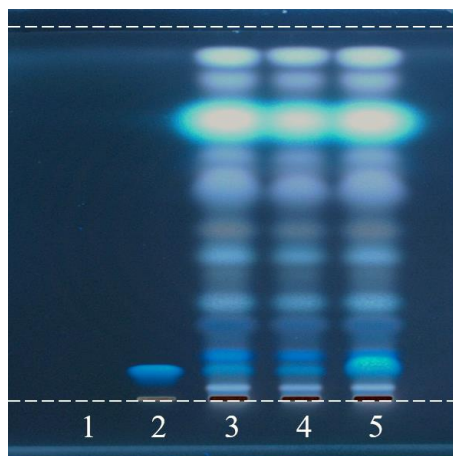
實驗日期：109/11/17

相對溼度(RH)：53%

溫度(RT)：22.6 °C

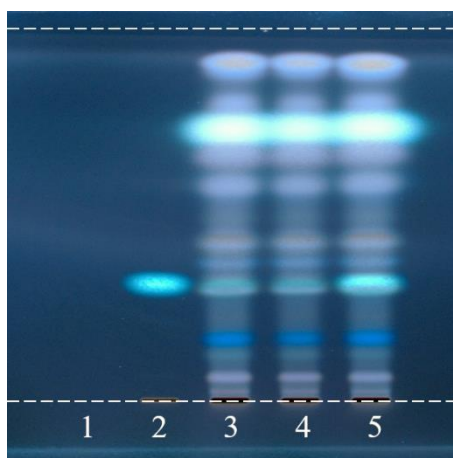
【展開劑 1】(臺灣中藥典第三版 2018；中華人民共和國藥典 2020)——正己烷：乙酸乙酯(7：3)

【萃取方法 2】(香港中藥材標準第六冊)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出(阿魏酸  $R_f$  值為 0.08)



【展開劑 2】(香港中藥材標準第六冊)——正己烷：乙酸乙酯：無水乙酸 (6：3：0.4)

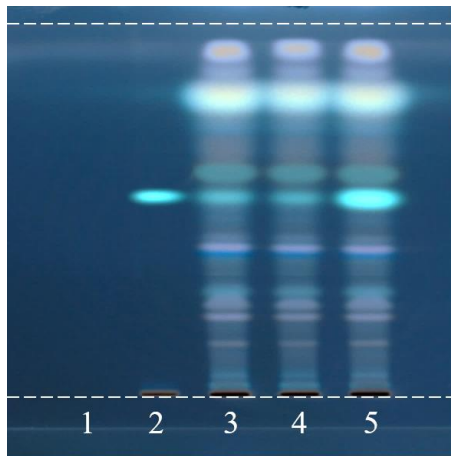
【萃取方法 2】(香港中藥材標準第六冊)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出(阿魏酸  $R_f$  值為 0.32)





【展開劑3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：1) ✓

【萃取方法2】(香港中藥材標準第六冊)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出(阿魏酸  $R_f$  值為 0.54)



1：Blank

2：阿魏酸

3，4：檢品溶液 5

5：Spike

建議溶媒系統：以【萃取方法2】及自行開發之【展開劑3】方式，可觀察之條帶較多，分離效果佳，標準品阿魏酸  $R_f$  值也適中，故採用【展開劑3】為展開溶媒。

#### 四、觀察方式選擇

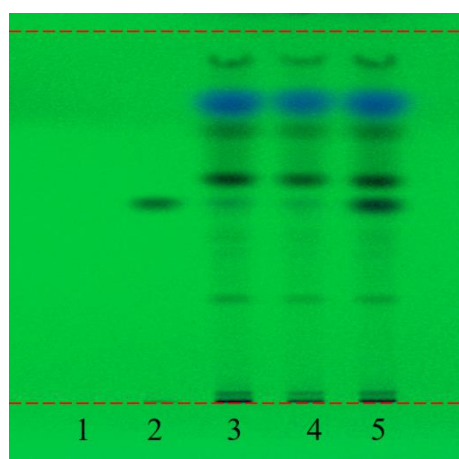
實驗日期：109/11/17

相對溼度(RH)：53%

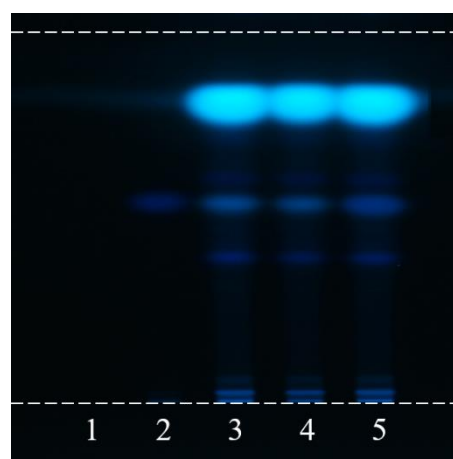
溫度(RT)：22.6 °C

【展開劑 3】 (自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：1)

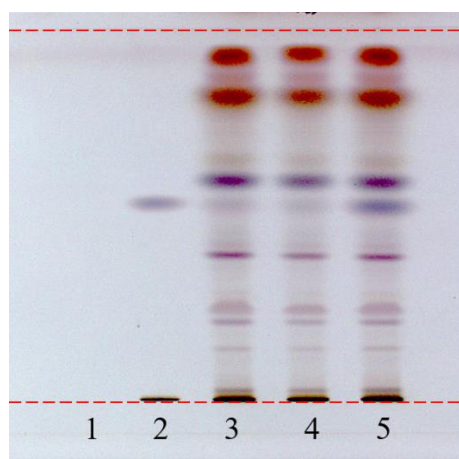
【萃取方法 2】 (香港中藥材標準第六冊) —HPTLC 紫外光(254 nm)檢出



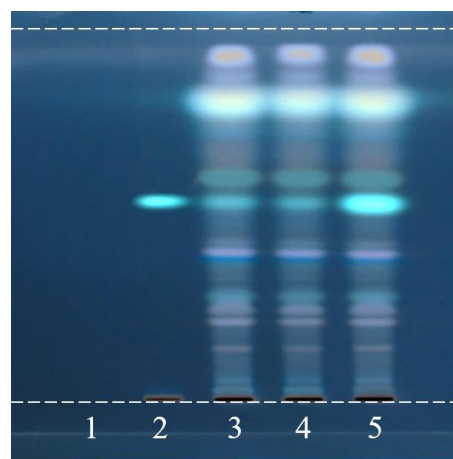
【萃取方法 2】 (香港中藥材標準第六冊) —HPTLC 紫外光(365 nm)檢出



【萃取方法 2】 (香港中藥材標準第六冊) —HPTLC 顯色/可見光檢出



【萃取方法 2】 (香港中藥材標準第六冊) —HPTLC 顯色/紫外光(365 nm)檢出✓



1：Blank

2：阿魏酸

3，4：檢品溶液 5

5：Spike

建議觀察方式：10%硫酸/乙醇顯色後於紫外光(365 nm)，有較明顯分離之條帶。

## 五、十批藁本藥材樣品檢測

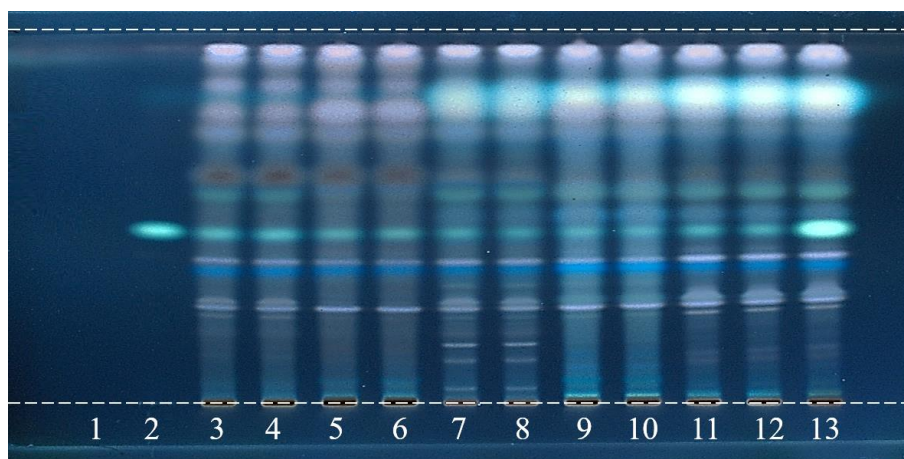
實驗日期：109/11/17

相對溼度(RH)：53%

溫度(RT)：22.6 °C

【展開劑3】(自行開發)——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：1)

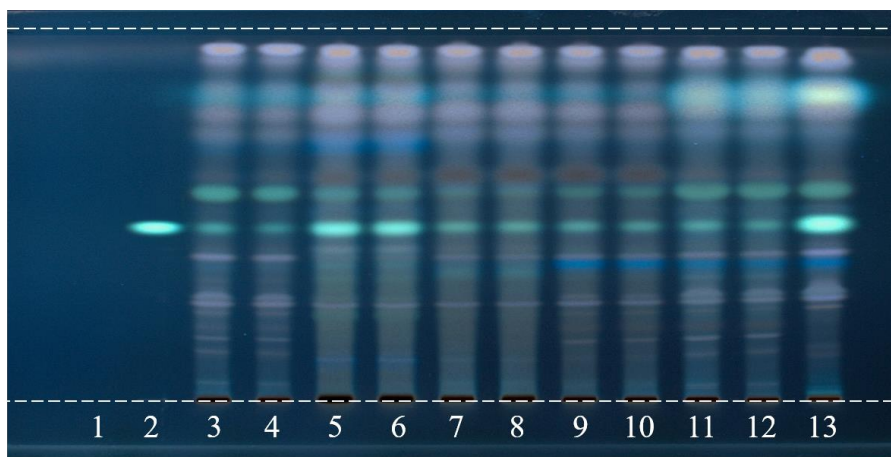
【萃取方法2】(香港中藥材標準第六冊)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出



|       |                |
|-------|----------------|
| 1     | Blank          |
| 2     | 阿魏酸(0.5 mg/mL) |
| 3，4   | 檢品溶液 1 (NR)    |
| 5，6   | 檢品溶液 2 (CAA)   |
| 7，8   | 檢品溶液 3 (CAB)   |
| 9，10  | 檢品溶液 4 (SA)    |
| 11，12 | 檢品溶液 5 (SAA)   |
| 13    | Spike (檢品溶液 5) |

【展開劑 3】（自行開發）——甲苯：乙酸乙酯：甲酸 (6：3：1)

【萃取方法 2】(香港中藥材標準第六冊)——HPTLC 10%硫酸/乙醇顯色後紫外光(365 nm)檢出



|       |                |
|-------|----------------|
| 1     | Blank          |
| 2     | 阿魏酸(0.5 mg/mL) |
| 3，4   | 檢品溶液 6 (SAB)   |
| 5，6   | 檢品溶液 7 (SG)    |
| 7，8   | 檢品溶液 8 (SU2)   |
| 9，10  | 檢品溶液 9 (SUA)   |
| 11，12 | 檢品溶液 10 (SUD)  |
| 13    | Spike (檢品溶液 5) |

結論與建議：以【萃取方法 2】及【展開劑 3】方式，顯示分離與檢出阿魏酸較佳，以 10%硫酸/乙醇顯色後於紫外光(365 nm)下檢視較佳。