

八角蓮

(DYSOSMA VERSIPELLIS (HANCE) M. CHENG)

八角蓮 HPLC	2
一、材料	2
二、儀器及層析管柱	2
三、實驗藥品及試劑來源	2
四、方法	2
五、結果	6
八角蓮 TLC	17
一、方法	17
二、溶媒系統選擇	18
三、觀察方式選擇	19
四、十家樣品檢測	20

八角蓮 (*Dysosma versipellis* (Hance) M. Cheng)

一、材料:

購自於北中南各地中藥店八角蓮藥材共 10 家。

二、儀器及層析管柱

(一) HPLC 儀器及層析管柱

Agilent 1100 series, 包含 Degasser (G1379A)、Quat Pump (G1311A)、DAD (G1315B)、Autosampler (G1329A), Column Oven H-650 (Chrom Tech, TNC.); 層析管柱 Cosmosil 5C18-AR-II (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 x 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。

(二) 標準品

標準品鬼臼毒素(Podophyllotoxin)購自 SIGMA-ALDRICH CO., 純度在 98% 以上。

四、方法

(一) 萃取溶媒開發

取本品粉末七份, 每份精確稱定 1.0 g, 置 125 mL 三角錐形瓶中, 精密加入甲醇、70%甲醇、50%甲醇、乙醇、70%乙醇、50%乙醇、水各 50mL, 超音波震盪處理(功率 200W, 頻率 40kHz) 30 分鐘, 以 NO.1 濾紙過濾至 50 mL 之定量瓶中, 加入溶媒至刻度, 搖勻, 過濾(Syringe filter, 0.45μm), 取濾液, 即得。每針 10 μL 注入高效能液相層析儀(HPLC), 以所測得每克重量之最大峰面積為最佳八角蓮萃取溶媒。

(二) 萃取次數考察

取本品粉末約 1.0 g, 精確稱定, 置 125 mL 三角錐形瓶中, 精確加入 50%乙醇 50 mL, 超音波震盪處理(功率 200 W, 頻率 40 kHz) 30 分鐘, 以 No.1 濾紙過濾至 50 mL 之定量瓶中, 加 50%乙醇至刻度, 搖勻, 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, 直到指標成份被萃取完全, 並選出最佳萃取次數。

(三) 對照標準品溶液

取標準品鬼臼毒素(Podophyllotoxin)精確稱定 10.0 mg, 加甲醇定體積至

10 mL 製成每 1 mL 含 1.0 mg 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)

(四) 檢品溶液

取本品粉末約 1.0 g，精確稱定，置 125 mL 三角錐形瓶中，精確加入 50%乙醇 50 mL，超音波震盪處理(功率 200 W，頻率 40 kHz) 30 分鐘，以 No.1 濾紙過濾至 50 mL 之定量瓶中，加 50%乙醇至刻度，搖勻再過濾(Syringe filter, 0.45 μ m)，即得。

(五) 測定法

分別精確吸取標準品溶液與檢品溶液 10 μ L，注入 HPLC，測定，用標準曲線計算溶液中鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的含量，即得。

(六) 檢量線

精確吸取鬼臼毒素(Podophyllotoxin)標準品儲備溶液各 500, 1000, 2500, 5000, 10000 μ L，以 50%乙醇溶液定體積至 10 mL 配製成含鬼臼毒素(Podophyllotoxin)分別為 50、100、250、500、1000 μ g/mL 的標準品溶液。以上溶液各取 10 μ 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

以鬼臼毒素(Podophyllotoxin)濃度為 1000 μ g/mL 之標準品儲備液連續進樣五針，以鬼臼毒素(Podophyllotoxin)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:取同一家市售八角蓮粉末，依八角蓮檢品溶液製備方法平行製備五份八角蓮檢品溶液，進樣測定，以鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的含量(%)為指標，求出相對標準差。
2. 穩定性:取同一家市售八角蓮粉末，依八角蓮檢品溶液製備方法製備八角蓮檢品溶液，分別在 0、2、4、8、16、24 小時進樣測定，以鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的含量為指標，求出相對標準差。

(九) 同日間與異日間試驗

取 100、250、500 μ g/mL 之鬼臼毒素(Podophyllotoxin)標準品溶液進行同日間測試(intra-day test；在 24 小時內每個濃度重複注射三次)與異日間測試(inter-day test；7 天內注射三次，每次間隔 24 小時以上，每個濃度重複注射三次)，求其相對標準差(R.S.D., %)以評估 HPLC 分析條件之穩定性及再現性。

(十) 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 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。

(十一) 添加回收率試驗

取本品粉末約 1.0 g, 精確秤定三份, 分別加入 5.0、10.0、20.0 mg 的鬼臼毒素(Podophyllotoxin), 並按檢品溶液製備方法製備, 每次取 10 μ L 注入 HPLC, 每個檢測品進行三重複。

(十二) HPLC 分析條件

1. 層析管：Cosmosil 5C18-AR-II (250 × 4.6 mm, 5 μm)
2. 檢測波長：UV 213 nm
3. 流速：1.0 mL/min
4. 管柱溫度：29 °C
5. 注入量：10 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇 (% , v/v)	H ₂ O (% , v/v)
0	50	50
25	50	50
40	65	35
60	65	35

(十三) 臺灣市售八角蓮含量測定

取十家市售八角蓮檢品溶液各 10 μL 注入 HPLC，每個檢測品各三重複，所得平均峰面積依公式計算樣品鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的百分含量。

(十四) UPLC 分析條件

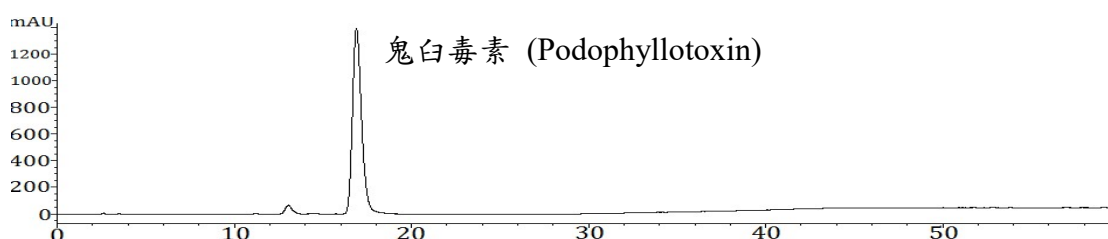
1. 層析管：Waters Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2.1 mm, 1.7 μm)
2. 檢測波長：213 nm
3. 流速：0.4 mL/min
4. 管柱溫度：35 °C
5. 注入量：1 μL
6. 移動相：

時間(min)	甲醇(% , v/v)	H ₂ O(% , v/v)
0	45	55
5	45	55
8	65	35
11	65	35

五、結果

(一) 標準品鬼臼毒素(Podophyllotoxin)之 HPLC 層析

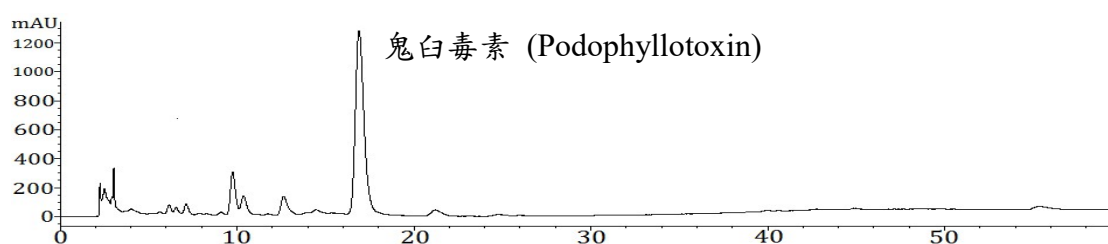
於滯留時間 16.853 分鐘處顯示鬼臼毒素(Podophyllotoxin)標準品波峰。



圖一、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)標準品溶液之 HPLC 圖

(二) 市售八角蓮檢品之 HPLC 層析

於滯留時間 16.872 分鐘處顯示八角蓮檢品中鬼臼毒素(Podophyllotoxin)波峰。



圖二、市售八角蓮檢品之 HPLC 圖

(三) 萃取溶媒開發

以 50%乙醇為溶媒時，每克藥材重量所得鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的峰面積最大，顯示 50%乙醇為最佳萃取溶媒。

表一 不同溶媒萃取比較

溶媒	甲醇	70% 甲醇	50% 甲醇	水
峰面積	20266.64	40917.84	40971.34	12714.94
Rank(1=Best, 7=Worst)	6	4	3	7
溶媒	乙醇	70% 乙醇	50% 乙醇	
峰面積	38474.64	43216.14	44548.04	
Rank(1=Best, 7=Worst)	5	2	1	

(四) 萃取次數考察

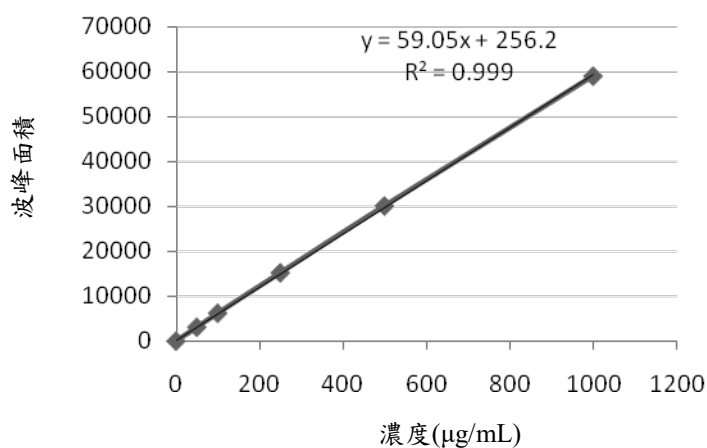
結果顯示萃取一次基本上已將鬼臼毒素(Podophyllotoxin)萃取完全(萃取率大於 98%)

表二 八角蓮檢品萃取次數考察

100% 甲醇萃取 次數	鬼臼毒素(Podophyllotoxin)峰 面積
第一次	43054.34
第二次	521.86
第三次	ND

(五) 標準品鬼臼毒素(Podophyllotoxin)檢量線

經不同濃度鬼臼毒素(Podophyllotoxin) (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 $y = 59.05394x + 256.19423$ ， $R^2 = 0.99988$ ，顯示濃度在 50.0–1000.0 $\mu\text{g/mL}$ 有良好的線性關係。



圖三、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)之檢量線圖

表三 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)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
鬼臼毒素 (Podophyllotoxin)	50.0~1000.0	$Y = 59.05394x + 256.19423$	0.99988

(六) 再現性與精密度試驗

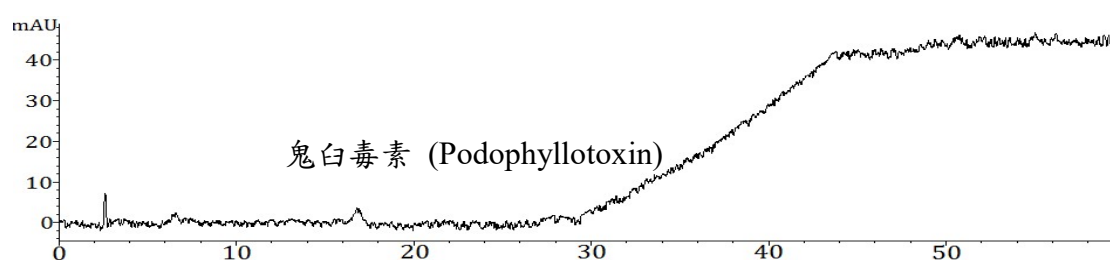
實驗結果顯示，利用 HPLC 定量條件的精密度良好，鬼臼毒素(Podophyllotoxin)精密度之相對標準差為 0.05%，再現性之相對標準差為 0.72%，均在可接受的範圍以內。

(七) 穩定性試驗

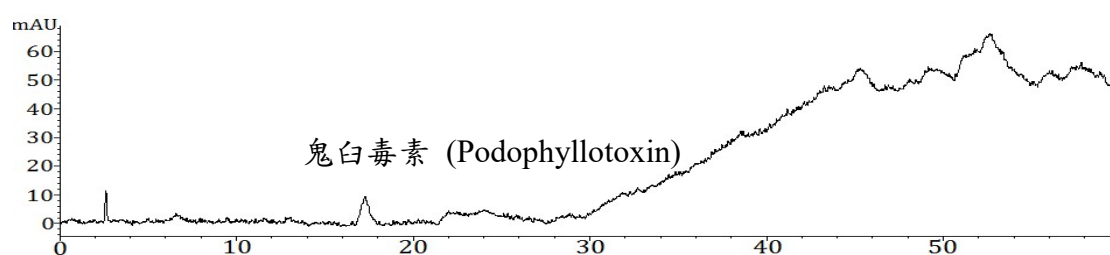
由結果可以得知，鬼臼毒素(Podophyllotoxin)在 24 小時內穩定，相對標準差為 0.31%，變化差異小，若所有樣品處理都在 24 小時內完成，則無太大差異。

(八) 偵測極限與定量極限試驗

鬼臼毒素(Podophyllotoxin)偵測極限(Limit of Detection, LOD)為 2500 ng/mL (圖四)，定量極限(Limit of Quantitation, LOQ)為 5000 ng/mL(圖五)。



圖四、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)之 LOD 層析圖



圖五、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)之 LOQ 層析圖

表四 各項檢驗分析

檢測項目	鬼臼毒素(Podophyllotoxin)	
	濃度	R.S.D. (%)
精密度 (n=5)	1000 µg/mL	0.054
再現性 (n=5)	檢品溶液 (No.3)	0.724
穩定性 (n=6)	檢品溶液 (No.3)	0.308
偵測極限 (n=1)	2500 ng/mL	-
定量極限 (n=1)	5000 ng/mL	-

(九) 日間與異日間試驗

由結果可以得知，鬼臼毒素(Podophyllotoxin)在檢量線之範圍濃度內同日間的相對標準偏差(R.S.D.，%)為 0.14–0.48%，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；異日間的相對標準偏差為 0.29–0.99%。

表五 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)同日間與異日間試驗

對照標準品	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	同日間 (n=3) mean $\pm$ RSD	異日間 (n=3) mean $\pm$ RSD
鬼臼毒素	100.0	100.58 $\pm$ 0.48	99.21 $\pm$ 0.99
(Podophyllotoxin)	250.0	253.88 $\pm$ 0.14	252.49 $\pm$ 0.29
	500.0	505.14 $\pm$ 0.14	499.57 $\pm$ 0.81

(十) 回收率試驗

鬼臼毒素(Podophyllotoxin)平均回收率 94.56%，相對標準偏差 1.50%。

表六 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)添加回收率試驗

編號	藥材稱重 (g)	含有量 (mg/g)	加入量 (mg)	測得量 (mg/g)	回收率 (%)	平均回收率(%)	R.S.D. (%)
1	1.000	37.85	5.0	42.50	92.82	94.56	1.50
2	1.000	37.85	10.0	47.48	96.30		
3	1.000	37.85	20.0	56.77	94.57		

(十一) 臺灣市售八角蓮中鬼臼毒素(Podophyllotoxin)含量測定

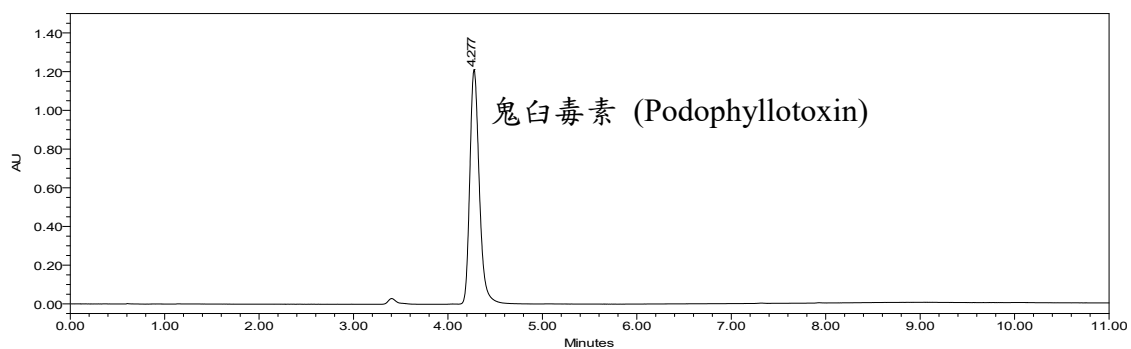
10 家八角蓮藥材之含量測定結果(乾燥品)，藥材中鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的含量為 4.252–0.535%。

表七、臺灣市售八角蓮檢品之鬼臼毒素(Podophyllotoxin)含量

中藥店編號 (No.)	鬼臼毒素(Podophyllotoxin) 含量(%)
1	4.252
2	3.955
3	3.785
4	3.540
5	3.524
6	3.403
7	2.958
8	2.931
9	0.604
10	0.535

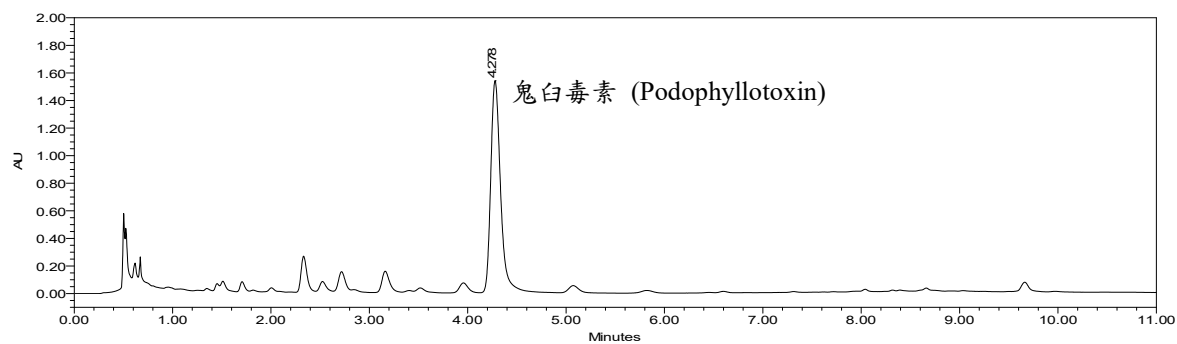
(十二) 標準品鬼臼毒素(Podophyllotoxin)之 UPLC 層析

結果如圖六所示鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的滯留時間為 4.277 分鐘。



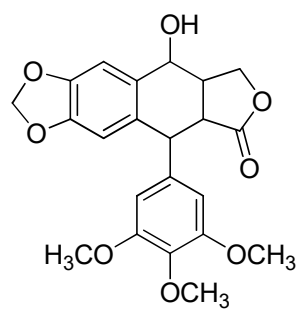
圖六、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)標準品溶液之 UPLC 層析圖

(十三) 市售八角蓮檢品之 UPLC 層析



圖七、市售八角蓮檢品之 UPLC 層析圖

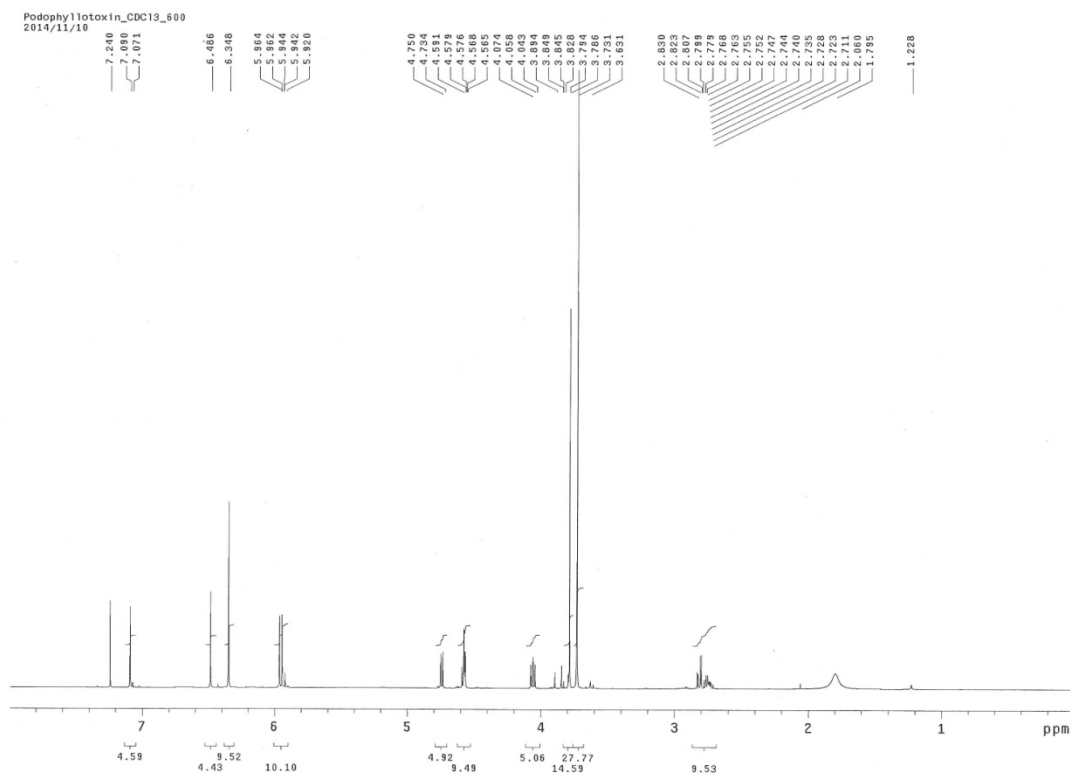
(十四) 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的結構



鬼臼毒素(Podophyllotoxin)

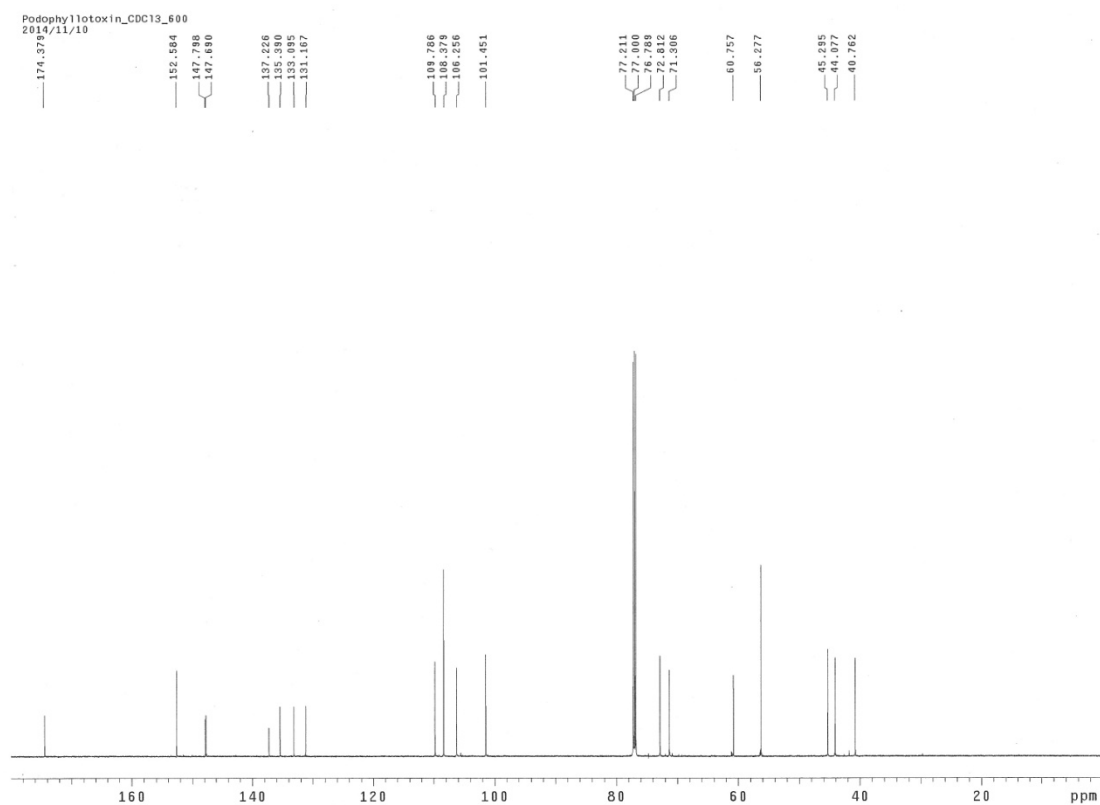
圖八、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的結構

(十五) 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 ^1H NMR 圖譜



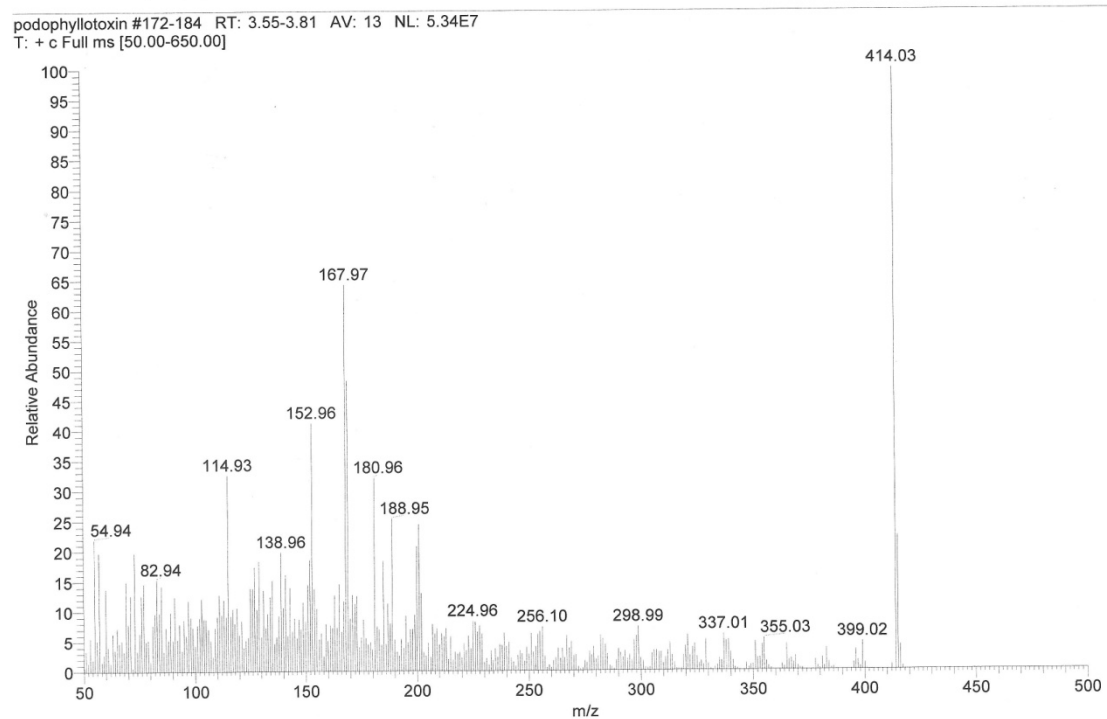
圖九、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 ^1H NMR 圖譜

(十六) 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 ^{13}C NMR 圖譜



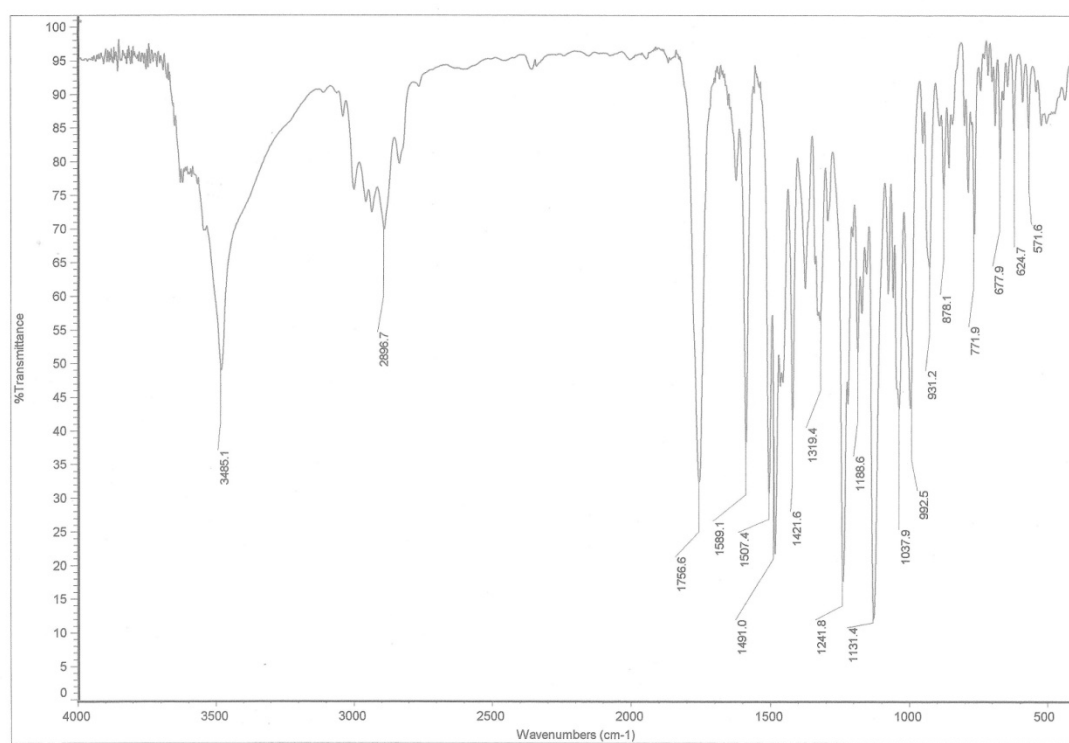
圖十、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 ^{13}C NMR 圖譜

(十七) 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 ESI-MS 圖譜



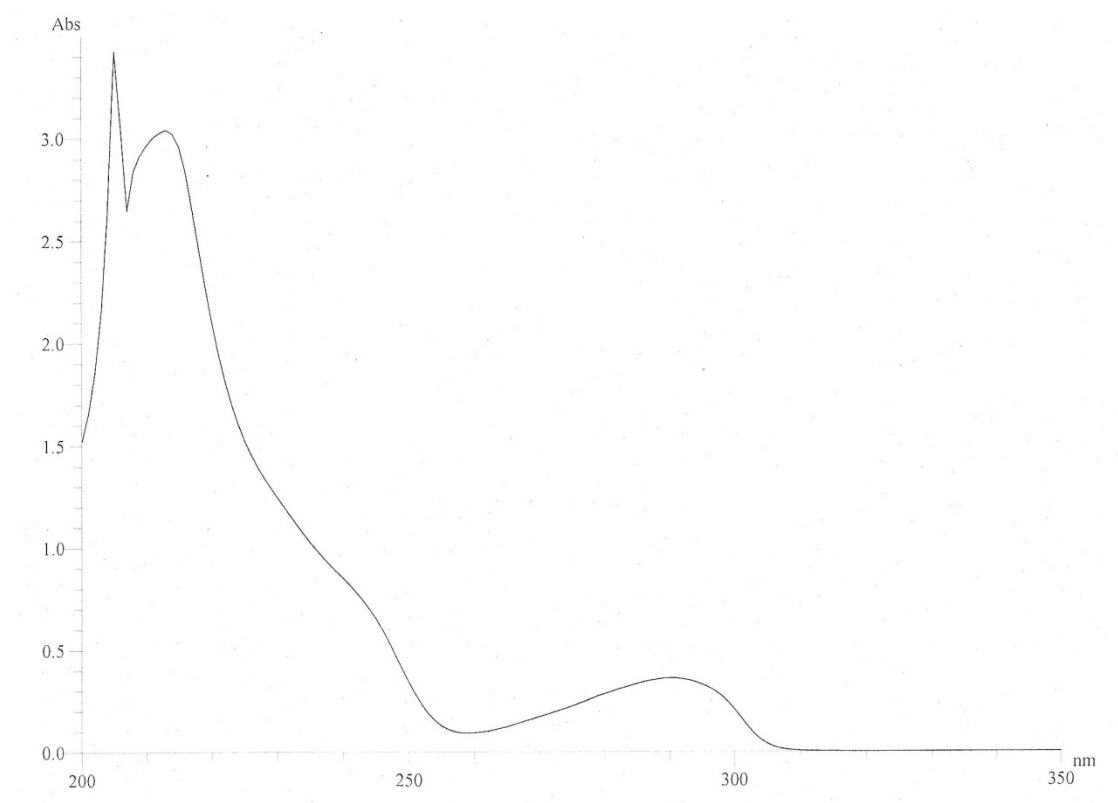
圖十一、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 ESI-MS 圖譜

(十八) 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 FTIR 圖譜



圖十二、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 FTIR 圖譜

(十九) 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 UV 圖譜

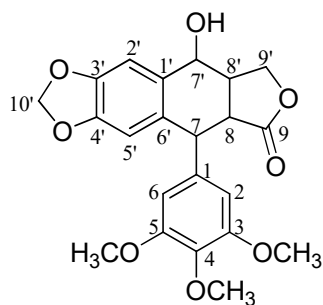


圖十三、鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的 UV 圖譜

(二十) 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的分子式、分子量與熔點

分子式： $C_{22}H_{22}O_8$ Mol. Wt.: 414.41 mp: 184°C

(二十一) 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的氫、碳化學位移



表八 鬼臼毒素(Podophyllotoxin)的氫、碳化學位移(CDCl₃)^a

position	δ_H (500 MHz)	δ_C (125 MHz)
1		135.4
2	6.35 (s)	108.4
3		152.6
4		137.2
5		152.6
6	6.35 (s)	108.4
7	4.58 (m)	44.1
8	2.81 (dd, 4.8, 14.1)	45.3
9		174.4
1'		133.1
2'	7.09 (s)	106.3
3'		147.7
4'		147.8
5'	6.49 (s)	109.8
6'		131.2
7'	4.74 (d, 9.6)	72.8
8'	2.75 (m)	40.8
9'	4.06 (t, 9.6); 4.58 (m)	71.3
10'	5.94 (d, 1.2); 5.96 (d, 1.2)	101.5
3-OCH ₃	3.73 (s)	56.3
4-OCH ₃	3.79 (s)	60.8
5-OCH ₃	3.73 (s)	56.3

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

八角蓮

中文名：八角蓮

生藥名：Dysosmae Rhizoma et Radix

英文名：Dysosmatis Rhizome and Root

基 原：本品為小蘗科 *Berberidaceae* 植物八角蓮 *Dysosma pleiantha* (Hance) Woodson 的根及莖。

一、方法：

(一) 檢品溶液 【萃取方法 1】(自行開發)

——取藥材粉末 1.0 g，加入甲醇 10 ml，超音波震盪 15 分鐘，

過濾，加甲醇至 10 ml。

(二) 對照標準品 取鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 對照品，加甲醇製成每 1 mL 含 1 mg 的溶液，作為對照品溶液

(八) 薄層板 TLC silica gel 60 F₂₅₄，2 cm× 6.6 cm
HPTLC silica gel 60 F₂₅₄，10 cm× 10 cm

(三) 展開劑 【展開劑 1】(中醫藥年報)

——正己烷：丙酮：乙酸乙酯：醋酸 (6.5:2.5:1:0.1)

【展開劑 2】(自行開發)

——正己烷：丙酮 (1.2:1)

(四) 展開槽 20 cm× 20 cm

(五) 展開 展開槽預先平衡 5 分鐘，上行展開。

(六) 顯色&檢視 於紫外光 (254nm) 下檢視。

二、溶媒系統選擇：

【展開劑 1】（中醫藥年報）——正己烷：丙酮：乙酸乙酯：醋酸 (6.5:2.5:1:0.1)

【萃取方法 1】（自行開發）——TLC 紫外光(254nm)檢視



【展開劑 2】（自行開發）——正己烷：丙酮 (1.2:1)

【萃取方法 1】（自行開發）——TLC 紫外光(254nm)檢視



standard：鬼臼毒素（podophyllotoxin）

NF：Sample NF

Spike：Spike

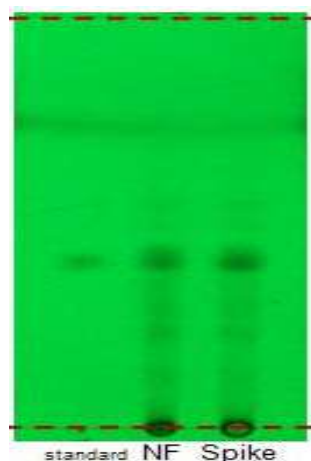
以【萃取方法 1】萃取，採用自行開發之溶媒系統【展開劑 2】展開，其結果經【展開劑 1】比較：斑點 R_f 值較高，分離效果亦佳。

三、觀察方式選擇：

【展開劑 2】（自行開發）——正己烷：丙酮 (1.2:1)

【萃取方法 1】（自行開發）

TLC 紫外光(254nm)檢出



【萃取方法 1】（自行開發）

TLC 紫外光(366nm)檢出



【萃取方法 1】（自行開發）

TLC 10%硫酸甲醇呈色/可見光檢出



【萃取方法 1】（自行開發）

TLC 10%硫酸甲醇呈色/紫外光(366nm)檢出



standard：鬼臼毒素（podophyllotoxin）

NF：Sample NF

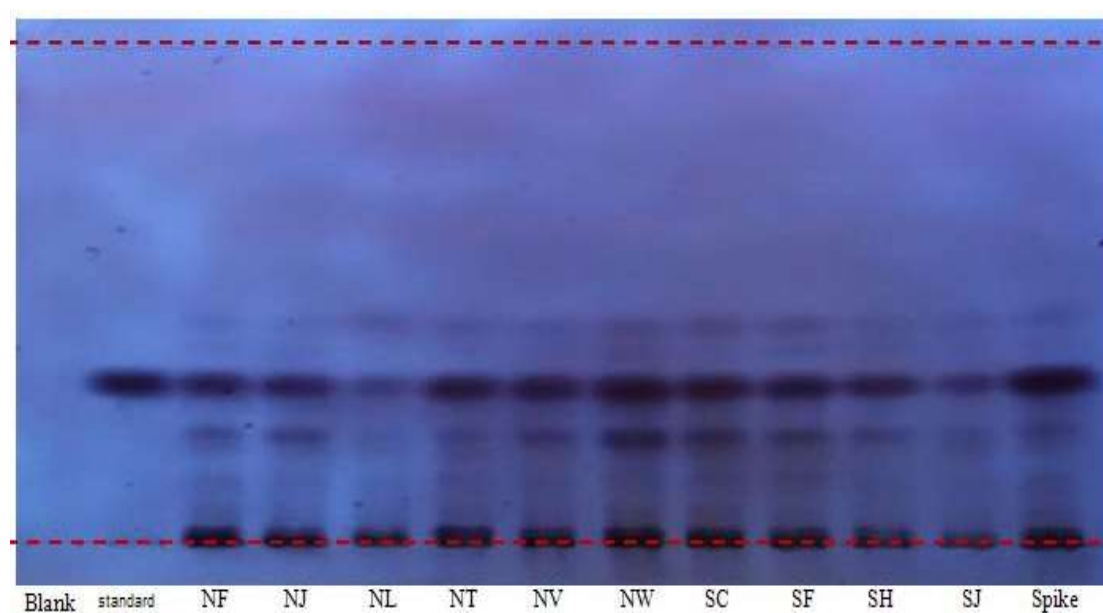
Spike：Spike

以【展開劑 2】（自行開發）的溶液展開，於紫外光（254nm）下檢出，顯示 1 個較明顯之成分主點。但經 10%硫酸甲醇呈色後在紫外光或可見光下檢出，比較未呈色成分主點顯示較單清楚，因此在 10%硫酸甲醇呈色/紫外光（366nm）檢出。

四、十家樣品檢測：

【展開劑 2】（自行開發）——正己烷：丙酮（1.2:1）

【萃取方法 1】（自行開發）——TLC 10%硫酸甲醇呈色/紫外光(366nm) 檢出



Blank	Blank
standard	鬼臼毒素 (podophyllotoxin) (1 mg/mL)
NF	Sample NF
NJ	Sample NJ
NL	Sample NL
NT	Sample NT
NV	Sample NV
NW	Sample NW
SC	Sample SC
SF	Sample SF
SH	Sample SH
SJ	Sample SJ
Spike	Spike