

藥物食品檢驗局調查研究年報9:152-158,1991
Ann. Rept. NLFD Taiwan R.O.C. 9:152-158,1991

市售芍藥製劑中PAEONIFLORIN之含量測定

盧芬鈴 林隆達 溫國慶

第三組

摘要

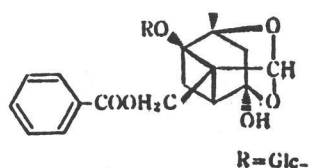
利用高效液相層析法，針對市售含芍藥製劑—小青龍湯及芍藥甘草湯、以水為抽取溶媒，測定paeoniflorin含量情形，以層析管：Nova-pak C₁₈(3.9mm I.D.×150mm)，移動相：1%醋酸水溶液：乙腈(=85：15)，流速：1.0ml/min，檢測波長：UV232nm，抽購市售製劑小青龍湯共計56件，paeoniflorin含量範圍：0.20~1.14%，芍藥甘草湯共計35件，paeoniflorin含量範圍：ND~5.24%。

關鍵語：paeoniflorin、小青龍湯、芍藥甘草湯、HPLC。

前言

近年來中藥製劑使用日漸普遍，中藥之管理及檢驗方法開發也益見重要。然中藥製劑大都為多種藥材組成，成分種類相當複雜且又受到產地、採收時期等等因素影響成分含量往往差異極大，品質評估相當困難，為求品質管制之合理化，期以高效液相層析法選擇特定有效成分作為製劑含量均一性的參考指標。

芍藥(Paeoniae Radix)藥材主成分paeoniflorin(如圖一)，據文獻記載具有解痙、鎮靜等與其藥材相似療效之功用¹⁻³，且其性質具備：一、易溶於水。二、對熱安定。三、不揮發性等特性，適於作為廠商實施品質管制含量測定之指標成分。本實驗對象選定兩種常用中藥處方：一、小青龍湯於傷寒論和金匱要略中均有記載，中醫臨床用以治療感冒、咳嗽及支氣管炎等症狀⁴、二、芍藥甘草湯載於傷寒論，用於肌肉痙攣、疼痛等症狀。為了解目前中藥品質管制情形，抽購此二種常用製劑，以高效液相層析法⁵測定其paeoniflorin含量，以比較該二製劑之品質差異情形。



圖一 Paeoniflorin 構造式

材料與方法

一、儀器及器具：

(一) 高效液相層析儀：

市售芍藥製劑中PAEONIFLORIN之含量測定

1. 溶媒輸送系統: Gilson HPLC pump: Model 303
2. 層析管: Nova-pak C₁₈, (3.9mm i.d. × 150mm), 4μm, Waters。
3. 紫外線檢出器: Gilson Holochrome UV / VIS detector
4. 資料處理機: Gilson Model 602

(二) 超音波振盪器: Sonorex RK 1028H

(三) Milli-Q water purification system (Millipore Corp.)

(四) Membrane filter: Millipore SLHV, 0.45 μm。

二、標準品及試藥:

(一) 對照用標準品:

paeoniflorin, HPLC級, 純度: 98% 以上, 日本半井化學株式會社。

(二) 溶媒: 甲醇、乙腈(均L.C.級); 醋酸(U.P.級) 皓峰公司。

三、檢體:

於民國77年10月~78年2月間陸續購自北、中、南部各藥局, 合計小青龍湯: 8家廠牌30批次共56件; 芍藥甘草湯: 8家廠牌16批次共35件, 總計91件。

四、實驗步驟:

(一) 標準溶液配製: 精取paeoniflorin適當量溶於甲醇配製成0.5, 0.25, 0.125, 0.0625及0.03125mg/ml五種濃度溶媒, 並分別以membrane filter過濾後供作標準品溶液。

(二) 移動相配製: 取乙腈, 1% 醋酸水溶液分別以Milli-Q減壓過濾後, 臨用前置超音波浴振盪15分鐘後使用。

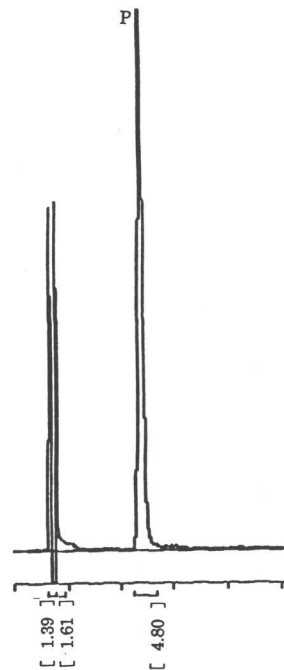
(三) 回收率測定溶液之配製: 精取同一檢品約500mg 5份分置三角瓶中, 其中四瓶各加經粉碎過篩(60號)且已知paeoniflorin含量之芍藥藥材50, 100, 150, 200mg, 各加水約20ml以超音波振盪器加熱50°C振盪抽取20分鐘後抽氣過濾, 殘渣重覆上述抽取步驟一次, 合併抽出液加水定容至50ml, 取5ml以membrane filter過濾供作檢液。

(四) 檢品溶液之配製: 精取各檢體約500mg, 各加水約20ml以超音波振盪器加熱50°C振

盪抽取20分鐘後抽氣過濾, 其餘同回收率測定溶液之配製法操作。

(五) 高效液相層析條件:

1. 層析管柱: Nova-Pak C₁₈, 4μm, (3.9mm i.d. × 150mm)。
2. 移動相: 1% 醋酸水溶液: 乙腈 = 85:15
3. 檢出器: UV 232nm; 靈敏度: 0.2 a.u.
4. 流速: 1.0ml/min
5. 記錄紙速度: 5mm/min
6. 注入量: 標準品溶液及小青龍湯溶液各10 μl; 芍藥甘草湯溶液5 μl。



圖二 paeoniflorin 之HPLC圖譜

P: paeoniflorin

高效液相層析條件:

層析管柱: Nova-Pak C₁₈, 4μm, (3.9mm i.d. × 150mm).

移動相: 1% 醋酸水溶液: 乙腈 = 85:15.

檢出器: UV 232nm; 靈敏度: 0.2 a.u.

流速: 1.0ml/min.

記錄紙速度: 5mm/min.

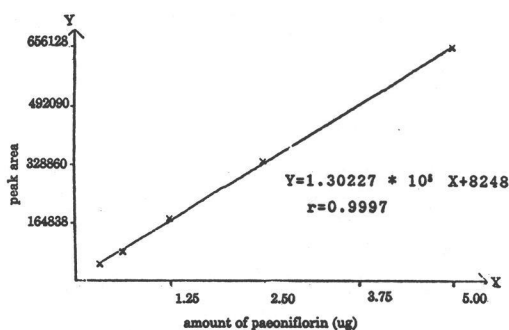
結果與討論

- 一、將五種濃度0.5, 0.25, 0.125, 0.0625及0.03125mg/ml之標準品溶液, 分別依序注入HPLC儀各三次, 每次10 μ , paeoniflorin之滯留時間約為4.8分鐘(如圖二), 且無其他雜訊, 以吸收峰面積為縱座標, 注入量為橫座標, 結果繪成標準曲線圖(如圖三), 由圖顯示呈現良好之線性關係, 並以統計學方法求出標準曲線之線性迴歸方程式, $Y=1.30227 \cdot 10^5 X+8248$ $r=0.9997$ 。
- 二、由於paeoniflorin屬中高極性化合物, 由報告得知水為最佳抽取溶媒⁶, 且迴流抽取與超音波振盪抽取結果相近, 是以本實驗以水當抽取溶媒且以超音波振盪器加熱50 $^{\circ}$ C抽取20分鐘2次後, 另殘渣再以水20ml同法抽取一次, 過濾後取此濾液10 μ l注入HPLC儀, 發現Peak已相當矮小, 故抽取次數定為二次。
- 三、回收實驗添加已知成分含量藥材從50mg到200mg, 因在中藥製劑中藥材間成分之相互作用情形目前仍不甚明瞭, 添加單一成分到製劑內是否會與其他成分相互作用而影響回收率則不得知, 是以製劑中之回收率實驗應當以添加已知成分含量藥材為妥, 本實驗所使用之製劑檢體paeoniflorin含量為1.12%, 所添加之芍藥含量為2.69%, 經測定結果回收率在94.07-98.17%間, 平均回收率亦在96.25%, 此結果於定量試驗中堪稱良好。(如表一)。
- 四、市售製劑小青龍湯、芍藥甘草湯所含之paeoniflorin以本定量條件分析得到相當良好的分離效果(如圖四、五), 小青龍湯抽購四種劑型: 濃縮散劑paeoniflorin含量範圍0.34-1.02%, 濃縮顆粒劑含量0.48-1.14%, 錠劑0.20-0.41%, 粉末劑0.40-0.59%; 芍藥甘草湯抽購二種劑型: 濃縮散劑paeoniflorin含量範圍: 1.53-5.24%, 濃縮顆粒劑含量ND-5.01%, 以此結果(如表二、三)可看出: 除芍藥甘草湯一件濃縮顆粒劑paeoniflorin含量為未檢出外, 劑型間差異濃縮

散劑及濃縮顆粒劑間paeoniflorin含量無顯著差異, 此未檢出之濃縮顆粒劑, 以外觀看較其他同製劑為深黑, 且全無香氣, 懷疑可能是加工過程影響所致。

本次定量之此二市售製劑中同廠同劑型同批號paeoniflorin含量差異不大, 顯示其均一性良好, 同廠不同批號間差異較為明顯, 小青龍湯同劑型paeoniflorin含量相差約1.9倍, 不同劑型相差至2.4倍, 芍藥甘草湯同劑型相差約1.1倍, 不同劑型相差至2.2倍, 而不同廠間小青龍湯含量0.2-1.14%, 上下相差約4.7倍, 芍藥甘草湯含量從ND-5.24%, 除含量一件為未檢出, 無法檢測其含量外, 其餘上下相差約2.4倍。

在本次實驗中發現市售芍藥甘草湯之處方, 芍藥與甘草比例皆固定為1:1, 與傷寒論⁷記載相同, 而小青龍湯於傷寒論⁷與金匱要略⁸中記載之處方比例相同(如表四), 而於各家廠牌處方標示則多有不同, 所標示芍藥比例則從1/11~1/7不等, 顯示市售小青龍湯處方比例相當紊亂, 此現象在其他市售製劑亦可能發生, 由於處方中藥材比例不同將會影響指標成分含量, 且藥效不穩定, 日後於建立中藥指標成分定量時, 應先將處方統一問題納入管理。

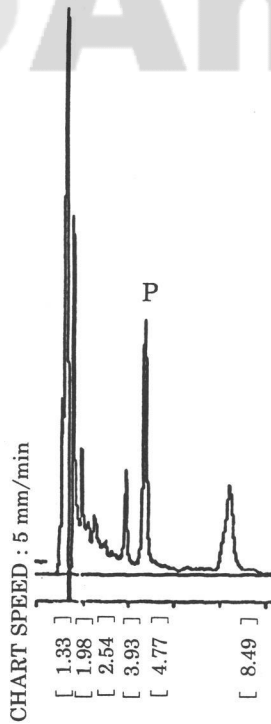


圖三 Paeoniflorin 之標準曲線圖

另外抽購之檢體中, 小青龍湯有1件未標示製造日期及批號; 芍藥甘草湯有一家廠牌4

市售芍藥製劑中PAEONIFLORIN之含量測定

Angle



圖四 小青龍湯HPLC圖譜

高效液相層析條件：

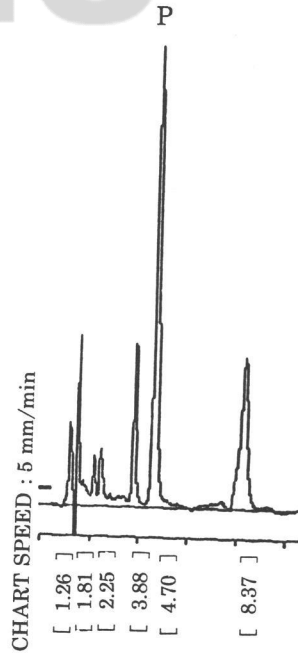
層析管柱：Nova-Pak C 18，4 μ m，
(3.9mm i.d. * 150mm).

移動相：1%醋酸水溶液；乙腈=85：15.

檢出器：UV 232nm；靈敏度：0.2 aufs.

流速：1.0ml/min.

記錄紙速度：5 mm/min.



圖五 芍藥甘草湯HPLC圖譜

高效液相層析條件：

層析管柱：Nova-Pak C 18，4 μ m，
(3.9mm i.d. * 150mm).

移動相：1%醋酸水溶液；乙腈=85：15.

檢出器：UV 232nm；靈敏度：0.2 aufs.

流速：1.0ml/min.

記錄紙速度：5 mm/min.

表一 檢體中paeoniflorin之回收率測定結果

檢體取量 (mg) 含paeoniflorin量 (mg)	芍藥添加量 (mg) 含paeoniflorine量 (mg)	paeoniflorin測出量 (mg)	回收率 (%)
503 (2.41)	—	2.41	—
505 (2.42)	52 (1.40)	3.73	94.07
507 (2.43)	101 (2.72)	5.07	97.06
505 (2.42)	153 (4.12)	6.36	95.70
508 (2.44)	200 (5.38)	7.72	98.17

平均回收率：96.25%

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)



表二 市售小青龍湯paeoniflorin含量測定結果

廠家	劑型	批次	件數	paeoniflorin 含量範圍(%)
壹	P	I	2	0.42 ; 0.47
壹	P	II	1	0.56
壹	G	I	3	0.48 ; 0.49 ; 0.53
壹	G	II	1	0.49
壹	T	I	1	0.20
壹	T	II	1	0.41
貳	P	I	2	1.01 ; 1.02
貳	P	II	1	0.71
貳	G	I	2	0.71 ; 0.75
貳	G	II	2	0.65 ; 0.71
貳	G	III	1	0.63
參	P	I	3	0.86 ; 0.92 ; 0.95
參	G	I	3	0.71 ; 0.83 ; 0.87
參	G	II	1	1.11
肆	P*	I	3	0.58 ; 0.58 ; 0.59
肆	P*	II	2	0.40 ; 0.43
肆	P*	III	1	0.48
伍	P	I	3	0.82 ; 0.83 ; 0.85
伍	G	I	1	0.77
陸	P	I	1	0.34
陸	P	II	2	0.46 ; 0.48
陸	P	III	2	0.93 ; 0.97
陸	G	I	3	0.83 ; 0.85 ; 0.86
陸	G	II	2	1.13 ; 1.14
柒	P	I	1	0.41
柒	G	I	1	0.71
柒	P	I	4	0.82 ; 0.82 ; 0.87 ; 0.97
柒	P	II	4	0.55 ; 0.56 ; 0.56 ; 0.58
柒	P	III	1	0.47
柒	G	I	1	0.56
合計		56	56	0.20 - 1.14

P: 濃縮散劑 G: 濃縮顆粒 T: 錠劑 P*: 粉末劑

件均未標示製造日期、批號及處方,另一廠牌四件處方內僅標示芍藥浸膏量而無藥材量,標示不完整者約佔1/10,顯示目前市

售中藥製劑除了指標成分含量差異大、處方內容不統一外,其外觀之標示仍不夠完整,有待改進。

市售芍藥製劑中PAEONIFLORIN之含量測定

表三 市售芍藥甘草湯paeoniflorin 含量測定結果

廠家	劑型	批次	件數	paeoniflorin 含量範圍(%)
壹	P	I	2	2.57 ; 2.61
壹	P	II	1	1.93
貳	P	I	1	3.71
貳	G	I	1	2.70
貳	G	II	2	2.64 ; 0.95
參	P	I	3	1.53 ; 1.57
參	G	I	1	2.38
參	G	II	2	4.28 ; 4.96
肆	P	I	4	2.21 ; 2.88
肆	P	II	1	2.62
肆	P	--	3	2.56 ; 2.67 ; 2.87
肆	G	--	1	ND
伍	P	I	3	4.36 ; 4.73 ; 4.84
伍	G	I	1	5.01
伍	G	II	2	4.82 ; 4.87
陸	P	I	1	2.73
陸	P	II	2	4.43 ; 4.58
柒	P	I	4	4.95 ; 4.99 ; 5.01 ; 5.24
合計		16	35	ND-5.24

-- : 無批號標示 ND : 未檢出

表四 傷寒論及金匱要略記載之小青龍湯處方

藥材	重量	藥材	重量
麻黃(去節)	3兩	甘草(炙)	3兩
芍藥	3兩	桂枝(去皮)	3兩
細辛	3兩	五味子	半升
乾薑	3兩	半夏(洗)	半升

參考文獻

1. 高木敬次郎, 原田正敏. 1969. 日本藥學雜誌. 89:879-886, 887-892, 893-898.
2. Shibata, S. and Nakahara, M. 1963. Chem. Pharm. Bull. 11:372-377.
3. Shibata, S., Nakahar, M. and Aimi, N. 1963. Chem. Pharm. Bull. 11:379-385.
4. 許鴻源, 許照信. 1980. 常用漢方方劑圖解. P.22-23, P.70-71. 新醫藥出版社.
5. 淺川直樹, 服部禎一, 上山政語, 篠田愛信, 三宅康夫. 1979. 日本藥學雜誌. 99:598-601.
6. 赤田良信, 河野貞子, 棚瀨彌一郎. 1980. 日本藥學雜誌. 100:958-961.
7. 何志峰. 1972. 傷寒論解說. p.116, p.130-131. 國立中國醫藥研究所.
8. 楊向輝. 1986. 金匱要略注釋. P154. 國立編譯館。

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

Angle

DETERMINATION OF PAEONIFLORIN IN CHINESE MEDICINAL PREPARATIONS BY HPLC

FEN-LING LU, LONG-DAR LIN AND KUO-CHING WEN

DEVISION OF PHARMACOGNOSY

ABSTRACT

Paeoniflorin in traditional Chinese medicinal preparations containing paeony root was determined by HPLC. Water extracts from preparations were assayed on a reversed phase column with a mobile phase of 0.1% aqueous acetic acid/ acetonitrile (85:15) at flow rate of

1.0 ml/min and by a detector at wavelength of 232 nm.

The results showed that paeoniflorin contains in 56 samples of sheau-ching-long-tong were found to be 0.20-1.14% and in 35 samples of shaur-yaw-gan-tsao-tang were found to be ND-5.24%.