

## 中藥成分對照標準品之標定與供應-Berberine chloride

徐雅慧 陳思慧 劉芳淑 劉宜祝 林哲輝 羅吉方

研究檢驗組

### 摘要

中草藥品質評估試驗中，用於檢驗分析比對之中藥成分對照標準品，因缺乏公認之標準，其品質參差不齊。本計畫依前所建立之「中藥成分對照標準品實驗室間共同比對試驗機制」模式，除本局外，邀請其他6個實驗室共同參與試驗，進行氯化小蘗鹼(Berberine chloride)檢品原料之各項理化學共同試驗。彙整7個實驗室之試驗結果，UV光譜最大吸收波長 $\lambda_{\max} = 227.8, 263.0, 344.6, 421.2 \text{ nm}$ ，比吸光度 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 821.8, 796.7, 724.5, 154.8$ 。IR光譜吸收位置在2846, 1634, 1567及1506  $\text{cm}^{-1}$ 具有Berberine chloride特有之吸收。高效液相層析檢測結果，7個參與實驗室分別檢出3~8個微量不純物，其不純物之含量均 $\leq 0.41\%$ ，總不純物之含量亦均 $\leq 0.52\%$ 。以上數據顯示，本批氯化小蘗鹼檢品原料，其品質應可做為氯化小蘗鹼對照標準品。本計畫除供應具有公認品質基礎之中藥成分對照標準品外，亦建立未來供應中藥成分對照標準品之品管模式，使中藥成分對照標準品品質邁向國際水準。

**關鍵詞：**氯化小蘗鹼、中藥成分對照標準品、實驗室間共同試驗

### 前言

中藥材化學成分複雜，不易分析，製成製劑後，其他成分之干擾更加分析之困難。且近年來，檢驗儀器之快速發展，有關中藥之檢驗技術與分析方法不斷地研究與改進，為提升中藥化學成分檢驗方法之精準性，中藥成分對照標準品之應用確有其必要性。此外，衛生署93年公布「中華中藥典」，其中已收載多種中藥成分之含量測定項目，然所需比對之中藥成分對照標準品鮮有供應之來源，亦無相關規範，且民間機構製備之市售品，因未依照國際標準予以標定，其品質參差不齊，難以做為檢驗分析之比對標準。因此，為確保中藥品質，並提升中藥檢驗分析方法之可靠性，建立中藥成分對照標準品之品質規範，提供優質之中藥成分對照標準品，係當務之急。

相較於各國在中藥成分對照標準品之製造與管理，日本應屬較有制度且管理較嚴謹之國家，

且已具40餘年經驗，其相關業務均由日本藥局方編輯委員會之專家委員會邀集討論。有關其管理模式，首先由委員會評估相關試驗方法後，購買精製過之原料，並選定包括官方與業界等4~5個實驗室，進行共同試驗。各實驗室分析所得結果經彙整後，再由專家委員會評估，最後由財團法人日本公定書協會等認證機關之核准、頒布。另以美國藥典為例，在取得標準品原料後，先經過美國FDA、USP及標準品原料提供者等三個實驗室共同試驗比對後，再由USP複審相關數據與評估，才核准分裝與販售。

為使中藥成分對照標準品之品質符合公認之標準，前曾於94年度規劃「建立中藥成分對照標準品實驗室間共同比對試驗機制」計畫，該計畫中邀請學術界及業者等多位學者專家組成諮詢委員會，討論計畫進行之相關方式與試驗方法，並以甘草酸為試驗對象，以建立試驗機制。同時，除本實驗室外，亦邀請研發單位及製藥界之實驗

室共同參與進行。每一個參與實驗室利用各實驗室現有之儀器，參照共同之試驗方法操作後，提供數據，彙整報告，以瞭解各實驗室間比對試驗結果之差異。依報告結果顯示，前述試驗機制應屬正確可行。

本計畫依前所建立之「中藥成分對照標準品實驗室間共同比對試驗機制」<sup>(1)</sup>為基礎，以中藥製劑查驗登記指標成分含量測定項，使用量較多之對照標準品為選擇供應之品項。98年度選定之「氯化小蘗鹼」，除了在本實驗室內，依照已評估之試驗方法<sup>(2,3)</sup>進行品質檢測外，亦由另外6個實驗室進行實驗室間共同試驗。經由本計畫，供應具公認標準之中藥成分對照標準品，亦建立可行之品管模式，使未來供應之中藥成分對照標準品品質符合國際水準。

## 材料與方法

### 一、材料

- (一)原料：氯化小蘗鹼Berberine chloride (購自日本Nacalai公司)。
- (二)標準品：日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品(批號：BER0202、BER0203、BER0207)。
- (三)試藥及溶媒：磷酸二氫鉀(SHOWA)、酒石酸(J. T. Baker)、Sodium lauryl sulfate (Nacalai)、Palmitine chloride (Nacalai)、甲醇(Lab-Scan)、乙腈(Lab-Scan)、正丁醇(Lab-Scan)、冰醋酸(Alps) (均使用試藥特級或特級相當品)。
- (四)濾膜：0.45 μm (Millipore)。
- (五)薄層層析板 (E. Merck；Silica gel 60 F<sub>254</sub>)。

### 二、儀器

本計畫「實驗室間共同試驗」之各參與實驗室分別以A, B, C, D, E, F及G表示，使用之相關儀器設備，如下：

- (一)精密天平
  1. Mettler Toledo AX 105、Mettler Toledo XP 56 (A)
  2. Mettler Toledo AT 250 (B)

3. Mettler Toledo AX 205 (C)
4. SARTORIUS BP 211D (D)
5. Mettler Toledo MT5 (E)
6. Mettler Toledo AX 205 (F)
7. SCALTEC SBC 22 (G)

#### (二)高效液相層析儀(HPLC)

1. Waters 2690 separations Module (A)
2. Waters 2695 separations Module (B)
3. Waters 2695 separations Module (C)
4. HITACHI L-2000 series (D)
5. Waters 600 (E)
6. Agilent 1100 series (F)
7. Agilent 1100 series (G)

#### (三)紫外光譜儀(UV)

1. CARY 300 Bio (A)
2. HITACHI U1900 (B)
3. Shimadzu UV-160 (C)
4. Perkin Elmer Lambda 25 (D)
5. HP-8453 (F)
6. HITACHI U2800 (G)

#### (四)薄層層析自動點樣裝置(TLC)

1. CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (A)
2. CAMAG Automatic TLC Sampler 4 (F)

#### (五)紅外光譜儀(IR)

1. Jasco FTIR-480 (A)
2. Perkin Elmer Spectrum I (F)
3. Perkin Elmer Spectrum One (G)

#### (六)水分測定裝置

1. Karl Fisher Coulometer KEM MKC-520 (A)
2. Karl Fisher Coulometer Metrohm 701KF (F)
3. Karl Fisher Coulometer Metrohm 831KF (G)

#### (七)熔點測定裝置

1. Fisher-Johns/Buchi 540 (A)
2. Buchi 540 (D)
3. Buchi 535 (F)

#### (八)核磁共振儀(NMR)

1. Varian/Unity Inova-500 (G)
2. Bruker Avance-500 (委託台灣大學貴重儀器中心檢測)

#### (九)元素分析儀(EA)

HERAEUS VarioEL-III (委託台灣大學貴重儀器中心檢測)

### 三、方法

#### (一)紫外光吸光度測定

取檢品原料約5 mg，加水10 mL水浴加熱(40°C)後，放冷，置100-mL容量瓶中，加水定容，混勻，取此溶液10 mL，置50-mL容量瓶中，加水定容，供作檢品溶液，按中華藥典第六版<sup>(4)</sup>紫外光吸光度測定法(附錄第6頁)測定之，記錄波長210~500 nm之吸光度。並於228、263、345、420 nm附近呈現最大吸收處，計算其比吸光度( $E_{1cm}^{1\%}$ )。

#### (二)薄層層析測定

##### 1. 檢品溶液配製

取檢品原料約5 mg，精確稱定，加甲醇1 mL溶解，供作檢品溶液。

##### 2. 稀釋檢品溶液配製

分別精確量取檢品溶液5、10、20、40  $\mu$ L，置20-mL容量瓶中，並分別加甲醇至定容，混勻，供作稀釋檢品溶液1、2、3、4。

##### 3. 薄層層析試驗

取檢品溶液及各稀釋檢品溶液5  $\mu$ L，進行薄層層析試驗，觀察不純物並測定其 $R_f$ 值。

薄層層析條件：

- 薄層板：Silica gel 60 F<sub>254</sub>
- 展開溶媒：正丁醇：水：冰醋酸(7：2：1)
- 展開距離：10 cm
- 檢測條件：紫外光下檢視(波長：366 nm)

#### (三)高效液相層析測定法

##### 1. 檢品溶液配製

取檢品原料約5 mg，精確稱定，置10-mL容量瓶中，加甲醇至定容，供作檢品溶液(500  $\mu$ g/mL)。

##### 2. 層析感度檢測液配製

精確量取檢品溶液1 mL，置100-mL容量

瓶中，加甲醇至定容，混勻，供作層析感度檢測原液(5  $\mu$ g/mL)。精確量取此溶液5 mL，置100-mL容量瓶中，加甲醇至定容，混勻，供作層析感度檢測液(0.25  $\mu$ g/mL)。

##### 3. 純度試驗

取檢品溶液20  $\mu$ L，注入液相層析儀分析，記錄其層析圖譜，測計其各波峯面積，以及各波峯面積與全波峯面積總和比較之相對百分率(%) (各波峯面積百分率小於0.01%者捨之)。

高效液相層析條件：

- 檢出器：紫外光吸光度計(測定波長：345 nm)。
- 層析管：Cosmosil 4.6 mm x 15 cm，C<sub>18</sub>-AR-II，5  $\mu$ m。
- 層析管溫度：室溫。
- 移動相：取Sodium lauryl sulfate (SDS) 2.0 g及酒石酸0.4 g，置1-L容量瓶中，加水450 mL溶解，再加乙腈至容量，以磷酸調整pH至2.68。
- 流速：調整Berberine chloride之滯留時間約為10分鐘。
- 層析條件測試：取Berberine chloride及Palmatine chloride各1 mg，置10-mL容量瓶中，加甲醇至定容。取此溶液20  $\mu$ L，依上述測定條件注入液相層析儀測定，其流出順序依次為Palmatine chloride、Berberine chloride，且兩者波峯分離完全。
- 檢出感度：取層析感度檢測液20  $\mu$ L，依上述高效液相層析條件檢測。Berberine chloride波峯面積以自動積分法確實計算調整(約為層析感度檢測原液層析結果中，Berberine chlorid波峯高度之20%)。
- 層析測定範圍：溶媒波峯出現後，Berberine chloride波峯滯留時間約3倍之範圍。
- 再現性測試：上述層析感度檢測原液，重複注入5次，Berberine chloride波峯面

積之相對標準偏差不得大於1.5%。

(四)紅外光吸光度測定

取預經60°C減壓(5 mmHg以下)乾燥4小時之檢品原料，按中華藥典第六版紅外光吸光度測定法(附錄第6頁)溴化鉀錠法測定之，其吸收光譜與日本藥局方Berberine chloride對照標準品以同法測得者，於相同波數處呈最大吸收。

(五)水分含量測定

本檢品原料按照中華藥典第六版費氏水分測定法(附錄第31頁)測定之。

(六)熔融溫度測定

本檢品原料按照中華藥典第六版熔融溫度測定法(附錄第1頁)測定之。

(七)核磁共振光譜測定

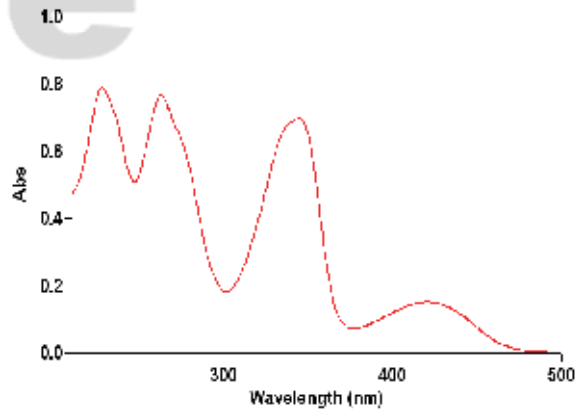
取檢品原料適量放入NMR Tube，溶於DMSO-d<sub>6</sub>溶劑，委託台灣大學貴重儀器中心檢測。

(八)元素分析

本檢驗委託台灣大學貴重儀器中心檢測。

## 結 果

為使本計畫「氯化小蘗鹼對照標準品」品質可達一定之標準，訂定有嚴謹之標準品品質規格之採購程序，係經由「實驗室內驗收試驗」與「實驗室間共同試驗」等各項試驗方法測試，作



圖一、氯化小蘗鹼檢品原料之紫外光吸光度光譜圖

為採購及驗收之依據，其試驗結果分述如下：

### 一、實驗室內驗收試驗

本計畫產生之氯化小蘗鹼檢品原料，經分裝(30 mg /瓶)，共計200瓶，依統計學原理，以隨機抽樣方式，抽驗 $\sqrt{n} + 1$ 瓶(共15瓶)，由本局執行下列驗收試驗，以評估本次採購之檢品原料，是否符合品質規格，以作為採購與否之依據。

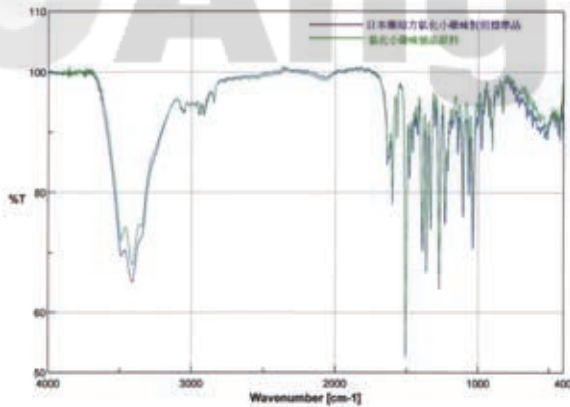
(一)確認試驗

1. 紫外光吸光度測定

依三、(一)之紫外光吸光度測定法試驗結果，其光譜圖如圖一，試驗數據(如表一)顯示，其最大吸收波長( $\lambda_{\max}$ )平均值分別為

表一、氯化小蘗鹼檢品原料之紫外光吸光度測定結果(實驗室內試驗)

	重覆試驗				Aver. (Mean ± S.D.)	R.S.D. (%)
	1	2	3	4		
最大吸收波長 ( $\lambda_{\max}$ , nm)						
$\lambda_{1\max}$	228.0	227.0	228.0	227.0	227.5 ± 0.7	0.3
$\lambda_{2\max}$	263.0	263.0	263.0	263.0	263.0 ± 0.0	0.0
$\lambda_{3\max}$	344.0	345.0	344.0	345.0	344.5 ± 0.7	0.2
$\lambda_{4\max}$	421.0	422.0	421.0	422.0	421.5 ± 0.7	0.2
比吸光度 ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ )						
E1 <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup>	810.5	817.0	836.4	819.3	820.8 ± 11.1	1.3
E2 <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup>	786.9	794.4	813.5	795.0	797.4 ± 11.3	1.4
E3 <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup>	713.8	719.1	740.3	721.2	723.6 ± 11.6	1.6
E4 <sub>1cm</sub> <sup>1%</sup>	155.9	156.9	159.4	156.1	157.1 ± 1.6	1.0



圖二、氯化小蘗鹼 檢品原料與日本藥局方氯化小蘗鹼 對照標準品之紅外光吸光度光譜比對圖

227.5 ± 0.7 nm、263.0 ± 0.0 nm、344.5 ± 0.7 nm、421.5 ± 0.7 nm，相對標準偏差分別為 0.3%、0.0%、0.2%、0.2%；而各最大吸收波長之比吸光度( $E_{1cm}^{1\%}$ )平均值分別為 820.8 ± 11.1、797.4 ± 11.3、723.6 ± 11.6、157.1 ± 1.6，相對標準偏差分別為 1.3%、1.4%、1.6%、1.0%。

2. 紅外光吸光度測定

依三、(四)之紅外光吸光度測定法試驗結果，其光譜圖如圖二，與日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品光譜圖比較，在 2846  $cm^{-1}$ ，1634  $cm^{-1}$ ，1567  $cm^{-1}$ 及 1506  $cm^{-1}$ 附近有 Berberine chloride 特有之吸收。

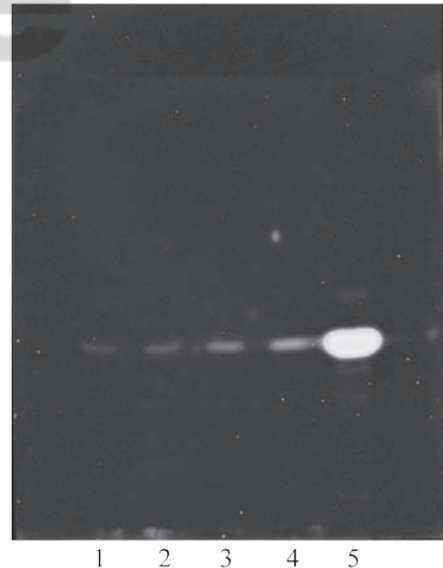
(二)純度試驗

1. 薄層層析試驗

依三、(二)薄層層析試驗法試驗結果，其薄層層析圖譜如圖三。由圖譜顯示檢品溶液檢測結果，除 Berberine chloride 斑點外，尚檢出 1 個以上不知名之斑點。而 Berberine chloride 於本試驗條件下，其最低檢測量為 0.00625  $\mu g$ 。

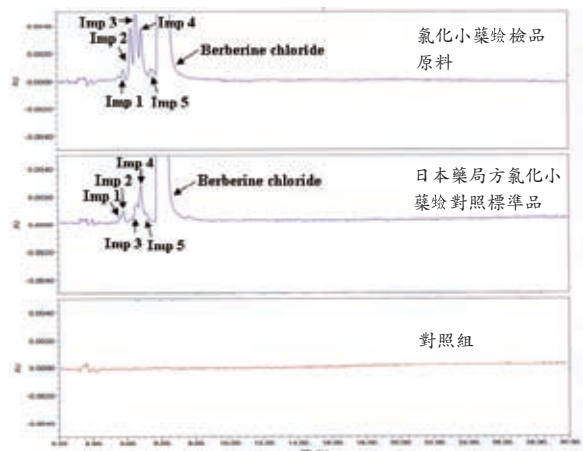
2. 高效液相層析試驗

本實驗係參照「日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品 HPLC 純度試驗法」<sup>(2,3)</sup>進行純度試驗，抽驗之 15 瓶檢品原料均依相同試驗



圖三、氯化小蘗鹼 檢品原料之薄層層析圖譜  
1~4 係標準溶液 1, 2, 3, 4,  
5 係檢品溶液

法操作。為檢測檢液中其他可能存在之微量不純物，選擇主成分 Berberine chloride 滯留時間約 3 倍之時間內作為波峯面積測定範圍。依三、(三)之高效液相層析試驗結果，其層析圖譜如圖四。計算各瓶檢品原料之



圖四、氯化小蘗鹼 檢品原料與日本藥局方氯化小蘗鹼 對照標準品之高效液相層析圖譜

表二、氯化小蘗鹼檢品原料之高效液相層析純度試驗結果(實驗室內試驗)

樣品編號	純度(%) (n=3)	
	Aver. (Mean ± S.D.)	R.S.D. (%)
1	99.57 ± 0.03	0.03
2	99.57 ± 0.02	0.02
3	99.55 ± 0.01	0.01
4	99.54 ± 0.01	0.01
5	99.55 ± 0.02	0.02
6	99.56 ± 0.02	0.02
7	99.55 ± 0.00	0.00
8	99.53 ± 0.02	0.02
9	99.56 ± 0.02	0.02
10	99.55 ± 0.03	0.03
11	99.54 ± 0.01	0.01
12	99.54 ± 0.01	0.01
13	99.54 ± 0.01	0.01
14	99.55 ± 0.01	0.01
15	99.53 ± 0.01	0.01
Aver. (Mean ± S.D.)	99.55 ± 0.02	
R.S.D. (%)	0.02	

層析試驗中，波峯面積百分率 $\geq 0.01\%$ ，且再現性較佳之波峯，其試驗結果如表二。檢品原料之純度介於99.53~99.57%，平均純度為99.55 $\pm$ 0.02%，相對標準偏差為0.02%。本計畫另以日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品依相同之配製及試驗法進行試驗，其層析圖譜如圖四，而純度亦達99.79%。

#### (三)水分含量測定

本檢品原料以Karl Fisher電量滴定法測定，其水分含量為7.6 $\pm$ 1.5%，相對標準偏差為19.7% (n=5)。

#### (四)熔融溫度測定

本檢品原料以熔點測定器測定，其熔融溫度為198~203 $^{\circ}\text{C}$  (n=3)。

#### (五)內容量測定

15瓶檢品原料其內容量測定結果如表三，分裝後其內容量達30 mg之100.3~102.0%之間。

表三、氯化小蘗鹼檢品原料分裝後之內容量測定結果

樣品編號	內容量(毫克/瓶)	樣品編號	內容量(毫克/瓶)
1	30.2	9	30.3
2	30.2	10	30.2
3	30.1	11	30.6
4	30.1	12	30.4
5	30.1	13	30.2
6	30.3	14	30.1
7	30.2	15	30.3
8	30.3		

#### (六)核磁共振光譜測定

本檢品原料委託台灣大學貴重儀器中心檢測，其 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜圖如圖五、六。

#### (七)元素分析

本檢品原料委託台灣大學貴重儀器中心檢測，結果如表四，C：59.6%，H：5.4%，N：3.1%。與理論值C：64.6%，H：4.9%，N：3.8%，稍有差異。本計畫另將日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品檢測，結果如表四，C：59.3%，H：5.6%，N：3.3%。

## 二、實驗室間共同試驗

#### (一)確認試驗

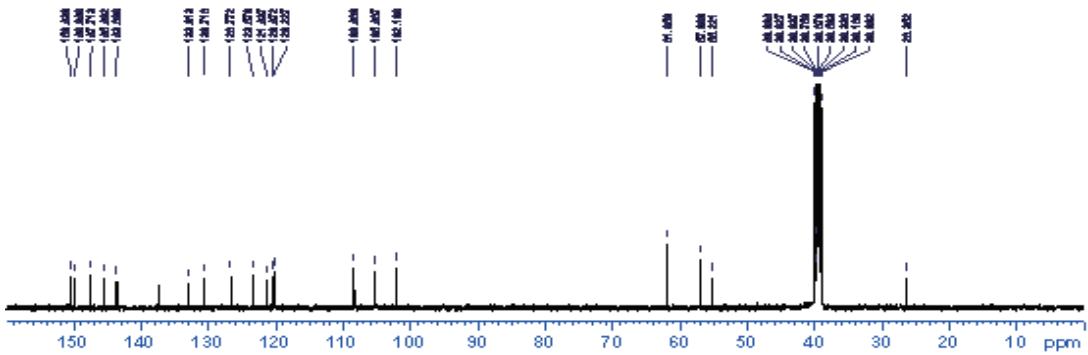
##### 1. 紫外光吸光度測定

依三、(一)之紫外光吸光度測定法試驗結果，其試驗數據(如表五)顯示，最大吸收波長( $\lambda_{\text{max}}$ )平均值分別為227.8 $\pm$ 0.2 nm、263.0 $\pm$ 0.1 nm、344.6 $\pm$ 0.8 nm、421.2 $\pm$ 0.6 nm，相對標準偏差分別為0.1%、0.0%、0.2%、0.1%；最大吸收波長之比吸光度( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ )平均值分別為821.8 $\pm$ 8.7、796.7 $\pm$ 9.4、724.5 $\pm$ 10.4、154.8 $\pm$ 4.5，相對標準偏差分別為1.1%、1.2%、1.4%、2.9%。

##### 2. 紅外光吸光度測定

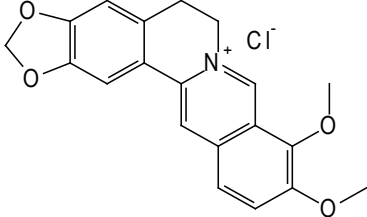
本檢品原料在不同實驗室內，依三、(四)之紅外光吸光度測定法試驗結果，其光譜圖如圖二，在2846  $\text{cm}^{-1}$ ，1634  $\text{cm}^{-1}$ ，1567





圖六、氯化小檗鹼檢品原料之 <sup>13</sup>C-NMR 圖譜

表四、氯化小檗鹼檢品原料與日本藥局方氯化小檗鹼對照標準品之元素分析結果

標準品	分子式 (分子量)	理論值	實測值
Berberine chloride R.S. (Raw material) 	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> Cl (371.092435)	C : 64.6% H : 4.9% N : 3.8%	C : 59.6% H : 5.4% N : 3.1%
Berberine chloride R.S. (J. P.)	C <sub>20</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>4</sub> Cl (371.092435)	C : 64.6% H : 4.9% N : 3.8%	C : 59.3% H : 5.6% N : 3.3%
Berberine chloride R.S.+ 1H <sub>2</sub> O	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>5</sub> Cl (389.103000)	C : 61.6% H : 5.2% N : 3.6%	—
Berberine chloride R.S.+ 2H <sub>2</sub> O	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>6</sub> Cl (407.113565)	C : 58.9% H : 5.4% N : 3.4%	—
Berberine chloride R.S.+ 3H <sub>2</sub> O	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>7</sub> Cl (425.124130)	C : 56.4% H : 5.7% N : 3.3%	—

cm<sup>-1</sup>及1506 cm<sup>-1</sup>附近有Berberine chloride特有之吸收。

(二)純度試驗

1. 薄層層析試驗

依三、(二)薄層層析試驗法試驗結果，其薄層層析圖譜如圖三。所得到之6個實驗室檢

表五、氯化小蘗鹼檢品原料之紫外光吸光度測定結果(實驗室間共同試驗)

	實驗室代號*							Aver. (Mean ± S.D.)	R.S.D. (%)
	A	B	C	D	E	F	G		
最大吸收波長 ( $\lambda_{\max}$ , nm)									
$\lambda_{1\max}$	227.5	228.0	227.7	228.0	—	228.0	—	227.8 ± 0.2	0.1
$\lambda_{2\max}$	263.0	263.0	262.8	263.0	—	263.0	—	263.0 ± 0.1	0.0
$\lambda_{3\max}$	344.5	344.0	344.5	346.0	—	344.0	—	344.6 ± 0.8	0.2
$\lambda_{4\max}$	421.5	421.0	420.5	422.5	—	421.0	—	421.2 ± 0.6	0.1
比吸光度 ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ )									
$E_{1\text{cm}}^{1\%}$	820.8	825.7	817.0	811.3	—	834.3	—	821.8 ± 8.7	1.1
$E_{2\text{cm}}^{1\%}$	797.4	794.7	795.1	785.0	—	811.1	—	796.7 ± 9.4	1.2
$E_{3\text{cm}}^{1\%}$	723.6	723.5	734.4	708.2	—	732.9	—	724.5 ± 10.4	1.4
$E_{4\text{cm}}^{1\%}$	157.1	148.3	154.2	154.1	—	160.5	—	154.8 ± 4.5	2.9

註：“\*” 參與共同試驗之7個實驗室分別以英文字母A~G表示

品溶液檢測結果，除Berberine chloride主斑點外，皆檢出1個以上不知名之斑點。而Berberine chloride於本試驗條件下，其最低檢測濃度，有5個實驗室為0.025%，另1個實驗室為0.05%。

## 2. 高效液相層析試驗

本實驗係參照「日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品HPLC純度試驗法」進行純度試驗，7個參與共同試驗之實驗室，均依相同試驗法操作。為檢測檢液中其他可能存在之微量不純物，選擇主成分Berberine chloride滯留時間約3倍之時間作為波峯面積測定範圍，其層析圖譜如圖四。本項試驗計算波峯面積百分率 $\geq 0.01\%$ ，且再現性較佳之波峯，檢測結果如表六，各個實驗室檢出之微量不純物，依其HPLC層析試驗滯留時間之先後順序排列，“→”代表Berberine chloride與各微量不純物間滯留時間之相關位置。結果顯示，各實驗室分別檢出3~8個微量不純物，或因儀器感度之差異，導致不純物之數量不一，惟各別不純物之波峯面積百分率大約均 $\leq 0.41\%$ ，而各實驗室檢測之總不純物波峯面積百分率範圍介於0.40~0.52%。

### (三)水分含量測定

本檢品原料在不同實驗室內以不同Karl Fisher電量滴定儀測定，其水分含量分別為7.6% (n=5)、10.6% (n=3)與5.9%(n=2)。

### (四)熔融溫度測定

本檢品原料在不同實驗室內以不同熔點測定器測定，其熔融溫度分別為198~203°C、203.5°C與209~215°C。

### (五)核磁共振光譜測定

本檢品原料在不同實驗室內，依三、(七)之核磁共振光譜測定試驗結果，其 $^1\text{H-NMR}$ 及 $^{13}\text{C-NMR}$ 光譜圖如圖五、六。

## 討 論

### 一、原料選定

中藥成分對照標準品係由天然物分離、純化而來，其品質本較難掌控，而要求每批產品間品質之一致性，更屬不易。本實驗室曾對市售多種不同廠牌，或同廠牌不同批號之氯化小蘗鹼對照標準品進行純度試驗，顯示其品質參差不齊。本實驗對於原料之選擇，除收集市售產品分析試驗外，亦購買日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品進行品質探討與比對試驗等評估後，訂定原料採購規格，期能購得符合需求之氯化小蘗鹼檢品原料，並做為未來氯化小蘗鹼對照標準品品質規

表六、氯化小蘗鹼檢品原料之高效液相層析純度試驗結果(實驗室間共同試驗)

不純物代號	不純物含量*(%)						
	A	B	C	D	E	F	G
Imp.1	0.02	0.02	0.01	0.01	0.11	0.01	0.03
Imp.2	0.11	0.02	0.01	0.10	0.18	0.02	0.41
Imp.3	0.18	0.11	0.10	0.20	0.11	0.11	0.04
Imp.4	0.11	0.20	0.20	0.13	→	0.21	→
Imp.5	0.01	0.08	0.13	0.03		0.14	
Imp.6	0.04	0.04	0.02	0.01		0.02	
Imp.7	→	→	0.03	→		0.01	→
Imp.8			0.01	→			
總不純物含量	0.47	0.47	0.51	0.48	0.40	0.52	0.48
純度(%)	99.53	99.53	99.49	99.52	99.60	99.48	99.52

註: 1. “\*” 係檢品溶液之高效液相層析純度試驗中，各波峯面積與全波峯面積比較，其百分率 $\geq 0.01\%$ 者

2. “→” 符號係表示Berberine chloride在各實驗室純度試驗之HPLC層析結果中，與各微量不純物滯留時間之相關位置

範之參考。同時，考量標定之成本與市場之需求性，本計畫曾先行調查氯化小蘗鹼對照標準品之年需求量，依調查結果，一次購買3年需求量之同一批氯化小蘗鹼檢品原料進行標定，以確保標定產品品質之一致性。

## 二、品質試驗

為驗證本批氯化小蘗鹼檢品原料品質均能符合相關規格，分別進行「實驗室內驗收試驗」與「實驗室間共同試驗」。針對試驗結果，分述如下：

### (一)內容量測試

氯化小蘗鹼檢品原料分裝後，抽樣 $\sqrt{n} + 1$ 瓶，進行內容量測試，其每瓶之內容量為30 mg之100.3~102.0%之間，顯示產品之分裝量應值得信賴。

### (二)確認試驗

1. 以「紫外光吸光度測定」試驗而言，實驗室內驗收試驗結果顯示，本批氯化小蘗鹼檢品原料之最大吸收波長( $\lambda_{max}$ )平均值分別為227.5 $\pm$ 0.7 nm、263.0 $\pm$ 0.0 nm、344.5 $\pm$ 0.7 nm、421.5 $\pm$ 0.7 nm，相對標準偏差分別為0.3%、0.0%、0.2%、0.2%；最大吸收

波長之比吸光度( $E_{1cm}^{1\%}$ )平均值分別為820.8 $\pm$ 11.1、797.4 $\pm$ 11.3、723.6 $\pm$ 11.6、157.1 $\pm$ 1.6，相對標準偏差分別為1.3%、1.4%、1.6%、1.0%。而實驗室間之共同試驗結果，最大吸收波長( $\lambda_{max}$ )平均值分別為227.8 $\pm$ 0.2 nm、263.0 $\pm$ 0.1 nm、344.6 $\pm$ 0.8 nm、421.2 $\pm$ 0.6 nm，相對標準偏差分別為0.1%、0.0%、0.2%、0.1%；最大吸收波長之比吸光度( $E_{1cm}^{1\%}$ )平均值分別為821.8 $\pm$ 8.7、796.7 $\pm$ 9.4、724.5 $\pm$ 10.4、154.8 $\pm$ 4.5，相對標準偏差分別為1.1%、1.2%、1.4%、2.9%。上述數據是否因各實驗室間不同儀器與人員之操作造成之差異性，仍需進一步討論。

2. 有關「紅外光吸光度測定」試驗，除了實驗室間之檢測光譜圖相仿外，另與日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品光譜圖比對結果，亦屬一致。

3. 水分含量測定方面，在不同實驗室以不同儀器之試驗結果，其水分含量分別為7.6%、10.6%與5.9%，本項試驗屬微量檢測，究係原料之水分含量抑或實驗室環境影響所致，仍待檢討。

4. 氯化小蘗鹼之熔融溫度檢測結果範圍較寬，原料提供廠商檢附之熔融溫度為198~200°C，然美國藥典(USP)氯化小蘗鹼對照標準品之物質安全資料與歐洲藥典(EP)<sup>(6)</sup>收載熔融溫度分別為204°C與204~206°C，兩者略有差異。另本次實驗所用之熔點測定裝置，其結果是以目視判定，推測應為人為因素與各實驗室間使用儀器之差異導致。
5. 另元素分析結果(C：59.6%，H：5.4%，N：3.1%)與理論值(C：64.6%，H：4.9%，N：3.8%)兩者不一，推測原料可能含有結晶水，經與含2個分子結晶水之氯化小蘗鹼元素分析理論值比對，數值相近，推測本品應屬含2個結晶水(如表四)之成品，另依日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品元素分析結果(C：59.3%，H：5.6%，N：3.3%)，推測其亦含2個結晶水。
6. 核磁共振光譜測定結果所得之<sup>1</sup>H-NMR及<sup>13</sup>C-NMR光譜圖與日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品光譜圖比對結果，亦屬一致。

### (三)純度試驗

1. 本實驗曾評估日本藥局方第15版黃柏、黃連中Berberine chloride定量試驗法<sup>(5)</sup>與「日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品HPLC純度試驗法」<sup>(2,3)</sup>等兩種試驗方法，由於兩者HPLC試驗條件稍有不同，純度試驗結果約有0.1~0.2%之差異，前者之移動相條件為「取KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.4 g和SDS 1.7 g，置1-L容量瓶中，加水：乙腈(1：1)混液至容量，以磷酸調整pH至4.58」，而後者之移動相條件為「取Sodium lauryl sulfate (SDS) 2.0 g和酒石酸0.4 g，置1-L容量瓶中，加水450 mL溶解，再加乙腈至容量，以磷酸調整pH至2.68」。因後者分離度較佳，對於微量不純物之定量積分亦較為明確，因此，本實驗參照「日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品HPLC純度試驗法」<sup>(2,3)</sup>進行純度試驗。
2. 實驗室內驗收試驗之15瓶檢品原料進行檢測，其純度均在99.53%以上，平均純度為

99.55±0.02%，相對標準偏差為0.02%。而實驗室間共同試驗，相同原料在不同實驗室、儀器、試藥及人員之操作下，7個共同試驗實驗室檢出微量不純物數量不一，其總不純物含量介於0.40~0.52%之間，純度介於99.48~99.60%之間。中藥屬天然物，其成分複雜，為使中藥對照標準品品質具有一定之標準，進行實驗室間共同試驗評估，其純度較能客觀且合理。本實驗亦曾以日本藥局方氯化小蘗鹼對照標準品，依本試驗方法進行試驗，其純度達99.79%。然以中藥成分對照標準品而言，本批氯化小蘗鹼檢品原料試驗結果，各別不純物之含量百分率均≤0.41%，總不純物含量百分率亦均≤0.52%，顯示其品質應可做為成分含量測定比對用。

### 三、供應作業

綜合前述實驗室內與實驗室間之確認試驗與純度試驗等各項檢測結果顯示，本批氯化小蘗鹼檢品原料之品質應足以做為「氯化小蘗鹼對照標準品」。俟本計畫相關作業完成後，將可正式成為中藥成分對照標準品，提供我國中藥業者，製造含該成分之中藥產品時，品質管制使用，以提升我國中藥產品之品質，確保民眾之健康。

### 四、品管模式確立

完成本計畫，除了確認本批氯化小蘗鹼檢品原料之品質，並作為下批標準品品質之參考外，亦提供未來中藥成分對照標準品製備之品管模式，以供遵循。

### 結 論

- 一、本計畫嚴選氯化小蘗鹼檢品原料，並經由「實驗室內驗收試驗」與「實驗室間共同試驗」，證實具有「氯化小蘗鹼對照標準品」之品質，供應所需，並建立未來製造中藥成分對照標準品之品管模式供參。
- 二、市售中藥成分對照標準品品質參差不齊，建立其公認之標準應屬必需。

- 三、訂定中藥成分對照標準品之品質規範，為求數據之客觀與合理，實驗室間共同比對試驗應屬必要。
- 四、中藥成分對照標準品需有一定之製造品管模式與公認之品質標準，方能符合所需。

### 誌 謝

本試驗過程中，為求數據之客觀與合理，進行之「實驗室間共同試驗」，特別感謝財團法人工業技術研究院生技與醫藥研究所、財團法人醫藥工業技術發展中心天然藥物研發處、財團法人台灣必安研究所、勝昌製藥廠股份有限公司、莊松榮製藥廠有限公司、科達製藥股份有限公司等6個實驗室協助，使本次試驗得以順利完成。

### 參考文獻

1. 劉芳淑、羅吉方、林哲輝。2006。建立中藥成分對照標準品實驗室間比對試驗機制。藥物食品檢驗局中程綱要研究計畫報告。
2. Okada, S., Kitajima, A., Tanimoto, T., Suzuki, H. and Satake, M. 1995. Berberine Hydrochloride Reference Standard (Control 941) of National Institute of Health Sciences. Bull. Natl. Inst. Health Sci. 113: 121-126.
3. Koide, T., Iwata, M., Maekawa, K., Saito, H., Tanimoto, T. and Okada, S. 2001. Berberine Hydrochloride Reference Standard (Control 001) of National Institute of Health Sciences. Bull. Natl. Inst. Health Sci. 119: 097-100.
4. 行政院衛生署中華藥典編修委員會。2006。中華藥典。第六版。行政院衛生署，台北。
5. 日本藥局方編輯委員會。2006。第十五改正日本藥局方。pp.1185、1187-1188。廣州書局，東京。
6. European Pharmacopoeia Convention, Inc. 2007. The European Pharmacopoeia Sixth Edition. pp. 404. European Pharmacopoeia Convention, Inc. Strasbourg Cedex. France.

## Qualitative Evaluation for the Establishment of Chinese Medicine Reference Standard – Berberine Chloride

YA-HUI HSU, SZU-HUI CHEN, FANG-SU LIU, YI-CHU LIU, JER-HUEI LIN  
AND CHI-FANG LO

Divison of Research and Analysis

### ABSTRACT

The raw material of berberine chloride was examined prior to the preparation of the “Berberine Chloride Reference Standard”. The physico-chemical properties of the candidate material were evaluated by a collaborative study from seven laboratories. Analytical data obtained were summarized as follows: the UV maximum absorption wavelength and the corresponding specific absorbance were 227.8, 263.0, 344.6, 421.2 nm and 821.8, 796.7, 724.5, 154.8, respectively. IR Spectra showed IR absorption at 2846, 1634, 1567 and 1506  $\text{cm}^{-1}$ . HPLC analysis revealed 3-8 impurities where individual amount was  $\leq 0.41\%$  and the total amount from any single laboratory was  $\leq 0.52\%$ .

Base on the above results, the candidate material met the requirement of authorization as the Berberine Chloride Reference Standard.

Key words: berberine chloride, Chinese medicine reference standard, collaborative study