

溫清中梔子之 Geniposide 及芍藥之 Paeoniflorin 定量研究

劉芳淑 林隆達 溫國慶

行政院衛生署藥物食品檢驗局

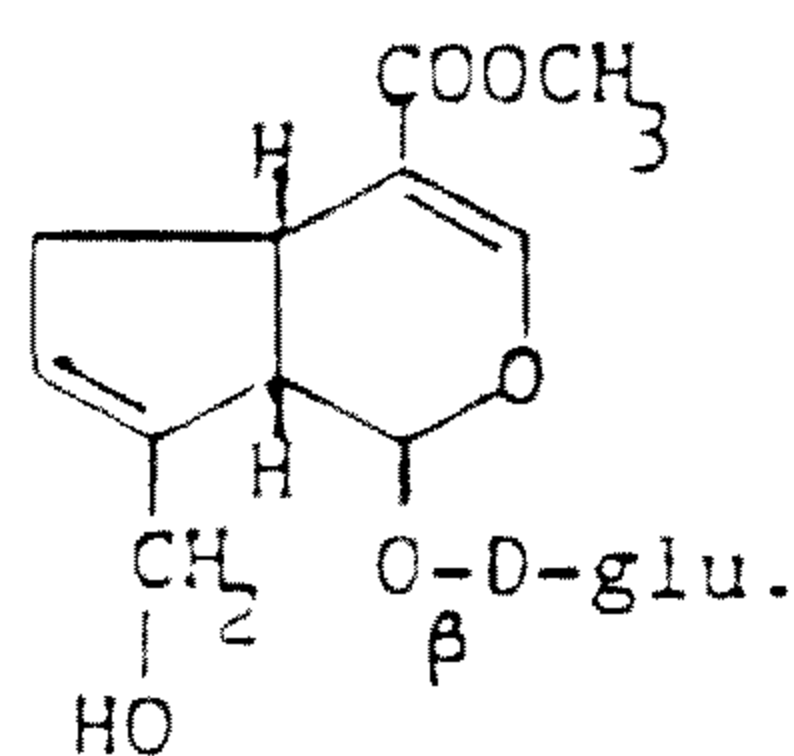
摘 要

市售中藥製劑溫清飲以 30% 甲醇於超音波 60°C 加熱振盪抽提後, 利用高效液相層析法 (HPLC), 以去羥梔苷 (Geniposide) 及芍藥苷 (Paeoniflorin) 為指標成分, 使用 P-Hydroxybenzoic acid methyl ester 為內部標準物質, 於層析管 RP-18 (Lichrospher), 移動相: 乙腈: 水: 醋酸 = 15: 85: 1, 檢測器: UV (238nm, 0.1 AUFS), 流速: 0.6ml/min 之條件下, 同時測定製造中梔子之 Geniposide 及芍藥之 Paeoniflorin 含量, 結果得到良好的分析效果。回收率亦分別達 97.5% 與 94.0%。本研究亦發現減壓濃縮乾燥或冷凍乾燥以及添加澱粉賦形劑等製造過程, 對上述兩種成分之含量測定均未造成影響。上述分析條件, 亦適用於加味逍遙散及防風通聖散等同時含梔子及芍藥之處方。

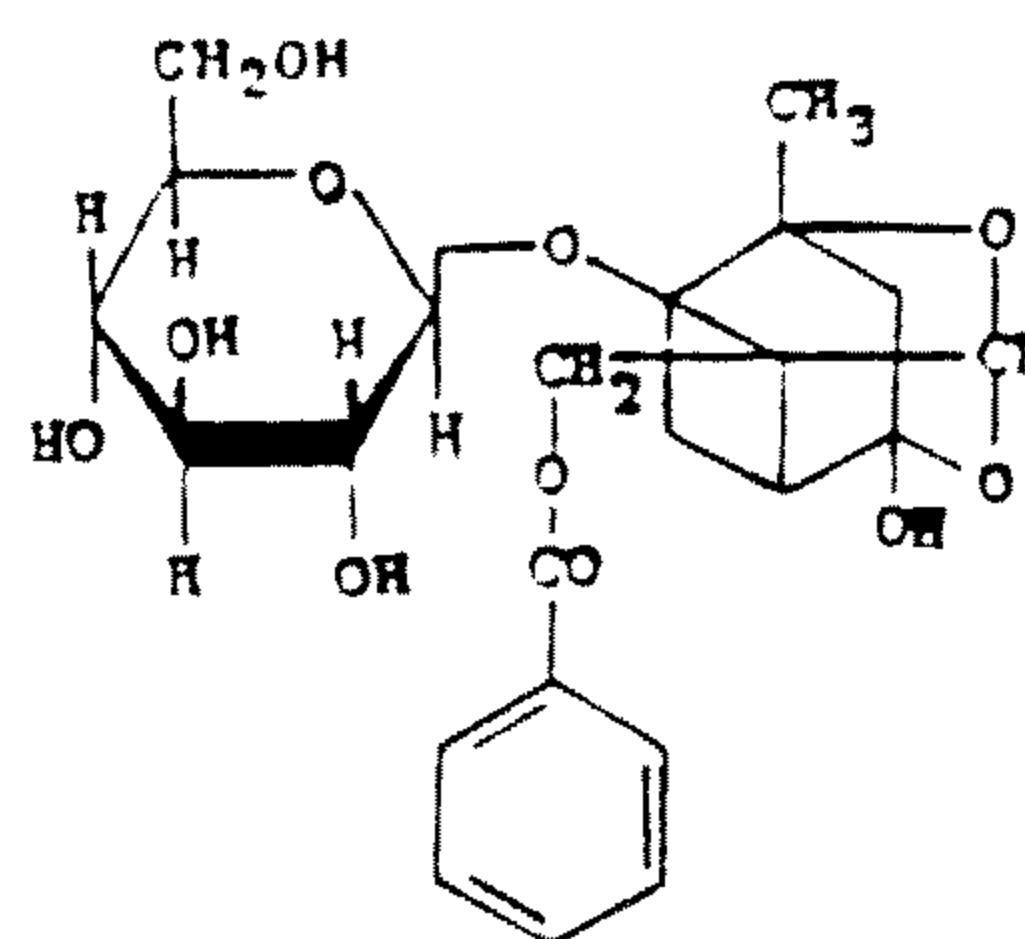
前 言

傳統中藥之濃縮製劑, 因使用上之簡便, 漸漸廣泛地被患者接受。在中藥有效成分尚未完全明瞭之際, 選擇製劑中某些較安定之成分作為含量測定之指標, 以為製劑品質均一性之參考, 亦漸為業者所接受。日本厚生省自 1985 年起規定各廠產製之中藥濃縮製劑與自行制定之標準湯劑 (即一日量藥材加二十倍重量之水, 煮沸三十分鐘以上, 至抽提液為原加水量之一半, 過濾即得) 比較, 其於“萬病回春”係四物湯及黃連解毒湯之合方, 以

溫與清為目的, 即取四物湯之溫, 以促血行, 取黃連解毒湯之清, 以解血熱, 為中藥常用方劑。因此本實驗試著以「溫清飲」為實驗對象, 選擇梔子之 Geniposide 及芍藥之 Paeoniflorin (如圖一) 為指標成分, 使用高效液相層析法探討其定量之適當條件。由於 Geniposide 及 paeoniflorin 均屬中高極性化合物, 根據有關 Geniposide 及 paeoniflorin 含量測定之文獻資料⁽³⁻⁷⁾, 尚未發現有同時定量此二種成分之報告。因此為了省時, 方便操作以及合乎指標成分含量偏差應在規定範圍以內, 在中藥製劑之查驗登記時, 亦規定必須選取處方中兩種以



Geniposide



Paeoniflorin

Figure 1. Structures of marker components

上成分作含量測定。而目前國內尚未訂定製劑定量以及標準湯劑之規範,為了評估中藥製劑之品質以及提升中藥製劑之水準,此等含量測定方法之研擬,應屬當務之急。中藥製劑「溫清飲」,始載經濟之原則,本實驗試圖尋找一同時定量兩種成分之可行方法,並於實驗中檢討製劑之濃縮乾燥過程以及所添加澱粉賦形劑對其含量測定之影響。

材料及方法

一、材料

- (一)原料生藥：
原料生藥包括當歸、川芎、芍藥、梔子、黃芩、黃連、黃柏、地黃。
- (二)市售濃縮製劑：
市售含梔子、芍藥製劑：溫清飲、加味逍遙散、防風通聖散。
- (三)標準品、內部標準品與試藥：
1.對照用標準品：geniposide 及 paeoniflorin 購自日本半井公司。
2.內部標準品：P-hydroxybenzoic acid methyl ester(methyl paraben)購自美國 Sigma。
3.溶媒：甲醇、乙腈(Merck, LC 級),醋酸(Merck, U.P 級)。

二、實驗方法：

- (一)標準品溶液之配製：
1.精確稱取對照用標準品 geniposide 1mg ,以 30% 甲醇溶解,並以 30% 甲醇稀釋至全量 10ml, 即為 geniposide 標準溶液。
2.精確稱取對照用標準品 paeoniflorin 1mg,

以 30% 甲醇溶解,並以 3% 甲醇稀釋至全量 10ml, 即為 paeoniflorin 標準溶液。

- (二)內部標準品溶液之配製：
1.精確稱取標準品 methyl paraben 10mg, 以 30% 甲醇溶解,並以 30% 甲醇稀釋至全量 100ml, 即為 methyl paraben 內部標準溶液。
- (三)標準曲線之製作：
genipolide; paeoniflorin
精確量取對照用標準品 geniposide 與 paeoniflorin 及內部標準品 methtyl paraben 適量,以 30% 甲醇稀釋調配成一系列濃度依序為：geniposide 0.032、0.064、0.096、0.128ml; paeoniflorin 0.02、0.04、0.06、0.08mg/ml 之溶液,且各溶液均含內部標準品 methylparaben 0.08mg/ml。分別取不同濃度之標準品溶液 10ul 注入高效液相層析儀分析。以各標準品與內部標準品波峰面積比為 Y 軸,標準品之濃度為 X 軸,作圖並求出標準曲線之線性迴歸方程式($Y = mx + b$)及相關係數。
- (四)標準湯劑處方：依據常用漢方方劑所列處方配製而成。

溫清飲：當歸 4.0g、川芎 3.0g、地黃 4.0g、芍藥 3.0g、黃連 1.5g、黃柏 1.5g、梔子 2.0g、黃芩 3.0g

- (五)高效液相層析法：
1.高效液相層析系統：
(1)溶媒輸送系統(Waters, Model 6000 A)
(2)層析管(Merck, RP-18 LiChrospher, 5μm)
(3)紫外部檢出器(Waters, Model450)
(4)記錄器(Waters, Model 730)
2.高效液相層析法條件：
(1)層析管：Merck, RP-18 LiChrospher, 5μm

Table 1. Relationship between concentration of Paeoniflorin and the peak area ratio
Regression eguation: $Y = 0.015 + 6.2x$
 $r = 0.9997$

concentration (mg/ml)	peak-area ratio *
0.02	0.14(1.89)
0.04	0.26(2.03)
0.06	0.39(2.32)
0.08	0.51(0.94)

* Peak area of Paeoniflorin/peak area of methyl paraben, with coefficient of variation (%)in parentheses(n = 3)

Table 2. Relationship between concentration of Geniposide and the peak area ratio
Regression eguation: $Y = -0.005 + 8.625x$
 $r = 0.9989$

concentration (mg/ml)	peak-area ratio *
0.032	0.28(0.95)
0.064	0.53(2.28)
0.096	0.83(1.73)
0.128	1.10(0.86)

* Peak area of Geniposide/peak area of methyl paraben, with coefficient of variation (%)in parentheses(n = 3)

Table 3. Recovery(%)of Paeoniflorin in Unseiin

Amount of Paloni Radix taken(g)	Content of Paeoniflorin in paeoniae Radix(mg)	No. of injections (n)	Amount measured (mg)	Recovery (%)	Mean $\pm$ SD (%)	CV (%)
0.6	8.7	3	7.8	89.7	94.0 $\pm$ 4.78	5.09
0.8	11.6	3	11.8	101.7		
1.0	14.5	3	13.1	90.3		
1.2	17.4	3	16.4	94.3		

Table 4. Recovery(%)of Geniposide in Unseiin

Amount of Gardeniae Fructus taken(g)	Content of Geniposide in Gardeniae Fructus(mg)	No. of injections (n)	Amount measured (mg)	Recovery (%)	Mean $\pm$ SD (%)	CV (%)
0.4	17.4	3	17.0	97.7	97.5 $\pm$ 2.38	2.44
0.6	26.0	3	24.3	93.5		
0.8	34.8	3	34.5	99.1		
1.0	43.5	3	43.3	99.5		

(2)移動相：乙腈：醋酸(15:85:1)

(3)流速：0.6ml/min

(4)檢測器：UV238nm；AUFS：0.1

(5)記錄紙速度：0.6cm/min

(六)抽取方法之檢討：

依處方比例精確稱取各藥材粗末配製溫清飲各 1.1g 四份，分別以甲醇，水 30% 甲醇及移動相(乙腈：水：醋酸 = 15:85:1)等四種溶媒各 100ml，依迴流及超音波 60℃ 振盪等方法抽提，抽提液同標準湯劑調製方法操作。

(七)標準湯劑、市售製劑之調製與測定：

1. 標準湯劑之調製：

依處方比例精確稱取藥材之粗末配製溫清飲一日量 22g，加二十倍量之水，沸騰三十分鐘以上過濾，濾液為原加水之半量即成標準湯劑。取濾液適量配製成 30% 甲醇之檢液。並於稀釋過程中加入內部標準品溶液，調製成含內部標準品 0.08mg/ml 之標準湯劑溶液。

2. 市售製劑之調製：精確稱取相當於梔子及芍藥標誌量分別為 100mg 及 150mg 之市售含梔子及芍藥製劑粉末，移入圓底燒瓶中加 30% 甲醇 100ml 於超音波 60℃ 振盪抽提半小時後過濾，濾液移入容量瓶中，並以 30% 甲醇稀釋至 100ml。在稀釋過程中同時加入內部標準品溶液，調製成含內部標準品 0.08mg/ml 之檢品溶液。

3. 取以上待測溶液適量，經微孔過濾器(孔徑約 0.45 μ m)過濾，取此液 10 μ l 分別注入高效液相層析儀中分離測定之，並由標準曲線求得 Geniposide 及 Paeoniflorin 之含量。

(八)回收實驗：

依處方比例精確稱取藥材之粗末配製溫清飲一日量 22g 共五份，各置入五個圓底燒瓶中，再分別依序加入已知 Geniposide 含量之梔子藥材 0.4g、0.6g、0.8g、1.0g；已知 Paeoniflorin 含量之芍藥藥材 0.6g、0.8g、1.0g、1.2g(餘一份乃對照組)後於每一燒瓶再加 30% 甲醇 100ml 於超音波 60℃ 振盪抽提三十分鐘，再依標準湯劑之操作後，以高效液相層析儀分析，求其回收率(如表三·四)。

(九)濃縮條件之檢討：

精確量取標準湯劑 100ml，移入容量瓶中，以水定容至 1000ml 分別依下列兩種方法濃縮。

1. 真空濃縮乾燥：

精確量取上述溶液各 100ml，共五份，分別於 40、50、60、70、80℃ 五種溫度在真空下濃縮至乾，再分別以 30% 甲醇溶解後移入容量瓶中，同時加入內部標準溶液後，定容至 100ml，其所含內部標準品為 0.08mg/ml。

2. 冷凍乾燥：

精確稱取上述溶液 100ml，於 -78℃ (乾冰/丙酮) 下先行凍結後，在溫度 -50 ~ -60℃、壓力 0.35torr 下冷凍乾燥，再以 30% 甲醇溶解後移入容量瓶中，同時加入內部標準溶液後，定容至 100ml，其所含內部標準品為 0.08mg/ml。

(十)添加賦形劑之影響：

精確量取二·(九)·溶液 100ml 於 50℃ 以下真空濃縮近乾，加入澱粉適量，再濃縮至乾，取此濃縮物以 30% 甲醇溶解後移入容量瓶中，同時加入內部標準溶液後，定容至 100ml，其所含內部標準

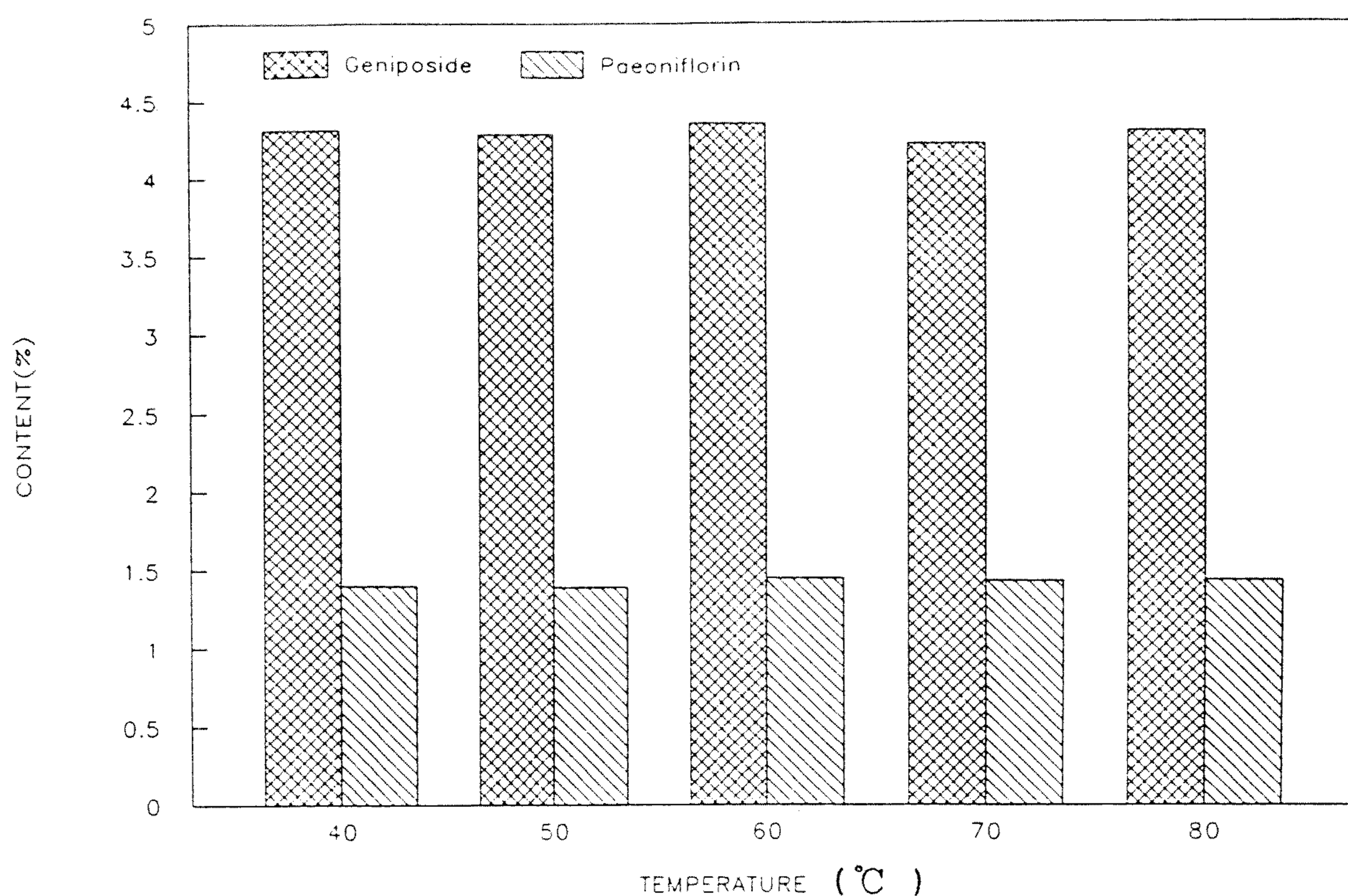


Figure 3. Effects of contents for Geniposide and Paeoniflorin in Unseiin concentrated at different temperatures

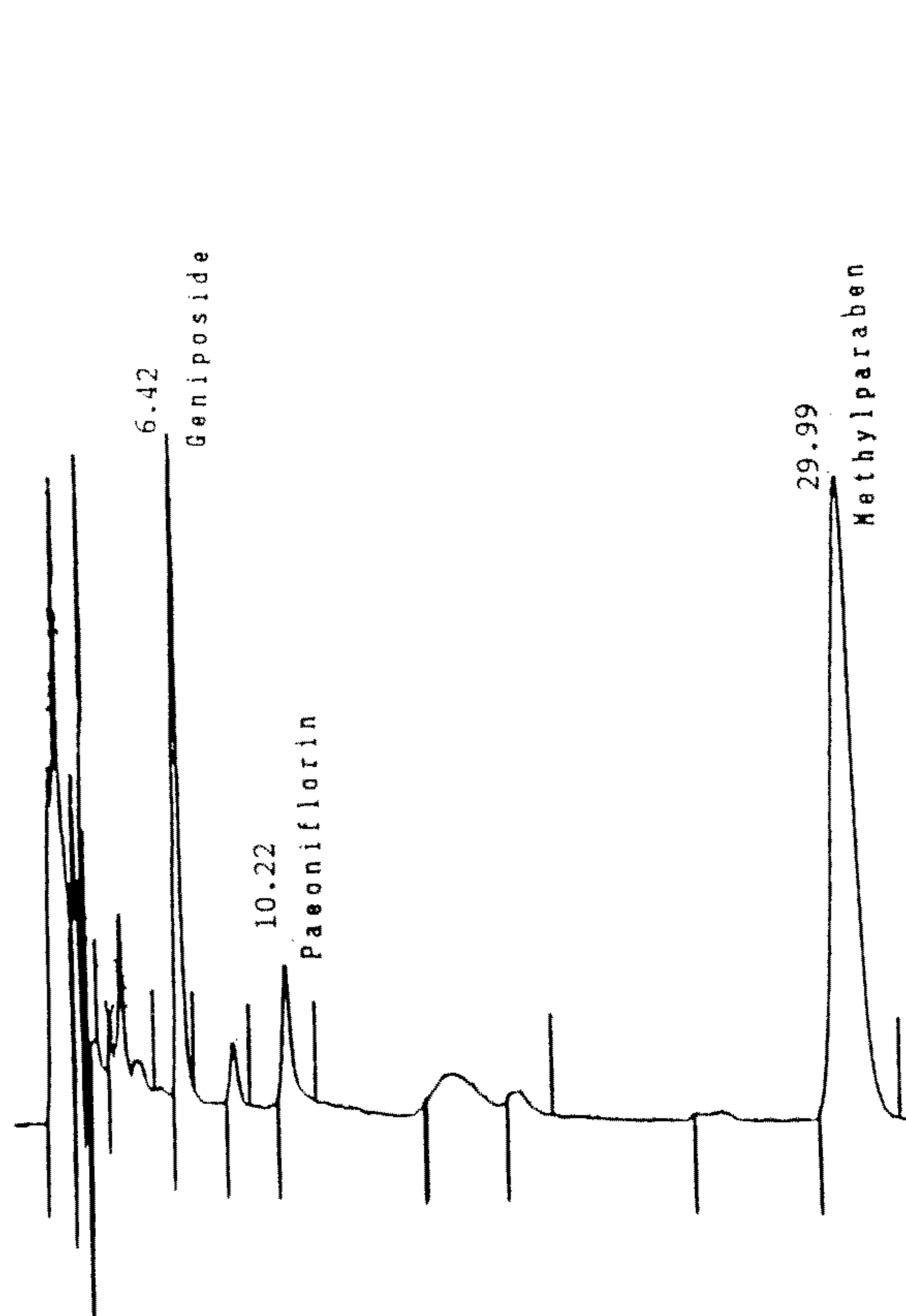


Figure 2. Chromatogram of Geniposide and Paeoniflorin in standard decoction of Unseiin.

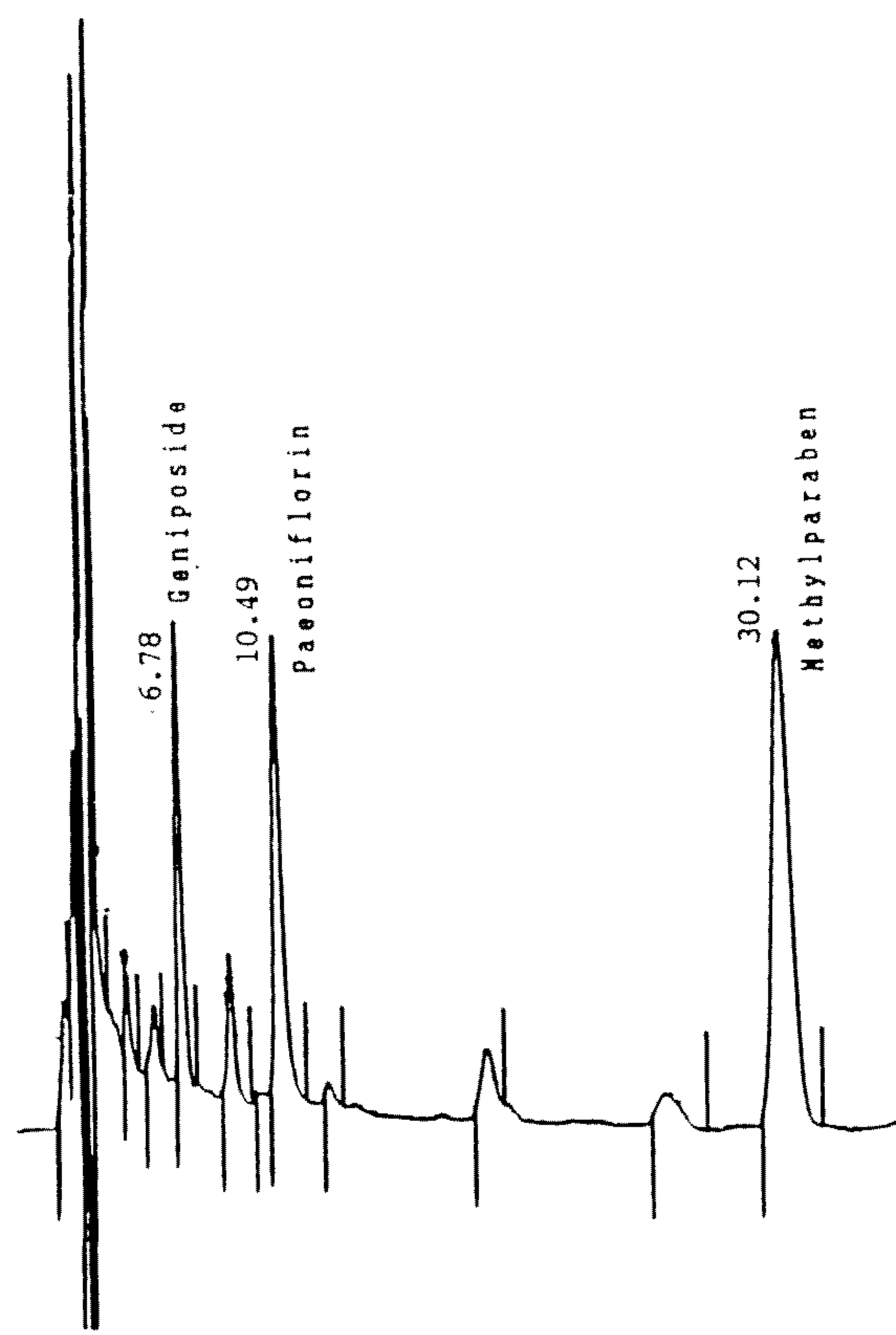


Figure 4. Chromatogram of Geniposide and Paeoniflorin in commercial preparations of Unseiin.

Table 5.Effects of Geniposide content in Unseiin extracted by different solvents and methods

method	yield(%)					
	methanol	methanol:water			acetonitrile:water :acetic acid (15:85:1)	water
		(30:70)	(50:50)	(70:30)		
A	98.9	99.6	99.2	98.8	97.8	100
B	99.6	99.8	99.0	99.6	98.2	100

A:under reflux for 30' B:agitated ultrasonic ally at 60℃ for 30'

Table 6.Effects of Paeoniflorin content in Unseiin extracted by different solvents and methods

method	yield(%)					
	methanol	methanol:water			acetonitrile:water :acetic acid (15:85:1)	water
		(30:70)	(50:50)	(70:30)		
A	39.3	98.8	85.6	73.2	98.5	100
B	41.7	99.3	87.9	76.3	97.4	100

A:under reflux for 30' B:agitated ultrasonic ally at 60℃ for 30'

Table 7.Effects on contents of Geniposie and Paeoniflorin in Unseiin concentrated under reduced-pressure and via lyophilization

method	content(%)	
	Geniposide	Paeoniflorin
decoction without concentration	4.35	1.45
concentrated under reduced-pressure at 50℃	4.32	1.42
lyophilization	4.34	1.43

Table 8.Effects on contents of Geniposide and Paeoniflorin in Unseiin by added starch

excipient	content(%)	
	Geniposide	Paeoniflorin
without starch	4.35	1.45
with starch	4.34	1.41

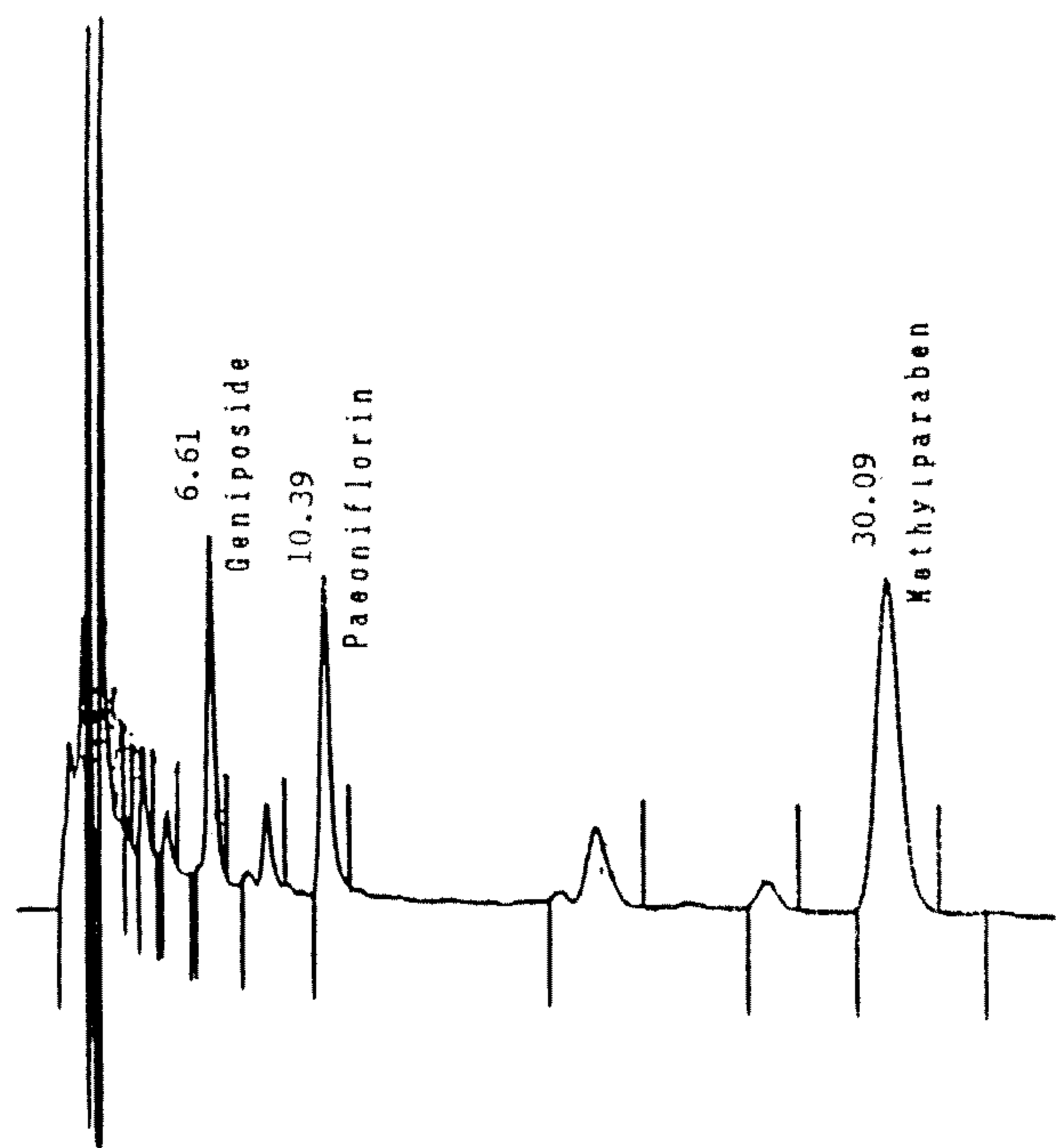


Figure 5. Chromatogram of Geniposide and Paeoniflorin in commercial preparations of Kamishoyosan.

品為 0.08mg/ml。

結果與討論

Table I. II 為 Geniposide 及 Paeoniflorin 對照標準品溶液之濃度對其波峰面積比平均值所對應之變異係數，各係數均小於 3%，顯示各注射之再現性良好。其迴歸方程式及相關係數分別為 Geniposide: $Y = -0.005 + 8.625x$, $r = 0.9989$; Paeoniflorin: $Y = 0.015 + 6.2x$, $r = 0.9997$ 。而溫清飲標準湯劑中梔子之 Geniposide 及芍藥之 Paeoniflorin 以高效液相層析法於本定量條件下同樣得到良好之分析效果(如圖二)，利用此方法 Geniposide 之回收率達 97.5%，Paeoniflorin 亦達 94.0%(如表三、四)。

關於抽取媒之選擇，由文獻資料得知 Geniposide 以水及甲醇之抽取效果最佳，而 Geniposide 則以水為最佳溶媒。由於 Geniposide 及 Paeoniflorin

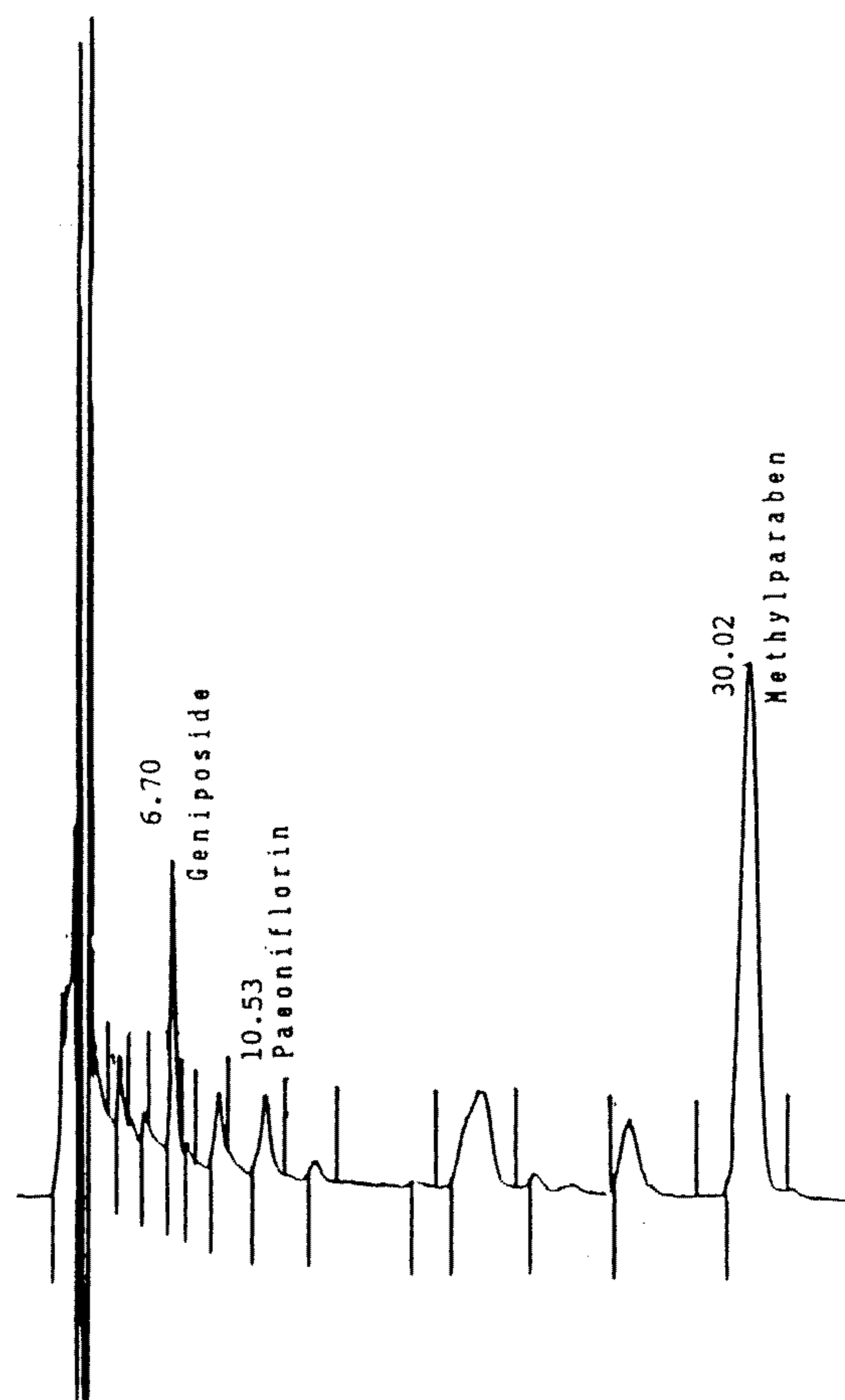


Figure 6. Chromatogram of Geniposide and Paeoniflorin in commercial preparations of Bofutsuseisan.

均屬中高極性化合物，因此選擇極性高之水、甲醇、移動相以及極性介於甲醇及水之間的 30%、50%、70% 甲醇作為溫清飲製劑之抽取溶媒，分別以加熱迴流及超音波 60℃ 振盪等兩種方法同時抽提 Geniposide 及 Paeoniflorin，以抽取量最大者定為 100%，比較其抽取效果。結果(如表六)以水或 30% 甲醇於超音波 60℃ 振盪之抽取率最高。但為實驗操作之方便，同時考慮應用於市售製劑之含量分析，因此選擇 30% 甲醇為溶媒於超音波 60℃ 振盪，同時抽提製劑中之 Geniposide 及 Paeoniflorin 含量。在減壓濃縮之溫度方面，實驗中選擇 40、50、60、70、80℃ 等五種溫度檢討溫清飲中 Geniposide 及 Paeoniflorin 含量之變化。結果(如圖三)Geniposide 及 Paeoniflorin 之含量幾無變化。因此，以溫度而言，此兩種化合物應屬安定。另外，實驗中以一般藥廠常用之 50℃ 以下減壓濃縮以及冷凍乾燥兩種濃縮乾燥法探討溫清飲中 Geniposide 及 Paeoniflorin 含量之影響。由數據(如表七)顯示，上述兩種濃縮乾燥方法均不影響兩種成

分之定量。而添加澱粉賦形劑,並未改變兩種成分之含量測定值(如表八)。因此,澱粉對於溫清飲製劑而言,應該算是良好之賦形劑。

再者,依標準湯劑之操作法(一日量之處方 22g 加二十倍量即 440ml 之水煎煮至半量),所抽提之 Geniposide 量比依不同溶媒抽提檢討實驗中,處方 1.1g 加 100ml 水所抽取者為低,兩者相差約 1.4 倍以上。根據推測,可能與標準湯劑抽提溶媒量不夠、抽取不完全所致。這個結果在市售濃縮製劑之製程上似乎應列為考慮因素之一。

本研究針對溫清飲中梔子之 Geniposide 及芍藥之 Paeoniflorin 發展出之層析條件,除了在標準湯劑及市售溫清飲製劑(如圖三)得到良好之分析外,對於市售同時含梔子及芍藥之製劑「加味逍遙散」及「防風通聖散」,亦得到令人滿意之分析效果(如圖五、六)。

參考文獻

1. Masatoshi; Harada, Yukio Ogihara, Yoshihiro Kano, Akira Akahori, Yoshiaki Ichio, Osamu Miura and Hideyo Suzuki. 1988. Quantitative Analysis of Chinese Pharmaceutical Preparations(I) Iyaku-hin Kenkyu. 19(5):852-860.
2. Hong-Yen Hsu and Chau-Shin Hsu. 1980. Commonly Used Chinese Herb Formulas with Illustrations. P. 350 Oriental Healing Arts Institute.
3. Junko Hayakawa, Naoki Noda, Sadaji Yamada, Eiichi Mikami and Keiichi Uno. 1985. Studies on Physical and Chemical quality Evaluation of Crude Drugs Preparations. III. Analysis of Gardenia Fruits and Its Preparations. Yakugaku zasshi. 105(10):996-1000.
4. Naoki Noda, Asdaji Yamada, Junko Hayakawa and Keiichi Uno. 1983. Analysis of Natural Dye in Foods. Determination of Natural Yellow Dye from the Fruits of Gardenia by Detecting Geniposide. Eisei Kagaku. 29(1):7-12.
5. Hideyo Suzuki. 1984. Standard Compounds for Quantitative Determination of Principles of Crude Drugs I. Paeoniflorin, A Major Principle of Peony Root. Shoyakugaku Zasshi. 38(2):144-148.
6. Yoshinobu Akada, Sadako Kawano and Yai-chiro Tanase. 1979. High-speed liquid chromatographic Analysis of Drugs. V. Rapid Estimation of Paeoniflorin in Paeony Root. Yakugaku Zasshi. 99(8):858-861.
7. Naoki Asakawa, Teiichi Hattori, Masaaki Ueyama, Aishin Shinoda and Yasuo Miyake. 1979. Determination of Paeoniflorin in Paeony Extract by High Performance Liquid Chromatography. Yakugaku Zasshi. 99(6):598-601.

Determination of Paeoniflorin and Geniposide in Traditional Chinese Medicinal Preparation by High Performance Liquid Chromatography

FANG-SU LIU, LONG-DAR LIN AND KUO-CHING WEN

National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan

ABSTRACT

A high-performance liquid chromatographic method for Quantitative analysis of geniposide in Gardeniae Fructus and paeoniflorin in Paeoniae Radix was developed. The samples were separated by a RP-18 Lichrospher column eluted with water-acetonitrile-acetic acid (85:15:1, v/v) at a flow rate 0.6ml/min and were detected at UV 238nm. The method was applied to monitor the optimum conditions for the extraction of the tra-

ditional Chinese medicinal preparation "Unseiin", which contains Gardeniae Fructus and Paeoniae Radix. In this study, methy paraben was used as the internal standard. A good and reproducible separation of paeoniflorin and geniposide was achieved within 31 min. The method was also applicable to other preparations that contain these two medicinal plants such as Kamishoyosan and Bofutsuseisan.

Key words : Geniposide, Paeoniflorin, Quantitative analysis, Unseiin