

複方甘草合劑錠中所含嗎啡之高效液相層析 定量法之研發

張秀圭 王肇 陳家楨 秦福壽 李志恆

行政院衛生署麻醉藥品經理處

摘 要

爲因應本處產品複方甘草合劑錠品質管理之需，本處曾自行研發經酸鹼處理後以有機溶劑抽提之『抽提法』定量其嗎啡含量；該法樣品量爲400錠，約需60個檢驗工時，耗材費時。爲改善此缺點，本處乃研發該製劑之嗎啡高效液相層析定量方法。本方法係將檢體以鹼液抽提後經Inertsil 5 ODS-2管柱（4.6mm×150mm），以75%含2.5mM sod. 1-dodecanesulfonate之1%醋酸溶液與25% acetonitrile之混合移動相層析之，其他較複雜成分可由提高有機相比比例沖提洗出。經取10批本處產品複方甘草合劑錠，依配對試驗（Paired Test）方式分別以抽提法及HPLC法定量其嗎啡。其結果之平均值經平均值檢定無顯著差異；標準偏差分別爲±1.98%及±1.94%；其相對標準偏差均爲0.016。計算10組成對檢驗結果之相關係數得 $r=0.8093$ ；該相關係數經 r -test及 t -test均呈非常顯著相關，表示可以HPLC法取代抽提法，而使檢驗樣品量減少至20錠，檢驗工時降低爲約8小時，明顯地減低檢驗成本。

關鍵詞：複方甘草合劑錠，抽提法，HPLC法，配對試驗，相關係數（ r ）。

前 言

『複方甘草合劑錠』收載於中華藥典第二版⁽¹⁾，至今臨床上還廣為使用。該製劑成分包括阿片粉、甘草浸膏、酒石酸銻鉀、安息香酸、樟腦、茴香油等原料，總重量為每錠210mg；其中源自阿片粉之嗎啡含量甚微，每錠僅含嗎啡0.25mg。中華藥典第二版未收載其定量方法，亦無法採用中華藥典第二版、第三版⁽²⁾所載阿片及其製劑（如阿片粉、阿片酊等）的法定嗎啡含量測定法（一般稱爲石灰法）來測定。此乃因該法須取相當於無水嗎啡800mg之檢體進行檢驗，如應用於複方甘草合劑錠，依含量換算則檢體須取3200錠，由於檢體量過大，使得石灰法之溶煤量及操作等條件

限制了該法在本製劑的應用。本處過去皆以自行研發的『抽提法』（詳如附錄）定量其嗎啡；該方法須使用400錠檢體，操作相當繁複而且所需檢驗工時約達60個小時，不適用於多批次生產之例行性檢驗。以抽提法定量用於製備該製劑之阿片粉嗎啡含量時，所得結果比法定之石灰法為高（依本處以往對阿片粉的檢驗資料，其抽提法/石灰法=1.2173，標準差=0.0205，RSD=0.0168， $n=16$ ）；因此以抽提法定量本製劑之嗎啡時，須將所得結果除以1.2173換算成法定石灰法之理論值。Ziegler於1975年發表同時測定阿片中6種生物鹼的HPLC方法⁽³⁾，但其檢體配製繁瑣；Wu⁽⁴⁾和Nobuhara⁽⁵⁾也分別於1977年及1980年發展出分析阿片生物鹼的HPLC方法，但均不適用於

本製劑例行性含量測定。Brochmann-Hanssen和Furuya⁽⁶⁾所用氣相層析法雖然快速，但本製劑含高分子量之甘草素(glycyrrhizin)亦不適用此GC方法。因此設計本研究以開發該製劑之嗎啡HPLC定量方法，並將此HPLC法與抽提法作比較試驗，再以統計分析方法評估以HPLC方法取代抽提法之可行性。

材料與方法

一、原料與試藥

- (一)複方甘草合劑錠：本處產品。
- (二)去離子水：本處實驗室製備。
- (三)氰化甲烷：HPLC grade, MALLINCK-RODT.
- (四)氫氧化鈉：G. R. grade，石津製藥。
- (五)十二烷基磺酸鈉：HPLC grade, TCI.
- (六)冰醋酸：G. R. grade, JANSSEN.
- (七)鹽酸嗎啡對照標準品：由本處研究組製備、標定，並供應國內檢驗機構。
- (八)過濾頭：0.45 μ m (PVDF, syringe filter)，WHATMAN.

二、儀器與設備

在此我們採用了二套HPLC儀器進行試驗：

- (一)System controller: SCL-10A, SHIMADZU.
- UV-vis detector: SPD-10A, SHIMADZU.
- Pump: liquid chromatograph LC-10AD, SHIMADZU.
- On-line degasser: GASTORR GT-104, LAB-QUATEC.
- Integrator: C-R7A, SHIMADZU.
- Photodiode array UV-vis detector: SPD-M6A, SHIMADZU.
- CHEM-LAB層析儀數據處理系統：訊華股份有限公司。
- (二)Pump: WATERS 510.
- Auto injector: SIL-9A, SHIMADZU.
- Detector: WATERS 490E, programmable multiwavelength detector.
- Recorder: Baseline 810, chromatography workstation, WATERS.

三、實驗方法

- (一)HPLC條件

1.移動相

(1) 2.5mM sod. 1-dodecanesulfonate之1%醋酸溶液。

(2) acetonitrile.

取(1)與(2)依雙液遞變程序層析(gradient elution)：

Time (min)	(1) %	(2) %
0.1-32	75	25
32-70	65	35
70-95	75	25

本法自第32分鐘後提高有機相比例，以加速洗出其他複雜成分。

2.流速：1ml / min。

3.偵測器：285nm。

4.注射量：20 μ l。

5.管柱：Inertsil 5 ODS-2, 4.6mm $\times$ 150mm。

(二)標準液之配製

精確稱取morphine HCl $\cdot$ 3H₂O 65.0 mg (相當morphine base 50mg)，以水配製成50.0ml，再取0.5ml, 0.7ml, 1.0ml, 2.0ml, 3.0ml稀釋成10.0ml。

(三)樣品溶液之配製⁽⁷⁾

取20錠檢品，置於250 ml三角錐瓶，加50.0ml 0.04N NaOH，震盪45分鐘，以0.45 μ m syringe filter過濾即得。

(四)結果之計算

將HPLC所得面積代入標準曲線求得嗎啡量，除以樣品所含嗎啡理論量(每錠含嗎啡0.25mg)即得百分比。

(五)HPLC分析方法之驗證

依上述HPLC之條件，及標準液之配製與樣品溶液之配製方法，驗證本HPLC之系統適合性(包括系統分離效能、嗎啡波峰完整性確認)、線性、分析系統精密性、分析方法精密性、及分析方法準確法。分析方法準確性之驗證，因阿片粉含10%嗎啡外，複方甘草合劑錠原料之其餘成分不明確，故以外加嗎啡之方法進行驗證。

結果與討論

一、HPLC分析方法之驗證

- (一)系統適合性 (Suitability of the system)

1. HPLC系統分離效能 (The separation efficiency of the HPLC system)：由HPLC圖譜

Table 1. The separation efficiency of the system

	Retention time (min)	Resolution factor		Asymmetric factor	Capacity factor
Morphine	24	A-B	4.2	0.97	21.06
		B-C	1.5		

Note: A, C: unknown components B: morphine

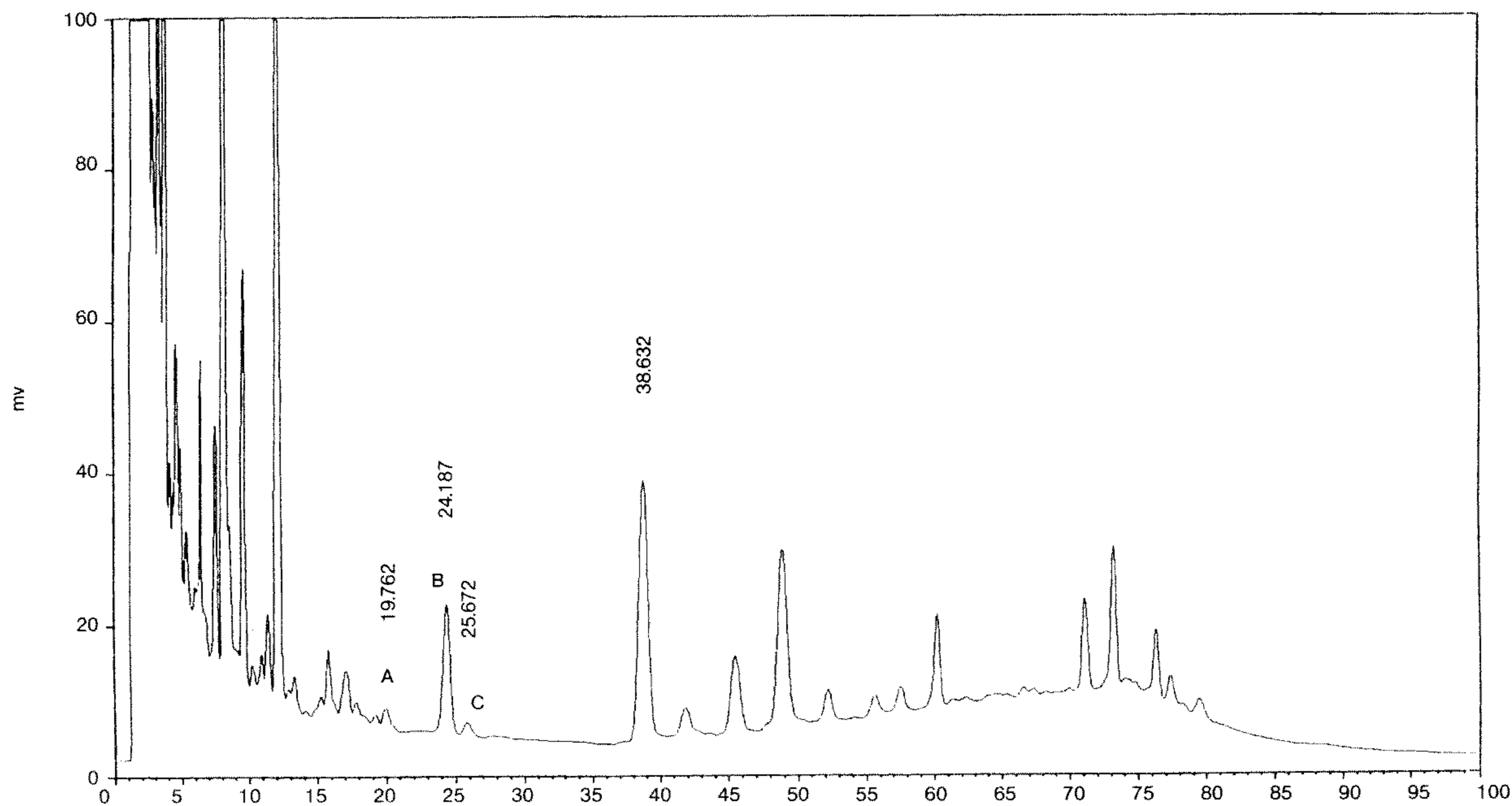


Figure 1. HPLC chromatogram of the sample preparation.

計算出嗎啡波峰之不對稱因子 (T)，容積因子 (k') 與相鄰不明成分 (A, C) 間之分離因子 (R)，以證明系統之分離能力與適合性。由表一， $T < 1.5$ ， $R \geq 1.5$ ，顯示本系統有良好的分離效能。

2.嗎啡波峰完整性確認 (Validation of the integrity of morphine peak)：以HPLC分析樣品時，用二極體列陣檢測器 (diode-array detector) 於波長255nm及284nm同時掃描檢測，嗎啡波峰於波峰頂點及兩邊中點等三處進行UV全波長比較，在此得到前後皆0.9999的純度，表示嗎啡波峰為一均質。

(二)線性 (Linearity)

線性試驗是由注射一組數個濃度的標準品溶液，這些濃度之標準溶液之個別對應之反應

值，必須呈線性關係，由這些濃度與其對應的反應值之線性迴歸分析，本實驗得相關係數為0.9996。

(三)分析系統精密性 (Precision of the analysis system)

注射六重覆濃度為0.107mg / ml的標準品溶液，測量每一重覆的反應值 (波峰面積)，本系統所得相對標準偏差為0.2698%。

(四)分析方法精密性 (Precision of the analysis method)

分析方法的精密性在同日內的測試，係取A、B、C三試樣依前述方法處理，各於同日內進行三次分析。結果如表二所示，本方法相對標準偏差為0.42%。

(五)分析方法準確性 (Accuracy of the analysis

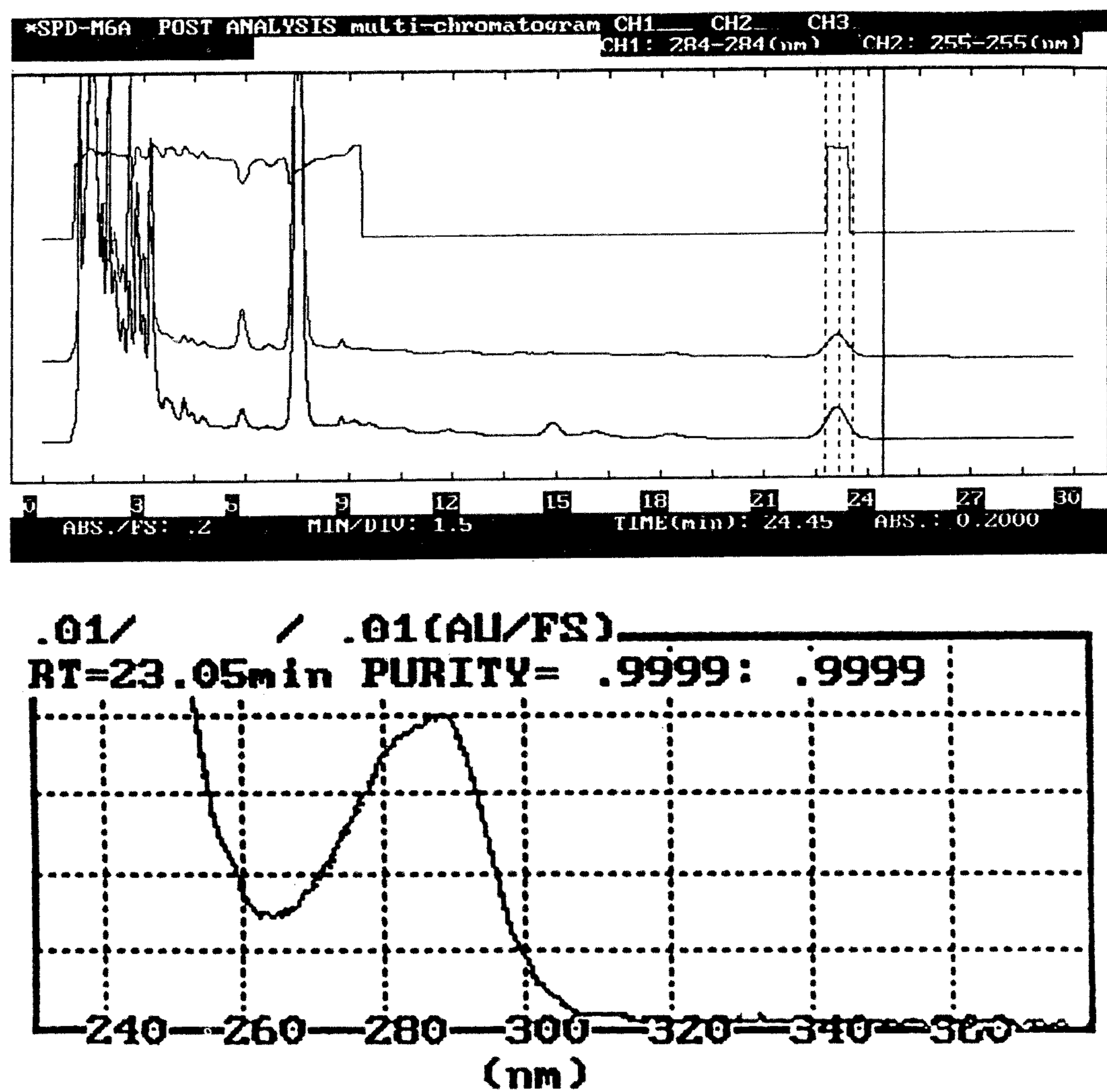


Figure 2. The chromatograms of sample and spectrum of morphine detected by a photodiode array UV-vis detector.

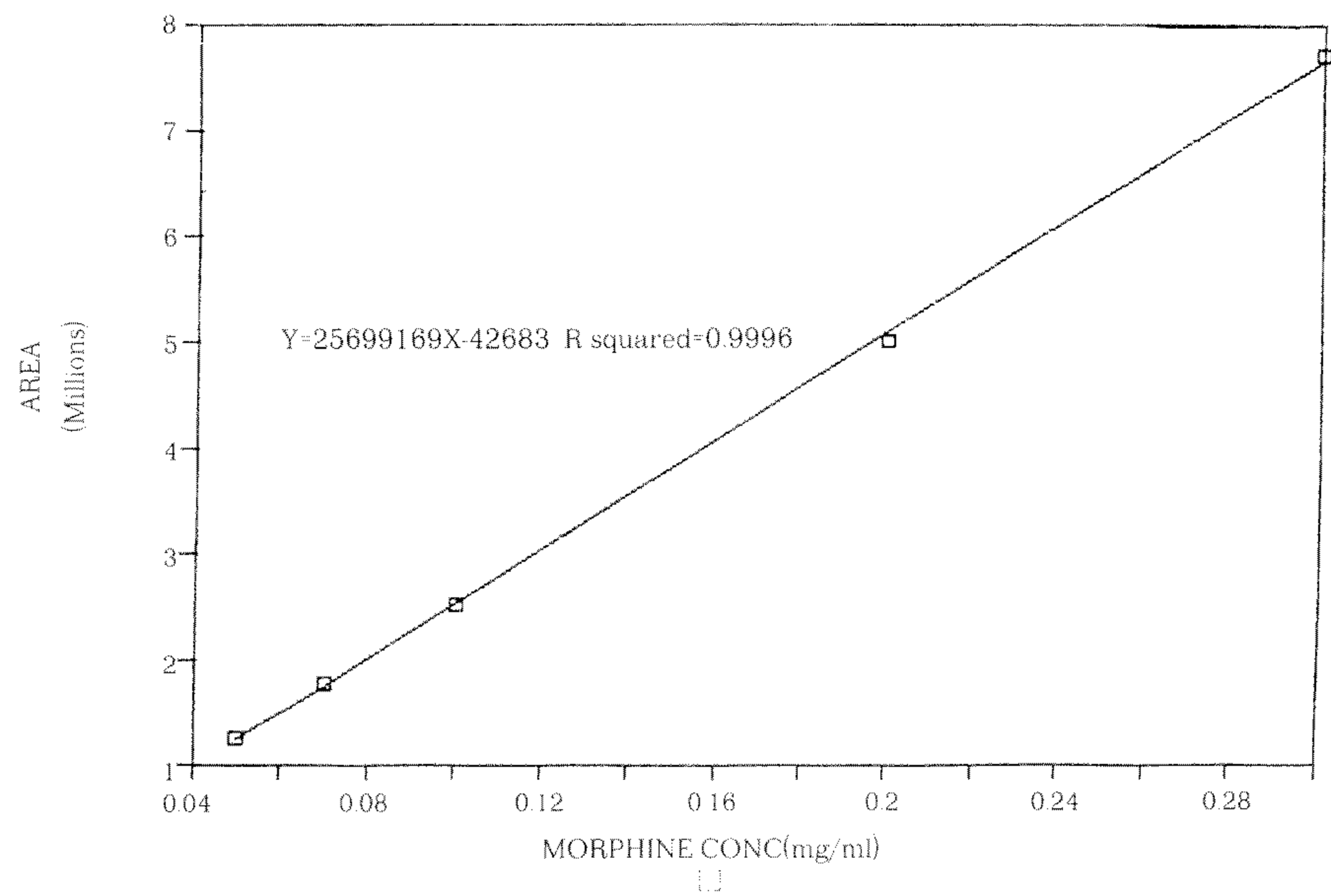


Figure 3. Standard curve of morphine.

Table 2. Intraday precision analysis

Sample	Sample wt. (g)	Assay (%)	Mean±SD*	RSD (%)
A	4.6553	118.52	118.31±0.49	0.42
B	4.5933	118.67		
C	4.6720	117.75		

*n= 3

method)

我們採用標準品添加法，分三組別（每組含A、B、C三個樣品），每個樣品取樣稱量20錠，再依組別個別加入相當於嗎啡0.98mg，1.96mg，2.94mg的鹽酸嗎啡後再配製成定容50.0ml。另一組樣品則不加鹽酸嗎啡當對照

組，計算嗎啡回收率，結果如表三。

二、HPLC方法與抽提法之比較試驗⁽⁸⁾

經取10批本處複方甘草合劑錠產品，依配對試驗（Paired Test）方式分別以HPLC法及抽提法定量其嗎啡。其結果及統計分析如下：

(一)檢驗結果及統計值

批號	HPLC法 (%) (X)	抽提法 (%) (Y)	XY	X-Y (d) (%)
8110-01	118.50	118.44	14035	0.06
8111-05	123.27	122.78	15135	0.49
8201-01	124.18	123.39	15323	0.79
8201-06	122.95	124.13	15262	-1.18
8202-03	118.34	118.54	14028	-0.20
8203-06	123.39	123.40	15226	-0.01
8204-01	121.38	122.51	14870	-1.13
8204-02	121.32	121.10	14692	0.22
8208-04	120.13	123.95	14890	-3.82
8208-05	120.63	121.07	14605	-0.44
平均	121.41	121.93	14806.6	-0.522
平方和	147439	148711		18.4116
和	1214.1	1219.3	148066	-5.22
標準偏差	1.94	1.98		
相對標準偏差	0.016	0.016		

Table 3. Accuracy of HPLC method

Sample	Average area*	Recovery (%)	Mean (%)±SD
A+0.98mg	384705.0	100.38	99.86±0.72
B+0.98mg	380558.5	99.04	
C+0.98mg	386934.5	100.15	
A+1.96mg	431248.5	99.11	100.44±1.18
B+1.96mg	441904.5	100.88	
C+1.96mg	444729.0	101.34	
A+2.94mg	502621.5	102.07	102.42±0.38
B+2.94mg	505825.5	102.83	
C+2.94mg	501829.0	102.36	

*n=2

(二) 相關係數 (r) 計算

$$\begin{aligned}SS(XX) &= \sum X^2 - (\sum X)^2 / n \\&= 35.1\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}SS(YY) &= \sum Y^2 - (\sum Y)^2 / n \\&= 41.8\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}SS(XY) &= \sum XY - (\sum X)(\sum Y) / n \\&= 31\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}r &= SS(XY) / \sqrt{SS(XX) \times SS(YY)} \\&= 0.8093\end{aligned}$$

(三) 相關係數檢定

r 檢定：

$$r = 0.8093 > r_0(9, 0.01) = 0.7348$$

非常顯著相關

t 檢定：

$$\begin{aligned}t &= r\sqrt{(N-2)/\sqrt{1-r^2}} \\&= 5.242 > t_0(8, 0.01) = 3.250\end{aligned}$$

非常顯著相關

(四) 兩種方法平均值差異檢定

$$\bar{d} = -0.522$$

$$\begin{aligned}S(d - \bar{d})^2 &= Sd^2 - (Sd)^2 / n \\&= 18.4116 - (-5.22)^2 / 10 \\&= 15.68676\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}V &= S(d - \bar{d})^2 / (n - 1) \\&= 15.68676 / 9 \\&= 1.743\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sigma_e &= \sqrt{V} \\&= 1.3202\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}t &= \bar{d} / \sigma_e / \sqrt{n} \\&= 1.2503 < t_0(9, 0.05) = 2.262\end{aligned}$$

故兩種方法平均值無顯著差異

三、結論

(一) 由本研究之 HPLC 分析方法驗證，將複方甘草合劑錠檢體以鹼液抽提後經 Inertsil 5 ODS-

2, 4.6mm × 150mm column，以 75% 2.5mM sod. 1-dodecanesulfonate 之 1% 醋酸溶液與 25% acetonitrile 層析，用 285nm 偵測，流速 1ml / min 之 HPLC 條件可定量其嗎啡。

(二) 該 HPLC 法經確認 (validation) 均符合各確認項目之要求。

(三) 原來的抽提法需達 400 錠的檢體，本 HPLC 法所需檢體則顯著減少；抽提法一次檢驗所需工時約 60 小時，本 HPLC 法則僅需約 8 小時；因此本 HPLC 法應比抽提法經濟。

(四) 經取 10 批本處複方甘草合劑錠產品，以本研究之 HPLC 法及抽提法做配對試驗，並將所得 10 組相對應含量測定值之平均值及該兩種方法之相關係數作統計檢定。抽提法與 HPLC 法之平均值經平均值差異檢定，兩者之間無顯著差異。兩種方法之變異係數皆為 0.016；相關係數 (r) 則為 0.8093，經 r-test 及 t-test 檢定均呈非常顯著相關。因此以本 HPLC 方法取代原來的抽提法以定量複方甘草合劑錠中之嗎啡應屬可行。

參考文獻

1. 內政部中華藥典編修委員會，1959，中華藥典，第二版，pp. 326-327，內政部，台北。
2. 行政院衛生署中華藥典編修委員會，1980，中華藥典，第三版，行政院衛生署，台北。
3. Ziegler, H. W., Beasley, T. H., Smith, D. W. 1975. Simultaneous Assay for Six Alkaloids in Opium, Using High-performance Liquid Chromatography. Journal of the AOAC. 58 (5) : 888-897.
4. Wu, C. Y. and Wittick, J. J. 1977. Separation of five Major Alkaloids in Gum Opium and Quantitation of Morphine, Codeine, and Thebaine by Isocratic Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography. Analytical Chemistry. 49 (3) : 359-363.
5. Nobuhara, Y., Hirano, S., Namba, K. and Hashimoto, M. 1980. Separation and Determination of Opium Alkaloids by High-performance Liquid Chromatography. J. Chromatography. 190: 251-255.
6. Brochmann-Hanssen, E., Furuya, T. 1964.

Opium Alkaloids Separation and Identification by Gas, Thin Layer, and Paper Chromatography. J. Pharmaceutical Sciences. 53(12): 1549-1550.

7. 中藥化學，第一版，1987，pp. 314-317，上海科學技術出版社。
8. 高級品質管制學，第六版，1978，pp. 46-53，中國生產力中心。

附 錄

嗎啡定量法（抽提法）

本方法為本處自行研發，適用於阿片及阿片粉、阿片酊等高嗎啡含量製劑，亦適用於複方甘草合劑錠等低嗎啡含量製劑。應用於複方甘草合劑錠時，係先將該製劑配方所用之阿片粉分別以石灰法及抽提法定量其嗎啡（以該兩種方法定量之結果有差異，其差異為抽提法 / 石灰法 = 1.2173，標準偏差 = 0.0205，RSD = 0.0168，n = 16）；製劑經以抽提法定量後，將其結果除以1.2173，得該批製劑之嗎啡含量。其操作步驟如下：

精確稱取各製劑品項所定之檢體量，置乳鉢中，加0.1N硫酸5ml，研勻。再加0.1N硫酸25ml，隨加隨磨。浸漬30分鐘，過濾，量取濾

液20ml，置第一分液漏斗中，加6N氫氧化鈉2ml，用氯仿30ml抽提。抽提液以5ml水及6N氫氧化鈉0.3ml於第二分液漏斗中洗滌，分出氯仿蒸餾回收，用氯仿抽提6~7次。第一分液漏斗中加6N硫酸2.2ml及二氯乙酸0.7ml，第二分液漏斗中加6N硫酸0.6ml及二氯乙酸0.2ml，另於第三分液漏斗加0.1N硫酸5ml及二氯乙酸0.1ml。第一分液漏斗加氯仿20ml抽提振搖後分出於第二分液漏斗，振搖洗滌後，分出放入第三分液漏斗中，振搖洗滌後放出，經Marquis試劑檢測，如仍有嗎啡反應，則於第四分液漏斗中以0.1N硫酸5ml及0.1ml二氯乙酸繼續洗滌之。如此用氯仿抽提五次，氯仿蒸餾回收。第一至第四分液漏斗酸液合併於第一分液漏斗中，加氨試液至鹼性，用氯仿醇（85：15）液，每次20~30ml，抽提至不含嗎啡為止（取1-2滴抽提液蒸乾，滴加Marquis試劑不呈現紫色），合併抽提液加水5ml洗滌之，用預以氯仿潤濕之小濾紙或棉花團濾入燒瓶內。洗液再用氯仿醇混合液（85：15）抽提五次，每次10ml，並濾入燒瓶內。置水鍋上蒸餾回收溶劑，蒸乾。殘渣中精確加入0.1N硫酸10ml及水20ml。加熱煮沸使殘渣溶解。放冷，以甲基紅試液為指示劑，用0.1N氫氧化鈉滴定。則每ml 0.1N硫酸 = 28.53mg無水嗎啡。

HPLC Analysis of Morphine in Tablet Mixture Glycyrrhizin Composite

SHIOW-GUEI CHANG, CHAO WANG, JIA-JEN CHEN,
FWU-SHOW CHIN AND JIH-HENG LI

Narcotics Bureau, Department of Health, Executive Yuan, Taipei, Taiwan, R. O. C.

ABSTRACT

For the quality control of morphine content in Tablet Mixture Glycyrrhizin Composite, previously a so called 《extraction》 method was developed by our bureau. However, this method required acid and base treatments, repeated extraction of the sample with organic solvents, and it took about 60 working-hours. In this study, we have established an HPLC method to determine the morphine content in the product by using an Inertsil 5 ODS-2 column ($4.6 \times 150\text{mm}$), and a mobile phase consisting of 75% 2.5mM sod. 1-dodecane-sulfonate in 1% acetic acid and 25% acetonitrile. In order to compare the HPLC method with extraction method, the morphine

content of 10 batches of product was quantified by both methods. The results obtained from both methods were not significantly different. The standard deviations of extraction method and HPLC method were $\pm 1.98\%$ and $\pm 1.94\%$, respectively. The correlation coefficient(r) of 10 pairs data was 0.8093, showing very significant relationship between two methods in accordance with the r -and t -tests. In addition, the HPLC method reduces the analysis time to 8 hours. These results strongly suggest that the HPLC method is more efficient than the extraction method.

Key words: Tablet Mixture Glycyrrhizin Composite, morphine, extraction method, HPLC method, quantitative analysis, correlation coefficient.