

中藥製劑中摻加Aminitroazole, Metronidazole, Ornidazole及Tinidazole之高效液相層析分析

顧祐瑞 蔡明哲 溫國慶

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘 要

本研究利用高效液相層析方法，分析aminitroazole、metronidazole、ornidazole及tinidazole四種西藥成分於中藥製劑中之摻加情況。本法採用C₁₈逆相層析管柱，以pH5.5之0.01M磷酸鹽溶液：乙腈（85：15）作等壓沖提。結果顯示，四種西藥成分之檢量線之直線相關係數介於0.9998至0.9999間，顯示良好之線性關係。添加於桂枝茯苓丸之回收率依序為aminitroazole，87.5%；metronidazole，90.0%；ornidazole，86.4%及tinidazole，85.9%，顯示準確性尚可接受。最低檢出濃度介於0.1μg/ml至0.4μg/ml間。同日内之相對標準差為1.5-1.6%，異日間之相對標準差為2.6-5.7%，顯示再現性亦可接受。

依此法分析送本局檢驗之中藥丸中摻加tinidazole之情況，其添加回收率為103.9%。結果顯示該中藥丸所含tinidazole之量介於3.1~4.4%之間。所檢測之9粒檢體中每丸tinidazole之含量介於15.3mg至22.0mg之間。

關鍵詞：中藥摻加西藥檢驗，高效液相層析，殺滴蟲劑，tinidazole。

前 言

Aminitroazole、metronidazole、ornidazole及tinidazole(構造式見圖一)等用於治療陰道滴蟲(*Trichomonas vaginalis*)、赤痢變形蟲(*Entamoeba histolytica*)及鞭毛蟲(*Giardia lamblia*)等之感染症，及男女泌尿生殖道之滴蟲症⁽¹⁾。有關應用高效液相層析方法於tinidazole及metronidazole成分之分析，曾有Gibson等⁽²⁾報導血漿中metronidazole及其代謝物之分析，Pashankov等⁽³⁾報導懸浮液劑中metronidazole benzoate之分析及Lanbeck等⁽⁴⁾報導血漿、糞便中metronidazole及tinidazole之分析，惟尚未見有上述四種同類成分於中藥製劑中之分析報

告。

近年來本局曾分別利用高效液相層析儀，進行中藥中摻加風濕鎮痛類成分⁽⁵⁾及sul-famethoxazole⁽⁶⁾之偵測及定量，及利用毛細管電泳層析儀定量中藥中摻加之acetaminophen、caffeine、phenylbutazone及prednisolone等⁽⁷⁾。本研究乃參考Lanbeck等⁽⁴⁾所採用之高效液相層析方法，分析tinidazole、metronidazole、ornidazole及aminitroazole四種西藥成分，對其迴歸方程式之線性關係、最低檢出濃度、再現性及準確性加以探討，以確認此法用於偵測並定量此四成分添加於桂枝茯苓丸中之可行性，並應用此法分析本局受理之不明來源之中藥丸檢體中摻加之tinidazole之情況。

材料與方法

一、檢體

(-)於民國83年9月間，台灣高等法院高雄分院轉高雄市政府衛生局送驗未記明來源，標示「白帶理」之黑色不知名中藥丸檢體，共計三包，每包約有中藥丸70粒。

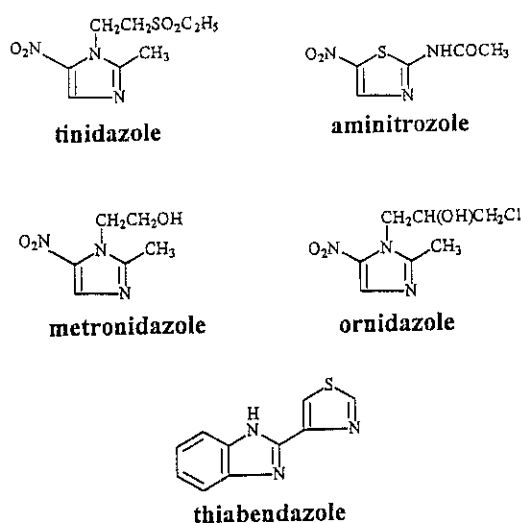


Figure 1. Structures of tinidazole, aminitrozole, metronidazole, ornidazole and thiabendazole (used as internal standard).

(-)桂枝茯苓丸（空白對照用中藥製劑），其組成藥材比例為桂枝 1.0，茯苓 1.0，桃仁 1.0，牡丹皮 1.0及芍藥 1.0。

二、試藥

Metronidazole, ornidazole, tinidazole及thiabendazole購自 SIGMA公司(St. Louis, USA), aminitrozole為製劑原料，乙腈(LC級)購自LAB-SCAN公司(Dublin, Ireland), 乙酸乙酯及氯仿(均GR級)購自皓峰公司(Taipei, Taiwan), 乙醚(GR級)購自BDH公司(England), 乙醇購自公賣局。Sodium dihydrogen phosphate及disodium hydrogen phosphate(均GR級)購自NACALAI公司(Kyoto, Japan)。薄層層析板silica gel 60F₂₅₄購自E. MERCK公司(Germany)。

三、儀器

日立廠牌附光二極體陣列檢出器之高效液相層析儀(HITACHI L-6200 Intelligent Pump with HITACHI L-3000 Photo-Diode Array Detector)，連接自動注射器(Shimadzu SIL-9A auto injector)，所用條件如下：層析管為Cosmosil 5C₁₈-AR (150×4.6 mm I.D.)；移動相為pH5.5之0.01M 磷酸鹽溶液：乙腈 (85：15)，流速為 1.0 ml/min，偵測波長為 320 nm。

Table 1. Relationships between concentrations of four antitrichomonal drugs and the peak area ratios

Concentration (mg/ml)	Peak area ratio*			
	Aminitrozole	Metronidazole	Ornidazole	Tinidazole
0.02	0.18(4.05)	0.28(2.48)	0.24(3.11)	0.20(4.49)
0.05	0.42(4.82)	0.70(1.95)	0.55(4.15)	0.48(4.57)
0.10	0.83(2.21)	1.36(1.32)	1.10(1.70)	0.94(1.79)
0.15	1.23(5.29)	2.05(4.23)	1.64(4.06)	1.42(4.29)
0.20	1.67(2.62)	2.69(2.54)	2.18(2.59)	1.87(2.21)

* Peak area of antitrichomonal drug/ peak area of thiabendazole, with relative standard deviation (%) in parentheses (n=3).

Aminitrozole: $Y=0.12X-7.01E-04$ ($r=0.9998$)

Metronidazole: $Y=7.46E-02X-1.76E-03$ ($r=0.9999$)

Ornidazole: $Y=9.23E-02X-1.38E-03$ ($r=0.9999$)

Tinidazole: $Y=0.11X-1.61E-03$ ($r=0.9999$)

Table 2. Recoveries of antitrichomonal drugs in Gui-Chi-Hu-Lin-Wan*

Drug	Added (mg)	Measured (mean $\pm$ SD, mg) [#]	Recovery (%)	Mean $\pm$ SD (%)
Aminitrozole	3.9	3.8 $\pm$ 0.1	97.4	87.5 $\pm$ 5.9
	5.5	4.6 $\pm$ 0.2	83.6	
	7.6	6.6 $\pm$ 0.2	86.8	
	9.6	7.9 $\pm$ 0.1	82.3	
Metronidazole	3.4	2.8 $\pm$ 0.0	82.4	90.0 $\pm$ 4.8
	5.0	4.6 $\pm$ 0.0	92.0	
	7.7	7.3 $\pm$ 0.5	94.8	
	10.3	9.6 $\pm$ 0.2	93.2	
Ornidazole	3.7	3.3 $\pm$ 0.1	89.2	86.4 $\pm$ 2.4
	5.7	4.8 $\pm$ 0.0	84.2	
	8.7	7.3 $\pm$ 0.4	83.9	
	10.2	9.0 $\pm$ 0.1	88.2	
Tinidazole	3.0	2.6 $\pm$ 0.1	86.7	85.9 $\pm$ 2.3
	5.0	4.1 $\pm$ 0.3	82.0	
	7.7	6.8 $\pm$ 0.1	88.3	
	11.0	9.5 $\pm$ 0.4	86.4	

*The component herbs were Cinnamomi Ramulus, Hoelen, Persicae Semen, Moutan Cortex and Paeoniae Radix.

[#] n=3.

Hewlett-Packard氣相層析質譜儀(Hewlett-Packard 5890 Series II Gas Chromatography with Hewlett-Packard 5970 Series Mass Selective Detector), 層析管為DB-1, 0.33 μ m, 12m $\times$ 0.2mm I.D., 檢出器及注入口之溫度均為250 $^{\circ}$ C, 層析管溫度最初100 $^{\circ}$ C維持2分鐘後, 採昇溫法以每分鐘10 $^{\circ}$ C昇溫至250 $^{\circ}$ C, 攜行氣體為氮氣。

四、實驗方法

(一)標準溶液之配製

精確稱取 aminitrozole, metronidazole, ornidazole, tinidazole 標準品及內部標準品thiabendazole適量, 以95%乙醇稀釋調配成一系列濃度依序為0.02、0.05、0.10、0.15及0.20 mg/ml; 內部標準品thiabendazole為0.05 mg/ml。

(二)檢量線之製作

分別取不同濃度之標準品溶液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, 作檢量線並求出其線性迴歸方程式及相關係數。

(三)檢液之配製

取中藥丸檢體一粒, 精確稱定, 剪碎後加2ml水, 靜置一小時俟藥丸崩散後, 加乙醇10ml, 於超音波40 $^{\circ}$ C振盪萃取30分, 重覆萃取二次, 過濾, 合併濾液以乙醇定容至25ml, 取此液1ml並加入內部標準品溶液, 以乙醇定容至10ml, 使其含thiabendazole 0.05mg/ml, 供作檢液。

(四)添加回收試驗

1.分別精確稱取aminitrozole、metronidazole、ornidazole及tinidazole對照標準品各約3、6、8及10mg, 分別置入490mg之桂枝茯苓丸粉末中, 同檢液之配製操作以高效液相層析儀分析, 求其添加回收率。

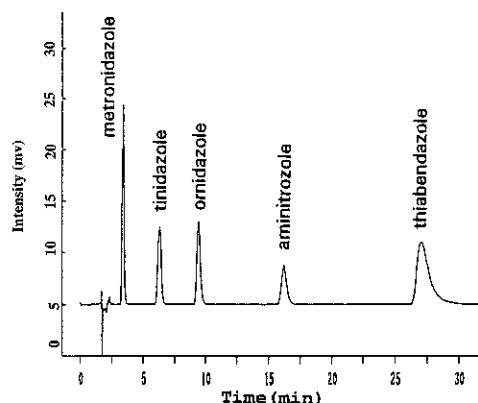


Figure 2. Chromatogram of four antitrichomonal added in Gui-Chi-Hu-Lin-Wan. Thiabendazole was used as internal standard.

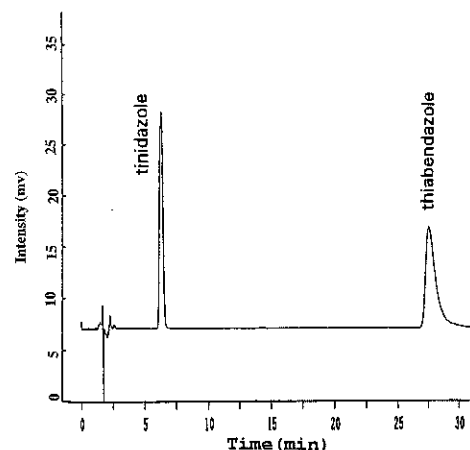


Figure 3. Chromatogram of tinidazole in sample. Thiabendazole was used as internal standard.

2.取中藥丸檢體五粒，剪碎後混合，分為五份(一份不添加tinidazole，作為空白對照用)，每份約為490mg，精確稱定，其中四份分別加入tinidazole對照標準品各約6、12、18及24mg，同檢液之配製操作以高效液相層析儀分析，求其添加回收率。

(四)西藥成分之篩檢

檢體依本局編印之中藥製劑鑒加西藥之檢驗⁽⁸⁾乙書所登載之方法檢驗，稱取中藥丸檢體約3g，剪碎並加少量水俟藥丸崩散後，加入乙醇15ml於超音波振盪萃取30分後過濾，供作檢液，以薄層層析法篩檢。薄層層析法之展開液為氯仿：乙酸乙酯(1：1, v/v)及乙酸乙酯：乙醚(4：1, v/v)，以紫外光燈(254 nm)檢測。

上述檢液經0.45μm孔徑之微孔濾膜過濾後，注入氣相層析質譜儀分析。

(五)同日内及異日間試驗

於各對照標準品檢量線之範圍內，選擇0.10mg/ml之對照標準溶液，於同一日及不同的五天重覆注入高效液相層析儀分析各五次，將所得之數據(peak area ratio)計算相對標準差。

(六)最低檢出濃度試驗

將四種對照標準品溶液，依序稀釋，以高效液相層析儀分析，以產生三倍於雜訊之波峰高度比之對照標準品濃度視為最低檢出濃度。

結果與討論

中藥製劑摻加西藥之檢驗，向為本局之重點工作，楊氏等⁽⁹⁾之報告，針對民國79年度台灣地區，中醫診所及中藥房調製之調經理帶類中藥製劑，篩檢metronidazole西藥成分，該次調查雖全部檢體均未檢出，但作者於83年9月就送本局檢驗之檢體中，篩檢出metronidazole之類似西藥成分tinidazole，顯示摻加西藥成分之品目有增加之趨勢，因而就此類成分之確認與定量分析進行研究。

一、metronidazole等四種西藥成分添加於桂枝茯苓丸之分析

(一)薄層層析方法篩檢

含metronidazole等四種對照標準品溶液經薄層層析方法分別以氯仿：乙酸乙酯(1：1, v/v)及乙酸乙酯：乙醚(4：1, v/v)展開，aminotrozole、metronidazole、ornidazole及tinidazole之R_f值分別依序為0.42、0.08、0.20及0.13；0.60、0.21、0.43及0.24，各成分經紫外光分光光度計檢測，紫外光分光吸收圖譜之最大及最小吸收波長依序為λ(95% ethanol)aminotrozole: 338、233nm；271、217nm，metronidazole: 311、218nm；263、220nm，ornidazole: 312nm；262nm及tinidazole: 310nm；261nm。其中metronidazole、ornidazole及tinidazole均為1位有取代之5-nitroimidazole，aminotrozole則為5-nitrothiazole，因此後者之結構式及性質與前三者差異較大，故aminotrozole之R_f值與紫外光分光吸收圖譜和前三者有較顯著之差異，而

Table 3. Intraday and interday analytical precisions of antitrichomonal drugs

Drug	Intraday RSD(%)*	Interday RSD(%)*
Aminitroazole	1.48	5.65
Metronidazole	1.56	4.73
Ornidazole	1.50	2.62
Tinidazole	1.56	2.65

* n=5.

Table 4. Recovery of tinidazole added in sample

Drug	Added (mg)	Measured (mean $\pm$ SD, mg)*	Recovery (%)	Mean $\pm$ SD (%)	RSD (%)
Tinidazole	6.4	6.9 $\pm$ 0.6	108.9	103.9 $\pm$ 3.0	2.9
	12.1	12.5 $\pm$ 0.3	103.1		
	18.1	19.0 $\pm$ 0.2	102.7		
	24.4	24.6 $\pm$ 0.4	100.9		

* n=3.

metronidazole、ornidazole及tinidazole三成分之Rf值與紫外光分光吸收圖譜相近，因此再利用高效液相層析方法探討。

(二) 高效液相層析方法分析

對照標準品溶液以高效液相層析儀分析，其滯留時間分別為metronidazole 3.4min、tinidazole 6.3min、ornidazole 9.4min及aminotroazole 16.2min，內部標準品thiabendazole為27.1min。對照標準品各成分之回歸方程式及相關係數(r)如表一所示，相關係數由0.9998至0.9999，顯示良好之線性關係。

桂枝茯苓丸具有活血祛瘀，緩消癥塊之效能，主治慢性子宮頸炎，帶下^(10,11,12)，一般中醫常用於婦科疾病之治療，故選用此方進行模擬添加西藥之分析。桂枝茯苓丸之乙醇萃取液，依本法注入高效液相層析儀分析，所探討之四種西藥成分之分析不受中藥成分干擾，層析圖如圖二所示，其添加各對照標準品之回收率，介於85.9至90.0%，如表二所示，顯示準確性尚可接受。另如表三所示，同日內之相對標準差為1.5-1.6%，異日間之相對標準差為2.6-5.7%，顯示再現性亦可接受。最低檢出濃度依

序為aminotroazole 0.4 μ g/ml、metronidazole 0.1 μ g/ml、ornidazole 0.2 μ g/ml及tinidazole 0.2 μ g/ml。以上結果顯示上述高效液相層析條件可用於中藥桂枝茯苓丸添加aminotroazole、metronidazole、ornidazole及tinidazole等西藥之分析。

二、不知名中藥丸檢體之分析

(一) 檢體添加tinidazole西藥成分之篩檢與確認

檢液經薄層層析方法分別以氯仿：乙酸乙酯(1:1, v/v)及乙酸乙酯：乙醚(4:1, v/v)展開，與tinidazole標準品比對，於紫外光燈254nm波長下檢視，其Rf值分別為0.13及0.24，分別刮下二種薄層層析板分離之成分及同操作之薄層層析板上之tinidazole對照標準品，溶於乙醇，經紫外光分光光度計檢測，檢出成分均與tinidazole對照標準品之紫外光分光吸收圖譜一致，其最大吸收為 λ (95% ethanol)310nm，最小吸收為261nm。

經氣相層析質譜儀分析之主要質譜裂片(m/z)為247(M⁺)、230、201(M-NO₂)⁺、171、154(M-SO₂C₂H₅)⁺、123、93及80，經與tinida-

Table 5. Content of tinidazole in sample.

Package of sample	Average weight (mean $\pm$ SD, mg)*	Sample	Weight (mg)	Content per pill (mean $\pm$ SD, mg)#	Content (mean $\pm$ SD, %)#
1	490.2 $\pm$ 9.5 (1.94)	P1	498.3	19.4 $\pm$ 0.2	3.9 $\pm$ 0.0
		P2	500.5	22.0 $\pm$ 0.1	4.4 $\pm$ 0.0
		P3	492.6	19.3 $\pm$ 0.3	3.9 $\pm$ 0.1
2	486.6 $\pm$ 7.7 (1.58)	P4	480.6	19.6 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.1
		P5	502.6	15.3 $\pm$ 0.2	3.1 $\pm$ 0.0
		P6	492.3	21.8 $\pm$ 0.4	4.4 $\pm$ 0.1
3	488.6 $\pm$ 12.3 (2.52)	P7	476.1	17.9 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.0
		P8	490.7	17.8 $\pm$ 0.5	3.6 $\pm$ 0.1
		P9	458.5	17.4 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 0.1

* n=20.

n=3.

zole對照標準品比對，結果一致。

(二) 檢體中所參加之tinidazole之定量

本研究所採用之高效液相層析分析方法，用於中藥丸檢體參加西藥之定量分析，結果如圖三所示。Tinidazole添加於不知名中藥丸檢體回收率之結果平均約為103.9%(如表四)，雖與添加於桂枝茯苓丸之平均回收率85.9%有所差異，可能因不同檢體基質之萃取影響所致，但兩者之相對標準差分別為2.9%及2.3%，準確性應可接受。就三包中藥丸檢體，其每包中取20粒檢體之平均重量分別為490.2、486.6及488.6mg，而其重量之相對標準差分別為1.9、1.6及2.5%，顯示其差異並不大。就三包中藥丸檢體，其每包中取3粒檢體之定量分析結果如表五所示，檢體中所含tinidazole之量介於3.1~4.4%之間，所檢測之9粒檢體中每丸tinidazole之含量介於15.3mg至22.0mg之間，平均為18.9mg。

參考文獻

1. Grunberg, E. and Titworth E.H. 1973. Chemotherapeutic Properties of Heterocyclic Compounds: Monocyclic Compounds with Five-membered Rings. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 317-346.
2. Gibson, R.A., Lattanizo, L. and McGee, H. 1984. Optimized Liquid-Chromatographic Determination of Metronidazole and Its Metabolites in Plasma. *Clin. Chem.* 30(5): 784-787.
3. Pashankov, P.P. and Kostova L.L. 1987. Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography of Metronidazole Benzoate in Suspension Dosage Form. *J. Chromatogr.* 394: 382-387.
4. Lanbeck, K. and Lindstrom, B. 1979. Determination of Metronidazole and Tinidazole in Plasma and Feces by High-performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* 162: 117-121.
5. 顧祐瑞, 蔡明哲, 溫國慶. 1995. 利用高效液相層析法篩檢中藥製劑中參加風濕鎮痛類西藥成分. *藥物食品分析*. 3(1): 51-56.
6. 顧祐瑞, 蔡明哲, 溫國慶. 1995. 中藥參加 Sulfamethoxazole 之定量探討. *藥物食品分析*. 3(2): 115-119.
7. 顧祐瑞, 蔡明哲, 溫國慶. 1995. 毛細管電泳法定量風濕鎮痛類中藥製劑中參加西藥成分之探討. *藥物食品分析*. 3(3): 185-192.
8. 劉宜祝, 林哲輝. 1991. 中藥檢驗方法專輯(四) 中藥製劑參加西藥之檢驗. p. 19. 行政院衛生

- 署藥物食品檢驗局.台北.
- 9.楊美華,劉宜祝,徐廷光,孫慈悌.1989.七十六年度市售感冒鎮咳類中藥製劑摻加西藥成分之調查.藥物食品檢驗局調查研究年報.7:148-149.
- 10.中華民國藥師公會全國聯合會.1991.臨床常用中藥方劑手冊. p. 70. 中華民國藥師公會全國聯合會.台北.
- 11.石野尚吾. 1992. 婦人科疾患の漢方治療概論. 現代東洋醫學. 13(2): 50-55.
- 12.油田正樹. 1992. 婦人科領域に頻用される生藥とその藥理. 現代東洋醫學. 13(2): 17-24.

Determination of Aminitroazole, Metronidazole, Ornidazole and Tinidazole Adulterated in Traditional Chinese Medicine by High Performance Liquid Chromatography

YOE-RAY KU, MING-JER TSAI AND KUO-CHING WEN

*National Laboratories of Foods and Drugs,
Department of Health, Executive Yuan,
Republic of China*

ABSTRACT

Four antitrichomonal drugs, aminitroazole, metronidazole, ornidazole and tinidazole, adulterated in traditional Chinese medicine were assayed simultaneously by high performance liquid chromatography on an ODS column. This chromatographic method was carried out using isocratic elution with 0.01M phosphate buffer (pH 5.5) and acetonitrile (85:15). Calibration graphs of four adulterants were constructed in the range 0.02-0.20 mg/ml and their correlation coefficients calculated in the range 0.9998-0.9999. The recoveries of antitrichomonal drugs added to Gui-Chi-Hu-Lin-Wan were 87.5% for aminitroazole, 90.0%

for metronidazole, 86.4% for ornidazole and 85.9% for tinidazole. The relative standard deviations for intraday and interday analyses were 1.5-1.6% and 2.6-5.7% (n=5), respectively.

Tinidazole was detected and confirmed by TLC, UV and GC-MS from a herbal black pill that was consigned by The High Court on Sep. 1994. The assay of tinidazole was carried out by the HPLC method mentioned above. The recovery of tinidazole added to the traditional Chinese medicine was 103.9%. The content of tinidazole in the black pill was ranged from 3.1 to 4.4% (15.3-22.0mg in each pill).

Key words: HPLC, traditional Chinese medicine, tinidazole, adulterant, antitrichomonal.