

毛細管電泳法定量風濕鎮痛類中藥 製劑中摻加西藥成分之探討

顧祐瑞 蔡明哲 溫國慶

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘 要

本研究利用毛細管電泳儀分析探討,經常於風濕鎮痛類中藥製劑中檢出之西藥成分,包括非固醇類鎮痛消炎劑acetaminophen, aminopyrine, buctin, ethoxybenzamide, indomethacin, ketoprofen, mefenamic acid, phenylbutazone 及 diclophenac sodium 九種;類固醇 dexamethasone及prednisolone二種;肌肉鬆弛劑chlorzoxazone;鎮靜安眠劑diazepam;中樞神經興奮劑caffeine等十四種西藥成分。本法利用pH9.0之0.02M硼酸鈉及磷酸二氫鈉溶液(含0.15M十二烷基硫酸鈉鹽)為緩衝液,上述成分可於25分內得到良好之分離。分析數據顯示,各成分之相關係數介於 $r=0.9987-0.9998$ 間,顯示線性關係良好。添加於獨活寄生湯濃縮散之回收率為92.1%至102.5%,顯示準確性佳。

利用上述方法分析由地方衛生局消費者服務中心送驗之風濕鎮痛中藥丸兩種sample A及B,結果sample A檢出acetaminophen, caffeine, phenylbutazone及prednisolone四種西藥成分。其含量百分比及每粒中藥丸之含量依序為0.9、0.4、4.7及0.3%;4.9、2.2、26.6及1.5mg,各成分之同日間及異日間之相對標準偏差依序為3.1、2.3、2.4及2.2%(同日間);4.1、5.1、3.5及2.9%(異日間)。Sample B檢出aminopyrine, caffeine及ethoxybenzamide三種西藥成分。其含量百分比及每粒中藥丸之含量依序為2.1、1.0及0.6%;11.8、5.6及3.6mg,各成分之同日間及異日間之相對標準偏差依序為3.5、2.0及3.4%(同日間);4.7、2.4及4.5%(異日間)。顯示毛細管電泳法用於上述中藥摻加西藥之分析應屬可行。

前 言

中藥製劑摻加西藥為衛生署所不許,故本局執行是項檢驗工作,一般只限於確認之定性分析。為因應龐大之檢體數量常採薄層層析法及紫外光分光光譜法^(1,2)先進行篩檢,再以其他儀器確認,惟因薄層層析法之分離效果仍屬有限,乃有應用高效液相層析儀、氣相層析質譜儀等分析多種西藥成分,如Omile等⁽³⁾之報告,以高效液相層析儀分析十種非固醇類消炎鎮痛劑;橋本等⁽⁴⁾之報告,以高效液相層析儀定量中藥製劑摻加dexamethasone,

acetaminophen, buctin, phenylbutazone 及 indomethacin等之西藥成分;Cairns⁽⁵⁾等之報告,以高效液相層析儀、氣相層析質譜儀鑑定中藥中摻加之indomethacin。毛細管電泳是近年發展出來的一種分析方法,已廣泛應用於蛋白質、氨基酸、有機酸及藥物等的分離分析。應用於非固醇類鎮痛劑之分析如Nishi^(6,7)及Donato⁽⁸⁾等之報告;分析xanthine類成分,如Lee⁽⁹⁾等之報告;分析corticosteroids,如Nishi⁽¹⁰⁾、Terabe⁽¹¹⁾等之報告。

本研究就治療風濕鎮痛類中藥選擇平素檢出頻率較高之西藥為對象加以探討,利用毛細管電泳儀分析十四種經常於風濕鎮痛類中藥製劑中檢出

之西藥成分,包括非固醇類鎮痛消炎劑acetaminophen, aminopyrine, buletin, ethoxybenzamide, indomethacin, ketoprofen, mefenamic acid, phenylbutazone及diclophenac sodium九種;類固醇

dexamethasone及prednisolone二種;肌肉鬆弛劑chlorzoxazone;鎮靜安眠劑diazepam;中樞神經興奮劑caffeine等五類西藥成分。其結構式如圖一所示。

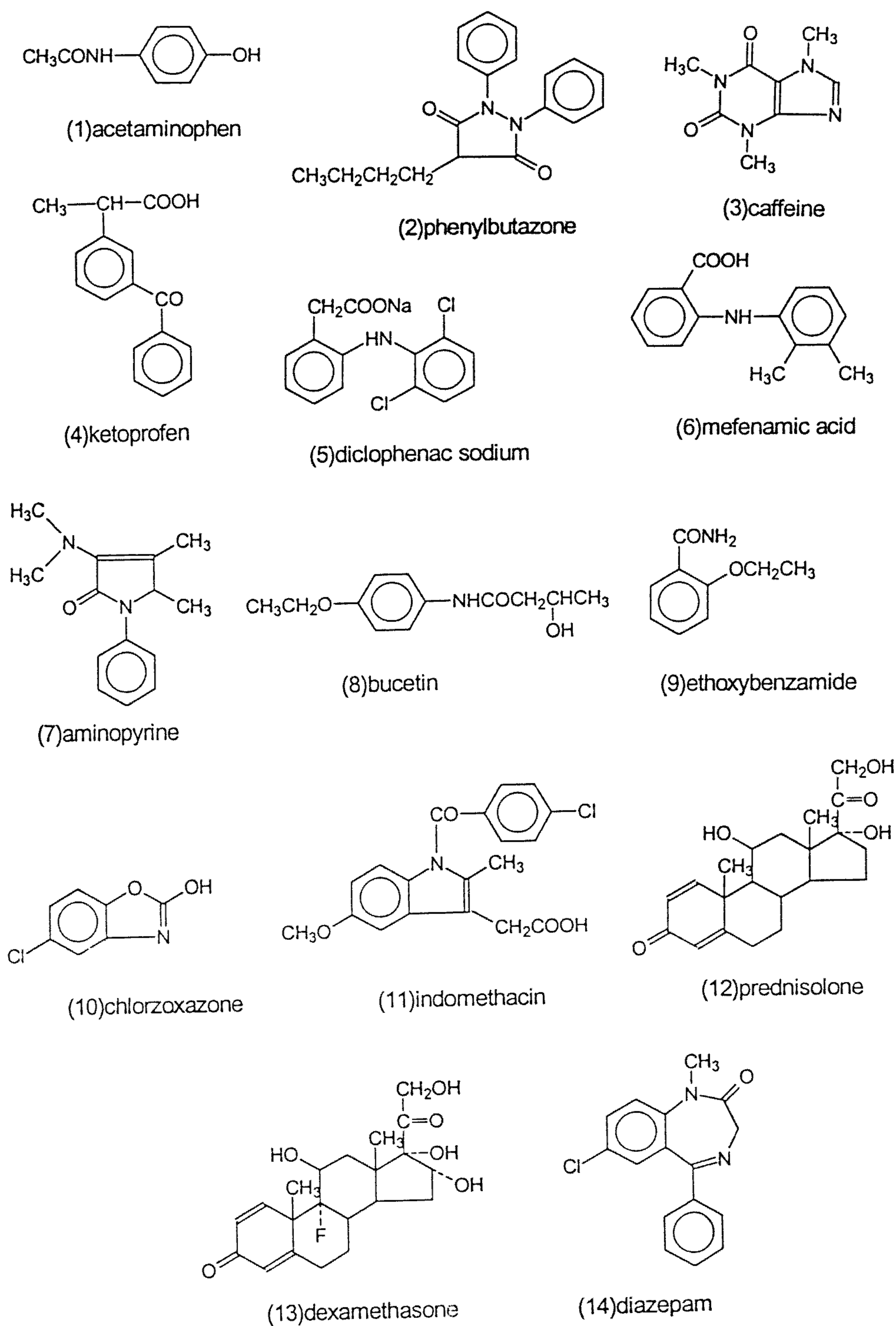


Figure 1. Structures of synthetic chemical drugs.

材料與方法

一、檢體

(一)Sample A及sample B分別為80年10月及81年6月,由宜蘭縣衛生局及高雄市政府衛生局消費者服務中心送驗,治療風濕鎮痛類之未知名中藥丸。

(二)順天堂獨活寄生湯濃縮散(空白對照用中藥製劑)。其組成藥材為獨活、桑寄生、秦艽、防風、細辛、當歸、白芍藥、川芎、熟地黃、杜仲、川牛膝、人參、茯苓、甘草及桂皮。

二、試藥

Acetaminophen, buccetin, caffeine, chlorzoxazone, indomethacin, ketoprofen, mefenamic acid, phenylbutazone, diclophenac sodium及propyl paraben購自美國SIGMA公司;dexamethasone, prednisolone, sodium dihydrogenphosphate及sodium lauryl sulfate(SDS), sodium tetraborate購自日本NACALAI公司;aminopyrine, diazepam及ethoxybenzamide均為製劑原料,乙醇購自公賣局。

三、儀器

使用BECKMAN毛細管電泳儀(BECKMAN P/ACE 2200 capillary electrophoresis system with UV detector),所用條件如下:毛細管柱為BECKMAN eCAP capillary tubing, 57cm total length/50cm effective length, 75 μ m I.D.,緩衝溶液為調配至pH 9.0之0.02M sodium tetraborate及0.02M sodium dihydrogenphosphate溶液(含0.15 M SDS),電壓為20KV,溫度為25°C,波長為254 nm。

四、實驗方法

(一)標準溶液配製

分別精確稱取對照標準品acetaminophen, aminopyrine, buccetin, caffeine, chlorzoxazone, diclophenac sodium, dexamethasone, diazepam, ethoxybenzamide, indomethacin, ketoprofen, mefenamic acid, phenylbutazone及prednisolone約10mg,加乙醇溶解並稀釋至10ml,再分別以緩衝液稀釋調配成系列濃度分別為0.02、0.05、0.10及0.20mg/ml及propyl paraben內部標準品0.05mg/ml。

(二)檢量線之製作

分別取如(一)所示不同濃度之標準品溶液注入

毛細管電泳儀分析。以各標準品與內部標準品波峰面積比為X軸,標準品之濃度(mg/ml)為Y軸,作圖並求出檢量線之線性回歸方程式及相關係數。

(三)添加回收試驗

分別精確稱取對照標準品各約5mg,加入2g之獨活寄生湯濃縮散,以氯仿15ml,於水浴中加熱迴流萃取三次,每次各30分,過濾後,合併濾液並定容至50ml後,取10ml,減壓濃縮至乾後加入緩衝液及內部標準品溶液,使其含propyl paraben為0.05mg/ml。以毛細管電泳儀分析,求其添加回收率。

(四)西藥成分之篩檢

兩種檢體依中藥製劑屬加西藥之檢驗⁽¹⁾之方法檢驗,分別稱取檢體約3g,剪碎,加少量水待崩散後,加入15ml乙醇,以超音波振盪萃取30分後過濾是為檢液,以薄層層析法檢驗。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(254nm)檢測,以Dragendorff's reagent及tetrazolium blue試液為呈色劑。

(五)未知名中藥丸定量用檢液之配製

精確稱取兩種檢體各約2g,加入氯仿15ml,同(三)之添加回收試驗檢液配製方法操作分析。

(六)同日間及異日間試驗

於兩種中藥丸檢體所含西藥成分之對照標準品檢量線之範圍內,選擇0.1mg/ml之對照標準溶液,於同一日及不同的五天重覆注入毛細管電泳儀分析各五次,將所得之數據(peak area ratio)計算相對標準偏差。

結果與討論

毛細管電泳法因使用中空毛細管柱,故具有分析時間短,樣品及沖提液用量少,且清洗容易,價格又比高效液相層析管柱低廉等優點⁽¹²⁾。1984年Terabe⁽¹³⁾氏等報告,分析時以各組成成分在毛細管內的膠束及緩衝液之間的分配為基礎的micellar electrokinetic capillary chromatography (MEK-C),此法加入界面活性劑,適用於不帶電荷之中性化合物之分離,而應用性大為增加。

就本局以往受理主述治療風濕鎮痛類中藥製劑檢體,其所參加之西藥成分種類,一般包括非固醇類鎮痛消炎劑acetaminophen, aminopyrine, buccetin, ethoxybenzamide, indomethacin, ketoprofen, mefenamic acid, phenylbutazone及diclophenac sodium九種;類固醇dexamethasone及prednisolone二種;肌肉鬆弛劑chlorzoxazone;鎮靜安眠劑diazepam;中樞神經興奮劑caffeine等五類西

藥成分,以上述毛細管電泳法探討,結果分述如下:

一、對照標準品添加於獨活寄生湯之分析

對照標準品溶液以毛細管電泳儀,依材料與方法所載之條件分析,其層析圖譜如圖二所示,上述14種成分在25分鐘內即可分離,各成分之遷移時間(migration time)如表一所示。本法利用調配成pH 9.0之0.02M硼酸鈉及磷酸二氫鈉溶液,並添加0.15 M十二烷基硫酸鈉鹽為緩衝液,各成分之波峰明顯。

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0.9987至0.9998,顯示良好之線性關係。獨活寄生湯具有祛風濕,補氣血之效能,主治風濕性慢性關節炎,坐骨神經痛⁽¹⁴⁾,一般中醫常用於風濕鎮痛類之治療,故選用此方作為空白對照用,並進行模擬添加西藥之分析。獨活寄生湯濃縮散之氯仿萃取液,依本法注入毛細管電泳儀分析,其中藥成分不會干擾本研究所探討之西藥成分分析,如圖二所示,其添加各對照標準品之回收率,介於92.1至102.5%,如表一所示,顯示準確性佳。

二、未知名中藥丸之分析

(一)兩種檢體其摻加西藥成分之薄層層析法篩檢

A及B兩種檢體,經薄層層析法分別以氯仿:乙酸乙酯(1:1,v/v)(M1)及乙酸乙酯:乙醚(4:1,v/v)(M2)為展開溶媒分離,並刮取薄層層析板上之成分,以紫外光分光光度計檢測,並與對照標準品比對,結果A檢體檢出鎮痛劑acetaminophen及phenylbutazone,中樞神經興奮劑caffeine,及類固醇pre-

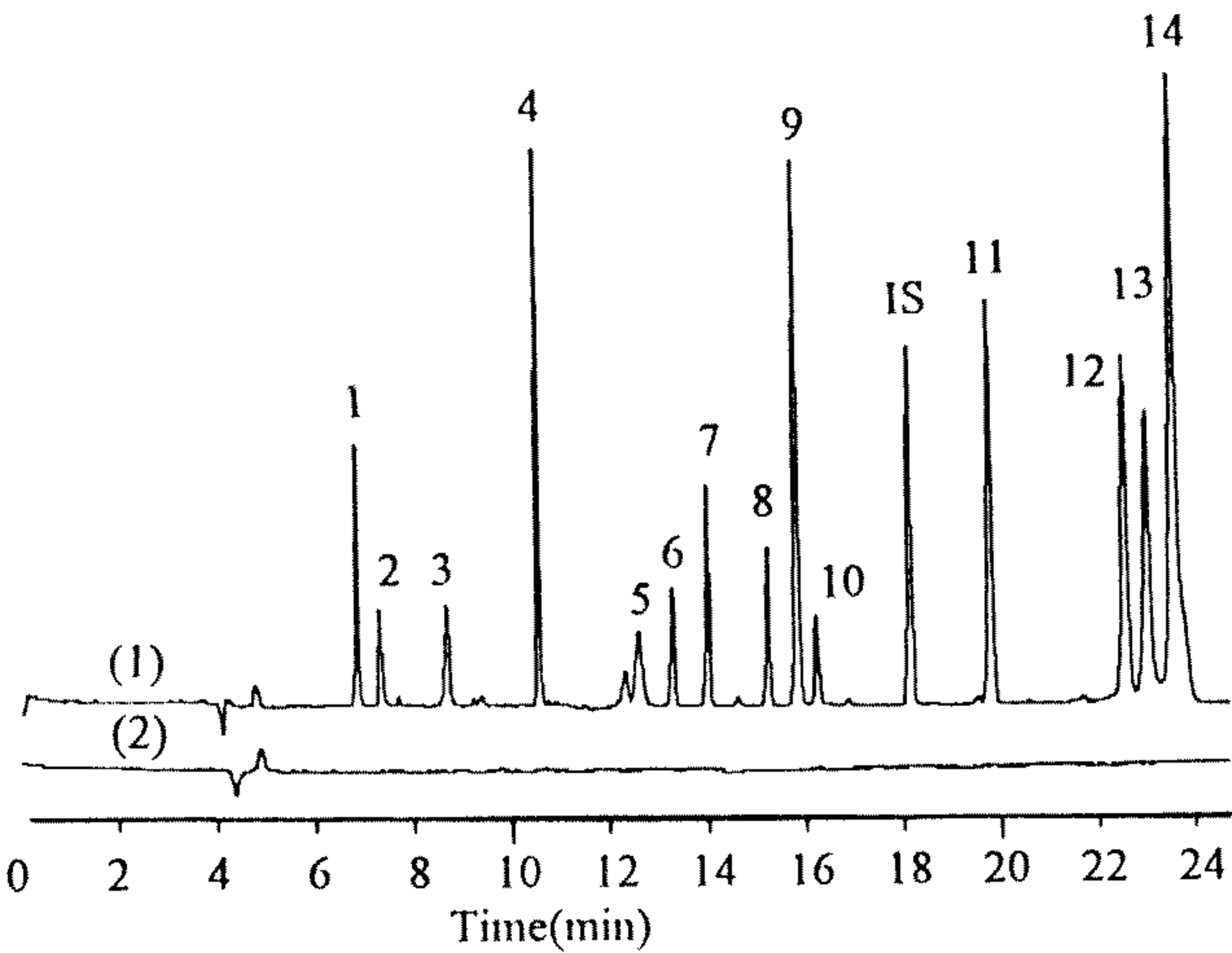


Figure 2. Electropherograms of 14 synthetic chemical drugs(1) and blank (Dwu-Hwo-Jih-Sheng-Tang) (2). Peak numbering as in Figure 1. IS for internal standard (propyl paraben).

Table 1. Migration time, recovery and correlation coefficient(r) of 14 synthetic chemical drugs in traditional Chinese medicine (Dwu-Hwo-Jih-Sheng-Tang)

Chemical drugs ^a	Migration time(min)	Recovery (mean±SD,%)	Linear regression	r
Acetaminophen	6.9	100.6±3.4	Y=135.99X+5.61	0.9993
Phenylbutazone	7.4	95.5±4.8	Y=261.44X-20.8	0.9989
Caffeine	8.8	102.5±3.0	Y=280.73X+1.92	0.9998
Ketoprofen	10.4	99.0±2.0	Y= 90.45X+1.85	0.9998
Diclophenac sodium	13.2	99.8±4.4	Y=316.29X+1.20	0.9995
Mefenamic acid	14.1	98.6±2.7	Y=168.56X+2.13	0.9995
Aminopyrine	14.5	97.1±4.2	Y=170.07X-1.53	0.9996
Bucetin	15.7	94.6±0.4	Y=215.41X+4.60	0.9994
Ethoxybenzamide	16.1	97.9±1.2	Y= 61.67X+2.10	0.9995
Chlorzoxazone	16.8	92.1±4.8	Y=355.69X+2.64	0.9987
Indomethacin	20.5	100.3±3.5	Y= 59.95X+1.71	0.9996
Prednisolone	22.6	98.5±0.8	Y= 94.65X-0.14	0.9993
Dexamethasone	23.0	95.7±1.7	Y=110.79X+0.12	0.9997
Diazepam	23.4	101.4±2.5	Y= 38.23X+3.04	0.9996

a:n=3

dnisolone; B檢體檢出鎮痛劑aminopyrine及ethoxybenzamide, 中樞神經興奮劑caffeine。其中A檢體以M1為展開溶媒分離, caffeine及prednisolone之Rf值分別為0.18及0.16, 其色點部分重疊。若以M2為展開溶媒分離效果較佳, 惟prednisolone含量低, 層析板上所見之色點並不明顯, 且摻雜有中藥成分之色點, 需以Tetrazolium blue試液呈色, 並刮取較多的層析板上之成分, 始可得到較佳之紫外光光譜圖譜, phenylbutazone在M1及M2二種展開溶媒下均展開至高處, 其Rf值分別為0.88及0.90, 均摻雜有中藥成分之色點, 分離效果差。B檢體顯示含三種西藥成分且含量均較多, 故分離較易, 惟如僅以單一方向展開, aminopyrine及caffeine其色點大且較接近, Rf值在M1及M2二種展開溶媒分別為0.23、0.18及0.24、0.19, 因此若用二種溶媒以雙向(two dimensions)展開可得到較佳之分離, ethoxybenzamide在M1為展開溶媒下亦會夾雜有中藥成分, 如刮取此成分以紫外光分光光度計檢測, 會影響其在波長240nm以下之吸收光譜圖譜。

由此可見薄層層析法篩檢之對象雖為檢體中之西藥, 惟檢體之基質均為成分複雜之中藥, 如遇有摻加多種西藥成分, 構造式類似之同類成分, 摻加西藥成分之量甚少時, 其分離效果仍屬有限; 以薄層層析法探討西藥成分的含量尤屬困難, 勢必須利用其他儀器為之。

(二)兩種檢體其摻加西藥成分含量之毛細管電泳法分析

以往之報告中⁽¹⁵⁾, 使用高效液相層析法篩檢中藥製劑中摻加風濕鎮痛類西藥成分, 效果雖然良好, 然而以毛細管電泳儀所具備之優點觀之, 如較高的理論板數、分離時間短、勿需平衡即可達到條件化等, 未來或有與高效液相層析儀相輔相成之趨勢。

A及B兩種檢體之毛細管電泳法之分析結果, 如圖三所示, 各西藥成分之波峰, 分離良好, 其所含西藥成分之含量百分比及每一粒中藥丸檢體之含量如表二所示, A及B兩種檢體, 20粒檢體間, 其重量之相對標準偏差分別為, A:5.9%, B:5.4%, 可見其差異不大, 推測可能由機器製造, 且較大量地供用, 似乎非由手工製造。二種檢體均摻有二種鎮痛消炎劑及caffeine, 其中aminopyrine業經衛生署於民國68年公告禁用⁽¹⁶⁾。Phenylbutazone亦於民國74年公告禁用於複方製劑⁽¹⁷⁾。Caffeine屬中樞神經興奮劑, 經查caffeine並無鎮痛消炎之效, 其與鎮痛劑合用, 亦無增強鎮痛效用之文獻報告, 惟由以往檢驗結果顯示⁽¹⁸⁾, 其檢出率頗高, 然由A及B兩檢

體顯示含量不高, 其摻加之目的, 尚無法理解。

在A檢體中, acetaminophen之含量僅4.9mg/粒, 而其一般口服一次量為325-650mg⁽¹⁹⁾; phenylbutazone若併用他種鎮痛劑或肌肉鬆弛劑使用, 其危險性遠超過其治療效益⁽¹⁷⁾, 口服一次量為400-600mg, 只能短期使用, 臨床上之使用, 應只限於急性痛風之控制, 而不作為風濕性關節炎之第一線用藥⁽²⁰⁾。Prednisolone一日量為5-60mg⁽¹⁹⁾, 而檢體中之含量為1.5mg/丸, 以中藥每次服用幾丸, 每日三次, 則劑量頗高。在B檢體之ethoxybenzamide成分, 長期、大量投與, 會造成肝、腎障害; 孕婦需慎重使用⁽²¹⁾。長期服用鎮痛藥混合製劑, 會有慢性中毒之現象出現, 其症狀有胃腸問題、貧血、變性血紅素血症、脾腫大及腎臟傷害等。

兩種檢體其同日間之相對標準偏差為2.0-3.5%, 異日間之相對標準偏差為2.4-5.1%, 如表三

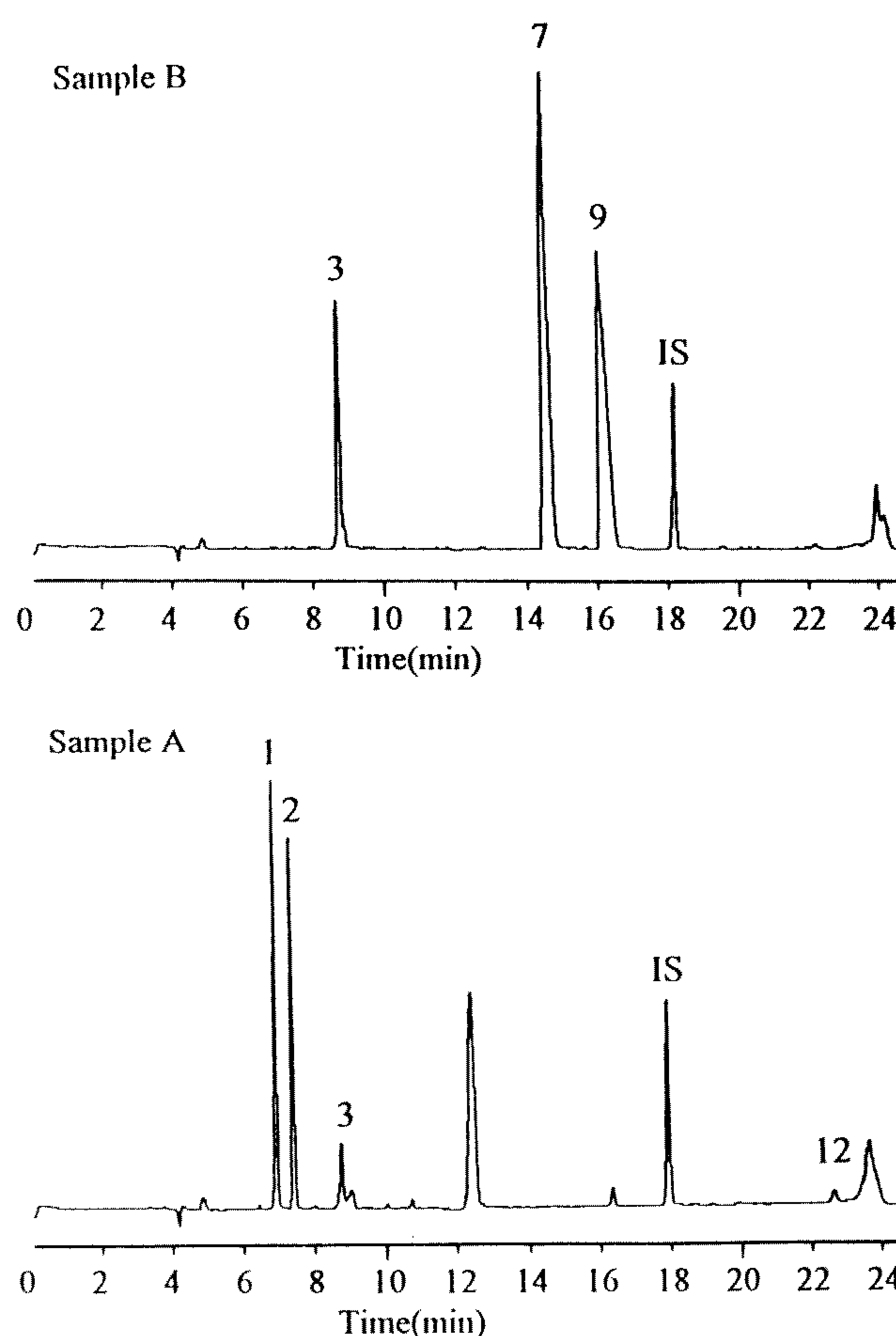


Figure 3. Electropherograms of sample A and B. Peak numbring as in Figure 1. IS for internal standard (propyl paraben).

Table 2. Content of synthetic chemical drugs in samples

Sample	Average weight mean±SD(mg) ^a (RSD,%)	Adulterants	Content (%) ^b	Content of per pill(mg) ^b
A	579.6±34.1 (5.9)	acetaminophen	0.9	4.9
		caffeine	0.4	2.2
		phenylbutazone	4.7	26.6
		prednisolone	0.3	1.5
B	577.7±31.0 (5.4)	aminopyrine	2.1	11.8
		caffeine	1.0	5.6
		ethoxybenzamide	0.6	3.6

a:n=20

b:n=3

Table 3. Intraday and interday analyses of sample A and B

Sample	Adulterants	Intraday R.S.D.(%) ^a	Interday R.S.D.(%) ^a
A	acetaminophen	3.1	4.1
	caffeine	2.3	5.1
	phenylbutazone	2.4	3.5
	prednisolone	2.2	2.9
B	aminopyrine	3.5	4.7
	caffeine	2.0	2.4
	ethoxybenzamide	3.4	4.5

a:n=5

所示。顯示毛細管電泳用於中藥摻加西藥之分析可得到良好的結果。毛細管電泳因其具備之優點,做為風濕鎮痛類中藥,大量檢體之篩檢及含量測定可行性高。

參考文獻

1.劉宜祝,林哲輝.1991.中藥檢驗方法專輯(四)中藥製劑羈加西藥之檢驗.pp.36-37.行政院衛生署藥物食品檢驗局.台北.

2.Yuen, S., Lau-Cam, C.A. 1985. Thin-layer Chromatographic Screening Procedure for Undeclared Synthetic Drugs in Chinese Herbal Preparations. J. Chromatogr. 329:107-122.

3.Omile, CI. and Tebbett, IR. 1986. Determination of Ten Antiinflammatory Drugs in Se-

rum by Isocratic Liquid Chromatography. Chromatographia. 26:187-188.

4.Hashimoto, K. and Hatanaka, H. 1984. Determination of Synthetic Drugs Illegally Enriched to Chinese Medicine. Yakugaku Zasshi. 104(3):287-292.

5.Cairns, T., Siegmund, E.G. and Rader, B.R. 1987. Identification of Prescription Drugs in Adulterated Chinese Herbal Medications. Pharm. Res.4(2):126-129.

6.Nishi, H., Fukuyama, T., Matsuo, M. and Terabe, S. 1990. Effect of Surfactant Structures on the Separation of Cold Medicine Ingredients by Micellar Electrokinetic Chromatography. J. Pharm. Sci. 79(6):519-523.

7.Nishi, H., Fukuyama T., Matsuo, M. and

- Terabe, S. 1990. Separation and Determination of the Ingredients of a Cold Medicine by Micellar Electrokinetic Chromatography with Bile Salts. *J. Chromatogr.* 498:313-323.
8. Donato, M.G., Eeckhout, E.V.D., Bossche, W.V.D. and Sandra, P. 1993. Capillary Zone Electrophoresis and Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Some Nonsteroidal Antinflammatory Drugs (NSAIDs). *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 11(3):197-201.
9. Lee, K-J., Heo, G.S., Kim, N.J. and Moon, D-C. 1992. Separation of Theophylline and Its Analogues by Micellar Electrokinetic Chromatography: Application to the Determination of Theophylline in Human Plasma. *J. Chromatogr.* 577:135-141.
10. Nishi, H., Fukuyama, T. and Matsuo, M. 1990. Separation and Determination of Lipophilic Corticosteroids and Benzothiazepin Analogues by Micellar Electrokinetic Chromatography Using Bile Salts. *J. Chromatogr.* 513:279-295.
11. Terabe, S., Ishihama, Y., Nishi, H., Fukuyama, T. and Otsuka, K. 1991. Effect of Urea Addition in Micellar Electrokinetic Chromatography. *J. Chromatogr.* 545:359-368.
12. 劉英玫, 許順吉. 1993. 毛細管電泳在中藥分析上的應用. *藥物食品分析*. 1(4):327-333.
13. Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. and Ando, T. 1984. Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-tubular Capillaries. *Anal. Chem.* 56:111-113.
14. 中華民國藥師公會全國聯合會. 1991. 臨床常用中藥方劑手冊. pp.101-102. 中華民國藥師公會全國聯合會. 台北.
15. 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摻加風濕鎮痛類西藥成分. *藥物食品分析期刊*. 3(1):51-56.
16. 李中銳, 廖俊亨, 鍾旺益. 1983. 藥物食品法規大全. "行政院衛生署68.1.9衛署藥字第216093號公告". pp.64-65. 葡萄樂園雜誌社. 台北.
17. 衛生署公報. 1985. 行政院衛生署74.5.9衛署藥字第532437號公告. 14(18):56-57.
18. 劉宜祝, 徐廷光, 孫慈悌. 1989. 七十六年度市售風濕鎮痛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*. 7:197-199.
19. Covington, T.R., Dipalma, J.R., Hussar, D. A., Kunkel, F.E., Lasagna, L, Tatro, D.S. and Whitsett, T.L. 1982. *Drug Facts and Comparisons*. pp.319,787. J. B. Lippincott Co. St. Louis. U.S.A.
20. 陳逸光. 1982. 臨床藥理學. pp.313,1201. 嘉洲出版社. 台北.
21. 日本醫藥情報センター. 1991. 醫療藥日本醫藥品集. p.193. 藥業時報社. 東京. 日本.

Study on the Adulterated Chemical Drugs in Rheumatic and Analgesic Traditional Chinese Medicine by MEKC

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

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

ABSTRACT

A micellar electrokinetic capillary chromatography was developed to identify adulterants in rheumatic and analgesic traditional Chinese medicine. This chromatographic technique was carried out using a buffer of (pH 9.0) 0.02M sodium tetraborate and sodium dihydrogenphosphate (contain 0.15 M sodium lauryl sulfate). This method was applied to simultaneously analyze 14 synthetic chemical drugs adulterated in traditional Chinese medicine within 25 minutes. They represented five pharmacological categories: antipyretic analgesics, glucocorticoids, CNS stimulants, muscle relaxants and sedatives, and included: acetaminophen, aminopyrine, buccetin, diclophenac sodium, ethoxybenzamide, indomethacin, ketoprofen, mefenamic acid, phenylbutazone, dexamethasone, prednisolone, chlorzoxazone, diazepam, and caffeine. The recovery of synthetic chemical drugs added to Dwu-Hwo-Jih-Sheng-Tang (獨活寄生湯) ranged from 92.1 to 102.5%.

This method was used to assess two traditional Chinese medicines sold by distributors of Chinese natural drugs collected by the consumer centers of local health bureaus from Oct. 1991 to Jun. 1992. In sample A, acetaminophen, caffeine, phenylbutazone, prednisolone were found, and their content in each pill were measured at 4.9, 2.2, 26.6 and 1.5mg, respectively. The relative standard deviation ranged between 2.2-3.1%(intraday) and 2.9-5.1%(interday). In sample B, aminopyrine, caffeine and ethoxybenzamide were found, and their content of each pill were measured at 11.8, 5.6, and 3.6mg, respectively. The relative standard deviation ranged between 2.0-3.5%(intraday) and 2.4-4.7%(interday). MEKC was found to be an efficient and sensitive chromatographic technique with which to measure adulterants in samples of rheumatic and analgesic traditional Chinese medicine.

Key Words : MEKC, traditional Chinese medicine, adulterant, rheumatic and analgesic.