

# 中藥製劑中摻放抗發炎 藥品之鑑定

## 高效液態層析法 (High Performance Liquid Chromatographic) 鑑定 corticosteroids

文 / 徐人英 許光淦

中藥製劑摻放西藥是本地一個嚴重的醫療問題 (特別是 corticosteroids 之摻放)，甚至，國外也有使用此種中藥而致中毒的報告。在此間尚未完全消除以前，為安全之見使用者最好在服用前先將中藥送檢。

關於中藥摻放西藥之檢驗，皆以薄層層析法 (TLC) 方法分離及辨認，然後再以分光光度法之光譜掃描作進一步證實，但是，在作者前次之研究中，發現 TLC 方法之敏感度不足，僅足以偵測治療劑量很高之非類固醇類 (nonsteroid) 藥物。

(如：Acetaminophen 500 mg, phenylbutazone 100 mg, phenacetin 500 mg ……等) 不足以偵測治療劑量很低之類固醇藥物 (如：Dexamethasone 0.5 mg, Prednisolone 5 mg 等) 除非其含量超過，何況如此少之藥品是摻混於成分複雜之大量中藥中。因此，以 TLC 檢驗對 steroid 之判

定，很可能會發生 Negative False 之檢驗結果而此錯誤結果，對服用者之安全而言，嚴重性之 Positive False 大很多。因此，極需一種較靈敏、方便且準確之檢驗方法，來確切地偵測中藥中摻放之少量 steroid 藥物。近年來，發展迅速之 HPLC 方法，在敏感度，簡易性以及普遍性方面，最符合於此種檢品檢驗之要求。本文即在報告以此法檢驗之結果。

### 1. 儀器：

HPLC 儀器是：Water's pump 6000A 附 U6K injection, 440 型 Variable wavelength Detector, 及 Houston instrument Recorder。

### 2. 試藥及材料：

試藥：methanol, water, dichloromethane, acetic acid, n-hexane, absolute alcohol 為 LC 級溶劑。

Acetic Acid, acetophenone, propiophenone, butaphenone, 為分析級試藥。

prednisolone, dexamethasone, triamcinolone, betamethasone, cortisone acetate, Caffeine, Acetaminophen, phenylbutazone, Phenacetin, aminopyrine ……等均為製藥原料，使用前未經再純化。

中藥檢品是任意收集的成品計二十個，有丸劑、散劑、膠囊。

標準液：正相層析法時，各種 steroid 及 non-steroid 藥物，均配製為 0.1 mg/ml 之 chloroform 溶液。逆相層析時則配製成 0.05 mg/ml 之 methanol 溶液。Acetophenone 等 phenyl alkyl ketone 則配製為 0.01 mg/ml 之 methanol 溶液。

檢品液：正相層析時，取檢品一次服用量  $\frac{1}{3}$  (若一次服用量不明，則假設為丸劑十顆或散劑一包或膠囊一顆) 以 5 ml chloroform 抽取，以濾紙過濾後，再經 0.45  $\mu$ m millipore 膜過濾。逆相層析無直接之檢品液。

HPLC 層析條件：

柱管：正相時使用 silica gel column (Lichrosorb, Si 60, 7  $\mu$ m merck) ID 4mm  $\times$  25 cm。

逆相時使用 octadecylsilane column (Lichrosorb RP-18, 10  $\mu$ m, Merck) ID 4mm  $\times$  25 cm。

流動相：正相時，使用 n-hexane, dichloromethane, ethyl alcohol, acetic acid (63.8 : 30 : 6 : 0.2) 使用前，減壓脫氣。

逆相時：使用 Methanol : H<sub>2</sub>O (60 : 40) 使用 0.45  $\mu$ m millipore 膜過濾。

流速：正相時，移動相先在 0.5 ml/min 流速下平衡一小時。然後以 3 ml/min (壓力約為 1500 psi) 為層析時之流速。

逆相時，則用 2.0 ml/min (壓力約為 2000 psi)

偵測：正相及逆相均在 254 nm，記錄紙速度為 5 cm/10 min。

AUFS 在正相中，原則上設於 0.2，於分析 Dexamethasone 時，在接近其滯流時間改為 0.02，超過了 Dexamethasone 之位置再改回 0.2，在逆相層析時則改為 0.02。

正相層析時注入層析之量為：標準液 5  $\mu$ l，檢品為 25  $\mu$ l。逆相層析時，標準液及 phenyl alkyl ketone 溶液均注入 5  $\mu$ l。而其檢品液是正相層析時，steroid peak 出現時收集之流出液，蒸乾後，再溶於 100  $\mu$ l 之甲醇。注入量為 50  $\mu$ l。

Retention index 之計算：

逆相層析時，每次注入 steroid 標準液或 phenyl alkyl ketone 溶液或正相層析所得到之檢品液時均記錄其 peak 尖峰出現之時間為 t，注入 NaNO<sub>3</sub> 後 peak 出現之時間為 t<sub>0</sub>。然後以式 1 及式 2 計算 retention index。

排除性呈色法預試：取上述檢品液 3 ml，其內依 steroid 之最小常用量估計至少含 steroid (dexamethasone) 25  $\mu$ g/ml 加入 3ml, 0.1 N HCl，振搖後，除去 HCl 液。再加入 3 ml, 0.1 N NaOH，振搖後除去水液。而 chloroform 液再以無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脫水乾燥過濾，濾液即為檢品液，另取二個 2 ml 氯仿溶液。一個加入 10  $\mu$ g 的 prednisolone 作為標準對照液。一個不加入任何物，作為空白對照組。然後對檢品液，標準對照液，空白對照液，分別加入 5 滴的 Blue tetrazonium solution (100 mg in 20 ml MeOH (or ethanol)) 及 5 滴 Tetramethylammonium hydroxide (1% Methanol solution)。觀察溶液紫紅色出現的快慢。檢品液很快出現和標準對照組一樣的紫色可視為 steroid (+)。如果放置多時後半小時至 1 小時有紫色出現，如標準對照液明顯

且強於空白液，仍視為 steroid (+)。放置多時候，紫色仍與空白對照液相同（明顯低於標準對照液者）即排除 steroid 存在。而紫色的認定，由紫紅→紅皆算。

抗風濕類中藥中摻放 steroid 的檢出率在鄭氏的報告中並不高。作者前次的研究結果也是很低。此偏低的結果很可能是由於中藥製劑中 steroid 的摻放量很少，TLC 方法敏感度不足。

實驗顯示，在 TLC 上 prednisolone 及 Dexamethasone 若有 Acetaminophen 共存（Rf 與 prednisolone 很接近）則需 3-5 ug 才能輕易以呈色法辨識，在 TLC plate 上，欲點上這麼多量，必須使用很濃之檢品液，如此中藥本身之成份及可能同時存在之 acetaminophen，將會嚴重干擾 steroid 的辨識，而治療劑量更低的 Dexamethasone，情形將更嚴重，因此 TLC 無法輕易偵測出 steroid，必須使用敏感度較高之 HPLC。

在進行 HPLC 分析之前，檢品可先以呈色法排除無摻放者，僅保留懷疑者作進一步分析。Corticosteroid，最常用的呈色反應是其 17  $\alpha$ -hydroxy ketone 側鏈與 Blue tetrazonium (BT) 在鹼性液中，進行氧化-還原反應，而使 BT 呈紫色。但由此反應機轉可知，它的特異性不高，許多中藥檢品液時，先用酸，再用鹼抽取，以儘量除去干擾物。但如此處理仍無法除盡干擾物。因此，檢品若呈陽性反應，並不一定表示有 steroid 存在，但是若無反應出現，或紫色明顯低於對照標準液 (prednisolone 10 ug/ml) 則可排除 steroid 存在之可能。二十個檢品中，以此法初驗之結果排除了六個，這六個檢品，再以 HPLC 方法檢驗確無 steroid 存在。

在預試 HPLC 之分離條件時，發現正相層析結果，比逆相層析好。因後者之層析結果較複雜，且最後欲分析物 (Dexamethasone) 出現之後不久，仍有 peak 出現。圖 1 及圖 2 所示分別為一不含 steroid 之檢品，其正相及逆相層析圖，圖 1 清楚顯示逆相法不適用於檢驗 Prednisolone 及 Dexamethasone 之 peak (因均為其它物遮蓋，無法認)。試圖利用正相層析之 silica gel (seppak, silica cartridge) 作前處理，再進行逆相層析，結果並無明顯改善。因此，在第一階段之

在預試 HPLC 之分離條件時，發現正相層析結果，比逆相層析好。因後者之層析結果較複雜，且最後欲分析物 (Dexamethasone) 出現之後不久，仍有 peak 出現。圖 1 及圖 2 所示分別為一不含 steroid 之檢品，其正相及逆相層析圖，圖 1 清楚顯示逆相法不適用於檢驗 Prednisolone 及 Dexamethasone 之 peak (因均為其它物遮蓋，無法認)。試圖利用正相層析之 silica gel (seppak, silica cartridge) 作前處理，再進行逆相層析，結果並無明顯改善。因此，在第一階段之

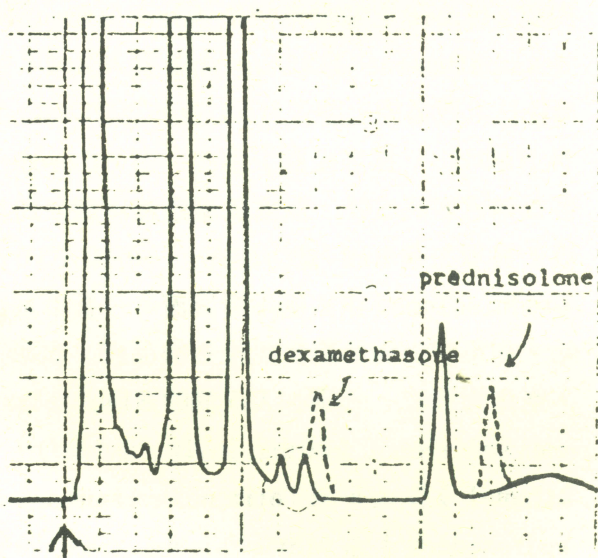


圖 1 一個已知不含 Prednisolone 及 Dexamethasone 之檢品之正相層析圖。虛線所示為該二 Steroid 之標準尖峰。

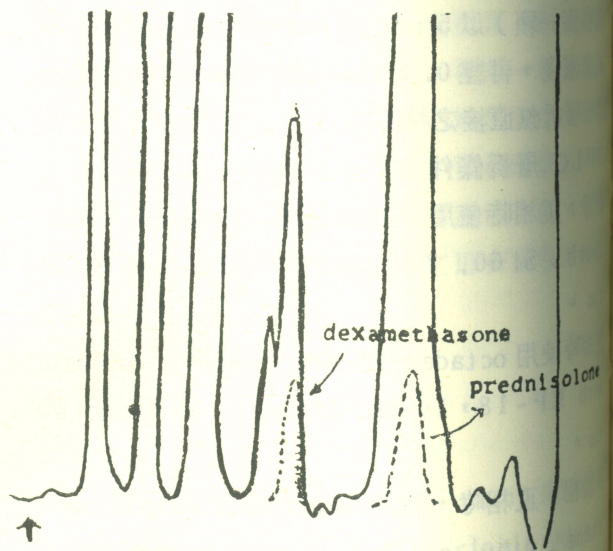


圖 2 一個已知不含 Prednisolone 及 Dexamethasone 之檢品之逆相層析圖。虛線所示為該二 Steroid 之標準尖峰。

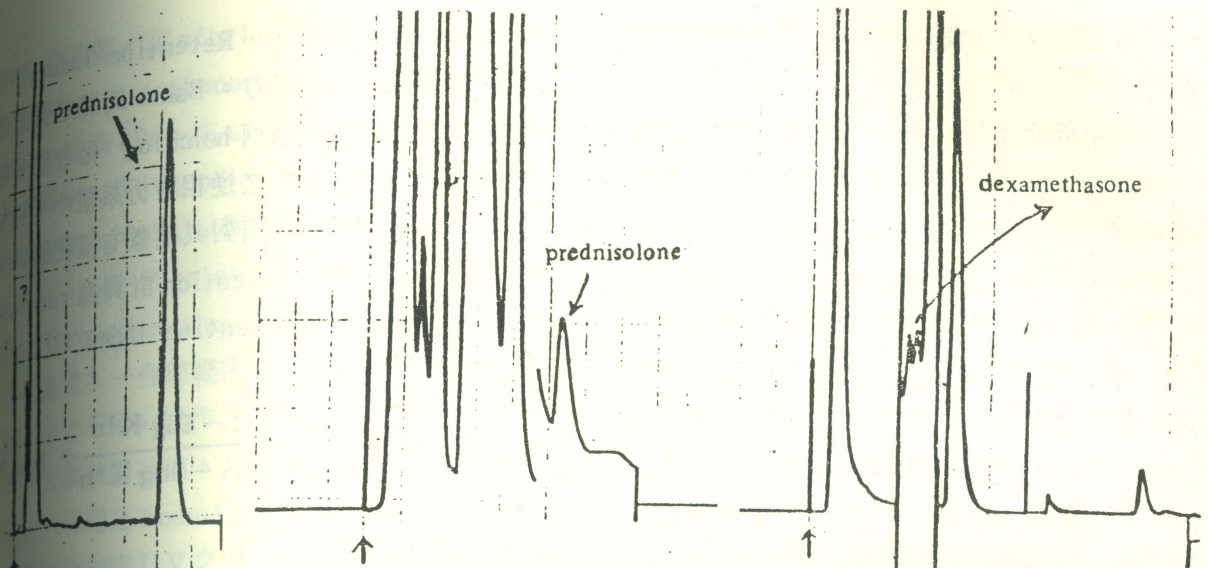


圖3 檢品之一層析圖，顯示層析圖單純，Prednisolone 清楚可辨 (檢品 7)

圖4 檢品之一層析圖，顯示層析圖複雜，但Prednisolone 仍清楚可辨 (檢品 2)

圖5 檢品之一層析圖，顯示可能有Dexamethasone 存在 (檢品 5)

採用正相系統層析法。不過，逆相層析法在進一步利用 retention index 證實時，非常有用。第一種之分離使用正相法還有一優點，即其 peak 之被很容易可蒸出溶媒而方便，濃縮作再進一步分析。

在正相層析法中，以同樣移動相試驗各種不同固定相 (silica gel, amino, cyano) 對標準混合之分離效果顯示，以 silica gel column 最佳。以此固定相，找尋最好移動相時，均先以 TLC 試驗其組成。在此類預試時，發現 dexamethasone 及 prednisolone 很容易與 caffeine, Acetaminophen 混合相夾不易分離。Caffeine 及 Acetaminophen 是中藥常摻有之成分，它們的干擾必須考慮在內，並確實分離。因此，在試驗各種移動相之能力時，僅以此四物能否分離為選擇標準。在試驗中，試過的移動相有：(I) Methylene chloride : MeOH (95:5) (II) Methylene chloride : THF : MeOH : Acetic Acid (60:1:1:0.2) 及 (III) hexane : Methylene chloride : Ethylalcohol : acetic acid (65.8:30:4~6:0.2)，其中以 (III) 效最好。溶劑系統 (III) 是 Loo 等人用以分離血清

中 dexamethasone 及 Prednisolone 之移動相。在本實驗中此二化合物之 retention time 却與 Loo 等人之報告相差很大。這可能是由於 silica gel 柱管上吸附水分量不同所致。實驗顯示 prednisolone 及 Dexamethasone 及 Caffeine 及 Acetaminophen 之 retention time 會受到 (1) 柱管使用情形 (新或舊)，(2) 注入檢品是否含水。(3) 是否中途用過含水之移動相……等因素之影響，本實驗過程中，並無以水作 isohydric 之處理，而是以少量高極性之甲醇及醋酸代替水來平衡穩定性柱管之分離能力。因此，在一連串檢品分析時，應前後使用同一柱管。為了避免檢品中之微量水，使得 retention time 逐漸改變，而無法以它來判定化合物是否出現。應在每批分析中，時時打入標準品以為校正。通常是懷疑有 steroid 之 peak 出現後，隨即打入一標準品，以為校正及證實。至於，檢品中吸聚力強之雜質，用 pre-column 可以輕易除去。(檢品大多為黃褐色溶液)。因為，本實驗之移動相極性很低，在欲分離物 prednisolone 流出後，即無 peak 出現，極性大之雜質，滯留在柱管中不會流出 (二十個檢品的結果均如此)。因此，可方便地連續分析檢品，在 prednisolone 之 peak 出現

後，即可注入新檢品。如此一次檢品層析需時約為二十分鐘。

由於，中藥所含成份，每一檢品都不同，因而無法放置已知的 steroid 於中藥中，研究中藥成份在此層析系統中對 prednisolone 及 Dexamethasone 之干擾情形。但以此系統分析二十個檢品，結果顯示大部份檢品之層析圖均很單純而可輕易判定此二種 steroid 之存在。如圖 3 所示，另有二個檢品層析結果較複雜，在此二個 steroid 位置附近有雜物之 peak 出現，其層析圖分別如圖 4，5 所示，檢品 5 在 Dexamethasone 位置附近有小 peak，檢品 2 則 prednisolone 清晰可辨。

僅憑一次層析而以其 retention time 來鑑定一個化合物是不夠的。因此，本實驗再將正相層析法之流出液收集，再於逆相層析中利用 retention

index 作進一步確認。Retention index 原用於液相層析中，而有很強之鑑別能力。Baker 氏將之引進液相層析中。它是利用一系列 homolog 化合物，在固定相為 C<sub>18</sub> 或 phenyl 之逆相層析系統中，其 Retention time 之 log 值對其碳數有直接關係，這一特性將各化合物之 retention 計算為 retention index。化合物的 retention index (I) 之計算式如(1)及(2)所示。

$$I = 100 \frac{\log K'd - \log K'n}{\log K'N_{+1} - \log K'n} + 100 N$$

$$K = \frac{t - t_0}{t_0}$$

log K'D 是藥品 K' 值之 log 值，log K'N 是某碳數 homolog 之 K' 值的 log 值。log K'N<sub>+1</sub> 是碳數加 1 之 homolog 之 K' 值的 log 值。N 為某一

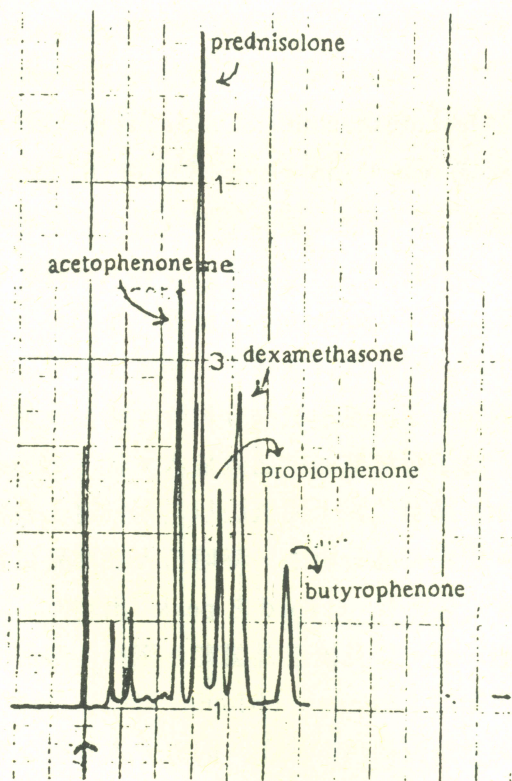


圖 6 三種 Alkyl Phenyl Ketone 及二種 Steroid 之逆相層析圖

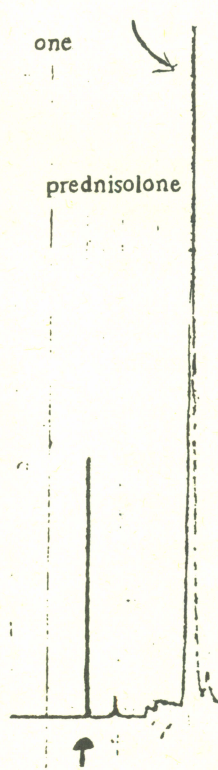


圖 7 檢品 7 經正相層析後其 Peak 流出液之逆相層析圖

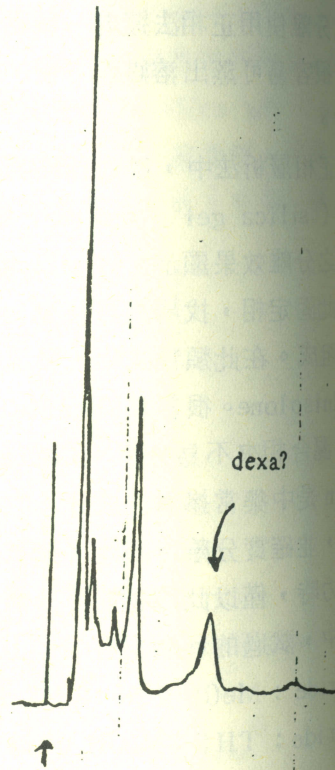


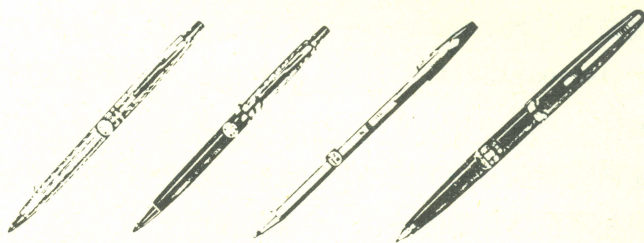
圖 8 檢品 5 經正相層析後其 Peak 流出液之逆相層析圖

homolog 之碳數。在 alkyl phenyl ketone 系列 homolog 中，acetophenone 為 8，而其 Retention Index 設為 800，在 alkyl ketone 系列中，acetone 為 3，其 retention index 設為 300。 $t_0$  之決定是以注入  $\text{NaNO}_3$  後出現之 peak 而計算。Retention index 比 relative retention time 及 absolute retention time 具有更穩定之恆值，移動相溶液組成在一合理範圍內之改變，及流速的改變，及管柱之不同，操作人之不同，儀器之不同，等皆不會明顯改變其值。Baker 氏曾利用此性質分析其檢品，所用之 homolog 為 alkyl ketone 系列。此系列化合物因 UV 之吸收很低，而需用較高之量，因而可能遮蓋本實驗欲分離之少量 steroid。因此本實驗改用 UV 吸收較強的 phenyl alkyl ketone 系列化合物。來計算 prednisolone 等 5 個 steroid 藥品之 retention index。此系列化合物在 retention index 上之特性已由 Smith 證實。在  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (60:40) 之移動相中，此系列化

合物及 prednisolone 及 dexamethasone 之 Retention Index 值，如表 1 所示。在不同時間，以不同批移動相分別進行之四次層析結果得到之值皆很相近。檢品 2.7 在正相層析中接近 prednisolone peak 時收集到之流出液，經此逆相層析後，計算其 peak 之 retention index，分別為 851, 850，很清楚證明是 prednisolone。圖 7 顯示為檢品 7 之逆相層析圖。檢品 5 peak 之 retention index 為 939，統計上 ( $P = 0.05$ ) 顯示它不是 dexamethasone，很可能是 Betamethasone，其層析圖如圖 8 所示。

由此結果中可特別一提的是在廿個檢品中，以 TLC 方法檢驗只測得檢品 7 有 prednisolone，檢品 2 及 5 均檢驗不出。可見 TLC 對 steroid 檢驗發生 Negative false 之可能性是很高的。更需注意的是檢品 7 之含量是很高的。因此，才可在 TLC 輕易檢出。如果含量在一般正常範圍亦無法測出。由此可證明 HPLC 法檢驗 steroid 之必要性。

## 明明文具公司



● 文具、事務用品、學生用品、批發零售 ●

☎ 701-1984

地址：台北市吳興街 215 號