



治療心臟病與排尿酸用之中藥丸中摻加 Caffeine, Diazepam, Chlorzoxazone, Ethoxybenzamide 及 Indomethacin 西藥成分之分析與定量研究

曾木全 蔡明哲 溫國慶*

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘要

來自消費者自稱用於治療心臟病、排尿酸之中藥丸，經薄層層析法，以氯仿：乙醇 (9:1,v/v) 及乙酸乙酯：甲醇：氨水 (8:1:1,v/v) 雙向展開後，再以紫外光分光光度計篩檢檢出 indomethacin, caffeine, ethoxybenzamide, chlorzoxazone 及 diazepam 五種西藥成分。續以逆相高效液相層析法探討定量，採 Cosmosil 5C₁₈-AR 層析管柱 (4.6x150 mm)，移動相為 0.05M 磷酸二氫鉀-0.1% 甲酸緩衝溶液 (A) 及甲醇 (B) 二種溶媒系，A 及 B 以不同之混合比例作線性梯度沖提，最初30分鐘以60:40遞變成40:60比例沖提，第30~60分鐘則維持40:60比例沖提，第60~75分鐘線性梯度回復成60:40比例沖提，以 propylparaben 為內部標準品，流速每分鐘 0.7ml，檢測波長 230nm，注入量10μl。各檢測成分之檢量線，其線性關係 ($r=0.9995 \sim 0.9999$) 良好；有關再現性之探討，採一固定已知濃度之混合標準品溶液進行同日內及異日間之測試，其同日內及異日間之相對標準偏差分別在0.7~2.8%及1.5~3.0%之間，顯示再現性亦佳。至於添加回收率分別為 indomethacin 96.0~109.0%，caffeine 96.7~103.4%，ethoxybenzamide 98.7~107.6%，chlorzoxazone 99.5~106.4% 及 diazepam 96.0~103.0% 顯示準確性均良好。經定量結果，每丸中各西藥成分之平均含量分別為 indomethacin 9.3mg, ethoxybenzamide 71.4 mg, caffeine 30.8 mg, chlorzoxazone 35.7 mg 及 diazepam 0.6 mg。

關鍵詞：中藥摻加西藥檢驗，薄層層析法，高效液相層析法，indomethacin，ethoxybenzamide，caffeine，chlorzoxazone，diazepam。

前言

中藥或民間藥均採天然物直接或經炮製後供藥用，除少數劇毒性藥物外，一般有效成分含量常較同類作用成分之西藥為低，故一般人認為中藥作用緩和，甚至無副作用，所以有部份人喜用中草藥。另因目前尚存在很多病症，西醫西藥尚無法治癒，且在臺灣提供中草藥管

道很多，患者常求助秘方或偏方，因此有少數不肖業者，為求令患者覺得速效或症狀有所改善，將西藥摻入中藥，患者在不知情之情況下服用而導致不良之影響或副作用，故中藥製劑摻加西藥之檢驗一向為本局之重點工作，多年來亦常對市售中藥製劑及中醫診所、中藥房、國術館等販售之中藥是否摻加西藥進行調查^{(1)~(8)}，Lai 等亦有報導⁽⁹⁾。本局一般接受各衛生

機關、檢警情治司法機關之檢體，為因應龐大之檢體數量，一般先採薄層層析法及紫外光分光吸收度法^(10,11)進行篩檢後，再加以確認。

將西藥摻入中藥製劑，在台灣地區均未被允許，故一般之檢驗只限於定性，但為進一步了解其摻加西藥之含量是否超過一般西藥使用劑量，近年來本局曾就部份檢出摻西藥之檢體予以定量^(12~17)，Gertner 等亦有檢出並定量之報導⁽¹⁸⁾。本實驗亦探討檢體檢出成分之含量，分析條件係參考文獻⁽¹⁹⁾所載，針對止痛藥及非固醇消炎止痛藥之高效液相層析方法，並將其移動相改以梯度沖提法，定量此中藥檢體中摻加之西藥成分。

材料與方法

一、檢體來源

消費者於服用黑色不知名中藥丸後，自覺有體力增加、尿液減少等症狀，因而質疑藥品質，向高雄市政府衛生局消費者中心申訴，於八十一年五月轉送本局檢驗，此藥每丸平均重 5.15g 之大丸，來文中未敘明一次或一日之服用量。

二、標準品及試藥

本實驗使用之 indomethacin, caffeine, chlorzoxazone, propylparaben 及 diazepam 對照標準品，購自美國 Sigma 公司 (St. Louis, USA)，ethoxybenzamide 對照標準品，購自 Nacalai 公司 (Kyoto, Japan)，甲醇採 LC 級，購自 Labscan 公司 (Dublin, Ireland)，氯仿採 LC 級，購自 ALPS 公司 (新竹，台灣)，磷酸二氫鉀 (KH_2PO_4) 購自和光純藥 (Osaka, Japan)，蟻酸 (formic acid) 購自 Merck 公司 (Frankfurter, Germany)，均採特級試藥。

三、儀器及裝置

索氏抽提器 (Soxhlet extractor)、減壓濃縮裝置 (BU CHI Rotavapor EL130 with BU CHI 168 Vacuum/Distillation controller)、薄層層析分析使用之層析板為 Silica gel 60F₂₅₄ 厚度 2mm；定量分析所使用之高效液相層析儀為 Waters 600E 系統控制器、Shimadzu SIL-9A 自動注射系統附 Waters 486Tunable 紫外線檢出器及訊華實驗數據處理系統。分析使用條件如下：層析管柱為 Cosmosil packed column 5C₁₈-

AR (4.6 x 150 mm)，移動相為 A (0.05M KH_2PO_4 : 0.1% formic acid 水溶液之緩衝溶液) 與 B (甲醇) 二種溶媒系，採梯度沖提法，A、B二者之比例，最初 30 分鐘由 60:40 線性梯度遞變成 40:60 比例沖提，第 30~60 分鐘則維持 40:60 比例沖提，第 60~75 分鐘，線性梯度回復成 60:40 比例沖提，流速每分鐘 0.7 ml，檢測波長 230nm，注入量 10μl。

四、實驗操作

(一)摻加西藥成分之篩檢

取十九丸稱量之，求每丸之平均重量；將中藥丸剪碎後，稱取檢體約 5g，依文獻^(10,11)所載方法，其溶媒系分別為氯仿：乙醇 (9:1, v/v) 及乙酸乙酯：甲醇：氨水 (8:1:1, v/v) 以雙向展開法分離後，於紫外燈 254nm 下檢視，標識出疑似西藥成分之斑點，經刮下各斑點之矽膠層，加 3ml 乙醇溶解，超音波振盪 10 分鐘後，置於 3000rpm 離心 10 分鐘，取上澄液，以紫外光分光光度計測其紫外光吸收光譜，並與各西藥對照標準品之光譜比對。

(二)定量

1. 檢體之萃取

精確稱取上述剪碎混勻之檢體 1.0g，置於索氏抽提器中，加入氯仿：甲醇 (1:1, v/v) 混液，於水浴上迴流充分抽提，萃取液置於減壓濃縮裝置中餾去溶媒，殘留物以甲醇溶解，復以甲醇 10ml 洗滌二次，合併溶液及洗液，以甲醇定容成 50ml。精確量取此液 5.0ml 加入濃度為 1.0mg/ml 之 propylparaben 內部標準品溶液 1.0ml，再以甲醇定容至 50ml 供作檢品溶液。

2. 標準品溶液及檢量線製作

精確稱取 caffeine, ethoxybenzamide, chlorzoxazone, diazepam 及 indomethacin 之對照標準品適量，加甲醇稀釋成如 Table 1 所示之系列濃度，並使 propylparaben 內部標準品之濃度均為 20μg/ml。

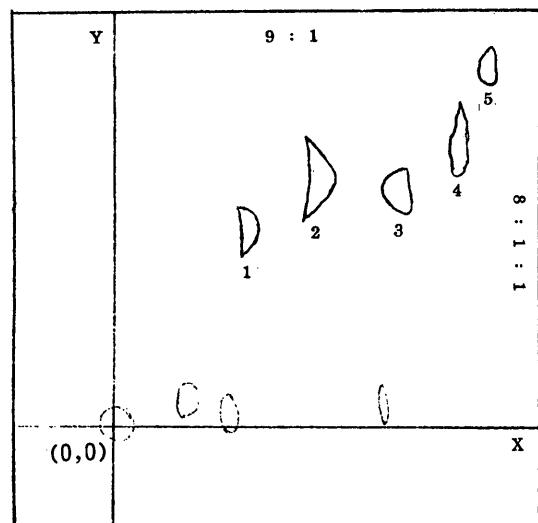
取上述所配製之標準品溶液，依上述高效液相層析條件分析，以各標準品與內部標準品波峰積分面積之比值為 Y 軸，標準品溶液濃度為 X 軸作圖，求出各西藥成分檢量線線性回歸方程式及相關係數。

3. 同日內與異日間試驗之評估

精確配製含 caffeine 15μg/ml, ethoxybenzamide 20μg/ml, diazepam 0.2μg/ml, chlorzoxazone

Table 1. Concentrations of standards and interanal standard in four calibrators

Reference standard	std-1 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	std-2 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	std-3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	std-4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
caffeine	10	20	30	40
ethoxybenzamide	15	30	45	60
chlorzoxazone	10	20	30	40
diazepam	0.2	0.4	0.6	0.8
indomethacin	2	4	6	8
propylparaben	20	20	20	20



Synthetic drug	Rf value	
	X-axis	Y-axis
1. indomethacin	0.33,	0.46
2. chlorzoxazone	0.50,	0.60
3. caffeine	0.68,	0.56
4. ethoxybenzamide	0.81,	0.69
5. diazepam	0.89,	0.89

X axis-chloroform: ethanol (9:1, v/v)

Y axis-ethyl acetate: methanol: ammonia water (8:1:1, v/v)

Figure 1. Two-dimensional TLC chromatogram and Rf values of synthetic drugs adulterated in the pills.

15 $\mu\text{g}/\text{ml}$, indomethacin 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 及 propylparaben 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 等混合標準品溶液，再依上述高效液相層析之分析條件，於同日內作五次分析；復於連續之五日，每日作一次分析，分別求其相對標準偏差。

4. 添加回收試驗

為測定三種不同含量之添加回收試驗，精確稱取三份各 1.0g 檢體，分別置於三套索氏抽提器中，並分別加入 5.0, 10.0 及 15.0ml 之添加回收試驗用之混合標準品溶液，該混合標準品溶液分別含 caffeine 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ethoxybenzamide 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$, chlorzoxazone 500 $\mu\text{g}/\text{mg}$, diazepam 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 indomethacin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。並依(二)-1之檢品溶液配製操作及上述高效液相層析條件分析，各不同添加量作三重複分

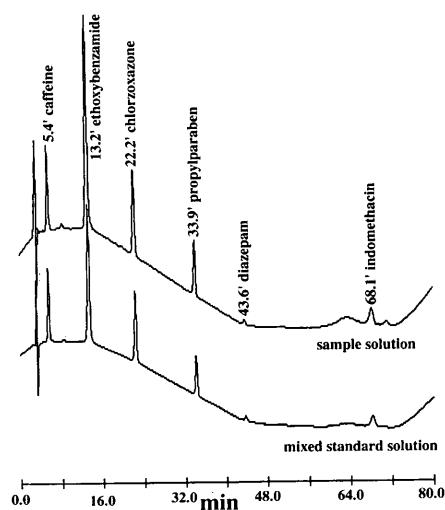


Figure 2. Chromatograms of mixed standards and sample solution.

Table 2. The linear equations and correlation coefficients of the calibration curves

Reference standard	Linear regression ($Y=mX+b$) equation		r:Correlation coefficient
	m	b	
caffeine	13.0989	0.137039	0.9999
ethoxybenzamide	7.4035	-0.166527	0.9998
chlorzoxazone	0.3323	6.60446E-03	0.9998
diazepam	10.8555	0.129919	0.9995
indomethacin	6.7568	9.95645E-02	0.9996

Table 3. Intraday and interday analyses of the five synthetic drugs

Reference standard	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Mean \pm S.D. (R.S.D.%) ^a	
		intraday	interday
caffeine	15	1.1678 \pm 0.0080 (0.68%)	1.1547 \pm 0.1344 (2.97%)
ethoxybenzamide	20	2.7673 \pm 0.0366 (1.32%)	2.7287 \pm 0.0418 (1.53%)
chlorzoxazone	15	1.4664 \pm 0.0305 (2.07%)	1.4206 \pm 0.0324 (2.27%)
diazepam	0.2	0.0506 \pm 0.0014 (2.75%)	0.0508 \pm 0.0013 (2.47%)
indomethacin	2	0.2951 \pm 0.0061 (2.07%)	0.2916 \pm 0.0061 (2.09%)

^an=5

析，再依據檢量線求出各成分之濃度，並予計算各成分之添加回收率。

結果與討論

一、摻加西藥成分之篩檢

原本聲稱治療心臟病、排尿酸之中藥檢體，經薄層層析法以兩種溶媒系進行XY軸雙向展開，其圖譜如 Fig. 1 所示，檢出五種成分为 indomethacin, caffeine, chlorzoxazone, ethoxybenzamide 及 diazepam；其X軸、Y軸之 Rf 值依序分別為 0.33, 0.50, 0.68, 0.81, 0.89 及 0.49, 0.60, 0.56, 0.69, 0.89；另各成分經紫外光分光光度計測得之光譜，與各成分標準品之光譜一致。

二、西藥成分之定量

(一) 檢出西藥成分之確認

本分析條件係參考 Moffat⁽¹¹⁾ 等文獻所載，針對止痛藥及非固醇消炎止痛藥之高效液相層析方法，但移動相改以梯度沖提法，以 propylparaben 為內部標準品，予以定量分析此中藥檢體中摻加之五種西藥成分。其各標準品混合溶液及檢體之高效液相層析圖譜如 Fig.2 所示，未受複雜中藥成分之干擾。

(二) 檢量線

以各標準品與內部標準品之波峰面積比換算其濃度，作成檢量線其線性回歸方程式及相關係數如 Table 2 所示，均在 0.9995 以上，顯示良好之線性關係。

Table 4. Recoveries of the five synthetic drugs from pills

Reference standard	Added ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Found ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Relative recovery(%)	Mean \pm S.D. ^a	R.S.D. (%)
caffeine	5.0	5.17	103.4	100.7 \pm 3.6	3.54
	10.0	10.22	102.2		
	15.0	14.50	96.7		
ethoxybenzamide	7.5	7.98	106.4	104.2 \pm 4.8	4.63
	15.0	16.14	107.6		
	22.5	22.20	98.7		
chlorzoxazone	5.0	5.32	106.4	102.6 \pm 3.5	3.41
	10.0	10.19	101.9		
	15.0	14.92	99.5		
diazepam	0.1	0.098	98.0	103.1 \pm 5.3	5.10
	0.2	0.217	108.5		
	0.3	0.308	102.7		
indomethacin	1.0	0.96	96.0	102.2 \pm 6.5	6.37
	2.0	2.18	109.0		
	3.0	3.05	101.7		

^an=3**Table 5.** The contents of the five synthetic drugs adulterated in the pills

Drug	Assayed amount (mg/pill)			Mean \pm S.D. ^a	R.S.D. (%)
	found	test-1	test-2	test-3	
caffeine	30.47	31.23	30.66	30.79 \pm 0.40	1.28
ethoxybenzamide	71.25	71.89	70.98	71.37 \pm 0.47	0.65
chlorzoxazone	34.36	36.40	36.46	35.74 \pm 1.20	3.34
diazepam	0.57	0.61	0.66	0.62 \pm 0.04	7.07
indomethacin	9.12	9.33	9.46	9.30 \pm 0.17	1.84

^an=3**(三)同日內與異日間試驗**

五種西藥成分之同日內與異日間試驗之結果如 Table 3 所示，同日內相對標準偏差介於 0.7%~2.8% 之間，異日間相對標準偏差則介於 1.5%~3.0% 之間。由於一次同時定量五種西藥成分且為避免中藥成分之干擾，以致分析滯留

時間長達 80 分；雖所分析之各西藥成分含量及各成分對檢測器之吸光度差異極大，上述所得相對標準偏差值尚稱良好。

(四)添加回收率試驗

各西藥成分之添加回收率試驗結果如 Table 4 所示，五種成分添加回收率介於 100.7%

~104.2%之間，相對標準偏差則介於3.4~6.4%之間，尚可接受。

(四)各西藥成分之含量

由檢量線求得壹丸中各西藥成分之含量，均取三次之平均值，其每丸含量分別為 caffeine 30.8mg, ethoxybenzamide 71.4mg, chlorzoxazone 35.7mg, diazepam 0.6mg 及 indomethacin 9.3mg (Table 5)。其相對標準偏差介於0.7~7.1%之間，其中 diazepam 之相對標準偏差最大，可能因含量較低所致。

三、檢出之西藥成分與聲稱療效及劑量探討

本送驗檢體稱係用於治療心臟病、排尿酸之中藥丸，但並未檢出任何與治療心臟病、促進尿酸排泄之西藥成分，卻檢出與該聲稱療效無關之解熱、鎮痛成分 ethoxybenzamide 及非固醇類消炎止痛劑 indomethacin，中樞神經系統興奮劑 caffeine，骨骼肌鬆弛劑 chlorzoxazone 及鎮靜安眠劑 diazepam。由其聲稱之療效與檢出之不同效能之五種成分，其摻加之行為堪慮。另觀每丸（平均重量 5.15g）所摻加之西藥成分含量均低於一般劑量，由於送驗之消費者未敘明該藥之一次或一日服用量，則無法了解其服用量，惟該類 5g 之中藥大丸一般服用一丸之情況，尚無過量之虞。然而多種西藥與中藥合用，是否造成其他作用則尚待探討。

參考文獻

- 秦玲、曾人和、林哲輝、曾千芳。1987。市售中藥感冒糖漿羼加未核准西藥成分之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報 5: 204-205。
- 劉宜祝、鄭守訓、謝伯舟、徐廷光、莊清堯。1988。台灣地區中醫診所及中藥房調製中藥製劑羼加西藥成分之調查報告第二報。藥物食品檢驗局調查研究年報 6: 146-149。
- 劉宜祝、徐廷光、莊清堯。1988。七十五年度台灣地區市售風濕鎮痛類中藥製劑羼加西藥成分之調查研究。藥物食品檢驗局調查研究年報 6: 150-151。
- 方燕嬌、劉宜祝、徐廷光、孫慈悌。1989。市售調經理帶類中藥製劑羼加西藥成分之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報 7: 144-145。
- 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羼加西藥成分之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報 7: 148-149。
- 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羼加西藥成分之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報 7: 197-199。
- 楊美華、方燕嬌、徐廷光、張柏林。1991。七十八年度台灣地區中醫診所及中藥房調製風濕鎮痛類中藥製劑羼加西藥成分之調查。藥物食品檢驗局調查研究年報 9: 48-53。
- 曾木全、李珮瑜、周秀冠等。1992。八十年度台灣地區國術館販售風濕鎮痛類中藥製劑羼加西藥成分之調查研究。藥物食品檢驗局調查研究年報 10: 42-46。
- Lai, S.J., Binder, S.R., Essien, H. and Wen, K.C., 1995, Identification of Western Medicines as Adulterants in Chinese Herbal Medicines Using a Broad-spectrum Drug Screening HPLC System. Journal of Liquid Chromatography 18(14): 2861-2875.
- 劉宜祝、林哲輝。1991。中藥檢驗方法專輯(四)--中藥製劑羼加西藥之檢驗。1-36頁。行政院衛生署藥物食品檢驗局。台北。
- 溫國慶、蔡明哲等。1995。中藥檢驗方法專輯(七)--中藥製劑羼加西藥數據圖譜(I)。行政院衛生署藥物食品檢驗局。台北。
- 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 3(1): 51-56。
- 顧祐瑞、蔡明哲、溫國慶。1995。中藥摻加 Sulfamethoxazole 之定量探討。藥物食品分析 3(2): 115-120。
- 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摻加西藥成分之探討。藥物食品分析 3(4): 185-192。
- 顧祐瑞、蔡明哲、溫國慶。1996。中藥製劑中摻加 Aminitroazole, Metronidazole, Ornidazole 及 Tinidazole 之高效液相層析分析。藥物食品分析 4(2): 141-148。

16. 曾木全、蔡明哲、溫國慶。1996。一種固精補元氣中藥丸摻加 Acetaminophen , Piroxicam , Ethoxybenzamide , Hydrochlorothiazide , Chlorzoxazone , Caffeine 及 Nicotinamide 西藥成分之分析與定量研究。藥物食品分析 4(1): 49-56。
17. Ku, Y.R., Tsai, M.J., Lin, J.H. and Wen, K.C., 1996, Micellar Electro Kinetic Capillary Chromatography of Clobenzorex HC1 and Diazepam Adulterated in Anorexiant Traditional Chinese Medicine. The Chinese Pharmaceutical Journal 48(2): 157-165.
18. Gertner, E., Marshall, P.S., Filandrinos, D., Potek, A.S. and Smith, T.M. 1995. Complications Resulting from the Use of Chinese Herbal Medications Containing Undeclared Prescription Drugs. Arthritis & Rheumatism 38(5): 614-617.
19. Moffat, A.C., Jackson, J.V., Moss, M.S., Widdop, B. 1986. Clarke's Isolation and Identification of Drugs. 2nd ed. pp.160-220. The Pharmaceutical Press, London, England.

Quantitative Analysis of Caffeine, Ethoxybenzamide, Chlorzoxazone, Diazepam and Indomethacin Illegally Adulterated in Chinese Medical Pills

MU-CHANG TSENE, MINE-JER TSAI AND KUO-CHING WEN*

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

ABSTRACT

A traditional Chinese medicine, which was brought by a consumer for treating heart disease and uricosuria, was obtained and tested the illegal adulteration with chemical drugs. In the qualitative analysis, two-dimensional TLC, with chloroform:ethanol (9:1,v/v) and ethyl acetate:methanol: ammonia water (8:1:1,v/v) as the solvent systems, established the presence of caffeine, indomethacin, ethoxybenzamide, chlorzoxazone and diazepam in the pills. For quantitative analysis, a reversed-phase HPLC method was established for simultaneous determination of the five chemical drugs. The analysis of the sample extract was performed on a Cosmosil 5C₁₈-AR column (4.6×150mm) by a linear gradient elution

with the mobile phase of 0.05 M KH₂PO₄-0.1% formic acid buffer and methanol, programmed from 60:40, v/v, to 40:60, v/v, for 30 min, with 30 mim hold and then 60:40, v/v, for the subsequent 15 min, at a flow rate of 0.7 ml/min and with propylparaben as an internal standard. The monitor wavelength was set at 230 nm. System suitability tests showed that the established method was quite suitable for the determination of the adulterants in the pills. By using this method, 30.8mg of caffeine, 71.4 mg of ethoxybenzamide, 35.7 mg of chlorzoxazone, 0.6 mg of diazepam and 9.3 mg of indomethacin, were found in each pill of the sample.

Key words: Traditional Chinese medicine, HPLC, TLC, indomethacin, caffeine, ethoxybenzamide, chlorzoxazone, diazepam.