

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. FDB)

以高效液相層析法定量複方強肝錠劑 中之 Thioctamide 成分

許淑纓 何 智 徐廷光

第一組

摘 要

本研究發展出一種高效液相層析法，可用於分離、定量單方或複方強肝錠劑中之 Thioctamide 成分，簡單、迅捷且具特异性。使用 Shimadzu PC 8-10(10 μ m, 4 mm I.D. \times 250 mm) 為層析管，以 1% 冰醋酸與乙腈(60:40)之混合液為移動相，Clofibrilic Acid 為內部標準品，於 250 nm 波長處以紫外光偵測器偵測之。標準曲線(Standard Curve)之線性迴歸方程式為 $Y=0.1684 X-0.0064$ ，相關係數 $r=0.9998$ (濃度範圍為 0.085~0.425 mg/ml)。注射不同濃度之模擬檢體各六次，所得平均回收率為 100.95%，市售檢體含量測定實驗之變異係數為 0.48%，顯示本法準確、可靠，適用於市售藥品錠劑之檢驗分析。

鍵語：Thioctamide、鑑別、含量測定、高效液相層析法。

前 言

Thioctamide 具有保護肝臟及解毒之作用¹，常存在於單方或配合有他種維他命之複方強肝製劑中。此成分之含量測定法在各國藥典中均未收載，以往所用的分析方法包括紫外光吸光度法、含氮測定法、極譜測定法及碘滴定法等，不僅操作繁瑣，費時頗多，且易受共存物的影響，難獲精確之定量結果。文獻上雖已有關 HPLC 應用於分離 Thioctic Acid 及 Thioctamide 的報導²，但僅討論定性工作。本研究擬發展一可靠不受干擾之分析方法，期能實際應用於含有 Thioctamide 成分之錠劑的例行檢驗上。

材料及方法

一、材料與裝置：

(一)高效液相層析儀：

1. 儀器：Shimadzu LC-6 A Liquid Chromatography.

2. 逆相層析管：Shimadzu PC 8-10 (10 μ m, 4 mm I.D. \times 250 mm)

3. 偵測器：Shimadzu SPD-6 AV UV-VIS Spectrophotometric Detector.

4. 熱感應積分儀：Shimadzu C-R 3 A Integrator Chromatopac.

5. Milli-Q water purification system (Millipore Corp.)

以高效液相層析法定量複方強肝錠劑中之Thioctamide成分

6. Solvent purification kit.

7. Microsyringe.

(二)試驗及標準品：

1. Thioctamide: Sigma No. T-5875.

2. Clofibrilic Acid: Sigma No. C-7142.

3. 冰醋酸及乙腈 (Acetonitrile) : E. Merck, LC-grade.

4. 氯仿及鹽酸 : E. Merck, Reagent grade.

二、試劑及溶液之配製：

(一)內部標準品溶液：

精確稱取適當量之 Clofibrilic Acid，以移動相溶解並稀釋成 1 mg/ml 之貯備溶液 (Stock Solution)。

(二)對照標準品溶液及混合標準品液：

精確稱取適當量之 Thioctamide 對照標準品，以移動相溶解並稀釋成 0.85 mg/ml 之貯備溶液。

精確量取貯備溶液各 5 ml, 10 ml, 15 ml, 20 ml 及 25 ml 於 50 ml 之容量瓶中，再各加入內部標準品貯備溶液 10 ml，以移動相稀釋至刻度，使成含有 Clofibrilic Acid 0.2 mg/ml 及 Thioctamide 各為 0.085 mg/ml, 0.170 mg/ml, 0.255 mg/ml, 0.340 mg/ml 及 0.425 mg/ml 之五種混合標準品溶液。

(三)移動相：

臨用時，取乙腈、冰醋酸及水依實驗所需比例 (乙腈 40% 及 1% 冰醋酸水溶液 60%) 混合，以 Mill-Q 減壓過濾後，置超音波浴 (ultrasonic bath) 中振盪約十五分鐘，驅氣後使用。

(四)模擬檢體溶液：

依照模擬檢體之處方 (表一)，精確稱取除 Thioctamide 以外一百倍量之各成分於中型研鉢中研成均勻細粉，精確稱取此細粉約 3.59 g 共 4 份，各加入 17.0 mg, 25.5 mg, 34.0 mg, 42.5 mg 之 Thioctamide 標準品，分置 4 支離心瓶中。以 3×50 ml 之氯仿抽提之。(必要

表一 Thioctamide 模擬檢體處方

Each Sugar Coated Tablet Contains:	
Thioctamide	5 mg
Lactose	124 mg
Starch	255 mg
Methylcellulose	4 mg
Dextrin	6 mg
Magnesium Stearate	125 mg
Sugar	148.5 mg
Talc	56 mg

時可置入 80°C 之水浴中加熱十分鐘，後以超音波浴振盪十分鐘)。合併抽提液，移置 4 支分液漏斗中，先後以經氯仿飽和之稀鹽酸及水各 50 ml 清洗後，將氯仿層通過上有無水硫酸鈉並經氯仿濕潤過之濾紙過濾。以適量氯仿洗濯硫酸鈉後，合併濾液及洗液，揮發濃縮至 50 ml 以下，移入 50 ml 容量瓶中，稀釋至刻度。精確量取此濃縮液各 10 ml，置入 4 支 20 ml 容量瓶中，通入氮氣流使恰達乾燥，各加入內部標準品貯備溶液 4 ml，以移動相溶解後稀釋至刻度，則配製而得之溶液所含 Clofibrilic Acid 應為 0.2 mg/ml，而 Thioctamide 含量則各應為 0.17 mg/ml, 0.255 mg/ml, 0.34 mg/ml 及 0.425 mg/ml。

(五)市售檢體溶液：

任取市售檢體 (處方見表二) 20 粒，仔細洗去糖衣乾燥後，稱得其平均重量，置研鉢中研磨成均勻細粉。精確稱取相當於 25 mg Thioctamide 之粉末，以 3×50 ml 氯仿抽提，合併抽提液移置分液漏斗中，先後以經氯仿飽和之稀鹽酸及水各 50 ml 清洗後，將氯仿層通過上有無水硫酸鈉並經氯仿濕潤過之濾紙過濾。以適量氯仿洗濯硫酸鈉後，合併濾液及洗液，揮發濃縮至 50 ml 以下，移入 50 ml 容量瓶中，稀釋至刻度，精確量取溶液 10 ml 置入 20 ml 容量瓶中，通入氮氣流使恰達乾燥，加入內部標準品貯備溶液 4 ml，以移動相溶解後稀釋至刻度。

表二 市售Thioctamide複方強肝錠劑處方

Each Sugar Coated Tablet Contains:	
Thioctamide	5 mg
Orotic Acid	30 mg
Vitamin B 1 HNO ₃	5 mg
Bitamin B 2	2 mg
Vitamin B 6	1 mg
Vitamin B 12	1 mg
Calcium Pantothenate	10 mg
Nicotinamide	15 mg
Inositol	5 mg
Vitamin C	10 mg
Dehydrocholic Acid	5 mg
Lactose	124 mg
Starch	255 mg
Methylcellulose	4 mg
Dextrin	6 mg
Magnesium Stearate	125 mg
Sugar	148.5 mg
Talc	56 mg

三、層析條件：

(一)層析管：Shimadzu PC 8-10 (10 μm, 4 mm I.D. × 250 mm).

(二)移動相：1%冰醋酸—乙腈(60:40)之混合溶液

(三)偵測器：UV 250 nm, 0.02 AUFS.

(四)記錄紙速度：0.2 cm/min.

(五)注射量：20 μl.

四、實驗步驟：

依前述之層析條件，將不同濃度之混合標準品溶液分別注射六次入高效液相層析儀中。同法亦分別注射六次不同濃度之模擬檢體溶液及市售檢體溶液，由波峰之滯留時間可鑑別出Thioctamide成分。

五、標準曲綫之製作：

由各混合標準品溶液六次注射所得對照標準品波峰高度與內部標準品波峰高度之比值，以統計學³上之方法求取高度比之平均值，標準偏差及變異係數等，並利用各平均值與濃度間

之關係求出標準曲綫之綫性迴歸方程式及相關係數。

六、市售檢體之含量計算：

由市售檢體溶液六次注射所得Thioctamide與Clofibric Acid波峰高度比之平均值，可依下列公式計算錠劑中Thioctamide之含量。

$$\text{Thioctamide mg/Tab} = 100 C \times (\text{Ru/Rs}) \times (\text{T/W})$$

式中

C = 混合標準品溶液中Thioctamide之濃度(mg/ml)

Rs = 混合標準品溶液中Thioctamide與Clofibric Acid之波峰高度比值。

Ru = 市售檢體溶液中Thioctamide與Clofibric Acid之波峰高度比值。

W = 檢體取量(mg)。

T = 裸錠之平均重量(mg)

結果與討論

圖一係在上述層析條件下操作所得Thioctamide及Clofibric Acid之層析圖譜，其滯留時間分別為4.782及9.775分鐘。圖二則為將此系統應用於市售檢體之檢驗分析

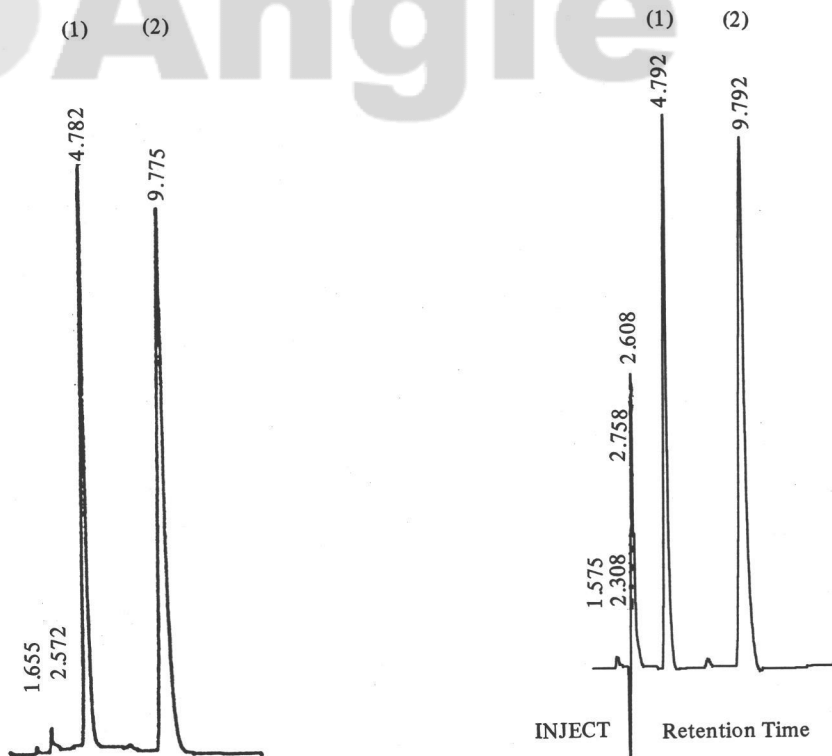
表三 Thioctamide濃度與波峰高度比之關係

濃度 mg/ml	*波峰高度比 平均值(**變異係數%) n=6
0.085	0.5384(1.86)
0.170	1.0558(1.64)
0.255	1.5635(0.64)
0.340	2.0313(0.70)
0.425	2.5737(0.55)

$$\text{*波峰高度比} = \frac{\text{Thioctamide波峰高度}}{\text{Clofibric Acid波峰高度}}$$

$$\text{**變異係數} = \frac{\text{標準偏差}}{\text{平均值}}$$

以高效液相層析法定量複方強肝錠劑中之Thioctamide成分



圖一 混合標準品溶液之典型液相層析圖(1) Thioctamide (2)Clofibrac Acid

圖二 市售檢體溶液之液相層析圖(1) Thioctamide (2)Clofibrac Acid

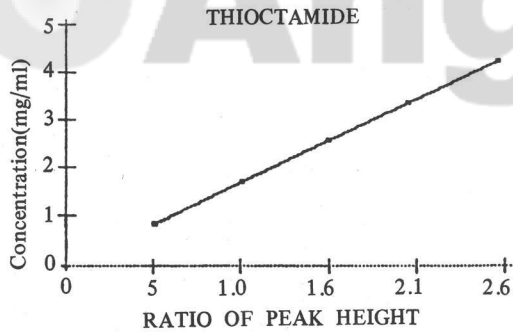
表四 以HPLC測定模擬檢體中有效成分之回收率

加入量 (mg)	注射次數(n)	檢出量 (mg)	回收率(%)	平均值±標準偏差	變異係數(%)
3.4	6	3.41	100.2	100.95±2.49	2.47
5.1	6	4.96	97.2		
6.8	6	7.001	103.0		
8.5	6	8.79	103.4		

表五 以HPLC測定市售Thioctamide複方強肝錠劑之再現性

注射次序	標誌量(mg)	檢出量(mg)	平均值±標準偏差	變異係數(%)
1	5	4.68	4.695±0.022	0.48
2	5	4.68		
3	5	4.69		
4	5	4.735		
5	5	4.715		
6	5	4.67		

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. FDB)



圖三 Thiocetamide 含量測定之標準曲線。
Thiocetamide 濃度對 Thiocetamide 與 Clofibric Acid 波峰高度之比值呈直線關係($r=0.9998$)

時的實測圖譜，顯示其分離效果良好。表三列出 Thiocetamide 與 Clofibric Acid 之波峰高度比平均值及各平均值所對應之變異係數，由於各變異係數均小於 2%，顯示各次注射之再現性(reproducibility)良好。圖三係以各高度比平均值為橫軸，各對應濃度值為縱軸(Y 軸)，依綫性迴歸方程式($Y=0.1684 \times 0.0064$)繪製而成之標準曲綫， $Y=0.9998$ ，綫性範圍從 0.085 mg/ml 到 0.425 mg/ml。表四所列者係從加有 3.4 mg, 5.1 mg, 6.8 mg 及 8.5 mg Thiocetamide 之四種模擬檢體中測得 Thiocetamide 之平均回收率($n=6$)，其值為 100.95%，顯示本法所具可靠性(reliability)

甚高。表五所列各值為市售檢體溶液在經過六次重複注射後所得檢出量、平均值±標準偏差及變異係數之結果，變異係數只有 0.48%，足證再現性甚佳。本法所用層析條件及層析管柱，皆為一般檢驗室中經常使用者，其分析時間不超過十二分鐘，實為一簡便、快捷、準確又可靠的分析法。

誌 謝

本報告之得以順利完成，一組全體同仁之有益討論及建議居功厥偉，尤其二科同仁在儀器使用上之鼎力襄助與配合令人難忘。特此致謝。

參考文獻

1. 蔡靖彥. 1986. 常用藥品手冊(Handbook of Common Drug). 666~667 頁. 玉山書局. 嘉義市.
2. Howard, S. C. and D. B. Mc Cormick, 1981, High-performance liquid chromatography, 208, pp 129~131.
3. 楊志良. 1983. 二個等距變相間之統計：簡單直線迴歸及相關。生物統計學新論. P.42 及 Ch. 12, 巨流圖書公司. 台北市.

以高效液相層析法定量複方強肝錠劑中之Thioctamide成分

DETERMINATION OF THIOCTAMIDE IN TABLETS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

SHU-YING, CHIG HO AND
TING-GUANG SHYU

ABSTRACT

A simple, rapid and specific method of high-performance liquid chromatography for the separation and determination of thioctamide in pharmaceutical preparations has been developed. In this study the mobile phase was a mixed solvent which contain 40% acetonitrile and 60% aqueous solution of 1% acetic acid, the internal standard was clofibrac acid, the detection wavelength was set at 250 nm, the column was the product of Shimadzu Company (PC 8-10, 10 μ m, 4 mm I.D. \times 250 mm), the flow rate of mobile phase was 1 ml/min. Results indicated an equa-

tion of the regression analysis for a standard curve (concentration of thioctamide versus peak height ratios) was $Y=0.1684 X-0.0064$, and coefficient of correlation (r) for the analysis was 0.9998 (from 0.085 mg/ml to 0.435 mg/ml). Recovery studies of model sample solutions gave a value of 100.95% ($n=6$). The coefficient of variation for the assay of a marketed product was 0.48%. We conclude that this study provides a precise and reliable method which is applicable to the analysis of commercial tablets.