

HPLC法测定注射用阿奇霉素枸橼酸二氢钠的含量及有关物质

柏大为*, 陈佳(泰州市食品药品检验所, 江苏泰州 225300)

中图分类号 R927.2;R978.1*5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)05-0450-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.05.24

摘要 目的:建立注射用阿奇霉素枸橼酸二氢钠含量和有关物质的测定方法。方法:采用高效液相色谱法,并与该制剂标准采用的含量测定方法(抗生素微生物检定法)及有关物质检查方法(薄层色谱法)测定结果进行比较。色谱柱为资生堂C₁₈MG II柱,流动相为磷酸盐缓冲液(pH 8.2)-乙腈(45:55, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为215 nm,柱温为35 ℃。结果:阿奇霉素检测质量浓度线性范围为0.5~3.0 mg/ml($r=0.9999$),平均回收率为100.2%,RSD=0.7%($n=9$)。本方法主药含量测定结果与原标准方法结果一致,有关物质检查方法优于原标准方法。结论:建立的方法简便、准确、专属性强、重复性好,可用于注射用阿奇霉素枸橼酸二氢钠含量及有关物质的测定。

关键词 高效液相色谱法;阿奇霉素;有关物质;含量测定

Content Determination and Related Substances of Azithromycin Sodium Dihydrogen Citrate for Injection by HPLC

BAI Da-wei, CHEN Jia(Taizhou Institute for Food and Drug Control, Jiangsu Taizhou 225300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of azithromycin and its related substances in Azithromycin sodium dihydrogen citrate for injection. METHODS: HPLC method was adopted and compared with the results of standard method for content determination of the preparation (antibiotic microbiological assay) and TLC for related substances. The determination was performed on C₁₈ MG II column with mobile phase consisted of phosphate buffer (pH 8.2)-acetonitrile (45:55, V/V) at flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 215 nm and column temperature was 35 ℃. RESULTS: The linear range for azithromycin was 0.5-3.0 mg/ml ($r=0.9999$) with average recovery of 100.2% (RSD=0.7%, $n=9$). The results of content determination of main component are concordant with those of standard method. The method for the determination of related substance was better than previous method. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, specific and reproducible, and suitable for the content determination of azithromycin and its related substances in Azithromycin sodium dihydrogen citrate for injection.

KEY WORDS HPLC; Azithromycin; Related substances; Content determination

净,产率高(93%),质量易控制。磺胺嘧啶铜利用磺胺嘧啶的铵盐与硫酸铜共沉淀制得,由于铵盐及SO₄²⁻均溶于水,所以制备中用蒸馏水充分洗涤沉淀至pH约为7,干燥后即可得纯度>97%的样品。

含量测定采用经典的容量分析方法,分别用亚硝酸钠法和碘量法测定磺胺嘧啶铜中2种不同基团(苯胺基和铜)。与《中国药典》“磺胺嘧啶锌”项下方法比较^[7],本法双重控制其含量,方法简便、准确。铜的测定是用间接碘量法,由于磺胺嘧啶铜不溶于水,应先加稀盐酸,待样品完全溶解后,再加水稀释。笔者对所加入稀盐酸的量进行了试验,从10~30 ml不等,结果测得的数据基本一致,但盐酸的量太少,样品不易溶解,因此加入20 ml较为适中。在滴定过程中,因Cu²⁺与I⁻作用生成的CuI同时也能吸附部分I₂,使终点难以判断,故加入硫酸氰钾,使CuI转化成溶解度更小的CuSCN,同时将所吸附的I₂释放,使终点更加敏锐。

检索近30年的有关资料表明,本品是一种新的合成化合物,其合成工艺等已经向国内有关部门申请专利。本品是国际上之首创,具有广阔的发展前景,蕴藏着巨大的经济效益和社会效益。磺胺嘧啶铜抗菌谱广、作用强,抗炎、收敛效果好,

因其难溶,局部外用能在创面保留较高的浓度和较长的时间,有利于疗效的发挥。

参考文献

- [1] 郭振荣.我国大面积深度烧伤创面处理的进展[J].继续医学教育,2007,21(13):26.
- [2] 祁义平,王顺宾.1999—2009年医院烧伤创面细菌菌群及药敏分析[J].中外医学研究,2011,9(26):51.
- [3] 李辉.磺胺嘧啶银临床应用回顾[J].河北北方学院学报,2005,2(4):71.
- [4] Cunningham JJ,Leffell M,Harmatz P, et al. Burn severity, copper dose, and plasma ceruloplasmin in burned children during total parenteral nutrition[J]. *Nutrition*, 2003,19(4):329.
- [5] 张友智,赵瑛.磺胺嘧啶铜对实验性口腔黏膜溃疡的药效学[J].中国医院药学杂志,2007,27(8):1055.
- [6] 戴新志,樊凤秋.水合磺胺嘧啶锌和氨合磺胺嘧啶锌结构的研究[J].河南师范大学学报,1992,20(1):108.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:1146-1147、附录21、附录45.

* 主管药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:0523-86200631。
E-mail: e11_nol@163.com

(收稿日期:2012-02-28 修回日期:2012-05-13)

阿奇霉素为15元环新型大环内酯类抗菌药物^[1-3],结构上与红霉素类似^[4],作用机制也相似,是通过抑制细菌蛋白质的合成而发挥作用,且具有抗菌谱广、不良反应小等优点^[5-6]。由于阿奇霉素物质自身显碱性,在一定酸性条件下不稳定^[2];而阿奇霉素枸橼酸二氢钠是阿奇霉素的枸橼酸二氢钠盐,稳定性更高,且其溶液的pH值接近人体血液酸碱度(pH 7.35~7.45),因而刺激性小、耐受性更好。国家部颁标准^[7]中对其含量采用抗生素微生物检定法测定,对有关物质采用薄层色谱法测定。这2种方法操作均较复杂,试验周期长,人为影响因素较多。笔者参考有关文献^[8-10]建立了高效液相色谱(HPLC)法测定注射用阿奇霉素枸橼酸二氢钠含量和有关物质的方法,结果表明建立的方法简便、准确、专属性强、重复性好,可用于注射用阿奇霉素枸橼酸二氢钠的含量及有关物质的测定。

1 材料

2695 HPLC仪、2996二极管阵列检测器(DAD)、Empower 色谱工作站(美国Waters公司);AG-135电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);Milli-Q超纯水系统(美国密理博公司)。

样品为市售注射用阿奇霉素枸橼酸二氢钠(浙江普洛康裕制药有限公司,含量测定有2批,批号:20101210B、20080702,有关物质测定有5批,批号编号为1~5,规格:每支0.25g);阿奇霉素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130593-201002,纯度:94.3%);乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:资生堂C₁₈ MG II柱(150 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:磷酸盐缓冲液(取0.05 mol/L磷酸氢二钾溶液,用20%的磷酸溶液调节pH至8.2)-乙腈(45:55,V/V),流速:1.0 ml/min;柱温:35℃;进样量:20 μl;检测波长:215 nm。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备。精密称取阿奇霉素对照品53.00 mg,置于25 ml量瓶中,加流动相适量使其溶解,定容,摇匀,待用。

2.2.2 供试品溶液的制备。取样品5支,精密称定,研细;精密称取细粉适量(约相当于阿奇霉素200.00 mg),置于100 ml量瓶中,加流动相适量使其溶解,定容,摇匀,过滤,待用。

2.3 阿奇霉素含量测定方法的建立

2.3.1 线性关系考察。精密称取阿奇霉素对照品约212.06 mg,置于20 ml量瓶中,用乙腈溶解并定容至刻度,摇匀,制成10 mg/ml的溶液。精密量取上述溶液0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 ml,分别置于10 ml量瓶中,加流动相稀释至刻度,按“2.1”项下色谱条件,进样测定,以阿奇霉素质量浓度(x)为横坐标,相应的峰面积(y)为纵坐标,进行线性回归,得线性方程为 $y=9.59562x-0.16459(r=0.9999)$ 。结果表明,阿奇霉素检测质量浓度线性范围为0.5~3.0 mg/ml。

2.3.2 精密度试验。取“2.2.2”项下供试品溶液,连续进样6次,记录色谱峰面积。结果RSD=0.7%,表明精密度良好。

2.3.3 溶液稳定性试验。取“2.2.2”项下供试品溶液,于0、1、2、4、6、8 h分别进样测定,记录色谱峰面积。结果,阿奇霉素色谱峰的RSD=0.8%,表明供试品溶液在8 h内稳定。

2.3.4 重复性试验。精密称取样品(批号:20101210B)6份,按“2.2.2”项下方法制备成6份供试品溶液,进样测定,记录色

谱面积,以含量为指标计算RSD。结果样品中阿奇霉素的平均含量为99.9%,RSD=0.8%,表明本方法的重复性良好。

2.3.5 回收率试验。精密吸取供试品溶液5 ml 9份,分别置于10 ml量瓶中,分别加入对照品溶液1、2、3 ml各3份,加流动相至刻度,摇匀,进样测定,计算回收率。结果,供试品中阿奇霉素平均回收率为100.2%,RSD=0.7%,详见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

供试品中已有量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
10.05	1.998	12.048	99.99		
10.05	1.998	12.034	99.32		
10.05	1.998	12.056	100.38		
10.05	3.996	14.031	99.62		
10.05	3.996	14.040	99.86	100.2	0.7
10.05	3.996	14.050	100.09		
10.05	5.994	16.146	101.70		
10.05	5.994	16.098	100.89		
10.05	5.994	16.040	99.94		

2.3.6 检出限。取“2.2.1”项下对照品溶液稀释70倍,进样测定,记录主成分峰高约为噪音峰高3倍时的色谱图,测得其最低检出限为4 μg/ml。

2.4 样品含量测定

取样品2批,分别按“2.2.2”项下方法每批制备3份供试品溶液,进样测定并记录峰面积;另取“2.2.1”项下对照品溶液,同法测定,记录峰面积,阿奇霉素对照品以及供试品的色谱图见图1。按外标法以峰面积计算样品中阿奇霉素的含量,并与抗生素微生物检定法相比较,结果见表2。

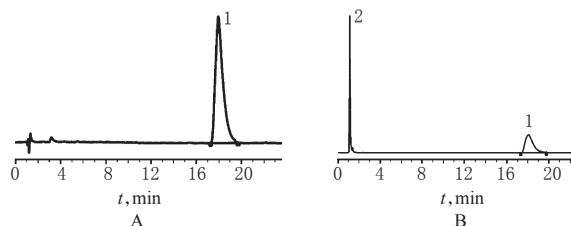


图1 主成分含量测定高效液相色谱图

A.对照品;B.供试品;1.阿奇霉素;2.枸橼酸

Fig 1 HPLC chromatograms of main components

A. substance control; B. test samples; 1. azithromycin; 2. citric acid

表2 2批样品中阿奇霉素含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of azithromycin in 2 batches of samples

批号	平均含量,%	
	HPLC法	抗生素微生物检定法
20101210B	100.4	99.9
20080702	99.8	99.2

2.5 有关物质的专属性试验

2.5.1 高温破坏试验。取供试品溶液在100℃条件下放置30 min,取此样液按有关物质测定法进行操作,图谱出峰时间保留至主成分出峰时间的1.5倍。结果各杂质峰与阿奇霉素之间分离度>1.5,分离效果良好,详见图2A。

2.5.2 酸破坏试验。精密称取样品适量(约相当于阿奇霉素25 mg),置于25 ml量瓶中用流动相稀释,加1 ml盐酸(1 mol/L),在沸水浴中加热25 min,冷却,用氢氧化钠(1 mol/L)调节至pH 7.0,过滤,按有关物质测定法操作。结果各杂质峰与阿

奇霉素峰完全分离, 详见图2B。

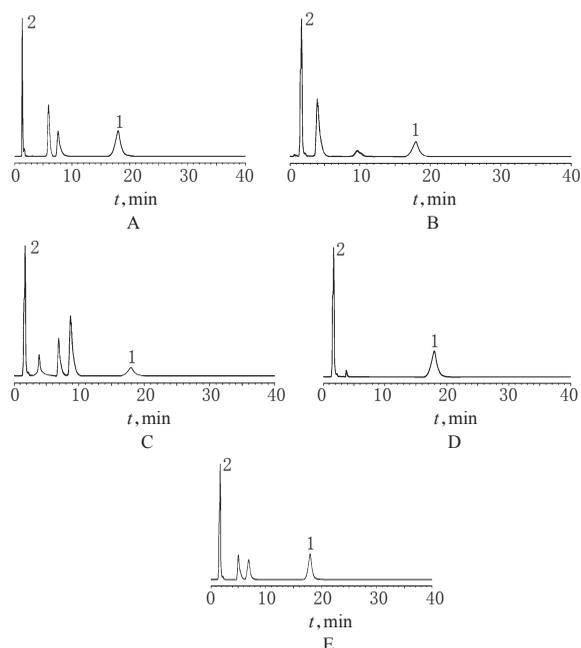


图2 破坏性试验高效液相色谱图

A. 高温破坏样品; B. 酸破坏样品; C. 碱破坏样品; D. 氧化破坏样品; E. 光照破坏样品; 1. 阿奇霉素; 2. 枸橼酸

Fig 2 HPLC chromatograms of destroyed test

A. samples destroyed by high temperature; B. samples destroyed by acid; C. samples destroyed by alkali; D. samples destroyed by oxidation; E. samples destroyed by light; 1. azithromycin; 2. citric acid

2.5.3 碱破坏试验。精密称取样品适量(约相当于阿奇霉素 25 mg), 置于 25 ml 量瓶中, 用流动相稀释, 加 1 ml 氢氧化钠 (1 mol/L), 在沸水浴中加热 25 min, 冷却, 用盐酸 (1 mol/L) 调节至 pH 7.0, 过滤, 按有关物质测定法操作。结果各杂质峰与阿奇霉素峰之间分离度 > 1.5, 实现完全分离, 详见图 2C。

2.5.4 氧化破坏试验。精密称取样品适量(约相当于阿奇霉素 25 mg), 置于 25 ml 量瓶中, 用流动相稀释, 加 1 ml H₂O₂ (30%), 置于沸水浴中加热 20 min, 冷却, 过滤, 取此滤液按有关物质测定法操作。结果各杂质峰与阿奇霉素峰完全分开, 有较好的分离度, 详见图 2D。

2.5.5 光照破坏试验。取样品适量, 于 4 000 lx 光照 12 h 后按有关物质测定方法操作。结果阿奇霉素峰与各杂质峰之间分离度 > 1.5, 完全分离, 详见图 2E。

2.6 样品中有关物质的测定

采用不加校正因子的自身对照法来测定, 结果 5 批样品中有关物质的含量分别为 0.9%、1.3%、1.2%、1.5% 和 1.1%。

综合以上结果显示, 在建立的 HPLC 条件下, 有关物质峰(降解产物峰)与主成分峰均达到基线分离, 说明该色谱条件可用于阿奇霉素有关物质的检测。

3 讨论

(1) 吸收波长的选择。阿奇霉素为大环内酯类抗菌药物, 紫外吸收较弱, 通过 DAD 进行全波长扫描, 发现其在 200 nm 波长附近有末端吸收。通过比较, 在 215 nm 波长处阿奇霉素峰出峰良好, 与相邻杂质峰分离显著, 杂质不干扰主药测定,

故选择 215 nm 作为测定波长。

(2) 色谱柱的选择。阿奇霉素枸橼酸二氢钠 pH 值偏碱性, 而普通 C₁₈ 色谱柱中的硅醇基会造成碱性化合物的峰形拖尾, 所以选用了型号为 MG II 的 ODS 色谱柱。该色谱柱采用高纯度硅胶为基质, 对硅胶表面进行了高分子包被, 可最大限度地抑制硅醇基的影响, 结果峰形满意。

(3) 溶剂的选择。阿奇霉素对照品在乙腈中溶解较好, 但阿奇霉素枸橼酸二氢钠在乙腈中溶解度不好, 会产生浑浊。在采用流动相作溶剂后, 溶解效果良好, 对照品和样品均能很好溶解, 故选用流动相为溶剂。

综上, 通过本试验表明, 所建立的 HPLC 法与抗生素微生物检定法含量测定结果基本一致, 同时也可替代原薄层色谱法对有关物质的检测; 而且所建立的方法相对更简便、快捷, 并具有良好的准确性和重复性。

参考文献

- [1] Wu YH, Ji XB, Hu SS. Studies on electrochemical oxidation of azithromycin and its interaction with bovine serum albumin[J]. *Bioelectrochemistry*, 2004, 64(1): 91.
- [2] 栾杰, 周庆国, 王海霞. HPLC 法电化学检测阿奇霉素片的有关物质[J]. *中国药房*, 2008, 19(25): 1 975.
- [3] Hoepelmana IM, Schneider MM. Azithromycin: the first of the tissue-selective azalides[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 1995, 5(3): 145.
- [4] Escudero E, Fernandez-Varon E, Marin P, et al. Pharmacokinetics and tissue tolerance of azithromycin after intramuscular administration to rabbits[J]. *Res Vet Sci*, 2006, 81(3): 366.
- [5] Hoepelman IM, Möllers MJ, van Schie MH, et al. A short (3-day) course of azithromycin tablets versus a 10-day course of amoxicillin-clavulanic acid (co-amoxiclav) in the treatment of adults with lower respiratory tract infections and effects on long-term outcome[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 1997, 9(3): 141.
- [6] Hand WL, Hand DL. Characteristics and mechanisms of azithromycin accumulation and efflux in human polymorphonuclear leukocytes[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 18(5): 419.
- [7] 国家食品药品监督管理局. WS-538(X-445)-2002 注射用阿奇霉素枸橼酸二氢钠[S]. 2002.
- [8] 王明娟, 许明哲, 胡昌勤, 等. HPLC 法分析阿奇霉素及各类注射剂中有关物质的含量[J]. *中国抗生素杂志*, 2008, 33(12): 740.
- [9] 纪标, 王东凯, 薛梅妍, 等. HPLC 法测定注射用门冬氨酸阿奇霉素的含量和有关物质[J]. *中国抗生素杂志*, 2005, 30(6): 347.
- [10] 刘柯, 张亚杰. HPLC 法测定阿奇霉素及阿奇霉素胶囊的含量[J]. *中国药师*, 2010, 13(1): 81.

(收稿日期: 2012-03-09 修回日期: 2012-04-13)