

高效液相色谱法分离测定阿奇霉素及其相关物质

姜建国¹, 张西茹¹, 杨梁¹, 吴如金² (1. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011; 2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立用 HPLC 分离测定阿奇霉素的含量及其相关物质的方法。方法 采用 Luna C₁₈₍₂₎ 柱, 以甲醇-水(92: 8) 为流动相, 检测波长 215 nm, 外标法测定含量, 面积归一化法测定相关物质。结果 线性范围 9.3 ~ 41.9 mg/mL ($r = 0.99992$), 重复性试验的相对标准偏差小于 1.0%。结论 方法简便、快速、准确, 适用于阿奇霉素的质量检查。

关键词:阿奇霉素; 相关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.7; R927.1

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2003)05-0395-03

Determination of azithromycin and its related substances by HPLC

JIANG Jian-guo, ZHANG Xi-ru, YANG Liang, WU Ru-jin (*Hebei Provincial Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a HPLC method for the determination of azithromycin and its related substances. **METHOD** Chromatographic condition included LunaC₁₈₍₂₎ column and the mobile phrase consisted of methanol-water(92: 8). The detection wavelength was at 215 nm. **RESULTS** The number of theoretical plates calculated for azithromycin peak was 3000. The linearity ranges were 9.3 ~ 41.9 mg/mL, $r = 0.9999$; the RSD of the repeatability test was not more than 1.0%. **CONCLUSION** This method is simple, rapid, accurate and practicable for the quality control of azithromycin.

KEY WORDS: azithromycin; related substances; HPLC

阿奇霉素是由南斯拉夫 Sour Pliva 公司开发研制的新一代大环内酯类抗生素,其作用机理与红霉素 A 相似,通过抑制细菌蛋白质的合成起作用,具有抗菌谱广,不良反应小,临床应用广泛等优点^[1]。中国药典 2000 年版二部收载的阿奇霉素含量测定方法为微生物效价法,其相关物质采用 TLC 法。本实验采用反相高效液相色谱法,以外标法测定阿奇霉素的含量,峰面积归一化法检查阿奇霉素的相关物质,方法简便、准确,适用于阿奇霉素的常规质量控制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪(515 泵,2487 多波长检测器,717 自动进样器,大连依利特色谱工作站);Waters 2690 型四元梯度泵,996 型二极管阵列检测器;UV-1221 型紫外分光光度计(北京普析通用有限公司)。

阿奇霉素对照品(原料精制品,HPLC 归一化测得纯度 99.86%)和阿奇霉素原料由石药集团欧意药业有限公司提供;甲醇为色谱纯,其它试剂均为分析纯。

1.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:LunaC₁₈₍₂₎ 柱(5μm,250 mm×4.6 mm);流动相:甲醇-水(92:8);流速:1.0 mL/min;检测波长:215 nm;柱温:室温;进样量:10 mL。理论板数按阿奇霉素峰计算,应不低于 3 000,阿奇霉素峰拖尾因子小于 1.5。

1.3 溶液的制备

对照品(供试品)溶液:精密称取 60℃减压干燥至恒重的阿奇霉素对照品(供试品)适量,以流动相配制成浓度约为 30 mg/mL 的溶液,混匀,即得。

2 实验结果

2.1 阿奇霉素峰纯度鉴定

取供试品溶液 10μL,进样,以上述色谱条件分离,以 DAD 检测,通过归一化光谱叠合法进行纯度鉴定,确定阿奇霉素主峰及 1,2,3,8 号主要杂质峰均为单一物质色谱峰。见图 1。

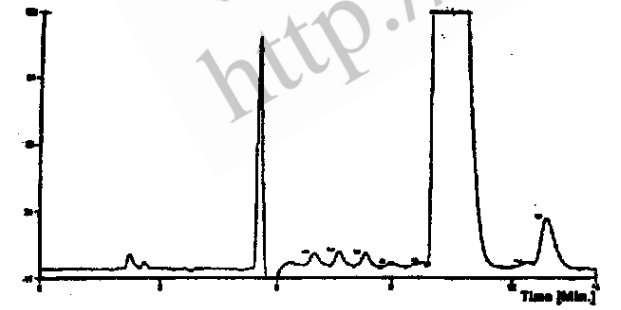


图 1 阿奇霉素相关物质色谱图
Fig 1 Chromatogram of azithromycin and related substances
6 阿奇霉素;1,2,3,8 主要相关物质
6 azithromycin;1,2,3,8 related substances

2.2 线性关系

精密称取阿奇霉素对照品 2.330g,置 50 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,精密吸取 2.0,4.0,6.0,

7.0,8.0 和 9.0 mL 分别置 10 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,进行色谱分析,以阿奇霉素峰面积(A)对阿奇霉素浓度(C)进行回归,得回归方程为: $C = 7.965 \times 10^{-4} \cdot A + 0.1287$, $r = 0.99992$

结果表明,阿奇霉素在 9.3~41.9 mg/mL 浓度范围内具有良好的线性关系。

2.3 阿奇霉素的检测限

取阿奇霉素适量,以流动相制备成每 1 mL 含阿奇霉素 1μg 的溶液,取 10μL 进样,记录色谱图,并根据仪器噪音求得阿奇霉素的检测限为 10 ng。

2.4 重复性与溶液稳定性

精密量取对照品溶液 5.0,6.0,7.0 mL,分别置 10 mL 量瓶中,以流动相定容,每份样品进样 3 次,结果见表 1。由峰面积计算其 RSD 为 0.47%。取线性关系中浓度约为 28 mg/mL 的溶液,分别放置 1,2,4,8 h 后测定,本溶液在 8 h 内稳定,其峰面积基本不变。

表 1 阿奇霉素重复性试验结果

浓度 (mg/mL)	第一针	第二针	第三针	RSD (%)
23.3	28964.7	29092.3	28791.4	0.52
28.0	35104.6	34942.1	34893.5	0.32
32.6	40793.8	41132.2	40684.6	0.57
平均值				0.47

2.5 相关物质的检查(峰面积归一化法)

取供试品溶液适量,以流动相配制成阿奇霉素浓度约为 3 mg/mL 的溶液作为预试液,取预试液 10μL 进样,调节检测灵敏度阿奇霉素度峰高为满量程的 20%~25%;再取供试品溶液 10μL 进行色谱分析,记录时间为阿奇霉素峰保留时间的 2 倍,以峰面积归一化法计算相关物质的含量,结果见表 2。

2.6 含量测定(外标法)

取 60℃减压干燥至恒重的阿奇霉素对照品及样品适量,按 1.3 项制备对照品及供试品溶液,进样,进行色谱分析,以外标法测定含量,结果见表 2。

表 2 阿奇霉素含量及相关物质测定结果(n=3)

样品批号	阿奇霉素含量 (%)	最大杂质含量 (%)	相关物质总量 (%)
990601	96.57	2.37	3.61
990602	96.85	2.26	3.56
011207	96.73	2.07	2.83
010201	97.24	2.43	3.49
010202	96.64	2.19	3.34
010203	96.81	2.32	3.43

3 讨论

3.1 采用本实验的色谱条件,选用同一牌号(LunaC₁₈₍₂₎)不同长度(250 mm×4.6 mm 5μm;150 mm×4.6 mm 5μm)以及两种不同牌号的高效液相色谱仪对阿奇霉素中的相关物质

进行检测,结果均能使阿奇霉素中的各杂质得到有效分离(主要杂质的个数相同)。按峰面积归一化计算,最大杂质约占总峰面积的2.0%~2.5%,杂质总量约为3.5%,这些主要相关物质的来源及结构正在进一步研究中,因此,在标准中可规定阿奇霉素中最大杂质峰面积不得过总峰面积的2.5%,杂质总量不得过4.0%。阿奇霉素的含量应不少于96.0%。

3.2 文献^[2]报道,阿奇霉素及其相关物质大多为末端吸收,应用DAD对分离后的组分进行光谱扫描,发现阿奇霉素和所有相关物质在上述色谱条件下均为末端吸收,最大吸收波

长约为204~205nm,考虑到紫外检测器在测定过程中的稳定性,故选择检测波长为215nm。

参考文献

- [1] 陆润钟. Azithromycin 及其相关化合物的分析[J]. 国外医药 抗生素分册 1995;16(2):87.
- [2] 余立,王俊秋,王国兰,等. 薄层色谱法检测阿奇霉素及其有关物质. 中国抗生素杂志,2001;26(3):227.

收稿日期:2002-12-28