

反相高效液相色谱法测定阿奇霉素及其相关化合物

史颖^{1,3} 姚国伟^{*2} 马敏²

¹ (北京理工大学材料科学与工程学院, 北京 100081) ² (北京理工大学生命科学与技术学院, 北京 100081)
³ (河北科技大学化学与制药工程学院, 石家庄 050018)

摘要 建立了利用简单流动相组成测定阿奇霉素及其相关化合物的反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Inertsil ODS-3 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (90/10, V/V), 流速 0.8 mL/min, 柱温 30 °C; 紫外检测波长为 205 nm。能够明确地分辨阿奇霉素粗品中 5 种物质: 红霉素 6, 9 亚胺醚、红霉素 9, 11 亚胺醚、阿奇霉素前体、甲基化硼酸酯和阿奇霉素。该方法简便快捷, 线性关系良好, 结果准确可靠, 对阿奇霉素合成工艺优化和成品的质量检测均具有指导作用。

关键词 阿奇霉素, 阿奇霉素前体, 阿奇霉素硼酸酯, 高效液相色谱

1 引言

作为“非典”时期首选抗生素药物的阿奇霉素 (Azithromycin, Azi) 是由红霉素衍生的氮杂广谱抗生素, 具有优于母体化合物的生物和药理特性^[1]。因此, 阿奇霉素与克拉霉素并称为新型红霉素的两个最具代表的药物。阿奇霉素是以红霉素为原料, 经过肟化、贝克曼重排、还原和甲基化反应合成的^[2,3]。

随着阿奇霉素新疗效的不断发现, 特别是“非典”时期的显著疗效, 使人们对该药物高度关注, 对其成品及中间体含量检测方法和合成工艺的研究日益深入。目前已有几种定量检测阿奇霉素含量的高效液相色谱方法^[4~6], 其中美国药典中阿奇霉素含量测定是采用带有双玻璃碳电极的安培电化学检测器, 且对于流动相的 pH 值要求高达 11, 这无疑对固定相提出了更高的要求; Kobrehel 等采用的是光二极管阵列检测器, 实验中对固定相的柱长和材质提出了特殊要求, 流动相的 pH 值为 9.3~9.5, 流动相组成为 3 种, 较为复杂。这几种方法虽然分离效果较好, 但对于一般的药物分析实验室, 方法中所需的检测设备是不易配备的。基于这种情况, 人们期望开发出简单易行的阿奇霉素质量分析方法。Patricia 等^[7]报道了一种使用常规仪器的分析方法, 但流动相的组成涉及了 5 种化合物, 且配制过程繁琐, 操作不便, 应用前景不乐观。本研究立足于利用常规仪器、原料和试剂, 建立了用于阿奇霉素合成监控和成品检测的高效液相色谱分析方法。实验中采用的乙腈-水流动相体系, 达到了较好的分离效果, 同时解决了阿奇霉素在酸性流动相中易产生酸性降解产物的问题。该方法目前未见报道, 且仪器易得, 流动相组成简单, 分离效果好, 快速准确。高效液相色谱给予的准确信息, 及时地反馈在阿奇霉素的合成中, 极大地促进了阿奇霉素的合成进程, 这也为阿奇霉素合成过程的工艺监控提供了一种实用的方法。

阿奇霉素及其相关物质结构式见图 1。5 种化合物红霉素 A 6, 9 亚胺醚、红霉素 A 9, 11 亚胺醚、阿奇霉素前体、阿奇霉素硼酸酯和阿奇霉素分别用 A、B、C、D、E 表示。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

高效液相色谱仪 (日本日立公司), HITECHIL-7100、HITECHIL-7300 柱温箱; L-7420 UV-VIS 检测器 (日本日立公司); T-2000 色谱工作站, 精密天平 (美国 OHAUS 公司)。试剂为乙腈 (色谱纯); 超纯水。

2.2 色谱条件

采用 DIKMA 公司的 Inertsil ODS-3 色谱柱, 流动相为乙腈-水 (V/V = 90/10), 超声排气, 流速为 0.8 mL/min; 检测波长 205 nm; 柱温 30 °C。样品溶于流动相, 进样量 5 μL。

2003-12-29 收稿; 2004-06-30 接受
本文系国家经贸委技术创新项目 (No. 01BK-009)

2.3 样品的制备

阿奇霉素、阿奇霉素前体、阿奇霉素硼酸酯、红霉素 A 9, 11 亚胺醚、红霉素 6, 9 亚胺醚样品均为作者合成提纯, 样品经过硅胶 (HGF254) 0.098 ~ 0.05 mm 粒径色谱柱或重结晶得到。所有纯品均通过 IR、¹H NMR、¹³C NMR、MS 和元素分析检测。用 1 mL 乙腈溶解相应化合物配制成的 10 g/L 样品溶液待用。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的优化

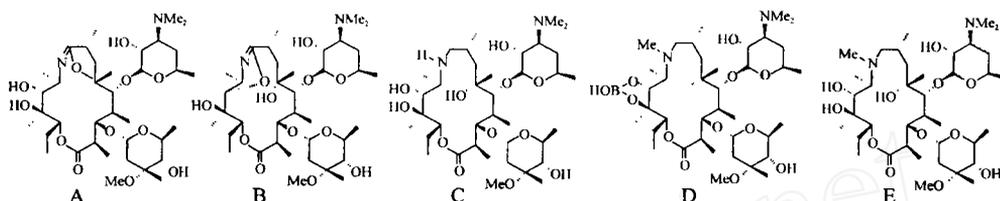


图 1 阿奇霉素及其相关物质结构图

Fig 1 Structure of the products of azithromycin and related substances

A 红霉素 6, 9 亚胺醚 (erythromycin 6, 9-innoether); B. 红霉素 9, 11 亚胺醚 (erythromycin 9, 11-innoether); C. 阿奇霉素前体 (azithromycin precursor); D. 阿奇霉素硼酸酯 (azithromycin hydrogen borate); E. 阿奇霉素 (azithromycin)。

3.1.1 流动相配比的影响 流动相是改善分离度的重要参数。实验选择乙腈-水为流动相, 考察了乙腈-水配比如 100:0, 95:5, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50 (V/V) 的情况, 乙腈比例提高, 柱压降低, 保留时间缩短, 峰形得到改善, 有助于分离, 但当配比低于 90:10 时, 随着有机相的比例下降, 主峰变宽, 分离效果下降; 当配比高于 90:10, 峰形变窄, 但杂峰数量下降, 分离失真。故配比选择 90:10 (V/V)。

3.1.2 柱温的影响 实验以 30、40 和 50 考察柱温对样品组分分离度的影响。随着柱温的升高, 柱压降低, 保留时间缩短, 分离度下降, 因此, 实验选择柱温 30。

3.1.3 流速的影响 实验选择 0.6、0.8、1.0、1.2 和 1.5 mL/min 流速, 随着流速增加, 柱压增高, 保留时间缩短, 但分离度降低。综合考虑分离度、保留时间和峰形等因素, 实验选择流速为 0.8 mL/min。

3.2 分析方法的线性相关性

准确称取 0.0737 g 阿奇霉素粗品, 加入到 5 mL 容量瓶, 流动相定容。准确进样 14.74、29.48、36.85、58.96、88.44、95.81 和 110.55 μg, 以乙腈-水为 90:10 (V/V) 溶液洗脱。以峰面积积分值为纵坐标, 进样量为横坐标进行线性相关分析, 结果显示阿奇粗品进样量在 15 ~ 110 μg 范围内与峰面积呈较好的线性关系 ($Y_{AZI} = 159752X - 203947$, $r = 0.9911$)。

3.3 分析方法精密度考察

准确称取阿奇霉素粗品 0.0651 g, 溶于 5 mL 的流动相中, 定容, 在优化的色谱条件下, 进样量为 5 μL。

表 1 方法的精密度 ($n = 5$)

Table 1 The precision of the method ($n = 5$)

物质 Compound	Na. 1	Na. 2	Na. 3	Na. 4	Na. 5	RSD (%)
A	2.24	2.26	2.17	2.19	2.11	0.06
B	1.96	1.95	1.83	1.81	1.70	0.10
C	2.25	2.33	2.15	2.20	2.14	0.07
D	1.94	1.95	2.16	2.04	2.07	0.09
E	88.89	89.26	89.07	89.10	88.84	0.17

A ~ E 同图 1 (A ~ E are shown in Fig 1)

3.4 合成产物中各组分的测定

由反应条件可推测, 在阿奇霉素粗品中含有未反应的阿奇霉素前体 (C)、未水解掉的甲基化硼酸酯 (D) 以及杂质红霉素 6, 9 亚胺醚 (A) 和红霉素 9, 11 亚胺醚 (B)。在优选的色谱条件下, 产物中各组分保留时间分别为: A 3.03 min, B 3.39 min, C 5.96 min, D 6.95 min 和 E 7.38 min。因此, 通过 HPLC

对产物的分析,可以有针对性地改进工艺条件,提高产物的内在质量。

3.5 反应样品的测定

该方法应用在阿奇霉素的合成工艺监控中,达到了明显的效果。按照优选的色谱条件,取 4 种不同反应条件下的阿奇霉素粗品进行测定,进样量 5 μL 。实验获得阿奇霉素粗品典型谱图见图 2。

表 2 阿奇霉素粗品检测结果

Table 2 Assay result of crude products (%)

No	A	B	C	D	E
1	2.17	1.83	2.15	2.16	89.07
2	2.06	2.01	2.10	5.44	85.67
3	2.18	1.97	1.98	10.55	80.52
4	2.16	1.79	1.96	14.58	76.31

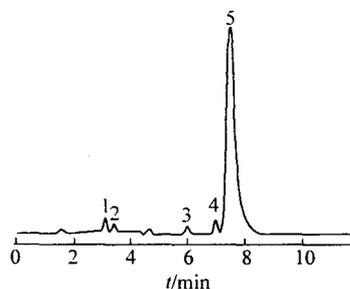


图 2 阿奇霉素粗品典型高效液相色谱图

Fig 2 Typical high performance liquid chromatogram of Azithromycin and related substances

1. 红霉素 6,9 亚胺醚 (erythromycin 6,9-ininoether);
2. 红霉素 9,11 亚胺醚 (erythromycin 9,11-ininoether);
3. 阿奇霉素前体 (azithromycin precursor);
4. 甲基化硼酸酯 (azithromycin hydrogen borate);
5. 阿奇霉素 (azithromycin)。

References

- Bright GM, Nagel A A, Bordnor J. *J. Antibiot*, **1988**, 41: 1029
- Djokic S, Kobrebel G, Lazarevski G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, **1986**: 1881 ~ 1889
- Bayod-Jasanada M, Rodrigo J, Lopez-Ortiz F. *J. Org. Chem.*, **1997**, 62: 7479 ~ 7481
- United States Pharmacopeia*, **1995**: 152 ~ 153
- Marince J K B, Lopotar N, Kobrehel G. *Chromatographia*, **1988**, 25: 999 ~ 1003
- Guan Qianming (关倩明), Li Zixiong (李子熊), Zhang Qiulian (张秋莲). *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis (药物分析杂志)*, **1998**, 18(5): 300 ~ 303
- Patricia Z, Ceresole R, Rosasco M A. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2002**, 27: 833 ~ 836

High Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Azithromycin and Related Compounds

Shi Ying^{1,3}, Yao Guowei², Ma Min²

¹ (School of Material Science and Engineering, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

² (School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081)

³ (School of Chemistry and Pharmaceutical Engineering, Hebei Technology and Science University, Shijiazhuang 050018)

Abstract A new validated liquid chromatographic method was developed for the determination of the azithromycin and related compounds. The sample was analyzed on a reversed phase ODS (150 mm \times 4.6 mm i.d) column maintained at 30 $^{\circ}\text{C}$ with acetonitrile-water (V/V, 90/10) as mobile phase at a flow rate of 0.8 mL/min and monitored by UV detector at a wavelength of 205 nm. The method can be used for the determination of five compounds: Azithromycin, Azithromycin precursor, erythromycin 6,9-ininoether, azithromycin hydrogen borate. It will play an important role in quality control of synthetic process.

Keywords Azithromycin, azithromycin precursor, azithromycin hydrogen borate, high performance liquid chromatography

(Received 29 December 2003; accepted 30 June 2004)