

分光光度法测定阿奇霉素的改进

胡 芳 刘 莉 孟 卫^①

(中国药科大学物理化学教研室 南京龙眠大道 639 号 211198)

摘 要 通过对阿奇霉素显色反应过程中硫酸浓度, 反应时间, 反应温度的研究, 优化了分光光度法测定阿奇霉素含量的方法。结果表明, 阿奇霉素在 $11.26\text{--}45.03\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 显色溶液在 482nm 处吸光度与其浓度具有良好的线性关系, 线性回归方程为 $A = 0.0172C(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) + 0.0504$, 平均回收率为 99.1% ($n = 9$)。该方法简单, 比传统光度法更灵敏、准确, 适合于阿奇霉素含量的快速测定。

关键词 阿奇霉素; 分光光度法; 硫酸; 显色反应

中图分类号: O657.32

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)03-499-04

1 引言

阿奇霉素(Azithromycin, AM)作为第一个 15 元大环内酯类抗生素, 具有理想抗生素的基本条件。已报道的浓度检测的方法主要有微生物效价法^[1]、HPLC^[2]、荧光法^[3]、高效毛细管电泳法及电化学分析法^[4]等, 但是这些方法中最为简单的是紫外分光光度法。阿奇霉素无共轭结构, 只在紫外末端吸收, 检测灵敏度低, 但可以通过其与硫酸发生显色反应来测定。虽然 2010 年版中国药典规定阿奇霉素溶出度检测方法为 HPLC, 但通过显色反应来测定阿奇霉素的含量却更方便, 易普遍使用, 同时也可作为 HPLC 方法的有益补充。据文献报道这种方法的重复性很高, 但是不同文献报道的结果却存在一定的差距^[5-8]。阿奇霉素与硫酸的反应式见图 1。

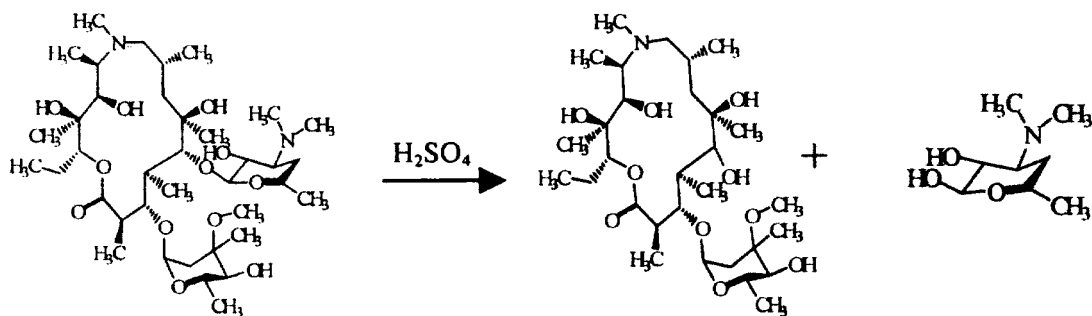


图 1 阿奇霉素在硫酸存在条件下的降解

其显色机理基于在强酸性条件下发生水解, 红霉支糖的脱离改变了大环内酯的共轭性质, 从而使体系在 482nm 显色^[8]。研究发现, 阿奇霉素的显色反应与很多的反应条件有关, 尤其是硫酸的用

^① 联系人, 手机: (0) 13851688892; E-mail: mengwei@cpu.edu.cn

作者简介: 胡芳(1975—), 女(土家族), 湖北省宜昌市人, 讲师, 硕士, 主要从事药物分析工作。

收稿日期: 2011-03-25; 接受日期: 2011-04-12

量和显色反应的温度对显色溶液的吸光度影响很大。传统的分光光度法使用 75% 的硫酸, 或只在室温下显色, 硫酸浓度的不确定性以及反应温度的不稳定(硫酸加入引起体系温度波动) 必然给实验带来很大的误差。但在目前关于紫外分光光度法测定阿奇霉素报道的方法中, 却未见对这些因素的研究, 本文通过对这些因素的研究使得实验的灵敏度和稳定性大大提高, 在线性范围内, 当阿奇霉素的浓度变化为 $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 显色溶液的吸光度变化值达到 0.086, 目前未见更好的报道结果。

2 实验部分

2.1 试剂与仪器

无水乙醇; 浓硫酸; 磷酸二氢钾; 磷酸氢二钾; 所用试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水; 阿奇霉素原料药(含量 92.5%, 江苏先声药业有限公司); 阿奇霉素标准品(百分含量 92.2%, 中国药品生物制品检定所)。

TU-1810 紫外可见光谱仪(北京普析通用仪器有限责任公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 阿奇霉素储备液的配制

准确称取阿奇霉素标准品适量, 加适量乙醇溶解后置于 100mL 容量瓶中(每 2mg 加乙醇 1mL), 用 pH6.0 的磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 摇匀(得到浓度分别为 $497.88\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液 1 和浓度为 $562.88\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储备液 2)。储备液 1 用于显色反应条件的研究和确定, 储备液 2 用于阿奇霉素校准曲线的绘制和加标回收率的测定。

2.2.2 最大吸收波长的选定

不同反应条件下的显色溶液的最大吸收波长均在 482nm 处(图 2)。

2.2.3 硫酸与阿奇霉素显色反应

5mL 阿奇霉素储备液 1 置于 50mL 容量瓶中, 加入适量的二次蒸馏水, 冰水浴($5-6^{\circ}\text{C}$) 中缓慢加入不同量的浓度为 $9.760\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸溶液, 中速摇匀, 取出放置室温 10min 后用二次蒸馏水定容。UV-Vis 谱图显示, 在 482nm 处无吸收, 说明此时样品几乎没有发生水解反应, 这为研究溶液不同温度下的显色反应提供可能。将样品置于不同温度的恒温水浴中, 每隔一段时间取样, 用冰水浴快速冷却至室温, 在 482nm 处测定其吸光度。

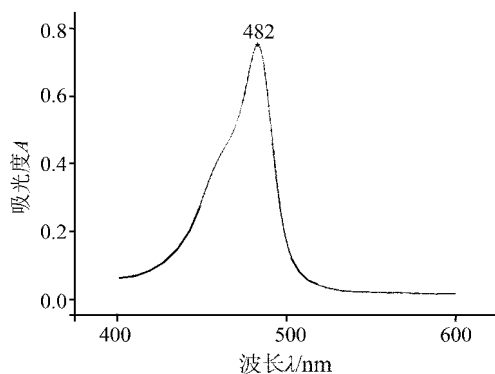


图 2 显色溶液的 UV-Vis 谱

3 结果与讨论

3.1 温度和硫酸用量对显色反应的影响

实验结果表明, 当硫酸溶液(浓度为 $9.760\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 用量为 35mL, 显色温度为 60°C 时, 吸光度到达最大值, 此时水解反应最完全。 60°C 下不同时间溶液的吸光度与硫酸用量的关系见图 3。

在 60°C 反应条件下, 尽管硫酸用量不同, 但所有的显色反应在 30min 时, 吸光度均达到最大值。随着硫酸用量的逐渐增大, 体系吸光度的最大值呈现一个先上升后下降的结果。说明硫酸用量过低, 水解不充分, 过高则会导致显色基团降解。当硫酸用量为 35mL 时, 显色最完全, 吸光度为最大。从图中还可以发现, 当硫酸量很少时(20、25mL), 体系吸光度到达一个最高值后逐渐下降。但当

硫酸用量为大于 30mL 时,体系的吸光度到达最高值后能够在 2h 基本不变。此实验现象目前未见报道,可能因为,一方面过量的硫酸对显色物质有降解作用,另一方面,适量的硫酸对显色物质又有一定的稳定作用^[8]。这需要进一步的研究。

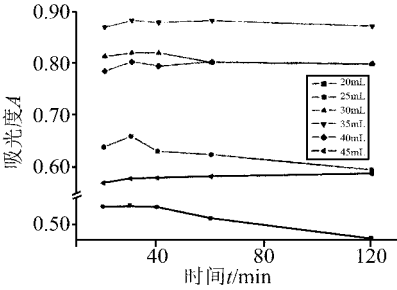


图 3 60℃下硫酸用量对吸光度的影响

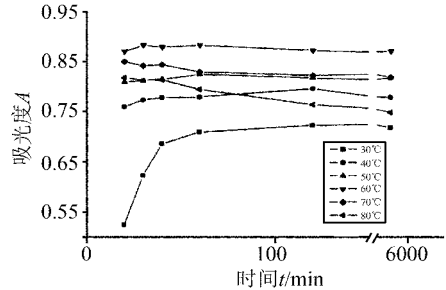


图 4 温度对溶液吸光度的影响

图 4 为硫酸用量为 35mL,不同温度下发生显色反应,溶液吸光度随反应时间的变化规律。当反应温度为 30℃和 40℃时,在 2h 内体系的吸光度一直增加,说明体系未水解完全,50℃和 60℃时,体系的吸光度到达最大值的时间分别为 60min 和 30min,此后在反应 2h 内基本不变,反应温度升高到 70℃和 80℃时,到达平衡的时间缩短为 20min,但随后吸光度逐渐下降。由此可见温度过低会导致水解不充分,过高显色基团会发生降解反应。所有样品室温放置后均有很好的稳定性,4d 后测试结果与反应结束时的吸光度相比相差不超过 2%,说明显色溶液在室温下稳定性良好。

3.2 校准曲线的绘制

准确量取不同体积的阿奇霉素储备液 2(562.88mg · L⁻¹),依 3.1 节中所示最优方法进行显色反应,测定吸光度。结果表明,阿奇霉素在 11.26—45.03mg · L⁻¹浓度范围内,吸光度与浓度呈良好的线性关系,回归方程为: $A = 0.0172C(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) + 0.0504$, $r = 0.9995(n = 7)$ 。

3.3 阿奇霉素原料的含量测定

参照 2.2.1 节准确称取 0.2670g 阿奇霉素原料药配制成 500mL 溶液(浓度为 493.95mg · L⁻¹)。准确量取 2.0,2.5,3.0,3.5,4.0,4.5,5.0mL 7 份不同体积的溶液,依照 3.1 中方法进行测定,根据校准曲线计算原料含量,结果分别为 92.4%,92.6%,93.3%,92.4%,91.8%,91.7%,90.7%,RSD 为 0.9%,平均含量为 92.1%,与实际百分含量 92.5%(HPLC 测定)很接近,表明该方法用于含量测定效果良好,可以作为 HPLC 方法的补充。

3.4 回收率的测定

采用加标回收法,分别移取浓度为 493.95mg · L⁻¹的阿奇霉素原料药溶液各 1.5,2.0,2.5mL 于 50mL 的量瓶中,各加入 1.5mL 阿奇霉素储备液 2 配制成样品 1,2,3,按上述显色及测定方法,测定阿奇霉素总量,每组平行测定 3 次,求平均值,并计算回收率,结果见表 1。

表 1 加标回收实验结果

样品编号	原样品量 (mg)	加标量 (mg)	加标测定值 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.741	0.844	1.581	99.5	99.1	0.4
2	0.988	0.844	1.826	99.3		
3	1.235	0.844	2.067	98.6		

4 结论

通过合理设计实验优化了分光光度测定阿奇霉素含量的方法。采用乙醇和 pH 6.0 的磷酸盐缓冲液作溶剂,检测波长为 482nm,冰水浴条件下缓慢加入硫酸溶液(硫酸最终浓度为 $6.832\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 60°C 恒温水浴槽中显色 30min,冷却至室温测定吸光度。结果表明该方法简便快速、专属性强,在一定浓度范围内线性良好,灵敏度高,重现性和回收率好,可用于阿奇霉素原料药及其各种制剂的含量的快速测定。

参考文献

- [1] 王实,夏书月,王鲁宁等.阿奇霉素在肺炎患者支气管灌洗液中的浓度测定[J].中国医院药学杂志,1999,19(8):457—458.
- [2] 李娜然,孟祥军,齐杰.用 HPLC 法测定乳糖酸阿奇霉素注射液的含量[J].光谱实验室,2006,23(2):405—408.
- [3] Sastre T J, Guchelaar H J. Quantitative Determination of the Macrolide Antibiotics Erythromycin, Roxithromycin, Azithromycin and Clarithromycin in Human Serum by High-Performance Liquid Chromatography Using Pre-Column Derivatization with 9-Fluorenylmethoxycarbonyl Chloride and Fluorescence Detection[J]. *J. Chromatogr B*, 1998, 720(1—2): 89—97.
- [4] Othman A E F, Niveen A L M. Voltammetric Determination of Azithromycin at the Carbon Paste Electrode[J]. *Talanta*, 2004, 62(3): 531—538.
- [5] 黄小权,张磊,熊健等.分光光度法测定阿奇霉素晶体的含量[J].药物分析杂志,2009,29(4):672—675.
- [6] 郑峰,程民.阿奇霉素颗粒溶出度检查方法研究[J].安徽医药,2009,13(2):145—146.
- [7] 汪锦飘,林茵,马再鸿.紫外分光光度法测定阿奇霉素干混悬剂的含量[J].中国实用医药,2008,3(4):46—47.
- [8] Sultana N. Degradation Studies of Azithromycin and Its Spectrophotometric Determination in Pharmaceutical Dosage Forms[J]. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 2006, 19(2): 94—98.

Determination of Azithromycin by Modified Spectrophotometry

HU Fang LIU Li MENG Wei

(Department of Physical Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, P. R. China)

Abstract The spectrophotometric method for determination of azithromycin based on the color reaction of sulfuric acid and azithromycin was optimized and all variables reaction conditions such as sulfuric acid concentration, heating time, temperature were carefully studied. The result showed the maximum absorbance at 482nm is linear to concentration of azithromycin with $A = 0.0172C(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) + 0.0504$ in the range of 11.26—45.03 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The average recovery was 99.1% ($n = 9$). This optimized method is simple, sensitive, accurate, and suitable for the rapid determination of azithromycin.

Key words Azithromycin; Spectrophotometry; Sulfuric Acid; Color Reaction

欢迎有敬业精神的同志自荐为本刊编委

本刊编委产生的方式有三种:自荐、推荐和聘请,自荐是本刊提倡的方式。凡不计报酬、乐意献身于科技期刊出版事业、基本具有副高级以上技术职称、对本刊有所贡献的同志,都可以自荐为本刊编委。

自荐者,请将本人简历发至 光谱实验室编辑部电子邮箱: gpsy@periodicals.net.cn