

分光光度法测定阿奇霉素晶体的含量*

黄小权, 张磊, 熊健, 应汉杰**

(南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009)

摘要 目的: 建立显色反应分光光度法测定阿奇霉素晶体的含量。方法: 利用硫酸与阿奇霉素酮基质子化可发生显色反应, 该反应溶液在 483 nm 处具有最大吸收值。可用分光光度法对阿奇霉素进行定量分析, 并采用正交实验设计优化了测定方法。结果: 阿奇霉素浓度在 18~72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内, 显色溶液吸收度同阿奇霉素浓度具有良好的线性关系, 线性回归方程为 C ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) = -12.01 + 85.27A, $r = 0.9997$, 平均回收率为 99.1%。结论: 该方法简单、灵敏、准确, 适合于阿奇霉素晶体含量的快速测定。

关键词: 阿奇霉素; 分光光度法; 硫酸; 显色反应; 正交设计

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0672-04

Spectrophotometry determination of the contents of azithromycin crystal*

HUANG Xiao-quan ZHANG Lei XIONG Jian YING Han-jie**

(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering Nanjing University of Technology, Nanjing 210009 China)

Abstract Objective To establish a spectrophotometric method for the determination of azithromycin crystal based on color reaction. **Method** Based on the protonation reaction of sulfuric acid and ketone group of azithromycin, the maximum absorption value was obtained at 483 nm. The quantitative analysis of azithromycin was carried by spectrophotometric method which was optimized by orthogonal design. **Results** The linear equation was C ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) = -12.01 + 85.27A, relation coefficient was 0.9997 in the range of 18-72 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The average recovery was 99.1%. **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate, and suitable for the rapid determination of azithromycin crystal.

Key words azithromycin; spectrophotometry; sulfuric acid; color reaction; orthogonal design

阿奇霉素 (azithromycin) 是具有十五元氮杂内酯环的半合成大环内酯类抗生素, 在酸性环境中具有较高的稳定性, 具有吸收好、生物利用度高、毒性低及耐受性好等优点。已报道的分析方法有微生物效价法^[1]、高效液相色谱 (HPLC) 法^[2]、薄层色谱法^[1,3]、可见光分光光度法^[4-6], 其中微生物法灵敏度低, 速度慢; 美国药典^[2]和欧洲药典^[7]采用高效液相色谱法, 需要用到安培电化学检测器 (ED) 和紫外吸收检测器 (UV), 该检测器对设备要求太高; 液相色谱-质谱联用^[8], 操作烦琐, 不适合快速定量测定; 薄层色谱法定量较困难; 电子荷移分光光度法抗干扰能力差。本文采用阿奇霉素晶体与硫酸发生显色反应, 建立起一种新的分光光度检测阿奇霉素

的方法, 并通过优化各种影响因素, 提高其检测的准确度和回收率。应用本方法测定了溶析结晶所得到的阿奇霉素晶体含量, 实验结果表明该方法简便、准确。

1 主要实验仪器和试剂

Lambda 25 紫外可见分光光度计 (美国 Perkin Elmer 公司), KQ-400DB 数控超声波清洗器 (昆山超声仪器有限公司)。

阿奇霉素原料 (上海现代制药股份有限公司), 阿奇霉素标准品 (Sigma 公司), 浓硫酸 (国药集团化学试剂有限公司, 分析纯), 其他试剂均为市售分析纯。

* 国家“973”计划 (2007CB714305) 国家“863”计划 (2006AA02Z236) 国家“863”计划 (2007AA021603)

** 通讯作者 Tel: (025) 86990001 E-mail: yinghanjie134@163.com

2 实验方法

2.1 硫酸显色原理的初探 阿奇霉素可见光分光光度法按原理分主要有电子荷移法、氧化法、沉淀法,对于硫酸显色的机理目前还在研究中,可能机制

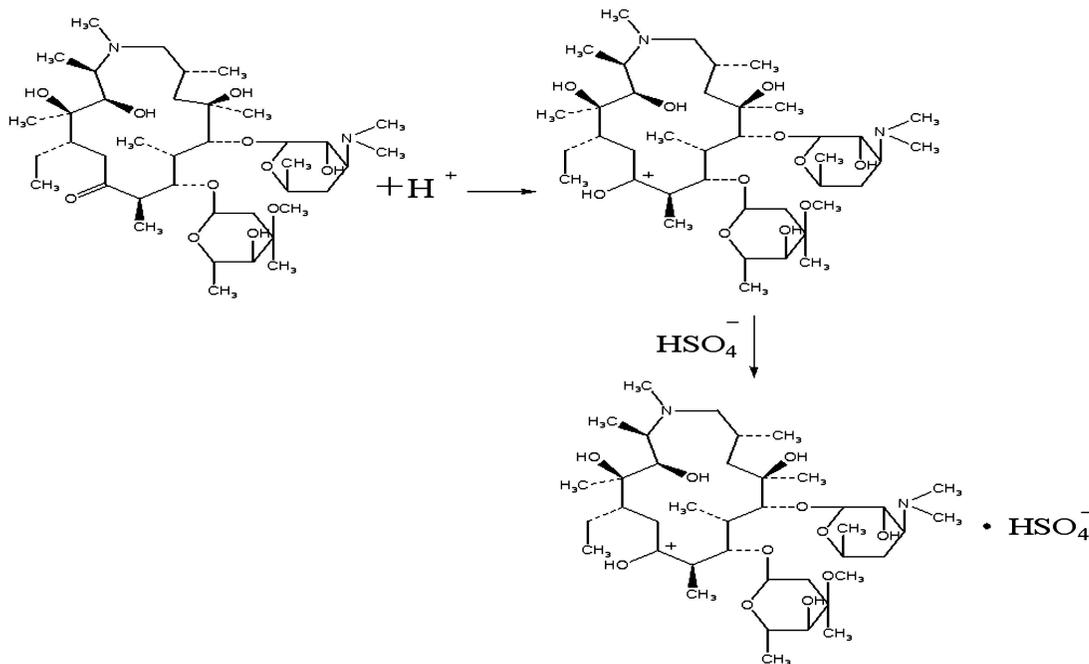


图 1 显色原理示意图

Fig 1 The diagram of color principle

2.2 测定方法 精确称取阿奇霉素标准品适量,置 50 mL 量瓶中,加乙醇 20 mL 使其溶解后以盐酸-磷酸二氢钾混合溶液(缓冲溶液)定容,配制成 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 阿奇霉素溶液,精确量取 5.0 mL,加入不同浓度的硫酸溶液适量,振摇混匀,恒温放置,至反应完全。以缓冲溶液为空白,在 350~650 nm 波长范围内扫描,该显色反应溶液在 483 nm 处有最大吸收值,且缓冲溶液在此处无吸收干扰。

2.3 测定方法的优化 检测方法的灵敏性和准确性取决于缓冲溶液的选择、缓冲溶液的 pH、显色剂硫酸的浓度及用量、显色反应的温度、显色反应的时间。本文采用正交实验设计方案,筛选出影响该方法灵敏度和准确度的主要因素,通过优化,得到了最佳的测定条件。

3 结果与讨论

3.1 缓冲溶液的选择 阿奇霉素具有二碱价双亲的特性^[10],在酸中溶解,且稳定。分别对比磷酸缓冲溶液、硼酸缓冲溶液、稀盐酸,发现磷酸缓冲溶液的浓度对结果影响显著,稳定性差;硼酸缓冲溶液易与糖类物质结合,测量误差较大;采用稀盐酸,测量结果偏高;采用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 稀盐酸与 $0.1 \text{ mol} \cdot$

为阿奇霉素的酮基与硫酸发生质子化反应,使阿奇霉素结构中含有一个 C^+ 原子,然后与 HSO_4^- 作用显橙色^[9]。

L^{-1} 磷酸二氢钾溶液的混合物作为缓冲溶液,稳定性和重复性较好,测量误差小。两者混合的比例决定了该缓冲溶液的 pH。

3.2 各因素对检测方法的影响 通过单因素实验,初步确定测定条件为:缓冲溶液的 pH 为 3.0 反应显色温度为 20°C ,显色剂硫酸的浓度为 70%,硫酸的用量为待显色溶液的 1 倍,反应时间为 2 h(图 2)。通过 $L_9(3^4)$ 正交实验设计,分析了缓冲溶液的 pH、反应显色的温度 $T(^\circ\text{C})$ 、硫酸的浓度 $C(\%)$ 及硫酸的用量 $\varphi(\%)$ 对测定方法的线性回归系数 r 、稳定性、重复性及平均回收率的影响,优化测定条件。

通过四因素对线性回归系数 (r),稳定性相对标准偏差 (RSD_{st}),重复性相对标准偏差 (RSD_{rep}) 及平均回收率 (R_{rec}) 的极差分析表(表 2)和因素效应曲线图(图 3)可以看出:缓冲溶液的 pH 对线性回归系数 (r),检测方法稳定性、重复性、平均回收率影响均显著,且 pH 有进一步降低的趋势,但过低,阿奇霉素在溶液中易变质,故选取最佳测定 pH 为 1.5 温度对检测方法的稳定性有一定的影响,在 20°C 下测定稳定性最好,对其他因素影响不大,为了操

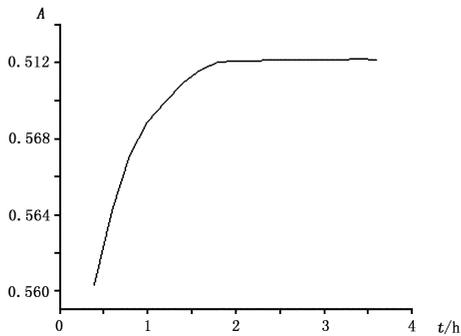


图 2 吸收值与反应时间之间的关系
Fig 2 Variation of absorbance with time

作方便,选择在常温下测定;硫酸的浓度对检测方法的稳定性影响显著,主要因为硫酸浓度过高会使显色太深,过低又会使显色太淡,测量误差较大,灵敏度也相应下降,选取浓度为 50% 较为合适;硫酸的用量为待显色溶液的 60% ~ 140% 影响均不显著,考虑到硫酸放热和试剂的成本,选取显色剂的用量为待显色溶液的 0.6 倍较为合适。

表 1 因素的水平及对应值

Tab 1 Level and corresponding value of factors

| 因素 水平数 (factor/level figure) | 1 | 2 | 3 |
|---------------------------------|-----|-----|-----|
| pH | 1.5 | 3 | 4.5 |
| T (°C) | 10 | 20 | 30 |
| C (%) | 30 | 50 | 80 |
| φ (%) | 60 | 100 | 140 |

表 2 极差分析表

Tab 2 The table of range analysis

| 因素 (factor) 极差 (range) | 因素 (factor) | | | |
|---------------------------|-------------|-------|-------|-------|
| | pH | T /°C | C /% | φ /% |
| r | 0.169 | 0.023 | 0.041 | 0.016 |
| RSD _{st} | 0.562 | 0.243 | 0.456 | 0.057 |
| RSD _{rep} | 0.365 | 0.018 | 0.009 | 0.026 |
| R _{rec} | 0.125 | 0.087 | 0.019 | 0.013 |

通过对极差和因素效应图的综合分析,确定了最优化的检测条件:缓冲溶液为 pH 1.5 的稀盐酸与磷酸二氢钾的混合溶液,显色剂硫酸的浓度为 50%,显色剂用量为待显色溶液体积的 0.6 倍,反应测量温度均为常温,反应时间为 2 h。由于硫酸显色反应时,放出大量的热量,硫酸的加入需缓慢,这样能够使热量均匀散出,确保测量样品的一致性。

3.3 标准曲线的绘制 精确配制每 1 mL 含阿奇霉素标准品 18.0, 27.0, 36.0, 45.0, 54.0, 63.0, 72.0 μg 的溶液,分别量取溶液 10 mL 加 50% 硫酸 6 mL,

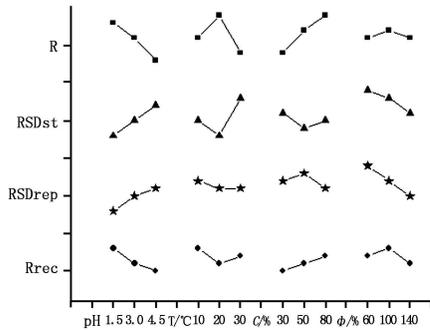


图 3 因素效应曲线图
Fig 3 The curve diagram of factorial effect

摇匀,静置反应 2 h,至常温。以缓冲溶液为空白,在 350~ 650 nm 波长段扫描,显色反应溶液在 483 nm 处有最大吸收值。将浓度 C 和相应吸收值 A 进行线性回归,可得到阿奇霉素在 18~ 72 μg·mL⁻¹ 浓度范围内的线性回归方程:

$$C = -12.01 + 85.27A \quad r = 0.9997 \quad (n = 7)$$

3.4 精密测定 精确配制 20, 40, 60 μg·mL⁻¹ 3 种浓度的标准品溶液,依次在 1d 内, 5d 内测定其显色反应溶液吸收值 6 次。3 种浓度显色反应溶液吸收值的日内 RSD 均小于 0.098% (n = 6), 日间 RSD 均小于 0.113% (n = 5), 表明该检测方法精密良好。

3.5 稳定性测定 精确配制浓度为 50 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液,显色后放置 2, 4, 8, 12, 18, 24, 32, 40 h 在 350~ 650 nm 波长内扫描测定最大吸收值,结果表明最大吸收值的 RSD 为 0.0449% (n = 12), 吸收波长稍有下降 (±0.05 nm), 说明了阿奇霉素显色反应溶液在 40 h 内稳定性良好。

3.6 重复性试验 配制浓度为 50 μg·mL⁻¹ 的对照品溶液,依法重复测定 6 次,得到最大吸收值的 RSD 为 0.163% (n = 6), 表明此方法的重复性良好。

3.7 回收率测定 精确称取阿奇霉素标准品适量,分别配制高、中、低 3 种浓度的标准品溶液,按上述方法测定阿奇霉素含量,计算回收率,结果见表 3。

表 3 回收率实验结果

Tab 3 Experimental result of recovery

| C _{cal} μg·mL ⁻¹ | C _{me} μg·mL ⁻¹ | 回收率 (recovery) /% | RSD /% |
|---|--|----------------------|-----------|
| 64.44 | 63.99 | 99.3 | 0.353 |
| 46.03 | 45.66 | 99.2 | 0.324 |
| 27.61 | 27.26 | 98.7 | 0.298 |

注 (note): C_{cal} 计算浓度 (calculating concentration); C_{me} 实测浓度 (measured concentration)

实验结果表明平均回收率为 99.1%, 表明该方

法在不同浓度条件下的回收率均良好。

3.8 样品含量测定 取上海现代制药厂生产的阿奇霉素作为原料, 选用乙醇 (A)、正丙醇 (B)、丙二醇 (C)、四氢呋喃 (D) 4 种溶剂, 溶析结晶得到的 4 种晶型的阿奇霉素晶体, 分别采用微生物效价法^[1]、HPLC 法^[11] 与本法测定各自含量, 测定结果几乎一致, 见表 4。

表 4 晶体纯度测定结果 (% , n = 5)

Tab 4 Result of detem ination purity of crystal

| 晶体类型 (crystal type) | 本方法 (this method) | 微生物法 (microbiological method) | HPLC法 (HPLC method) |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| 原料药 (raw medicine) | 96.3 | 96.0 | 96.6 |
| A | 99.0 | 99.5 | 99.0 |
| B | 99.5 | 98.9 | 99.0 |
| C | 98.2 | 98.2 | 98.6 |
| D | 98.7 | 98.7 | 99.0 |

4 结论

4.1 本文通过正交实验设计并进行因素分析, 优化显色反应条件, 建立了阿奇霉素显色反应分光光度法的检测方法。

4.2 初步探讨了硫酸对阿奇霉素的显色原理。

4.3 通过优化后的分光光度法测定阿奇霉素的含量, 对比 2005 年版中国药典的微生物效价法和高效液相色谱法, 测量结果相近, 且该法灵敏度高, 操作简单, 快速, 结果准确, 适合于阿奇霉素晶体含量的快速检测, 为进一步研究阿奇霉素多晶型奠定了基础。

参考文献

1 ChP(中国药典). 2005. VolII (二部): 291
 2 USP 28- NF23. 2005. 208
 3 YU Li(余立), WANG Jun- qiu(王俊秋), WANG Guo- lan(王

国兰), *et al* Studies on methodology of the detem ination of the related substances of the azithromycin by TLC (薄层色谱法检测阿奇霉素及其有关物质). *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2001, 26 (3): 227
 4 LIHua- kan(李华侃), ZHAO Yan- qing(赵延清), WANG Yu- hua(王玉华), *et al* Spectrophotometric detem ination of azithromycin based on the charge transfer reaction between azithromycin and alizarin(阿奇霉素与茜素的电荷转移反应及其测定). *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004 32 (5): 598
 5 LIU Hong- ju(刘红菊), JIANG Ye(蒋晔), XUE Na(薛娜), *et al* Spectrophotometric detem ination of azithromycin based on charge transfer reaction with 2,4- dinitrophenol (2,4- 二硝基酚荷移分光光度法测定阿奇霉素). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005 25 (3): 308
 6 ZHU Qing- ling(朱庆玲), DING Hong(丁红). Assaying of azithromycin in azithromycin capsule by spectrophotometry(分光光度法快速测定阿奇霉素胶囊的含量). *China Pharm* (中国药业), 2005 14 (12): 53
 7 EP6. 2. 2006. 1238
 8 LIU Shi- kun(刘世坤), PEI Qi(裴奇), LI Zuo- jun(李佐军), *et al* High performance liquid chromatography- mass spectrometry detem ination of azithromycin in human plasma(高效液相色谱- 质谱联用法测定人体内血浆中的阿奇霉素). *Chin J New Drugs Clin Res* (中国新药与临床杂志), 2005 24(07): 51
 9 YU Ling- zhuang(郁陵庄), WANG Zheng- guang(王争光), CHEN Yi- zhao(陈益钊), *et al* Color reactions of sulphate with some squaric acid azo chromogenic reagents and its spectrophotometric with detem ination (一些磺酸偶氮染料与硫酸根的显色反应及其分光光度测定). *J Sichuan Univ (Nat Sci Ed)* [四川大学学报(自然科学版)], 1999 36(2): 297
 10 ZHONG Shu- jun(钟淑君). Clinical analysis and pharmacological characterize of azithromycin in treating respiratory infections(阿奇霉素治疗呼吸道感染的药理特性与临床分析). *Chin Med Rep* (中国医药导报), 2006 26 (2): 36
 11 KAN Jia- yi(阚家义), XU Wei(许威). Content detem ination of azithromycin powder by HPLC (HPLC 法测定阿奇霉素散剂的含量). *Chin J Antibiot* (中国抗生素杂志), 2006 33 (11): 672

(本文于 2008 年 3 月 13 日收到)