

RP- HPLC 法测定阿莫西林—盐酸环丙沙星可溶性粉的含量

张小华, 张 龙, 李生其, 邢晓玲, 朱丽霞, 冯 艺

(江苏畜牧兽医职业技术学院药物检测中心, 江苏泰州 225300)

[收稿日期] 2003-07-14 [文献标识码] B [文章编号] 1002-1280(2004)02-0026-03 [中图分类号] TQ460.72

[摘 要] 应用 RP- HPLC 法测定阿莫西林—盐酸环丙沙星可溶性粉的含量。采用 Shim-pack CLC- ODS C₁₈柱(150 mm × 6 mm, 5 μm), 以 1.5×10^{-2} mol/L 三乙胺溶液(用磷酸调 pH 至 3.0) - 乙腈(体积比 85:15)为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 229 nm, 柱温为 40 ℃。在此色谱条件下两者能完全分离, 阿莫西林、盐酸环丙沙星分别在 22~ 108 μg/mL 和 29~ 146 μg/mL 范围内峰面积与浓度呈良好的线性关系, 相关系数均为 0.999 9。阿莫西林、盐酸环丙沙星的回收率分别为 99.50% ~ 100.20% 和 99.30% ~ 99.86% ($n = 5$); RSD 分别为 0.60% ~ 1.00% 和 0.86% ~ 1.02% ($n = 5$)。本法可用于阿莫西林—盐酸环丙沙星可溶性粉的质量控制。

[关键词] RP- HPLC 法; 阿莫西林; 盐酸环丙沙星; 可溶性粉

阿莫西林(羟氨苄青霉素)属半合成 β- 内酰胺类抗生素, 具有良好的抑菌、杀菌作用, 临床应用广泛。盐酸环丙沙星是第三代喹诺酮类药物, 具有广谱的抗菌活性。文献对两药单方制剂的含量测定方法均有报道: 阿莫西林可采用 UV 法、比色法、HPLC 法等; 盐酸环丙沙星有非水滴定法、UV 法、比色法、HPLC 法、交流示波极谱滴定法、四苯硼钠法、荧光法等^[1~3]。关于两药的复方制剂联合测定未见文献报道, 本文在文献^[2,3]基础上, 优化色谱条件, 采用反相高效液相色谱法成功地测定了阿莫西林—盐酸环丙沙星可溶性粉的含量。

1 仪器与药品

日本岛津高效液相色谱仪(配有 SCL-10AVP 系统控制器, LC-10AT_{VP} 泵, FCV-10AL_{VP} 梯度比例阀, DGU-14A 在线脱气机, CTO-10AT_{VP} 柱温箱, SPD-10AV_{VP} 紫外检测器, 7725i 进样器, 20 mL 定量环, CLASS-VP 5.02 色谱工作站)。756CRT 紫外可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司。乙腈, HPLC 级; 磷酸、三乙胺, AR 级; 水为双蒸水; 阿莫西

林对照品(含量 99.3%)、盐酸环丙沙星对照品(含量 99.5%), 均由中国药品生物制品检定所提供; 阿莫西林—盐酸环丙沙星可溶性粉, 两组分的标示量均为 5%, 本院丰达动物药品厂生产。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Shim-pack ODS C₁₈ 色谱柱(150 mm × 6 mm, 5 μm); 1.5×10^{-2} mol/L 三乙胺溶液(用磷酸调 pH 至 3.0) - 乙腈(体积比 85:15)为流动相, 流速为 1.0 mL/min; 柱温为 40 ℃; 进样量 20 μL; 检测波长为 229 nm。

2.2 对照品溶液的配制 分别精密称取阿莫西林和盐酸环丙沙星各 50 mg(本实验中阿莫西林实际称量 54.1 mg、盐酸环丙沙星实际称量 73.1 mg), 置于 50 mL 容量瓶中, 用流动相超声溶解, 再用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液。从中精密吸取 2.00 mL 置于 25 mL 容量瓶中, 再以流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

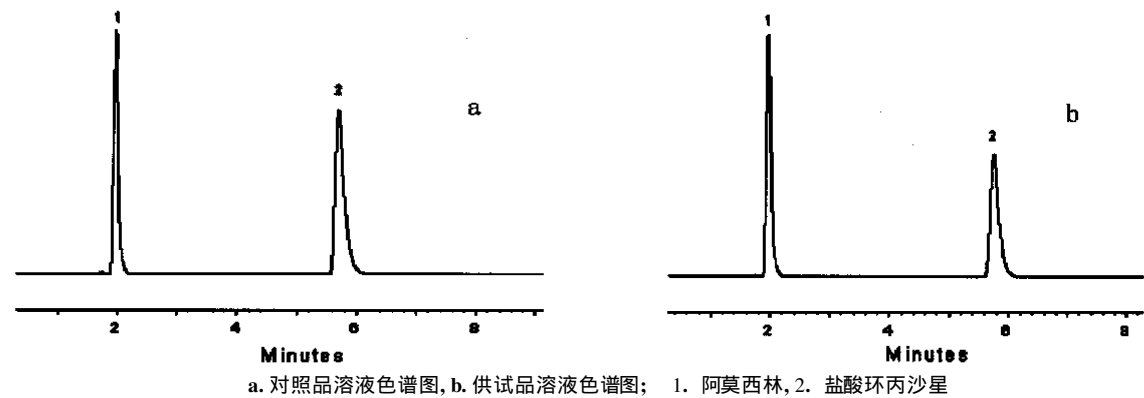
2.3 供试品溶液的配制 精密称取阿莫西林盐酸环丙沙星可溶性粉 1.050 2 g(约相当于阿莫西林、盐酸

张小华(1970 年~), 男, 学士, 讲师, 从事分析化学和药物分析教学研究工作。

环丙沙星各 50 ng)。置于 50 mL 容量瓶中用流动相超声溶解,再用流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,弃去初滤液,精密吸取续滤液 2.00 mL 置于 25 mL 容量瓶中,再以流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.4 系统适应性实验 在实验的色谱条件下,取经

0.45 μm 滤膜过滤的对照品溶液及供试品溶液各进样 20 μL ,记录色谱图。阿莫西林和盐酸环丙沙星保留时间分别为 1.96 和 5.75 min,理论塔板数分别为 3 090 和 8 284,不对称因子分别为 1.16 和 1.26。其色谱图如图 1 所示。



a. 对照品溶液色谱图, b. 供试品溶液色谱图; 1. 阿莫西林, 2. 盐酸环丙沙星
图 1 HPLC 色谱图

2.5 回归方程和最小检测浓度 精密吸取对照品贮备液 0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL 分别置于 25 mL 棕色容量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。按 2.1 项下色谱条件分别进样 20 μL ,得回归方程分别为:阿莫西林 $A = 32\ 625.2\ C + 8078.8$, $r = 0.999\ 9$; 盐酸环丙沙星 $A = 31\ 792.4\ C + 13\ 987.4$, $r = 0.999\ 9$ 。结果表明,阿莫西林和盐酸环丙沙星浓度分别在 22~ 108 $\mu\text{g/mL}$ 和 29~ 146 $\mu\text{g/mL}$ 范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系;阿莫西林和盐酸环丙沙星最小检测浓度分别为(按 $S/N = 3$ 计)0.57 和 0.83 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 回收率与精密度实验 按处方精密称取阿莫西林对照品、盐酸环丙沙星对照品、辅料适量,配成模拟供试品。精密称取适量,用流动相配成高、中、低 3 种不同浓度溶液,按实验方法测定,每一浓度平行测定 5 次,分别计算回收率和 RSD 。结果见表 1。

2.7 稳定性试验 精密吸取 2.6 项下溶液(60 $\mu\text{g/mL}$)1 份,在 6 h 内每隔 1 h 时进样 1 次,测量阿莫西林和盐酸环丙沙星峰面积,其 RSD 分别为 0.80% 和 1.5%,说明在选择的范围内溶液的稳定性良好。

2.8 样品测定结果 精密称取阿莫西林、盐酸环丙沙星对照品适量及供试品适量,以流动相为溶剂,分别配成阿莫西林、盐酸环丙沙星浓度各为 60 $\mu\text{g/mL}$ 的对照品溶液和供试品溶液,0.45 μm 滤膜滤过,各进样 20 μL ,测定峰面积,按峰面积外标法定量,每批

样品平行测定 5 次。结果见表 2。

表 1 回收率与精密度试验结果($n = 5$)

	加入量 $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	测定值 $/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	回收率 $/\%$	RSD $/\%$
阿莫西林	40.00	39.80	99.50	0.80
	60.00	60.10	100.2	1.00
盐酸环丙沙星	80.00	79.60	99.50	0.60
	40.00	39.44	99.30	1.02
	60.00	59.92	99.86	0.84
	80.00	80.56	99.70	0.86

表 2 样品中阿莫西林、盐酸环丙沙星含量分析结果($n = 5$)

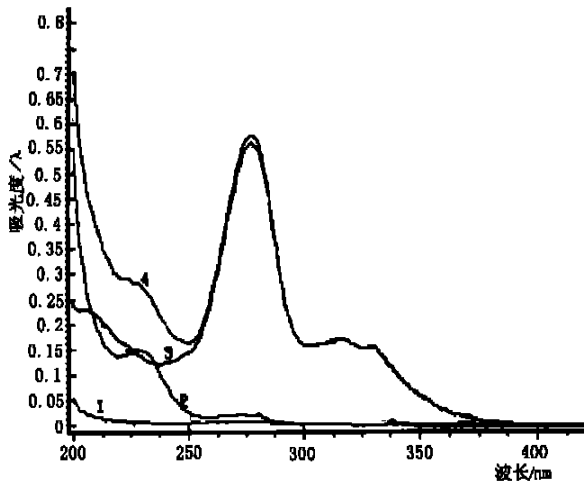
批 号	阿莫西林 $/\%$	RSD $/\%$	盐酸环丙沙星 $/\%$	RSD $/\%$
20020412	98.0	0.75	98.1	0.85
20020616	96.5	0.45	95.8	0.78
20020628	95.5	0.56	96.2	1.00
20020915	96.0	0.62	98.0	0.45

注:含量测定结果为占标示量的百分数。

3 讨论

3.1 检测波长的确定 分别配制一定浓度的阿莫西林和盐酸环丙沙星溶液,用 756CRT 紫外可见分光光度计在 200~ 400 nm 进行波长扫描,可得两者的吸收光谱图(见图 2)。图 2 显示阿莫西林在 229 nm、盐酸环丙沙星在 277 nm 波长有最大吸收,但在 277 nm 处阿莫西林几乎没有吸收,而在 229 nm 处盐酸环

丙沙星有较大吸收, 可满足紫外检测灵敏度的要求, 因此将检测波长确定为 229 nm,



1- 辅料; 2- 阿莫西林; 3- 盐酸环丙沙星;
4- 阿莫西林和盐酸环丙沙星的混合物

图2 阿莫西林、盐酸环丙沙星溶液吸收光谱图

在此波长下, 检测响应值范围宽、重现性好。《中华人民共和国药典》2000 版(二部)^[2]对阿莫西林、盐酸环丙沙星单方制剂含量测定采用的都是高效液相色谱法, 其检测波长分别为 254、277 nm。若将阿莫西林、盐酸环丙沙星可溶性粉的含量测定波长选择在 254 nm 或 277 nm 处, 盐酸环丙沙星虽然有一定响应值, 但阿莫西林响应值小, 灵敏度低, 不适宜同时测定其含量。

Determination of amoxicillin and ciprofloxacin hydrochloride in amoxicillin & ciprofloxacin hydrochloride soluble powder by RP-HPLC

ZHANG Xiaohua, ZHANG Long, LI Shengqi, XING Xiaoling, ZHU Lixia, FENG Yi

(Drug Analysis Center, Jiangsu Animal Husbandry and Veterinary College, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

Abstract: A RP-HPLC method for determination of the content of amoxicillin and ciprofloxacin hydrochloride in the soluble powder was established. Shim-pack CLC-ODS column (150 mm × 6 mm, 5 μm) was used with 1.5×10^{-2} mol/L triethylamine (it's pH was adjusted to 3.0 with phosphoric acid) - acetonitrile (85/15, V/V) as the mobile phase at flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was 229 nm. The temperature of column was controlled at 40 °C. Under the chromatographic conditions, the amoxicillin and ciprofloxacin hydrochloride could be completely separated. The standard curves for amoxicillin and ciprofloxacin hydrochloride were linear in the concentration range of 22~ 108 μg/mL and 29~ 146 μg/mL ($r = 0.9999$, $n = 5$), respectively. The recoveries of amoxicillin and ciprofloxacin hydrochloride were 99.50% ~ 100.20% ($RSD = 0.60\% \sim 1.00\%$) and 99.30% ~ 99.86% ($RSD = 0.86\% \sim 1.02\%$), $n = 5$, respectively. The method could be used to control the quality of amoxicillin & ciprofloxacin hydrochloride soluble powder.

Key words: RP-HPLC; amoxicillin; ciprofloxacin hydrochloride; soluble powder

3.2 流动相的选择 本实验参照文献^[2]以 pH 5.0 磷酸盐缓冲液-乙腈(体积比 94/6)为流动相, 盐酸环丙沙星的色谱峰严重拖尾; 参照文献^[2]以 0.05 mol/L 枸橼酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 3.5) - 乙腈(体积比 82/18)为流动相, 可以抑制盐酸环丙沙星的拖尾, 改善色谱峰形。但以枸橼酸调节溶液的 pH 值, 枸橼酸在 229 nm 处有较大的吸收度, 基线不易平稳; 如用磷酸来调节溶液的 pH 值, 则可以改善基线。另据文献报道^[4], pH 值越小越有利于抑制盐酸环丙沙星的拖尾和减少保留时间, 但 pH 值过低不利于保护色谱柱, 且会影响阿莫西林的稳定性^[5]。试验表明, 1.5×10^{-2} mol/L 三乙胺溶液(用磷酸调 pH 至 3.0) - 乙腈(85/15)为流动相组成时, 分析效果最好。

参考文献:

- [1] 卢海波, 李航, 杨莲芝. 紫外分光光度法快速测定阿莫西林含量[J]. 四川医学, 2000, 21(4): 344.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2000 年版 二部[S]. 北京: 化学工业出版社, 338, 622-623.
- [3] 陈爱民, 井明冉, 刘成刚, 等. 反相高效液相色谱法测定复方环丙沙星注射液的含量[J]. 中国药房, 2002, 13(3): 168-169.
- [4] 李修祿. 用 HPLC 法分析碱性含氮有机物的进展[J]. 国外医学药学分册, 1991, 18(5): 265.
- [5] 王齐放, 李三鸣, 赵吉吉, 等. pH 及不同缓冲盐对阿莫西林化学稳定性的影响[J]. 沈阳药科大学学报, 1999, 16(3): 176-178.