

# 阿莫西林胶囊中高分子聚合物测定方法的改进

蒋婷\*,袁明勇,郑玲利(成都医学院第一附属医院,成都 610500)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3152-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.29

**摘要** 目的:改进2010年版《中国药典》中阿莫西林胶囊中高分子聚合物的测定方法。方法:采用反相高效液相色谱法,使用高效凝胶色谱柱TSK-GEL G2000SWXL代替SephadexG-10凝胶柱,流动相用0.005 mol/L磷酸盐缓冲液(pH值7.0)-乙腈(等度洗脱)代替pH 8.0磷酸盐缓冲液-水(梯度洗脱),进样量由20  $\mu$ l代替100~200  $\mu$ l,柱温为25  $^{\circ}$ C,检测波长为254 nm。结果:阿莫西林主峰与高分子聚合物峰实现完全基线分离,分离度大于1.5,分析时间为20 min左右,理论板数不低于2 000;阿莫西林检测质量浓度线性范围为1.528~21.388  $\mu$ g/ml( $r=0.999\ 9$ ),重复性试验RSD=1.27%( $n=5$ ),检测限为6.012 ng。而原方法理论板数不低于700,分析时间约为50 min。结论:改进后方法比原方法柱效高、峰形对称,重复性更好,进样量更小,分析时间更短,操作更简便快捷,且结果可靠。

**关键词** 阿莫西林胶囊;高分子聚合物;反相高效液相色谱法;分子排阻色谱法;TSK-GEL G2000SWXL色谱柱;含量测定

## Improvement of the Determination Method for High-molecular Polymer in Amoxicillin Capsules

JIANG Ting, YUAN Ming-yong, ZHENG Ling-li (The First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To improve the determination method for the high-molecular polymer in Amoxicillin capsules in *Chinese Pharmacopoeia* (2010 edition). METHODS: RP-HPLC method was adopted. The determination was performed on TSK-GEL G2000SWXL column replacing SephadexG-10 gel column with mobile phase consisted of 0.005 mol/L phosphate buffer solution (pH 7.0)-acetonitrile (isocratic elution) replacing phosphate buffer solution (pH 8.0)-water (gradient elution). The sample size was 20  $\mu$ l instead of 100-200  $\mu$ l, and the column temperature was 25  $^{\circ}$ C. The detection wavelength was set at 254 nm. RESULTS: The peak of high-molecular polymer was completely separated from the main peak of amoxicillin; separation rate was higher than 1.5, and separation time was 20 min around; the number of the theoretical plate was no less than 2 000. The linear range of amoxicillin was 1.528-21.388  $\mu$ g/ml ( $r=0.999\ 9$ ). The RSD of repeatability test was 1.27% ( $n=5$ ), and the limit of detection was 6.012 ng. The number of the theoretical plate of primary method was no less than 700, and analysis time was 50 min around. CONCLUSIONS: The new method is of higher column efficiency, more symmetrical peak type, smaller sample size, shorter analysis time, simpler operation and more reliable results, compared to primary method.

**KEY WORDS** Amoxicillin capsules; High-molecular polymer; RP-HPLC; Molecular exclusion chromatography; TSK-GEL G2000SWXL column; Content determination

酯与异丙醇。

## 参考文献

- [1] 陈玲,邹栩.司替戊醇[J].中国药科大学学报,2008,39(5):481.
- [2] Madelmont JC, Dupuy JM, Rapp M, et al. Marquage par  $^{14}$ C et  $^3$ H du 4,4-dimethyl-1-(methylenedioxy-3,4-phenyl)-1-pentene-3-ol ou stiripentol[J]. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 1992, 31 (11): 961.
- [3] Vallet FM. 1-(3,4-methylenedioxy-phenyl)-4,4-dimethyl-1-en-3-ol:US,3910959[P].1975-10-07.
- [4] Casta LR, Hillier K. Stiripentol[J]. *Drugs Fut*, 1980, 5(8): 413.
- [5] Astolin J. Action of new ethylenic alcohols on the central nervous system[J]. *Eur J Med Chem-Chim Ther*, 1978, 13 (1):41.
- [6] 刘松,何源.高纯度洋茉莉醛生产工艺:中国,2009 10191127.5[P].2012-10-14.
- [7] 杜玉民,张恺,方瑜.一种司替戊醇的制备方法:中国,201110417419.3[P].2011-12-14.
- [8] 胡艾希,伍智林,叶姣.一种司替戊醇的制备方法:中国,201210200284.X[P].2012-06-18.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录61-63.
- [10] 周海钧.药品注册的国际技术要求:质量部分[M].北京:人民卫生出版社,2000:82-89.

\* 药师,硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail:405445347@qq.com

(收稿日期:2013-05-07 修回日期:2013-05-28)

阿莫西林是青霉素类 $\beta$ -内酰胺类抗生素,临床及实验研究证明,该类药物引发的过敏反应是由其中的高分子聚合物引起的<sup>[1-2]</sup>。因此,如何更好地控制这类药物中聚合物的含量,将是目前药品质量控制研究的主流<sup>[3]</sup>。2010年版《中国药典》采用SephadexG-10凝胶柱<sup>[4]</sup>分离测定阿莫西林胶囊中的高分子聚合物,但笔者在实际应用中发现该方法有一些问题,如:(1)柱效低,方法中仅要求理论板数不低于700;(2)峰形拖尾,方法中只要求拖尾因子小于2.0即可;(3)时间长,分析一个样品,包括系统适用性试验和样品测定至少需要3个多小时;(4)操作烦琐,测定中使用2种流动相和青霉素对照品,使试验和计算过程均较为烦琐等。近年来,为克服SephadexG-10凝胶色谱系统的弱点,已建立出了更为简单、方便、快捷、可靠的高效凝胶色谱方法<sup>[5]</sup>。笔者经过不断的方法探索和验证,建立了使用TSK-GEL G2000SWXL高效凝胶色谱柱的分子排阻色谱-反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定阿莫西林胶囊中高分子聚合物含量的方法。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1200型HPLC仪(美国Agilent公司);色谱柱TSK-GEL G2000SWXL(日本东曹公司);CP220D电子天平(德国Sartorius集团)。

### 1.2 药品与试剂

阿莫西林对照品(中国食品药品检定研究院,批号:130409-200810,纯度:86.9%);阿莫西林胶囊(香港澳美制药股份有限公司,批号:1107189、1107191、1108101,规格:每粒0.5g);乙腈为色谱纯,水为超纯水,磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为分析纯。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为TSK-GEL G2000SWXL(300 mm $\times$ 7.8 mm, 5  $\mu$ m);流动相为磷酸盐缓冲液[0.005 mol/L磷酸氢二钠-0.005 mol/L磷酸二氢钠(50:50,调pH值至7.0)]-乙腈(90:10),流速为0.6 ml/min;检测波长为254 nm;进样量为20  $\mu$ l;柱温为25  $^{\circ}$ C;理论板数不低于2 000。

取空白溶剂及“2.2”项下对照品和供试品溶液进样,色谱图见图1。

### 2.2 溶液的配制

精密称取适量阿莫西林对照品,加水溶解制成含阿莫西林10  $\mu$ g/ml的对照品溶液;另精密称取适量阿莫西林胶囊内容物,加水溶解制成1.0 mg/ml的溶液(临用现配),用0.22  $\mu$ m的微孔滤膜过滤,弃去初滤液约4 ml,取续滤液作为供试品溶液。

### 2.3 专属性试验

分别精密吸取阿莫西林对照品溶液、供试品溶液及高温、光照、酸、碱和氧化后的强制降解样品溶液各20  $\mu$ l注入色谱仪,进行分析,记录色谱。结果在该色谱条件下,所有强制条件下的降解产物与阿莫西林峰分离良好,降解样品溶液中阿莫西林峰纯度好,表明方法专属性良好。

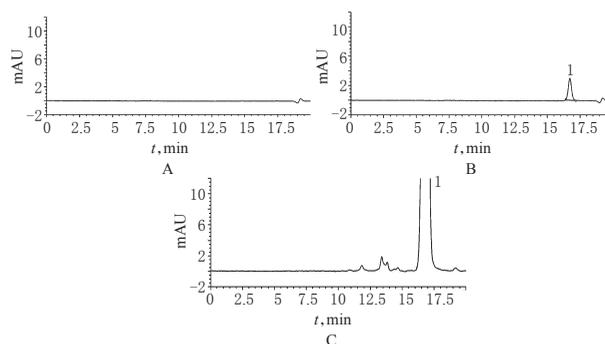


图1 高效液相色谱图

A.空白溶剂;B.对照品;C.供试品;1.阿莫西林

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank solvent; B. control; C. test sample; 1. amoxicillin

### 2.4 线性范围考察

取阿莫西林对照品17.58 mg,精密称定,用超纯水配制质量浓度为30.554 04  $\mu$ g/ml的对照品贮备液,准确移取贮备液0.5、1、2、3、4、5、6、7 ml,分别置于10 ml量瓶中,用超纯水稀释定容至刻度,摇匀即得质量浓度分别为1.528、3.055、6.111、9.166、12.222、15.277、18.332、21.388  $\mu$ g/ml的对照品系列溶液,分别取20  $\mu$ l进样,记录色谱。以对照品峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标进行线性回归,得其线性方程为 $A=5.245c-0.574$ ( $r=0.9999$ ),表明阿莫西林检测质量浓度线性范围为1.528~21.388  $\mu$ g/ml。

### 2.5 检测限试验

精密称取本品,加超纯水溶解并稀释至质量浓度为0.300 6  $\mu$ g/ml,进样。结果,信噪比为3.3时检测限为6.012 ng(RSD=0.82%, $n=6$ )。

### 2.6 稳定性试验

按“2.2”项下新制备的对照品溶液和供试品溶液(批号:1107189)各1份,室温放置,分别于0、0.5、1、2、3、4 h进样分析,记录对照品溶液和供试品溶液各色谱图的峰面积,计算得对照品溶液主峰峰面积的RSD=0.058%( $n=6$ ),表明对照品溶液在4 h内稳定性良好;但供试品溶液在常温下放置1 h后各个时间点其高分子聚合物杂质的含量都在明显增加,表明供试品溶液在室温下不稳定,须临用现配。

### 2.7 精密度试验

精密吸取“2.2”项下同一对照品溶液20  $\mu$ l,连续进样6次,其峰面积的RSD=0.27%,表明仪器精密度良好。

### 2.8 重复性试验

取同批样品(批号:1107189),配制成供试品溶液5份(临用现配),按“2.1”项下色谱条件重复测定其高分子聚合物含量,按外标法以峰面积计算得高分子聚合物含量分别为1.51%、1.53%、1.54%、1.49%、1.52%(RSD=1.27%, $n=5$ ),结果表明分析方法重复性良好。

### 2.9 样品中高分子聚合物含量测定

精密量取20  $\mu$ l对照品溶液,进样测定,记录色谱图。另取20  $\mu$ l供试品溶液进样,同法测定。按外标法以峰面积计算阿

莫西林中高分子聚合物的含量。3批样品的测定结果见表1。

表1 两种方法测定高分子聚合物含量结果(%)

Tab 1 Results of content determination of high-molecular polymer by 2 kinds of method (%)

批号	《中国药典》方法	改进方法
1107189	0.032	1.52
1107191	0.036	1.51
1108101	0.039	1.58

## 2.10 改进方法与《中国药典》方法的比较

2.10.1 色谱图的比较。2010年版《中国药典》阿莫西林胶囊项下使用分子排阻色谱法(附录VH)对高分子聚合物进行测定<sup>[4]</sup>。其色谱条件为:以葡聚糖凝胶G-10(40~120 μm)为填充剂,以pH 8.0磷酸盐缓冲液[0.05 mol/L磷酸氢二钠-0.05 mol/L磷酸二氢钠(95:5)]为流动相A,水为流动相B,流速为1.5 ml/min,检测波长为254 nm,进样量为100~200 μl。本文建立的方法(改进方法)与《中国药典》方法检测同批样品的色谱图见图2。

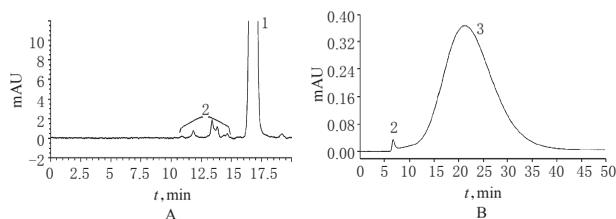


图2 两种方法色谱图

A.改进方法;B.《中国药典》方法;1,3.阿莫西林;2.高分子聚合物

Fig 2 Chromatograms of 2 kinds of methods

A. improved method; B. method stated in Chinese Pharmacopoeia; 1, 3. amoxicillin; 2. high-molecular polymer

2.10.2 测定方法的比较。《中国药典》方法规定对照溶液和供试品溶液的进样量均为100~200 μl,进样量大,进样时间长,对仪器的进样设备要求高;而改进方法只需正常进样20 μl即可,进样快且准确。《中国药典》方法以0.1 mg/ml蓝色葡聚糖2000溶液分别在流动相A、B中进行测定,规定在两种流动相系统中主峰保留时间的比值应在0.93~1.07、理论板数不低于700、拖尾因子均应小于2.0为其系统适用性试验要求的结果;以高聚体的峰高与单体与高聚体之间的谷高比应大于2.0判断分离度(见图2B),以青霉素对照品配制对照溶液,以流动相B为流动相同时测定对照溶液和样品溶液。按外标法以峰面积计算阿莫西林高分子聚合物的含量(阿莫西林-青霉素之比为1:10)<sup>[4]</sup>。而改进方法采用1种流动相进行等度洗脱,高分子聚合物峰与阿莫西林主峰能够完全分离(见图2A),主峰的理论板数均不低于2000,以阿莫西林对照品配制对照品溶液同法进样测定,不需要进行换算,按外标法以峰面积计算阿莫

西林高分子聚合物的含量。笔者分别用《中国药典》方法和改进方法对3批样品的高分子聚合物含量进行测定,测定结果见表1。

比较两种方法的色谱图和高分子聚合物测定结果,改进方法中高分子聚合物峰与阿莫西林主峰分离效果较好,达到了基线分离,分离度大于1.5,且分析时间明显缩短,只需20 min便能完成一个供试品的分析;而《中国药典》方法在分析供试品前要进行大量的系统适用性试验,并且是以高分子聚合物的峰高与单体与高分子聚合物之间的谷高比判断分离度,样品分析时间较长,分析一个样品要用50 min。因此,采用本文中所述改进的高分子聚合物含量测定方法较好地解决了《中国药典》方法柱效低、峰形拖尾、重复性不好和分析时间较长等问题,故本方法较《中国药典》方法更为简便快捷。

## 3 讨论

### 3.1 检测波长的选择

参照2010年版《中国药典》(二部)中收录的阿莫西林胶囊聚合物测定方法<sup>[4]</sup>确定。

### 3.2 流动相选择

笔者曾试验流动相中磷酸盐缓冲液的浓度分别为0.003、0.004、0.005和0.006 mol/L时的分离效果,结果当缓冲液浓度为0.005 mol/L、且与乙腈的比例为90:10时,高分子聚合物峰与阿莫西林主峰的分离效果好。因此,磷酸盐缓冲液的浓度选择为0.005 mol/L。

### 3.3 柱温选择

将柱温分别设为20、25、30、35、40 °C时测定同批样品,结果高分子聚合物含量分别为1.53%、1.51%、1.53%、1.54%、1.61%,相邻高分子聚合物峰与阿莫西林主峰的分离度均较大且符合要求。此时,适当控制温度恒定可使结果更加准确可靠并节省能源,故柱温选择为25 °C。

## 参考文献

- [1] 袁雯玮.高分子聚合物研究与《中国药典》2005年版β-内酰胺类抗生素高分子聚合物修订情况及操作要点[J].中国抗生素杂志,2005,30(12):727.
- [2] 张昕.《中国药典》2010年版高分子聚合物修订情况和探讨[J].今日药学,2010,20(9):57.
- [3] 胡昌勤.β-内酰胺抗生素聚合物分析技术的展望[J].中国新药杂志,2008,17(24):2098.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:401-404、附录37-38.

(收稿日期:2012-12-03 修回日期:2013-01-14)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊,欢迎投稿、订阅