

應用HPLC方法於Dicloxacillin製劑之 品質管制

范燕珍 許美智

第二組

摘要

本局於七十八年度發展出一種高效液相層析法，可用於鑑別及測定Dicloxacillin原料藥及膠囊製劑之力價。使用 μ -Bondapak C₁₈為層析管，以甲醇與4%醋酸(60:40)之混合液為移動相，dimethylphthalate為內部標準品，於254nm波長處紫外光偵測器測之。由於同時以HPLC法與微生物法作配對實驗測定力價，並用paired-t test作配對比較，結果證明Dicloxacillin原料藥及膠囊製劑以二種方法測定所得之力價並不具統上之差異。亦即HPLC法可用以取代微生物法來測定Dicloxacillin各製劑之力價。故本實驗乃應用此HPLC方法於市售四家不同廠牌Dicloxacillin膠囊製劑之品質管制。包括容量均一度(Content uniformity)，模擬處方試驗(Recovery)及溶離度試驗(Dissolution test)等。本方法簡單，迅捷且具特异性。

前言

近來已有數篇測定生物體液中dicloxacillin之HPLC法被報導¹⁻⁴，除此之外，Lauriault等⁵曾以HPLC法分離dicloxacillin及其酸鹼之分解產物；Briguglio等⁶則是利用HPLC法分離Penicillin類化合物，但其dicloxacillin之滯留時間為26.8分鐘，極為冗長。

目前公定書中Code of Federal Regulation⁷是以碘滴定法或微生物法(Microbiological agar diffusion)來分析dicloxacillin原料藥及其製劑，日本抗生物質基準解說⁸是以微生物法或碘滴定法來測定dicloxacillin之力價，然各法中仍以微生物法所得之結果為主。一般而言，抗生素鑑別用的呈色法或薄層層析法(T.

L.C)，力價測定用的光學法(酸分解法)或微生物法，均不具特异性；又傳統微生物分析法所得之結果差異性大且費時，因此本局於七十八年度研究出一種值得信賴、準確、省時又簡單的HPLC方法來分析dicloxacillin原料藥及膠囊製劑之檢體。

於本年度(七十九年度)，本局利用上年度所發展出之HPLC法⁹對於市售四家藥廠所生產之Dicloxacillin膠囊製劑進行品質管制研究。本研究包括藥廠一般例行檢驗項目如溶離度試驗及容量均一度等，而不同廠別所添加不同賦形劑對分析圖譜及定量所造成之影響亦可做一探討。

材料與方法

一、試藥與試劑：

(一)Dimethylphthalate及glacial acetic acid為Merck之試藥級，甲醇為ALPS Chemical Co.之LC級。磷酸氫二鉀及磷酸二氫鉀購自於和光為試藥級。

(二)標準品：本局自製之Dicloxacin sodium (house standard) 力價923.6 μ g/mg。

(三)市售膠囊製劑：向必美股份有限公司購買Diclocil 250mg之膠囊 (批號 RK725)及Diclocil 125mg之膠囊 (批號 RH851) 各乙瓶。向景德製藥股份有限公司購買Diclocin 250mg之膠囊二種批號 (D0449及D0448) 各乙瓶。向永信藥品工業股份有限公司購買Ziefmycin250mg之膠囊二種批號 (ZFCT004, ZFCT006) 各乙瓶。以及向中國化學製藥股份有限公司購買Dacocilin 250mg之膠囊二種批號 (MEW373及QLW443) 各乙瓶。

二、HPLC法：

(一)內部對照標準品(Internal standard)溶液之配製：

精確量取適當量之Dimethylphthalate,以acetonitrile : H₂O = 1 : 1之溶液稀釋成30mg/ml之貯備溶液。

(二)標準品溶液之配製：

精確稱取適當量之標準品，並加入內部對照標準品之貯備溶液，再以蒸餾水溶解並稀釋成每ml含1mg dicloxacin(力價)及0.3mg dimethylphthalate之標準品溶液。

(三)移動相之配製：

取適當量之glacial acetic acid,以雙重去離子水調配成4%之濃度，再以methanol : 4% acetic acid = 60 : 40比率配製成移動相，並以0.45 μ m(Acrodisc, LCPVDF)溶媒濾清器過濾。

(四)儀器及分析條件：

1.儀器：Waters 600E Liquid Chromatography。

2.逆相層析管： μ -Bondapak C₁₈, 3.9mmx 30cm, Waters P/N27324。

3.移動相：methanol : 4% acetic acid = 60 : 40之混合溶液。

4.UV偵測器：Waters 490E Progra-

mmable Multiwavelength Detector UV 254nm, AUFS1.0

5.記錄器：Waters 745 Data Module Attenuation 128, chart speed 0.5cm/min

6.注射量：10 μ l

(五)檢體溶液配製：

1.市售檢體添加dicloxacin之溶液配製：

於市售膠囊檢體中，研磨成均勻之粉末，分取四份，每份各精取50mg (力價)，分別加入0 mg, 10mg, 15mg, 20mg (potency) 之dicloxacin 標準品(即約實際檢體取量之0%, 20%, 30%, 40%) 及適當之蒸餾水溶液稀釋，使成含有dimethylphthalate 0.3mg/ml 及dicloxacin 各為1.0mg/ml, 1.2mg/ml, 1.3mg/ml, 1.4 mg/ml 之溶液。做回收率試驗時，再由各個溶液取10 μ l 注射入HPLC。

2.容量均一度試驗之溶液配製：

於市售檢體中，各取不同廠牌及批號之膠囊10粒，精確稱取其各別之內容量並研磨成均勻粉末，精確稱取相當於dicloxacin 50mg (力價) 之檢體，加入適量之內部對照標準品溶液，並以適量之蒸餾水溶解稀釋成每ml含1mg dicloxacin (力價) 及 0.3mg dimethylphthalate 之檢體溶液。

3.溶離度試驗之溶液配製：

依據U.S.P XXI¹⁰版所載，以蒸餾水900ml為溶離度試驗液，溫度設於37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C，試驗籃轉速為100r.p.m. 試驗時每槽放置一顆膠囊，每隔5, 10, 15, 20, 30, 45, 60分鐘各由槽中取出10ml溶液，並以蒸餾水10ml補足槽中體積。將上述取出之溶液加內部對照標準品溶液20 μ l，過濾後取40 μ l打入HPLC。本試驗之對照溶液配製法為取6顆與檢體相同廠牌之膠囊，取出內容物精確秤重並混合，精取相當於一顆平均重量之粉末溶於蒸餾水900ml中，使其充份溶解後取10ml並加20 μ l內部對照標準品溶液，過濾後同樣打40 μ l入HPLC。

結果與討論

圖一. 為各類dicloxacin製劑之層析圖。以dimethylphthalate為內部對照標準品，

應用HPLC方法於Dicloxacillin製劑之品質管制

針對dicloxacillin之各類製劑進行分析,包括:局製備標準品、原料藥、及四家不同廠牌之膠囊製劑。dimethylphthalate滯留時間約為3.5分鐘,dicloxacillin之滯留時間則均在7分鐘以內。顯示本法可適用於市售不同廠牌dicloxacillin膠囊製劑之分析,其滯留時間並不因各廠所加賦形劑之不同而受到影響。

應用此HPLC法於四家廠牌dicloxacillin膠囊之內容量測定,其結果示於表一.,以HPLC法取代微生物法,檢驗時間、人力物力均可節省很多,對於藥廠每天例行而繁重的品管工作有極大助益。表二.則為市售膠囊檢體中分別加入約標示力價含量20%,30%及40%之diclo-

xacillin標準品以測定不同廠牌添加不同賦形劑對平均回收率的影響。其回收率分別為A廠99.70%,B廠98.89%·C廠100.15%,D廠99.70%。由此可知,在此HPLC方法操作下,所得之回收率並不會因賦形劑之不同而受影響。

各家廠牌dicloxacillin膠囊製劑之溶離度曲線圖示於圖二,顯示各家廠牌製劑雖均在藥典所規定之45分鐘內溶離,但其速率卻因添加不同賦形劑而不同,同時溶離之程度也會受到賦形劑的影響,這些曲線亦可做為藥廠品質管制及處方開發研究之參考。

結 論

Table 1. Content Uniformity of Dicloxacillin in Different Brands, Expressed as % of Label Claim

Capsule No.	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2
1.	103.4	114.0	110.8	93.1	110.6	109.7	96.0	93.9
2.	105.9	117.4	114.8	107.6	117.6	101.7	98.9	95.7
3.	105.0	112.8	113.3	92.9	112.8	98.9	106.5	92.7
4.	108.2	110.8	114.4	89.9	109.9	103.8	98.7	104.9
5.	112.9	111.4	111.9	90.6	109.8	104.6	101.8	95.0
6.	106.6	113.3	109.8	95.1	112.0	107.0	99.5	107.9
7.	104.5	117.1	115.2	96.0	110.0	111.8	99.0	91.9
8.	110.5	106.2	109.4	98.1	110.4	109.4	100.1	101.3
9.	104.2	111.9	112.4	93.0	103.4	92.9	96.5	96.7
10.	108.8	107.8	113.7	96.1	111.7	114.6	107.4	101.7

Table 2.Recovery of Dicloxacillin from Spiked Samples

Brand	Amount added (mg)	Recovery*			Average
		20	30	40	
A	1	99.40	98.65	100.74	99.70
	2	100.08	99.52	99.78	
B	1	98.69	99.93	99.73	98.89
	2	98.68	97.67	98.65	
C	1	98.17	98.92	99.07	100.15
	2	100.29	102.81	101.62	
D	1	97.56	102.42	101.20	99.70
	2	99.52	98.12	99.37	

*an average of 6 determinations

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLF D)

以微生物法檢驗，至少需16-18小時，且特異性不高，操作人員亦需有純熟之技術才能將差異性降至最低；而本HPLC法只要在7分鐘內便可同時得知鑑別與力價之結果，不僅操作容易，特異性、再現性都高。除此之外，對市售四家

不同廠牌膠囊製劑作品質管制，發現無論添加何種賦形劑，本條件均可適用。故考量實驗精確性、時間及人力，本HPLC法確可提供予國內各藥廠做為dicloxacillin製劑之品質管制及研究開發時使用。

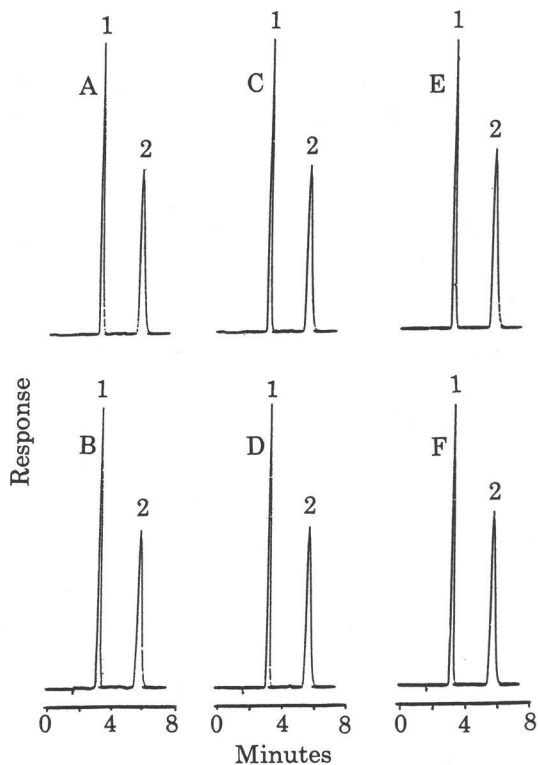
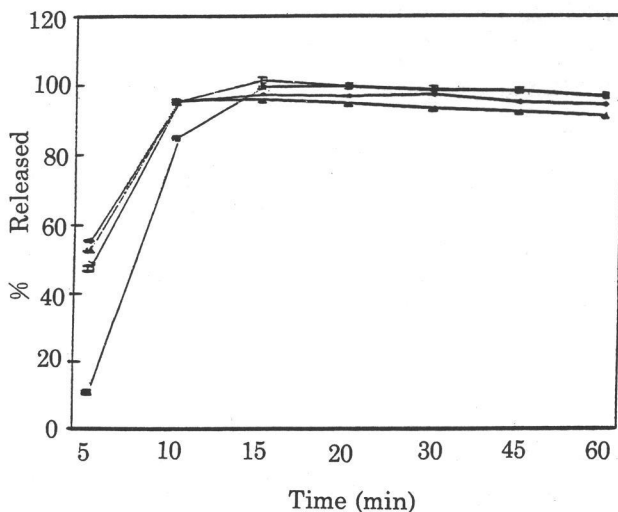


Fig 1. Typical chromatograms of dicloxacillin preparation :
 (A) house standard ;
 (B) bulk drug substance ;
 (C) Brand A capsule ;
 (D) Brand B capsule ;
 (E) brand C capsule ;
 (F) Brand D capsule ;
 Peaks : 1 , dimethylphthalate ;
 2 , dicloxacillin

Fig 2. Dissolution rates of dicloxacillin in water at 37°C
 Brand A (■), B (◆),
 C (▲) and D (▣)



應用HPLC方法於Dicloxacilli製劑之品質管制

參考文獻

1. Thisjssen, H. H. W. 1980. Analysis of isoxazolyl penicillins and their metabolites in body fluids by HPLC. *J. Chromatogr.* 183 : 339-345.
2. Tshji, A., Yoshikawa, T., Nishide, K., Minami, H., Kimura, M., Nakashima, E., Terasaki, T., Miyamoto, E., Nightingale, C. H., & Yamana, T. 1983. Physiologically based pharmacokinetic model for beta-lactam antibiotics I: Tissue distribution and elimination in rats. *J. Pharm. Sci.* 72 : 1239-1252.
3. Murai, Y., Nakagawa, T., Yamaoka, K., & Uno, T. 1984. Comparative pharmacokinetics of dicloxacillin and ampicillin between individual and combined doses. *J. Pharmacobiodyn.* 7 : 33-42.
4. Hung, C. T., Lim, J. K., Zoest, A. R., & Lam, F. C. 1988 Optimization of high-performance liquid chromatographic analysis for isoxazolyl penicillins using factorial design. *J. Chromatogr.* 425 : 331-341.
5. Lauriault, G., Awang, D. V. C., & Kindack, D. 1984. High-performance liquid chromatographic determination of dicloxacillin in presence of its degradation products. *J. Chromatogr.* 283 : 449-452.
6. Briguglio, G. T., & Lau-Cam, C. A. 1984. Separation and identification of nine penicillins by reverse phase liquid chromatography. *Associ. Analyt. Chem.* 67 : 228-231.
7. Code of Federal Regulation. 1988. Title 21, Part 440. U. S. Government Printing Office, Washington, D. C.
8. Minimum Requirements for Antibiotic Products of Japan. 1986. Japan Antibiotics Research Association.
9. Hsu, M. C., and Fann, Y. J. Determination of Dicloxacillin Preparations by Liquid chromatography. In preparation.
10. The United States Pharmacopeial Convention, Inc., 1985. The pharmacopoeia of United States of America. Twenty-first Revision, p.313. Washington, DC.

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)



APPLICATION OF HPLC FOR QUALITY CONTROL OF DICLOXACILLIN

YANN-JEN FANN AND MEI-CHICH HSU

DIVISION OF PHARMACOBIOLOGY

ABSTRACT

A reversed phase high performance liquid chromatographic method has been developed for the assay of dicloxacillin. The samples were analysed on a μ -Bondapak (C_{18}) column with a mobile phase consisting of methanol and acetic acid. Our previous study has shown that this method is a suitable substitute for the microbiological method for potency assays and stability studies of dicloxacillin preparations.

The assay was also applied success-

fully to four different commercial brands and proved to be free of interference from excipients normally used in formulations. The contents of uniformity and dissolution rates in different brands were performed. The results have shown that this analytical method could be utilized readily for routine quality control of dicloxacillin pharmaceuticals, since it offers a simple system and short analytical time coupled with reproducibility and accuracy.