

藥物食品檢驗局調查研究年報9:120-127,1991
Ann. Rept. NLFD Taiwan R.O.C. 9:120-127,1991



應用HPLC方法測定Cloxacillin 原料藥及其製劑之力價

鄭美釵 許美智

第 二 組

摘 要

本研究發展出一種高效液相層析法，可用於鑑別及測定Cloxacillin之原料藥及其製劑(包括膠囊、注射劑、糖漿)之力價，簡單、迅捷且具特异性。使用 μ -BondapakTM C₁₈為層析管，以甲醇與4%醋酸(60:40)之混合液為移動相，dimethylphthalate為內部對照標準品，於254nm波長處以紫外光偵測器測之。標準曲線(Standard Curve)之線性迴歸方程式為 $Y = 0.0379 + 0.1483x$ ，相關係數 $r = 0.9998$ (濃度範圍為0.2~3.0mg/ml)。添加不同量之cloxacillin於市售檢體(膠囊、注射劑、糖漿)中，所得之平均回收率均在99.5%以上。重覆注射同一濃度之cloxacillin標準品溶液，所測得之變異係數(C.V.)為0.13%，顯示本法再現性(Reproducibility)極高。

為得知HPLC法是否可取代微生物法測定cloxacillin製劑之力價，cloxacillin各製劑同時以二種方法作配對實驗測定力價，並用paired-t test作配對比較，結果發現，於99%可信度範圍(confidence level)內，原料藥、膠囊、注射劑、糖漿各同時以二種方法測定所得之力價並不具統計上之差異。亦即HPLC法可用以取代微生物法測定cloxacillin各製劑之力價。而且各製劑及其熱分解檢品以二種方法測定所得結果之線性關係亦將於本文中討論。

前 言

近來已有數篇測定生物體液中cloxacillin之HPLC法被報導¹⁻⁸。Briguglio等人⁹曾利用HPLC法分離penicillin類化合物，Lauriault等人¹⁰則是以HPLC法分析cloxacillin類製劑，但此兩篇報導cloxacillin之滯留時間皆在15分鐘左右，極為冗長。

目前公定書中Code of Federal Regulation¹¹是以碘滴定法或微生物法(microbiologica lagar diffusion)來分析cloxacillin原料藥及其製劑；日本抗生物質醫藥品基準解說¹²是以微生物法，碘滴定及光學法(酸分解法)來測定cloxacillin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

應用HPLC方法測定Cloxacillin原料藥及其製劑之力價

定用的光學法或微生物法，均不具特異性；又傳統微生物分析法，所得之結果差異性大且費時，因此本局希望研究出一種值得信賴、準確、省時又簡單的HPLC方法來分析cloxacillin各劑型之檢體。

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之LC級。磷酸氫二鉀及磷酸二氫鉀購自於WAKO，為試藥級。

(二)標準品：本局自行標定的cloxacillin sodium house standard力價為899.7 μ g/mg。

(三)原料藥：必美股份有限公司提供不同批號之cloxacillin sodium原料藥四件，中國化學製藥廠提供不同批號之原料藥四件，總共取得不同批號之cloxacillin sodium原料藥八件。

(四)膠囊製劑：向必美股份有限公司購買PROSTAPHLIN-A 250mg之膠囊(批號：RH 855)。

(五)注射劑：糖漿製劑：向友信行股份有限公司購買Orbenin 250mg/vial之注射劑(批號：BN1138901)及Orbenin 125mg/5ml之糖漿(批號BN2259W05)。

二、檢體之處理：

將膠囊、注射劑、糖漿等製劑貯存於室溫或55~150 $^{\circ}$ C之烘箱中，每隔一段時間取出，置於研鉢中研磨成均勻細粉，稱其重量，再分別以HPLC法及微生物法測定力價。

三、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(Stock Solution)。

(二)標準品及檢品溶液之配製：

精確稱取適當量之標準品或檢品，並加入內部對照標準品貯備溶液，再以蒸餾水溶解並稀釋成每ml含1mg cloxacillin(力價)及0.3mg Dimethylphthalate之標準品溶液或檢品溶液。

(三)移動相之配製：取適當量之glacial acetic acid，以雙次去離子水調配成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, 3.9mm \times 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 Programmable Multiwavelength Detector UV 254nm, AUFS 1.0

5.記錄器：Waters 745 Data module Attenuation 256, chart speed 0.5cm/min

6.注射量：10 μ l

(五)標準曲線溶液之配製：精確稱取適當量之cloxacillin sodium對照標準品，以蒸餾水溶解並稀釋成5mg/ml之貯備溶液。精確量取貯備溶液各2ml、5ml、10ml、15ml、20ml、25ml、30ml分別置於50ml之容量瓶中，再各加入內部對照標準品貯備溶液0.5ml，以蒸餾水稀釋至刻度，使成含有Dimethylphthalate 0.3mg/ml及cloxacillin各為0.2mg/ml、0.5mg/ml、1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/ml、2.5mg/ml、3.0mg/ml之七種混合標準品溶液。

(六)市售檢體添加cloxacillin之溶液配製：

1.於市售膠囊250mg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0mg、11.1mg、16.7mg、22.2mg之cloxacillin標準品(即約實際檢體取量之0%、20%、30%、40%)及適量之內部對照標準品溶液，並以適量之蒸餾水溶液溶解稀釋，使成含有dimethylphthalate 0.3mg/ml及cloxacillin各為1.0mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/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.於市售注射劑250mg/vial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0mg、11.8mg、16.7mg、22.3mg之cloxacillin標準品，即約實際檢體取量之0%、20%、30%、40%及適量之內部對照標準品溶液，並以適量之蒸餾水溶解稀釋，使成含有dimethylphthalate 0.3mg/ml及cloxacillin各為1.0mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/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。

3. 於市售糖漿125mg/5ml檢體中，均勻混合，分取四份，每份各精取50mg(力價)，分別加入0mg、11.7mg、16.9mg、22.2mg之cloxacillin標準品(即約實際檢體取量之0%、20%、30%、40%)及適量之內部對照標準品溶液，並以適量之蒸餾水溶解稀釋，使成含有dimethylphthalate 0.3mg/ml及cloxacillin各為1.0mg/ml、1.2mg/ml、1.3mg/ml、1.4mg/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。

四、微生物法(Microbiological Assay)：

依據MRAP中所載，以*Bacillus subtilis* ATCC6633為試驗菌種。標準品及檢品均以蒸餾水配製成濃度1.0mg/ml(力價)之儲備溶液。試驗時再以蒸餾水稀釋至最終濃度為16 μ g/ml及4 μ g/ml二種濃度。

每件檢品使用5個平碟，於32-35 $^{\circ}$ C培養箱中培養16-18小時後，測量其抑制圈直徑，所得之值以下列公式計算其力價

$$\log\theta = \frac{\Sigma(UH+UL)-\Sigma(SH+SL)}{\Sigma(UH+SH)-\Sigma(UL+SL)} \times \log A$$

$$A = \frac{\text{SH之力價濃度}}{\text{SL之力價濃度}}$$

$$\text{potency}(\%) = \text{antilog}\theta \times \frac{\text{標準品實際取量}}{\text{標準品理論取量}}$$

$$\times \frac{\text{檢品理論取量}}{\text{檢品實際取量}} \times 100\%$$

UH：檢品濃度16 μ g/ml所測得之抑制圈直徑

UL：檢品濃度4 μ g/ml所測得之抑制圈直徑

SH：標準品濃度16 μ g/ml所測得之抑制圈直徑

SL：標準品濃度4 μ g/ml所測得之抑制圈直徑

結果與討論

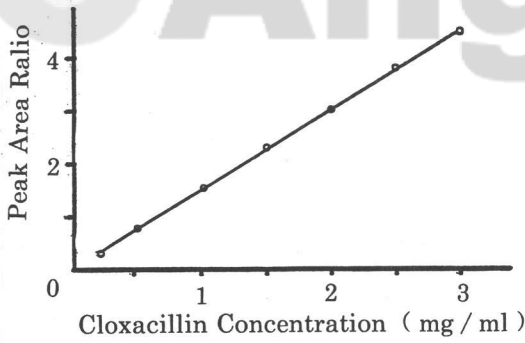
圖一係以cloxacillin標準品濃度為橫軸，各對應cloxacillin濃度與Dimethylphthalate波峰面積之比值(peak area ratio)為縱軸，依線性迴歸分析¹³(Linear regression analysis)所得之方程式($Y = 0.0379 + 0.1483x, r = 0.9998$)繪製而成的標準曲線，線性範圍從0.2mg/ml到3.0mg/ml。

於cloxacillin標準曲線之線性範圍內，擇1.0mg/ml之cloxacillin標準品溶液，每次注射10 μ l，重覆注射10次，將所得之數據(peak area ratio)計算標準偏差(Standard deviation)所得值為0.19%；變異係數(Coefficient of variation)為0.13%，顯示其再現性(Reproducibility)良好。

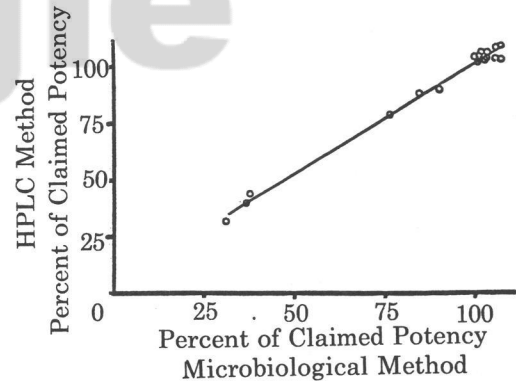
於市售250mg膠囊檢體中分取三份，分別加入約標誌力價含量20%、30%及40%之cloxacillin標準品以測定每一劑型之平均回收率。表一為市售膠囊內添加cloxacillin之回收率；分別加入11.1mg、16.7mg、22.2mg cloxacillin標準品於市售膠囊檢體中，測得之回收率分別為100.7%、99.3%、99.5%；平均回收率為99.83%。表二為市售注射劑內添加cloxacillin之回收率；分別加入11.8mg、16.7mg、22.3mg cloxacillin標準品於市售注射劑檢體中，測得之回收率分別為99.4%、98.9%、100.4%；平均回收率為99.57%。表三為市售糖漿內添加cloxacillin之回收率；分別加入11.7mg、16.9mg、22.2mg cloxacillin標準品於市售糖漿檢體中，測得之回收率分別為100.9%、101.8%、98.4%；平均回收率為100.37%，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。

各類cloxacillin製劑之層析圖示於圖二，以Dimethylphthalate為內部對照標準品，針對cloxacillin之各類製劑進行分析，包括：局製備標準品、原料藥、膠囊、注射劑、糖漿及在溫控下以熱分解之膠囊、注射劑、糖漿。Dimethylphthalate滯留時間約為3.5分鐘，cloxacillin之滯留時間皆約為5分鐘。綜觀前述，顯示本法可適用於cloxacillin各種劑型之分析。

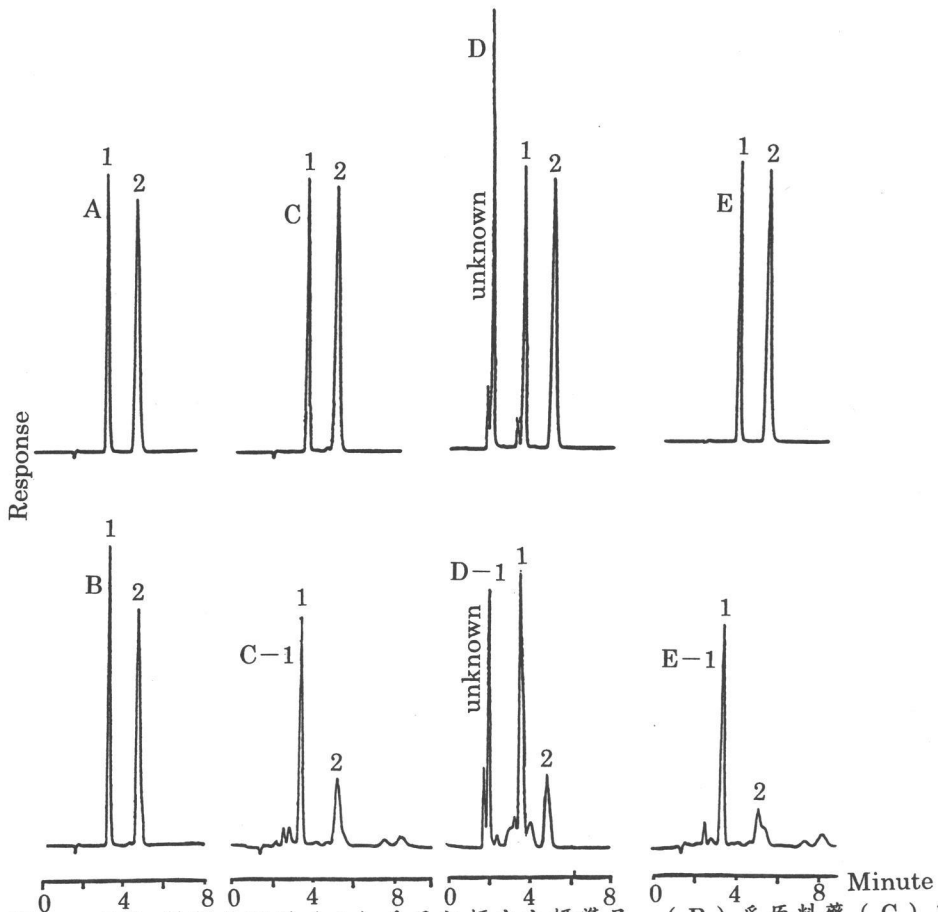
嬰兒配方食品中碘與氯之檢驗方法探討



圖一 cloxacillin標準曲線，依線性迴歸分析所得直線方程式為 $y=0.0379+0.1483x$ ，相關係數 $r=0.9998$

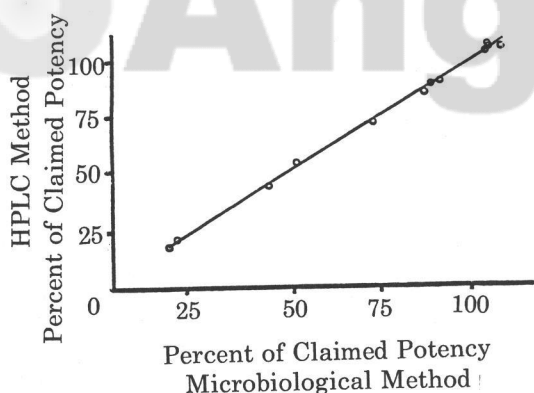


圖三 以微生物法及高效液相層析法測定250mg cloxacillin膠囊力價，其結果之相關性，依線性迴歸分析，所得直線方程式為 $y=2.0188+0.975x$ ，相關係數 $r=0.9941$

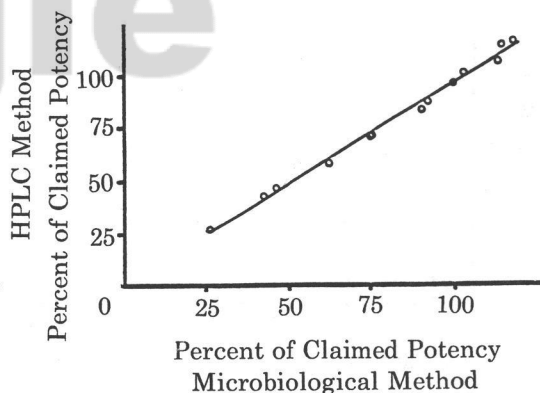


圖二 Cloxacillin製劑之圖譜 (A) 為局內標定之標準品，(B) 為原料藥 (C) 為250mg (C-1) 為熱分解之250mg膠囊 (D) 為125mg / 5ml 糖漿 (D-1) 為熱分解之125mg / 5ml糖漿 (E) 為250mg / 瓶注射劑 (E-1) 為熱分解之250mg / 瓶之注射劑波峰1。表示di methyl phthalate波峰2。表示cloxacillin

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)



圖四 以微生物法及高效液相層析法測定250mg cloxacillin注射劑力價，其結果之相關性，依線性迴歸分析，所得直線方程式為 $y=3.5188+0.9463x$ ，相關係數 $r=0.9988$



圖五 以微生物法及高效液相層析法測定250mg cloxacillin糖漿力價，其結果之相關性，依線性迴歸分析，所得直線方程式為 $y=1.4395+0.9608x$ ，相關係數 $r=0.9966$

表一 市售cloxacillin膠囊之回收率

| Added(mg) | Found(mg) | Rec.(%) | Average Recovery, % |
|-----------|-----------|---------|---------------------|
| 11.1 | 11.18 | 100.7 | 99.83 |
| 16.7 | 16.58 | 99.3 | |
| 22.2 | 22.08 | 99.5 | |

表二 市售cloxacillin注射劑之回收率

| Added(mg) | Found(mg) | Rec.(%) | Average Recovery % |
|-----------|-----------|---------|--------------------|
| 11.8 | 11.73 | 99.4 | 99.57 |
| 16.7 | 16.51 | 98.9 | |
| 22.3 | 22.39 | 100.4 | |

表三 市售cloxacillin糖漿之回收率

| Added(mg) | Found(mg) | Rec.(%) | Average Recovery % |
|-----------|-----------|---------|--------------------|
| 11.7 | 11.81 | 100.9 | 199.37 |
| 16.9 | 17.20 | 101.8 | |
| 22.2 | 21.84 | 98.4 | |

嬰兒配方食品中碘與氯之檢驗方法探討

表四 cloxacillin原料與微生物法高效液相層析法測定所得之力價

| Sample | Potency ($\mu\text{g} / \text{mg}$) | |
|----------------|---------------------------------------|-------|
| | Microbiological* | HPLC* |
| House Standard | 399.7 | 899.7 |
| USP Standard | 924.8 | 920.3 |
| Manufacturer1 | A | 849.2 |
| | B | 917.0 |
| | C | 900.2 |
| Manufacturer2 | A | 887.2 |
| | B | 927.8 |
| | C | 925.0 |

*Average of five determinations.

**Average of triplicate determinations.

表五 cloxacillin製劑包括膠囊、注射劑、糖漿以微生物法及高效液相層析法測定力價之比較

| % of Claim | | | | | |
|------------------------|-------------|-------------------------|-------------|------------------------|-------------|
| 250mg / capsule | | 250mg / vial, Injection | | 125mg / 5ml, Syrup | |
| Microbiological Method | HPLC Method | Microbiological Method | HPLC Method | Microbiological Method | HPLC Method |
| 107.4 | 107.3 | 109.9 | 105.0 | 117.2 | 116.4 |
| 107.1 | 101.3 | 106.1 | 105.9 | 113.7 | 114.7 |
| 105.9 | 106.3 | 105.8 | 106.3 | 112.8 | 107.4 |
| 105.7 | 101.5 | 105.5 | 103.3 | 102.2 | 101.8 |
| 103.5 | 104.4 | 92.7 | 90.9 | 99.4 | 96.7 |
| 103.2 | 102.1 | 90.1 | 89.2 | 91.5 | 87.9 |
| 102.8 | 100.8 | 88.5 | 85.2 | 89.7 | 84.0 |
| 101.8 | 104.1 | 73.6 | 72.3 | 75.2 | 72.0 |
| 101.3 | 101.0 | 51.6 | 54.2 | 74.3 | 71.5 |
| 101.1 | 102.3 | 44.0 | 43.9 | 62.1 | 58.5 |
| 100.8 | 100.1 | 18.0 | 21.1 | 45.9 | 47.4 |
| 99.9 | 102.4 | 15.7 | 18.2 | 42.0 | 43.5 |
| 90.1 | 88.2 | | | 25.9 | 27.6 |
| 84.8 | 86.1 | | | | |
| 76.6 | 77.6 | | | | |
| 38.2 | 43.7 | | | | |
| 37.0 | 39.3 | | | | |
| 31.4 | 26.6 | | | | |

應用HPLC方法測定Cloxacillin原料藥及其製劑之力價

為進一步得知本HPLC法是否可取代微生物法測定cloxacillin各劑型之力價，以同一檢品同時進行HPLC法及微生物為配對，並用統計學上之paired-t test¹³來分析兩組數據，表四為原料藥之配對實驗數值，結果顯示，以二種方法所測得之配對數據，於95%可信度範圍(confidence level)並不具統計上之明顯差異(no statistically significant difference, $P>0.05$)。表五為cloxacillin膠囊(250mg)、注射劑(250mg/vial)、糖漿(125mg/5ml)檢品及其熱分解檢品之配對實驗數值，結果顯示，以二種方法所測得之配對數據，於99%可信度範圍並不具統計上之明顯差異。

圖三係cloxacillin膠囊(250mg)配對實驗數值之相關性；以微生物法所測得之力價為橫軸，HPLC法測得之力價為縱軸，依線性迴歸分析所得之方程式為 $Y = 2.0188 + 0.9750x$, $r = 0.9941$ 。圖四係cloxacillin注射劑(250mg/vial)配對實驗數值之相關性；以微生物法所測得之力價為橫軸，HPLC法測得之力價為縱軸，依線性迴歸分析所得之方程式為 $Y = 3.5188 + 0.9463x$, $r = 0.9988$ 。圖五係cloxacillin糖漿(125mg/5ml)配對實驗數值之相關性；以微生物法所測得之力價為橫軸，HPLC法所測得之力價為縱軸，依線性迴歸分析所得之方程式為 $Y = 1.4395 + 0.9608x$, $r = 0.9966$ 。由以上結果可知，不同劑型所得之相關方程式亦不同。這些方程式亦可作為品質管制或安定性研究用。

結 論

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法則只要在6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，以HPLC測定一檢品之力價也比微生物法測定便宜，考量實驗精確性、時間、人力與財力，本HPLC法確可取代微生物法以測定cloxacillin各劑型之力價。

誌 謝

本局感謝台灣必治妥股份有限公司及中國化學製藥股份有限公司慨贈原料藥。

參考文獻

- 1.Thijssen, H. H. W. 1980. Analysis of isoxazolyl penicillins and their metabolites in body fluids by HPLC, *J. of Chromatogr.* 183 : 339-345.
- 2.Brunetta, A., L. Mosconi, S. Pongiluppi, U. Scagnolari and G. Zambonin. 1981. Chemical and microbiological determination of cephalexin and sodium flucloxacillin in combination, following separation by HPLC, *Boll Chim Farm.* 120 : 335-342.
- 3.Teare, F. W., R. H. Kwan, M. Spino and S. M. Mac Leod. 1982. High-pressure liquid chromatographic assay of cloxacillin in serum & urine. *J. of Pharm. Sci.* 71(8) : 938-941.
- 4.Moats, W. A. 1984. Determination of penicillin G and cloxacillin residues in beef & pork tissue by HPLC. *J. of Chromatogr.* 317 : 311-318.
- 5.Paton, D. M. 1986. Comparative bioavailability and half-lives of cloxacillin flucloxacillin. *J. of Clin. Pharmacol. Reas.* 6 : 347-349.
- 6.Jehl, F., P. Birckel and H. Monteil. 1987. Hospital routine analysis of penicillins, third-generation cephalosporins and aztreonam by conventional and high speed high performance liquid chromatography. *J. of Chromatogr.* 413 : 109-119.
- 7.Abuirjeie, M. A. and M. E. Abdel Hamid. 1988. Simultaneous high-pres-

應用HPLC方法測定Cloxacillin原料藥及其製劑之力價

- sure liquid chromatographic analysis of ampicillin and cloxacillin in serum and urine, *J. Clin. Pharm. ther.* 13 : 101-108.
8. Hung, C. T., J. K. Lim, A. R. Zoest, and F. c. Lam. 1988. Optimization of high-performance liquid chromatographic analysis for isoxazolyl penicillins using factorial design. *J. of Chromatogr.* 425 : 331-341.
9. Briguglio, G. T. and C. A. Lau-Cam. 1984. Separation and identification of nine penicillins by reverse phase liquid chromatography. *Associ. of Analyt. Chem.* 67 : 228-231.
10. Lauroault, G., M. J. Lebelle and A. Vilim . 1982 : High-performance liquid chromatographic determination of cloxacillin in pharmaceutical dosage forms, *J. of Chromatogr.* 246 : 157-160.
11. Code of Federal Regulations. 1988. Title 21, Part 440. U. S. Government Printing Office, Wastington. D. C.
12. Minimum Requirements for Antibiotic Products of Japan. 1986. Japan Antibiotics Research Association.
13. Colton, T., *Statistics in medicine.* 1974. Little, Brown and Company Boston, Massachusetts 02106.

DETERMINATION OF CLOXACILLIN PREPARATIONS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

MEI-CHAI CHENG AND MEI-CHICH HSU

DIVISION OF PHARMACOBIOLOGY

ABSTRACT

A reverse-phase liquid chromatographic (RP-LC) method was developed for the assay of cloxacillin in bulk drug and pharmaceutical preparations. The samples were analysed on a μ -Bondapak (C_{18}) column with a mobile phase of methanol - 4% acetic acid (60:40) at a flow-rate of 1.5 ml/min and UV absorbance detection at 254 nm. Equations were presented for linear relationships between peak area ratios of cloxacillin to dimethylphthalate (internal standard) and the cloxacillin concentration over a range of 2-30 μ g/ml ($r=0.9998$). Standard addition recoveries were generally greater than 98%

with all dosage forms. The coefficient of variation was less than 0.2%. Furthermore, cloxacillin formulations were assayed by microbiological and RP-LC methods to determine whether the RP-LC analytical method is a suitable substitute for the microbiological method. Paired assay results by the two analytical methods were obtained from capsule, syrup, and degraded compounds. The results indicated that the RP-LC method is a suitable substitute for the microbiological method for potency assays and stability studies of cloxacillin formulations.