

應用HPLC方法測定Dicloxacillin 原料藥及其製劑之力價

范燕珍 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Dicloxacillin之原料藥及其膠囊製劑之力價，簡單、迅捷且具特異性。使用 μ -Bondapak C_{18} 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 $Y = 0.0235 + 0.1097X$ ，相關係數 $r = 0.9999$ (濃度範圍為0.2~3.0mg/ml)。模擬市售Dicloxacillin 250mg及125mg膠囊處方，所得之平均回收率分別為99.77%及99.60%。重覆注射同一濃度之Dicloxacillin標準品溶液，所測得之變異係數(C.V.)為0.24%，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Dicloxacillin製劑之力價，Dicloxacillin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，250mg及125mg膠囊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Dicloxacillin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dicloxacillin之HPLC法被報導¹⁻⁴，除此之外，Lauriault等人⁵曾以HPLC法分離dicloxacillin及其酸鹼之分解產物；Briguglio等人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 Regul-

ation⁷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，日本抗生物質醫藥品基準解說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學法所得之結果為主。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

應用HPLC方法測定Dicloxacillin原料藥及其製劑之力價

種值得信賴、準確、省時又簡單的高效液相層析法來分析dicloxacillin原料藥及各劑型之檢體。

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Dicloxacillin sodium house standard,力價923.6 μ g/mg。

(三)原料藥：必美股份有限公司提供不同批號之dicloxacillin sodium原料藥四件，中國化學製藥廠提供不同批號之原料藥三件，總共取得不同批號之dicloxacillin sodium原料藥共七件。

(四)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。

二、檢體之處理：

將兩種膠囊製劑貯藏於室溫或55~150 $^{\circ}$ C之烘箱中，每隔一段時間取出，置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之貯備溶液，再以蒸餾水溶解並稀釋成每ml含1mg dicloxacillin(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 128,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dicloxacillin 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1ml、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，使成為含有dimethylphthalate 0.3mg/ml及dicloxacillin各為0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.5mg/ml、1.0mg/ml、1.5mg/ml、2.0mg/ml、2.5mg/ml、3.0mg/ml八種混合標準品溶液。

(六)模擬檢體溶液：

1.模擬250mg膠囊：依照模擬檢體之處方(表一)，精確稱取除dicloxacillin sodium以外一百倍量之各成份置於研鉢中，研成均勻細粉後，取此混合物細粉三份，每份約20.5mg，精確稱定，再各加入125mg,250mg,375mg(力價)(即實際檢體處方中用量之50%,100%,150%)之dicloxacillin標準品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，使成為含有dimethylphthalate 0.3mg/ml及dicloxacillin各為0.5mg/ml,1.0mg/ml及1.5mg/ml之溶液。

2.模擬125mg膠囊：精確稱取其賦形劑(表一)混合物細粉三份，每份約100mg，精確稱定，再各加入62.5mg,125mg,187.5mg(力價)(即實際檢體處方中用量之50%,100%,150%)之dicloxacillin標準品，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，使成為含有dimethylphthalate 0.3mg/ml及di-

cloxacillin各為0.5mg/ml,1.0mg/ml及1.5mg/ml之溶液。

四、微生物法(Microbiological Assay)：

依據MRAP⁸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1%磷酸鉀緩衝液(pH6.0)稀釋至最終濃度為10μg/ml及2.5μg/ml二種濃度。每件檢品使用5個平碟,於32~35°C培養箱中培養16~18個小時後,測量其抑制圈直徑,所得之值以下列公式計算力價。

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

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

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

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

UH：檢品濃度30μg/ml所測得之抑制圈直徑
 UL：檢品濃度7.5μg/ml所測得之抑制圈直徑
 SH：標準品濃度30μg/ml所測得之抑制圈直徑
 SL：標準品濃度7.5μg/ml所測得之抑制圈直徑

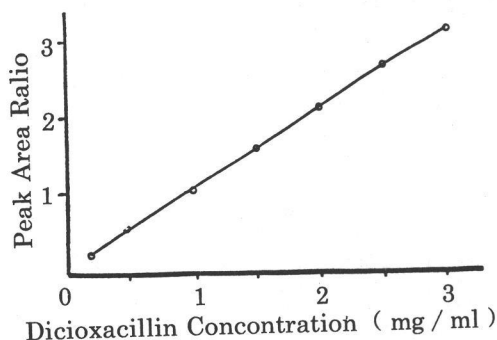
結果與討論

圖一係以dicloxacillin標準品濃度為橫軸,各dicloxacillin濃度與dimethylphthalate波峰面積之比值(peak area ratio)為縱軸,依線性迴歸分析(Linear regression analysis)⁹所得之方程式($Y = 0.0235 + 0.1097X$, $r = 0.9999$)繪製而成的標準曲線,線性範圍從0.2mg/ml到3.0mg/ml。

於dicloxacillin標準曲線之線性範圍內,擇1.0mg/ml之dicloxacillin標準品溶液,每次注射10μl,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0.27%,變異係數(Coefficient of

表一 市售Dicloxacillin膠囊之處方

250 mg capsule	
Dicloxacillin (sodium monohydrate)	250.0mg
Magnesium Stearate	10.5mg
Lactose	10.0mg
125 mg capsule	
Dicloxacillin (sodium monohydrate)	125.0mg
Magnesium Stearate	5.24mg
Lactose	q.s. ad. 225.0mg



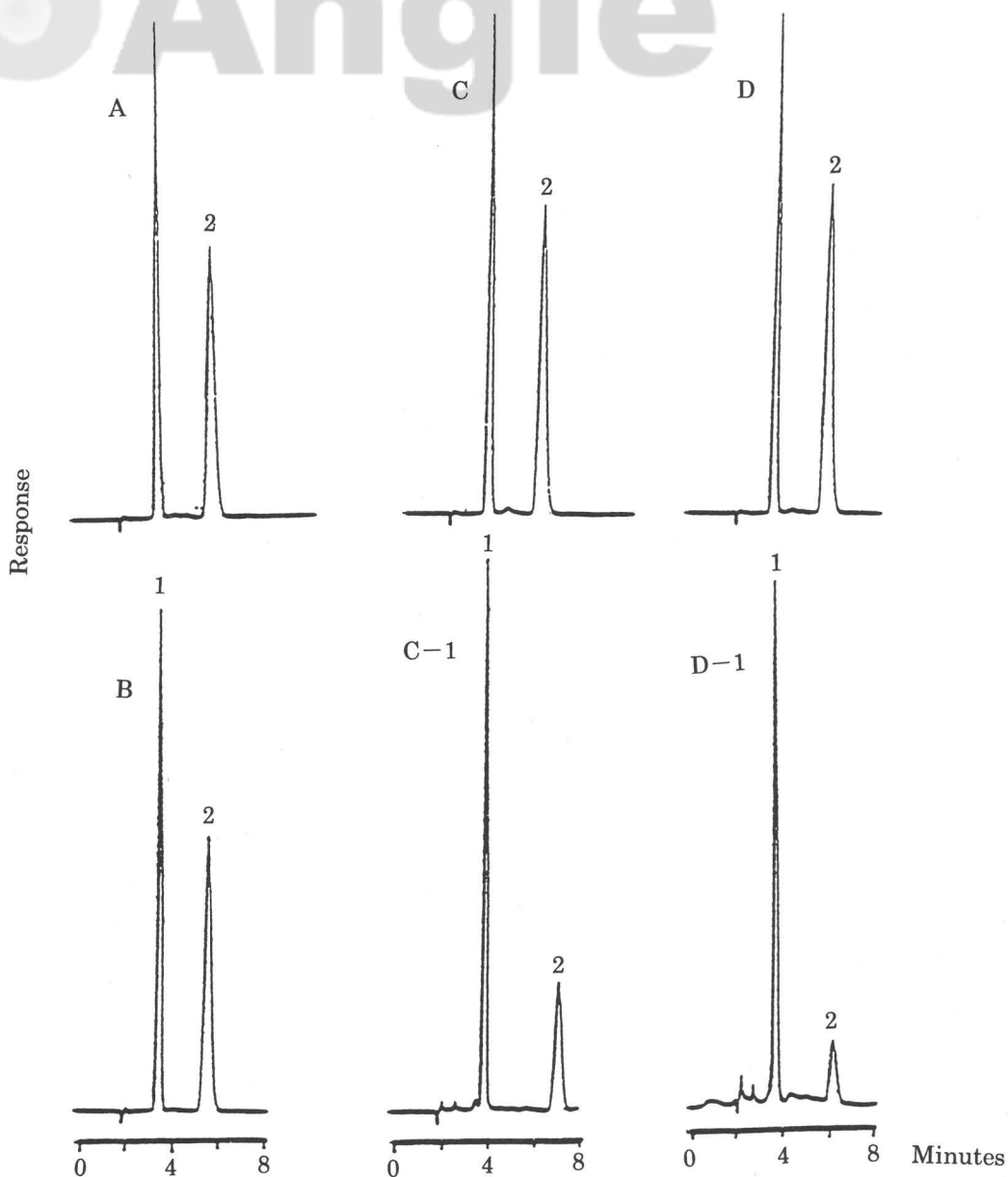
圖一 Dicloxacillin之標準曲線,依線性迴歸分析所得直線方程式為 $y = 0.0235 + 0.1097X$,相關係數 $r = 0.9999$

variation) 為0.24%,顯示其再現性(Reproducibility)良好。

表一為市售250mg及125mg膠囊劑之模擬檢體處方;於250mg膠囊之賦形劑中,各加入125mg, 250mg, 375mg(力價)之dicloxacillin標準品(即實際檢體處方中用量之50%, 100%, 150%)所測得之回收率分別為101.2%, 98.4%, 99.7%;平均回收率為99.77%,如表二所示。而於125mg膠囊之賦形劑中,各加入62.5mg, 125mg, 187.5mg(力價)之dicloxacillin標準品(即實際檢體處方中用量之50%, 100%, 150%),所測得之回收率分別為99.74%, 100.51%, 98.55%;平均回收率為99.60%(表二)。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存在及數量改變而受影響。

各類dicloxacillin製劑之層析圖示於圖

應用HPLC方法測定Dicloxacillin原料藥及其製劑之力價



圖二 Dicloxacillin製劑之圖譜。(A)局內標定之標準品(B)原料藥(C)250mg膠囊(c-1)熱分解之250mg波峰1。表示dimethylphthalate，波峰之表示dicloxacillin

二,以dimethylphthalate為內部對照標準品,針對dicloxacillin之各類製劑進行分析,包括:局製備標準品、原料藥、250mg膠囊製劑,125mg膠囊製劑及在溫控下以熱分解之250mg膠囊製劑,125mg膠囊製劑。dimethyl

phthalate滯留時間約為3.5分鐘。dicloxacillin之滯留時間皆約為6分鐘。綜觀前述,顯示本法可適用於dicloxacillin各種劑型之分析。

為進一步得知本HPLC法是否可取代微生物法測定dicloxacillin各劑型之力價,以同一

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLFD)

表二 市售Dicloxacillin膠囊之回收率

Added (mg)	Found (mg)	Rec. (%)	Average Recovery %
250mg / capsule			
135.3	136.92	101.2	
270.7	266.37	98.4	99.77
406.0	404.78	99.7	
125mg / capsule			
67.7	67.52	99.74	
135.3	135.99	100.51	99.60
203.0	200.06	98.55	

表三 Dicloxacillin原料以微生物法及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	923.6	923.6	
USP Standard	972.6	971.3	
Manufacturer 1	A	917.2	920.7
	B	941.4	940.7
	C	873.0	884.2
	D	828.0	805.2
Manufacturer 2	A	938.0	934.2
	B	935.0	926.0
	C	940.0	949.6

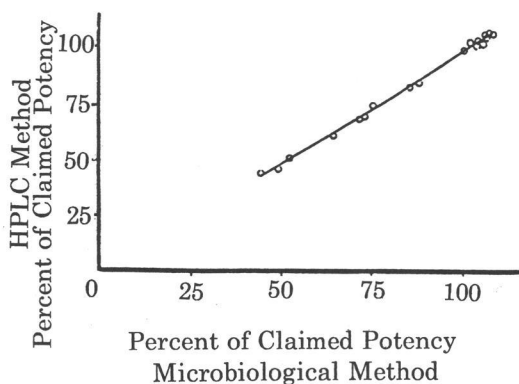
*Average of five determinations.

**Average of triplicate determinations.

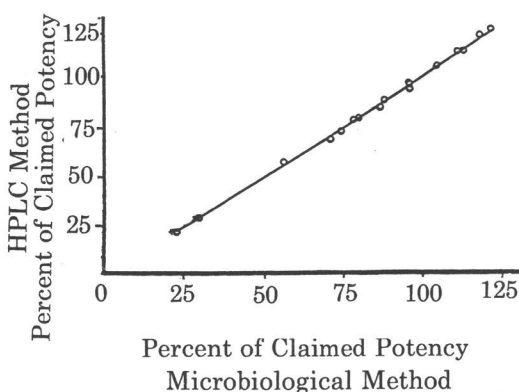
應用HPLC方法測定Dicloxacillin原料藥及其製劑之力價

表四 Dicloxacillin膠囊製劑以微生物法及高效液相層析法測定力價之比較

% of Claim			
250mg		125mg	
Microbiological Method	HPLC Method	Microbiological Method	HPLC Method
104.3	104.1	121.0	121.7
101.9	102.8	112.2	110.7
101.6	100.5	110.2	110.8
106.0	105.9	117.2	118.7
103.5	101.4	103.7	103.5
105.1	106.2	95.4	94.3
105.0	105.9	95.1	95.2
99.8	102.0	87.5	87.3
63.1	61.0	86.2	84.4
71.4	69.1	95.3	92.4
103.9	105.0	78.8	79.3
98.2	99.1	77.9	78.2
70.2	68.7	74.0	72.5
83.5	83.4	70.6	67.8
73.5	75.0	55.7	56.7
51.5	51.2	29.6	28.3
86.2	84.8	22.7	20.9
48.5	46.1		
43.6	44.6		



圖三 以微生物法及高效液相層析法測定250mg dicloxacillin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 $y = -2.1838 + 1.0231x$ ，相關係數 $r = 0.9981$



圖四 以微生物法及高效液相層析法測定125mg dicloxacillin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 $y = -1.9519 + 1.0159x$ ，相關係數 $r = 0.9990$

檢品同時進行HPLC法及微生物為配對，並用統計學上之paired-t test⁹來分析兩組數據。表三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99%可信度範圍(Confidence level)並不具統計上之明顯差異(no statistically significant difference, $P > 0.01$)。表四為dicloxacillin 250mg膠囊、125mg膠囊檢品及其熱分解檢品之配對數據，於99%可信度範圍並不具統計上之明顯差異。($P > 0.01$)。

圖三係dicloxacillin 250mg膠囊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 $Y = -2.1838 + 1.0231X$, $r = 0.9981$ 。

圖四係dicloxacillin 125mg膠囊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 $Y = -1.9519 + 1.0159X$, $r = 0.9990$ ，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，且特异性不高，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，特异性、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，HPLC法確可取代微生物法以測定dicloxacillin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 meta-

- bolites in body fluids by HPLC. *J. Chromatogr.* 183 : 339-345.
- 2.Tshji, A., T., Yoshikawa, K., Nishide, H., Minami, M., Kimura, E., Nakashima, T., Terasaki, E., Miyamoto, C. H., Nightingale, & T. Yamana, 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., T., Nakagawa, K., Yamaoka, & T. Uno. 1984. Comparative pharmacokinetics of dicloxacillin and ampicillin between individual and combined doses. *J. Pharmacobiodyn.* 7 : 33-42.
- 4.Hung, C. T., J. K. Lin, A. R., Zoest, & F. C. Lam, 1988. Optimization of high-performance liquid chromatographic analysis for isoxazolyl penicillins using factorial design. *J. Chromatogr.* 425 : 331-341.
- 5.Lauriault, G., D. V. C. Awang, & D. Kindack, 1984. High-performance liquid chromatographic determination of dicloxacillin in presence of its degradation products. *J. Chromatography.* 283 : 449-452.
- 6.Briguglio, G. T., & C. A. Lau-Cam, 1984. Separation and identification of nine penicillins by reverse phase liquid chromatography. *Assoc. 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.Colton, T., Statistics in medicine. 1974. Little, Brown and Company Boston, Massachusetts 02106.

應用HPLC方法測定Dicloxacillin原料藥及其製劑之力價



DETERMINATION OF DICLOXACILLIN PREPARATIONS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

YANN-JEN FANN AND MEI-CHICH HSU

DIVISION OF PHARMACOBIOLOGY

ABSTRACT

A reverse-phase liquid chromatographic(RP-LC) method was developed for the assay of dicloxacillin in bulk drug and pharmaceutical preparations. The samples were analyzed on a μ -Bondapak (C_{18}) column with a mobile phase of methanol-4 % acetic acid (60:40) at a flow-rate of 1.5ml / min and UV absorbance detection at 254nm. Equations were presented for linear relationships between peak area ratios of dicloxacillin to dimethylphthalate(internal standard) and the dicloxacillin concentration over a range of 0.2-30 mg/ml ($r=0.9999$). Standard addition recoveries were generally greater than 98.4% with all dosage forms. The coefficient of variation was less than 0.24%.

Furthermore, dicloxacillin formulations were assay 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, formulations containing dicloxacillin and degraded dicloxacillin. Statistical tests were used to assess the equivalence of the paired assay results. The data showed there was no statistically significant difference in mean potency of dicloxacillin bulk drug and pharmaceutical preparations when compared the results obtained from the two methods. The results indicated that the RP-LC method is a suitable substitute for the microbiological method for potency assays and stability studies of dicloxacillin formulations.