

利用高效液相層析法分析定量 Quinolone 類抗菌劑

陳玉盆 邵清益 張柏林

行政院衛生署藥物食品檢驗局

摘 要

本文提供一簡單、快速之逆相高效液相層析法，可同時鑑別六種 quinolone 類藥物：cinoxacin, nalidixic acid, pipemidic acid, ofloxacin, pefloxacin 及 ciprofloxacin。

本法採用之分析管柱為 Cosmosil 5C₁₈-MS column (25cm x 4.6 mm)，移動相為 3mM sodium lauryl sulfate /CH₃OH: 40 mM phosphate buffer : CH₃CN (25:55:20) 混液，以磷酸調整 pH 值至 3.50，移動相之流速為 0.8 mL/min，以波長 257 nm 之紫外光偵測。

本法以 piroxicam 為內部標準品可以於 40 分鐘內完全分離上述之六種 quinolone 類藥物，經確效結果，分離度 separation factor (α) 為 1.14~2.89，cinoxacin 濃度於 1 μ g/mL ~50 μ g/mL 間，其他五種成分濃度於 5 μ g/mL ~100 μ g/mL 間之線性關係良好，其精密度及準確度頗佳，應用此方法亦可檢測市售檢體，可快速分析定量該類藥物及製劑。

關鍵詞：高效液相層析法、Quinolone 類抗菌劑。

前 言

Quinolone 類抗菌劑為一新型之化學消炎殺菌劑，其抗菌作用較一般抗生素、磺胺劑或其他藥物為強，且無抗藥病菌或交叉抗藥病菌之慮。此類化合物對嗜氧葛蘭氏陰性菌及許多葛蘭氏陽性菌具極高之抗菌能力，其作用機轉是抑制細菌之 DNA gyrase，亦即 Topoisomerase II，因此干擾細菌 DNA 之合成、修補、重組以及互換。臨床上，用於治療尿道感染、胃腸道感染及預防手術感染⁽¹⁾。

因為其口服有效，並具有卓越之治療效果及較小的副作用，近年被快速的發展，更常見於查驗登記案件，此類藥物結構均很類似，具有 carboxylic acid 及 quinolone 兩基團，由於許多不明成分之案件中時有發現該類成分，雖然 quinolone 類抗菌劑均已有個別之 HPLC 分析方法^(2~8)，但未見有應用一次 HPLC 分析，即可快速鑑定下述六種成分的方法，基於業務上之

需要，本研究擬尋找利用 HPLC 同時分析定量 cinoxacin、nalidixic acid、pipemidic acid、ofloxacin、pefloxacin 及 ciprofloxacin 六種成分之方法。

本研究報告係採用逆相高效液相層析法，移動相中加入離子配對劑，以紫外光分光光度器偵測，同時分離上述六種 quinolone 類抗菌劑並定量之。

材料與方法

本研究所採用液相層析儀，係 Waters Model 600E System Controller、Waters Model 510 Pump、Waters Model 745B Data Model、Waters 484 Tunable Absorbance Detector 及 Spectra-Physics ChromaJet Integrator。液相層析管為 Cosmosil 5C₁₈-MS column (25cm x 4.6 mm I.D.) Nacalai tesque Inc. 之產品。溶媒淨化組件：Milli-Q Waters Purification System

Table 1. The standard curves of Quinolones

Quinolones	Conc. of Standard Solutions ($\mu\text{g/mL}$)	Regression Lines	r^2
Cinoxacin	1, 5, 10, 20, 30, 50	$y=0.129x-0.012$	0.9999
Nalidixic Acid	5, 10, 20, 30, 50, 100	$y=0.116x-0.107$	0.9998
Pipemidic Acid	5, 10, 20, 30, 50, 100	$y=0.114x-0.194$	0.9999
Ofloxacin	5, 10, 20, 30, 50, 100	$y=0.031x-0.050$	0.9994
Pefloxacin	5, 10, 20, 30, 50, 100	$y=0.040x-0.070$	0.9996
Ciprofloxacin	5, 10, 20, 30, 50, 100	$y=0.047x-0.066$	0.9999

*Piroxicam (25 $\mu\text{g/mL}$) used as internal standard**Table 2.** Precision and reproducibility

Cinoxacin	ADDED ($\mu\text{g/mL}$)	FOUND($\mu\text{g/mL}$)	MEAN $\pm$ SD	C.V.
Interday(n=5)	7.5	7.3, 7.6, 7.7, 7.5, 7.5	7.52 $\pm$ 0.13	1.80%
	25.0	25.0, 24.8, 24.7, 25.0, 25.1	24.92 $\pm$ 0.15	0.58%
	40.0	40.7, 39.7, 39.8, 39.9, 40.0	40.02 $\pm$ 0.35	0.88%
Intraday(n=3)	7.5	7.5, 7.5, 7.6	7.53 $\pm$ 0.05	0.60%
	25.0	25.0, 25.0, 24.9	24.96 $\pm$ 0.05	0.20%
	40.0	40.0, 39.9, 39.8	39.90 $\pm$ 0.08	0.20%
Nalidixic Acid	ADDED ($\mu\text{g/mL}$)	FOUND($\mu\text{g/mL}$)	MEAN $\pm$ SD	C.V.
Interday(n=5)	15.0	15.2, 15.3, 15.0, 14.8, 15.5	15.16 $\pm$ 0.24	1.60%
	40.0	40.8, 40.0, 40.3, 38.6, 39.4	39.82 $\pm$ 0.76	1.90%
	80.0	80.6, 80.3, 80.0, 79.2, 79.5	79.92 $\pm$ 0.51	0.60%
Intraday(n=3)	15.0	15.0, 14.9, 15.2	15.03 $\pm$ 0.12	0.80%
	40.0	40.5, 40.0, 39.6	40.03 $\pm$ 0.37	0.90%
	80.0	80.0, 80.3, 80.2	80.17 $\pm$ 0.12	0.20%
Pipemidic Acid	ADDED ($\mu\text{g/mL}$)	FOUND($\mu\text{g/mL}$)	MEAN $\pm$ SD	C.V.
Interday(n=5)	15.0	15.4, 14.8, 15.0, 15.6, 15.2	15.20 $\pm$ 0.28	1.80%
	40.0	39.6, 39.9, 39.2, 38.9, 40.1	39.54 $\pm$ 0.44	1.10%
	80.0	80.4, 79.9, 79.4, 80.1, 79.6	79.88 $\pm$ 0.35	0.40%
Intraday(n=3)	15.0	15.0, 14.9, 15.2	15.00 $\pm$ 0.12	0.80%
	40.0	39.9, 40.1, 39.3	39.70 $\pm$ 0.31	0.80%
	80.0	80.1, 79.9, 79.5	79.80 $\pm$ 0.24	0.30%

Table 2. Continued

Ofloxacin	ADDED ($\mu\text{g/mL}$)	FOUND($\mu\text{g/mL}$)	MEAN $\pm$ SD	C.V.
Interday(n=5)	15.0	15.2,14.9,15.0,15.1,15.1	15.06 $\pm$ 0.10	0.70%
	40.0	38.9,39.8,39.2,39.4,39.7	39.40 $\pm$ 0.32	0.80%
	80.0	80.4,79.9,79.2,80.3,79.5	79.86 $\pm$ 0.46	0.60%
Intraday(n=3)	15.0	15.0,14.8,15.1	14.97 $\pm$ 0.12	0.80%
	40.0	39.8,39.6,39.7	39.70 $\pm$ 0.08	0.20%
	80.0	80.3,79.9,79.4	79.86 $\pm$ 0.37	0.50%
Pefloxacin	ADDED ($\mu\text{g/mL}$)	FOUND($\mu\text{g/mL}$)	MEAN $\pm$ SD	C.V.
Interday(n=5)	15.0	15.3,14.9,15.5,15.2,14.8	15.14 $\pm$ 0.25	1.70%
	40.0	39.9,39.5,39.0,39.6,38.9	39.38 $\pm$ 0.38	0.96%
	80.0	80.0,79.8,79.6,81.2,78.9	79.90 $\pm$ 0.74	0.94%
Intraday(n=3)	15.0	15.0,14.9,14.7	14.90 $\pm$ 0.12	0.80%
	40.0	39.9,39.6,39.7	39.70 $\pm$ 0.12	0.30%
	80.0	80.0,79.9,79.8	79.90 $\pm$ 0.08	0.10%
Ciprofloxacin	ADDED ($\mu\text{g/mL}$)	FOUND($\mu\text{g/mL}$)	MEAN $\pm$ SD	C.V.
Interday(n=5)	15.0	15.3,14.9,15.4,15.2,15.0	15.20 $\pm$ 0.18	1.20%
	40.0	39.9,38.9,39.0,39.3,38.9	39.20 $\pm$ 0.38	0.96%
	80.0	80.0,79.8,79.6,81.0,79.2	79.92 $\pm$ 0.60	0.80%
Intraday(n=3)	15.0	15.0,14.9,15.2	15.03 $\pm$ 0.12	0.80%
	40.0	39.9,39.5,39.7	39.70 $\pm$ 0.16	0.40%
	80.0	80.0,79.9,80.2	80.03 $\pm$ 0.12	0.20%

(Milli-pore Corp.)。HPLC 移動相：(A)、3 mM sodium lauryl sulfate solution：稱取 432 mg 之 sodium lauryl sulfate，加入甲醇 500 mL。(B)、40 mM 磷酸二氫鉀溶液：稱取 5.44 gm 之磷酸二氫鉀，溶於 1000 mL 之水中。取 3 mM sodium lauryl sulfate solution 250 mL，加 40 mM 磷酸二氫鉀溶液 550 mL 及氘甲烷 200 mL，混勻後以磷酸調 pH 值至 3.50，並以 Milli Q 溶媒淨化設備過濾後，置超音波中波浴除氣，是為移動相溶媒。

甲醇 (LC 級) 及氘甲烷 (LC 級) 購自皓峰公司、磷酸二氫鉀 (試藥特級) 購自默克公司、sodium lauryl sulfate (試藥特級) 則採用 Sigma 公司之產品。cinoxacin 標準品由 "U.K." Lilly 公司提供、nalidixic acid 標準品由 "U.S.A." Winthrop 公司提供、pipemidic acid 標準品由

"Japan" Dainippon 公司提供、ofloxacin 標準品由 "Japan" Daiichi 公司提供、pefloxacin mesylate dihydrate 標準品由 "France" Bellon 公司提供、ciprofloxacin 標準品由 "U.K." Bayer 公司提供、piroxicam 標準品由 "U.S.A." Pfizer 公司提供。寧佳得錠 (含 nalidixic acid 500 mg) 購自 Winthrop 公司、樂必康錠 (含 pipemidic acid 250 mg) 購自永吉公司、歐伏菌膜衣錠 (含 ofloxacin 100 mg) 購自華興公司、必效新膜衣錠 400 mg (含 pefloxacin 400 mg) 購自 Bellon 公司、司淨膜衣錠 250 mg (含 ciprofloxacin 250 mg) 購自永信公司。

稱取適量之 piroxicam，以甲醇溶解，並稀釋至 1 mg/mL，作為內部標準品貯存溶液。

各別稱取適量之 nalidixic acid、pipemidic acid、ofloxacin、pefloxacin、ciprofloxacin，以

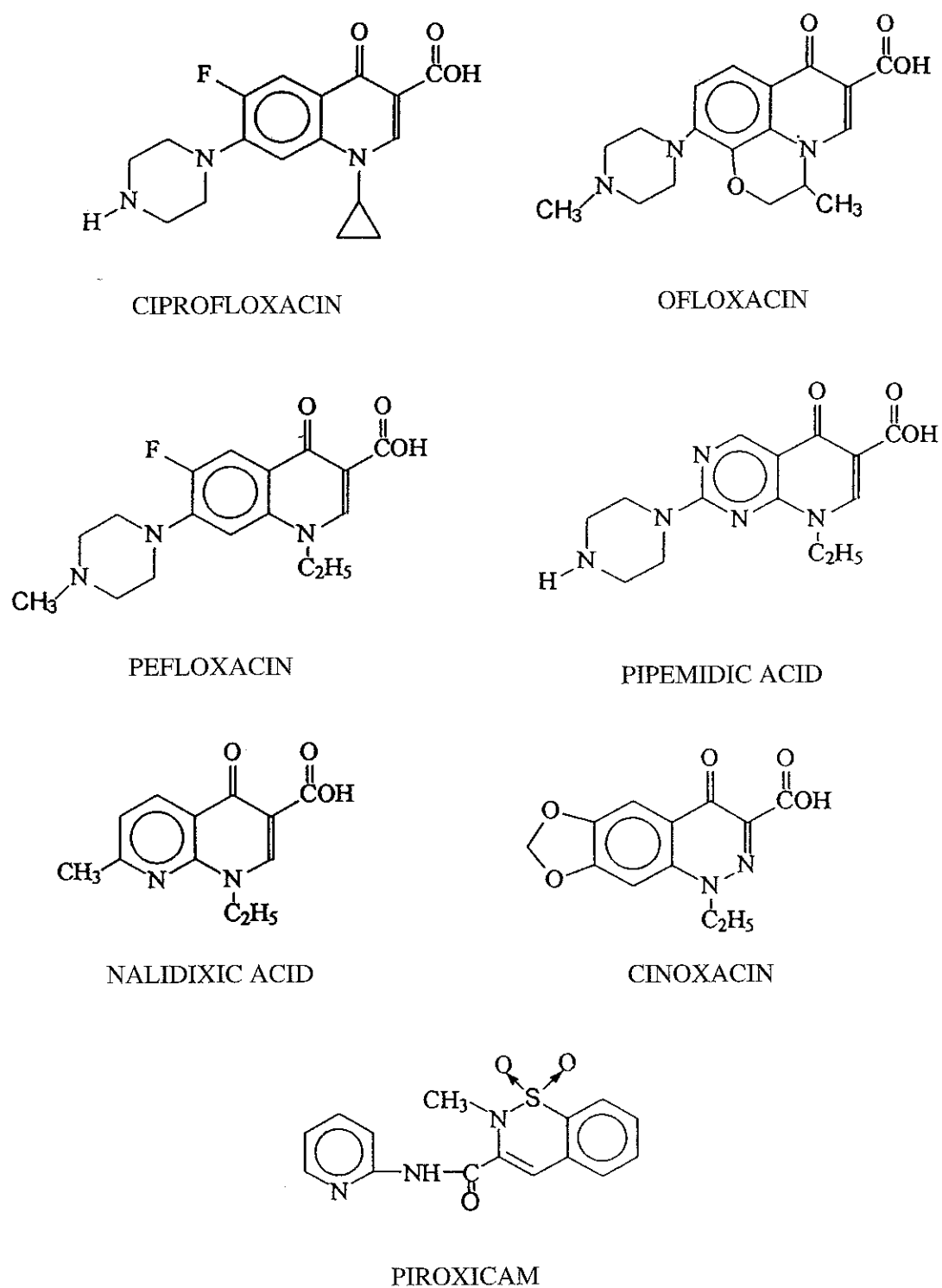


Figure 1. The structures of six Quinolones and Piroxicam.

甲醇溶解，並稀釋至 1 mg/mL，作為標準品貯存溶液。

稱取適量之 cinoxacin，以甲醇溶解，並稀釋至 0.25 mg/mL，以上述標準品貯存溶液依表一，所列各成分之六種濃度，精確量取，並加入內部標準品貯存溶液，使濃度成 25 μ g/mL，調配成標準品溶液。取上述各成分之六種不同濃度標準品溶液 20 μ L，分別注入高效液相層析儀分析，重覆六次，求各標的成分與內部標準品面積比值之平均值，並以濃度對面積比作圖，以統計學方法求出檢量線之線性迴歸方程式及相關係數。

分別測試如表二，所列之三種濃度，每天製作三組，計算其同日內數據之標準偏差 (S.D.) 及變異係數 (C.V.)，同樣方法分別測試五天，計算異日間數據之標準偏差 (S.D.) 及變異係數 (C.V.)，了解該方法之精密性及準確性。

以收集之市售固型製劑 (錠劑、膜衣錠) 之檢體五種，依照標準品添加法 (standard addition method)，依其成分含量之 0.25 倍、0.5 倍及 1 倍添加入標準品，調配適當濃度，並加入內部標準品貯存溶液，使濃度成 25 μ g/mL，是為檢品溶液，取上述各種檢品溶液

20 μ L，分別注入高效液相層析儀分析，重覆三次，由各標的成分與內部標準品面積比值，求出檢體中主成分實際含量，比照檢體標誌含量，計算其回收率。

結果與討論

本研究使用之六種 quinolone 類抗菌劑依結構分類：一、piperazine 類衍生物：ofloxacin、pefloxacin、ciprofloxacin、pipemidic acid。二、其他衍生物：cinoxacin、nalidixic acid 等。此類抗菌劑均具有 carboxylic acid 官能基，皆具有酸性，其化學結構如圖一。經查文獻大多應用逆相高效液相層析法分析之，因此採用 Cosmosil 5C₁₈-MS column，該管柱之固定相 endcapping 較完全(carbon content ca.16%)且金屬離子不純物較少，分析物之波峰不易拖曳(tailing)⁽⁹⁾，有別於傳統之 C₁₈ 管柱，本試驗為多成分之分析，使用此種管柱比傳統之 C₁₈ 管柱解析度為佳，研究中曾先採用一般之 C₁₈ 管柱，但分離效果欠佳。

移動相之選定乃分別測試各種溶媒強度、pH 值、緩衝溶液濃度及離子配對劑濃度對六種 quinolone 類抗菌劑之容量因素(capacity fac-

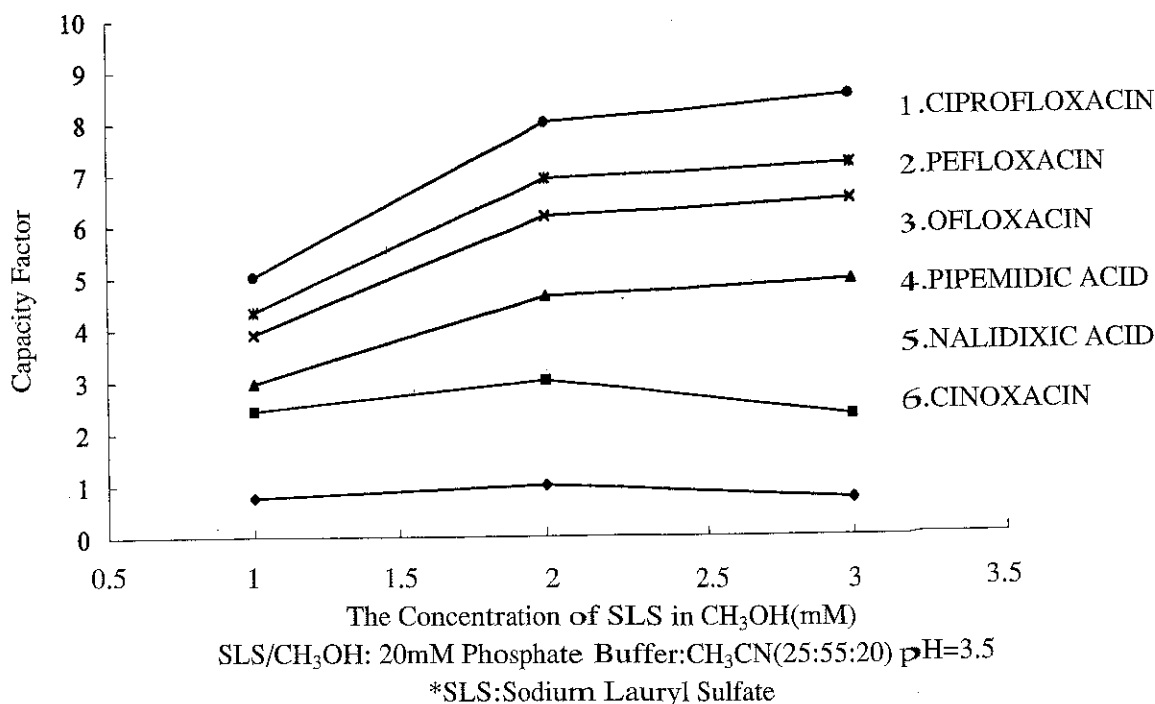


Figure 2. The effect of SLS concentration on capacity factor.

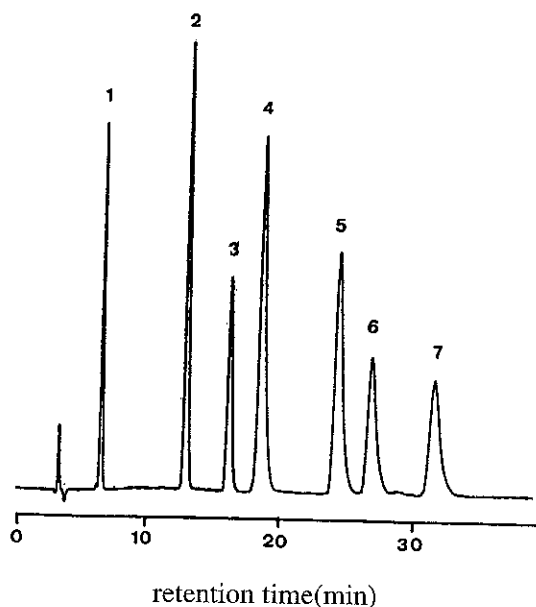
Table 3. The effect of SLS concentration in CH₃OH on capacity factor
SLS/CH₃OH:20mM phosphate buffer:CH₃CN(25:55:20)

SLS conc.	Cinoxacin	Nalidixic acid	Pipemidic acid	Ofloxacin	Pefloxacin	Ciprofloxacin
1mM	0.76	2.44	2.96	3.90	4.33	5.01
2mM	1.00	3.01	4.62	6.17	6.90	8.00
3mM	0.72	2.32	4.92	6.49	7.18	8.51

SLS*:Sodium Lauryl Sulfate

tor (k') 及分離因子 (separation factor (α)) 之影響，以期開發一最適當之分離條件。磷酸鹽緩衝溶液濃度對各成分之滯留時間影響不大，但影響其波峰形狀：磷酸鹽緩衝溶液濃度較低者，使檢品之波峰有拖曳之現象，磷酸鹽緩衝溶液濃度越高，波形越窄峭。經測試結果以 40 mM 磷酸鹽緩衝溶液之分離因子(separation factor(α)) 最佳，且可獲得對稱之波形。由於以甲醇與磷酸鹽緩衝溶液或以氘甲烷與磷酸鹽緩衝溶液二種混合溶媒之移動相，亦無法將此六種quinolone類抗菌劑完全分離，文獻中有採用離子配對劑者，例如：PIC B7⁽⁹⁾...等，因此嘗

試以氘甲烷、磷酸鹽緩衝溶液及甲醇中添加入各種不同離子配對劑之移動相以不同比例測試之，結果採用sodium lauryl sulfate，終於將六種 quinolone類抗菌劑完全分離，見圖二. 及表三.，結果以3 mM sodium lauryl sulfate甲醇溶液：40 mM 磷酸鹽緩衝溶液：氘甲烷(25：55：20)混液以磷酸調整 pH值至 3.5之移動相分離度最佳，在加入離子配對劑之條件下，如圖二.所示 pipemidic acid、ofloxacin、pefloxacin、ciprofloxacin四個具 piperazine 基團之衍生物其滯留時間往後移，而 cinoxacin 及 nalidixic acid 則未見後移，此可能因後二者鹼

**Figure 3.** The chromatogram of six Quinolones and internal standard.

- 1.Cinoxacin
- 2.Nalidixic Acid
- 3.Piroxicam
- 4.Pipemidic Acid
- 5.Ofloxacin
- 6.Pefloxacin
- 7.Ciprofloxacin

Table 4. The experimental parameters of Quinolones

Quinolones	k'	α	LOD at 257 nm ($\mu\text{g/mL}$)
Cinoxacin	1.10		0.05
		2.89	
Nalidixic Acid	3.18		0.05
		1.27	
Piroxicam	4.45		0.15
		1.46	
Pipemidic Acid	6.50		0.1
		1.36	
Ofloxacin	8.82		0.5
		1.14	
Pefloxacin	10.02		0.5
		1.19	
Ciprofloxacin	11.96		0.5

* k' :capacity factor* α :separation factor*LOD:Limit of detection $s/n>5$

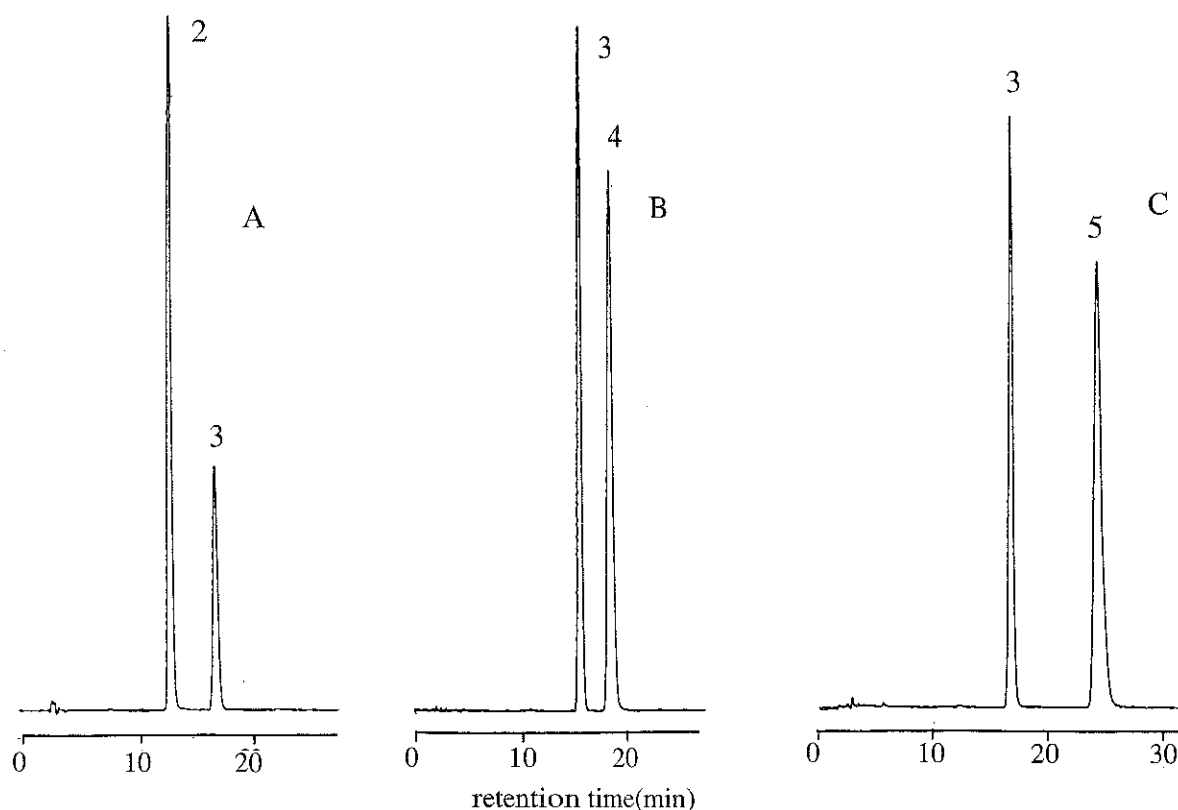


Figure 4. The chromatogram of commercial products.

A. Nalidixic acid tablet B. Pipemidic acid tablet C. Ofloxacin F.C. tablet
(2. Nalidixic acid 3. Piroxicam 4. Pipemidic acid 5. Ofloxacin)

Table 5. Recovery of Quinolone in spiked commercial products(standard addition method)

Quinolones	slope	intercept	r	recovery(%)
Nalidixic acid	1.010	509.8	0.9810	101.0
Pipemidic acid	1.012	269.9	0.9740	101.2
Ofloxacin	0.984	79.0	0.9931	98.4
Pefloxacin	0.974	563.2	0.9930	97.4
Ciprofloxacin	1.010	284.7	0.9999	101.0

性較弱，在此條件下無法形成離子對之故。

Quinolone 類藥物本具有螢光性質，然因 nalidixic acid 之激發波長、發散波長與 ciprofloxacin 等成分之激發波長、發散波長不相同，無法取得共通點，因此以紫外光分光光度計偵測之，紫外光波長：254 nm，257 nm，270 nm，280 nm 及 300 nm 等分別測試其吸光度，結果以 257 nm 之吸光度較為恰當。採用 HPLC 之分析條件為：使用 Cosmosil 5C₁₈-MS

column、3 mM sodium lauryl sulfate 甲醇溶液：40 mM 磷酸鹽緩衝溶液：氘甲烷 (25：55：20) 混液以磷酸調整 pH 值至 3.5 為移動相、流速為 0.8 mL/min 於紫外光波長 257 nm 下偵測之，所得之層析圖如圖三所示，實驗結果分離度之數據及 S/N > 5 之最低檢測濃度由 0.05 µg/mL~0.5 µg/mL，如表四。

本方法可行性之評估如表一，以 piroxicam 為內部標準品所製作之標準曲線，濃度分

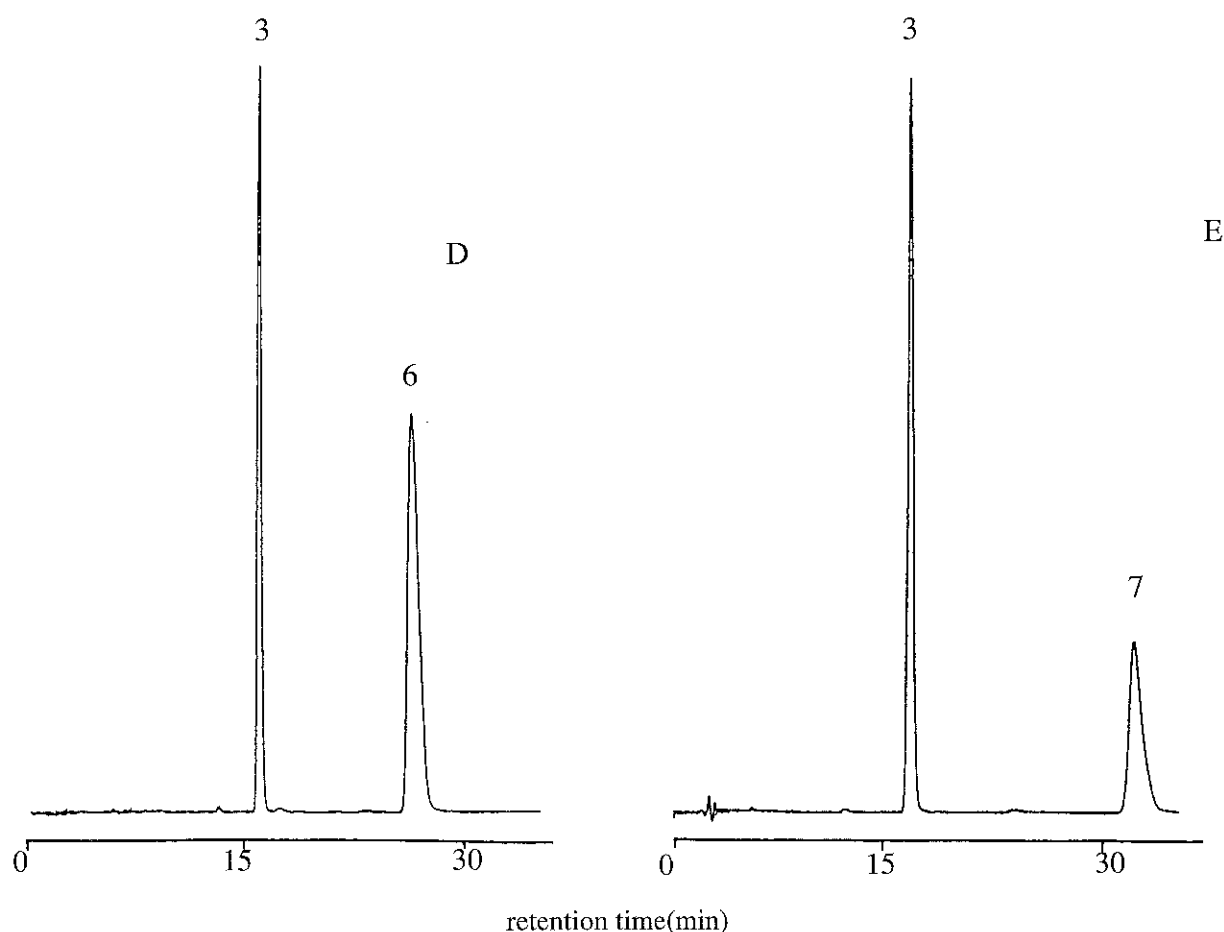


Figure 5. The chromatogram of commercial products
D. Pefloxacin F. C.tablet E. Ciprofloxacin F.C. tablet
(3.Piroxicam 6.Pefloxacin 7.Ciprofloxacin)

別為 cinoxacin 於 $1\text{ }\mu\text{g/mL} \sim 50\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、其他成分於 $5\text{ }\mu\text{g/mL} \sim 100\text{ }\mu\text{g/mL}$ 間線性關係良好，相關係數(r^2 值)為 $0.9994 \sim 0.9999$ ，精密度及準確度，經測試結果如表二，變異係數(C.V.)介於 $0.1\% \sim 1.9\%$ ，回收率以標準品添加法 (standard addition method) 之方式測試，結果如表五，其回收率介於 $97.4\% \sim 101.2\%$ 。

由於 cinoxacin 目前於市面上無法購得，經實際測試其他五種市售檢體結果如圖四、五，該方法不受賦形劑之影響，並由綜合上述實驗之結果，本分析方法操作簡便，且該層析方法具特異性、精密性及準確性，適合 cinoxacin、nalidixic acid、pipemidic acid、ofloxacin、pefloxacin、ciprofloxacin 等製劑之定性、定量分析，足見本法之實用性。

參考文獻

1. 陳宛華. 1994. 淺論 Fluoroquinolones. J. Pharm.10(3) : 85-91.
2. United States Pharmacopeial Convention, Inc. 1995. Cinoxacin, The United States Pharmacopeia XXIII, The National Formulary NF XVIII. Washinton D.C. pp. 374-375.
3. Katsuharu, F. and Yasuhiko, M. 1987. Simple Method for the Determination of Pipemidic Acid in Biological Fluids by High-Performance Liquid Chromatography. J. Chromatogr. 416 : 409-413.
4. Nobuhiro, I., Kohji, N., Masakazu, H. and Kikuo, I. 1993. High-Performance Liquid

- Chromatographic Determination of Nalidixic Acid in Rat Serum, Brain and Cerebrospinal Fluid. *J. Pharm. Anal.* 11(10): 993-997.
5. Fabre, D., Bressolle, F., Kinowski, J.M., Bouvet, O., Paganin, F. and Galtier, M. 1994. A Reproducible, Simple and Sensitive HPLC Assay for Determination of Ofloxacin in Plasma and Lung Tissue. Application in Pharmacokinetic Studies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12(11): 1463-1469.
6. Muner, M.I., Cuesta, F., Abadia, A., Vasquez, J. and Restrepo, M. 1994. Determination of Pefloxacin Concentration in Mesenteric Lymph Nodes by High-Performance Liquid Chromatography. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38(3) :682-634.
7. Yoshihiro, K., Kohji, N., Nobuhiro, I., Masakazu, H. and Kikuo, I. 1990. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Ciprofloxacin in Rat Brain and Cerebrospinal Fluid. *Chem. Pharma. Bull.* 38(10) :2884-2886.
8. Carolynm., M. and Jefferey, L. B. 1987. High-Performance Liquid Chromatography of Ciprofloxacin and Its Metabolites in Serum, Urine and Sputum. *J. Chromatogr.* 422: 153-164.
9. Masakazu, H., Koichi, S., Norihide, N. and Hiroyuki, N. 1994. Simultaneous Determination of Benofloxacin, Danofloxacin, Enofloxacin and Ofloxacin in Chicken Tissue by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. B.* 653: 69-76.

Simultaneous Determination of Six Quinolone Antibacterial Agents by HPLC

YU-PEN CHEN, CHING-YIH SHAW AND BER-LIN CHANG

*National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health,
Executive Yuan, 161-2, Kuen Yang Street, Nankang, Taipei, Taiwan, R.O.C.*

ABSTRACT

A simple, rapid and reliable high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of six quinolones (cinoxacin, nalidixic acid, pipemidic acid, ofloxacin, pefloxacin and ciprofloxacin) has been developed. Isocratic separation was achieved using a Nacalai Cosmosil 5C₁₈-MS column (25cm x 4.6 mm I.D.) with a mobile phase consisting of 3mM sodium lauryl sulfate in methanol : 40mM phosphate buffer : acetonitrile

(25:55:20) pH=3.50. An ultraviolet absorption photometer was used as the detector at the wavelength of 257nm. The HPLC separation was completed in 40 min, giving an excellent resolution and peak shape. Piroxicam was used as the internal standard for the assay. The precision, accuracy and reproducibility were satisfactory. The system can be used for assay of six quinolones in dosage forms as well as for identification of these six quinolones in unknown samples.

Key words : HPLC 、 Quinolones 、 Quinolone antibacterial agent.