

盐酸非那沙星原料药中 *R,R* 型异构体的 HPLC 法测定

王冬¹, 李晓博², 王晨^{1*}

1. 天津医科大学肿瘤医院 国家肿瘤临床医学研究中心 天津市肿瘤防治重点实验室, 天津 300060

2. 天津医科大学 药学院, 天津 300070

摘要: 目的 建立盐酸非那沙星原料药中 *R,R* 型异构体的 HPLC 测定方法。方法 采用 Chiralpak AY-H 手性色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 正庚烷-异丙醇-二乙胺 (75:25:0.1) 为流动相; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 35 ℃; 检测波长为 295 nm; 进样量 10 μL。结果 盐酸非那沙星在 101.2~813.1 ng/mL、*R,R* 型异构体在 115.6~817.8 ng/mL 与峰面积的线性关系良好。*R,R* 型异构体平均回收率为 100.31%, RSD 值为 1.1% (*n*=9)。结论 建立的盐酸非那沙星 *R,R* 型异构体 HPLC 法拆分检查法方便、准确, 能有效地控制盐酸非那沙星的质量。

关键词: 盐酸非那沙星; *R,R* 型异构体; 高效液相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2015)07-0805-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2015.07.011

Determination of *R,R* isomer in finafloxacin hydrochloride active pharmaceutical ingredient by HPLC

WANG Dong¹, LI Xiao-bo², WANG Chen¹

1. Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, National Clinical Research Center for Cancer, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, Tianjin 300060, China

2. School of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

Abstract: **Objective** To develop an HPLC method for determination of *R,R* isomer in finafloxacin hydrochloride active pharmaceutical ingredient. **Methods** The separation was performed on a Chiralpak AY-H column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with *n*-heptane - isopropanol - diethylamine (75 : 25 : 0.1) as mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min with injection volume of 10 μL, the column temperature was 35 ℃, and the detection wavelength was set at 295 nm. **Results** Finafloxacin hydrochloride and *R,R* isomer had good linearity in the ranges of 101.2 — 813.1 ng/mL and 115.6 — 817.8 ng/mL. The average recovery of *R,R* isomer was 100.31% with RSD 1.1% (*n*=9). **Conclusion** The method is convenient and accurate for split check of *R,R*-finafloxacin hydrochloride isomer, which can be used in quantity control for finafloxacin hydrochloride.

Key words: finafloxacin hydrochloride; *R,R* isomer; HPLC

盐酸非那沙星是美国爱尔康公司开发的一种用于治疗急性外耳道炎的药物, 在 2014 年 12 月 17 日美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准了非那沙星滴耳悬浮液, 商品名为 Xtoro。非那沙星结构类似莫西沙星, 具有良好的抗革兰阳性菌、革兰阴性菌、厌氧菌活性, 对鲍曼不动杆菌显示活性, 对败血症、泌尿道感染、腹腔感染、皮肤组织感染体外活性优于环丙沙星、左氧氟沙星和莫西沙星^[1-3]。

盐酸非那沙星分子结构中含有手性中心, 用普通 HPLC 法无法分离其对映异构体。该手性中心理论上存在 4 个构型的异构体, 即 *S,S*、*R,R*、*R,S*、*S,R* 型异构体。但实际上 *R,S*、*S,R* 型异构体并不存在。*S,S*、*R,R* 型异构体见图 1。因此, 本研究只对 *R,R* 型异构体进行了研究, 尝试采用手性色谱柱拆分盐酸非那沙星与其 *R,R* 型异构体, 并将其用于盐酸非那沙星的测定。

收稿日期: 2015-05-04

作者简介: 王冬, 男, 主管药师, 硕士研究生, 研究方向: 药物分析。Tel: (022)23340123-5104 E-mail: lvn1314@126.com

*通信作者 王晨, 女, 主任药师, 研究方向: 医院药学。Tel: (022)23340123-5104 E-mail: jieyi789@126.com

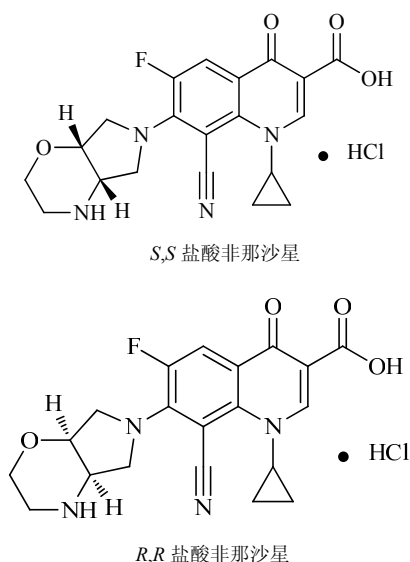


图1 盐酸非那沙星及其异构体的化学结构

Fig. 1 Structures of finafloxacin hydrochloride and its isomers

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 包括 G1311A 四元泵、G1313A 自动进样器、G1316A 柱温箱、G1314AVWD 紫外检测器、HP 色谱工作站。

1.2 试药

正庚烷(色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 异丙醇(色谱纯, 天津康科德科技有限公司), 二乙胺(分析纯试剂)。盐酸非那沙星样品(批号 20141101-1、20141101-2、20141101-3)、盐酸非那沙星对照品(质量分数 99.8%, 比旋度为 -85°)、*R,R* 型异构体(质量分数 99.6%)均由天津医科大学药学院提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性

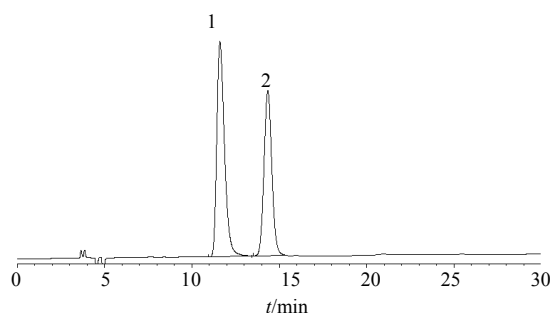
Chiralpak AY-H 手性色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 正庚烷-异丙醇-二乙胺(75:25:0.1)为流动相; 体积流量为 1.0 mL/min; 柱温 35 $^\circ$ C; 检测波长为 295 nm; 进样量 10 μ L。理论板数按盐酸非那沙星峰计算应不低于 3 000, 盐酸非那沙星与 *R,R* 型异构体峰的分度应符合要求。

2.2 溶液的配制

精密称取盐酸非那沙星样品约 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3 专属性试验

取盐酸非那沙星对照品、*R,R* 型异构体各适量, 用流动相溶解并稀释成质量浓度均为 100 μ g/mL 的混合溶液, 作为系统适应性溶液。取系统适应性溶液进样, 记录色谱图, 见图 2。盐酸非那沙星、*R,R* 型异构体的保留时间约 11、14 min, 两者分离度大于 1.5。



1-S,S 盐酸非那沙星 2-R,R 盐酸非那沙星
1-S,S-finafloxacin hydrochloride 2-R,R-finafloxacin hydrochloride

图2 系统适应性试验色谱图

Fig. 2 Chromatogram of system suitability test

2.4 破坏性试验

取盐酸非那沙星供试品溶液适量, 分别加入 3 滴 0.1 mol/L 盐酸乙醇溶液, 在 60~65 $^\circ$ C 水浴中加热 1 h; 加入 3 滴 0.1 mol/L 氢氧化钠乙醇溶液, 在 60~65 $^\circ$ C 水浴中加热 1 h; 在 60~65 $^\circ$ C 水浴加热 1 h; 加入 30%过氧化氢溶液 3 滴, 振摇后放置 0.5 h; 置 4 000 lx 光强下光照 3 d。取上述破坏性试验后的溶液进样分析。色谱图见图 3。

结果表明, 盐酸非那沙星在光照、加热、氧化破坏条件下性质稳定, 未见 *R,R* 型异构体、杂质的增加; 在酸、碱破坏条件下杂质峰略有增加, 但未见 *R,R* 型异构体的变化。各分解杂质峰与 *R,R* 型异构体峰均能达到基线分离, 对 *R,R* 型异构体的检查无干扰。

2.5 线性关系考察

取盐酸非那沙星对照品适量, 精密称定, 用流动相溶解并稀释成质量浓度分别为 101.2、201.4、406.3、605.1、813.1 ng/mL 的系列对照品溶液。精密量取上述对照品溶液各 10 μ L, 分别注入色谱仪, 进样测定, 记录色谱图。以峰面积为纵坐标, 质量浓度为横坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $Y = -1.76 + 2\,818.22 X$, $r = 0.999\,8$ 。结果表明, 盐酸非那沙星在 101.2~813.1 ng/mL 与峰面积的线性关系良好。

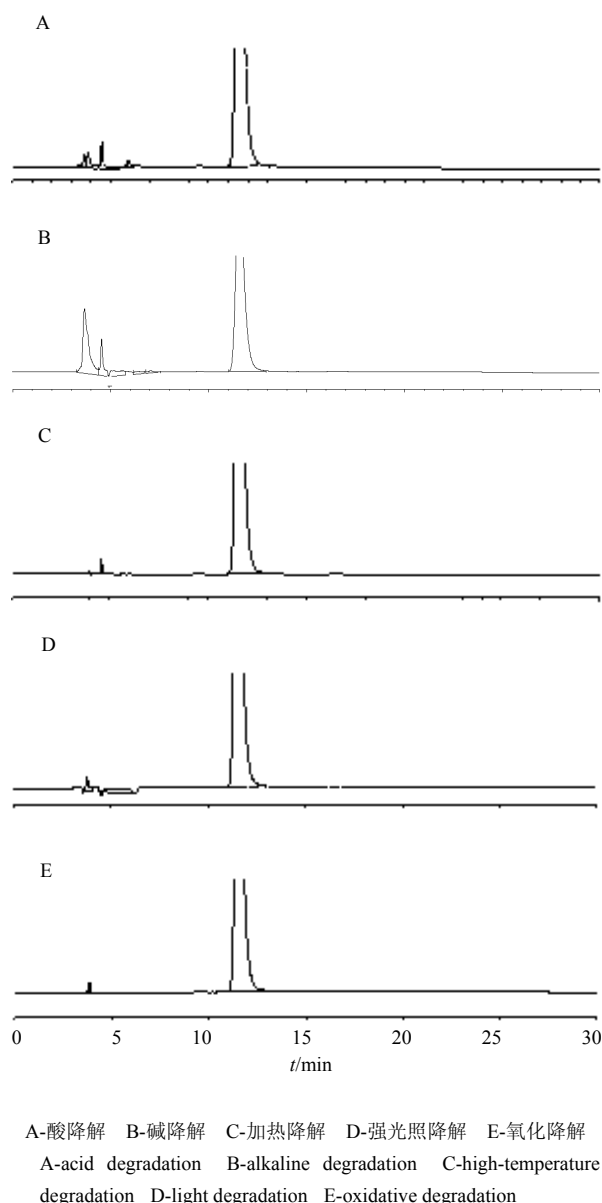


图3 破坏性试验色谱图

Fig. 3 Chromatograms of destructive tests

取 R,R 型异构体适量,精密称定,用流动相溶解并稀释成 115.6、201.9、408.2、612.3、817.8 ng/mL 溶液。精密量取上述溶液各 10 μ L,分别注入色谱仪,记录色谱图。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $Y=17.341+12.333 X$, $r=0.9996$ 。结果表明,盐酸非那沙星 R,R 型异构体在 115.6~817.8 ng/mL 与峰面积线性关系良好。

2.6 最低检出限和定量限的测定

精密称取盐酸非那沙星样品、 R,R 型异构体适量,分别加流动相稀释制成含主成分 0.1 mg/mL 溶

液。以流动相稀释至色谱峰响应约为基线噪音的 3 倍,在此色谱条件下,盐酸非那沙星、 R,R 型异构体的最低检测限分别为 59.3、76.0 ng/mL。以流动相逐渐稀释至检出峰为基线噪音的 10 倍,在此色谱条件下,盐酸非那沙星、 R,R 型异构体的定量限分别为 205.3、231.1 ng/mL。

2.7 精密度试验

分别精密量取批号 20141101-1 盐酸非那沙星供试品溶液 10 μ L 注入色谱仪,记录色谱图,连续测定 6 次,结果供试品溶液主峰面积的 RSD 值为 0.91%。

2.8 重复性试验

取批号 20141101-1 盐酸非那沙星样品 6 份,制备供试品溶液,进样测定,结果供试品溶液主峰面积的 RSD 值为 0.78%,未检出 R,R 型异构体。

2.9 稳定性试验

取批号 20141101-1 盐酸非那沙星样品制备的供试品溶液,分别在 0、2、4、24 h 进行测定,结果供试品溶液主峰面积的 RSD 值为 0.81%,结果表明,供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.10 回收率试验

取 R,R 型异构体适量,精密称定,分别加流动相溶解制成 0.1 mg/mL 的溶液,作为储备液。分别精密量取该储备液 0.8、1.0、1.2 mL 各 3 份,置于 100 mL 量瓶,加入批号 20141101-1 盐酸非那沙星样品约 10 mg,用流动相稀释至刻度,摇匀。取各溶液 10 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算得 R,R 型异构体平均回收率为 100.31%,RSD 值为 1.1% ($n=9$)。

2.11 样品测定

精密称取盐酸非那沙星原料药样品、 R,R 型异构体各 10 mg,置 100 mL 量瓶中,加乙醇适量使溶解,用流动相稀释至刻度。取该溶液重复进样 6 次,计算各异构体峰与主峰的相对响应因子。结果 R,R 型异构体的相对响应因子为 1.01,对主成分的相对响应因子在 0.9~1.1,因此可采用主成分自身对照法计算 R,R 型异构体的质量分数。精密量取供试品溶液 1 mL,用流动相稀释至 100 mL,摇匀,作为对照溶液。精密量取对照溶液 10 μ L,注入液相色谱仪,调节检测灵敏度使主成分峰高约为记录仪满量程的 15%~20%。再量取盐酸非那沙星原料药供试品溶液 10 μ L 注入色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍。以主成分自身对照法计算

盐酸非那沙星原料药中 R,R 型异构体的质量分数。3 批样品 R,R 型异构体测定结果见表1, 色谱图见图4。

表1 盐酸非那沙星原料药中 R,R 型异构体的测定结果
Table 1 Determination of R,R isomer in finafloxacin hydrochloride active pharmaceutical ingredient

批 号	R,R 型异构体
20141101-1	未检出
20141101-2	未检出
20141101-3	未检出

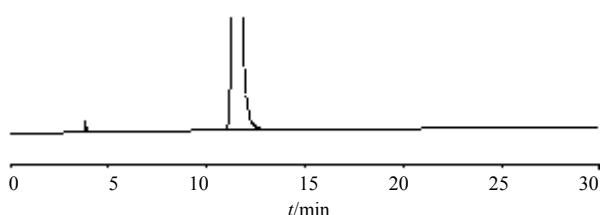


图4 盐酸非那沙星原料药的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of finafloxacin hydrochloride active pharmaceutical ingredient

3 讨论

3.1 测定波长的选择

分别取盐酸非那沙星、 R,R 型异构体对照品适量, 用流动相溶解并稀释成 0.1 mg/mL, 在 200~400 nm 进行紫外扫描, 结果盐酸非那沙星、 R,R 型异构体均在 295 nm 有最大吸收, 故采用此波长作为测定波长。

3.2 色谱柱的选择

采用 7 种不同类型的色谱柱对 R,R 型异构体进

行拆分。结果显示使用 Chiralpak IA、IC、OJ-H、OD-H、AS-H、AD-H 手性柱时, R,R 型异构体未能达到完全分离, 且色谱峰峰宽较大, 柱效不高。使用 Chiralpak AY-H 手性柱时, 柱效较高, 且分离效果好, 因此将其确定为研究用色谱柱。

3.3 流动相比例的选择

流动相考察了正己烷-异丙醇、正己烷-乙醇、正庚烷-异丙醇、正庚烷-乙醇系统, 综合考虑分析时间、柱压、分离度等因素, 流动相最后确定正庚烷-异丙醇 (75:25)。同时加入二乙胺作为扫尾剂, 根据本色谱柱推荐使用的二乙胺比例为 0.1%, 最后确定二乙胺的比例。

本实验通过改变流动相和测定条件, 利用 HPLC 手性固定相法将光学异构体较好地进行拆分, 可用于盐酸非那沙星原料药中 R,R 型异构体检查。本方法简便, 准确, 快速, 能有效地控制盐酸非那沙星的质量。

参考文献

- [1] Miklaylichenko S N, Patel S M, Dalili S, *et al.* A novel approach to finafloxacin hydrochloride (BAY35-3377) [J]. *Tetrahedron Lett*, 2009, 50(21): 2505-2508.
- [2] Higgins P G, Stubbings W, Wisplinghoff H, *et al.* Activity of the investigational fluoroquinolone finafloxacin against ciprofloxacin-sensitive and -resistant *Acinetobacter baumannii* isolates [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(4): 1613-1615.
- [3] 蒋晓磊, 崔玉彬, 曹胜华. 喹诺酮类抗菌药物研究新进展 [J]. *中国抗生素杂志*, 2011, 36(4): 255-263.