

HPLC 法测定加替沙星有关物质的方法研究

张琳, 袁雯玮, 曹晓云

天津市药品检验所, 天津 300070

摘要: 目的 建立 HPLC 法测定加替沙星有关物质。方法 采用 HPLC 法, 色谱柱为 Agilent HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为三乙胺磷酸溶液 [三乙胺溶液 (1→100), 用磷酸调节 pH 值至 4.3]-乙腈 (87:13), 检测波长为 325 nm, 柱温为 30 °C。结果 加替沙星和 9 个已知杂质均能达到基线分离, 样品中各杂质及主峰的分离度和检测灵敏度均满足有关物质的测定要求。结论 方法灵敏、准确, 专属性强, 可有效控制产品质量。

关键词: 加替沙星; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2014)03-0253-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.03.014

Determination of related substances in gatifloxacin by HPLC

ZHANG Lin, YUAN Wen-wei, CAO Xiao-yun

Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish a method for the determination of related substances in gatifloxacin by HPLC. **Methods** The separation was performed on a Agilent HC-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). using triethylamine-phosphoric acid solution [triethylamine solution (1→100), adjusted to pH 4.3 by phosphoric acid]-acetonitrile (87:13) as mobile phase. The column temperature was 30 °C and detective wavelength was 225 nm. **Results** The resolutions between gatifloxacin and its nine known impurities could meet the requirement. The sensitivity of the method was acceptable. **Conclusion** The method is sensitive, accurate, and specific, and can be used for the quality control of product effectively.

Key words: gatifloxacin; related substance; HPLC

加替沙星 (gatifloxacin) 是由日本杏林公司开发的第 4 代喹诺酮类抗生素, 1999 年 12 月由施贵宝公司首先在美国上市^[1], 具有吸收迅速、组织分布广、消除半衰期长、光毒性低、疗效好等特点, 被广泛应用于临床。2000 年中美上海施贵宝制药有限公司首先在国内申请加替沙星及制剂的进口注册, 之后, 国内企业进行了一系列的仿制。由于临床表现的抗结核作用, 2012 年加替沙星、加替沙星片和加替沙星注射液被列入全球基金结核病整合项目卫生系统加强部分 (HSS) 一期目录中。

在药品质量标准中, 对有关物质的控制是质量控制的重要环节, 是稳定性考察, 同时也是对药品评价的一个重要指标。在 ICH 指导原则 Q3A (R1) 和 Q3B (R2) 中对原料药和制剂中有机杂质的控制提出了明确的要求。

加替沙星及制剂在各国药典中均未收载, 国内各生产企业所执行的标准多采用三乙胺磷酸溶液-乙腈系统检查有关物质, 未对已知杂质加以控制。本文参考文献报道^[2]对其流动相系统进行了改进, 并对文献[2]中报道的加替沙星的已知杂质 (图 1) 进行了研究和分析, 建立了有关物质分析方法, 使加替沙星和 9 个已知杂质均能达到基线分离, 同时对有关物质限度进行了探讨, 制定了新的质量标准, 为加替沙星及制剂的质量控制提供依据。

1 仪器、试剂与试药

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪 (DAD 检测器) 和岛津 LC-20A 高效液相色谱仪。

1.2 试剂

磷酸、三乙胺均为分析纯, 乙腈为色谱纯。

收稿日期: 2014-03-27

基金项目: 全球基金结核病整合项目卫生系统加强部分: 药品质量标准提高课题 (GF2012-34, GF2012-35, GF2012-36)

作者简介: 张琳, 女, 主管药师, 主要从事抗生素药品质量研究。E-mail: ttylin@126.com

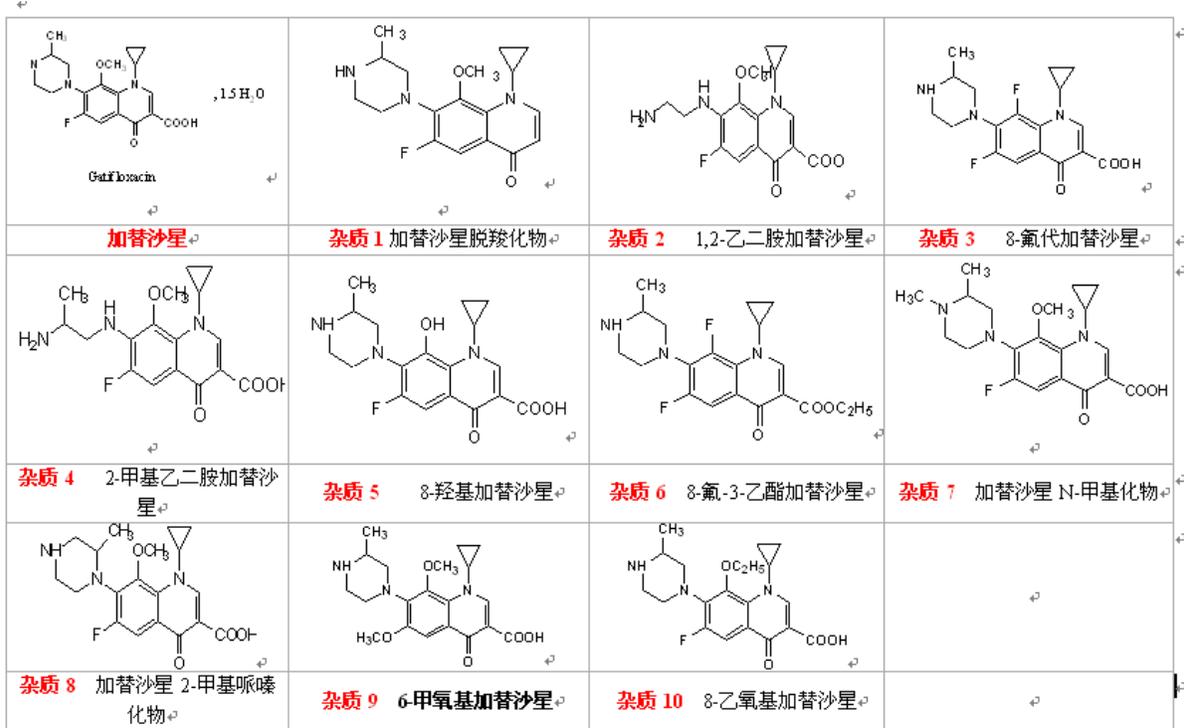


图1 加替沙星及其已知杂质结构式

Fig. 1 Chemical structures of gatifloxacin and its known impurities

1.3 对照品

加替沙星对照品(批号 130518-200402, HPLC 纯度 97.2%, 供含量测定用)和加替沙星杂质 3、杂质 5、杂质 7、杂质 8 对照品(杂质对照品仅供科研用)均由中国食品药品检定研究院提供。

加替沙星杂质 1、杂质 2、杂质 4、杂质 6 和杂质 10(质量分数均大于 95%)委托其他研究单位合成,并经结构确证。

1.4 药品

加替沙星原料(批号为 0805002、0805010、0805011)及制剂均为国内药厂生产产品。

2 方法研究和验证

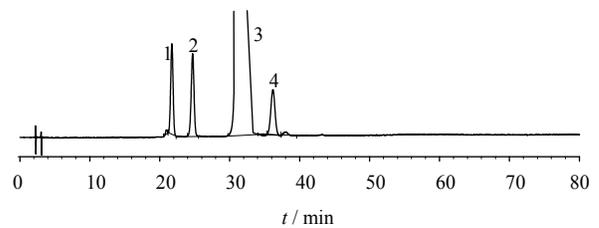
2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent HC-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以三乙胺磷酸溶液[三乙胺溶液(1→100),用磷酸调节 pH 值至 4.3]-乙腈(87:13)为流动相,体积流量为 1.0 mL/min,柱温为 30 °C,检测波长为 325 nm。

2.2 系统适用性试验

取加替沙星、8-氟代加替沙星、8-羟基加替沙星和加替沙星 N 甲基物对照品各适量,加磷酸溶液(2→1 000)适量使溶解,用 2.5 μmol/L 磷酸二氢钠溶液稀释制成含加替沙星 1.5 mg/mL、8-氟代加替

沙星 15 μg/mL、8-羟基加替沙星 15 μg/mL 和加替沙星 N 甲基物 15 μg/mL 的溶液,取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,加替沙星峰的保留时间在 30~40min,按 8-氟代加替沙星、8-羟基加替沙星、加替沙星和加替沙星 N 甲基物的顺序出峰,8-氟代加替沙星峰与 8-羟基加替沙星峰、8-羟基加替沙星峰与加替沙星峰、加替沙星峰和加替沙星 N 甲基物峰之间的分离度分别应不小于 3.5、6.0 和 4.0,见图 2。



1- 8-氟代加替沙星; 2- 8-羟基加替沙星; 3- 加替沙星; 4- 加替沙星 N 甲基物
1 - 8-fluoro gatifloxacin; 2 - 8-hydroxy gatifloxacin; 3 - gatifloxacin; 4 - gatifloxacin N-methyl compound;

图2 系统适用性试验分离度测试溶液色谱图

Fig. 2 Chromatogram of test of systematic applicability

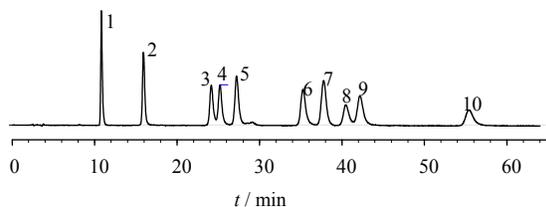
2.3 测定法

取本品约 75 mg,置 50 mL 量瓶中,加磷酸溶液(2→1 000)约 18 mL 使溶解,用 2.5 μmol/L 磷

酸二氢钠溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 精密量取适量, 用 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 磷酸二氢钠溶液定量稀释制成约 3 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 作为对照溶液。精密量取对照溶液适量, 用 2.5 mol/L 磷酸二氢钠溶液稀释制成约 0.75 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 作为灵敏度试验溶液。在上述色谱条件下, 取灵敏度试验溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分色谱峰峰高的信噪比不小于 10, 精密量取供试品溶液和对照溶液各 10 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍, 供试品溶液色谱图中如有杂质峰, 8-氟代加替沙星与 8-羟基加替沙星峰面积均不得大于对照溶液主峰面积的 0.75 倍 (0.15%); 其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积 (0.2%), 各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的 5 倍 (1.0%)。供试品溶液色谱图中任何小于灵敏度试验溶液主峰面积的杂质峰可忽略不计。

2.4 专属性考察

取加替沙星对照品和 9 个已知杂质各适量制成混合溶液, 采用上述方法进行分析, 各杂质之间、杂质与主成分之间均能达到基线分离, 见图 3。



1-杂质 1 (加替沙星脱羧化物); 2-杂质 2 (1, 2-乙二胺加替沙星); 3-杂质 3 (8-氟代加替沙星); 4-杂质 4 (2-甲基乙二胺加替沙星); 5-杂质 5 (8-羟基加替沙星); 6-杂质 6 (8-氟-3-乙酰加替沙星); 7-杂质 7 (加替沙星 *N*-甲基化物); 8-杂质 8 (加替沙星 2-甲基哌嗪化物); 9-杂质 9 (8-乙氧基加替沙星)

1 - gatifloxacin decarboxylation compound; 2 - 1,2-ethylene diamine gatifloxacin; 3 - 8-fluoro gatifloxacin; 4 - 2-methyl ethylene diamine gatifloxacin; 5 - 8-hydroxy gatifloxacin; 6 - gatifloxacin; 7 - 8-fluoro-3-ethyl gatifloxacin; 8 - gatifloxacin *N*-methyl compound; 9 - gatifloxacin 2-methyl piperazine compound; 10 - 8-ethoxy gatifloxacin

图 3 加替沙星及 9 个已知杂质色谱图

Fig. 3 Chromatogram of gatifloxacin and reference standards of nine known impurities

取加替沙星原料, 对其进行了酸、碱、热、氧化、日光与紫外光照等破坏试验, 采用拟定方法对破坏实验样品进行了考察。结果表明, 在各种破坏条件下所得的降解产物与主成分峰分离良好, 降解产物峰之间也均能达到基线分离。上述实验结果表

明该方法专属性较好。

2.5 线性关系

取加替沙星对照品适量, 采用上述溶液制备方法溶解并定量稀释制成系列浓度的溶液, 进样测试, 考察加替沙星的线性关系。结果表明, 在 0.2~20 $\mu\text{g/mL}$ 加替沙星峰面积与溶液质量浓度呈良好的线性关系, 线性方程为 $Y=38.261\ 4X-1.215\ 9$, $r=1.000\ 0$ 。

2.6 最低检出限

取加替沙星对照品, 照上述溶液制备方法制成浓度为 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液, 进样测试, S/N 大于 3, 可作为最低检出限, 相当于供试品溶液的 0.013%。

2.7 供试品溶液的稳定性

加替沙星供试品溶液分别于室温条件下放置 0、1、2、4、6、8 h, 进样测试, 以峰面积计算, 8-氟代加替沙星、8-羟基加替沙星、其他最大单一杂质和总杂质的 RSD 分别为 1.8%、1.3%、1.2% 和 0.8% ($n=6$)。结果表明供试品溶液室温条件下放置 8 h 内基本稳定。

2.8 供试品溶液浓度与有关物质测定结果的相关性

取同一批加替沙星原料, 照上述溶液制备方法分别制成 1.0、1.5、2.0 mg/mL 的供试品溶液和相应的 0.2% 的自身对照溶液。依法测定, 有关物质检测结果基本一致, 表明供试品溶液在 1.0~2.0 mg/mL , 有关物质测定结果与溶液浓度有良好的相关性。

2.9 方法耐用性

采用①Agilent HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) ②Thermo Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) ③SGE C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) ④岛津 Shim-pack VP-ODS (250 mm×4.6 mm, 5 μm) ⑤VARIAN C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 不同品牌色谱柱进行系统适用性试验, 结果表明, 8-氟代加替沙星、8-羟基加替沙星峰、加替沙星峰和加替沙星 *N* 甲基物峰之间的分离度均符合系统适用性试验要求。

采用色谱柱①Agilent HC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm 5 μm) ②Thermo Synchronis C₁₈ (250 mm×4.6 mm 5 μm) 分别在 Agilent 1200 高效液相色谱仪和岛津 LC kg20A 高效液相色谱仪上考察相同两批样品有关物质, 测定结果基本一致。上述实验结果表明该方法耐用性良好。

3 样品的测定结果

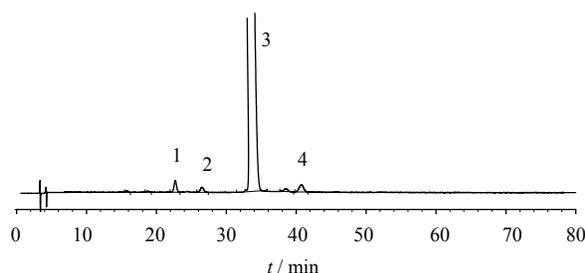
对 3 批加替沙星原料采用以上方法测定有关物

质, 结果见表 1, 供试品溶液典型色谱图见图 4。由加替沙星的杂质谱可知, 除单独控制的毒性杂质 8-氟代加替沙星和 8-羟基加替沙星外, 样品中最大单一杂质均为加替沙星-2-甲基哌嗪化物。

表 1 样品有关物质检查结果

Table 1 Results of samples

样品批号	8-氟代加替沙星/%	8-羟基加替沙星/%	其他最大单一杂质/%	杂质总量/%
0805002	0.08	0.06	0.11	0.31
0805010	0.09	0.06	0.10	0.32
0805011	0.10	0.06	0.06	0.30



1- 8-氟代加替沙星; 2- 8-羟基加替沙星; 3- 加替沙星; 4- 加替沙星 2-甲基哌嗪化物

1 - 8-fluoro gatifloxacin; 2 - 8-hydroxy gatifloxacin; 3 - gatifloxacin; 4 - gatifloxacin 2-methyl piperazine compound

图 4 供试品溶液色谱图

Fig. 4 Chromatogram of sample solution

4 讨论

4.1 供试品溶液浓度的确定

供试品溶液浓度为 1.5 mg/mL, 最小检出量约为 2.06 ng(相当于 0.013%), 灵敏度试验溶液为 0.75 μ g/mL(与最小定量浓度相当, 为供试品溶液浓度的 0.05%), 根据国家药典委员会对有关物质检查的最新要求, 规定其信噪比大于 10, 经试验结果均符合要求。

4.2 检测波长的选择

加替沙星最大吸收波长为 292 nm, 325 nm 为次大吸收波长。实验过程中发现, 在 325 nm 波长处检测出的杂质多于 292 nm, 且主成分与各已知杂质在 325 nm 波长处的响应值基本一致, 校正因子均在 0.8~1.1, 综合考虑, 采用 325 nm 为检测波长,

并以不加校正因子的主成分自身对照法进行杂质定量。

4.3 柱温的选择

试验中发现, 当采用 40 $^{\circ}$ C 柱温时, 8-羟基加替沙星峰与相邻杂质峰不易分离。当柱温降低为 30 $^{\circ}$ C 时, 采用的 4 根不同品牌色谱柱试验, 该两色谱峰之间的分离度均能达到 1.0 以上, 故规定柱温为 30 $^{\circ}$ C。

4.4 主峰保留时间的限定

采用 5 根色谱柱考察加替沙星与 9 个杂质的混合溶液, 主峰保留时间均在 30~40 min, 与其前后相邻杂质均可达到有效分离, 各已知杂质对主峰的相对保留时间基本一致, 均能满足系统适用性试验要求, 因此在质量标准中限定主峰保留时间为 30~40 min。

4.5 毒性杂质的控制

对药品中有机杂质的认识, 是渐进深入的研究过程, 从早期规定总杂质限度到规定单一杂质限度, 近年来, 更侧重于杂质谱分析, 针对杂质分类(降解杂质、工艺杂质)、杂质结构解析以及杂质毒理研究。曾有研究单位根据加替沙星杂质的结构特点对其各类杂质的毒性进行评估。提示加替沙星的第一类杂质(8 位甲氧基改变)可能是主要毒性杂质, 考察不同生产单位的多批次样品均未检出 8-氟-3-乙酯加替沙星, 因此本文增加了毒性较大特定杂质(8-羟基加替沙星和 8-氟加替沙星)与其他单一杂质的控制。

4.6 关于其他最大单一杂质加替沙星-2-甲基哌嗪化物

根据杂质结构推测及对原料的认识, 认为加替沙星-2-甲基哌嗪化物为工艺杂质^[2], 其形成机制以及在生产过程中如何减少该杂质生成还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 李纪勇. 静滴加替沙星的不良反应临床分析与防治对策 [J]. 中国中医药咨询, 2010, 2(3): 137.
- [2] 李娅萍, 杨敏智, 张斗胜, 等. 2009 年国产加替沙星注射剂评价性抽验结果及质量评价 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(3): 484-492.