

反相高效液相色谱法测定加替沙星胶囊中加替沙星及有关物质的含量

缪玉山¹,倪冲¹,倪桃²,蒋金元²(1.东南大学附属中大医院,江苏 南京 210009;2.南京泽辰科技有限公司,江苏 南京 210009)

摘要:目的 建立测定加替沙星胶囊中加替沙星及有关物质含量的高效液相色谱法。方法 以 Shimpack CLC-ODS C_{18} ($5\mu\text{m}$, $150\text{mm}\times 4.6\text{mm}$)为色谱柱;流动相:以 0.02mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调 $\text{pH} 4.0$)-乙腈($85:15$)配制的 0.002mol/L 四丁基溴化铵溶液为流动相;检测波长:UV 293nm;流速: 1.0mL/min 。结果 加替沙星在 $4\sim 32\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好,平均加样回收率为 99.6% , RSD 为 1.75% ($n=9$)。结论 该方法准确、灵敏度高、重现性好,可用于加替沙星胶囊及有关物质的含量测定。

关键词:加替沙星胶囊;加替沙星;反相高效液相色谱法;有关物质

中图分类号:R917.01;R927.2 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2003)06-0503-03

Determination of gatifloxacin and its related compound in gatifloxacin capsules by RP-HPLC

MI AO Yu-shan¹, NI Chong¹, NI Tao², JIANG Jing-yuan²(1. Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. Nanjing Zhecheng Science-Technique Limited Company, Nanjing, 210009, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To develop a RP-HPLC method for the determination of gatifloxacin and its related compound in gatifloxacin capsules. **METHOD** The HPLC was performed on Shimpack CLC-ODS C_{18} column. The mobile phase consisted of 0.02mol/L monobasic potassium phosphate buffer-acetonitrile($85:15$). The flow rate was 1.0mL/min . The detection wavelength was set at 293nm . **RESULTS** The assay was linear over the range of $4\sim 32\mu\text{g/mL}$. The average recovery was 99.6% , with the $RSD=1.75\%$ ($n=9$). **CONCLUSION** The method developed is accurate, sensitive and repeatable. It can be applied to the quality control of gatifloxacin capsules.

KEY WORDS: gatifloxacin capsules; gatifloxacin; RP-HPLC; related compound

加替沙星(gatifloxacin, AM1155)系一种新型喹诺酮类抗菌药,该药不仅对 G⁻菌具有强大抗菌活性,而且对金葡萄球菌、肺炎球菌等 G⁺菌的抗菌活性明显增强,同时,抗菌谱进一步拓宽,对厌氧菌、支原体、衣原体、抗酸菌也有较强的抗菌活性^[1,2]。该品在水中易溶,光毒性小^[3~5],具有作用时间长、组织转运好、生物利用度高等药动学特点^[6],它是氟喹诺酮类结构改造取得显著进展的主要标志之一。临床研究表明:加替沙星在治疗消化道感染、呼吸道感染、生殖道感染和皮肤软组织道感染方面显示极度好的疗效,是喹诺酮类的更新换代产品,市场前景广阔。为此,我们研究开发了加替沙星胶囊剂,为控制加替沙星胶囊的质量,我们建立了加替沙星含量测定的反相高效液相色谱法。该法效果良好,定量准确,快速。

1 仪器、药品和与试剂

岛津 LC-10AT 型高效液相色谱仪;SPD-10AT 型紫外检测器;WDL-95 色谱工作站;HP6Lpro 激光打印机。加替沙星对照品(南京泽辰科技有限公司合成室);乙腈为色谱专用,磷酸二氢钾为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shimpack CLC-ODS C_{18} ($5\mu\text{m}$, $150\text{mm}\times 4.6\text{mm}$);流动相:以 0.02mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(用磷酸调 $\text{pH} 4.0$)-乙腈($85:15$)配制的 0.002mol/L 四丁基溴化铵溶液为流动相;检测波长:UV 293nm;流速: 1.0mL/min ;柱温: 40°C 。

2.2 供试品溶液及对照溶液的制备

2.2.1 供试品溶液的制备 取加替沙星胶囊 20 粒,倾出内容物,精密称定,研细,精密称取适量(约相当于加替沙星 20mg),置于 100mL 量瓶中,加流动相适量,振摇使主药溶解,再加流动相稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为贮备液,精密量取贮备液 5mL 置 50mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.2 对照溶液的制备 精密称取加替沙星对照品适量,加流动相溶解,并稀释定容制成每 1mL 中含约 $20\mu\text{g}$ 的加替沙星作为对照品溶液。

2.3 方法学考察

作者简介:缪玉山,男,硕士,37岁。1996年毕业于中国药科大学药剂学专业,主要从事药物新剂型的开发研究及药动学研究。

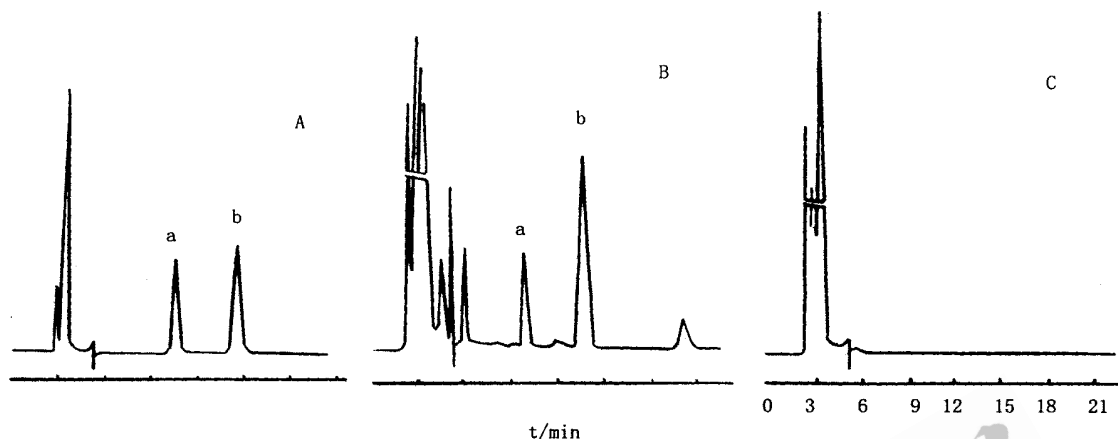


图1 色谱峰的 RP-HPLC (A) 空白辅料 (B) 加替沙星对照品 (C) 样品中的加替沙星

Fig 1 HPLC chromatograms (A) excipient; (B) gatifloxacin; (C) sample

2.3.1 波长的选择 精密称取加替沙星对照品适量,用流动相稀释并制成每1 mL中约8 μg的溶液,照紫外分光光度法于200~500 nm波长区间内扫描,于293 nm处有最大吸收且辅料无吸收,故选择293 nm为测定波长。

2.3.2 系统适应性试验 在实验确定的色谱条件下,加替沙星在5.58 min左右出峰,有关物质在4.38 min左右出峰,峰形良好,无杂峰干扰测定,见图1。理论板数以加替沙星峰计算不低于2000。

2.3.3 溶液稳定性试验 取含量测定下的样品溶液,分别于0,0.5,1,2,4,6,8,12 h测定其含量,其RSD为0.88%,结果表明测定液放置12 h内稳定。

2.3.4 精密度试验与重现性试验 精密称取待测样品5份,以流动相定量稀释至20 μg/mL,取加替沙星对照品同法操作,分别加进样20 μL,记录色谱图,按外标法计算,标示含量(%)分别为101.5,100.8,103.0,103.0,102.3%,平均为102.1%,RSD为0.94%;另精密称取待测样品5份,分5 d重复上述操作,标示含量(%)分别为100.2,99.9,101.7,99.4,100.4%,平均为100.3%,RSD为0.86%。结果表明:采用RP-HPLC法测定本品含量日内、日间差异小。

2.3.5 线性关系的考察 精密称取加替沙星对照品20 mg,加流动相溶解,定容至100 mL,摇匀,精密吸取上述溶液1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,6.0,8.0 mL分置于50 mL量瓶中,加流动相至刻度,摇匀,制成系列浓度的标准溶液,分别取上述溶液20 μL注入液相色谱仪,记录色谱峰面积,以峰面积分(Y)为纵坐标,加替沙星浓度(X, μg/mL)为横坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y = 224\,202.9X + 134\,007.9$, $r = 0.9997$ ($n = 7$);结果表明:加替沙星在4~32 μg/mL内色谱峰面积与浓度之间具有良好的线性关系。

2.3.6 辅料干扰试验 取处方量辅料,用流动相配成不含主药的约相当于含加替沙星20 μg/mL的模拟处方溶液,振摇,过滤,取20 μL进样,记录色谱图,结果见图1,图1显示本品辅料不干扰主药的含量测定。

2.3.7 回收率试验 分别精密称取经105℃干燥至恒重的加替沙星对照品16,20,24 mg各3份,按处方量加入辅料,置

于100 mL量瓶中,加流动相适量,振摇使主药溶解,再加流动相至刻度,摇匀,过滤,精密量取续滤液5 mL置50 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,精密量取20 μL进样,测定其含量,并计算回收率,回收率试验结果见表1。

表1 加替沙星胶囊加样回收率试验结果

Tab 1 Results of the recovery

加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
16.01	15.79	98.6	99.1	1.47
16.26	16.38	100.7		
15.83	15.49	97.9		
19.86	19.47	98.0	99.5	1.34
19.62	19.58	99.8		
20.15	20.27	100.6		
23.90	23.35	97.7	100.2	2.45
24.07	24.17	100.4		
24.04	24.67	102.6		

2.4 最小检测限试验

取本品适量,加流动相制成每1 mL中含0.2 mg的溶液作为供试品溶液;量取适量,加流动相制成每1 mL中含2 μg的溶液作为对照溶液。量取对照溶液适量,加流动相溶解并稀释制成含加替沙星一定浓度的供试品溶液,用流动相逐级稀释,进样,当溶液浓度为10 ng/mL时,信噪比(S/N)为3,以此计算,本品的最低检测限约为10 ng/mL。

2.5 含量测定

分别精密吸取对照品溶液与样品溶液20 μL注入高效液相色谱仪,依上述色谱条件,以外标法计算含量,结果3批样品(990817,990818,990819)的平均标示含量(%)分别为102.1,100.1,98.4;RSD(%)分别为0.94,1.00,0.31($n = 5$)。

2.6 有关物质的测定

2.6.1 破坏试验 取本品细粉适量(约相当于2 mg加替沙星主药)5份,依次(1)置10 mL量瓶中,加入1 mol/L盐酸溶液1 mL,水浴中加热4 h后,冷却,以1 mol/L氢氧化钠溶液回调至中性,用流动相稀释制成每1 mL含200 μg的溶液,滤过,取续滤液作为供试液。(2)置10 mL量瓶中,加入1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,水浴中加热4 h后,冷却,以1 mol/L盐酸溶

液回调至中性,用流动相稀释制成每 1 mL 含 200 μ g 的溶液,滤过,取续滤液作为供试液。(3) 置于小烧杯中,电炉直接加热炭化至棕色,用流动相稀释制成每 1 mL 含 200 μ g 的溶液,滤过,取续滤液作为供试液。(4) 置于紫外光下直接照射 8 h,用流动相稀释制成每 1 mL 含 200 μ g 的溶液,滤过,取续滤液作为供试液。(5) 置于量瓶中,加双氧水适量使破坏,用流动相稀释制成每 1 mL 含 200 μ g 的溶液,滤过,取续滤液作为供试液。分别取上述供试品溶液 20 μ L 进样,结果显示:该品在酸、碱、热、氧化破坏后不稳定,产生降解产物,但主峰与杂质峰的分离度均好。

2.6.2 辅料破坏试验 称取本品处方量辅料适量,分别经酸、碱、光、热、氧化破坏后,同上法操作,取续滤液 20 μ L 进样。结果表明:辅料峰与主峰分离度较好。

2.6.3 有关物质检查测定液的制备 取“含量测定”项下贮备液作为供试品溶液,量取适量,加流动相制成每 1 mL 含 2 μ g 的溶液作为预试溶液。

2.6.4 分析测定 照色谱条件进行实验,取预试溶液 20 μ L 注入液相色谱仪进行预试,调整检测灵敏度,使主成分色谱峰高达满量程的 10%~20%,再精密量取供试溶液 20 μ L 进样,记录色谱图至主成分保留时间的 2.5 倍,按峰面积归一化法计算降解产物的量。采用本法测定 3 批样品(批号 990817、990818、990819)有关降解产物的标示含量(%)分别为 0.69、0.75、0.73。

3 讨论与结论

3.1 作者建立的 RP-HPLC 能实现加替沙星与有关物质的有效分离,两者之间的分离度大于 1.5,色谱柱效高。

3.2 加替沙星在 4~32 μ g/mL 内其线性关系良好,含量测定回收率高,且重现性良好,可克服有关物质的干扰问题,具有准确、可靠、灵敏等特点。

3.3 运用我们建立的 RP-HPLC 测定加替沙星胶囊主药及有关物质含量方法方便实用,对控制加替沙星及其有关制剂的质量具有重要意义。

参考文献

- [1] Hosaka MA, Yasue TO, Fukua, *et al.* *In vitro* antibacterial activities of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxyquinolone [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36(10):2108.
- [2] Wakabayashi E, Mitsuhashi S. *In vitro* antibacterial activity of AM-1155, a novel 6-fluoro-8-methoxy quinolone [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(3):594.
- [3] Kuninishi Y, Nagata M, Omotera A, *et al.* Phototoxicity studies of gatifloxacin in guinea pigs and mice [J]. *Jpn Pharmacol Ther*, 1998, 26(10):91.
- [4] Kuninishi Y, Nomo Y, Tsuru, K, *et al.* Photosensitization study of gatifloxacin in guinea pigs [J]. *Jpn Pharmacol Ther*, 1998, 26(10):101.
- [5] Kusajima H, Ishida R, Uchida H. Phototoxicity of gatifloxacin, a new quinolone, and its related drugs in guinea pigs [J]. *Jpn Pharmacol Ther*, 1998, 26(10):95.
- [6] Nakashima M, Uematsuge K, Kusajima H, *et al.* Single and multiple-dose pharmacokinetics of AM-1155, a new 6-fluoro-8-methoxy quinolone in humans [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39(12):2635.