

盐酸环丙沙星中氯代环丙沙星的质量控制

何劼毅, 聂鹏*, 黄春青(贵州省食品药品检验所, 贵阳 550008)

摘要: 目的 建立以高效液相色谱法测定盐酸环丙沙星中氯代环丙沙星含量的方法。方法 采用 Welch Ultimate Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 梯度洗脱, 流速为 1.5 mL·min⁻¹, 检测波长 278 nm。结果 氯代环丙沙星和环丙沙星以及其他杂质分离度良好, 氯代环丙沙星在 1.050~10.5 μg·mL⁻¹ 内线性良好($r=0.999\ 9$), 回收率为 108.8%(RSD=1.97%)。结论 建立的质量标准简便、快捷、专属性强, 可以更好地控制盐酸环丙沙星的质量。

关键词: 盐酸环丙沙星; 氯代环丙沙星; 质量控制

中图分类号: R971.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)19-2538-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.19.016

引用本文: 何劼毅, 聂鹏, 黄春青. 盐酸环丙沙星中氯代环丙沙星的质量控制[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(19): 2538-2542.

Quality Control of Chlorociprofloxacin in Ciprofloxacin Hydrochloride

HE Jieyi, NIE Peng*, HUANG Chunqing(Guizhou Institute for Food and Drug Control, Guiyang 550008, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determination of chlorociprofloxacin in ciprofloxacin hydrochloride. **METHODS** The analysis was performed on a Welch Ultimate Plus C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) with gradient elution. The flow rate was 1.5 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 278 nm. **RESULTS** The other impurities and ciprofloxacin was completely separated from chlorociprofloxacin. Chlorociprofloxacin revealed good linearity over the range of 1.050–10.5 μg·mL⁻¹($r=0.999\ 9$), and the average recovery was 108.8%, while the RSD was 1.97%. **CONCLUSION** The method is rapid, accurate, sensitive, and can be well control the quality of ciprofloxacin hydrochloride.

KEYWORDS: ciprofloxacin hydrochloride; chlorociprofloxacin; quality control

盐酸环丙沙星由 Bayer 集团于 1987 年研发成功, 是第 3 代喹诺酮类抗菌药物, 抗菌谱广, 适用于敏感菌引起的泌尿生殖系统感染、呼吸道感染、胃肠道感染、皮肤软组织感染及伤寒等^[1-5]。胃肠道不适是常见的不良反应^[6-7]。

盐酸环丙沙星主要有盐酸环丙沙星片和盐酸环丙沙星胶囊 2 种制剂, 现行中国药典中收录了盐酸环丙沙星、盐酸环丙沙星片和盐酸环丙沙星胶囊以及其他相关剂型。在“盐酸环丙沙星”的有关物质里, 对杂质 A、B、C、D、E 和 I 等进行了相应控制^[8]。但是, 经 2020 年国家药品评价抽验项目“盐酸环丙沙星片和盐酸环丙沙星胶囊”的常规检验中发现, 盐酸环丙沙星片和盐酸环丙沙星胶囊的有关物质项中, 某一未知组分在保留时间为 22 min 左右存在较大吸收且含量相对较大(>0.1%), 该组分在中国药典 2020 年版中未进行相应控制。经检测盐酸环丙沙星片和盐酸环丙沙星胶囊 152 批样品, 该组分的含量为 0.01%~0.28%。对比美国药典, 在“环丙沙星片(Ciprofloxacin

Tablets)”有关物质项下, 该组分与氯代环丙沙星能够对应, 并且其含量有相应限制($\leq 0.3\%$)^[9]。通过 ADMET 性质预测软件 ADMET Predictor™ (Version 10.0, 美国 Simulations Plus 公司), 对以上杂质及异构体的毒理性参数做了全面预测, 氯代环丙沙星有较大可能对雄激素受体产生毒性并诱导哺乳动物细胞的染色体发生变异, 因此, 有必要对该杂质进行相应的质量控制研究。本研究表征了氯代环丙沙星的分子结构, 探索了该杂质的专属性、线性以及其他相关的方法学验证实验, 并对 6 批样品进行测定, 以促进“环丙沙星”有关物质项下的标准提升。

1 仪器与试剂

U-3000 高效液相色谱仪(美国 Thermo 公司); LC-6AD 半制备液相色谱仪(日本岛津公司); Xevo G-2 QTOF 液相质谱联用仪(美国 Waters 公司); XS-205 型电子分析天平、XPE-205DR 型电子分析天平均购自瑞士梅特勒公司; ME36S 型微量天平(德国 Sartorius 公司); KQ-500ED 超声波

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2021]—一般 041)

作者简介: 何劼毅, 男, 主管药师 E-mail: 240404110@qq.com

*通信作者: 聂鹏, 男, 博士, 副主任药师 E-mail: niepeng2001@163.com

清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

对照品:环丙沙星(中国食品药品检定研究院,批号:130451-201904;纯度:83.1%)、氯代环丙沙星对照品(牌牌生物,批号:2018203-01;纯度:100%);盐酸环丙沙星片和盐酸环丙沙星胶囊均为企业 A 生产的市售品(批号:001~007;规格:0.25 g)。三乙胺、磷酸、甲酸均购自天津市科密欧化学试剂有限公司,均为分析纯;乙腈(色谱纯,美国默克公司);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 杂质的分离与鉴别

2.1.1 分离色谱条件 色谱柱为 Welch Ultimate plus C₁₈ 半制备柱,以乙腈(A)和 0.1%甲酸(B)梯度洗脱(0~15 min, 14%A; 15~55 min, 14%→60%A; 55~56 min, 60%→14%A, 56~65 min, 14%A),流速 5.5 mL·min⁻¹。检测波长为 278 nm,柱温 30 ℃。

2.1.2 溶液的配制 对照品溶液的制备:精密称取氯代环丙沙星 10.50 mg 至 10 mL 量瓶中,加 0.1%甲酸使溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液的制备:精密称取批号为 0001 的环丙沙星片样品 725.7 mg(约相当于环丙沙星 500 mg),置 100 mL 量瓶中,加 0.1%甲酸溶解并稀释至刻度,摇匀,取 5 mL 置 50 mL 量瓶中,加 0.1%甲酸溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.1.3 鉴别 取盐酸环丙沙星片,研磨,取细粉 6.025 g,置 20 mL 量瓶中,加 0.1%甲酸溶液使溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取 100 μL 注入半制备液相色谱仪,分离保留时间约为 22 min 的色谱峰。

将多次收集的杂质溶液经 75 ℃减压浓缩至 2 mL,通过液质联用得到质谱图,见图 1。该组分的最大分子离子峰为 m/z 348.1133。

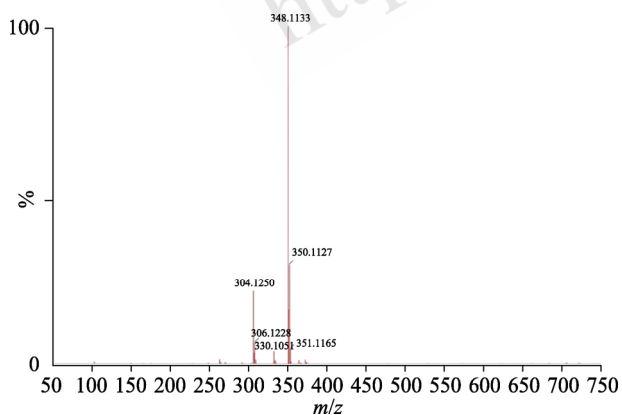


图 1 杂质质谱图

Fig. 1 Mass-spectrogram of impurity

另取对照品溶液注入质谱仪,得到其质谱图见图 2。氯代环丙沙星的最大分子离子峰为 m/z 348.0902,与该杂质溶液的质谱图一致。

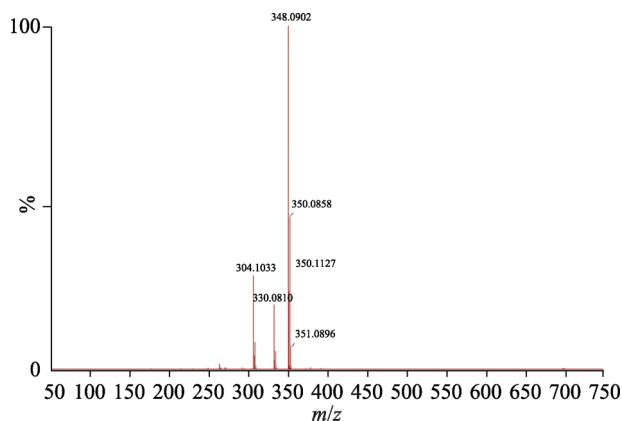


图 2 氯代环丙沙星质谱图

Fig. 2 Mass-spectrogram of chlorociprofloxacin

取对照品溶液照中国药典 2020 年版盐酸环丙沙星有关物质的液相条件,注入液相色谱仪,和供试品溶液的色谱图比较,有保留时间一致的峰,且该峰的紫外谱图相同,见图 3。

经过质谱和紫外吸收图谱对比,指认保留时间为 22 min 的杂质峰为氯代环丙沙星,即 1-环丙基-6-氯-4-氧代-7-(1-哌嗪基)-1,4-二氢喹啉-3-羧酸,结构式见图 4。该化合物分子式为 C₁₇H₁₈ClN₃O₃,分子量为 347.80,和中国药典中“盐酸环丙沙星”有关物质项下的杂质 D 为同分异构体。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件 照中国药典 2020 年版“盐酸环丙沙星”有关物质项下色谱条件,采用 Welch Ultimate Plus C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸溶液-乙腈(87:13)(用三乙胺调节 pH 值至 3.0±0.1)为流动相 A,以乙腈为流动相 B,梯度洗脱(0~16 min, 100%A; 16~53 min, 100%→40%A; 53~54 min, 40%→100%A; 54~65 min, 100%A);流速为 1.5 mL·min⁻¹;检测波长为 278 nm;柱温为 30 ℃;进样体积 20 μL。

2.2.2 溶液配制 对照品溶液的制备:精密称取氯代环丙沙星 8.160 mg 置 10 mL 量瓶中,加“2.2.1”项下流动相 A 溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相 A 溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液的制备:精密称取批号为 0004 的环丙沙星片样品 805.6 mg(约相当于环丙沙星

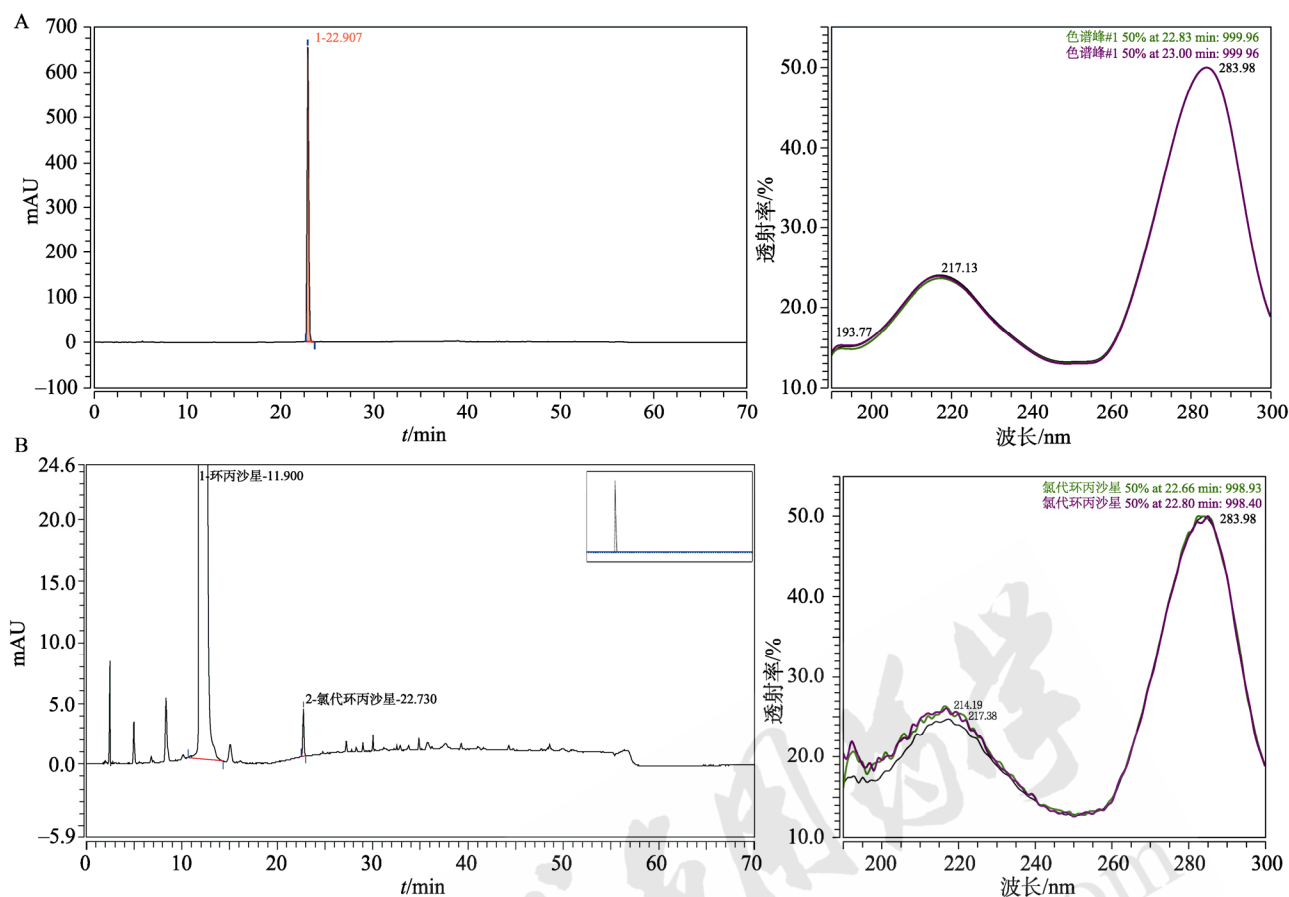


图3 高效液相色谱图和光谱图

A-氯代环丙沙星对照品溶液；B-盐酸环丙沙星供试品溶液。

Fig. 3 HPLC chromatograms and spectrograms

A-chlorociprofloxacin reference substance solution; B-ciprofloxacin hydrochloride sample solution.

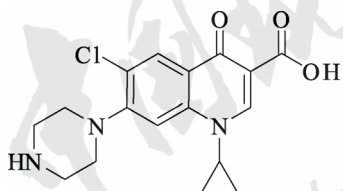


图4 氯代环丙沙星结构式

fig. 4 Molecular structure of chlorociprofloxacin

500 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加流动相 A 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品储备液, 精密量取供试品储备液 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加流动相 A 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 专属性试验 精密量取供试品储备液和对照品溶液各 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相 A 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 与对照品溶液、供试品溶液分别注入液相色谱仪, 按“2.2.1”项下色谱条件检测, 结果见图 5。结果表明, 氯代环丙沙星峰和其他杂质峰分离良好。

2.2.4 线性范围和修正因子的确定 精密量取氯代环丙沙星 10.50 mg 置 10 mL 量瓶, 加 0.1%甲酸

使溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 作为氯代环丙沙星线性储备液。精密量取线性储备液 1, 5, 10, 15 mL, 分别置于 10, 20, 20, 20 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀得 4 种浓度的线性溶液。分别取 4 种浓度的线性溶液和线性储备液各 20 μ L, 进样测定。

精密量取环丙沙星 12.80 mg 置 10 mL 量瓶, 加 0.1%甲酸使溶解并稀释至刻度, 摇匀, 取 1 mL 至 100 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 作为环丙沙星线性储备液, 精密量取线性储备液 1, 5, 10, 15 mL, 分别置于 10, 20, 20, 20 mL 量瓶中, 加流动相 A 稀释至刻度, 摇匀得 4 种浓度的线性溶液。分别取 4 种浓度的线性溶液和线性储备液各 20 μ L, 进样测定。

以峰面积和浓度计算线性范围。结果氯代环丙沙星在 $1.050\sim 10.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈线性, $r=0.9999$ 。环丙沙星在 $1.064\sim 10.637\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈线性, $r=0.9999$, 计算氯代环丙沙星的修正因子 f 为 2.3。

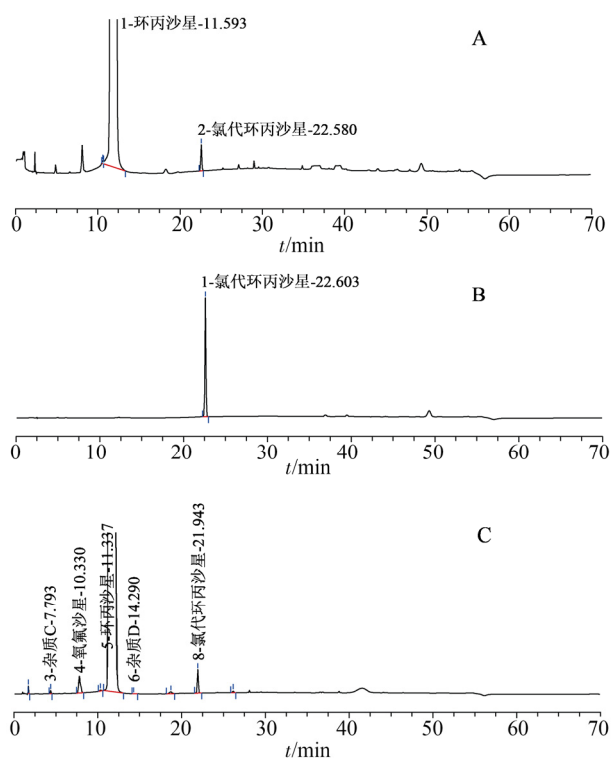


图5 氯代环丙沙星高效液相色谱图
A-样品溶液；B-对照品溶液；C-专属性溶液。

Fig. 5 HPLC chromatograms of chlorociprofloxacin
A-sample; B-control; C-specific solution.

2.2.5 检出限 精密量取 1 mL 对照品溶液至 50 mL 量瓶中，加流动相 A 稀释至刻度，摇匀，精密量取 5 mL 至 50 mL 量瓶中，加流动相 A 稀释至刻度，摇匀，取 20 μ L 注入液相色谱仪，信噪比 $>3:1$ 。经计算氯代环丙沙星的检出限为 $16 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.2.6 耐用性试验 取供试品溶液，分别用 Welch Ultimate Plus C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m)(柱号：60200200734)和中谱红 C_{18} (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m)(柱号：018021743)的色谱柱对样品进行测定。结果表明，上述 2 种柱子对氯代环丙沙星测量结果无显著影响。

2.2.7 重复性试验 取供试品溶液，按“2.2.1”项下色谱条件重复测定 6 次，结果含量平均为 0.195%，RSD 为 1.2%，重复性良好。

2.2.8 回收率试验 精密称取批号为 0007 的样品(环丙沙星含量为 93.9%、氯代环丙沙星含量为 0.195%)628.5 mg 置 100 mL 量瓶中，加流动相 A 使溶解并稀释至刻度，精密量取 5 mL 和对照品溶液 25 mL 置 6 个 100 mL 量瓶中，摇匀，即得回收率溶液。同时按“2.2.2”项下方法制备批号为 0007

样品的供试品溶液。分别取上述回收率溶液和供试品溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪，记录色谱图，结果平均回收率为 108.8%，RSD 为 1.97%，回收率良好。

2.2.9 限度的确定 氯代环丙沙星的限度参考 USP，限度为 0.3%。

2.2.10 稳定性试验 精密称取批号为 0005 的样品 672.8 mg，按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液，分别在 0, 1, 3, 5, 7, 10, 12 h 取 20 μ L 注入液相色谱仪，记录色谱图，结果峰面积 RSD 为 1.0%，表明在 12 h 内，样品比较稳定。

2.2.11 样品测定结果 检测同一生产企业生产的 6 批样品，包括 3 批盐酸环丙沙星片和 3 批盐酸环丙沙星胶囊。结果见表 1，该系列样品中的氯代环丙沙星含量批间均一度较好，均为 0.2%。

表 1 氯代环丙沙星测定结果

Tab. 1 Determination results of chlorociprofloxacin

名称	称样量/g	批号	氯代环丙沙星含量/%
盐酸环丙沙星片	0.756 33	0002	0.2
	0.760 08	0003	0.2
	0.748 85	0004	0.2
盐酸环丙沙星胶囊	0.645 45	0005	0.2
	0.658 93	0005	0.2
	0.650 12	0007	0.2

3 讨论

3.1 氯代环丙沙星的表征

经制备型液相色谱分离得到的化合物，通过液质联用仪表征，该化合物的最大分子离子峰为 348.1，其分子量与“盐酸环丙沙星”项下收录的杂质 D 相同，可能为同分异构体。与美国药典对比发现，其收录的“环丙沙星片”项下对杂质之一氯代环丙沙星进行了相应控制，其保留时间与本实验基本接近。经液质联用仪检测氯代环丙沙星对照品溶液，其最大分子离子峰也为 348.1，与该未知杂质相同。而氯代环丙沙星的平均分子量为 347.8，由于样品中各个原子同位素的丰度(^{35}Cl 、 ^{37}Cl 以及其他原子同位素)和合成所在地区不同，其最大标准分子离子峰应分别为 348.3 和 350.3，与该杂质的信号略有差异，结合高效液相色谱数据，通过氯代环丙沙星对照品在同一色谱条件下的保留时间和紫外光谱图对比，两者相吻合。因此可以推断，在保留时间 22 min 附近的未知杂质确定为氯代环丙沙星。

3.2 色谱柱的选择

根据耐用性试验结果,氯代环丙沙星对不同规格的色谱柱未有明显的要求。氯代环丙沙星在 2 根不同品牌的色谱柱条件下,其保留时间略有不同,但是其相对保留时间一致,并且测定结果也较为一致。因此,可使用常规的色谱柱对氯代环丙沙星进行测定。

3.3 相对保留时间的考察

根据专属性试验结果,氯代环丙沙星的相对保留时间较为固定,但是在该化合物的信号峰附近存在较多其他化合物信号峰的干扰。因此,使用氯代环丙沙星对照品进行保留时间定位,同时结合其紫外光谱图可进行指认。

3.4 小结

目前,中国药典 2020 年版“盐酸环丙沙星”有关物质项下收录了已知的 5 个相关杂质,但是未完全覆盖需要进行质量控制的所有杂质。经过实验检测和验证,市面上销售的盐酸环丙沙星片和盐酸环丙沙星胶囊中均含有氯代环丙沙星。基于严格控制药品质量的要求,同时提高治疗效果并有效降低杂质引起的不良反应,有必要完善该品种的质量标准。

本实验鉴定了盐酸环丙沙星中一种杂质的结构,与美国药典中收录氯代环丙沙星的相关图谱能相互对应,另外补充了 HPLC 检测盐酸环丙沙星中氯代环丙沙星的有关物质方法,并进行了相应的方法学验证。该方法可以有效鉴别并测定盐酸环丙沙星中的杂质氯代环丙沙星,专属性强,

重复性好,可以用于盐酸环丙沙星原料药和制剂的质量控制,为该品种的质量标准提升提供有力的支撑和依据。

REFERENCES

- [1] YANG K X, LV B H, SHEN H Z, et al. Life cycle assessment of pharmaceuticals: The ciprofloxacin hydrochloride case[J]. *Int J Life Cycle Assess*, 2021, 26(1): 64-75.
- [2] 张志东, 吴晓松, 金伟军, 等. 盐酸环丙沙星栓的处方改良[J]. *中国现代应用药学*, 2008, 25(S2): 702-703.
- [3] GAO J B, DING L X, YANG M, et al. Observation of the stability of infusions mixed with ciprofloxacin by convolution spectrometry[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2006, 23(S1): 676-678.
- [4] ZHANG Y Y, WANG J M, HOU Y, et al. Clinical observation on postoperative complications in 40 cases of mixed hemorrhoid treated with Zhilou Lotion at different frequency of drug dressing[J]. *J Gansu Univ Chin Med(甘肃中医药大学学报)*, 2018, 35(1): 68-71.
- [5] WEI D C, CAI X R, WU L L, et al. Correlation between antibiotic resistance and antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2019, 36(4): 489-492.
- [6] DAWABA H M, DAWABA A M. Development and evaluation of extended release ciprofloxacin HCl ocular inserts employing natural and synthetic film forming agents[J]. *J Pharm Investig*, 2019, 49(2): 245-257.
- [7] 夏训明. 美国 FDA 对氟喹诺酮类抗生素的说明书进行修改强化宣示其在精神卫生及引起低血糖方面的副作用[J]. *广东药科大学学报*, 2018, 34(5): 557.
- [8] 中国药典. 二部[S]. 2020: 1195-1196.
- [9] USP43-NF38[S]. 2019: 1009-1010

收稿日期: 2021-11-24

(本文责编: 曹粤锋)