

中国药典 2015 年版中诺氟沙星胶囊有关物质测定方法的改进研究

李俊，杨玉琴，王英瑛(台州市药品检验研究院，浙江 台州 318000)

摘要:目的 考察中国药典 2015 年版中诺氟沙星胶囊有关物质测定方法的质量可控性，并对现行方法进行改进。方法 分别采用中国药典 2015 年版和 EP9.3 版的方法对浙江省各地区抽样的 57 批诺氟沙星胶囊的有关物质进行检查，对结果进行比较研究；并对中国药典 2015 年版方法的合理性进行探讨。结果 57 批抽样样品按 EP9.3 版有关物质测定方法检查，结果有 5 批样品检出杂质 E 超出限度(0.15%)，1 批杂质 K 为限度边缘(0.15%)，而根据中国药典 2015 年版方法检查结果，57 批样品全部合格。现行的中国药典 2015 年版诺氟沙星胶囊有关物质测定方法专属性不强，杂质 E 被包含在主峰之中难于检出；现行标准有关物质测定方法中不同品牌的 C₁₈ 色谱柱以及流动相条件对测定结果影响较大，选择 Waters Sunfire C₁₈ 色谱柱，调整流动相的比例和梯度条件可以使杂质 E 与诺氟沙星主峰很好地分离，样品的测定结果也与 EP9.3 方法的测定结果一致，能达到控制杂质 E、杂质 K 以及其他杂质的目的。**结论** 目前浙江省市场上的诺氟沙星胶囊中杂质 E 有超标的情况，但根据中国药典 2015 年版的现行有关物质测定方法难以检出，难以有效控制药品的质量，需修订提高。

关键词：中国药典 2015 年版；诺氟沙星胶囊；有关物质；质量可控性

中图分类号：R917.101 文献标志码：B 文章编号：1007-7693(2019)06-0714-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.06.014

引用本文：李俊，杨玉琴，王英瑛. 中国药典 2015 年版中诺氟沙星胶囊有关物质测定方法的改进研究[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(6): 714-717.

Improvement of the Determination Method of Related Substances of Norfloxacin Capsules in Chinese Pharmacopoeia(2015 Edition)

LI Jun, YANG Yuqin, WANG Yingying(Taizhou Institute for Food and Drug Control, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study quality controllability of determination method of related substances of norfloxacin capsules in Chinese Pharmacopoeia(2015 Edition)(ChP2015) and to improve the current method. **METHODS** The related substances of 57 batches of norfloxacin capsules samples from all regions of Zhejiang province were determined according to ChP2015 method and EP9.3 method, and the results were compared. The rationality of the ChP2015 method was discussed. **RESULTS** The tested results of 57 batches of samples according to EP9.3 method showed that the contents of impurity E of 5 batches of samples exceeded the limit(0.15%), and the impurity K of 1 batch of sample was on the edge of the limit(0.15%). While the results of 57 batches of samples all met the requirements according to ChP2015 method. The method of related substances of Norfloxacin capsules in ChP2015 was not specific, and the impurity E included in the main peak was difficult to detect. The determination results were affected by the columns of different brand and the mobile phase conditions in ChP2015 method of related substances. Using Waters Sunfire C₁₈ column and adjusting the proportion and gradient condition of the mobile phase could make the impurity E well separated from the main peak of norfloxacin, the determination results of samples were in accordance with EP9.3 method, and it could control the impurity E, K and other impurities. **CONCLUSION** The contents of impurity E of norfloxacin capsules exceed the standard on the current market of Zhejiang province, and it can not be detected according to ChP2015 method. The determination method of related substances of norfloxacin capsules in ChP2015 can not control the quality of the drug effectively and need to be revised and improved.

KEYWORDS: ChP2015; norfloxacin capsules; related substances; quality controllability

诺氟沙星为第 3 代喹诺酮类药物，临幊上适用于敏感菌所致的尿道、肠道、耳喉鼻科、妇科、外科和皮肤科等感染性疾病^[1]。诺氟沙星胶囊现行法定标准是中国药典 2015 年版二部^[2]，其有关物质测定方法依照原料药的方法，采用 HPLC 梯度洗脱，对杂质 A、其他单个杂质和杂质总量进行控制。而 EP9.3 版^[3]、BP2015 版^[4]和 USP41 版^[5]

中收载的诺氟沙星的有关物质的测定方法虽然也是 HPLC 梯度洗脱法，但色谱条件、溶液浓度、控制的杂质指标等均不一样。为了考察诺氟沙星胶囊现行有关物质测定方法的可控性，保证药品的质量，笔者对中国药典中诺氟沙星胶囊现行有关物质的测定方法进行了探讨。

EP9.3 版方法、BP2015 版方法和 USP41 版方法

的色谱条件及测定方法相同,因此本实验仅选择EP9.3版方法与中国药典2015年版方法进行比较。

1 仪器与试药

Waters 2695 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司, 包括 2998 PDA 检测器、自动进样器和 Empower 色谱工作站); CPA2250 型电子天平(德国赛多利斯公司)。

诺氟沙星杂质 A(中国食品药品检定研究院, 批号: 130610-201502; 纯度: 99.7%); 杂质定位用诺氟沙星对照品(含杂质 K, EDQM, EP 标准品, 批号: 1.0); 诺氟沙星系统适用性对照品(EDQM, EP 标准品, 批号: 2.0); 诺氟沙星对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 130450-201502; 纯度: 99.7%); 57 批诺氟沙星胶囊样品为 2017 年浙江省药品质量风险考核抽验样品, 规格均为 0.1 g; 磷酸为分析纯; 甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 有关物质测定方法

2.1.1 中国药典 2015 年版方法 采用 Agilent SB C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 3.0±0.1)-乙腈(87:13)为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱(0~10 min, 100%A; 10~20 min, 100%→50%A; 20~30 min, 50%A; 30~32 min, 50%→100%A; 32~42 min, 100%A); 流速: 1.0 mL·mL⁻¹; 柱温: 35 °C; 检测波长 262, 278 nm。

取本品细粉适量, 精密称定, 按标示量加 0.1 mol·L⁻¹ 的盐酸溶液适量使其溶解, 用流动相 A 定量稀释成 0.15 mg·mL⁻¹, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。精密量取适量, 用流动相 A 定量稀释成 0.75 μg·mL⁻¹, 作为对照溶液。另精密称取杂质 A 对照品约 15 mg, 加乙腈溶解并稀释成 0.3 μg·mL⁻¹, 作为杂质 A 对照品溶液。分别取上述溶液进样测定, 杂质 A(262 nm 检测)不得>0.2%, 其他单个杂质(278 nm 检测)不得>0.5%, 其他杂质之

和(278 nm 检测)不得>1.0%。

2.1.2 EP9.3 版方法 采用 Supelcosil LC-ABZ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 以磷酸溶液(取水用磷酸调节 pH 值至 2.0±0.1)为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱(0~5 min, 95%A; 5~7 min, 95%→93%A; 7~10 min, 93%→87%A; 10~15 min, 87%→47%A; 15~20 min, 47%→10%A); 以 265 nm 为检测波长, 流速 1.4 mL·min⁻¹, 柱温 60 °C。

取本品细粉适量, 精密称定, 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液适量(每 12.5 mg 诺氟沙星加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL)使其溶解, 用稀释溶液(流动相 A: B=95:5, 下同)定量稀释成 0.4 mg·mL⁻¹, 作为供试品溶液, 精密量取适量, 用稀释溶液定量稀释成 0.4 μg·mL⁻¹, 作为对照溶液。取 4 mg 杂质定位用诺氟沙星对照品(含杂质 K), 加稀释溶液 5 mL, 超声使其溶解, 稀释至 10 mL, 即得杂质 K 鉴别对照溶液。取 4 mg 诺氟沙星系统适用性对照品, 加稀释溶液溶解并定容至 10 mL(含杂质 A、E、H 对照品), 作为系统适用性溶液。分别取上述溶液进样测定, 杂质 K、E 分别不得>0.15%, 其他未知杂质不得>0.10%, 总杂质不得>0.5%。

2.2 2 种方法测定 57 批样品的结果

2.2.1 中国药典 2015 年版方法测得的结果 按“2.1.1”项下方法对 57 批样品的有关物质进行测定, 结果 57 批样品的杂质 A 均<0.2%, 其他单一杂质均<0.5%、其他杂质总和均<1.0%, 合格率 100%。典型色谱见图 1。

2.2.2 EP9.3 版方法测得的结果 按“2.1.2”项下方法对 57 批样品的有关物质进行测定, 结果显示有 52 批合格, 3 个厂家的 5 批次样品检出杂质 E>0.15%(超出限度), 经过光谱比较, 样品中的杂质 E 峰与杂质 E 对照品峰的光谱一致, 不合格批次的结果见表 1。5 批次不合格样品中有 1 批样品的杂质 K 含量在 0.15% 的限度边缘, 另外 4 批次样品均检出杂质 K 在限度范围内。色谱图见图 2。

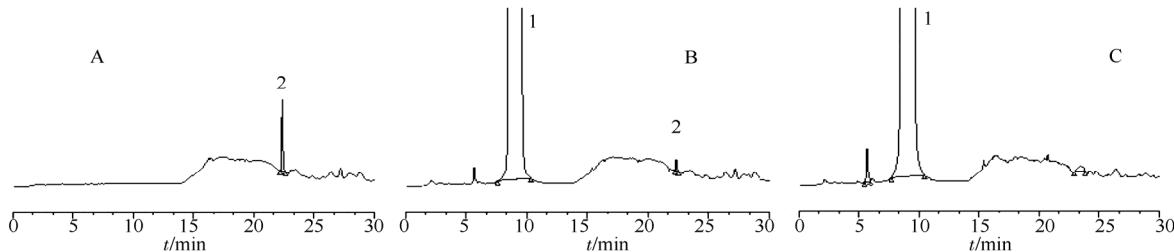


图 1 中国药典方法色谱图

A—杂质 A 对照品溶液(262 nm); B—典型供试品溶液(262 nm); C—供试品溶液(278 nm); 1—诺氟沙星; 2—杂质 A。

Fig. 1 HPLC chromatogram according to ChP2015 method

A—impurity A standard solution(262 nm); B—sample solution(262 nm); C—sample solution(278 nm); 1—norfloxacin; 2—impurity A.

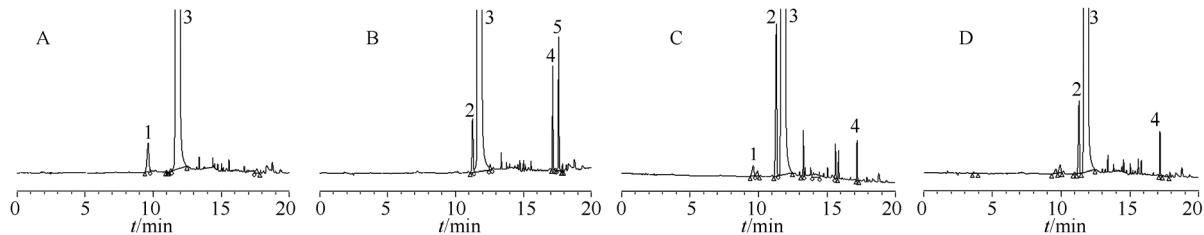


图 2 EP9.3 方法测定的部分样品 HPLC 色谱图

A—杂质 K 鉴别对照溶液; B—系统适用性溶液(含杂质 E、A、H 对照品); C—供试品溶液(批号: 161102); D—供试品溶液(批号: 17032203); 1—杂质 K; 2—杂质 E; 3—诺氟沙星; 4—杂质 A; 5—杂质 H。

Fig. 2 HPLC chromatogram of some samples according to EP9.3 method

A—impurity K identification solution; B—system suitability solution(contain impurity E, A, H); C—sample solution(Lot: 161102); D—sample solution(Lot: 17032203); 1—impurity K; 2—impurity E; 3—norfloxacin; 4—impurity A; 5—impurity H.

表 1 按 EP9.3 版方法测得的有关物质超标的结果

Tab. 1 Results of related substances exceeding the standard according to EP9.3 method

生产厂家	批号	杂质 K/%	杂质 E/%	杂质 A/%	其他最大单杂质/%	总杂质/%
厂家一	161102	0.04	0.37	未检出	未检出	0.41
厂家二	17032203	未检出	0.16	未检出	未检出	0.16
厂家三	161106	0.15	0.18	未检出	未检出	0.32
厂家三	161103	0.03	0.16	0.07	未检出	0.25
厂家三	170206	0.05	0.17	0.08	未检出	0.30

2.3 中国药典 2015 年版有关物质测定方法的合理性探讨

2.3.1 不同标准方法的比较 对中国药典 2015 年版方法与 EP9.3 版方法的色谱条件及控制指标、限度标准等进行比较发现, 与 EP9.3 版方法相比, 中国药典 2015 年版方法主要存在以下不同的地方: ①控制的杂质指标及限度不一样, 只控制了已知杂质 A, 没有对杂质 E、K 进行控制, 且其他单个杂质和总杂质的限度均相对较高; ②流动相组成中有机相的初始比例相对较高; ③色谱柱固定相类型不同。这些问题均有可能影响有关物质的测定结果。

2.3.2 中国药典 2015 年版方法与 EP9.3 版方法色谱行为的比较 对中国药典有关物质方法和 EP9.3 版方法进行比较, 取诺氟沙星系统适用性对照品适量, 加磷酸溶液(pH 值 3.0)-乙腈(95:5)溶解制成含杂质 E、杂质 A、杂质 H 和诺氟沙星的对照品溶液, 分别在中国药典 2015 年版二部有关物质方法和 EP9.3 版方法的色谱条件下, 进样测定, 记录色谱图, 结果见图 3。

通过色谱图的比较发现, 采用中国药典 2015 年版二部有关物质方法, 图中诺氟沙星主峰的峰型相对较宽, 主峰理论板数为 2 515, 是 EP9.3 版主峰理论板数的十分之一, 分离效果差, 杂质 E

完全被包含在主峰之中, 难以检出; 更换规格尺寸相同的其他品牌的 C₁₈ 色谱柱重新进行测定, 杂质 E 仍无法与诺氟沙星主峰分离。

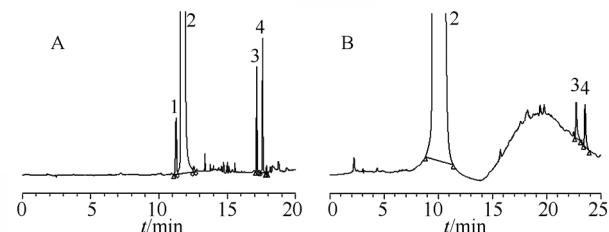


图 3 EP9.3 版与中国药典方法的色谱图比较

A—EP9.3 版方法; B—中国药典 2015 年版方法; 1—杂质 E; 2—诺氟沙星; 3—杂质 A; 4—杂质 H。

Fig. 3 Comparison of HPLC chromatograms between EP9.3 method and ChP2015 method

A—EP9.3 method; B—ChP2015 method; 1—impurity E; 2—norfloxacin; 3—impurity A; 4—impurity H.

2.4 中国药典有关物质测定方法的改进

2.4.1 有关物质测定改进方法的建立 EP9.3 中有关物质的测定均采用十六烷基酰胺基为固定性的色谱柱, 不是常用的 C₁₈ 色谱柱, 不容易获得。为此笔者尝试采用常用的 C₁₈ 色谱柱, 在中国药典 2015 年版有关物质测定方法的现行色谱条件的基础上进行调整和改进。分别采用 CAPCell PAK C₁₈ 柱、Agilent SB-C₁₈ 柱、Waters Xbridge C₁₈ 柱、Waters Sunfire C₁₈ 柱(规格均为 4.6 mm×250 mm, 5 μm), 并采用不同比例的梯度条件进行考察。

结果显示: ①不改变流动相梯度条件, 4 根色谱柱均无法很好地分离杂质 E 与诺氟沙星主峰; ②在调整流动相梯度条件下, CAPCell PAK C₁₈ 柱和 Agilent SB-C₁₈ 柱也不能很好地分离杂质 E 与诺氟沙星主峰, Waters Xbridge C₁₈ 柱和 Waters Sunfire C₁₈ 柱能够分离杂质 E 与诺氟沙星主峰, 但采用 Waters Xbridge C₁₈ 柱, 需要很长时间主峰才能得到分离, 而 Waters Sunfire C₁₈ 柱能又快又好地

分离杂质 E 与诺氟沙星主峰，是最适合的色谱柱。

最适合的色谱条件：采用 Waters Sunfire C₁₈ 色谱柱，以 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸溶液(用三乙胺调节 pH 值至 3.0±0.1)为流动相 A，乙腈为流动相 B，梯度洗脱(0~10 min, 91%A；10~13 min, 91%→55%A；13~18 min, 55%→50%A；18~26 min, 50%→10%A；26~27 min, 10%→91%A；27~35 min, 91%A)，流速 1.2 mL·min⁻¹，柱温 40 °C，其他参照中国药典 2015 年版的色谱条件不变。

2.4.2 改进中国药典方法的考察 取“2.1.2”项下的杂质 K 鉴别对照溶液和系统适用性溶液，按“2.4.1”项下改进的色谱条件分别进样测定，得到的色谱图见图 4，图 4B 系统适用性溶液中杂质 E 与诺氟沙星主峰的分离度为 3.3，杂质 K、杂质 E、杂质 A 和杂质 H 的峰型均较好，基线平稳。

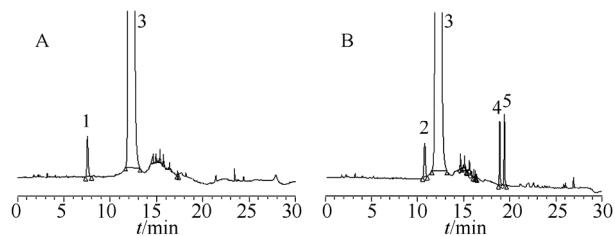


图 4 改进的中国药典方法的色谱图
A—杂质 K 鉴别对照溶液；B—系统适用性溶液(含杂质 E、A、H 对照品)；1—杂质 K；2—杂质 E；3—诺氟沙星；4—杂质 A；5—杂质 H。

Fig. 4 HPLC chromatograms of improved ChP2015 method
A—impurity K identification solution; B—system suitability solution(contain impurity E, A, H); 1—impurity K; 2—impurity E; 3—norfloxacin; 4—impurity A; 5—impurity H.

杂质 K 鉴别对照溶液和 EP 系统适用性溶液连续进样 6 次后得到的杂质 K、杂质 E 和杂质 A 的峰面积的 RSD 分别为 1.7%，1.6% 和 1.3%。

采用改进的中国药典方法对“2.2.2”项下的杂质 E 超标的 5 批样品进行测定，结果均与 EP9.3 方法的结果基本一致。

3 讨论

3.1 中国药典 2015 年版有关物质方法存在的问题

本实验结果表明，现行中国药典 2015 年版有关物质方法存在以下问题：①与 EP9.3 版的有关物质测定方法比较，控制的杂质指标少，限度不严，没有对杂质 E、杂质 K 进行控制；②方法的色谱条件存在一些缺点：方法的专属性不强，杂质 E 完全被包含在主峰之中，难以检出，即使更换色谱柱都无法分离，需加改进；而实际被测的 57 批

抽样样品中有 5 批杂质 E 超标的样品按照现行标准方法无法检出杂质 E，存在质量风险。

实验研究发现，现行有关物质方法中不同品牌的 C₁₈ 色谱柱及流动相条件对有关物质分离测定的结果影响较大，改进的方法采用特定品牌的 C₁₈ 色谱柱及调整流动相的比例和梯度条件可以使杂质 E、杂质 K 等杂质得到很好的分离测定。

中国药典 2015 年版诺氟沙星胶囊有关物质方法质量可控性不好，难以有效地控制药品的质量，存在很大的质量风险，需改进提高。

3.2 检出的杂质 K 处于限度边缘和杂质 E 超标的原因分析

杂质 E 即氯哌酸，为诺氟沙星结构式中 F 与 Cl 发生竞争置换得到的副产物^[6]，而杂质 K 为诺氟沙星结构式中 1 号位上乙基改为甲基的化合物，这 2 个杂质均为诺氟沙星原料在合成过程中产生的工艺杂质，结构均较稳定，同时经过强降解实验研究也没有发现这 2 个杂质产生，因此诺氟沙星原料中杂质控制不严是诺氟沙星胶囊样品中杂质 E 超标和杂质 K 处于限度边缘的主要原因，同时诺氟沙星原料有关物质方法也没有对这 2 个杂质进行控制，无法检出杂质 E，也成为杂质超限的另一个原因。

3.3 建议

针对上述问题，为了保证药品的质量安全，提出以下建议：①对诺氟沙星原料及胶囊的现行法定标准的有关物质测定方法进行修订，在现行方法的基础上进行流动相的调整和优化，规定色谱柱的品牌或采用十六烷基酰胺基为固定相的色谱柱，增加杂质 E、K 等已知杂质指标，以保证能有效控制药品的杂质；②加强对国内上市的诺氟沙星胶囊的跟踪抽验，以保障药品的质量。

REFERENCES

- [1] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药物学[M]. 第 15 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 105.
- [2] 中国药典. 二部[S]. 2015: 1198-1199.
- [3] EP9. 3 [S]. 2017: 4965-4967.
- [4] BP2015 [S]. 2015: 402-404.
- [5] USP41-NF36 [S]. 2017: 2976-2977.
- [6] JI G H. Survey on synthetic process of norfloxacin [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 1992, 23(3): 138-140.

收稿日期: 2018-04-08

(本文责编: 曹粤锋)