

# HPLC法测定妥舒沙星环合物中的有关物质

章 激\*(湖北文理学院附属医院,湖北襄阳 441021)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)33-4730-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.33.41

**摘要** 目的:建立测定妥舒沙星环合物中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为YMC-Pack ODS A-312,流动相为乙腈-水(5:3, V/V),流速为1.2 ml/min,检测波长为250 nm,柱温为25℃,进样量为10 μl。结果:该色谱条件能将妥舒沙星环合物中主成分与有关物质基线分离;妥舒沙星环合物检测质量浓度线性范围为0.04~1.8 μg/ml( $r=0.999\ 9$ );妥舒沙星环合物定量限为40.56 ng/ml,检测限为6.3 ng/ml;精密度、稳定性、重复性试验的RSD<3%;回收率为99.88%~100.68%(RSD=0.29%, $n=9$ );6批样品总杂质含量测定结果均<0.1%。结论:该方法专属性强,灵敏度、准确度和精密度高,可用于妥舒沙星环合物中有关物质的测定。

**关键词** 妥舒沙星环合物;高效液相色谱法;有关物质

## Determination of Related Substances in Tosufloxacin Cyclizaton by HPLC

ZHANG Ji(Hospital Affiliated to Hubei College of Arts and Sciences, Hubei Xiangyang 441021, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in tosofloxacin cyclizaton. METHODS: HPLC was performed on the column of YMC-Pack ODS A-312 with mobile phase of acetonitrile-water(5:3, V/V) at a flow rate 1.2 ml/min, detection wavelength was 250 nm, column temperature was 25℃ and injection volume was 10 μl. RESULTS: The main component and related substances could be baseline separated by the conditions; the linear range was 0.04-1.8 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ); the limit of quantification was 40.56 ng/ml and the limit of detection was 6.3 ng/ml; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 3%; recovery was 99.88%-100.68% (RSD=0.29%, $n=9$ ); the result of total impurities of 6 batches of sample were less than 0.1%. CONCLUSIONS: The method is specific, sensitivity with high accuracy and precision, and can be used for the determination of related substances in tosofloxacin cyclizaton.

**KEYWORDS** Tosufloxacin cyclizaton; HPLC; Related substance

妥舒沙星(Tosufloxacin)是日本富山化学工业公司于1990年开发上市的第三代广谱喹诺酮类抗菌药物,具有抗菌谱广、抗菌活性强的特点,对革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、厌氧菌的抗菌活性明显强于环丙沙星、氧氟沙星、诺氟沙星等同类药物<sup>[1]</sup>。目前,妥舒沙星片剂已在国内上市并广泛应用于临床治疗中。国内文献<sup>[2-6]</sup>相继报道了甲苯磺酸妥舒沙星分散片、包合物、凝胶、滴眼液、滴耳液的制备及质量控制方法。

妥舒沙星环合物为妥舒沙星合成过程中的重要中间体,其质量控制情况将直接影响原料药的生产合格率,因此建立其中有关物质的测定方法显得尤为重要。国内一些文献<sup>[7-10]</sup>曾报道了妥舒沙星制剂含量或用药后血液中药物浓度测定的方法,却鲜有关于其中间妥舒沙星环合物中有关物质测定的

报道。因此,本试验采用高效液相色谱法(HPLC),初步建立了测定妥舒沙星环合物中有关物质的方法,为其质量控制提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括SPD-20A可变波长紫外检测器、LCsolution色谱工作站等(日本岛津公司);Secura225D-1CN型电子天平(德国赛多利斯公司);DHG-9240A型数显真空干燥箱(上海和呈仪器制造有限公司);YP-250SDP型综合药品稳定性试验箱(上海林频仪器股份有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

妥舒沙星环合物样品(批号:S-140702、140601、140602、

[7] 李文斌.HPLC法测定麦味地黄丸中毛蕊花糖苷的含量[J].中国药房,2014,25(28):2 665.

[8] 何培根,刘菁,李志浩.补益地黄丸中毛蕊花糖苷的含量分析[J].现代中药研究与实践,2015,29(3):56.

[9] 王亮,张巧艳,年华,等.用HPLC法测定地黄叶中毛蕊花糖苷含量[J].药学服务与研究,2015,15(1):26.

[10] 赵群涛,张红伟,方永凯,等.HPLC法同时测定芪苈疏糖胶囊中梓醇和毛蕊花糖苷的含量[J].中华中医药学刊,2014,32(5):1 200.

[11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:124.

[12] 陈天朝,翟来超.HPLC同时测定地黄中梓醇与毛蕊花糖苷的含量[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(5):105.

[13] 陈健,刘钱林,张传平,等.HPLC法测定口炎颗粒中毛蕊花糖苷的含量[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(65):110.

(收稿日期:2016-01-27 修回日期:2016-08-29)

(编辑:刘 柳)

\* 副主任药师。研究方向:医院药学及临床药学。E-mail:xf-host@163.com

140603、140604、140605、140606)、妥舒沙星环合物对照品(批号:R-140701,纯度:97.1%)均为湖北某研究所药物化学研究室提供,使用前干燥至恒质量;乙腈(色谱纯,美国Honey Well公司);试验用水为高纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:YMC-Pack ODS A-312(150 mm×6.0 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(5:3, V/V);流速:1.2 ml/min;检测波长:250 nm;柱温:25 °C;进样量:10 μl。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶液 以流动相为空白溶液。

2.2.2 对照品溶液 精密称取妥舒沙星环合物对照品约50 mg,置于50 ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密称取样品约50 mg,置于50 ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.2.4 对照溶液 精密量取“2.2.3”项下供试品溶液1 ml,用流动相定容于100 ml量瓶中,摇匀,作为对照溶液。

### 2.3 系统适用性与专属性试验

2.3.1 系统适用性试验 取“2.2”项下空白溶液、对照品溶液、供试品溶液各适量,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。在该色谱条件下,妥舒沙星环合物与有关物质能基线分离,主成分峰与相邻成分峰的分离度>1.5,理论板数以主成分峰计>3 500。

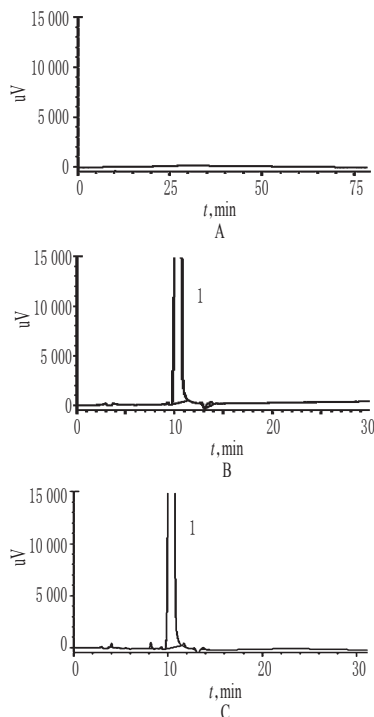


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

A.空白;B.对照品;C.供试品;1.妥舒沙星环合物

### Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

A. blank; B. reference substance; C. test sample; 1. tosuflouxacin cyclization

2.3.2 专属性试验 精密称取样品(批号:S-140702)约50 mg,共3份,分别置于50 ml量瓶中,其中一份加入1 mol/L盐酸溶液1 ml,室温放置1 h后加入1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml中

和;一份加入1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml,室温放置1 h后加入1 mol/L盐酸溶液1 ml中和;一份加入30%过氧化氢溶液1 ml,室温放置1 h。以上3份经处理后的样品分别用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,待用。另取样品适量,共2份,分别置于扁型称量瓶中,一份于60 °C的恒温箱中放置15 d;一份于光照强度(4 500±500)lx的稳定性试验箱内放置15 d。精密称取上述2份经处理后的样品各50 mg,分别置于50 ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,待用。分别取上述5份破坏试验溶液各适量,以0.45 μm微孔滤膜滤过后,分别取续滤液10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。结果,样品经酸、碱、氧化、高温、光照破坏试验后,主成分峰均能与降解峰、杂质峰有效分离,分离度>1.5。

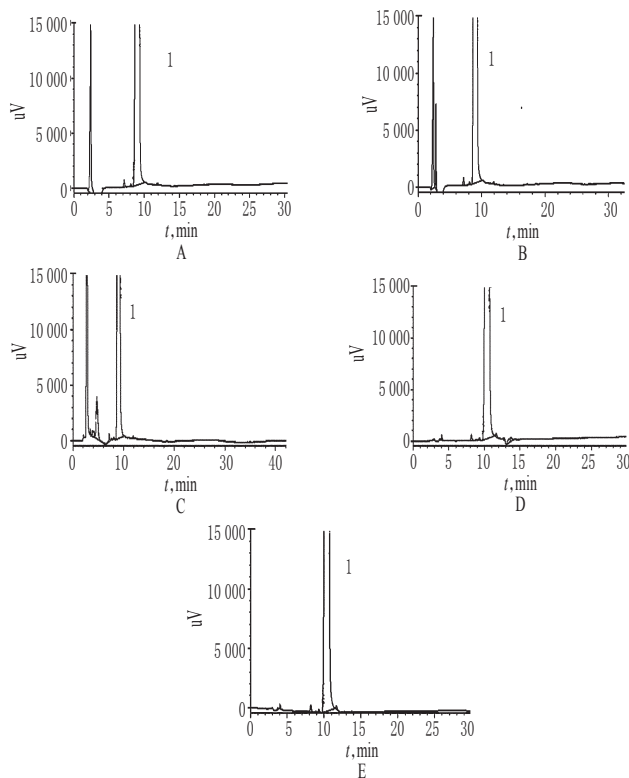


图2 专属性试验高效液相色谱图

A.酸破坏样品;B.碱破坏样品;C.氧化破坏样品;D.高温破坏样品;E.光破坏样品;1.妥舒沙星环合物

### Fig 2 HPLC chromatograms of specificity test

A. sample destroyed by acid; B. sample destroyed by alkali; C. sample destroyed by oxidation; D. sample destroyed by heat; E. sample destroyed by light; 1. tosuflouxacin cyclization

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液0.4、1.0 ml,置于100 ml量瓶中,0.3、0.7、1.0、1.5、1.8 ml置于10 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制得系列线性工作贮备液。分别精密量取上述系列线性工作贮备液各1 ml,置于100 ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,制得系列线性工作溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以妥舒沙星环合物质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $y=36.012x+994.56$ ( $r=0.9999$ )。结果表明,妥舒沙星环合物检测质量浓度线性范围为0.04~

1.8 μg/ml。

### 2.5 定量限与检测限考察

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液适量,分别用流动相进行逐级稀释,并按“2.1”项下色谱条件进样测定,其测试范围至少为半峰宽的5倍。当信噪比为10:1时,测得的质量浓度为定量限;当信噪比为3:1时,测得的质量浓度为检测限。结果,妥舒沙星环合物定量限为40.56 ng/ml,检测限为6.3 ng/ml。

### 2.6 精密度试验

取“2.2.2”项下对照品溶液适量,分别按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,妥舒沙星环合物峰面积的RSD=0.67%(n=6),表明仪器精密度良好。

### 2.7 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:S-140702)适量,分别于室温下放置0、4、8、12、16、20、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,总杂质峰面积的RSD≤2.87%(24 h时RSD=2.87%,n=7),表明供试品溶液在室温下放置24 h内较稳定。

### 2.8 重复性试验

精密称取样品(批号:S-140702)约50 mg,共6份,分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2.4”项下方法制备对照溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以自身对照法测定总杂质的含量。结果,总杂质含量的RSD=2.56%(n=6),表明本方法重复性良好。

### 2.9 回收率试验

精密称取妥舒沙星环合物对照品约40、50、60 mg,各3份,分别按“2.2.3”项下方法制得80%、100%、120%限度浓度的供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以外标法计算主成分含量并计算回收率,结果见表1。

表1 回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Result of recovery test(n=9)

加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
40.05	40.08	100.08		
40.09	40.14	100.12		
39.92	39.90	99.96		
49.98	50.00	100.04		
50.10	50.38	100.56	100.22	0.29
50.01	49.95	99.88		
60.06	60.47	100.68		
59.98	60.29	100.52		
60.08	60.16	100.14		

### 2.10 样品中有关物质测定

分别称取6批(除S-140702外)样品约50 mg,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2.4”项下方法制备对照溶液。分别取上述供试品溶液和对照溶液各10 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以自身对照法测定其中总杂质及最大单个杂质的含量,结果见表2。由表2可见,最大单个杂质含量<0.05%,总杂质含量<0.1%,符合质控标准要求。

## 3 讨论

本试验通过对检测波长进行考察,发现采用250 nm为检测波长时,能有效检出供试品溶液中的有关物质,结果准确、可靠,信噪比符合要求。故最终选定了该检测波长。

表2 样品中有关物质测定结果(n=3)

Tab 2 Results of determination of related substances in samples(n=3)

样品批号	最大单个杂质,%	总杂质,%
140601	0.045	0.076
140602	0.041	0.074
140603	0.043	0.074
140604	0.046	0.080
140605	0.044	0.073
140606	0.044	0.078

本试验前期曾比较了不同体积比(2:1、2:3、5:3, V/V)的乙腈-水为流动相时的分离效果。结果发现,乙腈-水体积比为2:1时,主峰出峰时间过快(约5 min出峰),与杂质峰不能有效分离(分离度<1.5),专属性不佳;体积比为2:3时,主峰出峰时间较慢,理论板数较低(<3 000),不符合药典标准;而当体积比为5:3时,出峰时间适宜,主峰与杂质峰能有效分离(分离度>1.5),且理论板数较高(>3 000)。故最终选定以乙腈-水(5:3, V/V)为本试验的流动相。

综上所述,本方法专属性强,灵敏度、准确度和精密度高,能有效分离主成分峰与杂质峰及酸、碱、氧化、高温、光照破坏条件下产生的降解峰,可用于妥舒沙星环合物中有关物质的测定。

## 参考文献

- [1] 曹忆堇,张婴元,张敬德,等.妥舒沙星的体内外抗菌作用研究[J].中国抗生素杂志,1999,24(2):138.
- [2] 王金香,黎莉.甲苯磺酸妥舒沙星分散片的研制和质量控制[J].海峡药学,2010,22(7):72.
- [3] 张颖,洪海龙,毛颖,等.甲苯磺酸妥舒沙星羟丙基-β-环糊精包合物的制备与表征[C]//中国化学会第29届学术年会摘要集:第07分会:有机化学.北京:中国化学会,2014.
- [4] 胡燕.甲苯磺酸妥舒沙星凝胶的制备及质量标准的建立[J].淮海医药,2013,31(4):353.
- [5] 张雪峰,胡燕.甲苯磺酸妥舒沙星滴眼液的制备与稳定性考察[J].医药导报,2011,30(7):934.
- [6] 雷美生.甲苯磺酸妥舒沙星滴耳液的制备及临床应用[J].海峡药学,2007,19(2):24.
- [7] 孙雪花,高楼军,于浩,等.基于铝敏化荧光法测定甲苯磺酸妥舒沙星的研究与应用[J].内蒙古大学学报:自然科学版,2012,43(1):59.
- [8] 邹尚荣,王明礼,尚德为,等.HPLC-MS/MS测定人血浆中妥舒沙星的浓度[J].中国现代应用药学,2014,7(31):846.
- [9] 石文宏,朱庆玲.高效液相色谱法测定甲苯磺酸妥舒沙星片的含量[J].北方药学,2005,3(5):11.
- [10] 赵玉姣,丁劲松,周彦彬,等.人血浆中甲苯磺酸妥舒沙星的HPLC-荧光法测定及相对生物利用度[J].中国医药工业杂志,2010,41(6):444.

(收稿日期:2016-07-06 修回日期:2016-09-27)

(编辑:周 箐)