

HPLC 法测定盐酸莫西沙星含量及其有关物质

徐颖, 吴琼珠*, 柯学

(中国药科大学药剂学教研室, 南京 210009)

摘要 采用 HPLC 法对盐酸莫西沙星含量及其有关物质进行检测, 色谱柱为 Sepax BR-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-四丁基硫酸铵磷酸缓冲液(28:72), 检测波长为 293 nm, 柱温为 45 °C, 流速为 1.3 mL/min。在所建立的色谱条件下, 盐酸莫西沙星与各杂质分离良好, 盐酸莫西沙星浓度在 38.55 ~ 57.82 μg/mL 范围内与峰面积呈良好线性关系 ($r=0.9998$), 最低检测限为 0.00625 μg/mL, 定量限为 0.025 μg/mL。结果表明, 所建立的方法专属性好, 操作简便, 可用于盐酸莫西沙星含量及其有关物质的含量测定。

关键词 盐酸莫西沙星; 高效液相色谱法; 含量测定; 有关物质

中图分类号 R917 文献标识码 A 文章编号 1000-5048(2012)01-0046-05

Determination of moxifloxacin hydrochloride and its related substances by HPLC

XU Ying, WU Qiong-zhu*, KE Xue

Department of Pharmaceutics, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract An HPLC method was established for the determination of moxifloxacin hydrochloride and its related substances. The method was carried out on a Sepax BR-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with a mobile phase consisting of methanol-buffer solution (tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate 0.5 g, KH₂PO₄ 1.0 g, H₃PO₄ 3.4 g in 1 L of purified water) (28:72) at the flow rate of 1.3 mL/min. The detection wavelength was 293 nm and column temperature was 45 °C. The calibration curves were linear over the range of 38.55-57.82 μg/mL ($r=0.9998$). The quantitative and detection limits were 0.025 μg/mL and 0.00625 μg/mL respectively. Good chromatographic separation of moxifloxacin hydrochloride and its related substances were obtained. As a result, the established HPLC method is simple, and could be used for the determination of moxifloxacin hydrochloride and its related substances.

Key words moxifloxacin hydrochloride; HPLC; content determination; related substances

This study was supported by China National Key Hi-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs(No. 20092X09310-004)

莫西沙星(moxifloxacin)是由德国拜耳公司研制的第4代氟喹诺酮类超广谱抗生素,它保留了第3代抗革兰阴性菌的活性,其8-甲氧基部分还提高了抗革兰阳性菌的活性,特别是增加了对厌氧菌的抗菌活性。1999年首次在德国上市,2002年在我国上市,商品名为拜复乐。由于其吸收快,体内分布广,临床上对绝大多数致病菌的综合疗效已达到或超过β-内酰胺类抗生素^[1-2]。英国药典2009版

收载的莫西沙星质量标准中需对多个有关物质逐一进行控制^[3],其结构见图1,分析方法主要采用HPLC法^[4-5],但参照其标准采用苯基硅烷键合硅胶柱^[6]进行测定,在分离峰定位对照品中的5个杂质时分离度不是特别好,故本文建立了使用常用的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的HPLC分析方法,该方法专属性好,盐酸莫西沙星与合成起始原料、中间体、各杂质及非对映异构体均能得到良好

* 收稿日期 2011-07-27 * 通讯作者 Tel:025-83271079 E-mail:wq2008@sina.com

基金项目 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(No. 20092X09310-004)

分离,方法简便、快速。

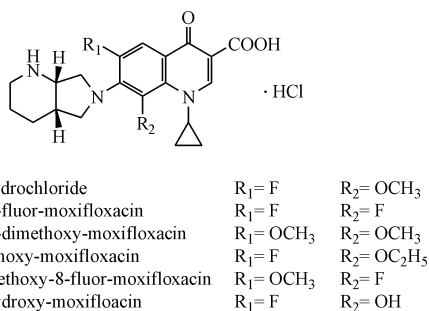


Figure 1 Structure of moxifloxacin hydrochloride and its related substances(5-9) in *British Pharmacopoeia* (2009)

1 材 料

1.1 药品与试剂

盐酸莫西沙星对照品(批号:MX-124-4,纯度99.9%),盐酸莫西沙星(批号:20100601,20100602,20100603),其环合酯,螯合物,(*RS,SR*)非对映异构体(批号:MX-100506-2)(江苏永达药业有限公司);莫西沙星峰定位对照品(批号:Y0000717,英国药典杂质对照品,含有杂质5~9,深圳倍索特科技有限公司),甲醇(色谱纯,美国Tedia有限公司),其他试剂均为市售分析纯,水为纯净水。

1.2 仪 器

LC-10ATvp 型高效液相色谱仪,SPD-10Avp 型紫外检测器,CTO-10ASvp 柱温箱(日本岛津公司),N2000 色谱工作站(浙江大学智能信息工程研究所),UV-2041 紫外分光光度计(日本岛津公司),BP 190S 天平,PB-20 pH 计(德国赛多利斯公司)。

2 方 法

2.1 色谱条件和系统适应性

色谱柱:Sepax BR-C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-缓冲液(四丁基硫酸氢铵 0.50 g,磷酸二氢钾 1.0 g,磷酸 3.4 g,加入水 1 L 中溶解)(28:72),检测波长:293 nm;柱温:45 °C;流速:1.3 mL/min;进样量:20 μL。

稀释液:四丁基硫酸氢铵 0.5 g,磷酸二氢钾 1.0 g,用水 500 mL 溶解后,加入磷酸 2.0 mL,无水亚硫酸钠 0.05 g,待溶解完全后,加水稀释至 1 L。

取盐酸莫西沙星对照品和非对映异构体对照

品适量,精密称定,加稀释液制成每毫升中含有盐酸莫西沙星对照品和非对映异构体各 0.25 mg 的混合对照品溶液,量取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,莫西沙星与非对映异构体的分离度大于 1.5,理论塔板数按莫西沙星峰计算为 12 415。

2.2 方法专属性

2.2.1 盐酸莫西沙星与有关物质的分离效能 根据生产工艺,盐酸莫西沙星合成过程中可能引进的有关物质包括起始原料(环合酯),中间体(螯合物),莫西沙星非对映异构体及对映异构体,杂质 5~9 等,且英国药典 2009 版收录的盐酸莫西沙星质量标准中其有关物质需用峰定位对照品定峰位,且规定杂质 5~9 均不得超过 0.1%。

取莫西沙星峰定位对照品约 5 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加稀释液溶解并稀释到刻度,摇匀,取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图(图 2-A),结果表明,莫西沙星与各杂质分离良好,各杂质间的分离度均大于 1.5,拖尾因子均小于 2.0。另配制同浓度的盐酸莫西沙星、起始原料、中间体和 非对映异构体溶液,各取 20 μL 分别进样及混合进样,记录色谱图,结果其保留时间分别为 11.86, 34.35, 112.56, 9.18 min,说明在此色谱条件下盐酸莫西沙星与起始原料、中间体及非对映异构体均能实现很好的分离,空白溶剂对测定无干扰,结果见图 2(B~D)。

2.2.2 降解产物的检出与确定 取本品约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,分别加入 6 mol/L 盐酸 2 mL,1 mol/L 氢氧化钠 2 mL,3% 双氧水 5 mL,沸水浴中加热 2 h 破坏后,冷却到室温,调节 pH 至中性,用稀释液稀释到刻度,摇匀,取续滤液 20 μL 进样测定。另取本品适量,分别于 130 °C 烘箱中放置 8 h,4 500 lx 光照条件下放置 10 d 后,取高温及光照放样样约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,用稀释液溶解并稀释至刻度,摇匀,取续滤液 20 μL 进样,记录色谱图。结果发现,同样浓度的盐酸莫西沙星样品经酸、碱、氧化、高温及光照条件进行强制破坏后,均有不同程度的降解,产生新的杂质峰,经与峰定位对照品图谱(图 2-A)对照可知,主要降解产物峰为杂质 5~9,且均与盐酸莫西沙星峰分离良好,说明本色谱条件能检出盐酸莫西沙星的有关物质,控制本品的质量是可行的,结果见图 2(E~I)。

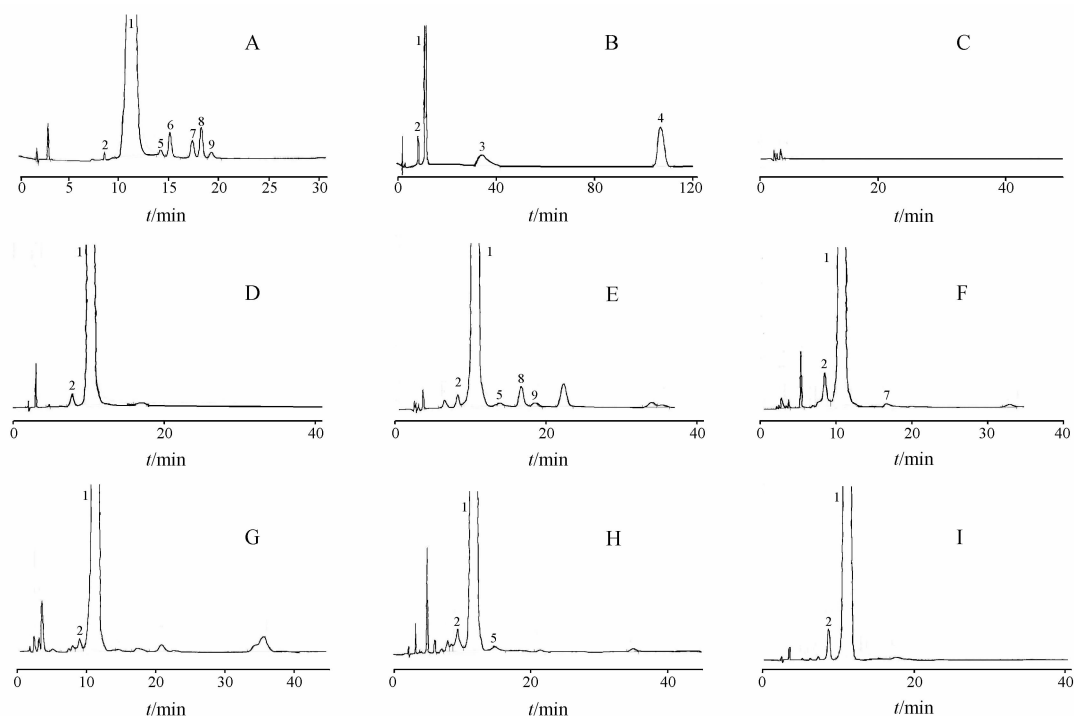


Figure 2 HPLC assay for moxifloxacin hydrochloride and its degradation products

A: Moxifloxacin hydrochloride reference; B: Moxifloxacin hydrochloride and its non-enantiomer, ester cyclization and chelate; C: Blank solvent; D: Moxifloxacin hydrochloride sample; E-I: Sample of moxifloxacin hydrochloride destroyed by acid (E), alkali (F), oxidation (G), light (H), and high temperature (I), respectively

1-4: moxifloxacin hydrochloride (1) and its non-enantiomer (2), ester cyclization (3) and 4-chelate (4); 5-9: degradation products of moxifloxacin hydrochloride

2.3 检测限和定量限

取盐酸莫西沙星适量,用稀释液溶解并逐级稀释,量取 20 μL 进样测定,分别以信噪比(S/N) 3 和 10 确定盐酸莫西沙星的检测限和定量限,结果表明,盐酸莫西沙星的检测限为 6.25×10^{-3} $\mu\text{g/mL}$,定量限为 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 耐用性试验

采用不同色谱柱、调节流动相比例($\pm 5\%$)、检测波长(± 5 nm)及柱温(± 5 $^{\circ}\text{C}$),依法测定,考察主峰和相邻杂质峰间的分离度、主峰的拖尾因子和纯度(按面积归一化法计),结果表明,盐酸莫西沙星在不同的柱温下耐用性不好,而在其余色谱条件下的色谱行为均符合系统适用性要求,耐用性良好,结果见表 1。

2.5 含量测定方法学

2.5.1 线性范围 取盐酸莫西沙星对照品适量,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加稀释液溶解并稀释至刻度,配制成质量浓度为 0.625 mg/mL 的溶液作为标准储备液。精密量取一定量的标准储备液,

加稀释液分别配制成浓度为 40, 42.5, 47.5, 50, 55, 60 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准溶液,在上述色谱条件下依法测定,并以峰面积(A)对浓度(c)进行线性回归,得到线性回归方程: $A = 152\,412c + 23\,640$ ($r = 0.999\,8$)。结果表明:盐酸莫西沙星浓度在 38.55 ~ 57.82 $\mu\text{g/mL}$ 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

Table 1 Durability of HPLC method established for determination of moxifloxacin hydrochloride and its related substances

Item	Condition	Separation degree	Trailing factor	Purity/%
Column	Sepax C ₁₈	3.93	0.78	99.90
	Agilent C ₁₈	3.69	0.86	99.91
Column Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	40	4.25	0.77	99.91
	50	2.92	1.74	99.88
Wavelength/nm	288	4.18	0.74	99.91
	298	4.14	0.82	99.90
Mobile phase	33:67	1.45	1.24	99.93
	23:77	6.00	0.77	99.94

2.5.2 进样精密度与重复性 取上述质量浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,连续进样测定 6 次,记录峰

面积,计算 RSD 为 0.4%。另取同一批样品,精密称定,共 6 份,按含量测定方法重复测定,计算 RSD 为 0.35%。结果表明本测定方法的进样精密度和重复性均较好。

2.5.3 稳定性 取盐酸莫西沙星对照品适量,精密称定,加稀释液溶解并定量稀释成浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,分别于室温放置 0,1,2,4,6,8 h 后测定,记录峰面积,计算 RSD 为 0.58%,表明样品溶液在室温条件下放置 8 h 内均稳定。

2.5.4 回收率 精密称取盐酸莫西沙星对照品 24,30,36 mg,各 3 份,用稀释液溶解并定量稀释成浓度约为 40,50,60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液(分别相当于测定浓度的 80%,100%,120%),依法测定,将测得的峰面积代入线性回归方程,计算得到实测值,将实测值与加入量相比即为回收率。高、中、低 3 个浓度的回收率(%)分别为 99.65、100.79 和 100.97, RSD(%)分别为 1.85、1.44 和 0.69。

2.6 样品测定

2.6.1 含量测定 取盐酸莫西沙星约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,稀释液溶解并稀释至刻度,摇匀,再精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,稀释液稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的供试品溶液。另取盐酸莫西沙星对照品,同法配制,即得对照品溶液。分别精密量取上述对照品溶液和供试品溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,按外标法以峰面积计算含量,3 批样品的含量测定结果见表 2。

Table 2 Content determination of moxifloxacin hydrochloride and its related substances by HPLC

Batch No.	Content/%	Related substances/%	
		Non-enantiomer	Total of impurities
0100601	99.39	0.043	0.064
0100602	99.61	0.039	0.052
0100603	100.49	0.046	0.063

2.6.2 有关物质检查 取盐酸莫西沙星约 25 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,稀释液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得浓度为 0.5 mg/mL 的供试品溶液。将上述溶液稀释 1 000 倍,配制成浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液作为对照溶液。取对照溶液 20 μL 进样,调节检测器灵敏度,使对照溶液中主成分色谱峰的峰高为满量程的 10%~20%。在此色谱条件下,精密量取供试品溶液和对照溶液各 20 μL ,注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2.5 倍,按不加校正因子的主成份自身对

照法计算有关物质的含量。结果表明:3 批原料中均未检测出环合酯,螯合物及杂质 5~9,非对映异构体及未知单个杂质的峰面积均小于对照溶液主峰面积(0.1%),总杂质峰面积均小于对照溶液主峰面积的 3 倍(0.3%),结果见表 2。

3 讨论

3.1 检测波长的确定

取本品原料适量,用稀释液溶解并稀释成浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液,在 200~400 nm 波长范围内进行扫描,结果显示其紫外最大吸收波长为 293.6 nm,李玮等^[4]将盐酸莫西沙星及其杂质进行紫外扫描,发现在 293 nm 附近均有最大吸收,因此参照英国药典 2009 版中盐酸莫西沙星的质量标准,确定检测波长为 293 nm。

3.2 色谱柱的选择

英国药典 2009 版采用苯基硅烷键合硅胶柱测定盐酸莫西沙星的有关物质,但当使用苯基柱测定峰定位杂质对照品时,峰定位对照品中的 5 个杂质峰分离度不好,只有 3 个峰分离出来,而且调节流动相比例为甲醇-缓冲液(23:77),也不能将 5 个峰全部检出(图略),而且此时盐酸莫西沙星的保留时间为 39.12 min,出峰时间太长,故不再继续调节流动相比例。考虑到苯基柱使用的普遍性不是很高,而且由于不同厂家苯基柱的填料差异等原因,导致对样品的分离效果与药典有差异。所以改用应用普遍的 C_{18} 柱,调节流动相比例,发现 C_{18} 柱可以将峰定位对照品中的 5 个峰全部检出,且分离度良好(图 2-A),所以本文建立了以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的 HPLC 分析方法。该方法专属性好,莫西沙星与合成起始原料、中间体、非对映异构体及各杂质均可以得到良好分离,且与相邻峰杂质 5 的分离度达 5.6。鉴于 3 批样品中均未检出环合酯和螯合物,且在此色谱条件下出峰时间较长,故参照英国药典 2009 版莫西沙星的质量标准,将测定时间定为主峰保留时间的 2.5 倍。

3.3 柱温的控制

表 1 的耐用性试验中,柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ 时的拖尾因子为 0.77,柱温 50 $^{\circ}\text{C}$ 时的拖尾因子为 1.74,柱温较低引起色谱峰前沿长,而柱温高时引起色谱峰拖尾,由此可见试验中要对柱温进行严格的控制,不

宜过高,以防引起拖尾。

参考文献

- [1] Chen HM, Zhao JB, Liu T, *et al.* Using HPLC-UV to assay concentration of moxifloxacin in human plasma [J]. *Zhejiang Pract Med* (浙江实用医学), 2010, **15**(5): 402-404.
- [2] Li PJ, Qiao J. The role of moxifloxacin and clinical application [J]. *Chin Mod Drug Appl* (中国现代药物应用), 2009, **3**(5): 99-100.
- [3] Kumar YR, Prasad Raju VV, Kumar RR, *et al.* Structural identification and characterization of impurities in moxifloxacin [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, **34**(5): 1125-1129.
- [4] Li W, Hu CQ, Hang TJ, *et al.* Identification of related substances of moxifloxacin by spectra correlation in chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2006, **41**(8): 627-631.
- [5] Zhu B, Hu CQ, Jiang SJ, *et al.* Determination of moxifloxacin preparations by high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Ant* (中国抗生素杂志), 2002, **27**(8): 462-464.
- [6] British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia* [S]. London: Stationary Office, 2009: 4 051-4 054.

· 新信息 ·

2012年有望获得FDA批准的热点药物

1. Adasuve (Alexza 制药公司) 适应证: 精神分裂症患者过度兴奋
2. AMR101 (Amarin 公司) 适应证: 血脂异常
3. Avanafil (VIVUS 公司) 适应证: 勃起功能障碍
4. Bio-T-Gel (梯瓦制药 (Teva) 和 BioSante 制药公司) 适应证: 性腺功能低下症
5. Bydureon (Amylin 制药公司) 适应证: 糖尿病
6. Carfilzomib (Onyx 制药公司) 适应证: 多发性骨髓瘤
7. Contrave (Orexigen Therapeutics 公司) 适应证: 肥胖症
8. Corlux (Corcept 制药公司) 适应证: 库兴氏综合征 (Cushing's Syndrome)
9. Dapagliflozin (Bristol-Myers Squibb) 公司 适应证: 糖尿病
10. Eliquis (Pfizer 和 Bristol-Myers Squibb 公司) 适应证: 房颤患者中风和血栓的预防
11. Inlyta (axitinib) (Pfizer 公司) 适应证: 肾癌
12. Kalydeco (Vertex 制药公司) 适应证: 囊性纤维化
13. Levadex (MAP 制药公司) 适应证: 偏头痛, 治疗偏头痛的吸入剂
14. Linaclotide (Ironwood 制药公司) 适应证: 肠易激综合征
15. Lorcaserin (Arena 制药公司) 适应证: 肥胖症
16. Northera (Chelsea Therapeutics 公司) 适应证: 体位性低血压
17. Peginesatide (Affymax 公司) 适应证: 肾透析患者的贫血
18. Pixantrone (Cell Therapeutics 公司) 适应证: 非霍奇金淋巴瘤
19. Qnexa (Vivus 公司) 适应证: 肥胖症
20. ridaforolimus (美国 Merck 和 Ariad 制药公司) 适应证: 肉瘤
21. Surfaxin (Discovery Labs 公司) 适应证: 早产儿呼吸窘迫综合征
22. Tysabri (Biogen Idec 和 Elan 公司)
23. Uplyso (Pfizer 和 Protalix Biotherapeutics 公司) 适应证: 高雪氏病 (Gaucher's disease)
24. Vismodegib (Roche 和 Curis 公司) 适应证: 晚期基底细胞癌
25. Xgeva (Amgen 公司) 适应证: 预防前列腺癌骨转移
26. 黄体酮阴道凝胶 (Columbia Labs 和 Watson 制药公司) 适应证: 降低早产风险

(生物谷)