

左旋盐酸安妥沙星中对映体杂质的高效毛细管电泳法检测

洪建文¹, 胡昌勤²

(1. 广东省药检所, 广东 广州 510180; 2 中国药品生物制品检定所, 北京 100050)

摘要: 建立了高效毛细管电泳检测盐酸安妥沙星中对映体杂质的方法。以含 20 mmol/L HP- β -CD 与 70 mmol/L 磷酸二氢钾溶液 (用磷酸调节 pH 3.0) 为运行缓冲液, 电压 30 kV, 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 297 nm。可在 10 min 内将两对映体良好分离, 检出限为 2 mg \cdot L⁻¹ (S/N=3), 左旋安妥沙星在 4.89 ~ 61.2 mg \cdot L⁻¹ 呈良好的线性关系, 日内精密度 (RSD) 为 2.1% (n=5), 日间精密度 (RSD) 为 3.2% (n=15)。

关键词: 盐酸安妥沙星; 对映体杂质; 高效毛细管电泳法

中图分类号: O657.8; TQ455.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2007)06-0888-03

Determination of Enantiomeric Impurity of Antofloxacin Hydrochloride by Capillary Electrophoresis

HONG Jian-wen¹, HU Chang-qin²

(1. Guangdong Province Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China; 2 National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Productions, Beijing 100050, China)

Abstract: Antofloxacin hydrochloride is a new chiral drug. A sensitive, simple and accurate method for enantiomeric impurity determination of antofloxacin hydrochloride was firstly developed by capillary electrophoresis. The optimum experimental conditions were 20 mmol/L HP- β -CD, 70 mmol/L phosphate buffers (pH 3.0) with an effective voltage of 30 kV at 30 $^{\circ}$ C and detected at 297 nm. The method offers good separation of the two enantiomers in less than 10 min. The limit of detection was 2 mg \cdot L⁻¹ (S/N=3). Good linear ranges were obtained from 4.89 to 61.2 mg \cdot L⁻¹. The relative standard deviations of intra- and inter-day were 2.1% (n=5) and 3.2% (n=15).

Key words: antofloxacin hydrochloride; enantiomeric impurity; capillary electrophoresis

盐酸安妥沙星, 属喹诺酮类手性药物 (结构式见图 1), 2000 年由中国专利局授权, 获得化合物专利、合成工艺专利和抗菌药用途专利^[1], 为我国拥有自主知识产权的一类新药。药理毒理实验表明该药具有广谱、强效和安全的特点, 该药已完成国家食品药品监督管理局要求的临床实验研究, 准备进行试生产。由于盐酸安妥沙星本身是单一的左旋体, 为了严格控制药品的工艺和质量, 必须对其对映体的残留量进行控制。

目前, 关于高效毛细管电泳法手性分离盐酸安妥沙星与其右旋体的方法, 国内外均未见报道。在采用高效毛细管电泳进行手性药物拆分中, 基于主客体配合物形成手性识别原理的环糊精-毛细管区带电泳法应用最为成功。常用的环糊精手性选择剂只有 α -、 β -、 γ -环糊精 (CD) 及其衍生物。实验发现 β -类 CD 的分离能力最强^[2-5], 应用最多, 特别适合芳香族化合物。本文以 β -环糊精 (β -CD)、羟丙基- β -环糊精 (HP- β -CD)、二甲基- β -环糊精 (DM- β -CD) 和羧甲基- β -环糊精 (CM- β -CD) 为手性选择剂, 对盐酸安妥沙星对映体和氧氟沙星对映体的拆分结果进行比较。首次建立了检测盐酸安妥沙星对映体杂质的高效毛细管电泳法。

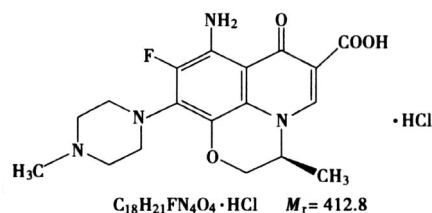


图 1 盐酸安妥沙星的结构式
Fig. 1 Structure of antofloxacin hydrochloride

收稿日期: 2007-05-18; 修回日期: 2007-06-19

作者简介: 洪建文 (1972-), 女, 福建平和人, 副主任药师, 硕士, Tel: 020-81887687, E-mail: gzjianwen@yahoo.com.cn

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

熔融石英毛细管 55 cm × 75 μm (有效柱长 50 cm); Agilent HP^{3D}毛细管电泳仪; 二极管阵列检测器; HP^{3D}工作站; Millipore 纯水机。

盐酸安妥沙星及其右旋异构体均由安徽环球药业提供。-CD (Sigma 公司)、HP- -CD (Aldrich Chemical Company), CM- -CD (华北制药厂), DM- -CD (Sigma 公司), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 和磷酸氢二钾均为分析纯, 实验用水为 Millipore 超纯水, 缓冲液、供试品溶液、对照品溶液使用前均用 0.45 μm 滤膜过滤。

1.2 色谱条件

运行缓冲液: 含 20 mmol/L HP- -CD 与 70 mmol/L 磷酸二氢钾, 用磷酸调节 pH 3.0 的缓冲液; 电压: 30 kV 由正到负; 柱温: 30 °C; 检测波长: 297 nm; 进样方式: 压力进样 345 kPa, 进样 4 s, 每次进样前用 1 mol/L 氢氧化钠冲洗 5 min, 超纯水冲洗 2 min, 再用运行缓冲液冲洗 5 min。

1.3 实验方法

样品溶液的制备: 取盐酸安妥沙星精密称定, 加水溶解并稀释成 1 g/L。

混合溶液的制备: 取盐酸安妥沙星与其右旋对映异构体适量, 加水溶解并稀释成分别含 0.5 g/L 的混合溶液。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

2.1.1 检测波长的选择 盐酸安妥沙星在 297 nm 有最大吸收, 因此选择 297 nm 为检测波长。

2.1.2 手性选择剂的选择 实验发现, 天然的 -CD 对盐酸安妥沙星对映体没有手性选择作用。环糊精的衍生物, 中性的 HP- -CD 和 DM- -CD 及带负电的 CM- -CD 均可使左旋体和右旋体达到基线分离, 且均为左旋体先出峰。环糊精分子为锥形筒体, 筒腔内部呈相对疏水, 羟基在开口处, 呈亲水性。其手性识别取决于主客体之间的包结络合作用和氢键作用, 而客体的分子大小和形状是否能与环糊精疏水腔很好地匹配是产生这两种作用的前提^[6]。从结构上看, 盐酸安妥沙星分子的主要部分均是一个较大的含苯环的三环体系, 它和分子另一端的较小的哌嗪环以 C—N 键相连。当与环糊精作用时, 较小的哌嗪环易于进入环糊精的空腔, 而较大的三环体系难于被环糊精分子完全包容, 造成分子手性中心离空腔边沿较远。环糊精衍生化后, 相当于加长了环糊精分子的长度, 其衍生基团易于与分子手性中心发生作用, 因此衍生化的环糊精比未衍生化的环糊精有更好的分离效果^[7]。

不同手性试剂对盐酸安妥沙星及右旋异构体的拆分实验结果见图 2。比较而言, 以 HP- -CD 为手性选择剂较适宜。虽然 CM- -CD 所需的试剂浓度最低, 但迁移时间较 HP- -CD 稍长, 且峰的对称性不如 HP- -CD。可能由于环糊精发挥手性作用在 pH 2~4 范围, 盐酸安妥沙星带电, 中性的环糊精更适用。据报道在许多药物的手性拆分中, 以 HP- -CD 最为出色, 这不仅与 CD 分子空腔大小有一定关系, 而且还和 CD 的对称性有关。同时, HP- -CD 也较常用, 易得。

2.1.3 运行缓冲液的选择 (1) HP- -CD 浓度的选择 选择 10、20、30、40 mmol/L HP- -CD 进行实验, 结果显示, 随环糊精浓度的增加, 迁移时间变长, 分离度增大, 当浓度增加到一定值时, 再加大浓度分离改善不明显。在浓度为 20 mmol/L, 两对映体已达到基线分离, 且分离时间较短。故选择 20 mmol/L HP- -CD。

(2) 磷酸二氢钾浓度的选择 分别采用 20、40、70、90 mmol/L 磷酸二氢钾缓冲液, 发现随浓度增高, 分离度变大, 迁移时间变化不大。而高浓度的磷酸缓冲液, 使电流过大, 90 mmol/L 时已接近 100 μA。故选择 70 mmol/L 磷酸二氢钾。

(3) 缓冲液 pH 值的选择 选择 pH 2.0、2.5、3.0、4.0、5.0 进行实验, 随 pH 减小, 分离变好, pH 小于 3.0, 改善不明显。pH 为 3.0 时分离及迁移时间适宜。

(4) 温度的选择 考察不同温度对盐酸安妥沙星对映体分离度的影响。随着温度的降低, 盐酸安

妥沙星两对映体的分离度增加, 但保留时间延迟, 综合考虑选用 30 作为操作温度可以达到完全分离。

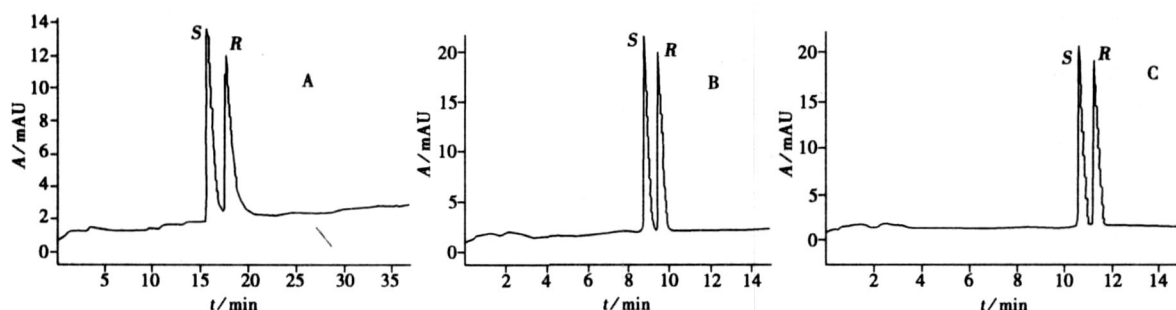


图 2 盐酸安妥沙星与其右旋异构体的高效毛细管电泳图

Fig. 2 Capillary electropherograms of antofloxacin hydrochloride and (R)-Antofloxacin
A. 7 mmol/L CM- β -CD with 5 mmol/L Tris buffers (pH 3.0); B. 20 mmol/L HP- β -CD with 70 mmol/L phosphate buffers (pH 3.0); C. 40 mmol/L DM- β -CD with 70 mmol/L phosphate buffers (pH 3.5); S. (S)-antofloxacin; R. (R)-antofloxacin

(5) 电压的选择 效率与电压间存在极大值。极大电压通常也是最佳工作电压。在本实验中, 30 kV 为仪器允许的最大电压。考察电压变化的影响, 随着电压的降低, 分离时间延长, 分离度略有提高。考虑到节省分析时间, 选用 30 kV 为分离电压。

2.2 检出限与线性范围

在确定的最佳实验条件下, 盐酸安妥沙星在 $4.89 \sim 61.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度范围内与峰面积和校正峰面积 (峰面积/迁移时间) 呈良好的线性关系, 峰面积回归方程为 $y = 539x + 0.391$, $r = 0.9996$; 校正峰面积回归方程为 $y = 61.913x + 0.026$ (y 为峰面积 (mAU), x 为质量浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)), $r = 0.9993$ 。检出限为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($S/N = 3$)。

2.3 精密度与回收率实验

取一批号未检出对映体杂质的样品, 加入相当于质量分数为 0.5% 的右旋异构体, 加水稀释成含安妥沙星 1 g/L 和含右旋异构体 0.005 g/L 的混合溶液, 按确定的方法实验, 日内重复测定 5 次, 并连续测定 3 天。日内精密度 (RSD) 为 2.1% ($n = 5$), 日间精密度 (RSD) 为 3.2% ($n = 15$)。

参照同类手性药物的对映体杂质一般控制在 1% 以内, 取一批号样品, 在样品溶液中加入相当于质量分数为 0.5% 的右旋异构体, 结果平均回收率为 97%, RSD ($n = 3$) 为 1.1%。

2.4 实际样品分析

取盐酸安妥沙星原料 (6 批), 精密称定, 加水溶解稀释成 1 g/L 。测定 3 批样品, 均未检出右旋对映异构体, 表明样品中的对映体杂质质量分数小于 0.2% (检出限 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

参考文献:

- [1] 叶辉, 武济民, 杨玉社, 等. 左旋氧氟沙星衍生物 (YH54, YH57) 体外抗菌活性 [J]. 中国药理学通报, 2002, 18 (1): 112 - 113.
- [2] 侯经国, 杜红英, 高锦章. 羟乙基-环糊精作为手性选择剂对手性药物的毛细管电泳拆分 [J]. 分析测试学报, 2006, 25 (2): 84 - 86.
- [3] YU YQ, CHEN Y, LIN, et al. Enantiomeric separation of meptazinol hydrochloride by capillary electrophoresis [J]. Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences, 2004, 13 (3): 187 - 189.
- [4] 朱颐申, 屠春燕, 顾薇, 等. 高效毛细管电泳法手性分离 D2 氨基酸取代胸腺五肽类似物的研究 [J]. 分析化学, 2007, 35 (1): 127 - 130.
- [5] 杜国华, 刘力宏, 魏君, 等. 毛细管电泳分离手性药物罗格列酮钠对映体的方法研究 [J]. 分析测试学报, 2005, 24 (6): 62 - 65.
- [6] 陈亮, 钞建宾, 马丽花. 氟哌酸-羟丙基环糊精固体包结物的制备及其性质研究 [J]. 波谱学杂志, 2000, 17 (3): 203 - 210.
- [7] 俞特, 王义明, 罗国安. 氧氟沙星对映体的毛细管电泳手性分离 [J]. 药学学报, 1997, 32 (3): 203 - 206.