

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.05.02

HPLC-DAD 法检测马波沙星片中 马波沙星氧化物的研究

赵晶晶

(山西省饲料兽药监察所,太原 030027)

[收稿日期] 2019-01-02 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019) 05-0010-07 [中图分类号] S859.796

[摘要] 建立并验证了高效液相色谱法测定马波沙星片中马波沙星氧化物含量的方法。试验采用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μ m),以辛烷磺酸钠磷酸盐缓冲液-甲醇-四氢呋喃(65:32:3)为流动相,流速 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,检测波长为 210~400 nm。试验结果表明:马波沙星氧化物在 0.5~100 μ g/mL 范围内线性良好, $R^2=0.9997$,平均回收率为 95.9% ($n=9$), $RSD\leq 1.5\%$ 。方法检测限为 0.2 μ g/mL,专属性好,可用于马波沙星片的质量控制。

[关键词] 马波沙星氧化物;高效液相色谱法

Content Determination of Marbofloxacin Oxide in Marbofloxacin Tablets by HPLC-DAD

ZHAO Jing-jing

(Shanxi Province Feed and Veterinary Drug Supervision Institute, Taiyuan 030027, China)

Abstract: The method for content determination of marbofloxacin oxide in marbofloxacin tablets by HPLC-DAD was developed and validated. The test was performed on a C18 column(4.6 mm×250 mm, 5 μ m) mixed with 32 volumes of methanol and 3 volumes tetrahydrofuran with 65 volumes of sodium octane sulfonate phosphate buffer as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 $^{\circ}$ C, and the determination wave length was 210~400 nm. It is shown that the good linear relationship was accepted in the range of 0.5~100 μ g/mL. ($r^2=0.9997$), and the average recovery was 95.9% ($n=9$) with RSD less than or equal to 1.5%. This method has the good specificity, as the limit of detection was 0.2 μ g/mL. As the result, this method was suitable to control the quality of marbofloxacin tablets.

Key words: marbofloxacin oxide; HPLC-DAD

马波沙星是隶属于喹诺酮类抗菌药,目前已在英国、法国、美国和欧洲上市并被列为动物专用药,马波沙星对多数肠杆菌、多杀性巴斯德氏菌、绿脓杆菌、金黄葡萄球菌、中间葡萄球菌的抑制和杀灭

作用与恩诺沙星和环丙沙星相当,对红霉素、林可霉素、氯霉素、强力霉素、磺胺药的耐药病原菌依然有效。马波沙星组织渗透力强,在体内吸收迅速、完全、分布广泛,消除半衰期长,安全剂量范围宽,

无明显生殖和遗传毒性^[1-3]。无论是肌肉注射还是口服给药,生物利用度都高^[4]。目前马波沙星已能在国内大规模生产,具有广阔的应用前景。

药物杂质影响药物质量和疗效,有必要掌握药物杂质的产生并采取一定的措施严格控制药品质量。药物的副作用与杂质有一定的相关关系,掌握微量杂质的形成并避免药物副作用具有重要意义^[5]。研究人员采用高效液相色谱^[6-7]及高效液相色谱串联质谱^[8]的方法分析马波沙星及其代谢产物,以期对马波沙星药物评价提供一定的支持。马波沙星化学名为 9-氟-2,3-二氢-3-甲基-10-(4-甲基-1-哌嗪基)-7-氧代-7H-吡啶-[3,2,1-ij](4,1,2) 苯并恶二嗪-6-羧酸,分子式为 C₁₇H₁₉FN₄O₄,在贮藏过程中会产生杂质,其中以氧化杂质最为明显,氧化产物为 1-氧-4-[9-氟--3-甲基-7-氧代 2,3-二氢-7H-吡啶--[3,2,1-ij](4,1,2) 苯并恶二嗪-10-二甲基氨基] 甲基哌嗪-6-羧酸,因而通过对氧化杂质含量的检测,可以对产品的质量稳定性做出判断。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器 安捷伦 1100 高效液相色谱仪,二极管阵列检测器。超声仪,昆山市超声仪器有限公司,KQ-250 型。水浴锅,德国 JULABO, TW12 型。

1.1.2 对照品 马波沙星对照品,含量为 100.0%,批号为 PMAB160301B,马波沙星氧化物对照品含量为 99.9%,批号为 MABF-YXM-2028-007,二者均来源于海门慧聚药业有限公司。

1.1.3 其他试剂 甲醇为色谱纯试剂;其他试剂均为分析纯试剂。

1.1.4 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 取磷酸二氢钾 1.1998 g,置 1000 mL 量瓶中,加水 950 mL 使溶解,用磷酸调节 pH 值至 2.6,用水稀释至刻度。

1.1.5 辛烷磺酸钠磷酸盐缓冲液 取辛烷磺酸钠 2 g,置 1000 mL 量瓶中,加 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液溶解并稀释至刻度。

1.1.6 稀释溶剂^[9] 取 0.01 mol/L 的磷酸盐缓冲液 650 mL,加甲醇 320 mL,四氢呋喃 30 mL,搅拌摇

匀,过滤。

1.1.7 硼酸-氯化钾缓冲液(pH 9.0)^[10] 取硼酸 3.09 g,加 0.1 mol/L 氯化钾溶液 500 mL 使溶解,再加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 210 mL,混匀。

1.1.8 马波沙星片 法国威隆制药股份有限公司(VETOQUINOL S.A.)生产,规格 80 mg。

1.2 溶液的制备

1.2.1 马波沙星氧化物对照品储备液的配制 取马波沙星氧化物对照品 50.05 mg,精密称定,置 500 mL 量瓶中,用水使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为氧化物对照品储备液。

1.2.2 马波沙星对照品溶液的配制 取马波沙星对照 80 mg,精密称定,置 200 mL 量瓶中,用 1.1.6 项稀释溶剂稀释至刻度,摇匀,超声处理 5 min,置 60 ℃ 水浴振荡 3 min 后,再超声处理 10 min,摇匀,作为马波沙星对照品储备液。取 3.00 mL 储备液置 100 mL 容量瓶中,用稀释溶剂稀释至刻度,作为马波沙星对照品溶液。

1.2.3 马波沙星氧化物标准工作液的配制 分别精密量取氧化物对照品储备液 5、3、5、10、5、2、1、1 mL 置 10、10、25、100、100、100、100、200 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为对照品工作液浓度分别为 50、30、20、10、5、2、1、0.5 μg/mL。

1.2.4 供试品溶液的配制^[9] 取马波沙星片 10 片,研细,精密称取适量,约相当于马波沙星 0.1 g,置 100 mL 量瓶中,用硼酸-氯化钾缓冲液(pH 9.0)溶解并稀释至刻度,摇匀,超声处理 5 min,置 60 ℃ 水浴振荡 3 min 后,再超声处理 10 min,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,置 50 mL 量瓶中,用稀释溶剂稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

1.2.5 光照破坏样品溶液的配制 取马波沙星片 10 片置玻璃平皿中,放在 4500 lx 的灯下照射 1 d,研细,精密称取适量(约相当于马波沙星 0.1 g)按 1.2.4 项方法配制,作为光照破坏样品溶液。

1.2.6 添加样品溶液的配制 农业部 2329 号公告中,马波沙星氧化物限量为不得过 0.5% (W/W),以此限度作为中间浓度,分别制备 3 个浓度的样品。取马波沙星片 30 片,研细,精密称取 9 份样

品,每份样品约相当于马波沙星 0.2 g,添加氧化物对照品三个浓度,分别添加 0.8、1、1.2 mg,每个浓度添加三份。完成添加后,置 200 mL 量瓶中,用硼酸-氯化钾缓冲液(pH 9.0)溶解并稀释至刻度,摇匀,超声处理 5 min,置 60 ℃水浴振荡 3 min 后,再超声处理 10 min,摇匀,滤过,精密量取续滤液 10 mL,置 50 mL 量瓶中,用稀释溶剂稀释至刻度,摇匀,作为添加样品溶液。

1.2.7 马波沙星与马波沙星氧化物混合溶液的配制 取 1.2.2 项马波沙星对照品储备液 15、20、25 mL 分别置 50 mL 容量瓶中;取 1.2.3 项中浓度为 5 μg/mL 的马波沙星标准工作液 10、20、30 mL 分别置上述 3 个容量瓶中,用稀释溶剂稀释至刻度,摇

匀,作为混合溶液 1~3。

1.3 色谱条件 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶,4.6 mm×250 mm,5 μm。柱温 30 ℃。流动相:辛烷磺酸钠磷酸盐缓冲液-甲醇-四氢呋喃(65:32:3)。流速 1.0 mL/min。检测波长 210~400 nm,分辨率 1.2 nm。记录298 nm波长处的色谱图。进样量 10 μL。

2 结果与分析

2.1 准确度 取 1.2.6 项添加样品溶液按 1.3 项色谱条件检测,结果见表 1。

2.2 重复性 取 1.2.7 项马波沙星与马波沙星氧化物混合溶液 1~3,按 1.3 项色谱条件检测,每份样品测定 3 次,计算马波沙星及马波沙星氧化物的响应因子,以响应因子作为评价依据,结果见表 2。

表 1 准确度测定结果
Tab 1 Accuracy test results

样品重/g (约相当于马波沙星 0.2 g)	氧化物对照品 添加量/mg	测得量/mg	回收率/%	RSD /%	平均回收率/%
2.5271	0.81	0.80	98.8	1.4	95.9
2.5270	0.84	0.81	96.4		
2.5265	0.82	0.79	96.3		
2.5261	1.04	1.01	97.1		
2.5269	1.03	0.98	95.1	1.2	
2.5273	1.02	0.99	97.1	1.5	
2.5264	1.23	1.17	95.1		
2.5266	1.22	1.13	92.6		
2.5272	1.20	1.14	95.0		

表 2 重复性测定结果
Tab 2 Repeatability test results

溶液编号	成分名称	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积	响应因子 (样品浓度/峰面积)	平均响应因子	RSD/%
1	马波沙星	120	39527	0.0030	0.0030	0.15
			39554	0.0030		
			39601	0.0030		
			52879	0.0030		
2		160	52783	0.0030		
			52801	0.0030		
			66097	0.0030		
3		200	66186	0.0030		
			66101	0.0030		

续表						
溶液编号	成分名称	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积	响应因子 (样品浓度/峰面积)	平均响应因子	RSD/%
1		1	321	0.0031	0.0031	1.61
			334	0.0030		
			329	0.0030		
			633	0.0032		
2	马波沙星氧化物	2	647	0.0031	0.0031	1.61
			641	0.0031		
			968	0.0031		
3		3	979	0.0031		
			962	0.0031		

马波沙星氧化物相对于马波沙星的相对响应因子为 1.03。

2.3 线性 吸取 1.2.3 项马波沙星氧化物标准工作液和 1.2.1 项氧化物对照品储备液,按照 1.3 项所述色谱条件测定,标准工作液色谱图见图 1,测定结果见表 3。以峰面积为纵坐标,以马波沙星氧化物质量浓度 $C(\mu\text{g}/\text{mL})$ 为横坐标线性回归,得回归方程为: $Y=320.74X+56.382$ ($r^2=0.9997$),检测结果表明,在 $0.5\sim100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内有良好的线性关系。

表 3 线性测定结果

Tab 3 Linear measurement results

溶液编号	氧化物对照品浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	峰面积
1	0.5	161
2	1	336
3	2	671
4	5	1539
5	10	3211
6	20	6373
7	30	10098
8	50	16234
9	100	31967

2.4 专属性 取 1.2.2 项马波沙星对照品溶液及 1.2.5 项光照破坏样品溶液,按照 1.3 项色谱条件测定,检测结果见图 1~图 6,马波沙星与马波沙星氧化物在检测过程中相互不干扰,马波沙星在光照条件下不稳定,由光照破坏样品溶液检测结果来看,马波沙星片产生的其他杂质与马波沙星氧化物峰的分离度良好,试验中采用了 DAD 检测器,在 298 nm 的色谱图上,马波沙星氧化物的相对保留时间为 1.5,光谱图中马波沙星氧化物的吸收峰值的位置与马波沙星是相同的,用以上两点可以区分马波沙星氧化物和其他杂质,说明本分析方法可以较好地排除干扰,专属性强。

2.5 检测限 将 1.2.6 项中低浓度添加样品逐步稀释检测,以信噪比为 3 : 1 时马波沙星氧化物的浓度作为检测限(图 7),检测限为 $0.2\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 定量限 将 1.2.6 项中低浓度添加样品逐步稀释检测,以信噪比为 10 : 1 时马波沙星氧化物的浓度作为检测限,定量限为 $0.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.7 范围 根据 2.3、2.4、2.5、2.6 项的结果分析,马波沙星氧化物的浓度范围在 $0.2\sim100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内均可获得可靠结果。根据农业部 2329 号公告该物质的限度为不得过 0.5%(W/W),按 1.2.4 项方法配制样品时,该限度在被测溶液中的浓度为 $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 。因而,检测限、定量限、限度均在检测范围之内。

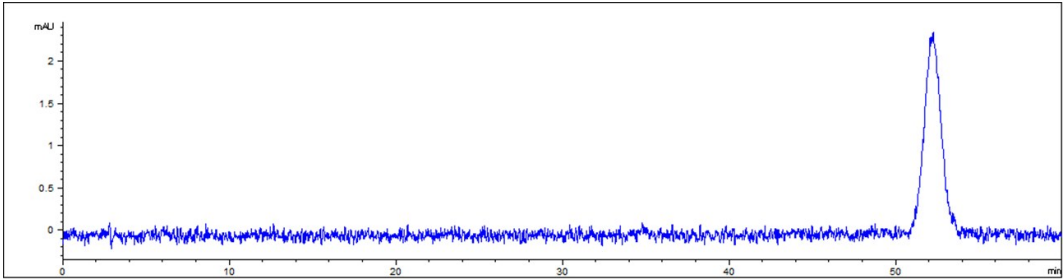


图 1 马波沙星氧化物图谱 (1 µg/mL)

Fig 1 Marbofloxacin oxide chromatogram (1 µg/mL)

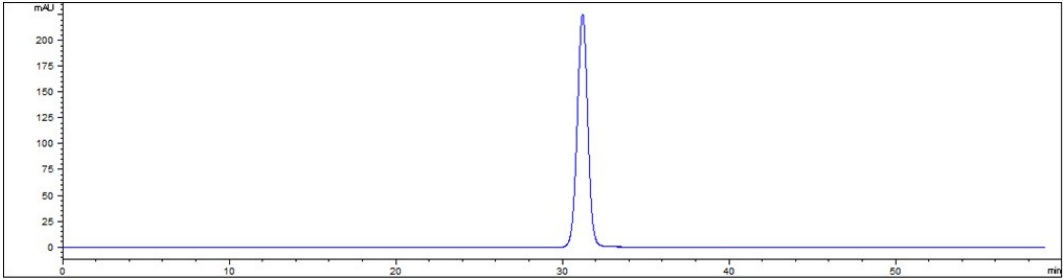


图 2 马波沙星对照品图谱 (12 µg/mL)

Fig 2 Marbofloxacin chromatogram (12 µg/mL)

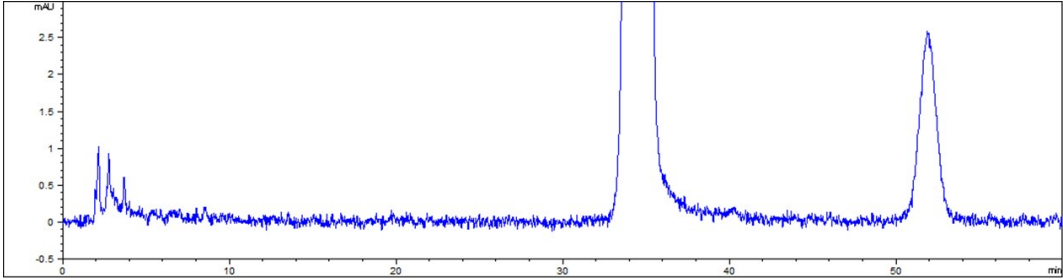


图 3 马波沙星与马波沙星氧化物混合溶液图谱 (马波沙星 120 µg/mL、马波沙星氧化物 1 µg/mL)

Fig 3 Marbofloxacin and Marbofloxacin oxide chromatogram (Marbofloxacin 120 µg/mL、Marbofloxacin oxide 1 µg/mL)

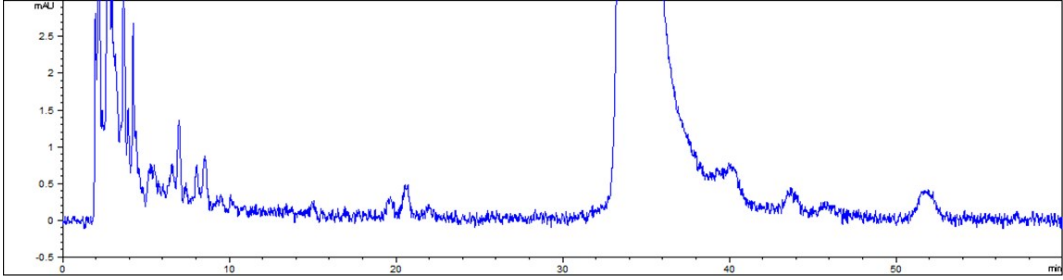


图 4 光照破坏马波沙星片样品图谱

Fig 4 Marbofloxacin tablets chromatogram

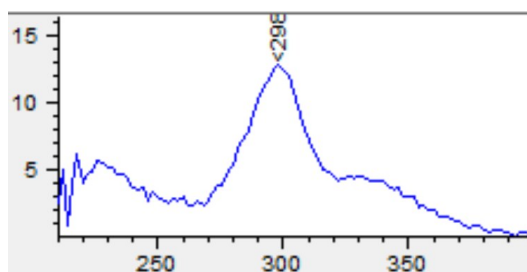


图 5 马波沙星氧化物光谱

Fig 5 Marbofloxacin oxide spectrogram

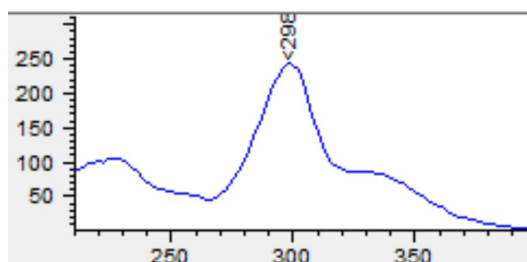


图 6 马波沙星光谱

Fig 6 Marbofloxacin oxide spectrogram

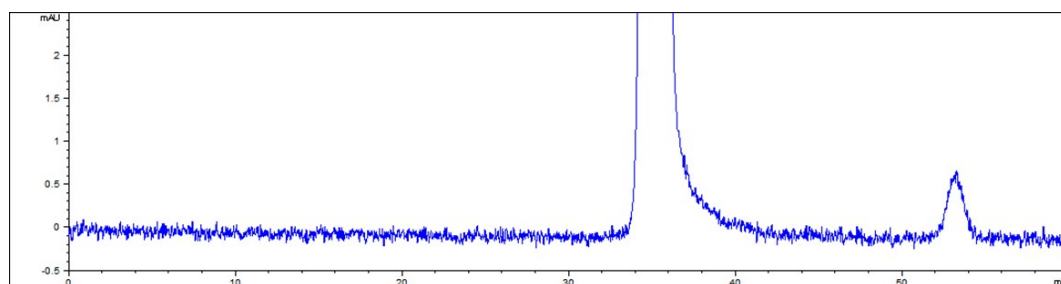


图 7 检测限图谱 (0.2 µg/mL)

Fig 7 limit of detection chromatogram (0.2 µg/mL)

2.8 耐用性 对流动相组成、缓冲液 pH 值、柱温、流速、色谱柱的品牌、柱长等因素进行考察,发现流动相比比例在 $\pm 5\%$,缓冲液 pH 值在 ± 0.2 pH 单位内,检测结果较为稳定,流速、色谱柱的品牌、柱长对保留时间影响明显,但马波沙星氧化物的相对保留时间均在 1.5 左右。柱温在 ± 2 °C 范围内,相对保留时间较为稳定。

3 讨论

任何影响药物纯度的物质均可能具有潜在的生物活性,药品在临床使用中产生的不良反应除了与药品本身的药理活性有关外,与药品中存在的杂

质也有很大关系。因而在药品生产和贮存过程中控制药品中杂质的含量是非常必要的。在实际检测工作中,要求杂质的检测方法既能保证药品质量可控,又能方便快捷地完成检测工作。尤其在新产品、新剂型研发过程中根据每种药物独有的理化性质及稳定性情况,研究制定适宜的杂质检测方法成为质量标准研究的重要一环。马波沙星经加速和长期稳定性试验,在避光条件下保存具有较好的稳定性^[11-12],但在光照条件下,会出现多种杂质,氧化物是最明显的杂质,在查询到的相关文献中未见专门就马波沙星氧化物与马波沙星含量用高效液

相色谱二极管阵列检测器检测结果的论述。本文的方法,用色谱图中的保留时间,结合光谱图最大吸收峰的位置,可以有效区分马波沙星氧化物与其他杂质,因而用马波沙星氧化物可以作为马波沙星片稳定性的标志物,通过控制马波沙星氧化物的含量来控制马波沙星片的杂质水平。由于马波沙星氧化物与马波沙星的结构十分相近^[5],发色基团是一致的,从本文的检测结果可以证实:二者光谱图基本一致,均在 298 nm 波长处有最大吸收,色谱图中马波沙星氧化物相对于马波沙星的相对响应因子为 1.03。所以分析后认为,在马波沙星片有关物质的检测中可以采用自身对照的方法来检测并控制马波沙星氧化物的含量,这样更方便,更快速,可以避免马波沙星氧化物对照品的购置,线性溶液的配制及繁琐的计算。为避免在检测过程中产品受光照的影响,建议在检测过程中最好使用棕色容量瓶完成检测。

参考文献:

- [1] 岳永波,吴好庭,范小平,等. 国产马波沙星注射液在母猪体内的药代动力学[J]. 中国兽药杂志, 2017, 53(1): 103-104.
Yue Y B, Wu H T, Fan X P, *et al.* Pharmacokinetics of domestic mabofloxacin injection in sows[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2017, 53(1): 103-104.
- [2] 曾庆林,苏佳,万鹏,等. 马波沙星在猪多杀性巴氏杆菌感染组织液中药代动力学的研究[J]. 中国兽医科学, 2017, (10): 1326-1330.
Zeng Q L, Su J, Wan P, *et al.* Pharmacokinetics of marbofloxacin in tissue cage fluid of pigs infected with *Pasteurella multocida* [J]. Chinese Veterinary Science, 2017, (10): 1326-1330.
- [3] 王志强,陈杖榴. 动物专用氟喹诺酮类抗菌新药——麻保沙星[J]. 中兽医医药杂志, 2001, (4): 38-41.
Wang Z Q, Chen Zh L. New drug " marbofloxacin" animal specific fluoroquinolones antimicrobial[J]. Chinese Journal of Veterinary Medicine, 2001, (4): 38-41.
- [4] 李云峰,曾振灵,陈杖榴,等. 麻保沙星(marbofloxacin)在猪体内的药代动力学[J]. 中兽医学报, 2004, (2): 177-180.

- Li Y F, Zeng ZH L, Chen ZH L, *et al.* Pharmacokinetics of marbofloxacin in pigs[J]. Chin J Vet Sci, 2004, (2): 177-180.
- [5] 马媛媛,李迎利,奥美珍,等. 采用分析技术研究喹诺酮类药物的杂质谱[J]. 广州化工, 2016, (23): 107-109.
Ma Y Y, Li Y L, Ao M Z, *et al.* Study of miscellaneous mass spectrometry of quinolones by analytical techniques[J]. Guangzhou Chemical Industry, 2016, (23): 107-109.
- [6] 贾国宾,苏然平,刘欣,等. 高效液相色谱法测定动物性食品中马波沙星残留量的研究[J]. 中国兽药杂志, 2016, 50(8): 39-43.
Jia G B, Su R P, Liu X, *et al.* Determination of Marboxacin residues in animal foods by HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016, 50(8): 39-43.
- [7] Tayeb-Cherif K, Peris-Vicente J, Carda-Broch S, *et al.* Use of micellar liquid chromatography to analyze oxolinic acid, flumequine, marbofloxacin and enrofloxacin in honey and validation according to the 2002/657/EC decision. [J]. Food chemistry, 2016, 2(7): 316-323.
- [8] Camilla Montesano, Roberta Curini, Manuel Sergi, *et al.* Determination of marbofloxacin in plasma and synovial fluid by ultrafiltration followed by HPLC - MS/MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2016, 1(61): 31-36.
- [9] 农业农村部. 中华人民共和国农业部公告 第 2329 号[S].
China Agriculture and Rural department. People's Republic of China Ministry of Agriculture Notice No. 2329[S].
- [10] 中国兽药典委员会.《中华人民共和国兽药典》2015 年版一部[S].
China Veterinary Drug Codex Commission. People's Republic of China Veterinary Pharmacopoeia, 2015 edition, one[S].
- [11] 李金明,魏丽娟,黄凯,等. 马波沙星的加速和长期稳定性研究[J]. 中国兽药杂志, 2015, 49(7): 30-33.
Li J M, Wei L J, Huang K, *et al.* Stability of Veterinary Medicine Marbofloxacin [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug. 2015, 49(7): 30-33.
- [12] 刘毅. 马波沙星注射液的研制[D]. 河北: 河北医科大学, 2015.
Liu Y. Studies on marbofloxacin injection[D]. Hebei Province: Hebei Medical University, 2015.

(编辑:侯向辉)