

· 药物制剂与药品质量控制 ·

甲硝唑有关物质测定及杂质谱研究

向东¹, 杨志勇², 何建武², 施春阳¹, 方建国¹, 王文清¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院药学部, 武汉 430030; 2. 湖北省宏源药业有限公司, 罗田 438600)

摘要 目的 建立甲硝唑原料药有关物质的高效液相色谱测定方法和杂质谱。**方法** 采用 Welch Ultimate®XB-C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 以甲醇-1.36 g·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液(20:80)为流动相; 流速 1 mL·min⁻¹; 检测波长: 315 nm, 主成分自身对照法测定有关物质。**结果** 甲硝唑与有关物质具有良好的分离度, 对近 6 年生产的 20 批样品进行了测定, 均满足质量控制标准。杂质谱的研究能有效监控甲硝唑合成工艺和杂质变化情况。**结论** 该方法简便、快速、灵敏, 能有效控制甲硝唑原料药中有关物质, 同时杂质谱研究有助于保证甲硝唑质量稳定性检测。

关键词 甲硝唑; 有关物质; 色谱法, 高效液相; 杂质谱

中图分类号 R978; R927.1

文献标识码 B

文章编号 1004-0781(2017)03-0308-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.03.016

Determination and Impurity Profile of Related Substances of Metronidazole by HPLC

XIANG Dong¹, YANG Zhiyong², HE Jianwu², SHI Chunyang¹, FANG Jianguo¹, WANG Wenqing¹ (1. Department of Pharmacy, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. Hubei Hongyuan Pharmaceutical CO. LTD, Luotian 438600, China)

ABSTRACT Objective To establish HPLC determination method and impurity profile of the related substances in metronidazole. **Methods** A Welch Ultimate®XB-C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with a mobile phase consisting of methanol-1.36 g·L⁻¹ solution of potassium dihydrogen phosphate (20:80). The detection wavelength was 315 nm and the flow rate was 1 mL·min⁻¹. Its related substances were determined by principal component self-contrast method. **Results** Good separation of metronidazole and the impurities could be achieved. Twenty batches of samples in the past six years were determined which meet quality standards. The study of impurity profiles could effectively monitor the synthetic process and the change of impurities in metronidazole. **Conclusion** The method is simple, quick and sensitive, which can be used to control the related substances in metronidazole. Meanwhile, the impurity profiles ensure the quality stability of metronidazole.

KEY WORDS Metronidazole; Related substances; Chromatography, high performance liquid; Impurity profile

甲硝唑具有广谱抗原虫作用, 临床广泛用于外科、妇科、口腔科, 尤其是滴虫性阴道炎的治疗, 效果显著^[1-2]。2010 年版《中华人民共和国药典》对甲硝唑中 2-甲基-5-硝基咪唑进行了限度检查, 而未考虑其他杂质^[3]。笔者在本实验建立高效液相色谱(HPLC)法测定甲硝唑原料药有关物质的方法, 同时分离甲硝唑及生产过程中可能产生的 9 种有关物质, 该方法操作简单, 灵敏度高, 测定了近 6 年生产的 20 批甲硝唑样品, 对生产工艺中可能产生杂质的来源进行了分析, 可为甲硝唑原料药的质量控制提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent1100 型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司), 包括紫外检测器, 在线脱气机, 四元梯度泵, 化学工作站; AUW 220D 型双量程分析天平(日本岛津公司, 感量: 0.1 mg/0.01 mg)。

1.2 药品与试剂 甲硝唑对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 100191-200606, 含量: 100%)。杂质 A 对照品(批号: 100512-200802, 含量: 99.8%)购于中国食品药品检定研究院, 杂质 B、C、D、E、F、G 对照品(批号分别为 1292-014A1、1317-059A8、1317-088A5、1303-099A5、1540-009A3、1319-032A3, 含量分别为 99.6%, 97.0%, 99.4%, 98.2%, 99.9%, 99.9%)购自于 TLC PharmaChem, 其化学结构分别为 2-甲基-5-硝基咪唑、4-硝基咪唑、2-(4-硝基-1H-咪唑-1-基)乙醇、2-(5-硝基-1H-咪唑-1-基)乙醇、2-(2-甲基-4-硝基-1H-咪唑-1-基)乙醇、2-[2-(2-甲基-5-硝基-1H-咪唑-1-基)乙氧基]乙醇、2-(2-甲基-5-硝基-1H-咪唑-1-基)乙酸; 甲硝唑原料药 20 批(湖北宏源药业有限公司, 批号: 09021002, 091111002,

收稿日期 2015-11-02 修回日期 2016-01-05

作者简介 向东(1989-), 男, 湖北利川人, 土家族, 在读博士, 主要研究方向: 药物分析与中药学。电话: 027-83649095, E-mail: xd9048@sina.com。

通信作者 王文清(1969-), 女, 四川遂宁人, 主任药师, 硕士生导师, 博士, 研究方向: 药物分析与中药学。电话: 027-83649095, E-mail: wwq3560@sina.com。

20100199, 20101101, 20110101, 20110633, 20110645, 20120101, 20120353, 20120534, 20120751, 20120913, 20121145, 20130101, 20130343, 20130404, 20130948, 20131032, 20131240, 20140112)。甲醇为色谱纯;磷酸二氢钾为分析纯;水为新制多效蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Welch Ultimate® XB-C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-1.36 g·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液 (20:80); 流速: 1 mL·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 检测波长: 315 nm; 进样体积: 10 μL。

2.2 溶液的制备 供试品溶液: 取甲硝唑原料药约 50 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

对照溶液: 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置于 10 mL 量瓶, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得。

杂质对照品溶液: 分别取甲硝唑对照品及杂质 A、B、C、D、E、F、G 对照品约 5 mg, 精密称定, 分别置于 10 mL 量瓶, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀。

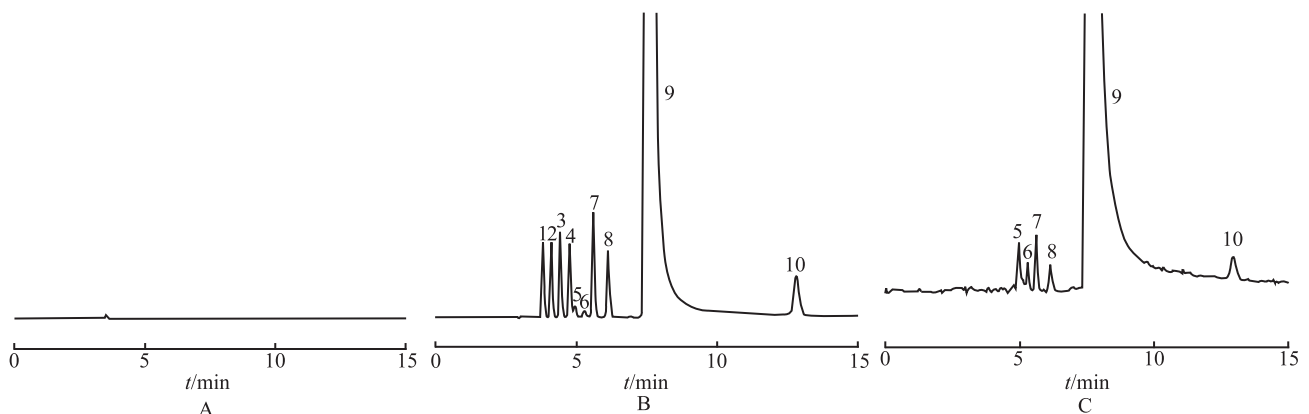
系统适用性溶液: 取甲硝唑原料药约 50 mg 精密称定, 再分别精密吸取上述杂质 A、B、C、D、E、F、G 对照品溶液 100 μL, 置于同一 100 mL 量瓶, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成含甲硝唑约 0.5 mg·mL⁻¹ 及各杂质对照品 0.5 μg·mL⁻¹ 的溶液。

2.3 系统适用性实验及有关物质归属 取空白溶剂、系统适用性溶液和供试品溶液分别进样测定, 记录色谱图。系统适用性溶液色谱图中, 测得甲硝唑的理论板数 > 10 000, 其他各杂质理论板数 > 5 000, 甲硝唑与

前后杂质峰的分离度 > 2.0, 其他各杂质峰分离度均符合要求, 实现了杂质 A、B、C、D、E、F、G 及未知杂质 1 和未知杂质 2 等 9 个杂质的有效分离, 保留时间分别为杂质 G (3.90 min)、杂质 C (4.17 min)、杂质 B (4.47 min)、杂质 E (4.86 min)、未知杂质 1 (5.10 min)、未知杂质 2 (5.37 min)、杂质 A (5.68 min)、杂质 D (6.19 min)、杂质 F (13.06 min), 见图 1。

2.4 破坏实验 取甲硝唑原料药 50 mg 精密称定, 5 份, 分别置 100 mL 量瓶, 进行酸破坏 (加 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 10 mL, 室温下避光放置 6 h, 用 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液调 pH 至中性)、碱破坏 (加 0.8 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 10 mL, 室温下避光放置 1 h, 用 0.8 mol·L⁻¹ 盐酸溶液调 pH 至中性)、氧化破坏 (加 30% 过氧化氢溶液 20 mL, 室温下放置 1 d)、高温破坏 (加适量水使溶解, 95 °C 水浴加热 1 d)、光照破坏 [加适量水使溶解, (4 500 ± 500) lx, 1 d]。破坏结束后, 用流动相稀释至刻度。按“2.1”项色谱条件测定。结果表明, 在选定的色谱条件下, 经酸、碱破坏后有降解, 其中碱破坏最为明显, 氧化破坏次之, 酸、光照、高温破坏后降解不明显。各降解产物峰与主峰分离度均符合要求, 见图 2。

2.5 线性关系考察 精密吸取甲硝唑对照品溶液及各杂质对照品溶液各 500 μL, 置同一 100 mL 量瓶, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 即得混合对照品溶液, 再分别量取 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 mL 置于 50 mL 量瓶, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 得到系列标准曲线溶液。按“2.1”项色谱条件, 进样, 记录色谱图。以峰面积值为纵坐标 (Y), 各对照品溶液的浓度为横坐标



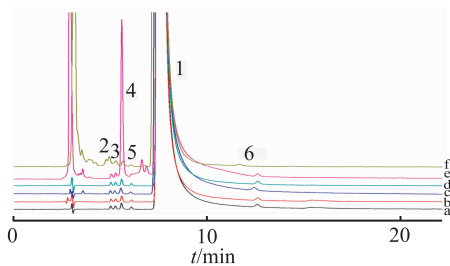
1. 杂质 G; 2. 杂质 C; 3. 杂质 B; 4. 杂质 E; 5. 未知杂质 1; 6. 未知杂质 2; 7. 杂质 A; 8. 杂质 D; 9. 甲硝唑; 10. 杂质 F

图 1 空白溶剂 (A)、系统适用性溶液 (B) 和供试品溶液 (C) 高效液相色谱图

1. impurity G; 2. impurity C; 3. impurity B; 4. impurity E; 5. unknown impurity 1; 6. unknown impurity 2; 7. impurity A; 8. impurity D; 9. metronidazole; 10. impurity F

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solvent (A), system suitability solution (B) and test solution (C)

(X),进行线性回归,结果显示甲硝唑及各杂质在浓度范围内呈良好的线性关系,见表1。



a. 未破坏;b. 酸破坏;c. 光照破坏;d. 高温破坏;e. 氧化破坏;f. 碱破坏;1. 甲硝唑; 2. 未知杂质 1;3. 未知杂质 2;4. 杂质 A;5. 杂质 D;6. 杂质 F

图2 方法专属性考察色谱图

a. undestroyed; b. destroyed by acid; c. destroyed by intense light; d. destroyed by excessive heating; e. destroyed by oxidation; f. destroyed by alkali; 1. metronidazole; 2. unknown impurity 1; 3. unknown impurity 2; 4. impurity A; 5. impurity D; 6. impurity F

Fig.2 HPLC chromatograms of the specificity test

2.6 检测限 取线性关系考察项下混合对照品溶液,将其稀释至一定浓度,以3倍噪声比($S/N = 3$)测定,甲硝唑及杂质A、B、C、D、E、F、G的检测限见表1。

表1 甲硝唑及有关物质的线性关系和检测限
Tab.1 Linearity and limit of detection (LOD) of metronidazole and related substances

化合 物	保留时 间(tR)	线性方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)
甲硝唑	7.70	$Y=24.622X-0.0037$	0.9997	0.0256~2.048	12.58
杂质A	5.68	$Y=26.495X-0.2606$	0.9998	0.0254~2.032	12.70
杂质B	4.47	$Y=22.600X-0.2241$	0.9996	0.0254~2.032	12.70
杂质C	4.17	$Y=18.235X+0.0469$	0.9998	0.0269~2.152	13.45
杂质D	6.19	$Y=32.981X-0.3584$	0.9997	0.0272~2.176	13.60
杂质E	4.86	$Y=20.676X+0.6327$	0.9999	0.0244~1.952	12.20
杂质F	13.06	$Y=25.358X+0.7081$	0.9997	0.0564~2.208	27.60
杂质G	3.90	$Y=20.704X-0.0882$	0.9998	0.0251~2.008	12.55

2.7 精密度实验 精密吸取甲硝唑对照品溶液及各杂质对照品溶液各100 μL ,置于同一100 mL量瓶,加流动相稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项色谱条件平行进样5次,计算各色谱峰的面积。甲硝唑及杂质A、B、C、D、E、F、G的RSD分别为0.55%,0.43%,0.76%,0.34%,0.61%,0.49%,0.63%,0.32%。RSD均小于0.8%,仪器精密度良好。

2.8 重复性实验 取甲硝唑样品平行制备6份供试

品溶液,按“2.1”项色谱条件进样测定,计算供试品溶液中各色谱峰的面积,甲硝唑及杂质A、D、F,未知杂质1、2的RSD分别为1.27%,10.66%,11.46%,3.01%,8.88%,6.87%。甲硝唑RSD<2.0%,由于供试品溶液杂质含量极低,仅在定量限附近,仅需满足RSD<10%,因各杂质RSD在3.01%~11.46%之间,表明仪器重复性良好。

2.9 稳定性实验 取甲硝唑样品,按“2.2”项制备供试品溶液,室温放置,分别在第0,2,4,6,8,10,12 h进样测定,测得甲硝唑及杂质A、D、F,未知杂质1、2的峰面积RSD分别为1.09%,4.54%,9.15%,12.16%,10.48%,6.61%。甲硝唑溶液在室温下放置12 h峰面积RSD为1.09%,稳定性好。虽然杂质在溶液中放置12 h后峰面积的RSD为4.5%~12.2%,但由于杂质含量极低,仅在定量限附近,只需满足RSD<20%的要求,稳定性较好。

2.10 样品中有关物质测定 按“2.2”项溶液制备方法配制20批甲硝唑原料药供试品溶液,进样测定,记录3倍主峰保留时间,以主成分自身对照法计算各杂质含量,结果见表2。

表2 甲硝唑有关物质测定结果
Tab.2 Results of metronidazole related substances %

生产 年份	批号	杂质 G	杂质 C	杂质 B	杂质 E	未知 杂质1	未知 杂质2	杂质 A	杂质 D	杂质 F	总 杂质
2014	20140112	-	-	-	-	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.08
2013	20131240	-	-	-	-	0.01	-	0.04	-	0.02	0.07
	20131032	-	-	-	-	0.01	-	0.02	-	0.01	0.04
	20130948	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00
	20130404	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00
	20130343	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.00
	20130101	-	-	-	-	0.01	-	0.02	-	0.02	0.05
2012	20121145	-	-	-	-	0.01	-	0.02	0.01	0.01	0.05
	20120913	-	-	-	-	0.01	-	0.01	-	0.01	0.03
	20120751	-	-	-	-	0.01	-	0.01	-	0.01	0.03
	20120534	-	-	-	-	0.01	0.01	0.02	-	0.02	0.06
	20120353	-	-	-	-	0.02	-	0.02	0.01	0.02	0.07
	20120101	-	-	-	-	0.01	-	0.01	-	-	0.02
2011	20110645	-	-	-	-	0.01	-	0.01	-	0.01	0.03
	20110633	-	-	-	-	0.01	-	0.01	-	0.01	0.03
	20110101	-	-	-	-	0.02	0.01	0.02	-	0.02	0.07
2010	20101101	-	-	-	-	0.02	0.01	0.03	-	0.02	0.08
	20100199	-	-	-	-	0.02	-	0.02	-	0.03	0.07
2009	091111002	-	-	-	-	0.02	0.01	0.02	0.01	0.03	0.09
	09021002	-	-	-	-	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.08

“-”表示未检出

“-”no detection

从测定结果可知,未知杂质 1 和未知杂质 2 的含量在 0.00% ~ 0.02% 之间。由于甲硝唑每日服用最大剂量 > 2 g,根据原料药杂质限度规定,若未知杂质含量未达报告限度(0.03%)、鉴定限度(0.05%)及质控限度(0.05%)可不对其进行报告、结构鉴定和质量控制,因此,目前可不对其未知杂质 1 和杂质 2 进行结构确证。杂质 A、D、F 的含量在 0.00% ~ 0.04%, 0.00% ~ 0.01%, 0.00% ~ 0.03% 之间,其他杂质未检出,总杂质含量在 0.00% ~ 0.09% 之间。表明甲硝唑原料药性质稳定,在室温避光下储存 1 ~ 5 年的原料药样品未出现新的降解杂质,已知杂质和未知杂质均在限度以内。

参考《欧洲药典》^[4],结合实验结果,将甲硝唑中杂质限度定为:总杂质含量 ≤ 0.2%,单个未知杂质含量 ≤ 0.05%,单个已知杂质含量 ≤ 0.1%,含量 < 0.01% 的杂质忽略不计。

3 讨论

3.1 色谱系统的选择 2010 年版《中华人民共和国药典》选择甲醇-水作为流动相用于检测甲硝唑有关物质,按此色谱条件进样发现,系统适用性溶液色谱图中杂质 G 未出峰,而有效检出所有杂质,加入磷酸二氢钾能够有效抑制杂质 G 的解离,使其出峰,以甲醇-磷酸二氢钾缓冲盐作为流动相更合理。笔者在本实验考察了 C₁₈ 和 C₈ 柱及不同厂家 C₁₈ 柱对实验中甲硝唑和各杂质分离的影响,甲硝唑样品的测定不受 C₁₈ 和 C₈ 柱的影响,但 C₈ 柱不能将系统适用性溶液中杂质 G、C、B、E 及未知杂质有效分离。由于杂质 B、C、E、G 结构相近,在色谱柱中的保留行为接近,将四者同时分离具有一定的难度,因此,选择合适的 C₁₈ 柱对甲硝唑原料药有关物质的检查十分重要。

3.2 有关物质来源分析 甲硝唑为 2-甲基-5-硝基咪唑与环氧乙烷羟乙基化所得。杂质 A 为起始原料 2-甲基-5-硝基咪唑。经有关物质检查,杂质 B 为起始原料中有关物质。杂质 C、D、E、F、G 分别为合成反应中的副产物。杂质 C 和杂质 D 是杂质 B 与环氧乙烷反应的副产物,杂质 F 为甲硝唑与环氧乙烷反应的副产物,杂质 G 为甲硝唑结构中羟基氧化为羧基所得。原料或副产物在反应过程中还可能发生其他氧化反应或与环氧乙烷的反应,以及在储存和运输中可能发生的降解反应,都是未知杂质产生的可能原因。

3.3 有关物质杂质谱的研究 对甲硝唑进行有关物质杂质谱的研究有助于对其合成工艺及杂质变化情况进行有效监测,从而保证原料药的质量稳定性^[5-6]。本实验将原料药杂质谱的研究分为产品杂质谱和稳定性杂质谱两个部分。

通过对比同一厂家不同时期生产的甲硝唑中杂质的种类和数量的关系,可了解厂家在不同阶段工艺改进与参数优化方面的变更情况;而对近期连续生产的甲硝唑杂质谱进行种类及数量的分布统计,可动态反映当前阶段生产工艺控制水平;同时,也可与其他厂家生产的甲硝唑原料药杂质谱比较,不仅反映产品质量在杂质控制水平上的差异,还可反映甲硝唑在合成工艺上的差异性。

对稳定性实验研究建立的杂质谱可定义为稳定性杂质谱。通过对比实验样品与空白实验样品的杂质谱,可分析哪些杂质是由工艺生产带进(此类杂质在稳定性实验中含量一般无显著变化),哪些杂质是由降解产生的(此类杂质在稳定性实验中含量可能显著改变)。通过对稳定性杂质谱进行分析,可了解杂质的基本组成及产生原因,杂质的变化情况,为制剂中杂质的定性、定量研究提供实验准备。

甲硝唑杂质谱的研究是药品质量研究、质量控制和安全性研究的基础。

本实验色谱条件将甲硝唑及生产过程中可能产生的 9 种有关物质进行了有效分离,方法简便、灵敏,对甲硝唑原料药单个杂质和总杂质进行了有效地控制。检出的已知杂质 A 为合成甲硝唑的起始原料,已知杂质 D、F 是合成的副产物。甲硝唑杂质谱的研究能够对原料药的合成工艺及杂质变化情况进行有效监测,保证其质量稳定性。虽然未知杂质均未达到报告限度,为了提高原料药的质量控制,未知杂质的定性还需要进一步研究。

参考文献

- [1] 汤自豪,卢小澍,高兴政. 甲硝唑体外抗阴道毛滴虫的电镜观察[J]. 郑州大学学报(医学版), 2008, 43(5): 918 - 921.
- [2] JAFARI M T, REZAEI B, ZAKER B. Ion mobility spectrometry as a detector for molecular imprinted polymer separation and metronidazole determination in pharmaceutical and human serum samples [J]. Anal Chem, 2009, 81(9): 3585 - 3591.
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010: 153.
- [4] EP 8.0(2014) (欧洲药典 2014 年版) [M] 2014:2768 - 2769.
- [5] GOROG S, BABJAK M, BALOGH G, et al. Drug impurity profiling strategies [J]. Talanta, 1997, 44(9): 1517 - 1526.
- [6] 郝杰,张哲峰,毕小平. 原料药杂质研究与控制浅析[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(6): 757 - 763.