

HPLC 测定奥硝唑注射液中的有关物质

谢莉 赵书文 陈佳 张丹*

(四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 采用 HPLC 法测定奥硝唑注射液中的有关物质。方法 采用 Topsisil C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 流动相为甲醇-水(22 : 78) 流速 1.0 mL·min⁻¹ , 波长 318 nm 处采用不加校正因子的主成分自身对照法对有关物质进行检查。结果 0.1 ~ 100 μg·mL⁻¹ 奥硝唑与峰面积的线性关系良好($r = 0.9999$) 检测限为 1 ng($S/N = 3$) 单一最大杂质的检查限度为 0.5% 有关物质总量的检查限度为 1.0%。结论 所用方法专属性强、准确、简便、快速 适用于奥硝唑注射液中有有关物质的检查。

关键词: 奥硝唑注射液; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2012) 04 - 0441 - 02

Determination of related substances in Ornidazole injection by HPLC

XIE Li ZHAO Shu - wen , CHEN Jia ZHANG Dan *

(West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041 P. R. China)

Abstract: **OBJECTIVE** To establish an HPLC method for determination of the related substances in Ornidazole injection. **METHODS** The analytical column was Topsisil C₁₈ column(150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol - water(22 : 78). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the detective wavelength was 318 nm. **RESULTS** The calibration curve was linear within the range of 0.1 - 100 μg·mL⁻¹ for Ornidazole($r = 0.9999$) and the limit of detection was 1 ng($S/N = 3$). The limit of the largest impurity was 0.5% and the limit of the related substances was 1.0%. **CONCLUSION** The method is specific, accurate, simple, sensitive and suitable for determination of related substances in Ornidazole injection.

Key words: Ornidazole injection; Related substances; HPLC

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2012) 04 - 0441 - 02

奥硝唑(Ornidazole)为第三代硝基咪唑类抗厌氧菌和抗原虫感染的药物^[1],与其他同类药物比较,其抗菌力强、耐受性好、不良反应小。现建立了测定奥硝唑注射液中有有关物质的 HPLC 法,方法的专属性强、准确、简便、快速,适用于奥硝唑注射液中有有关物质的控制。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

LC - 10Atvp 型高效液相色谱仪(日本岛津)。奥硝唑(批号:100608 - 200301)、2 - 甲基 - 5 - 硝基咪唑(批号:100512 - 200802)对照品(中国药品生物制品检定所);奥硝唑注射液(自制);甲醇为色谱纯;水为重蒸水;其余试剂为分析纯。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件与系统适用性试验 采用 Topsisil C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇 - 水(22 : 78) 检测波长 318 nm 柱温 30 °C。取 20 μL 系统适用性溶液进样,记录色谱图。2 - 甲

基 - 5 - 硝基咪唑、热降解产物 1 ~ 3 与奥硝唑各峰间的分离度应符合要求(图 1A)。

1.2.2 溶液的制备 取适量奥硝唑对照品,加流动相制成 100 μg·mL⁻¹ 的奥硝唑对照品溶液;另取适量 2 - 甲基 - 5 - 硝基咪唑对照品,加流动相制成 0.2 μg·mL⁻¹ 的 2 - 甲基 - 5 - 硝基咪唑对照品溶液;取上述两种溶液,按 1 : 1 混合,作为系统适用性溶液。精密量取适量奥硝唑注射液,加流动相稀释制成 500 μg·mL⁻¹ 的供试品溶液。精密量取 1 mL 该液,置 100 mL 量瓶中,用流动相定容,作为自身对照溶液。

1.2.3 测定的方法 取 20 μL 对照溶液进样,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的 10% ~ 20%。精密量取 20 μL 对照溶液与供试品溶液,分别进样,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍。供试品溶液的色谱图中如有杂质峰,单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的 0.5 倍(0.5%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积(1.0%)。

作者简介:谢莉(1989—),女,正攻读药物分析专业的硕士学位。Email:715614831@qq.com

* 通信作者(Correspondent author),Email:zdan321@126.com

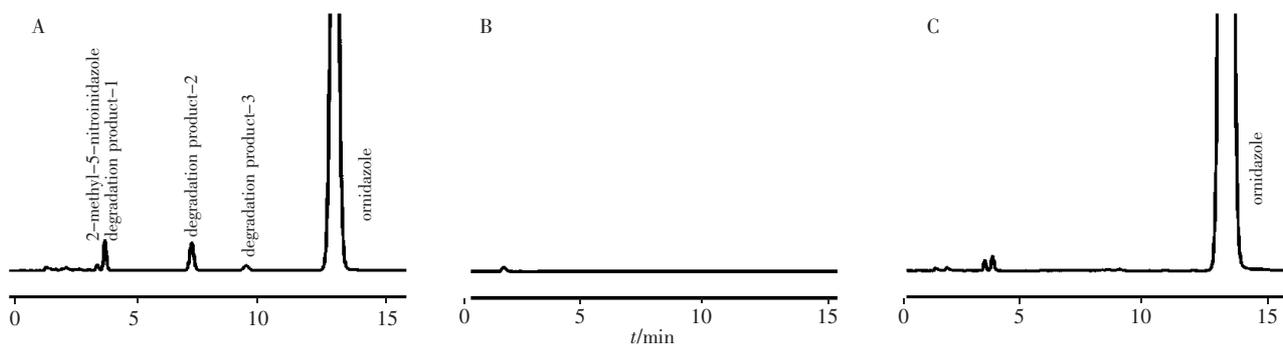


图1 系统适用性(A)、空白辅料(B)和供试品(C)溶液的色谱图

Fig 1 Chromatograms of system applicability solution(A) blank adjuvant solution(B) and sample solution(C)

1.2.4 专属性考察 分别取 20 μL 空白辅料溶液及“1.2.2”项供试品溶液,进样,记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍,空白辅料对各杂质的检查无干扰(图 1 B、C)。量取适量奥硝唑注射液 5 份,第 1 份加 1 mL 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸,室温下放置 5 min,用 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠中和至中性,作为酸解样品;第 2 份加 1 mL 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠,室温下放置 5 min,用 0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸中和至中性,作为碱解样品;第 3 份加 1 mL 3% 过氧化氢,于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 10 min,作为氧化降解样品;第 4 份于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中加热 0.5 h,作为热解样品;第 5 份于 4500 \pm 500 Lx 强光下照射 6 d,作为光解样品。按“1.2.1”“1.2.3”项方法测定,结果显示:酸解、碱解、氧化和高温降解试验均有新杂质产生,且有杂质峰面积增大,光照试验有杂质峰面积增大。该法能有效检出各破坏性试验产生的降解产物,且降解产物峰均能与奥硝唑峰达到基线分离,对有关物质检查的专属性较好。

1.2.5 线性范围及检测限 取适量奥硝唑对照品,精密称定,用流动相溶解并稀释制成 0.1、0.5、1.5、25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液,分别精密吸取 20 μL 进样,记录色谱图。以峰面积对浓度进行线性回归,得回归方程为: $Y = 3.660 \times 10^4 X - 2.039 \times 10^3$ ($r = 0.9999$) 检测限为 1 ng ($S/N = 3$)。

1.2.6 中间精密度 取供试品在 1、2、4、6、7 d 时,分别由不同分析人员按“1.2.2”项方法制备供试品溶液和对照溶液并测定。以有关物质的含量考察中间精密度,计算得单一最大杂质含量的 $RSD = 1.42\%$,有关物质总量的 $RSD = 1.21\%$ 。

1.2.7 重复性与供试品溶液的稳定性试验 取供试品,按“1.2.2”项方法制备 6 份供试品溶液和对照溶液并测定。计算得单一最大杂质含量的 $RSD = 1.29\%$,有关物质总量的 $RSD = 1.06\%$ 。取供试品在室温下放置 0、2、4、6、8 h 后,按“1.2.2”项方法分别制备供试品溶液和对照溶液并测定。计算得单一

最大杂质含量的 $RSD = 1.35\%$,有关物质总量的 $RSD = 1.19\%$ 。

1.2.8 耐用性试验 取供试品,用不同品牌的色谱柱,按“1.2.1”“1.2.3”项方法进行耐用性试验。采用不同色谱柱,样品的杂质峰个数相同,2-甲基-5-硝基咪唑、热降解产物 1、热降解产物 2、热降解产物 3 与奥硝唑各峰之间的分离度符合要求,有关物质的检查结果相近,表明方法耐用性较好。

1.2.9 有关物质的测定 按“1.2.1”“1.2.3”项方法测定 3 批样品中有关物质的含量,结果见表 1。

表 1 有关物质的检查结果(%)

Table 1 Results of related substances in Ornidazole injection(%)

No.	Content of the largest impurity	Content of related substances
1	0.117	0.286
2	0.129	0.282
3	0.133	0.289

2 讨论

采用 2-甲基-5-硝基咪唑对照品与热解后的奥硝唑对照品混合溶液作为系统适用性溶液^[2]。2-甲基-5-硝基咪唑是奥硝唑中的已知特殊杂质,但降解试验中 2-甲基-5-硝基咪唑的含量并未增加,说明其不是奥硝唑注射液的降解产物。奥硝唑降解产物中可能有的两种结构为奥硝唑二醇和奥硝唑环氧化物^[3],可通过 HPLC-MS 进一步确定结构。此外,在光解试验中,发现杂质峰面积明显增大,因此,该注射液在贮存和运输的过程中应避免光。

参考文献:

- [1] Knox RJ, Edwards DI, Knight RC. The mechanism of nitroimidazole damage to DNA: coulometric evidence[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1984, 10(8): 1315-1318.
- [2] 中华人民共和国国家食品药品监督管理局. 中国药品标准[S]. WS1-(X-012)-2010Z-2010.
- [3] 李志红,汪晓娟,蔡美明,等. 奥硝唑有关物质的液相色谱-电喷雾离子化-质谱联用分析[J]. 中国药品标准, 2008, 9(4): 277-279.

收稿日期: 2011-10-24