

## HPLC法测定塞克硝唑的含量及有关物质

张锦琳\*, 袁耀佐, 钱文, 张玫

(江苏省食品药品检验所, 南京 210008)

**摘要** 目的: 建立塞克硝唑含量及有关物质的 HPLC方法, 并对主要有关物质结构进行鉴定。方法: 采用 Agilent C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (10:90) 为流动相; 检测波长为 320 nm; 柱温 30 °C; 离子源为 ESI 源; 离子源温度: 350 °C; 雾化室压力: 0.34 MPa; 干燥气流速: 10 L/min; 正离子检测方式, 分流比为 7:3。结果: 主峰能与相邻杂质峰很好地分离, 塞克硝唑的质量浓度在 0.10 ~ 1 500.0 μg/mL 范围内线性关系良好,  $r = 0.9999$ 。3批样品的含量 (%) 分别为 100.5、100.3 和 100.7, 总杂质的百分含量 (%) 为 0.463、0.488 和 0.465; 实验中主要检出 3 个杂质, 经 HPLC-UV-MS<sup>n</sup> 鉴定, 一个为合成原料 2-甲基-5-硝基咪唑, 另两个均为塞克硝唑的同分异构体。结论: 该法可用于塞克硝唑质量控制及有关物质研究。

**关键词** 塞克硝唑; 含量测定; 有关物质; 高效液相色谱法

**中图分类号** R917 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2009)06-0527-04

## Determination of secnidazole and its related substances by HPLC

ZHANG Jin-lin\*, YUAN Yao-zuo, QIAN Wen, ZHANG Mei

Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China

**Abstract** Aim: To establish an HPLC method for the determination of secnidazole and its related substances, and to elucidate the structure of the main related substances. Methods: HPLC was performed on an Agilent C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column. The mobile phase consisted of acetonitrile and 0.1% formic acid solution (10:90). The detection wavelength was set at 320 nm and the column oven was maintained at 30 °C. The mass spectrometry detector was equipped with an ESI source with a temperature of 350 °C, and set at positive ion monitoring model. The spray chamber pressure was 0.34 MPa. The drying gas flow rate was 10 L/min. Results: Secnidazole was completely separated from the impurities. The calibration curve of secnidazole was linear over the range of 0.10-1 500.0 μg/mL with the correlation coefficient of 0.9999. The contents of secnidazole in the samples were 100.5%, 100.3% and 100.7%, respectively, and those of the related substances were 0.463%, 0.488% and 0.465%, respectively. The three related substances were identified by HPLC-UV-MS<sup>n</sup> as 2-methyl-5-nitroimidazole and the isomerides of secnidazole, respectively. Conclusion: The developed method is reliable for the quality control and determination of related substances of secnidazole.

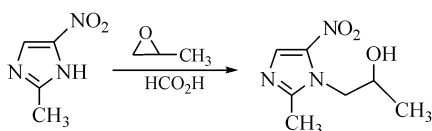
**Key words** secnidazole; determination; related substances; HPLC

塞克硝唑 (secnidazole), 化学名为 1-(2-羟基丙基)-2-甲基-5-硝基咪唑, 是法国 Spécia Rhone-Poulenc Rorer 公司研究开发的 5-硝基咪唑类药物, 能抗阿米巴病、贾第鞭毛虫病及厌氧菌感染<sup>[1]</sup>。塞克硝唑的合成过程大多以 2-甲基-5-硝基咪唑为原料, 投入环氧丙烷反应制得 (见路线 1), 成品中可能含有未完全反应的起始原料, 放置过程也有可

能产生降解产物<sup>[2]</sup>, 因此对塞克硝唑的含量和有关物质进行控制是十分有必要的。塞克硝唑含量和有关物质的测定方法已有文献报道<sup>[3-4]</sup>, 对报道方法进行重现时发现, 在流动相“甲醇-水 (30:70)”<sup>[3]</sup>和“乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液-三乙胺 (15:85:0.4)”<sup>[4]</sup>色谱系统下, 塞克硝唑主峰与其相邻杂质峰均不能达到有效的分离, 为更好地控

\* 收稿日期 2009-07-02 \* 通讯作者 Tel: 025 - 86631609 E-mail: zjluser@126.com

制产品质量,本研究在相关文献基础上,建立了新的色谱条件用于塞克硝唑的含量和有关物质的测定,并且首次采用 HPLC-UV-MS<sup>n</sup>,对检出有关物质的结构进行确证。



Scheme 1 Synthesis of secnidazole

## 材 料

### 1.1 药品与试剂

塞克硝唑(批号:20070601、20070602、20070603),塞克硝唑对照品(纯度:99.98%)均由南京泽辰药业有限公司提供;2-甲基-5-硝基咪唑(中国药品生物制品检定所);乙腈(色谱纯,美国迪马公司)。其余试剂为分析醇;水为纯化水。

### 1.2 仪器

Shim-pack LC-10AT 高效液相色谱仪、Shim-pack SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司);Agilent 1100 LC/MSD Trap 液质联用仪(美国安捷伦公司)。

## 方法与结果

### 2.1 塞克硝唑中有关物质结构的鉴定

2.1.1 液相色谱条件 色谱柱:Agilent C<sub>18</sub>(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1%甲酸水溶液(10:90)。

2.1.2 质谱测定条件 离子源为 ESI 源;离子源温度:350 °C;雾化室压力:0.34 MPa;干燥气流速:10 L/min;正离子检测方式。流速:1 mL/min;进样量:10 μL;分流比:7:3;柱温:30 °C。

2.1.3 供试品溶液的制备 精密称取塞克硝唑约 100 mg,置 100 mL 量瓶中,用流动相适量溶解并稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过,作为供试品溶液。

2.1.4 测定结果 塞克硝唑及其有关物质的液相色谱见图 1,各峰的质谱数据见表 1。

峰 C 的色谱保留时间与塞克硝唑对照品一致,一级 MS 所得相对分子质量 186,符合塞克硝唑的结构,表明该峰为塞克硝唑;峰 A 的色谱保留时间、一级质谱和二级质谱与 2-甲基-5-硝基咪唑对照品相同(C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub> 相对分子质量为 127, M + 1

= 128),表明该峰为未反应完全的原料 2-甲基-5-硝基咪唑;峰 B、峰 D 及塞克硝唑的 [M + H]<sup>+</sup> 均为 m/z 186,且二级质谱完全一致,均出现 m/z 128 的碎片离子,表明三者为同分异构体,且这两杂质的结构中均有 2-甲基-5(4)-硝基咪唑的结构单元。

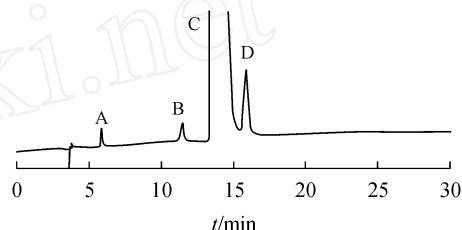


Figure 1 LC-MS(TIC) of secnidazole and the related substances

Table 1 Data of mass spectrograms of secnidazole and the related substances

Peak	t <sub>R</sub> /min	m/z	
		MS	MS/MS
A	6.0	128.0	128.0, 76.1
B	11.3	186.0	128.0
C	13.5	186.0	128.0
D	15.9	185.9	128.0

合成工艺提示,环氧丙烷中有两个 C-O 键,与 2-甲基-5-硝基咪唑的反应过程中,不同的断键位置可得到不同的化合物,同时起始原料咪唑环上的 N 和 N-H 之间位置会互变,会出现 2-甲基-5(4)-硝基咪唑<sup>[5]</sup>,根据合成工艺和相关文献,推测峰 B 和峰 D 可能是 1-(1-甲基-2-羟乙基)-2-甲基-5-硝基咪唑(图 2, A)、1-(2-羟基丙基)-2-甲基-4-硝基咪唑(图 2, B)和 1-(1-甲基-2-羟乙基)-2-甲基-4-硝基咪唑(图 2, C)中的两个,但仅根据二级质谱还无法确证,需要利用二维 NMR 进行分析。

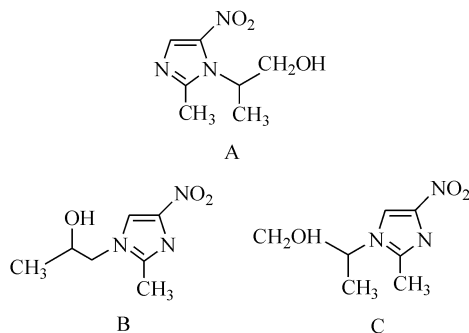


Figure 2 Structures of the main related substances

A: 1-(1-Methyl-2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole; B: 1-(2-Hydroxypropyl)-2-methyl-4-nitroimidazole; C: 1-(1-Methyl-2-hydroxyethyl)-2-methyl-4-nitroimidazole

## 2.2 塞克硝唑含量及有关物质测定

2.2.1 色谱条件 色谱柱: Agilent C<sub>18</sub> (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1% 甲酸水溶液 (10:90); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 320 nm; 进样量: 10 μL。

2.2.2 最大吸收波长的选择 已知和未知杂质的 PDA 检测结果显示, 各最大吸收均在 310 ~ 330 nm 的范围, 可见采用 320 nm 检测波长时, 方法对杂质有更高的检出灵敏度。因此本次拟定方法采用 320 nm 为检测波长。

2.2.3 方法专属性 塞克硝唑经过光照 (紫外灯)、高温 (水浴)、酸、碱及氧化破坏后, 取破坏后溶液以及它们与杂质 2-甲基-5-硝基咪唑的混合溶液 10 μL, 注入液相色谱仪, 以上述色谱条件分离, 记录色谱图, 结果显示, 在酸破坏、高温破坏和光照破坏下, 溶液较稳定; 碱破坏和氧化破坏溶液中有较多破坏产物峰产生, 破坏产物峰与主峰均有较好的分离, 互不干扰测定, 经考察该方法对塞克硝唑有良好的专属性, 对可能的降解产物及有关物质有良好的分离效果, 见图 3。

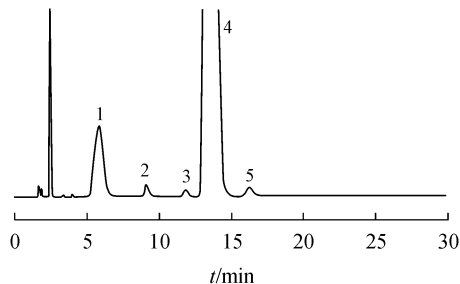


Figure 3 Mixed solution of 2-methyl-5-nitroimidazole and secnidazole sample subjected to oxidative degradation

1: 2-Methyl-5-nitroimidazole; 4: Secnidazole; 2, 3, 5: Related substances

2.2.4 线性范围 分别精密量取质量浓度为 0.10, 10.0, 50.0, 100.0, 200.0, 500.0, 1 000.0, 1 500.0 μg/mL 的塞克硝唑样品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪中, 记录色谱图, 以浓度 ( $c$ ) 为横坐标, 峰面积 ( $A$ ) 为纵坐标作线性回归, 回归方程为:  $A = 28\,947c + 9\,495$ ,  $r = 0.999\,9$ 。表明塞克硝唑在 0.10 ~ 1 500.0 μg/mL 质量浓度范围内有良好的线性关系。

2.2.5 最低检测限和最低定量限 在选定的色谱条件下, 按信噪比为 3 和信噪比为 10 测得塞克硝唑的最低检测限为 0.01 μg/mL, 最低定量限为 0.05 μg/mL; 2-甲基-5-硝基咪唑的最低检测限为

0.04 μg/mL, 最低定量限为 0.08 μg/mL。有关物质检查时样品中塞克硝唑质量浓度为 1 mg/mL, 进样 10 μL, 可检出十万分之一的有关物质, 可以满足有关物质检查要求。

2.2.6 重复性 取批号 20070601 样品, 平行制备 6 份供试品溶液, 测定含量, 含量平均值为 100.5%, RSD 为 0.48% ( $n = 6$ )。

2.2.7 含量测定 精密称取塞克硝唑约 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。另取对照品 10 mg, 同法配制, 得对照品溶液。精密量取上述两种溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪中, 记录色谱图, 根据外标法以峰面积计算样品的含量。同时采用经典的容量分析法进行含量测定, 结果进行对比。3 批样品含量测定结果见表 2。

Table 2 Results of the content of secnidazole by two methods

Batch No.	Method	
	HPLC/%	Titration/%
20070601	100.5	100.8
20070602	100.3	100.7
20070603	100.5	100.9

2.2.8 有关物质测定 精密称取塞克硝唑约 100 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。精确量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。精密称取 2-甲基-5-硝基咪唑对照品约 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取该溶液 2 mL 置 20 mL 量瓶中, 用流动相适量溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得 2-甲基-5-硝基咪唑对照品溶液。取对照溶液 10 μL, 进样, 调节仪器灵敏度使对照溶液主峰高度为满刻度量程的 10% ~ 15%, 记录色谱图及峰面积。取供试品溶液 10 μL, 进样, 记录色谱图至主峰保留时间的两倍。

2.2.9 有关物质的计算方法确定 有关物质常用的计算方法有自身对照法、归一化法和已知杂质对照品对照法<sup>[6]</sup>。

塞克硝唑供试品中检测出 3 个主要杂质, 2-甲基-5-硝基咪唑为已知杂质, 实验中对其与塞克硝唑的响应因子  $f(Ws/As)$  进行了测定, 分别为  $1.51 \times 10^{-9}$  和  $3.28 \times 10^{-9}$ , 已知杂质对主成分的相对响应因子为 0.46, 超出 0.9 ~ 1.1 的范围, 原则上

应采用杂质对照品测定该杂质或采用加校正因子的主成分的自身对照法<sup>[6]</sup>;其余几个杂质因无杂质对照品,未测定其与主成分的校正因子,结构推断结果显示,几个主要杂质均为主成分的同分异构体,且结构骨架相同,PDA结果也显示他们的紫外图谱相似,提示他们紫外吸收系数相近,可以采用不加校正因子的主成分自身对照方法进行测定。由于在 0.10 ~ 1 500.0  $\mu\text{g/mL}$  浓度范围内,塞克硝

唑的浓度与峰面积呈线性关系,提示可以采用归一化法进行有关物质计算。3种计算方法所得的有关物质数据见表 3。

结果显示,归一化法和自身对照法计算结果一致,使用对照品对照所得的数据为上述两种方法的一半,但由于 2-甲基-5-硝基咪唑的含量甚微,我们可以认为 3种方法的数据较为接近;最终本研究采用简便、准确的归一化法计算总杂质的百分含量。

**Table 3** Content of the related substances of secnidazole

Batch No.	Method	2-Methyl-5-nitroimidazole/%	Another related substances/%	Total related substances/%
20070601	1	0.034	0.429	0.463
	2	0.034	0.428	0.462
	3	0.015	/	0.444
20070602	1	0.048	0.440	0.488
	2	0.047	0.440	0.487
	3	0.022	/	0.462
20070603	1	0.032	0.433	0.465
	2	0.032	0.432	0.464
	3	0.015	/	0.448

1: Normalization method; 2: Self-calibration method; 3: Reference substance method

## 讨 论

本文建立了塞克硝唑含量及有关物质的 HPLC 方法,该方法的专属性好,可以将主峰与前后杂质峰及破坏实验中的主要降解产物良好分离,并且能与质谱联用检测。通过比较研究,最后确定采用归一化法计算塞克硝唑中杂质的量,该方法更为简便、准确。有代表性的样品中检出 3 个主要杂质,通过 HPLC-UV-MS<sup>n</sup> 法对的结构进行了鉴定,分别为合成用原料及合成过程的副产物。

## 参 考 文 献

[1] 戚 燕 (Qi Y), 单慧军 (Shan HJ), 吴 松 (Wu S). 反相高效液相色谱法测定塞克硝唑的含量及其有关物质 [J]. 中国新

药杂志 (*Chin New Drugs J*), 2002, **11** (4): 294 - 296.

[2] 孟 婷 (Meng T), 赵 敏 (Zhao M), 吕韶敏 (Lü SM), 等. 高效液相色谱法测定塞克硝唑中有关物质 [J]. 第四军医大学学报 (*J Fourth Mil Med Univ*), 2007, **28** (3): 282.

[3] Bakshi M, Singh S. ICH guidance in practice: establishment of inherent stability of secnidazole and development of a validated stability-indicating high-performance liquid chromatographic assay method [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2004, **36** (4): 769 - 775.

[4] 桂双英 (Gui SY), 周亚球 (Zhou YQ). 反相高效液相色谱法测定塞克硝唑片中塞克硝唑的含量 [J]. 中国药房 (*J China Pharm*), 2005, **16** (10): 783 - 784.

[5] 杨世昕 (Yang SX). 2-甲基-5(4)硝基咪唑合成的均匀设计试验 [J]. 华西药学杂志 (*West China J Pharm Sci*), 1999, **14** (4): 292 - 294.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 附录 183.