

HPLC 测定甘氨双唑钠中的有关物质

罗淑青, 卓开华, 周征, 曹琳(宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315048)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定甘氨双唑钠中的有关物质。方法 采用资生堂 CAPCELL C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)色谱柱, 以 0.05 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液(用氢氧化钠试液调 pH 值至 7.1)-乙腈(80:20)为流动相, 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长: 316 nm, 柱温: 35 °C, 进样量: 20 μL。结果 甘氨双唑钠及其相关杂质均能较好分离。甘氨双唑钠在 0.46~18.42 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.9999$), 甲硝唑在 0.04~20.12 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=1.0000$), 平均回收率为 98.81%(RSD=0.90%)。结论 本方法灵敏, 准确, 专属性强, 可用于甘氨双唑钠中有关物质的测定。

关键词: 甘氨双唑钠; 有关物质; 甲硝唑

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)11-1374-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.11.019

Determination of Related Substance in Glycididazole Sodium by HPLC

LUO Shuqing, ZHUO Kaihua, ZHOU Zheng, CAO Lin(Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method to determine the related-substance of glycididazole sodium. **METHODS** The assay was conducted on a CAPCELL ODS column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with 0.05 mol·L⁻¹ solution of ammonium acetate buffer (adjust to pH 7.1 with sodium hydroxide)-acetonitrile (80:20) as mobile phase at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was set at 316 nm, temperature was 35 °C, and the injection volume was 20 μL. **RESULTS** Glycididazole sodium was completely separated from impurities. The linear concentration range of glycididazole sodium was 0.46~18.42 μg·mL⁻¹ with the correlation coefficient of 0.9999. And the linear concentration range of metronidazole was 0.04~20.12 μg·mL⁻¹ with the correlation coefficient of 1.0000, the average recovery was 98.81%(RSD=0.90%). **CONCLUSION** The method is sensitive, accurate and specific. It can be used to determine related-substance in glycididazole sodium.

KEY WORDS: glycididazole sodium; related-substance; metronidazole

甘氨双唑钠是一种放射增敏药, 于 1983 年由第二军医大学放射医学研究所立项研究, 1993 年 9 月获国家专利局授予发明专利权, 2002 年获得原 SFDA 颁发的一类新药证书和生产批文, 独家生产上市, 商品名希美纳。甘氨双唑钠对离体试验和整体 S180 肿瘤、食道癌、鼻咽癌、宫颈癌和肺腺癌细胞等均有较好的放射增敏效果^[1-3]。甲硝唑既是甘氨双唑钠的合成中间体, 又是它的降解产物。原标准 WS-167(X-144)-2002(试行)^[4]中规定“记录色谱图至主成分峰保留时间的 2 倍, 限度为甲硝唑不得过 4.0%, 总杂质不得过 6.0%”, 杂质限度较宽, 且在破坏试验中发现在主峰保留时间 3 倍左右有一光照降解产物, 故本实验修订了有关物质检查法, 并进行了方法学验证。该色谱条件可同时完成各有关物质的检查, 并且与含量测定方法保持一致。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Agilent 1200 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); Waters 2695-2996 液相色谱仪(美国 Waters 公司); 甘氨双唑钠(某企业提供, 批号: 091212, 091216, 100307); 甘氨双唑钠对照品(某企业提供, 批号: 060501, 水分: 9.5%, 乙醇: 0.5%, 按无水乙醇计, 含量: 98.7%); 甲硝唑对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 100191-200305, 纯度: 100%); 醋酸铵、氢氧化钠均为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司; 乙腈(色谱纯, 美国天地试剂公司); 水为超纯水(自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Shiseido CAPCELL C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 0.05 mol·L⁻¹ 醋酸铵溶液

基金项目: 国家药品标准提高研究课题(附件 2-266)

作者简介: 罗淑青, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0574)87834153

E-mail: soph.rowe@hotmail.com

(用氢氧化钠试液调 pH 7.1)-乙腈(80 : 20); 检测波长: 316 nm, 柱温: 35 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。

2.2 对照品溶液和供试品溶液制备

2.2.1 甲硝唑对照品贮备液的配制 取甲硝唑对照品适量, 精密称定, 加流动相制成含甲硝唑 0.101 7 g·L⁻¹ 的溶液。

2.2.2 甘氨酸双唑钠对照品贮备液的配制 取甘氨酸双唑钠对照品适量, 精密称定, 加流动相制成含甘氨酸双唑钠 0.460 4 g·L⁻¹ 的溶液。

2.2.3 供试品溶液的配制 取样品精密称定, 加流动相制成含甘氨酸双唑钠 0.5 g·L⁻¹ 的溶液。

2.3 检测波长的确定

取供试品溶液进行 DAD 检测, 结果表明, 在 316 nm 波长处有最大吸收, 确定 316 nm 为检测波长。

2.4 系统适用性试验

取甘氨酸双唑钠供试品溶液及溶剂, 分别选用迪马 Diamonsil(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、资生堂 CAPCELL(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent Zorbax(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 按“2.1”项下色谱条件测定, 进行分离度试验。结果表明, 该色谱条件下甘氨酸双唑钠及其相关杂质均能较好分离, 该方法的耐用性良好。供试品溶液甘氨酸双唑钠峰理论板数均>4 000, 各杂质与主峰分离度均>1.5, 峰形对称。结果见图 1。

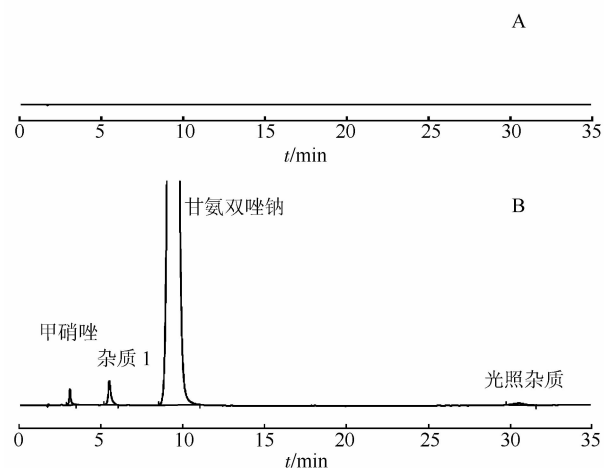


图 1 空白溶液(A)和供试品溶液(B)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank solution (A) and sample solution (B) of glycididazole sodium

2.5 线性关系和方法学研究

2.5.1 线性关系 精密量取甘氨酸双唑钠对照品贮

备液 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mL 分别置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别得每 1 mL 含甘氨酸双唑钠 0.46, 0.92, 2.30, 4.60, 9.21, 18.42 μg 的对照品溶液。精密量取甲硝唑对照品贮备液 0.04, 0.08, 0.25, 2.5, 5.0, 20.0 mL 分别置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 分别得每 1 mL 含甲硝唑 0.04, 0.08, 0.25, 2.52, 5.03, 20.12 μg 的对照品溶液。分别进样, 记录色谱图, 分别以对照品溶液峰面积(Y)为纵坐标, 浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 计算甘氨酸双唑钠回归方程为: $Y=38.663X-10.4(r=0.9999)$; 甲硝唑回归方程为: $Y=61.249X-1.0961(r=1.0000)$ 。

2.5.2 最低检出浓度和定量浓度试验 由对照品溶液逐级稀释, 按“2.1”项下色谱条件测定, 直到峰高的信噪比 S/N 约为 10 时作为定量限, 信噪比 S/N 约为 3 时作为最低检出浓度, 结果表明甘氨酸双唑钠的定量浓度为 0.46 μg·mL⁻¹(n=5, RSD=4.06%), 甲硝唑的定量浓度为 0.04 μg·mL⁻¹(n=5, RSD=2.56%), 最低检出浓度为 0.01 μg·mL⁻¹。

2.5.3 仪器精密度与溶液稳定性试验 取对照品溶液进样, 重复测定 5 次, 甘氨酸双唑钠 4.60 μg·mL⁻¹, RSD 为 1.14%, 甲硝唑 5.03 μg·mL⁻¹, RSD 为 0.13%; 0.25 μg·mL⁻¹, RSD 为 2.56%。供试品溶液连续进样测定 5 次, 甘氨酸双唑钠 RSD 为 0.01%, 甲硝唑由 0.45 μg·mL⁻¹ 增至 0.64 μg·mL⁻¹, RSD 为 13.34%。表明精密度符合药典要求。同时甘氨酸双唑钠对照品溶液放置 1, 2, 3, 4 h 时, 测定峰面积, 结果甘氨酸双唑钠 4.60 μg·mL⁻¹, RSD 为 1.18%; 甲硝唑对照品溶液放置 4, 6, 9, 12 h 时, 测定峰面积, 结果甲硝唑 0.25 μg·mL⁻¹, RSD 为 1.90%。供试品溶液放置 2, 9, 13, 16, 18 h, 测定峰面积, 结果 RSD 为 0.08%, 甲硝唑由 0.45 μg·mL⁻¹ 增至 1.37 μg·mL⁻¹, RSD 为 37.95%。

2.5.4 甲硝唑加样回收率 取甘氨酸双唑钠约 45 mg, 精密称定, 分别置 50 mL 量瓶中, 分别加甲硝唑对照品贮备液 2.0, 3.0, 4.0 mL, 加流动相溶解并稀释至刻度, 进样, 根据峰面积计算回收率。甲硝唑平均回收率为 98.81%, RSD 为 0.90%。

2.6 破坏性试验

①酸破坏: 称取甘氨酸双唑钠 12.56 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 0.1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL, 50 °C 水浴振摇 1 h, 加 0.1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL, 加流动相稀释至刻度。②碱破坏: 称取甘氨酸双唑

钠 12.06 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 0.01 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 5 mL, 放置 5 min, 加 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 5 mL, 加流动相稀释至刻度。③氧化破坏: 称取甘氨双唑钠 12.53 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 3% H₂O₂ 溶液 5 mL, 室温放置 15 min, 加流动相稀释至刻度。④强光破坏: 称取甘氨双唑钠 10.28 mg, 置 20 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 光照 24 h, 3 500 lx。

分别取上述破坏性试验溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定。结果表明甘氨双唑钠对酸、碱、光照和氧化剂均不稳定, 在各条件下产生若干不同降解产物峰, 主峰与各降解产物分离度良好。结果见图 2。

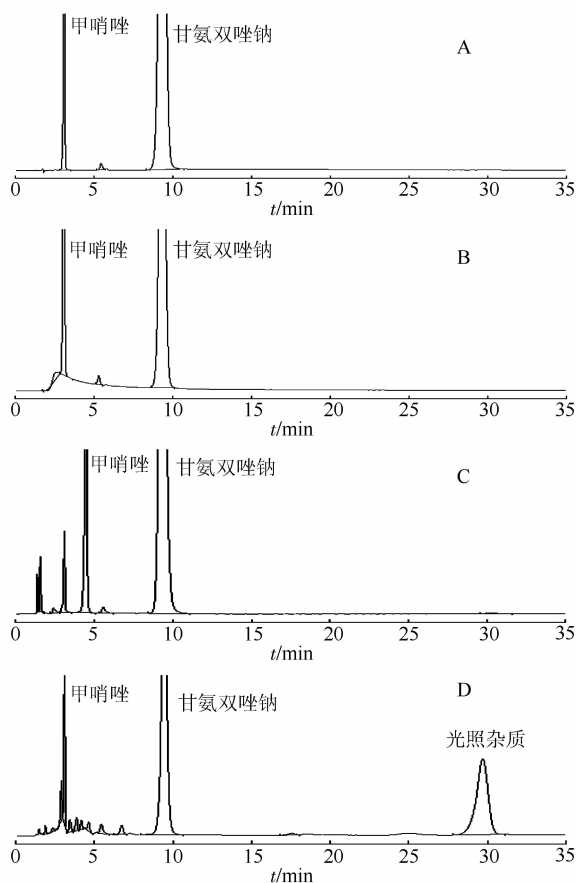


图 2 专属性考察色谱图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-氧化破坏; D-光照破坏。

Fig. 2 HPLC Chromatograms of the exclusion inspection
A-treated with acid; B-treated with base; C-treated with H₂O₂;
D-treated with light.

2.7 有关物质的检查

取 3 批样品, 按“2.2”项下方法制备对照品溶液和供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进样分析, 结果甲硝唑按外标法以峰面积计算得 3 批 (091212; 091216; 100307) 含量分别为 0.09%, 0.10%, 0.10%, 总杂质含量分别为 0.59%, 0.65%, 0.69%。

3 讨论

甘氨双唑钠自身稀释对照液在 4 h 内稳定, 而供试品溶液连续进样 5 针, 甲硝唑峰面积逐渐增大, 因而供试品溶液需临用新制。

在破坏试验中发现在主峰保留时间 3 倍左右有一光照降解产物, 由于甘氨双唑钠原料药中该杂质含量极低, 曾采用液相色谱-质谱联用技术进行分析, 但无法鉴定其结构。王志蓓等^[5]利用质谱技术, 采用电喷雾离子源对一个未知杂质进行了对比分析, 确定了未知成分的结构, 并用 MS/MS 串联技术进一步证实了该结构的可靠性, 提示该未知成分可能为甘氨双唑钠的醇解产物, 即氨三乙酸乙醇甲硝唑双酯或氨三乙酸乙醇甲硝唑双酯钠, 后者在酸性条件下可能转化为前者。由于光照条件下更易产生二聚体, 同时结合出峰行为推测, 光照杂质可能为该未知成分的二聚体。关于这个物质结构的验证, 还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] WANG M Z, WU W, WU G, et al. The clinical study of CMNa on radiosensitivity-enhanced effect treating esophageal cancer [J]. Mod Med J China(中国现代医药杂志), 2011, 13(10): 63-65.
- [2] NI X Y, QIAN N, LIN T, et al. Radiosensitization effect of gold nanoparticles modified by sodium glycidazole on lung adenocarcinoma cell A549 [J]. Chin J Radiol Med Port(中华放射医学与防护杂志), 2013, 33(3): 265-268.
- [3] CAI B Z, KONG F, CHEN X Z. Effect of enhanced sensitivity of glycidazole sodium on radiotherapy of esophageal carcinoma [J]. China Tropic Med(中国热带医学), 2008, 8(3): 416-417.
- [4] WS-167(X-144)-2002[《国家药品监督管理局标准》(试行)] [S]. 2002.
- [5] WANG Z B, XU Y Z, WU H M, et al. Study on mass spectra of sodium glycidazole and its micro component [J]. J Chin Mass Spec Soc(质谱学报), 2001, 21(3/4): 125-126.

收稿日期: 2014-01-16