

HPLC法检测脱氢环氧甲基醌霉素中间体 *N*-(2-乙酰氧基苯甲酰基)-2,5-二甲氧基苯胺及其杂质^A

胡克余*,汪岩峰,余卫麟,马俊,邓双炳[#](深圳万和制药有限公司,广东深圳 518057)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5125-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.26

摘要 目的:建立检测脱氢环氧甲基醌霉素(DHMEQ)中间体 *N*-(2-乙酰氧基苯甲酰基)-2,5-二甲氧基苯胺(MA)及其杂质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Ultimate AQ-C₁₈,流动相为乙腈-0.05%磷酸(梯度洗脱),流速为 1 ml/min,检测波长为 230 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 10 μl。结果:MA 与各杂质间以及各杂质之间的分离度均>1.5,理论板数以 MA 峰计≥5 000,保留时间约为 41 min;MA、乙酰水杨酸甲酯、SM2、SM1、MA-6、水杨酸、MA-2 的定量限(相当于 MA 样品的百分比)分别为 0.04%、0.03%、0.01%、0.05%、0.05%、0.05%、0.05%,检测限(相当于 MA 样品的百分比)分别为 0.01%、0.01%、0.004%、0.02%、0.02%、0.02%、0.02%;溶液稳定性及方法耐用性良好。结论:该方法专属性、检测限、耐用性均符合要求,可用于检测 DHMEQ 中间体 MA 及其杂质。

关键词 脱氢环氧甲基醌霉素;中间体;*N*-(2-乙酰氧基苯甲酰基)-2,5-二甲氧基苯胺;杂质;高效液相色谱法

Determination of DHMEQ Intermediates MA and Its Impurity by HPLC Method

HU Keyu, WANG Yanfeng, YU Weilin, MA Jun, DENG Shuangbing (Shenzhen WanHe Pharmaceutical Co. Ltd, Guangdong Shenzhen 518057, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a HPLC method to determine DHMEQ intermediate *N*-(2-acetoxybenzoyl)-2,5-dimethoxyaniline(MA). METHODS: The column was Ultimate AQ-C₁₈ with mobile phase of acetonitrile-0.05% phosphoric acid (gradient elution) at a flow rate of 1 ml/min, detection wavelength was 230 nm, column temperature was 30℃, and the injection volume was 10 μl. RESULTS: The separation degrees of MA and the impurities were above 1.5, the number of theoretical plates (calculated with MA peaks) was no less than 5 000, retention time was about 41 min; the detection limits (the percentages of MA samples) of MA, methyl acetylsalicylate, SM2, SM1, MA-6, salicylic acid and MA-2 were 0.04%, 0.03%, 0.01%, 0.05%, 0.05%, 0.05% and 0.05%; detection limits (the percentage of MA samples) were 0.01%, 0.01%, 0.004%, 0.02%, 0.02%, 0.02% and 0.02%, respectively; the stability of solution and durability of method were good. CONCLUSIONS: The specificity, detection limit, and durability of the method are all in line with the requirements, which can be used for DHMEQ intermediate MA and its impurity.

KEYWORDS DHMEQ; Intermediate; *N*-(2-acetoxybenzoyl)-2,5-dimethoxyaniline; Impurity; HPLC

脱氢环氧甲基醌霉素(Dehydroxy methyl epoxy quinomicin, DHMEQ)是由抗生素经结构改造合成的一种新型小分子核因子-κB(NF-κB)抑制剂,具有抗癌和抗炎活性^[1]。DHMEQ 可特异性抑制 NF-κB 移位入核,以 1:1 的化学计量比共价修饰 p65 和其他 Rel 同源蛋白中的特定半胱氨酸残基^[2]。DHMEQ 作为 NF-κB 抑制剂,通过在各种疾病的动物模型中进行广泛测试,证明其对治疗实体瘤、血液恶性肿瘤、关节炎、肠缺血和动脉粥样硬化在内的疾病具有广谱效力^[3],因此 DHMEQ 有望在临床上用于癌症和炎症疾病的治疗。

N-(2-乙酰氧基苯甲酰基)-2,5-二甲氧基苯胺(简称 MA)是 DHMEQ 合成过程中一个重要的中间体,它的纯度对终产品 DHMEQ 有显著影响,故很有必要对其纯度进行控制。结合合

成工艺路线进行分析,MA 中潜在的有机杂质分别是水杨酸、阿司匹林(简称 SM1)、2,5-二甲氧基苯胺(简称 SM2)、乙酰水杨酰氯[高效液相色谱法(HPLC)检测时溶剂含有甲醇、乙酰水杨酰氯以乙酰水杨酸甲酯形式存在]以及 MA-2、MA-6 两个工艺杂质。因此,本课题组采用 HPLC 法检测 DHMEQ 中间体 MA 及其杂质,旨在为该中间体的纯度控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

e2695 型 HPLC 仪,包括 2998 PDA 二极管阵列检测器、Empower 3 色谱工作站(美国 Waters 公司);MS105 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

1.2 药品与试剂

MA 样品(自制,批号:20160523、20160607、20160706);MA 对照品(自制,批号:20160512105,氢谱、碳谱核定结构,HPLC 测定纯度为 99.6%);乙酰水杨酸甲酯对照品(东京化成工业株式会社,批号:AG02,纯度:98.9%);水杨酸对照品(批号:100106-201104,纯度:99.9%)、SM1 对照品(批号:100113-201405,纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;SM2 对照品[阿法埃莎(中国)化学有限公司,批号:10183987,纯度:98.6%];MA-2 对照品(自制,批号:

^A 基金项目:国家科技重大专项——重大新药创制项目(No.2012ZX09103101-004);广东省战略性新兴产业核心技术攻关项目(No.2012A080800010);深圳市技术研究开发计划(三大产业)项目(No.JSA201105090126A)

*工程师。研究方向:药品质量、项目管理及注册申报。E-mail: hukeyu@wanhe-phar.com

[#]通信作者:工程师,硕士。研究方向:药品质量、项目管理及注册申报。E-mail: dengshuangbing@wanhe-phar.com

20160104, 氢谱、碳谱核定结构, HPLC 法测定纯度为 100%); MA-6 对照品(自制, 批号: 20160123, 氢谱、碳谱核定结构, HPLC 法测定纯度为 99.0%); 乙腈为色谱纯(德国 Fisher 公司), 磷酸为色谱纯(美国 Tedia 公司), 其余试剂为分析纯, 水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Ultimate AQ-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-0.05% 磷酸(B), 梯度洗脱(0 min, 20.0% A; 5 min, 20.0% A; 10 min, 25.0% A; 15 min, 25.0% A; 30 min, 45.0% A; 40 min, 45.0% A; 45 min, 20.0% A; 50 min, 20.0% A); 流速: 1 ml/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 10 μl。

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶剂 取冰乙酸 10 ml, 置于 1 000 ml 量瓶中, 用甲醇定容, 混匀, 即得空白溶剂(即 1% 冰乙酸甲醇溶液)。

2.2.2 混合对照品溶液 取乙酰水杨酸甲酯、水杨酸、SM1、SM2、MA-2、MA-6 对照品各约 10 mg, 精密称定, 分别置于 20 ml 量瓶中, 用 1% 冰乙酸甲醇溶液定容, 摇匀, 制成各单一对照品贮备液; 另取 MA 对照品 10 mg, 精密称定, 置于 20 ml 量瓶中, 加入各单一对照品贮备液 0.2 ml, 用 1% 冰乙酸甲醇溶液定容, 摇匀, 制成含 MA 0.5 mg/ml 和乙酰水杨酸甲酯、水杨酸、SM1、SM2、MA-2、MA-6 均约为 1% 的混合溶对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取 MA 样品约 25 mg, 精密称定, 置于 50 ml 量瓶中, 加 1% 冰乙酸甲醇溶液适量, 振荡使溶解, 用 1% 冰乙酸甲醇溶液定容, 摇匀, 即得。

2.3 系统适用性与专属性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶剂各适量, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 详见图 1。由图 1 可知, 在该色谱条件下, 各成分均能达到基线分离, 分离度均>1.5; 理论板数以 MA 峰计≥5 000, 保留时间约为 41 min。

2.4 定量限与检测限考察

取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 等倍逐步稀释, 分别按“2.1”项下色谱条件连续进样测定, 记录峰面积。当信噪比为 10:1 时, 得定量限(LOQ); 当信噪比为 3:1 时, 得检测限(LOD), 结果见表 1。由表 1 可知, 当 MA 质量浓度为 0.5 mg/ml 时, MA 及各杂质的检测灵敏度均符合 ICH Q3A(新原料药中的杂质)指导原则关于报告限度的要求。

2.5 稳定性与耐用性考察

2.5.1 稳定性试验 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 分别于室温下放置 0、2、4、6、10 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, MA 及各杂质峰面积的 RSD 均<10% (n=5), 表明混合对照品溶液室温下放置 10 h 内稳定性良好。

2.5.2 耐用性考察 取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量, 分别在不同波长、流速、柱温、流动相比例及不同批号色谱柱条件下, 按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果, 在不同波长 [(230±1) nm]、不同流速 [(1.0±0.1) ml/min]、不同柱温 [(30±5) ℃]、不同流动相比例 (±2%)、不同批号色谱柱条件下, MA 及各杂质含量的 RSD 均<10%, 表明方法耐用性良好。

2.6 样品纯度测定

取 3 批样品各适量, 分别按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算 MA 的纯度。结果, 3 批(批号: 20160523、20160607、20160706)样品的纯度分别为 96.5%、97.3%、95.0% (n=3)。

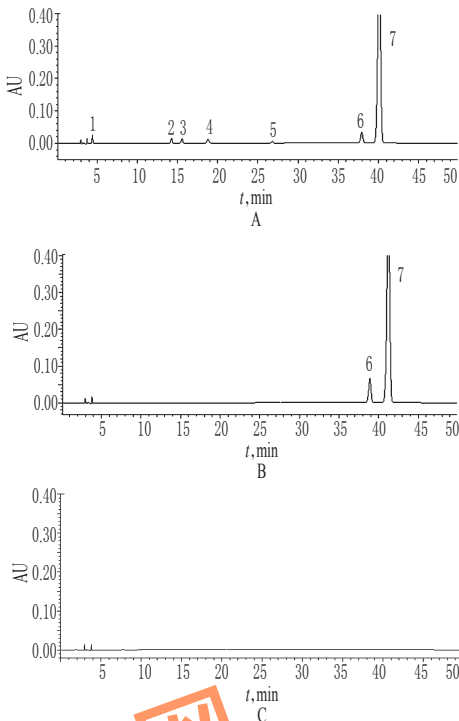


图 1 高效液相色谱图

A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 空白溶剂; 1. SM2; 2. SM1; 3. MA-6; 4. 水杨酸; 5. 乙酰水杨酸甲酯; 6. MA-2; 7. MA

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference substance; B. test sample solution; C. blank control; 1. SM2; 2. SM1; 3. MA-6; 4. salicylic acid; 5. methyl acetylsalicylate; 6. MA-2; 7. MA

表 1 定量限与检测限测定结果

Tab 1 Determination results of quantitation limit and detection limit

MA 及相关杂质	LOQ			LOD		
	质量浓度, μg/ml	质量, ng	相当于 MA 样品, %	质量浓度, μg/ml	质量, ng	相当于 MA 样品, %
MA	0.194	1.94	0.04	0.065	0.65	0.01
乙酰水杨酸甲酯	0.138	1.38	0.03	0.046	0.46	0.01
SM2	0.065	0.65	0.01	0.022	0.22	0.004
SM1	0.259	2.59	0.05	0.086	0.86	0.02
MA-6	0.252	2.52	0.05	0.084	0.84	0.02
水杨酸	0.245	2.45	0.05	0.082	0.82	0.02
MA-2	0.249	2.49	0.05	0.083	0.83	0.02

3 讨论

MA 是 DHMEQ 合成过程中一个重要的中间体, 其纯度对后续中间体和终产品的质量有显著影响, 所以有必要进行其纯度控制。作为中间体, MA 纯度测定结果是以峰面积归一化方法计算, 故不受仪器精密度的影响, 因而未进行精密度的验证, 只需按照 2015 年版《中国药典》^[4] 限度方法学要求验证专属性、检测限、耐用性足以保证本方法的可靠性。此外, MA 生产后很快就投入下一步的反应中, 无需长期放置, 故其纯度测定方法的专属性验证重点考察分离度、溶剂干扰试验, 不进行降解试验。

综上所述, 本方法专属性、检测限、耐用性均符合要求, 可用于 DHMEQ 中间体 MA 及其杂质的检测。

参考文献

HPLC法测定萘普生固体脂质纳米粒中主成分的含量^Δ

付佳*,高赛男,周学刚,辛萍,孙世芹[#](哈尔滨医科大学大庆校区药学院,黑龙江大庆163319)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)36-5127-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.36.27

摘要 目的:建立测定萘普生固体脂质纳米粒中主成分含量的方法。方法:采用微乳法制备萘普生固体脂质纳米粒,并采用高效液相色谱法测定含量。色谱柱为Elite C₁₈,流动相A为甲醇、流动相B为0.01 mol/L磷酸二氢钾缓冲溶液(磷酸调节pH至3.0)(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,检测波长为240 nm,柱温为25℃,进样量为20 μl。结果:萘普生检测质量浓度线性范围为0.2~180.0 μg/ml($r=0.9997$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1%;加样回收率为98.97%~100.67%,RSD=0.50%($n=9$)。结论:该方法简便、精确,可排除萘普生固体脂质纳米粒中辅料的干扰,适用于其中主成分的含量测定。
关键词 萘普生固体脂质纳米粒;高效液相色谱法;含量测定

Content Determination of Main Ingredient in Naproxen Solid Lipid Nanoparticles by HPLC

FU Jia, GAO Sainan, ZHOU Xuegang, XIN Ping, SUN Shiqin[College of Pharmacy, Harbin Medical University (Daqing Area), Heilongjiang Daqing 163319, China]

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of main ingredient in naproxen solid lipid nanoparticles. METHODS: Microemulsion method was used to prepare naproxen solid lipid nanoparticles, and HPLC was used for the content determination. The column was Elite C₁₈ with mobile phase A of methanol and B of 0.01mol/L KH₂PO₄ buffer solution (adjust pH to 3.0 by phosphoric acid)(gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min, detection wavelength was 240 nm, column temperature was 25℃, and injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of naproxen was 0.2-180.0 μg/ml($r=0.9997$); RSDs of precision, stability and reproducibility were lower than 1.00%; recovery was 99.73%-100.29% (RSD=0.20%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, and can exclude the accessories' interference in naproxen solid lipid nanoparticles, which is suitable for the content determination of main ingredient.
KEYWORDS Naproxen solid lipid nanoparticles; HPLC; Content determination

萘普生(Naproxen, Nap)又名甲氧异丙酸,化学名(+)- α -甲基-6-甲氧基-2-萘乙酸,是一种非甾体抗炎药,具有明显的抑制前列腺素合成的作用,可使前列腺素的释放减少甚至停止,因而有较强的消炎、解热和镇痛作用,临床主要用于治疗风湿性关节炎、类风湿性关节炎及强直性脊椎炎等^[1]。Nap的常用剂型有片剂、胶囊、颗粒剂和注射剂等,而使用这些剂型可能出现不同程度的胃部不适、胃溃疡及心血管系统不良反应^[2]。固体脂质纳米粒(Solid lipid nanoparticles, SLN)是一种新型的纳米粒给药系统,具有物理稳定性高、可控制药物释放、可避免药物降解或泄漏以及靶向性好、无毒等优点^[3-4]。笔者以硬脂酸为油相,大豆磷脂为表面活性剂,牛黄胆酸钠为助表面活性剂^[5],利用微乳法^[6]成功制备了Nap固体脂质纳米粒(Nap-SLN),可避免使用Nap常规口服或注射剂型可能引发的不良反应,从而利于达到更好的治疗效果。此前国内外已有

采用紫外分光光度法(UV)和高效液相色谱法(HPLC)测定Nap含量的文献报道^[7-8]。但是,由于Nap-SLN中辅料的存在,沿用药典或文献报道的方法测定其中主成分的含量可能会存在干扰。因此,本试验在已有的国内外相关文献报道基础上探索了新的测定Nap-SLN中主成分含量的HPLC法,旨在为后续研究奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

LC-20AT型HPLC仪,包括SIL-20A型自动进样器、LC solution色谱工作站等(日本岛津公司);KH-500SPV型超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);DF-101S型集热式恒温加热磁力搅拌器(河南省予华仪器有限公司);HH-1型数显恒温水浴锅(金坛市荣华仪器制造有限公司);JY92-11型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);H1650-W型

[1] Matsumoto N, Ariga A, To-e S, *et al.* Synthesis of NF- κ B activation inhibitors derived from epoxyquinomicin C [J]. *Bioorg. Med. Chem. Lett*, 2000, 10(9): 865.

[2] Yamamoto M, Horie R, Takeiri M, *et al.* Inactivation of

NF- κ B Components by Covalent Binding of (-)-Dehydroxymethylepoxyquinomicin to Specific Cysteine Residues[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(18): 5 780.

[3] Horie R, Watanabe T, Umezawa K. Blocking NF-kappa-B as a potential strategy to treat adult T-cell leukemia/lymphoma[J]. *Drug News Perspect*, 2006, 19(4): 201.

[4] 孙婷,杨浩天,刘红莉,等.HPLC法测定洛伐他汀分散片中的有关物质[J]. *中国药房*, 2016, 27(12): 1 683.

^Δ 基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(No.C2007-01);大庆市指导性科技计划项目(No.szd-2015-12)

* 硕士。研究方向:类风湿性关节炎。E-mail: 13159826215@163.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:类风湿性关节炎。电话:0459-8153631。E-mail: ssq7610@126.com

(收稿日期:2016-09-21 修回日期:2016-11-07)
(编辑:刘柳)