

# 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<sup>△</sup>

胡克余\*, 汪岩峰, 余卫麟, 马俊, 邓双炳<sup>#</sup>(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-C<sub>18</sub>,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%,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%;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-C<sub>18</sub> 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% 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 quinomycin, 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>,因此DHMEQ有望在临幊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

△ 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

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:

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-C<sub>18</sub>(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, 摆匀, 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, 摆匀, 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, 振摇使溶解, 用 1% 冰乙酸甲醇溶液定容, 摆匀, 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%( $n=3$ )。

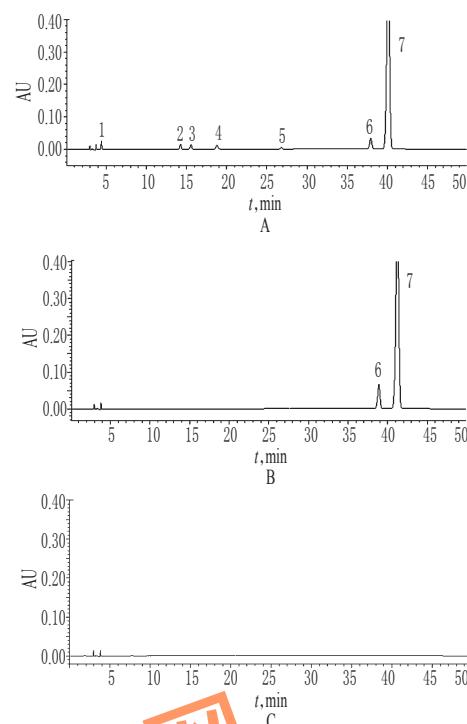


图 1 高效液相色谱图

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、准确度影响, 因而未进行精密度、准确度等验证, 只需按照 2015 年版《中国药典》<sup>[4]</sup>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<sup>△</sup>

付佳\*,高赛男,周学刚,辛萍,孙世芹<sup>#</sup>(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 C<sub>18</sub>,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 C<sub>18</sub> with mobile phase A of methanol and B of 0.01mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 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(+)- $\alpha$ -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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3-4]</sup>。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<sup>[5]</sup>,利用微乳法<sup>[6]</sup>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<sup>[7-8]</sup>。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-κB 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

△ 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

- NF-κB 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.

(收稿日期:2016-09-21 修回日期:2016-11-07)

(编辑:刘柳)