

HPLC 测定二-(2,4-二氟苯甲酰异羟肟酸)二苯基合锡原料药的含量及有关物质

高竹妍, 郑娟, 李云兰*, 李青山(山西医科大学药学院, 太原 030001)

摘要: 目的 建立反相高效液相色谱法测定有机锡类抗癌化合物二-(2,4-二氟苯甲酰异羟肟酸)二苯基合锡(DPDFT)原料药的含量及有关物质。方法 分析柱为 Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以甲醇-水(20:80, 用磷酸调 pH 至 3.0)为流动相; 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 含量测定检测波长为 228 nm, 有关物质检测波长为 246 nm, 柱温为 25 °C。结果 样品中待测组分与有关物质分离良好, 平均回收率为 99.0%, RSD 为 0.65%(n=9), 回归方程为 $A=1.65 \times 10^7 C - 3286$ ($r=0.9999$), 线性范围为 1.7~150 μg·mL⁻¹。最低检测限为 10 ng。结论 本方法操作简便快速, 结果准确, 专属性强, 灵敏度高, 可同时用于抗癌化合物 DPDFT 原料药的含量控制及有关物质检查。

关键词: 二-(2,4-二氟苯甲酰异羟肟酸)二苯基合锡; 含量测定; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)11-1119-03

Determination of Crude Drug Di-phenyl-di-(2,4-difluorobenzohydroxamato) tin and Its Related Substances by HPLC

GAO Zhuyan, ZHENG Juan, LI Yunlan*, LI Qingshan(School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method to determine the content of crude drug di-phenyl-di-(2,4-difluorobenzohydroxamato)tin (DPDFT) and its related substances by RP-HPLC. **METHODS** The HPLC system was adopted with Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) as the stationary phase. The mobile phase was consisted of methanol-water (20:80, adjusted to pH 3.0 with phosphoric acid) with the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹ and column temperature was 25 °C. The detection wavelength for determination of contents and related substances were set at 228 nm and 246 nm, respectively. **RESULTS** Under the selected chromatographic conditions, related substances and degraded substances were completely separated from DPDFT. The average recovery was 99.0 % and the RSD was 0.65%(n=9). The linear range was 1.7–150 μg·mL⁻¹, and the regression equation was $A=1.65 \times 10^7 C - 3286$ ($r=0.9999$). The limit of detection was 10 ng. **CONCLUSION** The analytical method was simple, quick, accurate, sensitive and selective for the determination of crude drug DPDFT and its related substances.

KEY WORDS: di-phenyl-di-(2,4-difluorobenzohydroxamato)tin; content; related substances; HPLC

目前恶性肿瘤尤其是肝癌、肺癌、胃癌等晚期肿瘤尚属不治之症, 延长肿瘤患者生命的主要手段之一是化学治疗, 几乎所有的患者都离不开化疗药物。二-(2,4-二氟苯甲酰异羟肟酸)二苯基合锡(DPDFT)是课题组通过系统合成和大量筛选, 成功地获得有很强抗癌活性、值得进一步研究的新化合物^[1]。由于该化合物是本课题组首次自主合成, 目前尚没有建立有关物质和含量测定的检测方法, 为使该化合物的质量可控并为后续研究提供质量稳定的样品, 笔者对该化合物的含量和有关

物质检查方法进行了研究^[2]。结果表明, 所建立的方法准确, 专属性强, 灵敏度高, 分离度好^[3], 可用于 DPDFT 原料药中有关物质的控制和含量测定, 为此化合物的质量标准的建立和体内成分分析奠定了实验基础^[4]。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪、2996 型二极管阵列检测器(Waters 公司); Empower 色谱工作站; DPDFT 对照品(本课题组合成, 高效液相色谱峰面积归一化法测定, 纯度 ≥ 99.0%); DPDFT 样品(本

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-104); 国家自然科学基金项目(30973603; 30772682); 山西省青年科技研究基金(2007021035); 山西医科大学 08 博士启动基金

作者简介: 高竹妍, 女, 硕士生 Tel: (0351) 4135243
导 Tel: (0351)4690322 E-mail: liyunlanrr@163.com

E-mail: gaozhuyan55@163.com *通信作者: 李云兰, 女, 博士, 副教授, 硕

课题组合成,批号:20091101,20091105,20091110)。甲醇为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-水(20:80, 用磷酸调 pH 至 3.0); 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 检测波长为 228 nm(含量测定)和 246 nm(有关物质); 进样量: 20 μL。

2.2 线性关系考察

精密称取 DPDFT 对照品 10.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 少量甲醇溶解并用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备溶液。分别精密量取上述贮备溶液 0.17, 0.5, 1, 5, 10, 15 mL 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 进样测定, 以峰面积(A)为纵坐标, 样品浓度(C, μg·mL⁻¹)为横坐标, 进行线性回归, 回归方程为: $A=1.65 \times 10^7 C - 3286$, $r=0.9999$ 。结果表明, DPDFT 浓度在 1.7~150 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3 稳定性考察

配制浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 分别于 0, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样, 记录色谱图。结果 24 h 内主峰与有关物质峰的峰面积均没有变化, RSD 分别为 0.3%与 0.2%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.4 有关物质的精密度试验

配制浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的供试品溶液, 平行 6

份, 进样测定, 计算杂质总量及相应的 RSD。结果 6 次测定杂质总量的 RSD 为 0.7%, 表明该方法的重复性良好。

2.5 回收率与精密度

取高、中、低 3 种浓度, 相当于被测样品浓度的 120%, 100%和 80%, 以回归方程计算测得的浓度, 与理论浓度相比, 计算方法回收率。每个浓度每日平行测定 5 次, 以获得日内精密度, 连续测定 5 d, 获得日间精密度, 结果见表 1。

表 1 方法的回收率和精密度($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Recovery and precision of the assay($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

理论值/ mg·mL ⁻¹	测得值/ mg·mL ⁻¹	方法 回收率/%	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
0.081	0.080	98.8±0.4	0.5	0.8
0.102	0.101	99.0±0.1	0.3	0.7
0.121	0.120	99.2±0.3	0.6	0.9

2.6 定量限和检测限

将对照品贮备溶液逐步稀释, 进样测定。当 S/N=3 时, 测得检测限为 10 ng; 当 S/N=10 时, 测得定量限为 35 ng($n=6$, RSD=0.3%)。

2.7 专属性试验

取对照品溶液(1 mg·mL⁻¹)分别经酸、碱、氧化、光、热破坏后, 进样测定, 色谱图见图 1。由图可见, 主成分与其降解产物能很好地分离, 专属性良好。化合物在光照条件下, 能够稳定存在。主峰的峰纯度见表 2。由表可见, 峰纯度高, 专属性强, 满足定量分析的要求。

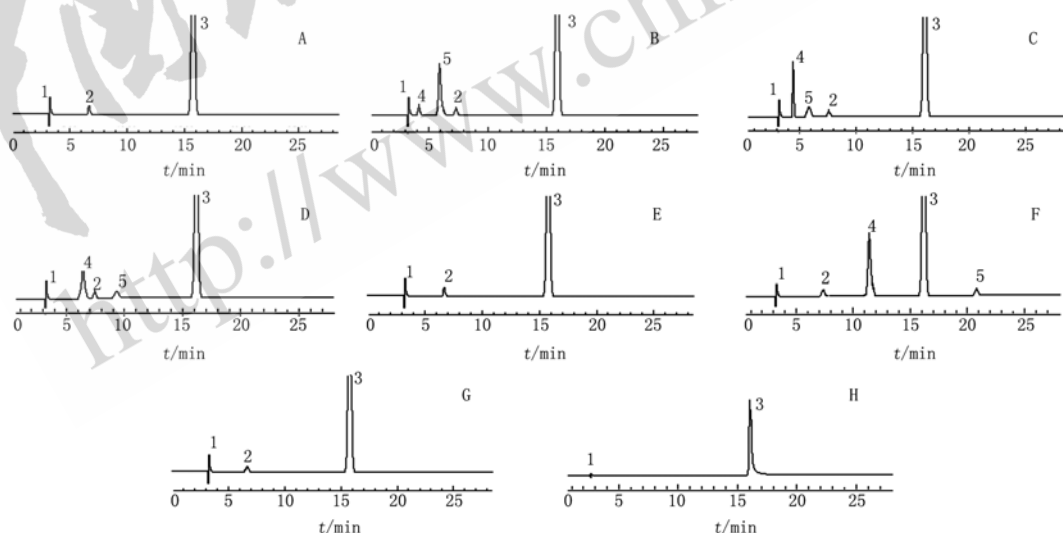


图 1 DPDFT 典型色谱图

A-空白; B-酸破坏; C-碱破坏; D-氧化破坏; E-光照破坏; F-高温破坏; G-有关物质检测; H-含量测定; 1-溶剂峰; 2-有关物质; 3-主成分; 4,5-破坏出的峰

Fig 1 Typical chromatograms of DPDFT

A-blank; B-destroyed by acid; C-destroyed by alkali; D-destroyed by oxidation; E-destroyed by light radiation; F-destroyed by heat; G-detected related substances; H-determination; 1-solvent; 2-related substance; 3-peak; 4,5-damage peaks

表 2 专属性试验主峰的峰纯度

Tab 2 The peak purity of specificity test

破坏	空白	酸破坏	碱破坏	氧化破坏	光照破坏	高温破坏
主峰的峰纯度/%	100.0	99.1	99.2	98.5	100.0	97.7

2.8 有关物质的测定

精密称取 DPDFT 样品 50.0 mg 于 10 mL 量瓶中, 加少量甲醇溶解并用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 精密量取供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。精密量取供试品溶液和对照品溶液 20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 2.5 倍。供试品溶液色谱图中如有杂质峰, 量取各杂质峰的峰面积, 计算有关物质的量。3 批样品的有关物质含量分别为 0.38%, 0.41%和 0.45%。

2.9 样品含量测定

取 3 批样品, 精密称取适量, 加流动相溶解并定量稀释成浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为供试品溶液; 另取对照品适量, 精密称定, 加流动相溶液并定量稀释成浓度为 0.1 mg·mL⁻¹ 的溶液, 作为对照品溶液。精密量取供试品溶液和对照品溶液 20 μ L, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算。3 批样品的含量分别为 99.5%, 99.2%和 99.7%。

3 讨论

3.1 流动相 pH 的确定

本品极易溶于甲醇, 因此本实验选用甲醇作溶剂, 选用水和甲醇作为流动相。由于该化合物的 pH

显酸性, 所以用磷酸调节水中的 pH 至 3.0, 以保证化合物在检测过程中不会降解。

3.2 检测波长的确定

应用二极管阵列检测器确定主成分和有关物质的测定波长, 结果表明, 主成分的最大吸收波长是 228 nm, 而有关物质的最大吸收波长是 246 nm。

3.3 色谱图记录时间的确定

为保证可能出现的杂质峰完全出峰, 且分离度良好; 参照中国药典高效液相色谱图集第一卷(2005) 中有关物质和含量测定的图谱, 确定记录时间为主成分峰保留时间的 2.5 倍。

3.4 含量限度的确定

由 3 批化合物的含量和有关物质的测定结果, 确定该化合物的含量为其标示量的 95.0%~105.0%, 有关物质的限度为 $\leq 1.0\%$, 这些研究结果为其质量标准的建立和体内成分分析奠定了基础。

REFERENCES

[1] SHANG X M, WU J, LI Q S. The initial structure-activity relationship of aromatic hydroxamic acid organotin anticancer compound [J]. Sci Sin B(中国科学 B 辑), 2008, 38(5): 429-440.

[2] CAO F X, JIANG J G, LIU H L. Determination of the related substances of difenidol hydrochloride by RP-HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(8): 661-664.

[3] LIU W F, CHEN J, HU G Y. RP-HPLC determination of the related substances in pantoprazole sodium [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2006, 26(6): 784-786.

[4] LI Y L, WANG X J, YANG L. et al. Determination of a novel organometallic antitumor crude drug arylhydroxamic acid of di-butyl-tin (IV) by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Lab(分析试验室), 2007, 26(8): 21-24.