

RP-HPLC测定4,5,2'-三吗啉酰氧基-2,5'-二氯二苯甲酮原料药的含量及有关物质

程 章, 张圆琳, 张乐华, 冯秀娥*, 李青山

山西医科大学药学院, 山西 太原 030001

摘要: 目的 建立测定原料药4,5,2'-三吗啉酰氧基-2,5'-二氯二苯甲酮(LF1)的含量及有关物质的RP-HPLC方法。方法 采用Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-磷酸水(60:40, pH3.0)为流动相, 检测波长230 nm, 体积流量1 mL/min, 柱温25 °C。结果 主峰与杂质峰分离良好, LF1和杂质A分别在质量浓度1.0~100 ($r=0.999\ 8$)和0.2~2.4 mg/L ($r=0.999\ 6$) 线性关系良好, 最低检测限分别为1和2 ng/mL, 平均回收率分别为100.7%和102.0%。结论 本法简便、快速、准确, 可用于LF1原料药的含量及有关物质的测定。

关键词: 高效液相色谱; 4,5,2'-三吗啉酰氧基-2,5'-二氯二苯甲酮; 有关物质; 含量测定

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 05-0895-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.05.015

Determination of 4,5,2'-trimorpholinyl acyloxy-2,5'-dichlorobenzophenone and its related substances by RP-HPLC

CHENG Zhang, ZHANG Yuanlin, ZHANG Lehua, FENG Xiu'e, LI Qingshan

School of Pharmacy, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Abstract: Objective This paper aims to establish a RP-HPLC method to determine the content of 4,5,2'-trimorpholinyl acyloxy-2,5'-dichlorobenzophenone (LF1) and its related substances. **Methods** The HPLC method was explored on Diamonsil C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with acetonitrile-phosphoric acid water (60:40, pH 3.0) as the mobile phase. The detection wavelength was 230 nm, the flow rate was 1 mL/min and the column temperature was 25 °C. **Results** The LF1 was well separated from the impurities, respectively. The calibration curves of LF1 and impurity A showed good linear relationship within 1.0—100 ($r=0.999\ 8$) and 0.2—2.4 mg/L ($r=0.999\ 6$), The lowest limit of detection for LF1 and impurity A were 1 and 2 ng/mL, and the average recoveries were 100.7% and 102.0%, respectively. **Conclusion** The established HPLC method is simple, rapid and accurate, and can be used for the determination of LF1 and its related substances.

Key words: HPLC; 4,5,2'-trimorpholinyl acyloxy-2,5'-dichlorobenzophenone; related substance; content determination

天然来源的卤酚类化合物具有抗肿瘤^[1]、抗炎^[2]、蛋白酪氨酸激酶抑制^[3]、抗氧化^[4]、抗菌^[5]、抗血栓^[6]、保肝、抗糖尿病和舒张血管等多种生物活性^[7]。近年来,通过对卤酚的持续深入研究,课题组以获得的对H₂O₂损伤的人脐静脉内皮细胞具有高保护活性的溴酚4,5,2'-三羟基-2,5'-二溴二苯甲酮(EC₅₀为0.4 μmol/L)为先导化合物^[7],引入吗啉环和氯原子进行结构衍生,获得了活性更高的氯代二

苯甲酮类化合物4,5,2'-三吗啉酰氧基-2,5'-二氯二苯甲酮(LF1),其EC₅₀为0.06 μmol/L^[8],进一步的药效学实验表明LF1能有效改善II型糖尿病肾病大鼠的肾功能,在治疗糖尿病肾病方面有重要的应用前景^[9]。为了为后续进一步深入的药效学和药理研究提供足量质量均一、稳定可控的样品,需要建立LF1原料药的含量测定及有关物质控制方法。本文采用高效液相色谱(HPLC)对LF1原料药的含量及有

收稿日期: 2018-10-14

基金项目: 国家自然科学基金(81473100); 国家重大专项(2017ZX09101003-001-017); 2017年山西省重点研发计划(重点)项目(201703D111033)

第一作者: 程章,男,硕士。Tel: 18234136954 E-mail: 1176368425@qq.com

*通信作者: 冯秀娥,女,博士,硕士研究生导师。Tel: 13191058319 E-mail: xiuefeng@163.com

关物质的检查进行了研究,结果表明,所建立的方法准确、专属性强、灵敏度高、分离度好,可有效测定原料药中LF1的含量并对有关物质进行控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); BT25S 型电子天平(德国 Sartorius); UV-1800PC 分光光度计(上海 Mapada); LF1 对照品(纯度>99.5%,以5-氯-2-甲氧基苯甲酰氯与4-氯-1,2-二甲氧基苯为起始原料经傅克酰基化得到4,5,2'-三甲氧基-2,5'-二氯二苯甲酮(中间体一),中间体

一经脱甲基反应得到关键中间体4,5,2'-三羟基-2,5'-二氯二苯甲酮(中间体二),再与4-吗啉碳酰氯进行酯化反应得到LF1^[8],经3次重结晶,面积归一化法测定其纯度(结构式见图1);杂质A对照品(碱破坏后的降解产物,中和、萃取、分离提纯得到,经质谱(MS)、氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)、二维谱HSQC和HMBC对其结构进行了确证,纯度>95%); LF1 供试品(自制,批号:20160514、20160610、20160810);乙腈为色谱级;超纯水,其他试剂均为国产分析纯。

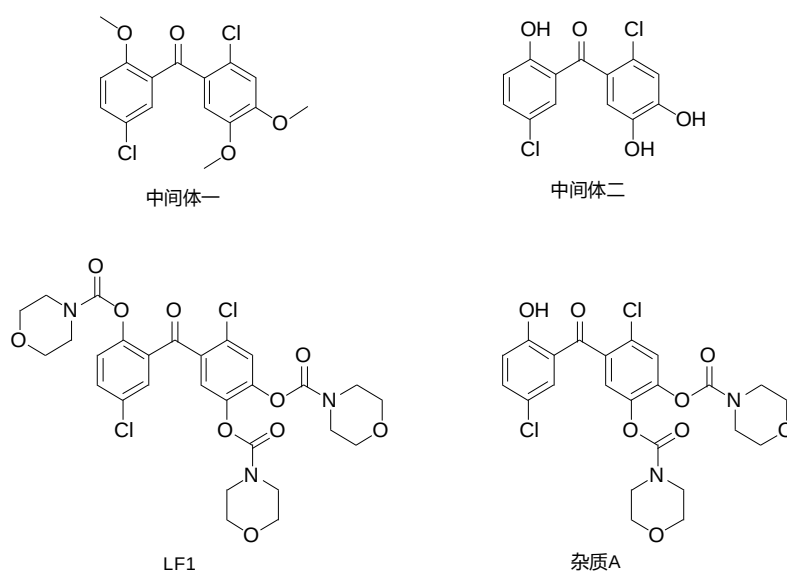


图1 LF1及其中间体和有关物质的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of LF1, its intermediates and related substances

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱条件: Diamonsil C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 乙腈-磷酸水(60:40, pH3.0)为流动相, 检测波长230 nm, 体积流量1 mL/min, 柱温25℃, 进样量20 μL。

2.2 LF1含量测定方法

取室温下真空减压干燥至恒重后的LF1样品20 mg, 置于100 mL的量瓶中, 用流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密量取6.25 mL, 置于25 mL的量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液; 另取精密称取LF1对照品20 mg, 同法配制。按外标法以峰面积计算, 即得。

2.3 有关物质的检查法

精密称取LF1样品10 mg于100 mL量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为供试溶液, 精密量取供试溶液1 mL, 置于100 mL量瓶中, 加流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。精密

量取对照溶液20 μL, 注入液相色谱仪, 调节检测器灵敏度, 使主成分色谱峰约为满量程的30%, 再精密量取供试液20 μL注入液相色谱仪, 记录色谱图至对照品主峰保留时间的2.5倍。按外标法以峰面积计算, 单杂含量不超过0.5%, 总杂的含量不超过1%, 对杂质A采用加校正因子的主成分自身对照法检查, 其他未知杂质采用不加校正因子的主成分自身对照法。

2.4 对照品溶液和供试品溶液的配制

取室温下真空减压干燥至恒重后的LF1对照品和供试品(批号20160514)各25 mg, 精密称定, 分别置于50 mL量瓶中, 用流动相溶解并定容至刻度, 摇匀, 即得500 μg/mL的LF1对照品和供试品储备液, 另取杂质A 25 mg, 同法制得500 μg/mL的对照品, 都置于4℃冰箱中保存。

2.5 检测波长的确定

用紫外分光光度计测得LF1在乙腈中的紫外最大吸收波长为221 nm。考虑到221 nm附近干扰比

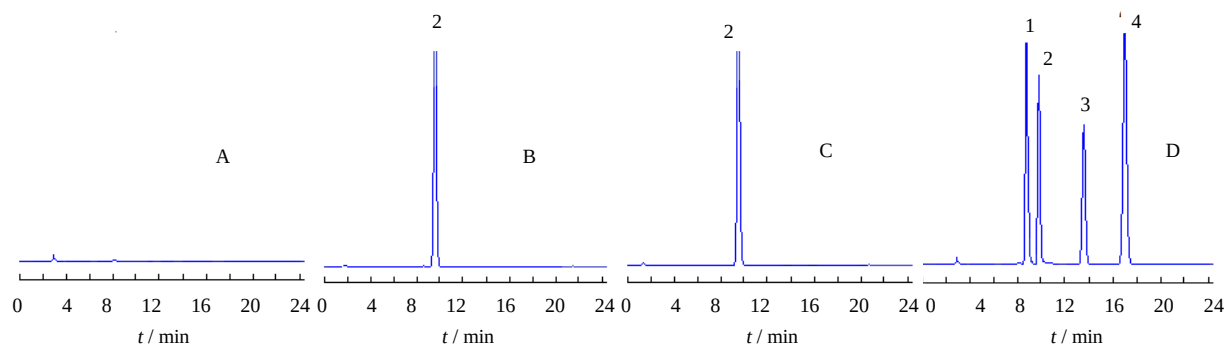
较多,故采用在230 nm下进行相关实验,且杂质A在此波长下也有较强吸收。

2.5 分析方法的验证

2.5.1 系统适用性实验 对照品和供试品溶液分别用流动相稀释为50 $\mu\text{g/mL}$ 。按“2.1”项下的色谱条件进行测定,LF1的保留时间为9.706 min,理论塔板按LF1计算不低于9 000,对称因子为0.96,峰型对称。相邻两峰的分离度大于1.5,分离良好,结果

见图2A~C。

2.5.2 方法专属性考察 精密称取原料杂质A,中间体一、中间体二适量,分别用流动相配制成50 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,单独进样后各物质的保留时间分别为13.361、17.062、8.402 min。精密量取一定量的供试品溶液及上述溶液混合在一起配制成各物质质量浓度为20 $\mu\text{g/mL}$ 的混合溶液,按“2.1”项下的色谱条件进行测定,结果见图2D。



A-空白溶剂;B-LF1对照品溶液;C-LF1供试品溶液;D-LF1对照品/杂质/中间体混合溶液;1-中间体二;2-LF1;3-杂质A;4-中间体一
A-blank solvent; B-LF1 reference substance; C-LF1 test sample; D-LF1/impurity A/intermediates; 1- second intermediate; 2- LF1; 3- impurity A; 4- first intermediate

图2 系统适用性试验相关HPLC色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of system suitability of LF1

2.5.3 强制降解实验 对LF1进行了酸、碱、氧化、高温、强光照射等加速破坏实验^[10-11]。取LF1供试品(20160514)适量,用流动相溶解制成100 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,取样10 mL,共4份。其中一份加10 mL 0.1 mol/L的盐酸溶液,室温放置2 h,用0.1 mol/L的氢氧化钠溶液中和至中性;一份加10 mL 0.1 mol/L的氢氧化钠溶液,室温放置15 min,用0.1 mol/L的盐酸溶液中和至中性;其中一份加30%的过氧化氢溶液2.5 mL,室温放置1 h;1份80 $^{\circ}\text{C}$ 加热回流1 h。另精密称取LF1供试品(20160514)10 mg,置于100 mL的量瓶中,置于4 500 lx照度下光照72 h。按“2.1”项下色谱条件进样测定,结果见图3。由实验结果可知,该方法能有效检测出各破坏性实验所产生的降解产物,且降解产物均能与主成分峰能良好分离,不干扰测定,表明其对有关物质检查的专属性良好。

2.5.4 线性关系 分别精密吸取LF1和杂质A对照品储备液,用流动相稀释成一系列不同浓度的对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以质量浓度C为横坐标,色谱峰面积A为纵坐标,绘制标准曲线。结果LF1的回归方程为: $A = 36.678 C + 31.585$, $r = 0.999 8$,表明LF1在1.0~100 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系

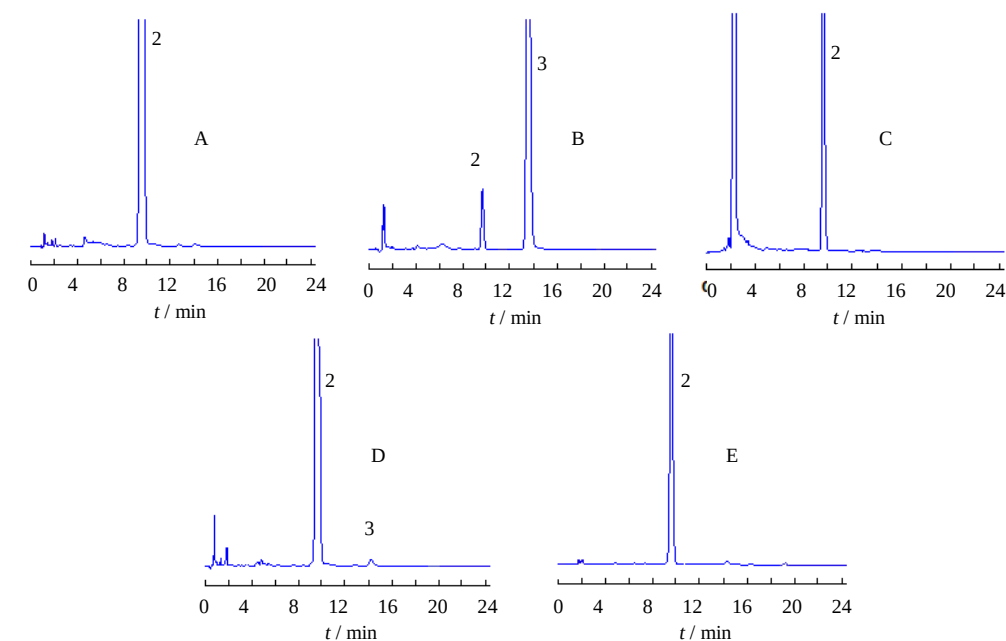
良好;杂质A的回归方程为 $A = 31.016 C - 0.7334$, $r = 0.999 6$,表明杂质A在0.2~2.4 $\mu\text{g/mL}$ 内线性关系良好。

2.5.5 校正因子 以LF1的回归方程斜率与杂质A的回归方程斜率的比值为该有关物质的校正因子,杂质A的校正因子为1.18(LF1的校正因子按1.0计)

2.5.6 检测限和定量限 精密量取LF1和杂质A对照品储备液适量,逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录信噪比(S/N)为3、10的色谱峰。检测限分别为1 ng/mL和2 ng/mL,其RSD分别为1.68%和1.54%,定量限分别为15 ng/mL和10 ng/mL,其RSD分别为1.32%和1.79%。

2.5.7 重复性 取同一批样品5份制成供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别对LF1和杂质A进行进样测定,其RSD分别为1.40%和1.73%。

2.5.8 回收率 取LF1供试品(批号20160514)4.98 mg,用流动相溶解并定容至100 mL量瓶中,精密量取供试品溶液1 mL于10 mL量瓶中,共9份,分别加入对照品溶液50 $\mu\text{g/mL}$ 各0.8、1、1.2 mL,各3份,加流动相稀释至刻度,定容摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算平均回收率为



A-酸破坏; B-碱破坏; C-氧化破坏; D-高温破坏; E-光照破坏

A-treated with acid; B-treated with base; C-treated with H₂O₂; D-treated with high temperature; E-treated with light

图3 专属性考察色谱图

Fig. 3 HPLC chromatograms of the exclusion inspection

100.7%, RSD值为1.73%。

取LF1对照品溶液(500 μg/mL)1 mL于10 mL量瓶中,再分别量取杂质A对照品溶液(20 μg/mL)各0.8、1、1.2 mL于同一量瓶中,共9份,加流动相稀释至刻度,定容摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算平均回收率。杂质A的平均回收率为102.0%,RSD值为2.42%($n=9$)

2.5.9 稳定性 取浓度为50 μg/mL(批号20160514)的供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别测定其在常温下放置0、2、4、8 h后的峰面积,用峰面积考察其稳定性,LF1的RSD为0.86%,杂质A和其他杂质含量未增加。

2.5.10 耐用性试验 精密量取LF1、中间体一和二、杂质A各适量,置于同一量瓶中,用流动相稀释至刻度,配制成各物质浓度为20 μg/mL的混合溶液,按“2.1”项下的色谱条件的基础上,单独改变柱温(20或30 °C)或改变体积流量(0.95或1.05 mL/min)测定,LF1与其他杂质峰之间的分离度均大于1.5,以LF1峰计算,理论塔板数依次为10 583、10 326、10 195、10 448,均超过9 000,符合要求。

2.5.11 LF1含量测定和有关物质检查结果 按“2.1”项下色谱条件进样,测定3批样品中主药和有关物质的量,结果见表1。

3 讨论

在破坏性实验中,由于LF1结构中含有酯基和

表1 3批样品含量测定和有关物质结果

Table 1 Content determination of main component and related substances in 3 batches of samples

批号	LF1/%	有关物质/%			
		中间体一	中间体二	杂质A	总杂质
20160514	99.65	未检出	未检出	0.40	0.87
20160610	99.45	未检出	未检出	0.30	0.91
20160810	101.2	未检出	未检出	0.41	0.79

和酰胺基,在碱性条件下不稳定,碱性破坏时产生了一个单一杂质,能使三氯化铁溶液显色,表明有酰氧键断裂,降解产物为酚。

LF1难溶于水,若采用容量法测定含量应当首选非水滴定,虽其作为容量分析法测定结果成本低、准确度高,但是当对样品进行批量分析检验时,时间成本偏高,而本文建立的高效液相色谱法高效、准确,可以为实验者带来便利。另外由于该含量测定方法与有关物质的色谱条件一致,所以能一定程度上缩短原料药的检验时间、提高检验工作效率。

LF1在甲醇中的溶解性较差,所以选择乙腈和水的混合溶剂作为流动相,实验中用pH为3的磷酸水溶液代替水相,主峰和中间体二的峰型明显改善,以主峰对称因子为评价指标,调整流动相的比

例及流速大小,使保留时间合适,峰型对称,最终确定的流动相比比例为乙腈:磷酸水(pH为3)=60:40。本实验为LF1原料药建立了简便、专属、准确、快速的HPLC检测方法,为其质量控制及相关物质检查提供了可靠的依据。

参考文献

- [1] Wei Y X, Xu Z H. Study on antioxidant activity of high molecular weight fucoidan in brown algae [J]. Chin Herb Med, 2003, 34(4): 317-319.
- [2] Li K, Li X M, Ji N Y, et al. Natural bromophenols from the marine red alga *Polysiphoniaurceolata* (Rhodomelaceae): Structural elucidation and DPPH radical-scavenging activity [J]. Bioorg Med Chem, 2007, 15(21): 6627-6631.
- [3] Wang B G, Zhang W W, Duan X J, et al. *In vitro* antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomelaconfervoides* (Rhodomelaceae) [J]. Food Chem, 2009, 113(4): 1101-1105.
- [4] Katsui N, Suzuki Y, Kitamura S, et al. 5, 6-Dibromoprotocatechualdehyde and 2, 3-dibromo-4, 5-dihydroxybenzyl methyl ether: New dibromophenols from rhodomelalarix [J]. Tetrahedron, 1967, 23(3): 1185-1188.
- [5] Choi J S, Park H J, Jung H A, et al. A cyclohexanonyl bromophenol from the red alga *Symphycladialatiuscula* [J]. J Nat Prod, 2000, 63(12): 1705-1706.
- [6] Duan X J, Zhang W W, Li X M, et al. Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphoniaurceolata* [J]. Food Chemistry, 2006, 95(1): 37-43.
- [7] Zhao W Y, Feng X E, Ban S R, et al. Synthesis and biological activity of halophenols as potent antioxidant and cytoprotective agents [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2010, 20(14): 4132-4134.
- [8] 李青山, 张圆琳, 冯秀娥. 氮甲酰氧基取代的氯代二苯甲酮类衍生物 [P]. 中国: ZL201610278055.8, 2017-8-25.
- [9] 李青山, 冯秀娥, 常熔熔. 两种卤酚化合物在制备抗II型糖尿病肾病药物中的应用 [P]. 中国: 201610278158.4, 2016-4-29.
- [10] 王文清, 高春丽, 蔡钰. 高效液相色谱法测定对羟基苯甲酸甲酯的含量及有关物质 [J]. 中国药师, 2009, 12(1): 70-72.
- [11] 崔红霞, 霍艳双, 李清, 等. 反相高效液相色谱法测定WF-208的含量及有关物质 [J]. 中国新药杂志, 2012(17): 2069-2071.