

RP-HPLC法测定 TM 208的含量及有关物质*

王皎¹, 李晓娜¹, 张建美¹, 凌笑梅^{1,2**}, 李润涛², 崔景荣²

(1. 北京大学药学院药物分析教研室, 北京 100191; 2. 北京大学医学部天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191)

摘要 目的: 建立 TM 208含量及有关物质的 RP-HPLC方法。方法: 采用 Phenomenex Luna C₁₈(2) (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为水-甲醇 (25:75), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 254 nm, 柱温 25℃, 进样量 20 μL。结果: TM 208与其他物质分离良好, 线性范围为 1.0~200 μg·mL⁻¹ (r=0.9997), 日内、日间精密密度 RSD 均在 5% 以下, 平均回收率为 100.2%, 检测限为 50 ng·mL⁻¹。结论: 该方法快速、准确、灵敏。

关键词: 高效液相色谱; TM 208 含量测定; 有关物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)01-0099-04

RP-HPLC determination of TM 208 and its related substances*

WANG Jiao¹, LIXiao-na¹, ZHANG Jian-mei¹, LING Xiao-mei^{1,2**},
LIRun-tao², CUI Jing-rong²

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmaceutical Science, Peking University, Beijing 100191, China

2. State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, Peking University, Beijing 100191, China)

Abstract Objective To establish RP-HPLC methods for the determination of TM 208 and its related substances. **Methods** Separation was performed on a Phenomenex Luna C₁₈(2) column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The column temperature was maintained at 30℃, the detection wavelength was at 254 nm. The mobile phase consisted of water-methanol (25:75) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The injection volume was 20 μL. **Results** TM 208 was separated completely from impurities. The linear range of TM 208 was 1.0~200 μg·mL⁻¹. The intra- and inter-day precision was lower than 5%. The average recovery of TM 208 was 100.2%. The lowest limit of detection was 50 ng·mL⁻¹. **Conclusion** This method is fast, accurate and sensitive to determine TM 208 and its related substances.

Key words HPLC; TM 208 assay; related substances

4-甲基哌嗪-1-二硫代甲酸-(3-氰基-3,3-二苯基)丙酯盐酸盐 (4-methyl-piperazine-1-carbothioic acid 3-cyano-3,3-diphenylpropyl ester hydrochloride, TM 208 结构见图 1) 是一种新合成的氨基二硫代甲酸酯类化合物 (dithiocarbamate)。研究表明氨基二硫代甲酸酯类化合物对多种疾病, 如获得性免疫抑制综合征^[1]、癌症^[2]、动脉粥样硬化^[3]、糖尿病^[4]等具有治疗作用。本课题组在研究中发现, 一些氨基二硫代甲酸酯类化合物具有较强的抗肿瘤活性^[5~9], 其中化合物 TM 208 的活性最强。目前, 该化合物经药理研究, 证明其活性强、毒

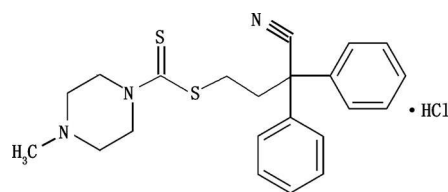


图 1 TM 208 的结构式

Fig 1 Chemical structure of TM 208

性小^[10], 同时本课题组进行了一系列非临床药代动力学研究, 揭示了该化合物的作用规律^[11~17], 具有

* 北京市自然科学基金项目 (7102107); 北京大学天然药物及仿生药物国家重点实验室基金项目 (K20090207); 国家重大新药创制基金项目 (2009ZX09301-010); 国家自然科学基金 (81072612)

** 通讯作者 Tel (010) 82801590 Fax (010) 82802414; E-mail: pkukm@126.com

成为我国创制新药的潜力。为了进一步推进该化合物的研究进程,本研究目的在于建立 TM 208 含量及有关物质的 RP-HPLC 方法,为该原料药的质量控制提供依据。有关此方面的研究,尚未见相关报道。

1 仪器与试药

DIONEX SUMM IT 高效液相色谱仪, D DNECHromleon 工作站; PHXB-302k 型酸度计(北京市理化分析测试中心)。TM 208 对照品(纯度 > 99.9%)及样品由我校化学生物学系杂环药物研究组李润涛教授提供;甲醇为色谱纯(购于 FISHER SCIENTIFIC),色谱用水为娃哈哈饮用纯净水,其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性 色谱柱: Phenomenex Luna C₁₈ (2) (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 水-甲醇 (25:75); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长: 254 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。在上述色谱条件下, TM 208 峰与相邻杂质峰的分离度大于 1.5, 理论板数按 TM 208 计算在 5000 以上。

2.2 专属性 取流动相 20 μL 进样, 记录色谱图, 结果表明流动相对测定无干扰。精密称取 TM 208 适量, 加甲醇溶解并稀释制成每 1 mL 含 5 mg 的 TM 208 溶液。精密量取 5 mg · mL⁻¹ TM 208 溶液 2 mL 置 50 mL 量瓶中, 加入 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2 mL, 放置 4 h 后, 用 1 mol · L⁻¹ 盐酸调节 pH 至中性, 再加入流动相稀释至刻度, 得碱破坏溶液; 精密量取 5 mg · mL⁻¹ TM 208 甲醇溶液 2 mL 置 50 mL 量瓶中, 加入 1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 2 mL, 放置 4 h 后, 用 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液调节 pH 至中性, 再加入流动相稀释至刻度, 得酸破坏溶液; 精密量取 5 mg · mL⁻¹ TM 208 甲醇溶液 2 mL 置 50 mL 量瓶中, 加入 3% 过氧化氢溶液 2 mL, 放置 4 h 后, 调节 pH 至中性, 再加入流动相稀释至刻度, 得氧化破坏溶液; 精密量取 5 mg · mL⁻¹ TM 208 甲醇溶液 2 mL 置 50 mL 量瓶中, 加甲醇稀释成 200 μg · mL⁻¹ TM 208 溶液, 在 100 °C 中水浴加热 2 h, 得热破坏溶液; 取适量样品平铺于带盖平底瓶中, 在 4500 lx 光照条件下光照 24 h 用甲醇配制成 200 μg · mL⁻¹ 的溶液, 得光破坏溶液。将上述溶液分别进样 20 μL, 记录色谱图。结果表明, 本方法能有效检查出各破坏性实验中产生的降解产物和样品中的相关杂质, 且杂质峰与主成分峰能很好分离, 见图 2。

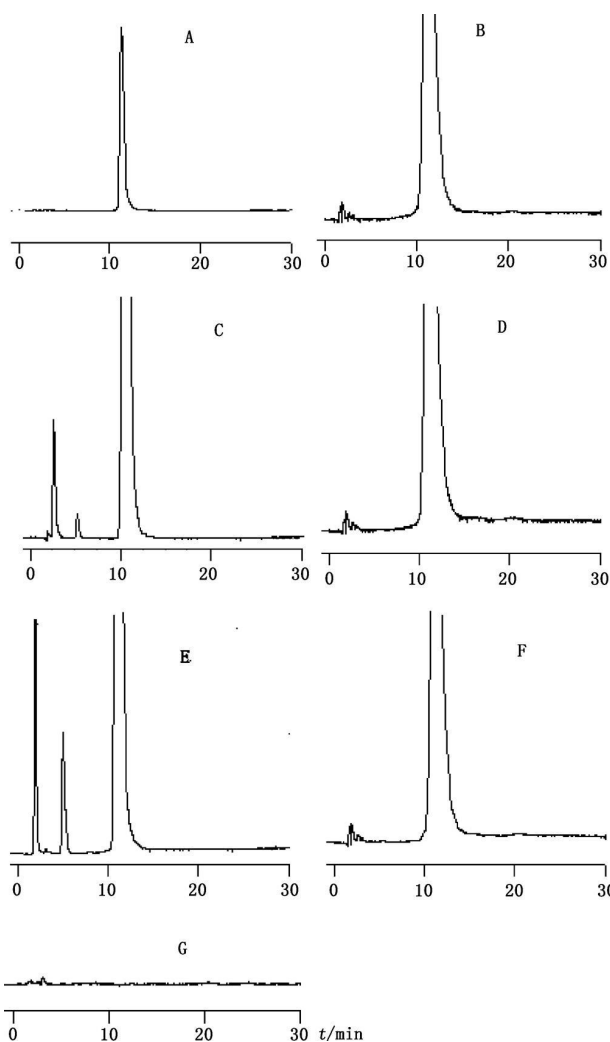


图 2 TM 208 对照品及样品破坏色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of reference substance and the degradation products of TM 208

A 对照品 (reference substance) B 光照 (degraded by light) C. 碱破坏 (degraded by base) D. 酸破坏 (degraded by acid) E. 氧化破坏 (degraded by oxidation) F. 加热破坏 (degraded by heat) G. 流动相 (mobile phase)

2.3 线性关系 精密称取对照品 10 mg 置 10 mL 量瓶中, 加入流动相定容, 配制成 1 mg · mL⁻¹ 的溶液。精密移取此溶液适量, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 制成 TM 208 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 μg · mL⁻¹ 的 7 种浓度溶液, 各取 20 μL 进样。以 TM 208 的峰面积平均值 A 对 TM 208 浓度 C 进行回归运算, 回归方程为:

$$A = 0.5363C + 0.0412 \quad r = 0.9997$$

TM 208 浓度在 1.0 ~ 200 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好。

2.4 精密度 精密称取对照品适量, 制成 TM 208

10, 100, 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 3 种浓度溶液, 每个浓度连续进样 5 次, 考察日内精密度, 高、中、低 3 种浓度的峰面积 RSD 分别为 0.27%, 3.0%, 1.0%。平行 5 d 连续测定, 考察日间精密度, 高、中、低 3 种浓度的峰面积 RSD 分别为 1.8%, 0.92%, 4.8%。

2.5 溶液稳定性 配制 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 TM 208 甲醇供试品溶液, 室温下放置, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 时进样测定含量, 计算其 RSD 为 2.0%。说明 TM 208 溶液在室温下放置 12 h 稳定。

2.6 检测限与定量限 在上述色谱条件下, 平行测定 5 次的 TM 208 检测浓度为 50 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 3$), 峰面积的 RSD 为 7.5%; 平行测定 5 次的 TM 208 定量浓度为 200 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N = 10$), 峰面积的 RSD 为 5.3%。

2.7 含量测定 精密称取供试品 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得供试品溶液。取供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪中, 记录色谱图。采用标准曲线法以峰面积计算供试品中的 TM 208 含量。测得 3 批样品中 TM 208 的含量分别为 99.75%, 99.12%, 99.16%。

2.8 有关物质测定 精密量取“2.7”项下供试品溶液 1 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加流动相溶解并定容制成每 1 mL 中含 5 μg 的对照溶液。分别取供试品溶液和对照溶液各 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以不加校正因子的自身对照法计算总杂质含量。测定 3 批样品杂质含量均不大于 1%。

3 讨论

在相同体积比下, 考察乙腈-水与甲醇-水对 TM 208 对照品的洗脱能力, 甲醇-水混合流动相可以改善 TM 208 的拖尾现象, 改善峰形, 故本研究采用甲醇-水作为流动相。分别考察在不同 pH 条件下 TM 208 的保留行为, 峰形改变不大, 为了实验的方便简洁和重复性, 决定不加入盐类调节流动相 pH。TM 208 在光照、加热和酸性条件下较为稳定, 对碱性、氧化条件比较敏感; 降解产物结构需要在后续研究中采用液质等手段确定, 并做出毒性检测。本法可用于 TM 208 的含量及有关物质的测定。

参考文献

- Reisinger EC, Kemp P, Ernst M, *et al* Inhibition of HIV progression by dithiocarbamate. *Lancet*, 1990, 335(8691): 679
- Gandara DR, Perez EA, Weibe V, *et al* Cisplatin chemoprotection and rescue pharmacologic modulation of toxicity. *Semin Oncol*, 1991, 18(S3): 49

- Moeller D, M c andrew J, Jo H, *et al* Effects of pyrrolidine dithiocarbamate on endothelial cells protecting against oxidative stress. *Free Radic Biol Med*, 1999, 26(9-10): 1138
- Yoshida A, Yoshida S, Ishibashi T, *et al* Suppression of retinal neovascularization by the NF- κ B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in mice. *Invest Ophthalmol Visual Sci*, 1999, 40(7): 1624
- Gerhauser C, You M, Liu JF, *et al* Cancer chemopreventive potential of sulforamate: a novel analogue of sulforaphane that induce phase 2 drug metabolizing enzymes. *Cancer Res*, 1997, 57: 272
- GUO Bao-guo (郭保国), GE Ze-mei (葛泽梅), CHENG Tie-min (程铁民), *et al* Synthesis and anti-tumor activity of 1,4-bis[3-(aminodithiocarbonyl)propionyl]piperazine derivatives (1,4-二[3-(氨基硫代甲酰硫基)丙酰基]哌嗪类化合物的合成及其抗肿瘤活性). *Acta Pharm Sin*, 2001, 36(3): 185
- Ge ZM, Li RT, Cheng TM, *et al* Synthesis and biological activities of dipiperazinium salts containing dithiocarbonyl. *Arch Pharm Med Chem*, 2001, 334(5): 173
- Li RT, Cheng TM, Cui JR, *et al* Study synthesis and activity of dithiocarbamate. US Pat 1328999, 2002-01
- Li RT, Cheng TM, Cui JR, *et al* Piperazine mono(dithio)-carbamate ester compounds and analog preparation method and pharmaceutical use. US Pat 20/157733, 2002-05. WO Apply NO: PCT/US02/16772, 2002-5
- GUO Wei (郭维), RAN Fu-xiang (冉福香), WANG Rui-qing (王瑞卿), *et al* Antitumor effect of hydrochloride 4-methylpiperazine-1-carbodithioc acid 3-cyano-3,3-diphenylpropyl ester (4-甲基哌嗪-1-二硫代甲酸-(3-氰基-3,3-二苯基)丙酯盐酸盐在小鼠的抗肿瘤作用). *Chin J Clin Pharmacol Ther* (中国临床药理学与治疗学), 2004, 9(1): 59
- Jiang XM, Kong DT, Ling XM, *et al* Studies on the metabolism of 4-methylpiperazine-1-carbodithioc acid 3-cyano-3,3-diphenylpropyl ester hydrochloride in rat bile by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21(10): 1599
- Kong DT, Wang SL, Ling XM, *et al* Determination of anti-tumor agent TM 208 4-methylpiperazine-1-carbodithioc acid 3-cyano-3,3-diphenylpropyl ester hydrochloride in rats by LC. *Chromatographia*, 2009, 70(11-12): 1721
- Jiang XM, Bai YH, Ling XM, *et al* Studies on the metabolism of 4-methylpiperazine-1-carbodithioc acid 3-cyano-3,3-diphenylpropyl ester hydrochloride and its major metabolite in rats by HPLC. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48(2): 125
- Jiang XM, Ling XM, Han FB, *et al* Studies on the metabolism of 4-methylpiperazine-1-carbodithioc acid 3-cyano-3,3-diphenylpropyl ester hydrochloride in rats by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(5): 1127
- Jiang XM, Ling XM, Han FB, *et al* Analysis of 4-methylpiperazine-1-carbodithioc acid 3-cyano-3,3-diphenylpropyl ester hydrochloride and its major metabolites in rat plasma and tissues by LC-MS/MS. *J Sep Sci*, 2007, 30(13): 2080
- JIANG Xiao-mei (姜小梅), LING Xiao-mei (凌笑梅), LI Run-

tao (李润涛), *et al.* Analysis of hydrochloride 4-methyl-piperazine-1-carboxylic acid 3-cyano-3,3-diphenyl-propyl ester and its metabolites in rats by HPLC-ESI/MSⁿ (HPLC/ESI-MSⁿ) 法分析大鼠体内 4-甲基哌嗪-1-二硫代甲酸-(3-氰基-3,3-二苯基)酯盐酸盐及其主要代谢物). *Acta Pharm Sin* (药

学报), 2006, 41(11): 1084

- 17 Kong DT, Ling XM, Han FB *et al.* Identification of the metabolite and cytochrome P450 isoenzymes involved in rat liver microsomal metabolism of TM208 *J Chin Pharm Sci* 2008 17(1): 30

(本文于 2010 年 3 月 11 日收到)

关于举办第二届全国药品质量分析论坛(第一轮)

为不断提高药品质量,交流药物分析技术及方法,促进药品生产工艺改进,保障公众用药安全有效,中国药学会药物分析杂志编辑部定于 2011 年上半年召开“第二届全国药品质量分析论坛”,欢迎广大从事药品检验、药物分析、药品生产质量控制及相关领域人员参会交流和投稿。现将有关论坛征文事宜通知如下:

一、论坛主题

药品质量与分析研究。

二、征文内容与要求

(一)征文内容:主要针对 2010 年药品评价和监督抽验品种的研究论文、专项成果、专题报告、综述评论等内容。

(二)征文格式:

来稿应不超过 6000 字。每篇来稿须撰写 600~800 字的结构式摘要。所有稿件均应附英文文题和摘要,内容须与中文一致。

结构式摘要应明确列出 4 个要素,即“目的 /Objective(s)”、“方法 /Method(s)”、“结果 /Result(s)”、“结论 /Conclusion(s)”。目的 /Objective(s): 研究、研制、调查等前提、目的和任务,所涉及的主题范围。方法 /Method(s): 所用的理论、条件、对象、材料、工艺、结构、手段、装备、程序等。结果 /Result(s): 实验及研究的结果、数据,被确定的关系,观察结果得到的效果、性能等。结论 /Conclusion(s): 结果分析、研究、比较、评价、应用,提出的问题,今后的课题、假设、启发、建议、预测等。

投稿请登陆药物分析杂志主页 (www.ywfxzz.cn), 点击“在线投稿”按提示要求操作上传稿件, 期刊栏目请选择“论坛”。投稿时请留下联系人有效电子邮箱及手机等信息。

(三)征文投稿联系人

中国食品药品检定研究院 药物分析杂志编辑部 (邮编 100050) 刘小帅 于宝珠

电话: 010-67058427/010-67012819 转 8 或 3

传真: 010-67058427/010-67012819 转 4 或 3

E-mail: ywfx@nicbpb.org.cn

参会请登陆 www.nicbpb.org.cn 或 www.ywfxzz.cn 下载并填写回执后发传真或邮件至本编辑部。

中国药学会药物分析杂志编辑部