

# 反相离子对 HPLC法测定替莫唑胺酯原料药的有关物质<sup>\*</sup>

陈莹, 李德馨, 乔艳丽, 肖梅, 张悦, 王国成<sup>\*\*</sup>, 王永峰

(天津天士力集团化学制药研究所, 天津 300402)

**摘要** 目的: 建立替莫唑胺酯中有关物质的测定方法。方法: 采用反相高效液相色谱法, 色谱柱为 Thermo 公司 ODS-2HYPERASIL (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 - 0.04 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠与 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵混合溶液 (含 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 辛烷磺酸钠, pH = 2.5) (35: 65); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 254 nm。结果: 替莫唑胺酯质量浓度在 1.0~50.0 μg·mL<sup>-1</sup> 内, 线性关系良好 ( $r = 0.9998$ )。结论: 本法简便、灵敏, 重复性好, 可用于替莫唑胺酯原料药中有关物质的限度检查。

**关键词:** 高效液相色谱法; 替莫唑胺酯; 有关物质

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0279-03

## RP- HPLC determination of related substances in temozolamide hexyl ester<sup>\*</sup>

CHEN Ying LI De-xin, QIAO Yan-li XIAO Mei, ZHANG Yue

WANG Guo-cheng<sup>\*\*</sup>, WANG Yong-feng

(Chem-Pharm R&D Institute, Tianjin Tashly Group, Tianjin 300402, China)

**Abstract Objective** To develop a method so as to determine the related substances in temozolamide hexylester. **Methods** Thermo ODS-2HYPERASIL (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was used, the mobile phase was composed of acetonitrile-0.01 mol·L<sup>-1</sup> sodium 1-octanesulfonate (pH = 2.5) in 0.01 mol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate and 0.04 mol·L<sup>-1</sup> sodium acetate mixed solution (35: 65), at a flow rate of 1 mL·min<sup>-1</sup> and the detect wavelength was 254 nm. **Results** The linear calibration curves obtained in the concentration range of 1.0-50 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9998$ ). **Conclusion** This method is convenient, accurate, reproducible and suitable for the determination of the related substances in temozolamide hexylester.

**Key words** high performance liquid chromatography; temozolamide hexylester; related substances

替莫唑胺为一种烷化剂型抗癌药物, 具有广谱抗肿瘤活性<sup>[1]</sup>, 尤其是对神经胶质瘤(脑癌)和黑色素瘤(皮肤癌)。但在皮肤给药时受到皮肤屏障及药物理化性质的制约, 替莫唑胺不能通过人造皮肤(硅膜)、大鼠皮肤和人皮肤, 不能直接制成透皮制剂。因此, 替莫唑胺的应用范围受到一定的限制。我公司通过对替莫唑胺进行结构改造, 合成出脂溶性和透皮吸收能力高于母体替莫唑胺, 而且具有强烈的抑制癌细胞活性的新化合物替莫唑胺酯 (temozolamide hexylester, TMZA-HE)<sup>[2]</sup>。为了监测替莫唑胺酯合成过程中的反应, 同时快捷、准确地测定替莫唑胺酯原料中的有关物质, 本文建立了反相离子

对高效液相色谱法对替莫唑胺酯原料有关物质的测定方法, 试验表明该方法简便、灵敏, 重现性好, 可用于替莫唑胺酯原料中有关物质的限度测定。

### 1 仪器和试剂

美国安捷伦公司 Agilent 1100 高效液相色谱仪: 包括 Agilent 1100 G1322A 在线脱气机、Agilent 1100 G1311A 四元泵、Agilent 1100 G1313A 自动进样器、Agilent 1100 G1316A 柱温箱、Agilent 1100 G1315B 二极管阵列检测器 (DAD)。

乙腈为色谱纯; 水为二次蒸馏水; 其他试剂均为国产分析纯。

替莫唑胺酯对照品 (归一化含量为 99.8%) 及

\* “重大新药创制”科技重大专项 2009ZX09102-058

\*\* 通讯作者 Tel: (022) 26736511 E-mail: wanggc@tashly.com

样品(批号: 060801, 060802, 060803)均由天津天士力集团化学制药研究所研制。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Thermo 公司 ODS-2HYPER II(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-0.04 mol·L<sup>-1</sup>醋酸钠与 0.01 mol·L<sup>-1</sup>醋酸铵混合溶液(含 0.01 mol·L<sup>-1</sup>辛烷磺酸钠, pH = 2.5)(35:65); 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长为 254 nm; 进样量: 20 μL; 柱温: 40 °C。理论板数按替莫唑胺酯峰计算大于 5000。

**2.2 波长的选择** 取本品适量, 用流动相溶解并稀释成每 1 mL 中约含替莫唑胺酯 20.0 μg 的溶液, 在 200~400 nm 范围内进行全波长扫描, 本品在 328 nm、254 nm 的波长处有最大吸收, 其他各主要中间体及反应主要副产物替莫唑胺酸、4-羧酸酯-5-氨基咪唑(已知杂质)在 254 nm 处也有较大吸收。故选择 254 nm 作为检测波长。

**2.3 流动相的选择** 由于替莫唑胺酯在含羟基的溶剂如甲醇、乙醇中易被破坏变色, 参考与替莫唑胺有关的文献[3], 结合分析各物质结构, 缓冲盐溶液为 0.04 mol·L<sup>-1</sup>醋酸钠与 0.01 mol·L<sup>-1</sup>醋酸铵混合溶液(含 0.01 mol·L<sup>-1</sup>辛烷磺酸钠, pH = 2.5), 有机相为乙腈。乙腈与缓冲盐溶液的比例为 35:65。

**2.4 测定方法** 取本品, 加流动相分别制成 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>和 0.005 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液, 分别作为供试品溶液和对照溶液。取对照溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 调节检测灵敏度, 使主成分的峰高约为记录仪满量程的 20%。再取供试品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主成分峰保留时间的 3 倍。供试品溶液色谱图中如显杂质峰, 各杂质峰峰面积的总和不得大于对照溶液主峰面积(1%)。

## 2.5 方法学考察

**2.5.1 系统适用性试验** 取替莫唑胺酯对照品适量, 加流动相制成 0.05 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液, 作为对照品溶液。取对照品溶液 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。理论塔板数为 8032, 分离度 > 1.5, 对称因子为 0.97。

**2.5.2 峰纯度检查** 为检查样品的 HPLC 色谱峰是单个还是多个成分, 故用二极管阵列检测器对主峰的纯度进行检查。结果纯度因子为 997.8, 大于 990.00(阈值)。

**2.5.3 破坏试验** 称取替莫唑胺酯对照品适量, 分别用 0.1 mol·L<sup>-1</sup>盐酸溶液、0.1 mol·L<sup>-1</sup>氢氧化

钠溶液、3% 过氧化氢溶液、光照 10 d 及 105 °C 高温 2.5 h 进行破坏。光照 10 d 后, 样品仍然稳定。除光照外, 适当控制其他条件下的破坏强度, 使替莫唑胺酯含量按峰面积归一化法计算在 80%~90% 之间。结果表明: 在破坏性试验图谱中(图 1), 各杂质峰与替莫唑胺酯主峰均有良好的分离度; 相邻杂质峰之间的分离度大于 1.5。

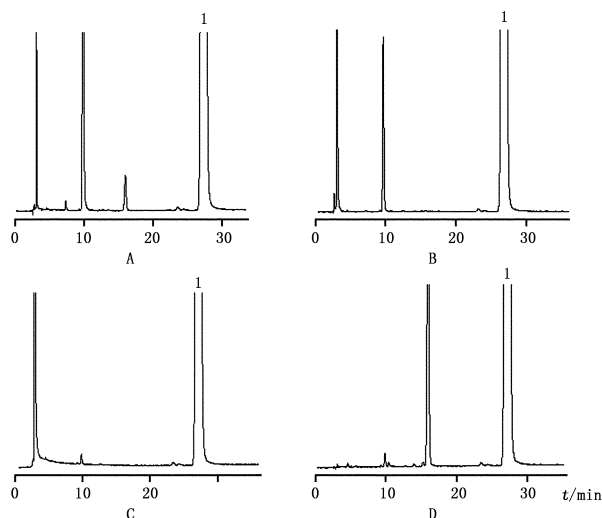


图 1 替莫唑胺酯破坏试验色谱图

Fig 1 The destroyed test chromatograms of temozolomide hexyl ester  
A. 酸破坏试验 (destroyed by acid) B. 碱破坏试验 (destroyed by alkali)  
C. 氧化破坏试验 (destroyed by oxidation) D. 高温破坏试验 (destroyed by heating)

1 替莫唑胺酯 (temozolomide hexyl ester)

**2.5.4 最低检测限试验** 分别取替莫唑胺酯、4-羧酸酯-5-氨基咪唑(已知杂质)适量, 制成溶液, 逐步稀释进样, 记录色谱图, 以信噪比为 3:1 时的浓度确定其最低检测限分别为 0.216 ng·mL<sup>-1</sup>、5.05 ng·mL<sup>-1</sup>。

**2.5.5 线性关系考察** 精密称取替莫唑胺酯对照品适量, 制成 1 mg·mL<sup>-1</sup>的溶液, 分别精密量取上述溶液 0.1, 0.25, 0.5, 1.1, 2.0, 4.0, 5.0 mL, 至 100 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀。精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。采用最小二乘法对色谱图中替莫唑胺酯的峰面积(A)与对照品溶液质量浓度(C)进行线性回归, 回归方程为:

$$A = 192.8C + 4.018 \quad r = 0.9998$$

结果表明替莫唑胺酯质量浓度在 1.0~50 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内呈良好线性关系。

**2.5.6 精密度试验** 取浓度为 0.005 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 以主峰的峰面积计算 RSD = 1.3% (n = 6)。

**2.5.7 重复性试验** 按照“2.4”项下方法制备 060801 批样品 6 份,按“2.1”项下色谱条件测定样品中有关物质的平均含量为 0.377%,计算 RSD = 1.9% (n= 6)。

**2.5.8 稳定性试验** 精密称取替莫唑胺酯样品(批号: 060801)适量,分别以流动相配成 0.5 mg·mL<sup>-1</sup>的供试品溶液于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h 分别进行测定,结果表明替莫唑胺酯溶液较不稳定,样品需要临用现制。

**2.6 样品有关物质测定** 照“2.1”项下色谱条件和“2.4”项下的方法对 3 批样品中有关物质进行测定,结果表明:批号 060801, 060802, 060803 的有关物质分别为 0.38%, 0.24%, 0.27%。

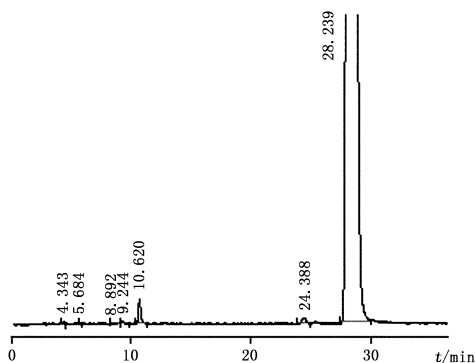


图 2 有关物质测定的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC of related substances

### 3 讨论

**3.1 检测波长的选择** 采用 UV 分光光度计对供试品溶液和已知杂质溶液进行了全波长扫描,通过对主峰和杂质的 UV 光谱分析发现:替莫唑胺酯主峰的最大吸收波长为 328 nm,而杂质峰在该波长处

却没有吸收,若选用 328 nm 为检测波长,则不能真实地反映出替莫唑胺酯原料中有关物质的量;但替莫唑胺酯和所有杂质在 254 nm 处均有较大吸收,作者最终采用 254 nm 作为检测波长。

**3.2 色谱柱及流动相的选择** 参考替莫唑胺的流动相,首先采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,乙腈 - 0.5% 乙酸溶液 (50: 50) 为流动相,经试验,本品主峰对称性差;然后采用乙腈 - 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸钠溶液 (含 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 辛烷磺酸钠, pH = 2.5) (50: 50) 为流动相,结果发现,本品主峰对称性仍然较差;为了改善主峰的对称性,作者在缓冲盐中加入了 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵,结果表明主峰对称性得到了极大改善,同时通过考察流动相组分、流动相中 pH 及流速等各种影响分离结果的因素,最终优化了替莫唑胺酯原料中有关物质测定的最佳色谱分析条件。此外,全光谱记录的结果表明各杂质的峰纯度均符合要求。

### 参考文献

- 1 Lincoln LH Tsang, Chamaine PQ, Andreas G, *et al*. Comparison of the cytotoxicity in vitro of tenozomide and dacarbazine prodrugs of 3-methyl- (triazen-1-yl) imidazole-4-carboxamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 1991, 27: 342
- 2 Panassaya S, Ubonthip N, Barbara RC, *et al*. Micromulsions as topical delivery vehicles for the anti-melanoma prodrug tenozomide hexyl ester (TMZA-HE). *Pharm Pharmacol* 2007, 59: 787
- 3 ZHANG Jun-ren (张君仁), PANG Hua (庞华), HUANG Gui-hua (黄桂华), *et al*. Studies on determination of tenozomide in plasma by HPLC and its pharmacokinetics in mice (小鼠血浆中替莫唑胺 HPLC 测定及药动学研究). *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2002, 37(11): 852

(本文于 2010 年 3 月 26 日收到)