

RP-HPLC法测定四取代四苯基卟啉衍生物的含量^Δ

纪海莹^{1,2*}, 洪 阁^{1,2}, 苏 喆¹, 庞丽云¹, 刘天军^{1#}(1.中国医学科学院生物医学工程研究所/天津生物医学材料重点实验室,天津 300192;2.武警部队灾害应急救援医学全军重点实验室,天津 300162)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)09-1254-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.09.31

摘要 目的:建立测定四取代四苯基卟啉衍生物(TLTAPP)含量的方法。方法:采用反相高效液相色谱法。色谱柱为 Waters SunFire™ C₁₈,流动相A为乙腈-水(含0.1%三氟乙酸,95:5, V/V)、流动相B为乙腈-水(含0.1%三氟乙酸,5:95, V/V)(梯度洗脱),流速为1.0 ml/min,柱温为30 ℃,检测波长为418 nm,进样量为20 μl。结果:TLTAPP检测质量浓度线性范围为1.55~95 μg/ml($r=0.9994$);检测限和定量限分别为1.1 ng和3.8 ng;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1%;加样回收率为99.00%~101.60%,RSD=0.89%($n=9$)。结论:该方法简单、快速、准确、专属性强,可用于TLTAPP的含量测定。

关键词 四取代四苯基卟啉衍生物;含量测定;反相高效液相色谱法

Content Determination of Tetra-substituted Tetraphenylporphyrin Derivative by RP-HPLC

Ji Haiying^{1,2}, Hong Ge^{1,2}, Su Zhe¹, Pang Liyun¹, Liu Tianjun¹(1.Institute of Biomedical Engineering, Chinese Academy of Medical Sciences/Tianjin Key Laboratory of Biomedical Material, Tianjin 300192, China; 2.Key Laboratory of Disaster & Emergency Rescue Medicine in People's Liberation Army, Tianjin 300162, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of tetra-substituted tetraphenylporphyrin derivative (TLTAPP). METHODS: RP-HPLC was performed on the column of Waters SunFire™ C₁₈ with the mobile phase A of acetonitrile-water (containing 0.1% trifluoroacetic acid, 95:5, V/V) and mobile phase B of acetonitrile-water (containing 0.1% trifluoroacetic acid, 5:95, V/V) (gradient elution) at a flow rate of 1.0 ml/min; the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 418 nm and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of TLTAPP was 1.55-95 μg/ml ($r=0.9994$); the detection limit and quantitation limit were 1.1 ng and 3.8 ng; RSDs of precision, reproducibility and stability tests were lower than 1%; recovery was 99.00%-101.60% (RSD=0.89%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and specific, and can be used for the content determination of TLTAPP.

KEYWORDS Tetra-substituted tetraphenylporphyrin derivative; Content determination; RP-HPLC

四取代四苯基卟啉衍生物(TLTAPP)化学名为5,10,15,20-四[4-[(S)-2,6-二氨基乙酰氨基]苯基]卟啉,是本实验室用赖氨酸对四氨基四苯基卟啉进行结构修饰得到的新的水溶性光动力候选抗菌药物。药效学研究显示,该药抗菌活性高、毒性低[耐甲氧西林金黄色葡萄球菌最低抑菌浓度(MIC_{MRSA})为4.6 μg/ml,皮下注射半数致死量(LD₅₀)>1 g/kg]^[1],且治疗指数大于目前临床上常用的抗菌药物,如头孢他啶(MIC_{MRSA}为512 μg/ml,皮下注射LD₅₀=20 mg/kg)^[2]、氨苄西林(MIC_{MRSA}为128 μg/ml,皮下注射LD₅₀>5 mg/kg)^[3]等。基于光动力疗法自身的特点,TLTAPP还具备了抗菌谱广、不易产生耐药性以及可用于局部治疗等诸多现有抗菌药物无法比拟的优势,因此该药有望成为一种专门治疗耐药菌感染的新型替代药物。TLTAPP由于其化学结构上的新颖性和独特性,目前尚无相应的含量测定方法。为此,笔者通过查阅文献^[4-8],采用反相高效

液相色谱(RP-HPLC)法,建立了以低浓度的三氟乙酸水溶液和乙腈为流动相梯度洗脱测定TLTAPP含量的方法。试验证明此方法分离度和测定精度均符合药典要求,适用于该候选抗菌药物的质量控制。

1 材料

1.1 仪器

e2695型高效液相色谱(HPLC)仪,包括2998型二极管阵列检测器和Empower工作站等(美国Waters公司);G285型十万分之一电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

TLTAPP样品(深紫色固体粉末,本实验室自制,批号:20140911、20140918、20140925);TLTAPP对照品(深紫色固体粉末,本实验室自制,经HPLC面积归一化法检测纯度>99%);乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果^[9-10]

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters SunFire™ C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-水(含0.1%三氟乙酸,95:5, V/V)为流动相A,乙腈-水(含0.1%三氟乙酸,5:95, V/V)为流动相B,进行梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 ml/min;柱温:30 ℃;检测波长:418 nm;进样量:20 μl。

^Δ 基金项目:天津市科技计划项目(No.12ZCDZSY11900);北京协和医学院“竞争项目”计划(No.33320140057);基本科研业务费申请项目;全军重点实验室开放基金科研项目(No.JY1405)

* 硕士研究生。研究方向:抗菌药物评价。E-mail: jhyswqs@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:分子设计与纳米技术。电话:022-87893236。E-mail: liutianjun@hotmail.com

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	95	5
10	60	40
13	95	5
15	95	5

2.2 溶液的制备

供试品溶液:取TLTAPP样品约10 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

对照品溶液:取TLTAPP对照品约10 mg,精密称定,置于100 ml量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

空白溶剂:超纯水。

2.3 系统适用性和专属性试验

2.3.1 系统适用性试验 分别取“2.2”项下供试品溶液、对照品溶液、空白溶剂适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。结果表明,色谱基线平稳,对照品和供试品色谱按TLTAPP峰计理论板数均不低于5 000,拖尾因子在0.95~1.05之间,TLTAPP主峰与各有关物质峰可以达到基线分离,分离度均大于1.5。

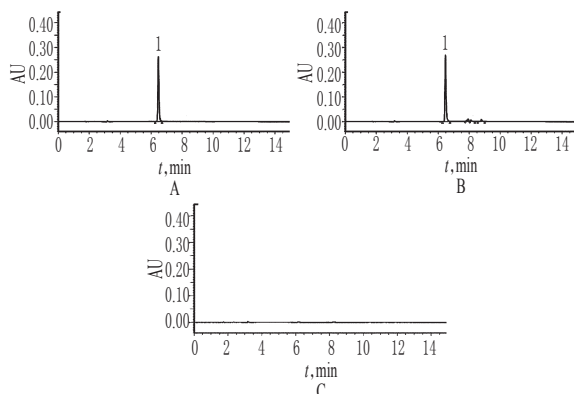


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

A.对照品溶液; B.供试品溶液; C.空白溶剂; 1.TLTAPP

Fig 1 HPLC chromatograms for system suitability test

A.reference substance solution; B.test sample solution; C.blank solvent; 1.TLTAPP

2.3.2 专属性试验 为验证本方法对TLTAPP测定的专属性,对供试品溶液分别进行了强酸、强碱、高温、强光照和强氧化降解试验。取供试品溶液5份,分别用0.1 mol/L盐酸、0.1 mol/L氢氧化钠、80 °C高温、4 000 lx光照和3%过氧化氢处理后,各精密量取20 μl,并量取未经处理的供试品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。结果表明,TLTAPP在强酸、高温、强氧化和强光照条件下稳定性较好,在强碱下不太稳定,但各降解产物均分离良好。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2”项下对照品溶液适量,分别用水稀释成质量浓度为95、49.5、24.75、12.38、6.19、3.1、1.55 μg/ml的系列对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、TLTAPP峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $y=26\ 780x-1\ 070$ ($r=0.999\ 4$)。结果

表明,TLTAPP检测质量浓度线性范围为1.55~95 μg/ml。

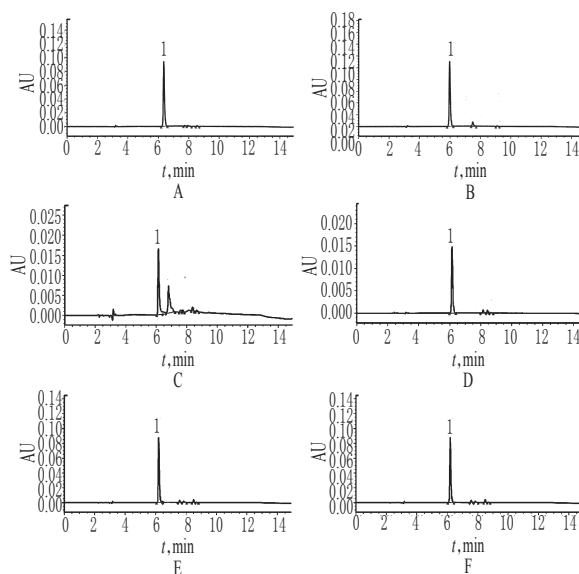


图2 专属性试验高效液相色谱图

A.光照破坏; B.高温破坏; C.碱破坏; D.氧化破坏; E.酸破坏; F.未破坏; 1.TLTAPP

Fig 2 HPLC chromatograms for specificity test

A.treated with strong light; B.treated with high temperature; C.treated with base; D.treated with oxidation; E.treated with acid; F.untreated sample; 1. TLTAPP

2.5 检测限和定量限

取“2.2”项下对照品溶液适量,逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算主峰峰高与噪声的比值(信噪比),以信噪比为3时的对照品溶液中含TLTAPP的量为检测限;以信噪比为10时的对照品溶液中含TLTAPP的量为定量限。结果显示,TLTAPP的检测限和定量限分别为1.1 ng和3.8 ng。

2.6 精密度的试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液20 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,TLTAPP峰面积的RSD=0.52%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2”项下供试品溶液(批号:20140911)适量,分别于室温放置0、1、2、4、8、12、24 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,TLTAPP峰面积的RSD=0.65%(n=7),表明供试品溶液在室温下放置24 h内较稳定。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20140911)适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,TLTAPP峰面积的RSD=0.76%(n=6),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取同一批样品(批号:20140911)适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,共9份,每份50 ml,均分为3组,分别向每组溶液中加入4、5、6 mg的TLTAPP对照品,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery tests(n=9)

取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
5.25	4.96	4.00	8.92	99.00		
5.25	5.15	4.00	9.12	99.20		
5.25	5.08	4.00	9.06	99.63		
5.25	5.02	5.00	10.03	100.20		
5.25	4.92	5.00	9.94	100.40	99.87	0.89
5.25	5.00	5.00	10.03	100.60		
5.25	4.98	6.00	10.92	99.00		
5.25	5.10	6.00	11.05	99.20		
5.25	5.04	6.00	11.14	101.60		

2.10 样品含量测定

取3批样品各适量,分别按“2.2”项下方法制备供试品溶液,并按“2.2”项下方法制备的对照品溶液适量,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法以峰面积计算TLTAPP的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果(n=3)

Tab 3 Result of contents determination of samples(n=3)

批号	TLTAPP, %	RSD, %
20140911	95.5	1.02
20140918	95.8	0.65
20140925	96.7	0.94

3 讨论

3.1 流动相的选择

笔者曾选用不同比例的甲醇-水和乙腈-水为流动相,结果显示甲醇-水对TLTAPP洗脱能力较弱,而乙腈-水对TLTAPP的洗脱能力较强(乙腈比例大于75%),但分离度差、保留时间短。王洁等^[6]报道以醋酸盐缓冲液-乙腈为流动相可以测定赖氨酸的含量,但在相同色谱条件下,TLTAPP保留时间短,拖尾严重;通过调节流动相的pH值,发现pH<3时,TLTAPP洗脱效果较好,且乙腈-三氟乙酸水溶液体系洗脱效果最好,但保留时间仍旧较短。Sibrian-Vazquez M等^[7-8]报道可以采用梯度洗脱的方法测定聚赖氨酸-单羧基卟啉衍生物的纯度。故本试验中笔者尝试以梯度洗脱的方法优化TLTAPP的色谱条件,结果表明不仅主峰与其他杂质峰可以达到基线分离,而且分析时间适宜。

3.2 检测波长的选择

由结构分析可知,TLTAPP的基本结构是4个吡咯环通过亚甲基相连形成的具有18个 π 电子的大环共轭体系,亦是产生紫外吸收的基本基团。其紫外吸收特征为:410~440 nm产生强吸收的Soret带,500~750 nm存在若干个弱吸收的Q带^[11]。通过二极管阵列检测器提取紫外扫描图谱,TLTAPP在418 nm波长附近有最大吸收,故选择418 nm作为检测波长。

3.3 本方法的优越性

目前,已经批准使用和正在临床试验的光敏剂,大多不含亲水性基团,只能采用纯有机系的流动相进行含量测定。TLTAPP作为本实验室自行合成的新一代抗菌光敏剂,具有新

颖的化学结构和较好的水溶性,而上述特点亦导致无法参照已有的卟啉类光敏剂检测方法对其进行质量控制。本试验所建立的以乙腈-三氟乙酸水溶液为流动相、梯度洗脱检测TLTAPP含量的液相色谱条件,其不仅对水溶性卟啉衍生物及类似物的含量测定具有重要的参考意义,而且可以为TLTAPP的质量研究和药物代谢研究提供必要的技术支持。

综上所述,本方法简单、快速、准确、专属性强,可用于TLTAPP的含量测定。

参考文献

- [1] Meng S, Xu ZP, Hong G, *et al.* Synthesis, characterization and in vitro photodynamic antimicrobial activity of basic amino acid-porphyrin conjugates[J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 92: 35.
- [2] 李小清.美洛西林/三唑巴坦的体内、外抗菌活性的研究[D].重庆:重庆医科大学,2006.
- [3] Zuo GY, An J, Han J, *et al.* Isojacareubin from the Chinese herb *Hypericum japonicum*: potent antibacterial and synergistic effects on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(7): 8 210.
- [4] 成丹,李健,彭词艳,等.高效液相色谱法和非水电位滴定法测定注射用盐酸赖氨酸含量的比较[J]. *中国药业*, 2012, 21(15): 51.
- [5] 王洁,李清,徐珊珊,等.高效液相色谱法测定头孢呋辛赖氨酸原料药的含量[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(3): 359.
- [6] 农辉,廖孙启.盐酸赖氨酸及其注射液的HPLC测定[J]. *化工技术与开发*, 2003, 2(32): 33.
- [7] Sibrian-Vazquez M, Jensen TJ, Fronczek FR, *et al.* Synthesis and characterization of positively charged porphyrin-peptide conjugates[J]. *Bioconjugate Chem*, 2005, 16(4): 852.
- [8] Sibrian-Vazquez M, Jensen TJ, Vicente MG. Synthesis, Characterization, and metabolic stability of porphyrin-peptide conjugates bearing bifunctional signaling sequences[J]. *J Med Chem*, 2008, 51(10): 2 915.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:194-195.
- [10] 刘文英.药物分析[M].北京:人民卫生出版社,2008: 98-101.
- [11] 洪阁.用于肿瘤光动力疗法的新型水溶性光敏剂的研究[D].北京:北京协和医学院,2013.

(收稿日期:2015-03-21 修回日期:2016-02-02)

(编辑:周 箐)