

高效液相色谱法测定马西替坦中 N,N-二甲基苯胺含量

程蕤^a, 姜辉^b, 周晶^a, 李霖明^a, 汪琛媛^a

(安徽中医药大学第一附属医院, a 药学部, b 科研科, 合肥 230031)

[摘要] **目的** 建立高效液相色谱法(HPLC)测定马西替坦中 N,N-二甲基苯胺的含量。**方法** 采用高效液相色谱法,色谱柱为菲罗门 Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为水(用磷酸调节 pH 值至 2.5):乙腈 = 20:80,检测波长 254 nm,柱温 30 ℃。**结果** N,N-二甲基苯胺在 0.031 ~ 0.937 μg/mL 范围内线性关系良好($r=0.9995, n=5$),平均回收率为 99.58%,RSD 为 1.22% ($n=9$)。**结论** HPLC 可作为马西替坦中 N,N-二甲苯胺含量测定方法。

[关键词] 高血压, 肺性; 气相色谱-质谱法; 内皮素受体拮抗剂

DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2019.04.018

Determination of N,N-dimethylaniline in Macitentan by HPLC Cheng Rui*, Jiang Hui, Zhou Jing, Li Jiming, Wang Chenyuan (Department of Medicine, the First Affiliated Hospital of Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230031, China)

[Abstract] **Objective** To establish HPLC method for determining the content of N,N-dimethylaniline in Macitentan. **Methods** HPLC was performed on a Phenomenex Luna C₁₈ column(250mm × 4.6mm, 5 μm). The mobile phase is water (Adjust pH to 2.5 with phosphoric acid) - acetonitrile(20:80). The detection wavelength is 254 nm, and the column temperature is 30 ℃. **Results** The linear of N,N-dimethylaniline was in the range from 0.031 to 0.937 μg/mL ($r=0.9995, n=5$). The average recovery was 99.58%, with RSD was 1.22% ($n=9$). **Conclusions** The HPLC can be used as a method for determining the content of N,N-dimethylaniline in Macitentan.

[Keywords] Hypertension, pulmonary; Gas chromatography-mass spectrometry; Endothelin receptor antagonists

肺动脉高压(PAH)是由已知或未知原因引起肺动脉压力异常升高的疾病,最终导致右心力衰竭甚至死亡,平均生存期仅为 2.8 年^[1]。PAH 的治疗一直是医学界的挑战,除常规治疗和钙通道阻滞剂治疗外,靶向治疗如内皮素受体拮抗剂、前列环素及其类似物等在动脉型 PAH 的治疗中发挥了重要的作用^[2-3]。

马西替坦是一种口服的双重内皮素受体(ET_A和 ET_B)拮抗剂,临床用于 PAH 的治疗,与已经上市的波生坦相比,马西替坦有更好的组织分布,与内皮素受体亲和性更高,且药物相互作用少,药物耐受性和安全性都令人满意,成为广受关注的 PAH 治疗新药物,目前马西替坦及其片剂在国内尚未上市^[4-5]。N,N-二甲基苯胺是合成马西替坦用的一种原料,鉴于其有一定的毒性,为保证药品的安全,需要对马西替坦中 N,N-二甲基苯胺含量进行控制。目前,在药

物分析领域常用的色谱法主要有气相色谱法、高效液相色谱法和色谱联用技术^[6],国内对 N,N-二甲基苯胺的分析方法还没有统一标准。已有研究表明,采用气相色谱法可以定量测定水中的 N,N-二甲基苯胺含量^[7-9],采用液相色谱-质谱联用可以检测药品中痕量 N,N-二甲基苯胺的含量^[10-11],而直接用液相色谱分析法来测定 N,N-二甲基苯胺的含量,鲜有报道。与气相色谱法相比,液相色谱法具有定量准确性更好、重复性更好和液相的流动相变化更灵活等优点。本组于 2014 年 3 月建立了高效液相色谱法测定马西替坦中的 N,N-二甲基苯胺的含量,探讨其有效性。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(美国科学仪器公司 SSI 500 DETECTOR Dual Wavelength US/Vis, SSI Series III 泵, Anastar 色谱工作站);电子分析天平(瑞

基金项目:安徽省高等学校省级自然科学研究(重点)项目(KJ2015A0598)

作者简介:程蕤,主管药师,Email:13956955316@163.com

士梅特勒公司,型号:AB135-S);紫外-可见分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司,型号:TU1810);超声波清洗器(广州市科洁盟实验仪器有限公司,型号:KM-615B)。

1.2 试剂 N,N-二甲基苯胺对照品(北京百灵威科技有限公司,批号:L290N30);马西替坦(合肥久诺医药科技有限公司,批号:1403010、1405010、1405011、1405012),甲醇、乙腈为色谱纯;水为重蒸水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:菲罗门 Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:水(用磷酸调节 pH 值至 2.5)-乙腈(20:80);流速:1.0 mL/min;检测波长 254 nm,柱温 30 °C;进样量:20 μL。

2.2 流动相的选择 参照文献^[9]“液相色谱法测定水中痕量 N,N-二甲基苯胺”中流动相与检测波长,并在此基础上,进行流动相筛选及优化,确定最终流动相为水(用磷酸调节 pH 值至 2.5)-乙腈(20:80)。

2.3 检测波长的选择 取 N,N-二甲基苯胺适量,精密称定,用流动相定量稀释制成每 1 毫升中约含 10 μg 的溶液,参照紫外-可见分光光度法(中国药典 2015 年版四部通则 0401),在 200 ~ 400 nm 波长范围内扫描,见图 1。结果显示,N,N-二甲基苯胺在 254 nm 波长处有最大吸收,与参考文献^[9]一致,故选择 254 nm 作为检测波长。

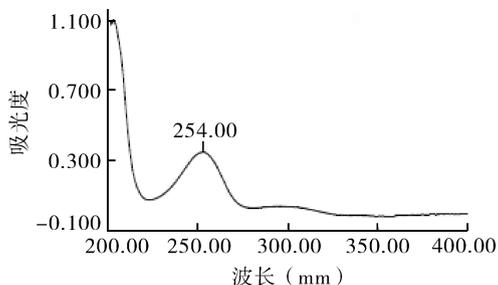


图1 N,N-二甲基苯胺紫外扫描图

2.4 溶液的制备

2.4.1 对照品溶液的制备 取 N,N-二甲基苯胺对照品适量,精密称定,用流动相定量稀释制成 1 mL 中约含 0.5 μg 的溶液,摇匀,作为对照品溶液。见图 2,3。

2.4.2 供试品溶液的制备 取马西替坦约 20 mg,精密称定,置 20 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释制成每 1 毫升中含 1 mg 的溶液,摇匀,作为供试品溶

液。见图 4。

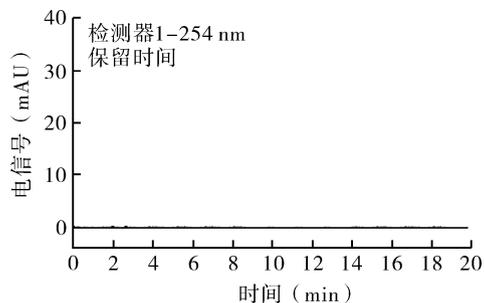


图2 空白溶剂图

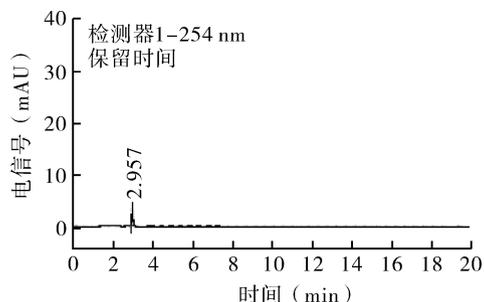


图3 对照品溶液高效液相色谱图

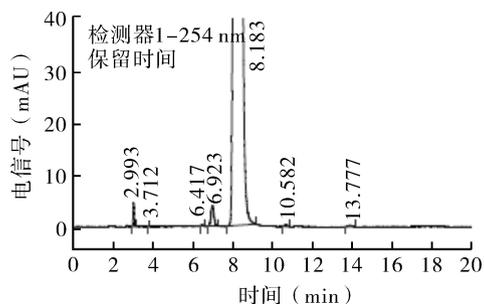


图4 供试品溶液高效液相色谱图

2.5 线性试验 取 N,N-二甲基苯胺对照品适量,精密称定,用流动相定量稀释制成 1 mL 中约含 0.75 mg 的溶液,摇匀,精密量取 1 mL 至 50 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为贮备液。精密量取贮备液 0.2、2、3、4、5、6 mL,分别置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下的色谱条件,分别进样 20 μL,记录色谱图。以 N,N-二甲基苯胺峰面积(A)对浓度(C, μg/mL)进行线性回归,得回归方程 $A = 24812C - 105.6$,相关系数 $r = 0.9995 (n = 5)$ 。结果表明,浓度在 0.031 ~ 0.937 μg/mL 范围内线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密量取线性试验项下浓度为 0.625 μg/mL 的溶液,按“2.1”项下的色谱条件,重复进样 6 次,记录主峰面积,算得主峰面积的 RSD

为 0.46%,说明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 取马西替坦(批号:1403010),按“2.4”项下方法配制供试品溶液 6 份,按“2.1”项下的色谱条件依次测定。结果按外标法计算的平均含量为 24.5 ppm,RSD 为 1.58%。说明本方法重复性好。

2.8 定量限 取线性试验项下浓度为 0.625 μg/mL 的溶液,用流动相逐级稀释成系列浓度的溶液,按“2.1”项下的色谱条件测定,以信噪比 S/N = 10 计算定量限,测得 N,N-二甲基苯胺定量限为 0.4 ng。

2.9 溶液稳定性 按“2.4”项下方法配制供试品溶液,室温放置,在 0、1、2、4、8、12、24h 时,按“2.1”项下的色谱条件测定,记录主峰面积,得主峰面积 RSD 为 0.73%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.10 回收率试验 取 N,N-二甲基苯胺对照品适量,精密称定,用流动相稀释制成每 1 毫升中含 3 μg 的溶液,作为对照品贮备液。取马西替坦(批号:1403010)约 20 mg,精密称定,共 9 份,分别置 20 mL 量瓶中,再分别加入 1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL 的上述对照品贮备液,并用流动相稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另按“2.4”项下方法配制对照品溶液。按“2.1”项下的色谱条件测定,按外标法计算回收率。结果 N,N-二甲基苯胺的平均回收率为 99.58%,RSD 为 1.22% (n=9),具体结果见表 1。

表 1 N,N-二甲基苯胺回收率测定结果

加样比例	样品中的量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	均值(%)	RSD(%)
50%	0.4932	3.0780	3.5415	99.04		
	0.5059	3.0780	3.5363	98.45		
	0.4724	3.0780	3.5241	99.15		
100%	0.5113	6.1560	6.5100	97.44		
	0.4939	6.1560	6.6832	100.5	99.58	1.22
	0.5113	6.1560	6.6620	99.91		
150%	0.5032	9.2340	9.7372	100.0		
	0.4795	9.2340	9.8592	101.6		
	0.4841	9.2340	9.7278	100.1		

2.11 耐用性试验 参照中国药典 2015 年版四部^[12]要求,微调分析条件,按“2.4”项下方法配制供试品溶液,在不同的色谱条件下进样,以分离度为主要考察指标,考察方法的耐用性,结果柱温、流速、流

动相比例、pH 值等进行微小调整,分离度均符合要求,表明本方法的耐用性较好。见表 2。

表 2 高效液相色谱法耐用性测定结果

影响因素	变动水平	分离度
柱温	条件不变	1.82
	20℃	1.73
	30℃	1.89
流速	0.95 mL/min	1.93
	1.05 mL/min	1.72
流动相比例	水(磷酸调 pH 值至 3.5)-乙腈(34:66)	1.90
	水(磷酸调 pH 值至 3.5)-乙腈(26:74)	1.69
pH 值	水(磷酸调 pH 值至 3.3)-乙腈(30:70)	1.83
	水(磷酸调 pH 值至 3.7)-乙腈(30:70)	1.80
色谱柱	Diamonsil C ₁₈ 色谱柱(250mm × 4.6mm, i. d 5 μm)	1.61
	Apollo C ₁₈ 色谱柱(250mm × 4.6mm, i. d 5 μm)	1.93

2.12 样品测定及含量限度的确定 按照建立的方法测定 3 批马西替坦样品,按外标法计算 N,N-二甲基苯胺含量(批号:1405010 为 0.0182‰,批号:1405011 为 0.0211‰,批号:1405012 为 0.0159‰)。根据试验研究结果并参考中国药典 2015 年版四部^[12]残留溶剂的相关规定,同时考虑不同批次间的差异,将马西替坦中 N,N-二甲基苯胺限度规定为不得过 50 × 10⁻⁶。

3 讨论

马西替坦属孤儿药,虽然有报道对马西替坦有关物质进行过测定^[13],但目前关于马西替坦中 N,N-二甲基苯胺含量测定鲜有文献报道。N,N-二甲基苯胺是合成马西替坦用的一种试剂,鉴于其有一定的毒性,为保证药品的安全,通过对马西替坦中 N,N-二甲基苯胺含量测定,可以控制马西替坦中 N,N-二甲基苯胺含量,同时为化学药品中 N,N-二甲基苯胺的含量测定色谱法的选择提供参考。

笔者曾试图通过气相色谱法检测马西替坦中 N,N-二甲基苯胺含量,但经对色谱柱、载气及柱温等条件筛选后发现在保证 N,N-二甲基苯胺与马西替坦及各杂质达到基线分离的情况下色谱保留时间均大于 45 min,检测效率低。因此,改用液相色谱法,经对检测波长、流动相组成及比例的优化筛选,根据分离度、柱效及色谱保留时间最终采用水-乙腈体系,以磷酸调节 pH 值改善峰形,N,N-二甲基苯胺与马西替坦及各杂质分离良好,色谱保留时间在 20 min 内。

国内有很多文献报道高效液相色谱法适合一些