

离子色谱-质谱联用法测定枸橼酸西地那非中 N-甲基哌嗪残留

冯顺卿^{1*}, 梁淑琦^{1,2}, 刘洪涛^{1*}

(1. 中山大学 分析测试中心, 广东 广州 510275; 2. 中山大学 化学学院, 广东 广州 510006)

摘要: 建立了枸橼酸西地那非原料药中N-甲基哌嗪残留的离子色谱-质谱联用分析方法。样品中N-甲基哌嗪采用流动相超声提取, 样品溶液经Cleanert IC-RP固相萃取小柱净化后, 进行离子色谱-质谱分析。N-甲基哌嗪采用加热电喷雾离子源, 正离子和选择离子模式下检测, 外标法定量。结果表明, N-甲基哌嗪在1.0~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内与峰面积呈良好线性关系, 相关系数(r^2)为0.999 4。方法检出限为0.30 $\mu\text{g/g}$, 定量下限为1.0 $\mu\text{g/g}$ 。4个加标水平的回收率为88.6%~103%, 相对标准偏差为0.62%~4.9%。该方法灵敏度高、快速准确, 适用于枸橼酸西地那非原料药中N-甲基哌嗪残留的测定和确证。

关键词: 离子色谱-质谱联用(IC-MS); 枸橼酸西地那非; N-甲基哌嗪; 残留

中图分类号: O657.63; TQ460.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2025)02-0364-05

Determination of N-methylpiperazine Residue in Sildenafil Citrate by Ion Chromatography-Mass Spectrometry

FENG Shun-qing^{1*}, LIANG Shu-qi^{1,2}, LIU Hong-tao^{1*}

(1. Instrumental Analysis & Research Center of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

2. School of Chemistry, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: An ion chromatography-mass spectrometry (IC-MS) method for the determination of N-methylpiperazine residue in sildenafil citrate (SC) active pharmaceutical ingredient (API) was developed. The N-methylpiperazine in samples was extracted by sonication with the eluent, then purified with a Cleanert IC-RP cartridge, and determined by IC-MS. The confirmation was achieved with heated electrospray ionization (HESI) in positive ion mode and selective ion monitoring (SIM) mode, and quantified by the calibration curve method. Good linear relationship between peak area and concentration of N-methylpiperazine within the range of 1.0~100 $\mu\text{g/L}$ was found with a correlation coefficient (r^2) of 0.999 4. The limit of detection of the method (MLOD) and limit of quantitation of the method (MLOQ) for N-methylpiperazine were 0.30 $\mu\text{g/g}$ and 1.0 $\mu\text{g/g}$, respectively. The average recoveries at spiked levels of 0.020, 0.10, 0.20, 0.50 μg ranged from 88.6% to 103%, with relative standard deviations (RSDs, $n=3$) of 0.62%~4.9%. The established method demonstrated to be good sensitivity and high accuracy, which could be used for the determination and confirmation of N-methylpiperazine in SC API.

Key words: ion chromatography-mass spectrometry (IC-MS); sildenafil citrate; N-methylpiperazine; residue

枸橼酸西地那非(Sildenafil citrate)化学名为1-[[3-(6, 7-二氢-1-甲基-7-氧-3-丙基-1H-吡唑并[4, 3-d]嘧啶-5-基)-4-乙氧苯基]磺酰]-4-甲基哌嗪枸橼酸盐(化学结构式如图1A所示)^[1], 是一种特异性环磷酸鸟苷(cGMP)磷酸二酯酶5型(PDE5)抑制剂, 被广泛用于治疗性功能障碍和肺动脉高血压^[2-4]。N-甲基哌嗪(化学结构式见图1B)是一种有机合成、制药等的中间体, 在制药上用作西地那非、甲哌利霉素、氧氟沙星、氯氮平等的中间体^[5-6]。由于N-甲基哌嗪具有一定的毒性, 为了保障药品质量和用药安全, 需对枸橼酸西地那非原料药中N-甲基哌嗪残留进行测定。

收稿日期: 2024-10-09; 修回日期: 2024-11-07

基金项目: 中山大学分析测试中心实验技术方法开发及仪器改造专项(202103)

* 通讯作者: 冯顺卿, 实验师, 研究方向: 分析化学, E-mail: ncsfshq@mail.sysu.edu.cn
刘洪涛, 正高级实验师, 研究方向: 分析化学, E-mail: liuht@mail.sysu.edu.cn

近年来, 离子色谱-质谱联用技术以其在分析离子型和强极性有机化合物方面的优势, 成为反相液相色谱-质谱联用法的重要补充, 在生命科学、环境分析、药物分析等领域均有应用^[7-11]。N-甲基哌嗪极易溶于水, 无紫外吸收, 文献中关于N-甲基哌嗪的检测方法主要有气相色谱法^[12-14]、气相色谱-质谱法^[15]、离子色谱法^[15]等。目前, 关于枸橼酸西地那非含量^[16-20]及有关物质^[16-17]的测定已有较多文献报道, 但采用离子色谱-质谱联用测定枸橼酸西地那非原料药中N-甲基哌嗪含量的方法尚未见报道。本文以20 mmol/L 甲基磺酸水溶液提取枸橼酸西地那非原料药中的N-甲基哌嗪, 经Cleanert IC-RP固相萃取小柱净化后, 采用离子色谱-质谱测定, 建立了枸橼酸西地那非原料药中N-甲基哌嗪残留的离子色谱-质谱分析方法。该方法简便准确、灵敏度高、重复性好, 对枸橼酸西地那非原料药的质量评价具有积极意义。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Dionex ICS-5000⁺离子色谱-Q Exactive Focus Orbitrap 高分辨质谱联用仪(美国 Thermo Fisher 公司)。离子色谱部分主要包括高压泵、淋洗液在线发生器 EGC 500 KOH、AS-AP 自动进样器、色谱柱、抑制器、电导检测器及2个 AXP 辅助泵。百万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); 5510E-DTH 型超声波清洗仪(美国 Branson 超声有限公司); Millipore Advantage A10 超纯水机(美国 Millipore 公司)。

甲基磺酸、N-甲基哌嗪对照品(99%, ACROS ORGANICS); 实验用水均为超纯水($\leq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$, 由 Advantage A10 超纯水机生产); 甲醇(色谱纯, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司); 甲酸(98%, 北京百灵威科技有限公司); Cleanert IC-RP 固相萃取小柱(1cc, 北京艾杰尔科技有限公司)。枸橼酸西地那非原料药: 批号为4002、1001、1003、1004、1005, 由某药厂提供。

1.2 样品前处理

称取样品10~10.5 mg(精确至0.001 mg), 置于10 mL容量瓶中, 加入适量流动相后, 超声20 min 溶解, 以流动相定容至刻度。Cleanert IC-RP 固相萃取小柱分别经5 mL 甲醇、10 mL 水活化, 静置10 min 后, 取样品溶液上样, 弃去前3 mL 溶液, 取后面1 mL 溶液, 待测定。

1.3 对照品储备液与中间储备液

准确称取17.8 mg N-甲基哌嗪对照品, 置于10 mL 棕色容量瓶, 用水定容至刻度, 得到质量浓度为1 762 mg/L 的N-甲基哌嗪对照品储备液。准确移取1 135 μL 对照品储备液至100 mL 棕色容量瓶, 用水定容至刻度, 得到质量浓度为20.0 mg/L 的N-甲基哌嗪中间储备液。

1.4 色谱条件

采用Dionex IonPac CS17(2 mm $\times$ 250 mm) 分析柱以及相应的Dionex IonPac CG17(2 mm $\times$ 50 mm) 保护柱, 淋洗液为20 mmol/L 甲基磺酸, 流速0.25 mL/min, 柱温30 $^{\circ}\text{C}$, 进样体积5 μL 。电导检测池温度为35 $^{\circ}\text{C}$, 抑制器采用外加水模式, 抑制电流为15 mA, 外加水由 AXP 辅助泵输送, 流速为0.5 mL/min。第二个 AXP 辅助泵以0.10 mL/min 的流速输送甲醇, 通过一个T型三通与经电导检测器后的流动相混合后进入质谱以提高离子化效率。

1.5 质谱条件

采用加热电喷雾离子源, 鞘气40 arb, 辅助气10 arb, 喷雾电压3.5 kV, 毛细传输管温度320 $^{\circ}\text{C}$, 辅气加热温度300 $^{\circ}\text{C}$, S-lens RF level 50, 质谱采用正离子检测、选择离子监测SIM模式, 分辨率为35 000, 隔离窗口为3.0 m/z , N-甲基哌嗪加氢正离子精确分子量 $[M+H]^+$ 为101.107 32。数据的采集和处理采用 Thermo Scientific Xcalibur 软件。

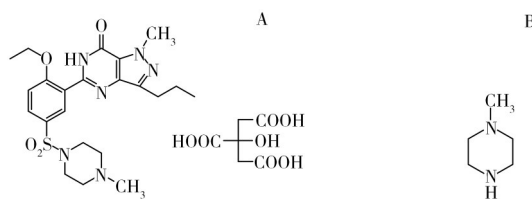


图1 枸橼酸西地那非(A)和N-甲基哌嗪(B)的化学结构式

Fig. 1 Structures of sildenafil citrate(A) and N-methylpiperazine(B)

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

N-甲基哌嗪具有良好水溶性,在酸性水溶液中为正离子。IonPac CS17 是具有羧酸功能基的中等容量阳离子交换柱,它同时具有阳离子交换和反相性质,采用酸性流动相,无需添加有机溶剂即可用于分析疏水性或多价胺、碱金属、碱土金属和铵根离子。以流速为 0.25 mL/min,比较了分别以 10、18、20 mmol/L 甲基磺酸水溶液作流动相的分离效果。结果显示,以 10、18 mmol/L 甲基磺酸水溶液作流动相时,N-甲基哌嗪的峰展宽。最后确定以 20 mmol/L 甲基磺酸水溶液作流动相,在该条件下,N-甲基哌嗪的保留时间为 3.83 min,峰形较好。图 2 为 100 $\mu\text{g/L}$ N-甲基哌嗪对照品溶液的色谱图及质谱图。

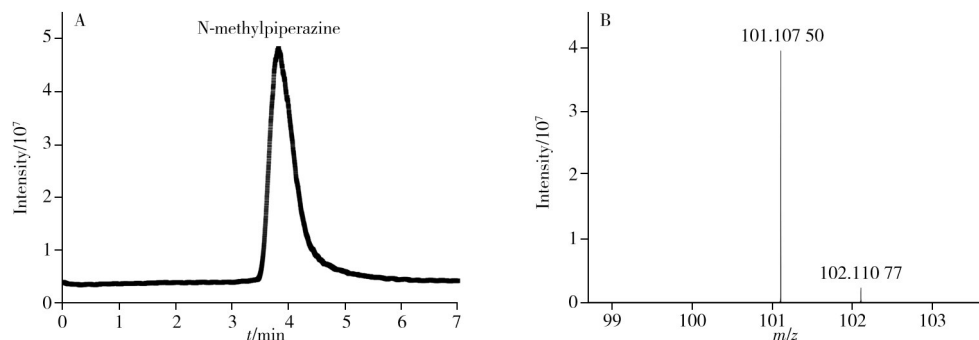


图 2 N-甲基哌嗪的色谱图(A)及一级质谱图(B)

Fig. 2 Chromatogram(A) and mass spectrum(B) of N-methylpiperazine

2.2 辅助溶剂的选择与流速优化

为提高质谱离子化效率,考察了在抑制电导后的流动相中添加辅助溶剂再进入离子源的分离效果。考虑到 N-甲基哌嗪在酸性溶液中易转变成带正电荷的 N-甲基哌嗪离子,分别以含 0.05% 甲酸的甲醇及甲醇做辅助溶剂,考察了 AXP 辅助泵流速为 0.01、0.05、0.10、0.15 mL/min 时 100 $\mu\text{g/L}$ N-甲基哌嗪对照品溶液的信号强度,每个条件做 3 个平行。从图 3A 可以看出, N-甲基哌嗪在含 0.05% 甲酸的甲醇溶液辅助雾化下,信号强度随流速增大而减少,表明含 0.05% 甲酸的甲醇溶液对 N-甲基哌嗪离子化有抑制作用,流速越大,抑制效果越明显。从图 3B 可以看出, N-甲基哌嗪在甲醇辅助雾化下,信号强度随流速增大而增大,表明甲醇能提高 N-甲基哌嗪的离子化效率。N-甲基哌嗪在流速 0.15 mL/min 时的信号强度比 0.10 mL/min 时稍有增加,但稳定性(RSD: 3.9%)不如 0.10 mL/min(RSD: 0.5%)。综合考虑信号强度和稳定性,实验选择以辅助泵流速为 0.10 mL/min 的甲醇做辅助溶剂。

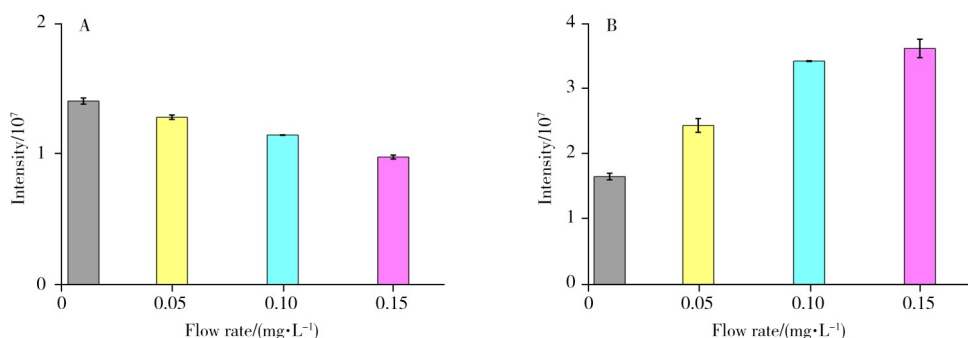


图 3 N-甲基哌嗪在添加不同辅助溶剂时的信号强度对比

Fig. 3 Comparison of intensities of N-methylpiperazine after adding different makeup solvents

A: methanol in 0.05% formic acid; B: methanol

2.3 样品前处理方法的优化

枸橼酸西地那非具有苯环结构,与阳离子交换柱 CS17 填料中的苯乙烯-二乙烯基苯聚合物填料具有较强的作用力^[21],在色谱柱上保留较强。RP 固相萃取小柱为聚合物基质,可有效去除具有苯环结构的疏水性化合物,有利于减少质谱基质效应。本实验选择 Cleanert IC-RP 固相萃取小柱净化样品溶液。

分别使用水和流动相配制2.00、50.0 $\mu\text{g/L}$ N-甲基哌嗪溶液,考察其经Cleanert IC-RP固相萃取小柱净化后的回收率。结果显示用水配制的2.00、50.0 $\mu\text{g/L}$ N-甲基哌嗪溶液,过IC-RP固相萃取小柱后,其回收率分别为17.9%、1.14%,推测IC-RP固相萃取小柱对N-甲基哌嗪有吸附作用。在酸性溶液中,N-甲基哌嗪转变成带正电荷的N-甲基哌嗪离子,用流动相配制的2.00、50.0 $\mu\text{g/L}$ N-甲基哌嗪溶液,过IC-RP固相萃取小柱后,其回收率分别为102%、96.2%。因此在N-甲基哌嗪样品溶液的制备过程中,溶液经流动相超声提取后,可采用Cleanert IC-RP固相萃取小柱去除其中的西地那非后,再进行分析。

2.4 方法学验证

2.4.1 线性范围、检出限及定量下限 分别准确移取适量对照品中间储备液配制系列对照品溶液:1.0、2.0、5.0、10、20、50、100 $\mu\text{g/L}$ 。在优化条件下进样分析。以峰面积为纵坐标,对照品溶液的质量浓度为横坐标绘制标准曲线。结果表明,N-甲基哌嗪对照品溶液在1.0~100 $\mu\text{g/L}$ 范围内,响应峰面积与质量浓度呈良好的线性关系: $Y = 1.335 \times 10^7 X + 6.939 \times 10^6$,相关系数(r^2)为0.999 4。

按信噪比 $S/N \geq 3$ 计算,N-甲基哌嗪的检出限为0.30 $\mu\text{g/L}$;按信噪比 $S/N \geq 10$ 计算,N-甲基哌嗪的定量下限为1.0 $\mu\text{g/L}$ 。对应方法检出限和定量下限分别为0.30、1.0 $\mu\text{g/g}$ 。

2.4.2 准确度与精密度 对20.0 $\mu\text{g/L}$ N-甲基哌嗪对照品溶液连续进样6次,峰面积的RSD为1.6%。取批号为4002的样品,按“1.2”方法分别制备含N-甲基哌嗪质量浓度为2.0、10、20、50 $\mu\text{g/L}$ 的样品溶液,相当于含N-甲基哌嗪0.020、0.10、0.20、0.50 μg ,每个水平做3个平行。按本方法进行测定,标准曲线法定量。结果表明,N-甲基哌嗪在枸橼酸西地那非原料药中4个加标水平下的平均回收率为88.6%~103%,RSD为0.62%~4.9%(见表1)。

表1 N-甲基哌嗪的回收率试验结果
Table 1 Recovery data of N-methylpiperazine

Added/ μg	Found/ μg	Recovery/($n=3$, %)	RSD/($n=3$, %)
0.020	0.018 7, 0.017 3, 0.017 1	88.6	4.9
0.10	0.101, 0.102, 0.103	102	1.2
0.20	0.205, 0.208, 0.207	103	0.62
0.50	0.505, 0.513, 0.510	102	0.77

2.5 实际样品检测

应用所建立的方法对批号为4002、1001、1003、1004、1005的枸橼酸西地那非原料药进行检测,结果显示,5批样品均检出N-甲基哌嗪,其含量均低于方法定量下限($< 1.0 \mu\text{g/g}$)。

3 结 论

本文建立了离子色谱-质谱联用法测定枸橼酸西地那非原料药中N-甲基哌嗪残留的分析方法。该方法操作简便、灵敏度高、重复性好,能够快速准确地检测枸橼酸西地那非原料药中的N-甲基哌嗪含量,对使用N-甲基哌嗪作为中间体的其他原料药中N-甲基哌嗪含量测定及方法开发具有重要参考意义。

参考文献:

- [1] Yathirajan H S, Nagaraj B, Nagaraja P, Bolte M. *Acta Cryst.*, **2005**, E61: o489-o491.
- [2] He P B, Zhang P F, Ding Y X. *Chin. J. New Drugs* (何鹏彬, 张培福, 丁以绚. 中国新药杂志), **2002**, 11(12): 914-917.
- [3] Kouvelas D, Goulas A, Papazisis G, Sardeli C, Pourzitaki C. *Curr. Pharm. Design*, **2009**, 15(30): 3464-3475.
- [4] Francis S H, Blount M A, Corbin J D. *Physiol. Rev.*, **2011**, 91(2): 651-690.
- [5] Jin W G. *A Practical Technical Handbook of Pharmaceutical Intermediates Production*. Beijing: Chemical Industry Press (金维高. 医药中间体生产实用技术手册. 北京: 化学工业出版社), **2002**: 396.
- [6] Zhou X L. *Handbook of Fine Chemical Products-Pharmaceuticals*. Beijing: Chemical Industry Press (周学良. 精细化工产品手册-药物. 北京: 化学工业出版社), **2003**: 738-741.
- [7] Hu S, Wang J H, Ji E H, Christison T, Lopez L, Huang Y Y. *Anal. Chem.*, **2015**, 87: 6371-6379.
- [8] Zuo Y T, Cheng S, Jiang H H, Zhang H, Wu J, Sun H F, Zhu F, Li A M, Zongli Huo Z L, Li W T. *Talanta*, **2023**, 253: 124022.

- [9] Rodriguez E S, Lam S, Smith G G, Haddad P R, Paull B. *Helvion*, **2021**, 7: e06885.
- [10] Ngere J B, Ebrahimi K H, Williams R, Pires E, Walsby-Tickle J, McCullagh J S O. *Anal. Chem.*, **2023**, 95: 152–166.
- [11] Lewis Z, Jackson B A, Crampton A, Ray A D, Holman S W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2020**, e8680.
- [12] Zhang S M, Cheng Y, Xu C. *Environ. Monit. China*(张莘民, 程滢, 徐朝. 中国环境监测), **2003**, 19(4): 50–51.
- [13] Li J, Wang Y Y. *Chin. J. Mod. Appl. Pharm.* (李俊, 王英瑛. 中国现代应用药学), **2013**, 30(3): 319–321.
- [14] Yang B X, Zheng Z D, Zhao Y Q. *Chin. J. Pharm.* (杨本霞, 郑子栋, 赵用强. 中国医药工业杂志), **2015**, 46(1): 62–64.
- [15] Cuccia L, Bekhti N, Dugay J, Bontemps D, Louis-Louisy M, Morand T, Bellosta V, Vial J. *Int. J. Greenhouse Gas Control*, **2018**, 76, 215–224.
- [16] Bi J Y, Lu H D, Cheng S M, Zhao F, Shi Y J, Zhang G G. *J. Shenyang Pharm. Univ.* (毕嘉益, 芦红代, 程思谟, 赵芳, 石亚杰, 张国刚. 沈阳药科大学学报), **2015**, 32(7): 527–530.
- [17] Wang Z Q, Ni K Y. *J. China Pharm. Univ.* (王志群, 倪坤仪. 中国药科大学学报), **2001**, 32(6): 429–431.
- [18] Zhong H, Liang S M, Zeng W J, Gao K W. *Mod. Food Sci. Technol.* (钟华, 梁淑明, 曾伟杰, 高凯雯. 现代食品科技), **2010**, 26(2): 206–208.
- [19] Sasal A, Tyszczyk-Rotko K. *Microchem. J.*, **2019**, 149: 104065.
- [20] Bunaciu A A, Nashar R M. El, Aboul-Enein H Y. *Anal. Lett.*, **2011**, 44: 2085–2093.
- [21] Chen M L, Zhang T T, Ye M L, Huang Q Q, Hu Z Y, Pan G W. *Chin. J. Pharm. Anal.* (陈梅兰, 张婷婷, 叶明立, 黄巧巧, 胡忠阳, 潘广文. 药物分析杂志), **2013**, 33(6): 999–1002.

(责任编辑: 龙秀芬)