

表 1 方法的线性关系及检出限

Tab 1 Detection limits and aggression equation of Fumaric acid

离子	线性方程	相关系数 (r)	线性范围/ mg·L ⁻¹	检出限(S/N=3)/ mg·L ⁻¹
富马酸	$Y=0.028\ 9X+0.040\ 9$	0.999 9	0.1~100.0	0.014

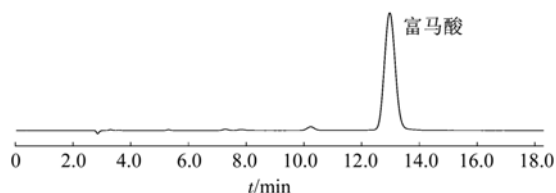


图 2 富马酸样品离子色谱图

Fig 2 Chromatogram of sample

按照实际样品的前处理步骤, 在进行前处理之前, 在样品中分别按照低、中、高 3 个水平加入富马酸对照品溶液。在相同的分析条件下测定 3 个浓度加入量下的加标回收率数据。结果表明, 回收率为 98.8%~100.6%, 基本满足分析测试的要求。结果见表 2。

表 2 富马酸样品测定结果和加标回收率

Tab 2 Concentrations and recoveries of fumaric acid in a sample

编号	溶液中富马酸的 含量/mg·L ⁻¹	加入量/ mg·L ⁻¹	测得量/ mg·L ⁻¹	回收率/ %
1	17.22	15.00	32.04	98.8
2	17.22	20.00	32.31	100.6
3	17.22	25.00	32.12	99.3

3 讨论

实验结果表明, 离子色谱方法可以快速的测

定富马酸的含量, 样品无需复杂前处理, 使用简单的 KOH 等度淋洗液淋洗, 抑制电导检测, 可以准确地对富马酸离子进行分离测定。富马酸峰形良好, 并不受其他常规阴离子杂质的干扰。方法简便, 基体干扰小, 可在实际产品的检验中发挥重要作用, 对其他基体中的富马酸的测定也有一定的指导意义。

REFERENCES

- [1] FU Y Q, ZHAO P P, LI S, et al. Determination of fumaric acid in fermentation broth of *Rhizopus oryzae* by ion-exclusion liquid chromatography [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2008, 36(22): 9350-9351.
- [2] YU F, JIN Z P, ZHI X P, et al. Relationship of different ages, sex and blood levels of children in Anshan city [J]. J Hyg Res(卫生研究), 2007, 36(5): 608-609.
- [3] FU Y Q, WANG G L, XU Q, et al. Quick detection of fumaric acid in *Rhizopus oryzae* fermentation broth using KMnO₄ titration [J]. J Nanjing Univ Technol(Nat Sci)(南京工业大学学报: 自然科学版), 2007, 29 (6): 91-94.
- [4] SHENG Z H. Determination method of fumaric Acid [J]. Faxiao Keji Tongxun(发酵科技通讯), 2001, 30(2): 33-34.
- [5] CAO N, DU J X, GONG C S, et al. Simultaneous production and recovery of fumaric acid from immobilized *Rhizopus oryzae* with a rotary biofilm contactor and an adsorption column [J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62(8): 2926-2931.
- [6] ZHOU Y, DU J, TSAO G T. Comparison of fumaric acid production by *Rhizopus oryzae* using different neutralizing agents [J]. Bioprocess Biosyst Eng, 2002, 25(3): 179-181.
- [7] SHI J H, XU X Z. Separation and determination of fumaric acid by reversed phase high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem(分析化学), 2000, 28(4): 470-472.
- [8] LI K L, WU W T, SONG X Z, et al. Determination of the purity of maleic acid and fumaric acid by liquid chromatography [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 1994, 25(2): 106-108.

收稿日期: 2012-02-14

LC-MS/MS 测定马来酸桂哌齐特原料合成中间体残留

徐力昆, 窦媛媛, 王洪权* (军事医学科学院微生物流行病研究所, 北京 100071)

摘要: 目的 采用 LC-MS/MS 测定马来酸桂哌齐特原料中间体氯乙酰吡咯烷、1-哌嗪乙酰基吡咯烷的含量, 考察马来酸桂哌齐特原料中两种中间体残留情况。方法 建立 LC-MS/MS 测定中间体氯乙酰吡咯烷、1-哌嗪乙酰基吡咯烷的方法, 测定马来酸桂哌齐特原料样品中的中间体杂质残留。结果 LC-MS/MS 测定中间体氯乙酰吡咯烷、1-哌嗪乙酰基吡咯烷方法精密度分别为 3.6%和 4.0%, 线性回归方程分别为 $Y=26\ 501X-6\ 034(r=0.999\ 8, n=5)$ 及 $Y=51\ 616X-10\ 434(r=0.999\ 9, n=5)$, 平均回收率分别为 98.2%和 97.3%, 测定马来酸桂哌齐特原料中两中间体均 $<0.05\%$ 。结论 该方法准确可靠, 灵

作者简介: 徐力昆, 男, 博士生, 助理研究员 Tel: (010)66948553 E-mail: xu_likun@yahoo.cn *通信作者: 王洪权, 男, 研究员 Tel: (010)66948552 E-mail: hongquan_wang@yahoo.cn

敏度高, 可为马来酸桂哌齐特原料质量控制及质量标准的建立提供依据。

关键词: 马来酸桂哌齐特; LC-MS/MS; 中间体; 氯乙酰吡咯烷; 1-哌嗪乙酰基吡咯烷; 质量控制

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)04-0421-04

Determination of the Synthesized Intermediates Residual of Cinepazide Maleate by LC-MS/MS

XU Likun, DOU Yuanyuan, WANG Hongquan* (Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the content of chloroacetyl pyrrolidine and 1-piperazine acetyl pyrrolidine which are the intermediates of cinepazide maleate synthesis in cinepazide maleate by LC-MS/MS. **METHODS** The LC-MS/MS method was established for determination of chloroacetyl pyrrolidine and 1-piperazine acetyl pyrrolidine. The residue of these two intermediates had been determined in cinepazide maleate. **RESULTS** The precision of the LC-MS/MS for chloroacetyl pyrrolidine and 1-piperazine acetyl pyrrolidine were 3.6% and 4.0%, the linear regression equation were $Y=26\,501X-6\,034$ ($r=0.999\,8$, $n=5$) and $Y=51\,616X-10\,434$ ($r=0.999\,9$, $n=5$), the average recoveries were 98.2% and 97.3%. The contents of two intermediates in cinepazide maleate were both less than 0.05%. **CONCLUSION** The method is accurate, reliable with high sensitivity, and can provide the basic to quality control and the establishment of quality standard for cinepazide maleate.

KEY WORDS: cinepazide maleate; LC-MS/MS; intermediates; chloroacetyl pyrrolidine; 1-piperazine acetyl pyrrolidine; quality control

马来酸桂哌齐特(cinepazide maleate, CM), 化学名为(E)-1-{4-[(3',4',5'-三甲氧基肉桂酰基)]-1-哌嗪}乙酰吡咯烷顺丁烯二酸盐, 为钙离子通道阻滞剂, 是由法国巴黎狄朗药厂开发, 并于1974年首先于法国上市。其药理作用是通过阻止 Ca^{2+} 跨膜进入血管平滑肌细胞, 使血管平滑肌松弛脑血管、冠状血管和外周血管扩张。临床上马来酸桂哌齐特主要应用于心脑血管疾病的治疗。目前国内已有北京四环制药有限公司生产的马来酸桂哌齐特原料药及注射液被批准上市。

文献报道^[1-3]的马来酸桂哌齐特的合成路线主要是由四氢吡咯和氯乙酰氯制备氯乙酰吡咯烷, 再与哌嗪反应制备1-哌嗪乙酰基吡咯烷, 然后与(E)-3,4,5-三甲氧基肉桂酰氯反应制备桂哌齐特游离碱, 最后与马来酸成盐制得目标产物。该路线为美国专利 US3634411(1972)报道, 中国专利 CN1631877A 采用相同路线, 为目前国内上市品种生产路线。

该合成路线马来酸桂哌齐特制备过程中的中间体有氯乙酰吡咯烷、1-哌嗪乙酰基吡咯烷、3,4,5-三甲氧基肉桂酰氯。在马来酸桂哌齐特杂质谱研究中采用高效液相色谱法可以测定中间体3,4,5-三甲氧基肉桂酰氯(衍生化)的残留量, 对于中间体氯乙酰吡咯烷和1-哌嗪乙酰基吡咯烷, 因二者无紫外吸收, 采用高效液相色谱法检测灵敏度低, 不能满足残留量的检测要求。为考察马来酸桂哌齐

特原料样品是否残留上述中间体, 笔者参考中国药典^[4]相关要求建立了液相-质谱联用方法并对原料进行了检测。

1 材料与仪器

甲醇为色谱纯(德国 Merck), 超纯水为自制, 乙酸铵为分析纯(北京化学试剂公司)。氯乙酰吡咯烷及1-哌嗪乙酰基吡咯烷对照品均为自制, 含量分别为98.6%及98.2%(由电位滴定法测定), 中间体测定¹H-NMR 数据与文献报道一致; 马来酸桂哌齐特原料(纯度: 99.1%)为按照专利报道路线和方法自制^[1,3]。

Agilent1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), 包括 G1322A 在线脱气机、G1311A 四元泵、G1329A 自动进样器; 4000 Qtrap 质谱仪(美国 AB 公司), ESI 电喷雾接口。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分析柱为 xTerra RP18(4.6 mm×150 mm, 5 μm); 流动相为 5 mmol·L⁻¹ 乙酸铵溶液-甲醇(50:50); 流速为 0.5 mL·min⁻¹; 进样量为 10 μL; 柱温为 25 ℃。

2.2 质谱条件

2.2.1 1-哌嗪乙酰基吡咯烷测定质谱参数 离子源为 ESI 源; 正离子方式检测; 喷射电压为 5 500 V, 源温度为 450 ℃, 雾化气压力(GS1)为 50 Pa, 辅助气压力(GS2)为 50 Pa, 气帘气压力(CUR)为 10 Pa,

扫描方式为多反应(MRM)监测,用于定量分析的质荷比 m/z 198.2 $\rightarrow$ m/z 99.2, 去簇电压(DP)为 58.0 V, 聚焦电压(EP)为 3.0 V, 碰撞电压(CE)为 26.0 V, 碰撞室射出电压(CXP)为 4.2 V, 扫描时间为 200 ms。

2.2.2 氯乙酰吡咯烷测定质谱参数 离子源为 ESI 源; 正离子方式检测; 喷射电压为 5 500 V; 源温度为 450 $^{\circ}\text{C}$, GS1 为 50 Pa, GS2 为 50 Pa, CUR 为 10 Pa, 扫描方式 MRM 监测, 用于定量分析的质荷比 m/z 148.1 $\rightarrow$ m/z 72.2, DP 为 70.0 V, EP 为 6.0 V, CE 为 27.0 V, CXP 为 5.0 V, 扫描时间为 200 ms。

2.2.3 二级全扫描质谱图 取氯乙酰吡咯烷及 1-哌嗪乙酰吡咯烷标准溶液经稀释后, 采用液质联用分析, 二者在正离子模式下的相应的二级全扫描质谱图, 见图 1。

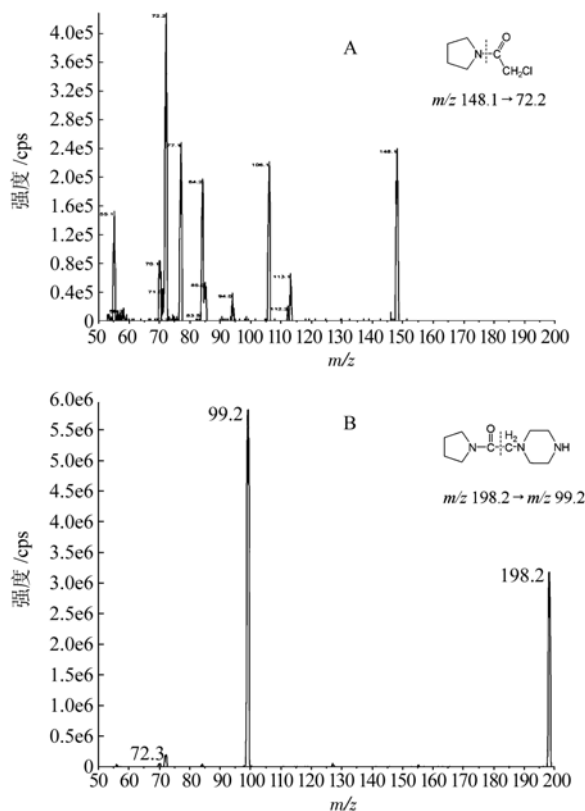


图 1 中间体二级全扫描质谱图及离子对

A-氯乙酰吡咯烷二级全扫描质谱图及离子对; B-1-哌嗪乙酰吡咯烷二级全扫描质谱图及离子对

Fig 1 Product ion mass spectra and proposed patterns of fragmentation of intermediates

A-product ion mass spectra and proposed patterns of fragmentation of chloroacetyl pyrrolidine; B-product ion mass spectra and proposed patterns of fragmentation of 1-piperazine acetyl pyrrolidine

2.3 溶液的配制

2.3.1 对照品溶液的配制 分别精密称取氯乙酰吡咯烷及 1-哌嗪乙酰吡咯烷对照品 10 mg, 置于 100 mL 量瓶中, 用甲醇逐级稀释配制成浓度为 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的储备溶液。

分别取储备溶液 1 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释配成 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液。

2.3.2 样品溶液的配制 称取马来酸桂哌齐特原料 10 mg 置 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 取 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用甲醇稀释成浓度为 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液作为样品溶液。

2.4 专属性试验

按照色谱和质谱条件, 采用 MRM 方式进行测试, 1-哌嗪乙酰基吡咯烷 m/z 198.2 $\rightarrow$ 99.2, 氯乙酰吡咯烷 m/z 148.1 $\rightarrow$ 72.2。结果表明, 氯乙酰吡咯烷保留时间为 4.47 min, 相同测试条件空白溶剂无干扰。1-哌嗪乙酰吡咯烷保留时间为 4.84 min, 相同测试条件下空白溶剂无干扰, 见图 2。

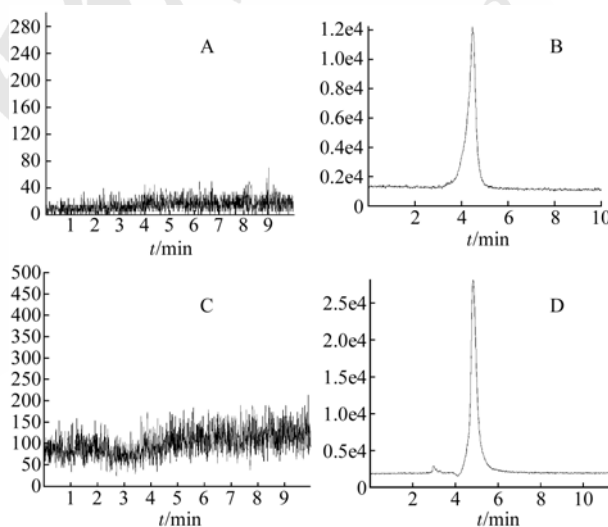


图 2 氯乙酰吡咯烷及 1-哌嗪乙酰基吡咯烷 LC-MS/MS 色谱图

A-空白溶剂(MRM m/z 148.1 $\rightarrow$ 72.2); B-氯乙酰吡咯烷样品; C-空白溶剂(MRM m/z 198.2 $\rightarrow$ 99.2); D-1-哌嗪乙酰基吡咯烷样品

Fig 2 The LC-MS/MS chromatogram chloroacetyl pyrrolidine and 1-piperazine acetyl pyrrolidine

A-solvent(MRM m/z 148.1 $\rightarrow$ 72.2); B-chloroacetyl pyrrolidine sample; C-solvent(MRM m/z 198.2 $\rightarrow$ 99.2); D-1-piperazine acetyl pyrrolidine sample

2.5 线性关系考察

取储备溶液(100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)用甲醇依次稀释制成浓度为 20, 10, 1, 0.1, 0.01, 0.005 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$

的溶液, 按上述条件进行测定。以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标建立线性回归方程, 结果见表 1。

表 1 LC-MS/MS 测定中间体线性关系(n=5)

Tab 1 The linear relationship of intermediates determined by LC-MS/MS(n=5)

样 品	线性方程	线性范围/ ng·mL ⁻¹
氯乙酰吡咯烷	$Y=26\ 501X-6\ 034(r=0.999\ 8)$	0.010~100
1-哌嗪乙酰吡咯烷	$Y=51\ 616X-10\ 434(r=0.999\ 9)$	0.005~100

2.6 定量下限(LLOQ)

由标准曲线方程可知, 氯乙酰吡咯烷定量下限为 0.010 ng·mL⁻¹, 1-哌嗪乙酰吡咯烷定量下限为 0.005 ng·mL⁻¹。

2.7 仪器精密度的试验

取对照品溶液连续进样 5 次, 测定其峰面积, 测定的氯乙酰吡咯烷与 1-哌嗪乙酰吡咯烷峰面积的 RSD 分别为 3.6%, 4.0%。

2.8 回收率试验

取对照品溶液分别配制成 10, 1, 0.01 ng·mL⁻¹ 浓度溶液每个浓度 5 个样品, 注入 LC-MS/MS 进行测定, 比较测定值与实际值。氯乙酰吡咯烷与 1-哌嗪乙酰吡咯烷平均回收率分别为 98.3%和 98.9%, 结果见表 2。

表 2 LC-MS/MS 测定氯乙酰吡咯烷及 1-哌嗪乙酰吡咯烷回收率(n=5)

Tab 2 The recoveries of chloroacetyl pyrrolidine and 1-piperazine acetyl pyrrolidine determined by LC-MS/MS (n=5)

样 品	配制浓度/ ng·mL ⁻¹	平均测定值/ ng·mL ⁻¹	回收率/ %	平均回 收率/%
氯乙酰吡咯烷	10.1	10.23	101.3	98.2
	1.01	0.993	98.3	
	0.01	0.009 52	95.2	
1-哌嗪乙酰吡咯烷	10.2	10.08	98.9	97.3
	1.02	0.994	97.5	
	0.01	0.009 56	95.6	

2.9 样品测定

按“2.3.2”项下方法配制浓度为 10 μg·mL⁻¹ 样品溶液 3 份, 取 10 μL 注入 LC-MS/MS 进行测定。计算中间体含量, 结果见表 3。

表 3 马来酸桂哌齐特样品中间体测定结果(n=3)

Tab 3 The determined results of the intermediates of cinepazide maleate sample(n=3)

样品	批号	测定值/ng·mL ⁻¹	含量/%
氯乙酰吡咯烷	20111001	0.256	0.002 56
	20111002	0.289	0.002 89
	20111003	0.234	0.002 34
1-哌嗪乙酰吡咯烷	20111001	0.244	0.002 44
	20111002	0.331	0.003 31
	20111003	0.306	0.003 06

由表 3 可见, 样品中中间体氯乙酰吡咯烷及 1-哌嗪乙酰吡咯烷的含量均远远小于 0.05%(小于对照面积的 0.5 倍), 根据化学药品杂质研究技术指导原则及中国药典 2010 版的相关规定^[4], 不将其作为单独杂质检查列入质量标准。

3 讨论

马来酸桂哌齐特原料合成过程中的中间体氯乙酰吡咯烷和 1-哌嗪乙酰吡咯烷, 因二者无紫外吸收, 采用高效液相色谱法检测灵敏度低, 不能满足残留量的检测要求。笔者建立了液相-质谱联用方法并进行检测, 该方法准确可靠、灵敏度高、为质量控制及质量标准的建立提供依据, 同时为无紫外吸收的合成中间体检测及质控提供参考。

REFERENCES

[1] GAO J H. Synthesis method of cinepazide maleate: China, 1631877 (A) [P]. 2005-06-29.
[2] WANG S J, YANG Z, ZHANG TJ, et al. Synthesis of cinepazide maleate [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2010, 20(14): 278-281.
[3] CLAUDE P F, GUY M R, BERNARD M P, et al. Derivatives of 1-(3,4,5-trimethoxy cinnamoyl)-piperazine and process for their preparation: US, 3634411 [P]. 1971-1-11.
[4] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 194-195.

收稿日期: 2012-09-11