

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.19.012

# 柱前衍生化高效液相色谱法测定他达拉非中氯乙酸残留量

徐 然

(江苏省南京市食品药品监督检验院,江苏 南京 211100)

**摘要:**目的 建立测定他达拉非中氯乙酸残留量的柱前衍生化高效液相色谱法。方法 用2-硝基苯肼盐酸盐对样品进行衍生化,色谱柱为岛津 Inertsil ODS-3 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈-0.1%磷酸溶液(梯度洗脱),流速 1.0 mL/min,检测波长 392 nm。结果 氯乙酸衍生物检测的专属性强,检测限 20 ng/mL,定量限 50 ng/mL;质量浓度在 50~500 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r=0.9996$ );平均回收率为 94.68%,RSD 为 3.94% ( $n=9$ )。结论 经方法学验证,该方法适用于他达拉非中氯乙酸残留量的测定。

**关键词:**他达拉非;氯乙酸;衍生化;高效液相色谱法

中图分类号:R917;R927.2

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2019)19-0040-03

## Content Determination of Residual Chloroacetic Acid in Tadalafil by Pre-Column Derivatization HPLC

XU Ran

(Nanjing Institute for Food and Drug Control, Nanjing, Jiangsu, China 211100)

**Abstract: Objective** To establish a pre-column derivatization HPLC method for the content determination of residual chloroacetic acid in tadalafil. **Methods** The samples were derivatized with 2-nitrophenylhydrazine hydrochloride. The chromatographic column was Shimadzu Inertsil ODS-3 column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.1% phosphoric acid solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was 392 nm. **Results** The detection of chloroacetic acid derivatives had strong specificity, the detection limit was 20 ng/mL and the quantitative limit was 50 ng/mL. The chloroacetic acid derivative showed good linear relationship with peak area in the range of 50~500 ng/mL ( $r=0.9996$ ). The average recovery was 94.68% and RSD was 3.94% ( $n=9$ ). **Conclusion** The method is suitable for the content determination of residual chloroacetic acid in tadalafil through the methodology validation.

**Key words:** tadalafil; chloroacetic acid; derivatization; HPLC

他达拉非(tadalafil)为口服磷酸二酯酶 V 型(PDE5)抑制剂,用于治疗男性勃起功能障碍(MED)。根据现有他达拉非合成路径<sup>[1-3]</sup>,氯乙酸是他达拉非中可能残留的特殊杂质。氯乙酸含有基因毒性警示结构,具有潜在基因毒性<sup>[4]</sup>。欧洲药品管理局(EMA)、美国食品药品监督管理局(FDA)及人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)先后颁布了基因毒性杂质控制的指导文件,均推荐以毒理学关注阈值(TTC, 1.5 μg/d)来控制用药风险<sup>[5]</sup>。基于 TTC,以他达拉非最大口服剂量 20 mg/d 计算,氯乙酸限度须不超过  $75 \times 10^{-6}$ ,故需建立专属高灵敏度好的分析方法测定他达拉非中的氯乙酸残留量。以往研究中主要采用高效液相色谱(HPLC)法对他达拉非的含量<sup>[6]</sup>、有关物质<sup>[7]</sup>及异构体杂质<sup>[8]</sup>进行控制。目前,对于测定水环境中氯乙酸的残留,主要采用离子色谱法<sup>[9]</sup>和衍生化气相色谱法<sup>[10]</sup>,尚未见有药物基质中氯乙酸残留的测定报道。本研究中采用 2-硝基苯肼与氯乙酸中的羰基在催化剂作用下发生缩合反应<sup>[11-12]</sup>,将其转化为具有较强紫外吸收的衍生化产物,进而采用 HPLC 法进行测定。

### 1 仪器与试剂

仪器:LC-20AT 型高效液相色谱仪(配置 LC-So-

lution 色谱工作站,日本岛津公司);XS205 型电子天平(瑞士梅特勒-托利多国际有限公司,分度值为 0.1 mg)。

试剂:氯乙酸(MCAA,纯度为 98%,昀冠<上海>生物科技有限公司);1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐(EDC·HCl,纯度为 97%,国药集团化学试剂有限公司);2-硝基苯肼盐酸盐(2-NPH·HCl,纯度为 97%,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);他达拉非原料药(南京海融医药科技股份有限公司,纯度大于 99%,批号分别为 20170301,20170302,20170303)。

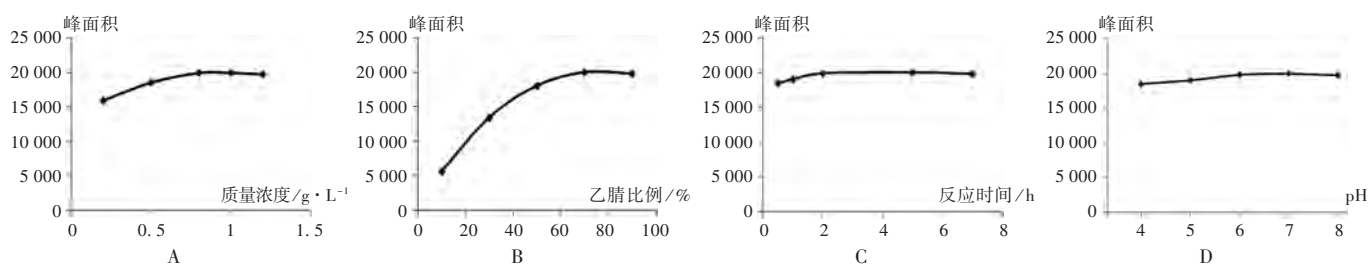
### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-3 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A相)-0.1%磷酸溶液(B相),梯度洗脱,0 min 30% A~70% B、12 min 55% A~45% B;流速:1.0 mL/min;进样量:20 μL;柱温:30℃;检测波长:392 nm。

#### 2.2 溶液制备

取氯乙酸约 10 mg,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,用 80% 乙腈稀释至刻度,摇匀,作为氯乙酸贮备液。精密量取一定量的氯乙酸贮备液,用 80% 乙腈逐级稀释,配



A. 衍生化试剂质量浓度 B. 反应体系中乙腈比例 C. 衍生化反应时间 D. 反应体系 pH

图1 衍生化反应影响因素

制成氯乙酸对照溶液。取2-硝基苯胍盐酸盐100 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,用80%乙腈稀释至刻度,摇匀,作为衍生化试液。取1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐100 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为催化剂溶液。

### 2.3 衍生化步骤

空白溶液衍生化反应:精密量取80%乙腈200  $\mu$ L,置10 mL容量瓶中,再加入500  $\mu$ L衍生化试液,500  $\mu$ L催化剂溶液,加70%乙腈稀释至刻度,摇匀。室温反应1 h后取20  $\mu$ L进样。

对照品溶液衍生化反应:精密量取氯乙酸对照溶液200  $\mu$ L,置10 mL容量瓶中,再加入500  $\mu$ L衍生化试液,500  $\mu$ L催化剂溶液,加80%乙腈稀释至刻度,摇匀。室温反应1 h后取20  $\mu$ L进样。

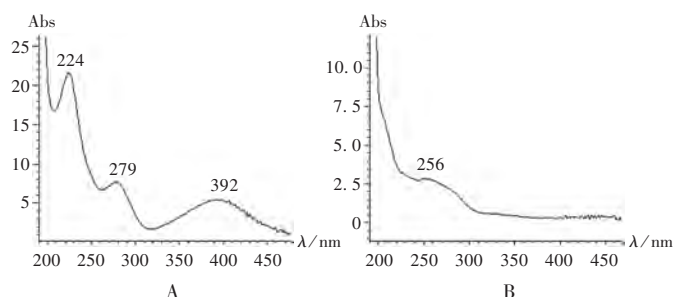
供试品溶液衍生化反应:取他达拉非原料药20 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加入500  $\mu$ L衍生化试液,500  $\mu$ L催化剂溶液,加80%乙腈稀释至刻度,摇匀,室温反应1 h,取20  $\mu$ L进样。

### 2.4 衍生化条件优化

为了确保衍生化反应快速进行,在室温反应条件下,选择单因素试验设计法,对体系中衍生化试剂的用量、有机相的比例、反应时间和反应体系pH等因素进行考察。以生成的衍生化产物的峰面积(1  $\mu$ g/mL)为指标,考察了不同质量浓度的2-硝基苯胍盐酸盐(0.20, 0.50, 0.80, 1.00, 1.25 g/L)、乙腈比例(10%, 30%, 50%, 70%, 90%)、反应时间(1, 2, 3, 5, 7 h)、反应体系pH(4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0)对衍生化反应效率的影响,结果见图1。可见,当其他条件相同时,衍生化试剂质量浓度在0.80~1.25 g/L范围的2-硝基苯胍足以使衍生化反应完全,因此将加入的衍生化试剂的质量浓度设为1.00 g/L;当反应体系中乙腈比例达到70%、反应时间为2 h时,衍生化产物的响应达到最佳,而反应液pH在考察范围内,衍生化产物的峰面积变化不大,因此选择不调整反应液pH直接反应。最终确定衍生化反应条件为与2-硝基苯胍(1.00 g/L)衍生化2 h后直接进样,反应体系乙腈比例为70%。

### 2.5 检测波长选择

氯乙酸与2-硝基苯胍反应产物的检测波长见图2。虽然在低波长处吸光度较强,但色谱图中的干扰也较严重。选择392 nm为检测波长时,他达拉非及其有关物质无明显吸收,色谱图基线干扰较少,检测灵敏度高。

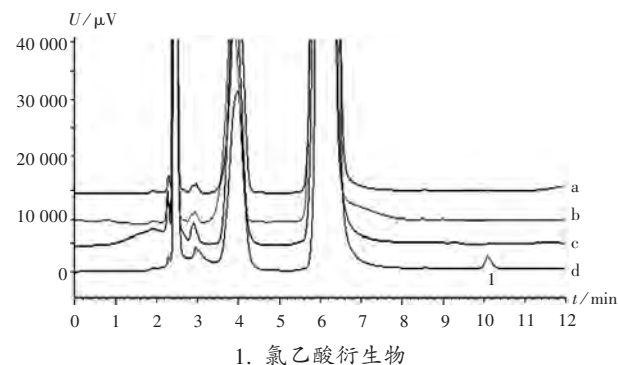


A. 氯乙酸与硝基苯胍的衍生化产物 B. 空白衍生化溶液

图2 紫外光谱图

### 2.6 方法学考察

专属性试验:分别进样不含氯乙酸的空白衍生化反应溶液、2 g/L他达拉非的衍生化反应溶液、100 ng/mL氯乙酸的衍生化反应溶液(不含催化剂)和100 ng/mL氯乙酸的衍生化反应溶液(含催化剂),结果见图3。可见,氯乙酸在催化剂存在的条件下可与2-硝基苯胍生成衍生化产物,保留时间约为10.1 min,空白溶剂和药物基质不干扰待测物的测定,方法专属性良好。



1. 氯乙酸衍生物  
a. 不含氯乙酸的空白衍生化反应溶液  
b. 2 g/L 他达拉非的衍生化反应溶液  
c. 150 ng/mL 氯乙酸的衍生化反应溶液(不含催化剂)  
d. 100 ng/mL 氯乙酸的衍生化反应溶液(含催化剂)

图3 专属性试验色谱图

线性关系考察:精密移取氯乙酸贮备液,用80%乙腈溶液逐渐稀释,制成含氯乙酸2.5,5.0,10.0,15.0,20.0,25.0  $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。取200  $\mu\text{L}$ 上述不同质量浓度的氯乙酸溶液,置10 mL容量瓶中,按衍生化步骤,取20  $\mu\text{L}$ 进样。最终氯乙酸的质量浓度为50,100,150,200,300,400,500  $\text{ng/mL}$ ,以氯乙酸质量浓度( $C$ ,  $\text{ng/mL}$ )为横坐标、氯乙酸衍生物峰面积( $A$ )为纵坐标,按最小二乘法进行线性回归,得回归方程  $C = 54.858A + 333.82$ ,  $r = 0.9996$  ( $n = 7$ )。结果表明,待测物质量浓度在50~500  $\text{ng/mL}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取质量浓度为150  $\text{ng/mL}$ 的对照溶液,衍生化反应后重复进样6次。结果的  $RSD$  为1.42% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

定量限和检测限确定:以信噪比( $S/N$ )3:1为本方法的检测限,以信噪比( $S/N$ )10:1为本方法的定量限,衍生化反应后,50  $\text{ng/mL}$ 氯乙酸衍生物的信噪比为13.2,作为定量限;20  $\text{ng/mL}$ 氯乙酸衍生物的信噪比为4.1,作为检测限。

加样回收试验:精密称取他达拉非20.03 mg,置10 mL容量瓶中,加入500  $\mu\text{L}$ 衍生化试剂,500  $\mu\text{L}$ 催化剂溶液,加80%乙腈稀释至刻度,摇匀,精密称取他达拉非20.11 mg,分别制备低(50.28  $\text{ng/mL}$ )、中(150.82  $\text{ng/mL}$ )、高(502.75  $\text{ng/mL}$ )质量浓度的加样供试品溶液,每个质量浓度各3份,按2.3项下方法反应制得,另制备150.11  $\text{ng/mL}$ 氯乙酸的衍生化反应对照溶液。分别取以上溶液进样测定,记录色谱图,按外标法以峰面积计算回收率。结果见表1。

表1 加样回收试验结果( $n = 9$ )

| 取样量<br>(mg) | 样品含量<br>(mg) | 加入量<br>(mg)           | 测得量<br>(mg)           | 回收率<br>(%) | $\bar{X}$<br>(%) | $RSD$<br>(%) |
|-------------|--------------|-----------------------|-----------------------|------------|------------------|--------------|
| 20.03       | 0            | $5.03 \times 10^{-4}$ | $4.90 \times 10^{-4}$ | 97.42      |                  |              |
| 20.13       | 0            | $5.03 \times 10^{-4}$ | $4.72 \times 10^{-4}$ | 93.84      |                  |              |
| 20.22       | 0            | $5.03 \times 10^{-4}$ | $4.60 \times 10^{-4}$ | 91.45      |                  |              |
| 20.36       | 0            | $1.51 \times 10^{-3}$ | $1.55 \times 10^{-3}$ | 102.65     |                  |              |
| 20.11       | 0            | $1.51 \times 10^{-3}$ | $1.46 \times 10^{-3}$ | 96.69      | 94.68            | 3.94         |
| 20.06       | 0            | $1.51 \times 10^{-3}$ | $1.43 \times 10^{-3}$ | 94.70      |                  |              |
| 20.35       | 0            | $5.03 \times 10^{-3}$ | $4.61 \times 10^{-3}$ | 91.65      |                  |              |
| 20.24       | 0            | $5.03 \times 10^{-3}$ | $4.65 \times 10^{-3}$ | 91.85      |                  |              |
| 20.16       | 0            | $5.03 \times 10^{-3}$ | $4.62 \times 10^{-3}$ | 91.85      |                  |              |

稳定性试验:对150  $\text{ng/mL}$ 氯乙酸对照溶液进行衍生化后,于室温下放置0,1,2,4,6,8 h时测定,以待测物峰面积( $A$ )的变化考察待测物的稳定性。结果的  $RSD$  为2.64% ( $n = 6$ ),表明氯乙酸衍生物在室温下放置0~8 h稳定性较好。

## 2.7 样品含量测定

取他达拉非供试品20 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加入500  $\mu\text{L}$ 衍生化试剂,500  $\mu\text{L}$ 催化剂溶液,加70%乙腈稀释至刻度,摇匀,室温反应2 h,取20  $\mu\text{L}$ 进样。同法测定150  $\text{ng/mL}$ 氯乙酸对照溶液,以峰面积计算含量,结果他达拉非样品中的氯乙酸未达检测限。

## 3 讨论

色谱分离时,由于2-硝基苯胍显碱性,pH越小出峰时间越早,为使其与衍生化产物足够分离,选择了酸性较强的0.1%磷酸溶液作为水相。通过对流动相比例的优化,进一步提高了分离度,且不影响柱效。

以氯乙酸衍生物的色谱峰面积为指标,此衍生化方法和色谱条件对其他药物中氯乙酸残留的测定同样具有借鉴意义。衍生化溶剂需要完全溶解待测药物,才能准确测定药物中的氯乙酸残留,有机相比比例过低会影响反应效率,有机相比比例过高会导致衍生化试剂的溶解度下降,进而影响衍生化效率,对于该衍生化方法的应用而言,溶剂对反应效率和回收率的影响需要重点考察。

## 参考文献:

- [1] 要少波,蔡明德,卢小逸,等.他达拉非合成研究进展[J].精细与专用化学品,2011,19(10):37-44.
- [2] 伍普华,谢义鹏.他达拉非合成路线图解[J].中国药物化学杂志,2015,25(5):407-410.
- [3] 熊野娟.男性勃起功能障碍药物他达拉非的合成研究进展[J].中国药业,2010,19(15):1-3.
- [4] MÜLLER L, MAUTHE RJ, RILEY CM, et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2006, 44(1):198.
- [5] SZEKELY G, SOUSA MCAD, GIL M, et al. Genotoxic Impurities in Pharmaceutical Manufacturing: Sources, Regulations, and Mitigation [J]. Chem Rev, 2015, 115(8):8182.
- [6] 王俊龙,江专新,杨念钦,等.他达拉非按需与按时治疗勃起功能障碍前瞻性、多中心研究[J].中华男科学杂志,2014,20(1):14-18.
- [7] 钱亚萍.反相高效液相色谱法分离测定他达拉非的含量[J].中国药业,2006(15):34-35.
- [8] 郭兴辉.HPLC法测定他达拉非片含量和有关物质[J].中国药师,2015,18(5):870-872.
- [9] 靖雅,王丽敏,杜诗琦,等.HPLC测定他达拉非中的对映异构体和非对映异构体[J].中国现代应用药学,2017,34(1):89-93.
- [10] 谢永洪,郑昌杰,杨坪,等.离子色谱法同时测定水中的甲酸、乙酸、丙烯酸和氯乙酸[J].四川环境,2011,30(3):24-28.
- [11] 叶坚,王娟,余涛.二硝基苯胍柱前衍生-HPLC法测定水中微量甲醛和乙醛[J].环境卫生学杂志,2013,3(4):361-363.
- [12] 李秀波,李林,阮长青,等.2,4-二硝基苯胍比色法测定食品中甲醛的改进[J].中国食品添加剂,2016(8):205-209.

(收稿日期:2019-01-28)