

RP-HPLC法测定 *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺的含量及其有关物质*

张红霞, 黄荣清**, 肖炳坤, 杨建云
(军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850)

摘要 目的: 采用反相高效液相色谱法测定 *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺含量及其有关物质。方法: 采用 DiamonsilTM (钻石) C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为甲醇-乙腈-水 (2: 21: 77) 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长 238 nm。结果: 在本文色谱条件下 *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺与有关物质能达到有效分离, 在 52.84~211.36 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好, *r* = 0.9998 仪器精密性 RSD 为 0.95%; 方法重复性 RSD 为 1.2%; 最低检测限 3.18 ng。结论: 该方法简便、准确、可行, 可用于 *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺的质量控制。

关键词: 反相高效液相色谱法; *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺; 含量测定; 有关物质; 3-乙酰氨基苯乙酮

中国分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1793-04

RP-HPLC determination of content of *N*-[3-[3-(dimethylamino)-1-oxo-2-propenyl]-phenyl]-acetamide and its related substances*

ZHANG Hong-xia, HUANG Rong-qing**, XIAO Bing-kun, YANG Jian-yun

(Institute of Radiation Medicine Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China)

Abstract Objective A reversed phase high performance liquid chromatography method for the determination of content of *N*-[3-[3-(dimethylamino)-1-oxo-2-propenyl]-phenyl]-acetamide and its related substances. **Methods** The analysis was performed on Diamonsil C₁₈ reversed-phase analytical column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of a mixture of methanol-acetonitrile-water (2: 21: 77) at the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹; The ultraviolet detection wavelength was set at 238 nm. **Results** *N*-[3-[3-(dimethylamino)-1-oxo-2-propenyl]-phenyl]-acetamide and its related substances could be separated well. The linearity of the *N*-[3-[3-(dimethylamino)-1-oxo-2-propenyl]-phenyl]-acetamide curve was well correlated (*r* = 0.9998) within the range of 52.84~211.36 μg · mL⁻¹. The instrument precision RSD was 0.95%; The method precision RSD was 1.2%; The detection limit was 3.18 ng. **Conclusion** The method appeared to be simple, accurate and reproducible. It can be used to control the quality of *N*-[3-[3-(dimethylamino)-1-oxo-2-propenyl]-phenyl]-acetamide.

Key words RP-HPLC; *N*-[3-[3-(dimethylamino)-1-oxo-2-propenyl]-phenyl]-acetamide; assay; related substances; 3-acetamidoacetophenone

N-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺是一种重要新药 Indiplon 的中间体, 由 3-乙酰氨基苯乙酮经过醇醛缩合, 在酸的催化下脱水而形成。实验表明: 在合成过程中, 中

间体 *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺很难完全反应, 会带入最终产物, 加之合成新药 Indiplon 在放置过程中, 很可能会重新生成 *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧

* 国家科技重大专项“重大新药创制”综合性新药研究开发技术平台 (No. 2009ZX09301-002) 资助; 国家自然科学基金项目 (No. 20672143)

** 通讯作者 Tel: (010) 66930217 E-mail: huangrq@tm.com

基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺,因此,测定 N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺不仅能够反应新药 Indiplon 的含量,而且是保证合成药品安全性的方法之一。本文建立了准确快速的反相高效液相色谱法,测定 N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺含量和有关物质。分析结果表明,此方法能够很好地分离 Indiplon, N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺、3-乙酰氨基苯乙酮以及其他有关物质,可以作为 N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺和新药 Indiplon 的质量控制方法。

1 仪器和试剂

Waters 2695-2996型高效液相色谱仪;二极管阵列检测器;Empower数据处理系统;色谱柱: Diamonsil™(钻石) C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);乙腈(色谱纯,天津西华);甲醇(色谱纯,天津西华);水(纯净水);Indiplon对照品(含量:99.9%,军事医学科学院放射与辐射医学研究所自制); N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺对照品(含量:99.7%,军事医学科学院放射与辐射医学研究所自制);3-乙酰氨基苯乙酮对照品(含量:99.8%,军事医学科学院放射与辐射医学研究所自制); N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺供试品(自制,批号分别为20070901,20070902,20070903)。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

2.1.1 对照品溶液 取 N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺对照品约13 mg精密称定,置100 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释制成每1 mL中约含0.13 mg的对照品溶液,即得。

2.1.2 供试品溶液: 取 N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺供试品约13 mg精密称定,置100 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,0.45 μm微孔滤膜过滤,取续滤液作为供试品溶液,即得。

2.2 色谱条件与系统适用性试验 色谱柱: Diamonsil™(钻石) C_{18} (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)柱;流动相: 甲醇-乙腈-水(2:21:77);流速: 1.0 mL·min⁻¹;检测波长: 238 nm;进样量: 10 μL;柱温: 室温。理论塔板数以 N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺计不低于5000,对称因子1.13且在30 min内检测完成。按上述色

谱条件,将10 μL对照品溶液、供试品溶液分别进样, N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺峰的保留时间为9 min左右,主成分与有关物质峰能得到良好分离,分离度大于2。对照品和供试品的色谱图见图1。

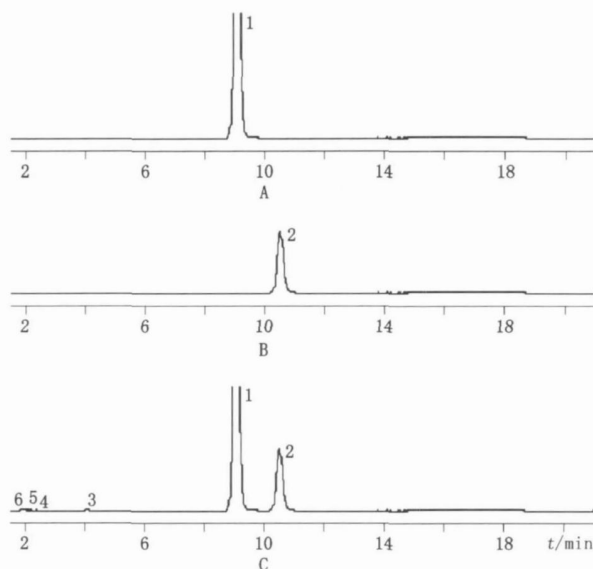


图1 HPLC图谱

Fig 1 HPLC chromatogram s

A. N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺对照品(N -[3-[3-(diethylamino)-1-oxo-2-propenyl-phenyl]-acetamide reference substance)

B. 3-乙酰氨基苯乙酮对照品(3-acetamidoacetophenone reference substance) C. 供试品(sample)

1. N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺(N -[3-[3-(diethylamino)-1-oxo-2-propenyl-phenyl]-acetamide) 2. 3-乙酰氨基苯乙酮(3-acetamidoacetophenone) 3~6. 有关物质(related substances)

2.3 线性关系考察^[1] 取对照品约26 mg精密称定,置100 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。精密量取对照品储备液2.0 3.0 4.0 5.0 6.0 7.0 8.0 mL,分别置10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,得一系列浓度的标准溶液。分别取10 μL进样测定,记录色谱图,以浓度 C (μg·mL⁻¹)对峰面积 A 进行线性回归,得线性方程: $A = 4.180 \times 10^4 C + 2.736 \times 10^5$ $r = 0.9998$

结果表明, N -[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺的浓度在52.84~211.36 μg·mL⁻¹范围内与峰面积线性良好。

2.4 仪器精密度试验 取“2.1.1”项下对照品溶液,连续进样6次,RSD为0.95%。

2.5 重复性试验 分别精密称取样品(批号20070901)6份,按“2.1.2”项下方法操作,平均含量

为 91.3%, RSD 为 1.2%。

2.6 稳定性试验 取“2.3”项下对照品储备液,用流动相配制相当于 $N - [3 - [3 - (\text{二甲基氨基}) - 1 - \text{氧基} - 2 - \text{丙烯基}] - \text{苯基}] - \text{乙酰胺}$ 浓度为 $105.68 \sim 132.12, 158.52 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溶液,在室温条件下放置,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 内进样 $10 \mu\text{L}$,按“2.2”项下的色谱条件测定峰面积,结果低、中、高 3 个浓度峰面积的 RSD 分别为 1.7%, 1.5%, 1.4%,表明供试品溶液在 10 h 内基本稳定。

2.7 最低检测限与定量限 精密吸取“2.1.1”项下对照品溶液,加流动相逐级稀释成系列浓度,精密量取 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图,在信噪比 (S/N) 为 3 时测得的检测限为 3.2 ng ,在信噪比 (S/N) 为 10 时测得的定量限为 10.56 ng 。

2.8 样品含量测定 按“2.1”项下的方法分别制备对照品溶液和供试品溶液,分别进样 $10 \mu\text{L}$,按外标法以峰面积计算样品含量,结果批号为 20070901, 20070902, 20070903 的样品含量 ($n = 2$) 分别 91.33%, 91.26%, 91.45%。

2.9 有关物质测定 为控制 $N - [3 - [3 - (\text{二甲基氨基}) - 1 - \text{氧基} - 2 - \text{丙烯基}] - \text{苯基}] - \text{乙酰胺}$ 质量,保证用药安全,应检查有关物质,供试品溶液的色谱图中如显有关物质峰,其中 3-乙酰氨基苯乙酮采用外标法控制质量;因其他有关物质对照品难以获得,所以采用自身对照法控制质量。

2.9.1 3-乙酰氨基苯乙酮测定方法 取 3-乙酰氨基苯乙酮对照品约 13 mg 精密称定,置 100 mL 量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为 3-乙酰氨基苯乙酮对照溶液;按“2.2”项下的色谱条件实验,精密量取 3-乙酰氨基苯乙酮对照溶液 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约达满量程的 20%。分别精密量取 3-乙酰氨基苯乙酮对照品溶液和“2.1.2”项下供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$ 分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 2 倍,见图 1。检测样品 3 批 (20070901, 20070902, 20070903), 3-乙酰氨基苯乙酮含量分别为 8.73%, 8.70%, 8.74%。结果表明:样品中 3-乙酰氨基苯乙酮含量在 8.72% 左右。

2.9.2 其他有关物质测定方法 精密取“2.1.2”项下供试品溶液适量,加流动相溶解并稀释成浓度 $1.30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液 (约为“2.1.2”项下供试品溶液浓度的 1%),作为自身对照溶液,按“2.2”项下的色谱条件实验,精密量取自身对照溶液 $10 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰

高约达满量程的 20%,精密量取自身对照溶液与“2.1.2”项下供试品溶液各 $10 \mu\text{L}$ 分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 2 倍,见图 1。按照 1% 自身对照法计算样品 (20070901, 20070902, 20070903) 中的有关物质峰面积和 (3-乙酰氨基苯乙酮除外) 分别为 0.02%, 0.01%, 0.01%。结果表明:样品中有关物质含量在 0.01% 左右,证明方法可行。

3 讨论

3.1 流动相的选择 流动相组成的选择:首先考察甲醇-水作为流动相,发现主药与有关物质分离度不好,且获得的峰形钝、前延严重;后改为乙腈-水为流动相,虽达到良好分离,但保留时间太短 (约 5 min 左右)。经比较发现流动相中加入甲醇可明显延长主峰保留时间,而乙腈的加入能改善主药与有关物质的分离度,所以为了能达到各峰良好分离且峰形较好,在乙腈-水作为流动相的基础上又加入了少许甲醇,选择甲醇-乙腈-水作为流动相。为能在适宜的分析时间内完成对主药及有关物质的分析,曾采用梯度洗脱,但发现梯度洗脱时基线漂移严重,2 次进样之间的平衡时间较长 (约 15 min),进行实际测定非常耗时,故放弃梯度洗脱,后在等度洗脱条件下,降低有机相比例至 23%,药物及有关物质在 30 min 内能完全出峰,且能达到良好分离。

流动相比例的考察:在确定甲醇-乙腈-水作为流动相后,对不同比例进行考察,结果有机相与水的比例为 23:77 时,主峰在 9 min 左右出峰,且对称性好、分离度大,已达到了色谱分离的要求,故选择流动相的比例为 23:77。同时还比较了不同流速对分离效果的影响,最后选用流速为 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,该条件保留时间适中、分离效果好。

3.2 波长的选择 经二极管阵列全波长扫描,得主药的最大吸收波长为:238.1 nm, 347.2 nm;有关物质最大吸收波长为:233.4 nm,综合考虑各峰峰高及峰面积比例,选 238 nm 作为检测波长,在此波长条件下,主药和 3-乙酰氨基苯乙酮及其他有关物质均有较适宜的峰高响应值。主药与 3-乙酰氨基苯乙酮的紫外吸收光谱图见图 2。

3.3 有关物质 3-乙酰氨基苯乙酮的确定 3-乙酰氨基苯乙酮是 $N - [3 - [3 - (\text{二甲基氨基}) - 1 - \text{氧基} - 2 - \text{丙烯基}] - \text{苯基}] - \text{乙酰胺}$ 合成过程中的一步中间体,在实际检测过程中,由于此有关物质与 3-乙酰氨基苯乙酮对照品有相同的紫外吸收,且在相同浓度、相同色谱条件下,此有关物质与 3-乙酰

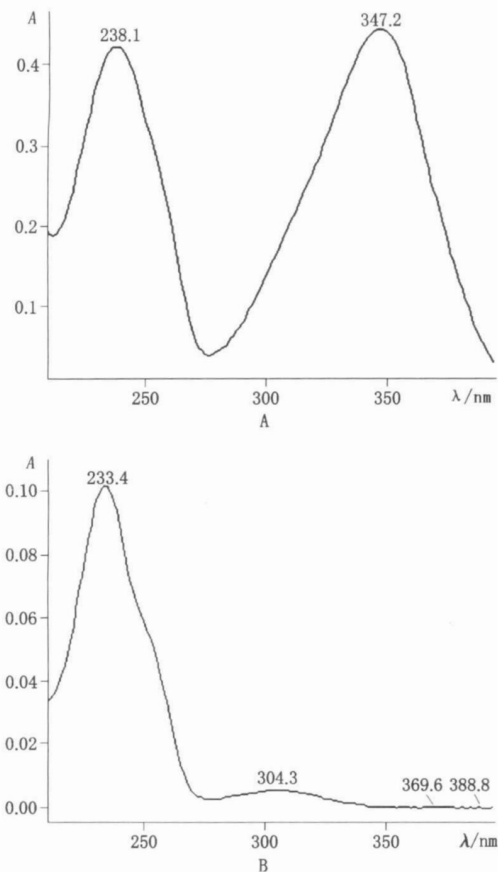


图 2 紫外图谱

Fig 2 UV spectrograms

A. *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺 (*N*-[3-[3-(dimethylamino)-1-oxo-2-propenyl]-phenyl]-acetamide) B. 3-乙酰氨基苯乙酮 (3-acetamido-acetophenon)

氨基苯乙酮对照品有完全相同的色谱行为、出峰时间一致(约 10.5 min)。为了进一步确保结论的真实可靠,最后把 3-乙酰氨基苯乙酮对照品与样品混合,结果显示 10.5 min 左右的峰明显增大且无其他杂峰出现,因此,可以断定此有关物质为 3-乙酰氨基苯乙酮。

3.4 Indiplon *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺、3-乙酰氨基苯乙酮及其他有关物质考察 由于 *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺在合成过程中会带入最终产品,且与最终产品 Indiplon 有相同的紫外吸收光谱(Indiplon 的紫外吸收光谱图见图 3),为考察在此液相色谱条件下,*N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺、有关物质与最终产品 Indiplon 的分离情况,进行了以下试验:取 Indiplon 对照品约 13 mg 精密称定,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 0.13 mg 的溶液,作为 Indiplon 对照品溶液。将 Indiplon 对照品溶液与

“2.1.2”项下供试品溶液同体积混匀,作为混合溶液。按“2.2”项下的色谱条件实验,分别精密量取 Indiplon 对照品溶液与混合溶液各 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,见图 4。结果表明:此方法能很好地分离 Indiplon、*N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺、3-乙酰氨基苯乙酮及其他有关物质,可以作为 *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺以及新药 Indiplon 的质量控制方法。

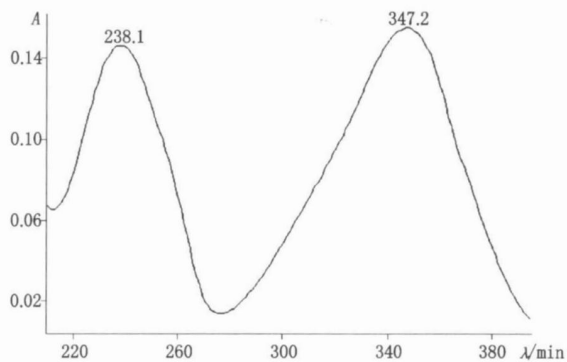


图 3 Indiplon 紫外图谱

Fig 3 Indiplon UV spectrogram

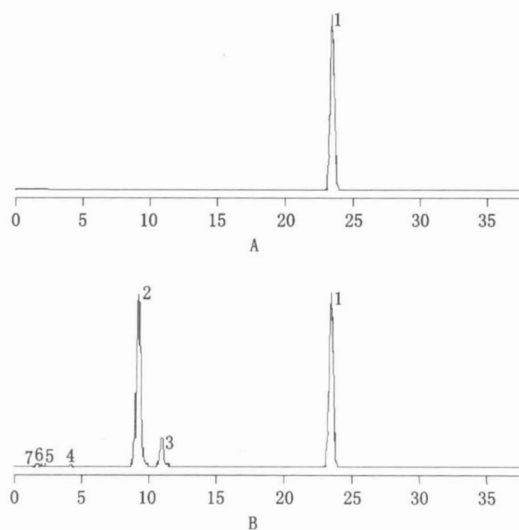


图 4 Indiplon 对照品(A)、供试品(B)HPLC 色图谱

Fig 4 HPLC chromatograms of Indiplon reference substance (A) and sample (B)

1. Indiplon 2. *N*-[3-[3-(二甲基氨基)-1-氧基-2-丙烯基]-苯基]-乙酰胺 (*N*-[3-[3-(dimethylamino)-1-oxo-2-propenyl]-phenyl]-acetamide) 3. 3-乙酰氨基苯乙酮 (3-acetamido-acetophenon) 4~7. 有关物质 (related substances)

参考文献

1 ChP(中国药典). 2005 Vol II (二部): Appendix(附录)

(本文于 2008 年 11 月 4 日收到)