GC法测定高哌嗪中乙二胺和哌嗪的残留量

甘冬彦[1]，杨建玲[2]，杨晓芸[2]，陈云建[2*]
1. 大理大学，云南 大理 671000
2. 昆药集团股份有限公司，云南 昆明 650100

摘　要：目的 建立气相色谱法（GC）测定高哌嗪中杂质残留乙二胺和哌嗪。**方法** 采用GC法，色谱柱为CP-sil8 CB（30 m×0.25 mm×0.50 μm）；进样口温度240 ℃；升温程序：60 ℃保持1 min，以5 ℃/min的速率升温至110 ℃，再以40 ℃/min的速率升温至200 ℃，保持3 min；检测器为氢火焰离子化检测器（FID），检测器温度为250 ℃；载气为氮气；分流比为2∶1；进样方式为直接进样，进样量1 μL；体积流量：1 mL/min。**结果** 高哌嗪中乙二胺杂质和哌嗪杂质与主成分间均能有效分离，线性范围分别为20.2～161.7 μg/mL（*r*=0.999 8），20.4～163.6 μg/mL（*r*=0.999 9）。重复性和精密度的RSD值均在规定范围内。**结论** 该方法适用于高哌嗪中乙二胺和哌嗪杂质的准确测定和质量控制。

关键词： 高哌嗪；乙二胺；哌嗪；气相色谱法；质量控制
中图分类号： R927.2　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1674-6376（2020）06-1071-04
DOI： 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.06.015

Determination of ethylenediamine and piperazine residues in homopiperazine by GC

GAN Dongyan[1], YANG Jianling[2], YANG Xiaoyun[2], CHEN Yunjian[2]
1. Dali University, Dali 671000, China
2. KPC Pharmaceuticals, Inc., Kunming 650100, China

Abstract: Objective A GC method was established to determine the residual impurities of ethylenediamine and piperazine in homopiperazine. **Methods** Gas chromatography was applied to this study. The determination was carried out on CP-sil8 CB(30 m×0.25 mm×0.50 μm). Injection temperature was 240 ℃. Temperature rise procedure was kept at 60 ℃ for 1 min, then the temperature was raised to 110 ℃ at the rate of 5 ℃/min. And the temperature was raised to 200 ℃ at the rate of 40 ℃/min for 3 min. The detector was FID, and the detector temperature was 250 ℃. The carrier gas was nitrogen, the split ratio was 2∶1. The injection volume was 1 μL, the flow rate was 1 mL/min. **Results** Ethylenediamine impurity and piperazine impurity in homopiperazine can be separated from the principal component effectively. The linear range was 20.2 — 161.7 μg/mL (*r*=0.999 8), and 20.4 — 163.6 μg/mL (*r*=0.999 9), respectively. The RSD values of repeatability and precision were within the specified range. **Conclusion** The method is simple, accurate and reliable, and has good specificity, and can be used for quality control of homopiperazine.

Key words: homopiperazine; ethylenediamine; piperazine; GC; quality control

高哌嗪在多个领域有重要作用，是一种较为常见的化工原料及作为连接医药产业和药物合成之间的重要中间体，还可用来合成多种精细化学品[1]。由于高哌嗪的特殊结构使它的很多衍生物对相关药物有着很强的生物活性，在药物化学领域和药用价值方面发挥着极其重要的作用，因而近年来对高哌嗪系及其衍生物的研究越来越广泛。在我国高哌嗪应用于制药工业领域成就显著，据统计已合成的医药品多达数十种[2-5]。因此高哌嗪的质量研究就显得尤为重要，任何影响高哌嗪纯度的杂质若控制不当，都有可能会传递到终产品中影响药物的安全性和稳定性，甚至产生毒副作用从而对人类健康有害，故应开发合适的分析方法对其杂质进行研究和控制。

本文将主要针对乙二胺杂质和哌嗪杂质对其进行研究，经高哌嗪合成路线可知，国内合成高哌嗪的起始物料主要是乙二胺[6]，乙二胺既是初始原

收稿日期：2020-01-15
第一作者：甘冬彦，女，大理大学在读硕士研究生，研究方向为药物分析。E-mail：1175641906@qq.com
*通信作者：陈云建 E-mail：chyjkm@163.com

料，也可作为工艺杂质残留在高哌嗪中影响高哌嗪的纯度，甚至会伴随高哌嗪参与到药物合成反应中作为药物中潜在的工艺杂质，但乙二胺属于胺类有机物，过量会在体内形成致癌物质；哌嗪杂质来源于合成原料乙二胺与合成过程中涉及的杂质1，2-二溴乙烷环化产生的杂质，同样属于潜在的工艺杂质。已有文献报道过采用气相色谱法（GC）对不同药物中的乙二胺和哌嗪的含量进行测定[7-12]，但测定高哌嗪中乙二胺和哌嗪残留量的方法尚未见报道，而乙二胺和哌嗪均属于二胺类有机化合物，且两者作为工艺杂质其限度要求一般均不得过0.1%，可采用相同的分析方法进行测定，结果表明此法可用于高哌嗪的质量控制。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 7890B型气相色谱仪（安捷伦科技有限公司）；G3440B型氢火焰离子化检测器FID（安捷伦科技有限公司）；Agilent CP-Sil 8 CB型毛细管柱（安捷伦科技有限公司）；C.01.07 SR2版OpenLAB CDS ChemStation Edition色谱工作站（安捷伦科技有限公司）；CPA225D型电子分析天平（赛多利斯科学仪器有限公司）

1.2 试药

乙二胺杂质对照品（Stanford，纯度99.91%，批号YT170112-16）；哌嗪对照品（Stanford，纯度99.86%，批号AL160612-03）；甲醇（默克股份两合公司，HPLC级，批号10951907818）；高哌嗪样品（共5批，北京嘉瑞时代科技有限公司，批号160201、170202；峨眉山宏昇药业股份有限公司，批号2M168180401、2M168180801、2M168181001）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱CP-sil8 CB（30 m×0.25 mm×0.50 μm）毛细管柱，升温程序为60 ℃保持1 min，以5 ℃/min的速率升温至110 ℃，再以40 ℃/min的速率升温至200 ℃，保持3 min；进样口温度为240 ℃；检测器为FID（250℃）；以N_2为载气，分流比为2∶1；进样量为1 μL；体积流量为1 mL/min。理论塔板数按高哌嗪峰计算应不低于5 000。

2.2 溶液的配制

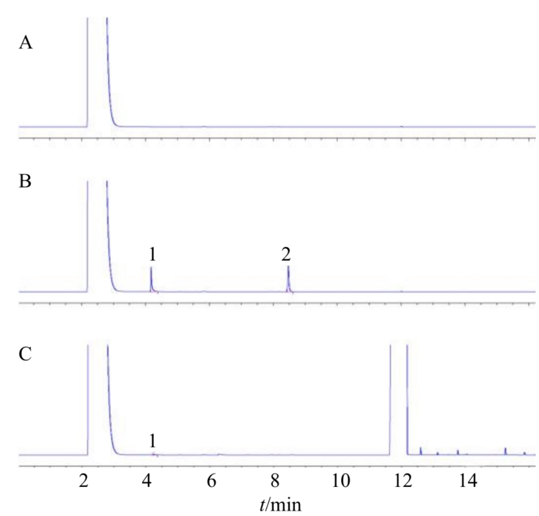
2.2.1 供试品溶液(0.1 g/mL） 取高哌嗪样品约1 g，精密称定，置10 mL量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

2.2.2 对照品储备液 取乙二胺对照品约100 mg，精密称定，置于100 mL量瓶中，加甲醇溶解并定容后摇匀，作为乙二胺对照品储备液；同法配制哌嗪对照品储备液。取乙二胺和哌嗪对照品各100 mg，精密称定，置100 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，作为乙二胺和哌嗪混合对照品储备液。

2.2.3 混合对照品溶液（0.1 mg/mL） 各精密量取1 mL乙二胺对照品储备液和哌嗪对照品储备液置10 mL量瓶中，加甲醇稀释至刻度，摇匀，即得。

2.3 系统适用性试验与专属性试验

甲醇作为空白溶剂，取“2.2项”下混合对照品溶液作为对照品溶液，供试品溶液作为专属性溶液。分别取空白溶剂及连续6针对照品溶液，注入气相色谱仪，记录色谱图，作为系统适用性试验；除上述2份溶液外，再取专属性溶液照色谱条件分别准确进样，作为专属性试验，根据进样结果及色谱图进行分析，色谱图见图1。



1-乙二胺 2-哌嗪

1- ethylenediamine 2- piperazine

图1 空白溶剂(A)、对照品溶液(B)、供试品溶液(C)色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank solution（A）, reference solution（B）and test solution（C）

结果显示：空白溶剂在乙二胺、哌嗪保留时间处没有干扰，连续进样6针对照品溶液中乙二胺峰面积的RSD值为1.10%，保留时间的RSD值为0.04%；哌嗪峰面积的RSD值为1.12 %，保留时间的RSD值为0.01%。表明该方法的系统适用性好；高哌嗪和乙二胺、哌嗪杂质分离度较好，且色谱图显示空白溶剂在乙二胺和哌嗪杂质峰的保留时间没有出现其它的杂质峰，不影响目标峰杂质含量的测定，表明该方法专属性良好。

2.4 线性关系考察

取“2.2.2项”下的溶液作为线性储备液，分别精

密量取线性储备液1、3、2、1、3、4 mL，分别置于50、50、25、10、25、25 mL量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，得到系列浓度线性溶液，分别取1 μL注入气相色谱仪进行测定，以对照品的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标进行线性回归计算，得乙二胺杂质的线性回归方程：$Y=1\ 759.4\ X-18.729$，$r=0.999\ 8$；哌嗪的线性回归方程为：$Y=2\ 490.8\ X-4.916\ 2$，$r=0.999\ 9$。结果表明乙二胺在20.2～161.7 μg/mL线性关系良好，哌嗪在20.4～163.6 μg/mL线性关系良好。

2.5 定量限与检测限

取“2.2.2项”下的乙二胺和哌嗪的单独对照品储备液，分别单独逐级稀释，使信噪比满足定量限要求，即S/N≥10，分别作为乙二胺杂质、哌嗪杂质的定量限溶液。取乙二胺、哌嗪杂质的定量限溶液用稀释剂进行稀释，使其信噪比满足检测限要求，即S/N＝3～10，作为乙二胺、哌嗪杂质的检测限溶液。分别取上述配制好的溶液1 μL进样测定峰面积和信噪比，并根据进样结果分别计算。结果显示：高哌嗪中残留杂质乙二胺的定量限浓度为0.01 mg/mL，相当于限度浓度的10%水平，连续6针溶液峰面积的RSD为1.71%，信噪比均满足要求，其平均值为15；残留杂质乙二胺的检测限浓度为0.006 mg/mL，相当于限度浓度的6%水平，连续6针乙二胺杂质检测限溶液的信噪比为5.5，6针峰面积的RSD值为1.66%。高哌嗪中残留杂质哌嗪的定量限浓度为0.006 mg/mL，是限度的6%水平浓度，连续6针的平均信噪比为14.97，且峰面积的RSD为0.59%；残留杂质哌嗪的检测限浓度为0.003 mg/mL，相当于限度浓度的3%水平，连续6针溶液峰面积的RSD为2.30%，信噪比为6.2。表明本方法的检测灵敏度较高。

2.6 准确度试验

对照品储备液按照“2.2.2项”下配制乙二胺和哌嗪杂质混合对照品储备液操作步骤配制含1 mg/mL的混合对照品储备液。

80%、100%和120%限度浓度对照品溶液：照上述线性溶液的制备步骤配制相当于杂质限度80%、100%和120%水平的杂质对照品溶液。

精密称取批号为2M168180401高哌嗪样品100 mg于进样小瓶中，重复12份；首先取3份各直接精密加入1 mL稀释剂溶解并摇匀，作为空白供试品溶液；剩下的9份供试品，分别精密加入4.32、5.40、6.48 μg配制好的不同限度浓度水平的对照品溶液，使其溶解并混匀，各不同浓度水平的溶液均配制3份，即成为浓度为80%、100%和120%限度浓度水平的加标供试品溶液。准确量取测定所需的混合对照品溶液和各准确度溶液进样并分别对各份进样溶液进行计算。

结果表明：乙二胺杂质的回收率在96.53%～104.05%，9份溶液的平均回收率为100.26%，RSD为2.30%。哌嗪杂质的回收率在89.62%～92.16%，9份溶液的平均回收率为91.39%，RSD值为0.96%，根据回收率结果可知该方法准确度达到定量测定的要求。

2.7 精密度试验

取批号为2M168180401高哌嗪样品，分别制备6份供试品溶液，各取1 μL上述精密度溶液注入气相色谱仪，根据进样结果按照同条件下混合对照品溶液中杂质峰的峰面积，同准确度计算方法计算各溶液中乙二胺和哌嗪杂质的回收率。结果显示，6份加标供试品中，乙二胺和哌嗪杂质的平均回收率分别为101.32%和92.15%，乙二胺和哌嗪杂质的RSD值分别为1.72%和1.21%。表明在此色谱条件下本方法的精密度良好。

2.8 稳定性试验

精密称取高哌嗪（批号2M168180401）约1 g置10 mL量瓶中，准确加入1 mL当天配制的混合对照品储备液，加甲醇溶解并稀释至刻度，作为高哌嗪加标供试品溶液；并取乙二胺和哌嗪混合对照品溶液，分别于室温和冷藏条件（2～8 ℃）下放置。分别在0、5、24 h后取空白溶剂及上述稳定性样品进样，观察各时间点下与0 h比较的峰面积变化，并根据峰面积计算相对偏差。结果显示对照品溶液和加标供试品溶液在室温和2～8 ℃条件下放置1 d，与0 h检测结果比较，室温条件下乙二胺峰面积的相对偏差最大值为8.33%，2～8 ℃条件下相对偏差最大值为8.27%；室温条件下哌嗪峰面积的相对偏差最大值为7.23%，2～8 ℃条件下相对偏差最大值为8.14%。表明对照品溶液和加标样品溶液在冷藏条件和室温下放置24 h内稳定性良好。

2.9 耐用性试验

取空白溶剂及“2.8项”下的对照品溶液和加标供试品溶液，按“2.1项”下测定高哌嗪中的杂质乙二胺和哌嗪的色谱条件进行测定，作为初始条件的检测数据。稍微对色谱条件中的进样口温度、体积流量和初始柱温进行改动，分别为±10 ℃、±0.2 mL/min和±10 ℃，取空白及上述溶液按规定的进样量进行进样，记录色谱图，并根据进样结果计算乙二胺和哌嗪杂质的含量，并将结果与初始色谱条件下的结果进行比较，计算乙二胺、哌嗪含量的相对偏差。

根据结果可知，分别对色谱条件进行微小变动后，各条件下空白溶剂对乙二胺、哌嗪测定无干扰；与初始条件比较，乙二胺和哌嗪杂质含量的最大相对偏差均小于10%，表明该方法的耐用性较好。当体积流量为±0.2 mL/min为时，对照品溶液和加标样品中乙二胺、哌嗪含量的相对偏差略大，故为获得准确的测量结果，体积流量需精密控制在1 mL/min。

2.10　样品测定

分别配制混合对照品溶液和不同批次的高哌嗪样品溶液，取空白溶剂及上述各溶液进样并记录色谱图，根据进样结果按外标法计算高哌嗪样品中残留杂质乙二胺和哌嗪的含量，结果见表1。

表1　5批样品测定结果

Table 1　Determination results of 5 batches of samples

批号	限度标准/%	乙二胺/%	哌嗪/%
160201	0.1	0.014 7	0.119 2
170202	0.1	0.010 7	0.077 5
2M168181001	0.1	0.029 4	未检出
2M168180401	0.1	0.005 2	未检出
2M168180801	0.1	0.054 4	未检出

结果表明：5批样品中批号为160201的样品哌嗪残留为0.119 2%，大于限度0.1%；批号为2M168181001、2M168180401、2M168180801的3批样品中均未检出哌嗪杂质，其余批号的样品乙二胺和哌嗪杂质残留均小于0.1%。

3　讨论

高哌嗪中的残留杂质乙二胺来源于合成原料引入，哌嗪杂质属于工艺杂质，来源于合成原料乙二胺与工艺杂质1，2-二溴乙烷环化产生的杂质，在生产过程中若控制不当，均可能会传递到高哌嗪中，而高哌嗪作为重要的药物合成中间体，最终会传递到成品中或是形成未知的副反应产物，故为保证终产品的安全可靠性，需用合适的分析方法对其进行检测并控制在安全范围内，因此开发并采用了GC法测定高哌嗪中的残留杂质乙二胺和哌嗪。

其中色谱柱的选择：根据参考文献方法[8,12]中使用较多的HP-5柱和DB-624柱，分别考察了CP-sil8 CB（30 m×0.25 mm×0.50 μm）柱、HP-5（30 m×0.32 mm×0.25 μm）柱、DB-624UI（30 m×0.32 mm×1.8 μm）柱，实验结果表明在同一分析方法下同时测定乙二胺和哌嗪时，采用HP-5柱乙二胺和哌嗪峰严重拖尾，采用DB-624柱时基线不平且杂峰对目标峰干扰较多，CP-sil8CB（30m×0.25mm×0.50μm）柱更适合乙二胺和哌嗪杂质的分析。

检测器的选择：分别考察了FID检测器和TCD检测器下各杂质响应的灵敏度，结果显示FID检测器对乙二胺和哌嗪测定的灵敏度比TCD高，故选用FID检测器。

高哌嗪样品浓度及对照品浓度的考察：经实验证实，当样品浓度大于0.1 g/mL时供试品中乙二胺和哌嗪杂质的峰型不佳且基线不平，干扰峰较多，即0.1 g/mL为最佳样品浓度，由于乙二胺和哌嗪的暂定限度为0.1%，故0.1 mg/mL为对照品的最佳浓度。方法学验证结果表明，所建立的分析方法能准确测定高哌嗪中乙二胺和哌嗪杂质的含量且操作简单，可作为高哌嗪中乙二胺和哌嗪杂质的质控方法，为高哌嗪的质量控制提供依据。

参考文献

[1] 杨玉芬, 崔建兰, 要晓丽, 等. 高哌嗪及其衍生物的合成研究进展 [J]. 化工中间体, 2011, 8(7): 38-40.

[2] Curtis M P, Dwight W, Pratt J, et al. D-amino acid homopiperazine amides: Discovery of A-320436,a potent and selective non-imidazole histamine H(3) - receptor antagonist [J]. Arch Pharm, 2004, 337(4): 219-229.

[3] Imai M, Shiota T, Kataoka K I, et al. Small molecule inhibitors of the CCR2b receptor. Part 1: Discovery and optimization of homopiperazine derivatives [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14(21): 5407-5411.

[4] Moree W J, Kataoka K, Ramirez-Weinhouse M M, et al. Small molecule antagonists of the CCR2b receptor. Part 2: Discovery process and initial structure-activity relationships of diamine derivatives [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14(21): 5413-5416.

[5] 蔡留青. 高哌嗪的合成及工艺改进 [D]. 太原: 中北大学, 2009.

[6] 王道林, 钱建华, 刘　琳, 等. 高哌嗪的新合成法 [J]. 化学试剂, 2006, 28(5): 311-312.

[7] 陈赞民, 陈颖江. 气相色谱法测定氨茶碱及其制剂中乙二胺的含量 [J]. 药物分析杂志, 2012, 32(9): 1673-1676.

[8] 李世霞, 袁世柳, 耿春香. 毛细管柱气相色谱法测定工作场所空气中乙二胺的含量 [J]. 理化检验: 化学分册, 2018, 54(1): 106-108.

[9] 段　刚, 孙伏恩. 气相色谱法测定羟乙基乙二胺中的乙二胺含量 [J]. 分析测试技术与仪器, 2016, 15(4): 238-240.

[10] 刘　文, 马　平, 李　平, 等. 气相色谱内标法测定乙二胺、哌嗪及三乙烯二胺含量 [J]. 应用化工, 2014, 43(3): 554-556.

[11] 李　俊, 王英瑛. GC测定氧氟沙星和诺氟沙星中N-甲基哌嗪和哌嗪的残留量 [J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(3): 319-321.

[12] 钮小松, 刘华权, 杨　玲, 等. GC法检测羟乙基哌嗪中哌嗪含量的方法 [J]. 化工管理, 2019(18): 43-44.