

REFERENCES

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2010: 518-519.
- [2] WANG T J, DI Y P. Study on the content determination method of in Tianma Toutong tablets [J]. China Med Her(中国医药导报), 2007, 4(15): 156.
- [3] ZHAO C. Determination of gastrodin in Tianma Toutong Tablets by HPLC [J]. Res Pract Chin Med(现代中药研究与实践), 2007, 21(6): 41-43.
- [4] LIU X L, ZHAO Z G. Determination of gastrodin in Tianma Toutong tablets by HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2008, 17(14): 36-37.
- [5] JIANG H. Determination of imperatorin in Tianma Toutong tablets by HPLC [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2012, 32(12): 992-993.
- [6] CHEN J F, YUAN Z M, WANG J. Determination of ferulic acid in Tianma Toutong tablets by RP-HPLC [J]. China Med Her(中国医药导报), 2011, 4(2): 330-331.
- [7] ZHENG J, MAO C. Simultaneous determination of epigotrin, chlorogenic acid and liquiritin in Child Kechuanling granules by wavelength conversion HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(6): 727-731.
- [8] ZHANG X J, WANG Y Y, LI J. Simultaneous determination of seven active components in Mian'anning Mixture by HPLC under multiple UV wavelengths [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(2): 194-198.

收稿日期: 2015-08-04

柱前衍生化 GC 测定佐芬普利钙中间体光学杂质

郑一美¹, 苗飞², 周福富¹, 王平³(1.金华职业技术学院, 浙江 金华 321000; 2.浙江华海药业有限公司, 浙江 台州 317000; 3.浙江工业大学药学院, 杭州 310014)

摘要: 目的 建立测定佐芬普利钙中间体(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸的光学异构体杂质(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸含量的柱前衍生化 GC。方法 以高纯试剂 D-(+)-2-辛醇对(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸样品进行衍生化处理, 衍生产物以 Agilent DB-1701(30 m×0.53 mm, 1.0 μm)柱为分析柱, 以氮气为载气, 流速为 2.0 mL·min⁻¹, 检测器温度为 250 °C, 进样口温度为 200 °C, 柱温为程序升温, 进样量为 1.0 μL。结果 光学杂质(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸在 3.22~121.44 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好($r=0.995\ 2$), 定量限为 3.22 μg·mL⁻¹, 加样回收率为 99.6%~102.4%, 日内和日间精密度 RSD 均<2.0%。结论 该方法操作简便、专属性强, 试剂成本低廉、易得, 结果准确性高、重复性好, 可用于佐芬普利钙中间体(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸光学杂质的含量测定。

关键词: 佐芬普利钙; 中间体; 光学杂质; 气相色谱法; 柱前衍生化

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)03-0335-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.03.018

Determination of Optical Isomer Impurity in the Intermediate of Zofenopril Calcium by GC with Pre-column Derivatization

ZHENG Yimei¹, MIAO Fei², ZHOU Fufu¹, WANG Ping³(1.Jinhua Polytechnic, Jinhua 321000, China; 2.Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 317000, China; 3.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the quantitative determination of optical isomer impurity in the intermediate of zofenopril calcium by GC with pre-column derivatization. **METHODS** Using D-(+)-2-Octanol as pre-column derivatization reagent, the optimal chromatographic separation was performed on Agilent DB-1701(30 m×0.53 mm, 1.0 μm) column with nitrogen as the carrier gas at a flow rate of 2.0 mL·min⁻¹, the detector temperature was at 250 °C, the inlet temperature was at 200 °C. The temperature program was used. The injection volume was 1.0 μL. **RESULTS** The calibration curve was good linear relationship in the range of 3.22–121.44 μg·mL⁻¹ for the optical isomer impurity (R)-(+)-3-benzoyl thiol-2-methyl propionate($r=0.995\ 2$). The limit of quantification was 3.22 μg·mL⁻¹. The average recovery was 99.6%–102.4%. The RSD of intra and inter day were <2.0%. **CONCLUSION** The method is simple, specific and accurate with good repeatability, which can be used for the determination of optical isomer impurity in the intermediate of zofenopril calcium.

KEY WORDS: zofenopril calcium; intermediate; optical impurity; GC; pre-column derivatization

作者简介: 郑一美, 女, 硕士, 副教授

Tel: (0579)82264089

E-mail: jhyimei@163.com

佐芬普利钙为首个含巯基第 3 代长强效血管紧张素转化酶抑制剂, 在体内转化为佐芬普利拉发挥降压作用, 能有效治疗轻中度原发性高血压, 并对急性心肌梗死也有一定的疗效^[1-4]。而(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸是合成该降压药的重要原料, 因其光学异构体杂质(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸会对后续工艺产生极高的生产成本, 且如果残留到佐芬普利钙中, 则其降压作用将会大打折扣, 甚至产生严重的不良反应。因此, 控制中间体(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸的光学杂质(R)-异构体的含量具有十分重要的意义。

有文献报道使用手性色谱柱来拆分(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸^[5], 但由于该物质分子量较小, 空间结构差别不大, 所以对色谱柱的要求很高, 必须使用价格昂贵的手性色谱柱, 而且存在峰形不好、分离度较差以及灵敏度较低等问题。衍生化技术是通过化学反应将难以分析检测的目标化合物官能团定量转化为易于分析检测的化合物, 增加样品的挥发度或提高检测灵敏度, 通过对衍生物的分析检测, 可以对目标化合物进行定性和定量分析^[6]。本研究在文献[7-13]的基础上, 对(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸衍生反应条件进行优化, 确定了其光学异构体杂质的 GC, 该方法在国内尚未有报道。

1 仪器与试剂

Agilent 6890 色谱仪(包括 FID 检测器、Agilent 7683B 进样器、Agilent Chemstation 色谱工作站, 美国 Agilent); BSA 124S 电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸对照品(浙江华海药业有限公司, 光学纯度: 99.9%, 批号: 140829); (S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸供试品(浙江华海药业有限公司, 批号: 20141028, 20141029, 20141030); 正己烷、*N,N*-二甲基甲酰胺均为 ROE 公司生产的色谱纯试剂; 二氯亚砷、甲苯均为分析纯; D-(+)-2-辛醇(DAMAS-BETA, 光学纯度 $\geq 99.5\%$, 批号: P08461)。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱为 Agilent DB-1701(30 m \times 0.53 mm, 1.0 μ m); 柱温升温程序: 初始温度 100 $^{\circ}$ C, 保持 10 min, 以 20 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹ 升至 200 $^{\circ}$ C 并保持 6 min; 检测器温度为 250 $^{\circ}$ C, 进样口温度为 200 $^{\circ}$ C, 分

流比为 10:1, 氮气为载气, 流速为 2.0 mL \cdot min⁻¹, 进样量为 1.0 μ L。

2.2 溶液配制

2.2.1 衍生化试液的配制 精密量取 2.5 mL 氯化亚砷置于 25 mL 量瓶中, 用正己烷溶解并稀释至刻度, 加入 2.5 μ L *N,N*-二甲基甲酰胺, 混匀, 得溶液 A; 精密量取 2.0 mL D-(+)-2-辛醇置于 20 mL 量瓶中, 用甲苯溶解并稀释至刻度, 混匀, 得溶液 B; 衍生化试液均在 4~8 $^{\circ}$ C 下储存。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸对照品 10 mg, 置于 20 mL 量瓶中, 用溶液 A 溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备液。精密吸取对照品储备液适量, 用溶液 A 配制成 100 μ g \cdot mL⁻¹ 的溶液, 再精密吸取该溶液 1.0 mL, 置于 5.0 mL 的反应瓶中, 密封, 室温放置 30 min 后, 在 60 $^{\circ}$ C 下氮气吹干。然后加入 1.0 mL 的溶液 B, 密封, 60 $^{\circ}$ C 下保温反应 30 min, 冷却至室温, 得对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸样品 5.0 mg, 置于 5.0 mL 的反应瓶中进行衍生化, 加入 1.0 mL 溶液 A, 密封, 按“2.2.2”项下对照品溶液制备方法进行衍生化反应。

3 结果

3.1 衍生化试剂用量的选择

保持(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸的浓度不变, 考察溶液 A 中加入二氯亚砷 0.5, 2.5, 5.0 mL 及溶液 B 中加入 D-(+)-2-辛醇 0.4, 2.0, 4.0 mL 对衍生化反应效果的影响。结果显示, 衍生化反应在溶液 A 中加入二氯亚砷 2.5 mL、溶液 B 中加入 D-(+)-2-辛醇 2.0 mL 时, 其生成的衍生物色谱峰面积数值趋于稳定, 表明反应已完全, 衍生试剂用量的微小差别不会对衍生结果产生影响。结果见表 1。

表 1 衍生化试剂用量的影响($n=3$)

Tab. 1 The influence of amount of derivatization reagents ($n=3$)

溶液 A 中氯化亚砷体积/mL	溶液 B 中 D-(+)-2-辛醇体积/mL	衍生物单位浓度峰面积	反应率/%	RSD/%
0.5	2.0	30.997	97.9	1.17
2.5	2.0	31.639	100.0	
5.0	2.0	31.581	99.8	
2.5	0.4	30.999	98.0	1.02
2.5	2.0	31.639	100.0	
2.5	4.0	31.429	99.3	

3.2 衍生化反应时间和温度的影响

分别在加入溶液 A 后温度为 25, 35, 45 °C, 加入溶液 B 后温度为 50, 60, 70 °C 时, 考察衍生化反应效果。表 2、表 3 结果表明, 衍生化反应完成迅速, 反应温度和反应时间对衍生化反应率影响较小。

表 2 衍生化反应温度的影响($n=3$)

Tab. 2 The influence of reaction temperature($n=3$)

加入溶液 A 后的 衍生反应温度/°C	加入溶液 B 后的 衍生反应温度/°C	衍生物单位 浓度峰面积	反应率/ %	RSD/ %
25	60	31.639	100.0	0.06
35	60	31.623	99.9	
45	60	31.643	100.0	
25	50	31.006	98.0	1.11
25	60	31.639	100.0	
25	70	31.588	99.8	

表 3 衍生化反应时间的影响($n=3$)

Tab. 3 The influence of reaction time($n=3$)

加入溶液 A 后的 衍生反应时间/min	加入溶液 B 后的 衍生反应时间/min	衍生物单位 浓度峰面积	反应率/ %	RSD/ %
20	30	31.048	98.2	1.02
30	30	31.639	100.0	
40	30	31.622	99.9	
30	20	31.021	98.0	1.09
30	30	31.639	100.0	
30	40	31.534	99.7	

为保证衍生化反应彻底完成, 最终选择反应时间为 30 min, 加入溶液 A 的反应温度为室温, 加入溶液 B 的反应温度为 60 °C。

表 1~3 中衍生化反应率是以其他条件下得到的衍生物单位浓度峰面积之比, 除以方法规定反应条件下得到的衍生物单位浓度峰面积之比。

3.3 方法专属性考察

精密称取一定重量的(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸供试品, 用浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液作为稀释液, 配制成含 2% (R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸对照品的供试液。按“2.2.2”项下对照品溶液制备方法进行衍生化反应后, 按“2.1”项下色谱条件分别对空白衍生化溶液、对照品溶液以及上述含 2% 异构体杂质(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸的供试液进行分析。异构体杂质与主峰具有良好的分离度, 过量的衍生化试剂在 2.1 min 左右出峰, 不会对(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸(出峰时间 8.1 min)和(S)-(-)-3-苯甲酰巯

基-2-甲基丙酸(出峰时间 8.7 min)产生干扰。色谱图见图 1。

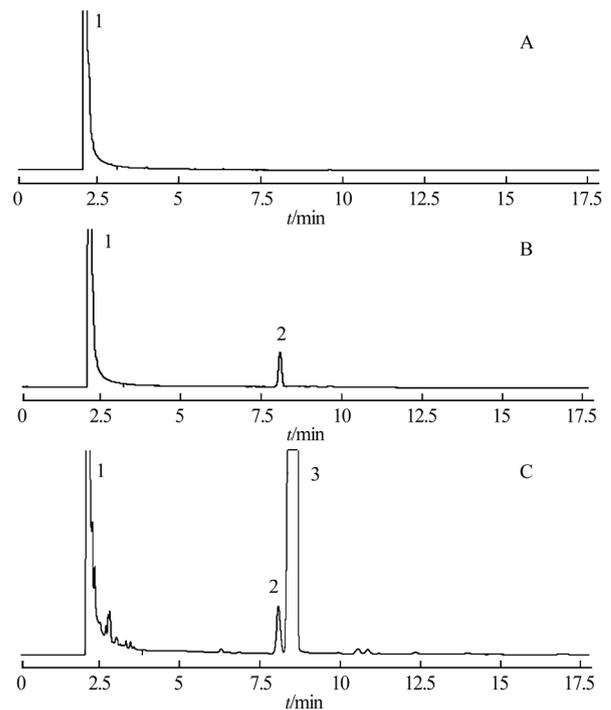


图 1 (S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸衍生化产物色谱图 A-空白衍生化试液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-溶剂峰; 2-(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸衍生物; 3-(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸衍生物。

Fig. 1 Chromatogram of the derivative products of (S)-(-)-3-benzoyl thiol-2-methyl propionate

A-blank; B-reference substance; C-sample; 1-solvent; 2-derivatives of (R)-(+)-3-benzoyl thiol-2-methyl propionate; 3-derivatives of (S)-(-)-3-benzoyl thiol-2-methyl propionate.

3.4 线性关系、检出限及定量限试验

分别精密吸取对照品储备液适量, 制成 3.22, 11.04, 33.12, 55.20, 72.86, 97.15, $121.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸系列溶液, 按“2.2.2”项下对照品溶液制备方法进行衍生化反应后, 再按“2.1”色谱条件测定, 记录色谱图, 以峰面积(A)对质量浓度(c)进行线性回归, 得回归方程为 $A=1.8684c+5.6561$, $r=0.9952$, (R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸在 $3.22\sim 121.44 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系, 方法的检测限和定量限分别为 1.07, $3.22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.5 精密度试验

对同一批(S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸样品 1 d 内平行测定 6 次得日内精密度, 连续测定 3 d 得日间精密度。测得的(R)-异构体含量的 RSD 分别为 0.89%, 0.97%, 表明本方法的精密度良好。

3.6 加样回收率试验

取已知杂质含量的一定量供试品 9 份, 分别加入不同体积的(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸对照品储备液, 按“2.2.2”项下对照品溶液制备方法, 使(R)-异构体的最终质量浓度分别为 3.320, 3.313, 3.326, 96.62, 96.45, 96.51, 126.14, 121.01, 120.60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。衍生化反应后, 以实际测得的(R)-(+)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸的浓度与加入浓度的比值来计算回收率, 低、中、高浓度的回收率分别为 102.4%, 99.6%和 99.8%, RSD 分别为 1.40%, 1.03%和 1.75%, 表明该方法的准确度良好。

3.7 稳定性试验

将按“2.2.3”项下方法配制的供试品溶液室温放置, 分别于第 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 天后进样测定, 测得峰面积的 RSD 为 1.99%。表明衍生化后所得的供试品溶液 7 d 内不会发生消旋或分解反应, 稳定性良好。

3.8 样品中 R-光学异构体杂质的含量测定

取 3 批样品, 按建立的方法制成供试品溶液后分别进样测定, 以外标法和面积归一化法计算含量, 结果见表 4。

表 4 光学异构体杂质含量测定结果($n=3$)

Tab. 4 The determination results of optical isomers impurity($n=3$)

批号	外标法/%	面积归一化法/%
20141028	0.873	0.861
20141029	0.869	0.877
20141030	0.878	0.875

4 讨论

实验中发现进样浓度较低时, (S)-(-)-3-苯甲酰巯基-2-甲基丙酸和其对映体杂质的分离度比较好, 但进行痕量分析时, 需要一个适当的进样浓度来保证检测灵敏度, 所以在专属性试验时要加入一定量的杂质对照品。

本实验建立的衍生化方法中使用的手性试剂 D-(+)-2-辛醇在市场上易得到, 光学纯度高, 且衍生化反应条件易于控制, 操作简便, 产物稳定。按外标法和面积归一化法 2 种计算方法所得的光学杂质含量差异不大, 因此, 即使没有对照品, 也能方便、准确地进行定量测定。

药物中间体经生化反应后的药物分子碳链加长, 空间位阻增大, 沸点也大大降低, 从而达到在普通色谱柱上也能实现分离的目的。这为降压药佐芬普利钙生产过程的中间体和成品的质量控制提供了快速、准确、低成本的检测方法。

REFERENCES

- [1] RUAN J Y, QU M J, JIANG D P, et al. Synthesis and characterization of (S)-3-benzoylthio-2-methylpropionic acid [J]. Chem Indust Engin Prog(化工进展), 2012, 31(5): 1130-1133.
- [2] QIN X Y, LU X Z, ZHANG H, et al. Influence of zofenopril to rats hypertrophic cardiomyocytes on ACE2 and Mas [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2014, 30(1): 11-13.
- [3] WEN Y P. Clinical results of zofenopril in the treatment of mild-and moderate-hypertension [J]. J Youjiang Med School(右江民族医学院学报), 2010, 32(6): 831-833.
- [4] ZHAO X L, ZHOU H, LI J J, et al. Efficacy and safety of zofenopril in the treatment of Mild to moderate hypertension [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2009, 18(11): 1005-1007.
- [5] 刘武威. 气相色谱方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [6] 王立, 汪正范. 色谱分析样品处理[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [7] WU Y L, MAO S L, MIAO J K, et al. Determination of Related Substances in Zofenopril Calcium by RP-HPLC [J]. China Pharm(中国药业), 2011, 20(1): 37-38.
- [8] WU F, GAO F, DING L, et al. Determination of zofenopril and its active metabolite zofenoprilat by a new derivative LC-MS method and their pharmacokinetics in healthy Chinese volunteers [J]. J China Pharm Univ(中国药科大学学报), 2009, 40(4): 353-358.
- [9] YANG S C, ZHANG H, WANG J H, et al. Quantification of acrylamide in foods by gas chromatography-mass spectrometry coupled with pre-column derivatization [J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2011, 29(5): 404-408.
- [10] TAN L, YANG Y, ZHANG Q. Determination of the contents of monosaccharide components in non-starch polysaccharides of aerial part of *Apium graveolens* L. by pre-column derivatization GC [J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2011, 28(1): 40-46.
- [11] CHEN Z W, LI Y C, BAO M J. Determination of glycine and taurine in pulvis fellis suis conjugated cholic acid by pre-column derivatization HPLC [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 3(2): 288-290.
- [12] WANG J Z, HU G Y, ZENG S. Determination of optical impurity in *L*-norephedrine hydrochloride by RP-HPLC with pre-column derivatization [J]. Chin Pharm J(中国药理学杂志), 2009, 44(16): 1266-1268.
- [13] LI H J, GAO Z Q. Determination of zofenopril by high performance liquid chromatography [J]. J Taiyuan Univ Sci Technol(太原科技大学学报), 2009, 30(6): 510-513.

收稿日期: 2015-05-23