

顶空气相色谱法测定依帕司他有机溶剂残留量

张巍^{1,2}, 蔡犇², 李范珠^{1*} (1.浙江中医药大学, 杭州 310053; 2.浙江永宁药业股份有限公司, 浙江 台州 318020)

摘要: **目的** 建立测定依帕司他原料药中残留有机溶剂甲醇、乙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、甲苯的检测方法, 为建立质量标准提供依据。 **方法** 采用 DB-624 毛细管柱(30 m×0.53 mm, 3.0 μm), 氢火焰离子化检测器(FID), 进样口温度 210 °C, 检测器温度 250 °C, 程序升温, 流速 3.0 mL·min⁻¹, 分流比 10:1, 顶空平衡温度 85 °C, 平衡时间 30 min, 按内标法(内标物叔戊醇)测定各残留溶剂的含量。 **结果** 药物中 7 种残留溶剂的精密度 RSD 均<5%, 在各自的浓度范围内具有良好的线性关系, 相关系数均>0.999, 平均回收率为 90.0%~100.0%。 **结论** 本方法专属性好, 灵敏度高, 操作简单, 测定结果准确, 适用于依帕司他原料药 7 种残留溶剂的同时测定。

关键词: 依帕司他; 残留溶剂; 顶空气相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)09-1286-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.09.015

引用本文: 张巍, 蔡犇, 李范珠. 顶空气相色谱法测定依帕司他有机残留溶剂的残留量[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(9): 1286-1288.

Determination of Residual Organic Solvents in Epalrestat by Headspace GC

ZHANG Wei^{1,2}, CAI Ben², LI Fanzhu^{1*} (1.Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2.Zhejiang Yongning Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 318020, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of residual solvents (methanol, ethanol, dichloromethane, *n*-hexane, ethyl acetate, tetrahydrofuran, toluene) in epalrestat for controlling the quality of epalrestat. **METHODS** The solvents were separated on DB-624 capillary column(30 m×0.53 mm, 3.0 μm) with programming temperature, and detected using hydrogen flame ionization detector(FID). The headspace and other chromatographic conditions were as follows: 250 °C of detector temperature, 3.0 mL·min⁻¹ of flow rate, 10:1 of split ratio, 210 °C of inlet temperature, 85 °C of equilibrium temperature and 30 min of equilibrium time. The contents of residual solvents were determined according to the internal standard method(internal standard tert-amyl alcohol). **RESULTS** There were good linear relationship in the concentration ranges with correlation coefficient above 0.999, respectively. The precisions (RSD values) were less than 5% in all seven kinds of residual solvents, and the average recoveries were within 90.0%–100.0%. **CONCLUSION** This method had good specificity, high sensitivity, simple operation and accurate results. It was suitable for the determination of above 7 kinds of residual solvents in Epalrestat API at same time.

KEY WORDS: epalrestat; residual solvent; headspace GC

依帕司他是醛糖还原酶特异性抑制剂, 通过阻断多元醇通路而发挥作用, 主要用于治疗糖尿病神经病变, 不仅对糖尿病周围神经病变有效, 而且对自主神经病变也有效^[1]。依帕司他辅助治疗早期糖尿病视网膜病变可显著提高临床疗效, 减轻机体氧化应激及炎症反应^[2]。杨卫华^[3]在临床研究中证实依帕司他治疗中度非增生性糖尿病视网膜病变的疗效优于羟苯磺酸钙胶囊。国内目前关于依帕司他合成工艺的文献报道较少且都是早期的^[4-6], 本实验室对于依帕司他合成工艺进行了重新设计和优化, 大大提高了产品的纯度和收率。在该药的合成、精制过程中, 需要用到甲醇、乙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、

甲苯 7 种有机溶剂, 为保障用药安全, 根据中国药典和 ICH 对有机溶剂残留量测定的指导原则, 需对残留溶剂建立测试方法并进行限度测定。本实验建立毛细管柱顶空气相色谱法, 测定依帕司他工艺中用到的 7 种溶剂, 并进行方法学考察。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 7890 气相色谱仪(美国 Agilent 公司), 7697A 顶空进样器, 氢火焰离子化检测器(FID), 安捷伦气相色谱工作站。

1.2 材料

甲醇(批号: 20140605, 纯度: 99.5%)、乙醇(批号: 20140606, 纯度: 99.5%)、二氯甲烷(批号:

作者简介: 张巍, 男 Tel: (0576)84082002 E-mail: kirkwei3@hotmail.com
E-mail: lifanzhu@zcmu.edu.cn

*通信作者: 李范珠, 男, 博士, 教授 Tel: (0571)86633030

20140606, 纯度: 99.5%)、正己烷(批号: 20130923, 纯度: 99.5%)、乙酸乙酯(批号: 20130116, 纯度: 99.5%)、四氢呋喃(批号: 20140420, 纯度: 99.5%)、甲苯(批号: 20140308, 纯度: 99.5%)、叔戊醇(批号: 20140209, 纯度: 99.5%); *N,N*-二甲基甲酰胺(批号: 20130312, 纯度: 99.5%), 以上对照品及试剂均购买于国药集团化学试剂有限公司。依帕司他原料药由本实验室自制, 批号 140801-03。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

毛细管色谱柱为 DB-624(30 m×0.53 mm, 3.0 μm)(6%氰丙基苯-94%二甲基硅氧烷); 初始温度为 40 ℃, 维持 6 min, 再以每分钟 10 ℃速率升至 120 ℃, 维持 1 min, 再以每分钟 20 ℃速率升至 210 ℃, 维持 4 min; 载气为氮气, 流速为 3.0 mL·min⁻¹, 进样口温度为 210 ℃; 检测器温度为 250 ℃; 顶空瓶平衡温度为 85 ℃, 定量环温度为 95 ℃, 传输管线温度为 105 ℃, 瓶加热时间为 30 min, 平衡时间为 30 min; 顶空瓶体积为 20 mL, 加入被测液体为 2 mL, 分流比为 10:1。

2.2 溶液制备

2.2.1 内标液的配制 称取叔戊醇约 100 mg, 置于 200 mL 量瓶中, 用 DMF 稀释至刻度, 混匀。

2.2.2 对照品溶液的配制 精密称取各对照溶剂适量, 用内标溶液定量稀释制成每 1 mL 中含甲醇 300 μg、乙醇 500 μg、二氯甲烷 60 μg、正己烷 29 μg、四氢呋喃 72 μg、乙酸乙酯 500 μg、甲苯 89 μg 的混合溶液, 精密量取 2 mL, 置 20 mL 顶空瓶中。

2.2.3 供试品溶液的配制 取本品约 0.2 g, 精密称定, 置 20 mL 顶空瓶中, 精密加入内标溶液 2 mL, 使溶解。

2.3 专属性试验

取内标液 2 mL, 置顶空瓶, 按“2.1”项下色谱条件测试, 记录色谱图, 与对照品图谱和供试品图谱比较。结果表明: 溶剂对样品测试无干扰, 溶剂峰和主峰分离良好。见图 1。

2.4 线性和范围

精密称取 301.5 mg 甲醇、503.5 mg 乙醇、60.0 mg 二氯甲烷、29.3 mg 正己烷、508.9 mg 乙酸乙酯、70.5 mg 四氢呋喃和 88.1 mg 甲苯到一个含 25 mL 内标液的 100 mL 量瓶, 再加入内标液稀释到刻度, 混匀作为对照储备溶液。分别量取上

述溶液 1, 2, 3, 4, 5 mL 到 50 mL 量瓶, 用内标液稀释到刻度, 即分别得到相对对照品溶液浓度为 20%, 40%, 60%, 80%, 100% 的系列溶液。分别移取 2 mL 溶液到顶空瓶, 依次进样。记录色谱图, 计算回归方程。线性测试结果见表 1。

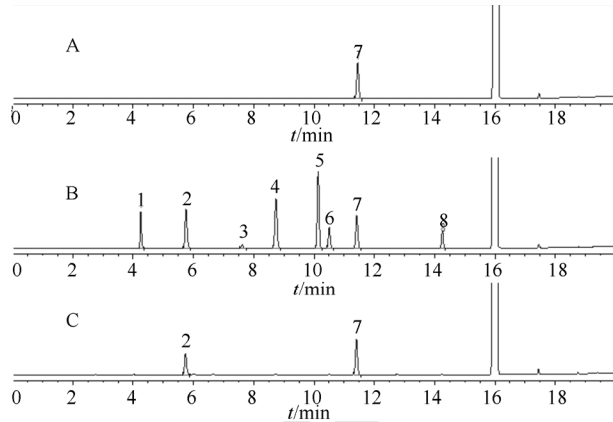


图 1 气相色谱图

A-空白内标溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-甲醇; 2-乙醇; 3-二氯甲烷; 4-正己烷; 5-乙酸乙酯; 6-四氢呋喃; 7-叔戊醇; 8-甲苯。

Fig. 1 GC chromatograms

A-blank; B-standard solution; C-sample solutions; 1-methanol; 2-ethanol; 3-dichloromethane; 4-*n*-hexane; 5-ethyl acetate; 6-tetrahydrofuran; 7-tert-amyl alcohol; 8-toluene.

表 1 线性关系测试结果

Tab. 1 Test results of linear relationship

溶剂	回归方程	<i>r</i>	线性范围/ mg·mL ⁻¹
甲醇	$y=0.673\ 6x+0.005\ 9$	0.999 6	0.060~0.300
乙醇	$y=1.145\ 3x+0.005\ 4$	0.999 8	0.100~0.501
二氯甲烷	$y=0.093\ 6x+0.001\ 5$	0.999 8	0.012~0.060
正己烷	$y=1.539\ 6x+0.019\ 4$	0.999 9	0.006~0.029
乙酸乙酯	$y=2.048\ 2x+0.033\ 1$	0.999 9	0.101~0.506
四氢呋喃	$y=0.538\ 4x+0.014\ 4$	0.999 9	0.014~0.070
甲苯	$y=0.421\ 1x+0.006\ 8$	1.000 0	0.018~0.088

2.5 精密度

2.5.1 仪器精密度及重复性 取对照品溶液 2 mL 至 20 mL 顶空瓶中, 按“2.1”项下色谱条件顶空进样 5 次, 计算每种溶剂峰面积与内标峰面积比值的 RSD。结果甲醇、乙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、甲苯色谱峰与内标叔戊醇峰面积比值的 RSD 分别为 0.8%, 0.4%, 0.8%, 2.0%, 0.9%, 0.9%, 0.5% ($n=5$)。取供试品约 0.2 g, 精密称定, 置顶空瓶中, 精密加入内标溶液 2 mL 使溶解, 重复测定 6 份, 结果除乙醇外, 其他残留溶剂均未检出, 乙醇测定值的 RSD 为 1.4% ($n=6$)。

2.5.2 中间精密度 由同一人员于不同时间, 分别测试同一样品残留溶剂的含量。两次测定的中

间精密度的 RSD 为 1.5%。

重复性和中间精密度测试结果说明此法具有良好的精密性。

2.6 检测限

精密性试验中除乙醇检出外，其余残留溶剂均未检出，故选择响应值低(A/C)的乙醇作为代表；吸取 0.676 mL 对照储备溶液加内标液稀释至 100 mL，混匀；分别移取 2 mL 溶液到顶空瓶。平行制备 3 份；按“2.1”项下色谱条件测试，色谱峰响应值满足信噪比 $S/N=3$ 。乙醇的最低检测限浓度为 $3.39 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7 回收率

标准溶液：移取“2.4”项下对照储备溶液 4.0, 5.0, 6.0 mL 到 50 mL 量瓶，用稀释液稀释到刻度，混匀，分别得到相对标准溶液浓度为 80%, 100%, 120% 的 3 个溶液。回收率测试液：精密称取约 200 mg 的供试品到顶空瓶 9 份，分别加入 80%, 100%, 120% 的 3 个浓度的溶液 2 mL。每个浓度准备 3 份，按照前述分析方法测定。结果甲醇的平均回收率为 97.02%，RSD 为 2.3%，乙醇的平均回收率为 98.89%，RSD 为 2.7%，二氯甲烷的平均回收率为 98.22%，RSD 为 2.1%；正己烷的平均回收率为 94.29%，RSD 为 2.7%；四氢呋喃的平均回收率为 98.07%，RSD 为 1.8%；乙酸乙酯的平均回收率为 95.62%，RSD 为 2.0%；甲苯的平均回收率为 97.27%，RSD 为 1.1%。

2.8 耐用性

分别考察顶空进样口温度改变 $\pm 10^\circ\text{C}$ 、检测器温度改变 $\pm 10^\circ\text{C}$ 、流速改变 $\pm 0.5 \text{ mL}$ 对色谱行为的影响。耐用性试验结果表明进样口温度、检测器温度、流速的适当改变，其最低的理论板数 ($N \geq 27662$)、最低的分离度 ($R \geq 2.8$)、各溶剂峰面积与内标峰面积比值的相对标准偏差最大 ($\text{RSD} \leq 2.1\%$) 均能满足系统适用性要求，对检测结果没有影响。

2.9 样品测定

取 3 批样品，精密称取 0.2 g 到顶空瓶中，加内标液 2 mL 溶解，按“2.1”项下色谱条件进行测试，以内标法计算。3 批供试品的残留溶剂结果均符合中国药典对残留溶剂的规定。

3 讨论

3.1 溶剂的选择

依帕司他为水难溶性药物，可溶解于 DMF 中，

且 DMF 在专属性试验中与各溶剂对照分离良好，不干扰样品的测试，故选择 DMF 为测试溶剂。

3.2 内标的选择

顶空气相色谱存在的最大问题是进样体积不准。选择与残留溶剂分离良好的叔戊醇为内标物，可消除由进样体积带来的误差，提高检测的准确度。

3.3 色谱柱的选择

由于甲醇、乙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、甲苯 7 种溶剂极性差异较大，色谱柱极性太大或者太小都不利于分离，通过比较，选择中等极性的 DB-624 色谱柱，配合程序升温可很好地分离 7 种有机溶剂。

3.4 柱温的选择

7 种残留溶剂和内标液中，甲醇、乙醇沸点较低，乙酸乙酯和四氢呋喃极性接近，较难分离，而甲苯沸点较高，DMF 沸点最高为 153°C ，故选择较低的初始温度，然后采用程序升温的方法有效地分离各残留溶剂。

本实验采用顶空气相色谱法对依帕司他原料药 7 种残留溶剂进行检测。结果表明该色谱条件下各残留溶剂分离良好，精密度高，在考察浓度范围内具有良好的线性关系 ($r > 0.999$)，回收率为 90.0%~100.0%，符合中国药典关于有机溶剂残留量测定的要求，可以作为依帕司他原料药中残留溶剂的质量控制方法。

REFERENCES

- [1] ZHENG Q R, SU Q. Pharmacologic actions and clinical utility of epalrestat [J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床杂志), 2006, 25(11): 876-884.
- [2] LAI X N, DU H Y, LIAO W F. Effect of epalrestat for auxiliary treatment of early diabetic retinopathy and its influence on serum oxidative stress and inflammation factors [J]. China Pract Med(中国实用医药), 2017, 12(1): 11-13.
- [3] YANG W H. Clinical efficacy of Epalrestat for moderate non-proliferative diabetic retinopathy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(1): 107-110.
- [4] SHENG R, LIU T, HU Y Z. Improved method of epalrestat synthesis [J]. J Zhejiang Univ(Med Sci)(浙江大学学报: 医学版), 2003, 32(4): 356-358.
- [5] LI Y Z, LAI Y S, LIANG C Y. A study on the synthetic technology of epalrestat [J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2001, 11(3): 165-167.
- [6] YU S H, YANG F L, ZHU Q, et al. Synthesis of epalrestat [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 1996, 27(1): 5-6.

收稿日期: 2017-04-26

(本文责编: 曹粤锋)