

顶空气相色谱法测定对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药中 5 种有机溶剂的残留量

田太平, 许军*, 刘燕华, 王晨, 易梦娟, 李豫园, 刘波(江西中医药大学药学院, 南昌 330004)

摘要: 目的 建立顶空气相色谱法测定对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药中乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶和甲苯有机残留溶剂的方法。方法 采用检测器为氢火焰离子化检测器(FID), 色谱柱为 Agilent DB-624 毛细管柱(30 m×0.32 mm, 1.8 μm), 溶剂为 DMSO, 进样口温度为 200 ℃, 检测器温度 250 ℃, 分流比为 10:1, 程序升温, N₂ 为载气, H₂ 和空气为燃气, 顶空平衡温度 85 ℃, 平衡时间 30 min, 进样体积 1 μL。结果 乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶和甲苯在建立的色谱条件下均能完全分离, 分离度均>1.5, 理论板数均>10 000; 在考察浓度范围内线性关系良好(相关系数 *r* 分别为 0.999 8, 0.999 8, 0.999 7, 0.999 6, 0.999 4); 定量限分别为 19.83, 4.50, 48.28, 10.44, 2.08 μg·mL⁻¹; 检测限分别为 3.97, 0.90, 9.66, 3.07, 0.69 μg·mL⁻¹; 重复性 RSD 均<2.5%; 平均回收率为 102.40%~106.45%; 对照品溶液在 24 h 内稳定性良好。结论 该方法操作简便、灵敏, 结果准确、可靠, 可用于对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药中有机溶剂残留量的控制。

关键词: 顶空气相色谱法; 对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯; 原料药; 有机溶剂; 残留量

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2018)01-0041-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.01.009

引用本文: 田太平, 许军, 刘燕华, 等. 顶空气相色谱法测定对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药中 5 种有机溶剂的残留量[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(1): 41-44.

Determination of Five Organic Solvent Residues in *p*-Chlorophenoxyisobutyric Acid Methoxyphenyl Acrylate by Head Space Gas Chromatography

TIAN Taiping, XU Jun*, LIU Yanhua, WANG Chen, YI Mengjuan, LI Yuyuan, LIU Bo(College of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a head space gas chromatography method for determination of ethanol, acetone, chloroform, pyridine and toluene residual solvents in active pharmaceutical ingredients of *p*-chlorophenoxyisobutyric acid methoxyphenyl acrylate. **METHODS** The experiment was carried out by headspace gas chromatography with a detector for the hydrogen flame ionization detector (FID) and the column for the Agilent DB-624 capillary column(30 m×0.32 mm, 1.8 μm). The sample was dissolved in DMSO solvent. The temperature of inlet was 200 ℃ and the temperature of detector was 250 ℃. The split ratio was set to 10:1. Program temperature was used in the whole process, and the N₂ was used as carrier gas, H₂ and air were used as burn gas. The headspace balance temperature was 85 ℃, and the balance time was 30 min. In such conditions, the sample was injected 1 μL each time. **RESULTS** Ethanol, acetone, chloroform, pyridine and toluene could be completely separated in the established method, *R* were all >1.5, *N* were all >10 000; the linear relationship was good in the investigated mass concentration degree(*r* was 0.999 8, 0.999 8, 0.999 7, 0.999 6, 0.999 4); the limit of quantification was 19.83, 4.50, 48.28, 10.44, 2.08 μg·mL⁻¹, respectively; limit of detection was 3.97, 0.90, 9.66, 3.07, 0.69 μg·mL⁻¹ respectively; RSD were all <2.5%; the average recoveries were within 102.40%~106.45%; the reference substance kept stable within 24 h. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, with accurate and reliable results, which can be applied on the organic solvent residue control of *p*-chlorophenoxyisobutyric acid methoxyphenyl acrylate.

KEY WORDS: head space gas chromatography; *p*-chlorophenoxyisobutyric acid methoxyphenyl acrylate; active pharmaceutical ingredients; organic solvent; residue

对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯是经过结构改造、筛选所得具有降血脂作用的创新先导化合物^[1], 其化学结构式见图 1, 为白色针状结晶, 熔点为 143~144 ℃, 微溶于水, 加热后其溶解度

基金项目: 江西省科技专项(20121BBG70022); 江西省卫生厅科技计划项目(20122028)

作者简介: 田太平, 男, 硕士生 Tel: 13155817780 E-mail: 1205521330@qq.com *通信作者: 许军, 男, 教授 Tel: (0791)87118908 E-mail: xujun881@163.com

增加,难溶于石油醚、苯,易溶于氯仿、丙酮等有机溶剂,具有较好的耐热性和良好的吸光作用,尤其是对 290~330 nm 的紫外线。前期大鼠长期毒性与小鼠急性毒性的实验证明,高剂量的对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯对肾功能的影响较小,停药后小鼠肝肾损伤可逆,未出现药物延迟性毒性反应。因此推断,临床拟用剂量($8.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)应该有较好的安全性^[2]。此外,经临床前动物实验研究发现,对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯能够较好的从胃肠道吸收,且能较好地降低高脂饲料所致高血脂症大鼠的血脂水平,可作为降血脂候选药物^[3]。

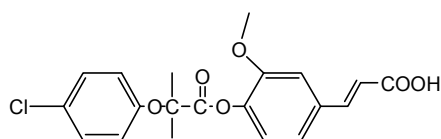


图 1 对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯化学结构式
Fig. 1 The chemical structure of *p*-Chlorophenoxyisobutyric acid methoxyphenyl acrylate

对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯在制备过程中使用了乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶和甲苯等有机溶剂。按照中国药典 2015 年版四部残留溶剂测定法的规定^[4],三氯甲烷、吡啶、甲苯均为第 2 类限制残留量的溶剂,乙醇、丙酮均为第 3 类低毒性溶剂,这些有机溶剂对人体具有一定的危害,故应严格控制原料药的有机溶剂残留量在规定范围内,保证原料药的质量安全。目前尚未有对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药有机溶剂残留量的文献报道^[5-6]。本实验采用毛细管气相色谱法配以顶空进样,对原料药中的乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶和甲苯残留溶剂进行测定分析。

1 仪器与试药

Agilent 7890B 型气相色谱仪、Agilent 7697A 顶空进样器[Agilent 科技(中国)有限公司];BS124S 电子分析天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司)。

DMSO(色谱纯,上海星可高纯溶剂有限公司,批号:161170401,纯度 $\geq 99.9\%$);乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶、甲苯(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号分别为 20161210,20160910,20160720,20160321,20160421,含量均 $\geq 99.5\%$);对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯(自制,批号分别为 20160910,20160918,20160925,纯度 $> 99.0\%$)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent DB-624 毛细管柱($30 \text{ m} \times 0.32 \text{ mm}$, $1.8 \mu\text{m}$);进样口温度: $200 \text{ }^\circ\text{C}$;FID 检测器温度: $250 \text{ }^\circ\text{C}$;程序升温:初始温度 $45 \text{ }^\circ\text{C}$ (维持 2 min),以 $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 $120 \text{ }^\circ\text{C}$ (维持 4 min),以 $30 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 $220 \text{ }^\circ\text{C}$ (维持 5 min);分流比: 10:1;流量: $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; N_2 为载气, H_2 和空气为燃气;顶空平衡温度: $85 \text{ }^\circ\text{C}$;平衡时间: 30 min;定量环温度: $90 \text{ }^\circ\text{C}$;传输线温度: $100 \text{ }^\circ\text{C}$;进样体积 $1 \mu\text{L}$ 。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品储备溶液的配制 分别精密量取乙醇 79.3 mg、丙酮 18.0 mg、三氯甲烷 193.1 mg、吡啶 30.7 mg、甲苯 20.8 mg,置 50 mL 量瓶中,加 DMSO 稀释至刻度,混匀,备用。

2.2.2 供试品溶液配制 精密称取供试品 100 mg,置于 20 mL 顶空瓶中,精密加入 2 mL DMSO,加盖密封,室温下超声溶解,1 min 即得供试品溶液。

2.2.3 对照品溶液配制 准确量取 5 mL 对照品储备溶液,置 25 mL 量瓶中,加 DMSO 稀释至刻度,混匀即得。

2.3 系统适用性试验考察

按“2.2”项下的方法制备对照品储备溶液和供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,色谱图见图 2。结果显示,色谱图中乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶、甲苯峰的分离度均 >1.5 ,理论板数均 $>10\ 000$,分离度符合要求,其保留时间分别为乙醇 2.792 min、丙酮 3.178 min、三氯甲烷 5.178 min、吡啶 7.786 min、甲苯 7.942 min。

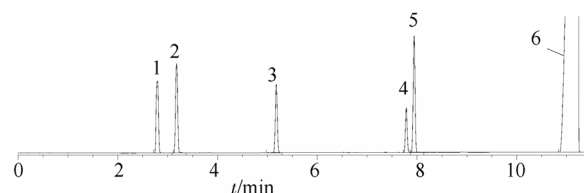


图 2 有机溶剂残留气相色谱图
1-乙醇; 2-丙酮; 3-三氯甲烷; 4-吡啶; 5-甲苯; 6-溶剂(二甲亚砜)。
Fig. 2 GC chromatograms of residual organic solvents
1-ethanol; 2-acetone; 3-chloroform; 4-pyridine; 5-toluene; 6-solvent(dimethyl sulfoxide).

2.4 线性关系考察

精密称取乙醇 80.6 mg、丙酮 20.1 mg、三氯

甲烷 200.8 mg、吡啶 48.3 mg、甲苯 12.1 mg，置 50 mL 量瓶中，加 DMSO 稀释至刻度，混匀作为对照品溶液 1；吸取 5 mL 上述对照品溶液 1 置 10 mL 量瓶中，加 DMSO 溶解并稀释至刻度，混匀作为对照品溶液 2；精密吸取 5 mL 上述对照品溶液 2 置 10 mL 量瓶中，加 DMSO 溶解并稀释至刻度，混匀作为对照品溶液 3；精密吸取 5 mL 上述对照品溶液 3 置 10 mL 量瓶中，加 DMSO 溶解并稀释至刻度，混匀作为对照品溶液 4；精密吸取 5 mL 上述对照品溶液 4 置 10 mL 量瓶中，加 DMSO 溶解并稀释至刻度，混匀作为对照品溶液 5；精密吸取 2 mL 上述对照品溶液 5 置 10 mL 量瓶中，加 DMSO 溶解并稀释至刻度，混匀作为对照品溶液 6；分别取样 2 mL 置 20 mL 顶空瓶中，密封，按“2.1”项下色谱条件进行测定。各个对照品溶液重复进样 2 次，计算每个溶剂的平均值。分别以 5 种残留溶剂浓度(X)为横坐标，以峰面积(Y)为纵坐标，建立回归方程，结果见表 1。

2.5 定量限与检测限考察

将“2.4”项下对照品溶液 4 依次用 DMSO 稀释，按“2.1”项下色谱条件进样分析，以信噪比 $S/N=3$ 计算检测限，以信噪比 $S/N=10$ 计算定量限，结果见表 1。

表 1 5 种有机溶剂的线性关系、检测限和定量限

Tab. 1 The linear relationship, limit of detection and quantitation of 5 kinds of organic solvents

残留溶剂	线性方程	相关系数 r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOD/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	LOQ/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
乙醇	$Y=652.98x+2.18$	0.999 8	20.15~1 612.00	3.97	19.83
丙酮	$Y=2 901.60x+1.44$	0.999 8	5.03~402.00	0.90	4.50
三氯甲烷	$Y=209.41x+1.26$	0.999 7	50.45~4 036.00	9.66	48.28
吡啶	$Y=509.26x+1.62$	0.999 6	12.08~966.00	3.07	10.44
甲苯	$Y=888.63x+1.87$	0.999 4	3.03~242.00	0.69	2.08

2.6 重复性

取 2.0 mL “2.2.3”项下对照品溶液置 20 mL 顶空瓶中，密封，按“2.1”项下色谱条件重复进样 6 针。测得乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶、甲苯的 RSD 值分别为 1.30%，1.20%，2.05%，2.28% 和 1.79%。

2.7 溶剂稳定性试验

精密量取 2.0 mL “2.2.3”项下对照品溶液置 20 mL 顶空瓶中，密封，共 13 份，分别于 0，2，4，6，8，10，12，14，16，18，20，22，24 h，

按“2.1”项下色谱条件进样测定分析，分别计算出乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶、甲苯的 RSD 值分别为 4.98%，4.87%，4.92%，5.89%、5.68%，表明该对照品溶液在室温下 24 h 内稳定性良好。

2.8 仪器精密度试验

精密量取“2.2.3”项下对照品溶液 2.0 mL，置 20 mL 顶空瓶中，共 6 份，密封，按“2.1”项下色谱条件进样，结果乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶、甲苯的 RSD 值分别为 1.58%，1.25%，1.90%，1.80%和 1.50%，结果表明仪器精密度良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取已知溶剂含量的对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药(批号：20160910)共 9 份，每份 0.1 g，置 10 mL 量瓶中，第 1~3 份分别加入“2.2.1”项下对照品储备溶液 1.6 mL，第 4~6 份分别加入“2.2.1”项下对照品储备溶液 2 mL，第 7~9 份分别加入“2.2.1”项下对照品储备溶液 2.4 mL，密封并室温下超声 1 min，使样品完全溶解，加 DMSO 稀释至刻度，混匀，即得低、中、高浓度(80%，100%，120%)的加样回收样品溶液。按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。按外标法以峰面积计算加样回收率，结果乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶和甲苯的平均回收率分别为 105.99%，102.40%，103.61%，105.15%和 106.45%，RSD 分别为 2.53%，1.12%，3.05%，3.45%和 2.19%。

2.10 样品测定

取 3 批样品(批号：20160910，20160918，20160925)各适量，按“2.1”项下色谱条件进样分析，记录峰面积并以外标法计算乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶和甲苯的残留量，结果 3 批样品残留量均符合国家药典规定残留溶剂限量要求，结果见表 2。

表 2 样品有机溶剂残留量测定结果($n=3$)

Tab. 2 Determination of residual organic solvents in samples ($n=3$)

溶液	样品批号			ICH 规定 %
	20160910	20160918	20160925	
乙醇	0.010	0.011	0.015	0.5
丙酮	0.002	0.003	0.002	0.5
三氯甲烷	0.014	0.012	0.014	0.06
吡啶	0.002	0.003	0.006	0.02
甲苯	未检出	未检出	未检出	0.089

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本实验分别考察了 DB-624 和 HP-5 毛细管色谱柱, 其中 DB-624 为中等极性色谱柱, 在“2.1”项下色谱条件, 它能够更好、更快地分离乙醇等 5 种有机溶剂来, 且峰形较好, 所以本实验最终选择选用 DB-624 毛细管色谱柱。

3.2 进样方式的选择

考虑到对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药沸点较低, 如果采用液体直接进样, 可能进样口温度容易使样品发生降解, 污染进样口和色谱柱, 加上所测的 5 种有机溶剂沸点不高, 因此, 笔者选用了顶空进样来分析, 避免进样口受到污染和样品降解干扰实验的可能。

3.3 柱温的选择

在柱温的选择上, 考虑到吡啶和甲苯的沸点相差不大, 笔者以 $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时, 将其维持时间定在 4 min 左右, 保证了吡啶和甲苯完全分离的情况下, 最大可能地减少实验的时间成本以及气体的消耗, 进样一次的总时间控制 21 min 左右。

3.4 残留溶剂限度的确定

参考中国药典 2015 年版(四部)“通则 0861”的残留溶剂及限度的有关规定^[4], 建议乙醇、丙酮限度为 0.5%, 三氯甲烷、吡啶、甲苯的限度分别为 0.06%、0.02% 和 0.089%。本实验测定的 3 批样品中 5 种残留溶剂的含量远远低于 ICH 规定的限

度要求, 检验结果均符合有关规定。

本实验首次采用顶空气相色谱法测定对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药中 5 种残留溶剂的含量。该方法操作简便、灵敏, 结果准确、可靠, 可用于对氯苯氧异丁酸甲氧基苯丙烯酸酯原料药中乙醇、丙酮、三氯甲烷、吡啶和甲苯残留溶剂的质量控制。

REFERENCES

- [1] LIANG G M, XU J, XIE Y F, et al. Lipid-lowering and anti-oxidation effects of (E)-3-[4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl] acrylic acid derivatives on hyperlipidemia model rats [J]. J China Pharm(中国药房), 2014, 25(41): 3863-3865.
- [2] ZHAO P, XU J, CHEN X B, et al. Acute toxicity of (E)-4-[2-(4-chlorophenoxy)-2-methylpropanoyloxy]-3-methoxyphenyl acrylic acid in mice and long-term toxicity in rats [J]. Chin J Pharmacol Toxicol(中国药理学与毒理学杂志), 2011, 25(4): 391-396.
- [3] WANG F H, XU J, TANG Z, et al. Pharmacokinetics of the active metabolite chlorophenoxy isobutyric acid in rat plasma after oral administration of a new compound AZ at different dosages [J]. Chin Hosp Pharm J(中国医院药学杂志), 2012, 32(11): 844-847.
- [4] 中国药典. 四部[S]. 2015: 105-109, 375.
- [5] CHEN P P, LIU X, WANG D H, et al. Determination of residual solvents in losartan potassium by head space gas chromatography [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(7): 1015-1017.
- [6] ZHANG Y, LI P, HU L H, et al. Simultaneously determination of residual organic solvents in rivaroxaban drug substance by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(5): 525-528.

收稿日期: 2017-07-11

(本文责编: 李艳芳)