

毛细管气相色谱法测定依诺昔酮原料药中6种有机溶剂残留量

冯光玲^{1,2*}, 丁文娟³, 冯爱国³, 伊星璐^{1,2} (1.山东省医药工业研究所, 济南 250101; 2.山东省化学药物重点实验室, 济南 250101; 3.山东临沂动植物园, 山东临沂 276037)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1210-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.20

摘要 目的: 建立测定依诺昔酮原料药中6种有机溶剂(乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与甲苯)残留量的方法。方法: 采用毛细管气相色谱法。色谱柱为 DB-1301 毛细管柱; 柱温采用程序升温; 氢火焰离子化检测器, 检测器温度为 250 ℃; 载气为高纯氮气; 进样口温度为 200 ℃; 分流比为 10:1; 顶空进样, 加热温度为 100 ℃, 加热时间为 40 min; 进样瓶装量为 2 ml。结果: 乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与甲苯在各自检测质量浓度范围内线性关系良好($r=0.999\ 6\sim 0.999\ 9$); 平均回收率为 99.9%~101.3% ($RSD=0.76\%\sim 1.89\%$, $n=3$); 检测限分别为 0.04、0.11、0.21、0.07、0.16、0.08 ng; 3 批样品中只检出乙醇。结论: 建立的方法快速、灵敏、准确, 可用于依诺昔酮原料药中有机溶剂残留量测定。

关键词 依诺昔酮; 原料药; 有机溶剂; 残留量; 毛细管气相色谱法

Determination of 6 Residual Organic Solvents in Enoximone Raw Material by Capillary Gas Chromatography
FENG Guang-ling^{1,2}, DING Wen-juan³, FENG Ai-guo³, YI Xing-lu^{1,2} (1. Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Jinan 250101, China; 2. Shandong Provincial Key Lab of Chemical Drug, Jinan 250101, China; 3. Shandong Linyi Botanical Garden, Shandong Linyi 276037, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of 6 residual organic solvents as alcohol, acetone, diethyl ether, dichloromethane, ethyl acetate and methylbenzene in enoximone. METHODS: Capillary gas chromatography was used. The determination was performed on DB-1301 capillary column by temperature programming; flame ionization detector was used with temperature of 250 ℃. High-purity N₂ was used as carrier gas; the temperature of injector was 200 ℃; split ratio was 10:1. The heating temperature of headspace sampling was set at 100 ℃, heating time was 40 min; the volume of sampling was 2 ml. RESULTS: There was good linear relationship of alcohol, acetone, diethyl ether, dichloromethane, ethyl acetate and methylbenzene ($r=0.999\ 6\sim 0.999\ 9$) with average recoveries of 99.9%~101.3% ($RSD=0.76\%\sim 1.89\%$, $n=3$). The detection limits were 0.04, 0.11, 0.21, 0.07, 0.16 and 0.08 ng, respectively. Only the alcohol was detected in 3 batches of sample. CONCLUSIONS: The method is rapid, simple and accurate. It can be used for the determination of residual organic solvents in enoximone raw material.

KEYWORDS Enoximone; Raw material; Organic solvents; Residual; Capillary gas chromatography

依诺昔酮(Enoximone)为新型咪唑酮类磷酸二酯酶 III 抑制剂, 其分子式为 C₁₂H₁₂N₂O₂S, 相对分子质量为 248.3, 是一种非昔非儿茶酚胺类强心药, 兼有正性肌力和血管扩张作用, 是治疗充血性心力衰竭的理想药物^[1-5]。该药于 1988 年在法国首次上市, 开发商为 Hoechst Marion Roussel, 其原料药国内目前正处于在研状态。依诺昔酮原料药在合成中使用了乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与甲苯等有机溶剂, 为保证用药安全, 应对有机溶剂残留量进行控制。毛细管气相色谱(GC)法具有分析速度快、分离效率高、灵敏度高的优点, 被广泛用于药物有机溶剂残留测定。由于本品微溶于水, 故本研究以 *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂, 建立了毛细管 GC 法^[6]测定 6 种有机溶剂残留量的方法, 结果表明建立的方法快速、灵敏、准确。

依诺昔酮合成路线见图 1。

1 材料

1.1 仪器

7890 GC 仪、7694E 自动顶空进样器(美国 Agilent 公司)。

1.2 药品与试剂

依诺昔酮原料药(山东省医药工业研究所合成室提供, 批

* 副主任药师。研究方向: 新药研发。电话: 0531-81213291。E-mail: jnfengguangling@163.com.cn

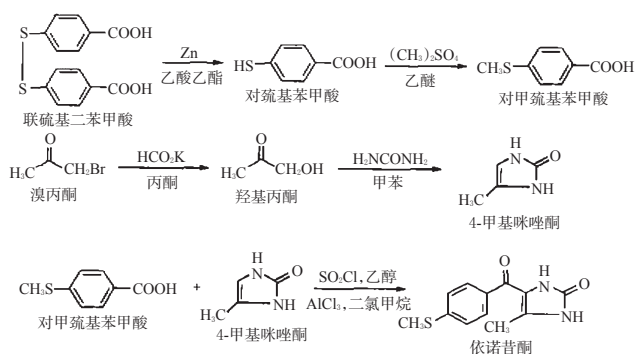


图 1 依诺昔酮合成路线

Fig 1 Synthesis route of enoximone

号: 130101、130102、130103, 纯度: 99.81%、99.92%、99.79%); 乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲苯和 DMF 均为分析纯(含量均大于 99%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent DB-1301 毛细管柱(6% 氰丙基苯基-94% 二甲基硅氧烷为固定液, 30 m×0.32 mm×0.25 μm); 柱温采用程序升温: 35 ℃ 保持 10 min, 再以 50 ℃/min 的速率升温至

200 ℃,保持10 min。氢火焰离子化检测器,检测器温度:250 ℃。载气:高纯氮气,流速:10 ml/min。进样口温度:200 ℃,分流比:10:1;采用顶空进样法测定,顶空进样加热温度:100 ℃,加热时间:40 min。进样瓶装量:2 ml(顶空气体进样)。

2.2 溶液制备

空白溶液:精密量取DMF 2 ml,置于顶空进样瓶中,作为空白溶液。

标准溶液贮备液:称取乙醇约500 mg、丙酮约500 mg、乙醚约500 mg、二氯甲烷约60 mg、乙酸乙酯约500 mg、甲苯约89 mg,置于含有适量DMF的100 ml量瓶中,充分振摇使溶解,加DMF稀释至刻度,摇匀,作为标准溶液贮备液。

标准溶液:精密量取上述贮备液10 ml置于100 ml量瓶中,加DMF至刻度,摇匀,作为标准溶液。

供试品溶液:精密称取依诺昔酮0.2 g,置于顶空进样瓶中,分别加DMF 2 ml,作为供试品溶液。

3种溶液进样分析后的结果表明各溶剂分离良好,空白溶剂无干扰。色谱图见图2。

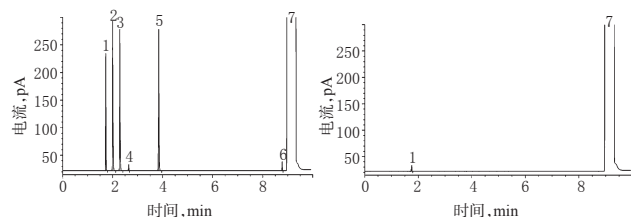


图2 毛细管GC色谱图

A.标准溶液;B.供试品溶液(批号:130101);1.乙醇;2.丙酮;3.乙醚;4.二氯甲烷;5.乙酸乙酯;6.甲苯;7. DMF

Fig 2 Capillary GC chromatograms

A. reference solution; B. test solution (lot No. 130101); 1. ethanol; 2. acetone; 3. diethyl ether; 4. dichloromethane; 5. ethyl acetate; 6. methylbenzene; 7. DMF

2.3 标准曲线绘制

分别精密量取标准溶液贮备液0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 ml,置于10 ml量瓶中,加DMF稀释至刻度,摇匀。各取上述溶液2 ml,置于顶空进样瓶中,按“2.1”项下色谱条件分别进样。分别以乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与甲苯质量浓度(c)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线,其线性关系结果见表1。

表1 各溶剂线性关系结果

Tab 1 Linear relationship of solvents

溶剂	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	线性关系方程	相关系数
乙醇	249.1~750.9	$A=1.2018c-97.99$	0.999 6
丙酮	249.6~750.1	$A=1.3601c+0.4802$	0.999 7
乙醚	250.3~749.8	$A=1.3824c-159.9$	0.999 9
二氯甲烷	29.04~91.09	$A=0.2977c-0.46$	0.999 7
乙酸乙酯	248.9~749.8	$A=2.3126c-126.9$	0.999 8
甲苯	44.52~133.53	$A=0.8911c-1.11$	0.999 8

2.4 精密度试验

取标准溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样6次,记录色谱图,计算RSD。结果乙醇为0.11%、丙酮为0.12%、乙醚为0.88%、二氯甲烷为0.76%、乙酸乙酯为0.56%、甲苯为0.36% ($n=6$),表明方法精密度符合要求。

2.5 回收率试验

精密称取样品(批号:130101)0.2 g,共10份,其中一份加

入2 ml DMF,作为空白溶液。另分别配制低(80%)、中(100%)、高(120%)3种质量浓度的标准溶液,分别取上述不同浓度的标准溶液2 ml,加入盛有样品的顶空进样瓶中。以“2.2”项下的标准溶液作为对照。按“2.1”项下色谱条件,分别进样。计算其回收率,结果平均回收率为99.9%~101.3% (RSD=0.76%~1.89%, $n=3$),表明方法准确度好,结果详见表2。

表2 回收率试验结果(%, $n=3$)

Tab 2 Results of recovery tests(%, $n=3$)

溶剂	低质量浓度 平均回收率	中质量浓度 平均回收率	高质量浓度 平均回收率	平均回收率	RSD ($n=3$)
乙醇	101.1	100.9	100.8	100.9	1.16
丙酮	100.0	100.3	100.2	100.2	1.82
乙醚	101.5	101.1	101.2	101.3	1.01
二氯甲烷	100.6	100.2	100.4	100.4	0.99
乙酸乙酯	101.4	101.2	101.3	101.3	0.76
甲苯	100.0	99.8	100.0	99.9	1.89

2.6 定量限、检测限试验

将标准溶液逐级稀释,分别取2 ml,置于顶空进样瓶中,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,直至信噪比为10:1和3:1,即得定量限和检测限。结果乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲苯定量限分别为0.12、0.33、0.63、0.21、0.48、0.24 ng,检测限分别为0.04、0.11、0.21、0.07、0.16、0.08 ng。

2.7 重复性试验

取同一批(批号:130101)样品6份,每份约0.2 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液并测定。结果,乙醇平均含量为0.088%,RSD=0.79% ($n=6$),表明方法重复性良好。

2.8 样品中有机溶剂残留量测定

精密量取标准溶液和供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,以外标法计算得3批样品的乙醇残留量平均值分别为0.099%、0.082%和0.079%,3批样品中均未检出丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与甲苯。

3 讨论

3.1 溶剂的选择

依诺昔酮微溶于水,为降低待测溶剂的最小检出浓度、提高检测灵敏度,根据气-液平衡理论,本试验采用了较高的顶空(加热)温度(100 ℃),因此选用DMF作为溶剂。毛细管GC法具有分析速度快、分离良好、灵敏度高的优点^[7],广泛应用于痕量物质的分析,故本文选用此法为测定方法。

3.2 顶空条件的确定

根据待测溶剂的沸点高低确定顶空温度为100 ℃,但此时应兼顾溶液的热分解特性。实验证明,溶液中的未知杂质和挥发性热降解物不干扰测定^[8-9]。顶空(加热)时间为40 min,目的是保证溶液的气-液两相有足够的时间达到平衡,又避免了顶空时间过长引起顶空瓶气密性变差而导致定量准确性的降低。

3.3 色谱条件的确定

色谱条件主要包括进样口温度、柱温、检测器温度的设定。进样口温度主要由样品的沸点范围决定,应保证待测样品全部汽化。待测溶剂的沸点均小于或在100 ℃附近,但DMF的沸点较高,进样口温度的设定应防止DMF冷凝而污染汽化室,所以进样口温度设定为200 ℃。检测器为氢火焰离子化检测器,检测器温度对灵敏度影响不大,只要保证流出色谱柱的组分不冷凝即可,故设定为250 ℃。色谱柱温度的选择主

HPLC法检查左乙拉西坦缓释片的有关物质

张少桦^{1*}, 王锦刚^{1,2#}, 蒋海松²(1. 陕西中医学院, 西安 712046; 2. 北京科信必成医药科技发展有限公司哈尔滨分公司, 哈尔滨 150000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)13-1212-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.13.21

摘要 目的: 建立检查左乙拉西坦缓释片有关物质的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Wondasil C₁₈, 流动相为缓冲液(含磷酸二氢钾、庚烷磺酸钠, pH 2.8)-乙腈(950:50), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 200 nm, 进样量为 10 μl。以外标法计算杂质质量。结果: 左乙拉西坦酸检测质量浓度线性范围为 0.168 7~6.714 μg/ml($r=1.000$); 低、中、高质量浓度的回收率分别为 90.3%、101.7%、103.3%, RSD 分别为 0.17%、1.08%、0.43%($n=3$); 左乙拉西坦酸定量限为 76.51 ng/ml。结论: 建立的方法简便、准确、专属性好, 可以用于左乙拉西坦缓释片中的有关物质检查。

关键词 左乙拉西坦缓释片; 左乙拉西坦酸; 高效液相色谱法; 有关物质; 检查

Determination of Related Substances in Levetiracetam Sustained-release Tablets by HPLC

ZHANG Shao-hua¹, WANG Jin-gang^{1,2}, JIANG Hai-song²(1. Shaanxi College of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 712046, China; 2. Harbin Branch, Beijing Kexinbicheng Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd., Harbin 150000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Levetiracetam sustained-release tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The separation was performed on Wondasil C₁₈ column with mobile phase consisted of buffer (potassium dihydrogen phosphate, sodium heptanesulfonate, pH 2.8)-acetonitrile (950:50) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 200 nm, and injection volume was 10 μl. The content of related substances was calculated by external standard method. RESULTS: The linear range of levetiracetam were 0.168 7-6.714 μg/ml ($r=1.000$). The average recoveries were 90.3%, 101.7% and 103.3% at low, medium and high concentrations, and RSDs were 0.17%, 1.08% and 0.43% ($n=3$), respectively. The limit of quantification of levetiracetam acid was 76.51 ng/ml. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and specific for the determination of related substances in Levetiracetam sustained-release tablets.

KEYWORDS Levetiracetam sustained-release tablets; Levetiracetam acid; HPLC; Related substances; Determination

要由样品的复杂程度决定, 既要保证待测物完全分离, 又要保证所有组分全部流出, 测定时间又不宜过长。本试验待测溶剂有 6 种, 包括 DMF 在内共有 7 种组分, 柱温大于 40 °C 时, 分离度达不到要求, 因此柱温定为 35 °C。应先使低沸点的溶剂有效分离, 然后以 50 °C/min 的速率升温至 200 °C, 保持 10 min, 使 DMF 加快出峰以改善峰形, 缩短分析时间, 提高工作效率, 并保证 DMF 不残留于色谱柱中。

3.4 检测限度的确定

根据 2010 年版《中国药典》的相关要求^[10], 将依诺昔酮中乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯和甲苯的限度定为 0.5%、0.5%、0.5%、0.06%、0.5% 和 0.089%。

综上, 本文建立的方法线性、精密性、回收率、定量限、检测限等试验结果均较好, 能够准确、迅速地检测出依诺昔酮原料药中残留的乙醇、丙酮、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯与甲苯, 从而为保证药品质量提供依据。

参考文献

[1] 卓彩兰, 戚敏. 抗心衰药物: 依诺昔酮[J]. 山东医药工业,

* 硕士研究生。研究方向: 缓释制剂。E-mail: zsh907496653@aliyun.com

通信作者: 高级工程师, 硕士。研究方向: 缓释制剂。E-mail: wangj163@vip.163.com

1999, 18(1): 58.

- [2] 李树政. 小儿充血性心力衰竭的治疗进展[J]. 小儿急救医学杂志, 1994, 1(2): 49.
- [3] 陈练. 磷酸二酯酶抑制剂治疗充血性心衰的现状[J]. 国外医学药学分册, 1993, 20(5): 286.
- [4] 马淑涛. 依诺昔酮的合成[J]. 中国医药工业杂志, 1999, 30(2): 529.
- [5] 洪中立, 曲静伟. 抗心衰新药依诺昔酮的临床应用[J]. 新药与临床杂志, 1990, 9(1): 22.
- [6] 郭晓玲, 钱蔚, 杨昌金, 等. 毛细管气相色谱法测定速效伤风胶囊中对乙酰氨基酚、咖啡因、马来酸氯苯那敏的含量[J]. 色谱, 1998, 16(2): 164.
- [7] 栾成章, 祝波, 王尊文, 等. 顶空气相色谱法测定夫西地酸中有机溶剂残留量[J]. 中国药房, 2006, 17(7): 535.
- [8] 吕志华, 王远红, 赵峡. 顶空气相色谱法测定几丁糖酯中溶剂残留[J]. 药物分析杂志, 2001, 21(4): 276.
- [9] 秦立, 胡昌勤, 刘文英. 顶空气相色谱法测定头孢泊肟酯中有机溶剂残留量[J]. 药物分析杂志, 2003, 23(6): 452.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 63.

(收稿日期: 2013-05-16 修回日期: 2013-05-28)