

顶空气相色谱法测定丁苯酞原料药中 6 种有机溶剂残留量

李钦^{1,2}, 孙明君¹, 王芷¹, 周海瑞³, 张树祥¹, 张贵生²

(1.北京四环制药有限公司,北京 101113;

2.河南师范大学 化学化工学院,河南 新乡 453007;3.佳木斯大学 基础医学院,黑龙江 佳木斯 154007)

摘 要:采用顶空气相色谱法对丁苯酞原料药中的甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃和正庚烷共 6 种残留溶剂的含量进行测定.使用 Agilent DB-624(0.32 mm×30 m,3 μm)色谱柱,色谱柱程序升温;氢火焰离子化检测器,检测器温度为 250 ℃.进样口温度为 220 ℃;顶空平衡温度为 80 ℃,平衡时间为 30 min.结果显示,6 种残留溶剂间分离度良好.在一定质量浓度范围内,各残留溶剂线性关系均良好,相关系数 $r>0.999\ 0$.重复性实验结果的相对标准偏差值均小于 5%,加样回收率均在 80%~120% 范围内,不同批次原料药残留溶剂检查结果均符合要求.该方法准确灵敏,可用于丁苯酞原料药中残留溶剂的测定.

关键词:顶空气相色谱法;丁苯酞;残留溶剂

中图分类号:R917

文献标志码:A

丁苯酞(NBP)又名芹菜甲素,具有抗脑缺血、减轻脑损伤等作用^[1-3].丁苯酞软胶囊是我国心脑血管领域第一个拥有自主知识产权的药物,主要用于治疗轻、中度急性缺血性脑卒中.近些年来,又发现其对神经退行性疾病,如肌萎缩侧索硬化症、阿尔兹海默症及帕金森症等具有较好的疗效^[4-6].

目前,关于 NBP 原料药中残留溶剂的测定,尚未见文献报道.北京四环制药有限公司的 NBP 原料药在合成过程中,使用了甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃和正庚烷共 6 种有机溶剂,为了严格控制 NBP 原料药质量,本文作者参照国家食品药品监督管理局颁布的丁苯酞原料药国家标准(标准号:WS1-(X-124)-2005Z^[7])及 2015 年版中国药典四部通则 0861(残留溶剂测定法)^[8],并结合多批次原料药的检测结果及参考文献^[9],建立了可同时检测 NBP 原料药中 6 种残留溶剂的顶空气相色谱法,对 NBP 合成过程中使用到的有机溶剂进行检测和监控.该方法准确度高、重复性好,可在实际生产中严格控制 NBP 原料药的质量.

1 仪器与试剂

安捷伦 7890B 气相色谱仪(美国安捷伦公司),CPA225D 电子天平(德国赛多利斯公司).NBP 原料药(批号:010106-180701,010106-180702 和 010106-180801,四环控股集团吉林汇康制药有限公司),*N*-甲基吡咯烷酮(液相色谱级,Fisher Scientific),甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃和正庚烷(分析纯,均来自北京化工厂).

收稿日期:2019-07-02;**修回日期:**2019-10-02.

基金项目:教育部“长江学者和创新团队发展计划”创新团队(IRT-14R15);北京市博士后工作经费资助项目(2017-ZZ-096).

作者简介:李钦(1978—),男,河南南阳人,北京四环制药有限公司高级工程师,主要从事药物分析研究工作,E-mail:1098333455@qq.com.

通信作者:张贵生(1965—),男,河南林州人,河南师范大学教授,博士生导师,主要从事有机及药物合成的教学与科研工作,E-mail:zgzs@htu.cn.

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用安捷伦 DB-624(0.32 mm×30 m,3 μm)色谱柱,载气为氮气,检测器为氢火焰离子化检测器,流速为 3.0 mL·min⁻¹,色谱柱程序升温,起始温度为 40 ℃,维持 5 min,以 8 ℃/min 的速率升温至 150 ℃,维持 2 min,再以 50 ℃/min 的速率升温至 220 ℃,维持 3 min.进样口温度为 220 ℃,检测器温度为 250 ℃.顶空瓶平衡温度为 80 ℃,平衡时间为 30 min.

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白溶剂的制备

精密量取 *N*-甲基吡咯烷酮 5 mL,置顶空瓶中,密封,作为空白溶剂.

2.2.2 定位溶液的制备

分别取甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃和正庚烷适量,精密称定,分置不同的容量瓶中,分别用 *N*-甲基吡咯烷酮定量稀释制成每 1 mL 中约含甲醇 0.300 mg、乙腈 0.041 mg、二氯甲烷 0.060 mg、乙酸乙酯 0.500 mg、四氢呋喃 0.072 mg 和正庚烷 0.500 mg 的溶液,精密量取 5 mL,置顶空瓶中,密封,作为各溶剂的定位溶液.

2.2.3 样品溶液的制备

精密称取 NBP 适量,用 *N*-甲基吡咯烷酮溶解并定量稀释制成每 1 mL 中约含 0.1 g 的溶液,精密量取 5 mL,置顶空瓶中,密封后超声 5 min,作为样品溶液.

2.2.4 对照品溶液的制备

精密称取甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃和正庚烷各适量,置同一容量瓶中,用 *N*-甲基吡咯烷酮稀释制成每 1 mL 中约含甲醇 0.300 mg、乙腈 0.041 mg、二氯甲烷 0.060 mg、乙酸乙酯 0.500 mg、四氢呋喃 0.072 mg 和正庚烷 0.500 mg 的混合溶液,精密量取 5 mL,置顶空瓶中,密封,作为对照品溶液.

2.3 专属性实验

取空白溶剂和对照品溶液分别顶空进样,记录色谱图,见图 1.由图 1 可知,空白溶剂对各残留溶剂的检测无干扰,各残留溶剂间分离度良好.

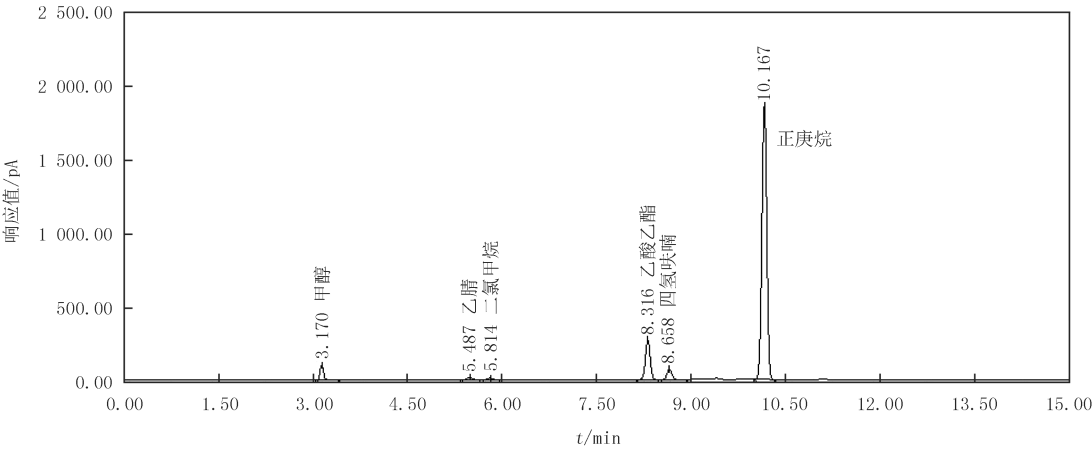


图1 对照品溶液的气相色谱图
Fig.1 GC chromatogram of reference standard solution

2.4 进样精密度

连续取 6 份对照品溶液,置顶空瓶中,密封,进样分析.甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃和正庚烷峰面积的相对标准偏差($n=6$)分别为 5.15%、5.65%、6.35%、6.59%、6.48%和 6.27%,均小于 10.00%,进样精密度良好.

2.5 检测限与定量限

取各残留溶剂对照品适量,精密称定,加 *N*-甲基吡咯烷酮使溶解并逐级稀释,精密量取 5 mL,置 20 mL 顶空瓶中,密封,进样分析,以信噪比(*S/N*)约为 3 和 10 时对应的质量浓度作为检测限和定量限,结果见表 1.

表 1 6 种残留溶剂线性关系、定量限和检测限

Tab.1 Linear range, the limit of quantitation and determination of six residual solvents					
残留溶剂	线性回归方程	相关系数	浓度范围/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	检测限/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
甲醇	$Y=1.20X-10.81$	0.999 3	30.43~456.44	0.317	0.905
乙腈	$Y=1.81X-2.19$	0.999 1	4.04~60.59	0.281	0.803
二氯甲烷	$Y=0.85X-1.39$	0.999 0	6.18~92.65	0.585	1.671
乙酸乙酯	$Y=2.89X-41.74$	0.999 0	50.72~760.77	0.194	0.554
四氢呋喃	$Y=5.37X-10.86$	0.999 1	7.35~110.22	0.104	0.296
正庚烷	$Y=20.79X-219.30$	0.999 2	48.59~728.90	0.038	0.110

2.6 线性与范围

取各残留溶剂对照品适量,精密称定,加 *N*-甲基吡咯烷酮使溶解并逐级稀释制成质量浓度分别约为各自限度 10%、50%、80%、100% 及 150% 的溶液,分别精密量取 5 mL,置 20 mL 顶空瓶中,密封,进行分析,记录色谱图.以各有机溶剂的峰面积(*Y*)为纵坐标,质量浓度(*X*, $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标,使用 Microsoft Excel 绘制标准曲线,记录回归方程及相关系数,线性范围结果见表 1,各有机溶剂在其质量浓度范围内线性关系良好.

2.7 重复性实验

重复配制 6 份样品溶液和 2 份对照品溶液,按拟定的色谱条件进行测定,记录色谱图,测量各溶剂峰面积,计算残留量,以 6 次测定结果的相对标准偏差考察方法的重复性.结果表明,甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃和正庚烷残留量测定结果的相对标准偏差均小于 10%,表明该方法重复性良好.

2.8 准确度实验

精密称取 NBP 适量,置顶空瓶中,分别加入质量浓度为各残留溶剂限定浓度 50%、100% 及 150% 的残留溶剂溶液 5 mL,密封,作为准确度样品溶液.每个质量浓度,准确度样品溶液平行配制 3 份,按拟定色谱条件测定残留溶剂,扣除样品中各溶剂的本底残留量(以重复性实验项下的测得的各残留溶剂的含量作为其各自的本底残留量),根据加入量计算回收率,结果见表 2.

表 2 加样回收率试验结果

Tab.2 Results of the accuracy					
残留溶剂	平均回收率($n=3$)/%			平均回收率($n=9$)/%	相对标准偏差 RSD/%
	50%	100%	150%		
甲醇	98.66	98.57	102.52	99.92	3.58
乙腈	98.54	96.94	102.03	99.17	3.93
二氯甲烷	100.40	97.84	103.41	100.55	3.92
乙酸乙酯	94.86	92.59	94.10	93.85	3.95
四氢呋喃	91.86	90.11	91.38	91.12	3.72
正庚烷	90.41	87.36	87.35	88.37	3.62

结果表明,6 种溶剂在 3 个浓度水平下的回收率均在 80%~120% 的范围内,相对标准偏差均小于 5%,方法的准确度良好.

2.9 耐用性试验

取对照品溶液,略微改变色谱条件的参数,分别进样,记录色谱图,考察色谱条件的耐用性.当流速变化 $\pm 0.2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、检测器温度变化 $\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、进样口温度变化 $\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、顶空平衡温度变化 $\pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、平衡时间变

化±5 min 以及更换不同序列号的色谱柱时,对照品溶液中各色谱峰的流出顺序没有发生改变,各色谱峰间的分离度均大于 2.0,方法的耐用性良好.

2.10 样品测定

按拟定的方法检测 3 批样品,按外标法计算结果,3 批样品中均未检测到甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯和四氢呋喃,2 批样品中检测到了微量的正庚烷,3 批样品中,6 种残留溶剂的残留量均符合中国药典要求.

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的选择

丁苯酞原料药国家标准(WS1-(X-124)-2005Z)中的残留溶剂测定使用的是内标法,用庚烷作为内标物,因此无法测定庚烷自身的含量,然而庚烷却是本文要测定的一种残留溶剂;此外,在国家标准方法中,二氯甲烷的定量限约为 $20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,仅为其限定质量浓度 $60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 1/3,也就是当 NBP 原料药中含有的二氯甲烷的量低于其限度的 1/3 时,国家标准方法是无法对其进行准确定量的,由此可以看出国家标准方法的灵敏度较差.综上所述,国家标准的残留溶剂方法在本公司检测时并不适用.根据 6 种待测残留溶剂的理化性质,参考公司其他原料药的残留溶剂测定方法,优化并确定了最终的色谱条件,在最终的色谱条件中,由于使用外标法,没有用庚烷作为内标物,庚烷能在本方法中被精确测定,此外,二氯甲烷的定量限为 $1.67\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,比国家标准方法的灵敏度提高了约 12 倍,自建方法的灵敏度相对较好,能够精确测定出 NBP 原料药中所含的微量二氯甲烷.

3.2 溶剂的选择

为了精确测定 NBP 原料药中的各残留溶剂含量,需要选择一种溶剂,使 NBP 和待测的各溶剂在此溶剂中均能完全溶解,为此,对二甲基亚砷和 N-甲基吡咯烷酮进行了考察,通过回收率实验发现,选择二甲基亚砷作为溶剂时,正庚烷的回收率只有 72%左右,准确度较差,估计是由于正庚烷在二甲基亚砷中的溶解度较差导致的;而在使用 N-甲基吡咯烷酮作为溶剂时,各待测溶剂的回收率均能达到 80%以上,准确度较好.因此,最终选择了 N-甲基吡咯烷酮作为溶剂.

3.3 色谱柱的选择

本实验对 DB-WAX 毛细管柱和 DB-624 毛细管柱进行了考察,结果发现在 DB-WAX 毛细管柱上,N-甲基吡咯烷酮峰对正庚烷峰有干扰,调整色谱柱升温程序后也无法解决这个问题,而在 DB-624 毛细管柱上,各溶剂峰间的分离度均较好,不互相干扰,因此最终使用 DB-624 毛细管柱作为色谱柱,在此基础上,为了达到更好分离效果,优化了色谱柱升温程序.

4 结 论

本实验利用顶空气相色谱法,建立了可同时定量检测 NBP 原料药中甲醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、四氢呋喃和正庚烷共 6 种残留溶剂含量的检测方法,经方法学验证,该方法准确灵敏,可用于丁苯酞原料药中残留溶剂的测定.

参 考 文 献

[1] 侯圆圆,梁志刚,孙旭文,等.丁苯酞对缺血性脑卒中的保护机制及治疗研究进展[J].医学综述,2018,24(19):3841-3846.
HOU Y Y,LIANG Z G,SUN X W,et al.Research progress of the protective mechanism and treatment of N-butylphthalide on ischemic stroke[J].Medical Recapitulate,2018,24(19):3841-3846.

[2] 肖林婷,周辉,陈聪,等.丁苯酞注射液治疗进展性脑梗死的临床研究[J].中国临床药理学杂志,2018,34(5):514-517.
XIAO L T,ZHOU H,CHEN C,et al.Clinical trial of butylphthalide injection in the treatment of patients with progressive cerebral infarction[J].The Chinese Journal of Clinical Pharmacology,2018,34(5):514-517.

[3] 张晓璇,朱江,李佳佳,等.丁苯酞对急性缺血性脑卒中大鼠的脑保护作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2019,45(4):843-848.
ZHANG X X,ZHU J,LI J J,et al.Protective effect of butylphthalide on brain in rats with acute ischemic stroke and its mechanism[J].

Journal of Jilin University(Medicine Edition),2019,45(4):843-848.

[4] 孙灿,闫欣,郝澎丽,等.丁苯酞对肌萎缩侧索硬化模型小鼠的生存期脊髓前角运动神经元 Nrf2 及 HO-1 表达[J].脑与神经疾病杂志,2016,24(3):136-141.

SUN C,YAN X,HAO P L,et al.Effects of dl-3n-butyipthalide on lifespan and Nrf2 and HO-1 expression in the mice model of amyotrophic lateral sclerosis[J].Journal of Brain and Nervous Diseases,2016,24(3):136-141.

[5] HUANG L J,WANG S,MA F,et al.From stroke to neurodegenerative diseases:The multi-target neuroprotective effects of 3-n-butylphthalide and its derivatives[J].Pharmacological Research,2018,135(9):201-211.

[6] PENG Y,SUN J,HON S,et al.L-3-n-Butylphthalide Improves Cognitive Impairment and Reduces Amyloid in a Transgenic Model of Alzheimer's Disease[J].Journal of Neuroscience,2010,30(24):8180-8189.

[7] 国家食品药品监督管理局.丁苯酞国家药品标准:WS1-(X-124)-2005Z[S].[出版地不详;出版者不详],2005.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典第四部(2015 年版)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:105-109.

[9] 郝二军,李朝阳,刘玉侠,等.顶空毛细管气相色谱法测定奥柳氮锌中有机溶剂残留量[J].河南师范大学学报(自然科学版),2010,38(2):183-184.

HAO E J,LI C Y,LIU Y X,et al.Determination of residual organic solvents in Olsalazine zinc by headspace gas chromatography[J].Journal of Henan Normal University(Natural Science Edition),2010,38(2):183-184.

Determination of six residual solvents in butylphthalide by headspace gas chromatography

Li Qin^{1,2},Sun Mingjun¹,Wang Zhi¹,Zhou Hairui³,Zhang Shuxiang¹,Zhang Guisheng²

(1.Beijing Sihuan Pharmaceutical Co.,Ltd.,Beijing 101113,China;

2.School of Chemistry and Chemical Engineering,Henan Normal University,Xinxiang 453007,China;

3.School of Basic Medicine Sciences,Jiamusi University,Jiamusi 154007,China)

Abstract: A headspace gas chromatography(GC) method was developed for the analysis of six residual solvents in butylphthalide,the residual solvents including methanol,acetonitrile,dichloromethane,ethyl acetate,tetrahydrofuran and n-heptane.Separation was performed on a DB-624 capillary column(0.32 mm×30 m,3 μm)using a column temperature programming.Flame ionization detector was used as the detector.The detector temperature and the inlet temperature were 250 °C and 220 °C respectively.The headspace temperature was 80 °C and the equilibrium time was 30 min.6 residual solvents were separated very well.The linearity of the 6 residual solvents were perfect ranged from 10%—150% of their limit concentration($r>0.999\ 0$).The relative standard deviations of repeatability results were all less than 5%.The average recoveries were in the range of 80%—120%.The residual solvents results of different batches of butylphthalide were in accordance with the requirements.This method is accurate and sensitive,and it can be used for the determination of the residual solvents in butylphthalide.

Keywords: headspace GC;butylphthalide;residual solvents

[责任编辑 赵晓华 陈留院]