

气相色谱法测定盐酸法舒地尔中有机溶剂残留量

方海燕¹ 方学勤² 刘元胜²

1.湖北省黄石市食品药品监督管理局生测室,湖北黄石 435000;2.湖北省黄石市世星药业有限责任公司,湖北黄石 435003

[摘要] 目的 建立气相色谱法测定盐酸法舒地尔中有机溶剂残留量的方法。方法 采用气相色谱法, FID 检测器, 以毛细管色谱柱 SE-54(30 m×0.53 mm, 5.0 μm) 为分析柱。柱温为程序升温, 用初始柱温 55℃ 平衡 0.5 min, 以 40℃/min 的速度升温至 70℃, 平衡 1 min, 以 40℃/min 的速度升温至 180℃, 平衡 3 min 程序升温分别测定甲醇、二氯甲烷。用初始柱温 50℃ 平衡 3 min, 以 20℃/min 的速度升温至 180℃, 平衡 3 min 程序升温测定 N,N-二甲基甲酰胺。载气为氮气, 进样口温度 200℃, 检测器温度 250℃。结果 3 种有机溶剂完全分离, 在所考察的浓度范围内具有良好线性关系, 3 个溶剂相关系数均大于 0.999 0, 甲醇、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺的检测限分别为 0.065 7、1.100 0、0.016 6 μg/mL, 平均回收率分别为 99.8%、98.4%、99.1%。结论 本试验建立的方法简便灵敏, 结果准确可靠, 适用于盐酸法舒地尔原料药中有机溶剂残留量的检测。

[关键词] 盐酸法舒地尔; 有机溶剂残留量; 气相色谱法

[中图分类号] R284.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2012)02(b)-0114-03

Determination of the residual organic solvents in Fasudil hydrochloride by GC

FANG Haiyan¹ FANG Xueqin² LIU Yuansheng²

1.Lab of Biochemical Detection, Huangshi Institute for Food and Drug Control, Hubei Province, Huangshi 435000, China;

2.Huangshi Shixing Pharmaceutical Co., Ltd, Hubei Province, Huangshi 435003, China

[Abstract] **Objective** To establish a method for determination of residual organic solvents in Fasudil hydrochloride by headspace gas chromatography. **Methods** The residual solvents was determined by GC. The FID detector was adopted, SE-54 capillary column (30 m×0.53 mm, 5.0 μm) was used, the column temperature was programmed temperature, the initial column temperature was 55℃ maintained for 0.5 minutes and then raised (40℃/min) to 70℃ for 1 minute, raised (40℃/min) to 180℃ for 3 minutes for methanol and methylene chloride detection, respectively. The initial column temperature was 50℃ maintained for 3 minutes and then raised (20℃/min) to 180℃ for 3 minutes for N,N-dimethyl formamide detection. The carrier gas was nitrogen, the inlet temperature was 200℃ and the detector temperature was 250℃. **Results** Three kinds of organic solvents methanol, methylene chloride and N,N-dimethyl formamide completely separated, they showed a good linearity within the designed range of concentration, all the correlation coefficients were above 0.999 0. Methanol, methylene chloride and N,N-dimethyl formamide minimum detectable concentrations were 0.065 7, 1.100 0, 0.016 6 μg/mL, the recovery was 99.8%, 98.4%, 99.1%. **Conclusion** The method is accurate and sensitive, it can be used for the determination of the residual organic solvents in Fasudil hydrochloride.

[Key words] Fasudil hydrochloride; Residual organic solvents; Gas chromatography

盐酸法舒地尔是一种具有广泛药理作用的新型药物, 它的分子结构为 5-异噻啉磺酰胺衍生物, 为 RHO 激酶抑制剂, 它抑制了 RHO 激酶参与的细胞黏附、细胞迁移、平滑肌细胞收缩、胞质分裂的调节, 从而抑制了动脉粥样硬化的发生与发展。在日本 1995 年正式批准进入临床, 用来防治慢性缺血性脑血管痉挛^[1]。由于该药在合成过程中需使用甲醇、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺等有机溶剂, 产品中的有机残留量对人体是有害, 故应对原料药中有机溶剂残留量进行控制。由于现有文献中尚未发现这方面的研究, 本试验根据 ICH 和《中国药典》2010 年版二部对有机溶剂残留量测定的指导原则^[2], 并参考有关文献^[3-9], 采用气相色谱法测定了盐酸法舒地尔原料中的甲醇、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺的含量, 方法简便灵敏, 结果准确可靠。

1 仪器与试剂

岛津 GC-14C 气相色谱仪, 氢火焰离子检测器 (FID),

CS-Light 色谱工作站, 梅特勒 AL204 分析天平; 毛细管色谱柱 SE-54(30 m×0.53 mm, 5.0 μm)。

盐酸法舒地尔(批号: 20080601、20080602、20080603, 自制), 甲醇、N,N-二甲基甲酰胺和二甲基亚砷均为色谱纯, 二氯甲烷为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

由于 N,N-二甲基甲酰胺是高沸点有机溶剂, 采用其色谱条件不能有效将甲醇、二氯甲烷进行分离。因此, 分别采用两种程序升温条件, 测定甲醇、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺。FID 检测器, 检测器温度 250℃, 进样口温度 200℃, 载气为氮气, 采用恒流模式, 流速为 12 mL/min, 氢气流速 50 mL/min, 空气流速 500 mL/min, SE-54(30 m×0.53 mm, 5.0 μm) 毛细管柱, 分流时间 0.1 s, 分流流速 3 mL/s, 进样量 1 μL。采用岛津 CS-light 气相色谱工作站, 色谱峰理论塔板数不低于 5 000, 分

离度大于1.5。

分析甲醇、二氯甲烷的程序升温:初始柱温 55℃,平衡 0.5 min,以 40℃/min 的速度升温至 70℃,平衡 1 min,以 40℃/min 的速度升温至 180℃,平衡 3 min。

分析 N,N-二甲基甲酰胺的程序升温:初始柱温 50℃,平衡 3 min,以 20℃/min 的速度升温至 180℃,平衡 3 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 甲醇、二氯甲烷溶液的制备

2.2.1.1 对照品溶液的制备 分别取甲醇、二氯甲烷适量,精密称定,用二甲基甲酰胺(DMF)稀释成 1 mL 约含甲醇 300 μg、二氯甲烷 60 μg 的溶液,另加 0.5 mL 内标溶液。内标物质具体制备为:取分析纯苯约 60 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加 DMF 并稀释至刻度,振匀。

2.2.1.2 供试品溶液的制备 取盐酸法舒地尔 1.0 g,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加入 0.5 mL 内标溶液,用 DMF 稀释至刻度,振摇使溶解,即得。

2.2.2 N,N-二甲基甲酰胺溶液的制备

2.2.2.1 对照品溶液的制备 取 N,N-二甲基甲酰胺定量稀释制成每 1 mL 中分别约含 88 μg 的溶液,另精密量取内标溶液 0.5 mL 置于该量瓶中,用 20% 甲醇稀释至刻度,振匀。内标物质具体制备为:取分析纯 N,N-二甲基乙酰胺约 80 mg,精密称定,置于 50 mL 量瓶中,加 20% 甲醇稀释至刻度,振匀。

2.2.2.2 供试品溶液的制备 另取本品约 0.1 g,精密称定,取 0.5 mL 内标溶液,置于 10 mL 量瓶中,20% 甲醇稀释至刻度,充分振摇。

2.3 测定方法

分别取对照溶液和供试品溶液,按上述色谱条件测定,甲醇、二氯甲烷结果,见图 1、2;N,N-二甲基甲酰胺结果,见图 3、4。

2.4 线性关系考察

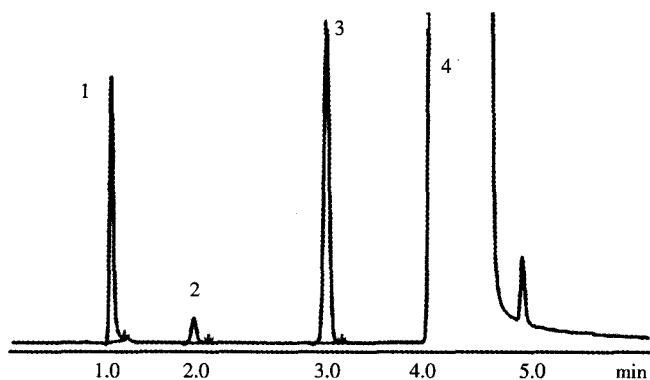
分别精密称取甲醇、二氯甲烷适量,用 DMF 稀释成含甲醇 0.065 7、0.657 0、6.570 0、65.700 0、657.000 0 μg/mL,含二氯甲烷 1.76、17.60、176.00、246.40、316.80 μg/mL,取以上各浓度溶液 10 mL,分别加入 0.5 mL 苯内标溶液,用 20% 甲醇稀释成含 N,N-二甲基甲酰胺 0.166、1.660、16.600、66.400、83.000、99.600 μg/mL 的溶液备用,取此系列浓度溶液 10 mL 分别加入 0.5 mL N,N-二甲基乙酰胺内标溶液,取 1 μL 样品直接进样以 AR/AS 为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),计算甲醇、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺的回归方程分别为 $Y = 1.012 2X + 0.002 9$ ($r = 1.000 0$)、 $Y = 0.438 7X + 0.000 2$ ($r = 0.999 1$)、 $Y = 10.857X + 0.056$ ($r = 0.999 8$)。结果表明甲醇在 0.065 7~657.000 0 μg/mL,二氯甲烷在 0.76~316.80 μg/mL,N,N-二甲基甲酰胺在 0.166~99.600 μg/mL 的浓度范围内呈较好的线性关系。

2.5 精密度试验

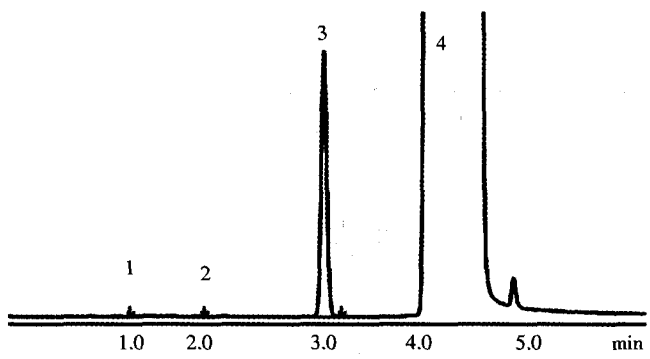
取对照品溶液,连续测定 6 次,结果甲醇溶液中苯/甲醇的峰面积的 RSD 为 1.02%,二氯甲烷溶液中苯/二氯甲烷的峰面积的 RSD 为 1.61%,N,N-二甲基甲酰胺溶液中苯/DMF 的峰面积的 RSD 为 3.13%,符合《中国药典》2010 年版规定的有机溶剂残留内标法测定精密度的要求 (RSD 不大于 5%)。见表 1。

2.6 最低检测限的测定

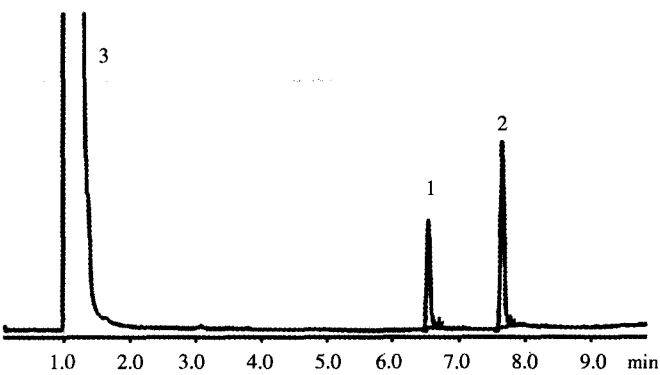
取“2.4”项下的标准溶液,采用逐步稀释法,按上述色谱



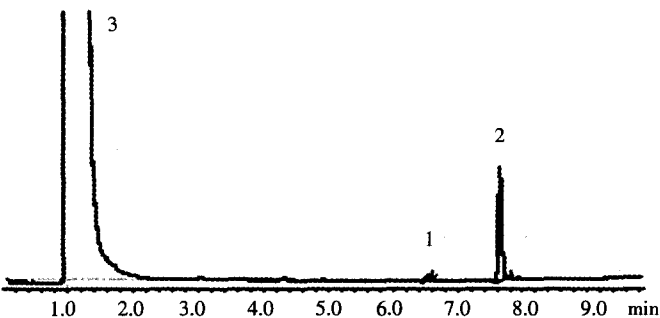
1.甲醇;2.二氯甲烷;3.苯;4.DMF
图1 甲醇、二氯甲烷对照品溶液图谱



1.甲醇;2.二氯甲烷;3.苯;4.DMF
图2 甲醇、二氯甲烷供试品溶液图谱



1.DMF;2.N,N-二甲基乙酰胺;3.20%甲醇
图3 N,N-二甲基乙酰胺对照品溶液色谱图



1.DMF;2.N,N-二甲基乙酰胺;3.20%甲醇
图4 N,N-二甲基乙酰胺供试品溶液色谱图

条件进样,测得甲醇、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺的检测限(S/N=3)分别为 0.065 7、1.100 0、0.016 6 μg/mL。

表1 残留溶剂测定精密度试验

序号	苯/甲醇峰面积之比	苯/二氯甲烷峰面积之比	N,N-二甲基乙酰胺/DMF峰面积之比
1	1.765	13.69	1.567
2	1.794	13.72	1.542
3	1.758	13.56	1.458
4	1.780	13.15	1.489
5	1.807	13.72	1.581
6	1.785	13.66	1.554
RSD(%)	1.02	1.61	3.13

2.7 回收率试验

2.7.1 甲醇、二氯甲烷回收率试验测定

分别量取甲醇、二氯甲烷对照储备液 0.5、4.0、5.0 mL,置 10 mL 量瓶中,加二甲基亚砷稀释至刻度,摇匀,作为浓度为 12%、100%、120% 的混合加样溶液。分别精密称取已知残留量的供试品(批号:20080603)各 0.1 g,分别加以上各浓度的混合溶液 10 mL 使其溶解,摇匀,分别依法测定,计算各有机溶剂的平均回收率。见表 2。

表2 甲醇、二氯甲烷回收率测定结果

对照品	加入量 (mg/mL)	实测值 (mg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
甲醇	0.065 7	0.066 0	0.999	0.998	0.43
	0.545 0	0.543 0	0.993		
	0.657 0	0.658 5	1.002		
二氯甲烷	0.017 6	0.016 6	0.945	0.984	6.97
	0.148 0	0.154 4	1.043		
	0.176 0	0.169 5	0.963		

2.7.2 N,N-二甲基甲酰胺回收率试验测定

分别量取 N,N-二甲基甲酰胺对照储备液 4、5、6 mL,置 10 mL 量瓶中,加 0.5 mL 内标溶液,用 20% 甲醇稀释至刻度,摇匀,作为浓度为 80%、100%、120% 的混合加样溶液。分别精密称取已知残留量的供试品(批号:20080601)各 0.1 g,分别加以上各浓度的混合溶液 10 mL 使其溶解,摇匀,分别依法测定,计算 N,N-二甲基甲酰胺平均回收率,见表 3。

表3 N,N-二甲基甲酰胺回收率测定结果

对照品	加入量 (mg/mL)	实测值 (mg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
DMF	0.066 4	0.068 8	1.029		
	0.083 0	0.080 7	0.973	0.991	3.96
	0.099 6	0.096 7	0.971		

2.8 样品测定

取盐酸法舒地尔样品 3 批,各约 1.0 g,精密称定,置 10 mL 量瓶中,加 0.5 mL 内标溶液和 DMF 溶解并定容,摇匀,平行制备 3 份。加 0.5 mL 内标溶液和 20% 甲醇溶解并定容,摇匀,平行制备 3 份。按上述色谱条件进样,以内标法计算,取

平均值作为测定结果。见表 4。由表 4 可知,3 批样品的残留溶剂均符合规定(残留溶剂甲醇 ≤ 0.3%,二氯甲烷 ≤ 0.06%,DMF ≤ 0.088%)。

表4 残留溶剂检测结果(%)

批号	甲醇	二氯甲烷	DMF
20080601	0.004	0.003	0.014
20080602	0.003	0.003	0.016
20080603	0.003	0.003	0.014

3 讨论

3.1 进样方式的选择

通常采用顶空进样和直接进样的方法,由于 N,N-二甲基甲酰胺沸点为 180℃,不能采用顶空进样法,改用直接进样,但是 N,N-二甲基甲酰胺出峰较晚,不能选用高沸点溶剂作溶媒,但如果选用低熔点溶剂作溶媒又干扰了甲醇及二氯甲烷的出峰,所以检测 3 种残溶不能共用同一种溶媒。因此,选用两种溶媒,采用两种不同的程序升温,进行测定样品中甲醇、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺含量。

3.2 色谱柱的选择

本实验室曾选用不同极性 & 不同口径的毛细管色谱柱,如 SE-54(30 m×0.32 mm,0.25 μm)、SE-54(30 m×0.53 mm,5.0 μm)、FFAP(25 m×0.32 mm,0.50 μm) 经多次试验采用 SE-54(30 m×0.53 mm,5.0 μm) 柱,可使 DMF 达到较好的基线分离,基线平直,色谱峰峰型对称,分离度较好,同时也能满足甲醇及二氯甲烷的检测要求。因此本次检测采用的是毛细管色谱柱 SE-54(30 m×0.53 mm,5.0 μm),此色谱柱为大口径色谱柱。

3.3 残留溶液含量计算方法的选择

本文建立以添加内标物的方法,采用内标法计算残留溶液的含量。测定组分分离完全,各组分出峰时间靠近,原料药溶液中各组分出峰保留时间与相应物质对照品溶液出峰保留时间一致,精密性及线性较为理想,添加组分回收完全。

综上所述,本检测方法操作简便,经济可行,并已于近期通过了药品监督管理局的审核。

[参考文献]

- [1] 孟祥军,齐杰,田莉.盐酸法舒地尔的合成、药理和临床研究进展[J].沈阳医学院学报,2010,12(1):45-50.
- [2] 国家药典委员会.中国药典[S].二部.北京:中国医药科技出版社,2010:附录 61.
- [3] 安彦,王卫,唐素芳.顶空毛细管气相色谱法测定地塞米松磷酸钠有机溶剂残留量[J].天津药学,2010,22(4):12-14.
- [4] 赵玉新,刘丹,任吉秋.气相色谱法测定头孢孟多酯钠的残留溶剂[J].中国医药导报,2010,7(13):49-50.
- [5] 甘丽卿,叶志彬.毛细管气相色谱法测定头孢匹罗中有机溶剂残留量[J].海峡药学,2011,23(8):90-92.
- [6] 祖金凤.气相色谱法测定枸橼酸莫沙必利中有机溶剂残留量[J].齐鲁药事,2011,30(9):519-520.

(收稿日期:2011-11-08 本文编辑:卫莉)