

# 顶空毛细管气相色谱法测定羟戊基苯甲酸钾中的残留溶剂

张艳红<sup>1</sup>, 吕昭云<sup>2</sup>, 张颖<sup>1</sup>, 张秋佳<sup>1</sup>, 张宝军<sup>1</sup>

(1 国家新药开发工程技术研究中心 北京科莱博医药开发有限责任公司, 北京 102600 2 北京协和药厂, 北京 102600)

**摘要** 目的: 建立顶空毛细管气相色谱法测定羟戊基苯甲酸钾中的残留溶剂。方法: 采用气相色谱法测定, 以 0.1 mol L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液为溶解介质, 甲醇为内标; 色谱柱为石英毛细管柱 (DB-1, 60 m × 0.32 mm × 1 μm), FID 检测器, 载气为氮气。结果: 二氯甲烷、丙酮、乙醇均能得到有效分离; 线性范围分别为 1.7~170, 10~1000, 10~1000 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9991 \sim 0.9998$ ); 平均回收率为 98.0%~103.7%。结论: 本方法灵敏, 准确可靠, 可用于羟戊基苯甲酸钾原料药中有机溶剂残留量的检测。

**关键词:** 顶空毛细管气相色谱法; 羟戊基苯甲酸钾; 残留溶剂

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)09-1565-03

## Determination of residual solvent in potassium-hydroxypentyl benzoate by headspace capillary GC

ZHANG Yan-hong<sup>1</sup>, LÜ Zhao-yun<sup>2</sup>, ZHANG Ying<sup>1</sup>, ZHANG Qiu-jia<sup>1</sup>, ZHANG Bao-jun<sup>1</sup>

(1 National Engineering Research Center for the Development of New Drugs Beijing Collab Pharma Co., Ltd, Beijing 102600, China  
2 Beijing Union Pharmaceutical Factory, Beijing 102600, China)

**Abstract Objective** To establish a method of headspace capillary GC for the determination of residual solvents in potassium-hydroxypentyl benzoate. **Methods** The residual solvents (dichloromethane, acetone, ethanol) were separated by DB-1 capillary column (60 m × 0.32 mm × 1 μm) with an FID detector. The carried gas was nitrogen. The sample was dissolved in 0.1 mol L<sup>-1</sup> caustic soda solution, methanol was used as the internal standard. **Results** Three residual solvents (dichloromethane, acetone, ethanol) were completely separated. The calibration curves were linear in the ranges of 1.7-170, 10-1000, 10-1000 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9991 \sim 0.9998$ ), respectively. The average recovery was in the range of 98.0% - 103.7%. **Conclusion** The established method is accurate and reliable and can be used for the determination of residual solvents in potassium-hydroxypentyl benzoate.

**Key words** headspace capillary GC; potassium-hydroxypentyl benzoate; residual organic solvent

羟戊基苯甲酸钾 [消旋 2-(α-羟基戊基)苯甲酸钾 (简称 dl-HPB)] 是国家一类抗脑缺血新药 3-正丁基苯酞 (简称 dl-NBP, 商品名“恩必普”) 的前体药物<sup>[1,2]</sup>。dl-HPB 是全新的化学实体, 为白色结晶性粉末状物质, 易溶于水, 与 dl-NBP 油状液体性状比较, 在制剂、包装、运输和贮藏等方面具有更多的优点。动物实验表明 dl-HPB 无论口服或静脉给药, 在体内经化学或酶的作用可迅速、完全地转变成 dl-NBP 而发挥药效<sup>[3,4]</sup>。本文根据 dl-HPB 的合成工艺, 参照 ICH 颁布的残留溶剂研究指导原则和中国药典 2005 年版二部<sup>[5]</sup>附录残留溶剂测定

法, 以制备过程中可能残留的二氯甲烷、丙酮、乙醇 3 种有机溶剂为检测对象, 采用顶空气相色谱法, 对样品溶解介质、内标物质及气相色谱参数等进行了优化选择, 方法简便, 结果准确可靠, 重现性好。

### 1 仪器与试剂

Agilent 6820 气相色谱仪及工作站, Agilent 7694E 顶空进样仪, FID 检测器。

dl-HPB 样品由中国医学科学院药物研究所提供。二氯甲烷、丙酮、乙醇均为色谱标准物, 购自北京化学试剂公司; 甲醇为色谱纯试剂, 纯化水, 其他试剂均为分析纯。

## 2 色谱条件

色谱柱为 Agilent DB-1 (60 m × 0.32 mm × 1 μm); 进样口温度为 180 °C; FID 检测器温度 250 °C; 柱温采取程序升温, 初始温度 50 °C, 保持 8 min, 再以 10 °C · min<sup>-1</sup> 的速率升至 120 °C, 保持 3 min; 载气为高纯氮气, 流速 1 mL · min<sup>-1</sup>, 分流比为 50:1; 进样瓶平衡温度为 100 °C, 平衡时间为 20 min, 定量环温度为 105 °C, 传输管温度为 110 °C。

## 3 测定方法

**3.1 内标溶液的配制** 精密称取甲醇适量, 以 0.1 mol · L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液配制 2 mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液, 即得。

**3.2 对照品储备液的配制** 精密称取二氯甲烷、丙酮、乙醇适量, 以内标溶液制成浓度分别为 0.65 5 mg · mL<sup>-1</sup> 的混合溶液, 即得。

**3.3 供试品溶液** 取 dl- PHPB 样品约 1 g 精密称定, 加内标溶液溶解并定容至 5 mL, 摇匀, 即得。

**3.4 测定** 取供试品溶液 1 mL 于 10 mL 顶空进样瓶中, 密封, 预热平衡后, 取顶空瓶上部气体 1 mL 进样。

## 4 方法学验证

**4.1 系统适用性** 各峰的保留时间分别为甲醇 6.0 min, 乙醇 6.6 min, 丙酮 7.1 min, 二氯甲烷 8.2 min, 各峰之间的分离度均符合要求, 且峰对称性良好。

**4.2 检测限和定量限的确定** 精密称取二氯甲烷、丙酮、乙醇适量, 以内标溶液分步稀释, 在上述色谱条件下测定, 以信噪比  $S/N = 3$  计算检测限, 结果分别为 0.64, 0.08, 3 μg · mL<sup>-1</sup>; 以信噪比  $S/N = 10$  计算定量限, 结果分别为 1.95, 0.26, 10 μg · mL<sup>-1</sup>。

**4.3 线性关系考察** 精密量取对照品储备液 2.0, 1.2, 1.0, 0.6, 0.2, 0.05, 0.02 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 加内标溶液稀释至刻度, 摇匀。分别精密量取 1.0 mL 置 10 mL 顶空瓶中, 依法进行测定, 以浓度 (mg · mL<sup>-1</sup>) 为横坐标, 各溶剂峰与内标峰的峰面积比值为纵坐标, 进行线性回归。结果见表 1。

表 1 回归方程与线性范围

Tab 1 Calibration curve data of 3 solvents

残留溶剂 (residual solvent)	回归方程 (regression equation)	$r$	线性范围 (linear range) / μg · mL <sup>-1</sup>
二氯甲烷 (dichloromethane)	$Y = 2.087X - 0.005$	0.9991	1.7~170
丙酮 (acetone)	$Y = 4.135X - 0.038$	0.9994	10~1000
乙醇 (ethanol)	$Y = 1.350X - 0.030$	0.9998	10~1000

**4.4 精密度试验** 取同一份对照品储备液, 分别加同一内标溶液稀释 6 份, 连续进样, 计算各溶剂峰面积与内标峰面积的比值, 结果二氯甲烷、丙酮、乙醇峰面积比的 RSD 分别为 4.5%, 0.8%, 1.2%。

**4.5 重复性试验** 测定同一批样品 6 份, 按“3.3”项下方法制备供试品溶液, 依法测定。结果 6 份平行样品均未检出丙酮和二氯甲烷, 测得乙醇含量为 0.1343% RSD 为 2.9% ( $n = 6$ )。

**4.6 回收率试验** 取已知残留溶剂含量 (乙醇含量 0.1343%) 的样品约 1 g 精密称定, 共 9 份, 分别置 5 mL 量瓶中, 分别精密加入对照品储备液 0.8, 1.0, 1.2 mL (各 3 份), 再加内标溶液定容至刻度, 依法测定, 计算回收率。结果二氯甲烷、丙酮、乙醇回收率均在 80% ~ 120% 之间, 回收率平均值 ( $n = 9$ ) 分别为 98.0%, 100.8%, 103.7%。符合残留溶剂测定准确度的要求。

## 5 样品测定

按“3.3”项下方法制备供试品溶液; 取对照品储备液适量, 加内标溶液定量稀释制成每 1 mL 中分别含二氯甲烷 0.06 mg, 乙醇 0.5 mg, 丙酮 0.5 mg 的混合溶液, 作为对照品溶液。依法测定, 按内标法以峰面积计算二氯甲烷、乙醇、丙酮的含量。结果见表 2, 色谱图见图 1。

表 2 样品中残留溶剂测定结果 (% ,  $n = 3$ )

Tab 2 Results of sample analysis

批号 (Lot No.)	乙醇 (ethanol)	二氯甲烷 (dichloromethane)	丙酮 (acetone)
061226	0.2086	0.00004	0.0014
061227	0.2232	未检测出 (non-detected)	0.0011
061229	0.2419	未检测出 (non-detected)	0.0003

## 6 讨论

**6.1 研究对象的确定** 供试样品合成工艺中用到二氯甲烷、丙酮和乙醇, 参照 ICH 残留溶剂指导原则的要求, 对可能存在的残留溶剂进行检测。同时, 通过程序升温的方式, 关注到本品不存在由反应副产物、合成原料或反应溶剂引入的其他溶剂。

**6.2 色谱柱的选择** 先后比较了 DB-WAX 和 DB-1 这 2 种不同极性的毛细管柱, 各待测组分在 2 种毛细管柱中均能得到有效分离, 发现在 DB-1 柱中各组分的灵敏度、分离效果均优于 DB-WAX 柱, 最终选择 DB-1 毛细管柱用于本品的检测。

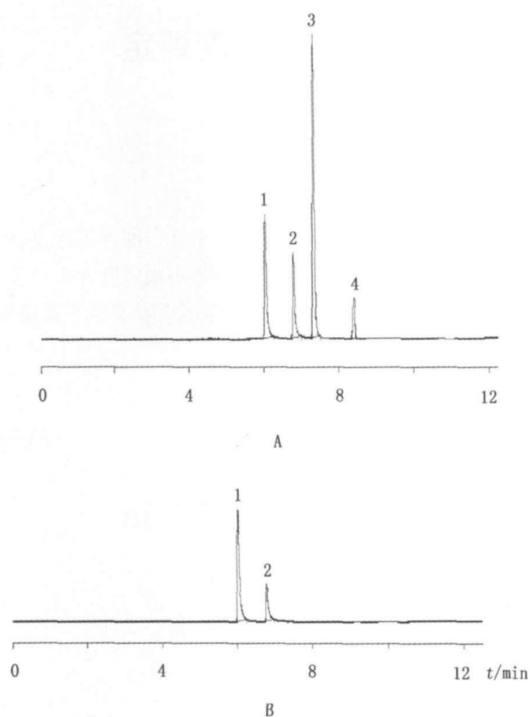


图 1 对照品 (A) 及样品 (B) GC 色谱图

Fig 1 GC chromatograms of reference substances (A) and sample (B)  
 1. 甲醇 (methanol) 2. 乙醇 (ethanol) 3. 丙酮 (acetone) 4. 二氯甲烷 (dichloromethane)

**6.3 顶空预热温度选择** 取二氯甲烷、丙酮、乙醇适量,加水制成一定浓度溶液,取 1 mL 置于顶空瓶中,分别在 60 °C、70 °C 和 80 °C 的顶空条件下进样。结果表明,待测组分在 80 °C 预热 30 min 浓度较高,故选择 80 °C 作为顶空瓶的预热温度。

**6.4 溶解介质的选择** dl-HPBP 为水溶性化合物,在残留溶剂测定中,水是较理想的溶解介质,研究过程中曾以水为溶解介质,但是本品在水溶液中受热不稳定,容易环合成 dl-NBP (油状液体,沸点 290~300 °C) 堵塞顶空管路,导致不出峰。根据 dl-HPBP 易溶于 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液,并且在碱水溶液中稳定的性质,以 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液为介质,解决了管路堵塞问题。提示在选择

溶解介质的时候除了考虑供试样品的溶解性能和对待测组分的干扰情况外,还应考虑供试样品在介质中的稳定性。

**6.5 内标物质的选择** 研究过程中曾以二氯乙烷为内标物质,试验发现内标溶液色谱图中产生一未知杂质峰,可能为二氯乙烷在强碱溶液中加热发生消去反应所得杂质,干扰测定。改用甲醇为内标,色谱峰位置接近待测组分,并且与各组分有良好的分离,不与其他成分发生反应,最终选择甲醇为内标物质。提示在选择内标物质时也应考虑内标物质在溶解介质中的稳定性。

**6.6 柱温的选择** 本品在 50 °C 恒温条件下保持 8 min 能够保证沸点较低的二氯甲烷、丙酮、乙醇和甲醇的分离,再以 10 °C·min<sup>-1</sup> 升至 120 °C,并保持 3 min,以确保样品中如果存在其他较高沸点的溶剂也能被有效检出。

参考文献

- 1 YANG Jing-hua (杨靖华), ZHANG Ying-xin (张迎新), FENG Yi-pu (冯亦璞). The method for preparation of optical activity 3- n-butylphthalide (制备光学活性 3-正丁苯酞的方法). CN: 1136209. 2001-02-14
- 2 YANG Jing-hua (杨靖华), WANG Xiao-liang (王晓良), XU Zhi-bin (徐志斌), et al. The preparation and usage of dl- potassium-2-(α-hydroxyphenyl) benzoate [2-(α-羟基戊基)苯甲酸盐及其制法和用途]. CN: 1243541. 2002-12-04
- 3 LI Jiang (李江), WANG Xiao-liang (王晓良). Pharmacokinetics of the in vivo and in vitro conversion of prodrug dl-HPBP (前药 dl-HPBP 的体内外转化及药代动力学研究). Chin Pharm acol (中国药理通讯), 2007, 24(3): 50
- 4 FENG Nan (冯楠), XU Shao-feng (徐少锋), WANG Xiao-liang (王晓良). Protection effect of HPBP on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats brain by intra Inj (静脉注射 HPBP 对大鼠脑缺血再灌注损伤的脑保护作用研究). Chin Pharm acol (中国药理通讯), 2007, 24(3): 23
- 5 ChP (中国药典). 2005. Vol II (二部): Appendix (附录) VIII P

(本文于 2008 年 11 月 19 日收到)