

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.17.016

顶空气相色谱法测定国产米格列奈钙原料药中有机溶剂残留

李 珉, 侯金凤, 刘海涛, 车宝泉, 李文东[△]

(北京市药品检验所·国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室·中药成分分析与生物评价
北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 建立同时测定国产米格列奈钙原料药中甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺等有机溶剂残留量的顶空气相色谱法。方法 色谱柱为 DB-624 毛细管色谱柱(以 6% 氰丙基苯基-94% 二甲基聚硅氧烷为固定液, 60 m×0.53 mm, 3 μm), 程序升温, 进样口温度为 220 ℃, 检测器为火焰离子化检测器(FID), 温度为 250 ℃, 载气为氮气, 载气流速为 2.0 mL/min, 分流比为 10:1, 顶空加热温度为 80 ℃, 平衡时间为 30 min。结果 甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺的质量浓度分别在 0.03~0.45 mg/mL, 0.05~0.75 mg/mL, 0.05~0.75 mg/mL, 0.004 1~0.061 0 mg/mL, 0.006~0.089 mg/mL, 0.003~0.045 mg/mL, 0.05~0.75 mg/mL, 0.007 3~0.110 0 mg/mL, 0.002~0.030 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好(r 均大于 0.995); 检测限分别为 1.50, 2.50, 1.00, 0.41, 0.59, 0.06, 0.50, 0.37, 0.40 μg/mL, 定量限分别为 3.00, 5.00, 2.50, 2.00, 1.20, 0.15, 1.00, 1.50, 0.99 μg/mL; 精密度试验的 RSD 分别为 5.07%, 5.46%, 5.16%, 5.14%, 3.91%, 4.77%, 3.71%, 3.75%, 4.62% ($n=6$); 平均加样回收率分别为 98.73%, 98.85%, 99.46%, 100.91%, 95.67%, 106.85%, 102.35%, 100.79%, 102.53%, RSD 分别为 3.17%, 3.31%, 3.27%, 3.34%, 2.97%, 3.40%, 2.78%, 2.85%, 3.72% ($n=6$)。国内 5 个厂家的 15 批次米格列奈钙原料药样品中均未检出上述 9 种有机溶剂残留。结论 所建立的方法可用于国产米格列奈钙原料药中有机溶剂残留的测定; 国产米格列奈钙原料药中有机溶剂残留控制情况较好。

关键词: 米格列奈钙; 原料药; 有机溶剂残留; 顶空气相色谱法

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)17-0061-04

Determination of Organic Solvent Residues in Domestic Active Pharmaceutical Ingredients of Mitiglinide Calcium by Headspace Gas Chromatography

LI Min, HOU Jin Feng, LIU Haitao, CHE Baoquan, LI Wendong

(Beijing Institute of Drug Control · NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs · Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: Objective To establish a headspace chromatographic method for the simultaneous determination of nine kinds of organic solvent residues (methanol, ethanol, isopropanol, acetonitrile, dichloromethane, n -hexane, ethyl acetate, tetrahydrofuran, and triethylamine) in the domestic active pharmaceutical ingredients (API) of mitiglinide calcium. **Methods** The chromatographic column was DB-624 capillary column (6% cyanopropyl phenyl-94% dimethylpolysiloxane was taken as the stationary phase, 60 m×0.53 mm, 3 μm) with temperature-programmed, the temperature of the injection port was 220 ℃, the detector was flame ionization detector (FID) with temperature of 250 ℃, the carrier gas was nitrogen with flow rate of 2.0 mL/min, the split ratio was 10:1, the headspace heating temperature was 80 ℃, and the equilibrium time was 30 min. **Results** The linear ranges of methanol, ethanol, isopropanol, acetonitrile, dichloromethane, n -hexane, ethyl acetate, tetrahydrofuran and triethylamine were 0.03-0.45 mg/mL, 0.05-0.75 mg/mL, 0.05-0.75 mg/mL, 0.004 1-0.061 0 mg/mL, 0.006-0.089 mg/mL, 0.003-0.045 mg/mL, 0.05-0.75 mg/mL, 0.007 3-0.110 0 mg/mL, 0.002-0.030 mg/mL ($r > 0.995$), their limits of detection (LOD) were 1.50, 2.50, 1.00, 0.41, 0.59, 0.06, 0.50, 0.37 and 0.40 μg/mL, respectively, and their limits of quantitation (LOQ) were 3.00, 5.00, 2.50, 2.00, 1.20, 0.15, 1.00, 1.50 and 0.99 μg/mL, respectively. The RSD s of their precision tests were 5.07%, 5.46%, 5.16%, 5.14%, 3.91%, 4.77%, 3.71%, 3.75% and 4.62% ($n=6$), respectively. The average recoveries of methanol, ethanol, isopropanol, acetonitrile, dichloromethane, n -hexane, ethyl acetate, tetrahydrofuran and triethylamine were 98.73%, 98.85%, 99.46%, 100.91%, 95.67%, 106.85%, 102.35%, 100.79%, 102.53% with RSD s of 3.17%, 3.31%, 3.27%, 3.34%, 2.97%, 3.40%, 2.78%, 2.85% and 3.72% ($n=6$), respectively. The above nine organic solvent residues were not detected in 15 batches of API of mitiglinide calcium from five domestic manufacturers. **Conclusion** The established method can be used for the simultaneous determination of organic solvent residues in the domestic API of mitiglinide calcium. The organic solvents residues in the domestic API of mitiglinide calcium were under well controlled.

Key words: mitiglinide calcium; active pharmaceutical ingredients; organic solvent residues; headspace gas chromatography

第一作者: 李珉, 女, 博士, 主管药师, 研究方向为药物分析及质量控制, (电话)010-52779629 (电子信箱) mirandali418@sina.com。

[△]通信作者: 李文东, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药物分析及质量控制, (电话)010-52779601 (电子信箱) sxlwd76@163.com。

米格列奈,化学名为2-(S)-苄基-4-氧代-4-(顺-全氢异吡啶-2-基)丁酸,是继瑞格列奈、那格列奈之后的又一新型苯甲酸衍生物类降糖药物。2004年由日本Kissei制药公司研制的米格列奈钙首次在日本上市^[1-3]。米格列奈钙可通过抑制胰腺B细胞膜上ATP依赖型K⁺通道,促进Ca²⁺内流,从而增加细胞内Ca²⁺浓度,促进胰岛素分泌,发挥降血糖作用,具有起效快、作用时间短、引起低血糖危险性小的优点,可单独用于经饮食和运动疗法不能有效控制高血糖的非胰岛素依赖型糖尿病患者,又称“餐时血糖调节剂”^[4-6]。目前,各国药典中仅《日本药局方》XVII版^[7]中收录了米格列奈钙原料,但其标准中未设置残留溶剂项目。国内各企业所产米格列奈钙原料分别执行不同的标准^[8-11]控制不同溶剂残留。在已有文献报道中,米格列奈钙残留溶剂的检测方法均未能完全覆盖各企业^[12-13]。本研究中针对撰写时在产的5家国内企业使用的9种残留溶剂,建立了统一的米格列奈钙残留溶剂的测定方法,并对国内上市产品进行了评价。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

7890型气相色谱仪,包括火焰离子化检测器(FID)、7697A型顶空进样器(美国Agilent公司);XA205型电子天平(瑞士MettlerToledo公司,精度为十万分之一)。

1.2 试药

米格列奈钙原料样品(企业A,批号分别为0320160401,0320160501,0320160601;企业B,批号分别为01616015,01616021,01616022;企业C,批号分别为150801,150802,150803;企业D,批号分别为MG-161101, MG-161102, MG-160403;企业E,批号分别为170401Y, 170402Y, 170403Y)。甲醇(批号为20150717)、无水乙醇(批号为20150717)、异丙醇(批号为20110803)、乙腈(批号为20141105)、二氯甲烷(批号为20150710)、正己烷(批号为20150723)、乙酸乙酯(批号为20120222)、四氢呋喃(批号为20141109)和三乙胺(批号为20110905),均购自国药集团化学试剂有限公司,均为色标对照品,含量均为100%;二甲基亚砜为色谱纯(美国Merck公司);水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 气相色谱条件

色谱柱:Agilent DB-624毛细管柱(以6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷为固定液,60 m×0.53 mm,3 μm);柱温:程序升温,初始柱温为40℃,维持12 min,以5℃/min的速率升至80℃,维持5 min,再以50℃/min的速率升至200℃,维持15 min;进样口温度:220℃;顶空瓶平衡温度:80℃;平衡时间:30 min;进样时间:1 min;载气:高纯度氮气;载气流速:1.0 mL/min;分流

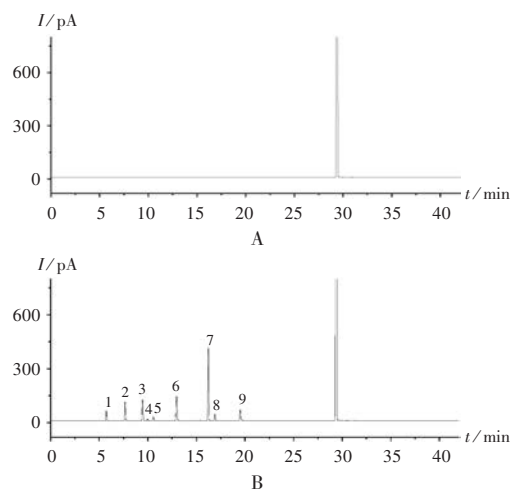
比:10:1;检测器:FID;检测器温度:250℃。

2.2 溶液制备

分别取甲醇300 mg、乙醇500 mg、异丙醇500 mg、乙腈41 mg、二氯甲烷60 mg、正己烷29 mg、乙酸乙酯500 mg、四氢呋喃72 mg和三乙胺20 mg,精密称定,置同一100 mL容量瓶中,用二甲基亚砜溶解并定容,摇匀,作为混合对照品贮备液。精密量取5 mL,置50 mL容量瓶中,用二甲基亚砜定容,摇匀,即得混合对照品溶液。取样品约100 mg,精密称定,置顶空瓶中,精密加入二甲基亚砜1 mL,密封,即得供试品溶液。取二甲基亚砜作为空白溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取上述混合对照品溶液、空白溶剂各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图(见图1)。各成分色谱峰分离度均大于2.9,基线分离良好,无干扰峰,表明专属性良好。



1. 甲醇 2. 乙醇 3. 异丙醇 4. 乙腈 5. 二氯甲烷
6. 正己烷 7. 乙酸乙酯 8. 四氢呋喃 9. 三乙胺
A. 空白溶剂 B. 对照品溶液

图1 空白溶液及对照品溶液高效液相色谱图

1. methanol 2. ethanol 3. isopropanol 4. acetonitrile 5. dichloromethane
6. n-hexane 7. ethyl acetate 8. tetrahydrofuran 9. triethylamine
A. Blank solution B. Reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of blank solution and reference solution

线性关系考察:分别精密量取2.2项下混合对照品贮备液适量,以二甲基亚砜制成系列混合对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X, mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程和线性范围。结果见表1。

检测限与定量限考察:分别精密量取2.2项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,并按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比为3:1和10:1分别计算检测限和定量限。结果见表2。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按

表1 线性关系考察结果

Tab. 1 Results of the linear relation test

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围(mg/mL)
甲醇	$Y_1 = 1\,042.2 X_1 - 1.452\,4$	0.999 8	0.03 ~ 0.45
乙醇	$Y_2 = 1\,207.1 X_2 - 3.423\,3$	0.999 8	0.05 ~ 0.75
异丙醇	$Y_3 = 1\,483.4 X_3 - 0.983\,3$	0.999 8	0.05 ~ 0.75
乙腈	$Y_4 = 1\,551.6 X_4 - 0.280\,7$	0.999 8	0.004 1 ~ 0.061 0
二氯甲烷	$Y_5 = 2\,300.2 X_5 - 0.418\,5$	0.999 8	0.006 ~ 0.089
正己烷	$Y_6 = 33\,414 X_6 - 43.872$	0.996 0	0.003 ~ 0.045
乙酸乙酯	$Y_7 = 4\,483.2 X_7 - 10.49$	0.999 8	0.05 ~ 0.75
四氢呋喃	$Y_8 = 2\,945.3 X_8 - 2.307\,1$	0.999 7	0.007 3 ~ 0.110 0
三乙胺	$Y_9 = 20\,206 X_9 - 22.841$	0.998 0	0.002 ~ 0.030

表2 检测限和定量限考察结果

Tab. 2 Results of LOD and LOQ

成分	检测限		定量限	
	质量浓度(μg/mL)	百分含量(%)	质量浓度(μg/mL)	百分含量(%)
甲醇	1.50	0.001 5	3.00	0.003 0
乙醇	2.50	0.002 5	5.00	0.005 0
异丙醇	1.00	0.001 0	2.50	0.002 5
乙腈	0.41	0.000 41	2.00	0.002 0
二氯甲烷	0.59	0.000 59	1.20	0.001 2
正己烷	0.06	0.000 06	0.15	0.000 2
乙酸乙酯	0.50	0.000 50	1.00	0.001 0
四氢呋喃	0.37	0.000 37	1.50	0.001 5
三乙胺	0.40	0.000 40	0.99	0.001 0

2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,甲醇、乙醇、异丙醇、乙腈、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺峰面积的RSD分别为5.07%, 5.46%, 5.16%, 5.14%, 3.91%, 4.71%, 3.77%, 3.75%, 4.62% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(企业A,批号为0320160401)适量,共9份,每份100 mg,分别加入一定质量浓度的混合对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表3。

2.4 样品含量测定

取样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定。结果均未检出任何有机溶剂残留。详见图2。

3 讨论

目前各国药典中,即使是唯一收录了米格列奈钙原料的XⅦ版《日本药局方》^[7]中也未设置残留溶剂项目。国内各家企业生产时均执行不同的标准^[8-11]控制不同残留溶剂。由于各企业生产工艺中所使用的有机溶剂不同,本文作者与目前国内拥有米格列奈钙生产批准文号的6家生产企业进行了沟通,对在产5家企业工艺中使

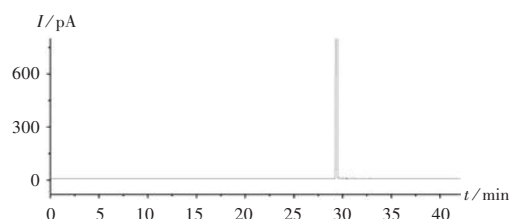


图2 供试品溶液高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of test solution

用到的溶剂进行了汇总。

本研究中,除三乙胺(未收录)外,各溶剂均按2020年版《中国药典(四部)》通则0861残留溶剂测定法中规定的限度来折算并制备^[14]。而在2020年版《中国药典(二部)》中,存在3个品种的残留溶剂中包含了三乙胺。分别为齐多夫定项下三乙胺限度为0.02%^{[15]481-482},拉米夫定项下三乙胺限度为0.032%^{[15]774-775},罗红霉素项下三乙胺限度为0.032%^{[15]797-799}。根据最低限度折算对照品溶液中三乙胺的浓度,并进行制备。对新建方法灵敏度进行验证,除三乙胺外,各残留溶剂的定量限均低于前述规定限度的1/20,检测限均低于规定限度的1/100。而三乙胺定量限和检测限分别为2020年版《中国药典(二部)》中最低限度0.02%的1/20和1/50,该结果表明新建方法灵敏度较高。

本研究中建立的顶空气相色谱法可测定米格列奈钙原料中9种残留溶剂含量,经方法学验证,该方法灵敏度高,专属性、精密度、准确度等均符合分析需求。采用该方法对5家国内企业的15批次产品进行了残留溶剂测定,各企业产品均未检出残留溶剂。该结果表明国内各企业米格列奈钙产品的溶剂残留较少,工艺控制较好。

参考文献

- [1] OHNOTA H, KOIZUMI T, TSUTSUMI N, et al. Novel Rapid-acting and short-acting hypoglycemic agent, a calcium(2s)-2-benzyl-3-(cis-hexahydro-2-isoinidolyl carbonyl) propionate (KAD-1229) that acts on the sulfonylurea receptor-comparison of effects between KAD-1229 and gliclazide[J]. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1994, 269(2): 489-495.
- [2] KAISER N, NESHER R, OPRESCU A, et al. Characterization of the action of S 21403 (mitiglinide) on insulin secretion and biosynthesis in normal and diabetic beta-cells[J]. British Journal of Pharmacology, 2005, 146(6): 872-881.
- [3] 李珉, 刘海涛, 侯金凤, 等. 米格列奈及其3个异构体杂质的反相液相色谱分离及质谱碎裂分析[J]. 色谱, 2019, 37(4): 412-417.
- [4] 刘史佳, 黄国栋, 孙冰婷, 等. 米格列奈片在健康人体内的药动学和生物等效性评价[J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 26(1): 10-14.
- [5] ZHANG Y, DING L, TIAN Y, et al. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry for the quantification of

表3 加样回收试验结果($n=6$)
Tab. 3 Results of the recovery test($n=6$)

成分	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)	成分	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)			
甲醇	0.298 08	0.300 95	100.96	98.73	3.17	二氯甲烷	0.059 00	0.053 95	91.44	106.85	3.40			
	0.298 08	0.298 30	100.07				0.059 00	0.057 47	97.41					
	0.298 08	0.286 30	96.05			正己烷	0.059 00	0.058 03	98.36					
	0.298 08	0.279 11	93.64				0.029 97	0.030 42	101.50					
	0.298 08	0.301 55	101.16				0.029 97	0.032 33	107.87					
	0.298 08	0.299 49	100.47				0.029 97	0.031 30	104.44					
乙醇	0.500 95	0.508 08	101.42	98.85	3.31		0.029 97	0.031 94	106.57					
	0.500 95	0.498 40	99.49				0.029 97	0.032 55	108.61					
	0.500 95	0.481 17	96.05				0.029 97	0.033 59	112.08					
	0.500 95	0.469 18	93.66			乙酸乙酯	0.502 15	0.515 14	102.59					
	0.500 95	0.506 17	101.04					0.502 15	0.520 00			103.55		
	0.500 95	0.508 26	101.46					0.502 15	0.501 84			99.94	102.35	2.78
异丙醇	0.500 65	0.508 83	101.63		0.502 15	0.492 15	98.01							
	0.500 65	0.501 07	100.08	99.46	3.27		0.502 15	0.525 43	104.64					
	0.500 65	0.480 67	96.01				0.502 15	0.529 11	105.37					
	0.500 65	0.474 60	94.80			四氢呋喃	0.073 08	0.073 82	101.01					
	0.500 65	0.510 49	101.97					0.073 08	0.074 58	102.05				
	0.500 65	0.511 88	102.24					0.073 08	0.071 93	98.43	100.79	2.85		
乙腈	0.040 92	0.042 23	103.20					0.073 08	0.070 42	96.36				
	0.040 92	0.041 70	101.91	100.91	3.34		0.073 08	0.075 30	103.04					
	0.040 92	0.039 76	97.17				0.073 08	0.075 88	103.83					
	0.040 92	0.039 34	96.14			三乙胺	0.019 88	0.019 17	96.43					
	0.040 92	0.042 28	103.32					0.019 88	0.020 72	104.23				
	0.040 92	0.042 44	103.71					0.019 88	0.020 08	101.01	102.53	3.72		
二氯甲烷	0.059 00	0.057 34	97.19				0.019 88	0.020 08	101.01					
	0.059 00	0.057 15	96.86		0.019 88	0.021 06	105.94							
	0.059 00	0.054 73	92.76	95.67	2.97		0.019 88	0.021 19	106.59					

- mitiglinide in human plasma: validation and its application to pharmacokinetic studies[J]. Biomedical Chromatography, 2008, 22(8):873-878.
- [6] HADI H, MAKHALEH A, SAAD B, et al. Hollow fiber liquid-phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of trace mitiglinide in biological fluids[J]. Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2012(895/896): 131-136.
- [7] The Japanese Pharmacopoeia. JP17[M]. Tokyo: Ministry of Health, Labour and Welfare, 2016: 1142-1143.
- [8] YBH01942015, 国家食品药品监督管理总局标准[S].
- [9] YBH04902010, 国家食品药品监督管理总局标准[S].
- [10] YBH01202012, 国家食品药品监督管理总局标准[S].
- [11] YBH10022008, 国家食品药品监督管理总局标准[S].
- [12] 寻延滨, 姜连阁, 白政忠. 气相色谱法测定米格列奈钙中6种有机溶剂残留量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(11): 1681-1683.
- [13] 曾 檀, 霍丹群, 程辉跃, 等. 气相色谱法测定米格列奈钙中有机溶剂残留量[J]. 中国药业, 2013, 22(18): 42-43.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 116-120.
- [15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.

(收稿日期: 2020-11-02; 修回日期: 2021-02-09)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号: 78-130, 各地邮局均可订阅; 补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真: (023) 86592565
网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业官方网站在线投稿系统