

盐酸艾司洛尔残留溶剂测定方法优化

陈思明¹, 翁贤坤², 孙海芸², 罗宗玉¹

(1. 海南省食品药品检验所五指山分所, 海南 五指山 572299;

2. 海南倍特药业有限公司, 海口 572000)

摘要 **目的:**优化盐酸艾司洛尔残留溶剂检测方法, 以便于内部质量控制。**方法:**使用气相色谱顶空进样方式, 选择合适的顶空平衡温度和时间, 降低样品对仪器的污染, 优化溶剂比例, 降低基质效应, 调整了载气流速和分流比, 采用极性毛细管柱程序升温的方法, 延长了高温段保持时间等, 并进行方法学验证。**结果:**乙醚、乙酸乙酯、甲醇、甲苯均能得到有效分离, 精密度良好, 峰面积和质量浓度均呈很好的线性关系, 分别考察样品加标 50%、100%、150% 3 个浓度的准确度, 平均回收率均能在 94.8% ~ 105.6%。**结论:**该方法准确, 灵敏度高, 克服了《中国药典》方法的缺陷, 可用于盐酸艾司洛尔残留溶剂检测。

关键词:盐酸艾司洛尔; 残留溶剂; 顶空进样; 方法优化; 毛细管气相色谱; 方法学验证

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)02-0154-05

doi:10.19778/j.chp.2024.02.007

Optimization of determination method for residual solvents of esmolol hydrochloride

CHEN Siming¹, WENG Xiankun², SUN Haiyun², LUO Zongyu¹

(1. Wuzhishan Branch of Hainan Provincial Food and Drug Inspection Institute, Wuzhishan 572299, China;

2. Hainan Beite Pharmaceutical Co., Ltd, Haikou 572000, China)

Abstract **Objective:** To optimize the detection method for residual solvents of esmolol hydrochloride for control of internal quality. **Methods:** Gas chromatography headspace injection method was adopted by selecting appropriate headspace equilibrium temperature and time in order to reduce sample contamination of the instrument, optimizing solvent ratio for reducing matrix effect and adjusting carrier gas flow rate and split ratio. Polar capillary column programmed temperature rise method was used with high temperature holding time, etc., and methodological validation was conducted. **Results:** Ether, ethyl acetate, methanol, and toluene could all be effectively separated with good precision, and there were good linear relationships between peak areas and mass concentrations. The accuracy of sample spiking at 50%, 100%, and 150% concentrations was investigated, and the average recovery rates could all reach ranges of 94.8% - 105.6%. **Conclusion:** This method is accurate, highly sensitive, and overcomes the shortcomings of the *Chinese Pharmacopoeia* methods. It can be used for the detection of residual solvents in esmolol hydrochloride.

Key words: esmolol hydrochloride; residual solvents; headspace injection; method optimization; capillary gas chromatography; methodological validation

盐酸艾司洛尔是一种 β 肾上腺素受体阻断药, 化学名为 4-[[3-[(1-甲基乙基)氨基]-2-羟基]丙氧基]苯丙酸甲酯盐酸盐^[1,2], 化学式为 $C_{16}H_{26}ClNO_4$, 分子量 331.84。作用机制是在心肌通过竞争儿茶酚胺结合位点而抑制 β_1 -受体, 具有减缓静息和运动心率, 降低血压, 降低心肌耗氧量的作用^[3,4]。主要用于治疗心房颤动、心房扑动时控制心室率; 急性心肌梗死伴心衰; 围手术期高血压以及窦性心动过速等症状^[5-7]。最早 1986 年在美国获批, 《中国药典》2020 年版二部收载盐酸艾司洛尔, 残留溶剂检测方法为气相色谱直接进样法^[8], 由于残留溶剂含量较低, 进样时样品在溶剂中的浓度较大, 盐酸艾司洛尔沸点 430.2 $^{\circ}\text{C}$, 在气相色谱实验条件下很难挥发, 会造成色谱柱污染, 影响检测灵敏度和重复性。本文采用气相色谱顶空进样的方式, 优化盐酸艾司洛尔残留溶剂检测方法, 经方法学验证, 各项指标满足测定要求^[9], 该方法优于《中国药典》2020 年版盐酸艾司洛尔的残留溶剂检测方法。

1 仪器与试药

1.1 仪器

气相色谱仪(型号: 7890B, Agilent Technologies GC System); 顶空进样器(型号: 7697A, Agilent Technologies Headspace Sampler); 十万分之一电子天平(型号: XSR205, METTLER TOLEDO Dual Range); Millipore 超纯水机(型号: Simplicity UV, 法国密理博公司生产)。

1.2 试剂

盐酸艾司洛尔(湖州某制药公司, 批号: CP220701, CP220802, CP220803); 乙醚(广州化学试剂厂, 分析纯, 批号: 20190901-08, 含量: $\geq 99.5\%$); 乙酸乙酯(广州化学试剂厂, 分析纯, 批号: 20210902-22, 含量: $\geq 99.5\%$); 甲醇(DIKMAPURE, 批号: R142452, 含量: $\geq 99.9\%$); 甲苯(广州化学试剂厂, 分析纯, 批号: 20140802-2, 含量: $\geq 99.5\%$); N,N -二甲基甲酰胺(广东光华科技股份有限公司, 分析纯, 批号: 20210423, 含量: $\geq 98.5\%$); 自制实验用超纯水。

空白溶剂: 取 N,N -二甲基甲酰胺和超纯水按照 19:1 混合后超声 10 min, 备用。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 混合对照品储备液

精密称取 250 mg, 乙酸乙酯 250 mg, 甲醇 30 mg, 甲苯 89 mg, 置预先装有少量溶剂的 100 mL 量瓶中, 再用溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。

2.1.2 混合对照品溶液 精密量取 5 mL 混合对照品储备液置 50 mL 量瓶中, 用溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得含乙醚 $0.200 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 乙酸乙酯 $0.250 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 甲醇 $0.030 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, 甲苯 $0.089 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.1.3 供试品溶液 精密称取本品 1.00 g, 置 10 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。

2.1.4 加标供试品溶液 精密称取本品 1.00 g, 置 10 mL 量瓶中, 加混合对照品溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀。

2.2 色谱条件及专属性

2.2.1 色谱条件 进样口温度: 200°C ; 检测器: FID; 检测器温度: 250°C ; 极性色谱柱(以聚乙二醇为固定液, 型号: DB-WAX, $30 \text{ m} \times 0.530 \text{ mm} \times 1.00 \mu\text{m}$, Part Number: 125-7032), 载气(高纯氮气, 含量: 99.999%), 柱流速: $2.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 隔垫吹扫: $3.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 氢气流速: $40 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 空气流速: $400 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 尾吹流速: $30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 分流比: 10:1。

顶空平衡温度 70°C , 平衡时间 30 min, 进样量: 1 mL, 定量环温度: 130°C , 传输线温度: 150°C 。

程序升温条件: 初始温度 40°C , 维持 6 min, 以每分钟 30°C 升温至 200°C , 维持 5 min。

2.2.2 专属性 分别精密量取空白溶剂、混合对照品溶液和供试品溶液各 2 mL, 置 10 mL 顶空瓶中, 密封, 按照上述色谱条件进行检测。

结果: 空白溶液无干扰; 混合对照品溶液色谱图中待测组分与其相邻色谱峰的最小分离度为 2.6; 供试品溶液色谱图中各待测组分无干扰; 乙醚理论板数超过 4 万; 乙酸乙酯理论板数超过 10 万; 甲醇理论板数超过 20 万; 甲苯理论板数超过 40 万。详见图 1。

2.3 准确度

分别考察样品加标 50%、100%、150% 的回收率, 称取 9 份已知残留溶剂浓度的盐酸艾司洛尔原料(批号: CP220701), 每份 1.00 g, 置 10 mL 量瓶中, 分别加入混合对照品储备液 0.5、1.0、1.5 mL 各 3 份, 再加空白溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取样品 2 mL 至 10 mL 顶空瓶中, 密封。按照“2.2.1”色谱条件检测, 结果扣除已知的残留溶剂含量, 计算回收率, 结果见表 1。

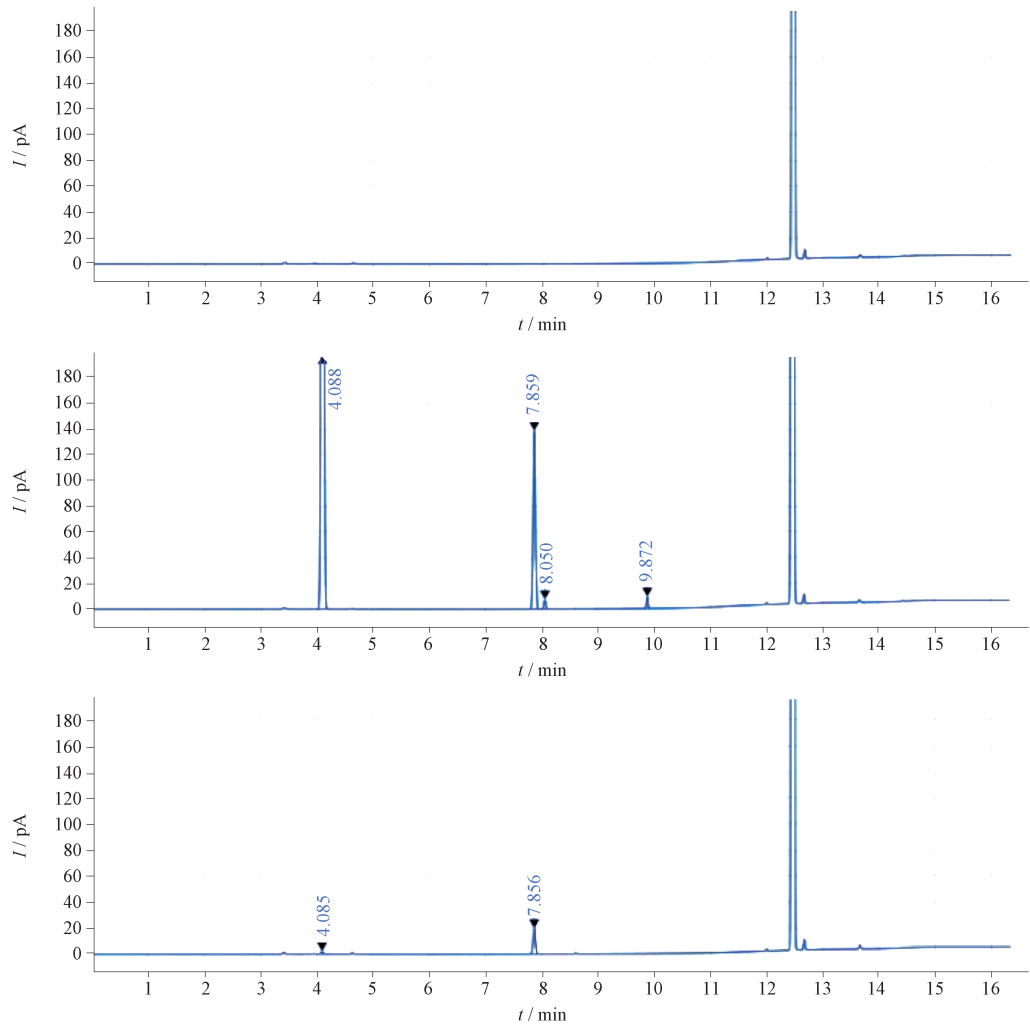


图1 空白溶剂(A)混合对照品溶液(B)供试品溶液(C)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of blank (A), standard (B) and sample (C) solution

表1 4种残留溶剂3个浓度平均回收率

Tab. 1 Average recovery rate of four residual solvents and three concentrations

残留溶剂 (residual solvent)	回收率浓度水平 (concentration level)/%	平均回收率 (average recovery)/ %, (n=3)	RSD/%, (n=3)
乙醚(ether)	50	100.4	0.6
	100	105.1	0.6
	150	101.9	0.8
乙酸乙酯(ethyl acetate)	50	102.7	1.5
	100	103.3	1.1
	150	105.6	0.5
甲醇(methanol)	50	94.8	0.9
	100	98.3	0.9
	150	97.9	0.7
甲苯(toluene)	50	100.3	1.3
	100	101.6	1.4
	150	104.4	0.5

2.4 精密度考察

2.4.1 重复性 精密量取混合对照品溶液 2 mL 至 10 mL 顶空瓶中,密封。取 6 份,按照“2.2.1”色谱条件,连续进样,结果乙醚保留时间 RSD 为 0.06%,峰面积 RSD 为 0.9%;乙酸乙酯保留时间 RSD 为 0.03%,峰面积 RSD 为 0.7%;甲醇保留时间 RSD 为 0.02%,峰面积 RSD 为 1.7%;甲苯保留时间 RSD 为 0.02%,峰面积 RSD 为 1.3%。

2.4.2 中间精密度 考察不同日期,不同实验人员,按照“2.4.1 重复性”项下操作,不同实验人员各检出 6 份混合标准溶液,12 份待测组分峰面积 RSD 最大为 3.5%。结果见表 2。

2.5 检测限与定量限

将混合对照品溶液逐级稀释后,精密量取 2 mL 至 10 mL 顶空瓶中,密封。按照“2.2.1”色谱条件,进样分析,直至信噪比接近 10:1,分别计算各残留

溶剂的浓度,确定待测组分定量限,继续稀释直至信噪比接近 3:1 分别计算各残留溶剂的浓度,确定待测组分检出限,结果见表 3。

表 2 中间精密度考察结果(%)

Tab. 2 Results of intermediate precision assessment

残留溶剂 (residual solvent)	实验员 1 (researcher 1) RSD(<i>n</i> = 6)	实验员 2 (researcher 2) RSD(<i>n</i> = 6)	实验员 1 和 2 RSD (<i>n</i> = 12)
乙醚(ether)	0.8	1.7	3.5
乙酸乙酯(ethyl acetate)	1.6	1.3	1.4
甲醇(methanol)	1.6	4.3	3.3
甲苯(toluene)	1.4	2.5	2.5

表 3 检出限与定量限

Tab. 3 Detection limit and quantification limit

残留溶剂 (residual solvent)	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>S</i> / <i>N</i>	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	<i>S</i> / <i>N</i>
乙醚(ether)	0.138 7	12.5	0.046 2	3.8
乙酸乙酯(ethyl acetate)	0.255 0	10.5	0.085 0	3.5
甲醇(methanol)	0.213 3	12.3	0.071 1	3.4
甲苯(toluene)	0.151 7	11.1	0.050 6	3.3

2.6 线性与范围

分别精密量取 0.1、0.5、1.0、1.5、2.0 mL 混合对照品储备液置 10 mL 量瓶中,再用空白溶剂稀释至刻度,摇匀,即得混合对照品曲线溶液。分别精密量取 2 mL 至 10 mL 顶空瓶中,密封。按照“2.2.1”色谱条件,进样分析,计算得各残留溶剂的标准曲线,结果见表 4。

表 4 线性和范围

Tab. 4 Linearities and ranges

残留溶剂 (residual solvent)	线性范围 (linear range)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程 (regression equation)	<i>r</i>
乙醚(ether)	20.45-409.07	$Y = 0.190\ 6X + 0.183\ 7$	0.999 7
乙酸乙酯(ethyl acetate)	25.39-507.85	$Y = 1.520\ 1X - 3.194\ 4$	0.999 9
甲醇(methanol)	3.11-62.12	$Y = 0.008\ 7X + 0.003\ 0$	0.999 2
甲苯(toluene)	9.02-180.35	$Y = 1.837\ 2X - 1.200\ 2$	0.999 8

2.7 耐用性

2.7.1 溶液稳定性 由于残留溶剂检测一般都能在 8 h 内完成,因此考察 8 h 的稳定性,分别考察混合对照品溶液和加标供试品溶液 1、2、4、8 h

的稳定性。

结果:在 8 h 内,混合对照品溶液四个点峰面积的 RSD 分别为乙醚 1.0%、乙酸乙酯 1.2%、甲醇 1.7% 和甲苯 1.3%,加标供试品溶液四个点峰面积的 RSD 分别为乙醚 1.7%、乙酸乙酯 3.8%、甲醇 2.1% 和甲苯 1.9%。

2.7.2 色谱条件改变 验证测定条件小的变动,如色谱条件变动范围起始温度 $\pm 2\ ^\circ\text{C}$,顶空平衡温度 $\pm 2\ ^\circ\text{C}$,顶空平衡时间 $\pm 2\ \text{min}$,不同批号同类型极性色谱柱,结果分离度和理论板数均能满足要求。

2.8 样品测定

取盐酸艾司洛尔 3 批,分别精密称取 1.00 g,置 10 mL 量瓶中,加空白溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,每批平行操作 2 份。再精密量取供试品溶液 2 mL 至 10 mL 顶空瓶中,密封。按照“2.2.1”色谱条件,进样分析,结果见表 5。

表 5 3 批样品测定结果(%)

Tab. 5 Results of 3 batches of samples

批号 (Lot No.)	乙醚 (ether)	乙酸乙酯 (ethyl acetate)	甲醇 (methanol)	甲苯 (toluene)
CP220701	0.000 4	0.025	未检出	未检出
CP220802	0.000 5	0.036	未检出	未检出
CP220803	0.000 6	0.035	未检出	未检出

按照方法学验证的结果,拟定残留溶剂限度分别为:乙醚 0.20%,乙酸乙酯 0.25%,甲醇 0.03%,甲苯 0.089%。作为内部质量控制标准。

3 讨论

《中国药典》2020 年版二部盐酸艾司洛尔标准项下收载残留溶剂(乙醚、乙酸乙酯、甲醇、甲苯)检测方法为气相色谱直接进样法,由于残留溶剂含量很低,需要供试品溶液浓度很大,盐酸艾司洛尔的沸点为 430.3 $^\circ\text{C}$,在标准规定的色谱条件下,不易挥发,导致进样口和色谱柱污染,影响仪器精密度。通过采用顶空进样的方式,能有效避免仪器污染^[10,11]。

使用药典的程序升温方法,对照品乙醚的理论板数低于 5 000,不能满足测定要求,将色谱柱由 DB-WAX(30 m $\times$ 0.320 mm $\times$ 0.25 μm) 替换成 DB-WAX(30 m $\times$ 0.530 mm $\times$ 1.00 μm) 后,优化色谱条件,调整柱流速为 2.0 mL $\cdot$ min⁻¹,分流比:10:1,再将高温段延长 3 min,分离度和理论塔板数达到要求。

使用药典标准的溶剂 *N,N* 二甲基乙酰胺时,加标供试品溶液中乙醚、乙酸乙酯和甲苯部分回收率大于 115.0%,推测是基质效应导致,尝试将供试品浓度降低一倍后,回收率仍未改善,最后换成 *N,N* 二甲基甲酰胺并加入 5% 的超纯水,基质效应降低,回收率达到测定要求。

参考文献

- [1] 贾芳,陈冰涵,闫旭冉. 艾司洛尔中间体 3-(4-羟基苯基)丙酸甲酯的合成[J]. 湖北大学学报(自然科学版), 2021, 43(5): 590.
JIA F, CHEN BH, YAN XR. Synthesis of esmolol intermediate methyl 3-(4-hydroxyphenyl) propionate [J]. J Hubei Univ (Nat Sci Ed), 2021, 43(5): 590.
- [2] 贺正国,蒋琳,江登榜,等. 艾司洛尔盐酸盐的新合成方法[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2021, 43(5): 985.
HE ZG, JIANG L, JIANG DB, *et al.* A new synthetic method of esmolol hydrochloride [J]. J Yunnan Univ (Nat Sci Ed), 2021, 43(5): 985.
- [3] 张振祥. 盐酸艾司洛尔并氨氯地平治疗高血压并主动脉夹层的疗效观察[J]. 智慧健康, 2021, 7(7): 100.
ZHANG ZX. Observation on the efficacy of esmolol hydrochloride combined with amlodipine in the treatment of hypertension and aortic dissection [J]. Wise Health, 2021, 7(7): 100.
- [4] 丛中华. 艾司洛尔在冠心病心肌缺血治疗中的临床效果观察[J]. 中国现代药物应用, 2021, 15(22): 128.
CONG ZH. Clinical effect observation of esmolol in the treatment of myocardial ischemia in coronary heart disease [J]. Chin J Mod Drug Appl, 2021, 15(22): 128.
- [5] 孙红梅. 经皮冠状动脉介入术中静脉应用盐酸艾司洛尔对急性 ST 段抬高型心肌梗死患者临床疗效及安全性[J]. 系

统医学, 2020, 5(18): 96.

SUN HM. Clinical efficacy and safety of intravenous esmolol hydrochloride during percutaneous coronary intervention in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction [J]. Syst Med, 2020, 5(18): 96.

- [6] 李娜. 重组人脑利钠肽联合盐酸艾司洛尔治疗急性心肌梗死伴心衰患者疗效观察[J]. 哈尔滨医药, 2020, 40(1): 7.

LI N. Observation on the efficacy of recombinant human brain natriuretic peptide combined with esmolol hydrochloride in the treatment of patients with acute myocardial infarction and heart failure [J]. Harbin Med J, 2020, 40(1): 7.

- [7] 徐博. 盐酸艾司洛尔联合盐酸胺碘酮治疗急性快速房颤患者的临床研究[J]. 中国现代药物应用, 2021, 15(13): 170.

- [8] 中国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 1063.
ChP2020. Vol II [S]. 2020: 1063.

- [9] 朱凤昌,崇小萌,杨青,等. ICH Q3C 残留溶剂指导原则与中国药典残留溶剂控制策略[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(9): 1259.

ZHU FC, CHONG XM, YANG Q, *et al.* ICH Q3C residual solvent guidelines and Chinese Pharmacopoeia residual solvent control strategy [J]. Chin J Pharm Ind, 2021, 52(9): 1259.

- [10] 于梦,孙玲,王金虎,等. 顶空气相色谱法测定帕瑞昔布钠中有机溶剂残留量[J]. 广东化工, 2022, 49(2): 111.

YU M, SUN L, WANG JH, *et al.* Determination of residual organic solvents in parecoxib sodium by headspace gas chromatography [J]. Guangdong Chem, 2022, 49(2): 111.

- [11] 兰为环,张绿茵,李爽,等. 顶空毛细管 GC 法测定佐匹克隆原料药中有机溶剂的残留量[J]. 化工与医药工程, 2022, 43(1): 25.

LAN WH, ZHANG LY, LI S, *et al.* Determination of residual organic solvents in zopiclone API by headspace capillary GC [J]. Chem Pharm Eng, 2022, 43(1): 25.

(收稿日期: 2023-11-23)