doi:10.3969 / j.issn.1006 - 4931.2022.17.017

气相色谱 - 火焰光度法检测羟苯磺酸钙中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的残留量*

汪 鑫[1],章 华[2]

(1. 湖北省武汉药品医疗器械检验所,湖北 武汉 430075; 2. 湖北广辰药业有限公司,湖北 宜昌 443000)

摘要:目的 建立同时测定羟苯磺酸钙中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯残留量的气相色谱 - 火焰光度(GC - FPD)法。**方法** 色谱柱为 Agilent DB - WAX 毛细管柱(30 m × 0.32 mm,0.5 μm),程序升温,采用火焰光度检测器(FPD)检测,载气为氮气,流速为 5 mL / min,进样口温度为 230 ℃,检测器温度为 150 ℃,直接进样,进样量为 2 μL。**结果** 硫酸二甲酯和硫酸二乙酯质量浓度在 0.04 ~ 2.00 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好(r = 0.998 6,0.997 9,n = 6);检测限分别为 0.032 μg / g 和 0.028 μg / g,定量限分别 0.085 μg / g 和 0.077 μg / g。平均回收率分别为 95.70% 和 96.84%,*RSD* 分别为 3.66% 和 4.18%(n = 9),**结论** 该方法简便、高效、准确、灵敏度好,可用于羟苯磺酸钙原料药中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯残留量的检测。

关键词:气相色谱法;火焰光度检测器;羟苯磺酸钙;原料药;硫酸二甲酯;硫酸二乙酯;残留量

中图分类号:R927.2;R972 **文献标志码:A** **文章编号:1006 - 4931(2022)17 - 0065 - 03**

Determination of Dimethyl Sulfate and Diethyl Sulfate Residues in Calcium Dobesilate by the GC - FPD

WANG Xin[1], *ZHANG Hua*[2]

(1. Wuhan Institute for Drug and Medical Device Control, Wuhan, Hubei, China 430075; 2. Hubei Guangchen Pharmaceutical Co., Ltd., Yichang, Hubei, China 443000)

Abstract: Objective To establish a gas chromatography - flame photometry detector (GC - FPD) method for the simultaneous determination of dimethyl sulfate and diethyl sulfate residues in calcium dobesilate. **Methods** The chromatographic column was Agilent DB - WAX capillary column (30 m × 0.32 mm, 0.5 μm), the temperature was programmed, the flame photometry detector (FPD) was adopted, the carrier gas was nitrogen, the flow rate was 5 mL / min, the inlet temperature was 230 ℃, the detector temperature was 150 ℃, and the direct injection was adopted with the injection volume of 2 μL. **Results** The linear range of dimethyl sulfate and diethyl sulfate was 0.04 - 2.00 μg / mL (r = 0.998 6, 0.997 9, n = 6). The limits of detection (LOD) of dimethyl sulfate and diethyl sulfate were 0.032 μg / g and 0.028 μg / g, respectively. The limits of quantitation (LOQ) of dimethyl sulfate and diethyl sulfate were 0.085 μg / g and 0.077 μg / g, respectively. The average recoveries of dimethyl sulfate and diethyl sulfate were 95.70% and 96.84% with *RSD*s of 3.66% and 4.18% (n = 9), respectively. **Conclusion** The method is simple, efficient, accurate and sensitive, which can be used for the determination of dimethyl sulfate and diethyl sulfate residues in calcium dobesilate active pharmaceutical ingredient.

Key words: GC; flame photometry detector; calcium dobesilate; active pharmaceutical ingredient; dimethyl sulfate; diethyl sulfate; residue

硫酸二甲酯和硫酸二乙酯具有典型的遗传毒性致癌物警示结构,可通过核酸烷基化而损害遗传性基因和诱变染色体,是潜在的致癌物质和基因毒性杂质[1]。由于其高风险性,欧洲联盟在 2012 年就将其列入第八批需授权高度关注物质(SVHC)候选清单,制药企业与监管机构也越来越重视对该类杂质的检测与控制。羟苯磺酸钙是一种血管保护药,能选择性作用于毛细血管壁,显著改善血管微循环,临床广泛应用于糖尿病视网膜病变等疾病的治疗[2-7]。羟苯磺酸钙的合成工艺[8-9]中会使用大量浓硫酸和甲醇、乙醇等醇类有机溶剂,高温条件下可能生成硫酸二甲酯和硫酸二乙酯[10-11]。这 2 种物质的高毒性,使药物的安全使用风险很大,故在羟苯磺酸钙质量标准研究中,应对其残留量进行严格监测和控制。本研究中参考硫酸酯类化合物现有文献分析方法[12-15],采用气相色谱 - 火焰光度(GC - FPD)法对羟苯磺酸钙中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的残留量进行检测,并进行方法学验证。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Trace1300 型气相色谱仪(赛默飞世尔科技 < 中国 > 有限公司),配有 SSL(分流 / 不分流进样口)、火焰

* **基金项目:**湖北省药品监督管理局科研项目[20200113]。

第一作者:汪鑫,男,硕士研究生,主管药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)451076591@qq.com。

光度检测器(FPD)、Chromeleon工作站);Vortex－5型涡旋仪(其林贝尔仪器制造有限公司);AG285型电子天平(梅特勒－托利多公司,精度为0.01 mg);SK250HP型超声清洗器(上海科导超声仪器有限公司);L530型医用离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司)。

1.2 试药

硫酸二甲酯对照品(批号为FL060159,纯度99.0%),硫酸二乙酯对照品(批号为F1505086,纯度99.5%),均购自阿拉丁试剂上海有限公司;试验用水为超纯水;乙酸乙酯(色谱纯,美国Fisher公司);羟苯磺酸钙原料药(批号分别为202111021,202111022,202111023,均由A企业提供)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent DB－WAX毛细管柱(30 m×0.32 mm,0.5 μm);程序升温:起始温度为70 ℃、保持2 min,以10 ℃/min的速率升至180 ℃;检测器:FPD;检测器温度:150 ℃;燃气:氢气,流速90 mL/min;助燃气:空气,流速115 mL/min;载气:氮气,流速:5 mL/min;进样口温度:230 ℃;进样量:2 μL;进样方式:直接进样,不分流。

2.2 溶液制备

取硫酸二甲酯对照品和硫酸二乙酯对照品各25 mg,精密称定,置同一25 mL棕色容量瓶中,用乙酸乙酯定容,摇匀,作为混合对照品贮备液;精密量取混合对照品贮备液适量,用乙酸乙酯定量稀释成每1 mL含硫酸二甲酯和硫酸二乙酯各约0.1 μg的溶液,摇匀,作为混合对照品溶液。精密量取混合对照品溶液3.0 mL,置10 mL棕色容量瓶中,用乙酸乙酯稀释并定容,摇匀,作为灵敏度溶液。取羟苯磺酸钙原料药0.5 g,精密称定,置10 mL带盖离心管中,精密加入乙酸乙酯5.0 mL,涡旋混合2 min,超声10 min,以3 000 r/min的速率离心5 min,取上清液,经0.45 μm有机膜滤过,取续滤液作为供试品溶液。将乙酸乙酯作为阴性对照溶液。

2.3 方法学考察

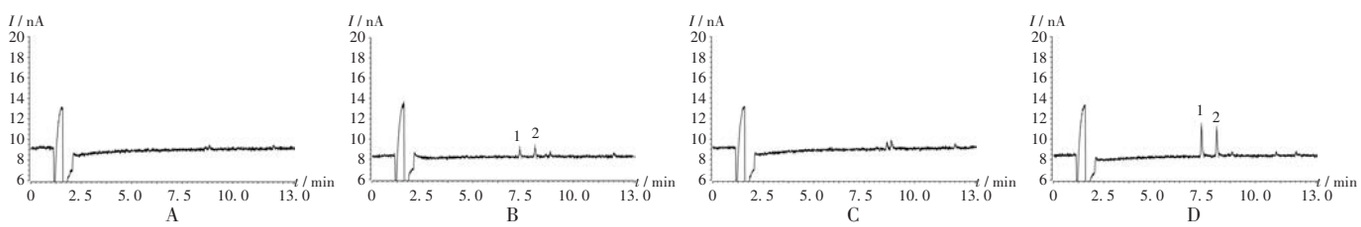
专属性试验:取2.2项下混合对照品溶液、灵敏度溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样检测,记录色谱图。结果灵敏度溶液色谱图中2个主峰的信噪比(S/N)均大于5;阴性对照溶液色谱图中,在与硫酸二甲酯和硫酸二乙酯色谱峰相同保留时间处均无杂峰干扰,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下混合对照品贮备液适量,用乙酸乙酯逐级稀释成每1 mL各约含硫酸二甲酯和硫酸二乙酯0.04,0.06,0.08,0.10,0.15,2.00 μg的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,μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行二次曲线拟合,得硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的回归方程,分别为$Y_{甲}=6.30X_{甲}^2+0.70X_{甲}+0.035$($r=0.998\,6$,$n=6$)、$Y_{乙}=6.72X_{乙}^2+0.44X_{乙}+0.048$($r=0.997\,9$,$n=6$)。结果表明,硫酸二甲酯和硫酸二乙酯质量浓度在0.04～2.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取2.2项下混合对照品溶液适量,逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按信噪比(S/N)分别为3∶1和10∶1时的含量计算检测限和定量限。结果硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的检测限分别为0.032 μg/g和0.028 μg/g,定量限分别为0.085 μg/g和0.077 μg/g。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果硫酸二甲酯和硫酸二乙酯峰面积的RSD分别为2.93%和3.22%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:精密称取样品(批号为20211021)0.5 g,加入混合对照品溶液适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果硫酸二甲酯和硫酸二乙酯峰面积的RSD分别为3.64%和3.48%($n=6$),表明方法重复性良好。



1. 硫酸二甲酯 2. 硫酸二乙酯

A. 阴性对照溶液 B. 灵敏度溶液 C. 供试品溶液 D. 混合对照品溶液

图1 气相色谱图

1. Dimethyl sulfate 2. Diethyl sulfate

A. Negative reference solution B. Sensitivity solution C. Test solution D. Mixed reference solution

Fig. 1 GC chromatograms

稳定性试验：取 2.2 项下混合对照品溶液适量，按 2.1 项下色谱条件分别于 0，4，8，12 h 时进样测定，记录峰面积。结果硫酸二甲酯和硫酸二乙酯峰面积的 *RSD* 分别为 3.12% 和 3.34%（$n = 4$），表明混合对照品溶液 12 h 内稳定性良好。

加样回收试验：精密称取已知含量的羟苯磺酸钙原料药（批号为 20211021）0.5 g，共 9 份，分别加入低、中、高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，记录色谱图，并计算回收率。结果见表 1。

表 1　加样回收试验结果（$n = 9$）

Tab. 1　Results of the recovery test（$n = 9$）

加入量（μg）		测得量（μg）		回收率（%）		$\bar{X}$（%）		*RSD*（%）	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.269 1	0.270 7	0.264 5	0.264 6	98.29	97.75				
0.269 1	0.270 7	0.254 5	0.247 7	94.57	91.50				
0.269 1	0.270 7	0.247 7	0.244 3	92.05	90.25				
0.538 2	0.541 5	0.491 8	0.534 4	91.38	98.69				
0.538 2	0.541 5	0.536 2	0.555 4	99.63	102.57	95.70	96.84	3.66	4.18
0.538 2	0.541 5	0.536 6	0.531 8	99.70	98.21				
0.807 3	0.812 2	0.755 4	0.778 0	93.57	95.79				
0.807 3	0.812 2	0.802 1	0.820 9	99.36	101.07				
0.807 3	0.812 2	0.748 9	0.777 3	92.77	95.70				

注：A 为硫酸二甲酯，B 为硫酸二乙酯。原料药中均未检测到硫酸二甲酯和硫酸二乙酯。

Note: A refers to dimethyl sulfate, and B refers to diethyl sulfate. Dimethyl sulfate and diethyl sulfate were not detected in the calcium dobesilate active pharmaceutical ingredient.

2.4　样品残留量测定

取 3 批样品（批号分别为 20211021，20211022，20211023）各适量，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，同时配制对照品溶液和灵敏度溶液，再按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果 3 批样品均未检出硫酸二甲酯和硫酸二乙酯。

3　讨论

由于硫酸二甲酯和硫酸二乙酯在药物中并未明确规定限度，本研究中参照国际人用药品注册技术协调会（ICH）指导原则，以毒理学关注阈值（TTC）1.5 μg / d 计算其可接受的限量[16]，以羟苯磺酸钙临床日最大使用量为 1.5 g 估算，将本品中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的限度拟订为均不得过 1 μg / g。考虑到测定对象是样品中的微量杂质，为减少主药对测定结果的干扰，选择测定磷、硫元素的特异型检测器 FPD 进行检测；乙酸乙酯对硫酸二烷基酯易溶，对羟苯磺酸钙几乎不溶，选用乙酸乙酯作为提取溶剂，目标物经有效提取后，可直接进样分析，与顶空衍生化法比较，处理过程简单快捷；采用不分流模式进样，提高了灵敏度，硫酸二甲酯和硫酸二乙酯的检测限可达 0.03 μg / g，满足限度需求。

综上所述，所建立的方法操作简便、灵敏度高、准确度好，可用于羟苯磺酸钙原料药中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯残留量的日常监测，为该品种的质量控制提供科学依据。

参考文献

[1] 马　磊，马玉楠，陈　震，等. 遗传毒性杂质的警示结构[J]. 中国新药杂志，2014，23（18）：2106－2111.
[2] 张成珍，张玉侠. 羟苯磺酸钙的应用进展[J]. 医药导报，2012，34（9）：1181－1184.
[3] 高　立，祁连涛，徐文彬，等. 和血明目片联合羟苯磺酸钙治疗早期糖尿病视网膜病变临床研究[J]. 中国药业，2020，29（10）：133－135.
[4] 陈墨馨，俞明朝，张　宇，等. 羟苯磺酸钙对血清肌酐测定干扰的研究进展[J]. 中国老年学杂志，2021，41（12）：2685－2688.
[5] 秦　明. 羟苯磺酸钙对糖尿病性视网膜病变患者的疗效及其对血清 hs－CRP、VEGF 和 IGF－1 的影响[J]. 山东医药，2015，55（37）：39－40.
[6] 郑晓英，张成志，薛丽芬，等. 羟苯磺酸钙治疗慢性下肢静脉疾病疗效与安全性 Meta 分析[J]. 中国药业，2018，27（22）：62－66.
[7] ZHANG XY，LIU W，WU SS，et al. Calcium dobesilate for diabetic retinopathy：a systematic review and meta－analysis[J]. Sci China Life Sci，2015，58（1）：101－107.
[8] 姜凤超，周　晓. 羟苯磺酸钙的合成[J]. 中国医药工业杂志，1994，25（9）：389－390.
[9] 赵一玫，谭忠琴，王　凯，等. 羟苯磺酸钙的合成工艺研究[J]. 湖北大学学报（自然科学版），2019，41（4）：411－419.
[10] 汪　生，倪悦泠，陆宇婷，等. 顶空气相色谱法测定塞来昔布中硫酸二乙酯基因毒性杂质[J]. 中国新药杂志，2018，27（20）：2437－2441.
[11] BENIGINI R，BOSSA C. Mechanisms of chemical carcinogenicity and mutagenicity：a review with implications for predictive toxicology[J]. Chem Rev，2011，111（4）：2507－2536.
[12] 吴楚森，王　斌，王　莉，等. 气相色谱－质谱联用测定化妆品中硫酸二甲酯与硫酸二乙酯[J]. 分析测试学报，2018，37（1）：70－75.
[13] 陈　蓉，汪　鑫. 气相色谱火焰光度法检测膏霜类化妆品中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯残留量[J]. 中国药师，2019，22（9）：1735－1737.
[14] 李小娟，马永建. 工作场所空气中硫酸二甲酯的气相色谱快速测定[J]. 中国工业医学杂志，2010，23（4）：301－302.
[15] 裘德君. 气相色谱－质谱联用法测定纺织品中硫酸二甲酯和硫酸二乙酯[J]. 分析试验室，2015，34（1）：31－33.
[16] International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. Assessment and control of DNA reactive（mutagenic）impurities in pharmaceuticals to limit pot ential carcinogenic risk M7（R1）[EB / OL].（2017－03－31）[2021－12－15]. https：// database. ich. org / sites / default / files / M7_R1_Guideline. pdf.

（收稿日期：2021－12－21；修回日期：2022－03－18）