

# 气相色谱法测定阿卡波糖中痕量树脂残留物

郑婷<sup>1</sup> 李伟<sup>1\*</sup> 刘君臣<sup>1</sup> 白艳艳<sup>2</sup>

1. 山西双雁生物科技有限公司 山西 大同 037000

2. 国药集团威奇达药业有限公司 山西 大同 037000

**摘要:** 建立了顶空毛细管气相色谱法测定阿卡波糖中痕量树脂残留物的检验方法, 即丙烯酸甲酯、1,2-二氯乙烷、苯乙烯和二乙烯苯。采用HP-FFAP色谱柱, 使用FID检测器, 以N<sub>2</sub>为载气, 程序升温。经方法学验证, 建立的方法专属性及系统适用性良好, 丙烯酸甲酯、1,2-二氯乙烷、苯乙烯和二乙烯苯在定量限~120%限度浓度范围内线性关系良好, 4种树脂残留物的回收率为88.0~99.6%, RSD小于3.5%, 定量限和检测限分别为0.01~0.14 μg/ml和0.004~0.03 μg/ml。

**关键词:** 阿卡波糖; 树脂残留物; 气相色谱; 测定

阿卡波糖(Acarbose)是一种微生物合成的假性四糖, 属于α-糖苷酶抑制剂类药物。阿卡波糖最早由德国拜耳公司于1977年从放线菌的培养液中提取出来, 并与1984年7月在德国首先上市(商品名Glucobay), 1994年进入中国市场, 1996年获FDA批准在美国上市。阿卡波糖降糖效果明显, 可单独全程使用, 亦可与多种口服降糖药联用<sup>[1]</sup>, 作用温和持久、毒副作用小, 自上市以来便成为治疗II型糖尿病的理想药物之一<sup>[2]</sup>。

阿卡波糖是由菌种发酵产生的次级代谢产物, 发酵液成分非常复杂, 除阿卡波糖外还有很多物质, 如菌体代谢产生的色素、糖类似物、蛋白及无机盐等, 所以在阿卡波糖提取精制过程中, 一般会选用大孔吸附树脂和离子交换树脂进行脱色、除盐和除杂等<sup>[3]</sup>。阿卡波糖生产共用到5种树脂, 这5种树脂合成过程中使用了苯乙烯、二乙烯苯、1,2-二氯乙烷、丙烯酸甲酯、甲醇、乙醇、汽油等有机物, 在树脂用于阿卡波糖发酵液分离纯化过程中, 由于采用不同PH的溶液和不同的溶媒吸附解析<sup>[4]</sup>, 可能会将树脂残留物随阿卡波糖一起洗脱出来<sup>[5]</sup>。甲醇和乙醇等属于常规溶媒微量分析, 方法易于开发, 本研究旨在建立阿卡波糖中丙烯酸甲酯、1,2-二氯乙烷、苯乙烯和二乙烯苯4种痕量树脂残留物的分析方法, 并制定合理的限度列入质量标准, 进而为阿卡波糖产品质量提升提供有力保证。

## 实验部分

### 1 仪器与试剂

GC 8890气相色谱仪, Agilent 7697A型顶空进样装置(Agilent); METTLER TOLEDO MS204TS分析天平。

1,2-二氯乙烷、苯乙烯、丙烯酸甲酯(GC级别); 二甲基亚砜(分析纯)、二乙烯苯(间位和对位混合物); 水(高纯水); 阿卡波糖原料药(批号

分别为ACB2103001、ACB2103002、ACB2103003、ACB2103004)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用Agilent HP-FFAP色谱柱, 30m×0.53 mm, 1.00 μm, 程序升温(60℃保持3 min, 以10℃/min的速率升温至140℃, 维持6 min, 再以20℃/min的速率升温至200℃, 维持2 min), 进样口温度200℃, FID检测器, 温度230℃, 载气(N<sub>2</sub>)流速为1.5 ml/min, 氢气(H<sub>2</sub>)流速为30 ml/min, 空气(O<sub>2</sub>)流速为400 mL/min, 分流比为5:1。顶空条件: 顶空85℃平衡30 min, 定量环温度90℃, 传输线温度100℃。

### 2.2 溶液配制

空白溶液: 1%二甲基亚砜(DMSO)水溶液。

对照品储备溶液: 精密称取0.06 g丙烯酸甲酯、0.1 g 1,2-二氯乙烷、0.04 g苯乙烯、0.68 g二乙烯苯于装有少量DMSO的100 ml容量瓶中, 用DMSO溶解定容。

对照品溶液: 移取1 ml对照品储备液至装有少量DMSO的20 ml容量瓶中, 用DMSO溶解并定容; 再移取1 ml上述溶液至装有少量高纯水的100 ml容量瓶中, 用高纯水溶解并定容。

供试品溶液: 称取0.5 g阿卡波糖样品至顶空瓶中, 加5 ml 1% DMSO水溶液溶解。

### 2.3 系统适用性试验

精密量取空白溶液、对照品溶液和供试品溶液各5 ml, 置20 ml顶空瓶中, 加盖, 密封, 按“1.2.1”项下方法测定。空白溶剂在各主成分峰处均未出现干扰峰, 对照品溶液中各组分主峰之间分离度良好, 供试品溶液中无干扰待测组分的干扰峰出现。对照品溶液连续重复进样5

次, 所得待测组分峰面积的RSD为4.0%~6.0%(表1)。

表1 对照品溶液中各组分保留时间、理论塔板数和分离度

树脂残留物	出峰时间/min	理论塔板数	分离度
丙烯酸甲酯	5.277	43276	-
1,2-二氯乙烷	6.186	57594	8.88
苯乙烯	8.462	67708	19.52
二乙烯苯(间位)	12.833	85177	28.57
二乙烯苯(对位)	13.182	80610	1.93

#### 2.4 线性试验

精密量取1.2.2项下对照品储备液0.2 ml、0.4 ml、0.6 ml、0.8 ml、1.0 ml和1.2 ml, 加水定容, 摇匀, 作为不同

浓度的对照品线性溶液, 进样测定。以各树脂残留物浓度( $\mu\text{g/ml}$ )对峰面积进行线性回归。结果见表2。

表2 4种树脂残留物的线性试验、LOD和LOQ结果

树脂残留物	回归方程	r	线性范围/ $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	定量限/ppm	检测限/ppm
丙烯酸甲酯	$y = 30.344x + 0.8742$	0.9989	0.016 ~ 0.37	0.016	0.0045
1,2-二氯乙烷	$y = 42.684x + 1.8012$	0.9985	0.051 ~ 0.60	0.051	0.017
苯乙烯	$y = 191.05x + 1.2323$	0.9979	0.010 ~ 0.27	0.010	0.0040
二乙烯苯(间位)	$y = 162.64x - 10.055$	0.9980	0.034 ~ 2.76	0.034	0.014
二乙烯苯(对位)	$y = 164.36x - 3.4616$	0.9976	0.14 ~ 1.34	0.14	0.034

#### 2.5 精密度试验

精密量取空白溶液5 mL、对照品溶液5 mL(平行制备5份)、供试品溶液5 mL(平行制备6份), 分别进样测定。计算得对照品溶液中丙烯酸甲酯、1,2-二氯乙烷、苯乙烯、二乙烯苯的峰面积的RSD为4.2%、4.2%、6.3%、5.6%, 6份供试品溶液中丙烯酸甲酯、1,2-二氯乙烷、苯乙烯、二乙烯苯单人测定结果的RSD分别为8.6%、7.4%、未检出、未检出; 双人测定结果的RSD分别为8.3%、8.0%、未检出、未检出。

#### 2.6 回收率试验

精密称取0.06 g丙烯酸甲酯、0.1 g 1,2-二氯乙烷、0.04 g苯乙烯、0.68 g二乙烯苯于装有少量DMSO的100ml容量瓶中, 用DMSO溶解并定容。移取0.5ml上述溶液至装有少量DMSO的20ml容量瓶中, 用DMSO溶解并定容,

得加标回收溶液。精密称取供试品0.5g, 共9份, 分别置于20ml顶空瓶中, 精密加入50 $\mu\text{L}$ 、100 $\mu\text{L}$ 和200 $\mu\text{L}$ 加标回收溶液各3份, 分别用水补足至5 ml, 加盖, 密封, 按“1.2.1”项下方法测定。计算得丙烯酸甲酯、1,2-二氯乙烷、苯乙烯、二乙烯苯的平均回收率分别为88.0%、89.2%、98.2%、99.6%, RSD分别为1.8%、3.3%、2.0%、3.3%。

#### 2.7 样品测定

分别取空白、对照品溶液和4批供试品溶液进样测定, 按照中国药典2020版四部通则0521气相色谱法中的外标法计算供试品中树脂残留量。四批阿卡波糖原料药中丙烯酸甲酯残留为0.2 ppm, 1,2-二氯乙烷残留为0.4 ppm, 苯乙烯和二乙烯苯均未检出。结果见表3。

表3 4批阿卡波糖中4种树脂残留物的测定结果( $n = 3$ )

树脂残留物	ACB2103001	ACB2103002	ACB2103003	ACB2103004
丙烯酸甲酯/ppm	0.2	0.2	0.2	0.2
1,2-二氯乙烷/ppm	0.4	0.4	0.4	0.4
苯乙烯/ppm	未检出	未检出	未检出	未检出
二乙烯苯/ppm	未检出	未检出	未检出	未检出

#### 结束语

树脂技术因提纯分离效果好、树脂可反复多次使用

等优势, 已经作为一种新的色谱技术广泛应用于化学原料药有效成分的纯化, 但树脂残留物在原料药中的残留

超过一定的限值,就会对人体和环境产生危害。本文研究的4种树脂残留物,1,2-二氯乙烷为第一类溶剂,是中国药典和ICH Q3C明确规定的应避免使用的溶剂,规定其限度为5ppm,WHO国际癌症研究机构(IARC)致癌物清单中的2B类致癌物;苯乙烯、二乙烯苯和丙烯酸甲酯是合成树脂的主要原料,无足够的毒理学数据,无PDE值,中国药典和ICH Q3C未规定残留限度值,但在IARC

致癌物清单中,苯乙烯为2A类致癌物,丙烯酸甲酯为2B类致癌物,这些物质均会对人体的健康产生严重危害。参照ICH Q3C《残留溶剂指导原则》中每日允许暴露量(PDE)计算公式、各残留物在小鼠/大鼠体内的LD<sub>50</sub>和阿卡波糖片的日最大允许服用量(600 mg/天),对苯乙烯、二乙烯苯和丙烯酸甲酯残留物的限度进行了计算和限定(见表4)。

表4 4种树脂残留物的限度

树脂残留物	LD <sub>50</sub> /mg·Kg <sup>-1</sup>	PDE/mg·天 <sup>-1</sup>	计算限度/ppm	ICH规定限度/ppm	拟定限度/ppm
丙烯酸甲酯	827	0.0017	2.9	-	3
1,2-二氯乙烷	-	-	-	5	5
苯乙烯	316	0.0013	2.2	-	2
二乙烯苯	4100	0.0205	34.2	-	34

4种树脂残留物的限度均在100 ppm以下,属于痕量测定,与常量测定有着不同的特点,检验方法的选择对测定结果有着重要的影响,有时采用不同的方法测定同一个样品会得到不同的结果。本研究分别考察了不同的色谱柱、柱温、检测器温度、流速等色谱条件,当采用文中色谱条件时,所有成分均能全部出峰,方法专属性良好,系统适用性满足要求,且已按照2020版中国药典指导原则9101《分析方法验证指导原则》完成方法验证。方法快速、准确、灵敏度高,适用于阿卡波糖中痕量树脂残留物的测定,进一步为阿卡波糖的质量提高提供了依据。

#### 参考文献

- [1]任飞.产阿卡波糖放线菌的选育、发酵条件优化及代谢调控研究[D].江苏:江南大学博士学位论文,2018.
- [2]吴海娟.阿卡波糖联合津力达治疗新诊2型糖尿病的临床观察[D].甘肃:甘肃中医药大学硕士学位论文,2018.
- [3]刘喜纲,刘翠哲,王栋.离子交换树脂在医药方面的应用[J].承德医学院学报,2004,21(3):243-244.
- [4]朱贺文.离子交换树脂有机物检测及其在应用过程中的迁移研究[D].江苏:江南大学硕士学位论文,2022.
- [5]王琦,曾志坚,何上儿.《中国药典》药品检验标准中2种常用树脂规范应用探讨[J].中国药业,2021,30(16):37-39.