

# 碱化衍生-顶空气相色谱法测定 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中的有关物质

孙士真, 刘金光\*, 田文静

(烟台药物研究所, 烟台 264000)

**摘要:** **目的** 建立碱化衍生-顶空气相色谱法同时测定 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中有关物质含量。 **方法** 色谱柱为 Agilent DB-624 UI, 进样口温度为 200 °C, 分流比 20:1, 火焰离子化检测器 (FID) 温度为 250 °C。升温程序: 起始柱温 40 °C, 保持 10 min, 以 40 °C/min 速率升温至 200 °C, 保持 5 min。以氮气为载气, 流速为 1.0 mL/min, 顶空平衡温度为 80 °C。 **结果** L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-丙氨酸乙酯盐酸盐、L-丙氨酸正丙酯盐酸盐、L-丙氨酸叔丁酯盐酸盐峰与相邻杂质峰分离度良好; 定量限分别为 0.0320、0.0120、0.0016、0.0039 mg/mL, 检测限分别为 0.0128、0.0048、0.0010、0.0016 mg/mL; 在相应浓度范围内线性关系良好, 相关系数  $r \geq 0.998$ ; 3 个水平下的平均回收率在 85.0%~95.8% 之间, 相对标准偏差 (RSD) 均 < 5.0%。 **结论** 建立的方法准确、可靠、灵敏, 可用于 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中 4 种有关物质同时快速测定。

**关键词:** 碱化衍生; L-丙氨酸异丙酯盐酸盐; 杂质; 顶空气相色谱法

## 0 引言

丙氨酸异丙酯盐酸盐(L-AIEH)是医药化工领域中一种重要的原料和中间体<sup>[1]</sup>。L-丙氨酸异丙酯盐酸盐的有关物质包括 L-丙氨酸甲酯盐酸盐(L-AMEH)、L-丙氨酸乙酯盐酸盐(L-AEEH)、L-丙氨酸正丙酯盐酸盐(L-APEH)、L-丙氨酸叔丁酯盐酸盐(L-AOEH), 这类杂质的化学结构与主成分相似。这 4 种杂质会随主成分参与后续反应, 生成难以清除的衍生杂质。为确保药品安全, 必须对这些杂质进行充分研究。

到目前为止, 针对 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中有关物质的测定研究主要有邻苯二甲醛(OPA)柱前在线衍生高效液相色谱法<sup>[2]</sup>、高效液相色谱法<sup>[3]</sup>。采用柱前衍生, 通过自动化设备, 使衍生试剂与待测试液在线混合和反应, 本方法对试验设备要求高, 操作复杂, 且衍生产物不稳定<sup>[4-5]</sup>。高效液相色谱法多采用离子对试剂, 因 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐及其相关杂质的紫外吸收较弱, 检测波长多选用 205 nm 或 210 nm, 低波长下杂质干扰较多, 且离子对试剂可对色谱柱改性, 缩短使用寿命。因此建立一种能够准确检测 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中有关物质的方法很

有必要。酯类化合物在碱性条件下易分解<sup>[6]</sup>, 基于此类化合物的特点, 本工作利用 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中有关物质碱解衍生成成甲醇、乙醇、正丙醇、叔丁醇, 衍生物性质稳定。目前, 关于甲醇、乙醇等衍生物检测的常用方法为气相色谱法<sup>[7-8]</sup>, 因此本研究采用碱化衍生-顶空气相色谱法<sup>[9]</sup>测定碱解后各衍生物的含量, 并优化了顶空平衡温度、平衡时间和氢氧化钠浓度等试验条件, 考察了方法的各项特征指标, 为 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐的质量研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

安捷伦 8890-7696A 型顶空-气相色谱仪, 配置氢火焰离子化检测器(FID)(美国安捷伦公司); QUINTIX224-1CN 型分析天平(德国赛多利斯公司)。L-丙氨酸异丙酯盐酸盐(H4013-231201, 安徽红杉生物医药科技有限公司); L-丙氨酸甲酯盐酸盐(98.0%, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); L-丙氨酸乙酯盐酸盐(98.0%, 萨恩化学技术(上海)有限公司); L-丙氨酸正丙酯盐酸盐(99.8%, 实验室自制); L-丙氨酸叔丁酯盐酸盐(97.0%, 上海阿拉

第一作者: 孙士真, 硕士, 工程师, 研究方向为药品质量研究。

\* 通信作者: 刘金光, 硕士, 工程师, 研究方向为药品质量研究。E-mail: 991214603@qq.com

丁生化科技股份有限公司); 氢氧化钠(国药化学试剂股份有限公司); 水为超纯水。

## 1.2 色谱条件

DB-624UI 毛细管色谱柱(30 m×0.32 mm×1.8 μm, 美国安捷伦公司)。升温程序: 起始柱温 40 °C, 保持 10 min, 以 40 °C/min 速率升温至 200 °C, 保持 5 min; 载气为氮气, 流速 1.0 mL/min, 分流比 20:1, 进样口温度 200 °C, 氢火焰离子化检测器(FID)温度 250 °C。顶空平衡温度 80 °C, 定量环温度 110 °C, 传输线温度 120 °C; 顶空平衡时间 20 min; GC 循环时间 27 min。

## 1.3 溶液配制

空白溶液: 精密量取水 1.0 mL、10% 氢氧化钠溶液 1.0 mL, 置 20 mL 顶空瓶中, 密封, 作为空白溶液。

标准溶液: 精密称取 4 种杂质对照品 25 mg, 置于不同的 25 mL 量瓶中, 用水稀释制成含 L-AIEH、L-AMEH、L-APEH、L-AOEH 各 1 mg/mL 的杂质储备液。精密量取上述杂质储备液各 1.0 mL, 置同一 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液 1.0 mL、10% 氢氧化钠溶液 1.0 mL, 置 20 mL 顶空瓶中, 密封, 作为标准溶液。

线性溶液: 分别精密量取杂质储备液 0.5、0.8、1.0、1.2、1.5 mL, 置不同的 10 mL 量瓶中, 得到 5 种不同质量浓度系列混合标准溶液。精密量取上述溶液 1.0 mL、10% 氢氧化钠溶液 1.0 mL, 置 20 mL 顶空瓶中, 密封, 作为线性溶液。

供试品溶液: 精密称取 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐约 100 mg, 置 20 mL 顶空瓶中, 精密加入 1.0 mL 水和 1.0 mL 10% 氢氧化钠溶液, 密封, 摇匀。

供试品加标溶液: 精密称取 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐约 100 mg, 置 20 mL 顶空瓶中, 精密加入 1.0 mL 标准溶液和 1.0 mL 10% 氢氧化钠溶液, 密封, 摇匀。

## 2 结果与分析

### 2.1 顶空参数的选择

#### 2.1.1 顶空平衡温度

顶空平衡温度对杂质测定的影响主要有两个方面。一方面温度可以影响化学反应<sup>[10]</sup>的速率和化学平衡, 另一方面温度可以显著影响气液平衡常数。因此, 本试验考察顶空平衡温度为 60、70、80、100 °C 时, 对各杂质峰面积测定的影响, 结果见图 1。可以看出, 在 60~100 °C 的范围内, 4 个杂质的峰面积随着平衡温度的升高而增大。考虑到水的沸点为 100 °C, 继续升温可能会引起顶空瓶漏气或爆裂, 同时会有杂质产生干扰目标物的测定。因此顶

空平衡温度选择 80 °C。

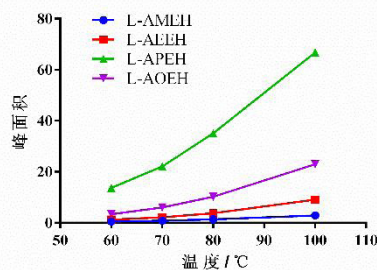


图 1 平衡温度对标准溶液中 4 种杂质峰面积的影响

#### 2.1.2 顶空平衡时间

顶空平衡时间是顶空瓶内待测杂质达到气液平衡的时间, 这个时间取决于待测组分分子的扩散速度。杂质响应值随顶空平衡时间的延长而增大。在保证检测结果准确的前提下, 缩短平衡时间, 提高检测效率。在 10、20、30 min 3 个平衡时间条件下, 分别取标准溶液进行气相测定, 结果见图 2。综合衡量, 顶空平衡时间选择 20 min。

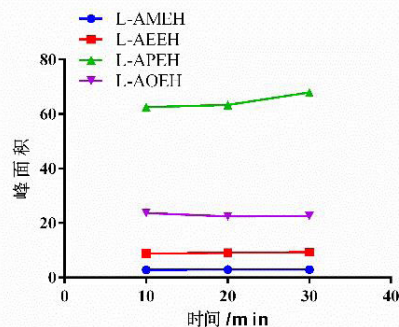


图 2 顶空平衡时间对标准溶液中 4 种杂质峰面积的影响

#### 2.1.3 氢氧化钠浓度

试验考察了氢氧化钠浓度对 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐及其待测杂质的影响。L-丙氨酸异丙酯盐酸盐浓度为 100 mg/mL, 4 种杂质浓度为 100 μg/mL, 氢氧化钠浓度分别为 5%、10%、15% 时, 各杂质峰面积随着氢氧化钠浓度增大而增大。氢氧化钠浓度为 5% 时, 平行 6 份供试品加标溶液中 L-丙氨酸正丙酯盐酸盐回收率分别为 29.8%、29.7%、28.0%、43.5%、30.4%、37.4%, RSD 为 18.2%, 回收率偏低, 且重复性差; 氢氧化钠浓度为 10% 时, 平行 6 份供试品加标溶液中 4 个杂质的回收率均在 84%~105% 之间, RSD 小于 5.1%, 说明 10% 氢氧化钠浓度下 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐及杂质已完全转化。结果见图 3, 故氢氧化钠浓度选择 10%。

## 2.2 方法学考察

#### 2.2.1 系统适用性试验

取标准溶液平行配制 6 份, 记录峰面积, 分别计算 4 种待测组分峰面积的 RSD。结果发现: 标准溶液中待测杂

质的峰面积 RSD 为 0.62%~2.21%, 均小于 5.0%。各待测杂质峰的理论板数最小为 42402, 待测杂质峰与相邻峰之间的分离度最小为 14.43, 方法系统适用性满足要求。

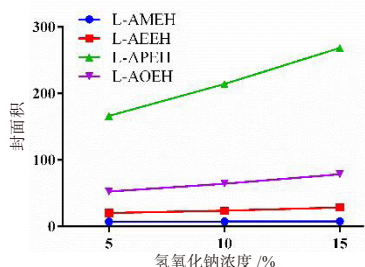
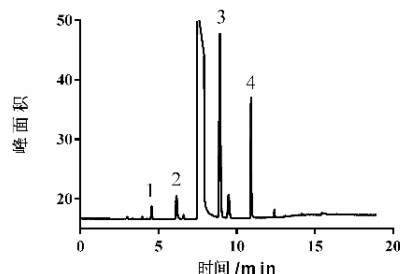


图 3 氢氧化钠浓度对 4 种杂质测定的影响

### 2.2.2 专属性试验

取 1.3 项下的空白溶液、供试品溶液以及供试品加标溶液, 进样分析。结果空白溶液和供试品溶液均无干扰; 供试品加标溶液中待测杂质峰与相邻峰的分离度均大于 1.5, 图 4 显示方法专属性良好。



注: 1-L-AMEH; 2- L-AEEH; 3- L-APEH; 4- L-AOEH

图 4 系统适用性试验的气相色谱图

### 2.2.3 线性与范围

分别取 1.3 项下各系列线性溶液, 进行顶空气相检测, 纵坐标为 4 种杂质的峰面积 ( $Y$ ), 横坐标为质量浓度 ( $X$ ), 绘制标准曲线, 各待测杂质的线性方程如表 1。结果表明: 4 种待测组分在考察浓度范围内线性关系良好, 相关系数  $r$  值不小于 0.998。

表 1 4 种杂质的线性范围、线性方程、相关系数、检出限与定量限

杂质	范围/(mg/mL)	线性方程	相关系数	定量限/(mg/mL)	检测限/(mg/mL)
L-AMEH	0.0320~0.1501	$Y=67.613X+0.5516$	0.9982	0.0320	0.0128
L-AEEH	0.0120~0.1501	$Y=235.04X+0.0957$	0.9991	0.0120	0.0048
L-APEH	0.0016~0.1545	$Y=1939.30X+4.4260$	0.9991	0.0016	0.0010
L-AOEH	0.0039~0.1459	$Y=641.99X-0.4493$	0.9990	0.0039	0.0016

### 2.2.4 检出限与定量限

采用逐渐稀释法, 当信噪比 3:1、10:1 时, 即认为达到了方法的检测限、定量限。表 2 结果表明, 方法灵敏度满足要求。

### 2.2.5 准确度试验

精密称取 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐 100 mg 共 9 份, 置 20 mL 顶空瓶中, 分别精密加入低、中、高 3 个不同质量浓度的混合标准溶液 1.0 mL, 10% 氢氧化钠溶液 1.0 mL, 密封, 摇匀。进行顶空气相检测, 记录峰面积, 计算 4 种待测组分的回收率, 具体见表 2。可以看出, 各待测杂质的回收率在 83.8%~104.5%, RSD 为 0.2%~3.2%, 平均回收率在 80.0%~120.0% 范围内, RSD( $n=3$ ) 小于等于 5.0%, 表明本方法的准确度良好。

### 2.2.6 重复性试验

按 1.3 项下方法, 平行制备 6 份供试品加标溶液。进行顶空气相检测, 记录峰面积, 计算 4 种杂质的含量 RSD。供试品加标溶液中各待测杂质的含量 RSD 均小于 3.0%, 由结果可知, 该方法具有较好的重复性。

### 2.2.7 耐用性

分别改变气相色谱参数, 顶空平衡温度 70、80 °C, 顶空平衡时间 20、30 min, 载气流速 (1.0±0.1) mL/min,

考察色谱参数微小改变对标准溶液、供试品溶液、供试品加标溶液中待测杂质测定的影响。由试验结果可知, 上述气相色谱参数的微小改变对标准溶液、供试品溶液、供试品加标溶液中各待测杂质的测定几乎无影响, 说明本方法具有良好的耐用性。

表 2 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中 4 种杂质在 3 个水平下的回收率和 RSD( $n=3$ )

杂质	浓度水平	加标量 /%	检出量 /%	回收率 /%	RSD /%
L-AMEH	低	0.0819	0.0715	87.3	1.9
		0.0812	0.0724	89.2	
		0.0821	0.0706	86.0	
	中	0.1029	0.0997	96.9	1.7
		0.1031	0.0979	95.0	
		0.1001	0.0984	98.3	
	高	0.1194	0.1248	104.5	1.9
		0.1243	0.1252	100.7	
		0.1205	0.1249	103.7	
L-AEEH	低	0.0819	0.0760	92.8	1.4
		0.0812	0.0740	91.2	
		0.0821	0.0769	93.7	
	中	0.1029	0.0963	93.6	3.2
		0.1031	0.0967	93.8	
		0.1001	0.0991	99.0	
	高	0.1194	0.1095	91.7	0.9
		0.1243	0.1160	93.3	
		0.1205	0.1113	92.4	

续表					
杂质	浓度水平	加标量 /%	检出量 /%	回收率 /%	RSD /%
L-APEH	低	0.0843	0.0735	87.3	1.6
		0.0835	0.0707	84.7	
		0.0844	0.0731	86.6	
	中	0.1059	0.0900	85.0	
		0.1061	0.0891	84.0	
		0.1030	0.0881	85.5	
	高	0.1229	0.1029	83.8	
		0.1280	0.1092	85.3	
		0.1240	0.1045	84.3	
L-AOEH	低	0.0796	0.072	91.1	0.2
		0.0788	0.072	90.9	
		0.0797	0.073	91.4	
	中	0.1000	0.090	90.0	
		0.1002	0.090	89.6	
		0.0973	0.091	93.9	
	高	0.1160	0.103	89.1	
		0.1208	0.109	90.6	
		0.1171	0.105	89.7	

### 2.3 多批次样品检测

取 5 批供试品, 在已验证的顶空气相色谱条件下检测, 记录峰面积, 计算各待测组分的含量, 结果见表 3。由结果可知, 在 5 批样品中, 4 种待测杂质均有不同程度的检出。

表 3 样品中 4 种杂质的检测

样品	L-AMEH	L-AEEH	L-APEH	L-AOEH
1	0.074%	0.009%	0.004%	ND
2	0.033%	0.008%	0.004%	ND
3	0.034%	0.007%	0.004%	ND
4	0.039%	ND	0.007%	0.031%
5	0.021%	ND	0.001%	0.004%

注: ND 表示未检出。

### 3 讨论与结论

结合物料及待测杂质的极性及理化性质, 试验中选择不同的色谱柱进行测定, 选用安捷伦 DB-1701 (30 m×0.25 mm×0.25 μm) 柱时, L-丙氨酸叔丁酯衍生峰与主峰的分度度不能满足要求。而使用安捷伦 DB-624UI (30 m×0.32 mm×1.8 μm) 柱时, 各待测杂质分度度均满足要求, 故选择 DB-624UI 作为分析色谱柱。

L-丙氨酸异丙酯盐酸盐及待测杂质均易溶于水, 且价廉易得, 无毒无害, 所以选择水作为溶剂。待测杂质衍生后生成甲醇、乙醇、异丙醇、叔丁醇、正丙醇, 5 种化合物的沸点范围为 60~100 °C, 因此本试验采用起始柱温 40 °C。

实验通过优化氢氧化钠浓度、顶空平衡温度和平衡时

间等条件, 确定碱化衍生-顶空气相色谱法测定 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中四种待测组分。本方法所设立的实验条件下, 四种待测杂质的分度度满足要求、峰形良好, 在考察浓度范围内呈良好的线性关系 ( $r$  均大于 0.998)。L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中 4 种杂质在不同浓度水平下回收率均满足要求, 准确度良好。本方法样品前处理操作简便, 可减少目标组分的损失。方法具有检出限低、准确度高、重复性好等优点。采用拟定的方法, 对多批次样品进行测定, 结果 4 种待测杂质均有不同程度的检出。该方法的建立可以对 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中的相关杂质进行准确定量。

与现有分析方法相比, 本文建立的测定方法更加高效、操作简单, 能够准确可靠地对 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中的 4 种杂质进行准确的定量分析。本方法的建立可以为 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐的质量控制提供有效的手段和参考, 保证药品质量安全。

### 参考文献

- [1] 刘秀萍, 任杰, 张庆文, 等. 富马酸丙酚替诺福韦的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2019, 50(8): 863-867.
- [2] 韩抒真, 潘林玉, 徐良金, 等. OPA柱前在线衍生 HPLC 法检测 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐中有关物质[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(12): 1647-1651.
- [3] 邱妍川, 余虹, 王韵, 等. 一种采用高效液相色谱法测定 L-丙氨酸异丙酯盐酸盐有关物质的方法: CN202110589627. 5 [P]. 2023-06-20.
- [4] 罗学平, 蒋宾, 李丽霞, 等. OPA柱前衍生 HPLC 同时测定川红工夫红茶 20 种氨基酸含量[J]. 贵州师范大学学报(自然科学版), 2024, 42(4): 53-62.
- [5] 倪先哲, 王刚, 顾菊菊. OPA/FMOC 柱前衍生高效液相色谱法检测东太湖原水中游离氨基酸含量[J]. 给水排水, 2021, 57(S2): 32-36.
- [6] 赵温涛, 王光伟, 马宁. 有机化学 [M]. 7 版. 北京: 高等教育出版社.
- [7] 农利, 李丽波, 严靖婷, 等. 顶空气相色谱法测定虾青素中甲醇和乙醇的残留量[J]. 云南化工, 2024, 51(10): 149-151.
- [8] 邵雪力, 宋闫军, 谭洋. 毛细管柱顶空进样程序升温气相色谱法检测单硝酸异山梨酯缓释片中乙醇量[J]. 实验室检测, 2024, 2(10): 165-167.
- [9] 谢诚, 马超云, 陈慧, 等. 碱化衍生-顶空气相色谱法测定固体废物中的三氯乙醛[J]. 绿色科技, 2024, 26(8): 210-213+218.
- [10] 王明召, 高盘良, 王磊. 化学反应原理 [M]. 山东: 山东科学技术出版社.