

- medicine preparation [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2012, 32(2): 261-266.
- [4] LAI G F, CHENG B, LU J. Determination of chemical components illegally mixed in antirheumatic traditional Chinese medicine by LC-MS [J]. *Lishizhen Med Mater Res*(时珍国医国药), 2010, 13(4): 847-848.
- [5] SHEN G F, ZHU J, QIU Y J. UPLC-MS/MS method for determination of sibutramine and its desmethyl derivatives added in slimming foods [J]. *Chin Pharm J*(中国药理学杂志), 2011, 46(20): 1609-1611.
- [6] ZHU B, ZHAO Z G, WANG Z W, et al. Analysis of 15 sedatives and soporifics illegally added into functional foods and traditional Chinese medicine preparations by LC-MS/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2010, 30(4): 745-751.
- [7] LI D, WEN H M, CUI F C, et al. LC-MS/MS screening for 36 chemical components in health food and Chinese traditional patent medicine [J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2010, 30(8): 1527-1532.
- [8] WANG W, LIU Y S, QIAO S, et al. Simultaneous determination of carbamazepine, lamotrigine, clonazepam, diazepam and oxazepam in human plasma by UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2013, 30(11): 1215-1220.
- [9] ZHU R H, LI H D, YANG J, et al. Pharmacokinetics of benazepril and benazeprilat in Chinese healthy volunteers based on UPLC-MS/MS [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2012, 32(18): 1437-1442.

收稿日期: 2013-01-24

GC 测定安立生坦原料药中 6 种有机溶剂残留

张玲¹, 杨华良¹, 王家明²(1.天津市中心妇产科医院药剂科, 天津 300100; 2.工业发酵微生物教育部重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

摘要: 目的 建立测定安立生坦原料药中可能残留的 6 种有机溶剂(甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺)含量的检测方法。方法 采用顶空气相色谱法, 色谱柱为 DB-624 毛细管柱(30.0 m×0.53 mm, 3.00 μm), 氢火焰离子化检测器(FID), 进样口温度 250 °C, 检测器温度 300 °C; 载气为高纯氮气, 恒压模式, 压力 2 psi; 柱温为升温程序, 50 °C 保持 10 min, 以 20 °C·min⁻¹ 升温升至 200 °C, 保持 4 min; 顶空瓶平衡温度 100 °C, 平衡时间 30 min。结果 6 种残留溶剂色谱峰的理论板数均>10 000, 相邻峰的分度均>2.0, 甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺的线性关系良好(*r* 分别为 0.999 6, 0.999 2, 0.999 5, 0.999 3, 0.999 3, 0.999 6); 精密性与重复性 RSD 均<5.0%; 最低检出浓度分别为 0.36, 0.034, 0.51, 0.43, 0.45, 5.27 μg·mL⁻¹; 平均回收率均在 90%以上; 供试品溶液 24 h 内稳定。结论 该气相色谱法操作简便, 准确, 灵敏度高, 可用于检测安立生坦原料药中有机溶剂的残留量。

关键词: 安立生坦; 顶空进样法; 毛细管气相色谱法; 有机溶剂残留

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2014)10-1238-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.10.019

Determination of the Six Residual Organic Solvents in Ambrisentan by GC

ZHANG Ling¹, YANG Hualiang¹, WANG Jiaming²(1.Department of Pharmacy, Tianjin Central Obstetrics and Gynecology Hospital, Tianjin 300100, China; 2.Key Laboratory of Industrial Microbial Fermentation of Ministry of Education, Tianjin University of Science and Technology Biological Engineering Institute, Tianjin 300457, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of the six residual organic solvents(methanol, ether, dichloromethane, ethyl acetate, 1,4-dioxane and *N,N*-dimethylformamide) in ambrisentan. **METHODS** Gas chromatography with headspace sampling was applied in the study. Agilent DB-624 silica capillary column(30.0 m×0.53 mm, 3.00 μm) was used. The inlet temperature was 250 °C and the FID detector temperature was 250 °C. N₂ was carrier gas at a column pressure of 2 psi. The initial temperature was kept at 50 °C for 10 min, then the temperature was raised to 200 °C at the rate of 20 °C·min⁻¹ and subsequently sustained for 4 min. FID detector temperature was 300 °C. The vial temperature was 100 °C, and the vial time was 30 min. **RESULTS** The linear correlation coefficients of this method for methanol, ether, dichloromethane, ethyl acetate, 1,4-dioxane and *N,N*-dimethylformamide were 0.999 6, 0.999 2, 0.999 5, 0.999 3, 0.999 3 and 0.999 6, respectively. The RSDs of precision and repeatability were all <5.0%. The limits of detection were 0.36, 0.034, 0.51, 0.43, 0.45 and 5.27 μg·mL⁻¹, respectively. The average recovery were >90%. The sample solution was stable in 24 h. **CONCLUSION** The analytical method

is simple, accurate and sensitive, and is suitable for the determination of residual solvents in ambrisentan.

KEY WORDS: ambrisentan; headspace sampling; GC; residual organic solvents

安立生坦是由美国 Myo-gen 生物制药公司开发的一种选择性内皮素受体 A(ETAR)拮抗剂。安立生坦可强效抑制内皮素所致血管收缩, 2007 年 6 月 15 日获得美国 FDA 批准, 口服用于肺动脉高压(pulmonary arterial hypertension, PAH)的治疗。国内目前对于安立生坦相关的文献报道较少^[1]。在该药的合成工艺与精制过程中, 需要用到甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺 6 种有机溶剂, 这些溶剂会对人体健康造成危害, 在生产过程中完全去除比较困难, 但必须确保产品中的这些溶剂残留量是人体可以接受的, 中国药典和国际人用药品注册技术协调大会(ICH)对各类溶剂残留量有严格的规定^[2-3]。本实验使用溶剂残留中最常用的中等极性的气相色谱柱 DB-624 毛细管柱^[4-6], 测定安立生坦合成工艺中用到的 6 种有机溶剂。

1 仪器与材料

Agilent 7890 气相色谱仪; Agilent G1888 顶空进样器; 氢火焰离子化检测器(FID); ChemStation 工作站(美国 Agilent 公司)。

甲醇为色谱纯; 乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺、二甲基亚砜均为分析纯(天津市康科德科技有限公司)。安立生坦样品(某制药有限公司, 批号分别为 130603, 130604, 130605)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: DB-624 毛细管柱(30.0 m×0.53 mm, 3.00 μm); 柱温: 采用程序升温, 50 °C, 维持 10 min, 以 20 °C·min⁻¹ 升温速率升至 200 °C, 维持 4 min; 进样口温度为 250 °C, 检测器温度为 300 °C。检测器: FID; 载气为高纯氮气, 恒压模式, 压力: 2 psi, 分流比 5 : 1; 顶空条件: 平衡温度 100 °C, 加热 30 min, 定量圈 110 °C, 传送带 120 °C, 自动顶空进样, 进样量 3 mL。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的配制 分别精密移取甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺各适量, 加二甲基亚砜(DMSO)配制

成每 1 mL 含甲醇 7.51 mg、乙醚 12.51 mg、二氯甲烷 1.48 mg、乙酸乙酯 12.49 mg、1,4-二氧六环 0.95 mg、*N,N*-二甲基甲酰胺 2.20 mg 的对照品储备液。再精密量取 1 mL 对照品储备液, 加 DMSO 定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀, 精密量取 3.0 mL 置 10 mL 顶空瓶中, 加盖密封。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取安立生坦 300 mg, 置 10 mL 顶空瓶中, 精密加入二甲基亚砜(DMSO)3.0 mL, 摇匀, 加盖密封。

2.3 专属性和系统适用性 分别取空白溶液、对照品溶液、供试品溶液, 精密量取 3.0 mL 置 10 mL 顶空瓶中, 摇匀, 加盖密封, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果空白溶液无干扰, 对照品溶液中各组分的分离度均>2.0, 柱效均>10 000, 样品不干扰 6 种有机溶剂的测定。

2.4 线性关系考察

分别移取对照品储备液 0.5, 0.75, 1.0, 1.2, 1.8 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 DMSO 稀释到刻度, 混匀。分别移取各浓度溶液 3.0 mL 置 10 mL 顶空瓶中, 加盖密封, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。以待测物浓度 X 为横坐标, 待测物峰面积 Y 为纵坐标, 进行线性回归。结果表明, 甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺在一定的浓度范围内线性关系良好, 结果见表 1。

表 1 线性关系考察试验结果

Tab. 1 Calibration curve and linear range

有机溶剂	回归方程	r	线性范围/mg·mL ⁻¹
甲醇	$Y=1\ 819.25X+3.21$	0.999 6	0.150 1~0.540 5
乙醚	$Y=49\ 646.91X+47.79$	0.999 2	0.250 2~0.900 7
二氯甲烷	$Y=3\ 425.41X+3.64$	0.999 5	0.029 68~0.106 8
乙酸乙酯	$Y=7\ 454.23+92.17X$	0.999 3	0.249 8~0.899 5
1,4-二氧六环	$Y=1\ 935.83X+1.94$	0.999 3	0.019 00~0.068 42
<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺	$Y=183.23X-0.027$	0.999 6	0.0439 4~0.158 2

2.5 仪器精密度试验

取对照品溶液 3.0 mL 置 10 mL 顶空瓶中, 加盖密封, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。重复进样 6 次, 计算各溶剂峰面积的 RSD, 测得甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺对照品溶液峰面积的 RSD 分别为

3.04%, 4.03%, 1.85%, 1.39%, 1.70%, 3.57%, 表明该方法的仪器精密性良好。

2.6 重复性试验

取供试品溶液(批号: 130603)3.0 mL 置 10 mL 顶空瓶中, 加盖密封, 配制 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。计算各溶剂的峰面积的 RSD, 甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺未检出, 乙醚的峰面积 RSD 为 2.35%, 结果表明该方法的重复性良好。

2.7 检测限与定量限试验

将对照品溶液用 DMSO 逐步稀释, 当信噪比 $S/N=3$ 时, 计算所测溶剂的最低检测限, 测得甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺对照品溶液最低检测限浓度分别为 0.36, 0.034, 0.51, 0.43, 0.45, 5.27 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当信噪比 $S/N=10$ 时, 计算所测溶剂的定量限, 测得甲醇、乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺对照品溶液定量限浓度分别为 1.2, 0.102, 1.70, 1.44, 1.49, 17.58 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.8 回收率试验

分别移取对照品储备液 0.8, 1.0, 1.2 mL 置 25 mL 量瓶中, 加 DMSO 稀释到刻度, 混匀, 配制成 80%, 100%, 120% 已知浓度的标准溶液。称取样品 300 mg 共 9 份, 置 10 mL 顶空瓶中, 分别移取各浓度标准溶液 3 mL, 加盖密封摇匀, 即得 80%, 100%, 120% 加样标准溶液。另称取样品 300 mg, 置 10 mL 顶空瓶中, 加入 3 mL DMSO, 加盖密封摇匀, 即得样品溶液。标准溶液、加样标准溶液和样品溶液分别顶空进样, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。甲醇的平均回收率为 106.07%, RSD 为 2.48%; 乙醚的平均回收率为 101.77%, RSD 为 3.26%; 二氯甲烷的平均回收率为 97.80%, RSD 为 1.34%; 乙酸乙酯的平均回收率为 100.53%, RSD 为 1.23%; 1,4-二氧六环的平均回收率为 101.67%, RSD 为 1.09%; *N,N*-二甲基甲酰胺的平均回收率为 100.32%, RSD 为 2.80%。采用外标法计算, 均符合药典规定。

2.9 样品溶液稳定性试验

取批号为 130603 样品 300 mg, 置 10 mL 顶空瓶中, 加入 3 mL DMSO, 加盖密封, 摇匀, 配制 6 份, 分别放置 0, 2, 4, 8, 12, 24 h, 按“2.1”项下色谱条件进行测定。结果表明, 供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.10 样品中有机溶剂残留物的测定

分别取批号为 130603, 130604 和 130605 的样品各 300 mg, 精密称定, 置 10 mL 顶空瓶中, 加入 3 mL DMSO, 加盖密封, 摇匀, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 结果见表 2。测试结果表明各批样品的残留溶剂含量符合中国药典 2010 版中的限度规定, 3 批样品中甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺均未检出, 乙醚残留量不超过限度标准。空白溶液、对照品溶液、样品溶液的色谱图见图 1。

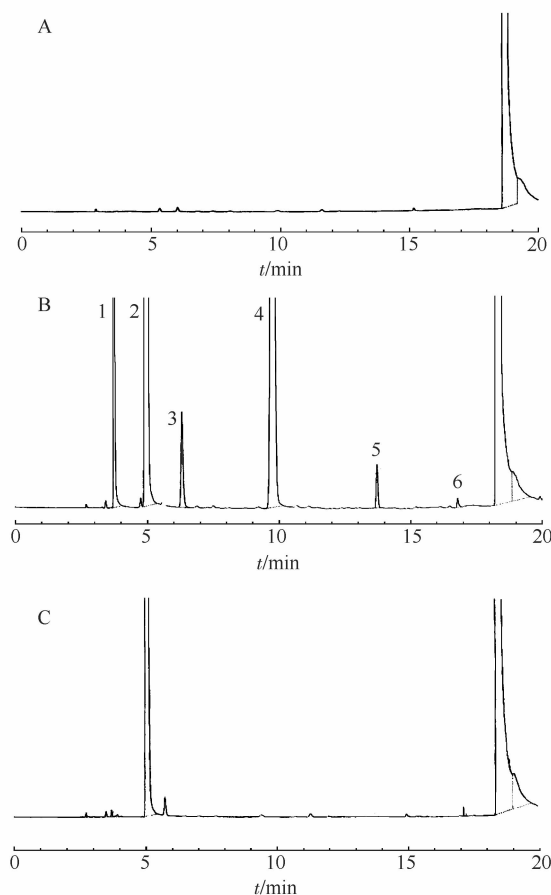


图 1 气相色谱图

A-空白溶液; B-对照品溶液; C-样品溶液; 1-甲醇; 2-乙醚; 3-二氯甲烷; 4-乙酸乙酯; 5-1,4-二氧六环; 6-*N,N*-二甲基甲酰胺。

Fig. 1 GC chromatograms

A-blank solvent; B-reference solution; C-sample solution; 1-methanol; 2-ether; 3-dichloromethane; 4-ethyl acetate; 5-1,4-dioxane; 6-*N,N*-dimethylformamide.

3 讨论

3.1 溶剂的选择

考察了 DMSO 与水作为溶剂, 发现样品在 DMSO 中能完全溶解, 样品在 DMSO 中溶解度较大, 且 DMSO 溶解性好, 沸点高, 因此选择 DMSO 作为溶剂。

表 2 样品测定结果($n=3$)Tab. 2 Results of sample analysis($n=3$)

批号	残留量/%					
	甲醇	乙醚	二氯甲烷	乙酸乙酯	1,4-二氧六环	<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺
限度要求 ^[2]	0.3	0.5	0.06	0.5	0.038	0.088
130603	未检出	0.20	未检出	未检出	未检出	未检出
130604	未检出	0.18	未检出	未检出	未检出	未检出
130605	未检出	0.17	未检出	未检出	未检出	未检出

3.2 顶空温度及平衡时间的考察

根据样品热稳定性及其中残留溶剂沸点情况选择顶空温度。对沸点较高的残留溶剂,通常选用较高的平衡温度。同时也要兼顾样品的热分解特性,尽量避免样品产生挥发性热分解产物,以免干扰测定。实验分别考察了在 80, 90, 100, 110 °C 条件下预热, 经过比较发现随着温度的提高, 各组分的响应值相对增大, 分析灵敏度较好。这是由于温度越高, 顶空气体的浓度越高造成的。但是在达到一定温度后某些溶剂的峰面积有可能减小, 这是由于顶空体系中 DMSO 逐渐气化, 从而减少了气相中被测溶剂的浓度。综合考察后选择 100 °C 作为顶空温度。

顶空平衡一般要达到一定时间, 以保证样品溶液的气液两相有足够的时间达到平衡。顶空时间一般不宜过高, 以防止引起顶空瓶的气密性变差, 导致定量准确性降低。实验分别考察了平衡 20, 30, 40 min 后进行测定。开始峰面积随着平衡时间的增加有所增加, 平衡 40 min 后峰面积与平衡 30 min 时基本一致, 故选择顶空平衡时间为 30 min。

3.3 测定溶剂的残留

在样品测定的过程中, 一些测定溶剂残留在顶空进样器定量圈和传送带中, 例如 *N,N*-二甲基甲酰胺, 所以如果测定样品之前使用过 *N,N*-二甲基甲酰胺, 必须反复清洗, 使用空白溶剂检测 *N,N*-二甲基甲酰胺是否洗净, 以免影响样品的测定。

3.4 测定结果分析

对样品进行了残留溶剂检测, 3 批样品中甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、1,4-二氧六环、*N,N*-二甲基甲酰胺均未检出, 乙醚残留量不超过限度标

准。样品中残留的乙醚的沸点很低, 事实上通过加热可以除去, 但是由于样品在结晶过程中有部分乙醚包合在样品的晶体中, 所以最后会有一些残留。

ICH 和药典规定, 甲醇、二氯甲烷、1,4-二氧六环和 *N,N*-二甲基甲酰胺为第二类残留溶剂, 限度分别为 0.3%, 0.06%, 0.038% 和 0.088%, 乙醚、乙酸乙酯属第三类残留溶剂, 限度均为 0.5%。本实验首次采用顶空气相色谱法对安立生坦原料药中的 6 种残留溶剂进行检测。方法验证结果表明该方法色谱条件分离良好, 灵敏度高, 在考察的浓度范围内线性关系良好, 回收率符合规定, 样品溶液稳定, 可以作为安立生坦原料药中残留溶剂的质量控制方法。

REFERENCES

- [1] XU J, ZHANG Y S, SONG Q, et al. Comparative study of effects of ambrisentan and bosentan on right ventricle remodeling in hypoxic pulmonary hypertension rats [J]. *Chin Heart J*(心脏杂志), 2013, 25(3): 257-261.
- [2] Ch.P(2010)Vol II(中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 73-74.
- [3] ZHOU H J. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use Quality Section(药品注册的国际技术要求·质量部分) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.
- [4] YE X X, YANG Y J, JIN F. Determination of eight residual organic solvents in docetaxel by headspace capillary gas chromatography [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2012, 43(12): 1035- 1036.
- [5] CHENG L, LI Y L, TANG Y M, et al. Determination of five residual organic solvents in thymalfasin by GC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2013, 30(6): 657-660.
- [6] LI Y, YU J F, XU Q, et al. Determination of five residual organic solvents in gemcitabine HCl by GC [J]. *Chin J Hosp Pharm*(中国医院药学杂志), 2013, 33(14): 1199-1201.

收稿日期: 2014-01-06