

毛细管气相色谱法测定 2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸中有机溶剂残留量

车慧^{1,2}, 靳守东², 郑志兵¹, 谢剑炜^{1*} (1. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850; 2. 总后勤部卫生部药品仪器检验所, 北京 100169)

摘要:目的 建立 2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸原料药中乙腈、1,4-二氧六环、四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮、乙醇和异丙醇 7 种有机溶剂残留量的气相色谱测定方法。方法 采用 DB-1(30 m×0.53 mm, 5.00 μm) 毛细管色谱柱, 氢火焰离子化检测器(FID), 以氮气为载气, 进样口温度 160 ℃, 检测器温度为 250 ℃, 柱温为程序升温; 分流进样, 外标法计算残留溶剂的含量。结果 7 种有机溶剂均得到有效分离, 在考察的浓度范围内, 回收率及线性关系良好, 且 3 批样品中有机溶剂残留量均符合规定。结论 本方法操作简便, 精密度好, 准确可靠, 适用于该原料中 7 种残留有机溶剂的同时测定。

关键词:毛细管气相色谱法; 2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸; 有机溶剂残留量

doi:10.11669/cpj.2013.07.016 中图分类号:R972.6;R927 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2013)07-0562-03

Determination of Residual Organic Solvents in 2-[2-Methyl-4-[[2-[4-(trifluoromethyl) phenyl] pyrimidin-4-yl] methylsulfanyl] phenoxy] acetic Acid by Capillary Gas Chromatography

CHE Hui^{1,2}, JIN Shou-dong², ZHENG Zhi-bing¹, XIE Jian-wei^{1*} (1. Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China; 2. Institute for Drug and Instrument Control of PLA, Beijing 100169, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a capillary GC method for the determination of residual solvents including ethanol, acetone, isopropanol, ethyl acetate, dioxane and THF in 2-[2-methyl-4-[[2-[4-(trifluoromethyl) phenyl] pyrimidin-4-yl] methylsulfanyl] phenoxy] acetic acid. **METHODS** The residual organic solvents were separated on DB-1 capillary column (30 m×0.53 mm, 5.00 μm). FID was used as detector with a temperature of 250 ℃, and the inlet temperature was 160 ℃. The carrier gas was nitrogen, and the column temperature was programmed set. The contents of residual solvents were calculated by external standard method. **RESULTS** The seven residual organic solvents were completely separated, the recovery rates and linear relationship were good, and three batches of samples all met the requirements. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, and reproducible, so it can be used for the detection of seven residual organic solvents in the raw.

KEY WORDS: GC; 2-[2-methyl-4-[[2-[4-(trifluoromethyl) phenyl] pyrimidin-4-yl] methylsulfanyl] phenoxy] acetic acid; residual solvent

2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸是由军事医学科学院研发, 尚未在国内外上市销售的全新药物, 为一种全新结构的过氧化物酶体增殖物激活受体-δ 拮抗剂, 临床上用于高脂血症的治疗。其在合成过程中使用了乙腈、1,4-二氧六环、四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮、乙醇和异丙醇等多种有机溶剂。上述有机溶剂的残留会对人体产生不同程度的毒性, 应严格控制。《中国药典》2010 年版二部^[1]及人用药品注册技术规范国际协调会(ICH)^[2]对此类溶剂规定了残留限度。本实验参考文献[3-8], 采用毛细管气相色谱法, 以二甲基亚砜为溶剂, 同时测定该原料中上述 7 种溶剂的残留量。方法简便、灵敏、准确, 可用于该原料

药的质量控制, 为该新药项目的申报、注册与质量控制提供了数据基础。

1 仪器与试剂

安捷伦气相色谱仪(Agilent GC-6890), 氢火焰离子化检测器(FID), 安捷伦色谱工作站; Sartorius BP 210S 天平。

乙腈、1,4-二氧六环、四氢呋喃、乙酸乙酯、丙酮、乙醇、异丙醇均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 二甲基亚砜(DMSO)为色谱纯(J&K 公司); 2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸原料药由军事医学科学院毒物药物研究所提供(批号 2010201、2010205、2010305)。

基金项目:国家“重大新药创制”药物分子设计高效筛选平台(2012ZX09103003-001-002)

作者简介:车慧, 女, 主管药师 研究方向: 新药及质量标准研究 * 通讯作者: 谢剑炜, 男, 研究员, 博士生导师 研究方向: 毒物药物分析 Tel: (010)66931649 E-mail: xiejw@bmi.ac.cn

2 方法与结果

2.1 气相色谱条件

色谱柱为 Agilent DB-1 (30 m × 0.53 mm, 5.00 μm); 载气高纯氮气; 柱头压力为 1.5 psi; 分流比为 8:1; 起始柱温为 30 °C, 保持 10 min 后, 以 15 °C · min⁻¹ 的速率升至 150 °C, 保持 3 min, 再以 40 °C · min⁻¹ 的速率升至 240 °C, 保持 3 min; 进样口温度为 160 °C; 检测器温度为 250 °C; 进样量 1 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照储备液的制备 精密量取乙腈 50 μL、乙醇 630 μL、乙酸乙酯 550 μL、丙酮 630 μL、异丙醇 640 μL、1,4-二氧六环 350 μL 和四氢呋喃 80 μL, 置于 100 mL 量瓶中, 加 DMSO 稀释至刻度, 摇匀, 得对照储备液。

2.2.2 对照溶液的制备 精密量取对照储备液 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 加 DMSO 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取 2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸约 200 mg, 精密加入 DMSO 2.0 mL, 振摇使溶解, 作为供试品溶液。

2.3 系统适用性实验

精确量取对照溶液和供试品溶液各 1 μL, 注入气相色谱中, 测定各有机溶剂的分离度及柱效, 乙醇、乙腈、丙酮、异丙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃和 1,4-二氧六环的保留时间分别为 7.9、8.8、9.5、10.5、16.1、16.8 和 19.3 min。结果表明, 以上各有机溶剂计算的理论板数均大于 8 000, 相邻溶剂的分离度均大于 2.5。

2.4 专属性实验

取 DMSO、对照溶液和供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, DMSO 的保留时间为 23.3 min, 对乙腈、乙醇、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、1,4-二氧六环、四氢呋喃的测定没有影响; 供试品溶液色谱图中, 无干扰测定的杂质峰。色谱图见图 1。

2.5 线性关系考察

分别精密量取对照储备液各 0.4、0.8、1.0、1.6、2.0、3.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加 DMSO 稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液各 1 μL, 注入气相色谱仪, 记录色谱图, 以溶液质量浓度 ρ (g · L⁻¹) 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 结果见表 1。

2.6 精密度实验

取“2.2.2”项下对照溶液, 连续测定 6 次, 计算峰面积 RSD 值, 乙腈、乙醇、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、1,4-二氧六环和四氢呋喃的 RSD 分别为 0.64%、

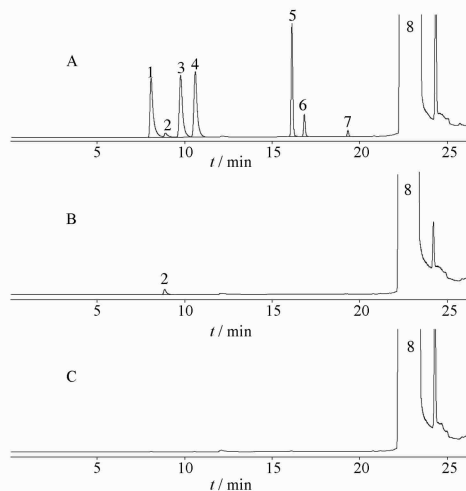


图 1 7 种残留溶剂对照溶液 (A)、供试品溶液 (B) 和空白溶液 DMSO (C) 的色谱图

1 - 乙醇; 2 - 乙腈; 3 - 丙酮; 4 - 异丙醇; 5 - 乙酸乙酯; 6 - 四氢呋喃; 7 - 1,4-二氧六环; 8 - DMSO

Fig. 1 GC Chromatograms of reference substances of seven solvents (A), sample (B) and blank solvent (C)

1 - ethanol; 2 - acetonitrile; 3 - acetone; 4 - isopropanol; 5 - ethyl acetate; 6 - dioxane; 7 - THF; 8 - dimethyl sulfoxide

表 1 7 种残留溶剂的回归方程和线性范围

Tab. 1 Regression equations and linear ranges of seven solvents

| Solvent | Regression equation | Linear range / g · L ⁻¹ | r |
|---------------|-------------------------|------------------------------------|---------|
| Ethanol | $A = 769.1\rho + 5.208$ | 0.20 - 1.5 | 0.999 9 |
| Acetonitrile | $A = 777.1\rho - 0.125$ | 0.016 - 0.12 | 0.999 8 |
| Acetone | $A = 793.1\rho + 16.94$ | 0.20 - 1.5 | 0.999 4 |
| Isopropanol | $A = 888.9\rho + 8.876$ | 0.20 - 1.5 | 0.999 9 |
| Ethyl acetate | $A = 670.4\rho + 21.90$ | 0.20 - 1.5 | 0.999 6 |
| Dioxane | $A = 521.6\rho + 0.214$ | 0.028 - 0.21 | 0.999 9 |
| THF | $A = 872.8\rho + 4.986$ | 0.015 - 0.11 | 0.999 3 |

0.67%、0.69%、0.63%、0.69%、0.82% 和 0.54%。

2.7 重复性实验

取 2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸原料药 (批号 2010305) 6 份, 按“2.3.3”配制供试品溶液, 进样测定, 结果乙腈平均含量为 0.031% (RSD = 0.90%), 其他溶剂在该批样品中未检出。

2.8 回收率实验

精密称取 2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸原料药 (批号 2010305) 9 份, 每份 1 g, 置 10 mL 量瓶中, 加适量 DMSO 溶解, 分别加入对照储备液 0.8、1.0、1.2 mL (各 3 份), 再加 DMSO 溶解并稀释至刻度, 摇匀。分别进样测定, 记录色谱图。按外标法计算回收率。结果见表 2。平均回收率均在 96.0% ~ 103.0% 之间, 表明回收率良好。

表2 7种残留溶剂的回收率实验结果, n=9

Tab. 2 Results of recovery test of seven solvents. n=9

| Solvent | Recovery/% | | | | | | | | | Average recovery | RSD |
|---------------|---------------------------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|----------------------------|--------|--------|------------------|------|
| | 80% of the labeled amount | | | 100% of the labeled amount | | | 120% of the labeled amount | | | /% | /% |
| Ethanol | 104.63 | 104.25 | 103.93 | 103.84 | 98.29 | 103.84 | 97.38 | 102.66 | 104.28 | 102.57 | 2.68 |
| Acetonitrile | 95.47 | 96.87 | 95.04 | 100.89 | 100.66 | 95.86 | 95.86 | 95.66 | 95.22 | 96.84 | 2.37 |
| Acetone | 96.84 | 97.62 | 97.09 | 99.43 | 96.63 | 96.61 | 95.93 | 96.72 | 96.69 | 97.06 | 1.02 |
| Isopropanol | 98.61 | 99.31 | 98.93 | 98.80 | 99.00 | 98.68 | 98.41 | 99.53 | 99.24 | 98.94 | 0.37 |
| Ethyl acetate | 96.26 | 96.21 | 96.97 | 96.57 | 97.07 | 96.38 | 97.02 | 97.71 | 96.50 | 96.74 | 0.50 |
| Dioxane | 96.78 | 100.55 | 99.57 | 99.07 | 103.56 | 101.87 | 101.14 | 100.13 | 103.05 | 100.64 | 2.07 |
| THF | 104.87 | 103.76 | 104.37 | 104.71 | 104.34 | 104.26 | 99.31 | 100.99 | 98.86 | 102.83 | 2.35 |

2.9 最低检测量

取对照溶液采用逐步稀释法稀释制成一定浓度的溶液,测定各溶剂的检测量(S/N=3),乙腈、乙醇、乙酸乙酯、丙酮、异丙醇、1,4-二氧六环和四氢呋喃最低检测量分别为4.0、2.5、0.99、2.5、2.1、0.37和1.4 ng。

2.10 样品中残留溶剂的测定

取3批供试品溶液,按“2.2.3”项下的配制方法制备供试品溶液,进样测定,按外标法以峰面积计算样品中溶剂残留量,3批2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸原料药中,只有乙腈残留为0.04%、0.03%、0.03%,其他溶剂均未检出,符合中国药典规定。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

实验考察了3种不同极性的毛细管气相色谱柱(Agilent DB-1、Agilent DB-624、Agilent DB-WAX,规格均为30 m×0.53 mm,5.00 μm)对7种残留溶剂的分离效果。结果发现,采用Agilent DB-WAX毛细管气相色谱柱,乙醇与异丙醇不能完全分离;采用Agilent DB-624毛细管气相色谱柱,样品降解产生的色谱峰干扰四氢呋喃测定,而且程序升温造成基线抬高,从而导致各溶剂峰的分离效果欠佳;采用Agilent DB-1毛细管气相色谱柱能使上述各待测溶剂之间以及与空白溶剂二甲亚砷均能够达到基线分离,所以最终选择Agilent DB-1毛细管气相色谱柱作为本实验的分离柱。

3.2 进样口温度的选择

进样口温度为200℃进行实验时,我们发现供试品溶液在1,4-二氧六环出峰处与四氢呋喃出峰处处有一未知色谱峰干扰测定,通过对原料药合成路线中易挥发的中间体及副产物进行筛查,得知该杂质峰不是中间体及副产物,推断为供试品在进样口的分解产物。考察进样口温度160℃与180℃,当进样口温度为160℃时,可以完全除去干扰,方法学验证得到满意效果,最终选择进样口温度为160℃进行测定。

3.3 “共出峰”的排除

所谓“共出峰”是指与被测组分色谱峰保留时间相同,与被测组分一同洗脱出柱的其他组分色谱峰^[1]。3批供试品中均检测到了乙腈,我们通过更换不同极性(Agilent DB-WAX)的气相色谱柱对乙腈进行测定。结果表明,两种极性色谱柱的检测结果一致,无“共出峰”干扰,可以证明原料药中的残留溶剂为乙腈。乙腈为2-[2-甲基-4-[4-[2-[4-(三氟甲基)苯基]嘧啶基]甲硫基]苯氧基]乙酸合成过程中重结晶所用溶剂,测得3批该原料药中乙腈的残留量接近限度(0.041%),我们分别对样品在60℃减压干燥4、8、24和48 h后同时测定残留量和有关物质,结果减压干燥48 h的原料药,乙腈残留量依然没有降低,而有关物质质量有所增加,关于降低乙腈残留量的方法还需进一步研究。

REFERENCES

- [1] *Ch. P*(2010) Vol II(中国药典2010年版. 二部)[S]. 2010: Appendix 61.
- [2] ZHOU H J. *Impurities Guideline for Residual Solvents*(残留溶剂指导原则)[M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2006: 133-136.
- [3] SONG G S, JIANG J G, ZHANG X R, *et al.* Determination of residual organic solvents in rocuronium bromide by capillary gas chromatography[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2010, 45(7): 553-555.
- [4] SHAN M Q, ZHANG A H, GUO R, *et al.* Determination of residual organic solvents in mitoglinide calcium by GC[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2010, 45(11): 865-867.
- [5] LI D X, CHEN Y, CHEN Y M, *et al.* Capillary GC determination of residual organic solvents in acetylated lanolin[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2011, 31(5): 965-967.
- [6] WU C H, WANG X M, GU B M. Head-space sampling CGC determination of residual solvents in raw material drug of tetracaine hydrochloride[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2011, 31(6): 1188-1192.
- [7] GAO Z Y, ZHENG J, LI Y L, *et al.* Determination of residual organic solvents in di-phenyl-di-(2,4-difluorobenzohydroxamate) tin(IV) by gas chromatography[J]. *Chin Hosp Pharm J*(中国医院药学杂志), 2011, 31(18): 1487-1489.
- [8] GUO Q, WU N Y, WU X Y. Screening and analyses on the residues of organic solvents in mailuoning injection by GC with head-space sampler[J]. *Chin Pharm J*(中国药学杂志), 2011, 46(4): 300-303.

(收稿日期:2013-01-18)