

# 气相色谱法同时测定尼尔雌醇原料药中7种有机溶剂的残留量<sup>Δ</sup>

孙婷\*,张菁,姜建国#,刘红莉(河北省药品检验研究院,石家庄 050011)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1357-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.13

**摘要** 目的:建立同时测定尼尔雌醇原料药中甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯残留量的方法。方法:采用气相色谱法。色谱柱为DB-WAX毛细管柱,检测器为氢火焰离子化检测器,分流比为5:1,载气为氮气(纯度:99.999%),流速为1.0 mL/min,进样量为1 μL,直接进样,固定相为键合交联聚乙二醇,升温程序为初始温度40℃,保持5 min,以10℃/min速率升温至90℃,再以5℃/min速率升温至200℃,进样口温度为220℃,检测器温度为230℃。结果:甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯的检测质量浓度线性范围分别为0.24~12.00 μg/mL( $r=0.9997$ )、0.40~20.00 μg/mL( $r=0.9995$ )、0.033~1.64 μg/mL( $r=0.9998$ )、0.40~20.00 μg/mL( $r=0.9995$ )、0.071~3.56 μg/mL( $r=0.9996$ )、0.058~2.88 μg/mL( $r=0.9998$ )、0.40~20.00 μg/mL( $r=0.9997$ );定量限分别为0.24、0.40、0.033、0.40、0.071、0.058、0.40 μg/mL,检测限分别为0.08、0.10、0.01、0.13、0.02、0.02、0.13 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%;加样回收率分别为98.17%~100.48%(RSD=0.92%, $n=9$ )、97.77%~101.30%(RSD=1.32%, $n=9$ )、97.56%~100.85%(RSD=1.20%, $n=9$ )、98.64%~100.92%(RSD=0.87%, $n=9$ )、98.54%~100.62%(RSD=0.76%, $n=9$ )、98.26%~100.00%(RSD=0.74%, $n=9$ )、98.30%~100.59%(RSD=0.76%, $n=9$ )。结论:该方法灵敏度较高、准确度较好,可用于同时测定尼尔雌醇原料药中甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯的残留量。

**关键词** 尼尔雌醇;气相色谱法;残留量;甲醇;乙醇;乙腈;异丙醇;甲苯;四氢呋喃;乙酸乙酯

## Simultaneous Determination of Seven Residual Solvents in Nilethylenol Raw Material by GC

SUN Ting, ZHANG Jing, JIANG Jianguo, LIU Hongli (Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of residual methanol, ethanol, acetonitrile, isopropanol, methylbenzene, tetrahydrofuran and ethyl acetate in Nilethylenol raw material. METHODS: GC was performed. The determination was performed on DB-WAX capillary column. The detector was hydrogen flame ionization detector with split ratio of 5:1. The carrier gas was nitrogen (purity: 99.999%) at the flow rate of 1.0 mL/min. The sample size was 1 μL, directly sampling with bonded crosslinked polyethylene glycol as stationary phase. The initial temperature was 40℃ and was maintained for 5 min, increased to 90℃ at 10℃/min, and then increased to 200℃ at 5℃/min. The temperature of injector was 220℃, and detector temperature was 230℃. RESULTS: The linear range was 0.24-12.00 μg/mL for methanol ( $r=0.9997$ ), 0.40-20.00 μg/mL for ethanol ( $r=0.9995$ ), 0.033-1.64 μg/mL for acetonitrile ( $r=0.9998$ ), 0.40-20.00 μg/mL for isopropanol ( $r=0.9995$ ), 0.071-3.56 μg/mL for methylbenzene ( $r=0.9996$ ), 0.058-2.88 μg/mL for tetrahydrofuran ( $r=0.9998$ ), 0.40-20.00 μg/mL for ethyl acetate ( $r=0.9997$ ), respectively. The limits of quantitation were 0.24, 0.40, 0.033, 0.40, 0.071, 0.058, 0.40 μg/mL, respectively. The limits of detection were 0.08, 0.10, 0.01, 0.13, 0.02, 0.02, 0.13 μg/mL, respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2%. The recoveries were 98.17%-100.48% (RSD=0.92%, $n=9$ ), 97.77%-101.30% (RSD=1.32%, $n=9$ ), 97.56%-100.85% (RSD=1.20%, $n=9$ ), 98.64%-100.92% (RSD=0.87%, $n=9$ ), 98.54%-100.62% (RSD=0.76%, $n=9$ ), 98.26%-100.00% (RSD=0.74%, $n=9$ ), 98.30%-100.59% (RSD=0.76%, $n=9$ ), respectively. CONCLUSIONS: The method has high sensitivity and good accuracy, and can be used for the simultaneous determination of residual methanol, ethanol, acetonitrile, isopropanol, methylbenzene, tetrahydrofuran and ethyl acetate in Nilethylenol raw material.

**KEYWORDS** Nilethylenol; GC; Residual determination; Methanol; Ethanol; Acetonitrile; Isopropanol; Methylbenzene; Tetrahydrofuran; Ethyl acetate

尼尔雌醇(Nilethylenol)是一种人工合成的非甾体类雌激素,是雌二醇与雌酮的代谢物。该药的药理作用与雌二醇相似,可在体内代谢为炔雌三醇和雌三醇,以

原型、炔雌三醇和雌三醇3种形式由尿液排出。有研究指出,在尼尔雌醇第3位碳原子上引入环戊醚后,可增加其亲脂性,有利于肠道吸收并储存在脂肪组织中而发挥长效作用;第17位碳原子上引入乙炔基后,可保护羟基并增强雌激素活性,但对子宫内膜的增生作用较弱,可适用于围绝经期妇女的雌激素替代治疗<sup>[1-3]</sup>。尼尔雌醇在合成工艺中使用了甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四

Δ 基金项目:河北省科技计划项目(No.162777244)

\* 高级工程师,硕士。研究方向:药品检验。电话:0311-85212009。E-mail:122547652@qq.com

# 通信作者:主任药师,硕士。研究方向:药品检验。电话:0311-85212009。E-mail:meshall1983@126.com

氢呋喃和乙酸乙酯等有机溶剂,为确保药品有效、安全以及质量可控,该药按照2015年版《中国药典》(四部)<sup>[4]</sup>、《药品注册的国际技术要求:质量部分》<sup>[5]</sup>及其他相关要求<sup>[6]</sup>,应增加对该药有机溶剂残留量的考察。目前,仅有2015年版《中国药典》(二部)收录了尼尔雌醇原料药和片剂的相关标准<sup>[7]</sup>,而《英国药典》(2017年版)、《欧洲药典》(9.0版)、《日本药典》(17版)、《美国药典》(41版)均未收录,也尚未见有关测定尼尔雌醇原料药中有机溶剂残留量的报道。为此,本研究采用气相色谱法(GC)同时测定了尼尔雌醇原料药中甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯7种有机溶剂的残留量,旨在为其质量标准的完善提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

7890B型GC仪,包括氢火焰离子化检测器、柱温箱(美国Agilent公司);MCM36型百万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);XS205型十万分之一电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);UL TRASONIC型超声波清洗机(北京中晟铭科技有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

尼尔雌醇原料药(A公司,批号:20170201A,纯度:99.8%;B公司,批号:20170202B,纯度:99.6%;C公司,批号:20170203C,纯度:99.5%);甲醇对照品(批号:10945607812,纯度:≥99.9%)、异丙醇对照品(批号:k47208640544,纯度:≥99.9%)、乙腈对照品(批号:JA070530,纯度:≥99.9%)均由美国Merck公司提供;乙醇对照品(批号:20180524,纯度:≥95.0%)、甲苯对照品(批号:20171114,纯度:≥99.5%)、乙酸乙酯对照品(批号:20170824,纯度:≥99.5%)均由国药集团化学试剂有限公司提供;四氢呋喃对照品[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号:H1602108,纯度:≥99.9%];甲醇、异丙醇、乙腈、*N,N*-二甲基甲酰胺、四氢呋喃均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

## 2 方法及结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:DB-WAX毛细管柱(30 m×0.53 mm, 1.00 μm);检测器:氢火焰离子化检测器;分流比:5:1;载气:氮气(纯度:99.999%);流速:1.0 mL/min;进样量:1 μL,直接进样;固定相:键合交联聚乙二醇;升温程序:初始温度40℃,保持5 min,以10℃/min速率升温至90℃,再以5℃/min速率升温至200℃;进样口温度:220℃;检测器温度:230℃。

### 2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品贮备液 精密量取甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯对照品适量,分别置于100 mL量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺溶解并定容,得单一对照品溶液;分别取上述单一对照品溶液适量至同一量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺稀释并定容,制成甲

醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯质量浓度分别为60、100、8.2、100、17.8、14.4、100 μg/mL的混合对照品贮备液。

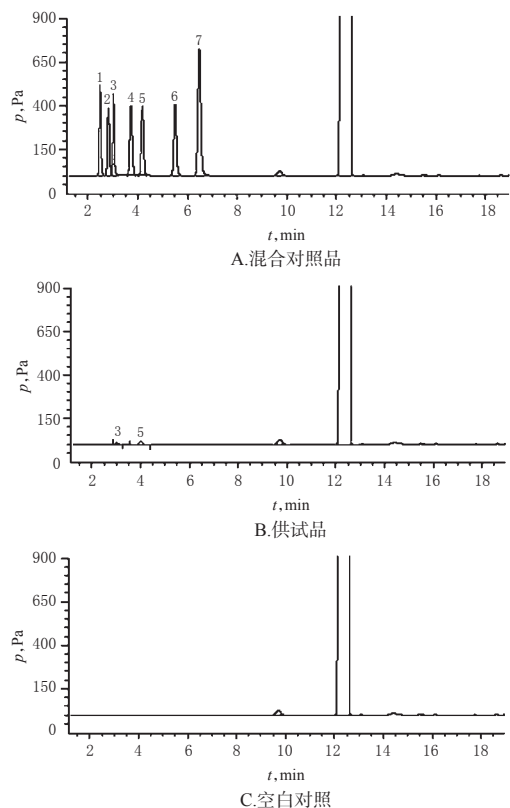
2.2.2 混合对照品溶液 精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液1 mL,置于10 mL量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺定容,摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液 取原料药样品20 mg,精密称定,置于10 mL量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺溶解并定容,即得。

2.2.4 空白对照溶液 以*N,N*-二甲基甲酰胺为空白对照溶液。

### 2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能实现基线分离,分离度均大于1.5,空白对照溶液对待测物的测定无干扰。



注:1.四氢呋喃;2.乙酸乙酯;3.甲醇;4.异丙醇;5.乙醇;6.乙腈;7.甲苯

Note: 1.tetrahydrofuran; 2. ethyl acetate; 3. methanol; 4. isopropanol; 5. ethanol; 6. acetonitrile; 7. methylbenzene

图1 气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms

### 2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL,置于25 mL量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺定容,摇匀,得系列单一线性关系工

作溶液。取上述系列线性关系工作溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分质量浓度( $x, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标、峰面积( $y$ )为纵坐标进行线性回归,回归方程与线性范围见表1。

表1 回归方程与线性范围

Tab 1 Regression equation and linear range

待测成分	回归方程	$r$	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
甲醇	$y=2.4588x-1.0507$	0.9997	0.24~12.00
乙醇	$y=5.9061x+17.7940$	0.9995	0.40~20.00
乙腈	$y=3.0831x-0.0410$	0.9998	0.033~1.64
异丙醇	$y=5.7061x+18.9990$	0.9995	0.40~20.00
甲苯	$y=1.3892x+0.0415$	0.9996	0.071~3.56
四氢呋喃	$y=1.7494x-0.0302$	0.9998	0.058~2.88
乙酸乙酯	$y=5.6078x+20.9010$	0.9997	0.40~20.00

## 2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.2”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,分别以信噪比为10:1,3:1计算定量限、检测限。结果,甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯的定量限分别为0.24、0.40、0.033、0.40、0.071、0.058、0.40  $\mu\text{g/mL}$ ,检测限分别为0.08、0.10、0.01、0.13、0.02、0.02、0.13  $\mu\text{g/mL}$ 。

## 2.6 精密度试验

取“2.2.2”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,甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯峰面积的RSD分别为0.5%、0.2%、0.4%、0.6%、0.3%、0.8%、0.7% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.7 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:20170201A)适量,分别于室温放置0、1、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯峰面积的RSD分别为1.4%、1.5%、1.3%、1.8%、1.1%、1.2%、1.7% ( $n=7$ ),表明供试品溶液于室温下放置12 h内基本稳定。

## 2.8 重复性试验

取原料药样品(批号:20170201A)适量,共6份,按“2.2.3”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,记录峰面积并以外标法计算样品中有机溶剂的残留量。结果,甲醇、乙醇平均残留量分别为0.01%、0.03%,峰面积的RSD分别为0.7%、0.9% ( $n=6$ ),其他成分未检出,表明本方法重复性良好。

## 2.9 加样回收率试验

精密称取已知含量的样品(批号:20170201A),共9份,每份约20 mg,分别加入一定量的混合对照品溶液,按“2.2.3”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,记录峰面积并以外标法计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果( $n=9$ )

Tab 2 Results of recovery tests ( $n=9$ )

待测成分	取样量, mg	样品含量, $\mu\text{g}$	加入量, $\mu\text{g}$	测得量, $\mu\text{g}$	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
甲醇	20.05	2.00	6.00	7.90	98.33	99.38	0.92			
	20.01	2.00	6.00	7.89	98.17					
	20.03	2.00	6.00	7.91	98.50					
	20.04	2.00	30.00	31.75	99.17					
	20.06	2.00	30.00	31.82	99.40					
	20.07	2.00	30.00	31.88	99.60					
	20.08	2.00	60.00	62.22	100.37					
	20.11	2.00	60.00	62.26	100.43					
	20.21	2.00	60.00	62.29	100.48					
	乙醇	20.10	6.00	10.00	15.98			99.80	99.55	1.32
		20.31	6.00	10.00	15.89			98.89		
		20.02	6.00	10.00	15.77			97.77		
		20.03	6.00	50.00	56.36			100.72		
		20.05	6.00	50.00	55.87			99.74		
		20.06	6.00	50.00	56.55			101.10		
20.02		6.00	100.00	107.30	101.30					
20.05		6.00	100.00	104.13	98.13					
20.03		6.00	100.00	104.58	98.58					
乙腈		20.02	0	0.82	0.80	97.56	99.34	1.20		
		20.03	0	0.82	0.81	98.78				
		20.03	0	0.82	0.81	98.78				
		20.02	0	4.10	4.13	100.73				
		20.04	0	4.10	4.08	99.51				
		20.05	0	4.10	4.13	100.73				
	20.03	0	8.20	8.27	100.85					
	20.07	0	8.20	8.06	98.29					
	20.02	0	8.20	8.10	98.78					
	异丙醇	20.03	0	10.00	10.00	100.00			99.72	0.87
		20.02	0	10.00	9.95	99.50				
		20.05	0	10.00	9.97	99.70				
		20.07	0	50.00	50.22	100.44				
		20.08	0	50.00	50.36	100.72				
		20.09	0	50.00	50.46	100.92				
20.03		0	100.00	98.73	98.73					
20.04		0	100.00	98.64	98.64					
20.05		0	100.00	98.80	98.80					
甲苯		20.03	0	1.78	1.79	100.56	99.46	0.76		
		20.06	0	1.78	1.77	99.44				
		20.07	0	1.78	1.76	98.88				
		20.03	0	8.90	8.77	98.54				
		20.08	0	8.90	8.88	99.78				
		20.06	0	8.90	8.78	98.65				
	20.07	0	17.80	17.91	100.62					
	20.06	0	17.80	17.67	99.27					
	20.09	0	17.80	17.69	99.38					
	四氢呋喃	20.11	0	1.44	1.44	100.00			99.11	0.74
		20.12	0	1.44	1.44	100.00				
		20.13	0	1.44	1.44	100.00				
		20.14	0	7.20	7.08	98.33				
		20.12	0	7.20	7.11	98.75				
		20.11	0	7.20	7.14	99.17				
20.13		0	14.40	14.15	98.26					
20.12		0	14.40	14.17	98.40					
20.13		0	14.40	14.27	99.10					
乙酸乙酯		20.14	0	10.00	9.91	99.10	99.25	0.76		
		20.12	0	10.00	9.83	98.30				
		20.11	0	10.00	9.84	98.40				

续表2

Continued tab 2

待测成分	取样量, mg	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
乙酸乙酯	20.12	0	50.00	49.73	99.46		
	20.13	0	50.00	49.64	99.28		
	20.13	0	50.00	49.69	99.38		
	20.22	0	100.00	99.47	99.47		
	20.21	0	100.00	100.59	100.59		
	20.16	0	100.00	100.30	100.30		

### 2.10 样品中有机溶剂残留量测定

取3批原料药样品各适量,按“2.2.3”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,平行操作3次,记录峰面积并以外标法计算样品中有机溶剂的残留量,结果见表3。

表3 样品中有机溶剂残留量的测定结果( $n=3$ ,%)Tab 3 Determination results of residual solvents in samples( $n=3$ ,%)

批号	甲醇	乙醇	乙腈	异丙醇	甲苯	四氢呋喃	乙酸乙酯
20170201A	0.01	0.03	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
20170202B	0.02	0.04	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
20170203C	0.01	0.06	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出

## 3 讨论

### 3.1 色谱柱的选择

笔者比较了HP-5(弱极性)、DB-624(中等极性)、HP-210(中等极性)、AT-1000(极性)、DB-Wax(极性)等不同极性毛细管柱的分离效果,结果显示以DB-Wax极性毛细管柱进行分离时的分离效果最好,峰形尖锐且对称,灵敏度较高,故选择DB-Wax极性毛细管柱为本研究的色谱柱。

### 3.2 溶剂的选择

尼尔雌醇原料药在水中几乎不溶,以水为溶剂时某些残留有机溶剂亦不溶于水,且可能会包裹在未溶解的固态尼尔雌醇样品中,而导致进样浓度不准确,故不宜以水作为溶剂。有研究认为,当样品不溶于水时,可选用高沸点的有机溶剂为溶剂,因其出峰较晚故不会干扰测定<sup>[8]</sup>。而甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯均为中、低沸点的有机挥发性溶剂。因此,笔者参考上述文献<sup>[8]</sup>,选择 $N,N$ -二甲基甲酰胺为本研究的溶剂及稀释剂。

### 3.3 有机溶剂残留量测定结果分析

在原料药合成生产过程中,未能完全去除的有机溶剂残留量限度应符合2015年版《中国药典》(四部)<sup>[4]</sup>中的相关规定:甲醇不得超过0.3%、乙醇不得超过0.5%、乙腈不得超过0.041%、异丙醇不得超过0.5%、甲苯不得超过0.089%、四氢呋喃不得超过0.072%、乙酸乙酯不得超过0.5%。其中,甲醇、乙腈、甲苯、四氢呋喃为二类药品生产质量管理规范质量要求限制使用溶剂;乙醇、异丙醇、乙酸乙酯为三类限制使用溶剂。本研究中,甲醇、

乙醇的测定结果均低于文献<sup>[9]</sup>结果及2015年版《中国药典》(四部)<sup>[4]</sup>中的相关规定,乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯在3批样品中均未检出,有机溶剂的残留量符合2015年版《中国药典》(四部)的要求。

此外,笔者参考相关文献<sup>[10-15]</sup>,建立了采用GC法同时测定尼尔雌醇原料药中7种有机溶剂的残留量。经方法学验证,该方法具有良好的系统适用性,可为尼尔雌醇质量标准的完善提供参考。

综上所述,该方法灵敏度较高、准确度较好,可用于同时测定尼尔雌醇原料药中甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇、甲苯、四氢呋喃和乙酸乙酯的残留量。

## 参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知:化学药和生物制品卷[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:554.
- [2] 王淑芳,刘晓阳.尼尔雌醇片溶出度测定方法的研究[J].药物分析杂志,2005,25(2):239-240.
- [3] 孙婷,张菁,刘云,等.反相高效液相色谱法测定尼尔雌醇原料及片剂的有关物质和含量[J].中国药业,2019,28(5):33-36.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:105-107.
- [5] ICH 指导委员会.药品注册的国际技术要求:质量部分[S].北京:人民卫生出版社,2006:79.
- [6] 吕东.化学药物残留溶剂研究的原则、方法及关注的问题[J].中国新药杂志,2008,17(20):1811-1813.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:306.
- [8] 国家药典委员会.中国药典分析检测技术指南[S].北京:中国医药科技出版社,2017:224.
- [9] 关洪亮,潘祖亭.尼尔雌醇的荧光光谱法研究与应用[J].分析试验室,2006,25(1):20-23.
- [10] 刘英,刘葵葵,邓玉晓.顶空气相色谱法同时测定硫酸沃拉帕沙原料药中7种有机溶剂的残留量[J].中国药房,2018,29(16):2224-2227.
- [11] 汪斌,郑璐,姚仲青,等.顶空气相色谱法测定胡黄连苷II原料药中7种有机溶剂残留量[J].中国药房,2015,26(27):3859-3861.
- [12] 吴朝华,王秀梅,顾保明,等.顶空毛细管气相色谱法测定盐酸丁卡因原料药中的残留溶剂[J].药物分析杂志,2011,31(6):1188-1192.
- [13] 张晶蓉.顶空气相色谱法测定富马酸喹硫平的残留溶剂[J].天津药学,2015,27(5):17-19.
- [14] 孙婷,张菁,刘云,等.HPLC法同时测定雌激素类药物尼尔雌醇片和己烯雌酚片中主药含量[J].中国药房,2019,30(4):469-472.
- [15] 张欣耘,李建华,杨永健,等.高效液相色谱法测定尼尔雌醇含量方法的建立[J].药物分析杂志,2001,21(2):105-107.

(收稿日期:2018-10-10 修回日期:2019-03-21)

(编辑:陈宏)