

气相色谱法测定左西孟旦原料药中6种有机溶剂残留量

孙晋瑞^{1,2*}, 伊星璐¹, 张昊然³, 刘宜辉¹, 任业明¹(1.山东省医药工业研究所, 济南 250101; 2.山东省化学药物重点实验室, 济南 250101; 3.济南大学医学与生命科学学院, 济南 250022)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)21-1995-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.21.25

摘要 目的:建立测定左西孟旦原料药中6种有机溶剂即甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环残留量的方法。方法:采用气相色谱法。Agilent HP-5毛细管柱,(5%)苯基-(95%)甲基聚硅氧烷为固定液;柱温采取程序升温;氢火焰离子化检测器温度为250℃;载气为高纯N₂;进样口温度为200℃,分流比为10:1;采用顶空进样法测定,顶空加热温度为100℃,加热时间为40 min。结果:甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环的检测质量浓度线性范围分别为150.1~449.5 μg/ml($r=0.999\ 8$)、250.6~751.2 μg/ml($r=0.999\ 6$)、249.8~749.9 μg/ml($r=0.999\ 7$)、29.09~89.68 μg/ml($r=0.999\ 8$)、250.2~750.9 μg/ml($r=0.999\ 6$)、18.91~57.92 μg/ml($r=0.999\ 7$);平均回收率为99.9%~100.0%(RSD=0.88%~1.11%, $n=3$);定量限分别为0.12、0.18、0.33、0.21、0.45、0.99 ng。样品中只检出异丙醇。结论:建立的方法快速简便,结果准确可靠。

关键词 左西孟旦;气相色谱法;顶空进样;有机溶剂;残留量

Determination of 6 Residual Organic Solvents in Levosimendan Raw Material by GC

SUN Jin-rui^{1,2}, YI Xing-lu¹, ZHANG Hao-ran³, LIU Yi-hui¹, REN Ye-ming¹(1.Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Jinan 250101, China; 2.Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China; 3.School of Medicine and Life Science, Jinan University, Jinan 250022, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of 6 residual organic solvents as methanol, alcohol, acetone, dichloromethane, isopropanol and dioxane in levosimendan raw material. METHODS: Gas chromatography was used. Capillary column (5%) phenyl-(95%) methylpolysiloxane was used as fixation fluid by temperature programming; and the temperature of flame ionization detector was 250 °C, and high purity N₂ was used as carrier gas. Inlet temperature was set at 200 °C with split ratio of 10:1. The conditions of headspace method included heating temperature of 100 °C and heating time of 40 min. RESULTS: The linear range of methanol, alcohol, acetone, dichloromethane, isopropanol and dioxane were 150.1-449.5 μg/ml($r=0.999\ 8$), 250.6-751.2 μg/ml($r=0.999\ 6$), 249.8-749.9 μg/ml($r=0.999\ 7$), 29.09-89.68 μg/ml($r=0.999\ 8$), 250.2-750.9 μg/ml($r=0.999\ 6$) and 18.91-57.92 μg/ml($r=0.999\ 7$), respectively; average recoveries were 99.9%-100.0% (RSD=0.88%-1.11%, $n=3$). The limits of quantification were 0.12, 0.18, 0.33, 0.21, 0.45 and 0.99 ng. Only the isopropanol was detected in samples. CONCLUSIONS: The established method is rapid, simple, accurate and reliable.

KEYWORDS Levosimendan; Gas chromatography; Headspace sampling; Organic solvents; Residual

- *****
- [3] Meenakshi G, Deepika T. Aprepitant: a novel drug to prevent cancer chemotherapy induced nausea and vomiting [J]. *JK Science*, 2010, 12(1): 46.
- [4] U.S. Food and Drug Administration. Aprepitant[EB/OL]. (2003-03-27) [2013-09-28]. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm>.
- [5] 国家食品药品监督管理局.阿瑞匹坦胶囊(进口药品)[EB/OL]. (2013-09-22) [2013-11-20]. <http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0001/>.
- [6] Benjamin T, Rajyalakshmi CH, Rambabu C. Stress degradation studies and validation method for quantification of aprepitant in formulations by using RP-HPLC[J]. *International Journal of ChemTech Research*, 2013, 5(4): 1 462.
- [7] Skrdla PJ, Abraham A, Wu Y. An HPLC chromatographic reactor approach for investigating the hydrolytic stability of a pharmaceutical compound[J]. *J Pharma Biomed Anal*, 2006, 41(3): 883.
- [8] Nama S, Chandu BR, Awen BZ. Development and validation of a new RP-HPLC method for the determination of aprepitant in solid dosage forms[J]. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 2011, 10(4): 491.
- [9] 《化学药物杂质研究的技术指导原则》课题研究组.化学药物杂质研究的技术指导原则[EB/OL]. (2007-08-23) [2013-12-07]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=initValue&frameStr=0>.
- [10] 叶辉岩, 郑淑凤. HPLC法测定氯诺昔康片中有关物质的含量[J]. *中国药房*, 2013, 24(37): 3 537.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 V D.

(收稿日期: 2013-10-11 修回日期: 2013-12-12)

* 副主任药师。研究方向: 新药研发。电话: 0531-81213291。E-mail: sjrcxl@126.com

左西孟旦(Levosimendan)是新一代强心药物钙增敏剂类中的第一个上市品种,作用机制为选择性与心肌钙蛋白C的N-末端结合,稳定心肌钙键,增强心肌钙蛋白C对钙离子的敏感性,增强心肌收缩力^[1]。本品具有独特的双重作用模式,能增加心脏输出,并使血管扩张,但不加快心率,临床上主要用于各种急性心力衰竭病症的治疗^[1-2]。左西孟旦最初由法国Orion Phama公司开发研制,2000年10月在瑞典首次上市,2005年获得在美国的上市许可;2010年,左西孟旦原料药及规格为12.5 mg:5 ml的注射液在国内批准注册上市^[3]。

左西孟旦的合成工艺国内外均有报道,不同的工艺所使用的有机溶剂不同,笔者在参照国内外文献^[4-8]的基础上,对其进行工艺路线设计和工艺改进,制备出符合新药注册标准的产品。

左西孟旦在合成过程中使用了甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环等有机溶剂,由于甲醇、二氯甲烷、二氧六环属第二类溶剂,毒性较大,应该限制使用,而乙醇、丙酮、异丙醇属第三类溶剂,在药品生产质量管理规范或其他质量中要求限制使用^[9],为确保临床用药安全,必须对其溶剂残留量进行控制。笔者按照2010年版《中国药典》(二部)残留溶剂测定法指导原则^[9],采用气相色谱法对6种有机溶剂进行测定和验证,结果表明建立的方法可有效控制左西孟旦原料药中残留的6种有机溶剂,且快速简便,结果准确可靠。

1 材料

1.1 仪器

7890气相色谱仪、7694E自动顶空进样器(美国Agilent公司);BP 211D型电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 药品与试剂

左西孟旦原料药(山东省医药工业研究所合成室提供,批号:130201、130202、130203,纯度:99.87%、99.86%、99.73%);甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇、二氧六环、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(天津市广成化学试剂有限公司,均为分析纯,纯度:均≥99%);试验用水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:(5%)苯基-(95%)甲基聚硅氧烷为固定液,Agilent HP-5毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm);柱温采取程序升温:30℃保持5 min,再以45℃/min的速率升温至200℃,保持8 min;氢火焰离子化检测器,检测器温度:250℃;载气:高纯N₂,流速:1.0 ml/min;进样口温度:200℃,分流比:10:1;采用顶空进样法测定,顶空进样条件:加热温度:100℃,加热时间:40 min,进样瓶装量:2 ml(顶空气体进样)。

2.2 溶液配制及系统适用性试验

空白溶液:精密量取DMF 2 ml,置于顶空进样瓶中,作为空白溶液。

标准溶液贮备液:称取甲醇约300 mg、乙醇约500 mg、丙酮约500 mg、二氯甲烷约60 mg、异丙醇约500 mg、二氧六环约38 mg,置于有适量DMF的100 ml量瓶中,充分振摇使溶解,加DMF稀释至刻度,摇匀,即得。

标准溶液:精密量取上述溶液10 ml置于100 ml量瓶中,

加DMF至刻度,摇匀,即得。

供试品溶液:精密称取左西孟旦0.2 g,置于顶空进样瓶中,分别加DMF 2 ml,即得。

取标准溶液及供试品溶液(批号:130201)进样,色谱图见图1。

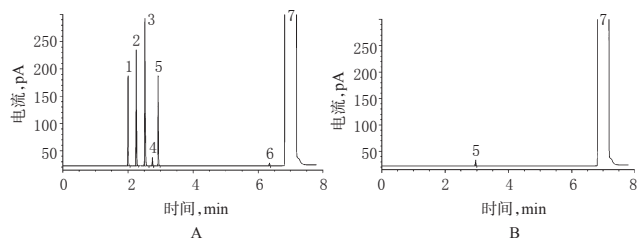


图1 毛细管气相色谱图

A.标准溶液;B.供试品溶液;1.甲醇;2.乙醇;3.丙酮;4.二氯甲烷;5.异丙醇;6.二氧六环;7. DMF

Fig 1 Capillary GC chromatogram

A. reference solution; B. test solution; 1. methanol; 2. alcohol; 3. acetone; 4. dichloromethane; 5. isopropanol; 6. dioxane; 7. DMF

由图1可见,各溶剂分离良好,甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷与异丙醇两两之间的分离度分别为3.57、3.64、3.58、3.66、3.49,甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环的理论板数分别为45 084、47 029、46 387、48 214、47 819、49 217,空白溶剂无干扰。

2.3 线性关系试验

分别精密量取标准溶液贮备液0.50、0.75、1.00、1.25、1.50 ml,置于10 ml量瓶中,加DMF稀释至刻度,摇匀。各取上述溶液2 ml,置于顶空进样瓶中,按“2.1”项下色谱条件分别进样。分别以甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环的质量浓度(*c*)为横坐标、峰面积(*A*)为纵坐标绘制标准曲线,其线性关系见表1。

表1 6种有机溶剂的线性关系试验结果

Tab 1 Linear relationship of 6 kinds of organic solvents

有机溶剂	线性范围, μg/ml	线性关系方程式	<i>r</i>
甲醇	150.1~449.5	$A=1.195 7c-27.89$	0.999 8
乙醇	250.6~751.2	$A=1.294 5c-97.69$	0.999 6
丙酮	249.8~749.9	$A=1.362 5c+41.25$	0.999 7
二氯甲烷	29.09~89.68	$A=0.298 5c-0.41$	0.999 8
异丙醇	250.2~750.9	$A=1.397 8c+23.57$	0.999 6
二氧六环	18.91~57.92	$A=0.278 6c+0.55$	0.999 7

由表1可知,甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环在各自的检测质量浓度范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系,表明该方法可靠。

2.4 精密度试验

取标准溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样6次,记录色谱图,计算RSD,结果分别为甲醇0.35%、乙醇0.14%、丙酮0.99%、二氯甲烷1.15%、异丙醇1.02%、二氧六环1.28%(*n*=6),表明精密度符合要求。

2.5 回收率试验

精密称取样品(批号:130201)0.2 g,共10份,其中1份加入2 ml DMF,作为空白溶液;另9份分别配制低(80%)、中(100%)、高(120%)3种质量浓度的标准溶液各3份。分别取

上述不同质量浓度的溶液 2 ml,加入盛有样品的顶空进样瓶中,以“2.2”项下的标准溶液作为对照。按“2.1”项下色谱条件,分别进样,计算其回收率结果见表 2。

表 2 6 种有机溶剂的回收率试验结果($n=3$)

Tab 2 Results of recovery tests of 6 kinds of organic solvents ($n=3$)

有机溶剂	80%质量浓度平均回收率, %	100%质量浓度平均回收率, %	120%质量浓度平均回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
甲醇	100.1	100.0	99.9	100.0	0.88
乙醇	100.1	99.8	99.7	99.9	1.01
丙酮	100.0	100.0	100.2	100.1	0.96
二氯甲烷	100.3	100.4	100.5	100.4	1.99
异丙醇	100.1	100.2	99.9	100.1	1.02
二氧六环	100.0	99.9	99.8	99.9	1.11

由表 2 可知,甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环的回收率均符合要求。

2.6 定量限、检测限试验

将标准溶液逐级稀释,分别取 2 ml,置于顶空进样瓶中,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,直至信噪比为 10:1 和 3:1,即得定量限和检测限。结果,甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环定量限分别为 0.12、0.18、0.33、0.21、0.45、0.99 ng,检测限分别为 0.04、0.06、0.11、0.07、0.15、0.11 ng。

2.7 重复性试验

取同一批(批号:130201)样品 6 份,每份约 0.2 g,精密称定,按“2.2”项下方法制备供试品溶液并测定。结果,异丙醇平均含量为 0.082%,RSD=0.99%($n=6$),表明方法重复性良好。

2.8 样品中有机溶剂残留量测定

精密量取标准溶液和 3 批供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样测定,以外标法计算得 3 批样品的异丙醇残留量平均值分别为 0.099%、0.081% 和 0.079%,3 批样品中均未检出甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷与二氧六环。

3 讨论

3.1 溶解介质的选择

根据供试品和待测有机溶剂的溶解度,选择合适的溶解介质且应不干扰待测有机溶剂的测定。通常以水为溶剂,并且水对色谱柱、检测器和环境均无污染。但是左西孟旦不溶于水,易溶于沸点较高的 DMF,而 DMF 不干扰其他溶剂的检查,故选择 DMF 作为溶剂。

3.2 进样方式及条件的选择

本文采用顶空进样法测定 6 种有机溶剂的残留量,与经典气相色谱法比较,可以避免样品溶液对色谱柱的污染及样品基质的干扰。考虑到待测有机溶剂的沸点,甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环的沸点均小于 102 °C,因此采用顶空瓶加热温度为 100 °C。并且在此条件下,对顶空瓶平衡时

间进行筛选,结果发现加热时间在 40 min 后,峰面积基本不再改变,因此选择在 100 °C 加热温度条件下加热平衡 40 min。笔者曾分别选择柱温 30 °C、35 °C 和 40 °C 试验,结果在 30 °C 时甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环分离较好,而 35 °C 和 40 °C 时出峰过快、分离度差。故选择 30 °C 作为初温,保持 5 min,然后再升高至 200 °C,使 DMF 出峰。

左西孟旦作为国内新开发上市的药品,关于其残留溶剂的研究,未见有国内外文献报道。本文中各种有机溶剂限度,根据人用药品注册技术规范国际协调会(ICH)要求^[10]及 2010 年版《中国药典》^[9]的规定,暂将左西孟旦原料药中甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环的限度定为 0.3%、0.5%、0.5%、0.06%、0.5% 和 0.038%。经过验证,建立的方法线性、精密度、回收率、定量限、检测限等系统适用性试验均较好,能够准确、迅速地检测出左西孟旦原料药中残留的甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、异丙醇与二氧六环,为药品质量标准的修订提供了科学依据,对保障药物的质量和用药安全具有重要的意义。

参考文献

- [1] 孙晋瑞,王功霞,梁大连.新型抗心衰药:左西孟旦[J].齐鲁药事,2004,23(7):2359.
- [2] 纪木火,李仁奇,张庆伟,等.钙增敏剂左西孟旦的研究进展[J].药学与临床研究,2010,18(5):458.
- [3] 赖鑫芬,黄耀东,宗矩.新型心力衰竭治疗药物研究进展[J].世界临床药物,2007,28(3):157.
- [4] 孟繁浩,刘翔宇,刘雅茹,等.新型抗心力衰竭药左西孟旦的合成[J].化学与生物工程,2006,23(12):50.
- [5] 张丽娟,宋宏锐,王玉玲,等.6-(4-氨基苯基)-5-甲基-4,5-二氢-3(2H)-吡嗪酮的拆分及左西孟旦的合成[J].沈阳药科大学学报,2004,21(1):22.
- [6] Owing FF, Fox M, Kowalski CJ, et al. An enantioselective synthesis of SK & F93505 LR, a key intermediate for preparing cardiotonic agents[J]. *J Org Chem*, 1991, 56(5):1963.
- [7] 陈桂荣,陈玉彬.钙增敏剂-左西孟旦的合成[J].化学工程与装备,2011(3):23.
- [8] Baeckstroem R, Haarala J. Pyridazine derivative:GB, 2251615[P].1995-06-13.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录 61-64.
- [10] 周海钧.药品注册的国际技术要求质量部分(ICH)[M].北京:人民卫生出版社,2000:82-89.

(收稿日期:2013-09-22 修回日期:2013-10-09)

《中国药房》杂志——WHO 西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,欢迎投稿、订阅