

毛细管气相色谱法测定阿仑膦酸钠原料药中甲烷磺酸乙酯的残留量

邱妍川^{1*}, 李跃芬², 钟玲², 伍彬^{1#} (1.重庆医药高等专科学校, 重庆 400016; 2.重庆药友制药有限责任公司, 重庆 400060)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)24-2295-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.24.30

摘要 目的:建立测定阿仑膦酸钠原料药中甲烷磺酸乙酯残留量的方法。方法:采用毛细管气相色谱法。色谱柱为HP-5毛细管色谱柱,载气为氮气,柱温为100℃保持8 min,流速为1.0 ml/min,进样量为1.0 μl,分流比为10:1,进样口温度为220℃,检测器为氢火焰离子化检测器,检测器温度为300℃。结果:甲烷磺酸乙酯检测质量浓度在3.92~27.44 μg/ml范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系($r=0.9997$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD≤2.30%;平均回收率为97.94%,RSD=1.48%($n=9$)。3批样品中均未检出甲烷磺酸乙酯。结论:该方法简便、灵敏、可靠,可用于阿仑膦酸钠原料药中甲烷磺酸乙酯残留量的测定。

关键词 阿仑膦酸钠原料药;毛细管气相色谱法;甲烷磺酸乙酯;残留量

Determination of Residual Ethyl Methyl Sulfonate in Alendronate Sodium by GC

QIU Yan-chuan¹, LI Yue-fen², ZHONG Ling², WU Bin¹ (1.Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 400016, China; 2.Chongqing Yaoyou Pharmaceutical Co. Ltd., Chongqing 400060, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the determination of residual ethyl methyl sulfonate in alendronate sodium raw material. METHODS: Capillary GC method was adopted. The determination was performed on HP-5 capillary column with nitrogen as carrier gas at the flow rate of 1.0 ml/min. The column temperature was 100 °C for 8 min, and sample size was 1.0 μl. The split ratio was 10:1, and temperature of injector was 220 °C. The flame ionization detector was used with the temperature of 300 °C. RESULTS: The linear range of ethyl methyl sulfonate were 3.92-27.44 μg/ml ($r=0.9997$) with average recovery of 97.94% (RSD=1.48%, $n=9$). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.30%. Ethyl methyl sulfonate was not detected in 3 batches of samples. CONCLUSIONS: The established method is simple, sensitive and reliable, and it can be used for the content determination of ethyl methyl sulfonate in alendronate sodium.

KEYWORDS Alendronate sodium; Capillary GC; Ethyl methyl sulfonate; Residual

阿仑膦酸钠为氨基二膦酸盐骨吸收抑制剂,与骨内羟磷灰石有强亲和力,对破骨细胞有双重抑制作用。由于其强力抑制骨吸收,能有效改善骨质疏松患者在骨吸收与形成间的失衡状态,使骨生成作用加强,从而达到治疗目的^[1-5]。在阿仑

膦酸钠的合成中,要用到甲烷磺酸和乙醇两种试剂,可能产生潜在的基因毒性副产物——甲烷磺酸乙酯^[6-8]。甲烷磺酸乙酯具有致畸作用,人用药品注册技术规定国际协调会议(ICH)要求其在药品中的残留限量为38 μg/g^[9-10]。而为了严格控制药

(12):1 211.

[6] 匡艳辉,朱晶晶,王智民,等.一测多评法测定黄连中小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱、药根碱含量[J].中国药学杂志,2009,44(5):390.

[7] 何欢,马双成,张启明,等.HPLC替代对照品法同时测定莪术油及其注射液中6种成分的含量[J].药物分析杂志,2009,29(11):1 892.

[8] 魏峰,李启艳,马玲云,等.对照品替代法同时测定中药和保健品中6种大豆异黄酮类成分的含量[J].药物分析杂

志,2009,29(5):725.

[9] 谢元超,金少鸿,张启明.替代对照品法用于丹参和复方丹参片含量测定的研究[J].药物分析杂志,2007,27(4):497.

[10] 高运玲,潘正,张涛,等.HPLC测定独一味不同制剂中4种环烯醚萜苷的含量[J].中成药,2010,32(1):71.

[11] 高晓燕,卢建秋.HPLC-DAD法同时测定大黄中7个蒽醌类化合物的含量[J].药物分析杂志,2010,30(9):1 636.

[12] 汪航,冯芳,王学全,等.栀子大黄汤化学成分的HPLC-PDA-ESI-MS/MS分析[J].中国药科大学学报,2009,40(3):232.

* 讲师,硕士。研究方向:药物制剂。E-mail:christiana42@163.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:药物分析。E-mail:532859882@qq.com

(收稿日期:2014-01-28 修回日期:2014-05-06)

品中的甲烷磺酸乙酯残留量,必须采用灵敏、准确和可靠的检测方法。通过文献调研,未见目前国内有阿仑膦酸钠原料药中甲烷磺酸乙酯残留量检测方法的报道。故笔者根据甲烷磺酸乙酯的性质,采用毛细管气相色谱法,建立了阿仑膦酸钠原料药中甲烷磺酸乙酯残留量的检测方法。

1 材料

1.1 仪器

6890 气相色谱仪,配有氢火焰离子化检测器(美国 Agilent 公司);XS205 电子分析天平(精度:0.000 01 g,瑞士 Mettler-Toledo 公司)

1.2 药品与试剂

阿仑膦酸钠原料药(中试样品,重庆凯林制药有限公司提供,批号:070301、070302、070303,质量分数:99.85%、99.50%、99.10%);甲烷磺酸乙酯(美国 Alfa Aesar 公司生产,批号:A080905,质量分数:>99%);二氯甲烷、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:HP-5 毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm,内填 5% 的苯基乙基甲基聚硅氧烷);柱温:100 ℃保持 8 min;进样口温度:220 ℃;检测器:氢火焰离子化检测器;检测器温度:300 ℃;载气及流速:氮气(高纯氮),1.0 ml/min;进样量:1.0 μl;分流比:10:1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取甲烷磺酸乙酯 0.04 g,用二氯甲烷溶解并定容至 100 ml,即配成 400 μg/ml 的对照品贮备液。将上述对照品贮备液逐级稀释成 20 μg/ml 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取阿仑膦酸钠原料药样品 1.0 g,于 10 ml 具塞离心管中,加入 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液 8.0 ml,使其充分溶解,再用 1.0 ml 二氯甲烷充分振摇萃取 2 次,合并下层溶液,作为供试品溶液。

2.2.3 空白对照溶液的制备 取二氯甲烷作为空白对照溶液。

2.3 专属性试验

精密吸取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液各 1.0 μl,分别注入气相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,详见图 1。由图 1 可见,样品中甲烷磺酸乙酯色谱峰的保留时间为 4.17 min,该峰与其相邻色谱峰的分离度 >1.5,理论板数以甲烷磺酸乙酯计不小于 5 000;二氯甲烷峰不干扰甲烷磺酸乙酯的检测。

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下的甲烷磺酸乙酯对照品贮备液 1、2、5、6、7 ml,置于 100 ml 量瓶中,加二氯甲烷至刻度,稀释成不同浓度的系列对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件分别进样分析。以峰面积(*y*)为纵坐标、质量浓度(*x*, μg/ml)为横坐标,进行线性回归,得回归方程 $y=0.483\ 7x-0.173\ 6$ ($r=0.999\ 7$)。结果表明,甲烷磺酸乙酯检测质量浓度在 3.92~27.44 μg/ml 范围内与其峰面积积分值呈良好的线性关系。

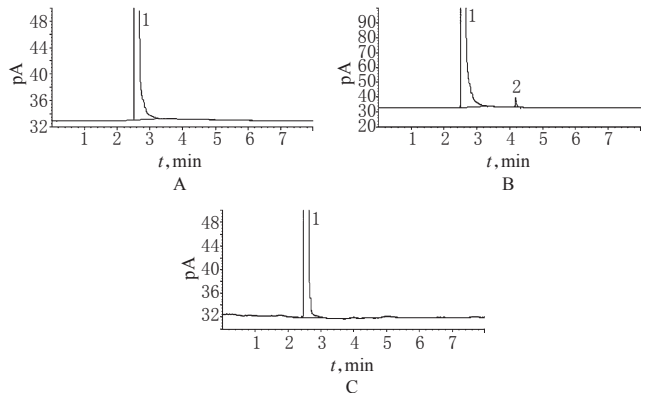


图 1 毛细管气相色谱图

A. 空白对照; B. 对照品; C. 供试品; 1. 二氯甲烷; 2. 甲烷磺酸乙酯

Fig 1 GC chromatograms

A. blank control; B. substance control; C. test samples; 1. dichloromethane; 2. ethyl methyl sulfonate

2.5 定量限、检测限试验

逐级稀释“2.2.1”项下甲烷磺酸乙酯对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,直至信噪比分别为 10:1 和 3:1,即得甲烷磺酸乙酯的定量限和检测限分别为 1.60 和 3.92 μg/ml。

2.6 精密度试验

精密吸取“2.2”项下对照品溶液 1.0 μl,按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录色谱,计算甲烷磺酸乙酯峰面积的 RSD。结果, RSD=2.30%,表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,在室温下放置,分别于放置 0、1、2、4、6、8 h 时精密吸取对照品溶液 1.0 μl,按“2.1”项下色谱条件进样检测,记录色谱,计算甲烷磺酸乙酯峰面积的 RSD。结果, RSD=1.60%,表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取阿仑膦酸钠原料药样品(批号:070301)适量,共 6 份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算甲烷磺酸乙酯的残留量。结果,各份样品中甲烷磺酸乙酯均未检出,表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取阿仑膦酸钠原料药样品(批号:070301)1.0 g,共 9 份,分别置于 10 ml 具塞离心管中,加入 1.0 mol/L 的 NaOH 溶液 8.0 ml,使其充分溶解,分别加入高、中、低质量浓度的对照品溶液各 1 ml,充分振摇萃取,再加入二氯甲烷 1 ml 萃取,合并下层溶液,作为供试品溶液,以“2.2”项下的对照品溶液作为对照,分别按“2.1”项下色谱条件进样,计算回收率,结果见表 1。

2.10 样品中甲烷磺酸乙酯残留量的测定

采用本试验建立的方法,分析 3 个批号(070301、070302、070303)的阿仑膦酸钠原料药样品,结果均未检出甲烷磺酸乙酯。

3 讨论

3.1 溶剂和萃取次数的选择

以 DMF、水和二氯甲烷溶解对照品和样品,分别考察三者

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

| 所含量, μg | 加入量, μg | 测得量, μg | 加样回收率, % | 平均加样回收率, % | RSD, % |
|--------------------|--------------------|--------------------|----------|------------|--------|
| 0 | 15.68 | 15.14 | 96.58 | | |
| 0 | 15.68 | 15.01 | 95.75 | | |
| 0 | 15.68 | 15.20 | 96.92 | | |
| 0 | 39.20 | 38.13 | 97.26 | | |
| 0 | 39.20 | 38.45 | 98.09 | 97.94 | 1.48 |
| 0 | 39.20 | 38.50 | 98.21 | | |
| 0 | 47.04 | 46.74 | 99.37 | | |
| 0 | 47.04 | 46.59 | 99.04 | | |
| 0 | 47.04 | 47.14 | 100.22 | | |

对色谱峰峰形的影响。结果表明,当用水作溶剂时,色谱峰峰形很差;用DMF作溶剂可获得相对较好的色谱峰峰形,但其不能溶解阿仑膦酸钠,而加入NaOH溶液溶解阿仑膦酸钠后,DMF又不能有效萃取甲烷磺酸乙酯;用二氯甲烷作溶剂,既可有效地提取阿仑膦酸钠中潜在的甲烷磺酸乙酯,回收率高,又可以获得良好的色谱峰峰形。因此,本试验选用二氯甲烷为对照品和样品的溶剂。同时,笔者尝试了加不同体积的二氯甲烷和采用不同萃取次数(1~3次)进行萃取,结果表明萃取次数越多,回收率越高,但同时灵敏度越低。为同时满足灵敏度及回收率要求,本试验最终选择了加入1 ml的二氯甲烷萃取2次。

3.2 气相色谱条件的优化

本试验选用不同极性的毛细管柱HP-1、HP-5、DB-624及DB-WAX进行比较,结果表明HP-5柱分离效果最好,可以很好地分离甲烷磺酸乙酯、二氯甲烷和其他杂质,并在相对较短的时间内完成甲烷磺酸乙酯的测定,这可能与甲烷磺酸乙酯的极性有关。且HP-5柱具有峰形对称等特点,故选择HP-5毛细管柱为工作色谱柱。另外,本试验尝试了80、100、120℃不同的柱温,结果表明采用80℃时甲烷磺酸乙酯峰形变差,而采用120℃时甲烷磺酸乙酯峰与溶剂峰分离度变差;采用100℃时得到了相对较好的峰形,且分离度能够满足要求。故选择100℃为工作柱温。

综上所述,本试验建立了测定阿仑膦酸钠原料药中潜在基因毒性杂质甲烷磺酸乙酯残留量的方法,本方法简便、灵

敏、可靠,填补了国内该方面研究的空白。

参考文献

- [1] 王艺,贾国栋,潘可风,等.阿仑膦酸钠与雌激素对实验性骨质疏松大鼠种植体骨结合作用的比较研究[J].现代口腔医学杂志,2006,20(5):526.
- [2] 宇空,王景云.阿仑膦酸钠抑制骨吸收的研究进展[J].国外医学:口腔医学分册,2006,33(1):36.
- [3] 严鹏霄,崔维顶,胡继坤.阿仑膦酸钠、辛伐他汀对体外成骨细胞和破骨细胞的作用[J].南京医科大学学报:自然科学版,2009,29(12):1690.
- [4] Romanello M, Bivi N, Pines A, et al. Bisphosphonates activate nucleotide receptors signaling and induce the expression of Hsp90 in osteoblast-like cell lines[J]. Bone, 2006,39(4):739.
- [5] 王海军,张培锋.阿仑膦酸钠三水合物的合成[J].实用药物与临床,2005,8(S1):7.
- [6] Kusamori K, Katsumi H, Abe M, et al. Development of a novel transdermal patch of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, for the treatment of osteoporosis [J]. J Bone Miner Res, 2010,25(12):2582.
- [7] Morris SM, McGarrity LJ, Domon OE, et al. The role of programmed cell death in the toxicity of the mutagens, ethyl methanesulfonate and N-ethyl-N'-nitrosourea, in AHH-1 human lymphoblastoid cells[J]. Mutat Res, 1994,306(1):19.
- [8] Chen SH, Lee LY, Garber DA, et al. Neither LAT nor open reading frame P mutations increase expression of spliced or intron-containing ICP0 transcripts in mouse ganglia latently infected with herpes simplex virus[J]. J Virol, 2002,76(10):4764.
- [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61-63.
- [10] 周海钧.药品注册的国际技术要求:质量部分[M].北京:人民卫生出版社,2000:82-89.

(收稿日期:2013-10-12 修回日期:2014-03-31)

国家卫生和计划生育委员会副主任陈啸宏出席第七届中国外科医师年会行业管理国际高峰论坛暨第十八届中葡国际医学论坛开幕式

本刊讯 由中国医师协会、澳门科技大学健康科学学院、澳门健康管理及促进会联合主办的“第七届中国外科医师年会行业管理国际高峰论坛暨第十八届中葡国际医学论坛”于2014年5月16日在北京开幕。来自美国、英国、佛得角、瑞典、意大利、葡萄牙、莫桑比克以及香港地区和澳门地区医学组织和专家学者300多人与会,论坛就外科模拟培训、微创医学新技术等内容进行交流。

国家卫生计生委副主任陈啸宏在开幕式致辞中充分肯定了中国与葡语系国家的友好合作关系,赞扬了中国医疗队在派驻的葡语国家中发挥的作用,对中葡国际医学论坛为中国与葡语系国家间搭建的沟通平台表示感谢,并提出了三点倡议:一是推动中国与葡语系国家卫生全方位合作。二是加强

中国与葡语系国家医生人才培养。三是促进在全球卫生治理中的协调。开幕式上,中国医师协会分别同葡萄牙医师协会、巴西医学联邦委员会签署了谅解备忘录,并向澳门科技大学健康科学学院院长霍文逊先生颁发了感谢状。

中葡国际医学论坛至今已经在中国澳门地区成功举办了17届,邀请了众多来自美国、英国、法国、瑞典、意大利、葡萄牙、莫桑比克、澳洲以及内地、香港和澳门地区等世界各地的优秀学者及医疗专家出席。本届论坛是第一次在中国内地召开。

设在澳门特区的中葡论坛秘书处的代表也出席了开幕式。