

毛细管气相色谱法测定阿德福韦酯有机溶剂残留量

杨国栋(浙江省药品认证中心,浙江 杭州 310012)

摘要:目的 建立气相色谱法分离测定阿德福韦酯中残留有机溶剂丙酮、醋酸乙酯、正丁醚、乙腈、甲苯、乙二醇和二甲基甲酰胺。方法 以 HP-INNOWAX 弹性石英毛细管柱为色谱柱(30m×0.32mm),载气为氮气,采用氢火焰离子化检测器,进样口温度为 200℃,检测器温度为 250℃。顶空进样法采用程序升温(50℃,保持 15min,以 10℃·min⁻¹升至 200℃),进样量 1.0mL。直接进样法柱温为 100℃,进样量 1.0μL。结果 3 批样品中 7 种有机溶剂残留量均符合规定。结论 本方法可测定阿德福韦酯中的有机溶剂残留量,方法简单准确。

关键词:气相色谱法;丙酮 醋酸乙酯;正丁醚;乙腈;甲苯;乙二醇;二甲基甲酰胺;阿德福韦酯

Capillary Gas Chromatographic Determination of Residual Solvents in Adefovir

YANG Guo-dong(Zhejiang Provincial Certification Committee for Drugs, Hangzhou 310012, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To determine the contents of residual volatile organic solvents : acetone, ethyl acetate, n-butyl ether, acetonitrile, toluene, ethyleneglycol, dimethylformamide in adefovir by GC **METHOD** HP-INNOWAX column was Used . The carrier gas is nitrogen . The injection port and detector temperatures were 200℃ and 250℃ respectively . Headspace injection method initial temperature was kept at 50℃ for 15min, then the temperature was raised to 200℃ at the rate of 10℃·min⁻¹. Straightforward injection method temperature was kept at 100℃. **RESULTS** The contents of seven residual volatile organic solvents in three batches of samples were complied with the specification requirements. **CONCLUSION** The method is simple, rapid and precision.

KEY WORDS: GC; acetone; ethyl acetate; n-butyl ether; acetonitrile; toluene; ethyleneglycol; dimethylformamide; adefovir

阿德福韦酯(adefovir)系一种新型核苷类抗乙型肝炎药物^[1],目前国内尚处于临床阶段。由于该药物在合成过程中需使用丙酮、醋酸乙酯、正丁醚、乙腈、甲苯、乙二醇和二甲基甲酰胺等有毒性的有机溶剂,故有必要在成品质量控制时对其含量进行有效的检测。本文建立气相色谱法,测定阿德福韦酯原料药中的残留量,方法灵敏、准确、可信。

1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪; Agilent 7694 顶空进样器; Agilent 7683 自动进样器。阿德福韦酯原料药(由浙江某药厂提供,批号: 001104, 001105, 001106)丙酮、醋酸乙酯、正丁醚、甲苯和乙二醇均为分析纯,乙腈和二甲基甲酰胺均为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 顶空气相色谱法

2.1.1 色谱条件 色谱柱:石英毛细管柱 HP-INNOWAX (聚乙二醇), 0.32mm×30m, 1.00μm(J&W scientific);柱温 50℃维持 15min,以每分钟 10℃的速率升温至 200℃;气室温度: 200℃,检测器温度: 250℃;氢火焰离子化检测器(FID);载气:氮气;流速(恒流):1.0mL·min⁻¹;分流比:1:20。空白溶剂、对照品及样品的图谱见图 1,对照品间相互分离度大于 3.0。

2.1.2 线性范围 配置不同浓度的对照品 10% DMF 稀硫酸溶液,其中内标异丙醇的浓度为 40μg·mL⁻¹。取 5.0mL 置于 20mL 的顶空瓶中,在 80℃恒温加热 45min,取顶空瓶中的气体,在上述色谱条件下,进样 1.0mL,以对照品浓度(μg·mL⁻¹)为横坐标,面积比为纵坐标进行线性回归。结果表明:丙酮在 15.1~74.4μg·mL⁻¹,醋酸乙酯 7.6~38.1μg·mL⁻¹,正丁醚 74.5~372.3μg·mL⁻¹,乙腈 6.0~30.2μg·

mL⁻¹, 甲苯 13.4 ~ 67.2 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 回归方程分别为: 丙酮 Y = 65.83X - 0.67 (r = 0.9981); 醋酸乙酯 Y = 184.75X - 0.063 (r = 0.9815); 正丁醚 Y = 21.92X - 3.10 (r = 0.9911); 乙腈 Y = 15.77 X - 0.062 (r = 0.9992); 甲苯 Y = 392.13X - 0.15 (r = 0.9917)。

2.1.3 回收率与精密度 取已测知溶剂残留量的阿德福韦酯样品约 0.5g, 精密称定, 置 10mL 的量瓶中, 加含对照品丙酮 50.3 μg · mL⁻¹、醋酸乙酯 25.4 μg · mL⁻¹、正丁醚 248.2 μg · mL⁻¹、乙腈 20.1 μg · mL⁻¹、甲苯 44.8 μg · mL⁻¹ 及内标异丁醇 40 μg · mL⁻¹ 的 10% DMF 稀硫酸溶液溶解并稀释至刻

度, 取 5.0mL 置于 20mL 的顶空瓶中, 照上述方法进行测定。丙酮、醋酸乙酯、正丁醚、乙腈与甲苯的平均回收率 (n = 6) 分别为 101.1%、96.1%、103.5%、98.4%、99.7%, RSD% 分别为 0.56%、4.8%、3.2%、0.44%、0.52%。

2.1.4 样品的测定 取阿德福韦酯样品约 0.5g, 精密称定, 置 10mL 的量瓶中, 加含内标异丁醇 40 μg · mL⁻¹ 的 10% DMF 稀硫酸溶液溶解并稀释至刻度, 取 5.0mL 置于 20mL 的顶空瓶中, 照上述方法进行测定。结果丙酮未检出, 其余残留量见表 1。

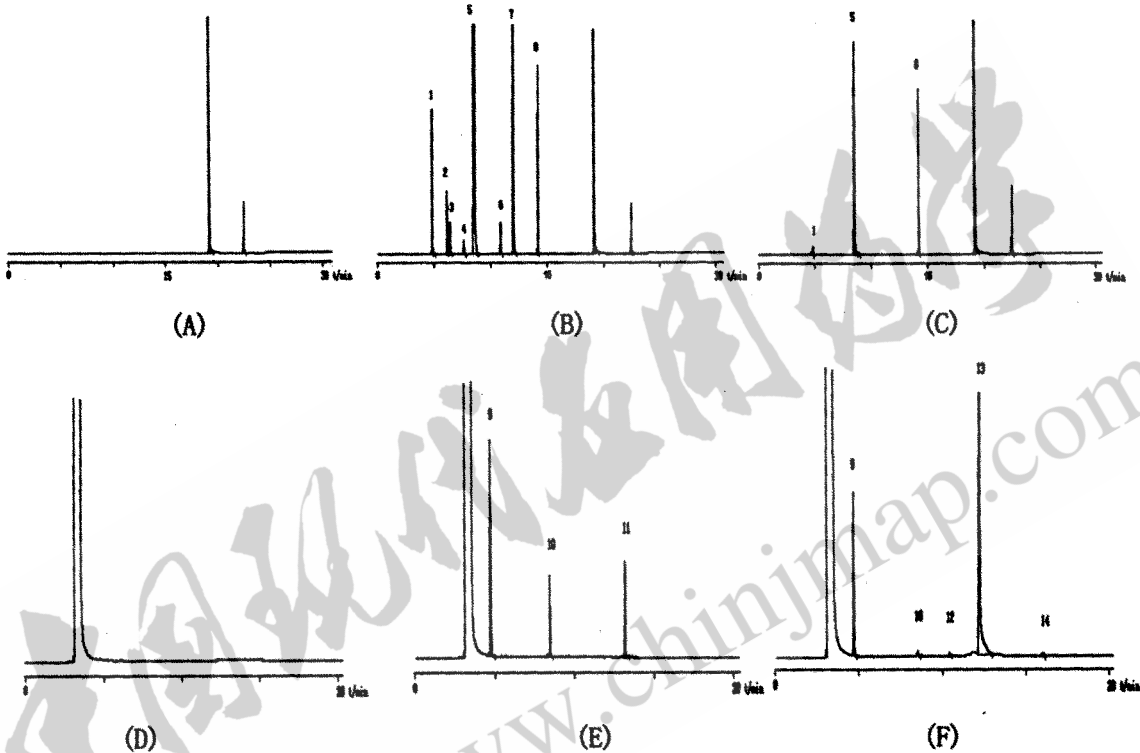


图 1 顶空进样空白溶剂 (A)、对照品溶液 (B) 与供试品溶液 (C) 及直接进样空白溶剂 (D)、对照品溶液 (E) 与供试品溶液 (F) 色谱图

Fig 1 Chromatograms of blank solution (A)、reference solution (B) and test solution (C) by headspace injection and blank solution (D)、reference solution (E) and test solution (F) by straightforward injection

1. 丙酮 (acetone, 4.82 min) 2. 乙醇 (ethanol, 6.13 min) 3. 正丁醚杂质 (n-butyl ether substance, 6.38 min) 4. 醋酸乙酯 (ethyl acetate, 7.60 min) 5. 正丁醚 (n-butyl ether, 8.59 min) 6. 乙腈 (acetonitrile, 10.86 min) 7. 甲苯 (toluene, 12.01 min) 8, 9. 内标 (internal standard, 14.20 min, 4.70 min) 10. 二甲基甲酰胺 (dimethylformamide, 8.44 min) 11. 乙二醇 (ethyleneglycol, 13.15 min) 12, 13, 14. 未明峰 (unknown, 10.40 min, 12.14 min, 16.02 min)

表 1 样品测定结果

Tab 1 Determination results of samples

含量/%	批号	批号	批号
	001104	001105	001106
丙酮	0.0072	0.0085	0.0075
正丁醚	0.12	0.15	0.12
乙二醇	0.016	0.016	0.016

2.1.5 最低检出限 S/N > 3, 本方法溶液中丙酮、醋酸乙酯、正丁醚、乙腈与甲苯的最低检出限分别为 0.076 μg · mL⁻¹、0.086 μg · mL⁻¹、0.021 μg · mL⁻¹、0.065 μg · mL⁻¹、0.017 μg · mL⁻¹。

2.2 直接进样气相色谱法

2.2.1 色谱条件 除柱温保持 100℃ 外, 其余同顶空进样色谱条件。空白溶剂、对照品及样品的图谱见图 1。

2.2.2 线性范围 配置不同浓度的对照品甲醇溶液, 其中内标异丁醇的浓度为 100 μg · mL⁻¹。在上述色谱条件下, 进样 1.0 μL, 以对照品浓度 (μg · mL⁻¹) 为横坐标, 面积比为纵坐标进行线性回归。结果表明: 乙二醇在 18.6 ~ 93.4 μg · mL⁻¹, DMF 在 26.4 ~ 131.0 μg · mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 回归方程分别为: 乙二醇 Y = 239.02X - 4.38 (r = 0.9988); DMF Y = 244.33X - 0.50 (r = 0.9995)。

2.2.3 回收率与精密度 取已测知溶剂残留量的阿德福韦酯样品约 1.0g, 精密称定, 置 10mL 的量瓶中, 加含对照品乙二醇 62 μg · mL⁻¹、DMF 88 μg · mL⁻¹ 及含内标异丁醇 100 μg

• mL^{-1} 的甲醇溶解并稀释至刻度,照上述方法进行测定。乙二醇与 DMF 的平均回收率($n=6$)分别为 100.5%、99.5%, RSD% 分别为 0.75%、0.50%。

2.2.4 样品的测定 取阿德福韦酯样品约 1.0g,精密称定,置 10mL 的量瓶中,加含内标异丁醇 $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的甲醇溶解并稀释至刻度,结果见表 1,其中 DMF 均未检出。

2.2.5 最低检出量 $S/N > 3$,本方法溶液中乙二醇与 DMF 的最低检出限分别为 $0.62\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.88\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 方法的选择 因 DMF(153°C)与乙二醇(197°C)沸点较高,故采用直接进样法,其余有机溶剂采用污染很少的采用顶空进样法。

3.2 溶剂的选择 阿德福韦酯在稀硫酸溶液与甲醇中易溶。故分别采用 10% DMF 稀硫酸溶液和甲醇作为顶空进样法和直接进样法的溶解样品溶剂。醋酸乙酯在 10% DMF 稀硫酸溶液部分水解为乙醇。

3.3 色谱柱的选择 实验中我们分别选用低极性的色谱柱(HP-1 即 100% 聚二甲基硅氧烷 $0.32\text{mm} \times 30\text{m} \times 0.25\mu\text{m}$)与中极性的色谱柱(HP-50+ 即 50% 二苯基-50% 聚二甲基硅氧烷 $0.32\text{mm} \times 30\text{m} \times 0.25\mu\text{m}$),结果前者乙腈与丙酮不能分离,后者正丁醚与甲苯不能分离。

3.4 内标物的选择 因为待测的有机残留溶剂为样品中微量的挥发性物质,采用内标法定量可以减少由仪器系统或操作过程带来的误差。实验中对多种溶剂进行筛选,分别选用异丙醇与氯苯作为内标。

3.5 限度的规定 第四届人用药品注册技术规范国际协调会(ICH)将丙酮与醋酸乙酯列为低毒性的第三类有机试剂,而乙腈、甲苯、乙二醇与 DMF 列为必须限制使用的第二类毒性试剂,正丁醚为未明确毒性的试剂^[2]。中国药典 2000 年版对丙酮、醋酸乙酯、正丁醚、乙腈、乙二醇与 DMF 的残留量均未作规定。根据 ICH 的控制指标,结合实际测定结果,将正丁醚、乙腈、乙二醇与 DMF 的限度分别规定为 0.5%、0.041%、0.062% 与 0.088%,不控制丙酮与醋酸乙酯的残留量。参考中国药典^[3],将甲苯的限度分别规定为 0.089%。

参考文献

- [1] 姚光弼.核苷类抗乙肝病毒药物研究近况.中国新药与临床杂志[J].2002;21(6):370.
- [2] 周海钧主译.药品注册的国际技术要求(质量部分)[M].人民卫生出版社,2000:87.
- [3] 中国药典[S].2000.二部:附录:64.

收稿日期:2004-03-29