

顶空气相色谱法测定舒尼铂中5种有机溶剂残留量

杨晓燕¹, 沈红娅¹, 姜倩², 高安丽², 杨志¹, 王京昆¹, 徐红贵^{1*}

(1. 云南省药物研究所 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111;

2. 昆明贵金属研究所, 昆明 650106)

摘要: 建立了同时测定舒尼铂中乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷及1,4-二氧六环共5种残留有机溶剂的顶空气相色谱分析方法。以Agilent DB-624毛细管色谱柱为分离柱, N,N-二甲基甲酰胺(DMF)为载体溶剂, 氢火焰离子化检测器检测, 外标法计算含量。在选定条件下, 5种有机试剂分离度良好, 在选定浓度范围内线性关系良好, 相关系数(r)均不小于0.999; 加标回收率为98.68%~101.05%, 相对标准偏差(RSD)均不大于2.07%; 检测限为0.32~2.64 $\mu\text{g/mL}$; 定量限为0.81~6.59 $\mu\text{g/mL}$ 。测定结果满足舒尼铂中5种有机溶剂残留量限值检测要求。

关键词: 舒尼铂; 溶剂残留量; 顶空气相色谱法(HS-GC)

中图分类号: O657.7⁺¹ 文献标识码: A 文章编号: 1004-0676(2020)04-0068-04

Residual Concentration Determination of Five Organic Solvents in Suniplatin by HS-GC

YANG Xiao-yan¹, SHEN Hong-ya¹, JIANG Jing², GAO An-li², YANG Zhi¹, WANG Jing-kun¹, XU Hong-gui^{1*}

(1. Yunnan Institute of Materia Medica, Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation,

Kunming 650111, China; 2. Kunming Institute of Precious Metals, Kunming 650106, China)

Abstract: A HS-GC method was developed for the simultaneous determination of five residual organic solvents in Suniplatin, including ethanol, ethyl acetate, tetrahydrofuran, cyclohexane, and 1,4-dioxane. Using an Agilent DB-624 capillary column as the separation column, DMF as the carrier solvent and a hydrogen flame ionization detector for detection, and the results were calculated by the external standard method. Under the selected conditions, the separation resolution of the five organic reagents was satisfactory and the linear relationship was excellent in the range of the selected concentrations. The correlation coefficient (r) was not less than 0.999, and the average recovery rate was 98.68%~101.05%. The relative standard deviation (RSD) was less than 2.07%. The minimum detectable concentration of the five organic solvents was 0.32 to 2.64 $\mu\text{g/mL}$. The quantification limit was 0.81 to 6.59 $\mu\text{g/mL}$. The determination results meet the requirements of the residue limit of five organic solvents in Suniplatin.

Key words: Suniplatin; residual solvents; HS-GC

恶性肿瘤(癌症)是严重威胁人类健康和生命安全的重大疾病, 是继心血管疾病后的全球第二大死亡原因, 每年导致的死亡人数超过800万人。恶性肿瘤特点之一是肿瘤细胞不受控制的快速增殖, 增殖需要DNA的复制和转录, 因此, DNA是抗肿瘤药物的重要靶点。铂类药物就是一类以DNA为作

用靶点的无机抗癌配合物^[1], 它们可破坏癌细胞DNA结构和功能, 造成癌细胞的凋亡, 从而达到治疗的目的^[2]。

含铂类药物的联合化疗一直是治疗胃癌的首选方案, 但铂类抗癌药普遍存在肝肾毒性高, 骨髓抑制毒性大, 很多老年患者不能耐受, 以及交叉耐用

收稿日期: 2020-01-20

基金项目: 国家重大新药创制专项(2009ZX09103-109); 云南省新药开发专项(2014BC010)

第一作者: 杨晓燕, 女, 硕士, 高级工程师, 研究方向: 分析检测和技术管理。E-mail: wangzhiqi110207@126.com

*通信作者: 徐红贵, 男, 硕士, 工程师, 研究方向: 化学药开发。E-mail: hongguixu2005@126.com

性等问题。因此, 研制毒性小、对胃癌有较高疗效的新型铂类抗癌药物仍具有重要社会意义和经济价值。舒尼铂(如图1所示)作为治疗胃癌药物舒泊的衍生物, 具有我国自主知识产权^[3-6], 它的研发正是以改善铂类抗癌药的肝肾毒性和骨髓抑制毒性为目的, 从而达到提高患者的生活质量, 延长生存期的最终目标。

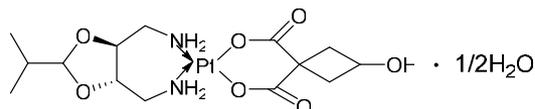


图1 舒尼铂的化学结构式

Fig.1 Chemical formula of Suniplatin

药品中的残留溶剂是指在原料药或辅料的生产中以及在制剂制备过程中使用、在工艺过程中未能完全去除的有机试剂^[7]。人用药物注册技术要求国际协调会(ICH)将残留溶剂分为3个类别, 并明确规定了限度^[8]。因此, 为保障用药安全, 控制残留溶剂十分重要。溶剂残留检测报道的文献^[9-11]较多, 但试剂种类不同。本文对舒尼铂原料药在合成工艺中使用的乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷及1,4-二氧六环5种有机溶剂建立分析方法, 并进行方法学验证。

1 实验

1.1 仪器与试剂

Agilent GC 7890B GC System, 配置有FID检测器以及OpenLab CMS工作站。Agilent 7694E顶空单元。XP205电子天平(Mettler Toledo)。

标准物质: 乙醇(色谱纯, MERCK); 四氢呋喃(色谱纯, MERCK); 乙酸乙酯(分析纯, 利安隆博华科技有限公司); 环己烷(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 1,4-二氧六环(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。试剂: N,N-二甲基甲酰胺(DMF)(色谱纯, MERCK)。

供试品: 舒尼铂原料药, 由云南省药物研究所提供。

1.2 试液配制

1) 对照品溶液。准确称取(精确至0.1 mg) 500 mg乙醇、500 mg乙酸乙酯、72 mg四氢呋喃、388 mg环己烷、38 mg 1,4-二氧六环, 用总量为40 mL的DMF溶解转移至100 mL容量瓶中, 用DMF稀

释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备溶液。取10.00 mL储备溶液至100 mL量瓶中, 用DMF稀释至刻度, 摇匀, 得到的溶液中5种有机物的浓度分别为500、500、72、388和38 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液。分取2.00 mL置于20 mL顶空进样瓶中, 适当密封顶空进样瓶, 作为色谱分析用对照品工作溶液。

2) 供试品溶液。称取舒尼铂原料药200 mg(精确至0.1 mg), 加2 mL DMF溶解在20 mL顶空进样瓶中, 适当密封顶空进样瓶, 作为色谱分析用供试品溶液。

1.3 色谱工作条件

色谱条件: DB-624毛细管色谱柱(0.53 mm \times 30 mm; 0.25 μm), 起始温度40 $^{\circ}\text{C}$, 保持5 min, 以5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至80 $^{\circ}\text{C}$, 再以20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率升温至200 $^{\circ}\text{C}$, 保持3 min。检测器为氢火焰离子化检测器(FID)。检测器温度为250 $^{\circ}\text{C}$; 进样口温度220 $^{\circ}\text{C}$ 。载气为氮气, 流速为4 mL/min, 分流比为10:1, 氢气流量为40 mL/min, 空气流量为400 mL/min, 进样体积1 mL。

顶空条件: 平衡温度140 $^{\circ}\text{C}$, 定量环温度150 $^{\circ}\text{C}$, 传输管线温度160 $^{\circ}\text{C}$, 样品平衡时间25 min。

2 结果与讨论

2.1 系统适用性

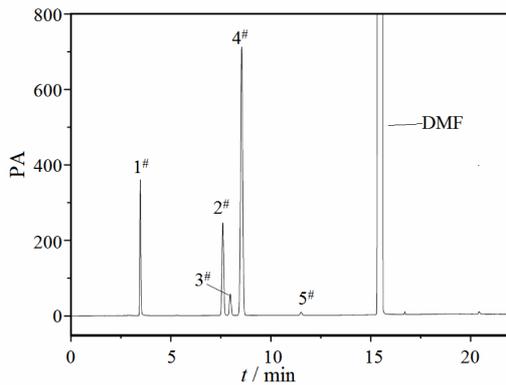
对照品溶液重复进样6次, 计算5种溶剂的保留时间及峰面积的相对标准偏差(RSD)。结果显示5种溶剂保留时间及峰面积的RSD均小于5.0%, 理论板数均不低于20000, 分离度均大于2.0, 符合定量测定要求。

2.2 专属性

以对照品溶液和空白溶液作为测试溶液进行色谱分析测定, 所得色谱图如图2所示。图2中15 min后为空白溶剂(DMF)峰, 不干扰检测。乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷和1,4-二氧六环等5种有机溶剂及DMF间最小分离度为2.31, 专属性良好。

2.3 线性范围

分取对照品储备溶液, 分别加入不同体积的DMF稀释, 配制成不同浓度的系列对照品标准溶液, 按浓度由低到高依次进行色谱测定, 以峰面积(A)为纵坐标, 浓度(C)为横坐标进行线性拟合。所得结果如表1所列。根据表1结果, 线性拟合的相关系数(r)均在0.9991以上, 表明各组分溶剂在浓度范围内线性关系良好。



1#: 乙醇(Ethanol); 2#: 乙酸乙酯(Ethyl acetate);
3#: 四氢呋喃(Tetrahydrofuran); 4#: 环己烷(Cyclohexane);
5#: 1,4-二氧六环(1,4-dioxane)

图2 5种溶剂对照混合溶液气相色谱图

Fig.2 Gas chromatograms of the five acontrol mixture solvents

表1 5种有机溶剂的线性关系考察结果($n=9$)

Tab.1 Results of investigation on linear relationship of 5 organic solvents ($n=9$)

组分	回归方程	相关系数(r)	线性范围/ ($\mu\text{g/mL}$)
乙醇	$A=2.4343C-11.364$	0.9993	5.0~1002
乙酸乙酯	$A=2.9049C-6.8908$	0.9995	5.0~1012
四氢呋喃	$A=48322C-5.0462$	0.9995	7.3~146
环己烷	$A=13.521C-30.335$	0.9997	3.9~783
1,4-二氧六环	$A=1.3058C-0.9134$	0.9991	16.2~81

2.4 检测限与定量限

逐级稀释各组分溶液,按1.3进行测定,乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷、1,4-二氧六环最低检出限($S/N \geq 3$)及定量限($S/N \geq 10$)如表2所列。

表2 5种有机溶剂的检测限(LOD)与定量限(LOQ)

Tab.2 Limits of detection and quantification for 5 organic solvents

组分	LOD		LOQ	
	浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	信噪比 (S/N)	浓度/ ($\mu\text{g/mL}$)	信噪比 (S/N)
乙醇	1.01	5.4	2.53	12.0
乙酸乙酯	1.20	4.1	3.01	11.0
四氢呋喃	0.83	4.8	2.07	12.6
环己烷	0.32	4.6	0.81	11.8
1,4-二氧六环	2.64	4.0	6.59	10.9

2.5 回收率

准确称取12份舒尼铂原料药样品,分别加入高、中、低不同浓度(相当于对照样品工作溶液中5种有机溶剂浓度的120%、100%、80%)的混标溶液,平行制备3份,其中3份为空白样品溶液。计算平均回收率及RSD,结果列于表3。乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷及1,4-二氧六环5种有机溶剂平均回收率为98.68%~101.05%, $RSD(n=9)$ 为1.28%~2.07%。3个浓度水平的平均回收率在100%±10%范围内,RSD均不超过5.0%,符合定量要求。

表3 5种有机溶剂回收率结果($n=9$)

Tab.3 Recovery results for 5 organic solvents ($n=9$) %

组分	平均回收率	RSD
乙醇	98.95	2.07
乙酸乙酯	101.05	1.58
四氢呋喃	99.31	1.28
环己烷	98.68	1.49
1,4-二氧六环	100.58	1.88

2.6 耐用性试验

以对照品溶液和供试品溶液作为测试溶液。通过改变载气流速、起始柱温和炉温评价方法耐用性,结果显示,在载气流速($4.0 \pm 0.5 \text{ mL/min}$)、起始柱温($40 \pm 5^\circ\text{C}$)、炉温($140 \pm 5^\circ\text{C}$)发生微小改变时,供试品溶液溶剂残留量无明显差异,对照品溶液各组分分离度良好,各参数无显著变化,此方法耐用性良好。

2.7 样品测定结果

称取不同批次舒尼铂原料药各200.0 mg,分别加2 mL DMF溶解,置于20 mL顶空进样瓶中,进行色谱测定,以外标法计算各组分含量,结果如表4所列。

表4 舒尼铂原料药中溶剂残留测定结果

$/10^{-6}$

Tab.4 Results of solvent residue determination in Suniplatin API

组分	测定值			限值
	201606- SNB-01	201607- SNB-01	201608- SNB-01	
乙醇	50.75	47.05	64.61	5000
乙酸乙酯	未检出	未检出	未检出	5000
四氢呋喃	未检出	未检出	未检出	720
环己烷	未检出	未检出	未检出	3880
1,4-二氧六环	未检出	未检出	未检出	380

根据《中国药典》2015年版规定,四氢呋喃、环己烷及1,4-二氧六环为限制使用的二类溶剂,乙醇、乙酸乙酯为限制使用的三类溶剂,其限值列于表4。表4结果表明,3批样品中均未检出乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷、1,4-二氧六环,仅检出乙醇,且远低于限度,各溶剂残留量均符合规定。

3 结论

采用顶空气相色谱法测定乙醇、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷及1,4-二氧六环5种残留溶剂,并进行方法学验证。各项方法学验证结果均符合相关要求,方法操作简单、准确灵敏,可满足舒尼铂中5种有机溶剂残留量限值的检测要求。

参考文献

- [1] KELLAND L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2007, 7(8): 573-584.
- [2] DILRUBA S, KALAYDA G V. Platinum-based drugs: past, present and future[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 2016, 77(6): 1103-1124.
- [3] LIU W P, CHEN X Z, YE Q S, et al. A novel water-soluble heptaplatin analogue with improved antitumor activity and reduced toxicity[J]. *Inorganic Chemistry*, 2011, 50(12): 5324-5326
- [4] LIU W P, JIANG J, XIE C Y, et al. Synthesis, anticancer activity and toxicity of a water-soluble 4S,5S-derivative of heptaplatin, cis-{Pt(II)}[(4S,5S)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]-(3-hydroxyl-cyclobutane-1,1-dicarboxylate)}[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2014, 140: 126-130.
- [5] 姜婧, 楼丽广, 谌喜珠, 等. 两种新型水溶性庚铂衍生物的合成和抗癌活性研究[J]. *无机化学学报*, 2014, 30(2): 317-322.
JIANG J, LOU L G, CHEN X Z, et al. Synthesis and anti-tumor activity of two new water-soluble derivatives of heptaplatin[J]. *Chinese Journal of Inorganic Chemistry*, 2014, 30(2): 317-322.
- [6] 刘伟平, 楼丽广, 谌喜珠, 等. 一种水溶性 S,S-庚铂衍生物: CN102079761[P]. 2012-09-19.
LIU W P, LOU L G, CHEN X Z, et al. A water-soluble S,S-type heptaplatin derivative: CN 102079761[P]. 2012-09-19.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典 2015年版四部[S]. 中国医药科技出版社, 2015年.
Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia 2015 Edition Four*[S]. China Medical Science and Technology Press, 2015
- [8] Government of Canada, Health Canada, Health Products and Food Branch, Therapeutic Products Directorate, Bureau of Pharmaceutical Sciences. Impurities: Guideline for Residual Solvents[J]. *Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations*, 2009: 96-102.
- [9] 冒宜兰, 姚晓敏, 倪桃, 等. 毛细管气相色谱法测定伏立康唑中有机溶剂的残留量[J]. *华西药学杂志*, 2009, 24(6): 640-642.
MAO Y L, YAO X M, NI T, et al. Determination of residual organic solvents in Voriconazole by capillary GC[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2009, 24(6): 640-642.
- [10] 沙云菲, 蔡磊, 黄滔敏, 等. 雷替曲塞中有机溶剂残留量的毛细管气相色谱法测定[J]. *中国新药与临床杂志*, 2004, 23(10): 674-676.
SHA Y F, CAI L, HUANG T M, et al. Determination of residual organic solvents in raltitrexed by capillary GC[J]. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*, 2004, 23(10): 674-676.
- [11] 翁水旺. 紫杉醇中有机溶剂残留量的毛细管 GC 测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2005, 36(7): 420-421.
WENG S W. Determination of residual organic solvents in paclitaxel by capillary GC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceuticals*, 2005, 36(7): 420-421.