

顶空气相色谱法同时测定法匹拉韦原料药中5种有机溶剂的残留量^Δ

刘葵葵*, 邓玉晓, 邢学敏, 王 伶[#](山东省药学科学院化学药物重点实验室, 济南 250101)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3415-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.30

摘要 目的:建立同时测定法匹拉韦原料药中乙醇、丙酮、乙酸乙酯、*N,N*-二异丙基乙胺、甲苯5种有机溶剂残留量的方法。方法:采用顶空气相色谱法。色谱柱为DB-624毛细管柱,程序升温,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250℃,载气为氮气,载气流速为2.0 mL/min,分流比为10:1,顶空平衡温度为80℃,平衡时间为20 min,顶空进样量为1 mL。结果:乙醇、丙酮、乙酸乙酯、*N,N*-二异丙基乙胺和甲苯检测质量浓度线性范围分别为10.0~501.4 μg/mL($r=0.999\ 9$)、10.0~501.4 μg/mL($r=0.999\ 9$)、10.1~502.6 μg/mL($r=0.999\ 9$)、0.2~11.4 μg/mL($r=0.999\ 9$)、1.8~89.4 μg/mL($r=0.999\ 7$);定量限分别为5.3、3.4、5.2、6.1、20.4 μg/mL,检测限分别为1.4、1.1、1.3、1.6、5.9 μg/mL;精密度试验的RSD<4.0%,稳定性、重复性试验中只检出丙酮,其RSD<4.0%;加样回收率分别为96.61%~99.70%(RSD=1.01%, $n=9$)、95.81%~99.50%(RSD=1.29%, $n=9$)、96.42%~99.76%(RSD=1.24%, $n=9$)、96.36%~99.30%(RSD=1.19%, $n=9$)、97.00%~99.51%(RSD=0.82%, $n=9$)。结论:该方法简单、准确、重复性好,可用于法匹拉韦原料药中5种有机溶剂残留量的同时测定。

关键词 气相色谱法;法匹拉韦;有机溶剂;残留量;乙醇;丙酮;乙酸乙酯;*N,N*-二异丙基乙胺;甲苯

Simultaneous Determination of 5 Organic Solvents in Favipiravir by Headspace GC

LIU Kuikui, DENG Yuxiao, XING Xuemin, WANG Ling (Key Laboratory for Chemical Drug Research, Shandong Academy of Pharmaceutical Science, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 5 kinds residual ethanol, acetone, ethylacetate, *N,N*-diisopropylethylamine and toluene in favipiravir. METHODS: Headspace GC was adopted. The determination was performed on DB-624 capillary column, temperature programmed. The inlet temperature was 220 °C, and detector was flame ionization detector with temperature of 250 °C. Nitrogen was used as carrier gas at flow rate of 2.0 mL/min, split ratio was 10:1, headspace equilibrium temperature was 80 °C, equilibrium time was 20 min and headspace sample size was 1 mL. RESULTS: The linear range was 10.0-501.4 μg/mL for ethanol ($r=0.999\ 9$), 10.0-501.4 μg/mL for acetone ($r=0.999\ 9$), 10.1-502.6 μg/mL for ethylacetate ($r=0.999\ 9$), 0.2-11.4 μg/mL for *N,N*-diisopropylethylamine ($r=0.999\ 9$) and 1.8-89.4 μg/mL for acetone ($r=0.999\ 7$). The limits of quantification were 5.3, 3.4, 5.2, 6.1 and 20.4 μg/mL, and the limits of detection were 1.4, 1.1, 1.3, 1.6, 5.9 μg/mL. RSD of precision test was lower than 4.0%, and RSDs of acetone in stability and reproducibility tests were both lower than 4.0%. The recoveries were 96.61%-99.70% (RSD=1.01%, $n=9$), 95.81%-99.50% (RSD=1.29%, $n=9$), 96.42%-99.76% (RSD=1.24%, $n=9$), 96.36%-99.30% (RSD=1.19%, $n=9$), 97.00%-99.51% (RSD=0.82%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reproducible and can be used for simultaneous determination of 5 organic solvents in favipiravir.

KEYWORDS Gas chromatography; Favipiravir; Organic solvents; Residual; Ethanol; Acetone; Ethylacetate; *N,N*-diisopropylethylamine; Toluene

法匹拉韦(Favipiravir)为日本富士胶片公司旗下富山化学工业公司研发的流感治疗药物,2011年3月在日本完成Ⅲ期临床试验,2014年3月在日本批准上市^[1]。法匹拉韦是一种病毒RNA聚合酶抑制剂,能够阻断病毒RNA的合成,从而起到抗病毒的作用,同时法匹拉韦对哺乳动物细胞内的RNA合成不会产生任何抑制作

用,因此是一种安全有效的抗病毒药物。由于其特定的作用机制,除流感病毒外,法匹拉韦还可以对抗其他多种RNA病毒,如黄热病、埃博拉等^[2-4]。

目前已有相关文献报道了法匹拉韦制剂中相关含量的测定^[5],但尚未见有关法匹拉韦原料药中有机溶剂残留量测定的报道;且根据法匹拉韦的合成工艺,生产中分别使用了*N,N*-二异丙基乙胺、乙酸乙酯、甲苯、丙酮和乙醇等有机溶剂。为确保药品的安全、有效和质量可控,笔者采用顶空气相色谱法建立了同时测定法匹拉韦原料药中上述5种有机溶剂残留量的方法^[6-8]。

1 材料

^Δ 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No.ZR2013HQ043)

* 工程师。研究方向:新药研发。电话:0531-88562280。E-mail: Srhksdu2008@sina.com

[#] 通信作者:高级工程师,硕士。研究方向:新药研发。电话:0531-88562280。E-mail:lw6624@126.com

1.1 仪器

6890N型气相色谱仪,包含氢火焰离子化检测器(FID)和7697A顶空自动进样器(美国Agilent公司);BS 210S型十万分之一电子分析天平(德国Sartorius公司);ZUPT-I-20T型超纯水机(台湾艾柯公司)。

1.2 药品与试剂

法匹拉韦原料药(山东省药学院化学药物重点实验室自制,批号:20151001、20151002、20151003);乙醇对照品(批号:20150611;纯度:99.8%)、丙酮对照品(批号:20140116;纯度:99.7%)、乙酸乙酯对照品(批号:20150813;纯度:99.6%)、*N,N*-二异丙基乙胺对照品(批号:20150507;纯度:99.5%)、甲苯对照品(批号:20150106;纯度:99.8%)均购自国药集团化学试剂有限公司;*N,N*-二甲基甲酰胺为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:DB-624毛细管柱(30 m×0.53 mm,3.0 μm);升温程序:初始温度为50℃,保持3 min,以10℃/min升温至180℃,保持2 min;进样口温度:220℃;检测器:FID;检测器温度:250℃;载气:氮气;载气流速:2.0 mL/min;分流比:10:1;顶空平衡温度:80℃;平衡时间:20 min;顶空进样量:1 mL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取乙醇、丙酮、乙酸乙酯、*N,N*-二异丙基乙胺、甲苯对照品适量,置于同一100 mL量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺溶解并定容,摇匀,制成每1 mL含乙醇500 μg、丙酮500 μg、乙酸乙酯500 μg、*N,N*-二异丙基乙胺11.4 μg、甲苯89 μg的混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液5 mL,置于50 mL量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品0.5 g,置于10 mL顶空瓶中,精密加入*N,N*-二甲基甲酰胺5 mL,密封,振荡使溶解,即得。

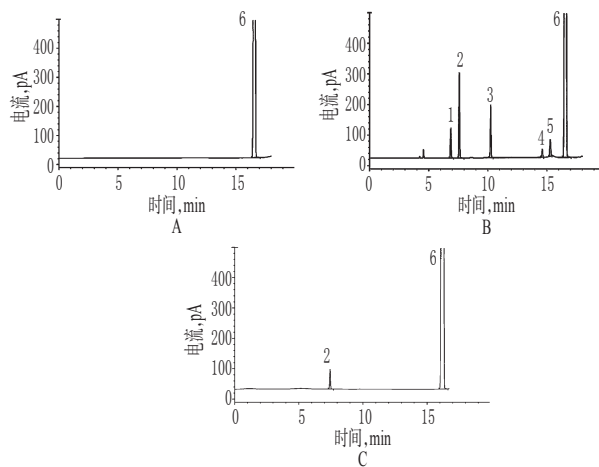
2.2.3 空白对照溶液 精密量取*N,N*-二甲基甲酰胺5 mL作为空白对照溶液,置于顶空瓶中,密封。

2.3 系统适用性试验

精密量取“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,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度>6;理论板数以乙醇峰计为58 688,保留时间为6.862 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液1、2、5、10、25 mL,分别置于50 mL量瓶中,加*N,N*-二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,即得系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各5 mL,分别置于顶空瓶



A.空白对照;B.混合对照品;C.供试品;1.乙醇;2.丙酮;3.乙酸乙酯;4.*N,N*-二异丙基乙胺;5.甲苯;6.*N,N*-二甲基甲酰胺

A. blank control; B. mixed control; C. test samples; 1. ethanol; 2. acetone; 3. ethylacetate; 4. *N,N*-diisopropylethylamine; 5. toluene; 6. *N,N*-dimethylformamide

图1 气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms

中,密封,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(x , μg/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 equations and linear ranges

待测有机溶剂	回归方程	r	线性范围, μg/mL
乙醇	$y=0.837x-0.969$	0.999 9	10.0~501.4
丙酮	$y=2.446 5x-2.591 4$	0.999 9	10.0~501.4
乙酸乙酯	$y=1.596 1x-3.684 8$	0.999 9	10.1~502.6
<i>N,N</i> -二异丙基乙胺	$y=26.763x-0.105$	0.999 9	0.2~11.4
甲苯	$y=1.507 5x+1.282 6$	0.999 7	1.8~89.4

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,乙醇、丙酮、乙酸乙酯、*N,N*-二异丙基乙胺、甲苯的LOQ分别为5.3、3.4、5.2、6.1、20.4 μg/mL, LOD分别为1.4、1.1、1.3、1.6、5.9 μg/mL。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”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,乙醇、丙酮、乙酸乙酯、*N,N*-二异丙基乙胺、甲苯峰面积的RSD分别为3.5%、2.6%、1.9%、3.4%、2.8% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20151001)适量,分别于室温下放置0、2、4、6、8 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,只检出丙酮,其峰面积的RSD=2.4% ($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置8 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:20151001)适量,共6份,按“2.2.2”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,记录峰面积并计算待测有机溶液残留量。结果,只检出丙酮,其残留量平均值为0.04%,RSD=1.86%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取样品(批号:20151001)适量,共9份,各置于10 mL量瓶中,分别加入低、中、高质量的待测有机溶剂对照品,按“2.2.2”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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表2。

2.10 样品有机溶剂残留量测定

取3批样品(批号:20151001、20151002、20151003)各适量,按“2.2.2”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待测有机溶剂的残留量。结果,3批样品中均只检出丙酮,残留量分别为0.04%、0.03%、0.05%($n=3$)。

3 讨论

3.1 进样方式的选择

虽然直接进样相比顶空进样操作简单,但是本研究的待测有机溶剂在高温条件下可分解出挥发性产物,干扰溶剂的测定,故本研究采用顶空进样^[9-10]。

3.2 色谱柱的选择

笔者考察了不同极性的毛细管柱(DB-1、DB-wax、HP-5、DB-624),结果采用HP-5毛细管柱进行测定时,乙醇和丙酮不能完全分离;采用DB-1、DB-wax毛细管柱进行测定时, N,N -二异丙基乙胺峰对称性差;采用DB-624毛细管柱进行测定时,待测有机溶剂峰之间的分离度符合要求,峰对称性良好^[10]。因此,选择DB-624毛细管柱为本试验的色谱柱。

3.3 溶剂的选择

法匹拉韦的水溶性较差,待测有机溶剂甲苯也不溶于水。顶空气相色谱法常用溶剂为水、 N,N -二甲基甲酰胺和二甲基亚砜,经考察法匹拉韦在 N,N -二甲基甲酰胺中溶解性比在二甲基亚砜中好,且 N,N -二甲基甲酰胺在待测有机溶剂之后出峰,对待测有机溶剂无干扰,故选用 N,N -二甲基甲酰胺作为本试验的溶剂。

3.4 顶空平衡温度的考察

本研究比较了不同顶空平衡温度(70、80、90 ℃),结果发现顶空平衡温度为80 ℃时待测有机溶剂峰的灵敏度与重复性最佳,且样品完全溶解,故选择80 ℃作为本试验的顶空平衡温度。

3.5 LOD的确定

根据2015年版《中国药典》(四部)“通则0861”的要求,乙醇、丙酮、乙酸乙酯和甲苯的检测限分别为0.5%、0.5%、0.5%、0.089%,未规定 N,N -二异丙基乙胺的LOD。《欧洲药品质量管理局(EDQM)关于化学纯度和微生物质量方面的文档要求》规定了 N,N -二异丙基乙胺

表2 加样回收率试验结果($n=9$)

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

待测有机溶剂	取样量, g	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, %
乙醇	0.501 4	0	50.3	49.60	98.61	98.34	1.01
	0.502 6	0	50.2	48.50	96.61		
	0.501 9	0	50.2	49.10	97.81		
	0.504 7	0	250.8	246.70	98.37		
	0.503 6	0	250.8	243.90	97.25		
	0.502 1	0	250.8	246.70	98.37		
	0.502 9	0	501.7	498.60	99.38		
	0.505 4	0	501.7	500.20	99.70		
	0.503 7	0	501.7	496.70	99.00		
丙酮	0.501 4	200.6	50.1	248.60	95.81	97.78	1.29
	0.502 6	201.0	50.1	249.10	96.01		
	0.501 9	200.8	50.1	249.80	97.80		
	0.504 7	201.9	250.7	446.30	97.49		
	0.503 6	201.4	250.7	446.80	97.89		
	0.502 1	200.8	250.7	445.70	97.69		
	0.502 9	201.2	501.4	700.10	99.50		
	0.505 4	202.2	501.4	698.90	99.06		
	0.503 7	201.5	501.4	696.70	98.76		
乙酸乙酯	0.501 4	0	50.3	48.50	96.42	98.57	1.24
	0.502 6	0	50.3	48.70	96.82		
	0.501 9	0	50.3	49.60	98.61		
	0.504 7	0	251.3	250.40	99.64		
	0.503 6	0	251.3	248.40	98.85		
	0.502 1	0	251.3	246.70	98.17		
	0.502 9	0	502.6	500.60	99.60		
	0.505 4	0	502.6	501.40	99.76		
	0.503 7	0	502.6	498.80	99.24		
N,N -二异丙基乙胺	0.501 4	0	1.1	1.06	96.36	98.09	1.19
	0.502 6	0	1.1	1.08	98.18		
	0.501 9	0	1.1	1.09	99.09		
	0.504 7	0	5.7	5.65	99.12		
	0.503 6	0	5.7	5.61	98.42		
	0.502 1	0	5.7	5.54	97.19		
	0.502 9	0	11.4	11.26	98.77		
	0.505 4	0	11.4	11.32	99.30		
	0.501 4	0	1.1	1.06	96.36		
甲苯	0.501 4	0	8.9	8.76	98.43	98.34	0.82
	0.502 6	0	8.9	8.81	98.99		
	0.501 9	0	8.9	8.69	97.64		
	0.504 7	0	44.7	44.31	99.13		
	0.503 6	0	44.7	43.36	97.00		
	0.502 1	0	44.7	43.84	98.08		
	0.502 9	0	89.4	88.14	98.59		
	0.505 4	0	89.4	87.36	97.72		
	0.503 7	0	89.4	88.96	99.51		

的最大日用量为38.8 mg,且其LOD为0.388%,因此可将该原料药中的 N,N -二异丙基乙胺的LOD暂定为0.388%^[11]。

综上所述,本方法简单、准确、重复性好,可用于法匹拉韦原料药中5种有机溶剂残留量的同时测定。

参考文献

- [1] 刘翠艳,张园园,利超,等.HPLC法测定法匹拉韦片的含量[J].中国药师,2005,18(7):1231-1233.
- [2] 魏娜,王彩霞,刘喜宝,等.抗病毒新药法匹拉韦研究进展[J].医药导报,2016,35(2):168-170.

HPLC法同时测定复方甲硝唑克林霉素乳膏中4种成分的含量^Δ

范义凤*,王 钦(南通大学附属医院药学部,江苏南通 226001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)24-3418-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.24.31

摘要 目的:建立同时测定复方甲硝唑克林霉素乳膏中甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B₆含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Diamonsil C₁₈,流动相为乙腈-[0.68%磷酸氢二钾溶液(含1%三乙胺)](梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为210 nm,柱温为25 ℃,进样量为20 μL。结果:甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B₆检测质量浓度线性范围分别为20.0~120.0 μg/mL($r=0.999\ 9$)、10.0~60.0 μg/mL($r=0.999\ 1$)、4.0~24.0 μg/mL($r=0.999\ 4$)、10.0~60.0 μg/mL($r=0.999\ 4$);定量限分别为13.06、7.36、2.43、6.42 μg/mL,检测限分别为4.18、1.82、0.76、1.79 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2.0%;回收率分别为98.97%~100.91%(RSD=0.79%, $n=9$)、99.02%~101.80%(RSD=1.03%, $n=9$)、98.18%~101.05%(RSD=1.01%, $n=9$)、98.75%~101.36%(RSD=0.87%, $n=9$)。结论:该方法简便、快速、结果准确,可用于复方甲硝唑克林霉素乳膏中甲硝唑、盐酸克林霉素、螺内酯、维生素B₆含量的同时测定。

关键词 甲硝唑;盐酸克林霉素;螺内酯;维生素B₆;高效液相色谱法;含量

Simultaneous Determination of 4 Components in Compound Metronidazole Clindamycin Cream by HPLC

FAN Yifeng, WANG Qin (Dept. of Pharmacy, the Affiliated Hospital of Nantong University, Jiangsu Nantong 226001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for simultaneous determination of the content of metronidazole, clindamycin hydrochloride, spironolactone and vitamin B₆ in Compound metronidazole clindamycin cream. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Diamonsil C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-[0.68% dipotassium hydrogen phosphate solution (containing 1% triethylamine)] (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and column temperature was 25 ℃. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear ranges of metronidazole, clindamycin hydrochloride, spironolactone and vitamin B₆ were respectively 20.0-120.0 μg/mL ($r=0.999\ 9$), 10.0-60.0 μg/mL ($r=0.999\ 1$), 4.0-24.0 μg/mL ($r=0.999\ 4$), 10.0-60.0 μg/mL ($r=0.999\ 4$). The quantitative limits were respectively 13.06, 7.36, 2.43, 6.42 μg/mL. The detection limits were 4.18, 1.82, 0.76, 1.79 μg/mL. RSDs of the precision, stability, repeatability tests were all less than 2%. The recovery rates were respectively 98.97% -100.91% (RSD=0.79%, $n=9$), 99.02% -101.80% (RSD=1.03%, $n=9$), 98.18% -101.05% (RSD=1.01%, $n=9$) and 98.75% -101.36% (RSD=0.87%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, accurate and can be used for the determination of metronidazole, clindamycin hydrochloride, spironolactone and vitamin B₆ in Compound clindamycin metronidazole cream.

KEYWORDS Metronidazole; Clindamycin hydrochloride; Spironolactone; Vitamin B₆; HPLC; Content

- [3] 赵旭,周辛波,钟武,等.抗病毒药物:法匹拉韦[J].临床药物治疗杂志,2015,13(4):16-20.
- [4] 裴诗恩,黄颖琦,吴淑曼,等.基于静电势电荷的抗击埃博拉病毒新药物法匹拉韦及其衍生物水溶解度 logS 值预测[J].当代化工,2017,46(1):33-34.
- [5] 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,2015:105-110.
- [6] 李眉,马玉楠.简介 ICH 关于药品中溶剂残留的指导原则[J].中国药师,1998,1(3):119-120.
- [7] 陆焯,夏宇沁,昌军,等.毛细管气相色谱法测定13种有机溶剂残留[J].复旦学报(医学版),2013,40(2):222-226.
- [8] 王建,王红波,王知坚.GC测定盐酸克林霉素棕榈酸酯中的9种溶剂残留[J].中国现代应用药学,2012,29(9):829-833.
- [9] 吴春丽,张俊霞,史云涛,等.顶空毛细管气相色谱法测定来曲唑原料中有机溶剂残留量[J].中国药房,2010,21(17):1601-1603.
- [10] 章为,李文波,李晓燕,等.顶空气相色谱法同时测定甲苯磺酸妥舒沙星原料药中6种有机溶剂的残留量[J].中国药房,2017,28(6):847-850.
- [11] 张雅军,孙会敏,李科,等.气相色谱法测定阿德福韦酯中的10种残留溶剂[J].药物分析杂志,2005,25(6):660-662.

Δ 基金项目:江苏省药学会—奥赛康医院药学基金立项课题(No.A201616)

* 主任药师。研究方向:医院药学。电话:0513-85052282。
E-mail:fyfeng606@126.com

(收稿日期:2017-02-06 修回日期:2017-04-29)
(编辑:刘 柳)