

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.15.017

顶空气相色谱法同时测定拉帕替尼原料药7种有机溶剂残留量*

付丙月,王金虎,王颖超,段崇刚[△]

(山东省药科学院·山东省化学药物重点实验室,山东 济南 250011)

摘要:目的 建立同时测定拉帕替尼原料药中乙醇、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、*N,N*-二甲基甲酰胺7种有机溶剂残留量的顶空气相色谱法。方法 色谱柱为Agilent DB-624毛细管柱(30 m×0.32 mm,1.8 μm),检测器为氢火焰离子化检测器,程序升温,进样口温度为200℃,检测器温度为200℃,载气为氮气,流速为2.0 mL/min,分流比为10:1,进样方式为顶空进样,顶空平衡温度为80℃,平衡时间为35 min,进样量为5 mL。结果 乙醇、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、*N,N*-二甲基甲酰胺7种残留有机溶剂均完全分离,空白溶剂无干扰;各对照品均在各自的质量浓度范围内与峰面积线性关系良好;精密度、稳定性、重复性试验的结果均符合要求;7种有机溶剂的平均加样回收率为98.22%~98.73%,RSD为0.71%~1.31%(*n*=9)。结论 该方法操作简便,结果准确,重复性好,可用于同时测定拉帕替尼原料药中7种有机溶剂的残留量。

关键词:拉帕替尼;原料药;顶空气相色谱法;有机溶剂;残留量;同时测定

中图分类号:R927.1;R979.1

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)15-0062-04

Simultaneous Determination of Seven Residual Organic Solvents in Lapatinib Raw Materials by Headspace Gas Chromatography

FU Bingyue, WANG Jinhua, WANG Yingchao, DUAN Chonggang

(Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences · Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drugs, Jinan, Shandong, China 250011)

Abstract: Objective To establish a headspace gas chromatography method for the simultaneous determination of ethanol, acetone, isopropanol, dichloromethane, tetrahydrofuran, toluene and *N,N*-dimethylformamide in lapatinib raw materials. **Methods** The chromatographic column was Agilent DB-624 capillary column(30 m×0.32 mm,1.8 μm),the detector was flame ion detector(FID) with programmed temperature,the temperature of injection port was 200℃,the temperature of FID was 200℃,the carrier gas was nitrogen,the flow rate was 2.0 mL/min,the split ratio was 10:1,the injection mode was headspace injection,the temperature of headspace equilibration was 80℃,the equilibration time was 35 min,and the injection volume was 5 mL. **Results** The seven kinds of organic residual solvents(ethanol,acetone,isopropanol,dichloromethane,tetrahydrofuran,toluene and *N,N*-dimethylformamide) were completely separated,and the blank solvent had no interference. There was a good linear relationship between the peak area and the concentration of each reference substance. The results of precision, stability and repeatability tests all met the requirements. The average recoveries of seven organic solvents were in the range of 98.22% - 98.73% with RSDs of 0.71% - 1.31% (*n*=9). **Conclusion** The method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the simultaneous determination of seven residual organic solvents in lapatinib raw materials.

Key words: lapatinib; raw materials; headspace gas chromatography; organic solvents; residual amount; simultaneous determination

拉帕替尼(商品名泰立沙)是一种口服的小分子表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKI),由英国葛兰素史克公司研发,于2007年3月由美国食品药品监督管理局批准上市,联合卡培他滨治疗表皮生长因子受体2(HER2)过度表达的晚期或转移性乳腺癌。目前,拉帕替尼在国内是曲妥珠单抗耐药患者的一线治疗用药^[1-4],其多条合成路线及工艺优化中,均使用了乙醇、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、*N,N*-二甲基甲酰胺等有机溶剂^[5-12]。为保障药品质量和用药安全,减轻溶剂残留对人体及环境的危害,人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)、各国药典等均对药品中有机溶剂残留量限度作出了规定。本研究中参照2020年版《中国药典

(四部)》的相关规定,参考文献[13]的研究方法,采用气相色谱(GC)法测定拉帕替尼原料药中7种有机溶剂的残留量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

7890A型气相色谱仪,配有7694E型顶空自动进样器(美国安捷伦公司);XS-205型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司,精度为十万分之一)。

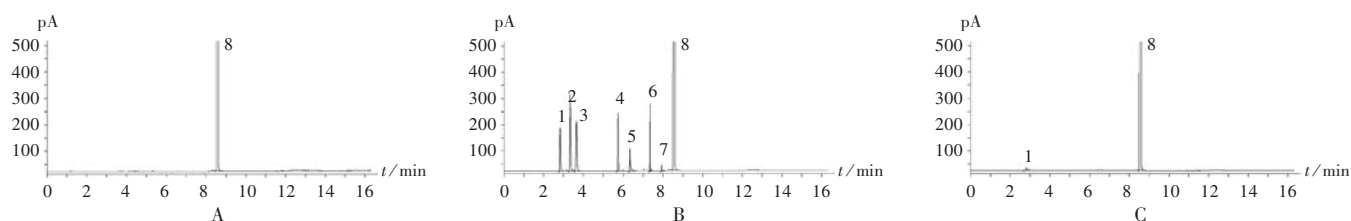
1.2 试剂

拉帕替尼原料药(实验室自制,批号分别为20190802,20190807,20190812,20190819,20170627,20190820,20190829,纯度分别为99.9%,99.8%,

*基金项目:山东省重大科技创新工程和结转项目[2019JZZY010520]。

第一作者:付丙月,女,硕士,副主任药师,研究方向为新药研发和药物分析学,(电子信箱)fubingyue-2004@163.com。

[△]通信作者:段崇刚,男,博士,主任药师,研究方向为药物合成,(电子信箱)wjh1573@126.com。



1. 乙醇 2. 丙酮 3. 异丙醇 4. 二氯甲烷 5. 四氢呋喃 6. 甲苯 7. *N,N*-二甲基甲酰胺 8. 二甲亚砜

A. 空白溶剂 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 气相色谱图

1. Ethanol 2. Acetone 3. Isopropanol 4. Dichloromethane 5. Tetrahydrofuran 6. Toluene 7. *N,N*-dimethylformamide 8. Dimethyl sulfoxide

A. Blank solvent B. Mixed reference solution C. Test solution

Fig. 1 Gas chromatograms

99.9%, 99.8%, 99.9%, 99.9%, 99.9%); 二甲亚砜(色谱纯, 默克股份两合公司); *N,N*-二甲基甲酰胺(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司); 乙醇、丙酮、异丙醇、甲苯、二氯甲烷、四氢呋喃(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Agilent DB-624 毛细管柱(30 m × 0.32 mm, 1.8 μm); 色谱柱起始温度: 30 °C, 保持 6 min, 以 30 °C/min 的速率升至 200 °C, 保持 6 min; 氢火焰离子化检测器(FID)温度: 200 °C; 进样口温度: 200 °C; 载气: 氮气; 流速: 2.0 mL/min; 分流比: 10:1; 顶空进样瓶容积: 10 mL; 平衡温度: 80 °C; 平衡时间: 35 min; 进样量: 5 mL。精密量取混合对照品溶液、供试品溶液和空白溶剂各 5 mL, 按上述色谱条件分别进样测定, 记录色谱图, 理论板数按乙醇峰计不低于 3 000。该色谱条件下 *R* 值均 > 3, 混合对照品溶液各待测组分峰基线完全分离, 空白溶剂二甲亚砜对其他成分的色谱峰无干扰。详见图 1。

2.2 溶液制备

分别取乙醇、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、*N,N*-二甲基甲酰胺适量, 精密称定, 置 10 mL 容量瓶中, 加二甲亚砜稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品贮备液。精密量取上述对照品贮备液 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 制成每 1 mL 分别含乙醇 500 μg、丙酮 500 μg、异

丙醇 500 μg、二氯甲烷 60 μg、四氢呋喃 70 μg、甲苯 90 μg、*N,N*-二甲基甲酰胺 90 μg 的混合对照品溶液。取拉帕替尼原料药 0.5 g, 精密称定, 置 10 mL 顶空瓶中, 精密加入二甲亚砜 5 mL, 密封, 轻摇使溶解, 即得供试品溶液。精密量取二甲亚砜 5 mL, 置 10 mL 顶空瓶中, 密封, 即得空白溶剂。

2.3 方法学考察

线性关系考察: 分别精密量取混合对照品溶液 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 加入二甲亚砜定容, 摇匀, 即得系列线性混合对照品溶液。精密量取上述溶液各 5 mL, 置 10 mL 顶空瓶中, 加盖密封, 于顶空进样器中平衡 30 min, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。以峰面积(*Y*)为纵坐标、各组分质量浓度(*X*, μg/mL)为横坐标进行线性回归。结果见表 1。

定量限(LOQ)与检测限(LOD)确定: 取混合对照品溶液, 加二甲亚砜逐级稀释, 进样测定, 按信噪比(*S/N*) = 10 计算 LOQ, 按 *S/N* = 3 计算 LOD。结果见表 1。

精密度试验: 精密量取混合对照品溶液 5 mL, 共 6 份, 置 10 mL 顶空瓶中, 密封, 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果表明仪器精密度良好, 详见表 1。

稳定性试验: 取样品(批号为 20190820)适量, 精密称定, 依法制备供试品溶液, 置 10 mL 容量瓶中, 加入混

表1 各待测成分线性回归方程、线性范围、LOQ 和 LOD 测定及精密度、稳定性试验结果(*n* = 6)

Tab. 1 Linear regression equation, linear range, LOQ and LOD, precision, stability and repeatability tests of each component(*n* = 6)

待测成分	<i>r</i>	回归方程	线性范围(μg/mL)	LOQ(μg/mL)	LOD(μg/mL)	精密度试验的 <i>RSD</i> (%)	稳定性试验的 <i>RSD</i> (%)
乙醇	0.999 9	$Y = 137.76X + 3.928 7$	10.37 ~ 137.10	10.37	3.46	0.45	1.41
丙酮	0.999 8	$Y = 506.1X + 8.617 9$	10.13 ~ 101.32	10.13	3.38	0.80	2.06
异丙醇	0.999 8	$Y = 213.56X + 12.056$	10.25 ~ 102.50	10.25	3.42	0.78	0.85
二氯甲烷	0.999 8	$Y = 17.361X + 0.877 8$	1.26 ~ 12.66	1.26	0.42	0.65	2.30
四氢呋喃	0.999 9	$Y = 1 468X + 3.997 9$	1.58 ~ 15.83	1.58	0.53	0.79	1.84
甲苯	0.999 5	$Y = 228.37X + 6.397 8$	1.84 ~ 18.42	1.84	0.61	0.61	1.37
<i>N,N</i> -二甲基甲酰胺	1.000 0	$Y = 3 081.9X - 32.584$	1.89 ~ 18.91	1.89	0.63	0.76	0.59

表2 加样回收试验结果($n=9$, %)
Tab. 2 Results of the recovery test($n=9$, %)

待测成分	回收率									$\bar{X}$	RSD
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
乙醇	99.21	96.13	98.11	98.57	98.97	99.40	99.85	98.35	98.01	98.51	1.10
二氯甲烷	96.36	97.02	98.34	99.47	97.27	97.61	100.20	98.87	99.30	98.27	1.31
正己烷	98.41	99.20	96.25	99.64	98.56	98.44	100.18	98.73	99.18	98.73	1.12
乙酸乙酯	97.82	97.42	96.41	99.72	100.16	99.08	99.30	98.84	99.08	98.65	1.21
四氢呋喃	98.15	96.23	96.36	99.61	99.20	98.02	98.23	99.20	99.00	98.22	1.24
甲苯	97.12	98.06	97.14	98.62	98.80	98.41	99.48	99.84	99.04	98.50	0.96
N, N -二甲基甲酰胺	97.94	97.87	98.95	98.69	97.19	98.68	99.00	97.32	98.71	98.26	0.71

合对照品溶液 0.5 mL,加二甲亚砷定容,摇匀。精密量取供试品溶液 5 mL,共 6 份,置 10 mL 顶空瓶中,密封,分别于室温下放置 0,2,4,6,10,16 h 时,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果表明供试品溶液在室温下放置 16 h 内稳定,详见表 1。

重复性试验:取样品(批号为 20190820)适量,共 6 份,精密称定,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算溶剂残留量。结果均未检出乙醇、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、 N, N -二甲基甲酰胺峰面积,乙醇残留量的平均值为 0.01%, RSD 为 7.90%($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知有机溶剂含量的样品(批号为 20190820)9 份,分别加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液适量,各 3 份,超声,溶解,按 2.1 项下色谱条件进样测定 3 次,并计算加样回收率。结果见表 2。

2.4 样品有机溶剂残留量测定

取 7 批样品(批号分别为 20190802, 20190807, 20190812, 20190819, 20170627, 20190820, 20190829)各 0.5 g,精密称定,依法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算有机溶剂残留量。结果见表 3。

3 讨论

3.1 提取溶剂选择

GC 法通常采用水、醇、 N, N -二甲基甲酰胺、二甲亚砷等作为溶剂,本研究中 N, N -二甲基甲酰胺是残留溶剂之一,无法作为溶剂使用;甲苯极性较小、不溶于水;拉帕替尼虽为磺酸盐形式,但溶于二甲亚砷,难溶于水和乙醇,甲醇中溶解度同样较低。同时,二甲亚砷保留时间在拉帕替尼各残留溶剂的保留时间之后,与各组分峰完全分离,对测定结果无干扰。因此,选用二甲亚砷为提取溶剂。

3.2 进样方式选择

顶空进样通常在低温下进行,不仅可减少样品及溶剂对色谱系统的干扰和污染,还可延长色谱柱的使用寿命,优势明显。本试验中各待测残留溶剂的沸点相差较

表3 样品中有机溶剂残留量测定结果($n=3$, %)

Tab. 3 Content determination of the residual organic solvents in the sample($n=3$, %)

批号	乙醇	丙酮	异丙醇	二氯甲烷	四氢呋喃	甲苯	N, N -二甲基甲酰胺
20190802	0.01	-	-	-	-	-	-
20190807	0.01	-	-	-	-	-	-
20190812	0.01	-	-	-	-	-	-
20190819	0.01	-	-	-	-	-	-
20170627	-	-	-	-	-	-	-
20190820	0.01	-	-	-	-	-	-
20190829	-	-	-	-	-	-	-

注:- 为未检出。

Note: - means not detected.

大,特别是二氯甲烷的沸点为 39.8 °C,极易挥发,受温度影响明显,非常适合选用顶空进样方式。虽然 N, N -二甲基甲酰胺的沸点较高,更适合直接进样,但试验发现,顶空进样不影响其检测结果的准确度,故最终选用顶空进样方式。

3.3 色谱柱选择

由于拉帕替尼各残留溶剂极性差异较大,甲苯极性非常弱,不溶于水,通常被近似认为非极性分子;而 N, N -二甲基甲酰胺属强极性溶剂,极性仅次于水。因此,考察了 INNOWAX 型、HP-5 型、AT-5 型、DB-WAXETR 型、DB-624 型等多种不同极性的气相色谱柱,结果采用 DB-624 型色谱柱时,各待测成分色谱峰分离良好,峰形尖锐对称,无拖尾、漏检,与其他峰无干扰,故选择 DB-624 型毛细管色谱柱。

3.4 方法评价

本研究中建立的同时测定拉帕替尼原料药中乙醇、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、 N, N -二甲基甲酰胺 7 种有机溶剂残留量的顶空 GC 法,操作简便,结果准确,重复性好,可用于拉帕替尼原料药中有机溶剂残留量的控制。

参考文献

[1] LI Y, GONG C, LU Q, et al. Real-World data of triplet combina-