

顶空气相色谱法测定阿哌沙班原料药中有机溶剂残留

刘东方¹, 郭秀财², 赵丽娜^{2*}, 靳朝东^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: 目的 建立测定阿哌沙班原料药中可能残留的 12 种有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇、叔丁基甲醚、二氯甲烷、醋酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺、原甲酸三甲酯、吗啉、*N,N*-二甲基甲酰胺)的检测方法。方法 采用顶空气相色谱法, 色谱柱为 DB-624 毛细管柱(30.0 m×0.53 mm×3.00 μm), 载气为高纯度氮气; 顶空温度为 100 °C, 顶空平衡时间为 20 min; 柱温 40°C, 维持 6 min, 以 20°C/min 升至 220°C, 维持 10 min; 氢火焰离子化检测器(FID), 进样口温度为 250 °C, 检测器温度为 250 °C, 体积流量为 2.8 mL/min, 分流比为 5:1。结果 在考察的浓度范围内线性关系良好($r=0.9994\sim0.9999$), 12 种残留溶剂均完全分离, 精密度试验 RSD 值以及被测组分的平均回收率均符合要求。结论 该气相色谱法操作简单, 准确度、灵敏度高, 可用于检测阿哌沙班原料药中残留的有机溶剂。

关键词: 阿哌沙班; 顶空气相色谱; 有机残留溶剂

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)01-0063-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.01.011

Determination of residual organic solvents in Apixaban bulks drug by headspace gas chromatography

LIU Dong-fang¹, GUO Xiu-cai², ZHAO Li-na², JIN Chao-dong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of the twelve residual organic solvents, including methanol, ethanol, acetone, isopropanol, tert-Butyl methyl ether, dichloromethane, acetic ether, tetrahydrofuran, triethylamine, trimethyl orthoformate, morpholine, *N,N*-Dimethylformamide in Apixaban bulks drug. **Methods** Gas head-space chromatography was applied to this study. The column was DB-624 silica capillary column (30.0 m × 0.53 mm × 3.00 μm) and the carrier gas was high purity nitrogen; The vial temperature was 100 °C, and the vial time was 20 min. The Column temperature was kept at 40 °C for 6 min, then the temperature was raised to 220 °C at the rate of 20 °C/min and subsequently sustained for 10 min. FID detector temperature and injection temperature were both 250 °C. The N_2 flow rate was 2.8 mL/min. Split ratio was 5:1. **Results** Twelve kinds of solvents were completely separated and determined with a good linearity ($r = 0.9994\sim0.9999$). The RSD values of precision experiments and the average recovery was in line with the requirements. **Conclusion** The analytical method is simple, accurate and sensitive, which could be used for determination of residual organic solvents in Apixaban bulks drug.

Key words: Apixaban; headspace gas chromatography; residual organic solvents

阿哌沙班是一种新型的口服直接 Xa 因子抑制剂^[1], 由百时美施贵宝公司和辉瑞公司联合研制^[2]。目前, 阿哌沙班已获欧盟及美国在内的多个国家批准, 用于降低非瓣膜性房颤患者中风和全身性栓塞的风险^[3-4]。此外, 还可用于降低已接受择期髋关节

或膝关节置换手术成人患者的静脉血栓栓塞^[5]、深静脉血栓或肺血栓^[6]、癌症患者静脉血栓^[7]形成的风险, 并对血栓栓塞具有较好的治疗效果。在该原料药的合成和精制过程中, 需要用到二氯甲烷、四氢呋喃、乙醇、异丙醇、甲醇、丙酮、醋酸乙酯、

收稿日期: 2016-10-20

作者简介: 刘东方(1988—), 女, 河南省新乡市, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。Tel: 17612206832 E-mail: 1558090948@qq.com

*通信作者: 靳朝东, 男, 研究员, 硕士生导师, 研究方向为药物分析。Tel: (022) 23006877 E-mail: jincd@tjipr.com

赵丽娜, 女, 助理研究员, 研究方向为药物分析。Tel: 13821855931 E-mail: 13821855931@163.com

叔丁基甲醚、吗啉、三乙胺、DMF、原甲酸三甲酯 12 种溶剂。这些残留溶剂对人体健康有一定的影响, 需要除去或者使其残留的量不超过 2015 年版《中国药典》规定的限度。因此, 本实验建立了测定阿哌沙班原料药中可能残留的 12 种有机溶剂的气相色谱检测方法, 结果表明, 该方法分离度良好, 灵敏度高, 在考察的浓度范围内线性关系良好, 回收率符合规定, 耐用性良好, 可作为阿哌沙班原料药中残留溶剂的检测方法。

1 仪器与试剂

Agilent 7890B 气相色谱仪; Agilent 7697A 顶空进样器; 氢火焰离子化检测器 (FID); HG-Model300A 色谱专用氢气发生器; AIR-Model-5L 色谱专用空气压缩机(天津市色谱科学技术公司); Open LBA CDS Chem Station Edition 工作站; Sartorius BP211D 电子分析天平。

甲醇、乙醇、异丙醇、二氯甲烷、醋酸乙酯、四氢呋喃、DMF (分析纯, 天津市康科德科技有限公司); 丙酮 (分析纯, 天津市凯信化学工业有限公司); 叔丁基甲醚 (分析纯, 天津市化学试剂三厂); 三乙胺、原甲酸三甲酯 (分析纯, 天津市光复科技发展有限公司); 吗啉 (分析纯, 天津市化学试剂批发公司)。阿哌沙班原料药由天津药物研究院化药部自制 (质量分数 $\geq 99.0\%$), 批号分别为 160310、160706、160707。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

DB-624 毛细管柱 (30.0 m $\times$ 0.53 mm $\times$ 3.00

μm), 升温程序为 40 $^{\circ}\text{C}$ 维持 6 min, 以 20 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 升至 220 $^{\circ}\text{C}$, 维持 10 min, 进样口温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 检测器温度为 250 $^{\circ}\text{C}$, 检测器为 FID, 载气为高纯度氮气, 体积流量 2.8 mL/min, 分流比 5:1, 顶空条件: 平衡温度 100 $^{\circ}\text{C}$, 加热 20 min, 定量环 110 $^{\circ}\text{C}$, 传输线 120 $^{\circ}\text{C}$, 自动顶空进样, 定量环 1 mL。溶剂为 *N*-甲基吡咯烷酮 (阿拉丁, HPLC 测质量分数 $\geq 99.5\%$)。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照溶液的配制 分别精密移取二氯甲烷、四氢呋喃、乙醇、异丙醇、吗啉、三乙胺、DMF、甲醇、丙酮、醋酸乙酯、叔丁基甲醚、原甲酸三甲酯适量至 100 mL 量瓶中, 加溶剂稀释定容, 摇匀, 配制成质量浓度分别为 0.6、0.72、5、5、1、0.32、0.88、3、5、5、5、1 mg/mL 对照品储备液。再精密量取对照储备液 5 mL, 加溶剂稀释定容至 100 mL 量瓶中, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取阿哌沙班原料药 100 mg, 置 10 mL 顶空瓶中, 加入 2 mL 溶剂, 加盖密封, 即得。

2.3 系统适用性试验

取对照溶液, 精密量取 2 mL 置 10 mL 顶空瓶中, 加盖密封, 平行配制 6 份, 进样测定。结果各组分的分离度均大于 1.5, 峰面积 RSD 均小于 10%, 理论塔板数均大于 5 000, 符合规定。色谱图见图 1。

2.4 定量限

2.4.1 定量限的确定 分别精密移取甲醇、乙醇、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、原甲酸三甲酯、吗啉、

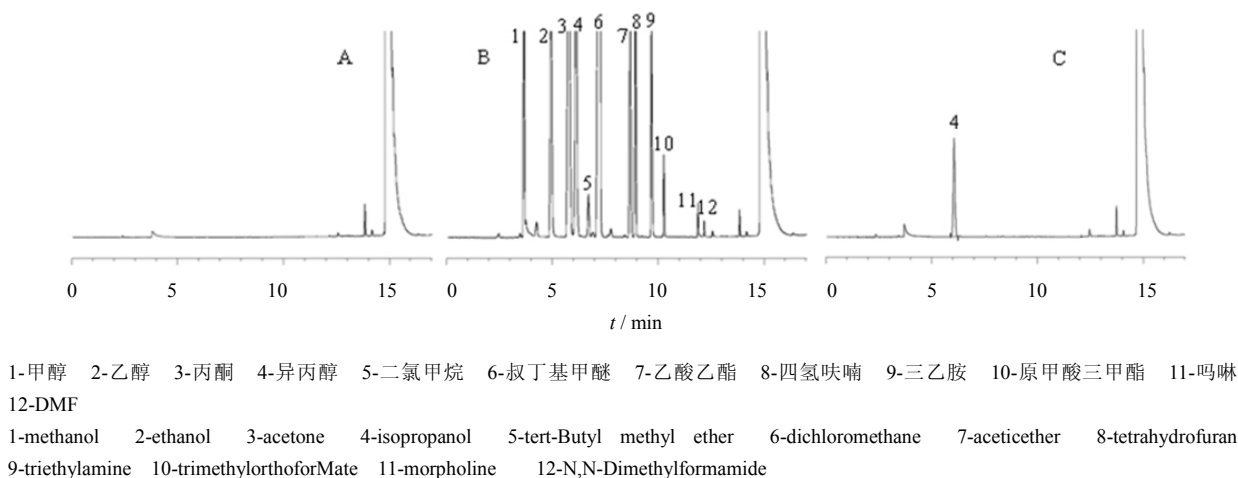


图1 空白(A)、对照溶剂(B)和阿哌沙班原料药(C)的GC图谱

Fig. 1 GC chromatograms of blank solution (A), reference substance solvents (B), and Apixaban bulks drug (C)

DMF、叔丁基甲醚、醋酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺适量至同一 25 mL 量瓶,加溶剂稀释定容,摇匀,作为溶液 A。将溶液 A 用溶剂逐步稀释,直至信噪比为 10,计算所测溶剂的定量限,结果见表 1。

2.4.2 定量限精密度 平行配制 6 份定量限溶液,计算各成分峰面积的 RSD 值,结果见表 1。

2.4.3 定量限回收率 取对照溶液 2 mL 置 10 mL 顶空瓶中,加盖密封,平行配制 2 份对照溶液;称取样品 100 mg 置 10 mL 顶空瓶中,加入 2 mL 溶剂,加盖密封,平行配制 2 份样品溶液;样品加定量限溶液:称取样品 100 mg 置 10 mL 顶空瓶中,平行 3 份,分别加入定量限溶液 2 mL,加盖密封,对照和样品溶液分别进 2 针,加定量限溶液进样 3 针测定,使用外标法计算回收率,结果见表 1。

$$\text{测得量} = A_1 / A_{\text{对}} \times C_{\text{对}}$$

$$\text{质量分数} = A_2 / A_{\text{对}} \times C_{\text{对}} / C_2$$

$$\text{原始量} = C_1 \times \text{质量分数}$$

$$\text{加入量} = C_3$$

$$\text{回收率} = (\text{测得量} - \text{原始量}) / \text{加入量}$$

式中, $A_{\text{对}}$ 为对照溶液中各溶剂峰面积; A_1 为样品加定量限溶液各溶剂峰面积; A_2 为样品溶液中含有的溶剂峰面积; $C_{\text{对}}$ 为对照溶液中各溶剂质量浓度; C_1 为样品加定量限溶液质量浓度; C_2 为样品溶液质量浓度; C_3 为各溶剂定量限的质量浓度。

2.5 检出限

将定量限溶液用溶剂逐步稀释,直至信噪比为 3,计算所测溶剂的检出限,结果表明,二氯甲烷、四氢呋喃、乙醇、异丙醇、吗啉、三乙胺、DMF、甲醇、丙酮、醋酸乙酯、叔丁基甲醚、原甲酸三甲酯检出限分别为 1.154、0.2206、0.8968、0.9448、

表 1 定量限考察结果

Table 1 Results of LOQ test

溶剂	定量限/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	定量限精密 度/%	定量限回收率 /%
二氯甲烷	5.768	1.16	98.34
四氢呋喃	1.103	0.81	95.45
乙醇	4.484	1.18	100.40
异丙醇	4.724	1.13	96.56
吗啉	20.01	2.11	90.70
三乙胺	0.698	1.08	103.51
DMF	23.54	4.85	93.08
甲醇	4.804	3.18	98.75
丙酮	2.680	0.66	90.24
醋酸乙酯	1.714	0.85	100.84
叔丁基甲醚	0.80	0.47	95.98
原甲酸三甲酯	4.296	0.60	103.57

4.002、0.1396、4.708、0.9608、0.5360、0.3428、0.1600、0.8592 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 线性关系考察

取对照储备液 5 mL 至 25 mL 量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀;分别移取 1.25、2.00、2.50、3.00、6.25 mL 置不同 10 mL 量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀;定量限浓度参考“2.4 定量限”,进样测定。结果表明,各溶剂在一定浓度范围内线性关系良好,结果见表 2。

2.7 方法精密度试验

对照溶液:取对照溶液 2 mL 置 10 mL 顶空瓶中,加盖密封,平行配制 2 份。

样品溶液:称取样品 100 mg 至 10 mL 顶空瓶中,加入 2 mL 溶剂,加盖密封,平行配制 6 份,结果表明,样品中只检测出异丙醇,异丙醇质量分数的 RSD 为 2.64%。

表 2 线性关系考察结果

Table 2 Results of linearity test

有机溶剂	回归方程	r	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
二氯甲烷	$A = -1.7792 + 3.054C$	0.999 8	5.768~79.88
四氢呋喃	$A = -10.578 + 13.835C$	0.999 7	1.103~94.54
乙醇	$A = -20.992 + 3.7299C$	0.999 7	4.484~629.5
异丙醇	$A = -23.716 + 3.998C$	0.999 7	4.724~623.7
吗啉	$A = -5.2346 + 1.0059C$	0.999 6	20.01~134.9
三乙胺	$A = -10.16 + 25.226C$	0.999 6	0.698~41.64
DMF	$A = 1.6016 + 0.369C$	0.999 5	23.54~122.1
甲醇	$A = -8.6058 + 3.4542C$	0.999 9	4.804~373.4
丙酮	$A = -64.875 + 12.308C$	0.999 7	2.680~620.5
醋酸乙酯	$A = -36.463 + 7.944C$	0.999 8	1.714~621.5
叔丁基甲醚	$A = -236.81 + 33.136C$	0.999 4	0.80~632.2
原甲酸三甲酯	$A = -2.4425 + 2.3042C$	0.999 7	4.296~129.7

样品加对照溶液：称取样品 100 mg 至 10 mL 顶空瓶中，加入对照溶液 2 mL，加盖密封，平行配制 6 份，进样测定，计算各溶剂 RSD 值，结果见表 3。

2.8 中间精密度

配制方法同 2.7，由另一人员在另外一台仪器上完成；样品溶液测定结果表明，异丙醇质量分数的 RSD 为 2.12%，两台仪器异丙醇质量分数的 RSD 为 4.46%。样品加对照溶液结果见表 3。

表 3 精密度试验结果

Table 3 Results of precision test

溶剂	RSD/%		
	仪器1	仪器2	两台仪器
二氯甲烷	1.09	1.68	1.87
四氢呋喃	0.67	1.25	1.51
乙醇	1.66	2.72	2.62
异丙醇	2.72	2.71	3.39
吗啉	1.02	1.33	4.12
三乙胺	0.39	1.43	1.89
DMF	3.93	3.76	4.70
甲醇	2.89	2.26	2.48
丙酮	0.67	1.24	1.60
醋酸乙酯	0.38	1.43	1.59
叔丁基甲醚	0.89	0.76	1.81
原甲酸三甲酯	1.96	2.35	2.30

2.9 回收率试验

对照溶液：取对照溶液 2 mL 置 10 mL 顶空瓶中，加盖密封，平行配制 2 份。

样品溶液：称取样品 100 mg 置 10 mL 顶空瓶中，加入 2 mL 溶剂，加盖密封，平行配制 2 份。

80%、100%、120%的回收率溶液配制：取对照储备液 10 mL 置 50 mL 量瓶，加入溶剂稀释定容，作为 A 溶液；从 A 溶液中分别移取 2.0、2.5、3.0 mL 至 10 mL 量瓶，加入溶剂稀释定容，摇匀，各平行配制 3 份；称取样品 100 mg 至 10 mL 顶空瓶，平行 9 份，分别加入各上述配置好的溶液 2 mL，加盖密封，进样测定。结果见表 4。

2.10 耐用性试验

试验表明，顶空温度、检测器温度、进样口温度、平衡时间、升温速率发生微小变化时，对照溶液中各溶剂的峰面积 RSD 值在 2.18%~4.63%。方法耐用性良好。

2.11 稳定性试验

由于样品以 *N*-甲基吡咯烷酮为溶剂时，常温状态下 50 mg/mL 尚不能溶解，因此，未考察样品溶液的稳定性。

对照溶液稳定性试验：分别考察了 0、1、2、4、8、20、30 d 稳定性，试验表明，各溶剂 30 d 内稳定性良好。结果见表 5。

表 4 回收率试验结果

Table 4 Results of recovery test

溶剂	平均回收率/%	RSD/%
二氯甲烷	103.04	1.85
四氢呋喃	101.13	1.26
乙醇	104.64	2.14
异丙醇	107.84	2.50
吗啉	104.10	2.22
三乙胺	104.54	1.21
DMF	94.06	3.28
甲醇	101.69	2.69
丙酮	101.60	1.39
醋酸乙酯	103.13	1.55
叔丁基甲醚	101.67	0.68
原甲酸三甲酯	105.10	2.65

表 5 稳定性试验结果

Table 5 Results of stability test

溶剂	RSD/%
二氯甲烷	2.23
四氢呋喃	1.83
乙醇	1.73
异丙醇	1.91
吗啉	3.92
三乙胺	3.27
DMF	3.48
甲醇	3.77
丙酮	1.84
醋酸乙酯	1.87
叔丁基甲醚	2.28
原甲酸三甲酯	1.98

2.12 样品测定

分别精密称定 160310、160706、160707 批阿哌沙班原料药各 100 mg，置 10 mL 顶空瓶中，加入 2 mL 溶剂，加盖密封，进样测定，采用外标法计算，结果见表 6。阿哌沙班原料药中有机溶剂残留限度参考 2015 年版《中国药典》^[8]及国际人用药品注册技术协调大会（ICH）等相关指导原则和文献，最后设定控制标准：二氯甲烷、四氢呋喃、乙醇、异丙醇、DMF、甲醇、丙酮、醋酸乙酯、叔丁基甲醚、吗啉、三乙胺、原甲酸三甲酯的限度分别为 0.06%、0.072%、0.5%、0.5%、0.088%、0.3%、0.5%、0.5%、0.5%、0.1%、0.032%、0.1%。结果表明，3 批样品中异丙醇残留量不超过规定限度，其他溶剂均未检出。

表6 阿哌沙班原料药中有机溶剂残留测定结果

Table 6 Determination of residual organic solvents in Apixaban bulks drug

残留溶剂	残留量/%		
	160310	160706	160707
二氯甲烷	未检出	未检出	未检出
四氢呋喃	未检出	未检出	未检出
乙醇	未检出	未检出	未检出
异丙醇	0.148	0.146	0.150
三乙胺	未检出	未检出	未检出
吗啉	未检出	未检出	未检出
DMF	未检出	未检出	未检出
甲醇	未检出	未检出	未检出
丙酮	未检出	未检出	未检出
醋酸乙酯	未检出	未检出	未检出
叔丁基甲醚	未检出	未检出	未检出
原甲酸三甲酯	未检出	未检出	未检出

3 讨论

3.1 溶剂的选择

考察了 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基亚砜 (DMSO)、*N,N*-二甲基乙酰胺、*N*-甲基吡咯烷酮、水 5 种溶剂, 常温条件下, 发现样品在以上溶剂中均不溶解; 70℃ 水浴加热条件下, 样品能在 *N*-甲基吡咯烷酮中完全溶解。考虑到样品溶解性问题及各残留溶剂沸点, 选择 *N*-甲基吡咯烷酮作为溶剂。

3.2 温度的选择

考察了 250℃、280℃ 两个检测器温度, 发现 280℃ 比 250℃ 基线噪音大; 考察了 40℃、45℃ 两个起始温度, 发现 40℃ 比 45℃ 分离度更好。

3.3 分流比的选择

考察了分流比为 1:1、5:1、10:1 三个条件, 发现分流比为 5:1 时, 灵敏度较高, 溶剂噪音尚可接受, 因此确定分流比为 5:1。

3.4 体积流量的选择

考察了 3、2.8 mL/min 两个体积流量条件, 发现流速为 2.8 mL/min 时, 各溶剂分离度更好。

3.5 测定结果分析

检测结果表明, 3 批样品中二氯甲烷、四氢呋喃、乙醇、吗啉、三乙胺、DMF、甲醇、丙酮、醋酸乙酯、叔丁基甲醚、原甲酸三甲酯均未检出, 异丙醇残留量未超过限度标准。该 12 种溶剂均是合成阿哌沙班原料药的工艺杂质, 本次试验旨在建立一

个全面的检测方法对阿哌沙班原料药予以控制。

4 结论

2015 年版《中国药典》四部通则 0861 规定, 二氯甲烷、甲醇、四氢呋喃、DMF 为第二类残留溶剂, 限度分别为 0.06%、0.3%、0.072%、0.088%, 该 4 种残留溶剂对人体有一定的毒性, 应限量使用; 醋酸乙酯、叔丁基甲醚、乙醇、异丙醇、丙酮为第三类残留溶剂, 危害性比第二类残留溶剂较小, 因此限度均为 0.5%。药典上未规定吗啉、三乙胺、原甲酸三甲酯的残留限度, 并且这 3 种残留溶剂检测的相关文献报道较少, 本实验根据 ICH 对阿哌沙班原料药残留溶剂的规定及项目需求, 设定三者的限度分别为 0.1%、0.032%、0.1%。本实验采用顶空气相色谱法对阿哌沙班原料药相关的 12 种残留溶剂进行检测, 方法学验证证明该方法分离度良好, 灵敏度高, 在考察的浓度范围内线性关系良好, 回收率符合规定, 耐用性良好, 可作为阿哌沙班原料药中残留溶剂的质量控制方法。

参考文献

- [1] Tomari S, Homma K, Noguchi T, et al. Development of Interstitial Lung Disease after Initiation of Apixaban Anticoagulation Therapy [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2016, 25: 1767-1769.
- [2] 许 昕, 薛晓文. 开发中的新型口服抗凝血药-Xa 因子抑制剂 [J]. 药学与临床研究, 2010, 18(3): 294-298.
- [3] Connolly S J, Eikelboom J, Joyner C, et al. Apixaban in patients with atrial fibrillation [J]. New Engl J Med, 2011, 364(9): 806-817.
- [4] Granger C B, Alexander J H, McMurray J J V, et al. Apixaban versus warfarin in patients with atrial fibrillation [J]. New Engl J Med, 2011, 365(11): 981-992.
- [5] Lassen M R, Gallus A, Raskob G E, et al. Apixaban versus enoxaparin for thromboprophylaxis after hip replacement [J]. New Engl J Med, 2010, 363(26): 2487-2498.
- [6] Agnelli G, Buller H R, Cohen A, et al. Oral apixaban for the treatment of acute venous thromboembolism [J]. New Engl J Med, 2013, 369(9): 799-808.
- [7] Agnelli G, Buller H R, Cohen A, et al. Oral apixaban for the treatment of venous thromboembolism in cancer patients: results from the AMPLIFY trial [J]. J Thromb Haemost, 2015, 13(12): 2187-2191.
- [8] 中国药典 [S]. 四部. 2015.