

DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.202102004



米诺膦酸原料药中 4 种有机残留溶剂 的毛细管气相色谱法测定

杨镇伟¹, 林琪¹, 吴振², 刘智阳³, 王立强¹

(1. 华侨大学 生物医学学院, 福建 泉州 362021;

2. 厦门大学 药学院, 福建 厦门 361102;

3. 中铭生物(深圳)集团有限公司, 广东 深圳 518101)

摘要: 建立对米诺膦酸原料药中的乙醇、甲醇、二氯甲烷、甲苯等 4 种残留溶剂含量的毛细管气相色谱测定方法. 采用安捷伦 DB-624(0.32 mm×30 m, 3 μm)色谱柱, 固定液为 6% 氰丙基苯基+94% 二甲基聚硅氧烷, 载气为 N₂, 检测器为火焰离子化检测仪(FID), 进样口温度为 250 ℃, 检测器温度为 200 ℃, 柱温为程序升温, 初始温度 40 ℃, 保持 3 min, 以每分钟 15 ℃ 升温至 200 ℃, 并保持 10 min; 以 *N,N*-二甲基甲酰胺作为主要溶剂, 采用直接进样法测定 4 种溶剂的残留量. 结果表明: 4 种残留溶剂的色谱峰分离度良好, 在一定范围内呈良好线性关系($R^2 > 0.998$), 乙醇、甲醇、二氯甲烷和甲苯的检测限分别为 0.029, 0.052, 0.051, 0.051 ng, 平均回收率均在 96.71%~112.37% 的范围内, 相对标准偏差(RSD)均小于 5%; 米诺膦酸 3 批小试样品中均未检出乙醇、甲醇、二氯甲烷和甲苯等 4 种残留溶剂. 本检测方法灵敏度高、准确度良好, 可作为米诺膦酸原料药中有机溶剂残留量的检测方法.

关键词: 米诺膦酸; 残留溶剂; 毛细管气相色谱法; *N,N*-二甲基甲酰胺

中图分类号: R 917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2022)01-0096-06

Capillary Gas Chromatography Determination of Four Organic Residual Solvents in Minodronic Acid Bulk Drugs

YANG Zhenwei¹, LIN Qi¹, WU Zhen²,
LIU Zhiyang³, WANG Liqiang¹

(1. School of Medicine, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China;

3. Zhongming Biology (Shenzhen) Group Company Limited, Shenzhen 518101, China)

Abstract: A capillary gas chromatography method was established for the determination of 4 organic residual solvents (ethanol, methanol, dichloromethane, and toluene) in minodronic acid bulk drugs. The Agilent DB624 (0.32 mm×30 m, 3 μm) chromatographic column was used and the parameters were set as: the stationary liquid was 6% cyanopropylphenyl-94% dimethylpolysiloxane, the carrier gas was N₂, the detector was flame ionization detector (FID), the injection port temperature was 250 ℃, the detector temperature was 200 ℃, the column temperature was programmed with the initial temperature 40 ℃ (maintained for 3 min), and

收稿日期: 2021-02-02

通信作者: 王立强(1970-), 男, 教授, 博士, 主要从事药剂学和创新药物的研究. E-mail: wlq1599@163.com.

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFE0101700); 福建省高校产学研合作项目(2019Y4007); 福建省泉州市科技计划项目(2020SY001); 华侨大学研究生科研创新能力培育计划项目(18013071019)

the temperature was increased to 200 ℃ at 15 ℃ per minute and maintained for 10 min. Using *N,N*-dimethyl-formamide as the main solvent, the residual of 4 organic solvents was determined by direct injection method. The results show that the chromatographic peaks of the four organic solvents were well separated. It has a good linear relationship in a certain range($R^2>0.998$), and the detection limits of ethanol, methanol, dichloromethane and toluene were 0.029, 0.052, 0.051, 0.051 ng, respectively. The average recoveries were in the range of 96.71%-112.37% with relative standard deviation (RSD) less than 5%. Four residual solvents, including ethanol, methanol, dichloromethane and toluene were not detected in 3 batches of minodronic acid samples. This detection method has high sensitivity and accuracy, and can be used as a detection method for residual organic solvents in minodronic acid bulk drugs.

Keywords: minodronic acid; residual organic solvent; capillary gas chromatography method; *N,N*-dimethyl-formamide

米诺膦酸(minodronic acid)是一种双膦酸盐化合物,为日本小野药品株式会社和日本 Astellas 制药株式会社共同研究开发,可用于治疗原发性和继发性骨质疏松症^[1]. 作为第三代双膦酸盐类抗骨吸收剂,米诺膦酸能够抑制破骨细胞法尼焦磷酸合成酶(FPP)的活性,降低骨转换,进而防治骨质疏松^[2-4]. 据文献报道,其抑制骨吸收的体外活性约为依地膦酸盐的 10 000 倍,阿仑膦酸盐的 10~100 倍^[5]. 在诸多药物的合成过程中需使用有机溶剂,这些有机溶剂对人体存在不同程度的毒性,当原料药及制剂中残留有机溶剂超过安全水平,则会对人体造成损害. 因此,为了提高药物的安全性,对原料药及制剂中残留溶剂的检测至关重要.

目前,国内已有对米诺膦酸含量测定及有关物质测定的报道^[6-8],米诺膦酸也有多种合成路线^[9-10]. 然而,有关米诺膦酸中残留溶剂检测的报道仅有吴素平等^[11],即对四氢呋喃、乙酸乙酯、甲醇、乙腈和甲苯等 5 种残留溶剂进行检测,其检测限分别为 0.16, 0.10, 1.19, 0.22, 0.02 μg · mL⁻¹. 甲醇、二氯甲烷和甲苯属于第二类有机溶剂,乙醇属第三类有机溶剂,目前尚无长期毒性试验结果. 关于药物中乙醇、甲醇、二氯甲烷和甲苯等残留溶剂检测的报道有许多,如张巍等^[12]对依帕司他中有机残留溶剂的检测,裴丽娟等^[13]对布南色林原料药中 9 种有机残留溶剂的检测等. 但这些对乙醇、甲醇、二氯甲烷、甲苯等残留溶剂的检测限均较高. 本文采用袁淑杰米诺膦酸合成新工艺制备米诺膦酸原料药^[14],并对合成过程中使用的乙醇、甲醇、二氯甲烷、甲苯等 4 种有机残留溶剂进行定量分析.

1 实验部分

1.1 实验仪器

毛细管气相色谱仪(氢火焰离子检测器,浙江福立分析仪器股份有限公司);电子天平(德国赛多利斯科学仪器有限公司);超声波清洗仪(河南省巩义市予华仪器有限责任公司)

1.2 实验材料

乙醇、甲醇、二氯甲烷、甲苯均为色谱级,水为超纯水,其余试剂均为市售分析纯.

1.2 实验方法

- 1.1.1 色谱条件 采用安捷伦 DB-624(0.32 mm×30 m, 3 μm)色谱柱;固定液为 6% 氰丙基苯基-94% 二甲基聚硅氧烷;初始温度为 40 ℃,保持 3 min,以 15 ℃ · min⁻¹持续升温至 200 ℃,并保持 10 min;检测器温度为 200 ℃,进样口温度为 250 ℃,载气为 N₂,柱流量为 1.5 mL · min⁻¹;采用直接进样法测定.
- 1.1.2 溶液的配制 1) 供试品溶液的配制. 分别精密称取乙醇、甲醇、二氯甲烷和甲苯,置于 100 mL 量瓶中,用 *N,N*-二甲基甲酰胺分别稀释制备成浓度为 0.500, 0.300, 0.060 和 0.089 mg · mL⁻¹ 的溶液,作为峰定位试验的供试品溶液. 2) 线性母液的配制. 分别精密称取乙醇、甲醇、二氯甲烷和甲苯,用 *N,N*-二甲基甲酰胺分别稀释制备成浓度为 50.0, 30.0, 6.0 和 8.9 mg · mL⁻¹ 的溶液,作为线性母液. 3) 混合溶液的配制. 分别精密称取乙醇、甲醇、二氯甲烷和甲苯,用 *N,N*-二甲基甲酰胺稀释制备成浓度分别为 50.0, 30.0, 6.0 和 8.9 mg · mL⁻¹ 的混合溶液. 4) 对照品母液的配制. 分别精密称取乙醇、甲醇、二氯甲烷和甲苯,用 *N,N*-二甲基甲酰胺分别稀释制备成浓度为 5.00, 3.00, 0.60 和 0.89 mg ·

mL^{-1} 的溶液,作为对照品母液.

2 实验结果与分析

2.1 系统适应性考察

分别精密量取 $1\ \mu\text{L}$ 供试品溶液及 N,N -二甲基甲酰胺,注入毛细管气相色谱仪,其毛细管气相色谱(GC)图如图 1(a)~(e)所示. 图 1(a)~(e)中: A 为峰面积; t 为洗脱时间,下同略. 由图 1(a)~(e)可知:乙醇的保留时间为 $5.116\ \text{min}$,甲醇的保留时间为 $4.359\ \text{min}$,二氯甲烷的保留时间为 $6.130\ \text{min}$,甲苯的保留时间为 $11.138\ \text{min}$, N,N -二甲基甲酰胺的保留时间为 $12.405\ \text{min}$.

精密量取 $1\ \text{mL}$ 混合溶液于容量瓶,用 N,N -二甲基甲酰胺定容至刻度,摇匀,取 $1\ \mu\text{L}$ 注入毛细管气相色谱仪,其毛细管气相色谱(GC)图如图 1(f)所示. 由图 1(f)可知:本品各主峰之间的分离度均符合规定. 因此,上述毛细管气相色谱条件,可用于本品的溶剂残留检查.

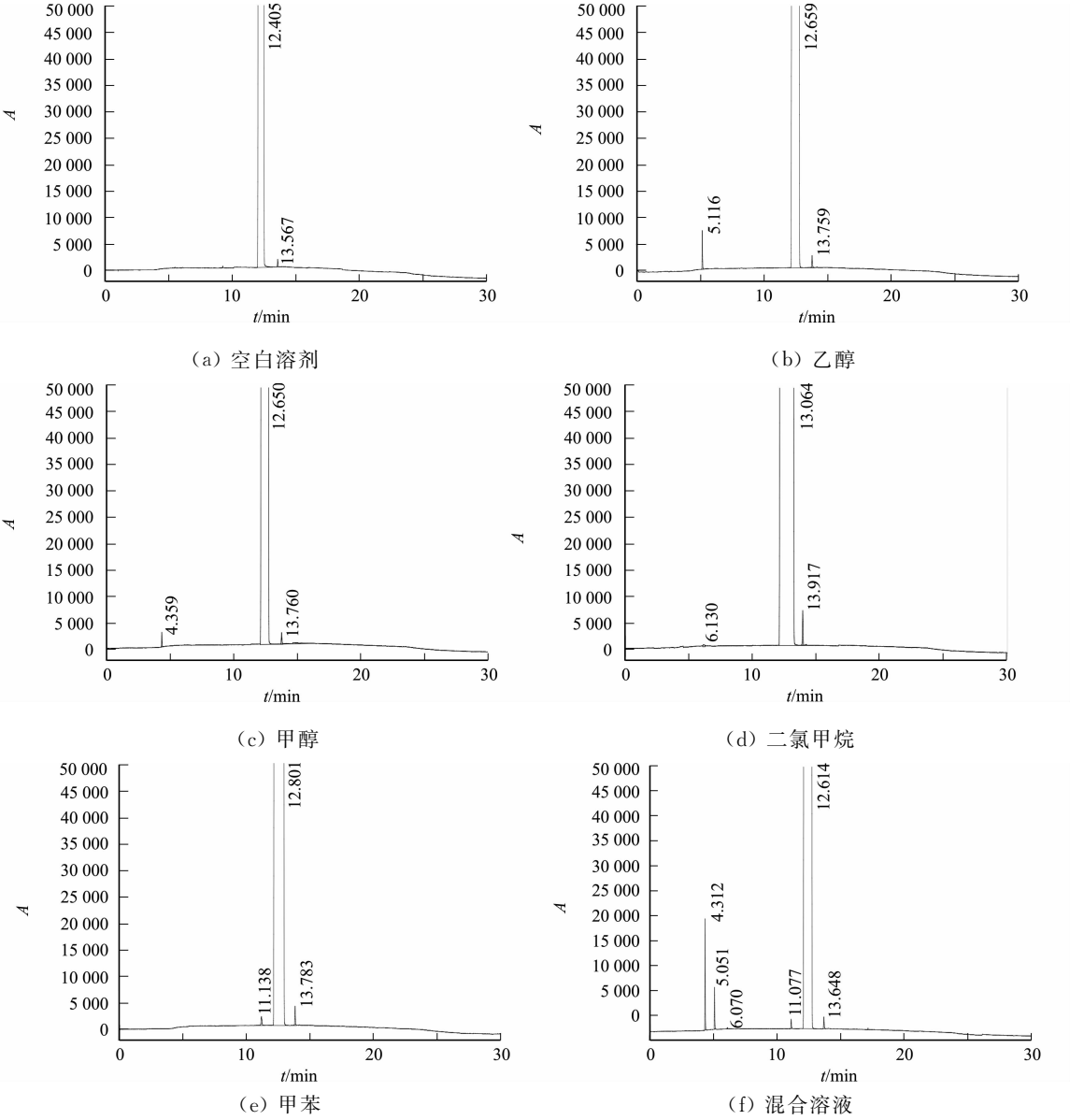


图 1 不同溶液的毛细管气相色谱图

Fig. 1 Capillary gas chromatograms of different solutions

2.2 线性关系和检出限的考察

分别精密量取 $0.2, 0.5, 1.0, 2.0$ 和 $4.0\ \text{mL}$ 的中线性母液,放置于 $100\ \text{mL}$ 量瓶中,用 N,N -二甲基甲酰胺稀释定容,并振荡摇匀,作为线性溶液. 然后,分别精密量取 $1\ \mu\text{L}$ 线性溶液,进样,记录色谱图

及峰面积. 以各个峰面积(A)作为纵坐标, 以线性溶液的浓度(c)作为横坐标, 进行线性回归, 计算线性回归方程及相关系数(R^2). 4 种溶剂分别用 N,N -二甲基甲酰胺稀释直至峰高与基线噪音的比值约为 3 时, 记录样品浓度即检测限, 结果见表 1 所示.

表 1 不同溶剂的线性关系及其检出限

Tab. 1 Linear relationship of different solvents and their detection limits

名称	回归方程	R^2	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	检出限/ ng
乙醇	$Y=357\ 590X+8\ 133.8$	0.998 0	0.100 28~2.005 6	0.029
甲醇	$Y=106\ 063X+2\ 603.6$	0.998 9	0.079 8~1.203 6	0.052
二氯甲烷	$Y=8\ 087X+3.686$	0.999 1	0.016 8~0.245 4	0.051
甲苯	$Y=50\ 056X+459.0$	0.999 4	0.023 0~0.368 0	0.051

2.3 精密度试验

分别精密量取 1 mL 混合溶液, 放置于 100 mL 量瓶中, 用 N,N -二甲基甲酰胺稀释定容, 并振荡摇匀. 精密量取上述溶液 1 μL , 连续进样 6 次, 记录色谱图, 计算峰面积的相对标准偏差(RSD), 结果如表 2 所示. 表 2 中: D_{RS} 为相对标准偏差. 从表 2 可知: 精密度试验结果良好.

表 2 精密度试验结果

Tab. 2 Results of precision test

溶剂	进样						$D_{\text{RS}}/\%$
	1	2	3	4	5	6	
甲醇	40 416.7	36 312.3	37 384.7	35 199.0	31 589.6	31 900.0	9.50
乙醇	16 967.0	15 564.1	16 166.7	14 848.0	13 439.8	13 613.7	9.30
二氯甲烷	506.6	440.6	494.1	427.7	471.9	404.4	8.72
甲苯	4 953.3	4 467.1	4 762.9	4 721.3	3 748.7	4 378.5	9.44

2.4 回收率试验

1) 本底值测定供试品溶液的制备. 精密称取米诺膦酸约 1.0 g, 溶解并放置于 10 mL 量瓶中, 用 N,N -二甲基甲酰胺稀释定容, 振荡摇匀, 即得. 2) 回收率供试品溶液的制备. 分别精密称取米诺膦酸 6 份, 溶解并放置于 10 mL 量瓶中, 加入 1 mL 的对照品母液, 用 N,N -二甲基甲酰胺溶解并稀释定容, 振荡摇匀, 即得. 3) 对照品溶液的制备. 精密量取对照品母液 1 mL, 放置于 10 mL 量瓶中, 用 N,N -二甲基甲酰胺稀释定容, 振荡摇匀, 即得.

分别精密量取对照品溶液、本底值测定供试品溶液和回收率供试品溶液各 1 μL , 进样, 记录色谱图及峰面积, 按照外标法计算测得量. 计算样品的回收率, 结果如表 3 所示. 表 3 中: m_1 为加入量; m_2 为测定量; η 为回收率; D_{RS} 为相对标准偏差. 从表 3 可知: 本品的回收率试验结果良好.

表 3 回收率试验结果

Tab. 3 Recovery test results

溶剂	m_1/mg	m_2/mg	$\eta/\%$	$D_{\text{RS}}/\%$	溶剂	m_1/mg	m_2/mg	$\eta/\%$	$D_{\text{RS}}/\%$
乙醇	5.025 0	5.637 0	112.18	3.22	甲醇	3.128 0	3.264 0	104.35	3.63
	5.025 0	5.287 0	105.21			3.128 0	3.334 0	106.59	
	5.025 0	5.190 0	103.28			3.128 0	3.251 0	103.93	
	5.025 0	5.274 0	104.96			3.128 0	3.025 0	96.71	
	5.025 0	5.324 0	105.95			3.12 08	3.254 0	104.03	
二氯甲烷	0.603 8	0.648 5	107.40	1.84	甲苯	0.896 3	0.902 5	100.69	1.00
	0.603 8	0.668 9	110.78			0.896 3	0.900 3	100.45	
	0.603 8	0.658 7	109.09			0.896 3	0.903 6	100.81	
	0.603 8	0.678 5	112.37			0.896 3	0.899 6	100.37	
	0.603 8	0.652 9	108.13			0.896 3	0.921 4	102.80	

2.5 小试 3 批样品的残留溶剂测定

根据人用药物注册技术要求, 以及国际协调会(ICH)^[15] 和《中华人民共和国药典: 四部(2020 年版)》^[16] 中甲醇的限量不超过 0.3%, 乙醇的限量不超过 0.5%, 二氯甲烷的限量不超过 0.06%, 甲苯的限量不超过 0.089%. 按照色谱条件对本品 3 批小试样品进行溶剂残留测定, 如表 4 所示. 从表 4 可知:

3 批小试样品中均未检出 4 种残留溶剂,表明小试 3 批样品的上述溶剂残留均符合规定.

2.6 溶剂选择

为了精确检测米诺膦酸原料药中残留溶剂的含量,需选择一种合适的溶剂,既能完全溶解米诺膦酸又可完全溶解有机溶剂. 因此,对二甲基亚砜、水、氢氧化钠溶液、*N,N*-二甲基甲酰胺等溶剂进行考察,结果显示米诺膦酸在二甲基亚砜中几乎不溶,在水中微溶,在氢氧化钠溶液中易溶,在 *N,N*-二甲基甲酰胺中溶解. 然而,由于碱性溶液直接进样会污染内衬管,容易损坏色谱柱,且米诺膦酸在 *N,N*-二甲基甲酰胺溶液中回收率能达到 95% 以上. 因此,文中选择 *N,N*-二甲基甲酰胺作为溶剂进行实验.

2.7 进样方式选择

根据《中华人民共和国药典: 四部(2020 年版)》^[16] 中残留溶剂测试方法,选择直接进样法. 溶液直接进样法无需前处理过程,简单快速、精密度高,且重复性好. 实验过程中测定 4 种有机溶剂的检测限,乙醇、甲醇、二氯甲烷和甲苯的检测限分别为 0.029,0.052,0.051,0.051 ng. 结果表明,该方法检测限低,灵敏度高,因此可选择溶液直接进样法进行实验.

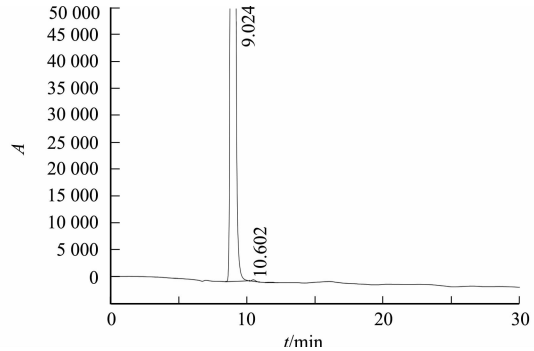
2.8 色谱柱选择

DB-1701 毛细管色谱柱是一款(14% 氰丙基-苯基)-甲基聚硅氧烷色谱柱,DB-1301 毛细管色谱柱与 DB-1701 毛细管色谱柱类似,是一款(6% 氰丙基-苯基)-甲基聚硅氧烷色谱柱,二者均具有较低至中等极性;DB-624 毛细管色谱柱则是一款高惰性色谱柱,该色谱柱可用于快速 GC/MS 分析,专门为了分析挥发性物质和残留溶剂而设计的,对活性化合物具备优良的惰性. 3 种色谱柱均经过键合交联,均可使用溶剂冲洗.

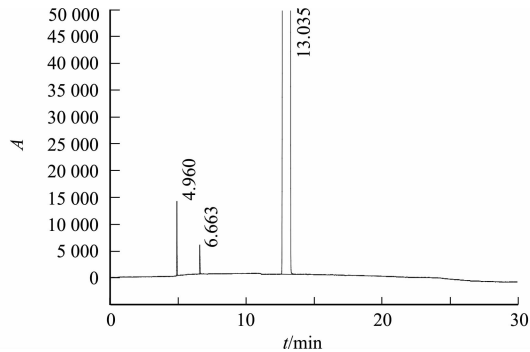
采用进样混合溶液,分别考察安捷伦 DB-624,DB-1701,DB-1301 等 3 种毛细管色谱柱的分离效果,结果如图 2 所示. 由图 2 可知:采用安捷伦 DB-1701 色谱柱得到的色谱图峰型差、灵敏度低;采用 DB-1301 色谱柱得到的色谱图峰型较好,但灵敏度同样较低;采用安捷伦 DB-624 色谱柱分离得到的峰型较好,且灵敏度高、出

表 4 小试 3 批样品残留溶剂测定结果
Tab. 4 Determination results of residual solvent
in 3 batches of small test samples

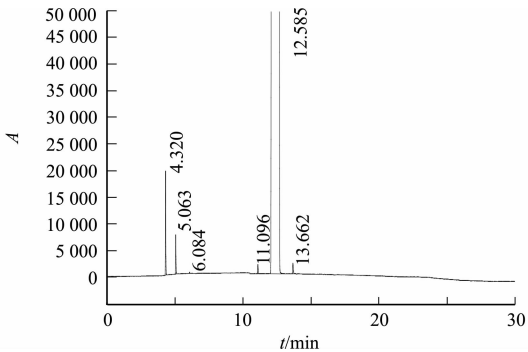
批次	20191101	20191201	20200101
乙醇	未检出	未检出	未检出
甲醇	未检出	未检出	未检出
二氯甲烷	未检出	未检出	未检出
甲苯	未检出	未检出	未检出



(a) DB-1701 色谱柱



(b) DB-1301 色谱柱



(c) DB-624 色谱柱

图 2 不同毛细管色谱柱的 GC 图谱

Fig. 2 GC spectra of different capillary columns

峰时间短、分离度好. 因此,选用安捷伦 DB-624 色谱柱作为实验色谱柱.

3 结束语

实验建立了米诺膦酸中乙醇、甲醇、二氯甲烷、甲苯等 4 种残留溶剂的含量测定方法. 该方法精密

度好、准确度高,可为米诺膦酸原料药及米诺膦酸片剂的质量控制提供参考依据.通过对 3 批米诺膦酸原料药的小试样品进行残留溶剂的检测,结果表明,3 批米诺膦酸原料药中均未检出乙醇、甲醇、二氯甲烷、甲苯等 4 种残留溶剂,符合《中华人民共和国药典:四部(2020 年版)》^[16]的原料药质量要求.接下来的研究将会测试采集到的车间生产样品,进一步考察该方法的实际可行性和适用性.

参考文献:

- [1] KITAMURA N,SHIRAIWA H,INOMATA H,*et al.* Efficacy and safety of minodronic acid hydrate in patients with steroid-induced osteoporosis[J]. *Int J Rheum Dis*,2018,21(4):813-820. DOI:10.1111/1756-185X.12844.
- [2] 宋伟杰,曾皓月,龙莎,等.采用原研制剂制备米诺膦酸片及体外溶出度的一致性考察[J]. *华侨大学学报(自然科学版)*,2018,39(1):70-74. DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.201706032.
- [3] TANAKA M,HOSOYA A,MORI H,*et al.* Minodronic acid induces morphological changes in osteoclasts at bone resorption sites and reaches a level required for antagonism of purinergic P2X2/3 receptors[J]. *J Bone Miner Metab*,2018,36(1):54-63. DOI:10.1007/s00774-017-0814-y.
- [4] TAGUCHI A,UEMURA Y,IMAI T,*et al.* Incidence of osteonecrosis of the jaw in Japanese osteoporosis patients taking minodronic acid[J]. *J Bone Miner Metab*,2019,37(5):886-892. DOI:10.1007/s00774-019-00990-5.
- [5] DUNFORD J E,THOMPSON K,COXON F P,*et al.* Structure-activity relationships for inhibition of farnesyl diphosphate synthase *in vitro* and inhibition of bone resorption *in vivo* by nitrogen-containing bisphosphonates[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2001,296(2):235-242.
- [6] 华小懿,沈于兰,杨敏智.离子色谱法测定米诺膦酸及其片剂的含量[J]. *中国药品标准*,2019,20(2):138-142. DOI:10.19778/j. chp. 2019. 02. 008.
- [7] 宋伟杰,周玥莹,王立强,等.高效液相色谱法测定米诺膦酸的含量及有关物质[J]. *中国新药杂志*,2018,27(16):1932-1938.
- [8] 郭方宁.高效液相色谱法测定米诺膦酸片中米诺膦酸[J]. *现代药物与临床*,2011,26(1):66-67.
- [9] 邵宪伟.米诺膦酸的合成工艺研究[D].北京:北京化工大学,2017.
- [10] 赵世明,李玲,韩世磊,等.米诺膦酸的合成[J]. *中国新药杂志*,2014,23(11):1307-1310.
- [11] 吴素平,蔡玲,金坚,等.顶空气相色谱法检测米诺膦酸中残留溶剂[J]. *中国新药杂志*,2016,25(24):2839-2842.
- [12] 张巍,蔡彝,李范珠.顶空气相色谱法测定依帕司他有机溶剂残留量[J]. *中国现代应用药学*. 2017,34(9):1286-1288. DOI:10.13748/j. cnki. issn1007-7693. 2017. 09. 015.
- [13] 裴丽娟,田晨,齐然然,等.顶空气相色谱法同时测定布南色林原料药中 9 种有机溶剂的残留量[J]. *中国药房*,2017,28(12):1699-1702. DOI:10.6039/j. issn. 1001-0408. 2017. 12. 32.
- [14] 袁淑杰.新型杂环双膦酸类化合物米诺膦酸的合成新工艺研究[J]. *中国医药指南*,2015,13(5):291-292. DOI:10.15912/j. cnki. gocm. 2015. 05. 220.
- [15] RYAN A E. Protecting the rights of pediatric research subjects in the international conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use[J]. *Fordham International Law Journal*. 2000,23(3):848-934. DOI:10.1007/s11270-010-0628-1.
- [16] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部(2020 年版)[M].北京:中国医药科技出版社,2020.

(责任编辑:黄仲一 英文审校:刘源岗)