

顶空气相色谱法测定 selexipag 中 6 种有机溶剂残留量

李丽丽, 王洪朋, 田海伟, 李晋, 高双双, 哈婧*

(河北科技大学化学与制药工程学院, 石家庄 050018)

摘要 建立顶空气相色谱法, 测定 selexipag 中甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、四氢呋喃和甲苯的残留量, 为其质量控制提供试验依据。色谱柱为 Kromat PC-624(V) (30.0 m × 0.32 mm, 1.8 μm) 毛细管柱, 采用程序升温模式: 初始柱温 40 °C, 维持 5 min, 以 20 °C/min 升至 180 °C, 维持 5 min; 氢火焰离子化检测器 (FID), 进样口温度为 200 °C, 检测器温度为 250 °C, 分流比为 20:1。在该色谱条件下, 6 种残留溶剂均完全分离, 峰面积与浓度呈良好线性关系 ($r=0.9982\sim 1.000$); 精密性、重复性、稳定性试验结果符合要求, 各被测组分的平均回收率在 96.67% ~ 101.7% 之间。该气相色谱法操作简单, 准确度、灵敏度高, 可用于检测 selexipag 原料药中残留的有机溶剂。

关键词 selexipag; 顶空气相色谱; 残留溶剂

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)01-0093-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180113

引用本文 李丽丽, 王洪朋, 田海伟, 等. 顶空气相色谱法测定 selexipag 中 6 种有机溶剂残留量[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(1): 93-96.

Cite this article as: LI Lili, WANG Hongpeng, TIAN Haiwei, et al. Determination of 6 residual solvents in selexipag by headspace gas chromatography[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(1): 93-96.

Determination of 6 residual solvents in selexipag by headspace gas chromatography

LI Lili, WANG Hongpeng, TIAN Haiwei, LI Jin, GAO Shuangshuang, HA Jing*

School of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China

Abstract A headspace gas chromatography method was developed for the determination of six residual solvents including methanol, ethanol, acetone, dichloromethane, tetrahydrofuran and toluene residues in selexipag to provide the experimental basis for its quality control. The samples were separated on Kromat PC-624(V) silica capillary column (30.0 m × 0.32 mm, 1.8 μm) using temperature programming. The column temperature was kept at 40 °C for 5 min initially, and then raised to 180 °C at the rate of 20 °C/min and subsequently sustained for 5 min. FID detector temperature was 250 °C and injection temperature was 200 °C. The split ratio was 20:1. The six residual solvents are separated completely under the given chromatographic conditions with a good linearity ($r=0.9982\sim 1.000$); the results of precision, repeatability and stability experiments met the requirement, and the mean recoveries of all solvents were in the range of 96.67% - 101.7%. The analytical method is simple, accurate and sensitive, and it can be used for the determination of residual solvents in selexipag.

Key words selexipag; headspace gas chromatography; residual solvents

肺动脉高压是以血管增殖、重塑、原位血栓形成、肺血管床进行性闭塞和肺血管阻力进行性增加为特征的肺小动脉疾病。Selexipag 是由日本新药株式会社和爱可泰隆医药公司联合开发

的一种前列环素受体 (PGI₂) 激动剂^[1]。该药于 2015 年 12 月 21 日获美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市, 又于 2016 年 5 月 12 日获欧洲药品管理局 (EMA) 批准上市, 用于治疗肺动脉高

压。Selexipag 化学名为 2-[4-(5,6-二苯基吡嗪-2-基)(异丙基)氨基]丁氧基}-N-(甲基磺酰基)乙酰胺, 药理作用为舒缓血管壁平滑肌从而扩张血管, 增加肺部供血^[2]。Selexipag 及其活性代谢产物对 IP-受体的选择性优于其他前列腺素受体, 被 FDA 授予孤儿药地位^[3]。其结构式见图 1。

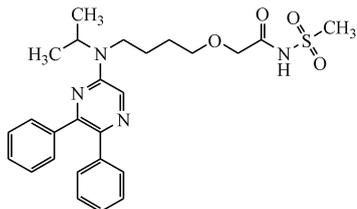


Figure 1 Chemical structure of selexipag

Selexipag 在合成过程中使用了 6 种溶剂^[4-5], 其中 4 种第二类溶剂(甲醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯), 2 种第三类溶剂(乙醇、丙酮)。目前尚未见有关 selexipag 原料药残留溶剂的检测方法报道, 为有效控制产品质量、保证用药安全, 本研究参考人用药物注册技术要求国际协调会(ICH)的有机溶剂残留量研究指导原则和《中华人民共和国药典》(2015 年版)四部通则^[6], 采用顶空毛细管气相色谱法^[7-10]对 selexipag 原料药中 6 种残留溶剂进行测定, 建立了 selexipag 原料药中甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、四氢呋喃和甲苯顶空气相色谱测定方法, 并进行了方法学验证^[11], 结果表明, 该方法分离度好, 精密度高、加样回收率结果满意, 适用于 selexipag 原料药中 6 种残留溶剂的测定, 并为保证用药安全, 进一步控制 3 类有机溶剂的残留量提供了科学依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

Selexipag 原料药为河北省药用分子重点实验室自制, 批号分别为 20160813、20160911、20160918。其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器

GC7900 气相色谱仪(中国天美科学仪器有限公司); DK3001A 顶空进样器(中国北京中兴分析仪器新技术研究所); GH-30 高纯氢发生器、GA-2000A 低噪音空气泵(中国北京中兴汇利科技发展有限公司); AL204 万分之一电子天平(瑞士

Mettler 公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件及测定方法

色谱柱为 Kromat PC-624(V) 毛细管柱(固定相为 6% 氰丙基苯基-94% 二甲基聚硅氧烷, 30.0 m × 0.32 mm, 1.8 μm); 进样口温度: 200 °C, 检测器温度: 250 °C; 柱温: 初始温度为 40 °C, 保持 5 min, 以 20 °C/min 的速率升温至 180 °C, 保持 5 min; 载气: 高纯氮气; 进样方式: 顶空进样, 定量环 1 mL; 平衡温度: 80 °C, 平衡时间: 30 min; 阀箱温度: 100 °C, 传输线温度: 110 °C。

精密量取对照品溶液或供试品溶液 5 mL, 密封于 20 mL 顶空瓶中, 经顶空平衡后, 量取其顶端气体, 注入气相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积来计算各残留溶剂的含量。

2.2 溶液制备

2.2.1 混合对照品溶液制备 称取甲醇约 1.5 g、无水乙醇约 2.5 g、二氯甲烷约 0.3 g、四氢呋喃约 0.36 g、丙酮约 2.5 g、甲苯约 0.5 g, 精密称定, 各置 50 mL 量瓶中用二甲基亚砷溶解定容; 精密量取上述溶液各 1 mL 置 10 mL 量瓶中用二甲基亚砷定容至刻度, 作为混合对照品储备液。精密吸取上述对照品储备液 0.4 mL 置 10 mL 量瓶中用二甲基亚砷定容至刻度, 摇匀, 作为混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 取 selexipag 原料药约 0.2 g, 精密称定, 置 20 mL 顶空瓶中, 精密加入二甲基亚砷 5 mL 使样品溶解, 摇匀, 密封, 即得。

2.3 系统适应性试验

取空白溶剂二甲基亚砷、混合对照品溶液、供试品溶液, 按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 结果表明空白溶剂无干扰, 限度混合对照品溶液中各色谱峰的理论塔板数均大于 5 000, 各相邻峰的分度大于 1.5, 色谱图见图 2。

2.4 线性关系考察

精密量取混合对照品储备液 1, 3, 5, 7, 10 mL 分别置于 100 mL 量瓶中, 加二甲基亚砷稀释至刻度, 摇匀, 作为系列标准线性溶液, 分别精密量取 5 mL 置 20 mL 顶空进样瓶中, 密封, 摇匀, 按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 以峰面积为纵坐标, 浓度为横坐标, 进行线性回归, 结果见表 1。

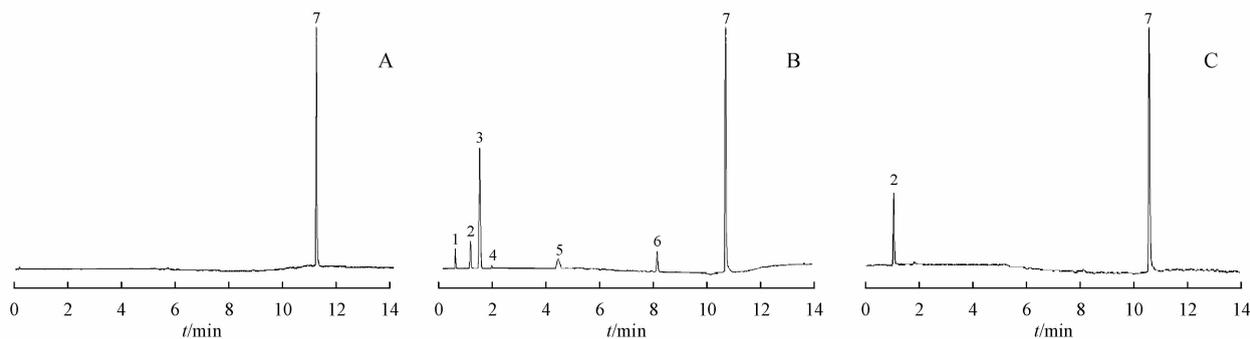


Figure 2 HPLC of blank solution (A), mixed solvent (B) and selexipag test solution (C)

1: Methanol; 2: Ethanol; 3: Acetone; 4: Dichloromethane; 5: Tetrahydrofuran; 6: Toluene; 7: Dimethyl-sulfoxide

Table 1 Results of linearity test for the mixed solvent

Solvent	Linear equation	<i>r</i>	Linear range/($\mu\text{g/mL}$)
Methanol	$Y = 2.074 X + 0.0412$	1.000	32.07-320.1
Ethanol	$Y = 2.599 X - 0.0656$	1.000	50.10-501.0
Acetone	$Y = 16.98 X - 36.16$	1.000	51.64-516.4
Dichloromethane	$Y = 0.3131 X - 0.5616$	0.9982	6.080-60.76
Tetrahydrofuran	$Y = 21.62 X - 32.76$	0.9991	7.590-75.88
Toluene	$Y = 14.31 X - 28.58$	0.9986	10.76-107.6

2.5 精密度试验

精密量取混合对照品溶液 5.0 mL, 分别置于 20 mL 顶空瓶中, 平行制备 6 份作为精密度试验溶液, 按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 计算各被测组分甲醇、乙醇、二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲苯峰面积的 RSD (% , $n=6$), 分别为 2.9, 3.0, 3.2, 2.4, 2.5 和 3.1, 表明色谱系统精密度良好。

2.6 重复性试验

取 selexipag 原料药 (批号 20160813) 约 0.2 g, 按“2.2.2”项配制供试品溶液 6 份, 按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 记录色谱图按外标法进行计算。结果甲醇、二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲苯均未被检出, 乙醇的平均含量为 0.3%, RSD 为 2.0% ($n=6$), 表明系统重复性良好。

2.7 供试品稳定性试验

取 selexipag 原料药 (批号 20160813) 约 0.2 g, 按“2.2”项配制供试品溶液 5 份, 按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 考察样品溶液 8 h 之内的稳定性。结果甲醇、二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲苯均未被检出, 乙醇的平均含量为 0.3%, RSD 为 1.7% ($n=5$), 表明样品在 8 h 内稳定性良好。

2.8 检出限与定量限

取各对照品储备液, 用二甲基亚砜逐级稀释, 按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 以信噪比

$S/N=10$ 为定量限, 甲醇、乙醇、二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲苯定量限 ($\mu\text{g/mL}$) 分别为 16.0, 25.15, 28.82, 3.03, 28.45, 26.90。以信噪比 $S/N=3$ 为检测限 ($\mu\text{g/mL}$) 分别为 1.60, 2.50, 2.58, 1.51, 5.69, 5.38。

2.9 定量限精密度试验

分别精密量取甲醇、乙醇、二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲苯定量限溶液, 按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 计算甲醇、乙醇、二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲苯定量限峰面积的 RSD (% , $n=3$), 分别为 2.5, 1.9, 2.2, 3.4, 2.8 和 3.5, 表明定量限精密度良好。

2.10 准确度试验

精密量取对照品储备液 0.32, 0.40, 0.48 mL 置于 10 mL 量瓶中加入二甲基亚砜定容至刻度。精密称取 20160813 批样品约 0.2 g, 共 9 份, 分别精密加入上述试液 5 mL, 每个浓度平行 3 份, 密封、摇匀, 按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 记录色谱图, 按外标法进行计算, 结果见表 2。

2.11 样品测定

取 selexipag 原料药 3 批 (批号分别为 20160813, 20160911, 20160918), 按“2.2.2”项制备供试品溶液, 每批 2 份按“2.1”项色谱条件及进样方法进行分析, 按外标法计算 3 批样品中乙醇的

含量分别为0.3%, 0.3%, 0.4%, 甲醇、二氯甲烷、丙酮、四氢呋喃、甲苯均未被检出。

Table 2 Recovery of six residual solvents of selexipag ($n=9$)

Solvent	Average recovery/%	RSD/%
Methanol	99.67	2.49
Ethanol	98.72	3.24
Acetone	101.67	2.49
Dichloromethane	98.64	1.36
Tetrahydrofuran	97.84	1.46
Toluene	98.57	1.64

3 讨论

3.1 进样方式选择

Selexipag 采取直接进样模式时, 甲醇色谱峰拖尾严重, 与乙醇分离度较差, 而且由于样品质量浓度较大, 直接进样易造成色谱柱污染, 所以采取顶空进样方式。

3.2 溶剂的选择

Selexipag 水溶性较差, 不能用水作溶剂直接进样, *N,N*-二甲基甲酰胺作溶剂时各溶剂峰之间分离度不理想; 而用二甲基亚砷作溶剂时对待测的6种溶剂无干扰回收率好, 各溶剂峰形较好, 最终选择二甲基亚砷作为试验溶剂。

3.3 顶空平衡温度的选择

固定顶空平衡时间 30 min, 考察平衡温度分别为 80, 90, 100 °C 时各待测溶剂的色谱峰面积的变化。随着平衡温度的提高, 色谱峰面积没有明显增高的趋势, 考虑到温度过高会使药物分解影响分析结果, 且待测溶剂均可在 80 °C 条件下全部检出, 故将平衡温度设为 80 °C。

3.4 顶空平衡时间的选择

固定平衡温度 80 °C, 分别考察平衡时间为 20, 30, 40 min, 各待测溶剂的色谱峰面积的变化结果表明, 平衡时间为 30 和 40 min 时, 待测组分峰面积明显高于 20 min, 但 30 min 和 40 min 平衡时间测定的待测溶剂峰面积没有明显差异, 故将平衡时间设为 30 min。

3.5 顶空进样瓶中溶剂体积的选择

顶空瓶中分别加入溶剂 3, 4, 5 mL, 考察峰面积变化情况, 结果表明加入 5 mL 溶剂时峰面积明显高于 3 mL, 4 mL。因考虑到气液平衡及进样针的位置问题并没有继续考察加大溶剂量的情况, 最终选择 5 mL 作为进样瓶中的溶剂体积。

参考文献

- [1] Liu YG, Zhao LJ, Xiao GZ, et al. Selexipag[J]. *Drugs Clin* (现代药物与临床), 2010, **25**(6):469-471.
- [2] Du C, Liu YX. Selexipag[J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2016, **26**(4):352.
- [3] Xia XM. FDA approved Uptarvi (selexipag) tablets in the treatment of pulmonary arterial hypertension[J]. *J Guangdong Pharm Univ* (广东药学院学报), 2016, **32**(1):35.
- [4] Wang H. Study on the synthesis of selexipag (Selexipag 的工艺研究)[D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2017.
- [5] Shang ZH, Wang H, Fang Q. Method for preparing selexipag: CN, 201610357729.3[P]. 2016-06-20[2017-07-15].
- [6] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*: part 4[S]. (中华人民共和国药典: 四部), Beijing: China Medical Science Press, 2015:105-109.
- [7] Ito Y, Ishizuki K, Sekiguchi W, et al. Analysis of residual solvents in annatto extracts using a static headspace gas chromatography method[J]. *Ameri J Analy Chem*, 2012, **3**(9):638-645.
- [8] Teglia CM, Montemurro M, Zan MMD, et al. Multiple responses optimization in the development of a headspace gas chromatography method for the determination of residual solvents in pharmaceuticals[J]. *J Pharm Anal*, 2015, **5**(5):296-306.
- [9] Grodowska K, Parczewski A. Grouping of residual solvents present in pharmaceuticals using experimental planning and chemometric methods[J]. *Acta Poloniae Pharm*, 2013, **70**(2):191-203.
- [10] Cheng C, Liu S, Mueller B J, et al. A generic static headspace gas chromatography method for determination of residual solvents in drug substance [J]. *J Chromatogr A*, 2010, **1217**(41):6413-6421.
- [11] Huang R, Zhang SJ, Huang LY. Determination of residual organic solvents in fenazinel dihydrochloride by headspace gas chromatography[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2008, **39**(2):183-184.