

静态顶空气相色谱法测定有机残留溶剂二甲基亚砷

郑超 王伯初* 祝连彩

(重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

摘 要 建立了高灵敏度、高精度的静态顶空气相色谱结合氢火焰离子化检测器测定药物辅料中二甲基亚砷残留溶剂的方法。以液体石蜡为溶解溶剂, 优化了顶空瓶的液相体积, 并对顶空气相色谱的关键实验参数: 自动进样时间、顶空加压时间、顶空平衡温度、顶空平衡时间及气相柱温箱升温程序等进行了优化。在最优条件下, 确定了方法的检出限和定量限分别为 1.0 和 3.0 $\mu\text{g/g}$ 。在 25 ~ 300 $\mu\text{g/g}$ 浓度范围内, 线性回归方程为 $y = 215.49x - 828.94$ $R^2 = 0.9991$ 。应用本方法成功分析了药物包衣材料 Kollicoat® IR 中的残留二甲基亚砷溶剂。

关键词 静态顶空; 气相色谱; 残留溶剂; 二甲基亚砷

1 引言

药物残留溶剂是在原料药或辅料生产及制剂制备过程中使用或产生而很难完全除去的有机溶剂。药物中的有机残留溶剂给人类健康带来极大风险^[1], 残留溶剂也会影响药物的物理化学性质, 如晶形结构、颗粒大小、颜色气味甚至溶解性等^[3~5]。人类用药注册技术要求国际协调会议 (ICH) 对残留溶剂种类和限度进行了明确的规定^[6]。欧洲药典也描述了鉴定和控制有机残留溶剂的分析方法^[7]。根据毒性大小, 残留溶剂被划分为 4 类总计 69 种。尽管药典描述的方法适用于大部分样品和残留溶剂的分析, 但是对 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、*N,N*-二甲基乙酰胺 (DMA)、苯甲醇 (BA) 以及二甲基亚砷 (DMSO) 等高沸点有机溶剂缺乏较高的检测灵敏度。

分析残留溶剂一般采用气相色谱法, 静态顶空气相色谱法分析残留溶剂有着广泛报道和研究^[8~10]。选择合适的稀释媒介是分析测定残留溶剂一个关键因素^[11]。根据分析测试样品的水溶性确定溶解溶剂, 使用较多的溶剂有水、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲基亚砷 (DMSO) 以及 1,3-二甲基-2-咪唑啉酮 (DMI) 等。然而这些有机溶剂在作为溶解溶剂的同时, 自身也可能作为残留溶剂残存在药物中, 它们具有低蒸汽压、高沸点等特性, 在大部分稀释溶剂中具有较高的分配系数, 造成了检测灵敏度的降低。文献 [12~14] 报道, 使用具有极低蒸汽压的离子液体作为溶剂分析此类残留溶剂, 基底峰对分析物的干扰较大, 并且离子液体较为昂贵, 目前尚未成为成熟的稀释溶剂。本研究建立了具有较高灵敏度的分析高沸点、低蒸汽压溶剂二甲基亚砷的方法, 并对方法进行了验证和应用研究。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

静态顶空气相色谱仪 (美国 Perkin Elmer 公司), 配 Turbomatrix HS40 型顶空自动进样器; 气相色谱仪 (法国 Argenteuil 公司), 配 Delsi-Nermag 200 结合氢火焰离子化检测器。20 mL 顶空瓶 (比利时 Filter Service 公司)。

1,3-二甲基咪唑啉酮 (DMI)、*N,N*-二甲基乙酰胺 (DMA)、苯甲醇 (BA)、石蜡油 (色谱纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司); 二甲基亚砷 (DMSO, 色谱纯, 德国默克公司); *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF, 英国 Fisher Scientific 公司); 纯水由 Milli-Q 水纯化系统 (美国 Bedford 公司) 制备; Kollicoat® IR 样品和 Kollicoat® IR 空白对照来自比利时鲁汶大学。

2010-12-02 收稿; 2011-01-25 接受

本文系中央高校基本科研业务费资助项目 (No. CDJZR10230001)

* E-mail: wangbc2000@126.com

2.2 溶液及样品制备

制备溶于液体石蜡的 5000 $\mu\text{g/g}$ 二甲基亚砜溶液为母液,并按实验所需以液体石蜡为稀释溶剂进行稀释。

样品制备: 每个顶空瓶准确称量 25.0 mg 由二甲基亚砜处理过的 Kollicoat[®] IR 样品,每个顶空瓶中加入 1.0 g 液体石蜡,加盖封口。

3 结果与讨论

3.1 方法的建立

3.1.1 样品顶空瓶中液相体积的优化 顶空瓶中气相部分和液相部分的体积比直接影响分析物在气液两相的分配,因此有必要对顶空瓶中液体体积进行优化。选取一系列顶空瓶,每个顶空瓶中分别加入 1.0 mL 250 $\mu\text{g/g}$ DMSO 溶液,然后分别加入 0.0 ~ 11.0 mL 稀释液,顶空瓶中的总体积分别为 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 和 12.0 mL,分别进样,以研究顶空瓶中液体体积对峰面积响应的影响(图 1)。从图 1 可见,随着顶空瓶内液相体积的增加,响应值不断减小,表明液相体积对灵敏度影响较大。

3.1.2 样品稀释液的选择 基于 3.1.1 的研究结果,将顶空瓶液相体积优化为 1.0 mL,使用常规稀释液(水、DMF、DMA、DMI、苯甲醇及正辛醇等)作为稀释溶液,检测二甲基亚砜残留溶剂。除 DMI 外,其它溶剂均未能检出二甲基亚砜。根据液体石蜡的物理化学性质,将其引入作为稀释液,得到了清晰的二甲基亚砜残留溶剂峰(图 2)。本研究选用液体石蜡作为稀释溶液。

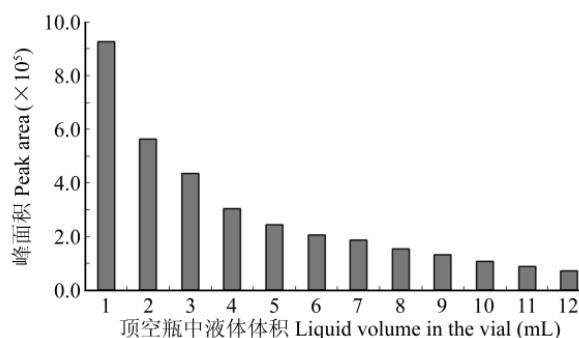


图 1 顶空瓶中液体体积对信号响应的影响

Fig. 1 Influence of liquid volume in vial on response

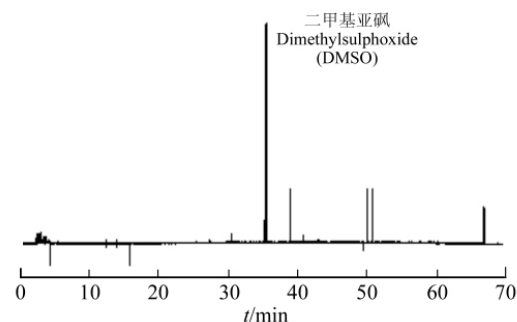


图 2 顶空瓶内液相体积为 1.0 mL,以液体石蜡为稀释液检测二甲基亚砜的色谱图

Fig. 2 Chromatogram with liquid paraffin as dilution, volume of liquid in vial is 1.0 mL

3.2.2 气相色谱方法参数优化 使用 250 $\mu\text{g/g}$ 二甲基亚砜溶液进行优化实验。选取对灵敏度影响较大的顶空气相参数(表 1)进行优化以提高灵敏度。

本研究还对气相温度程序进行了优化(表 2),总分析时间明显缩短(约 10 min),降低了分析成本。参数优化曲线如图 3 所示。最佳平衡温度为 160 $^{\circ}\text{C}$,最佳平衡时间为 10 min,最佳加压时间为 1.0 min,最大进样时间为 0.08 min。加压时间对峰面积影响不大,实验选择加压时间为 1.0 min。

表 2 优化前后的气相色谱升温程序

Table 2 Comparison of programmed temperature

温度程序 Temperature program	初始温度 Initial temperature ($^{\circ}\text{C}$)	初始温度持续时间 Duration (min)	升温幅度 Ramp ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	中间温度 Media temperature ($^{\circ}\text{C}$)	中间温度持续时间 Dutration (min)
欧洲药典 European pharmacopeia	50	20	6	165	20
优化程序 Optimized program	140	5	6	165	10

表 1 优化的顶空气相参数及范围

Table 1 Optimization of headspace parameters and ranges

顶空参数 Headspace parameters	范围 Range	数值间隔 Interval
平衡温度 Equilibration temperature ($^{\circ}\text{C}$)	80 ~ 160	20
平衡时间 Equilibration time (min)	5 ~ 30	5
注射时间 Injection time (min)	0.04 ~ 0.08	0.02
加压时间 Pressurize time (min)	0.5 ~ 2.0	0.5

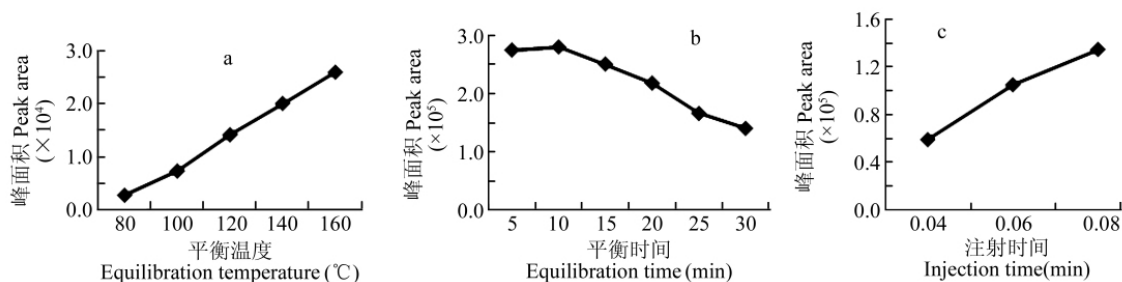


图3 平衡温度 (a), 平衡时间 (b) 及注射时间 (c) 对响应的影响

Fig.3 Influence of equilibration temperature (a), equilibration time (b), and injection time (c) on peak areas

采用本方法进行 DMSO 残留溶剂的分析测定, 结果如图 4b 所示。缩短了分析时间, 提高了分析灵敏度。图 4 展示了参数优化前后的对比色谱图。

3.3.3 方法验证 对本方法的专属性、线性范围、测量精密度、检出限、定量限等进行了验证研究。在每个顶空瓶加入 25 mg 的空白 Kollicoat® IR 以消除基质影响。

本实验中, 二甲基亚砷是色谱图中唯一溶剂峰, 无其它干扰峰, 因此溶剂峰就是二甲基亚砷, 可证明其专属性。

进样浓度分别为 25, 50, 125, 200, 250 和 300 $\mu\text{g/g}$, 各浓度重复进样 4 次, 线性回归方程为 $y = 215.49x - 828.94$, $R^2 = 0.9991$ 。

研究实验重复性以确定方法的精密度。每个浓度分别进样 4 次, RSD 在 0.4% ~ 3.0% 之间, 说明了方法的重复性及精密度良好。

3.3.4 定量限和检出限 分别以 3 倍标准偏差和 10 倍标准偏差 ($n = 24$) 计算出检出限和定量限, 分别为 1.1 和 3.2 $\mu\text{g/g}$, 结果和信噪比法的结果相类似, 佐证了方法的检出限和定量限结果是准确可靠的。

3.4 方法应用

Kollicoat® IR 为聚乙烯醇-聚乙二醇接枝共聚物, 在药品中作为速溶包衣材料使用。本方法应用于 Kollicoat® IR 样品中残留溶剂二甲基亚砷的分析测定。

3.4.1 外标曲线法 准确称量 25.0 mg Kollicoat® IR 样品, 加入 1.0 g 液体石蜡, 外标法分析结果为 4.64 mg/g , $\text{RSD} = 11.5\%$ ($n = 4$) 相对较高。可能是由于二甲基亚砷在样品中未能匀质化地分布, 或未能完全从样品中完全释放到液体媒介中。因此, 采用液氮对样品进行低温处理, 目的是破坏样品结构, 使二甲基亚砷完全释放到溶液中, 继续使用标准添加法对样品进行分析。

3.4.2 标准添加法 准确称量 25.0 mg Kollicoat® IR 样品, 在每个样品瓶中加入 1.0 g 一系列浓度的二甲基亚砷溶液。标准曲线为 $y = 527.49x + 62659$, $R^2 = 0.9966$ 。标准加入法获得的结果为 4.75 mg/g 与外标曲线法结果十分相近, 说明了方法的可靠性。标准添加法获得的浓度稍高, 可能是由于样品经过液氮冷却和碾磨处理所致。

4 结论

本研究采用液体石蜡为制备样品的稀释液, 液体石蜡作为新型稀释液可承受高达 160 $^{\circ}\text{C}$ 的平衡温度而不产生基质干扰。本方法的分析时间缩短为 10 min, 具有良好的专属性、线性、准确度及较低的检出限, 显著提高了分析灵敏度, 并成功应用于 Kollicoat® IR 样品分析。

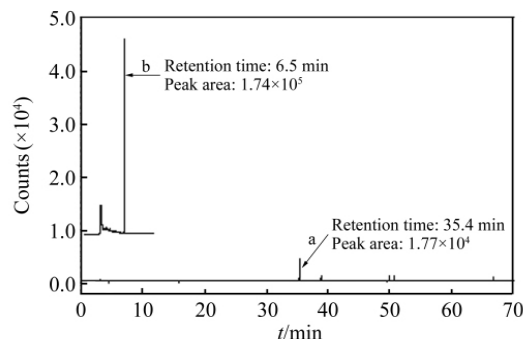


图4 参数优化前 (a)、后 (b) 的色谱图对比

Fig.4 Comparison of chromatograms from initial (a) and optimized (b) parameters

致谢 感谢比利时鲁汶大学(荷兰语区) 生物医学部药学院药物分析实验室 Erwin Adams 教授对本研究提供的帮助。

References

- 1 B'Hymer C. *Pharm. Res.* ,**2003** ,20(3) : 337 ~ 343
- 2 Devotta I , Badiger M V , Rajamohanam P R , Ganapathy S , Mashelkar R A. *Chem. Eng. Sci.* ,**1995** , 50 (16) : 2557 ~ 2569
- 3 Witschi C , Doelker E. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* ,**1997** ,43(3) : 142 ~ 215
- 4 Nojavan S , Ghassempour A , Bashour Y , Darbandi M K , Ahmadi S H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* ,**2005** , 36(5) : 983 ~ 988
- 5 Barbarin N. Rollmann B. Tilquin B. *J. Pharm.* ,**1999** ,178(2) : 203 ~ 212
- 6 In *Q3C(R4) Impurities: Guidelines for Residual Solvents* , International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use: Geneva ,**2009**
- 7 In *European Pharmacopoeia* , 6th ed , European Department for the Quality of Medicines: Strasbourg ,**2010**
- 8 Camarasu C C. *Chromatographia* ,**2002** ,56: S137 ~ S143
- 9 Iosefzon-Kuyavskaya B. *Accredit. Qual. Assur.* ,**1999** ,4(6) : 240 ~ 246
- 10 Kumar N. Gow J G. *J. Chromatogr. A* ,**1994** ,667 (1-2) : 235 ~ 240
- 11 Urakami K. Higashi A. Umemoto K , Godo M. *J. Chromatogr. A* ,**2004** ,1057(1-2) : 203 ~ 210
- 12 Andre L G , Bentivoglio M , Schottenberger G H. *J. Chromatogr. A* ,**2009** ,1216 (32) : 6020 ~ 6023
- 13 Von W , Albers G , Cortes D , McCabe H T. *J. Chromatogr. A* ,**2008** ,1201(1) : 15 ~ 20
- 14 Snow N H , Bullock G P. *J. Chromatogr. A* ,**2010** ,1217(16) : 2726 ~ 2735

Determination of Dimethylsulphoxide as Residual Solvent by Static Headspace Gas Chromatography

ZHENG Chao , WANG Bo-Chu* , ZHU Lian-Cai

(College of Bioengineering , Chongqing University , Chongqing 400044)

Abstract A sensitive , precise static headspace gas chromatography method coupled with flame ionization detection was developed for the analysis of residual dimethyl sulphoxide (DMSO) in drugs. Liquid paraffin oil was used as dilute solvent , liquid volume in the vial and GC parameters such as autosampler injection time , headspace pressurize time , equilibration temperature , equilibration time and oven temperature program were optimized to yield the highest sensitivity. Optimum value of GC parameters such as equilibration temperature , equilibration time , headspace pressurize time , autosampler injection time were 160 °C , 15 min , 1.0 min , 0.08 min respectively. Limits of detection (LOD) and quantitation (LOQ) were determined to be 1 and 3 µg/g , respectively. Linear regression equation in the range of 25 – 300 µg/g was $y = 215.49x - 828.94$ with R^2 of 0.9991. The method was successfully used to analyze residual DMSO in drug coating materials Kollicoat® IR.

Keywords Static headspace; Gas chromatography; Residual solvent; Dimethyl sulphoxide

(Received 2 December 2010; accepted 25 January 2011)