

## 顶空毛细管气相色谱法测定替诺福韦酯原料药中 10 种残留溶剂

郑 银, 韩建萍\*

天津药物研究院 原料药研发中心, 天津 300193

**摘要:** 目的 建立顶空毛细管气相色谱法测定富马酸替诺福韦二吡呋酯(替诺福韦酯)原料药中甲醇、异丙醇、二氯甲烷、异丙醚、醋酸乙酯、环己烷、乙酸异丙酯、甲苯、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)和 *N*-甲基吡咯烷酮 10 种溶剂残留量。方法 DB-624 色谱柱(30 m×0.53 mm×3 μm); 载气: N<sub>2</sub>; 体积流量: 4 mL/min, 程序升温: 35 °C 保持 10 min, 再以 20 °C/min 的速率升温至 220 °C, 保持 5 min。进样口温度: 230 °C, FID 检测器, 检测器温度: 250 °C, 分流比: 10:1。LOOP: 110 °C, TR line: 120 °C, 平衡时间: 40 min, 平衡温度: 90 °C。结果 10 种有机溶剂的分离度均符合要求, 线性关系良好( $r$  均大于 0.999 0), 平均回收率在 92.8%~107.0%。结论 本方法简便合理, 适用于替诺福韦酯原料药中残留溶剂的质量控制, 也为其他需要测定沸点和限度均相差较大有机溶剂的原料药提供参考。

**关键词:** 替诺福韦酯; 残留溶剂; 甲醇; 异丙醇; 二氯甲烷; 异丙醚; 醋酸乙酯; 环己烷; 乙酸异丙酯; 甲苯; *N,N*-二甲基甲酰胺; *N*-甲基吡咯烷酮; 顶空毛细管气相色谱

中图分类号: R927.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2019)08-2283-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.08.007

## Determination of 10 residual solvents in tenofovir dipivoxil API by headspace capillary gas chromatography

ZHENG Yin, HAN Jian-ping

API R&D Center, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

**Abstract: Objective** To establish a headspace capillary gas chromatography method for the determination of residual organic solvents in tenofovir dipivoxil fumarate (tenofovir dipivoxil) API, including methanol, isopropanol, dichloromethane, isopropyl ether, ethyl acetate, cyclohexane, isopropyl acetate, toluene, *N,N*-dimethylformamide (DMF) and *N*-methyl pyrrolidone. **Methods** DB-624 chromatographic column (30 m × 0.53 mm × 3 μm) was used, carrier gas was used with N<sub>2</sub>, and volume flow rate was 4 mL/min. Programmed temperature was 35 °C for 10 min, then increased to 220 °C as the velocity of 20 °C/min for 5 min. Sample inlet temperature was 230 °C, FID detector was used, and detector temperature was set at 250 °C. Shunt ratio was 10:1, LOOP was 110, TR line was 120, equilibrium time was 40 min, and equilibrium temperature: 90 °C. **Results** The separation degree of ten organic solvents met the requirements, and the linear relationship was good ( $r > 0.999 0$ ). The average recovery was between 92.8% and 107.0%. **Conclusion** The method is simple and reasonable, and can be used for the quality control of residual solvents in tenofovir dipivoxil API. It also provides reference for other API which need to determine boiling point and organic solvents with large difference in boiling point and limit.

**Key words:** tenofovir dipivoxil; residual solvent; methanol; isopropanol; dichloromethane; isopropyl ether; ethyl acetate; cyclohexane; isopropyl acetate; toluene; *N,N*-dimethylformamide; *N*-methyl pyrrolidone; headspace capillary gas chromatography

富马酸替诺福韦二吡呋酯(替诺福韦酯)是美国吉利德公司研发的一种核苷酸类逆转录酶抑制剂, 2002 年在欧盟上市, 目前广泛用于 HIV-1 感染和慢性乙型肝炎的治疗中<sup>[1]</sup>。此外, 替诺福韦酯作为一种核苷酸类抗病毒化合物, 具有广谱抗菌的特

性, 还具有良好的体外抗寨卡病毒活性, 有望成为研发抗寨卡病毒的先导化合物<sup>[2]</sup>。在替诺福韦酯合成过程中, 使用了甲醇、异丙醇、二氯甲烷、异丙醚、醋酸乙酯、环己烷、乙酸异丙酯、甲苯、*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)和 *N*-甲基吡咯烷酮等溶剂。

收稿日期: 2019-05-14

作者简介: 郑 银, 女, 黑龙江人, 主要从事药品质量研究工作。E-mail: zhengy@tjipr.com

\*通信作者 韩建萍, 女, 副研究员, 主要从事药品研发工作。E-mail: hanjp@tjipr.com

按照 ICH 和中国药典的要求,需控制以上溶剂的残留量。上述多种溶剂控制限度不同、且溶剂间沸点相差较大。为控制替诺福韦酯原料药中有机溶剂含量,需建立一种能兼顾不同溶剂灵敏度和专属性的色谱方法。因此本研究建立了一种分析方法同时测定替诺福韦酯中 10 种有机溶剂。

## 1 仪器与试剂

XSE 105 型电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司; Agilent 7890A 型气相色谱仪 (FID 检测器)、Agilent 7697A 顶空进样器,美国安捷伦公司。

甲醇、异丙醇、二氯甲烷、异丙醚、醋酸乙酯、环己烷、乙酸异丙酯、甲苯、*N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 和 *N*-甲基吡咯烷酮均为分析纯。二甲基亚砜 (DMSO) 为美国 ROE 色谱纯; 替诺福韦酯原料药,自制,批号 A、B、C。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

DB-624 色谱柱 (30 m×0.53 mm×3 μm); 载气: N<sub>2</sub>; 体积流量: 4 mL/min, 程序升温: 35 °C 保持 10 min, 再以 20 °C/min 的速率升温至 220 °C, 保持 5 min。进样口温度: 230 °C, FID 检测器, 检测器温度: 250 °C, 分流比: 10:1。LOOP: 110 °C, TR line: 120 °C, 平衡时间: 40 min, 平衡温度: 90 °C。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 对照储备溶液的制备** 精密称取甲醇 120 mg、异丙醇 200 mg、二氯甲烷 24 mg、异丙醚 200 mg、醋酸乙酯 200 mg、环己烷 155.2 mg、乙酸异丙酯 200 mg、甲苯 35.6 mg、DMF 35.2 mg、*N*-甲基吡咯烷酮 21.2 mg, 置 10 mL 装有适量 DMSO 的量瓶中, 用 DMSO 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

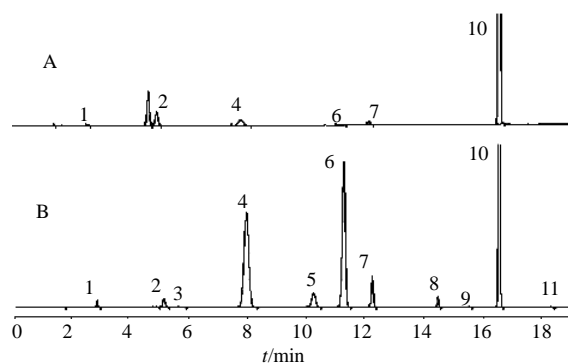
**2.2.2 对照品溶液的制备** 精密移取对照储备溶液 0.5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用 DMSO 稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.3 供试品溶液的制备** 取替诺福韦酯原料药 0.6 g, 置 10 mL 顶空瓶中, 用 3 mL DMSO 溶解, 密封, 即得。

**2.2.4 空白溶剂的制备** 精密移取 3 mL DMSO, 置 10 mL 顶空瓶中, 密封, 即得。

### 2.3 专属性试验

取供试品溶液、对照品溶液进样, 记录色谱图, 见图 1。可见溶剂 DMSO 不影响测定, 各溶剂之间分离度良好, 分离度均大于 1.5。



1-甲醇 2-异丙醇 3-二氯甲烷 4-异丙醚 5-醋酸乙酯 6-环己烷  
7-乙酸异丙酯 8-甲苯 9-DMF 10-DMSO 11-*N*-甲基吡咯烷酮  
1-methanol 2-isopropyl alcohol 3-dichloromethane 4-isopropyl ether  
5-ethyl acetate 6-cyclohexane 7-isopropyl acetate 8-toluene 9-*N*,  
*N*-dimethylformamide 10-dimethyl sulfoxide 11-*N*-methyl pyrrolidone

图 1 替诺福韦酯原料药样品 (A) 和混合对照品 (B) 的 GC 图谱

Fig. 1 GC chromatograms of tenofovir dipivoxil sample (A) and reference substances (B)

### 2.4 线性关系和检测限

分别精密移取 1 mL 对照品储备液 25、50、100、250、500、750、1 000 μL 置于装有适量 DMSO 的 10 mL 量瓶中, 用 DMSO 稀释至刻度, 摇匀即得 7 个不同质量浓度的对照品溶液。分别移取各溶液 3 mL 置顶空瓶中, 密封进样, 记录色谱图。以各溶剂的质量浓度为横坐标, 峰面积作为纵坐标进行线性回归, 得线性方程。将线性溶液继续逐步稀释, 进样测定, 直至 S/N=3 左右, 该质量浓度作为溶剂的检测限。结果见表 1。可见, 各溶剂在浓度范围内线性关系良好, *r* 均大于 0.999 0, 并且各溶剂定量限满足测定需求。

### 2.5 精密度试验

取混合对照品溶液连续进样 6 次, 测定甲醇、异丙醇、二氯甲烷、异丙醚、醋酸乙酯、环己烷、乙酸异丙酯、甲苯、DMF 和 *N*-甲基吡咯烷酮的峰面积, 计算得各成分的 RSD 值分别为 1.6%、2.4%、1.8%、2.0%、2.0%、1.8%、2.2%、2.4%、2.9%、2.6%。

### 2.6 重复性试验

取批号 B 替诺福韦酯原料药样品 6 份, 配制供试品溶液, 进样分析, 计算甲醇、异丙醇、异丙醚、环己烷、乙酸异丙酯的峰面积, 结果各成分的残留量分别为 0.001 2%、0.073%、0.001 4%、0.000 2%、0.000 6%, RSD 值分别为 2.0%、3.7%、1.1%、1.2%、3.2%。

表1 各成分的线性范围和定量限

Table 1 Linear range and quantitative limit of components

成分	回归方程	<i>r</i>	线性范围/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	检测限/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
甲醇	$Y=1.0466X-7.6410$	0.9999	30.1~1203.8	0.15
异丙醇	$Y=1.6585X-22.4890$	0.9998	49.8~1993.9	0.25
二氯甲烷	$Y=1.2969X+1.5734$	0.9998	6.0~283.5	0.03
异丙醚	$Y=38.085X+684.280$	0.9995	50.0~2001.6	0.005
乙酸乙酯	$Y=4.6383X+5.0540$	0.9996	50.0~1998.0	0.25
环己烷	$Y=48.512X+641.380$	0.9994	38.5~1541.4	0.038
乙酸异丙酯	$Y=5.431X+15.754$	0.9995	50.0~2001.0	0.25
甲苯	$Y=6.3016X-3.4853$	0.9995	8.9~355.5	0.04
DMF	$Y=0.1607X-0.9665$	0.9993	8.8~350.6	1.75
<i>N</i> -甲基吡咯烷酮	$Y=0.0537X-0.0155$	0.9993	5.4~215.5	5.39

## 2.7 稳定性试验

取批号 B 替诺福韦酯原料药样品, 配制供试品溶液, 分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 进样测定, 结果显示甲醇、异丙醇、异丙醚、环己烷、乙酸异丙酯的峰面积 RSD 值变化均小于 10%, 结果表明供试品溶液于室温下放置 24 h 稳定。

## 2.8 回收率试验

精密吸取对照储备溶液 0.5 mL, 置于装有适量 DMSO 的 10 mL 量瓶中, 用 DMSO 稀释至刻度, 摇匀即得 (甲醇、异丙醇、二氯甲烷、异丙醚、醋酸乙酯、环己烷、乙酸异丙酯、甲苯、DMF 和 *N*-甲基吡咯烷酮质量浓度分别为 0.6、1.0、0.12、1.0、1.0、0.776、1.0、0.178、0.212、0.176 mg/mL)。精密吸取对照储备溶液 0.4、0.5、0.6 mL, 置于装有适量 DMSO 的 10 mL 量瓶中, 用 DMSO 稀释至刻度, 摇匀即得浓度为 80%、100%、120% 的对照品

溶液。

精密称取批号 B 替诺福韦酯原料药样品 2 份, 称样量约为 0.6 g, 置顶空瓶中, 各加 DMSO 3 mL 溶解, 测定, 记录色谱图。称取 9 份替诺福韦酯原料药样品各约 0.6 g, 精密称定, 置顶空瓶中, 用 3 mL 各质量浓度对照溶液平行 3 份溶解, 摇匀, 进行测定。结果甲醇、异丙醇、二氯甲烷、异丙醚、醋酸乙酯、环己烷、乙酸异丙酯、甲苯、DMF 和 *N*-甲基吡咯烷酮的平均回收率分别为 107.0%、98.7%、105.1%、93.2%、99.2%、92.7%、99.3%、100.3%、100.9%、105.3%, RSD 值分别为 2.6%、7.4%、2.3%、2.3%、2.2%、2.6%、2.7%、2.9%、3.6%、2.9%。

## 2.9 样品测定

取 3 批替诺福韦酯原料药, 制备供试品溶液, 与对照品溶液分别进样, 记录各成分峰面积, 按外标法计算各有机溶剂的残留量, 结果见表 2。

表2 替诺福韦酯原料药中各残留溶剂的测定结果 ( $n=3$ )Table 2 Results of residual organic solvents in tenofovir dipyrofuril fumarate samples ( $n=3$ )

批号	甲醇/%	异丙醇/%	二氯甲烷/%	异丙醚/%	醋酸乙酯/%
A	0.0014	0.068	未检出	0.0005	未检出
B	0.0013	0.080	未检出	0.0013	未检出
C	0.0006	0.028	未检出	0.0008	未检出
批号	环己烷/%	乙酸异丙酯/%	甲苯/%	DMF/%	<i>N</i> -甲基吡咯烷酮/%
A	0.0001	0.0007	未检出	未检出	未检出
B	0.0001	0.0030	未检出	未检出	未检出
C	0.0001	0.0018	未检出	未检出	未检出

### 3 讨论

本试验对顶空进样中影响结果的平衡温度、平衡时间、分流比等关键参数进行了优选,采用单因素实验考察了不同平衡温度(80、85、90 °C)、平衡时间(35、40、45min)、分流比(10:1、20:1)时各溶剂检出情况,最终确定了替诺福韦酯分析方法的顶空参数。

替诺福韦酯在高温下不稳定,如果进样口温度过高,易被破坏从而产生未知杂峰<sup>[3]</sup>,而顶空进样是通过测定样品基质上方的气体成分来测定这些组分在原样品中的含量,故进样口温度可以设置在相对较低水平,且顶空进样具有进样量大、无需对样品进行复杂处理等优点,因此顶空法更适合替诺福韦酯中溶残的测定。

本实验所建立的气相色谱法对于沸点(从 40~202 °C)和限度(0.06%~0.5%)都有较大差别的 10 种溶剂均有良好的分离度,且灵敏度高。

另外,经过方法学验证和 3 批样品的检测,证

明能够达到同时测定替诺福韦酯原料药中甲醇、异丙醇、二氯甲烷、异丙醚、醋酸乙酯、环己烷、乙酸异丙酯、甲苯、DMF 和 *N*-甲基吡咯烷酮等有机溶剂的目的。

综上所述,本方法简便合理,适用于替诺福韦酯原料药中残留溶剂的质量控制,也为其他需要测定沸点和限度均相差较大的有机溶剂的原料药提供参考。

### 参考文献

- [1] Michailidis E, Kirby K A, Hachiya A, *et al.* Antiviral therapies: focus on hepatitis B reverse transcriptase [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(7): 1060-1071.
- [2] 陈秀秀, 罗荣华, 郑昌博, 等. 富马酸替诺福韦二吡啶酯体外抗寨卡病毒活性研究 [J]. *药学学报*, DOI:10.16438/j.0513-4870.2018-1135
- [3] 袁秀菊, 宿亮, 赵静芝, 等. GC 法测定富马酸替诺福韦二吡啶酯的残留溶剂 [J]. *上海医药*, 2018, 39(19): 83-86.