

· 研究报告 ·

GC-MS 对多西他赛原料药中 DMAP 和 DCC 的残留检测

杜毅¹, 陈磊², 李玲³, 周瑾⁴, 吕磊⁴ (1. 上海交通大学医学院附属新华医院药学部, 上海 200092; 2. 上海长海医院药材科, 上海 200433; 3. 第二军医大学药学院分析测试中心, 上海 200433; 4. 上海东方肝胆外科医院药材科, 上海 200438)

[摘要] **目的** 采用 GC-MS 技术对多西他赛原料药中催化剂 4-二甲氨基吡啶(DMAP)和脱水剂二环己基碳二亚胺(DCC)进行残留检测。**方法** 色谱柱为安捷伦的 DB-5msUI(30 m×0.25 mm, 0.25 μm)超高惰性毛细管气相色谱柱;采用程序升温方式,载气为高纯氦气,流速 1.5 ml/min;进样量为 1 μl。质谱采用 EI 源,选择离子监测模式;DMAP 的定量离子为 121,DCC 的定量离子为 163,内标龙脑的定量离子为 95。多西他赛原料药采用甲醇超声提取。**结果** DMAP 和 DCC 的线性关系良好($r>0.9992$),其定量限分别为 50.90 和 10.21 ng/ml,日内、日间精密度 RSD 均小于 5.0%,回收率大于 90%,符合方法学要求。3 批样品中均未检测到 DMAP 和 DCC 的残留。**结论** 该方法灵敏度高,专属性好,可用于多西他赛原料药中微量杂质的残留检测。

[关键词] 气相色谱-质谱联用;多西他赛;4-二甲氨基吡啶;二环己基碳二亚胺;残留检测

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2018)05-0446-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.05.014

Residue detection of DMAP and DCC in docetaxel by GC-MS

DU Yi¹, CHEN Lei², LI Ling³, Zhou Jin⁴, LÜ Lei⁴ (1. Department of Pharmacy, Xinhua Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China; 2. Department of Pharmacy, Shanghai Changhai Hospital, Shanghai 200433, China; 3. Pharmaceutical Analysis Center, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 4. Department of Pharmacy, Shanghai Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Shanghai 200438, China)

[Abstract] **Objective** To establish a GC-MS method for residue detection of 4-Dimethylaminopyridine (DMAP) and Dicyclohexyl Carbodiimide (DCC) in docetaxel. **Methods** The separation was performed on an Agilent DB-5msUI capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) with programmed temperature. The carrier gas was high purity helium, the flow rate was 1.5 ml/min and the injection volume was 1 μl. Electron impact ion source (EI) and selection monitoring mode (SIM) were applied for quantitative analysis. The quantitative ion of DMAP, DCC and internal standard (IS) was 121, 163 and 95 respectively. Docetaxel was ultrasonically extracted with methanol. **Results** The calibration of DMAP and DCC showed good linear relationship ($r>0.9992$), the limits of quantification (LOQ) were 50.90 ng/ml and 10.21 ng/ml separately. Intra-day and inter-day precision were all less than 5% and recoveries were more than 90%, which conformed with the requirement of methodology validation. No residues of DMAP and DCC were detected in three batches of samples. **Conclusion** The method was sensitive and selective which can be used for the detection of trace impurities in docetaxel.

[Key words] GC-MS; docetaxel; DMAP; DCC; residue detection

多西他赛又称多西紫杉醇,主要通过人工合成获得^[1],用于晚期乳腺癌、胃癌、非小细胞肺癌的治疗^[2-4]。4-二甲氨基吡啶(DMAP),分子式为 C₇H₁₀N₂,结构如图 1A 所示,在多种化学药物的合成过程

中作为催化剂使用^[5],对人体的皮肤、呼吸系统、消化系统、神经系统具有刺激性及高毒性^[6]。二环己基碳二亚胺(DCC),分子式为 C₁₃H₂₂N₂,结构如图 1B 所示,在多种药物合成中作为脱水剂使用^[7],对人体皮肤有较大的刺激作用,其蒸气会损伤人的眼角膜和呼吸道等^[8]。DMAP 和 DCC 在多西他赛原料药的合成过程中作为催化剂和脱水剂,由于两者对人体危害较大,影响药物质量,因此本研究对两者在多西他赛原料药中的残留量进行检测。

[作者简介] 杜毅,主管药师, Tel: (021) 25077173, Email: dongyi02@xinhumed.com.cn

[通讯作者] 吕磊,硕士,主管药师,研究方向:中药药效物质基础及体内代谢, Tel: (021) 81875578, Email: k_owen2002@126.com

目前 DMAP 和 DCC 相关检测的研究较少,已有的报道采用 HPLC 法测定 DMAP^[9],采用 GC 法测定 DCC^[10],方法较为烦琐,且定量限无法达到微量杂质残留检测的要求,未见 2 种成分同时测定的报道。本实验采用 GC-MS 方法,选取龙脑作为内标(图 1C),方法简单,专属性强,灵敏度高,可用于同时检测多西他赛原料药中 2 种微量杂质。

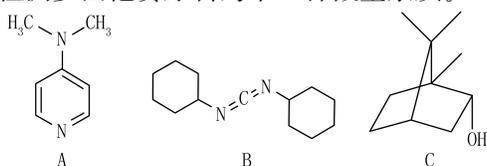


图 1 DMAP(A)、DCC(B)和内标龙脑(C)的化学结构式

1 仪器与试剂

1.1 仪器

气相色谱仪 Thermo Trace GC Ultra, 质谱仪 ThermoDSQII (美国赛默飞世尔公司), Xcalibur 工作站。METTLER AE240 型电子天平(瑞士梅特勒公司);FRESCO 台式低温离心机(美国 Thermo 公司);SB3200-T 超声发生器(上海必能信超声有限公司)。

1.2 药材和试剂

DMAP 对照品(批号:101178143,纯度>98%),DCC 对照品(批号:101280587,纯度>98%),均购于 Sigma 公司;内标龙脑对照品(批号:110881-201508,纯度>98%,上海食品药品检定研究院);多西他赛原料药(批号:160501、160502、160503,为仿制药申报品种);甲醇为色谱纯(默克公司);其余试剂均为分析纯,水为纯水。

2 方法和结果

2.1 溶液的配制

2.1.1 对照品及内标储备液

取 DMAP、DCC 对照品适量,精密称定,用甲醇溶解稀释,配制成 1.018 mg/ml 的 DMAP 和 1.021 mg/ml 的 DCC 混合溶液,取该溶液 100 μ l 置 10 ml 容量瓶中,用甲醇定容,即得 10.18 μ g/ml 的 DMAP 和 10.21 μ g/ml 的 DCC 的混合对照品储备液。精密称取龙脑对照品适量,用甲醇溶解稀释,配制成 11.13 μ g/ml 的内标储备液,取内标储备液 1 ml 置 10 ml 容量瓶中,即得 1.113 μ g/ml 的内标溶液。

2.1.2 供试品溶液

取多西他赛原料药 0.1 g,精密称定,加入 1 ml

内标溶液(1.113 μ g/ml),用甲醇定容至 10 ml,超声提取 20 min(功率 240 W,频率 40 kHz),补足失重,11 600 \times g 离心 5 min,取上清液,即得供试品溶液。

2.2 气相条件

色谱柱为安捷伦 DB-5msUI(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)超高惰性毛细管气相色谱柱;采用程序升温方式,起始温度 40 $^{\circ}$ C,以 25 $^{\circ}$ C/min 的速率升至 220 $^{\circ}$ C,保持 4 min,进样口温度 180 $^{\circ}$ C,传输线温度 230 $^{\circ}$ C,不分流进样;载气为高纯氦气,流速 1.5 ml/min,进样量为 1 μ l。

2.3 质谱条件

采用电子轰击源 EI,离子源温度 200 $^{\circ}$ C;选择离子监测模式;DMAP 的定量离子为 121,定性确证离子为 78、122;DCC 的定量离子为 163,定性确证离子为 83、124;内标定量离子为 95。

2.4 方法学验证

2.4.1 专属性试验

取对照品溶液,加入适量内标,用甲醇定容,稀释成浓度约为 1 μ g/ml 的混合对照品溶液,按“2.2”和“2.3”项下条件进样,结果如图 2A 所示,DMAP 的保留时间为 5.51 min,DCC 的保留时间为 7.65 min,内标的保留时间为 4.68 min;另取内标溶液进样 1 μ l,如图 2B 所示。由两张图谱可以看出 DMAP、DCC 及内标峰分离良好,两待测物的出峰位置基线平整,内标和溶剂对 DMAP 和 DCC 的检测没有干扰,专属性良好。

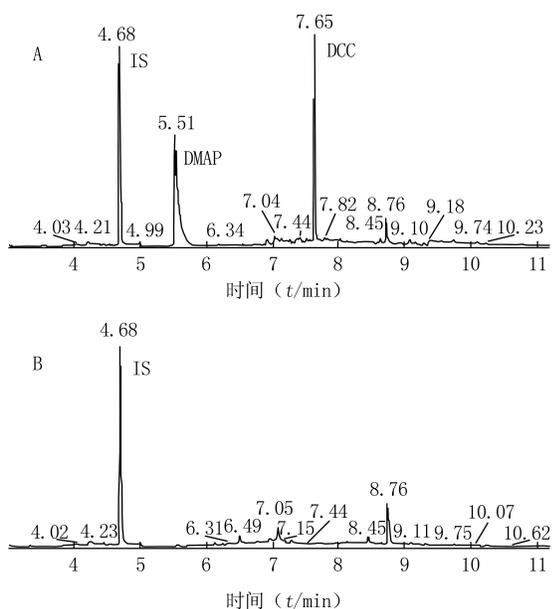


图 2 GC-MS 选择离子流图
A.混合对照品;B.含内标的空白溶剂

2.4.2 线性关系及范围

精密量取对照品储备液 1 ml,按 1、2、4、10、20、100 的倍数逐级稀释,并加入 1 ml 内标溶液,用甲醇定容至 10 ml,依次配制成 6 个不同浓度的 DMAP 和 DCC 的混合对照品溶液,作为线性工作溶液。分别取上述线性工作溶液,浓度由低到高依次进样 1 μ l,以目标化合物的浓度为横坐标(X),目标化合物和内标的峰面积比值为纵坐标(Y),计算 DMAP 和 DCC 的线性回归方程,其中 DMAP 最低点低于定量限,以 5 个浓度点计。DMAP 在 50.90~1 018 ng/ml 范围内线性关系良好,线性方程为: $Y=0.0058X+0.0716$, $r=0.9994$;DCC 在 10.21~1 021 ng/ml 范围内线性关系良好,线性方程为: $Y=0.0167X-0.0961$, $r=0.9992$ 。

2.4.3 检测限和定量限

取线性试验低浓度工作溶液用甲醇逐级稀释,直至信噪比为 3:1,即为最低检测限,DMAP 的最低检测限 25.45 ng/ml,DCC 的最低检测限 5.11 ng/ml;定量限为线性的最低浓度,信噪比为 10:1,DMAP 的定量限为 50.90 ng/ml,DCC 的定量限为 10.21 ng/ml。

2.4.4 精密度试验

取线性试验中间浓度的混合对照品溶液(10 倍浓度点),按“2.2”和“2.3”项下的色谱质谱条件,在 1 d 内进样 6 次以及连续 3 d 分别进样,测定 DMAP 和 DCC 与内标的峰面积比值,结果 DMAP 的日内精密度 RSD 为 3.15%,日间精密度为 3.90%;DCC 的日内精密度 RSD 为 2.57%,日间精密度为 3.64%,方法精密度良好。

2.4.5 回收率试验

精密称取多西他赛原料药 0.05 g,加入含 DMAP 5.090 μ g/ml 和 DCC 5.105 μ g/ml 混合对照品溶液 1 ml,加入 1 ml 内标溶液,用甲醇定容至 10 ml,按“2.1”项下条件处理,重复配制 6 份,按“2.2”和“2.3”项下的色谱质谱条件进样 1 μ l,计算回收率,结果如表 1 所示,方法的回收率符合要求。

2.4.6 耐用性试验

考察 4 个因素的微小改变对试验结果的影响,包括程序升温速率(24、25、26 $^{\circ}$ C/min),进样口温度(175、180、185 $^{\circ}$ C),流速(1.4、1.5、1.6 ml/min),离子源温度(195、200、205 $^{\circ}$ C)。结果显示,DMAP 和 DCC 的峰面积及保留时间的 RSD 均 $<10\%$,分离度符合方法学要求,证明方法的耐用性良好。

2.5 实验结果

按“2.1”项下方法分别制备 3 个批次的供试品

表 1 DMAP 和 DCC 回收率试验($n=6$)

化合物	加入量 (m/ μ g)	测得量 (m/ μ g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
DMAP	5.090	4.741	93.14	92.36	2.22
		4.655	91.45		
		4.780	93.91		
		4.843	95.15		
		4.627	90.90		
		4.562	95.52		
DCC	5.105	4.785	93.73	95.23	2.80
		4.859	95.18		
		5.002	97.98		
		4.991	97.77		
		4.893	95.85		
		4.639	94.79		

溶液,各取 1 μ l,按“2.2”和“2.3”项下色谱质谱条件进样分析,结果如图 3 所示:内标在 4.68 min 出峰稳定,而 5.51 min 和 7.65 min 处未见色谱峰,3 批样品均未检测到 DMAP 和 DCC 的残留。

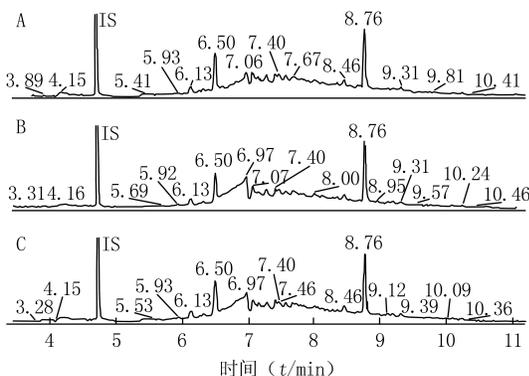


图 3 3 批样品的提取离子流图

A.160501;B.160502;C.160503

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

DMAP 属于氨基类化合物,活性较强,在色谱条件优化初期,笔者分别考察了极性的毛细管柱 HP-INNOWAX 柱,中等极性柱 DB-624 柱及弱极性的 DB-5msUI 柱,结果显示 DCC 在各色谱柱上的出峰时间适当,峰形良好,但是 DMAP 在各色谱柱上的峰均有不同程度的拖尾,综合两峰的出现时间、分离度以及 DMAP 的拖尾程度,最终选择高惰性低流失的毛细管气相色谱柱 DB-5ms UI。

3.2 溶剂的选择

DMAP 的化学结构中具有 2 个甲氨基,其极性较大,易溶于水,不溶于弱极性有机溶剂;DCC 极性小,不溶于水,易溶于弱极性有机溶剂。为同时检测

DMAP 和 DCC,需要选择一种溶剂能同时溶解这两种物质,笔者分别考察了甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷,结果显示,DMAP 和 DCC 在甲醇和乙醇中溶解度良好,且这两种溶剂能很好地溶解待测样品。但实验中发现,用乙醇作为溶剂溶解样品时,在 DMAP 出峰时间附近有一干扰峰,因此最终选择了甲醇作为配制对照品及处理样品的溶剂。

3.3 定量离子的选择

本实验目的是检测样品中的微量杂质的残留,因此选择了灵敏度较高的选择离子监测模式。对于定量离子的选择,首先要考虑特征性,排除周围其他杂质峰的干扰,其次是考虑离子强度,以保证检测的灵敏度。由图 4A 可见,DMAP 对照品在全扫描模式下得到的质谱碎片信息,图中 121 的丰度最强,且在总离子流图提取 121 时周围没有干扰,因此选择 121 作为 DMAP 的定量离子,另外,由于样品中的杂质含量可能很低,为避免出现假阳性结果,在选择定量离子的同时,还选择了 122 和 78 作为定性确证,如图 4B 所示。同理,图 5A 为 DCC 对照品在全扫描模式下得到的质谱碎片信息,笔者选择 163 作为 DCC 的定量离子,并选择 83 和 124 作为辅助的定性确证离子,如图 5B 所示。

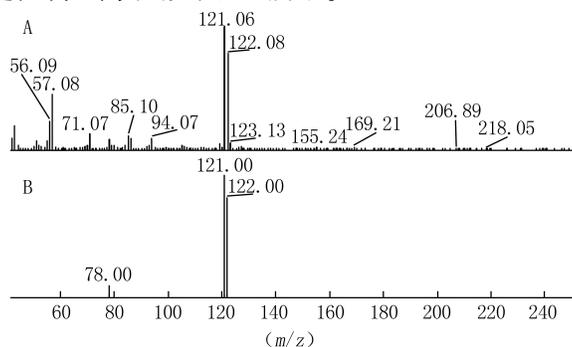


图 4 DMAP 两种质谱图比较

A.全扫描;B.选择离子监测

4 小结

本研究采用 GC-MS 对多西他赛原料药中的催化劑 DMAP 和脱水剂 DCC 进行残留检测。与文献报道方法相比,本方法采用选择离子监测模式,提高了检测灵敏度,有助于样品中微量杂质的检出;在选择定量离子的同时选取了两个特征离子作为定性确证,提高了检测的专属性,使检测结果更加准确可

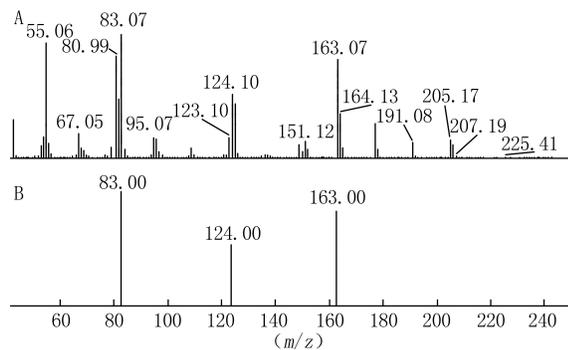


图 5 DCC 两种质谱图比较

A.全扫描;B.选择离子监测

靠。本研究方法简单、灵敏度高、专属性强,为药物合成中此类微量杂质的检测提供了参考依据,具有重要的实用价值。

【参考文献】

- [1] 徐少杰,袁建勇,周辉,等.多西他赛合成工艺[J].科技导报,2010,28(13):82-86.
- [2] 孟秀敏.多西他赛联合卡培他滨治疗紫杉醇耐药乳腺癌患者40例[J].中国药业,2013,22(17):64-65.
- [3] 黄和,李丕宏,张毅,等.多西他赛联合奥沙利铂及氟尿嘧啶治疗晚期胃癌临床观察[J].浙江医学,2011,33(2):183-185.
- [4] 朱庆华,张国兵.多西他赛与奈达铂联合治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效观察[J].中国现代医生,2015,53(20):89-92.
- [5] 孙继国,周自成,夏玲远.4-二甲氨基吡啶(DMAP)在医药合成中的应用[J].沧州师范学院学报,2014,30(1):49-53.
- [6] WIKIPEDIA. DMAP. Wikipedia website (2016). (2016-09-18). [2018-03-07]. <https://en.wikipedia.org/wiki/4-Dimethylaminopyridine>.
- [7] SAVJANI JK, MULAMKATTIL S, VARIYA B, et al. Molecular docking, synthesis and biological screening of mefenamic acid derivatives as anti-inflammatory agents [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 801: 28-34.
- [8] 薄采颖,毕良武,王玉民,等. DCC 及其在有机合成中的应用 [J]. 化工时刊, 2007, 21(10): 4-6.
- [9] 范小振,张小杰,徐宝军.高效液相色谱法测定烯草酮成液液中 4-二甲氨基吡啶含量 [J]. 化学研究与应用, 2015, 27(2): 237-239.
- [10] 刘义国,郝文明.气相色谱法分析 N,N'-二环己基碳二亚胺的纯度 [J]. 山东化工, 1998, 27(5): 39-40.

【收稿日期】 2018-03-07 【修回日期】 2018-04-13

【本文编辑】 李睿旻