

顶空气相色谱法测定盐酸文拉法辛原料药中11种有机溶剂残留量

张文*, 雒琪, 张鉴[#](山东大学附属省立医院, 济南 250021)

中图分类号 R927.11; R971⁺.43 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2392-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.32

摘要 目的:建立盐酸文拉法辛原料药中11种有机溶剂残留量的测定方法。方法:采用顶空气相色谱法。色谱柱为Agilent DB-624, 氢火焰离子化检测器(FID)温度为250℃, 进样口温度为200℃, 顶空平衡温度为80℃, 平衡时间为30 min, 载气为氮气, 50% *N,N*-二甲基甲酰胺为溶解介质。测定3批样品中有机溶剂甲醇、乙醇、乙醚、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷、甲苯的含量。结果:11种有机溶剂均能完全分离, 各组分在线性范围内均呈良好线性关系($r=0.999\ 5\sim0.999\ 9$), 平均回收率为94.40%~102.87%, $RSD\leq 5.27\%$ ($n=9$)。3批样品中均检出异丙醇, 1批检出甲苯, 并符合相关要求。结论:本方法用于测定文拉法辛原料药中的有机溶剂残留, 操作简便、结果可靠。

关键词 顶空气相色谱法; 文拉法辛; 有机溶剂; 残留量

Determination of Residual of 11 Organic Solvents in Venlafaxine Hydrochloride Crude Drug by Headspace Gas Chromatography

ZHANG Wen, LUO Qi, ZHANG Jian (Provincial Hospital Affiliated to Shandong University, Jinan 250021, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish a method for the determination of 11 organic solvents in venlafaxine crude drug. **METHODS:** The contents of solvents were determined by Headspace GC chromatography on Agilent DB-624 column. The temperature of FID was 250℃, and that of injector was 200℃. Vial equilibrium temperature was 80℃, and equilibrium time was 30 min. The contents of methanol, ethanol, aether, acetone, isopropanol, dichloromethane, n-hexane, ethyl acetate, tetrahydrofuran, cyclohexane and methylbenzene were determined using nitrogen as carrier gas and 50% DMF as solvent media. **RESULTS:** 11 kinds of organic solvents were separated completely. Good linearity was obtained ($r=0.999\ 5\sim0.999\ 9$). The average recovery rates were 94.40%-102.87% ($RSDs\leq 5.27\%$, $n=9$). Isopropanol was found in 3 batches of samples, and methylbenzene was only found in 1 batch of samples, which were all in line with the requirements. **CONCLUSIONS:** The method is simple, sensitive and reliable for the determination of organic solvents in venlafaxine hydrochloride crude drug.

KEY WORDS Headspace gas chromatography; Venlafaxine; Organic solvents; Residual

盐酸文拉法辛(Venlafaxine hydrochloride, VH), 化学名为1-[2-(二甲氨基)-1-(4-甲氧基苯基)乙基]环己醇盐酸盐^[1], 为苯乙胺类抗抑郁药, 是5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)双重再摄取抑制剂, 与三环类抗抑郁药疗效相似, 起效快、不良反应少, 临床主治各类抑郁症^[2-3]。由文拉法辛的合成工艺可知, 其可能的残留溶剂主要为甲醇、乙醇、乙醚、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷、甲苯。为保证产品安全性, 更好地控制盐酸文拉法辛原料药中的有机溶剂残留量, 以利于成品质量的控制, 笔者参照残留溶剂测定法(《中国药典》2010年版二部附录Ⅷ P第二法^[4]), 采用顶空气相色谱法在同一个色谱条件下, 对上述11种有机溶剂残留量进行了检查。结果表明, 本方法操作简便、结果可靠、灵敏度高。

1 材料

890N气相色谱仪、G1888顶空自动进样器(美国Agilent公司); CPA255D十万分之一天平(德国Sartorius公司)。

样品盐酸文拉法辛原料药(江西同和药业有限责任公司,

* 主管药师。研究方向: 临床药学。电话: 0531-68776449。E-mail: zhangwen_jyk@126.com

[#] 通信作者: 主任药师。研究方向: 药事管理、临床药学。电话: 0531-68776241。E-mail: sdjnzjhjx@163.com

批号: 20080706, 纯度: 99.8%; 批号: 20091101, 纯度: 99.8%; 批号: 20091102, 纯度: 99.9%); 水为超纯水, 甲醇、乙醇、乙醚、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷、甲苯均为分析纯, *N,N*-二甲基甲酰胺(DMF)为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent DB-624 (30 m×0.32 mm, 1.80 μm); 柱温: 初始40℃, 保持10 min, 然后以10℃/min升至140℃, 再以30℃/min升至220℃保持2 min; 载气氮气(N₂)流速: 2.0 ml/min, 氢气(H₂)流速: 30 ml/min, 空气流速: 300 ml/min, 分流比: 20:1; 氢火焰离子化检测器(FID)温度: 250℃; 进样口温度: 200℃; 顶空平衡温度: 80℃, 平衡时间: 30 min。

2.2 对照品溶液、供试品溶液的配制

2.2.1 对照品溶液制备。精密称取二氯甲烷0.089 29 g、正己烷0.030 42 g、四氢呋喃0.073 53 g、甲苯0.081 33 g, 置于10 ml量瓶中, 加50% DMF溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取1 ml, 置于100 ml量瓶中; 再精密称取甲醇0.046 08 g、乙醇0.050 28 g、乙醚0.051 6 g、丙酮0.059 18 g、异丙醇0.048 33 g、乙酸乙酯0.058 07 g、环己烷0.035 97 g, 均置于该100 ml量瓶中, 加50% DMF溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。精密量取贮备液5 ml, 置于10 ml量瓶中, 加50% DMF溶液稀释至

刻度,摇匀;精密量取1 ml,置于20 ml顶空瓶中,精密加入50%DMF溶液2 ml,密封,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备。精密称取样品约0.1 g,置于20 ml顶空瓶中,精密加入50%DMF溶液2 ml。密封,即得。

2.3 系统适用性试验

2.3.1 峰归属、理论板数及分离度试验。取对照品溶液依法进样测定。结果,各组分峰之间的分离度良好,能达到基线分离,详见图1A。

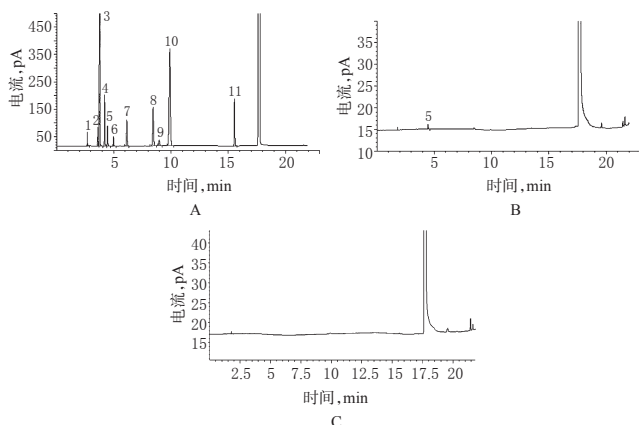


图1 气相色谱图

A.对照品;B.供试品;C.空白(DMF);1.甲醇;2.乙醇;3.乙醚;4.丙酮;5.异丙醇;6.二氯甲烷;7.正己烷;8.乙酸乙酯;9.四氢呋喃;10.环己烷;11.甲苯

Fig 1 GC chromatograms

A. substance control; B. test sample; C. blank (DMF); 1. methanol; 2. ethanol; 3. aether; 4. acetone; 5. isopropanol; 6. dichloromethane; 7. n-hexane; 8. ethyl acetate; 9. tetrahydrofuran; 10. cyclohexane; 11. methylbenzene

2.3.2 专属性试验。分别取供试品溶液(批号:20091101)、50%DMF溶液(空白),依法测定。结果,溶剂、样品及其降解产物不干扰主峰测定,结果见图1B、C。

2.4 精密度试验

精密量取同一对照品溶液,依法测定5次,记录色谱,考察精密度。结果,甲醇、乙醇、乙醚、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷、甲苯峰面积的RSD分别为0.98%、1.03%、1.45%、1.15%、0.94%、1.32%、1.50%、1.59%、1.45%、1.34%、1.43%,表明本方法精密度良好。

2.5 检测限、定量限试验

精密量取对照品溶液适量,加50%DMF溶液逐级稀释至一定质量浓度后,依法测定。当信噪比分别为3、10时,计算其检测限和定量限,结果详见表1。

2.6 线性关系考察

精密量取对照品贮备液适量,依次稀释成相应质量浓度,按“2.1”项下色谱条件测定。以对照品峰面积为纵坐标(y)、对照品溶液质量浓度为横坐标(x)进行线性回归,结果r为0.999 5~0.999 9,详见表2。

2.7 准确度(回收率)试验

精密量取样品约0.1 g,共9份,置于20 ml顶空瓶中,再分别精密加入对照品贮备液各0.8、1.0、1.2 ml各3份,精密加入50%DMF溶液补足至2 ml,密封,测定,量取峰面积,按外标法计算回收率。结果,甲醇、乙醇、乙醚、丙酮、异丙醇、二氯甲

表1 11种溶剂的检测限和定量限

Tab 1 LOD and LOQ of 11 solvents

溶剂	检测限,ng/ml	定量限,ng/ml
甲醇	891.9	2 972.9
乙醇	773.5	2 578.5
乙醚	19.1	63.7
丙酮	467.2	1 557.4
异丙醇	1 115.3	3 717.7
二氯甲烷	334.8	1 116.1
正己烷	13.8	46.1
乙酸乙酯	248.9	829.6
四氢呋喃	0.53	1.75
环己烷	6.4	21.4
甲苯	10.3	34.5

表2 11种溶剂回归方程与线性范围

Tab 2 Regression equations and linear ranges of 11 solvents

溶剂	回归方程	线性范围, $\mu\text{g/ml}$	r
甲醇	$y=184.28x-0.442\ 5$	4.608~921.6	0.999 9
乙醇	$y=315.32x-1.194\ 1$	5.028~1 005.6	0.999 9
乙醚	$y=7\ 002.3x+7.082\ 9$	5.16~1 032	0.999 8
丙酮	$y=849.99x+2.483$	5.918~1 183.6	0.999 8
异丙醇	$y=467.4x-0.866\ 8$	4.833~966.6	0.999 9
二氯甲烷	$y=1\ 073.9x-0.131\ 7$	1.785 8~178.58	0.999 8
正己烷	$y=14\ 373x+1.646\ 4$	0.608 4~60.84	0.999 8
乙酸乙酯	$y=1\ 379.8x-4.104\ 9$	11.614~1 161.4	0.999 5
四氢呋喃	$y=1\ 667.2x-0.823\ 7$	1.470 6~147.06	0.999 5
环己烷	$y=76\ 257x+10.416$	0.359 7~71.94	0.999 8
甲苯	$y=6\ 380.1x-0.301\ 2$	0.813 3~162.66	0.999 6

烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷、甲苯的低、中、高水平的平均回收率分别为96.61%(RSD=5.27%)、96.63%(RSD=5.15%)、101.59%(RSD=3.37%)、99.41%(RSD=3.52%)、97.62%(RSD=3.94%)、98.25%(RSD=3.50%)、102.87%(RSD=3.18%)、98.63%(RSD=3.96%)、98.32%(RSD=3.78%)、101.59%(RSD=2.89%)、94.40%(RSD=4.02%),表明本方法回收率良好(94.40%~102.87%,RSD≤5.27%)。

2.8 重复性试验

精密称取样品(批号:20091101)5份,依法测定。结果只检出异丙醇,其含量的RSD=2.60%;其余溶剂均未检出。

2.9 样品中有机溶剂测定

分别取3个批次的样品各约0.1 g,精密称定,置于顶空瓶中,精密加入50%DMF溶液2 ml使溶解,密封,作为供试品溶液。分别称取甲醇、乙醇、乙醚、丙酮、异丙醇、二氯甲烷、正己烷、乙酸乙酯、四氢呋喃、环己烷、甲苯适量,用50%DMF溶液定量稀释制成每1 ml中分别含甲醇0.15 mg、乙醇0.25 mg、乙醚0.25 mg、丙酮0.25 mg、异丙醇0.25 mg、二氯甲烷0.03 mg、正己烷0.014 5 mg、乙酸乙酯0.25 mg、四氢呋喃0.036 mg、环己烷0.194 mg、甲苯0.044 5 mg的溶液,精密量取2 ml,置于顶空瓶中,密封,作为对照品溶液。精密量取供试品溶液和对照品溶液分别顶空进样,测定,记录色谱图,按外标法以峰面积计算。结果3批样品中有机溶剂残留量均符合2010年版《中国药典》^[4](异丙醇限度为0.5%,甲苯限度为0.089%)的要求,详见表3。

3 讨论

(1)本试验方法涵盖了文拉法辛合成工艺中可能使用的11种有机溶剂,而且在同一个色谱条件下11种有机溶剂达到

恶性肿瘤药物敏感性试验方法及其临床应用研究进展

陈娟^{1*},程国华^{2#},陈历排¹,汪小乐¹(1.广州医学院附属肿瘤医院,广州510095;2.暨南大学药学院,广州510632)

中图分类号 R979.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)25-2394-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.25.33

摘要 目的:综述恶性肿瘤药物敏感性试验方法及其临床应用进展。方法:查阅1993—2012年的中外文相关文献,总结体外、体内药物敏感性试验方法优缺点及分子生物学在药物敏感性试验中的应用情况。结果与结论:体外试验方法有四甲基偶氮唑盐比色法,该法操作简便,无需特殊设备,成本低廉,但不能区分正常细胞与肿瘤细胞,需要被溶解后才能被检测;端粒酶活性法,该法不受细胞数量的限制,灵敏度高,可区分正常细胞和肿瘤细胞,特异性更强,但缺乏大量临床验证,需要进一步探究;三磷酸腺苷生物荧光法,该法灵敏度高,所需细胞数量少,结果稳定,重复性好,但该法只能检测活细胞,不能区分正常细胞和肿瘤细胞,且需要荧光检测,成本相对较高。体内试验方法有裸鼠模型法,该法饲养价格昂贵,多用于新药测试;肾包膜下移植法,该法操作复杂,饲养成本高,临床应用受限制;分子生物学检测方法,其具有高通量、快速、可靠、重复性好的优势,但费用昂贵,预计还是有良好的发展前景。

关键词 恶性肿瘤;药物敏感性试验;抗癌药物;研究进展

恶性肿瘤是威胁人类健康的常见病和多发病,其病死率极高。由于肿瘤的异质性,不同类型肿瘤对抗癌药物的敏感性不同,即使是同一类型的肿瘤,由于患者遗传背景不同,对抗癌药物的敏感性也不尽相同。而临床上大多凭经验用药,同一化疗方案固定不变的应用于许多患者,忽视个体差异,总体疗效不佳。因此,临床用药前或治疗中进行肿瘤药物敏感性试验,根据试验结果选择敏感药物对患者进行个体化治疗,可以避免经验用药的盲目性,提高治疗效果而减少毒副作用。目前,肿瘤药物敏感性试验方法主要分为体外法和体内

法,此外,还有针对分子靶向药物的检测。笔者查阅1993—2012年的中外文相关文献,将常用的肿瘤药物敏感性试验方法及其临床应用研究进展综述如下。

1 体外检测法

1.1 四甲基偶氮唑盐比色法(Methylthiazolyl tetrazolium assay)

传统3-(4,5-二甲基-2-噻唑)-2,5-二苯基溴化四氮唑蓝(MTT)法的基本原理为活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶可以将黄色MTT还原成不溶性蓝紫色甲臞结晶,加入盐酸异丙

表3 3批样品中有机溶剂残留量测定结果(%)

Tab 3 Results of the residual of organic solvent in 3 batches of samples (%)

批次	异丙醇	甲苯	其他
20080706	0.003	0.000 4	未检出
20091101	0.008	未检出	未检出
20091102	0.009	未检出	未检出

很好的分离,未见干扰,从而达到快速检测文拉法辛中残留溶剂的目的。

(2)前期试验中考虑溶剂中含有甲醇、乙醇、异丙醇等极性物质,曾采用了极性毛细管柱Agilent FFAP(30 m×0.32 mm, 1.80 μm)、程序升温(柱温初始35℃,保持10 min,然后以10℃/min升至150℃,再以30℃/min升至220℃保持2 min)条件进行测定,结果发现异丙醇与二氯甲烷保留时间基本一致,无法分离。而采用中等极性色谱柱DB-624,可以较好分离各组分,且未见其他干扰峰存在,因此采用DB-624色谱柱作

为本次试验的检测柱。

(3)盐酸文拉法辛在水、稀盐酸中易溶,在乙醇、氯仿中溶解,在乙醚中不溶。前期试验选择用水作为溶剂,发现正己烷、环己烷、丙酮、乙醚、甲苯等极性较小的物质在水中的溶解度较小,甚至会有明显析出,无法保证对照品溶液的稳定性以及试验结果的准确可靠。而完全使用DMF作为溶解介质,则会使被检测的残留溶剂的检测灵敏度大大降低。因此选择能够兼顾样品溶解以及被测残留溶剂检测灵敏度的50%DMF溶液作为溶解介质,既保证了样品的完全溶解,又能保证被测组分的检测灵敏度,而且未见干扰。

参考文献

- [1] 李焕德,彭文兴.抑郁症药物治疗新进展[J].国外医学精神病学分册,1997,24(2):129.
- [2] 潘志斌,李易平.4种抗抑郁药的经济评价[J].中国药房,2011,22(6):484.
- [3] 冯晓东,徐玲君,周健,等.文拉法辛的临床疗效评价[J].医药导报,2002,21(10):641.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录61-65.

(收稿日期:2012-08-21 修回日期:2013-01-05)

* 硕士研究生。研究方向:抗肿瘤药物敏感性。电话:020-66673666-2010。E-mail:chenjuanlovely@126.com

通信作者:教授,主任药师,硕士研究生导师,博士。研究方向:抗肿瘤药物敏感性研究、药物制剂及临床药学。E-mail:ghcheng661203@126.com