

顶空气相色谱法测定单磷酸阿糖腺苷原料药中5种残留溶剂^Δ

焦旭雯*, 陈 华, 梁蔚阳[#](广东省药品检验所, 广州 510180)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3408-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.29

摘要 目的:建立测定单磷酸阿糖腺苷原料药中乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、吡啶5种残留溶剂的方法。方法:采用顶空进样气相色谱法。色谱柱为Agilent DB-624毛细管柱,程序升温,进样口温度为200℃,检测器为氢火焰离子化检测器,检测温度为250℃,载气为氮气,流速为3 ml/min,进样方式为分流进样,分流比为1:1,顶空平衡温度为100℃,平衡时间为45 min,进样量为1 ml。按外标法进行定量分析。结果:5种残留溶剂峰分别与相邻峰分离完全。乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、吡啶的检测质量浓度线性范围为24.7~296.3 μg/ml($r=0.999\ 6$)、1.9~23.2 μg/ml($r=0.999\ 0$)、2.8~33.6 μg/ml($r=0.998\ 0$)、24.7~295.9 μg/ml($r=0.999\ 5$)、1.0~11.9 μg/ml($r=0.998\ 6$);精密密度、重复性试验的RSD≤4.35%;加样回收率分别为102.4%、102.1%、105.5%、100.3%、98.3%,RSD分别为2.0%、3.4%、4.8%、4.8%、4.0%;定量限为0.304 4~0.988 0 μg/ml,检测限为0.101 5~0.329 3 μg/ml。结论:该方法简单、准确、重复性好,可用于单磷酸阿糖腺苷中5种原料药残留溶剂的检测。

关键词 单磷酸阿糖腺苷;顶空气相色谱法;残留溶剂;检测

Determination of Five Residual Solvents in Vidarabine Monophosphate by Headspace Gas Chromatography

JIAO Xuwen, CHEN Hua, LIANG Weiyang (Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of ethanol, acetonitrile, dichloromethane, ethyl acetate, pyridine in vidarabine monophosphate. METHODS: Headspace GC was performed on the column of Agilent DB-624, programmed temperature, inlet temperature was 200 °C, the detector was flame ionization detector, detecting temperature was 250 °C, nitrogen was carrier gas, flow rate was 3 ml/min, split ratio was 1:1, the top bottles equilibrium temperature was 100 °C, and equilibrium time was 45 min, injection volume was 1 ml. external standard was used for quantitative analysis. RESULTS: The peaks of five residual solvents could be completely separated from the other peaks respectively, The linear rang was 24.7-296.3 μg/ml for ethanol ($r=0.999\ 6$), 1.9-23.2 μg/ml for acetonitrile ($r=0.999\ 0$), 2.8-33.6 μg/ml for dichloromethane ($r=0.998\ 0$), 24.7-295.9 μg/ml for ethyl acetate ($r=0.999\ 5$), 1.0-11.9 μg/ml for pyridine ($r=0.998\ 6$); RSDs of precision and reproducibility tests were lower than 4.35%; recoveries were 102.4% (RSD=2.0%, $n=9$), 102.1% (RSD=3.4%, $n=9$), 105.5% (RSD=4.8%, $n=9$), 100.3% (RSD=4.8%, $n=9$), 98.3% (RSD=4.0%, $n=9$). The minimum quantifation limit was 0.304 4-0.988 0 μg/ml and the minimum detection limit was 0.101 5-0.329 3 μg/ml. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reproducible, and can be used for the determination of residual solvents in vidarabine monophosphate.

KEYWORDS Vidarabine monophosphate; Headspace GC; Residual solvent; Determination

单磷酸阿糖腺苷临床主要用于治疗慢性乙型肝炎和其他病毒性感染,如带状疱疹、单纯疱疹、生殖器疱疹等,此外其在手足口病及儿童水痘方面也有一定的疗效。该药现行质量标准为国家药品监督管理局发布的国家药品标准WS1-(X-060)-2001Z,对残留溶剂未进行控制,也未见相关文献进行报道。根据不同企业的生产工艺,单磷酸阿糖腺苷生产的后3步中分别使用了乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯与吡啶等有机溶剂。为确保药品的安全、有效和质量可控,根据《中国药典》2015年版(四部)^[1]的相关规定和药用注册技术要求国际协调会(ICH)^[2-3]的指导原则,应增加有机溶剂的检查。因此,笔者对单磷酸阿糖腺苷原料药的残留溶剂进行了考察,建立了顶空气相色谱法测定单磷酸阿糖腺苷原料药中5种残留溶剂的测定方法。

1 材料

^Δ 基金项目:广东省医学科学技术研究基金项目(No.A2015256);广东省食品药品检验检测技术创新专项资金项目(No.2015ZX05)

* 主管药师。研究方向:生化药品检验和药品标准。电话:020-81887684。E-mail:jjxxw17@163.com

[#] 通信作者:主任药师。研究方向:生化药品与生物制品检验和药品标准。电话:020-81887684。E-mail:w1-1023@163.com

1.1 仪器

GC-6890N型气相色谱仪,包含氢火焰离子化检测器(FID)和G1888型顶空进样器(美国Agilent公司);CPA225D型电子天平(德国Sartorius公司)。

1.2 试剂

单磷酸阿糖腺苷原料药由5家企业提供(批号分别为IB200400A、111101、20130203、Y20130402、130401);二甲基亚砜为色谱纯,乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、吡啶均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent DB-624毛细管柱(30 m×0.32 mm, 1.8 μm)^[4];程序升温:柱温80℃,保持5 min,再以30℃/min升至230℃,保持3 min;载气:氮气;流速:3.0 ml/min;进样方式:分流进样,分流比:1:1;进样口温度:200℃;检测器:氢火焰离子化检测器(FID);检测温度:250℃;顶空平衡温度:100℃(平衡时间:45 min);进样量:1 ml。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别称取乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯和吡啶适量,用二甲基亚砜溶解并稀释制成每1 ml含

乙醇2.5 mg、乙腈0.21 mg、二氯甲烷0.3 mg、乙酸乙酯2.5 mg和吡啶0.1 mg的混合对照品贮备液。精密量取上述混合对照品贮备液5 ml,置于50 ml量瓶中,加二甲基亚砒定容,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品0.1 g,置于顶空瓶中,精密加入二甲基亚砒2 ml,密封,振荡使溶解,即得。

2.2.3 空白对照溶液 以二甲基亚砒作为空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验与专属性考察

分别量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液及空白溶剂(二甲基亚砒)适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。理论板数以各待测成分峰计,详见表1。由图1、表1可知,在此色谱条件下,目标峰位置附近无显著干扰峰,待测成分与相邻峰的分度度均 $>1.5^{[5]}$ 。

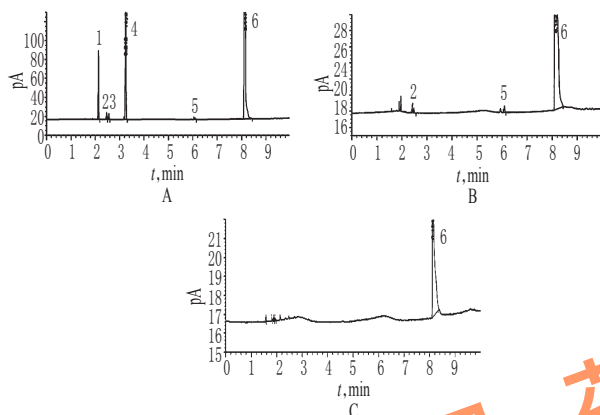


图1 气相色谱图

A.混合对照品;B.供试品;C.空白对照;1.乙醇;2.乙腈;3.二氯甲烷;4.乙酸乙酯;5.吡啶;6.二甲基亚砒

Fig 1 GC chromatograms

A.mixed reference substance; B.test sample; C.blank control; 1.ethanol; 2.acetonitrile; 3.dichloromethane; 4.ethyl acetate; 5.pyridine; 6.DMSO

表1 理论板数与分离度

Tab 1 Oretical plate number and resolution

待测成分	理论板数	分离度
乙醇	74 624	
乙腈	79 045	10.27
二氯甲烷	73 299	2.40
乙酸乙酯	56 080	14.81
吡啶	178 337	50.45

2.4 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液0.5、1、2、4、6 ml,置于50 ml量瓶中,用二甲基亚砒定容,摇匀,得系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各2 ml,分别置于顶空瓶中,密封。按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度($x, \mu\text{g/ml}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程与线性范围,详见表2。

表2 回归方程与线性范围($n=5$)

Tab 2 Regression equations and linear ranges($n=5$)

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/ml}$
乙醇	$y=2.928 1x-0.670 7$	0.999 6	24.7~296.3
乙腈	$y=2.061 8x-0.909 3$	0.999 0	1.9~23.2
二氯甲烷	$y=27.104x+2.526 3$	0.998 0	2.8~33.6
乙酸乙酯	$y=0.105 8x+0.376 5$	0.999 5	24.7~295.9
吡啶	$y=2.559 8x+0.076 3$	0.998 6	1.0~11.9

2.5 定量限与检测限考察

精密量取对照品贮备液适量,作系列稀释后按照“2.1”项下色谱条件进样测定,以各峰信噪比为3:1、10:1时的量分别为定量限和检测限。结果,乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、吡啶定量限分别为0.914 4、0.645 7、0.933 6、0.304 4、0.988 0 $\mu\text{g/ml}$,检测限分别为0.304 8、0.215 2、0.311 2、0.101 5、0.329 3 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6 精密度试验

取“2.2”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积。结果,乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯、吡啶峰的RSD分别为1.9%、1.5%、0.6%、0.7%、3.6%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一批号(IB1200400A)的样品适量,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,按照“2.1”项下色谱条件进样测定6次,记录峰面积,以外标法计算残留溶剂的含量。结果,乙腈平均含量为0.003 0 $\mu\text{g/ml}$,RSD=4.35%,其他4种溶剂未检出,表明本方法重复性较好^[6]。

2.8 加样回收率试验

分别精密量取“2.2.1”项下混合对照品贮备液4、5和6 ml,各置于50 ml量瓶中,加二甲基亚砒定容,摇匀,制成80%、100%和120%的低、中、高质量浓度溶液。精密称取已知残留溶剂量的原料药0.1 g,共9份,各置于顶空瓶中,再分别精密加入上述3种质量浓度溶液各2 ml,各3份,密封,顶空进样。同时,制备相应质量浓度的对照品溶液,精密量取2 ml,置于顶空瓶中,密封,顶空进样,按外标法计算加样回收率。结果,5种残留溶剂的总平均回收率为98.3%~105.5%,总平均RSD为2.0%~4.8%($n=9$),详见表3。

表3 加样回收率试验结果($n=9, \%$)

Tab 3 Results of recovery test($n=9, \%$)

待测成分	低质量浓度		中质量浓度		高质量浓度		平均加样回收率	RSD
	平均加样回收率	RSD	平均加样回收率	RSD	平均加样回收率	RSD		
乙醇	102.1	0.25	100.2	0.79	104.8	0.63	102.4	2.0
乙腈	103.4	0.44	97.8	1.71	105.3	0.49	102.1	3.4
二氯甲烷	101.6	0.41	103.5	4.58	111.2	1.32	105.5	4.8
乙酸乙酯	96.4	0.92	98.8	4.62	105.6	1.59	100.3	4.8
吡啶	101.5	2.95	94.8	3.02	98.6	3.4	98.3	4.0

2.9 样品残留溶剂测定

按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,每批各2份,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,并以外标法计算各有机溶剂残留量,结果见表4。

表4 样品残留溶剂测定结果($n=2, \%$)

Tab 4 Results of content determination of 5 solvents in samples($n=2, \%$)

生产企业	样品批号	乙醇	乙腈	二氯甲烷	乙酸乙酯	吡啶
A	IB1200400A		0.003			
B	111101		0.003			0.008
C	20130203		0.003			
D	Y20130402	0.022	0.003			
E	130401		0.003			

3 讨论

3.1 进样方式的选择

直接进样相比顶空进样操作简单,适合高沸点化合物的分析^[7],但由于待测样品溶解度较差,难以找到合适的溶剂使样品溶解,故本研究采用顶空进样。

HPLC法测定养阴合剂中黄芩苷的含量^Δ

车珂科^{1*}, 杨帆^{2,3}, 邓开英^{2,3#} (1.重庆市第三人民医院药学部, 重庆 400014; 2.重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 3.重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3410-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.30

摘要 目的: 建立测定养阴合剂中黄芩苷含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 SunFire C₁₈, 流动相为甲醇-水-磷酸(43:57:0.2, V/V/V), 流速为 1.0 ml/min, 检测波长为 280 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μl。结果: 黄芩苷的检测进样量线性范围为 0.055 75~1.115 μg ($r=0.999\ 9$); 精密性、稳定性、重复性试验的 RSD < 2%; 加样回收率为 95.39%~98.44% (RSD=1.19%, $n=6$)。结论: 该方法简便、快速, 结果准确, 适用于养阴合剂中黄芩苷的含量测定。

关键词 养阴合剂; 黄芩苷; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Baicalin in Yangyin Mixture by HPLC

CHE Keke¹, YANG Fan^{2,3}, DENG Kaiying^{2,3} (1. Dept. of Pharmacy, Chongqing Third People's Hospital, Chongqing 400014, China; 2. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 3. Chongqing Engineering Center for Pharmaceutical Process and Quality Control, Chongqing 401121, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of baicalin in Yangyin mixture. METHODS: HPLC was performed on the column of SunFire C₁₈ with mobile phase of methanol-water-phosphoric acid (43:57:0.2, V/V/V) at a flow rate of 1.0 ml/min, the detection wavelength was 280 nm, column temperature was 30 ℃, and the volume injection was 10 μl. RESULTS: The linear range of baicalin was 0.055 75-1.115 μg ($r=0.999\ 9$); RSDs of precision, stability and reproducibility test were lower than 2%; recovery was 95.39%-98.44% (RSD=1.19%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid and accurate, and suitable for the content determination of baicalin in Yangyin mixture.

KEYWORDS Yangyin mixture; Baicalin; HPLC; Determination

3.2 溶剂的选择

单磷酸阿糖腺苷在水中极微溶解, 待测溶剂二氯甲烷也不溶于水。经考察, 单磷酸阿糖腺苷经过 100 ℃ 顶空平衡后, 在二甲基亚砜中溶解。二甲基亚砜在待测成分之后出峰, 对乙醇、乙腈、二氯甲烷、乙酸乙酯与吡啶均无干扰, 故选择二甲基亚砜作为溶剂。

3.3 柱温的考察

待测成分沸点相差较大, 初始柱温为 100 ℃ 时, 样品对待测溶剂乙腈有干扰。优化程序升温条件, 将初始柱温设定为 80 ℃, 保持 5 min, 再以 30 ℃/min 升至 230 ℃, 保持 3 min, 氮气流速为 3.0 ml/min, 5 种溶剂的色谱峰均有良好的分离度。

3.4 顶空瓶平衡温度的考察

本研究比较了不同顶空瓶温度(90、100、110 ℃)的影响, 结果发现 100 ℃ 时各溶剂峰的灵敏度与重复性最佳, 且样品完全溶解, 故选择 100 ℃ 作为平衡温度。

综上所述, 本研究考察了目前生产单磷酸阿糖腺苷的 5 家企业的多批样品, 建立的方法具有适用性。方法学研究结果表明, 本方法简单、准确、重复性好、专属性强, 可用于单磷酸阿糖腺苷原料药 5 种残留溶剂的检测^[9-9]。

^Δ 基金项目: 重庆市卫生计生委医学科研项目(No. 2015MSX-M067)

* 主管药师, 博士研究生。研究方向: 医院制剂、药物新剂型与新技术。电话: 023-63501082。E-mail: beayerchoe@163.com

通信作者: 主任药师。研究方向: 药品质量检测与质量控制。电话: 023-86072717。E-mail: dengkaiying6811@sina.com

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 105.
- [2] ICH 指导委员会. 药品注册的国际技术要求: 质量部分[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 79.
- [3] 李眉, 马玉楠. 简介 ICH 关于药品中溶剂残留的指导原则[J]. 中国药师, 1998, 1(3): 119.
- [4] 崇小萌, 胡昌勤. 利用中等极性气相色谱系统分析药物残留溶剂[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 2 048.
- [5] 陈汝红, 杨春巧, 张轶华. 顶空气相色谱法检测苯星青霉素原料药中的 5 种残留溶剂[J]. 中国药房, 2012, 23(45): 4 287.
- [6] 祁彩霞, 杨发胜. 气相色谱法测定盐酸左氧氟沙星原料药中有机溶剂三氯甲烷残留[J]. 中国药业, 2014, 23(12): 73.
- [7] 高文超, 李启艳, 咸瑞卿, 等. 气相色谱法测定破壁灵芝孢子粉类保健食品中 8 种残留溶剂[J]. 药学研究, 2014, 33(11): 642.
- [8] 宁伟志, 吴秀荣, 林焕泽, 等. 顶空气相色谱法测定盐酸伐昔洛韦中的残留溶剂[J]. 中国药房, 2012, 23(9): 832.
- [9] 温耀明, 李国琴, 范建辉, 等. 顶空气相色谱法测定盐酸普拉克索中残留溶剂[J]. 中国药事, 2014, 28(9): 1 001.

(收稿日期: 2015-07-16 修回日期: 2016-05-18)

(编辑: 申琳琳)