

GC 测定褪黑素类似物中有机溶剂残留量

谢晓霞^{1,2}, 肖炳坤¹, 杨建云¹, 甄蓓¹, 黄荣清^{1*} (1.军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 北京 100850; 2.安徽医科大学, 合肥 230032)

摘要: 目的 建立毛细管气相色谱法测定褪黑素类似物 AGO 中乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯 5 种有机溶剂的残留量。方法 采用 DB-Wax(30 m×0.45 mm, 0.85 μm)毛细管色谱柱; 氢火焰离子化检测器(FID); 程序升温: 初始温度 45 °C(维持 9 min), 以 30 °C·min⁻¹ 速率升温至 200 °C(维持 9 min); 载气为氮气, 柱流速为 3.5 mL·min⁻¹; 进样口温度: 200 °C; 检测器温度: 250 °C; 分流直接进样, 二甲基亚砜为溶剂, 乙腈为内标物, 内标法测定残留溶剂的含量。结果 各组分分离完全, 在所考察的浓度范围内线性关系良好, 其中乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯的线性范围分别为 107.44~1 074.4 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9), 108.24~1 082.4 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 7), 18.550~185.50 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 8), 14.208~142.08 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 4), 19.074~190.74 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9), 平均回收率为 98%~102%。结论 该方法操作简单, 精密度好, 准确可靠, 可用于该药物有机溶剂残留量的测定。

关键词: 褪黑素类似物; 毛细管气相色谱法; 有机溶剂残留

中图分类号: R917.101

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2013)06-0645-04

Determination of Residual Organic Solvents in Melatonin Analogue by GC

XIE Xiaoxia^{1,2}, XIAO Bingkun¹, YANG Jianyun¹, ZHEN Bei¹, HUANG Rongqing^{1*} (1.Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Science, Beijing 100850, China; 2.Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a capillary GC method for the determination of residual organic solvents including ethanol, ethyl acetate, methylene chloride, tetrahydrofuran and toluene in melatonin analogue. **METHODS** The residual organic solvents were separated on DB-Wax capillary column(30 m×0.45 mm, 0.85 μm). FID was used as detector with a temperature of 250 °C, and the inlet temperature was 200 °C. The carrier gas was nitrogen, and the flow rate was 3.5 mL·min⁻¹. The programmed column temperature was set as follows: maintained at 45 °C for 9 min and raised to 200 °C at the rate of 30 °C·min⁻¹ followed by holding for 9 min. The sample dissolved in dimethylsulfoxide and acetonitrile was used as the internal standard. The assay of residual solvents was calculated by internal standard method. **RESULTS** Five residual organic solvents were completely separated. The linear ranges of ethanol, ethyl acetate, methylene chloride, tetrahydrofuran and toluene were 107.44~1 074.4 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9), 108.24~1 082.4 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 7), 18.550~185.50 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 8), 14.208~142.08 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 4), 19.074~190.74 μg·mL⁻¹(*r*=0.999 9), the average recovery of the preparation were between 98%~102%. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, accurate, and can be used for the determination of the residual organic solvents in melatonin analogue.

KEY WORDS: melatonin analogue; GC; residual organic solvents

褪黑素类似物 AGO 作为一种新型抗抑郁药,能有效治疗抑郁症,尤其对严重抑郁症疗效明显,并具有改善睡眠参数、不影响性功能的特点^[1]。其独特的作用机制是通过激活褪黑素受体和拮抗 5-HT_{2C} 受体发挥抗抑郁效应^[2]。本品在合成过程中使用了乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯等有机溶剂。参考有关文献^[3-7]并参照人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)Q3C 残留溶剂指

导原则和中国药典 2010 年版二部(附录 VIII P)残留溶剂测定法,本实验建立了毛细管气相色谱法,以直接进样的方式同时测定上述 5 种有机溶剂,操作简单、灵敏度高,重现性好,可有效用于 AGO 中有机溶剂残留量的控制。

1 仪器与试剂

Agilent 6820 型气相色谱仪, FID 检测器, Certity QA-QC 色谱工作站(美国 Agilent 公司);

基金项目: 国家自然科学基金项目(81072613); 十二五国家科技重大专项“重大新药创制”综合性新药研究开发技术大平台(2012ZX09301003-001-010)

作者简介: 谢晓霞,女,硕士生 Tel: (010)66930217 E-mail: xiexiaoxia.2006@163.com *通信作者: 黄荣清,男,硕士,教授 Tel: (010)66931341 E-mail: huangrq@tom.com

Sartorius BP211D 型十万分之一天平。

乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯、乙腈均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司), 溶解介质二甲基亚砜为分析纯(国药集团化学试剂有限公司), 经蒸馏纯化而得, 对测定无干扰; AGO 原料药(由军事医学科学院放射与辐射医学研究所提供, 批号: 20100819, 20101201, 20101202, 20101203)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 DB-Wax(30 m×0.45 mm, 0.85 μm) 毛细管色谱柱; 载气高纯氮; 柱流速为 3.5 mL·min⁻¹; 分流比为 10:1; 进样口温度为 200 °C, FID 检测器温度为 250 °C; 程序升温, 初始温度为 45 °C, 维持 9 min, 然后以 30 °C·min⁻¹ 的速率升至 200 °C, 维持 9 min; 进样量 1 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 内标储备液的制备 精密称取乙腈 39.30 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀, 作为内标储备液。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取四氢呋喃 71.04 mg, 乙酸乙酯 541.20 mg, 二氯甲烷 92.75 mg, 乙醇 537.20 mg, 甲苯 95.37 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 0.5 mL 和内标储备液 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取本品 500 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 精密量取内标储备液 1 mL, 加二甲基亚砜溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取二甲基亚砜对照品溶液和供试品溶液各 1 μL, 注入气相色谱仪, 记录色谱图, 测定各有机溶剂的分离度和柱效, 结果见图 1。表明二甲基亚砜及内标溶液对乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯的测定无干扰。以上各有机溶剂计算的理论板数均≥5 000, 相邻溶剂的分离度均符合要求。

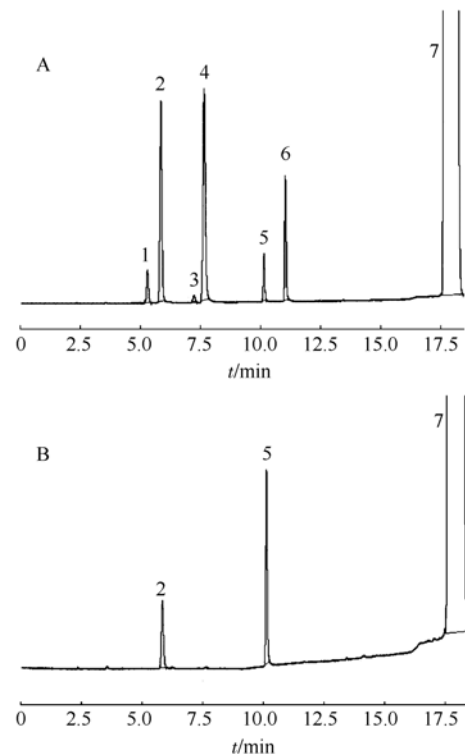


图 1 有机溶剂残留气相色谱图

A-对照品; B-样品; 1-四氢呋喃; 2-乙酸乙酯; 3-二氯甲烷; 4-乙醇; 5-乙腈(内标); 6-甲苯; 7-二甲基亚砜(溶剂)

Fig 1 GC chromatograms of residual organic solvents

A-control; B-sample; 1-tetrahydrofuran; 2-ethyl acetate; 3-methylene chloride; 4-ethanol; 5-acetonitrile; 6-toluene; 7-dimethylsulfoxide (solvent)

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液 1 μL, 连续进样 7 次, 记录色谱图, 计算对照品峰面积与内标峰面积比值的 RSD。乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯的 RSD 分别为 0.77%, 1.54%, 1.68%, 2.04%, 0.53%。实验结果表明, 该仪器精密密度良好。

2.4 线性关系考察

精密量取对照品储备液 0.2, 0.4, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0 mL, 分别置 10 mL 量瓶中, 再分别加入内标储备液 1.0 mL, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀。配成一系列标准溶液, 每 1 mL 含四氢呋喃: 14.208, 28.416, 35.520, 49.728, 71.040, 106.56, 142.08 μg; 乙酸乙酯: 108.24, 216.48, 270.60, 378.84, 541.20, 811.80, 1082.4 μg; 二氯甲烷: 18.550, 37.100, 46.375, 64.925, 92.750, 139.13, 185.50 μg; 乙醇: 107.44, 214.88, 268.60, 376.04, 537.20, 805.80, 1074.4 μg; 甲苯: 19.074, 38.148, 47.685, 66.759, 95.370, 143.06, 190.74 μg。取系列标准溶液, 分别进样 1 μL, 记录色谱

图,以各溶液浓度 $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,各对照品峰面积与内标峰面积比值 Y 为纵坐标绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表 1。

表 1 线性范围与回归方程($n=7$)

Tab 1 Linear ranges and regression equations of the organic solvents($n=7$)

溶剂	回归方程	r	浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
四氢呋喃	$Y=0.026\ 6C-0.000\ 15$	0.999 4	14.208~142.08
乙酸乙酯	$Y=0.022\ 49C-0.054\ 27$	0.999 7	108.24 ~1 082.4
二氯甲烷	$Y=0.005\ 14C+0.004\ 09$	0.999 8	18.550~185.50
乙醇	$Y=0.028\ 79C-0.116\ 88$	0.999 9	107.44 ~1 074.4
甲苯	$Y=0.058\ 7C-0.044\ 82$	0.999 9	19.074~190.74

2.5 检测限和定量限

取对照品溶液逐步稀释,按基线噪音信号的 3 倍计算检测限,按基线噪音信号的 10 倍计算定量限,实验结果表明,乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯的检测限分别为:1.32, 1.96, 5.52, 1.78, 0.72 ng; 定量限($n=6$)分别为:3.95, 6.01, 18.40, 5.92, 2.17 ng, RSD 分别为 1.75%, 2.15%, 3.20%, 2.54%, 0.95%。

2.6 重复性试验

取本品(批号:20101201)6 份,各约 500 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密量取内标储备液 1 mL,加二甲基亚砷溶解并稀释至刻度,摇匀。精密吸取溶液各 1 μL ,分别注入气相色谱仪,记录色谱图,同法测定对照品溶液。按内标法计算各有机溶剂残留量。结果,乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯在该批样品中均未检出,乙酸乙酯平均含量为 0.043%(RSD=2.28%)。

2.7 稳定性试验

取本品(批号:20101201)500 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密量取内标储备液 1 mL,加二甲基亚砷溶解并稀释至刻度,摇匀。吸取 1 μL 每间隔 2 h 进样 1 次,测定各溶剂与内标峰面积比值。结果表明乙酸乙酯峰面积与内标峰面积比值的 RSD 为 0.76%;乙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯均未检出。结果显示样品溶液在 12 h 内稳定。

2.8 加样回收率试验

取本品(批号:20101201)500 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,精密量取内标储备液 1 mL 和适量的标准储备液制成 3 个不同浓度的待测溶液,其中各待测溶剂浓度分别为对照溶液各浓度的 80%, 100%, 120%。每个浓度配制成 3 份样品,

按样品测定的方法进行回收率测定,计算时扣除原料药中所含的残留溶剂量。乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃和甲苯的平均回收率分别为 100.76%, 101.49%, 99.33%, 98.71%, 98.74%, RSD 分别为 3.29%, 2.87%, 1.49%, 3.09%, 2.53%。

2.9 样品中残留溶剂测定

取供试品,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,分别进样 1 μL ,按内标法计算各有机溶剂的残留量。结果见表 2。

表 2 4 样品测定结果($n=4$)

Tab 2 Determination results of samples ($n=4$)

溶剂	批号/%				规定 限量/%
	20100819	20101201	20101202	20101203	
乙醇	未检出	未检出	未检出	未检出	0.5
乙酸乙酯	0.023	0.045	0.029	0.026	0.5
二氯甲烷	未检出	未检出	未检出	未检出	0.06
四氢呋喃	未检出	未检出	未检出	未检出	0.072
甲苯	未检出	未检出	未检出	未检出	0.089

结果表明,4 批 AGO 原料药中 5 种有机溶剂残留均符合规定。

3 讨论

3.1 溶剂的选择

考虑到本品在水中几乎不溶,在二甲基亚砷中易溶且二甲基亚砷能与上述 5 种待测组分以任意比例互溶,因此选择二甲基亚砷为测定溶剂。结果表明,在本色谱条件下,二甲基亚砷可以与待测组分分离,且对各组分测定均无干扰。

3.2 柱温的选择

为了改善分离、缩短分析时间,柱温的选择尤为重要。在本实验中采用程序升温方式,初始温度 45 $^{\circ}\text{C}$,维持 9 min,使低沸点乙醇、乙酸乙酯、二氯甲烷、四氢呋喃在 DB-Wax 色谱柱上可以得到较好分离;再以 30 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至 200 $^{\circ}\text{C}$,维持 9 min,使甲苯和二甲基亚砷能迅速分离且二甲基亚砷出峰完全。

3.3 内标物的选择

本实验采用内标法来抵消可能由直接进样等操作条件变化而引起的误差,以便得到较准确的结果。试验过程中考察了以苯、正丁醇、正丙醇、乙腈等作为内标物质,结果乙腈色谱峰位于几个被测组分色谱峰中间,并与这些组分完全分离。最终,选择乙腈为内标物质。

3.4 有机溶剂残留的限度要求

本实验参照中国药典和 ICH Q3C 残留溶剂指导原则^[8-9], 应对本品合成工艺过程中所使用的未能完全去除的有机溶剂进行严格控制。5 种溶剂中二氯甲烷、四氢呋喃、甲苯为限制使用的第二类溶剂, 其他为药品 GMP 或其他质量要求限制使用的第三类溶剂, 根据限度要求, 规定二氯甲烷不得过 0.06%, 四氢呋喃不得过 0.072%, 甲苯不得过 0.089%, 乙醇、乙酸乙酯不得过 0.5%。经测定, 合成的 4 批样品均符合规定。

REFERENCES

- [1] COREY R, HOPKINS. ACS chemical neuroscience molecule spotlight on valdoxen [J]. ACS Chem Neurosci, 2010, 1(12): 772-773.
- [2] BODINAT C D, BÉATRICE G L, MOCAER E, et al. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 25(6): 1-15.

- [3] SHI J F, CHEN Y J, SHI Y, et al. Determination of residual organic solvents in rosuvastatin calcium by capillary GC [J]. China Pharm(中国药师), 2012, 15(5): 621-623.
- [4] WANG J, WANG H B, WANG Z J. Determination of nine residual organic solvent in clindamycin palmitate hydrochloride by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(9): 829-833.
- [5] TENG J J, LI Q, JI W, et al. Determination of residual organic solvents in naltrexone methylbromide by capillary gas chromatography [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 153-156.
- [6] DIAO Y Z, YI M J, JIA J, et al. Determination of residual organic solvents in nelarabine by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(10): 956-958.
- [7] GAO R Y, WEI F R, SHAN M Q, et al. Determination of residual solvents in pirfenidone by GC [J]. Qilu Pharm Aff(齐鲁药事), 2011, 30(7): 383-384.
- [8] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 61.
- [9] ZHOU H J. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals For Human Use Quality Section (药品注册的国际技术要求·质量部分) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2001.

收稿日期: 2012-10-16

HPLC 同时测定西归中阿魏酸和佛手柑内酯的含量

张海珠, 李齐贤, 孙帮燕, 周萍* (大理学院药学与化学学院, 云南 大理 671000)

摘要:目的 建立同时测定西归药材中阿魏酸和佛手柑内酯含量的方法。方法 采用色谱柱为 PhenomeneX Gemini-NX C₁₈ 110A 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-0.05%磷酸水溶液, 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长为 322 nm; 柱温为 30 °C。结果 阿魏酸在 0.020 1~0.603 μg、佛手柑内酯在 0.020 3~0.609 μg 内线性关系良好; 阿魏酸和佛手柑内酯的平均回收率分别为 96.8%(RSD=2.0%)和 98.7%(RSD=2.9%)。结论 本方法首次建立了同时测定西归中阿魏酸和佛手柑内酯的 HPLC 分析方法, 结果准确, 重复性好, 可作为西归药材的质量评价方法。

关键词: 西归; 阿魏酸; 佛手柑内酯; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2013)06-0648-04

Simultaneous Determination of Bergapten and Ferulic Acid in Seselopsis by HPLC

ZHANG Haizhu, LI Qixian, SUN Bangyan, ZHOU Ping* (College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To simultaneous determine the content of ferulic acid and bergapten in Seselopsis. **METHODS** The chromatographic separation was performed on a PhenomeneX Gemini-NX C₁₈ 110A (250 mm×4.60 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of methanol-0.05% phosphoric acid with gradient elute, the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The detection wavelength was 322 nm and the column temperature was 30 °C. **RESULTS** Good linear relationship between the peak area and content of ferulic acid and bergapten was achieved when the amount was within 0.020 1-0.603 μg, 0.020 3-0.609 μg; the

基金项目: 大理学院应用开发研究基金(YYKF2006-1-1)

作者简介: 张海珠, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0872)2257417 E-mail: zhouping725@126.com

E-mail: hzningjing@163.com

*通信作者: 周萍, 女, 硕士, 教授 Tel:

(0872)2257417 E-mail: zhouping725@126.com