

# 顶空气相色谱法测定替考拉宁原料药及注射剂中5种有机溶剂残留量

耿文飞<sup>1\*</sup>, 吴军营<sup>1</sup>, 王春霞<sup>2</sup>, 任乐民<sup>1</sup>, 可爱兵<sup>1#</sup>(1.华北制药集团新药研究开发有限责任公司/微生物药物国家工程研究中心/河北省工业微生物代谢工程技术研究中心, 石家庄 050015; 2.河北省食品药品检验院, 石家庄 050011)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)18-2554-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.18.37

**摘要** 目的:建立测定替考拉宁原料药及注射剂中5种有机溶剂残留量的方法。方法:采用顶空气相色谱法。色谱柱为以6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷(DB-624)为固定液的毛细管柱,采用程序升温,进样口温度为200℃,检测器为氢火焰离子化检测器(FID),载气为高纯氮气,恒定流速为1 ml/min,分流比为40:1,进样量为1 ml。结果:乙醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃和三乙胺在各自检测质量浓度范围内与峰面积线性关系良好( $r$ 在0.999 0~0.999 3之间);精密度、重复性试验的RSD $\leq$ 2.6%;平均加样回收率分别为95.6%、97.0%、103.2%、94.3%、98.2%(RSD在2.1%~4.9%之间, $n=9$ );最低检测限分别为2、2、2、0.7、0.3  $\mu\text{g/ml}$ 。结论:该方法快速、灵敏、准确,可用于替考拉宁原料药及注射剂中有机溶剂残留量测定。

**关键词** 替考拉宁;原料药;注射剂;残留溶剂;顶空气相色谱法

## Determination of Residues of 5 Organic Solvents in Teicoplanin Raw Material and Injection by Headspace GC

GENG Wen-fei<sup>1</sup>, WU Jun-ying<sup>1</sup>, WANG Chun-xia<sup>2</sup>, REN Le-min<sup>1</sup>, KE Ai-bing<sup>1</sup> (1.North China Pharmaceutical Group Corporation New Drug Research and Development Co., Ltd./National Engineering Research Center of Microbial Medicine/Research Center of Hebei Industry Microbial Metabolic Engineering & Technology, Shijiazhuang 050015, China; 2.Hebei Inspection Institute for Food and Drug Control, Shijiazhuang 050011, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the residues determination of 5 organic solvents in teicoplanin raw material and injection. METHODS: Headspace GC was performed on the column with 6% cyanopropylphenyl-94% dimethyl polysiloxane (DB-624) as the stationary phase capillary column, the carrier gas was nitrogen, using the temperature program. The temperature of inlet was 200 °C, detector was hydrogen flame ionization detector with the flow rate of 1 ml/min, split ratio was 40 : 1 and the volume was 1 ml. RESULTS: Good linearity of ethanol, acetone, ethyl acetate, tetrahydrofuran and triethylamine were obtained ( $r$  were 0.999 0-0.999 3); the average recoveries were respectively 95.6%, 97.0%, 103.2%, 94.3% and 98.2% (RSD were 2.1%-4.9%,  $n=9$ ); RSDs of precision and repeatability tests  $\leq$ 2.6%; and the minimum detectable concentration were respectively 2, 2, 2, 0.7 and 0.3  $\mu\text{g/ml}$ . CONCLUSIONS: The established method is rapid, sensitive and accurate, and can be used for the residues determination of organic solvents in teicoplanin raw materials and injection.

**KEYWORDS** Teicoplanin; Raw material; Injection; Residual solvents; Headspace GC

分析的研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 1966.

[4] 陈长功, 安靓, 王新宏, 等. GC-MS法测定麝香保心丸中龙脑、异龙脑、麝香酮、苯甲酸苄酯的含量[J]. 中成药, 2007, 29(2): 215.

[5] 方颖, 赵希贤, 赵鸣舒, 等. 气相色谱法同时测定醒脑静注射液中的麝香酮、龙脑、樟脑、异龙脑的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(8): 96.

[6] 汪秀月. 气相色谱法测定醒脑静注射液中的麝香酮含量[J]. 海峡药学, 2011, 23(11): 66.

[7] 罗建明, 李桃, 王欣然, 等. 气相色谱测定脑清喷鼻剂中麝香与冰片的方法学研究[J]. 中药材, 2011, 34(5): 797.

[8] 鞠建明, 孔铭, 钱大玮, 等. 六神软膏质量控制标准研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(6): 1060.

[9] 刘亚妮, 魏柳珍, 于捷飞, 等. 气相色谱法同时测定无极膏中5个挥发性有效成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(3): 406.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部[S]. 2010年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 360.

[11] 于超, 孙冠芸, 王宇, 等. 用气-质联用技术测定美声喉泰含片中薄荷脑含量[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(11): 45.

(收稿日期: 2014-09-19 修回日期: 2015-03-20)  
(编辑: 陈宏)

\* 高级工程师。研究方向: 新药研发、质量研究。电话: 0311-85993040。E-mail: wenfei-g@163.com  
# 通信作者: 高级工程师。研究方向: 新药研发、天然药物。电话: 0311-85992995。E-mail: keaibing@ncpc.com

替考拉宁(Teicoplanin),又名太古霉素,是特定的游动放线菌 *Actinoplanes teichomyceticus* 经发酵、提取后得到的糖肽类抗生素,为多个化学结构非常相似的化合物组成的抗生素混合物,是盐酸万古霉素之后又一重要的抗耐药菌抗生素<sup>[1-4]</sup>。其生产工艺<sup>[5-6]</sup>中先后用两种树脂进行脱色、吸附,解吸过程中使用了乙醇;解吸液过滤、真空浓缩后,加丙酮和乙酸乙酯结晶得到粗粉;树脂柱层析使用了四氢呋喃和乙醇,层析液浓缩、加丙酮结晶得到精粉;工艺中还多次用三乙胺调节酸碱度。基于此,应对乙醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺这5种溶剂在成品中的残留量进行测定和控制。本试验建立了以顶空气相色谱法测定替考拉宁原料药及制剂中上述5种有机溶剂残留量的方法,供同行参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

7890A 气相色谱仪,包括 7697A 顶空进样器、ChemStation 工作站(美国 Agilent 公司);AL204 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司)。

### 1.2 药品与试剂

替考拉宁原料药(批号:130101、130102、130103)、注射用替考拉宁(无辅料冻干制剂,规格:0.2 g,批号:T130202、T130303)均为华北制药股份有限公司生产;乙醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺均为色标物质(纯度均不低于99.5%);二甲基亚砜(Merck GC 级)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:以6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷(DB-624)为固定液的毛细管柱(30 m×0.32 mm×1.8 μm);升温程序:初始温度为70℃,保持4 min,以7℃/min升温到100℃,保持4 min;进样口温度:200℃;载气:高纯氮气;恒定流速:1 ml/min;分流比:40:1;检测器:氢火焰离子化检测器(FID);顶空瓶平衡温度:85℃,平衡时间:50 min;进样量:1 ml。

### 2.2 溶液的制备

空白溶液:精密量取二甲基亚砜2 ml,置于20 ml顶空瓶中,压盖。

对照品溶液:精密称取乙醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺各适量,以二甲基亚砜制成每1 ml中分别含各组分0.5、0.5、0.5、0.072、0.032 mg的溶液,精密量取2 ml,置于20 ml顶空瓶中,压盖。

供试品溶液:分别精密称取样品0.2 g,置于20 ml顶空瓶中,准确加入二甲基亚砜2 ml,压盖。

### 2.3 系统适用性试验

按“2.1”项下色谱条件,取“2.2”项下空白溶液、对照品溶液、注射用替考拉宁供试品溶液、原料药供试品溶液进样分析,记录色谱,详见图1。由图1可知,各组分均可完全分离,最难分离组分间的分离度为3.5,各组分理论板数均大于15 000。

### 2.4 线性关系考察

精密称取乙醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺各适量,加二甲基亚砜逐级稀释,制成乙醇、丙酮、乙酸乙酯质量浓度分别为1 000、750、500、250、125、62.5 μg/ml,四氢呋喃质量浓度分别为144、108、72、36、18、9 μg/ml,三乙胺质量浓度分别为64、48、32、16、8、4 μg/ml的6组线性对照品溶液。分别按“2.1”项下色谱条件进样,以各组分质量浓度( $x$ , μg/ml)为横

坐标、对应的峰面积( $y$ )为纵坐标进行一阶线性拟合,回归方程和线性范围详见表1。

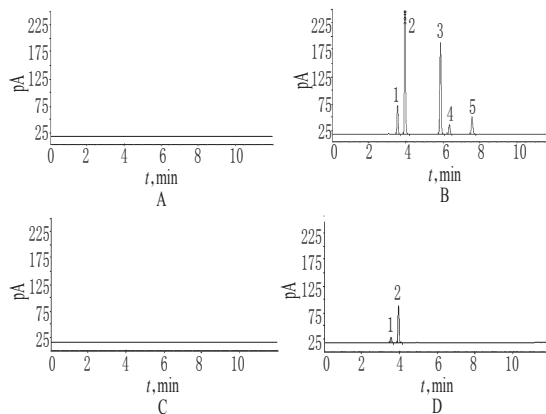


图1 顶空气相色谱图

A.空白溶液;B.对照品溶液;C.注射用替考拉宁供试品溶液(批号:T130202);D.原料药供试品溶液(批号:130101);1.乙醇;2.丙酮;3.乙酸乙酯;4.四氢呋喃;5.三乙胺

Fig 1 Headspace GC chromatograms

A.blank solution; B.reference solution; C.teicoplanin for injection solution (lot No. T130202); D.raw material solution (lot No.130101); 1.ethanol; 2.acetone; 3.ethyl acetate; 4.tetrahydrofuran; 5.triethylamine

表1 回归方程和线性范围( $n=6$ )

Tab 1 Regression equation and linear range ( $n=6$ )

待测成分	回归方程	线性范围, μg/ml	$r$
乙醇	$y=0.5197x-9.0925$	62.5~1 000	0.9992
丙酮	$y=3.2015x-62.4780$	62.5~1 000	0.9993
乙酸乙酯	$y=1.8380x-38.1760$	62.5~1 000	0.9991
四氢呋喃	$y=1.3794x-4.0192$	9~144	0.9990
三乙胺	$y=6.3941x-11.9880$	4~64	0.9990

### 2.5 灵敏度试验

将对照品溶液用二甲基亚砜逐级稀释,进样,当信噪比约为10:1时,乙醇、丙酮、乙酸乙酯的最低定量限均为5 μg/ml;四氢呋喃、三乙胺的最低定量限分别为2、1 μg/ml。当信噪比约为3:1时,乙醇、丙酮、乙酸乙酯的最低检测限均为2 μg/ml;四氢呋喃、三乙胺的最低检测限分别为0.7、0.3 μg/ml。结果表明,方法灵敏度可以达到测定要求。

### 2.6 精密度试验

按“2.2”项下方法配制对照品溶液8份,按“2.1”项下色谱条件连续进样,统计8次进样色谱中乙醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺峰面积的RSD。结果,RSD分别为1.2%、2.2%、1.4%、2.6%、1.8% ( $n=8$ ),均远小于10%,符合2010年版《中国药典》(二部)附录VIII P规定。

### 2.7 重复性试验

按“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下供试品溶液配制方法,对替考拉宁原料药样品(批号:130101)重复测定6次。结果,乙醇、丙酮残留量均值分别为0.10%、0.15%,RSD分别为2.4%、1.9% ( $n=6$ ),其他3种溶剂未检出。对注射用替考拉宁样品(批号:T130202)重复测定6次。结果,5种溶剂均未检出。以上表明该方法重复性好。

### 2.8 基质校正试验

取注射用替考拉宁(批号:T130202)0.2 g,精密称定,置于20 ml顶空瓶中,加入“2.2”项下对照品溶液2 ml,压盖,重复配

制4份,按“2.1”项下色谱条件进样,色谱图中各组分峰面积与“2.2”项下对照品溶液图谱中对应组分峰面积比值定义为基质校正因子 $F$ 。则 $F_{乙醇}$ 、 $F_{丙酮}$ 、 $F_{乙酸乙酯}$ 、 $F_{四氢呋喃}$ 、 $F_{三乙胺}$ 分别为0.99、0.95、1.11、1.07、0.93。其中,乙醇、丙酮、四氢呋喃、三乙胺的 $F$ 均在0.9~1.1之间,说明采用此方法,供试品溶液与对照品溶液中这4种溶剂气液平衡时挥发比例相近。而 $F_{乙酸乙酯}$ 大于1.1,说明同浓度的乙酸乙酯在供试品溶液中测定响应值大于对照品溶液中对响应值10%以上,会影响测定准确度。

## 2.9 加样回收率试验

取注射用替考拉宁(批号:T130202)0.2 g,精密称定,共10份,其中1份加入2 ml二甲亚砜,作为空白溶液;另9份分别加入低(50%)、中(100%)、高(150%)3种质量浓度的对照品溶液2 ml,每种质量浓度各配制3份,置于顶空瓶中,作为加样回收率供试品溶液,以“2.2”项下对照品溶液作为对照,按“2.1”项下色谱条件分别进样,加样回收率供试品溶液中各组分峰面积除以相应的基质校正因子后,照外标法计算乙醇、丙酮、乙酸乙酯、四氢呋喃、三乙胺的加样回收率,结果详见表2(注:表中低、中、高代表低、中、高质量浓度)。

表2 加样回收率试验结果( $n=9$ , %)

Tab 2 Results of recovery test( $n=9$ , %)

加样回收率	乙醇	丙酮	乙酸乙酯	四氢呋喃	三乙胺
低-1	99.13	94.35	107.11	96.10	108.08
低-2	90.60	98.50	95.30	97.03	101.99
低-3	91.29	92.56	96.82	92.36	100.23
中-1	98.75	93.15	101.07	92.24	97.60
中-2	97.70	98.45	106.15	95.07	96.03
中-3	93.23	98.85	104.18	91.40	98.91
高-1	97.82	99.74	106.00	95.35	92.66
高-2	93.68	96.95	105.15	93.23	93.22
高-3	98.22	100.04	106.56	95.93	94.89
均值	95.60	96.95	103.15	94.30	98.18
RSD	3.5	3.0	4.3	2.1	4.9

## 2.10 样品测定

取对照品溶液和供试品溶液各适量,分别记录色谱,按照外标法计算,供试品中乙醇、丙酮、乙酸乙酯残留量均不得过0.5%,四氢呋喃不得过0.072%,三乙胺不得过0.032%。其中,人用药物注册技术要求国际协调会议(ICH)和2010年版《中国药典》(二部)均未收载三乙胺限度要求,但欧洲议会公共卫生委员会 AP-CSP(93)5号决议(修订版)规定了三乙胺的限度范围<sup>[7-9]</sup>,据此将三乙胺列入溶剂残留检测范围并拟订限度。

经测定,注射用替考拉宁2批(批号:T130202、T130303)中所有5种溶剂均未检出;替考拉宁原料药3批(批号:130101、130102、130103)中,乙醇残留量均为0.10%,丙酮残留量均为0.15%,其他3种溶剂均未检出。被测样品均符合规定。

## 3 讨论

### 3.1 溶剂的选择

虽然替考拉宁在水中易溶,但以水作溶解介质时,基质校正因子 $F_{三乙胺}$ 小于0.2,即同浓度的三乙胺在供试品溶液中峰面积仅是对照品溶液对应峰面积的1/5,说明三乙胺在供试品存在的水溶液中很难挥发到气相中,故水不适合作溶解介质。因此,选择万能溶剂二甲亚砜作为溶解介质。

### 3.2 色谱柱的选择

对比弱极性 HP-5、中等极性 DB-624、强极性 FFAP 毛细管柱的分离效果和峰形:乙醇在 HP-5 柱色谱图中峰形不对称,柱效较低;FFAP 柱上三乙胺与乙酸乙酯分离度不佳;而选用 DB-624 柱时 5 种成分均能完全分离,色谱峰的对称性好。

### 3.3 顶空平衡温度和平衡时间的选择

由于供试品结构中含有甲氧基,平衡温度过高会有甲醇降解产生,影响测定结果。故保持顶空瓶平衡时间 50 min,平衡温度分别选择 70、75、80、85、90 °C 进样,结果以二甲基亚砜为溶解介质、平衡温度为 85 °C 时,既无分解峰出现,又可以获取较高的灵敏度。向二甲基亚砜中加入适量对照品溶液作溶解介质配制供试品溶液 6 份,在 85 °C 平衡温度下,分别平衡 20、30、40、50、60、70 min 后进样,结果表明在 5 个组分中,三乙胺气液平衡最慢,其峰面积随平衡时间增加而增大,在平衡 50 min 后才能达到稳定。故最终选择平衡温度为 85 °C,平衡时间为 50 min。

### 3.4 其他

加样回收率试验必须考虑基质校正因子,否则测定结果的准确度会降低。例如,乙酸乙酯加样回收率计算时若不考虑基质校正因子,平均回收率为 114.6% ( $n=9$ )。

随着各国对溶剂残留更加重视,各种溶剂的毒理和每日暴露量日益完善,为我们提供了更可靠的限量控制依据。生产工艺应尽量选择 ICH 已有明确等级划分和限量的三类溶剂和工艺无法回避的二类溶剂,如乙酸、乙醇、二氯甲烷、甲苯等,避免选择一类高毒溶剂,并避免选择未知毒理数据的四类或其他溶剂,如石油醚、三乙胺、二乙胺等。

综上所述,该方法快速、灵敏、准确,可用于替考拉宁原料药及注射剂中有机溶剂残留量测定。

## 参考文献

- [1] 夏振强,古勇,官家发.糖肽类抗生素替考拉宁研究进展[J].天然产物研究与开发,2005,17(2):247.
- [2] 吴亚铭.新一代抗生素:替考拉宁[J].中国抗生素杂志,1999,24(增刊):51.
- [3] 胡茗.替考拉宁临床应用进展和安全性评价[J].天津药学,2012,24(6):42.
- [4] 纪淳安.替考拉宁的抗菌活性和临床应用[J].国外医药抗生素分册,2001,22(3):122.
- [5] 王增霞,吴明,蒋宁.替考拉宁提炼工艺的研究进展[J].国外医药抗生素分册,2004,25(2):87.
- [6] 谢鹏,秦鹏,赵培静,等.采用响应面法优化替考拉宁的层析工艺[J].今日药学,2014,24(2):73.
- [7] European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare. Content of the dossier for chemical purity and microbiological quality[S]. 2007-02.
- [8] 周帆,邹巧根,孙莉莉.雷美替胺中有机溶剂残留的 HS-GC 法测定[J].中国医药工业杂志,2014,45(3):279.
- [9] 江月华,李俊,王英瑛.顶空气相色谱法测定盐酸溴己新原料药中 4 种有机溶剂的残留量[J].中国药房,2014,25(25):2366.

(收稿日期:2014-07-15 修回日期:2014-08-09)

(编辑:余庆华)