

顶空毛细管气相色谱法测定腺嘌呤原料药中5种有机溶剂残留量

秦宇芬^{1*}, 睢凤英², 傅应华^{2#}(1.湖州市中医院, 浙江湖州 313000; 2.嘉兴学院医学院, 浙江嘉兴 314001)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0840-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.25

摘要 目的:建立测定腺嘌呤原料药中二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯和二氧六环等5种有机溶剂残留量的分析方法。方法:采用顶空毛细管气相色谱法。以1 mol/L氢氧化钠溶液溶解样品, DB-624石英毛细管为色谱柱;程序升温;进样口温度200℃;氢火焰离子化检测器检测口温度250℃;载气为高纯氮气;分流进样,分流比1:1;顶空加热温度85℃,平衡时间15 min。结果:二氯甲烷、三氯甲烷、三氯乙烯和二氧六环4种溶剂检测质量浓度范围内线性范围为0.002~0.5 mg/ml($r=0.997\sim 0.999\ 9$),苯为0.000 2~0.05 mg/ml($r=0.999\ 3$)。5种有机溶剂平均加样回收率为89.1%~93.4%,RSD为1.91%~2.89%($n=3$);检测限为0.01~0.3 μg/ml,定量限为0.03~2.0 μg/ml。结论:本法简便、灵敏、快速、准确,适用于腺嘌呤原料药中有机溶剂残留量的测定。

关键词 腺嘌呤原料药;顶空毛细管气相色谱法;有机溶剂;残留量测定

Determination of 5 Residual Solvents in Adenine Raw Materials by Head-space Capillary Gas Chromatography

QIN Yu-fen¹, SUI Feng-ying², FU Ying-hua²(1.Huzhou Hospital of TCM, Zhejiang Huzhou 313000, China; 2. Medicine College of Jiaxing University, Zhejiang Jiaxing 314001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of 5 residual solvents as dichloromethane, trichloromethane, benzene, trichloroethylene and dioxane in adenine raw materials. METHODS: Head-space capillary gas chromatography was adopted. Sample was prepared by 1 mol/L sodium hydroxide solution. DB-624 quartz capillary column was adopted by temperature programming; injector temperature was set at 200℃. FID detector was adopted with temperature of 250℃ using high purity nitrogen as carrier gas; split sampling was adopted with splitting-ratio of 1:1. The headspace vials were balanced at 85℃ for 15 min. RESULTS: The linear ranges were 0.002-0.5 mg/ml for dichloromethane, trichloromethane, trichloroethylene and dioxane ($r=0.997\ 1\text{-}0.999\ 9$) and 0.000 2-0.05 mg/ml for benzene ($r=0.999\ 3$). Average recoveries of 5 solvents were 89.1%-93.4% (RSD=1.91%-2.89%, $n=3$). The LODs and LOQs were 0.01-0.3 μg/ml and 0.03-2.0 μg/ml, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive, quick and accurate. It can be used for the detection of residual solvents in adenine raw materials.

KEYWORDS Adenine raw materials; Head-space capillary GC; Organic solvent; Residual determination

腺嘌呤又称6-氨基嘌呤(英文名:Adenine),分子式为 $C_5H_5N_5$,分子质量为135.13;其性状为白色针状结晶,溶于沸水和氢氧化钠溶液,微溶于冷水、稀盐酸,不溶于乙醇和氯仿;其水溶液呈中性,具有强烈的咸味^[1]。本品是核酸的组成成分,参与遗传物质的合成,能促进白细胞增生,使白细胞数增加,用于防治各种原因引起的白细胞减少症,特别是用于肿瘤化疗时引起的白细胞减少症,也用于急性粒细胞减少症;还可用于血液保存^[2-3]。《美国药典》(USP)32-处方集(NF)27收录了腺嘌呤原料药质量标准^[4],在其检查项下规定了有机挥发性杂质的检测方法:采用二甲基亚砜(DMSO)作溶剂,直接进样法测定二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯、二氧六环等5种溶剂残留量。笔者在参照USP32版附录方法^[4]检测腺嘌呤原料药中有机溶剂残留量时发现该方法存在几个问题:(1)由于腺嘌呤在DMSO中的溶解度较小,导致样品不能完全溶解,影响检测准确性;(2)由于制备的对照溶液质量浓度较低,直接进样检测时对照溶液中三氯甲烷、苯的响应值很低,不能做到准确定

性和定量。

药品中残留溶剂检测方法主要是顶空进样法^[5-9]。笔者根据2010年版《中国药典》二部收录的残留溶剂测定法^[10],对顶空进样毛细管气相色谱(GC)法测定腺嘌呤中上述5种有机溶剂残留量的方法进行了研究。以1 mol/L氢氧化钠溶液代替DMSO作溶剂,大大增强了5种溶剂残留量的检测灵敏度,使样品能够快速完全溶解,提高了样品检测准确性,且方法操作简单、结果准确,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

6890N型气相色谱仪[带氢火焰离子化检测器(FID检测器)]及ChemStation色谱数据工作站、7694E顶空进样器(美国Agilent公司);BP211D型电子天平(北京Sartorius公司,精度:±0.01 mg)。

1.2 药品与试剂

腺嘌呤原料药(A药厂提供,批号分别为:111018、120614、130113,含量分别为:99.8%、99.6%、100.2%);二氯甲烷(含量:>99.5%)、三氯甲烷(含量:>99.0%)、苯(含量:>99.5%)、三氯乙烯(含量:>99.0%)、氢氧化钠均为分析纯;二氧六环(含量:>99.5%)、DMSO均为色谱纯;水为纯化水。

* 副主任药师。研究方向:医院药学。电话:0572-2025655。E-mail:qinyufen2003@163.com

通信作者:教授。研究方向:药物制剂与质量控制。电话:0573-83643848。E-mail:yaoji6217@sohu.com

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱为美国J&W公司DB-624弹性石英毛细管柱(固定相:6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷,30 m×0.530 mm×3.00 μm);进样口温度为200 ℃,FID检测口温度为250 ℃;柱温为程序升温:40 ℃(保持3 min),再以10 ℃/min的速率升至150 ℃;载气为高纯氮气(99.999%),流速为5.0 ml/min;分流进样,分流比为1:1。顶空加热温度为85 ℃;平衡时间为15 min;进样时间为1 min。

取“2.2.2”项下对照品溶液进样分析,理论板数以苯峰计为67 763;二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯、二氧六环各峰的分离度均符合要求($R>1.5$);保留时间分别约为二氯甲烷4.2 min、三氯甲烷6.2 min、苯6.9 min、三氯乙烯7.6 min、二氧六环8.1 min。色谱图见图1。

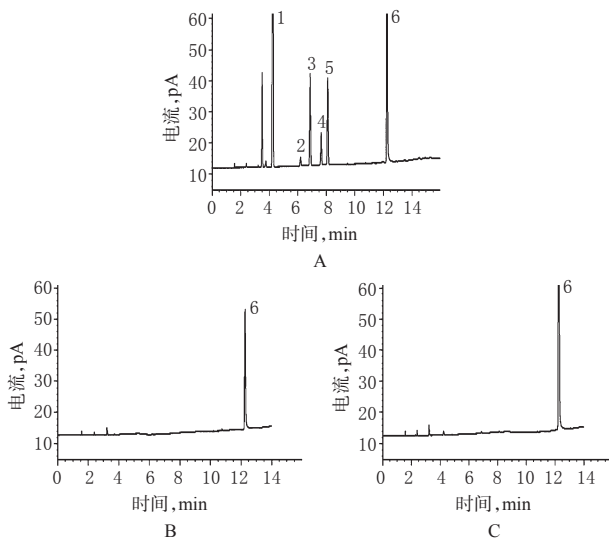


图1 气相色谱图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液(批号:111018); C. 空白溶液; 1. 二氯甲烷; 2. 三氯甲烷; 3. 苯; 4. 三氯乙烯; 5. 二氧六环; 6. DMSO

Fig 1 GC chromatograms

A. substance control solution; B. test sample solution (lot No. 111018); C. blank solution; 1. dichloromethane; 2. trichloroethylene; 3. benzene; 4. trichloromethane; 5. dioxane; 6. DMSO

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照贮备溶液。精密称取苯10.02 mg,置于10 ml量瓶中,加DMSO至刻度;再精密量取2 ml,置于100 ml量瓶中,加DMSO至刻度,作为对照贮备溶液a。精密称取三氯甲烷60.2 mg,置于100 ml量瓶中,加DMSO至刻度,作为对照贮备溶液b。精密称取三氯乙烯80.5 mg,置于100 ml量瓶中,加DMSO至刻度,作为对照贮备溶液c。精密称取二氯甲烷60.3 mg,置于10 ml量瓶中,加DMSO至刻度,作为对照贮备溶液d。精密称取二氧六环38.6 mg,置于10 ml量瓶中,加DMSO至刻度,作为对照贮备溶液e。

2.2.2 对照品溶液及对照测定溶液。精密量取上述对照贮备溶液a、b、c、d、e各1 ml,置于同一100 ml量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶液至刻度,摇匀,作为对照品溶液。再精密量取2 ml,置于10 ml顶空瓶中,加盖密封,作为对照测定溶液。

2.2.3 供试品溶液。精密称取原料药0.2 g,置于10 ml顶空瓶中,精密加入1 mol/L氢氧化钠溶液2 ml,加盖密封,振摇溶解,即得。

2.2.4 空白溶液。取DMSO 5 ml,置于100 ml量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶液至刻度,摇匀。

2.3 专属性考察

取上述供试品溶液、空白溶液,分别顶空进样,记录色谱图。结果表明,空白溶液中的杂质峰不干扰残留溶剂的分析,专属性强。色谱图见图1。

2.4 线性关系考察

取二氯甲烷、三氯甲烷、三氯乙烯、二氧六环各100 mg,苯10 mg,精密称定,用DMSO定容至100 ml;精密量取1 ml,50% DMSO定容至10 ml;再精密量取5 ml,依次用1 mol/L氢氧化钠溶液逐级稀释至二氯甲烷、三氯甲烷、三氯乙烯、二氧六环质量浓度均分别为0.5、0.25、0.1、0.02、0.002 mg/ml和苯0.05、0.025、0.01、0.002、0.000 2 mg/ml的对照品溶液。各精密量取2 ml,置于10 ml顶空瓶中,加盖密封,顶空进样测定。以各溶剂峰面积(y)对其各自的质量浓度(x, mg/ml)进行线性回归,得到5种溶剂的线性方程及相关系数r,结果见表1。

表1 线性关系考察结果(n=5)

Tab 1 Results of linear relationship test(n=5)

溶剂	线性方程	r	质量浓度线性范围,mg/ml
二氯甲烷	$y=1.272 \times 10^4 x - 90.42$	0.999 7	0.002~0.5
三氯甲烷	$y=6.154 \times 10^4 x - 0.68$	0.999 9	0.002~0.5
苯	$y=1.369 \times 10^4 x - 135.58$	0.999 3	0.000 2~0.05
三氯乙烯	$y=8.494 \times 10^4 x + 12.78$	0.997 1	0.002~0.5
二氧六环	$y=2.587 \times 10^4 x + 6.62$	0.999 9	0.002~0.5

2.5 进样精密度试验

取“2.2.2”项下对照测定溶液,共6份,顶空进样测定。计算各有机溶剂平均峰面积的RSD,结果分别为二氯甲烷2.39%、三氯甲烷3.12%、苯0.93%、三氯乙烯2.26%、二氧六环1.47%(n=6),表明进样精密度良好。

2.6 溶液稳定性试验

取“2.2.2”项下对照测定溶液,分别于室温放置0、2、4、6 h,顶空进样测定,计算5种溶剂各自峰面积的RSD,结果均在3%以内(n=4),表明溶液在6 h内稳定。

2.7 检测限与定量限试验

取对照测定溶液依次用1 mol/L氢氧化钠溶液稀释,并进样测定,以信噪比为3计算检测限,得二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯、二氧六环分别为0.2、1.0、0.01、0.3、0.3 μg/ml;以信噪比为10计算定量限,结果分别为0.6、2.0、0.03、1.0、1.0 μg/ml。

2.8 加样回收率试验

采用加样回收方法测定。精密称取样品0.2 g,共9份,置于10 ml顶空瓶中,各精密加入相当于“2.2.2”项下质量浓度80%、100%、120%的对照品溶液各2 ml,进样测定。根据峰面积计算回收率,结果平均加样回收率为89.1%~93.4%(RSD为1.91%~2.89%,n=3),具体见表2。

2.9 样品中有机溶剂残留量测定

取本品3批,按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液,顶空进样测定;另取“2.2.2”项下对照测定溶液同法测定作对照。按外标法以峰面积计算残留量,结果3批腺嘌呤原料药中均未检出二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯、二氧六环。

3 讨论

笔者在试验中发现,采用DMSO作溶剂,当顶空进样时,二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯、二氧六环5种溶剂均检测不到相应的色谱峰,检测灵敏度很低。为了提高检测灵敏度,拟采用水作溶剂,但腺嘌呤不溶于水,可溶于沸水和氢氧化钠

表2 加样回收率试验结果(n=3)

Tab 2 Results of recovery tests(n=3)

溶剂	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均值,%	RSD,%
二氯甲烷	96.48	86.60	89.8	92.8	2.89
	120.60	112.80	93.5		
	144.72	137.50	95.0		
三氯甲烷	9.63	8.71	90.4	93.0	2.85
	12.04	11.19	92.9		
	14.45	13.83	95.7		
苯	0.321	0.290	90.3	91.5	1.91
	0.401	0.375	93.5		
	0.481	0.436	90.6		
三氯乙烯	12.88	11.72	91.0	93.4	2.47
	16.10	15.39	95.6		
	19.32	18.08	93.6		
二氧六环	61.76	53.79	87.1	89.1	2.36
	77.20	68.63	88.9		
	92.64	84.58	91.3		

溶液,故用氢氧化钠溶液作为溶剂,为此考察了不同浓度氢氧化钠溶液对样品的溶解度。结果表明,取腺嘌呤0.2 g,加1 mol/L 氢氧化钠溶液2 ml可完全溶解,能满足测定需要。前期试验中曾采用二甲基甲酰胺作溶剂制备对照贮备液,再用1 mol/L 氢氧化钠溶液稀释制成对照品溶液,但顶空进样发现二甲基甲酰胺溶剂峰前移至3 min处出峰,且拖尾严重,对上述残留溶剂测定有干扰。原因可能是二甲基甲酰胺在氢氧化钠溶液中产生了分解产物,其结果与文献^[6]报道一致。采用DMSO作溶剂,DMSO出峰时间在12 min处,表明DMSO在1 mol/L 氢氧化钠溶液中稳定,故选择DMSO作为制备对照品溶液的溶剂。

前期试验考察了在不同色谱柱包括HP-INNOWAX柱(30 m×0.320 mm×0.25 μm)、DB-624柱(30 m×0.530 mm×3.00 μm)和DB-1301柱(30 m×0.320 mm×0.25 μm)对5种溶剂的分离效果,结果发现DB-624柱对上述5种溶剂的分离效果最好。采用程序升温,先在较低柱温下完成5种溶剂的分离,再升高温度,使高沸点的DMSO快速出峰,达到快速分析的目的。同时考察流动相的流速,以5.0 ml/min为宜,在此流速下二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯、二氧六环5种溶剂的保留时间分别为4.242、6.203、6.866、7.644、8.097 min,理论板数分别为35 049、50 459、67 763、83 977、92 989,分离度分别为19.47、6.13、7.36、4.28,容量因子分别为2.07、3.50、3.98、4.54、4.87。

考察顶空加热温度,先固定顶空平衡时间15 min,测定在加热温度70、75、80、85、90℃下的色谱响应值(峰面积)。结果表明,随着加热温度升高,二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯、二氧六环5种溶剂的色谱响应值增大,在85~90℃时色谱响应值趋于平缓。因水的沸点是100℃,再升高温度可使水膨胀导致压力升高,会引起顶空瓶耐压和仪器气密性等问题,使色谱响应值变小,故选择85℃作为顶空加热温度。再固定顶空加热温度85℃,在不同平衡时间10、15、20、30 min条件下测定5种溶剂的色谱响应值。结果表明,当平衡时间超过15 min时,各溶剂响应值基本不再增加,表明在加热15 min时,各组分在气液两相间达到平衡,故选择15 min作为顶空平衡时间。采用顶空进样法测定这5种溶剂的溶剂残留量,可大大提高5种溶剂的检测灵敏度,提高了定性和定量的准确性。

腺嘌呤是很多医药原料的中间体,主要用于生产维生素B₄、植物激素6-BA及其他医药原料,用途广泛,近几年全世界

用量呈不断扩大趋势^[9]。腺嘌呤在国内除作为药用原料外,还大量出口美国。由于起始原料不同,在合成工艺中用到很多原料和试剂,尽管该厂的制备工艺没有用到2010年版《中国药典》(二部)附录记载的一类和二类溶剂,但购买的原料和试剂在生产过程中用到了二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯和二氧六环等5种溶剂。按照2010年版《中国药典》(二部)附录残留溶剂测定法的规定,在合成过程中使用的原料和试剂中含有必须控制的一、二类溶剂,在其成品中均必须控制。目前,2010年版《中国药典》(二部)未记载腺嘌呤原料药质量标准。USP32版记载的腺嘌呤质量标准,在其检查项下规定需要控制二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯和二氧六环等5种溶剂残留量^[4]。供出口的腺嘌呤原料药需符合USP32版质量标准规定,包括上述5种有机溶剂残留量。本文参照USP32版附录有机残留检测方法^[4],对测定腺嘌呤中上述5种有机溶剂残留量的方法进行了改进,提高了检测灵敏度和准确性。

按照2010年版《中国药典》(二部)附录^[10]记载的残留溶剂测定法附表1的规定,其中苯属于一类溶剂;二氯甲烷、三氯甲烷、三氯乙烯、二氧六环均属于二类溶剂,均需要严格控制其含量。相应限度规定为二氯甲烷0.06%、三氯甲烷0.006%、苯0.000 2%、三氯乙烯0.008%、二氧六环0.038%。

综上所述,笔者对USP32版腺嘌呤原料药中检测二氯甲烷、三氯甲烷、苯、三氯乙烯、二氧六环等5种溶剂残留量的测定方法进行了改进;建立的顶空进样测定腺嘌呤原料药中上述5种有机溶剂残留量的气相色谱方法,具有检测灵敏度更高、定性和定量准确性更好的优点,适用于测定腺嘌呤原料药中上述5种有机溶剂残留量。这为生产厂家提供了一种稳定可靠的检测方法,也为制订腺嘌呤质量标准中有机溶剂残留量控制提供了方法依据。

参考文献

- [1] 李丽琴,颜孙司.浅谈维生素B₄特点及应用[J].科技致富向导,2012,19(11):175.
- [2] 陈新谦,金有豫.新编药理学[M].12版.北京:人民卫生出版社,1985:502-503.
- [3] 吴兴财,陈昆民.浅谈腺嘌呤化学合成[J].中国科技纵横,2011,7(10):363.
- [4] 美国药典委员会.美国药典(32)-国家处方集(27)[S].费城:美国药典委员会,2009:1 432、附录467.
- [5] 孙悦,王卫,唐素芳.顶空气相色谱法测定盐酸帕罗西汀中残留的有机溶剂及基质效应考察[J].药物分析杂志,2010,30(5):963.
- [6] 孙红亚,朱琦峰,傅应华.顶空毛细管气相色谱法测定长春西汀原料药中乙酸乙酯残留量[J].中国药房,2011,22(45):4 278.
- [7] 李晔,赵桂珠,傅应华.顶空毛细管气相色谱法测定交联羧甲基纤维素钠中的5种残留溶剂[J].中国药房,2012,23(41):3 914.
- [8] 陈宁,陈朝艳.顶空气相色谱法测定头孢替坦二钠中的残留溶剂[J].中国抗生素杂志,2011,36(11):849.
- [9] 叶海青,傅应华.毛细管气相色谱法测定丙酸倍氯米松中3种有机溶剂残留量[J].中国药房,2010,21(13):1 235.
- [10] 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:2013-06-03 修回日期:2013-07-31)