

气相色谱法测定3-氯-7-氨基去乙酰氧基 头孢烷酸中残留溶剂

马丽,姚彤炜

(浙江大学药学院药物分析与药物代谢研究室,浙江 杭州 310058)

[摘要] **目的:**建立3-氯-7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(7-ACCA)中丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、异丁醇、吡啶、甲苯残留量的测定方法。**方法:**采用气相色谱法,载气为氮气,FID检测器,色谱柱为Agilent INNOWAX毛细管柱,柱温为程序升温:起始温度70℃,保持6 min,以10℃/min升温至160℃,保持1 min;进样量1.0 μl,分流进样,分流比10:1,外标法检测7-ACCA中丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、异丁醇、吡啶、甲苯的含量。**结果:**在本研究建立的色谱条件下,丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、异丁醇、吡啶、甲苯的最低检出质量浓度分别为2.5 μg/ml、1.5 μg/ml、15 μg/ml、2.5 μg/ml、2.5 μg/ml、2.5 μg/ml、11 μg/ml。样品中仅检测到丙酮,且其残留量远在药典规定的限量以下。**结论:**建立的方法能有效控制7-ACCA中丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、异丁醇、吡啶、甲苯的残留量。

[关键词] 色谱法,气相/方法;头孢菌素类/分析;药物残留物;甲醇/分析;二氯甲烷/分析;甲苯/分析;丙酮/分析

[中图分类号] R 927.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2011)01-0040-04

Determination of residual solvents in 7-amino-3-chloro cephalosporanic acid by gas chromatography

MA Li, YAO Tong-wei (Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

[Abstract] **Objective:** To develop a gas chromatography method for determination of residual solvents in 7-amino-3-chloro cephalosporanic acid (7-ACCA). **Methods:** The residual levels of acetone, methanol, dichloromethane, ethyl acetate, isobutanol, pyridine and toluene in 7-ACCA were measured by gas chromatography using Agilent INNOWAX capillary column(30 m×0.32 mm,0.5 μm). The initial column temperature was 70℃ maintained for 6 min and then raised (10℃/min) to 160℃ for 1 min. Nitrogen gas was used as carrier and FID as detector. The flow of carrier was 1.0 ml/min, the temperature of injection port and detector was 200℃ and 250℃, respectively. **Results:** The limits of detection for acetone, methanol, dichloromethane, ethyl acetate, isobutanol, pyridine, toluene in 7-ACCA were 2.5 μg/ml, 1.5 μg/ml, 15 μg/ml, 2.5 μg/ml, 2.5 μg/ml, 2.5 μg/ml and 11 μg/ml, respectively. Only acetone was detected in the sample, and was less than the limits of Ch. P. **Conclusion:** The method can effectively detect the residual solvents in 7-ACCA.

收稿日期:2010-09-15 修回日期:2010-11-24

作者简介:马丽(1977-),女,硕士,中级工程师。

通讯作者:姚彤炜(1953-),女,教授,从事药品质量研究与药物代谢研究;E-mail: yaotw@zju.edu.cn

[**Key words**] Chromatography, gas/methods; Cephalosporins/anal; Drug residues; Methanol/anal; Methylene chloride/anal; Toluene/anal; Acetone/anal

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2011,40(1):40-43.]

3-氯-7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(7-ACCA)是合成多种头孢菌素类药物的重要中间体,根据合成工艺7-ACCA中可能残留丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、异丁醇、吡啶、甲苯,为保证产品质量,须对这些有机溶剂的残留量进行控制。为此,本研究建立了可同时测定上述有机溶剂的毛细管气相色谱法。实验结果显示,该方法操作简便,重复性好,而且结果准确、可靠。

1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪配置氢火焰离子化检测器(FID)和 HP ChemStations 软件。所用水为纯净水。7-ACCA 原药为浙江法码医药公司合成,丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、异丁醇、吡啶、甲苯、丁酮、N,N'-二甲基甲酰胺(DMF)及二甲亚砜(DMSO)均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Agilent HP-INNOWAX (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm) 毛细管色谱柱,起始柱温 70℃,保持 6 min,以 10℃/min 升温至 160℃,保持 1 min;载气为高纯氮气(纯度 ≥ 99.99%),柱流速 1.0 ml/min,气化室温度 200℃,检测器温度 250℃,氢气流速 40.0 ml/min,空气流速 400 ml/min,尾吹气(氮气)流速 25.0 ml/min,分流比 10:1。进样体积为 1 μl,手动进样。

2.2 溶液的制备

2.2.1 定位溶液 溶液(1-8):精密吸取丙酮(密度 0.79) 630 μl、甲醇(密度 0.79) 380 μl、二氯甲烷(密度 1.32) 45 μl、乙酸乙酯(密度 0.90) 555 μl、异丁醇(密度 0.81) 620 μl、吡啶(密度 0.98) 20 μl、丁酮约 400 μl(内标),甲苯(密度 0.87) 100 μl 分别置于 100 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀即得。相当于质量浓度分别为 5 mg/ml、3 mg/ml、0.6 mg/ml、5 mg/ml、

5 mg/ml、0.2 mg/ml、0.32 mg/ml、0.87 mg/ml 的定位溶液(1-8)。

2.2.2 限量对照溶液 溶液(1-7):精密吸取丙酮 630 μl、甲醇 380 μl、二氯甲烷 45 μl、乙酸乙酯 555 μl、异丁醇 620 μl、吡啶 20 μl、丁酮约 400 μl(内标),分别置于 100 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得对照溶液(1-7)。溶液(8):精密吸取甲苯 0.5 ml,置于 50 ml 量瓶中,加 DMF 稀释至刻度,摇匀,得甲苯贮备液。精密吸取该溶液 5 ml 置 50 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得对照液(8)。再精密吸取上述对照液(1-8)各 1 ml,置于同 1 个 10 ml 量瓶中,加水稀释至刻度,即得限量对照溶液。

2.2.3 对照系列溶液 分别精密吸取丙酮 630 μl、甲醇 380 μl、二氯甲烷 45 μl、乙酸乙酯 555 μl、异丁醇 620 μl、吡啶 20 μl、丁酮约 400 μl(内标),甲苯贮备液 10 ml,置于同一 100 ml 量瓶中,摇匀,得对照液 5;取对照液 5 稀释 5 倍作为对照液 4,取对照液 4 稀释 2 倍作为对照液 3(浓度与限量对照溶液相当),取对照液 3 稀释 1 倍作为对照液 2,取对照液 2 稀释 1 倍作为对照液 1。

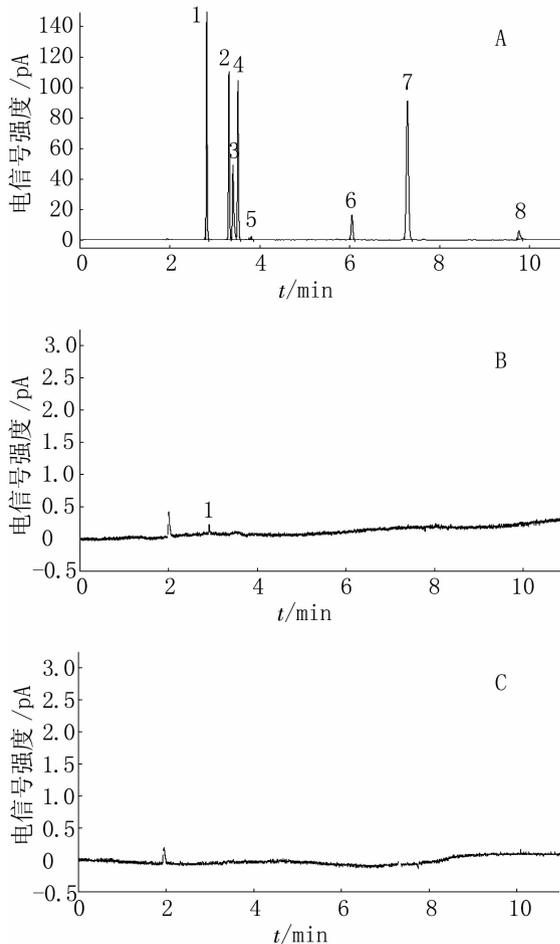
2.2.4 供试品溶液的制备 取样品 1 g,精密称定,置 10 ml 量瓶中,加水适量,冰浴中超声 10 min 后定容,3 000 r/min 离心 3 min,取上清液。照残留溶剂测定法(中国药典 2010 年版附录 VIII P 第三法)测定。

2.3 系统适用性试验 取定位溶液分别进样测定,获得各有机溶剂的保留时间;然后,取限量对照溶液进行系统适用性试验。各组色谱峰的理论板数均 > 70 000,分离度 > 1.5,与内标丁酮的相对保留时间(RRT)与中国药典(2010)提供的参考值基本一致(表 1)。同法测定空白溶剂色谱图和样品色谱图(图 1),在空白溶剂色谱图中,7 种残留溶剂色谱峰保留位置处无干扰峰。

表1 残留有机溶剂的系统适用性试验

Table 1 System suitability of residual organic solvents

有机溶剂	保留时间/min	相对保留时间	中国药典参考值	理论板数	分离度
丙酮	2.810	0.8010	0.816	103550	/
乙酸乙酯	3.307	0.9427	0.949	98551	12.86
甲醇	3.397	0.9684	0.976	73755	1.97
丁酮	3.508	1.0000	1.00	99991	2.34
二氯甲烷	3.798	1.0827	1.073	112399	6.47
甲苯	6.035	1.7204	1.696	131547	39.93
异丁醇	7.275	2.0738	2.102	98407	15.53
吡啶	9.741	2.7768	3.542	302814	30.11



1:丙酮;2:乙酸乙酯;3-甲醇(methanol);4:丁酮;5:二氯甲烷;6:甲苯;7-异丁醇;8:吡啶.

图1 对照溶液(A)、供试品溶液(B)和空白溶剂(C)的气相色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixed standard solution (A), sample solution (B) and the blank solution (C)

2.4 线性关系和检测限 取标准液1、2、3、4、5,分别进样测定,以峰面积为 Y 值,标准品浓度为 X 值,计算各有机溶剂的回归方程及相关系数(表2)。逐步稀释对照品溶液,按上述方法测定,当信噪比为2时,测得的检测限见表3。由表3可知,样品中各溶剂的检出量远低于中国药典规定量。

表2 线性与回归方程

Table 2 The linear correlations of the volatile solvents

溶剂	回归方程	相关系数(r)
丙酮	$Y = 454.6X - 12.61$	0.9993
乙酸乙酯	$Y = 301.7X + 10.69$	0.9994
甲醇	$Y = 331.8X + 3.902$	0.9997
二氯甲烷	$Y = 59.38X - 0.131$	0.9987
甲苯	$Y = 811.4X - 20.95$	0.9991
异丁醇	$Y = 621.7X - 1.974$	0.9999
吡啶	$Y = 721.0X - 1.420$	0.9958

表3 检测限测定结果

Table 3 Limit of detection

溶剂	药典规定 限度/%	检测限(S/N=2)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	样品 检出量/%
丙酮	0.5	2.5	0.0025
乙酸乙酯	0.5	2.5	0.0025
甲醇	0.3	1.5	0.0015
二氯甲烷	0.06	15.0	0.0150
甲苯	0.089	11.0	0.0110
异丁醇	0.5	2.5	0.0025
吡啶	0.02	2.5	0.0025

2.5 精密度试验 取限量对照品溶液,按上述方法测定,所得结果符合《中国药典》2010年版规定的残留溶剂外标法精密度测定要求(RSD不大于10%),测得丙酮、甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、异丁醇、吡啶、甲苯色谱峰面积的RSD分别为4.78%、4.81%、6.89%、5.01%、4.55%、4.56%、6.11%和5.98%。

2.6 样品测定 取样品测定液进样,在样品溶液的色谱图中仅观测到极微量的丙酮峰(图1C),外标法计算得丙酮残留量为0.0012%。因此7-ACCA样品中残留溶剂符合要求。

3 讨论

7-ACCA不溶于水和各种有机溶剂(包括醇、二氯甲烷、三氯甲烷、DMF、DMSO等溶剂),仅溶于一定浓度的(5%)碳酸钠溶液中,且需经长时超声,才能完全溶解(0.1 g/ml),而其在碱液中也不稳定,直接进样有许多降解物峰干扰残留溶剂的测定。考虑用顶空气相色谱法测定,但标准液中乙酸乙酯在碱性加热条件下降

解,难以检出。因此,采用样品加水超声,取上清液进行测定,为避免超声产生的热可能使残留溶剂挥发,采用冰浴中超声。

试验考察了在50℃、60℃、70℃的柱温条件下对8种残留溶剂分离度的影响,结果表明,在50℃、60℃条件下,甲醇与内标物丁酮不能完全分离,在70℃下各组分色谱峰的理论板数均>70 000,分离度>1.5,与内标丁酮的相对保留时间与中国药典(2010)提供的参考值基本一致。同时考虑使溶剂DMF在色谱条件下也出峰,不影响下一个样品的出峰,因此选择梯度升温。最终确定色谱条件为起始柱温70℃,保持6 min,以10℃/min升温至160℃,保持1 min。

经过系统适应性、线性及精密度实验验证,该方法灵敏度完全可以满足7-ACCA中有机溶剂残留测定的需要。再者,经文献检索,尚未发现同时能检测以上7种有机溶剂的方法报道。

[责任编辑 黄晓花]

第二届中国皮肤科学学术研讨会成功举办

由浙江大学医学部附属二院皮肤科郑敏教授领队,来自浙江大学,中国医学科学院皮肤病研究所、中国协和医科大学、北京大学、复旦大学、中山大学等国内高等医学院校皮肤病学专业的中青年学者一行14人和德国各大学皮肤病医院的中青年专家17人于12月6日至7号在德国柏林菲得利女皇基金会(Kaiserin-Friedrich Stiftung fuer das Aerztliche Fortbildungswesen Berlin)会议大厅举行题为“皮肤炎症:机制与相关问题”的第二届中国皮肤科学学术研讨会。会议期间中德科学交流中心副主任陈乐生教授作了重要讲话。中德双方皮肤病学研究领域的专家就共同关心的问题进行交流,为今后双方皮肤科领域的进一步合作研究奠定了基础。本次会议由中德科学交流中心(中国自然科学基金会和德国研究基金会)全额资助。第一届中德皮肤科学学术研讨会已于去年在北京中德科学交流中心成功举办。中德科学交流基金为两国间多学科的合作提供很好的学术交流平台。