

李云兰¹, 赵晶晶², 林志华¹, 李青山^{1*} (1. 山西医科大学药学院, 太原 030001; 2. 山西省兽药研究所, 太原 030001)

摘要:目的 建立毛细管气相色谱法测定有机金属抗癌原料药二氯二茂钛中的有机溶剂残留量。方法 采用 HP-5 (5% 苯基甲基聚硅氧烷) 毛细管色谱柱, FID 检测器。载气为 N₂, 柱温为 45 ℃, 检测器温度为 160 ℃, 流速为 1.2 mL·min⁻¹, 分流比为 20:1, 正己烷为内标进行测定。结果 三氯甲烷和四氢呋喃的线性范围分别为 0.399 ~ 319.2 μg·mL⁻¹ 和 6 ~ 48 μg·mL⁻¹, 平均回收率为 96.7% 和 102.3% (n=9); RSD 分别为 1.6% 和 1.1% (n=9); 最低检测限分别为 0.23 μg·mL⁻¹ 和 0.9 μg·mL⁻¹。结论 方法操作简便、准确、灵敏度高、重复性好, 适用于二氯二茂钛原料药中有机溶剂残留量的测定。

关键词: 二氯二茂钛; 毛细管气相色谱法; 有机溶剂残留

中图分类号: R917.101; R979.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693 (2008) 02-0146-03

Determination of Residual Organic Solvents in Organometallic Antitumor Crude Drug Titanocene Dichloride by Capillary Gas Chromatography

LI Yun-lan¹, Zhao Jing-jing², LIN Zhi-hua¹, LI Qing-shan^{1*} (1. School of Pharmaceutical Science, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China; 2. Shanxi Research Institute for Veterinary Drugs, Taiyuan 030001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a capillary gas chromatography method for the determination of residual organic solvents in organometallic antitumor crude drug titanocene dichloride. **METHODS** The HP-5 (5% Phenyl methyl siloxane) capillary column and FID detector were adopted. The carrier gas was nitrogen with flow rate 1.2 mL·min⁻¹. The column and detector temperature was 45 ℃ and 160 ℃, respectively. The split ratio was 20:1. N-hexane was used as the internal standard to determine the residual organic solvents. **RESULTS** Under the selected chromatographic conditions, all solvents were separated and the better separation efficiency between internal and degradation of the sample was obtained. The linear range were 0.399 ~ 319.2 μg·mL⁻¹ for chloroform and 6 ~ 48 μg·mL⁻¹ for tetrahydrofuran. The average recoveries were 96.7% and 102.3% (n=9) with RSD of 1.6% and 1.1% (n=9). The lowest detectable limits were 0.23 μg·mL⁻¹ and 0.9 μg·mL⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The analytical method is simple, accurate and sensitive with good reproducibility. It can be used to determine the residual organic solvents.

KEY WORDS: titanocene dichloride; capillary gas chromatography; residual organic solvents

二氯二茂钛金属化合物具有抗肿瘤活性且几乎没有肾脏毒性和骨髓毒性, 在生理条件下顺氯离去后形成的金属活性中心与 DNA 形成链内或链间交链, 使 DNA 复制发生障碍, 从而发挥其抗肿瘤作用^[1-3]。二氯二茂钛是一种新型结构的有机金属类化合物, 其生产过程中残存的有机溶剂对人体有不同程度的毒性, 根据中国药典 (2005 年版) 和人用药品注册技术规范国际协调组织 (ICH) 起草的有机溶剂残留量测定指导原则^[4], 对该药物在合成过程中采用的三氯甲烷和四氢呋喃进行检测, 以保证产品质量和用药安全。本实验采用毛细管气相色谱法测定二氯二茂钛原料药中有机溶剂残留量, 并进行了方法学验证, 方法简便快速, 结果准确可靠。

1 仪器与试剂

HP 6890 气相色谱仪; Chenstation 工作站; 二氯二茂钛由

山西医科大学药学院药化教研室合成; 三氯甲烷、四氢呋喃、二氯甲烷和正己烷等均为分析纯。

2 色谱条件

Agilent HP-5 (5% Phenyl methyl siloxane, 30 m × 320 μm, 0.25 μm) 毛细管柱; 柱温: 45 ℃, 进样口: 140 ℃, FID 检测器: 160 ℃; 载气为 N₂, 流量: 1.2 mL·min⁻¹; 空气流: 450 mL·min⁻¹; H₂: 65 mL·min⁻¹; 分流比为 20:1; 柱前压: 40 kPa; 尾吹: 20 mL·min⁻¹; 进样量 1 μL。上述色谱条件下对照品和供试品溶液的色谱图见图 1, 各组分、溶剂及内标分离度大于 2, 理论塔板数均大于 5 000。

3 方法与结果

3.1 溶液的配制

3.1.1 内标贮备液 精密量取正己烷 151.5 μL (相当于 100 mg), 置于 50 mL 量瓶中, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀,

基金项目: 国家教育部新世纪优秀人才支持计划项目 (NCET-04-0258); 山西省重点科技攻关项目 (No. 051105-2); 山西省首批青年学科带头人基金 (晋教科 No. 200413); 山西省青年科技研究基金 (2007021035); 山西省研究生教育创新项目 (20061038); 太原市大学生创新基金 (07010729)

作者简介: 李云兰, 女, 在读博士, 副教授 * 通讯作者: 李青山, 男, 博士, 教授, 博士生导师 Tel: (0351) 4690322 E-mail: qingshanl@yahoo.com

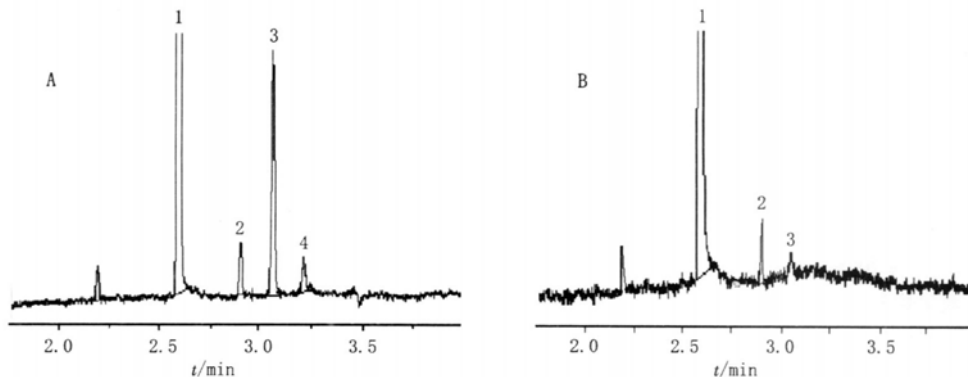


图 1 气相色谱图

A - 对照溶液的色谱图; B - 样品的色谱图; 1 - 二氯甲烷 (溶剂, $t_R = 2.586$ min); 2 - 正己烷 (内标, $t_R = 2.895$ min); 3 - 三氯甲烷 ($t_R = 3.053$ min); 4 - 四氢呋喃 ($t_R = 3.212$ min)

Fig 1 GC chromatograms

A - chromatograms of the standard solution; B - chromatograms of sample; 1 - dichloromethane (solvent, $t_R = 2.586$ min); 2 - N-hexane (internal standard, $t_R = 2.895$ min); 3 - trichloromethane ($t_R = 3.053$ min); 4 - tetrahydrofuran ($t_R = 3.212$ min)

作为内标贮备液。

3.1.2 对照贮备液 分别精密量取三氯甲烷 27 μL (相当于 39.9 mg), 四氢呋喃 68 μL (相当于 60.4 mg), 置同一 50 mL 量瓶中, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀, 作为对照贮备液。

3.2 线性关系

精密量取对照贮备液 0.005, 0.05, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各精密加内标贮备液 1.0 mL, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀。分别精密量取上述各浓度溶液 1 μL , 注入气相色谱仪, 记录色谱图。以待测物与内标峰面积比 (γ) 为纵坐标, 对照品溶液浓度 ($c/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 为横坐标进行线性回归。结果三氯甲烷在 0.399 ~ 319.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 回归方程为: $\gamma = 0.02597c + 0.2015$ ($r = 0.9994$); 四氢呋喃在 0.06 ~ 48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, 回归方程为: $\gamma = 0.1620c - 0.01348$ ($r = 0.9990$)。

3.3 精密度试验

取对照品溶液 (含三氯甲烷和四氢呋喃分别为 239.4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 36 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 连续进样 6 次, 测得三氯甲烷和四氢呋喃的 RSD 分别为 2.7% 和 2.5%。

3.4 重复性试验

取二氯二茂钛原料药 (批号: 20040315) 5 份, 分别精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 精密加入内标贮备液 1 mL, 加二氯甲烷溶解后稀释至刻度, 摇匀, 进样 1 μL , 注入气相色谱仪, 记录峰面积。本品可检出残留溶剂三氯甲烷的平均含量为 220 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, RSD 为 2.6%。

3.5 加样回收率试验

取已知残留量的二氯二茂钛原料药 (批号: 20040315) 0.2 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中 (共 9 份), 分别精密加入对照贮备液 0.5 mL (3 份), 1.0 mL (3 份), 2.0 mL (3 份), 精密加内标贮备液 1.0 mL, 加入二氯甲烷 5 mL, 加塞密封后, 超声震荡 30 min, 密封静置至室温, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述各浓度溶液 1 μL , 注入气相色谱仪, 记录峰面积, 按内标法以峰面积之比计算回收率。三氯甲烷

和四氢呋喃的平均回收率分别为 96.7% ($n = 9$, RSD = 1.6%) 和 102.3% ($n = 9$, RSD = 1.1%)。

3.6 检测限试验

取逐级降低浓度的对照品溶液进样测定, 直到峰高约为基线噪声的 3 ~ 5 倍时的进样量确定为最低检出浓度。测得三氯甲烷和四氢呋喃的最低检出浓度分别为 0.23 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 0.9 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.7 样品中残留溶剂的测定

取二氯二茂钛 0.5 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 精密加内标贮备液 1.0 mL, 加入二氯甲烷 5 mL, 加塞密封后, 超声震荡 30 min, 密封静置至室温, 用二氯甲烷稀释至刻度, 摇匀。精密量取上述溶液 1 μL , 注入气相色谱仪, 记录峰面积, 按内标法以峰面积之比计算样品中各有机溶剂残留量。平行测定 5 份。结果 3 批样品均未检出四氢呋喃, 说明样品中四氢呋喃残留量低于最低检出浓度。结果见表 1。

表 1 3 批样品测定结果 ($n = 5$)

Tab 1 Determination results of three batches samples ($n = 5$)

样品批号	三氯甲烷		四氢呋喃
	含量 / %	RSD / %	
20040315	0.002 2	2.6	未检出
20040421	0.003 2	1.8	未检出
20040428	0.003 0	1.2	未检出

根据测定结果, 再结合 ICH 和中国药典 2005 年版关于有机溶剂残留量的指导原则将三氯甲烷的限度定为不得过 0.006% (g/100 g)。

4 讨论

4.1 二氯二茂钛为新型化合物, 其在水、酸、碱中均不溶, 微溶于甲醇和乙醇, 本实验曾尝试用 *N-N*-二甲基乙酰胺溶解样品, 结果干扰大无法测定, 最后选择二氯甲烷做溶剂既能溶解被测组分, 且各组分之间的分离度良好, 避免溶剂干扰; 另外室温观察, 样品在二氯甲烷中 12 h 稳定, 能够满足定量分析的要求, 故选择二氯甲烷做溶剂。

4.2 仪器条件的选择:毛细管的柱前压及柱温对被测组分的分离度影响较大。在仪器其他条件不变的情况下,随着柱温的降低,各组分的保留时间延长而影响被测组分的分离,柱温选择在 40 ~ 50 ℃时,分离度、基线稳定性以及保留时间适宜;改变柱前压,随着柱前压增大,被测组分的保留时间缩短,柱前压超过 60 kPa时,三氯甲烷、四氢呋喃和内标分离不开,故柱前压选择 40 ~ 50 kPa。

4.3 ICH和中国药典 2005年版在关于有机溶剂残留量的指导原则中将三氯甲烷和四氢呋喃列为第二类必须限制使用的毒性试剂,将三氯甲烷的限度定为不得过 0.006%;四氢呋喃虽然在样品中未检出,但因其亦为第二类毒性溶剂,规定其限度为不得过 0.072%。

4.4 实验采用正己烷为内标测定三氯甲烷和四氢呋喃的含量,色谱图显示溶剂、内标以及待测组分间能基线分离,无干扰;方法操作简便快速,重复性和准确度较好,线性、检测限

和精密度等均满足定量分析的要求,适用于二氯二茂钛中残留溶剂的检测。

REFERENCES

- [1] KORFEL A, SCHEULEN M E. Phase I clinical and pharmacokinetic study of titanocene dichloride in adults with advanced solid tumors[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(11): 2701-2708.
- [2] O'CONNOR K, GILL C, TACKE M, *et al.* . Novel titanocene anticancer drugs and their effect on apoptosis and the apoptotic pathway in prostate cancer cells[J]. Apoptosis, 2006, 11 (7): 1205-1214.
- [3] FICHTER IDUNA, PAMPILLON CLARA, SWEENEY NIGEL, *et al.* Anti-tumor activity of Titanocene Y in xenografted caki-1 tumors in mice[J]. Anti Cancer Drugs, 2006, 17(3): 333-336.
- [4] Ch. P(2005) Vol II (中国药典 2005年版 .二部) [S]. 2005: appendix 54.

收稿日期: 2006-10-08