

顶空气相色谱法测定拉米夫定中有机溶剂残留量

倪珍珍^{1,2}, 王翰华¹, 姚彤炜^{1*} (1. 浙江大学药学院药物分析和药物代谢研究室, 杭州 310058; 2. 浙江大学医学院附属第二医院, 杭州 310003)

摘要:目的 建立顶空气相色谱法测定拉米夫定中有机溶剂残留量的方法。方法 色谱柱为 HP-5 毛细管柱 (5% phenyl methyl siloxane, 30 m × 320 μm), 柱温采取程序升温, 检测器温度为 200 ℃, 载气为氮气, 流速 7.8 mL·min⁻¹, 分流比 5:1。结果 四种残留溶剂在 8 min 内能很好地分离, 日内精密度 <8.3%; 最低检测限为 0.4 ~ 4.0 μg·mL⁻¹。供试样品中残留有机溶剂含量符合药典规定。结论 该方法可用于拉米夫定中有机溶剂残留量的测定。

关键词:拉米夫定; 顶空气相色谱法; 有机溶剂; 残留量

中图分类号: R917.1.01; TQ460.7 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)04-0325-03

Determination of Residual Solvents in Lamivudine by Headspace Gas Chromatography

NI Zhen-zhen^{1,2}, WANG Han-hua¹, YAO Tong-wei^{1*} (1. Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 2. The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for detecting the residual solvents in lamivudine. **METHODS** The determination was performed on HP-5 capillary column (5% phenyl methyl siloxane, 30 m × 320 μm), the column was subjected to temperature programming, the detector temperature was 200 ℃, the carrier gas was nitrogen, the flow rate was 7.8 mL·min⁻¹ and the split ratio was 5:1. **RESULTS** All the four residual solvents were well separated in 8 minutes, the intra-day variability were <8.3%, the limits of detection were 0.4 ~ 4.0 μg·mL⁻¹. The sample met the requirements of this test. **CONCLUSION** The method can be used to determine the residual solvents in lamivudine.

KEY WORDS: lamivudine; headspace gas chromatography; organic solvents; residual volume

拉米夫定为核苷类抗病毒药, 是 HBV 聚合酶的抑制剂, 用于乙型肝炎病毒复制的慢性乙型肝炎。国内学者对拉米

夫定的临床应用做了很多研究, 在分析方面建立了测定拉米夫定含量的高效液相色谱法、液相与串联质谱联用等方

法^[12],但未发现有关测定拉米夫定中有机溶剂残留量的公开文献,而药典规定药品中的残留溶剂不可以超出规定限度,故本实验对拉米夫定中有机溶剂残留量的测定方法进行了初步的研究。本实验中的拉米夫定在制备过程中使用了乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、甲苯这些溶剂。目前,测定残留溶剂的方法有顶空进样法和溶液直接进样法^[3],本实验采用顶空气相色谱法测定拉米夫定中乙醇、异丙醇、乙酸乙酯和甲苯的残留量。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 6890N 气相色谱仪; Agilent 7694E 顶空进样仪; HP ChemStations 软件。

1.2 试剂

拉米夫定样品由浙江大学药学院药剂教研室提供;乙醇、异丙醇、乙酸乙酯、甲苯和 *N,N*-二甲基甲酰胺 (DMF) 均为分析纯;水为超纯水。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: HP-5 毛细管柱 (5% phenylmethyl siloxane, 30 m × 320 μm)。柱温 45 °C, 保持 5 min 然后以 30 °C · min⁻¹ 升至 90 °C, 保持 2 min, 气化室 180 °C, 检测室 200 °C。检测器: FID, 氢气 45 mL · min⁻¹, 空气 450 mL · min⁻¹; 载气: 氮气, 流速 7.8 mL · min⁻¹, 分流比 5:1。平衡温度 80 °C, 加热 30 min 定量圈 105 °C, 传送带 120 °C, 自动顶空进样。

在上述色谱条件下, 对照品溶液及样品溶液的色谱图见图 1。

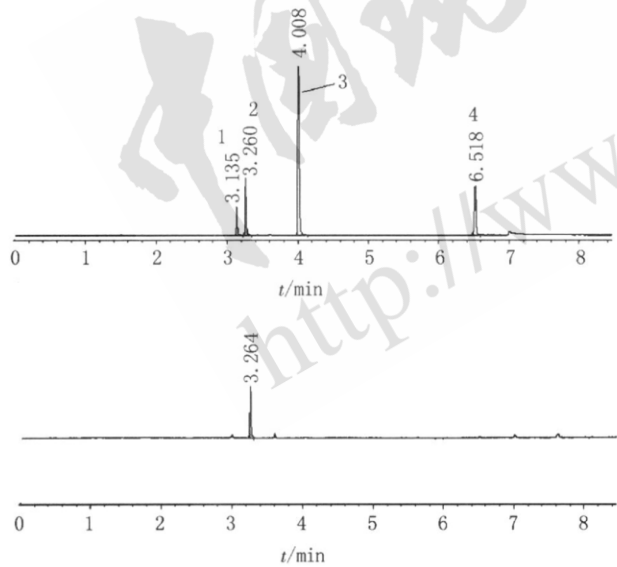


图 1 对照品溶液和样品溶液的色谱图

1-乙醇; 2-异丙醇; 3-乙酸乙酯; 4-甲苯

Fig 1 Chromatograms of standards(A) and samples(B)

1-ethanol; 2-propanol; 3-ethyl acetate; 4-toluene

2.2 系统适用性试验

四种有机溶剂的理论塔板数均大于 150 000, 分离度均大于 4, RSD 均小于 10%, 符合要求, 结果见表 1。

表 1 色谱参数

Tab1 Chromatographic parameters

溶剂	保留时间 /min	理论塔板数	分离度
乙醇	3.142	> 150 000	
异丙醇	3.272	> 180 000	> 4
乙酸乙酯	4.024	> 170 000	> 21
甲苯	6.521	> 330 000	> 59

2.3 线性关系考察

准确称取乙醇、异丙醇、乙酸乙酯各约 1 g 和甲苯约 0.2 g 置 50 mL 量瓶中, 用 DMF 稀释至刻度, 精密量取上述溶液 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用不含有机物的水稀释至刻度, 摇匀, 作为标准储备液。准确量取标准储备液适量, 用不含有机物的水稀释, 制成一系列不同浓度的溶液 (含乙醇 9.910~198.2 μg · mL⁻¹, 异丙醇 9.933~198.7 μg · mL⁻¹, 乙酸乙酯 9.916~198.3 μg · mL⁻¹, 甲苯 1.994~39.88 μg · mL⁻¹), 作为对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进样, 记录色谱图。以对照品溶液浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标进行线性回归, 结果见表 2。

表 2 线性关系与线性范围

Tab2 Linearity and its range

溶剂	浓度 /μg · mL ⁻¹	峰面积	线性方程	相关系数
乙醇	9.910	0.778 3	y = 0.062 2x + 0.1723	0.999 9
	19.82	1.379		
	39.64	2.698		
	99.10	6.298		
	198.2	12.50		
异丙醇	9.933	1.252	y = 0.124 2x + 0.146 5	0.999 9
	19.87	2.590		
	39.73	5.237		
	99.33	12.53		
	198.7	24.79		
乙酸乙酯	9.916	5.004	y = 0.452 3x + 1.046 8	0.999 2
	19.83	9.777		
	39.66	18.78		
	99.16	47.66		
	198.3	89.95		
甲苯	1.994	2.061	y = 0.710 3x + 0.953 5	0.991 7
	3.988	4.106		
	7.976	5.623		
	19.94	16.72		
	39.88	28.66		

2.4 精密度测定

准确量取 3 mL 对照品溶液 (含乙醇 19.86 μg · mL⁻¹, 异丙醇 19.90 μg · mL⁻¹, 乙酸乙酯 19.94 μg · mL⁻¹, 甲苯 3.960 μg · mL⁻¹) 5 份, 置顶空瓶中, 按“2.1”项下色谱条件进样, 计算得乙醇、异丙醇、乙酸乙酯和甲苯的 RSD 分别为 1.4%、2.7%、1.7% 和 8.3%。

2.5 检测限

采用逐步稀释法测得, 以 S/N = 3~4 作为检测限, 乙醇、异丙醇、乙酸乙酯和甲苯的检测限分别为 4.02 μg · mL⁻¹ 和 0.4 μg · mL⁻¹。根据样品取用量, 计算被检样品中乙醇、异丙醇、乙酸乙酯和甲苯的最低检出量为 0.0105%, 0.0053%, 0.0021% 和 0.0011%。

2.6 定量限

以 $S/N=10$ 测得各有机溶剂的定量限,平行测定 3~5 次,计算其 RSD,结果如下:乙醇: $9.9 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 RSD 9.1%;异丙醇: $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 RSD 7.9%;乙酸乙酯: $2.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 RSD 5.2%;甲苯: $0.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 其 RSD 6.4%。

2.7 样品测定结果

准确称取样品约 0.4 g,置 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,作为样品溶液。准确量取 3 mL 样品溶液 3 份,置顶空瓶中,按“2.1”项下色谱条件进样。按照外标峰面积法计算样品中的有机溶剂残留量,只检测到异丙醇,其含量为 0.0873%, RSD 8.1%,其余三种有机溶剂均未检测到。

3 讨论

四种有机溶剂中,甲苯沸点较高,其他三个较为接近,为在短时间内达到有效的分离,采用程序升温法。

国际人用药品注册技术协调大会 (ICH) 和药典都规定,甲苯为第二类残留溶剂,限度为 0.089%,乙醇、乙酸乙酯和异丙醇属第三类残留溶剂,限度均为 0.5%^[3-4]。本实验测得样品中残留有机溶剂的最低检出量分别为乙醇 0.0105%,乙

酸乙酯 0.0021%,甲苯 0.0011%,异丙醇含量为 0.0873%,均符合要求。因此,本实验建立的方法可以用来控制拉米夫定中有机溶剂残留量。

REFERENCES

- [1] SHAO L H, MA L X, SUN S A, *et al.* Determination of Lamivudine Concentration in Human Serum by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志) 2002, 22(1): 53-55.
- [2] ZHENG Q M, LI X M, *et al.* Establishment of LC-MS/MS Method for Determination of Lamivudine [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志) 2005, 25(1): 73-75.
- [3] Ch. P (2005) Vol III (中国药典 2005 年版, 二部) [S]. 2005: 附录 54-57.
- [4] KOJIMA S. Impurities: Guideline for Residual Solvents (Q3C): proceedings of the 4th International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals, Brussels, Belgium, July 16-18, 1997 [C]. <http://www.ich.org/>.

收稿日期: 2007-07-02