

气相色谱法测定头孢替坦二钠中残留溶剂

程云峰 张译

海南通用三洋药业有限公司 海南 海口 570312

【摘要】目的: 以气相色谱法测定头孢替坦二钠原料中的残留溶剂。方法: Agilent 7890A 气相色谱仪, Agilent G1888 顶空进样器, 氢火焰离子化检测器 (FID), 载气为氮气, 色谱柱为 DB-624 30m×0.53mm×3μm, 柱温 40°C, 维持 12min, 再 40°C/分钟升温至 200°C, 再维持 5 分钟, 进样口温度 210°C, 检测器温度 250°C, 柱流量 2ml/min; 分流比 10:1; 顶空进样, 平衡温度为 80°C, 平衡时间 30 分钟, 顶空进样体积为 1.0ml。结果: 系统适用性试验的结果基本符合药典的要求。各主成分各溶剂峰间分离度均大于 5, 最小理论塔板不低于 20000, 说明该色谱条件具有良好的专属性; 甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、丁酮、四氢呋喃、苯甲醚、N,N-二甲基苯胺的检测限分别为 1.51μg/ml、1.10μg/ml、0.49μg/ml、0.88μg/ml、0.28μg/ml、0.36μg/ml、0.09μg/ml、1.88μg/ml, 定量限分别为 4.56μg/ml、3.35μg/ml、1.51μg/ml、2.70μg/ml、0.86μg/ml、1.15μg/ml、0.28μg/ml、3.58μg/ml, 灵敏度良好; 方法重复性及精密度均小于 10%, 线性良好, r 值均在 99% 以上。在 50%、100%、150% 浓度的回收率均在 85%~110% 之间。结论: 该方法简便, 专属, 灵敏, 可靠, 适用于原料头孢替坦二钠原料残留溶剂的测定。

【关键词】气相色谱; 头孢替坦二钠; 残留溶剂

Determination of Residual Solvents in Cefotetan Disodium by Gas Chromatography

Yunfeng Cheng, Yi Zhang

Hainan General Sanyo Pharmaceutical Co., Ltd., Hainan Haikou 570312

Abstract: Objective: The residual solvent in cefotetan disodium was determined by gas chromatography. Method: Agilent 7890A gas chromatograph, Agilent G1888 headspace sampler, hydrogen flame ionization detector (FID), nitrogen carrier gas, column DB-624 30m×0.53mm×3μm, column temperature 40°C, keep 12min, then heating to 200°C with the velocity 40°C/min, keep for 5 min, inlet temperature 210°C, detector temperature 250°C, Column flow 2ml/min; Split ratio 10:1; The equilibrium temperature was 80°C, the equilibrium time was 30 minutes, and the headspace injection volume was 1.0ml. Results: The results of the system applicability test basically meet the requirements of pharmacopoeia. The separation degree between each solvent peak of each principal component is more than 5, and the minimum theoretical plate is not less than 20000, indicating that the chromatographic conditions have good specificity. The detection limits of methanol, ethanol, acetone, dichloromethane, butanone, tetrahydrofuran, anisole, N,N-dimethylaniline were 1.51μg/ml, 1.10μg/ml, 0.49μg/ml, 0.88μg/ml, 0.28μg/ml, 0.36μg/ml, 0.09μg/ml, 1.88μg/ml, respectively, the limits of quantitation were 4.56μg/ml, 3.35μg/ml, 1.51μg/ml, 2.70μg/ml, 0.86μg/ml, 1.15μg/ml, 0.28μg/ml, 3.58μg/ml, respectively. The reproducibility and precision of the methods were less than 10%, and the linear was good, r values were more than 99%. The recoveries of 50%, 100% and 150% concentration are between 85% and 110%. Conclusion: The method is simple, exclusive, sensitive and reliable, which is suitable for the determination of residual solvent of cefotetan disodium.

Keywords: Gas chromatography; Cefotetan disodium; Residual solvent

头孢替坦二钠属头霉素类, 作用与第三代头孢菌素近似。对产酶革兰阴性菌和厌氧菌有好作用。适应症用于易感菌所致腹内、皮肤软组织感染和尿路、下呼吸道及妇产科等感染的治疗^[1]。本品为在海南通用三洋药业有限公司实验室自行合成, 合成过程中主要用到了甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、丁酮、四氢呋喃、苯甲醚、N,N-二甲基苯胺作为反应用溶剂^[2]。根据 API 的合成路线所应用到的残留溶剂, 以及基于药品质量及安全性的考虑, 对用到的有机溶剂进行控制。另外, 残留溶剂大多没有特征吸收, 故采用气相色谱法进行控制^[3]。通过以往类似经验和查阅文献, 确定本品残留溶剂的分析方法, 根据中国药典的要求, 对所摸索的方法进行方法验证^[4-5]。

1 方法的选择

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器

气相色谱仪 Agilent 7890A, 顶空进样器 Agilent G1888, Waters Empower 工作站, DB-624 毛细管柱, 规格 30m×0.53mm×1.0μm; 电子天平 XS105。

1.1.2 对照品

甲醇, 批号: 202105173, 来源: TEDIA, 色谱纯; 乙醇, 批号: 20015028, 来源: TEDIA 色谱纯; 丙酮, 批号: 108076, 来源: Fisher Scientific 色谱纯; 二氯甲烷, 批号: 20191102, 来源: 天津市永大化学试剂有限公司 AR; 丁酮, 批号: 20080905, 来源: 广东光华科技股份有限公司 AR; 四氢呋喃, 批号: 20200210, 来源: 阿拉丁 色谱纯; 苯甲醚, 批号: 20171116, 来源: 天津市百世化工有限公司 AR; N,N-二甲基苯胺, 批号: DS1451-002, 来源: TEDIA 色谱纯。

1.2 方法来源

根据合成工艺路线, 以上有机溶剂为合成过程中使用, 故需在质量标准中制定方法加以控制, 同时对摸索的方法

进行验证^[6]。

1.3 色谱条件

Agilent 7890A 型气相色谱仪, Agilent G1888 型顶空进样器, 氢火焰离子化检测器 (FID), 载气为氮气, 色谱柱为 DB-624 30m×0.53mm×3μm, 柱温 40°C, 维持 12min, 再 40°C/分钟升温至 200°C, 再维持 5 分钟, 进样口温度 210°C, 检测器温度 250°C, 柱流量 2ml/min; 分流比 10:1; 顶空进样, 顶空体积 10ml, 平衡温度为 80°C, 平衡时间 30 分钟, 顶空进样体积为 1.0ml。溶剂: N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)。

2 方法的验证

2.1 专属性

2.1.1 溶剂定位

分别取甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、丁酮、四氢呋喃、苯甲醚、N,N-二甲基苯胺适量, 加 DMF 稀释制成溶液, 摇匀, 精密量取空白溶液及上述溶液各 10ml, 置顶空瓶中, 密封瓶口, 顶空进样。

2.1.2 分离度

溶液制备 精密称取甲醇 600mg, 乙醇、丙酮、丁酮、苯甲醚各 1000mg, 二氯甲烷 120mg, 四氢呋喃 144mg, N,N-二甲基苯胺 400mg 至同一个 100ml 容量瓶中, 用 DMF 稀释至刻度, 摇匀。制成每 1ml 中含甲醇 6mg, 乙醇 10mg, 丙酮 10mg, 二氯甲烷 1.2mg, 丁酮 10mg, 四氢呋喃 1.44mg, 苯甲醚 10mg, N,N-二甲基苯胺 4mg 的溶液, 作为对照品贮备液。再精密量取 50ml 贮备液至 100ml 容量瓶中, 用 DMF 稀释至密度, 摇匀, 作为对照品溶液。

供试品溶液 取本品 2.0g 至顶空瓶中, 加 DMF 10ml 溶解, 摇匀。

空白溶液 N,N-二甲基甲酰胺。

取以上溶液各 10ml 置顶空瓶中, 按 1.3 项下色谱条件, 分别进样, 记录色谱图。

试验结果与结论: 主成分出峰顺序依次为甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、丁酮、四氢呋喃、苯甲醚、N,N-二甲基苯胺, 出峰时间分别为 2.5, 3.5, 4.1, 4.8, 6.5, 6.8, 10.3, 12.2, 分离度依次为 12.446, 6.249, 7.957, 20.281, 3.834, 14.834, 27.761, 所有主成分理论塔板数均在 20000 以上。结果显示主成分各溶剂峰间分离度均大于 5, 最小理论塔板不低于 20000, 说明该色谱条件具有良好的专属性。

2.2 精密度试验

2.2.1 进样精密度

取 2.1.2 对照品溶液, 共 6 份, 按 1.3 项下系统条件, 注入气相色谱仪, 记录色谱图。

试验结果 8 个主成份 6 针的进样的峰面积 RSD 均在 5% 以内, 说明仪器精密度良好。

2.2.2 重现性

按照 2.1.2 制备供试品溶液 6 份, 记录色谱图, 以 2.1.2 项下作为对照品溶液, 按外标法以峰面积计算 6 份结果。

试验结果 乙醇、丙酮 6 份结果的 RSD 均在 5% 以内, 其余均未检出。

2.2.3 中间精密度

由不同分析人员, 不同日期, 在同一实验室采用不同的液相色谱仪, 分别测定本品中 8 个主成份的精密度。

试验结果 另一名试验员的乙醇、丙酮 6 份结果的 RSD 也均在 5% 以内, 其余均未检出。与第一人检测的结果, 共 12 份结果的 RSD 也均在 5% 以内。

试验结果 本品重复性及精密度良好。

2.3 检测限与定量限

取 2.1.2 项下对照品溶液, 逐级稀释至各个主成份的信噪比 S/N 为 3 和 10 时浓度, 分别作为其检测限与定量限的浓度。

精密量取稀释后的各种浓度溶液 10ml 至顶空瓶中, 顶空进样 1.0ml, 记录色谱图, 依据色谱峰的峰高, 再结合其浓度, 以信噪比约为 10:1 时的样品浓度作为定量限浓度, 以信噪比约为 3:1 时的样品浓度作为定量限浓度, 连续进样 6 次。

试验结果与结论 甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、丁酮、四氢呋喃、苯甲醚、N,N-二甲基苯胺的检测限分别为 1.51μg/ml、1.10μg/ml、0.49μg/ml、0.88μg/ml、0.28μg/ml、0.36μg/ml、0.09μg/ml、1.88μg/ml, 定量限分别为 4.56μg/ml、3.35μg/ml、1.51μg/ml、2.70μg/ml、0.86μg/ml、1.15μg/ml、0.28μg/ml、3.58μg/ml。系统灵敏度良好。

2.4 线性与范围

50% 对照品溶液的配制: 精密量取 2.1.2 项下对照品溶液 25ml, 至 50ml 容量瓶中, 用 DMF 稀释至刻度, 摇匀;

100% 对照品溶液的配制: 精密量 2.1.2 项下对照品溶液, 即得;

150% 对照品溶液的配制: 精密量取 2.1.2 项下对照贮备液 75ml, 至 100ml 容量瓶中, 用 DMF 稀释至刻度, 摇匀;

200% 对照品溶液的配制: 精密量 2.1.2 项下对照品贮备液, 即得。

将以上溶液按 1.3 项下色谱条件, 各取 10ml 至顶空瓶中, 顶空进样, 记录色谱图。将以上溶液及定量限溶液浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标进行线性回归, 得出线性方程。

试验结果 甲醇线性回归方程: $y=33583x-5422, R=0.9916$; 乙醇线性回归方程: $y=58356x-7124.2, R=0.9961$; 丙酮线性回归方程: $y=290363x-18020, R=0.9913$; 二氯甲烷线性回归方程: $y=7660.4x-927.31, R=0.9976$; 丁酮线性回归方程: $y=164353x-10097, R=0.9983$; 四氢呋喃线性回归方程: $y=61597x-11918, R=0.9944$; 苯甲醚线性回归方程: $y=4256.8x-640.52, R=0.9925$; N,N-二甲基苯胺线性回归方程: $y=214.74x+3.806, R=0.9953$;

试验结论: 各溶液在相应的浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.5 准确度

对照品贮备溶液、对照品溶液、供试品溶液、系统适用性溶液均同 2.1.2 项下。

供试品溶液 取自制样品头孢替坦二钠约 2.0g, 精密称定, 置顶空瓶中, 加 DMF 10ml, 摇匀。同法配制三份。

加标操作

50% 回收率供试品溶液 取自制样品头孢替坦二钠约 2.0g, 精密称定, 置顶空瓶中, 精密量取 2.4 项下 50% 对照品溶液 10ml, 摇匀。同法配制三份。

100% 回收率供试品溶液 取自制样品头孢替坦二钠约

2.0g, 精密称定, 置顶空瓶瓶中, 精密量取 2.4 项下 100% 对照品溶液 10ml, 摇匀。同法配制三份。

150% 回收率供试品溶液 取自制样品头孢替坦二钠约 2.0g, 精密称定, 置顶空瓶瓶中, 精密量取 2.4 项下 150% 对照品溶液 10ml, 摇匀。同法配制三份。

精密量取上述溶液 10ml 至顶空瓶中, 分别顶空进样, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算, 扣除本底, 求出各个成份的回收率。

试验结果 甲醇平均回收率为 93.4%, RSD(%) 为 2.15, 乙醇平均回收率为 96.8%, RSD(%) 为 4.13, 丙酮平均回收率为 90.3%, RSD(%) 为 4.12, 二氯甲烷平均回收率为 93.1%, RSD(%) 为 3.95, 丁酮平均回收率为 93.9%, RSD(%) 为 3.59, 四氢呋喃平均回收率为 89.94%, RSD(%) 为 4.88, 苯甲醚平均回收率为 92.3%, RSD(%) 为 3.97, N,N-二甲基苯胺平均回收率为 90.4%, RSD(%) 为 4.04。

试验结论 回收率均在 85% ~ 110% 之间, 说明本方法回收率良好。

2.6 耐用性

耐用性系指在测定条件有小的变动时, 测定结果不受影响的承受程度, 为使方法用于常规检验提供依据。耐用性试验是药学研究方法学考察中非常重要的试验之一。

通过分别考察进样口温度变化 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、检测器温度变化 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、柱温变化 $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 、柱流量变化 $\pm 20\%$ 、色谱柱变化、顶空进样体积变化 $\pm 1\%$ 、顶空温度变化 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、顶空平衡时间 ± 2 分钟, 并在这些条件下进行样品测定, 根据仪器色谱行为的变化, 通过耐用性试验可以评价 8 个主成份方法学的可信性。

对照品、供试品溶液制备同 2.1.2 项下, 分别于以上变化后的系统中顶空进样, 记录色谱图, 按外标法以峰面积进行计算。

试验结果 本品进样口温度、检测器温度、柱温、柱流量、色谱柱、顶空体积、顶空温度及平衡时间变化时相应的系

统适用性试验的结果基本符合药典的要求, 同时, 测定结果 RSD 均在 5% 以内。因此, 本品分析方法在方法参数发生微小的变异后可靠性较好。

2.7 稳定性

稳定性系指样品溶液在一定条件下一定时间内, 检测结果的稳定性, 即样品溶液的稳定性, 为待检验的样品溶液存放时限提供依据。

样品制备 同 2.5 项下 100% 回收率供试品溶液, 通过对加标样品溶液在常温下放置 2、4、8 小时, 再分别按 1.3 色谱条件顶空进样, 并记录色谱图。

试验结果及结论 8 种主成份在 2、4、8 小时分别进样并积分得出的峰面积的 RSD 值均在 5% 以内。因此, 可以断定, 本品分析方法在 8 小时内样品溶液稳定性良好。

3 讨论

(1) 测定结果较小或未检出, 精密度及耐用性试验应该也加标, 今后的试验应注意应用。

(2) 样品中含有如苯甲醚与 N,N-二甲基苯胺等高沸点的有机溶剂, 通常可采用直接进样的方式, 但顶空进样也适合, 如果分析效果不理想, 可以开发一个系统, 采用直接进样法。

(3) 顶空体积通常可为顶空瓶的 25% ~ 75%, 考虑到待测物质中有沸点较高的成份, 为使灵敏度不受影响, 故顶空体积定为 10ml。

参考文献

- [1] 注射用头孢替坦二钠说明书.
- [2] 头孢替坦二钠合成工艺草案.
- [3] 中国药典 2020 年版四部附录 0521 气相色谱法.
- [4] ICH Q2(R1) 分析方法验证.
- [5] 中国药典 2020 年版四部附录 9101 分析方法验证指导原则.
- [6] 头孢替坦二钠质量标准草案.