

气相色谱法测定阿戈美拉汀原料药中乙酸和乙醚残留

邹孟瑶¹, 赵丽娜^{2*}, 李银峰^{2*}, 靳朝东²

1. 天津中医药大学, 天津 300193

2. 天津药物研究院, 天津 300193

摘要: **目的** 建立测定阿戈美拉汀原料药中残留的2种有机溶剂(乙酸、乙醚)的检测方法。**方法** 采用直接进样气相色谱法, 色谱柱为DB-FFAP毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.5 μm), 载气为高纯度氮气; 柱温40℃, 维持2 min, 以50℃/min升至120℃; 再以20℃/min升至220℃, 维持2 min; 氢火焰离子化检测器(FID), 进样口温度为250℃, 检测器温度为250℃, 载气流量为2 mL/min, 进样量1 μL, 分流比为20:1。**结果** 在考察的浓度范围内线性关系良好($r=0.9997\sim 0.9998$), 2种残留溶剂均完全分离, 精密度试验RSD值以及被测组分的平均回收率均符合要求。**结论** 该气相色谱法操作简单, 准确度、灵敏度高, 可用于检测阿戈美拉汀原料药中残留的有机溶剂。

关键词: 阿戈美拉汀; 直接进样气相色谱; 有机残留溶剂

中图分类号: R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)11-2021-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.11.016

Determination of residual organic solvents in Agomelatine bulks drug by gas chromatography

ZOU Mengyao¹, ZHAO Lina², LI Yinfeng², JIN Chaodong²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of the two residual organic solvents, including acetic acid, diethyl ether in Agomelatine bulks drug. **Methods** Direct injection gas chromatography was applied to this study. The column was DB-FFAP silica capillary column (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm) and the carrier gas was high purity nitrogen. The column temperature was kept at 40℃ for 2 min, then the temperature was raised to 120℃ at the rate of 50℃/min, then the temperature was raised to 220℃ at the rate of 20℃/min and sustained for 2 min. FID detector temperature and injection temperature were both 250℃. The N₂ flow rate was 2.0 mL/min. The injection volume was 1 μL. The split ratio was 20:1. **Results** Two kinds of solvents were completely separated and determined with a good linearity ($r = 0.9997\sim 0.9998$). The RSD values of precision experiments and the average recovery was in line with the requirements. **Conclusion** The analytical method is simple, accurate and sensitive, which could be used for determination of residual organic solvents in Agomelatine bulks drug.

Key words: Agomelatine; direct injection gas chromatography; residual organic solvents

阿戈美拉汀是一种新型的具有褪黑激素能激动和5-羟色胺(5-HT)_{2C}受体拮抗作用的抗抑郁药, 由法国施维雅公司研发, 商品名为Valdoxan/Thymannax, 来自于基础研究、动物研究和临床研究的结果显示出其确切的抗抑郁效果, 并且对焦虑症状、睡眠及性功能有改善作用^[1-4]。在临床研究中,

相比于其他抗抑郁药物, 表现出起效较快、停药反应少和较好的耐受性, 为抑郁症患者的治疗带来新的选择^[5-8]。在该原料药的工艺中使用了三氟化硼乙醚和醋酸酐, 需要检测乙醚及副产物乙酸2种溶剂。这些残留溶剂对人体健康有一定的影响, 需要除去或者使其残留的量不超过《中国药典》2015年

收稿日期: 2018-03-20

第一作者: 邹孟瑶(1993—), 女, 河北省保定市, 在读硕士研究生, 研究方向为药物分析。Tel: 13091268876 E-mail: 1170382800@qq.com

*通信作者: 李银峰, 男, 助理研究员, 研究方向为药物分析。Tel: (022)23006877 E-mail: jined@tjipr.com

赵丽娜, 女, 助理研究员, 研究方向为药物分析。Tel: 13821855931 E-mail: 13821855931@163.com

版规定的限度。因此,本实验建立了测定阿戈美拉汀原料药中残留的2种有机溶剂的气相检测方法,结果表明,该方法分离度良好,灵敏度高,在考察的浓度范围内线性关系良好,回收率符合规定,耐用性良好,是首次且可同时检测乙酸和乙醚两种残留溶剂。

1 仪器与试剂

Agilent 7890A 气相色谱仪;Agilent 7890B 气相色谱仪;氢火焰离子化检测器(FID);纯水氢气发生器(济南浩伟实验仪器有限公司)、SGK-2LB 低噪空气泵(北京东方精华苑科技有限公司);Open LBA CDS Chem Station Edition 工作站;Sartorius BP211D 电子分析天平。

乙醚(分析纯,天津市康科德科技有限公司),乙酸(分析纯,天津市康科德科技有限公司),*N,N*-二甲基甲酰胺(DMF),阿戈美拉汀原料药由天津药物研究院化学原料药研究中心自制(质量分数 $\geq 99.0\%$),批号分别为040115091101、040115091302、040115100403。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

DB-FFAP 毛细管柱(30 m \times 0.32 mm,0.5 μ m),载气为高,纯度氮气,升温程序为柱温40 $^{\circ}$ C,维持2 min,以50 $^{\circ}$ C/min升至120 $^{\circ}$ C,再以20 $^{\circ}$ C/min升至220 $^{\circ}$ C,维持2 min,氢火焰离子化检测器(FID),进样口温度为250 $^{\circ}$ C,检测器温度为250 $^{\circ}$ C,体积流量为2 mL/min,进样量1 μ L,分流比为20:1。溶剂为DMF。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照溶液的配制 分别精密移取乙酸、乙醚1 000 mg至同一100 mL量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀即得10 mg/mL对照储备液。再精密量取10 mL储备液至100 mL量瓶中。加溶剂稀释定容,摇匀即得1 mg/mL对照溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取阿戈美拉汀原料药2 g,置10 mL量瓶中,加入溶剂溶解并定容至刻度,摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

取对照溶液至进样瓶中,进样测定6份。结果各组分的分离度均大于2.0,峰面积RSD均小于10%,理论塔板数均大于10 000,符合规定。色谱图见图1。

2.4 定量限

2.4.1 定量限的确定 分别精密移取乙酸、乙醚各

1 000 mg至不同的100 mL量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀即得10 mg/mL乙酸储备液和乙醚储备液。精密移取2.5 mL乙醚储备液、5 mL乙酸储备液至同一100 mL量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀作为溶液A。再量取20 mL溶液A至100 mL量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀得定量限溶液。

2.4.2 定量限精密度的测定 平行配制6份定量限溶液,计算各成分峰面积的RSD值,结果见表1。

2.4.3 定量限回收率的测定 取对照溶液至进样瓶中,平行配制2份对照溶液;取供试品溶液至进样瓶中,平行配制2份供试品溶液;样品加定量限溶液:称取样品2 g置10 mL量瓶中,加入定量限溶液溶解并定容至刻度,摇匀,平行6份。对照和供试品溶液分别进2针,加样定量限溶液进样6针测定,使用外标法计算回收率,结果见表1。

$$\text{测得量} = A_1 / A_{\text{对}} \times C_{\text{对}}$$

$$\text{质量分数} = A_2 / A_{\text{对}} \times C_{\text{对}} / C_2$$

$$\text{原始量} = C_1 \times \text{质量分数}$$

$$\text{加入量} = C_3$$

$$\text{回收率} = (\text{测得量} - \text{原始量}) / \text{加入量}$$

式中, $A_{\text{对}}$ 为对照溶液中各溶剂峰面积; $C_{\text{对}}$ 为对照溶液中各溶剂质量浓度; A_1 为样品加定量限溶液中各溶剂峰面积; C_1 为样品加定量限溶液质量浓度; A_2 为样品溶液中溶剂峰面积; C_2 为样品溶液质量浓度; C_3 为各溶剂定量限质量浓度。

表1 定量限考察结果

Table 1 Results of LOQ

溶剂	定量限/(mg ·mL ⁻¹)	定量限精密 度/%	定量限回收 率/%
乙醚	0.050	3.81	95.18
乙酸	0.103	5.22	99.90

2.5 检出限

精密移取0.2 mL乙醚储备液、0.3 mL乙酸储备液至同一10 mL量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀作为溶液B。再量取0.5 mL溶液B至50 mL量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀得检出限溶液。平行配制2份。乙醚和乙酸检出限分别为2.004、3.018 μ g/mL。

2.6 线性关系考察

分别取对照品储备液2、1.5、1、0.5、0.2 mL至不同10 mL量瓶中,加溶剂稀释定容,摇匀得对照品溶液浓度的200%、150%、100%、50%、20%的溶液;定量限浓度参考“2.4定量限”,进样测定。结果表明,各溶剂在一定浓度范围内线性关系良好,结果见表2。

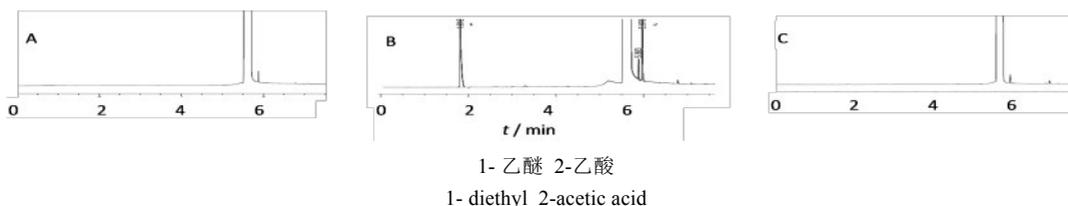


图2 空白(A)、对照溶剂(B)和阿戈美拉汀原料药(C)的GC图谱

Fig. 2 GC chromatograms of blank solution(A), reference substance solvents (B), and Agomelatine bulks drug(C)

表2 线性关系考察结果

Table 2 Results of linearity

溶剂	回归方程	r	线性范围/(mg·mL ⁻¹)
乙醚	Y=271.92x-2.287 6	0.999 7	0.050~2.004
乙酸	Y=132.56x-0.183 7	0.999 8	0.101~2.012

2.7 方法精密度试验

对照溶液:取配制好的对照溶液至进样瓶中,平行2份。样品加对照溶液:取供试品2 g至10 mL量瓶中,加对照品储备液1 mL,加溶剂稀释定容。平行配制6份;进样测定。计算各溶剂RSD值,结果见表3。

2.8 中间精密度

配制方法同2.7,由另一人员在另外一台仪器上完成。结果见表3。

2.9 回收率试验

对照溶液:取配制好的对照溶液至进样瓶中,平行2份;供试品溶液:取配制好的供试品溶液至进样瓶中,平行2份。

80%、100%、120%的回收率溶液配制:分别取对照品储备液0.8、1.0、1.2 mL至不同的盛有2 g供试品的10 mL量瓶中,加入溶剂稀释定容,每个浓度平行3份,进样测定。结果见表4。

表3 精密度试验结果

Table 3 Results of precision test

溶剂	RSD/%		
	仪器1	仪器2	两台仪器
乙醚	1.99	1.34	3.27
乙酸	1.13	0.46	1.98

表4 回收率试验结果

Table 4 Results of recovery test

溶剂	平均回收率/%	RSD/%
乙醚	95.10	2.31
乙酸	95.16	1.05

2.10 耐用性试验

试验表明,起始温度、检测器温度、进样口温度、流速发生微小变化时,对样品测定无明显影响,对照溶液中各溶剂的峰面积RSD值在0.63%~5.56%。方法耐用性良好。

2.11 稳定性试验

样品溶液稳定性试验:分别考察了0、2、18.5、24、48 h稳定性,试验表明样品48 h内稳定性良好。

2.12 样品测定

分别精密称定040115091101、040115091302、040115100403批阿戈美拉汀原料药各2 g,置10 mL量瓶中,加入溶剂稀释定容,进样测定,采用外标法计算,结果见表5。阿戈美拉汀原料药中有机溶剂残留限度参考2015年版《中国药典》^[9]最后设定控制标准:乙酸、乙醚的限度分别为0.5%、0.5%。结果表明,3批样品中乙酸、乙醚溶剂均未检出。

表5 阿戈美拉汀原料药中有机溶剂残留测定结果

Table 5 Datermination of residual organic solvents in Agomelatine bulks drug

残留溶剂	残留量/%	
	乙醚	乙酸
040115091101	未检出	未检出
040115091302	未检出	未检出
040115100403	未检出	未检出

3 讨论

3.1 溶剂及进样方式的选择

考察了二氯甲烷、正丁醇、N-甲基吡咯烷酮、正庚烷、DMF 5种溶剂。样品在正庚烷中200 mg/mL不溶解。采用顶空进样方式,样品在二氯甲烷中200 mg/mL可溶,但乙酸峰形拖尾,且发现进样过的顶空瓶内溶剂全部挥发,表明该二氯甲烷不适合作溶剂。样品在正丁醇中90℃水浴200 mg/mL可溶,溶剂有干扰,不适用。样品在N-甲基吡咯烷酮中500 mg/mL可溶,但乙酸未出峰,不适用。后采用直接进样方式,样品在DMF中200 mg/mL可溶,乙醚和乙酸峰能够与溶剂峰及溶剂中的杂质峰分离,

DMF 适合做溶剂。考虑到样品溶解性问题、峰形、及对待测组分峰的干扰,选择DMF作为溶剂。

3.2 温度的选择

考察了 200、230、250 °C 3 个进样口温度, 230 °C 和 250 °C 乙醚峰形更好, 暂定 250 °C。考察了 230、250、270 °C 3 个检测器温度, 结果相差不大, 暂定 250 °C。

3.3 分流比的选择

考察了 5:1、10:1、20:1 3 个条件。分流比主要影响响应大小。考虑到 5:1、10:1 时, 溶剂中干扰峰较多, 选择 20:1。

3.4 流速的选择

考察了 1、1.5、2 mL/min 3 个条件, 发现 2 mL/min 时, 各溶剂分离度更好。

3.5 色谱柱的选择

考察了 DB-WAX (30 m×0.32 mm×0.25 μm)、DB-624 (30 m×0.53 mm×3 μm)、DB-FFAP (30 m×0.32 mm×0.5 μm) 3 种色谱柱。DB-624 色谱柱中乙酸峰拖尾, 且乙醚和乙酸峰响应都较小些。DB-WAX 也可满足要求, 表明该方法耐用性良好。

3.6 测定结果分析

检测结果表明, 3 批样品中乙醚、乙酸均未检出。该 2 种溶剂均是合成阿戈美拉汀原料药的工艺杂质, 表明本品的后续工艺对 2 种溶剂具有良好的去除作用。

4 结论

《中国药典》2015 年版四部通则 0861 规定, 乙醚、乙酸为第三类残留溶剂, 限度分别为 0.5%、0.5%。本实验采用直接进样气相色谱法对阿戈美拉汀原料药相关的 2 种残留溶剂进行检测, 方法学验证证明该方法分离度良好, 灵敏度高, 在考察的

浓度范围内线性关系良好, 回收率符合规定, 耐用性良好, 可作为阿戈美拉汀原料药中残留溶剂的质量控制方法。

参考文献

- [1] 陈发展, 陆 峥. 新型抗抑郁药物阿戈美拉汀的研究进展 [J]. 世界临床药物, 2012, 33(07): 450-452.
- [2] 戴雯姬, 司天梅. 阿戈美拉汀的药理机制及临床疗效 [J]. 中国心理卫生杂志, 2012, 26(03): 193-198.
- [3] Audinot V, M F ailliet Lahaye-Brasseur C, et al. New selective ligands of human cloned melatonin M T1 and M T2 receptors [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2003, 367(6): 553-561.
- [4] Kasper S, Hamon M. Beyond the monoaminergic hypothesis: agomelatine, a new antidepressant with an innovative mechanism of action [J]. World J Biol Psychiatry, 2009, 10(2): 117-126.
- [5] Bodinat C, Guardiola-Lemaitre B, Mocaer E, et al. Agomelatine, the first melatonergic antidepressant: discovery, characterization and development [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(8): 628-642.
- [6] 廖波, 李彦, 高镨, 等. 阿戈美拉汀治疗抑郁障碍的应用及效果评估 [J]. 中国生化药物杂志, 2017(10): 117-120.
- [7] 况雷雨. 阿戈美拉汀与 SSRIs 治疗抑郁症疗效及安全性比较的系统综述和 meta 分析 [D]. 济宁: 济宁医学院, 2016.
- [8] Fang T, Zhou Z, Cheng G, et al. Implementation of a reference-scaled average bioequivalence approach for highly variable generic drug products of agomelatine in Chinese subjects [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2016, 6(1): 71-78.
- [9] 中国药典 [S]. 四部. 2015.