

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2021.12.04

顶空毛细管 GC 法测定马波沙星原料药中 6 种溶剂的残留量

董玲玲, 汪霞, 杨星, 马秋冉, 于晓辉, 赵富华

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-04-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2021) 12-0020-05 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立顶空毛细管气相色谱法测定马波沙星原料药中甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、苯和甲苯等 6 种溶剂残留量。色谱柱为 DB-624 毛细管柱(30 m×0.53 mm, 3.0 μm), 采用程序升温的方式, 检测器为火焰离子化检测器(FID), 检测器温度为 250 ℃; 顶空瓶平衡温度为 105 ℃, 平衡时间为 20 min。结果显示, 在该色谱条件下, 6 种溶剂均能得到良好分离; 加样回收率均在 100% ~ 110% 之间($RSD < 8\%$, $n=9$), 精密度重复性和稳定性结果均良好。该方法操作简便, 重复性高, 结果稳定可靠, 可用于马波沙星残留溶剂的检测。

[关键词] 马波沙星; GC; 残留溶剂

Determination of 6 Kinds of Residual Solvents in Marbofloxacin Bulk Drug by Headspace Capillary Gas Chromatography

DONG Ling-ling, WANG Xia, YANG Xing, MA Qiu-ran, YU Xiao-hui, ZHAO Fu-hua

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: A method for the simultaneous determination of six kinds of residual solvents as methanol, ethanol, acetonitrile, dichloromethane, benzene and toluene in marbofloxacin bulk drug was established by headspace gas chromatography. The residual solvents were separated on DB-624 (30 m×0.53 mm, 3.0 μm) capillary column using temperature programming. FID was used as detector with the temperature of 250 ℃. The sample was extracted at 105 ℃ for 20 min. The results showed that the separation of six kinds of residual solvents was good. The average recoveries were ranged from 100% ~ 110% ($RSD < 8\%$, $n=9$). Results of precision, repeatability and stability were good. Therefore, the established method which is simple, reproducible, stable and reliable can be used for detection of residual solvents in marbofloxacin bulk drug.

Key words: marbofloxacin; gas chromatography; residual solvents

马波沙星(Mabofloxacin)又名麻保沙星,化学名为 9-氟-3-甲基-10-(4-甲基-1-哌嗪基)-7-氧代-2,3-二氢-7H-吡啶-[3,2,1-*ij*][4,1,2]-苯并噁二嗪-6-羧酸,通过抑制细菌复制中所需的 DNA 拓扑异构酶 II 和 IV 而表现杀菌作用^[1],是一种动物专用的第三代喹诺酮类抗菌药物,抗菌谱广,对绝大多数革兰氏阳性菌有较强的抗菌活性^[1-2],且具有很高的生物利用度^[3],统计国内现有企业马波沙星原料的合成工艺,使用了包括甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、苯与甲苯在内的 6 种溶剂^[4-6],因此,根据《中国兽药典》2015 年版^[7]及 VICH^[8]的相关规定,采用顶空毛细管气相色谱法同时测定上述 6 种溶剂的残留量。

1 仪器与试药

Agilent 7890A 气相色谱仪,配 Agilent 7697A 顶空进样器及 FID 检测器,ChemStation 色谱工作站;METTLER TOLEDO XS 205 电子天平。甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、苯与甲苯均为分析纯。N,N-二甲基甲酰胺为色谱纯。马波沙星原料来自两个企业,企业 1 批号:171101、171201、171202;企业 2 批号:160919、161011、170306。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:DB-624 毛细管柱(30 m×0.53 mm, 3.0 μm);载气:高纯氮;初始温度为 40 ℃,维持 10 min 后,以每分钟 20 ℃的速率升温至 80 ℃,维持 2 min,再以每分钟 30 ℃的速率升温至 200 ℃,维持 5 min。以氮气为载气,流速为每秒 24.1 cm,分流比为 5:1;进样口温度为 180 ℃;检测器为火焰离子化检测器(FID),检测器温度为 250 ℃;顶空瓶平衡温度为 105 ℃,平衡时间为 20 min。

2.2 溶液的制备

2.2.1 供试品溶液制备 取本品约 0.1 g,精密称定,置顶空瓶中,精密加 N,N-二甲基甲酰胺 1 mL,密封,作为供试品溶液。

2.2.2 对照品溶液配制方法 分别精密称取甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、苯与甲苯适量,加二甲基甲酰胺定量稀释制成每 1 mL 中分别含甲醇 0.3 mg、乙醇 0.5 mg、乙腈 0.041 mg、二氯甲烷 0.06 mg、苯 0.002 mg 和甲苯 0.089 mg 的混合溶液,精密量取 1 mL,置顶空瓶中,密封,作为对照品溶液。

2.3 专属性 溶剂空白:精密量取 1 mL N,N-二甲基甲酰胺置顶空瓶中,密封,即得。取溶剂空白及 2.2 项下的对照品溶液和供试品溶液按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图(图 1~图 4)。结果表明,空白溶剂无干扰峰出现;对照品溶液色谱图中,各残留溶剂分离度良好;两个企业供试品色谱图中,残留溶剂出峰处无干扰。

2.4 检测限和定量限 取对照品溶液加 N,N-二甲基甲酰胺系列稀释,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以信噪比约为 3 时的浓度,作为检测限;以信噪比约为 10 时的浓度,作为定量限,结果见表 1。

2.5 线性和范围 分别精密称取 6 种残留溶剂适量,用 N,N-二甲基甲酰胺溶解并稀释使成每 1 mL 中含甲醇 30.0 mg、乙醇 50.0 mg、乙腈 4.1 mg、二氯甲烷 6.0 mg、苯 0.02 mg 和甲苯 8.9 mg 的对照贮备液,用 N,N-二甲基甲酰胺逐步稀释使成梯度浓度。分别精密量取上述稀释溶液各 1 mL,置顶空瓶中,密封,进样。以浓度为横坐标(*X*),峰面积为纵坐标(*Y*),分别进行线性回归,结果 6 种溶剂的浓度与峰面积均呈良好的线性关系(表 1)。

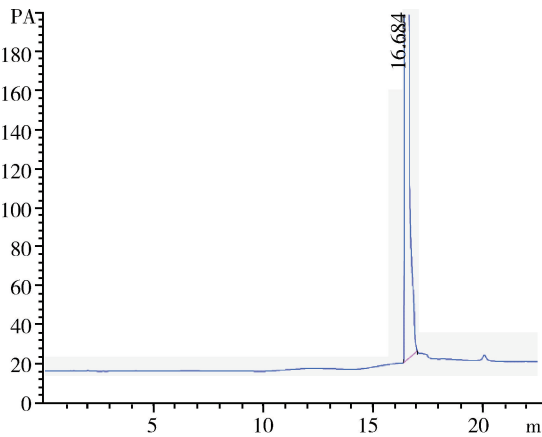


图 1 溶剂空白色谱图(DMF)

Fig 1 Chromatogram of solvent(DMF)

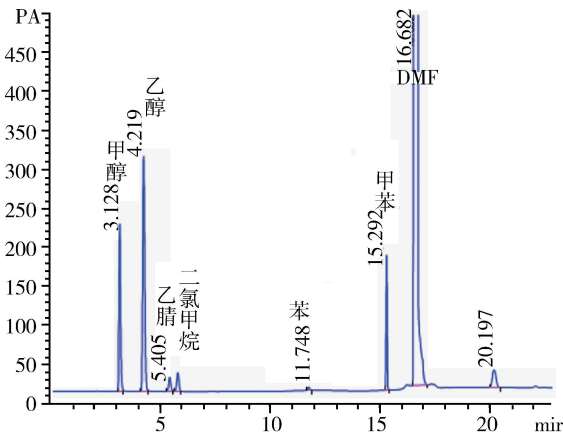


图 2 残留溶剂对照品溶液色谱图

出峰顺序依次为甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、苯、甲苯、DMF

Fig 2 Chromatogram of six kinds of residual solvents

The peak outflows by methanol, ethanol, acetonitrile, dichloromethane, benzene and toluene

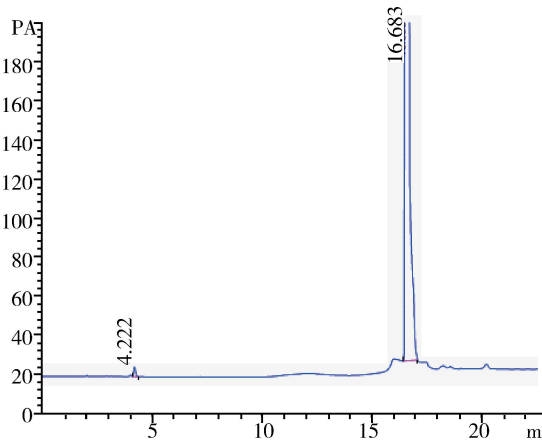


图 3 供试品溶液残留溶剂色谱图(企业 1)

Fig 3 Chromatogram of Marbofloxacin draw material (sample1)

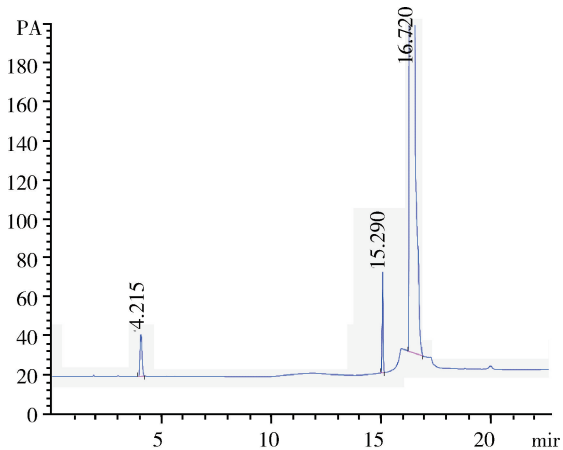


图 4 供试品溶液残留溶剂色谱图(企业 2)

Fig 4 Chromatogram of Marbofloxacin draw material (sample2)

表 1 马波沙星残留溶剂的标准曲线、检测限和定量限结果表

Tab 1 Results of range, linearity, limit of detection and limit of quantification.

残留溶剂	范围/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	线性方程	R^2	检测限/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	定量限/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
甲醇	6 ~ 1500	$y = 3.6012x - 7.2964$	0.9999	3	6
乙醇	10 ~ 2500	$y = 3.6067x - 26.62$	0.9999	5	10
乙腈	0.82 ~ 205	$y = 2.78x - 1.7537$	0.9999	0.41	0.82
二氯甲烷	1.2 ~ 300	$y = 2.5591x - 2.5067$	0.9999	0.6	1.2
苯	0.4 ~ 10	$y = 10.659x - 0.7149$	0.9999	0.1	0.4
甲苯	1.78 ~ 445	$y = 6.2321x - 7.2964$	0.9999	0.89	1.78

2.6 精密度 取 2.5 项下的对照贮备液 0.1 mL 至 10 mL 量瓶中,加 N,N - 二甲基甲酰胺稀释至刻度,平行制备 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定,甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、苯、甲苯 6 次进样峰面积的 *RSD* 结果分别为 2.1% ,3.0% ,3.8% ,2.8% ,3.3% 和 4.9% ,精密度良好。

2.7 重复性 取马波沙星原料(企业 1,批号 171202)制备供试品溶液 6 份,按 2.1 项下色谱条件分别进样,检出甲醇含量的均值为 0.01% ,*RSD* 为 0% ,其余均未检出。

2.8 准确度 混合对照品溶液:取 2.5 项下的对照贮备液 1 mL 至 10 mL 量瓶中,加 N,N - 二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,即得。平行配制 3 份。

分别取 9 份马波沙星原料(企业 1,批号 171202)各 0.1 g,依次精密加入上述各混合对照品溶液 0.08、0.1、0.12 mL,配制成相当于 80%、100% 和 120% 限度的混合对照品溶液各 3 份。按

2.1 项下色谱条件进样测定,结果为:甲醇的平均回收率为 113.3% (*RSD* = 6.8%);乙醇的平均回收率为 116.4% (*RSD* = 3.7%)、乙腈的平均回收率为 109.7% (*RSD* = 4.0%)、二氯甲烷的平均回收率为 115.6% (*RSD* = 5.9%)、苯的平均回收率为 103.3% (*RSD* = 6.7%)、甲苯的平均回收率为 115.3% (*RSD* = 6.2%)。

2.9 稳定性 取 2.2.2 项下对照品溶液 4 份,分别于 0、6、12 和 24 h 按 2.1 项下方法测定,记录 6 种残留溶剂的峰面积,考察溶液的稳定性。甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、苯和甲苯峰面积的 *RSD* 分别为 0.9%、1.0%、1.5%、1.6%、2.0% 和 0.9% ,各待测成分色谱峰面积的 *RSD* ≤ 2.0% 。说明该溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.10 供试品测试结果 取 2 个企业 6 批供试品,按 2.1 项下色谱条件分别进样测定,按外标法以峰面积计算,结果见表 2。

表 2 马波沙星残留溶剂结果表

Tab 1 Results of residual solvents in Marbofloxacin draw material.

企业编号	批号	残留溶剂/%					
		甲醇	乙醇	乙腈	二氯甲烷	苯	甲苯
1#	171202	未检出	0.01	未检出	未检出	未检出	未检出
	171201	未检出	0.01	未检出	未检出	未检出	未检出
	171101	未检出	0.01	未检出	未检出	未检出	未检出
	170306	未检出	0.03	未检出	未检出	未检出	0.03
2#	161011	未检出	0.03	未检出	未检出	未检出	0.04
	160901	未检出	0.03	未检出	未检出	未检出	0.05

测定过程中使用的色谱柱为 DB - 624/30 m,0.53 mm,3.0 μm。

3 讨 论

3.1 溶剂的选择 研究之初拟采用较环保且经济的 0.5 mol/L 氢氧化钠溶液作为溶剂^[9],但其在乙腈和二氯甲烷出峰处有干扰,因此,又考察 N’N - 二甲基甲酰胺 (DMF)、N’N - 二甲基乙酰胺 (DMA)和二甲基亚砷 (DMSO),考虑到 DMF 毒性相对较小,最终采用 DMF 作为溶剂。

3.2 顶空平衡时间和平衡温度的选择 因本法采用 DMF 为溶媒,沸点较高,为保证马波沙星原料中

的残留溶剂能更好的释放达到平衡,拟采用较高的平衡温度,考察 100、105、110、115 ℃,平衡 15、20、25、30 min 的残留溶剂结果,结果表明:固定平衡温度为 105 ℃时,20 min 之后随平衡时间延长,供试品中残留溶剂量无明显增加,确定平衡时间为 20 min;固定平衡时间为 20 min,两个企业供试品中乙醇和甲苯的检出量随平衡温度增加而增加,在 105 ℃之后趋于平衡,但企业 1 供试品随平衡温度增加而颜色加深明显,为防止因供试品降解而产生

乙醇,最终确定平衡温度为 105 ℃。

3.3 结果判定 根据 VICH 和《中国兽药典》2015 年版附录规定,甲醇、乙醇、乙腈、二氯甲烷、苯和甲苯的残留限度分别为:不得超过 0.3%、0.5%、0.041%、0.06%、0.0002% 和 0.089%^[7-8]。实际测定过程中若残留溶剂峰面积低于检测限,判为未检出;残留量低于限度判为符合规定。本试验结果表明,2 个生产企业的 6 批供试品检测结果均符合规定。

综上所述,本方法简单、灵敏、准确、可操作性强,可以用于马波沙星原料药中 6 种残留溶剂的检测。

参考文献:

- [1] Dubreuil L, Houcke I, Leroy I. *In vitro* activity of a new fluoroquinolone, marbofloxacin against strictly anaerobic bacteria and some bacteria from human fecal flora[J]. *Pathol Biol (Paris)*, 1996, 44(5):333-336.
- [2] 王志强,陈杖榴. 动物专用氟喹诺酮为抗菌新药—麻保沙星[J]. *中兽医医药杂志*, 2001, (4):38-41.
Wang Zhiqiang, Chen Zhangliu. A new kind of Fluoroquinolone antibacterial drug for animals - Marbofloxacin[J]. *Journal of Traditional Chinese Veterinary Medicine*, 2001, (4):38-41.
- [3] Schneider M, Thomas V, Boissiere B, *et al.* Pharmacokinetics

of marbofloxacin in dogs after oral and parenteral administration[J]. *J Vet Pharmacol Ther*, 1996, 19(1):56-61.

- [4] 李金明,魏丽娟,李冀,等. 马波沙星的合成工艺优化[J]. *广东化工*, 2015, 42(19):65-66.
Li Jinming, Wei Lijuan, Li Ji, *et al.* Synthesis process optimization of marbofloxacin[J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2015, 42(19):65-66.
- [5] 单国洋,姚礼高,蒋狄峰,等. 麻保沙星新合成路线研究[J]. *精细化工中间体*, 2015, 45(02):35-37.
Shan Guoyang, Yao Ligao, Jiang Difeng, *et al.* Research on the new synthetic route of Marbofloxacin[J]. *Fine Chemical Intermediates*, 2015, 45(02):35-37.
- [6] 严智. 麻保沙星的合成工艺优化[D]. 北京化工大学, 2007.
Yan Zhi. Optimization of the synthesis process of Marbofloxacin[D]. *Beijing University of Chemical Technology*, 2007.
- [7] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典. 2015 年版[S].
Commission of Chinese Veterinary Pharmacopoeia. *Veterinary Pharmacopoeia of People's Republic of China*. 2015 Edition [S].
- [8] VICH. International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Veterinary Medicinal Products.
- [9] 中华人民共和国农业部. 农业部公告 2192 号[S].
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. No. 2192 Bulletin of the Ministry of Agriculture[S].

(编辑:侯向辉)