

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.09.07

阿维菌素残留溶剂气相色谱检测方法的建立

韩宁宁, 于晓辉, 戴青, 于丽娜, 赵晖, 杨秀玉*

(中国兽医药品监察所, 北京 100081)

[收稿日期] 2017-11-29 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 09-0042-04 [中图分类号] S859.83

[摘要] 采用 6% 氰丙基苯基-94% 二甲基聚硅氧烷为固定相的毛细管柱, 进样口温度 220 ℃, 检测器温度 250 ℃, 载气: 氮气, 流速 5 mL/min, 进样量 0.2 μL, 分流比: 10:1, 程序升温: 初始温度为 50 ℃, 保持 5 min, 以每分钟 15 ℃ 的速率升温至 80 ℃, 再以每分钟 26.7 ℃ 的速率升温至 240 ℃。在该色谱条件下, 甲醇与内标异丙醇及溶剂间二甲苯分离度良好, 检出限为 6 μg/mL, 重复性 *RSD* 为 3.0%, 添加回收率为 90.8%。不同色谱柱、柱温、流速、不同进样口温度、不同检测器温度耐用性良好。结果表明该方法可用于阿维菌素残留溶剂的定量检测。

[关键词] 阿维菌素; 甲醇; 残留溶剂; 气相色谱法

Establishment of the Method for Determination of the Residual Solvent of Avermectin by Gas Chromatography

HAN Ning-ning, YU Xiao-hui, DAI Qing, YU Li-na, ZHAO Hui, YANG Xiu-yu*

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

Corresponding author: YANG Xiu-yu, E-mail: yangxiuyu@ivdc.gov.cn

Abstract: In order to establish a gas chromatographic method for the determination of the residual solvent of avermectin, a capillary column with 6% cyano propyl phenyl -94% two methyl polysiloxane as a stationary phase

作者简介: 韩宁宁, 硕士, 从事抗生素检验检测工作。

通讯作者: 杨秀玉。E-mail: yangxiuyu@ivdc.gov.cn

[7] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 2292 号[S].

Ministry of Agriculture. No. 2292 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].

[8] Galvidis I A, Burkin M A. Selective Immunodetection of Difloxacin in Animal Muscles and Sera: Role of Hapten Orientation [J]. Food Analytical Methods, 2017, 10(6): 1755-1764.

[9] Galvidis I A, Burkin M A. Simultaneous and differential determination of drugs and metabolites using the same antibody: difloxacin and sarafloxacin case [J]. Analytical Methods, 2016, 8(29): 5843-5850.

[10] Tayeb Cherif K, Peris-Vicente J, Carda-Broch S, *et al.* Analysis of danofloxacin, difloxacin, ciprofloxacin and sarafloxacin in honey using micellar liquid chromatography and validation according to the 2002/657/EC decision [J]. Analytical Methods, 2015, 7(15): 6165-6172.

[11] 农业部. 中华人民共和国农业部公告 2448 号[S].

Ministry of Agriculture. No. 2448 Bulletin of the Ministry of Agriculture of the People's Republic of China[S].

(编辑: 侯向辉)

was used. The inlet temperature was 220 °C; the detector temperature was 250 °C; the carrier gas was nitrogen; the flow rate was 5 mL/min; the injection volume was 0.2 µL; the shunt ratio was 10 : 1; the heating program was 50 °C as the initial temperature which was kept 5 min, and up to 80 °C with the heating rate of 15 °C/min, and then up to 240 °C with the heating rate of 26.7 °C/min. In this chromatographic condition, the separation of methanol, isopropanol and m-xylene was good, and the detection limit was 6 µg/mL, the RSD of repeatability was 3.0%, the rate of recovery of sample addition was 90.8%. The durability of different column, oven temperature, flow rate, inlet temperature and detector temperature was good. Therefore this method could be used for the quantitative detection of the residual solvent of avermectin.

Key words: avermectin; methanol; residual solvent; gas chromatography

阿维菌素 (avermectin) 是 1975 年从阿维链霉菌中分离得到的十六元环大环内酯类聚酮化合物, 因其高效、低毒的杀虫活性而被广泛应用在农业、畜牧业和医药行业上^[1]。目前, 我国是阿维菌素唯一生产国^[2], 获原料药生产批准文号的企业达 16 个。但由于其稳定性欠佳, 一直未收录至《中国兽药典》, 目前其标准收载于农业部公告第 1960 号中, 该标准对阿维菌素残留溶剂并未进行相应控制。其制备工艺的主要残留溶剂为甲醇, 本研究拟采用气相色谱法建立阿维菌素残留溶剂检测方法, 以完善其质量标准。

1 仪器与试剂

1.1 仪器与设备 气相色谱仪: Agilent 7890A, 配氢火焰离子化检测器 (FID); 电子天平: METTLER AX205; 离心机: Thermo Biofuge Stratos。

1.2 药品与试剂 甲醇来源/批号: Merck/1060074008; 阿维菌素原料药来源: 河北威远动物药业有限公司。

2 方法

2.1 色谱条件 采用 Agilent DB-624 毛细管柱, 柱编号 125-1334/USA302214H, 固定相: 6% 氰丙基苯基-94% 二甲基聚硅氧烷, 30 m×0.53 mm×3 µm。进样口温度 220 °C。检测器温度 250 °C。载气: 氮气。流速 5 mL/min。进样量 0.2 µL。分流比: 10 : 1。程序升温: 初始温度为 50 °C, 保持 5 min, 以每分钟 15 °C 的速率升温至 80 °C, 再以每分钟 26.7 °C 的速率升温至 240 °C。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 取甲醇约 0.15 g, 精密

称定, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 2 mL 置离心管中, 精密加水 2 mL, 精密加内标溶液 (取异丙醇 0.5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度) 1 mL, 混匀, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取供试品约 0.12 g, 精密称定, 置离心管中, 加间二甲苯 2 mL 使溶解。精密加水 2 mL, 混匀, 离心。取出上层液再精密加水 2 mL 萃取一次。合并两次萃取的水层液, 精密加内标溶液 1 mL, 离心去掉上层剩余间二甲苯, 取水层作为供试品溶液。

2.2.3 回收率供试品溶液的制备 取供试品约 0.24 g, 精密称定, 置离心管中, 加间二甲苯 4 mL 使溶解。加甲醇约 12 mg, 精密称定, 混匀。精密加水 4 mL, 混匀, 离心。取出上层液再精密加水 4 mL 萃取一次。合并两次萃取的水层液, 精密加内标溶液 2 mL, 离心去掉上层剩余间二甲苯, 取水层作为回收率供试品溶液。

2.2.4 定量限溶液的制备 取甲醇约 0.15 g, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 200 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀。精密量取 2 mL 置离心管中, 精密加水 2 mL, 精密加内标溶液 1 mL, 混匀, 作为定量限溶液。

2.2.5 线性溶液的制备 取甲醇适量, 精密称定, 用水稀释制成浓度分别为 0.015、0.15、0.3、0.6、1.2、3、6 mg/mL 的溶液, 作为线性溶液。将上述线性溶液照对照品溶液“精密量取 2 mL……”处理后进样。

3 结果与分析

3.1 专属性 对照品溶液色谱图 (图 1) 中, 甲醇峰与内标异丙醇峰的分离度为 12.2, 符合《中国兽药

典》^[3] 2015 年版一部附录残留溶剂测定法分离度应大于 1.5 的要求;理论塔板数按甲醇峰计为 14410,亦符合主峰塔板数应不低于 5000 的要求。供试品溶液色谱图(图 2)中,除甲醇峰、异丙醇峰外,还有萃取残存的间二甲苯峰,其与异丙醇的分离度为 70.2,亦符合要求。

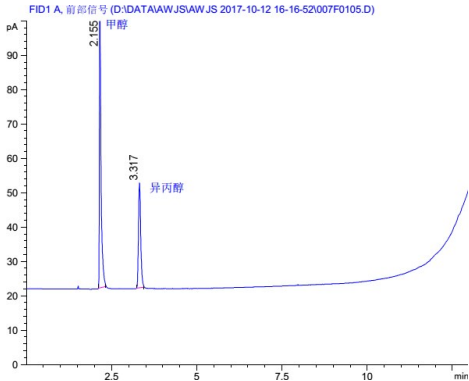


图 1 对照品溶液色谱图

Fig 1 The chromatography of the standard solution

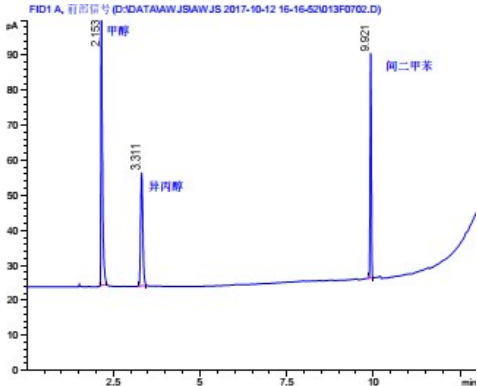


图 2 供试品溶液色谱图

Fig 2 The chromatography of the sample solution

3.2 标准曲线及线性范围 以甲醇峰面积与异丙醇峰面积的比值为(y)为纵坐标,相应甲醇浓度(x)为横坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 1.3142x - 0.0188$,相关系数 $r = 0.9999$,表明甲醇在 0.006~2.4 mg/mL 的浓度范围内线性关系良好。

3.3 定量限 以甲醇峰信噪比 S/N 约为 10 的甲醇浓度作为定量限。此时甲醇浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.4 回收率 该方法甲醇的平均添加回收率为 90.8%, RSD 为 1.4%。添加回收率损失了 10% 左右,表明两步萃取过程使甲醇产生了损失,但仍符合《中国兽药典》^[3] 兽药质量标准分析方法验证指导原则关于待测成分含量 0.1% 左右回收率限度为 90%~108% 的要求(表 1)。

3.5 重复性 对上述阿维菌素原料药进行 6 次甲醇含量测定,结果平均为 0.3%, RSD 为 3.0%,亦符合《中国兽药典》^[3] 兽药质量标准分析方法验证指导原则关于待测成分含量 0.1% 左右重复性限度为 3% 的要求(表 2)。

3.6 耐用性 对该方法进行了柱温起始温度 $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、流速 $\pm 0.5\text{ mL/min}$ 、进样口温度 $\pm 10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、检测器温度 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 及更换不同内径的色谱柱等方面的耐用性进行了考察,结果参见表 3。在上述各耐用性考察条件下,甲醇理论塔板数均符合《中国兽药典》^[3] 2015 年版一部附录残留溶剂测定法应不低于 5000 的规定,甲醇与异丙醇的分离度均符合大于 1.5 的规定。

表 1 甲醇添加回收率测定结果

Tab 1 The results of the recovery rate of added methanol

阿维菌素原料取样量/g	甲醇添加量/mg	甲醇测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.23596	13.41	12.90	91.98	90.8	1.4
0.23489	13.30	12.87	92.54		
0.23331	13.58	12.88	90.80		
0.23147	13.57	12.85	90.66		
0.23470	13.78	12.91	89.73		
0.23388	13.86	12.87	88.98		

表 2 甲醇含量重复性测定结果

Tab 2 The results of the repeatability of methanol content

供试品称样量/g	甲醇含量/%	甲醇含量平均值/%	RSD/%
0.12516	0.26	0.3	3.0
0.12864	0.26		
0.12532	0.25		
0.11900	0.24		
0.13039	0.26		
0.12008	0.26		

表 3 方法耐用性结果

Tab 3 The results of method durability

耐用性条件	甲醇理论塔板数	甲醇与异丙醇分离度
柱温起始温度 45 ℃	12536	12.538
柱温起始温度 55 ℃	11594	10.115
流速 4.5 mL/min	13212	11.903
流速 5.5 mL/min	12384	11.239
进样口温度 210 ℃	12646	11.414
进样口温度 230 ℃	14842	12.026
检测器温度 240 ℃	15570	12.125
30 m×320 μm×1.8 μm DB-624 毛细管柱	5021	8.627

4 讨论与结论

4.1 色谱柱的选择 由于伊维菌素是阿维菌素的衍生物,二者在溶解性质等方面具有相似性,故本方法在建立过程中参考了《中国兽药典》^[3]一部伊维菌素残留溶剂检查方法。上述方法测定目标物为乙醇与甲酰胺,采用的色谱柱为聚乙二醇(PEG-20M)毛细管柱。在建立阿维菌素中甲醇残留溶剂

的检查方法过程中,考虑聚乙二醇为强极性色谱柱填料,同为强极性的甲醇在该柱上保留欠佳,峰形拖尾严重,故将聚乙二醇毛细管柱更换为中等极性的 DB-624 毛细管柱,以增加保留与改善峰形。

4.2 检测器温度的选择 上述方法检测器温度为 280 ℃。而本方法将色谱柱更换为 DB-624 柱后,该色谱柱的最大耐受温度为 260 ℃,故将检测器温度降低为 250 ℃,以避免对色谱柱填料产生不可逆的损坏。

本试验所建立的阿维菌素残留溶剂气相色谱检查方法简单易行,耐用性良好,可用于阿维菌素原料中甲醇残留溶剂的测定,弥补了原质量标准中该项的空白。

参考文献:

[1] Miller T W, Chalet L, Cole D J, *et al.* Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: isolation and chromatographic properties[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1979, 15 (3): 368-371.

[2] 陈金松,刘梅,张立新. 从阿维菌素获得诺贝尔奖到中国创造[J].微生物学报,2016, 56(3): 543-558.

Chen Jinsong, Liu Mei, Zhang Lixin. From avermectins getting the Nobel prize to Chinese creation[J].Journal of Microbiology, 2016, 56(3): 543-558.

[3] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版[S]. The Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Chinese Veterinary Pharmacopoeia 2015 Edition[S].

(编辑:侯向辉)