中图分类号：R917　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)12－0066－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.12.015

顶空进样－气相色谱法检测达托霉素中残留溶剂*

李佳蕊[1,2]，韩　彬[1]，张雪霞[3]，任凤芝[3]，徐艳梅[1]，闫　凯[1]，王　巧[2]，高燕霞[1,2△]

（1. 河北省药品医疗器械检验研究院，河北 石家庄　050021；2. 河北医科大学药学院，河北 石家庄　050017；
3. 华北制药集团新药研究开发有限责任公司，河北 石家庄　050021）

摘要：目的　建立测定达托霉素中3种有机溶剂残留量的顶空进样－气相色谱法。**方法**　色谱柱为Agilent DB－624毛细管柱（60 m×0.53 mm，3.0 μm），载气为氮气（流速为5.0 mL/min），程序升温，氢火焰离子化检测器（FID）检测，进样口温度为200 ℃，检测器温度为230 ℃，分流比为5∶1（*V*/*V*），顶空瓶平衡温度为85 ℃，平衡时间为30 min，进样量为1 μL。**结果**　乙醇、异丙醇和正丁醇质量浓度均在10～200 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好（*r*=1.000 0）；检测限分别为0.75，0.30，0.75 μg/mL，定量限分别为2.50，1.01，2.50 μg/mL；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于2.0%；平均回收率分别为101.85%，101.65%，102.33%，*RSD*分别为0.59%，0.77%，0.78%（*n*=9）。**结论**　该方法专属性强，灵敏度高，精密度好，可用于达托霉素中前述3种有机溶剂残留量的测定。3批样品中检出的有机溶剂残留量远低于国家标准限度。

关键词：达托霉素；冻干工艺；有机溶剂残留；溶解性；复溶时间

Detection of Residual Solvents in Daptomycin by Headspace Gas Chromatography

LI Jiarui[1,2], HAN Bin[1], ZHANG Xuexia[3], REN Fengzhi[3], XU Yanmei[1], YAN Kai[1], WANG Qiao[2], GAO Yanxia[1,2]

(1. Hebei Institute for Drug and Medical Device Control, Shijiazhuang, Hebei, China 050021; 2. School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei, China 050017; 3. North China Pharmaceutical Group New Drug Research and Development Co., Ltd., Shijiazhuang, Hebei, China 050021)

Abstract: Objective　To establish a headspace gas chromatography method for the determination of three organic solvent residues in daptomycin. **Methods**　The chromatographic column was the Agilent DB－624 capillary column (60 m × 0.53 mm, 3.0 μm), the carrier gas was nitrogen with a flow rate of 5.0 mL/min, the temperature was programmed, the flame ionization detector (FID) was adopted, the inlet temperature was 200 ℃, the detector temperature was 230 ℃, the split ratio was 5∶1 (*V*/*V*), the balance temperature of headspace bottle was 85 ℃, the balance time was 30 min, and injection volume was 1 μL. **Results**　The linear ranges of ethanol, isopropanol and *n*－butanol were 10－200 μg/mL (*r*=1.000 0). The limits of detection (LOD) of the above three components were 0.75, 0.30, 0.75 μg/mL, and their limits of quantification (LOQ) were 2.50, 1.01, 2.50 μg/mL, respectively. The *RSD*s of precision, stability, and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above three components were 101.85%, 101.65%, 102.33%, with the *RSD*s of 0.59%, 0.77%, 0.78% respectively (*n*=9). **Conclusion**　This method is specific, sensitive and precise, which can be used for the determination of the above three organic solvent residues in daptomycin. The residual amount of organic solvents detected in three batches of samples is far below the limit of national standard.

Key words: daptomycin; freeze－drying process; organic solvent residue; solubility; redissolution time

达托霉素为首个进入临床应用的新型环脂肽类抗菌药物，抗菌活性强，耐药率低，已成为治疗耐革兰阳性菌感染的一线用药[1－3]。但其药品不良反应可累及全身多个系统[4－5]。该药化学结构复杂，原料药很难通过化学全合成制备，现阶段仍采用微生物发酵工艺获得[6－7]，随着生物发酵法和纯化工艺的稳定，药物冻干工艺成为该品种药物质量控制的关键[8－10]，通过对冻干工艺中各步骤关键参数进行优化，选择乙醇、异丙醇和正丁醇为冻干溶剂，同时考虑到在冻干过程中药物溶液会形成相关结构差异，直接导致临床用药溶解性差异，因此选择残留溶剂作为评估达托霉素冻干工艺的关键质量参数。基于此，本研究中建立了顶空进样－气相色谱法测定达托霉素有机溶剂（乙醇、异丙醇、正丁醇）残留量，同时参考制剂药品说明书为评价冻干工艺的参数改进效果提供参考。现报道如下。

1　仪器与试药

1.1　仪器

Agilent 7890B型气相色谱仪（美国Agilent公司），含氢火焰离子化检测器（FID），Open LBACDS Chem Station Edition工作站；SPH－300A型纯水氢气发生器（济

*基金项目：河北省自然科学基金[B2022329002]。

第一作者：李佳蕊，在读硕士研究生，研究方向为药物分析，（电子信箱）47359647@qq.com。

△通信作者：高燕霞，博士研究生，主任药师，研究方向为药品标准及药品质量控制，（电子信箱）657968434@qq.com。

南浩伟实验仪器有限公司）；SGK－2LB型低噪音空气泵（北京东方精华苑科技有限公司）；XS205型电子分析天平（德国Mettler Toledo公司，精度为0.01 mg）。

1.2 试药

注射用达托霉素（河北某药厂，批号分别为YNDN220902，YNDN211001，YNDN230302）；乙醇、异丙醇、正丁醇均为色谱纯，其余试剂均为分析纯，水为超纯水（自制）。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Agilent DB－624毛细管柱（60 m×0.53 mm，3.0 μm）；程序升温：起始柱温40 ℃、维持2 min，以10 ℃/min的速率升至100 ℃、维持8 min，再以20 ℃/min的速率升至200 ℃、维持2 min；载气（氮气）流速：5.0 mL/min；进样口温度：200 ℃；检测器温度：230 ℃；顶空瓶平衡温度：85 ℃；平衡时间：30 min；分流比：5∶1（*V*/*V*）；进样量：1 μL。

2.2 溶液制备

精密量取乙醇、异丙醇、正丁醇各适量，加水稀释，制成每1 mL含乙醇、异丙醇、正丁醇各1 mg的混合对照品贮备液；精密量取5 mL，置50 mL容量瓶中，加水定容，摇匀；精密量取5 mL，置顶空瓶中，即得混合对照品溶液。取样品0.1 g，精密称定，置20 mL顶空瓶中，精密加水5 mL，轻轻振摇使溶解，即得供试品溶液。精密量取水5 mL，置顶空瓶中，即得空白溶液。均密封保存。

2.3 方法学考察

专属性试验：取2.2项下对照品溶液、供试品溶液和空白溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果各色谱峰分离度良好，且空白溶液不干扰待测成分测定。详见图1。

线性关系考察：精密量取2.2项下混合对照品贮备液1.0，2.0，5.0，10.0，20.0 mL，分别置100 mL容量瓶中，加水定容，摇匀，制成质量浓度分别为10，20，50，100，200 μg/mL的系列对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。以待测成分质量浓度（*X*，μg/mL）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

表1 线性关系及检测限、定量限考察结果（*n* = 5）

Tab. 1 Results of the linear relation test, LOD and LOQ investigation（*n* = 5）

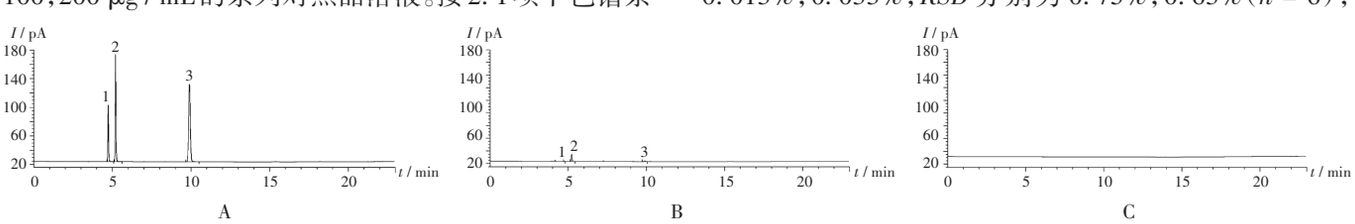
待测成分	回归方程	*r*	线性范围（μg/mL）	检测限（μg/mL）	定量限（μg/mL）
乙醇	$Y_1 = 2.3668X_1 + 1.1134$	1.0000	10～200	0.75	2.50
异丙醇	$Y_2 = 5.3266X_2 + 6.3887$	1.0000	10～200	0.30	1.01
正丁醇	$Y_3 = 7.8429X_3 - 5.0979$	1.0000	10～200	0.75	2.50

检测限与定量限考察：精密量取2.2项下混合对照品溶液适量，逐级稀释，按2.1项下色谱条件进样测定，以信噪比（*S*/*N*）约为3和10时待测成分的质量浓度分别为检测限和定量限。结果见表1。

精密度试验：1）日内精密度。取2.2项下混合对照品溶液适量，按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录待测成分色谱峰保留时间和峰面积。结果，乙醇、异丙醇、正丁醇色谱峰保留时间的*RSD*分别为0.12%，0.05%，0.11%（*n* = 6），峰面积的*RSD*分别为0.71%，0.80%，0.71%（*n* = 6），表明仪器精密度良好。2）中间精密度。取2.2项下配制对照品溶液和供试品（批号为YNDN220902）溶液各6份，由不同试验人员按2.1项下色谱条件连续进样测定6次，记录峰面积。结果不同试验人员乙醇、异丙醇、正丁醇检出量的*RSD*分别为0.58%，0.67%，0（*n* = 6），表明方法中间精密度良好。

稳定性试验：取2.2项下混合对照品溶液适量，分别于室温放置0，1，2，3，4，5，6 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果乙醇、异丙醇、正丁醇峰面积的*RSD*分别为1.62%，1.09%，1.93%（*n* = 7），表明对照品溶液室温放置6 h内基本稳定。

重复性试验：取样品（批号为YNDN220902）和混合对照品贮备液各适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，平行6份，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果乙醇、异丙醇的平均含量分别为0.013%，0.033%，*RSD*分别为0.75%，0.63%（*n* = 6），



1. 乙醇 2. 异丙醇 3. 正丁醇

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白溶液

图1 气相色谱图

1. Ethanol 2. Isopropanol 3. *n* － Butanol

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Blank solution

Fig. 1 GC chromatograms

表2 回收试验结果（$n=9$）

Tab. 2 Results of the recovery test ($n=9$)

取样量(g)	加入量(μg/mL)			测得量(μg/mL)			回收率(%)			$\bar{X}$(%)			RSD(%)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0.100 3	50	50	50	53.60	58.13	50.65	101.50	101.94	101.30						
0.102 1	50	50	50	53.45	57.98	51.75	101.12	101.46	103.50						
0.101 6	50	50	50	53.75	57.03	50.90	101.71	99.86	101.80						
0.101 8	100	100	100	105.30	109.08	102.50	102.38	101.82	102.50						
0.100 9	100	100	100	105.44	109.18	102.40	102.54	101.98	102.40	101.85	101.65	102.33	0.59	0.77	0.78
0.102 0	100	100	100	104.06	108.58	102.10	101.17	101.34	102.10						
0.100 6	150	150	150	156.70	161.33	155.40	102.54	102.73	103.60						
0.101 6	150	150	150	156.40	160.28	153.45	102.33	102.02	102.30						
0.101 8	150	150	150	154.90	159.83	152.25	101.34	101.72	101.50						

注：A为乙醇，B为异丙醇，C为正丁醇。

Note: A refers to ethanol, B refers to isopropanol, and C refers to *n* - butanol.

表明方法重复性良好（正丁醇未检出）。

回收试验：取样品（批号为YNDN220902）约0.1 g，精密称定，共9份，置顶空瓶中，分别加入低、中、高质量浓度的混合对照品溶液5.0 mL，密封，按2.1项下色谱条件进样测定，记录色谱图，并计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取3批样品各适量，按2.2项下方法制备供试品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算3种有机溶剂残留量。结果见表3（－为未检出）。

表3 样品含量测定结果（%，$n=3$）

Tab. 3 Results of content determination of three organic solvents in samples (%, $n=3$)

待测成分	YNDN220902	YNDN211001	YNDN230302	标准限度(%)
乙醇	0.014	0.014	0.012	≤0.5
异丙醇	0.035	0.035	0.032	≤0.5
正丁醇	－	－	－	≤0.5

3 讨论

3.1 顶空平衡温度[11-12]

常压条件下，乙醇、异丙醇、正丁醇沸点分别为78.3，82.5，117.6 ℃，温差跨度较大，需选择合适的顶空瓶平衡温度。固定平衡时间30 min，分别考察平衡温度80，85，90，95 ℃，发现85，90 ℃条件下，各待测成分峰面积未明显增大，但从90 ℃起，达托霉素受热降解导致杂质生成，干扰残留溶剂测定，故选择顶空平衡温度为85 ℃。

3.2 顶空平衡时间[13-14]

保持顶空平衡温度为85 ℃，考察平衡时间10，20，30，40 min，结果各组分气化扩散情况依据色谱峰峰面积增长情况观察，30，40 min无继续增加趋势，故选择顶空平衡时间为30 min（耗时最短）。

3.3 色谱条件[15-16]

按拟订方法，使用对照品溶液分别考察不同载气流速（4.0，5.0，6.0 mL/min），进样口温度（180，200，220 ℃），检测器温度（220，230，240 ℃），以及分流比[5∶1（V/V）、10∶1（V/V）]下色谱保留行为，最终选择本研究中所用色谱条件，色谱保留行为较佳。

3.4 方法评价

该方法专属性强，灵敏度高，结果准确，精密度符合2020年版《中国药典（四部）》通则0861[17]相关要求，可真实体现达托霉素制剂中残留溶剂含量测定结果，3种有机溶剂残留量均远低于国家限度要求。

参考文献

[1] 彭希希，王赛赛，付　琛. 新型环脂肽抗生素达托霉素研究进展[J]. 药学学报，2018，53(6)：839－844.

[2] 常　亮，魏增辉，李敏娜，等. 从发酵液中提取达托霉素的工艺优化[J]. 化学与生物工程，2013，30(7)：86－87.

[3] 达托霉素临床应用专家意见编写专家组，中国研究型医院学会感染性疾病循证与转化专业委员会. 达托霉素临床应用专家意见[J]. 中国感染控制杂志，2019，18(11)：989－1003.

[4] 刘晓东，张　蔚，管凌燕. 达托霉素药物不良反应的文献计量研究[J]. 中国临床药理学杂志，2017，33(19)：1961－1968.

[5] 展敬伦，石　健，柴　双，等. 基于OpenFDA数据库挖掘与评价达托霉素上市后的不良反应[J]. 中国药业，2022，31(7)：109－111.

[6] 张昊月，郭正彦，吕志堂. 应用响应面法优化发酵培养基提高达托霉素产量[J]. 微生物学通报，2021，48(1)：113－122.

[7] 张凯红. 达托霉素高产菌株选育及发酵条件优化[D]. 南阳：南阳师范学院，2022.

[8] 刘　超. 冻干工艺可控结晶技术应用与探讨[J]. 医药工艺与工程，2019，40(6)：28－31.

[9] 王秀杰. 药物冻干工艺的设计与优化[J]. 科技风，2021(6)：1－2.

[10] 刘素英. 改进冻干工艺参数降低药物中杂质提高产品质