

测定,米诺地尔峰面积的RSD为1.1%,表明米诺地尔样品溶液在室温放置24 h后峰面积无明显变化,基本稳定。

2.8 检测限、定量限

取米诺地尔对照品加入空白样品中,按“2.3.2”项下方法制备溶液,用流动相逐级稀释后按“2.1”项下色谱条件测定,以S/N约为3作为检测限,以S/N约为10作为定量限,当取样量为1 g时,最低检测浓度约 $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,最低定量浓度约 $20 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ($n=3$, RSD=1.5%)。

2.9 样品测定

按上述方法,对市场上5家企业生产的共17批育发类化妆品进行了检测,结果有2家企业生产的共3批样品在米诺地尔对照品色谱峰保留时间处出现一色谱峰,见图1。且该色谱峰的DAD实时光谱图与米诺地尔对照品一致,初步怀疑该3批样品中含有米诺地尔。

3 讨论

本实验分别考察了甲醇-水、甲醇-0.1%磷酸溶液和甲醇-磺基丁二酸钠二辛酯溶液(pH 3.0)3种流动相体系,结果发现在甲醇-磺基丁二酸钠二辛酯溶液(pH 3.0)流动相体系中,米诺地尔在 C_{18} 柱上有更好的保留,与化妆品中其他干扰成分分离更好,这可能是因为在该流动相体系中米诺地尔与磺基丁二酸钠二辛酯形成离子对,从而增强了其在 C_{18} 柱上的保留。且在该流动相体系中米诺地尔在280 nm波长处有最大吸收,在该检测波长下色谱图基线平稳,干扰峰更少,故选择甲醇-磺基丁二酸钠二辛酯溶液(pH 3.0)为流动相,在280 nm波长检测。

对“2.9”项下怀疑含有米诺地尔的阳性样品,按“2.2”项下条件进行了LC-MS/MS分析,结果该3批样品中疑似色谱峰的一级、二级质谱图均与米诺地尔对照品一致,可确证该3批样品中含有米诺地尔,米诺地尔的二级全扫描质谱图见图2。按“2.1”项下方法定量测定,3批样品含米诺地尔分别为2.0%, 2.1%, 3.0%,达到了米诺地尔生发作用的有效浓度,极有可能为非法添加。

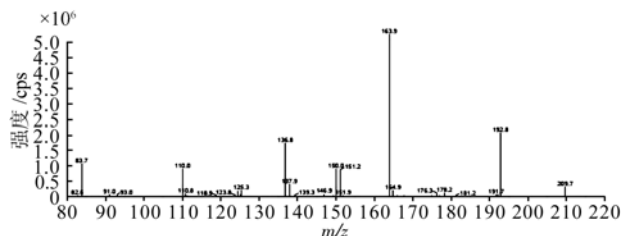


图2 米诺地尔的二级全扫描质谱图

Fig 2 Full scan MS-MS Spectra of minoxidil

本实验建立的育发类化妆品中米诺地尔的检测方法快速准确、专属性强、精密度好、灵敏度高,可用于育发类化妆品中米诺地尔的日常检测。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II(中国药典2010年版·二部)[S]. 2010: 285.
- [2] ZHAO T G. Hygienic Standard for Cosmetics(化妆品卫生规范)[M]. Beijing: Military Medical Science Press, 2007: 10.
- [3] PAN L, GUO X D, LUO H Y, et al. Determination of minoxidil in hair care cosmetics by high performance liquid chromatography [J]. J Jiangnan Univ(Nat Sci)(江南大学学报:自然科学版), 2011, 10(2): 217-220.
- [4] YU C H, ZHU W, LU Z Y, et al. Determination of minoxidil in cosmetics by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Flavour Fragrance Cosmetics(香精香料化妆品), 2011(4): 36-38.

收稿日期: 2012-06-28

GC 测定胸腺法新中 5 种有机溶剂残留量

程磊¹, 李玉兰², 唐洋明³, 毕开顺¹, 陈晓辉^{1*}, 王铁杰^{2*}(1.沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016; 2.深圳市药品检验所, 广东 深圳 518057; 3.深圳翰宇药业股份有限公司, 广东 深圳 518057)

摘要: 目的 建立胸腺法新中5种有机溶剂残留量的气相测定方法。方法 采用气相色谱法, FID 检测器, DB-624 毛细管色谱柱, 以正丁醇为内标进行测定。结果 5种有机溶剂完全分离($R>2.0$), 理论板数均 $>10\ 000$, 样品不干扰5种残留溶剂的测定, 线性关系良好, 甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的线性范围分别为 $30\sim 480 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 8$), $4.1\sim 65.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$), $6.0\sim 96 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 2$), $2.0\sim 32.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 3$), $8.8\sim 141 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$)。

作者简介: 程磊, 女, 硕士生 Tel: (0755)26031735 E-mail: chenglei2267673@163.com *通信作者: 陈晓辉, 女, 博士, 教授 Tel: (024)23986259 E-mail: cxh_syphu@yahoo.com.cn 王铁杰, 女, 博士, 教授 Tel: (0755)26031728 E-mail: wangtj88@163.com

5种有机溶剂的平均回收率($n=9$)依次为99.6%, 100.8%, 99.8%, 100.8%, 99.0%。结论 该方法简单、灵敏、准确、耐用性好,适用于胸腺法新中5种有机溶剂残留量的测定。

关键词: 胸腺法新; 有机溶剂残留量; 内标法; 气相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)06-0657-04

Determination of Five Residual Organic Solvents in Thymalfasin by GC

CHENG Lei¹, LI Yulan², TANG Yangming³, BI Kaishun¹, CHEN Xiaohui^{1*}, WANG Tiejie^{2*} (1.School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2.Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen 518057, China; 3.Shenzhen Hybio Pharmaceutical Corporation, Shenzhen 518057, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a GC method for the determination of five residual organic solvents in thymalfasin. **METHODS** The five residual organic solvents were determined by GC with FID detector, on DB-624 capillary GC column, with n-butyl alcohol as internal standard. **RESULTS** The five residual organic solvents were completely separated ($R>2.0$), and theoretical plate numbers were all above 10 000. Thymalfasin sample had no interference with the detection of the five residual organic solvents. The method had a good linearity and the liner range of methanol, acetonitrile, dichloromethane, pyridine and DMF were 30–480 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 8$), 4.1–65.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$), 6.0–96 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 2$), 2.0–32.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 3$), 8.8–141 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$), respectively. The recoveries ($n=9$) of above five organic solvents were 99.6%, 100.8%, 99.8%, 100.8%, 99.0%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, and accurate with good durability. It can be used for the determination of the five residual organic solvents in thymalfasin.

KEY WORDS: thymalfasin; residual organic solvent; internal standard method; GC

胸腺法新为化学合成的由28个氨基酸构成的多肽,用于治疗慢性乙型肝炎,并作为免疫损害患者的疫苗免疫应答增强剂,发挥调节免疫活性、抗肿瘤和拮抗细胞凋亡的作用^[1],临床应用呈广泛趋势。目前胸腺法新的合成方法主要为固相多肽合成法^[2],在合成过程中使用了甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)等多种有机溶剂,溶剂残留量的检测方法国内未见报道。笔者参考中国药典^[3]及ICH对有机溶剂残留量测定的指导原则^[4],首次建立了一种灵敏、准确、便捷的气相色谱内标法,同时测定上述5种有机溶剂的残留量。

1 仪器与材料

Shimadzu GC-2010 气相色谱仪(日本岛津公司); AG285 型电子天平(梅特勒-托利多公司); Milli-Q50 型超纯水仪(密理博中国有限公司)。

甲醇、乙腈(色谱纯,德国默克公司); 二氯甲烷、吡啶、正丁醇(分析纯,广州化学试剂厂); DMF(色谱纯,天津市福晨化学试剂厂); 水为超纯水; 胸腺法新原料药(深圳翰宇药业股份有限公司,批号: 20100701, 20100801, 20100802)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent DB-624 毛细管气相色谱柱

(30.0 m \times 0.53 mm, 3.0 μm); 气化室温度: 200 $^{\circ}\text{C}$; 检测器: FID; 检测器温度: 250 $^{\circ}\text{C}$; 程序升温: 50 $^{\circ}\text{C}$ 保持7 min,以30 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升至200 $^{\circ}\text{C}$,保持5 min; 载气: 氮气; 柱流速: 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 分流比: 5 : 1; 进样量: 1 μL ; 尾吹气: 30.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

2.2 溶液的配制

2.2.1 内标溶液 精密量取正丁醇适量,用水定量稀释成每1 mL含0.2 mg的溶液,作为内标溶液。

2.2.2 对照品储备液 精密量取甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF适量,用水定量稀释成每1 mL中约含甲醇0.6 mg,乙腈0.082 mg,二氯甲烷0.12 mg,吡啶0.04 mg,DMF0.176 mg的溶液,作为对照品储备液^[5]。

2.2.3 对照品溶液 精密量取对照品储备液5.0 mL,置于10 mL量瓶中,精密加入内标溶液1.0 mL,加水稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.4 供试品溶液 取胸腺法新原料药约1.0 g,精密称定,置于10 mL量瓶中,加水适量使之溶解,精密加入内标溶液1.0 mL,加水稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.3 专属性和系统适用性试验 精密量取空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液、供试品与对照品混合溶液各1 μL ,注入气相色谱仪分析。结果显示,相邻溶剂峰的分离度均 >2.0 ,各峰的理论板数

均达到 10 000 以上, 样品不干扰 5 种有机溶剂的测定。色谱图见图 1。

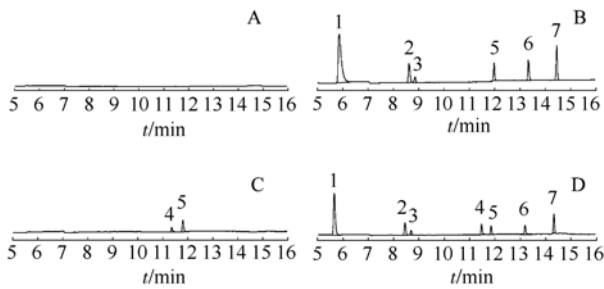


图 1 气相色谱图

A-空白溶剂; B-对照品溶液; C-供试品溶液; D-供试品与对照品混合溶液; 1-甲醇; 2-乙腈; 3-二氯甲烷; 4-样品主峰; 5-正丁醇; 6-吡啶; 7-N,N-二甲基甲酰胺

Fig 1 GC chromatograms

A-blank solvent; B-standard solution; C-sample solution; D-solution of standard and sample; 1-methanol; 2-acetonitrile; 3-dichloromethane; 4-the main peak of sample; 5-n-butyl alcohol; 6-pyridine; 7-DMF

2.4 线性关系

精密量取对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 mL, 分别置于 10 mL 量瓶中, 各精密加入内标溶液 1.0 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀。进样分析, 以各待测残留溶剂与内标物的峰面积比为纵坐标(Y), 各待测残留溶剂浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为横坐标(X)进行线性回归, 结果见表 1, 甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF 在各自的线性范围内线性关系良好($r>0.999$)。

表 1 线性范围与回归方程

Tab 1 Liner ranges and regression equations of calibration curve

溶剂	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回归方程	r
甲醇	30.0~480.0	$Y=43.91X-3.120$	0.999 8
乙腈	4.1~65.6	$Y=32.25X+0.4320$	0.999 9
二氯甲烷	6.0~96.0	$Y=154.7X-1.522$	0.999 2
吡啶	2.0~32.0	$Y=20.02X-1.022$	0.999 3
DMF	8.8~141.0	$Y=47.90X+1.893$	0.999 9

2.5 定量限和检测限

按照本方法所确定的实验条件, 精密称取甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF 适量, 逐步加水稀释, 配制成一系列浓度的溶液, 进样分析, 记录信噪比 3:1 时的浓度为检测限, 信噪比 10:1 时的质量浓度为定量限。结果甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶和 DMF 的检测限分别为 2.0, 0.82, 1.2, 0.40 和 $0.88 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 定量限分别为 6.0, 2.5, 3.6, 1.2 和 $2.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 仪器精密度试验

按“2.2.3”项下方法配制对照品溶液 1 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析 6 次, 甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF 与内标峰面积比值的 RSD 值分别为 1.0%, 1.4%, 3.6%, 1.9%, 1.2%。

2.7 重复性试验

取样品约 1.0 g, 精密称定, 按“2.2.4”项下方法配制供试品溶液, 平行操作 6 份, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 5 种有机溶剂均未检测出。

2.8 稳定性试验

按“2.2.3”项下方法配制对照品溶液 1 份, 于室温下放置 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 h, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF 与内标的峰面积比值的 RSD 值分别为 1.4%, 2.0%, 4.1%, 2.4%, 2.5%, 说明对照品溶液在 6 h 内稳定。

2.9 回收率试验

取胸腺法新原料药样品约 1.0 g, 精密称定, 置于 10 mL 量瓶中, 加入适量水使之溶解, 平行操作 9 份, 其中 3 份加入对照品储备液 4.0 mL, 3 份加入对照品储备液 5.0 mL, 3 份加入对照品储备液 6.0 mL, 然后分别精密加入内标溶液 1.0 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得低、中、高浓度供试品溶液各 3 份。分别精密量取上述供试品溶液各 1 μL , 注入气相色谱仪, 记录峰面积, 计算回收率。结果见表 2。

表 2 回收率试验结果(n=3)

Tab 2 Results of recovery test(n=3)

溶剂	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/%
甲醇	2 660	2 750	103.4	99.6	2.1
	3 287	3 241	98.6		
	3 917	3 796	96.9		
乙腈	352.0	355.5	101.0	100.8	2.7
	440.0	449.5	102.2		
	528.0	523.8	99.2		
二氯甲烷	544.0	538.2	98.9	99.8	4.0
	680.0	674.4	99.2		
	816.0	827.3	101.4		
吡啶	176.0	182.8	103.9	100.8	2.8
	220.0	219.8	99.9		
	264.0	260.3	98.6		
DMF	696.0	668.4	96.0	99.0	3.8
	870.0	865.8	99.5		
	106.0	108.3	101.4		

2.10 样品含量测定

取样品约 1.0 g, 精密称定, 按“2.2.4”项下方法配制供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行样分析, 记录峰面积, 按内标法以峰面积计算样品中残留溶剂量。实验结果表明, 3 批样品中, 一批均未检测出 5 种残留溶剂; 一批只检测出甲醇, 残留量为 0.04%, 其他未检出; 一批检测出甲醇的残留量为 0.05%, 乙腈的残留量为 0.007%, 其他未检出。

2.11 耐用性试验

改变柱温起始温度($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$)、升温速率($\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$)、载气柱流量($\pm 0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)、起始温度保持时间($\pm 1\text{ min}$)、分流比($\pm 2:1$), 取对照品溶液进样分析, 考察各溶剂的理论板数及相邻溶剂间的分离度。结果各待测有机溶剂的理论板数均 $>10\ 000$, 相邻溶剂间的分离度均 >2.0 , 说明方法耐用性良好, 小范围的条件波动不影响测定。

3 讨论

3.1 色谱条件的考察

对色谱柱的选择进行了考察, 甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF 等 5 种有机溶剂的沸点和极性差异较大, 故尝试了不同极性与填料的毛细管气相色谱柱。DB-FFAP、DB-INNOWAX、DB-624 3 种类型的色谱柱均可将本实验的 5 种残留溶剂分离出来, 但由于前两者均为极性柱, 且温度下限均为 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 在此温度下甲醇的峰形不甚理想, 理论板数 $<10\ 000$, 故选择 DB-624 作为分析胸腺法新种 5 种残留溶剂的色谱柱。

3.2 内标物的选择

理想的内标物应是待测溶剂的理化性质相

近, 响应值相差不大, 峰形对称, 性质稳定, 毒性较小, 在待测 5 种残留溶剂的保留时间的中部出峰, 且与待测残留溶剂无干扰^[6]。本实验分别考察了乙醇、丙酮、正丁醇, 结果显示正丁醇出峰时间处于 5 种待测溶剂中间, 且相互无干扰, 故选择正丁醇作为测定胸腺法新中 5 种残留溶剂的内标物。

3.3 结论

建立了测定胸腺法新原料药中甲醇、乙腈、二氯甲烷、吡啶、DMF 5 种有机溶剂残留量的气相色谱法, 该方法简便、快速、准确。所测定的 5 种溶剂均为二类溶剂, 是限制使用的溶剂, 因此该方法的建立, 为提高胸腺法新原料药的质量控制水平和临床用药的安全性提供了依据。

REFERENCES

- [1] GAO D M, WANG F S. Review on the characteristics and function of thymosin $\alpha 1$ [J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志), 2007, 28(2): 136-138.
- [2] CHENG H, ZHU P, ZHU Y S. Solid-phase synthesis of thymosin $\alpha 1$ [J]. J Nanjing Univ Tech(南京工业大学学报), 2004, 26(2): 78-80.
- [3] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: Appendix 73-74.
- [4] ZHOU H J. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Quality Section(药品注册的国际技术要求-质量部分) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 87.
- [5] HAO G Q, ZHU W S, LIU Y K, et al. GC-FID quantitative determination of five residual solvents in alfuzosin hydrochloride [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2009, 29(3): 498-500.
- [6] RUAN H, CHEN Y. Determination of residual solvents in azlocillin sodium by GC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(11): 1047-1050.

收稿日期: 2012-11-13

HPLC 同时测定新疆药桑枝中 6 种成分的含量

孙莲, 孟磊, 勉强辉, 孟海强(新疆医科大学药学院化学教研室, 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定新疆药桑枝中绿原酸、芦丁、异槲皮苷、紫云英苷、白藜芦醇和桑色素含量的方法。方法 采用 PMC pack ODS 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm, 5 μm), 以 0.2%磷酸水溶液-0.2%磷酸乙腈溶液为流动相, 梯度洗脱, 检测波长: 360 nm, 流速: 0.6 mL \cdot min⁻¹。结果 6 种成分在 45 min 内完全分离, 6 种成分的平均回收率为 97.7%~100.7%(RSD $\leq 2.0\%$)。结论 本方法操作简单、结果准确, 具有较好的重复性和稳定性, 为药桑枝的质量控制提供参考。
关键词: 药桑枝; 紫云英苷; 白藜芦醇; 桑色素; 高效液相色谱法

作者简介: 孙莲, 女, 硕士, 教授 Tel: (0991)4362364 E-mail: sl_yxy@126.com