

顶空毛细管气相色谱法测定重组人心钠肽中残留乙腈*

易俊波, 买制刚, 邱岗峰, 李凌云, 周兆平**, 林枫

(深圳大学生化工程技术研究中心, 深圳 518057)

摘要 目的: 建立重组人心钠肽中残留溶剂乙腈的气相色谱分离测定方法。方法: 采用 DB-624 弹性石英毛细管色谱柱 (30 m × 0.32 mm, 1.8 μm), 载气为氮气, 氢火焰离子化检测器 FID 进样口温度为 250 °C; 检测器温度为 250 °C; 柱温为 40 °C 保持 8 min, 分流比 10:1, 水为溶剂, 乙醇为内标物。结果: 使用该方法被测物乙腈能得到良好的分离与测定, 峰面积与浓度呈良好的线性关系, 精密度良好。结论: 方法准确可靠, 可用于重组人心钠肽药品中有机溶剂残留量的检测。

关键词: 顶空进样法; 毛细管气相色谱法; 重组人心钠肽; 乙腈

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)03-0501-03

Determination of residual solvents in atrial natriuretic peptide by head-space capillary gas chromatography*

YI Jun-bo MAI Zhi-gang QIU Gang-feng LI Ling-yun,

ZHOU Zhao-ping**, LIN Feng

(Shenzhen University Biotechnology Research Center, Shenzhen 518057, China)

Abstract Objective This paper reports a GC method for determination of acetonitrile in atrial natriuretic peptide by a head-space GC method. **Method** The analytical column was DB-624 (30 m × 0.32 mm, 1.8 μm). The injector temperature was 250 °C, the detector used was FID at 250 °C. The column temperature was 40 °C holding 8 min, the carrier gas was nitrogen. The solvent was water. **Results** The solvent can be completely separated, and the calibration curves of each solvent had good linear relationship within a certain range. **Conclusion** This method is simple, rapid and precise, it is suitable for the measurement of residual solvents in atrial natriuretic peptide.

Key words head-space injecting capillary gas chromatography; atrial natriuretic peptide; acetonitrile

基因工程药物重组人心钠肽 (atrial natriuretic peptide ANP) 是本校生化中心与中国医学科学院合作的国家重大科技 863 专项项目, 目前已经进入 III 期人用临床研究。ANP 是人类内源性的心脏激素, 它具有很强的利钠利尿, 舒张血管从而降低血压的功能, 对急性心肌梗塞、高血压、急性肾功能衰竭、肝硬化、肺水肿、心功能不全等临床疾病都有很好的疗效^[1-4]。

在 ANP 的生产工艺中, 只引入了唯一的有机溶剂乙腈, 它在蛋白纯化中起了重要作用, 然而乙腈是对人体有毒的有机溶剂, 必须控制其残留的浓度, 本文根据中国药典 2005 年版二部附录 VIII P 的要求建立了气相色谱的测定方法, 该方法准确可靠, 灵敏度高, 精密度好, 可以作为基因工程药物重组人心钠肽

中乙腈的标准方法。

1 仪器与试剂

气相色谱仪: Agilent 6890N 气相色谱仪, FID 检测器 (氢火焰离子检测器), 配 Agilent 7694 顶空进样器, Agilent 操作控制及积分软件。乙腈、无水乙醇均为色谱纯。样品重组 ANP 药品 (批号 20041009001, 20060428001, 20071221001) 由深圳大学生化工程技术研究开发中心提供。

2 色谱条件

色谱柱: DB-624 石英毛细管柱 (30 m × 0.32 mm, 1.8 μm), 载气为氮气。检测器温度: 250 °C; 进样口温度: 250 °C; 柱温: 40 °C 保持 8 min 顶空进样, 平衡温度为 80 °C, 平衡时间为 20 min 进样体积为 1 mL。

* 深圳大学科研启动基金资助项目 (项目编号: 200822)

** 通讯作者 Tel: (0755) 26553196 E-mail: zhouzp88@163.com

3 内标及标准溶液的配制

3.1 内标溶液 取乙醇 10 μL , 精密量取, 置 1000 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

3.2 标准溶液 取乙腈 50 μL , 精密量取, 置 500 mL 量瓶中, 加内标溶液稀释至刻度, 摇匀, 做为标准储备液, 分别精密量取该标准储备液 1, 3, 5 mL 各置于 100 mL 量瓶中, 加内标溶液稀释至刻度, 摇匀, 分别作为标准溶液, II, III 浓度分别为 $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, $3 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, $5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.3 对照溶液 取浓度为 $5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的标准溶液 III 作为对照溶液。

3.4 供试品溶液 取本样品 ($500 \mu\text{g} \cdot \text{支}^{-1}$), 加入 1 mL 内标溶液配制成 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为供试品溶液。

4 方法与结果

4.1 方法的专属性考察 分别精密量取对照溶液 1 mL 置顶空进样瓶中, 按上述色谱条件进行测定, 记录色谱图, 见图 1, 空白溶剂不干扰残留溶剂的测定, 其中测得乙腈、乙醇的保留时间分别为 4.39 min 和 3.35 min, 乙腈与乙醇峰间的分离度大于 1.5, 分离度符合规定。

4.2 线性关系考察 分别精密量取标准溶液 I, II, III 1 mL 置顶空进样瓶中, 按上述色谱条件进行测定, 每个浓度各进样 3 次, 以所得的峰面积 (Y) 和各标准溶液 (X) 按内标法作回归处理, 得到回归方程。因此, 乙腈浓度在 $1 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 至 $5 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈线性关系, 回归方程为:

$$Y = 1.462T + 6.661 \times 10^{-3} \quad r = 1.000$$

4.3 最低检测限 精密量取对照溶液逐步稀释, 当信噪比 S/N 约等于 3 时, 乙腈的浓度为 $0.6 \times 10^{-6} \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

4.4 重复性及稳定性试验 精密量取对照溶液置于顶空瓶中, 连续进样 5 次, 计算, 对照溶液中乙腈与乙醇峰面积的 RSD 分别为 0.40% 和 0.07%, 保留时间的 RSD 分别为 0.01% 和 0.06%。

4.5 回收率试验 取本样品 15 支, 分别以标准溶液 I, II, III 为溶剂配制成 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 每一种标准液配制成 5 支, 分别以 1 mL 顶空进样, 按内标法以峰面积计算回收率, 乙腈回收率分别为 89.2%, 91.6%, 92.1%, 对应的 RSD 为 0.52%。

4.6 样品测定 精密量取供试品溶液 1 mL 置顶空进样瓶中, 按上述色谱条件进行测定, 批号为 20041009001, 20060428001, 20071221001 的重组

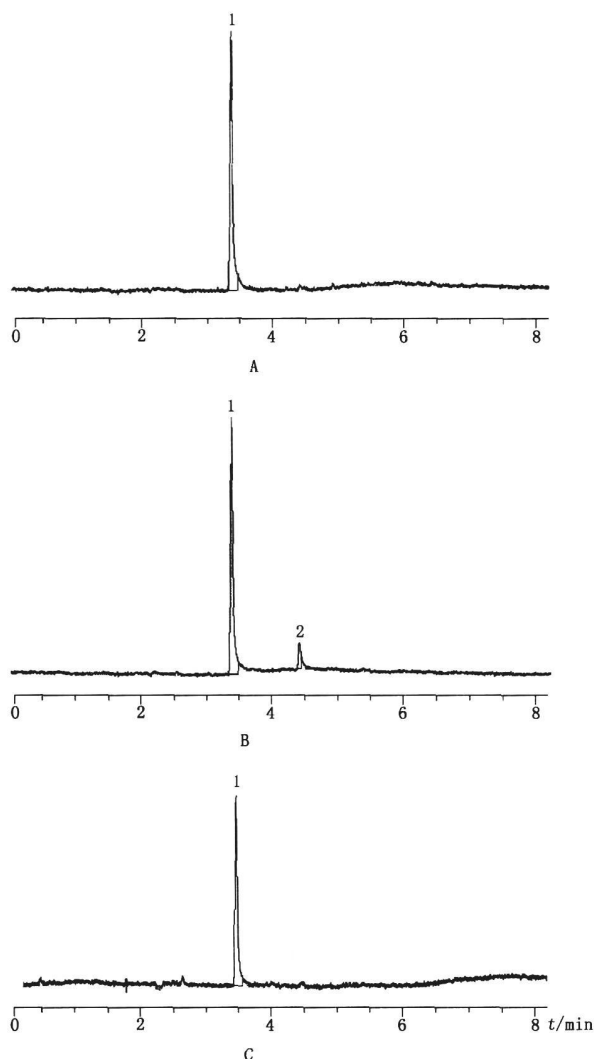


图 1 空白溶液 (A)、对照溶液 (B) 与样品溶液 (C) 色谱图

Fig 1 GC chromatograms of blank solution (A), reference solution (B) and sample solution (C)

1. 乙醇 (ethanol) 2. 乙腈 (acetonitrile)

ANP 中乙腈残留量分别为 0.00096%, 0.00010% 和 0.00092% 均符合规定 (乙腈的残留量不超过 0.004%)。

5 讨论

5.1 溶剂及内标物的选择 重组 ANP 作为一种急性心脏病的注射用药, 将采用水作为溶剂, 故本实验中以纯水作为溶剂, 在选择内标物时考虑到与水的互溶性及与乙腈峰的分离度, 以及 2 种溶液的物理性质, 我们选择了乙醇为内标物, 并采用顶空进样法, 收到了比较满意的效果。

5.2 色谱柱的选择 根据本实验室的条件, 我们分别试用 HP-5 (30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm), HP-FFAP (30 m $\times$ 0.32 mm, 0.25 μm), DB-624 (30 m $\times$ 0.32 mm, 1.8 μm) 弹性石英毛细管柱, 均能分离

出,但 DB-624 分离效果及稳定性方面更好,所以最终选择了 DB-624

5.3 色谱条件的选择 乙腈、乙醇的沸点分别为 82℃和 78℃,在 40℃柱温下,它们的保留时间分别为 4.39 min 和 3.35 min,分离效果较好,出峰时间较早,并且没有其他组分峰出现,故保持 8 min 即可完成测定。

6 结论

中国药典^[5]规定,乙腈的残留量不得超过 0.04%,而在我们的新药测定中检出乙腈残留为 0.001%左右,符合药典的规定。作为即将上市的新药,我们的这种检测方法可以作为乙腈残留量的标准方法。

参考文献

- 1 GAO Hong-li(高红丽), YAN Song-biao(严松彪), CHEN Hui(陈晖). 心钠肽在急性心力衰竭治疗中的研究进展. *Adv Cardiovasc Dis*(心血管病学进展), 2007, 28(3): 386
- 2 Dietz JR. Mechanisms of atrial natriuretic peptide secretion from the atrium. *Cardiovasc Res* 2005; 68(1): 8
- 3 Aronow WS. Epidemiology, pathophysiology, prognosis and treatment of systolic and diastolic heart failure in elderly patients. *Heart Dis* 2003; 5(4): 279
- 4 Marplein L, Michael K, Andrew JS *et al*. Neurohormonal activation and the chronic heart failure syndrome in adults with congenital heart disease. *Circ J*, 2002, 106(1): 92
- 5 ChP(中国药典). 2000 Vol II (二部): Appendix(附录) VIII P (本文于 2009 年 2 月 24 日修改回)

全国医院药学(药学服务与实践)学术会议征文通知

由中国药学会医院药专业委员会主办、《中国医院药学杂志》承办的“全国医院药学(药学服务与实践)学术会议”将于 2009 年第 3 季度在内蒙古召开。本次会议以药学服务与实践为主题,深入探讨药学服务的范畴、流程及其创新实践。交流药学服务在合理用药中的任务与表现,促进安全、合理用药,更好的服务于患者,满足患者对医疗的需求,推动医院药学事业的发展。会议还将邀请全国知名药学专家作专题报告,与代表进行学术交流和研讨。现向全国医院药学工作者、医药研究人员、医药单位管理层人员征文。欢迎踊跃投稿。

1 征文内容

(1) 医院药学工作落实医疗卫生体制改革的思路与实践;(2) 药师在临床药物治疗中的药学服务及管理模式的探索;(3) 药学服务的流程及服务的创新;(4) 药学服务中药品调剂自动化管理及经验;(5) 药学服务中的信息化管理的建设;(6) 药品管理及保障药品安全性中的新观念;(7) 临床合理用药,新药的临床评价和临床观察,药物的配伍,药物的不良反应与分析等中的新经验;(8) 国外医院药学发展动态,临床药师的培养和继续教育,如何开展适合我国的临床药学,医院药学的学科建设和管理经验。

2 征文要求

所有征文均属于未公开发表,未一稿两投,每篇文章均需附 600~800 字的摘要。论文书写格式按《中国医院药学杂志》2009 年第一期稿约,请用电子邮件发送。请附作者详细通讯地址,电话和电子信箱。

3 说明

被大会录取的论文将编入论文集(光盘),优秀论文可在《中国医院药学杂志》发表。会议将评出一、二、三等优秀论文并进行奖励。参会代表将被授予中国药学会 II 类药学继续教育学分并获论文证书。

4 会议地点和时间

内蒙古,具体时间和地点将另行通知。

5 征文截止时间

2009 年 6 月 30 日。

来稿请 E-mail 82836596@163.com,请在电子邮件上注明“会议征文”字样,以免与其他稿件混淆。

6 联系地址

地址:武汉市胜利街 155 号《中国医院药学杂志》编辑部,邮政编码:430014,电话/传真:027-82836596