

## 顶空气相色谱法测定注射用胸腺法新中5种有机溶剂残留量

张洁, 程龙, 陈霞\*

成都市药品检验研究院, 四川 成都 610041

**摘要:** 目的 建立同时测定注射用胸腺法新中乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯和苯甲醚5种有机溶剂残留量的顶空气相色谱法。方法 采用Agilent DB-624 (30 m×0.53 mm×3 μm) 毛细管色谱柱; 火焰离子化检测器; 进样口温度200 °C; 检测器温度250 °C; 载气为氮气; 载气体积流量为2.0 mL·min<sup>-1</sup>; 分流比为10:1; 升温程序: 起始温度40 °C, 保持6 min, 以8 °C·min<sup>-1</sup>的速率升温至90 °C, 保持2 min, 再以20 °C·min<sup>-1</sup>的速率升温至200 °C, 保持5 min; 采用顶空进样方式, 顶空加热箱温度80 °C, 样品瓶平衡时间30 min。进行系统适用性、检测限(LOD)与定量限(LOQ)、线性关系和范围、加样回收率、精密度、稳定性、耐用性考察。结果 注射用胸腺法新中5种残留溶剂在各自线性浓度范围内与峰面积线性关系良好; 平均加样回收率在95.7%~106.3%; 精密度、稳定性、耐用性均符合要求。5批胸腺法新中均未检出5种有机溶剂。结论 建立的顶空气相色谱法操作简单、灵敏度和准确度高、重现性和耐用性好, 可用于注射用胸腺法新中5种有机溶剂残留量的测定。

**关键词:** 注射用胸腺法新; 溶剂残留; 顶空气相色谱法; 乙腈; 二氯甲烷; 醋酸乙酯; 苯; 苯甲醚

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)03-0500-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.03.014

## Determination of residues of five organic solvents in thymalfasin for injection by HS-GC

ZHANG Jie, CHENG Long, CHEN Xia

Chengdu institute for Drug Control, Chengdu 610041, China

**Abstract: Objective** To establish HS-GC method to simultaneously determine the residues of five organic solvents (acetonitrile, dichloromethane, ethyl acetate, benzene, and anisole) in thymalfasin for injection. **Methods** The determination was performed on Agilent DB-624 capillary column (30 m × 0.53 mm × 3 μm) with temperature programming by FID. The inlet temperature was 200 °C and the detector temperature was 250 °C. The carrier gas was nitrogen, and the carrier gas flow rate was 2 mL·min<sup>-1</sup>. The column temperature started at 40 °C for 6 min, and then at 8 °C·min<sup>-1</sup> to 90 °C for 2 min, followed by 20 °C·min<sup>-1</sup> to 200 °C for 5 min. The temperature of HS heating box was 80 °C and the equilibrium time of sample bottle was 30 min. **Results** The five residual solvents in thymalfasin for injection had a good linear relationship in their concentration ranges ( $r > 0.999$ ). The average recovery was 95.7%—106.3%. Precision, stability and durability all meet the requirements. **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate, reproducible and durable, and can be used to determine the residues of five organic solvents in thymalfasin for injection.

**Key words:** thymalfasin for injection; solvent residue; HS-GC method; acetonitrile; dichloromethane; ethyl acetate; benzene; anisole

胸腺法新(C<sub>129</sub>H<sub>215</sub>N<sub>33</sub>O<sub>55</sub>)又称胸腺肽α1(thymosin α1),是由28个氨基酸组成的注射用小分子多肽类免疫制剂,最早由胸腺提取,现已化学合成。注射用胸腺法新是胸腺法新加适量赋形剂和pH调节剂制成的无菌冻干粉针,临床上用于慢

性乙型肝炎、慢性丙型肝炎、肝炎后肝硬化的治疗和作为免疫损害患者的疫苗免疫增强剂<sup>[1-5]</sup>;还广泛地用于肿瘤的治疗,肿瘤患者在抗肿瘤药物治疗的基础上使用胸腺法新,不仅可以提高耐受性,还可以重建免疫系统的功能,达到很好的抗肿瘤效果,

收稿日期: 2021-06-26

基金项目: 四川省科技计划项目: 高端制剂共性关键技术研究及公共技术服务示范基地建设(2020YFS0570)

第一作者: 张洁(1982—),女,硕士研究生,主管药师。E-mail: 48848101@qq.com

\*通信作者: 陈霞(1983—),女,硕士研究生,主管药师。E-mail: 281804706@qq.com

改善患者生存质量,延长患者生存期<sup>[6]</sup>。

目前胸腺法新的合成方法主要为固相多肽合成法<sup>[7]</sup>,在合成过程中不同厂家使用了不同的有机溶剂,但2020年版《中国药典》(二部)<sup>[8]</sup>收载的注射用胸腺法新未对残留溶剂进行控制,本研究参考2020年版《中国药典》四部通则0861“残留溶剂测定法”<sup>[9]</sup>和ICH的要求及规定<sup>[10]</sup>,新建立了一种同时测定注射用胸腺法新中乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯和苯甲醚5种有机溶剂残留的方法,并经方法学验证,所建立方法准确、灵敏、重现性好,可有效地控制药品质量。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent Technologies 7890B GC System气相色谱仪,包括Agilent Technologies 7697A Headspace Sampler顶空进样器、火焰离子化检测器;MS205DU十万分之一电子天平(METTER TOLEDO)。

### 1.2 药物及主要试剂

注射用胸腺法新(批号N200201、N200201、N200301、N200401、N200501,成都九泓制药厂)。对照品:乙腈(批号194210)、二氯甲烷(批号19055155),均为色谱纯试剂,Fisher Chemical公司;醋酸乙酯(批号QCHG1H),色谱纯试剂,Burdick& Jackson公司;苯(批号2018112101),色谱纯试剂,成都市科隆化学品有限公司;苯甲醚(批号2019012101),分析纯试剂,成都科隆化学品有限公司。*N,N*-二甲基甲酰胺(批号20200409)、三乙胺(批号20200110),均为色谱纯试剂,天津市科密欧化学试剂有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

采用Agilent DB-624(30 m×0.53 mm×3 μm)毛细管色谱柱;火焰离子化检测器;进样口温度200 °C;检测器温度250 °C;载气为氮气;载气体积流量为2.0 mL·min<sup>-1</sup>;分流比为10:1;升温程序:起始温度40 °C,保持6 min,以8 °C·min<sup>-1</sup>的速率升温至90 °C,保持2 min,再以20 °C·min<sup>-1</sup>的速率升温至200 °C,保持5 min;采用顶空进样方式,顶空加热箱温度80 °C,样品瓶平衡时间30 min;以*N,N*-二甲基甲酰胺:水(1:1)作为溶剂。

### 2.2 溶液制备

**2.2.1 系统适用性溶液** 分别取乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯、三乙胺和苯甲醚各适量,用*N,N*-二甲基甲酰胺溶解稀释制成质量浓度分别为4.1、6、50、

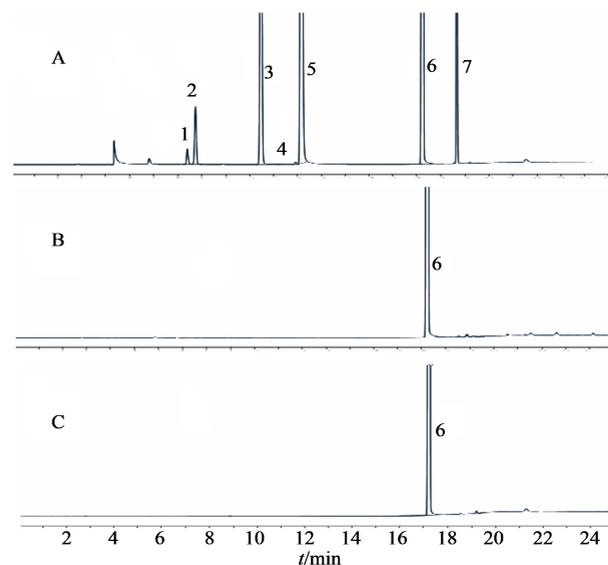
0.02、50、50 mg·mL<sup>-1</sup>的混合标准储备溶液,再用稀释剂[*N,N*-二甲基甲酰胺-水(1:1)]定量稀释制成质量浓度分别为41、60、500、0.2、500、500 μg·mL<sup>-1</sup>的混合溶液,精密量取此混合溶液2.0 mL,置20 mL顶空瓶中,密封,作为系统适用性溶液。

**2.2.2 对照品溶液** 精密称取乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯和苯甲醚各适量,用*N,N*-二甲基甲酰胺溶解后,再用稀释剂[*N,N*-二甲基甲酰胺-水(1:1)]定量稀释制成质量浓度分别为41、60、500、0.2、500 μg·mL<sup>-1</sup>的混合溶液,精密量取此混合溶液2.0 mL,置20 mL顶空瓶中,密封,作为对照品溶液。

**2.2.3 供试品溶液** 取注射用胸腺法新约0.2 g,精密称定,置20 mL顶空瓶中,精密加入稀释剂[*N,N*-二甲基甲酰胺-水(1:1)]2.0 mL,使胸腺法新溶解,密封,作为供试品溶液。

### 2.3 方法学考察

**2.3.1 系统适用性试验** 系统适用性溶液、供试品溶液、空白溶剂的气相色谱图见图1。各溶剂峰之间的分离度均符合要求。



1-乙腈;2-二氯甲烷;3-醋酸乙酯;4-苯;5-三乙胺;6-*N,N*-二甲基甲酰胺;7-苯甲醚

1-acetonitrile; 2-dichloromethane; 3-ethyl acetate; 4-benzene; 5-triethylamine; 6-*N,N*-dimethylformamide; 7-anisole

图1 系统适用性溶液(A)、供试品溶液(B)、空白溶剂(C)气相色谱图

Fig. 1 GC Chromatograms of mix reference solution (A), test solution (B), and blank solution (C)

**2.3.2 检测限(LOD)与定量限(LOQ)** 分别精密称取乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯、苯甲醚适量,分别置10 mL量瓶中,用*N,N*-二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度,作为各溶剂的储备液,精密量取各溶剂

储备液适量,用 $N,N$ -二甲基甲酰胺-水(1:1)逐级稀释,以 $S/N$ 约为3时的进样浓度为LOD,以 $S/N$ 约为10时的进样浓度为LOQ,并平行配制3份LOQ溶液,进样检测。LOD与LOQ结果见表1。

表1 LOD与LOQ  
Table 1 LOD and LOQ

溶剂	LOD/	LOQ	
	( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	质量浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	峰面积RSD/%
乙腈	0.291 3	0.873 8	3.2
二氯甲烷	0.134 3	0.403 0	3.8
醋酸乙酯	0.114 8	0.344 4	8.9
苯	0.006 7	0.020 1	5.9
苯甲醚	0.093 9	0.281 6	1.0

**2.3.3 线性关系和范围** 精密量取“2.2.1”项下混合标准储备液用 $N,N$ -二甲基甲酰胺-水(1:1)逐级稀释,制成6个质量浓度的系列线性溶液。精密量取各线性溶液2 mL置20 mL顶空瓶中,密封,顶空进样,记录各质量浓度下线性溶液的峰面积,以质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标做线性回归,结果见表2。

表2 线性关系测定结果( $n=6$ )  
Table 2 Linear relationship measurement ( $n=6$ )

溶剂	线性方程	$r$	线性范围/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )
乙腈	$y=2.211x+0.217$	0.999 9	4.136~82.720
二氯甲烷	$y=5.907x+2.702$	0.999 8	6.103~122.100
醋酸乙酯	$y=7.603x+59.790$	0.999 9	49.65~992.90
苯	$y=73.70x+0.48$	0.999 8	0.021 1~0.422 7
苯甲醚	$y=4.478x+46.770$	0.999 8	51.04~1 021.00

**2.3.4 加样回收率试验** 取注射用胸腺法新(批号N200201)约200 mg,精密称定,分别置20 mL顶空瓶中,分别精密加入50%、100%、150%对照品溶液2 mL,密封,振摇使胸腺法新溶解,即制得限度浓度50%、100%、150%的供试品加标溶液,每个浓度平行制备3份。取供试品溶液2 mL,置20 mL顶空瓶中,密封。进样检测,乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯、苯甲醚平均回收率分别为105.9%、95.7%、106.2%、96.1%、102.9%,RSD分别为1.6%、2.1%、2.7%、2.9%、1.5%。表明该方法的加样回收率良好。

**2.3.5 精密度试验** 参照“2.3.4”项下100%浓度供试品加标溶液配制方法平行配制6份;更换试验人员及测定时间,同法配制6份;进样分别测定日内及

日间精密度。乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯和苯甲醚的日内精密度(RSD)分别为1.4%、2.6%、1.5%、1.5%和0.9%;日间精密度的RSD分别为2.3%、3.2%、2.1%、3.3%和1.3%。表明该方法精密度良好。

**2.3.6 稳定性试验** 取配制好的对照品溶液分别放置0、2、4、8、16、24 h后置顶空瓶进样,测定各色谱峰峰面积。乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯和苯甲醚峰面积的RSD分别为1.8%、1.5%、1.3%、1.2%、1.4%,表明对照品溶液在24 h内基本稳定。

**2.3.7 耐用性试验** 改变柱温起始温度 $\pm 5^\circ\text{C}$ 、载气柱体积流量 $\pm 0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 、分流比 $\pm 5:1$ ,取对照品溶液进样分析,考察各溶剂间的分离度。各待测有机溶剂间的分离度均 $>1.5$ ,说明该方法耐用性良好,小范围的条件波动不影响测定。

**2.3.8 样品测定** 取5批注射用胸腺法新按照建立的检测方法测定,结果见表3。5批样品中均未检出5种有机溶剂。

表3 样品检验结果

Table 3 Sample determination

批号	乙腈	二氯甲烷	醋酸乙酯	苯	苯甲醚
N200101	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
N200201	未检出	未检出	0.00%	未检出	0.00%
N200301	未检出	未检出	0.00%	未检出	0.00%
N200401	未检出	未检出	未检出	未检出	未检出
N200501	未检出	未检出	0.00%	未检出	0.00%

### 3 讨论

#### 3.1 残留溶剂中的三乙胺

系统适用性溶液中加入三乙胺是因为胸腺法新合成过程中使用了三乙胺,在方法学准确度的考察中发现三乙胺的平均回收率仅为27.06%,推测三乙胺可能与胸腺法新发生反应,导致三乙胺回收降低,故本课题组另外建立了一个单独测定三乙胺残留溶剂的方法并进行了验证,但为了保证样品检测中三乙胺不会与其他溶剂峰相干扰,故在系统适用性溶液中加入三乙胺,以考察各溶剂间的分离度是否符合要求。

#### 3.2 溶剂的选择

5种残留溶剂均溶于 $N,N$ -二甲基甲酰胺,但以 $N,N$ -二甲基甲酰胺为溶剂进样后发现 $N,N$ -二甲基甲酰胺拖尾,与苯甲醚分离度稍差,故采用 $N,N$ -二甲基甲酰胺-水(1:1)为样品稀释剂, $N,N$ -二甲基甲酰胺浓度稀释后,与苯甲醚分离度大于1.5;但苯甲

醚在稀释剂中溶解不完全,故配制储备液时先用N,N-二甲基甲酰胺将各残留溶剂溶解后,再用稀释剂稀释。

### 3.3 起始柱温的选择

以60℃做起始柱温时,苯的限度溶液与三乙胺分离度较差,故将起始柱温调整至40℃,苯与三乙胺能达到基线分离。

### 3.4 残留溶剂的限度规定

根据2020年版《中国药典》四部0861残留溶剂测定法,乙腈、二氯甲烷、醋酸乙酯、苯和苯甲醚5种溶剂的规定限度分别为0.041%、0.06%、0.5%、0.0002%和0.5%;试验中的各限度浓度均根据此限度配制。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 高德民,王凤山.胸腺肽 $\alpha 1$ 的特征与功能综述[J].中国生化药物杂志,2007,27(2):136-139.  
Gao D M, Wang F S. Review on the characteristics and function of thymosin alpha 1 [J]. Chin J Biochem Pharm, 2007, 27(2): 136-139.
- [2] 郑立运.胸腺肽 $\alpha 1$ 的功能研究进展[J].中国处方药,2014,12(7):143-144.  
Zheng L Y. Advances in functional studies of thymopeptide  $\alpha 1$  [J]. J China Prescr Drug, 2014, 12(7): 143-144.
- [3] 王治.重组人干扰素 $\alpha 2b$ 联合胸腺法新治疗慢性乙型肝炎分析[J].中国医药导刊,2013,15(6):995-998.  
Wang Z. The chronic hepatitis B treatment by recombinant human interferon alpha-2b Thymus Andrew method [J]. Chin J Med Guide, 2013, 15(6): 995, 998.
- [4] 聂青和,张久聪,闫英琪.胸腺素 $\alpha 1$ 治疗慢性丙型肝炎的临床荟萃分析[J].实用肝脏病杂志,2005,8(6):346-351.
- [5] 张颖,尹红锐,徐蓓菁,等.注射用胸腺法新杂质结构鉴定及含量测定[J].中国药师,2020,23(7):1417-1422.  
Zhang Y, Yin H R, Xu B J, et al. Structure identification and content determination of the impurities in thymalfasin for injection [J]. China Pharm, 2020, 23(7): 1417-1422.
- [6] 初怡君,张显玉,张有学,等.胸腺法新在肿瘤治疗中的应用研究进展[J].癌症进展,2019,17(16):1879-1880-1884.  
Chu Y J, Zhang X Y, Zhang Y X, et al. Progress in the application of thymus method in tumor treatment [J]. Oncol Prog, 2019, 17(16): 1879-1880, 1884.
- [7] 程虎,韦萍,朱颐申.固相合成胸腺素 $\alpha 1$ [J].南京工业大学学报:自然科学版,2004,26(2):78-80.  
Cheng H, Wei P, Zhu Y S. Solid-phase synthesis of thymosin  $\alpha 1$  [J]. J Nanjing Univ, 2004, 26(2): 78-80.
- [8] 中国药典[S].二部.2020:1388-1389.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume II. 2020: 1388-1389.
- [9] 中国药典[S].二部.2020:116-120.  
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume II. 2020: 116-120.
- [10] ICH指导委员会著,周海钧主译.药品注册的国际技术要求:质量部分[M].北京:人民卫生出版社,2000:343.  
ICH Steering Committee, translated by Zhou Haijun. *International technical requirements for drug Registration: Quality part* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 343.

[责任编辑 兰新新]