

· 交流 ·

HPLC 法测定重组人胰岛素制剂中 苯酚和间甲酚含量

中国药品生物制品检定所 北京 100050

杨化新 张培培 徐康森

重组人胰岛素制剂中含有苯酚或苯酚和间甲酚,其作用为促进胰岛素空间结构的形成^[1,2]和防腐,但是含量过高,对人体有害,因此,苯酚和间甲酚的定量是重组人胰岛素制剂质控内容之一。本文采用 RP-HPLC 法测定该类药物制剂中的苯酚和间甲酚含量。

1 仪器与材料

岛津 LC-10AD 泵, CTO-10A 柱温箱, SPD-10A 检测器, DGU-4A 脱气机, C-R7Ae plus 积分仪。

重组人胰岛素及其制剂: Gansulin (通化安泰克生物工程制药公司); Novolin (Novo Nordisk 公司); Humlin (Eli Lilly 公司); 中性重组人胰岛素注射液 (rhInsulin R); 低精蛋白锌人胰岛素注射液 (rhInsulin N) (徐州万邦生化制药公司); 苯酚和间甲酚对照品均为色谱纯,其含量 > 99.5%; 乙腈为色谱纯试剂,其它试剂均为国产分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件^[3] Vydac Protein and Peptide C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为 0.2 mol·L⁻¹ 硫酸盐缓冲液 (pH 2.3) - 乙腈 (74:26), 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 40 °C; 检测波长 270 nm。

2.2 系统适应性试验 精密称取苯酚和间甲酚对照品各约 100 mg 和 200 mg, 置 100 mL 量瓶中, 用 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备溶液。取重组人胰岛素 10 mg 和对照品贮备溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中, 用 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。苯酚与间甲酚、间甲酚与人胰岛素峰之间的分离度分别为 1.8 和 3.2; 苯酚和间甲酚峰的理论塔板数分别为 5 570 和 5 580, 拖尾因子均为 1.0, 峰面积测量值的 RSD 分别为 0.46% 和 0.47% (n = 6)。在本色谱条件下, 苯酚与间甲酚、间甲酚与人胰岛素峰能达到基线分离。见图 1。流动相中乙腈的量对人胰岛素峰的保留时间影响较大, 变化乙腈的比例可延长或缩短人胰岛素峰的保留时间。

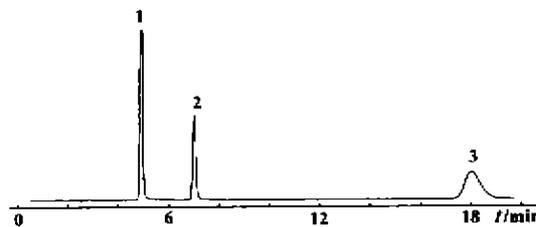


图 1 苯酚与间甲酚、人胰岛素的色谱图

Fig 1 The profile of HPLC with phenol, m-cresol and hlnsulin

1. 苯酚 (phenol) 2. 间甲酚 (m-cresol)

3. 人胰岛素 (hlnsulin)

2.3 线性试验 精密量取上述对照品贮备溶液 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0 mL 分别置于 10 mL 量瓶中, 用 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 各取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。分别以苯酚和间甲酚峰面积为纵坐标, 对照品溶液浓度为横坐标进行直线回归, 苯酚在浓度为 0.01 ~ 0.4 mg·mL⁻¹ 范围内, 回归方程为:

$$Y = 1\ 514\ 181X + 8\ 382 \quad r = 0.999\ 97$$

间甲酚在浓度为 0.02 ~ 1.0 mg·mL⁻¹ 范围内, 回归方程为:

$$Y = 1\ 315\ 224X + 11\ 197 \quad r = 0.999\ 1$$

苯酚和间甲酚的最低检出量分别为 0.2 ng 和 0.5 ng。

2.4 回收率试验 精密称取苯酚与间甲酚对照品各约 120 mg 和 300 mg 置于 100 mL 量瓶中, 用 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液溶解并稀释至刻度, 作为对照品溶液。取已知含量的注射液 5 瓶, 照样品测定项下酸化后, 分别精密量取 1.0 mL 和对照品溶液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 用 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液稀释至刻度, 摇匀, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。另精密量取对照品溶液 1.0 mL 置于 10 mL 量瓶中, 同法稀释和测定, 以峰面积按外标法计算, 苯酚的平均回收率为 98.8%, RSD 为 0.7% (n = 5); 间甲酚的平均回收率为 98.5%, RSD 为 0.5% (n = 5)。

2.5 样品的测定 取重组人胰岛素注射液, 每 1 mL 中加入 9.6 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 3 μL 酸化, 按标示量取澄清液适量, 用 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸溶液制成含间甲酚 0.3 mg·mL⁻¹、苯酚 0.12 mg·mL⁻¹ 的溶液, 摇匀, 取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。另取相应的对照品溶液同法稀释和测定, 以峰面积按外标法计算, 测定结果见表 1。结果表明, 上述制剂中苯酚与间甲酚的含量均符合规定 (应为标示量

的80%~110%)。综上所述,本法简便,快速,准确,重现性好。

表1 胰岛素制剂中苯酚与间甲酚的测定结果

Tab 1 The results of determining of phenol and *m*-cresol in rhInsulin formulations

样品 (sample)	n	苯酚 (phenol)		间甲酚 (<i>m</i> -cresol)		
		标示量 (labeled amount) %	RSD/%	标示量 (labeled amount) %	RSD/%	
Novolin	R	8	-	-	103.7	1.0
	N	8	103.8	0.9	103.3	0.8
	30R	8	103.8	1.0	104.0	0.6
Gansulin	R	7	99.6	0.5	-	-
	N	7	96.8	0.7	-	-
	30R	6	90.4	0.5	-	-
Humulin	R	4	-	-	99.6	1.1
	N	6	100.0	1.3	101.2	1.4
	30R	6	98.5	1.0	97.5	1.1
rhInsulin N	7	106.0	1.2	-	-	-
rhInsulin R	10	103.6	1.0	-	-	-

注: -表示制剂无苯酚或间甲酚

Note: - expressed no phenol or *m*-cresol in formulations

参考文献

- 1 Wollmer A, Rannefeld B, Johansen BR, et al. Phenol - promoted structural transformation of insulin in solution. *Biol Chem Hoppe - Seyler*. 1987, 368: 903
- 2 Derewenda U, Derewenda Z, Dodson GG, et al. Phenol stabilizes more helix in a new symmetrical zinc insulin hexamer. *Nature*. 1989, 338: 594
- 3 Eli Lilly specifications for rhInsulin products

(本文于2000年11月21日修改回)

紫外分光光度法测定注射用 亚锡植酸钠中植酸的含量

江苏省原子医学研究所核医学国家重点实验室

无锡 214063

汪洋 杨敏 胡名扬

注射用亚锡植酸钠是用于制备放射性诊断药的配套药盒,主要用于肝显像。其主药植酸具有环己烷结构,其分子式为: $C_6H_6(H_2PO_4)_6$ 。药典上收载的定量方法^[1]是消化测磷分光光度法。由于在消化过程中磷易有损失,影响定量结果。本文讨论了

无需消化而采用紫外分光光度法测定药盒中植酸量的方法^[2]。

1 仪器与试剂

DU-650型紫外分光光度计,美国 Beckman 公司。

植酸钠对照品(纯度为99.0%)由 Aldrich Chemical Company, Inc. 提供,原料由 Sigma 提供。

注射用亚锡植酸钠由本所药厂自制。其每瓶组成为9 mg 植酸、0.12 mg 氯化亚锡 ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$)、3.8 μ L 盐酸。

2 方法

2.1 样品预处理 取本品3瓶,分别精密加水2 mL,溶解后,合并,混匀。精密量取2 mL,精密加入2%稀盐酸2 mL,混匀。通入硫化氢,待沉淀完全,离心,移出上清液,吹气除去上清液中过量硫化氢。取上清液2 mL,置50 mL容量瓶中,用水定容,即为供试品溶液。

2.2 操作步骤 精密移取适量供试品溶液于25 mL容量瓶中,依次加入0.05%氯化铁溶液3 mL,0.5%磷基水杨酸和pH 2.2邻苯二甲酸氢钾-盐酸缓冲液各5 mL,再加水定容,以试剂空白为参比,置1 cm比色皿中,于500 nm波长测其吸收度。

3 结果

3.1 测定波长选择 取植酸钠对照品用水溶解制成含植酸200 μ g \cdot mL⁻¹的溶液,取2.5 mL于25 mL容量瓶中,按试验方法操作,以水为空白,于400~800 nm波长范围内记录紫外光谱,结果见图1,表明在500 nm波长处有最大吸收。

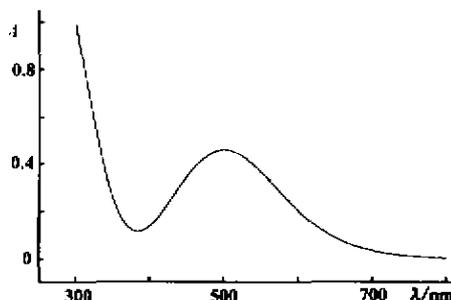


图1 紫外吸收曲线

Fig 1 Curve of UV absorption

3.2 标准曲线 分别移取200 μ g \cdot mL⁻¹植酸对照品溶液0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL,按试验方法测定不同浓度植酸标准液的吸收度,并绘制标准曲线,以吸收度A对取用量C (μ g \cdot mL⁻¹)进行线性回归,得回归方程:

$$A = -1.6965 \times 10^{-4} - 0.006C \quad r = 0.9999$$