

HPLC-MS/MS法测定胸腺肽肠溶片中胸腺素 α_1 的含量

邱新峰*(安徽医科大学附属安庆医院药剂科,安徽 安庆 246003)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)30-4302-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.30.34

摘要 目的:建立测定胸腺肽肠溶片中胸腺素 α_1 含量的方法。方法:采用高效液相色谱-串联质谱法。色谱柱为 Luna C₁₈(2),流动相为 0.1% 甲酸-乙腈(梯度洗脱),流速为 0.7 mL/min,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μ L;离子化模式为电喷雾电离,喷雾电压为 4.5 kV,鞘气流速为 60 arb,辅助气流速为 30 arb,吹扫气流速为 10 arb,毛细管温度为 320 ℃,工作模式为正离子监测模式。结果:胸腺素 α_1 检测质量浓度线性范围为 1~1 000 ng/mL ($r=0.999\ 9$);定量限为 1 ng/mL,检测限为 0.1 ng/mL;精密性、稳定性、重复性试验的 RSD<2.0%;加样回收率为 95.0%~98.0% (RSD=1.2%, $n=6$)。结论:该方法简单快速、灵敏度高、结果准确,适用于胸腺肽肠溶片中胸腺素 α_1 含量的测定。

关键词 胸腺肽肠溶片;胸腺素 α_1 ;高效液相色谱-串联质谱法

Content Determination of Thymosin α_1 in Thymopolypeptides Enteric-coated Tablets by HPLC-MS/MS

QIU Xinfeng (Dept. of Pharmacy, Anqing Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Anhui Anqing 246003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of thymosin α_1 in Thymopolypeptides enteric-coated tablets. METHODS: HPLC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on Luna C₁₈(2) with mobile phase consisted of 0.1% formic acid-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.7 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃, and sample size was 20 μ L. ESI was used with ion spray voltage of 4.5 kV, sheath gas flow rate of 60 arb, aux gas flow rate of 30 arb, sweep gas flow rate of 10 arb and capillary temperature at 320 ℃. The working mode was positive ion monitoring mode. RESULTS: The linear range for thymosin α_1 was 1-1 000 ng/mL ($r=0.999\ 9$). The limit of quantitation was 1 ng/mL. The limit of detection was 0.1 ng/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The recoveries were 95.0%-98.0% (RSD=1.2%, $n=6$), respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, sensitive and accurate, and can be suitable for simultaneous determination of thymosin α_1 in Thymopolypeptides enteric-coated tablets.

KEYWORDS Thymopolypeptides enteric-coated tablet; Thymosin α_1 ; HPLC-MS/MS

胸腺肽为免疫调节药,能调节和增强人体细胞免疫功能,促进T淋巴细胞成熟,增加T细胞上淋巴因子受体的水平^[1-2]。胸腺肽抑制剂可用于类风湿性关节炎、慢性肝炎等的治疗,均取得较好的疗效^[3];现有研究表明,其亦可用于肿瘤放疗引起的细胞免疫功能低下的辅助治疗,以防止癌症的扩散、复发和新生^[4-5]。胸腺肽肠溶片主要成分为从健康小牛胸腺中提取的具有生物活性的分子量小于6 000的多肽^[6],其中以胸腺素 α_1 为主^[7-8]。尽管胸腺肽制剂的临床应用比较广泛,但是由于各生产厂家的制备工艺不同导致多肽组分及活性各有差异;这给临床用药带来了巨大阻碍^[9-10]。Q Exactive Plus型质谱仪是一种新型四极杆和轨道阱杂交高分辨质谱仪,其将高选择性四极杆的离子过滤与静电轨道阱质谱高分辨准确质量数测量技术相结合,与传统的多肽定量方法相比较,其在分辨率、扫描速度和灵敏度等性能上均有所提升,可以同时涵盖蛋白质组学的定量和定性需求。鉴于此,笔者采用高效液相色谱-串联质谱法(HPLC-MS/MS)建立了测定胸腺肽肠溶片中胸腺素 α_1

含量的方法,以期完善该制剂的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Q Exactive Plus型质谱仪,配有H-ESI源和Xcalibur 3.0数据处理软件(美国Thermo Fisher公司);Nexera LC-30A型HPLC系统,包括SIL-30AC型恒温自动进样器、CTO-20AC型恒温柱箱(日本Shimadzu公司);Model A120S型电子分析天平(德国Sartorius公司);Hettich ROTINA 38/38R型离心机(德国Hettich公司);Branson 3510型超声机(美国Branson公司)。

1.2 药品与试剂

胸腺肽肠溶片(厂家1,批号:20150701,规格:5 mg/片;厂家2,批号:20141012,规格:20 mg/片;厂家3,批号:20150604,规格:10 mg/片;厂家4,批号:20150401,规格:5 mg/片);胸腺素 α_1 对照品(日本Sigma公司,批号:T3410,纯度:99.8%);乙腈、甲酸均为色谱纯,水为实验室自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 试验条件和系统适用性试验

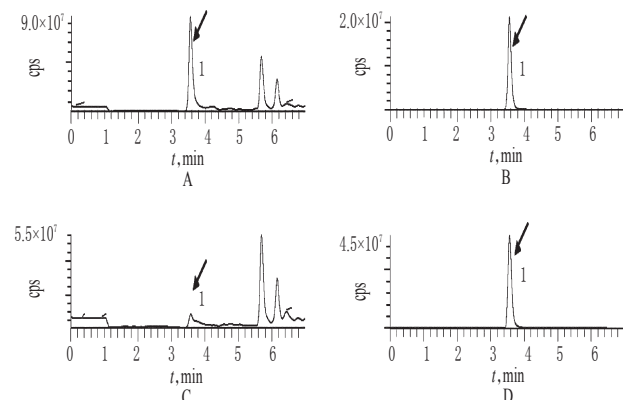
2.1.1 色谱条件 色谱柱:Luna C₁₈(2)(50 mm \times 2 mm,

*副主任药师。研究方向:药物与临床。电话:0556-5218788。
E-mail:87360008@qq.com

5 μm);流动相:0.1%甲酸(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~2 min, 100% A; 2~7 min, 100%→95% A; 7~8 min, 95%→85% A; 8~8.5 min, 85%→95% A; 8.5~10 min, 95%→100% A);流速:0.7 mL/min;柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.1.2 质谱条件 离子化模式:电喷雾电离;喷雾电压:4.5 kV;鞘气流速:60 arb;辅助气流速:30 arb;吹扫气流速:10 arb;毛细管温度:320℃;工作模式:正离子监测模式;最大离子注入时间:200 ms;扫描范围: m/z 400~1 500。

在上述试验条件下进样测定,理论板数按胸腺素 α_1 计>3 000,分离度>1.5,色谱见图1。



A.对照品总提取离子流;B.对照品特征提取离子流;C.供试品总提取离子流;D.供试品特征提取离子流;1.胸腺素 α_1

A.total extraction ion flow of control;B.characteristic extraction ion flow of control;C.total extraction ion flow of test sample;D.characteristic extraction ion flow of test sample;1.thymosin α_1

图1 提取离子流图

Fig 1 Extraction ion flow diagram

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取胸腺素 α_1 对照品1 mg,置于10 mL量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取样品适量,除去肠溶衣,研细,置于10 mL量瓶中,加水制成一定质量浓度溶液(厂家1和4的样品制成质量浓度为0.125 mg/mL,厂家2的样品制成质量浓度为0.5 mg/mL,厂家3的样品制成质量浓度为0.25 mg/mL),超声(功率:400 W,频率:40 kHz,下同)处理30 min,然后在4℃下以半径为5 cm、10 000 r/min离心10 min,取上清液,即得。

2.2.3 空白溶液 以水为空白溶液。

2.3 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,用水逐级稀释制成胸腺素 α_1 质量浓度分别为1、10、100、500、1 000 ng/mL的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液各适量,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。以胸腺素 α_1 质量浓度(x , ng/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得胸腺素 α_1 的回归方程为 $y=137\ 124x-$

67 985($r=0.999\ 9$)。结果表明,胸腺素 α_1 检测质量浓度线性范围为1~1 000 ng/mL。

2.4 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,胸腺素 α_1 的LOQ为1 ng/mL,LOD为0.1 ng/mL。

2.5 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,按“2.1”项下试验条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,胸腺素 α_1 峰面积的RSD=0.12% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:20150701)适量,分别于室温下放置0、3、6、9、12、16 h时按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,胸腺素 α_1 峰面积的RSD=1.09% ($n=6$),表明供试品溶液在室温下放置16 h内稳定性良好。

2.7 重复性试验

取样品(批号:20150701)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,胸腺素 α_1 峰面积的RSD=0.61% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.8 加样回收率试验

取样品(批号:20150701)适量,置于10 mL量瓶中,加入一定质量的胸腺素 α_1 对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery tests($n=6$)

取样量, mg	样品含量, ng	加入量, ng	测得量, ng	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
0.5	0	10.0	9.8	98.0		
0.5	0	10.0	9.7	97.0		
0.5	0	10.0	9.5	95.0	97.0	1.2
0.5	0	10.0	9.7	97.0		
0.5	0	10.0	9.8	98.0		
0.5	0	10.0	9.6	96.0		

2.9 样品含量测定

取4批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算胸腺素 α_1 的含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果($n=3$, ng/mL)

Tab 2 Results of contents determination of samples ($n=3$, ng/mL)

样品批号	胸腺素 α_1
20150701	0
20141012	23.41
20150604	27.66
20150401	10.96

3 讨论

工业药学领域药学硕士专业学位研究生课程体系改革探索^Δ

陈欣*,徐萍,叶敏(北京大学药学院,北京 100191)

中图分类号 G642.0 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)30-4304-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.30.35

摘要 目的:为完善工业药学领域药学硕士专业学位研究生课程体系提供参考。方法:采用比较研究法分析了国内9所“985”高等院校工业药学领域药学硕士专业学位研究生课程体系现状,在此基础上对我校药学院工业药学领域药学硕士专业学位研究生课程体系的改革思路及措施进行总结和阐述。结果与结论:工业药学领域药学硕士专业学位研究生课程体系方面,存在部分高等院校课程体系定位不明确、课程多与药学学术型硕士研究生或制药工程硕士研究生趋同、职业培训知识课程有名无实以及缺乏实践性课程等问题。我校药学院以努力实现工业药学领域药学硕士专业学位研究生课程体系的独立性和实践性为主要思路进行课程体系改革探索,重新定位了区别于药学学术型硕士研究生的培养目标;本着“充分合理利用现有课程”的原则梳理了现有课程;增加了职业培训知识课程和实践性课程;创新了教学方法。经过改革,该专业研究生毕业时的就业率逐年提高。

关键词 工业药学;药学硕士;专业学位;课程体系;改革

Reform and Exploration of the Curriculum System for Master of Pharmacy in the Field of Industrial Pharmacy

CHEN Xin, XU Ping, YE Min (School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To provide reference for improving the curriculum system for Master of Pharmacy in the field of industrial pharmacy. METHODS: The method of comparative study was adopted to analyze the situation of curriculum system for Master of Pharmacy in the field of industrial pharmacy in 9 domestic universities of “985 Project”. Based on it, reform idea and measures of the curriculum system for Master of Pharmacy in the field of industrial pharmacy in our university. RESULTS & CONCLUSIONS: There were some problems in curriculum system for Master of Pharmacy in the field of industrial pharmacy, such as positioning of curriculum system was unclear; many courses of Master of Pharmacy were same as the Academic Master of Pharmacy or Master of Pharmaceutical Engineering; vocational training knowledge course was merely nominal; practical curriculum

本试验曾考察了水-乙腈、0.1%甲酸-甲醇、0.1%甲酸-乙腈作为流动相时的分离情况。结果,0.1%甲酸-乙腈为流动相时,胸腺素 α_1 的响应值更大、灵敏度更高,因此本试验最终选择0.1%甲酸-乙腈作为流动相。本试验还考察了胸腺素 α_1 的工作模式,发现其在正离子监测模式下响应值均较好,故最终采用正离子监测模式。

综上所述,本方法简单快速、灵敏度高、结果准确,适用于胸腺肽肠溶片中胸腺素 α_1 含量的测定。

参考文献

- [1] 杨华良.胸腺肽肠溶片治疗顽固性复发性口疮的临床研究[J].中国医药指南,2014,12(1):125-126.
- [2] 张鹏,黄启来,华子春.胸腺肽 α_1 的研究进展[J].东南大学学报,2013,32(3):344-350.
- [3] 林兰,刘建文.胸腺肽制剂及临床应用研究现状[J].中国药事,2009,23(7):706-717.

- [4] 李洁,王晓杰,邹素兰.胸腺肽的临床应用与研究进展[J].中国药房,2008,19(14):1108-1109.
- [5] Garaci E, Pica F, Rasi G, et al. Thymosin alphas in the treatment of cancer: from basic research to clinical application[J]. *INT J Immuno Pharmacol*, 2000, 22(12):1067-1076.
- [6] 国家药品监督管理局.国家药品标准:WS1-(X-001)-2000[S].2002.
- [7] 周天琼,俞保彬.胸腺肽肠溶胶囊含量测定方法学研究[J].山东化工,2013,42(10):80-82.
- [8] Low TL, Goldstein AL. Thymosins: structure, function and therapeutic applications[J]. *Thymus*, 1984, 6(1/2):27-42.
- [9] 杨昭鹏,刘海静,廖海明,等.胸腺肽及制剂质量标准的研究[J].药物分析杂志,2002,22(2):144-146.
- [10] 杨晓晖.胸腺肽及制剂多肽含量测定方法研究[J].黑龙江医药,2003,16(6):499-501.

^Δ 基金项目:全国药类专业药学硕士专业学位研究生教育教学改革课题(No.yjzw2015A04)

* 副研究员,硕士。研究方向:药学教育。电话:010-82802184。
E-mail:chenxin@bjmu.edu.cn

(收稿日期:2017-03-25 修回日期:2017-05-25)

(编辑:刘柳)