

无衍生化-气相色谱法测定药用胶塞提取液中硬脂酸和棕榈酸

余秋玲, 马 艳, 谢 威, 杨 倩, 龙 梅

(重庆市计量质量检测研究院, 重庆 401123)

摘要: 建立了无衍生化-气相色谱法测定药用胶塞提取液中硬脂酸和棕榈酸的分析方法。采用 3 种不同介质(pH 值为 3 的酸性缓冲溶液、pH 值为 10 的碱性缓冲溶液、20% 乙醇溶液)对胶塞进行提取, 得到的提取液经正己烷萃取后, 采用 DB-FFAP(30 m×0.25 mm×0.25 μm)色谱柱进行分离, 经火焰离子化检测器(FID)检测, 外标法定量。结果表明, 在最优条件下, 硬脂酸和棕榈酸峰形对称, 分离效果和标准曲线线性良好, 平均加标回收率为 97.6%~100.5%, 相对标准偏差(RSD)为 0.4%~2.3%($n=6$), 检出限(LOD)为 1.0~1.5 mg/L。方法前处理简单、准确度高, 可用于药用胶塞提取液中硬脂酸和棕榈酸的检测。

关键词: 硬脂酸; 棕榈酸; 无衍生化; 气相色谱法; 药用胶塞

中图分类号: O657.7⁺ 1

文献标志码: B

文章编号: 1006-3757(2022)03-0299-05

DOI: 10.16495/j.1006-3757.2022.03.011

Determination of Stearic Acid and Palmitic Acid in Medical Rubber Plug Extracting Solution by Non-derivative Gas Chromatography

YU Qiu-ling, MA Yan, XIE Wei, YANG Qian, LONG Mei

(Chongqing Academy of Metrology and Quality Inspection, Chongqing 401123, China)

Abstract: A non-derivative gas chromatography (GC) for determining stearic acid and palmitic acid in the extracting solution of medical rubber plug has been established. Three different media (pH=3 acidic buffer solution, pH=10 alkaline buffer solution, 20% ethanol solution) were used to extract the rubber plug. The extracted solution was extracted by hexane, separated on a DB-FFAP (30 m×0.25 mm×0.25 μm) column, detected by a flame ionization detector (FID), and quantified by an external standard method. The results showed that the peaks of stearic acid and palmitic acid were symmetrical under optimal conditions. The separation effect was good and the linear curve fitted well. The average recoveries were 97.6%~100.5%, and the relative standard deviations (RSD) were 0.4%~2.3% ($n=6$). The detection limit (LOD) was 1.0 mg/L to 1.5 mg/L. The method is simple and accurate, and can be used for the determination of stearic acid and palmitic acid in the extracting solution of medicinal rubber plug.

Key words: stearic acid; palmitic acid; non-derivative; GC; medicinal rubber plug

药用胶塞是一种常见的药品包装弹性体密封件^[1], 胶塞的生产过程中常需加入工业硬脂酸作为

润滑剂^[2], 而工业硬脂酸中一般含有较大比例的棕榈酸。胶塞与药品直接接触, 胶塞中的硬脂酸和棕

收稿日期: 2022-07-04; 修订日期: 2022-08-15.

基金项目: 重庆市计量质量检测研究院自立项目 [2020(研)-3]

作者简介: 余秋玲(1989-), 硕士, 工程师, 研究方向: 药品与包材相容性研究, E-mail: cqyuqiuling12@163.com

通信作者: 龙梅(1983-), 硕士, 高级工程师, 研究方向: 主要从事与健康相关的有害物质分析研究, E-mail: 57162725@qq.com.

桐酸可能迁移至药品中^[3]。研究表明,硬脂酸和棕榈酸均具有一定的毒性,可导致心脑血管疾病的发病率升高^[4]。此外,《化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)》^[5]中明确规定密封件材料中需要重点关注的可提取物包含硬脂酸。因此对药用胶塞中硬脂酸和棕榈酸进行检测十分必要。

目前,检测硬脂酸和棕榈酸的方法主要为衍生化的气相色谱法^[6-7]或气相色谱-质谱联用法^[8]。衍生方法主要以三氟化硼^[9]、氢氧化钾^[10]或氢氧化钠^[11]为催化剂,使硬脂酸和棕榈酸与甲醇发生酯化反应生成硬脂酸甲酯和棕榈酸甲酯,然后通过测定硬脂酸甲酯和棕榈酸甲酯的含量来计算硬脂酸和棕榈酸的含量,前处理操作复杂耗时。近年来也有报道采用无衍生化的气相色谱法^[12]或气相色谱-质谱联用法^[13]直接对硬脂酸和棕榈酸进行检测,其中气相色谱-质谱联用法虽能提高检测的灵敏度,但也存在仪器维护成本高昂的缺点,而气相色谱法^[14-15]的仪器成本则相对较低,应用范围更广泛。

本文参考《化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)》并结合大多数药品为水性、含醇量不高、pH 范围多为 3~10 之间等特点,采用 3 种提取介质(pH 值为 3 的酸性缓冲溶液、pH 值为 10 的碱性缓冲溶液、20% 乙醇溶液)对药用胶塞进行提取研究,建立了一种无衍生化-气相色谱法用于测定药用胶塞提取液中硬脂酸和棕榈酸的检测方法。本方法前处理简单快速,定量准确,为药品与包材相容性试验提供了技术支持。

1 试验部分

1.1 仪器、试剂与材料

GC-2030 气相色谱仪(日本岛津公司); SQP/Quintix224-1CN 电子分析天平(德国赛多利斯公司);电热恒温培养箱(上海森信试验仪器有限公司);LDZX-30KBS 立式高压蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);Lab Dancer 涡旋混合仪(德国 IKA 公司);酸度计(美国梅特勒-托利多公司)。

硬脂酸(>99%)、棕榈酸(>99%)均购于上海安谱实验科技股份有限公司。正己烷(色谱纯)购于霍尼韦尔贸易有限公司;磷酸、氢氧化钠、氯化钾、浓盐酸、磷酸氢二钠和乙醇均为分析纯,购于重庆川东化工(集团)有限公司;市售药用胶塞(分别为 10 个不同厂家生产)。

1.2 标准溶液的配制

分别精密称取各标准品 25 mg(精确至 0.1 mg),置于 25 mL 容量瓶中,加适量正己烷溶解并稀释至刻度,摇匀,作为标准储备液。分别准确移取一定体积的标准储备液,使用正己烷稀释成质量浓度为 5、10、20、50、100、200 mg/L 的标准工作溶液。

1.3 样品前处理

1.3.1 提取介质的配制

由于大多数药品为水性、含醇量不高,pH 范围多为 3~10 之间,故参考《化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)》中提取介质的选择原则,选取以下 3 种提取介质,其配制方法如下:(1)pH 值为 3 的酸性缓冲液。配制 0.2 mol/L 氯化钾溶液,使用 0.2 mol/L 盐酸调节 pH 至 3±0.1。(2)pH 值为 10 的碱性缓冲液。配制 0.2 mol/L 磷酸氢二钠溶液,使用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 10±0.1。(3)20% 乙醇溶液。乙醇和超纯水按照体积比为 2:8 混合。

1.3.2 胶塞的提取

将药用胶塞剪成小碎片(单个碎片的直径≤0.3 cm),称取 20 g(精确至 0.1 mg)置于带盖试剂瓶中,加入 100 mL 提取介质,加盖密封,按照表 1 中的条件对胶塞进行提取,冷却至室温,过滤即得胶塞的提取液。同时进行空白试验(不加入胶塞,其余操作步骤均同胶塞的提取),得到空白提取液。

表 1 提取条件和使用设备

Table 1 Extraction conditions and equipment

提取介质	试验温度/℃	加热时间/h	使用设备
酸性缓冲液 (pH为3)	121	2	立式高压蒸汽灭菌器
碱性缓冲液 (pH为10)	121	2	立式高压蒸汽灭菌器
20%乙醇溶液	60	24	电热恒温培养箱

1.3.3 胶塞提取液的检测

准确移取 2.0 mL 提取液于 10 mL 比色管中,采用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液或 10% 磷酸溶液调节 pH 至 6~7,再加入 2.0 mL 正己烷,充分涡旋振荡萃取后静置分层,取上层清液供气相色谱分析。

1.4 色谱条件

色谱柱:DB-FFAP(30 m×0.25 mm×0.25 μm)石英毛细柱;进样口温度:250 ℃;进样量:1 μL;分流

比:20:1;升温程序:初始温度150℃,保持3min,60℃/min升温至240℃,保持13.5min;FID检测器温度:250℃。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱的选择

本文采用5 mg/L硬脂酸和棕榈酸的混合标准工作溶液分别考察了弱极性色谱柱HP-5(30 m×0.32 mm×0.25 μm)、中等极性色谱柱DB-17(30 m×0.32 mm×0.25 μm)、强极性色谱柱DB-WAX(30 m×0.32 mm×0.25 μm)和硝基对苯二甲酸改性的强极性色谱柱DB-FFAP(30 m×0.25 mm×0.25 μm)对分离效果的影响,结果如图1所示。结果表明,使用HP-5色谱柱和DB-17色谱柱时,硬脂酸和棕榈酸的色谱峰严重拖尾。使用DB-WAX色谱柱时,硬脂酸和棕榈酸的响应很低。使用DB-FFAP色谱柱时,由于该色谱柱的固定相具有酸性修饰基团,可减少有机酸类化合物的吸附且增加挥发性自由酸样品的容量,从而使硬脂酸和棕榈酸的峰形对称且响应强度更佳。因此最终选择DB-FFAP(30 m×0.25 mm×0.25 μm)色谱柱对硬脂酸和棕榈酸进行分离。

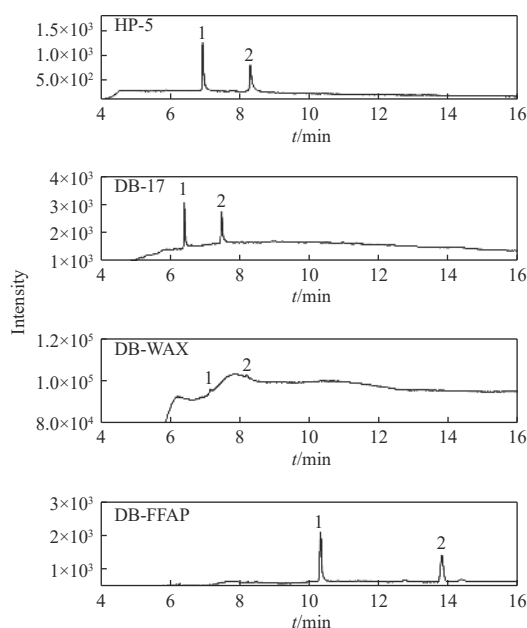


图1 不同色谱柱对硬脂酸和棕榈酸分离效果的影响
(1) 棕榈酸, (2) 硬脂酸

Fig. 1 Effects of different chromatographic columns on separation of stearic acid and palmitic acid

2.2 色谱条件的优化

硬脂酸和棕榈酸的沸点分别约为361℃和

341℃,相对较高,因此其在色谱柱上的保留较强,为节省分析时间,宜选用较高的初始柱温。另一方面,当初始柱温小于溶剂(正己烷)的沸点(69℃)时,溶剂的凝结会使待测组分得以浓集,从而改善峰形并提高响应强度。本文考察了初始柱温分别为50、100、150℃条件下,硬脂酸和棕榈酸的分离效果和响应强度,结果如图2所示。由图2可以看出,随着初始柱温的升高,目标峰的保留时间明显提前,硬脂酸和棕榈酸的分离度未明显下降,棕榈酸的峰强度虽有下降,但不明显,因此最终选择的初始柱温为150℃。

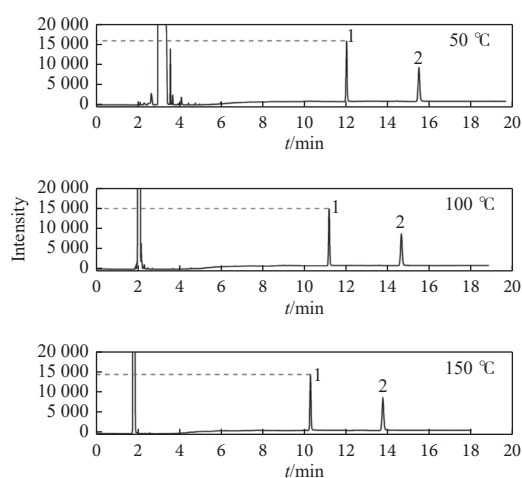


图2 不同初始柱温对硬脂酸和软脂酸分离效果和响应强度的影响
(1) 棕榈酸, (2) 硬脂酸

Fig. 2 Effects of different initial column temperatures on separation efficiency and response intensity of stearic acid and palmitic acid

2.3 萃取溶剂的选择

分别考察了3种不同极性的萃取溶剂(正己烷、二氯甲烷和乙酸乙酯)对硬脂酸和棕榈酸的回收率的影响,每组试验平行测定6次。结果表明,萃取溶剂的极性对目标物的回收率影响不大。其中,二氯甲烷的密度比水大,萃取之后有机层在下层,导致提取有机层时容易取到水相。相同条件下乙酸乙酯在水中的溶解度比正己烷大很多,因此采用乙酸乙酯进行萃取后取的有机相里可能存在较多的水分,从而影响色谱柱的使用寿命。因此,最终选择正己烷为萃取溶剂。

2.4 线性关系

按照“1.2”配制硬脂酸和棕榈酸的系列标准

工作溶液,在最优的条件下上机测试,以各待测物的质量浓度为横坐标(x , mg/L),对应的峰面积为纵坐标(y)进行线性回归,建立线性回归方程,结果如表 2 所列.由表 2 可见,各待测物在各自浓度范围内线性良好,线性相关系数 r 均大于 0.999 00.

2.5 检出限、定量限、回收率与标准偏差

选取 3 种空白提取液分别加标,按照“1.3.3”进行前处理后上机测试,分别以信噪比($S/N=3, 10$)确定各待测物的方法检出限(LOD)和方法定量限(LOQ).选取 3 种空白提取液分别进行 3 个浓度水平的加标试验,每个浓度水平进行 6 次试验.结果如表 3 所列,不同提取液介质中硬脂酸和棕榈酸的

LOD 为 1.0~1.5 mg/L, LOQ 为 3.0~5.0 mg/L.各待测物的平均加标回收率范围为 97.6%~100.5%,相对标准偏差(RSD)范围为 0.4%~2.3%,表明该方法具有良好的准确度与精密度,能满足实际检测要求.

表 2 线性方程、线性相关系数和线性范围

Table 2 Linear equations, linear correlation coefficients and linear ranges

化合物	线性方程	r	线性范围/(mg/L)
棕榈酸	$y=1\ 069.88x-2\ 539.03$	0.999 54	5~200
硬脂酸	$y=1\ 004.81x-3\ 128.35$	0.999 49	5~200

表 3 检出限、定量限、加标回收率和相对标准偏差 ($n=6$)

Table 3 Limit of detection, limit of quantitation, spiked recovery and relative standard deviation ($n=6$)

化合物	提取介质	加标质量 浓度/(mg/L)	测得质量 浓度平均值/(mg/L)	平均 回收率/%	相对 标准偏差/%	检出限/ (mg/L)	定量限/ (mg/L)
棕榈酸	酸性缓冲液(pH为3)	5.00, 50.00, 200.00	4.93, 50.10, 198.20	98.6, 100.2, 99.1	0.9, 0.6, 0.5	1.0	3.0
硬脂酸			4.91, 49.80, 198.00	98.2, 99.6, 99.0	1.2, 0.7, 0.4	1.5	4.6
棕榈酸	碱性缓冲液(pH为10)	5.00, 50.00, 200.00	4.93, 49.95, 200.20	98.5, 99.9, 100.1	1.0, 0.8, 0.6	1.1	3.5
硬脂酸			4.93, 50.25, 199.60	98.6, 100.5, 99.8	1.3, 0.9, 0.5	1.4	5.0
棕榈酸	20% 乙醇溶液	5.00, 50.00, 200.00	4.90, 49.60, 198.20	98.0, 99.2, 99.1	2.0, 1.0, 1.3	1.0	3.2
硬脂酸			4.88, 49.50, 198.40	97.6, 99.0, 99.2	2.3, 1.5, 1.0	1.5	5.0

2.6 实际样品检测

采用本方法(无衍生化)和中国药典(2020 年版四部)中的衍生化方法,分别对 10 种市售药用胶塞中棕榈酸和硬脂酸的 3 种提取液进行检测.其中,有 2 种胶塞的碱性缓冲液(pH 为 10)提取液检出棕榈酸,1 种胶塞的和 20% 乙醇提取液检出硬脂酸和棕榈酸,检出浓度如表 4 所列.结果表明,2 种方法

的检测结果无显著性差异.

选取 3 种不同药液(pH 分别为 3.3、6.2、8.0)分别对表 4 中的 2 号胶塞进行提取,并对提取液进行检测,结果均为未检出.这表明胶塞中的棕榈酸和硬脂酸向药品中迁移的可能性较小.但是,在药品的保质期内,胶塞与药品会长期接触,因此胶塞中的棕榈酸和硬脂酸可能会缓慢迁移至药品中.因此,为从严控风险,需要在药品稳定性试验中关注棕榈酸和硬脂酸的迁移量.

表 4 实际样品中硬脂酸和棕榈酸检出结果

Table 4 Detected result of stearic acid and palmitic acid in real samples

阳性样品 序号	化合物	提取介质	/(mg/L)	
			无衍生化 方法	衍生化 方法
1	棕榈酸	碱性缓冲液(pH为10)	4.2	4.0
	硬脂酸		未检出	未检出
2	棕榈酸	20% 乙醇	3.5	3.5
	硬脂酸		1.5	1.6
3	棕榈酸	碱性缓冲液(pH为10)	2.9	3.1
	硬脂酸		未检出	未检出

3 结论

本文通过对色谱柱、初始柱温和萃取溶剂的优化,建立了一种无衍生化-气相色谱法测定药用胶塞提取液中硬脂酸和棕榈酸的检测方法.本方法前处理简单快速,定量准确,为保证药品包装材料的安全使用提供了技术手段.

参考文献:

[1] 晏菊姣,黄金秋,陈蓉.气相色谱法测定注射用艾司

- 奥美拉唑钠包装用覆膜丁基胶塞中相关成分的迁移量[J]. *中国药业*, 2022, 31(12): 91-94. [YAN Ju-jiao, HUANG Jin-qiu, CHEN Rong. Migration determination of related components in film-coated butyl rubber stopper for packaging of esomeprazole sodium for injection by GC[J]. *China Pharmaceuticals*, 2022, 31(12): 91-94.]
- [2] 魏雪峰, 宋大龙, 苏俊杰, 冯莺. 硬脂酸用量对天然橡胶性能的影响机理分析[J]. *弹性体*, 2018, 28(6): 6-9. [WEI Xue-feng, SONG Da-long, SU Jun-jie, FENG Yin. Effect of amount of stearic acid on properties of natural rubber[J]. *China Elastomerics*, 2018, 28(6): 6-9.]
- [3] 马艳, 何小玲, 黄武平, 余秋玲, 牟琼. 冻干粉针用溴化丁基胶塞中溴化物的迁移及安全性评价[J]. *分析测试技术与仪器*, 2021, 27(4): 286-291. [MA Yan, HE Xiao-ling, HUANG Wu-ping, YU Qiu-ling, MOU Qiong. Migration and safety evaluation of bromide in bromobutyl rubber stopper for freeze-dried powder injection[J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2021, 27(4): 286-291.]
- [4] Michael M. Hoffmann, Hubert Scharnagl, Wolfgang Köster, Karl Winkler, Heinrich Wieland, Winfried März Apolipoprotein E1 Baden (Arg¹⁸⁰→Cys) A new apolipoprotein E variant associated with hypertriglyceridemia[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2001, 303: 41-48.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)[S]. 2018.
- [6] 尹翔, 霍东风, 仲昭庆. 气相色谱法测定卤化丁基胶塞中棕榈酸和硬脂酸的含量[J]. *黑龙江医药*, 2018, 31(5): 949-951. [Yin Xiang, Huo Dong-feng, Zhong Zhao-qing. Determination of palmitic acid and stearic acid in halogenated butyl rubber stopper with GC method[J]. *Heilongjiang Medicine Journal*, 2018, 31(5): 949-951.]
- [7] 谢兰桂, 赵霞, 王峰, 侯玉磊, 李靖, 孙会敏. 药用卤化丁基胶塞中脂肪酸类物质含量的测定[J]. *塑料科技*, 2014, 42(9): 102-104. [XIE Lan-gui, ZHAO Xia, WANG Feng, HOU Yu-lei, LI Jing, SUN Hui-min. Determination of fatty acids in rubber stoppers[J]. *Plastics Science and Technology*, 2014, 42(9): 102-104.]
- [8] 杨振, 郑敏燕, 魏永生. 迎春花脂肪酸成分的GC/MS分析[J]. *应用化工*, 2006, 35(4): 307-315. [YANG Zhen, ZHENG Min-yan, WEI Yong-sheng. Study on fatty acid composition in jasminum nudiflorum lindl by GC/MS[J]. *Applied Chemical Industry*, 2006, 35(4): 307-315.]
- [9] 甘永琦, 朱斌. 乳酶生菌种脂肪酸组分的GC-MS检测分析[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(12): 2145-2153. [GAN Yong-qí, ZHU Bin. GC-MS determination of fatty acids in lactasin strain[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2017, 37(12): 2145-2153.]
- [10] 祝伟霞, 袁萍, 张丽, 杨冀州, 刘亚凤, 张丹, 孙武勇. 气相色谱同位素比质谱测定不同产地鱼油中5种不饱和脂肪酸碳同位素比值[J]. *分析试验室*, 2015, 34(11): 1276-1280. [ZHU Wei-xia, YUAN Ping, ZHANG Li, YANG Ji-zhou, LIU Ya-feng, ZHANG Dan, SUN Wu-yong. Chinese Journal of Analysis Laboratory, 2015, 34(11): 1276-1280.]
- [11] 胡梦玲, 张帅, 方益, 方双琪, 张小军. 溶剂萃取-柱前衍生-气相色谱法测定南极磷虾中脂肪酸组成和含量[J]. *分析试验室*, 2019, 38(5): 569-574. [HU Meng-ling, ZHANG Shuai, FANG Yi, FANG Shuang-qi, ZHANG Xiao-jun. Determination of fatty acid content in euphausia superba by solvent extraction-pre-column derivatization-gas chromatography[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2019, 38(5): 569-574.]
- [12] 韩海燕, 吴红洋, 张璞, 李莎, 曹汐, 张帆, 范能全. 气相色谱法测定药用胶塞中游离棕榈酸和硬脂酸的方法改进[J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(11): 2024-2030. [HAN Hai-yan, WU Hong-yang, ZHANG Pu, LI Sha, CAO Xi, ZHANG Fan, FAN Neng-quan, An improved method for the determination of free palmitic acid and stearic acid in medical rubber stopper by GC[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2021, 41(11): 2024-2030.]
- [13] 余秋玲, 张清, 陆嘉莉, 邱月, 张永梅, 陈豪. 无衍生化-气相色谱-质谱联用法测定药用溴化丁基胶塞中硬脂酸和软脂酸的可提取量和迁移量[J]. *分析试验室*, 2021, 40(4): 469-473. [YU Qiu-ling, ZHANG Qing, LU Jia-li, QIU Yue, ZHANG Yong-mei, CHEN Hao. Determination of extractable amount and migration amount of stearic acid and palmitic acid in medicinal brominated butyl rubber plug by nonderivative GC-MS[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2021, 40(4): 469-473.]
- [14] 张佳晨, 王晋宇, 丁尤. 气相色谱-电子捕获检测器法检测水中氟乐灵[J]. *分析测试技术与仪器*, 2021, 27(4): 309-313. [ZHANG Jia-chen, WANG Jin-yu, DING You. Determination of trifluralin in water by gas chromatography with electron capture detector[J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2021, 27(4): 309-313.]
- [15] 肯生叶, 段勤, 苏丹丹, 杨屹, 田飞宇, 杨雪燕. 气相色谱法测定烟草浸膏中的烟碱[J]. *分析测试技术与仪器*, 2022, 28(6): 205-209. [KEN Sheng-ye, DUAN Qin, SU Dan-dan, YANG Yi, TIAN Fei-yu, YANG Xue-yan. Determination of nicotine in tobacco concrete by gas chromatography[J]. *Analysis and Testing Technology and Instruments*, 2022, 28(6): 205-209.]