doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2023.01.015

气相色谱法测定胃蛋白酶中丙酮和异丙叉丙酮残留量*

张德伟[1]，袁　林[1]，李洁玉[2]，冉丽娟[1]，曾　珍[1]，郭　娅[1△]

（1. 重庆市万州食品药品检验所，重庆　404000；2. 重庆市三峡医药高等专科学校，重庆　404000）

摘要：目的　建立测定胃蛋白酶原料药中丙酮和异丙叉丙酮溶剂残留量的气相色谱法。**方法**　以纯化水为溶剂制备样品，85 ℃条件下顶空加热30 min；色谱柱为Agilent DB－Wax毛细管柱（30 m×0.25 mm，0.25 μm），程序升温，检测器为火焰离子化检测器，氮气流量为1.0 mL/min，采用外标法定量。**结果**　丙酮、异丙叉丙酮的质量浓度分别在50～400 μg/mL（r=0.999 4）和2～16 μg/mL（r=0.999 0）范围内与峰面积线性关系良好；丙酮和异丙叉丙酮的检测限分别为0.03，0.09 μg/mL，定量限分别为0.10，0.30 μg/mL；精密度试验中，丙酮、异丙叉丙酮峰面积的*RSD*分别为1.85%和2.16%（n=6）；平均加样回收率分别为95.87%和95.00%，*RSD*分别为1.24%和1.90%（n=9）。**结论**　该方法操作简便、结果准确、残留溶剂分离度好、灵敏度高、重复性良好，可用于胃蛋白酶原料药中有机溶剂残留量的检测。

关键词：胃蛋白酶；丙酮；异丙叉丙酮；气相色谱法；溶剂残留量

中图分类号：R927.2；R975　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1006－4931（2023）01－0066－04

Determination of Acetone and Mesityl Oxide Residues in Pepsin by GC

ZHANG Dewei[1], YUAN Lin[1], LI Jieyu[2], RAN Lijuan[1], ZENG Zhen[1], GUO Ya[1]

(1. Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 404000; 2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing, China 404000)

Abstract: Objective　To establish the gas chromatography (GC) method for the determination of acetone and mesityl oxide residues in active pharmaceutical ingredients (APIs) of pepsin. **Methods**　The samples were prepared with purified water as the solvent and heated at 85 ℃ in headspace for 30 min. The chromatographic column was Agilent DB－Wax capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm), the temperature was programmed, the detector was flame ionization detector, the flow rate of nitrogen was 1.0 mL/min, and the external standard method was used for quantitative analysis. **Results**　The linear ranges of acetone and mesityl oxide were 50－400 μg/mL (r=0.999 4) and 2－16 μg/mL (r=0.999 0) respectively. The limits of detection (LOD) of acetone and mesityl oxide were 0.03 μg/mL and 0.09 μg/mL respectively, the limits of quantitation (LOQ) of acetone and mesityl oxide were 0.10 μg/mL and 0.30 μg/mL respectively. In the precision test, the *RSD*s of peak areas of acetone and mesityl oxide were 1.85% and 2.16% (n=6) respectively. The average recoveries of acetone and mesityl oxide were 95.87% and 95.00% with *RSD*s of 1.24% and 1.90% (n=9) respectively. **Conclusion**　The method is simple, accurate, separable, sensitive and repeatable, which can be used for the determination of organic solvent residues in pepsin APIs.

Key words: pepsin; acetone; mesityl oxide; GC; solvent residue

胃蛋白酶又名胃液素，是胃液中主要的蛋白水解酶，能催化具有苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸等的肽键断裂，使大分子的蛋白质分解为小分子多肽[1－2]。胃蛋白酶在消化道中具有非常重要的生理功能，其活性的大小与人体消化道疾病直接相关[3]。目前，国内外对胃蛋白酶的研究主要集中在临床疗效、药理学领域[4－10]，对其质量的研究较少。生产胃蛋白酶的原料主要来源于脊椎动物的胃黏膜，但胃黏膜主细胞分泌的是胃蛋白酶原，胃蛋白酶原在pH 2.0的酸性条件下，N端约有25个氨基酸残基从肽链上水解下来，被激活后才能生成胃蛋白酶。胃蛋白酶的分离技术主要为有机溶剂提取法、盐析法、底物亲和法等，工业生产中的常用方法为有机溶剂提取法，利用胃蛋白酶在不同浓度有机溶剂中的溶解度实现分离，从而获得混合的胃蛋白酶初品。工业生产过程中常用有机溶剂为工业丙酮，丙酮对胃蛋白酶的分辨力相对较高，获得胃蛋白酶粗品的活性较强，且丙酮易被除去，可回收再利用，但反复萃取会增加溶剂的消耗量，同时会造成少部分酶失活，影响收率，甚至会产生新的溶剂杂质[11－15]。现有生产工艺还不能完全除去胃蛋白酶原料中残留的有机溶剂，这是制约该产业发展的一个技术难题。田玉琼等[16]采用单扫描极谱法测定胃蛋白酶中丙酮残留量，但该法对除丙酮以外的其他有机溶剂分离度欠佳，且极谱分析仪普及率低。现行质量标准未对该品种残留溶剂进行全

*基金项目：重庆市药品监督管理局　重庆市科学技术局2021年度重庆市药品科研项目［渝药监〔2021〕30号］；重庆市万州区2020年度科技创新项目［wzstc－2020059］。

第一作者：张德伟，男，大学本科，副主任中药师，研究方向为食品药品质量检测分析，（电子信箱）23616980@qq.com。

△通信作者：郭娅，女，大学本科，主管中药师，研究方向为食品药品质量检测分析，（电子信箱）603725622@qq.com。

面检测[17]。本研究中建立了同时测定胃蛋白酶中丙酮和异丙叉丙酮溶剂残留的气相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

QUINTIX224 - 1CN 型电子天平（赛多利斯科学仪器有限公司，精度为万分之一）；SCI 20D 型超纯水机（重庆科润水处理设备有限公司）；G6500 - CTC 型自动进样器、2010Plus 型气相色谱仪（日本岛津科技有限公司）。

1.2 试药

纯化水（实验室自制）；丙酮（色谱纯，天津市科密欧化学试剂有限公司）；异丙叉丙酮（分析纯，山东西亚化学科技有限公司）；胃蛋白酶样品购于西南地区的 4 个厂家（分别编号为 A，B，C，D），各 2 个批次，随机采样。

2 方法与结果

2.1 色谱条件[18-20]

顶空进样瓶：汽化室温度 85 ℃，汽化时间 30 min；进样口温度：200 ℃；分流 - 不分流进样（SSL）：进样量 1 mL，分流比 25∶1；色谱柱：Agilent DB - Wax 型毛细管色谱柱（30 m × 0.25 mm，0.25 μm）；氮气流量：1.0 mL / min，柱温：程序升温（初始温度 40 ℃，保留时间 7 min，以 10 ℃ / min 的速率升至 80 ℃，再以 25 ℃ / min 的速率升至 200 ℃，保持 5 min）；火焰离子化检测器（FID）：温度 250 ℃，氢气流量 45 mL / min，空气流量 200 mL / min，尾吹氮气流量 25 mL / min。

2.2 溶液制备

取样品 0.3 g，精密称定，置 20 mL 顶空进样瓶中，加纯化水 5 mL，密封，涡旋溶解，即得供试品溶液。取丙酮、异丙叉丙酮对照试剂各适量，精密称定，置 50 mL 容量瓶中，加纯化水稀释并定容，摇匀，制成质量浓度分别为 500，20 μg / mL 的混合对照贮备液。分别精密量取混合对照贮备液 1，2，4，6，8 mL，置 10 mL 容量瓶中，加纯化水稀释并定容，摇匀，即得系列混合对照试剂溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验：精密量取纯化水 5 mL，置 20 mL 顶空进样瓶中，密封，即得空白溶液。取 2.2 项下混合对照试剂溶液、供试品溶液及空白溶液各适量，按 2.1 项下色谱条件进样测定，色谱图见图 1。供试品溶液色谱图中，在与混合对照试剂溶液相应保留时间处有相应色谱峰，空白溶液无干扰，表明方法专属性良好。

线性关系考察：分别精密量取 2.2 项下系列混合对照试剂溶液各 5 mL，置 20 mL 顶空进样瓶中，密封，按 2.1 项下色谱条件进样测定。以质量浓度（X）为横坐标、测得峰面积（Y）为纵坐标进行线性回归，得回归方程 $Y_{丙} = 2\,866.5\,X_{丙} - 8\,289.8$（$r = 0.999\,4$），$Y_{异} = 821.4\,X_{异} - 312.60$（$r = 0.999\,0$）。结果表明，丙酮、异丙叉丙酮质量浓度分别在 50 ~ 400 μg / mL 和 2 ~ 16 μg / mL 范围内与峰面积线性关系良好。

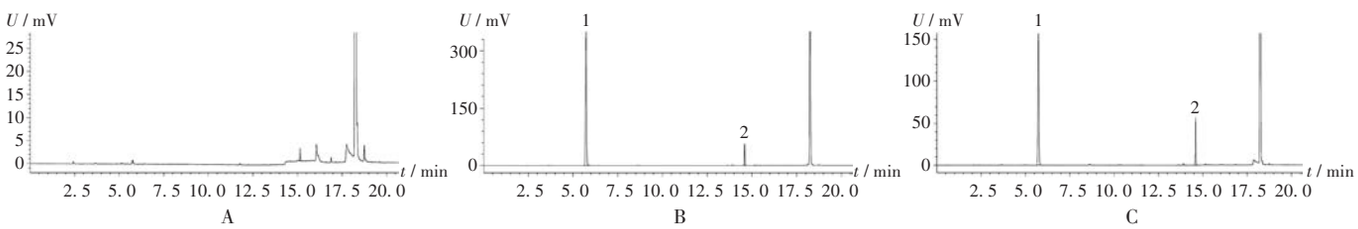
检测限和定量限确定：取 2.2 项下混合对照试剂溶液适量，逐级稀释，按 2.1 项下色谱条件进样测定，按信噪比（S / N）分别为 3，10 的质量浓度计算。结果丙酮、异丙叉丙酮的检测限分别为 0.03，0.09 μg / mL，定量限分别为 0.10，0.30 μg / mL，表明检测灵敏度高。

精密度试验：精密量取 2.2 项下混合对照试剂溶液 10 mL，置 50 mL 容量瓶中，加水稀释并定容，摇匀。精密吸取 5 mL，置 20 mL 顶空进样瓶中，密封。按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积。结果丙酮、异丙叉丙酮峰面积的 *RSD* 分别为 1.85%，2.16%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

加样回收试验：取已知含量的胃蛋白酶样品适量，精密称定，共 9 份，分别精密加入低、中、高质量浓度的混合对照贮备液 1 mL，加纯化水 4.0 mL，按 2.1 项下色谱条件进样测定，并计算加样回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取厂家 A，B，C，D 各 2 批次胃蛋白酶样品适量，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，平行测定 2 次，按峰面积计算各批次样品中有机溶剂丙酮和异丙叉丙酮的残留量，结果见表 2。结果表明，不同厂家生产的胃蛋白酶样品中有机溶剂丙酮和异



1. 丙酮　2. 异丙叉丙酮

A. 空白溶液　B. 混合对照试剂溶液　C. 供试品溶液

图 1　气相色谱图

1. Acetone　2. Mesityl oxide

A. Blank solution　B. Solution of mixed reference reagents　C. Test solution

Fig. 1　GC chromatograms

表1 加样回收试验结果（$n=9$）

Tab. 1 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$(%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
578	11.5	250	10	815	20.6	94.80	91.00				
578	11.5	250	10	811	21.0	93.20	95.00				
578	11.5	250	10	819	20.9	96.40	94.00				
578	11.5	500	20	1 057	30.4	95.80	94.50				
578	11.5	500	20	1 060	30.5	96.40	95.00	95.87	95.00	1.24	1.90
578	11.5	500	20	1 062	30.8	96.80	96.50				
578	11.5	1 000	40	1 548	50.1	97.00	96.50				
578	11.5	1 000	40	1 539	49.7	96.10	95.50				
578	11.5	1 000	40	1 541	50.3	96.30	97.00				

注：A为丙酮，B为异丙叉丙酮。

Note: A refers to acetone, and B refers to mesityl oxide.

丙叉丙酮残留量差异较大。所有胃蛋白酶样品中均检测出了丙酮、异丙叉丙酮残留，丙酮的残留量为1 008～4 692 μg/g，异丙叉丙酮的残留量为31～90 μg/g，表明不同厂家的生产工艺对胃蛋白酶原料残留溶剂有较大影响。

表2 样品中丙酮、异丙叉丙酮溶剂残留量检测结果（μg/g，$n=2$）

Tab. 2 Results of determination of acetone and mesityl oxide residues in samples (μg/g, $n=2$)

厂家批次	丙酮	异丙叉丙酮	厂家批次	丙酮	异丙叉丙酮
A1	1 008	34	C1	3 545	70
A2	1 017	31	C2	3 660	73
B1	2 834	55	D1	4 687	88
B2	2 897	58	D2	4 692	90

3 讨论

胃蛋白酶属亲水性生物酶，在生产过程中先将胃黏膜溶解于一定浓度的盐酸溶液中，再加丙酮沉淀，分离干燥后易形成泡状微粒，残留的有机溶剂很难再挥发除尽。曾考察了以*N*,*N*－二甲基甲酰胺作溶剂的液体进样方式，但其重复性、精密度均较差。本研究中比较了样品溶解密封后，分别置70，80，90 ℃汽化环境中各加热20 min。结果显示，样品置70 ℃加热时，沸点较高的异丙叉丙酮信号响应值较低，检测限大于5 μg/mL；置90 ℃加热时，由于丙酮沸点较低，残留量相对较多，其峰面积响应值太高，而异丙叉丙酮沸点较高，且含量相对较低，不能兼顾两者信号的响应强度；85 ℃顶空加热20 min时，2种有机溶剂的线性关系及回收率均相对良好，样品中有机溶剂的释放浓度能完全满足检测要求，检出率高，响应灵敏，兼顾了各化合物沸点不同的问题。

本研究中采用顶空进样，可避免样品对仪器和色谱柱造成污染，对挥发性有机溶剂的灵敏度更好，降低了样品中其他组分对检测结果的干扰，第1次增加了胃蛋白酶中异丙叉丙酮的检测指标。结果显示，不同厂家的生产工艺存在一定差异，有机溶剂残留量也较大，厂家A生产的胃蛋白酶中丙酮残留量约为0.10%，厂家D约为0.46%。

综上所述，该方法操作简便、结果准确、精密度高、重复性好，可用于胃蛋白酶原料药中有机溶剂残留量的检测。

参考文献

[1] 童耕雷. 实用生物化学与分子生物学词典[M]. 北京：科学出版社，2003：588.

[2] 喻 东. 生物碱对胃蛋白酶的酶学性质及光谱性质的影响[D]. 成都：四川大学，2005.

[3] 邹亚竹，杨朝霞. 胃蛋白酶与反流相关性疾病研究进展[J]. 检验医学与临床，2018，15(22)：3472－3475.

[4] 孟 洁，冯国建，王德望，等. 声带息肉组织胃蛋白酶表达情况对术后疗效的影响[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志，2022，36(1)：14－18.

[5] 刘 杰，肖 翠，邓 利，等. 48例双侧广基型声带息肉患者不同术式疗效的主客观评估[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志，2021，35(2)：160－163.

[6] DOUKAS PG, VAGELI DP, SASAKI CT, et al. Pepsin Promotes Activation of Epidermal Growth Factor Receptor and Downstream Oncogenic Pathways, at Slightly Acidic and Neutral pH, in Exposed Hypopharyngeal Cells [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8)：4275.

[7] LEE YJ, KWON J, SHIN S, et al. Optimization of Saliva Collection and Immunochromatographic Detection of Salivary Pepsin for Point－of－Care Testing of Laryngopharyngeal Reflux[J]. Sensors(Basel), 2020, 20(1)：325.

[8] HUNT EB, SULLIVAN A, GALVIN J, et al. Gastric Aspiration and Its Role in Airway Inflammation[J]. Open Respir Med J, 2018, 12：83.

[9] JOHNSTON N, DETTMAR PW, ONDREY FG, et al. Pepsin: binmarker, mediator, and therapeutic target for reflux and aspiration[J]. Ann N Y Acad Sci, 2018, 1434(1)：282－289.

[10] WANG L, TAN JJ, WU T, et al. Association between Laryngeal Pespsin Levels and the Presence of Vocal Fold Polyps[J]. Otolaryngol Head Neck Surg, 2017, 156(1)：144－151.

[11] 王 莹. 猪胃蛋白酶分离纯化新工艺建立及技术参数研究[D]. 大庆：黑龙江八一农垦大学，2009.

[12] 林 海，但卫华，曾 睿，等. 胃蛋白酶提取猪皮胶原蛋白的工艺优化与过程模拟[J]. 中国皮革，2006(5)：19－22.

[13] 梁贵江，曾茂茂，何志勇，等. 大豆分离蛋白及其不同酶法水解产物对植脂末乳化稳定性的影响[J]. 食品工业科技，2019，40(21)：20－24.

[14] 辛秀兰. 生物分离与纯化技术[M]. 北京：科学出版社，2005：64－65.