

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 30/02

G01N 30/36 G01N 30/40

G01N 30/74



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03148594.4

[43] 公开日 2003 年 12 月 10 日

[11] 公开号 CN 1460854A

[22] 申请日 2003.7.7 [21] 申请号 03148594.4

[71] 申请人 中国科学院长春应用化学研究所
地址 130022 吉林省长春市人民大街 5625 号

共同申请人 吉林省祥东商务咨询有限公司

[72] 发明人 景遐斌 杨立新 王洪喜 奚廷斐
陈学思 于海军 关彦学 郑道铉

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 1 页

[54] 发明名称 医用聚丙烯酰胺水凝胶中残留单体
丙烯酰胺含量分析方法

[57] 摘要

一种医用聚丙烯酰胺水凝胶中残留单体丙烯酰胺含量的分析方法。首先将凝胶用与水相混溶的有机溶剂如丙酮进行沉淀和萃取，并将有机溶剂挥发掉，得到丙烯酰胺的萃取液，然后用高效液相色谱进行分析。该方法的检测下限是 5×10^{-9} g/g，检测物回收率 90% 以上，检测误差 10 - 25%。与现有分析方法相比，具有灵敏度高、操作简单、容易重复、溶剂毒性小、分析成本低等优点，适合于医用聚丙烯酰胺水凝胶的常规质量控制。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种分析医用聚丙烯酰胺水凝胶中残留单体丙烯酰胺含量的方法：首先将凝胶用与水相混溶的有机溶剂进行沉淀和萃取，并将有机溶剂挥发掉，得到丙烯酰胺的萃取液，然后用高效液相色谱进行分析；该方法的检测下限是 5×10^{-9} g/g，检测物回收率90%以上，检测误差10—25%。

2、如权利要求1所述的分析方法，其特征在于，所述与水相混溶的有机溶剂是甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮或乙腈及它们的混合物。

3、如权利要求1所述的分析方法，其特征在于，使用旋转蒸发器来除去萃取液中的有机溶剂，用水流泵或真空泵为蒸发器减压，蒸发器温度控制在0—40℃。

4、如权利要求1所述的分析方法，其特征在于，使用高效液相色谱法进行丙烯酰胺单体的分析，使用C18反相色谱柱和水流动相，使用紫外检测器，检测波长190—200nm。

医用聚丙烯酰胺水凝胶中残留单体丙烯酰胺含量分析方法

技术领域

本发明涉及一种医用聚丙烯酰胺水凝胶中残留单体含量的分析方法。

技术背景

医用聚丙烯酰胺水凝胶是近年出现的一种用于软组织填充的材料，在整形和美容方面有广泛的应用。它是一种水凝胶，整体性和弹性较好，手感和软组织很相似。它可用注射法置入，手术简单，基本无疤痕。材料无毒，生物相容性好，置入人体后，排异反应小，在材料和人体组织之间形成的包膜很薄，且柔软，因而病人感觉良好。由于这些优点，医用聚丙烯酰胺水凝胶受到广大医务工作者和患者的欢迎，从上个世纪90年代以来，国内用医用聚丙烯酰胺水凝胶进行“注射隆胸”的人数超过10万人。主要2个牌号的产品：从乌克兰进口的“英捷尔法勒”和吉林富华医用高分子材料有限公司生产的“奥美定”。据统计，注射隆胸出现并发症的比例大约在1—2%，绝大部分是由于手术不当和感染后处置不当造成的。国家医疗器械主管部门对使用聚丙烯酰胺水凝胶过程中出现的医疗事故特别重视，组织专家逐个进行检查和分析，采取有效措施杜绝重大医疗事故，减少并发症。在这一过程中，聚丙烯酰胺水凝胶的毒性问题，再次引起了主管部门和广大医生和患者的关注。

人所共知，聚丙烯酰胺本身是惰性的和无毒的，但单体丙烯酰胺是世界公认的有毒和致癌物质，主要损伤人的神经系统。因而国际上规定了丙

烯酰胺生产环境中允许的丙烯酰胺最大含量为 $0.03\text{mg}/\text{M}^3$ ，工业和食品用固体聚丙烯酰胺的产品中残留单体的允许含量分别为 0.1% 和 0.01% ，使用聚丙烯酰胺作絮凝剂的饮用水中残留单体的允许含量为 0.5×10^{-9} 。为了测出这些指标，规定了相应的分析方法。

在医用聚丙烯酰胺水凝胶研制和动物、临床试验过程中，逐步形成了以下的共识：残留丙烯酰胺含量在 10^{-7} 以下，对人体没有可以觉察的危害。在这个浓度范围，针对工业和食品用聚丙烯酰胺的分析方法不再适用，用于饮用水的丙烯酰胺分析需要气相色谱（或液相色谱）和质谱，甚至二次串联质谱的联用，有的还要进行溴化和同位素稀释，一般实验室难以实现。医用聚丙烯酰胺水凝胶生产商在申请专利时，都提供了残留单体的检测方法，其中中国专利 ZL-99116009.6 关于残留单体的说法是“参照 GB 12005.5-89 的分析方法，利用气相色谱仪（GC，型号 3700）残留单体含量的实测值为 0.0000016% ”，而 GB 12005.5-89 方法本身的检测范围在 0.01% 以上。中国专利 ZL-94195147.2 用了一大段描述样品萃取和 HPLC 分析方法，概括起来就是：用二次蒸馏水按 100:1 的比例室温浸泡 14-30 天；浸取液室温真空干燥；用 HPLC 分析，色谱柱固定相为特制 C18 柱，流动相为 1:1 的甲醇/水溶液。可见这些方法中，有的不适用于医用水凝胶的单体浓度范围，有的含糊不清，操作任意性太大，有的样品处理方法明显不合理，不适合于凝胶样品，有的使用特制的色谱柱，别人无法重复。所以，建立一个适合于水凝胶样品特点的，一般实验室能够实现的，各实验室间数据能够重复，可以互相比较的测定方法，是当前整顿医用聚丙烯酰胺水凝胶市场，加强对产品的技术管理的迫切需要。

发明内容

本发明的目的是提供一种医用聚丙烯酰胺水凝胶中残留单体丙烯酰胺含量的分析方法。

本发明的方法比目前用于分析工业用和食用聚丙烯酰胺的方法有更高的灵敏度；它的样品处理方法针对水凝胶样品的特点，简单、有效，既能排除聚丙烯酰胺对丙烯酰胺分析的干扰，又有足够的检测物回收率；它使用市场上容易买到的色谱仪和色谱柱，便于推广使用和实验室间数据交流和比较；它不使用一般实验室难以装备的色谱/质谱联用的仪器设备，不采用提高分析灵敏度和选择性的溴化法和同位素稀释法，以便降低分析成本。

为实现上述目的，本发明不采用简单的浸取法来处理样品，而是用与水相混溶的有机溶剂处理凝胶，将交联聚丙烯酰胺从凝胶中沉淀出来，并将残留单体萃取到溶剂之中，实现聚合物和单体的有效分离。这个方法以下简称“沉淀萃取”。操作实践表明：用水来稀释凝胶和浸取单体，即使采用 100:1 的比例，效果也非常不好。原因是聚丙烯酰胺在水中的溶解性太好，溶胀度很高，凝胶在体系中高度分散，用过滤和离心的方法都无法将聚合物和浸取液完全分开。大量水留在凝胶中，残留单体的回收率必然很低；凝胶混入浸取液中，将堵塞 HPLC 进样系统或色谱柱，带来很大麻烦。正是由于这样的原因，国内没有一个单位能重复中国专利 ZL-94195147.2 的分析方法。采用本发明的“沉淀萃取法”，能克服简单水浸取的上述缺点，沉淀出的聚合物和浸取液很容易分离，残留单体回收率高，浸取液中没有凝胶，对后续的 HPLC 分析威胁小。

显然，以上沉淀萃取所用的溶剂，既应与水相混溶，又能使聚丙烯酰胺聚合物沉淀出来。这样的有机溶剂很多，如甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、乙腈及它们的混合物。进一步的选择考虑以下的因素：（1）对后续的 HPLC

分析没有干扰；（2）使聚合物沉淀彻底，容易定量分离；（3）沸点低，易挥发；（4）毒性小；（5）杂质少，易纯制。综合考虑各种因素，丙酮是较好的沉淀萃取剂。

沉淀萃取剂的用量根据沉淀聚合物的需要确定。为了减少溶剂蒸发量，减少在溶剂挥发过程中残留单体的逃逸，在沉淀出聚合物的前提下，使用溶剂越少越好。一般取凝胶体积的1—4倍，以2—3倍为宜。

将浸取液浓缩是样品处理的另一个关键步骤。不浓缩，残留单体的有效浓度太低，HPLC 检出误差大。浓缩条件不适当，会造成残留单体逃逸，降低回收率。本发明使用旋转蒸发器来除去萃取液中的有机溶剂，用水流泵或真空泵为蒸发器减压，优选水流泵；蒸发器温度控制在0—40℃，优选35—40℃。对丙酮来说，2—4小时即可完成一次蒸发，使浸取液的体积减少到凝胶的原始体积以下。多次的回收试验表明，本方法的丙烯酰胺回收率达到90%以上。挥发温度过高，会使回收率下降，甚至下降到50%以下。影响回收率的另一因素是蒸发终点的确定。未知物中残留单体含量在 10^{-8} 以上，蒸发到凝胶原体积即可。含量更低，可进一步蒸发到原体积的1/2，1/3或1/4，以便满足HPLC的分析下限要求。

本发明的HPLC分析仪器和色谱柱条件，参照了EPA—8316方法，使用C18反相色谱柱和水流动相，使用紫外检测器，检测波长190—200nm，优选195nm。同国标GB 12005.4—89相比，色谱柱、固定相、检测波长不同，因而灵敏度有很大提高。所用的仪器和色谱柱，都是一般实验室能够买到的型号，易于普及，便于各实验室间数据交流和比较。

HPLC分析的操作程序和数据处理方法，是色谱分析人员所熟知的，这里不赘述。本发明使用已知浓度的丙烯酰胺的水溶液绘制HPLC标定曲线，浓度范围 10^{-5} — 10^{-8} g/g，从标定曲线上读取浸取液中丙烯酰胺的含量，然

后换算成原始凝胶样品中残留单体的含量。

附图说明：

图 1：丙烯酰胺标样的 HPLC 谱图。

图 2：典型的 HPLC 标定曲线，用 UV 吸收强度对丙烯酰胺浓度双对数作图。

具体实施方式

下面在实施例中给出有关条件试验的结果。

实施例 1：

高效液相色谱分析使用 Waters 公司的 HPLC 仪，型号 LC-10ATVP，配有 WATERS 2487 紫外检测器，使用岛津公司的 Shim-pack VP-ODS 型 C18 反相色谱柱， $\phi 4.6 \times 250\text{mm}$ ，填料为用 ODS (Octadecylsilyl 化合物) 处理过的 SiO_2 微粒，平均直径 $4.6 \mu\text{m}$ ，平均孔径 12nm ，比表面积 $410\text{m}^2/\text{g}$ 。流动相使用二次蒸馏水。柱温 25°C 。使用自动进样器，每次进样 $20 \mu\text{L}$ 。注入样品经过过滤，滤网孔径 $0.46 \mu\text{m}$ 。紫外检测器的检测波长设置在 195nm 。用浙江大学生产的 N2000 色谱工作站控制仪器和读取色谱数据。

用经过重结晶的新鲜丙烯酰胺和二次蒸馏水配制成 6 个浓度的标准溶液，浓度范围 $10^{-5} - 10^{-8} \text{g/g}$ 。用上述 HPLC 仪器和条件进行分析，获得 HPLC 谱图，如图 1 所示。在给定条件下，丙烯酰胺的保留时间约 5.3min 。取基线，读取峰高的 mV 数作为样品的紫外吸收强度，用样品浓度和 UV 吸收强度进行双对数作图，得图 2。可见，在所测定的标样浓度范围内，线性关系很好，回归曲线的方程是 $y=6.9355+0.9373x$ ，线性指数 $R=0.99$ 。由此推断，本方法的检出下限为 $5 \times 10^{-9} \text{g/g}$ 。

实施例 2:

取医用聚丙烯酰胺水凝胶样品越 10g, 准确称重 W_g 。加入 20ml 经纯制的丙酮, 搅拌, 静置 4h。将清液转移到旋转蒸发器中, 水流泵减压, 温度维持 36—40℃。挥发 2h 后液体条件减小到 10ml 以下, 停止旋转蒸馏, 将液体转移至带塞容量瓶中, 准确称取液体重量 W_w 。

用实施例 1 中的 HPLC 分析条件, 进行未知样分析, 由所获得的 UV 检测器读数, 在标定曲线上读出浓缩萃取液中丙烯酰胺的浓度 C_w , 然后用下式计算凝胶样品中残留丙烯酰胺的含量 C_g :

$$C_g = W_w \times C_w / W_g$$

表 1 是 3 个典型样品的检测结果。可见, 它们中的残留单体含量确实有所不同。

表 1 典型凝胶样品中残留丙烯酰胺单体含量

典型样品	残留单体含量, g/g
1	8.1×10^{-8}
2	1.1×10^{-7}
3	2.3×10^{-6}

实施例 3:

取已知浓度的丙烯酰胺标准溶液, 用实施例 2 中的样品处理方法进行处理。目的是考察在萃取液蒸发浓缩的过程中, 未知物丙烯酰胺是否流失。试验结果见表 2。

取已知浓度的丙烯酰胺标准溶液, 加在待测凝胶样品中, 然后按实施例 2 中的样品处理方法进行处理。比较加与不加标准溶液时 HPLC 测定的结果, 见表 2。

表2 样品回收率试验

样 品	检出浓度 (g/g)
丙烯酸胺标准溶液 (1.51×10^{-7})	1.48×10^{-7}
丙酮加入丙烯酸胺标准溶液	1.37×10^{-7}
未知凝胶样品	1.00×10^{-7}
未知凝胶样品中加入丙烯酸胺标准溶液 (1.51×10^{-7})	2.39×10^{-7}

由表2结果可知,在本专利操作条件下,样品回收率约93%,满足医用水凝胶样品分析的要求。

实施例4:

称取10g医用水凝胶样品,按实施例2中的沉淀萃取方法,获得萃取液后,将沉淀出的凝胶用10g二次蒸馏水溶胀至平衡(约6—8小时)后,加入20ml丙酮进行沉淀萃取,得到第二份萃取液。再重复一次,得到第三份萃取液。此3份萃取液分别用旋转蒸发器蒸发,用水流泵为蒸发器减压,蒸发温度控制在36—40℃,蒸发进行到剩余物的体积小于10ml时为止。精确称取剩余液的重量,转移到带塞容量瓶中。用实施例1中的方法进行HPLC分析。表2中对比了沉淀萃取1次、2次和3次的结果。

表3 沉淀萃取次数对比试验

沉淀萃取次数	残留单体浓度测定结果 (g/g)
第1次	1.65×10^{-6}
第2次	5.54×10^{-8}
第3次	未检出

可见，沉淀萃取一次，样品的回收率已相当不错，而耗用的时间，包括沉淀萃取和溶剂挥发在内，不会超过8小时。

实施例 5:

取同一个批号的医用聚丙烯酰胺水凝胶 100g，分成 10 份，按实施例 2 中沉淀萃取方法处理一次，蒸发丙酮到剩余体积小于 10ml。按实施例 1 中的条件，对萃取液进行 HPLC 分析，结果列于表 4。可见，10 次重复试验的误差约 25%。

表 4 重复试验数据

样品编号	丙烯酰胺浓度测定结果 (10^{-8} g/g)
1	1.43
2	1.69
3	1.29
4	0.97
5	2.29
6	1.46
7	0.83
8	0.86
9	1.51
10	1.62
平 均	1.39 ± 0.33

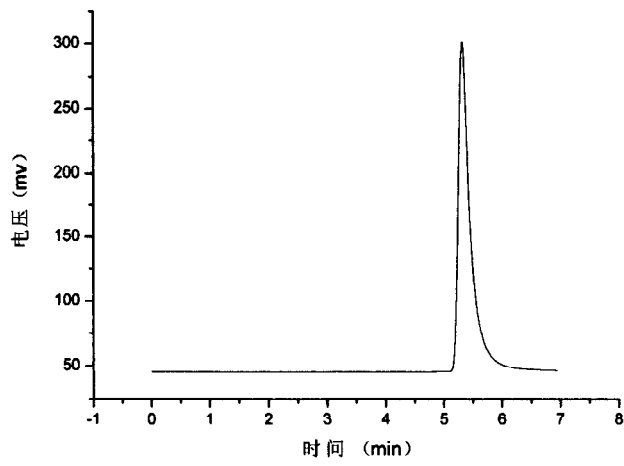


图 1

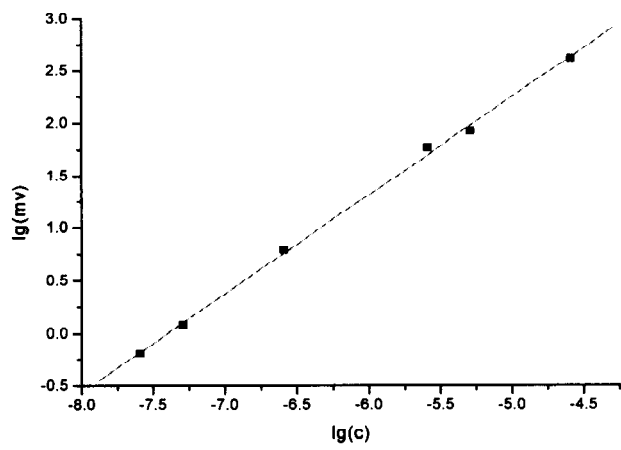


图 2