

气相色谱法测定盐酸氮芥酞含量

李洁*(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

中图分类号 R927.2;R986 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)13-1222-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.13.25

摘要 目的:建立测定盐酸氮芥酞含量的方法。方法:采用气相色谱法,并与原标准方法(滴定法)结果进行比较。色谱柱为DB-225毛细管,氢火焰离子化检测器温度为250℃,采用程序升温,载气为氮气,分流进样,进样口温度为200℃,进样量为1μl。结果:盐酸氮芥检测质量浓度线性范围为0.05~1.00 mg/ml($r=0.9999$),检测限为0.01 μg,平均回收率为101.0%,RSD为0.81%。效期内的4批样品两种方法含量测定结果一致,10批样品两种方法测得含量RSD分别为0.54%、0.69%。结论:本方法操作简便,结果准确可靠。

关键词 盐酸氮芥酞;气相色谱法;含量测定

Content Determination of Chlormethine Hydrochloride Tincture by Gas Chromatography

LI Jie(Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of Chlormethine hydrochloride tincture. METHODS: Gas chromatography was used and compared with previous method (titration method). DB-225 capillary column was used and FID detector temperature was 250 °C by temperature programmed. N₂ was carrier gas with split sampling, inlet temperature of 200 °C and injection volume of 1 μl. RESULTS: The linear ranges of chlormethine hydrochloride were 0.05-1.00 mg/ml ($r=0.9999$). The limit of detection was 0.01 μg, and average recovery rate was 101.0% (RSD=0.81%). Results of content determination of 4 batches of samples in expiration date were same between 2 methods; the average RSDs of 10 batches of samples were 0.54%, 0.69%, respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate and reliable.

KEY WORDS Chlormethine hydrochloride tincture; GC; Content determination

题。另外,氯苯加样回收率只有50%左右,表明样品基质对氯苯影响显著。为了解决这一问题,经过反复摸索,通过在对照品溶液中加入等量的苄达赖氨酸样品,可消除样品基质对氯苯回收率的干扰,对二甲苯、氯苯的检测起到稳定作用。同时,比较研究了苄达赖氨酸加入量对二甲苯、氯苯的影响,确定以1 ml对照品溶液中含苄达赖氨酸0.1 g为宜;并比较取1 ml与5 ml对照品溶液进行顶空进样后的分析效果,结果以取1 ml为佳。综合各项考察结果,以取0.1 g样品、加对照品溶液1 ml作为测定溶液,二甲苯、氯苯进样精密度、线性关系均好,氯苯的加样回收率较好。

3.3 分离条件的选择

前期试验考察了3种不同极性的毛细管色谱柱(HP-5、HP-INNOWAX,规格均为30 m×0.320 mm×0.25 μm;DB-624,规格为50 m×0.53 mm×3.0 μm)对4种有机溶剂的分离效果。结果发现,HP-INNOWAX对对照品与苄达赖氨酸原料药中各有机溶剂分离效果最佳。采用程序升温方法,能使对照品与样品中4种有机溶剂达到完全分离,尤其对二甲苯中的间二甲苯、对二甲苯、乙苯、邻二甲苯的分离良好,可以做到准确定量。因此,最终选用HP-INNOWAX色谱柱作为分析柱。

3.4 顶空平衡温度的选择

依据2010年版《中国药典》(二部)^[1]以水作溶剂顶空加热温度的要求,本试验固定顶空平衡时间30 min,比较了各有机溶剂在平衡温度70、75、80、85、90℃下的的色谱响应值(峰面积)。结果表明,随着平衡温度升高,各溶剂色谱响应值增大,但在平衡温度90℃时,氯苯色谱响应值不增反降,其余溶剂色谱响应值趋于平缓。考虑到水的沸点是100℃,增加温度使水膨胀导致压力升高,易引起顶空瓶耐压和仪器气密性等问题,

而且水汽增大还会缩短聚乙二醇色谱柱的使用寿命,影响测定。故试验选择85℃作为平衡温度。

3.5 顶空平衡时间的选择

平衡时间取决于被测组分子从样品基质到气相的扩散速度。平衡温度不同,平衡所需时间也不同。本试验固定平衡温度为85℃,对平衡时间分别为10、20、30、40、50 min的各溶剂色谱响应值(峰面积)进行了考察。结果表明,当平衡时间超过30 min时,各溶剂响应值基本不再增加,说明在30 min时,各组分在气液两相间达到平衡。故本试验选择30 min作为顶空平衡时间。

本文对苄达赖氨酸原料药中4种有机溶剂残留量检测方法进行了系统研究,通过在对照液中加入样品以消除样品基质的干扰,使所建立的溶剂残留检测方法简便、准确、有效,能够满足实际样品检测的需要。本法适用于生产企业及其有关检验机构对苄达赖氨酸原料药进行质量控制,也为其他生产企业不同合成工艺路线检测有机溶剂残留提供了参考。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[S]. 2010年版. 北京:中国医药科技出版社, 2010:306,307,附录61.
- [2] 孙悦,王卫,唐素芳. 顶空气相色谱法测定盐酸帕罗西汀中残留的有机溶剂及基质效应考察[J]. 药物分析杂志, 2010,30(5):963.
- [3] 许莉勇. 顶空气相色谱法测定咪唑莫特中有机溶剂残留量[J]. 药物分析杂志, 2010,30(6):1084.
- [4] 叶海青,傅应华. 毛细管气相色谱法测定丙酸倍氯米松中3种有机溶剂残留量[J]. 中国药房, 2010,21(13):235.
- [5] 孙红亚,朱琦峰,傅应华. 顶空毛细管气相色谱法测定长春西汀中的残留溶剂[J]. 中国药房, 2011,22(45):4278.

(收稿日期:2012-05-23 修回日期:2012-07-23)

* 副主任药师。研究方向:化学药物分析。电话:0371-63388290。
E-mail: zhanglujieliying@sina.com

盐酸氮芥酐为盐酸氮芥的无水乙醇溶液,临床上主要用于治疗白癜风^[1-2]。国家食品药品监督管理局化学药品地方标准上升国家标准第十五册^[3]收录的含量测方法为碘滴定法。根据国家药典委员会“化学药品质量标准提高工作计划”安排,拟对该制剂质量标准进行提高。本文参照卫生部化妆品卫生规范(2007年版)育发类氮芥检测方法^[4],采用气相色谱法测定盐酸氮芥酐含量,结果表明该法具有简便易行、准确快速、专属性强的特点;并采用该方法对自制盐酸氮芥溶液进行了稳定性考察,结果表明该溶液在高温和光照下易降解,宜在低温避光条件下保存。

1 材料

6890气相色谱仪、氢火焰离子化检测器(FID)、7693自动进样器(美国Agilent公司);GC-2010Plus气相色谱仪、AOC-5000自动进样器、LC solution色谱工作站(日本岛津公司);AX205DR电子天平(瑞士Mettler-toledo公司)。

盐酸氮芥对照品(批号:081100030,纯度:99.8%)、盐酸氮芥酐(批号:100300040、100300050、100400010、100400020、100400030、100400040、110900020、111000020、120100020、120200020,规格均为:25 mg:50 ml)均由河南天方药业股份有限公司提供;无水乙醇为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:DB-225毛细管柱(30 m×0.53 mm, 1.0 μm);柱温:采用程序升温:135 ℃维持1 min,再以8 ℃/min升温至160 ℃维持5 min;FID温度:250 ℃;载气:氮气;流速:3.0 ml/min;分流进样,分流比:5:1;进样口温度:200 ℃;进样量:1 μl。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液。精密称取60 ℃减压干燥至恒质量的盐酸氮芥对照品约12.5 mg,置于25 ml量瓶中,用无水乙醇溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.2.2 空白溶液。即无水乙醇。

2.2.3 供试品溶液。取样品即为供试品溶液。

2.2.4 系统适用性试验。精密量取对照品溶液和供试品溶液各1 μl,分别注入气相色谱仪。结果,盐酸氮芥理论板数为54 685,与溶剂(无水乙醇)分离度为21.9,色谱见图1A、B、C。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性试验。精密称取以五氧化二磷为干燥剂、60 ℃减压干燥至恒质量的盐酸氮芥对照品0.125 5 g,置于100 ml量瓶中,加无水乙醇适量,超声使盐酸氮芥溶解,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,作为贮备液;分别精密量取0.4、2.0、4.0、6.0、8.0 ml置于10 ml量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,为线1~线5溶液,进样。以峰面积(A)对质量浓度(c, mg/ml)绘制标准曲线,得盐酸氮芥回归方程 $A=766\ 802.15c-12\ 787.11$ ($r=0.999\ 9$),结果表明,盐酸氮芥检测质量浓度线性范围为0.05~1.00 mg/ml。

2.3.2 精密度试验。精密吸取对照品溶液1 μl,于日内连续进样6次,记录峰面积,测得日内RSD为0.31%;连续5 d(每日1次)进样,记录峰面积,测得日间RSD为3.59%。结果表明盐酸氮芥日内精密度良好,日间精密度较差,原因为该溶液放置4 d即产生降解产物所致。

2.3.3 重复性试验。取同一批次样品(批号:100300040),进样6次,测定峰面积,分别计算盐酸氮芥含量,结果RSD为

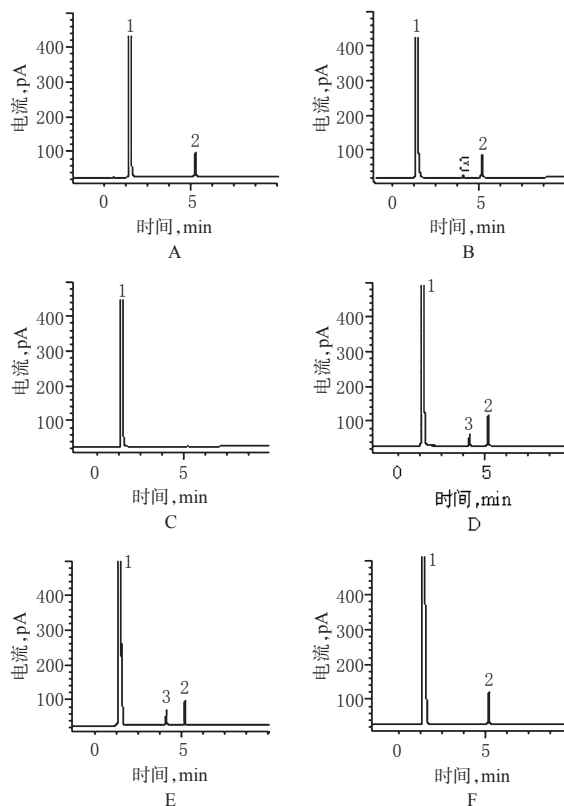


图1 气相色谱图

A. 对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 空白溶液; D. 自然光照射10 d溶液; E. 60 ℃放置10 d溶液; F. 4 ℃放置10 d溶液; 1. 无水乙醇; 2. 盐酸氮芥; 3. 杂质 I

Fig 1 GC chromatograms

A. reference solution; B. sample solution; C. blank solution; D. solution by natural light for 10 days; E. solution placing for 10 days at 60 ℃; F. solution placing for 10 days at 4 ℃; 1. anhydrous ethanol; 2. chlormethine hydrochloride; 3. impurity I

0.11%, 表明方法重复性好。

2.3.4 稳定性试验。取对照品溶液,分别在4、6、9、12、26、46 h时测定峰面积,结果RSD为1.1%,表明样品在46 h内稳定。

2.3.5 检测限。精密量取“2.3.1”项下线1溶液2 ml,置于10 ml量瓶中,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀;精密量取1 μl注入气相色谱仪,当信噪比为3时,检测限为0.01 μg。

2.3.6 干扰试验。取无水乙醇进样,在盐酸氮芥出峰位置处未检出色谱峰,表明该溶剂不干扰测定,见图1C。

2.3.7 回收率试验。精密称取盐酸氮芥对照品约10、12.5、15 mg各3份,分别置于25 ml量瓶中(相当于处方量80%、100%、120%),加无水乙醇适量,超声使盐酸氮芥溶解,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀。各进样1 μl测定,计算3个水平回收率。结果平均回收率为101.0%,RSD为0.81%,详见表1。

2.3.8 耐用性。分别用同一根色谱柱在两台不同品牌气相色谱仪测定10批样品含量。结果两台色谱仪含量测定结果一致,表明该方法耐用性良好,详见表2。

2.4 样品含量测定

取10批样品,在上述色谱条件下进样分析,以峰面积按外标法计算含量,并与原滴定法结果比较。结果平均RSD值分别为0.54%、0.69%,详见表3。

表1 回收率试验结果($n=9$)Tab 1 Results of recovery tests($n=9$)

加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%
10.00	10.07	100.7		
10.52	10.53	100.1		
9.99	10.00	100.1		
12.81	12.96	101.2		
13.44	13.47	100.2	101.0	0.81
12.49	12.65	101.3		
15.47	15.82	102.3		
15.84	16.16	102.0		
15.63	15.68	100.3		

表2 耐用性试验结果($n=4$)Tab 2 Results of serviceability tests($n=4$)

样品批号	含量,%	
	Agilent 6890气相色谱仪	岛津GC-2010Plus气相色谱仪
100300040	93.8	93.3
100300050	94.6	93.6
100400010	84.0	84.6
100400020	87.5	87.8
100400030	92.5	91.2
100400040	90.0	89.9
110900020	99.7	101.9
111000020	102.0	102.7
120100020	107.5	107.3
120200020	108.6	108.5

表3 两种方法测定盐酸氮芥酞的含量结果比较($n=4$)Tab 3 Comparison of content results of Chlormethine hydrochloride tincture by 2 kinds of methods($n=4$)

样品批号	气相色谱法		滴定法	
	含量,%	RSD,%	含量,%	RSD,%
100300040	93.8	0.11	95.9	0.68
100300050	94.6	0.48	98.0	0.93
100400010	84.0	0.77	94.0	0.85
100400020	87.5	0.57	93.5	0.67
100400030	92.5	0.34	95.6	0.42
100400040	90.0	0.29	95.8	0.39
110900020	99.7	0.52	101.7	0.64
111000020	102.0	1.16	102.7	0.79
120100020	107.5	0.73	108.1	0.82
120200020	108.6	0.41	109.2	0.66

表3结果显示,已过有效期(有效期为2年)的6批样品(即编号为100开头的)GC法测定结果较滴定法结果偏低,生产日期较近的4批样品(即编号为11、12开头的)两种测定方法结果基本一致。

2.5 自制溶液稳定性

按照处方量制备盐酸氮芥溶液(本所制备,质量浓度0.5 mg/ml),分别置于自然光、4℃、60℃、暗处、室温条件下各放置5、10、30 d后测定含量,结果见表4;前3种条件下溶液色谱见图1D、E、F。

另取盐酸氮芥原料药在60℃放置5、10、30 d后分别制成供试品溶液测定含量,结果未见明显变化,也未产生降解产物,表明原料药较稳定;而表4结果表明盐酸氮芥溶液在光照和高温下易降解,在避光和低温下较稳定。

3 讨论

盐酸氮芥酞含量测定原方法为:样品加入碳酸氢钠后,精

表4 稳定性试验结果(含量,%)

Tab 4 Results of stability test(content,%)

时间,d	强光	暗处	室温	4℃	60℃
0	98.8	98.8	98.8	98.8	98.8
5	95.1	97.7	95.7	97.7	75.3
10	93.8	96.7	95.1	97.7	73.2
30	90.6	94.9	93.2	96.5	57.8

密加入硫代硫酸钠滴定液,在(25±2)℃静置2.5 h,盐酸氮芥在碳酸氢钠液(pH 8)中,生成1-甲基-1-(β-氯乙基)-吡丙啶鎓离子^[5],再与硫代硫酸钠反应生成氮芥的本提盐(Bunte salt),用碘滴定液滴定剩余的硫代硫酸钠,加入淀粉指示液,微过量的碘与淀粉显蓝色为终点。为消除测定误差,滴定结果用空白试验校正。经与现方法比较,原方法测定结果受实验室温度影响较大^[6],且专属性不强;而现方法操作简便、专属性强,结果准确可靠,能将降解产物与主成分有效分离并能真实反映样品含量。

盐酸氮芥具有引湿性,易结块,配制对照品溶液前应将其置于玛瑙乳钵中研细,以五氧化二磷为干燥剂60℃减压干燥至恒质量再称样,以免因所含水分不均匀造成测定误差。

白癜风是临床上常见的获得性色素脱失性皮肤病,目前临床上的治疗方法很多。盐酸氮芥酞为治疗白癜风的常用药物,该药物经渗入皮肤后形成乙烯基胺基,与巯基起作用,激活、加速黑素细胞产生黑色素^[7]。而自制盐酸氮芥溶液室温放置4 d即开始降解,在光照和高温下降解加速,由于试验条件所限,无法将降解产物定性。有盐酸氮芥酞致过敏反应的文献报道^[8-9],但其是否与该溶液降解产物有关还有待进一步研究。

盐酸氮芥酞说明书标注贮藏条件为密封避光保存,包装为棕色玻璃瓶。该包装已起到避光作用,但笔者通过光照和温度的影响因素试验,发现温度对其稳定性影响更大。建议该制剂冷藏保存,并进一步考察样品的有效期。

参考文献

- [1] 张平,杨风贤.盐酸氮芥局部外涂治疗白癜风疗效观察[J].山西临床医药杂志,1999,8(4):287.
- [2] 赵建林.氮芥制剂治疗白癜风135例临床观察[J].临床皮肤科杂志,1996,25(5):284.
- [3] 国家药品监督管理局.国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第十五册[S].北京:化学工业出版社,2003:161.
- [4] 卫生部.化妆品卫生规范[S].2007年版.北京:军事医学科学出版社,2007:244.
- [5] 毛文仁.药品检定方法原理[M].成都:西南交通大学出版社,1989:265.
- [6] 李有富,李魏林,刘小敏.实验室温度对盐酸氮芥含量测定的影响[J].中国医药导报,2011,8(23):61.
- [7] 全小荣,郭奕好,唐惠芬.梅花针联合窄谱中波紫外线、盐酸氮芥酞治疗白癜风25例临床观察[J].中国中西医结合皮肤性病学期刊,2009,8(5):306.
- [8] 刘洪,王润娟,刘隆玲.外用盐酸氮芥酞致过敏反应1例[J].成都医学院学报,2008,3(1):15.
- [9] 张桦.氮芥治疗白癜风中出现过敏的处理[J].皮肤病与性病,1993,15(1):31.

(收稿日期:2012-05-31 修回日期:2012-06-15)