

柱前衍生化 HPLC 法测定异烟肼注射液中游离肼的含量

李滋¹, 于润芳², 侯宁², 刘帅¹, 王卫¹

(1. 天津市药品检验所, 天津 300070; 2. 天津金耀药业有限公司, 天津 300457)

摘要 目的: 建立柱前衍生化高效液相色谱法测定异烟肼注射液中游离肼含量。**方法:** 以苯甲醛为衍生化试剂, 将游离肼衍生化为苯甲醛吡嗪, 然后进行高效液相色谱测定。采用 Ultimate XB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 乙二胺四乙酸二钠溶液 - 乙腈 (30:70), 流速 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 310 nm, 柱温 40 °C。**结果:** 游离肼质量浓度在 2.5 ~ 100 μg · mL⁻¹ 范围内与其衍生物的峰面积呈良好线性关系, 在低、中、高 3 个添加水平范围内的平均回收率为 96.9%~101.0%, RSD 在 0.2%~3.0% 之间, 游离肼的检出限为 0.5 μg · mL⁻¹, 定量限为 2.5 μg · mL⁻¹。3 个批次样品的测定结果分别为 0.014%、0.043% 和 0.095%。**结论:** 本文方法为异烟肼注射液的质量控制提供了有效的检测方法。

关键词: 游离肼; 降解物; 致癌杂质; 异烟肼注射液; 雷米封; 抗结核药物; 合成抗菌药; 苯甲醛; 苯甲醛吡嗪; 高效液相色谱法

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793 (2017) 02-0316-04

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.02.19

Determination of free hydrazine in isoniazid injection by HPLC with precolumn derivatization

LI Zi¹, YU Run-fang², HOU Ning², LIU Shuai¹, WANG Wei¹

(1. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Kingyork Pharmaceuticals Co., Ltd., Tianjin 300457, China)

Abstract Objective: To develop an HPLC method for determination of free hydrazine in isoniazid injection by precolumn derivatization. **Methods:** This method is based on precolumn derivatization with benzaldehyde to form benzaldehyde azine. Welch Ultimate XB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase consisted of 0.1% EDTA-acetonitrile (30:70) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the detection wavelength was 310 nm, and the column temperature was 40 °C. **Results:** The calibration curve of free hydrazine showed good linearity in the ranges of 2.5-100 μg · mL⁻¹. The average recoveries were 96.9%-101.0% with RSDs of 0.2%-3.0% at three spiked levels. The limit of detection was estimated to be 0.5 μg · mL⁻¹, and the limit of quantification was 2.5 μg · mL⁻¹. The contents of free hydrazine in three batches of samples were 0.014%, 0.043% and 0.095%, respectively. **Conclusion:** Our study provides an effective method for the quality control of isoniazid injection.

Keywords: free hydrazine; degradation; carcinogenic impurity; isoniazid injection; rimifon; antituberculous; synthetic antibiotic; benzaldehyde; benzaldehyde azine; HPLC

* 通信作者 Tel: (022) 23513769; E-mail: wwtide@163.com

第一作者 Tel: 13820982530; E-mail: hanshu37@126.com

异烟肼别名雷米封,是一种广泛使用的一线抗结核药物,对各型结核分枝杆菌都有高度选择性抗菌作用,是目前抗结核药物中具有最强杀菌作用的合成抗菌药^[1-2]。异烟肼不稳定,由制备时原料引入或在储存过程中降解而产生的游离肼($\text{NH}_2\text{-NH}_2$)^[3-4],是一种诱变剂和致癌物质^[5-8]。因此国内外药典中,在异烟肼及其制剂项下大都收录了游离肼检查项,其检查方法多采用以硫酸肼为对照品的薄层色谱法^[9-11]。

异烟肼注射液收载于中国药典2010年版第一增补本中^[12],其中游离肼的检查项规定如下:取本品适量(约相当于异烟肼0.15 g),加水稀释至5 mL,加水杨醛的乙醇溶液(1→20)0.1 mL,5 min内不得发生浑浊。该方法的原理为比浊法,即游离肼和水杨醛反应生成水杨醛腙而产生沉淀,通过控制沉淀出现的时间来判断样品中游离肼的含量。但在实际操作中发现,该方法存在如下问题:(1)样品溶液中的异烟肼也会与水杨醛发生反应生成腙类沉淀,从而对游离肼的检查产生干扰,造成检测方法的专属性不佳,影响判定结果的准确性。(2)反应的重现性差;操作中并未说明加入水杨醛的乙醇溶液后是否需要摇匀,以及试验所用试剂或反应温度等条件都可能导致试验中出现浑浊的时间不一致。(3)游离肼的检查限度不定;反应中要求5 min内不得发生浑浊,对应的游离肼的量并不明确。

基于以上原因,本文提出采用柱前衍生化的高效液相色谱法来检测游离肼,即通过对游离肼与苯甲醛反应生成的苯甲醛吡嗪进行色谱分析(图1)^[13],间接测定游离肼的含量,提高游离肼测定的检测灵敏度和准确性。

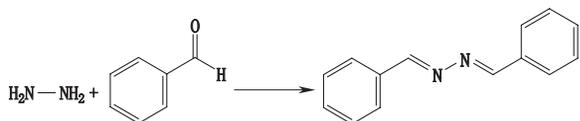


图1 苯甲醛与游离肼的反应方程式

Fig. 1 The reaction equation of benzaldehyde and hydrazine

1 仪器与试剂

HP-1100液相色谱仪,岛津液相色谱-质谱联用色谱仪(LC-30AD, LCMS-8050),月旭科技 Ultimate XB-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm; 十八烷基硅烷键合硅胶)。

甲醇、乙腈为色谱纯,乙二胺四乙酸二钠、苯甲醛为分析纯,甲酸铵、甲酸为质谱级。

硫酸肼对照品,中国食品药品检定研究院,批号101117-201001;苯甲醛吡嗪对照品, Toronto Research

Chemicals Inc.,批号13-GHZ-57-1,纯度98%。

异烟肼注射液样品由天津金耀药业有限公司提供,规格为2 mL:100 mg,批号为1401201、1502091、1510111。

2 溶液的制备

硫酸肼对照品溶液:取硫酸肼对照品约10 mg,置50 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度(相当于游离肼0.05 mg·mL⁻¹),即得。

苯甲醛溶液:取苯甲醛2 mL,用甲醇-水(9:1)溶液稀释至100 mL,即得。

苯甲醛吡嗪对照品溶液:取苯甲醛吡嗪对照品约5 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇65 mL使溶解,用水稀释至刻度,即得。

空白溶液:精密量取水2 mL和苯甲醛溶液5 mL,混合均匀,即得。

对照品溶液:精密量取硫酸肼对照品溶液1 mL,置25 mL量瓶中,精密加水1 mL和苯甲醛溶液5 mL,振摇反应20 min,即得。

供试品溶液:精密量取本品1 mL,置25 mL量瓶中,精密加水1 mL和苯甲醛溶液5 mL,振摇反应20 min,即得。

3 色谱条件及专属性试验

3.1 色谱条件

采用月旭 Ultimate XB-C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),以0.1%乙二胺四乙酸二钠溶液-乙腈(30:70)为流动相,流速1.0 mL·min⁻¹,检测波长310 nm,柱温40℃,进样20 μL。

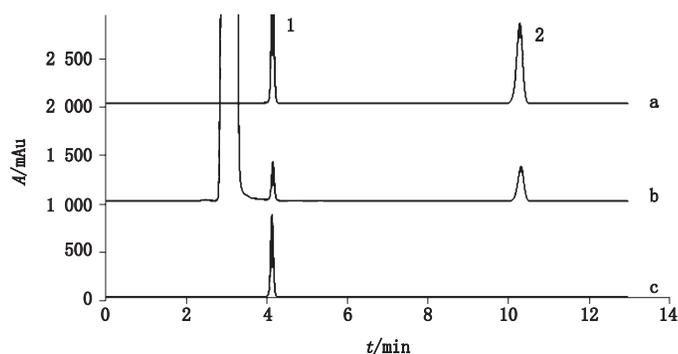
3.2 专属性试验

3.2.1 高效液相色谱分析

精密量取对照品溶液、供试品溶液和空白溶液各20 μL,分别进样分析,结果见图2,由图可见,游离肼的衍生化反应产物苯甲醛吡嗪的峰形对称,与苯甲醛峰分离度良好,空白溶液不干扰测定。

3.2.2 液相色谱-质谱分析

对对照品溶液及苯甲醛吡嗪对照品溶液进行高效液相色谱-质谱联用(LC-MS-MS)分析,仪器为岛津液相色谱-质谱联用色谱仪(LC-30AD, LCMS-8050),采用安捷伦 Atlantis[®] T3柱(100 mm×2.1 mm, 3 μm),以乙腈-5 mmol·L⁻¹甲酸铵水溶液(含0.1%甲酸)(7:3)为流动相,流速0.2 mL·min⁻¹,柱温25℃,进样1 μL;ESI离子源进行正离子扫描,离子源接口电压4.5 kV,雾化气(氮气)流速3.0 L·min⁻¹,干燥器(氮气)流速10.0 L·min⁻¹,碰撞气为氩气,加热



1. 苯甲醛 (benzaldehyde) 2. 苯甲醛吡嗪 (benzaldehyde azine)

图2 对照品溶液 (a)、供试品溶液 (b) 和空白溶液 (c) 衍生化后的液相色谱图

Fig. 2 Chromatograms of reference solution (a), test solution (b), blank reagent (c) after derivatization

模块温度 400 °C, 多反应监测模式 (MRM) 进行检测, 用于定性分析的离子分别为 m/z 209.15 \rightarrow 77.20 (碰撞电压 -15.0 eV)、 m/z 209.15 \rightarrow 79.20 (碰撞电压 -17.0 eV)。结果表明, 衍生化溶液主峰的保留时间与苯甲醛吡嗪对照品一致, 用于定性分析的离子具有相同的离子相对丰度比, 可以确定硫酸胍与苯甲醛的衍生化产物即为苯甲醛吡嗪。

4 结果与讨论

4.1 衍生化反应的条件优化

4.1.1 衍生化试剂苯甲醛用量的考察

取苯甲醛适量, 用甲醇-水 (9:1) 分别配制成体积分数为 0.2%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0%、10.0% 的系列溶液, 按上述方法进行衍生化反应。结果表明, 在苯甲醛溶液浓度达到 2% 时, 供试品溶液与硫酸胍对照品溶液均可反应完全。

4.1.2 衍生化反应时间的考察

精密量取本品和硫酸胍对照品溶液各 1 mL, 分别置 25 mL 量瓶中, 精密加水 1 mL 及 2% 苯甲醛溶

液 5 mL, 振摇反应 5、10、20、30、45、60 min, 分别得供试品溶液和对照品溶液; 精密量取 20 μ L 注入液相色谱仪。结果表明, 当反应时间为 20 min 时, 供试品溶液和对照品溶液均可反应完全。

4.2 方法学验证试验

4.2.1 线性试验

取硫酸胍对照品适量, 加水溶解并稀释成游离胍质量浓度分别为 2.5、5.0、12.5、25、50、100 μ g \cdot mL⁻¹ 的一系列溶液, 分别精密量取 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 精密加水 1 mL 及苯甲醛溶液 5 mL, 振摇反应 20 min 后, 精密量取 20 μ L 注入液相色谱仪。以质量浓度 (C) 为横坐标, 衍生化产物峰面积 (A) 为纵坐标, 进行线性回归。结果表明, 游离胍质量浓度在 2.5 ~ 100 μ g \cdot mL⁻¹ 范围内与其衍生物的峰面积呈良好的线性关系, 其线性方程:

$$A = 173.07C + 24.567 \quad r = 1.000 \quad (n = 6)$$

4.2.2 回收率试验

取硫酸胍对照品适量, 加水溶解并稀释成游离胍质量浓度分别为 0.025、0.050、0.075 mg \cdot mL⁻¹ 的溶液; 精密量取已知游离胍含量的样品 (批号 1502091) 1 mL, 置 25 mL 量瓶中, 分别精密加入上述 3 种浓度的溶液 1 mL 及苯甲醛溶液 5 mL, 每种浓度平行 3 份, 按照本方法进行衍生化试验, 进行液相色谱测定, 回收率测定结果见表 1。结果表明以本文所确定的液相色谱法进行游离胍的含量分析, 准确度较高。

4.2.3 重复性试验

取同一批异烟胍注射液 6 份 (批号 1502091), 按照所确定的供试品溶液制备方法和色谱条件, 测定游离胍的含量; 结果 6 份样品的平均含量为 0.043%, RSD 为 0.4%, 表明重复性较好。

表 1 回收率测定结果

Tab. 1 Results of determination of recovery

原含量 (original) / (mg \cdot mL ⁻¹)	加入量 (added) / (mg \cdot mL ⁻¹)	实测量 (measured) / (mg \cdot mL ⁻¹)	回收率 (recovery) /%	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
0.020 88	0.025 26	0.046 76	102.4	100.9	3.0
		0.045 48	97.4		
		0.046 87	102.9		
0.020 88	0.050 53	0.071 62	100.4	101.0	0.6
		0.071 86	100.9		
		0.072 20	101.6		
0.020 88	0.077 51	0.096 14	97.1	96.9	0.2
		0.095 96	96.9		
		0.095 91	96.8		

4.2.4 检出限与定量限试验

精密量取对照品溶液适量,采取逐步稀释法测定。按照 $S/N=3$ 计算,游离肼的检出限为 $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;按照 $S/N=10$ 计算,游离肼的定量限为 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

4.2.5 稳定性试验

取供试品溶液和对照品溶液,分别于 0、2、4、6、8、24 h 精密量取 $20 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,测定衍生物苯甲醛吡嗪的峰面积, RSD 均为 0.7%,说明供试品溶液和对照品溶液在 24 h 内稳定。

4.2.6 耐用性试验

4.2.6.1 色谱柱考察 曾考察了月旭 C_{18} 色谱柱 ($250 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$)、华谱 C_{18} 色谱柱 ($250 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$) 和 Agilent C_{18} 色谱柱 ($150 \text{ mm}\times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$),结果游离肼的含量平均值 ($n=3$) 为 0.043%, RSD 为 1.2%。

4.2.6.2 柱温考察 曾考察了柱温 38、40、42 $^{\circ}\text{C}$,结果游离肼含量平均值 ($n=3$) 为 0.044%, RSD 为 0.3%。

4.2.6.3 流速考察 曾考察了流速 0.8、1.0、1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,结果含量平均值 ($n=3$) 为 0.044%, RSD 为 0.03%。

4.2.6.4 流动相考察 曾考察了流动相 0.1% 乙二胺四乙酸二钠溶液 - 乙腈 (32:68)、0.1% 乙二胺四乙酸二钠溶液 - 乙腈 (30:70)、0.1% 乙二胺四乙酸二钠溶液 - 乙腈 (28:72),结果含量平均值 ($n=3$) 为 0.043%, RSD 为 0.4%。

耐用性试验结果表明,选定的色谱系统耐用性良好。

4.3 样品测定结果

取 3 批异烟肼注射液样品,按照上述方法衍生化后进行液相色谱分析,按照游离肼含量

$$\text{量} = \frac{A_{\text{样}} \times W/50 \times 32.04/130.12}{A_{\text{对}} \times 100/2} \times 100\% \quad (A_{\text{样}} \text{ 为 供 试 品 溶 液 的 主 峰 峰 面 积; } W \text{ 为 硫 酸 肼 对 照 品 的 称 样 量, mg; } 32.04 \text{ 为 游 离 肼 的 相 对 分 子 质 量; } 130.12 \text{ 为 硫 酸 肼 的 相 对 分 子 质 量; } A_{\text{对}} \text{ 为 对 照 品 溶 液 的 主 峰 峰 面 积})$$

计算游离肼的含量,结果见表 2。

表 2 样品测定结果 (%)

Tab. 2 Results of determination of samples

批号 (lot No.)	游离肼含量 (content of free hydrazine)
1510111	0.014
1502091	0.043
1401201	0.095

5 结论

本文建立了柱前衍生化高效液相色谱法测定异烟肼注射液中游离肼的含量,即以苯甲醛为衍生化试剂,将游离肼衍生化为苯甲醛吡嗪后进行液相色谱测定,并对衍生化反应条件进行了优化。该方法的各项参数指标符合中国药典 2015 年版的要求,并且准确性好,专属性强,灵敏度高,可以用于异烟肼注射液的质量控制。

参考文献

- [1] 殷春阳,冷东雷,何仲贵. 抗结核药物的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报, 2015, 32(1): 77
YIN CY, LENG DL, HE ZG. Progress on antituberculosis drugs[J]. J Shenyang Pharm Univ, 2015, 32(1): 77
- [2] 王天才,周金培,张惠斌. 抗结核药物的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2010, 41(4): 2995
WANG TC, ZHOU JP, ZHANG HB. Advances in the research of antituberculosis drugs[J]. J China Pharm Univ, 2010, 41(4): 299
- [3] 陈震. 异烟肼原料药的杂质分析控制的探讨[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26(10): 793
CHEN Z. Discussion about the analysis and control of impurities of isoniazid[J]. China J Clin Pharmacol, 2010, 26(10): 793
- [4] CARLIN A, GREGORY N, SIMMONS J. Stability of isoniazid in isoniazid syrup: formation of hydrazine[J]. J Pharm Biomed Anal, 1998, 17(4-5): 885
- [5] SARICH TC, YOUSSEFI M, ZHOU T, et al. Role of hydrazine in the mechanism of isoniazid hepatotoxicity in rabbits[J]. Arch Toxicol, 1996, 70(12): 835
- [6] ELDR DP, SNODIN D, TEASDALE A. Control and analysis of hydrazine, hydrazides and hydrazones—genotoxic impurities in active pharmaceutical ingredients (APIs) and drug products[J]. J Pharm Biomed Anal, 2011, 54(5): 900
- [7] 张志华,吴红海,薛改,等. 异烟肼和利福平合用及异烟肼代谢物对人肝细胞的毒性作用[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(8): 632
ZHANG ZH, WU HH, XUE G, et al. Cellular toxicity of isoniazid used together with rifampicin and the metabolites of isoniazid on QSG-7701 hepatocytes[J]. China Hosp Pharm J, 2010, 30(8): 632
- [8] 廖艳丽,彭双清,张立实. 异烟肼致肝脏毒性的蛋白质组学分析[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(1): 18
LIAO YL, PENG SQ, ZHANG LS. Proteomics analysis of isoniazid toxicity in rat liver[J]. China New Drugs J, 2011, 20(1): 18
- [9] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 413
ChP 2010. Vol II [S]. 2010: 294
- [10] USP 36-NF 31 [S]. 2013: 3987
- [11] EP 8.0 [S]. 2013: 2536
- [12] 中国药典 2010 年版. 第一增补本[S]. 2012: 287
ChP 2010. The First Supplement [S]. 2012: 287
- [13] GYLLENHAAL O, GRÖNBERG L, VESSMAN J. Determination of hydrazine in hydralazine by capillary gas chromatography with nitrogen-selective detection after benzaldehyde derivatization[J]. J Chromatogr A, 1990, 511: 303

(本文于 2016 年 3 月 2 日收到)