

中图分类号: R917; R927

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2023)06-0085-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.021



高效液相色谱法测定羟丙甲纤维素中亚硝酸盐含量

盖成, 郝丽娟, 闫凯, 徐艳梅, 张素平[△]

(河北省药品医疗器械检验研究院, 河北 石家庄 050200)

摘要:目的 建立测定羟丙甲纤维素中亚硝酸盐含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 优化羟丙甲纤维素的前处理方法。色谱柱为 Agela Venusil HILIC 亲水色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为磷酸盐缓冲液(pH 3.8)-乙腈(50:50, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 205 nm, 柱温为 25℃, 进样量为 20 μL。结果 采用水和乙腈为溶剂, 交替递加使羟丙甲纤维素均匀溶胀, 再用过量乙腈消溶胀并析出沉淀, 制成亚硝酸盐溶液, 多余乙腈经甲苯萃取浓缩。亚硝酸根离子质量浓度在 25~1 000 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2=0.9999$); 检测限为 10 ng/mL, 定量限为 25 ng/mL; 精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.0%; 平均加样回收率为 99.16%, RSD 为 0.41% ($n=9$)。结论 优化的前处理方法可较好地避免羟丙甲纤维素在水中强烈的溶胀作用, 有助于样品的充分提取。建立的 HPLC 法专属性强, 结果准确可靠, 可用于羟丙甲纤维素中亚硝酸盐的含量测定。

关键词: 亚硝酸盐; 羟丙甲纤维素; 高效液相色谱法; 溶胀; 痕量检测

Content Determination of Nitrite in Hypromellose by HPLC

GE Cheng, HAO Lijuan, YAN Kai, XU Yanmei, ZHANG Suping

(Hebei Provincial Institute of Drug and Medical Device Inspection, Shijiazhuang, Hebei, China 050200)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of nitrite in hypromellose. **Methods** The pre-treatment method of hypromellose was optimized. The chromatographic column was Agela Venusil HILIC hydrophilic chromatographic column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was phosphate buffer (pH 3.8)-acetonitrile (50:50, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 205 nm, the column temperature was 25℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** With water and acetonitrile as the solvent, hypromellose was evenly swelled by alternating addition of them, and then excessive acetonitrile was used to eliminate the swelling of hypromellose and precipitate to make nitrite solution. The excess acetonitrile was extracted and concentrated by toluene. The linear range of nitrite ion was 25-1 000 ng/mL ($R^2=0.9999$). The limit of detection (LOD) was 10 ng/mL, and the limit of quantitation (LOQ) was 25 ng/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 1.0%. The average recovery of nitrite ion was 99.16% with an RSD of 0.41% ($n=9$). **Conclusion** The optimized pre-treatment method can avoid the strong swelling effect of hypromellose in water, and is conducive to the full extraction of samples. The established HPLC method is specific, accurate, and reliable, which can be used for the content determination of nitrite in hypromellose.

Key words: nitrite; hypromellose; HPLC; swelling; trace detection

羟丙甲纤维素为半合成纤维素类辅料, 广泛用于药物制剂^[1-2]。其性质稳定^[3-4], 通常被认为无毒、无刺激性, 但其所含活性杂质会危害人体健康, 还会与配伍药物产生相互作用。研究发现, 羟丙甲纤维素中常含亚硝酸盐, 残留量过高时会对人体产生毒副作用, 而一些含胺基团的药物在一定条件下还可与亚硝酸发生系列反应, 生成亚硝胺类的基因毒性杂质^[5-8]。因此, 监控羟丙甲纤维素中亚硝酸盐含量对于减少药物的毒副作用具有重要意义。羟丙甲纤维素收载于2020年版《中国药典(四部)》, 但质量标准中未涉及亚硝酸盐的检测。目前, 亚硝酸盐的常用检测方法有比色法、紫外-可见分光光度法、液相色谱法、气相色谱法、离子色谱法、荧光

法等^[9-16], 其中, 比色法无法准确定量, 紫外-可见分光光度法、液相色谱法和气相色谱法前处理多采用衍生方式, 方法操作烦琐, 干扰较多, 加之羟丙甲纤维素在水溶液中会发生明显溶胀, 在多数有机溶剂中也不能有效溶解, 从而导致提取困难。为此, 本研究中采用水和乙腈交替递加的方式提取亚硝酸盐, 经萃取浓缩后, 以高效液相色谱(HPLC)法测定含量。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); XS105 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); MS3 型旋涡混匀器(德国 IKA 公司)。

第一作者: 盖成, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)gecheng386@sina.com。

[△]通信作者: 张素平, 女, 大学本科, 高级工程师, 研究方向为实验室仪器设备管理, (电话)0311-69086078。

1.2 试药

羟丙甲纤维素(厂家A,批号分别为F07-01-190102, F07-01-190201, F07-01-191201, F07-01-210201, F07-01-210202, F07-01-210203);亚硝酸根标准溶液(国家有色金属及电子材料分析测试中心,批号为206011-1,质量浓度为1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$);不含亚硝酸盐的羟丙甲纤维素(实验室制备);乙腈为色谱纯,磷酸二氢钾、氢氧化钠、碳酸氢钠、甲苯为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agela Venusil HILIC 亲水色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm);流动相:磷酸盐缓冲液(取磷酸0.3 mL,加水1 000 mL,用1 mol/L 氢氧化钠溶液调pH至3.8)-乙腈(50:50, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:205 nm;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL 。

2.2 溶液制备

取样品0.1 g,置10 mL离心管中,精密加入乙腈2 mL,摇匀,加水1 mL与100 mmol/L 碳酸氢钠溶液20 μL ,涡旋混匀;加水1 mL,涡旋混匀;加乙腈1 mL,涡旋混匀;加乙腈5 mL,涡旋混匀,离心,量取上清液8 mL,置50 mL离心管中,加甲苯8 mL,振摇,静置,分层后(必要时离心)弃上层溶液,再加入甲苯8 mL,重复操作;取下层溶液,经0.22 μm 滤膜滤过,取续滤液,作为供试品溶液。取亚硝酸根标准溶液及不含亚硝酸盐的羟丙甲纤维素适量,同法分别制备对照品溶液及阴性对照品溶液(因萃取过程导致两相体积发生变化,两者应与供试品溶液平行操作)。

2.3 方法学考察

专属性试验及系统适用性试验:精密吸取2.2项下3种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色

谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应吸收峰,阴性对照无干扰。亚硝酸盐与硝酸盐分离度为7.6,理论板数按亚硝酸盐峰计为21 362,分离度均大于1.5,基线分离良好,表明硝酸根离子不干扰亚硝酸根离子的测定。详见图1。

其他离子干扰试验:配制亚硝酸根离子质量浓度为250 ng/mL的溶液,添加100倍质量浓度的常见无机阴离子(Cl^- , SO_4^{2-} , SO_3^{2-} , PO_4^{3-} , CO_3^{2-}),按2.1项下色谱条件进样测定。结果上述无机阴离子不影响亚硝酸盐的测定。

线性关系考察:取亚硝酸根标准溶液,用水逐级稀释,制成质量浓度分别为25, 100, 200, 400, 800, 1 000 ng/mL的系列标准溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以峰面积(Y)为纵坐标,亚硝酸根离子质量浓度(X , ng/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 103.42X - 1\,069.6$ ($R^2 = 0.999\,9$, $n = 6$),结果表明亚硝酸根离子质量浓度在25~1 000 ng/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限考察:取上述1 000 ng/mL的亚硝酸根离子溶液,用水逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)约为3, 10时的质量浓度分别作为检测限和定量限。结果检测限为10 ng/mL,定量限为25 ng/mL。

精密度试验:取对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录亚硝酸根离子峰面积。结果的 RSD 为0.30% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一批样品(批号F07-01-190102)0.1 g,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置0, 2, 4, 6, 8 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录亚硝酸根离子峰面积。结果的 RSD 小于1.0% ($n = 5$),表明供试品溶液室温下放置8 h内

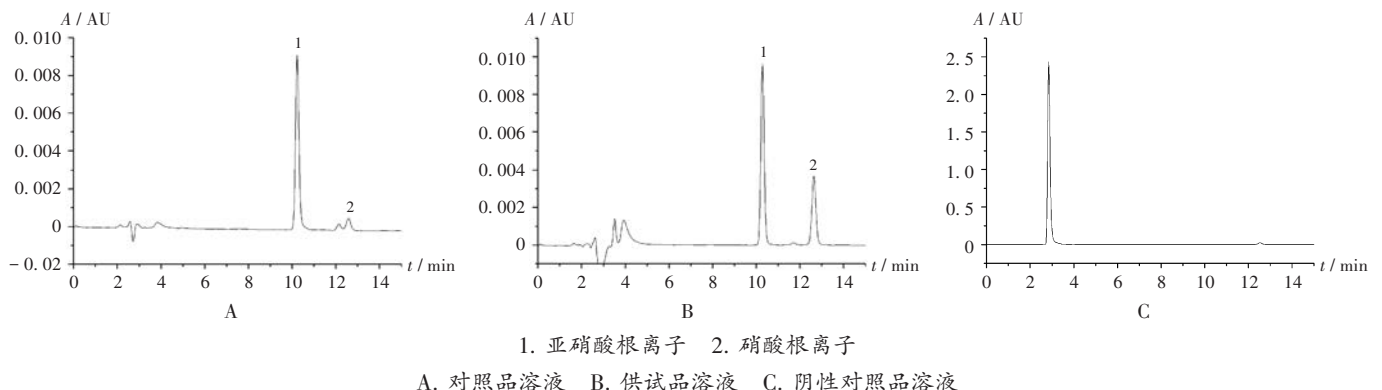


图1 高效液相色谱图

1. Nitrite ion 2. Nitrate ion

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

基本稳定。

重复性试验:取同一批样品(批号为F07-01-190102)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,共6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录亚硝酸根离子峰面积,并计算平均含量。结果亚硝酸根离子平均含量为6.53 mg/kg, *RSD*为0.90% (*n* = 6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号F07-01-210201)0.1 g,共9份,分别加入上述1 000 ng/mL的亚硝酸根标准溶液0.4, 0.8, 1.2 mL,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,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

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(ng)	加入量(ng)	测得量(ng)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	<i>RSD</i> (%)
75.60	400	470.9	98.82		
75.60	400	469.6	98.50		
75.60	400	470.3	98.68		
75.60	800	873.2	99.70		
75.60	800	871.5	99.49	99.16	0.41
75.60	800	869.4	99.22		
75.60	1 200	1 270.2	99.55		
75.60	1 200	1 266.8	99.27		
75.60	1 200	1 265.7	99.18		

2.4 样品含量测定

取样品适量,平行3份,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,记录亚硝酸根离子峰面积,计算样品含量,并与传统方法(无水乙醇超声提取,亚硝酸盐经衍生后用紫外-可见分光光度法测定)的检测值进行比较。结果见表2。

表2 样品含量测定结果(mg/kg, *n* = 3)

Tab. 2 Results of the content determination of nitrite in samples
(mg/kg, *n* = 3)

批号	本方法	传统方法	批号	本方法	传统方法
F07-01-190102	6.490	2.830	F07-01-210201	0.728	0.223
F07-01-190201	6.560	2.910	F07-01-210202	1.230	0.400
F07-01-191201	8.070	3.300	F07-01-210203	0.838	0.259

3 讨论

3.1 提取方法

羟丙甲纤维素为高分子化合物,生产过程引入的亚硝酸盐不仅附着于样品表面,还存在于高分子内部。预试验中发现,乙腈对亚硝酸盐有一定的溶解能力且不会使羟丙甲纤维素溶胀,但单用乙腈难以扩散进入羟丙甲纤维素内部,因此很难将其包裹的亚硝酸盐洗

脱出来,选用无水甲醇、无水乙醇时情况类似。本研究中采用水与乙腈交替递加的方式,溶剂能有效渗入样品内部并将亚硝酸盐溶解,最后加入过量的乙腈,使羟丙甲纤维素重新沉淀,可避免溶解的羟丙甲纤维素损害色谱柱。用不同的提取方式来处理0.1 g的羟丙甲纤维素并测定亚硝酸盐含量加以验证,结果,本研究所建立的提取方法测得的亚硝酸盐含量(7.18 mg/kg)明显高于用传统方法(乙腈和无水甲醇直接溶解并超声),对样品的提取更完善。

3.2 萃取次数

取80%乙腈水溶液、甲苯各100 mL,置分液漏斗中,充分振摇,静置分层后取下层水溶液,配制质量浓度为250 ng/mL的亚硝酸钠溶液(溶液a);用分得的上层溶液10 mL重新提取溶液a(此时下层水液已分配平衡,重新提取时两相体积不会发生变化),离心分层后,取下层液进样,测得的结果与溶液a比较,回收率为102%,表明用甲苯提取乙腈水溶液中乙腈的过程几乎不造成水溶液中亚硝酸盐的损失,为浓缩样品溶液并尽量减少甲苯使用量,确定萃取次数为2次。

3.3 样品处理量范围

本研究中采用的提取溶剂中含有水分,而羟丙甲纤维素极易吸水并发生溶胀,过高的样品量会使样品吸水不均匀,导致提取不充分(可表现为线性相关系数降低),因此有必要考察样品处理量。预试验中取样品(批号F07-01-190102)按2.2项下方法提取并进行测定,结果表明,样品处理量在0~0.15 g范围内与亚硝酸根离子峰面积线性关系良好,采用2.2项下方法能有效提取0.1 g羟丙甲纤维素中的亚硝酸盐。

综上所述,本研究中利用溶胀和消溶胀的过程,开发了一种有效的提取方法,可避免因羟丙甲纤维素的缔合、包埋等因素的影响而使提取不充分。并建立了无需衍生的HPLC法,操作简便、准确度高,能测定样品中痕量的亚硝酸盐。

参考文献

- [1] 吴明凯. 羟丙甲纤维素在药物制剂中的研究进展[J]. 医药卫生:文摘版, 2016(3):101.
- [2] 许国琴, 苏峰, 何广卫. 羟丙甲纤维素在药物制剂中的研究进展[J]. 广州化工, 2014, 42(4):5-7.
- [3] ROWE RC, SHESKEY PJ, WELLER PJ. 郑俊民, 主译. 药用辅料手册[M]. 北京:化学工业出版社, 2005:343-347.
- [4] 罗明生, 高天慧. 药剂辅料大全[M]. 成都:四川科学技术出版社, 2006:1228-1232.
- [5] MILLS AL, ALEXANDER M. N-nitrosamine formation by cultures of several microorganisms[J]. Appl Environ Microbiol, 1976, 31(6):892-895.