

顶空 - 气相色谱质谱法分析药品中的水合肼

刘茜 余翀天

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词

药品；HS-GCMS；水合肼

目标

通过衍生化法完成对水合肼的衍生，采用顶空法及直接进样法分析衍生产物，完成对药品中水合肼的分析方法开发，该方法通过气相色谱质谱法结合顶空进样方式分析不同溶解性药品中的水合肼，采用质谱法可以进一步对药品中的水合肼进行确证。

引言

肼是一种无色发烟的、具有腐蚀性和强还原性的液体化合物，它是比氨弱的碱，通常由水合肼脱水制得。他是常用作制药原料，如合成氨基尿、异烟肼、呋喃西林盐酸阿齐利特，硫酸阿米卡星和他唑巴坦酸等，同时在肼还常用于生产多种农药，如植物生长调节剂，落叶剂及除草剂等。肼可对肝、肼可对肝、肾、血液等系统产生毒副作用。有数据显示，肼可能具有致癌作用。因此，要求药品中肼的残留量越来越低，如何快速、简便、高灵敏地监测生产过程中肼的残留量，一直是药物溶剂残留检测研究的一个问题。

目前水合肼的气相色谱法一般采用直接和衍生化法。直接法是采用热导检测器分析，但其灵敏度低，另外水合肼是强碱性化合物，对柱子要求较高。衍生化法一般采用 2, 4-二硝基苯甲醛或乙酰丙酮来进行，此方法需要加额外的衍生化试剂。James R. Holtzelaw 采用丙酮作为衍生化试剂，对空气中存在的肼类化合物（肼、甲基肼、偏二甲肼）进行了分析，收到了良好的效果。本文用丙酮乙酸作为衍生化试剂，采用顶空进样及液体直接进样法结合气相色谱质谱法药品中水合肼进行了分析，另外本文采用 Time-SIM 方式定量，灵敏度高，选择性好，样品前处理简单。



仪器

仪器条件见表 1。

表 1. 仪器参数设置

仪器型号及配置	Trace 1310-ISQ SSL 进样口 Triplus-300 顶空自动进样器
色谱柱类型尺寸、S/N 号及柱温	TG-wax MS B, 30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m 柱温: 40°C (5 min), 15°C /min 到 220°C (1 min) P/N: 26086-1420; S/N: 1125129
检测器类型、工作参数	ISQ: 离子源: 温度 280°C, Transfer line: 250°C 扫描方式: SIM, 定量离子 56, 定性离子 97, 112
载气类型及流速	氦气, 恒流模式, 流速: 1.2 mL/min
进样方式及进样体积 (如使用顶空、吹扫捕集需增加具体参数)	顶空 Oven: 90°C, manifold: 120°C, Transfer line: 130°C 平衡时间: 15min Pressure mode: standard Pressure: 100kpa, pressure equilibration time: 0.2min Loop mode: standard, loop fill time: 0.2min, loop equilibration time: 0.2min Purge parameters, purge time: 1min, purge flow: 20mL/min 进样模式: split, 分流比: 5:1, 进样口温度: 280°C; 进样体积: 1 μ L
	液体进样 进样模式: splitless, 进样口温度: 250°C; 进样体积: 1 μ L

顶空法

溶液配制

标准储备溶液：标准品衍生化：取 0.03 g 肼溶于 10 mL (1:10) 乙酸丙酮，制备 3000 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备液。

标准溶液的配制：配制 0.01、0.02、0.04、0.1、0.4 五个浓度水平，称取标准储备液采用饱和 NaCl 水溶液稀释至 5 mL，其中加入 50 μL 50% NaOH 水溶液。

样品的前处理

称取样品 0.01 g，溶于 4.85 mL 饱和 NaCl 水溶液中溶解后加入 100 μL 乙酸丙酮 (1:10) 超声 15 min，再加入 50 μL 50% NaOH 水溶液，上 HS-GCMS 分析。

液体直接进样法

溶液配制

标准储备溶液：标准品衍生化：取 0.04 g 肼溶于 10 mL

(1:10) 乙酸丙酮，制备 4000 $\mu\text{g/mL}$ 标准储备液。

标准溶液的配制：配制 0.01、0.02、0.04、0.1、0.4 五个浓度水平。

样品的前处理

称取样品 0.01g，加入 100 μL 乙酸丙酮 (1:10) 再溶于 2 mL 乙酸乙酯超声提取 10 min，过滤膜，上 GCMS 分析。

结果与讨论

1. 顶空条件的选择

水合肼一种无色发烟的、具有腐蚀性和强还原性的液体化合物，它是比氨弱的碱，其沸点为 118.5 $^{\circ}\text{C}$ ，因其在 100 $^{\circ}\text{C}$ 左右分解成 N_2 、 NH_3 和 H_2 ，因此常采用衍生后对其进行分析，如下图 1、2 为肼及其衍生后（乙酸丙酮 (1:10)）的产物的质谱图。

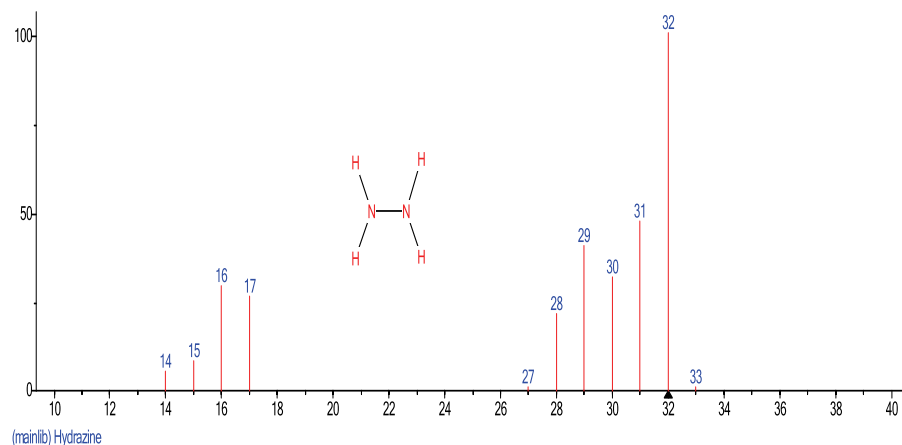


图 1. 水合肼的质谱图

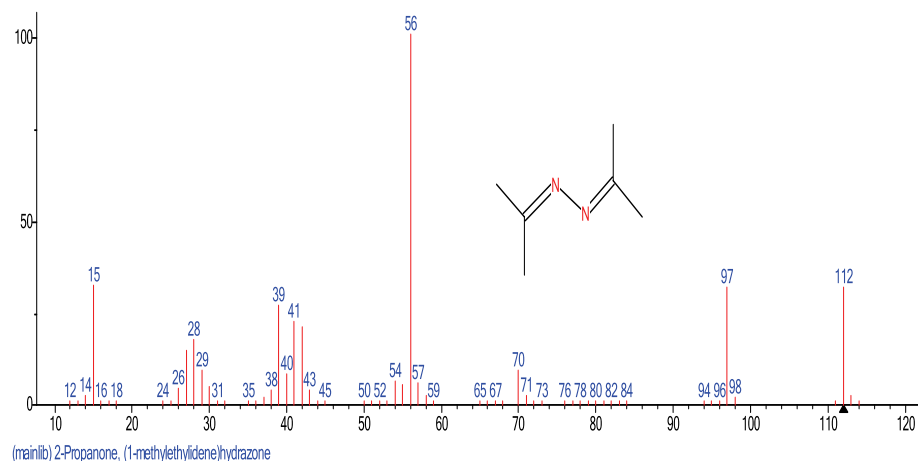


图 2. 水合肼衍生产物的质谱图

水合肼衍生产物为碱性，且衍生产物沸点在 110℃，易溶于水，因此该物质易采用液体直接进样进行分析，但考虑到有些药品不易溶于有机溶剂且极易溶于水，本方法采用顶空法及液体直接进样法分析。由于该衍生产物的强碱性，采用顶空法时在其中加入 50 μ L 50% NaOH 水溶液，可有效的提高灵敏度，同时采用顶空分析干扰物质减少。

本实验选取饱和氯化钠水溶液做溶剂，可将待分析药品完全溶解，溶剂中含大量有机溶剂因此顶空温度不易过高，同时随着样品平衡温度的升高，进入气相的有机物的量增加，从而提高分析的灵敏度，由于实验中采用水溶，孵化温度不易过高，本实验中主要考察了

60℃、70℃、80℃、90℃ 的平衡温度对灵敏度的影响，试验结果表明选择平衡温度 90℃ 时目标化合物的灵敏度最大，更适宜分析。实验中传输线温度选择 130℃ 以保证没有水气带入色谱柱，影响分析效果。

当孵化时间增长分析物在水相和气相两相中的分配系数越小，当孵化时间达到一定时间分析物在两相间达到最大的分配，此时为最佳的分析时间，本实验中考察了 5 min, 10min, 15 min, 20 min, 30 min, 对孵化效率的影响，实验最终结果表明，当孵化时间为 15 min 时效率最高，随后灵敏度达到最大值，鉴于提高分析效率考虑，最终选择孵化时间 15min。如下图 3 为不同孵化时间下孵化效率的比较图。

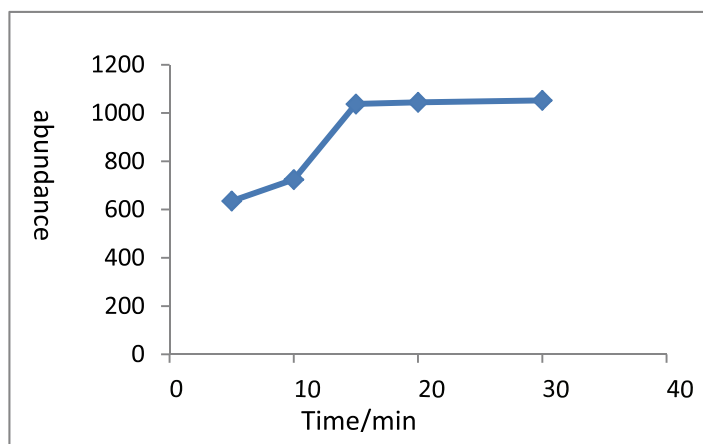


图 3. 不同孵化时间下孵化效率，其中 y 为丙酮连氮的响应值

2. 色谱柱的选择

已有文献报道水合肼的分析，采用 -17 及 624 色谱柱分析。本方法采用乙酸丙酮 (1:10) 衍生法将水合肼衍生为丙酮连氮。对于不同的药品，有些药品为水溶性的，此时可采用顶空法分析，另外有些药品为非水溶性的，此时可采用有机溶剂直接溶解分析。同时采用顶空法分析可以减少仪器的污染，由于水合肼衍生产物沸点较高，顶空法未显出明显的灵敏度优势。无论哪种方法通常都需要将水合肼衍生，衍生后产物丙酮连氮为碱性、极性物质，本方法考察了 Tg-17 30 m \times 0.25 μ m \times 0.25 mm 和 Tg-Wax 30 m \times 0.25 μ m \times 0.25 mm, Tg-5 amine 30 m \times 0.25 μ m \times 0.25 mm, Tg-Wax B 30 m \times 0.25 μ m \times 0.25 mm 四种不同类型色谱柱，实验结果发现，当选 1701 及 wax 色谱柱时，由于衍生产物

显碱性，色谱峰有明显的拖尾，见下图 4。当分析目标化合物为碱性时，此时宜选择碱性化处理的色谱柱。由于目标物为极性化合物，因此本方法最终选择分析色谱柱为 Tg-Wax B 30 m \times 0.25 μ m \times 0.25 mm，色谱峰形得到明显改善，灵敏度明显提高，同时进样一段时间后，色谱柱无流失。

3. 标准品色谱图及样品加标色谱图

水合肼为药物生产中的副产物，本方法采用不同的方法分析水合肼，如下图 5-6 分别为液体及顶空进样方式水合肼的 TIC 谱图，由此图发现，当采用顶空进样时干扰更少且灵敏度较好。本法采用 T-SIM 方式定量，如图 7 为标准物质 T-SIM 谱图及空白样品加标色谱图，其中下图为样品加标色谱图。

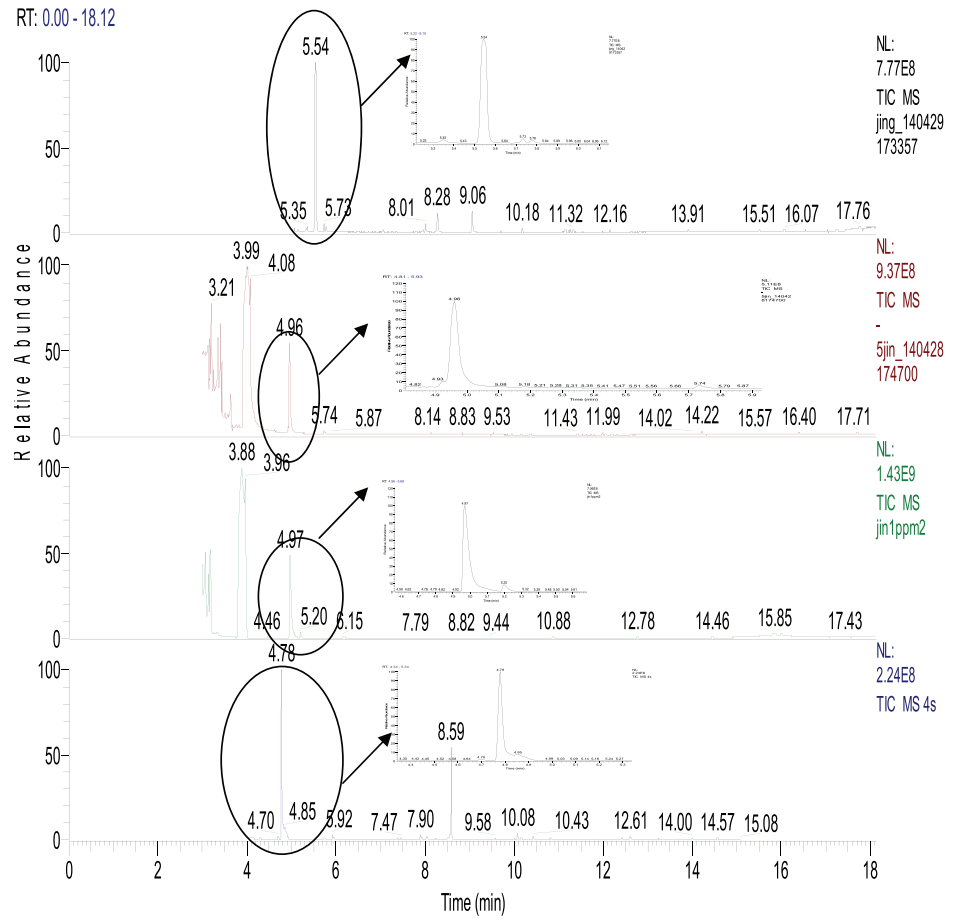


图 4. 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水合肼衍生后在不同类型色谱柱上的分离情况

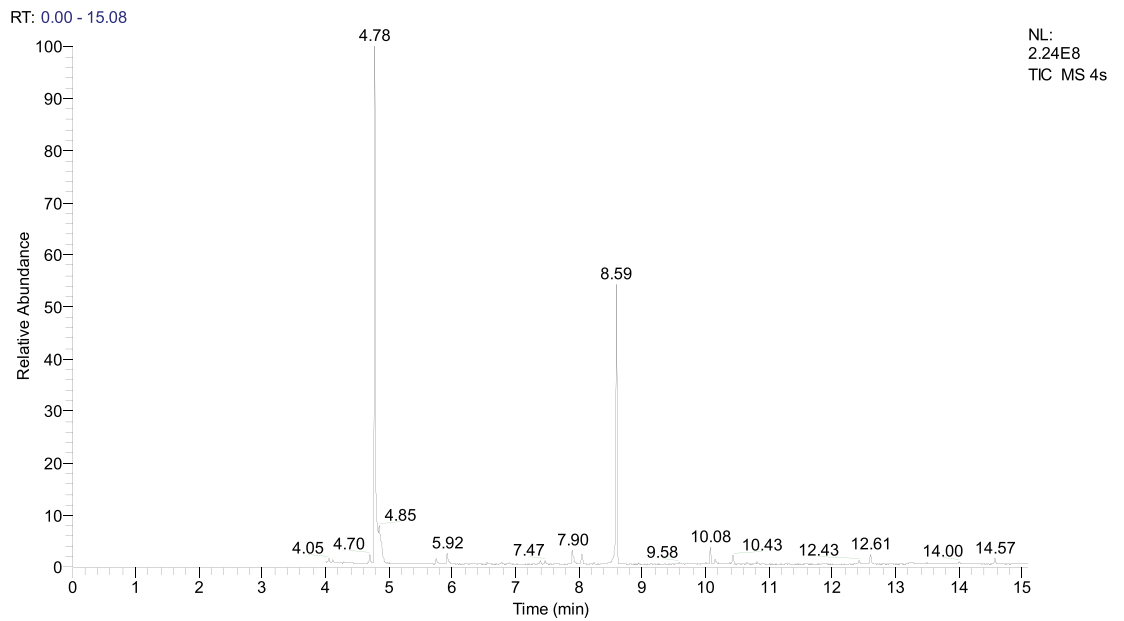


图 5. 液体进样方式—2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 水合肼衍生后 TIC 色谱图

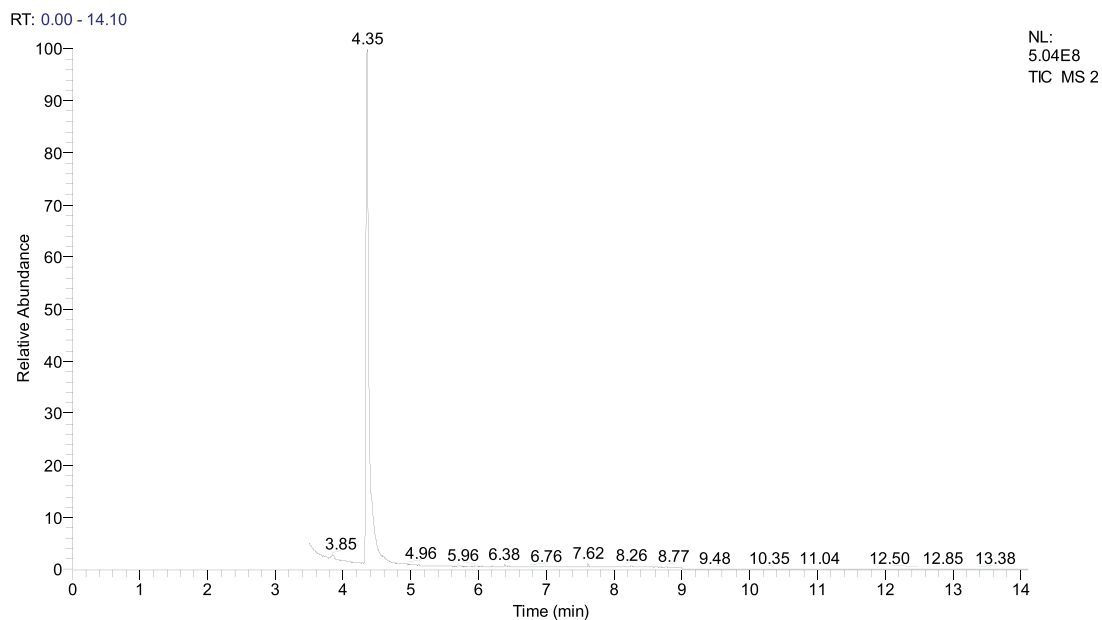


图 6. 顶空进样方式—2.0 µg/mL 水合肼衍生后 TIC 色谱图

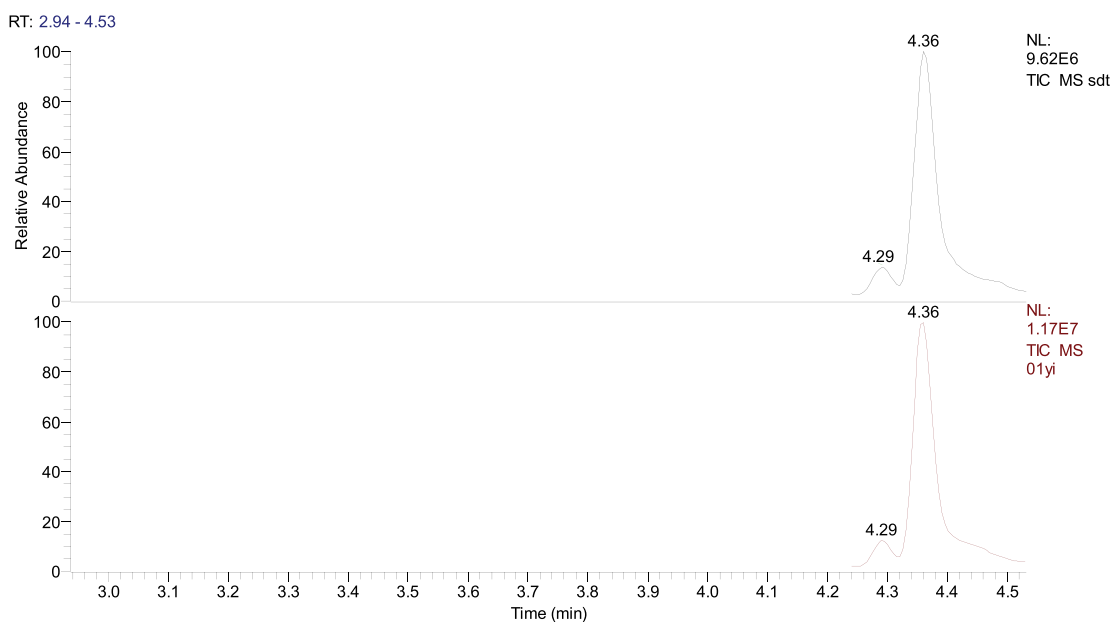


图 7. 标准品、样品加标水合肼的 T-SIM 色谱图

4. 线性、检出限及 RSD

顶空法：

配制浓度分别为：0.01、0.02、0.04、0.1、0.2 µg/mL 的校准溶液，采用上述液体进样方法进样分析，考察各组分在 0.01-0.2 µg/mL 浓度范围内的线性。实验结果表明该衍生物在 0.01-0.2 µg/mL 内线性关系良好，线性相关系数为 0.9956，见下图 8。

对某样品添加混合标准溶液（加标浓度为 5.0 µg/g、50 µg/g），考察的加标回收情况。实验结果表明加标回收率为 82.0-93.0% 之间，符合日常分析检测的要求。对 5.0、50 µg/g 加标水平平行测定 6 次，平均 RSD 值在 4.8-8.3%，符合稳定性要求。同时以三倍信噪比计算水合肼的检出限，测得仪器检出限在 0.01 µg/mL。

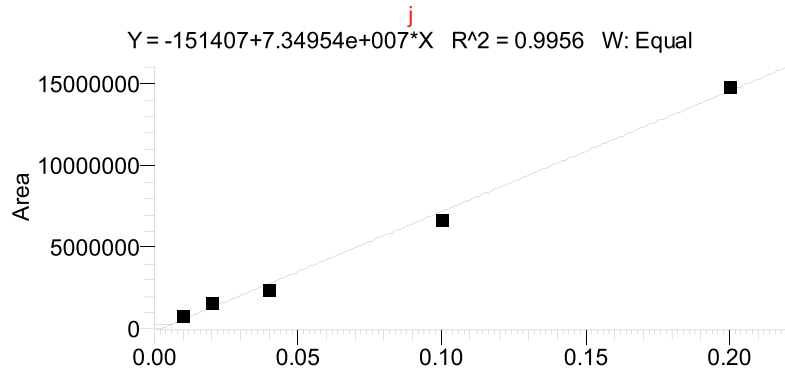


图 8. 为水合肼的液体进样方式线性

液体直接进样法:

配制浓度分别为: 0.02、0.04、0.2、0.4、2.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的校准溶液, 采用上述方法分别进样分析, 考察各组分在 0.02-4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内的线性。实验结果表明该衍生物在 0.02-4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 内线性关系良好, 线性相关系数均大于 0.999, 见下图。

对某样品添加混合标准溶液 (加标浓度为 2.0 $\mu\text{g}/\text{g}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{g}$), 考察的加标回收情况。实验结果表明加标回收率为 78.0-88.0% 之间, 符合日常分析检测的要求。对 2.0、40 $\mu\text{g}/\text{g}$ 加标水平平行测定 6 次, 平均 RSD 值在 4.9-9.3%, 符合稳定性要求。同时以三倍信噪比计算水合肼的检出限, 测得仪器检出限在 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

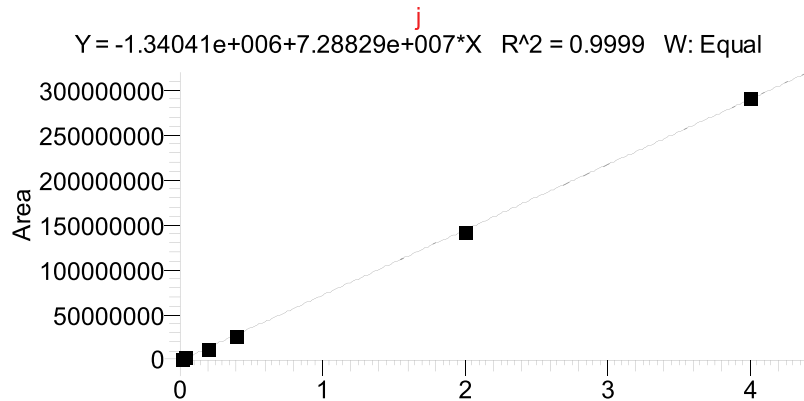


图 9. 为水合肼的顶空进样方式线性

实际样品测试结果

采用如下顶空进样法条件测定了几个市售药品, 其中某

药品中检测出含有该成份水合肼, 测试谱图如下, 含量为 37.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ 。如下表为测定三个样品结果。

表 1. 未知样品测试结果

样品 AFTN-1	保留时间	测得值浓度 / $\mu\text{g}/\text{mL}$	样品中含量 / $\mu\text{g}/\text{g}$
20130202	4.37	<0.01	<5
20130204	4.37	0.075	37.5
20130201	4.37	<0.01	<5

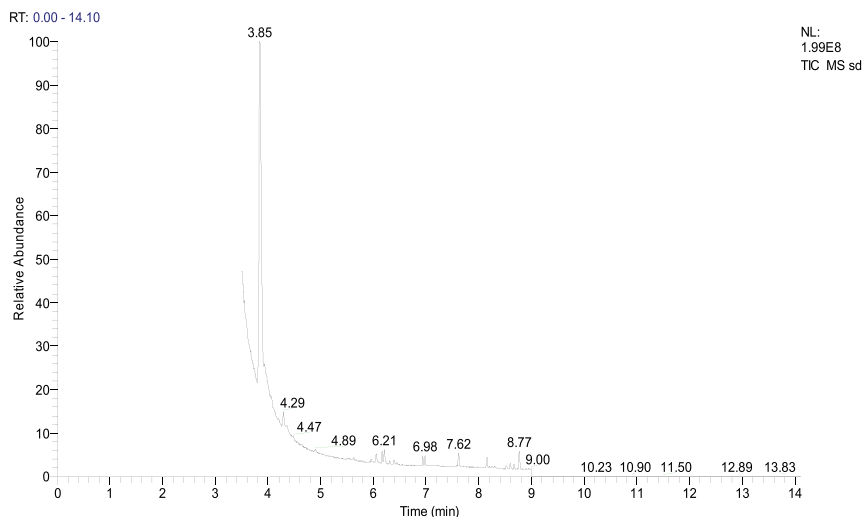


图 10. 图为某测出水合肼未知样品 TIC 色谱图

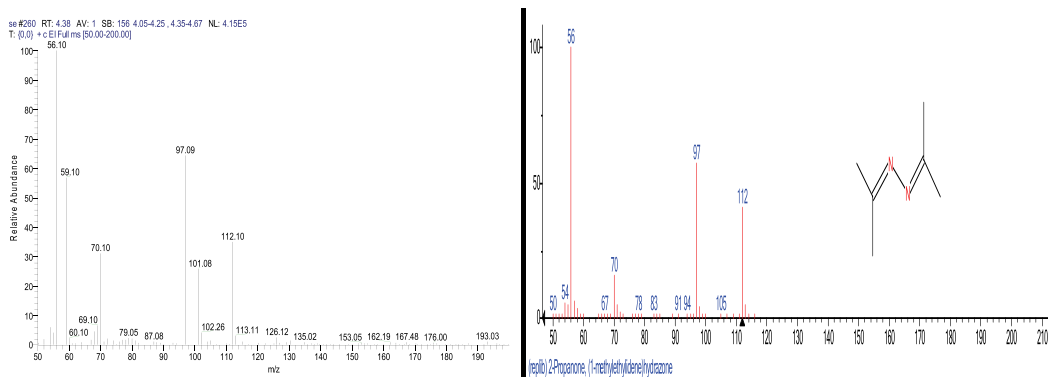


图 11. 左图为某样品在 4.37min 处的质谱图，其中右图为 NIST 谱库中水合肼的标准质谱图

总结

本实验采用赛默飞世尔科技 Triplus 300 顶空自动进样器结合 1300GC 配 ISQ 质谱检测器分析药品中的水合肼，样品通过衍生法分别采用顶空进样方式及液体直接进样方式，方法准确，灵敏度高，满足检测要求。

参考文献

- [1] 周延生, 李赛钰, 韩东升等. 药物中水合肼残留量的气相色谱分析 分析试验室, 2008,27 (3): 84-85.
- [2] Mingjiang Sunr, Lin Bai, David Q.Liu A generic approach for the determination of trace hydrazine in drug substances using in situ derivatization-headspace GC-MS Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. 2009, (49):529-533
- [3] Emanuela Gionfriddo, Attilio Naccarato, Giovanni Sindona. Determination of hydrazine in drinking water: Development and multivariate optimization of a rapid and simple solid phase microextraction-gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry protocol. Analytica Chimica Acta 2014, (X)

赛默飞世尔科技（中国）有限公司

免费服务热线：800 810 5118
400 650 5118 (支持手机用户)

ThermoFisher
SCIENTIFIC