doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.11.09

# 高效液相色谱法测定沙咪珠利中的水合肼残留量

王汝金,朱建德,张丽芳*,薛飞群*

(中国农业科学院上海兽医研究所,兽药安全评价与兽药残留重点开放实验室,上海 200241)

[收稿日期] 2017-03-17　[文献标识码]A　[文章编号]1002-1280 (2017) 11-0059-06　[中图分类号]S859.2

[摘　要]　建立了一种沙咪珠利中水合肼残留检测的高效液相色谱法。含水合肼样品用盐酸溶液溶解后,加苯甲醛溶液衍生化,再用己烷提取,过滤后进样测定。采用 Dikma Technologies Diamonsil C18 色谱柱(250×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙二胺四乙酸钠 0.03% m/V∶乙腈(300∶700,*V/V*);流速 1 mL/min;紫外检测波长 268 nm。该方法在 5~150 ng/mL 的范围内具有良好的线性关系,回归方程 $Y=260.35X+796.12$, $R^2=0.9993$。10、50、100 ng/mL 三个添加浓度的添加回收率分别为 105.58%、100.21%、102.60%,*RSD* 分别为 2.66%、3.16%、2.31%。该方法精密度好,快速准确,适用于沙咪珠利样品中水合肼残留量的检测。

[关键词]　沙咪珠利;水合肼;含量测定;高效液相色谱法

# The Determination of Hydrazine Hydrate Residues in Acetamizuril by HPLC

WANG Ru-jin, ZHU Jian-de, ZHANG Li-fang*, XUE Fei-qun*

(*Key Laboratory of Veterinary Drug Safety Evaluation and Residue Research, Shanghai Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shanghai* 200241, *China*)

*Corresponding author*: *ZHANG Li-fang*, *E-mail*: *twingzhang@shvri.ac.cn*; *XUE Fei-qun*, *fqxue@shvri.ac.cn*

**Abstract**: A high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of hydrazine hydrate residues in acetamizuril was established. The hydrazine hydrate sample was dissolved in hydrochloric acid solution and then derivatized with benzaldehyde solution, extracted with hexane and filtered to measure the sample. A Diamonsil C18 column (250×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was sodium ethylenediaminetetraacetate 0.03% m/V, acetonitrile (300∶700, *V/V*). The flow rate was 1 mL/min and the detection wavelength was 268 nm. The resolute showed that a good linear relationship was obtained with the concentration range of 5~150 ng/mL and the regression equation was $Y=260.35X+796.12$, $R^2=0.9993$. The recoveries at the three concentration of 10、50、100 ng/mL were 105.58%, 100.21%, 102.60% and *RSD* were 2.66%, 3.16% and 2.31%, respectively. The method was sensitive, accurate, convenient, and it is suitable for the determination of hydrazine hydrate residues in the samples of acetamizuril.

**Key words**: acetamizuril; hydrazine hydrate; determination; High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

---

**基金项目**:公益性行业(农业)科研专项(201303038);国家高技术研究发展计划(863 计划)(2011AA10A214)

**作者简介**:王汝金,硕士,从事药物分析相关工作。

**通讯作者**:张丽芳,twingzhang@shvri.ac.cn;薛飞群,fqxue@shvri.ac.cn

水合肼是肼的一水化合物,又名水合联氨,是一种基础的强性还原剂。肼及其盐作为一种中间体,广泛应用于药物工业以得到具有不同功效的药物,例如脱羧酶抑制剂、抗血压及抗菌等。水合肼还可作为一种玻璃发泡剂、腐蚀抑制剂及火箭燃料等[1-3]。同时,肼也是一种有毒物质。国际化学安全项目及综合风险信息系统根据该系统的证据特征权重给予肼 B2 的分级[4](可能的人类致癌物质),因为肼在很多动物体内可以诱导肿瘤的产生并且在许多测定中表现出诱变的特性[5]。肼是一种刺激性强烈的皮肤致敏物;它对神经系统、肝、肾有严重的不良影响。因为肼是一种毒性的并可能致癌的物质,它在欧洲药典论著中一些药物中的含量受到限制[6]。

沙咪珠利是中国农业科学院上海兽医研究所动物药学实验室设计合成的新型结构的抗球虫药物,该药物具有良好的抗球虫效果,与地克珠利、妥曲珠利等其他传统抗球虫药物无交叉耐药性,安全高效。水合肼是该药物合成过程中的一种中间体。在沙咪珠利原料药的质量研究中,需对水合肼的残留量进行检测,以使该药物符合质量标准的相关要求。目前国内对肼的测定方法有气相色谱面积归一化法[7-8]、薄层色谱法、阳离子交换柱液相色谱法、分光光度法[9]、高效液相色谱法等。高效液相色谱法是药物合成中间体检测的常用方法[10-11],具有灵敏度高、专属性好等特点。本研究的目的在于建立一种水合肼检测的高效液相色谱方法,从而为沙咪珠利及相关药品的水合肼质量控制提供一种检测方法。

## 1　材料与方法

### 1.1　药品与试剂

1.1.1　肼标准品　$H_4N_2 \cdot 2HCl$,西格玛化学试剂,Pcode:1012120562,含量≥99.99%。

1.1.2　沙咪珠利样品　中国农业科学院上海兽医研究所动物药学研究室制备,批号 20150104;20150106;20150107。

1.1.3　试剂　苯甲醛,分析纯,阿法埃莎化学有限公司;盐酸,分析纯,上海埃彼化学试剂有限公司;乙二胺四乙酸钠,分析纯,上海埃彼化学试剂有限公司;己烷,分析纯,国药集团化学试剂有限公司;乙腈,色谱纯,赛默飞世尔科技。

1.2　仪器　Waters2690 高效液相色谱仪(美国 Waters公司);Waters 2487 检测器(美国 Waters 公司);AE240 双量程分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);超声波清洗器(SCQ-250 型,上海申波超声公司);超纯水系统(上海瑞枫生物科技有限公司);涡旋混合器(上海凌初环保仪器有限公司);LXJ-IIB 低速离心机(上海安亭(飞鸽))。

### 1.3　方法

#### 1.3.1　溶液配制

1.3.1.1　肼标准溶液的制备　精密称取相当于 10 mg 肼的盐酸盐标准品至 10 mL 容量瓶中,加入适量 10%的盐酸溶液溶解并定容至刻度,得到肼浓度为 1 mg/mL 的标准储备液。精密量取适量上述标准储备液,用 10%的盐酸溶液逐步稀释成系列浓度的肼标准溶液。

1.3.1.2　苯甲醛溶液的制备　精密称取 6 g 苯甲醛至 100 mL 容量瓶中,加入甲醇稀释并定容至刻度。将上述溶液转移至 250 mL 的锥形瓶中,加入 100 mL水并混匀,得到苯甲醛溶液。

1.3.2　溶液衍生化　精密量取 2 mL 待测溶液至 15 mL 离心管中,加入 2 mL 苯甲醛溶液,涡旋 90 s,加入 2 mL 己烷,涡旋 120 s,待溶液分层后取上层过滤进样。

1.3.3　色谱条件　Dikma Technologies Diamonsil C18 色谱柱(250×4.6 mm, 5μm);流动相为乙二胺四乙酸钠 0.03% m/V∶乙腈(300∶700,*V/V*);流速1 mL/min;进样量 10 μL;运行时间 20 min;柱温 30 ℃;紫外检测波长 268 nm。

#### 1.3.4　方法学考察

1.3.4.1　专属性　取 2 mL 10%的盐酸溶液衍生化后进样,以不同浓度的标准溶液作为参考,观察空白溶液的色谱图,考察方法的专属性。

1.3.4.2　线性及范围　将肼浓度分别为 5、10、20、

50、100、150 ng/mL 的肼标准溶液衍生化后进样。将得到的峰面积对进样浓度进行线性回归,得到回归方程、相关系数及线性范围。

1.3.4.3　检测限和定量限　将肼标准溶液逐步稀释,衍生化后进样,记录色谱图。以检出目标峰峰高为 3 倍基线噪音值时所对应的溶液浓度为该方法的检测限浓度,以检出目标峰峰高为 10 倍基线噪音值时所对应的溶液浓度为该方法的定量限浓度。

1.3.4.4　精密度　将浓度为 50 ng/mL 肼标准溶液衍生化后在 1.3.3 项的色谱条件下进行分析,平行进样 6 次,测定峰面积间的相对标准偏差(*RSD*)。

1.3.4.5　添加回收率　精密称取 9 份 0.5 g 沙咪珠利样品放置在不同的 15 mL 离心管中,加入适量的肼标准溶液,并用 10%的盐酸溶液稀释,得到添加浓度分别为 10、50、100 ng/mL 各 3 个添加溶液。将各个溶液超声 10 min,4000 r/min 离心 5 min,取上清液衍生化后在 1.3.3 项的色谱条件下进行分析,测定高、中、低三种添加浓度的回收率。

1.3.4.6　耐用性　将肼标准溶液衍生化后在 1.3.3 项的色谱条件下进行分析,然后分别改变 1.3.3 项色谱条件中的流速(±0.2 mL/min)、柱温(±5 ℃)、流动相配比(±2%)、色谱柱(更换色谱柱),进样分析,考察色谱条件变动时,该方法的耐用性。

## 2　结果与分析

2.1　专属性　空白对照及标准品的色谱图如图 1 所示。空白对照的色谱图在肼的出峰位置并无峰出现,表明空白溶剂对肼的测定并无影响。对照品的峰与其他峰并无干扰且峰型较好,这说明对照品能与其他物质实现良好分离,该方法的专属性较好。

2.2　线性及范围　以对照品的浓度对其峰面积进行线性回归,得到回归方程:$Y=260.35X+796.12$,$R^2=0.9993$。这表明肼在 5~150 ng/mL 的范围内线性良好。

2.3　检测限及定量限　以检出目标峰峰高为 3 倍基线噪音值时所对应的溶液浓度为该方法的检测限浓度,以检出目标峰峰高为 10 倍基线噪音值时所对应的溶液浓度为该方法的定量限浓度。经测定,该方法的检测限浓度及定量限浓度分别为 3 ng/mL 及 8 ng/mL。根据添加回收率的测定方法,沙咪珠利样品中水合肼的检测限浓度及定量限浓度分别为 0.06 mg/kg 及 0.16 mg/kg。

2.4　精密度　将同一浓度的肼对照品溶液重复进样 6 次,测得其峰面积间的相对标准偏差 *RSD* = 0.51%,这表明该方法的精密度较好(表 1)。

2.5　添加回收率　对供试样品分别进行 10、50、100 ng/mL 三个浓度的添加回收试验,测得高、中、低三个浓度的添加回收率分别为 102.60%、100.21%、105.58%, *RSD* 分别为 2.66%、3.16%、2.31%,这表明该方法的准确度较好(表 2)。

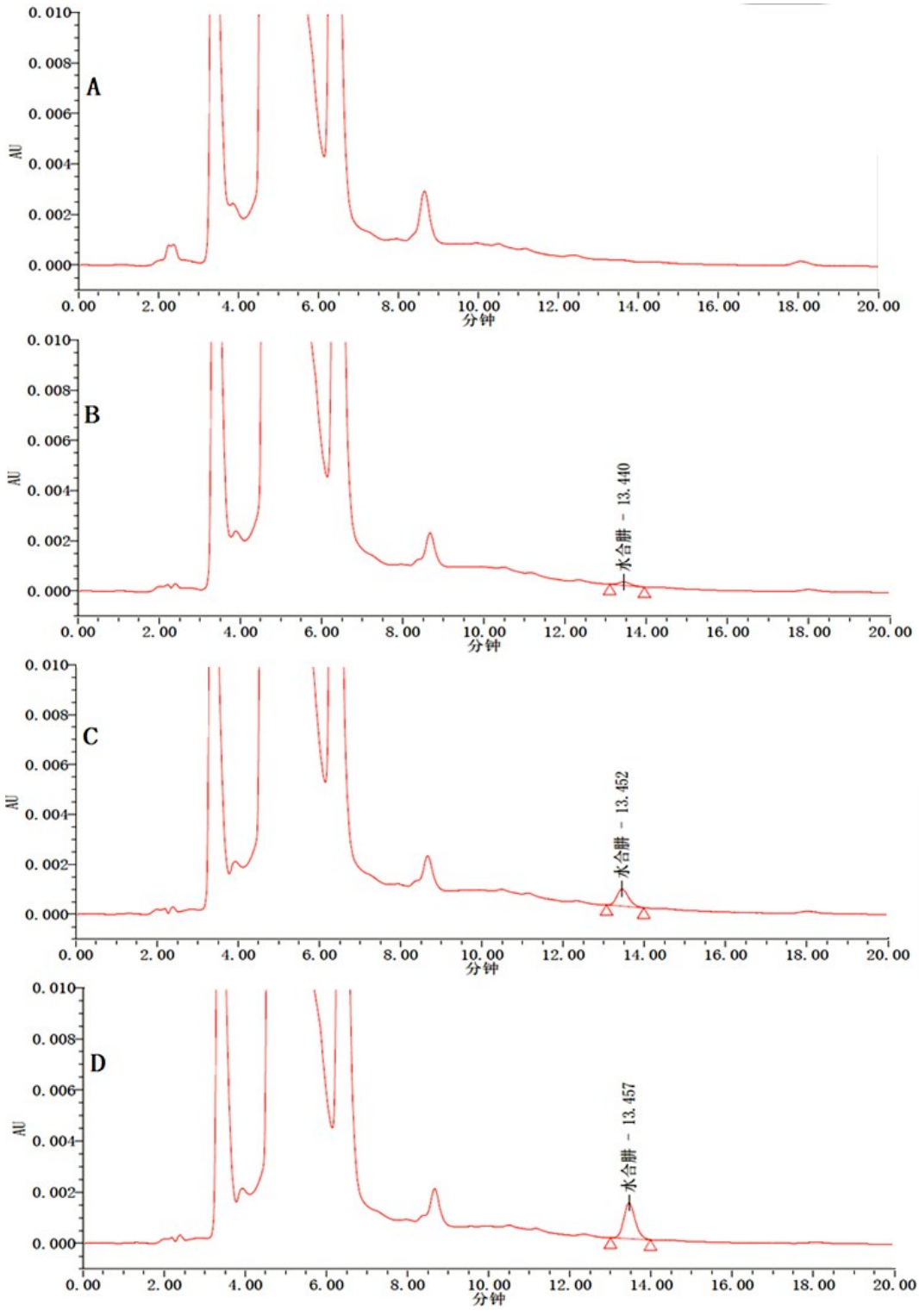
2.6　耐用性　分别改变 1.3.3 项色谱条件中的柱温、流速、流动相配比、色谱柱条件,测定同一肼标准溶液。结果表明,各色谱条件下的主峰均能与其他峰实现良好分离,且峰面积的测定值较稳定,测定结果未产生较大影响,该方法具有一定的耐用性。

2.7　实际样品测定　选取 3 批沙咪珠利样品,准确称取 0.5 g 样品至 15 mL 离心管中,加入 10%的盐酸溶液 10 mL,将各个溶液超声 10 min,4000 r/min 离心 5 min,取上清液衍生化后在 1.3.3 项的色谱条件下进行分析,测定沙咪珠利样品中的肼含量。经测定三批样品中的肼浓度均在定量限浓度以下。

**表 1　肼供试溶液精密度试验结果**

**Tab 1　Precision test results**

| 进样次序 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | *RSD*/% |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 峰面积 | 14614 | 14831 | 14769 | 14693 | 14693 | 14752 | 0.51 |




A 空白对照;B 10ng/mL 的肼标液;C 50ng/mL 的肼标液;D 100ng/mL 的肼标液

A blank; B Hydrazine standard solution 10ng/mL; C Hydrazine standard solution 50ng/mL; D Hydrazine standard solution 100ng/mL

**图 1　肼含量测定的专属性色谱图**

**Fig 1　Specific chromatogram of determination of hydrazine content**

**表 2　沙咪珠利中肼添加回收率试验结果**

**Tab 2　Experimental results of recovery**

| 添加浓度/(ng · mL$^{-1}$) | 重复次数 | 回收率/% | 平均回收率/% | 组内 *RSD*/% |
|---|---|---|---|---|
| | 1 | 102.76 | | |
| 10 | 2 | 108.39 | 105.58 | 2.66 |
| | 3 | 105.60 | | |
| | 1 | 98.74 | | |
| 50 | 2 | 103.84 | 100.21 | 3.16 |
| | 3 | 98.04 | | |
| | 1 | 104.58 | | |
| 100 | 2 | 103.24 | 102.60 | 2.31 |
| | 3 | 99.97 | | |

## 3　讨论与小结

### 3.1　样品前处理

3.1.1　衍生化试剂　柱前衍生化是对低含量物质进行液相测定的一种有效方法[12]，现行的用于肼测定的方法大多数将肼衍生化后测定其衍生物，而不将其衍生化的方法，如使用钴酞菁电极分析肼水溶液的电流分析法等则较为少用[13]。用于肼衍生化的试剂有肉桂醛、氯苯甲醛、五氟苯甲醛、香草醛、苯甲醛、水杨醛等。肉桂醛、氯苯甲醛、五氟苯甲醛多用于生物样品的分析，应用气相色谱技术进行检测；香草醛多用于环境样品的分析，应用紫外可见分光光度法进行检测；苯甲醛用于药物或环境样品的分析，液相色谱技术及气相色谱技术均可应用于其衍生物的检测分析。系列试验结果表明，相比于其他衍生化试剂，苯甲醛与肼生成的衍生物在液相色谱检测中有较高的灵敏度。本研究的目的是建立测定药品沙咪珠利中肼含量的高效液相色谱方法，因此采用苯甲醛作为肼的衍生化试剂。

3.1.2　衍生化条件　肼盐酸盐与苯甲醛溶液反应需在酸性条件下进行，故试验中首先将肼对照品及待测样品溶解于盐酸溶液中。某些药物中肼含量测定以苯甲醛作为衍生化试剂时，常会在加入苯甲醛溶液后出现药物大量析出的现象。为提高药物在苯甲醛溶液中的溶解度，增加衍生化效率，往往会在药物衍生化时对其进行加热处理。本实验中，在向药物中加入苯甲醛溶液时，未出现明显的药物析出现象，且欧洲药典中收录的衍生化方法大多数在常温下进行，故本试验的衍生化过程也在常温下进行。与有机相萃取的溶剂有正己烷、正庚烷、正辛烷等，正庚烷、正辛烷沸点较高多用于加热条件下的萃取，本试验在常温下反应且正己烷为较为常用的有机相萃取溶剂，故将其用于本试验的有机相萃取。

3.2　色谱条件的确定　采用相关文献中的检测波长进行试验时发现空白溶液在肼的出峰位置有干扰，故重新选择检测波长。分别配制盐酸-己烷提取液、苯甲醛-水-己烷提取液、苯甲醛-盐酸-己烷提取液以及水合肼对照品衍生溶液，在紫外分光光度计下进行全波长扫描，测定结果如图 2 所示。

该紫外吸收图由上至下依次为水合肼对照品衍生溶液谱图、苯甲醛-水-己烷提取液和苯甲醛-盐酸-己烷提取液重合谱图、盐酸-己烷提取液谱图。由图 2 可知，水合肼对照品衍生溶液相比于其他空白溶液在 205～220、260～280、300～330 nm 的波长范围内有较强的紫外吸收，故在这些波长范围内选用几个波长条件作为液相色谱的检测波长并做进一步研究。将空白溶剂及肼标准溶液衍生化后进样测定，除紫外波长不同外，其他色谱条件均按 1.3.3 项的要求。结果表明，205～220 nm 及 300～330 nm 检测波长下测定的空白溶剂均对肼的测定均有干扰或肼标液的测定结果不理想，而 268 nm 波长下测定的空白溶剂均对肼的测定无干扰且肼

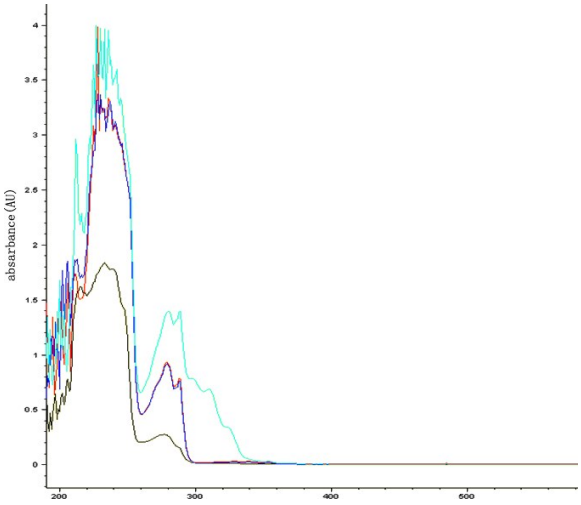



**图 2　紫外吸收图**

**Fig 1　UV absorption diagram**

标液的测定结果较为理想。因此,选取 268 nm 作为肼测定的最终检测波长。结合其他文献资料,最终确定该方法的色谱条件为 Dikma Technologies Diamonsil C18 色谱柱(250×4.6 mm, 5μm);流动相为乙二胺四乙酸钠 0.03% m/V∶乙腈(300∶700, *V/V*);流速 1 mL/min;进样量 10 μL;运行时间 20 min;柱温 30 ℃;紫外检测波长 268 nm。

本研究建立了一种沙咪珠利原料药中肼残留的高效液相色谱检测方法,该方法操作简便,准确快速,重现性好,能够满足药物相关物质残留的检测要求。

## 参考文献:

[1] 李 明. 水合肼的生产应用及市场前景[J]. 精细化工原料及中间体,2007,(8):16-19.
Li Ming. Production and Application of Hydrazine Hydrate and Its Market Prospect[J]. Fine Chemical Industrial Raw Materials & Intermediates, 2007,(8):16-19.

[2] 崔小明. 水合肼的生产、应用及市场前景[J]. 中国氯碱,2007,(11):13-16.
Cui Xiaoming. Production, Application and Market Prospect of Hydrazine Hydrate[J]. China Chlor-Alkali, 2007,(11):13-16.

[3] 郑淑君. 水合肼的发展、现状、展望[J]. 化学推进剂与高分子材料,2005,(1):17-21.
Zheng Shujun. Development, present situation and Prospect of hydrazine hydrate[J]. Chemical Propellants&Polymeric Materials, 2005,(1):17-21.

[4] Hydrazine/hydrazine sulphate. Integrated Risk of Information System(IRIS), National Library of Medicine, National Institute of Health, Washiongton DC.

[5] Environmental health criteria NO. 68 hydrazine(1987). International Programme on Chemical Safety(IPCS).

[6] Guidance on the Limits of Genotoxic Impurities. Ref: CPMP/SWP/5199/02. EMEA ;2004[guideline].

[7] 王 莹,刘卫国,赵 冰,等.气相色谱面积归一法测定无水肼组分含量[J].化学分析计量,2016,1:34-37.
Wang Ying, Liu Weiguo, Zhao Bing, *et al*. Determination of Hydrazine Hydrate Content by Gas Chromatography Area Normalization Method[J]. Chemical Analysis and Meterage, 2016,1:34-37.

[8] 赵小红,匙丹丹,何伟国,等. 气相色谱面积归一法测定无水肼的纯度和水含量[J]. 化学推进剂与高分子材料,2015,4:94-96.
Zhao Xiaohong, Chi Dandan, He Weiguo, *et al*. Determination of purity and water content of anhydrous hydrazine by gas chromatographic area normalization method[J]. Chemical Propellants & Polymeric Materials, 2015,4:94-96.

[9] 黄旭锋. 便携式分光光度法测定水中水合肼的研究[J]. 河南科学,2014,9:1845-1848.
Huang Xufeng. Study on Determination of Hydrazine Hydrate in Water by Portable Spectrophotometry[J]. Henan Sciences, 2014, 9:1845-1848.

[10] 颜琳琦,罗 镭,戚绿叶. HPLC 法测定奥扎格雷中的合成中间体及降解产物[J]. 中国卫生检验杂志,2015,(15):2489-2490.
Yan Linqi, Luo Lei, Qi Lvye. Determination of synthetic intermediates and degradation products in Ozagrel by HPLC[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology. 2015,(15):2489-2490.

[11] 罗志琴. 医药中间体三氟丙酸和三苯基氯甲烷的柱前衍生化色谱分析研究[D].长沙:中南大学,2012.
Luo Zhiqin. Analytical studies on pharmaceutical intermediates 3, 3, 3 - trifluoropropionic acid and triphenylchloromethane by chromatography with pre-column derivatization[D]. Changsha: Central South University,2012.

[12] Elder D P, 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): 900-910.

[13] 马秋冉,张 璐,戴 青,等. 柱前衍生化-高效液相色谱法检测疫苗中游离甲醛含量[J]. 中国兽药杂志,2016,50(8):20-23.
Ma Qiuran, Zhang Lu, Dai Qing, *et al*. Determination of free formaldehyde content in vaccine by pre-column derivatization HPLC[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2016,50(8):20-23.

(编 辑:侯向辉)