

高效液相色谱法检测西药制品中甲醛残留的方法研究

董海峰, 沈上圯, 李琴梅, 刘伟丽, 魏晓晓, 段艳, 高峡, 张梅*

(北京市理化分析测试中心, 北京市食品安全分析测试工程技术研究中心, 有机材料检测技术与质量评价
北京市重点实验室, 北京 100094)

摘要: **目的** 针对西药制品建立一种基于高效液相色谱(HPLC)的甲醛残留检测方法。**方法** 西药中甲醛经2,4-二硝基苯肼衍生化得到2,4-二硝基苯腙后, 采用高效液相色谱进行分析, 以乙腈-水(60:40, V:V)为流动相进行等度洗脱。并对高效液相色谱条件进行优化。考察所建方法的线性关系、检出限、精密度、回收率、专属性、耐用性、样品及标准溶液的稳定性。**结果** 甲醛在2.38~14.28 mg/L内呈现良好的线性关系, 回收率为92.21%, 相对标准偏差(RSD)为1.897%。**结论** 该方法具有较强的专属性和耐用性, 可用于西药制品中甲醛残留的实际检测。

关键词: 甲醛; 高效液相色谱; 西药制品

Determination of formaldehyde residues in medicine by high performance liquid chromatography

DONG Hai-Feng, SHEN Shang-Yi, LI Qin-Mei, LIU Wei-Li, WEI Xiao-Xiao, DUAN Yan,
GAO Xia, ZHANG Mei*

(Beijing Key Laboratory of Organic Materials Testing and Quality Evaluation, Beijing Engineering Research Center of Food Safety Analysis, Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis, Beijing 100094, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for determination of formaldehyde residues in medicine by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Formaldehyde in medicine reacted with 2,4-dinitrobenzenhydrazine to form 2,4-dinitrobenzenhydrazone, which was analyzed by high performance liquid chromatography with acetonitrile-water(60:40, V:V) as the mobile phase. Conditions for sample analysis by HPLC were optimized. The linearity, limits of detections (LODs), precision, recovery, specificity, durability and stability of sample and standard solutions were studied. **Results** This analytical method showed a good linear relationship which was 2.38~14.28 mg/L. The recovery and relative standard deviation (RSD) was 92.21% and 1.897%, respectively. **Conclusion** The test result demonstrated that this analytical method exhibits strong specificity and durability, and it can meet the requirement for the formaldehyde residual in medicine.

KEY WORDS: formaldehyde; high performance liquid chromatography; medicine

*通讯作者: 张梅, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为有机分析。E-mail: zhmei@scbg.ac.cn

*Corresponding author: ZHANG Mei, Ph.D, Assistant Researcher, Beijing Centre for Physical and Chemical Analysis. Fuhua Building B, 7 Fengxian Middle Road, Haidian District, Beijing 100094, China. E-mail: zhmei@scbg.ac.cn

1 引言

甲醛是一种无色、有强烈刺激性气味的气体,易溶于水、醛类和醇类等^[1,2]。甲醛是一种破坏生物细胞蛋白质的公认强毒性物质^[3-5],长期摄入甲醛会造成中枢神经的麻痹,进一步造成肺水肿、肝昏迷、肾衰竭等一系列危害^[6]。世界卫生组织已经确认甲醛为致畸、致癌物质,长期接触和摄入会导致基因突变^[7]。甲醛在制药厂中主要作为反应物或催化剂使用在药品合成过程中,或作为消毒剂用于洁净区空间的灭菌^[8]。这些过程中可能导致甲醛在药品中的残留。由于甲醛为小分子化合物,易挥发,并且在紫外区的吸收较低,无法直接采用高效液相法进行检测。故本文采用 2,4-二硝基苯肼^[9]对于样品中甲醛进行衍生化,在加热条件下 2,4-二硝基苯肼能与甲醛发生特异反应产生产物 2,4-二硝基苯腙^[10-13]。甲醛衍生后采用高效液相法进行检测,并且通过优化液相色谱条件以达到较好的分离效果,提高方法的可靠性。该方法应用于西药制品中甲醛残留的测定,结果显示该方法操作简单、结果准确。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

LC-6AD 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器(日本岛津公司);电子天平(Mettler Toledo XS205);Milli-Q 超纯水器(美国 Millipore 公司);涡旋仪(MOBIO 公司);恒温水浴锅(上海蓝凯仪器仪表有限公司)。

盐酸达帕西汀(样品来自某制药厂);甲醛溶液(10.4 mg/mL,阿拉丁);乙腈(色谱纯,美国 Fisher 公司);实验用水为经过 Milli-Q 净化系统(0.22 μm 过滤膜)过滤的去离子水;其他试剂均为分析纯。

缓冲溶液:称取 728 mg 乙酸钠,以适量超纯水溶解,加入 200 μL 冰乙酸,超纯水定容至 100 mL;

2,4-二硝基苯肼溶液:称取 2,4-二硝基苯肼 60 mg,用乙腈溶解定容至 100 mL;

甲醛衍生溶液:量取 100 mL 缓冲溶液和 100 mL 2,4-二硝基苯肼溶液混匀。

2.2 标准溶液配制

准确称取甲醛标准溶液并置于容量瓶中,准确加入 10.0 mL 甲醛衍生溶液,使用超纯水稀释并定容,制得质量浓度为 50 mg/L 的标准储备液。使用前再用

超纯水将储备液稀释至所需的标准工作溶液。所有标准溶液在 4 °C 保存。

2.3 样品前处理

称取样品(盐酸达帕西汀)100 mg(准确至 0.01 mg),置于 10 mL 具塞比色管中,准确加入 10.0 mL 甲醛衍生溶液。盖上塞子,涡旋混匀后置于 60 °C 恒温水浴中 1 h,取出冷却至室温。取清液过 0.22 μm 滤膜上机测定。

2.4 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);检测器:二极管阵列检测器^[14,15];流动相:乙腈-水(60:40, V:V);流速:1.0 mL/min;柱温 30 °C;检测波长:355 nm;进样量:20 μL。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的优化

对乙腈和水的比例进行优化,分别对乙腈-水(70:30, V:V)、乙腈-水(60:40, V:V)和乙腈-水(50:50, V:V)流动相体系进行考察。结果显示,流动相为乙腈-水(60:40, V:V)时,2,4-二硝基苯腙与其他物质之间能较好的分离,分离度为 5.996,理论塔板数为 16007.315,且时间较短。图 1 为最优方法下 2,4-二硝基苯腙标准品的高效液相色谱图;图 2 为最优方法下样品中甲醛衍生物(2,4-二硝基苯腙)的高效液相色谱图。

3.2 方法的线性关系和检出限

配制甲醛标准溶液,在最优的液相色谱条件下依次进行进样,以甲醛标准溶液浓度为横坐标(X),甲醛的峰面积为纵坐标(Y)绘制甲醛标准溶液的校正曲线。结果显示,甲醛在浓度范围为 2.38~14.28 mg/L 内呈现良好的线性关系,线性方程为: $Y=701385X+24668$,相关系数为 0.9999。以甲醛峰面积的信噪比(S/N) 3 为标准确定方法检出限,以 S/N 10 为标准确定方法的定量限。结果显示,该方法的甲醛检出限为 0.046 mg/kg,定量限为 0.162 mg/kg。

3.3 加标回收率和精密度

向已知浓度的样品中添加浓度为 4.76 mg/L 的甲醛标准溶液,进行回收率和精密度实验。结果显示,该方法的甲醛回收率为 92.21%(n=3),相对标准偏差(RSD)为 1.897%(n=3)。

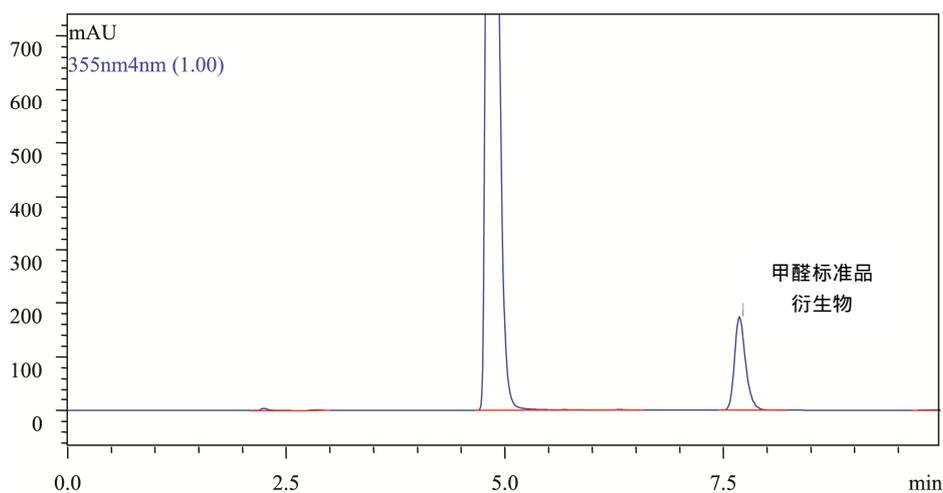


图 1 甲醛标准品衍生物的高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of formaldehyde standard

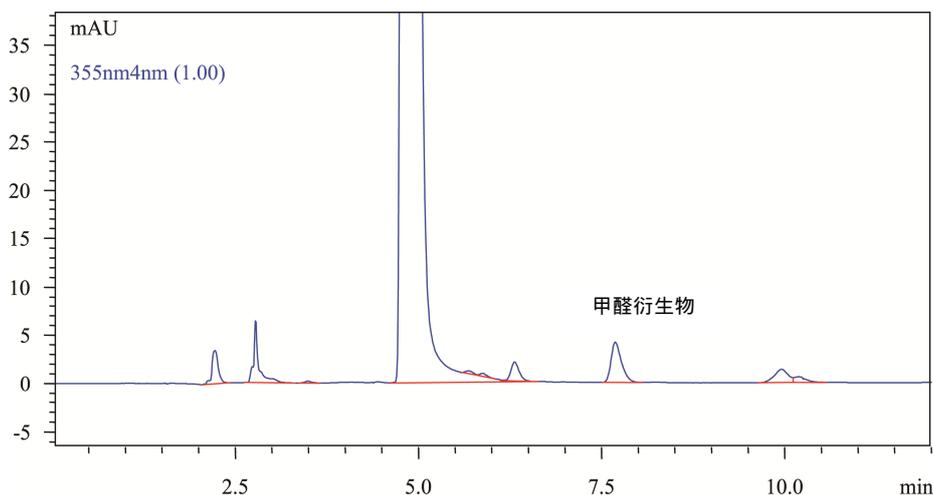


图 2 样品中甲醛衍生物的高效液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of formaldehyde in sample

3.4 专属性

使用 3 mol/L HCl 对供试品在 60 °C 水浴下破坏 3 h。样品经过酸破坏后, 对样品进行衍生化和仪器检测。如表 1 所示, 酸破坏后空白溶剂峰、样品峰与甲醛衍生物峰无干扰, 并且酸破坏对甲醛含量检测无影响。酸破坏样品、供试品高效液相色谱图如图 3 所示:

3.5 样品及标准溶液稳定性

样品及标准溶液经过前处理后, 进行室温下放置, 对不同放置时间(0、2、4、6、8 h)的样品及甲醛

标准品衍生物溶液进行上机检测以验证样品及标准溶液的稳定性, 表 2 中为不同放置时间下样品及甲醛标准品衍生物溶液的保留时间、峰面积以及相对标准偏差。

3.6 仪器方法耐用性

通过改变最优的仪器条件, 流速 ± 0.1 mL/min, 温度 ± 3 °C, 流动相比比例微小变化, 考察方法的变化对检测结果的影响。结果显示, 最优的仪器方法具有较好的耐用性。表 3 为不同仪器方法下样品的耐用性实验谱图信息。

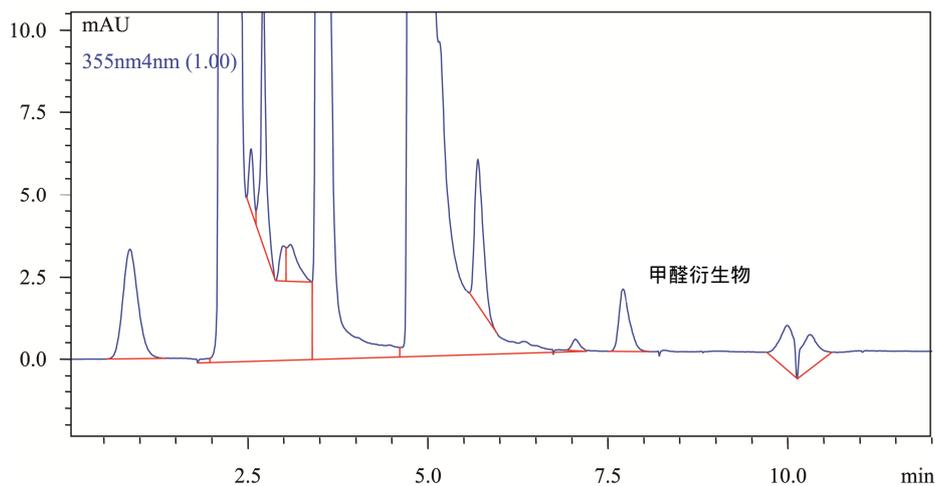


图 3 酸破坏后样品中甲醛衍生物的高效液相色谱图

Fig. 3 HPLC chromatogram of formaldehyde in sample which was destroyed by acid

表 1 专属性实验谱图信息

Table 1 The information of specificity experimental

	保留时间 min	峰面积	RSD %
未经过酸破坏	7.798	49328	
	7.771	49355	0.398
	7.752	49003	1.069
经过酸破坏	7.745	48760	
	7.729	49465	1.430
	7.724	48070	

表 2 稳定性实验谱图信息

Table 2 The information of stability experimental

	级别	保留时间 min	峰面积	RSD %
供试品	供试品 0 h	7.703	47470	
	供试品 2 h	7.699	46961	
	供试品 4 h	7.702	46165	0.390
	供试品 6 h	7.697	46426	
	供试品 8 h	7.691	47152	
甲醛溶液	甲醛标准溶液 0 h	7.690	3283078	
	甲醛标准溶液 2 h	7.697	3296982	
	甲醛标准溶液 4 h	7.654	3312220	1.138
	甲醛标准溶液 6 h	7.704	3314785	
	甲醛标准溶液 8 h	7.695	3305691	

表 3 耐用性实验谱图信息
Table 3 The information of durability experimental

方法	空白		甲醛标准溶液		供试品		样品含量 mg/kg	RSD %
	保留时间 min	峰面积	保留时间 min	峰面积	保留时间 min	峰面积		
原始方法	7.7	16628	7.695	3091458	7.704	49759	5.127	
流速 1.1 mL/min	7.023	15806	7.024	2809538	7.015	47812	5.451	
流速 0.9 mL/min	8.546	17174	8.529	3245214	8.534	50791	4.956	
乙腈-水(58:42)	8.424	15756	8.432	3097714	8.432	47190	4.854	4.67%
乙腈-水(62:38)	7.126	16571	7.111	3093413	7.117	50923	5.313	
柱温箱温度 33 °C	7.607	16616	7.611	3093573	7.614	51713	5.427	
柱温箱温度 27 °C	7.91	16217	7.977	3098412	7.938	51310	5.418	

表 4 9 个样品检测结果
Table 4 The results of 9 samples

样品批次	保留时间 min	峰面积	样品重量 mg	含量 mg/kg
130801	7.701	18467	100.74	未检出
130802	7.692	49533	100.56	1.651
130803	7.693	19093	99.93	未检出
130901	7.696	18161	101.69	未检出
130902	7.694	18967	100.44	未检出
130903	7.699	16770	101.43	未检出
140701	7.686	65421	101.49	3.865
140801	7.68	61179	101.52	3.269
140802	7.667	60524	100.79	3.199

3.7 样品检测

使用 2.3 中建立的前处理方法和 2.4 中建立的仪器检测方法对某公司不同日期不同批次的 9 个盐酸达泊西汀样品进行了检测。9 个实际样品为某制药厂不同批次中随机选取的样品, 9 中样品均为白色粉末状。结果显示, 样品中甲醛残留量均小于限量值 4.76 mg/kg 《中华人民共和国药典(2010 年版)》。表 4 为 9 个样品的检测结果。

4 结论

本文建立了高效液相色谱法检测西药制品中甲醛溶剂残留的分析方法。该方法采用 2,4-二硝基苯肼溶液对样品进行衍生化后, 以乙腈-水(60:40, V:V)为

流动相, 采用等度洗脱的方式进行 HPLC-DAD 检测, 甲醛具有较好的分离效果。甲醛在 2.38-14.28 mg/L 内呈现良好的线性关系 (线性方程为: $Y=701385X+24668$, 相关系数为 0.9999), 回收率为 92.21%, 相对标准偏差(RSD)为 1.897%, 该方法的甲醛检出限为 0.046 mg/kg, 定量限为 0.162 mg/kg。该方法适用性强、结果准确可靠、灵敏度高。使用已经建立的方法对某公司不同日期不同批次的 9 个盐酸达泊西汀样品进行了检测, 结果显示该方法可以满足对西药制品中甲醛溶剂残留的分析检测要求。

参考文献

- [1] 董华模. 化学物的毒性及其环境保护参数手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.

- Dong HM. Toxicity of chemicals and environmental protection parameter manual [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1988.
- [2] 张锦. 甲醛毒性的研究进展[J]. 职业与健康, 2006, (23): 2041-2044.
Zhang J. The research progress of toxicity of formaldehyde [J]. Occup Health, 2006, (23): 2041-2044.
- [3] 程文文, 李兰, 胡传禄, 等. 气态甲醛致小鼠骨髓细胞 DNA-蛋白质交联的研究[J]. 生态毒理学报, 2010, (5): 262-267.
Cheng WW, Li L, Hu CL, *et al.* Gaseous formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in mouse bone marrow cells [J]. Asian J Ecotoxicol, 2010, (5): 262-267.
- [4] 吴富忠, 黄丽君. 鱿鱼及制品中甲醛来源与产生规律探索[J]. 中国公共卫生管理, 2006(22): 256-258
Wu FZ, Huang LJ. The squid and sources of formaldehyde and generates regular products [J]. Chin J Pub Health Manag, 2006, (22): 256-258.
- [5] 谢颖, 易义珍, 唐明德, 等. 甲醛对雄性小鼠生殖细胞的毒性[J]. 环境与健康, 2003, (20): 84-85.
Xie Y, Yi YZ, Tang MD, *et al.* Toxicity of formaldehyde on germ cells of male mice [J]. J Environ Health, 2003, (20): 84-85.
- [6] 梁志锋, 扬斌, 林军, 等. 甲醛吸入致大鼠急性肺水肿动物模型的建立[J]. 环境与职业医学, 2007, (23): 204-206.
Liang ZF, Yang B, Lin J, *et al.* Establishment of animal model of aelite pulmonary edema on rat induced by formaldehyde inhalation [J]. J Environ Med, 2007, (23): 204-206.
- [7] 张晓凤, 项锦欣, 付钰洁. 甲醛检测方法研究进展[J]. 重庆工学院学报, 2007, (21): 140-143.
Zhang XF, Xiang JX, Fu YJ, Research progress in analysis methods for formaldehyde [J]. J Chongqing Inst Technol, 2007, (21): 140-143.
- [8] 杨宁波, 吕晓倩, 孙新蕊. 制药洁净厂房设备设施表面甲醛残留的测定[J]. 河北化工, 2011, (34): 27-30.
Yang NB, Lv XQ, Sun XR. Determination on residual of formaldehyde the surface of facilities and equipments in cleanroom [J]. Hebei Chem Eng, 2011, (34): 27-30.
- [9] 陈笑梅, 施旭霞, 朱卫建, 等. 高效液相色谱直接测定甲醛衍生物反应条件的研究[J]. 分析化学, 2004, (11): 1489-1491.
Chen XM, Shi XX, Zhu WJ, *et al.* A study of the reaction condition for the direct determination of formaldehyde derivative by high performance liquid chromatography [J]. Chin J Anal Chem, 2007, (11): 1489-1491.
- [10] 孙敏, 刘二东, 宋春霞, 等. 二硝基苯肼柱前衍生 HPLC 法测定啤酒中甲醛[J]. 化学工程师, 2006, (09): 26-28.
Sun M, Liu ED, Song CX, *et al.* Determination of trace formaldehyde in beer by HPLC with pre-column dinitrophenylhydrazine derivation [J]. Chem Eng, 2006, (09): 26-28.
- [11] 陈辉, 黄龙江, 滕大为. 高效液相色谱法测定硫酸二甲酯中的甲醛含量[J]. 青岛科技大学学报, 2013, (34): 457-460.
Chen H, Huang LJ, Teng DW. Determination of formaldehyde in diethyl sulfate by HPLC [J]. J Qingdao Univ Sci Technol, 2013, (34): 457-460.
- [12] 谭莹, 倪竹南, 张晶, 等. HPLC 法检测食品中的甲醛[J]. 中国卫生检疫杂志, 2011, (21): 851-853.
Tan Y, Ni ZN, Zhang J, *et al.* Determination of formaldehyde in food with HPLC [J]. Chin J Health Lab Technol, 2011, (21): 851-853.
- [13] 于文佳, 卫碧文, 郑翊, 等. 分散液液微萃取-高效液相色谱串联质谱法快速测定水迁移相中甲醛[J]. 分析实验室, 2014, (33): 597-600.
Yu WJ, Wei BW, Zheng Y, *et al.* Rapid analysis of aqueous migration of formaldehyde by dispersive liquid-liquid micro-extraction and high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2014, (33): 597-600.
- [14] 周众, 王传现, 方晓明, 等. 奶和奶制品中甲醛含量测定方法研究[J]. 卫生研究, 2011, (40): 107-108.
Zhou Z, Wang CX, Fang XM, *et al.* The determination method of formaldehyde content in milk and milk products [J]. J Hyg Res, 2011, (40): 107-108.
- [15] 邹悦, 杨式华, 王惠, 等. 超高效液相色谱法测定卷烟包装纸中的甲醛和乙醛[J]. 云南化工, 2012(39):41-44
Zou Y, Yang SH, Wang H, *et al.* Determination of formaldehyde and acetaldehyde in cigarette wrapping paper by UPLC [J]. Yunnan Chem Technol, 2012, (39): 41-44.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



董海峰, 硕士, 实习研究员, 主要研究领域为食品安全, 色谱分析检测。
E-mail: donghaifeng66@aliyun.com



张梅, 博士, 助理研究员, 主要研究方向为未知物成分分析与有机结构鉴定。
E-mail: zhmei@scbg.ac.cn