

测试·分析

药用胶塞中二丁基二硫代氨基甲酸锌的高效液相色谱分析方法研究

谢兰桂^{1,2}, 袁淑胜^{1,2}, 韩小旭^{1,2}, 杨会英^{1,2}, 赵霞^{1,2*}, 肖新月^{1,2}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 国家药品监督管理局药用辅料质量研究与评价重点实验室, 北京 100050)

摘要:建立高效液相色谱(HPLC)法测定药用胶塞中二丁基二硫代氨基甲酸锌的残留量的方法。药用胶塞浸于液氮脆化后粉碎,经四氢呋喃-乙腈(体积比为10:90)超声提取制得供试品溶液。以四氢呋喃-乙腈(体积比为35:65)为流动相,供试品溶液经SunFire C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)分离后,用254 nm检测波长进行HPLC测试。试验结果显示:二丁基二硫代氨基甲酸锌的质量浓度在20~750 μg·mL⁻¹范围内与HPLC峰面积的线性相关性良好,相关因数为0.999 9;高、中、低质量浓度的供试品溶液的HPLC峰面积的相对标准偏差小于3%,测试精密度高;本方法检出限和定量限分别为20和30 ng,加标回收率为98.84~102.58%,供试品溶液在6 h内稳定。本方法简便、准确、灵敏、稳定,适用于测定药用胶塞中二丁基二硫代氨基甲酸锌的残留量。

关键词:药用胶塞;二丁基二硫代氨基甲酸锌;高效液相色谱法;金属螯合物

中图分类号:TQ336.6;TQ330.38⁺5

文献标志码:A

文章编号:1000-890X(2022)07-0547-05

DOI:10.12136/j.issn.1000-890X.2022.07.0547



OSID开放科学标识码
(扫码与作者交流)

药用胶塞是药品包装材料中一类典型的密封制品,常与玻璃、陶瓷等包装容器搭配使用,用于包装药用液体和固体制剂。药用胶塞由橡胶配合适宜的助剂制备而成。胶塞中常用助剂有硫化剂、促进剂、防老剂、填充剂、防焦剂、着色剂以及活性剂等。

硫代氨基甲酸锌是常见的促进剂^[1]。然而,硫代氨基甲酸锌可释放游离仲胺,与亚硝化剂反应生成N-亚硝胺^[2]。亚硝胺可增大食道癌、咽癌、膀胱癌、肺癌、胃癌和白血病的患病风险,也可能导致操作工人出现鼻出血、眼喉灼热、声音嘶哑、咳嗽、恶心和头痛的症状。为保障橡胶产品生产者以及使用人员的健康和安全^[3-4],《化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)》^[5]

将硫代氨基甲酸锌类化合物(包括二甲基二硫代氨基甲酸锌、二乙基二硫代氨基甲酸锌和二丁基二硫代氨基甲酸锌^[6])列为药用密封件慎用助剂,GB 9685—2016《食品接触材料及制品用添加剂使用标准》^[7-8]将二乙基二硫代氨基甲酸锌列为食品接触材料及制品需要控制用量的助剂,并规定了二乙基二硫代氨基甲酸锌最大使用量(占总基材质量的百分比)不得超过1.5%。

虽然《化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)》《食品接触材料及制品用添加剂使用标准》对硫代氨基甲酸锌类化合物有限量使用要求,但未收录定量分析方法。检索发现文献中鲜有报道药用胶塞中二丁基二硫代氨基甲酸锌的定量分析方法,而类似化合物二甲基二

基金项目:国家药典委员会药品标准制修订研究课题(2018Y011)

作者简介:谢兰桂(1981—),女,湖南涟源人,中国食品药品检定研究院研究员,博士,主要从事药品包装材料的质量控制工作;袁淑胜(共同第一作者)(1992—),女,河北邢台人,中国食品药品检定研究院助理研究员,硕士,主要从事药品包装材料的检测工作。

*通信联系人(rayradix@126.com)

引用本文:谢兰桂,袁淑胜,韩小旭,等.药用胶塞中二丁基二硫代氨基甲酸锌的高效液相色谱分析方法研究[J].橡胶工业,2022,69(7):547-551.

Citation: XIE Langui, YUAN Shusheng, HAN Xiaoxu, et al. Study on HPLC analysis of zinc dibutylthiocarbamate in pharmaceutical rubber stoppers[J]. China Rubber Industry, 2022, 69(7): 547-551.

硫代氨基甲酸锌的定量分析方法有化学分析法^[9]、快速比色法、高效液相色谱(HPLC)法。化学分析法^[10]和快速比色法^[11]干扰因素多,不适合作为精准定量分析方法。HPLC法准确、高效^[12-13],更适合作为药用胶塞的质量控制手段,也方便今后建立标准分析方法。二丁基二硫代氨基甲酸锌为金属螯合物,即为2个或多个配体与同一金属离子形成整合环配合物。金属螯合物在HPLC上的保留行为并不理想^[14-15],谱峰拖尾、稳定性差,出现多个谱峰是常见现象^[16]。本研究通过排除不稳定因素,建立了可简便、准确、稳定、经济地定量分析二丁基二硫代氨基甲酸锌的HPLC方法,为建立二丁基二硫代氨基甲酸锌的标准分析方法奠定基础。

1 实验

1.1 试剂和样品

二丁基二硫代氨基甲酸锌对照品,中国食品药品检定研究院提供;四氢呋喃,国药集团化学试剂有限公司产品;乙腈,色谱纯,美国霍尼韦尔公司产品;纯化水,自制;液氮,北京普莱克斯实用气体有限公司产品;药用胶塞(3批),某企业产品。

1.2 仪器

Mettler XS205DU型电子天平,美国梅特勒-托利多公司产品;HPLC仪,美国沃世特公司产品。

2 结果与讨论

2.1 HPLC测试条件优化

2.1.1 优选色谱柱

从分离类型和经济角度出发,考察了2种色谱柱的分离效果。A号色谱柱为Sunfire C₁₈色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 美国沃世特公司产品),搭配的流动相为四氢呋喃-乙腈(35:65)(体积比,下同);B号色谱柱为离子色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm, 天津博纳艾杰尔科技有限公司产品),搭配的流动相为甲醇-磷酸二氢铵水溶液(90:10)。

结果显示:A号色谱柱的出峰时间稳定,谱峰峰形尖锐;B号色谱柱的出峰时间漂移,且可见解离峰。因此,选择Sunfire C₁₈色谱柱进行检测。

2.1.2 优选溶剂

二丁基二硫代氨基甲酸锌溶于苯、四氯化碳、氯仿、二硫化碳,微溶于醋酸乙酯、丙酮,不溶于水^[17-18]。为建立适用于二丁基二硫代氨基甲酸锌的HPLC分析方法,首先应探索其在常规HPLC分析用溶剂中的溶解性。

本工作考察了二丁基二硫代氨基甲酸锌对照品在甲醇、乙腈、四氢呋喃3种溶剂中的溶解性。通过配制质量浓度为0.75 mg·mL⁻¹的对照品溶液得出,二丁基二硫代氨基甲酸锌在甲醇中不易溶解,在乙腈中可超声溶解,在四氢呋喃中易溶解。考虑到四氢呋喃对液相体系有一定的腐蚀作用,不适合使用纯四氢呋喃溶解对照品,因此使用四氢呋喃与乙腈混合溶剂溶解对照品。配比试验结果显示,对照品在四氢呋喃-乙腈(10:90)中溶解良好,因此选择四氢呋喃-乙腈(10:90)作为溶剂。

2.1.3 优化流动相

在相同色谱条件(Sunfire C₁₈柱,流动相流速 1 mL·min⁻¹,波长 254 nm,柱温 30 ℃,进样量 2 μL)下,参考相关文献,考察了甲醇-磷酸二氢铵水溶液(90:10)、四氢呋喃-乙腈-磷酸二氢铵(25:50:25)、四氢呋喃-甲醇(35:65)、四氢呋喃-乙腈(35:65)4种流动相对二丁基二硫代氨基甲酸锌对照品HPLC行为的影响。

试验结果显示,在4种流动相中,二丁基二硫代氨基甲酸锌均可出峰。在甲醇-磷酸二氢铵水溶液(90:10)、四氢呋喃-乙腈-磷酸二氢铵(25:50:25)流动相中,二丁基二硫代氨基甲酸锌出现不同程度的解离,其原因是二丁基二硫代氨基甲酸锌为金属螯合物^[19-20],配体二丁基二硫代氨基甲酸与金属离子锌形成了4个配位键^[21],其中2个配位键由配体上酸性基团解离去H⁺后与金属离子锌配位形成,另两个配位键由2个配体上含孤电子对S与金属离子锌配位形成。二丁基二硫代氨基甲酸配体与金属离子锌配合后形成四原子环,四元环是热力学不稳定体系,易发生解离,且即使溶剂体系中含有缓冲盐也难以抑制其解离。

考虑到解离需要适宜的溶剂环境,尝试

除去水相环境抑制解离,采用四氢呋喃-甲醇(35:65)、四氢呋喃-乙腈(35:65)两种流动相进行试验。结果显示,在上述两种流动相中,二丁基二硫代氨基甲酸锌的解离均可被抑制。在四氢呋喃-甲醇(35:65)中,二丁基二硫代氨基甲酸锌的HPLC峰易发生漂移,稳定性差;在四氢呋喃-乙腈(35:65)中,二丁基二硫代氨基甲酸锌的HPLC峰稳定性良好。因此,选择四氢呋喃-乙腈(35:65)作为流动相。

综上所述,确定优化HPLC测试条件为:色谱柱 SunFire C₁₈(4.6 mm×250 mm, 5 μm),柱温 30 °C,进样量 2 μL,流动相 四氢呋喃-乙腈(35:65),流动相流速 1 mL·min⁻¹,检测器 紫外检测器,波长 254 nm。

2.2 方法学考察

2.2.1 线性回归方程

精确称取37.5 mg二丁基二硫代氨基甲酸锌对照品,置于50 mL容量瓶中,用四氢呋喃-乙腈(10:90)溶解并稀释定容至刻度,摇匀溶液,作为贮备液。

吸取适量贮备液,依次稀释为质量浓度为500,250,50,20 μg·mL⁻¹的系列对照品溶液。分别取上述各对照品溶液2 μL进行HPLC测试,以谱峰面积(Y)对样品质量浓度(X)进行线性回归,得到线性回归方程为 $Y=6\ 123\ 638X-314\ 147$,相关系数为0.999 9。结果表明,二丁基二硫代氨基甲酸锌对照品的质量浓度在20~750 μg·mL⁻¹范围内与谱峰面积呈良好的线性关系。

2.2.2 精密度

吸取适量贮备液,依次稀释为质量浓度为750,500,250 μg·mL⁻¹的系列对照品溶液,分别取各对照品溶液2 μL进行测试,重复测试3次,结果见表1。

表1 精密度试验结果
Tab.1 Precision test results

谱峰面积	对照品溶液质量浓度/(μg·mL ⁻¹)		
	250	500	750
测试值1	1 168 030	2 734 102	4 250 487
测试值2	1 164 794	2 678 466	4 146 163
测试值3	1 195 034	2 797 584	4 203 826
平均值	1 175 953	2 736 717	4 200 159
相对标准偏差/%	0.5	2.2	1.2

由表1可知,3种质量浓度的对照品溶液的谱峰面积的相对标准偏差均小于3%,表明测试精密度高。

2.2.3 稳定性

配制质量浓度为500 μg·mL⁻¹的对照品溶液,分别在放置0,2,4,6 h时进行测试,记录HPLC峰面积。结果显示,这4个时间点测试的谱峰面积的相对标准偏差为1.6%,表明供试品溶液在6 h内稳定。

2.2.4 检出限和定量限

取质量浓度为20 μg·mL⁻¹对照品溶液逐步稀释并进行检测,信噪比为10时得到定量限,信噪比为3时得到检出限。计算得出检出限为20 ng,定量限为30 ng。按二乙基二硫代氨基甲酸锌限量使用要求(≤1.5%),本方法检出限和定量限可满足检测要求。

2.2.5 回收率

药用胶塞经液氮脆化处理后,分别置于粉碎机中粉碎成末。称取胶塞样品置于锥形瓶中,平行制备9份(每份约350 mg)。每3份胶塞样品中分别加入约3,5,6 mg的二丁基二硫代氨基甲酸锌,然后加入10 mL四氢呋喃-乙腈(10:90)超声提取60 min(分2次完成)。按优化色谱条件对提取液进样测试,计算回收率,结果见表2。

表2 回收率试验结果
Tab.2 Recovery test results

序号	二丁基二硫代氨基甲酸锌溶液质量浓度		回收率/%
	添加量/(μg·mL ⁻¹)	测定值/(μg·mL ⁻¹)	
1	596	597	100.21
2	599	610	101.87
3	602	632	101.66
4	928	939	101.13
5	951	958	100.70
6	920	909	98.84
7	1 056	1 083	102.58
8	1 112	1 113	100.11
9	1 036	1 058	102.13

由表2可知,高、中、低加标回收率试验的回收率在98.84%~102.58%范围内,平均回收率为101.03%,相对标准偏差为1.17%,表明本方法准确性良好。

2.3 药用胶塞检测

3批药用胶塞经液氮脆化处理后,分别置于

粉碎机中粉碎成末。称取适量胶塞样品置于锥形瓶中,加入四氢呋喃-乙腈(10:90)超声萃取60 min(分2次完成)。按上述建立的HPLC方法对提取液进行测试,即对3批药用胶塞样品中二丁基二硫代氨基甲酸锌的残留量进行测试。结果显示,3批药用胶塞中均未检出二丁基二硫代氨基甲酸锌。

2.4 适用性

金属螯合物的解离行为与HPLC行为密切相关。本研究在确认测试方法后,进一步探究了不同配体取代基对螯合物配合稳定性的影响。对3种硫代氨基甲酸锌盐(二丁基二硫代氨基甲酸锌、二乙基二硫代氨基甲酸锌和二甲基二硫代氨基甲酸锌)的解离行为进行了分析,发现其配体与金属离子的配合稳定性从高到低的顺序为二丁基二硫代氨基甲酸锌、二乙基二硫代氨基甲酸锌、二甲基二硫代氨基甲酸锌。其原因在于3种配体上取代基(丁基、乙基和甲基)的差异影响螯合物的稳定性。丁基、乙基和甲基为给电子基团,给电子能力越强的基团可给氮提供更充分的电子,从而使得配体的碱强度增大和螯合能力增强,有助于螯合物稳定。丁基、乙基和甲基的给电子能力顺序减弱,这与3种硫代氨基甲酸锌盐的配体与金属离子的配合稳定性高低顺序一致。

本研究建立的HPLC法还适用于二乙基二硫代氨基甲酸锌的定量分析,但不适用于二甲基二硫代氨基甲酸锌的定量分析,这表明对于配体与金属离子的配合相对稳定的金属螯合物,可通过抑制解离实现其HPLC分析,但对于配体与金属离子的配合稳定性较差的金属螯合物,很难通过抑制解离方式对其进行HPLC分析。

3 结论

本研究建立了HPLC法测定药用胶塞中二丁基二硫代氨基甲酸锌的残留量的方法,填补了当前该方面检测的空白。该方法简便、准确、灵敏、稳定,适用于二丁基二硫代氨基甲酸锌的分析和检测。实际药用胶塞产品检测证明该方法适用性良好。该方法为胶塞类药品包装材料的质量监测提供了有效的技术手段。

参考文献:

- [1] 金玉碧. 二硫代氨基甲酸锌和噻唑类促进剂并用对天然橡胶的硫化作用[J]. 橡塑资源利用, 2012(2): 5-11, 13.
JIN Y B. Vulcanization of natural rubber by zinc dithiocarbamate and thiazole accelerators[J]. Rubber and Plastics Resources Utilization, 2012(2): 5-11, 13.
- [2] SENTHONG P, BORIBOON U. Evaluation of occupational exposure to nitrosamine, carbon black and dust in rubber processing industry[J]. International Journal of Occupational and Environmental Medicine, 2017, 8(3): 181-183.
- [3] JENKE D. 药品与包装材料的相容性: 可提取物与浸出物相关安全性研究[M]. 杨会英, 马玉楠, 译. 北京: 化学工业出版社, 2012: 85-91.
- [4] PASKIET D, JENKE D, BALL D, et al. The product quality research institute (PQRI) leachables and extractables working group initiatives for parenteral and ophthalmic drug product (PODP) [J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2013, 67(5): 430-447.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 化学药品与弹性体密封件相容性研究技术指导原则(试行)[EB/OL]. 2018-04-26. <http://www.nmpa.gov.cn/yaopin/ypggg/ypqgg/20180426165301393.html>.
- [6] 丁炳伟, 张智亮, 李红良, 等. 二乙基二硫代氨基甲酸锌制备及性质[J]. 工业催化, 2018(2): 81-84.
DING B W, ZHANG Z L, LI H L, et al. Preparation and characterization of zinc diethyl dithiocarbamate[J]. Industrial Catalysis, 2018(2): 81-84.
- [7] 国家卫生和计划生育委员会. 食品接触材料及制品用添加剂使用标准: GB 9685—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [8] 菁菁. 为消费者健康提供安全保障——新版食品接触材料强制性国家标准解读[J]. 中国质量技术监督, 2017(3): 20-21.
JING J. Providing safety guarantee for consumer health—Interpretation of new mandatory national standards for food contact materials[J]. China Quality and Technical Supervision, 2017(3): 20-21.
- [9] 全国橡胶与橡胶制品标准化技术委员会化学助剂分技术委员会. 硫化促进剂二丁基二硫代氨基甲酸锌(ZDBC): HG/T 4781—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.
- [10] 廖祥云. 化学分析法与ICP分析法在分析合金时的差异分析[J]. 中国化工贸易, 2019, 11(25): 242.
LIAO X Y. Difference analysis of chemical analysis and ICP analysis in alloy analysis[J]. China Chemical Trade, 2019, 11(25): 242.
- [11] 刘希东, 黄玉明. 快速比色法和滴定法测定化学耗氧量[J]. 重庆师专学报, 1995(4): 20-22.
LIU X D, HUANG Y M. Determination of chemical oxygen consumption by rapid colorimetry and titration method[J]. Chongqing Shizhuan Xuebao, 1995(4): 20-22.
- [12] 杨左军, 王成云, 梁烽, 等. 各类螯合剂在无机高效液相色谱中的

- 应用[J]. 深圳大学学报, 2000, 17(4): 60-67.
- YANG Z J, WANG C Y, LIANG F, et al. Application of chelate reagents in HPLC[J]. Journal of Shenzhen University, 2000, 17(4): 60-67.
- [13] 付国永. 高效液相色谱-串联质谱法测定塑料建材中的六溴环十二烷[J]. 塑料科技, 2021, 49(6): 92-95.
- FU G Y. Determination of hexabromocyclododecane in plastic building materials by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Plastic Science and Technology, 2021, 49(6): 92-95.
- [14] 赵毅, 陈骏林, 雷应奇, 等. 液相色谱法分离金属螯合物的进展[J]. 色谱, 1996, 14(5): 360-363.
- ZHAO Y, CHEN J L, LEI Y Q, et al. Progress in separation of metal chelates by liquid chromatography[J]. Chinese Journal of Chromatography, 1996, 14(5): 360-363.
- [15] 张莉, 张国英, 崔兆杰. 重金属离子-二乙基二硫代氨基甲酸钠螯合体系的HPLC分析方法研究[J]. 中国环境监测, 2005, 21(1): 38-40.
- ZHANG L, ZHANG G Y, CUI Z J. Study on the analytical method of some heavy metal ions with diethyldithiocarbamate chelates by the reversed-phase high performance liquid chromatography[J]. Environmental Monitoring in China, 2005, 21(1): 38-40.
- [16] 冯薇. 金属螯合效应在高效液相色谱分析中的影响[D]. 重庆: 重庆大学, 2008.
- [17] 何明辉. 溶剂法合成橡胶促进剂二丁基二硫代氨基甲酸锌[J]. 山东化工, 2019, 48(20): 56-57.
- HE M H. Synthesis of zinc dibutyl dithiocarbamate as rubber accelerator by solvent method[J]. Shandong Chemical Industry, 2019, 48(20): 56-57.
- [18] 李新良, 瞿龙, 舒万良. 润滑油添加剂二丁基二硫代氨基甲酸钼的合成[J]. 精细化工中间体, 2002, 32(6): 40-41.
- LI X L, QU L, SHU W G. The synthesis of molybdenum dibutyldithiocarbamate as lubricating oil additive[J]. Fine Chemical Intermediates, 2002, 32(6): 40-41.
- [19] 许甲平, 鲍宏云, 邓志刚, 等. 有机微量元素中螯合率、稳定常数和螯合强度之间的关系[J]. 饲料广角, 2012(23): 29-30.
- XU J P, BAO H Y, DENG Z G, et al. Relationship between chelation rate, stability constant and chelation strength of organic trace elements[J]. Feed China, 2012(23): 29-30.
- [20] 赵仁英. 锌铁双金属与胶原蛋白螯合规律的研究[D]. 天津: 天津科技大学, 2017.
- [21] 周晶晶. 新型多齿螯合配体及其配合物的合成、表征和性能研究[D]. 兰州: 兰州交通大学, 2017.

收稿日期: 2022-02-12

Study on HPLC Analysis of Zinc Dibutyldithiocarbamate in Pharmaceutical Rubber Stoppers

XIE Langui^{1,2}, YUAN Shusheng^{1,2}, HAN Xiaoxu^{1,2}, YANG Huiying^{1,2}, ZHAO Xia^{1,2}, XIAO Xinyue^{1,2}

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Pharmaceutical Excipients, Beijing 100050, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established to determine the residual amount of zinc dibutyldithiocarbamate in pharmaceutical rubber stoppers. The pharmaceutical rubber stopper was pulverized after being embrittled in liquid nitrogen, and then it was ultrasonically extracted with tetrahydrofuran-acetonitrile (volume ratio of 10 : 90) to prepare a test solution. The tetrahydrofuran-acetonitrile (volume ratio of 35 : 65) was used as the mobile phase, after passing through SunFire C₁₈ chromatographic column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) for separation, the test solution was tested by HPLC with the detection wavelength of 254 nm. The results showed that the mass concentration of zinc dibutyldithiocarbamate in 20 ~ 750 μg · mL⁻¹ had a good linearity correlation with the HPLC peak area, the correlation coefficient was 0.999 9. The relative standard deviations of HPLC peak area of the test solutions with high, medium and low concentration were less than 3%, and the test precision was high. The detection limit and quantification limit of this test were 20 and 30 ng respectively, the recovery rate was 98.84% ~ 102.58%, and the test solution was stable within 6 h. This method established in this paper was simple, accurate, sensitive, stable, and it was suitable for the determination of the residual amount of zinc dibutyldithiocarbamate in pharmaceutical rubber stoppers.

Key words: pharmaceutical rubber stopper; zinc dibutyldithiocarbamate; HPLC; metal chelates