

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.17.019

高效液相色谱法测定柠檬酸三甲酯含量及有关物质*

张冬,王强,毕华,靳玲,高燕霞[△]

(河北省药品医疗器械检验研究院,河北 石家庄 050200)

摘要:目的 建立测定自制柠檬酸三甲酯含量及有关物质的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Thermo Hypersil GOLD C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 25 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(用磷酸调 pH 至 2.5)–乙腈(90:10, V/V),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 214 nm,柱温为 35 ℃,进样量为 20 μL。结果 柠檬酸三甲酯质量浓度在 1.3~53.2 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 8$, $n=5$);检测限为 13 ng,定量限为 26 ng;精密度和稳定性试验的 RSD 均小于 2.0%;平均加样回收率为 99.98%,RSD 为 0.54%($n=9$);3 批自制样品中柠檬酸三甲酯的平均含量为 98.71%。自制柠檬酸三甲酯经强酸、强碱、高温、氧化、强光照射破坏后,柠檬酸三甲酯峰与有关物质柠檬酸、杂质 a、杂质 b、杂质 c 的色谱峰均可实现有效分离;上述有关物质均被检出,含量分别为 0.21%~0.22%,0.01%,0.06%~0.07%,0.03%~0.04%。结论 该方法专属性强、准确度高,可用于柠檬酸三甲酯的含量测定和有关物质分析。

关键词:柠檬酸三甲酯;高效液相色谱法;含量测定;有关物质

中图分类号:R927.2

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)17-0073-04

Determination of Trimethyl Citrate and Related Substances by HPLC

ZHANG Dong, WANG Qiang, BI Hua, JIN Ling, GAO Yanxia

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

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of homemade trimethyl citrate and related substances. **Methods** The chromatographic column was Thermo Hypersil GOLD C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 25 mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution (adjusting the pH to 2.5 with phosphoric acid)–acetonitrile (90:10, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 214 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of trimethyl citrate was 1.3–53.2 μg/mL ($r=0.999\ 8$, $n=5$). The limit of detection (LOD) of trimethyl citrate was 13 ng, and the limit of quantitation (LOQ) of trimethyl citrate was 26 ng. The RSDs of precision and stability tests were lower than 2.0%. The average recovery of trimethyl citrate was 99.98% with an RSD of 0.54% ($n=9$). The average content of trimethyl citrate in the three batches of homemade samples was 98.71%. After the homemade trimethyl citrate was damaged by the strong acid, strong alkaline, high-temperature, oxidation and strong light, the trimethyl citrate peak could be effectively separated from the chromatographic peaks of related substances such as citric acid, impurity a, impurity b and impurity c. The above related substances in the three batches of homemade samples were all detected, and their contents were in the range of 0.21%–0.22%, 0.01%, 0.06%–0.07% and 0.03%–0.04%, respectively. **Conclusion** The method is specific and accurate, which can be used for the content determination of trimethyl citrate and the analysis of related substances.

Key words: trimethyl citrate; HPLC; content determination; related substance

*基金项目:中央引导地方科技发展资金项目[216Z4802G]。

第一作者:张冬,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)kafeipian@sina.com。

[△]通信作者:高燕霞,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为药物分析,(电子信箱)657968434@qq.com。

中草药,1995,26(4):201–203.

[15] 姚全胜,周国林. 香茶菜甲素体外抗癌、抗菌活性的初步研究[J]. 江苏医药,1984,15(1):22–24.

[16] 向润清,范源. 熊果酸及其衍生物抗肿瘤作用的研究进展[J]. 药学研究,2019,38(2):63–69.

[17] 姚素华,彭南安,许刚. 香茶菜甲素对四氯化碳肝损伤的保护作用[J]. 湖南中医学院学报,1988,8(4):46–48.

[18] 马学惠,赵元昌,尹镭,等. 乌苏酸对实验性肝损伤的防治作用[J]. 药理学,1986,21(5):332–335.

[19] 马学惠,赵元昌,尹镭,等. 齐墩果酸防治实验性肝损伤作用的研究[J]. 药理学,1982,17(2):93–97.

[20] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:1265.

[21] 陈玉俊,许美娟,顾维. 不同产地香茶菜地下部分总二萜含量测定[J]. 时珍国医国药,2000,11(4):294.

[22] 江苏省药品监督管理局. 江苏省中药材标准[M]. 南京:江苏科学技术出版社,2016:456–458.

[23] 浙江省食品药品监督管理局. 浙江省中药材标准[M]. 杭州:浙江科学技术出版社,2017:28–30.

[24] 安徽省药品监督管理局. 安徽省中药饮片炮制规范[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,2019:226.

(收稿日期:2022-01-12;修回日期:2022-03-14)

柠檬酸三甲酯又称枸橼酸三甲酯,多由柠檬酸经酸催化进行酯化反应制得^[1-4],具有生物降解性好、无毒、不易挥发、抗细菌等优点^[5],是一种环境友好型医药中间体,且性能较稳定,广泛应用于医药、食品、化工等领域。其作为样本中的微量成分之一,通常采用气相色谱(GC)法或气相色谱-质谱(GC-MS)法检测^[6-10],但对于主成分的定量分析,GC法及GC-MS法存在重复性差、仪器普及率较低等缺点。本研究中建立了测定柠檬酸三甲酯含量及有关物质的高效液相色谱法,采集并分析自制样品的表征数据,以提高其定量分析的准确性,并为其合成工艺的改进提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT型高效液相色谱仪、UV-2450型紫外可见分光光度计(日本岛津公司);Mettler XS 205型电子天平(瑞士梅特勒-托利多集团,精度为0.01 mg)。

1.2 试剂

柠檬酸三甲酯对照品(上海谱振生物科技股份有限公司,克拉玛尔试剂,批号为ZY160517,含量为98%);柠檬酸三甲酯(自制样品,批号分别为D0414, D0421, D0512);甲醇、四氢呋喃、乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技<中国>有限公司);磷酸二氢钠、磷酸氢二铵、磷酸二氢钾、磷酸二氢铵、柠檬酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Thermo Hypersil GOLD C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:25 mmol/L磷酸二氢钠溶液(用磷酸调pH至2.5)-乙腈(90:10, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:214 nm;柱温:35℃;进样量:20 μL。在此色谱条件下,采用强酸破坏(0.1 mol/L盐酸溶液)供试品溶液10 min,结果理论板数为9 958,拖尾因子为1.2,柠檬酸三甲酯与相邻杂质峰的分度为12.9,符合2020年版《中国药典(四部)》^[11]中方法学验证的相关规定。

2.2 含量测定

2.2.1 溶液制备

分别取柠檬酸三甲酯对照品和样品各适量,精密称定,分别加流动相溶解并稀释成质量浓度为1 mg/mL的溶液,摇匀,滤过,作为对照品溶液及供试品溶液。

取柠檬酸三甲酯对照品25 mg,精密称定,置5 mL容量瓶中,加0.1 mol/L盐酸溶液1 mL,摇匀,放置10 min,加0.1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,用流动相稀释并定容,摇匀,滤过,作为系统适用性试验溶液。

2.2.2 方法学考察

线性关系考察:取柠檬酸三甲酯对照品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释成质量浓度分别为1.3, 6.6, 13.3, 26.6, 53.2 μg/mL的系列对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 1\,061X + 203.93$ ($r = 0.999\,8$, $n = 5$)。结果表明,柠檬酸三甲酯质量浓度在1.3~53.2 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限和检测限确定:精密量取2.2.1项下对照品溶液适量,逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,分别以信噪比(S/N)为10:1和3:1时的质量浓度计算柠檬酸三甲酯的定量限和检测限,结果分别为26 ng和13 ng。

精密度试验:取2.2.1项下对照品溶液20 μL,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次。结果柠檬酸三甲酯峰面积的RSD为0.04% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为D0512)适量,按2.2.1项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件分别于室温下放置0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 h时进样测定。结果的RSD为0.60% ($n = 8$),表明供试品溶液于室温下放置8 h内稳定。

加样回收试验:取样品(批号为D0512)9份,每份50 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,另分别取柠檬酸三甲酯对照品30, 50, 70 mg,各3份,分别置上述容量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,滤过,按2.1项下色谱条件进样测定。结果柠檬酸三甲酯的平均加样回收率为99.98%, RSD为0.54% ($n = 9$),表明方法准确度好。

耐用性试验:改变色谱柱[Thermo Hypersil GOLD C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Capcell Pak MG II C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Diamonsil™ C₁₈柱(200 mm × 4.6 mm, 5 μm)],流速(0.9, 1.0, 1.1 mL/min),柱温(30, 35, 37℃),乙腈体积分数(9.5%, 10.0%, 10.5%),流动相pH(2.3, 2.5, 2.7),微量调整色谱条件。取样品(批号为D0512),依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。结果改变色谱条件,柠檬酸三甲酯含量的RSD不超过0.21%,表明方法耐用性好。

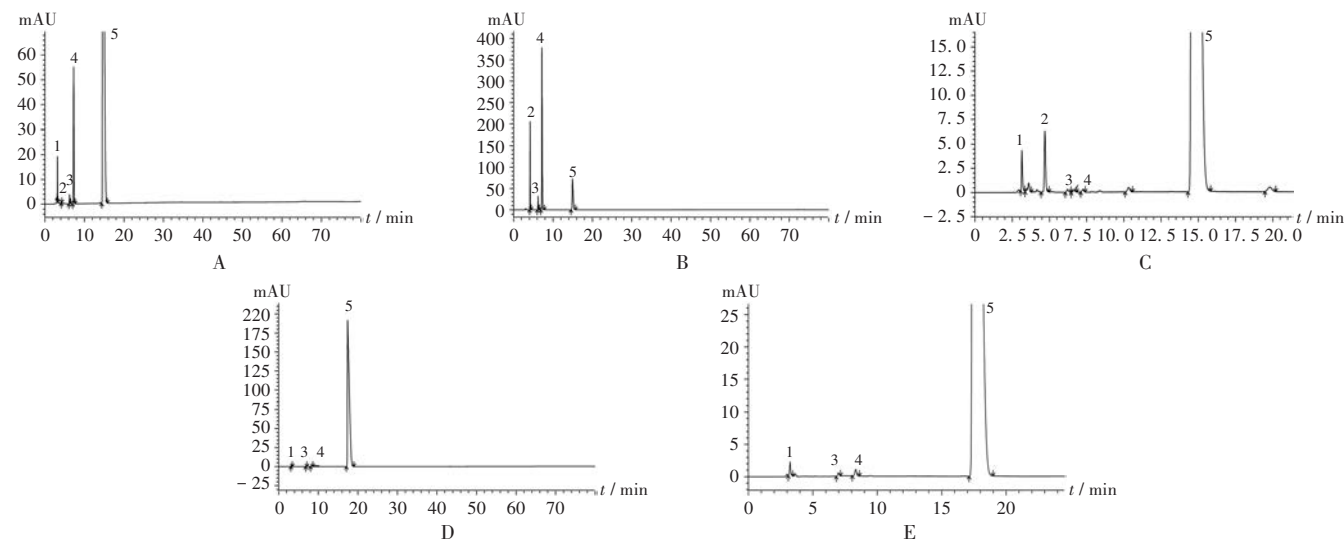
2.2.3 样品含量测定

取3批(批号分别为D0414, D0421, D0512)样品,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果3批自制柠檬酸三甲酯样品的含量分别为98.54%, 98.89%, 98.71%。

2.3 有关物质分析

2.3.1 溶液制备

取样品50 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加流



1. 柠檬酸 2. 杂质a 3. 杂质b 4. 杂质c 5. 柠檬酸三甲酯
A. 酸破坏 B. 碱破坏 C. 高温破坏 D. 氧化破坏 E. 光照破坏

图1 专属性试验高效液相色谱图

1. Citric acid 2. Impurity a 3. Impurity b 4. Impurity c 5. Trimethyl citrate

A. Acid damage B. Alkaline damage C. High - temperature damage D. Oxidation damage E. Light damage

Fig. 1 HPLC chromatograms of the specificity test

动相溶解并定容,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液。精密量取供试品溶液1 mL,置100 mL容量瓶中,加流动相稀释并定容,摇匀,滤过,作为对照溶液。

2.3.2 方法学考察

专属性试验:采用强酸(0.1 mol/L盐酸溶液10 min)、强碱(0.1 mol/L氢氧化钠溶液10 min)、高温(加热熔融)、氧化(10%过氧化氢溶液10 min)、强光照射(照度为4 500 lx,24 h)对供试品溶液进行加速破坏,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图至主成分峰保留时间的5倍。结果不同破坏途径,供试品溶液中所含杂质量均不同程度增加,酸、碱破坏供试品溶液中杂质检出量较大,提示供试品溶液在酸、碱条件下不稳定;氧化破坏对供试品溶液影响较小。色谱图见图1。杂质b及高温破坏试验中保留时间1.3倍处杂质的检出量较小,故未进行定性分析,有待进一步研究。主要产生有关物质柠檬酸、杂质a、杂质c。其中,柠檬酸杂质峰通过保留时间与柠檬酸试剂主峰保留时间的一致性进行定性;采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法初步分析杂质a与杂质c的化学结构,杂质a与柠檬酸单甲酯的化学结构一致,杂质c与柠檬酸二甲酯的化学结构一致。鉴于破坏试验中所产生的杂质峰均位于主成分峰保留时间前,仅高温破坏在主峰保留时间1.3倍处检出一杂质峰,故设定样品测定洗脱时间为主成分峰保留时间的2倍。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为D0512)适量,分别于室温放置0,1,2,3,4,5,6,8 h时按2.1项下色谱

条件进样测定。供试品溶液杂质含量随时间变化的情况见表1。可见,8 h内柠檬酸、杂质b的含量均无明显变化;3 h时杂质a含量增加较多,说明溶剂的酸性环境对样品有一定影响,可导致杂质a含量增加,这与酸破坏试验结果一致。故供试品溶液应在室温放置2 h内完成检测。

表1 稳定性试验结果(%)

Tab. 1 Results of the stability test (%)

时间	柠檬酸	杂质a	杂质b	杂质c	合计
0 h	0.22	0.01	0.06	0.03	0.32
1 h	0.21	0.01	0.06	0.04	0.32
2 h	0.21	0.01	0.06	0.04	0.32
3 h	0.21	0.02	0.07	0.04	0.34
4 h	0.22	0.02	0.06	0.04	0.34
5 h	0.22	0.03	0.06	0.05	0.36
6 h	0.22	0.04	0.06	0.04	0.36
8 h	0.21	0.04	0.06	0.06	0.37

2.3.3 样品有关物质测定

取3批(批号分别为D0414,D0421,D0512)样品各适量,按2.3.1项下方法制备供试品溶液;取柠檬酸三甲酯对照品(批号为ZY160517)适量,制备对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,结果3批供试品溶液中杂质总和均低于1.00%,且杂质个数及杂质含量基本一致,均优于市售克拉玛尔试剂。表明自制样品合成工艺稳定,质量满意。详见表2。

表2 有关物质测定结果(%)

Tab. 2 Results of determination of related substances (%)

批号	柠檬酸	杂质a	杂质b	杂质c	合计
D0414	0.21	0.01	0.07	0.04	0.31
D0421	0.22	0.01	0.06	0.04	0.32
D0512	0.22	0.01	0.06	0.03	0.32
ZY160517	0.41	0.10	0.12	0.39	1.02

2.3.4 质量守恒验证试验

分别用3批(批号分别为D0414, D0421, D0512)样品制备的供试品溶液的主峰峰面积与总杂质峰面积之和除以相同浓度酸破坏后的供试品溶液主峰峰面积与总杂质峰面积之和,结果分别为100.57%, 99.92%, 101.15%, 介于98%~102%范围内,提示该方法可有效检出降解产生的杂质。

2.4 自制样品表征数据分析

红外吸收光谱:3批(批号分别为D0414, D0421, D0512)样品均在 $1\,750\sim 1\,650\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内检出三重峰,在 $3\,500\sim 3\,250\text{ cm}^{-1}$ 波数范围内检出羟基峰,这符合柠檬酸三甲酯存在3个羰基、1个羟基的结构特征,与柠檬酸三甲酯对照品紫外光谱图一致。

熔点检测:自制样品的熔程为 $76.0\sim 77.2\text{ }^{\circ}\text{C}$,柠檬酸三甲酯熔程为 $75\sim 78\text{ }^{\circ}\text{C}$,可见自制样品的熔程较短,纯度较高。

表观及晶型检查:自制样品晶体洁白,透明度高,纯度较好,80倍显微镜下呈块状结晶。

3 讨论

3.1 初始流动相选择

反相键合相色谱的流动相通常以水作基础溶剂,再加入与水互溶的甲醇、乙腈、四氢呋喃等极性调整剂。研究报道,以 $25\text{ mmol/L}(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (用磷酸调pH至2.5)-甲醇-四氢呋喃(80:20:3, V/V/V)为流动相,采用2.1项下色谱条件进行重复试验,结果流动相中由于含有四氢呋喃,本底吸收较大,且四氢呋喃增加了流动相的极性,柠檬酸和柠檬酸三甲酯洗脱较快,使柠檬酸峰与溶剂峰部分叠合,无法对柠檬酸进行准确定量,另四氢呋喃对流路中peak管有一定腐蚀,故流动相中不再选择四氢呋喃。与甲醇相比,乙腈洗脱能力较强,且黏度较小,可满足在 $185\sim 214\text{ nm}$ 波长范围内检测的要求,故流动相选择乙腈。

3.2 色谱条件优化

柠檬酸是制备柠檬酸三甲酯的主要原料,柠檬酸三甲酯有关物质中是否含有柠檬酸可作为反应是否完全的依据。柠檬酸易在水中发生电离,导致出现多峰现象,影响测定。为使柠檬酸以分子形式存在,选用酸性流动相以抑制柠檬酸解离,同时加入一定比例缓冲盐

保持流动相pH值稳定。

柠檬酸三甲酯和柠檬酸的分子结构中无共轭双键,其在紫外区无明显紫外吸收,但二者均在 $190\sim 230\text{ nm}$ 波长范围内有吸收带,故检测波长可选择末端吸收,为减少检测波长过低所引起的基线干扰,最终确定检测波长为 214 nm 。

许多缓冲液在 210 nm 波长附近有较强紫外吸收,使基线增高,检测灵敏度降低,对常用的4种无机盐溶液(25 mmol/L 磷酸二氢钾溶液、 25 mmol/L 磷酸二氢铵溶液、 25 mmol/L 磷酸氢二铵溶液、 25 mmol/L 磷酸二氢钠溶液)进行紫外扫描,结果磷酸二氢钠溶液的紫外吸收光谱图较平缓,更接近基线,故缓冲液选用磷酸二氢钠溶液。

3.3 方法评价

由于无法买到正规对照品,以市售精制试剂作为柠檬酸三甲酯对照品,其含量标注不低于98%,以98%计算,3批自制样品含量实测值均大于对照品的含量,表明合成工艺良好。该方法快速、简便、精确、可靠,可为柠檬酸三甲酯的质量控制提供有效的分析方法。

参考文献

- [1] 黄飞,胡雪倩,芦黎黎,等.柠檬酸三甲酯催化合成条件的研究[J].齐齐哈尔大学学报,2019,35(2):64-67.
- [2] 田红丽,刘荣杰,朱璠珊.柠檬酸三甲酯合成工艺研究[J].山东化工,2017,46(21):1-4.
- [3] 黄丽,李春莲,胡庆国.固体酸催化合成柠檬酸三甲酯[J].辽宁化工,2012,41(3):232-233.
- [4] 谢国豪,胡昕,罗荣.固体酸催化合成柠檬酸三甲酯[J].上饶师范学院学报,2011,31(6):47-50.
- [5] 李静,蒋剑春,徐俊明.柠檬酸酯合成用催化剂研究进展[J].生物化学工程,2009,43(1):52-56.
- [6] 刘诚,彭小雪,赖璟琦.1,2-二氯乙烷接触者尿液中生物指标监测的研究[J].中国卫生检验杂志,2015,25(2):269-270.
- [7] FRY S O, CESLA P, BAJEROVÁ P, et al. Optimization of focused ultrasonic extraction of propellant components determined by gas chromatography / mass spectrometry [J]. Talanta, 2012,99:316-322.
- [8] 徐秀娟,屈展,何保江,等.不同品种葡萄干中有机酸的成分分析[J].河南工业大学学报(自然科学版),2015,36(4):107-113.
- [9] 林海,李变,容穗华.青梅的化学成分研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(16):110-112.
- [10] 周黎,赵振军,刘勤晋,等.不同贮藏年份普洱茶非挥发物质的GC-MS分析[J].西南大学学报(自然科学版),2009,31(11):140-144.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.

(收稿日期:2021-11-02;修回日期:2022-03-23)