

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.18.018

高效液相色谱法测定过氧化碳酰胺中枸橼酸含量

林新文¹,唐闪光^{2△},武欣倩²,朱光冕²,李颖¹,海乐¹

(1. 湖南省药品审核查验中心,湖南长沙 410001; 2. 湖南一格制药有限公司,湖南湘潭 411100)

摘要:目的 建立测定过氧化碳酰胺中枸橼酸含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Kromasil 100-5-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相为乙腈(以三乙胺调 pH 至 7.0)-0.05 mol/L 磷酸二氢铵(梯度洗脱),流速为 0.7 mL/min,检测波长为 210 nm,柱温为 25 ℃,进样量为 20 μL。结果 枸橼酸质量浓度在 10.11~404.48 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好;精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%;平均加样回收率为 99.43%,RSD 为 2.10%(n=9);在流速及流动相 pH 发生一定程度改变时,该方法能满足试验要求。结论 所建立的方法操作简便、专属性强、灵敏度高、重复性及耐用性较好,可用于过氧化碳酰胺中枸橼酸的含量控制。

关键词:过氧化碳酰胺;枸橼酸;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)18-0076-03

Content Determination of Citric Acid in Carbamide Peroxide by HPLC

LIN Xinwen¹,TANG Shangguang²,WU Xinqian²,ZHU Guangmian²,LI Ying¹,HAI Le¹

(1. Hunan Provincial Drug Examination and Inspection Center, Changsha, Hunan, China 410001; 2. Hunan Yige Pharmaceutical Co., Ltd., Xiangtan, Hunan, China 411100)

Abstract: **Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of citric acid in carboxamide peroxide. **Methods** The chromatographic column was Kromasil 100-5-C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was phosphate acetonitrile (adjusted to pH 7.0 with triethylamine)-0.05 mol/L ammonium dihydrogen with gradient elution, the flow rate was 0.7 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 25 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of citric acid was 10.11-404.48 μg/mL. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 2.0%. The average recovery of citric acid was 99.43% with an RSD of 2.10% (n=9). When the flow rate and pH of the mobile phase changed within a certain range, the method could meet the test requirements. **Conclusion** The established method is simple, specific, sensitive, reproducible and durable, which can be used for the content control of citric acid in carboxamide peroxide.

Key words: carboxamide peroxide; citric acid; HPLC; content determination

过氧化碳酰胺是尿素与过氧化氢以氢键结合形成的配合物,临床常用作静脉给氧药物,可治疗因缺氧所致各种急重症^[1]。由于过氧化氢属极弱酸($K_a=2.4\times 10^{-12}$),在碱性条件下易分解^[2],故需添加适量的 pH 调节剂稳定其性质。枸橼酸又名柠檬酸,属大分子有机酸,为药物制剂中常用的 pH 调节剂,具有良好的理化特性。其添加量在药典中未明确限定,可按实际生产需要量添加,但为了更好地确保临床用药的安全有效,采用

准确的测定方法,对于了解不同药品中枸橼酸的含量及对枸橼酸加入量的控制有重要意义。目前枸橼酸常用测定方法有高效液相色谱(HPLC)法、紫外-可见分光光度法、离子色谱法、气相色谱法等^[3-5]。其中,紫外-可见分光光度法的灵敏度较低,离子色谱法和气相色谱法成本较高且操作较烦琐。为此,本研究中采用 HPLC 法测定过氧化碳酰胺中枸橼酸的含量。现报道如下。

第一作者:林新文,男,硕士,主管中药师,研究方向为药品、医疗器械生产审核查验,(电子信箱)272511799@qq.com。

△通信作者:唐闪光,男,大学本科,主管药师,研究方向为新药开发和药品生产质量管理,(电话)0731-58289813(电子信箱)89007304@qq.com。

- [8] 周加太,德吉措,多杰拉旦. 六味安消散治疗功能性便秘的临床研究[J]. 临床医药文献电子杂志,2017,4(31):6086.
- [9] 白阿荣. 蒙药六味安消散治疗胃结石病1例[J]. 中国民族医药杂志,2018,24(4):19.
- [10] 林茂恩,刘英杰. 六味安消散胶囊治疗老年功能性便秘60例疗效观察[J]. 浙江中医药大学学报,2009,33(2):232-233.
- [11] 贾宝洋,曲智威. 六味安消散胶囊治疗老年习惯性便秘的疗效[J]. 中国老年学杂志,2012,32(23):5278-5279.
- [12] 宋晓玲,潘俊英,吴彤,等. 六味安消分散片处方优化与

质量控制研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(3):610-613.

- [13] 李小伟. 蒙药阿木日-6味散的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版),2013,28(5):578-580.
- [14] 朱红红,侯小琪,张森,等. 基于 HPLC 的大黄居群蒽醌类成分含量测定及品质评价研究[J]. 中草药,2021,52(17):5295-5302.
- [15] 郭新强,姜军华. HPLC 法同时测定六味安消片中大黄素、大黄酚及没食子酸的含量[J]. 药品评价,2021,18(11):661-663.

(收稿日期:2021-11-02;修回日期:2022-03-25)

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪(日本Shimadzu公司);MA105DU型电子天平(德国Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);Evolution 220型紫外-可见分光光度计(美国Thermo Fisher公司)。

1.2 试药

过氧化碳酰胺(批号分别为20191019, 20191006, 20191016);枸橼酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为100396-201503,含量100%,规格为每支200 mg);乙腈为色谱纯,磷酸二氢铵为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil 100-5-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.05 mol/L磷酸二氢铵(A)-乙腈(以三乙胺调pH至7.0, B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:0.7 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:25℃;进样量:20 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab.1 Gradient elution procedure of the mobile phase

时间(min)	A(%)	B(%)	时间(min)	A(%)	B(%)
0	97	3	8	30	70
5	97	3	12	97	3
6	30	70	20	97	3

2.2 溶液制备

取枸橼酸对照品25.28 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,用流动相A溶解并定容,作为对照品贮备液;精密量取2.0 mL,置10 mL容量瓶中,用流动相A定容,混匀,即得对照品溶液。取过氧化碳酰胺样品1.00 g,精密称定,置10 mL容量瓶中,用流动相A定容,混匀,即得供试品溶液。以流动相A作为空白对照溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性与专属性试验:取2.2项下3种溶液各20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结

果供试品溶液与对照品溶液色谱在相同保留时间处有相应色谱峰,理论板数以枸橼酸峰计为14 514(>2 000),枸橼酸峰拖尾因子为1.0(≤1.5),各成分基线分离良好,且阴性对照无干扰,表明专属性好。详见图1。

线性关系考察:精密量取对照品贮备液0.2, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 mL,置10 mL容量瓶中,加流动相A定容,制成质量浓度为10.11, 50.56, 101.12, 202.24, 404.48 μg/mL的系列对照品溶液。精密量取20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定。以枸橼酸质量浓度(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 $Y = 2.19 \times 10^6 X + 4.57 \times 10^3$ ($r = 0.998 0, n = 5$)。结果表明,枸橼酸质量浓度在10.11~404.48 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

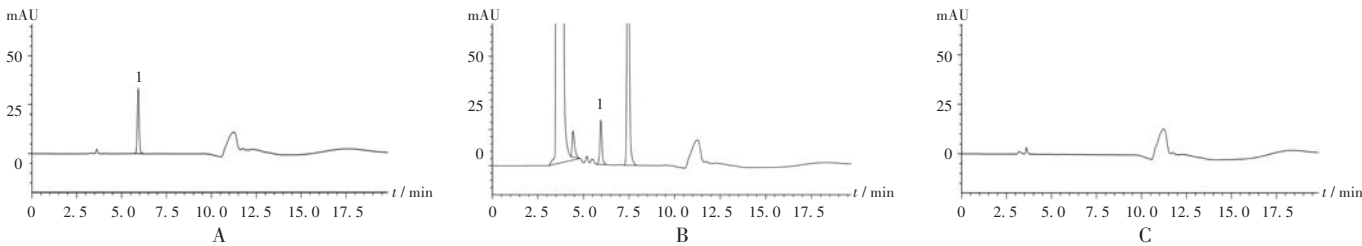
定量限与检测限考察:精密量取2.2项下对照品溶液0.1 mL,加流动相A稀释至200 mL,按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比为10:1、3:1时的待测成分质量浓度分别记作定量限及检测限。结果枸橼酸定量限及检测限分别为0.05 μg/mL及0.01 μg/mL。

精密密度试验:取2.2项下对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果枸橼酸峰面积的RSD为0.78% ($n = 6$),表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品溶液适量,分别于室温下放置0, 2, 4, 6, 8 h,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果枸橼酸峰面积的RSD为1.10% ($n = 5$),表明供试品溶液在室温放置8 h内基本稳定。

重复性试验:精密称取样品(批号20191006)适量,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果枸橼酸峰面积的RSD为0.64% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号20191006)适量,共9份,分别加入低、中、高质量浓度的枸橼酸对照品溶液,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表2。



1. 枸橼酸
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白对照溶液

图1 高效液相色谱图

1. Citric acid

A. Reference solution B. Test solution C. Blank reference solution

Fig.1 HPLC chromatograms

表2 加样回收试验结果($n=9$)
Tab. 2 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
1.021 6	0.809 0	1.815 9	98.18	99.43	2.10
1.022 6	0.809 0	1.827 0	99.43		
1.021 2	0.809 0	1.803 7	96.72		
1.026 6	1.011 2	2.035 3	99.75		
1.020 4	1.011 2	1.994 4	96.32		
1.023 4	1.011 2	2.048 8	101.40		
1.020 4	1.213 4	2.258 7	102.05		
1.026 8	1.213 4	2.231 4	99.27		
1.021 2	1.213 4	2.256 1	101.77		

2.4 耐用性试验

称取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件(分别设置流速为0.56,0.70,0.84 mL/min)进样测定,记录峰面积;取样品适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件(分别设置流动相pH为5.6,7.0,8.4)进样测定,记录峰面积。结果见表3。可见,流动相或其流速发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

表3 耐用性试验结果
Tab. 3 Results of the durability test

检测条件	保留时间(min)	峰面积(mAU)	理论板数	拖尾因子
正常条件	5.947	237 368	14 514	1.024
流速0.84 mL/min	5.051	193 417	13 201	1.073
流速0.56 mL/min	7.442	290 750	16 750	1.028
流动相pH8.4	5.577	242 340	26 647	1.228
流动相pH5.6	6.523	223 084	14 427	1.109

2.5 样品含量测定

取3批样品各适量,各批平行测定2次,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品含量,结果见表4。

表4 枸橼酸含量测定结果($n=2$)

批号	取样量(g)		含量(%)		$\bar{X}$ (%)
	1	2	1	2	
20191006	0.913 4	0.914 5	0.106	0.108	0.107
20191016	0.916 5	0.917 3	0.107	0.108	0.108
20191019	0.918 2	0.919 4	0.108	0.108	0.108

3 讨论

现有研究对枸橼酸含量的检测主要集中于食品、饮料和饲料^[6-11],对于药品中枸橼酸的含量检测报道较少。预试验中,取0.04 mg/mL过氧化碳酰胺溶液和0.50 mg/mL枸橼酸对照品溶液进行紫外光谱(190~260 nm波长)扫描,定性检测。结果过氧化碳酰胺和枸橼酸在190~240 nm波长范围中存在末端吸收,随着波

长的增加,吸收逐渐减少,结合已有文献^[12-14],选择210 nm作为检测波长。参考相关文献^[15],选择以乙腈-0.05 mol/L磷酸二氢铵作为流动相,并对流速等相关条件进行了优化。结果表明,在优化后的色谱条件下,主要成分枸橼酸与相邻成分的色谱峰分离度良好。

综上所述,本研究中建立了一种符合药典相关要求,适用于药品生产企业相关检测,能有效测定过氧化碳酰胺中枸橼酸含量的方法,并对每个参数设立了可以接受的标准和验证步骤。过氧化碳酰胺中枸橼酸的含量测定,可为药品中pH调节剂添加量的有效性和安全性提供保障。

参考文献

- [1] 林平珍. 注射用内给氧联合微波在治疗输卵管阻塞性不孕中的应用[J]. 中国现代医生, 2015, 53(25): 41-43.
- [2] 李兵营, 闫杰, 倪环宸, 等. 过碳酸胺分子合成条件优化、晶体结构及其热稳定性[J]. 应用化学, 2015, 32(12): 1423-1430.
- [3] 李建红, 王志畅. 气相色谱法测定土壤中丙酸、苹果酸、柠檬酸[J]. 东华理工学院学报, 2006, 29(4): 376-378.
- [4] 陈发兴, 刘星辉, 林华影, 等. 离子交换色谱法测定枇杷果实和叶片中的有机酸[J]. 福建农业大学学报(自然科学版), 2004, 33(2): 195-199.
- [5] 龚宁, 李红洲, 陈学航, 等. 高效液相色谱法快速测定酸汤中柠檬酸[J]. 食品科技, 2021, 46(7): 290-294.
- [6] 魏瑜. 几种检测食用盐中柠檬酸铁铵含量方法的利与弊[J]. 中国井矿盐, 2020, 51(3): 38-39.
- [7] 贺永鸿, 王玉新. 应用高效液相色谱法测定白糖中的柠檬酸[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(12): 1471-1472.
- [8] 赵艳, 张凤桦, 杨发树, 等. 高效液相色谱法同时测定饲料添加剂中6种有机酸含量[J]. 中国粮油学报, 2015, 30(2): 127-130.
- [9] 郑悦珊, 洪泽淳, 李南, 等. 气相色谱法测定食品添加剂柠檬酸脂脂肪酸甘油酯中柠檬酸的改进[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(4): 1235-1239.
- [10] 田沛霖, 李玥琦, 王思渊, 等. 高效液相色谱-电喷雾检测器法测定程序性死亡蛋白-1抑制剂中甘露醇含量[J]. 中国药业, 2022, 31(11): 63-66.
- [11] 谭凯燕. 高效液相色谱-串联质谱法测定葡萄酒中的柠檬酸[J]. 现代食品, 2022, 28(5): 160-163.
- [12] 郑天, 屠春燕. 高效液相色谱法和液相色谱-质谱联用技术在食品工业上的应用[J]. 南京工业大学学报(自然科学版), 2004, 26(2): 99-105.
- [13] 李兴春, 张建勇, 李洁. 高效液相色谱法测定消毒液中柠檬酸等有机酸的含量[J]. 中国消毒学杂志, 2018, 35(9): 654-655.
- [14] 朱会卷, 张卓娜, 杨艳伟, 等. 高效液相色谱法和离子色谱法测定柠檬酸的方法比对[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(9): 2059-2061.
- [15] 郑梅, 贾昌平. 化妆品中10种 α -羟基酸的高效液相色谱检测及质谱确证[J]. 中南药学, 2022, 20(4): 919-923.

(收稿日期: 2022-05-26)