

HPLC 测定酮缬氨酸钙含量的方法优化

王宇, 朱碧楠(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 优化 HPLC 测定酮缬氨酸钙含量的方法。方法 HPLC 采用 CAPCELL PAK C₁₈ MG II 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为高氯酸钠溶液(pH 2.5)-乙腈(96 : 4), 柱温为 35 °C, 检测波长 205 nm, 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 酮缬氨酸钙在 0.025~0.185 mg·mL⁻¹ 内有良好的线性关系($r=1.000 0$), 平均回收率($n=9$)为 100.0%。结论 该方法简便、快速、准确, 灵敏度高, 重复性好, 可用于酮缬氨酸钙的含量测定。

关键词: 酮缬氨酸钙; 高效液相色谱法; C₁₈ 柱

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2020)18-2233-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.18.011

引用本文: 王宇, 朱碧楠. HPLC 测定酮缬氨酸钙含量的方法优化[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(18): 2233-2235.

Improvement of Content Determination for α -Ketovaine Calcium by HPLC

WANG Yu, ZHU Binan(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To improve an HPLC method for the content determination of α -ketovaine calcium. **METHODS** The HPLC method was performed on CAPCELL PAK C₁₈ MG II column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of sodium perchlorate buffer(pH 2.5)-acetonitrile(96 : 4). Column temperature was 35 °C, detective wavelength was 205 nm, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** The linear range of α -ketovaine calcium was 0.025–0.185 mg·mL⁻¹ ($r=1.000 0$), the average recovery($n=9$) was 100.0%. **CONCLUSION** The method is simple, rapid and accurate with good repeatability, which can be used for the determination of α -ketovaine calcium.

KEYWORDS: α -ketovaine calcium; HPLC; C₁₈ column

酮缬氨酸钙是复方 α -酮酸片的重要成分之一, 主要用于预防和治疗慢性肾功能引起的蛋白质代谢失调。现行酮缬氨酸钙质量标准有进口药品注册标准及企业注册标准, 各国药典均未收载, 其酮缬氨酸钙含量测定均为 HPLC, 亦有文献报道采用氢型强阳离子交换色谱柱测定酮缬氨酸钙含量^[1]。经考察, 方法耐用性较差、色谱柱不易维护、损耗较快。另有文献报道反相离子对色谱-蒸发光散射法亦可用于测定复方 α -酮酸片中的 5 种主要成分^[2], 但其灵敏度不高, 检测器通用性不够。笔者采用通用性更高的 C₁₈ 柱为色谱柱, 旨在优化酮缬氨酸钙含量测定方法, 以期为酮缬氨酸钙的质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

1260 型高效液相色谱仪(配有二极管阵列检测器, 美国 Agilent 公司); XPE205 电子分析天平(感量: 十万分之一)、S40k pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司); Milli-Q 纯水仪(美国 Millipore 公司)。

高氯酸钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20110422); 乙腈(色谱纯, 默克化工技术有限公司, 批号: JA040030); 水为超纯水;

酮缬氨酸钙(中国食品药品检定研究院, 批号: 140804-201401; 含量: 93.4%); 海因(浙江昂利泰制药有限公司, 批号: 04-07-0005; 规格: 100 mg; 含量: 99.6%); 酮缬氨酸钙原料药(浙江新和成股份有限公司, 批号: Y1609101, Y1610101, Y1610102; 规格: 10 g)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: CAPCELL PAK C₁₈ MG II 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 高氯酸钠缓冲液(100 mmol·L⁻¹ 的高氯酸钠溶液, 用高氯酸调节 pH 至 2.5)-乙腈(96 : 4); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 205 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。理论板数按酮缬氨酸钙峰计算 $\geq 2 000$ 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取酮缬氨酸钙对照品适量, 精密称定, 加水溶解并定量, 稀释制成每 1 mL 中含酮缬氨酸钙 0.24 mg 的溶液, 作为对照品贮备液; 精密量取 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取酮缬氨酸钙原料药适量,

作者简介: 王宇, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0571)87180340

E-mail: fishloverain@163.com

精密称定,加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中含酮缬氨酸钙 0.12 mg 的溶液,作为供试品溶液。

2.2.3 系统适用性溶液 海因为本品生产工艺中的主要起始物料^[3-4],可能引入到原料当中成为工艺杂质,故取海因与酮缬氨酸钙混合作为系统适用性溶液。分别取酮缬氨酸钙与海因对照品各适量,加水溶解并定量稀释制成每 1 mL 中分别约含 0.12 mg 与 0.06 mg 的溶液,即得。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性试验 取溶剂(水)及“2.2.3”项下系统适用性溶液,按“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪进行测定。结果显示,溶剂无响应,不干扰酮缬氨酸钙的测定;酮缬氨酸钙峰与海因峰能够实现完全分离,两者之间的分离度 >8 ,结果见图 1。

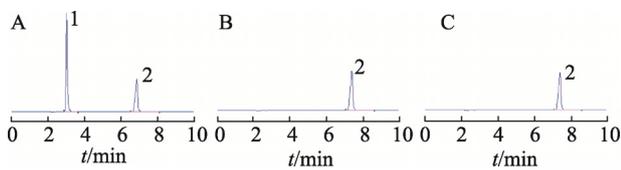


图 1 3 种溶液的 HPLC 图谱
A-系统适用性溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-海因; 2-酮缬氨酸钙。
Fig. 1 HPLC chromatograms of three kinds of solution
A-system suitability solution; B-control solution; C-sample solution; 1-hydantoin; 2- α -ketovaine calcium.

①酸破坏:取酮缬氨酸钙约 12 mg,置 100 mL 量瓶中,加 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 0.5 mL,室温放置 3 h,加 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 0.5 mL,用水稀释至刻度。②碱破坏:取酮缬氨酸钙约 12 mg,置 100 mL 量瓶中,加 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 0.5 mL,室温放置 3 h,加 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 0.5 mL,用水稀释至刻度。③氧化破坏:取酮缬氨酸钙约 12 mg,置 100 mL 量瓶中,加 0.3%过氧化氢溶液 0.5 mL,室温放置 5 min,用水稀释至刻度。④光照破坏:取酮缬氨酸钙约 12 mg,置 100 mL 量瓶中,在 4 500 Lx 照度下放置 24 h,用水溶解并稀释至刻度。⑤高温破坏:取酮缬氨酸钙约 12 mg,置 100 mL 量瓶中,置 105°C 烘箱 7 h,放冷至室温,用水溶解并稀释至刻度。

分别取上述破坏性试验溶液,按“2.1”项下色谱条件测定。结果表明,酮缬氨酸钙在酸、碱、光、高温条件下均较为稳定,在氧化条件下会产生一较大氧化降解产物峰。在该色谱条件下,酮缬氨酸钙可与海因及各降解产物色谱峰完全分离,结果见

图 2。

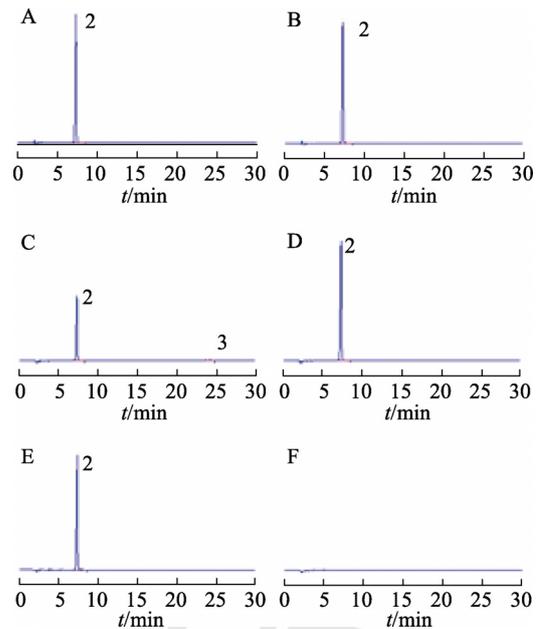


图 2 专属性考察色谱图
A-酸破坏样品; B-碱破坏样品; C-氧化破坏样品; D-光破坏样品; E-高温破坏样品; F-空白溶剂; 2-酮缬氨酸钙; 3-氧化降解产物。
Fig. 2 HPLC chromatograms of specificity test
A-sample of acid-destruction; B-sample of alkali-destruction; C-sample of oxidation-destruction; D-sample of light-destruction; E-sample of high temperature-destruction; F-blank solution; 2- α -ketovaine calcium; 3-oxidative degradation product.

2.3.2 线性关系考察 精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液 2, 5, 4, 5, 6, 15 mL,分别置于 20, 20, 10, 10, 10, 20 mL 量瓶中,分别用水稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件测定,以峰面积(A)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,进行线性回归,线性方程为 $A=14.223C+1.3986$,线性范围为 $0.025\sim 0.185 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, r 为 1.000 0。

2.3.3 仪器精密度试验 取“2.2.1”项下对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 5 次。结果酮缬氨酸钙峰面积的 RSD 值为 0.1%($n=5$),表明该方法的仪器精密度良好。

2.3.4 重复性试验 取批号为 Y1609101 的样品,按“2.2.2”项下制备 6 份供试品溶液,分别进样,按“2.1”项下色谱条件测定。结果酮缬氨酸钙的平均含量为 100.1%,RSD 值为 0.4%($n=6$)。

2.3.5 稳定性试验 取批号为 Y1609101 的样品,按“2.2.2”项下制备供试品溶液,分别于 0, 2, 4, 8, 12, 18, 24 h 进样,按“2.1”项下色谱条件测定。结果酮缬氨酸钙峰面积 RSD 值为 0.1%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.6 加样回收率试验 精密称取已知含量的酮

缬氨酸钙原料(批号: Y1609101; 水分为 6.7%; 按无水物计算, 含量为 100%)约 15 mg, 分别置 9 个 250 mL 量瓶中, 分别加入酮缬氨酸钙对照品 9, 15 和 21 mg, 各 3 份, 分别用水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成低、中、高 3 种不同浓度的溶液(80%, 100%, 120%), 按“2.1”项下色谱条件测定, 计算回收率, 平均回收率为 100.0%, RSD 为 0.08%, 结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果

Tab. 1 Results of recovery test

原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
14.76	8.88	23.63	99.96		
14.98	9.10	24.10	100.08		
14.86	9.04	23.90	100.00		
15.15	14.95	30.06	99.87		
15.03	14.97	30.01	100.03	100.0	0.08
14.88	14.90	29.75	99.90		
14.93	20.87	35.76	99.89		
15.15	20.81	35.94	99.94		
15.17	20.70	35.90	100.08		

2.3.7 样品测定结果 取 3 批样品及对照品, 按“2.2”项下方法制备对照品溶液和供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 结果见图 1, 按外标法以峰面积计算酮缬氨酸钙的含量。同时与现行国家标准酮缬氨酸钙含量测定项下方法测定结果进行比较, 结果见表 2。

表 2 不同方法测定酮缬氨酸钙含量结果比较

Tab. 2 Comparison of different methods for detecting α -ketovaine calcium content

批号	HPLC (C ₁₈ 柱)/%	HPLC (氢型强阳离子交换柱)/%
Y1609101	100.3	100.1
Y1610101	100.6	100.5
Y1610102	100.9	100.7

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

酮缬氨酸钙属于离子型化合物, 在 C₁₈、C₈ 等色谱柱上保留较弱, 现行质量标准均采用氢型强阳离子交换色谱柱。但该方法耐用性较差, 且色谱柱损耗较快, 故考虑通过优化流动相体系, 改用更为通用、便于维护的 C₁₈ 柱作为色谱柱。

3.2 流动相的选择

现行企业注册标准中有 2 家企业标准有关物质检查采用 C₁₈ 柱, 磷酸水溶液-乙腈作为流动相。笔者首先参照该流动相体系并通过优化流动相比例, 结果发现主峰峰形不够理想。后参考复方 α -酮

酸片企业注册标准中含量测定方法, 以高氯酸钠溶液-乙腈为流动相体系, 等度洗脱, 调整有机相比比例使酮缬氨酸钙出峰时间合适。结果表明, 以高氯酸钠溶液-乙腈(96:4)作为流动相能够满足含量测定要求, 主峰出峰时间约为 7 min, 峰形良好, 且与已知杂质均能实现有效分离。同时, 高氯酸钠溶液-乙腈流动相体系可通过调整有机相比比例同时用于复方 α -酮酸片中其他几种酮酸成分的含量测定。综上, 选择高氯酸钠溶液-乙腈作为流动相。

3.3 检测波长的选择

采用二极管阵列检测器在 190~400 nm 扫描, 酮缬氨酸钙为末端紫外吸收, 无特征紫外吸收峰。综合吸收响应强度、避免溶剂及杂质干扰, 选择 205 nm 作为测定波长。

3.4 色谱柱耐用性考察

由于酮缬氨酸钙在 C₁₈ 柱上的保留较弱, 笔者选取常用的 4 个品牌 C₁₈ 柱, 取系统适用性溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行耐用性考察。结果主峰与海因的分离度均符合规定, 结果见表 3, 表明该色谱系统耐用性较好。

表 3 色谱柱耐用性考察结果

Tab. 3 Result on durability of chromatographic column

色谱柱	规格	主峰保留 时间/min	分离度
CAPCELL PAK C ₁₈ MG II	250 mm×4.6 mm, 5 μ m	7.382	20.44
InertSustain C ₁₈	250 mm×4.6 mm, 5 μ m	7.367	17.08
Kromasil 100-5-C ₁₈	150 mm×4.6 mm, 5 μ m	3.756	9.52
Ultimate XB-C ₁₈	150 mm×4.6 mm, 5 μ m	4.640	13.99

4 结论

经本研究优化后的酮缬氨酸钙含量测定方法操作简便、快速, 灵敏度高, 重复性好, 结果准确可靠, 可用于酮缬氨酸钙的质量控制。

REFERENCES

- [1] 张逊, 冯国江, 谢鹏. 高效液相色谱法测定 α -酮缬氨酸钙含量[J]. 医药导报, 2010, 29(11): 1496-1498.
- [2] ZHONG Y, HUANG X Y, FAN Y L, et al. Determination of five components in compound α -ketoacid tablets by ion-pair HPLC-ELSD [J]. Chin J Anal Lab(分析试验室), 2014, 33(7): 847-850.
- [3] LU X, LI Y Y, LI F. The synthesis of α -ketovaline calcium [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2007, 31(1): 37-39.
- [4] HAO H S, ZI C R, ZHOU J L. Synthesis of α -ketovaline calcium [J]. Fine Chem Intermediates(精细化工中间体), 2011, 41(1): 42-44.

收稿日期: 2019-11-21

(本文责编: 李艳芳)