

离子色谱法测定枸橼酸芬太尼原料药和注射液中枸橼酸的含量^Δ

马 迅^{1*}, 李盼盼², 刘桂霞², 宗艳平², 孙 伟², 山广志², 陈 华¹, 南 楠^{1#}(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)18-2536-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.18.25

摘要 目的: 采用离子色谱法测定枸橼酸芬太尼原料药和注射液中枸橼酸的含量。方法: 分析柱为 Thermo Dionex IonPac™ AS11-HC, 流动相为氢氧化钾溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 35 ℃, 进样量为 20 μL, 检测器为抑制型电导检测器。结果: 枸橼酸检测质量浓度线性范围为 0.115 7~74.05 μg/mL ($r=0.999 5$); 定量限为 0.115 0 μg/mL, 检测限为 0.040 0 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 2.0%; 加样回收率为 99.6%~101.5% (RSD=0.68%, $n=9$)。结论: 该方法环保、简便, 准确度和精密度良好, 适用于枸橼酸芬太尼原料药及注射液中枸橼酸的含量测定。

关键词 枸橼酸芬太尼; 枸橼酸; 含量测定; 离子色谱法

Contents Determination of Citric Acid in Fentanyl Citrate Raw Materials and Its Injection by Ion Chromatography

MA Xun¹, LI Panpan², LIU Guixia², ZONG Yanping², SUN Wei², SHAN Guangzhi², CHEN Hua¹, NAN Nan¹(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China; 2. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the contents of citric acid in fentanyl citrate raw materials and its injection by ion chromatography. METHODS: The determination was performed on Thermo Dionex IonPac™ AS11-HC column with mobile phase consisted of potassium hydroxide (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The column temperature was 35 ℃, and sample size was 20 μL. The detector was suppressed conductivity detector. RESULTS: The linear range of citric acid were 0.115 7-74.05 μg/mL ($r=0.999 5$). The limit of quantitation was 0.115 0 μg/mL, and the limit of detection was 0.040 0 μg/mL; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%; the average recoveries were 99.6%-101.5% (RSD=0.68%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is environmentally-friendly and simple with good accuracy and precision, and suitable for the contents determination of citric acid in fentanyl citrate raw materials and injection.

KEYWORDS Fentanyl citrate; Citric acid; Content determination; Ion chromatography

枸橼酸芬太尼(Fentanyl citrate)是人工合成的强效麻醉性镇痛药,为阿片类受体激动药,镇痛作用机制与吗啡相似,作用强度为吗啡的60~80倍;其可用于麻醉前、中、后的镇静与镇痛,以及各种肿瘤疼痛和慢性疼痛的治疗^[1]。枸橼酸(柠檬酸)作为枸橼酸芬太尼中的反离子配基,提高了药物的溶解性、稳定性和生物利用度,检测和控制枸橼酸芬太尼原料药和注射液中枸橼酸的含量对保证其结构均一和质量可靠具有积极意义^[1]。

目前用于有机酸分析的方法主要有薄层色谱法(TLC)^[2-3]、气相色谱法(GC)^[4-5]、毛细管电泳法(CE)^[6-7]、高效液相色谱法(HPLC)^[8-11]和离子色谱法(IC)^[12-15]等。TLC、GC和CE法检测结果不准确,而HPLC法多采用有机相与一定浓度的缓冲盐溶液洗脱,流动相的制备较为

复杂。IC法流动相简单,环保无污染;采用在线淋洗液发生器能够简化操作,增强方法重复性;且采用电导或紫外检测器,有较好的选择性和灵敏度^[16]。鉴于此,本课题组采用IC法建立了测定枸橼酸芬太尼原料药和注射液中枸橼酸含量的方法,以期为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Thermo Dionex ICS-5000⁺型IC仪,包括自循环模式的抑制型电导检测器、EGC-500淋洗液自动发生器、Chromleon 7.2 色谱工作站(美国 Thermo Fisher Scientific公司);XP205 型十万分之一电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo公司);Milli-Q Integral 型超纯水器(德国 Merck Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

枸橼酸芬太尼原料药(A厂,批号:B01-20140402;B厂,批号:3F141101);枸橼酸芬太尼注射液(A厂,批号:1140439、1140609、1141102、1141204-A2、1141204-A3、

^Δ 基金项目:中国医学科学院与健康科技创新工程系统创新团队基金(No.2016-I2M-3-010)

* 主管药师,硕士。研究方向:药品质量标准。电话:010-67095458。E-mail:maxun@nifdc.org.cn

通信作者:主任药师。研究方向:药品质量标准。电话:010-67095455。E-mail:nannan@nifdc.org.cn

1141208、1141209、1150406、1150407、2120501、20150205、20150207,规格:2 mL:0.1 mg;批号:1141104-B3,规格:10 mL:0.5 mg;B厂,批号:20150205、20150207,规格:2 mL:0.1 mg);枸橼酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111679-200401,纯度:>98%);试验所用试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分析柱:Thermo Dionex IonPac™ AS11-HC(250 mm×4 mm,6 μm);保护柱:Thermo Dionex IonPac™ AG11-HC(50 mm×4 mm,8 μm);流动相:氢氧化钾溶液(KOH),梯度洗脱(0~5 min,25 mmol/L KOH;5~25 min,25→75 mmol/L KOH;25~30 min,75→25 mmol/L KOH);流速:1.0 mL/min;柱温:35 ℃;进样量:20 μL;检测器:抑制型电导检测器。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取枸橼酸对照品14.81 mg,置于50 mL量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,即得对照品贮备液;取上述对照品贮备液适量,置于50 mL量瓶中,制成每1.0 mL约含枸橼酸37 μg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取注射液样品作为供试品溶液1。精密称取原料药样品约0.925 mg,置于25 mL量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,制成每1.0 mL约含枸橼酸37 μg的供试品溶液2。

2.2.3 阴性对照溶液 以水作阴性对照溶液。

2.3 系统适用性和专属性试验

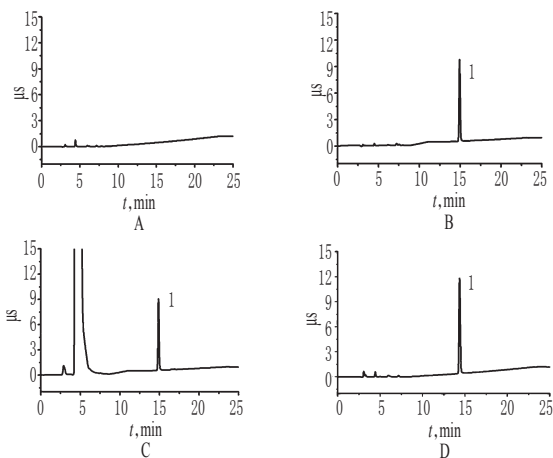
精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,在该色谱条件下,理论板数按枸橼酸峰计为52 547,保留时间为14.923 min;且其他成分在枸橼酸峰的保留时间处无色谱峰出现,各成分均能达到基线分离,分离度>2.0。结果表明,其他成分对测定无干扰,本方法可满足检测的需要。

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,逐级稀释,制成质量浓度分别为74.05、37.02、18.51、4.628、2.314、1.157、0.578 5、0.115 7 μg/mL的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。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,得枸橼酸回归方程 $y=0.021 52x-0.408 5(r=0.999 5)$ 。结果表明,枸橼酸检测质量浓度线性范围为0.115 7~74.05 μg/mL。

2.5 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限;当信噪比为3:1时,得检测限。结果,枸橼酸的定量限为0.115 0 μg/mL,检测限为0.040 0 μg/mL。



A.阴性对照;B.对照品;C.供试品1;D.供试品2;1.枸橼酸
A.negative control;B.substance control;C.test sample 1;D.test sample 2;
1.citric acid

图1 离子色谱色谱图

Fig 1 IC chromatograms

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,枸橼酸峰面积的RSD=0.29%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液1(批号:1141102)适量,分别于室温下放置0、3、6、12、24 h时按“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=1.29%($n=5$),表明供试品溶液在室温下放置24 h内基本稳定。

2.8 重复性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液1(批号:1141102)适量,共6份,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,枸橼酸峰面积的RSD=0.70%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取枸橼酸对照品适量,加水制成质量浓度为206 μg/mL的对照品溶液。取上述对照品溶液约2.3、3.1、3.8 mL,平行制备3份,分别置于10 mL量瓶中,加注射液样品(批号:1141102)5.0 mL,加水定容,摇匀,即得系列待测溶液。取上述系列待测溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

2.10 样品含量测定

取2批原料药样品及13批注射液样品适量,按“2.2.2”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,记录峰面积并计算枸橼酸的含量。结果,2批原料药样品(批号:3F141101、B01-20140402)的含量分别为36.40%、37.40%($n=3$),13批注射液样品含量测定结果见表2。

3 讨论

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
149.60	478.40	632.28	100.9		
149.60	478.40	631.74	100.8		
149.60	478.40	635.02	101.5		
149.60	644.80	803.61	101.4		
149.60	644.80	803.77	101.5	100.8	0.68
149.60	644.80	794.98	100.1		
149.60	790.40	936.71	99.6		
149.60	790.40	946.85	100.9		
149.60	790.40	940.78	100.1		

表2 样品含量测定结果(n=3, $\mu\text{g/mL}$)Tab 2 Results of content determination of samples (n=3, $\mu\text{g/mL}$)

厂家	批号	含量	平均含量	RSD, %
A	1140439	29.45	29.63	0.88
	1140609	29.61		
	1141102	29.41		
	1141204-A2	29.79		
	1141204-A3	29.52		
	1141104-B3	29.92		
	1141208	29.56		
	1141209	29.84		
	1150406	29.10		
	1150407	30.01		
	2120501	29.71		
B	20150205	30.12	30.59	2.47
	20150207	31.06		

3.1 色谱柱的选择

枸橼酸为三元有机酸,在色谱柱中的保留较难洗脱。综合考虑选用Thermo Dionex IonPac™ AS11-HC分析柱,在KOH溶液梯度洗脱下,可使枸橼酸较快出峰,且注射液和原料药中其他成分可与枸橼酸达基线分离,不干扰其测定。

3.2 方法耐用性考察

取“2.2.2”项下供试品溶液1(批号:1141102)适量,在不同流速($\pm 0.2 \text{ mL/min}$)、柱温($\pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$)等色谱条件下进样测定。结果,各条件下枸橼酸理论板数均 $> 10\ 000$,枸橼酸峰与相邻杂质峰分离度 > 2 ;枸橼酸的平均含量为 $29.34 \mu\text{g/mL}$,RSD均 $< 2.0\%$ ($n=4$),表明本方法耐用性良好。

3.3 含量测定结果

在13批注射液样品中,枸橼酸的平均含量约为 $29.63 \mu\text{g/mL}$,按芬太尼规格 $2 \text{ mL}:0.1 \text{ mg}$ ($50 \mu\text{g/mL}$)并结合枸橼酸的分子量(192.14)、芬太尼的分子量(336.47)以及枸橼酸芬太尼注射液的分子量(528.60),计算得出枸橼酸的含量约占注射液样品的 37.5% ;2批原料药样品中枸橼酸含量分别为 36.40% 和 37.40% 。所有测定结果与枸橼酸的理论含量(36.35%)相当,证明成盐完全。

综上所述,本方法环保、简便,准确度和精密度良

好,适用于枸橼酸芬太尼原料药及注射液中枸橼酸的含量测定。

参考文献

- [1] 孙红. 枸橼酸芬太尼注射液市场销售分析[J]. 海峡药学, 2006, 18(1): 200-202.
- [2] 肖宏华, 孙磊, 金红宇, 等. 5种升麻中有机酸、色原酮和三萜皂苷的薄层色谱指纹图谱分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(3): 547-553.
- [3] 何兵, 冯文字, 田吉, 等. 黄金咽喉片中挥发油及有机酸的同板薄层色谱鉴别[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(4): 884-885.
- [4] 张伟, 李晓君, 张静, 等. 柱前衍生-气相色谱法同时测定功能食品中8种有机酸[J]. 分析实验室, 2014, 33(4): 175-179.
- [5] 师君丽, 孔光辉, 李勇, 等. 烤烟种子中有机酸的气相色谱法分析及聚类分析[J]. 西南农业学报, 2014, 27(6): 2650-2653.
- [6] 韦寿莲, 刘君红, 郭海福, 等. 毛细管电泳对叶下珠中有机酸的分离检测[J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 692-696.
- [7] 韩海峰, 王庆, 刘霞, 等. 聚合离子液体为添加剂的毛细管电泳法用于快速高效分离饮料中7种有机酸[J]. 色谱, 2012, 30(5): 538-542.
- [8] 向瑾, 余勤, 梁茂植, 等. 柱切换HPLC法测定人血浆中的枸橼酸[J]. 华西药学杂志, 2015, 30(2): 232-233.
- [9] 李丽, 肖永庆, 于定荣, 等. HPLC测定五味子中3种有机酸的含量[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(23): 3286-3289.
- [10] 彭明丽, 赵冠人, 温筱煦. HPLC法同时测定茵栀黄颗粒中黄芩苷、木犀草素和绿原酸的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(6): 837-839.
- [11] 刘敏彦, 高淑丽, 刘丽华, 等. HPLC法同时测定不同产地金银花和山银花中6种有机酸成分[J]. 中药材, 2013, 30(2): 196-198.
- [12] 李桂镇, 范伢, 穆凯艳, 等. 固相萃取-离子色谱法测定中药萝芙木中常见有机酸和阴离子[J]. 分析实验室, 2015, 34(8): 913-917.
- [13] 顾一丹, 李继文, 宋卫林, 等. 离子色谱法测定合成气制烯烃产物中的 $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ 有机酸[J]. 色谱, 2014, 32(2): 204-209.
- [14] 潘丙珍, 刘青, 庞世琦, 等. 离子色谱法测定酒中的有机酸和无机阴离子[J]. 现代食品科技, 2013, 29(4): 876-880.
- [15] 姚萍, 徐丽霞, 罗军, 等. 离子色谱法测定琥珀酰明胶注射液中琥珀酸含量[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(3): 352-356.
- [16] 许晓辉, 秦雯雯, 张生萍, 等. 离子色谱法在药品检验及《中国药典》中的应用进展[J]. 转化医学电子杂志, 2016, 3(5): 69.

(收稿日期:2016-12-13 修回日期:2017-03-20)

(编辑:刘柳)