

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2020.02.07

高效液相色谱法测定卡巴匹林钙产品与反应液中尿素的含量

王瑞菲^{1,2}, 徐婷², 魏凤^{1,2}, 王艳², 冯维春^{1,2*}

(1. 青岛科技大学山东化工研究院, 济南 250014;

2. 山东省化工研究院, 山东省水相有机合成及高效清洁分离工程技术研究中心, 济南 250014)

[收稿日期] 2019-10-17 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2020) 02-0039-07 [中图分类号] S859.2

[摘要] 建立了一种用于测定卡巴匹林钙产品及反应液中尿素含量的高效液相色谱法。确立了最佳色谱条件, 色谱柱为 Waters Xselect HSS T3 C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-水 (5:95, V/V), 检测波长为 195 nm, 流速为 0.5 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 10 μL。结果显示, 尿素浓度在 0.12 ~ 120 μg/mL 范围内具有良好的线性关系 ($r > 0.999$); 尿素的检出限为 0.05 μg/mL, 定量限为 0.1 μg/mL; 分离度 $R > 1.5$, 重复性的相对标准偏差 $< 1.0\%$ ($n = 6$); 卡巴匹林钙产品中尿素的回收率范围为 98.10% ~ 100.46%, 反应液中尿素的回收率范围为 95.32% ~ 101.20%。本方法操作简便、准确度高、重复性好、检测速度快, 在合成工艺中对卡巴匹林钙产品及反应液中尿素的质量控制具有重要意义。

[关键词] 高效液相色谱法; 卡巴匹林钙; 反应液; 尿素

Determination of Urea in Carbasalate Calcium and Reaction Solution by HPLC

WANG Rui-fei^{1,2}, XU Ting², WEI Feng^{1,2}, WANG Yan², FENG Wei-chun^{1,2*}

(1. Qingdao University of Science & Technology, Shandong Chemical Industry Research Institute, Jinan 250014, China;

2. Chemical Technology Academy of Shandong Province, Organic Reaction in Aqueous Engineering

Research Center of Shandong Province, Jinan 250014, China)

Corresponding author: FENG Wei-chun, E-mail: hgyfengweichun@126.com

Abstract: A new method for the determination of urea in carbasalate calcium and its reaction solution by HPLC was established, and the optimum chromatographic conditions were established. The determination was carried out with a Waters Xselect HSS T3 C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). Methanol-water (5:95) was taken as mobile phase at a flow rate of 0.5 mL/min, and detection wavelength was 195 nm, column temperature was 30 °C, the injection volume was 10 μL. The results showed that a good linear relationship was accepted in the range of

基金项目: 山东省“泰山学者”建设工和基金项目 (TS20130918)

作者简介: 王瑞菲, 硕士, 从事化学品检测研究。

通讯作者: 冯维春, E-mail: hgyfengweichun@126.com

0.12 ~ 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r > 0.999$). and limit of detection was 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, limit of quantity was 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The resolution was more than 1.5, the relative standard deviation of this method was within 1.0% ($n = 6$; the recovery rate of urea in carbasalate calcium were in the range of 98.10% ~ 100.46%, the recovery rate of urea in its reaction solution were in the range of 95.32% ~ 101.20%. The experimental results show that the method is simple, accurate, and fast, which provides the basis for the quality control of urea in carbasalate calcium and its reaction solution.

Key words: HPLC; carbasalate calcium; reaction solution; urea;

卡巴匹林钙,是“阿司匹林”(乙酰水杨酸)衍生物,是乙酰水杨酸钙与尿素的络合物,能够在水中分解为乙酰水杨酸进而发挥解热、镇痛、抗炎及抑制血小板聚集作用^[1],还可在畜牧养殖等领域中用于猪、鸡、牛等各种动物的发热和缓释疼痛^[2-3]。尿素的含量作为卡巴匹林钙的一个重要检测指标,其测定结果决定了产品的质量,而且在卡巴匹林钙生产过程中,卡巴匹林钙与卡巴匹林钙反应液中尿素含量的测定,对于工艺和中控分析尤为重要,因此建立快速、准确的尿素含量测定方法具有重要的实际意义。卡巴匹林钙质量标准收载于 2017 年兽药质量标准目录中(农业部公告第 1433 号)^[4],主要采用紫外-可见分光光度法测定尿素的含量,但是在测定过程中,受衍生试剂(对二甲氨基苯甲醛)来源、衍生的温度等因素影响,该分析方法的重复性比较差。传统尿素测定方法主要有高效液相色谱-荧光法^[5-7]、高效液相色谱-质谱法^[8-9]、分光光度法^[10-11]、折光率法^[12]、比色法、脲酶法^[13]等分析法,检测样品大多为白酒、环境、罐头食品等,存在检测成本高、操作繁琐、耗时长等弊端,不适用于卡巴匹林钙反应液中尿素含量测定。高效液相色谱法快速,应用广泛。高效液相色谱法直接测定卡巴匹林钙中尿素含量的方法未见报道。因此,本研究利用建立的方法进行实际样品检测,以期测定卡巴匹林钙以及卡巴匹林钙反应液中尿素的含量,为优化卡巴匹林钙的工艺路线提供技术支持以及完善卡巴匹林钙的质量控制提供参考数据。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器 高效液相色谱仪:Thermo Ultimate 3000 以及配套紫外检测器和工作站;SQP 电子天平

(感量 0.1 mg),德国赛多利斯天平公司;UV-2700 紫外-可见分光光度仪,岛津公司。

1.2 材料 甲醇、乙腈为色谱纯,Thermo Fisher Scientific;其他试剂均为分析纯。尿素对照品,购于中国食品药品检定研究院,含量为 100%,批号为 100288-201302。

2 方法与结果

2.1 检测波长的选择 取尿素对照品适量,加水溶解并稀释成约含 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液,在 190 ~ 240 nm 波长范围内进行扫描。综合考虑,本研究选择 195 nm 作为检测波长(图 1)。

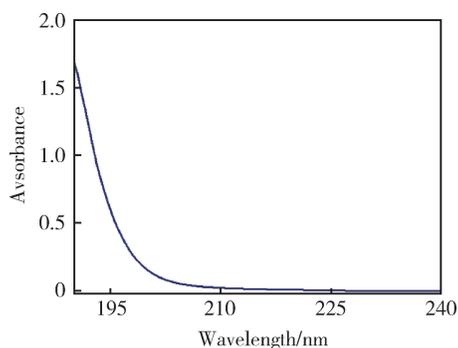


图 1 尿素吸收波长光谱图

Fig 1 Absorption wavelength spectrogram of urea

2.2 分析方法的选择 目前尿素的测定多采用乙腈-水体系作为流动相,由于尿素为强极性物质,在普通 C18 色谱柱上较难保留;在乙腈-水体系下,使用适用于强极性化合物测定的 Waters Xselect HSS T3 C18 色谱柱,卡巴匹林钙中尿素色谱峰与相邻色谱峰分离度 < 1.5 ,不符合色谱分离要求。选择甲醇-水作为流动相体系,能够增强尿素的保留能力。通过对不同甲醇-水比例与不同流速进行

考察,选择甲醇-水最佳比例为 5:95 (V/V) 且流速为 0.5 mL/min,尿素峰形对称,保留时间比较合适,分离较好。

2.3 高效液相色谱条件 色谱柱为 Waters Xselect HSS T3 C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(5:95, V/V),检测波长为 195 nm,流速为 0.5 mL/min,进样量为 10 μL,柱温为 30 ℃。

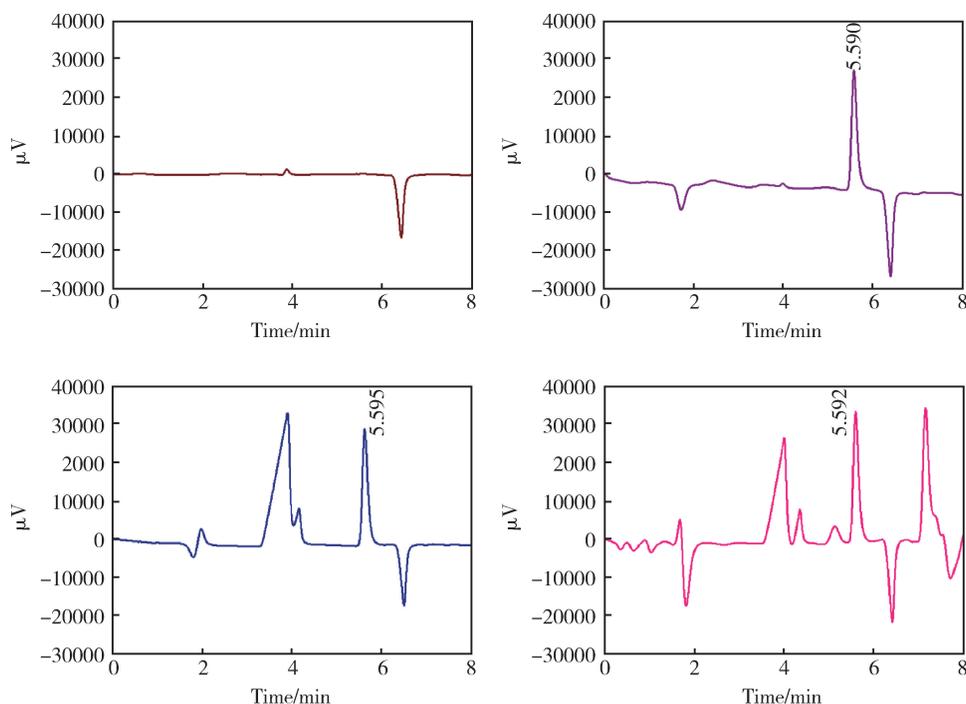
2.4 尿素对照品溶液的制备 精密称取尿素对照品 80 mg,用流动相溶解并稀释至 100 mL,配制成 0.8 mg/mL 尿素标准储备溶液。精密量取 10 mL,加流动相稀释至 100 mL,配制成 0.08 mg/mL 的尿素对照品溶液。

2.5 样品溶液的制备 精密称取卡巴匹林钙 0.5

g,加流动相溶解并稀释至 100 mL;精密量取 10 mL,加流动相稀释至刻度 100 mL,配制成卡巴匹林钙供试品溶液。

精密称取卡巴匹林钙反应液 0.5 g,加流动相溶解并稀释至 100 mL,配制成卡巴匹林钙反应液供试品溶液。

2.6 专属性试验 分别量取空白溶剂(流动相)、尿素对照品溶液、卡巴匹林钙供试品溶液和卡巴匹林钙反应液供试品溶液各 10 μL,按照 2.3 项确定的色谱条件进行测定,试验结果见图 2。尿素色谱峰的保留时间均约为 5.59 min,尿素色谱峰与相邻色谱峰的分度均大于 1.5,达到基线分离,尿素的理论塔板数大于 3000,表明其他组分对尿素测定无干扰。



(1 为空白溶剂-流动相;2 为尿素对照品溶液;3 为卡巴匹林钙供试品溶液;4 为卡巴匹林钙反应液供试品溶液)

图 2 不同样品色谱图

Fig 2 Chromatogram of different samples

2.7 灵敏度考察 取 0.8 mg/mL 尿素标准储备液,用流动相稀释,平行制备 5 份 0.1 μg/mL 尿素对照品溶液,供 HPLC 检测,取信噪比 S/N ≥ 3 时的样品浓度为检出限 (LOD),信噪比 S/N ≥ 10 的样品

浓度为定量限 (LOQ)。

添加浓度为 0.1 μg/mL 时,信噪比 S/N 均大于 10,信噪比满足定量限的要求,确定本方法的定量限。添加浓度为 0.05 μg/mL 时,信噪比 S/N 均大

于 3, 信噪比满足检出限的要求, 确定为本方法的检出限。

2.8 标准曲线及线性关系考察 分别量取 0.8 mg/mL 尿素标准储备液适量, 加流动相稀释, 配制含尿素浓度约为 0.12、16、32、48、64、80、96、120 μg/mL 的标准溶液。依照浓度由小到大的顺序, 按照上述确定的色谱条件, 以质量浓度 *C* 为横坐标, 相应的峰面积(*A*)为纵坐标, 绘制标准曲线。尿素标准曲线为 $Y = 3823X - 286.7$, 相关系数 *r* 为 0.99985 (图 3)。

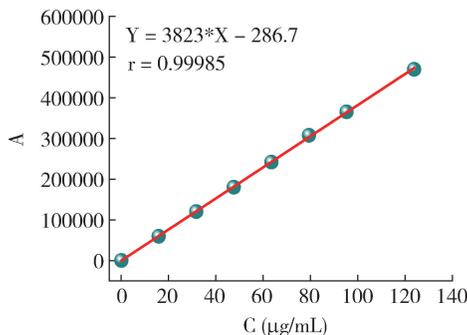


图 3 尿素的标准曲线

Fig 3 Standard curve of urea

2.9 仪器精密密度考察 取尿素对照品溶液 (80 μg/mL), 按上述色谱条件重复连续进样 6 次, 测得峰面积相对标准偏差为 0.4%。表明此方法的仪器精密密度良好 (表 1)。

表 1 仪器精密密度试验数据

Tab 1 Precision test data sheet

	进样次数					
	1	2	3	4	5	6
峰面积	294505	290930	292285	292311	290517	293000
峰面积 均值	292258					
RSD/%	0.4					

2.10 重复性考察 取卡巴匹林钙 (20181121 批) 与卡巴匹林钙反应液 (20181121 批), 分别平行制备 6 份卡巴匹林钙供试品溶液与卡巴匹林钙反应液供试品溶液, 按上述色谱条件测定尿素含量, 并计算相对标准偏差 (表 2 ~ 表 3)。结果显示, 卡巴匹林钙重复性的 RSD 为 0.70%, 卡巴匹林钙反应液重复性的 RSD 为 0.92%, 表明此方法的重复性符合要求。

表 2 卡巴匹林钙中尿素重复性试验数据

Tab 2 Precision test data sheet of urea in carbasalate calcium

1	2	3	4	5	6	均值/%	RSD/%
13.11	13.12	12.96	13.20	13.02	12.99	13.07	0.70

表 3 卡巴匹林钙反应液中尿素重复性试验数据

Tab 3 Precision test data sheet of urea in reaction solution

1	2	3	4	5	6	均值/%	RSD/%
1.710	1.689	1.720	1.687	1.697	1.678	1.697	0.92

2.11 准确度考察

2.11.1 卡巴匹林钙准确度考察 取卡巴匹林钙 (20181121 批, 尿素含量为重复性数据) 0.25 g, 分别加入尿素对照品适量, 加流动相溶解, 配制含尿素对照品浓度为 24、32、40、48 μg/mL 的供试品溶液。每个浓度水平制备 5 份平行供试品溶液, 分别测定回收率、每个水平浓度下 (组内) 的 RSD 和所有浓度下的 RSD。结果显示, 卡巴匹林钙中尿素回

收率范围为 98.10% ~ 100.46%, 组内 RSD 范围为 0.71% ~ 0.93%, 平均回收率为 99.20%, RSD 为 0.75% (表 4)。

2.11.2 卡巴匹林钙反应液准确度考察 取卡巴匹林钙反应液 (20181121 批, 尿素含量为重复性数据) 0.25 g, 分别加入 0.8 mg/mL 尿素标准品储备液适量, 配制含尿素对照品浓度为 4、20、40、64 μg/mL 的供试品溶液。每个浓度水平制备 5 份平

行供试品溶液,分别测定回收率、每个水平浓度下 (组内)的 *RSD* 和所有浓度下的 *RSD*。结果显示,卡巴匹林钙反应液中尿素回收率范围为 95.32% ~ 101.20%,组内 *RSD* 范围为 0.97% ~ 1.97%,平均回收率为 98.75%,*RSD* 为 1.44% (表 5)。

表 4 卡巴匹林钙中尿素回收率试验数据

Tab 4 Recovery test results of urea in carbasalate calcium

本底样品中尿素浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加标水平/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	组内回收率/%	组内 <i>RSD</i> /%	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
32.7	24	99.35	99.41	0.74	99.20	0.75
		98.25				
		99.75				
		100.25				
		99.47				
	32	98.10	99.06	0.79		
		98.51				
		99.15				
		100.11				
		99.42				
	40	99.35	99.12	0.93		
		98.15				
		98.35				
		99.28				
		100.46				
	48	99.35	99.20	0.71		
		98.75				
		100.35				
		98.98				
		98.56				

表 5 卡巴匹林钙反应液中尿素回收率试验数据

Tab 5 Recovery test results of urea in reaction solution

本底样品中尿素浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	加标水平/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率/%	组内回收率/%	组内 <i>RSD</i> /%	平均回收率/%	<i>RSD</i> /%
42.4	4	97.48	97.64	1.97	98.75	1.44
		95.32				
		100.35				
		96.52				
		98.53				
	20	99.12	98.52	1.65		
		97.53				
		96.47				
		98.73				
		100.74				
	40	100.79	99.33	0.97		
		98.64				
		99.35				
		99.56				
		98.32				
	64	99.50	99.21	1.37		
		97.56				
		99.35				
		98.45				
		101.20				

2.12 稳定性考察 取 20181201 批卡巴匹林钙与卡巴匹林钙反应液供试品溶液,分别于 0、2、4、6、12、16、24 h 进行测定,测得卡巴匹林钙中尿素峰面积相对标准偏差为 1.2%,卡巴匹林钙反应液中尿素峰面积相对标准偏差为 1.3%,表明供试品溶液

稳定性良好。

2.13 实际样品测定 对实验室尿素规格 13.10% 的三批卡巴匹林钙样品分别采用本研究建立的检测方法和紫外-可见分光光度法进行检测,结果对比如表 6 所示。

表 6 HPLC 法与紫外可见分光光度法测定尿素含量结果比较 (n=3)

Tab 6 Comparison of the results of urea determination by HPLC and UV-Vis spectrophotometry (n=3)

批号	标示量/%	高效液相色谱法		衍生+紫外-可见分光光度法	
		含量/%	RSD/%	含量/%	RSD/%
20181201	13.10	13.14	0.70	13.00	1.14
20181202	13.15	13.08	0.65	13.01	1.65
20181203	13.12	13.18	0.44	13.07	1.04

通过上表数据对比发现,紫外-可见分光光度法测定的结果与本研究的高效液相色谱法相比,偏低且精度较差。

3 讨论与结论

《兽药质量标准汇编》(2017 年)中尿素测定方法中衍生试剂为对二甲氨基苯甲醛,其来源不同造成的品质差异、存储过程中易变质等问题而且衍生温度与衍生放置时间等因素易引起数据波动,均可能对尿素分析方法的重现性和数据的精密度造成影响。另一方面,由于卡巴匹林钙反应液中尿素浓度范围广,《兽药质量标准汇编》(2017 年)中尿素测定方法并不适用。

卡巴匹林反应液供试品溶液中成分复杂,且甲醇能够加强其他有机组分的洗脱,使尿素与相邻色谱峰分离达到色谱要求,提高分析方法的重复性。同时,流动相中含有的适量有机溶剂能够延长色谱柱使用寿命。相比于文献^[5,14]中记载的尿素分析方法,本方法采用甲醇-水(5:95,V/V)为流动相。与文献^[6-7]所采用的荧光检测器与衍生测定尿素方法不同,采用紫外检测器进行尿素含量的测定,操作简单、灵敏度高、线性范围宽,适合卡巴匹林钙反应液中的尿素检测。

本研究建立了一种用于检测卡巴匹林钙产品及反应液中尿素含量的高效液相色谱方法;分离度 $R \geq 1.5$;线性相关系数达到了 0.999 以上;重复性

的标准偏差均小于 1.0%;卡巴匹林钙产品中尿素的回收率范围为 98.10%~100.46%,反应液中尿素的回收率范围为 95.32%~101.20%;检出限为 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 。本方法具有分析时间短、灵敏度高、精确度好等优点,填补了国内空白;检测卡巴匹林钙产品与反应液中尿素含量,对产品生产工艺、中控分析及推广应用均具有重要的指导意义。

参考文献:

- [1] 侯曙光,魏树礼.卡巴匹林钙的性质及应用[J].中国药学杂志,1996,31(2):105-107.
Hou S G,Wei S L.The properties and applications of carbasalate calcium[J].Chinese Pharmaceutical Journal,1996,31(2):105-107.
- [2] 郑文,陈洪亮,黄玲利,等.卡巴匹林钙可溶性粉在鸡体内药物动力学研究[J].家禽科学,2011,11:13-15.
Zheng W,Chen H L,Huang L L,*et al.* Pharmacokinetics of Ca-soluble Carbapirin Powder in Chicken [J]. Poultry Science, 2011,11:13-15.
- [3] 孟芳,牛华星,郑莉,等.卡巴匹林钙对猪的解热效果及靶动物安全性试验[J].中国兽医杂志,2017,53(12):102-104.
Meng F,Niu H X,Zheng L,*et al.* Antipyretic effect of carbapeline calcium on pigs and safety test of target animals[J]. Chinese Journal of Veterinary Drug. 2017,53(12):102-104.
- [4] 农业部兽药评审中心.兽药质量标准(2017)[M].北京:中国农业出版社,2017.
Ministry of Agriculture veterinary drug evaluation center. Veterinary

- drug quality standards (2017) [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2017.
- [5] 杜光宇, 李晨光, 张勇. 高效液相色谱法测定游泳池水中尿素含量[J]. 中国卫生工程学, 2015, 14(5): 478-479.
- Du C Y, Li C G, Zhang Y. Determination of urea in swimming pool water by HPLC[J]. Chinese Journal of Public Health Engineering, 2015, 14(5): 478-479.
- [6] 申世刚, 李国辉, 钟其顶, 等. 高效液相色谱-荧光检测器法测定白酒中尿素含量方法研究[J]. 酿酒科技, 2015(3): 111-114.
- Sheng S G, Li G H, Zhong Q D, et al. Measurement of Urea Content in Baijiu (Liquor) by HPLC-FLD[J]. Liquor-Making Science & Technology, 2015(3): 111-114.
- [7] 曾琪, 张缙, 徐敦明, 等. 柱前衍生-高效液相色谱-荧光检测法测定罐装食品中的尿素[J]. 色谱, 2015, 33(1): 80-83.
- Zeng Q, Zhang J, Xu D M, et al. Determination of urea in canned foods by high performance liquid chromatography-fluorescence detection coupled with precolumn derivatization[J]. Chinese Journal of Chromatography, 2015, 33(1): 80-83.
- [8] Gyeong H. L., Dae Y. B., Jung H. L., et al. Simultaneous determination of ethyl carbamate and urea in Korean rice wine by ultra-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometric detection[J]. Journal of Chromatography B. 2017, (1065-1066): 44-49.
- [9] 张海婧, 徐春雨, 胡小键, 等. 呼出气冷凝液中尿素的高效液相色谱-串联质谱测定法[J]. 环境与健康杂志, 2017, 34(2): 161-163.
- Zhang H J, Xu C Y, Hu X J, et al. Determination of urea in exhaled breath condensate by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Journal of Environment and Health, 2017, 34(2): 161-163.
- [10] 王立媛, 冯靓, 吴平谷, 等. 分光光度法测定黄酒中尿素含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 20(11): 3059-3059.
- Wang L Y, Feng L, Wu P G, et al. Determination of urea in rice wine by Spectrophotometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2010, 20(11): 3059-3059.
- [11] 王益萍, 陈海红, 沈仁富, 等. 二乙酰-脲分光光度法测定游泳池水中的尿素含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2012, 22(3): 644-644.
- Wang Y P, Chen H H, Sheng R F, et al. Determination of urea in swimming pool water by diacetylmonoxime Spectrophotometry[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2012, 22(3): 644.
- [12] 郑丽行, 樊小林, 刘刚, 等. 折光率测定尿素含量的方法研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, 38(12): 93-98.
- Zheng L X, Fan X L, Liu G, et al. Study on refractive index method for determination of urea concentration[J]. Journal of Northwest A&F University(Nat. Sci. Ed.), 2010, 38(12): 93-98.
- [13] 陈国忠, 钟建, 刘天洁, 等. 邻苯二甲醛法、OPA法、脲酶-Berthlot法测定游泳池水中尿素的研究[J]. 预防医学情报杂志, 2002, 18(3): 197-199.
- Chen G Z, Zhong J, Liu T J, et al. Study by Phthalic Aldehyde, OPA, Urease Berthlot to Detect Urea in Swimming Pool[J]. Journal of preventive medicine information, 2002, 18(3): 197-199.
- [14] 杨华梅. 反相高效液相色谱法测定游泳池水中尿素[J]. 理化检验-化学分册, 2013, 49(2): 168-173.
- Yang H M. RP-HPLC Determination of Urea in Water of Swimming-POOL[J]. PTCA (PART B: CHEM. ANAL.), 2013, 49(2): 168-173.

(编辑: 侯向辉)