

RP - HPLC 法定量测定枸橼酸离子含量

王敏力 杨鹏云 侯继锋

(中国药品生物制品检定所,北京 100050)

摘要 目的:建立定量测定含枸橼酸盐和蔗糖的血液制品或干热法病毒灭活中间制品中枸橼酸离子含量的高效液相分析方法,并与中国药典 2005 年版三部枸橼酸离子测定第二法进行比较。方法:采用 RP - C₁₈ 色谱柱以磷酸盐缓冲液作为流动相,以 5 mmol · L⁻¹ 枸橼酸离子溶液做回收率和精密度分析。选择 5 种共 20 个批次仅含枸橼酸盐不含有蔗糖的血液制品,按 2005 年版中国药典枸橼酸离子测定第二法平行分析,比较两者一致性。结果:RP - HPLC 法枸橼酸离子保留时间大约在 5 min,其 5 次进样保留时间 RSD% (n = 5) 为 0.0,峰面积 RSD% (n = 5) 为 0.1,实验所测枸橼酸离子标准回收率大于 99.0%,标准曲线线性相关系数 r 大于 0.999。RP - HPLC 法与 IEC - HPLC 法平行检测 20 个批次制品的枸橼酸离子含量,统计学结果显示 2 种方法相关系数 r 为 0.9994,两者无显著差异 (P > 0.05)。结论:RP - HPLC 法的准确性和精密度良好,与 2005 年版中国药典三部第二法结果一致并可规避其缺点,适用于含枸橼酸盐和蔗糖的血液制品及干热病毒灭活中间制品的枸橼酸离子含量分析,也可用于检测常规血液制品,可以作为 2005 年版中国药典枸橼酸离子测定的补充方法。

关键词: 枸橼酸离子; 血液制品; 反相高效液相色谱法; 离子交换高效液相色谱法; 干热病毒灭活

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2011)04 - 0788 - 04

RP - HPLC method for quantitative analysis of citration

WANG Min - li ,YANG Peng - yun HOU Ji - feng

(National institute for the control of pharmaceutical and biological products ,Beijing 100050 ,China)

Abstract Objective: To establish the quantitative determination method of sodium citrate by HPLC in citrate and sucrose containing blood products or dry - heat treated intermediate products. Comparison was also carried out between the developed method and ion exchange HPLC method published in ChP 2005. **Methods:** An HPLC method was developed to specifically determine sodium citrate on reversed - phase chromatography column with UV detection at 210 nm. The separations were performed at 40°C on a Waters Symmetry shield RP - C₁₈ column with a mobile phase of phosphoric acid solution as elution. In each experiment 5 mmol · L⁻¹ sodium citrate standard solution was detected with external standard method to mensurate recovery rate. Five kinds of blood products with a total of 20 batches derived from different manufactures were selected for sodium citrate determination. These products only contain sodium citrate but do not contain sucrose which makes it possible to use IEC - HPLC method issued in ChP 2005 and make it easier to do methodology comparison with RP - HPLC method. Samples were divided into two parts after pre - treatment to do comparison in the recovery rate, linear and consistency. **Results:** The results showed that the retention time of sodium citrate was in about 5 minutes. Sodium citrate standard solution was injected for 5 times to get recovery results which indicate that RSD (n = 5) was 0.0% (calculated by retention time) and 0.1% (calculated by peak area), respectively. The average recovery was over 99.0% and linear correlation r was over 0.999. Statistical data showed that the amount of sodium citrate in 20 batches of blood products determined by RP - HPLC method and IEC - HPLC method has no significant difference (P > 0.05) and the correlation coefficient r was 0.9994. These results demonstrated that RP - HPLC method and IEC - HPLC method are highly consistent in sodium citrate quantitative determination. **Conclusion:** The proposed RP - HPLC method is simple, accurate and. It can effectively avoid the shortcomings issued in ChP 2005 which can not detect total citrate in citrate and sugar containing blood products. The determination results of sodium citrate in blood products by RP - HPLC method were in

第一作者 Tel: (010) 67095547; E - mail: wmlmail@hotmail.com

good accordance with those from the IEC - HPLC method. High attention should be given to the developed RP - HPLC method and it can be widely applied as an effectively complementary way for sodium citrate determination for ChP 2005.

Key words: sodium citrate; blood product; RP - HPLC ; ion exchange HPLC ; dry - heat treatment

枸橼酸钠又称为柠檬酸三钠(sodium citrate),通常做为抗凝血剂和渗透压调节剂添加在凝血因子类、血浆类、重组人促红细胞生成素等多种血液制品及部分血液制品病毒灭活中间品当中。2005年版中国药典三部(以下简称05版药典三部)中规定要对上述制品中的枸橼酸离子进行定量检测,药典检验方法包括2种^[1],其中第二法高效液相色谱法采用离子交换(IEC - HPLC)原理测定枸橼酸离子,该法要求在较高柱温条件下进行,以期获得较好的分离度。但当某些血液制品同时添加枸橼酸盐和蔗糖且当血液制品的病毒灭活方法为干热法时,该法无法分离枸橼酸离子和蔗糖,原因是蔗糖经过干热病毒灭活过程或在有较高柱温的情况下会发生焦化,表现为非单一的色谱峰,与随后洗脱出来枸橼酸离子峰产生干扰无法测定。

05版药典第一法比色法可以检测上述制品的枸橼酸离子含量,但该方法操作步骤较为繁琐,并且需要醋酸酐做反应试剂,该试剂理化性质特殊,申领、审批极为严格,来源受限不方便广泛应用。因此,为了准确定量上述血液制品中的枸橼酸离子,本文参考有关文献^[2],完善了反相色谱柱盐洗脱法(RP - HPLC)定量测定枸橼酸,并同时按IEC - HPLC平行测定多种血液制品,验证两者测定结果的一致性。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(Waters 2690);紫外检测器(Waters 2487);示差折光检测器(Waters 474);Waters Millennium³²数据处理工作站。

枸橼酸钠对照品(北京化工厂,AR);蔗糖对照品(Sigma);异丙醇(Fisher,HPLC级);磷酸、磺基水杨酸、硫酸、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠均为国产分析纯试剂。

2 色谱条件

2.1 IEC - HPLC 阳离子交换柱(H^+) Phenomenex S/No: 245135 - 18(300 mm × 7.8 mm 8 μm);柱温 50℃;流动相 0.004 mol · L⁻¹ 硫酸;流速 0.8 mL · min⁻¹;示差折光检测器。系统适用性试验符合 05 版药典。

2.2 RP - HPLC 十八烷基硅烷键合硅胶填充柱

Waters Symmetry shield RP18(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);柱温 40℃;流动相 18.2 mmol · L⁻¹ 磷酸盐 0.1% 异丙醇缓冲液(pH 2.0 ~ 2.5);流速 1.0 mL · min⁻¹;检测器波长 210 nm。

系统适用性检测用样品:0.05% 二氢萘;流动相 乙腈 - 水(60:20);流速 1 mL · min⁻¹;进样体积 10 μL;检测波长 254 nm;运行时间 10 min。要求二氢萘峰拖尾因子 T 应为 0.95 ~ 1.40,RSD 要求应符合液相色谱仪国家计量检定规程。

3 溶液的配制及样品处理

3.1 25 mmol · L⁻¹ 枸橼酸钠标准储备液 准确称取经减压干燥至恒重的枸橼酸钠($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$,分子量:294.1)0.735g,用超纯水溶解定容至 100 mL。使用时根据制品情况以 1.5% 5 - 磺基水杨酸(取 1.5 g 5 - 磺基水杨酸,用超纯水溶解并定容至 100 mL)适当稀释制成工作浓度备用,并以稀释后的 5 mmol · L⁻¹ 的枸橼酸钠作为标准溶液测定回收率。

3.2 1.0% 蔗糖标准溶液 准确称取经减压干燥至恒重的蔗糖 1.0g,用超纯水溶解并定容至 100 mL,混匀备用。

3.3 供试品处理 根据供试品的蛋白浓度,适量加入 1.5% 磺基水杨酸沉淀 2 h 去除蛋白,3000 r · min⁻¹离心 15 min 取上清液,分成 2 份分别按 IEC - HPLC 法及 RP - HPLC 法备检。

上述标准溶液、供试品溶液离心 15 min(3000 r · min⁻¹)上清以及流动相均需经 0.45 μm 水溶性膜过滤后备用。

4 方法与结果

4.1 RP - HPLC 法验证

4.1.1 可行性分析 在很多血液制品如人纤维蛋白原中通常含有蔗糖和枸橼酸盐,干热病毒灭活的高温过程有时会使蔗糖焦化(见图 1)造成 IEC - HPLC 法无法测定枸橼酸离子。在创建 RP - HPLC 法测定枸橼酸离子实验中,首先将 1.0% 的蔗糖标准溶液 20 μL 注入色谱仪,结果显示在“2.2”项下色谱条件蔗糖无吸收;再将 1.5% 磺基水杨酸溶液 20 μL 注入色谱仪,结果磺基水杨酸的保留时间约为 8.6 min,峰形较宽,在色谱柱上有较强的保留

(见图2),但可以洗脱完全。为验证其是否会对枸橼酸离子色谱峰产生影响,再将 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸离子标准溶液与 1.5% 磺基水杨酸 $1:1$ 混合,制成 $12.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸溶液,精密量取混合液 $30\text{ }\mu\text{L}$ 注入色谱仪,结果磺基水杨酸与枸橼酸离子色谱峰分离度大于 6.0 (见图3),证实实验中通常使用的蛋白沉淀剂磺基水杨酸也不会对枸橼酸离子产生干扰。因此,RP-HPLC色谱方法检测枸橼酸离子具有可行性。

4.1.2 线性关系考察 精密量取“3.1”项下的 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸标准储备液,以 1.5% 5-磺基水杨酸稀释成浓度为 $12.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的标准溶液,再以超纯水依次进行2倍的梯度稀释为 $12.5, 6.25, 3.125, 1.562, 0.781, 0.390, 0.195, 0.0976, 0.4488, 0.0244\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 系列溶液,分别进样 $30\text{ }\mu\text{L}$,以进样浓度($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)为横坐标,峰面积为纵坐标,其线性回归方程为:

$$Y = 17.07 \times 10^3 + 3.732 \times 10^5 X \quad r = 0.9998$$

线性范围为 $0.0244 \sim 12.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

4.1.3 精密度 连续进样5针 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的枸橼酸标准溶液保留时间RSD为 0.0% ,峰面积RSD为 0.1% ,精密度良好。

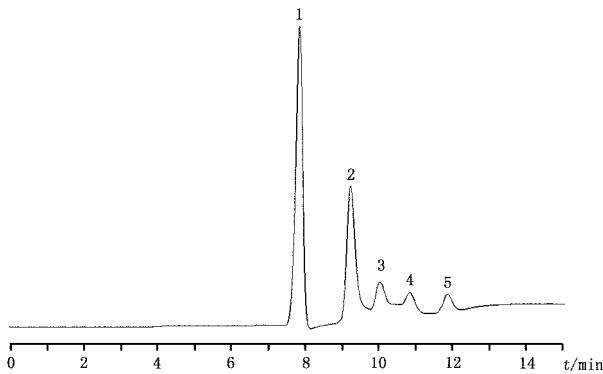


图1 蔗糖及枸橼酸供试品色谱图(IEC-HPLC)
Fig 1 Chromatogram of sodium citrate in sucrose containing product (IEC-HPLC)

1. 5-磺基水杨酸(5-sulfosalicylic acid) 2. 蔗糖主峰(main peak of sucrose) 3. 枸橼酸与碳化蔗糖(sodium citrate and carbonized sucrose) 4. 碳化蔗糖(carbonized sucrose) 5. 碳化蔗糖(carbonized sucrose)

4.1.4 回收率及重复性分析 本实验以磺基水杨酸稀释的 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的枸橼酸离子标准溶液来测定回收率,按照“4.1.2”项下的方法进行分析,结果枸橼酸离子回收率平均值为 100.1% ($n=5$),RSD为 0.6% ($n=5$),回收率及重复性良好。具体结果见表1。

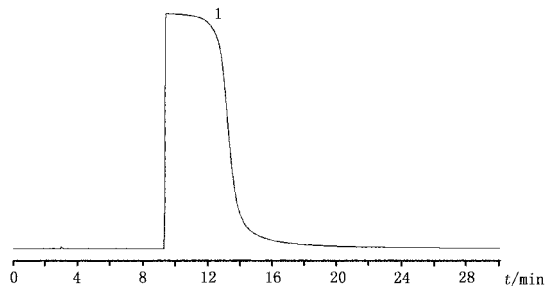


图2 1.5% 5-磺基水杨酸色谱图(RP-HPLC)
Fig 2 Chromatogram of 1.5% 5-sulfosalicylic acid dihydrate (RP-HPLC)
1. 5-磺基水杨酸(5-sulfosalicylic acid dihydrate)

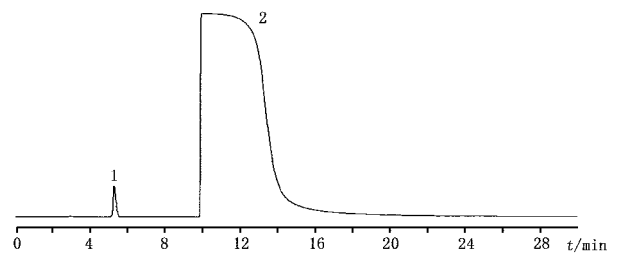


图3 $12.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 枸橼酸离子色谱图(5-磺基水杨酸与枸橼酸混合样)(RP-HPLC)
Fig 3 Chromatogram of $12.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ sodium citrate (mixture of 1.5% 5-sulfosalicylic acid dihydrate and sodium citrate solution) (RP-HPLC)
1. 枸橼酸(sodium citrate) 2. 5-磺基水杨酸(5-sulfosalicylic acid dihydrate)

表1 RP-HPLC法测定枸橼酸离子回收率结果($n=5$)
Tab 1 Recovery of sodium citrate by RP-HPLC

批号 (batch code)	实测 (found) / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	回收率 (recovery) /%	平均回收 率(average recovery) /%
20070310	4.995	99.9	100.1
20070405	5.053	101.1	
20070414	4.989	99.8	
20070526	5.010	100.2	
20070614	4.969	99.4	

4.2 RP-HPLC与IEC-HPLC方法的比较

将来自国内11个厂商、5个不同种类共20个批次的血液制品(包括人纤维蛋白原、重组人促红细胞生成素、人凝血因子FVIII、人凝血酶原复合物、冰冻SD处理人血浆)作为分析对象,这些制品中仅含有枸橼酸盐,无蔗糖干扰问题,便于用IEC-HPLC和RP-HPLC方法平行分析。检验结果见表2。

表 2 IEC - HPLC 法与 RP - HPLC 法测定枸橼酸离子结果比较($n = 20$)
Tab 2 Linearity and recovery of sodium citrate by IEC - HPLC and RP - HPLC

厂家代码 (manufacturer code)	品名 (sample name)	批号 (batch code)	IEC - HPLC		RP - HPLC	
			实测 (found) /mmol · L ⁻¹	实测 (found) /mmol · L ⁻¹	线性 (linearity) r^2	回收率 (recovery) /%
ASHLS	人纤维蛋白原(human fibrinogen)	20060622A2	35	36	0.9999	99.96
ASHLS	人纤维蛋白原(human fibrinogen)	20060721A2	37	37	0.9999	99.96
ASHLS	人纤维蛋白原(human fibrinogen)	20060722A2	37	37	0.9999	99.96
BSYSS	rhEPO(recombinant Human Erythropoietin Injection)	20070201	19	20	0.9999	99.96
CLSZ	人凝血因子Ⅷ(Human coagulation Fator)	20070101	8	8	1.0000	99.98
DSHXX	人凝血酶原复合物(human Prothrombin Complex)	20061108	5	5	1.0000	100.01
ASHLS	人凝血因子Ⅷ(Human coagulation Fator)	200703H011	9	9	1.0000	100.31
ASHLS	人凝血因子Ⅷ(Human coagulation Fator)	200701H006	9	9	1.0000	100.31
ASHLS	人凝血酶原复合物(human Prothrombin Complex)	200603P015	9	9	1.0000	100.31
EHLWS	人凝血酶原复合物(human Prothrombin Complex)	200612054	10	10	1.0000	100.31
FSDKX	rhEPO(recombinant Human Erythropoietin Injection)	20061033	19	19	1.0000	99.76
FSDKX	rhEPO(recombinant Human Erythropoietin Injection)	20070410	20	20	1.0000	99.76
CLSZ	人凝血因子Ⅷ(Human coagulation Fator)	20060601S - 1	8	8	1.0000	99.89
CLSZ	人凝血因子Ⅷ(Human coagulation Fator)	20060702S - 1	8	8	1.0000	99.89
CLSZ	人凝血因子Ⅷ(Human coagulation Fator)	20060703S - 1	8	8	1.0000	99.89
GSSS	人凝血因子Ⅷ(Human coagulation Fator)	200705001	5	5	1.0000	99.89
HGYQF	人凝血酶原复合物(human Prothrombin Complex)	20070507	17	17	1.0000	99.94
HGYQF	人凝血酶原复合物(human Prothrombin Complex)	20070508	17	17	1.0000	99.94
IWHRD	冰冻 SD 处理血浆(Frozen S/D treated plasma)	20070638	15	15	1.0000	99.35
IWHRD	冰冻 SD 处理血浆(Frozen S/D treated plasma)	20070639	14	15	1.0000	99.35

4.3 结果与结论

统计学 t 检验对上述结果分析表明 IEC - HPLC 法与 RP - HPLC 法测定枸橼酸离子结果无显著差异($P > 0.05$) $r = 0.99942$ 。RP - HPLC 法与 IEC - HPLC 法检测结果高度一致。

因此,RP - HPLC 法可以用于检测普通血液制品中的枸橼酸离子含量,更能用于检测含有蔗糖和枸橼酸的干热病毒灭活中间品及成品,不但能很好地解决 05 版药典第二法无法检测上述特殊工艺生产的血液制品问题,也能避免 05 版药典第一法试剂来源受限、审批严格的问题,因此具有很高的应用价值和实际意义。

综上所述,本文中所建立和完善的枸橼酸离子 RP - HPLC 检测法,易于操作,快速准确,为目前枸橼酸离子的快速检验提供了方法学依据。

参考文献

- 1 DONG Xiao - dong(董晓东),SUN Jing(孙静),HE Ying(何颖). Determination of total content of citric acid and sodium citrate in e-rythrocyte preserve fluid by high performance liquid chromatogr(高效液相色谱法测定红细胞保存液中枸橼酸及其钠盐总量). *Chin J Chromatography*(色谱) 2003 22(1):46
- 2 ChP(中国药典). 2005. Vol III(三部). Appendix(附录) VII H 40 (本文于 2010 年 3 月 11 日收到)