

# HPLC 法测定氨基己酸注射液的含量及有关物质

张静, 丁怡 (广州市药品检验所, 广东 广州 510160)

**摘要:** 目的 建立简便、高效的氨基己酸注射液含量及其有关物质己内酰胺测定方法。方法 采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲溶液(磷酸调节 pH 至 2.0), 流动相 B 为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钾缓冲溶液(磷酸调节 pH 至 2.0)-乙腈(70:30, V/V) 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温室温, 检测波长 210 nm。结果 氨基己酸与有关物质峰之间以及各杂质峰之间分离度良好。氨基己酸和己内酰胺质量浓度分别在 11.14~334.1 μg·mL<sup>-1</sup>、1.060~31.80 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内线性良好, 平均回收率( $n=9$ ) 分别为 99.5%、101.8%, 己内酰胺的检测限( $S/n=3$ ) 及定量限( $S/n=10$ ) 分别为 0.01 μg·mL<sup>-1</sup> 及 0.03 μg·mL<sup>-1</sup>。结论 本法可用于氨基己酸注射液的含量测定及有关物质检测。

**关键词:** 氨基己酸; 有关物质; 己内酰胺; 含量; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-229X(2019)02-0101-04

Doi: 10.12048/j.issn.1674-229X.2019.02.008

## Determination of the Content and Related Substances of Aminocaproic Acid Injection by HPLC

ZHANG Jing, DING Yi (Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou, Guangdong 510160, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for the determination of the content and related substances of aminocaproic acid injection. **METHODS** An Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted in the study with mobile phase consisting of solvent A 0.05 mol·L<sup>-1</sup> dihydrogen phosphate (pH adjusted to 2.0 by phosphoric acid) and solvent B 0.05 mol·L<sup>-1</sup> dihydrogen phosphate (pH adjusted to 2.0 by phosphoric acid)-acetonitrile (70:30, V/V). The determination was realized on the HPLC with gradient elution at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and column temperature at room temperature, and the detection wavelength was 210 nm. **RESULTS** The related substances were completely separated from aminocaproic acid, and an excellent separation was achieved for the related substances. The calibration curves for aminocaproic acid, caprolactam related good linearities in the range of 11.14-334.1 μg·mL<sup>-1</sup>, 1.060-31.80 μg·mL<sup>-1</sup>, respectively. The average recoveries ( $n=9$ ) of the above compounds were 99.5%, 101.8%, respectively. The LOD ( $S/n=3$ ) and LOQ ( $S/n=10$ ) of caprolactam were 0.01 μg·mL<sup>-1</sup> and 0.03 μg·mL<sup>-1</sup>, respectively. **CONCLUSION** The established method can be applied to determination of aminocaproic acid injection.

**KEY WORDS:** aminocaproic acid; related substances; caprolactam; content; HPLC

氨基己酸能阻碍纤维蛋白溶解酶的形成,因而抑制纤维蛋白的溶解而达到止血目的,临床用于预防及治疗纤维蛋白溶解亢进引起的各种出血<sup>[1]</sup>。氨基己酸原料药及其注射液质量标准收载于中国药典<sup>[2]</sup>, EP<sup>[3]</sup>与 USP<sup>[4]</sup>亦有收载原料药。文献<sup>[5]</sup>研究表明氨基己酸主要杂质为己内酰胺和氨基己酸二聚体,其中己内酰胺是一种致痉挛性和细胞原质毒物<sup>[6-7]</sup>。氨基己酸注射液在中国药典 2015 年版中采用 HPLC 外标法测定有关物质己内酰胺,滴定法定量分析氨基己酸的含量<sup>[2]</sup>。滴定法测定含量操作繁琐且专属性差, HPLC 测定己内酰胺所用流动相中含有离子对试剂对色谱柱有较大损伤;有关物质己内酰胺的检查及含量的测定分别采用不同的方法,

造成检测周期较长。文献报道,氨基己酸含量测定有滴定法<sup>[2]</sup>、高效液相色谱法<sup>[8]</sup>,己内酰胺含量测定的方法有高效液相色谱法<sup>[9-10]</sup>、高效液相色谱-质谱法<sup>[7]</sup>、气相色谱法<sup>[11-14]</sup>和气相色谱-串联质谱法<sup>[15]</sup>,但未见有同时测定二者的文献报道。本文拟建立一种 HPLC 法同时测定氨基己酸的含量及其有关物质己内酰胺,旨在简化试验操作,提高检验效率。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

安捷伦 1260 高效液相色谱仪(二极管阵列检测器、四元高压梯度泵、真空脱气机、柱温箱、自动进样器;色谱工作站);METTLER TOLEDO pH 计(Seven

作者简介:张静,主管药师,研究方向:药品、化妆品、保健食品检测, Tel: 13711531066, E-mail: zhangjing332332@126.com

今日药学 2019 年 2 月第 29 卷第 2 期

Pharmacy Today 2019 Feb, Vol.29 No.2 • 101 •

Easy); SARTORIUS 电子分析天平( CPA225D)。

## 1.2 试药

对照品氨基己酸(批号: 100105-201103, 含量 99.4%)、己内酰胺(批号: 100235-199701, 含量 100%) 中国食品药品检定研究院; 氨基己酸注射液(规格 10 mL:2 g, 批号: 1510412、1631213、1631214、1631215) 上海信谊金朱药业有限公司; 乙腈(色谱纯 批号: JA043030) 默克股份有限公司; 水为超纯水 磷酸二氢钾(分析纯 批号: 20160803-1) 广州化学试剂厂; 磷酸(色谱纯 批号: Q216K025) CNW Technologies。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 供试品溶液 I** 精密量取氨基己酸注射液 1 mL 于 20 mL 量瓶中, 用水稀释并定容至刻度, 摇匀, 即得氨基己酸浓度约为  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的供试品溶液 I, 用于有关物质的测定。

**2.1.2 供试品溶液 II** 精密量取供试品溶液 I 1 mL 于 50 mL 量瓶中, 用水稀释并定容至刻度, 摇匀, 即得氨基己酸浓度约为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的供试品溶液 II, 用于含量测定。

**2.1.3 对照品储备液** 分别称取氨基己酸、己内酰胺对照品适量, 精密称定, 分别加水稀释制成质量浓度分别为  $1114 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  及  $159 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的溶液, 摇匀, 即得。

**2.1.4 混合对照品溶液** 分别称取氨基己酸、己内酰胺对照品适量, 精密称定, 加水稀释制成质量浓度分别为  $210.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $2.107 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  的混合对照品溶液, 摇匀, 即得。

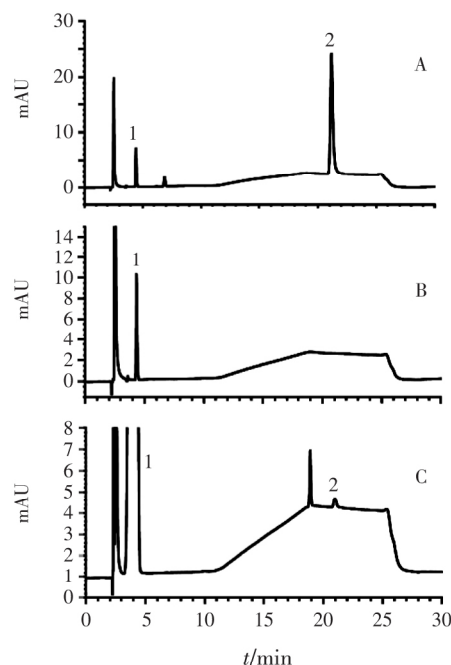
### 2.2 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub> 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) 流动相 A 为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾缓冲溶液(磷酸调节 pH 至 2.0), 流动相 B 为  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸二氢钾缓冲溶液(磷酸调节 pH 至 2.0)-乙腈(70:30, V/V), 流速  $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温为室温, 检测波长 210 nm, 进样量 20  $\mu\text{L}$ 。梯度洗脱, 条件如下: 0~7 min, B=10%; 7~15 min, B 升至 30%; 15~22 min, B=30%; 22~23 min, B 降至 10%; 23~30 min, B=10%。

### 2.3 系统适用性试验

精密量取“2.1.4”项下混合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件, 氨基己酸峰及其有关物质己内

酰胺与相邻峰分离度大于 1.5, 理论塔板数按氨基己酸计大于 3 000, 结果见图 1。



注: A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液 II; C. 供试品溶液 I; 1. 氨基己酸; 2. 己内酰胺。

图 1 各溶液的 HPLC 色谱图

### 2.4 专属性试验

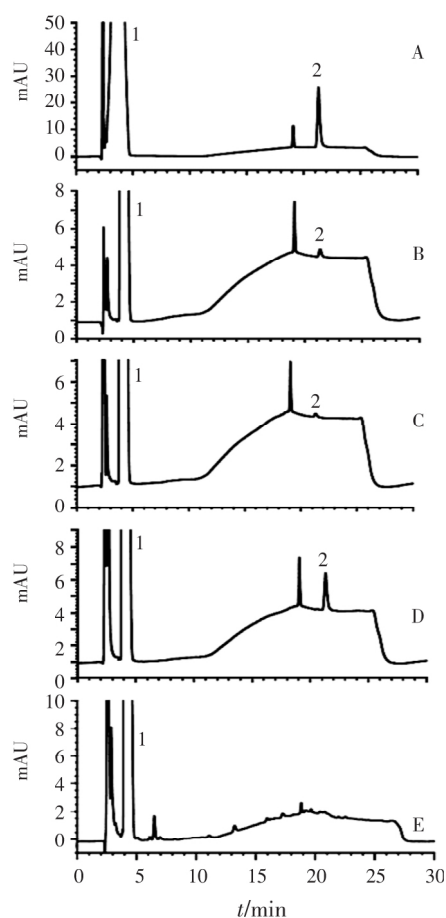
分别取氨基己酸注射液 1 mL, 置 20 mL 量瓶中, 进行酸破坏( $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  盐酸溶液 2 mL, 90 °C 破坏 2 h)、碱破坏( $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  氢氧化钠溶液 2 mL, 90 °C 破坏 2 h)、光照破坏(254 nm 紫外灯下照射 3 h)、氧化破坏(3% 过氧化氢溶液 2 mL, 90 °C 破坏 0.5 h)、高温破坏(105 °C 烘箱中放置过夜), 加酸或碱调节至中性, 加水稀释至刻度。取上述 5 种破坏溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定, 结果见图 2。各降解产物峰与氨基己酸、己内酰胺分离良好, 表明该色谱条件适用于氨基己酸含量及有关物质的测定。

### 2.5 检测限及定量限

将“2.1.3”项下对照品储备液用水逐步稀释成不同浓度, 注入液相色谱仪, 按信噪比  $S/n=3$  测定己内酰胺检测限, 按信噪比  $S/n=10$  测定定量限, 结果分别为  $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  和  $0.03 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.6 线性关系考察

分别精密量取“2.1.3”项下对照品储备液用水逐步稀释成不同线性浓度, 分别注入液相色谱仪, 以进样浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 计算回归方程, 结果见表 1。结果表明氨基己酸及己内酰胺在其各自浓度范围内线性关系良好。



注: A.高温破坏; B.光照破坏; C.酸破坏; D.碱破坏; E.氧化破坏; 1.氨基乙酸; 2.己内酰胺。

图2 专属性试验的 HPLC 色谱图

表1 2种成分的线性关系考察结果

成分	回归方程	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	<i>r</i>
氨基乙酸	$Y=0.378\ 8X+0.170\ 0$	11.14~334.1	1.000
己内酰胺	$Y=32.85X+1.291$	1.060~31.80	0.999

## 2.7 精密度试验

**2.7.1 进样精密度** 精密量取“2.3”项下混合标准溶液连续进样6次,结果氨基乙酸、己内酰胺峰面积的RSD( $n=6$ )依次为0.4%、0.4%。结果表明仪器的精密度良好。

**2.7.2 重复性试验** 分别精密量取氨基乙酸注射液(批号1631213)按“2.1.1”、“2.1.2”配制,按“2.2”项下色谱条件进行有关物质及含量测定,平行测定6次。计算氨基乙酸峰含量RSD( $n=6$ )为0.7%,有关物质己内酰胺RSD( $n=6$ )为1.9%。结果表明该分析方法重复性良好。

## 2.8 回收试验

**2.8.1 氨基乙酸加样回收试验** 取供试品溶液Ⅱ

9份,分别加入相当于供试品溶液Ⅱ80%、100%、120%浓度水平的氨基乙酸对照品溶液,低、中、高浓度各3份,按“2.2”项下色谱条件进行含量测定,平均回收率为99.5%,RSD为0.5%( $n=9$ ),见表2。

**2.8.2 己内酰胺加样回收试验** 供试品溶液Ⅰ9份,分别加入相当于己内酰胺(限度0.15%)限度80%、100%、120%浓度水平的对照品溶液,低、中、高浓度各3份,按“2.2”项下色谱条件进行有关物质测定,己内酰胺平均回收率为101.8%,RSD为1.3%( $n=9$ ),见表2。

表2 氨基乙酸及己内酰胺加样回收试验结果( $n=9$ )

溶液	样品量 $/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	加入量 $/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	测得量 $/\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
氨基乙酸	0.197 8	0.170 2	0.367 6	99.7	99.5	0.5
	0.197 8	0.170 2	0.367 7	99.8		
	0.197 8	0.170 2	0.366 9	99.3		
	0.197 8	0.212 8	0.407 9	98.7		
	0.197 8	0.212 8	0.409 9	99.7		
	0.197 8	0.212 8	0.411 3	100.3		
	0.197 8	0.255 4	0.450 4	98.9		
	0.197 8	0.255 4	0.451 5	99.3		
	0.197 8	0.255 4	0.452 2	99.6		
己内酰胺	0.108 4	12.64	13.00	102.0	101.8	1.3
	0.108 4	12.64	12.82	100.5		
	0.108 4	12.64	12.61	98.9		
	0.108 4	15.80	16.30	102.4		
	0.108 4	15.80	16.30	102.5		
	0.108 4	15.80	16.28	102.4		
	0.108 4	18.96	19.59	102.8		
	0.108 4	18.96	19.55	102.5		
	0.108 4	18.96	19.53	102.4		

## 2.9 稳定性试验

精密量取供试品溶液Ⅰ、供试品溶液Ⅱ,室温放置,每隔4 h在不同时间点分别进样,考察供试品溶液的稳定性。结果在12 h内,供试品溶液Ⅰ未见有杂质增加,供试品溶液Ⅱ峰面积的RSD为0.9%,表明供试品溶液Ⅰ、Ⅱ均在室温放置12 h稳定。

## 2.10 耐用性试验

取“2.1.4”项下溶液在流速0.8~1.2  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,柱温20℃~30℃,流动相pH 2.0~3.0,波长208~212 nm等范围波动下进样,分离度均可符合要求。

另选择SHISEIDO UG120  $\text{C}_{18}$ 色谱柱,JADE-PAK ODS-AQ色谱柱(250 mm×4.6 mm 5  $\mu\text{m}$ )按“2.2”项下色谱条件进样,分离度均符合要求。

### 3 含量测定及其有关物质测定

取4批氨基己酸注射液,分别按“2.1.1”、“2.1.2”项下方法制备供试品溶液I、II,按“2.2”项下色谱条件进样分析,以外标法计算氨基己酸及有关物质己内酰胺含量,结果见表2。

取上述4批氨基己酸注射液,按中国药典2015年版方法测定有关物质及含量,结果见表2。

结果表明,该HPLC方法测定氨基己酸及其有关物质的结果与中国药典2015年版方法测定,结果基本一致。

表3 4批氨基己酸注射液的含量及有关物质测定结果

批号	本方法		中国药典法	
	含量/%	己内酰胺/%	含量/%	己内酰胺/%
1510412	98.5	0.001 9	98.3	0.001 9
1631213	98.9	0.001 1	98.6	0.001 2
1631214	99.2	0.000 8	98.5	0.000 8
1631215	100.1	0.000 9	99.0	0.000 9

### 4 讨论

#### 4.1 流动相的选择

中国药典2015年版<sup>[2]</sup>和USP<sup>[4]</sup>均采用己烷磺酸钠溶液-甲醇作为流动相检查己内酰胺,己烷磺酸钠为离子对试剂,对普通C<sub>18</sub>柱伤害比较大,且试剂昂贵。由于HPLC方法的检测波长设为210 nm,考虑到甲醇的末端吸收为205 nm会降低检测灵敏度,因此采用末端吸收为190 nm的乙腈作为流动相。故本文尝试用0.05 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾缓冲溶液(磷酸调节pH至2.0)-乙腈作为流动相,并最终确定洗脱条件,可以获得满意的保留时间、峰形、分离度及灵敏度。

#### 4.2 溶剂的选择

分别考察采用流动相和水作溶剂对样品稀释后测量,显示二者结果无差异。考虑到水作溶剂较有机试剂更为环保、经济和方便,因此选用水作溶剂稀释样品。

本研究建立的HPLC法优化了色谱条件,同时

检查氨基己酸含量及有关物质己内酰胺,且避免使用对色谱系统造成损伤的离子对试剂;方法学考察结果表明该法分离度、线性、检出限和灵敏度、重复性、回收率等均符合要求,且氨基己酸含量和己内酰胺含量的测试结果与中国药典2015年版方法测定结果无差异,说明本方法可以满足同时检查氨基己酸含量及有关物质。

#### 参考文献

- [1] 陈吉生. 新编临床药理学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 548.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 2部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1156-1157.
- [3] 欧洲药典委员会. 欧洲药典[M]. 第8版. 欧洲药品质量管理局, 2013: 1540.
- [4] 美国药典委员会. 美国药典[M]. USP 35-NF 30, 2012: 2167.
- [5] 江文明, 宋冬梅, 任美婷, 等. 氨基己酸注射液中有物质检查方法的研究[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1258-1262.
- [6] 刘君动, 叶正良, 李德坤, 等. 丹参多酚酸中己内酰胺和低聚物的残留测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 62-65.
- [7] 江阳, 李彩云, 曾红燕, 等. 直接进样-高效液相色谱-质谱法同时测定生活饮用水中的4种痕量胺类物质[J]. 分析试验室, 2017, 36(9): 1088-1091.
- [8] 庄文君, 毛向阳. 氨基己酸注射液中氨基己酸的含量测定[J]. 抗感染药学, 2016, 13(3): 506-509.
- [9] 陈鸿楠, 邓颖, 郭秀娟, 等. HPLC法测定丹酚酸B中己内酰胺残留[J]. 北方药学, 2016, 13(2): 18-19.
- [10] 刘君动, 叶正良, 李德坤, 等. 丹参多酚酸中己内酰胺和低聚物的残留测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 62-65.
- [11] 陈章捷, 张艳燕, 钟坚海, 等. 气相色谱法同时测定食品模拟物中己内酰胺和十二内酰胺[J]. 分析试验室, 2015, 34(12): 1447-1450.
- [12] 鄢艳, 谭安菊, 陈思颖, 等. 注射用复方荭草冻干粉针剂中己内酰胺残留量检测[J]. 贵阳医学院学报, 2011, 36(5): 446-447.
- [13] 刘俊, 李锋格, 田延河, 等. 毛细管气相色谱法测定食品包装材料中己内酰胺残留量[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1): 65-66.
- [14] 杨先炯, 王永林, 王爱民, 等. 气相色谱法测定聚酰胺树脂中己内酰胺残留量[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(4): 877-878.
- [15] 马明, 吴晓红, 周宇艳, 等. 气相色谱-串联质谱法测定尼龙6树脂及其成型品中己内酰胺残留量[J]. 理化检验(化学分册), 2013, 49(10): 1176-1178.

(收稿日期: 2018-06-22; 在线出版日期: 2019-01-14)