

# 高效液相色谱法测定尿素中缩二脲和缩三脲的含量

钱保勇, 吴珺, 赵慧\* (泰州市药品检验院, 泰州 225300)

**摘要** 目的: 建立了HPLC法测定尿素中缩二脲和缩三脲的含量。方法: 采用Waters Atlantis T3色谱柱(4.6 mm×250 mm, 3.5 μm), 以超纯水为流动相, 流速为0.9 mL·min<sup>-1</sup>, 测定波长为195 nm。结果: 尿素、缩二脲和缩三脲之间的分离度均大于1.5, 缩二脲和缩三脲在0.2~10 μg·mL<sup>-1</sup>范围内线性关系良好( $r=1.000$ ), 检测限和定量限分别为0.062 μg·mL<sup>-1</sup>和0.206 μg·mL<sup>-1</sup>。缩二脲和缩三脲的平均回收率分别为100.2%和102.2%, RSD分别为1.2%和0.9% ( $n=9$ )。结论: 本方法准确、可靠、灵敏, 可用于尿素中缩二脲和缩三脲的测定, 作为2019年国家药典委员会标准提高项目, 弥补了目前药典标准中尿素有关物质的研究空白。

**关键词:** 尿素; 缩二脲; 缩三脲; 高效液相色谱法; 药典

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)05-0541-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.05.008

## Determination of Biuret and Triuret in Urea by HPLC

Qian Baoyong, Wu Jun, Zhao Hui\* (Taizhou Insitute for Drug Control, Taizhou 225300, China)

**Abstract Objective:** To establish an HPLC method for the determination of biuret and triuret in urea. **Methods:** Separation was performed by using a Waters Atlantis T3 column (4.6 mm×250 mm, 3.5 μm). The mobile phase was ultra-pure water at flow rate of 0.9 mL·min<sup>-1</sup>, and the detection wave length was 195 nm. **Results:** The resolutions among urea, biuret and triuret were more than 1.5. The linear relationship of biuret and triuret was good at a range of 0.2-10 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r=1.000$ ). The limits of detection (LODs) and limits of quantificaion (LOQs) were 0.062 μg·mL<sup>-1</sup> and 0.206 μg·mL<sup>-1</sup>. The average recovery of biuret and triuret were 100.2% and 102.2% with the RSD of 1.2% and 0.9% ( $n=9$ ). **Conclusion:** The method is accurate, reliable and sensitive, and could be used for the determination of biuret and triuret in urea. As the standard improvement project of Chinese Pharmacopoeia Commissoonin 2019, it makes up the research gap of urea-related substances in the current pharmacopoeia.

**Keywords:** urea; biuret; triuret; HPLC; pharmacopoeia

基金项目: 2019年国家药典委员会标准提高项目(编号 2019H040)

作者简介: 钱保勇 Tel: (0523) 86200632; E-mail: 114778266@qq.com

通信作者: 赵慧 E-mail: yaoxuezh@yeah.net.com

尿素又称脲或碳酰胺,临床上可用于脱水药和利尿药,在药物制剂中主要用作透皮促进剂和助溶剂,以增加一些药物在水中的溶解度,可用于注射剂、口服制剂和外用制剂等<sup>[1]</sup>。药用尿素通常是对工业尿素精制提纯而获取,杂质主要来源于工业尿素。工业上尿素的常见生产方式,是用液氮和二氧化碳为原料,在高温高压条件下直接合成尿素。尿素对热不稳定,在合成过程中温度达到150~160℃易发生聚合反应,生成缩二脲和缩三脲等副产物<sup>[2-3]</sup>,所以这两者的含量是评价尿素质量的一项重要指标。采用不同等级的工业尿素,以及不同的精制工艺,会导致药用尿素的质量差异。2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)未控制尿素的有关物质检查,美国药典和欧洲药典都设定了缩二脲的限度检查项<sup>[4-6]</sup>。本研究建立的HPLC法同时测定尿素中缩二脲和缩三脲的含量,可为增强尿素的质量控制提供参考。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Waters 2695高效液相色谱仪, Waters 2996二极管阵列检测器(美国Waters公司); Mettler XSE205DU电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司)。

### 1.2 试剂

尿素对照品(USP,纯度99.6%,批号R073L0);缩二脲对照品(USP,纯度100.0%,批号R085X0);缩三脲对照品(USP,纯度100.0%,批号F053T0)。

药用尿素(产地:安徽合肥,批号:

20010201、20010302、20010303;产地:江苏张家港,批号:190514、190515、1901516;产地:安徽阜阳,批号:191001、191002、191003)。

水为超纯水。

## 2 方法

### 2.1 溶液的制备

#### 2.1.1 系统适用性溶液

取尿素对照品、缩二脲对照品和缩三脲对照品各适量,加水溶解并稀释制成每1 mL中约含尿素2 mg、缩二脲和缩三脲各2 μg的混合溶液,作为系统适用性溶液。

#### 2.1.2 系列对照品溶液

精密称取缩二脲对照品、缩三脲对照品各约25 mg,置500 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。量取对照品储备液适量,加水稀释成每1 mL含缩二脲和缩三脲0.2、0.5、1、2、5、10 μg溶液作为系列对照品溶液。

#### 2.1.3 供试品溶液

精密称取供试样品约0.1 g,置50 mL量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

### 2.2 色谱条件和系统适用性试验

采用Waters Atlantis T3色谱柱(4.6 mm×250 mm, 3.5 μm),流动相为水,流速0.9 mL·min<sup>-1</sup>,柱温30℃,检测波长195 nm,进样量10 μL。在上述色谱条件下,分别精密量取系统适用性溶液和空白溶剂各10 μL,注入液相色谱仪进行测定,尿素和缩二脲、缩二脲和缩三脲之间的分离度分别为12、32,空白溶剂峰不干扰3个主峰的检测,相关色谱图见图1。

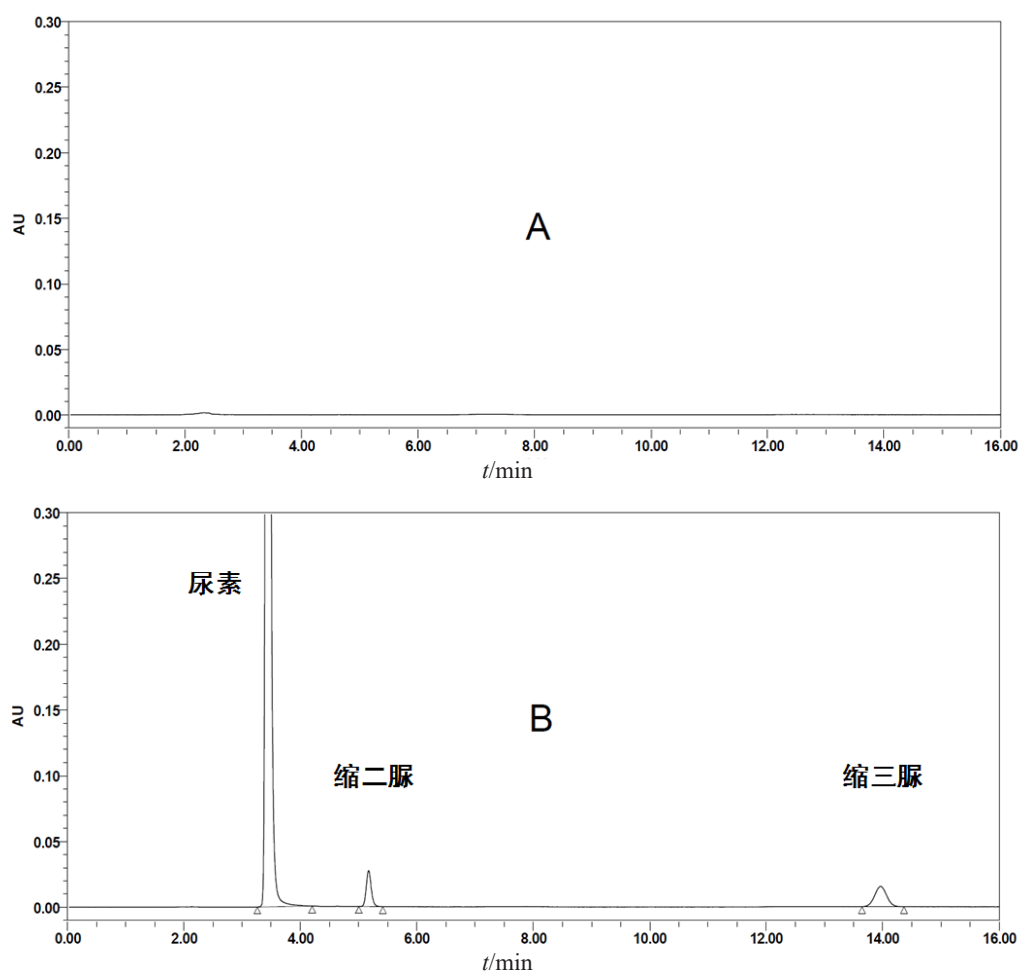


图1 空白(A)及系统适用性(B)色谱图

## 2.3 方法学验证

### 2.3.1 线性关系考察

精密量取质量浓度为0.2、0.5、1、2、5、10  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液各10  $\mu\text{L}$ ，按“2.2”项下色谱条件进样测定，以质量浓度为横坐标(X)，峰面积为纵坐标(Y)，绘制标准曲线。缩二脲回归方程为 $Y=45854X+445$  ( $r=1.000$ ,  $n=6$ )，缩三脲回归方程为 $Y=99056X-1742$  ( $r=1.000$ ,  $n=6$ )，缩二脲和缩三脲的线性范围分别为0.2046~10.23  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.2041~10.20  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，表明线性关系良好。

### 2.3.2 重复性试验

取同批供试品(厂家:安徽阜阳;批号:191001)共6份,精密称定,按“2.1.3”项下方法制成供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件测定,

结果缩二脲含量的RSD为2.1% ( $n=6$ ), 缩三脲含量的RSD为1.8% ( $n=6$ )。

### 2.3.3 稳定性试验

取同一供试品溶液(厂家:安徽阜阳;批号:191001), 分别于0、3、6、9、12、24 h进行测定, 缩二脲和缩三脲峰面积的RSD分别为1.3%和0.72%, 供试品溶液在24 h内稳定。

### 2.3.4 回收率试验

精密称取供试品(厂家:安徽阜阳;批号:191001;缩二脲含量:0.087%;缩三脲含量:0.045%)约100 mg, 置50 mL量瓶, 共9份。分别精密称取等量的缩二脲和缩三脲对照品20 mg、25 mg和30 mg, 分别置3个500 mL量瓶, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液(1)、(2)、(3)。精密量取对照品储备液(1)、

(2)、(3)各2 mL,分别置上述50 mL量瓶,“2.2”项下色谱条件测定,计算回收率,结果见每个浓度3份,加水溶解并稀释至刻度,摇匀。按表1。

表1 缩二脲和缩三脲的回收率( $n=9$ )

化合物	称样量/mg	含量/ $\mu\text{g}$	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	$\bar{x}$ /%	RSD/%
缩二脲	104.6	91.00	81.56	173.1	100.7	100.2	1.2
	100.5	87.44	81.56	169.6	100.7		
	100.8	87.70	81.56	168.9	99.56		
	102.9	89.52	102.2	190.9	99.20		
	101.8	88.57	102.2	191.2	100.4		
	102.8	89.44	102.2	193.3	101.6		
	105.7	91.96	122.5	217.1	102.2		
	102.6	89.26	122.5	210.9	99.30		
	105.8	92.05	122.5	212.7	98.49		
缩三脲	104.6	47.07	83.00	132.3	102.7	102.2	0.90
	100.5	45.23	83.00	130.2	102.4		
	100.8	45.36	83.00	129.4	101.3		
	102.9	46.31	101.9	150.0	101.8		
	101.8	45.81	101.9	149.4	101.7		
	102.8	46.26	101.9	151.0	102.8		
	105.7	47.57	122.4	175.0	104.1		
	102.6	46.17	122.4	170.6	101.7		
	105.8	47.61	122.4	171.8	101.5		

### 2.3.5 检测限和定量限

精密量取对照品溶液(缩二脲:  $2.056 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; 缩三脲:  $2.066 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )逐级稀释后再测定,以基线噪音的3倍计,两者检测限均为  $0.062 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;以基线噪音的10倍计,两者定量限均为  $0.206 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.3.6 耐用性

取系统适用性溶液  $10 \mu\text{L}$  注入液相色谱

仪,调整柱温、流速等色谱条件,更换色谱柱(CAPCELL PAK  $\text{C}_{18}$  色谱柱),记录色谱图,该方法耐用性良好,结果见表2和表3。

取供试品(厂家:安徽阜阳和安徽合肥),按“2.2”项下色谱条件测定,采用2个品牌的适用纯水相的  $\text{C}_{18}$  柱进行测定,结果无明显差异,见表4。

表2 不同柱温和流速的试验结果 (Waters Atlantis T3 色谱柱)

系统适用性		柱温 (流速 0.9 mL · min <sup>-1</sup> )			流速 (柱温 30 °C)		
		25 °C	30 °C	35 °C	0.8 mL · min <sup>-1</sup>	0.9 mL · min <sup>-1</sup>	1.0 mL · min <sup>-1</sup>
尿素	保留时间 /min	3.462	3.438	3.411	3.869	3.440	3.102
	理论板数	10811	11166	11273	11229	11132	10982
缩二脲	保留时间 /min	5.409	5.175	4.951	5.822	5.180	4.673
	理论板数	17459	18420	18227	18368	18147	17726
缩三脲	保留时间 /min	15.852	13.980	12.291	15.705	13.999	12.641
	理论板数	35858	22186	22357	22602	21989	22162
尿素与缩二脲分离度		12.8	12.0	11.0	12.1	12.1	11.9
缩二脲与缩三脲分离度		41.5	32.6	30.3	33.1	32.5	32.2

表3 不同色谱柱试验结果 (柱温: 30 °C, 流速: 0.9 mL · min<sup>-1</sup>)

系统适用性		色谱柱	
		CAPCELL PAK C <sub>18</sub>	Waters Atlantis T3
尿素	保留时间 /min	4.257	3.444
	理论板数	10196	11593
缩二脲	保留时间 /min	5.726	5.193
	理论板数	17506	18795
缩三脲	保留时间 /min	12.550	14.057
	理论板数	24816	22371
尿素与缩二脲分离度		8.5	12.3
缩二脲与缩三脲分离度		27.2	33.1

表4 两种色谱柱测定结果

生产企业	批号	CAPCELL PAK C <sub>18</sub> 色谱柱		Waters Atlantis T3 色谱柱	
		缩二脲含量 /%	缩三脲含量 /%	缩二脲含量 /%	缩三脲含量 /%
安徽阜阳	191001	0.091	0.045	0.085	0.045
	191002	0.088	0.044	0.084	0.045
	191003	0.086	0.046	0.087	0.046
安徽合肥	20010201	0.420	0.025	0.460	0.026
	20010302	0.510	0.032	0.490	0.031
	20010303	0.500	0.028	0.500	0.031

## 2.4 样品测定

取各生产企业提供的样品,按“2.1.3”项下方法制备供试品溶液,分别进样 $10\mu\text{L}$ ,并按“2.2”

项下色谱条件测定,记录色谱图,见图2,计算各批样品中缩二脲和缩三脲的含量,结果见表5。

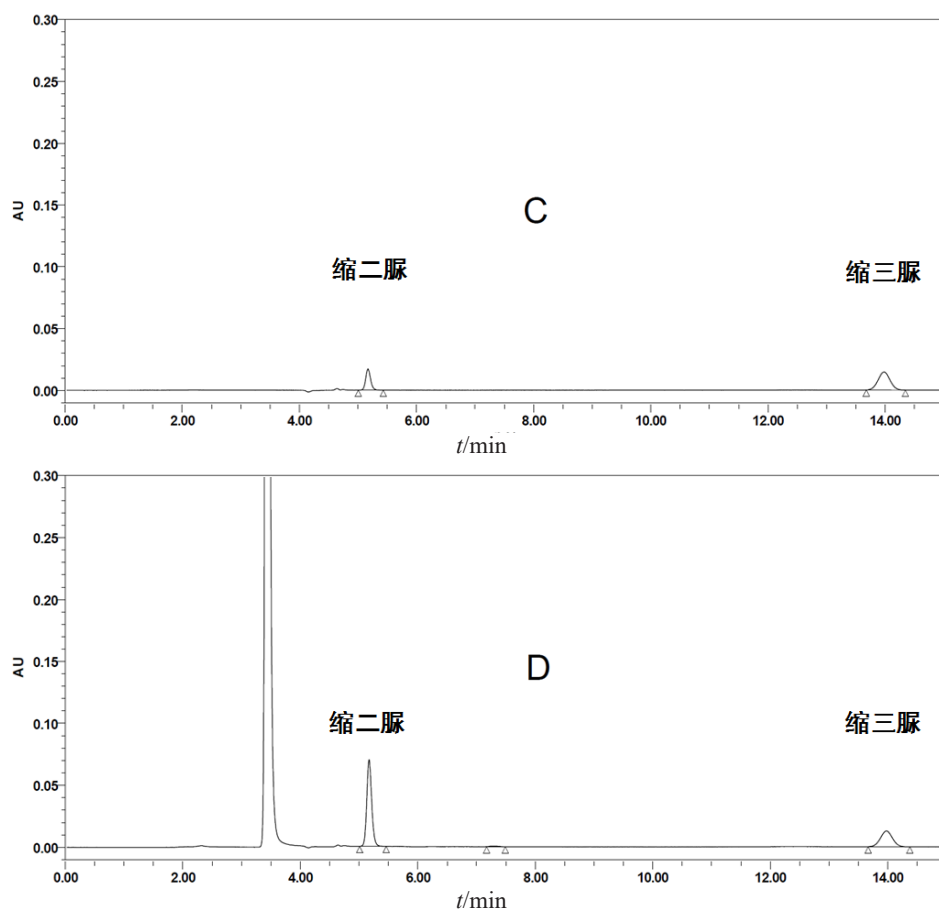


图2 对照品(C)及供试品(D)色谱图

表5 样品中缩二脲和缩三脲含量的测定结果

产地	批号	缩二脲含量 /%	缩三脲含量 /%
安徽合肥	20010201	0.450	0.026
	20010302	0.530	0.030
	20010303	0.490	0.031
江苏张家港	190514	0.091	0.017
	190515	0.084	0.014
	190516	0.079	0.016
安徽阜阳	191001	0.082	0.045
	191002	0.082	0.045
	191003	0.084	0.046

### 3 讨论

尿素属于强极性化合物,在常规 $C_{18}$ 柱上保留较弱<sup>[7-9]</sup>,且与缩二脲、缩三脲分离效果差,影响结果准确性,本研究尝试对不同品牌的色谱柱进行筛选。主要考察了SupelcoAscentis Express 90A OH5、CAPCELL PAK  $C_{18}$ 和Waters Atlantis T3三款色谱柱对3种成分的分​​离效果和峰形,发现:SupelcoAscentis Express 90A OH5色谱柱测定峰形较差,保留时间重叠,不能达到完全分离;CAPCELL PAK  $C_{18}$ 色谱柱在持续使用纯水流动相24 h后,柱效下降明显,在尿素峰和缩二脲峰之间会出现倒峰,影响尿素和缩二脲的积分;Waters Atlantis T3色谱柱对缩二脲、缩三脲和尿素有良好保留,并能有效分离,峰形较好,长时间使用纯水流动相后柱效无明显下降。

流动相系统考察了乙腈-水<sup>[10]</sup>、乙腈-0.1%甲酸溶液不同比例配比以及梯度洗脱的分离效果,由于乙腈存在末端吸收,试验比较了不同品牌的色谱乙腈,空白溶剂峰都会影响供试品中杂质峰的积分;选择以纯水作为流动相,尿素中各杂质峰都能达到很好的分离,基线平稳,无杂质峰干扰积分。尿素在水中易溶,缩二脲和缩三脲在水中微溶,经试验,10 mg的缩二脲在40 mL水中能完全溶解,10 mg缩三脲在100 mL水中能完全溶解,所以选择水作为溶剂。取“2.1.1系统适用性溶液”在HPLC仪器上进行全波长扫描(190~400 nm),缩三脲在波长197 nm有最大吸收,尿素和缩二脲无最大吸收波长,低于200 nm有较大吸收。本研究参照美国药典,检测波长设为195 nm。

在2019年国家药典委员会尿素质量标准提高项目中发现,目前仅美国药典标准中采用高效液相色谱法进行尿素的有关物质检查,其中仅对缩二脲

进行测定,限度为不得过0.1%,未对缩三脲进行具体考察。欧洲药典采用理化反应对尿素中的缩二脲进行限度检查,限度也为不得过0.1%。鉴于缩二脲和缩三脲均为尿素的主要杂质,尿素标准提高项目有必要对缩二脲和缩三脲进行研究控制,从而加强对尿素的质量控制。在2019年国家药典委员会尿素质量标准提高项目中建立的HPLC法,操作简便,专属性强,灵敏度高,且为等度洗脱,分析时间短,适用于尿素中缩二脲和缩三脲的测定,可以用于提高尿素的质量控制。

### 参考文献:

- [1] 萧三贯.最新国家药用辅料标准手册[M].北京:中国医药科技出版社,2006:595.
- [2] 吕洪坤,杨卫娟,周俊虎,等.尿素溶液高温热分解特性的实验研究[J].中国电机工程学报,2010,30(17):35-40.
- [3] 李才红.尿素系统中缩二脲含量的测定[J].河北化工,2008,31(6):66,73.
- [4] 中华人民共和国药典:二部[S].2020:652.
- [5] USP43-NF38[S].2020:6217.
- [6] EP10.0[S].2020:4149.
- [7] 钱文慧,王婷,侯忆璠.尿素乳膏的质量标准研究[J].中国现代应用药学,2017,34(11):1564.
- [8] 刘丽萍,孙成跃,王剑.尿素乳膏的改进及质量控制[J].中国药房,2010,21(13):1221.
- [9] 谢向阳,李银科,李旸,等.HPLC法测定尿素软膏中尿素的含量[J].中国药师,2012,15(9):1279.
- [10] 赵恂,袁耀佐,范青峰,等.尿素及其有关物质含量的HPLC-CAD分析研究[J].中国药品标准,2018,19(6):453-458.

(收稿日期 2021年10月27日 编辑 邹宇玲)