

高效液相色谱-示差折光检测器法测定牛磺酸颗粒中牛磺酸

覃婷婷, 房思萌, 王培, 鲁鑫, 白海娇, 韩晓捷*

天津市药品检验研究院, 天津 300070

摘要: 目的 建立高效液相色谱-示差折光检测器 (HPLC-RID) 法测定牛磺酸颗粒中牛磺酸。方法 采用 Welch Ultimate HILIC Amide 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.1% 冰醋酸-乙腈 (30:70) 为流动相, 柱温为 30 ℃, 示差折光检测器温度 30 ℃, 体积流量 1.0 mL/min, 进样体积 20 μL。结果 牛磺酸在 0.008~1.211 mg/mL 与峰面积呈良好线性关系, 平均回收率为 99.9%, RSD 值为 0.7%。结论 本法测定准确、可靠、专属性强, 为牛磺酸制剂的测定提供新的检测方法。

关键词: 牛磺酸颗粒; 牛磺酸; HPLC-RID

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)09-2276-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.09.010

Determination of taurine in Taurine Granules by HPLC-RID

QIN Tingting, FANG Simeng, WANG Pei, LU Xin, BAI Haijiao, HAN Xiaojie

Tianjin Institute of Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To establish an HPLC-RID method for determination of taurine in Taurine Granules. **Methods** Welch Ultimate HILIC Amide column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was 0.1% glacial acetic acid - acetonitrile (30:70). The column temperature was 30 ℃, and the differential refractive detector temperature was 30 ℃. The volume flow rate was 1.0 mL/min, and the injection volume was 20 μL. **Results** Taurine had good linear relationships of 0.008 — 1.211 mg/mL, and the average recovery rate was 99.9% with RSD 0.7%. **Conclusion** This method is accurate, reliable, and highly specific, which provides a new detection method for the determination of taurine preparations.

Key words: Taurine Granules; taurine; HPLC-RID

牛磺酸颗粒中主要成分为牛磺酸, 化学名称为 2-氨基乙磺酸, 分子式为 $C_2H_7NO_3S$, 为解热镇痛药, 临床上主要用于缓解感冒初期的发热。牛磺酸作为一种人体内源性氨基酸是中枢抑制性递质, 能调节神经组织兴奋性, 亦能调节体温, 故有解热、镇静、镇痛、抗炎、抗风湿、抗惊厥作用, 还可提高机体非特异性免疫功能^[1-2]。国家药品监督管理局数据库显示, 目前牛磺酸上市的口服剂型以颗粒剂和胶囊剂为主。牛磺酸颗粒的生产企业共有 42 家, 药品批准文号 52 个, 制剂规格为 0.4、0.8、1.2 g。

牛磺酸颗粒剂已收载于《中国药典》2020 年版二部^[3], 其含量测定方法为氨基酸分析仪或柱后衍生化 HPLC 法, 衍生化试剂毒性大, 污染环境, 且衍生化产物稳定性不好, 影响测定的准确度和实验

效率。牛磺酸制剂在《美国药典》《英国药典》《欧洲药典》《日本药局方》现行版中均未收载, 仅《美国药典》现行版^[4]和《日本药局方》18 版^[5]收载了牛磺酸原料, 含量测定方法分别为 HPLC-蒸发光检测器 (ELSD) 和电位滴定法。现行版药典方法均存在一定的局限性, 需建立专属性强、准确度高的方法, 且该品种的患者群体主要为婴幼儿和儿童, 因此亟须对该品种的质量标准进行提升。近年来文献报道的牛磺酸含量测定方法有电位滴定法^[6]、拉曼光谱法^[7]、氨基酸分析仪法^[8]、高效液相色谱法^[9-12]、液相色谱串联质谱法^[13]。目前文献报道的 HPLC 法无法分离牛磺酸和葡萄糖的色谱峰。被抽样的牛磺酸颗粒的处方中含有大量的蔗糖和葡萄糖, 葡萄糖的量与牛磺酸相当, 蔗糖的量约为牛磺酸的 4 倍,

收稿日期: 2024-06-26

基金项目: 国家药品标准制修订研究课题 (2021H032)

作者简介: 覃婷婷 (1981—), 女, 广西人, 副主任药师, 硕士, 主要从事生化药品和生物制品检验与质量研究。E-mail: 57213467@qq.com

*通信作者: 韩晓捷 (1980—), 女, 天津人, 副研究员, 主要从事生化药品和生物制品检验与质量研究。E-mail: hxjtcd@163.com

牛磺酸与葡萄糖、蔗糖的极性相近, 色谱峰保留时间较近。因此本研究建立了高效液相色谱法-示差折光检测器法, 不通过衍生化过程直接进行测定, 通过方法学验证, 本法测定准确、可靠、专属性强, 为牛磺酸制剂的测定提供新的检测方法。

1 仪器与试剂

Waters e2695-2414 高效液相色谱仪[Empower 3 色谱工作站, 沃特世科技(上海)有限公司]; L-8900 日立全自动氨基酸分析仪; Mettler Toledo XS205 十万分之一分析天平。

牛磺酸对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 111616-201605, 质量分数 100.0%), 牛磺酸颗粒(迪沙药业集团有限公司, 规格 0.8 g/袋, 批号 210501; 深圳海王药业有限公司, 规格 0.4 g/袋, 批号 20210302; 赤峰维康生化制药有限公司, 规格 0.4 g/袋, 批号 20210618; 湖南中和制药有限公司, 规格 0.4 g/袋, 批号 210401; 神威药业集团有限公司, 规格 0.4 g/袋, 批号 21040151), 乙腈、冰醋酸(液质级, 天津康科德公司); 水为 Millipore 超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Welch Ultimate HILIC Amide 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.1%冰醋酸-乙腈(30:70)为流动相, 柱温为 30℃, 示差折光检测器温度 30℃, 体积流量 1.0 mL/min, 进样体积 20 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 混合辅料溶液的制备 分别取蔗糖 320 mg、葡萄糖 86 mg、糊精 4 mg、柠檬黄 1 mg、羟丙甲纤维素 1 mg、香兰素 1 mg、羟甲基纤维素钠 1 mg、桔子香精 1 mg, 混合均匀, 即得混合辅料。称取处方比例的混合辅料 80 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相适量, 超声 10 min, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

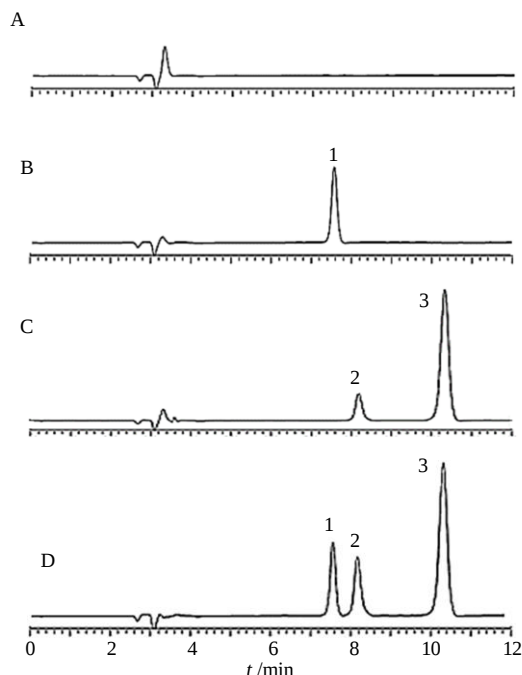
2.2.2 对照品溶液的制备 称取牛磺酸对照品约 20 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相使溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 即得 0.8 mg/mL 对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 取牛磺酸颗粒研细粉适量(约相当于牛磺酸 40 mg), 置 50 mL 量瓶中, 加流动相适量使溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.3 专属性和系统适用性

分别取流动相、混合辅料溶液、牛磺酸对照品

溶液、牛磺酸颗粒供试品溶液, 进样, 记录色谱图, 见图 1。空白溶剂不干扰牛磺酸的测定, 牛磺酸和葡萄糖的分离度为 2.1, 符合要求, 理论塔板数按牛磺酸计为 13 559, 符合要求。



1-牛磺酸, 2-葡萄糖, 3-蔗糖。

1-*taurine*, 2-*glucose*, 3-*saccharose*.

图1 流动相(A)、牛磺酸对照品(B)、混合辅料(C)和牛磺酸颗粒(D, 批号 20210302)的 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC Chromatograms of mobile phase (A), taurine reference substance (B), mixed excipients (C), Taurine Granules (D, batch 20210302)

2.4 线性范围考察

取牛磺酸对照品 100 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加流动相适量使溶解, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品贮备液。精密量取牛磺酸对照品贮备液适量, 加流动相稀释制成 1.2、0.8、0.48、0.32、0.16、0.08、0.04、0.008 mg/mL 的线性系列溶液, 进样测定, 记录色谱图。以峰面积对质量浓度进行线性回归, 计算得回归方程 $Y=1\,147\,497.507\,4\,X-1\,081.790\,5$, $r=1.000\,0$ 。结果表明, 牛磺酸在 0.008~1.211 mg/mL 与峰面积呈良好线性关系。

2.5 定量限和检测限

取牛磺酸对照品贮备液, 用流动相稀释至信噪比约为 10:1, 相对应的质量浓度为定量限试验溶液; 用流动相稀释至信噪比约为 3:1, 相对应的浓度为检测限试验溶液。进样测得的牛磺酸的定量限

为 161 ng, 检测限为 48 ng。

2.6 重复性试验

取牛磺酸颗粒(批号为 20210302)平行配制 6 份供试品溶液, 进样测定峰面积, 计算牛磺酸的质量分数, 结果其均值为 0.399 g/袋, RSD 值为 0.2%。

2.7 回收率试验

分别精密称取牛磺酸对照品适量和混合辅料适量, 使得加入的牛磺酸质量浓度分别为 0.64、0.80、0.96 mg/mL 的溶液各 3 份, 进样, 记录色谱图, 计算回收率, 结果牛磺酸的平均回收率为 99.9%, RSD 值为 0.7%。

2.8 稳定性试验

分别取新配制的牛磺酸对照品溶液和牛磺酸颗粒供试品溶液(批号为 20210302), 分别于 10 °C 样品仓条件下放置 0、4、8、12、24、48、70 h, 进样测定牛磺酸峰面积。结果显示在 10 °C 样品仓条件下放置 70 h, 牛磺酸对照品溶液和牛磺酸颗粒供试品溶液中牛磺酸的峰面积 RSD 值分别为 0.4%、0.5%。结果表明, 牛磺酸对照品溶液和牛磺酸颗粒供试品溶液在 10 °C 条件下放置 70 h 稳定性良好。

2.9 耐用性试验

考察了高效液相色谱系统参数变化, 包括流动相中有机相比例±1%、体积流量±0.1 mL/min、柱温±2 °C。各条件下系统适用性试验符合要求, 牛磺酸质量分数的 RSD 值分别为 0.7%、0.3%、0.8%, 表明该方法耐用性良好。

2.10 样品测定

准确量取牛磺酸颗粒供试品溶液、牛磺酸对照品溶液各 20 μL, 分别进样, 记录色谱图。供试品溶液中牛磺酸的质量分数按外标法计算。另按照《中国药典》2020 年版二部牛磺酸颗粒剂含量测定项下方法使用氨基酸分析仪测定牛磺酸的质量分数, 结果见表 1。

表 1 牛磺酸颗粒中牛磺酸的测定结果 (n=20)

Table 1 Determination of taurine in Taurine Granules (n=20)

批号	规格/(g 袋 ⁻¹)	牛磺酸/(g 袋 ⁻¹)	
		本法	药典方法
20210302	0.4	0.399	0.400
210501	0.8	0.797	0.794
210401	0.4	0.411	0.407
20210618	0.4	0.388	0.392
21040151	0.4	0.391	0.389

3 讨论

3.1 检测器的选择

由于牛磺酸紫外吸收弱, 采用紫外检测器直接进行测定时, 灵敏度较差, 一般宜采用柱前或柱后衍生化, 但是衍生化过程操作繁琐, 衍生化产物易随放置时间而变化^[14-15]。本研究不采用衍生化法, 通过筛选适宜的检测器对样品溶液直接进行测定。考察的检测器分别为示差折光检测器 (RID)、ELSD、电喷雾检测器 (CAD)。通过对比, 示差检测器和蒸发光检测的灵敏度相近, CAD 检测器灵敏度最高, 考虑到方法的普适性, 本实验采用示差折光检测器。

3.2 色谱柱的选择

牛磺酸的极性较强, 在普通的 C₁₈ 柱上几乎没有保留, 不宜采用 C₁₈ 色谱柱。在普通氨基柱和 HILIC 柱上通过调节流动相, 牛磺酸与辅料可有效分离。《美国药典》中牛磺酸原料药的测定方法用到了 Cosmosil HILIC 色谱柱 (L104), 但该色谱柱在国内很难采购, 本实验对色谱柱考察和筛选, 结果表明 Welch Ultimate HILIC Amide 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agela HILIC (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 等色谱柱可满足测定的需求。

3.3 色谱条件考察

本实验考察了流动相体系 0.05%冰醋酸-乙腈、0.1%冰醋酸-乙腈、0.05%甲酸-乙腈, 随着酸浓度的提高, 牛磺酸、葡萄糖、蔗糖的保留时间提前, 峰形更好; 同等浓度的甲酸和冰醋酸体系, 在甲酸体系色谱峰保留时间更短, 但牛磺酸和葡萄糖的分离度会减小。实验还考察了 0.1%冰醋酸-乙腈的比例 20:80、25:75、30:70, 随着流动相中乙腈比例提高, 色谱峰保留时间延长, 为提高分析效率, 在保证分离的情况下, 最终选择的流动相为 0.1%冰醋酸-乙腈 (30:70)。柱温也同样影响牛磺酸和葡萄糖、蔗糖的分离, 当柱温为 30 °C 时, 二者分离度为 2.1, 柱温升至 35 °C 时分离度为 1.5, 故选定柱温和示差折光检测器的温度为 30 °C。还考察了溶解样品的溶剂, 结果表明用流动相溶解样品的色谱峰对称性较好, 理论塔板数按牛磺酸计算约为 13 000, 而用水溶解的样品中牛磺酸理论塔板数约为 3 000, 故选择流动相来溶解样品。由于流动相中乙腈含量较高, 建议对样品仓进行低温控制, 防止有机溶剂的挥发。

经方法验证, 本法测定准确、可靠、专属性强,

为牛磺酸制剂的测定提供新的检测方法。本法也适用于牛磺酸其他固体口服制剂的含量测定、溶出度测定、牛磺酸制剂中葡萄糖和蔗糖的测定等研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 覃婷婷, 荣姣, 黄哲甦. 牛磺酸颗粒色素含量分析 [J]. 天津药学, 2019, 31(3): 13-16.
- [2] 李宇, 张乃合, 刘洪海. 牛磺酸分析方法的研究进展 [J]. 中国卫生检验杂志, 2021, 31(17): 2167-2173.
- [3] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 88-90.
- [4] 美国药典 [S]. USP-NF2023. ISSUE1.
- [5] 日本药局方 [S]. JP18.
- [6] 汤晨希. 库伦滴定法测定牛磺酸含量研究 [D]. 武汉: 武汉理工大学, 2018.
- [7] 赖源发, 胡佳, 庄峙厦, 等. 拉曼光谱法用于牛磺酸片鉴别及含量测定 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(5): 777-782.
- [8] 武春阳, 马佳呈, 张楠, 等. 氨基酸分析仪法批量测定小鼠皮质和海马中氨基酸类神经递质和牛磺酸的含量 [J]. 神经药理学报, 2019, 9(5): 10-16.
- [9] 朱晓雯. HPLC-ELSD 法测定复方牛磺酸口服液中牛磺酸的含量 [J]. 海峡药学, 2017, 29(6): 64-66.
- [10] 康明芹, 陈明岩, 王岸英, 等. UPLC-ELSD 法测定 12 种保健食品中的牛磺酸 [J]. 药物分析杂志, 2017, 37(11): 1957-1961.
- [11] 仵淑红, 王丽霞. HPLC-RID 法同时测定复方牛磺酸滴眼液中牛磺酸和氨基己酸的含量 [J]. 中国药师, 2018, 21(5): 919-922.
- [12] 娄良, 楼秋霞, 郭然, 等. 一种新的牛磺酸含量的检测方法: 中国, CN109856258A [P]. 2019-06-07.
- [13] 潘军, 王颖臻. 亲水作用色谱-质谱法检测牛磺酸颗粒中的牛磺酸 [J]. 药物分析杂志, 2016, 36(11): 1999-2003.
- [14] 许舒瑜, 关斌, 陈晓琳. 高效液相色谱法测定辅助改善记忆力保健食品中牛磺酸含量 [J]. 海峡药学, 2019, 31(7): 50-53.
- [15] 张冬生, 李强, 翟洪稳, 等. 柱前在线衍生-高效液相色谱法测定婴幼儿配方奶粉中牛磺酸 [J]. 食品安全导刊, 2021(18): 79-80.

[责任编辑 解学星]