·检验检测·

doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2018.17.008

高效液相色谱－示差折光检测器法测定牛磺酸颗粒和滴眼液中牛磺酸含量

仵淑红,王丽霞△

(北京市东城区食品药品安全监控中心,北京 100050)

摘要:目的 建立测定牛磺酸颗粒和牛磺酸滴眼液中牛磺酸含量的高效液相色谱－示差折光检测器法。**方法** 色谱柱采用 Waters NH_2 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为水－乙腈(40∶60),流速为 0.8 mL/min,柱温为 35.0 ℃,检测器参比池和检测池温度均为 35.0 ℃,进样量为 20 μL。**结果** 牛磺酸质量浓度在 0.05～1.00 g/L(r=0.998 58,n=7)范围内与峰面积线性关系良好,检出限为 0.5 μg/mL;牛磺酸颗粒和牛磺酸滴眼液的平均回收率分别为 100.27%和 100.61%,*RSD* 分别为 1.26%和 1.58%(n=9)。**结论** 该方法可用于牛磺酸颗粒和牛磺酸滴眼液中牛磺酸的质量控制。

关键词:牛磺酸;高效液相色谱－示差折光检测器;高效液相色谱法;含量测定

中图分类号:R927.2;R917　　**文献标识码:**A　　**文章编号:**1006－4931(2018)17－0029－03

Content Determination of Taurine in Taurine Granules and Taurine Eye Drops by High Performance Liquid Chromatography－Refractive Index Detector

Wu Shuhong, Wang Lixia

(Beijing Dongcheng District Food and Drug Safety Monitoring Center, Beijing, China 100050)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography－refractive index detector(HPLC－RID) method for content determination of taurine in Taurine Granules and Taurine Eye Drops. **Methods** Waters NH_2 column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was adopted, the mobile phase was water－acetonitrile(40∶60) at a flow rate of 0.8 mL/min, the column temperature was 35.0 ℃, the temperature of detector reference cell and sample cell were all set at 35.0 ℃, the sample size was 20 μL. **Results** The linear range of taurine was 0.05－1.00 g/L(r=0.998 58, n=7), the lower detection limit was 0.5 μg/mL. The average recovery rates of Taurine Granules and Taurine Eye Drops were 100.27% and 100.61%, *RSDs* were 1.26% and 1.58% (n=9). **Conclusion** The method can be used for the quality control of taurine in Taurine Granules and Taurine Eye Drops.

Key words: taurine; high performance liquid chromatography－refractive index detector; HPLC; content determination

牛磺酸(taurine)广泛分布于人体内各组织、器官,是人体生长、发育必需的氨基酸。牛磺酸对中枢神经系统、视觉发育系统有重要作用,还具有增强心肌收缩力、抗心律失常、钙流动调控、促进胆汁分泌、解毒、提高机体免疫等生物学功能[1]。牛磺酸颗粒作为解热镇痛药,可缓解感冒初期的发热,适用于感冒、扁桃体炎、支气管炎、风湿性关节炎等。牛磺酸滴眼液用于牛磺酸代谢失调引起的白内障治疗,也可用于急性结膜炎、疱疹性结膜炎、病毒性结膜炎的辅助治疗。由于牛磺酸的紫外吸收较弱,2015 年版《中国药典(二部)》[2]对牛磺酸片剂、胶囊剂和散剂采用中和滴定方法测牛磺酸含量,方法衍生步骤比较烦琐,同时要求在反应管中进行,对仪器的配置要求较高。其他测定方法还有高效液相色谱－蒸发光散射检测法[3]、自动电位滴定法[4]、分光光度法[5]、质谱法[6]等。国家药品标准[7]采用苯乙烯共聚体与磺基(Ca－配位)结合的凝胶为填充剂,内消旋肌醇为内标物的高效液相色谱－示差折光检测器法可对复方牛磺酸滴眼液中牛磺酸成分进行分析。本研究中采用示差折光检测器,NH_2 柱为分析柱,建立了牛磺酸颗粒和牛磺酸滴眼液中牛磺酸含量的高效液相色谱分析方法。现报道如下。

1 仪器与试药

仪器:Agilent 1260 Infinity 高效液相色谱仪,Agilent 1260 示差折光检测器(1260－RID);XP205 型电子天平(梅特勒－托利多);Satorius 611DI 纯化水系统;FB15065 型超声波清洗器(Fisher Scientific)。

试药:牛磺酸对照品(批号为 111616－201605,含量为 100.0%),丙氨酸对照品(批号为 140680－200803,含量为 99.9%),均购于中国食品药品检定研究院;牛磺酸颗粒(A 厂,批号为 160601;B 厂,批号为20160522;C 厂,批号为 151108),规格均为每袋 0.4 g;牛磺酸滴眼液(A 厂,批号为 16011501,规格为每支 0.4 g∶8 mL);

第一作者:仵淑红,女,大学本科,主管药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)1831710806@qq.com。

△**通信作者:**王丽霞,女,博士研究生,主管药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)wangada2016@sohu.com。

牛磺酸滴眼液(B厂,批号为161204,规格为每支0.5 g∶10 mL);牛磺酸滴眼液(C厂,批号为161001,规格为0.5 g∶10 mL);乙腈为Fisher Chemical色谱纯,试验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液制备

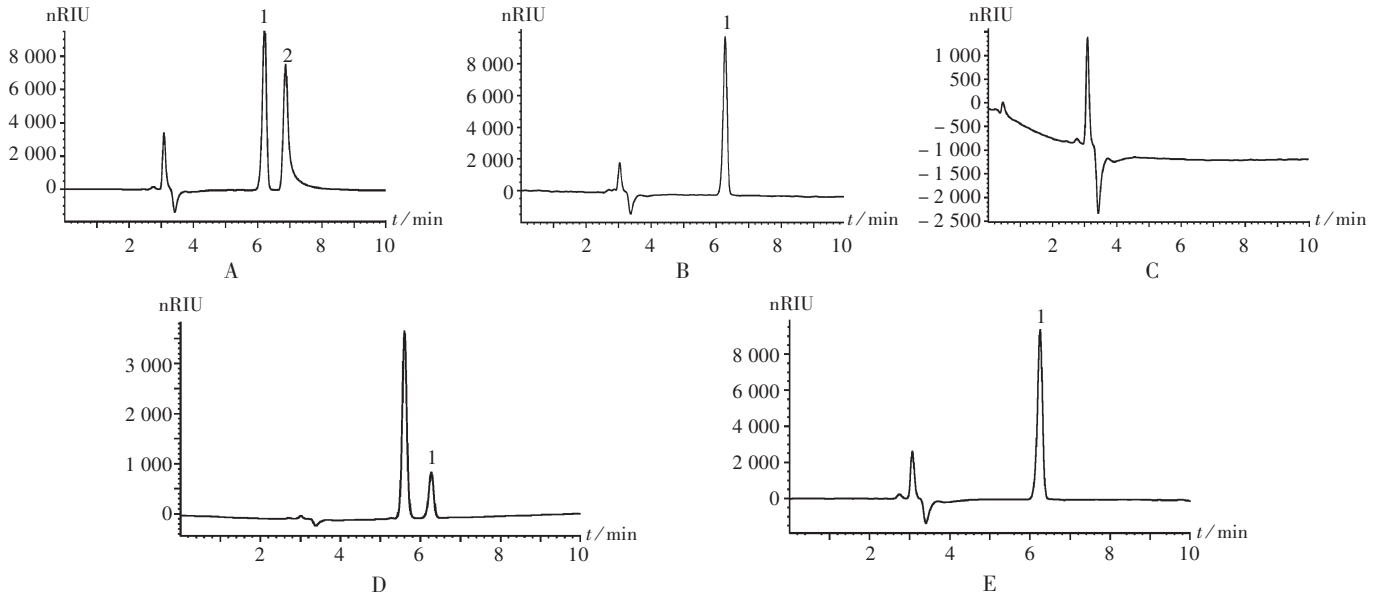
取牛磺酸对照品适量,精密称定,置容量瓶中,加流动相溶解,制成质量浓度为1.6 g/L的牛磺酸对照品贮备液;精密量取5 mL,置20 mL容量瓶中,加流动相稀释至刻度,得质量浓度为0.4 g/L的对照品溶液。

取牛磺酸颗粒细粉适量(相当于牛磺酸100 mg),精密称定,置50 mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,制成质量浓度为2 g/L的牛磺酸颗粒供试品贮备液;精密量取续滤液5 mL,置25 mL容量瓶中,加流动相稀释至刻度,制成质量浓度为0.4 g/L的牛磺酸颗粒供试品溶液A。精密量取牛磺酸滴眼液2 mL(相当于牛磺酸100 mg),置50 mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,制成质量浓度为2 g/L的牛磺酸滴眼液贮备液;精密量取续滤液5 mL,置25 mL容量瓶中,加流动相稀释至刻度,制成质量浓度为0.4 g/L的供试品溶液B。取流动相,即得空白溶液。

取牛磺酸和丙氨酸对照品各约10 mg,精密称取,置25 mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得系统适用性试验溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters NH_2柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:水-乙腈(40∶60);流速:0.8 mL/min;柱温:35.0 ℃;参比池温度:35.0 ℃;检测池温度:35.0 ℃;进样量:20 μL。分别取2.1项下5种溶液,按拟订色谱条件进样,牛磺酸保留时间为6.217 min,丙氨酸保留时间为6.873 min,丙氨酸与牛磺酸完全分离,分离度为2.66,牛磺酸峰理论板数为11 614。在供试品溶液A色谱图中,牛磺酸保留时间为6.273 min,5.601 min处出现一峰,两峰分离度为3.03,该峰对牛磺酸的测定无干扰;供试品溶液B色谱图中,除溶剂外未发现干扰峰。色谱图见图1。



1. 牛磺酸 2. 丙氨酸

A. 系统适用性试验溶液 B. 对照品溶液 C. 空白溶液 D. 供试品溶液A E. 供试品溶液B

图1 高效液相色谱图

2.3 方法学考察

线性关系考察:取牛磺酸对照品约50 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀;分别精密量取5.00,4.00,3.00,2.00,1.00,0.50,0.25 mL,置10 mL容量瓶中,制成质量浓度为1.00,0.80,0.60,0.40,0.20,0.10,0.05 g/L的牛磺酸对照品溶液。按拟订色谱条件,进样20 μL,记录峰面积,以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y=195\ 768.56X+1\ 085.93$,$r=0.998\ 58$($n=7$)。结果表明,牛磺酸质量浓度在0.05~1.00 g/L范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:分别取线性关系考察项下质量浓度为1.00,0.40,0.05 g/L的对照品溶液,按拟订色谱条件进样20 μL,结果的 *RSD* 分别为0.31%,0.37%,0.36%($n=5$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取质量浓度为0.4 g/L的对照品溶液,室温放置,按拟订色谱条件分别在制备后0,1,2,4,6,20,24 h时进样20 μL。结果的 *RSD* 为0.28%($n=7$),

表 1 牛磺酸加样回收试验结果（$n=9$）

样品含量(g/L)		加入量(g/L)		测得量(g/L)		回收率(%)		$\overline{X}$(%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0.312 63	0.416 28	0.317 76	0.317 76	0.632 61	0.737 89	100.70	101.21				
0.312 63	0.416 28	0.317 76	0.317 76	0.623 46	0.744 39	97.82	103.26				
0.312 63	0.146 28	0.317 76	0.317 76	0.632 31	0.737 42	100.60	101.06				
0.390 79	0.416 28	0.397 20	0.397 20	0.784 75	0.806 62	99.18	98.27				
0.390 79	0.416 28	0.397 20	0.397 20	0.784 52	0.806 05	99.13	98.12	100.27	100.61	1.26	1.58
0.390 79	0.416 28	0.397 20	0.397 20	0.791 57	0.815 81	100.90	100.59				
0.468 90	0.416 28	0.476 64	0.476 64	0.951 69	0.897 44	101.29	100.95				
0.468 90	0.416 28	0.476 64	0.476 64	0.951 28	0.900 16	101.20	101.52				
0.468 90	0.416 28	0.476 64	0.476 64	0.953 15	0.895 57	101.60	100.56				

注：A 为牛磺酸颗粒，B 为牛磺酸滴眼液。

表明对照品溶液在 24 h 内稳定。

检测限确定：取质量浓度为 0.4 g/L 的牛磺酸对照品溶液，逐步稀释，按拟订色谱条件进样 20 μL，记录色谱图。结果信噪比为 3/1 时，检测限为 0.5 μg/mL。

加样回收试验：分别精密量取 2.1 项下牛磺酸颗粒供试品贮备液 1.6，2.0，2.4 mL，共 9 份，分别置 10 mL 容量瓶中，分别加入牛磺酸对照品贮备液 2.0，2.5，3.0 mL，加流动相稀释至刻度，按拟订色谱条件分别进样 20 μL，记录色谱图，计算回收率。结果见表 1。精密量取 2.1 项下牛磺酸滴眼液供试品贮备液 2 mL，共 9 份，分别置 10 mL 容量瓶中，以 80%，100%，120% 3 个水平浓度精密加入牛磺酸对照品贮备液2.0，2.5，3.0 mL，加流动相稀释至刻度，按拟订色谱条件分别进样 20 μL，记录色谱图，计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

取 3 批牛磺酸颗粒、牛磺酸滴眼液和牛磺酸对照品适量，精密称定，依法制备供试品溶液和对照品溶液，按拟订色谱条件分别进样 20 μL，记录色谱图，按外标法计算含量。结果 3 批牛磺酸颗粒样品（批号分别为 160601，20160522，151108）的牛磺酸含量分别为 98.33%，103.42%，100.54%；3 批牛磺酸滴眼液样品（批号分别为 16011501，161204，161001）的牛磺酸含量分别为 93.67%，96.65%，99.08%。

3 讨论

牛磺酸化学结构式 $H_2N—CH_2—CH_2—SO_3H$，相对分子量为 125.15，易溶于水，不溶于无水乙醇、乙醚和丙酮。由于牛磺酸分子量相对较小，无苯基类疏水集团，在药物分析常用的十八烷基硅胶柱上的保留能力较弱，试验初期采用 C_{18} 柱，水 - 乙腈不同比例分析，其保留时间比较短。分子中具有极性氨基、磺基亲水基团，在水和乙腈体系流动相中，能与氨基柱的氨基基团达到保留，增大流动相中乙腈的比例，牛磺酸的保留时间增加，水 - 乙腈（40∶60）流动相条件下，氨基柱对牛磺酸的保留时间达到 6 min，理论板数达 11 614，分离效果良好。由于牛磺酸溶解能力限制，继续增加流动相中乙腈比例至水 - 乙腈（30∶70），牛磺酸不能充分溶解，因此选择水 - 乙腈（40∶60）为流动相，氨基柱为分析柱。

2015 年版《中国药典》[2]、美国药典 USP35 - NF30[8] 和日本药典 JP17[9]，未收载明确的牛磺酸杂质。参考 2015 年版《中国药典》[2] 和文献[10]，选择丙氨酸和牛磺酸作为系统适用性溶液考察方法的专属性，分离度良好。专属性试验表明，在牛磺酸色谱峰处无干扰峰。加样回收试验结果表明，回收率满足要求。

参考文献：

[1] 白小琼，孔德义. 牛磺酸研究进展[J]. 中国食物与营养，2011，17(5)：78 - 80.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（二部）[M]. 北京：中国医药科技出版社，2015：77 - 80.
[3] 扈本荃，廉江平，秦定坤，等. 高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法测定牛磺酸滴眼液中主药含量[J]. 中国药房，2011，22(45)：4285 - 4286.
[4] 张 彤，山广志，陈 思. 自动电位滴定法测定牛磺酸含量[J]. 首都医药，2009(10)：63 - 64.
[5] 杨 涓，康建宏，魏智清，等. 分光光度法测定地骨皮中牛磺酸含量[J]. 氨基酸和生物资源，2006，28(3)：26 - 29.
[6] Marine DP，Aurelie H，Claire E，et al. Development and validation of a hydrophilic interaction chromatography - mass spectrometry assay for taurine and methionine in matrices rich in carbohydrates[J]. Journal of Chromatography A，2005，1081(2)：174 - 181.
[7] WS_1 - (X - 206) - 2003Z，国家药品标准·新药转正标准第 42 册·复方牛磺酸滴眼液[S].
[8] The United States Pharmacopeial Convention. USP 38 /NF33[M]. Rockville：The United States Pharmacopeial Convention，2014：5451.
[9] The Japanese Pharmacopeia. JP17[M]. Tokyo：Minstry of Health，Labour and Welfare，2014：5451.
[10] 吕 雯，王 焱，马 迅，等. 牛磺酸有关物质检查的方法研究及质量考察[J]. 中国药业，2011，20(4)：35 - 36.

（收稿日期：2017 - 12 - 28）