

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.17.015

高效液相色谱法测定小儿生血糖浆中尿囊素含量*

陈玉龙¹, 苟英², 孙晓^{3△}, 张亚锋³, 董曼曼³, 李敏³

(1. 陕西省药品和疫苗检查中心, 陕西 西安 710065; 2. 陕西省渭南市中医医院, 陕西 渭南 714000;
3. 陕西省西安市食品药品检验所, 陕西 西安 710054)

摘要:目的 建立测定小儿生血糖浆中尿囊素含量的高效液相色谱法。方法 采用二极管阵列检测器, 色谱柱为 Waters XBridge Amide 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 191 nm, 柱温为 30 ℃, 进样量为 10 μL。结果 尿囊素质量浓度在 18.03~288.50 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.999\ 9, n=5$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 2.0% ($n=6$); 平均加样回收率为 99.70%, RSD 为 1.40% ($n=9$)。样品中尿囊素平均含量为 0.27 mg/mL。结论 该方法操作简便、结果准确, 可用于小儿生血糖浆中尿囊素的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 小儿生血糖浆; 尿囊素; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2022)17-0058-03

Content Determination of Allantoin in Xiaer Shengxue Syrup by HPLC

CHEN Yulong¹, XUN Ying², SUN Xiao³, ZHANG Yafeng³, DONG Manman³, LI Min³

(1. Shaanxi Center for Drug and Vaccine Inspection, Xi'an, Shaanxi, China 710065; 2. Weinan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Weinan, Shaanxi, China 714000; 3. Xi'an Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710054)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of allantoin in Xiaer Shengxue Syrup. **Methods** A diode array detector was adopted. The chromatographic column was Waters XBridge Amide column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-water (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 191 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear range of allantoin was 18.03-288.50 μg/mL ($r=0.999\ 9, n=5$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were lower than 2.0% ($n=6$). The average recovery of allantoin was 99.70% with an RSD of 1.40% ($n=9$). The average content of allantoin in the sample was 0.27 mg/mL. **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be used for the content determination of allantoin in Xiaer Shengxue Syrup.

Key words: HPLC; Xiaer Shengxue Syrup; allantoin; content determination

*基金项目: 陕西省创新能力支撑计划项目[2021PT-044]。

第一作者: 陈玉龙, 男, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药品注册与药品生产监管, (电子信箱)79808299@qq.com。

△通信作者: 孙晓, 男, 硕士研究生, 中药师, 研究方向为药品及食品质量标准, (电子信箱)sunxiao193@163.com。

- 响的研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(1): 220-224.
- [9] 夏荃, 林传权, 莫全毅, 等. 珍珠层粉超微粉的制备及药理学研究[J]. 中成药, 2014, 36(2): 396-399.
- [10] 杨蕙, 王宇红, 张秀丽, 等. 马钱子超微粉对类风湿性关节炎模型大鼠的量效关系参数研究[J]. 中国中医急症, 2012, 21(12): 1942-1944.
- [11] 邢晓玲. 浅析超微粉碎技术及其在中药制药中的应用优势[J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(1): 179.
- [12] 李婧琳, 王媚, 史亚军, 等. 超微粉碎技术在中药制剂中的应用分析[J]. 现代中医药, 2018, 38(5): 121-123.
- [13] 冯媛, 郑玉光, 刘岩, 等. Box-Behnken 响应面法优化黄柏药材中生物碱提取工艺[J]. 中国药业, 2021, 30(22): 61-65.
- [14] 孔馨逸, 刘妍如, 唐志书, 等. 响应面法优选葛根超微粉的制备工艺及活性成分测定研究[J]. 中草药, 2018, 49(13): 2993-3000.
- [15] 蔡丹凤, 吴长辉, 唐阔杰, 等. 响应面法优化茯苓超微粉碎工艺的研究[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(7): 1467-1471.
- [16] 祖元刚, 钟晨, 赵修华, 等. 石榴皮超微粉制备工艺优化及体内抗氧化研究[J]. 中草药, 2015, 46(10): 1454-1459.
- [17] 陈铭, 薛琪, 沈婷, 等. 超微粉碎对莲子心活性成分提取率及抗氧化能力的影响[J]. 现代食品科技, 2016, 32(11): 228-234.
- [18] 张福君, 瞿晶田, 王强. 超微粉碎技术对灵芝中三萜类成分溶出的影响[J]. 中国药房, 2018, 29(5): 599-602.
- [19] 许启泰, 杜钢军, 包翠屏, 等. 复方地黄超微粉药理学研究[J]. 中草药, 2002, 33(6): 537-539.
- [20] 王爱武, 刘丽娟, 张薇. 超微粉碎对当归散镇痛免疫作用的影响[J]. 医药导报, 2003, 22(3): 149-150.
- [21] 孟雪莲, 刘晓娜, 张欣, 等. 基于网络药理学研究莲子心化学成分防治阿尔茨海默病的作用机制[J]. 辽宁大学学报(自然科学版), 2021, 48(4): 289-299.
- [22] 程艳, 隆会芝, 罗红宇, 等. 基于网络药理学和细胞实验探究莲子心生物碱防治非小细胞肺癌的分子机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(13): 164-171.
- [23] 占秋晓, 李丹丹, 刘璐, 等. 基于网络药理学探究莲子心治疗高血压的分子机制[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2020, 18(7): 1039-1045.

(收稿日期: 2021-11-17; 修回日期: 2022-03-09)

贫血对儿童的健康成长有一定影响,中医药治疗小儿贫血效果较好^[1-2]。小儿生血糖浆治疗小儿缺铁性贫血及营养不良性贫血起效更迅速,药品不良反应发生率低,且口感较好,更易被儿童接受^[3-7]。小儿生血糖浆由山药、大枣、熟地黄、硫酸亚铁等制成,目前国内共有8个批准文号,现行药品标准^[8]含量测定项下山药[以尿囊素($C_4H_6N_4O_3$)计^[9]]的含量测定操作烦琐、费时,专属性及重复性差。本研究中建立了测定小儿生血糖浆中尿囊素含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UltiMate3000型高效液相色谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),配有Chromeleon7.2工作站,二极管阵列(DAD)检测器;Agilent1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司),配有DAD检测器;MS105型电子天平(梅特勒-托利多仪器<上海>有限公司,精度为十万分之一);KQ-700 VDB型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为700 W,频率为100 kHz)。

1.2 试剂

小儿生血糖浆(西安润泰药业有限公司,批号分别为2018901,2018902,20181203);尿囊素对照品(中国食品药品检定研究院,批号为111501-200202);甲醇(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,德国Merck公司);超纯水(实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Waters XBridge Amide柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-水(B),梯度洗脱(0~21.0 min时94%A,21.0~21.5 min时94%A→80%A,21.5~28.0 min时80%A,28.0~28.5 min时80%A→94%A,28.5~35.0 min时94%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:191 nm;柱温:30℃;进样量:10 μL。理论板数按尿囊素峰计应不低于4 000。

2.2 溶液制备

取尿囊素对照品36.06 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,用甲醇定容,即得每1 mL含3.606 mg的对照品贮备液。精密吸取对照品贮备液1 mL,置100 mL容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,即得每1 mL含36.06 μg的对照品溶液。精密量取样品5 mL,置25 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声处理(功率为250 W,频率为40 kHz)15 min,放至室温,用甲醇定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得供试品溶液。按现行药品标准^[8]制备不含山药的阴性样品,按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

2.3 方法学考察^[10-11]

专属性试验:精密吸取2.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,结果分离度大于1.5,尿囊素峰理论板数超过4 000,阴性对照无干扰。色谱图见图1。

线性关系考察:精密吸取2.2项下尿囊素对照品溶液(质量浓度为3.606 mg/mL)适量,加甲醇稀释成质量浓度分别为18.03,36.06,72.12,144.2,288.50 μg/mL的系列对照品溶液,以尿囊素质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.3277X + 1.0737$, $r = 0.9999$ ($n = 5$)。结果表明,尿囊素质量浓度在18.03~288.50 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取尿囊素对照品溶液(质量浓度为36.06 μg/mL)适量,按2.1项下色谱条件进样测定6次。结果保留时间和峰面积积分值的RSD分别为0.13%和1.72% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:取样品(批号为2018902)适量,依法制备供试品溶液,共6份,按2.1项下色谱条件进样测定。结果的RSD为1.20% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

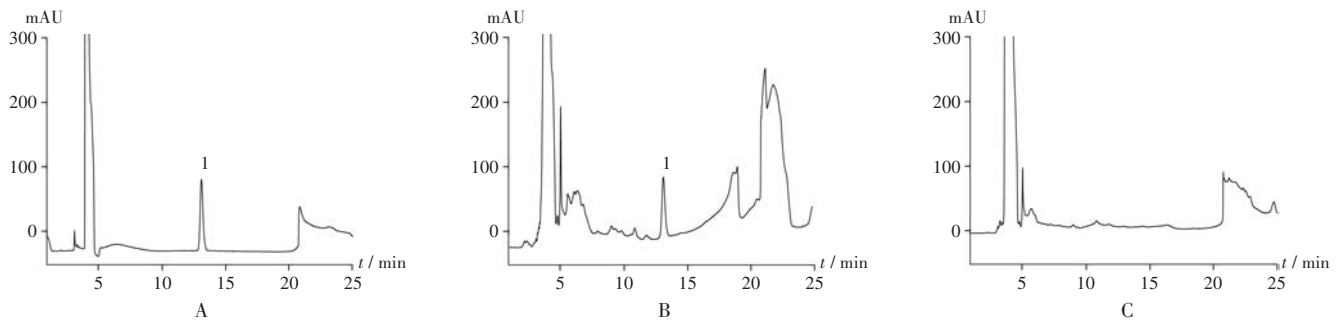
稳定性试验:取样品(批号为2018902)适量,依法制备供试品溶液,分别于制备后0,3,8,13,18,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定。结果峰面积的RSD为0.80% ($n = 6$),表明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

加样回收试验:精密量取样品(批号为2018902,质量浓度为0.2904 mg/mL)5 mL,共9份,分别置25 mL容量瓶中,按50%,100%,150%比例分别加入尿囊素对照品溶液(质量浓度为0.2885 μg/mL),各3份,依法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算含量。结果见表1。

耐用性试验:在2.1项下色谱条件基础上,通过改变色谱柱(Waters XBridge Amide柱、Welch XB-NH₂柱、Agela Innoval Durashell NH₂柱)、流动相(低组分流动相比比例变化±5%)、柱温[(30±5)℃]、流速[(1.0±0.2) mL/min]、检测波长[(191±2) nm],考察方法耐用性。结果不同色谱条件下样品测定含量与拟订方法测定含量的RSD均不超过3.60%,表明方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取3批(批号分别为2018901,2018902,2018203)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算含量。结果每1 mL样品中尿囊素含量分别为0.22,0.29,0.30 mg,平均为0.27 mg。



1. 尿囊素
A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Allantoin

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果(n=9)

Tab. 1 Results of the recovery test (n=9)

样品含量(mg/mL)	加入量(mg/mL)	测得量(mg/mL)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
0.290 4	0.144 2	0.436 7	101.46		
0.290 4	0.144 2	0.431 7	97.99		
0.290 4	0.144 2	0.430 6	97.23		
0.290 4	0.288 5	0.582 2	101.14		
0.290 4	0.288 5	0.578 6	99.90	99.70	1.40
0.290 4	0.288 5	0.580 6	100.59		
0.290 4	0.432 7	0.723 8	100.16		
0.290 4	0.432 7	0.719 6	99.19		
0.290 4	0.432 7	0.721 6	99.65		

3 讨论

3.1 前处理方法改进

原标准^[8]含量测定项下尿囊素测定方法先用乙醇提取、离心、上清液浓缩、冷藏、浓缩,再重复提取1次,用水定容。操作烦琐、费时,且提取效果和方法重复性均较差。现修订方法采用甲醇超声提取,极大地简化了提取步骤,操作简单、省时,方法重复性好。

3.2 色谱方法改进

原标准^[8]高效液相色谱分析采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的反向色谱柱,该类型色谱柱对尿囊素类极性较大物质的保留能力很弱,导致尿囊素出峰时间过早,无法与制剂中的干扰物质完全分离,专属性较差,无法满足分析要求;检测波长为201 nm,并非尿囊素色谱峰的最大吸收波长,灵敏度有待提高。现修订方法采用以丙基酰胺键合硅胶为填充剂的正向色谱柱,对极性物质选择性更强,保留能力和专属性均增强,采用乙腈-水(94:6, V/V)为初始流动相进行目标组分的分离,后用乙腈-水(80:20, V/V)洗脱保留更强的

杂质峰,有效节省了分析时间;更换检测波长为191 nm,更接近尿囊素的最大吸收波长,提高了检测灵敏度,达到了分析要求。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、结果准确,可用于小儿生血糖浆中尿囊素的含量测定,为其质量控制提供技术支撑。

参考文献

- [1] 崔雁. 小儿生血糖浆治疗缺铁性贫血50例疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2005, 14(2): 171-172.
- [2] 邓丽莎, 刘翠瑛, 莫珊, 等. 小儿生血糖浆治疗小儿营养性贫血57例[J]. 湖北中医杂志, 2002, 24(1): 33.
- [3] 夏天. 对比分析小儿生血糖浆与富马酸亚铁治疗儿童缺铁性贫血效果[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(3): 183-184.
- [4] YOON KD, CHIN YM, YANG H, et al. Determination of allantoin in Dioscoreae Rhizoma by HPLC using CN Column[J]. Planta Medica, 2007, 73(9): 913.
- [5] 朱群英, 张亚锋, 苏超男, 等. HILIC-HPLC双波长法测定山药中尿囊素和腺苷的含量[J]. 西北药学杂志, 2018, 33(3): 334-336.
- [6] 胡翮, 李昂. 反相高效液相色谱法测定保健品纯怀山药粉中尿囊素的含量[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(8): 1520-1523.
- [7] 郭新华, 牛卫宁, 胡玉霞. 小儿生血颗粒质量标准研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(3): 45-46.
- [8] WS₃-B-2654-97-2, 卫生部颁药品标准·中药成方制剂第十四册[S].
- [9] 王薇, 刘祖雄, 覃贝. 2008年山药及其制剂临床应用文献综述[J]. 中国药业, 2010, 19(7): 85-86.
- [10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 30.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 480-483.

(收稿日期: 2021-09-01; 修回日期: 2022-03-17)