

高效离子交换色谱法测定肌氨肽苷注射液中次黄嘌呤含量

白璧炜^{1,2}, 刘永成², 岳云飞², 王春贺², 王常禹², 孙晖^{1*} (1.黑龙江中医药大学国家中医药管理局中医方证代谢组学研究中心, 哈尔滨 150040; 2.黑龙江省药品检验研究院, 哈尔滨 150087)

摘要: 目的 建立采用磺酸基阳离子交换键合硅胶的离子交换色谱法, 对肌氨肽苷注射液中次黄嘌呤含量进行测定。方法 采用磺酸基阳离子交换键合硅胶色谱柱; 水(硫酸调节 pH 值至 2.5±0.1)为流动相; 二极管阵列检测器, 检测波长为 260 nm; 流速 0.8 mL·min⁻¹; 柱温 30 °C。结果 次黄嘌呤在 1~50 µg·mL⁻¹ 线性良好, 平均回收率为 99.0%。结论 该方法操作简便, 色谱图基线稳定, 主成分峰形对称, 分离度高, 方法的重复性和耐用性好、准确度高, 可用于肌氨肽苷注射液中次黄嘌呤的含量测定。

关键词: 肌氨肽苷注射液; 次黄嘌呤; 离子交换色谱法; 分离度; 定量分析

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)03-0339-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.009

引用本文: 白璧炜, 刘永成, 岳云飞, 等. 高效离子交换色谱法测定肌氨肽苷注射液中次黄嘌呤含量[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(3): 339-342.

Determination of Hypoxanthine in Muscular Amino Acids and Peptides and Nucleosides Injection by High Efficiency Ion Exchange Chromatography

BAI Biwei^{1,2}, LIU Yongcheng², YUE Yunfei², WANG Chunhe², WANG Changyu², SUN Hui^{1*} (1. Research Center of Traditional Chinese Medicine Prescription Metabolomics, National Administration of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Heilongjiang Institute for Drug Control, Harbin 150087, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determining content of hypoxanthine in Muscular Amino Acids and Peptides and Nucleosides injection by ion used exchange chromatography of sulfonic cation exchange bonded silicone. **METHODS** The ion chromatographic column used exchange chromatography of sulfonic cation exchange bonded silicone were adopted, the mobile phase was water(pH adjusted to 2.5±0.1 with sulfuric acid) at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C, the photo-diode array detector was used with the detection wavelength of 260 nm. **RESULTS** There was a good linear relationship of hypoxanthine in the concentration of 1–50 µg·mL⁻¹. The average recovery was 99.0%. **CONCLUSION** The method has the advantages of simple operation, stable chromatogram baseline, symmetrical principal component peaks, high resolution, good repeatability, durability and high accuracy. It can be used for the determination of hypoxanthine in Muscular Amino Acids and Peptides and Nucleosides injection

KEYWORDS: Muscular Amino Acids and Peptides and Nucleosides injection; hypoxanthine; ion exchange chromatography; separation degree; quantitative analysis

肌氨肽苷注射液现行标准^[1]测定次黄嘌呤含量, 流动相为磷酸二氢钾(0.001 mol·L⁻¹, pH 6.9)-甲醇(100:0.2), 色谱柱为十八烷基键合硅胶填充剂, 流动相基本为纯水相, 色谱柱使用较短时间, 色谱柱使用几次后次黄嘌呤与黄嘌呤的分离度不能满足现行标准的要求^[2]。2014 年国家评价性抽样明确指出了肌氨肽苷注射液现行标准次黄嘌呤含量测定的 HPLC 方法的不合理问题^[3], 检索 2015 年以来的有关文献, 发现科学家为解决次黄嘌呤及该类物质在复杂基质中的定量问题, 开发了各

种方法例如液质联用技术或探针, 为去除基质干扰寻求专属性强方法并增加测定效率^[4-6]。在肌氨肽苷注射液的测定中发现, 对次黄嘌呤色谱峰产生干扰的不仅有黄嘌呤, 还另有其他物质。在调研中发现部分厂家为增加二者分离度以满足现行标准要求, 在流动相中加入四氢呋喃, 但四氢呋喃毒性较大且对仪器有一定的腐蚀性。次黄嘌呤属于核苷类物质, 含氮基团。磺酸基阳离子交换键合硅胶色谱柱对许多化合物具有高选择性和适宜的保留作用, pH 稳定性为 2~8, 适合分离

基金项目: 国家生化药标准提高项目(174)

作者简介: 白璧炜, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: 676306826@qq.com

*通信作者: 孙晖, 女, 博士, 主任药师 E-mail: Sunhui0745@163.com

阳离子、含氮化合物以及中性化合物,例如分离利巴韦林^[7-9]、中药中生物碱类^[10]、蛋白及多肽类物质^[11-12]等。磺酸基阳离子交换键合硅胶色谱柱用于生化药品中次黄嘌呤的含量测定国内鲜有报道,本实验考察该方法的可行性。

1 仪器与试剂

U3000RSLC 高效液相色谱仪, DAD 紫外检测器(Thermo Fisher); Waters S5 SCX 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 艾杰尔 Venusil SCX(T) 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 资生堂 UG-80A SCX 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 艾杰尔 Venusil MP C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); XS205DU 电子天平(梅特勒-托利多); 超声仪(宁波生物科技股份有限公司); Advantage A10 超纯水机(Milli-Q)。

磷酸二氢钾(分析纯)、硫酸(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司; 甲醇(色谱纯, 美国赛默飞世尔公司); 对照品: 次黄嘌呤(批号: 140661-201704; 供含量测定用)、黄嘌呤(批号: 140662-200802; 供系统适应性试验用)均由中国食品药品检定研究院提供; 肌氨肽苷注射液(1 号厂家, 批号: 20161201; 2 号厂家, 批号: 1505012, 150203, 150502, 160604, 160603, 161201, 161103; 3 号厂家, 批号: 20161202, 20161203; 4 号厂家, 批号: 201601052, 201601142, 201701092, 201701112, 201608262)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

磺酸基阳离子交换键合硅胶为色谱柱; 以水(用硫酸调节 pH 值至 2.5±0.1)为流动相; 检测波长: 260 nm; 流速: 0.8 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液

2.2.1.1 次黄嘌呤对照品溶液 精密称取次黄嘌呤对照品 12.5 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 0.5 mol·L⁻¹ 的硫酸溶液溶解并稀释至刻度作为对照品储备溶液。精密量取对照品储备溶液 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 制成每 1 mL 中含 10 μg 的溶液作为次黄嘌呤对照品溶液。

2.2.1.2 黄嘌呤对照品溶液 精密称取黄嘌呤对照品 12.5 mg 置 50 mL 量瓶中, 加 0.5 mol·L⁻¹ 的硫酸溶液溶解并稀释至刻度, 制成每 1 mL 中含黄嘌呤 0.25 mg 的溶液作为黄嘌呤对照品储备液。

2.2.1.3 系统适应性溶液 精密量取“2.2.1.1”项

下的次黄嘌呤对照品储备液 10 mL 与“2.2.1.2”项下的黄嘌呤对照品储备液 1 mL 至 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度。制成每 1 mL 中含次黄嘌呤 25 μg 与黄嘌呤 2.5 μg 的系统适应性溶液。黄嘌呤与次黄嘌呤的分离度应符合要求。现行标准系统适应性色谱图见图 1, 新方法系统适应性色谱图见图 2。

2.2.2 供试品溶液 精密量取肌氨肽苷注射液 1 mL 置 25 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度制成每 1 mL 中含次黄嘌呤 10 μg 的溶液作为供试品溶液。现行标准系供试品色谱图见图 1, 新方法供试品色谱图见图 2。

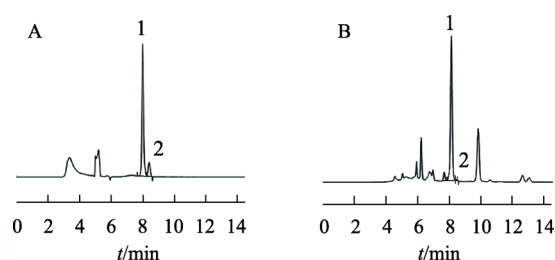


图 1 现行标准离子交换色谱图

A-系统适应性溶液; B-供试品溶液; 1-次黄嘌呤; 2-黄嘌呤。

Fig. 1 Ion exchange chromatogram of current standard

A-system suitability solution; B-test solution; 1-hypoxanthine; 2-xanthine.

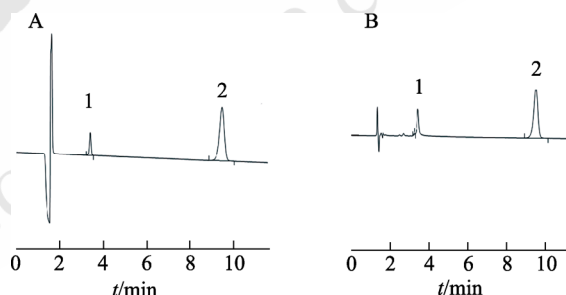


图 2 新建方法离子交换色谱图

A-系统适应性溶液; B-供试品溶液; 1-黄嘌呤; 2-次黄嘌呤。

Fig. 2 Ion exchange chromatogram of new method

A-system suitability solution; B-test solution; 1-hypoxanthine; 2-xanthine.

2.3 方法学考察

2.3.1 线性关系考察 精密称取次黄嘌呤对照品 50 mg 至 50 mL 量瓶中, 作为标准储备溶液。分别精密量取 1, 2, 3 mL 至 100 mL 量瓶中, 得到浓度为 10, 20, 30 μg·mL⁻¹ 的线性标准溶液, 再从标准储备液中精密量取 1 mL 溶液分别置于 25 mL 和 20 mL 量瓶中, 得到浓度为 40 μg·mL⁻¹ 与 50 μg·mL⁻¹ 的线性标准溶液。以次黄嘌呤的峰面积(Y)为纵坐标, 质量浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 线性方程为 $Y=1.3048X$, $r=0.9995$, 线性关系

良好。

2.3.2 仪器精密度试验 精密量取“2.2.1.1”项下的对照品溶液，连续进样 6 次，次黄嘌呤峰面积 RSD 为 0.3%。

2.3.3 稳定性试验 精密量取“2.2.2”项下制备的供试品溶液 20 μL ，分别在 0, 2, 4, 6, 8, 24 h 时测定，供试品次黄嘌呤峰面积的 RSD 为 0.5%。

2.3.4 重复性试验 按照“2.2.2”项下方法，制备 4 号厂家批号为 201601052 的样品 6 份，测定次黄嘌呤的含量，平均含量为 96.6%，RSD 为 0.5%。

2.3.5 回收率试验 精密量取 4 号厂家批号为 201601052 的样品(含量为 103.2%)0.5 mL 与“2.2.1.1”项下的次黄嘌呤对照品储备液(精密称取次黄嘌呤对照品 14.62 mg 加入 0.5 mol·L⁻¹ 硫酸溶解并稀释至 50 mL 量瓶)0.5 mL 置于 25 mL 量瓶并稀释至刻度，制备 6 份样品。回收率的平均值为 99.0%，RSD 为 1.0%，测定结果见表 1。

表 1 回收率测定结果($n=6$)

Tab. 1 Recovery test results ($n=6$)

原有量/ μg	加入量/ μg	测定量/ μg	回收率/%	RSD/%
129.0	146.2	272.8	98.17	1.0
129.0	146.2	273.1	98.34	
129.0	146.2	272.0	97.51	
129.0	146.2	275.2	100.01	
129.0	146.2	274.7	99.60	
129.0	146.2	274.5	99.47	

2.3.6 耐用性试验 选取 3 种不同品牌色谱柱，进行耐用性考察。次黄嘌呤主峰理论板数均>2 000，耐用性良好。3 种不同品牌色谱柱对批号为 201601142 样品进行含量测定，通过对比 3 种品牌的磺酸基阳离子色谱柱，测定结果分别为 99.2%，99.5%与 98.9%，RSD 为 0.3%。测定结果表明新方法耐用性良好。

2.4 结果

15 批次肌氨肽苷注射液分别按照现行标准与新方法进行测定，结果见表 2。测定结果为现行标准次黄嘌呤含量在 102.3%~121.8%，新方法含量在 87.9%~106.7%，结果见表 2。

3 讨论

3.1 pH 值对保留行为的影响

磺酸基阳离子键合硅胶色谱柱的 pH 值耐用范围为 2~8。调节流动相 pH 值 2.2, 2.5, 2.8 与 3.5，测定后发现黄嘌呤的保留时间未变，次黄嘌呤

的保留时间随着 pH 值增大而增加。在 pH 2.2~3.5 时，次黄嘌呤相对黄嘌呤的保留时间随着 pH 值的改变呈线性关系($Y=0.677\ 5X+1.572\ 8$, $R=0.99$)。各 pH 值条件下的色谱图见图 3，观察次黄嘌呤与黄嘌呤的分离情况，不同 pH 值条件下测定结果的比较见表 3，pH 2.2 接近柱子的最低允许值对色谱柱有一定损伤，pH 3.5 时次黄嘌呤色谱峰

表 2 现行标准方法与新方法含量测定结果比较($n=2$)

Tab. 2 Comparison of determination results between the current standard method and the new method($n=2$) %

厂家	批号	现行方法 含量结果	新方法 含量结果	RSD
1	201601142	103.8	95.2	4.3
2	201701092	106.8	91.7	7.6
2	201701112	109.8	96.5	6.4
2	201608262	108.7	95.1	6.7
2	201601142	102.3	87.9	7.6
2	201701092	112.4	94.5	8.6
2	201701112	104.6	89.5	7.7
2	201608262	108.1	93.7	7.1
3	201601142	121.8	99.2	10.3
3	201701092	120.9	96.5	11.2
4	201601052	113.2	103.2	4.6
4	201608262	109.7	97.0	6.2
4	201601142	107.7	95.7	5.9
4	201701092	111.5	98.8	6.0
4	201701112	121.4	106.7	6.5

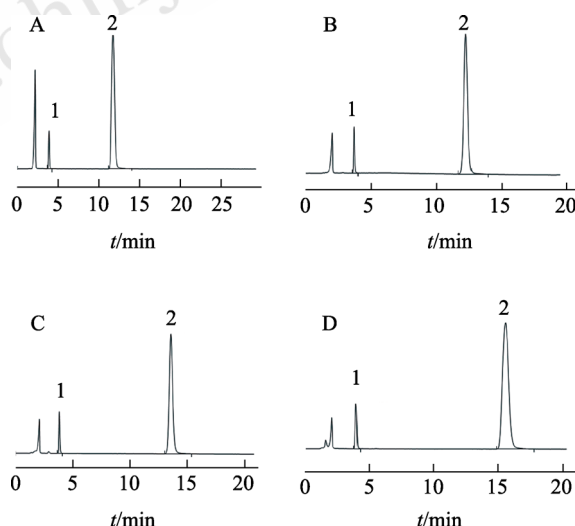


图 3 不同流动相 pH 值下的离子交换色谱图

A-流动相 pH 为 2.2; B-流动相 pH 为 2.5; C-流动相 pH 为 2.8; D-流动相 pH 为 3.5; 1-黄嘌呤; 2-次黄嘌呤。

Fig. 3 Ion exchange chromatogram of mobile phase with different pH values

A-mobile phase pH was 2.2; B-mobile phase pH was 2.5; C-mobile phase pH was 2.8; D-mobile phase pH was 3.5; 1-xanthine; 2-hypoxanthine.

表 3 不同 pH 值条件下测定结果比较($n=4$)

Tab. 3 Comparison of determination results under different pH values($n=4$)

pH 值	峰宽/min	理论板数	分离度
2.2	0.68	4 446	16.81
2.5	0.52	9 260	26.17
2.8	0.58	9 670	28.21
3.5	0.87	4 656	20.18

明显展宽且保留时间延长, pH 值为 2.5 与 2.8 时的色谱峰宽最窄且理论板数最高。pH 值 2.5 与 2.8 相比较, 2.5 时次黄嘌呤出峰时间较快, 因此选择 pH(2.5±0.2)为新建方法的 pH 值。

根据次黄嘌呤与黄嘌呤的理化性质^[13], pH 值与在流动相 pH 值为 2.5 时, 次黄嘌呤有约 38% 的荷正电离子存在, 而黄嘌呤几乎在此流动相条件下无解离, 与实验结果一致。

3.2 2 种方法测定结果讨论

采用现行标准进行含量测定的 3 批样品, 次黄嘌呤含量超限(标准规定为 85.0%~115.0%)。原因为肌氨肽苷注射液的基质较复杂, 从色谱图中可以看出十八烷基键合硅胶柱测定含量时, 不仅黄嘌呤对次黄嘌呤的含量产生干扰, 另有其他物质对主峰产生干扰, 提示原方法专属性不强。采用磺酸基阳离子交换柱含量均在标准规定的范围内, 且磺酸基阳离子交换柱次黄嘌呤峰的周围无干扰, 同时有文献^[14]指出核苷类物质采用“离子交换色谱受基质干扰较少”。对 2 组数据(均通过了正态分布检验)进行经配对样本的 T 检验, 存在极显著差异($1.7 \times 10^{-9} < 0.05$), 提示新方法建立的必要性。另外本方法无需使用黄嘌呤对照品进行系统适用性试验, 节省成本并节约时间。

3.3 对照品溶解性问题

次黄嘌呤与黄嘌呤在水中的溶解度不理想, 易溶解于稀酸与稀碱中, 因此新方法中对照品溶解和稀释采用 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸, 方法稳定性及重复性均良好。

本研究所建立的方法适用于含氮类型化合物, 尤其是基质复杂样品的测定, 例如生化药中

核苷类成分及中成药中生物碱类成分。本方法可以作为一个通用的检测方法, 具有广泛的适用性。

REFERENCES

- [1] 化学药品地方标准上升国家标准第十六册[S]. 2003: 79-80.
- [2] 中国药品检验标准操作规范 2019 年版[S]. 2019: 175-176.
- [3] SHAO C J, HE J H, LU L, et al. Discussion on content determination of hypoxanthine in muscular amino acids peptides and nucleosides injection[J]. Chin J Drug Eval(中国药物评价), 2015, 32(3): 142-143.
- [4] WANG C, ZHANG Y, MENG L, et al. Simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on poly(3-amino-5-mercapto-1, 2, 4-triazole)/multi-walled carbon nanotubes modified glassy carbon electrode[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2017, 36(9): 1124-1128.
- [5] WANG X R, ZHAO X Z, WANG X M, et al. SPE-LC-MS/MS method for determination of hypoxanthine concentration in Shuxuetong injection[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med(天津中医药大学学报), 2019, 38(5): 478-481.
- [6] LUO Y Y, LIU J X, LIU X H, et al. Simultaneous determination of nucleosides and nucleobases in Polygoni Multiflori Radix from different origins by UPLC-QTRAP- MS/MS[J]. J Instrum Anal(分析测试学报), 2015, 34(5): 519-524.
- [7] 中国药典. 二部[S]. 2020: 486-487.
- [8] USP40-NF35[S]. 2016: 5995-5996.
- [9] IP2010[S]. 2010: 2050-2051.
- [10] LIU Q, JIANG S Y, TIAN S J. Analysis of some alkaloids in Chinese traditional medicine using HPLC on microparticulate strong cation-exchange materials[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2004, 21(1): 64-67.
- [11] ZHANG Z B, WANG F J, XU B, et al. Preparation of capillary hybrid monolithic column with sulfonate strong cation exchanger for proteome analysis[J]. J Chromatogr A, 2012(1256): 136-143.
- [12] HUANG Z, FISH W P. Development of simple isocratic HPLC methods for siRNA quantitation in lipid-based nanoparticles[J]. J Pharm Biomed Anal, 2019(172): 253-258.
- [13] Chemicalize Features[K/OL]. <https://chemicalize.com/app/calculation>.
- [14] WEI R Q, YANG Y, ZHANG T T, et al. Determination of ribavirin injection by HPLC with homemade cation(strongly acidic) chromatogram column-I[J]. Ion Exch Adsorption(离子交换与吸附), 2007, 23(2): 119-128.

收稿日期: 2021-02-21

(本文责编: 李艳芳)