

高效阳离子交换色谱法测定尿素^[13C]胶囊中尿素的含量^Δ

刘桂霞^{1*}, 姚静², 左利民¹, 李盼盼¹, 山广志¹, 姜威^{1#}(1.中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2.中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)09-1236-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.09.23

摘要 目的: 采用高效阳离子交换色谱法测定尿素^[13C]胶囊中尿素的含量。方法: 色谱柱为 Zorbax 300 SCX, 流动相为乙腈-0.1% 磷酸溶液(20:80, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 200 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 20 μL。结果: 尿素检测质量浓度线性范围为 0.003 9~1.003 0 mg/mL($r=0.999 7$); 定量限为 3.918 μg/mL, 检测限为 0.975 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD<2.0%; 加样回收率为 99.3%~101.0%(RSD=0.67%, $n=9$)。结论: 该方法简便、快速、灵敏, 适用于尿素^[13C]胶囊中尿素的含量测定。

关键词 尿素^[13C]胶囊; 尿素; 含量测定; 阳离子交换法

Content Determination of Urea in Urea ^[13C] Capsules by High Performance Cation-exchange Chromatography

LIU Guixia¹, YAO Jing², ZUO Limin¹, LI Panpan¹, SHAN Guangzhi¹, JIANG Wei¹(1.Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China; 2.National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To determine the content of urea in Urea ^[13C] capsules by high performance cation-exchange chromatography (HPCEC). METHODS: The determination was performed on Zorbax 300 SCX column with mobile phases consisting of acetonitrile-0.1% phosphoric acid (20:80, V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 200 nm and column temperature was 35 °C. The sample size was 20 μL. RESULTS: The linear range of urea was 0.003 9-1.003 0 mg/ml($r=0.999 7$). The limit of quantitation was 3.918 μg/mL and the limit of detection was 0.975 μg/mL. RSDs of precision, stability and repetitive test were all lower than 2.0%. The recovery ranged 99.3%-101.0% (RSD=0.67%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, rapid, sensitive and suitable for the content determination of urea in Urea ^[13C] capsules.

KEYWORDS Urea ^[13C] capsules; Urea; Content determination; High performance cation-exchange chromatography

尿素^[13C]胶囊是一种非放射性的同位素药物,常用于胃幽门螺旋杆菌(Hp)感染的非侵入性诊断^[1],其尿素含量直接影响诊断结果的准确性^[2-4],因此检测和控制尿素含量具有重要意义。2015年版《中国药典》未收录尿素^[13C]胶囊中尿素含量的测定方法;现有尿素原料及制剂的含量测定方法主要包括显色-紫外分光光度法、液相色谱法、液相色谱-质谱法^[5-10]等。显色-紫外分光光度法的操作较为烦琐,液相色谱法、液相色谱-质谱法所用色谱柱耐用性较差。因此,本课题组结合尿素的特性(即尿素属极性小分子化合物,呈弱碱性),采用阳离子交换机制的色谱柱,建立了高效阳离子交换色谱法测定尿素^[13C]胶囊中尿素含量的方法,以期为该制剂的质量控制方法的建立提供参考。

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81573474);中国医学科学院医学与健康科技创新工程系统创新团队基金(No.2016-I2M-3-010)

* 硕士研究生。研究方向:药物分析。E-mail:13051320081@163.com

通信作者:研究员,博士。研究方向:药物分析。电话:010-63021345。E-mail:jiangwei@imb.pumc.edu.cn

1 材料

1.1 仪器

UltiMate 3000型高效液相色谱(HPLC)仪,包括双三元低压梯度泵、自动在线脱气机、自动进样器、柱温箱、可变波长检测器及变色龙7.2工作站(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); ME204型电子分析天平、XP205型电子分析天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司); SCAA-104型有机相针式过滤器(上海安谱科学仪器有限公司,规格:0.22 μm); SCAA-102型水相过滤膜(上海安谱科学仪器有限公司,规格:0.22 μm); Milli-Q Advantage A10型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

尿素^[13C]胶囊(深圳市某企业,批号:05150705、05150710,规格:75 mg/粒);尿素对照品(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:#BCBP0904V,纯度:99.7%);乙腈为色谱纯,磷酸为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Zorbax 300 SCX(250 mm×4.6 mm, 5 μm);

流动相:乙腈-0.1%磷酸溶液(20:80, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:200 nm;柱温:35 ℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液的制备

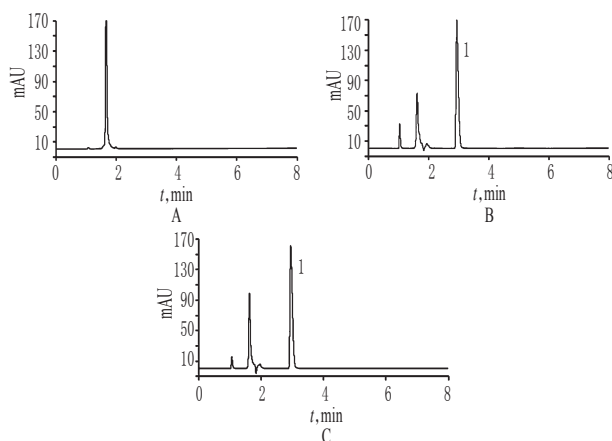
2.2.1 对照品溶液 精密称取尿素对照品 50.30 mg,置于 25 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容,摇匀,作为对照品贮备液。取上述对照品贮备液适量,置于 25 mL 量瓶中,用流动相定容,摇匀,即得每 1.0 mL 中约含尿素 0.5 mg 的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品内容物 12.57 mg,置于 25 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容,摇匀,即得每 1.0 mL 中约含尿素 0.5 mg 的供试品溶液。

2.2.3 空白对照溶液 取流动相适量,置于 25 mL 量瓶中,作为空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液和空白对照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 1。由图 1 可知,在该色谱条件下,各成分均能达到基线分离,分离度 > 1.5;理论板数以尿素峰计 > 5 000,保留时间为 2.970 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.空白对照;B.对照品;C.供试品;1.尿素

A. blank control; B. substance control; C. test sample; 1. urea

图 1 系统适用性试验高效阳离子交换色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

2.4 破坏性试验

2.4.1 氧化破坏样品溶液 取样品(批号:05150705)适量,置于 25 mL 量瓶中,加 30%过氧化氢溶液 1.0 mL,于室温下放置 1 h 后,用流动相溶解并定容(每 1.0 mL 中约含尿素 0.5 mg),摇匀,即得。

2.4.2 光照破坏样品溶液 取样品(批号:05150705)适量,置于 25 mL 量瓶中,用流动相溶解并定容(每 1.0 mL 中约含尿素 0.5 mg),摇匀,置于紫外光灯(254 nm)下照射 24 h,即得。

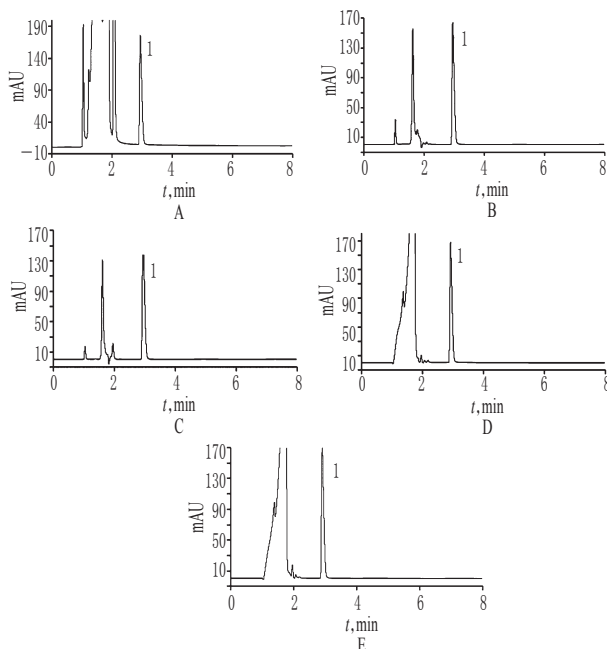
2.4.3 高温破坏样品溶液 取样品(批号:05150705)适量,置于 100 ℃烘箱中加热 1 h,取出放至室温,加流动相

溶解,转移至 25 mL 量瓶中,用流动相定容(每 1.0 mL 中约含尿素 0.5 mg),摇匀,即得。

2.4.4 酸破坏样品溶液 取样品(批号:05150705)适量,置于 25 mL 量瓶中,加 1 mol/L 盐酸溶液 1.0 mL,于室温下放置 1 h 后,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1.0 mL,调节 pH 为 7.0,用流动相溶解并定容(每 1.0 mL 中约含尿素 0.5 mg),摇匀,即得。

2.4.5 碱破坏样品溶液 取样品(批号:05150705)适量,置于 25 mL 量瓶中,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1.0 mL,于室温下放置 1 h 后,加 1 mol/L 盐酸溶液 1.0 mL,调节 pH 为 7.0,用流动相溶解并定容(每 1.0 mL 中约含尿素 0.5 mg),摇匀,即得。

取上述溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图 2。由图 2 可知,在该色谱条件下,本品经氧化破坏、光照破坏、高温破坏、酸破坏、碱破坏后,产生杂质峰,但杂质峰与尿素峰之间的分离度均符合要求,不干扰主成分测定。



A.氧化破坏;B.光照破坏;C.高温破坏;D.酸破坏;E.碱破坏;1.尿素

A. destroyed by oxidation; B. destroyed by light; C. destroyed by heat; D. destroyed by acid; E. destroyed by alkaline; 1. urea

图 2 破坏性试验高效阳离子交换色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive test

2.5 线性关系考察

取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,用流动相逐级稀释,制备质量浓度分别为 1.003 0、0.501 5、0.250 7、0.125 4、0.062 7、0.031 3、0.015 7、0.007 8、0.003 9 mg/mL 的系列对照品溶液。取上述系列对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以尿素质量浓度(x , mg/mL)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得尿素回归方程为 $y=28.2x+0.204 1$ ($r=0.999 7$)。结果表明,尿素检测质量浓度线性范围为 0.003 9~1.003 0 mg/mL。

2.6 定量限与检测限考察

取“2.2.1”项下对照品溶液适量,倍比稀释,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得定量限(LOQ),当信噪比为3:1时,得检测限(LOD)。结果,尿素的LOQ为3.918 μg/mL,LOD为0.975 μg/mL。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下对照品溶液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,尿素峰面积的RSD=0.11% (n=6),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:05150710)适量,分别于室温下放置0、2.5、6、8、10、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,尿素峰面积的RSD=1.66% (n=7),表明供试品溶液在室温下放置12 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取样品(批号:05150705)适量,共6份,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算平均含量。结果,尿素的平均含量为95.8%,RSD=0.62% (n=6),表明本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

取样品(批号:05150705)适量,共9份,各置于50 mL量瓶中,分别加入低、中、高质量的尿素对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果(n=9)
Tab 1 Results of recovery test(n=9)

取样量, mg	样品含量, mg	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
1.996	1.911	1.980	3.910	101.0		
1.996	1.911	1.980	3.900	100.5		
1.996	1.911	1.980	3.901	100.5		
1.996	1.911	2.988	4.900	100.0		
1.996	1.911	2.988	4.900	100.0	100.3	0.67
1.996	1.911	2.988	4.930	101.0		
1.996	1.911	3.978	5.860	99.3		
1.996	1.911	3.978	5.860	99.3		
1.996	1.911	3.978	5.923	100.9		

2.11 样品含量测定

取两批样品(批号:05150705、05150710)各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并以外标法计算尿素的含量。结果,两批样品中尿素的含量分别为96.7%、95.2% (n=3)。

3 讨论

3.1 流动相的选择

本课题组考察了乙腈-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%甲酸溶液分别作为流动相时的洗脱效果。研究发现,乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相时,色谱图基线平稳、峰形较

为对称,故本试验采用乙腈-0.1%磷酸溶液为流动相。

3.2 色谱柱的选择

本试验曾采用普通C₁₈柱进行测定,结果尿素不保留,且与溶剂峰难以分离^[11-12];采用氨基键和硅胶结合色谱柱虽可延长尿素的保留时间,但氨基基易水解;采用亲水作用模式的HILIC色谱柱,易引起基线波动,干扰测定;而采用阳离子交换机制的Zorbax 300 SCX色谱柱,能使色谱峰分离较好,且基线稳定。因此,采用Zorbax 300 SCX为本试验的色谱柱。

3.3 其他试验条件的选择

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:05150705)适量,在200 nm波长下检测不同流速(0.8、1、1.2 mL/min)、柱温(30、35、45 °C)对本试验的影响。结果,各条件下主峰理论板数均>7 000,主峰拖尾因子<2.0,主成分平均含量为94.8%,RSD均<2.0% (n=6),表明本方法对考察范围内流速、柱温变化耐用性好。

综上所述,本方法简便、快速、灵敏,适用于尿素^{[13]C}胶囊中尿素的含量测定。

参考文献

- [1] 祁小鸣,周步良,陈恕之.¹⁴C-尿素呼气试验检查幽门螺杆菌感染的临床应用[J].临床和实验医学杂志,2013,12(2):105-106.
- [2] 李静,陈天明,周孟如.尿素¹⁴C呼气实验诊断幽门螺杆菌感染[J].中外医学研究,2011,9(25):40.
- [3] Mattar R, Villares CA, Marostegam PFF, et al. Low dose capsule based ¹³C-urea breath test compared with the conventional ¹³C-urea breath test and invasive tests[J]. *Arg Gastroenterol*, 2014, 51(2):133-138.
- [4] 钟建国,宋天琦.高效色谱法测定尿素¹³C混合粉末中的尿素¹³C含量[J].同位素,2006,19(4):246-248.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:531-532.
- [6] 汪刚,张松,刘效筠.尿素维E珍珠乳膏的制备及质量控制[J].中国药房,2010,21(33):3126-3128.
- [7] 刘炜,孙颖,曾蔚欣,等.紫外分光光度法测定尿素乳膏中尿素的含量[J].天津药学,2011,23(6):19-20.
- [8] 李爱红,徐腾.HPLC法测定尿素维E乳膏中主药的含量[J].中国药师,2012,15(10):1444-1446.
- [9] Masha P, Matthew SP, Patrick LK, et al. Determining urea levels in exhaled breath condensate with minimal preparation steps and classic LC-MS[J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(9):1026-1032.
- [10] 刘丹,李志平,吴磊明,等.反相高效液相色谱法测定尿素乳膏的含量[J].今日药学,2015,25(4):266-270.
- [11] 金德磊,李建勇,周绪正,等.高效液相色谱法测定氢溴酸槟榔碱的含量[J].中国生化药物杂志,2008,36(34):14841-14842.
- [12] 谢向阳,李银科,李旻,等.HPLC法测定尿素软膏中尿素的含量[J].中国药师,2012,15(9):1279-1281.

(收稿日期:2016-09-30 修回日期:2016-12-11)

(编辑:刘柳)