

HPLC-RID 法测定辅料乳糖

马晓宁, 刘宏大, 张 硕, 齐 琰, 薛 雁, 王宏英

辽宁远大诺康生物制药有限公司, 辽宁 沈阳 110171

摘要: 目的 建立辅料乳糖的 HPLC-RID 检测方法。方法 色谱柱为 Boston Green Amino 氨基键合硅胶柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水 (70:30), 体积流量 1.0 mL/min, 柱温 45 ℃; 检测器为示差折光检测器, 检测器温度 40℃, 进样量 10 μL。结果 乳糖在 0.2~5.0 mg/mL 范围内线性关系良好 ($r \geq 0.9998$), 检测限为 0.06 mg/mL, 平均回收率为 99.6%, 相对标准偏差为 0.7%。结论 该方法专属性好、操作简便、快速准确, 适用于辅料乳糖的含量测定。

关键词: HPLC-RID; 乳糖; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)07-0942-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.07.012

Determination of accessories lactose by HPLC-RID

MA Xiao-ning, LIU Hong-da, ZHANG Shuo, QI Yan, XUE Yan, WANG Hong-ying

Liaoning Grand Nuokang Biopharmaceutical CO., LTD, Shenyang 110171, China

Abstract: Objective To establish a method for determination of accessories lactose by HPLC-RID. **Methods** Boston Green Amino-NH₂ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase was acetonitrile-water (70:30). The flow rate was 1.0 mL/min. The column temperature was 45 ℃, the detector temperature was 40 ℃ and the injection volume was 10 μL. **Results** Lactose showed good linearity in the range of 0.2—5.0 mg/mL ($r \geq 0.9998$). The detection limit was 0.06 mg/mL. The average recovery was 99.6% and the relative standard deviation was 0.7%. **Conclusion** The method is specific, convenient, fast and accurate, which can be used for determination of accessories lactose.

Key words: HPLC-RID; lactose; content determination

乳糖广泛用作片剂和胶囊剂的填充剂或稀释剂, 有时也用在冻干产品和婴儿食物配方中, 同时乳糖也可作为粉末吸入剂的稀释剂^[1]。乳糖不耐受是指由于体内乳糖酶缺乏导致乳糖消化吸收障碍而引起的腹胀、腹泻、腹痛等症状^[2]。亚洲人体质中乳糖不耐受的比例较高^[3], 乳糖不耐受者应用以乳糖为甜味剂的药品后可出现消化系统症状, 并且使用乳糖作为辅料的注射剂极易引起过敏反应, 在临床应用时会给企业造成较多麻烦, 而且乳糖用于注射剂时其纯度会影响产品的质量。因此, 乳糖作为制剂辅料时有必要进行监测, 应严格控制其纯度。本文将对乳糖的含量测定及有关物质进行方法学研究, 以便指导药用辅料乳糖含量的准确测定。

近几年, 测定乳糖的方法主要有高效液相色谱法^[4-8]、毛细管电泳-紫外检测法^[9]、阴离子交换色谱

-脉冲安培检测法^[10]、离子色谱法^[11]等, 早年还有旋光仪法^[12]、硫代硫酸钠滴定法^[13]等。毛细管电泳-紫外检测法测定乳糖时, 半乳糖会干扰其测定; 阴离子交换色谱-脉冲安培检测法需要复杂的仪器, 昂贵的色谱柱; 离子色谱法检测乳糖的样品前处理操作繁琐、灵敏度低; 早年应用的旋光法和滴定法需要各种腐蚀性试剂和较长的检验时间, 且化学法测得的是总糖或还原糖, 结果并不能测定出单糖的具体含量, 专属性较差。因此, 本文仍然采用高效液相色谱与示差检测器联用 (HPLC-RID) 检测辅料乳糖, 研究和建立一种操作简单、分析快速、结果准确、直接测定辅料乳糖的方法。本实验首次采用流动相保温法测定辅料乳糖的含量及有关物质, 能明显缩短示差检测器检测糖类时的流动相的平衡时间, 基线能持续平稳, 大大提高了工作效率, 为糖

收稿日期: 2017-02-20

作者简介: 马晓宁 (1981—), 硕士研究生, 工程师, 主要从事注射剂的研发与质量标准研究。E-mail: may8155@126.com

类检测方法提供了参考依据。

1 仪器、试剂与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪 (LC-10A, 日本岛津株式会社); 示差折光检测器 (RID-10A, 日本岛津株式会社); 电子分析天平 (BP211D 型, 赛多利斯) 等。

1.2 试剂

乳糖对照品 (批号 100058-201204, 中国食品药品检定研究院); DMV 乳糖 (供注射用) (批号 IX090017、JX210017、EW280017, 戴维林国际贸易 (上海) 有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯, 盐酸、氢氧化钠、双氧水为分析纯, 水为纯净水。

2 方法与结果^[14]

2.1 色谱条件与系统适用性试验

2.1.1 色谱条件 用氨基键合硅胶为填充剂; 以乙腈-水 (70:30) 为流动相, 流动相水浴 40℃ 保温; 示差折光检测器; 柱温 45℃, 检测器温度 40℃, 体积流量为 1.0 mL/min, 乳糖与蔗糖分离度应符合要求, 理论板数以乳糖计不得低于 5 000。

2.1.2 系统适用性试验 分别精密称定乳糖 9.86、10.11、10.03、10.05、9.89、10.02 mg, 按照供试品溶液制备项下方法配制 6 份供试品溶液, 分别精密量取 10 μL, 注入高效液相色谱仪, 记录色谱图, 计算主峰峰面积的相对标准差为 1.4%, 主峰保留时间的相对标准差为 1.4%。由色谱图 (图 1) 可知, 主峰拖尾因子均不大于 2.0, 主峰与杂质峰基线分离, 本方法系统适用性良好。

2.2 样品溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取乳糖对照品适量, 精密称定, 加水溶解并稀释制成约含乳糖对照品 1 mg/mL 的溶液, 即得。

2.2.2 供试品溶液的制备 含量测定供试品溶液: 取本品适量, 精密称定, 加水溶解并稀释成约含乳糖 1 mg/mL 的溶液, 即得。有关物质测定供试品溶液: 精密量取本品适量, 加水超声溶解, 制成含 100 mg/mL 的溶液, 即得。

2.2.3 自身对照溶液的制备 精密量取有关物质测定供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 制成 1 mg/mL 的溶液, 作为对照溶液。

2.2.4 空白溶液 取空白水溶剂作为空白溶液。

2.3 专属性

2.3.1 酸破坏 精密称取本品 10.09 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入浓 HCl 溶液 1 mL, 放置 12 h,

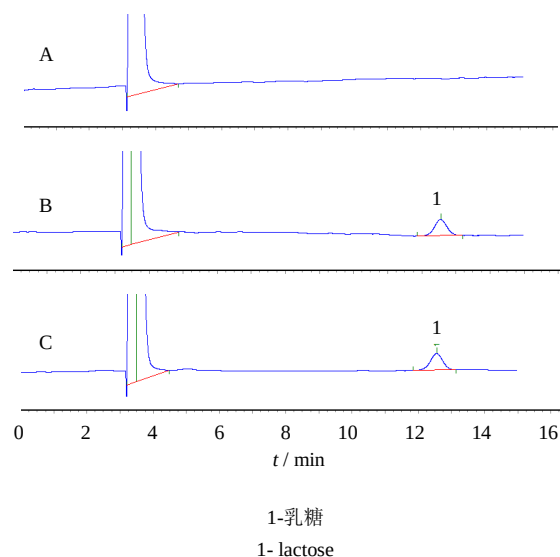


图 1 空白样品 (A)、乳糖对照品 (B)、乳糖样品 (C) 色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank sample (A), lactose reference substance (B) and lactose sample (C)

加水定容至刻度, 作为供试品溶液。

2.3.2 碱破坏 精密称取本品 10.15 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 5 mol/L NaOH 溶液 1 mL, 放置 5 h, 用 5 mol/L HCl 溶液调节至中性, 加水定容至刻度, 作为供试品溶液。

2.3.3 氧化破坏 精密称取本品 10.02 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加入 30% 双氧水溶液 9 mL, 放置 24 h, 加水定容至刻度, 作为供试品溶液。

2.3.4 高温破坏 精密称取本品 10.06 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 置 150℃ 烘箱中加热 2 h, 冷却后, 加水溶解并定容至刻度, 作为供试品溶液。

2.3.5 光照破坏 精密称取本品 10.12 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 在 4 500 lx 光照强度下照射 10 d 后, 加水定容至刻度, 作为供试品溶液。

精密量取上述供试品溶液各 10 μL, 注入液相色谱仪, 结果乳糖破坏产物检测结果显示未产生干扰主峰检测的色谱峰。结果表明, 本方法专属性强, 可用于辅料乳糖的含量与总杂质的测定。

2.4 线性关系考察

精密称定乳糖对照品 0.100 6 g, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并定容至刻度, 稀释成约含乳糖对照品 10.06 mg/mL 的溶液, 精密量取此对照品溶液 0.2、0.5、1、2、5 mL 加入 10 mL 量瓶中, 分别用水稀释并定容至刻度, 制成浓度分别约为 0.201 2、0.503 0、1.006、2.012、5.030 mg/mL 的乳糖对照品

溶液。照含量测定方法测定,以乳糖浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为 $Y=56\ 324\ x+586$, $R^2=0.999\ 8$ 结果表明乳糖在 0.201 2~5.030 mg/mL 线性关系良好。

2.5 定量限

精密称取乳糖对照品 0.100 6 g,加水溶解并稀释成约含乳糖对照品 1.006 mg/mL 的溶液,取此溶液 5 mL,加水稀释至 10 mL,记录信噪比,继续取此溶液 4 mL,加水稀释至 10 mL,精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪,使信噪比在 10:1 范围,测得乳糖的定量限为 0.20 mg/mL。配制 6 份最低定量限浓度的溶液,测得 6 份溶液乳糖峰保留时间的相对标准差为 0.6%,峰面积的相对标准差为 1.9%。

2.6 检测限

取定量限浓度下的溶液 3 mL,加水稀释至 10 mL,精密吸取 10 μ L 注入液相色谱仪,使信噪比大约为 3:1,测得乳糖的检测限为 0.06 mg/mL。

2.7 精密度试验

2.7.1 重复性试验

分别精密称定乳糖 9.86、10.11、10.03、10.05、9.89、10.02 mg,分别按照供试品溶液制备项下方法配制 6 份供试品溶液,分别精密量取 10 μ L,注入高效液相色谱仪,记录色谱图,每个样品进样 1 次,按外标法分别计算 6 个样品乳糖的质量分数,并计算 RSD 值,试验结果 RSD 为 0.6%。

分别称取乳糖样品 0.100 5、0.099 8、0.100 3、0.101 1、0.100 9、0.100 5 g,在 150℃ 高温下放置 2 h 后使杂质峰面积和达到限度值,分别按有关物质供试品溶液的制备方法制备 6 个样品,按自身对照溶液的制备方法同时制备 6 个自身对照溶液样品,每个样品进样 1 次,按自身对照法分别计算 6 个样品杂质质量分数之和,并计算 RSD 值,结果 RSD 为 2.2%。两项试验结果均表明方法学重复性良好。

2.7.2 中间精密度试验 更换液相色谱仪,由另一分析人员,使用另一台岛津 10A 高效液相色谱仪与配套的 RID-10A 示差检测器,同法对“重复性试验项下”的 6 份含量样品进行检测,按外标法分别计算 6 份样品乳糖的质量分数,并计算 RSD 值,试验结果 RSD 为 1.0%;同法对“重复性试验项下”的 6 份有关物质样品进行检测,按自身对照法分别计算 6 个样品杂质质量分数之和,并计算 RSD 值,结果 RSD 为 3.6%。两项试验结果均表明不同仪器测得样品质量分数的重复性良好。

2.8 耐用性试验

精密称取乳糖样品 9.96 mg,按含量供试品溶液的制备方法制备样品,摇匀,即得;称取乳糖样品 0.100 2 g,在 150℃ 高温下放置 2 h 后,按有关物质供试品溶液的制备方法制备样品,摇匀,即得。同下法测定。

在其他色谱条件不变的情况下改变柱温,分别在柱温 40℃、45℃、50℃ 条件下,精密量取各供试品溶液 10 μ L,注入液相色谱仪,连续进样 2 次,记录色谱图,考察乳糖峰的质量分数、拖尾因子、杂质质量分数之和。

在其他色谱条件不变的情况下改变流动相比例,分别在体积流量为 0.8、1.0、1.2 mL/min 条件下,精密量取各供试品溶液 10 μ L,注入液相色谱仪,连续进样 2 次,记录色谱图,考察乳糖的质量分数、拖尾因子、杂质质量分数之和。

由结果可知,柱温变化 $\pm 5^\circ\text{C}$ 以及流动相体积流量变化 $\pm 20\%$ 时,供试品主峰质量分数的 RSD 值分别为 0.9% 和 0.7%,主峰拖尾因子均不大于 2.0,主峰与杂质峰达到基线分离,杂质质量分数之和的 RSD 值分别为 1.6% 和 1.4%。试验结果表明,方法的耐用性良好。

2.9 稳定性试验

精密称取同批乳糖样品 10.12 mg,按含量供试品溶液的制备方法制备样品;称取同批乳糖样品 0.100 3 g,在 150℃ 高温下放置 2 h 后使杂质峰面积和达到限度值,按有关物质供试品溶液的制备方法制备样品。含量与有关物质样品均常温放置 12 h,分别在第 0、2、4、6、8、12 h 精密量取 10 μ L,注入液相色谱仪进行测定,计算得乳糖质量分数的 RSD 值为 1.0%,杂质质量分数之和的 RSD 为 1.4%,结果表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.10 回收率试验

精密称定乳糖对照品 0.101 4 g,置 10 mL 量瓶中,加水溶解并定容至刻度,摇匀,作为乳糖对照品贮备液。精密量取乳糖对照品贮备液 1 mL 至 10 mL 量瓶,加水定容至刻度,作为乳糖的对照品溶液。分别精密量取乳糖对照品贮备液 0.8、1.0、1.2 mL,置 10 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,制成 1 mL 的水溶液约含乳糖 1 mg 的 80%、100%、120% 的供试品溶液,每个浓度制备 3 份,精密量取乳糖对照品溶液和供试品溶液各 10 μ L 注入液相色谱仪,计算回收率。结果此方法测定乳糖含量的总

平均回收率为 99.6%，RSD 为 0.7%，说明本方法准确度良好。

2.11 样品测定

按供试品溶液的制备方法，3 批样品各配制 3 份样品溶液，精密量取对照品溶液与样品溶液各 10 μ L，注入液相色谱仪进行测定，计算 3 批乳糖的质量分数。结果见表 9。

表 1 3 批辅料乳糖样品的测定结果

Table 1 Determination of lactose in three batches of excipients

样品批号	乳糖/%	有关物质/%
IX090017	99.1	0
JX210017	100.8	0
EW280017	99.7	0

3 讨论

目前高效液相色谱法测定糖类多采用示差折光检测器和蒸发光散射检测器，也有用近年来发展起来的一种新型电喷雾检测器^[15]。电喷雾检测器与示差折光检测器和蒸发光散射检测器同属于通用型质量检测器，虽然灵敏度较高，但是由于是新研制出的检测器，普及率低，不便于日常监测，且色谱柱易受样品基体的污染，造成较高的分析成本；蒸发光散射检测器，价格昂贵，而且使用不便，需要引入高压氮气，不但提高了实验成本，且实验中产生的废气对身体有害，同时易受温度和氮气体积流量的影响，在实际应用中的分析结果并不十分理想。本实验所采用的示差折光检测器，是连续检测样品流路与参比流路间液体折光指数差值的检测器，同前两种检测器一样，对没有紫外吸收、荧光或电化学活性的物质以及产生末端紫外吸收的物质均能产生响应，对糖类检测灵敏度较高，仪器操作方便，样品前处理简单，降低了检测成本，提高了样品的分析速度，可获得精密而准确的分析结果，在实际检测工作中的实用价值更强。而且本方法选用的等度洗脱方法，方法简洁，可直接选用示差折光检测器检测。此检测器虽然基线受环境温度波动的影响较大，但本方法采用的流动相水浴保温法，克服了示差检测器检测糖类时系统平衡时间长的缺点，且在短时间内即能完成对乳糖及杂糖的良好分离。

本实验建立的辅料乳糖的检测方法，选择了可用于糖类分析的氨基键合硅胶柱、HPLC-RID 法等

度洗脱对辅料乳糖进行分离。检测限为 0.06 mg/mL，在 0.2~5.0 mg/mL 有良好的线性关系，且相关系数大于 0.999，平均回收率为 99.6%。本方法专属性、溶液稳定性、耐用性均良好，简单易行，能满足定量检测的要求，为辅料乳糖的检测提供理想的检测方法。

参考文献

- [1] 于丽娜, 孙会敏, 杨 锐, 等. 功能性辅料的发展和应
用 [J]. 中国药事, 2013, 27(6): 631.
- [2] 孙 俊, 杨 娜, 吴芝岳, 等. 无乳糖配方粉的研究进
展及应用 [J]. 食品安全导刊, 2016, 8: 74.
- [3] 王丽霞, 张 宇. 游离脂肪酸水平对于乳糖不耐症
的影响 [J]. 卫生职业教育, 2016, 34(6): 158.
- [4] 刘志辉, 曾玉梅, 李淑娟. HPLC-RID 法同时测定维
生素 EC 咀嚼片中维生素 C 葡萄糖蔗糖乳糖的含量 [J].
今日药学, 2016, 26(2): 115-117.
- [5] 陈少美. HPLC 示差折光分析法测定乳糖含量 [J]. 海
峡药学, 2011, 23(2): 37-38.
- [6] 吴基任. HPLC-ELSD 测定饮料中果糖、葡萄糖、蔗糖
和乳糖的含量 [J]. 热带农业科学, 2013, 33(6): 55-58.
- [7] 李公斌, 辛秀兰. HPLC-ELSD 法测定酸奶中乳糖的含
量 [J]. 食品研究与开发, 2011, 32(11): 99-101.
- [8] 尚 姝, 冯有龙. 高效液相色谱蒸发光散射检测器测
定保健食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖和
木糖 [J]. 西北药学杂志, 2014, 29(1): 27-31.
- [9] 张欢欢, 李 疆, 赵 珊, 等. 毛细管区带电泳-间接紫
外检测法快速测定食品中乳糖、蔗糖、葡萄糖和果糖
[J]. 色谱, 2015, 33(8): 816-821.
- [10] 张 岩, 刘玉秀. 离子色谱脉冲安培法测定无乳糖食
品饮料中乳糖含量 [J]. 中国无机分析化学, 2012, 2 增
(1): 65-66.
- [11] 蔡明明, 陈 启, 李 爽, 等. 离子色谱法测定人乳中
乳糖 [J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(7):
2054-2058.
- [12] 李述信, 译. AOAC 分析方法手册 [M]. 14 版. 北京:
中国光学学会光谱专业委员会, 1986: 515-516.
- [13] 日本食品工业学会《食品分析》编辑委员会. 食品分析
方法(上册) [M]. 郑州粮食学院《食品分析方法》翻译
组, 译. 成都: 四川科学技术出版社, 1983: 142-143.
- [14] 中国药典 [M]. 四部. 2015.
- [15] 杨 勇, 吴琳琳, 罗 奕, 等. HPLC-CAD 法测定乳制
品中果糖、葡萄糖、蔗糖、乳糖、半乳糖和麦芽糖含
量的不确定度评定 [J]. 中国食品添加剂, 2015, 9:
172-180.