

邻苯二甲醛柱前衍生化HPLC法测定复方制剂中盐酸赖氨酸的含量

张 亿*,朱 蓉,郑 萍,熊 玲(成都市食品药品检测中心,成都 610045)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)15-2131-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.15.42

摘要 目的:建立测定复方制剂中盐酸赖氨酸含量的方法。方法:采用邻苯二甲醛(OPA)柱前衍生化高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为0.04 mol/L磷酸二氢钠溶液(10%氢氧化钠溶液调节pH至7.2)-甲醇-乙腈(70:15:15, V/V/V),流速为1.5 ml/min,检测波长为338 nm,柱温为35 ℃,供试品与OPA衍生剂及硼酸盐缓冲液按设定程序自动混匀后进样。结果:盐酸赖氨酸质量浓度在0.027 4~0.438 8 mg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.999 5$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD≤0.84%;在五维赖氨酸颗粒、赖氨酸肌醇维B₁₂口服溶液、赖氨酸磷酸氢钙片中盐酸赖氨酸的平均加样回收率分别为99.8%(RSD=0.86%, $n=9$)、100.1%(RSD=0.79%, $n=9$)、99.6%(RSD=0.65%, $n=9$)。对3批含盐酸赖氨酸的复方制剂进行含量测定,所得结果与原质量标准测定方法中的结果一致。结论:该方法样品处理简单快速,可用于含有盐酸赖氨酸的复方制剂的质量控制。

关键词 邻苯二甲醛;柱前衍生化;高效液相色谱法;盐酸赖氨酸

Content Determination of Lysine Hydrochloride in Compound Preparations by OPA Pre-column Derivatization HPLC

ZHANG Yi, ZHU Rong, ZHENG Ping, XIONG Ling (Chengdu Center for Food and Drug Control, Chengdu 610045, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of lysine hydrochloride in compound preparations. METHODS: Pre-column derivatization HPLC was conducted with the pre-column of OPA. The column was Kromasil C₁₈ with the mobile phase of 0.04 mol/L sodium dihydrogen phosphate solution (adjust pH to 7.2 by 10% NaOH)-methanol-acetonitrile (70:15:15, V/V/V) at the flow rate of 1.5 ml/min, the detection wavelength was 338 nm and the column temperature was 35 ℃. According to set procedure, the sample solution was automatic mixed with OPA agent and borate buffer. RESULTS: The quality concentration of lysine hydrochloride had a good linear relationship in the range of 0.027 4-0.438 8 mg/ml ($r=0.999 5$), and the RSD of precision, stability and reproducibility tests was no more than 0.84%. The average recoveries of Five-dimensional lysine granules, Lysine inositol-dimensional B₁₂ oral solution and DCP lysine tablets were respectively 99.8% (RSD=0.86%, $n=9$), 100.1% (RSD=0.79%, $n=9$) and 99.6% (RSD=0.65%, $n=9$). The contents of 3 batches of compound preparations containing lysine hydrochloride were measured and the results were consistent with the results of the original quality standard method. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate and can be used for the quality control of compound preparations containing lysine hydrochloride.

KEYWORDS OPA; Pre-column derivatization; HPLC; Lysine hydrochloride

盐酸赖氨酸为人体必需的8种氨基酸之一,具有刺激胃蛋白酶与胃酸的分泌、增进食欲、提高钙的吸收及其在体内的积累、加速骨骼生长的作用。其常与其他维生素组成复方制剂,用于调节幼儿新陈代谢、促进生长与发育^[1]。因此,建立这类复方制剂中盐酸赖氨酸含量的测定方法,有利于更加严格地控制制剂的质量,保证用药安全。目前,复方赖氨酸制剂已有的质量标准多采用甲醛滴定法^[2-3]或茚三酮比色法^[4-7],但这两种方法的专属性和精密性均不够高,仅适合于含单一赖氨酸成分且浓度较高的样品。考虑到复方制剂中辅料和其他成分可能会对赖氨酸成分的测定造成干扰,且赖氨酸含量较低,笔者采用了高效液相色谱(HPLC)法,并以邻苯二甲醛(OPA)试剂对盐酸赖氨酸进行柱前衍生化,这样不仅解决了盐酸赖氨酸无发色基团、在紫外检测器下无特征吸收的问题,而且通

过自动进样系统实现了被分析样品衍生后的在线分析,方法简便、快速,无需配置特殊衍生设备。

1 材料

1260 HPLC仪,包括四元泵、自动进样器、柱温箱、带二级管阵列的紫外检测器(美国Agilent公司);BP211D电子天平(德国Sartorius公司);KQ-500B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

盐酸赖氨酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号:140624-200805,纯度:100%);五维赖氨酸颗粒(批号:120925,规格:每克含盐酸赖氨酸50 mg、维生素B₁ 1.2 mg、维生素B₂ 0.15 mg、维生素B₆ 0.075 mg、烟酰胺2.4 mg、泛酸钙0.15 mg、枸橼酸0.09 mg)、赖氨酸肌醇维B₁₂口服溶液(批号:130605,规格:每毫升含盐酸赖氨酸60 mg、维生素B₁₂ 3 μg、肌醇10 mg)、赖氨酸磷酸氢钙片(批号:1306071,规格:每片含盐酸赖氨酸100 mg、磷酸氢钙100 mg)均为日常监督抽检样品;OPA为美

* 副主任药师。研究方向:药品检验。电话:028-85362213。
E-mail:Zhangyi_1964@126.com

国 Agilent 公司市售产品(将邻苯二醛与 3-巯基丙酸混合于硼酸盐缓冲液中);甲醇、乙腈为色谱纯,硼酸钠、磷酸二氢钠、氢氧化钠为分析纯,水为 Millipore 超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 盐酸赖氨酸对照品溶液 取盐酸赖氨酸对照品约 100 mg,精密称定,置于 100 ml 量瓶中,加水溶解并稀释制成每 1 ml 中含 1 mg 盐酸赖氨酸的对照品贮备液;精密量取上述对照品贮备液 10 ml,置于 50 ml 量瓶中,加水溶解并稀释制成每 1 ml 中含 0.2 mg 盐酸赖氨酸的对照品溶液。

2.1.2 五维赖氨酸颗粒供试品溶液(S1) 取五维赖氨酸颗粒 1 g,置于 50 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度;精密量取 10 ml,置于 50 ml 量瓶中,加水稀释制成每 1 ml 中含 0.2 mg 盐酸赖氨酸的供试品溶液。

2.1.3 赖氨肌醇维 B₁₂口服溶液供试品溶液(S2) 取赖氨肌醇维 B₁₂口服溶液 1 ml,置于 50 ml 量瓶中,加水稀释至刻度;精密量取 10 ml,置于 50 ml 量瓶中,加水制成每 1 ml 中含 0.24 mg 盐酸赖氨酸的供试品溶液。

2.1.4 赖氨酸磷酸氢钙片供试品溶液(S3) 取赖氨酸磷酸氢钙片 10 片,研细,精密称取约相当于 50 mg 盐酸赖氨酸的细粉,置于 50 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤;精密量取续滤液 10 ml,置于 50 ml 量瓶中,加水制成每 1 ml 中含 0.2 mg 盐酸赖氨酸的供试品溶液。

2.2 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Kromasil C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:0.04 mol/L 磷酸二氢钠溶液(10% 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.2)-甲醇-乙腈(70:15:15, V/V/V);流速:1.5 ml/min;柱温:35 ℃;检测波长:338 nm。将供试品按照自动衍生化进样程序,与硼酸盐缓冲溶液(取硼酸钠 15.25 g,加水 100 ml 溶解,并用 45% 氢氧化钠溶液调节 pH 至 10.2)混合后,再与 OPA 混合并定时反应 2 min 后,注入 HPLC 仪中。自动衍生化进样程序见表 1。在此色谱条件下,空白溶剂中未见未反应的衍生试剂 OPA 的色谱峰,供试品溶液中未见干扰赖氨酸衍生物色谱峰的杂质峰,赖氨酸理论板数>3 000。色谱见图 1。

表 1 自动衍生化进样程序

Tab 1 Automatic derivatization and injection procedure

函数	参数
抽取	抽取 2.5 μl 硼酸钠缓冲溶液
抽取	抽取 0.5 μl 样品溶液
混合	与 2.5 μl 空气以最大速度混合 2 次
等待	0.5 min
抽取	抽取 0 μl 水溶液
抽取	抽取 0.5 μl OPA 溶液
混合	与 3 μl 空气以最大速度混合 6 次
抽取	抽取 20 μl 水溶液
混合	与 23 μl 空气以最大速度混合 2 次
等待	2 min
进样	

2.3 线性关系考察

精密称取盐酸赖氨酸对照品 20 mg,置于 25 ml 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,以此溶液作为线性试验母液。分别精密吸取上述线性试验母液适量,加水制成质量浓度为 0.02、0.05、0.1、0.2、0.4 mg/ml 的系列对照品溶液。取上述系列对照

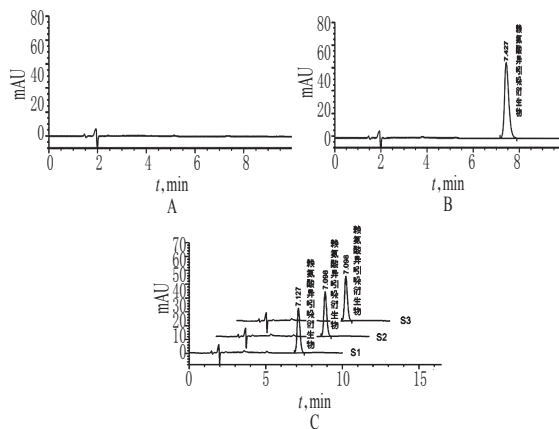


图 1 柱前衍生化高效液相色谱图

A.空白溶剂;B.对照品;C.供试品

Fig 1 Pre-column derivatization HPLC chromatograms

A.blank solution;B.reference;C.test sample

品溶液适量,按“2.2”项下色谱条件进样测定。以质量浓度(x, mg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得盐酸赖氨酸的回归方程为 $y = 2.0219 \times 10^3 x - 26.34$ ($r = 0.9995$)。结果表明,盐酸赖氨酸质量浓度在 0.027 4~0.438 8 mg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系。

2.4 精密度试验

精密量取盐酸赖氨酸对照品溶液 0.5 μl,按“2.2”项下色谱条件连续进样 6 次。结果,峰面积 RSD 为 0.55%,表明仪器精密度良好。

2.5 稳定性试验

取“2.1”项下供试品溶液 S1、S2、S3 各 1 份,分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 时按“2.2”项下色谱条件进样。结果,峰面积 RSD 分别为 0.67%、0.58%、0.79%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.6 重复性试验

取五维赖氨酸颗粒、赖氨肌醇维 B₁₂口服溶液、赖氨酸磷酸氢钙片各 6 份,分别按“2.1”项下方法制成供试品溶液,按“2.2”项下色谱条件进样,按外标法计算盐酸赖氨酸的含量。结果,含量 RSD 分别为 0.78%、0.66%、0.84%,表明该方法重复性良好。

2.7 加样回收率试验

精密称取五维赖氨酸颗粒 0.20 g,共 9 份,分别置于 50 ml 量瓶中,加入“2.1.1”项下对照品贮备液适量,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,作为五维赖氨酸颗粒加样回收率试验样品溶液。精密量取赖氨肌醇维 B₁₂口服溶液 0.2 ml,共 9 份,分别置于 50 ml 量瓶中,加入“2.1.1”项下对照品贮备液适量,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,作为赖氨肌醇维 B₁₂口服溶液加样回收率试验样品溶液。取赖氨酸磷酸氢钙片 10 片,研细,精密称取约相当于 10 mg 盐酸赖氨酸的细粉,共 9 份,分别置于 50 ml 量瓶中,加入“2.1.1”项下对照品贮备液适量,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,过滤,作为赖氨酸磷酸氢钙片加样回收率试验样品溶液。按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并按外标法以峰面积计算加样回收率,结果见表 2。

表2 3种复方制剂的加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of recovery test of 3 compound preparations (n=9)

供试品	加入量, mg	测得量, mg	加样回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
五维赖氨酸颗粒	5.143	5.150	100.1	99.80	0.86
	10.290	10.270	99.8		
	15.420	15.344	99.5		
赖氨酸醇维B ₁₂ 口服溶液	5.143	5.153	100.2	100.10	0.79
	10.290	10.311	100.2		
	15.420	15.383	99.8		
赖氨酸磷酸氢钙片	5.143	5.126	99.7	99.60	0.65
	10.290	10.249	99.6		
	15.420	15.344	99.5		

2.8 样品含量测定

取盐酸赖氨酸对照品溶液与供试品溶液S1、S2、S3,按“2.2”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按外标法以峰面积计算含量。同时,按国家标准方法茚三酮比色法测定五维赖氨酸颗粒及赖氨酸磷酸氢钙片中盐酸赖氨酸的含量,按国家标准方法甲醛滴定法测定赖氨酸醇维B₁₂口服溶液中盐酸赖氨酸的含量。将HPLC法测定结果与国家标准方法测定的结果进行比较,结果见表2。由表2可知,HPLC法与国家标准方法测定的结果一致,精密度有所提高。

表3 3种复方制剂的盐酸赖氨酸含量测定结果比较(%)

Tab 3 Comparison of lysine hydrochloride content of 3 compound formulations(%)

检测方法	五维赖氨酸颗粒		赖氨酸醇维B ₁₂ 口服溶液		赖氨酸磷酸氢钙片	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
HPLC法	101.0	0.78	98.0	0.66	104.0	0.84
茚三酮比色法	102.5	1.40			105.2	1.80
甲醛滴定法			97.5	2.00		

3 讨论

3.1 衍生化方法的选择

柱前衍生化HPLC法具有分析时间短、方法灵活多样、灵敏度高的优点,一直是分析化学领域探索的重要课题。OPA法为一种常用的衍生化方法,其缺点是OPA只能与一级氨反应,不能同时检测二级氨,使OPA-氨基酸的稳定性差、需要及时进样;考虑到复方盐酸赖氨酸制剂所含的氨基酸为一级氨,且其他主药成分和辅料对衍生化的干扰较小,故选用反应迅速、对仪器设备要求较低的、易于实现自动化的OPA法。OPA与硫醇试剂联用,能与赖氨酸迅速反应,产生具有高荧光强度的异吲哚衍生物,这些衍生物可以被荧光检测器或紫外检测器检出^[8]。考虑到本次样品的质量浓度在20 μg/ml以上,故采用紫外检测器。

3.2 色谱条件的优化

唐涛^[9]曾以OPA及2,4-二硝基氟苯为衍生剂,考察了柱温、衍生剂用量、反应时间及流动相pH等因素对HPLC分析结果的影响。本文参考其色谱条件,确定了新的色谱条件:柱温为35℃,流动相pH为7.2,衍生剂比例为OPA-赖氨酸(50:1, V/V)。由于OPA与赖氨酸的衍生物不稳定,其峰面积会随时间的延长而减小,故采用自动程序进行衍生化,供试品与衍生剂精确混匀,准确反应2 min后立即进样分析。

利用二极管阵列检测器对衍生产物进行光谱扫描,提取衍生物紫外吸收图谱,可见在231 nm和338 nm波长处有最大吸收。考虑到衍生剂在230 nm波长处有紫外末端吸收,会在

色谱中形成杂峰,故选择338 nm作为检测波长。

3.3 不同测定方法对含量测定结果的影响

赖氨酸醇维B₁₂口服溶液的质量标准中采用甲醛直接滴定盐酸赖氨酸,通过pH的变化来指示终点;五维赖氨酸颗粒(片)、赖氨酸磷酸氢钙片质量标准中采用茚三酮比色法定量测定盐酸赖氨酸的含量。这两种方法各有优缺点。甲醛滴定法操作简单、成本低,当样品中只含有单一的已知氨基酸,则可由此法滴定的结果算出氨基酸的含量;但该反应的终点依靠pH来显示,根据碱的消耗量来计算赖氨酸浓度,误差较大,且测试的误差随样品浓度的降低逐渐增大,仅适合测定高浓度样品^[10]。茚三酮比色法是利用茚三酮与氨基酸反应生成有色物质,该物质在565 nm波长附近有最大吸收,且吸收强度与氨基酸含量呈正比;但该方法受溶液pH、显色剂用量、加热时间和冷却时间多重影响,精密度、重复性、专属性均较差^[11-12]。柱前衍生化HPLC法专属性强、灵敏度高、重复性和准确性均较好,将其所测得的盐酸赖氨酸的含量结果与原质量标准方法进行比较,基本一致,而精密度有所提高。因此,该方法可用于含有盐酸赖氨酸的复方制剂的质量控制。

参考文献

- [1] 左云龙,王兴勇.口服L-赖氨酸对小儿生长发育及营养影响的临床研究[J].现代医药卫生,2004,20(19):1960.
- [2] 国家药典委员会编.WS-10001-(HD-0482)国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第5册[S].2002:267.
- [3] 国家药典委员会编.WS-10001-(HD-0304)国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第4册[S].2002:23.
- [4] 国家药典委员会编.WS-10001-(HD-0597)国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第7册[S].2002:23.
- [5] 国家药典委员会编.WS-10001-(HD-0596)国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第7册[S].2002:20.
- [6] 国家药典委员会编.WS-10001-(HD-0387)国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第4册[S].2002:309.
- [7] 国家药典委员会编.WS-10001-(HD-0388)国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准:第4册[S].2002:313.
- [8] 陆明,孙黛妮,汪杨,等.OPA-FMOC联用柱前衍生化法测定复方氨基酸注射液氨基酸的含量[J].药物分析杂志,2010,30(12):2323.
- [9] 唐涛.氨基酸柱前衍生化HPLC方法发展及应用[D].南京:南京理工大学,2006:6.
- [10] 李春兰,庞克坚,纪平山.甲醛酸碱法测定赖氨酸王浆口服液的含量[J].海峡药学,1995,7(1):85.
- [11] 刘飞飞,李群,于岚.茚三酮比色法定量检测盐酸赖氨酸条件的研究[J].中国食品添加剂,2010,5(102):223.
- [12] 崔敏,傅婕,迟原龙,等.茚三酮比色法和甲醛滴定法测定水解胶原的比较[J].中国皮革,2011,7(40):1.

(收稿日期:2014-09-17 修回日期:2015-01-13)

(编辑:申琳琳)