

高效液相色谱柱前衍生生化法测定胚宝胶囊中盐酸赖氨酸的含量

李樱红, 鲁敏, 金樟照, 祝明 (浙江省食品药品检验所, 杭州 310004)

摘要:目的 建立高效液相色谱柱前衍生生化法测定胚宝胶囊中盐酸赖氨酸的含量。方法 采用 2,4-二硝基氟苯为衍生化试剂进行柱前衍生, 色谱柱为 Zorbax SB-C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.04 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液 (40:60), 检测波长为 360 nm, 流速为 1.0 mL · min⁻¹。结果 盐酸赖氨酸在 0.12 ~ 5.74 μg 内线性关系良好, 相关系数 $r=0.999\ 9$ 。平均回收率为 99.55 %, (RSD=0.48 %, $n=7$)。结论 该方法简单、快速、重复性好, 可作为胚宝胶囊的质量控制方法。

关键词:胚宝胶囊; 盐酸赖氨酸; 高效液相色谱柱前衍生法

中图分类号: R917.101; R917.796

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2009) 01-0066-03

Determination of L-lysine Hydrochloride Content in Peibao Capsule by Pre-column Derivation HPLC

LI Yinghong, LU Min, JING Zhangzhao, ZHU Ming (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for the determination of L-lysine hydrochloride content in Peibao capsule by pre-column derivation HPLC. **METHODS** 2,4-DNFB was used as a derivatization reagent and separation of DNP-amino acid derivatives was performed by HPLC with Zorbax SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was consisted of acetonitrile and 0.04 mol · L⁻¹ KH₂PO₄ water solution (40:60). The flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ with the wavelength at 360 nm. **RESULTS** L-lysine hydrochloride showed a good linear relationship at a range of 0.12-5.74 μg, $r=0.999\ 9$. The average recovery was 99.55% with RSD=0.48 % ($n=7$). **CONCLUSION** The method is simple, rapid, accurate and reliable, and it can be applied to control the quality of Peibao capsule.

KEY WORDS: peibao capsule; L-lysine hydrochloride; pre-column derivation HPLC

胚宝胶囊是由羊胎盘用酶水解后加适量淀粉制成的中成药制剂, 具有补肾温阳, 养血填精之功用, 用于肾阳不足, 精血亏虚, 食欲不振等症状。原标准收载于中药部颁标准第十五册, 采用氮测定法控制产品质量, 测定时干扰大且操作复杂烦琐。盐酸赖氨酸为羊胎盘的主要成份之一^[1], 其在药品中的含量可以更好地表征药品的质量。本实验首次采用高效液相色谱柱前衍生生化法对胚宝胶囊中盐酸赖氨酸进行含量测定, 为该制剂的质量控制提供有效、可行的方法。

1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪, W2487 双通道紫外可见检测器, Empower 色谱工作站; 乙腈为色谱纯; 其它试剂为分析纯; 盐酸赖氨酸对照品 (L-lysine hydrochloride, 批号: 140673-200405) 由中国药品生物制品检定所提供; 胚宝胶囊及缺羊胎盘的阴性制剂均由浙江大德药业集团有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取本品内容物, 研细, 取约 0.5 g, 精密称定, 置三角烧瓶中, 精密加入 10% 甲醇溶液 25 mL, 称重, 超声处理 30 min (56 kHz, 300 W), 冷却, 称重, 用 10% 甲醇溶液补足减失的重量, 离心, 精密量取上清液 1.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加入 0.05 mol · L⁻¹ 碳酸钠溶液 1.0 mL 和 1% 2,4-二硝基氟苯的乙腈溶液 1.0 mL, 摇匀, 置于 60 °C 水浴中加热 30 min, 期间应不时振摇, 取出, 放冷, 加 0.01 mol · L⁻¹ 磷酸氢二钾溶液至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。

2.2 对照品溶液的制备

取盐酸赖氨酸对照品适量, 精密称定, 加 10% 甲醇溶液制成每 1 mL 中约含 0.12 mg 的溶液。精密量取 1.0 mL, 置 25 mL 量瓶中, 自“加入 0.05 mol · L⁻¹ 碳酸钠溶液 1.0 mL”起同“2.1”项下方法制备。

2.3 阴性对照试验

取缺羊胎盘的阴性制剂, 按“2.1”项下方法, 制备阴性对照液。

2.4 色谱条件

色谱柱:Zorbax SB - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相:乙腈-0.04 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液 (40 : 60), 检测波长: 360 nm, 流速: 1.0 mL · min⁻¹, 进样量为 10 μL。理论板数按盐酸赖氨酸峰计算应不低于 4 000。

分别吸取对照品、供试品及阴性对照液各 10 μL, 在此色谱条件下进样, 根据色谱图可知阴性样品对盐酸赖氨酸的测定无干扰, 且衍生化后的盐酸赖氨酸色谱峰与相邻其它组分峰分离度良好。

2.5 线性关系考察

取盐酸赖氨酸对照品适量, 精密称定, 加 10% 甲醇溶液制成初始浓度为 0.573 6 mg · mL⁻¹ 的对照品储备液, 并配比稀释成盐酸赖氨酸浓度分别为 0.011 95, 0.023 9, 0.071 7, 0.143 4, 0.286 8, 0.458 9, 0.573 6 mg · mL⁻¹ 的工作溶液, 同法衍生化后进样, 以盐酸赖氨酸浓度为横坐标 (*C*, mg · mL⁻¹), 峰面积积分值为纵坐标 (*A*), 绘制标准曲线, 其回归方程为:

$A = 4\,217\,558C - 7\,755.45, r = 0.999\,9$

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Result of recovery test

序号	称样量/g	测得量/mg	加入量/mg	原有量/mg	方法回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	0.249 3	3.848	2.295	1.574	99.08	99.55	0.48
2	0.256 6	3.912	2.295	1.620	99.86		
3	0.252 1	3.868	2.295	1.592	99.18		
4	0.249 6	3.87	2.295	1.576	99.96		
5	0.253 6	3.875	2.295	1.601	99.07		
6	0.251 3	3.888	2.295	1.587	100.27		
7	0.253 2	3.881	2.295	1.599	99.45		

2.10 样品含量测定

取不同批号胚宝胶囊, 按“2.1”项下方法处理, 进行 HPLC 分析, 计算盐酸赖氨酸的含量, 结果见表 2。

表 2 胚宝胶囊中盐酸赖氨酸的含量测定结果 (*n* = 4)

Tab 2 Contents of L-lysine hydrochloride in Peibao capsule (*n* = 4)

批号	含量/mg · g ⁻¹	RSD/%
051201	6.28	1.59
060301	5.95	0.54
060701	6.23	0.33

3 讨论

3.1 盐酸赖氨酸结构中无发色基团, 采用一般的 HPLC 与 UV 检测器无法测定其含量。目前报道的

结果表明, 盐酸赖氨酸在 0.12 ~ 5.74 μg 内线性关系良好。

2.6 仪器精密度的试验

取“2.2”项下对照品溶液, 重复进样 6 次, 测定峰面积, 其 RSD 为 0.29%, 仪器精密密度良好。

2.7 重复性试验

按“2.1”项下平行制备 7 份供试品溶液 (批号: 051201), 按拟定的含量测定方法进行 7 次平行测定, 结果平均含量为 6.31 mg · g⁻¹, RSD 为 2.09%。

2.8 稳定性试验

取衍生化后的供试品溶液 (批号: 051201), 每隔一定时间进样, 测定峰面积, 结果 RSD = 2.62%, 表明经过衍生化处理后的供试品溶液至少在 72 h 内稳定。

2.9 回收率试验

精密称取已知盐酸赖氨酸含量的供试品 7 份 (批号: 051201), 分别加入一定量盐酸赖氨酸对照品溶液, 按“2.1”项下操作, 测定盐酸赖氨酸含量, 计算回收率。结果见表 1。

测定盐酸赖氨酸的方法主要有定氮法、高效液相色谱 - 蒸发光散射检测法^[2] 等。二硝基氟苯衍生化法步骤简单, 反应速度快, 剩余试剂不干扰测定, 因此在氨基酸含量测定中应用较为广泛^[3]。本实验采用二硝基氟苯柱前衍生化法 - 高效液相法测定盐酸赖氨酸的含量, 比原有标准中氮测定法更确切, 具有分析时间短、重现性好、稳定性好等优点, 对控制胚宝胶囊质量起到一定的作用。

3.2 衍生化条件的优化 取“2.2”项下的对照品溶液, 通过对衍生化试剂用量 (0.5, 1.0, 2.0 mL)、衍生化温度 (40, 60, 80 °C 水浴)、衍生化时间 (20, 30, 40, 60 min) 的比较, 最终选择衍生化条件为“加入 0.05 mol · L⁻¹ 碳酸钠溶液 1.0 mL 和 1% 2,4-二硝基氟苯的乙腈溶液 1.0 mL, 摇匀, 置于 60 °C 水浴中

加热 30 min”。

3.3 供试品提取条件的优化 通过对提取溶剂(水、10% 甲醇、30% 甲醇、50% 甲醇)、提取方式(加热回流、水浴超声)、提取时间(超声 20, 30, 40 min)、取样量(0.25, 0.50, 0.75 g)的比较,最终选择供试品的提取条件为“取约 0.5 g,精密称定,置三角烧瓶中,精密加入 10% 甲醇溶液 25 mL,超声处理 30 min”。

3.4 色谱柱的选择 色谱柱分别选择 Zorbax SB - C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、大连依利特 hypersil ODS2(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)、Extend - C₁₈(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)色谱柱,流动相均为乙腈-0.04 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钾水溶液(40:60),检测波长为 360 nm。由表 3 可知,三种色谱柱所得供试品(批号:051201)含量结果均在误差范围内,说明该含量测定的耐用性较好。在样品测定中,最后选择 Zorbax SB - C₁₈ 色谱柱。

表 3 色谱柱的选择($n=4$)

Tab 3 Choose of column($n=4$)

色谱柱	Zorbax SB - C ₁₈	hypersil ODS2	Extend - C ₁₈	平均	RSD/%
样品含量 /mg · g ⁻¹	6.75	6.76	6.73	6.75	0.23

REFERENCES

- [1] LU H, YAN X M, ZHANG S Q. Composition Analyses of Microelements and Amino Acids in Sheep Placenta Living Cell Extract [J]. J Nanjing Normal Univ(Nat Sci) (南京师大学报:自然科学版), 2001, 24(1): 79-82.
- [2] LIN H Q, ZHONG Y. Determination of lysine hydrochloride in Xiaoerweian Pian by HPLC-ELSD [J]. Drug Evaluation (药品评价), 2006, 3(3): 200-201.
- [3] WANG J, ZHAN X Y, TENG Y K, et al. Determination of the content of amino acid by pre-column derivatization and RP-HPLC [J]. J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报), 2003, 20(6): 428-430.

收稿日期:2007-12-18