

HPLC 同时测定赖氨酸片中葡萄糖酸锌和盐酸赖氨酸的含量

董丽, 杨洁, 杨志军, 孙祥德 (河南省新乡医学院, 河南 新乡 453003)

摘要: 目的 建立赖氨酸片中葡萄糖酸锌和盐酸赖氨酸含量同时测定的高效液相色谱法。方法 以 C_{18} 色谱柱、 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH}=3.00$) 为流动相分离、 210 nm 紫外检测、外标法定量。结果 葡萄糖酸锌的线性范围为 $0.045 \sim 5.80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, L-赖氨酸的线性范围为 $0.133 \sim 17.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。方法回收率大于 98.0% ; 日内及日间 RSD 小于 2.0% 。结论 本方法不经分离直接同时测定赖氨酸片中葡萄糖酸锌和盐酸赖氨酸的含量, 快速、简便、准确, 可用于赖氨酸片剂的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法; 葡萄糖酸锌; 盐酸赖氨酸; 同时测定

中图分类号: R917.101; R917.791; R917.796

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693 (2009) 05-0403-04

Simultaneous Determination of Zinc Gluconate and Lysine Hydrochloride in Lysine Hydrochloride and Zinc Gluconate Tablet by RP-HPLC

DONG Li, YANG Jie, YANG Zhijun, SUN Xiangde (Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To establish a RP-HPLC method for simultaneous determination of zinc gluconate and lysine hydrochloride in lysine hydrochloride and zinc gluconate tablet. **METHODS** Reverse phase ODS column was used as the stationary phase and $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH}=3.00$) was used as mobile phase with 210 nm for detection wavelength. **RESULTS** The calibration curve was linear over the range of $0.0453 \sim 5.80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ for zinc gluconate and $0.133 \sim 17.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ for lysine hydrochloride. The recovery was $98.8\% \sim 101.9\%$. The coefficients of variation for within day and between days were all less than 2.0% ($n=5$). **CONCLUSION** The method could be easily employed with high precision and accuracy for simultaneous determination of zinc gluconate and lysine hydrochloride in lysine hydrochloride and zinc gluconate tablet without prior separation, and could be used for the quality control in production process of the tablet.

KAY WORDS: HPLC; zinc gluconate; lysine hydrochloride; simultaneous determination

赖氨酸片主要用于小儿及青少年因缺乏赖氨酸和锌而引起的生长发育迟缓、营养不良及食欲缺乏等, 其主要成分是盐酸赖氨酸和葡萄糖酸锌。对于单一组分的含量测定, 盐酸赖氨酸的测定方法报道有分光光度法^[1]、非水电位滴定法^[2]⁵⁸²、柱前衍生 HPLC^[3]、HPLC-ELSD^[4]、HPLC 直接测定^[5]等, 葡萄糖酸锌的测定方法报道有 EDTA 配位滴定法^[2]⁶⁹⁶、分光光度法^[6]、HPLC^[7]等。同时测定盐酸赖氨酸、葡萄糖酸锌的方法尚未见有报道。目前, 赖氨酸片中 2 种组分是分别用非水滴定法测定赖氨酸、EDTA 滴定法测定葡萄糖酸锌来进行质量控制的。为建立快速、准确、有效的质量控制方法, 本实验通过优化色谱条件, 利用反相高效液相色谱法, 实现了不经衍生直接同时对盐酸赖氨酸和葡萄糖酸锌的含量进行测定, 方法操作简便, 重复性好。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

shimadzu LC-6A 高效液相色谱仪; SPD-6AV 紫

外检测器; XK96-A 快速混合器 (姜堰市新康医疗器械有限公司); pH-3C 精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 试剂

磷酸二氢钾、磷酸为国产分析纯试剂, L-赖氨酸对照品 (上海康达氨基酸厂生产), 葡萄糖酸锌对照品为自制试剂, 经重结晶纯化, 用 EDTA 标准溶液测定其纯度为 99.9% ; 样品赖氨酸片 (太阳石 (唐山) 药业有限公司, 批号为 061102、070201、070401)。实验用水均为自制二次蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱分离柱: Spherigel C_{18} 柱 ($4.6 \text{ mm} \times 200 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$); 预柱: C_{18} ($4.6 \text{ mm} \times 25 \text{ mm}$); 流动相: $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ($\text{pH}=3.00$); 检测波长: 210 nm ; 流速: $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温: 25°C ; 进样量: $20 \mu\text{L}$ 。

2.2 对照品溶液及标准曲线的制备

分别准确称量葡萄糖酸锌、L-赖氨酸对照品适

量,以流动相溶解各配制 $11.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖酸锌和 $34.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ L-赖氨酸溶液作为对照品储备液。将葡萄糖酸锌和 L-赖氨酸对照品储备液等体积混合,然后以流动相稀释,得到如下系列浓度对照品混合溶液($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$):葡萄糖酸锌: 5.80, 2.90, 1.45, 0.725, 0.363, 0.181, 0.090 6, 0.045 3; L-赖氨酸($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$): 17.0, 8.50, 4.25, 2.13, 1.06, 0.531, 0.266, 0.133。分别取上述标准混合液 $20 \mu\text{L}$ 进样。以各组分浓度(Y)对相应的峰面积(X)回归, L-赖氨酸的回归方程: $Y=7.902\times 10^{-6}-0.117 3$, $r=0.999 5$; 葡萄糖酸锌的回归方程: $Y=1.870\times 10^{-6}-0.052 80$, $r=0.998 8$ 。说明 L-赖氨酸和葡萄糖酸锌分别在 $0.133\sim 17.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.045 3\sim 5.80 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.3 检测限和定量限

取“2.2”项下使用的葡萄糖酸锌和 L-赖氨酸对照品混合液 $20 \mu\text{L}$ 注入色谱仪测定,当信噪比为 3 时的进样溶液浓度即为检测限, L-赖氨酸的检测限为 $1.10\times 10^{-3} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖酸锌检测限为 $3.00\times 10^{-4} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。当信噪比为 10 时的进样溶液浓度即为定量限, L-赖氨酸的定量限为 $2.80\times 10^{-3} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 葡萄糖酸锌定量限为 $7.10\times 10^{-4} \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 耐用性考察

根据中国药典 2005 版药品质量标准分析方法验证指导原则,考察了方法的耐用性。按照已确定的色谱条件进行实验,同一样品使用同一色谱柱(Spherigel C_{18} 柱, $4.6 \text{ mm}\times 200 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$) 在 3 台不同仪器上测定(shimadzu LC-6A, shimadzu LC-6AD, Varian PROSTAR210);使用同一台仪器(shimadzu LC-6A),分别用 sinochrom ODS-BP($4.6 \text{ mm}\times 200 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)、Shimadzu VP-ODS ($4.6 \text{ mm}\times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)和 Spherigel C_{18} ($4.6 \text{ mm}\times 200 \text{ mm}$,

$10 \mu\text{m}$) 3 根不同厂家的色谱柱,在不同时间经不同实验人员测定。结果,两组分的峰形均较理想,二者的分离度均大于 1.5,理论板数均大于 3 000,含量测定结果一致。另外还考察了柱温、流动相流速和缓冲液 pH 值等因素的微小变化对分离度和峰面积的影响。结果显示,当流速大于 $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,两组份的分离度下降,而小于 $0.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时,流速越小分离度越大,但保留时间增大。因此,实验时控制流速不大于 $0.7 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$,都能得到较好的分离度,含量测定结果也无影响。当柱温在 $\pm 5^\circ\text{C}$ 范围内波动,测定结果无明显差异。分别用 pH 值为 2.80、2.90、3.10 的缓冲液作为流动相试验,对实验结果和分离度也无明显影响。使用本实验纯缓冲盐溶液做流动相,连续测定 10 h,两组份的分离度、理论板数和峰拖尾因子都没有变化,考虑到长期使用不含有机相的缓冲盐溶液对色谱柱固定相的影响,连续测定 10 h 后及时用纯有机溶剂(甲醇或乙腈)冲洗色谱柱是必要的。上述试验结果显示,本方法在测定条件有较小的变动时,样品测定结果不受影响,方法的耐用性良好。

2.5 专属性试验

赖氨酸锌片的辅料有乳糖、聚维酮 K30、滑石粉和硬脂酸镁等。按照处方比例制备不含盐酸赖氨酸和葡萄糖酸锌的阴性制剂样品,按照“2.7”项下的方法分别制备供试品溶液和阴性制剂溶液,以“2.1”项下的方法进行分析,得样品溶液和阴性溶液色谱图,见图 1。结果显示,在 210 nm 下检测时,样品中辅料等不干扰赖氨酸和葡萄糖酸锌的分离。在本文色谱条件下, L-赖氨酸和葡萄糖酸锌两组分实现基线分离,其中 L-赖氨酸保留时间为 3.88 min 、葡萄糖酸锌为 4.53 min ,两组分的分离度符合要求,理论板数按葡萄糖酸锌峰计算不低于 3 000。

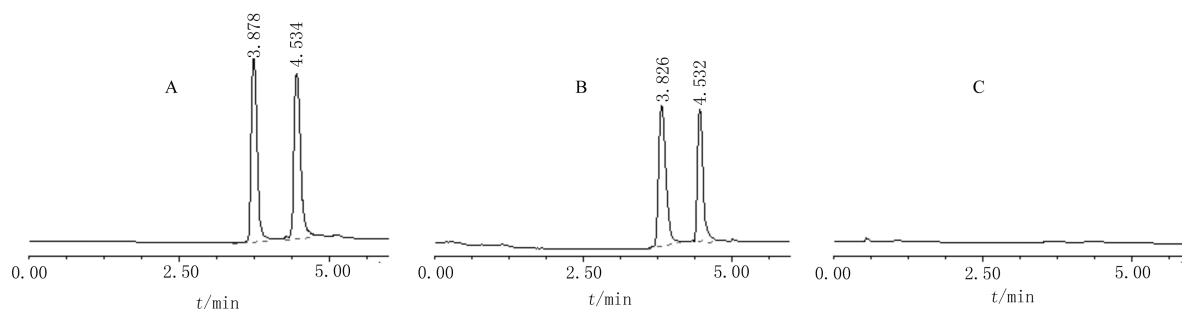


图 1 高效液相色谱图

A-对照品; B-样品; C-阴性样品

Fig 1 HPLC chromatograms

A-control; B-sample; C-negative sample

2.6 方法回收率及精密度

准确量取已知含量的样品溶液于 10 mL 量瓶中，分别准确加入不同量的葡萄糖酸锌和 L-赖氨酸对照品，室温下定容，配制高、中、低 3 种浓度溶液。分别进样 20 μ L（其中两个高浓度溶液再以流动相适当

表 1 精密度及回收率测定结果（n=5）

组 分	样品量 /mmol·L ⁻¹	加入量 /mmol·L ⁻¹	日内		日间		回收率/%
			测定值/mmol·L ⁻¹	RSD/%	测定值/mmol·L ⁻¹	RSD/%	
L-赖氨酸	0.925	0.133	1.055	1.34	1.057	1.39	99.0
	0.925	1.060	1.945	2.05	2.005	1.80	101.9
	0.925	17.000	17.820	1.31	17.920	1.40	100.0
葡萄糖酸锌	0.322	0.045	0.367	1.18	0.366	1.27	98.8
	0.322	0.363	0.688	1.89	0.682	1.00	99.3
	0.322	5.800	6.072	1.75	6.212	1.17	101.6

2.7 样品测定

取本品20片（标示量：盐酸赖氨酸40 mg·片⁻¹；葡萄糖酸锌35 mg·片⁻¹），除去薄膜衣，精密称定，研细，精密称取适量（约相当于盐酸赖氨酸16.7 mg；葡萄糖酸锌14.6 mg），置100 mL量瓶中，加流动相适量，超声处理使溶解，放冷，用流动相稀释至刻度，摇匀，滤过。进样20 μ L测定。测定结果见表2。

表 2 样品测定结果（n=3）

样品批号	盐酸赖氨酸/标示量%	葡萄糖酸锌/标示量%
061102	100.3	103.8
070201	96.4	99.5
070401	98.5	100.0

2.8 溶液的稳定性试验

取新配制的样品供试溶液于室温下放置，于 1，3，5，7，10 d 进样各 20 μ L，L-赖氨酸和葡萄糖酸锌的峰面积的 RSD 分别为 1.39%和 1.67%，表明供试溶液至少能稳定 10 d。

3 讨论

3.1 检测波长的选择

葡萄糖酸锌和赖氨酸中都存在有机酸根离子，而有机酸根离子中羰基氧和羟基氧上孤对电子的共轭作用，使其在 205~215 nm 处有吸收带。基于此，本文以 210 nm 为检测波长，采用在紫外吸收波长末端用 HPLC 测定。文献报道的 HPLC 测定赖氨酸大多采用衍生法，尽管衍生提高了检测的灵敏度，但增加了分析步骤和成本。本实验不经衍生，利用赖氨酸分子中的羧基的紫外吸收直接检测，简便快速，分析结果的精密度和准确度符合分析工作的要求。

3.2 缓冲溶液的选择

许多缓冲溶液由于在 210 nm 附近有较强的吸

稀释后进样，以确保进样溶液浓度在线性范围之内），记录色谱图。由回归方程计算测定值和加样回收率。每一浓度溶液平行配制 5 份，测定日内精密度。每天重复配制上述 3 种浓度溶液 1 份，连续测定 5 d，计算日间精密度。精密度和回收率结果见表 1。

收，使得本底值提高，灵敏度降低，以致无法测定。磷酸盐在紫外区几乎无吸收，有利于降低本底，提高检测灵敏度，故选择该缓冲系。但由于所测样品中含有 Zn^{2+} ，应注意避免生成其磷酸盐沉淀。从磷酸的分布曲线可知，在本实验的 pH 值下，由于流动相溶液中 PO_4^{3-} 和 HPO_4^{2-} 浓度极低，而供试溶液的 Zn^{2+} 浓度又较小，此时离子积小于溶度积，不会生成磷酸盐沉淀。

3.3 分离条件的选择

葡萄糖酸为一元弱酸，在溶液中以分子和酸根离子两种型体存在。而 L-赖氨酸分子中含有 2 个伯氨基和 1 个羧基，最高可离解的质子数为 3，在溶液中有 4 种存在型体。各型体的分布系数取决于水溶液的 pH 值。这种平衡体系的存在，使得同一组分在色谱图中可能出现多峰，或造成峰展宽或峰拖尾，影响定量的准确性。因此，应控制流动相溶液的 pH 值，使被分离组分以单一型体存在。文献报道^[8]，分离弱酸时，缓冲溶液的 pH 值范围为 $2 \leq pH \leq pK_a - 2$ 。若 $pK_a < 4$ ，常利用酸的共轭碱测定其含量，pH 值范围为 $pK_a + 2 \leq pH \leq 9$ 。实际上，只要保证缓冲溶液的缓冲容量并严格控制其 pH 值，按 $2 \leq pH \leq pK_{a1} - 1$ 选择实验条件，仍能得到满意的结果。葡萄糖酸 pK_a 为 3.56^[9]，完全质子化赖氨酸阳离子为 2.04 (pK_{a1})、9.08 (pK_{a2})、10.69 (pK_{a3})^[10]，虽然可以将流动相控制在 $pK_a + 2 \leq pH \leq 9$ ，测定其共轭碱，但 pH 值增大有可能使样品中锌离子生成磷酸盐或氢氧化物沉淀。因此，本实验考察了 pH 值为 2.10，2.50，2.80，3.00 的 KH_2PO_4 缓冲溶液，结果 pH 2.10~3.00 之间的 0.05 mol·L⁻¹ NaH_2PO_4 缓冲溶液对两成分的分离影响不大，出峰顺序不变，考虑酸

性对固定相的影响,选择 $\text{pH}=3.00$ 作为缓冲溶液的酸度条件,在此酸度条件下,赖氨酸分子中的两个氨基都将质子化,而质子化的赖氨酸分子的极性大于葡萄糖酸锌,故赖氨酸分子首先被洗脱。缓冲溶液的浓度高低直接影响其缓冲容量的大小,影响酸在流动相中的存在形式及溶液的离子强度,从而影响色谱柱的分离效果。用 $\text{pH}=3.00$ 浓度依次为 0.025 , 0.050 , $0.10 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶液进行试验,发现浓度对两组分的分离度和保留时间影响不大,但随着浓度的增大,溶液黏度增大,系统压力增高。 $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 溶液做流动相时,两组分峰有较明显的拖尾,故选择 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度条件。流动相中少量甲醇或乙腈的加入,能改善有机酸组分的峰形,又能抑制酸的离解。在本实验条件下,少量甲醇的加入对两组分的分离度影响不大,这与文献^[11]结果一致。最终确定使用 $0.05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$ 的单组分溶液做为流动相,在此条件下,两组分都以单峰出现,分离度和标准曲线的线性关系良好。

本试验建立的反相高效液相色谱同时测定盐酸赖氨酸和葡萄糖酸锌的方法,简单、快速,精密度实验结果表明,其测定结果准确可靠,可用于片剂的质量控制。

REFERENCES

[1] LI X H,YANG J F,SUN J X.Determination of lysine in

naproxen disperse tablets[J].Chin New Drugs J.(中国新药杂志),2000,9(10):696-697.

- [2] Ch.P(2005)Vol II (中国药典 2005 版.二部)[S]. 2005:582;696.
- [3] LIU Y B, MIAO H Z,LIU Y E, et al. HPLC determination of lysine hydrochloride in compound l-Lysine granules[J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志),1999,19(6):410-412.
- [4] ZHANG W,ZHUO Z,ZHOU D J,et al.Determination of Lysine hydrochloride in compound lysine hydrochloride tables by HPLC-ELSD [J].J Pediat Pharm (儿科学杂志), 2004, 10(4): 43-44.
- [5] ZHAO P,WANG D K,ZHUANG R,et al.Determination of Lysine and related compounds by RP-HPLC[J].Chin Pharm J(中国药学杂志),2006,41(13):1023-1026.
- [6] HUANG Y L,ZHAO H Y,TONG X,et al.Determination of the content of zinc gluconate in Xinxuekang tablets by dithizone spectrophotometry[J].J Shenyang Pharm Univ (沈阳药科大学学报),1999,16(2):142-143.
- [7] GAO G,SUN X D,ZHAO J H,et al.Simultaneous determination of calcium lactate and zinc gluconate in oral solution by RP-HPLC [J].China J Mod Med (中国现代医学杂志), 2006, 16(3): 387-389.
- [8] ZHAO J C,GUO Z A,CHANG J H,et al.Study on reversed-phase high performance liquid chromatography separation condition and determination method of organic acids [J].Chin J Chromatogr (色谱),2001,19(3):260- 263.
- [9] SUN X D,YIN X C,ZHU S R,et al.Coordination reaction of L-threonic acid with metal ions[J].J Inorg Chem (无机化学学报),1998,14(1):109- 113.
- [10] LI K A.A Course in Analytical Chemistry (分析化学教程)[M]. Beijing:Peking University Press,2005:739.
- [11] YANG Y,LI Q,CHEN Y,et al.Determination of organic acids in beer and wort by reverse phase high performance liquid chromatography[J].Food Ferment Ind (食品与发酵工业), 2003,29(8):6.

收稿日期: 2008-04-11