

UPLC-QDa 测定乳果糖口服溶液中乳果糖及其有关物质含量

曹琳¹, 胡樱¹, 章燕¹, 陈军¹, 曾亚军²[1.宁波市药品检验所, 浙江 宁波 315048; 2.沃特世科技(上海)有限公司, 上海 200000]

摘要: 目的 采用 UPLC-QDa 测定乳果糖口服溶液中乳果糖的含量及其有关物质塔格糖、果糖、半乳糖、依匹乳糖、乳糖的含量。方法 采用 ACQUITY UPLC BEH Amide(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm)色谱柱, 以水(含 0.1%二乙胺, 500 ng·mL⁻¹ 盐酸胍)和乙腈(含 0.1%二乙胺, 500 ng·mL⁻¹ 盐酸胍)为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 电喷雾离子化(ESI), 负极性下 SIR 模式采集。结果 塔格糖、果糖、依匹乳糖、乳果糖的定量限分别为 0.5, 0.5, 0.2, 0.2 μg·mL⁻¹, 乳糖和半乳糖的检测限分别为 0.2, 2 μg·mL⁻¹; 塔格糖、果糖、半乳糖、依匹乳糖、乳果糖、乳糖分别在 5.1~123.2, 4.9~117.8, 5.4~129.8, 5.2~125.0, 5.0~119.9 和 5.0~121.2 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系, r 均 ≥ 0.995 ; 平均加样回收率均为 90%~107%($n=6$); 方法仪器精密度高, 峰面积 RSD 均 $<2.8\%$ ($n=5$)。2 个不同厂家生产的乳果糖口服溶液中乳果糖的含量和有关物质塔格糖、果糖、半乳糖、依匹乳糖、乳糖的含量均符合中国药典 2015 年版规定, 并与中国药典方法结果基本一致。结论 该方法可用于乳果糖口服溶液中乳果糖和有关物质含量的检测分析。

关键词: 乳果糖口服溶液; 含量测定; 有关物质; UPLC-QDa

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)12-1493-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.12.015

引用本文: 曹琳, 胡樱, 章燕, 等. UPLC-QDa 测定乳果糖口服溶液中乳果糖及其有关物质含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(12): 1493-1496.

Determination of the Contents of Lactulose and Related Substances in Lactulose Oral Solution by UPLC-QDa

CAO Lin¹, HU Ying¹, ZHANG Yan¹, CHEN Jun¹, ZENG Yajun²[1.Ningbo Institute for Drug Control, Ningbo 315048, China; 2.Waters Technologies(Shanghai) Limited., Shanghai 200000, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish UPLC-QDa for the content determination of lactulose and its related substances including tagatose, fructose, galactose, epilactose, lactose in lactulose oral solution. **METHODS** ACQUITY UPLC BEH Amide column(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm) was used for the separation with a mobile phase of water(containing 0.1% diethylamine and 500 ng·mL⁻¹ guanidine hydrochloride) and acetonitrile(containing 0.1% diethylamine and 500 ng·mL⁻¹ guanidine hydrochloride) at a flow rate of 0.6 mL·min⁻¹ in gradient elution mode. The method was developed at ESI(-) with SIR mode. **RESULTS** The limit of quantitation of tagatose, fructose, epilactose and lactulose were 0.5, 0.5, 0.2 and 0.2 μg·mL⁻¹, respectively. The limit of detection of lactose and galactose were 0.2 and 2 μg·mL⁻¹, respectively. The linearity ranges of the tagatose, fructose, galactose, epilactose, lactulose, lactose were 5.1~123.2, 4.9~117.8, 5.4~129.8, 5.2~125.0, 5.0~119.9 and 5.0~121.2 μg·mL⁻¹ respectively, with the excellent correlation coefficient($r \geq 0.995$). The average recoveries were 90%~107% ($n=6$). The instrument of methods had a good precision. The RSD of peak area were all $<2.8\%$ for the six target compounds($n=5$). The contents of lactulose and related substances in lactulose oral solution produced by two different manufacturers were all in accordance with the regulations of Chinese Pharmacopoeia 2015 Edition, and were basically consistent with the results of method in Chinese Pharmacopoeia. **CONCLUSION** The established method can be applied to the determination of the contents of lactulose and related substances in lactulose oral solution.

KEYWORDS: lactulose oral solution; content determination; related substances; UPLC-QDa

乳果糖^[1], 化学名为 4-*O*-β-*D*-galactopyranosyl-*D*-arabino-hex-2-ulofuranose。乳果糖口服溶液在临床上用于慢性或习惯性便秘及肝性脑病的治疗, 不良反应少, 为 2018 年新增国家基本药物目录品种。

由国家药品监督管理局网站数据库查询, 目前国内生产乳果糖口服溶液的有 9 家企业, 进口

乳果糖口服溶液的有 2 家企业。现行质量标准有中国药典 2015 年版二部^[2]、企业注册标准^[3]和进口注册标准^[4], USP43^[5]也有收载; 其有关物质和含量测定均采用 HPLC-RID, 系统耐用性及稳定性较差, 针对该问题, 建立塔格糖、果糖、半乳糖、依匹乳糖、乳糖和乳果糖的 UPLC-QDa 定量测定方

基金项目: 浙江省药品监督管理局科技计划项目(2021017)

作者简介: 曹琳, 女, 硕士, 主任药师

Tel: (0574)89180382

E-mail: portia1104@139.com

法, 并进行方法学验证^[6-9]。按照建立的 UPLC-QDa 方法对原研厂家(杜密克)和国内市场占有率较高的湖南科伦制药有限公司生产的乳果糖口服溶液中乳果糖的含量和有关物质塔格糖、果糖、半乳糖、依匹乳糖、乳糖含量进行检测分析。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters ACQUITY UPLC I Class(QDa 检测器、MassLynxV4.1/UNIFI 数据信息系统, 美国 Waters 公司); XS205DU 电子天平(梅特勒托利多有限公司)。

1.2 样品和试药

乳果糖对照品(批号: 100057-201703; 含量: 99.1%)、果糖对照品(批号: 100231-201807; 含量: 99.9%)、半乳糖对照品(批号: 100226-201506; 含量: 100%)和乳糖对照品(批号: 100058-201605; 含量: 94.8%)均购自中国食品药品检定研究院; 塔格糖对照品(YRC, 批号: T004850-2-AGE-69-1; 含量: 100%); 依匹乳糖(USP, 批号: 1236801-R018L0; 含量: 100%)。

乙腈、二乙胺和盐酸胍均为色谱纯, 均购自默克公司; 水为超纯水。

2 个不同厂家生产的乳果糖口服溶液, 分别标记为 A[Abbott Biologicals B.V.(杜密克), 批号: 357748; 规格: 667 mg·mL⁻¹; 相对密度: 1.330] 和 B(湖南科伦制药有限公司, 批号: N181202; 规格: 100 mL : 66.7 g; 相对密度: 1.339)。

2 方法与结果

2.1 仪器条件

2.1.1 色谱条件 ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.7 μm); 流动相 A 为水(含 0.1%二乙胺, 500 ng·mL⁻¹ 盐酸胍), 流动相 B 为乙腈(含 0.1%二乙胺, 500 ng·mL⁻¹ 盐酸胍), 梯度洗脱(0~0.5 min, 95%B; 0.5~4.0 min, 95%→93%B; 4.0~4.5 min, 93%→87%B; 4.5~10.0 min, 87%B; 10.0~10.1 min, 87%→95%B; 10.1~18.0 min, 95%B); 流速为 0.6 mL·min⁻¹; 柱温为 50 °C; 进样量为 1 μL; 运行时间为 18 min。

2.1.2 质谱条件 QDa 质谱系统, ESI 离子化模式, 毛细管电压为 0.8 kV, 锥孔电压为 5 V, 探针温度为 600 °C, 采集模式: SIR, 2~5.7 min 检测离子为 215.6 Da(塔格糖、果糖、半乳糖), 7.8~12 min 检测离子为 377.7 Da(依匹乳糖、乳果糖、乳糖)。

2.2 对照品和供试品溶液的制备

2.2.1 稀释溶剂 乙腈: 水(1: 1)。

2.2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取乳果糖、果糖、乳糖、半乳糖、依匹乳糖、塔格糖 10.08, 9.83, 10.65, 10.82, 10.42, 10.27 mg, 用稀释溶剂溶解并定容至 20 mL, 作为对照品储备液(500 μg·mL⁻¹); 另称取乳果糖 50.28 mg, 用稀释溶剂溶解并定容至 20 mL, 作为乳果糖对照品储备液(2 500 μg·mL⁻¹); 将对照品储备液用稀释溶剂逐级稀释至 5, 10, 20, 40, 80, 120 μg·mL⁻¹ 作为标准工作曲线溶液。

2.2.3 供试品溶液的制备 精密称取样品 0.1 g, 用稀释溶剂溶解并稀释至 25 mL, 作为样品储备液; 量取样品储备液 1.0 mL, 用稀释溶剂稀释至 50 mL, 作为乳果糖测定样品溶液; 另量取样品储备液 5.0 mL, 用稀释溶剂稀释至 10 mL, 作为半乳糖、果糖、乳糖、依匹乳糖、塔格糖测定供试品溶液。

2.2.4 阴性对照溶液的制备 按处方配比取不含乳果糖的样品, 按“2.2.3”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 结果

2.3.1 系统适用性 取“2.2.2”项下对照品储备液稀释制成 10 ng·mL⁻¹ 的乳果糖、果糖、乳糖、半乳糖、依匹乳糖、塔格糖混合对照品溶液, 按“2.1”项下仪器条件进样, 色谱图见图 1, 乳果糖、果糖、乳糖、半乳糖、依匹乳糖、塔格糖峰形良好、有效分离。

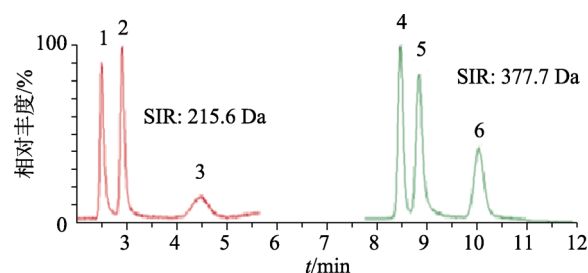


图 1 混合对照品溶液的 SIR 图

1-塔格糖; 2-果糖; 3-半乳糖; 4-依匹乳糖; 5-乳果糖; 6-乳糖。

Fig. 1 SIR chromatogram of mix reference substances solution

1-tagatose; 2-fructose; 3-galactose; 4-epilactose; 5-lactulose; 6-lactose.

2.3.2 专属性试验 取“2.2.4”项下阴性对照溶液, 按“2.1”项下仪器条件进样, 均未检测出目标化合物, 表明该分析方法专属性良好。结果见图 2。

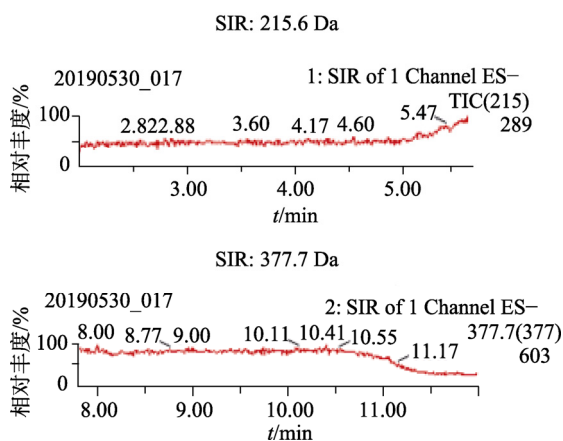


图2 专属性图谱
Fig. 2 Chromatogram of the specificity

2.3.3 定量限(limit of quantitative, LOQ)和检测限(limit of detection, LOD) 将“2.2.2”项下对照品储备液逐级稀释,按“2.1”项下仪器条件进样,按照 LOQ 的 $S/N \geq 10$ 、LOD 的 $S/N \geq 3$ 的要求,塔格糖、果糖、依匹乳糖和乳果糖的 LOQ 分别为 0.5, 0.5, 0.2, 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;乳糖的 LOD 为 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;半乳糖的灵敏度偏低,LOD 为 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。表明该分析方法灵敏度良好。结果见图 3。

2.3.4 仪器精密度 取“2.2.3”项下供试品溶液(批号: 357748),按“2.1”项下仪器条件进样,各化合物仪器精密度良好, RSD 均 $< 2.8\%$ ($n=5$),表明仪器精密度良好。

2.3.5 标准曲线 将“2.2.2”项下系列标准曲线溶液按“2.1”项下仪器条件进样,以目标化合物质量浓度(x)为横坐标,峰面积(y)为纵坐标,绘制标准曲线并进行线性回归,见表 1,结果表明乳果糖、果糖、乳糖、半乳糖、依匹乳糖、塔格糖均在试验范围内线性关系良好, $r \geq 0.995$ 。

2.3.6 加样回收率 称取样品(各 2 份) 50 mg 于 50 mL 量瓶中,加入“2.2.1”项下稀释溶剂 30 mL,超声 5 min 使溶解,冷却至室温,加入“2.2.2”项下对照品储备液 1.5, 3.0, 4.5 mL,用稀释溶剂稀释至刻度,涡旋混匀,按“2.1”项下仪器条件进样。5 个杂质加样回收率为 90%~107%,结果见表 2。

称取样品(6 份)50 mg 置 25 mL 量瓶中,加入“2.2.1”项下稀释溶剂 10 mL,超声 5 min 使溶解,冷却至室温,加入“2.2.2”项下乳果糖对照品储备液 10.0 mL,用稀释溶剂稀释至刻度,摇匀;取 1.0 mL 置 50 mL 量瓶中,用稀释溶剂稀释至刻度,

涡旋混匀,按“2.1”项下仪器条件进样。乳果糖的加样回收率为 98%~102%。

结果显示,回收率良好,表明该分析方法准确可靠;且通过双加样的测试结果可知,该分析方法的平行性结果良好。

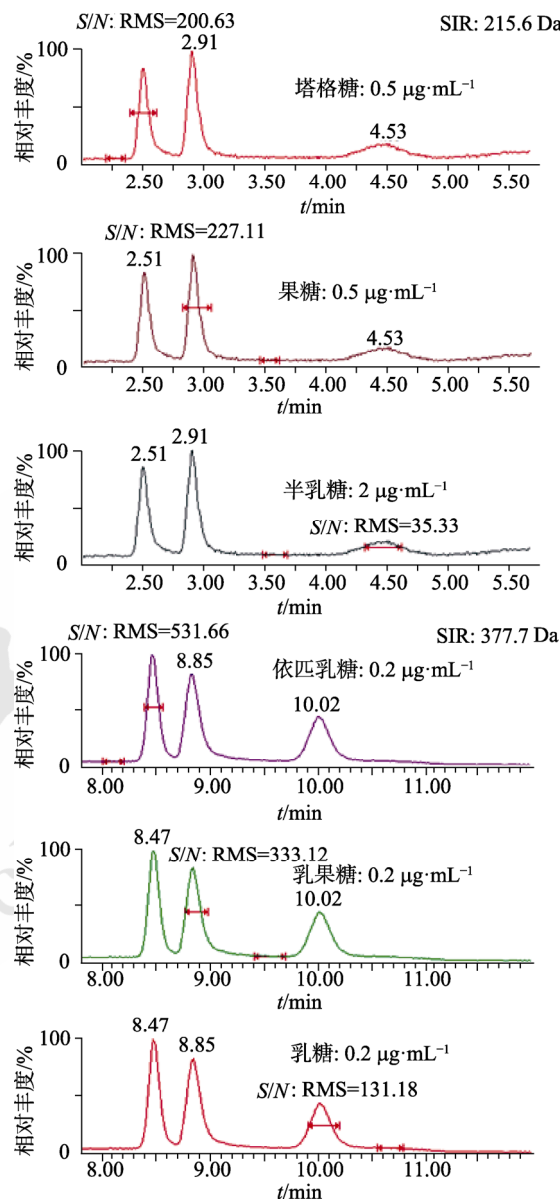


图3 6种目标化合物的定量限和检测限
Fig. 3 LOQ and LOD of the six target compounds

表1 6种目标化合物线性关系考察结果
Tab. 1 Linear regression of the six target compounds

化合物	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	r	标准曲线方程
塔格糖	5.1~123.2	0.998	$y=50.3807x-207.129$
果糖	4.9~117.8	0.998	$y=67.6512x-272.199$
半乳糖	5.4~129.8	0.996	$y=26.8399x-93.4823$
依匹乳糖	5.2~125.0	0.995	$y=145.021x+41.2006$
乳果糖	5.0~119.9	0.997	$y=190.315x-296.311$
乳糖	5.0~121.2	0.999	$y=138.058x-259.759$

表 2 5 个杂质的加样回收率结果

Tab. 2 Results of recoveries for the five related substances

加样浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	塔格糖/%	果糖/%	半乳糖/%	依匹乳糖/%	乳糖/%
15	103.3	90.0	99.3	98.7	96.7
	105.3	100.0	99.3	107.3	93.3
30	100.0	99.3	101.3	104.7	96.0
	105.0	96.0	107.1	98.0	93.6
45	99.8	101.8	104.3	101.8	100.4
	102.4	97.6	99.7	90.9	104.0
平均	102.6	97.5	101.8	100.2	97.3

表 3 UPLC-QDa 和 HPLC-RID 有关物质和含量测定结果对比表

Tab. 3 Comparison determination results of related substances and content by UPLC-QDa and HPLC-RID

样品	塔格糖		果糖		半乳糖		依匹乳糖		乳糖		含量测定(乳果糖)	
	QDa		QDa		QDa		QDa		QDa		QDa	
	RID	RID	RID	RID	RID	RID	RID	RID	RID	RID	RID	RID
A	/	/	/	/	10.6	11.8	4.3	2.7	9.0	6.4	103.8	100.8
B	1.4	1.3	/	/	4.6	5.6	3.3	0.8	6.7	4.6	99.8	98.2

注: “/” 表示未检出。

Note: “/” meant not detected.

3 讨论

本研究建立了乳果糖口服溶液中塔格糖、果糖、半乳糖、依匹乳糖、乳糖和乳果糖的 UPLC-QDa 定量测定方法, 优化了流动相组成和梯度, 最终采用含 0.1% 二乙胺和 $500\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 盐酸胍的水相和乙腈梯度洗脱, 并通过了方法学验证。该分析方法灵敏、稳定、准确, 且平行性结果良好, 改善了国内外现行质量标准中 HPLC-RID 方法系统耐用性及稳定性较差的问题。

按照建立的 UPLC-QDa 方法测定, 原研厂家(杜密克)和国内市场占有率较高的湖南科伦制药有限公司生产的乳果糖口服溶液中乳果糖的含量和有关物质塔格糖、果糖、半乳糖、依匹乳糖、乳糖的含量与中国药典 2015 年版方法结果基本一致。

本研究建立的方法灵敏、稳定、准确, 可用于乳果糖口服溶液中有关物质和含量测定的检测分析。

REFERENCES

- [1] LI F L, LI M Y. Research progress in preparation methods for and functions of lactulose[J]. Beverage Ind(饮料工业), 2012, 15(10): 9-13.

2.3.7 样品测定 将“2.2.3”项下供试品溶液按“2.1”项下仪器条件进样, 结果 2 个不同厂家生产的 2 批乳果糖口服溶液中乳果糖的含量及有关物质塔格糖、果糖、半乳糖、依匹乳糖、乳糖含量均符合中国药典 2015 年版规定的限度要求。测定结果与中国药典 2015 年版测定方法比较, 除依匹乳糖和乳糖采用 UPLC-QDa 法测定结果偏高以外, 其余均基本一致, 结果见表 3。

- [2] 中国药典. 二部[S]. 2015: 677.
- [3] 国家食品药品监督管理总局标准 YBH04882009[S]. 2009.
- [4] 国家食品药品监督管理总局进口药品注册标准 JX20170031[S]. 2017.
- [5] USP 43-NF38[S]. 2017: 4763-4764.
- [6] WANG C Q, QIAN Y Z, ZHANG C H, et al. Residue determination of 15 carbamates and their metabolites in Chinese cabbages and pakchoi by QuEChERS-ultra high performance liquid chromatography-QDa mass spectrometry [J]. Chin J Pest Sci(农药学报), 2018, 20(4): 1589-1605.
- [7] QIAN J Q, HU C Q. Rapid identification of the degradation products in cefuroxime aqueous solution by HPLC coupled with unit resolution single quadrupole mass spectrometer and calibrated lineshape isotope profile search(CLIPS) [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2012, 32(9): 1605-1613.
- [8] ZHAO J L, OU B L, ZHOU Y. Simultaneous determination of 11 chemicals added in itching agents traditional Chinese medicines by UPLC-MS/MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2016, 33(12): 1558-1562.
- [9] LI J, CHEN H B, WANG Y Y, et al. Microdetermination of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in candesartan cilexetil by GC-MS[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(13): 1615-1620.

收稿日期: 2020-05-25

(本文责编: 李艳芳)