

HPLC-ELSD 法测定氨基酸原料药中 5 种糖类杂质

刘 蕾[#], 姜 峰[#], 欧阳汉霖, 惠人杰^{*}

(江南大学药学院, 无锡 214122)

摘要 建立一种高效液相色谱-蒸发光散射检测(HPLC-ELSD)测定氨基酸原料药中5种糖类杂质的分析方法。利用离子交换树脂分离富集氨基酸样品中的残留糖类杂质, 并采用 Lichropher NH₂色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)进行分离, 以乙腈-水为流动相进行梯度洗脱, 漂移管温度为40 °C; 增益值为8; 载气为氮气(压力为350 kPa)。经验证, 果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖检测限为20.8 ~ 75.0 mg/kg, 定量限为96.2 ~ 238.8 mg/kg, 5种糖在线性范围内线性关系良好, 相关系数均大于0.999, 加样回收率在84.9% ~ 107.8%之间。该方法操作简便、灵敏度高、精密度好、准确可靠, 可用于氨基酸原料药的残糖杂质分析。

关键词 氨基酸; 糖类杂质; HPLC-ELSD; 阳离子交换树脂

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2021)01-0066-05

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20210109

引用本文 刘蕾, 姜峰, 欧阳汉霖, 等. HPLC-ELSD 法测定氨基酸原料药中 5 种糖类杂质[J]. 中国药科大学学报, 2021, 52(1):66-70.

Cite this article as: LIU Lei, JIANG Feng, OUYANG Hanlin, et al. Determination of five carbohydrate impurities in amino acid bulk drug by HPLC-ELSD[J]. J China Pharm Univ, 2021, 52(1):66-70.

Determination of five carbohydrate impurities in amino acid bulk drug by HPLC-ELSD

LIU Lei[#], JIANG Feng[#], OUYANG Hanlin, HUI Renjie^{*}

School of Pharmaceutical Sciences, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

Abstract An analytical method was developed for the determination of five carbohydrate impurities in amino acid drug substances by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection (HPLC-ELSD). Sugar impurities in the amino acid sample were separated and enriched by cation exchange resin. A Lichropher NH₂ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) was used for chromatographic separation, and a gradient elution was performed using acetonitrile-water as mobile phase. The drift tube temperature was 40 °C, the gain value was 8, and nitrogen (350 kPa) was auxiliary gas. Method validation results showed that the limits of detection for fructose, glucose, sucrose, maltose and lactose were in the range of 20.8–75.0 mg/kg and that the limits of quantitation were in the range of 96.2–238.8 mg/kg. Good linear relationship ($r \geq 0.999$) were in the linear range for the five sugars, and the recoveries ranged from 84.9%–107.8%. With easy operation, high sensitivity, good precision and reliable accuracy, the method can be used for analysis of residual sugar impurities in amino acid drug bulk drug.

Key words amino acids; sugar impurities; HPLC-ELSD; cation exchange resin

This study was supported by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. JUSRP22047) and the Special Funds for Jiangnan University Laboratory Management (No. JDSYS201927)

收稿日期 2020-05-07 *通信作者 Tel: 025-85329024 E-mail: huirenjie@yeah.net

基金项目 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(No. JUSRP22047); 江南大学实验室管理专项资助项目(No. JDSYS201927)

[#]刘蕾和姜峰为共同第一作者

*LIU Lei and JIANG Feng contributed equally to this work

氨基酸是构成蛋白质的基本单位, 在人类的生长、繁殖和免疫等方面发挥着重要作用^[1]。氨基酸的生产方法主要有提取法、发酵法、化学合成、酶法等方法^[2]。传统的提取法、化学合成法和酶法由于前体成本高、工艺复杂, 难以达到工业化生产的目的。因此, 发酵法是目前工业上普遍采用的生产方法。在发酵法的工艺流程中, 糖作为发酵过程中微生物的糖源被引入, 可能成为氨基酸原料药中的痕量杂质。目前因为缺乏高灵敏度的检测手段, 对于氨基酸原料药中残糖的杂质分析尚未见报道。

常用的糖类分析方法主要有毛细管电泳法^[3]、离子色谱法^[4]、气相色谱法^[5]、液相色谱法^[6-7]、液质联用法^[8]等。高效液相法是最常用的检测方法, 但由于糖类物质没有紫外特征吸收, 需经衍生化带上发色基团后, 才能采用紫外检测器检测进行测定, 操作步骤相对繁琐^[9-10]。应用示差折光检测器可直接测定糖类物质, 但检测器灵敏度低, 受温度影响较大, 且无法与梯度洗脱相兼容^[11-12], 因此普及度较低。而蒸发光散射检测器(ELSD)不依赖样品的光学特性或官能团结构, 主要是基于粒子引起光散射的通用能力, 因此 ELSD 非常适合于糖类物质的检测^[13-15]。

本研究利用阳离子交换树脂将氨基酸原料药中的氨基酸与痕量糖类杂质进行分离, 实现了氨基酸中残糖的有效富集, 并利用高效液相-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法对果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖类杂质进行定量分析, 旨在为氨基酸原料药的质量控制提供参考依据。

1 材 料

1.1 材料与试剂

D-果糖(批号:K1830110, 纯度≥99.5%)、D-(+)-葡萄糖(批号:I1718029, 纯度≥99.5%)、蔗糖(批号:K1814122, 纯度>98%)、D-(+)-麦芽糖一水合物(批号:J1829062, 纯度>98%)、 α -乳糖一水合物(批号:E1815005, 纯度>98%)、732强酸型苯乙烯系阳离子交换树脂(Na型)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司);市售醋酸赖氨酸、精氨酸、缬氨酸、丝氨酸和谷氨酸样品(纯度99%);乙腈(色谱

纯, 美国 Tedia 公司);实验所用水为自制超纯水。

1.2 仪 器

LC-20AT 高效液相色谱仪, 配置 ELSD-LT II 低温型蒸发光散射检测器(日本岛津株式会所); LYOQUEST-85 型冻干机(西班牙 Telstar 公司); BSA224S 精密电子天平[精度为 0.1 mg, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; RE-2000B 旋转蒸发仪(郑州科泰实验设备有限公司)。

2 方 法

2.1 溶液制备

2.1.1 混合对照品溶液的制备 分别精确称取果糖 2.0 mg、葡萄糖 3.0 mg、蔗糖 2.3 mg、麦芽糖 3.0 mg、乳糖 3.0 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 以水溶解并定容至刻度, 得混合对照品溶液。

2.1.2 供试品溶液的制备 阳离子交换树脂预处理: 精密称取 732 阳离子交换树脂 10.0 g, 置于 250 mL 锥形瓶中, 先用水洗涤至出水无色, 后用 5% HCl 100 mL 过夜处理, 水洗至中性; 再依次用等体积的 0.05 g/mL NaOH、5% HCl 过夜处理, 水洗至中性, 备用。

氨基酸样品的静态吸附: 精密称取氨基酸样品 0.20 g 于 250 mL 锥形瓶中, 加水 100 mL 溶解后, 加入预处理好的树脂, 并于室温下低速磁力搅拌静态吸附 4 h。静态吸附完成后, 过滤溶液, 滤液旋蒸至原体积的 25% 后, -80 ℃冻干。冻干物用水 1 mL 复溶, 得供试品溶液。

2.2 色谱条件

液相条件: Lichropher NH₂ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μ m); 柱温 30 ℃; 流动相: 水(A)-乙腈(B); 流速 1.0 mL/min; 梯度洗脱: 0~3 min, 88% B, 3~12 min, 88% B→75% B, 12~15 min, 75% B, 15~23 min, 75% B→88% B, 23~30 min, 88% B; 漂移管温度 40 ℃; 增益值 8; 载气氮气, 压力 350 kPa; 进样量 20 μ L。

3 结 果

3.1 专属性试验

取混合对照品溶液和空白溶剂水, 在“2.2”项下条件下进行测定, 考察方法的专属性。结果如

图1所示,溶剂对各组分的测定均无影响,方法专属性良好。

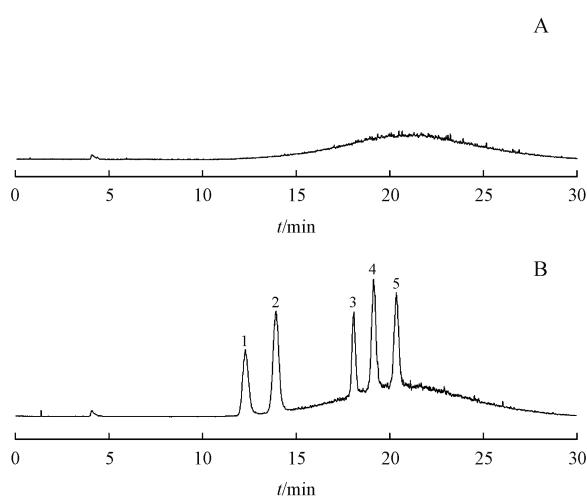


Figure 1 Chromatograms of blank solution (A) and sugar standard mixed solution (B)
1: Fructose; 2: Glucose; 3: Sucrose; 4: Maltose; 5: Lactose

3.2 线性关系、检测限与定量限

配制系列浓度的混合对照品溶液,在“2.2”项下条件下进行测定,以各组分峰面积的对数为纵坐标(y),以相应质量浓度的对数为横坐标(x),绘制标准曲线。取混合对照品溶液1 mL,逐级稀释,按照“2.2”项条件进行测定,根据信噪比 $S/N = 3$ 确定检测限(LOD)、 $S/N = 10$ 确定定量限(LOQ)。结果如表1所示,5种糖类化合物的线性关系良好,相关系数(r)均大于0.999,LOD和LOQ分别在20.8~75.0 mg/kg和96.2~238.8 mg/kg之间。

3.3 仪器精密度

取混合对照品溶液,在“2.2”项下条件下进行测定,连续测定6次,计算各组分峰面积的RSD。结果表明,果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖等5种糖的峰面积RSD(%)分别为0.70、0.76、0.62、0.56、0.43,仪器精密度良好。

Table 1 Linear equation, limits of detection and limits of quantitation for the five sugars

Sugar	Linear equation	r	Linear range/(mg/kg)	LOD/(mg/kg)	LOQ/(mg/kg)
Fructose	$y = 1.3297x - 2.4252$	0.9997	250.0~1500.0	75.0	238.8
Glucose	$y = 1.2622x - 2.6624$	0.9998	250.0~1500.0	66.6	212.3
Sucrose	$y = 1.1603x - 3.172$	0.9997	150.0~1500.0	20.8	96.2
Maltose	$y = 1.1101x - 3.2285$	0.9999	150.0~1500.0	25.0	123.0
Lactose	$y = 1.0463x - 3.4555$	0.9998	150.0~1500.0	34.6	125.0

3.4 重复性

按照“2.1.1”所述方法制备混合对照品溶液6份,在“2.2”项条件下进行测定,记录峰面积,计算各组分峰面积的RSD。结果表明,果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的峰面积的RSD(%)分别为1.1、1.4、2.1、2.0、1.3,表明方法重复性良好。

3.5 加样回收率

分别精密称取果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖6.8 mg,溶于水4 mL,分别精密吸取上述溶液0.8、1、1.2 mL于10 mL量瓶,加水定容混匀,配制成低、中、高3种质量浓度的混合标准溶液。精密称取精氨酸样品0.2 g各9份,加适量水溶解,再分别加入低、中、高质量混合标准溶液1 mL,以水定容至100 mL,每个浓度平行3次。按照“2.1.2”项下方法进行树脂交换处理,以“2.2”项下条件进行测定,记录峰面积,依据“3.2”项下的标准曲线,计算各种糖类化合物的加样回收率。如表2所示,不同质量浓度的加样回收率在88.0%~109.0%之间。

间,RSD(%)在2.4~8.8之间,表明方法的准确度可以满足氨基酸中的糖类杂质的测定要求。

Table 2 Recoveries of spiked sample ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Sugar	Spiked/(mg/kg)	Average recovery/%	RSD/%
Fructose	680.0	99.9 ± 8.0	5.5
	850.0	94.7 ± 2.1	
	1 020.0	99.6 ± 5.0	
Glucose	680.0	94.0 ± 2.7	4.8
	850.0	91.9 ± 3.5	
	1 020.0	95.5 ± 7.0	
Sucrose	680.0	92.6 ± 4.6	8.8
	850.0	92.7 ± 2.4	
	1 020.0	109.0 ± 0.8	
Maltose	680.0	88.2 ± 1.7	2.4
	850.0	92.4 ± 1.1	
	1 020.0	89.7 ± 0.9	
Lactose	680.0	88.0 ± 3.7	
	850.0	91.4 ± 1.4	3.2
	1 020.0	88.0 ± 2.4	

3.6 样品测定

分别取精氨酸、醋酸赖氨酸、缬氨酸、丝氨酸和谷氨酸样品各两批次,按照“2.1.2”项所述方法进行处理,依据“2.2”项下条件进行测定,按外标法计算样品中的果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖的含量。结果表明,5种氨基酸样品中均未检测到果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖这5种糖类杂质。

4 讨 论

4.1 树脂的选择

分别考察了D113型阳离子交换树脂、D001型阳离子交换树脂和732阳离子交换树脂对氨基酸的吸附能力。按照“2.1.2”项所述方法分别使用3种树脂对精氨酸与糖的混合溶液进行处理,并依据“2.2”项条件进行测定。结果表明,D113弱酸型阳离子交换树脂对氨基酸的吸附在4.5 h内完成,吸附能力较差。D001型阳离子交换树脂能在3 h内对氨基酸完成吸附,吸附能力较好,但糖在树脂上大量附着,回收率只有57.8%。732阳离子交换树脂能在4 h内对氨基酸完成吸附,且糖回收率较高,回收率达88.4%。因此,选择732阳离子交换树脂对氨基酸样品进行处理。

4.2 液相条件优化

4.2.1 柱温的选择 分别考察了柱温为30 °C、35 °C和40 °C时对测定结果的影响。结果表明,柱温对5种糖类化合物的分离度无明显影响,但对5种糖类化合物的响应稍有影响,且柱温为30 °C时,糖类化合物的总峰面积最大。

4.2.2 洗脱条件优化 考察了不同的洗脱条件对5种糖类化合物的分离情况。在25%水相等度洗脱条件下,5种糖类化合物的色谱峰基线平稳,但未达到有效分离。在20%水相等度洗脱条件下,5种糖的分离度虽明显改善,但色谱峰形及信噪比较差,且二糖组分(蔗糖、麦芽糖、乳糖)响应较低。基于以上结果,改用梯度洗脱方式进行分离,当以10%~30%的水相进行梯度洗脱时,5种糖达到基线分离,峰形较好,且二糖组分响应高。根据此情况摸索了一系列的梯度条件,发现当系统采用梯度洗脱条件:0~3 min, 88% B; 3~12 min, 88% B→75% B; 12~15 min, 75% B; 15~23 min, 75% B→88% B; 23~30 min, 88% B时,5种糖类化

合物的出峰时间合适,色谱峰的分离情况较好,相邻峰最低分离度为2.72,且响应值较高。在梯度条件摸索过程中,发现高水相位置的基线始终不平稳。推测因水的沸点高,挥发性差,导致雾化及蒸发过程中液滴的大小和均匀性不如高有机相水平,因此基线产生飘移。

4.3 ELSD 条件优化

4.3.1 漂移管温度的选择 漂移管温度是蒸发光检测器的重要参数之一,选取原则是达到最佳信噪比时的最低漂移管温度。漂移管温度过低,流动相挥发不完全,漂移管温度过高,流动相趋向沸腾,背景噪音变大,并且样品形成的颗粒大小不一,响应降低,从而信噪比降低。分别考察了漂移管温度为40 °C、45 °C、50 °C等不同漂移管温度,对测定结果的影响,以总峰面积和信噪比为指标。结果表明,在漂移管温度为40~50 °C时,信噪比变化不明显,差别较小,而总峰面积在此范围内呈下降趋势(如图2所示)。实验结果表明,漂移管温度为40 °C时,流动相已挥发完全,且信噪比达到理想结果,因此选择漂移管温度为40 °C。

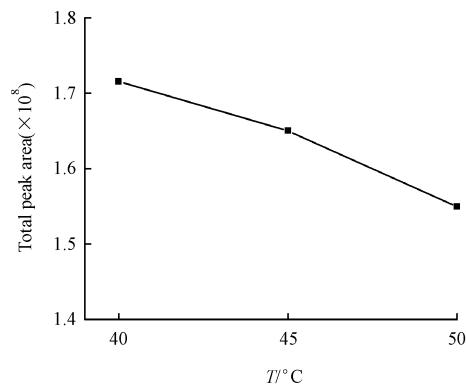


Figure 2 Total peak area of sugar at different drift tube temperatures

4.3.2 增益值的选择 增益值与光散射信号呈线性关系,增益值越大,待测组分响应值会越高,同时基线噪音也会随之增大。本试验考察了增益值分别为4、6、8时,对测定结果的影响,以信噪比为指标。当增益值为8时,5种糖类化合物的平均信噪比最大。

5 结 论

文献报道^[16],麦芽糖和乳糖由于互为同分异构体,结构和性质相近,两者经1-苯基-3-甲基-5-毗

唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolone, PMP)试剂衍生化后,利用紫外检测器进行检测,色谱峰会发生重合,难以分离。在本实验中利用氨基柱对麦芽糖和乳糖进行直接分离,经蒸发光检测器检测,两者的色谱峰可完全分离,并达到定量要求,因此可利用该方法对二糖物质进行直接定性定量分析。

本试验针对氨基酸原料药中5种可能的糖类残留杂质进行分析测定。利用氨基酸和糖类物质的带电性质差异,通过阳离子交换树脂成功分离并富集了氨基酸样品中可能的5种痕量糖类杂质,利用梯度洗脱方式成功分离了5种糖,并直接利用蒸发光散射检测器完成了定性和定量分析。所建立的方法经方法学验证,精密度良好、灵敏度高,且方法操作简单,易于推广,适用于氨基酸原料药中残糖杂质的检测。本研究为氨基酸原料药的质量控制提供了科学依据,也为其他发酵型产品的质量控制提供了参考依据。

References

- [1] Negrotto L, Correale J. Amino acid catabolism in multiple sclerosis affects immune homeostasis [J]. *J Immunol*, 2017, **198**(5): 1900-1909.
- [2] Hashimoto SI. Discovery and history of amino acid fermentation [J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2017, **159**: 15-34.
- [3] Szilágyi TG, Vecseri BH, Kiss Z, et al. Analysis of the oligosaccharide composition in wort samples by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection [J]. *Food Chem*, 2018, **256**: 129-132.
- [4] Fa Y, Liu YH, Xu AH, et al. Color and alcohol removal for the simultaneous detection of amino acids and sugars in wine by two-dimensional ion chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 2017, **1063**: 36-41.
- [5] Li B, Lu F, Tian SY. Simultaneous determination of neutral sugar, uronic acid, amino sugar and sialic acid of polysaccharides by gas chromatography [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2011, **37**(9): 208-211.
- [6] Nayik GA, Dar BN, Nanda V. Physico-chemical, rheological and sugar profile of different unifloral honeys from Kashmir valley of India [J]. *Arab J Chem*, 2019, **12**(8): 3151-3162.
- [7] Chen JC, Li L, Zhou X, et al. Preliminary characterization and antioxidant and hypoglycemic activities *in vivo* of polysaccharides from *Huidouba* [J]. *Food Funct*, 2018, **9**(12): 6337-6348.
- [8] Georgelis N, Fencil K, Richael CM. Validation of a rapid and sensitive HPLC/MS method for measuring sucrose, fructose and glucose in plant tissues [J]. *Food Chem*, 2018, **262**: 191-198.
- [9] Ai YJ, Yu Z, Chen YQ, et al. Rapid determination of the monosaccharide composition and contents in tea polysaccharides from *Yingshuang* Green Tea by pre-column derivatization HPLC [J]. *J Chem*, 2016, **2016**: 1-5.
- [10] Beňo E, Góra R, Huttá M. Development of a precolumn derivatization HPLC method with diode-array detection for the determination of amino sugars in peat and soil humic acids [J]. *J Sep Sci*, 2018, **41**(4): 814-821.
- [11] Gao Q, Han ZT. Determination of soluble sugars in forest biomass raw materials by high performance liquid chromatography-differential refractive index detector [J]. *Chin J Anal Lab* (分析试验室), 2017, **36**(12): 1406-1410.
- [12] Wang XJ, Zhang YL, Liu JB, et al. Analysis of glycosyl profile of aroma glycosides in Meili Grape by high performance liquid chromatography-refractive index detector with amino column [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2017, **45**(5): 681-686.
- [13] Ma CM, Sun Z, Chen CB, et al. Simultaneous separation and determination of fructose, sorbitol, glucose and sucrose in fruits by HPLC-ELSD [J]. *Food Chem*, 2014, **145**: 784-788.
- [14] Ding HL, Li C, Jin P, et al. Simultaneous determination of monosaccharides, disaccharides oligosaccharides and sugar alcohols in foods by high performance liquid chromatography with evaporative light-scattering detection [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2013, **31**(8): 804-808.
- [15] Lindqvist DN, Pedersen HÆ, Rasmussen LH. A novel technique for determination of the fructose, glucose and sucrose distribution in nectar from orchids by HPLC-ELSD [J]. *J Chromatogr B*, 2018, **1081**: 126-130.
- [16] Tian Y, Chen ZX, Zhang N, et al. Study on the method of reducing sugar derivatization in water-extract of Chinese materia medica [J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2016, **31**(9): 3803-3807.