

示差折光高效液相色谱法测定复方胃蛋白酶颗粒中的糖

颜 军^{1,2}, 谢贞建¹, 何 钢², 邬晓勇², 郭晓强¹, 苟小军^{1,2,*}

(1. 成都大学药食同源植物资源开发重点实验室, 四川 成都 610106; 2. 成都大学中药化学实验室, 四川 成都 610106)

摘 要: 建立用示差折光高效液相色谱法测定复方胃蛋白酶颗粒中葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的方法。选用色谱柱为 Sugar-D, 流动相为乙腈-水(78:22, *V/V*), 流速为 1.0 mL/min, 在室温条件下进样分析。结果表明: 在该条件下, 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖能够较好分离, 在 0.50 ~ 10.00 mg/mL 范围内线性关系良好; 葡萄糖回收率为 94.3% ~ 103.7%, 蔗糖回收率为 101.4% ~ 105.1%; 经不确定度评价, 合成不确定度为 1.92%, 扩展不确定度为 4.1%。该方法简单、准确、稳定、可靠, 可用于复方胃蛋白酶颗粒中葡萄糖、蔗糖的含量测定。

关键词: 示差折光高效液相色谱法; 复方胃蛋白酶颗粒; 葡萄糖; 蔗糖; 麦芽糖

Determination of Sugars in Compound Saccharated Pepsin Granules by High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection

YAN Jun^{1,2}, XIE Zhen-jian¹, HE Gang², WU Xiao-yong², GUO Xiao-qiang¹, GOU Xiao-jun^{1,2,*}

(1. Key Laboratory of Medicinal and Edible Plants Resources Exploitation, Chengdu University, Chengdu 610106, China;

2. Laboratory for Chemistry of Traditional Chinese Medicine, Chengdu University, Chengdu 610106, China)

Abstract: A high performance liquid chromatography with refractive index detection (HPLC-RI) method was established for the simultaneous quantification of glucose, sucrose and maltose. The chromatographic separation was achieved on a Sugar-D column using a mixture of acetonitrile and water (*V/V* = 78:22) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min. Under these conditions, glucose, sucrose and maltose could be well separated. A good linear relationship for each analyte was observed over the concentration range of 0.50 - 10.00 mg/mL. The spike recoveries of glucose and sucrose were 94.3% - 103.7% and 101.4% - 105.1% respectively. The results of uncertainty evaluation indicated that the combined standard uncertainty was 1.92% and the expanded uncertainty was 4.1%. The method was simple, accurate, stable, reproducible, and suitable for the practical determination of glucose, sucrose and maltose in compound saccharated pepsin granules.

Key words: high performance liquid chromatography with refractive index detection (HPLC-RI); compound saccharated pepsin granules; glucose; sucrose; maltose

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)22-0248-03

糖是人体必需的营养要素, 吃少量的糖对人体有益。但每个人的糖耐量有差异, 进食过多的糖对身体不利。糖作为药剂的矫味剂, 可以掩盖苦味, 深受患者欢迎。因此, 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等在一些生化制品、药剂中广泛应用^[1]。这些糖的存在还可以起到稳定剂的作用。如今, 还没有检测生化制品中葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的国家标准方法。所以, 建立一种检测生化制品中糖含量的测定方法十分必要。

糖含量测定常用的方法有比色法^[2-3]、高效液相色谱

法-蒸发光散射法(high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detector, HPLC-ELSD)^[4-5]、高效液相色谱-示差折光检测法(HPLC-refractive index, HPLC-RI)^[6-8]等。比色法是一种还原糖的测定方法, 常采用费林试剂。所有单糖和大多数二糖是还原糖, 但蔗糖除外。而蔗糖在生化制品中添加较为普遍, 所以采用比色法有局限性^[9]。因此, 根据糖的性质, 采用分离分析的液相色谱法能弥补比色法的不足^[10]。ELSD最大的优点在于能检测不含发色团的化合物, 如碳水化合物

收稿日期: 2011-06-29

基金项目: 国家标准化管理委员会国家标准制修订计划项目(20091323-T-469); 成都大学基金项目(2010XJZ24)

作者简介: 颜军(1971—), 男, 副教授, 硕士, 研究方向为生物活性成分的分离与检测。E-mail: yj7162@cdu.edu.cn

* 通信作者: 苟小军(1974—), 男, 教授, 博士, 研究方向为药食同源植物加工技术。E-mail: jmee@cdu.edu.cn

物、脂类、氨基酸、脂肪酸和聚合物等^[11-15],还具有对温度变化不敏感、检测灵敏度高、基线稳定、适合梯度洗脱等特点。但在糖的分析上,常采用的是氨基柱。在有水的流动相中,氨基要流失。所以在ELSD的色谱图中,常有较大的针状的噪声产生,且影响目标物质的出峰。另外,检测器的条件需要优化,操作相对繁琐。示差折光检测器也是通用型检测器^[16-17]。虽然检测灵敏度相对较低,但氨基的流失不影响仪器的噪声和目标物质,且操作相对简单。本实验采用高效液相色谱-示差折光检测法,建立一种同步检测胃蛋白酶制剂中葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的分析方法,方法准确、简便、快速,具有较强的实用性。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

葡萄糖、蔗糖、麦芽糖 国药集团化学试剂有限公司;复方胃蛋白酶颗粒1# 重庆申高生化制药有限公司;复方胃蛋白酶颗粒2# 四川菲德力制药有限公司;乙腈(色谱纯) 四川航嘉生物医药科技有限责任公司。

L-2000 高效液相色谱仪、L-2490 示差折光检测器 日本 Hitachi 公司;T15RT 台式高速离心机 上海天美生化仪器设备工程有限公司;KQ3200 超声波清洗器 昆山市超声仪器有限公司;分析天平 北京赛多利斯天平有限公司。

1.2 方法

1.2.1 标准储备液的配制

分别精确称取5g(精确至0.0001g)经 95 ± 2 干燥2h的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖标准品,加适量60%乙腈溶液溶解,转移到100mL容量瓶中,用60%乙腈溶液定容至刻度,摇匀,备用。

1.2.2 混合标准品溶液的配制

分别取等量1.2.1节中配制好的葡萄糖、蔗糖、麦芽糖标准储备液于容量瓶中,60%乙腈溶液定容至刻度,0.45 μ m微孔膜过滤,备用。

1.2.3 供试品溶液的制备

精确称量研磨成粉末的混匀试样0.5g,精确至0.0001g。加去离子水10mL溶解后于沸水浴中加热10min。冷却后,离心(10000r/min, 10min),上清液转移至50mL容量瓶中,60%乙腈溶液定容至刻度,摇匀,用0.45 μ m滤膜过滤,供液相色谱测定。

1.2.4 色谱条件

色谱柱: Sugar D(4.6mm \times 250mm, 5 μ m);流动相: 乙腈-水(78:22, V/V);流速: 1.0mL/min;柱温: 30 ;检测器池温度: 35 ;进样量: 20 μ L。

2 结果与分析

2.1 色谱分析条件

本实验比较了Alltima Amino柱、岛津-GL Inertsil NH₂柱和Sugar-D色谱柱,最后发现Sugar-D色谱柱的分离效力好。氨基柱分离糖的液相色谱分析中,一般都采用乙腈溶液为流动相。对乙腈溶液的体积分数为76%、78%、80%的流动相进行考察,结果表明乙腈溶液的体积分数为78%时,分离效果最好(图1)。从图1可见,3种糖峰形良好,各糖峰分离完全(分离度大于1.5)。

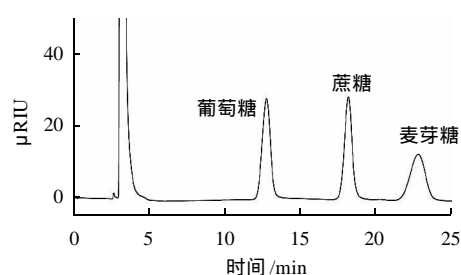


图1 混合标准溶液色谱图

Fig.1 HPLC chromatogram of mixed glucose, sucrose and maltose standards

2.2 方法特性考察

2.2.1 线性关系

分别精确移取50.00mg/mL葡萄糖、蔗糖、麦芽糖标准溶液0.50、1.00、2.50、5.00、7.50、10.00mL于50mL容量瓶中用,60%乙腈溶液定容。配成0.50、1.00、2.50、5.00、7.50、10.00mg/mL的3种糖的混合溶液。以样品质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标绘制标准曲线,结果见表1。

表1 葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的线性方程

Table 1 Linear regression equations with linear ranges of glucose, sucrose and maltose

糖	线性方程	相关系数 r	线性范围 / (mg/mL)
葡萄糖	$y = 1694663.9942x + 33146.1923$	0.9997	0.50 ~ 10.00
蔗糖	$y = 1337306.0081x + 98402.1307$	0.9998	0.50 ~ 10.00
麦芽糖	$y = 1136126.4602x + 20964.9675$	0.9995	0.50 ~ 10.00

由表1可知,葡萄糖、蔗糖、麦芽糖在0.50~10.00mg/mL的范围内,线性关系良好。

2.2.2 精密度

取混合标准品溶液,连续进样分析6次。分别测

得峰面积, 计算各组峰面积的相对标准偏差。葡萄糖、蔗糖、麦芽糖各组峰面积的相对标准偏差分别为 0.75%、1.28%、1.29%。

2.2.3 重复性

取同一批样品, 按 1.2.3 节的供试品溶液制备方法平行制备供试液 6 份, 进样分析。结果葡萄糖、蔗糖含量的相对标准偏差分别为 1.31%、1.27%, 表明重复性良好。

2.2.4 稳定性

取供试品溶液, 于 0、2、4、6、8、24 h 各进样一次, 记录峰面积, 计算相对标准偏差, 考察样品的稳定性。结果表明, 各样品峰的保留时间基本一致, 各时间点葡萄糖、蔗糖峰面积的相对标准偏差分别为 0.92%、0.75%。因此, 样品在 24 h 内稳定。

2.2.5 加样回收率

经检测, 复方胃蛋白酶样品中添加的辅料为葡萄糖、蔗糖。按标样与样品中糖含量的比为 0.8:1、1:1、1.2:1 的比例加入葡萄糖、蔗糖标准品, 并计算加样回收率。结果表明, 葡萄糖回收率在 94.3% ~ 103.7% 之间, 蔗糖回收率在 101.4% ~ 105.1% 之间。

2.2.6 方法扩展不确定度评定

根据 JJF 1135—2005《化学分析测量不确定度评定》^[18]对本方法进行不确定度评定。结果表明, 在引起复方胃蛋白酶颗粒中糖含量测定的不确定度中, 测量误差和重复性所带来的不确定度所占比例分别为 40.32%、24.48%。其合成不确定度为 1.92%, 扩展不确定度为 4.1%。

2.3 样品含量测定

采用本方法对复方胃蛋白酶颗粒中葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量进行测定, 结果见表 2。

表 2 样品糖含量测定结果

Table 2 Analysis results of fructose, glucose, sucrose and maltose in compound saccharated pepsin granule samples

复方胃蛋白酶颗粒号	葡萄糖/(mg/g)	蔗糖/(mg/g)	麦芽糖/(mg/g)
1 [#]	未检出	971.8	未检出
2 [#]	365.0	618.6	未检出

3 结论与讨论

3.1 经方法特性考察, 所建立的方法稳定性、重现性良好。可用于对胃蛋白酶中葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含

量测定。

3.2 供试品制备中, 采用沸水浴中加热 10 min, 主要是为了沉淀蛋白。在糖的分析中, 效果较好。各糖峰分离较好, 没有蛋白等杂质干扰。

3.3 经不确定度的计算, 测量误差和重复性所带来的不确定度所占比例分别为 40.32%、24.48%。由于示差折光检测器对温度变化很敏感, 所以仪器本身的不稳定性以及环境温度的变化是造成不确定度的主要因素。因此, 应尽量控制环境温度保持恒定。

参考文献:

- [1] 郭丽珍, 刘京华. 降低中药糖浆剂含糖比例[J]. 中国中药杂志, 1992, 17(2): 92.
- [2] 黄文武, 邵秋霞, 马岚. 应用比色法测定静脉注射用人血球蛋白中麦芽糖含量[J]. 中国生物制品学杂志, 2000, 13(1): 53-54.
- [3] 吴明东, 许文举, 李其国, 等. 比色法测定静注人乙型肝炎球蛋白中麦芽糖的含量[J]. 医药世界, 2007(1): 69-70.
- [4] 林婧烨, 柯李晶, 鲁伟, 等. 高效液相色谱法测定龙眼果中水溶性单糖和寡糖[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4): 513-516.
- [5] 张媛媛, 聂少平, 万成, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定单糖、双糖及低聚果糖[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 237-239.
- [6] 柯云翠, 朱义. HPLC-RI 测定复方甘露醇注射液甘露醇、葡萄糖的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(3): 245-247.
- [7] 梁蔚阳, 冯炜菁. 高效液相色谱-示差折光检测法测定注射用转化糖中果糖与葡萄糖的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2007, 28(2): 116-117.
- [8] 张云楚, 张新规. 高效液相色谱-示差折光检测法同时测定维生素 C 葡萄糖注射液维生素 C 与葡萄糖的含量[J]. 中国药品标准, 2008, 9(6): 421-423.
- [9] 孙兰, 黎淑端, 聂木海, 等. 一起食品中还原糖测定结果异常的原因分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1137.
- [10] 沈小婉, 李明元, 叶世柏, 等. 色谱法在食品分析中的应用[M]. 北京: 北京大学出版社, 1992.
- [11] 张媛媛, 聂少平, 万成, 等. 高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定单糖、双糖及低聚果糖[J]. 食品科学, 2009, 30(18): 237-239.
- [12] 莫海涛, 李永库, 潘发用, 等. 高效液相色谱-激光蒸发光散射检测法测定低蔗糖食品中葡萄糖、蔗糖、麦芽糖和乳糖含量[J]. 食品工业科技, 2006, 27(3): 186-187.
- [13] 鄢丹, 韩玉梅, 董小萍. 反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法同时测定阿胶中的 17 种未衍生氨基酸[J]. 色谱, 2006, 24(4): 359-362.
- [14] 韩雪, 汪勇, 胡长鹰, 等. 大豆卵磷脂中脑苷脂类物质的分析与检测研究[J]. 中国粮油学报, 2011, 26(5): 111-118.
- [15] 郑姜彬, 陈宝宝, 陈干良, 等. HPLC-ELSD 法测定麻花素中 4 种脂溶性成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(5): 787-790.
- [16] 刘玉峰, 李黎, 李东, 等. 高效液相色谱法测定食品中的单糖、双糖[J]. 食品科学, 2007, 28(3): 293-296.
- [17] 张书芬, 史萍萍, 王全林, 等. 液相色谱示差折光法测定蜂蜜中的果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 280-283.
- [18] 国家标准物质研究中心. JJF 1135—2005 化学分析测量不确定度评定[S]. 2005.