

柱前衍生 HPLC-UV 法测定氯氮平片中乳糖的含量

doi:10.3969/j.issn.1674-7100.2021.04.003

陈瑶¹ 汤建新¹

唐英^{1,2}

1. 湖南工业大学

生命科学和化学学院

生物医用纳米材料与器件

湖南省重点实验室

湖南 株洲 412007

2. 湖南大学

化学化工学院

化学生物传感与计量学

国家重点实验室

湖南 长沙 410082

摘要: 采用 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮 (PMP) 为衍生试剂, 建立柱前衍生高效液相色谱法准确测定氯氮平片中乳糖的含量。实验结果显示, 在 0.060 4~0.399 7 mg/mL 范围内, 衍生目标物的峰面积与乳糖质量浓度呈现良好的线性关系, 线性相关系数 R^2 为 0.999 4, 加标回收率在 96.7%~99.2% 之间, 定量限为 0.32 $\mu\text{g/mL}$ 。随机抽选 3 个批次氯氮平片仿制样品进行检测, 乳糖含量分别是 42.09, 43.36, 43.45 mg/片, 实测含量与处方含量的偏差不超过 2.0 mg/片, 结果完全满足氯氮平参比制剂中乳糖含量的检测需要。与现有的检测方法相比较, 所提方法具有专属性强、灵敏度高、结果准确可靠等优点, 可为氯氮平一致性评价处方的开发提供数据支持, 有利于加快仿制药的开发速率和成功率。

关键词: 高效液相色谱; 乳糖; 氯氮平片; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮; 一致性评价

中图分类号: O65

文献标志码: A

文章编号: 1674-7100(2021)04-0016-08

引文格式: 陈瑶, 汤建新, 唐英. 柱前衍生 HPLC-UV 法测定氯氮平片中乳糖的含量 [J]. 包装学报, 2021, 13(4): 16-23.

1 研究背景

氯氮平 (clozapine) 是常见的非典型抗精神病药物^[1]。根据药物一致性评价的要求, 制剂处方中原料药及各辅料的含量需与参比制剂 (reference listed drug, RLD) 保持一致。医药研发技术需要保密, 因而医药企业只公示氯氮平参比制剂的辅料种类, 并无辅料的相关用量。故利用逆向工程研究技术, 测出相

关辅料的含量, 对氯氮平一致性评价项目的处方研究具有重要意义^[2]。

乳糖是存在于大多数哺乳动物乳中的天然二糖, 由半乳糖和蔗糖组成^[3]。乳糖因其安全性高, 广泛用于片剂和胶囊剂的填充剂或稀释剂^[4]、静脉注射剂、冻干产品和婴儿食品配方中。不同粒度的乳糖具有不同的作用, 如片剂湿法制粒及伴有研磨混合的过程时, 宜选择细小粒度级别的乳糖, 这样更易于与其他

收稿日期: 2021-03-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21705044, 21804040); 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ50134); 湖南省教育厅科学研究基金资助项目 (19C0554); 化学生物传感与计量学国家重点实验室开放课题基金资助项目 (2018015); 湖南工业大学“绿色包装与安全”专项研究基金资助项目 (2017ZBLY14)

作者简介: 陈瑶 (1987-), 女, 湖南湘潭人, 湖南工业大学讲师, 博士, 主要从事化学计量学和浑浊体系光谱校正分析研究, E-mail: chenyaoy717@hnu.edu.cn

通信作者: 唐英 (1986-), 女, 重庆合川人, 湖南工业大学讲师, 博士, 主要从事生物传感以及靶向肿瘤细胞荧光成像与治疗研究, E-mail: yingtang@hnu.edu.cn

成分混合,也可更有效发挥黏合剂的作用^[5]。氯氮平作为口服制剂,工艺配方中也需加入了一定比例的乳糖作为填充剂。乳糖作为氯氮平不可或缺的辅料,确定其含量,可为氯氮平片剂工艺处方的开发提供有效数据,从而加快氯氮平片剂的仿制速度。

乳糖无紫外吸收能力。目前其检测方法有碘量法^[6]、滴定法^[7]、酶解法^[8]、比色法^[9]、旋光仪法^[10]、近红外光谱法^[11-12]、拉曼光谱法^[13],以及高效液相色谱谱(high-performance liquid chromatography, HPLC)与示差折光检测器^[14-18]、蒸发光散射检测器^[19-20]、质谱检测器^[8,21]、电喷雾检测器^[22]等串联的方法。其中,碘量法、酶解法、滴定法、旋光仪法,这些方法存在操作复杂、技术要求高、测试时间长、灵敏度不足、准确度较低的问题;近红外光谱法及拉曼光谱法需结合化学计量学建立定量模型,模型的建立需要大量样品和预先测定目标值,成本较高;高效液相色谱与示差折光检测器、蒸发光散射检测器、电喷雾检测器、质谱检测器等串联的方法具有灵敏度高优点,但该类仪器设备昂贵,制约其在中小型医药企业的广泛应用。因此,发展一种成本低、快速、灵敏的乳糖检测技术具有重要意义。

1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮(1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolinone, PMP)可与乳糖发生衍生反应(见图1),其衍生物具有较强的紫外吸收能力,从而可通过高效液相色谱-紫外检测器(ultraviolet absorption detector, UV)对乳糖进行间接检测^[23-24]。目前, HPLC-UV 普及率高且经济,实验操作简单,准确度高。虽然 HPLC-UV 广泛用于中药材、食品、生物材料中乳糖含量的检测,但其应用于仿制药领域的报道尚少。

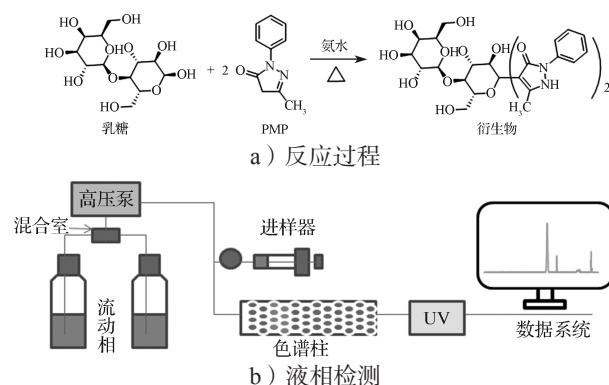


图1 乳糖和PMP反应过程及液相检测模拟

Fig. 1 Lactose derivatization simulation with PMP and the detection principle of HPLC

综上所述,本研究利用PMP与乳糖进行衍生反应,再对衍生物(在245 nm处有紫外吸收)进行检测,间接定量分析氯氮平片中乳糖的含量。该方法具有简便、快速、专属性强、灵敏度高优点,可满足氯氮平一致性评价中逆向工程研究的需求,进而加快仿制药的研发进程。

2 实验部分

2.1 主要设备与仪器、试剂与材料

1) 设备与仪器

分析天平, XSE105DU型, 瑞士Mettler Toledo集团; 水浴锅, DF-101S型, 郑州豫华仪器制造有限公司; 高效液相色谱仪, Waters e2695-2998型, 美国Waters公司; 色谱工作站, Empower 3型, 美国Waters公司; 纯水仪, Exceed-Ad-32型, 成都艾柯分析设备有限公司; 超声清洗仪, SB-5200D型, 宁波新芝生物科技股份有限公司; pH计, PHS-3C型, 上海仪电科学仪器股份有限公司。

2) 试剂与材料

乳糖、磷酸,均为分析纯,天津科密欧化学试剂有限公司; 1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮、氨水,均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司; 醋酸铵,分析纯,山东西亚化学工业有限公司; 甲醇、乙腈,均为色谱纯,德国默克公司; 氯氮平片参比制剂,批号为T17039,规格为25 mg,诺华集团; 氯氮平片仿制样品,批号为190701、190705、190708,规格为25 mg,湖南中南制药有限公司。

2.2 实验方法

2.2.1 色谱条件

采用Inertsil ODS-3色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相A为0.1 mol/L醋酸铵溶液,用磷酸调节溶液pH至5.5,流动相B为乙腈,流速为1.0 mL/min,检测波长为245 nm,柱温为30℃,进样量为10 μL,按照表1进行梯度洗脱。

表1 流动相梯度洗脱条件

Table 1 HPLC mobile phase gradient elution condition

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	90	10
25.0	65	35
25.5	20	80
30.0	20	80
30.5	90	10
35.0	90	10

2.2.2 溶液配制

1) 空白基质: 按照自研氯氮平处方混合相关辅料制得(无乳糖)。

2) 衍生溶液: 精确称量 2.000 76 g PMP 至 100 mL 容量瓶, 再加入甲醇经超声溶解, 定容, 摇匀, 配制成质量浓度为 20.007 6 mg/mL 的衍生溶液。

3) 衍生空白溶液: 称量 12.05 mg 空白基质至 50 mL 容量瓶, 精确加入 4.0 mL 20.007 6 mg/mL 的 PMP 衍生溶液、1.0 mL 纯水和 0.4 mL 氨水, 90 °C 水浴中衍生 30 min, 冷却至室温, 用甲醇定容, 摇匀, 过滤, 即得。

4) 对照溶液: 分别精确称量 220.95 mg 和 220.43 mg 空白基质至 20 mL 容量瓶中, 分别向容量瓶中加入 200.05 mg 和 199.97 mg 乳糖, 加适量的水经超声溶解, 定容后作为储备溶液; 再精确移取 1.0 mL 储备溶液、0.4 mL 氨水、4.0 mL 20.0076 mg/mL 的 PMP 衍生溶液至 50 mL 容量瓶中, 90 °C 水浴中衍生 30 min, 冷却至室温, 再用甲醇定容, 摇匀, 过滤, 即得。

5) 供试品溶液: 随机选取 2 片氯氮平片(需称量质量)至 20 mL 容量瓶中, 加适量的水经超声至完全溶解, 定容后作为储备溶液; 再移取 1.0 mL 上述储备溶液至 50 mL 容量瓶中, 加入 0.4 mL 氨水和 4.0 mL 20.007 6 mg/mL 的 PMP 衍生溶液, 90 °C 水浴中衍生 30 min, 冷却至室温, 用甲醇定容, 摇匀, 过滤, 即得。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的优化

移取 1.0 mL 10.039 mg/mL 的乳糖溶液和 1.0 mL 2.5 mg/mL 氯氮平溶液至 50 mL 容量瓶中, 再加入 4.0 mL 20.001 1 mg/mL 的 PMP 衍生溶液和 0.4 mL 氨水, 90 °C 水浴中加热 30 min, 取出冷却至室温, 用甲醇定容, 作为供试品溶液, 用于色谱条件优化。供试品溶液经过衍生反应后, 进行等度洗脱分离, 结果显示衍生物保留时间约为 22 min, 氯氮平峰在 35 min 之内未出峰。为提高分析效率, 将色谱条件调整为梯度洗脱, 按照最佳梯度洗脱条件(见表 1)进样, 得到衍生目标峰、PMP 和氯氮平的色谱峰如图 2 所示。衍生目标峰与 PMP 间分离度 ($R=7.0$) 良好, 氯氮平峰在分析周期内得以洗脱, 且分析时间适中。

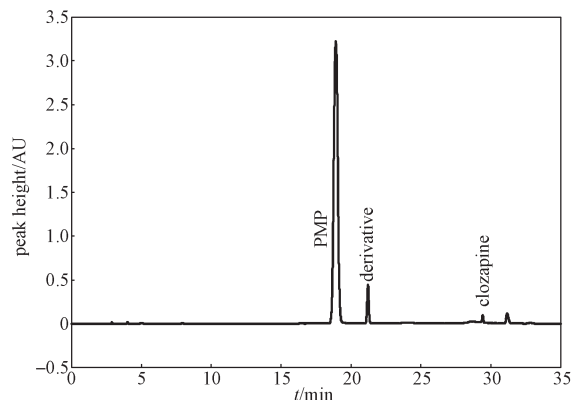


图 2 供试品样品的衍生色谱图

Fig. 2 Chromatogram of the test sample derivatized by PMP

3.2 衍生条件的优化

3.2.1 催化剂氨水用量的优化

移取 1.0 mL 10.008 mg/mL 的乳糖溶液至 50 mL 容量瓶, 再加入 4.0 mL 20.003 4 mg/mL 的 PMP 衍生溶液, 做 7 份平行试样, 分别加入 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.5, 2.0 mL 的氨水, 90 °C 水浴中加热 30 min, 取出冷却至室温, 用甲醇定容。

不同体积的氨水 (V_1) 对乳糖衍生目标峰峰面积的影响曲线如图 3 所示。由图可知, 随着氨水用量的增加, 衍生目标峰的峰面积呈现先增大后减小的趋势。当氨水体积为 0.4 mL 时, 衍生目标峰的峰面积最大。所以氨水最优体积选择 0.4 mL。

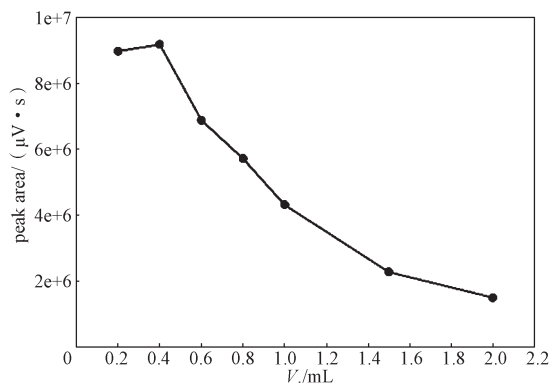


图 3 乳糖衍生目标峰峰面积与氨水体积的关系图

Fig. 3 The peak area of lactose's derivative to different volume of ammonia

3.2.2 衍生试剂 PMP 用量的优化

移取 1.0 mL 10.012 mg/mL 的乳糖溶液至 50 mL 容量瓶, 再加入 0.4 mL 氨水, 做 5 份平行试样, 分别加入 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 mL 质量浓度为 20.000 3

mg/mL 的 PMP 衍生溶液, 90 °C 水浴中加热 30 min, 取出冷却至室温, 用甲醇定容。

不同体积的 PMP 衍生溶液 (V_2) 对乳糖衍生目标峰峰面积的影响曲线如图 4 所示。由图可知, 随着 PMP 用量的增加, 衍生目标峰的峰面积增加幅度不明显, 呈现波动变化。但当 PMP 体积为 4.0 mL 时, 衍生峰面积出现最大值, 且当 PMP 体积为 5.0 mL 时, 衍生峰面积明显减小。因此, 最终选择 PMP 衍生溶液体积为 4.0 mL。

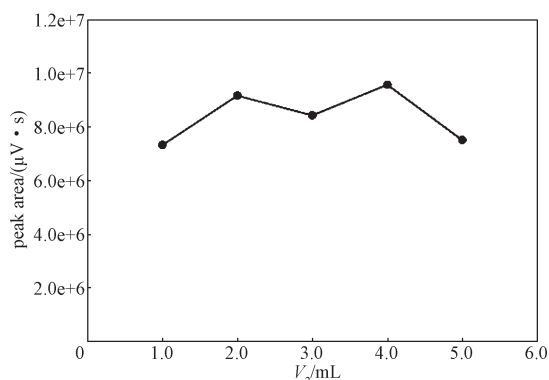


图 4 乳糖衍生目标峰峰面积与 PMP 衍生溶液体积的关系图

Fig. 4 The peak area of lactose's derivative to different volume of PMP

3.2.3 衍生温度的优化

移取 1.0 mL 10.020 mg/mL 乳糖溶液至 50 mL 容量瓶中, 再加入 0.4 mL 氨水和 4.0 mL 质量浓度为 20.001 7 mg/mL 的 PMP 衍生溶液, 做 5 份平行试样, 分别放置于 50, 60, 70, 80, 90 °C 水浴中加热 30 min, 取出冷却至室温后, 用甲醇定容。

不同衍生温度对乳糖衍生目标峰峰面积的影响曲线如图 5 所示。

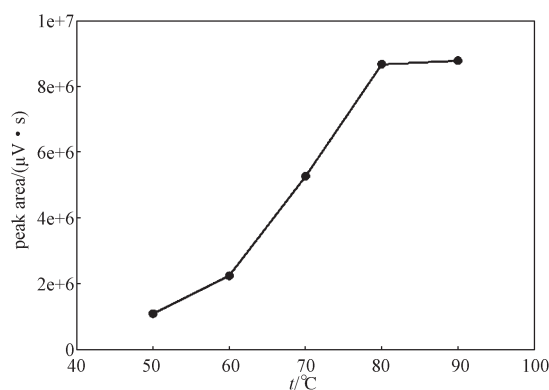


图 5 乳糖衍生目标峰峰面积与衍生温度的关系图

Fig. 5 The peak area of lactose's derivative to different temperatures

由图 5 可知, 随着衍生温度的增加, 衍生目标峰的峰面积不断增加; 当水浴温度达到 80 °C 时, 衍生目标峰的峰面积达到平台期, 说明该温度下衍生反应基本完成。但为使衍生反应彻底并降低结果波动性的影响, 最终选择 90 °C 作为衍生温度。

3.2.4 衍生时间的优化

移取 1.0 mL 质量浓度为 10.000 7 mg/mL 的乳糖溶液至 50 mL 容量瓶中, 再加入 0.4 mL 氨水和 4.0 mL 质量浓度为 20.002 mg/mL 的 PMP 衍生溶液, 做 7 份平行试样, 90 °C 水浴中分别加热 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50 min, 取出冷却至室温, 用甲醇定容。

不同衍生时间对乳糖衍生目标峰峰面积的影响曲线如图 6 所示。由图可知, 在 30 min 前, 衍生目标峰的峰面积不断增大; 在 30~40 min, 峰面积呈现减小趋势; 过了 40 min, 峰面积又呈现增大趋势。在 50 min 内, 衍生目标峰的峰面积在 30 min 时达到最大值。故最优的衍生时间为 30 min。

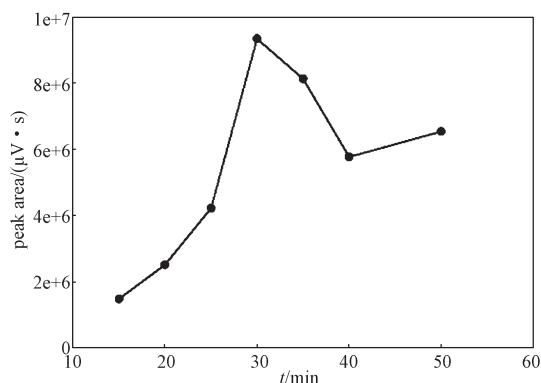


图 6 乳糖衍生目标峰峰面积与衍生时间的关系图

Fig. 6 The peak area of lactose's derivative to different derivation time

3.3 实验方法的性能验证

3.3.1 系统精密度

按照 2.2.2 的方法配制对照溶液, 重复进样对照溶液 6 针, 计算 6 针衍生目标物的峰面积和保留时间的相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 分别为 0.85% 和 0.08%, 由此说明进样系统的精密度良好。

3.3.2 稳定性

按照方法 2.2.2 配制对照溶液和供试品溶液, 将对照溶液和样品溶液在室温分别放置 0, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48 h 后进样, 计算衍生目标峰峰面积的相对标准偏差分别为 0.38% 和 0.48%。该结果表明对照溶液和供试品溶液在室温 48 h 内稳定, 后续批量制备溶液

和进样可在室温 48 h 内完成。

3.3.3 专属性

图 7 为衍生空白溶液、对照溶液、氯氮平样品溶液的色谱图。由图可以看出, PMP、乳糖衍生目标物、氯氮平的保留时间分别为 19.348, 22.243, 29.484 min, 各化合物之间分离度良好, 且完全不干扰衍生目标峰, 由此说明该方法专属性良好。

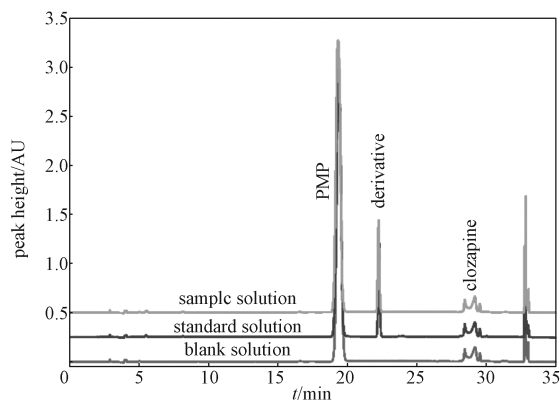


图 7 衍生空白溶液、对照溶液、氯氮平样品溶液的色谱图

Fig. 7 Chromatogram of derivative blank solution, control solution and clozapine sample solution

3.3.4 线性范围和定量限

以衍生目标物的峰面积为纵坐标, 乳糖的质量浓度 c (mg/mL) 为横坐标, 建立标准加入法的标准曲线 (如图 8), 其线性回归方程为: $y=41\ 856\ 509.560\ 5x+36\ 592.315\ 8$, 相关系数 R^2 为 0.999 4。实验结果表明, 在 0.060 4~0.399 7 mg/mL 范围内, 衍生目标物的峰面积与乳糖质量浓度呈良好的线性关系。再将乳糖储备溶液逐步稀释后进行衍生, 直至信噪比 (S/N) 在 10~20 之间, 得到乳糖定量限为 0.32 $\mu\text{g/mL}$ 。

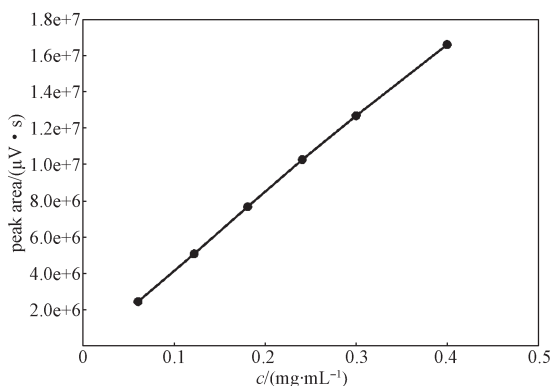


图 8 乳糖衍生目标物的峰面积与浓度关系图

Fig. 8 The peak area of lactose's derivative to different concentration

同时, 将该方法与其他一些报道的乳糖检测方法进行比较 (见表 2)。本方法不需要昂贵的设备仪器、实验操作简单、具有较宽的线性响应范围、准确度高, 能满足氯氮平片中乳糖的检测要求。

表 2 不同方法检测乳糖的检出限和线性范围

Table 2 Detection limits and linear ranges of different methods for lactose detection

方法	定量限	线性范围	参考文献
碘量法	0.89%	N. D.	[6]
滴定法	20 mmol/L	0~100 mmol/L	[7]
LC-MS	50 ng/mL	50~1 100 ng/mL	[8]
比色法	0.14 mmol/L	0.8~300 $\mu\text{mol/L}$	[9]
旋光仪法	250 mg/L	N. D.	[10]
近红外光谱法	0.43%	0~10%	[11]
柱前衍生 HPLC-UV	0.32 $\mu\text{g/mL}$	0.060 4~0.399 7 mg/mL	

注: N. D. 代表未检出。

3.3.5 耐用性

将对照溶液和供试品溶液, 分别按照流速 (1.0 ± 0.1) mL/min、柱温 (30 ± 5) $^{\circ}\text{C}$ 、检测波长 (245 ± 2) nm 改变色谱参数及换用不同品牌色谱柱进样对照溶液和供试品溶液, 计算的乳糖含量相对标准偏差为 1.04%, 且目标峰无相关干扰, 由此说明本方法的耐用性及抗干扰性良好。

3.3.6 回收率

取 9 份供试品溶液, 按照高、中、低 3 个水平添加乳糖作为加标溶液, 考察本方法的回收率, 结果如表 3 所示。

表 3 乳糖在空白基质中的加标回收率 ($n=9$)

Table 3 Spiked recoveries of hydrazine in blank substrate ($n=9$)

序号	空白基质中乳糖含量/mg	加入量/mg	测定量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1	未检出	8.010 5	7.946 6	99.2	98.16	0.81
2	未检出	8.009 0	7.867 2	98.2		
3	未检出	8.007 5	7.917 8	98.8		
4	未检出	10.015 5	9.828 3	98.1		
5	未检出	10.014 5	9.929 5	99.1		
6	未检出	10.013 5	9.776 8	97.6		
7	未检出	12.025 0	11.761 5	97.8		
8	未检出	12.029 5	11.763 3	97.8		
9	未检出	12.018 5	11.628 5	96.7		

由表 3 可知溶液, 其回收率在 96.7%~99.2%, 平均回收率为 98.16%, RSD 为 0.81%。各个浓度水平的回收率结果均较好, 且相对标准偏差较小, 由此说明本方法检测结果的准确度高, 重复性较好。

3.4 样品检测

按照处方, 仿制 3 批 (批号为 190701, 190705, 190708) 乳糖含量已知的氯氮平片样品和参比制剂 (批号为 T17039) 样品, 按照上述方法衍生后测定乳糖含量, 经过换算得出 4 个批次乳糖含量及偏差如表 4 所示。

表 4 自制处方和参比制剂中乳糖含量的测定结果

Table 4 Determination results of lactose content in homemade prescription and reference preparation

批号	样品 编号	测定含量/ (mg/片)	平均测定含量/ (mg/片)	处方含量/ (mg/片)	偏差/ (mg/片)
190701	1	42.11	42.09	40.50	1.59
	2	42.08			
190705	1	43.29	43.36	42.50	0.86
	2	43.42			
190708	1	43.44	43.45	42.50	0.95
	2	43.46			
T17039	1	45.52	45.34	40.39 ^[25]	4.95
	2	45.17			

注: * 为参考文献 [25] 中批号为 AE2350F 的参比制剂 (与 T17039 的生产厂家和规格相同) 的测定结果。

从表 4 数据可知, 本法测定的自制处方中乳糖含量实测值分别为 42.09, 43.36, 43.45 mg/片, 与处方含量的偏差均小于 2.0 mg/片。参比制剂测得乳糖的含量为 45.34 mg/片, 但其对照含量 40.39 mg/片是根据文献 [25] 报道的, 该文献利用的是 HPLC 结合示差折光检测器检测氯氮平中乳糖的含量。因为检测器的不同、参比制剂的批间差异、方法测定误差等原因, 综合导致参比制剂检测结果中乳糖含量检测偏差为 4.95 mg/片。本文自制处方的检测结果与实际处方含量相差较小, 均小于 2.0 mg/片, 而文献 [25] 检测方法中自制检测结果与其实际含量偏差在 2.91 mg/片, 较本法结果误差偏大。且文献中的检测方法需要使用氨基柱这种特殊类型的色谱柱, 其氨基柱的键合官能团氨基容易水解, 在进行样品检测时, 流动相中水的比例较高, 易引起氨基的水解, 从而影响色谱柱的使用寿命。官能团氨基带有负电荷, 在分析酸性物质 (如糖类) 时, 容易与带质子的酸性物质发生反应, 使得氨基柱的柱效降低, 影响检测的结果, 故需要对氨基柱进行维护。本方法中使用的色谱柱填料为常规的 C18 填料, 分析方法中水相比比例可放宽调整, 也不会因色谱柱维护不当影响结果检测。因此, 利用本实验方法测定的参比制剂数值, 可以加快一致性评价项目的处方研究, 缩短研发周

期和降低研发成本。

4 结论

药物一致性评价要求仿制药与参比制剂在剂型、处方、规格及给药途径等各方面保持一致。仿制药同参比制剂越相似, 生物等效性成功的可能性就越大。因此, 本研究提出了柱前衍生 HPLC-UV 法, 测定氯氮平片中乳糖含量, 即用 PMP 作为衍生试剂与乳糖衍生后, 用 HPLC-UV 法间接测定氯氮平中乳糖含量。该方法各项参数指标符合中华人民共和国药典的要求, 具有经济、简便、专属性强及准确度高优点, 可用于氯氮平片中乳糖的含量测定, 进而可推广到其他仿制药中乳糖的逆向研究中。

参考文献:

- [1] 倪尉, 周和平, 项光亚, 等. 非典型抗精神病药物的研究进展 [J]. 医药导报, 2010, 29(3): 342-346.
NI Wei, ZHOU Heping, XIANG Guangya, et al. Research Progress of Atypical Antipsychotics [J]. Herald of Medicine, 2010, 29(3): 342-346.
- [2] 于风平, 贺敦伟, 闫敏, 等. 口服固体制剂中淀粉类辅料含量的“逆向工程”分析 [J]. 中国药事, 2018, 32(3): 348-353.
YU Fengping, HE Dunwei, YAN Min, et al. “Reverse Engineering” Analysis of Starch Excipient in Oral Solid Preparations [J]. Chinese Pharmaceutical Affairs, 2018, 32(3): 348-353.
- [3] FOX P F, UNIACKE-LOWE T, MCSWEENEY P L H, et al. Lactose [M] // Dairy Chemistry and Biochemistry. Cham: Springer International Publishing, 2015: 21-68.
- [4] LAL N, DUBEY J, GAUR P, et al. Chitosan Based in Situ Forming Polyelectrolyte Complexes: A Potential Sustained Drug Delivery Polymeric Carrier for High Dose Drugs [J]. Materials Science and Engineering: C, 2017, 79: 491-498.
- [5] ZHOU Q, MORTON D A V. Drug-Lactose Binding Aspects in Adhesive Mixtures: Controlling Performance in Dry Powder Inhaler Formulations by Altering Lactose Carrier Surfaces [J]. Advanced Drug Delivery Reviews, 2012, 64(3): 275-284.
- [6] 刘乃齐, 刘立杰, 白英, 等. 不同酸度乳清中乳糖质量分数的检测方法 [J]. 中国乳品工业, 2017,

- 45(7): 53–55.
- LIU Naiqi, LIU Lijie, BAI Ying, et al. Study on Detection Method of Lactose in Whey with Different Acidity[J]. *China Dairy Industry*, 2017, 45(7): 53–55.
- [7] PRASAD A, TRAN T, GARTIA M. Multiplexed Paper Microfluidics for Titration and Detection of Ingredients in Beverages[J]. *Sensors*, 2019, 19(6): 1286.
- [8] TRANI A, GAMBACORTA G, LOIZZO P, et al. Comparison of HPLC-RI, LC/MS-MS and Enzymatic Assays for the Analysis of Residual Lactose in Lactose-Free Milk[J]. *Food Chemistry*, 2017, 233: 385–390.
- [9] LIU T, ZHANG S X, LIU W, et al. Smartphone Based Platform for Ratiometric Fluorometric and Colorimetric Determination H₂O₂ and Glucose[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2020, 305: 127524.
- [10] GAMBELLI L. Milk and Its Sugar-Lactose: A Picture of Evaluation Methodologies[J]. *Beverages*, 2017, 3(4): 35.
- [11] WARNECKE S, WU J X, RINNAN Å, et al. Quantifying Crystalline α -Lactose Monohydrate in Amorphous Lactose Using Terahertz Time Domain Spectroscopy and Near Infrared Spectroscopy[J]. *Vibrational Spectroscopy*, 2019, 102: 39–46.
- [12] MOHAMED H, NAGY P, AGBABA J, et al. Use of Near and Mid Infra-Red Spectroscopy for Analysis of Protein, Fat, Lactose and Total Solids in Raw Cow and Camel Milk[J]. *Food Chemistry*, 2021, 334: 127436.
- [13] HE H R, SUN D W, PU H B, et al. Applications of Raman Spectroscopic Techniques for Quality and Safety Evaluation of Milk: A Review of Recent Developments[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2019, 59(5): 770–793.
- [14] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 524.
- Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the people's Republic of China(Part II)[M]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2020: 524.
- [15] HADJIKINOVA R, PETKOVA N, HADJIKINOV D, et al. Development and Validation of HPLC-RID Method for Determination of Sugars and Polyols[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 2017, 9(8): 1263.
- [16] GONZAGA N, WATANABE L S, MAREZE J, et al. Green Method Using Water for Lactose and Lactulose Extraction and Determination in Milk by High-Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detection[J]. *LWT*, 2019, 113: 108288.
- [17] PAZOUREK J. Rapid HPLC Method for Monitoring of Lactulose Production with a High Yield[J]. *Carbohydrate Research*, 2019, 484: 107773.
- [18] 马晓宁, 刘宏大, 张 硕, 等. HPLC-RID 法测定辅料乳糖 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(7): 942–945.
- MA Xiaoning, LIU Hongda, ZHANG Shuo, et al. Determination of Accessories Lactose by HPLC-RID[J]. *Drug Evaluation Research*, 2017, 40(7): 942–945.
- [19] SCHMIDT C M, ZÜRN T, THIENEL K J F, et al. Development, Optimization and Validation of an HPLC-ELSD Method for the Analysis of Enzymatically Generated Lactulose and Saccharide By-Products[J]. *Food Chemistry*, 2017, 215: 347–353.
- [20] WANG S, LIU C Y, CHEN Y J, et al. A High-Sensitivity HPLC-ELSD Method for HPMC-AS Quantification and Its Application in Elucidating the Release Mechanism of HPMC-AS Based Amorphous Solid Dispersions[J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2018, 122: 303–310.
- [21] GARBALLO-RUBIO A, SOTO-CHINCHILLA J, MORENO A, et al. Determination of Residual Lactose in Lactose-Free Cow Milk by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) Coupled to Tandem Mass Spectrometry[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2018, 66: 39–45.
- [22] 孙亚飞, 赵 恂, 张 玫, 等. HPLC-CAD 法测定乳糖含量及有关物质 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(5): 894–901.
- SUN Yafei, ZHAO Xun, ZHANG Mei, et al. Determination of Lactose and Its Related Substances by HPLC-CAD[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2018, 38(5): 894–901.
- [23] 林 雪. 糖类物质的 PMP (1-苯基-3-甲基-5-吡啶啉酮) 衍生化及 HPLC 和 MALDI-TOF 分析 [D]. 西安: 西北大学, 2006.
- LIN Xue. An Improved PMP (1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolone) Precolumn Derivatization Method of Carbohydrate for HPLC and MALDI-TOF Analysis[D]. Xi'an: Northwest University, 2006.
- [24] 张璐瑶, 赵 峡, 陈欢欢. 糖类化合物 PMP 衍生分析进展 [J]. *分析测试学报*, 2016, 35(3): 367–372.
- ZHANG Luyao, ZHAO Xia, CHEN Huanhuan. Advance in 1-Phenyl-3-Methyl-5-Pyrazolone (PMP) Derivatization Analysis of Carbohydrates[J]. *Journal of*

Instrumental Analysis, 2016, 35(3): 367-372.

[25] 林玲, 王兰. 参比制剂及仿制制剂处方中乳糖含量测定 [J]. 中文科技期刊数据库 (全文版) 医药卫生, 2020: 99-100.

LIN Ling, WANG Lan. Determination of Lactose

Content in the Reference and Generic Preparations[J]. Chinese Journal of Science and Technology Database (Full Text Edition) Medicine and Health, 2020: 99-100.

(责任编辑: 李玉华)

Determination of Lactose in Clozapine by Pre-Column Derivatization HPLC-UV

CHEN Yao¹, TANG Jianxin¹, TANG Ying^{1,2}

(1. Hunan Key Laboratory of Biomedical Nanomaterials and Devices, College of Life Science and Chemistry, Hunan University of Technology, Zhuzhou Hunan 412007, China; 2. State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: A high-performance liquid chromatography (HPLC) method based on 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolinone (PMP) as an agent of pre-derivatization was developed for the accurate determination of lactose content in clozapine tablets. The results showed that a good linear relationship between the peak area of the derivative product and lactose concentration was observed in the range of 0.060 4~0.399 7 mg/mL, the linear correlation coefficient R^2 was 0.999 4. The recovery was within the range of 96.7%~99.2% and the limit of quantification was estimated to be 0.32 $\mu\text{g/mL}$. Three batches of clozapine tablet imitation samples were randomly selected for testing, and the lactose contents were 42.09 mg/tablet, 43.36 mg/tablet and 43.45 mg/tablet, respectively. The deviation between the measured results and the prescribed content was less than 2.0 mg/tablet, and the results could fully meet the requirement of detection of lactose in drugs. Moreover, compared with the existing tests, this method had the advantages of high specificity, high sensitivity, accurate and reliable results, and could provide data support for the development of clozapine consistency evaluation prescription, which is beneficial to the acceleration in the development and success rate of generic drugs.

Keywords: HPLC; lactose; clozapine; 1-phenyl-3-methyl-5-pyrazolinone; consistency evaluation