

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.04.07

HPLC 法测定二氧化氯乳头消毒剂中乳酸的含量

王欢欢, 刘静, 张靖菊, 徐飞*

(国家饲料药物基准实验室, 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081)

[收稿日期] 2021-11-25 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 04-0041-06 [中图分类号] S859.83

[摘要] 建立 HPLC 法测定二氧化氯乳头消毒剂中乳酸的含量并研究此方法的耐用性。采用 HPLC 法, 色谱柱为资生堂 Capcell Pak C₁₈ MG (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.1% 磷酸水溶液 - 乙腈 (97.5:2.5, V/V), 检测波长为 215 nm, 流速为 1 mL/min, 柱温为 35 °C, 进样量为 20 μL。结果表明: 乳酸在 200 ~ 1000 μg/mL 内线性关系良好 ($R^2 = 0.9999$), 检测限为 5 μg/mL, 定量限为 13 μg/mL, 精密度试验峰面积 *RSD* 均符合标准, 平均回收率为 98.50%, 供试品工作液在 24 h 内稳定。耐用性试验结果显示, 在测试范围内, 检测波长、流速、柱温、流动相比比例和色谱柱对样品中乳酸的含量测定均无影响, 且分离度符合要求。此方法操作简易, 可靠性高, 可以用作该乳头消毒剂中乳酸的质量控制。

[关键词] 二氧化氯乳头消毒剂; 乳酸; 含量测定

Lactic Acid Content in Chloride Dioxide Emulsion Disinfectant Determined by HPLC

WANG Huan-huan, LIU Jing, ZHANG Jing-ju, XU Fei*

(National Feed Drug Reference Laboratories, Feed Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Corresponding author: XU Fei, E-mail: xufei@caas.cn

Abstract: To establish a method for content determination of lactic acid in chlorine dioxide nipple disinfectant by HPLC, and to study the durability of this method, HPLC method was adopted, the chromatographic column is Shiseido Capcell Pak C₁₈ MG (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was 0.1% phosphoric acid aqueous solution - acetonitrile (97.5:2.5, V/V). The detection wavelength was 215 nm. The flow rate was 1 mL/min. The column temperature was 35 °C. The injection was 20 μL. Results showed that lactic acid had a good linear relationship ($R^2 = 0.9999$) within 200 to 1000 μg/mL, the detection limit was 5 μg/mL, the quantitative limit was 13 μg/mL. Precision testing, all peak area *RSD* meets the standard. The average recovery rate was 98.50%. A sample working fluid was stably in 24 h. The durability test showed, in the test range, the

基金项目: 国家重点研发计划“畜禽养殖环境中耐药性数据库建设及生态风险评估”(2016YFD0501305)

作者简介: 王欢欢, 助理兽医师, 从事兽药检测分析工作。

通讯作者: 徐飞, E-mail: xufei@caas.cn

detection wavelength, flow rate, column temperature, mobile phase ratio and chromatographic column had no effect on the determination of lactic acid content in the sample, and the separation degree meet the requirements. This method was simple and reliability, which can be used as the quality control of lactic acid in the nipple disinfectant.

Key words: chlorine dioxide nipple disinfectant; lactic acid; content determination

乳酸是一种天然的有机酸,是重要的抗菌化合物^[1],属于消毒防腐类药,是公认安全的 GRAS (Generally recognized as safe, GRAS) 添加剂^[2],广泛应用于饮食业、化妆品业、医药业和畜牧业等行业中^[3]。乳酸主要有三种构型^[4],分为 D 型、L 型和 DL 型,由于 D-乳酸、DL-乳酸对人体有一定的毒副作用,所以与饮食业相关的乳酸构型为 L 型。乳酸能抑制真菌的生长^[5],有助于农副产品的保存。有研究表明^[6-8],乳酸对部分革兰氏阳性菌、部分革兰氏阴性菌和部分真菌都有杀灭和抑制作用,其对致病菌主要是通过延长代时和破坏正常细胞膜电位来达到抑菌及杀菌作用^[9]。乳酸作为原料药收录于 2020 版《中国药典》中^[10],与水溶液显酸性,含量测定方法为滴定法,范围为 85% ~ 92% (g/g)。文献报导的乳酸的含量测定方法有高效液相色谱法^[11]、液质联用技术^[12]、离子色谱法^[13]、气相色谱法^[14]等。液质联用技术、离子色谱法和气相色谱法测定乳酸均具有局限性,与高效液相色谱法相比操作复杂且成本较高。乳酸具有热不稳定性,在高温下易分解^[15],用气相色谱法测定时,需将极性强的乳酸衍生化为极性弱的酯化物^[16],处理过程较为复杂且耗时较长。本文拟建立 HPLC 法测定二氧化氯乳头消毒剂中乳酸的含量,并对其色谱条件进行耐用性试验,验证其可靠性,可作为该乳头消毒剂中乳酸的含量测定方法。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂 高效液相色谱仪 (Waters 2695, 配 2487 紫外检测器),美国 Waters 公司;超纯水一体化系统,美国 Pall 公司;电子天平(万分之一),德国 Sartorius 公司;针式过滤器(有机系)(0.22 μm),天津市津腾实验设备有限公司;微孔

过滤膜(有机系)(0.22 μm),美国 Waters 公司;二氧化氯乳头消毒剂(其中乳酸含量 2.4%),中国农业科学院饲料研究所国家饲料药物基准实验室自主研发;乳酸原料药(含量 85%),国药集团化学试剂有限公司;乳酸对照品(含量 89.9%),德国 Ehrenstorfer GmbH 公司;磷酸为分析纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司;乙腈为色谱级纯,美国 Fisher 公司。

1.2 色谱条件 色谱柱:资生堂 Capcell Pak C₁₈ MG (250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.1% 磷酸水溶液 - 乙腈 = 97.5:2.5, V/V;检测波长:215 nm;流速:1 mL/min;柱温:35 °C;进样量:20 μL。

1.3 溶液配制 对照品溶液的配制:精密称取乳酸对照品适量,加水溶解并稀释制成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液,作为对照品储备液。精密移取乳酸对照品储备液适量,加水稀释制成 500 μg/mL 的乳酸溶液,作为对照品工作液。

供试品溶液的配制:取充分混匀后的本品适量(约相当于乳酸 50 mg),精密称量,置 10 mL 量瓶中,加入甲醇至刻度线,振荡提取 1 min。精密移取 1 mL 提取液置 10 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,作为供试品工作液溶液。

1.4 方法参数考察和耐用性试验 参照 2015 版《中国兽药典》附录 0512,对系统适应性、线性、灵敏度、精密度、准确度、溶液稳定性及方法耐用性试验进行了考察和研究。

2 结果与分析

2.1 系统适应性 如图 1 所示,对照品和供试品乳酸保留时间分别为 4.313 和 4.318 min,对照品工作液中乳酸主成分峰与相邻色谱峰完全分离,USP 拖尾因子为 1.05,USP 理论塔板数为 18739,连续进样 6 针后,主峰峰面积 RSD 为 0.35%,小于

2%,符合标准。

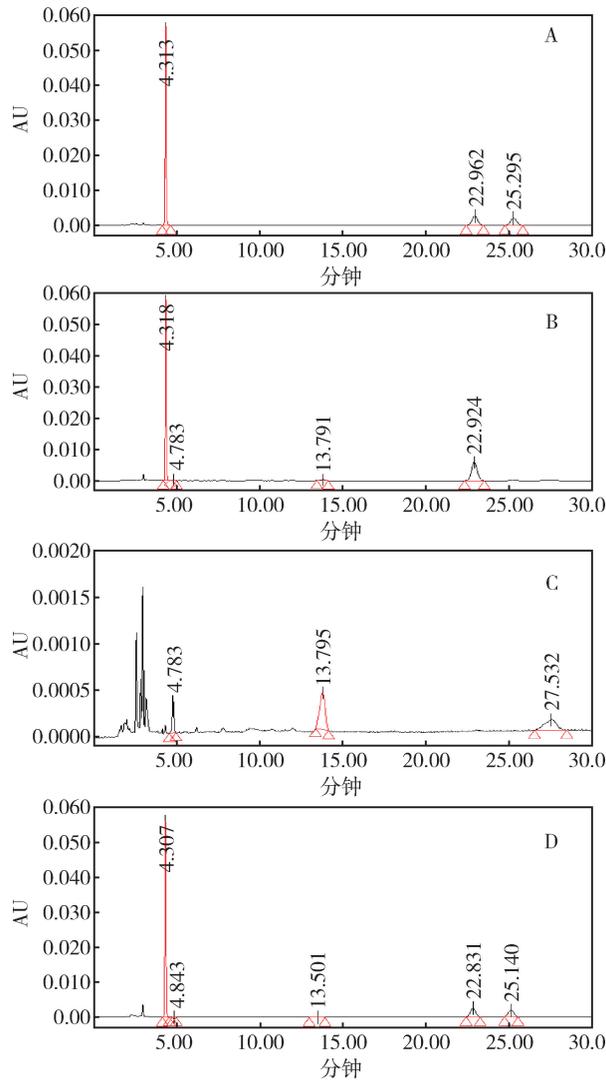


图 1 色谱图(500 $\mu\text{g/mL}$ 乳酸对照品(A);
500 $\mu\text{g/mL}$ 乳酸供试品(B);
空白辅料(C);空白辅料-500 $\mu\text{g/mL}$ 乳酸对照品(D))

2.2 线性关系考察 精密移取对照品储备液适量,用水稀释成 200、400、500、600、800、1000 $\mu\text{g/mL}$ 的系列浓度溶液,按 1.2 项下色谱条件进样,以浓度为横坐标,乳酸峰面积为纵坐标,得出标准曲线回归方程为: $Y=536X+3280$,决定系数 $R^2=0.9999$,显示该方法的线性良好。乳酸标准曲线如图 2 所示。

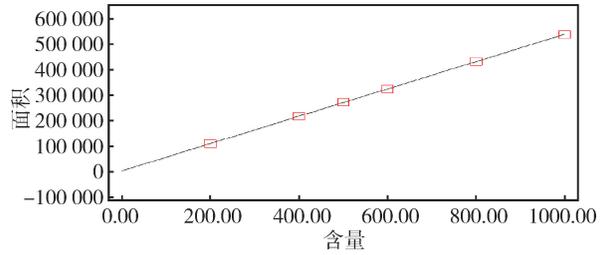


图 2 乳酸峰面积-浓度标准曲线图
Fig 2 The peak area-concentration
standard curve of lactic acid

2.3 灵敏度 采用逐步稀释的方法,按信噪比 $S/N \geq 3$,得出检测限为 5 $\mu\text{g/mL}$;按信噪比 $S/N \geq 10$,得出定量限为 13 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.4 精密度

2.4.1 重复性 供试品工作液(500 $\mu\text{g/mL}$)按照 1.2 项下色谱条件连续进样 6 次,计算主峰峰面积相对标准偏差(RSD)。结果表明, RSD 为 0.11%,重复性良好。

2.4.2 方法精密度 配制 6 份供试品工作液(500 $\mu\text{g/mL}$)按照 1.2 项下色谱条件进样,计算主峰峰面积 RSD 。结果表明, RSD 为 0.23%,方法精密度良好。

2.4.3 中间精密度 同一人员,不同时间另配制 6 份供试品工作液(500 $\mu\text{g/mL}$),按照 1.2 项下色谱条件进样,计算主峰峰面积 RSD ,以及与方法精密度平均结果的相对偏差(RD)。结果表明,中间精密度主峰峰面积 RSD 为 0.14%,与方法精密度平均结果的相对偏差为 0.17%,小于 2.0%,该方法重现性良好。

2.5 准确度 空白辅料中分别加入乳酸对照品 318.35、265.45、212.56 mg 各三份,制成高、中、低三个浓度(120%、100%、80%)的样品。分别取充分混匀后的上述样品适量,按 1.3 项条件下配制为供试品工作液,按照 1.2 项下色谱条件进样检测,另取乳酸对照品工作液(500 $\mu\text{g/mL}$)进样检测。记录峰面积并计算回收率及 RSD 。结果如表 1 所示,平均回收率为 98.50%, RSD 为 0.32%,准确度良好。

表 1 乳酸准确度(回收率)试验结果

Tab 1 Accuracy (recovery rate) test results of lactic acid

浓度/%	样品编号	添加量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
120	1-1	318.35	313.55	98.49	98.50	0.32
	1-2	318.35	314.54	98.80		
	1-3	318.35	313.35	98.43		
100	2-1	265.45	261.50	98.51		
	2-2	265.45	261.46	98.49		
	2-3	265.45	262.87	99.03		
80	3-1	212.56	209.58	98.60		
	3-2	212.56	208.35	98.02		
	3-3	212.56	208.51	98.09		

2.6 溶液稳定性试验 供试品工作液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)室温条件下放置 24 h,分别于 0、2、4、6、8、10、24 h 按照 1.2 项下色谱条件进行测定,计算放置不同时间下乳酸的含量并与 0 h 初始值峰面积比较。结果表明,放置 24 h 后峰面积为初始值的 100.02%,乳酸含量 RSD 为 0.09%,表明该溶液在 24 h 以内具有很好的稳定性。

2.7 耐用性

2.7.1 检测波长考察 取供试品工作液及对照品工作液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)适量,考察在 210 ~ 220 nm 范围内不同检测波长对乳酸含量测定的影响。结果表明,主成分乳酸含量 RSD 为 0.11%,表明在检测波长在 210 ~ 220 nm 之间样品中主成分乳酸的含量能准确测定。

2.7.2 检测流速的考察 取供试品工作液及对照品工作液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)适量,考察 0.8 ~ 1.2 mL/min 范围内不同检测流速对乳酸含量测定的影响。结果表明,主成分乳酸含量 RSD 为 0.07%,表明在检测流速在 0.8 ~ 1.2 mL/min 之间样品中主成分乳酸的含量能准确测定。

2.7.3 检测柱温的考察 取供试品工作液及对照品工作液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)适量,考察 30 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 范围内不同检测柱温对乳酸含量测定的影响。结果表明,主成分乳酸含量 RSD 为 0.40%,表明在检测柱温 30 ~ 40 $^{\circ}\text{C}$ 之间样品中主成分乳酸的含量能准确测定。

2.7.4 不同流动相组成比例的考察 取供试品工作液及对照品工作液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)适量,考察不同流动相组成比例(表 2)对乳酸含量测定的影响。结果表明,主成分乳酸含量 RSD 为 0.34%,表明在此 5 组不同流动相比例样品中主成分乳酸的含量能准确测定。

表 2 五组不同流动相比例

Tab 2 Five groups of different flow phase ratio

流动相比例	乙腈	0.1% 磷酸水
1	2.3	97.7
2	2.4	97.6
3	2.5	97.5
4	2.6	97.4
5	2.7	97.3

2.7.5 不同色谱柱的考察 取供试品工作液及对照品工作液(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)适量,考察相同类型不同品牌的色谱柱(表 3)对乳酸含量测定的影响。结果显示,主成分乳酸含量 RSD 为 0.51%,表明使用相同类型不同品牌的色谱柱样品中主成分乳酸的含量能准确测定。

表 3 三根不同色谱柱

Tab 3 Three different chromatocolumns of chromatography

色谱柱	名称	厂家	批号
1	Capcell Pak C ₁₈ MG	日本资生堂	AKAD 22417
2	XBridge™ Shield RP18	美国 Waters	012031356136 14
3	XTerra RP18	美国 Waters	012632004138 55

2.8 样品含量测定 取二氧化氯乳头消毒剂五批 (YL200507、YL200512、YL200515、YL211020、YL211021),按 1.3 项条件下配制为供试品工作液,按照 1.2 项条件下色谱进行检测,五批样品的含量分别为 102.38%、103.95%、104.43%、100.94%、100.09%。

3 讨论与结论

3.1 样品前处理的优化 二氧化氯乳头消毒剂为本实验室自主研发,用于挤奶后消毒的消毒产品,分为 A 剂(主要成分为乳酸)和 B 剂(主要成分为亚氯酸钠)两部分,使用时两部分混合,亚氯酸钠和乳酸发生歧化反应产生的二氧化氯为消毒作用的主要成分。为达到持续消毒的效果,本产品中含有增稠剂、稳定剂和着色剂等辅料,滴定法等方法既无法测定 A 剂中辅料是否对乳酸含量有影响也无法测定混合后产品中乳酸的余量。

对二氧化氯乳头消毒剂样品进行前处理,主要目的是排除增稠剂、稳定剂和着色剂等辅料对检测结果的影响。样品用超纯水稀释提取后,工作液浑浊,不易过 0.22 μm 的滤膜,需多次过滤,上机检测时,主峰与杂质峰分离度较差,且杂质峰过多。样品用乙腈和乙醇提取时,主峰峰型分叉。样品用甲醇提取时,提取液易过膜,主峰响应高且与杂质峰完全分离,故选用甲醇作为提取液。由于甲醇中有羟基,微量乳酸与之反应,乳酸在水溶液中稳定性好,样品用甲醇提取后加水稀释为供试品工作液,此溶液在 24 h 内稳定。

3.2 色谱条件的选择 根据相关文献报道^[15]及全波长(210~400 nm)扫描结果,乳酸的响应随着波长增大而减弱,在 215 nm 处有良好的吸收且峰型及分离度较好,故选用 215 nm 作为检测波长。根据已经发表的文献^[17-20],流动相中水相相比有机相所占比例较大,大部分流动相都是含盐流动相,此类流动相易堵塞仪器,需要耗费时间维护仪器,故选用不含缓冲盐的流动相。流动相分别考察了乙腈-0.1%磷酸水、乙腈-0.1 甲酸水溶液、甲醇-0.1%磷酸水等,结果以乙腈-0.1%磷酸水为流动相时,乳酸峰型及分离度最好。分别对表 3 中

的三根色谱柱进行考察,含量测定选用乳酸峰型及分离度最好的色谱柱,即 Capcell Pak C₁₈ MG 色谱柱。

本文建立了 HPLC 法测定二氧化氯乳头消毒剂中乳酸的含量方法,该方法线性关系良好,精密度高,准确度良好,溶液稳定性和耐用性好,且操作简便、可靠性好,可以用作该乳头消毒剂中乳酸的质量控制。

参考文献:

- [1] Noelia R, Laura V, Noelia P, *et al.* Cell-Free Supernatants Obtained from Fermentation of Cheese Whey Hydrolyzates and Phenylpyruvic Acid by *Lactobacillus plantarum* as a Source of Antimicrobial Compounds, Bacteriocins, and Natural Aromas[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2013, 171(4).
- [2] Lin Y T, Labbe R G, Shetty K. Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2005, 6(4): 453-458.
- [3] 陈浩. 利用廉价生物质生产 L-乳酸[D]. 北京化工大学, 2020.
Chen Hao. Using cheap biomass to produce L-lactic acid [D]. Beijing University of Chemical Technology, 2020.
- [4] 陈宝利,张青萍. 乳酸生产的现状及未来的发展方向[J]. 广东化工, 2011, 38(09): 65-66.
Chen Baoli, Zhang Qingping. Status and future development direction of lactic acid production [J]. Guangdong Chemical Industry, 2011, 38(09): 65-66
- [5] Ranjith F H, Muhiaddin B J, Yusof N L, *et al.* Effects of Lacto-Fermented Agricultural By-Products as a Natural Disinfectant against Post-Harvest Diseases of Mango (*Mangifera indica* L.). [J]. Plants (Basel, Switzerland), 2021, 10(2).
- [6] 朱晓萍,庄智威,崔英杰,等. 不同酸化剂对常见致病菌的体外抑菌效果研究[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(04): 78-80.
Zhu Xiaoping, Zhuang Zhiwei, Cui Yingjie, *et al.* Study on in vitro inhibition effects of different acidifiers on common pathogenic bacteria [J]. Anhui Agricultural Science, 2020, 48(04): 78-80.
- [7] 马鑫,马秋刚,计成,等. 蛋氨酸羟基类似物和有机酸化剂对主要肠道病原菌体外抑菌效果的比较[J]. 动物营养学报, 2008(02): 238-241.

- Ma Xin, Ma Qiugang, Cheng, *et al.* Comparison of in vitro anti-bacterial effects of methionine hydroxyl analogues and organic acidification agents on major intestinal pathogens [J]. *Journal of Animal Nutrition*, 2008 (02): 238 - 241.
- [8] 屈思佳, 李天密, 高文惠, 等. 乳酸菌抗真菌活性及应用研究新进展[J]. *中国乳品工业*, 2019, 47(03): 37 - 40.
- Qu Sijia, Li Tianmin, Gao Wenhui, *et al.* New progress in the antifungal activity and Application of *Lactobacillus* [J]. *China Dairy Industry*, 2019, 47 (03): 37 - 40.
- [9] 乔支红, 程永强, 鲁战会, 等. 乳酸对三种食源性致病菌的抑菌及杀菌作用[J]. *食品科技*, 2008(10): 187 - 191.
- Qiao Zhihong, Cheng Yongqiang, Lu Zhan, *et al.* antibacterial and bactericidal effect of lactic acid on three foodborne pathogens [J]. *Food Technology*, 2008 (10): 187 - 191.
- [10] 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.
- National Pharmacopoeia Commission. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part II* [M]. Beijing: China Medical Technology Publishing House, 2020.
- [11] 马晓娟, 谢有发, 刘文君, 等. 乳酸菌素原料中有机酸的测定分析[J]. *中国乳品工业*, 2020, 48(08): 53 - 56.
- Ma Xiaojuan, Xie Youfa, Liu Wenjun, *et al.* Analysis of organic acids in lactic acid ingredients [J]. *China Dairy Industry*, 2020, 48 (08): 53 - 56.
- [12] 曾凯. 电喷雾质谱研究水相中多种有机酸-铀酰配合形态[D]. 东华理工大学, 2019.
- Zeng Kai - Electrospray mass spectrometry studies of various organic acid - uranyl complexes in the aqueous phase [D]. Donghua University of Technology, 2019.
- [13] 王艳, 江阳, 雍莉. 淋洗液在线发生离子色谱法同时测定果汁中的乳酸、富马酸和柠檬酸[J]. *现代预防医学*, 2019, 46 (12): 2235 - 2238.
- Wang Yan, Jiangyang, Yongli. - - lactic ate, fumarate and citric acid in fruit juice [J]. *Modern Preventive Medicine*, 2019, 46 (12): 2235 - 2238.
- [14] 张霞, 刘志华, 杨光宇, 等. 固相萃取富集/气相色谱法测定烟草中的 9 种有机酸[J]. *分析测试学报*, 2014, 33(5): 545.
- Zhang Xia, Liu Zhihua, Yang Guangyu, *et al.* Nine organic acids for enrichment / gas extraction were measured in tobacco by solid phase chromatography [J]. *Analytical Test Journal*, 2014, 33 (5): 545.
- [15] 孔璇, 吴燕, 李华龙. HPLC 法测定药用辅料乳酸中乳酸[J]. *现代药物与临床*, 2020, 35(08): 1524 - 1526.
- Kong Xuan, Wu Yan, Li Hualong. By HPLC method [J]. *Modern Drugs and Clinical Medicine*, 2020, 35 (08): 1524 - 1526.
- [16] 张莉, 文燕, 齐伟明, 等. 毛细管气相色谱法测定眼科手术粘弹剂中乳酸含量[J]. *化学分析计量*, 2014, 23 (03): 43 - 45.
- Zhang Li, Wen Yan, Qi Weiming, *et al.* Measurement of lactic acid content in ophthalmic surgical viscoelastic agents by capillary hemostometry [J]. *Chemichimetry*, 2014, 23 (03): 43 - 45.
- [17] 王珍珍, 沙如意, 王高坚, 等. HPLC 法同时测定食用植物酵素中 12 种有机酸[J]. *食品工业科技*, 2020, 41 (19): 279 - 285.
- Wang Zhenzhen, Sha Ruyi, Wang Gaojian, *et al.* 12 organic acids [J] were also measured simultaneously by HPLC. *Food Industry Technology*, 2020, 41 (19): 279 - 285.
- [18] 梅婕, 郑东影, 司冠儒, 等. 高效液相色谱法测定黄水中的乳酸[J]. *酿酒*, 2020, 47(05): 42 - 43.
- Mei Jie, Zheng Dongying, Si, ru, *et al.* Lactate acid [J] in yellow water by HPLC. *Brewing*, 2020, 47 (05): 42 - 43.
- [19] 江锋, 赵振宇, 聂叶, 等. 高效液相色谱法对白酒中的 L-乳酸和 D-乳酸的手性分离和测定[J]. *酿酒科技*, 2019(09): 93 - 97.
- Jiang Feng, Zhao Zhenyu, Nie Ye, *et al.* chiral separation and determination of L and D - lactic acid in liquor by HPLC [J]. *Brewing Technology*, 2019, (09): 93 - 97.
- [20] 张微微. 高纯度聚合用乳酸的分离纯化及理论研究[D]. 哈尔滨工业大学, 2019.
- Zhang Weiwei. Isolation and purification of lactic acid for high-purity polymerization [D]. Harbin Institute of Technology, 2019.

(编辑: 侯向辉)