

doi: 10.12452/j.fxcxb.250312182

# 高效液相色谱-示差折光检测器法测定玻璃化冷冻液中保护剂和营养物质的含量

冯霞兰<sup>1</sup>, 赵欣庆<sup>1</sup>, 蒲小聪<sup>2\*</sup>, 唐敏<sup>2</sup>, 张蓉琴<sup>1\*</sup>

(1. 成都市药品检验研究院, 四川省药品监督管理局化学药品质量研究与控制重点实验室, 四川 成都 610041;  
2. 四川省药品检验研究院, 四川省医疗器械检测中心, 四川 成都 610097)

**摘要:** 建立了高效液相色谱-示差折光检测器(HPLC-RID)法同时测定玻璃化冷冻液中4种保护剂和2种营养物质的含量。以0.01 mol/L硫酸溶液为流动相进行洗脱, 采用BIO-RAD Aminex HPX-87H(300 mm×7.8 mm, 9 μm)色谱柱分离, 示差折光检测器(RID)检测, 外标法定量。结果表明, 在优化的色谱条件下, 6种待测组分能有效分离, 且在各自考察的质量浓度范围内线性关系良好, 相关系数( $r$ )均不小于0.999 9, 检出限(LOD)和定量下限(LOQ)分别为0.009~0.025 mg/mL和0.030~0.085 mg/mL。阴性样品在低、中、高3个浓度水平下的平均加标回收率为99.8%~103%, 相对标准偏差(RSD,  $n=3$ )为0.20%~1.8%。该方法简便、专属性强、准确度高, 适用于玻璃化冷冻液中保护剂和营养物质的含量测定。

**关键词:** 高效液相色谱-示差折光检测器法; 玻璃化冷冻液; 胚胎冷冻; 保护剂; 营养物质

**中图分类号:** O657.7; R917 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-4957(2025)12-2619-05

## Determination of Cryoprotectants and Nutrients in Vitrification Solution by High Performance Liquid Chromatography with Refractive Index Detector

FENG Xia-lan<sup>1</sup>, ZHAO Xin-qing<sup>1</sup>, PU Xiao-cong<sup>2\*</sup>, TANG Min<sup>2</sup>, ZHANG Rong-qin<sup>1\*</sup>

(1. SCMPA Key Laboratory for Quality Research and Control of Chemical Medicine, Chengdu Institute for Drug Control, Chengdu 610041, China; 2. Sichuan Testing Center of Medical Devices, Sichuan Institute for Drug Control, Chengdu 610097, China)

**Abstract:** A method for determination of four cryoprotectants and two nutrients in vitrification solution was developed by high performance liquid chromatography with refractive index detector (HPLC-RID). The samples were eluted by using 0.01 mol/L sulfuric acid as mobile phase, and the chromatographic separation was carried out on the BIO-RAD Aminex HPX-87H column (300 mm × 7.8 mm, 9 μm). Refractive index detector (RID) was used for detection and the external standard method was applied for quantitative determination. Under this specific condition, the samples were well separated and showed good linear relationships with the correlation coefficients ( $r$ ) not less than 0.999 9. The limits of detection (LODs) and the limits of quantification (LOQs) were 0.009~0.025 mg/mL and 0.030~0.085 mg/mL, respectively. The average spiked recoveries of the negative samples at three concentration levels were from 99.8% to 103%, and relative standard deviations (RSDs,  $n=3$ ) were between 0.20% and 1.8%. The method is simple, specific, accurate and suitable for the determination of cryoprotectants and nutrients in vitrification solution.

**Key words:** HPLC-RID; vitrification solution; embryo freezing; cryoprotectants; nutrients

胚胎冷冻保存是辅助生殖的重要手段, 已广泛用于胚胎移植、动物克隆及动物资源保护<sup>[1-2]</sup>。保存方法包括慢速冷冻、快速冷冻和玻璃化冷冻, 玻璃化冷冻具有操作简单、存活率高、不需昂贵设备等优点, 已成为首选方法<sup>[1]</sup>。玻璃化冷冻液中的保护剂是影响冷冻效果的重要因素, 分为渗透性冷冻保护剂和非渗透性冷冻保护剂<sup>[1-3]</sup>, 前者分子量小, 如乙二醇、二甲亚砜、丙二醇, 可渗入细胞, 将

收稿日期: 2025-03-12; 修回日期: 2025-04-14

\* 通讯作者: 蒲小聪, 博士, 高级工程师, 研究方向: 药品与药包材相容性研究, E-mail: 154048972@qq.com

张蓉琴, 硕士, 副主任药师, 研究方向: 药品质量控制, E-mail: 184629699@qq.com

网络首发时间: 2025-10-22

细胞内水分吸出,减少冰晶形成;后者多为大分子物质,如蔗糖、海藻糖、葡萄糖等,通过改变渗透压导致细胞脱水,减少前者引起的化学毒性;二者配合使用,可提高冷冻效率。本研究的玻璃化冷冻液,除添加保护剂海藻糖、葡萄糖、乙二醇、二甲亚砜外,还添加丙酮酸钠、乳酸钠作为营养物质。目前,玻璃化冷冻液中保护剂及营养物质的含量测定方法缺乏,现有文献报道多集中在冷冻效果及作用机制研究方面<sup>[4-7]</sup>。为确保玻璃化冷冻液质量,保证胚胎冷冻效果,建立同时测定其保护剂和营养物质含量的方法具有重要意义。

《中国药典》(2020年版)四部收载海藻糖的含量测定方法为高效液相色谱-示差折光检测器(HPLC-RID)法<sup>[8]</sup>。目前已有采用HPLC法或离子色谱法单独或同时测定葡萄糖、乳酸钠含量的文献报道<sup>[9-14]</sup>;丙酮酸钠含量测定方面的报道较少;乙二醇、二甲亚砜的紫外吸收弱、沸点高,多采用气相色谱-直接进样法<sup>[15-19]</sup>测定含量。以上方法涉及多种仪器和检测器,单次分析目标物数量较少,检测成本高,故本文建立了HPLC-RID法同时测定玻璃化冷冻液中海藻糖、葡萄糖、丙酮酸钠、乳酸钠、乙二醇、二甲亚砜的含量。该法简便、专属、准确,可缩短分析周期,提高工作效率,为玻璃化冷冻液的质量控制提供有力支撑,具有良好的应用前景。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

1260 Infinity II 高效液相色谱仪,配备RID检测器(美国安捷伦公司);XS205DU电子天平(德国赛多利斯公司);Milli-Q Advantage 10超纯水仪(美国密理博公司)。

海藻糖(纯度 $\geq 99.0\%$ ,南宁中诺生物工程有限责任公司);葡萄糖(纯度 $\geq 99.5\%$ )、丙酮酸钠(纯度 $\geq 99\%$ )、乳酸钠(纯度 $\geq 99.0\%$ )、二甲亚砜(纯度 $\geq 99.7\%$ )购于美国Sigma-Aldrich公司;乙二醇(纯度 $\geq 99.5\%$ ,上海麦克林生化科技有限公司);硫酸(分析纯,成都市科隆化学品有限公司);实验用水为超纯水(由Milli-Q Advantage 10超纯水仪制得)。

### 1.2 对照品溶液的配制

1.2.1 对照品溶液 准确称取丙酮酸钠约10 mg,乳酸钠、葡萄糖约300 mg,置于10 mL容量瓶中,用水溶解并定容,作为储备中间液;各准确称取海藻糖、乙二醇约250 mg,二甲亚砜约100 mg,置于10 mL容量瓶中,精密加入储备中间液1 mL,用水溶解并定容,作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液2 mL,置于5 mL容量瓶中,用水定容,即得。

1.2.2 系统适用性溶液 准确称取麦芽三糖、丙酮酸钠约10 mg,置于5 mL容量瓶中,精密加入对照品贮备液2 mL,用水定容,即得。

### 1.3 供试品溶液的配制

精密量取玻璃化冷冻液(A厂,批号A01、A02、A03,每批均含冷冻液1和冷冻液2,二者需配合使用)1 mL,置于20 mL容量瓶中,用水定容,摇匀,0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,即得。

### 1.4 液相色谱条件

采用以磺化交联的聚苯乙烯-二乙烯苯共聚物为填充剂的BIO-RAD Aminex HPX-87H(300 mm $\times$ 7.8 mm, 9  $\mu\text{m}$ )色谱柱;流动相为0.01 mol/L硫酸溶液,流速:0.5 mL/min;进样量:20  $\mu\text{L}$ ;RID检测器温度:50  $^{\circ}\text{C}$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测器的选择

本次检测涉及海藻糖、葡萄糖、丙酮酸钠、乳酸钠、乙二醇、二甲亚砜6种物质,在流动相中丙酮酸钠、乳酸钠游离为丙酮酸和乳酸,目标物涵盖糖、有机酸、醇类及砜类,在以聚苯乙烯-二乙烯苯为填充剂的BIO-RAD Aminex HPX-87H(300 mm $\times$ 7.8 mm, 9  $\mu\text{m}$ )色谱柱上,6种待测组分可实现有效分离。二甲亚砜的紫外吸收弱,比较了其在RID与紫外检测器上的响应情况,结果显示RID的响应信号远大于紫外检测器,为方便操作,6种物质均采用RID检测。

## 2.2 色谱条件的优化

**2.2.1 流动相的优化** 为使葡萄糖、丙酮酸钠获得较好的分离, 对流动相中酸浓度及流速进行了考察, 结果见图 1。结果显示, 当流速为 0.5 mL/min, 以 0.005 mol/L 硫酸溶液为流动相时, 葡萄糖、丙酮酸钠能基线分离; 以 0.01 mol/L 硫酸溶液为流动相时, 二者分离度进一步改善; 考虑到色谱柱对 pH 的耐受性(pH 1~3), 确定流动相为 0.01 mol/L 硫酸溶液。进一步对流速进行了考察, 流速降低为 0.4 mL/min 时, 葡萄糖的峰形拖尾, 二者分离变差, 而色谱柱可耐受的最大流速为 0.6 mL/min, 故确定流速为 0.5 mL/min。

**2.2.2 系统适用性实验** 海藻糖为由两分子葡萄糖缩合而成的双糖, 缩合过程中可能会产生麦芽三糖, 故参考《中国药典》(2020 年版)四部海藻糖的含量测定方法<sup>[8]</sup>, 在系统适用性实验中增加了麦芽三糖。此外, 样品中各组分的含量差异较大, 为更好地考察各组分的分离情况, 系统适用性溶液中增大了丙酮酸钠浓度。以优化的色谱条件进行分析, 系统适用性溶液的色谱图如图 2 所示, 出峰顺序依次为麦芽三糖(7.67 min)、海藻糖(8.43 min)、葡萄糖(10.15 min)、丙酮酸钠(11.22 min)、乳酸钠(14.45 min)、乙二醇(18.50 min)、二甲亚砆(30.47 min), 各组分之间的分离度均大于 1.5, 理论板数均大于 5 000。

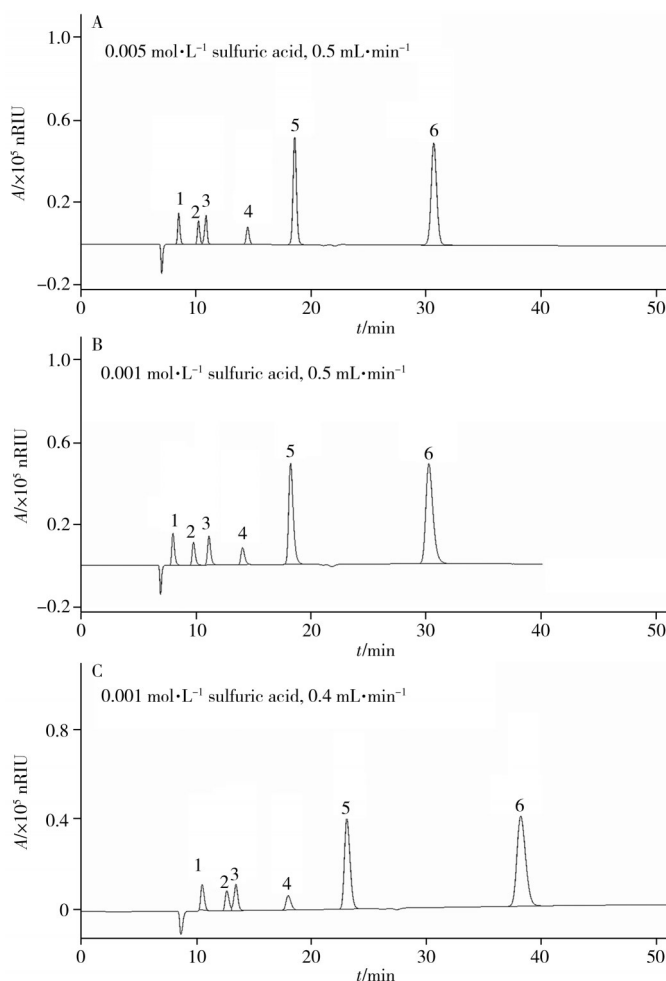


图 1 流动相中硫酸浓度及流速对 6 种组分分离效果的影响  
Fig. 1 Effects of sulfuric acid concentration in mobile phase and flow rate on the separation of six compounds

1: trehalose; 2: glucose; 3: sodium pyruvate; 4: sodium lactate;  
5: ethylene glycol; 6: dimethyl sulfoxide

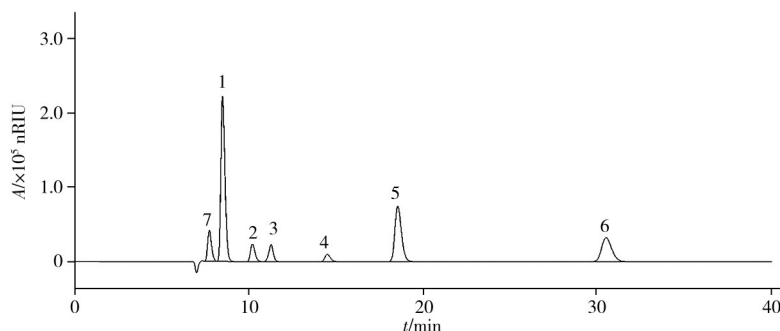


图 2 系统适用性实验色谱图

Fig. 2 Chromatogram of system suitability test

chromatographic peaks 1 to 6 were the same as those in Fig. 1; 7: maltotriose

## 2.3 样品稀释倍数的考察

样品中各待测组分的浓度差异较大, 为同时测定 6 种组分, 对稀释倍数进行了考察。稀释倍数较大时, 含量较小的化合物(如丙酮酸钠)无法准确定量; 若直接测定, 海藻糖、乙二醇超载, 易污染系统, 影响检测。综合考虑, 将样品稀释 20 倍后进行分析, 实验过程中仪器压力正常, 基线无波动。

## 2.4 方法学验证

**2.4.1 线性范围、检出限及定量下限** 取“1.2.1”的对照品贮备液,根据检测需求逐级稀释制成系列质量浓度的对照品溶液,依次测定,以各组分的峰面积( $y$ )对质量浓度( $x$ , mg/mL)进行线性回归。取对照品溶液逐级稀释,分别按3倍信噪比( $S/N=3$ )和10倍信噪比( $S/N=10$ )计算各待测组分的方法检出限(LOD)和定量下限(LOQ)。结果表明,6种待测组分在各自质量浓度范围内线性关系良好,相关系数( $r$ )均不小于0.999 9, LOD和LOQ分别为0.009~0.025 mg/mL和0.030~0.085 mg/mL(表1)。

表1 6种目标物的线性范围、回归方程、检出限及定量下限  
Table 1 Linear ranges, regression equations, LODs and LOQs of 6 analytes

| Compound                 | Linear range/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | Regression equation | $r$     | LOD/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | LOQ/(mg·mL <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------|-------------------------------------|---------------------|---------|----------------------------|----------------------------|
| Trehalose(海藻糖)           | 0.2~25                              | $y=35\ 349x+1\ 468$ | 0.999 9 | 0.009                      | 0.030                      |
| Glucose(葡萄糖)             | 0.03~3                              | $y=34\ 334x+1\ 130$ | 1.000 0 | 0.012                      | 0.042                      |
| Sodium pyruvate(丙酮酸钠)    | 0.001~0.1                           | $y=22\ 219x+19.05$  | 0.999 9 | 0.011                      | 0.038                      |
| Sodium lactate(乳酸钠)      | 0.02~3                              | $y=18\ 280x+487.1$  | 1.000 0 | 0.025                      | 0.083                      |
| Ethylene glycol(乙二醇)     | 0.2~22                              | $y=21\ 469x+5\ 043$ | 1.000 0 | 0.015                      | 0.050                      |
| Dimethyl sulfoxide(二甲亚砜) | 0.1~10                              | $y=31\ 250x+3\ 234$ | 1.000 0 | 0.025                      | 0.085                      |

**2.4.2 精密度** 取对照品溶液,连续进样测定6次,记录色谱图及峰面积,6种组分峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.10%~1.3%,表明进样精密度良好。

**2.4.3 稳定性** 取对照品溶液,分别于0、2、3、20、37 h进样分析,记录色谱图及峰面积,6种组分峰面积的RSD为0.10%~1.5%,表明对照品溶液在37 h内稳定。

**2.4.4 重复性** 取基质更为复杂的冷冻液2(批号:A01),平行制备6份供试品溶液,进样分析,海藻糖、葡萄糖、丙酮酸钠、乳酸钠、乙二醇、二甲亚砜的平均质量浓度分别为168.00、0.29、0.012、0.28、216.63、104.44 mg/mL, RSD分别为2.3%、3.7%、2.7%、4.2%、4.0%、4.0%,表明方法重复性良好。

**2.4.5 回收率** 精密量取“1.2.1”的对照品贮备液320、400、480  $\mu$ L,各置于1 mL容量瓶中,用阴性样品溶液定容,摇匀,每个浓度平行制备3份,分别作为低、中、高浓度加标供试液,进样测定。6种待测组分的平均回收率为99.8%~103%, RSD为0.20%~1.8%(表2),各组分回收率良好,符合《中国药典》(2020年版)四部通则9101分析方法验证指导原则<sup>[8]</sup>中规定的回收率限度要求。

表2 回收率实验结果  
Table 2 Results of recovery tests

| Compound           | Spiked/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | Average measured/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | Average recovery/% | RSD/%            |
|--------------------|-------------------------------|-----------------------------------------|--------------------|------------------|
| Trehalose          | 8.016, 10.020, 12.024         | 8.232, 10.253, 12.162                   | 103, 102, 101      | 1.7, 1.3, 1.0    |
| Glucose            | 1.003, 1.253, 1.504           | 1.010, 1.260, 1.508                     | 101, 100, 100      | 0.20, 0.20, 0.60 |
| Sodium pyruvate    | 0.038, 0.047, 0.057           | 0.038, 0.048, 0.057                     | 100, 102, 100      | 1.2, 1.1, 0.80   |
| Sodium lactate     | 0.945, 1.181, 1.417           | 0.954, 1.189, 1.422                     | 101, 101, 100      | 0.20, 0.20, 0.50 |
| Ethylene glycol    | 7.082, 8.852, 10.622          | 7.300, 9.092, 10.767                    | 103, 103, 101      | 1.8, 1.7, 1.3    |
| Dimethyl sulfoxide | 3.405, 4.256, 5.107           | 3.406, 4.239, 5.098                     | 100, 99.9, 99.8    | 0.40, 0.70, 1.2  |

## 2.5 样品测定

取“1.3”的供试品溶液进样分析,采用外标法定量,冷冻液1及冷冻液2中各组分的测定结果见表3。冷冻液1中未添加海藻糖,其余各组分的测定结果与企业提供的实际添加浓度基本一致,表明该法可准确测定玻璃化冷冻液中海藻糖、葡萄糖、丙酮酸钠、乳酸钠、乙二醇及二甲亚砜的含量。

表3 样品测定结果(mg·mL<sup>-1</sup>)  
Table 3 Determination results of sample(mg·mL<sup>-1</sup>)

| Sample                   | Lot No. | Trehalose | Glucose | Sodium pyruvate | Sodium lactate | Ethylene glycol | Dimethyl sulfoxide |
|--------------------------|---------|-----------|---------|-----------------|----------------|-----------------|--------------------|
| Vitrification solution 1 | A01     | —*        | 0.39    | 0.015           | 0.40           | 108.73          | 52.71              |
|                          | A02     | —         | 0.39    | 0.013           | 0.41           | 109.42          | 54.18              |
|                          | A03     | —         | 0.41    | 0.018           | 0.38           | 107.68          | 51.89              |
| Vitrification solution 2 | A01     | 168.96    | 0.29    | 0.012           | 0.28           | 213.73          | 103.02             |
|                          | A02     | 169.39    | 0.29    | 0.012           | 0.28           | 222.01          | 107.07             |
|                          | A03     | 165.66    | 0.29    | 0.012           | 0.28           | 214.16          | 103.25             |

\*not added

### 3 结 论

本文建立了玻璃化冷冻液中海藻糖、葡萄糖、丙酮酸钠、乳酸钠、乙二醇和二甲亚砜的 HPLC-RID 检测方法, 方法专属性强, 准确度高, 可用于玻璃化冷冻液的质量控制与评价。关于玻璃化冷冻液中各保护剂及营养物质的含量范围及限度, 目前国内外暂无相关要求或标准, 生产企业一般根据胚胎冷冻效果自行调整。该方法有助于填补检验标准领域的空白, 为相关标准体系的完善提供技术支撑, 应用前景良好。

#### 参考文献:

- [1] Zhang P P, Hao H S, Du W H, Pang Y W, Liu Y, Zhao S J, Zhao X M, Zhu H B. *Chin. J. Anim. Sci.* (张培培, 郝海生, 杜卫华, 庞云渭, 刘岩, 赵善江, 赵学明, 朱化彬. 中国畜牧杂志), **2020**, 56(3): 19-25.
- [2] Xue M Q, Zhou Y, Liu K K, Wang X Y, Dong Y Y, Tang X C, Wang X L. *China Anim. Husb. Vet. Med.* (薛梦琦, 周悦, 刘可可, 王欣雨, 董胤余, 唐小川, 王晓丽. 中国畜牧兽医), **2021**, 48(7): 2475-2483.
- [3] Zhuang L W. *Vitrified Cryopreservation of Embryos and It's Relative Techniques in Mice and Gui Zhou Xiang Pig*. Guiyang: Guizhou University (庄丽伟. 小鼠和贵州香猪胚胎玻璃化冷冻保存相关技术研究. 贵阳: 贵州大学), **2008**.
- [4] Chen Y R. *Effects and Mechanism of Vitrification on Mouse Embryo Development*. Changchun: Jilin University (陈雨荣. 玻璃化冷冻对小鼠胚胎发育的影响及机制研究. 长春: 吉林大学), **2023**.
- [5] Mei L L, Guo T, Yang Y, Xiao Z. *Chin. J. Woman Child Health Res.* (梅玲珑, 郭涛, 杨有, 肖准. 中国妇幼健康研究), **2023**, 34(11): 82-86.
- [6] Qu X X, Ha L X, Du Y D, Wang J J. *Ningxia Med. J.* (屈潇潇, 哈灵侠, 杜玉冬, 王金娟. 宁夏医学杂志), **2024**, 45(2): 108-112.
- [7] Han X M, Wang J Z, Li C Z, Zhang D Q. *Matern. Child Health Care China* (韩晓敏, 王君佐, 李昌周, 张德庆. 中国妇幼保健), **2024**, 39(7): 1253-1256.
- [8] National Pharmacopoeia Committee. *Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Volume IV*. Beijing: China Pharmaceutical Science and Technology Press (国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部. 北京: 中国医药科技出版社), **2020**.
- [9] Shi J, Zhu F, Zhou J, Huo L R. *Pharm. Clin. Res.* (石洁, 朱飞, 周静, 霍立茹. 药学与临床研究), **2022**, 30(2): 123-126.
- [10] Zhao F. *China Food Saf. Magaz.* (赵芳. 食品安全导刊), **2021**, (33): 92-94.
- [11] Zhou C D, Huang Z S. *Tianjin Pharm.* (周朝东, 黄哲甦. 天津药学), **2017**, 29(6): 22-24, 48.
- [12] Liu Y P, Zhu S, Wang Z, Zeng Q Z. *Chem. Anal. Meterage* (刘艳平, 朱山, 王曾, 曾庆真. 化学分析计量), **2022**, 31(5): 39-43.
- [13] Wu H N, Wang X Q, Pan H X. *Food Drug* (武红娜, 王晓琦, 潘海霞. 食品与药品), **2020**, 22(4): 272-275.
- [14] Guo Y J, Wang C M, Lin S X, Chen Y. *Chin. J. Pharm. Anal.* (郭雅娟, 王彩媚, 林嗣翔, 陈英. 药物分析杂志), **2022**, 42(3): 525-530.
- [15] Kong X X, Li J B, Chen D, Sun C L, Wang T, Sun Y, Zang J Q, Song L, Liang Y. *Qual. Saf. Inspec. Test.* (孔祥祥, 李建兵, 陈东, 孙晨磊, 王婷, 孙云, 臧金秋, 宋蕾. 梁野. 质量与安全检验检测), **2024**, 34(3): 6-9.
- [16] Wen J P, Li Z R. *Deterg. Cosmet.* (文俊萍, 黎志锐. 日用化学品科学), **2024**, 47(3): 35-38, 42.
- [17] Zhang Y, Zhao Y, Xie Y Y. *China Pharm.* (张悦, 赵勇, 谢莹莹. 中国药师), **2019**, 22(12): 2358-2361.
- [18] Zhou Y, Li J, Wang Y Y. *China Pharm.* (周谊, 李俊, 王英瑛. 中国药师), **2017**, 20(6): 1144-1146.
- [19] Jiang Y, Wang Y Y. *Environ. Sci. Manage.* (姜燕, 王元有. 环境科学与管理), **2022**, 47(5): 104-107.

(责任编辑: 丁 岩)