

反相高效液相色谱柱前在线衍生法测定氨基葡萄糖硫酸钾盐的含量

王德伟*, 叶礼红, 杨祖伟

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 建立一种反相高效液相色谱柱前在线衍生法测定保健品中氨基葡萄糖硫酸钾盐的含量。 **方法** 利用邻苯二甲醛衍生试剂与氨基葡萄糖硫酸钾盐中的氨基进行柱前在线衍生化反应, 采用 C₁₈ 色谱柱分离, 以 0.68% 醋酸缓冲液: 甲醇 (V: V=82: 18) 为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 340 nm。 **结果** D-盐酸氨基葡萄糖浓度在 0.052 ~ 1.045 mg/mL 之间呈现良好的线性, 平均回收率为 97.5%, RSD%=1.2 (n=9)。 **结论** 该方法推广性高、简便、准确, 可用于制剂及保健品中氨基葡萄糖硫酸钾盐的含量测定。

关键词: 氨基葡萄糖硫酸钾盐; 柱前在线衍生; 邻苯二甲醛衍生试剂; 反相高效液相色谱法

Determination of N-Sulfo-glucosamine potassium salt by reversed-phase high performance liquid chromatography with online pre-column derivation

WANG De-Wei*, YE Li-Hong, YANG Zu-Wei

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of N-Sulfo-glucosamine potassium salt by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) with online pre-column derivation in health food. **Methods** Online pre-column derivation were reacted by using phthalic dicarboxaldehyde (OPA) derived reagents and amino of N-Sulfo-glucosamine potassium salt. The products were separated by C₁₈ column with 0.68% acetic acid buffer: methanol (V: V=82: 18) as mobile phase, the flow rate of 1.0 mL/min, and detection wavelength of 340 nm. **Results** D-glucosamine hydrochloride concentration had a good linearity in the range of 0.052~1.045 mg/mL. The average recovery rate was 97.5%, RSD%=1.2 (n=9). **Conclusion** The method is high, simple and accurate, and can be used to determine the content of N-Sulfo-glucosamine potassium salt in pharmaceuticals and health food.

KEY WORDS: N-Sulfo-glucosamine potassium salt; online pre-column derivatization; phthalic dicarboxaldehyde derived reagents; reversed-phase high performance liquid chromatography

1 引言

氨基葡萄糖硫酸钾盐又名 D-氨基葡萄糖硫酸钾

盐, 是一种海洋生物制剂, 能促进人体粘多糖的合成, 提高关节滑液的粘性, 能改善关节软骨的代谢; 具有促进抗生素注射效能的作用, 用于合成水溶性抗癌

*通讯作者: 王德伟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 790007532@qq.com

*Corresponding author: WANG De-Wei, Licensed Pharmacist, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 790007532@qq.com

药物氯脲霉素, 其具有亚硝基脲类化合物的抗癌性^[1,2], 也是医学界视为迄今为止的可以治疗骨关节疾病的物质, 氨基葡萄糖应与硫酸软骨素配合使用, 具有止痛、促进软骨再生、清除自由基等功效^[3-7]。

目前现有检测方法为比色法^[8]、滴定法^[9]、衍生气相色谱法^[10]、衍生高效液相色谱法^[11-15], 由于现有方法配衍生试剂繁琐、衍生后不稳定等, 本文采用 reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)法, 安捷伦 OPA 衍生试剂在线柱前衍生, 测定氨基葡萄糖硫酸钾盐含量, 方法推广性高、更方便、更实用、更准确。

2 材料与方 法

2.1 仪器与试剂

美国 Agilent 1260 高效液相色谱仪(带紫光检测器); KQ-500E 型超声仪(昆山市超声仪器有限公司); XW-80A 型旋转混合仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); XP-205 型分析天平(Mettler Toledo 公司)。

OPA 试剂(来源: 安捷伦公司, 批号: BCBF1444); *D*-盐酸氨基葡萄糖标准品(中国药品生物制品检定所); 甲醇(色谱纯, 广州化学试剂厂); 醋酸钠(分析纯, 广州化学试剂厂); 骨胶原高钙片(汤臣倍健股份有限公司)。

2.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C₁₈ 5 μm, 4.6 mm×250 mm (Agilent);

流动相: 0.68%醋酸缓冲液:甲醇=82:18 (*V:V*);

流速: 1.0 mL/min;

柱温: 35 °C;

进样量: 2 μL;

检测器: 紫外检测器;

波长: 340 nm;

进样程序:

抽取: 使用补偿值从含默认速度的位置抽取 OPA 衍生试剂(安捷伦)2 μL;

抽取: 使用默认补偿值从带默认速度的样品中抽取 2 μL;

混合: 将来自针座的最大体积和最大速度混合 6 次;

等待: 等待 1 min;

进样: 样品进样。

2.3 溶液的制备

2.3.1 标准储备液

取 *D*-盐酸氨基葡萄糖标准品适量, 精密称定, 加水制成浓度为 1.0 mg/mL 的溶液, 4 °C 保存。

2.3.2 标准工作液

取标准储备液 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加水定容至刻度, 制成系列标准工作溶液。

2.3.3 样品处理

取本品粗粉约 0.2 g, 精密称定, 加水溶解于 50 mL 容量瓶中, 超声振荡 3 min, 加水定容至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液程序进样。

2.4 线性试验

取 2.3.2 系列标准工作液按照程序进样, 记录色谱图, 以标准品浓度为(*X*)横坐标, 标准品衍生后 α 异构体和 β 异构体总峰面积(*Y*)为纵坐标, 绘制标准曲线, 求得回归方程。

2.5 精密度试验

精密称取样品 6 份, 按照 2.3.3 样品处理方法处理样品, 检测样品含量, 计算其相对标准偏差 RSD(%)。

2.6 加标回收率试验

取本品粗粉约 0.1 g, 精密称定, 分成 3 组, 每组 3 份, 向 3 组分别加 *D*-盐酸氨基葡萄糖标准品约 8、10、12 mg, 于 50 mL 容量瓶中, 加入适量水溶解超声震荡 3 min, 再加水定容至刻度, 摇匀, 过滤, 取续滤液程序进样。

3 结果与讨论

3.1 GB/T 20365-2006 《硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法》分析

GB/T 20365-2006 方法中规定波长为 192 nm, 流动相、杂质等均有吸收, 干扰因素多, 流动相、杂质等的吸收造成实际检测虚高, 结果不准确。本方法将对照和样品前处理衍生后, 在 340 nm 波长下检测, 流动相、杂质等吸收小, 排出了基质的干扰, 操作简单、快速、高效、准确。

3.2 标准曲线验证结果

D-盐酸氨基葡萄糖的标准曲线方程见表 1。相关系数在 0.999 以上, 浓度在 0.052 ~ 1.045 mg/mL 的范

围内均具有良好的线性关系。

表1 标准曲线方程的结果
Table 1 The results of standard curve equation

名称	标准曲线方程	相关系数(<i>r</i>)
D-盐酸氨基葡萄糖	$Y=1868.9X+29.939$	0.9999

3.3 精密度实验

D-盐酸氨基葡萄糖的精密度结果见表2, 6个样品的相对标准偏差(RSD)均小于1.0%, 表明该方法有良好的精密度。

表2 精密度的实验(*n*=6)
Table 2 The precision of the experiment (*n*=6)

名称	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
D-盐酸氨基葡萄糖	16.86	16.67	1.0
	16.59		
	16.78		
	16.79		
	16.44		
	16.58		

3.4 回收率实验

D-盐酸氨基葡萄糖在3个不同添加水平下浓度

的回收率结果见表3, 3个浓度下样品中的D-盐酸氨基葡萄糖平均回收率为: 97.5%, 相对标准偏差(RSD)均小于2.0%, 加标回收率高, 说明本方法对D-盐酸氨基葡萄糖和保健食品中D-盐酸氨基葡萄糖的含量能起到质量控制的目的。能为D-盐酸氨基葡萄糖原料和保健食品中D-盐酸氨基葡萄糖的含量测定提供检测标准依据。

3.5 实际样品的测定

在2.3.3条件下, 与D-盐酸氨基葡萄糖标准品色谱峰相对应的位置上, 衍生后可以分离出 α 异构体和 β 异构体, 如图1所示, 分离效果良好, 同时也不受杂质峰影响。

4 结论

本试验采用RP-HPLC法, OPA衍生试剂在线柱前衍生, 排除了GB/T 20365-2006在192 nm条件下基质的干扰, 解决了盐酸氨基葡萄糖在反相柱上保留时间短, 难于与其他杂质分离的缺点。本方法采用紫外检测器, 推广性高, 排除了运用荧光检测器的高选择性、背景荧光和猝灭效应等, 无需现配衍生试剂。采用程序进样, 自动衍生, 操作简单、快速、高效、准确。推广性高, 适用于含氨基葡萄糖盐酸盐、氨基葡萄糖硫酸钾盐及其制剂等的检测。

表3 加标回收率实验结果(*n*=9)
Table 3 Standard addition recovery of experimental results (*n*=9)

名称	理论加标量(mg)	实测含量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
D-盐酸氨基葡萄糖	8.032	7.813	97.07	97.5	1.2
	8.025	7.796	97.15		
	8.003	7.693	96.13		
	10.112	9.905	97.95		
	10.026	9.815	97.90		
	10.005	9.613	96.08		
	11.956	11.643	97.38		
	12.025	11.993	99.73		
	12.006	11.801	98.29		

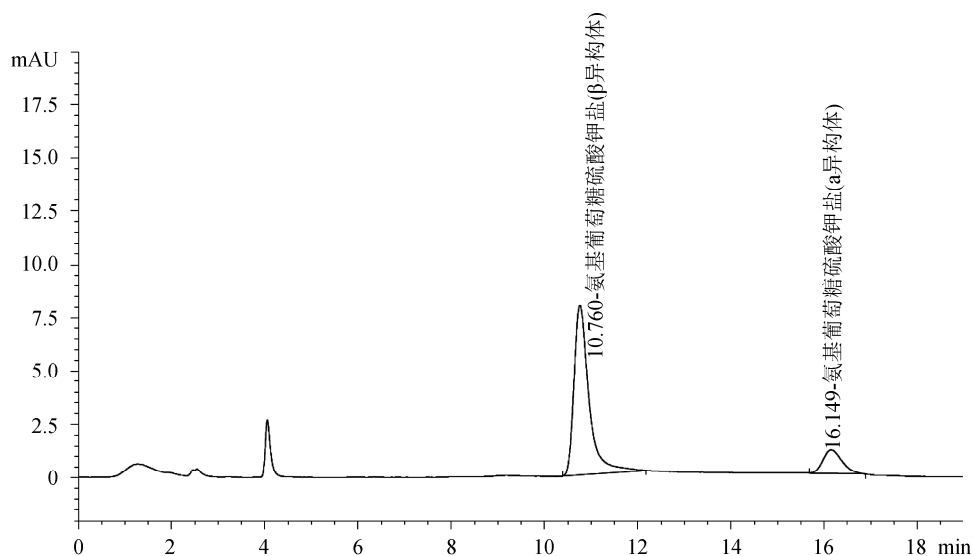


图 1 样品的色谱峰图

Fig. 1 Chromatogram of sample

参考文献

- [1] 曹秀明, 张珍珠, 刘万顺. *D*-氨基葡萄糖盐酸盐体外抗肿瘤及其免疫调节作用[J]. 中国生化药物杂志, 2008, (1): 54–56.
Cao XM, Zhang ZZ, Liu WS. *D*-glucosamine hydrochloride in vitro anti-tumor and immune regulation [J]. Chin J Biochem Pharm, 2008, (1): 54–56.
- [2] 张莉, 刘万顺, 韩宝芹. *D*-氨基葡萄糖及其衍生物抗肿瘤活性的初步研究[J]. 中国海洋药物, 2006, (2): 30–35.
Zhang L, Liu WS, Han BQ. Study on antitumor activity of *D*-amino glucose and its derivatives [J]. Chin J Mar Drugs, 2006, (2): 30–35.
- [3] 胡彤宇, 李建衡. 硫酸氨基葡萄糖治疗膝关节骨性关节炎的临床疗效[J]. 临床荟萃, 2003, (12): 36.
Hu DY, Li JH. The clinical efficacy of glucosamine sulfate treatment of knee osteoarthritis [J]. Clin Meta, 2003, (12): 36.
- [4] 陈怡. 硫酸氨基葡萄糖临床应用的研究进展[J]. 中国药业, 2012, (9): 102–104.
Chen Y. Progress in clinical application of glucosamine sulfate [J]. Chin Pharm, 2012, (9): 102–104.
- [5] 王虹蕾. 硫酸氨基葡萄糖治疗骨关节炎[J]. 医药论坛杂志, 2006, (8): 47.
Wang HL. Treatment of osteoarthritis by amino acid sulfate [J]. J Med Forum, 2006, (8): 47.
- [6] 赵永德, 王晓焕. *D*-氨基葡萄糖衍生物的研究进展[J]. 化学研究, 2007, (1): 110–113.
Zhao YD, Wang XH. Research progress of *D*-amino glucose derivatives [J]. Chem Res, 2007, (1): 110–113.
- [7] 张兰杰, 候冬岩, 辛广, 等. *D*-氨基葡萄糖盐酸盐的制备及抗氧化特性的研究[J]. 食品科学, 2007, (4): 105–107.
Zhang LJ, Hou DY, Xin G, et al. Preparation and antioxidant properties of *D*-glucosamine hydrochloride [J]. Food Sci. 2007, (4): 105–107.
- [8] 冉兰, 张榕, 文霞, 等. 比色法测定盐酸氨基葡萄糖片的含量[J]. 华西药学杂志, 2001, (3): 217–218.
Ran L, Zhang R, Wen X, et al. Colorimetric determination of glucosamine hydrochloride tablets [J]. West Chin J Pharm Sci, 2001, (3): 217–218.
- [9] 陈金东, 李蔚. 滴定分析法和分光光度法测定保健食品中 *D*-氨基葡萄糖盐酸盐含量的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, (2): 16–17.
Chen JD, Li W. Study on the titration and determination in health food *D*-glucosamine hydrochloride by Spectrophotometry [J]. Chin J Health Lab Technol, 2002, (2): 16–17.
- [10] 李俊, 王英瑛. 衍生化气相色谱法测定氨基葡萄糖制剂含量[J]. 医药导报, 2009, (3): 88–90.
Li J, Wang YY. Determination of contents of amino glucose by derivatization gas chromatography [J]. Her Med, 2009, (3): 88–90.
- [11] 郑家概, 王飞, 农云军, 等. 氨基葡萄糖盐酸盐含量的 HPLC 柱前衍生法测定[J]. 分析测试学报, 2009, (9): 93–95.
Zheng JG, Wang F, Nong YJ, et al. Determination of glucosamine

- hydrochloride HPLC column derivatization [J]. *J Instrum Anal*, 2009, (9): 93–95.
- [12] 狄平平, 劳苑子, 赵立平, 等. HPLC 法测定复方氨基葡萄糖片中盐酸氨基葡萄糖和硫酸软骨素含量[J]. *中国药事*, 2010, (3): 69–72.
- Di PP, Lao YZ, Zhao LP, *et al.* Determination of glucosamine hydrochloride in glucosamine and chondroitin sulfate content by HPLC [J]. *Chin Pharm Aff*, 2010, (3): 69–72.
- [13] 王萍亚, 赵华, 周勇, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定氨基葡萄糖盐酸盐的含量[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2009, (1): 50–53.
- Wang PY, Zhao H, Zhou R, *et al.* HPLC determination of glucosamine hydrochloride with pre column derivatization[J]. *J Zhejiang Ocean Univer (Nat Sci)*, 2009, (1): 50–53.
- [14] 王英瑛, 李俊, 曾苏. 反相高效液相色谱衍生化法测定氨基葡萄糖原料及其制剂的含量[J]. *医药导报*, 2008, (7): 117–118.
- Wang YY, Li J, Zeng S. Determination of glucosamine raw materials and preparation of HPLC derivatization [J]. *Herald Med*, 2008, (7): 117–118.
- [15] 常碧影, 刘洪基, 闫惠文, 等. 柱前衍生高效液相色谱法测定氨基酸[J]. *分析化学*, 1995, (1): 106–109.
- Chang BY, Liu HJ, Yan HW, *et al.* Determination of amino acids by HPLC [J]. *Chin J Anal Chem*, 1995, (1): 106–109.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



王德伟, 执业药师, 主要研究方向为保健食品的质量控制。
E-mail: 790007532@qq.com