

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2019.11.08

高效液相色谱法测定饲料原料葡萄糖胺盐酸盐含量

商 军, 华贤辉, 张浩然, 张亦菲, 田 恺, 徐 汀

(上海市兽药饲料检测所, 上海 201103)

[收稿日期] 2019-08-30 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2019)11-0043-06 [中图分类号] S859.2

[摘 要] 建立了高效液相色谱法测定饲料原料葡萄糖胺盐酸盐含量。采用 ODSC18 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以磷酸盐缓冲液(pH = 7.3 ~ 7.7) - 乙腈(30 + 70, $V_1 + V_2$) 为流动相, 进样量 10 μL, 流速 0.6 mL/min, 检测波长 195 nm, 柱温 35 °C。在此色谱条件下, 葡萄糖胺盐酸盐在 3.00 ~ 5.00 mg/mL 浓度范围内呈良好线性关系, $r = 0.99951$, 方法平均回收率为 99.1%, 相对标准偏差(RSD) 为 0.6% ($n = 9$), 以信噪比(S/N) ≥ 3 为检测限, 信噪比(S/N) ≥ 10 为定量限, 检测限和定量限分别为 0.032 mg/mL 和 0.12 mg/mL。本法操作简便、快速、结果准确, 应用于实际样品检测, 结果满意, 可作为葡萄糖胺盐酸盐含量测定的质控方法。

[关键词] 高效液相色谱; 饲料原料; 葡萄糖胺盐酸盐

Determination of Glucosamine Hydrochloride in Feed Material by HPLC

SHANG Jun, HUA Xian-hui, ZHANG Hao-ran, ZHANG Yi-fei, TIAN Kai, XU Ting

(Shanghai Institute for Veterinary Drug and Feeds Control, Shanghai 201103, China)

Abstract: A method for determination of glucosamine hydrochloride in feed material by HPLC was developed. The separation was performed on ODS C18 column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase of phosphate buffer solution (pH = 7.3 ~ 7.7) - acetonitrile (30 + 70, $V_1 + V_2$) and flow rate was 0.6 mL/min. The determination was done at 35 °C for the column temperature and at 195 nm for the detect wavelength. Under above experimental conditions, the calibration curve for glucosamine hydrochloride was linear in range of 3.00 ~ 5.00 mg/mL ($r = 0.99951$). The average recovery was 99.1% ($n = 9$, $RSD = 0.6\%$). The limit of detection (LOD) was 0.032 mg/mL ($S/N \geq 3$), and the limit of quantitation (LOQ) was 0.12 mg/mL ($S/N \geq 10$). The results obtained by experimental verification showed that the method is simple, rapid and reliable for the determination of glucosamine hydrochloride in feed material with satisfactory results.

Key words: HPLC; feed material; glucosamine hydrochloride

葡萄糖胺盐酸盐是一种天然的氨基单糖, 可以刺激软骨细胞产生正常多聚体结构的蛋白多糖, 提

高软骨细胞的修复能力,抑制产生损伤软骨的酶,促进软骨基质的修复和重建,可延缓骨关节疼痛的病理过程和疾病的进程^[1]。现代工业生产中主要采用甲壳类动物和其他节肢动物的外骨骼为原料,经盐酸水解,再经活性炭脱色和干燥步骤得到其成品^[2],葡萄糖胺盐酸盐已被收录于中华人民共和国农业部公告第 1773 号《饲料原料目录》中,其不仅广泛应用于医药及保健食品领域,而且也已在畜禽养殖业和宠物保健中得到了应用^[3]。

目前医药及保健食品领域葡萄糖胺盐酸盐含量测定的国内外文献报道主要有以下几种方法:分光光度法^[4]、高效液相色谱(HPLC) - 紫外检测法^[5-6]、HPLC - 蒸发光散射检测法^[7-8]、HPLC - 示差折光检测法^[9]和 HPLC - 荧光光度检测法^[10],其中分光光度法操作繁琐费时、人为操作误差较大;采用 HPLC - 蒸发光散射检测法,ELSD 的响应值与葡萄糖胺盐酸盐浓度的关系曲线,在较高浓度范围内大致呈线性,而在低浓度范围内呈指数关系;采用 HPLC - 示差折光检测法,示差折光检测器的灵敏度低,不能实现梯度洗脱,对有干扰峰的样品不适用;采用 HPLC - 荧光光度检测法,需要衍生,操作相对复杂,消耗时间长,上述检测法的稳定性和重复性,均不如 HPLC - 紫外检测法。目前,标准收载的葡萄糖胺盐酸盐原料含量测定方法主要有电位滴定法(欧洲药典 9.0 版)^[11]、高效液相色谱法(美国药典 40 版)^[12],国内尚无国家和行业标准,而质量控制的重要指标之一含量测定就非常重要,为此,本方法参考美国药典 40 版,进一步优化相关条件,建立高效液相色谱法测定不同来源和批次的葡萄糖胺盐酸盐原料含量,并与电位滴定法进行了对比研究,结果表明,建立的方法具有准确、简便、专属性强的特点,可以作为饲料原料葡萄糖胺盐酸盐含量测定的质量控制方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(分离系统 e2695,二极管阵列检测器 PDA2998,紫外检测器 2487,美国 Waters 公司,配 Empower 3 软件);电位滴定仪(904 Titrand,瑞士万通公司);电子天平(AB135 - S,瑞

士 METTLER TOLEDO 公司,精度为 0.01 mg);纯水机(Molatom 1810A,中国重庆摩尔水处理设备有限公司)。

1.2 试剂 葡萄糖胺盐酸盐对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 140649 ~ 201304,含量为 100%);磷酸氢二钾(分析纯);磷酸(分析纯);乙腈(色谱纯);磷酸盐缓冲溶液(pH 7.5,称取磷酸氢二钾 3.5 g,精确至 0.01 g,置 1000 mL 容量瓶中,加水适量使溶解,加入 0.25 mL 氨水,用水稀释至刻度,摇匀;用磷酸调节 pH 值至 7.5 ± 0.2);0.1 mol/L 氢氧化钠标准滴定溶液;实验用水(电阻率 $>18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$,符合 GB/T6682 一级用水的规定)。饲料原料葡萄糖胺盐酸盐由国内 4 家典型的生产企业各提供 3 批(企业 1 的批号为 201802173、201803122、201805215;企业 2 的批号为 Y1710015、Y1710023、Y1803001;企业 3 的批号为 20171102、20180116、20180429;企业 4 的批号为 M1811001、M1811002、M1811003)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:C18 柱(长:150 mm,内径:4.6 mm,粒径:4 ~ 5 μm);流动相:乙腈 - 磷酸盐缓冲溶液($70 + 30, V_1 + V_2$);流速:0.6 mL/min;柱温:35 $^{\circ}\text{C}$;检测波长:195 nm;进样量:10 μL 。在上述色谱条件下,葡萄糖胺盐酸盐对照品溶液(4.00 mg/mL)和葡萄糖胺盐酸盐供试品溶液(4.00 mg/mL)的典型色谱图见图 1,保留时间约为 2.5 ~ 2.6 min,分离度大于 1.5。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液制备 称取葡萄糖胺盐酸盐对照品约 0.2 g,精确至 0.1 mg,置 50 mL 容量瓶中,加 50% 乙腈溶液($V_1:V_2$)适量使溶解,用 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀;经 0.45 μm 滤膜滤过,滤液作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液制备 称取供试品约 0.2 g,精确至 0.1 mg,置 50 mL 容量瓶中,加 50% 乙腈溶液($V_1:V_2$)适量使溶解,用 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀;经 0.45 μm 滤膜滤过,滤液作为供试品溶液。

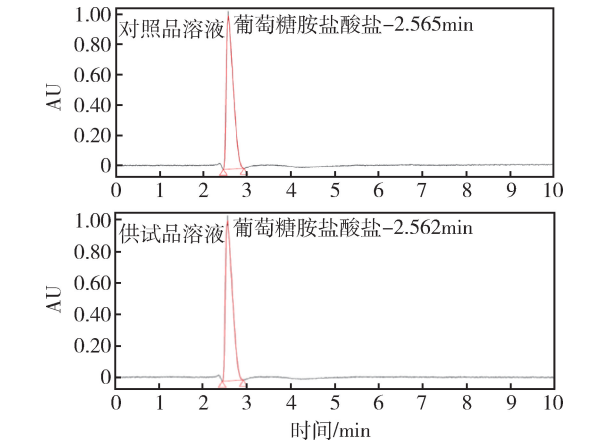


图1 葡萄糖胺盐酸盐对照品溶液和供试品溶液的HPLC色谱图

Fig 1 Chromatogram of standard solution and sample solution of glucosamine hydrochloride

2.3 供试品测定 分别取对照品溶液和供试品溶液,按2.1项的色谱条件操作,分别注入液相色谱仪,得对照品和供试品溶液中葡萄糖胺盐酸盐的峰面积,按外标法计算供试品中葡萄糖胺盐酸盐含量。

2.4 线性关系考察 分别称取葡萄糖胺盐酸盐对照品0.15、0.175、0.2、0.225、0.25 g,精确至0.1 mg,分别置50 mL棕色容量瓶中,加50%乙腈溶液($V_1: V_2$)至刻度,摇匀,制成葡萄糖胺盐酸盐浓度分别为3.00、3.50、4.00、4.50和5.00 mg/mL的对照品曲线溶液。取10 μ L注入液相色谱仪,按2.1项的色谱条件操作,记录色谱峰面积,以对照品溶液的浓度(C)为横坐标,峰面积(A)为纵坐标,绘制对照品曲线,结果见表1。实验结果表明,在3.00~5.00 mg/mL浓度范围内,线性关系良好。

表1 葡萄糖胺盐酸盐的线性关系($n=3$)
Tab 1 Linear relationship of glucosamine hydrochloride ($n=3$)

$C/(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1})$	峰面积/AU	线性回归方程
3.00	20398617	$A = 5.12277 \times 10^6 C + 5.05487 \times 10^6$ $r = 0.99951$
3.50	22962982	
4.00	25568947	
4.50	28224193	
5.00	30574926	

2.5 精密度试验

2.5.1 重复性实验 分别取2.2.1项的葡萄糖胺盐酸盐对照品溶液(4.00 mg/mL)1份,按2.1项的色谱条件重复进样5次,检验系统测定的重复性;取201802173一批供试品,按2.2.2项的供试品溶液制备,分别制备成供试品溶液5份,按2.1项的色谱条件进样,检验供试品测定的重复性,结果见表2。实验结果表明,葡萄糖胺盐酸盐对照品峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.02%,保留时间的相对标准偏差(RSD)为0.3%;5份葡萄糖胺盐酸盐供试品峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.1%,系统和供试品测定重复性均良好。

2.5.2 中间精密度实验 取201802173一批供试品,分别于不同日期、不同人员和不同仪器,按2.3项的供试品测定对该批供试品含量进行双样测定,结果见表3。实验结果表明,不同日期、不同人员和不同仪器对批号201802173葡萄糖胺盐酸盐含量测定结果的 RSD 为0.09%。精密度较好。

2.6 稳定性试验 取2.5.1项的重复性试验中201802173一批供试品溶液,分别于0、2、4、6、8、10、12、16、24、30、36 h进样10 μ L,在0~12 h,测得峰面积的 RSD 为0.7%;在16 h后峰面积有显著下降,说明供试品有部分降解。实验结果表明,供试品溶液在12 h内稳定。

2.7 回收率试验 分别称取已知含量的供试品约0.1 g,精确至0.1 mg,共9份,分别置50 mL容量瓶中,另分别称取葡萄糖胺盐酸盐对照品0.08 g、0.1 g和0.12 g各3份,精确至0.1 mg,依低、中、高分别置上述9个50 mL容量瓶中,加50%乙腈溶液($V_1: V_2$)适量使溶解,用50%乙腈溶液稀释至刻度,摇匀;经0.45 μ m滤膜滤过,滤液作为供试品溶液;另取葡萄糖胺盐酸盐对照品,按2.2.1项的对照品溶液制备操作,制备成对照品溶液。分别取10 μ L注入液相色谱仪,按2.1项的色谱条件操作,记录色谱图,按外标法计算测定结果,结果见表4。实验结果表明,供试品不同量的葡萄糖胺盐酸盐平均回收率为99.1%,标准偏差(SD)为0.6%, RSD 为0.6%,方法的准确度较好。

表 2 方法的重复性试验结果

Tab 2 Repeatability test results of the method						
序号	系统重复性				供试品测定重复性	
	峰面积/AU	RSD/%	保留时间/min	RSD/%	峰面积/AU	RSD/%
1	25568769	0.02	2.565	0.3	25376823	0.1
2	25572251		2.563		25416772	
3	25567924		2.572		25386917	
4	25583162		2.581		25436297	
5	25569526		2.579		25372926	

表 3 方法的中间精密度试验结果

Tab 3 Intermediate precision test results of the method						%
日期	分析人员	仪器	含量		平均含量	RSD
			I	II		
1	A	Waters e2695 – 2998	99.46	99.64	99.5	0.09
2	B	Waters 2695 – 2487	99.61	99.52		
3	C	Agilent 1100	99.37	99.48		

表 4 回收率试验测定结果

Tab 4 Method recovery test results			
添加量/g	回收率/%	平均回收率 ± SD/%	RSD/%
0.0813	98.46	99.1 ± 0.6	0.6
0.0824	99.21		
0.0846	98.40		
0.1013	99.13		
0.1024	100.13		
0.1005	98.79		
0.1204	100.07		
0.1211	99.07		
0.1202	98.56		

2.8 检测限与定量限 精密称取葡萄糖胺盐酸盐对照品 0.03028 g,置 10 mL 容量瓶中,用 50% 乙腈溶液(V₁: V₂) 溶解稀释至刻度,摇匀。精密量取 1 mL,用 50% 乙腈溶液(V₁: V₂) 逐级稀释成系列浓度,吸取 10 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。以信噪比(S/N) ≥3 计算为检测限,以信噪比(S/N) ≥10 计算为定量限。检测限为 0.032 mg/mL,定量

限为 0.12 mg/mL。
2.9 本法与电位滴定法测定含量的比较 取批号为 M1811001 和 Y1710015 的供试品,分别按欧洲药典 9.0 版的电位滴定法和本法的 HPLC 法进行测定,测定的结果采用双样本 *T* 进行检验,由表 5 和图 2 可知,两法测定供试品批号为 M1811001 和 Y1710015 葡萄糖胺盐酸盐含量的结果均无显著差异(*P* > 0.05)。

表 5 本法与电位滴定法测定结果比较(n = 6)

Tab 5 Comparison of the results of this method and potentiometric titration (n = 6)				
批号	平均值 ± SD/%		<i>T</i> 值	<i>P</i>
	本法	电位滴定法		
M1811001	99.43 ± 0.25	99.50 ± 0.17	-0.59	0.361
Y1710015	99.56 ± 0.24	99.45 ± 0.06	1.00	0.571

2.10 不同实验室比较测定结果 分别取 4 家生产企业提供的饲料原料葡萄糖胺盐酸盐各 3 批,按本法由本实验室(I)与 4 家生产企业实验室(II)

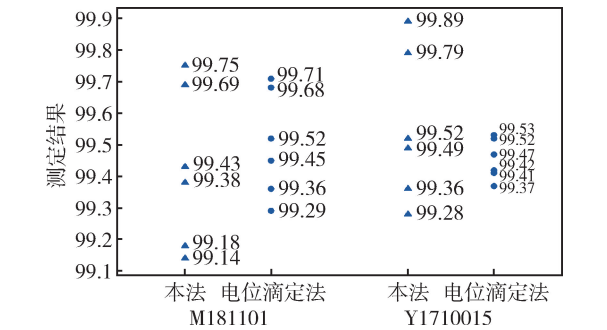


图 2 本法与电位滴定法含量测定结果的分布比较图

Fig 2 Comparisons of determination results between this method and potentiometric titration

测定同批供试品中葡萄糖胺盐酸盐含量,结果见表 6。实验结果表明,按本法测定饲料原料葡萄糖胺盐酸盐含量,本实验室与生产企业实验室测定的结果基本一致。

表 6 供试品比较测定结果 (n = 3)				
Tab 6 Comparisons of sample determination results in different laboratories (n = 3)				
来源	批号	平均值 ± SD		差值
		I	II	
企业 1	201802173	99.17 ± 0.13	99.16 ± 0.31	0.01
	201803122	99.35 ± 0.16	99.48 ± 0.22	-0.13
	201805215	99.47 ± 0.21	99.25 ± 0.18	0.22
企业 2	Y1710015	99.56 ± 0.24	99.26 ± 0.33	0.30
	Y1710023	99.23 ± 0.22	99.34 ± 0.14	-0.11
	Y1803001	99.23 ± 0.22	99.21 ± 0.24	-0.09
企业 3	201711102	98.89 ± 0.11	98.56 ± 0.22	0.33
	201801116	98.79 ± 0.14	98.86 ± 0.23	-0.07
	20180429	98.66 ± 0.15	98.50 ± 0.27	0.16
企业 4	M1811001	99.43 ± 0.25	99.29 ± 0.15	0.14
	M1811002	99.51 ± 0.19	99.51 ± 0.24	0
	M1811003	99.49 ± 0.18	99.39 ± 0.24	0.10

3 讨论与结论

3.1 检测波长的选择 由于葡萄糖胺盐酸盐分子结构中无共轭双键,基本无紫外吸收,在 195 nm 和

205 nm 波长处具有较强的末端吸收,美国药典(40 版)^[12]和相关文献报道^[6,13]对原料药的测定检测波长均采用 195 nm,故本实验选择 195 nm 为本品的检测波长。

3.2 流动相与流速的优化 目前,从高效液相色谱法测定葡萄糖胺盐酸盐含量的文献报道来看,流动相组成主要有乙腈与磷酸盐缓冲液^[6,12]、乙腈与乙酸铵溶液^[13-14]。本研究参考了美国药典(40 版),采用乙腈与磷酸盐缓冲液为组成的流动相,并优化了流动相的比例和磷酸盐缓冲液的 pH 值,优化结果表明,乙腈比例在 65% ~ 75% 范围及磷酸盐缓冲液 pH 值在 7.2 ~ 7.7 范围时保留时间和分离效果均较好,为确保方法的耐用性,选择了乙腈比例为 70%,磷酸盐缓冲液 pH 值为 7.5 ± 0.2,优化结果见图 3 和图 4。美国药典(40 版)采用 NH₂ 色谱柱进行分离测定,由于该型柱对葡萄糖胺盐酸盐的保留行为较强,故流速为 1.5 mL/min,保留时间约为 25 min,随着测定的进行,保留时间的重复性变化较大。为此本实验采用了 C18 柱进行分离测定,并对流速进行了优化,优化结果表明,当流速为 0.6 mL/min 时,葡萄糖胺盐酸盐色谱峰与供试品中的基质峰能完全分离,保留时间约为 2.5 ~ 2.6 min,大大缩短了分析时间,且保留时间的重复性较好。

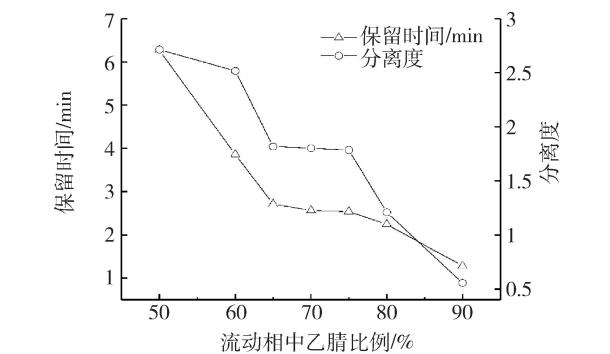


图 3 流动相中乙腈比例对保留时间和分离度的影响

Fig 3 Effect of acetonitrile ratio on retention time and resolution in mobile phase

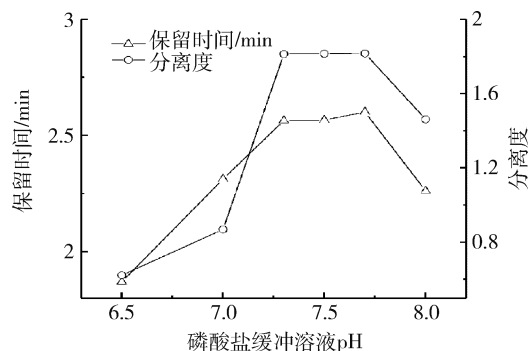


图 4 磷酸盐缓冲液 pH 对保留时间和分离度的影响

Fig 4 Effect of pH of phosphate buffer on retention time and resolution

采用高效液相色谱法测定葡萄糖胺盐酸盐含量,该方法操作简便易行、快速,方法的准确性、重复性均较好,可用于饲料原料葡萄糖胺盐酸盐含量测定的质量控制。

参考文献:

- [1] 李源力. 盐酸氨基葡萄糖治疗膝关节关节炎的临床效果分析[J]. 华西医学, 2016, 31(7): 1203 - 1204.
Li Y L. Clinical effect of glucosamine hydrochloride in the treatment of knee osteoarthritis [J]. West China Medical Journal, 2016, 31(7): 1203 - 1204.
- [2] 孙丽. 盐酸降解甲壳素制备氨基葡萄糖盐酸盐的机理研究[J]. 海峡药学, 2018, 30(4): 14 - 16.
Sun L. Mechanism Study of Preparation of Glucosamine Hydrochloride from Chitin Degraded by Hydrochloric Acid [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2018, 30(4): 14 - 16.
- [3] 文光林, 施晓丽, 陈朝桂, 等. 氨基葡萄糖对开产蛋鸡生产性能、蛋品质和蛋壳质量的影响[J/OL]. 中国畜牧杂志. <https://doi.org/10.19556/j.0258-7033.20190513-08>.
Wen G L, Shi S J, Chen C G, et al. Effects of Glucosamine on Production Performance, Egg Quality and Eggshell Quality of Laying hens [J/OL]. Chinese Journal of Animal Science. <https://doi.org/10.19556/j.0258-7033.20190513-08>.
- [4] 赵海珍, 姚丽娜. 中药保健品中 D-氨基葡萄糖盐酸盐含量测定[J]. 黑龙江医药, 2008, 21(5): 27 - 28.
Zhao H Z, Yao L. Determination of the Content of Glucosamine Hydrochloride in Health Foods which Contain Traditional Chinese Medicine [J]. Heilongjiang Medicine Journal, 2008, 21(5): 27 - 28.
- [5] Shao Y, Alluri R, Mummert M A. Stability indicating HPLC meth-

- od for the determination of glucosamine pharmaceutical formulations [J]. Pharm Biomed Anal, 2004, 35(3): 625 - 631.
- [6] 沈丹丹, 曾杰, 王玥, 等. HPLC 测定盐酸氨基葡萄糖有关物质与含量[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(4): 314 - 318.
Shen D D, Zeng J, Wang Y, et al. Determination of Related Substances and Content of Glucosamine Hydrochloride by HPLC [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2017, 52(4): 314 - 318.
- [7] Karlsson G, Winge S, Sandberg H. Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection [J]. J Chromatogr A, 2005, 1092(22): 246 - 249.
- [8] 吴虹, 顾宏霞, 王效山. HPLC - ELSD 测定盐酸氨基葡萄糖含量[J]. 安徽中医学院学报, 2008, 27(2): 41 - 43.
Wu H, Gu H X, Wang X S. Content Determination of Glucosamine Hydrochloride by HPLC - ELSD [J]. Journal of Anhui University of Chinese Medicine, 2008, 27(2): 41 - 43.
- [9] 李俊. HPLC - RID 法测定氨基葡萄糖盐酸盐的含量[J]. 海峡药学, 2011, 23(2): 42 - 44.
Li J. Determination of glucosamine hydrochloride by RID - HPLC [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2011, 23(2): 42 - 44.
- [10] 张华琨, 陈敏. 氨基葡萄糖荧光光度分析法的研究[J]. 食品研究与开发, 2009, 30(2): 100 - 104.
Zhang H J, Chen M. Improved Fluorescence Spectrophotometric Method for Determination of Glucosamine [J]. Journal of Food Research and Development, 2009, 30(2): 100 - 104.
- [11] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia Version 9.0 [S].
- [12] United States Pharmacopoeia Commission. United States Pharmacopoeia 40 Edition and National Formulary 35 Edition [S].
- [13] 张洁, 马青青, 张欣烨, 等. 反相 HPLC 测定盐酸氨基葡萄糖含量[J]. 环境卫生学杂志, 2015, 5(6): 552 - 555.
Zhang J, Ma Q Q, Zhang X Y, et al. Determination of Glucosamine Hydrochloride by HPLC [J]. Journal of Environmental Hygiene, 2015, 6(6): 552 - 555.
- [14] 甘宾宾, 刘展华, 黎少豪. HPLC 法测定保健食品中盐酸氨基葡萄糖含量的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2011, 23(6): 531 - 533.
Gan B B, Liu Z H, Li S H. Determination of glucosamine hydrochloride in health food by HPLC [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2011, 23(6): 531 - 533.