

反相高效液相色谱-蒸发光散射检测法测定 复方中的盐酸葡萄糖胺

吕 颖¹, 齐 莹¹, 张 莉¹, 迟颖红¹, 陶 宏¹, 孙 浩²

(1. Nu Skin China 华茂上海研发中心, 上海 201203; 2. Pharmanex Research Institute, Provo, Utah, USA)

摘要 :建立了应用反相高效液相色谱-蒸发光散射检测器(RP-HPLC-ELSD)测定复方产品中盐酸葡萄糖胺含量的方法。该方法以 C18 色谱柱为固定相, 甲醇-0.3% 五氟丙酸为流动相, 采用蒸发光检测器, 测定了复方中盐酸葡萄糖胺的含量。结果表明, 盐酸葡萄糖胺在 0.2 ~ 1.0 mg/mL 的质量浓度范围内二次回归的相关系数为 0.999 9, 精密密度(以相对标准偏差表示)为 0.50%。该方法具有简便、快速、准确、重现性较好的特点。

关键词 :反相高效液相色谱(reversed-phase high performance liquid chromatography);蒸发光散射检测器(evaporative light scattering detection);盐酸葡萄糖胺(glucosamine hydrochloride);复方(complex formula)

中图分类号:O658 文献标识码:B 文章编号:1000-8713(2007)06-0948-02 栏目类别:技术与应用

盐酸葡萄糖胺, 又称氨基葡萄糖盐酸盐(GAH), 作为一种食品添加成分, 已越来越多地应用到食品和保健食品中。文献[1, 2]采用高效液相色谱法(HPLC)-紫外检测器, 在紫外区末端吸收处(195 nm)对该化合物进行了检测, 但灵敏度低, 重现性差, 对于在含有多种成分的制剂中检测该化合物具有一定的难度。文献[3, 4]采用柱前衍生化-HPLC-紫外检测的方法, 将盐酸葡萄糖胺衍生化后于 254 nm 下检测, 此法耗时间长, 且衍生化的条件受 pH、温度等多种因素的限制。近些年来, 蒸发光散射检测器(ELSD)作为 HPLC 中的一种检测方法, 已越来越多地应用于在紫外光谱区无吸收的化合物。Alltech 公司(Alltech 公司应用文集, 2004)曾报道采用该检测器, 以乙腈-水为流动相, 测定了原料盐酸葡萄糖胺的纯度, 但将该法用于检测复方中的盐酸葡萄糖胺时, 会有干扰峰而无法完全分离分析。固格胶囊(Bone banker)是一种含有维生素 D3, 矿物质 Ca、Mg 和盐酸葡萄糖胺等多种成分的复方补钙产品, 本文在文献方法的基础上, 建立了新的 HPLC-ELSD 检测该复方中盐酸葡萄糖胺含量的方法, 取得了满意结果。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent HP1100 高效液相色谱系统包括四元梯度泵、自动进样器、在线脱气机、自动进样器、柱温箱、工作站和 Alltech 500 蒸发光散射检测器。水浴超声仪(美国, Branson 公司)。

盐酸葡萄糖胺标准品购自美国 Sigma 公司(纯度 99.0%)。甲醇为色谱纯, 购自德国 Merck 公司;

三氟乙酸(TFA)为色谱纯(纯度 > 97.0%), 购自美国 Sigma 公司; 五氟丙酸(PFPA)为色谱纯(纯度 > 97.0%), 购自美国 Fluka 公司。实验用水为二次蒸馏水(经 Milli-Q 系统纯化)。固格胶囊由 Nu Skin 海外研发部提供(该产品中盐酸葡萄糖胺的标示含量为 15.0%)。

1.2 对照品溶液的制备

精密称取盐酸葡萄糖胺对照品约 62 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 以水溶解并定容至刻度, 作为对照品储备溶液。分别精密吸取适量该储备液, 用水稀释, 得到质量浓度分别为 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1.0 mg/mL 的系列对照品溶液。

1.3 样品溶液的制备

取固格胶囊 20 粒, 倾出内容物, 充分研磨, 使混合均匀。精密称取 80 mg 样品粉末, 置于 25 mL 容量瓶中, 加入约 20 mL 水, 振摇后水浴超声 30 min, 取出, 以水定容至刻度, 摇匀, 过 0.45 μ m 微孔滤膜, 作为供试品溶液。

1.4 测定方法

色谱条件: Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(5 μ m, 250 mm $\times$ 4.6 mm, Phenomenex 公司); 流动相: 甲醇-0.3% PFPA 水溶液(体积比为 10:90); 柱温 25 $^{\circ}$ C; 流速 0.6 mL/min; ELSD 检测器参数: 漂移管温度 120 $^{\circ}$ C; 气体流速 2.6 ~ 2.8 mL/min。

2 结果与讨论

2.1 方法的专属性

根据固格胶囊的处方, 制备了不含盐酸葡萄糖胺的阴性样品。按照“1.3”节操作, 制备样品溶液, 进样 5 μ L。结果显示, 在盐酸葡萄糖胺出峰处, 没

有检测到干扰峰(见图1-a,b),表明本方法对测定盐酸葡萄糖胺具有一定的专属性。

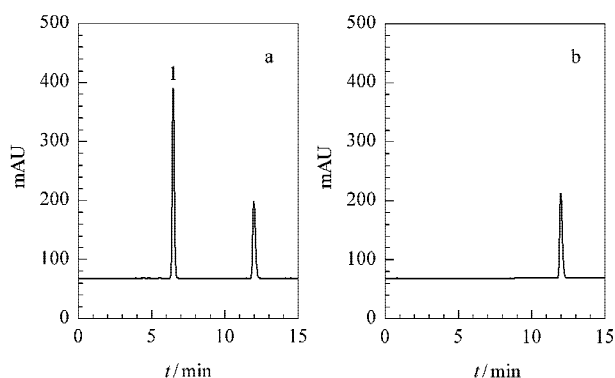


图1 (a)固格胶囊和(b)阴性样品溶液的色谱图
1. 盐酸葡萄糖胺。

2.2 检测器参数的优化

根据流动相的种类和比例,首先设定漂移管温度为105℃,气体流速为2.8 mL/min,通过观察发现,此时由于水相比比例过高,溶剂不宜完全挥发而导致基线噪声信号较高,因此通过进一步调整、观察,最后确定检测器的参数为:漂移管温度为120℃,气体流速为2.6~2.8 mL/min。

2.3 流动相的选择

文献[2]中所使用的流动相磷酸缓冲液可用于GAH的检测,但不能用于ELSD检测器。本文根据化合物的特征,尝试使用了甲醇-0.1% TFA体系和甲醇-0.3% PFPA体系作为流动相。结果发现,当采用甲醇-0.1% TFA体系为流动相时,盐酸葡萄糖胺在色谱柱中的保留时间过短,且与后面的色谱峰无法分离(图2-a),后经选择甲醇-0.3% PFPA作为流动相,使得盐酸葡萄糖胺在C18色谱柱上得到了很好的保留和峰形,且与后面的干扰峰完全分离(图2-b)。

2.4 标准曲线的绘制

取对照品系列溶液分别进样5 μL,以峰面积(y)对质量浓度(x , mg/mL)进行二次回归绘制标准曲线,计算回归方程,得 $y = 2439x^2 + 8124.1x - 794.5$, $r = 0.9999$ 。

2.5 精密度试验

取样品溶液,连续进样6次,测得盐酸葡萄糖胺峰面积的相对标准偏差(RSD)为0.50%。

2.6 样品测定

按“1.3”节所述方法配制样品溶液,进样分析。测定3批固格胶囊中盐酸葡萄糖胺的含量,结果分别为15.0%、14.9%和15.2%。

2.7 稳定性试验

取同一份样品溶液,分别在放置0、2、4、6、8、

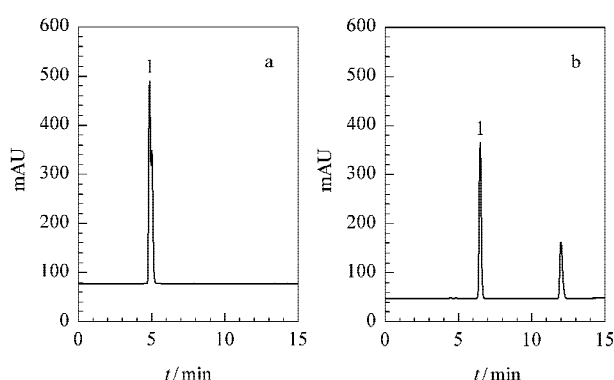


图2 流动相固格胶囊在不同流动相条件下的色谱图

a. 甲醇-0.1% TFA水溶液(体积比为10:90); b. 甲醇-0.3% PFPA水溶液(体积比为10:90).
1. 盐酸葡萄糖胺。

24、48 h后进样,进行稳定性考察。结果表明,在48 h内GAH的色谱峰没有明显变化,含量的RSD为2.0%。

2.8 讨论

盐酸葡萄糖胺为极性化合物,在C18反相色谱柱上不易保留,且无紫外吸收。本文对流动相的组成进行了考察和优化,将PFPA应用于该化合物的色谱分离,并经优化色谱条件,使得该化合物在反相色谱柱上有很好的保留,且与其他色谱峰之间有良好的分离。在实验中,曾分别采用了0.1%和0.3%的PFPA溶液作为流动相,结果表明,不同含量的PFPA溶液对盐酸葡萄糖胺色谱峰的保留时间没有影响,与干扰峰也完全分离,但应用0.3% PFPA得到的色谱峰峰形较好,柱效更高。同时,ELSD检测器的应用解决了该化合物无紫外吸收的难题,避免了柱前衍生化法的复杂操作步骤,而且与UV检测器在195 nm末端处直接检测相比,避免了基线漂移和其他成分色谱峰的干扰,特别是在检测含有多种维生素矿物质成分的复方产品中的盐酸葡萄糖胺含量时,具有更好的选择性。

3 结论

本文建立了应用HPLC-ELSD检测复方中盐酸葡萄糖胺的新方法,为控制复方中盐酸葡萄糖胺的质量提供了一种有效、准确、快速、简便的方法。

参考文献:

- [1] USP NF29, 2006: 2341
- [2] Shao Y, Alluri R, Mummert M, Koetter U, Lech S. J Pharm Biomed Anal, 2004, 35: 625
- [3] Liang Z M, Leslie J, Adebawale A, Ashraf M, Eddington N D. J Pharm Biomed Anal, 1999, 20: 807
- [4] Diaz J, Lliberia J L, Comellas L, BrotoPuig F. J Chromatogr A, 1996, 719: 171