

高效阴离子色谱法测定保健食品中的盐酸氨基葡萄糖

张思维, 郑波, 邹晓莉*, 曾红燕, 孙成均, 陈鑫

(四川大学华西公共卫生学院卫生检验教研室, 四川 成都 610041)

摘要:建立了保健食品中盐酸氨基葡萄糖的高效阴离子色谱测定方法。在 Am inoPac PA10离子色谱分离柱(2 mm ×250 mm)上,以 250 mm ol/L NaOH溶液作为流动相,利用 Au工作电极、pH参比电极的脉冲安培检测器测定了盐酸氨基葡萄糖。方法的线性范围为 0.05 ~ 10.0 mg/L,检出限为 0.012 mg/L,标准品和样品测定的相对标准偏差分别为 0.69%和 1.38%。用该法测定了保健食品中盐酸氨基葡萄糖,取得了较为满意的结果,加标回收率为 96.6% ~ 105.2%,与国家标准方法的测定结果对照,相对偏差为 - 1.4% ~ 1.0%,表明所建立的方法具有高的灵敏度和精密度,适合于保健食品中盐酸氨基葡萄糖的分析。

关键词:高效阴离子色谱;脉冲安培检测器;盐酸氨基葡萄糖;保健食品

中图分类号: O 658 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8713(2009)01-0117-03 **栏目类别:** 技术与应用

Determination of glucosamine hydrochloride in health foods using high performance anion exchange chromatography

ZHANG Siwei, ZHENG Bo, ZOU Xiaoli*, ZENG Hongyan, SUN Chengjun, CHEN Xin

(Department of Sanitary Technology, West China School of Public Health,
Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: The method for the analysis of glucosamine hydrochloride in health foods using high performance anion exchange chromatography was established. The determination of glucosamine hydrochloride was performed on an Am inoPac PA10 column (2 mm ×250 mm) with a pulse amperometric detector with an Au working electrode and an Ag/AgCl reference electrode. The linear range was 0.05 - 10.0 mg/L, and the detection limit was 0.012 mg/L. The relative standard deviations for the determination of the standard and a sample were 0.69% and 1.38%, respectively. The satisfactory results were obtained for the analysis of health food samples with the proposed method, and the spiked recovery was 96.6% - 105.2%. In comparison with the national standard method, the relative deviations of the determination results were - 1.4% - 1.0%. The method is sensitive and precise. One analysis can be completed within 5 min. This method was available for the determination of glucosamine hydrochloride in health foods.

Key words: high performance anion exchange chromatography; pulse amperometric detector; glucosamine hydrochloride; health food

盐酸氨基葡萄糖是一种氨基己糖,是人体及动物体内关节组织中糖蛋白的天然成分。盐酸氨基葡萄糖具有修复和维持软骨及关节功能的作用,可延缓骨性关节炎的病理过程和疾病进展。另外,它还参与肝肾解毒,可刺激婴儿肠道中双歧杆菌增长^[1];还有报道称盐酸氨基葡萄糖可抑制癌细胞的生长,有防腐抗菌作用,是合成抗生素和抗癌药物的主要原料^[2,3]。随着保健品的大量开发应用,盐酸

氨基葡萄糖的生化作用在保健品领域也受到了高度重视。

目前,测定盐酸氨基葡萄糖的国家标准方法(GB/T 20365-2006)是离子对色谱法,但离子对色谱试剂对色谱柱损伤较大,且流动相平衡所需时间较长。在关于盐酸氨基葡萄糖的测定研究中,比色法^[4]和反相高效液相色谱法(RP-HPLC)^[5]报道甚多。但比色法干扰较多,难以满足测定所需的准确

*通讯联系人: 邹晓莉, 副教授, 医学博士, 研究方向为食品理化检验。Tel: (028) 85501301, E-mail: zouxl_1113@163.com.

基金项目: 国家科技支撑计划课题项目(07kjB-01).

收稿日期: 2008-06-14

度。RP-HPLC通常以磷酸-乙腈为流动相,于 195 nm 处进行紫外检测。但本实验室对上述 HPLC 法进行了相关的研究,结果表明,由于氨基葡萄糖的末端吸收不稳定,测定的重现性相当不好。也有学者报道柱前衍生化 HPLC 测定盐酸氨基葡萄糖,并取得了较为满意的结果,但因需要进行紫外衍生化,使得样品前处理较为繁琐^[6]。

离子色谱法(IC)自 1975 年问世以来,以其分析速度快、灵敏度高、样品前处理简单等优点而广泛应用于各个领域。脉冲安培检测器对于多羟基、氨基等化合物有着灵敏的感应,已有不少学者成功地建立了糖类^[7,8]、氨基酸^[9,10]等的离子色谱-安培检测分析方法。Clarke 等^[11]还详细考察了不同波形下脉冲安培检测对氨基酸的影响,建立了 18 种常见氨基酸的阴离子色谱分析法,并将其用于蛋白质水解产物的测定。考虑到盐酸氨基葡萄糖也具有类似的结构,故笔者采用 Am inoPac PA10 氨基酸分离柱,以 NaOH 溶液作为流动相,用脉冲安培检测器对保健品中盐酸氨基葡萄糖进行了分离测定,样品无需衍生化,前处理简单,分析周期短,测定的精密度高。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ICS2000 离子色谱仪(美国戴安公司),主要的配置为:在线脱气装置的四元梯度泵、柱温箱、脉冲安培检测器(Au 工作电极, pH 参比电极)、淋洗液自动发生器、氨基酸分离柱(美国 Am inoPac PA10, 2 mm × 250 mm)、Chrom eleon 6.0 色谱工作站。

250 mmol/L NaOH; Milli Q 超纯水; 盐酸氨基葡萄糖标准品(中国药品生物制品检定所, 649-200001)。盐酸氨基葡萄糖标准溶液的配制:准确称取 100 mg 盐酸氨基葡萄糖标准品,用水稀释定容至 100 mL,配成 1 g/L 的标准贮备液。

1.2 实验部分

色谱条件:积分脉冲安培检测器, Au 工作电极, pH 参比电极, 四电位波形见表 1。流动相: 250 mmol/L NaOH, 流速 0.25 mL/min; 进样体积:

表 1 测定盐酸氨基葡萄糖的波形

Table 1 Waveform for the determination of glucosamine hydrochloride

Time/min	Voltage/V	Integration
0.00	+0.05	
0.20	+0.05	start
0.40	+0.05	end
0.41	+0.75	
0.60	+0.75	
0.61	-0.15	
1.00	-0.15	

20 μL; 柱温 30 °C。

用水稀释盐酸氨基葡萄糖标准溶液使其质量浓度为 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 mg/L, 直接进样测定, 以盐酸氨基葡萄糖标准溶液的质量浓度 X (mg/L) 为横坐标, 峰面积 Y 为纵坐标绘制标准曲线。

称取适量的样品, 加入 60 mL 水, 超声波提取 15 min。用水定容至 100 mL, 用 0.45 μm 滤膜过滤, 取上清液, 用水适当稀释后测定。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

通常情况下, 随着淋洗液中 NaOH 浓度的降低, 大多数糖的质子解离程度差异增大, 分离变好, 但保留时间增长。在 10 ~ 250 mmol/L 浓度范围内改变 NaOH 溶液的浓度, 考察其对样品分离测定的影响。结果表明, 使用 250 mmol/L 高浓度的 NaOH 作为流动相, 即可使盐酸氨基葡萄糖和样品中的杂峰得到有效分离, 且不需要进行色谱柱的再生和活化, 大大缩短了分析时间。另外, 因保健食品中盐酸氨基葡萄糖浓度较高, 而安培检测器测定灵敏, 样品通常需高倍稀释后测定, 这使得大部分干扰得以去除。

在 20 ~ 40 °C 范围内考察柱温对分离的影响。结果表明, 柱温对盐酸氨基葡萄糖的测定影响不大, 本文选择在 30 °C 柱温下进行分析。

2.2 干扰实验

对常见的一些糖类(果糖、木糖、阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、岩藻糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇)和 18 种常见氨基酸进行了干扰试验。在“1.2 节的色谱条件下, 于 2.0 mg/L 盐酸氨基葡萄糖标准溶液中加入一定量的干扰物质进行分析, 以加干扰物的标准溶液和标准溶液两者的峰面积相对误差小于 10% 定为不干扰测定。实验结果表明, 氨基酸在此波形下无响应。果糖、木糖、半乳糖、岩藻糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖、甘露醇能与盐酸氨基葡萄糖完全分离。小于 0.1 倍的阿拉伯糖和 0.5 倍的鼠李糖不干扰测定。保健食品中盐酸氨基葡萄糖的含量通常很高(20% ~ 30%), 而阿拉伯糖和鼠李糖经过样品高倍稀释后, 其干扰可不予考虑。色谱图见图 1。

2.3 检出限、线性范围及精密性

配制质量浓度为 0.05, 1.00, 2.00, 3.00, 5.00, 8.00, 10.0 mg/L 盐酸氨基葡萄糖标准溶液, 按优化条件进行测定, 氨基葡萄糖在上述浓度范围内呈良好的线性关系, 其线性回归方程为 $Y = 6.82X + 0.82$ ($r = 0.999$), 其中 Y 为峰面积, 单位为 nC · s; X 为

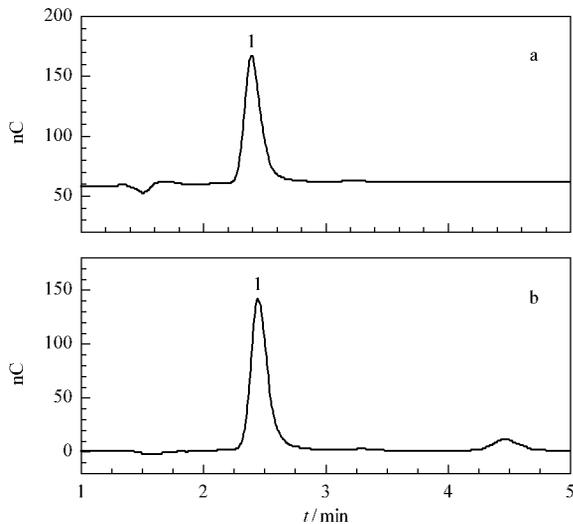


图 1 (a) 盐酸氨基葡萄糖标准品与 (b) 保健食品样品的色谱图
Fig. 1 Chromatograms of (a) glucosamine hydrochloride standard and (b) a health food sample
1. glucosamine hydrochloride.

质量浓度,单位为 mg/L 。以 3 倍基线噪声 (基线噪声为 $0.3 \text{ nC} \cdot \text{s}$) 对应的质量浓度计算方法的检出限为 0.012 mg/L 。

在选定的条件下,对同一标准溶液连续测定 8 次,峰面积和保留时间的相对标准偏差分别为 0.69% 和 0.68%。平行称取同一保健食品样品 8 份并测定其含量,测定结果的相对标准偏差为 1.38%。

2.4 加标回收率

取 12 份平行样品,3 份用于本底值的测定,其余 9 份加入不同水平的盐酸氨基葡萄糖标准溶液,按上述方法测定盐酸氨基葡萄糖含量,平均加标回收率为 96.6% ~ 105.2%,结果见表 2。

表 2 样品中添加盐酸氨基葡萄糖的回收率 ($n=3$)

Table 2 Recoveries of glucosamine hydrochloride spiked in samples ($n=3$)

Sample	Background/ mg	Added/ mg	Found/ mg	Recovery/ %
Health food 1	21.0	9.0	29.7	96.6
	21.0	20.0	40.6	98.1
	21.0	40.0	63.1	105.2
Health food 2	50.2	20.0	70.3	100.3
	50.2	40.0	89.6	98.6
	50.2	80.0	128.2	97.5

2.5 方法的对照实验

用所建立的方法与国家标准方法 (GB/T 20365-2006) 对同一保健食品中的盐酸氨基葡萄糖进行测定,结果见表 3,相对偏差均小于 10%。

2.6 样品的测定

用本法对 5 种保健食品样品进行了测定,每种保健食品抽查 12 个样品,每个样品平行测定 3 次,测得值与样品标示值一致,结果见表 4。

表 3 本法与国家标准方法测定样品中盐酸氨基葡萄糖含量的比较 ($n=3$)

Table 3 Comparison between this method and national standard method for the determination of glucosamine hydrochloride in samples ($n=3$) %

Sample	National standard method	This method	Relative deviation %
Health food 1	49.8	50.2	0.8
Health food 2	21.3	21.0	-1.4
Health food 3	30.4	30.1	1.0

表 4 保健食品样品测定结果 ($n=12$)

Table 4 Determination results of health food samples ($n=12$) %

Sample	Found	Label value
Health food 1	49.5 - 50.1	50
Health food 2	19.6 - 20.4	20
Health food 3	19.6 - 20.3	20
Health food 4	19.5 - 21.0	20
Health food 5	29.7 - 30.3	30

3 结论

本文建立了保健食品中盐酸氨基葡萄糖的高效阴离子色谱测定方法。用该法测定了保健食品中盐酸氨基葡萄糖,取得了较为满意的结果,加标回收率为 96.6% ~ 105.2%,与国家标准方法的测定结果对照,相对偏差为 -1.4% ~ 1.0%,表明所建立的方法具有高的灵敏度和精密性,适合于保健食品中盐酸氨基葡萄糖的分析。

参考文献:

- [1] McAlindon T E, Lavalley M P, Gulin J P. J AMM, 2000, 283 (11): 1469
- [2] Zhang L, Liu W S, Han B Q. Chinese Journal of Marine Drugs (张莉, 刘万顺, 韩宝芹. 中国海洋药物), 2006, 25(2): 26
- [3] Chen X. Fine Chemicals (陈忻. 精细化工), 2001, 18(2): 78
- [4] Ran L, Zhang R, Wen X, et al West China Journal of Pharmaceutical Sciences (冉兰, 张榕, 文霞, 等. 华西药学杂志), 2001, 16(3): 217
- [5] Yang L, Li T L, Huang T, et al West China Journal of Pharmaceutical Sciences (杨岚, 李铜铃, 黄婷, 等. 华西药学杂志), 2005, 20(3): 259
- [6] Liang Z M, Leslie J, Adebawale A, et al J Pharm Biomed Anal, 1999, 20(5): 807
- [7] Ou Y F, Yin P H, Zhao L. Chinese Journal of Chromatography (欧云付, 尹平河, 赵玲. 色谱), 2006, 24(4): 411
- [8] Tang K T, Liang L N, Cai Y Q, et al Chinese Journal of Analytical Chemistry (唐坤甜, 梁立娜, 蔡亚岐, 等. 分析化学), 2007, 35(9): 1274
- [9] Ding Y S, Mou S F. Chinese Journal of Chromatography (丁永胜, 牟世芬. 色谱), 2004, 22(3): 210
- [10] Yu H, Ding Y S, Mou S F. Chinese Journal of Chromatography (于泓, 丁永胜, 牟世芬. 色谱), 2002, 20(5): 398
- [11] Clarke A P, Jandik P, Rocklin R D, et al Anal Chem, 1999, 71: 2774