

参考文献

- [1] 谷岩,崔松林,周宇,等. 高效液相色谱法测定辣椒粉中碱性橙玫瑰精含量[J]. 分析测试技术与仪器, 2006, 12(4): 202.
- [2] 铁晓威,黄百芬,任一平. RP-HPLC 测定染色黄鱼中的碱性橙含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 14(1): 59.
- [3] 任一平,黄百芬,铁晓威,等. LC-MS/MS 测定染色海洋杂鱼中的碱性橙的含量[R]. 第十五次全国色谱学术报告会文集, 2005: 741.
- [4] 赵丽佳,饶伟文,吴萌. 染色红花中酸性橙 II 测定法的研究[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(11): 1794.
- [5] 张耀武,顾慧莹,路军辉. 高效液相色谱法测定食品中的酸性橙 II [J]. 化学分析计量, 2005, 14(1): 48.
- [6] 卢彩霞,陈艳,李永波. 高效液相色谱法测定豆制品中酸性橙 II 和酸性金黄[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(15): 2594.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局. GB/T 19681—2005 食品中苏丹红的检测方法-高效液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.
- [8] 温忆敏,汪国权,张慧敏,等. 食品中苏丹红系列和对位红的测定方法研究[J]. 环境与职业医学, 2006, 23(1): 27-30.
- [9] 喻凌寒,杨运云,闫世平,等. LC-ESI/MS 分析食品中微量苏丹红 I ~ IV [J]. 分析测试学报, 2005, 24(4): 28-31.
- [10] 苏小川,黄梅,甘宾宾,等. 调味品辣椒粉和腌料中苏丹 I 染料的 GC-MS 分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(9): 1073-1074.

实验技术与方法

HPLC 法测定保健食品中盐酸氨基葡萄糖含量的研究

甘宾宾,刘展华,黎少豪

(广西壮族自治区疾病预防控制中心,广西 南宁 530028)

摘要:目的 建立高效液相色谱法(HPLC)测定保健食品中盐酸氨基葡萄糖含量的简便方法。方法 样品用水超声提取,色谱柱:CAPCELL PAK CR(4.6 mm × 150 mm, 5 μm);流动相:25 mmol/L 乙酸铵 + 乙腈(加 0.1% 甲酸)(25 + 75, V/V);流量 1.0 ml/min,检测波长 200 nm。结果 盐酸氨基葡萄糖在 0.2 ~ 26.0 μg 范围内呈良好线性,相关系数为 1.000;检出限为 0.02 μg;回收率 99.5% ~ 101.0%;RSD 1.03%。结论 该方法操作简便快速、结果准确可靠,可作为保健食品中盐酸氨基葡萄糖的质量控制监测。

关键词: HPLC; 盐酸氨基葡萄糖; 保健食品

中图分类号: O657.72; TS207.3 文献标识码: B 文章编号: 1004-8456(2011)06-0531-03

Determination of glucosamine hydrochloride in health food by HPLC

Gan Binbin, Liu Zhanhua, Li Shaohao

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Center for Disease Prevention and Control, Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To establish a method for the determination of glucosamine hydrochloride in health food by HPLC. **Methods** Samples were extracted ultrasonically with water and separated on a CAPCELLPAKCR column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of 25 mmol ammonium acetate + acetonitrile (in 0.1% formic acid) (25 + 75, V/V). The flow rate was 1.0 mL/min; the detection wavelength was 200 nm. **Results** The standard curve of glucosamine hydrochloride was linear over the range in 0.2 ~ 26.0 μg ($r = 0.999\ 982$). The limit of detection was 0.02 μg. The recovery was 98.1% ~ 104%, RSD was 1.03%. **Conclusion** This method is simple, accurate and reliable, which can be used for the quality control of glucosamine hydrochloride in health food.

Key words: HPLC; glucosamine hydrochloride; function food

盐酸氨基葡萄糖(GAH)又称氨基葡萄糖盐酸盐或葡胺糖盐酸盐,学名 2-氨基-2-脱氧-D-葡萄糖盐酸盐,是氨基葡萄糖的一种稳定化合物,它可利用节肢动物外壳中提取的甲壳素在盐酸溶液中

充分水解而制得^[1],它具有消炎止痛,治疗与修复关节软骨组织,抗氧化,保护肝,抗肿瘤等功效^[2]。由于盐酸氨基葡萄糖具有多种重要的生理功能,它正成为人们研究的热点。现在,市场上已出现了多

收稿日期: 2011-01-18

作者简介: 甘宾宾 女 主任技师 研究方向为理化分析检验 E-mail: gan-bb@tom.com

种以盐酸氨基葡萄糖为主要功能因子的保健食品。目前,国内外对盐酸氨基葡萄糖的测定主要采用分光光度法、电位滴定法、高效液相色谱法等^[1,3-5],高效液相色谱法是较常用的检测方法,其他方法由于准确性较差、灵敏度低、重现性较差等原因很少使用。高效液相色谱法基本上采用衍生化法或离子对试剂法进行检测,衍生化法检测时间较长、操作复杂、不易掌握;而离子对试剂法色谱柱平衡时间较长,柱效损耗大等也给检测带来许多困难。为此,通过实验,摸索出检测盐酸氨基葡萄糖的新方法,该方法简便、快速、结果令人满意。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

岛津 LC-10AT 高效液相色谱仪 配备 SIL-20AC 自动进样器、LC-10ATVP 高压泵、SPD-10AVP 紫外—可见光检测器;2200 超声波清洗器; WatersDOA-VBO-BN 隔膜真空泵。乙酸铵、甲酸分析纯;乙腈为色谱纯;水为重蒸水;盐酸氨基葡萄糖标准品由中国药品生物制品检定所提供。

1.2 标准溶液配制

准确称取 5 mg 盐酸氨基葡萄糖标准(精确至 0.000 01 g)于 10 ml 容量瓶,用水溶解并定容,标准液浓度为 0.500 mg/ml。

1.3 色谱条件

色谱柱: CAPCELL PAK CR(4.6 mm × 150 mm, 5 μm); 检测器: 岛津 SPD-10AVP 紫外—可见光检测器;检测波长 200 nm;流动相 25 mmol/L 乙酸铵 + 乙腈(加 0.1% 甲酸)(25 + 75, V/V);流量 1.0 ml/min;柱温 30 ℃。

1.4 样品处理

取粉碎均匀的样品 1 g(精确至 0.000 1 g)于 50 ml 容量瓶中,加入 40 ml 水,超声提取 20 min,取出冷却至室温,再用水定容至刻度。用水稀释到适当体积(视样品含量而定),用 0.45 μm 微孔滤膜过滤,滤液供 HPLC 分析。

2 结果与讨论

2.1 样品处理条件

用水作提取剂,分别采用索氏法、加热回流法、超声波振荡法等对样品进行提取,结果以超声波振荡提取效果最佳。分别采用 5、10、15、20、25、30 min 用水对同一样品进行超声提取,经高效液相色谱分析盐酸氨基葡萄糖含量分别为 32.1、32.5、32.5、32.8、32.6 和 32.8 g/100 g。结果表明,10 min 以后提取结果基本相同。为适合各种样品的提取,本实验采用 20 min 用水超声提取。

2.2 检测波长

对盐酸氨基葡萄糖标准在 190 ~ 800 nm 波长范围内进行扫描,结果表明,盐酸氨基葡萄糖在 192 ~ 210 nm 处波长范围呈最大吸收,其光谱图见图 1。考虑到在低波长 192 nm 左右干扰较多,为保证检测的灵敏度,本法选用 200 nm 为检测波长。标准及样品色谱图见图 2、图 3。

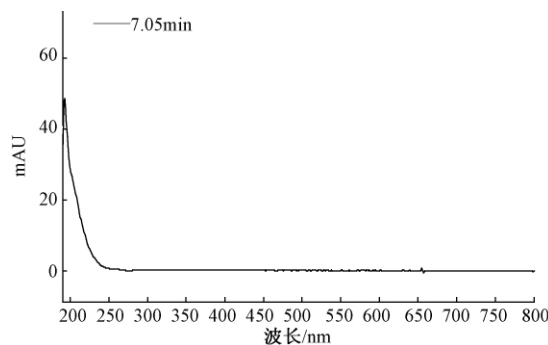


图 1 盐酸氨基葡萄糖标准光谱图

Figure 1 Spectrum of glucosamine hydrochloride standard

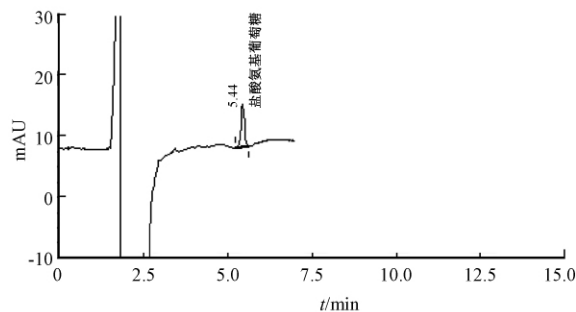


图 2 盐酸氨基葡萄糖标准色谱图

Figure 2 Chromatogram of glucosamine hydrochloride standard

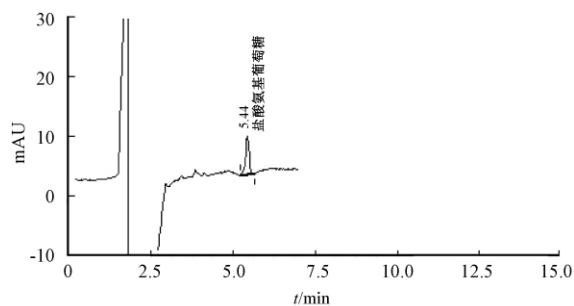


图 3 盐酸氨基葡萄糖样品色谱图

Figure 3 Chromatogram of glucosamine hydrochloride in sample

2.3 标准曲线及线性范围

分别取上述标准液 0.4 ~ 50 μl 进样。以盐酸氨基葡萄糖的含量 (Y) 为纵坐标,以对应峰面积 (X) 为横坐标绘制盐酸氨基葡萄糖的标准曲线。盐酸氨基葡萄糖在 0.2 ~ 26.0 μg 范围内线性良好,其线性回归方程 $Y = 2.02 \times 10^{-4} X + 0.164$,相关系数 $r = 1.000$ 。

2.4 精密度和回收率试验

取含盐酸氨基葡萄糖的同一样品 6 份按照上述方法处理进行测定,其相对标准偏差(RSD)为 1.10%。取同样样品 3 份按照上述方法处理,分别加入盐酸氨基葡萄糖标准高、中、低 3 个浓度,加标回收率见表 1。

表 1 样品回收率测定结果

Tab 1 Recovery of standard addition

组分	样品含量 (g/100 g)	加入量 (g/100 g)	测出总量 (g/100 g)	回收率 (%)
	32.8	31.24	63.88	99.5
盐酸氨基葡萄糖	32.8	15.87	48.62	99.7
	32.8	5.25	38.11	101.0

2.5 方法

用本法与衍生化法^[1]和离子对试剂法^[5]进行比较,结果表明,衍生化法采用邻苯二甲醛衍生试剂,操作较复杂,实验时间长,不易掌握;离子对试剂法由于流动相加入了戊烷磺酸钠或三乙胺离子对试剂,实验时柱子的平衡和冲洗时间长,柱效下降较快。而本方法不用衍生化试剂,减少了实验操作步骤,流动相中不需加入离子对试剂,使实验时间大大缩短,柱效能够得到很好的保持。

2.6 色谱柱的选择

本实验对 CAPCELL PAK CR 柱和 Symmetry[®] C₁₈ 柱进行比较,实验表明,用 25mmol/L 乙酸铵 + 乙腈(加 0.1% 甲酸)(25 + 75, V/V) 流动相, CAPCELL PAK CR 柱能将盐酸氨基葡萄糖与杂质很好分离,出峰时间较合适,而 Symmetry[®] C₁₈ 柱不能将盐酸氨基葡萄糖与杂质很好分离,同时出峰时间较快,杂质峰与组分峰很难分离。这说明 CAPCELL PAK CR 色谱柱中的 C₁₈ 与强阳离子混合填料在合适的离子浓度和酸度的流动相中,对盐酸氨基葡萄糖有很好的保留和分离,而 Symmetry[®] C₁₈ 要在流动相中加入离子对试剂,盐酸氨基葡萄糖才有较好的保留和分离。为了节省实验时间和保护柱效,本实验选择 CAPCELL PAK CR 色谱柱为分析柱。

2.7 流动相的确定

该分析柱要在酸性条件下使用,才能使样品离子化,增加样品与填料的作用。流动相酸度越大,盐酸氨基葡萄糖的保留时间越长。增加流动相的

离子强度,流动相的洗脱能力增强,即保留时间缩短。该柱 pH 使用范围是 pH2 ~ 10,因此,本实验选择了在乙腈中加 0.1% 甲酸溶液作为流动相,同时分别用 5、10、15、25、30 mmol/L 乙酸铵:乙腈(0.1% 甲酸) = 25:75 对样品进行分析。结果表明,选择 25 mmol/L 乙酸铵流动相出峰时间最佳,盐酸氨基葡萄糖没有受到其他杂质的干扰。

2.8 样品检测

为了更好地验证本法,用本法对送检的多份含盐酸氨基葡萄糖的保健食品进行了检测,结果样品中盐酸氨基葡萄糖含量在 30.2 ~ 40.7 g/100 g 范围。这与实际添加量一致。

3 结论

本文通过探讨、优化及验证性试验,建立了检测保健食品中盐酸氨基葡萄糖的新方法,与国标 GB/T 20365—2006 及郑家概等的《氨基葡萄糖盐酸盐含量的 HPLC 柱前衍生法测定》方法相比,本方法快速、简便、准确,不需要复杂的前处理步骤,流动相中无需加入离子对试剂,实验时间缩短,色谱柱寿命延长,排除了杂质的干扰,本法可作为日常样品的检测方法,为保健品中盐酸氨基葡萄糖的检测提供一个较好的检测手段。

参考文献

- [1] 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, 28(9): 1081-1083.
- [2] 江敏. 氨基葡萄糖的药理学研究进展[J]. 中国药房, 2010, 21(117): 1622-1624.
- [3] 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, 28(1): 47-50.
- [4] YA SSER S EL-SAHARTY, AHMED ABDEL BARY. High performance liquid chromatographic determination of nutraceuticals, glucosamine sulphate and chitosan in raw materials and dosage forms[J]. Anal Chim Acta, 2002, 462: 125-131.
- [5] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局,中国国家标准化管理委员会. 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.