

氨基葡萄糖类化合物的含量测定—高效液相色谱法

一、 工作简介

1.1 起草单位、起草人

起草单位：惠州市食品药品检验所、广东省惠州市质量技术监督标准与编码所、惠州市百草植物制品有限公司。

该标准由黄秀丽负责，主要参加人员有翁 嘉，张丰芸，王晓琴，温晓裕，林凤屏，陈文财，宁燕凌，刘文标。

1.2 简要起草过程

国内氨基葡萄糖类保健食品以盐酸氨基葡萄糖为主，硫酸氨基葡萄糖因其稳定性差而受到限制，但是硫酸氨基葡萄糖更利于人体吸收且副作用更小，以硫酸氨基葡萄糖为主要原料的保健食品也逐步增多^[3]。保健食品中盐酸氨基葡萄糖的含量测定可参照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》。参照 GB/T 20365-2006 液相色谱法对保健食品中盐酸氨基葡萄糖进行测定时，发现含氯化合物中的氯离子与目标物的保留时间一致，进而干扰有效成分的精确定量。硫酸氨基葡萄糖因其硫酸氨基葡萄糖含量测定尚无标准。参照分光光度法（《中国药典》2010年版二部附录IV A）虽然可以对氨基葡萄糖进行含量测定，但是操作繁琐，耗时耗力。

本标准起草人在充分收集、认真研究了国内外相关标准及资料的基础上，分析对比了国内外标准技术内容方面的差异及原因，在遵循先进性、科学性、实用性的原则下，建立了保健食品中氨基葡萄糖类化合物含量测定的高效液相色谱法。该方法适用于保健食品中盐酸氨基葡萄糖和硫酸氨基葡萄糖含量测定，适用范围更广。该方法前处理简便快速，是对氨基葡萄糖类化合物的直接检测，不受氯离子、硫酸根离子的干扰，专属性更强。经实验室论证和分析，该方法的回收率、重复性和再现性等技术指标均符合标准编制的要求。

二、与我国有关法律法规和其他标准的关系

保健食品中盐酸氨基葡萄糖的含量测定可参照标准 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》，硫酸氨基葡萄糖含量测定尚无标准。药品中盐酸氨基葡萄糖和硫酸氨基葡萄糖含量测定为分光光度法（《中

国药典》2010年版二部附录IV A)。美国药典氨基葡萄糖含量测定为液相色谱法，C8柱或氨基柱法。

三、国外有关法律、法规和标准情况的说明

无。

四、标准的制（修）订原则

本标准遵循先进性、科学性、实用性的原则进行编制。本标准注重科学性和可操作性的结合，利于推广应用。

五、确定各项技术内容的依据

5.1 提取条件的确定

样品制备参照《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》，但对超声时间进行了优化。结果见图 1，超声 10 min 的样品提取率较超声 5 min 高，后续随着超声时间的延长，样品提取率没有显著增加。综合考虑，将样品提取时的超声时间确定为 10 min。

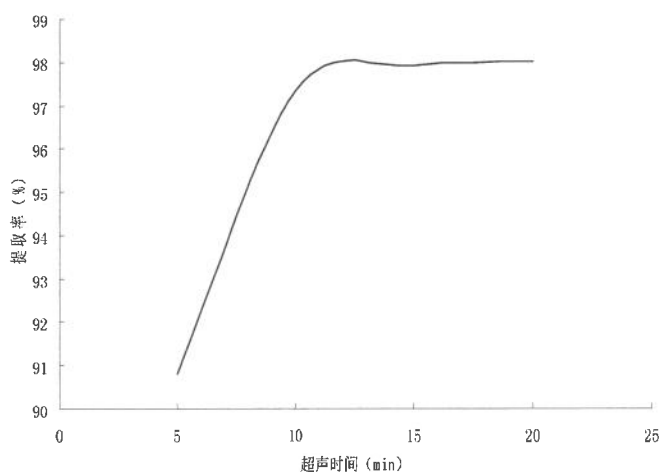


图 1 超声时间对氨基葡萄糖提取率的影响

5.2 色谱条件的确定

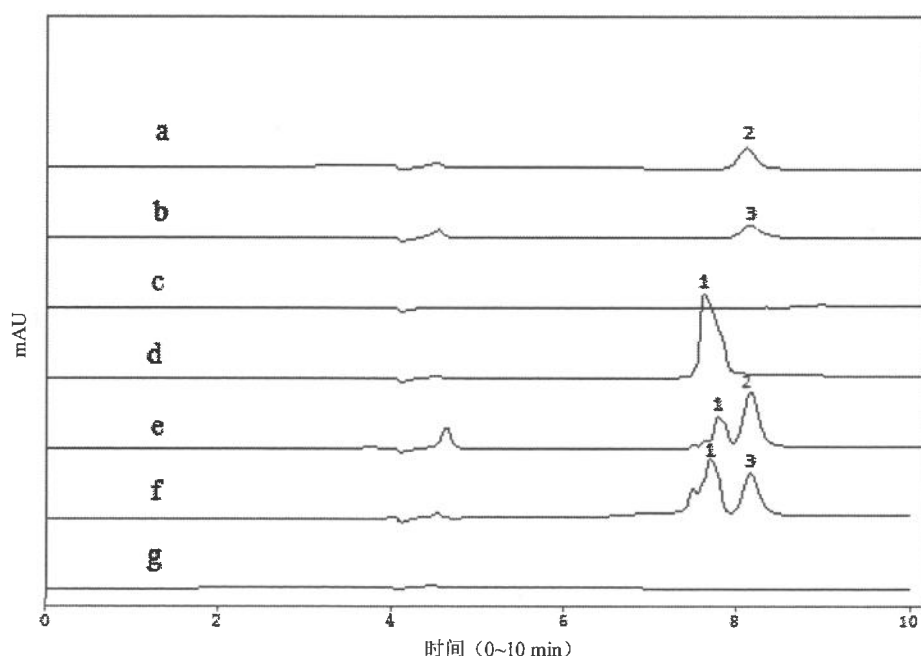
5.2.1 色谱柱的选择

以盐酸氨基葡萄糖为目标物，比较了 C18 柱（NUCLEODUR C18 Pyramid:

250 mm × 4.6 mm, 5 μm) (参照 GB/T 20365-2006) 和 NH₂ 柱的分离效果。参照 GB/T 20365-2006, 采用 C18 柱对盐酸氨基葡萄糖进行分离时, 目标物的保留时间约为 2.1 min。实验过程中还发现, 参照 GB/T 20365-2006 对含氯化合物进行分离时, 氯离子保留时间与目标物一致, 此类化合物中的氯离子会干扰有效成分测定。以乙腈: 水 (70:30, v/v) 为流动相, 采用 NH₂ 柱对盐酸氨基葡萄糖进行分离时, 目标物的保留时间约为 8.3 min, 可排除氯离子的干扰 (见图 2), 定量更准确。采用 NH₂ 柱对硫酸氨基葡萄糖进行分离时, 目标物的保留时间同盐酸氨基葡萄糖, 排除硫酸根离子的干扰 (见图 2)。因此, 选择 NH₂ 柱用于氨基葡萄糖类化合物的含量测定。

5.2.2. 流动相的选择

以盐酸氨基葡萄糖为目标物, 对流动相乙腈-戊烷磺酸钠 (5:95, v/v) 和乙腈-水 (70:30, v/v) 进行了比较。采用乙腈-戊烷磺酸钠流动相, NH₂ 柱分离盐酸氨基葡萄糖时出现 2 个色谱峰, 保留时间约为 4.4 min 的氨基葡萄糖峰, 以及保留时间约为 5.1 min 的氯离子峰, 但是氯离子保留时间不稳定会出现漂移, 故认为该体系不适于盐酸氨基葡萄糖的定量分析。采用乙腈-水体系流动相, NH₂ 柱分离盐酸氨基葡萄糖时, 得到一保留时间约为 8.3 min 的色谱峰, (见图 2), 可排除氯离子的干扰。采用此流动相对硫酸氨基葡萄糖进行分离时, 目标物的保留时间同盐酸氨基葡萄糖, 排除硫酸根离子的干扰 (见图 2)。因此, 确定乙腈-水体系为流动相, 用于氨基葡萄糖类化合物的定量分析。



a: 盐酸氨基葡萄糖对照品; b: 硫酸氨基葡萄糖对照品; c: 硫酸钠溶液; d: 氯化钠溶液; e: 氯化钠+盐

酸氨基葡萄糖对照品; f: 氯化钠+硫酸氨基葡萄糖对照品; g: 空白

1: Cl^- ; 2: 盐酸氨基葡萄糖; 3: 硫酸氨基葡萄糖

图 2 7 种溶液在 NH_2 柱上的液相色谱图 (0-10 min)

5.3 标准曲线与线性范围

称取适量对照品, 依次配制成浓度为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 的系列溶液。按照色谱条件进行分析。以峰面积为纵坐标, 对照品浓度为横坐标, 绘制标准曲线。盐酸氨基葡萄糖: 线性回归方程为 $Y = 1984.3X - 12.735$, $R^2 = 0.9996$; 硫酸氨基葡萄糖: 线性回归方程为: $Y = 1477.8X - 11.074$, $R^2 = 0.9985$; 两者在 0.2~1.0 mg/mL 范围内都呈现良好的线性关系。

5.4 检出限与定量限

将对照品溶液逐级稀释后, 以信噪比 $S/N=3$ 时的质量浓度为检出限, $S/N=10$ 时的质量浓度定位定量限。盐酸氨基葡萄糖的检出限为 0.04 mg/mL, 定量限为 0.12 mg/mL。硫酸氨基葡萄糖的检出限为 0.05 mg/mL, 定量限为 0.15 mg/mL。

5.5 精密度试验

以浓度为 0.4 mg/mL 的对照品溶液为考察对象, 连续进样 6 针, 盐酸氨基葡萄糖峰面积的 RSD 为 0.92 %, 硫酸氨基葡萄糖峰面积的 RSD 为 1.55 %。结果表明本方法精密度良好。

5.6 稳定性试验

取供试品溶液, 分别在室温放置 1、2、3、4、6、12 h 后进样。盐酸氨基葡萄糖供试品溶液 6 针峰面积的 RSD 为 0.66 %, 硫酸氨基葡萄糖供试品溶液 6 针峰面积的 RSD 为 0.95 %。表明供试品溶液中氨基葡萄糖类化合物在 12 h 内稳定性良好。

5.7 重复性试验

取同一试样, 精密称取 6 份, 制备供试品溶液并按照色谱方法进行测定。结

果表明, 供试品盐酸氨基葡萄糖平均含量为 37.24 g/100 g, RSD 为 2.66 % (n=6), 供试品硫酸氨基葡萄糖平均含量为 78.06 g/100 g, RSD 为 0.39 % (n=6)。表明本方法重复性较好。

5.8 加标回收率

精密称取 25.0 mg 已知盐酸氨基葡萄糖含量 (37.24 g/100 g) 供试品, 再加入盐酸氨基葡萄糖对照品 (9.60 mg), 按照 “1.3.3” 制备 6 份供试品溶液, 按照 “1.3.1” 方法进行测定, 结果见表 1。盐酸氨基葡萄糖加标回收率为 95.33 % ~ 99.21 %, 平均回收率为 97.21 %, RSD 为 1.67 %。

精密称取 10.0 mg 已知硫酸氨基葡萄糖含量 (78.06 g/100 g) 供试品, 再加入硫酸氨基葡萄糖对照品 (6.83 mg), 按照 “1.3.3” 制备 6 份供试品溶液, 按照 “1.3.1” 方法进行测定, 结果见表 1。硫酸氨基葡萄糖加标回收率为 90.71 % ~ 97.71 %, 平均回收率为 93.28 %, RSD 为 2.90 %。

表 1 加标回收率结果
Table 1 Standard addition recovery experiment results

成分	称样量 (mg)	样品中含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
盐酸氨基 葡萄糖	25.8	9.61	9.60	18.76	95.33	97.21	1.67
	25.6	9.53	9.60	18.69	95.38		
	25.5	9.50	9.60	19.02	99.21		
	25.4	9.46	9.60	18.79	97.20		
	25.8	9.61	9.60	18.96	97.42		
	26.3	9.80	9.60	19.27	98.71		
硫酸氨基 葡萄糖	9.7	7.57	6.83	13.95	93.38	93.28	2.90
	10.0	7.81	6.83	14.07	91.71		
	10.5	8.20	6.83	14.87	97.71		
	10.6	8.27	6.83	14.50	91.11		
	11.1	8.66	6.83	14.86	90.71		
	11.2	8.74	6.83	15.23	95.04		

5.9 实际样品的测定

对市售 10 个品牌 (不同厂家) 的氨基葡萄糖类保健食品中标识性成分盐酸氨基葡萄糖或硫酸氨基葡萄糖含量进行分析, 按照 “1.3.3” 制备供试品, 按照

“1.3.1”方法进行测定，每个样品制备 3 个平行样，含量平均值及相对标准偏差（RSD）结果见表 2。10 个样品中氨基葡萄糖类化合物含量在 18.80 g/100 g ~ 78.06 g/100 g，接近或高于产品标识含量。

表 2 市售保健食品中氨基葡萄糖类化合物的含量

Table 2 The content of glucosamine in health foods

氨基葡萄糖类 化合物	样品编号									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
标识含量 (g/100 g)	32.50	37.50	18.6	30.0	18.10	22.40	23.00	50.00	19.00	65.00
平均含量 (g/100 g)	34.98	37.24	21.58	34.02	20.06	22.20	26.31	48.90	18.80	78.06
RSD(%)	1.97	1.72	1.11	0.62	3.63	3.45	1.13	0.62	2.93	1.19

注：1-8 号为含盐酸氨基葡萄糖的保健食品；9 号和 10 号为含硫酸氨基葡萄糖的保健食品。

Note: 1 to 8 samples with glucosamine hydrochloride; 9 and 10 samples with glucosamine sulfate.