

以離子層析儀檢測市售食品中葡萄糖胺鹽酸鹽之方法研究與調查

陳佩慈、蔣青蓉、李盈霖、陳怡

臺南市政府衛生局

前言

隨著台灣進入老年人口的社會，退化性關節炎這個疾病在社會上越來越普遍，而葡萄糖胺就成為大眾需求的保健食品。葡萄糖胺(C₆H₁₃NO₅)，是葡萄糖的一個羥基被胺基取代後的化合物。是人體組織中的胺基酸單醣，為軟骨基質與關節液的主成分之一，人體可自行合成，其作用可修護受損的軟骨組織，改善關節退化、摩擦所引起的腫脹、發炎與酸痛症狀⁽⁸⁾。

目前市售的葡萄糖胺產品有不含鹽類葡萄糖胺(glucosamine free base)、葡萄糖胺硫酸鹽(glucosamine sulfate)及葡萄糖胺鹽酸鹽(glucosamine HCl)三種形式。其中葡萄糖胺硫酸鹽因有部分文獻支持其有輔助骨關節炎之療效，在國內是列為藥品管理；而不含鹽類葡萄糖胺及葡萄糖胺鹽酸鹽則因缺乏足夠臨床文獻支持其有效性，故列為食品管理⁽¹⁾。

在本研究中是以檢驗食品中葡萄糖胺鹽酸鹽為主，而目前檢驗葡萄糖胺鹽酸鹽的方法是國際 AOAC 組織所公定的含葡萄糖胺硫酸鹽及/或葡萄糖胺鹽酸鹽之原料及膳食補充品中葡萄糖胺檢驗方法(AOAC Official Method 2005.01)⁽⁴⁾，此方法是以高效能液相層析儀(High-Performance Liquid Chromatography)進行分析，因葡萄糖胺對於紫外光/可見光波長 190 nm~700 nm 之吸光性非常弱，導致無法以紫外光/可見光偵測器(UV-VIS Detector)直接檢測⁽⁶⁾，故必須利用具吸光性化合物 FMOc-Su，與葡萄糖胺進行衍生化反應後，才能進行檢測，其過程相當費時。

而本研究則以高效陰離子交換層析-脈衝式安培檢測法(High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD)，利用離子層析儀具有電化學偵測器(脈衝式安培檢測(Pulsed Amperometric Detection, PAD))可用於氧化還原物質之分析，可直接以脈衝安培檢測的氧化電位對葡萄糖胺鹽酸鹽進行偵測，無須進行衍生化步驟，可節省前處理時間，且前處理步驟也變得相當簡易。

材料與方法

一、檢體來源

本研究之檢體於藥妝店、藥局等地隨機價購，總計檢體 30 件。依樣品型態進行分類，其中錠劑有 12 件、膠囊有 3 件、粉狀有 5 件及液體有 10 件(如圖一)。

二、試藥

(一) 對照標準品

D-(+)-葡萄糖胺鹽酸鹽(D-(+)-Glucosamine hydrochloride)：分析級，購自 SIGMA-ALDRICH。

(二) 藥品及溶劑

IC 用氫氧化鈉溶液 50-52% (Sodium hydroxide solution, 50-52% in H₂O, eluent for IC)：分析級，購自 SIGMA-ALDRICH。

(三) 去離子水：電阻係數可達 18MΩ·cm 以上。

三、器具及材料

- (一) 定量瓶：10 mL、100 mL。
- (二) 樣品瓶含蓋及墊片：1.5 mL。
- (三) 塑膠離心管：15 mL 及 50 mL，PP 材質。
- (四) 濾膜：孔徑 0.22μm，PVDF 材質。
- (五) 分析天平：Sartorius TE214S。
- (六) 超音波震盪器：Rocker Soner 220H。
- (七) 高速離心機：HITACHI CF15RN。

四、儀器設備

- (一) 高效能離子層析儀 (HPIC)：Thermo Scientific™ Dionex™ ICS-5000⁺ Modular HPIC™ System (如圖二)。
- (二) 檢出器：脈衝式電化學檢出器(pulsed electrochemical detector)
- (三) 層析管柱：Dionex CarboPac PA10 Analytical Columns, 4 x 250 mm(P/N 046110)
- (四) 保護管柱：Dionex CarboPac PA10 Guard Columns, 4 x 50 mm(P/N 046115)

五、標準溶液配製

(一) 稱取 0.01 g 葡萄糖胺鹽酸鹽標準品，以去離子水定量至 100 mL，作為標準原液。再取適量標準原液稀釋，配製 1、2、5、8、10 μg/mL 等 5 個濃度製作檢量線。

六、移動相配製

(一) 200 mM NaOH：取 50% NaOH 10.46 mL，以去離子水定容至 1000 mL，混合均勻。

七、檢驗方法

- (一) 固態檢體前處理 稱取 0.5 g 檢體置於 100 mL 定量瓶中，以不含二氧化碳之去離子水定容至 100 mL，混合均勻，超音波震盪 30 分鐘，以 3500 rpm 進行離心 10 分鐘，取上清液過濾至 1.5 mL 樣品瓶內。
 - (二) 液態檢體前處理 取 0.5 mL 檢體置於 100 mL 定量瓶中，以不含二氧化碳之去離子水定容至 100 mL，混合均勻，超音波震盪 30 分鐘後，以 3500 rpm 進行離心 10 分鐘，取上清液過濾至 1.5 mL 樣品瓶內。
- 註：若待測物濃度超出檢量線範圍時，則將待測物進行稀釋後，再測定。

(三) 葡萄糖胺鹽酸鹽含量測定

固態檢體葡萄糖胺鹽酸鹽含量測定：

葡萄糖胺鹽酸鹽濃度(mg/g)
=C×V/W/1000×D
C：由檢量線求得葡萄糖胺鹽酸鹽含量(μg/mL)
V：檢體定容之體積(mL)
W：檢體取樣重量(g)
D：稀釋倍數

液態檢體葡萄糖胺鹽酸鹽含量測定：

葡萄糖胺鹽酸鹽濃度(mg/mL)
=C×V/M/1000×D
C：由檢量線求得葡萄糖胺鹽酸鹽含量(μg/mL)
V：檢體定容之體積(mL)
M：檢體取樣體積(mL)
D：稀釋倍數

(四) 高效能離子層析儀 (HPIC) 測定條件

檢出器	脈衝式電化學檢出器
層析管柱	Dionex CarboPac PA10 Analytical Columns, 4x250 mm
保護管柱	Dionex CarboPac PA10 Guard Columns, 4x50 mm
層析管柱溫度	30℃
注射體積	25 μL
移動相流速	1 mL/min
移動相	A液：去離子水；B液：200 mM NaOH

(五) 移動相溶液：A 液與 B 液以下列條件進行梯度分析⁽⁷⁾

時間 (min)	A(%)	B(%)
0 → 20	96 → 90	4.0 → 10
20 → 22	90 → 50	10 → 50
22 → 27	50 → 50	50 → 50
27 → 27.1	50 → 96	50 → 4.0
27.1 → 35	96 → 96	4.0 → 4.0

(六) 定量極限 (limit of quantification, LOQ) 評估

取空白樣品，加入適量標準溶液，配製三個樣品，依本研究方法中待測樣品之分析步驟操作，並加以分析，若三次分析之訊/噪比(S/N ratio)均大於 10 之添加量做為定量極限⁽²⁾⁽³⁾。

(七) 準確度(accuracy)評估

將適量之待測物標準品添加於空白樣品中，添加濃度為 2 μg/g，再依本實驗方法分析，進行 5 重複之檢測，計算其回收率⁽²⁾⁽³⁾。回收率計算公式如下：

$$\text{回收率}\% = (X/A) \times 100\%$$

X：實際測定濃度 A：添加濃度

(八) 精密度(precision)評估

將適量之待測物標準品添加於空白樣品中，添加濃度為 2 μg/g，再依本實驗方法分析步驟，進行 5 重複之檢測，計算變異係數(CV%)⁽²⁾⁽³⁾。變異係數(CV%)計算公式如下：

$$\text{CV}\% = (\text{標準偏差}/\text{平均值})$$

結果

一、檢量線製作

配製 1、2、5、8、10 μg/mL 等 5 個濃度製作檢量線，其線性回歸方程式之相關係數 R 平方值大於 0.99⁽²⁾⁽³⁾，顯示此方法檢量線藉由高效能離子層析儀 (HPIC) 分析，有良好的線性關係(如圖三)。

二、定量極限 (limit of quantification, LOQ)

取 3 個空白樣品，添加濃度 0.2 ppm，三次分析之訊/噪比(S/N ratio)均大於 10⁽²⁾⁽³⁾，表示本研究方法之定量極限(LOQ)為 0.2 ppm(如表一)。以高效能離子層析儀 (HPIC) 分析食品中葡萄糖胺鹽酸鹽，亦有很好的感度(如圖四)。

表一、訊號雜訊比 (S/N ratio)

次數	訊號雜訊比 (S/N ratio)
1	42.2
2	71.6
3	34.7

三、準確度(accuracy)

以回收率評估之，添加濃度為 2 μg/g，做 5 重複，以高效能離子層析儀 (HPIC) 分析食品中葡萄糖胺鹽酸鹽，結果顯示，其平均回收率介於 75 ~ 120% 間⁽²⁾⁽³⁾(如表二)。

表二、平均回收率

次數	平均回收率(%)
1	78.99
2	82.23
3	93.17
4	84.82
5	76.31

四、精密度(precision)

以重複性評估之，添加濃度為 2 μg/g，做 5 重複，以高效能離子層析儀 (HPIC) 分析食品中葡萄糖胺鹽酸鹽，結果顯示，其重複性變異係數(CV%)皆在 15% 以內⁽²⁾⁽³⁾(如表三)。

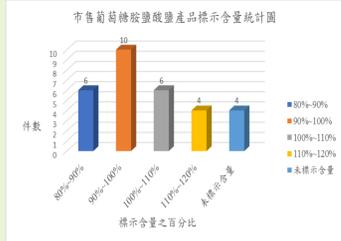
表三、重複性變異係數百分比

次數	變異係數(%)
1	1.79
2	6.45
3	1.14
4	6.26
5	1.39

五、食品中葡萄糖胺鹽酸鹽含量

於藥妝店、藥局等地隨機價購 30 件市售葡萄糖胺鹽酸鹽產品，分別以高效能離子層析儀 (HPIC) 建立食品中葡萄糖胺鹽酸鹽之檢驗方法，進行葡萄糖胺鹽酸鹽檢測分析。根據現行法規的規定，葡萄糖胺並非必要標示的營養素，沒有強制規定要標出含量，因此檢測的產品若沒有標示含量，則依產品的外包裝標示成分，來判斷是否含有葡萄糖胺鹽酸鹽；而若有標示含量，則葡萄糖胺產品之葡萄糖胺鹽酸鹽實際含量須在標示值之 80% ~120% 間。

結果顯示，30 件市售葡萄糖胺鹽酸鹽產品以上述方法檢測，其中葡萄糖胺鹽酸鹽含量為標示值之 80%~90% 有 6 件、為標示值之 90%~100% 有 10 件、為標示值之 100%~110% 有 6 件、為標示值之 110%~120% 有 4 件，而未標示含量但確實有含葡萄糖胺鹽酸鹽成分則有 4 件(如圖五)，皆符合標示值與相關規範。



圖五、市售葡萄糖胺鹽酸鹽產品標示含量統計圖

討論

目前葡萄糖胺鹽酸鹽的檢驗方法，主要為國際 AOAC 組織所公定的含葡萄糖胺硫酸鹽及/或葡萄糖胺鹽酸鹽之原料及膳食補充品中葡萄糖胺檢驗方法(AOAC Official Method 2005.01)⁽⁴⁾，此方法須進行衍生化步驟，過程相當費時。為了建立一個便捷的檢驗方法，本研究是以高效陰離子交換層析-脈衝式安培檢測法(High-Performance Anion-Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection, HPAEC-PAD)進行葡萄糖胺鹽酸鹽的檢測，無須衍生化步驟，節省前處理時間且步驟簡易。

結果顯示，本研究方法檢量線之線性相關係數 R 平方值大於 0.99；定量極限濃度為 0.2 ppm，三次分析之訊/噪比(S/N ratio)均大於 10；樣品之添加濃度 2.0 μg/g，進行五重複檢測，其樣品之添加平均回收率介於 75%~120% 間，變異係數(CV%)皆在 15% 以內⁽²⁾⁽³⁾。從結果看來，此方法有不錯的準確度及精密度。

在 30 種葡萄糖胺鹽酸鹽產品的檢測結果中，有 26 件有標示葡萄糖胺鹽酸鹽成分及其含量；而有 4 件只標示葡萄糖胺鹽酸鹽成分，並未標示含量。其中葡萄糖胺鹽酸鹽含量為標示值之 80%~90% 有 6 件、為標示值之 90%~100% 有 10 件、為標示值之 100%~110% 有 6 件、為標示值之 110%~120% 有 4 件，而未標示含量但確實有葡萄糖胺鹽酸鹽成分則有 4 件。

根據現行法規的規定，葡萄糖胺並非必要標示的營養素，沒有強制規定要標出含量，但這造成大眾選購葡萄糖胺產品的困難，使大眾無法清楚明瞭葡萄糖胺產品是否真的含有葡萄糖胺或者其含量究竟是多少等疑惑。對此，本研究建立一個便捷的方法來檢驗葡萄糖胺，可以作為參考，也希望未來能夠訂定相關規範，使成分標示透明化，為民眾的食用安全把關。

參考文獻

- 黃育文。2005。行政院衛生署藥政處。葡萄糖胺/Glucosamine 與退化性關節炎。藥物食品簡訊月刊。297:1-4。
- 衛生福利部食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範。
- 衛生福利部食品藥物管理署。2014。實驗室品質管理規範—化學領域測試結果之品質管制。
- Joseph Ziqi Zhou, Ted Waszkuc, and Felicia Mohammed. 2005. Determination of Glucosamine in Raw Materials and Dietary Supplements Containing Glucosamine Sulfate and/or Glucosamine Hydrochloride by High-Performance Liquid Chromatography with FMOc-Su Derivatization: Collaborative Study. J AOAC Int. 88(4): 1048-1058.
- Richard Kornfeld, Valoran Hanko, and Jeffrey Rohrer Thermo Fisher Scientific, Sunnyvale, CA, USA. 2016. Determination of Glucosamine in Dietary Supplements Using HPAEC-PAD
- 連秀庭。2004。葡萄糖胺-FMOc 衍生化反應之高效能液相層析法分析方法開發。http://ir.lib.cyut.edu.tw:8080/handle/310901800/27587。
- 衛生福利部。2015。食品中糖類之檢驗方法。公開方法 TFDAO0022.01。
- 維基百科。https://zh.wikipedia.org/wiki/。

