高效液相色谱-串联质谱法测定保健品中甲壳素

吴治将
（顺德职业技术学院机电工程学院，广东佛山 528333）

摘要：本研究建立了保健品中甲壳素的高效液相色谱-串联质谱（HPLC-MS/MS）测定方法。含甲壳素保健品样品经盐酸水解后生成氨基葡萄糖，吸取上清液过OASIS MCX固相萃取小柱，用水淋洗固相萃取柱并弃去全部流出液，用真空泵抽干小柱，再用5%氨水甲醇洗脱被测物，洗脱液于60 ℃水浴中氮气吹干，用初始流动相定容，以C18色谱柱和乙腈-0.1%甲酸水流动相体系进行梯度洗脱分离，采用电喷雾负离子多反应监测（MRM）模式测定。实验考察优化了水解条件、净化条件和仪器条件。在优化实验条件下，甲壳素水解产物在0.1~50 mg/L浓度范围内线性关系良好，相关系数为0.9907；甲壳素的方法检出限（S/N=3）为1.5 μg/g，方法定量限（S/N=10）为6.25 μg/g；平均加标回收率为89.2%~92.4%，相对标准偏差（n=6）为0.25%~1.35%。该方法前处理简单、灵敏度高、选择性强、回收率高、精密度好，适用于保健品中甲壳素的测定。

关键词：保健品；甲壳素；高效液相色谱-串联质谱法；测定
文章篇号：1673-9078(2015)1-226-230 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2015.1.039

Determination of Chitin in Health Foods Using High Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

WU Zhi-jiang
(Department of Mechanical and Electrical Engineering, Shunde Polytechnic, Foshan 528333, China)

Abstract: A new method for the determination of chitin in health foods using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) was established. After hydrolysis with hydrochloric acid, chitin in health food samples is transformed into glucosamine. The supernatant was passed through an OASIS MCX solid phase extraction (SPE) column, followed by washing with water; the eluent was discarded. Prior to elution with 5% ammonia/methanol, the column was drained using a vacuum pump. The eluent was dried under nitrogen at 60 ℃ in a water bath, and then dissolved in the initial mobile phase. The separation was performed on a C18 column using acetonitrile and 0.1% formic acid aqueous solutions as the mobile phase for gradient elution. Tandem mass spectral acquisition was conducted in the negative electrospray ionization mode using multiple reaction monitoring (MRM). The hydrolysis, purification, and reaction conditions were investigated and optimized. The results indicated that under the optimized conditions, the chitin hydrolyzate had a good linear relationship with concentration in the range of 0.1~50 mg/L, with a correlation coefficient of 0.9907. The limit of determination (LOD) of Chitin was 1.5 μg/g (S/N = 3), limit of quantification (LOQ) was 6.25 μg/g (S/N = 10). The mean spiked recovery rate of the samples was 89.2%~92.4% with a relative standard deviation of 0.25%~1.35% (n = 6). The method established was demonstrated to have simple pre-treatment and high selectivity, recovery rate, and accuracy, showing its suitability for the determination of chitin in health foods.

Key words: health food; chitin; high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; determination

甲壳素又称几丁质，化学名称β-（1,4）-2-乙酰氨基-2-脱氧-D-葡萄糖，是一种线性氨基多糖，约由8000个单体组成，在自然界中广泛存在于低等植物菌类、虾、蟹、昆虫等甲壳动物的外壳、高等动物的细胞壁等。甲壳素具有抗癌，抑制癌、瘤细胞转移，提高人体免疫力及护肝解毒作用，尤其适用于糖尿病、肝肾病、高血压、肥胖等病症，有利于预防癌细胞病变和辅助放化疗治疗肿瘤疾病[1~2]。因此，甲壳素已经被广泛添加于食品、保健品和药品中，其质量指标一直以粘度和脱乙酰度为参考参数。脱乙酰度为胺基葡萄糖结构单元数与总结构单元数（胺基葡萄糖和乙酰胺基葡萄糖）的摩尔比，是甲壳素大分子中胺基含量的一个指标，一般采用电位滴定法[1~2]进行测定。但脱乙酰度只是影响甲壳素及其衍生物物化特性和生物活性功能的重要参数，不适于作为判定甲壳素含量的指标。对于宣称富含甲壳素的保健品，若不能准确监测其中

收稿日期：2014-06-24
基金项目：国家自然科学基金项目（51246006）；佛山市科技创新专项资金项目（2013AG100063）
作者简介：吴治将(1979-)，男，博士，讲师，研究方向化学工程

甲壳素的含量，将对消费者产生较大的误导和欺骗。所以,研建保健品中甲壳素含量的测定方法非常重要。

目前，对甲壳素的测定主要有比色法[3~4]，液相色谱法[5~7]和气相色谱法[8]。其中比色法的误差较大，达不到质量控制的要求；气相色谱法和液相色谱法均需对样品进行水解（水解反应式如图 1 所示），而水解产物氨基葡萄糖盐酸盐（GAH）由于紫外吸收弱和难以气化，需对水解产物进行衍生处理后，方能用液相色谱和气相色谱测定，操作繁琐，且多重的反应会带入更大的实验误差以及样品的损耗率，测试结果准确性和稳定性较差。本实验根据甲壳素水解产物 GAH 的结构性质，利用高效液相色谱-串联质谱（HPLC-MS/MS）的电喷雾电离能力、高选择性和高灵敏度等特点，建立定性定量检测甲壳素水解产物 GAH 的方法[9]，并根据 GAH 含量计算样品中甲壳素的含量。方法灵敏度较高、检出限低、定量准确，可以广泛应用于实验室和相关部门监测保健品中甲壳素的含量情况。

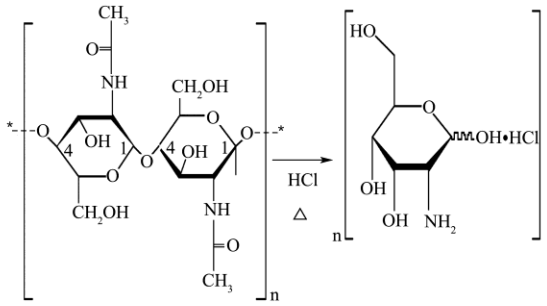


图 1 甲壳素水解反应式

Fig.1 Reaction formula of Chitin hydrolysis

1 实验部分

1.1 主要仪器和材料

Agilent 1200高效液相色谱仪，美国Agilent公司；API 4000 Q Trap质谱仪，美国AB Sciex公司，配有电喷雾离子源（ESI）；振荡器，德国IKA公司；N-EVAP 112水浴氮吹仪，美国OA公司；Milli-Q去离子水发生器，美国Millipore公司；5804R高速离心机；德国Eppendorf；固相萃取装置，waters公司，美国；固相萃取小柱（OASIS MCX，3 mL/60mg，美国Waters公司，临用前依次用5 mL甲醇和5 mL 0.1%甲酸水活化）。

甲壳素标准品（纯度 98%（以干基计），购自 sigma 公司）；氨基葡萄糖盐酸盐（98.0%~102.0%（以干基计），阿拉丁）；甲酸、乙腈（美国 TEDIA 公司）均为色谱纯；水为超纯水；盐酸（浓度为 35%，广州化学试剂厂）为分析纯。保健品样品为甲壳素胶囊，购自本地市场。

1.2 标准溶液的配置

对照品储备液：准确称取适量氨基葡萄糖盐酸盐，用超纯水溶解，配制成浓度为 100 mg/L 的标准储备液。置于 4 ℃冰箱冷藏，有效期为 3 个月。

对照品工作溶液的配制：吸取标准储备液 0.1、1.0、5.0、10.0、50.0 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇配制成浓度分别为 0.1、1.0、5.0、10.0、50.0 mg/L 的系列对照品工作液。

1.3 样品和标准品的前处理

将甲壳素标准品及样品置于105 ℃烘箱烘2 h，取出置于干燥器中冷却至室温。准确称取0.02 g（精确至0.001 g）甲壳素标准品以及0.04 g（精确至0.001 g）样品，分别置于2支10 mL试管中，各加入1 mL浓盐酸，然后在试管顶部放置一实验室用玻璃漏斗，以达到回流的作用，将试管置于沸水浴中水解4 h。

待水解液冷却至室温，倾入已活化的MCX小柱，待水解液全部通过固相萃取柱后，用5 mL水淋洗，弃去全部流出液，用真空泵抽干小柱，再用5 mL 5%氨水甲醇（*V*/*V*）洗脱，收集全部洗脱液，置于60 ℃水浴中氮气吹干，用1.0 mL初始流动相复溶。样液过0.22 μm滤膜，供HPLC-MS/MS测定。

1.4 分析条件

1.4.1 色谱条件

色谱柱：Phenomenex Kinetex C18（2.6 μm，100×4.6 mm）；流动相：A 为乙腈，B 为 0.1%甲酸水溶液；梯度洗脱程序：0~0.5 min，10% A；0.5~1.0 min，10% A~35%A；1.0~2.0 min，35%A；2.0~2.1min，35% A~10% A；2.1~5.0 min，10% A；流速：0.3 mL/min；进样量：10 μL；柱温为室温。

1.4.2 质谱条件

离子源：Tubro Ion spray ESI 正模式；电离电压（IS）：5500 V；雾化气（GS1）压力：35 psi；气帘气（CUR）压力：10 psi；辅助加热气（GS2）压力：20 psi；辅助气温度：500 ℃。

检测模式：采用多反应监测模式（MRM），监测离子对为 m/z 180.0>60.1、180.0>72.1、180.0>162.1，其中 m/z180.0>162.1 为定量离子对；锥孔电压为20 V；碰撞电压分别为 25 V、24 V、10 V；滞留时间均为 100 ms。

1.5 甲壳素含量的计算

通过 GAH 对照品的工作曲线，计算样品和甲壳素标准品水解产物 GAH 的含量，再根据公式（1）计算样品中甲壳素的含量。

$$X\%=\frac{m_{GAH}\times m_0}{m_S\times m_{0\text{-}GAH}}\times 100 \quad (1)$$

其中：X 为样品中甲壳素的含量（%）；m_{GAH} 为甲壳素样品水解后的 GAH 质量（mg）；m_0 为甲壳素标准品质量（mg）；m_s 为甲壳素样品质量（mg）；$m_{0\text{-}GAH}$ 为甲壳素标准品水解后的 GAH 质量（mg）。

2 结果与讨论

2.1 样品处理方法的选择

由于甲壳素极易吸潮，而样品一般都是暴露在空气中的，极易吸收空气中的水分，导致影响称量精度，从而影响到实验的准确性。所以，在称取样品前，一般先对样品和标准品同时进行干燥至恒重，以干基计算其含量，这样能保证样品含量的真实性。

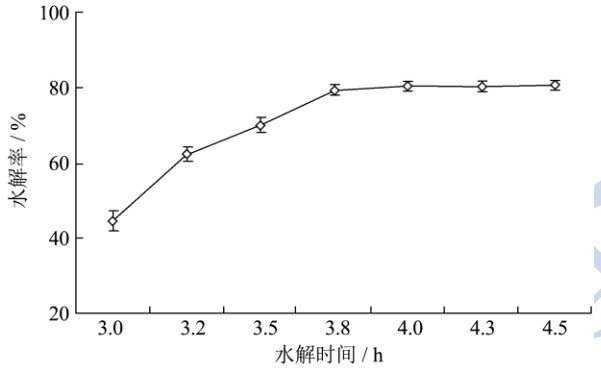


图 2 水解时间对水解率的影响

Fig.2 Effect of hydrolysis time on yield

由于甲壳素为高分子聚合物，无法直接进行测定，需对其进行水解后方能进行测试，故甲壳素水解条件的确定尤为重要。关于甲壳素水解条件的相关文献较多，朱晓兰[7]用50 mL 8 mol/L HCl对40 mg甲壳素样品在110 ℃条件下水解4 h；刘意[4]针对灰分为8%~14%的甲壳素样品，采用甲壳素与浓盐酸比例不到1:3的条件下，分别在90~96 ℃水解4.5~5.3 h，等等。但本实验发现朱晓兰[7]的方法水解后溶液酸性极强，按该法所述的用硼酸调节后仍难以进行衍生反应，且该法需使用反应釜，限制了其在实验室的推广使用；按刘意[4]的方法，由于本试验用的甲壳素样品为质量很轻的粉末状，在本文的取样量（0.04 g）下，按1:3的比例添加浓盐酸时，样品未能充分湿润和溶解，经试验观测，发现浓盐酸添加量为1 mL时，样品得到良好的分散溶解，体系粘度合适，反应充分，不会出现粘壁的现象。因此，本试验确定浓盐酸添加量为1 mL，同时，为了方便操作和控制，本试验选择在沸水浴条件下进行水解，并利用甲壳素标准品对水解时间进行了单因素的试验优化（n=6），结果如图2所示，可见，水解时间为3.8 h时，水解产率已基本平衡，但考虑到不同品牌的甲壳素样品存在一定的差异，故本试验选择水解时间为4 h，6次平行试验中的水解产率的平均值为80.4%，相对标准偏差（RSD）为2.3%。

甲壳素保健食品中除了主要成分甲壳素外，还含有其他一些辅料如复配成分等，同时也存在于样品水解后的溶液中，成为干扰检测水解产物GAH的杂质，因此有必要进行净化除杂。由于GAH在水溶液中呈离子状态（阳离子氨基葡萄糖和阴离子Cl^-），极性大，故实验选择阳离子交换固相萃取柱MCX进行净化除杂，上样时以MCX柱所键合的羧基吸附阳离子氨基葡萄糖，然后以水淋洗除去水溶性杂质，再以NH_4^+置换洗脱，实验表明，过柱后回收率为87%~95%，可有效除去基质干扰，实现对目标物的良好净化。

2.2 仪器分析方法的选择

本文比较了不同方法对目标物的分析情况：

2.2.1 高效液相色谱法

采用液相色谱-紫外检测器分别直接测定甲壳素的水解溶液[10]和对水解产物进行衍生后的溶液。由于甲壳素的水解产物 GAH 的发色基团较少，紫外检测波长低，为 190 nm，大部分有机化合物在此波长下均有较强的紫外吸收，而 GAH 在色谱柱上保留时间非常短（见图 3 中 a），存在严重杂质峰干扰，无法满足分析需求；对水解产物 GAH 进行衍生，加入氯甲酸芴甲酯衍生反应 4 h 后，以液相色谱在 254 nm 下检测，由于 GAH 分子 1 位-OH 有两种不同的构型，在衍生化后会产生两种同分异构体，所以在色谱图中会出现两个相连的色谱峰（见图 3 中 b1 和 b2），且杂质干扰严重，会导致定量不准确。

2.2.2 液相色谱-串联质谱法

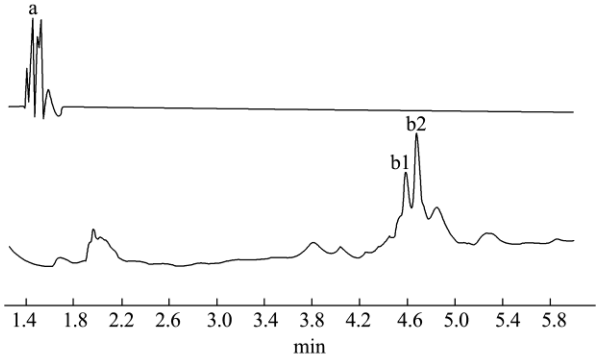


图 3 液相色谱法测定甲壳素

Fig.3 HPLC chromatogram of chitin

注：a.直接测定甲壳素水解物，b.测定甲壳素衍生化产物（b1 和 b2 为同分异构体）。

将甲壳素的水解溶液过固相萃取小柱净化后，采用液相色谱-串联质谱的 MRM 模式进行分析，避免了衍生化可能产生的损失及衍生试剂的干扰，方法具有较高的选择性和灵敏度，还可以获得较好的准确性和重现性。所以实验最终选用本方法进行测定。

2.3 仪器分离条件的优化

2.3.1 质谱条件的选择与优化

氨基葡萄糖，是葡萄糖结构的一个羟基被一个氨基取代的化合物，极易溶于水，分子量为 179。用纯水配制浓度为 1 μg/mL 的标准溶液分别在质谱的正、负离子模式下进行全扫描。结果表明，在负离子模式下未发现相应的准分子离子峰，在正离子模式下发现 m/z=180.0 的$[M+H]^+$准分子离子峰且信号较强，因此，选择正离子扫描模式，以 m/z=180.0 为母离子，通过调谐并优化裂解电压、碰撞能量等参数，确定 m/z180.0>162.1、m/z180.0>60.1 和 m/z180.0>72.1 为特征的定性定量离子对，其中 m/z180.0>162.1 为定量离子对，优化后的质谱参数见 1.4.2.

2.3.2 液相条件优化

试验比较了 GAH 在不同色谱柱 Synergi C18（4 μm，50×2.0 mm）和 phenomenex Kinetex C18（2.6 μm 100×4.6 mm）的分离效果，结果见图 4。GAH 在 Synergi C18（图 4a）色谱柱上保留弱，出峰时间过快，容易受杂质峰干扰，且峰拖尾严重。phenomenex Kinetex C18（图 4b）对氨基葡萄糖有合适的保留能力，峰形良好。因此，选择 phenomenex Kinetex C18 作为目标物的分离色谱柱。

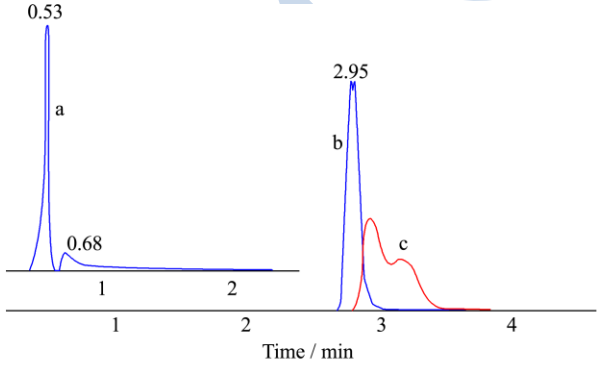


图 4 GAH 在不同色谱柱和不同流动相体系中色谱行为的比较

Fig.4 Comparison of different columns and different mobile phases

注：a. Synergi C18色谱柱；b. Kinetex C18色谱柱；乙腈-0.1%甲酸水；c. Kinetex C18色谱柱，乙腈-10 mmol/L乙酸铵溶液）。

应用 LC-MS/MS 的 ESI^+模式检测时，通常在流动相中添加少量的挥发性酸来提高目标物的离子化效率，或添加少量的乙酸铵来改善目标物的色谱峰型。试验比较了乙腈-10 mmol/L 乙酸铵溶液和乙腈-0.1%甲酸水两组流动相体系对 GAH 色谱行为的影响。流动相中添加 10 mmol/L 乙酸铵时，GAH 出现分叉，并对 GAH 的响应有较强的抑制作用（见图 4c）；添加 0.1%甲酸时，灵敏度明显提高，峰形良好（见图 4b）。因此，选择乙腈-0.1%甲酸水作为流动相。

在优化好的仪器条件下，甲壳素水解产物 GAH 对照品溶液的 MRM 色谱图见图 5。

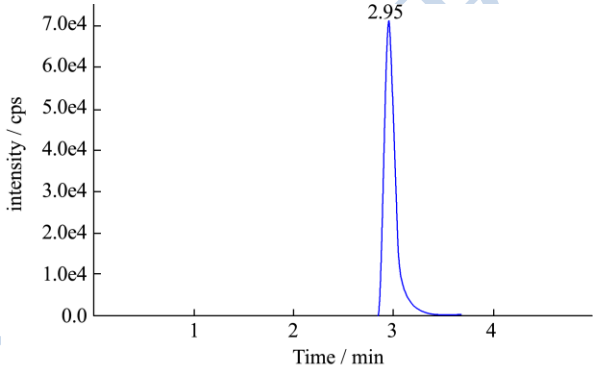


图 5 氨基葡萄糖盐酸盐对照品溶液的 MRM 色谱图

Fig.5 MRM chromatograms of the glucosamine hydrochloride control solution

2.4 线性关系以及检出限

在本实验条件下测定浓度为 0.1~50 mg/L 的系列对照品溶液，以峰面积为纵坐标，溶液质量浓度为纵坐标，绘制标准曲线。线性回归方程为 Y=9040X+16200，相关系数为 0.9907，表明相关性良好。

以 S/N=3 计算 GAH 的最低检测限为 0.05 mg/L，定量限（S/N=10）为 0.2 mg/L，换算得到仪器对甲壳素的检出限为 0.0625 mg/L，定量限为 0.25 mg/L，方法对甲壳素的检出限为 1.5 μg/g，定量限为 6.25 μg/g。

2.5 稳定性试验

考察 20 mg/L GAH 溶液水解前后的浓度变化。取同一份样品溶液，按本实验水解条件处理，分别于 0、1、2、4、8、12、24 h 测定其峰面积，其 RSD 为 1.56%，表明样品水解溶液至少在 24 h 内保持稳定。GAH 在前处理前后的浓度变化小于 5%，表明 GAH 不受酸水解影响。

2.6 回收率和精密度

由于甲壳素的含量可以间接通过 GAH 含量表示，所以本实验采用添加 GAH 的方式来考察方法的回收率和精密度。选取 2 个含甲壳素的保健食品（水解后

GAH 含量分别为 4.54 mg/kg 和 3.25 mg/kg）按本实验方法进行 2 个添加水平的回收试验（n=6），结果如表 2 所示。试验表明：GAH 回收率介于 89.2%~92.4%，RSD 在 0.3%~1.4%之间，说明方法回收率和精密度良好。

表 2 回收率和精密度测定结果（n=6）

Table 2 Recovery rate and accuracy results (n = 6)

样品	加入 GAH 的量/mg	测得总量 /mg	RSD /%	回收率 /%
1	0.00	4.54±0.02	0.3	-
	2.5	6.80±0.05	0.8	90.4
	5.0	9.09±0.07	1.4	91.0
2	0.00	3.25±0.05	1.2	-
	2.5	5.48±0.03	0.4	89.2
	5.0	7.87±0.05	0.8	92.4

2.7 样品测试

在本底药店购买了 10 个不同品牌的甲壳素保健品（其标称甲壳素含量均为≥95%），采用本方法对甲壳素含量进行测定。10 个样品中，甲壳素含量（以干基计）最高的为 87.54%，最低的仅为 21.75%，与其宣称的含量存在一定的差异。

3 结论

本研究建立了高效液相色谱-串联质谱法测定保健品中甲壳素含量的方法。样品经酸水解后，以MCX固相萃取小柱净化，Kinetex C18色谱柱分离，串联质谱MRM模式检测，甲壳素的方法检出限为1.5 μg/g。本方法具有前处理简单、灵敏度高、回收率和重复性好、测定速度快等优点，可以广泛应用于保健品中甲壳素含量的定性、定量测定。

参考文献

[1] 汪玉庭,刘玉红,张淑琴.甲壳素、壳聚糖的化学改性及其衍生物应用研究进展[J].功能高分子学报.2002,15(1):107-114
WANG Yu-ting, LIU Yu-hong, ZHANG Shu-qin. Advances in chemical modof ication and application of chitin, chitosan and their derivatives [J]. Journal of Functional Polymers. 2002, 15(1): 107-114

[2] 刘流,刘晓岚,王云普.甲壳素、壳聚糖在医药领域的应用[J].辽宁化工,2001,30(12):537-541
LIU Liu, LIU Xiao-lan, WANG Yun-pu. Application and research of chitin and chitiosan in medicine [J]. Liaoning Chemical Industry. 2001, 30(12): 537-541

[3] 陈金东,李蔚.滴定分析法和分光光度法测定保健食品中D-氨基葡萄糖盐酸盐含量的研究[J].中国卫生检验杂志, 2002, 12(2):143-144
CHEN Jin-dong, LI Wei. Determination of glucosamine hydrochloride in healthy food with titration and spectrophotometry [J]. Chinses Journal of Health Laboratory Technology, 2002, 12(2): 143-144

[4] 刘意,孙亚,张华彬.甲壳素水解制备氨基葡萄糖盐酸盐的优化工艺条件[J].应用化工.2008,37(4):373-376
LIU Yi, SUN Ya, ZHANG Hua-bin. New process of preparation of aminoglucose by hydrolysing chitin [J]. Applied Chemica l Industry, 2008, 37(4): 373-376

[5] 王英锋,晏利芝,郭雪清.HPLC-示差折光分析法测定D-氨基葡萄糖盐酸盐中的N-乙酰-D-氨基葡萄糖[J].首都师范大学学报(自然科学版),2008,29(1):40-42
WANG Ying-feng, YAN Li-zhi, GUO Xue-qing. Determination of n-acetyl-d-glucosamine in d-glucosamine hydrochloride by HPLC with refractive index detector [J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition), 2008, 29(1): 40-42

[6] 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
WANG Ping-ya, ZHAO Hua, ZHOU Yong, et al. Determination of glucosamine hydrochloride (GAH) by high performance liquid chromatography with precolumn derivatization [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2009, 28(1): 47-50

[7] 朱晓兰,夏文水.甲壳素纯度的高效液相色谱法测定[J].分析测试学报,2003,22(4):9-12
ZHU Xiao-lan, XIA Wen-shui. Determination of purity of chitin by high performance liquid chromatography [J]. Journal of Instrumental Analysis, 2003, 22(4): 9-12

[8] 朱晓兰,夏文水.用毛细管气相色谱法测定甲壳素的纯度[J].烟草科技/烟草化学,2002,8:28-32
ZHU Xiao-lan, XIA Wen-shui. Determination of purity of chitin by capillary gas chromatography [J]. Tobacco Science & Technology, 2002, 8: 28-32

[9] 侯向昶,朱丽萍,刘春生,等.超高效液相色谱-串联质谱法测定燕窝中唾液酸的含量[J].现代食品科技,2013, 29(7): 1706-1720
HOU Xiang-chang, ZHU Li-ping, LIU Chun-sheng, et al. Determination of sialic acid in edible bird's nest using UPLC-MS/MS [J]. Modern Food Science and Technology. 2013, 29(7): 1706-1720

[10] 张华珺,张喆,张蓉.氨基葡萄糖液相色谱-质谱联用含量测定

方法研究[J].中国卫生检验杂志.2013,23(5):1148-1150
ZHANG Hua-jun, ZHANG Zhe, ZHANG Rong. A study on determination of glucosamine by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology. 2013, 23(5): 1148- 1150

[11] 綦艳,黄秋研,梁德沛.高效液相色谱法同时测定果蔬中多种防腐剂[J].现代食品科技.2013,29(6): 1409-1412
QI Yan, HUANG Qiu-yan, LIANG De-pei. Simultaneous determination of multiple preservatives in fruits and vegetables by HPLC [J]. Modern Food Science and Technology. 2013, 29(6): 1409-1412

现代食品科技