

# 膠囊錠狀食品中葡萄糖胺之檢驗方法探討

許瀨尤 蔡瑩潔 吳白玟 林汝青 高雅敏 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

## 摘要

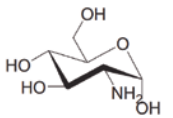
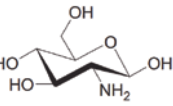
葡萄糖胺(Glucosamine)，係由蝦蟹甲殼萃取，經乾燥、去蛋白質、礦物質處理後而生成。前行政院衛生署於民國94年公告含葡萄糖胺製品之管理規定，其中葡萄糖胺及葡萄糖胺鹽酸鹽(Glucosamine hydrochloride)兩種成分列為食品管理。一般常見葡萄糖胺食品以膠錠、飲品及軟膠囊形式存在。衛生福利部食品藥物管理署(下稱食藥署)於106年公開之建議方法「食品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之檢驗方法」不適用於軟膠囊檢體，且未將葡萄糖胺2種首旋異構物均納入含量計算。本研究係將非油性及油性基質檢體經不同前處理流程，前者以去離子水萃取均質樣品，後者先以乙酸乙酯溶解樣品，再以太離子水重複萃取兩次，收集下層液，以鄰苯二甲醛溶液進行衍生化反應。檢液以Poroshell HPH-C18 (2.7  $\mu$ m, 3.0 mm  $\times$  10 cm)管柱及超高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器(UPLC-PDA)，以磷酸二氫鈉溶液(pH 7.8)與乙腈/甲醇/水(4.5:4.5:1, v/v/v)溶液，90:10 (v/v)比例作為移動相，以流速1 mL/min進行沖提，可於5分鐘內良好分離葡萄糖胺之2種首旋異構物。於粉狀膠錠及油性軟膠囊空白樣品中分別添加相當於5、25及50 mg/g葡萄糖胺之葡萄糖胺鹽酸鹽標準品進行確效試驗，其平均回收率分別為97-110%及98-105%，變異係數為2.4-3.6%及1.4-7.9%，皆符合「食品化學檢驗方法之確效規範」。以此方法進行7件市售產品中葡萄糖胺之含量檢測，檢測值介於21.6-372.7 mg/g，均高於標示值80%，符合「包裝食品營養標示應遵行事項」之含量標示規定。本研究優化層析條件及前處理流程，提供更精確可靠之檢測方法，適用於廠商自主管理及後市場監測。

**關鍵詞：**葡萄糖胺、葡萄糖胺鹽酸鹽、高效液相層析儀、軟膠囊

## 前言

葡萄糖胺(Glucosamine)，又稱胺基葡萄糖、葡糖胺或胺基葡糖，是一種單醣胺類物質(Amino-monosaccharide) (表一)，可在人體或動物體內以胺化葡萄糖之內生性生物合成(Biosynthesized endogenously)方式產生，其聚合結構可依連結方式不同而形成幾丁質(Chitosan)、黏多醣(Mucopolysaccharides)及

表一、葡萄糖胺之化學結構

英文名	分子式	分子量	化學結構
$\alpha$ -Glucosamine	$C_6H_{13}NO_5$	179.17	
$\beta$ -Glucosamine	$C_6H_{13}NO_5$	179.17	

(Yan, X. and Evenocheck, H. M. 2012)

蛋白聚醣(Proteoglycans)等物質。葡萄糖胺是合成關節軟骨及關節液之中間物質，可刺激蛋白聚醣(Proteoglycan)的合成及關節潤滑液的分泌，以重建軟骨構造，減少骨頭間的摩擦，達到骨骼保健之效用。葡萄糖胺依加工方式不同，可分為不含鹽類之葡萄糖胺(Glucosamine)、葡萄糖胺鹽酸鹽(Glucosamine hydrochloride)及葡萄糖胺硫酸鹽(Glucosamine sulfate)。現行食藥署之管理方式，葡萄糖胺硫酸鹽因有文獻支持其關節保健之作用，列為指示藥品管理，而不含鹽類葡萄糖胺及葡萄糖胺鹽酸鹽因缺乏足夠臨床文獻支持其有效性，以食品管理<sup>(1)</sup>。

近年來國人健康意識普及，業者將葡萄糖胺作為機能性成分添加於食品中以提升自身價值之產品日益增多。高雄市政府衛生局曾於108年接獲民眾檢舉某市售膠囊食品中葡萄糖胺含量與標示不符，並先後於108年11月及109年2月函請食藥署協助檢驗6件膠囊食品、3件原料(裸裝膠囊)進行葡萄糖胺/葡萄糖胺鹽酸鹽含量檢測。食藥署依據106年9月7日公開之建議方法「食品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之檢驗方法(TFDAA0060.00)」<sup>(2)</sup>(下稱原建議方法)進行檢測，惟送驗檢體為油性稠狀軟膠囊基質，使試驗結果有低估之虞。本研究為改善油性基質軟膠囊中葡萄糖胺之檢測，以原建議方法為基礎，進行樣品萃取及層析條件之優化，以提供更精確的膠囊錠狀食品中葡萄糖胺之檢測方法。

## 材料與方法

### 一、試驗樣品

膠囊(粉狀)1件、錠狀1件、乳粉1件及軟膠囊4件，共7件樣品，於110年購自網路商城，並儲放於室溫備用。確效試驗之膠囊錠狀(粉狀)空白樣品為參考多件市售產品配製而成，油性基質之軟膠囊空白樣品係購自市售軟

膠囊產品，兩者成分如下：

#### (一)膠囊錠狀(粉狀)空白樣品

32%澱粉、32%玉米澱粉、32%乳糖、2%二氧化矽及2%硬脂酸鎂。

#### (二)油性基質軟膠囊空白樣品

胺基酸螯合鈣、大豆油、明膠、甘油、大豆卵磷脂、雞胸軟骨萃取粉(第二型膠原蛋白)、純水、蜜蠟、二氧化鈦及維生素D3(膽鈣化醇)。

## 二、試藥、溶劑與標準品

甲醇(Methanol)、乙腈(Acetonitrile)及乙酸乙酯(Ethyl acetate)均採用液相層析級，購自德國Merck KGaA公司(Darmstadt, Germany)；鹽酸(Hydrochloric acid)、3-硫醇丙酸(3-Mercaptopropionic acid, 3-MPA)、9-芴甲基氯甲酸酯(9-Fluorenylmethyl chloroformate, FMOC-Cl)、氫氧化鈉(Sodium hydroxide)及鄰苯二甲醛(*o*-Phthalaldehyde, OPA)均採用試藥級，購自美國Sigma-Aldrich公司(Saint Louis, MO, USA)。硼酸(Boric acid)採用試藥級，購自德國Merck KGaA公司；磷酸二氫鈉(Sodium dihydrogen phosphate monohydrate)採用試藥級，購自美國J. T. Baker公司(Center Valley, PA, USA)。對照用標準品葡萄糖胺鹽酸鹽(Glucosamine hydrochloride)純度為99.7%，購自美國Sigma-Aldrich公司(St. Louis, MO, USA)。

## 三、儀器與設備

(一)旋渦混合器(Vortex genie-2, Scientific Industries, USA)

(二)超音波振盪器(Transonic Digital S, Elma Schmidbauer GmbH, Germany)

(三)振盪器(MMS, EYELA, Japan)

(四)去離子水製造機(Millipore milli-Q, Millipore, USA)

(五)離心機(Allegra 25R Centrifuge, Beckman

Coulter, USA)

(六)超高效液相層析儀(Acquity UPLC H-class, Waters, USA)

1. 光二極體陣列檢出器(Acquity UPLC PDA eλ, Waters, USA)
2. 層析管柱(Poroshell HPH-C18, 2.7 μm, 3.0 × 10 cm, Agilent Technologies, USA)

#### 四、試劑之調製

(一)50%氫氧化鈉溶液

稱取氫氧化鈉50 g，以去離子水溶解使成100 mL。

(二)0.4 M硼酸緩衝液

稱取硼酸2.47 g，以去離子水溶解使成100 mL，再以50%氫氧化鈉溶液調整pH值至10.2。

(三)鄰苯二甲醛溶液

稱取鄰苯二甲醛100 mg，以0.4 M硼酸緩衝液9 mL溶解，加3-硫醇丙酸20 μL，再加0.4 M硼酸緩衝液使成10 mL。

(四)9-芴甲基氯甲酸酯溶液

稱取9-芴甲基氯甲酸酯25 mg，以乙腈溶解使成10 mL。

#### 五、移動相溶液之調製

(一)移動相溶液A：

稱取磷酸二氫鈉5.5 g，以去離子水溶解使成1000 mL，再以50%氫氧化鈉溶液調整pH值至7.8，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

(二)移動相溶液B：

取乙腈450 mL，加入甲醇450 mL及去離子水100 mL，混合均勻，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

#### 六、標準溶液之配製

取相當於含葡萄糖胺約100 mg之對照用標準品，精確稱定，以去離子水溶解並定容至

10 mL，作為標準原液，冷藏儲存。臨用時取適量標準原液，以去離子水稀釋至25-250 μg/mL，供作標準溶液。

#### 七、衍生化標準溶液之配製

取標準溶液各20 μL，加入0.4 M硼酸緩衝液100 μL，混合均勻，加入鄰苯二甲醛溶液20 μL，旋渦混合30秒，加入去離子水1360 μL，混合均勻，供作衍生化標準溶液<sup>(註)</sup>。

註：衍生化反應後，應儘快進行儀器分析。

#### 八、檢液之調製

(一)非油性基質檢體

將檢體均質混勻後，取約0.25 g，精確稱定，置於離心管中，加入去離子水40 mL，旋渦混勻，以超音波振盪10分鐘，再以去離子水定容至50 mL，以8000 ×g離心1分鐘，經濾膜過濾，取濾液20 μL，加入0.4 M硼酸緩衝液100 μL，混合均勻，以下步驟同第七節，供作檢液。

(二)油性基質檢體

將檢體均質混勻後，取約0.25 g，精確稱定，置於離心管中，加入乙酸乙酯10 mL，旋渦混勻，加入去離子水20 mL，振盪5分鐘，再以8000 ×g離心1分鐘，收集下層液，上層液再加去離子水10 mL，振盪5分鐘，再以8000 ×g離心1分鐘，合併下層液，以去離子水定容至50 mL，以8000 ×g離心1分鐘，經濾膜過濾，取濾液20 μL，加入0.4 M硼酸緩衝液100 μL，混合均勻，以下步驟同第七節，供作檢液。

#### 九、高效液相層析儀分析條件

(一)光二極體陣列檢出器：偵測波長338 nm。

(二)層析管柱：Poroshell HPH-C18，2.7 μm，內徑3.0 mm × 10 cm。

(三)層析管溫度：40°C。

(四)樣品槽溫度：10°C。

(五)樣品注入量：20  $\mu\text{L}$ 。

(六)移動相溶液：依第五節調製之溶液，以表二層析條件進行分析。

(七)移動相流速：1 mL/min。

## 十、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及衍生化標準溶液各20  $\mu\text{L}$ ，分別注入高效液相層析儀中，依第九節條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別之，並依下列計算式求出檢體中葡萄糖胺之含量(mg/g)：

$$\text{檢體中葡萄糖胺之含量(mg/g)} = \frac{C \times V}{M \times 1000}$$

C：由 $\alpha$ -glucosamine及 $\beta$ -glucosamine之波峰面積總和代入標準曲線求得檢液中葡萄糖胺之濃度( $\mu\text{g/mL}$ )

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)。

## 十一、方法確效

依據本署公布之「食品化學檢驗方法之確效規範」<sup>(3)</sup>，進行確效試驗，評估本研究檢驗方法之準確度(Accuracy)、精密度(Precision)及定量極限(Limit of quantification, LOQ)。

### (一)標準曲線

至少包括5種不同濃度，線性迴歸方程式之相關係數不應低於0.99，檢液中待測物濃度應在標準曲線之線性範圍內。

### (二)準確度及精密度試驗

於同日及異日進行添加回收試驗，將適當濃度之標準溶液添加至空白樣品中，使檢體內葡萄糖胺含量約為5、25及50 mg/g，各濃度皆進行5重複試驗，依前述流程製成檢液，並計算其回收率及變異係數以評估是否符合食品化學確效規範要求。

### (三)定量極限之評估

將適當濃度之標準溶液添加至空白樣品中，依前述流程操作製成檢液，並計算其

回收率、重複性及波峰之訊噪比(Signal/Noise Ratio, S/N)，以回收率、重複性及波峰之訊噪比  $\geq 10$  之最低添加濃度作為定量極限。

## 結果與討論

### 一、層析條件探討

食藥署於106年9月7日公告之建議方法「食品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之檢驗方法(TFDAA0060.00)」(下稱原建議方法)採用Poroshell HPH-C18之10公分管柱，以UPLC搭配光二極體陣列檢出器，定量波長338 nm，層析管溫度為40 $^{\circ}\text{C}$ 條件下，依該方法層析條件進行實驗，於圖譜(如圖一)上呈現兩波峰，但兩波峰分離情況不佳，且原建議方法僅針對出峰時間約為6.5分鐘之波峰進行含量計算。根據文獻<sup>(4-7)</sup>表示兩波峰分別代表葡萄糖胺之首旋異構物 $\alpha$ -及 $\beta$ -glucosamine，皆應納入含量計算。本研究參考AOAC文獻<sup>(4)</sup>方法，將沖提方式改為等梯度沖提(Isocratic elution)，於流速1 mL/min，分別以15%、10%及7%移動相B評估兩波峰之分離情形，由圖二顯示，當移動相B比例越低，分離效果越佳，分析時間越長。

綜合考量分離程度及分析時間等因素，本研究最後採用表二之層析條件，流速1 mL/min，10%移動相B作為層析條件，搭配光二極體陣列檢出器，葡萄糖胺兩首旋異構物( $\alpha$ -及

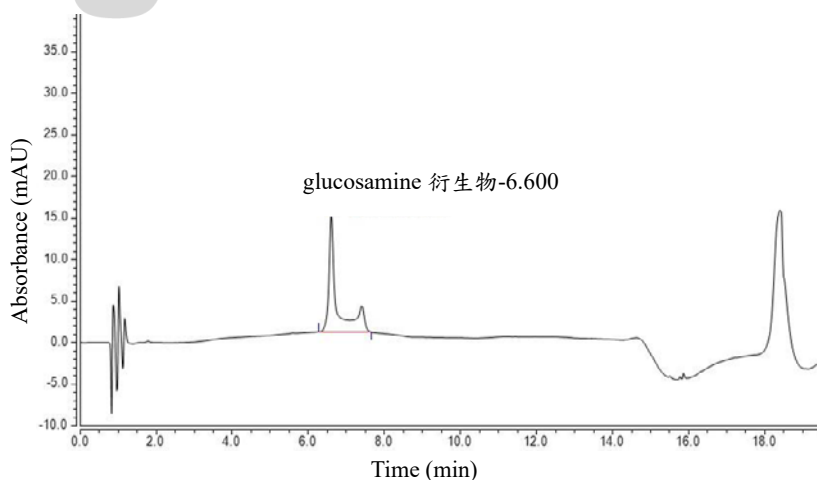
表二、高效液相層析儀移動相分析條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0 → 6	90 → 90	10 → 10
6 → 6.5	90 → 0	10 → 100
6.5 → 10.5	0 → 0	100 → 100
10.5 → 11	0 → 90	100 → 10
11 → 15	90 → 90	10 → 10

A：磷酸二氫鈉水溶液(pH 7.8)

B：乙腈/甲醇/水(4.5:4.5:1, v/v/v)





圖一、衍生化後葡萄糖胺標準品依「食品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之檢驗方法(TFDAA0060.00)」分析條件所得之HPLC圖譜

$\beta$ -glucosamine)分別可於約3.5分鐘及4.5分鐘出峰，比原建議方法6-8分鐘節省約一半時間。

## 二、衍生化試劑及偵測波長探討

原建議方法中衍生化係以檢液加入適量硼酸緩衝液(pH 10.2)，旋渦混合後依序加入鄰苯二甲醯溶液及9-芴甲基氯甲酸酯溶液混合均勻，再加入去離子水稀釋反應。本研究欲簡化衍生化試劑種類及步驟，依文獻探討<sup>(8,9)</sup>，上述兩種衍生化試劑均可與葡萄糖胺作用，惟偵測波長不相同。本研究參考原建議方法，分別以鄰苯二甲醯溶液及9-芴甲基氯甲酸酯溶液作為衍生化試劑，以338 nm及262 nm作為偵測波長進行實驗，實驗結果為以9-芴甲基氯甲酸酯溶液作為衍生化試劑於上述兩波長中皆無波峰出現，以鄰苯二甲醯溶液作為衍生化試劑於262 nm偵測下有基線飄移的現象，最終採用以鄰苯二甲醯溶液作為衍生化試劑，338 nm作為偵測波長進行實驗(如圖三)。

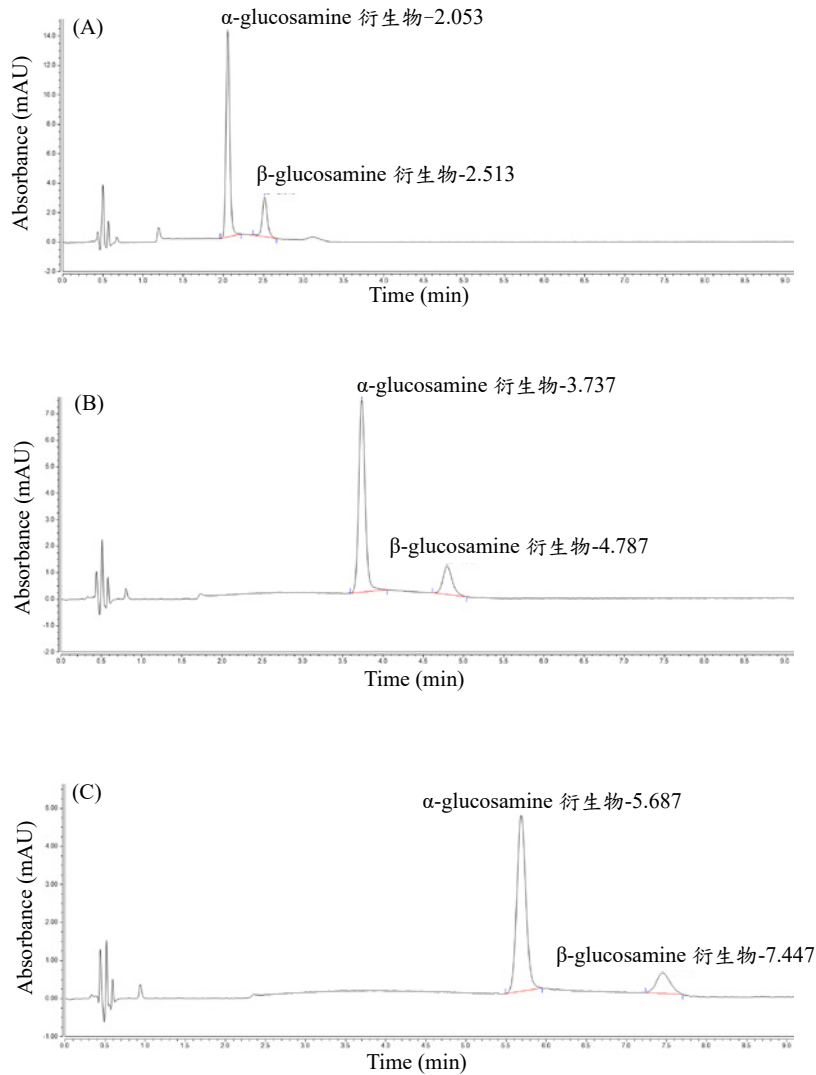
## 三、前處理條件探討

(一)油性基質檢體使用有機溶劑之萃取效果探討

油性基質軟膠囊若直接以水溶液萃取，其溶解及萃取效果不佳，本研究以有機溶劑-乙酸乙酯溶解樣品再以水溶液萃取葡萄糖胺，檢測市售軟膠囊檢體(編號G4)之葡萄糖胺含量，以未使用乙酸乙酯及使用乙酸乙酯進行萃取，結果：葡萄糖胺含量分別為338 mg/顆及417 mg/顆，後者與前者之差異百分比為24%，即使用乙酸乙酯萃取者較未使用者可多測得24%葡萄糖胺含量，故後續油性基質檢體採乙酸乙酯溶解後再進行水溶液萃取流程。

(二)油性基質檢體之萃取溶液探討

依原建議方法，葡萄糖胺萃取溶液為0.1 N鹽酸溶液(若為高濃度檢體則先以1 N鹽酸溶液萃取再以0.1 N鹽酸溶液稀釋)，本研究參考AOAC方法<sup>(4)</sup>，以去離子水作為萃取溶液與原建議方法使用之鹽酸溶液進行萃取溶液比較，結果如表三，於市售軟膠囊檢體(編號G4)中葡萄糖胺含量檢測結果相差11%，而標準添加試驗回收率分別為101及104%，皆符合「食品化學檢驗方法之確效規範」。經文獻探討<sup>(10)</sup>，使用稀



圖二、衍生化後葡萄糖胺標準品分別以15% (A)、10% (B)及7% (C)移動相B進行層析所得之HPLC圖譜

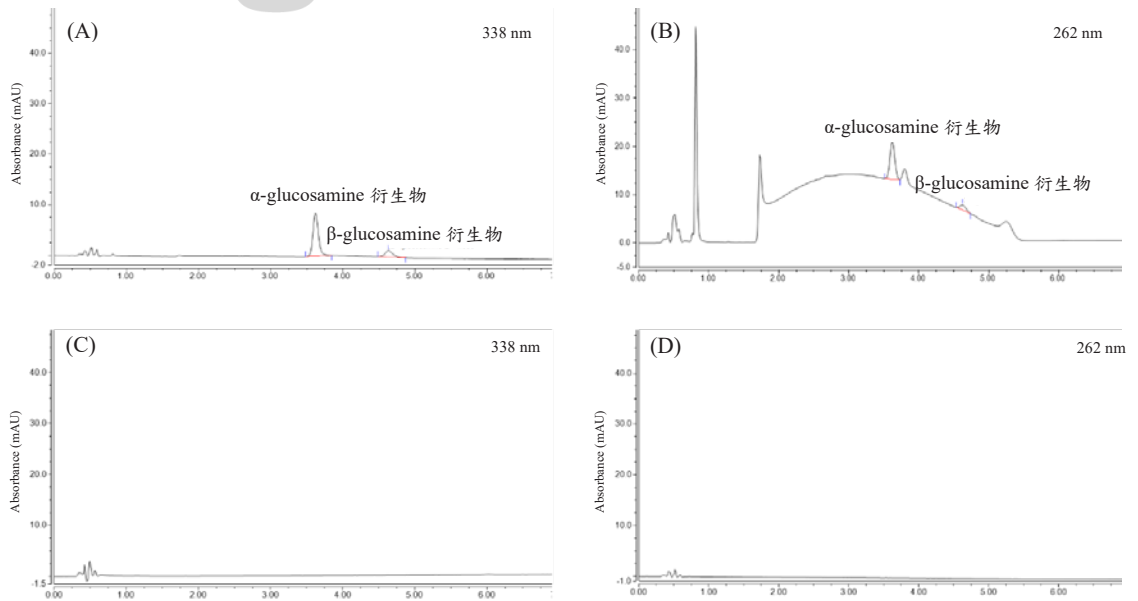
鹽酸作為萃取溶液，主要原因為多種胺基酸，如精胺酸(Arginine)、天門冬胺酸(Aspartic acid)、麩醯胺酸(Glutamine)及離胺酸(Lysine)等，於稀鹽酸中皆有較佳萃取率，故胺基酸之檢驗方法多以0.1 N鹽酸作為萃取溶液。依本研究結果顯示以去離子水或0.1 N鹽酸作為萃取溶液對葡萄糖胺萃取效果影響不大。為使實驗操作及

表三、不同萃取溶劑對檢體中葡萄糖胺之萃取效果

萃取溶液	市售樣品平均含量 (mg/g) <sup>a</sup>	添加回收試驗 平均回收率(%) <sup>b</sup>
去離子水	270	101
1 N鹽酸	299	104

<sup>a</sup> 含葡萄糖胺鹽酸鹽之軟膠囊食品市售樣品(編號G4)，平均含量以葡萄糖胺鹽酸鹽計，n=2

<sup>b</sup> 添加葡萄糖胺鹽酸鹽標準品(160 mg/g)於空白檢體，n=2



圖三、衍生化後葡萄糖胺標準品分別以鄰苯二甲醛溶液(A)、(B)及9-芴甲基氯甲酸酯溶液(C)、(D)作為衍生化試劑，於不同偵測波長進行分析所得之HPLC圖譜

準備工作更便利，後續採用去離子水作為萃取溶液。

#### 四、安定性試驗評估

本研究以濃度為250  $\mu\text{g/mL}$ 衍生化葡萄糖胺鹽酸鹽標準溶液進行12小時重複試驗，樣品槽溫度為10 $^{\circ}\text{C}$ ，實驗結果如圖四，在經過12小時後葡萄糖胺波峰面積總和與第0小時相比僅減少8%，無明顯衰退情形發生。

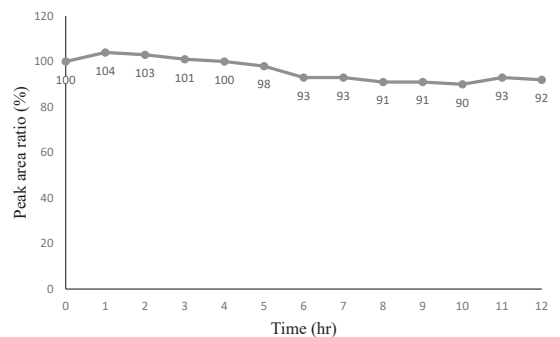
#### 五、確效試驗

##### (一)專一性及標準曲線

空白樣品經前處理步驟後分析，與標準品層析圖譜比對，於空白樣品之層析圖譜中並無明顯干擾波峰出現。此外，葡萄糖胺標準曲線之線性範圍為25-250  $\mu\text{g/mL}$ ，其R均可達0.99以上，顯示線性良好。

##### (二)準確度及精密度

結果如表四，同日間葡萄糖胺鹽酸鹽標準品添加於粉狀膠錠及油性軟膠囊空白基質之平均回收率分別為97-110%及98-105%，變異係數分別為2.4-3.6%及1.4-7.9%；異日間葡萄糖胺鹽酸鹽標準品添加



圖四、葡萄糖胺標準品於衍生化後之安定性測試

# Angle

於粉狀膠錠及油性軟膠囊空白基質之平均回收率分別為97%及105%，變異係數分別為4.5%及3.4%，顯示方法準確度符合確效規範。

### (三) 定量極限之評估

依定量極限之評估所得粉狀膠錠及油性軟膠囊之定量極限結果，葡萄糖胺於定量極限(5 mg/g)之平均回收率為110及98%，變異係數為2.4及7.9%，訊噪比為25.2及15.3，皆符合確效規範訊噪比  $\geq 10$  之要求(表四)。

胺字樣、成分標示中含葡萄糖胺或葡萄糖胺鹽酸鹽之膠錠、軟膠囊及乳粉產品為主，共計7件產品。以本方法對上述產品進行檢測，如圖五結果顯示，於膠錠、軟膠囊及乳粉產品中葡萄糖胺波峰皆不受基質干擾。檢測結果如表五，7件檢體之葡萄糖胺鹽酸鹽含量介於21.6-372.7 mg/g之間，除其中1件錠狀檢體無標示值外，其餘6件檢測值為標示值之91-137%之間，皆與「包裝食品營養標示應遵行事項」<sup>(11)</sup> 規定需大於標示值之80%相符。

## 結 論

### 六、市售產品測試方法適用性評估

本研究市售產品之選擇，以名稱含葡萄糖

本研究建立之分析方法，確效結果符合食

表四、葡萄糖胺鹽酸鹽標準品添加於粉狀膠錠及油性軟膠囊空白基質之方法確效結果

基質	同日間(n=5)						異日間(n=10)		定量極限	
	5 mg/g <sup>a</sup>		25 mg/g <sup>a</sup>		50 mg/g <sup>a</sup>		25 mg/g <sup>a</sup>		5 mg/g <sup>a</sup>	
	平均回收率 (%)	變異係數 (%)	平均回收率 (%)	變異係數 (%)	平均回收率 (%)	變異係數 (%)	平均回收率 (%)	變異係數 (%)	$\alpha$ -葡萄糖胺 訊噪比	$\beta$ -葡萄糖胺 訊噪比
粉狀膠錠 <sup>b</sup>	110	2.4	97	3.6	98	2.5	97	4.5	150.7	25.2
油性軟膠囊 <sup>c</sup>	98	7.9	105	4.9	100	1.4	105	3.4	87.4	15.3

<sup>a</sup> 添加回收試驗之添加量以葡萄糖胺含量表示

<sup>b</sup> 粉狀膠錠基質成分：澱粉、玉米澱粉、乳糖、二氧化矽、硬脂酸鎂

<sup>c</sup> 油性軟膠囊基質成分：胺基酸螯合鈣、大豆油、明膠、甘油、大豆卵磷脂、雞胸軟骨萃取粉(第二型膠原蛋白)、純水、蜜蠟、二氧化鈦、維生素D3(膽鈣化醇)

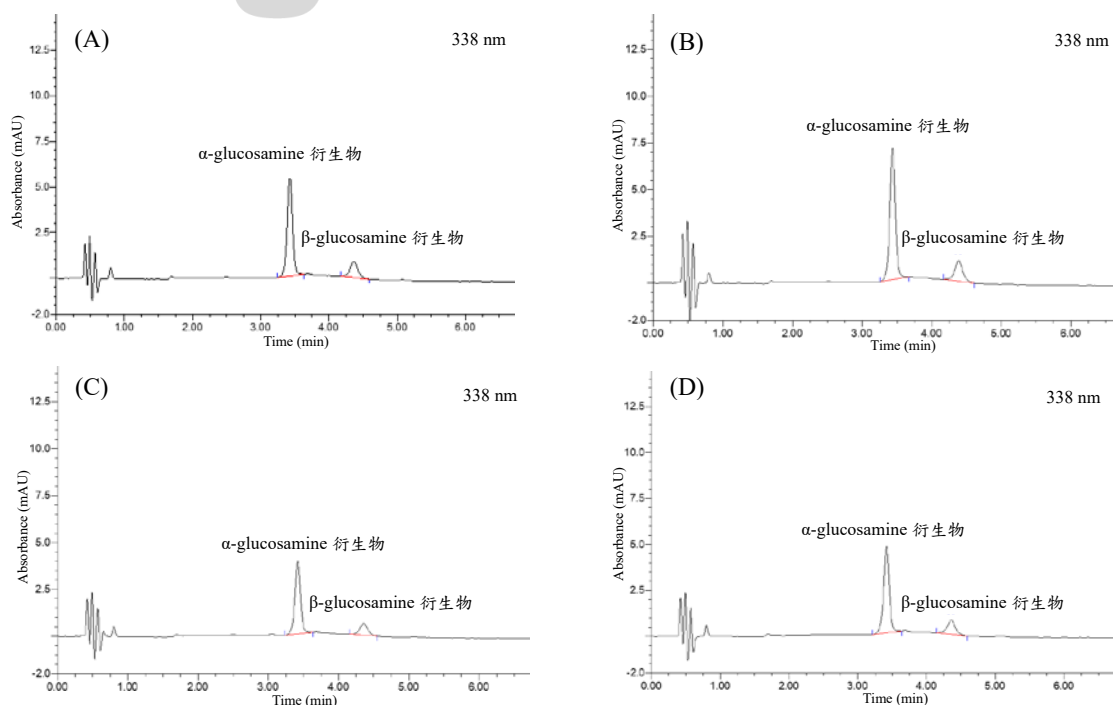
表五、市售產品中葡萄糖胺之含量檢測結果

編號	型態	檢測值(n=2) <sup>a</sup>	檢測值(n=2) <sup>a</sup>	標示值 <sup>a</sup>	檢測值/標示值(%) <sup>b</sup>
G1	膠囊(粉狀)	366.7 (mg/g)	273.9 (mg/2顆)	200 (mg/2顆)	137
G2	乳粉	21.6 (mg/g)	2164.8 (mg/100 g)	1985 (mg/100 g)	109
G3	錠狀	233.4 (mg/g)	247.9 (mg/顆)	無標示	-
G4	軟膠囊(油狀)	277.4 (mg/g)	387.2 (mg/顆)	400 (mg/顆)	97
G5	軟膠囊(油狀)	372.7 (mg/g)	578.3 (mg/顆)	625 (mg/顆)	93
G6	軟膠囊(油狀)	155.0 (mg/g)	93.2 (mg/顆)	100 (mg/顆)	93
G7	軟膠囊(油狀)	371.5 (mg/g)	567.7 (mg/顆)	625 (mg/顆)	91

<sup>a</sup> 市售產品之檢測值及標示值均以葡萄糖胺鹽酸鹽計

<sup>b</sup> 依「包裝食品營養標示應遵行事項」，其它自願標示營養素之標示誤差允許範圍為  $\geq 80\%$





圖五、衍生化後葡萄糖胺標準溶液(A)、市售產品G1 (B)、市售產品G2 (C)及市售產品G4 (D)之HPLC圖譜

藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」，適用於膠囊錠狀食品中葡萄糖胺之檢驗，可作為監測保健食品品質之參考。

### 參考文獻

1. 黃育文。2005。葡萄糖胺/Glucosamine與退化性關節炎。藥物食品簡訊，297: 1-4。
2. 衛生福利部食品藥物管理署。2017。食品中游離胺基酸、葡萄糖胺及牛磺酸之檢驗方法(TFDAA0060.00)。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=1574&key=%e8%91%a1%e8%90%84%e7%b3%96%e8%3%ba>]。
3. 衛生福利部食品藥物管理署。2021。食品化學檢驗方法之確效規範。[<http://www.fda.gov.tw/TC/siteList.aspx?sid=4115>]。
4. Zhou, J. Z., Waszkuc, T. and Mohammed, F. 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.
5. Bartolomeo, M. P. and Maisano, F. 2006. Validation of a reversed-phase HPLC method for quantitative amino acid analysis. *J. Biomol. Tech.* 17: 131-137.
6. Yan, X. and Evenocheck, H. M. 2012. Chitosan analysis using acid hydrolysis and HPLC/UV. *Carbohydr. Polym.* 87: 1774-1778.
7. Huang, T. M., Cai, L., Yang, B., Zhou, M. X. and et al. 2006. Liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry method for the assay of glucosamine sulfate in

- human plasma: validation and application to a pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 20(3): 251-256.
8. Zhu, X., Cai, J., Yang, J. and Su, Q. 2005. Determination of glucosamine in impure chitin samples by high-performance liquid chromatography. *Carbohydr. Res.* 340(10): 1732-1738.
9. Song, M., Hang, T. J., Wang, C., Yang, L. and *et al.* 2012. Precolumn derivatization LC-MS/MS method for the determination and pharmacokinetic study of glucosamine in human plasma and urine. *J. Pharm. Anal.* 2(1): 19-28.
10. Qiu, X., Reynolds, R., Johanningsmeier, S. and Truong, V.-D. 2020. Determination of free amino acids in five commercial sweetpotato cultivars by hydrophilic interaction liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Food Compos. Anal.* 92: 103522.
11. 衛生福利部。2018。包裝食品營養標示應遵行事項。107.03.31衛授公字第1071300530號公告修訂。[<http://www.fda.gov.tw/TC/newsContent.aspx?cid=3&id=26968>]。



# Development of an Analytical Method for Glucosamine Quantification in Foods in Capsule and Tablet Form

CHING-YU HSU, YING-JIE TSAI, PAI-WEN WU, NU-CHING LIN,  
YA-MIN KAO, SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

## ABSTRACT

Glucosamine extracted from shrimp and crab shell, after drying, de-protein and de-mineral treatment, is often made into the form of capsule, beverages and soft capsule in commercial food products. Two peaks of glucosamine can be found in the HPLC profile, due to the interconversion of the natural stereoisomers ( $\alpha$  and  $\beta$ ) in aqueous solution. “Method of Test for Free Amino Acids, Glucosamine and Taurine in Foods”, pronounced in 2017 by the Taiwan Food and Drug Administration, is not applicable to quantify glucosamine in soft capsule, besides, only one of the isomers was used for calculation. In this study, the non-oily and oily samples were analyzed using different extraction treatment. The former was extracted with deionized water, and the latter was dissolved with ethyl acetate before extracted with deionized water. The filtrate collected from the aqueous layer was derivatized with *o*-phthalaldehyde solution, and then analyzed by an ultra-high performance liquid chromatography system with a Poroshell HPH-C18 column (2.7  $\mu\text{m}$ , 3.0 mm  $\times$  10 cm) and a photodiode array detector. The derivatized samples were subjected to 1 mL/min isocratic elution with sodium dihydrogen phosphate solution (pH 7.8) and acetonitrile/methanol/water (4.5:4.5:1, v/v/v) solution at the ratio of 90:10 (v/v). Glucosamine can be detected within 5 minutes, and the content is calculated by the sum of both stereoisomers. The average recoveries of glucosamine in the non-oily and oily samples spiked at the levels of 5, 25 and 50 mg/g ranged between 97-110% and 98-105%, and the coefficients of variation were 2.4-3.6% and 1.4-7.9%, respectively. All results showed that the method had good precision and accuracy. Seven commercial products were investigated, the results showed that the contents of glucosamine in the samples were in the range of 21.6-372.7 mg/g. The detected values were all higher than 80% of the labeled value, which were in compliance with the regulation.

Key words: glucosamine, glucosamine hydrochloride, high performance liquid chromatography, soft capsule