

DOI: 10.13208/j.electrochem.130620

Cite this: *J. Electrochem.* 2014, 20(2): 164-170

Artical ID:1006-3471(2014)02-0164-07

Http://electrochem.xmu.edu.cn

电化学-积分脉冲安培法的氨基葡萄糖 盐酸盐检测

范艳群^{1,2}, 陈庆阳¹, 夏金梅¹, 许建中¹, 徐 洵^{1,2}, 许 晨^{1*}

(1. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用电化学-脉冲安培法分析氨基葡萄糖盐酸盐(GAH)检测的影响因素, 包括积分电位、NaOH 浓度和流速等。在实验范围内, 积分电位增大, 峰面积先增大后减小, 背景信号大幅度提高, 仪器噪音先升高再下降, 积分电位以 0.1 V 为宜。淋洗液浓度增大, 保留时间不断缩短, 峰面积先快速增大后趋于基本稳定, 理论塔板数先增加后减小, 淋洗液浓度以 50 mmol·L⁻¹ 为宜。流速增大, 保留时间和峰面积均减小, 淋洗液流速以 0.6 mL·min⁻¹ 为宜。文中比较了两种积分脉冲安培检测器(戴安 ED3000 PAD 和厦门纳精 NJPAD)不同串联形式的氨基葡萄糖盐酸盐的转化量: ED3000 前置串联, 氨基葡萄糖盐酸盐的转化量约占其总含量的 1.27%; NJPAD 前置串联, 氨基葡萄糖盐酸盐的转化量约占其总含量的 2.79%。

关键词: 脉冲安培检测器; 氨基葡萄糖盐酸盐; 转化量

中图分类号: O646

文献标识码: A

氨基葡萄糖是葡萄糖 2 位羟基被氨基取代的一种单糖, 是人体及动物体内关节组织中糖蛋白的天然组成成分, 具有抗炎止痛和修复软骨及关节功能的作用, 并以氨基葡萄糖盐酸盐或硫酸盐的形式广泛应用于医疗药品和保健食品。与大多数糖类化合物一样, 氨基葡萄糖盐酸盐无紫外吸收, 其分离检测方法主要采用衍生化气相色谱法^[1]、直接示差折光检测法^[2]、蒸发光检测法^[3]、电化学安培检测法^[4-5]及毛细管电泳法^[6]。气相色谱法需衍生化处理, 液相-示差折光检测法灵敏度较低, 液相-蒸发光检测法不适用于含不挥发性盐的流动相, 液相-毛细管电泳法对大多数糖还需衍生化处理。而液相-脉冲安培检测法在糖化合物的检测中, 无需对糖类化合物衍生处理, 方法简便; 其灵敏度高, 甚至可检测至 pg 级; 不易受非电化学活性物质的干扰, 一定范围选择性高; 检测池体积小, 柱外效应较小, 噪声低, 响应速度快; 采用 NaOH 和 NaAc 等碱性洗脱液, 分析检测成本较低且对环境污染小。因此, 液相-脉冲安培检测法在糖化合物的检测分析中是一种较优的分析检测方法。

氨基葡萄糖盐酸盐分子的 C₂ 位有一个伯氨

基, 在碱性介质中以游离的氨基葡萄糖形式存在, 且在水溶液中可发生一级质子化, 受邻位半缩醛结构的吸电子效应的影响, 其质子化常数为 7.78^[7], 氨基葡萄糖水解可解离出 OH⁻(见图 1)。氨基葡萄糖盐酸盐满足离子色谱-脉冲安培检测法的主要基本条件: 首先, 碱性条件下在阴离子交换色谱柱上可以与其它糖类化合物实现分离; 其次, 在碱性介质中金电极上的氧化可灵敏定量检测, 金工作电极上施加一个电位, 氨基葡萄糖在其表面发生氧化反应, 低氨基葡萄糖浓度下(1.0×10⁻¹ ~ 1.0×10⁻² mmol·L⁻¹), 氨基葡萄糖浓度与氧化电流呈线性关系^[8](见图 2); 再者, 金电极氨基葡萄糖的氧化, 多周期循环后其曲线(见图 3)基本上趋于稳定, 故离子色谱-脉冲安培检测法极适合用于氨基葡萄糖浓度的分析检测。

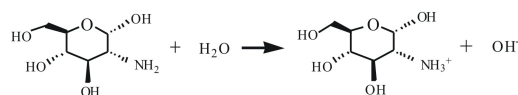
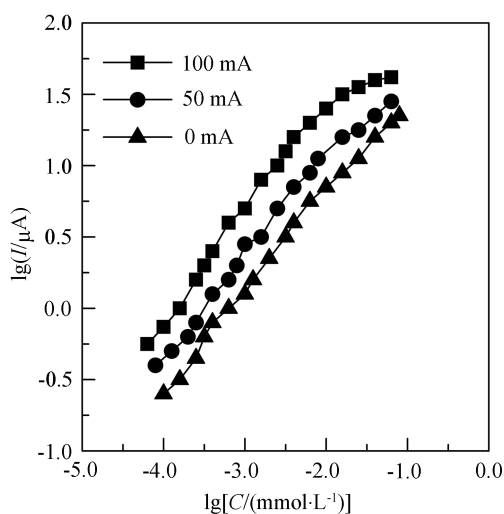
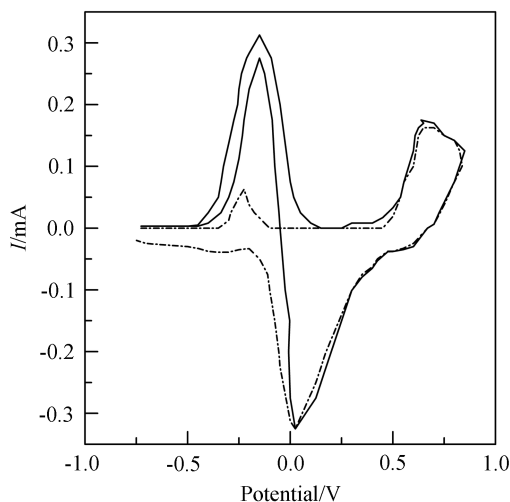


图 1 氨基葡萄糖水解解离反应式

Fig. 1 The dissociation reaction of glucosamine in aqueous solutions

图2 氨基葡萄糖的浓度与电流的关系^[8]Fig. 2 The relationship between the concentration of glucosamine and current^[8]图3 金电极上氨基葡萄糖($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)的循环伏安曲线($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$, 虚线;空白对照)扫描速率 $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$; $T = 298 \text{ K}$ ^[8]Fig. 3 The cyclic voltammograms of glucosamine ($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Au electrode, in $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$, blanked (dashed line), $v = 50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$, $T = 298 \text{ K}$ ^[8]

本文拟考察积分电位、淋洗液浓度和淋洗液流速等因素的影响,确定电化学积分脉冲检测器检测氨基葡萄糖盐酸盐的最佳条件.同时,将进口和国产积分脉冲安培检测器前置串联检测(见图4),计算氨基葡萄糖盐酸盐的转化量,比较两检测器的灵

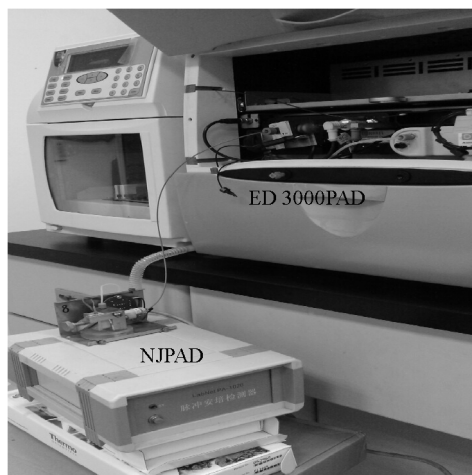


图4 ED3000 PAD 和 NJPAD 串联示意图

Fig. 4 The sketch of cascade between ED3000 PAD and NJPAD

敏度性能指标,为离子色谱电化学检测器的国产化开发积累实验数据.

1 实验

1.1 仪器与试剂

Dionex ICS-3000 型离子色谱仪,配四元梯度泵;ED3000 脉冲安培检测器(Au 工作电极,Ag/AgCl 参比电极,Ti 对电极);Chromeleon6.80 色谱工作站,AS 自动进样器.分析柱 Dionex CarboPac PA10($250 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$);保护柱 Dionex CarboPac PA10 ($50 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$);脉冲安培检测器(NJPAD);ME1020 多通道电化学分析仪工作站.

氨基葡萄糖盐酸盐(纯度 $> 99\%$,实验室自制).

1.2 方法

1) 检测条件

采用 CarboPac PA 10 色谱柱,流动相为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 溶液,流速为 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,进样体积 $25 \mu\text{L}$,柱温 35°C .

2) 电极处理

将不同粒度的 Al_2O_3 浮于水中,摇匀,依次将不同粒径(从大到小)的悬浮液滴于玻璃基座的麂皮布上,再将电极置于其上打磨($1 \sim 2 \text{ min}$),超纯水清洗,直至镜面即可^[8].

2 结果与讨论

2.1 采样电位

脉冲安培检测法采用四电位波形检测,各参数

详见表 1. 其四电位波形的电位 E_1 系氨基葡萄糖盐酸盐氧化电流的积分电位. 高负电位 E_2 可清除金电极表面的金氧化物(水电离质子和金电极表面的吸附物 $\text{Au}(\text{OH})$). 高正电位 E_3 保持电催化活性防止金电极的过度损耗. 电位 E_4 特异性地清除氨基葡萄糖盐酸盐氧化产物. 金电极氧化还原可视为表面电催化位点, 其氧化反应缺失使检测信号下降, 四电位波形可提高检测器灵敏度.

表 1 四位波形

Tab. 1 The quadruple-potential waveforms

Wave form	Potential/V	Time/s	Integration
E_1	0.1	0.00	Begin End
	0.1	0.20	
	0.1	0.40	
E_2	-2.0	0.41	
	-2.0	0.42	
E_3	0.6	0.43	
E_4	-0.1	0.44	
	-0.1	0.50	

图 5 给出积分电位 E_1 -氨基葡萄糖盐酸盐峰面积(A)、背景信号(B)和仪器噪声(C)曲线. 从图 5 看出, 积分电位 E_1 低于 0.1 V, 积分电位增大, 氨基葡萄糖盐酸盐峰面积无明显变化, 始终维持于 $40 \text{ nC} \cdot \text{min}$ 左右, 背景信号和仪器噪声变化并不明显; 积分电位 $E_1 > 0.2 \text{ V}$, 积分电位增大, 氨基葡萄糖盐酸盐峰面积显著变化, 先增大而后急剧下降并维持稳定一段时间又翘升起来, 背景信号此时急剧升高, 仪器噪声在 0.3 V 后也急剧加大, 故选取 0.1 V 积分电位, 就可获得高信噪比和高灵敏度.

2.2 NaOH 浓度

NaOH 溶液中 OH^- 除作为淋洗离子外, 其强碱性性质也使脉冲安培检测器对氨基葡萄糖盐酸盐的检测有较高灵敏度. 考察不同浓度 NaOH ($0 \sim 140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 与氨基葡萄糖盐酸盐的保留时间(A)、峰面积(B)和理论塔板数(C)的关系, 实验结果见图 6 (流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, NaOH 淋洗液淋洗色谱柱).

从图 6 可以看出, 调节淋洗液 pH 值可以改变氨基葡萄糖盐酸盐在固定相和流动相之间的分配, 在 $0 \sim 100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 浓度范围内, 氨基葡萄

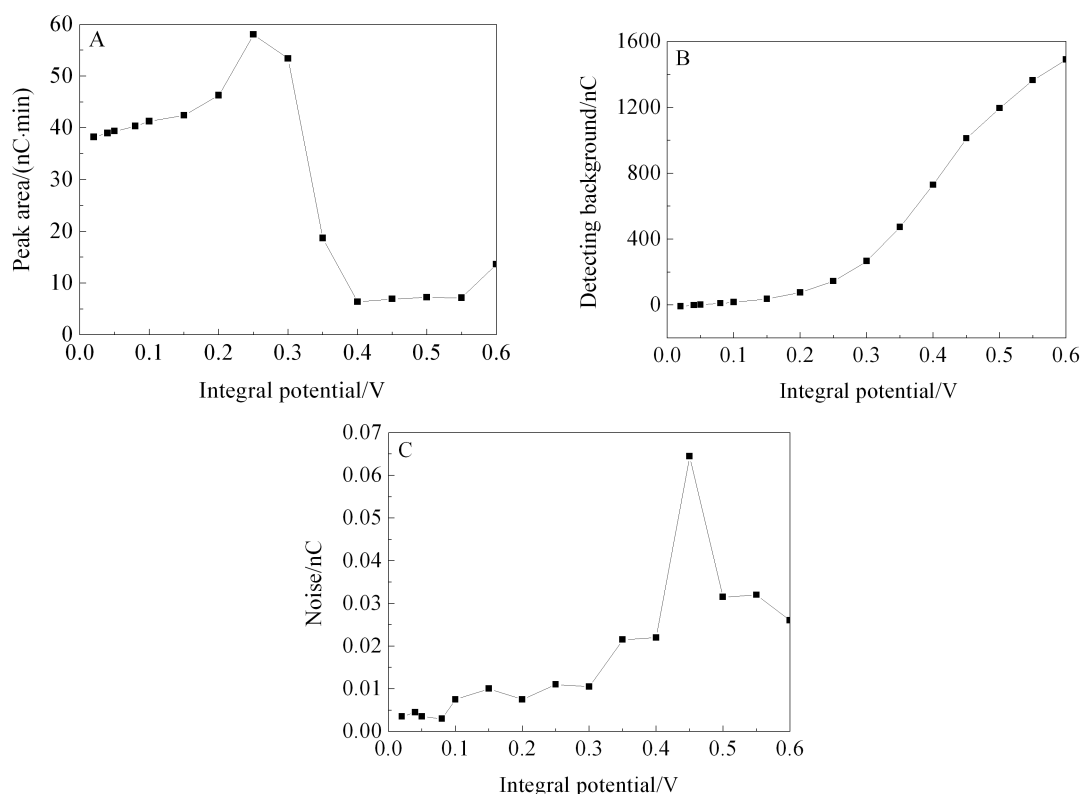


图 5 积分电位-氨基葡萄糖盐酸盐峰面积(A)、背景信号(B)和仪器噪声(C)曲线

Fig. 5 Influence of integral potential on peak area (A), background signal (B) and noise (C) of GAH

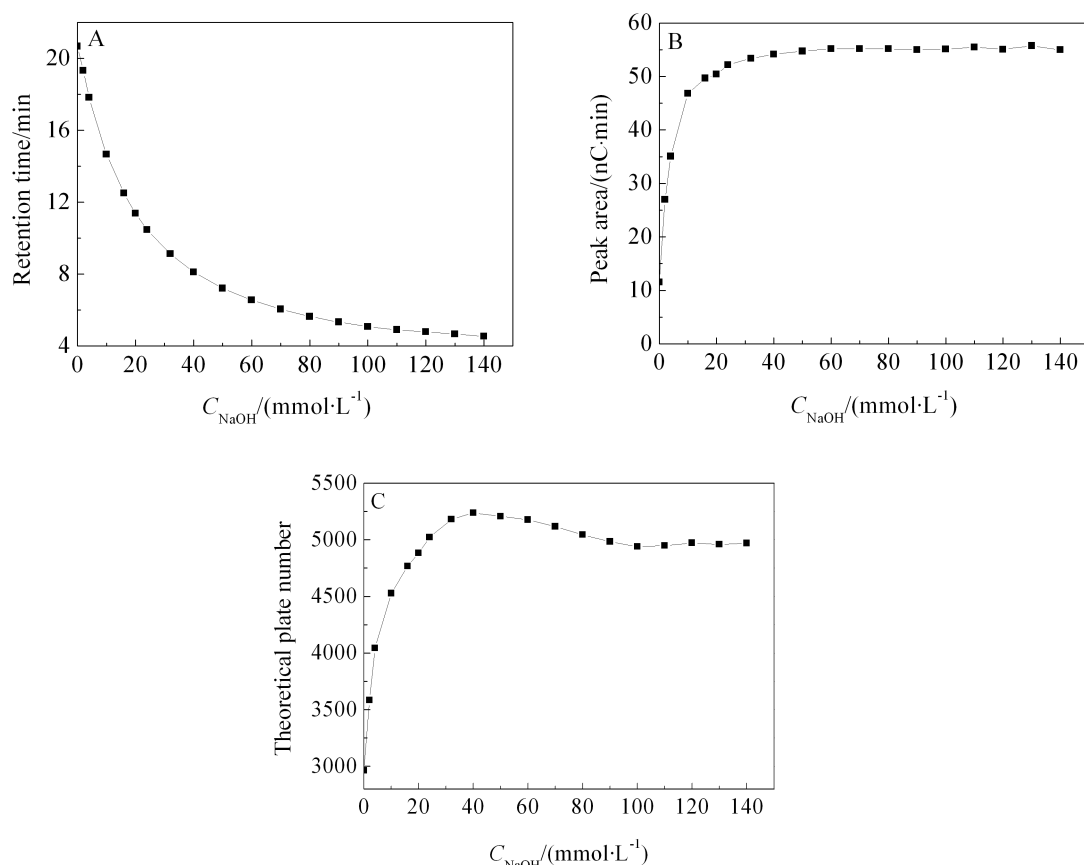


图6 NaOH浓度-氨基葡萄糖盐酸盐保留时间(A)、峰面积(B)、理论塔板数(C)曲线

Fig. 6 Influence of NaOH concentration on retention time (A), peak area (B) and theoretical plate number (C) of GAH

糖盐酸盐保留时间的变化率随淋洗液浓度增大而迅速降低,浓度越低,氨基葡萄糖盐酸盐保留时间随 OH^- 浓度变化而变化的幅度越大; NaOH 浓度高于 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,氨基葡萄糖盐酸盐峰面积达到稳定,不再随淋洗液的浓度提高而增加; NaOH 浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,理论塔板数达到最大,随洗脱液浓度升高,理论塔板数微降.综合考虑保留时间、峰面积和理论塔板数,选取 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 淋洗液为最佳.

2.3 流速

以 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液为流动相,采用4种不同流速(0.60 、 0.65 、 0.70 、 $0.75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)考察流动相流速对保留时间、峰面积、理论塔板数的影响,实验结果见图7.从图7中可以看出,淋洗液流速增加,氨基葡萄糖盐酸盐的保留时间、峰面积和色谱柱的理论塔板数均下降,符合色谱规律.

2.4 氨基葡萄糖盐酸盐转化量

将 47.70 mg 氨基葡萄糖盐酸盐溶解于 50 mL

容量瓶,配制成 $954.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨基葡萄糖盐酸盐储备液,再稀释成浓度分别为 3.82 、 7.63 、 9.54 、 11.45 、 14.31 和 $19.08 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氨基葡萄糖盐酸盐样品溶液.在 NaOH 浓度为 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,流速 $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、柱温 35°C 、进样量 $25 \mu\text{L}$ 的色谱条件下制作标准曲线.

1) ED3000 前置串联

ED3000开关与NJPAD检测信号列于表2.从表2看出,转化量: $(1-11.931/12.076) \times 100\% < \text{转化量} < (1-11.931/12.095) \times 100\%$,即 $1.20\% < \text{转化量} < 1.35\%$.设信号衰减呈比例下降,衰减比例 X ,则 $12.095X^2 = 12.076$, $X = 99.92\%$;故氨基葡萄糖盐酸盐理论转化量应为 $(1-11.931/12.095X) \times 100\% = 1.27\%$.

2) NJPAD 前置串联

NJPAD开关与ED3000检测信号列于表3.从表3看出,转化量: $(1-5.5686/5.6120) \times 100\% < \text{转化量} < (1-5.5686/5.8467) \times 100\%$;即 $0.77\% < \text{转化量}$

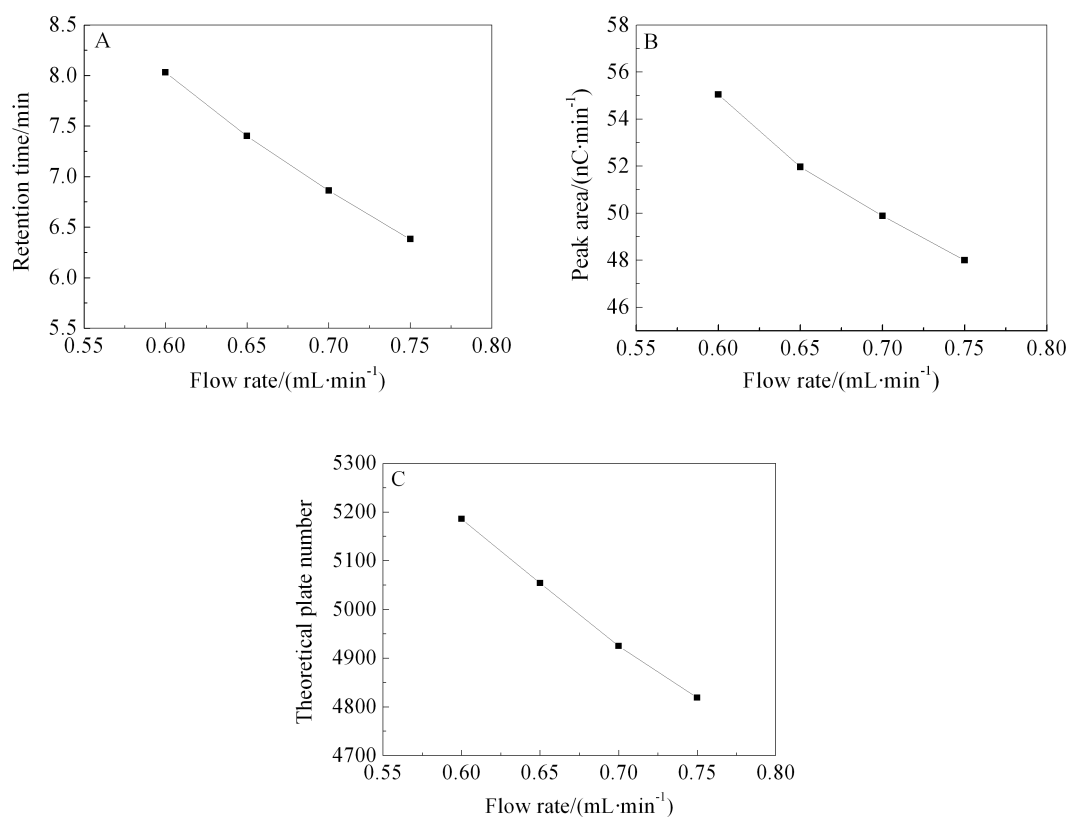


图 7 氨基葡萄糖盐酸盐流速-保留时间(A)、峰面积(B)和理论塔板数(C)曲线

Fig. 7 Influence of flow rate on retention time (A), peak area (B) and theoretical plate number (C) of GAH

表 2 ED3000 的开关与 NJPAD 检测信号

Tab. 2 Effect of ED3000 on detection signal of NJPAD

NJPAD	ED3000	Linear range/(mg·L ⁻¹)	Linear equation	<i>r</i>
On	Off	3.82 ~ 19.08	$Y = 12.095X + 0.6746$	0.9997
On	On	3.82 ~ 19.08	$Y = 11.931X - 1.0697$	0.9999
On	Off	3.82 ~ 19.08	$Y = 12.076X + 0.2248$	0.9998

表 3 NJPAD 开关与 ED3000 检测信号

Tab. 3 Effect of NJPAD on detection signal of ED3000

ED3000	NJPAD	Linear range/(mg·L ⁻¹)	Linear equation	<i>r</i>
On	Off	3.82 ~ 19.08	$Y = 5.8467X - 0.1198$	0.9997
On	On	3.82 ~ 19.08	$Y = 5.5686X + 0.143$	0.9999
On	Off	3.82 ~ 19.08	$Y = 5.612X + 0.1724$	0.9997

量 < 4.76%。设信号衰减呈比例下降, 衰减比例为 X , 则 $5.8467X^2 = 5.6120$, $X = 97.97\%$; 故氨基葡萄

糖盐酸盐理论转化量应为 $(1 - 5.5686/5.8467X) \times 100\% = 2.79\%$ 。

测试说明,戴安 ED3000 检测器对氨基葡萄糖盐酸盐的转化量约占总含量的 1.27%, 国产 NJPAD 检测器对氨基葡萄糖盐酸盐的转化量约占总含量的 2.79%。两检测器的检测分析氨基葡萄糖盐酸盐转化量在同一数量级,可以满足检测分析的需求,而国产 NJPAD 检测器的灵敏度稍低。

3 结 论

积分电位、淋洗液浓度和淋洗液流速影响着积分脉冲安培法的氨基葡萄糖盐酸盐分离检测。在检测范围内,离子色谱-脉冲安培检测法的氨基葡萄糖盐酸盐最佳分离检测条件:积分电位 0.1 V;淋洗液浓度 50 mmol·L⁻¹;淋洗液流速 0.6 mL·min⁻¹;粗略估算,ED3000 对氨基葡萄糖盐酸盐的转化量约占总含量的 1.27%,NJPAD 对氨基葡萄糖盐酸盐的转化量约占总含量的 2.79%,氨基葡萄糖盐酸盐的转化量在同一数量级,ED3000 检测器检测氨基葡萄糖盐酸盐灵敏度略高,对该液相脉冲安培检测器的研究,可为国产化提供参考。

参考文献(References):

- [1] Kang X J(康学军), QU J S(曲见松). Analysis of Angelica dahurica polysaccharide by gas chromatography[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis(药物分析杂志), 2006, 26(7): 891-894.
- [2] Yan J(颜军), Xie Z J(谢贞建), He G(何钢), et al. Determination of sugars in compound saccharated pepsin granules by high performance liquid chromatography with refractive index detection[J]. Food Science(食品科学), 2011, 32(22): 248-250.
- [3] Karlsson G, Winge S, Sandberg H. Separation of monosaccharides by hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1092(2): 246-249.
- [4] Caseiro A, Marr I L, Claeys M, et al. Determination of saccharides in atmospheric aerosol using anion-exchange high-performance liquid chromatography and pulsed-amperometric detection[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1171(1/2): 37-45.
- [5] Torto N, Lobelo B, Gorton L. Determination of saccharides in waste water from the beverage industry by microdialysis sampling, microbore high performance anion exchange chromatography and integrated pulsed electrochemical detection[J]. The Analyst, 2000, 125(8): 1379-1381.
- [6] Karamanos N K, Axelsson S, Vanky P, et al. Determination of hyaluronan and galactosaminoglycan disaccharides by high-performance capillary electrophoresis at the attomole level. Applications to analyses of tissue and cell culture proteoglycans[J]. Journal of Chromatography A, 1995, 696(2): 295-305.
- [7] Dong L(董丽), Ma S Y(马素英), Yang L M(杨利敏), et al. Coordination reaction of glucosamine with Cu²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research(时珍国医国药), 2008, 19(4): 836-837.
- [8] Gu W X(顾文秀). Study on the synthesis and coordination property of glucosaminic acid[D]. Jiangnan University: 2008.

Detection of Glucosamine Hydrochloride by Ion Chromatography with Integrated Pulsed Amperometric Detector

FAN Yan-qun^{1,2}, CHEN Qing-yang¹, XIA Jin-mei¹, XU Jian-zhong¹, XU Xun^{1,2}, XU Chen^{1*}

(1. *Third Institute of Oceanography State Oceanic Administration, Xiamen 361005, Fujian, China*; 2. *College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, Fujian, China*)

Abstract: Factors (integral potential, concentration of NaOH and flow rate) affecting detection of Glucosamine hydrochloride by ion chromatography with integrated pulsed amperometric detector were studied. As the integral potential increased, the detection signal first increased and then decreased, while the detection background and noise increased directly. The suitable integral potential should be 0.1 V. With the concentration of NaOH increased, the retention time descended sharply, while the integral area increased quickly before they are coming back into balance. The number of theoretical plates increased firstly and then decreased. The optimum concentration of NaOH was 50 mmol·L⁻¹. As the flow rate increased, the retention time and peak area reduced. Thus, the flow rate of 0.6 mL·min⁻¹ was the suitable one. The transformation-quantity of Glucosamine hydrochloride using ED3000 detector was 1.27% by connecting the two integrated pulsed amperometric detectors, while the total amount was 2.79% by NJPAD detector.

Key words: integrated pulsed amperometric detector; glucosamine hydrochloride; transformation-quantity