

保健食品中羥基檸檬酸檢驗方法之探討

吳白玟 吳駿逸 曾素香 闕麗卿 施養志

食品藥物管理局研究檢驗組

摘 要

本研究探討以高效液相層析儀配合光二極體陣列偵測器(HPLC-PDA)，檢測含藤黃果萃出物之保健食品中羥基檸檬酸(hydroxycitric acid, HCA)之含量。串聯2支逆相層析管柱，配合pH調至2.5含配位離子劑四丁基硫酸氫銨之5 mM磷酸鹽溶液為移動相，在紫外光210 nm波長，流速0.5 mL/min條件下，進行HCA高效液相層析。樣品經固相萃取淨化處理可除去干擾積分之波峰，且pH值影響樣品淨化效果，當檢液為鹼性(pH 10)時，可有效的滯留在固相萃取匣中，再經1 mL 2%甲酸溶液，逐步沖提定容至4 mL後，進行HPLC分析。三件標示含藤黃果之檢體，均無標示HCA含量，其HCA檢測含量範圍介於13-31 mg/g之間。

關鍵詞：羥基檸檬酸、保健食品、藤黃果萃出物、固相萃取匣、高效液相層析

前 言

羥基檸檬酸(hydroxycitric acid, HCA)是由自古以來被當作加哩粉香辛料成分之一的藤黃果，其果皮抽出物所萃取之成分，結構與檸檬酸相近，乾燥藤黃果中可萃得10-30%之HCA⁽¹⁻³⁾。因HCA可抑制ATP citrate lyase作用，阻止acetyl CoA形成，在人體葡萄糖轉為脂肪時，影響脂肪酸合成，並且抑制糖解(glycolysis)作用的進行等特性^(4,5)，故被利用於瘦身食品中⁽⁶⁾。對於其毒性研究，雖有報導認為HCA安全性高，但Saito等人(2005)⁽⁷⁾提出高劑量(> 778 mg HCA/kg bw/day)易使肥胖症的雄鼠(male Zucker obese rats)生殖器官萎縮之報導。Hayamizu等人(2001)⁽⁸⁾認為日本含藤黃果之市售膳食補充食品，每人每天HCA建議攝取量為750-1500 mg。我國現行行政管理規範，於國產食品產製前配方審查之可供食品使用原料中規定「以其所含之羥基檸檬酸⁽⁹⁾(hydroxy citric acid, HCA)計每日食用限量為1500 mg以下」。

有關HCA分析方法，Revathi等人(2010)⁽¹⁰⁾曾以TLC、HPTLC及HPLC進行藤黃果萃出物中HCA成分之分析。於添加藤黃果萃出物之食品中，常因基質干擾成分多而影響HCA分析。本局曾於2005年採用固相萃取淨化方式，檢測16件含有藤黃果之進口及國產膠囊、錠劑樣品中HCA含量⁽¹¹⁾。2011年協助衛生局送驗樣品中HCA含量分析，進而探討檢測保健食品中HCA含量時，pH值對於檢液經固相萃取匣淨化處理之影響情形。

材料與方法

一、材料與設備

(一)試藥試劑

羥基檸檬酸鈣[(-)-hydroxycitric acid tricalcium salt, 97%, HCA-Ca, Fluka]，四丁基硫酸氫銨(tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate, TBAHS, Nakali)，磷酸二氫鉀(potassium dihydrogen phosphate, Merck)，甲酸(formic

acid, Merck)，磷酸(85% ortho-phosphoric acid, Merck)，0.1N 氫氯酸溶液(0.1N hydrochloric acid, Merck)，氨水(28% ammonium hydroxide, Merck)。

(二)設備器材

1. 儀器設備

高效液相層析儀(High performance liquid chromatograph)：Hitachi L-2130 HTA 溶液輸出系統、L-2300 分離管柱恆溫箱、L-2200 自動樣品取樣器，搭配 L-2455 光二極陣列檢出器及 EZCrom 數據處理系統。

2. 層析管柱及固相萃取匣

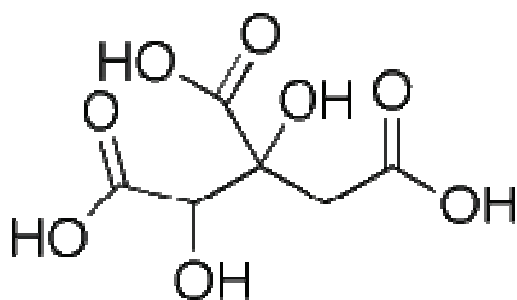
使用 ACE 5 AQ (250 × 3.0 mm, 5 μm) 及 ACE 5 C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm) 層析管柱 (Advanced Chromatography Technologies 產品)，固相萃取管柱 Oasis® MAX (6 mL, 125 mg)(Waters 產品)。

(三)檢體來源

1 件檢體為衛生局送驗樣品，另 2 件為市售檢體，共計 3 件，均標示含藤黃果(或含其萃出成分)，但均未標示經基檸檬酸的含量。

二、標準溶液之調製及標準曲線之製作

取 HCA-Ca 標準品約 10 mg，精確稱定，以去離子水溶解並定容至 10 mL (濃度約 970 μg/mL)，作為標準原液，於 -20°C 避光貯存備用。取標準原液 2.5 mL 及 10% 甲酸溶液 1 mL，以去離子水定容至 5 mL，再以 2% 甲酸溶液稀釋成 30、60、120、240、360 μg/mL，供作標準溶液，進行 HPLC 分析，就標準溶液濃度波峰面積與其對應



圖一、經基檸檬酸結構

濃度製作標準曲線並求出線性迴歸方程式。

三、HPLC分析條件

(一)移動相溶液配製

1. 100 mM 磷酸緩衝溶液(pH 2.5)：取 85% 磷酸溶液 11.5 mL，加入去離子水 800 mL 混合後，以 1N 氫氧化鈉溶液調整 pH 值至 2.5，再以去離子水定容至 1 L。

2. 10 mM tetrabutyl ammonium hydrogen sulfate (TBAHS) 溶液：取 TBAHS 3.4 g，以去離子水溶解並定容至 1 L。

(二)HPLC設定條件

移動相溶液：100 mM H₃PO₄ (pH 2.5)：10 mM TBAHS：乙腈 = 50：48：2 (v/v/v)。

層析管：ACE 5 AQ (250 × 3.0 mm, 5 μm) + ACE 5 C18 (250 × 4.6 mm, 5 μm)。

移動相流速：0.5 mL/min。

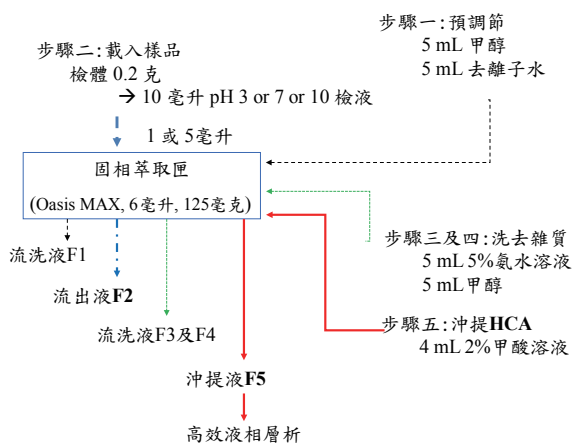
光二極體陣列檢出器：波長 210 nm。

注射體積：20 μL。

四、固相萃取淨化處理(圖二)

(一)檢液pH值調製

分別稱取檢體約 0.2 g，精確稱定，置於三支 15 mL 塑膠離心管中，各加入去離子水約 8 mL，旋渦混合均勻後，分別以 0.5N 氫氧化鈉



圖二、固相萃取淨化處理流程

溶液及2%甲酸溶液，調製為酸性(pH 3)、中性(pH 7)和鹼性(pH 10)三組，以去離子水定容至10 mL，於室溫下超音波水浴萃取30分鐘後，以3000 rpm離心10分鐘，取上清液，供淨化用。

(二)固相萃取匣淨化沖提

取前述經pH調製之供淨化用溶液1 mL，於預先經甲醇和去離子水潤洗之Oasis® MAX (6 mL, 125 mg)固相萃取匣中，依序以5%氨水和甲醇各4 mL沖洗，收集經2%甲酸溶液1 mL逐步沖提數次之濾液，定容至4 mL，經0.45 µm濾膜過濾後，供作檢液。

五、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各20 µL，分別注入高效液相層析儀中，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之。將檢液測得之HCA的波峰面積帶入標準曲線之線性回歸方程式中，求出檢液中HCA濃度，並依下列計算式求得檢體中之HCA含量：

檢體中HCA含量(mg/g) =

$$\frac{C_A}{W} \times D \times V (\text{mL}) \times \frac{1 (\text{mg})}{1000 (\mu\text{g})} \times 0.78$$

C_A ：檢液中HCA-Ca之濃度(µg/mL)

D ：稀釋倍數

V ：定容體積(mL)

W ：取樣檢體分析之重量(g)

0.78：HCA分子量/HCA-Ca分子量

六、添加回收

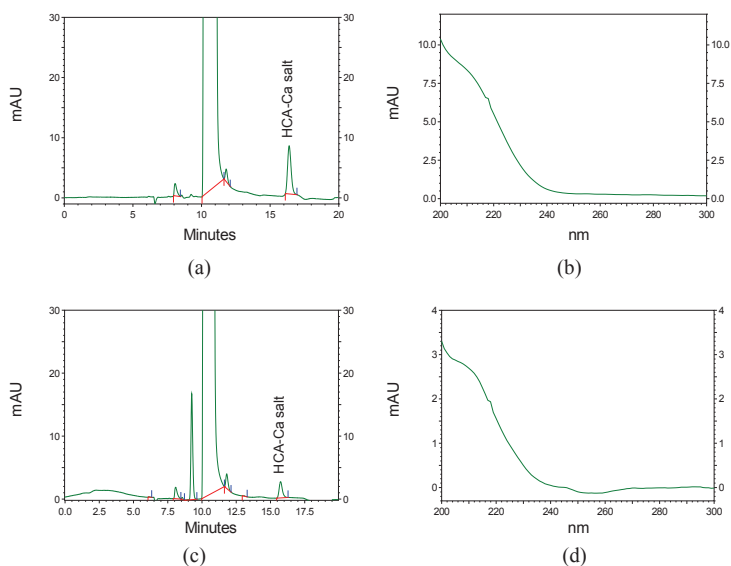
於檢體中分別添加HCA-Ca 1.5及3.0 mg/g，依材料與方法四、五及六節之檢驗步驟，就添加前後之檢測含量之差值與其添加量之百分比值，計算其回收率。

結果與討論

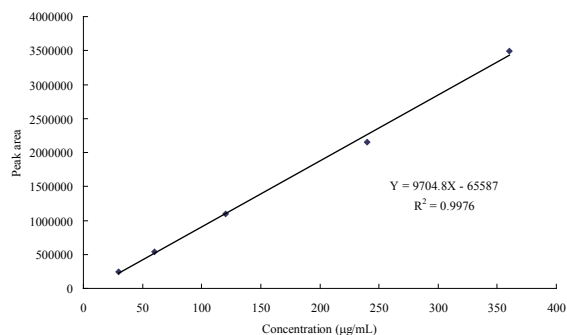
本研究原先採用先前開發之保健食品中經基檸檬酸(HCA)的檢驗方法進行檢體分析⁽¹¹⁾，惟檢體前處理時以同款加大容量之固相萃取匣進行淨化處理方式。雖然對於HCA標準溶液分析並無影響，但對於部分樣品檢液，經固相萃取匣流程時，HCA卻無法有效的滯留在固相萃取匣中而隨著濾液流出，故本研究進一步探討pH對於檢液於淨化處理時之影響情況。

一、HCA的層析圖譜與標準曲線

比較HCA-Ca標準溶液(48.6 mg/mL)經淨化處



圖三、經基檸檬酸標準溶液(46.8 µg/mL)未經固相萃取管柱淨化前之(a) HPLC層析圖譜；(b)吸收光譜圖；經固相萃取管柱淨化之(c) HPLC層析圖及(d)吸收光譜圖



圖四、羥基檸檬酸之標準曲線

理前後之層析圖譜與其吸收光譜圖，其滯留時間及光譜波形一致(圖三)。以HCA-Ca標準品配製成30、60、120、240和360 µg/mL五點濃度之線性回歸方程式為 $Y = 9704.8X - 66587$ 及其決定係數(coefficient of determination, R^2)為0.9976 (圖四)。

二、固相萃取淨化處理

固相萃取淨化處理初步結果，檢液不若標準溶液理想。當檢液載入(loading)固相萃取匣，其流出液(F2)之層析圖顯示，其HCA無法有效滯留於萃取匣而隨著流出液流出。探討添加HCA標準溶液於調製成3種不同pH值之檢體檢液中，使其各含HCA 120 µg/mL檢測結果如下：

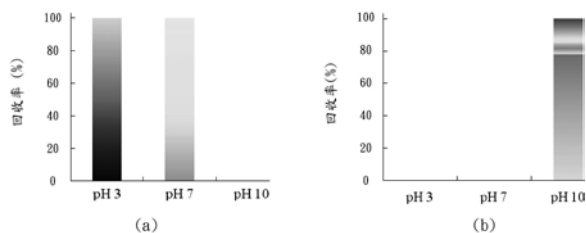
(一)不同pH值檢液載入固相萃取匣後流出液(F2)中HCA流失量：

1 mL鹼性(pH 10)檢液之HCA滯留於固相萃取匣並未流失，至於中性(pH 7)和酸性(pH 3)檢液之淨化處理結果，其HCA均與其他雜質隨著濾液流出。

(二)沖提液(F5)中HCA含量：

1 mL鹼性(pH 10)檢液，以每次1 mL的2%甲酸溶液逐步沖提，收集4次沖提液(F5)定容至4 mL之HCA檢測含量扣除原檢液之HCA含量差值再與其添加量相除之百分比值，其HCA回收率可達99%；至於中性(pH 7)和酸性(pH 3)之檢液中HCA含量，因已隨著流出液(F2)流出而未檢出(圖五)。

對於兼具逆相及陰離子性之固相萃取匣(如Oaiss MAX)而言，將檢液調成鹼性，有利於



圖五、不同pH值之檢液經固相萃取淨化處理效果(a)流出液(F2)及(b)沖提液(F5)之羥基檸檬酸回收情形

其吸附帶負電之離子形態之HCA，大部分非離子性干擾物因此流出，並藉由有機溶液(甲醇)等沖離，去除溶於有機溶液之物質，最後由酸性沖提液，使HCA成為不帶電之中性型態被沖提出來。顯示將檢液調成鹼性，較有利於HCA之淨化效果。

三、回收率

於檢體C中分別添加相當於含HCA 1.17及2.34 mg/g，其回收率分別為85.5及98.3% (表一)。

四、市售檢體之HCA含量

以所建立之檢驗方法分析三件市售標示含藤黃果但均無標示HCA含量之檢體。三件檢體除1件為飲品外，其他2件均為內含粉末之膠囊食品。檢測結果之HPLC層析圖如圖六，其HCA含量分別為13、21及31 mg/g，換算為每日攝取量(daily intake amount, DIA)，其中2件為14及21 mg/day，另1件為3100 mg/day，高於衛生署規定之HCA每日食用限量1500 mg (表二)。

結 論

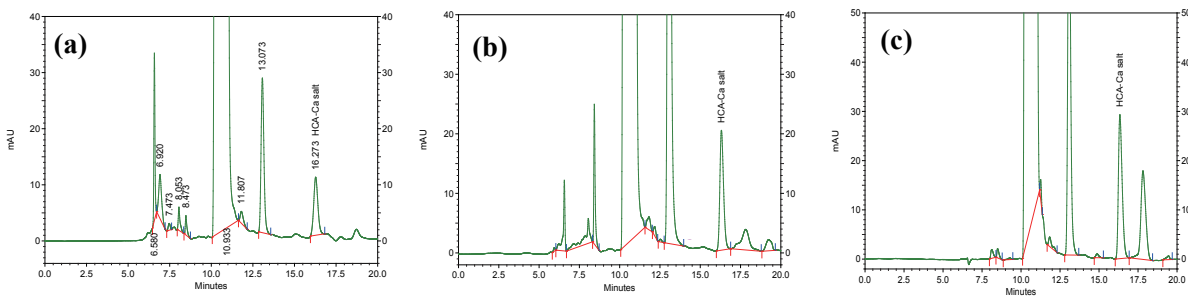
以串聯管柱及適當移動相條件，配合HPLC-

表一、檢體中添加羥基檸檬酸之回收率

添加量(mg/g)	檢測值 (mg/g)	回收率(%)
0	12.9* (0.78**)	—
1.17	13.9 (0.72)	85.5* (9.3**)
2.34	15.2 (0)	98.3 (2.0)

*二重複平均值

**相對差異百分比(relative percent deviation, RPD%)



圖六、市售檢體中HCA之層析圖(a) A品牌內含粉末之膠囊食品；(b) B品牌內含粉末之膠囊食品及(c) C品牌飲品

表二、市售檢體中經基檸檬酸含量

檢體編號	標示建議用量 (份/天)	檢測含量 (毫克/克)	每份 (克/瓶、包、錠)	每日最高用量 (毫克/天)換算值
A	每日2瓶(50毫升/瓶)	31	50	3100
B	每日2次，每次1粒(500毫克/粒)	21	0.5	21
C	每日1-2包	13	0.52	14

DAD檢測保健食品中HCA之含量，並經固相萃取淨化處理，載入鹼性檢液，最後以2%甲酸溶液沖提，所得其回收率可達85.5及98.3%。

3件市售標示含藤黃果但均無標示HCA含量之檢體，其HCA檢測值分別為13、21及31 mg/g，換算為每日攝取量，其中1件高於衛生署規定之每日食用限量1500 mg。

參考文獻

1. Lewis, Y. S. 1969. Isolation and properties of hydroxycitric acid. *Methods Enzymol.* 13: 613-619.

2. Jayaprakasha, G. K. and Sakariah, K. K. 1998. Determination of organic acid in *Garcinia cambogia* (Desr.) by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 806: 337-339.

3. Soni, M. G., Burdock, G. A., Preuss, H. G., Stohs, S. J., Ohia, S. E. and Bagchi, D. 2004. Safety assessment of (-)-hydroxycitric acid and Super CitriMax® a novel calcium/potassium salt. *Food Chem. Toxicol.* 42: 1513-1529.

4. Jena, B. S., Jayaprakasha, G. K. and Sakariah, K. K. 2002. Chemistry and biochemistry of (-)-hydroxycitric acid from *Garcinia*. *J. Agric. Food Chem.* 50(1): 10-22.

5. Lowenstein, J. M. and Brunegraber, H. 1981. Hydroxycitrate. *Methods Enzymol.* 72: 486-497.

6. Shechter, S. R. 1997. Weight loss products. *Health Foods Business* 43(2): 26-57.

7. Saito, M., Ueno, M., Ogino, S., Kubo, K., Nagata, J. and Takeuchi, M. 2005. High dose of *Garcinia cambogia* is effective in suppressing fat accumulation in developing male Zucker obese rats, but highly toxic to the testis. *Food Chem. Toxicol.* 43: 411-419.

8. Hayamizu, K., Issii, Y., Kaneko, I., Shen, M., Skaguchi, H., Okuhara, Y., Shigematsu, N., Miyazaki, S. and Shimasaki, H. 2001. Effects of long-term administration of *Garcinia cambogia* extract on visceral fat accumulation in humans: a placebo-controlled double blind trial. *J. Oleo Sci.* 50: 805-812.

9. 行政院衛生署。2010。草、木本植物類(1) 藤黃果。可供食品使用原料彙整一覽表。[<http://consumer.fda.gov.tw/Food/Material.aspx?nodeID=160#>]。

10. Revathi, R., Ravi, R., Saravanan, V. S., Ethiraj, T. and Sudhamani, T. 2010. Isolation and

characterization of (-) hydroxy citric acid from *Garcinia Cambogia* fruit extract. Int. J. Pharm. Res. Dev. [<http://IJPRD/2010/PUB/ARTI/VOV-2/ISSUE-7/SEP/015>].

11. Wu, P. W. and Pan, J. Q. 2006. Analysis of hydroxycitric acid in dietary supplements by HPLC method. Handbook of 120th AOAC International Annual Meeting & Exposition. Minnesota.

Determination of Hydroxycitric Acid in Dietary Supplements

PAI-WEN WU, CHUN-YI WU, SU-HSIANG TSENG, LIH-CHING CHIUEH AND DANIEL YANG-CHIN SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

An improved analytical method was developed for the determination of hydroxycitric acid in dietary supplements containing *Garcinia cambogia* extract. Sample solution was adjusted to high pH 10 before cleaning up with a solid phase extract cartridge. Analysis was performed by HPLC: equipped with two connected columns eluted with ion-paired phosphate solution (pH 2.5). The hydroxycitric acid was quantified within 20 min and identified by on line photodiode array spectra. Three dietary supplements were analyzed with their hydroxycitric acid contents in the range of 13-31 mg/g.

Key words: hydroxycitric acid, dietary supplements, *Garcinia cambogia* extract, solid phase extract cartridge, HPLC