

反相高效液相色谱法测定保健品中左旋肉碱的含量

胡晓娟^① 张锦 赵 渊

(河南农业大学理学院 郑州市文化路 95 号 450002)

摘 要 建立了反相高效液相色谱测定保健品中左旋肉碱含量的方法。采用 Nucleosil C₁₈ (250mm×4.6mm, 5μm) 色谱柱, 以甲醇-0.05mol·L⁻¹磷酸二氢钾(用 80% 磷酸调 pH 为 2.5) (8:92) 为流动相, 流速为 0.6mL/min, 用紫外检测器在 210nm 波长处检测。标准品及样品均采用 0.5mmol/L 盐酸溶解, 且样品要在 30℃ 下超声提取 30min。结果表明, 左旋肉碱有良好线性关系($r^2=0.9997$), 样品的分离程度较好, 相对标准偏差(RSD)为 1.54%, 加标回收率为 100.08%—117.89%。该方法较为简便, 快速, 有良好的准确度。可用于肉碱类保健品中左旋肉碱含量的测定。

关键词 左旋肉碱; 反相高效液相色谱法; 保健品

中图分类号: O657.7⁺ 2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2011)02-0743-04

1 引言

左旋肉碱(L-Carnitine) 亦称 Vitamin BT, 是一种相对分子量小的类蛋白质分子, 广泛存在于人体的各组织中, 尤以心肌及骨骼肌中含量最高, 大部分机体所需的肉碱成分来源于饮食中的肉类和奶制品。其主要功能是促进脂类代谢, 将长链脂酰基带入线粒体基质, 同时将线粒体内产生的短链脂酰基输出, 调节线粒体内外酰基 CoA/CoA(辅酶 A) 的比率^[1]。左旋肉碱缺乏将干扰脂肪酸的代谢而导致能量合成不足, 出现易疲劳, 肌肉无力, 心慌等症状, 严重者出现代谢紊乱, 昏迷甚至死亡。随着人们对左旋肉碱营养价值的关注及认可, 它已经被越来越多的用于减肥食品, 婴幼儿食品, 饮料, 营养补充剂, 临床等方面^[2]。目前肉碱的检测方法有标准溶液滴定法^[3], 酶技术测定法^[4], 高效液相色谱法^[5]等。标准溶液滴定法较为粗糙, 难以得到肉碱的准确含量; 酶技术测定法主要用于血浆中; 鉴于保健品中肉碱大多是左旋肉碱, 方法可以简化, 本实验采用反相高效液相色谱法测定了泡腾片中左旋肉碱的含量, 弥补了该剂型保健品中左旋肉碱含量测定的空白, 可用于肉碱类保健品中左旋肉碱含量的测定。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

SUMMIT 高效液相色谱仪(美国戴安公司), UVD170V 紫外检测器, Nucleosil-C₁₈ 色谱柱 (250mm×4.6mm, 5μm), 变色龙(Chromeleon) 色谱工作站; KQ-500B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); pHs-2C 型实验室 pH 计(上海宇隆仪器有限公司); BS 110S 型电子天平(德国 Sartorius 公司)。

^① 联系人, 手机: (0) 13838023668; E-mail: huxjx@163.com

作者简介: 胡晓娟(1966—), 女, 郑州市人, 副教授, 学士, 主要从事天然产物的提取和检测研究工作。

收稿日期: 2010-07-10; 接受日期: 2010-08-06

甲醇(色谱纯);磷酸二氢钾、庚烷磺酸钠和盐酸均为分析纯;左旋肉碱标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer 公司)。实验用水为超纯水。

2.2 色谱条件

色谱柱: Nucleosil C₁₈(250mm×4.6mm, 5μm) 色谱柱; 流动相: 甲醇-0.05mol/mL 磷酸二氢钾缓冲溶液(pH=2.5)(体积比 8:92); 流速: 0.6mL/min; 检测波长: 210nm; 柱温: 20℃; 进样量: 20μL。

2.3 缓冲溶液的配制

称取 6.8045g 磷酸二氢钾及 0.4045g 庚烷磺酸钠,溶于 500mL 水中,用磷酸调 pH 为 2.5。装于棕色试剂瓶中,备用。实验表明,缓冲溶液中加入庚烷磺酸钠能使左旋肉碱更加稳定,使测定的结果更加准确。

2.4 标准溶液的配制

准确称取 50.0mg 左旋肉碱标准品,用 0.5mmol/L 盐酸溶解并定容至 25mL,配制成 2000μg/mL 的标准储备液。

2.5 样品处理

取肉碱泡腾片两片(3.5951g)溶于 100mL 水中,30℃超声提取 30min,取 5mL 置于 25mL 容量瓶中,用 0.5mmol/mL 盐酸定容至刻度,同样方法配制平行样 3 份,分别记为样品 1、2、3。用孔径为 0.45μm 的滤头过滤后,置于小离心管中,作为待测液。

3 结果与讨论

3.1 色谱条件的筛选

3.1.1 缓冲溶液的 pH 值

在反相高效液相色谱分析中,pH 值对所分析化合物的保留时间,峰形都会产生较大的影响。实验中随着 pH 的增加,保留时间延长。尝试了不同 pH 值(2.3、2.5、2.9)的缓冲溶液,综合考虑色谱柱,保留时间,分离效果等多方面因素最终选择 pH 2.5 的缓冲溶液。

3.1.2 流动相的选择

由于左旋肉碱在 210nm 时有最大吸收,而甲醇在此波长下会出现明显的溶剂峰,所以实验初期,曾尝试用乙腈作为流动相,但实验结果表明,用乙腈作为流动相时的峰形不理想,而甲醇作为流动相时的峰形及保留时间都较为理想,所以最终忽略了甲醇的溶剂峰,选择了甲醇作为流动相。考察了甲醇比例为 15%、10%、8%、5% 时的情况,发现保留时间随甲醇比例的增大而减小,甲醇比例较低时分离效果较好,综合考虑最终选择了甲醇比例为 8%。

3.1.3 流速和柱温的选择

实验中尝试不同的流速 1.0、0.8、0.6mL/min,只有在 0.6mL/min 时样品的分离程度较为理想;考察柱温为 30、25、20℃,在 20℃ 时样品的分离效果最好。故选择流速为 0.6mL/min,柱温为 20℃。

3.2 校准曲线

分别取 1.0、2.0、4.0、6.0、8.0mL 左旋肉碱标准储备液置于 10mL 容量瓶中,用 0.5mmol/L 盐酸定容,配成 200、400、800、1200、1600μg·mL⁻¹ 的左旋肉碱标准溶液。经 0.45μm 滤膜过滤后,按色谱条件进样 20μL 测定,以峰面积 y (mAU·min) 为纵坐标,肉碱浓度 x (μg/mL) 为横坐标绘制

校准曲线。结果表明左旋肉碱在 200—1600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内有良好线性关系, 线性回归方程为 $y = 0.0068x - 0.0539$, $r^2 = 0.9997$ 。标准品色谱图见图 1。

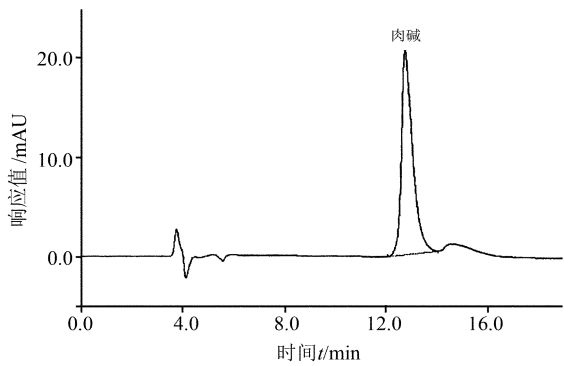


图 1 左旋肉碱标准品的 HPLC 色谱图

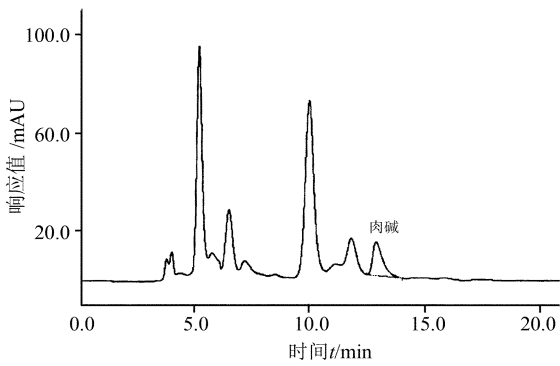


图 2 样品的 HPLC 色谱图

3.3 样品的测定

取待测液按照 2.2 中色谱条件分别进样, 每个样品平行进样两次, 结果取平均值, 计算出样品中左旋肉碱含量 0.2211 g/g 。样品的 HPLC 谱图见图 2。样品的相对标准偏差(RSD)为 0.70%。

3.4 精密度实验

选取 1200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的左旋肉碱标准溶液进行精密度实验, 按照 2.2 中色谱条件连续进样 5 次, 相对标准偏差(RSD)为 1.54%。

3.5 加标回收实验

为了考察方法的可靠性, 对实验结果进行了加标回收率实验, 结果见表 1。本方法的回收率在 100.08%—117.89% 之间。

表 1 加标回收率实验结果

	基础值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加标值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测定值 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	669.68	600	1374.65	117.50	109.51
2	669.68	600	1377.03	117.89	
3	669.68	800	1470.31	100.08	
4	669.68	800	1490.21	102.57	

3.6 稳定性实验

取同一批样品, 室温放置 2、6、12、16、18h, 按 2.2 色谱条件进行测定, 肉碱浓度基本稳定。

4 结论

本方法简单, 易于掌握, 重复性和再现性都比较好。可用于肉碱类保健品中左旋肉碱含量的测定和产品质量控制。

参考文献

[1] Selinek K G, Joheinh H. The Determination of L-Carnitine in Several Food Samples[J]. *Food Chem.*, 2007, **105**(2): 793—804.
[2] 周书凤. 左旋肉碱——一种人体特定条件下的必需营养素[J]. 国外医学 卫生学分册, 1996, **23**(1): 33—35.
[3] 中华人民共和国国家标准. 食品添加剂 左旋肉碱[S]. GB/T 17787-1999. 北京: 国家质检总局、国家标准委, 1999. 7—12.
[4] 贺稚非, 王勇德. 新型营养剂 L-肉碱的检测研究[J]. 肉类工业, 2000, **7**: 32—34.
[5] 伟霞, 杨冀州, 刘亚风等. 保健品中左旋肉碱的反相高效液相色谱法测定[J]. 分析测试学报, 2008, **27**(10): 1124—1127.

Determination of *L*-Carnitine in Health Food by RP-HPLC

HU Xiao-Juan ZHANG Jin ZHAO Tian

(College of Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, P. R. China)

Abstract A method for analysis of the content of *L*-carnitine in health food by HPLC was developed. The samples were separated on a C₁₈ column (250mm × 4.6 mm, 5μm) using methanol-potassium dihydrogen phosphate (0.05mol/L) (pH = 2.5) (8 : 92) as mobile phase at a flow rate of 0.6mL/min and with UV detection at 210nm. Standard products and sample were dissolved by 0.5mol/L hydrochloric acid. And the samples need to be extracted 30min under 30℃. The method has good linearity (correlation coefficients of 0.9997), and the relative standard deviation is 1.54%. The recoveries of *L*-carnitine were 100.08%—117.89%. The method is simple, quick and suitable for the determination of *L*-carnitine in health food.

Key words *L*-Carnitine; RP-HPLC; Health Food

穷酸的西南联大与 3 位诺贝尔奖得主 ——真正意义上的世界一流大学

西南联大的历史,前后不过 8 年半(1937 年 9 月至 1946 年 5 月)。当年的物质条件可够穷酸的:学生宿舍无一砖一瓦,全是夯黄土为墙,堆茅草为顶,窗户没有一块玻璃,仅有几根树枝聊以象征。绝大多数师生经常是食不果腹,衣不蔽体,不时还要在敌机轰炸下逃生。在校学生不超过 2000。可是当年的西南联大,在三不管的地方,坚守大学理想,主张“教授是大学的灵魂”,实行“不妄用一钱,不妄用一人”,教师为爱国而教,学生为救国而学,吃红薯干,点桐油灯,以苦为乐,励精图治,弦歌不辍,为人师表,一身正气,人格独立,不党不官,沉潜专注,甘于寂寞。一言以蔽之,“五·四”运动所倡导的“科学和民主”精神之传承与发扬光大也!因此,培养出 3 位诺贝尔奖得主——杨振宁和李政道,另一位则是朱棣文(其父朱汝瑾是联大助教,其姑朱汝华是教授——曾昭抡的得意门生)。

拥有国家一流的教授阵容;运行一套“思想自由,兼容并包”和纯粹研究学问的办学理念;推行一种通才教育的培养目标;有一位深孚众望的校长——这些因素奠定了西南联大堪称世界一流大学的基础。

西南联大身后的三校(北大、清华和南开),当今在校学生总数当在 60000—70000 之间,相当于当年的 30 多倍,三校校园内高楼大厦林立,与当年西南联大的茅屋草舍相比,真是天壤之别。所耗费的资金当在西南联大的数百倍以上。三校的年寿,从 1950 年算起,已有 59 年,若从改革开放算起,亦有 30 年,为当年西南联大寿命的 4 倍至 5 倍。以人力、财力和时间来看,都是当年西南联大无法望其项背的。以如此优越的条件和实力,却培养不出世界一流杰出的人才——60 年来无 1 人获得诺贝尔奖,其故安在!?

清华大学 1 位教授在美国访问时发现,世界一流的哈佛大学大门,却是十分古旧俭朴的:拱型的门洞是用红砖砌的,中间是铁制的大门,门框上面是三角形的尖顶。两边的围墙也是红砖砌的,中间是陈旧的铁制护栏。但是而今中国学校的大门,甭说大学,就是一些重点中学的校门,也比哈佛大学的壮观。在一些国人看来,似乎要成为世界一流大学、一流中学就在于校门以及办公大楼的气派和壮观!?

我国是世界最大的发展中国家(最大的穷国),美国是世界最大的发达国家(最大的富国)。这位清华大学教授还看到在这世界最大的富国中,名牌大学的办公大楼和办公家具仍是俭朴的:楼房大多是 3 层的,上个世纪的转盘电话和用过多年的木制家具还在使用。而在我们这个世界最大的穷国中的某些名牌大学,转盘电话和古朴的木制家具早已(淘汰)不见踪影!仿佛这些“过时”的东西,与名牌大学的“身份”太不相称了吧!。

清华大学前校长梅贻琦说过:“大学者,非谓有大楼之谓也,有大师之谓也”。靠浮华的“形象工程”能建成世界一流名牌大学吗?

早在两千多年前,古希腊哲学大师亚里士多德就说过,产生杰出的思想家和杰出发明家需要三个条件:一是对学问有真正的兴趣,二是有充分的思想自由,三是有充足的闲暇时间。

北京大学前校长蔡元培说过,“大学并不是贩卖毕业证的机关,也不是灌输固定知识的机关,而是研究学问的机关。所以,大学的学生并不是熬资格,也不是硬记教员讲义,是在教员指导之下自动地研究学问的。”“尤当养成学问家之人格”。“所以延聘教员,不但是求有学问的,还要求于学问上很有研究的兴趣,并能引起学生的研究兴趣的。”

这些举世公认的学术大师的忠告,也许正是我们办大学需要深刻反思的。(2011-01-16)

(本刊摘编自《随笔》杂志 2008 年第 2 期何兆武《关于诺贝尔奖情节》等文)