

离子对反相高效液相色谱法测定保健食品中肉碱^{*}

赵 榕 孙开奇 罗仁才

(北京市疾病预防控制中心,北京 100013)

肉碱(Carnitin),分子式为 $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2(\text{COO}^-)$,化学名称为 β -羟基- γ -三甲基氨基丁酸,是一种低分子、水溶性营养素。^[1]肉碱不仅在脂肪酸的 β -氧化过程中,作载体将长链脂肪酸转运入线粒体进一步氧化,而且在生酮作用、生热作用、支链氨基酸代谢、防止高脂酰辅酶A的毒性蓄积以及游离辅酶A的再生方面均有一定的生理功能。^[2]近来研究发现肉碱在心血管病治疗、^[3]肝肾病治疗、^[3]减肥、^[3]提高运动能力、^[3,4]抗衰老^[5]等方面具有重要的作用。目前,以肉碱为主要原料和功效成分保健食品很多,为此,我们在卫生部基金资助下,建立了离子对反相高效液相色谱法测定营养保健食品中肉碱。

1 材料与方法

1.1 方法原理 试样中的肉碱以0.5 mmol/L盐酸超声提取,在酸性流动相中带正电和带负电的离子对与试剂辛烷磺酸钠结合形成疏水性离子对,经反相色谱分离,与标准的保留时间比较定性,以峰面积外标法定量。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 Waters 高效液相色谱系统 配有2487紫外检测器;510泵;Millennium32工作站。超声波提取器。溶剂微孔过滤器带0.45 μm 水相滤膜。色谱条件:Shim-pack CLC-ODS色谱柱(岛津公司),4.6 mm $\times$ 200 mm;检测波长:210 nm;流动相:称取3.4 g磷酸二氢钾溶液(0.05 mol/L)及0.22 g辛烷磺酸钠(0.002 mol/L)溶于500 mL水中,用磷酸调pH=2.5,乙腈(色谱纯)含量为10%;流速:1 mL/min。

1.2.2 肉碱标准溶液 准确称取肉碱标准品(Sigma公司提供)0.0200 g,用0.5 mmol/L盐酸溶解并定容为10.0 mL,此溶液含肉碱为2.0 mg/mL。

1.2.3 0.50 mmol/L 盐酸。

除特殊说明,所用试剂均为分析纯。实验用水为超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 试样制备 固体试样取20 g左右,混合均匀,粉碎,称取0.5 g(含肉碱约40 mg);液体试样取5.0 mL,于50 mL容量瓶中,加入0.50 mmol/L盐酸约35 mL,超声提取10 min,用0.50 mmol/L盐酸定容,混匀,过滤,弃初滤液数毫升,收集滤液,过0.45 μm 水相滤膜,为试样处理液。供HPLC分析。

1.3.2 色谱分析 分别取标准溶液及试样10 μL 进样。根据保留时间定性,试样峰面积与标准峰面积比较定量。

1.3.3 结果计算 $X = C \times V/M$ 式中: X 为试样中肉碱含量,mg/g; C 为试样处理液中肉碱的浓度,mg/mL; V 为试样定容体积,mL; M 为试样重量,g。

2 结果与讨论

2.1 分离体系的选择 分别用反相液相色谱、离子交换色谱以及离子对反相液相色谱等分离体系对肉碱进行了测试,由于反相液相色谱法色谱柱对其不保留,离子交换色谱法峰形不好且灵敏度达不到要求,因此,反相色谱法和离子交换色谱法不能用于肉碱的分离和测定。根据肉碱的性质,对溴化四丁胺及辛烷磺酸钠2类不同性质离子对试剂进行了测试,使用溴化四丁胺作为离子对试剂时,肉碱得不到很好的分离,而辛烷磺酸钠作为离子对试剂时,可以得到较好的分离效果、峰形及灵敏度。因此选择以辛烷磺酸钠作为离子对试剂的反相液相色谱法用于肉碱的分离和测定。

2.2 色谱条件的选择 流动相中离子对试剂的浓度、盐浓度、pH值以及乙腈浓度的条件实验。

在1.0、2.0及3.0 mmol/L浓度下,分别对离子对试剂辛烷磺酸钠的影响进行了实验。结果表明,随着辛烷磺酸钠浓度的加大,肉碱的保留时间增长。但是,离子对试剂对色谱柱损害较大,因此,我们确定辛烷磺酸钠的浓度为2.0 mmol/L。

由于离子对反相液相色谱要求较严格的pH值范围,所以选择磷酸二氢钾-磷酸作为缓冲体系。通过对磷酸二氢钾浓度以及pH值的选择,当磷酸

^{*}卫生部基金资助课题(BJ-01-20)

二氢钾浓度为 0.05 mol/L、pH = 2.5 时,标准品及试样均可以得到较稳定的分离测定结果。

实验表明,随着乙腈浓度的不断加大,肉碱的保留时间不断缩短。因此,在 0.05 mol/L 磷酸二氢钾、2.0 mmol/L 辛烷磺酸钠、pH = 2.5、10 %乙腈的色谱条件下,出峰时间为 9 min 左右,不受杂质及试剂的干扰,能够达到实验的要求。在此条件得到了标准谱图(图 1)及试样谱图(图 2)。

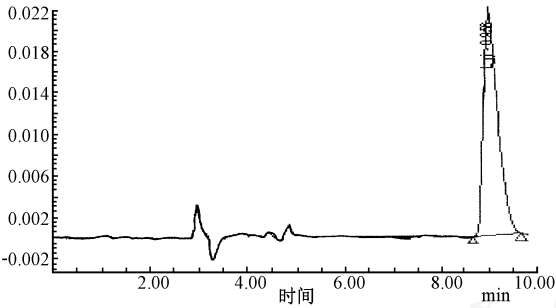


图 1 标准谱图

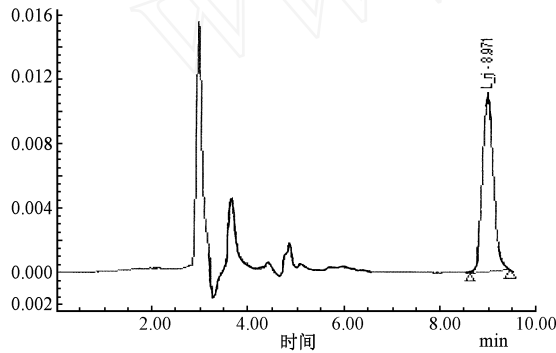


图 2 试样谱图

2.3 提取条件的选择 实验证明,用 0.50 mmol/L 盐酸提取试样中肉碱与用纯水提取效果均较好,但在酸性条件下有利于肉碱与辛烷磺酸钠形成稳定的离子对,因此本方法选择 0.50 mmol/L 盐酸作为提取液。

2.4 方法的精密度和准确度实验 在不同时间对同一试样进行了测定,结果见表 1。在对照试样中分别加入肉碱 0.9、0.4 mg/mL 进行了准确度实验,结果见表 2。

2.5 方法线性范围、检出限、最低检出浓度及试样含量 方法的线性范围为 0.0 ~ 2.0 mg/mL,回归方程为 $y = 473x - 192$,相关系数 $r = 0.9991$;本方法检

出限为 13.7 $\mu\text{g/mL}$;当试样的取样量为 0.5 g 时,方法的最低检出浓度为 1.37 mg/g。

表 1 精密度实验结果 mg/g

试样编号	测定结果	测定次数 <i>n</i>	平均值	RSD %
1	127.6 ~ 133.4	6	131.7	5.41
2	129.3 ~ 134.2	6	132.2	5.21
3	128.0 ~ 135.2	6	131.2	5.92
4	127.8 ~ 132.9	6	130.1	4.80
5	128.6 ~ 135.3	6	132.4	5.11
6	129.7 ~ 133.2	6	131.2	4.31

表 2 准确度实验结果 mg/mL

试样编号	本底值	加标量	测定次数	测定值	回收率范围 %	平均回收率 %
1	1.30	0.9	6	2.12 ~ 2.21	91.0 ~ 101.1	95.8
2	1.30	0.4	6	1.68 ~ 1.71	95.0 ~ 102.5	97.2

3 实际样品的测定 用所建立的方法检测实际样品,结果见表 3。

表 3 实际样品测定结果

试样编号	肉碱含量(mg/g)
1	9.4 ~ 9.6
2	13.0 ~ 15.0
3	80.0 ~ 90.0
4	110.0

参考文献:

[1] 周键鸿,刘冬生. 强化 L - 肉碱对幼鼠生长和脂肪代谢的影响[J]. 营养学报,1996,18(2) :209—213.

[2] 周键鸿,刘冬生. 肉碱与婴儿配方食品[J]. 国外医学卫生学分册,1994,21(5) :290—293.

[3] 周书凤,何志谦. 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.

[4] 李志敢. L - 肉碱对运动能力的影响[J]. 现代康复,2000,4(3) :360—361.

[5] 朱寿民. 对肉碱的新认识——作为延缓衰老特别是脑衰老的因子[J]. 营养学报,1999,21(2) :226—228.

[收稿日期:2001 - 11 - 22]

中图分类号:R15;O657.7⁺2;TS218 文献标识码:B

文章编号:1004 - 8456(2002)04 - 0025 - 02