

高效液相色谱法测定保健食品中左旋肉碱含量

莫紫梅*, 韦春梦

(广西-东盟食品药品安全检验检测中心, 南宁 530021)

摘要: **目的** 建立高效液相色谱(HPLC)测定口服液中左旋肉碱含量的方法。**方法** 样品经 0.5 mmol/L 盐酸溶液超声提取, 采用 CAPCELL PAK ACR C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.002 mol/L 辛烷磺酸钠溶液(加入 0.125%磷酸二氢钾、0.125%磷酸氢二钾, 用磷酸调 pH3.0)-乙腈(92: 8, V:V)为流动相, 流速 1.0 mL/min, 检测波长: 210 nm, 柱温: 25 °C。**结果** 左旋肉碱的浓度在 150.1~1800.7 μg/mL 范围内呈良好的线性关系($r = 0.9999$), 平均加样回收率为 95.50%, RSD 为 2.0%($n = 6$)。**结论** 本方法快速、准确、重复性好, 可作为口服液类辅助降血脂保健食品的质量控制方法。

关键词: 高效液相色谱; 保健食品; 左旋肉碱

Determination of *L*-carnitine in health foods by high performance liquid chromatography

MO Zi-Mei*, WEI Chun-Meng

(Guangxi-ASEAN Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of *L*-carnitine in health foods by high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** The separation was performed on a CAPCELL PAK ACR C₁₈ column with the mixture of acetonitrile-0.002 mol/L 1-octanesulfonic acid solution (8:92, V:V) containing 0.125% potassium dihydrogen phosphate and 0.125% dipotassium phosphate with pH 3.0 as mobile phase. Detection wavelength was 210 nm and flow rate was 1.0 mL/min with the column temperature of 25 °C. **Results** The linear range for *L*-carnitine was from 150.1 μg/mL to 1800.7 μg/mL, and the average recovery was 95.50% with a RSD of 2.0% ($n=6$). **Conclusions** This method is accurate, simple and sensitive, and can be used for the quality control of the health foods with oral liquids.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; health food; *L*-carnitine

1 引言

左旋肉碱是一种促进脂肪转化为能量的类氨基酸, 具有提高血液中高密度脂蛋白水平作用, 能加快细胞对脂肪的消耗, 具有抗氧化、抗衰老和提高人体免疫力等功能^[1,2]。机体中的肉碱主要来源于日常的膳食和自身的合成, 一般不会出现缺乏。额外服用左旋肉碱, 有利于氧化消耗

掉更多的脂肪, 因此成为辅助降血脂类保健食品中经常添加的一种成分^[3]。

目前, 文献报道测定左旋肉碱的方法有紫外分光光度法^[4-9]、离子色谱法^[1]、液质联用法^[10]、柱前衍生法^[11,12]和酶反应试剂盒法。这些方法, 或因前处理繁琐, 影响实验效率; 或因所用仪器昂贵, 通用性不够等, 未得到推广应用。左旋肉碱分子极性较大, 在色谱柱上保留不

*通讯作者: 莫紫梅, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测。E-mail: 269636574@qq.com

*Corresponding author: MO Zi-Mei, Engineer, Guangxi-ASEAN Food and Drug Safety Inspection and Testing Center, No.9, Qinghu Road, Qingxiu District, Nanning 530021, China. E-mail: 269636574@qq.com

好,高效液相色谱(HPLC)法测定纤体、减肥、降血脂产品中的左旋肉碱主要解决两方面的问题^[13-15],一是延长在反相柱的保留,二是提高检测的灵敏度。本文主要研究 HPLC 法测定口服液类辅助降血脂保健食品中左旋肉碱的含量。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

Waters 2695 高效液相色谱仪-配紫外检测器(美国 Waters 公司);Mettler AE 260 十万分之一电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。乙腈、辛烷磺酸钠(均为 HPLC 级,美国 Fisher 公司),盐酸、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾(均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司),磷酸(分析纯,广东光华科技股份有限公司),水为超纯水。左旋肉碱标准品(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH, LOT: 114K1492),含量 $\geq 99.0\%$;花红牌飞燕(HHFY)口服液,为花红药业有限公司生产。

2.2 色谱条件

采用 CAPCELL PAK ACR C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m),以 0.002 mol/L 辛烷磺酸钠溶液(加入 0.125%磷酸二氢钾、0.125%磷酸氢二钾,用磷酸调 pH 3.0)-乙腈(92: 8, V:V)为流动相,流速 1.0 mL/min,检测波长: 210 nm,柱温: 25 $^{\circ}$ C,进样量: 10 μ L。

2.3 标准曲线的制备

取经干燥至恒重的左旋肉碱标准品适量,精密称定,置棕色量瓶中,加入 0.5 mmol/L 盐酸溶液溶解,制成浓度约为 2 mg/mL 标准品储备溶液。

精密吸取标准品储备溶液 0.75、1.50、3.00、6.00、9.00 mL 分别置于 10 mL 量瓶,加入 0.5 mmol/L 盐酸溶液

稀释至刻度,摇匀,配制成浓度范围为 150.1 ~ 1800.7 μ g/mL 的标准曲线溶液,取 10 μ L 进样,测定峰面积。以峰面积为纵坐标,左旋肉碱的质量浓度(μ g/mL)为横坐标,进行线性回归。

2.4 供试品制备

取 5 支口服液混合均匀,准确量取样品 1.00 mL,置 100 mL 量瓶中,加入 0.5 mmol/L 盐酸溶液约 35 mL,超声 10 min,放冷,加入 0.5 mmol/L 盐酸溶液稀释至刻度,混匀,过 0.45 μ m 微孔滤膜后,取滤液进样分析。

3 结果与分析

3.1 色谱条件的选择

左旋肉碱是两性化合物,在酸性流动相溶液中,羧基电离被抑制,而季铵基团带正电荷,与流动相中辛烷磺酸根阴离子形成离子对,在 C₁₈ 柱上有保留^[2]。考察流动相的 pH 与保留时间的关系,结果表明,当 pH 在 2.5 到 3.5 范围内,降低流动相的 pH,峰形改善并延长保留时间,大于 3.3 时,色谱峰呈较为明显的前沿峰,综合考虑分离度、柱子耐受性、保留时间等因素,选择 pH 3.0。

左旋肉碱结构中,羧基上的碳氧双键有紫外末端吸收,灵敏度低,干扰因素多。考察乙腈和甲醇做为流动相在测定中的差别,对比试验表明,甲醇、乙腈在分离和保留左旋肉碱上并没有明显差别,考虑到乙腈洗脱能力更强,选用乙腈做为流动相体系之一。考察了乙腈比例 12%、10%、8%和 5%,发现左旋肉碱保留时间随乙腈比例的增大而减小,乙腈比例 8%时,口服液中左旋肉碱与其他杂质的分离效果较好,综合考虑选择乙腈比例为 8%。即采用“2.2 色谱条件”进样,见图 1。

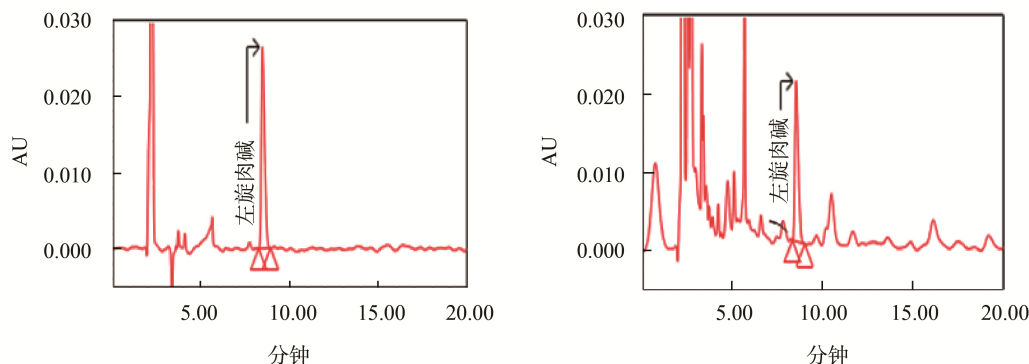


图1 左旋肉碱标准品及供试品的 HPLC 图

Fig. 1 Chromatograms of L-carnitine and sample

注:图 a 为左旋肉碱标准品 HPLC 图谱;图 b 为 HHFY 口服液 HPLC 图谱

3.2 样品提取方法确定

左旋肉碱有较好的水溶性和醇溶性, 本文研究了甲醇-水、乙醇-水、0.5 mmol/L 盐酸水溶液进行样品前处理, 结果发现, 用不同比例甲醇-水、乙醇-水提取的样品, 杂质较多, 无法与左旋肉碱分离, 且峰形拖尾, 影响左旋肉碱的分析; 而 0.5 mmol/L 盐酸水溶液提取的样品, 在流动相比比例合适的条件下, 可与杂质完全分离, 且峰形对称。可能是由于 HHFY 口服液是以左旋肉碱、葛根、山楂、甜菊糖苷为原料制成, 口服液中含有在酸性水溶液中溶解度较差的物质^[1], 如黄酮类物质, 减少了对样品的干扰。

3.3 标准曲线

在 2.2 色谱条件下, 取系列浓度左旋肉碱标准曲线溶液进样 10 μL, 以峰面积(Y)为纵坐标, 左旋肉碱的质量浓度(μg/mL)(X)为横坐标, 进行线性回归。左旋肉碱的线性方程分别为 $Y=157X-929(r=0.9999)$ 。结果表明左旋肉碱在 150.1~1800.7 μg/mL 浓度范围内具有良好的线性关系, 见图 2。

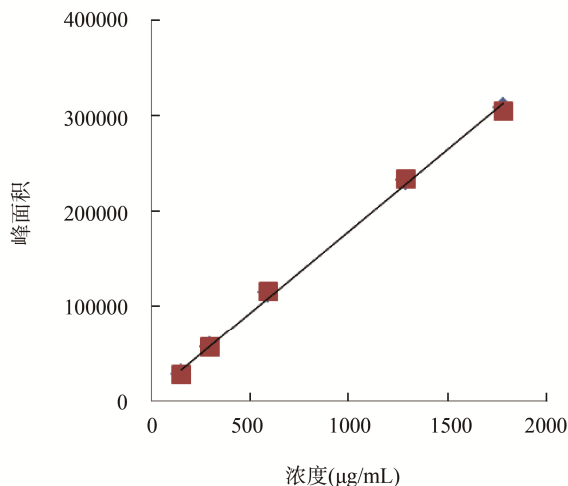


图 2 标准曲线图
Fig. 2 The diagram of standard curve

3.4 精密度试验

取同一标准曲线溶液 1 份, 连续进样 5 次, 测定峰面积, 结果左旋肉碱峰面积的 RSD 分别为 0.56%。表明仪器精密度良好。

3.5 重复性试验

取供试品溶液 6 份, 精确量取 1.00 mL, 分别置 100 mL 量瓶中, 按 2.4 项下方法制备供试品溶液, 依次操作, 得到 6 次结果的 RSD 为 1.6%, 表明方法重复性良好。

3.6 稳定性试验

取同一供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8、10 h 进样 10 μL 进行测定, 结果左旋肉碱的峰面积 RSD 为 2.0%(n=6), 表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

3.7 加标回收率试验

取 5 支口服液混合均匀, 准确量取 1.00 mL, 置 100 mL 量瓶中, 共 6 份, 分别精密加入一定量的对照品溶液, 按 2.4 项下方法制备样品共 6 份, 所得平均回收率 95.50%, RSD 为 2.0%(n=6), 结果见表 1。

3.8 样品测定

取样品按 2.4 项下方法进行样品制备, 分别精密吸取对照品溶液、供试品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪测定, 计算左旋肉碱含量为 8.7 g/100 mL(RSD = 2.0%, n = 3)。

4 结 论

本实验采用 HPLC 法测定保健食品中左旋肉碱含量, 操作简单, 专属性高, 并进行了方法学考察, 结果表明该方法精确可靠, 可作为口服液类辅助降血脂保健食品功效成分控制方法。

表 1 左旋肉碱回收率试验结果(n=6)
Table 1 Recovery of L-carnitine (n=6)

序号	加入量(mg)	取样量(mL)	样品含量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
1	9.85	1.00	87.02	96.33	94.53	95.50	2.0
2	9.85	1.00	87.02	96.48	96.05		
3	9.85	1.00	87.02	96.16	92.79		
4	24.62	1.00	87.02	110.98	97.31		
5	24.62	1.00	87.02	110.26	94.38		
6	24.62	1.00	87.02	111.13	97.93		

参考文献

- [1] 邹晓莉, 周艳阳, 乔蓉, 等. 高效阴离子色谱法快速分析保健食品中的左旋肉碱[J]. 卫生研究, 2011, 40(3): 358–361.
Zou XL, Zhou YY, Qiao R, *et al.* Rapid analysis of *L*-carnitine in health food by high performance anionexchange chromatography with pulsed amperometric detector [J]. J Hyg Res, 2011, 40(3): 358–361.
- [2] 宋周虎, 周璐意, 胡晓敏, 等. 离子对色谱法测定保健食品中左旋肉碱的含量[J]. 今日药学, 2014, 24(05): 337–339.
Song ZH, Zhou LY, Hu XM, *et al.* Determination of *L*-carnitine in health food by ion-pair high performance liquid chromatography [J]. Pharm Today, 2014, 24(05): 337–339.
- [3] 董军, 陈成, 勇艳华, 等. 亲水作用色谱法测定保健食品中的左旋肉碱[J]. 食品工业, 2013, 34(9): 191–193.
Dong J, Chen C, Yong YH, *et al.* Determination of *L*-carnitine content by hydrophilic interaction liquid chromatography (hilic) in health food [J]. Food Ind, 2013, 34(9): 191–193.
- [4] 左惠心, 张玉斌, 黄明明, 等. 分光光度法测定牦牛不同脏器中左旋肉碱方法优化及含量分析[J]. 食品工业科技, 2014, 35(2): 54–59.
Zuo HX, Zhang YB, Huang MM, *et al.* Optimization the *L*-carnitine determination by spectrophotometric method and comparison of content in the yak organs [J]. Sci Technol Food Ind, 2014, 35(2): 54–59.
- [5] 单艺, 王象欣, 赵秋莲, 等. UPLC-MS /MS 法与分光光度法测定乳及乳制品中左旋肉碱的比较[J]. 食品与发酵工业, 2014, 40(6): 152–158.
Shan Y, Wang XX, Zhao QL, *et al.* Comparison of ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and spectrophotometry in the determination of *L*-carnitine in milk and dairy products [J]. Food Ferment Ind, 2014, 40(6): 152–158.
- [6] 金世梅, 赵志红, 朱慧, 等. 分光光度法检测保健茶中左旋肉碱[J]. 粮食与食品工业, 2011, 18(5): 54–59.
Jin SM, Zhao ZH, Zhu H, *et al.* Determination of *L*-carnitine in sanitarian tea with spectrophotometry [J]. Cereal Food Ind, 2011, 18(5): 54–59.
- [7] 王文特, 任雪梅, 周传静, 等. 反应温度和时间对分光光度法测定乳粉中左旋肉碱的影响[J]. 山东农业科学, 2013, 45(11): 120–122.
Wang WT, Ren XM, Zhou CJ, *et al.* Effects of reaction temperature and time on spectrophotometric determination of *L*-carnitine in milk powder [J]. Shandong Agric Sci, 2013, 45(11): 120–122.
- [8] 孙娜, 余群力, 曹晖. 超声波辅助高氯酸法提取牛肝中左旋肉碱工艺优化[J]. 农业工程学报, 2012, 28(21): 280–286.
Sun Na, Yu QL, Cao Hui. Optimizing of ultrasonic wave-assisted extraction process of *L*-carnitine from bovine liver [J]. Trans CSAE, 2012, 28(21): 280–286.
- [9] 张丹妮, 曹扬, 张华燕, 等. 婴幼儿奶粉中左旋肉碱测定的不确定度[J]. 农产品加工·学刊, 2011, 8: 96–99.
Zhang DN, Cao Y, Zhang HY, *et al.* Determination of uncertainty of *L*-carnitine in infant milk powder [J]. Acad Period Farm Prod Process, 2011, 8: 96–99.
- [10] 竺琴, 苏流坤, 郑家概, 等. 高效液相色谱-质谱联用测定婴幼儿配方奶粉中的左旋肉碱[J]. 分析测试学报, 2012, 31(3): 355–358.
Zhu Q, Su LK, Zheng JK, *et al.* Determination of *L*-carnitine in infant formula milk powder by highperformance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. J Instrum Anal, 2012, 31(3): 355–358.
- [11] 翟旭峰, 肖小春, 李养学, 等. 反相高效液相色谱法测定纤体产品中左旋肉碱的含量[J]. 中中药学, 2014, 12(9): 912–915.
Zhai XF, Xiao XC, Li YX, *et al.* RP-HPLC determination of *L*-carnitine in slimming products [J]. Central South Pharm, 2014, 12(9): 912–915.
- [12] 徐娟娟, 李杰梅, 梁淑明, 等. 手性高效液相色谱法测定左旋肉碱中光学异构体的含量[J]. 现代食品科技, 2010, 26(3): 311–313.
Xu JJ, Li JM, Liang SM, *et al.* Analysis of the optical isomer of *L*-carnitine by chiral liquid chromatography [J]. Mod Food Sci Technol, 2010, 26(3): 311–313.
- [13] 徐连明, 王振中, 毕宇安, 等. HP LC 法测定减肥胶囊中左旋肉碱的含量[J]. 海峡药学, 2009, 21(11): 46–47.
Xu LM, Wang ZZ, Bi YA, *et al.* Determination of *L*-carnitine in Slimming Capsules by HPLC [J]. Strait Pharm J, 2009, 21(11): 46–47.
- [14] 胡晓娟, 张锦, 赵阔. 反相高效液相色谱法测定保健品中左旋肉碱的含量[J]. 光谱实验室, 2011, 28(2): 743–746.
Hu XJ, Zhang J, Zhao T. Determination of *L*-carnitine in health food by RP-HPLC [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2011, 28(2): 743–746.
- [15] 李春篱. HPLC 法测定甘之肖口服液左旋肉碱的含量[J]. 中国药师, 2011, 14(6): 893–894.
Li CL. Determination of *L*-carnitine in Ganzhixiao liquid by HPLC [J]. China Pharm, 2011, 14(6): 893–894.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



莫紫梅, 工程师, 主要研究方向为食品质量与安全检测。
E-mail: 269636574@qq.com