

高效液相色谱法测定肌酸粉中一水肌酸、肌酸酐和双氰胺含量

叶少文, 高芝炆*, 苏昭仑
(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法同时检测肌酸粉中一水肌酸、肌酸酐和双氰胺含量的分析方法。**方法** 样品用水溶解稀释至一定溶度, 过滤膜即得样品供试液。采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定, 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调 PH 至 10.5)作为流动相, 检测波长为 220 nm, 流速 0.8 mL/min, 外标法定量。**结果** 本方法在 10 min 内完成 3 种目标化合物的分离分析。试样中一水肌酸浓度在 0.204~1.02 mg/mL 的范围内线性关系良好, 相关系数 $r > 0.999$ 。在三水平不同浓度一水肌酸标准品添加下, 一水肌酸的回收率为 100.3%。试样中肌酸酐浓度在 0.530~6.36 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内线性关系良好, 相关系数 $r > 0.999$ 。在三水平不同浓度肌酸酐标准品添加下, 肌酸酐的回收率为 99.0%。试样中双氰胺浓度在 0.0531~0.637 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内线性关系良好, 相关系数 $r > 0.999$ 。在三水平不同浓度双氰胺标准品添加下, 双氰胺的回收率为 106.1%。**结论** 该方法快速、准确、灵敏, 适合同时测定肌酸粉中一水肌酸, 肌酸酐和双氰胺含量。

关键词: 肌酸粉; 一水肌酸; 肌酸酐; 双氰胺; 高效液相色谱法

Determination of creatine monohydrate, creatinine and dicyandiamide in creatine powder by high performance liquid chromatography

YE Shao-Wen, GAO Zhi-Yang*, SU Zhao-Lun
(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for simultaneous determination of creatine monohydrate, creatinine and dicyandiamide in creatine powder by high performance liquid chromatography. **Methods** The sample was dissolved and diluted with water to a certain solubility, and the sample solution was obtained by filtering the membrane. It was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The mobile phase was 10 mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution (pH was adjusted by ammonia water to 10.5). The detection wavelength was 220 nm, the flow rate was 0.8 mL/min, and the external standard method was used for quantitative analysis. **Results** The separation and analysis of three target compounds were completed in 10 minutes. The linear relationship of creatine monohydrate was good in the range of 0.204–1.02 mg/mL, and the correlation coefficient (r) was greater than 0.999. The recovery rate of creatine monohydrate was 100.3% at three levels with different concentrations of creatine monohydrate standard. The linear relationship of creatinine concentration was good in the range of 0.530–6.36 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficient(r) was greater than 0.999. The recovery rate of creatinine

*通讯作者: 高芝炆, 助理研究员, 主要研究方向为营养与食品安全。E-mail: 1046621420@qq.com

*Corresponding author: GAO Zhi-Yang, Assistant Professor, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 1046621420@qq.com

was 99.0% at three levels with different concentrations of creatinine standard. The linear relationship of dicyandiamide was good in the range of 0.0531–0.637 $\mu\text{g/mL}$, and the correlation coefficient (r) was greater than 0.999. The recovery rate of dicyandiamide was 106.1% at three levels with different concentrations of dicyandiamide standard. **Conclusion** The proposed method is fast, accurate and sensitive, which is suitable for the simultaneous determination of creatine monohydrate, creatinine and dicyandiamide in creatine powder.

KEY WORDS: creatine powder; creatine monohydrate; creatinine; dicyandiamide; high performance liquid chromatography

1 引言

肌酸粉中的功效成分是一水肌酸,一水肌酸是能增加健美者瘦体重,增强肌肉爆发力和耐久力的化学物质^[1-5],同时一水肌酸可以把水带进肌肉,使得肌细胞的体积增大,有利于肌细胞吸收氨基酸^[6-9]。目前,检测肌酸粉中一水肌酸的检测方法有 GB 24154-2015《食品安全国家标准 运动营养食品通则》^[10],QB/T 2834-2006《运动营养食品食用肌酸》^[11]。GB 24154-2015 和 QB/T 2834-2006 只要求对肌酸粉中一水肌酸的含量进行检测。而肌酸粉在生产过程中会产生副产物双氰胺和肌酸酐,双氰胺是一种用于合成农药、合成医药、染料固色剂等用途的化工原料,摄入一定量会对人体健康产生危害,因而除了对肌酸粉中一水肌酸的含量进行质量监控,很有必要对肌酸粉中的副产物进行质量监控^[12,13]。

GB 24154-2015 和 QB/T 2834-2006 检测一水肌酸均采用甲醇-水(40:60, V:V)为流动相,该条件下一水肌酸和双氰胺色谱峰难分离,分离度往往不理想,因此对一水肌酸含量测定造成干扰,从而影响肌酸粉的质量监控^[14,15]。

本研究旨在建立一种有效的同时检测肌酸粉中一水肌酸、肌酸酐和双氰胺含量的检测方法,可以从源头有效控制肌酸粉中副产物残留带来的食品安全问题。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); 60H 超声仪(德国 Elmasonic P 公司)。

一水肌酸对照品、肌酸酐对照品(纯度: 98.0%, 上海源叶公司); 双氰胺对照品(纯度 100.0%, 中国食品药品检定研究院); 磷酸二氢钠(色谱纯, 广州化学试剂厂); 氨水(分析纯, 广州化学试剂厂); 实验室用水为 Milli-Q 超纯水(美国密理博公司)。

2.2 实验方法

2.2.1 溶液配制

一水肌酸标准溶液配制: 准确称取约 30 mg 的一水肌酸, 置 25 mL 容量瓶中, 加适量水溶解并定容至容量瓶刻

度, 配制成约 1.2 mg/mL 标准工作液, 现配现用。

肌酸酐标准溶液配制: 准确称取约 5 mg 的肌酸酐, 置 50 mL 容量瓶中, 加适量水溶解并定容至容量瓶刻度, 配制成约 1 mg/mL 标准储备液。量取肌酸酐标准储备液 1 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 用水稀释并定容至容量瓶刻度, 配制成约 0.002 mg/mL 标准工作液, 现配现用。

双氰胺标准溶液配制: 准确称取约 5 mg 的双氰胺, 置 50 mL 容量瓶中, 加适量水溶解并定容至容量瓶刻度, 配制成约 1 mg/mL 标准工作液。量取双氰胺标准储备液 0.1 mL, 置 50 mL 容量瓶中, 用水稀释并定容至容量瓶刻度, 配制成约 0.0002 mg/mL 标准工作液, 现配现用。

10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调 PH 至 10.5): 称取磷酸二氢钠 12 g 到 1 L 水, 用氨水调节 PH 至 10.5。

2.2.2 样品前处理

精密称取均匀试样 20 mg 至 50 mL 容量瓶中, 加入适量的纯化水, 室温超声, 待试样完全溶解, 取出用水定容至容量瓶刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 水相滤膜, 即得。(注意: 样品供试液需现配现测定, 不可放置超过 0.5 h, 因一水肌酸会在水溶液中缓慢转换成肌酸酐。)

2.2.3 液相色谱条件

色谱柱: Phenomenex Kinetex(5 μm); XB-C₁₈ 100A LC Column (250 mm×4.6 mm), 流动相: 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调 pH 值至 10.5), 流速: 0.8 mL/min, 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$, 波长: 220 nm。

2.2.4 测定

分别精密吸取一水肌酸、肌酸酐、双氰胺标准工作液 5、20、30、40、80 μL , 样品供试液 20 μL 注入高效液相色谱仪。以一水肌酸、肌酸酐、双氰胺峰面积 Y 为纵坐标, 一水肌酸、肌酸酐、双氰胺标准工作液浓度(X , mg/mL)为横坐标绘制标准曲线, 外标法定量。

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

GB 24154-2015 和 QB/T 2834-2006 检测一水肌酸均采用甲醇-水(40:60, V:V)为流动相, 该条件下一水肌酸和双氰胺色谱峰难分离, 分离度往往不理想。本研究采用 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液作为流动相, 在研究中发现,

在全水相流动相实验中, 关键参数为流动相的 pH 值, pH 值的大小对一水肌酸、双氰胺、肌酸酐的分离有重要的影响。本研究把 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液使用氨水调节至不同 PH 值得出的色谱图作为分析, 优化流动相条件。实验一: 以 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调节 pH 值至 3)为流动相, 其 HPLC 色谱图如图 1 所示, 一水肌酸、肌酸酐和双氰胺分离效果不理想。实验二: 以 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调节 pH 值至 7)为流动相, 其 HPLC 色谱图如图 2 所示, 一水肌酸、肌酸酐和双氰胺分离效果不理想。实验三: 以 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调节 pH 值至 10.5)为流动相, 其色谱图如图 3 所示, 一水肌酸、肌酸酐和双氰胺的色谱峰能完全分离, 且分离度好, 峰型完整。因此将 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调节 pH 值至 10.5)作为本研究的流动相。

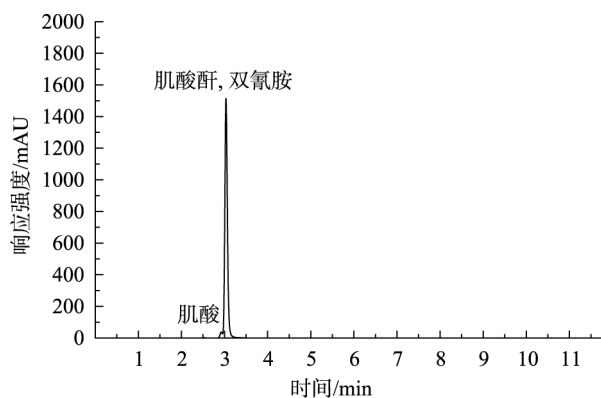


图 1 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调节 pH 值至 3)标准工作液色谱图

Fig.1 Standard chromatogram of 10 mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution (adjusted pH to 3 by ammonia)

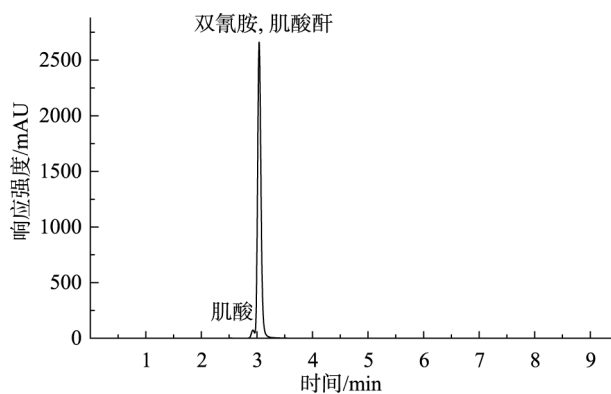


图 2 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调节 pH 值至 7)标准工作液色谱图

Fig.2 Standard chromatogram of 10 mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution (adjusted pH to 7 by ammonia)

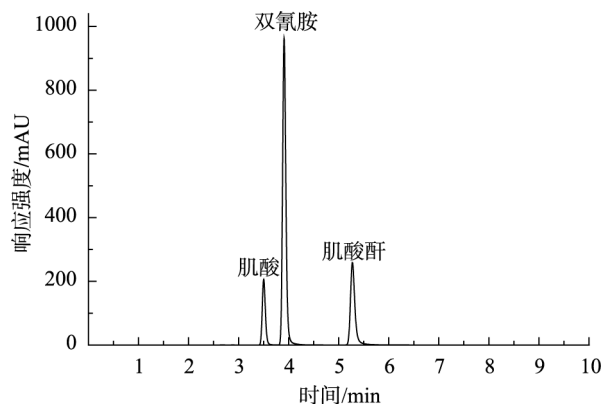


图 3 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(氨水调节 pH 值至 10.5)标准工作液色谱图

Fig.3 Standard chromatogram of 10 mmol/L sodium dihydrogen phosphate solution (adjusted pH to 10.5 by ammonia)

3.2 标准曲线

一水肌酸的标准曲线方程为 $Y=2267.2X+21.3$, 其相关系数为 0.9998, 表明一水肌酸在浓度 0.204~1.02 mg/mL 范围内均具有良好的线性^[13]。肌酸酐的标准曲线方程为 $Y=43248X-0.72$, 其相关系数为 0.9999, 表明肌酸酐在浓度 0.530~6.36 $\mu\text{g/mL}$ 范围内均具有良好的线性^[13]。双氰胺的标准曲线方程为 $Y=112783X+0.25$, 其相关系数为 0.9999, 表明双氰胺在浓度 0.0531~0.637 $\mu\text{g/mL}$ 范围内均具有良好的线性^[13]。

3.3 检出限

将一水肌酸浓度为 0.0001 mg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件计算得 $S/N=3$ 。按实际样品的处理过程计算, 一水肌酸的方法检出限(limits of detection, LOD)为 5 mg/g。将肌酸酐浓度为 0.0001 mg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件计算得 $S/N=3$ 。按实际样品的处理过程计算, 肌酸酐的方法检出限为 5 mg/g。将双氰胺浓度为 0.00002 mg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件计算得 $S/N=3$ 。按实际样品的处理过程计算, 双氰胺的方法检出限为 1 mg/g。

3.4 精密度

12 个样品中一水肌酸平均含量为 99.8%, 相对标准偏差(RSD)小于 1.3%; 12 个样品中肌酸酐平均含量为 0.088%, 相对标准偏差(RSD)小于 1.3%; 12 个样品中双氰胺平均含量为 0.0035%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)小于 1.3%表明该方法有良好的精密度^[14]。

3.5 加标回收率

本研究使用肌酸粉作为测试样品, 加入一水肌酸标准溶液在 3 个不同添加水平下的回收率结果见表 1, 样品

的平均回收率为 100.3%, RSD 为 1.2%, 表明该方法测定一水肌酸准确。本研究使用肌酸粉作为测试样品, 加入肌酸酐标准溶液在 3 个不同添加水平下的回收率结果见表 2, 样品的平均回收率为 99.0%, RSD 为 2.2%, 表明该方法测

定肌酸酐准确。本研究使用肌酸粉作为测试样品, 加入双氰胺标准溶液在 3 个不同添加水平下的回收率结果见表 3, 样品的平均回收率为 106.1%, RSD 为 1.0%, 表明该方法测定双氰胺准确。

表 1 一水肌酸的加标回收率($n=9$)
Table 1 Standard addition recovery of creatine monohydrate ($n=9$)

名称	理论加标量/mg	实际测得标准品量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
一水肌酸	49.96	49.26	98.59	100.3	1.2
	51.23	50.53	98.62		
	50.36	50.79	100.84		
	82.36	83.57	101.46		
	81.32	82.61	101.58		
	82.34	82.49	100.17		
	110.31	110.61	100.26		
	110.67	110.10	99.48		
	109.84	110.90	100.96		

表 2 肌酸酐的加标回收($n=9$)
Table 2 Standard addition recovery of creatinine($n=9$)

名称	理论加标量/ μg	实际测得标准品量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
肌酸酐	84.83	82.63	97.41	99.0	2.2
	84.83	82.20	96.9		
	84.83	85.27	100.51		
	106.31	108.54	102.09		
	106.31	106.79	100.45		
	106.31	105.74	99.46		
	127.57	128.57	100.78		
	127.57	124.07	97.25		
	127.57	122.60	96.1		

表 3 双氰胺的加标回收率($n=9$)
Table 3 Standard addition recovery of dicyandiamide($n=9$)

名称	理论加标量/ μg	实际测得标准品量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
双氰胺	5.52	5.93	107.37	106.1	1.0
	5.52	5.86	106.1		
	5.52	5.95	107.7		
	6.90	7.27	105.25		
	6.90	7.32	106.06		
	6.90	7.32	105.98		
	8.28	8.77	105.91		
	8.28	8.71	105.20		
	8.28	8.71	105.20		

4 结 论

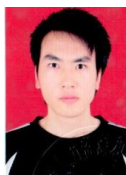
通过优化流动相体系后, 以肌酸粉作为测试样品, 测得其一水肌酸含量为 99.8%, 相关系数为 0.9998, 回收率为 100.3%; 测得其肌酸酐含量为 0.088%, 相关系数为 0.9999, 回收率为 99.0%; 测得其双氰胺含量为 0.0035%, 相关系数为 0.9999, 回收率为 106.1%。数据表明该方法测试一水肌酸、肌酸酐和双氰胺可以实现良好的分离, 有效准确地检测肌酸粉中一水肌酸、肌酸酐和双氰胺的残留量, 该方法前处理简单, 分析快速, 可以准确有效检测一水肌酸、肌酸酐和双氰胺的含量, 可以为肌酸粉的监控提供依据。

参考文献

- [1] 宫克城. 补充肌酸对运动能力提高的探讨[J]. 科技信息, 2008, 21(20): 156-157.
Gong KC. Discussion on the improvement of exercise ability by creatine supplementation [J]. Sci Technol Inform, 2008, 21(20): 156-157.
- [2] 张王虎, 张玉兰. 论肌酸与运动[J]. 西安工程科技学院学报, 2005, 19(3): 390-392.
Zhang WH, Zhang YL. Creatine and exercise [J]. Xi'an Instit Eng Technol, 2005, 19(3): 390-392.
- [3] 金宏. 肌酸提高运动能力的作用[J]. 氨基酸和生物资源, 2001, (4): 32-35.
Jin H. The role of creatine in improving exercise ability [J]. Amino Acid Biotic Resour, 2001, (4): 32-35.
- [4] 杨佩璇, 柯杰兵, 沈志峰. 补充肌酸对大强度运动能力的影响[J]. 体育学刊, 2001, (5): 86-88.
Yang PX, Ke JB, Shen ZF. The effect of creatine supplementation on high-intensity sports ability [J]. J Phys Edu, 2001, (5): 86-88.
- [5] 刘大川, 贾炳善, 李秀英. 补充肌酸对运动能力的影响[J]. 中国运动医学杂志, 1998, (2): 1-2.
Liu DC, Jia BS, Li XY. Effect of creatine supplementation on exercise ability [J]. Chin J Sports Med, 1998, (2): 1-2.
- [6] C 卡瓦萨. 用于促进骨骼肌适应剧烈运动和对抗虚弱个体疲劳过度的营养增补剂, 中国: CN98803848.X[P].
C Kawasa. It is used to promote skeletal muscle to adapt to strenuous exercise and fight weakness Nutritional supplement for individual fatigue, China: CN98803848.X [P].
- [7] 邱宾, 孙曦. 对优秀运动员以补充肌酸来提高运动成绩的探讨[J]. 宜春学院学报(自然科学), 2006, (2): 155-156.
Qiu B, Sun X. Discussion on improving sports performance by supplementing creatine for excellent athletes [J]. J Yichun Univ (Nat Sci), 2006, (2): 155-156.
- [8] 魏源. 补充肌酸对运动能力和健康的影响[J]. 沈阳体育学院学报, 2005, (2): 85.
Wei Y. Effect of creatine supplementation on sports ability and health [J]. J Shenyang Inst Phys Edu, 2005, (2): 85.
- [9] 张一鸣, 王若宁. 服用肌酸对肌肉运动能力的影响[J]. 南京医科大学学报, 2000, 20(6): 431-432.
Zhang YM, Wang RN. Effect of creatine on muscle motor ability [J]. J Nanjing Med Univ, 2000, 20(6): 431-432.
- [10] GB 24154-2015 食品安全国家标准 运动营养食品通则[S].
GB 24154-2015 National food safety standard-General rules for sports nutrition food [S].
- [11] QB/T 2834-2006 运动营养食品食用肌酸[S].
QB/T 2834-2006 Sports nutrition food creatine [S].
- [12] 李森. 高纯度肌酸及其一水合物的生产工艺, 中国: CN98110909.8[P].
Li S. production process of high purity creatine and its monohydrate, China: CN98110909.8 [P].
- [13] 姚方, 徐天有, 许文松. 肌酸合成新工艺[J]. 化学反应工程与工艺, 2003, (2): 150-154.
Yao F, Xu TY, Xu WS. New process of creatine synthesis [J]. Chem React Eng Technol, 2003, (2): 150-154.
- [14] 田富饶, 冯均利, 邹春海, 等. 双氰胺高效液相色谱检测方法的研究进展[J]. 光谱实验室, 2013, (6): 106-108.
Tian FR, Feng JL, Zou CH, et al. Research progress in the determination of dicyandiamide by HPLC [J]. Chin J Spectrosc Lab, 2013, (6): 106-108.
- [15] 宋汉恩, 任燕. HILIC-MS/MS 测定牛奶中 4 种含氮化合物的含量[J]. 广州化工, 2020, (4): 111-115.
Song HE, Ren Y. Determination of four nitrogen compounds in milk by HILIC-MS/MS [J]. Guangzhou Chem Ind, 2020, (4): 111-115.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介



叶少文, 高级工程师, 主要研究方向为营养膳食补充剂质量检测。
E-mail: 442884571@qq.com



高芝扬, 助理研究员, 主要研究方向为营养与食品安全。
E-mail: 1046621420@qq.com