

非抑制离子色谱法测定减肥产品中的左旋肉碱

陈军 钟新林

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词: 左旋肉碱; 离子色谱; 非抑制离子色谱法; 减肥产品

Key words: L-carnitine; Ion chromatography; Non-suppressor; Slimming products

引言

左旋肉碱(L-carnitine, β -羟基 γ -三甲铵丁酸)又称肉毒碱或维生素BT,其化学式为 $C_7H_{15}O_3N$,分子量为162.2,是一种促使脂肪转化为能量的类氨基酸。L-肉碱的主要功能是参与动物体内的脂肪代谢,它作为载体将长链脂肪酸从腺粒体膜外输送到膜内,促进脂肪酸的 β -氧化,从而促进脂肪的代谢,因此左旋肉碱具有多种重要的生理功能^[1,2]。左旋肉碱已广泛应用于医药、保健和食品等领域,被瑞士、法国、美国和世界卫生组织规定为法定的多用途营养剂。我国食品添加剂卫生标准GB2760-1996规定了左旋肉碱酒石酸盐为食品营养强化剂,可应用于咀嚼片、饮液、胶囊、乳粉及乳饮料等。市场上已出现了许多以左旋肉碱为主要功能的减肥产品。

左旋肉碱极性较强,缺少发色基团,定量分析困难。国内外对左旋肉碱的测定主要有酶法^[3,4]、电泳法^[5]、电化学法^[6],高效液相色谱法^[7-10]等。高效液相色谱法中有的需要衍生、有的灵敏度较低。其它方法准确性较差,设备较贵等原因较少使用。

离子色谱法可测定在水溶液中能电离的物质。在酸性溶液中,左旋肉碱表现为阳离子特性,带正电荷,可用阳离子交换色谱柱分离。但左旋肉碱的两性特征使其无法采用抑制型电导检测。为此,我们通过实验,摸索出左旋肉碱的非抑制型离子色谱测定的新方法。该方法前处理简便、检测快速,用于实际样品的检测,结果令人满意。

测试条件

仪器: ICS系列离子色谱系统带柱温箱。

分析柱: IonPac CS17+IonPac CG17, 4mm

流动相组成:

MSA: 0-22min, 5mM; 流速: 1mL/min

柱温: 30°C

检测方式: 抑制型电导检测

进样量: 25 μ L

样品前处理

胶囊: 拆开胶囊外皮,称取其中的粉末样品约0.1g至100mL容量瓶中,用超纯水定容到100mL后,室温超

声提取30min,静置30min,取上层清液,4000r/min离心20min后,将溶液通过0.22 μ m尼龙滤膜和OnGuard II RP柱,弃去6mL初始流出液后采集2mL样品用于离子色谱测定。

咀嚼片: 将咀嚼片粉碎,混匀,称取其中的粉末样品约0.1g至100mL容量瓶中,用超纯水定容到100mL后,室温超声提取30min,静置30min,取上层清液,4000r/min离心20min后,将溶液通过0.22 μ m尼龙滤膜和OnGuard II RP柱,弃去6mL初始流出液后采集2mL样品用于离子色谱测定。

OnGuard II RP柱(2.5cc),预先使用10mL甲醇和15mL水活化。

结果与讨论

1. 前处理条件的选择

减肥产品中,通常加入左旋肉碱稳定形式的左旋肉碱酒石酸盐。左旋肉碱酒石酸盐易溶于水,但不易溶于有机溶剂。离子色谱的淋洗液是水溶液,因此选用水作提取剂。对用水作溶剂提取极性化合物,超声提取是有效的提取方法。我们考察了用超声提取时,提取温度与提取时间对回收率的影响,实验结果列于表1和表2。

从表1数据可见,增加提取时间,测得结果逐渐增大,当提取时间大于20min后,提取效率增大不明显了。考虑到某些基体复杂的减肥产品,可将提取时间适当延长,因此提取时间选择为30min。表2中,30°C时测得左旋肉碱含量已经是50°C时的99.9%,这说明30°C左旋肉碱的提取已经充分。因此选择在30°C、30min下超声提取即可。

表1. 30°C下,提取时间对回收率的影响
Table 1 Effect Of Extraction time on recovery of L-carnitine at 30°C

分析物 Analyte	样品测定结果 (mg/g)			
	时间 (min)			
	10	20	30	40
左旋肉碱 L-carnitine	318.6	320.9	322.5	323.7

表2. 提取温度对回收率的影响
Table 2 effect of extraction temperature on recovery of L-carnitine

分析物 Analyte	样品测定结果 (mg/g)			
	温度 (°C)			
	20	30	40	50
左旋肉碱 L-carnitine	312.5	322.5	322.6	322.7

2. 色谱柱的选择

按实验方法, 我们比较了左旋肉碱在IonPac SCS1、IonPac CS12A、IonPac CS17三种不同色谱柱上的出峰及分离情况。SCS1柱为硅胶基质的色谱柱, 不耐酸碱, 虽然可用低浓度(3mM)的淋洗液等度洗脱, 但L-肉碱在该柱拖尾严重, 对称因子为4.05, 灵敏度不高。CS12A柱的离子交换功能基团为羧基/磷酸基, 柱容量高(2800ueq), 亲水性较CS17柱弱, 对一价和二价阳离子的保留相对较强, 对疏水性比较强的L-左旋肉碱离子保留比较强, 需用高浓度的淋洗液才能洗脱保留的阳离子, 这会导致高的背景电导和高的检出限。采用15.56mM的甲基磺酸在CS12A柱上等度淋洗左旋肉碱,

背景电导5371 uS, 色谱峰的对称因子2.25, 理论塔板数1936, 可见对称性和柱效也不好。CS17柱功能基团为羧酸基, 柱容量(1450 ueq)较CS12A柱低, 可用较低浓度的淋洗液洗脱一价和二价阳离子, 因此降低背景电导, 提高检出限。L-肉碱在此色谱上对称性良好, 5mM等度淋洗, 对称因子为1.17, 与可能存在的其它阳离子易于分开。因此, 选择CS17+CG17作为分析L-左旋肉碱的色谱柱。

3. 淋洗液浓度的确定

我们选用不同浓度的甲基磺酸, 测定混合标样a中左旋肉碱的色谱分析特征。随着淋洗液浓度降低, 背景电导降低, 噪声降低, 理论塔板数提高, 各成分间的分离度增大, 对称因子降低, 峰形改善(如表3所示)。但由于浓度降低, 酸度降低, 导致峰高降低, 灵敏度降低。因为L-肉碱是弱碱, 溶液的酸度减弱, L-肉碱的解离减弱, 电导响应也将减弱。同时, 更低浓度的酸使各成分的保留时间明显增长, 特别是两价离子的保留时间增加更多, 当浓度降低到3mmol/L时, Ca²⁺离子的保留时间大于50min, 不利于提高分析效率(如表4所示)。综合考虑, 我们选择5mmol/L的甲基磺酸作为分析用淋洗液。

表3. 不同淋洗液浓度对左旋肉碱分析能力的影响

Table 3 effect of methanesulfonic acid concentration on the Characteristic of L-carnitine

Analyte	Characteristic	甲基磺酸 MSA (mM)			
		9	7	5	3
左旋肉碱 L-carnitine	保留时间Retention time (min)	5.04	5.89	7.44	10.69
	对称因子Asymmetry factor	1.19	1.19	1.17	1.16
	理论塔板Theoretical plates (N)	3548	3763	4121	4791
	峰高 Peak High (uS)	103	90	74	54
	背景电导Background conductivity (uS)	3443	2701	1943	1213
	噪声Noise (uS)	0.1	0.09	0.06	0.05
	分离度Resolution	1.99	2.28	2.72	3.54

表4. 不同淋洗液浓度对各种离子保留时间的影响

Table 4 effect of methanesulfonic acid concentration on the retention time

Analyte	Characteristic	甲基磺酸MSA (mM)			
		9	7	5	3
Li ⁺	保留时间 Retention time (min)	3.21	3.59	4.30	5.85
Na ⁺		3.48	3.94	4.78	6.63
NH ₄ ⁺		3.67	4.18	5.13	7.19
K ⁺		4.02	4.62	5.73	8.15
Mg ²⁺		7.01	10.14	17.93	43.99
Ca ²⁺		7.71	11.30	20.29	>50
胆碱+乙酰胆碱		5.72	6.78	8.72	12.96
左旋肉碱L-carnitine		5.04	5.89	7.44	10.69

a Li⁺(0.5mg/L); Na⁺(5mg/L); NH₄⁺(5mg/L); K⁺(5mg/L); L-carnitine(400mg/L); 6 Choline+ Acetylcholine (50mg/L+50mg/L); 7 Mg²⁺(5mg/L); 8 Ca²⁺(5mg/L)

4. 干扰实验

由于钾、钠、钙、镁、铵为水中的常见离子，在样品中普遍存在。而某些含左旋肉碱的保健产品也会添加胆碱类物质例如胆碱及乙酰胆碱来促进脂肪运输和神经发育。因此我们考察了常见阳离子及胆碱和乙酰胆碱对左旋肉碱出峰的影响。从图1可见，常见六种阳离子能与左旋肉碱较好分离。50mg/L的胆碱和乙酰胆碱与400mg/L的左旋肉碱出峰互相不干扰，分离度达到2.72。

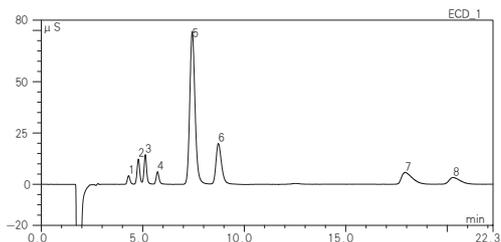


图1. L-肉碱及共存离子分离色谱图

Fig. 1 Interferences test on L-carnitine

- 1 Li⁺(0.5mg/L); 2 Na₊(5mg/L); 3 NH₄⁺(5mg/L);
4 K⁺(5mg/L); 5 L-carnitine(400mg/L);
6 Choline+Acetylcholine(50mg/L+50mg.L);
7 Mg²⁺(5mg/L); 8 Ca²⁺(5mg/L)

5. 检出限与线性范围

按实验方法在选定的色谱条件下，对左旋肉碱进行线性和检出限测定。检出限按照S/N=3进行测算，Noise=0.06μS。数据见表5。在选定的浓度范围内，线性相关系数r>0.999。左旋肉碱检出限1mg/g。

6. 精密度与回收率

按实验方法，取减肥产品进行不同浓度加标试验，

连续进样5次，测定左旋肉碱平均回收率和精密度，结果列于表5，该方法的回收率在87.9%~106%之间，RSD小于6.6%。

实际样品分析

按实验方法，对市售标示含有左旋肉碱的减肥产品进行了测试，结果见表7及图2。

表7. 实际样品中左旋肉碱含量

Table 7 Determination of L-carnitines in real slimming products

Sample	No.1 减肥咀嚼片	No.2 胶囊样品
左旋肉碱 L-carnitine (mg/g)	322.5	- *

1.-: Not Detected

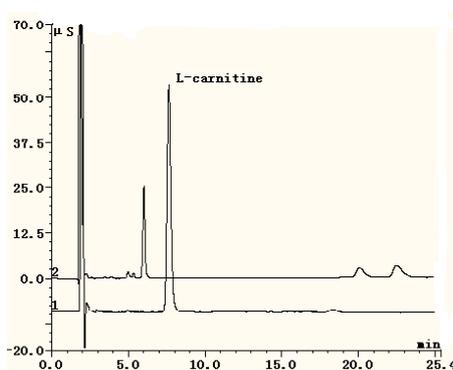


图2. 实际样品分离谱图

表5. 左旋肉碱检出限与线性范围

Table 5 The limit of detection and linear range of L-carnitine

		分析物Analyte
线性 Linearity	相关系数Correlation coefficient	0.9995
	斜率Slope	0.057
	截距Intercept	0
	线性范围Range (mg/L)	10-1000
检出限LOD (mg/L)	1	
定量限LOQ (mg/L)	3	

表6. 方法的回收率与精密度 (n=5)

Table 6 Recoveries and precisions of the method (n=5)

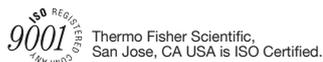
分析物 Analyte	加入标准量Spiked (mg/g)	左旋肉碱含量 Content	Recovery (%)	RSD (%)
左旋肉碱 L-carnitine	20		87.9%~106 %	6.6%
	100	322.5	95.8%~99.0%	1.6%
	500		99.6%~102%	0.9%

结论

采用非抑制型离子色谱法来测定左旋肉碱具有简单、快速、干扰少、环保等特点。相比常见液相色谱方法, 无需衍生化, 避免了繁琐的操作, 节约时间, 重复性好。该方法可用于减肥产品中左旋肉碱的含量测定。

参考文献

- i ZHOU You-ya(周友亚), WANG Xue(王雪). Journal of Hebei Normal University Natural Science, (河北师范大学学报(自然科学版)), 2001, 25(1), 99~101
- ii MA Wen-Jun (马文军), ZHANG Tao (张涛). Journal of Wuhan Institute of Physical Education., (武汉体育学院学报), 2002, 36(5): 52~53
- iii David C. Woollard , Harvey E.Indyk, Gerald A. Woollard. Food Chem., 1997, 59 (3): 325~332
- iv K.-G. Seline, H. Johein. Food Chemistry ,2007,105: 793~804
- v K. Heinig, J. Henion . J. Chromatogr. B, 1999, 735 : 171~188
- vi A.A. Rat' ko et al . Talanta,, 2004, 63 :515~519
- vii A. Longo et al. I J. Chromatogr. B , 1996, 686: 129~139.
- viii G.-X. He, T. Dahl. J. Pharm. Biomed. Anal. 2000, 23 : 315~321
- ix A. Kakou et al. J. Chromatogr. A 2005, 1069: 209~215
- x ZHU Wei-xia (祝伟霞), YANG Ji-zhou (杨冀州), LIU Ya-feng (刘亚风), WEIWei (魏薇), ZHANG Shu-sheng (张书胜). Journal of Instrumental Analysis , (分析测试学报), 2008, 27(10), 1124~1127
- xi XU Juan-juan(徐娟娟), LI Jie-mei(李杰梅), LIANG Shu-ming(梁淑明), CHEN Jia-shu(陈家树), Modern Food Science and Technology , (现代食品科技), 2010, 26(3), 311~313
- xii Xu Lian-ming(徐连明), WANG Zhen-zhong(王振中), BI Yu-an(毕宇安), ZOU Yan-ping(邹艳萍), GUO Xiao-li(郭小莉), Strait Pharmaceutical Journal , (海峡药学), 2009, 21(11), 47~46
- xiii GAN Bin-bin(甘宾宾), LI Shao-hao(黎少豪), Chinese Journal of Health Laboratory Technology , (中国卫生检验杂志), 2010, 20(7), 1688~1689



thermoscientific.com

© 2012 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property of Thermo Fisher Scientific Inc. and its subsidiaries. Specifications, terms and pricing are subject to change. Not all products are available in all countries. Please consult your local sales representative for details.

上海
上海浦东新金桥路27号6号楼
邮编: 201206
电话: 021-68654588
传真: 021-64457830

北京
北京东城区安定门东大街28号
雍和大厦西楼F座7层702-715室
邮编: 100007
电话: 010-84193588
传真: 010-88370548

免费服务热线:
800 810 5118
400 650 5118

Thermo
SCIENTIFIC
Part of Thermo Fisher Scientific