

实验技术与方法

手性镧系位移试剂识别-核磁共振氢谱法测定保健食品中
肉碱对映体含量

夏金涛,朱松松,朱芊,江丰

(湖北省食品质量安全监督检验研究院,国家市场监督管理总局重点实验室 动物源性食品中重点化学危害物
检测技术 湖北省食品质量安全检测工程技术研究中心,湖北 武汉 430075)

摘要:目的 采用手性镧系位移试剂识别-核磁共振氢谱法(CLSR-¹H qNMR)对保健食品中的肉碱对映体进行快速定性、定量分析研究。方法 样品经氘代甲醇溶解,以吡嗪为内标,经过涡旋、超声辅助萃取、离心后,取适量上层清液,加入手性镧系位移试剂 Eu(thfc)₃,直接对待测物进行检测。结果 左旋肉碱的质量浓度线性范围在 16.3~4 800 μg/mL,相关系数(*r*)>0.99,检出限(LOD)为 24.5 mg/kg,定量限(LOQ)为 73.5 mg/kg;右旋肉碱的质量浓度线性范围在 10.6~530 μg/mL,*r*>0.99,LOD 为 27.5 mg/kg,LOQ 为 82.5 mg/kg。方法的加标回收率为 95.9%~114.6%,RSD(*n*=6)为 3.31%~6.12%。对网购宣称具有减肥功效的胶囊、奶茶、咖啡粉、片剂进行检测,均未检测出右旋肉碱。结论 本方法简便、快速、灵敏,25 min 内即可完成检测,能够为肉碱对映体各自含量的快速检测提供理论基础。

关键词:手性镧系位移试剂;定量核磁共振氢谱;肉碱对映体;保健食品

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)04-0730-07

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.04.015

Determination of carnitine enantiomers in dietary supplement by ¹H-nuclear magnetic resonance combined with chiral lanthanide shift reagents

XIA Jintao, ZHU Songsong, ZHU Qian, JIANG Feng

(Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-derived Food for State Market Regulation, Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Hubei Wuhan 430075, China)

Abstract: Objective A qualitative and quantitative method has been established to rapidly determine carnitine enantiomers in dietary supplement by ¹H-nuclear magnetic resonance combined with chiral lanthanide shift reagents (CLSR-¹H qNMR). **Methods** Pyrazine acted as internal standard was added to the samples dissolved in *d*₄-methanol. After vortexing, ultrasonic-assisted extraction and centrifugation, an appropriate amount of supernatant and chiral lanthanide shift reagent (CLSR) Eu(thfc)₃ were added to the NMR tube for directly determination. **Results** The linearity range of L-carnitine was 16.3~4 800 μg/mL with correlation coefficient (*r*)>0.99. The limit of detection (LOD) was 24.5 mg/kg, and the limit of quantification (LOQ) was 73.5 mg/kg. While the linearity range of D-carnitine was 10.6~530 μg/mL with *r*>0.99. The LOD was 27.5 mg/kg, and the LOQ was 82.5 mg/kg. Recovery rates obtained from spiked samples were between 95.9% and 114.6% with the RSDs (*n*=6) of 3.31%~6.12%. Tests on capsules, milk tea, coffee powder and tablet from online shopping that claimed to have weight-loss effects failed to detect D-carnitine. **Conclusion** This method is simple, rapid and sensitive. And the sample test could be completed within 25 min, which could provide a theoretical basis for rapidly detection of carnitine enantiomers.

Key words: Chiral lanthanide shift reagents; quantitative ¹H-nuclear magnetic resonance; carnitine enantiomers; dietary supplement

收稿日期:2022-02-17

基金项目:湖北省自然科学基金青年项目(2021CFB077);国家重点研发计划项目(2018YFC1602300)

作者简介:夏金涛 男 工程师 研究方向为食品安全与检测 E-mail: 2501820896@qq.com

通信作者:江丰 男 高级工程师 研究方向为食品安全与检测 E-mail: 349136833@qq.com

左旋肉碱(β -羟基- γ -三甲铵丁酸,L-carnitine)又称L-肉毒碱或维生素BT,是一种类氨基酸,广泛分布于人体组织、器官中,具有加速脂肪代谢、促进疲劳恢复、提高机体免疫力、保护心血管及延缓衰老等功能^[1]。人体内不能直接产生左旋肉碱,其主要来源于日常膳食。肉碱的缺乏将导致能量合成不足,出现易疲劳、肌无力、心悸心慌等症状,严重者表现出昏迷甚至死亡。因此,左旋肉碱常作为食品营养强化剂、添加剂加入到减肥保健食品、婴幼儿食品和功能性疾病中。

肉碱因分子含一个手性碳原子而有左、右旋之分,临床上只有左旋肉碱有生理活性;右旋肉碱则具有潜在的危害性,不仅会抑制人体对左旋肉碱的吸收,还会造成肌肉疼痛、萎缩或肌无力等症状^[2]。早在1993年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)就禁止出售D-型、DL-型肉碱混合物,而我国市售与线上销售含左旋肉碱产品中存在着含右旋肉碱的风险^[3]。另外,我国食品安全国家标准食品营养强化剂使用标准GB 14880—2012中规定饮料中左旋肉碱最大使用量为3 g/L^[4],虽然保健食品中对左旋肉碱的用量未有明确的规定,但是肉碱的过量摄入会对机体的正常代谢造成不利影响。基于以上分析研究可以看出,建立区分左右旋肉碱的方法十分有必要。

目前有关左旋肉碱测定的国家及行业标准方法有电位滴定法^[5]、分光光度法^[6]及滴定法^[7-8]。文献针对单纯检测左旋肉碱的方法主要有离子色谱法^[9]、高效液相色谱法^[10-12]、液质联用法^[13-16]、分光光度法^[17-18]、液相色谱-荧光法^[19]、化学发光法^[20]、酶解法^[21]、电泳色谱法^[22]和核磁共振波谱法^[23]等。而对于肉碱对映体的同时检测方法则报道不多,据本次调研所知,目前仅有柱前衍生-高效液相-荧光法^[3]、柱前衍生-高效液相色谱-串联质谱法^[23]、柱前衍生-核磁共振波谱法^[24]三例,且柱前衍生-核磁共振波谱法主要针对的是肉碱原料。基于已报道方法存在检测形式单一、前处理复杂及耗时长等缺点,本研究采用手性镧系位移试剂识别-核磁共振氢谱法,实现保健食品中肉碱对映体的同时区分、测定,建立保健食品中D/L-肉碱的测定方法,为能高效、简便、准确地测定左旋肉碱的纯度及含量提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

Bruker Avance III HD 600 MHz 超导傅立叶变换核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司),230 Volt 涡旋振荡器(美国 Talboys 公司),S 180H 超声波清洗仪(德

国艾尔玛公司),Centrifuge5810 常温低速离心机(德国 Eppendorf 公司),XS204 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

氘代甲醇(CD_3OD , D: 99%, Sigma-Aldrich 贸易有限公司),左旋肉碱(纯度 98.6%,北京曼哈格生物科技有限公司),右旋肉碱(D-carnitine,纯度 95.0%,天津阿尔塔科技有限公司),三[3-(七氟丙基羟亚甲基)-(+)-樟脑酸]铕($Eu(thfc)_3$ (纯度 98%,比旋光度 $[\alpha]_D^{20}+158.0^\circ$, $c=1$ in chloroform),Sigma-Aldrich 贸易有限公司),吡嗪(纯度 99%,北京伊诺凯科技有限公司),5 mm 核磁管(美国 Norell 公司)。其中,左旋肉碱和右旋肉碱在方法建立过程均作为试剂使用。

空白基质、商品标示左旋肉碱片剂、粉剂、胶囊保健食品购自网上,未开启时常温储存,保质期内测定。

1.2 实验方法

1.2.1 溶液的制备

1.2.1.1 标准品储备液配制

采用差减法准确称取右旋肉碱 26.50 mg,以氘代甲醇定容至 5 mL,制得 5 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准储备液;用移液枪准确吸取 500 μL 以上标液,定容至 5 mL,进一步制成 530 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液;差减法准确称取左旋肉碱 98.00 mg,以氘代甲醇定容至 5 mL,制得 19.6 mg/mL 的标准储备液;用移液枪准确吸取 500 μL 以上标液,定容至 5 mL,进一步制成 1 960 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液。以上储备液于 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中储存备用。

1.2.1.2 位移试剂及内标储备液配制

精密称取 $Eu(thfc)_3$ 500.00 mg,用氘代甲醇溶解并定容至 5 mL 容量瓶,制成 100 mg/mL 的位移试剂储备液;精密称取吡嗪 100.00 mg,用氘代甲醇溶解并定容至 5 mL 容量瓶,制成 20 mg/mL 的内标储备液;4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中储存备用。

1.2.1.3 待测样品溶液制备

精密称取待测样品 20 mg,加入 50 μL 20 mg/mL 的内标溶液,用氘代甲醇溶解、定容至 1 mL,样品经涡旋震荡 2 min 后,超声辅助提取 10 min,于 3 900 r/min 离心 5 min,取上层清液 550 μL 加入核磁管中,并向核磁管中加入 50 μL 100 mg/mL 的 $Eu(thfc)_3$,充分摇匀后,上机检测。

1.2.2 CLSR- ^1H qNMR 采样参数

^1H NMR 采样条件:实验所用 ^1H NMR 的共振频率为 600 MHz,脉冲序列(PULPROG):zg30;采样时间(AQ):3 s;采样温度(T):298 K;弛豫延迟时间(D1):36 s;采样次数(NS):32;谱宽(SW):13 ppm;观察道中心频率偏置(O1P):4 ppm;脉宽(PL):10 μs ;增益(RG):32。

1.2.3 ^1H qNMR 定量原理

核磁共振定量分析的基本原理是谱图中原子的响应信号(一般指峰面积)与所含原子核的个数成正比,而与核的其他性质无关。本研究对选定的内标及目标峰进行峰面积积分,按式 1 计算肉碱的含量。

$$m_x = m_{std} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{n_{std}}{n_x} \frac{A_x}{A_{std}} = m_{std} \frac{161.4}{80.9} \frac{4}{9} \frac{A_x}{A_{std}} = 0.89444 \times m_{std} \times \frac{A_x}{A_{std}} \quad (1)$$

式中: m_x 为待测物含量; m_{std} 为内标含量; n_x 为待测物定量峰所含氢原子数; n_{std} 为内标物所含氢原子数; A_x 为待测物定量峰信号面积; A_{std} 为内标物定量峰信号面积。

1.2.4 对映体质量比范围线性考察

准确吸取一定体积的标准品储备液,配制成左旋与右旋肉碱质量比为 1:10、1:2、1:1、10:1、50:1、80:1、100:1 的系列梯度混合溶液,向核磁管中分别加入 50 μL 100 mg/mL $\text{Eu}(\text{thfc})_3$,并用 CD_3OD 定容至 600 μL ,样品经充分混匀后,按 1.2.2 所述条件上机测试样品的核磁共振氢谱。

1.2.5 标准曲线的绘制

向七支核磁管中分别移取一定体积标准品储备液,向每只核磁管中分别加入 50 μL 质量浓度为 100 mg/mL 的位移试剂 $\text{Eu}(\text{thfc})_3$ 和 30 μL 质量浓度为 20 mg/mL 的内标溶液,用氘代甲醇定容至 600 μL ,配制成含不同浓度(单位: $\mu\text{g}/\text{mL}$)的左旋和右旋肉碱(10.6, 16.3)、(17.7, 91.5)、(26.5, 196.0)、(53.0, 392.0)、(159.0, 980.0)、(265.0, 1960.0)、(530.0, 4800.0)的系列梯度混合溶液,样品经充分混匀后,按 1.2.2 所述条件上机测试样品的核磁共振氢谱。

1.2.6 精密度实验

随机选取一个肉碱对映体样品,按照 1.2.2 所述条件上机测试样品的核磁共振氢谱,同 1 d 内连续测定 6 次,计算平均值,分析方法的日内精密度;连续测定 6 d,每天测定 1 次,分析方法的日间精密度。

1.2.7 回收率实验

取空白基质样品约 20 mg,精密称定,分别向基质中添加低、中、高 3 个水平的肉碱,每个水平平行测定 6 次,计算平均回收率和相对标准偏差。

1.3 统计学分析

核磁谱图通过 MestRenova 5.3.1, Topspin 3.5 pl 7 软件分析处理,分子结构式绘制通过 ChemBiodraw 14.0 绘制,数据分析通过 Microsoft Excel 2013,

Origin 9.0 软件处理。

2 结果

2.1 测试条件的选择

2.1.1 溶剂、内标物及定量峰的选择

肉碱是一种内盐,易溶于极性质子溶剂醇类、碱液和水中,难溶于丙酮、氯仿等极性非质子溶剂;手性镧系位移试剂 $\text{Eu}(\text{thfc})_3$ 为缺电子有机金属络合物,易溶于有机溶剂醇类、氯仿、丙酮等,不溶于水。因此,为兼顾二者的溶解特性,本研究选择氘代甲醇为溶剂。

由图 1A、1B 可知,肉碱对映体在无外加位移试剂的情况下,出峰的化学位移(三甲基季胺位特征峰 $\delta=3.24$)基本相同;吡嗪性质稳定,四个氢原子化学位移($\delta=8.65$)(图 1C)相同,且在芳香区出现尖锐的单峰,容易辨认,与肉碱脂肪区的定量峰化学位移互不干扰。同时吡嗪价格便宜,因此,本研究选择吡嗪为内标物。

当加入位移试剂 $\text{Eu}(\text{thfc})_3$ 时,发现肉碱分子结构中仅有三甲基季胺位上的氢原子化学位移发生了明显的区分,且该位置以单峰形式呈现,易识别(图 1D)。因此,本实验选取三甲基季胺位作为定量峰进行后续定量研究。

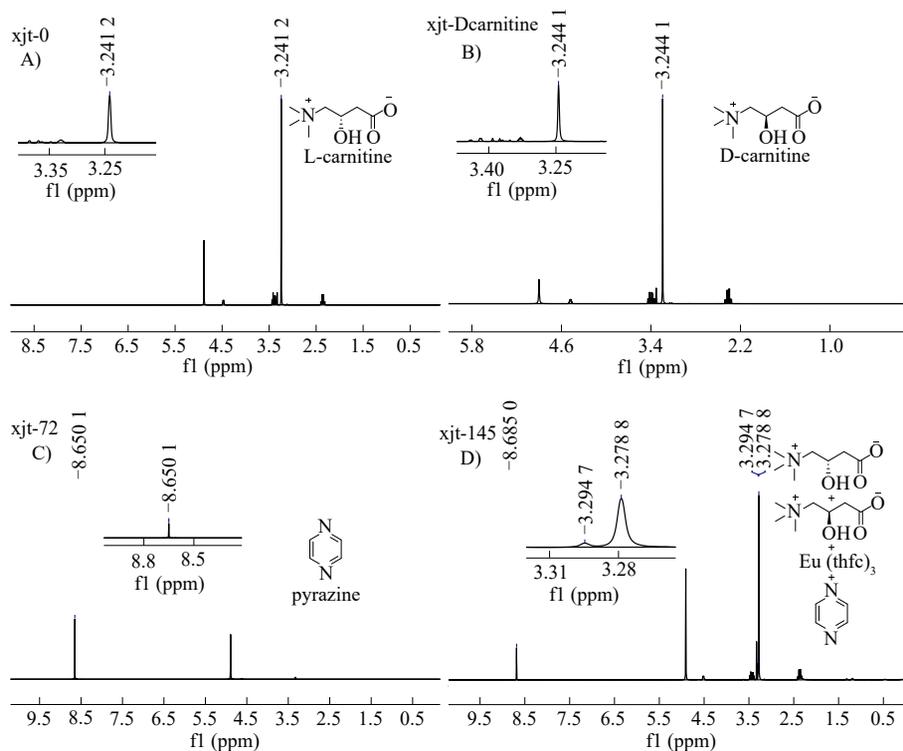
2.1.2 弛豫延迟时间 D_1 及采样时间(AQ)的选择

通过反转恢复法,使用标准脉冲序列 t1ir 对肉碱各质子及内标吡嗪的纵向弛豫时间 T_1 进行测定,结果见表 1。为了保证采集响应信号的准确性,弛豫延迟时间 D_1 不应小于 T_1 的 5 倍。因此,当本实验 D_1 的值设定为 36 s 时,可以满足测量精度的要求。

采样时间对图谱质量及定量效果影响较大。采样时间过短,会导致信号被截尾,得到不准确的信息,增加采样时间反而会降低信噪比且增加测试时间,不利于快速定量。通过观察发现采样时间为 3.0 s 时,信号衰减完毕且有少量富余,因此设定采样时间为 3.0 s。

2.1.3 位移试剂最佳比例的确定

在左、右旋肉碱低、中、高 3 个浓度水平条件下,通过添加不同质量的化学位移试剂,观察肉碱定量峰-NMe₃ 的诱导位移 $\Delta\delta$ 、对映体位移差 $\Delta\Delta\delta$ 及与氘代甲醇的谱峰交叠情况,结果见表 2。当 $\text{Eu}(\text{thfc})_3$ 加入质量为 2.0 mg 时,左右旋肉碱定量峰交叠严重,不利于定量分析;加大 $\text{Eu}(\text{thfc})_3$ 用量至 4.0 mg 时,左右旋肉碱定量峰已有较好的分离度,但峰谷还有部分重叠;继续加大 $\text{Eu}(\text{thfc})_3$ 用量至 5.0 mg 时,肉碱定量峰峰谷交叠情况得以改善;当 $\text{Eu}(\text{thfc})_3$ 用量为 6.0 mg 时,右旋肉碱定量峰与氘代

注:A:L-肉碱;B:D-肉碱;C:吡嗪;D:肉碱对映体、吡嗪和Eu(thfc)₃的混合物图1 肉碱对映体及吡嗪的结构及其¹H NMR图Figure 1 The structures and ¹H NMR spectra of carnitine enantiomers and pyrazine表1 肉碱及吡嗪的纵向弛豫时间T₁Table 1 Longitudinal relaxation time (T₁) of carnitine and pyrazine

肉碱及内标结构式	各氢原子裂分形式、个数、化学位移及耦合常数	纵向弛豫时间T ₁
	H ₁ (m, 1H, δ _H 4.53-4.42)	1.954 s
	H _{2a} (dd, 1H, δ _H 3.43, J=13.4, 1.8 Hz)	925 ms
	H _{2b} (dd, 1H, δ _H 3.37, J=13.5, 9.7 Hz)	971 ms
	H ₃ (s, 9H, δ _H 3.24)	864 ms
	H _{4a} (dd, 1H, δ _H 2.39, J=15.7, 6.8 Hz)	1.232 s
	H _{4b} (dd, 1H, δ _H 2.39, J=15.5, 7.0 Hz)	1.271 s
	H(s, 4H, δ _H 8.65)	7.044 s

甲醇的信号峰又有所重叠,会对定量积分造成不利。因此,本实验选用位移试剂的用量为5.0 mg。

2.1.4 对映体质量比范围线性考察

按1.2.4所述方法进行实验,通过解卷积的积分方法,以左、右旋肉碱积分面积比为纵坐标,以左、右旋肉碱质量比为横坐标,进行线性关系考察。结果发现左、右旋肉碱质量比 m_L/m_D 在0.1~100范围内, m_L/m_D 与 S_L/S_D 线性关系良好,其回归方程为 $y=0.9966x+2.0452$, $R^2=0.992$ 。该结果表明,当 m_L/m_D 在0.1~100区间时,方法能够适用于肉碱对映体含量的测定。

2.2 方法学考察

2.2.1 标准曲线、线性范围、检出限及定量限

按1.2.5所述方法进行实验,通过解卷积积分,以左、右旋肉碱积分面积与内标物的积分面积比 S_1/S_2 为纵坐标,以样品浓度与内标物浓度比 C_1/C_2 为横坐标,进行线性关系考察,结果如图2。在右旋肉碱浓度为10.6~530.0 μg/mL,左旋肉碱浓度为16.3~4800.0 μg/mL的范围内,积分面积比 S_1/S_2 与浓度比 C_1/C_2 呈现良好的线性关系,右旋肉碱线性回归方程为 $y=0.8359x+0.0026$, $R^2=0.9978$;左旋肉碱线性回归方程为 $y=1.2327x-0.0091$, $R^2=0.9999$ 。表明使用吡嗪作为内标物,定量核磁共振测定肉碱对映体各自含量的方案是可行的。

根据国际纯粹与应用化学联合会(International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)对检出限和定量限的定义^[25],3倍信噪比对应的浓度为检出限,10倍信噪比对应的浓度为定量限。为考察这一定义的真实性,以检测实际浓度进行了验证。将质量浓度为49 μg/mL的含左旋肉碱的基质溶液逐步稀释,配成49、24.5、9.8、4.9、0.49 μg/mL的标准系列;将质量浓度为11 μg/mL的含左旋肉碱的基质溶液逐步稀释,配成11、5.5、2.2、1.1、0.55 μg/mL的标准系列进行测试。结果发现:当左旋肉碱和右旋肉碱质量浓度分别降到0.49 μg/mL和0.55 μg/mL

表2 位移试剂加入量对肉碱对映体的识别效果
Table 2 The effect of added CLSR on carnitine enantiomer

肉碱各自含量/($\mu\text{g/mL}$)	Eu(thfc)3加入质量/mg	位移试剂加入量			
		2	4	5	6
196	26.5				
1 960	265				
9 800	1 060				

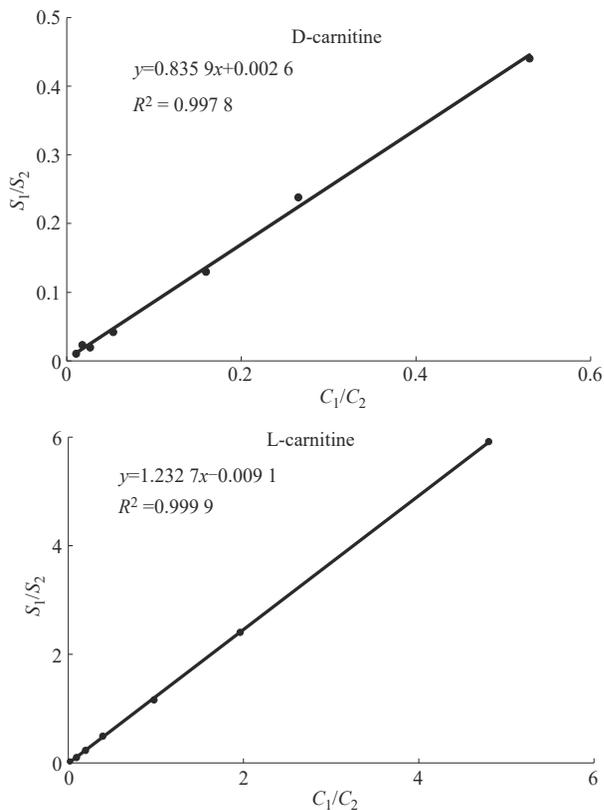


图2 左旋及右旋肉碱与内标浓度与积分面积线性关系
Figure 2 The linearity of concentration and integral area of L- and D-carnitine with internal standard

时,定量特征峰信号与噪音已经非常接近。因此,本方法左旋肉碱的最低检出浓度为 $0.49 \mu\text{g/mL}$ (对应 24.5 mg/kg),定量限为 73.5 mg/kg ;右旋肉碱的最低检出浓度为 $0.55 \mu\text{g/mL}$ (对应 27.5 mg/kg),定量限为 82.5 mg/kg 。

2.2.2 精密度及回收率实验

按 1.2.6 的方法,使用 $^1\text{H-NMR}$ 计算肉碱对映

体峰面积与内标峰面积的比值,考察方法的日内和日间精密度。左旋肉碱的日内精密率为 0.52% ,日间精密率为 3.3% ;右旋肉碱的日内精密率为 1.02% ,日间精密率为 3.6% 。表明使用 $^1\text{H-NMR}$ 测定肉碱对映体具有较高的精密度。

按 1.2.7 的方法,取空白基质样品约 20 mg ,精密称定,分别向基质中添加低、中、高 3 个水平的肉碱,每个水平平行测定 6 次,计算平均回收率和相对标准偏差,结果见表 3。其中左旋肉碱的平均回收率为 $98.3\% \sim 114.6\%$,相对标准偏差为 $3.31\% \sim 4.18\%$;右旋肉碱的平均回收率为 $95.9\% \sim 105.8\%$,相对标准偏差为 $3.59\% \sim 6.12\%$ 。

表3 加标回收率及相对标准偏差

Table 3 Average recoveries and relative standard deviations of this methods

化合物名称	加入量/(mg/kg)	实测量/(mg/kg)	平均回收率/%	RSD/%
左旋肉碱	294.0	325.6	110.7	4.18
	1 470.0	1 674.1	114.6	3.57
	2 940.0	2 889.0	98.3	3.31
右旋肉碱	265.0	280.5	105.8	3.59
	1 325.0	1 271.1	95.9	6.12
	2 650.0	2 578.1	97.3	4.72

通过与现有方法进行比对,可以看出:本法测定左旋肉碱加标回收率范围明显优于其他方法,而 RSD 范围与其他方法相当;测定右旋肉碱加标回收率范围偏高,而 RSD 范围优于其他方法,结果见表 4。鉴于该法无需对待测样品进行复杂的前处理,且加标回收率和 RSD 范围均与其他方法无显著性差异,因此该法可作为测定保健食品中肉碱对映体的一种简便、实用的补充方法。

表4 加标回收率及相对标准偏差方法比对

Table 4 Methods comparison of average recoveries and relative standard deviations of this methods

化合物名称	加标回收率/%		RSD/%	
	右旋肉碱	左旋肉碱	右旋肉碱	左旋肉碱
本法	95.9~105.8	98.3~114.6	3.59~6.12	3.31~4.18
ref.3 (二极管荧光法)	85~100	84~104	3.6~6.2	4.5~7.0
ref.3 (二极管阵列法)	80~94	73~96	4.36~8.89	3.91~7.08
ref.23	—	90.9~108	—	4.54~6.91

2.2.3 样品检测

对网购的9份保健食品及3份食品级肉碱添加剂进行了肉碱对映体含量测试,结果如表5所示,可以看出所有品牌测试过程中均未检测出右旋肉碱,并且核磁测试值均在误差允许范围内;其中,某品牌胶囊6检测结果与标签标注结果出入较大,推测可能是将“g/100g”错写成了“mg/100g”。总体来讲,保健食品及食品级添加剂中L-肉碱的原料质量较好,但目前国内对于肉碱如何合理化添加、商标说明的严格监督和审核依然缺乏规范性的指导和评估;同时,民众的使用意识也需进一步加强。

表5 样品测试结果

Table 5 Results of determination of samples

保健品类别	测试D-肉碱含量/(g/100g)	测试L-肉碱含量/(g/100g)	标称肉碱含量/(g/100g)
某品牌奶茶1	ND	7.56	7.32
某品牌片剂2	ND	1.18	≥0.94
某品牌片剂3	ND	19.41	21.00
某品牌胶囊4	ND	8.27	9.00
某品牌胶囊5	ND	28.96	31.50
某品牌胶囊6	ND	1.85	0.015
某品牌咖啡粉7	ND	17.98	18.50
某品牌咖啡粉8	ND	17.98	18.50
某品牌咖啡粉9	ND	17.99	18.50
某厂家肉碱	ND	94.00	食品级,
添加剂10			无标识
某厂家肉碱	ND	94.75	>99.00
添加剂11			
某厂家肉碱	ND	91.31	99.00
添加剂12			

注:ND为未检出

3 结论

本研究以氘代甲醇为溶剂,以吡嗪为内标,在不需要标准品的情况下,通过手性镧系位移试剂识别-核磁共振氢谱法(CLSR-¹H qNMR)对保健食品中肉碱对映体含量进行了检测。在适宜的浓度范围内,肉碱对映体的线性范围良好,方法的加标回收率为95.9%~114.6%,相对标准偏差($n=6$)为3.31%~6.12%。对网购的9份保健食品及3份食品级肉碱添加剂进行肉碱对映体含量测试均未检测出右旋肉碱,说明所购保健食品中左旋肉碱的对映体纯度

较好,但是肉碱的实际用量依旧需要进行合理管控。该方法前处理简单,25 min内即可完成单个样品的测试分析,检测效率高,方法准确,能够作为补充检验方法用于保健食品中肉碱纯度的快速筛查,具有一定的实用性。

参考文献

- [1] 朱静华, 丛林, 张兆臣. 浅谈左旋肉碱的功效和使用[J]. 田径, 2020(9): 84.
ZHU J H, CONG L, ZHANG Z C. Qiantan zuoxuanroujian de gongxiao he shiyong[J]. Track and Field, 2020(9): 84.
- [2] WATANABE S, AJISAKA R, MASUOKA T, et al. Effects of L- and DL-carnitine on patients with impaired exercise tolerance [J]. Japanese Heart Journal, 1995, 36(3): 319-331.
- [3] 王丹. 婴幼儿配方食品中肉碱对映体的含量分析与评价[D]. 青岛: 青岛大学, 2016.
WANG D. Yingyouer peifang shipin Zhong roujian duiyingti de hanliang fenxi yu pingjia[D]. Qingdao: Qingdao University, 2016.
- [4] 中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准: GB 14880—2012[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
Ministry of Health of the People's Republic of China. Shipin anquan guojia biao zhun shipin yingyang qianghua ji shiyong biao zhun: GB 14880—2012[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会, 国家食品药品监督管理总局. 食品安全国家标准 食品营养强化剂左旋肉碱(L-肉碱): GB 1903.13—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission, National Food and Drug Administration. Shipin anquan guojia biao zhun shipin yingyang qianghua ji zuoxuanroujian (L-roujian): GB 1903.13—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [6] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定: GB 29989—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
National Health and Family Planning Commission. Shipin anquan guojia biao zhun yingyouer shipin he rupin Zhong zuoxuanroujian de ceding: GB 29989—2013 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2013.
- [7] 中华人民共和国农业部. 饲料添加剂左旋肉碱: NY/T 1028—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
Ministry of Agriculture of the People's Republic of China. Feed additive levocarnitine NY/T 1028—2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006.
- [8] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品营养强化剂 左旋肉碱(L-肉碱): GB 1903.13—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.
National Health and Family Planning Commission. Shipin anquan guojia biao zhun shipin yingyang qianghua ji zuoxuanroujian (L-roujian): GB 1903.13—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [9] 宋周虎, 周璐意, 胡晓敏, 等. 离子色谱法测定保健食品中左旋肉碱的含量[J]. 今日药学, 2014, 24(5): 337-339.

- SONG Z H, ZHOU L Y, HU X M, et al. Determination of L-carnitine in health food by ion-pair high performance liquid chromatography[J]. *Pharmacy Today*, 2014, 24(5): 337-339.
- [10] 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 Y H, et al. Determination of L-carnitine content by hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in health food[J]. *The Food Industry*, 2013, 34(9): 191-193.
- [11] 莫紫梅, 韦春梦. 高效液相色谱法测定保健食品中左旋肉碱含量[J]. *食品安全质量检测学报*, 2016, 7(5): 2093-2096.
- MO Z M, WEI C M. Determination of L-carnitine in health foods by high performance liquid chromatography[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2016, 7(5): 2093-2096.
- [12] 周文清. 高效液相色谱法检测运动饮料中的L-肉碱[J]. *食品研究与开发*, 2017, 38(11): 144-147.
- ZHOU W Q. Determination of L-carnitine in sports drink by HPLC[J]. *Food Research and Development*, 2017, 38(11): 144-147.
- [13] 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 L K, ZHENG J G, et al. Determination of L-carnitine in infant formula milk powder by high performance liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Instrumental Analysis*, 2012, 31(3): 355-358.
- [14] KIVILOMPOLO M, ÖHRNBERG L, OREŠIČ M, et al. Rapid quantitative analysis of carnitine and acylcarnitines by ultra-high performance-hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2013, 1292: 189-194.
- [15] 王艳, 刘芸, 姜珊, 等. 高效液相色谱-高分辨质谱法测定奶粉及保健品食品中的左旋肉碱[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(17): 5920-5926.
- WANG Y, LIU Y, JIANG S, et al. Determination of L-carnitine in milk powder and healthy food by high performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry[J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2020, 11(17): 5920-5926.
- [16] 王冬梅, 杨明, 邱肖依, 等. 分光光度法和液相-质谱联用法检测奶粉中的左旋肉碱[J]. *食品工业*, 2020, 41(3): 282-285.
- WANG D M, YANG M, QIU X Y, et al. Determination of L-carnitine in milk powder by spectrophotometry and liquid-phase mass spectrometry[J]. *The Food Industry*, 2020, 41(3): 282-285.
- [17] 张海红, 田洪芸, 王文特, 等. 分光光度法检测特殊医学用途婴儿配方乳粉中左旋肉碱[J]. *中国乳品工业*, 2020, 48(9): 41-46.
- ZHANG H H, TIAN H Y, WANG W T, et al. Determination of L-carnitine content in special medical formula food by ultraviolet visible spectrophotometry[J]. *China Dairy Industry*, 2020, 48(9): 41-46.
- [18] 孟瑾, 孙晓莉, 秦向阳, 等. HPLC荧光检测法测定盐酸文拉法辛血药浓度及人体生物等效性研究[J]. *药物分析杂志*, 2008, 28(9): 1442-1445.
- MENG J, SUN X L, QIN X Y, et al. HPLC determination with fluorimetric detection of venlafaxine hydrochloride in human plasma and its application to bioequivalence studies[J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2008, 28(9): 1442-1445.
- [19] 龚尚于, 刘明, 朱辰瑶, 等. 高灵敏化学发光法检测减肥药物中左旋肉碱的含量[J]. *中国卫生检验杂志*, 2015, 25(11): 1685-1688.
- GONG S Y, LIU M, ZHU C Y, et al. Determination of L-carnitine in anti-obesity agents using ultra sensitive chemiluminescence method[J]. *Chinese Journal of Health Laboratory Technology*, 2015, 25(11): 1685-1688.
- [20] PRIETO J A, ANDRADE F, ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA L, et al. Determination of free and total carnitine in plasma by an enzymatic reaction and spectrophotometric quantitation spectrophotometric determination of carnitine[J]. *Clinical Biochemistry*, 2006, 39(10): 1022-1027.
- [21] PROKORÁTOVÁ V, KVASNIČKA F, ŠEVČÍK R, et al. Capillary electrophoresis determination of carnitine in food supplements[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1081(1): 60-64.
- [22] 胡正松, 卢明祝, 阙玉和. 一种通过核磁共振氢谱定量测定左旋肉碱类保健品中有效成分的方法[P]. 中国专利: CN112345575A, 2021-02-09.
- HU Z S, LU M Z, QUE Y H. Method for quantitatively determining effective components in L-carnitine health care products through nuclear magnetic resonance hydrogen spectrum[P]. *zhongguozhuanli*: CN112345575A, 2021-02-09.
- [23] 黄芳, 吴惠勤, 黄晓兰, 等. 配方奶粉中肉碱对映体的拆分及液相色谱-串联质谱法测定[J]. *分析实验室*, 2014, 33(9): 1101-1104.
- HUANG F, WU H Q, HUANG X L, et al. Enantioseparation and determination of the carnitine enantiomers in powdered formulas by LC-MS/MS[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2014, 33(9): 1101-1104.
- [24] KAGAWA M, MACHIDA Y, NISHI H, et al. Enantiomeric purity determination of acetyl-L-carnitine by NMR with chiral lanthanide shift reagents[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38(5): 918-923.
- [25] MOLAABASI F, TALEBPOUR Z. Enantiomeric discrimination and quantification of the chiral organophosphorus pesticide fenamiphos in aqueous samples by a novel and selective ³¹P nuclear magnetic resonance spectroscopic method using cyclodextrins as chiral selector[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(3): 803-808.