

实验技术与方法

基于¹H-qNMR的水溶性镧系位移试剂识别法测定功能性食品中谷氨酰胺对映体夏金涛¹,黄秀秀²,朱松松¹,朱芊¹,李贝贝¹,江丰¹

(1. 湖北省食品质量监督检验研究院,国家市场监管重点实验室(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;2. 黄冈市中心医院妇产科,湖北黄冈 438000)

摘要:目的 建立基于¹H-qNMR的水溶性镧系位移试剂识别法,实现对功能性食品中谷氨酰胺(Gln)对映体各自含量的快速定性、定量分析。方法 样品经超纯水溶解,以对苯二甲酸钠(DT)为内标,经过涡旋、离心后,取适量上层清液于NMR管中,以氘水为锁场溶剂,水溶性镧系位移试剂钐(Ⅲ)-丙二胺四乙酸钠为手性拆分试剂,采用600 MHz核磁共振波谱仪采集¹H-NMR谱,直接对功能性食品中的Gln对映体含量进行定量分析。结果 Gln对映体和DT定量峰分离良好。左、右旋Gln的质量浓度在100.0~2 000.0 μg/mL范围内线性良好, $R^2>0.99$,检出限为30.0 μg/mL,定量限为100.0 μg/mL。方法的平均加标回收率为94.27%~116.07%,相对标准偏差($n=6$)为0.18%~1.84%。结论 该方法回收率高、重现性好,前处理过程简便,15 min内可完成测样。对商超平台购买的不同剂型功能性食品进行检测,样品中Gln对映体纯度均 $\geq 99\%$ 。在Gln总量测定方面,该方法与高效液相色谱法检测结果无显著性差异($P>0.05$),能够为Gln对映体含量的快速检测提供一种实用的技术。

关键词:水溶性镧系位移试剂;定量核磁共振氢谱;谷氨酰胺;对映异构体;功能性食品

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2023)11-1579-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.11.005

Determination of glutamine enantiomers in functional foods by a water-soluble lanthanide shift reagent-identified method based on the ¹H-qNMR technique

XIA Jintao¹, HUANG Xiuxiu², ZHU Songsong¹, ZHU Qian¹, LI Beibei¹, JIANG Feng¹

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Key Laboratory of Detection Technology of Focus Chemical Hazards in Animal-Derived Food for State Market Regulation, Hubei Provincial Engineering and Technology Research Center for Food Quality and Safety Test, Hubei Wuhan 430075, China; 2. Huanggang Central Hospital, Hubei Huanggang 438000, China)

Abstract: Objective This study aimed to achieve rapid qualitative and quantitative analysis of the respective contents of glutamine (Gln) enantiomers in functional foods by establishing a water-soluble lanthanide shift reagent-identified method based on the ¹H-qNMR technique. **Methods** The internal standard disodium terephthalate was added to the samples dissolved in ultrapure water. After vortexing and centrifuging, an appropriate amount of supernatant was taken into the NMR tube with deuterium water as a field-locking solvent and the water-soluble lanthanide shift reagent samarium (Ⅲ)-propylenediaminetetraacetate as the chiral selector. The ¹H-NMR spectrum was collected by a 600 MHz nuclear magnetic resonance spectrometer for the direct determination of the contents of Gln enantiomers in functional foods.

Results The Gln enantiomers and DT quantitative peaks were well-separated. The mass concentration of D- and L-glutamine has a good linearity in the range of 100.0-2 000.0 μg/mL with $R^2>0.99$. The limit of detection was 30.0 μg/mL, and the limit of quantification was 100.0 μg/mL. The average recovery rates obtained from standard addition methods were between 94.27% and 116.07% with the relative standard deviations ($n=6$) being 0.18%-1.84%. **Conclusion** This method offers high recovery, good repeatability, and a simple pretreatment process, and the sample test can be completed within 15 min. The testing of different dosage forms of functional foods purchased from the supermarket platform revealed

收稿日期:2022-07-11

基金项目:湖北省自然科学基金青年项目(2021CFB077)

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

that the enantiomeric purity of Gln in the samples was $\geq 99\%$. No significant difference was observed between this method and high-performance liquid chromatography ($P > 0.05$) in the determination of total Gln. The method can provide a practical technique for the rapid detection of the contents of glutamine enantiomers.

Key words: Water-soluble lanthanide shift reagents; quantitative ^1H -nuclear magnetic resonance; glutamine; enantiomers; functional foods

L-谷氨酰胺(L-Glutamine, L-Gln)是人体含量最为丰富的一种氨基酸,在人体的生物代谢过程中起着非常重要的作用。研究表明^[1],L-Gln具有增强机体免疫、维护酸碱平衡、促进肌肉蛋白合成和改善脑神经机能等功能。正常情况下,机体内合成的L-Gln能够满足代谢的需要,但在发热、创伤和感染等应激状态下,机体对L-Gln的需求增加,以致自身合成不能满足代谢的要求,若不能及时从外界进行补充,将导致肌肉蛋白降解、肠黏膜通透性增加和免疫功能受损等负面影响^[1]。

近年来,随着人民生活水平的提高,作为特殊功能性食品,L-Gln开始出现在各商超平台。由于具有营养增补的功能,在运动健美爱好者中广受欢迎。L-Gln可以来源于天然产物提取,也可以采用生物发酵或化学合成法进行工业生产。L-Gln氨基酸的 α 位存在一个手性中心,在化学合成中,手性源合成、不对称合成和外消旋体拆分是其来源的三种主要方式。在动物体内,D型氨基酸一般不易被吸收。虽然未见有关L-Gln对映异构体D-Gln对人体危害的相关报道,但是快速、简便、准确地检测手性对映异构体的绝对构型和含量将有利于提升对谷氨酰胺及其相关产品的质量控制和健康风险防控^[2]。

目前,用于药物^[3-6]、特医食品^[7-8]、饮料^[9]、发酵酒^[9]、调味品^[9]、乳基食品^[10]及血清^[11]、血浆^[12-13]等样品中L-Gln的检测方法有较多报道,包括(超)高效液相色谱法^[3,6-9]、(超)高效液相色谱串联质谱法^[5,10,12-13]和毛细管电泳法^[4,11]等。这些方法的前处理过程主要通过离子对试剂、柱前衍生试剂等对分析物进行富集和净化,前处理过程较为繁琐,且需要对照品。由于未有手性辅剂的参与,这些方法还存在不能对样本中的D-Gln进行鉴定和检测的缺陷。 ^1H -qNMR是一种常用的定量检测方法,该法集定性鉴别和定量测定于一体,具有明显的优势。随着磁场强度的提高和超低温探头技术的发展, ^1H -qNMR技术的检测灵敏度和精确度得到了大幅提高,已在药品^[14-15]、食品^[16-20]、代谢组学^[21]及化合物纯度定值^[22]等领域得到了广泛应用,成为对映异构体含量测定最便捷的方法之一。基于目前检测方法存在的不足和qNMR的优势,本研究提供了

一种基于 ^1H -qNMR的水溶性镧系位移试剂识别法,用于评价样品中谷氨酰胺对映异构体的含量,以期作为功能性保健食品及特医食品基质中谷氨酰胺对映体各自含量的检测提供必要的技术手段。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与材料

Bruker Avance III HD 600 MHz 超导傅里叶变换核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司),Waters e2695 液相色谱仪(美国 Waters 公司),ME204/02 电子天平(瑞士 Mettler Toledo 国际贸易有限公司),MS-H-ProALCD 数显加热型圆盘磁力搅拌器(成都一科仪器设备有限公司),HEI-VAP 旋转蒸发仪(德国 Heidolph GmbH 公司),CIRVpro4 机械泵(上海威伊真空设备有限公司),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)。

氘水(D:99.9%,美国 CIL 公司),D-谷氨酰胺(纯度:98.0%),L-谷氨酰胺(纯度:99.0%)、氧化钆(纯度:99.99%)(上海麦克林生化科技有限公司),(S)-1,2-二氨基丙烷-2,6-N,N,N',N'-四乙酸(纯度:95%)、对苯二甲酸二钠(纯度:>99%)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司),1-辛烷磺酸钠(纯度:99%,离子对色谱试剂,上海易恩化学技术有限公司),磷酸(纯度:>99%,国药集团化学试剂有限公司),乙腈(色谱纯,赛默飞世尔科技(中国)有限公司),5 mm 核磁管(美国 Norell 公司)。

商品标示含谷氨酰胺的粉剂和颗粒等功能性食品均采购于网络平台,未开启时常温储存,保质期内测定。

1.2 试验方法

1.2.1 溶液的制备

1.2.1.1 水溶性 Sm-(S)-pdta 试剂的制备

将(S)-1,2-二氨基丙烷-2,6-N,N,N',N'-四乙酸(2 mmol,306.0 mg)加入到氧化钆(1 mmol,352.0 mg,0.05 mmol·mL⁻¹)的水溶液中,反应在磁力搅拌器上剧烈搅拌加热回流约 30 min 直至白色浑浊物全部溶解至透明澄清。将反应液冷却至室温,在冰浴下用 1 mol·L⁻¹ NaOH 约 2 mL 调节反应的 pH 至 8 左右。然后在旋蒸仪上旋去水溶剂,通过核磁共振一

维谱表征产品结构,并与文献进行比对,证实得到 Sm-(S)-pdta 试剂。为验证反应的可操作性和可重复性,实验室内部人员对该实验重复 3 次,确保反应能顺利进行。

1.2.1.2 标准储备液、内标、Sm-(S)-pdta 的配制

10 mg/mL DL-Gln、D-Gln 和 L-Gln 标准储备液:用天平分别精确称取 D-Gln 和 L-Gln 各 25.0 mg,充分混匀,以氘水为溶剂,用容量瓶定容至 5 mL,摇匀备用;精确称取 D-Gln 100.0 mg,用容量瓶定容至 10 mL,摇匀备用;同法制备 10 mg/mL 的 L-Gln 标准储备液。

10 mg/mL DT 标准储备液:精确称取 DT 100.0 mg,用容量瓶定容至 10 mL,摇匀,备用。

20 mg/mL Sm-(S)-pdta 标准储备液:用天平精确称取 Sm-(S)-pdta 500.0 mg,以氘水为溶剂,用容量瓶定容至 25 mL,摇匀备用。

以上储备液均置于 4 °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 20.0 mg,用超纯水溶解,超声辅助提取 10 min 后,定容至 2 mL,于涡旋振荡器上涡旋 5 min。取适量上层清液加入 PE 管中,加入 100 μL 10 mg/mL 的 DT 标准溶液,并向 PE 管中加入 450 μL 20 mg/mL 的 Sm-(S)-pdta 溶液,用 D₂O 定容至 1 mL。用移液枪取 600 μL 于核磁管中,充分摇匀后,待测。由于非氘代试剂体积改变会引起化学位移偏移,经实际考查化学位移偏移在 0.02 ppm 范围内不影响实际检测。

1.2.2 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):noesygprr1d,用于水(δ=4.79 ppm)特征峰信号压制;采样时间(Acquisition time, AQ):2.5 s;采样温度(T):298 K;弛豫延迟时间(D1):20 s;扫描次数(Number of scans, NS):32;谱宽(Sweep width, SW):10 ppm;观察道中心频率偏置(O1P):4.79 ppm;脉宽(Pulse width, PW):10 μs;增益(RG):32。在上述实验条件下,调整仪器参数,经调谐、锁场、匀场、采样,得到 ¹H-NMR 谱,再进行基线和相位调整。用水峰残余信号化学位移 4.79 ppm 定标。每批次样品检测前,检测温度稳定 5 min。

1.2.3 水溶性位移试剂 Sm-(S)-pdta 比例范围的确定

水溶性位移试剂与谷氨酰胺摩尔比会影响对映体是否有效分离,因此以 DL-Gln 为参考物质,设置 Sm-(S)-pdta/Gln 摩尔比为 0、1:6.52、1:3.26、1:1.63、1:1.30、1:1.09、1:0.93、1:0.82,考察了水溶

性位移试剂与 Gln 摩尔比变化对对映体谱峰分离情况的影响。

1.2.4 对映体质量比范围线性考察

谷氨酰胺对映体组分之间的过大差异会影响定量结果,设置 L-Gln、D-Gln 质量比 m_L/m_D 为 1:1、1.25:1、2:1、5:1、10:1、20:1、100:1 进行核磁检测,分别以 L-Gln、D-Gln 积分面积比为纵坐标,以 L-Gln、D-Gln 质量比为横坐标,绘制标准曲线进行线性关系考察。

1.2.5 标准曲线的绘制

向 7 支核磁管中分别移取一定体积标准品储备液,向每支核磁管中分别加入 Sm-(S)-pdta/Gln 摩尔比为 1.226 8 的水溶性位移试剂和 100 μL 质量浓度为 10 mg/mL 的内标溶液,用氘水定容至 600 μL,配制成 L-Gln、D-Gln 浓度分别为 100、200、500、800、1 000、1 500 和 2 000 μg/mL 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,绘制标准曲线。

1.2.6 精密度实验

选取一个谷氨酰胺对映体样品,按照 1.2.2 所述条件测试样品的核磁共振氢谱,同一天内连续测定 6 次,平行样取平均值,计算方法的日内精密度;连续测定 6 d,每天测定 1 次,计算方法的日间精密度。

1.2.7 基质加标回收率实验

取与检测样品组分类似的自行配制的固体饮料类基质样品约 20 mg,精密称定,分别向基质中添加低、中、高 3 个水平的左旋或右旋谷氨酰胺,每个水平平行测定 6 次,计算方法的平均回收率和相对标准偏差。

1.2.8 ¹H-qNMR 定量检测

核磁共振氢谱定量分析的基本原理是氢原子的响应信号(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。本研究选定 DT 苯环上相同化学位移的 4 个氢原子和 Gln 氨基酸 α 位的 1 个氢原子作为定量峰进行峰面积积分,按下式计算谷氨酰胺对映体的含量。

$$m_x = m_{std} \frac{M_x}{M_{std}} \frac{n_{std}}{n_x} \frac{A_x}{A_{std}} = m_{std} \frac{146.15}{210.10} \frac{4}{1} \frac{A_x}{A_{std}} \quad \text{式(1)}$$

$$= 2.7825 \times m_{std} \times \frac{A_x}{A_{std}}$$

式(1)中: m_x 为待测物含量; m_{std} 为内标含量; M_x 为待测物分子质量; M_{std} 为内标分子质量; 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。

1.3 液相色谱法评价

1.3.1 样品前处理

1.3.1.1 流动相配制

取 1-辛烷磺酸钠 1.730 g, 加 2 000 mL 水溶解, 再加 1 mL 磷酸, 超声混匀, 配制成 1-辛烷磺酸钠溶液, 待用。

1.3.1.2 待测样品制备

准确称取 0.1 g 待测样品, 用 50 mL 流动相配制成 2 mg/mL 的供试溶液, 用移液枪移取 4.5 mL 供试样品, 用容量瓶定容到 50 mL, 待测。

1.3.2 外标法标准曲线溶液配制

用移液枪分别移取 50、100、150、200、250、400 和 500 μ L 10 mg/mL DL-Gln 供试溶液, 用 100 mL 1-辛烷磺酸钠溶液:乙腈=95:5 的流动相溶液定容至 25 mL 容量瓶中, 配制成浓度分别为 20、40、60、80、100、160 和 200 μ g/mL 的系列梯度溶液, 待测。

1.3.2 色谱分离条件

参照文献[7]条件, 使用 Agilent Eclipse XDB-C18 型色谱柱(5 μ m, 4.6 \times 250 mm), 检测条件为: 1-辛烷磺酸钠溶液:乙腈=95:5 的流动相等度洗脱; 流速: 1.0 mL/min; 进样量: 20 μ L; 柱温: 38 $^{\circ}$ C; 检测波长: 210 nm。

1.4 统计学分析

用 MestRenova 9、Topspin 3.5 pl 7、Office 2013、Origin 9 等软件对数据进行统计、绘图分析处理。

2 结果

2.1 Sm-(S)-pdta 的合成制备

按 1.2.1.1 的方法制备水溶性手性镧系位移试剂 Sm-(S)-pdta, 合成简图如图 1。重复反应 3 次, 得到的产品为淡黄色晶体(平均产量 984.0 mg, 平均产率 96%), 其一维核磁氢谱、碳谱数据: ^1H NMR (600 MHz, D_2O) δ 3.91 (d, J = 13.1 Hz, 1H)、3.70 (d, J = 11.0 Hz, 1H)、3.01 (d, J = 15.4 Hz, 1H)、2.88 (d, J = 11.4 Hz, 2H)、2.68 (d, J = 15.4 Hz, 1H)、2.30 (brs, 2H)、1.10 (brs, 1H)、0.86 (d, J = 13.6 Hz, 1H)、0.46 (brs, 1H)、0.23 (d, J = 5.8 Hz, 3H)。 ^{13}C NMR (151 MHz, D_2O) δ 184.3, 183.7, 183.4, 182.9, 65.0, 64.2, 63.4, 61.2, 57.4, 54.9,

8.4。HRMS (ESI)测试 $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{N}_2\text{Sm}$ [M-H] $^-$ 理论准分子离子量为 453.995 29, 实际准分子离子量为 453.995 23。实验结果与文献^[23]报道相契合, 说明 Sm-(S)-pdta 得以成功制备。

2.2 测试条件的选择

2.2.1 内标及定量峰的选择

从图 2 可见, DL-Gln 在无外加位移试剂的情况下, 出峰的化学位移(氨基酸 α 位特征峰 δ = 3.78 ppm)基本相同; DT 性质稳定, 四个氢原子化学位移(δ = 7.88 ppm)在芳香区呈尖锐的单峰, 容易辨认, 与谷氨酰胺的特征峰化学位移互不干扰。因此, 本研究选择 DT 为内标物。当向谷氨酰胺和 DT 的混合溶液中加入位移试剂 Sm-(S)-pdta 后, DL-Gln 分子结构中 δ = 3.78 ppm 上的氢原子化学位移发生了明显的区分, 易于识别。因此, 本实验选取谷氨酰胺氨基酸 α 位特征峰作为定量峰进行后续定量研究。

2.2.2 主要参数优化

弛豫延迟时间(D1)是影响 NMR 定量峰面积准确性的重要参数之一, 其设定与纵向弛豫时间(T1)直接相关。为确保核自旋沿着极化磁场的方向完全恢复平衡, 保证被积分的信号强度与原子核数目完全成正比, D1 的设置通常应不小于 T1 的 5 倍^[24]。本实验采用反转恢复法测得谷氨酰胺的定量峰(3.78 ppm)和 DT 的定量峰(7.88 ppm)在 D_2O 中的 T1 分别为 1.35 s 和 3.95 s。为保证结果的准确性, 最终将 D1 设置为 20 s。

AQ 影响谱图质量及定量效果, 经优化最终确定 AQ 为 2.5 s; NS 对谱图的信噪比影响较大, 但 NS 太大影响实验时间, 经优化最终确定 NS 为 32 次能够满足定量测试需求。

2.2.3 分析方法学考察

2.2.3.1 水溶性位移试剂 Sm-(S)-pdta 比例范围的确定

按 1.2.3 法进行实验, 通过谱图 3 对比发现, 在形成络合物后, Sm-(S)-pdta 对底物诱导产生的化学位移偏移($\Delta\delta$)和对映体化学位移差值($\Delta\Delta\delta$)的变化逐渐增大, 具体分析结果见表 1。以特征峰质子共振信号为例, 当摩尔比由 0 增大至 1.226 8 时,

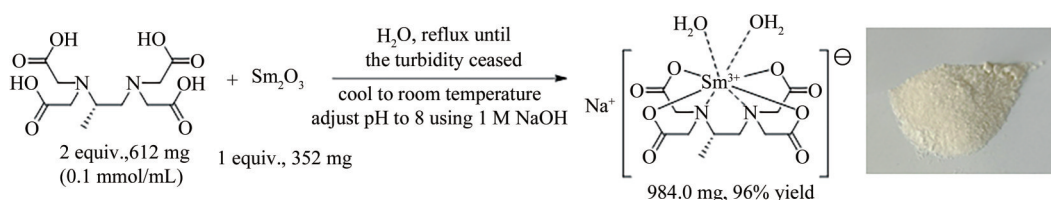


图 1 Sm-(S)-pdta 的合成路径

Figure 1 The synthetic route of Sm-(S)-pdta

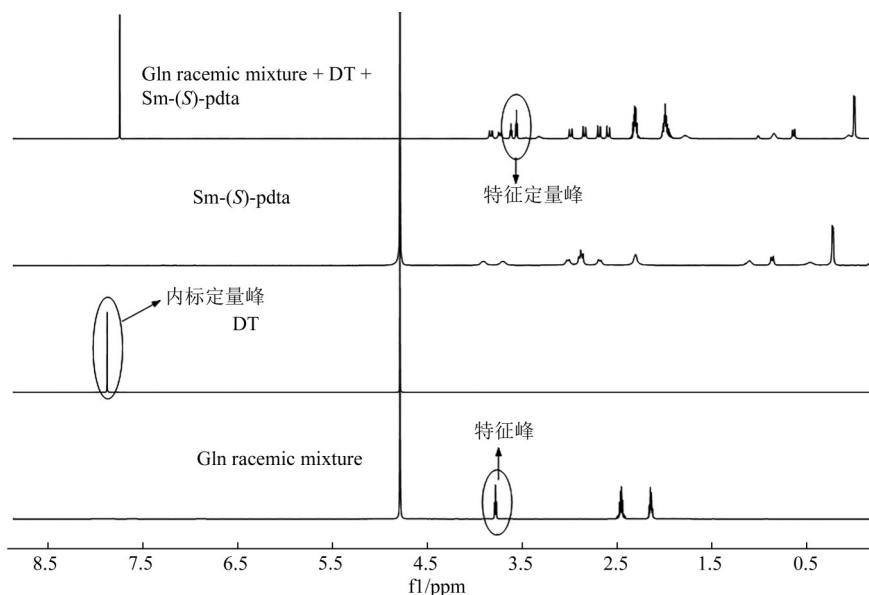


图2 标准品及混合物的 ^1H NMR 图

Figure 2 The ^1H NMR spectra of the standards and mixtures

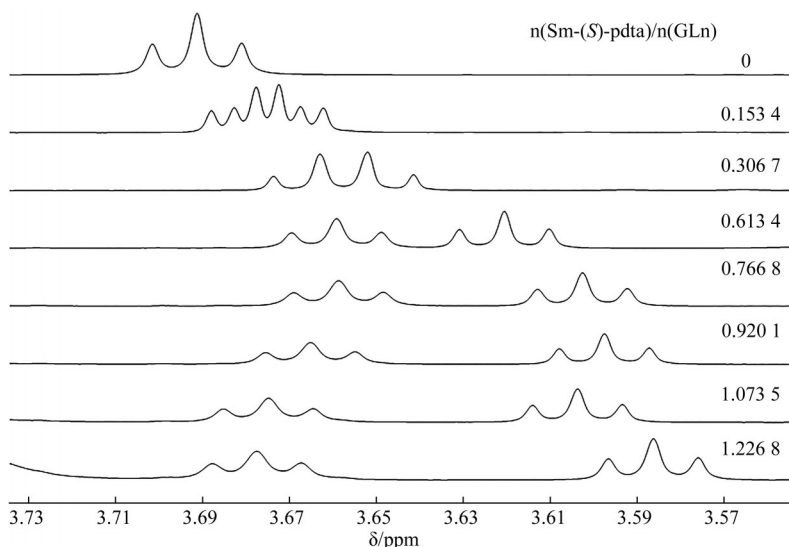


图3 Sm-(S)-pdta/Gln 比对化学位移的影响

Figure 3 The effect of Sm-(S)-pdta/Gln ratio on chemical shift

表1 Sm-(S)-pdta/Gln 比例对 (\pm) -Gln 产生的 $\Delta\delta$ 和 $\Delta\Delta\delta$ (ppm) 的影响
Table 1 Effect of Sm-(S)-pdta/Gln ratio on the $\Delta\delta$ and $\Delta\Delta\delta$ (ppm) of (\pm) -Gln

		摩尔比/ppm							
		0	0.153 4	0.306 7	0.613 4	0.766 8	0.920 1	1.073 5	1.226 8
δ/Hz	L-Gln	3.691 3	3.672 4	3.652 0	3.620 5	3.602 6	3.597 5	3.603 7	3.586 2
	D-Gln	3.691 3	3.677 7	3.663 0	3.659 2	3.658 7	3.665 1	3.674 8	3.677 5
$\Delta\delta/\text{Hz}$	L-Gln	0	11.340 0	23.580 0	42.480 0	53.220 0	56.280 0	52.560 0	63.060 0
	D-Gln	0	8.160 0	16.980 0	19.260 0	19.560 0	15.780 0	9.900 0	8.280 0
$\Delta\Delta\delta/\text{Hz}$		0	3.180 0	6.600 0	23.220 0	33.660 0	40.560 0	42.660 0	54.780 0

随着位移试剂的含量增大, $\Delta\Delta\delta$ 由 0 增大到 54.78 Hz, 即特征峰质子对映体识别逐渐清晰, 对于对映体识别分析来说是有利的。但从谱图可以看出, 化学位移差值过大, 特征峰质子信号会与水溶性位移试剂质子信号重叠, 并且 Sm^{3+} 离子的诱导作用使谱峰的半峰宽明显增大, 这些均给对映体识别及相对定量分析造成麻烦。因此, 水溶性

位移试剂的量并不是越大越好, 控制合理的 Sm-(S)-pdta/Gln 摩尔比, 是对映体手性识别分析的关键。

根据上述分析, 当 Sm-(S)-pdta/Gln 摩尔比范围为 0.766 8~1.226 8 时, 对映体信号区分较好, 能够满足将来定量分析的要求。因此, 将 Sm-(S)-pdta/Gln 比值设为 0.766 8~1.226 8。

2.2.3.2 对映体质量比范围线性考察

按 1.2.4 法进行实验,结果表明 L-Gln、D-Gln 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 $y=0.9911x+0.0168$, $R^2=0.9996$ 。因此,当 m_L/m_D 在 0.1~100 区间时,方法能够适用于谷氨酰胺对映体含量的测定。

2.2.3.3 线性范围和检出限

按 1.2.5 法进行采样实验,以 L-Gln、D-Gln 积分

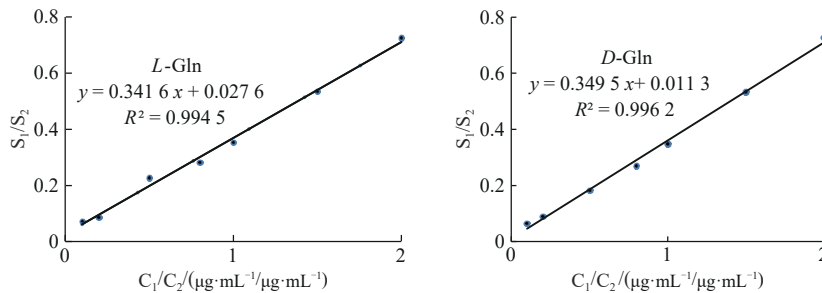


图4 L-Gln与D-Gln与DT积分面积比与浓度比的线性关系

Figure 4 The relationship between integral area ratio and concentration ratio of Gln with DT

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],检出限为3倍信噪比对应的浓度,定量限为10倍信噪比对应的浓度。本研究将质量浓度为 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的谷氨酰胺溶液逐步稀释,配成 50.0 、 40.0 、 30.0 、 20.0 、 10.0 、 $5.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的标准系列。实验结果表明,当谷氨酰胺质量浓度降到 $30.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,定量特征峰的信噪比为 3.05 。因此,本方法谷氨酰胺的最低检出浓度为 $30.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量限为 $100.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.2.3.4 精密度

使用 $^1\text{H-qNMR}$ 计算谷氨酰胺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

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。如图4所示, L-Gln、D-Gln 浓度在 $100.0\sim 2000.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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;表明使用 DT 作为内标物时,定量核磁氢谱测定谷氨酰胺对映体含量的方案是可行的。液相色谱法测试 DL-Gln 的积分面积与浓度的线性回归方程为 $y=803x+1600$, $R^2=0.9999$ 。

密度。实验结果表明, L-Gln 的日内精密密度为 0.52% , 日间精密密度为 0.48% ; D-Gln 的日内精密密度为 0.51% , 日间精密密度为 0.49% 。因此,使用 $^1\text{H-qNMR}$ 测定谷氨酰胺对映体具有较高的精密密度。

2.2.3.5 基质加标回收率

向与检测样品组分类似的自行配制的固体饮料类基质样品中添加低、中、高三个水平的谷氨酰胺,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2。其中 L-Gln 的平均回收率为 $94.27\%\sim 116.07\%$, 相对标准偏差为 $1.15\%\sim 1.84\%$; D-Gln 的平均回收率为 $97.14\%\sim 100.24\%$, 相对标准偏差为 $0.18\%\sim 0.67\%$ 。

表2 加标回收率及相对标准偏差

Table 2 Average recoveries and relative standard deviations of this methods

基质含量/(g/kg)		加入量/(g/kg)		实测量/(g/kg)		平均回收率/%		RSD/%	
L	D	L	D	L	D	L	D	L	D
		20	20	63.14	20.04	116.07	100.24	1.84	0.53
40	0	40	40	77.71	38.85	94.27	97.14	1.15	0.18
		120	120	154.89	117.59	95.74	97.97	1.35	0.67

2.3 方法比对

采用所建立的定量核磁共振氢谱法和 1.3 液相色谱法分别对 5 批次功能性食品进行检测,结果如表3所示,两种方法的检测结果无显著性差异,进一步说明所建立的定量核磁共振氢谱法的准确、可靠性。核磁共振氢谱法的优势在于能够证实样品中是否含有 D-Gln 及其含量的多少。两种方法的测试结果普遍偏小,可能与谷氨酰胺的吸水性强有关。

表3 不同检测方法对比

Table 3 Comparison of different detected methods

样品编号	检测结果	
	L-Gln/%	D-Gln
1	82.5 ^a /84.1 ^b /85.1 ^c	未检测 ^a /未检出 ^b
2	96.3 ^a /96.4 ^b /97.8 ^c	未检测 ^a /未检出 ^b
3	96.0 ^a /94.3 ^b /99.0 ^c	未检测 ^a /未检出 ^b
4	99.6 ^a /96.2 ^b /≥99.0 ^c	未检测 ^a /未检出 ^b
5	95.0 ^a /95.8 ^b /≥99.0 ^c	未检测 ^a /未检出 ^b

注:^a为液相色谱法检测结果;^b为核磁共振法检测结果;^c为样品标示含量

3 结论

本研究开发了一种基于¹H-qNMR的水溶性镧系位移试剂识别法测定功能性食品中谷氨酰胺对映体各自含量的方法。通过水峰压制脉冲序列采样,在DT作为内标物质的前提下,利用水溶性镧系位移试剂Sm-(S)-pdta实现了对谷氨酰胺对映体的精确识别和可靠定量。所建立的方法回收率高、重现性好,前处理过程简便,15 min内即可完成单个样品的测试分析,能为日常生产、监管、案件稽查提供有力技术支撑。该方法与液相色谱法的测试结果与标示值间无显著性差异,且该方法能够指示实际样品中D-Gln的含量,显示出该方法具有一定的实用性。对于痕量物质及基质复杂的样品的精确定量,核磁共振法的灵敏度不足限制了其广泛应用。因此,磁共振信号增强装置和超低温探头的研发,将是未来解决这一问题的主要研究方向。

参考文献

- [1] 史岩峰. 谷氨酰胺对运动能力影响的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(8): 3159-3163.
SHI Y F. Effect of glutamine on exercise ability[J]. Journal of Food Safety & Quality, 2021, 12(8): 3159-3163.
- [2] 师小春, 吴先富, 肖新月. 定量核磁共振法在同分异构体含量测定中的应用[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1914-1922.
SHI X C, WU X F, XIAO X Y. Advances in application of quantitative nuclear magnetic resonance in determination of isomers[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020, 40(11): 1914-1922.
- [3] 张帆, 罗域城. 反相高效液相色谱法同时测定L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒中L-谷氨酰胺和呱仑酸钠的含量[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(8): 1448-1450.
ZHANG F, LUO Y C. RP-HPLC simultaneous determination of L-glutamine and sodium gualenate in L-glutamine and sodium gualenate granules[J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2010, 30(8): 1448-1450.
- [4] 周洁, 左利民, 王智亮, 等. 毛细管电泳法测定L-谷氨酰胺呱仑酸钠颗粒中2种主成分的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(15): 2106-2108.
ZHOU J, ZUO L M, WANG Z L, et al. Content determination of 2 kinds of main components in L-glutamine and sodium gualenate granules by capillary electrophoresis [J]. China Pharmacy, 2015, 26(15): 2106-2108.
- [5] 匡宇明, 张继荣, 贺秀玲. 超高效液相色谱-串联质谱方法测定谷氨酰胺胶囊中谷氨酰胺含量[J]. 中国当代医药, 2021, 28(2): 18-21.
KUANG Y M, ZHANG J R, HE X L. Determination of glutamine content in glutamine capsules by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. China Modern Medicine, 2021, 28(2): 18-21.
- [6] 谷亦平, 杨园. 柱前衍生化HPLC测定复方谷氨酰胺肠溶胶囊中的L-谷氨酰胺[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(1): 78-81.
GU Y P, YANG Y. Determination of L- glutamine in compound glutamine enteric Sol capsule by pre-column derivatization HPLC [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2022, 39(1): 78-81.
- [7] 柳俊, 李汉西, 黄琪评, 等. HPLC法测定特医食品基肠中谷氨酰胺的含量[J]. 食品工程, 2020, 157(4): 52-54.
LIU J, LI H X, HUANG Q P, et al. Determination of glutamine in foods for special medical purpose Jichang by HPLC[J]. Food Engineering, 2020, 157(4): 52-54.
- [8] 张海华, 陶冠军, 周惠明. UPLC快速测定可溶性肽或蛋白中谷氨酰胺含量[J]. 食品工业科技, 2012, 33(1): 338-339.
ZHANG H H, TAO G J, ZHOU H M. Quick determination of glutamine in soluble protein or peptide by UPLC [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(1): 338-339.
- [9] 向仲朝, 杨文婉, 李佳佳. 饮料、发酵酒及调味品中L-谷氨酰胺的高效液相色谱测定法[J]. 现代预防医学, 2016, 43(15): 2736-2738.
XIANG Z Z, YANG W W, LI J J. Determination of L-glutamine in the fermented wine, drink and spice by high-performance liquid chromatography [J]. Modern Preventive Medicine, 2016, 43(15): 2736-2738.
- [10] 王荣艳, 徐聪玲, 李海龙. UPLC-MS/MS法测定乳基食品中谷氨酰胺含量研究[J]. 中国乳业, 2019, 206(2): 63-67.
WANG R Y, XU C L, LI H L. Determination of glutamine content in milk based foods by UPLC-MS/MS method [J]. China Dairy, 2019, 206(2): 63-67.
- [11] 贾珊珊, 李增宁, 骆彬, 等. 毛细管电泳紫外法检测重度创伤患者血清谷氨酰胺含量的实验研究[J]. 临床误诊误治, 2012, 25(1): 50-52.
JIA S S, LI Z N, LUO B, et al. Determination of glutamine in serum of the patients with severe trauma by capillary electrophoresis with UV detection [J]. Clinical Misdiagnosis & Mistherapy, 2012, 25(1): 50-52.
- [12] 韩雨钊, 姜悦, 林茂, 等. LC-MS/MS法测定人体血浆中谷氨酰胺的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2016, 33(7): 572-576.
HAN Y Z, JIANG Y, LIN M, et al. Determination of glutamine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. China Industrial Economics, 2016, 33(7): 572-576.
- [13] 王婷, 蒋学华, 王凌. HPLC-MS/MS测定大鼠血浆中谷氨酰胺的浓度及其应用[J]. 中国药理学杂志, 2015, 50(3): 253-257.
WANG T, JIANG X H, WANG L. HPLC-MS/MS method for determination of glutamine in rat plasma and application to pharmacokinetic study [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2015, 50(3): 253-257.
- [14] 师小春, 张雅军, 吴先富, 等. 定量核磁共振质谱法测定依诺肝素钠中多硫酸软骨素和硫酸皮肤素的含量[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(11): 1935-1939.
SHI X C, ZHANG Y J, WU X F, et al. Determination of oversulfated chondroitine sulfate and dermatan sulfate in enoxaparin sodium by quantitative proton nuclear magnetic resonance [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020, 40(11): 1935-1939.

- [15] WANG Z Y, WANG Z Y, JIANG M M, et al. Qualitative and quantitative evaluation of chemical constituents from Shuanghuanglian injection using nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2022, 2022: 7763207.
- [16] 吉鑫, 樊双喜, 杨彤晖, 等. 核磁共振法测定食品中水苏糖的含量[J]. *食品与发酵工业*, 2019, 45(19): 251-257.
JI X, FAN S X, YANG T H, et al. Quantitative determination of stachyose in foods by NMR[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2019, 45(19): 251-257.
- [17] HUANG Y J, LI X, PENG X R, et al. NMR-based structural classification, identification, and quantification of triterpenoids from edible mushroom *Ganoderma resinaceum* [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(9): 2816-2825.
- [18] 韩智, 江丰, 周密, 等. 核磁共振磷谱定量测定肉制品中磷酸盐的含量[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(9): 275-280.
HAN Z, JIANG F, ZHOU M, et al. Quantitative determination of phosphate in meat products by ^{31}P -nuclear magnetic resonance [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(9): 275-280.
- [19] 傅利军, 刘莉, 张秀敏, 等. 核磁共振氢谱定量检测3种食用菌麦角固醇[J]. *食品科学*, 2021, 42(20): 135-144.
FU L J, LIU L, ZHANG X M, et al. Quantitative detection of ergosterol in edible fungi by nuclear magnetic resonance spectroscopy [J]. *Food Science*, 2021, 42(20): 135-144.
- [20] 甄少波. 定量核磁氢谱法快速测定食用醋中乙酸含量[J]. *中国食品添加剂*, 2022, 33(5): 148-153.
ZHEN S B. Rapid determination of acetic acid content in vinegar using quantitative ^1H NMR method [J]. *China Food Additives*, 2022, 33(5): 148-153.
- [21] LI X, HU K. Quantitative NMR studies of multiple compound mixtures [J]. *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 2017, 90: 85-143.
- [22] SINGH N, TAIBON J, PONGRATZ S, et al. Absolute content determination by quantitative NMR (qNMR) spectroscopy: A curious case of aldosterone [J]. *RSC Advances*, 2021, 11(38): 23627-23630.
- [23] HRUBÁ L, BUDĚŠÍNSKÝ M, PÍCHA J, et al. Simplified syntheses of the water-soluble chiral shift reagents Sm-(R)-pdta and Sm-(S)-pdta [J]. *Tetrahedron Letters*, 2013, 54(47): 6296-6297.
- [24] MULDER F A A, TENORI L, LUCHINAT C. Fast and quantitative NMR metabolite analysis afforded by a paramagnetic Co-solute [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2019, 58(43): 15283-15286.
- [25] MOLAABASI F, TALEBPOUR Z. Enantiomeric discrimination and quantification of the chiral organophosphorus pesticide fenamiphos in aqueous samples by a novel and selective ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopic method using cyclodextrins as chiral selector [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(3): 803-808.