

实验技术与方法

食品营养强化剂L-苏糖酸镁中L-苏糖酸含量高效液相色谱
检测方法的建立及优化

田洪芸,王勇,张颖,刘毅,陆垣宏,胡明燕,胡梅,王骏

(山东省食品药品检验研究院,山东省特殊医学用途配方食品质量控制工程技术研究中心,国家市场监督管理总局
重点实验室(肉及肉制品监管技术),产业技术基础公共服务平台,山东 济南 250101)

摘要:目的 建立基于高效液相色谱检测食品营养强化剂L-苏糖酸镁产品中L-苏糖酸含量的方法。方法 试样经水溶解后,使用C18反相色谱柱分离,以0.1%磷酸水溶液-乙腈为流动相,流速为0.8 mL/min,柱温为40℃,使用二极管检测器于210 nm下进行检测。结果 L-苏糖酸标准溶液在20~500 µg/mL范围内线性关系良好,相关系数 $r^2>0.999$,检出限为1 g/100 g,定量限为2.5 g/100 g。日内精密度、日间精密度测试结果显示相对标准偏差为0.10%~0.19%,再现性测试结果显示测试结果相对标准偏差为0.25%~0.40%。结论 该方法精密度高、稳定性好、操作简便,可满足L-苏糖酸镁产品质量控制的要求。

关键词: L-苏糖酸镁; L-苏糖酸; 液相色谱法; 检出限; 定量限; 精密度

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2025)02-0138-07

DOI: 10.13590/j.cjfh.2025.02.005

Establishment and optimization of a HPLC method for determination of L-threonic acid in
magnesium L-threonateTIAN Hongyun, WANG Yong, ZHANG Ying, LIU Yi, LU Yuanhong, HU Mingyan,
HU Mei, WANG Jun(Shandong Institute of Food and Drug Control, Shandong Research Center of Engineering and
Technology for Quality Control of Food for Special Medical Purposes, Key Laboratory of Supervising
Technology for Meat and Meat Products for State Market Regulation, Industrial Technology Foundation
Public Service Platform, Shandong Ji'nan 250101, China)

Abstract: **Objective** To develop a high-performance liquid chromatography-based method for the determination of L-threonate in magnesium L-threonate products. **Methods** The samples were dissolved in water and separated by C18 reversed-phase chromatography with 0.1% phosphoric acid solution and acetonitrile as mobile phase. The flow rate was 0.8 mL/min and the column temperature was 40℃, detection was performed at 210 nm using a diode detector. **Results** The linear relationship between the reference materials of L-threonoid acid was good in the range of 20-500 µg/mL, and the correlation coefficient was $r^2>0.999$. The limit of detection was 1 g/100 g, and the limit of quantification was 2.5 g/100 g. The relative standard deviation (RSD) of intra-day precision and inter-day precision was 0.10%-0.19%, and RSD of the reproducibility was 0.25%-0.40%. **Conclusion** The method has the advantages of high precision, good stability and simple operation, and can meet the requirements of quality control of magnesium L-threonate product.

Key words: Magnesium L-threonate; L-threonic acid; chromatography; detection limit; quantitative limit; precision

收稿日期: 2024-08-06

基金项目: 国家卫生健康委员会食品安全国家标准制定项目(spaq-2019-118); 山东省市场监督管理局科技创新项目(2022298)

作者简介: 田洪芸 女 正高级工程师 研究方向为食品安全检测 E-mail: sdsythy@126.com

通信作者: 王骏 男 研究员 研究方向为食品安全检测 E-mail: sdzjywj@163.com

L-苏糖酸镁是 L-苏糖酸的有机盐, L-苏糖酸盐可以促进人体对抗坏血酸的吸收和利用^[1]。目前, L-苏糖酸镁主要作为食品营养强化剂使用, 国家卫生和计划生育委员会 2016 年第 8 号公告批准其为食品营养强化剂新品种^[2], 美国食品药品监督管理局 GRAS(GRN)NO. 499 公告将其作为公认安全的物质管理^[3]。相关研究表明, L-苏糖酸镁可显著提高大脑中的镁离子水平, 对突触可塑性有正向调节的功能, 可治疗多种神经系统疾病、改善精神分裂症状^[4]、增强记忆能力、改善记忆缺陷等^[5-6]。国家卫生健康委员会《关于印发 2019 年度食品安全国家标准第二批立项计划的通知》(国卫办食品函〔2019〕704 号)立项制定 L-苏糖酸镁食品安全国家标准^[7]。L-苏糖酸含量是产品的重要质量指标之一, 国内外法规标准均规定了 L-苏糖酸镁产品中 L-苏糖酸指标的限量要求, 但未规定检测方法。因 L-苏糖酸检测方法的缺失给产品质量控制、工艺改进带来一定困扰, 因此建立基于液相色谱分析的精准定量检测方法对提升企业产品质量的控制水平, 促进产业高质量发展, 避免在全球化贸易背景下技术壁垒导致的经济损失具有重要意义。

目前, 相关文献对 L-苏糖酸检测方法的报道较少, 采用液相色谱-质谱法测定血液、尿液中的 L-苏糖酸痕量分析方法不适用于营养强化剂原料中 L-苏糖酸含量的测定^[8-14]。因此, 本文采用高效液相色谱技术开展 L-苏糖酸含量检测方法的研究, 并对方法的线性范围、检出限、定量限、日内/间精密密度及再现性等指标开展验证^[15-16], 以建立满足食品营养强化剂 L-苏糖酸镁中 L-苏糖酸的精确定量分析方法, 为产品质量控制提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

高效液相色谱仪配备二极管阵列检测器(沃特世公司, 美国); 分析天平(梅特勒-托利多, 瑞士)。

L-苏糖酸镁样品(生产企业提供, 江苏、山东、河南); 磷酸(分析纯, 国药化学试剂, 上海); 乙腈(色谱纯, 默克, 德国); L-苏糖酸钙标准品(纯度 $\geq 98\%$, 佳途科技, 广州); 0.22 μm 水相微孔滤膜(安普, 上海)。

1.2 方法

1.2.1 试剂配制

L-苏糖酸标准溶液(1 mg/mL): 准确称取 L-苏糖酸钙标准物质 0.115 g(精确至 0.01 mg), 折算为 L-苏糖酸含量为 100 mg, 加水溶解并定容至

100 mL。或使用其他 L-苏糖酸盐标准物质时, 应折算成 L-苏糖酸含量为 100 mg, 加水溶解并定容至 100 mL。

标准系列工作液配制: 分别移取一定体积的 L-苏糖酸标准溶液, 用水稀释定容, 配制成浓度分别为 20.0、50.0、100.0、200.0、500.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液, 临用现配。

磷酸溶液(0.1%): 移取 1 mL 磷酸至烧杯中用适量水稀释至 1 000 mL。

1.2.2 样品前处理

称取 0.1 g(精确至 0.1 mg)试样, 加水溶解并定容至 50 mL, 摇匀。移取 1.0 mL 试液于 10 mL 容量瓶中, 加水定容后摇匀, 经 0.22 μm 水相微孔滤膜过滤, 滤液供液相色谱测定。

1.2.3 色谱条件

色谱柱: C18 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 流动相: 0.1% 磷酸水溶液-乙腈(90:10); 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 20 μL ; 检测波长: 210 nm。

1.2.4 标准曲线绘制

将 L-苏糖酸标准系列工作液分别注入液相色谱仪中, 测得相应的色谱峰面积, 以标准系列工作液中 L-苏糖酸的浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.2.5 样品测定

将试样溶液注入液相色谱仪中得到峰面积, 根据标准曲线得到待测溶液中 L-苏糖酸的含量。

2 结果

L-苏糖酸镁中会存在少量由生产过程带入的草酸杂质, 此外样品中还可能存在少量由原料带入的乳酸、乙酸等有机酸, 这些物质可能会在本方法检测波长下产生紫外吸收信号, 从而对检测结果造成影响, 因此通过对液相色谱流动相洗脱程序的优化可有效分离 L-苏糖酸杂酸色谱峰, 进而确保色谱分离的可靠性和检测结果的准确性。

2.1 流动相的优化

L-苏糖酸属于水溶性有机酸, 流动相中加入适量的有机相对色谱系统的稳定性、延长使用周期有利。方法研制过程中对甲醇、乙腈的不同添加比例的色谱分离效果进行比较。首先使用 0.1% 磷酸水溶液-甲醇(90:10)及 0.1% 磷酸水溶液-乙腈(90:10)作为流动相进行试验, 考察了流速为 0.8 mL/min 时的色谱分离效果, 如图 1 所示。结果显示, 采用甲醇作为流动相在谱图中 L-苏糖酸主峰后有显著的“倒峰”区域(吸光度负值)且直接影响主峰积分, 因此甲醇并不适合作为流动相溶剂进行使用。相

比之下,采用0.1%磷酸水溶液-乙腈(90:10)为流动相时分离效果及基线干扰较为理想。这可能与

甲醇在紫外低波长区域的紫外吸收干扰高于乙腈有关。结果见图1。

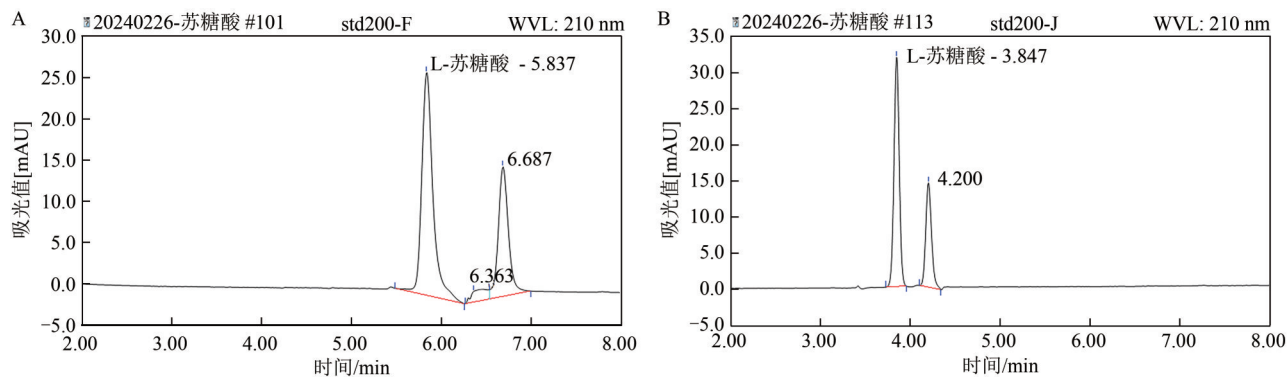


图1 10%甲醇添加流动相(A)及10%乙腈添加流动相(B)的标准溶液色谱图

Figure 1 Chromatograms of the standard solutions with the mobile phase added with 10% methanol (A) and the mobile phase added with 10% acetonitrile (B)

为进一步确定最优流动相比例,在0.8 mL/min流速条件下,分别对流动相中乙腈添加比例为

2.5%、5%和10%时的标准溶液及两个典型样品色谱分离效果进行考察,结果如图2~4所示。

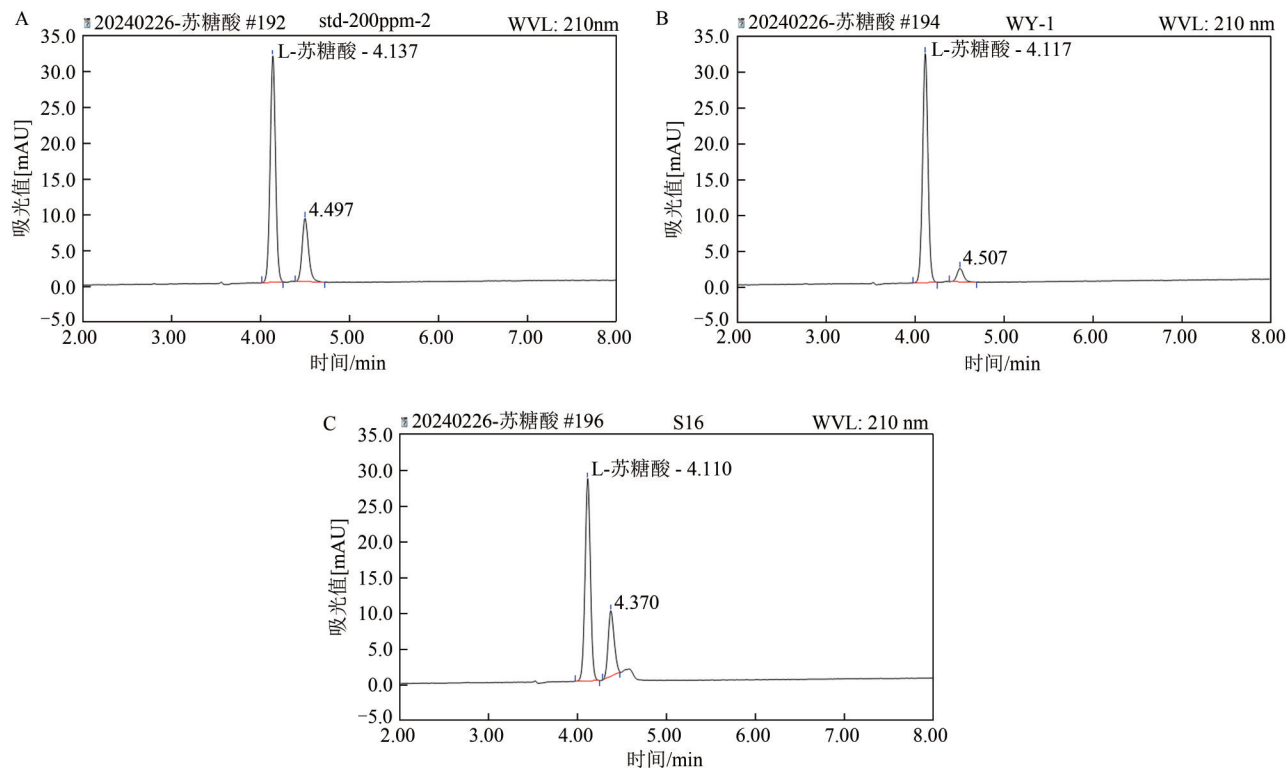


图2 乙腈添加比例2.5%时标样(A)、样品1(B)和样品2(C)色谱图

Figure 2 Chromatograms of the standard solutions (A), sample 1 (B) and sample 2 (C) with the mobile phase added with 2.5% methanol

结果显示,在流动相中乙腈比例分别为2.5%、5%和10%时,L-苏糖酸的主峰保留时间无明显变化,但后杂峰的保留时间随乙腈比例增加而增大,较高比例的乙腈能较好地实现主峰、杂峰分离效果。因此本方法最终确定的流动相中乙腈添加量为10%。

2.2 最佳检测波长的确定

为确定最佳检测波长,采用二极管阵列检测器对L-苏糖标准溶液(500 $\mu\text{g/mL}$)进行了200~400 nm

全扫描。由扫描结果可知,L-苏糖酸的吸光度随扫描波长的增大而降低。为进一步确定最佳检测波长,对200、210、220、230 nm波长进行了色谱图提取对比。光谱结果显示220、230 nm条件下的峰高有明显降低,对方法的灵敏度、检出限影响较大。此外,由于流动相本底及基质干扰物的吸光干扰,200 nm波长在液相色谱分析中较少使用,最终确定210 nm作为二极管阵列检测器的最佳检测波长。

由扫描结果可知,L-苏糖酸的吸光度随扫描波

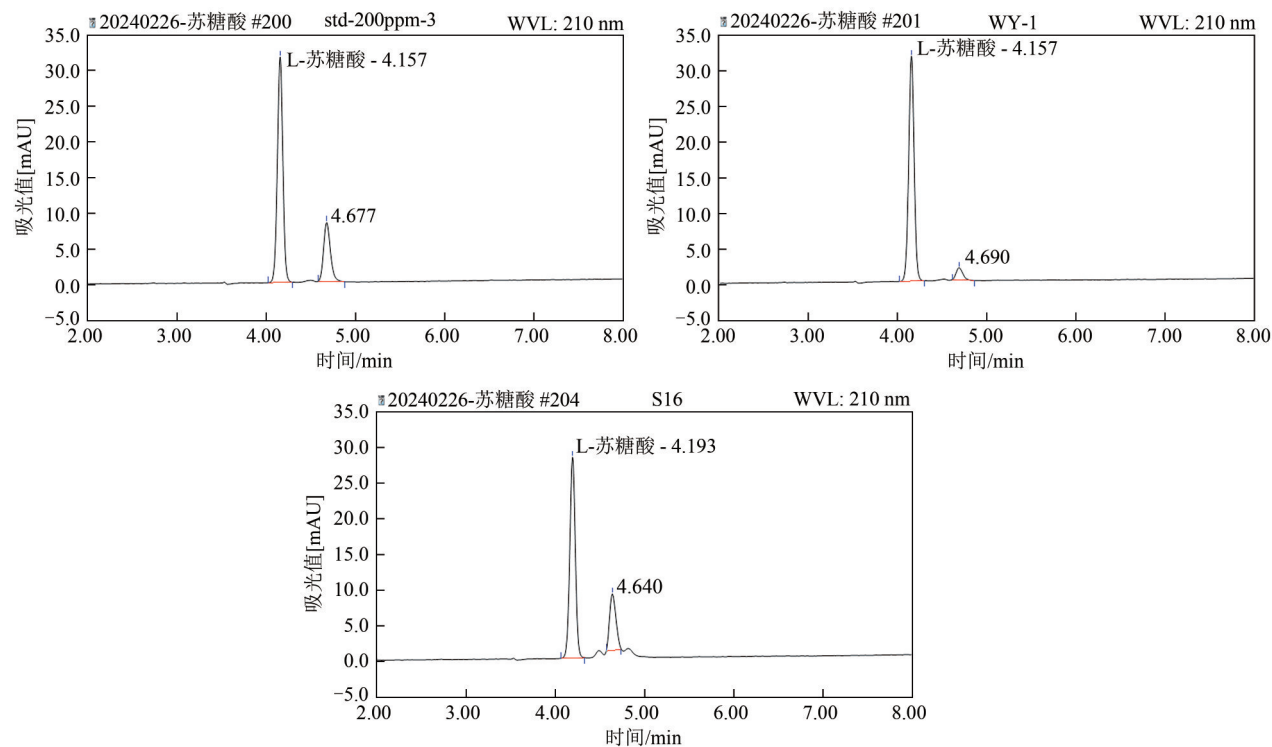


图 3 乙腈添加比例 5% 时标样(A)、样品 1(B)和样品 2(C)色谱图

Figure 3 Chromatograms of the standard solutions (A), sample 1 (B) and sample 2 (C) with the mobile phase added with 5% methanol

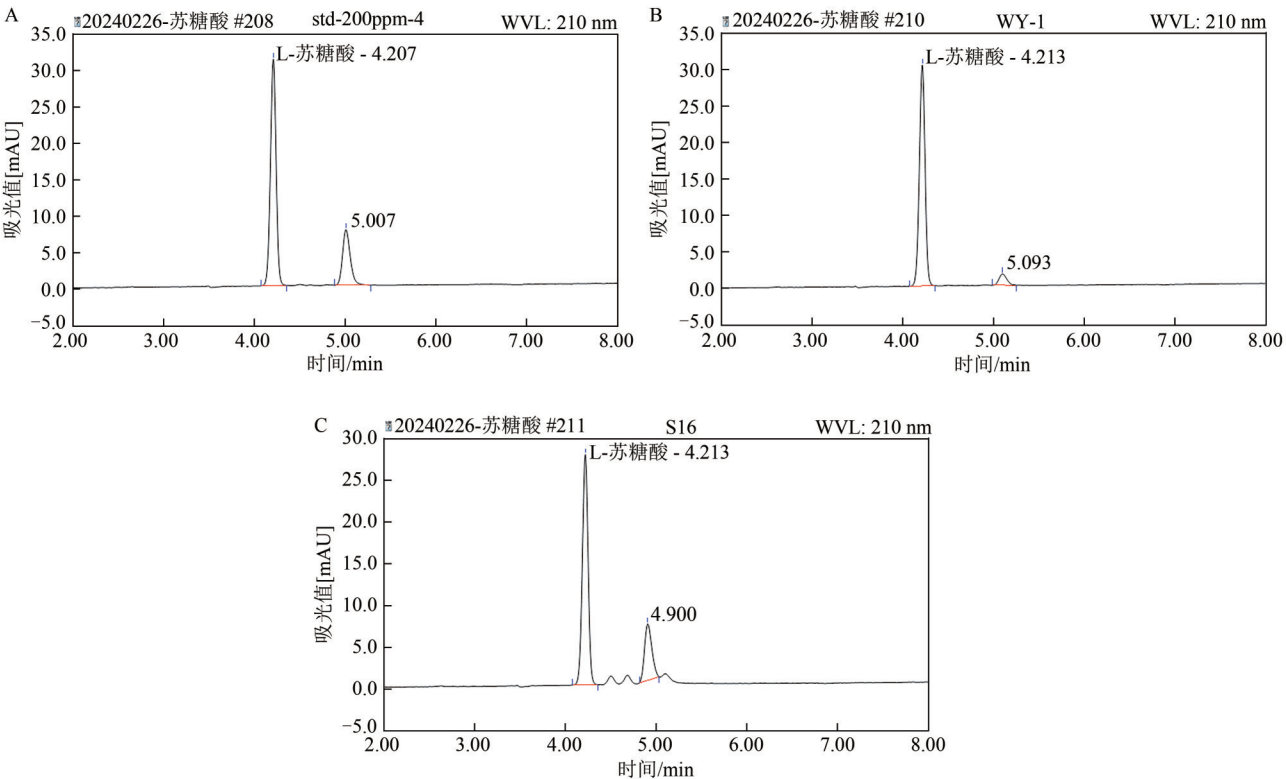


图 4 乙腈添加比例 10% 时标样(A)、样品 1(B)和样品 2(C)色谱图

Figure 4 Chromatograms of the standard solutions (A), sample 1 (B) and sample 2 (C) with the mobile phase added with 10% methanol

长的增大而降低。为进一步确定最佳检测波长,对 200 nm、210 nm、220 nm、230 nm 波长进行了色谱图提取对比。结果见图 5。

对 200、210、220、230 nm 波长进行了色谱图提取对比,光谱结果显示 220、230 nm 条件下的峰高

降有显著降低,对方法的灵敏度、检出限影响较大。此外,由于流动相本底及基质干扰物的吸光干扰,200 nm 波长在液相色谱分析中较少使用,本文最终确定 210 nm 作为二极管阵列检测器的最佳检测波长。结果见图 6。

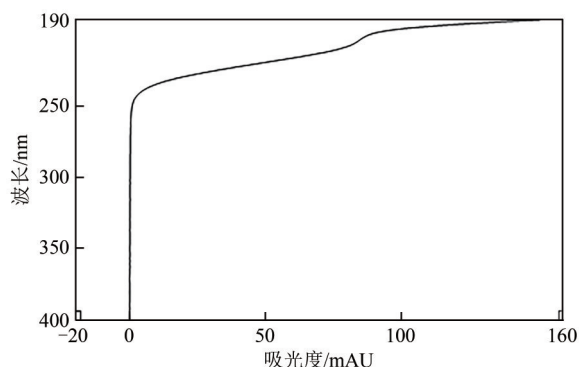


图5 L-苏糖酸标准溶液色谱峰扫描光谱图

Figure 5 L-threonic acid standard solution chromatogram peak scanning spectrum

2.3 检测条件的优化

2.3.1 样品前处理溶剂的优化

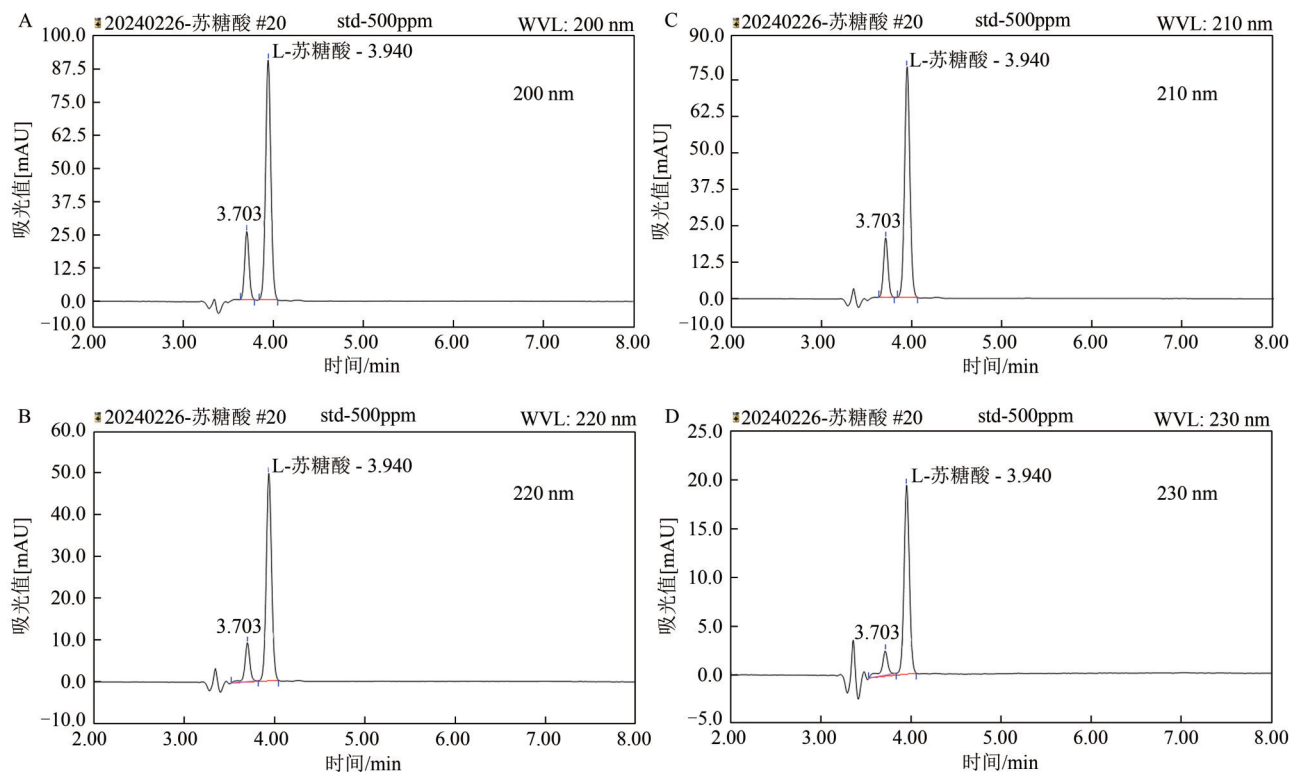
为确定最佳检测条件,对2批次代表性样品分别用流动相溶液、水配制后进行色谱分离,以确定试样配制用最佳溶剂。由液相色谱图可知,2种溶

剂配制样品的色谱分离效果无明显差别,为了便于操作,最终确定使用水作为配制溶剂。结果见图7。

由分别采用流动相、水配制样品后的液相色谱图可知,2种溶剂配制样品的色谱分离效果无明显差别,为了便于操作,最终确定使用水作为配制溶剂。

2.3.2 标准曲线、检出限和定量限

因L-苏糖酸镁中L-苏糖酸的含量在82%~91%之间,若称样量为0.1 g,需将试样稀释5 000倍后其仪器分析浓度才能达到200 mg/L。本研究测试了L-苏糖酸标准溶液浓度在20~500 $\mu\text{g/mL}$ 范围内的线性曲线,结果显示线性方程为 $Y=0.0108X-0.0084$,相关系数 $r^2=0.999$,线性良好。采用3倍信噪比和10倍信噪比法计算方法的检出限和定量限,并采用20平行加标测试,结果显示仪器检出限、定量限分别为2.5 $\mu\text{g/mL}$,对应的方法检出限、定量限分别为1 g/100 g、2.5 g/100 g。



注:A为200 nm;B为210 nm;C为220 nm;D为230 nm

图6 不同波长下L-苏糖酸标准溶液相色谱图

Figure 6 Chromatograms of L-threonylacid standard solution at different wavelengths

2.3.3 重复性、再现性

试验选取5批次代表性样品进行6次平行测定并计算相对标准偏差(Relative standards, RSD),考察了日内精密度、日间精密度和方法再现性。日内精密度测试结果显示(表1),6批次样品6平行测定结果的相对标准偏差为0.14%~0.19%,方法

精密度良好。

为进一步确认方法的科学性,同时进行了日间精密实验,连续6 d上午对同一样本进行6次平行测试。结果显示(表2),6次平行测定结果的相对标准偏差为0.10%~0.18%,方法日间精密度良好。

再现性测试以实验室、高效液相色谱仪及实验员

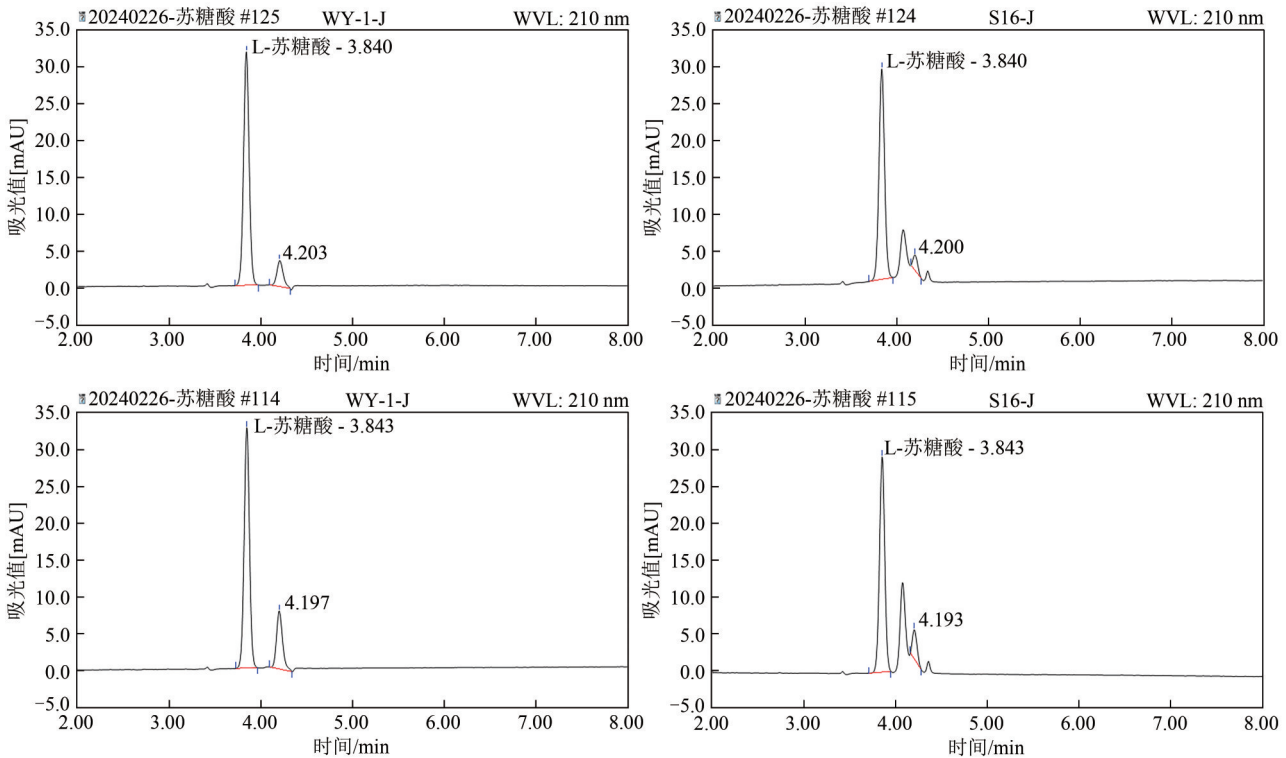


图7 流动相溶解样品(上图)、水溶解样品(下图)液相色谱图

Figure 7 Liquid chromatogram of mobile phase dissolved sample (top) and water dissolved sample (bottom)

表1 日内精密度测试结果

Table 1 Results of precision test within day								
样本 编号	L-苏糖酸含量/%						平均值	RSD/%
	平行1	平行2	平行3	平行4	平行5	平行6		
JH-2	87.09	86.72	86.79	86.92	86.98	86.68	86.86	0.16
WY-1	88.19	87.85	87.94	88.21	87.88	87.89	87.99	0.16
QD-1	88.16	87.82	87.73	87.84	87.75	87.61	87.82	0.19
S1	88.54	88.32	88.28	88.69	88.30	88.28	88.40	0.17
S16	88.13	88.18	88.44	88.18	88.28	88.45	88.28	0.14
L35	86.05	86.49	86.97	86.04	86.08	86.16	86.13	0.19

表2 日间精密度测试结果

Table 2 Daytime precision test results								
样本编号	L-苏糖酸含量/%						RSD/%	
	D1	D2	D3	D4	D5	D6		
JH-2	87.1	86.9	86.9	87.19	87.0	87.3	0.13	
WY-1	88.19	88.25	88.18	88.34	88.38	88.12	0.10	
QD-1	88.16	88.22	88.12	88.47	88.35	88.42	0.14	
S1	88.54	88.09	88.05	88.22	88.08	88.12	0.18	
S16	88.13	88.35	88.22	88.46	88.56	88.43	0.16	
L35	86.05	86.35	86.38	86.45	86.22	86.08	0.16	

等因素作为变量,对3批次样品进行检测。再现性测试时4名检验人员使用5台不同的液相色谱仪对3批次样品进行检测,6次平行测定结果的相对标准

表3 不同条件下样本中苏糖酸含量的再现性测试结果/%

Table 3 Reproducibility test results under different conditions/%							
样本编号	实验室A	实验室A	实验室A	实验室B	实验室C	实验室D	RSD/%
	仪器1	仪器1	仪器2	仪器3	仪器4	仪器5	
	实验员甲	实验员甲	实验员乙	实验员丙	实验员甲	实验员丁	
JH-2	87.09	86.54	86.66	86.51	86.35	86.63	0.25
WY-1	88.19	87.41	87.38	87.46	88.03	87.18	0.40
QD-1	88.16	87.22	87.33	87.81	87.44	87.66	0.35

偏差为0.25%~0.40%,方法的再现性良好,见表3。

2.4 样品测定

目前,国内共有L-苏糖酸镁生产企业3家,对采集到的49批次样品进行检测,结果见表4。测定结果显示,49批次样品L-苏糖酸含量为86.5%~88.8%,符合美国GRAS(GRN)NO.499公告规定的限量要求。

表4 企业样品检测结果汇总

Table 4 Summary of enterprise sample test results		
企业	批次数	检测结果/%
企业1	19	86.5~87.6
企业2	15	87.8~88.8
企业3	15	86.8~87.4

3 小结

本研究建立了食品营养强化剂L-苏糖酸镁产品中L-苏糖酸含量的高效液相色谱检测方法。经验证,流动相为0.1%磷酸水溶液:乙腈(90:10)时色谱分离效果较好,最佳检测波长为210nm,L-苏糖酸标准工作溶液在20~500μg/mL浓度范围内线

性关系良好, $r^2 > 0.99$ 。方法检出限、定量限分别为 1 g/100 g、2.5 g/100 g; 日内精密度、日间精密度以及再现性测试显示方法的精密度良好。3 家企业 49 批次样品测定结果显本实验建立的检验方法可满足产品质量控制的要求。

参考文献

- [1] 俱战锋. L-苏糖酸与生命必须金属元素化合物的研究[D]. 西安: 西北大学, 2003: 5-6.
JU Z F. Studies on L-threonic acid and essential metal compounds [D]. Xi'an: Northwestern University, 2003: 5-6.
- [2] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 关于海藻酸钙等食品添加剂新品种的公告(2016年第8号)[EB/OL]. (2016-06-15) [2016-07-01]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7890/201606/125c3d8fa2034de3b7d52a82608709d2.shtml>.
Announcement of the National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China on New Varieties of Food Additives such as Alginic Ac Calcium (No. 8 of 2016) [EB/OL]. (2016-06-15) [2016-07-01]. <http://www.nhc.gov.cn/sps/s7890/201606/125c3d8fa2034de3b7d52a82608709d2.shtml>.
- [3] 董丽明. 苏糖酸镁干预高磷诱导慢性肾功能衰竭大鼠血管钙化模型及其相关机制研究[J]. 中国医学装备, 2021(11): 177-184.
DONG L M. Intervention of magnesium threonate on vascular calcification induced by high phosphorus in chronic kidney failure rats and its mechanism[J]. Chinese Medical Equipment, 2021(11): 177-184.
- [4] 付金涛. L-苏糖酸镁与硫酸镁对局灶性脑缺血大鼠保护作用的比较研究[J]. 医药卫生科技, 2021(22): 23-26.
FU J T. A comparative study of the protective effects of magnesium l-threonate and magnesium sulfate on focal cerebral ischemia in rats[J]. Medical and Health Science and Technology, 2021(22): 23-26.
- [5] 吴长泉. L-苏糖酸镁复合物辅助改善记忆的功效[J]. 中国食品工业, 2021(24): 36-39.
WU C Q. Effects of magnesium l-threonate complex on memory [J]. China's Food Industry, 2021(24): 36-39.
- [6] 黄琴, 梁惠. 镁的生理与临床应用[J]. 微量元素与健康研究, 2005(22): 61-63.
HUANG Q, LIANG H. Physiological and clinical application of magnesium [J]. The Micronutrient and Health Study, 2005 (22): 61-63.
- [7] 国家卫生健康委办公厅关于印发2019年度食品安全国家标准第二批立项计划的通知[EB/OL]. (2019-08-28) [2024-09-02]. <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=74026f37bc424cc3bdc1ffbea6842ae6>.
National Health and Family Planning Commission. The second batch of 2019 National Food Safety Standards Program [EB/OL]. (2019-08-28) [2024-09-02]. <http://www.nhc.gov.cn/cms-search/xxgk/getManuscriptXxgk.htm?id=74026f37bc424cc3bdc1ffbea6842ae6>.
- [8] 王洪允. LC-MS/MS法测定人血浆和尿中L-苏糖酸的浓度[J]. 药物分析杂志, 2004(4): 36-40.
WANG H Y. Determination of L-threonic acid in human plasma and urine by LC-MS/MS [J]. Journal of Drug Analysis, 2004 (4): 36-40.
- [9] 高革, 孙祥德. 高效液相色谱法同时测定L-苏糖酸钙和柠檬酸的含量[J]. 新乡医学院学报, 2005(22): 12-15.
GAO G, SUN X D. Simultaneous high-performance liquid chromatography of calcium L-threonate and citric acid [J]. Journal of Xinxiang Medical University, 2005(22): 12-15.
- [10] 景瑞超, 李娟. 食品与药品中苹果酸的检测方法研究进展[J]. 精细与专用化学品, 2021, 29(10): 39-44.
JING R C, LI J. Progress in the determination of malic acid in food and medicine [J]. Fine and Specialty Chemicals, 2021, 29 (10): 39-44.
- [11] 王若燕, 王立媛. 高效液相色谱法测定食品中脱氢乙酸含量的研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2003(5): 79-82.
WANG R Y, WANG L Y. Study on the determination of dehydroacetic acid in food by high-performance liquid chromatography method [J]. Chinese Journal of Health Inspection, 2003(5): 79-82.
- [12] SARKAR S, MOHINI M, SHARMA A, et al. Effect of supplementing Leucaena leucocephala leaves alone or in conjunction with malic acid on nutrient utilization, performance traits, and enteric methane emission in crossbred calves under tropical conditions [J]. Tropical Animal Health and Production, 2021, 53: 1-10.
- [13] REYES R, MECAYDOR M, PESITO A, et al. Preparation of calcium citrate malate using citric acid and malic acid with calcium hydroxide synthesized from duck eggshell [J]. Key Engineering Materials, 2021, 897: 117-123.
- [14] 郑晶晶, 王慧. 高效液相色谱在食品检测中的应用[J]. 现代食品, 2017(11): 12-13.
ZHENG J J, WANG H. Application of High-performance liquid chromatography in food testing [J]. Modern Food, 2017(11): 12-13.
- [15] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中有机酸的测定: GB 5009.157—2016[S]. 北京: 中国标准化出版社, 2016.
National Health Commission; State Administration for Market Regulation. National standard for food safety, determination of organic acids in food: GB 5009.157—2016[S]. Beijing: Standards Press of China, 2016.
- [16] 国家卫生健康委员会, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 化学分析方法验证通则: GB 5009.295—2023[S]. 北京: 中国标准化出版社, 2023.
National Health Commission; State Administration for Market Regulation. National standard for food safety, General Rules for verification of chemical analysis methods: GB 5009.295—2023 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2023.