

手性色谱法测定 *L*-5-甲基四氢叶酸钙含量

倪兴刚¹, 邓泽元¹, 李静¹, 揭琴丰², 李露敏², 王杉^{2*}

(¹南昌大学食品科学与技术国家重点实验室 南昌 330047

²江西省疾病预防控制中心 南昌 330029)

摘要 建立手性色谱法测定 *L*-5-甲基四氢叶酸钙(*L*-5-MTHF-Ca)的分析方法,通过方法学验证评价方法的可行性。使用高效液相色谱系统,色谱柱为 CHIRALPAK HSA 手性色谱柱(4 mm×150 mm,5 μm),以磷酸盐缓冲溶液:乙腈(体积比 90:10)为流动相,流速 0.6 mL/min,进样量 5 μL,柱温 30 °C,检测波长 280 nm。方法学验证结果表明,此方法可很好地分离 *L*-5-MTHF-Ca,分离度达到 3.24,并且在 0.016~0.100 mg/mL 质量浓度范围线性关系良好,相关系数为 0.9997,检出限为 3.11 μg/mL,定量限为 4.98 μg/mL,精密度 0.38%,加标平均回收率 103.71%,系统适用性良好,然而,*L*-5-MTHF-Ca 会随时间缓慢降解,需尽快进样分析。方法操作简便,结果准确,可用于各种食品、保健品中 *L*-5-MTHF-Ca 含量的测定。

关键词 *L*-5-甲基四氢叶酸钙;手性色谱法;方法学验证

文章编号 1009-7848(2022)09-0270-06 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2022.09.028

叶酸是一类人体必需的 B 族维生素,在碳代谢、氨基酸代谢和细胞增殖生长中起着重要作用^[1-2]。叶酸缺乏会导致一些健康问题,例如衰老过程中出现的认知障碍可能与体内低叶酸水平有关^[3],孕妇摄入的叶酸不足会导致胎儿出现神经管缺陷^[4-5]和腭裂^[6],叶酸缺乏甚至还会导致一些癌症的发生^[7]。可见,补充叶酸对于人体健康是十分重要的,然而,天然食品中叶酸种类多,含量低且不稳定^[8],人体通过摄食天然食品获取叶酸很有限。

L-5-甲基四氢叶酸钙(calcium *L*-5-methyltetrahydrofolate,*L*-5-MTHF-Ca)是一种可以代替叶酸的新型营养补充剂,与叶酸相比,*L*-5-MTHF-Ca 具有更稳定且成本更低的优势^[9]。有研究发现,这两种化合物在等摩尔剂量下具有相当的生理活性、生物利用度和吸收率^[10-12],甚至在某些方面摄取 *L*-5-MTHFCa 比摄取叶酸的效果可能会更好^[13-14]。目前生产 *L*-5-MTHF-Ca 的方法多为人工合成,也有人通过基因工程的方法生产 *L*-5-甲基四氢叶酸^[15-16],然而,无论哪种方法,最终得到的产品中都会含有少量的 *D*-5-甲基四氢叶酸钙(calcium *D*-5-methyltetrahydrofolate,*D*-5-MTHF-Ca),而对于 *D* 型异构体的安全性目前尚

无相关报道。建立一种可以对 *L*-5-MTHF-Ca 进行分离、定量的检测方法意义重大。目前的检测方法多为高效液相色谱法和液相色谱串联质谱法^[17-19],这类检测方法虽可以测定 5-甲基四氢叶酸的含量,但无法检测其中 *L*-5-MTHF-Ca 的含量。针对这类问题,Gill 等^[20]利用手性色谱法成功分离出 RRR- α -生育酚。江锋等^[21]采用手性高效液相色谱法成功测出白酒中 *D*-乳酸和 *L*-乳酸的含量。黄晓婉等^[22]应用配位交换手性柱对 *L*-硒-甲基硒代半胱氨酸进行分离与测定。

本文应用手性色谱法对 *L*-5-MTHF-Ca 与其 *D* 型异构体进行分离,并研究 *L*-5-MTHF-Ca 的定量方法,同时进行方法学验证的相关指标测定,旨在为 *L*-5-MTHF-Ca 含量的测定提供一个高效、可靠的方法。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

L-5-MTHF-Ca 对照品(纯度 \geq 98.6%),Merck 公司;*D*, *L*-5-MTHF-Ca 对照品(纯度 \geq 98.8%,*L*型=49.8%),美国 USP;乙腈(纯度 \leq 100%),Merck 公司;磷酸二氢钠(纯度 \geq 99.5%),天津科密欧化学试剂有限公司;氢氧化钠(纯度 \geq 96.0%),国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

1260 Infinity II 型高效液相色谱系统,美国

收稿日期:2021-09-11

基金项目:食品安全国家标准制定项目(spaq-2019-119)

作者简介:倪兴刚(1997—),男,硕士

通信作者:王杉 E-mail: jxbzba@126.com

Agilent 公司; FA224 型电子天平, 上海舜宇恒平科学仪器有限公司; CHIRALPAK HSA 手性色谱柱(4 mm×150 mm, 5 μm), 上海大赛璐药物手性技术有限公司; PHS-3C 酸度计, 郑州宝晶电子科技有限公司; MV-100 型涡旋混匀仪, 武汉塞维尔生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱: CHIRALPAK HSA 手性色谱柱(4 mm×150 mm, 5 μm); 流动相: 按照磷酸二氢钠缓冲溶液(称取 4.54 g 磷酸二氢钠, 用水溶解定容至 1 000 mL); 乙腈=90:10(V/V)的比例混合, 用 32% 的氢氧化钠溶液调节 pH 值至 6.8 后过滤脱气; 柱温: 30 °C; 流速: 0.6 mL/min; 进样量: 5 μL; 检测器: VWD 紫外检测器; 检测波长: 280 nm。

1.3.2 *L*-5-MTHF-Ca 含量计算 根据试样溶液的色谱峰面积与标准曲线方程计算得到的 *L*-5-MTHF-Ca 质量分数 W , 数值以 % 表示, 计算公式如下:

$$W(\%) = \frac{f(A)}{m} \times 100$$

式中: $f(A)$ ——通过将试样溶液的色谱峰面积代入标准曲线方程得到的 *L*-5-MTHF-Ca 的质量, mg; m ——样品的质量, mg。

1.3.3 专属性检测 准确称取 *D,L*-5-MTHF-Ca 对照品 5 mg 于 25 mL 容量瓶中, 用水定容后超声溶解得到混标溶液。准确称取 *L*-5-MTHF-Ca 对照品 2.5 mg 于 25 mL 容量瓶中, 用水定容后超声溶解得到单标溶液。对这两种标准溶液分别进样, 记录色谱图, 确定各物质保留时间与分离度。

1.3.4 标准曲线的绘制 准确称取 10 mg 的 *D,L*-5-MTHF-Ca 对照品, 置于 50 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度后超声溶解。准确吸取 0.6, 1.2, 1.8, 3.0, 5.0 mL 的上述溶液至 5 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度后超声溶解。色谱进样前用 0.45 μm 孔径的水相滤膜对样液进行过滤处理, 进样 5 μL, 记录色谱图。以 *L*-5-MTHF-Ca 的峰面积为纵坐标 Y , 每次所进样液中 *L*-5-MTHF-Ca 的质量(μg)为横坐标 X , 绘制得到标准曲线。

1.3.5 定量限与检出限的检测 准确配制质量浓度为 0.1 mg/mL 的 *D,L*-5-MTHF-Ca 对照品溶液,

用水成比例依次稀释得到一系列浓度梯度的待测溶液, 将这些待测溶液依次进样, 根据色谱图中 *L* 型峰的信噪比 $S/N \geq 10$ 和 $S/N \geq 3$ 为依据, 得到该色谱条件下 *L*-5-MTHF-Ca 的定量限与检出限。

1.3.6 精密度检测 配制线性关系下质量浓度为 0.16 mg/mL 的 *D,L*-5-MTHF-Ca 对照品溶液, 重复进样 6 次, 以 *L*-5-MTHF-Ca 的百分含量计算相对标准偏差(RSD)。

1.3.7 稳定性检测 配制线性关系下质量浓度为 0.1 mg/mL 的 *L*-5-MTHF-Ca 对照品溶液, 分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10 和 12 min 时进样, 以各时刻得到的色谱图中 *L*-5-MTHF-Ca 的峰面积计算相对标准偏差(RSD)。

1.3.8 回收率检测 配制加标回收率检测溶液, 将 1 mg 的 *D,L*-5-MTHF-Ca 对照品与 0.75 mg 的 *L*-5-MTHF-Ca 对照品混合置于 5 mL 容量瓶, 用水溶解定容至刻度得到检测溶液(1); 将 1 mg 的 *D,L*-5-MTHF-Ca 对照品与 1 mg 的 *L*-5-MTHF-Ca 对照品混合置于 5 mL 容量瓶, 用水溶解定容至刻度得到检测溶液(2); 将 1 mg 的 *D,L*-5-MTHF-Ca 对照品与 1.25 mg 的 *L*-5-MTHF-Ca 对照品混合后置于 5 mL 容量瓶, 用水溶解定容至刻度得到检测溶液(3); 将 1 mg 的 *D,L*-5-MTHF-Ca 对照品置于 5 mL 容量瓶, 用水溶解定容至刻度得到标准溶液。将检测溶液的 *L* 型峰面积减去标准溶液的 *L* 型峰面积后再代入线性回归方程求得各检测溶液的 *L* 型物测定加入量, 从而计算得到加标回收率。

1.3.9 系统适用性检测 配制 0.2 mg/mL 的 *D,L*-5-MTHF-Ca 混标溶液与 0.1 mg/mL 的 *L*-5-MTHF-Ca 单标溶液, 取 1 mL 混标溶液, 用单标溶液稀释到 50 mL, 进样记录色谱图得到 *D*-5-MTHF-Ca 与 *L*-5-MTHF-Ca 的分离度。

1.3.10 统计分析 本文中重复测定的结果以平均值±标准差表示。使用 SPSS 统计分析软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 专属性检测

由图 1(A) *L*-5-MTHF-Ca 单标色谱图可知, *L*-5-MTHF-Ca 的保留时间为 15.026 min, 由图 1

(B) 可得, *D*-5-MTHF-Ca 的保留时间为 10.052 min。*D*, *L*-5-MTHF-Ca 的分离度为 3.24, 不小于 1.5, 说明在此色谱条件下这两种手性物质可以得到较好的分离。

2.2 标准曲线的绘制

按照 1.3.4 节配制标准曲线检测溶液, 依次进

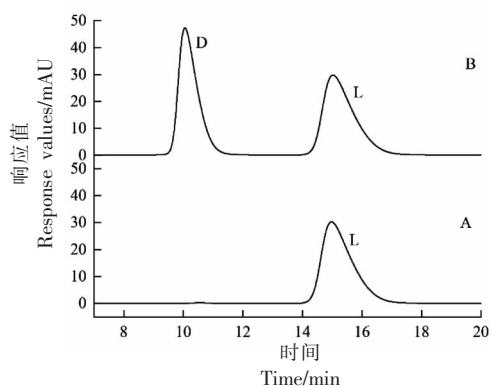


图 1 *L*-5-MTHF-Ca 专属性检测图谱

Fig.1 Chromatograms to determine the specificity for *L*-5-MTHF-Ca

2.3 定量限与检出限的检测

按照 1.3.5 节配制定量限与检出限待测溶液, 依次稀释后进样, 以信噪比 $S/N \geq 3$ 为检出限, 信噪比 $S/N \geq 10$ 为定量限, 测得在此色谱条件下 *L*-5-MTHF-Ca 的检出限和定量限分别为 3.11 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 4.98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

样后记录色谱图, 以 *L*-5-MTHF-Ca 的峰面积为纵坐标 Y , 每次所进溶液中 *L*-5-MTHF-Ca 的质量 (μg) 为横坐标 X , 绘制得到标准曲线(图 2), 得到的曲线方程为 $Y=4\,289.28X-100.81$, $R^2=0.9997$, 线性质量浓度范围为 0.016~0.100 mg/mL , 在此范围内线性关系良好。

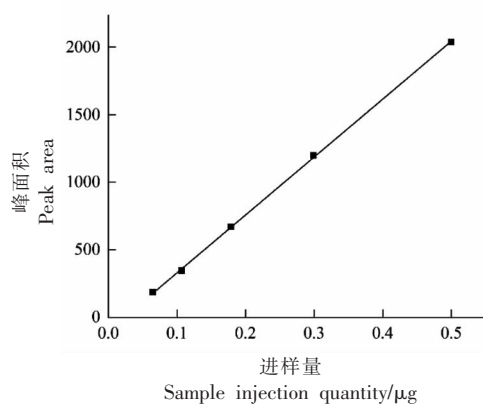


图 2 *L*-5-MTHF-Ca 标准曲线

Fig.2 Standard curve of *L*-5-MTHF-Ca

2.4 精密度检测

按照 1.3.6 节配制精密度检测溶液, 取 6 份检测溶液依次进样并记录色谱, 以 *L*-5-MTHF-Ca 的百分含量进行计算, 计算结果见表 1, 可知相对标准偏差 (RSD) 为 0.36%, 不大于 2%, 说明在此色谱条件下测定的精密度良好。

表 1 *L*-5-MTHF-Ca 精密度检测试验结果表

Table 1 Experimental results of *L*-5-MTHF-Ca precision detection

	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD/%
<i>L</i> -5-MTHF-Ca 含量/%	50.03	49.80	50.09	49.97	50.27	49.75	49.98 ± 0.18	0.36

2.5 稳定性检测

由图 3 可知, *L*-5-MTHF-Ca 的峰面积 (含量) 随着时间的推移不断减少, 杂质的峰面积 (含量) 则随着时间的推移不断增加, 说明 *L*-5-MTHF-Ca 在放置过程会缓慢降解从而转变为其它杂质物质。相较于 0 min 时 *L*-5-MTHF-Ca 的峰面积, 由 12 min 时的峰面积计算得到的相对标准偏差 (RSD) 为 0.66%, 小于 2%, 而由 2 min 时的峰面积计算得到的相对标准偏差 (RSD) 为 0.13%, 远小于 2%, 这也说明了虽然 *L*-5-

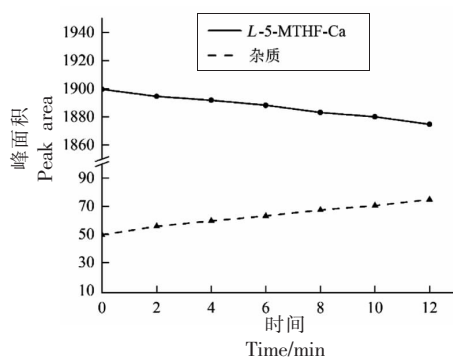


图 3 *L*-5-MTHF-Ca 稳定性检测试验结果图

Fig.3 Experimental results of *L*-5-MTHF-Ca stability test

MTHF-Ca 会随时间缓慢降解,但只要在制样完成后尽快进样分析,那么由于物质降解造成的误差就可以忽略不计。

2.6 回收率检测

按照 1.3.8 节配制 3 组回收率检测溶液,分别

进样后记录色谱图。回收率测定结果见表 2,计算得到的加标平均回收率为 103.71%,在 80%~120%之间,说明在此色谱条件下测定的回收率良好。

表 2 *L*-5-MTHF-Ca 回收率检测试验结果表

	标准量/ μg	加入量/ μg	测定加入量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
检测溶液(1)	1.00	0.75	0.77 ± 0.03	103.62 ± 4.32	103.71 ± 2.51	1.63
检测溶液(2)	1.00	1.00	1.05 ± 0.02	105.44 ± 1.60		
检测溶液(3)	1.00	1.25	1.28 ± 0.02	102.06 ± 1.62		

2.7 系统适用性检测

按照 1.3.9 节配制系统适用性溶液,进样后记录色谱图。由测定得到的谱图(图 4)可知,*D,L*-5-MTHF-Ca 的分离度为 3.0,不小于 1.5,说明溶液中 *D*-5-MTHF-Ca 在约 0.002 mg/mL 的低质量浓度下也能与 *L*-5-MTHF-Ca 很好地分离开来。

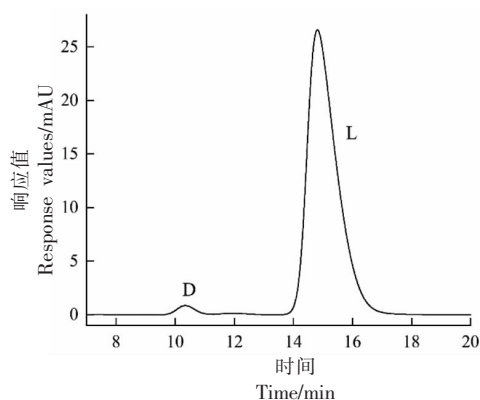


图 4 *L*-5-MTHF-Ca 系统适用性检测谱图

Fig.4 Chromatogram for testing the applicability of *L*-5-MTHF-Ca system

3 结论

研究应用手性色谱法分离测定 *L*-5-MTHF-Ca 的含量,测定方法使用高效液相色谱系统,色谱柱为 CHIRALPAK HSA 手性色谱柱,检测波长为 280 nm,流动相为磷酸二氢钠缓冲溶液:乙腈=90:10 的混合溶液,流速 0.6 mL/min,进样量 5 μL ,柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。方法学验证结果表明,应用手性色谱法可以很好地分离 *D,L*-5-MTHF-Ca 这一对手性物质,分离度达到 3.24,并且在 *D* 型物微量的情况下分离度也能达到 3.0,*L*-5-MTHF-Ca 在 0.016~

0.100 mg/mL 质量浓度范围内线性关系良好,相关系数为 0.9997,测得的检出限与定量限分别为 3.11 $\mu\text{g/mL}$ 和 4.98 $\mu\text{g/mL}$,精密度测定的 RSD 为 0.38%,稳定性检测结果表明 *L*-5-MTHF-Ca 会随时间缓慢降解需尽快进样测定,测得的加标平均回收率为 103.71%。试验结果表明手性色谱法测定 *L*-5-MTHF-Ca 含量的方法具有分离度高、精密度高、回收率高的优点,可以应用于各种食品与保健品中 *L*-5-MTHF-Ca 的含量测定,也可以为其它手性物质的分离测定提供参考。

参 考 文 献

- [1] SAINI R K, NILE S H, KEUM Y S. Folates: chemistry, analysis, occurrence, biofortification and bioavailability[J]. Food Research International, 2016, 89(1): 1-13.
- [2] GOUGH K R, READ A E, MCCARTHY C F, et al. Megaloblastic anaemia due to nutritional deficiency of folic acid[J]. The Quarterly Journal of Medicine, 1963, 32(3): 243-256.
- [3] ROSENBERG I H, MILLER J W. Nutritional factors in physical and cognitive functions of elderly people [J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1992, 55(6): 1237-1243.
- [4] RELTON C L, WILDING C S, LAFFLING A J, et al. Low erythrocyte folate status and polymorphic variation in folate-related genes are associated with risk of neural tube defect pregnancy[J]. Molecular Genetics and Metabolism, 2004, 81(4): 273-281.
- [5] MITCHELL L E, ADZICK N S, MELCHIONNE J,

- et al. Spina bifida[J]. Lancet, 2004, 364(9448): 1885-1895.
- [6] MALDONADO E, MURILLO J, BARRIO C, et al. Occurrence of cleft-palate and alteration of Tgf-beta (3) expression and the mechanisms leading to palatal fusion in mice following dietary folic-acid deficiency[J]. Cells Tissues Organs, 2011, 194(5): 406-420.
- [7] SAUBADE F, HEMERY Y M, ROCHETTE I, et al. Influence of fermentation and other processing steps on the folate content of a traditional African cereal-based fermented food[J]. International Journal of Food Microbiology, 2017, 266(2): 79-86.
- [8] 王博伦, 顾丰颖, 刘子毅, 等. 食品中叶酸测定方法的研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(9): 294-300.
- WANG B L, GU F Y, LIU Z Y, et al. Progress in the determination of folic acid in food[J]. Food Science, 2020, 41(9): 294-300.
- [9] PIETRZIK K, BAILEY L, SHANE B. Folic acid and L-5-methyltetrahydrofolate: Comparison of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics[J]. Clin Pharmacokinet, 2010, 49(8): 535-548.
- [10] PENTIEVA K, MCNULTY H, REICHERT R, et al. The short-term bioavailabilities of [6S]-5-methyltetrahydrofolate and folic acid are equivalent in men[J]. The Journal of Nutrition, 2004, 134(3): 580-585.
- [11] PRINZ-LANGENOHL R, LAMERS Y, MOSER R, et al. Effect of folic acid preload on the bioequivalence of [6S]-5-methyltetrahydrofolate and folic acid in healthy volunteers[J]. Journal of Inherited Metabolic Disease, 2003, 26(1): 124.
- [12] MELSE-BOONSTRA A, VERHOEF P, WEST C. Quantifying folate bioavailability: A critical appraisal of methods[J]. Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care, 2004, 7(5): 539-545.
- [13] HOUGHTON L A, SHERWOOD K L, PAWLOSKY R, et al. [6S]-5-Methyltetrahydrofolate is at least as effective as folic acid in preventing a decline in blood folate concentrations during lactation[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2006, 83(4): 842-850.
- [14] LAMERS Y, PRINZ-LANGENOHL R, BRÄMSWIG S, et al. Red blood cell folate concentrations increase more after supplementation with [6S]-5-methyltetrahydrofolate than with folic acid in women of childbearing age[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 2006, 84(1): 156-161.
- [15] 韩琳, 许激扬, 卞筱泓, 等. 重组甘氨酸脱羧酶基因工程菌生产 L-5-甲基四氢叶酸[J]. 生产医学前沿, 2013, 22(20): 2379-2382.
- HAN L, XU J Y, BIAN X H, et al. Production of L-5-methyltetrahydrofolate by recombinant glycine decarboxylase gene engineering strain[J]. Frontier of Production Medicine, 2013, 22(20): 2379-2382.
- [16] 刘娅梅, 卞筱泓, 许激扬, 等. 基因工程法生产 L-5-甲基四氢叶酸的研究[J]. 中国生化药物杂志, 2012, 33(3): 244-247.
- LIU Y M, BIAN X H, XU J Y, et al. Production of l-5-methyltetrahydrofolate by genetic engineering[J]. Chinese Journal of Biochemical Medicine, 2012, 33(3): 244-247.
- [17] 郭丽琼, 吴厚玖. 高效液相荧光检测法测定柑橘中 5-甲基四氢叶酸的含量[J]. 饮料工业, 2013, 16(9): 30-34.
- GUO L Q, WU H J. Determination of 5-methyltetrahydrofolate in Citrus by high performance liquid chromatography with fluorescence detection[J]. Beverage Industry, 2013, 16(9): 30-34.
- [18] 王博伦, 顾丰颖, 张帆, 等. 玉米中 5-甲基四氢叶酸提取方法的优化及高效液相色谱法定量分析[J]. 食品科学, 2020, 41(18): 196-202.
- WANG B L, GU F Y, ZHANG F, et al. Optimization of extraction method of 5-methyltetrahydrofolate from corn and its quantitative analysis by HPLC[J]. Food Science, 2020, 41(18): 196-202.
- [19] 彭絮, 邹迎曙, 杨宗兵, 等. 同位素稀释液相色谱串联质谱法测定人血清中 5-甲基四氢叶酸[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(3): 161-165.
- PENG X, ZOU Y S, YANG Z B, et al. Determination of 5-methyltetrahydrofolate in human serum by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. Journal of Clinical Laboratory, 2018, 36(3): 161-165.
- [20] GILL B D, INDYK H E. Separation of RRR- α -Tocopherol by chiral chromatography[J]. Journal of AOAC INTERNATIONAL, 2020, 103(5): 1288-1292.
- [21] 江锋, 赵振宇, 聂叶, 等. 高效液相色谱法对白葡萄酒中的 L-乳酸和 D-乳酸的手性分离和测定[J]. 酿酒科技, 2019, 40(9): 93-97.
- JIANG F, ZHAO Z Y, NIE Y, et al. Chiral separation and determination of L-lactic acid and D-

lactic acid in Baijiu by high performance liquid chromatography [J]. *Brewing Technology*, 2019, 40(9): 93-97.

- [22] 黄晓婉, 王杉, 揭琴丰, 等. 手性色谱法测定L-硒-甲基硒代半胱氨酸含量的研究[J]. *现代食品科*

技, 2015, 31(9): 309-313.

HUANG X W, WANG S, JIE Q F. Determination of L-Se-methylselenocysteine content by chiral chromatography [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2015, 31(9): 309-313.

Determination of Calcium L-5-Methyltetrahydrofolate by Chiral Chromatography

Ni Xinggang¹, Deng Zeyuan¹, Li Jing¹, Jie Qinfeng², Li Lumin², Wang Shan^{2*}

(¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330047

²Center for Disease Control and Prevention of Jiangxi Provincial, Nanchang 330029)

Abstract A chiral chromatographic method for the determination of calcium L-5-methyltetrahydrofolate (L-5-MTHF-Ca) was established, and the feasibility of the method was evaluated by methodology validation. Methods high performance liquid chromatography is used. The chromatographic column is CHIRALPAK HSA chiral column (4 mm×150 mm, 5 μm). The mobile phase is phosphate buffer solution:acetonitrile (90:10, V:V). The flow rate is 0.6 mL/min. The injection volume is 5 μL. The column temperature is 30 °C and the detection wavelength is 280 nm. The results shows that the method could separate L-5-MTHF-Ca well, the resolution is 3.24, and the linear relationship is good in the concentration range of 0.016-0.100 mg/mL, the correlation coefficient is 0.9997, the detection limit and quantitation limit are 3.11 μg/mL and 4.98 μg/mL respectively, the precision is 0.38%, and the average recovery is 103.71%. System suitability test results are good, but L-5-MTHF-Ca will slowly degrade over time, so sample analysis as soon as possible. The method is simple, accurate and can be used for the determination of L-5-MTHF-Ca in various foods and health products.

Keywords calcium L-5-methyltetrahydrofolate; chiral chromatography; methodology validation