

手性高效液相色谱法测定左卡尼汀片中右旋卡尼汀的含量

谷春秀¹, 程梦威, 刘露, 于亚萌, 张童, 鲍尹聪

(北京联合大学生物化学工程学院, 北京100023)

摘要 目的: 建立以高效液相色谱法测定左卡尼汀片中右旋卡尼汀含量的测定方法。方法: 采用phenomenex LUX Cellulose-1 (250mm×4.6mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.5mol/L高氯酸钠溶液, 梯度洗脱, 流速: 0.4ml·min⁻¹, 检测波长235 nm, 柱温: 28 °C。结果: 在本色谱条件下进样量: 10μl; 右卡尼汀在浓度1.978μg·ml⁻¹~23.741 μg·ml⁻¹范围内线性关系良好, 加样回收率 (n=9) 均在80%~120%之间, RSD值均小于5.0%。结论: 本方法快速、准确, 重复性好。可以满足左卡尼汀片中右旋卡尼汀含量的测定要求。

关键词 手性高效液相色谱法; 左卡尼汀片; 右旋卡尼汀; 含量测定

Determination of D-carnitine Content in Levocarnitine Tablets by Chiral Liquid Chromatography

Gu Chunxiu, Cheng Mengwei, Liu Lu, Yu Yameng, Zhang Tong, Bao Yincong

(Biochemical Engineering College, Beijing Union University, Beijing, 100023)

Abstract: Objective: To establish an HPLC method for determination of D-carnitine in L-carnitine tablets. **Methods:** The separation was performed on a phenomenex LUX Cellulose-1 column (250mm×4.6mm, 3μm) with the gradient elution of acetonitrile-0.5mol/L sodium perchlorate (26:74) at the mobile phase a flow rate of 0.4ml·min⁻¹, 235 nm detection wavelength and 28 °C column temperature. **Results:** Under the established chromatographic condition, with 10μl injection volume the linear range of D-carnitine was 1.978-23.741 μg·ml⁻¹, the range of recovery (n = 9) was 80% ~ 120%, and RSD values was less than 5.0%. **Conclusion:** The optimized method was reliable and effective, and could be used for determination of D-carnitine in Levocarnitine tablets.

Key Words: Chiral Liquid Chromatography; Levocarnitine Tablets; D-carnitine; Determination

引言

左卡尼汀作为一种有效的活性氧物质清除剂, 可加快缺血缺氧组织堆积的脂酰辅酶A进入线粒体内, 在缓解氧化应激、减少脂质过氧化、释放腺嘌呤核苷酸转位酶、促进脂类代谢、抗细胞凋亡等过程中作用明显^[1-5]。左卡尼汀 (L-carnitine, LCA), 又称左旋肉碱。肉碱分子中含有1个手性碳原子 (见图1), 形成左旋 (L-)、右旋 (D-) 肉碱对映异构体。右旋肉碱对肉碱乙酰转移酶 (CAT) 和肉碱脂肪酰转移酶 (PTC) 有竞争性抑制作用, 在生化过程中产生毒副作用^[6,7]。左卡尼汀片中杂质右旋卡尼汀的存在明显影响药品质量的安全有效。药品中右旋卡尼汀含量超标容易产生胃肠道反应, 造成患者恶心和呕吐、甚至过敏反应, 大剂量的情况下对人和动物有害^[6]。美国FDA于

1993年就禁止出售D-型和DL-型肉碱^[7]。国内外目前对左卡尼汀片中右旋卡尼汀测定的研究报导较少。分离卡尼汀对映体时须用手性拆分技术, 酶解^[8]、手性衍生化^[9-11]、手性固定相^[11]法常被用于左右旋肉碱拆分。国外尚未有左旋肉碱对映体拆分后含量检测的研究报道。美国药典25版及药典论坛和其他文献资料对左卡尼汀中手性杂质控制方法有少量的报道^[12], 也曾提供过方法和检测限度, 都是衍生后用HPLC分析, 但是过程复杂, 重复性较差, 根据《手性药物质量控制研究指导原则》、美国药典25版及其论坛 (pharmacopeial forum) 左卡尼汀专论部分规定控制了左卡尼汀原料右旋体的限度, 限度为1.0%。国内在此方面的研究仍是空白。左卡尼汀片杂质右旋卡尼汀含量的测定方法研究, 为市售左卡尼汀中杂质限量、质量控制提供技术支持, 促进此类制药生产的良性运作。

* 基金项目: 北京市大学生科技创新项目 (编号: 201411417XJ095)。

作者简介: 谷春秀, 女, 硕士研究生, 主要从事食品药品分析检测研究。联系电话: 010-52072331, Email: 2543774093@qq.com

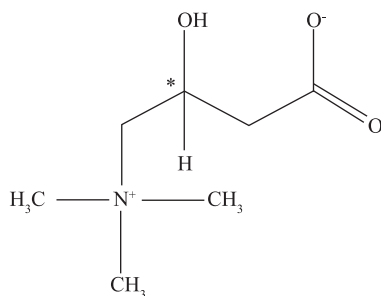


图1 肉碱的结构式

1 实验部分

1.1 实验仪器

岛津2010HT高效液相色谱仪(日本岛津公司); 2140型电子分析天平(上海奥豪斯公司)Mettler AB135 -S十万分之一电子天平(瑞士Mettler公司)。

1.2 实验材料

左卡尼汀片(批号: 120901, 120902, 120903)北京嘉事大恒制药有限公司; 对照品DL-肉碱(批号: 20111201纯度为98.69%)武汉福鑫化工有限公司; 乙腈为色谱纯(J.T.Baker公司); 高氯酸钠为分析纯(天津科密欧化学试剂有限公司); 高氯酸为分析纯(天津政成化学制品有限公司); α -溴代苯乙酮(MW=199.04)为化学纯(批号: T20110602)(国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇、乙酸乙酯为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 氢氧化钾、无水冰醋酸为分析纯(北京化工厂); 醋酐为分析纯(天津多利精细化工有限公司); 水为纯化水。

1.3 溶液制备

1.3.1 样品衍生化制备供试液

取一定浓度的左卡尼汀33%的乙醇溶液10mL置100mL圆底烧瓶中, 摇匀后, 向其中滴加一滴酚酞指示液, 加入一滴1mol/L的KOH溶液, 使之紫红色不退, 加入 α -溴代苯乙酮(MW=199.04)26.0mg, 摇匀后, 加热回流, 使圆底烧瓶中液体保持微沸, 从冷凝管流出液体开始计时, 加热回流30min, 回流过程中不时振摇溶液, 冷却至室温后, 向圆底烧瓶中加入50mL乙酸乙酯, 混合摇匀, 转入分液漏斗中, 摇匀静置后, 取下层水相作为备用溶液, 精密移取此备用液1.0ml, 置5ml容量瓶中, 加入水稀释至刻度, 即得供试液。

1.3.2 空白衍生溶液

精密移取33%的乙醇溶液10ml置100ml圆底烧瓶中, 按样品衍生化过程衍生后, 得下层水相备用液, 精密移取此备用液1.0 ml, 置5ml量瓶中, 加入水稀释至刻度, 即得供试液衍生溶液。

1.3.3 空白辅料衍生溶液

精密称取处方量的辅料约2.2g, 置100ml量瓶中, 加33%的乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 精密移取离心后的上述溶液的上清液2.0mL置25ml量瓶中, 加33%的乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 按样品衍生化过程衍生后, 得到下层水相备用液, 精密移取此备用液1.0ml, 置5ml量瓶中, 加入水稀释至刻度, 即得空白辅料衍生溶液。

1.3.4 左卡尼汀片(L-carnitine tablets)供试溶液

取左卡尼汀片20片(批号: 120901)精密称定, 研细, 精密称取药物粉末适量(约相当于左卡尼汀2.5g), 置100ml量瓶中, 加33%的乙醇溶液稀释至刻度后按1.3.2方法处理后加入水稀释至刻度, 即得左卡尼汀片供试衍生溶液。

1.3.5 右卡尼汀(D-carnitine)对照衍生溶液

精密称定DL-肉碱标准品约100mg(相当于D-carnitine对照品50mg), 置25ml量瓶中, 加33%的乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 精密移取上述溶液5.0ml, 置100ml量瓶中, 加33%的乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 精密移取上述溶液5.0mL置25ml量瓶中, 加33%的乙醇溶液稀释至刻度, 摇匀, 即得对照品溶液。按样品衍生化过程衍生后, 得到下层水相备用溶液, 精密移取此备用溶液1.0ml, 置5ml量瓶中, 加入水稀释至刻度, 即得右卡尼汀(D-carnitine)对照衍生溶液。

1.4 色谱条件

色谱柱为phenomenex LUX Cellulose-1(250×4.6mm, 5 μ m); 流动相A为乙腈; 流动相B为0.5mol/L高氯酸钠溶液(0.1M高氯酸溶液调节PH值3.8); 梯度洗脱见表1; 柱温为28; 检测波长235 nm; 流速为0.4mL·min⁻¹, 进样量为10 μ L。

表1 梯度洗脱程序

时间(分钟)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	22	78
28	22	78
38	45	55
48	22	78
58	22	78

1.5 测定方法

1.5.1 专属性实验

精密移取离心后的左卡尼汀片(L-carnitinetablets)供试溶液上清液2.0ml和右卡尼汀(D-carnitine)对照溶液5.0ml, 各置25ml量瓶中, 加33%的乙醇溶液稀释至刻度, 得到左卡尼汀(L-carnitine)供试液和D-carnitine对照供试液。进行衍生过程试验, 即得左卡尼汀供试衍生溶液和D-carnitine对照衍生溶液, 同法制备空白溶剂衍生溶液和空白辅料衍生溶液。按色谱条件进行分析。记录色谱图。

1.5.2 系统适用性

精密移取右旋卡尼汀(D-carnitine)对照溶液衍生后的溶液,分别进样6次,记录色谱图,以6次的峰面积计算RSD%值。

1.5.3 样品测定

右卡尼汀参照高效液相色谱法(附录VD)测定

(1) 色谱条件与系统适用性试验

用纤维素-三(3,5-二甲基苯基氨基甲酸酯)硅胶键合相手性色谱柱(Phenomene Lux 5u Cellulose-1色谱柱),以0.5mol/l高氯酸钠溶液(用高氯酸调节PH3.8)为流动相A,乙腈为流动相B,按表1进行梯度洗脱,流速为0.4ml·min⁻¹,检测波长为235nm,柱温28。精密量取供试品溶液和对照品溶液各10.0μL注入液相色谱仪中,记录色谱图,若供试品溶液中有右旋卡尼汀衍生物峰,按外标法以峰面积计算。

(2) 测定方法

左卡尼汀供试品溶液见1.3.4, D-carnitine对照品溶液见1.3.5。精密移取供试品溶液和对照品溶液分别10ml,各置100ml圆底烧瓶中,摇匀后,各滴加一滴酚酞指示液按1.3.2得对照品、供试品衍生溶液。照上述条件同法测定,按外标法以峰面积计算。

1.6 方法学考察

1.6.1 线性与范围

分别精密移取专属性实验项下的D-carnitine对照品衍生溶液0.10ml、0.20ml、0.40ml、0.80ml、1.00ml、1.20ml各置5ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得线性测定1~6号溶液,各精密移取上述线性测定1~6号溶液各10.0μl,按色谱条件进样,记录色谱图。

1.6.2 重复性

右卡尼汀对照品衍生溶液同1.3.5,供试品衍生溶液同1.3.4,平行制备6份供试样品衍生溶液。分别取上述对照品衍生溶液和供试品衍生溶液各10μl注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.6.3 溶液稳定性

在室温条件下将供试品衍生溶液同1.3.4放置于0、2、6、10、12小时分别进样10μl,记录色谱图。

1.6.4 回收率

各平行制备三份低、中、高浓度加标供试样品衍生溶液(n=9)。取右卡尼汀(D-carnitine)对照品衍生溶液及低、中、高浓度加标供试样品衍生溶液各10μl注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.6.5 耐用性

精密移取对照品衍生溶液见1.3.5、供试品衍生溶液见1.3.4各10μl注入色谱仪中,记录色谱图。

2 结果与与讨论

2.1 专属性实验

专属性实验结果见表2汇总表。记录色谱图见图2。

表2 专属性实验结果汇总表

样品名称	右卡尼汀衍生物峰保留时间(min)	分离度	右卡尼汀衍生物峰理论塔板数	右卡尼汀衍生物峰峰面积	右卡尼汀衍生物峰拖尾因子
空白衍生溶液	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
空白辅料衍生液	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
供试品衍生溶液	29.157	2.794	14973.634	4786	1.068
对照品衍生溶液	29.234	2.406	12286.936	91981	1.015

*N/A表示不适用,图谱中未出现该右卡尼汀衍生物色谱峰

专属性试验图谱如下:

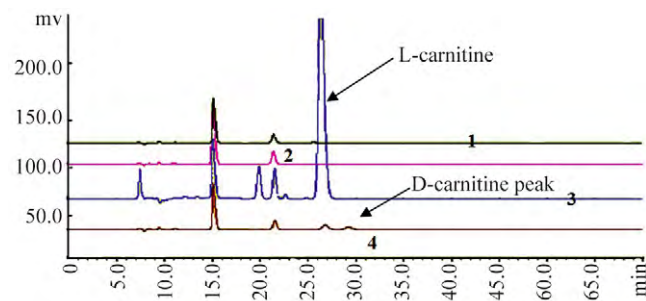


图2 专属性试验图谱

图中阿拉伯数字1表示为空白衍生溶液色谱图

2表示为空白辅料衍生溶液色谱图

3表示为供试品衍生溶液色谱图

4表示为对照品衍生溶液色谱图

空白辅料、空白溶剂不干扰供试品中右卡尼汀衍生物峰的测定,对照品及供试品中右卡尼汀衍生物峰峰形良好,理论塔板数大于5000,右卡尼汀衍生物峰与左卡尼汀衍生物峰分离度大于1.5,因此表明本方法专属性好。

2.2 系统适用性

以6次的峰面积计算RSD%,结果见表3。

右卡尼汀衍生物峰与左卡尼汀衍生物峰峰形良好,两峰分离度大于1.5,右卡尼汀衍生物峰理论塔板数大于5000,峰面积及峰保留时间RSD%(n=6)均小于2.0%,表明本方法系统适用性较好。

2.3 方法学考察

2.3.1 线性与范围

线性测定1.6.1溶液,按色谱条件各进样10.0μl,记录色谱

图见图4，以峰面积为纵坐标，各线性测定溶液浓度为横坐标进行线性回归，线性范围试验见图3，结果见表4。

表3 系统适用性实验结果汇总

样品编号	右旋卡尼汀衍生峰保留时间 (min)	峰面积	分离度	峰拖尾因子	峰理论塔板数
对照衍生溶液-1#	29.410	93331	2.419	1.019	12210.639
对照衍生溶液-2#	29.582	93616	2.429	1.016	12004.535
对照衍生溶液-3#	29.521	93698	2.429	1.017	12111.389
对照衍生溶液-4#	29.627	93036	2.439	1.014	12069.359
对照衍生溶液-5#	29.828	93591	2.455	1.013	12000.734
对照衍生溶液-6#	29.509	93799	2.433	1.017	12151.240
各参数平均值	29.580	93511.833	2.434	1.016	12091.316
RSD% (n=6)	0.48%	0.30%	0.50%	0.22%	0.69%

表4 线性与范围试验结果汇总表

溶液序号	1#	2#	3#	4#	5#	6#
浓度 (ug/ml)	1.978	3.957	7.914	15.827	19.784	23.741
峰面积	8401	18579	38190	74545	93200	109312
线性回归方程	A=4652C+282.7, R=1.0					
浓度范围(ug/ml)	1.978~23.741					
斜率	4652					
截距	282.7					
Y轴截距相对于100%相应值	0.30%					

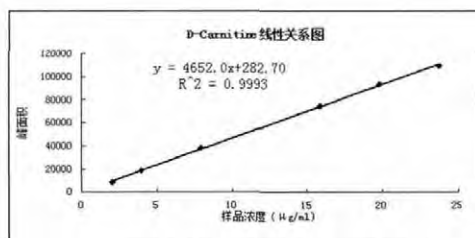


图3 线性范围关系图

由以上试验可知，右卡尼汀在浓度1.978μg/ml~23.741μg/ml范围内线性关系良好，回归方程为A=4652C+282.70，相关系数r=1，完全满足左卡尼汀片中右卡尼汀手性杂质的检查要求。

2.3.2 定量限、检测限

根据系统适用性试验项下对照品衍生溶液色谱图信噪比(S/N)为1109.36，将线性1号溶液稀释10倍，即可得到定量限，这时稀释样品图谱的信噪比为9.68，可以作为定量限样

品溶液。将线性1号溶液稀释50倍，即可得到检测限，这时稀释样品图谱的信噪比为2.22，可以作为检测限样品溶液。因此方法检测的定量限为1.98ng，相当于定量检测左卡尼汀片中手性杂质右卡尼汀的限度为0.01%，检测限为0.4ng，相当于最低检测左卡尼汀片中手性杂质右卡尼汀的限度为0.002%，远低于规定左卡尼汀片中手性杂质右卡尼汀的限度1.0%的要求，说明本检测方法灵敏度高，符合样品检测右卡尼汀手性杂质的要求。

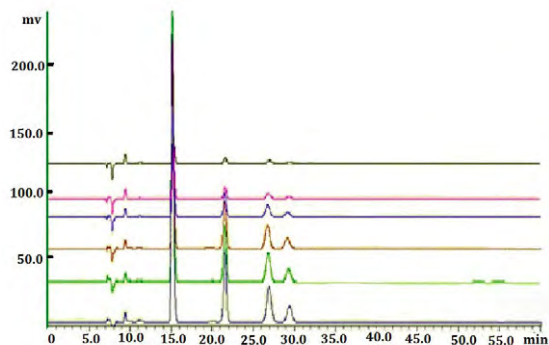


图4 线性测定色谱图

2.3.3 重复性

分别取1.6.2对照品衍生溶液和供试品衍生溶液各10μl注入液相色谱仪，记录色谱图。按外标法以峰面积计算含量，结果见表5。

表5 样品重复性试验结果汇总表

样品	1	2	3	4	5	6	平均%	%Mean±SD
含量%	0.04	0.06	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07±0.01

以上试验结果表明，本方法的重复性良好。

2.3.4 溶液稳定性

考察供试品衍生溶液稳定性，计算右卡尼汀衍生物色谱峰面积，结果见表6。

表6 溶液稳定性考察结果汇总表

考查时间 (hr)	0hr	2hr	6hr	10hr	12hr
峰面积	4137	4108	4078	4134	4157
色谱峰分离度	2.829	2.930	2.864	2.860	2.889
峰面积RSD% (n=5)	0.74%				
分离度RSD% (n=5)	1.31%				

试验结果表明，供试品衍生测定溶液放置12小时后，峰面积RSD=0.74%，同时色谱峰能完全分离，说明供试品衍生测定溶液在室温条件下至少12小时内是稳定的。

2.3.5 回收率

取右卡尼汀(D-carnitine)对照品衍生溶液及低、中、高

浓度加标供试样品衍生溶液 (n=9同1.6.4) 各10μl注入液相色谱仪, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算回收率, 结果见表7。

表7 不同浓度回收率结果

样品	加入量 (mg)	实测值 (mg)	回收率 (%)	平均值 (%)	RSD(%)
		0.4354	101.58		
低浓度加标供试溶液	0.4213	0.4365	103.61		
		0.4393	104.28		
		0.5123	95.87		
中浓度加标供试溶液	0.5266	0.5198	98.71	97.83	5.0
		0.5224	99.20		
		0.5742	89.69		
高浓度加标供试溶液	0.6319	0.5892	93.25		
		0.5955	94.24		
本底供试衍生溶液	/	0.0074	/		

以上结果表明, 高、中、低三个浓度9个加标供试测定溶液的加样回收率均在80%~120%之间, 回收率平均值为97.83%, RSD值为5.0%, 说明回收率良好。

2.3.6 耐用性

取对照品衍生液、供试品衍生液各10μl进样, 记录色谱图, 按外标法以峰面积计算含量, 耐用性试验结果如表8。

表8 耐用性试验结果

色谱参数	条件	含量测定结果 (%)	Mean±SD(%)
流速	0.3ml/min	0.07	0.07±0.02
	0.4ml/min	0.07	
	0.5ml/min	0.04	
柱温	23	0.08	
	28	0.07	
	33	0.09	
	27:73	0.05	
流动相初始比例	22:78	0.07	
	17:83	0.07	
PH值	3.6	0.08	
	3.8	0.07	
	4.0	0.08	

改变流速、柱温、流动相比例、PH值, 供试品溶液中右卡尼汀测定结果为0.07±0.02%, 说明本法耐用性较好。

在耐用性实验前为考察色谱条件的微小变化对本品中右卡尼汀手性杂质检查结果的影响, 分别考察了流速、柱温、流动相比例、流动相PH值的变动对测定结果的影响:

改变流速±10% (1、0.3ml/min ; 2、0.4ml/min)

改变柱温±5 (1、23 ; 2、33)

改变初始流动相有机相比例±5% (1、高氯酸钠溶液:

乙腈=73:27 ; 2、高氯酸钠溶液: 乙腈=83: 17)

改变PH±0.2 (1、pH 3.6 ; 2、pH 4.0)

实验中采用梯度洗脱, 随着乙腈比例的增加, 保留时间缩短较快。高效液相色谱法在对映异构体的分析中较为常用, 但可用于L-肉碱与D-肉碱分析的方法却较少^[7,13-17]。主要由于肉碱极性很大, 在色谱柱上保留不好, 同时在紫外可见光区吸收极弱, 灵敏度不够。

2.4 样品测定

色谱条件与系统适用性试验 精密量取对照品衍生溶液10μL注入液相色谱仪中, 记录色谱图, 右卡尼汀衍生物峰理论塔板数计算不低于5000, 左卡尼汀衍生物峰与右卡尼汀衍生物峰分离度应不小于1.5, 调节右卡尼汀衍生物峰高为满量程10%~20%。精密量取供试衍生溶液和对照衍生溶液各10.0μL注入液相色谱仪中, 记录色谱图, 若供试衍生溶液中有右旋卡尼汀衍生物峰, 按外标法以峰面积计算, 即得则不得过1.0%。

测定法 三批样品照高效液相色谱法(中国药典2010年版附录VD测定, 结果见表9。

表9 样品杂质测定结果

批号	120901	120902	120903
手性杂质含量 (%)	0.07	0.07	0.07

3 结论

本法适用于左卡尼汀片中右卡尼汀手性杂质检查, 三批样品中杂质含量均在0.1%以下, 远低于限度1.0%。通过方法学验证: 专属性及系统适用性、重复性、线性关系与范围、回收率、检测限及定量限及耐用性等试验考察, 该方法可行。首次对左卡尼汀片中的杂质右旋卡尼汀含量测定进行了方法确立与可行性研究。

采用柱前衍生法在phenomenex LUX Cellulose-1手性色谱柱上进行分析, 建立测定L-肉碱中D-肉碱含量的测定方法。该手性高效液相色谱法分离与分析对映异构体具有快速、简单、高灵敏度等特点, 对L-肉碱、D-肉碱具有良好的分离与分析效果, 可用于L-肉碱类原料药、保健品等样品中D-肉碱的含量检测。

本研究在参考国内外文献的基础上^[18], 改进了检测方法, 肉碱对映体化学反应主要发生在酯键或羟基, 手性试剂常与肉碱结构中的羟基反应。采用衍生化方法用手性色谱柱分离左卡尼汀手性杂质。该技术与衍生后用HPLC分析相比较, 克服了实验过程复杂、重复性差的缺点。

参考文献

- [1] 向忠权, 浦国荣, 韦志明, 等. 左旋肉碱的合成与应用[J]. 化工技术与开发, 2013, 42(2):15-21.
- [2] Morettis S, Famularo G, Marcellini S, *et al.* L-carnitine reduces lymphocyte apoptosis and oxidant stress in HIV-1- infected subjects treated with zidovudine and didanosine [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4(3): 391-403.
- [3] Knüttel G S, Harmeyer J. The determination of L-carnitine in several food samples[J]. *Food Chem*, 2007, 105(2): 793-804.
- [4] 郭文怡, 杨勇, 贾国良, 等. 左旋卡尼汀对缺氧/复氧诱导的心肌细胞氧化、凋亡影响的体外研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(1): 72-76.
- [5] 王丽霞, 刘安军, 朱晓萍, 等. 羊肉中L-肉碱抗疲劳作用的研究[J]. *现代食品科技*, 2008, 24(6):509-512.
- [6] Vogt C, Kiessig S. Separation of D /L-carnitine enantiomers by capillary electrophoresis [J]. *Journal of Chromatogr A*, 1996, 745: 53- 60.
- [7] 祝伟霞, 冀州, 刘亚凤, 等. 保健品中左旋肉碱的反相高效液相色谱法测定[J]. *分析测试学报*, 2008, 27 (10):1124-1127.
- [8] Alhpmida A S, Duhaimanas A J A, *et al.* Determination of L-carnitine, acylcarnitine and total carnitine levels in plasma and tissues of camel[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1995, 111(3) : 441- 445.
- [9] Freiml S, Altorfer H. A chiralHPLC method for the determination of low amounts of D-carnitine in L-carnitine after derivatization with (+) - FLEC[J]. *J PharmBiomed Anal*. 2002, 30: 209- 218.
- [10] Kagawa M, Mach I Y, Nish I H. Enantiomeric purity determination of acety-L-carnitine by reversed-phase high-performance liquid chromatography using chiral derivatization[J]. *Journal Chromatography: A*, 1999, 857: 127-135.
- [11] Vogt C, Georgi A, Wener G. Enantiomeric separation of D/L-carnitine using HPLC and CZE after derivatization[J]. *Chromatographia*, 1995, 40(5 /6): 287- 295.
- [12] 徐娟娟, 李杰梅, 梁淑明, 等. 手性高效液相色谱法测定左旋肉碱中光学异构体的含量[J]. *现代食品科技*, 2010, 26(3):311-313.
- [13] Misako T, Kiyoshi T, Motohiro N, *et al.* Separation of carnitine enantiomers as the 9-anthroylnitrile derivatives and high-performance liquid chromatographic analysis on an ovomucoid-conjugated column[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1996, 14: 1579- 1584.
- [14] 赵亚明, 李任, 王得新, 等. 高效液相色谱法检测血浆左旋肉碱方法的建立[J]. *中国临床神经科学*, 2006, 14 (5) :528-532.
- [15] 甘宾宾, 黎少豪. HPLC法测定保健品中左旋肉碱含量的研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2010, 20(7) : 1688-1689.
- [16] 赵榕, 孙开奇, 罗仁才. 离子对反相高效液相色谱测定保健品中的肉碱[J]. *实验技术与方法*, 2002, 14(4): 25-26.
- [17] 胡晓娟, 张锦, 赵阡. 反向高效液相色谱法测定保健品中左旋肉碱的含量[J]. *光谱实验室*, 2011, 28(2) : 743-745.
- [18] Acquarica I D, Gasparrini F, Giannoli B, *et al.* Enantio- and chemoselective HPLC separations by chiral- achiral tandem columns approach: the combination of Chirobiotic TAG and SCX columns for the analysis of propionyl carnitine and related impurities[J]. *Journal of Chromatography A*, 2004, (1061): 167-173.
- [15] Saxena S C, Kumar V, Hamde S T. Feature extraction from ECG signals using wavelet transforms for disease diagnostics [J]. *International Journal of Systems Science*, 2002, 33(13):1073-1085.
- [16] Istepanian R, Hadjileontiadis L, Panas S. ECG data compression using wavelets and higher order statistics methods [J]. *IEEE Transactions on Information Technology in Biomedicine*, 2001, 5(2):108-115.
- [17] Khadra L, Al-Fahoum A S, Al-Nashash H: Detection of life-threatening cardiac arrhythmias using the wavelet transformation [J]. *Medical and Biological Engineering and Computing*, 1997, 35(4):424-432.