

三重四极杆液质联用仪测定婴幼儿乳制品中胆碱含量

LCMSMS-374

摘要：本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera-X2 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定婴幼儿乳制品中胆碱的方法。采用外标法建立校准曲线，线性良好，相关系数均大于 0.999；通过低、中、高三个浓度水平的精密度实验和奶粉基质加标实验验证了方法的可靠性；定量限为 1.4 mg/100g；并分析了 3 种不同品牌的婴幼儿奶粉实际样品。

关键词：婴幼儿乳制品 胆碱 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱仪

胆碱是广泛存在于生物机体中的一种强有机碱性化合物，其存在形式包括游离态胆碱、乙酰胆碱以及与卵磷脂、鞘磷脂等结合形态。研究表明，胆碱在动物生长发育过程起着重要作用，可促进大脑发育、改善大脑代谢、促进神经系统信息传递、增强视力、改善钙代谢等。因此必须在婴幼儿食品中补充，GB 10765-2010 就规定了胆碱可作为婴幼儿配方食品中添加物。

胆碱在检测技术方面的报道较多，比如光度法、高效液相色谱法和液质联用法等。光度法需要进行酶反应，

酶价格偏高，检出限偏高。超高效液相色谱与质谱联用 (LC-MS/MS) 法结合超高效液相分析速度快、质谱抗干扰能力强，可以在短时间内分析含量低、组分复杂的样品，已成为一种较常用的食品分析手段。

本文参考《GB 5413.20-2013 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定》标准的前处理条件，建立超高效液相色谱与质谱联用测试方法，可供相关检测人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津液相色谱仪 Nexera-X2 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 (输液泵)，DGU-20A_{5R} (在线脱气机)，SIL-30AC (自动进样器)，CTO-30A (柱温箱)，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.91 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：Nexera-X2 系统

色谱柱：BEH HILIC (2.1 mm I.D.×100 mm L., 1.7 μm)

流动相：A — 0.01% 甲酸水溶液；B — 乙腈

流速：0.35 mL/min

进样体积：2 μL

柱温：40°C

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 60%，时间程序见表 1。

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.50	泵	B.Conc.	60
2.00	泵	B.Conc.	15
2.50	泵	B.Conc.	15
2.60	泵	B.Conc.	60
4.50	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8045

离子源：ESI(+)

雾化气：氮气 3.0 L/min

加热气：空气 10 L/min

干燥气：氮气 10 L/min

碰撞气：氩气

接口温度：300°C

脱溶剂管温度：250°C

加热模块温度：400°C

接口电压：1 kV

扫描模式：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

表2 MRM参数

名称	CAS No.	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE (V)	Q3 Pre Bias(V)
			60.25*	-12.0	-18.0	-23.0
胆碱酒石酸氢盐	87-67-2	104.15	58.20	-12.0	-29.0	-22.0
			45.20	-12.0	-22.0	-16.0

*表示定量离子

1.3 样品制备
1.3.1 标准溶液配制：

取 2000 µg/mL 标准品溶液，用水做溶剂，配制成 0.5、1.0、2.0、5.0、20、50 ng/mL 系列浓度。贮存在 PP 样品瓶中，待测。

1.3.2 样品前处理方法：

称取 2 g (精确至 0.01 g) 混合均匀的样品，于 50 mL 离心管中，加入 12 mL 1 mol/L 盐酸溶液，混匀后将离心管置于 70°C 水浴中，水解 3 h。冷却后至室温，然后用 500 g/L NaOH 溶液调 pH 为 3.5~4.0，转入 100 mL 容量瓶中，用超纯水定容。过滤，取上清液 0.25 mL 到 100 mL 容量瓶中，用超纯水定容。再用水稀释 10 倍后，过 0.22 µm 滤膜，上机测试。(参考《GB 5413.20-2013 食品安全国家标准婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定》)

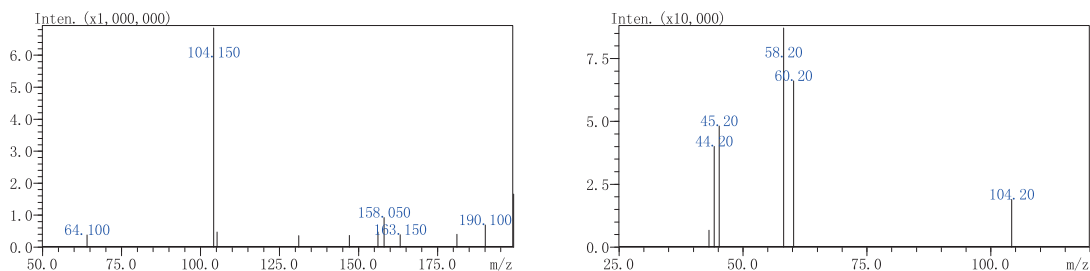
结果与讨论
2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图


图1 胆碱的一级质谱图 (左图) 和产物离子扫描质谱图 (CE值-27V, 右图)

2.2 标准溶液的 MRM 色谱图

标准溶液的 MRM 色谱如图 2 所示。

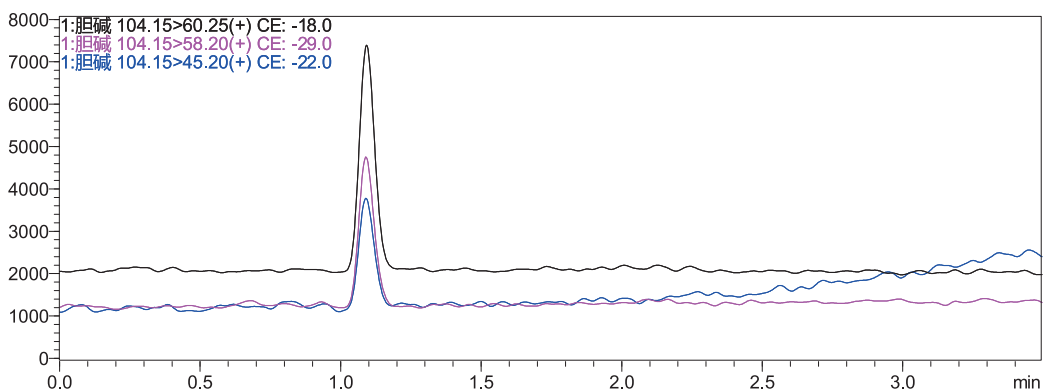


图2 0.5 ng/mL胆碱标样的MRM图

2.3 线性关系

将标准工作液，按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法制作校准曲线，如图 3 所示。

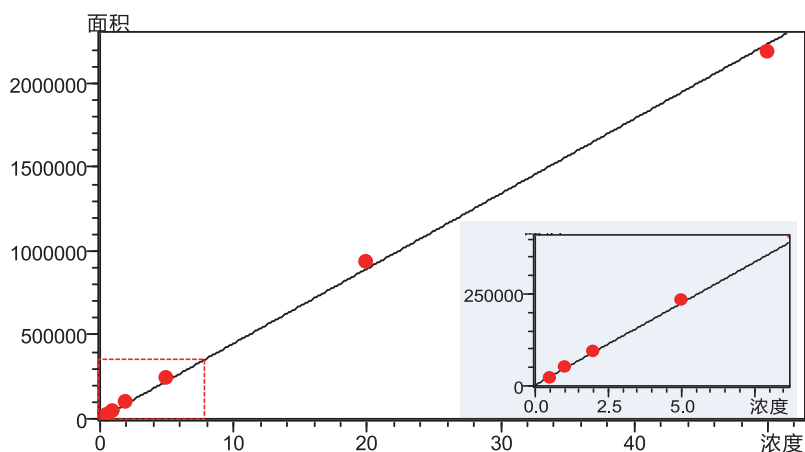


图3 胆碱的标准工作曲线

表3 胆碱的校准曲线参数（线性回归，权重系数为 $Y=1/C$ ）

名称	线性范围($\mu\text{g/L}$)	校准曲线	相关系数 r	准确度(%)
胆碱	0.5-50	$Y = (44546.4)X + (2456.64)$	0.9994	85.1~106.6

2.4 精密度实验

配制如表 4 浓度的标液，重复进样 7 次。胆碱的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.02~0.04 % 和 0.47~1.42% 之间，仪器精密度良好。

表4 保留时间和峰面积重复性结果(n=7)

No.	RSD% (1 ng/mL)		RSD% (5 ng/mL)		RSD% (20 ng/mL)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
1	1.105	42,635	1.104	211,867	1.105	834,705
2	1.106	43,276	1.104	213,675	1.105	842,504
3	1.105	42,062	1.104	213,926	1.104	841,990
4	1.105	43,259	1.104	215,962	1.104	845,052
5	1.105	43,068	1.104	212,518	1.104	845,397
6	1.105	42,875	1.104	210,977	1.104	839,072
7	1.104	41,709	1.104	213,371	1.104	845,309
平均值	1.105	42,698	1.104	213,185	1.104	842,004
RSD%	0.04	1.42	0.02	0.76	0.03	0.47

2.5 灵敏度考察

对浓度为 0.1 ng/mL 标样进样分析，以 ASTM 法计算噪声，以噪声的 3 倍作为检出限（即 S/N=3），以噪声的 10 倍作为定量限（即 S/N=10），则胆碱的检出限、定量限分别为 0.02 ng/mL、0.07 ng/mL。

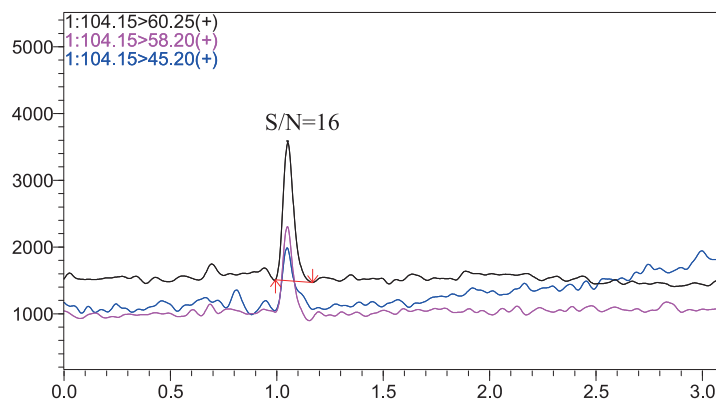


图3 0.1 ng/mL胆碱标液MRM图

2.6 基质加标实验

对奶粉样品进行加标实验，加标浓度为 10 ng/mL (94.8 mg/100 g) 及 40 ng/mL(379.2 mg/100 g)，样品和每个浓度样品平行处理三份，考察回收率。测试结果显示：94.8 和 379.2 mg/100 g 加标回收率分别为 94.2% 和 91.7%，相对标准偏差 RSD% 分别为在 2.29% 和 6.50%；具体结果如表 5。样品与样品加标的色谱图如图 4、图 5 所示。

根据 GB 5413.20-2013 标准，试样中的胆碱以胆碱氢氧化物计，以毫克每百克 (mg/100 g) 表示，具体计算公式如下：

$$\text{含量} = \frac{\text{测定量} \times \text{稀释倍数}}{\text{称样量}} \times 0.474 \times 100$$

式中：

0.474--- 胆碱酒石酸氢盐转化为胆碱氢氧化物的系数。

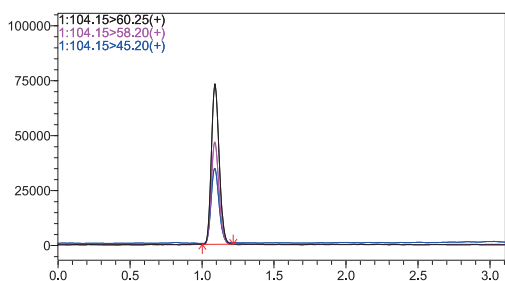


图4 奶粉样品的MRM图

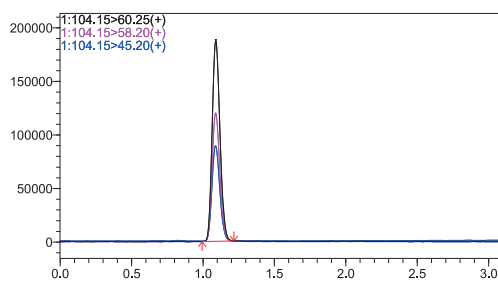


图5 奶粉基质加标样(94.8 mg/100 g)的MRM图

表5 奶粉基质加标样的测试结果 (n=3)

No.	奶粉样品浓度 (mg/100 g)	测定浓度(mg/100 g)*		加标回收率(%)	
		94.8 mg/100 g	379.2 mg/100 g	94.8 mg/100 g	379.2 mg/100 g
1	61.2	89.6	316.9	94.5	83.6
2	58.2	85.7	363.4	90.5	95.8
3	57.2	92.5	363.2	97.6	95.8
平均	58.9	89.3	347.8	94.2	91.7
RSD%	3.50	2.29	6.50	-	-

备注：“*”为扣除奶粉样品浓度后的测试浓度。

2.7 婴幼儿奶粉的实际样品分析

选取3个品牌的婴幼儿奶粉样品按照1.3.2中样品制备方法，每个样品平行2个。具体结果如表6所示。

表6 3个品牌的奶粉样品测试结果

No.	品牌 1 (mg/100 g)	品牌 2 (mg/100 g)	品牌 3 (mg/100 g)
1	238.5	55.8	56.3
2	235.7	61.1	57.2
平均值	237.1	58.4	56.8

结论

使用岛津超高效液相色谱仪 Nexera-X2 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定婴幼儿乳制品中胆碱含量，在 0.5~50 ng/mL 范围线性良好，相关系数均大于 0.999；不同浓度的精密度实验结果表明：其保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.02~0.04 % 和 0.47~1.42% 之间，仪器精密度良好。考察了奶粉基质两个浓度的加标回收率在 83.6 ~ 97.6% 之间，从而验证了方法的准确度。然后对 3 种不同品牌的奶粉样品进行的实际分析。灵敏度考察得出胆碱的定量限为 0.07 ng/mL (1.4 mg/100 g)。低于 GB 5413.20-2013 标准要求定量限为 5 mg/100 g。因此，该方法可以应用于婴幼儿奶粉中胆碱的快速分析。