

LC-MS/MS 法测定婴幼儿奶粉中左旋肉碱含量

LCMSMS-635

摘要：本应用建立了婴幼儿奶粉中左旋肉碱含量测定的方法。在优化后的色谱及质谱条件下，采用正离子模式扫描，通过多反应监测 (MRM) 模式对目标化合物进行测定。结果表明：左旋肉碱在 1~1000 ng/mL 浓度范围内线性良好，所得校准曲线相关系数在 0.9996 以上，各校准点准确度在 88.88%~110.14% 之间，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05%~0.13% 和 0.78%~2.86% 之间，加标回收率在 107.5~112.4% 之间。

关键词：婴幼儿奶粉 左旋肉碱 内标法 LC-MS/MS

左旋肉碱 (L-carnitine)，又称 L-肉毒碱、维生素 BT，是一种促使脂肪转化为能量的类氨基酸。左旋肉碱的主要功能是参与动物体内的脂肪代谢，它作为载体将长链脂肪酸从腺粒体膜外输送到膜内，促进脂肪酸的 β -氧化，从而促进脂肪的代谢。因为婴幼儿不能通过其不成熟的合成系统合成左旋肉碱，所以左旋肉碱对婴幼儿来说是一种重要的营养物质。

食品安全国家标准《GB 10765-2021 婴儿配方食品》、《GB 10766-2021 较大婴儿配方食品》和《GB 10767-2021 幼儿配方食品》中均规定，左旋肉碱为可选择性加入成分，规定最小添加量为 0.3 mg/100 kJ。

本文采用岛津三重四极杆液质联用仪建立了婴幼儿奶粉中左旋肉碱含量测定的方法，本方法灵敏度高、重现性好，适用于婴幼儿奶粉中左旋肉碱的快速检测。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8050 三重四极杆液质联用系统。配置信息如下：

系统控制器：SCL-40

自动进样器：SIL-40C X3

柱温箱：CTO-40C

输液泵：LC-40B X3

脱气机：DGU-405

工作站：Labsolutions Ver. 5.99

1.2 分析条件

1.2.1 液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST Amide (100 mm×2.1 mm I.D., 3.0 μ m)；
岛津 (上海) 实验器材有限公司；P/N: 227-30818-04)

流速：0.5 mL/min

进样量：0.2 μ L

柱温：35°C

流动相：A 相 -5 mM 甲酸铵水溶液 (0.1% 甲酸)，B 相 - 乙腈 (0.1% 甲酸)

洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 75%，洗脱程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.50	Pumps	B.Conc	75
1.60	Pumps	B.Conc	50
3.00	Pumps	B.Conc	50
3.10	Pumps	B.Conc	75
5.00	Controller	Stop	

1.2.2 质谱条件

分析仪器: LCMS-8050	接口温度: 300°C
离子源: ESI (+)	DL 温度: 200°C
雾化气流速: 3.0 L/min	加热模块温度: 400°C
干燥气流速: 10.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
加热气流速: 10.0 L/min	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

名称	离子模式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
左旋肉碱	+	162.1	102.9*	-18	-19	-44
			60.2	-12	-17	-24
左旋肉碱 -D3	+	165.1	85.1*	-12	-23	-32
			62.9	-12	-18	-22

注: * 表示定量离子对

1.3 混合标准溶液的制备

1.3.1 标准储备液

精密称取左旋肉碱标准品 20 mg, 加入适量 80% 甲醇 - 水溶液溶解, 配成浓度为 2 mg/mL 的左旋肉碱储备液; 精密称取左旋肉碱 -D3 标准品 5 mg, 加入适量 80% 甲醇 - 水溶液溶解, 配成浓度为 2 mg/mL 的左旋肉碱 -D3 储备液。

1.3.2 标准中间溶液

取 2 mg/mL 的左旋肉碱储备液 5 μ L, 加入 80% 乙腈 - 水 (0.1% 甲酸) 995 μ L, 配成浓度为 10 μ g/mL 的左旋肉碱中间溶液; 取 2 mg/mL 的左旋肉碱 -D3 储备液 5 μ L, 加入 80% 乙腈 - 水 (0.1% 甲酸) 995 μ L, 配成浓度为 10 μ g/mL 的左旋肉碱 -D3 中间溶液。

1.3.3 标准工作溶液

分别取浓度为 10 μ g/mL 的左旋肉碱中间溶液和左旋肉碱 -D3 中间溶液适量, 采用 80% 乙腈 - 水 (0.1% 甲酸) 逐级稀释, 配制成为左旋肉碱的浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 和 1000 ng/mL 的标准工作溶液, 左旋肉碱 -D3 的浓度为 100 ng/mL。

■ 样品前处理

2.1 样品提取

参照《SN/T 5146-2019 出口食品中左旋肉碱的测定 高效液相色谱和液相色谱 - 质谱 / 质谱法》，称取 1 g 样品于 50 mL 的容量瓶中，加入 20 mL 0.1 mol/L 盐酸溶液，涡旋振荡 1 min，超声 5 min 溶解样品，加入 5 mL 1 mol/L 氢氧化钾溶液涡旋混匀，60°C 水浴皂化 30 min，冷却至室温，加入 5 mL 1 mol/L 盐酸溶液，涡旋混匀 1 min，以 0.1 mol/L 盐酸溶液定容至 50 mL。取 1 mL 提取液于 15 mL 离心管中，加入 9 mL 乙腈，涡旋混匀 1 min 后取部分于 2 mL 离心管中，13000 r/min 条件下离心 5 min，所得上清液待净化。

2.2 样品净化

取 1 mL 待净化溶液于活化好的混合型阳离子交换固相萃取柱（3 mL，60mg；依次用 3 mL 甲醇、3 mL 水和 3 mL 10 mmol/L 的盐酸水溶液对柱子进行活化）中，以 1 滴 / 秒的速度过柱，用 10 mmol/L 的盐酸水溶液 3 mL 淋洗，弃去淋洗液，真空抽干 1 min，用 4% 氨水 - 甲醇溶液 2 mL 洗脱，收集洗脱液于 15 mL 离心管中，40°C 下氮气吹干，残渣采用 1 mL 的 80% 乙腈 - 水（0.1% 甲酸）复溶，复溶液于 13000 r/min 条件下离心 5 min，待上机分析。

■ 结果与讨论

3.1 MRM 色谱图

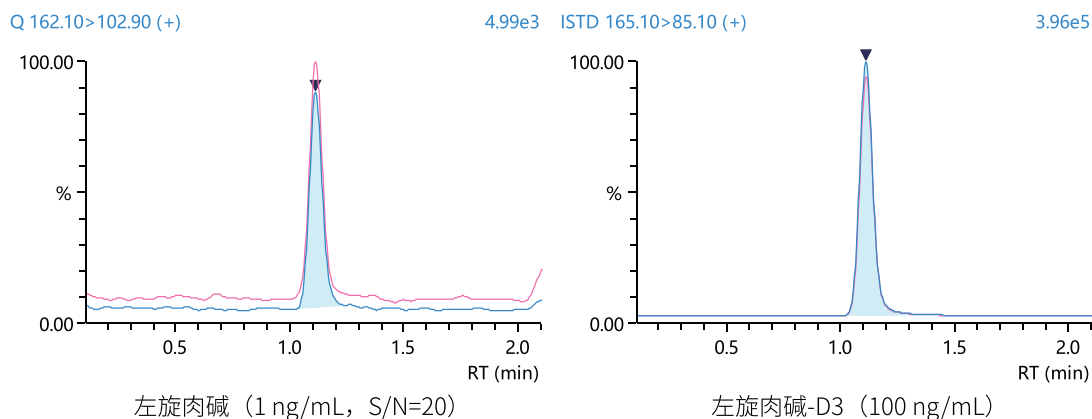


图 1 标准溶液 MRM 色谱图

3.2 校准曲线、检出限及定量限

将“1.3.3 标准工作溶液”按“1.2 分析条件”进行测定，使用内标法定量。以待测物定量离子与内标物定量离子峰面积比为纵坐标，对应的浓度比值为横坐标，绘制校准曲线，如图 2 所示。所得校准曲线相关系数大于 0.9996，各校准点准确度在 88.88~110.14% 之间，Labsolutions 软件依据信噪比自动计算检出限（S/N=3）及定量限（S/N=10）。线性方程、检出限及定量限结果见表 3。

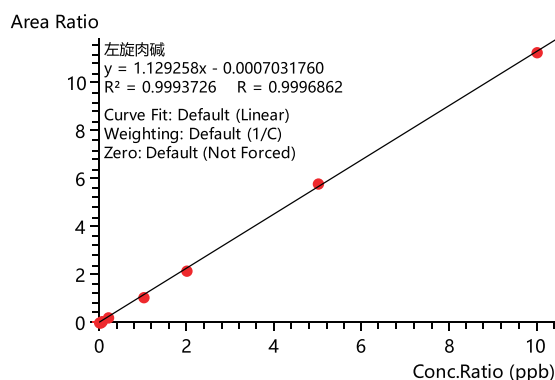


图 2 左旋肉碱校准曲线

表 3 校准曲线信息

目标物	校准曲线	相关系数 R	准确度 %	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
左旋肉碱	$Y = 1.129258X - 0.000703$	0.9996	88.88~110.14	0.15	0.50

3.3 精密度结果

分别采用 1 ng/mL、20 ng/mL 和 500 ng/mL 的标准工作溶液连续测定 6 次，考察仪器的精密度。结果如表 4 所示，保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.05% ~ 0.13% 和 0.78% ~ 2.86% 之间，显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

目标物	理论浓度 (ng/mL)	保留时间 RSD (%)	峰面积 RSD (%)
左旋肉碱	1	0.13	2.86
	20	0.05	1.55
	500	0.06	0.78

3.4 加标回收率

精密称取已知左旋肉碱含量的市售婴幼儿奶粉样品，每份 1 g，再分别加入一定量的低、中、高三个浓度的左旋肉碱标准储备液，每个浓度平行六份。按照“2. 样品前处理”方法处理后上机分析，并计算回收率。添加浓度及加标回收率具体结果如表 5 所示，结果显示：不同加标浓度下，左旋肉碱的加标回收率在 107.5~112.4% 之间。

表 5 加标回收率结果 (n=6)

目标物	样本浓度 (mg/kg)	添加浓度 (mg/kg)	实测浓度 (mg/kg)	平均回收率 (%)	RSD (%)
左旋肉碱	86.15	40	129.77	109.1	4.06
	86.15	80	176.10	112.4	1.51
	86.15	160	258.19	107.5	0.72

3.5 样品测定结果

取市售某品牌婴幼儿奶粉样品 1 g，每批次 6 样品，按照“2. 样品前处理”方法处理及“1.2 分析条件”进行测定，婴幼儿奶粉中左旋肉碱含量测定结果回算值见表 6。

表 6 样品测定结果 (mg/100 kJ)

目标物	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD (%)
左旋肉碱	0.433	0.428	0.427	0.431	0.429	0.436	0.431	0.77

■ 结论

本应用建立了采用岛津三重四极杆液质联用仪 LCMS-8050 测定婴幼儿奶粉中左旋肉碱含量的方法，采用岛津 Shim-pack GIST Amide 色谱柱进行分离，内标法测定。本方法分析时间短、回收率高、重复性好，可为婴幼儿奶粉中左旋肉碱的测定提供参考。

岛津应用云

