

# 高效液相色谱-质谱联用法测定乳品中的左旋肉碱

张朝晖, 李建辉\*, 崔风云, 何悦, 别玮, 韩深, 刘韦华, 刘鑫, 严华, 齐鹤鸣  
(北京出入境检验检疫局, 北京 100026)

**摘要:** **目的** 建立高效液相色谱串联质谱法测定乳品中左旋肉碱的含量。**方法** 样品中的左旋肉碱用乙腈水(3:1, *V:V*)溶液提取, 提取液经碱皂化后使溶液中结合态的左旋肉碱游离出来。提取液经酸液中和后, 高速离心去除杂质, 取上清液并用微孔滤膜过滤, 稀释后用高效液相色谱-质谱联用仪进行测定和确证。**结果** 待测物质在2~100 ng/mL范围内呈良好的线性关系( $r^2=0.9941$ ), 左旋肉碱在不同基质中的加标回收率为66.3%~110.5%, 精密密度为2.0%~8.8%。**结论** 此法可满足日常进出口乳品中左旋肉碱含量的测定工作, 同其他方法相比具有准确性、操作简单、省时高效的特点。

**关键词:** 乳品; 左旋肉碱; 高效液相色谱-质谱联用法

## Determination of *L*-carnitine in milk products by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

ZHANG Zhao-Hui, LI Jian-Hui\*, CUI Feng-Yun, HE Yue, BIE Wei, HAN Shen, LIU Wei-Hua,  
LIU Xin, YAN Hua, QI He-Ming

(Beijing Exit-Entry Inspection and Quarantine Bureau, Beijing 100026, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the detection of *L*-carnitine in milk products by high performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS/MS). **Methods** *L*-carnitine in samples was extracted by acetonitrile:water (3:1, *V:V*) solution. The combined *L*-carnitine was released by alkaline saponification. After neutralized by acid, the extraction was centrifuged to discard impurity. Then supernatant was filtered by syringe filter (0.2  $\mu\text{m}$ ) and diluted. Finally, the sample was measured by HPLC-MS/MS. **Results** It showed a good linearity of material in 2~100 ng/mL ( $r^2=0.9941$ ). The recoveries of *L*-carnitine in different matrix were 66.3%~110.5%, with the precision of 2.0%~8.8%. **Conclusion** This method can meet the daily inspection work of import and export of *L*-carnitine in milk products. Compared with other methods, it has the characteristics of exact determination, simple operation, time saving and high efficiency.

**KEY WORDS:** milk products; *L*-carnitine; high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

## 1 引言

肉碱(carnitine)是一种类氨基酸, 属于季铵阳离

子复合物, 可以由赖氨酸和蛋氨酸生物合成产生<sup>[1]</sup>。肉碱有两个立体异构: 生物活跃的左旋肉碱(*L*-carnitine)以及其非生物活跃的对映异构体右旋肉

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2015IK012)

**Fund:** Supported by the Science and Technology Planning Project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of People Republic China (2015IK012)

\*通讯作者: 李建辉, 硕士研究生, 工程师, 主要研究方向为食品检测。E-mail: lijh@bjciq.gov.cn

\*Corresponding author: LI Jian-Hui, Master, Engineer, Beijing Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No. 6, Tianshuiyuan Street, Chaoyang District, Beijing 100026, China. E-mail: lijh@bjciq.gov.cn

碱(*D*-carnitine)<sup>[2]</sup>。左旋肉碱主要分布在肌肉、心脏中, 能将长链脂肪酸转运进入线粒体, 并在此发生  $\beta$ -氧化产生能量<sup>[3]</sup>。人不仅可以通过食物获取左旋肉碱, 而且在体内可自行合成, 但婴幼儿自身的合成能力较低, 因此需要在婴幼儿食品中补充左旋肉碱。我国规定在较大婴儿和幼儿配方食品中选择添加或标签中标示含有左旋肉碱, 则其含量不低于 0.3 mg/100 kJ<sup>[4,5]</sup>。

目前, 左旋肉碱的检测方法主要有离子色谱法<sup>[6]</sup>、液相色谱法<sup>[7]</sup>、免疫法<sup>[8-10]</sup>、高效液相色谱-质谱联用法<sup>[11-14]</sup>等。由于婴幼儿配方奶粉的基质复杂, 干扰大, 不易准确测定<sup>[11]</sup>, 本文建立了高效液相色谱-质谱联用法, 用于婴儿配方奶粉、奶粉、牛奶等乳品中左旋肉碱的测定和确证。

## 2 材料与方 法

### 2.1 材料与试剂

材料: 乳品(北京出入境检验检疫局提供)。

试剂: 左旋肉碱标准品: CAS 541-15-1, 纯度 98.0%(Sigma 公司); 定值婴儿/成人营养配方粉: 左旋肉碱含量(136±14) mg/kg(Standard Reference Material 1849a Infant/Adult Nutritional Formula 2014 Gaithersburg, MD, USA); 实验用超纯水(由 Millipore Milli-Q 系统净化自来水获得); 浓盐酸和氢氧化钾均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司); 醋酸铵、甲醇、乙腈均为色谱纯(Fisher 公司); 甲酸为色谱纯(TEDIA 公司)。

标准储备液的配制: 称取左旋肉碱 0.05000 g 入 10 mL 容量瓶, 超纯水溶解, 并用超纯水稀释定容、混匀。即得浓度为 5 mg/mL 的标准储备液, 可在 -18 °C 保存 6 个月。

标准工作液的配制: 用超纯水将左旋肉碱标准储备液逐级稀释得到浓度为 2、5、10、20、50、100 ng/mL 的标准工作液, 现用现配。

### 2.2 仪器与设备

Xevo TQ 三重四极杆质谱仪(配有电喷雾离子源, 美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司)。

### 2.3 实验方法

#### 2.3.1 色谱条件

色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC<sup>®</sup> BEH HILIC(2.1 mm×150 mm, 1.7  $\mu$ m); 柱温: 35 °C; 进样

量: 10  $\mu$ L; 流速: 0.25 mL/min; 流动相使用前超声脱气 10 min; 流动相洗脱梯度见表 1。

表 1 流动相洗脱梯度  
Table 1 Gradient elution procedures

时间 (min)	甲醇 (%)	5 mmol/L 醋酸铵水溶液 +0.1%甲酸(%)	曲率 (Curve)
/	5	95	/
3.5	5	95	6
5.0	80	20	6
6.0	5	95	6

#### 2.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源; 扫描方式: 正离子扫描; 检测方式: 多反应监测(MRM); 毛细管电压: 3 KV; 雾化气、反吹气均为高纯氮气, 碰撞气为高纯氩气; 源温: 150 °C; 质谱参数见表 2。

表 2 左旋肉碱质谱参数  
Table 2 Mass spectrometry parameters of *L*-carnitine

名称	定量离子对 $m/z$	定性离子对 $m/z$	锥孔电压/V	碰撞能量/V
左旋肉碱	162 > 103	162 > 60	30	17

#### 2.3.3 样品前处理

##### (1) 奶粉的前处理

从原始固体样品中取出部分代表性样品, 充分混匀, 用四分法缩分出不少于 50 g 的样品, 称取 8 g 均匀样品于 50 mL 离心管中, 加入 40 mL 水, 涡旋混匀 1 min, 取 2.5 mL 上述混匀样品, 转移至 50 mL 离心管中, 加入 1.5 mL 水, 再加入 16 mL 乙腈水(3:1, *V/V*)提取液涡旋混匀 1 min, 再加入 5 mL 氢氧化钾水溶液(1 mol/L)涡旋混匀 1 min, 60 °C 水浴振荡提取 30 min, 静置在冷水浴中, 冷却至室温, 加入 5 mL 盐酸水溶液(1 mol/L)涡旋混匀 1 min, 取 1.8 mL 混合液至离心管, 14000 r/min 离心 5 min, 取上清液过微孔滤膜, 用水稀释 100 倍, 供高效液相色谱-质谱联用仪分析<sup>[11]</sup>。

##### (2) 液态乳的前处理

量取 4 mL 均匀样品于 50 mL 离心管中, 加入 16

mL 乙腈水(*V:V*, 3:1)提取液涡旋混匀 1 min, 再加入 5 mL 氢氧化钾水溶液(1 mol/L)涡旋混匀 1 min, 60 °C 水浴振荡提取 30 min, 静置在冷水浴中, 冷却至室温, 加入 5 mL 盐酸水溶液(1 mol/L)涡旋混匀 1 min, 取 1.8 mL 混合液至离心管, 14000 r/min 离心 5 min, 取上清液过微孔滤膜, 用水稀释 100 倍, 待高效液相色谱-质谱联用仪分析<sup>[11]</sup>。

### 3 结果与分析

#### 3.1 质谱条件

在流动注射条件下, 分别将 1 μg/mL 的标准溶液在正离子状态下进行全扫描, 选择合适的电离模式。结果表明左旋肉碱在正离子模式下产生[M+H]<sup>+</sup>的峰响应值最高, 选择其作为母离子并进行下一步碰撞诱导解离, 对锥孔电压、离子源温度、去溶剂气温度、去溶剂气流速、碰撞能量进行优化。选择丰度较高、干扰较小的两对子离子进行多反应监测, 其中丰度最高的作为定量离子, 经优化后的质谱条件见表 2。图 1 为左旋肉碱标准溶液的多反应检测(MRM)总离子流色谱图。

#### 3.2 样品前处理条件

本研究将氢氧化钾水溶液加入试样后, 水浴加热皂化<sup>[15]</sup>, 将离心管置于冷水浴中, 冷却至室温, 再加入 HCl 溶液调节 pH 值。对于奶粉中左旋肉碱的检测, 既要保证取样的均一性, 又要减少样品基质中常量目标化合物对仪器的污染。本研究从原始固体样品中取出部分代表性样品, 充分混匀, 用四分法缩分, 再称取均匀样品于离心管中, 加入适量水混匀, 进行后续测定。

#### 3.3 方法学验证

##### 3.3.1 线性关系

用超纯水将左旋肉碱标准储备液逐级稀释得到标准工作溶液, 以各组分的峰面积(*Y*)和相对的质量浓度(*X*)作标准曲线。实验表明, 待测物质在 2~100 ng/mL 范围内呈良好的线性关系( $r^2=0.9941$ ), 可以满足定量分析的需要, 结果计算采用外标法定量。

##### 3.3.2 精密度

分别对浓度为 5、20、100 ng/mL 的标准溶液进行 5 次连续进样, 计算 5 次测定值的平均值和 CV 值来考察方法的精密度, 结果如表 3 所示。

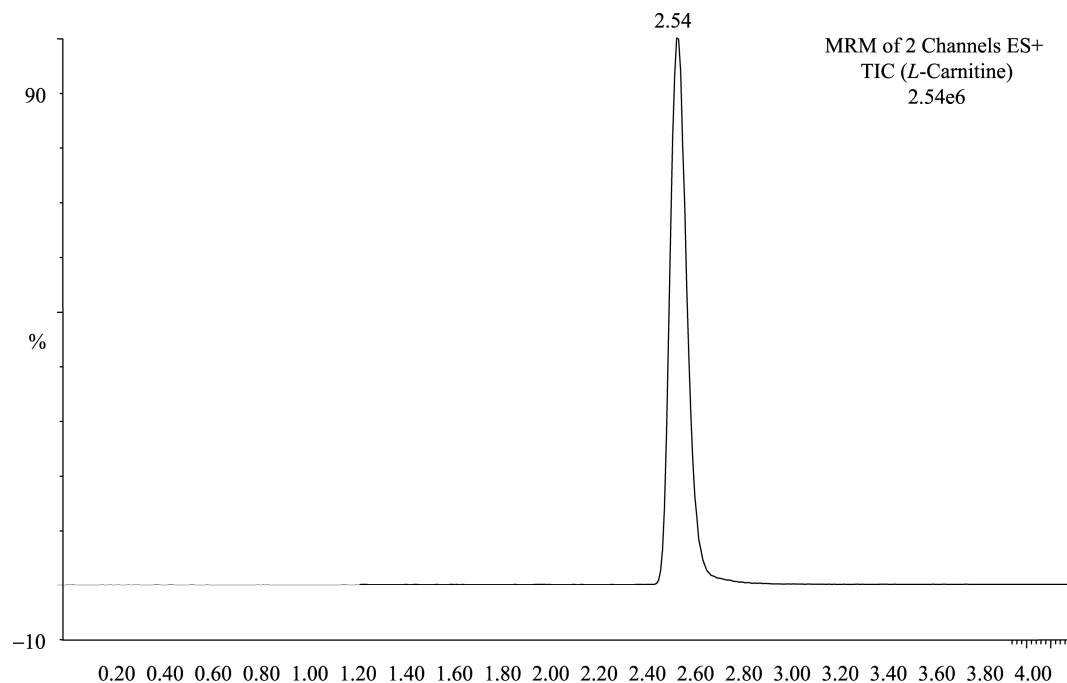


图 1 左旋肉碱标准溶液(100 ng/mL)的多反应检测(MRM)总离子流色谱图

Fig. 1 TIC chromatogram of *L*-Carnitine in multiple reaction monitoring (MRM) obtained from a standard solution (100 ng/mL)

表 3 三个不同浓度水平标准溶液测定值的精密度( $n=5$ )  
Table 3 Precision of standard solution at three levels ( $n=5$ )

浓度(ng/mL)	测定值(mean±sd, ng/mL)	CV(%)
5	5.3±0.1	1.7
20	21.6±0.3	1.2
100	107.1±1.0	0.9

由表 3 可见, 针对不同浓度的左旋肉碱标准溶液进行连续进样, 3 个浓度水平的 CV 值为 0.9%~1.7%, 显示了方法的随机误差小, 具有较好的精密度。

### 3.3.3 回收率和检测限

选择脱脂奶粉、全脂奶粉、脱脂牛奶和全脂牛奶 4 种样品, 分别测定其本底值( $n=5$ )。根据测定的本底值, 添加约 0.5、1.0 和 2.0 倍于本底值的标准物质到实际样品中, 进行回收率实验, 每个添加浓度平行重复 5 次, 左旋肉碱加标回收率在 66.3%~110.5%之间, 相对标准偏差在 2.0%~8.8%之间。表 4 显示了方法具有较好的回收率, 能够满足实际样品的分析要求。

取储备液逐级稀释, 进样量为 10  $\mu$ L。以信噪比

$S/N=3$  计算左旋肉碱的检出限(LOD), 以信噪比  $S/N=10$  计算其定量下限(LOQ), 并以标准品的质量进行计算, 得到左旋肉碱的 LOD 为 5.0 pg, LOQ 为 16.6 pg, 能够满足实际样品分析对检测限的需求。

### 3.3.4 重现性

通过同一台仪器、同一实验员、同一天对定值配方粉进行重复测定( $n=7$ ), 考察方法的日内精密度; 通过同一台仪器、同一实验员、连续 3 d 对定值配方粉进行重复测定( $n=7$ ), 考察方法的日间精密度。日内精密度和日间精密度良好, 分别为 2.0%和 4.0%。

## 4 结 论

本文建立了高效液相色谱-串联质谱联用法检测乳品中左旋肉碱含量。样品中的左旋肉碱用乙腈水溶液提取, 提取液经碱皂化后使溶液中结合态的左旋肉碱游离出来。提取液经酸液中和后, 高速离心去除杂质, 取上清液并用微孔滤膜过滤, 稀释后用液相色谱-质谱联用仪进行测定和确证。该方法重现性良好, 回收率和精密度均符合食品检测要求。

表 4 不同样品中左旋肉碱的回收率( $n=5$ )  
Table 4 Recovery assay of *L*-carnitine for different samples ( $n=5$ )

样品名称	本底测定值		添加量(mg/kg)	回收率	
	测定均值(mg/kg)	RSD(%)		回收率均值(%)	RSD(%)
脱脂奶粉	284.7	6.5	150	77.4	4.7
			300	82.9	2.0
			600	68.2	2.0
全脂奶粉	193.3	5.8	100	88.9	2.6
			200	94.2	5.1
			400	79.4	3.5
脱脂牛奶	27.6	4.5	15	97.9	6.8
			30	89.4	3.8
			60	84.6	2.4
全脂牛奶	27.1	5.9	15	103.6	6.2
			30	84.5	2.1
			60	68.5	8.8

## 参考文献

- [1] Steiber A, Kerner J, Hoppel CL. Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective [J]. *Mol Aspects Med*, 2004, 25(5-6): 455-473.
- [2] Liedtke AJ, Nellis SH, Whitesell LF, *et al.* Metabolic and mechanical effects using *L*- and *D*-carnitine in working swine hearts [J]. *Am J Physiol*, 1982, 243(5): H691-697.
- [3] McGarry JD, Brown NF. The mitochondrial carnitine palmitoyl-transferase system-from concept to molecular analysis [J]. *Eu J Biochem*, 1997, 244(1): 1-14.
- [4] GB 10765-2010 食品安全国家标准 婴儿配方食品[S]. GB 10765-2010 National food safety standard- Infant formula [S].
- [5] GB 10767-2010 食品安全国家标准 较大婴儿和幼儿配方食品[S]. GB 10767-2010 National food safety standard- Older infants and young children formula [S].
- [6] 钟新林, 陈军, 余彦海. 在线固相萃取非抑制离子色谱法测定奶粉中的左旋肉碱[J]. *中国无机分析化学*, 2012, 02(z1): 71-74.  
Zhong XL, Chen J, Yu YH. Determination of *L*-carnitine content in milk powder using on-line solid phase extraction with non-suppressed ion chromatography [J]. *Chin J Inorg Chem*, 2012, 02(z1): 71-74.
- [7] 李红艳, 陈小珍, 张水锋, 等. 柱前衍生-高效液相色谱-荧光法测定乳制品中左旋肉碱含量[J]. *现代食品科技*, 2013, 29(9): 2300-2305.  
Li HY, Chen XZ, Zhang SF, *et al.* Determination of *L*-carnitine in milk products by HPLC-fluorescence detection with pre-column derivatization [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2013, 29(9): 2300-2305.
- [8] 王天西, 熊文明, 林梦勇. 分光光度法测定乳粉中左旋肉碱含量[J]. *福建分析测试*, 2012, 21(1): 52-56.  
Wang TX, Xiong WM, Lin MY. Determination of *L*-carnitine content in milk powder with spectrophotometry [J]. *Fujian Anal Test*, 2012, 21(1): 52-56.
- [9] 王文特, 任雪梅, 周传静, 等. 反应温度和时间对分光光度法测定乳粉中左旋肉碱的影响[J]. *山东农业科学*, 2013, 45(11): 120-122.  
Wang WT, Ren XM, Zhou CJ, *et al.* Effects of reaction temperature and time on spectrophotometric determination of *L*-carnitine in milk powder[J]. *Shandong Agric Sci*, 2013, 45(11): 120-122.
- [10] 徐萍. 分光光度法测定婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的方法探讨[J]. *生命科学仪器*, 2013, 11(5): 45-47.  
Xu P. Spectrophotometric method was developed to determinate *L*-carnitine in infant food and milk products [J]. *Life Sci Instrum*, 2013, 11(5): 45-47.
- [11] 竺琴, 苏流坤, 郑家概, 等. 高效液相色谱-质谱联用测定婴幼儿配方奶粉中的左旋肉碱[J]. *分析测试学报*, 2012, 31(3): 355-358.  
Zhu Q, Su LK, Zheng JG, *et al.* Determination of *L*-carnitine in infant formula milk powder by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2012, 31(3): 355-358.
- [12] 单艺, 王象欣, 赵秋莲, 等. UPLC-MS /MS 法与分光光度法测定乳及乳制品中左旋肉碱的比较[J]. *食品与发酵工业*, 2014, 6: 152-158.  
Shan Y, Wang XX, Zhao QL, *et al.* Comparison of ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry and spectrophotometry in the determination of *L*-carnitine in milk and dairy products [J]. *Food Ferment Ind*, 2014, 6: 152-158.
- [13] Kivilompolo M, Öhrnberg L, Orešič M, *et al.* Rapid quantitative analysis of carnitine and acylcarnitines by ultra-high performance-hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2013, 1292: 189-194.
- [14] Desiderio C, Mancinelli A, De Rossi A, *et al.* Rapid determination of short chain carnitines in human plasma by electrospray ionisation-ion trap mass spectrometry using capillary electrophoresis instrument as sampler [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1150(1-2): 320-326.
- [15] GB 29989-2013 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定[S]. GB 29989-2013 National food safety standard-Determination of *L*-carnitine in infant food and milk products [S].

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



李建辉, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品检测。  
E-mail: lijh@bjciq.gov.cn



张朝晖, 博士, 高级工程师, 主要研究方向为食品检测。  
E-mail: zhangzh@bjciq.gov.cn