

LC-MS/MS 法测定保健食品中左卡尼汀的含量

王莎*, 郭彦丽, 周提军, 城田修

(资生堂(中国)投资有限公司先端科学事业推进部应用技术中心, 北京 100176)

摘要: **目的** 建立保健品中左卡尼汀的 LC-MS/MS 的测定方法。**方法** 待测样品经超声提取、稀释后, 分别采用 CAPCELL PAK CR 色谱柱和 PC HILIC 色谱柱进行分离, 最后用 LC-MS/MS 进行检测。**结果** 使用 CAPCELL PAK CR 法检测左卡尼汀能够得到更高的灵敏度, 线性范围为 0~200 ng/mL, 相关系数为 $r=0.9995$ 。**结论** 该方法灵敏度高、准确、重现性好, 可以用于一些保健食品中左卡尼汀的含量检测。**关键词:** 左卡尼汀; LC-MS / MS; 保健食品

Determination of levocarnitine in health care food by LC-MS/MS

WANG Sha*, GUO Yan-Li, ZHOU Ti-Jun, CHENG Tian-Xiu

(Advanced Science and Business Promotion Division Applied Technology Center of Shiseido (China)
Investment Co., Ltd., Beijing 100176, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of levocarnitine in health care food by LC-MS/MS. **Methods** After an ultrasonic extraction and dilution, the samples were separated by CAPCELL PAK CR and PC HILIC column, respectively. Finally the target compound was detected by LC-MS/MS. **Results** Compared with the PC HILIC column, using CAPCELL PAK CR column could get a higher sensitivity result. The method showed a good linearity over the range of 0~200.0 ng/mL for levocarnitine with $r=0.9995$. **Conclusion** This method has a good sensitivity, accuracy and reproducibility and it is suitable for the detection of levocarnitine in health care food.

KEY WORDS: levocarnitine; LC-MS/MS; health care food

1 引言

左卡尼汀又名左旋肉碱, 是哺乳动物能量代谢过程中需要的体内天然物质, 其主要功能是促进脂质代谢。作为人体的必须营养物质之一, 现已被广泛应用到除药品以外的食品、保健品等领域中。左卡尼汀分子内含有季铵结构, 同时也是拥有内盐结构的氨基酸衍生物。其亲水性非常高, pK_a 值为 3.8, 在常规的反相分析中常使用离子对法^[1,2]或在离子交换色谱上使用含高浓度盐的流动相来进行洗脱^[3]。但离子对法操作复杂、重现性较差且易损坏色谱柱; 离子交换色谱使用的流动相-高浓度的盐在分析过程中容易

结晶, 这两种方法都不太适合用 LC-MS 检测。因此, 我们尝试在不使用离子对试剂和高盐流动相的条件下, 使用资生堂的两款专门用于高极性化合物分析的色谱柱 CAPCELL PAK CR(1:4) 和 PC HILIC, 进行左卡尼汀的 LC-MS 分析。

CAPCELL PAK CR 是一款由高分子包被型反相填料和强阳离子交换填料混合填充而成的色谱柱^[4,5], 导入的 C_{18} 基和磺酸基按一定的比例(1:4; 1:20; 1:50)混合, 使 CR 柱同时具有十八烷基的反相分离模式和磺酸基的强阳离子交换模式。因此, 在酸性条件下使用 LC-MS 分析碱性化合物时, 可以在不含离子对试剂、富含有机溶剂的流动相条件下实现保留,

*通讯作者: 王莎, 应用技术人员, 研究方向: 食品、化妆品等领域的分析。E-mail: wangsha@shiseido.cn

并且由于所使用流动相有利于目标物质的离子化,因此有效地提高了 LC-MS 检测的灵敏度。

PC HILIC 是亲水性相互作用的一款色谱柱,在 HILIC 模式中,亲水性的键合相表面形成了水和相,样品的分配在流动相与水相间发生。因此,亲水性高的极性化合物在水和相中被保留,疏水性强的化合物基本不被保留,被快速溶出。本研究分别使用两款极性色谱柱对左卡尼汀进行分离后,用 LC-MS 进行检测,并对两款色谱柱的 LC-MS 分析结果进行了比较。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

AB SCIEX QTRAP 5500(美国应用生物系统公司),配有电喷雾离子源(ESI)和 Analyst 1.5.1 工作软件;资生堂 NANOSPACE 装置系统,包括 F3301 双泵(MS)、F3133 高通量自动进样器 HTS-Z、F3202 脱气装置、F3014 柱温箱;超声波洗净器(FUNGILAB);脱气装置(ASONE);pH 计(FE20, METTLER TOLEDO);电子天平(METTLER TOLEDO)。

甲酸铵(Acros);甲酸(色谱纯,Acros);乙腈(色谱纯,Acros);高纯水(MILLIPORE, Ultrapure Ion-ExTM Cartridge)。

左卡尼汀标准品由百灵威公司(中国)提供。

待测样品为日本资生堂提供的 Gymrind-SUPER BURN。

2.2 实验方法

2.2.1 标准储备液的配置

称取 1.0 mg 左卡尼汀标准品,用水溶解并定容至 100 mL,配制成 0.01 mg/mL 的标准储备液,然后用流动相进行稀释,分别稀释到 50、100、200 ng/mL,用于标准曲线的制作。

2.2.2 样品前处理

取本品 5 片,研细,精密称取适量(约相当于左卡尼汀 83.5 mg),置于 500 mL 容量瓶中,加入约 480

mL 水,超声处理 5 min 并振摇,使左卡尼汀充分溶解,用水定容至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,摇匀,再精密量取 10 mL,置于 100 mL 容量瓶中,用流动相定容至刻度,摇匀。取适量通过 0.22 μ m 水系滤膜,供 LC-MS 分析备用。

2.2.3 实验条件

色谱条件:

色谱柱: CAPCELL PAK CR 1:4 粒径 5 μ m(2.0 mm i.d.×150 mm);流动相: 10 mmol/L HCOONH₄:CH₃CN=30:70,用 HCOOH 酸化至 pH=3;流速: 200 μ L/min;温度: 35 $^{\circ}$ C;进样量: 3 μ L。

色谱柱: PC HILIC 粒径 5 μ m; 2.0 mm i.d.×150 mm;流动相: 5 mmol/L HCOONH₄·H₂O:CH₃CN=5:95(v:v);流速: 200 μ L/min;温度: 35 $^{\circ}$ C;进样量: 3 μ L。

质谱条件: 离子检测方式为多反应监测(MRM);电离方式: 电喷雾电离, ESI(+);离子喷雾电压(IS): 5500 V;源温度: 450 $^{\circ}$ C;气帘气体(CUR): 30 psi;碰撞气(CAD): Medium;离子源气体-雾化气(GS1): 40 psi;离子源气体-加热气(GS2): 45 psi;优化去簇电压(DP)等参数见表 1。

3 结果与讨论

3.1 流动相的选择

根据 CR 色谱柱的保留机理,向 10 mmol/L 的可挥发性盐-甲酸铵中加入甲酸调 pH 至 3.0 来抑制卡尼汀分子中羧酸根的解离,在酸性条件下更有利于目标物质的离子化,同时将有机相的比例上调到 70% 来加快左卡尼汀的洗脱。

PC HILIC 是正相的保留机理,增加流动相中有机溶剂的浓度,极性化合物的保留时间会随有机溶剂浓度的增大而增加。当使用 5 mmol/L 的甲酸铵并将有机相的浓度提高到 95%作为流动相时,由于左卡尼汀的标准溶解液为高纯水,PC HILIC 色谱柱的

表 1 左卡尼汀的质谱参数
Table 1 Mass spectrometric parameters of L-carnitine

Analyte	Parent ion (m/z)	Daughter ion (m/z)	Declustering potential/V	Entrance potential/V	Collision energy/eV	Collision exit potential/V
L-carnitine	162.1	85.0	120.0	10.0	26.0	24.0
	162.1	103.0	120.0	10.0	11.0	13.0

流动相为高浓度的有机溶剂, 两者极性相差较大, 会影响峰形及灵敏度, 所以样品用含 70% 的有机溶剂进行稀释。

将相同浓度的标准品在相同的 MS 条件下, 分别使用 CAPCELLPAK CR 色谱柱和 PC HILIC 色谱柱分离后发现, CR 色谱柱分离后检测的灵敏度要远高于 PC HILIC(如图 1 所示)。

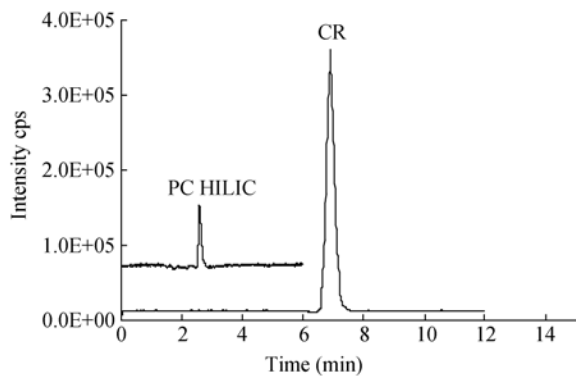


图 1 CR 和 PC HILIC 柱分析左卡尼汀结果比较
(进样浓度为 50 ng/mL)

Fig. 1 Comparison of the results analyzed by CR-MS
and PC HILIC-MS

3.2 标准曲线和线性范围

分别取上述不同浓度的标准溶液各 3 μ L, 按照 2.3 所述的色谱质谱条件进行测定。以标准品的浓度为横坐标 X, 相对应的峰面积为纵坐标 Y, 制作标准曲线(如图 2 所示)。实验表明, 左卡尼汀在 0~200 ng/mL

范围内具有良好的线性关系, 线性回归方程为 $Y=1.18e+005X+3.13e+005$, 相关系数 $r=0.9995$ (注: 使用 CAPCELL PAK CR 1:4 制作标准曲线)。

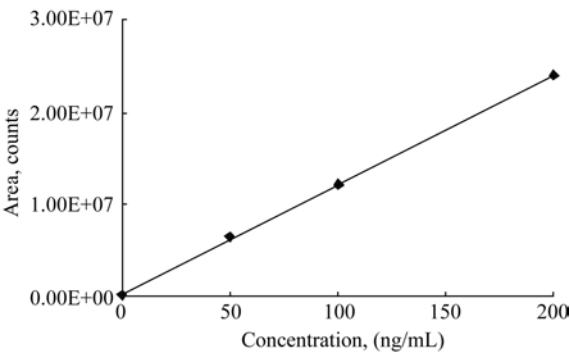


图 2 左卡尼汀的标准曲线
Fig. 2 The standard curve of levocarnitine

3.3 精密度实验

取同一份左卡尼汀标准品溶液按照上述条件 (CAPCELLPAK CR) 重复进样 6 次, 测定峰面积。结果的 RSD 为 1.02%($n=6$), 表明该方法重现性良好(见表 2)。

3.4 稳定性实验

准确吸取配制的标准品溶液 3 μ L, 按 0、1、2、4、6、8 h 时间间隔进样, 分别测定左卡尼汀峰面积, 计算得到左卡尼汀含量结果的 RSD 为 2.2%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定, 左卡尼汀含量无明显变化, 在此时间内供试品化学性质稳定。

表 2 精密度实验

Table 2 The relative standard deviations of samples

样品编号	1	2	3	4	5	6	RSD
峰面积	1.89e+007	1.92e+007	1.90e+007	1.91e+007	1.87e+007	1.92e+007	1.02%

3.5 重复性实验

取 6 份待测样品, 如 2.2.2 所述制备溶液, 测定待测样品中左卡尼汀的含量, RSD 为 2.7%, 说明重复性好。

3.6 加标回收实验

准确称取 6 份已知含量的样品, 再准确加入左卡尼汀标准品 67.000 mg/g, 按 2.2.2 所述制备溶液, 测定其中左卡尼汀的含量, 得到平均回收率为 97.2%, RSD 为 3.4%, 加标回收率均符合要求(见表 3)。

3.7 待测样品含量测定

将前处理过的样品用 LC-MS 进行含量测定, 分析结果见图 3。经计算, 样品浓度为 166.9 ng/mL。通过商品标示含量, 理论计算所得浓度为 167 ng/mL, 说明该方法可以正确分析待测样品。

4 结 论

使用两款极性化合物分析柱分别建立了左卡尼汀的 LC-MS/MS 分析方法。结果发现: 在相同进样量下, 使用 CAPCELLPAK CR 柱分析时, 灵敏度要明

表 3 加标回收率实验结果($n=6$)
Table 3 Results of recovery experiments($n=6$)

左卡尼汀量 mg/g	加入左卡尼汀量 mg/g	测得量 mg/g	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
55.667	67.000	119.400	95.1	97.2	3.4
55.333	67.000	122.900	100.8		
55.567	67.000	118.400	93.8		
54.967	67.000	122.522	100.8		
55.233	67.000	121.436	98.8		
55.435	67.000	118.334	93.9		

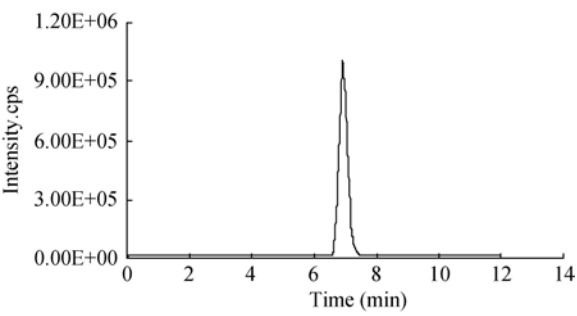


图 3 保健食品中左卡尼汀的色谱图
Fig. 3 Chromatogram of levocarnitine in health care food

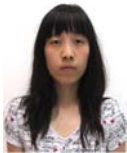
显高于 PC HILIC, 且 CR 柱得到的色谱峰形对称、保留时间稳定, CR 柱更适合对样品进行快速、高灵敏度的分析检测。因此, 推荐使用 CR 柱进行方法学的建立。另外, 该方法没有使用离子对法及高浓度的盐作为流动相进行洗脱, 分析条件相对简单、重现性好, 可以用于一些保健食品中左卡尼汀的含量检测。

参考文献

[1] 汤杰, 李永进, 方建国. 左卡尼汀氯化钠注射液中左卡尼汀的含量测定[J]. 医药导报, 2004, 23(7): 498.
[2] 徐连明, 王振中, 毕宇安, 等. HPLC 法测定减肥胶囊中左旋肉碱的含量[J]. 海峡药学, 2009, 21(11): 46.
[3] 胡晓娟, 张锦. 反相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.
[4] Ohtsu Y, Fukui H, Kanda T, *et al.* Structures and chromatographic characteristics of capsule-type silica gels coated with hydrophobic polymers in reversed-phase liquid chromatography [J]. Chromatographia, 1987, 24: 380.
[5] 郭彦丽, 城田修. 使用混合填料色谱柱的非衍生化肌氨酸和丙氨酸的 LC-MS 分析[J]. 分析实验室, 2011, 30(Suppl): 197.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



王莎, 应用技术人员, 研究方向: 食品、化妆品等领域的分析。
E-mail: wangsha@shiseido.cn