

关于 GB 29989-2013《婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定》几个关键步骤的探讨研究

邢朝宏, 印杰*, 葛淑丽, 杨健, 王育信, 彭亚峰

(国家食品质量监督检验中心(上海)/上海市质量监督检验技术研究院, 上海 200233)

摘要: 目的 探讨影响国家标准 GB 29989-2013《婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定》测定结果准确性的因素。**方法** 研究样品前处理过程中 pH 调节方式, 乙酰肉碱转移酶的配制, 待测液静置时长, 特殊基质前处理方法优化, 酶反应过程避光与否等方面对测定结果的影响。**结果** pH 调节对结果准确性影响较大, 待测液静置 2 h 检测结果与过夜后恢复室温检测结果基本无差异, 特殊医学用途配方食品加入高氯酸后无法直接沉淀过滤, 酶反应过程需是否避光对检测结果有较大影响。**结论** 测定过程中 pH 调节不可回调, 待测液静置 2 h 后可直接检测, 特殊医学用途配方乳粉前处理时应先加入 α -淀粉酶水解, 酶反应过程需避光。

关键词: 左旋肉碱; pH 调节; 婴幼儿配方食品

Discussion on several key steps of GB 29989-2013 Determination of L-carnitine in food and dairy products for infants and young children

XING Chao-Hong, YIN Jie*, GE Shu-Li, YANG Jian, WANG Yu-Xin, PENG Ya-Feng

(National Food Quality Supervision and Inspection Center (Shanghai)/Shanghai Institute of Quality Inspection and Technology Research, Shanghai 200233, China)

ABSTRACT: Objective To explore the factors influencing the accuracy of national standard GB 29989-2013 *Determination of L-carnitine in food and dairy products for infants and young children*. **Methods** The influence of pH regulation, the preparation of acetyl carnitine transferase, the standing time of the solution to be measured, the optimization of the pretreatment method of special substrate, and the avoidance of light during the enzyme reaction on the determination results were studied. **Results** The pH adjustment had a great influence on the accuracy of the results. There was basically no difference between the test results after 2 h standing and the test results after overnight. The formula foods for special medical purposes could not be directly precipitation filtration after adding perchloric acid, and whether the enzyme reaction process needed to be protected from light had a great influence on the detection results. **Conclusion** During the determination process, the pH can not be adjusted back, and the test solution can be directly detected after standing for 2 h. Alpha-amylase hydrolysis should be added to the pre-treatment of formula milk powder for special medical purposes. The enzyme reaction needs to be light-proof.

KEY WORDS: L-carnitine; pH adjustment; infant foods and dairy products

*通讯作者: 印杰, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: yinjie@sqi.org.cn

*Corresponding author: YIN Jie, Senior Engineer, Shanghai Institute of Quality Inspection and Technology Research, No.381, Cangwu Road, Xuhui District, Shanghai 200233, China. E-mail: yinjie@sqi.org.cn

1 引言

左旋肉碱, 化学名称为 β -羟基 γ -三甲铵丁酸, 又称 L-肉碱、维生素 BT, 是一种广泛存在于机体组织的特殊氨基酸。左旋肉碱目前主要作为食品营养强化剂, 用于营养保健食品、运动员的营养补剂及中老年人的营养补充剂, 还有用作饲料添加剂^[1,2]。左旋肉碱是婴儿必需营养物质, 它不仅在能量代谢产生和脂肪代谢过程中起主要作用, 而且可以维持婴儿生命、促进婴幼儿的某些生理发育。如生酮作用、氮代谢等方面具有一定的功能^[3,4]。目前文献报道的左旋肉碱测定方法有高效液相色谱法^[5-7](high performance liquid chromatography, HPLC)、高效液相色谱-质谱法^[8,9](high performance liquid chromatography-mass spectrometry, HPLC-MS)、超高效液相色谱串联质谱法^[10](ultra performance liquid chromatography-mass/mass spectrometry, UPLC-MS/MS)、分光光度法等。

我国现行有效的国家标准 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》^[11], 适用于婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定。该标准方法操作较为繁琐, 耗时较长, 影响结果准确性因素较多。因此本研究主要对国标 GB 29989-2013 中标准曲线制作、乙酰肉碱转移酶配制、预处理过程中 pH 调节、待测液是否需过夜及酶反应过程中是否需避光操作等几个关键步骤展开讨论, 了解影响左旋肉碱测定准确性的主要因素, 在实际检测过程中加以注意, 避免异常数据的出现, 为日常监测工作提供参考。

2 材料与方法

2.1 仪器与试剂

AL204 电子天平、S20K pH 计(万分之一感量, 瑞士梅特勒-托利多仪器公司); Eppendorf MiniSpin 离心机(德国 Eppendorf 仪器公司); U-3900H 紫外分光光度计(日本日立 HITACHI 公司)。

高氯酸、氢氧化钠、氢氧化钾、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)、N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸、乙二胺四乙酸二钠(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司); 乙酰辅酶 A(AcetylCoA)、乙酰肉碱转移酶(acetyl carnitine transferase, CAT)(分析纯, 上海普誉科贸有限公司)。

实验材料为市售婴幼儿配方乳粉、特殊医学用途配方乳粉。

2.2 实验方法

2.2.1 标准曲线配制

准确称取 20 mg 于 105 °C 烘箱中烘 2 h 的左旋肉碱, 用水定容至 250 mL 容量瓶中。分别吸取左旋肉碱标准储备液 0.25、0.5、1.0、2.0、3.0、5.0 mL 于 25 mL 容量瓶中,

用水定容至刻度, 混匀。标准工作液仅限于当天使用。

2.2.2 样品前处理

婴幼儿配方乳粉: 准确称取 5 g(精确至 0.001 g)混合均匀的试样于烧杯中, 用 30 mL 40 °C 温水溶解(特殊医学用途配方乳粉: 加入 0.5 g α -淀粉酶 40 °C 水解 15 min), 转入 100 mL 容量瓶中。加入 10 mL 13% 高氯酸溶液, 混合均匀后静置 20 min。用蒸馏水定容至刻度, 混匀, 用定量滤纸过滤。精确移取 20 mL 滤液, 用 4 mol/L 氢氧化钾调 pH 为 12.5~13.0 后, 置于 40 °C 水浴 60 min。冷却后先用 13% 高氯酸调 pH 为 9~10, 再用 3% 高氯酸溶液调 pH 为 7.0~7.5。将试样液转入 50 mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容, 混匀后静置 2 h, 取上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤后备用。或置于 4 °C 冰箱中过夜, 将试样处理液从冰箱中取出放置至室温, 取上清液用 0.45 μ m 滤膜过滤后备用。

2.2.3 标准曲线绘制及样品测定

吸取左旋肉碱标准工作液及样品溶液 2.0 mL 于 1 cm 比色皿中, 加入 0.8 mL 显色工作液和 100 μ L 乙酰辅酶 A 溶液, 盖上比色皿盖, 混合均匀后放入分光光度计中, 波长调为 412 nm, 5 min 后归零。迅速加入 100 μ L 乙酰肉碱转移酶溶液, 混合均匀后放入分光光度计中, 反应 10 min 后记录吸光值。整个操作过程应在避免光照条件下进行。以左旋肉碱工作液的浓度为横坐标, 以吸光值为纵坐标, 制作标准曲线。

3 结果与分析

3.1 标准曲线的绘制

与 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》相比, 本文中增加吸取 0.25 mL 左旋肉碱标准储备液(80 μ g/mL)作为标准曲线上第一点。标准溶液系列浓度以及对应的吸光度见表 1。按 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》取 5 个点拟合标准曲线为: $C=17.014-0.131$, 相关系数 $r^2=1$; 按本文取 6 个点拟合标准曲线为: $C=17.044-0.146$, 相关系数 $r^2=1$ 。可以看出, 2 个标准曲线几乎没有区别, 表明吸光度与左旋肉碱浓度在 0.8 ~16.0 μ g/mL 呈良好线性关系。实际检测过程中若左旋肉碱含量低于 7 mg/100 g 的婴幼儿配方乳粉会发生样品吸光度低于 0.1(称样量为 5 g), 此时吸光度低于国标中标准曲线第一点吸光度, 导致不在标曲线性范围内。最低点浓度 0.8 μ g/mL 6 次测定吸光度结果为 0.057、0.055、0.058、0.059、0.057、0.056, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 2.3%, 表明最低点吸光度值稳定。因此对于低含量样品检测建议降低标准曲线第一点浓度到 0.8 μ g/mL。

3.2 乙酰肉碱转移酶溶液的配制

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》中规定乙酰肉碱转移酶溶液配制方法为: 吸取 100 μL 乙酰肉碱转移酶悬浮液, 经 1500 r/min 离心 10 min, 弃去上层清液, 沉淀用 2 mL 水溶解, 临用时配制。实际操作过程中, 经多次试验发现在 1500 r/min 转速下离心 10 min, 上清液未完全澄清, 沉淀不完全, 若弃去上清液会造成乙酰肉碱转移酶实际含量降低。经过多次试验发现在转速 5000 r/min 下离心 10 min, 离心效果较好。另外比较了不经过离心直接吸取 100 μL 乙酰肉碱转移酶加入 2 mL 水配制, 结果标准曲线并无明显变化。

3.3 试样预处理过程中 pH 调节的探讨

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》中样品前处理需经过 2 步 pH 调节, 先调至 12.5~13.0 碱性条件下使结合态左旋肉碱皂化游离出来, 再调至 7.0~7.5 呈中性状态。在第一步调 pH 为 12.5~13.0, 若操作不当 pH 超过 13 时, 经过 60 min 水浴加热后会发现溶液颜色黄色加深。在第二步调 pH 为 7.0~7.5 尤为关键, 调到中性需非常小心。若出现溶液偏酸性 pH 低于 7 时再用氢氧化钾溶液调至 pH 为 7.0~7.5, 样品最终检测结果会有明显下降, 选取了 5 个不同品牌奶粉就第二步 pH 回调(pH 值调到 4 再回调至 7.0~7.5)对检测结果影响见表 2。从表 2 中可以看出不同奶粉品牌的左旋肉碱含量结果均出现明显下降, 最高下降比例达到 32.8%。

鉴于以上情况, 建议采用如下方式调节 pH 至 7.0~7.5: 样品溶液经 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min, 冷却后先用 13% 高氯酸调 pH 至 9~10, 再用 3% 的高氯酸溶液调节 pH 至 7.0~7.5。采用 3% 高氯酸溶液调节 pH 时可以缓慢降低 pH, 避免 pH 下降过快出现低于 pH 7 的情况发生。另外需要指出的是, 最终样品处理液 pH 必须在 7.0~7.5, 较多文献研究指出乙酰

肉碱转移酶的最适 pH 在 7.0~7.5, 酶能保持最大活性^[12]。

3.4 待测样品液是否需要过夜的探讨

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》中规定: 试样前处理溶液经定容混匀后置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜。本研究比较了待测样品液室温放置 2、4 h 及过夜恢复室温后检测结果如表 3。由表 3 可以看出, 待测样品液放置 2、4 h 及过夜恢复室温后检测结果之间并无明显差异。这是由于样品前处理第一步加氢氧化钾皂化时使溶液中结合态的左旋肉碱完全游离出来, 只要保证皂化完全, 在最适 pH 和最适温度条件下, 乙酰肉碱转移酶催化左旋肉碱与乙酰辅酶 A 完全生成乙酰肉碱和游离的辅酶 A。需要指出的是, 若样品放置过夜后取出直接检测与恢复室温后检测结果有较大差异, 如图 1 所示。

从图 1 可以看出, 样品放置过夜后取出直接检测相比恢复室温后检测结果下降明显, 最大相对相差达到 19.2%, 超过标准中规定的精密度的要求(低于 10%)。这是由于作为一个酶催化反应, 酶在不同温度下催化活性不一样, 低温时催化活性较低, 在标准规定的 10 min 催化反应时间内, 乙酰肉碱转移酶未能完全催化左旋肉碱与乙酰辅酶 A 反应生成乙酰肉碱和游离的辅酶 A, 造成结果偏低。王文特等^[13]研究指出, 加入乙酰肉碱转移酶后, 较高温度(29 $^{\circ}\text{C}$) 下, 反应在 4 min 时就能进行完全; 24 $^{\circ}\text{C}$ 下, 反应 6 min 能基本进行完全; 随着温度的降低, 反应完全的时间延长, 低温(15 $^{\circ}\text{C}$)下, 20 min 才基本反应完全。

据上所述, 实际检测过程中若碰到加急样品, 处理液可室温放置 2 h 后直接检测, 无需过夜。过夜后检测时需等到样品液完全恢复室温, 不可从冰箱中取出直接检测。

表 1 左旋肉碱标准品浓度与吸光度
Table 1 Standard concentration and absorbance of L-carnitine

标准液浓度 C/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.8	1.6	3.2	6.4	9.6	16.0
吸光度 A	0.057	0.100	0.197	0.384	0.573	0.947

表 2 pH 对样品左旋肉碱含量的影响($n=3$)
Table 2 Effect of pH on s L-carnitine content ($n=3$)

	正常 pH 样品含量/(mg/100 g)	RSD/%	pH 回调后样品含量/(mg/100 g)	RSD/%	下降比例/%
奶粉 1	15.2 \pm 0.13	1.0	12.2 \pm 0.25	2.0	19.7
奶粉 2	22.5 \pm 0.22	0.98	18.4 \pm 0.30	1.6	18.2
奶粉 3	18.7 \pm 0.17	0.90	16.6 \pm 0.22	1.3	11.2
奶粉 4	12.5 \pm 0.10	0.80	8.4 \pm 0.16	1.9	32.8
奶粉 5	10.3 \pm 0.18	1.7	7.2 \pm 0.31	4.3	30.0

表 3 处理液不同放置时间对检测结果的影响($n=3$)
Table 3 Influence of different storage time on the test results ($n=3$)

	2 h/(mg/100 g)	4 h/(mg/100 g)	过夜/(mg/100 g)	RSD/%
奶粉 1	15.0±0.15	15.3±0.28	15.2±0.13	0.81
奶粉 2	22.6±0.28	22.7±0.32	22.5±0.22	0.36
奶粉 3	18.2±0.22	19.0±0.19	18.7±0.17	1.8
奶粉 4	12.8±0.19	12.4±0.30	12.5±0.10	1.4
奶粉 5	10.2±0.30	10.5±0.27	10.3±0.18	1.2

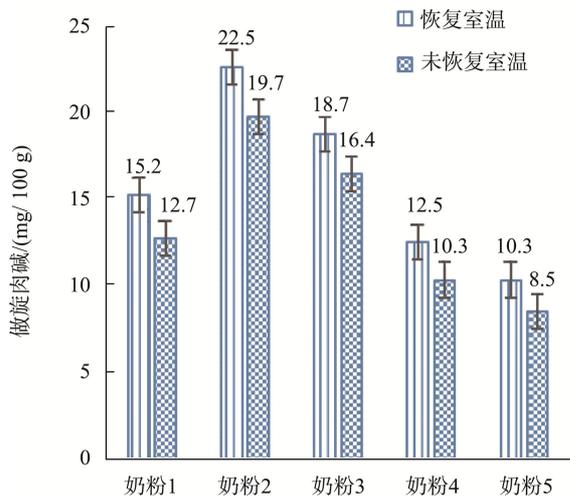


图 1 测定温度对检测结果的影响($n=3$)

Fig.1 Influence of measurement temperature on test results ($n=3$)

3.5 特殊基质样品前处理探讨

GB 25596-2010《食品安全国家标准 特殊医学用途婴

儿配方食品通则》及 GB 29922-2013《食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则》均未对左旋肉碱检测方法作出规定^[14,15]。实际检测过程中参照 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》。

部分特殊医学配方食品如早产儿乳粉、深度/部分水解蛋白乳粉,在样品溶解后加入 13%高氯酸沉淀蛋白质时未能有效沉淀,使用多层滤纸过滤也无法得到澄清滤液,使得后续操作无法进行。经过摸索发现在样品溶解后先加入 0.5 g α -淀粉酶 40℃水解 15 min 后再加入 13%高氯酸沉淀蛋白质效果较好,后续检测可以继续。

3.6 样品测定及不同浓度加标回收率验证

选取市面上常见的 3 种婴幼儿配方乳粉、2 种特殊医学用途婴儿配方乳粉,编号样品 A、B、C、D、E,按上述前处理方式测定,待测样液室温放置 2 h 后直接检测,结果如表 4。选择样品 D、E 做重复性试验,结果见表 5。

由表 4、表 5 可知,对于特殊医学用途婴儿配方乳粉采用本文前处理方式测定结果准确,加标回收率高,重复性令人满意。

表 4 样品测定及不同加标水平回收率验证($n=3$)
Table 4 Sample determination and verification of recovery rates for different spiked levels($n=3$)

样品名称	称样质量/g	加标水平/(mg/100 g)	样品本底含量/(mg/100 g)	加标后样品含量/(mg/100 g)	RSD/%	回收率/%
样品 A	5.0214	9.96		24.6		98.4
	5.0958	9.81		24.2		95.8
	5.0449	9.91	14.8±0.24	25.0	1.3	103
	5.1202	9.76		32.9		96.3
样品 B	5.0354	9.93		33.3		98.7
	5.0386	9.92	23.5±0.30	33.5	0.75	101
	5.1125	9.78		20.8		101
样品 C	5.0471	9.91		20.5		96.9
	5.1305	9.74	10.9±0.25	20.0	1.6	93.4
	5.0425	19.83		39.5		95.8
样品 D	5.1021	19.60		39.9		99.0
	5.2012	19.23	20.5±0.33	39.2	0.73	97.2
	5.0845	19.67		41.5		96.6
样品 E	5.0048	19.98		42.0		97.6
	5.1178	19.54	22.5±0.45	41.0	0.98	94.7

表 5 样品重复性试验($n=7$)
Table 5 Sample repeatability test ($n=7$)

样品名称	样品含量/(mg/100 g)							RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	
样品 D	21.1	20.3	20.5	20.2	20.6	20.4	20.1	1.6
样品 E	22.2	22.9	22.6	22.2	23.2	22.5	21.9	2.0

3.7 样品测定时是否需避光操作

本文研究了样品测定过程中是否避光对吸光度的影响。其他反应条件未变化情况下,加入乙酰肉碱转移酶后同一样品一组避光,一组阳光直射,比较吸光度随反应时间延长的变化,如图 2 所示。由图 2 可以看出,避光条件下 7 min 后吸光度达到一稳定值,反应基本结束,实测结果为 14.1 mg/100 g;阳光直射条件下 8 min 左右吸光度达到最大值,随后随时间延长吸光度反而下降了,最大实测结果为 9.7 mg/100 g,比避光检测结果下降了 31%。这说明游离的辅酶 A 和 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)反应生成的黄色物质见光易分解,很不稳定。因此,建议加酶检测过程中需避光操作。

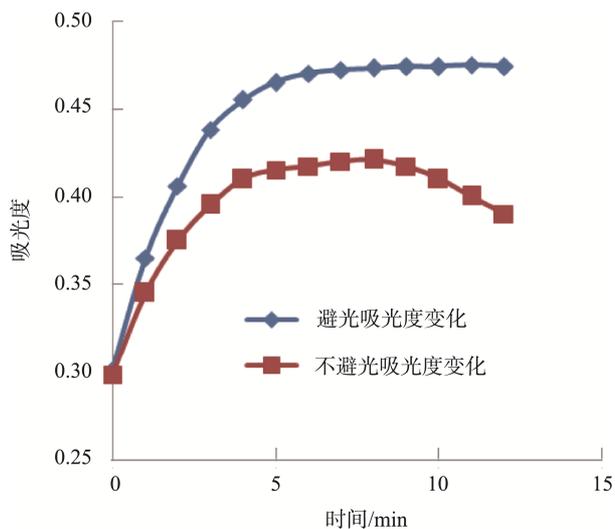


图 2 光照对吸光度变化的影响

Fig.2 Effect of light on absorbance changes

4 结论

本文详细分析讨论了 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》的几个关键控制点,前处理过程中第二步 pH 调节不可回调,待测液静置 2 h 后可直接加酶检测,特殊医学用途配方乳粉前处理时应先加入 α -淀粉酶水解,酶反应过程需避光,在实际检测过程中需加以重视,如 pH 调节及酶反应需避光操作等,

可避免异常数据的出现。在今后的标准修订中也可适当考虑部分内容予以修改。

参考文献

- [1] 何玉芳. UPLC-MS/MS 法测定婴幼儿乳粉中左旋肉碱含量的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [2] 许力. 左旋肉碱的生理功能及其在血液系统疾病治疗中的应用进展[J]. 中国临床新医学, 2016, 9(1): 86-89.
- [3] 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(10): 45-47.
- [4] Li K, Li W, Huang YF. Determination of free *L*-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility [J]. Clin Chim Acta, 2007, 378(1-2): 159-163.
- [5] Vernez L, Hopfgartner G, Wenk M, et al. Determination of carnitine and acylcarnitines in urine by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization ion trap tandem mass spectrometry [J]. J Chromatogr A, 2003, 984(2): 203-213.
- [6] Eder K. Effects of *L*-carnitine supplementation in sows [J]. Monatshefte für Chemie/Chem Monthly, 2005, 136(8): 1535-1544.
- [7] Li K, Li W, Huang YF. Determination of free *L*-carnitine in human seminal plasma by high performance liquid chromatography with pre-column ultraviolet derivatization and its clinical application in male infertility [J]. Clin Chim Acta, 2007, 378(1-2): 159-163.
- [8] Demarquoy J, Georges B, Rigault C, et al. Radioisotopic determination of *L*-carnitine content in foods commonly eaten in western countries [J]. Food Chem, 2004, 86(1): 137-142.
- [9] 唐吉旺, 袁列江, 肖泳, 等. 高效液相亲水作用色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿配方乳粉中胆碱和左旋肉碱的含量[J]. 理化检验-化学分册, 2019, 55(6): 621-625.
- [10] 徐敦明, 陈燕, 张缙, 等. 高效液相色谱串联质谱内标法测定乳品中左旋肉碱含量[J]. 分析测试学报, 2016, 35(1): 96-100.

- Xu DM, Chen Y, Zhang J, *et al.* Determination of *L*-carnitine in dairy products by high performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *J Instrum Anal*, 2016, 35(1): 96-100.
- [11] 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 foods and dairy products [S].
- [12] 左惠心, 张玉斌, 黄明明, 等. 分光光度法测定牦牛不同脏器中左旋肉碱方法优化及含量分析[J]. *食品工业科技*, 2014, 2: 54-58.
Zuo HX, Zhang YB, Huang MM, *et al.* Optimization the *L*-carnitine determination by spectrophotometric method and comparison of content in the yak organs [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, 2: 54-58.
- [13] 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.
- [14] GB 25596-2010 食品安全国家标准 特殊医学用途婴儿配方食品通则[S].
GB 25596-2010 National food safety standard-General rules for special

medical infant formula foods [S].

GB 29922-2013 食品安全国家标准 特殊医学用途配方食品通则[S].

- [15] GB 29922-2013 National food safety standard-General rules for special medical formula foods [S].

(责任编辑: 韩晓红)

作者简介



邢朝宏, 硕士, 工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: xingch@sqi.org.cn



印杰, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: yinjie@sqi.org.cn