

《食品中胆碱和左旋肉碱的测定 液相色谱-串联质谱法》

编制说明

一、工作简况

1.1 任务来源

本标准是依据深圳市分析测试协会下达的由深圳市计量质量检测研究院承担的名称为《食品中胆碱和左旋肉碱的测定 液相色谱-串联质谱法》团体标准任务而研究制定的。

项目负责单位：深圳市计量质量检测研究院。

项目参加单位：深圳市计量质量检测研究院。

该项目由陈佳平负责，主要参加人员有：蓝雄，王奇，刘永固，董珊，苏佳婷，肖伟敏，张协光，杨国武。

1.2 简要起草过程

本标准起草人在充分查阅和认真研究了国内外相关标准及资料的基础上，对比了国内外标准技术内容方面的差异及原因，在遵循先进性、科学性、实用性的原则下，起草组制订标准《食品中胆碱和左旋肉碱的测定 液相色谱-串联质谱法》（征求意见稿），经贵州省产品质量检验检测院、惠州市食品药品检验所、深圳市通量检测科技有限公司等3家实验室论证和分析，该方法的回收率、重复性和再现性等技术指标均符合标准编制的要求。

在公开征求意见后，及时处理，修改标准《食品中胆碱和左旋肉碱的测定 液相色谱-串联质谱法》（征求意见稿）形成标准送审稿，并编制了本标准送审稿的编制说明。

二、国内外有关法律、法规和标准情况的说明

国内外研究人员通过大量的研究明确了胆碱和左旋肉碱在人体生理活动中所发挥的重要作用，并且也发现对于这两种物质人体需要通过膳食来进行适当的补充。目前我国对胆碱和左旋肉碱的检测标准适用范围还较小并且研究对象单一。GB5413.20-2013《婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定》和 GB29989-2013《婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定》仅适用于婴幼儿食品和乳品的检测，GB 5009.272-2016《食品中磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇的测定》仅适用于大豆油、菜籽油、花生油、葵花籽油等少量食品样品的检测。由于我国还未建

立可同时广泛地分析检测食品中的胆碱和左旋肉碱的方法，因此亟待开展胆碱和左旋肉碱的检测方法研究，为未来的食品中上述两种物质的检测工作提供技术支持。

三、标准编制原则

本标准的编写制定过程中以提高测试方法的选择性、精密度、灵敏性、准确度和分析效率为总原则，反映科学技术的先进成果和先进经验。

在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，标准的编写规则及表述按照GB/T1.1-2009的要求编写。在标准制定过程中力求做到：技术内容的叙述正确无误；文字表达准确、简明、易懂；标准的构成严谨合理；内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

四、标准编制过程

1、2018年7至12月标准起草单位对标准项目进行了预研，收集国内外标准文献，明确工作思路和进程安排。

2、2019年1至8月形成项目建议书以及标准草案。

3、2019年9月向深圳市分析测试协会申请团标立项。

4、2019年10月至2020年11月开展本标准的起草研制工作，并向深圳市分析测试协会提交了本标准征求意见稿和编制说明。

5、2020年12月至2021年2月就本标准向有关专家征求意见，对标准进行修改和完善，形成送审稿，报协会进行审定。

6、2021年3月完成《食品中胆碱和左旋肉碱的测定 液相色谱-串联质谱法》答辩验收。

五、确定各项技术内容的依据

5.1 目标物的确定

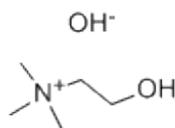
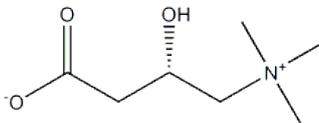
胆碱是人体中一类必需的有机碱，是卵磷脂的组成成分^[1]。研究表明当人体胆碱不足时，会出现生长受阻、营养不良、繁殖能力差和脂肪肝等症状^[2]。左旋肉碱是一种在人体能量代谢中起着重要作用且相对分子质量较小的类蛋白质分子，它在能将长链脂肪酸转运进入线粒体，并在此发生 β -氧化产生能量^[3]。左旋肉碱具有抗疲劳、促进脂肪代谢、减缓人体衰老和促进能量代谢等生理功能^[4]。胆碱以卵磷脂的形式广泛存在于肝脏、肉类、蛋类、花生、豆制品、奶类等各种

食物中^[5]，左旋肉碱主要来源为肉、奶等动物性食物^[6]。成年人所需的胆碱、左旋肉碱可由自身合成，也可通过膳食来补充，但是婴幼儿各种功能未发育完全，自身合成量非常有限，绝大部分胆碱、左旋肉碱需通过食物来补充^[2,7,8]。因此，针对食品中胆碱和左旋肉碱建立相关物质的检测方法对于建立食品营养成分数据库，进行营养膳食补充指导，以及开发富含胆碱和左旋肉碱营养保健食品均具有重要意义。

目前已经报道的胆碱和左旋肉碱检测方法和标准是酶比色法分光光度法或者雷氏盐分光光度法^[9-11]，酶比色法具有专一性好、灵敏度高、操作简单和具有很好的重现性的优点。雷氏盐分光光度法操作简便、测定重现性好,不需特殊的仪器设备。但是对于上述两种方法，酶反应试剂价格昂贵；理化反应时间长，效率低；实验准确度不高，再现性不好；方法适用范围窄，无法用于同时检测胆碱和左旋肉碱两种物质。

鉴于目前尚未有同时检测食品中胆碱和左旋肉碱的标准和文献报道，本研究首次建立液相色谱-串联质谱法同时检测食品中胆碱和左旋肉碱（胆碱和左旋肉碱的化学信息见表 1），适用范围广，准确简便，为居民营养膳食提供科学指导，并能促进相关基础应用和临床应用的研究发展。

表 1 胆碱和左旋肉碱的化学信息

分析物	CAS	分子式	分子量(M _r)	结构式
胆碱	123-41-1	C ₅ H ₁₅ NO ₂	121.18	
左旋肉碱	541-15-1	C ₇ H ₁₅ NO ₃	161.2	

5.2 样品处理条件的选择及优化

食品样品中的成分比较复杂，样品中杂质会影响胆碱和左旋肉碱的离子化效率，进而影响分析的准确性，因此在提取胆碱和左旋肉碱时，采用盐酸除去蛋白质等大分子物质，使胆碱和左旋肉碱完全以游离态溶于水^[1, 3]。胆碱和左旋肉碱的提取与浓盐酸加入量、反应温度及反应时间有关，实验中分别考察了上述

3 个因素。本实验称取 2 g (精确至 0.001 g) 样品, 溶解后转移至 50 mL 容量瓶, 定容。移取定容后的溶液 5 mL 于 100 mL 比色管, 在水浴温度 (70°C) 和水解时间 (3 h) 不变的条件下, 分别加入 0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL 浓盐酸来考察最佳浓盐酸加入量 (结果见表 2)。结果表明 0.5 mL 浓盐酸加入量的提取效果最好。

表 2 考察浓盐酸加入量

浓盐酸加入量 (mL)	0.10	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
胆碱含量 (mg/100g)	33.4	37.9	42.1	46.3	51.2	48.8
左旋肉碱含量 (mg/100g)	10.1	11.9	12.8	14.5	16.1	15.9

在浓盐酸加入量 (0.5 mL) 和水浴温度 (70°C) 不变的条件下, 考察不同水解时间 0.5 h、1 h、1.5 h、2 h、2.5 h、3 h、3.5 h 对样品中胆碱和左旋肉碱含量的影响。结果表明 3 h 即能达到稳定的提取效果(见表 3), 因此选择 3 h 作为水解时间。

表 3 考察水解时间

水解时间 (h)	0.5	1	1.5	2.0	2.5	3	3.5
胆碱含量 (mg/100g)	140.5	147.6	153.1	162.3	171.1	179.2	178.9
左旋肉碱含量 (mg/100g)	13.7	14.8	15.9	17.1	18.3	19.3	19.0

在浓盐酸加入量 (0.5 mL) 和水解时间 (3 h) 不变的条件下, 考察不同水浴温度 30°C、40°C、50°C、60°C、70°C、80°C 对样品中胆碱和左旋肉碱含量的影响。结果表明 70°C 即能达到稳定的提取效果(见表 4), 因此选择 70°C 作为水解温度。

表 4 考察水浴温度

水浴温度	30℃	40℃	50℃	60℃	70℃	80℃
胆碱含量 (mg/100g)	30.1	35.4	41.8	49.3	55.6	55.4
左旋肉碱含量 (mg/100g)	11.3	11.9	12.7	14.8	16.9	16.8

5.3 液相色谱条件的优化

5.3.1 色谱柱的选择

比较了 Thermo、Agilent、Waters 三种不同品牌 C18 色谱柱(Hypersil Gold C18 (100 ×2.1 mm, 1.9 μm)、ZORBA×SB C18 (100 ×2.1 mm, 1.8 μm)、ACQUITY UPLC BEH C18 (100×3.0 mm, 1.7 μm)) 对胆碱和左旋肉碱分离情况, 以考察不同色谱柱对分离的影响。实验结果表明, 不同品牌的 C18 色谱柱对胆碱和左旋肉碱都有良好的分离, 因此可以选择 C18 色谱柱对胆碱和左旋肉碱进行分离。

5.3.2 流动相条件的优化

胆碱和左旋肉碱的扫描模式选用 SRM, 有机相选用乙腈, 水相选用甲酸水或乙酸铵溶液。对比甲酸水和乙酸铵溶液, 当水相为 0.1%甲酸水时, 目标物质分离效果更好, 色谱图见图 1、图 2。

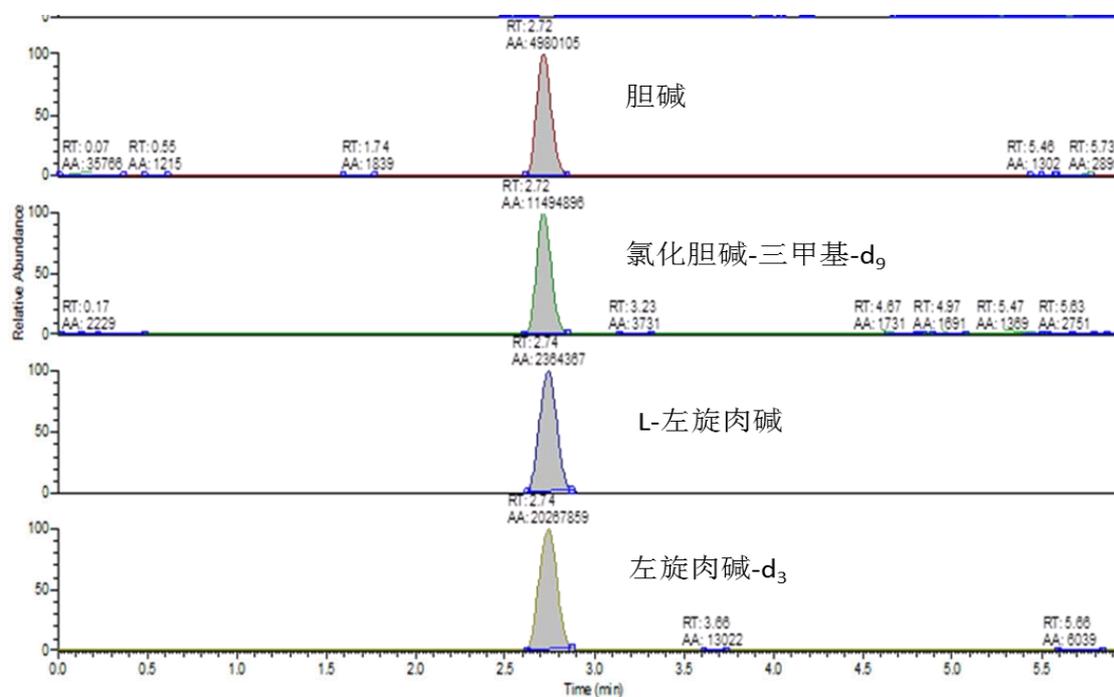


图 1 胆碱和左旋肉碱标准溶液的超高效液相色谱-串联质谱图

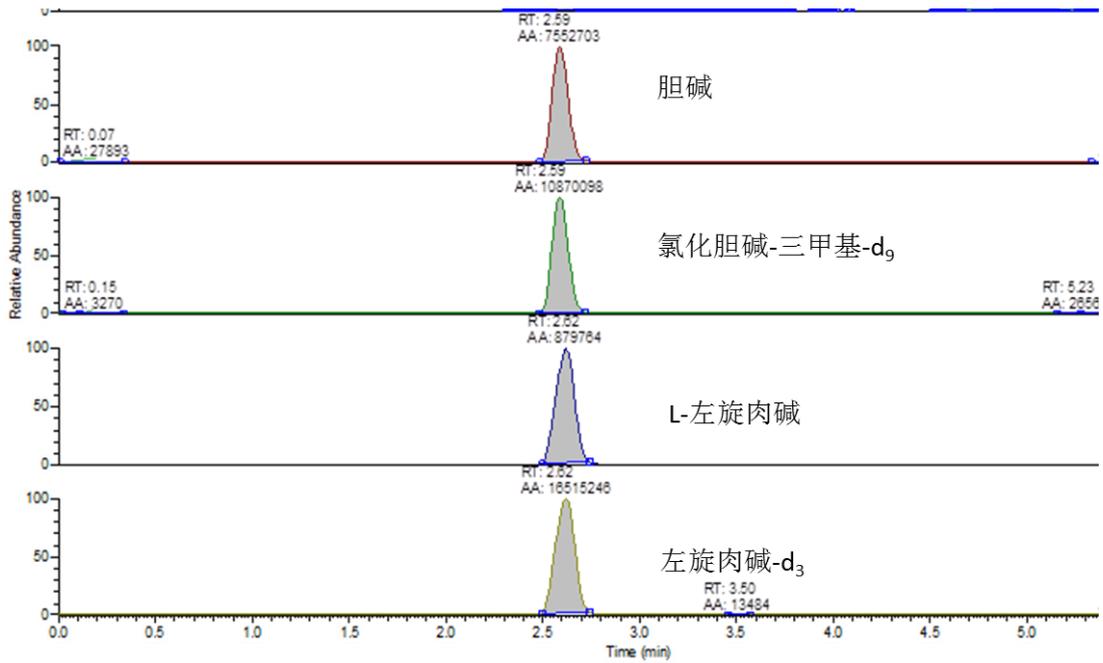


图 2 样品中胆碱和左旋肉碱检测的超高效液相色谱-串联质谱图

5.4 质谱条件的优化

采用蠕动泵进样的方式，将 $1 \mu\text{g/mL}$ 单标溶液以 $10 \mu\text{L/min}$ 的流速连续注入 ESI 源中，在正离子模式下进行一级质谱全扫描，可产生稳定的 $[M+H]^+$ 离子并得到待测物的母离子峰。优化离子源气流、电压、温度等参数，使母离子峰响应强度优且稳定；对母离子峰进行二级质谱扫描，确定子离子，优化碰撞能量和 S-lens。优化后的质谱参数见表 5。

表 5 胆碱和左旋肉碱的质谱参考条件

监测化合物	保留时间/min	母离子/ (m/z)	子离子/ (m/z)	S-lens 电压/V	碰撞能量/V
胆碱	0.84	104	58 60*	91	30.8 17.7
氯化胆碱-三甲基-d ₉	0.84	113	66 69*	92	31.6 18.7
左旋肉碱	0.86	162	85 103*	65	21.0 17.2
左旋肉碱-d ₃	0.86	165	85 103*	64	20.1 16.5

注：带*为定量离子

5.5 检出限、定量限、线性范围等的依据

将胆碱、左旋肉碱标准溶液进行梯度稀释后，按优化方法进样，以标准系列溶液浓度为横坐标 (x)，以相应的峰面积为纵坐标 (y) 做线性回归方程；以信噪比 (S/N) 为 3 和 10 计算检测限和定量限，结果见表 6。胆碱和左旋肉碱相关系数 R 为 0.9998，胆碱线性范围在 10.0 ng/mL-400 ng/mL 浓度范围内，左旋肉碱线性范围在 10.0 ng/mL-400 ng/mL 浓度范围内，各物质的线性相关性较好。

表 6 胆碱、左旋肉碱的线性方程、线性范围、相关系数、检出限与定量限

分析物	线性方程	线性范围 ρ / ($\mu\text{g/mL}$)	相关系数(R)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
胆碱	$y = 0.0122x - 0.0072$	10.0 ng/mL-400 ng/mL	0.9998	0.02	0.06
左旋肉碱	$y = 0.0086x - 0.0039$	10.0 ng/mL-400 ng/mL	0.9998	0.1	0.3

5.6 方法的回收率和精密度

本研究采用乳粉为样品进行加标，分别添加低、中、高 3 个水平的混合标准工作液，每个添加水平做 6 个平行样品，测定的回收率及精密度见表 7。胆碱、左旋肉碱的回收率范围均在 98.4%~99.5%之间，RSD 在 1.31%~2.51%之间，回收率和精密度符合 GB/T 27404-2008 F.1 和 F.3 的要求^[12]，实验结果准确。

表 7 胆碱、左旋肉碱的加标回收率和相对标准偏差 ($n=6$)

分析物	添加水平($\text{mg}/100\text{g}$)			回收率(%)			RSDs (%)		
	低	中	高	低	中	高	低	中	高
胆碱	60.7	122.1	251	98.4	99.1	98.9	1.99	1.31	1.57
左旋肉碱	9.26	18.9	38.8	98.5	99.1	98.8	1.41	2.31	1.88

5.7 方法的适用性

本研究分别检测了普通婴配乳粉、全脂乳粉、深度水解乳粉、液态奶、氨基酸配方乳粉、部分水解配方乳粉、无乳糖配方乳粉、米粉、豆基粉和固体饮料等多种类型的样品，结果见表 8。实验结果表明，液态奶中胆碱和左旋肉碱含量为 14.6 mg/100g 和 1.2 mg/100g，各种乳粉的胆碱和左旋肉碱含量明显高于液态奶。固体饮料中未检出胆碱，但是左旋肉碱有较高的含量，达到了 1.95×10^3 mg/100g，豆基粉和米粉胆碱含量分别达到了 168 mg/100g 和 93 mg/100g，但是左旋肉碱均

未检出。

表 8 食品中胆碱、左旋肉碱的含量 (mg/100g)

样品名称	胆碱 (mg/100g)	左旋肉碱(mg/100g)
普通婴配乳粉	181	19.2
全脂乳粉	109	16.6
深度水解乳粉	48.9	15.7
液态奶	14.6	1.2
氨基酸配方乳粉	133	13.4
部分水解配方乳粉	61	13.2
无乳糖配方乳粉	60.4	14.8
固体饮料	ND	1.95×10^3
豆基粉	168	ND
米粉	93	ND

ND : no detected.

通过对多种基质类型的样品进行分析,结果表明该方法对于不同含量的样品类型检测,无基质干扰,特异性好;实验中分析了普通婴配乳粉、液态奶、氨基酸配方乳粉、部分水解配方乳粉、无乳糖配方乳粉、米粉、豆基粉和固体饮料等多种样品类型,胆碱、左旋肉碱的含量检测准确,灵敏度高,且适用样品类型广泛,适用性好。

5.8 实验室间方法的验证

我们选择 3 个实验室进行比对,选用乳粉为验证样品,分别进行三个水平的加标实验,以及对 6 种不同类型的样品进行盲样检测。

5.8.1 方法的线性方程及相关系数

比对实验室的线性方程及相关系数见表 9。3 家实验室间线性相关系数 R 在 0.9997~0.9999 之间,线性相关性较好。

表 9 胆碱、左旋肉碱的线性方程

验证单位	分析物	线性方程	相关系数(R)	线性范围
深圳市通量检测 科技有限公司	胆碱	$y = 0.0119x + 0.006$	0.9999	10.0 ng/mL-400 ng/mL
	左旋肉碱	$y = 0.0066x - 0.0066$	0.9997	10.0 ng/mL-400 ng/mL
惠州市食品药品 检验所	胆碱	$y = 0.0129x - 0.0092$	0.9999	10.0 ng/mL-400 ng/mL
	左旋肉碱	$y = 0.0078x - 0.0026$	0.9999	10.0 ng/mL-400 ng/mL
贵州省产品质量 检验检测院	胆碱	$y = 0.0132x - 0.0173$	0.9998	10.0 ng/mL-400 ng/mL
	左旋肉碱	$y = 0.0084x - 0.0028$	0.9998	10.0 ng/mL-400 ng/mL

5.8.2 方法的准确度、精密度实验

比对实验室采用乳粉加标回收实验的测定结果见表 10。比对实验室的回收率范围和精密度实验满足 GB/T27404-2008 分析方法要求。

表 10 方法的准确度、精密度实验 (n=6)

验证单位	化合物	本底值 (mg/100g)	添加水平 (mg/100g)	实测平均值 (mg/100g)	平均回收率 (%)	相对标准 偏差 RSD(%)	
深圳市通量检 测科技有限公 司	胆碱	123	61.3	184	99.5	2.22	
			122	243	98.4	1.35	
			246	366	98.8	1.65	
	左旋肉碱		9.41	28.2	99.9	1.21	
			18.8	18.6	37.2	98.9	2.31
			37.8	56.5	99.7	1.85	
惠州市食品药 品检验所	胆碱	121	61.2	182	99.7	2.21	
			121	241	99.2	2.35	
			244	361	98.4	1.95	
	左旋肉碱		9.43	27.9	99.7	2.21	
			18.5	18.4	36.8	99.5	1.12
			37.6	55.7	98.9	1.75	
贵州省产品质 量检验检测院	胆碱	124	61	184	98.4	1.61	
			122	245	99.2	1.75	
			245	364	98	2.65	
	左旋肉碱		9.46	27.7	99.4	1.22	
			18.3	18.7	36.7	98.4	1.62
			37.9	55.5	98.2	1.95	

5.8.3 实验室间样品测定结果的比对

实验室间采用本标准规定的方法对婴配乳粉、全脂乳粉、深度水解乳粉、液态奶、豆基粉、米粉等 6 样品进行了检测。3 个比对实验室测定 6 样品的结果见表 11。6 样品的木酚素测定结果也是基本一致，因此实验室间有较好的再现性。

表 11 6 种盲样的胆碱、左旋肉碱含量

验证单位	样品名称	胆碱(mg/100g)	左旋肉碱(mg/100g)
深圳市通量 检测科技有 限公司	婴配乳粉	184	20.2
	全脂乳粉	116	17.1
	深度水解乳粉	50.2	16.5
	液态奶	14.9	1.21
	豆基粉	175	未检出
	米粉	101	未检出
惠州市食品 药品检验所	婴配乳粉	189	20.9
	全脂乳粉	113	17.5
	深度水解乳粉	50.8	16.9
	液态奶	14.7	1.25
	豆基粉	178	未检出
	米粉	103	未检出
贵州省产品 质量检验检 测院	婴配乳粉	182	19.6
	全脂乳粉	110	16.7
	深度水解乳粉	49.8	16.1
	液态奶	14.1	1.14
	豆基粉	171	未检出
	米粉	98	未检出

六、征求意见的采纳情况，附《征求意见汇总处理表》

七、标准实施日期和实施建议

建议标准实施前有 2 个月以上的实施前的宣贯培训期、缓冲期和过渡准备时间。

八、总结

本方法检测胆碱和左旋肉碱，采用液相色谱-串联质谱法进行检测，对各类食品均具有良好的适用性。经实验室论证和分析，该方法的回收率、重复性和再

现性等技术指标均符合标准编制的要求。

九、参考文献

- [1] 刘美霞, 胡彩霞, 任丽, 等. 离子色谱法测定奶粉中胆碱含量方法的研究[J]. 食品安全质量检测学报. 2013, 4(6): 1880-1884
- [2] 詹越城, 何斌, 刘梦婷, 等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定婴幼儿配方食品中胆碱 L-肉碱含量方法研究[J]. 农产品加工, 2019, 6: 68-73
- [3] 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
- [4] 马兴, 高云, 崔颖, 等. 左旋肉碱检测方法研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(2): 399-404
- [5] 朱惠莲, 胆碱[J], 营养学报, 2013, 35(2): 121-124
- [6] Karlic H, Lohninger A. Supplementation of L-carnitine in athletes: does it make sense? [J]. Nutrition, 2004, 20 (7-8): 709-715.
- [7] 刘艳明, 薛霞, 刘国强, 等. 亲水作用色谱-串联质谱法测定乳及乳制品中左旋肉碱[J]. 色谱, 2015, 33(9): 943-945
- [8] 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
- [9] GB5413.20-2013 婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定
- [10] GB29989-2013 婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定
- [11] 尹凤芝, 张慧. 婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定_雷氏盐分光光度法[J]. 生命科学仪器, 2013, 11(2): 54-57
- [12] GB/T 27404-2008. 实验室质量控制规范 食品理化检测. 中华人民共和国国家标准