

团 体 标 准

T/SATA ***—2021

食品中胆碱和左旋肉碱的测定

液相色谱-串联质谱法

Determination of choline and L-carnitine in foods-

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry

****-**-**发布

****-**-**实施

深圳市分析测试协会发布

目 次

目 次.....	1
前 言.....	2
1 范围.....	3
2 规范性引用文件.....	3
3 原理.....	3
4 试剂与材料.....	3
5 仪器和设备.....	4
6 分析步骤.....	4
7 分析结果的表述.....	6
8 精密度.....	6
9 其他.....	6
附录 A.....	7

前 言

本标准按照GB/T1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由深圳市分析测试协会提出并归口。

本标准主要起草单位：深圳市计量质量检测研究院。

本标准主要起草人：陈佳平，蓝雄，王奇，刘永固，董珊，苏佳婷，肖伟敏，张协光，杨国武。

本标准为首次发布。

食品中胆碱和左旋肉碱的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了胆碱和左旋肉碱的测定方法。
本文件适用于食品中胆碱和左旋肉碱的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样经酸水解后，得到游离的胆碱和左旋肉碱，用液相色谱-串联质谱测定，内标法定量。

4 试剂与材料

4.1 试剂

- 4.1.1 甲醇：色谱纯。
- 4.1.2 乙腈：色谱纯。
- 4.1.3 甲酸：色谱纯。
- 4.1.4 去离子水：一级水。
- 4.1.5 浓盐酸：密度为 1.19 g/mL，化学纯。

4.2 试剂配制

4.2.1 0.1%甲酸水溶液：准确吸取1 mL甲酸（4.1.3）于1 L容量瓶中，用水溶解并定容至刻度，混匀。

4.3 标准品

- 4.3.1 胆碱标准品：酒石酸氢胆碱（CAS：87-67-2），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；
- 4.3.2 左旋肉碱标准品：L-左旋肉碱（CAS：541-15-1），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；
- 4.3.3 氯化胆碱-三甲基-d₉内标：氯化胆碱-三甲基-d₉（CAS：61037-86-3），纯度≥95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；

4.3.4 左旋肉碱- d_3 内标：左旋肉碱- d_3 （CAS：350818-62-1），纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；

4.4 标准溶液配制

4.4.1 标准储备液：准确称0.0418 g（精确至0.0001 g）酒石酸氢胆碱和0.0200 g（精确至0.0001 g）L-左旋肉碱于100 mL容量瓶中，用甲醇（4.1.1）溶解，定容至刻度，配制成200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液。4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，保存期六个月。

分别称取标准物质左旋肉碱- d_3 和氯化胆碱-三甲基- d_9 各0.0200 g于100 mL容量瓶中，用甲醇（4.1.1）溶解，定容至刻度，配制成200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的内标储备液。4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，保存期六个月。

4.4.2 标准中间液：将储备液用甲醇（4.1.1）稀释，得到浓度均为2.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 胆碱、L-左旋肉碱、左旋肉碱- d_3 和氯化胆碱-三甲基- d_9 中间液。保存期一周。

4.4.3 标准工作液液：将中间液用甲醇（4.1.1）稀释，得到左旋肉碱- d_3 和氯化胆碱-三甲基- d_9 内标浓度均为40 ng/mL ，胆碱和L-左旋肉碱浓度均为10.0 ng/mL 、25.0 ng/mL 、50.0 ng/mL 、100 ng/mL 、200 ng/mL 、400 ng/mL 的标准系列工作液。临用前配制。

5 仪器和设备

5.1 超高效液相色谱-质谱联用仪（Ultra-performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry，UPLC-MS/MS）：配置电喷雾电离源（Electrospray Ionization，ESI）。

5.2 万分之一分析天平：感量0.0001 g。

5.3 漩涡混合器。

5.4 恒温水浴锅。

5.5 离心机：转速不低于6500 r/min。

6 分析步骤

6.1 样品前处理

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，加入0.5 mL浓盐酸，涡旋混匀。放置于70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水解3 h，将水解液转移至100 mL容量瓶中定容，过滤。移取滤液1 mL至25 mL容量瓶中，加入内标标准中间液0.500 mL，用去离子水定容。涡旋摇匀后，过滤上机。

6.2 仪器参考条件

6.2.1 液相条件

a) 色谱柱：Thermo Hypersil Gold (100 \times 2.1)

b) 流动相：乙腈和0.1%甲酸水溶液；洗脱条件：0~0.5min，20%乙腈；0.5~4.5min，95%乙腈；4.5~7min，20%乙腈。

- c) 流速: 0.3mL/min;
 d) 柱温: 35 °C ± 0.5 °C;
 e) 进样量: 5 µL;
 f) 淋洗梯度见表 1。

表 1 超高效液相色谱淋洗梯度

时间/min	0.1%甲酸水溶液 (%)	乙腈 (%)
0	80	20
0.5	80	20
4.5	5	95
7	80	20

6.2.2 质谱条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源;
 b) 离子模式: 正离子;
 c) 扫描方式: 选择反应监测 (SRM);
 d) 喷雾电压: 3500 V;
 e) 蒸发温度: 360 °C;
 f) 鞘气压力: 42 bar;
 g) 反吹气压力: 0 bar;
 h) 辅助气压力: 10 bar;
 i) 离子传输毛细管温度: 300 °C;
 j) 主要质谱参考条件见表 2。

表 2 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	91	30.8
			60*		17.7
氯化胆碱-三甲 基-d ₉	0.84	113	66	92	31.6
			69*		18.7
左旋肉碱	0.86	162	85	65	21.0
			103*		17.2
左旋肉碱-d ₃	0.86	165	85	64	20.1
			103*		16.5

注: 带*为定量离子

6.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液由低浓度到高浓度依次进样, 以胆碱、L-左旋肉碱与相应同位素内标的峰面积比值为纵坐标, 以胆碱、L-左旋肉碱标准系列工作液浓度 (ng/mL) 为横坐标, 分别绘制胆碱、L-左旋肉碱标准曲线。

6.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱中，得到胆碱和氯化胆碱-三甲基-d₉、L-左旋肉碱和左旋肉碱-d₃的峰面积比值，根据各自的标准曲线分别计算待测液中胆碱和L-左旋肉碱的浓度。

7 分析结果的表述

试样中胆碱和左旋肉碱的含量按式（1）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times V \times f}{m \times 10 \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X_i ——试样中各组分的含量，单位为毫克每 100 克（mg/100g）；

c_i ——由标准曲线计算得到的试液中各组分的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试液的定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）；

f ——稀释倍数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

8 精密度

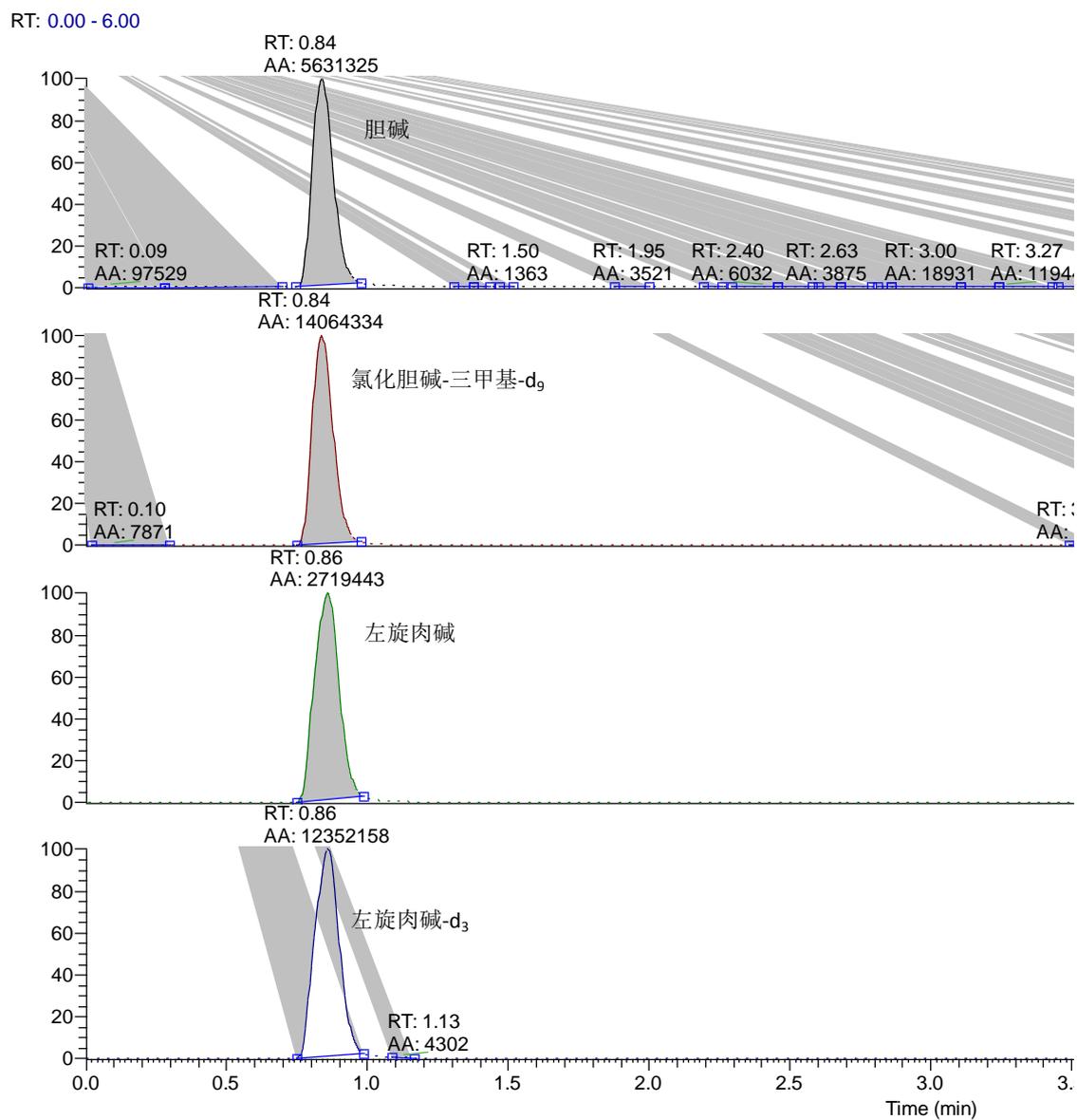
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

9 其他

当称样量为2.0g，方法的检出限为0.01 mg/100 g，定量限为0.03 mg/100 g。

附录 A

胆碱和左旋肉碱标准溶液的液相色谱-串联质谱图



A.1 胆碱和左旋肉碱标准溶液的液相色谱-串联质谱图