

阀切换 - 非抑制离子色谱法测定奶粉中的左旋肉碱

吴凌涛^{*1}, 方 丽¹, 霍柱健¹, 钟新林², 陈 军²

(1. 中国广州分析测试中心, 广东省分析测试技术公共实验室, 广州 510070;

2. 赛默飞世尔科技中国公司广州应用实验室, 广州 510070)

摘 要:建立了阀切换-非抑制型电导检测离子色谱法测定奶粉中的左旋肉碱的方法。奶粉样品经高纯水溶解后,以乙腈沉淀蛋白,离心,过 RP 固相萃取小柱和 Na 柱净化,再通过阀切换的方式进样,经浓缩柱浓缩并冲洗去除基体。以 3 mmol/L 的甲基磺酸为淋洗液等度洗脱, IonPac CS17 阳离子柱交换分离,非抑制电导检测。结果表明:左旋肉碱在 17.5 ~ 175 mg/kg 范围内线性关系良好 ($r=0.9995$);奶粉中左旋肉碱的加标回收率为 92.3% ~ 105.2%,相对标准偏差(RSD)在 1.4% ~ 4.3% 之间;检出限为 5 mg/kg。该方法能满足奶粉中左旋肉碱的检测及质量控制要求。

关键词:左旋肉碱;离子色谱;非抑制法;阀切换;奶粉

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-0720(2013)11-093-04

左旋肉碱(L-carnitine, β -羟基 γ -三甲铵丁酸)又称肉毒碱或维生素 BT,其化学式为 $C_7H_{15}O_3N$, 分子量为 162.2 是一种类氨基酸。L-肉碱作为载体将长链脂肪酸从腺粒体膜外输送到膜内,促进脂肪酸的 β -氧化,从而降低血清胆固醇及甘油三酯的含量,提高机体耐受力和减少代谢毒性作用^[1~4]。对婴幼儿来说,L-肉碱在维持婴幼儿生命及许多促进发育的生理过程,如生酮作用、蛋白质代谢等方面均有一定的功能。我国及许多其它国家已规定在婴幼儿食品配方中添加适量的 L-肉碱,以满足其生理需要,更好地促进婴幼儿健康成长。

左旋肉碱极性较强,缺少发色基团,定量分析困难。国内外对左旋肉碱的测定主要有酶法^[5,6]、电泳^[7,8]、流动相注射串联质谱法^[9]、高效液相色谱法^[10~13]等。离子色谱法可测定在水溶液中能电离的物质。在酸性溶液中,左旋肉碱表现为阳离子特性,带正电荷,可用阳离子交换色谱柱分离。但左旋肉碱的两性特征使其在抑制后呈电中性,无法采用抑制型电导检测。同时,奶粉中左旋肉碱添加量较低,需要更低检出限的测定方法。为此,提出左旋肉碱的阀切换-非抑制型离子色谱测定的新

方法。该方法前处理简便、检测快速,用于奶粉样品中左旋肉碱的检测,结果令人满意。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Dionex ICS-2000 和 ICS-900 离子色谱仪(美国 Dionex 公司),配有柱温箱和电导检测器, Chromeleon 6.8 色谱工作站, OnGuard II RP 固相萃取柱, OnGuard II Na 柱(美国 Dionex 公司), 0.22 μm 微孔滤膜(上海安谱科学仪器公司), CF16RX II 低温高速离心机(日本东芝)。

左旋肉碱标准品(含量 98%,阿拉丁化学公司),甲基磺酸($\geq 99\%$,Sigma-Aldrich 公司); 18.2 M $\Omega \cdot \text{cm}$ 超纯水,由 Millipore 超纯水发生器产生。乙腈(AR, ≥ 99.5)。

奶粉 1、奶粉 2、奶粉 3 购自当地超市。

1.2 色谱条件

超低压浓缩柱 IonPac TCC-UPL1,分离柱 IonPac CS17(6.5 μm , 250 mm \times 4 mm),保护柱 IonPac CG17(6.5 μm , 50 mm \times 4 mm);非抑制电导检测;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;进样量 500 μL ;3 mmol/L 甲基磺酸等度淋洗,流速 1 mL/min;峰面积定量。

收稿日期:2013-05-13

E-mail: cohlint007@163.com

1.3 标准溶液和淋洗液的配制

左旋肉碱标准储备液 1000 mg/L: 准确称取左旋肉碱标准物质 0.1000 g, 用 100 mL 超纯水定容至刻度, 摇匀于 4℃ 下避光保存, 备用。分别移取适量的标准品储备液, 用超纯水配制成 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1 mg/L 的系列工作溶液。

3 mmol/L 的甲基磺酸淋洗液: 取 0.16 mL 甲基磺酸溶于 1L 超纯水中。

1.4 前处理方法

称取奶粉样品约 1 g 至 50 mL 比色管中, 加入超纯水 10 mL, 涡旋振荡, 使奶粉充分溶解后加入 20 mL 乙腈沉淀蛋白, 振荡摇匀 10 s, 静置 10 min, 取上层清液 10 mL 置于离心管中, 10000 r/min 离心 5 min, 准确吸取 5 mL 离心清液, 定容至 25 mL。将稀释液依次通过 0.22 μm 尼龙滤膜和 OnGuard II RP 柱、Na 柱, 弃去 6 mL 初始流出液后采集 2 mL 样品用于离子色谱测定。

OnGuard II RP 柱 (规格 2.5 mL), 预先使用 10 mL 甲醇和 15 mL 水活化。

OnGuard II Na 柱, 用 10 mL 水活化。

2 结果与讨论

2.1 前处理条件

采用加入乙腈沉淀蛋白的方法, 沉淀蛋白效果较好, 可得到澄清的上层溶液。通过在 1 g 奶粉中加入 1, 2, 5, 10, 15 mL 的高纯水来溶解奶粉, 发现如果加入水的量过少, 则奶粉溶解不充分。考虑到检出限, 用 10 mL 高纯水溶解 1 g 奶粉样品, 用乙腈沉淀蛋白。在 10 mL 奶粉样品中加 10, 15, 20, 25, 30 mL 乙腈, 发现如乙腈的加入量小于水的量, 则蛋白沉淀不完全, 大量蛋白悬浮于溶液中, 无法沉淀。随着乙腈加入量增大, 沉淀蛋白速度加快, 上层液更加澄清。最终确定加入乙腈量为 20 mL。

2.2 阀切换条件

进样后, 将阀切换到浓缩柱一边, 用纯水将样品冲入浓缩柱, 这时, 残留的阳离子及左旋肉碱浓缩在柱上, 乙腈被冲出。5 min 后, 乙腈被冲洗干净。再将阀切换到分离柱侧, 左旋肉碱在色谱柱上得到分离。比较了不同时长冲洗效果, 5 min 可将乙腈及其它无保留杂质冲洗干净。阀切换配置图如图 1 所示。

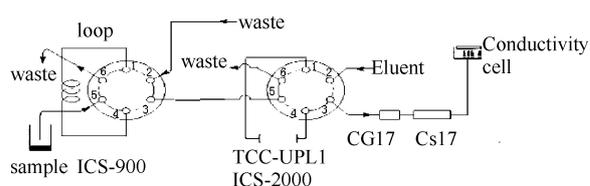


图 1 奶粉中左旋肉碱测定阀切换配置图

Fig. 1 Configurations of valve-switching in determination of L-carnitine in milk powder

2.3 色谱柱的选择

实验了 IonPac CS17, IonPac CS18 (6.0 μm, 250 mm × 2 mm), IonPac SCS1 三种不同色谱柱。实验发现 IonPac SCS1 柱亲水性差, 左旋肉碱的峰形不好。IonPac CS17, IonPac CS18 都是低疏水性柱, 左旋肉碱的峰形对称性好。但实际样品测试时, IonPac CS18 柱上左旋肉碱被不明峰干扰。因此选择 CS17 + CG17 作为分析 L-左旋肉碱的色谱柱。

2.4 淋洗液浓度

依次选用 6, 5, 4, 3, 2 mmol/L 的甲基磺酸作为淋洗液进行实验。结果表明: 随淋洗液浓度从 6 mmol/L 降低到 2 mmol/L, 背景电导从 2231 μS 降低至 777 μS, 噪声降低, 理论塔板数提高, 各成分间的分离度增大, 峰形改善, 信噪比从 12 增大至 67.8, 但保留时间也从 6.91 min 增大至 15.51 min。综合考虑, 选择 3 mmol/L 的甲基磺酸作为分析用淋洗液。

在优化的淋洗液浓度下, 标准样品及真实样品的左旋肉碱色谱图如图 2 所示。

2.5 干扰影响

通过在前处理时加入钠柱, 去除镁、钙、钾、铁、铜、锰、锌等阳离子, 避免干扰左旋肉碱。干扰电导响应的乙腈, 也在切换浓缩过程被纯水冲出浓缩柱, 因此不会干扰左旋肉碱的检测。

2.6 线性范围与检出限

按实验方法在选定的色谱条件下, 对左旋肉碱进行线性和检出限测定。取标准工作液, 以高纯水稀释成 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.8, 1 mg/L, 用离子色谱进行检测, 以峰面积 y 对质量浓度 ρ (mg/L) 进行作图, 得回归方程 $y = 0.686\rho - 0.006$ 。线性范围 17.5 ~ 175 mg/kg, 相关系数 $r > 0.9995$ 。取标准工作液, 以高纯水稀释成 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 mg/L, 按优化条件进行处理后, 以信噪比 (S/N) ≥ 3 的最

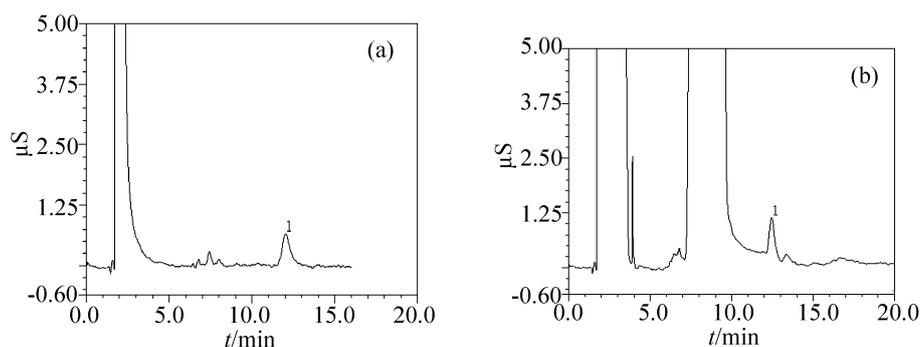


图 2 标准溶液 (a) 及奶粉样品 (b) 中左旋肉碱分离谱图

Fig. 2 Chromatograms of L-carnitine standard (a , 0.5 mg/L) and milk powder sample (b)
色谱柱: IonPac CS17(6.5 μm , 250 mm \times 4 mm); 淋洗液: 3 mmol/L 甲基磺酸; 峰: 1 - 左旋肉碱

低浓度作为奶粉中左旋肉碱的检出限, 测得左旋肉碱检出限为 5 mg/kg。

2.7 精密度与回收率

按实验方法, 取市售奶粉样品进行不同浓度加

标试验, 连续进样 5 次, 测得左旋肉碱平均回收率和 RSD, 结果列于表 2, 该方法的回收率在 92.3% ~ 105.2% 之间, RSD 在 1.4% ~ 4.3% 之间。

表 2 方法的回收率与精密度 (n = 5)

Tab. 2 Recovery and precision of the method (n = 5)

分析物	奶粉品牌编号	含量 $w/(\text{mg}/\text{kg})$	添加量 $w/(\text{mg}/\text{kg})$	回收率 /%	RSD /%
左旋肉碱	奶粉 1	85.9	20	96.3 ~ 104.8	3.3
			50	98.7 ~ 103.5	2.3
			100	97.8 ~ 101.7	2.1
	奶粉 2	15.7	20	98.8 ~ 102.9	2.4
			50	92.3 ~ 95.5	2.1
			100	97.7 ~ 101.5	1.4
	奶粉 3	55.1	20	94.5 ~ 105.2	4.3
			50	96.1 ~ 104.2	3.2
			100	94.9 ~ 99.5	2.0

3 结论

奶粉 1 产品包装上左旋肉碱标示含量为 7.7 mg/100 g, 本文所测结果与之接近。奶粉 2 和奶粉 3 产品包装上未标识添加有左旋肉碱, 但本实验依然检出, 这可能与天然奶源中就含有一定量左旋肉碱有关。

采用阀切换 - 非抑制型离子色谱法来测定奶制品中的左旋肉碱, 具有简单、快速、干扰少、环保等特点。该方法可用于奶粉中左旋肉碱的含量测定。

参考文献

[1] 张海燕, 张晓杰, 张红素. 中国食品添加剂, 1997,

2: 4

[2] 辛总秀. 青岛大学学报, 2002, 20(4): 9
[3] 王鸳鸯, 赵彦华. 食品科技, 2006, 3: 136
[4] Alison S, Janos K, Charles L H. Molecular Aspects of Med, 2004, 25: 455
[5] David C W, Harvey E I, Gerald A. Food Chem, 1997, 59(3): 325
[6] Jose A P, Fernando A, Luis A *et al.* Clin Biochem, 2006, 39: 1022
[7] V P, F K, R S, M V. J. Chromatogr A, 2005, 1081: 60
[8] C. M, N. V C. C, A. R, M. V. Anal Chim Acta, 1999, 382: 23

- [9] David W. J. Clin Biochem 2010 ,43: 1362
- [10] 黄 芳,黄晓兰,吴惠勤,等. 分析试验室,2011 ,
30(10) : 111
- [11] Christopher J M , Michael L , Malina K S. Clin Chim
Acta 2004 ,344: 123
- [12] Li K , Li W , Huang Y F. Clin Chim Acta , 2007 ,
378: 159
- [13] Paul E M , Stephen T I , Charles L H. Anal Chem ,
2005 ,77: 1448

Determination of L-carnitine in milk by valve-switching non-suppressed ion chromatography

WU Ling-tao^{*1} , FANG Li¹ , HUO Zhu-jian¹ , ZHONG Xin-lin² and CHEN Jun² (1. China National Analytical Centre , Guangdong Provincial Public Laboratory of Analysis and Testing Technology , Guangzhou 510070; 2. Guangzhou Lab , Thermo scientific China Limited Application Research Center , Guangzhou 510070) , Fenxi Shiyanshi 2013 32(11) : 93 ~ 96

Abstract: A novel assay was developed for the determination of L-carnitine in milk powder by valve-switching non-suppressed ion chromatography. In this method , milk powder samples were dissolved in high purity water. Acetonitrile was used to precipitate protein and online SPE(Ionpac TCC-ULP1) to serve as a concentrator after samples were purified by a Dionex RP column and a Na column. The chromatographic method was based on a Dionex IonPac CS17 + IonPac CG17 cation-exchange column with an aqueous methanesulfonic acid (3 mmol/L) as the isocratic eluent at a flow rate of 1 mL/min. The column temperature was maintained at 30°C. A good linear relationship was observed in the concentration range of 17.5 ~ 175 mg/kg(r = 0.9995) for L-carnitine . The recoveries of L-carnitine in milk powder were 92.3% ~ 105.2% with RSDs of 1.4% ~ 4.3% . The limit of detection was 5 mg/kg. No interference from other ions was found. The pretreatment and chromatographic conditions were discussed in this article. The results indicate that the assay is simple , rapid , accurate and suitable for the determination of L-carnitine in milk powder samples.

Keywords: L-carnitine; Ion chromatography; Non-suppressed; Valve-switching; Milk powder