



中华人民共和国国家标准

GB 5009.300—2025

食品安全国家标准 食品中左旋肉碱的测定

2025-03-16 发布

2025-09-16 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前 言

本标准代替 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》。

本标准与 GB 29989—2013 相比,主要变化如下:

- 标准名称更改为《食品安全国家标准 食品中左旋肉碱的测定》;
- 更改了分光光度法;
- 增加了“第二法 柱前衍生-高效液相色谱法”;
- 增加了“第三法 液相色谱-串联质谱法”。

食品安全国家标准

食品中左旋肉碱的测定

1 范围

本标准规定了食品中左旋肉碱的测定方法。

第一法分光光度法适用于婴幼儿食品(不含特殊医学用途婴儿配方食品中的乳蛋白部分水解配方、乳蛋白深度水解配方和氨基酸配方)和乳品中左旋肉碱的测定。

第二法柱前衍生-高效液相色谱法适用于食品(不含特殊医学用途婴儿配方食品 and 特殊医学用途配方食品)中左旋肉碱的测定。

第三法液相色谱-串联质谱法适用于婴幼儿配方食品和特殊医学用途配方食品中左旋肉碱的测定。

第一法 分光光度法

2 原理

试样经过水提取,用高氯酸沉淀蛋白质后过滤。滤液中结合态的左旋肉碱经碱皂化游离出来,与乙酰辅酶 A 在乙酰肉碱转移酶的催化下反应生成乙酰肉碱和游离的辅酶 A。游离的辅酶 A 和 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)反应生成黄色物质,其颜色深浅与游离的辅酶 A 含量成正比。因游离的辅酶 A 与左旋肉碱是等摩尔反应关系,可间接求出试样中左旋肉碱的含量。

3 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的三级水。

3.1 试剂

- 3.1.1 高氯酸(HClO_4)。
- 3.1.2 氢氧化钠(NaOH)。
- 3.1.3 氢氧化钾(KOH)。
- 3.1.4 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$)。
- 3.1.5 *N*-2-羧乙基哌嗪-*N*-2-乙烷磺酸($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$)。
- 3.1.6 乙二醇四乙酸二钠($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.7 乙酰辅酶 A(AcetylCoA):纯度 $\geq 85\%$,在 $2\text{ }^\circ\text{C} \sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。
- 3.1.8 乙酰肉碱转移酶(CAT):在 $2\text{ }^\circ\text{C} \sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 高氯酸溶液(13%):吸取 13 mL 高氯酸,用水稀释至 100 mL。
- 3.2.2 高氯酸溶液(3%):吸取 3 mL 高氯酸,用水稀释至 100 mL。

3.2.3 氢氧化钠溶液(10 mol/L):称取 40 g 氢氧化钠用水溶解,冷却后稀释至 100 mL。

3.2.4 氢氧化钾溶液(4 mol/L):称取 22.4 g 氢氧化钾用水溶解,冷却后稀释至 100 mL。

3.2.5 显色储备液:分别称取 50 mg 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)、5.96 g *N*-2-羟乙基哌嗪-*N*-2-乙烷磺酸、185 mg 乙二醇四乙酸二钠溶于 30 mL 水中,用 10 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 7.4~7.6,然后用水稀释至 50 mL。4℃保存,有效期 3 个月。

3.2.6 显色工作液:吸取 5 mL 显色储备液用水稀释至 25 mL。

3.2.7 乙酰辅酶 A(AcetylCoA)溶液:称取 20 mg 乙酰辅酶 A 溶于 2 mL 水中。临用现配。

3.2.8 乙酰肉碱转移酶(CAT)溶液:吸取 100 μL 乙酰肉碱转移酶悬浮液,加水至 2 mL,混匀。临用现配。

3.3 标准品

左旋肉碱标准品($C_7H_{15}NO_3$,CAS 号:541-15-1):纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。使用前于 $102\text{℃}\pm 2\text{℃}$ 电热鼓风干燥箱中干燥 2 h。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 左旋肉碱标准储备液(1 mg/mL):准确称取 10 mg(精确至 0.01 mg)左旋肉碱置于 10 mL 烧杯中,加入 5 mL 水溶解,全部转移至 10 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀。将溶液转移至棕色容器中,4℃避光保存,有效期 3 个月。

3.4.2 左旋肉碱标准中间液(80 μg/mL):吸取左旋肉碱标准储备液 2.00 mL,置于 25 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀。将溶液转移至棕色容器中,4℃避光保存,有效期 1 个月。

3.4.3 左旋肉碱系列标准工作液:分别吸取左旋肉碱标准中间液 0.125 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、3.00 mL、5.00 mL 置于 25 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀,即得。该系列标准工作液质量浓度分别为 0.4 μg/mL、1.6 μg/mL、3.2 μg/mL、6.4 μg/mL、9.6 μg/mL、16 μg/mL。临用现配。

4 仪器和设备

4.1 分析天平:感量分别为 0.001 g 和 0.01 mg。

4.2 pH 计。

4.3 恒温水浴装置。

4.4 分光光度计。

4.5 电热鼓风干燥箱。

5 分析步骤

5.1 试样处理

5.1.1 固态试样:准确称取 5.0 g(精确至 0.001 g)混合均匀的试样于烧杯中,用 30 mL 40℃温水溶解,转入 100 mL 容量瓶中。加入 10 mL 高氯酸溶液(13%),混合均匀后静置 20 min。用水定容至刻度,混匀,用定量滤纸过滤。

取滤液 20 mL,用氢氧化钾溶液(4 mol/L)调节 pH 至 12.5~13.0 后,置于 40℃水浴中 60 min。冷却后先用高氯酸溶液(13%)将 pH 调至 9~10,再用高氯酸溶液(3%)将 pH 调节至 7.0~7.5。将样液转入 50 mL 容量瓶中,用水定容。混匀后置于 4℃冰箱中静置 2 h 以上。将试样处理液从冰箱中取出放置至室温,取上清液,用 0.45 μm 滤膜过滤后备用。

5.1.2 液态试样:准确称取 25.0 g(精确至 0.001 g)混合均匀的试样,转入 100 mL 容量瓶中。后续步骤按 5.1.1 中“加入 10 mL 高氯酸溶液(13%),混合均匀后静置 20 min……”处理。

5.2 标准曲线的绘制

吸取左旋肉碱系列标准工作液 2.00 mL 于 1 cm 比色皿中,加入 0.80 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,分光光度计的波长调为 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。以左旋肉碱系列标准工作液的浓度为横坐标,以吸光值为纵坐标,制作标准曲线。

5.3 试样测定

取 2.00 mL 试样处理液按 5.2 的步骤测定其吸光值。在标准曲线上查得试样待测液的浓度。

6 分析结果的表述

试样中左旋肉碱的含量按式(1)计算。

$$X = \frac{c \times 50}{m \times V \times 10} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试样中左旋肉碱的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);

c ——由标准曲线得到的试样溶液中左旋肉碱的质量浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);

50 ——样液的定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样的取样质量,单位为克(g);

V ——滤液的体积,单位为毫升(mL);

10 ——换算系数;

100 ——样液的定容体积,单位为毫升(mL)。

计算结果保留至小数点后 2 位。

7 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

8 其他

固态试样的方法检出限为 0.6 mg/100 g,定量限为 2 mg/100 g。液态试样的方法检出限为 0.12 mg/100 g,定量限为 0.4 mg/100 g。

第二法 柱前衍生-高效液相色谱法

9 原理

试样中的左旋肉碱经稀盐酸提取、碱皂化、乙腈沉淀蛋白后,用阳离子交换固相萃取柱净化。净化液中的左旋肉碱在氯甲酸丁酯、三乙胺的催化下与 L-丙酰胺- β -萘胺发生衍生反应,衍生物用高效液相

色谱仪测定,外标法定量。

10 试剂和材料

除非另有说明,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 试剂及材料

- 10.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 10.1.2 无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)。
- 10.1.3 氨水($\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$)。
- 10.1.4 盐酸(HCl)。
- 10.1.5 氢氧化钾(KOH)。
- 10.1.6 二氯甲烷(CH_2Cl_2)。
- 10.1.7 三乙胺($\text{C}_6\text{H}_{15}\text{N}$)。
- 10.1.8 氯甲酸丁酯($\text{C}_5\text{H}_9\text{ClO}_2$)。
- 10.1.9 *L*-丙酰胺- β -萘胺($\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}$):CAS 号为 720-82-1。
- 10.1.10 碳酸氢钠(NaHCO_3)。
- 10.1.11 三水合磷酸氢二钾($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)。
- 10.1.12 磷酸(H_3PO_4)。
- 10.1.13 辛烷磺酸钠($\text{C}_8\text{H}_{19}\text{NaO}_4\text{S}$)。
- 10.1.14 混合型阳离子交换固相萃取柱(MCX):60 mg/3 mL 或相当者;使用前依次使用 3 mL 甲醇、3 mL 水和 3 mL 盐酸溶液(10 mmol/L)进行活化。
- 10.1.15 微孔滤膜:0.45 μm ,水系。

10.2 试剂配制

- 10.2.1 盐酸溶液(1 mol/L):吸取 90 mL 盐酸,加水稀释至 1 000 mL。
- 10.2.2 盐酸溶液(0.1 mol/L):吸取 9 mL 盐酸,加水稀释至 1 000 mL。
- 10.2.3 盐酸溶液(10 mmol/L):吸取 10 mL 盐酸溶液(0.1 mol/L),加水稀释至 100 mL。
- 10.2.4 氢氧化钾溶液(1 mol/L):称取 56 g 氢氧化钾,用水溶解并稀释至 1 000 mL。
- 10.2.5 4% 氨水甲醇溶液:吸取 4 mL 氨水,加甲醇稀释至 100 mL。
- 10.2.6 衍生溶液:称取 0.45 g *L*-丙酰胺- β -萘胺,用无水乙醇溶解并稀释至 100 mL,于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下保存,有效期 2 周。
- 10.2.7 催化剂 I:称取 0.5 g 三乙胺,加二氯甲烷稀释至 100 mL。
- 10.2.8 催化剂 II:称取 0.5 g 氯甲酸丁酯,加二氯甲烷稀释至 100 mL。
- 10.2.9 碳酸氢钠溶液(50 mmol/L):称取 0.42 g 碳酸氢钠,用水溶解并稀释至 100 mL。
- 10.2.10 磷酸盐缓冲溶液:称取 3.4 g 三水合磷酸氢二钾和 0.43 g 辛烷磺酸钠,用 900 mL 水溶解,用磷酸调节 pH 至 2.5~2.8 后,用水稀释至 1 000 mL。

10.3 标准品

同 3.3。

10.4 标准溶液配制

- 10.4.1 左旋肉碱标准储备液(1 mg/mL):同 3.4.1。

10.4.2 左旋肉碱标准中间液(10 $\mu\text{g/mL}$):吸取左旋肉碱标准储备液 0.25 mL 置于 25 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀。临用现配。

10.4.3 左旋肉碱系列标准工作液:分别吸取左旋肉碱标准中间液 0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL、10.0 mL 置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,混匀,即得。该系列标准工作液质量浓度分别为 0.200 $\mu\text{g/mL}$ 、0.500 $\mu\text{g/mL}$ 、1.00 $\mu\text{g/mL}$ 、2.00 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 。临用现配。

11 仪器和设备

11.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

11.2 分析天平:感量分别为 0.001 g 和 0.01 mg。

11.3 涡旋混合器。

11.4 离心机,转速 $\geq 4\,000\text{ r/min}$ 。

11.5 氮气浓缩装置。

11.6 超声波清洗仪。

11.7 恒温水浴装置。

11.8 pH 计。

11.9 电热鼓风干燥箱。

12 分析步骤

12.1 试样制备

液态试样摇匀;基质均匀的半固态试样和粉状试样直接用于提取;其他试样需匀浆或粉碎均匀。

12.2 试样提取

12.2.1 固态试样:称取 5.0 g(精确至 0.001 g)试样置于 150 mL 锥形瓶中,加入 20 mL 盐酸溶液(0.1 mol/L),涡旋混匀 1 min,超声 5 min 溶解试样,加入 5 mL 氢氧化钾溶液(1 mol/L)涡旋混匀,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴皂化 30 min,冷却至室温,加入 5 mL 盐酸溶液(1 mol/L),涡旋混匀 1 min,转移至 50 mL 容量瓶中,用盐酸溶液(0.1 mol/L)定容至刻度,摇匀。吸取 1.00 mL 提取液,加入 9.00 mL 乙腈,涡旋混匀 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,所得上清液待净化。

注:左旋肉碱含量大于 1 000 mg/kg 的试样,试样应先用水溶解并稀释至左旋肉碱含量小于或等于 1 000 mg/kg 后,按照 12.2.1 中提取方法进行提取。

12.2.2 液态试样:称取 25.0 g(精确至 0.001 g)试样置于 150 mL 锥形瓶中,加入 5 mL 氢氧化钾溶液(1 mol/L)涡旋混匀,于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴皂化 30 min,冷却至室温,加入 5 mL 盐酸溶液(1 mol/L),涡旋混匀 1 min,转移至 50 mL 容量瓶中,用盐酸溶液(0.1 mol/L)定容至刻度,摇匀。吸取 1.00 mL 提取液,加入 9.00 mL 乙腈,涡旋混匀 1 min,4 000 r/min 离心 5 min,所得上清液待净化。

注:左旋肉碱含量大于 200 mg/kg 的试样,试样应先用水稀释至左旋肉碱含量小于或等于 200 mg/kg 后,按照 12.2.2 中提取方法进行提取。

12.3 净化

吸取 1.00 mL 待净化溶液于活化好的固相萃取柱中,以 1 滴/s 的速度过柱,用 3 mL 盐酸溶液(10 mmol/L)淋洗,弃去淋洗液,真空抽 5 min 尽量除去柱中水分,用 3 mL 4% 氨水甲醇溶液洗脱,收集洗脱液,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气浓缩至干。所得残渣待衍生。

12.4 衍生

在残渣中加入 0.5 mL 衍生溶液,涡旋 1 min,超声 30 s 溶解残渣,再依次加入 0.5 mL 催化剂 I 和 0.5 mL 催化剂 II,剧烈涡旋 3 min,室温下放置反应 10 min。反应完成后,加入 2.00 mL 碳酸氢钠溶液 (50 mmol/L),剧烈涡旋混匀 3 min 终止反应,4 000 r/min 离心 3 min,取上层水相用 0.45 μm 滤膜过滤,制得试样待测液。

12.5 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下。

- a) 色谱柱: C_{18} 色谱柱 (3.0 mm $\times$ 150 mm, 2.7 μm) 或性能相当者。
- b) 流动相 A: 乙腈-甲醇 (1+1), 流动相 B: 磷酸盐缓冲溶液; 洗脱比例为 A : B (35 : 65, 体积比)。
- c) 流速: 0.6 mL/min。
- d) 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。
- e) 检测波长: 244 nm。
- f) 进样体积: 10 μL 。

12.6 标准曲线的制作

吸取 1.00 mL 左旋肉碱系列标准工作液,于 45 $^{\circ}\text{C}$ 氮气浓缩至干后按 12.4 衍生化,分别注入高效液相色谱仪中,测定相应的峰面积,以系列标准工作液的浓度为横坐标,以左旋肉碱衍生物的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。标准溶液的色谱图参见附录 A 中图 A.1。

12.7 试样溶液的测定

将试样待测液注入高效液相色谱仪中,以保留时间定性,测得待测物峰面积,根据标准曲线得到待测液中左旋肉碱的浓度。

12.8 空白试验

除不加试样外,均按上述操作步骤进行。

13 分析结果的表述

试样中左旋肉碱的含量按式(2)计算。

$$X = \frac{c \times V \times 10}{m \times 1\,000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- X —— 试样中左旋肉碱的含量,单位为毫克每百克 (mg/100 g);
- c —— 由标准曲线得到的试样溶液中左旋肉碱的质量浓度,单位为微克每毫升 ($\mu\text{g/mL}$);
- V —— 样液的定容体积,单位为毫升 (mL);
- 10 —— 稀释倍数;
- m —— 试样的取样质量,单位为克 (g);
- 1 000 —— 换算系数;
- 100 —— 换算系数。

计算结果保留至小数点后 2 位。

14 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

15 其他

固态试样的方法检出限为 0.6 mg/100 g, 定量限为 2 mg/100 g。液态试样的方法检出限为 0.12 mg/100 g, 定量限为 0.4 mg/100 g。

第三法 液相色谱-串联质谱法

16 原理

试样用水溶解或稀释, 经微波提取后, 用液相色谱-串联质谱仪测定, 同位素内标法定量。

17 试剂和材料

除非另有说明, 本方法所用试剂均为分析纯, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

17.1 试剂及材料

17.1.1 硝酸(HNO_3): 分析纯或更高纯度。

17.1.2 乙腈($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$): 色谱纯。

17.1.3 甲酸铵(NH_4COOH): 色谱纯。

17.1.4 甲酸(HCOOH): 色谱纯。

17.1.5 微孔滤膜: 0.22 μm , 水系。

17.2 试剂配制

17.2.1 流动相 A[5 mmol/L 甲酸铵乙腈-水溶液(含 0.2% 甲酸)]: 称取 0.63 g 甲酸铵, 溶于 1 L 水中, 再加入 1 L 乙腈和 4 mL 甲酸, 混匀, 即得。

17.2.2 流动相 B[30 mmol/L 甲酸铵乙腈-水溶液(含 0.2% 甲酸)]: 称取 3.78 g 甲酸铵, 溶于 1 L 水中, 再加入 1 L 乙腈和 4 mL 甲酸, 混匀, 即得。

17.3 标准品

左旋肉碱标准品($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_3$, CAS 号: 541-15-1): 纯度 $\geq 98\%$, 或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。使用前于 102 $^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 中干燥 2 h。

左旋肉碱同位素内标: 左旋肉碱- d_3 ($\text{C}_7\text{H}_{12}\text{D}_3\text{NO}_3$, CAS 号: 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。

17.4 标准溶液配制

17.4.1 左旋肉碱标准储备液(20 mg/mL): 准确称取 200 mg(精确至 0.1 mg)左旋肉碱置于 10 mL 烧杯中, 加入 5 mL 水溶解, 全部转移至 10 mL 容量瓶中, 用水定容至刻度, 混匀。将溶液转移至棕色容器

中,4℃避光保存,有效期6个月。

17.4.2 左旋肉碱标准工作液:分别吸取左旋肉碱标准储备液(20 mg/mL) 0.005 mL、0.01 mL、0.25 mL、1.00 mL、2.00 mL、2.50 mL置于10 mL容量瓶中,用水定容至刻度,混匀,即得。该系列标准工作液质量浓度分别为10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、500 μg/mL、2 000 μg/mL、4 000 μg/mL、5 000 μg/mL。左旋肉碱标准工作液(10.0 μg/mL、20.0 μg/mL)需临用现配;左旋肉碱标准工作液(500 μg/mL、2 000 μg/mL、4 000 μg/mL、5 000 μg/mL)需4℃避光保存,有效期3个月。

17.4.3 同位素内标溶液(200 μg/mL):准确称取10 mg(精确至0.1 mg)左旋肉碱- d_3 置于10 mL烧杯中,加入5 mL水溶解,全部转移至50 mL容量瓶中,用水定容至刻度,混匀。将溶液转移至棕色容器中,4℃避光保存,有效期3个月。

17.4.4 左旋肉碱系列标准工作液:分别吸取上述各浓度的左旋肉碱标准工作液50.0 μL于微波消解罐中,加入50.0 μL同位素内标溶液,按照19.2中方法同法操作,即得。该系列标准工作液质量浓度分别为10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、500 ng/mL、2 000 ng/mL、4 000 ng/mL、5 000 ng/mL。

18 仪器和设备

18.1 液相色谱-串联三重四极杆质谱仪:配有电喷雾(ESI)离子源。

18.2 分析天平:感量分别为0.001 g和0.1 mg。

18.3 涡旋混合器。

18.4 超声波清洗仪。

18.5 微波消解仪:配有聚四氟乙烯消解内罐。

18.6 电热鼓风干燥箱。

19 分析步骤

19.1 试样制备

液态试样摇匀;基质均匀的半固态试样和粉状试样直接用于提取;其他试样需匀浆或粉碎均匀。

19.2 试样提取

固态试样:称取5.0 g(精确至0.001 g)试样于50 mL离心管中,加入40.0 g水,涡旋混匀1 min,超声5 min溶解试样,冷却至室温,摇匀,即得固态试样溶解液,称重。称取固态试样溶解液1.0 g(精确至0.001 g)于微波消解罐中,加入50.0 μL同位素内标溶液、5 mL水和2.5 mL硝酸,涡旋混匀,旋紧罐盖,置微波消解仪中进行提取(10 min升至120℃,保持40 min,最大功率1 000 W)。冷却后取出,缓慢打开罐盖排气,用水稀释至25 mL,混匀,用0.22 μm微孔滤膜过滤,备用。吸取滤液0.50 mL,加入乙腈0.50 mL,混匀,供液相色谱-串联质谱仪测定。

液态试样:称取1.0 g(精确至0.001 g)试样于微波消解内罐中,加入50 μL同位素内标溶液、5 mL水和2.5 mL硝酸,涡旋混匀,旋紧罐盖,置微波消解仪中进行提取(10 min升至120℃,保持40 min,最大功率1 000 W)。冷却后取出,缓慢打开罐盖排气,用水稀释至25 mL,混匀,用0.22 μm微孔滤膜过滤,备用。吸取滤液0.50 mL,加入乙腈0.50 mL,混匀,供液相色谱-串联质谱仪测定。

19.3 仪器条件

19.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下。

- a) 色谱柱:强阳离子交换色谱柱(3.0 mm×50 mm,5 μm)或性能相当者。
- b) 流动相 A:5 mmol/L 甲酸铵乙腈-水溶液(含 0.2%甲酸),流动相 B:30 mmol/L 甲酸铵乙腈-水溶液(含 0.2%甲酸),梯度洗脱程序见表 1。
- c) 流速:1.0 mL/min。
- d) 柱温:40 ℃。
- e) 进样体积:1 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	A/%	B/%
0	100	0
1.0	100	0
1.5	0	100
2.5	0	100
3.0	100	0
4.2	100	0

19.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下。

- a) 离子化模式:电喷雾电离正离子模式(ESI⁺)。
- b) 扫描方式:多反应监测模式(MRM)。
- c) 干燥气温度与流速:300 ℃,10 L/min。
- d) 鞘气温度与流速:320 ℃,10 L/min。
- e) 毛细管电压:3 500 V。
- f) 左旋肉碱及其内标物的定量和定性离子、碰撞能量和碎裂电压参数见表 2。

表 2 质谱参数

化合物	母离子(<i>m/z</i>)	子离子(<i>m/z</i>)	碰撞能量/eV	碎裂电压/eV
左旋肉碱	162.1	103 [*]	80	22
	162.1	59.1	80	22
左旋肉碱- <i>d</i> ₃	165	103	80	22
[*] 为定量离子。				

19.4 标准曲线的制作

将左旋肉碱系列标准工作液分别注入液相色谱-串联质谱仪中,测定相应的峰面积,以系列标准工作液中左旋肉碱的浓度为横坐标,以左旋肉碱的响应值与内标的响应值的比值为纵坐标,绘制标准曲线。标准溶液的色谱图见图 A.2。

19.5 定性判定

按照 19.3 的条件测定试样溶液和标准工作液,如果试样中的目标化合物色谱峰保留时间与标准工

作溶液一致(变化范围在 $\pm 2.5\%$ 之内);试样中目标化合物的相对离子丰度与标准溶液的相对离子丰度的偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定试样中存在左旋肉碱。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度(X)	$X > 50$	$20 < X \leq 50$	$10 < X \leq 20$	$X \leq 10$
允许的相对偏差/ $\%$	± 20	± 25	± 30	± 50

19.6 空白试验

除不加试样外,均按上述操作步骤进行。

20 分析结果的表述

20.1 固态试样中左旋肉碱的含量按式(3)计算。

$$X = \frac{c \times V \times 2 \times m_w}{m \times m_s} \times \frac{1}{10\,000} \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中:

- X —— 固态试样中左旋肉碱的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
- c —— 由标准曲线得到的试样溶液中左旋肉碱的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 提取后的定容体积,单位为毫升(mL);
- 2 —— 稀释倍数;
- m_w —— 固态试样溶解液的总质量,单位为克(g);
- m —— 固态试样溶解液的取样质量,单位为克(g);
- m_s —— 固态试样的取样质量,单位为克(g);
- 10 000 —— 换算系数。

计算结果保留小数点后 2 位。

20.2 液态试样中左旋肉碱的含量按式(4)计算。

$$X = \frac{c \times V \times 2}{m} \times \frac{1}{10\,000} \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- X —— 液态试样中左旋肉碱的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
- c —— 由标准曲线得到的试样溶液中左旋肉碱的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- V —— 提取后的定容体积,单位为毫升(mL);
- 2 —— 稀释倍数;
- m —— 液体试样的取样质量,单位为克(g);
- 10 000 —— 换算系数。

计算结果保留小数点后 2 位。

21 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

22 其他

固态试样的方法检出限为 0.09 mg/100 g,定量限为 0.45 mg/100 g。液态试样的方法检出限为 0.01 mg/100 g,定量限为 0.05 mg/100 g。

附录 A
左旋肉碱色谱图

A.1 左旋肉碱标准溶液(1 $\mu\text{g/mL}$)的柱前衍生液相色谱图见图 A.1。

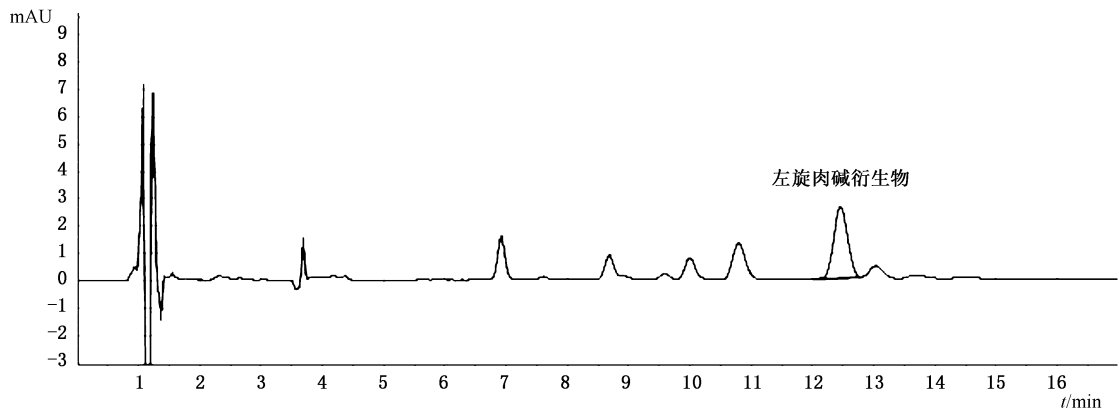


图 A.1 左旋肉碱标准溶液(1 $\mu\text{g/mL}$)柱前衍生液相色谱图

A.2 左旋肉碱标准溶液(500 ng/mL)的多反应监测(MRM)图见图 A.2。

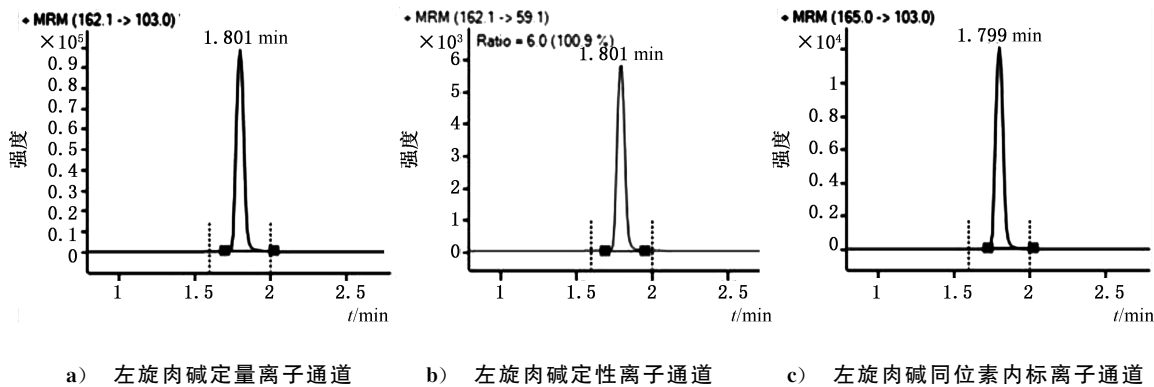


图 A.2 左旋肉碱标准溶液(500 ng/mL)(含内标)的多反应监测(MRM)图