

刘启月,李 勇,余向阳,等. 高效液相色谱-串联质谱法检测原桃胶中左旋肉碱的含量[J]. 江苏农业科学,2020,48(17):215-218.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.17.043

高效液相色谱-串联质谱法检测 原桃胶中左旋肉碱的含量

刘启月^{1,2}, 李 勇², 余向阳^{1,2}, 胡秋辉¹

(1. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏南京 210014; 2. 南京财经大学食品科学与工程学院, 江苏南京 210046)

摘要:利用超声波辅助提取技术和高效液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)对原桃胶中的左旋肉碱进行定量分析。以左旋肉碱的含量为研究对象,考察不同提取剂的提取效率,优化左旋肉碱的液质联用分析条件。结果表明,1 g 原桃胶经 80% 甲醇于 60 ℃、300 W 超声提取 1 h 处理的左旋肉碱得率最高;左旋肉碱在相应含量范围内的线性良好, $r^2 = 0.995$;左旋肉碱加标量为 140 ~ 560 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 时,回收率为 89.7% ~ 109.9%,相对标准偏差为 1.4% ~ 4.5%,方法定量限为 15.1 μg 。利用建立的分析方法测定 6 批桃胶样品中的左旋肉碱,结果显示,得率为 160 ~ 330 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。综上所述,该方法可准确快速地对桃胶中的左旋肉碱进行定量分析。

关键词:原桃胶;左旋肉碱;液质联用;LC-MS/MS

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)17-0215-04

桃胶别称桃树胶,是桃 [*Prunus persica* (L.) Batsch] 或山桃 [*Prunus davidiana* (Carr.) Franch] 等蔷薇科植物树干受到机械伤或致病后分泌出来的胶质半透明状物质^[1]在树干上晒干或采用其他脱水方法获得的淡黄色、黄褐色半透明的固体块状物质(图 1)。采摘后未经其他加工处理的桃胶为原桃胶,原桃胶味苦、性平、益气、和血、止渴、活血消肿、通淋止痛^[2]。古代早已记载,原桃胶具有治疗消渴症即糖尿病的作用^[2-4],现代研究也发现,原桃胶具有降血糖、降血脂、提高免疫力^[5]、抗氧化^[6]、抗菌^[7]等功能。并不是所有的桃树都能产生桃胶,一般新树不产生桃胶,随着树龄的增长,树枝上的干创口(生理或病理)增多,流胶开始变多。桃胶的产生与气候有很大关系,在我国亚热带季风气候区的沿海沿江地区,夏秋季桃胶的生产量较多,尤以湖北、浙江、福建、江苏秦岭-淮河以南地区盛产。盛产桃胶地区的居民常将桃胶作为一种食材烹饪成

各种地方特色美食食用,例如用桃胶煲羹,有土家燕窝之称,一度被很多爱美人士追捧。

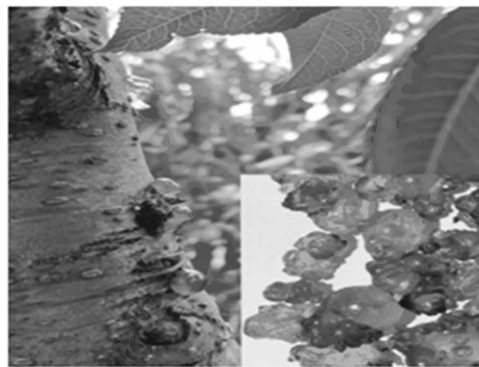


图1 桃树产生的桃胶

左旋肉碱(*L*-carnitine),又称 *L*-肉碱、左卡尼汀、*L*-肉毒碱或维生素 BT,是一种人类必需的类氨基酸,其主要的生理功能是作为载体将长链脂肪酸从线粒体膜外运输到膜内,从而促进脂肪酸的 β -氧化,加速机体的脂肪代谢^[8]。研究发现,适当增加人体内左旋肉碱的含量,可以促进脂酰基的转运,从而促进脂肪代谢,降低各种组织的脂肪量,达到减脂、减体质量的目的^[9]。左旋肉碱具有很好的保健作用,常作为食品中的营养强化剂、添加剂添加于婴儿食品、运动员饮品、减肥健美食品中,还可以作为饲料添加剂促进动物生长^[10]。人体内左旋肉碱的一个重要来源是从膳食中摄入,左旋肉碱在红肉中的含量较多,在植物中的含量极少甚至没

收稿日期:2019-10-07

基金项目:国家农产品质量安全风险评估项目(编号:GJFP2019020);桃胶安全性评价及功能成分分析(编号:KYCX19-1416);江苏省农业科技自主创新资金[编号:CX(19)3006]。

作者简介:刘启月(1991—),女,江苏盐城人,硕士研究生,主要从事食品营养与安全研究。E-mail:1475136474@qq.com。

通信作者:余向阳,博士,研究员,研究方向为产地污染控制。

E-mail:yuxy@jaas.ac.cn。

有。目前,左旋肉碱的检测方法主要有酶技术法、高效液相色谱法(HPLC)、离子色谱法和质谱联用法^[11],其中质谱联用法操作方便,不需要衍生化,不存在衍生过程中的水解问题,并且液相色谱可以消除载体干扰因素,适合样品中游离肉碱、总肉碱的测定^[12]。

目前,对于原桃胶的研究主要集中在桃胶多糖成分的分析及其功能研究,对其他成分的研究基本没有报道。原桃胶的营养价值不仅是因为其含有丰富的植物多糖,研究者在原桃胶中还发现了蛋白质、氨基酸及丰富的微量元素。笔者在试验前期发现,原桃胶中可能还存在左旋肉碱。原桃胶中的左旋肉碱含量可能是评价原桃胶营养价值的重要指标。本研究以原桃胶为原料,优化提取条件及液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)检测条件,对原桃胶中的左旋肉碱进行提取与定量分析。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1 批原桃胶混合样品采摘于湖北省武汉市,6 批不同品种的原桃胶样品于 2019 年 6 月采摘于浙江省杭州市;左旋肉碱标准品(纯度为 95.54%,购自上海安谱实验科技股份有限公司);超纯水(仪器购自 Direct-R 公司);甲酸、甲酸铵、甲醇、乙腈均为色谱纯。

Agilent 1290-6470 液相色谱质谱联用仪,购自美国 Agilent 公司;SBL-10DT 超声波恒温清洗剂,购自宁波新芝生物科技股份有限公司;TG16-WS 型高速离心机,购自长沙湘智离心机仪器有限公司;粉碎机,购自天津泰斯特检测有限公司;AP2500-0 型电子天平,产自瑞士 Ohaus 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 左旋肉碱的提取方法 挑选 100 g 干净的食用级原桃胶,经粉碎机粉碎 60 s 后,将桃胶粉过 60 目筛收集备用。取 1 g 桃胶粉于 50 mL 离心管中,加入 30 颗玻璃小珠(防止桃胶样品结团,提高提取效率),加入 10 mL 提取液,在 60 ℃ 温水中于 300 W 超声提取 60 min,室温冷却至常温后 5 000 r/min 离心 5 min,取 1 mL 上清液,用 0.22 μm 的有机滤膜过滤到进样小瓶中,待测。

1.2.2 标准液的制备 标准储备液的配制:称取 10.0 mg 左旋肉碱入 10 mL 容量瓶中,用甲醇溶解后稀释定容、混匀。配制的左旋肉碱标准储备液质

量浓度为 1 mg/mL,可于 -18 ℃ 保存 6 个月。

标准曲线的绘制:用甲醇将左旋肉碱标准储备液逐级稀释,得到质量浓度为 10、20、40、60、80、100 μg/L 的标准液,根据测得的结果绘制标准曲线。

1.2.3 色谱条件 色谱柱 Agilent poroshell 120 HILIC-Z(2.1 mm × 150.0 mm, 2.7 μm), Agilent ZORBAX SB-C₁₈(2.1 mm × 150.0 mm, 3.5 μm), 流动相:80% 乙腈-20% 水(含 20 mmol/L 甲酸铵,用纯度为 99% 的甲酸调节 pH 值为 2.3),流速为 0.3 mL/min,柱温为 25 ℃,进样量为 5 μL。

1.2.4 质谱条件 离子监测方式为多离子监测(MRM),离子化模式为正离子化方式,离子源为电喷雾(ESI),毛细管电压为 4.0 kV,雾化气压为 103.4 kPa,干燥气流速为 11 L/min,干燥器温度为 350 ℃,定量离子对的质荷比(m/z)为 162.1 → 103.1,定性离子对的 m/z 为 162.1 → 64.1,锥孔电压为 100 V,碰撞能量为 14 V,左旋肉碱在 3 min 左右即出峰。

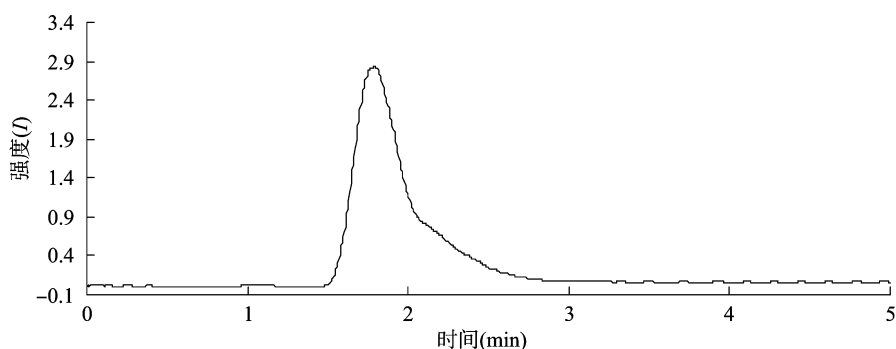
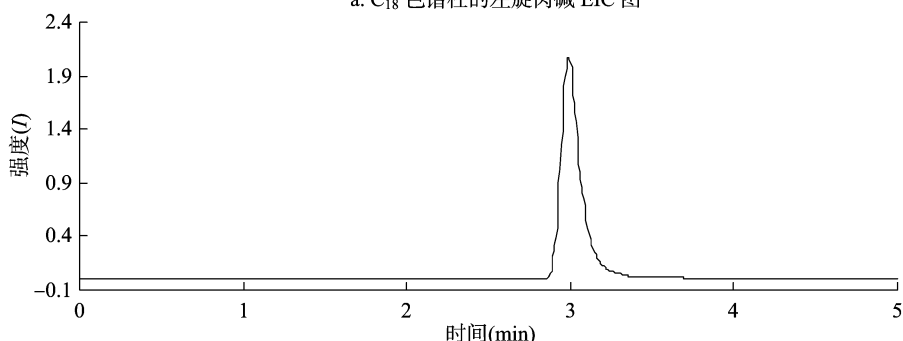
2 结果与分析

2.1 LC-MS 仪器条件的优化

左旋肉碱为极性化合物,本研究分别考察 C₁₈ 色谱柱、HILIC 色谱柱的分离效果,以 80% 乙腈-20% 水(20 mmol/L 甲酸铵, pH 值为 2.3)为流动相,由于左旋肉碱的极性较强, C₁₈ 柱峰型不佳且拖尾现象明显,而 HILIC 柱对左旋肉碱的保留时间适中且峰形佳,适合定量分析。图 2-a 为 C₁₈ 柱左旋肉碱的提取离子 EIC 图,图 2-B 为 HILIC 色谱柱左旋肉碱的提取离子 EIC 离子图。左旋肉碱在电喷雾正离子化方式下主要生成 $[M+H]^+$ (m/z :162.2),因此选择 $[M+H]^+$ 进行产物离子扫描,产生的主要碎片离子 m/z 为 103.1 和 64.0,将 m/z 为 103.1 的碎片离子作为定量离子,将 m/z 为 64.0 的碎片离子作为定性离子。整个检测过程为 5 min,出峰时间为 3 min 左右(图 2)。

2.2 样品提取优化

考察用不同含水量的有机提取液提取桃胶中左旋肉碱的效率,取 1 g 混合样桃胶粉末,加入 10 mL 提取液,提取液分别为体积分数为 90%、80%、70% 乙醇、甲醇和乙腈,按照“1.2.1”节的方法超声提取 1 h,取上清液,过滤后用 LC-MS/MS 测定其左旋肉碱含量。由图 3 可以看出,80% 甲醇

a. C₁₈ 色谱柱的左旋肉碱 EIC 图

b. HILIC 色谱柱的左旋肉碱 EIC 图

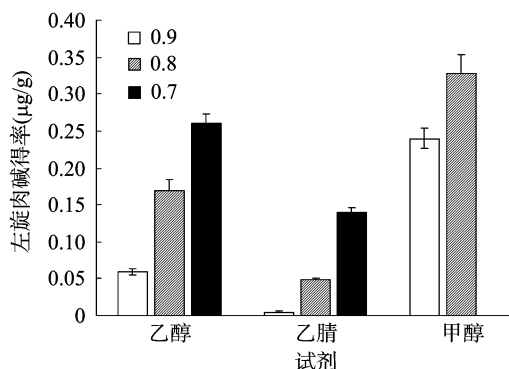
图2 左旋肉碱的 EIC 结果(m/z : 162.1→103.1)

图3 不同提取液提取桃胶中左旋肉碱的得率

的提取得率为 9 种提取液中最好的(当甲醇含水量大于 30% 时,桃胶泡发成黏稠状,无法分离上清)。因此,本研究选择 80% 甲醇提取左旋肉碱。

2.3 左旋肉碱的回收率与检出限

用 80% 甲醇按照“1.2.1”节的方法重复提取 7 份桃胶粉末,用 LC-MS/MS 测得左旋肉碱的均值为 288 $\mu\text{g}/\text{kg}$,相对标准偏差 (RSD) 为 4.9%。以 288 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 作为本底值,添加约 0.5、1.0、2.0 倍本底值的左旋肉碱标准物质到实际样品中,进行回收率试验,每个添加浓度平行重复 5 次。由表 1 可见,左旋肉碱的加标回收率为 89.7%~109.9%,相对标准偏差为 1.4%~4.5%。因此,本研究方法具有较好的回收率,能够满足实际样品的分析要求。

取储备液逐级稀释,进样量设为 5 μL 。以信噪

比(S/N) = 3 计算左旋肉碱的检出限(LOD),以信噪比 = 10 计算其定量限(LOQ),并以标准品的质量进行计算。结果表明,左旋肉碱的 LOD 为 5.0 pg/g , LOQ 为 15.1 pg/g ,能够满足实际样品分析对检测限的需求。

表 1 桃胶样品中左旋肉碱的回收率 ($n=5$)

左旋肉碱添加量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	本底测定值		加标回收率(%)	
	测定均值($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD (%)	均值	RSD
140	288	3.5	109.9	1.4
280	288	3.5	93.6	2.6
560	288	3.5	89.7	4.5

2.4 标准曲线与线性范围

利用 LC-MS/MS 分析 10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 系列标准溶液。以标准样品的峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标绘制标准曲线,得到线性方程为 $y = 274.9x + 815.8$, $r^2 = 0.995$ 。结果表明,在质量浓度为 10~100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 范围内时,左旋肉碱的线性关系良好。

2.5 精密度与重现性

分别对质量浓度为 10、20、100 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的标准溶液进行 5 次连续进样,计算 5 次测定值的平均值和变异系数(CV),考察方法的精密度。由表 2 可见,针对不同浓度的左旋肉碱标准溶液进行连续进样后,3 个质量浓度水平的 CV 为 1.0%~3.1%,表明

该方法随机误差较小,具有较好的精密度。通过同一台仪器、同一实验员同一天对定值配方粉进行重复测定($n=7$),考察方法的日内精密度;通过同一台仪器、同一实验员连续 3 d 对定值配方粉进行重复测定($n=7$),考察方法的日间精密度。结果显示,日内精密度和日间精密度良好, CV 分别为 3.2% 和 8.0%。

表 2 3 个不同浓度水平标准溶液测定值的精密度 ($n=5$)

质量浓度 ($\mu\text{g/L}$)	测定值 ($\mu\text{g/L}$)	CV (%)
10	9.7 ± 0.3	3.1
20	21.2 ± 0.5	2.4
100	105.1 ± 1.0	1.0

2.6 样品含量的测定

取 6 月份采集于浙江省的 6 批不同品种的桃胶样品,粉碎后分别准确称取 1 g,每个样品设 3 个平行,分别按照“1.2.1”节的方法对桃胶中的左旋肉碱含量进行测定。如表 3 所示,经本研究方法对 6 批桃胶样品进行定量分析,确定该 6 批原桃胶中的左旋肉碱含量为 160~330 $\mu\text{g/kg}$ 。左旋肉碱在动物红肉中含量丰富,在羊肉、牛肉中的含量较高,瑞士 LONZA 公司的数据显示,绵羊肉中的左旋肉碱含量达到 2 100 mg/kg,牛肉中的含量为 640 mg/kg,鸡肉中的含量为 75 mg/kg。目前的研究结果显示,左旋肉碱在植物中含量很少或基本没有,在椰菜花、花生中的含量为 1 mg/kg,橄榄、橙汁、菠菜叶中未检出左旋肉碱。原桃胶中左旋肉碱的含量尚达不到 GB 14880—2012《食品安全国家标准——食品营养强化剂使用标准》^[13] 中的含量范围,但其作为一种膳食兼备的天然植物源产品,还是含有一定量的左旋肉碱。原桃胶中不只含有桃胶多糖,研究原桃胶中的其他具体功能活性成分,可为后期桃胶功能型产品的开发与加工提供指导性建议。

表 3 浙江省 6 批桃胶样品左旋肉碱含量测定结果 ($n=3$)

编号	产地	品种	左旋肉碱含量 ($\mu\text{g/kg}$)
1	浙江省	1 [#] 油桃	271
2	浙江省	2 [#] 油桃	330
3	浙江省	3 [#] 油蟠桃	221
4	浙江省	24 [#] 普通桃	234
5	浙江省	27 [#] 普通桃	160
6	浙江省	45 [#] 油蟠桃	197

3 结论

本研究利用超声波辅助提取技术和高效液相色谱-串联质谱仪对原桃胶中的左旋肉碱进行定量分析。结果显示,1 g 原桃胶经 80% 甲醇于 60 $^{\circ}\text{C}$ 、300 W 超声提取 1 h 所得左旋肉碱得率最高。左旋肉碱在相应含量范围内的线性良好, $r^2=0.995$,加标回收率和检测限定量限均满足要求。利用本研究建立的分析方法,测得 6 批桃胶样品中左旋肉碱的得率为 160~330 $\mu\text{g/kg}$ 。

目前,评价桃胶的品质标准并不完善,还需从多方面做更详细的研究。一方面是应加大对其含量最多的桃胶多糖的生理作用机制的研究;另一方面,应加大对除桃胶多糖外其余的生理活性成分的定性定量研究;最后,桃胶作为采后可直接食用的食材,农药残留风险也是需要关注的重点。由此看出,原桃胶的价值研究需要投入更多关注。

参考文献:

[1]侯永发,李淑秀,吴 庄. 桃胶的理化性质及化学组成的研究(简报)[J]. 林产化学与工业,1986,6(1):39-42.

[2]潘文昭. 桃树胶的药用[J]. 农村新技术,2012(4):43.

[3]黄雪松. 桃胶的性质、加工及其开发利用[J]. 特产研究,2004(1):47-51.

[4]洪郁之,朱丽萍,徐玉萍. 桃树胶缓解餐后高血糖效应观察[J]. 中国糖尿病杂志,1999,7(5):309-310.

[5]郑依玲,董鹏鹏,梅全喜. 桃胶特性化学成分药理作用及临床应用研究进展[J]. 时珍国医国药,2017,28(7):1728-1730.

[6]Yao X C, Cao Y, Wu S J. Antioxidant activity and antibacterial activity of peach gum derived oligosaccharides [J]. International Journal of Biological Macromolecules,2013,62:1-3.

[7]张 璇. 桃树胶研究进展[J]. 粮食与食品工业,2011,18(1):29-31,36.

[8]Gülçin I. Antioxidant and antiradical activities of l-carnitine [J]. Life Sciences,2005,78(8):803-811.

[9]黄宗锈,林 健,林春芳. 左旋肉碱对肥胖人员减肥作用的效果观察[J]. 预防医学论坛,2007,13(1):6-8.

[10]周友亚,王 雪. 左旋肉碱的生理功能及应用进展[J]. 河北师范大学学报(自然科学版),2001,25(1):100-101.

[11]张朝晖,李建辉,崔凤云,等. 高效液相色谱-质谱联用法测定乳品中的左旋肉碱[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(11):4336-4340.

[12]杨晓惠,郑 侠,夏 玉. 左旋肉碱的分析方法[J]. 检测与标准,2018,43(2):40-43.

[13]中华人民共和国卫生部. 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准:GB 14880—2012[S].