



中华人民共和国国家标准

GB 5413.20—2013

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定

2013-11-29 发布

2014-06-01 实施

中华人民共和国
国家卫生和计划生育委员会 发布

前 言

本标准代替 GB/T 5413.20—1997《婴幼儿配方食品和乳粉 胆碱的测定》。

本标准与 GB/T 5413.20—1997 相比,主要变化如下:

- 修改了标准的中文名称;
- 修改了用于酶反应的显色剂成分;
- 增加了第二法雷氏盐分光光度法。

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定。

第一法 酶比色法

2 原理

试样中的胆碱经酸水解后变成游离态的胆碱,再经酶氧化后与显色剂反应生成有色物质,其颜色的深浅在一定浓度范围内与胆碱含量成正比。

3 试剂和材料

注:除非另有说明,本标准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 三羟甲基氨基甲烷 $[(\text{CH}_2\text{OH})_3\text{CNH}_2]$ 。

3.1.2 苯酚($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$)。

3.1.3 浓盐酸(HCl)。

3.1.4 氢氧化钠(NaOH)。

3.1.5 胆碱氧化酶:置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

3.1.6 过氧化物酶:置于 $2\text{ }^\circ\text{C}\sim 8\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

3.1.7 4-氨基安替比林($\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$)。

3.1.8 磷脂酶 D:置于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。

3.2 试剂配制

3.2.1 盐酸(1 mol/L):量取 85 mL 浓盐酸加水稀释至 1 000 mL。

3.2.2 盐酸(3 mol/L):量取 125 mL 浓盐酸加水稀释至 500 mL。

3.2.3 Tris 缓冲溶液(0.05 mol/L): $\text{pH}=8.0\pm 0.2$ 。

称取 6.057 g 三羟甲基氨基甲烷溶于 500 mL 蒸馏水中,用 1 mol/L 盐酸调 pH 至 8.0 ± 0.2 ,用蒸馏水定容至 1 000 mL。此溶液在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中可保存 1 个月。

3.2.4 用于酶反应的显色剂:取 100~120 活力单位的胆碱氧化酶、250 个~280 个活力单位的过氧化物酶、75 个~100 个活力单位的磷脂酶 D、15 mg 4-氨基安替比林、50 mg 苯酚置于 100 mL 的容量瓶中,用 0.05 mol/L Tris 缓冲溶液稀释至刻度。临用时配制。

3.2.5 氢氧化钠溶液(500 g/L):称取 500 g 氢氧化钠,溶于水并稀释至 1 000 mL。

3.3 标准品

胆碱酒石酸氢盐标准品($C_9H_{19}NO_7$):纯度 $\geq 99\%$ 。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 胆碱氢氧化物标准贮备溶液(2.5 mg/mL):称取在 $102\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 烘至恒重的胆碱酒石酸氢盐 523 mg 置于 100 mL 容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度。冷藏于 $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中,保存不超过 1 周。

3.4.2 胆碱氢氧化物标准工作溶液(250 $\mu\text{g/mL}$):吸取 10.0 mL 标准贮备溶液于 100 mL 容量瓶中,用水稀释至刻度。临用时配制。

4 仪器和设备

4.1 天平:感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

4.2 恒温水浴锅:温度可控制在 $70\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 和 $37\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 。

4.3 pH 计:精度 0.01。

4.4 分光光度计。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 固体试样

称取 5 g(精确到 0.01 g)混合均匀的试样,于 100 mL 的锥形瓶中,加入 30 mL 盐酸溶液(3.2.1)。

5.1.2 液体试样

称取 20 g(精确到 0.01 g)混合均匀的试样,于 100 mL 的锥形瓶中,加入 10 mL 盐酸溶液(3.2.2)。

5.1.3 水解

将装有试样的容器放在 $70\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴中,加塞混匀,水解 3 h(每隔 30 min 振摇一次),冷却。用氢氧化钠溶液调 pH 为 3.5~4.0,转入 50 mL 容量瓶中,用蒸馏水定容至刻度。

5.1.4 过滤

过滤水解液(5.1.3)。滤液应是澄清的,否则,用 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 的滤膜再次过滤。滤液放在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 的冰箱中可以保存 3 d。

5.2 测定

5.2.1 标准曲线的制作

分别吸取 2 mL、4 mL、6 mL、8 mL 胆碱氢氧化物标准工作溶液于 10 mL 的容量瓶中,用蒸馏水稀释至刻度。准备 6 支试管,一个试管用作试剂空白(A),另五支试管由 1 至 5 编号,分别用于标准溶液和标准溶液的四个稀释度。按表 1 加入试剂。

表 1 制作标准曲线时的试剂添加量

单位为毫升

试剂	管 A	管 1	管 2	管 3	管 4	管 5
稀释度 1/(50 μg/mL)	—	0.100	—	—	—	—
稀释度 2/(100 μg/mL)	—	—	0.100	—	—	—
稀释度 3/(150 μg/mL)	—	—	—	0.100	—	—
稀释度 4/(200 μg/mL)	—	—	—	—	0.100	—
标准溶液/(250 μg/mL)	—	—	—	—	—	0.100
蒸馏水	0.100	—	—	—	—	—
发色剂	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00	3.00

用密封保护膜盖住试管,混匀,把试管置于 37 °C 水浴中保温反应 15 min。

5.2.2 试样的测定

将每个试样准备 2 支试管(B、C),按表 2 加入试剂。

表 2 测定试样时的试剂添加量

单位为毫升

试剂	试管 B 滤液空白	试管 C 试样
待分析滤液	0.100	0.100
蒸馏水	3.00	—
发色剂	—	3.00

用密封保护膜盖住试管,混匀。把试管置于 37 °C 水浴中保温反应 15 min。

5.2.3 比色测定

将试样及标准系列溶液从水浴中取出,冷却至室温。在波长 505 nm 处,用蒸馏水作空白,测定吸光值。以胆碱标准溶液的浓度为横坐标,以标准溶液的吸光值减去试剂空白的吸光值为纵坐标,制作标准曲线。

6 分析结果的表述

6.1 净吸光值的计算

通常新鲜配制的试剂会产生轻微颜色,且由于水解作用滤液也不是无色的,为了除去这些干扰因素,应从总吸光值中减去各自的空白值(管 A 和管 B)。

试样净吸光值计算如式(1)所示:

$$A = A_{\text{tot}} - A_{\text{bl}} - A_{\text{ex}} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- A —— 试样净吸光值;
- A_{tot} —— 总吸光值(管 C);
- A_{bl} —— 试剂吸光值(管 A);

A_{ex} ——滤液吸光值(管 B)。

A_{bl} 和 A_{ex} 不应大于总吸光值的 20%，对于标准曲线， $A_{ex} = 0$ 。

6.2 胆碱含量的计算

在标准曲线上查出净吸光值的位置，并记下相应的浓度 c ，以每 100 g 试样中胆碱氢氧化物的毫克数表示胆碱的含量(X)，单位为(mg/100 g)，试样中的胆碱氢氧化物含量按式(2)计算：

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

式中：

X ——试样中的胆碱氢氧化物含量，单位为毫克每百克(mg/100 g)；

c ——自标准曲线上查得的胆碱氢氧化物的浓度，微克每毫升($\mu\text{g/mL}$)；

V ——水解液被稀释的体积(通常为 50 mL)，单位为毫升(mL)；

m ——试样的质量，单位为克(g)；

1 000 ——换算系数。

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，结果保留整数位。

7 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 8%。

8 其他

方法检出限为 1 mg/100 g，定量限为 3 mg/100 g。

第二法 雷氏盐分光光度法

9 原理

试样中的胆碱用氢氧化钡-甲醇-三氯甲烷混合溶液水解抽提，经弗罗里硅土层析净化，与雷纳克铵盐溶液形成粉红色的胆碱雷纳克铵盐，用丙酮溶解洗脱，于 526 nm 测定吸收值。在一定浓度范围内，胆碱雷纳克铵盐颜色的深浅与其含量成正比。

10 试剂和材料

注：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。

10.1 试剂

10.1.1 弗罗里硅土：100 目~200 目，650 °C 活化。

10.1.2 甲醇(CH₃OH)。

10.1.3 三氯甲烷(CHCl₃)。

10.1.4 氢氧化钡[Ba(OH)₂ · 8H₂O]。

10.1.5 冰乙酸(CH₃COOH)。

10.1.6 乙酸甲酯(C₃H₆O₂)。

10.1.7 丙酮(CH_3COCH_3)。

10.1.8 雷纳克铵盐($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{CrN}_7\text{S}_4$)。

10.2 试剂配制

10.2.1 饱和氢氧化钡-甲醇-三氯甲烷溶液:称取 6 g 氢氧化钡溶于 100 mL 甲醇中,放入超声波中溶解后,加入 10 mL 三氯甲烷,混匀。

10.2.2 冰乙酸-甲醇溶液(1+10):1 体积冰乙酸与 10 体积甲醇混合。

10.2.3 雷纳克铵盐溶液:称取 0.25 g 雷纳克铵盐,加入 10 mL 水中,放入超声波中溶解后过滤,临用时配制。

10.3 标准品

胆碱酒石酸氢盐($\text{C}_9\text{H}_{19}\text{NO}_7$):纯度 $\geq 99\%$ 。

10.4 标准溶液配制

胆碱酒石酸氢盐标准溶液(1 g/L):准确称取在 $102\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 烘至恒重的胆碱酒石酸氢盐 0.100 0 g,用蒸馏水定容至 100 mL 容量瓶中。冷藏于 $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中,保存不超过 1 周。

11 仪器和设备

11.1 天平:感量为 0.01 g 和 0.1 mg。

11.2 回流装置:250 mL 磨口锥形瓶及回流装置。

11.3 恒温水浴锅:温度可控制在 $79\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 。

11.4 层析柱:长约 10 cm、内径 1 cm 的带 50 mL 杯口的玻璃柱。

11.5 分光光度计。

12 分析步骤

12.1 试样制备

称取固体试样 10 g(精确到 0.01 g),称取液体试样 20 g(精确到 0.01 g)于磨口锥形瓶中,加入 50 mL 氢氧化钡-甲醇-三氯甲烷提取液。混合均匀后接入回流装置,于 $79\text{ }^\circ\text{C} \pm 2\text{ }^\circ\text{C}$ 的水浴锅内水解抽提 4 h。每隔 1 h 振荡一次,以避免试样结块。水解抽提结束后,取出锥形瓶冷却至室温,过滤。滤渣用冰乙酸-甲醇混合液洗涤 3 次~4 次,洗液一并收集于 100 mL 容量瓶中。用甲醇定容至刻度,混匀。

12.2 标准曲线的绘制

12.2.1 层析柱制备

用乳胶管连接层析柱与滴头,用少量脱脂棉堵住层析柱底部,倒入约 5 cm 左右高的弗罗里硅土,用甲醇浸湿,备用。

12.2.2 层析

分别吸取胆碱标准溶液 0 mL、1.0 mL、2.0 mL、3.0 mL、4.0 mL、5.0 mL 注入层析柱中,当溶液完全进入柱床后,依次用 5 mL 和 10 mL 甲醇,20 mL 乙酸甲酯洗涤层析柱。再加入 5 mL 雷纳克铵盐溶液,用适量的冰乙酸洗去过量的雷纳克铵盐,直至层析柱上无雷纳克铵盐附着处呈现硅土原有的白色。

用丙酮洗脱粉红色的胆碱雷纳克铵盐,收集于 10 mL 的容量瓶中,用丙酮定容(如果洗脱液混浊需过 0.45 μm 的滤膜)。在波长 526 nm 处测定溶液的吸光值,以胆碱酒石酸氢盐含量为横坐标(m_x),吸光值为纵坐标绘制标准曲线。

12.3 试样的测定

吸取 10 mL 试样水解液(12.1)于层析柱中,其余操作按照 12.2.2 进行。自标准曲线上查得 10 mL 试样水解液中胆碱酒石酸氢盐的含量。

13 分析结果的表述

试样中的胆碱以胆碱氢氧化物计,以毫克每百克(mg/100 g)表示,按式(3)计算:

$$X = \frac{m_x}{\frac{m}{100} \times V} \times 100 \times 0.474 \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

- X —— 试样中胆碱氢氧化物的含量,单位为毫克每百克(mg/100 g);
- m_x —— 从标准曲线上查得胆碱酒石酸氢盐的含量,单位为毫克(mg);
- m —— 试样的质量,单位为克(g);
- V —— 层析时吸取试样水解液的体积,单位为毫升(mL);
- 0.474 —— 胆碱酒石酸氢盐转化为胆碱氢氧化物的系数。

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,结果保留整数位。

14 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 10%。

15 其他

方法检出限为 2 mg/100 g,定量限为 5 mg/100 g。