



中华人民共和国食品安全国家标准

GB ××××—××××
代替GB/T 5413.20—1997

婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定

Determination of choline in foods for infants and young children,

raw milk and dairy products

(征求意见稿)

××××-××-××发布

××××-××-××实施

中华人民共和国卫生部 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 5413.23—1997相比，主要变化如下：

- 改变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；第三法离子色谱法。

本标准的附录A为资料性附录。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- GB 5413—1985、GB/T 5413.23—1997。

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。

本标准第一法、第二法适用于婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定；第三法适用于婴幼儿食品和乳粉中胆碱的测定。

本标准第一法检出限为 20mg/kg；第二法检出限为 50mg/kg；第三法检出限为 2 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准；然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T6682 分析实验室用水规格和试验方法

第一法 酶比色法

3 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。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T6682 规定的三级水。

4.1 0.05mol/L Tris 缓冲溶液（pH 8.0）：含质量分数 0.05% 的苯酚。

在注入约 500mL 蒸馏水的 1000mL 容量瓶中溶入 6.057g 三羟甲基氨基甲烷和 0.5g 苯酚，再用蒸馏水稀释至刻度。如需要可用 6mol/L 的盐酸调至 pH 至 8.0。

4.2 用于酶反应的显色剂

在一个 50mL 的容量瓶内溶入 7.81mg 胆碱氧化酶（12.8U/mg），1.31mg 过氧化物酶（190 U/mg），7.5mg 4-氨基安替比林和 0.02mg 磷脂酶，用 Tris 缓冲溶液（4.1）稀释至刻度。

4.3 盐酸：c（HCL）为 3mol/L。吸取 125mL 浓盐酸加水稀释至 500mL。

4.4 盐酸：c（HCL）为 1mol/L。吸取 42mL 浓盐酸加水稀释至 500mL。

4.5 氢氧化钠溶液：质量分数为 60%。

4.6 标准溶液：含胆碱氢氧化物 250ug/mL。

在 100mL 容量瓶中溶入 523mg 胆碱酒石酸氢盐（ $C_5H_{14}NO \cdot C_4H_5O_6$ ），用蒸馏水稀释至刻度。用刻度吸管吸取该溶液 10mL 于 100mL 容量瓶中并用蒸馏水稀释至刻度。

5 仪器和设备

5.1 电子天平：感量 0.01g。

5.2 分析天平：感量 0.1mg。

5.3 回流抽提器：250mL 的平底磨口烧瓶及回流装置。

5.4 分光光度计。

6 分析步骤

6.1 试样的制备

用混合或研磨的方法将试样均匀化，以 0.01g 的精确度准确称取试样，使其胆碱含量约为 1~10mg（以氢氧化物计算）。

6.1.1 固体试样

称取 5g 混合均匀的试样于 250mL 的平底磨口烧瓶中，加入 30mL 盐酸（4.4），搅拌。

6.1.2 液体试样

称取 20g 混合均匀的试样于 250mL 的平底磨口烧瓶中，加入 10mL 盐酸溶液（4.3），搅拌。

6.1.3 水解

将装有试样的容器与回流装置连接，在 70℃水浴中加热 5h，同时磁力搅拌。冷却。用氢氧化钠溶液（4.5）调至 pH 值为 3.4~3.6。若有必要的话再次冷却，并转入 50mL 容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度。

6.1.4 过滤

过滤水解液（6.1.3）。滤液应是澄清的，如果不澄清，通过 0.45um 的滤膜再次过滤。如果因试样的性质得不到澄清滤液，或者过滤困难，调 pH 值至 4.0~4.5。

6.2 测定

6.2.1 试样测定

将每个试样准备 3 支试管（A, B, C），按表 1 加入试剂。

表1

mL

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

用密封保护膜盖住试管，混匀。把试管置于37℃水浴中保温反应10min。

6.2.2 标准曲线制作

用刻度吸管移取2, 4, 6, 8mL标准溶液（4.6）于4支10mL的容量瓶内，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2加入试剂。

表2

mL

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

用密封保护膜盖住试管，混匀，把试管置于37℃水浴中保温反应10min。

6.2.3 比色测定

将试样及标准溶液系列从水浴中取出，冷却至室温。调整分光光度计波长至505nm，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为纵坐标，制作工作曲线，并在工作曲线上查得试样水解液中胆碱的浓度。

7 结果计算和表示

7.1 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，应该从总吸光值中减去各自的空白值（管A和管B）。

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

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} ——抽提液吸光值（管B）。

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

7.2 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100g试样中胆碱氢氧化物的毫克数表示的胆碱含量(X)，单位为(mg/100g)，按下式计算：

$$X = \frac{c \times V \times 100}{m \times 1000}$$

式中：

X ——试样中的胆碱含量，mg/100g；

c ——自标准曲线上查得的胆碱的浓度，ug/100g；

V ——水解液被稀释的体积（通常为50mL），mL；

m ——试样的质量，g。

以两次独立测定结果的算术平均值为测定结果，小数点后保留一位小数。

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8%。

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—氯仿混合溶液水解抽提，经弗罗里硅土层析净化，在层析柱子上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526nm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

除非另有规定，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 弗罗里硅土：60-120目，650℃活化。

10.2 甲醇。

10.3 丙酮。

10.4 冰乙酸。

10.5 乙酸甲酯。

10.6 冰乙酸—甲醇溶液(体积比1:10)。

10.7 饱和氢氧化钡—甲醇—氯仿溶液：称取5g无水氢氧化钡溶于100mL甲醇中，搅拌5~10min后，加入10mL氯仿，混匀。

10.8 雷纳克铵盐(Ammonium Reineckate)溶液：称取2.5g雷纳克铵盐(精确至0.1g)，加入100mL水中，搅拌10min，过滤除去多余的盐，使用当天配置。

10.9 胆碱标准溶液：胆碱酒石酸氢盐溶液($C_5H_{14}NO \cdot C_4H_5O_6$) 1g/L。

称取预先在干燥器中干燥2h以上的胆碱酒石酸氢盐1.0000g(精确至2mg)，用蒸馏水溶入100mL容量瓶中并定容。

11 仪器和设备

11.1 电子天平：感量0.1g。

11.2 分析天平：感量0.1mg。

11.3 回流装置：250mL磨口三角瓶及回流装置。

11.4 水浴锅。

11.5 层析柱：长约10cm、内径1cm的带50mL杯口的玻璃柱。

11.6 分光光度计。

12 分析步骤

12.1 试样的制备

固体试样称取 10g, 液体试样称取 20g 混合均匀的试样(精确至 0.01g)于磨口三角瓶中, 加入 50mL 氢氧化钡-甲醇-氯仿抽提液(10.7)。混合均匀后接入回流装置, 于 79±2℃的水浴内水解抽提 4 h。每隔 30min 震荡一次, 以避免试样结块。水解抽提结束后, 取出三角瓶冷却至室温, 过滤。滤渣用冰乙酸-甲醇混合液(10.6)洗涤 3~4 次, 洗液一并收集于 100mL 容量瓶中。用甲醇定容至刻度, 混匀。

12.2 净化与显色

12.2.1 层析柱的准备

用乳胶管将层析柱底部柱口与滴头连接, 用少量脱脂棉堵住层析柱底部, 将弗罗里硅土倒入柱中约 5cm 左右长度, 加入甲醇溶液, 使层析柱完全浸湿。

12.2.2 净化

待甲醇溶液完全进入层析柱后, 加入 10mL 试样水解液(12.1)。当试样水解液完全进入柱床后, 依次用 5mL 和 10mL 甲醇(10.2), 20mL 乙酸甲酯(10.5)洗涤层析柱。然后加入 5mL 雷纳克铵盐。待雷氏盐溶液完全进入柱床后, 用适量的冰乙酸(10.4)洗去过量的雷纳克铵盐, 直至层析柱上无胆碱雷氏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氏盐, 收集于 10mL 的容量瓶中, 用丙酮定容。(如果洗脱液混浊需过 0.45μm 的滤膜。)

12.2.3 标准曲线的绘制

分别吸取胆碱标准溶液 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0mL 注入层析柱中, 其余操作按照试样净化步骤(12.2.2)进行, 收集粉红色的胆碱雷纳克盐丙酮溶液, 用丙酮定溶于 10mL。

12.3 比色

以丙酮为参比, 于 526nm 处测定试样及标准溶液系列的吸光值, 以胆碱酒石酸氢盐含量为横坐标 (m_x), 吸光值为纵坐标, 制得一条通过圆点的标准曲线。自标准曲线上查得 10mL 试样水解中胆碱酒石酸氢盐的含量。

13 分析结果计算与表示

试样中的胆碱以胆碱氢氧化物计, 以克每百克 (g/100g) 表示, 按下式计算:

$$X = \frac{m_x}{\frac{m}{100} \times V} \times 100 \times 0.474 \dots \dots \dots (2)$$

式中:

X ——试样中胆碱氢氧化物的含量, mg/100g;

m ——试样的质量, g;

V ——层析时吸取试样水解液的毫升数, mL;

m_x ——从标准曲线上查得胆碱酒石酸氢盐的含量, mg;

0.474——胆碱酒石酸氢盐转化为胆碱氧化物的系数。

计算结果以两次独立测定结果算术平均值表示, 小数点后保留一位小数。

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 8%。

第三法 离子色谱法

15 原理

试样经盐酸水解, 生成游离胆碱。阳离子交换柱分离, 电导检测器检测, 外标法定量。

16 试剂和材料

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

- 16.1 丙酮：色谱纯。
- 16.2 酒石酸：分析纯。
- 16.3 浓盐酸：分析纯。
- 16.4 氯化胆碱（ $C_5H_{14}NClO$ ）：纯度不低于 99.0%。
- 16.5 盐酸溶液（1 mol/L）：量取 90 mL 盐酸，加适量水稀释，定容到 1000 mL。
- 16.6 胆碱标准溶液（1 mg/mL）：将氯化胆碱 105 °C 干燥恒重，称取 0.139 g（精确至 0.1 mg），置于 100 mL 容量瓶中，加水溶解，定容至刻度，配成 1 mg/mL 的胆碱标准溶液（以胆碱计）。该溶液现用现配。
- 16.7 胆碱标准系列工作溶液：分别准确吸取 1 mL、2 mL、5 mL、10 mL、20 mL 胆碱标准溶液，置于 100 mL 容量瓶中，用水定容至刻度。该标准系列浓度分别为 10 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L。
- 16.8 离子色谱淋洗储备液：称取酒石酸 6 g（精确至 0.1 g）于 1000 mL 容量瓶中，加水溶解，加入 175 mL 丙酮，用水定容至刻度。该溶液于 4 °C 可保存 1 个月。
- 16.9 离子色谱淋洗液（0.004 mol/L 酒石酸丙酮水溶液）：取 100 mL 离子色谱淋洗储备液加入到 1000 mL 的容量瓶中，用水定容至刻度。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤。
- 16.10 微孔滤膜，粒径为 0.45 μm，水相。
- 16.11 具塞锥形瓶。

17 仪器和设备

- 17.1 离子色谱仪：配有电导检测器。
- 17.2 恒温水浴锅。
- 17.3 分析天平：感量 0.1 mg。

18 分析步骤

18.1 试样处理

称取混匀试样 5 g（精确至 0.01 g）于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 30 mL 盐酸溶液，摇匀，于 70 °C 恒温水浴锅中水解 3 h（每隔 1 h 振摇一次，避免奶粉贴壁），取出冷却至室温。将水解液转移至 50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，滤纸过滤，滤液用 0.45 μm 滤膜过滤，待测。

18.2 离子色谱参考条件

色谱柱：Metrosep C4 100 mm×4.0 mm，粒径 5 μm 或相当者；
淋洗液：0.004 mol/L 酒石酸丙酮水溶液；
流速：0.9 mL/min；
进样量：20 μL；
检测器：电导检测器。

18.3 测定

将标准系列工作溶液和试液分别进样，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量，试液中胆碱的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应稀释后再进样分析。在上述色谱条件下，标准溶液及试液的色谱图参见附录 A。

18.4 平行试验

按以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

19 结果计算

离子色谱测定结果可由仪器工作站自动计算，也可按公式（3）计算：

$$X = \frac{c \times V}{m} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

- X ——试样中胆碱的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
 c ——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
 V ——试样的最终体积，单位为毫升（mL）；
 m ——试样质量的数值，单位为克（g）。

20 精密度

本标准的精密度数据是按照GB/T 6379.2规定确定的，重复性和再现性的值以95 %的可信度来计算。

20.1 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限（ r ），本标准的重复性方程见表1。

20.2 再现性

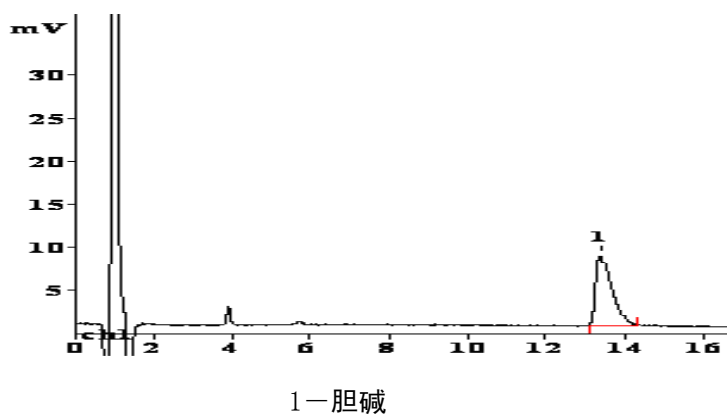
在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限（ R ），本标准的再现性方程见表1。

表1 重复性和再现性方程

名称	重复性限 r	再现性限 R
胆碱	$\text{Lg } r = -0.594 + 0.461 \text{ lg } m$	$\text{Lg } R = -1.211 + 0.903 \text{ lg } m$
M 为两次测定值的平均值，单位为毫克每千克（mg/kg）。		

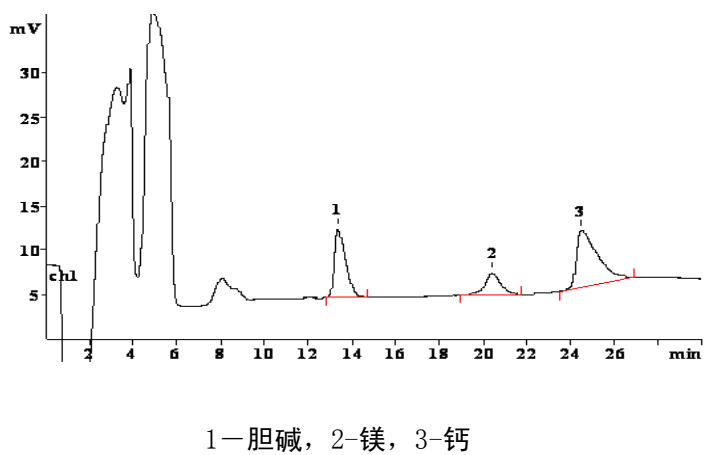
附录 A
(资料性附录)
婴幼儿配方乳粉中胆碱测定色谱图

胆碱标准物质的离子色谱图，见图 A.1。



A.1 胆碱标准物质的离子色谱图

婴幼儿配方乳粉的离子色谱图，见图 A.2。



A.2 婴幼儿配方乳粉的离子色谱图