

离子色谱法和酶比色法测定婴幼儿配方乳粉中胆碱的比较研究

赵丹¹, 张浩¹, 郝果^{2*}, 李凤³, 王国丽², 张雪⁴

(1.陕西圣唐乳业有限公司, 陕西 富平 711700; 2.陕西省羊乳产品质量监督检验中心, 陕西 富平 711799; 3.富平县市场监督管理局, 陕西 富平 711700; 4.陕西博羚乳业有限公司, 陕西 富平 711700)

摘要: 本研究采用离子色谱法及酶比色法对婴幼儿配方乳粉中胆碱进行了测定, 比较了两种方法标准曲线、精密度、重复性、再现性、加标回收率、检测成本等方面, 发现离子色谱法较酶比色法具有更好的线性, 呈现更好的精密度、重复性和再现性, 在后续检测成本成本控制上更具优势, 所以离子色谱法更适于婴幼儿乳粉中胆碱含量的测定, 对于婴幼儿配方食品企业和检验检测机构提升检测水平、控制检测成本具有重要意义。

关键词: 婴幼儿配方乳粉; 胆碱; 离子色谱法; 酶比色法; 比较

胆碱, 2-羟基-N, N, N-三甲乙铵, 分子式为 $C_5H_{15}NO_2$, 是磷脂和乙酰胆碱的构成成分, 参与脂肪代谢以及神经冲动的传递, 参与蛋氨酸、肌酸、肾上腺素等化合物的合成^[1], 促进大脑发育、提高记忆力; 能将脂肪和胆固醇乳化, 防止胆固醇积蓄在动脉壁或胆囊中; 能进入脑细胞, 生成能帮助记忆的物质。婴幼儿羊奶粉中胆碱的含量是其营养成分的主要表征之一, 以键合型和游离型两种形式存在。键合型的胆碱主要以卵磷脂和神经鞘磷脂的形式存在。为了检测奶粉中的胆碱总含量, 采用盐酸酸水解, 释放结合型胆碱, 将胆碱以游离的形式完全释放出来^[2]。

进入 21 世纪, 检测领域及食品行业都在努力与国际接轨, 新的形势下对食品的质量控制, 尤其是婴幼儿配方食品提出了更加严格的标准要求。我国也于近年对 2010 版的婴幼儿配方食品标准进行了修订, 修定的 GB 10765-2021^[3]、GB 10766-2021^[4]及 GB 10767-2021^[5]于 2023 年 2 月 22 日实施, 且将 1 段和 2 段中胆碱由可选择成分修改为必须成分, 3 段胆碱仍为可选择成分, 但绝大多数厂家 3 段奶粉势必也会强化胆碱含量, 增加市场卖点。

基金项目: 陕西省重点研发计划项目 (2024GH-YBXM-16)

第一作者简介: 赵丹, 男, 1992 年生, 本科学历, 陕西圣唐乳业有限公司检测中心主任、技术负责人, 研究方向为乳制品检测。

*通讯作者: 郝果, 女, 1985 年生, 高级工程师, 研究方向为乳制品检测。

胆碱测定的主要方法包括酶比色法、雷氏盐分光光度法、离子色谱法、液相色谱-串联质谱法等，与此同时，GB 5413.20-2022《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定》^[6]于2022年12月30日实施，标准延用了酶比色法并且增加了离子色谱法；其中酶比色法较为常见，但实验操作复杂、检测费用昂贵、前处理时间长等因素导致其检测成本高，故开展离子色谱法对胆碱进行测定具有多重意义。

本研究采用离子色谱法及酶比色法对婴幼儿配方乳粉中胆碱进行了测定，对两种方法标准曲线线性、精密度、重复性、再现性、加标回收率、后续检测成本等指标对比分析，为婴幼儿乳粉生产企业和检验检测机构提供技术指导。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器设备

离子色谱法：离子色谱仪（ICS-5000+DC，配有电导检测器，Thermo Fisher）；涡旋振荡器（VORTEX GENIE 2，SI公司）；恒温水浴锅（HH-6，常州国华电器有限公司）；电子天平（d=1mg，梅特勒-托利多仪器有限公司）。

酶比色法：分光光度计（960，上海仪电）；恒温水浴锅（HH-6，常州国华电器有限公司）；电子天平（d=1mg，梅特勒-托利多仪器有限公司）；PH计（FE28，梅特勒-托利多仪器有限公司）。

1.2 试剂

离子色谱法：浓盐酸（分析纯，国药集团化学试剂有限公司）；甲烷磺酸（色谱纯，上海麦克林生化科技股份有限公司）；试验用水均为超纯水。

酶比色法：三羟甲基氨基甲烷；苯酚、浓盐酸、氢氧化钠、4-氨基安替比林、胆碱氧化酶、过氧化物酶、磷脂酶D，均为分析纯。

胆碱酒石酸氢盐标准品：纯度≥99%，生产厂家：Sigma，货号C1629。

1.3 试验方法

1.3.1 标准溶液的配制

离子色谱法：胆碱（以胆碱氢氧化物计，相对分子质量121.18）标准储备溶液（2500mg/L）：准确称取在102℃±2℃烘至恒重的胆碱酒石酸氢盐522.5mg，用水溶解并转移至100mL容量瓶中定容，混匀。4℃以下避光保存，有效期3个月。

胆碱标准工作液（100mg/L）：吸取2.0mL上述胆碱标准储备液于50mL容量瓶中，用15mmol/L的甲烷磺酸溶液定容，混匀，4℃以下避光保存，有效期1个月。

胆碱标准系列工作液：分别吸取上述胆碱标准工作溶液 2.00mL、3.00mL、4.00mL、5.00mL、6.00mL、7mL 于一组 100mL 容量瓶中，用 15mmol/L 的甲烷磺酸溶液定容混匀，配得胆碱浓度为 2.0mg/L、3.0 mg/L、4.0mg/L、5.0mg/L、6.0mg/L、7.0mg/L 的标准系列工作液，临用现配。

酶比色法：胆碱（以胆碱氢氧化物计，相对分子质量 121.18）标准储备溶液（5000mg/L）：准确称取在 102°C±2°C 烘至恒重的胆碱酒石酸氢盐 522.5mg，用水溶解并转移至 50mL 容量瓶中定容，混匀。4°C 以下避光保存，有效期 3 个月。

分别吸取 1.00mL、2.00mL、3.00mL、4.00mL、5.00mL、6.00mL 胆碱标准储备溶液（5000mg/L）于 50mL 的容量瓶中，用水定容至刻度，混匀，配制成浓度分别为 100.0mg/L、200.0mg/L、300.0mg/L、400.0mg/L、500.0mg/L、600.0 mg/L 的标准系列工作液。准备 7 支比色管，一个比色管用作试剂空白（A），加入 100μL 水，另 6 支比色管对应加入标准系列工作溶液各 100μL，再分别加入 3.00mL 显色剂，混匀，把比色管置于 37°C±2°C 水浴中保温反应 15min。

1.3.2 样品前处理

离子色谱法：称取 2.5g（精确到 0.001g）混合均匀的婴幼儿配方乳粉于 50mL 比色管中，加入 25mL 盐酸溶液（1mol/L），加塞混匀，至于 70°C±2°C 水浴中水解 3h（每隔 30min 振摇一次）后冷却至室温，转入 50mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀待用。取上述滤液 15mL 过 C₁₈ 固相小柱（C₁₈ 固相萃取柱使用前依次用 10mL 甲醇、15mL 水通过，静置活化 30min），弃去前 3mL，收集后面洗脱液待测。

酶比色法：准确称取 5g（精确至 0.001g）混合均匀的婴幼儿配方乳粉于 100mL 锥形瓶中，加入 1mol/L 的盐酸溶液 30mL，加塞混匀，至于 70°C±2°C 水浴中水解 3h（每隔 30min 振摇一次），冷却至室温备用。用氢氧化钠溶液（500g/L）调 PH 至 3.5-4.0，转入 50mL 容量瓶中，用水定容至刻度。用滤纸过滤水解液，若滤液不澄清，用 0.45μm 水性滤膜针头滤器再次过滤，收集滤液待测；准备 2 支比色管（B,C），均加入待分析溶液 100μL，比色管 B 加入 3.00mL 水，比色管 C 加入 3.00mL 显色剂，混匀，置于 37°C±2°C 水浴中保温反应 15min 后上机测定。

1.3.3 仪器条件

离子色谱仪：色谱柱：IonPac CS12A（4mm*250mm）；保护柱：IonPac CG12A（4mm*50mm）；检测器：电导检测器，配阳离子抑制器；淋洗液：15mmol/L 甲烷磺酸溶液，等度淋洗，采集时间 25min；流速：1.0mL/min；进样量：100μL。

分光光度计：波长 505nm。

1.3.4 线性

离子色谱法：用 15mmol/L 甲烷磺酸溶液配制胆碱 3 份浓度分别为 2.0mg/L、3.0 mg/L、4.0mg/L、5.0mg/L、6.0mg/L、7.0mg/L 的标准系列工作液。配得的标准系列工作液直接上机检测，以样品浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，对标准曲线进行拟合。

酶比色法：配制 3 份胆碱浓度分别为 0.0mg/L、100.0mg/L、200.0mg/L、300.0mg/L、400.0mg/L、500.0mg/L、600.0 mg/L 的标准系列工作容液，以样品浓度为横坐标，以吸光值为纵坐标，对标准曲线进行拟合。

1.3.5 精密度

精密度系指在规定的测试条件下，同一个均匀供试品，经多次取样测定所得结果之间的接近程度。精密度采用相对标准偏差表示。

1.3.6 重复性

将同一批次样品平行称取 14 份，各选取 7 份按照 1.3.1 的方法分别进行处理并测定胆碱含量。

1.3.7 再现性

1.3.7.1 不同人员再现性试验

在相同实验条件下，由两名实验人员对同一婴幼儿配方乳粉的均匀样品分别平行测定 7 次，用相对标准偏差表示表示再现性。

1.3.7.2 不同方法再现性实验

在相同实验条件下，由两名实验人员分别采用酶比色法和离子色谱法对同一婴幼儿配方乳粉的均匀样品分别平行测定 6 次。

1.3.8 加标回收率的测定

在相同实验条件下，对同一均匀混合的婴幼儿配方乳粉进行本底检测和回收率试验，取不同体积的胆碱标准加入到样品中，每个加标梯度的样品平行测定 7 次。

加标回收率=测定加标量/实际加标量*100%

2 结果与分析

2.1 线性

根据 1.3.3 的方法，离子色谱法和离子色谱法测定胆碱的线性和范围结果如表 6 所示，结果表明，离子色谱法相比酶比色法具有更好的线性。

表 1 不同方法线性和范围结果

方法	线性方程	R ²	线性范围
离子色谱法	y=0.1865x-0.01307	0.9996	2.0mg/L-7.0mg/L
酶比色法	y=0.00411x-0.00558	0.9991	0.0 mg/L-600.0 mg/L

2.2 重复性实验结果

精密度的结果见表 2，结果表明离子色谱法 RSD 为 0.15%，酶比色法 RSD 为 0.35%，符合 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》^[7]附录 B.1，样品含量 ≥1000mg/kg 时，相对标准偏差应在 3.8% 以内的要求，但离子色谱法的重复性更优于酶比色法。

表 2 重复性试验结果

离子色谱法				酶比色法			
样品含量 mg/100g	平均含量 mg/100g	标准偏差 mg/100g	RSD%	样品含 量 mg/100 g	平均含 量 mg/100 g	标准偏 差 mg/100 g	RSD%
158.0				158.1			
157.2				158.4			
157.6				157.2			
157.7	157.7	0.24	0.15	158.1	157.8	0.56	0.35
157.8				157.5			
157.8				158.1			
157.5				156.9			

2.3 再现性实验结果

不同方法和不同人员再现性试验结果见表 3 和表 4，结果符合 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》^[7]附录 B.1，样品含量 ≥1000mg/kg 时，相对标准偏差应在 3.8% 以内的要求，但离子色谱法较酶比色法检测的再现性更好。

表 3 不同方法再现性试验结果

方 法	编 号	样品含量 mg/100g	平均含量 mg/100g	标准偏差 mg/100g	RSD %
离子 色 谱 法	1	157.6	$\bar{x}_1 = 157.6$	$s_1 = 0.228$	
	2	157.7			
	3	157.8			
	4	157.8			
	5	157.5			
	6	157.2			
					$S = 0.36$
酶 比 色 法	7	158.1	$\bar{x}_2 = 157.9$	$s_2 = 0.452$	
	8	158.4			
	9	157.2			
	10	158.1			
	11	157.5			
	12	158.1			

表 4 不同人员再现性试验结果

人 员	离子色谱法				酶比色法			
	样品含量	平均含量	标准偏差	RSD	样品含量	平均含量	标准偏差	RSD
	mg/100g	mg/100g	mg/100g	%	mg/100g	mg/100g	mg/100g	%
A	158.0				154.1			
	157.2				159.2			
	157.6				157.4			
	157.7	157.8	0.77	1.49	161.0	157.4	3.16	2.01
	157.8				159.2			
	157.8				157.1			
	156.9				156.7			
B	159.1				162.0			

156.5	151.1
157.8	154.3
159.2	157.2
158.4	154.1
157.0	161.1
158.2	159.4

2.4 加标回收率

离子色谱法和酶比色法加标回收率结果分别见表 5、表 6。离子色谱法回收率范围为 95.6%-101.1%，酶比色法回收率范围为 95.0%-102.2%，均符合 GB/T 27417-2017《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》[7]附录 A.1 中样品含量 $\geq 100\text{mg/kg}$ 时，回收率范围在 95%-105% 的规定；但结果表明离子色谱法较酶比色法具有更好的回收率。

表 5 离子色谱法加标回收率试验结果

编号	本底值 mg/100g	加标量 mL	实测值 mg/100g	回收率%	回收率范 围%
1			270	98.9	
2			272	101.1	
3			272	101.1	
4	181	0.9	271	100	95.6-101.1
5			269	97.8	
6			267	95.6	
7			269	97.8	
1			358	98.3	
2			360	99.4	
3	181	1.8	355	96.7	97.8-99.4
4			360	99.4	
5			360	99.4	
6			359	98.9	

7			357	97.8	
1			538	99.2	
2			540	99.7	
3			540	99.7	
4	181	3.6	543	100.6	98.9-100.3
5			542	100.3	
6			537	98.9	
7			544	100.3	

表 6 酶比色法加标回收率试验结果

编号	本底值 mg/100g	加标量 mL	实测值 mg/100g	回收率% 回收率%	回收率范 围%
1			267	95.6	
2			268	96.7	
3			267	95.6	
4	181	0.45	273	102.2	95.6-102.2
5			269	97.8	
6			269	97.8	
7			269	97.8	
1			353	95.6	
2			352	95.0	
3	181	0.9	357	97.8	95.0-97.8
4			355	96.7	
5			355	96.7	
6			352	95.0	
1	181	1.8	523	95.0	95.0-100.0

2	527	96.1
3	533	97.8
4	528	96.4
5	541	100.0
6	527	96.1

2.5 盲样比对结果

2023年陕西圣唐乳业有限公司参加了由北京安信龙海信息咨询中心/易乳网举行的盲样比对，结果见表8，盲样比对结果满意，表明离子色谱法能够满足婴幼儿配方食品中胆碱的测定要求。

表7 盲样比对结果

项目	反馈值 mg/100g	自检值 mg/100g	检测方法	RD%
胆碱	205	201	离子色谱法	2.0

2.6 检测成本的比对

表8 不同检测方法试剂耗材成本比较

酶比色法

名称	货号规格	价格（元）	可用次数 （次）	单次检测费 用（元）	合计单批次 费用（元）
胆碱氧化酶	C5896-1KU	9343.25/瓶	8	1168	1393
过氧化物酶	P8375-5KU	1251.00/瓶	19	66	
磷脂酶 D	P0515-2.5KU	1584.84/瓶	10	159	
离子色谱法					
名称	货号规格	价格（元）	可用次数 （次）	单次检测费 用（元）	合计单批次 费用（元）
C ₁₈ 固相萃取 小柱	BWSI86500	600/盒	5	120	120

不同方法测定胆碱的试剂耗材成本见表 9，以单批次 10 个样品为例，部分药品耗材费用较小忽略，酶比色法酶活力是根据证书计算所得，离子色谱法和酶比色法检测胆碱平均单批次的试剂耗材检测成本分别为 1393 元和 120 元，因此采用离子色谱法可大大减少检测成本。

3 结论

本研究采用离子色谱法及酶比色法对婴幼儿配方乳粉中胆碱进行了测定，对比较两种方法标准曲线线性、重复性、再现性、加标回收率、检测成本等指标，发现方法指标均符合 GB/T 27417-2017 的要求，离子色谱法和酶比色法检测胆碱都有较好的线性、精密度、重复性、再现性、加标回收率，但离子色谱法在线性、精密度、重复性、再现性、加标回收率及后续检测试剂耗材成本控制上更具优势，所以离子色谱法更适于婴幼儿乳粉中胆碱含量的测定。

参考文献：

- [1] 张洪杰, 党安坤.市售氯化胆碱品质调查分析[J]; 山东畜牧兽医, 1996: 48.
- [2] 刘美霞、胡彩霞、任丽、王佳、马文丽、宋晓东.离子色谱法测定奶粉中胆碱含量方法的研[J]; 食品安全质量检测学报, 2013.12: 1881.
- [3] GB 10765-2021 《食品安全国家标准 婴儿配方食品》[S]
- [4] GB 10766-2021 《食品安全国家标准 较大婴儿配方食品》[S]
- [5] GB 10767-2021 《食品安全国家标准 幼儿配方食品》[S]
- [6] GB 5413.20-2022 《食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定》[S]
- [7] GB/T 27417-2017 《合格评定 化学分析方法确认和验证指南》[S]
- [8] RB/T 208 《化学实验室内部质量控制 比对实验》[S]