



中华人民共和国国家标准

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

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

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定方法。

本标准适用于婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定。

2 原理

试样经过水提取，用高氯酸沉淀蛋白质后过滤。滤液经碱皂化后使溶液中结合态的左旋肉碱游离出来。左旋肉碱与乙酰辅酶 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 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含量。

3 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/T6682 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 2-硝基苯甲酸($\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$)。
- 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 乙二胺四乙酸二钠 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。
- 3.1.7 乙酰辅酶 A (AcetylCoA)：在 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 保存。
- 3.1.8 乙酰肉碱转移酶(CAT)：在 $2^\circ\text{C}\sim 8^\circ\text{C}$ 保存。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 高氯酸溶液 (13%)：13 mL 高氯酸稀释至 100 mL。
- 3.2.2 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。
- 3.2.3 氢氧化钾溶液 (4.0 mol/L)：称取 22.4 g 氢氧化钾用水溶解，冷却后稀释至 100 mL。
- 3.2.4 显色储备液：分别称取 50 mg 2-硝基苯甲酸、5.96 g N-2-羧乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸、185 mg 乙二胺四乙酸二钠溶于 30 mL 去离子水中，用 10 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.4~7.6，然后用水定容至 50 mL。此液置于 4°C 冰箱中可保存 3 个月。
- 3.2.5 显色工作液：吸取 5.0 mL 显色储备液用水定容至 25 mL。
- 3.2.6 乙酰辅酶 A (AcetylCoA) 溶液：称取 20.0 mg 乙酰辅酶 A 溶于 2.0 mL 水中。临用时配制。

3.2.7 乙酰肉碱转移酶(CAT)溶液：吸取 100 μL 乙酰肉碱转移酶悬浮液，经 1500 r/min 离心 10 min，弃去上层清液，沉淀用 2 mL 水溶解。临用时配制。

3.3 标准品

左旋肉碱标准品 ($\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_3$)：纯度 $\geq 98\%$ 。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 左旋肉碱标准储备液 (80 $\mu\text{g/mL}$)：准确称取 20 mg (精确 0.0001g) 于 $102^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 烘箱中烘 2 h 的左旋肉碱，用水定容至 250 mL 容量瓶中。此液置于 4°C 冰箱中可保存 1 个月。

3.4.2 左旋肉碱标准工作液：分别吸取左旋肉碱标准储备液 0.5 mL、1 mL、2 mL、3 mL、5 mL 于 25 mL 容量瓶中，用水定容至刻度，混匀。此溶液仅限于当天使用。

4 仪器和设备

4.1 分析天平：感量 0.1 mg。

4.2 pH 计：精度 0.01。

4.3 离心机：转速 ≥ 1500 r/min。

4.4 恒温水浴锅：温度可控制在 $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 。

4.5 分光光度计。

5 分析步骤

5.1 试样处理

准确称取 5 g (精确 0.0001g) 混合均匀的试样于烧杯中，用 30 mL 40°C 温水溶解，转入 100 mL 容量瓶中。加入 10 mL 13% 高氯酸溶液，混合均匀后静止 20 min。用蒸馏水定容至刻度，混匀，用定量滤纸过滤。

取滤液 20 mL，用 4 mol/L 氢氧化钾溶液调 pH 为 12.5~13.0 后，置于 40°C 水浴 60 min。冷却后用 13% 高氯酸调 pH 为 7.0~7.5。将样液转入 50 mL 容量瓶中，用蒸馏水定容。混匀后置于 4°C 冰箱中过夜。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。

5.2 标准曲线的绘制

吸取左旋肉碱标准工作液 2.0 mL 于 1 cm 比色皿中，加入 0.8 mL 显色工作液和 100 μL 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 μL 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 2.0 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

试样中的左旋肉碱的含量 X ，以质量分数 mg/100g 表示，按式 (1) 计算：

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

式中：

X ——样品中左旋肉碱含量，单位为毫克每百克（mg/100 g）；

c ——从标准曲线上查得的试样处理液浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——滤液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的质量，单位为克（g）。

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，结果保留小数点后一位。

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应超过算术平均值的 10%。

8 其他

方法检出限 0.6 mg/100g，定量限为 2 mg/100g。
