

惠氏（上海）贸易有限公司企业标准

Q/WIN00013S-2023

幼儿配方奶

2023-11-01 发布

2023-11-03 实施

惠氏（上海）贸易有限公司 发布

前 言

本标准参照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分:标准化文件的结构和起草规则》进行编制。

本标准要求主要参考 GB 10767《食品安全国家标准 幼儿配方食品》、GB 2761《食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量》、GB 2762《食品安全国家标准 食品中污染物限量》、GB 14880《食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准》进行制定。

本标准首次提出。

本标准由惠氏(上海)贸易有限公司提出。

本标准由惠氏(上海)贸易有限公司负责起草。

本标准主要起草人:黄瑛,张春梅。



幼儿配方奶

1 适用范围

本标准规定了幼儿配方奶的术语和定义、要求、检验方法、检验规则、标签、标志、包装、运输、贮存的要求。

本标准适用于以水、巴氏杀菌脱脂乳、乳糖、食用植物调和油（包含 1, 3-二油酸-2-棕榈酸甘油三酯，葵花籽油，低芥酸菜籽油等）、乳清蛋白粉为主要原料，添加二十二碳六烯酸油脂、花生四烯酸油脂、柠檬酸钾、硫酸锰、碘化钾、硒酸钠、醋酸维生素 A、胆钙化醇、dl- α -醋酸生育酚、植物甲萘醌、L-抗坏血酸钠、硝酸硫胺素、核黄素、烟酰胺、盐酸吡哆醇、叶酸、D-泛酸钙、氰钴胺、D-生物素、肌醇、牛磺酸、硫酸亚铁、硫酸锌、硫酸铜、柠檬酸钙、酒石酸氢胆碱、氯化钙、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、柠檬酸钙、氧化镁和（或）其他可用于幼儿配方食品的维生素和矿物质，添加或不添加 GB 10767 中规定的其他可选择成分，添加或不添加 GB 14880 中规定的可用于幼儿配方食品的其他营养强化剂，添加或不添加大豆磷脂、氢氧化钾、柠檬酸等食品添加剂，经过在线投料、均质、标准化、超高温瞬时灭菌、无菌储存和无菌灌装等主要工序制成的，适用于 12-36 月龄幼儿食用的液态产品。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 1.1 标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则

GB/T 191 包装储运图示标志

GB 1886.74 食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬酸钾

GB 1886.216 食品安全国家标准 食品添加剂 氧化镁（包括重质和轻质）

GB 1886.235 食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬酸

GB 1886.25 食品安全国家标准 食品添加剂 柠檬酸钠

GB 1886.329 食品安全国家标准 食品添加剂 磷酸氢二钠

GB 1886.337 食品安全国家标准 食品添加剂 磷酸二氢钾

GB 1886.358 食品安全国家标准 食品添加剂 磷脂

GB 1886.45 食品安全国家标准 食品添加剂 氯化钙

GB 1903.13 食品安全国家标准 食品营养强化剂 左旋肉碱（L-肉碱）

GB 1903.14 食品安全国家标准 食品营养强化剂 柠檬酸钙

GB 1903.42 食品安全国家标准 食品营养强化剂 肌醇（环己六醇）

GB 1903.54 食品安全国家标准 食品营养强化剂 酒石酸氢胆碱

GB 2716 食品安全国家标准 植物油

GB 2760 食品安全国家标准 食品添加剂使用标准

GB 2761 食品安全国家标准 食品中真菌毒素限量

GB 2762 食品安全国家标准 食品中污染物限量

GB 4789.1 食品安全国家标准 食品微生物学检验 总则

GB 4789.26 食品安全国家标准 食品微生物学检验 商业无菌检验

GB 4806.1 食品安全国家标准 食品接触材料及制品通用安全要求

GB 4806.7 食品安全国家标准 食品接触用塑料材料及制品

GB 4806.9 食品安全国家标准 食品接触用金属材料及制品

GB 5009.4 食品安全国家标准 食品中灰分的测定

GB 5009.5 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定

GB 5009.6 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定

GB 5009.8 食品安全国家标准 食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的测定

GB 5009.12 食品安全国家标准 食品中铅的测定

GB 5009.13 食品安全国家标准 食品中铜的测定

GB 5009.14 食品安全国家标准 食品中锌的测定

GB 5009.24 食品安全国家标准 食品中黄曲霉毒素 M 族的测定

GB 5009.33 食品安全国家标准 食品中亚硝酸盐与硝酸盐的测定

GB 5009.44 食品安全国家标准 食品中氯化物的测定

GB 5009.82 食品安全国家标准 食品中维生素A、D、E的测定

GB 5009.84 食品安全国家标准 食品中维生素B₁的测定

GB 5009.85 食品安全国家标准 食品中维生素B₂的测定

GB 5009.87 食品安全国家标准 食品中磷的测定

GB 5009.89 食品安全国家标准 食品中烟酸和烟酰胺的测定

GB 5009.90 食品安全国家标准 食品中铁的测定

GB 5009.91 食品安全国家标准 食品中钾、钠的测定

GB 5009.92 食品安全国家标准 食品中钙的测定

GB 5009.93 食品安全国家标准 食品中硒的测定

GB 5009.154 食品安全国家标准 食品中维生素B₆的测定

GB 5009.158 食品安全国家标准 食品中维生素K₁的测定

GB 5009.168 食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定

GB 5009.169 食品安全国家标准 食品中牛磺酸的测定

GB 5009.210 食品安全国家标准 食品中泛酸的测定

GB 5009.211 食品安全国家标准 食品中叶酸的测定

GB 5009.241 食品安全国家标准 食品中镁的测定

GB 5009.242 食品安全国家标准 食品中锰的测定

GB 5009.259 食品安全国家标准 食品中生物素的测定

GB 5009.267 食品安全国家标准 食品中碘的测定

GB 5009.270 食品安全国家标准 食品中肌醇的测定

GB 5009.285 食品安全国家标准 食品中维生素 B₁₂ 的测定
GB 5009.296 食品安全国家标准 食品中维生素 D 的测定
GB 5413.18 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中维生素 C 的测定
GB 5413.20 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中胆碱的测定
GB 5413.30 食品安全国家标准 乳和乳制品杂质度的测定
GB 5413.36 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中反式脂肪酸的测定
GB 5749 生活饮用水卫生标准
GB 7718 食品安全国家标准 预包装食品标签通则
GB 10767 食品安全国家标准 幼儿配方食品
GB 11674 食品安全国家标准 乳清粉和乳清蛋白粉
GB 13432 食品安全国家标准 预包装特殊膳食用食品标签
GB 14880 食品安全国家标准 食品营养强化剂使用标准
GB 19645 食品安全国家标准 巴氏杀菌乳
GB/T 22388 原料乳与乳制品中三聚氰胺检测方法
GB 23350 限制商品过度包装要求 食品和化妆品
GB 25575 食品安全国家标准 食品添加剂 氢氧化钾
GB 25595 食品安全国家标准 乳糖
GB 26687 食品安全国家标准 复配食品添加剂通则
GB 29202 食品安全国家标准 食品添加剂 氮气
GB 29921 食品安全国家标准 预包装食品中致病菌限量
GB 29989 食品安全国家标准 婴幼儿食品和乳品中左旋肉碱的测定
JJF 1070 定量包装商品净含量计量检验规则
中华人民共和国国务院令 [2008]第 536 号 乳品质量安全监督管理条例
国家市场监督管理总局令第 70 号 定量包装商品计量监督管理办法

3 术语与定义

下列术语和定义适用于本标准。

幼儿配方奶：以乳类及乳蛋白制品为主要蛋白来源，加入适量的维生素、矿物质和（或）其他原料，仅用物理方法生产加工制成的，适用于 12-36 月龄幼儿食用的乳基液态幼儿配方食品。

4 要求

4.1 原辅料要求

食品原辅料、食品添加剂应符合 GB 10767 和相应的标准和有关规定。

4.2 感官要求

应符合表 1 的规定。

表1 感官要求

项 目	要求	检验方法
色 泽	乳白偏米白色	取适量试样置于烧杯中，在自然光下观察色泽，闻其气味，用温开水漱口，品尝滋味
滋味、气味	具有牛乳的滋味气味和甜味，无异味	
组织状态	脱脂乳状，均匀性液体，无视力可见的外来杂质	摇匀后取适量试样置于烧杯中，在自然光下观察组织状态

4.3 营养成分指标

4.3.1 能量要求

表2 能量要求

项目	单位	指标	
		最小值 每 100 mL	最大值 每 100 mL
能量	kJ	250	334

4.3.2 必需成分指标

表3 必需成分指标

项目	单位	指标		检测方法
		最小值 每 100 kJ	最大值 每 100 kJ	
蛋白质 ^a	g	0.43	0.96	GB 5009.5
脂肪 ^b	g	0.84	1.43	GB 5009.6
亚油酸	g	0.07	0.33	GB 5009.168
α -亚麻酸	mg	12	N.S. ^c	GB 5009.168
亚油酸与 α -亚麻酸比值	-	5:1	15:1	-
碳水化合物 ^{d,e}	g	1.8	3.6	-
维生素 A ^f	$\mu\text{g RE}$	18	43	GB 5009.82
维生素 D ^g	μg	0.48	1.20	GB 5009.296
维生素 E ^h	mg α -TE	0.14	1.20	GB 5009.82
维生素 K ₁	μg	0.96	6.45	GB 5009.158
维生素 B ₁	μg	14	72	附录 A
维生素 B ₂	μg	19	155	GB 5009.85
维生素 B ₆	μg	11.0	41.8	GB 5009.154 第一法
维生素 B ₁₂	μg	0.041	0.478	GB 5009.285
烟酸（烟酰胺） ⁱ	μg	110	359	GB 5009.89

项目	单位	指标		检测方法
		最小值 每 100 kJ	最大值 每 100 kJ	
叶酸	μg	2.4	12.0	GB 5009.211
泛酸	μg	96	478	GB 5009.210
维生素 C	mg	2.4	16.7	GB 5413.18
生物素	μg	0.41	2.39	GB 5009.259
钠	mg	N.S. ^c	20	GB 5009.91
钾	mg	18	69	GB 5009.91
铜	μg	6.9	34.9	GB 5009.13
镁	mg	1.4	4.3	GB 5009.241
铁	mg	0.24	0.60	GB 5009.90
锌	mg	0.10	0.31	GB 5009.14
钙	mg	17	50	GB 5009.92
磷	mg	8	26	GB 5009.87
钙磷比值	-	1.2:1	2:1	-
碘	μg	1.4	14.1	GB 5009.267
氯	mg	N.S. ^c	52	GB 5009.44
^a 蛋白质含量的计算，应以氮（N）×6.25。 ^b 反式脂肪酸最高含量<总脂肪酸的 3%。总脂肪酸指 C4~C24 脂肪酸的总和。 ^c N.S.为没有特别说明。 ^d 对于乳基幼儿配方食品（无乳糖和低乳糖产品除外），乳糖占碳水化合物含量应≥50%。 ^e 碳水化合物的含量 A₁，按式（1）计算： $A_1 = 100 - (A_2 + A_3 + A_4 + A_5 + A_6) \dots\dots\dots (1)$ 式中： A₁——碳水化合物的含量，g/100g； A₂——蛋白质的含量，g/100g； A₃——脂肪的含量，g/100g； A₄——水分的含量，g/100g； A₅——灰分的含量，g/100g； A₆——膳食纤维的含量[可按低聚糖和（或）多聚糖的添加量计]，g/100g。 ^f RE 为视黄醇当量。1 μg RE=1μg 全反式视黄醇（维生素 A）=3.33 IU 维生素 A。维生素 A 只包括预先形成的视黄醇，在计算和声称维生素 A 活性时不包括任何的类胡萝卜素组分。 ^g 钙化醇，1μg 维生素 D=40 IU 维生素 D。 ^h 1 mg d-α-生育酚=1 mg α-TE（α-生育酚当量）；1 mg dl- α-生育酚=0.74 mg α-TE（α-生育酚当量）。 ⁱ 烟酸不包括前体形式。				

4.3.3 可选择成分指标

如果在产品中选择添加或标签中标示含有表4中的一种或多种成分，其含量应符合表4的规定。

表4 可选择成分指标

项目	单位	指标		检测方法
		最小值 每 100 kJ	最大值 每 100 kJ	
硒	μg	0.48	2.06	GB 5009.93

项目	单位	指标		检测方法
		最小值 每 100 kJ	最大值 每 100 kJ	
胆碱	mg	4.8	23.9	GB 5413.20
锰	μg	0.24	23.90	GB 5009.242
肌醇	mg	1.0	9.6	GB 5009.270
牛磺酸	mg	0.8	4.0	GB 5009.169
左旋肉碱	mg	0.3	N.S. ^a	附录 C
二十二碳六烯酸	mg	N.S. ^a	9.6	GB 5009.168
二十碳四烯酸	mg	N.S. ^a	19.1	GB 5009.168
注： ^a N.S.为没有特别说明。				

4.4 其他指标

表 5 其他指标

项目	单位	限量	检测方法
灰分	(按总干物质计) %	≤5.3	GB 5009.4
杂质度 ^a	mg/8L	≤2	GB 5413.30
^a 不适用于添加蔬菜和水果的产品			

4.5 微生物指标

应符合商业无菌的要求，按 GB 4789.26 规定的方法检验。

4.6 真菌毒素和污染物限量

表 6 真菌毒素和污染物限量

项目	单位	限量	检测方法
黄曲霉毒素 M ₁	μg/kg	≤0.5 (以粉状产品计)	GB 5009.24
铅 (以 Pb 计)	mg/kg	≤0.01	GB 5009.12
硝酸盐 (以 NaNO ₃ 计)	mg/kg	≤12.5	GB 5009.33
亚硝酸盐 (以 NaNO ₂ 计)	mg/kg	≤0.25	GB 5009.33
三聚氰胺	mg/kg	≤0.125	GB/T 22388

4.7 食品添加剂和营养强化剂

4.7.1 食品添加剂和营养强化剂的质量规格应符合相关标准和有关规定。

4.7.2 食品添加剂和营养强化剂的使用应符合 GB 2760、GB 14880 及食品添加剂新品种相关公告的规定。

4.8 净含量

净含量应符合《定量包装商品计量监督管理办法》的规定，净含量检验按JJF 1070规定执行。

5 检验规则

5.1 组批与抽样

按照同一产品配方，在同一条生产线一个生产周期内一次投料、一次连续包装，以相同工艺持续生产出具有预期均一质量及稳定性的一批成品为一个批次，每批产品按国家有关规定随机抽取样品。

5.2 出厂检验

每批产品出厂前均须经本企业质检部门按相关规定进行检验，检验合格后方可出厂。

5.3 型式检验

型式检验项目为本标准规定的全部检验项目。正常生产时，每年进行一次，有下列情况之一时，亦应进行型式检验：

- a) 产品正式投产时；
- b) 工艺有较大改变时，可能影响产品质量时。

5.4 判定规则

检验结果符合本标准要求时，判定该批产品为合格品。若检验结果不符合本标准要求时，可在同批产品中加倍取样，复检不合格项目，以复检结果为准。但微生物项目不得复检。

6 标志、标签、包装、运输、贮存及保质期

6.1 标志、标签

预包装产品的标志按 GB 7718、GB 13432、GB 10767 中 4.1、4.2 及有关规定执行。产品包装储运图示标志按 GB/T 191 的规定执行。

6.2 包装

包装材料聚丙烯瓶、聚丙烯瓶盖、铝箔盖膜应符合相应食品安全国家标准的要求，无毒无害。包装储运材料应干燥、清洁、无异味、无毒无害。应符合 GB 23350 有关限制商品过度包装的要求。

6.3 运输

运输工具与容器必须符合食品卫生要求，运输过程中应避免阳光直射和雨淋，不得与有害、有毒、有异味物品混合装运。

6.4 贮存

产品应贮存在 4-25℃、干燥、通风良好的场所。不得与有毒、有害、有异味、易挥发、易腐蚀的物品同处贮存。

6.5 保质期

在规定的条件下，产品的保质期不超过15个月。

附录 A

(规范性附录)

高效液相色谱法测定液态婴幼儿配方奶中维生素B₁

1 范围

本标准规定了高效液相色谱法测定液态婴幼儿配方奶中维生素B₁的方法。
本标准适用于液态婴幼儿配方奶中维生素B₁的测定。

2 原理

样品在稀盐酸介质中恒温水解、中和、再酶解，水解液用碱性铁氰化钾溶液衍生，正丁醇萃取后，经C₁₈反相色谱柱分离，用高效液相色谱-荧光检测器检测，外标法定量。

3 试剂和材料

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

3.1 试剂

- 3.1.1 正丁醇 (CH₃CH₂CH₂CH₂OH)
- 3.1.2 铁氰化钾 (K₃Fe(CN)₆)
- 3.1.3 氢氧化钠 (NaOH)
- 3.1.4 盐酸 (HCl)
- 3.1.5 乙酸钠 (CH₃COONa·3H₂O)
- 3.1.6 冰乙酸 (CH₃COOH)
- 3.1.7 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯
- 3.1.8 五氧化二磷 (P₂O₅) 或者氯化钙 (CaCl₂)
- 3.1.9 木瓜蛋白酶：应不含维生素B₁，酶活力≥800U（活力单位）/mg
- 3.1.10 淀粉酶：应不含维生素B₁，酶活力≥3700U/g

3.2 试剂配制

- 3.2.1 铁氰化钾溶液 (20g/L)：称取2g铁氰化钾，用水溶解并稀释至100mL，摇匀。临用前配制。
- 3.2.2 氢氧化钠溶液 (100g/L)：称取25g氢氧化钠，用水溶解并稀释至250mL，摇匀。
- 3.2.3 碱性铁氰化钾溶液：将5mL铁氰化钾溶液与200mL氢氧化钠溶液混合，摇匀。临用前配制。
- 3.2.4 盐酸溶液 (0.1mol/L)：移取8.5mL盐酸，加水稀释至1000mL，摇匀。
- 3.2.5 盐酸溶液 (0.01mol/L)：量取0.1mol/L盐酸溶液50mL，用水稀释至500mL，摇匀。
- 3.2.6 乙酸钠溶液 (0.05mol/L)：称取6.80g乙酸钠，加900mL水溶解，用冰乙酸调pH为4.0—5.0之间，加水稀释至1000mL。经0.45μm微孔滤膜过滤。
- 3.2.7 乙酸钠溶液 (2.0mol/L)：称取27.2g乙酸钠，用水溶解并稀释至100mL，摇匀。
- 3.2.8 混合酶溶液：称取1.76g木瓜蛋白酶、1.27g淀粉酶，加水稀释至50mL，涡旋，使呈混悬状液体，冷藏保存。临用前再次摇匀后使用。

3.3 标准品

维生素 B₁ 标准品：盐酸硫胺素（C₁₂H₁₇ClN₄OS·HCl），CAS：67-03-8，纯度≥99.0%

3.4 标准溶液配制

3.4.1 维生素B₁标准储备液（500μg/mL）：准确称取经五氧化二磷或者氯化钙干燥24h的盐酸硫胺素标准品63.5mg（精确至0.1mg），相当于50mg硫胺素、用0.01mol/L盐酸溶液溶解并定容至100mL，摇匀。置于0℃~4℃冰箱中，保存期为3个月。

3.4.2 维生素B₁标准中间液（10.0μg/mL）：准确移取2.00mL标准储备液，用水稀释并定容至100mL，摇匀。临用前配制。

3.4.3 维生素B₁标准系列工作液：吸取维生素B₁标准中间液10.0μL、20.0μL、50.0μL、100μL、200μL用水定容至10mL，标准系列工作液中维生素B₁的浓度分别为0.0100μg/mL，0.0200μg/mL，0.0500μg/mL，0.100μg/mL，0.200μg/mL。临用时配制。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱仪，配置荧光检测器。

4.2 分析天平：感量为0.01g和0.1mg。

4.3 离心机：转速≥4000r/min。

4.4 pH计：精度0.01。

4.5 组织捣碎机（最大转速不低于10000r/min）。

4.6 电热恒温干燥箱或高压灭菌锅。

5 分析步骤

5.1 试样的制备

液态样品摇匀后立刻测定或者于冰箱中冷藏。

5.2 试样溶液的制备

5.2.1 试液提取

称取约10g（精确至0.01g）样品于100mL锥形瓶中，在待测试样中加60mL 0.1mol/L盐酸溶液，充分摇匀，塞上软质塞子，高压灭菌锅中121℃保持30min。水解结束待冷却至40℃以下取出，轻摇数次；用pH计指示，用2.0mol/L乙酸钠溶液调节pH至4.0左右，加入2.0mL（可根据酶活力不同适当调整用量）混合酶溶液，摇匀后，置于培养箱中37℃过夜（约16h）；将酶解液全部转移至100mL容量瓶中，用水定容至刻度，摇匀，离心或者过滤，取上清液备用。

5.2.2 试液衍生化

准确移取上述上清液或者滤液2.0mL于10mL试管中，加入1.0mL碱性铁氰化钾溶液，涡旋混匀后，准确加入2.0mL正丁醇，再次涡旋混匀1.5min后静置约10min或者离心，待充分分层后，吸取正丁醇相（上层）经0.45μm有机微孔滤膜过滤，取滤液于2mL棕色进样瓶中，供分析用。若试液中维生素B₁浓度超出线性范围的最高浓度值，应取上清液稀释适宜倍数后，重新衍生后进样。

另取2.0mL标准系列工作液，与试液同步进行衍生化。

注 1：室温条件下衍生产物在 4h 内稳定。

注 2：5.2.1 和 5.2.2 操作过程应在避免强光照射的环境下进行。

5.3 仪器参考条件

仪器参考条件列出如下：

5.3.1 色谱柱：Waters C₁₈ 色谱柱（粒径 5μm，250mm×4.6mm）

5.3.2 流动相：0.05mol/L 乙酸钠溶液-甲醇（65+35）。

5.3.3 流速：1mL/min。

5.3.4 检测波长：激发波长 375nm，发射波长 435nm。

5.3.5 进样量：10μL。

5.4 标准曲线的制作

按照 5.3 的仪器参考条件，将标准系列工作液衍生物注入高效液相色谱仪中，测定相应的维生素 B₁ 峰面积，以标准工作液的浓度（μg/mL）为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

5.5 试样溶液的测定

按照 5.3 的仪器参考条件，将试样衍生物溶液注入高效液相色谱仪中，得到维生素 B₁ 的峰面积，根据标准曲线计算得到待测液中维生素 B₁ 的浓度。

6 分析结果的表述

试样中维生素 B₁（以硫胺素计）含量按式（1）计算：

$$x = \frac{c \times V \times f}{m \times 1000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中

X—试样中维生素 B₁（以硫胺素计）的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

c—由标准曲线计算得到的试液（提取液）中维生素 B₁ 的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V—试液（提取液）的定容体积，单位为毫升（mL）；

f—试液（上清液）衍生前的稀释倍数；

m—试样的质量，单位为克（g）；

100—换算系数；

1000—换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

注：试样中测定的硫胺素含量乘以换算系数 1.271，即得盐酸硫胺素的含量。

7 精密度

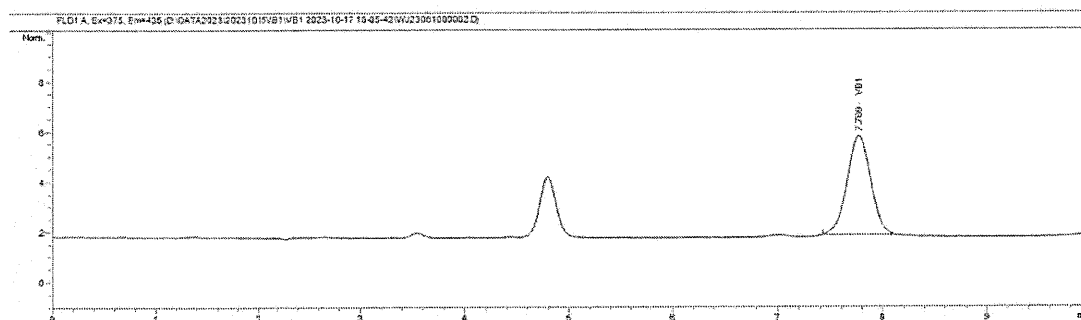
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

8 其他

当称样量为 10g 时，按照本方法的定容体积，维生素 B₁ 的定量限为 0.02mg/100g。

附录 B

(规范性附录)

维生素 B₁ 液态样品溶液高效液相色谱图维生素 B₁ 液态样品溶液高效液相色谱图见图 B.1。图 B.1 维生素 B₁ 液态奶样品溶液高效液相色谱图

附录 C

(规范性附录)

液态婴幼儿配方奶中左旋肉碱的测定

1 范围

本标准规定了液态婴幼儿配方奶中左旋肉碱的测定方法。

本标准适用于液态婴幼儿配方奶中左旋肉碱的测定。

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 和二硫-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/T 6682 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 二硫-2-硝基苯甲酸 ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$)
- 3.1.5 N-2-羟乙基哌嗪-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 ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 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%)：13mL 高氯酸稀释至 100mL。
- 3.2.2 氢氧化钠溶液 (10mol/L)：称取 40g 氢氧化钠用水溶解，冷却后稀释至 100mL。
- 3.2.3 氢氧化钾溶液 (4.0mol/L)：称取 22.4g 氢氧化钾用水溶解，冷却后稀释至 100mL。
- 3.2.4 显色储备液：分别称取 50mg 二硫-2-硝基苯甲酸、5.96g N-2-羟乙基哌嗪-N-2-乙烷磺酸、185mg 乙二胺四乙酸二钠溶于 30mL 去离子水中，用 10mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.4~7.6，然后用水定容至 50mL。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 5.0mL 显色储备液用水定容至 25mL。
- 3.2.6 乙酰辅酶 A (AcetylCoA) 溶液：称取 20.0mg 乙酰辅酶 A 溶于 2.0mL 水中。临用时配制。

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

3.3 标准品

左旋肉碱标准品 ($C_7H_{15}NO_3$): 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 μ g/mL): 准确称取 20mg (精确 0.0001g) 于 102 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C 烘箱中烘 2h 的左旋肉碱, 用水定容至 250mL 容量瓶中。此溶液置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中可保存 1 个月。

3.4.2 左旋肉碱分别吸取标准工作液: 左旋肉碱标准储备液 0.5mL、1mL、2mL、3mL、5mL 于 25mL 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 0.1mg, 0.01g

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 $^{\circ}$ C $\pm$ 2 $^{\circ}$ C

4.5 分光光度计

5 分析步骤

5.1 试样处理

准确称取摇匀的液态奶 5g 或 25g (精确 0.0001g) 混合均匀的试样于烧杯中, 用 30mL 40 $^{\circ}$ C 温水稀释, 转入 100mL 容量瓶中。加入 10mL 13% 高氯酸溶液, 混合均匀后静止 20min。用蒸馏水定容至刻度, 混匀, 用定量滤纸过滤。取滤液 20mL, 用 4mol/L 氢氧化钾溶液调 pH 为 12.5~13.0 后, 置于 40 $^{\circ}$ C 水浴 60min。冷却后用 13% 高氯酸调 pH 为 7.0~7.5。将样液转入 50mL 容量瓶中, 用蒸馏水定容。混匀后置于 4 $^{\circ}$ 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 μ m 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 2.0mL 于 1cm 比色皿中, 加入 0.8mL 显色工作液和 100 μ L 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 412nm, 5min 后归零。迅速加入 100 μ L 乙酰肉碱转移酶溶液, 混合均匀后放入分光光度计中, 反应 10min 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 2.0mL 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:

$$X = \frac{c \times 50}{m \times V \times 10} \times 100$$

式中:

X—样品中左旋肉碱含量, 单位为毫克每百克 (mg/100g);

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);

100—换算系数;

10—换算系数。

计算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

当称样量为 25g 时, 按照本方法的定容体积, 左旋肉碱的定量限为 0.4mg/100g。

参考文献

- [1]GB 5009.84-2016 食品安全国家标准 食品中维生素 B1 的测定 第一法高效液相色谱法
[2]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
-