

总胆碱的测定方法

比色法

1. 原理

食物中的胆碱经过碱处理提取后，通过 Florisil 柱色谱纯化，然后用雷纳克盐 (reineckate) 与胆碱反应形成粉红色的胆碱-雷纳克盐复合物，这种复合物被丙酮洗脱后，在 526nm 有最大吸收，其吸收值与胆碱浓度成正比。

2. 适用范围

参照《Methods of Vitamin Assay》。使用于各类食物中胆碱的测定。最小检出限为 0.15mg。

3. 仪器与设备

- (1) 实验室常用设备。
- (2) 回流提取装置。
- (3) 色谱柱：为 0.8cm (内径) × 30cm 的玻璃柱，柱上端为容积 30~50ml 的储液池，底端收缩变细，并装有活塞。活塞上约 1 cm 处有一玻璃筛板，筛板孔径为 16~30 μm。
- (4) 分光光度计。

4. 试剂

除特殊说明外，所有试剂均为分析级，实验用水为蒸馏水。

- (1) 甲醇。
- (2) 氯仿。
- (3) 乙酸甲酯。
- (4) 丙酮：用前重蒸馏。
- (5) 10% 丙酮：取 50ml 丙酮溶解于 450ml 水中。
- (6) 冰乙酸。
- (7) 冰乙酸-甲醇溶液：取 50ml 冰乙酸和 400ml 甲醇混合。
- (8) 饱和氢氧化钡提取液：于 1000ml 甲醇中加入 40g 无水 Ba(OH)₂，搅拌 10min，再加入 100ml 氯仿，混合，使 Ba(OH)₂ 饱和，过滤去除多余的 Ba(OH)₂。
- (9) 硅镁吸附剂 (Florisil)：Sigma 公司，60~100 目。
- (10) 雷纳克铵 (Ammonium Reineckate) 饱和溶液：称取 2~3g 雷纳克铵，加入 100ml 水中，搅拌 10min，过滤去除多余的雷纳克铵。实验当日配制。
- (11) 胆碱标准贮备液 (5g/L)：准确称取无水氯化胆碱 0.57613g，溶解于水中，并定容至 100mL。冰箱保存。
- (12) 胆碱标准工作液 (1g/L)：准确吸取 2.0ml 标准贮备液，用水稀释定容至 100ml。

5. 测定步骤

所有操作均需避光进行

5.1 提取：称取适量样品 (约含 5~50mg 胆碱)，置于 100ml 具塞锥形瓶中，加入 30ml 提取液，边加边摇，避免结块。然后放置于 76°C~80°C 恒温水浴回流 2~4h，回流速度为 1~2 滴/秒。

(注：加热回流的温度应严格控制在 80°C 左右，否则样品易扑溅，造成损失。样品提取率与回流时间有关，回流 2 小时，提取率达到最高值，回流 3~4 小时，可以保证样品提取较完全。) 冷却，样品过滤至 100ml 容量瓶中，反复用 5~10ml 冰乙酸-甲醇溶液洗涤锥形瓶和滤渣，滤液并入容量瓶中。用 pH 试纸测定提取液 pH 在 2~6 范围之内 (必要的话可加入冰乙酸调节 pH)，然后用甲醇定容至刻度。

5.2 纯化

- (1) 填充色谱柱：将硅镁吸附剂浸入甲醇中，湿法将硅镁吸附剂填充入色谱柱中 (注：色谱

上海洪纪仪器设备有限公司

柱最好经过干燥处理，否则影响洗脱液流速），至硅镁吸附剂的高度达 10cm（约 4g）。用甲醇冲洗色谱柱，并保持甲醇高于硅镁吸附剂顶端 0.5~1cm。

（2）柱色谱纯化：吸取一定量的提取液加到色谱柱中，打开底端活塞，使提取液靠重力作用通过色谱柱。先后用 5ml, 10ml 甲醇洗涤色谱柱。待甲醇通过色谱柱后，依次用 2 份 10ml 乙酸甲酯，10ml 冷的 10%丙酮洗涤色谱柱。接着加入 5ml 雷纳克铵饱和溶液（雷纳克铵与吸附于色谱柱上的胆碱结合），待雷纳克铵饱和溶液完全通过色谱柱后，用 2 份 10ml 冰乙酸洗涤直至流出液清亮为止（冰乙酸的作用是洗脱未与胆碱结合的过量的雷纳克铵，应注意洗脱完全）。用 15ml 丙酮洗脱色谱柱上胆碱-雷纳克盐复合物的粉红色色谱带，收集洗脱液，并用丙酮定容至 15ml。

5.3 比色测定：用 1cm 比色杯，以丙酮调节零点，于 526nm 波长下，测定样品吸光度，其值在标准工作曲线上查出，或通过回归方程计算出对应的胆碱含量，供计算使用。

5.4 标准工作曲线：分别吸取 0.50、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0ml 标准工作液（3.13），加至色谱柱上，按照上述样品测定步骤操作。以胆碱含量做横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线，计算回归方程。

6. 计算

$$X = \frac{C \times V_1 \times 100}{V_2 \times m} \times 100$$

式中：

X—样品中胆碱的含量，（mg/100g）；

C—从标准工作曲线或回归方程中查到的胆碱含量，mg；

V₁—样品提取液的总体积，ml

V₂—纯化用提取液的体积，ml；

m—样品质量，g

7. 注意事项

（1）同一实验室平行测定或重复测定结果的相对偏差绝对值 < 10%。

（2）硅酶吸附剂填充的高度关系到洗脱液的用量，如果填充过高，则应加大洗脱液用量，以保证胆碱的纯化和完全洗脱。

（3）纯化过程中冰乙酸的作用是将不能与胆碱形成复合物的多余雷纳克铵盐洗脱，丙酮则是洗脱胆碱-雷纳克铵复合物，如果这两步洗脱不完全，均影响胆碱的测定，所以必要时应增加冰乙酸和丙酮的用量以保证测定结果。