



中华人民共和国国家标准

GB xxxx—xxxx

食品安全国家标准 食品中唾液酸的测定

(征求意见稿)

xxxx-xx-xx 发布

xxxx-xx-xx 实施

中华人民共和国国家卫生健康委员会
国家市场监督管理总局 发布

前 言

本标准代替GB/T 30636-2014《燕窝及其制品中唾液酸的测定 液相色谱法》。

本标准与GB/T 30636-2014相比，主要变化如下：

- 明确了燕窝及其制品中结合态唾液酸的测定方法；
- 增加了液相色谱-荧光检测法和液相色谱-质谱/质谱法；
- 测定范围增加了液态乳、乳粉、糕点、饮料。

食品安全国家标准

食品中唾液酸的测定

1 范围

本标准规定了食品中唾液酸的测定方法。

第一法液相色谱-紫外检测法适用于燕窝及其制品中结合态唾液酸的测定。第二法液相色谱-荧光检测法和第三法液相色谱-质谱/质谱法适用于液态乳、乳粉、糕点、饮料中唾液酸总量的测定。

第一法 液相色谱-紫外检测法

2 原理

样品在盐酸溶液中加热水解，释放出唾液酸，样品试液用强阴离子交换色谱柱分离，紫外检测器或二极管阵列检测器检测，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 试剂及材料

- 3.1.1 乙腈(CH₃CN)：色谱纯。
- 3.1.2 磷酸(H₃PO₄)：色谱纯。
- 3.1.3 浓盐酸(HCl)：12 mol/L。
- 3.1.4 透析袋：可透过相对分子质量7 000以下的化合物，临用前用水浸泡1 h。
- 3.1.5 微孔滤膜：0.45 μm。

3.2 试剂配制

- 3.2.1 盐酸溶液(0.05 mol/L)：吸取4.17 mL浓盐酸，溶于水并稀释至1000 mL。
- 3.2.2 0.1%磷酸溶液：吸取1 mL磷酸，溶于水并稀释至1000 mL。
- 3.2.3 0.1%磷酸溶液-乙腈(4+6)：将0.1%磷酸溶液和乙腈按4比6的体积比混合均匀。

3.3 标准品

- 3.3.1 唾液酸(N-乙酰神经氨酸, C₁₁H₁₉NO₉, CAS号131-48-6)：纯度≥96%，或经国家认证授予标准物质证书的标准品。

3.4 标准溶液配制

- 3.4.1 唾液酸标准储备液(1000 mg/L)：准确称取适量唾液酸标准品，用水溶解并配制成浓度为1000 mg/L的标准储备溶液，于4℃下避光保存，保存期6个月。
- 3.4.2 唾液酸标准系列工作液：分别吸取唾液酸标准储备液(1000 mg/L) 0.1 mL、0.5 mL、1.0 mL、5.0 mL、10.0 mL和20.0 mL于100 mL容量瓶中，加流动相(3.2.3)定容至刻度，混匀。唾液酸标准系

列工作液的浓度分别为1.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、50.0 mg/L、100.0 mg/L和200.0 mg/L。临用现配。

4 仪器和设备

4.1 液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.2 恒温水浴锅。

4.3 涡旋混合器。

4.4 分析天平：感量为0.1 mg和0.01 g。

4.5 匀浆机：转速不低于10000 r/min。

4.6 烘箱。

4.7 高速离心机。

4.8 筛网：筛网孔径0.15 mm。

4.9 研钵。

5 分析步骤

5.1 样品前处理

5.1.1 试样制备

5.1.1.1 燕窝（盏、条、碎等）和固态燕窝制品

称取10.0 g燕窝、固态燕窝制品在101-105℃烘箱中烘干至恒重（两次质量差不超过2 mg），在干燥器中冷却后研磨，全部过100目筛（筛网孔径0.150mm）后装入洁净容器，放于干燥器内，密闭备用。

5.1.1.2 液态燕窝制品

液态燕窝制品样品混匀后取200.0 g，先低速匀浆，再缓慢升至转速10 000 r/min，匀浆3 min，静置至泡沫消除，低温避光，密闭保存。

5.1.2 试样提取

5.1.2.1 燕窝（盏、条、碎等）和固态燕窝制品

唾液酸总量的测定：称取0.1 g（精确至0.0001 g）固体样品粉末（5.1.1.1）于50 mL离心管中，加入0.05 mol/L盐酸溶液10 mL，盖上玻璃塞，置于80℃水浴中水解40 min，在水浴过程中每5 min振荡一次，取出离心管，冷却至室温。将水解液转移至100 mL容量瓶，用适量水洗涤离心管两次并转移至容量瓶中，用流动相（3.2.3）定容至刻度，混匀。移取2 mL于离心管中，15000 r/min离心3min，取上清液过0.45 μm微孔滤膜后，待测。

游离态唾液酸含量测定：称取0.1 g（精确至0.0001 g）固体样品粉末（5.1.1.1）于50 mL离心管中，加入10 mL水，涡旋振荡3 min，将试样溶液转移至100 mL容量瓶中，用适量水洗涤离心管两次并转移至容量瓶中，用水定容至刻度，混匀。移取2 mL于离心管中，15000 r/min离心3min，取上清液过0.45 μm微孔滤膜后，待测。

5.1.2.2 液态燕窝制品

结合态唾液酸含量测定：称取10 g（精确至0.0001 g）样品（5.1.1.2）置于透析袋中（试样体积不超过透析袋容积的20%），扎紧透析袋两端，置于1000 mL烧杯中在流水下透析24 h。透析后，将此

透析袋中的试液转移至 25 mL 比色管中，加少量水冲洗透析袋，合并至比色管中，加入 104 μL 浓盐酸，混匀，加水定容至 25 mL，使水解液中盐酸的浓度为 0.05 mol/L。盖上玻璃塞，置于 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中水解 40 min，取出比色管冷却至室温。将水解液转移至 100 mL 容量瓶中，用适量水洗涤比色管两次并转移至容量瓶中，用流动相（3.2.3）定容至刻度，混匀。移取 2 mL 于离心管中，15000 r/min 离心 3min，取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜后，待测。

5.2 液相色谱参考条件

5.2.1 色谱柱：SAX 强阴离子交换柱，250 mm \times 4.6 mm（内径），5 μm ，或相当者。

5.2.2 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.2.3 检测波长：205 nm。

5.2.4 流动相：0.1%磷酸溶液-乙腈（40+60，v/v）。

5.2.5 流速：1.0 mL/min。

5.2.6 进样量：10 μL 。

5.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以标准系列工作液中唾液酸的浓度为横坐标，以峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。唾液酸标准溶液的色谱图参见附录A图A.1。

5.4 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中唾液酸的浓度。标准工作液和待测样液中唾液酸的响应值均应在仪器线性响应范围内。如果含量超过标准曲线线性范围，需调整称样量或定容体积重新检测。

6 分析结果的表述

试样中唾液酸的含量按公式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中唾液酸的含量，单位为克每千克（g/kg）；

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中唾液酸的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

m——试样的取样量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

计算结果需扣除空白值，保留 3 位有效数字。

对于固体燕窝样品，需要分别测定唾液酸总量和游离态唾液酸含量。固体燕窝中结合态唾液酸含量由唾液酸总量减去游离态唾液酸含量计算得到。

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

固体燕窝，当称样量为0.1 g时，检出限为0.3 g/kg，定量限为1.0 g/kg；液态燕窝制品，当称样量为10 g时，检出限为0.003 g/kg，定量限为0.01 g/kg。

第二法 液相色谱-荧光检测法

9 原理

样品在盐酸溶液中加热水解，释放出唾液酸，提取液经固相萃取柱净化后，与邻苯二胺反应生成荧光衍生物，样品试液用反相色谱柱分离，荧光检测器检测，外标法定量。

10 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。

10.1 试剂及材料

- 10.1.1 乙腈(CH₃CN)：色谱纯。
- 10.1.2 浓盐酸(HCl)：12 mol/L。
- 10.1.3 邻苯二胺盐酸盐 (C₆H₈N₂·2HCl)。
- 10.1.4 乙酸锌[Zn(CH₃COO)₂·2H₂O]。
- 10.1.5 亚铁氰化钾[K₄Fe(CN)₆·3H₂O]。
- 10.1.6 冰乙酸 (CH₃COOH)。
- 10.1.7 三氯甲烷 (CHCl₃)。
- 10.1.8 甲醇(CH₃OH)：色谱纯。
- 10.1.9 含极性基团的反相聚合物固相萃取柱：60 mg，3 mL，或相当者。含极性基团的反相聚合物固相萃取柱吸附剂是由亲脂性二乙烯苯和亲水性 N-乙烯基吡咯烷酮两种单体按照一定比例聚合成的多孔聚合物。使用前依次用 3.0 mL 甲醇和 3.0 mL 水活化。
- 10.1.10 微孔滤膜：0.45 μm。

10.2 试剂配制

- 10.2.1 盐酸溶液 (0.05 mol/L)：吸取4.17 mL浓盐酸，溶于水并稀释至1000 mL。
- 10.2.2 乙腈-水溶液 (1+9)：将乙腈和水按1比9的体积比混合均匀。
- 10.2.3 邻苯二胺盐酸盐溶液 (50 mg/mL)：称取2.5 g邻苯二胺盐酸盐，加入50 mL 0.05 mol/L盐酸溶液溶解，混匀，现用现配。
- 10.2.4 乙酸锌溶液 (183 g/L)：称取21.9 g乙酸锌溶于少量水中，加入3 mL冰乙酸，用水定容至100 mL。
- 10.2.5 亚铁氰化钾 (92 g/L)：称取10.6 g亚铁氰化钾，溶于水并稀释至100 mL。
- 10.2.6 0.2%磷酸溶液：吸取2 mL磷酸，溶于水并稀释至1000 mL。

10.3 标准品

10.3.1 唾液酸 (N-乙酰神经氨酸, C₁₁H₁₉NO₉, CAS号131-48-6)：纯度≥96%，或经国家认证授予标准物质证书的标准品。

10.4 标准溶液配制

10.4.1 唾液酸标准储备液 (1000 mg/L)：准确称取适量唾液酸标准品，用水溶解并配制成浓度为1000 mg/L的标准储备溶液，于4℃下避光保存，保存期6个月。

10.4.2 唾液酸标准系列工作液：分别吸取唾液酸标准储备液（1000 mg/L）0.2 mL、1.0 mL、2.0 mL、4.0 mL、10.0 mL和20.0 mL于100 mL容量瓶中，用乙腈-水溶液定容至刻度，混匀。唾液酸标准系列工作液的浓度分别为2.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、40.0 mg/L、100.0 mg/L和200.0 mg/L。临用现配。

11 仪器和设备

- 11.1 液相色谱仪：配有荧光检测器。
- 11.2 恒温水浴锅。
- 11.3 分析天平：感量为0.1 mg和0.01 g。
- 11.4 匀浆机：转速不低于10000 r/min。
- 11.5 高速离心机。

12 分析步骤

12.1 样品前处理

12.1.1 试样制备

液态样品摇匀；基质均匀的半固态样品和粉状样品直接用于下一步试样提取；其他样品需匀浆或粉碎均匀。制备好的试样储存于样品瓶中，密闭备用。

12.1.2 试样提取

称取1.0 g（精确至0.01 g）样品于25 mL离心管中（固体粉末样品先加入3 mL水溶解），加入0.05 mol/L盐酸溶液10 mL，盖上盖子，混匀，置于80℃水浴中水解40 min，在水浴过程中每5 min振荡一次。取出离心管，冷却至室温。9000 r/min离心5 min，将上层水解液转移至25 mL容量瓶，用乙腈-水溶液（10.2.2）定容，混匀。取10 mL上清液放入离心管中，加入3 mL乙酸锌溶液、3 mL亚铁氰化钾溶液和3 mL三氯甲烷，涡旋混匀后，15000 r/min离心5 min，取上清液待净化。

12.1.3 试样净化

吸取上清液，使该样液以小于1 mL/min的流速通过固相萃取柱，弃去约1-2 mL流出液，再收集流出液，待衍生化。

12.1.4 衍生化

准确吸取1.0 mL样液于10 mL具塞比色管中，准确加入1.0 mL邻苯二胺溶液，盖上玻璃塞，混匀，置于80℃水浴中反应35 min后，取出比色管，冷却至室温，过0.45 μm微孔滤膜后，待测。

同时做唾液酸标准系列工作溶液的衍生化。

12.2 液相色谱参考条件

- 12.2.1 色谱柱： C_{18} 柱，150 mm×4.6 mm（内径），5 μm，或相当者。
- 12.2.2 柱温：30℃。
- 12.2.3 荧光检测器激发波长：235 nm，发射波长：414 nm。
- 12.2.4 流速：1.0 mL/min。
- 12.2.5 进样量：10 μL。
- 12.2.6 流动相：A相：甲醇；B相：乙腈；C相：0.2%磷酸溶液。梯度洗脱，见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	A (%)	B (%)	C (%)
0.0	5	10	85
2.0	5	10	85
2.5	30	10	60
4.0	30	10	60
4.5	80	10	10
10.0	80	10	10
11.0	5	10	85
15.0	5	10	85

12.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以标准系列工作液中唾液酸的浓度为横坐标，以峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。唾液酸标准溶液的色谱图参见附录B图B.1。

12.4 试样溶液的测定

将衍生后的试样溶液注入液相色谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中唾液酸衍生物的浓度。标准工作液和待测样液中唾液酸衍生物的响应值均应在仪器线性响应范围内。如果含量超过标准曲线线性范围，需调整称样量或定容体积重新检测。

13 分析结果的表述

试样中唾液酸的含量按公式（2）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times f}{m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中唾液酸的含量，单位为克每千克（g/kg）；

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中唾液酸的浓度，单位为毫克每升（mg/L）；

V ——试样的定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样的取样量，单位为克（g）；

f ——稀释倍数；

1000——换算系数。

计算结果需扣除空白值，保留3位有效数字。

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10%。

15 其他

称样量为1 g时，唾液酸的检出限为0.02 g/kg，定量限为0.05 g/kg。

第三法 液相色谱-质谱/质谱法

16 原理

样品在盐酸溶液中加热水解，释放出唾液酸，提取液经固相萃取柱净化后，样品试液用反相色谱柱分离，液相色谱-质谱/质谱测定，外标法定量。

17 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。

17.1 试剂及材料

17.1.1 乙腈(CH₃CN)：色谱纯。

17.1.2 浓盐酸(HCl)：12 mol/L。

17.1.3 乙酸锌[Zn(CH₃COO)₂·2H₂O]。

17.1.4 亚铁氰化钾[K₄Fe(CN)₆·3H₂O]。

17.1.5 冰乙酸 (CH₃COOH)。

17.1.6 三氯甲烷 (CHCl₃)。

17.1.7 甲醇(CH₃OH)：色谱纯。

17.1.8 含极性基团的反相聚合物固相萃取柱：60 mg，3 mL，或相当者。含极性基团的反相聚合物固相萃取柱吸附剂是由亲脂性二乙烯苯和亲水性 N-乙烯基吡咯烷酮两种单体按照一定比例聚合而成的大孔聚合物。使用前依次用 3.0 mL 甲醇和 3.0 mL 水活化。

17.1.9 微孔滤膜：0.22 μm。

17.2 试剂配制

17.2.1 盐酸溶液 (0.05 mol/L)：吸取4.17 mL浓盐酸，溶于水并稀释至1000 mL。

17.2.2 乙腈-水溶液 (1+9)：将乙腈和水按1比9的体积比混合均匀。

17.2.3 乙酸锌溶液 (183 g/L)：称取21.9 g乙酸锌溶于少量水中，加入3 mL冰乙酸，用水定容至100 mL。

17.2.4 亚铁氰化钾 (92 g/L)：称取10.6 g亚铁氰化钾，溶于水并稀释至100 mL。

17.2.5 0.1 % 甲酸溶液：吸取1 mL甲酸，溶于水并稀释至1000 mL。

17.3 标准品

17.3.1 唾液酸 (N-乙酰神经氨酸, C₁₁H₁₉NO₉, CAS号131-48-6)：纯度≥96%，或经国家认证授予标准物质证书的标准品。

17.4 标准溶液配制

17.4.1 唾液酸标准储备液 (1000 mg/L)：准确称取适量唾液酸标准品，用水溶解并配制成为浓度为1000 mg/L的标准储备溶液，于4℃下避光保存，保存期6个月。

17.4.2 唾液酸标准中间液 (100 mg/L)：吸取标准储备液 (1000 mg/L) 10 mL于100 mL容量瓶中，加水定容至刻度，混匀，于4℃下避光保存，保存期1个月。

17.4.3 唾液酸标准系列工作液：分别吸取唾液酸标准中间液 (100 mg/L) 0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL和2.0 mL于100 mL容量瓶中，用乙腈-水溶液定容至刻度，混匀。唾液酸标准系列工作液的浓度分别为0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L和2.0 mg/L系列混合标准溶液。临用现配。

18 仪器和设备

18.1 液相色谱串联质谱仪：配电喷雾离子源。

18.2 恒温水浴锅。

18.3 分析天平：感量为 0.1 mg 和 0.01 g。

18.4 匀浆机：转速不低于 10000 r/min。

18.5 高速离心机。

19 分析步骤

19.1 样品前处理

19.1.1 试样制备

液态样品摇匀；基质均匀的半固态样品和粉状样品直接用于下一步试样提取；其他样品需匀浆或粉碎均匀。制备好的试样储存于样品瓶中，密闭备用。

19.1.2 试样提取

称取 1.0 g（精确至 0.01 g）样品于 25 mL 离心管中（固体粉末样品先加入 3 mL 水溶解），加入 0.05 mol/L 盐酸溶液 10 mL，盖上盖子，混匀，置于 80℃ 水浴中水解 40 min，在水浴过程中每 5 min 振荡一次。取出离心管，冷却至室温。9000 r/min 离心 5 min，将上层水解液转移至 25 mL 容量瓶，用乙腈-水溶液（10.2.2）定容，混匀。取 10 mL 上清液放入离心管中，加入 3 mL 乙酸锌溶液、3 mL 亚铁氰化钾溶液和 3 mL 三氯甲烷，涡旋混匀后，15000 r/min 离心 5 min，取上清液待净化。

19.1.3 试样净化

吸取上清液，使该样液以小于 1 mL/min 的流速通过固相萃取柱，弃去约 1-2 mL 流出液，再收集流出液。取 50 μL 流出液，加入乙腈-水溶液 950 μL，混匀，过 0.22 μm 微孔滤膜后，待测。

19.2 液相色谱参考条件

19.2.1 液相色谱参考条件

19.2.1.1 色谱柱：C₁₈ 柱，3.0 mm×150 mm，1.8 μm，或相当者。

19.2.1.2 柱温：30℃。

19.2.1.3 流速：0.3 mL/min。

19.2.1.4 进样量：5 μL。

19.2.1.5 流动相：A相：0.1%甲酸；B相：乙腈。梯度洗脱，见表2。

表 2 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	A (%)	B (%)
0.0	55	45
4.00	30	70
4.01	10	90
6.00	10	90
6.01	55	45
10.00	55	45

19.2.2 质谱/质谱参考条件

19.2.2.1 离子源：电喷雾（ESI），扫描方式：负离子模式，检测方式：多反应监测(MRM)。

19.2.2.2 毛细管电压：3500 V，裂解电压：120 V。

19.2.2.3 干燥气温度：300 °C，干燥气流速：8 L/min；鞘气温度：350 °C；鞘气流速：10 L/min。

19.2.2.4 定性离子对、定量离子对和碰撞能量见表 3。

表3 定性离子对、定量离子对和碰撞能量

化合物	定性离子对及碰撞能量 (ev)	定量离子对及碰撞能量 (ev)
唾液酸	308/87.0 (-17)	308/87.0 (-17)
	308/170.0 (-13)	

19.3 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入液相色谱-质谱/质谱仪中，测定相应的峰面积，以标准系列工作液中唾液酸的浓度为横坐标，以峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。唾液酸标准溶液的多反应监测色谱图参见附录C图C.1。

19.4 定性测定

按照液相色谱-质谱/质谱条件测定试样溶液和标准工作溶液，如果被测化合物保留时间与标准品保留时间相差不超过±2.5%，并且在扣除背景后的样品质谱图中，所选择的离子均出现且信噪比≥3，而且定性离子对的相对丰度(是用相对于最强离子丰度的强度百分比表示)与浓度相当的标准工作溶液的相对丰度允许偏差不超过表 4 规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物，见表 4 所示。

表 4 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%~50%	>10%~20%	≤10%
允许的最大偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

19.5 定量测定

将试样溶液注入液相色谱-质谱/质谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中唾液酸的浓度。标准工作液和待测液中唾液酸的响应值均应在仪器线性响应范围内。如果含量超过标准曲线线性范围，需调整称样量或定容体积重新检测。

20 分析结果的表述

试样中唾液酸的含量按公式 (3) 计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times f}{m \times 1000} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

X——试样中唾液酸的含量，单位为克每千克 (g/kg)；

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中唾液酸的浓度，单位为毫克每升 (mg/L)；

V——试样的定容体积，单位为毫升 (mL)；

m——试样的取样量，单位为克 (g)；

f——稀释倍数；

1000——换算系数。

计算结果需扣除空白值，保留 3 位有效数字。

21 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%。

22 其他

称样量为1 g时，唾液酸的检出限为0.02 g/kg，定量限为0.05 g/kg。

附录 A

唾液酸标准溶液的液相色谱图

唾液酸标准溶液(5.0 mg/L)的液相色谱图见图A.1。

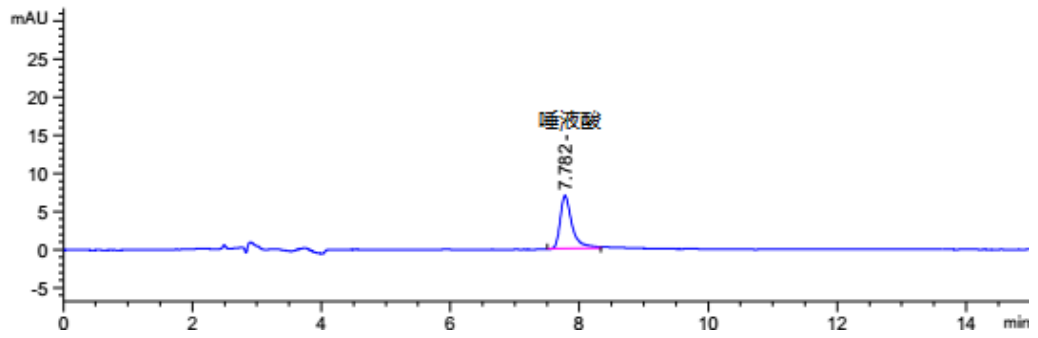
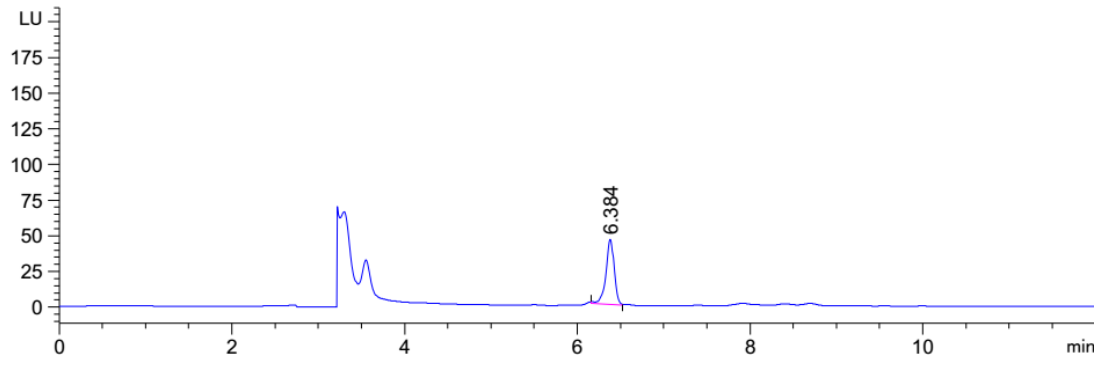


图 A.1 唾液酸标准溶液(5.0 mg/L)液相色谱图

附录 B

唾液酸衍生物的液相色谱图

唾液酸衍生物的液相色谱图见图B.1。

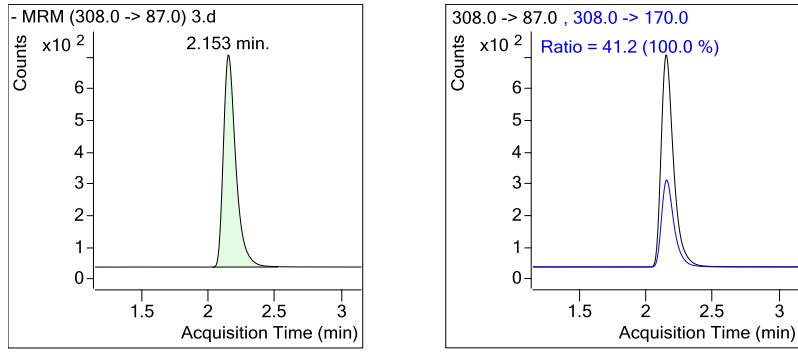


图B.1 唾液酸衍生物的液相色谱图

附录 C

唾液酸标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图

唾液酸标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图见图 C.1。



图C.1 唾液酸标准溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图