



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

食品中磷脂酰丝氨酸的测定

Determination of phosphatidylserine in food

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本文件按照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》的规定起草。

本文件由××××提出。

本文件由××××归口。

本文件起草单位：略。

本文件主要起草人：略。

食品中磷脂酰丝氨酸的测定

1 范围

本文件描述了食品中磷脂酰丝氨酸含量的测定方法。
本文件适用食品中磷脂酰丝氨酸含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中磷脂酰丝氨酸经超声提取，固相萃取柱净化后，采用正相液相色谱法分离，利用蒸发光散射检测器（ELSD）检测，以外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇(CH₃OH)：色谱纯。
- 5.1.2 乙腈(CH₃CN)：色谱纯。
- 5.1.3 氯仿(CHCl₃)：色谱纯。
- 5.1.4 正己烷[CH₃(CH₂)₄CH₃]：色谱纯。
- 5.1.5 异丙醇[(CH₃)₂CHOH]。
- 5.1.6 正丙醇(C₃H₇OH)。
- 5.1.7 三乙胺[(CH₃CH₂)₃N]。
- 5.1.8 冰乙酸(CH₃COOH)。
- 5.1.9 盐酸(HCl)。
- 5.1.10 磷酸(H₃PO₄)。
- 5.1.11 氯化钠(NaCl)。
- 5.1.12 二水合磷酸二氢钠(NaH₂PO₄·2H₂O)。

5.1.13 十二水合磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

5.1.14 氢氧化钠 (NaOH)

5.2 试剂配制

5.2.1 氯仿-甲醇溶液 (9:1, V/V)：取 50mL 甲醇和 450mL 氯仿，混匀备用。

5.2.2 甲醇-盐酸溶液 (90:10, V/V)：取 90mL 甲醇和 10mL 盐酸，混匀备用。

5.2.3 乙腈-正丙醇溶液 (60:30, V/V)：取 60mL 乙腈和 30mL 正丙醇，混匀备用。

5.2.4 异丙醇-甲醇盐酸溶液 (80:20, V/V)：取 80mL 异丙醇和 20mL 甲醇-盐酸溶液 (5.2.2)，混匀备用。

5.2.5 正己烷-异丙醇-乙酸-三乙胺溶液 (820:170:10:0.8, V/V)：取 820mL 正己烷，170mL 异丙醇，10mL 乙酸，0.8mL 三乙胺，混匀备用。

5.2.6 异丙醇-水-乙酸-三乙胺溶液 (850:140:10:0.8, V/V)：取 850mL 异丙醇，140mL 水，10mL 乙酸，0.8mL 三乙胺，混匀备用。

5.2.7 饱和氯化钠溶液：取足量的氯化钠于 200mL 水中，搅拌混匀，超声 30min 直至不再继续溶解氯化钠。

5.2.8 氢氧化钠溶液 (1mol/L)：称取 0.4g 氢氧化钠于烧杯中搅拌溶解，冷却至室温后转移至 100mL 容量瓶中，用水定容至刻度并混匀。

5.2.9 缓冲盐溶液 (0.1mol/L)：称取 27.4g 二水合磷酸二氢钠 (5.1.12) 及 8.80g 十二水合磷酸氢二钠 (5.1.13) 于 1000mL 烧杯中，加入 800mL 水溶解后，1mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 至 6.0，再转移至 1000mL 容量瓶中，用水定容至刻度并混匀。

6 材料

6.1 氨基固相萃取柱 (6cc, 500mg)。

6.2 滤膜：0.22 μm ，有机相。

7 标准品

磷脂酰丝氨酸 (CAS号：51446-62-9)：纯度 $\geq 97\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

8 标准溶液配制

8.1 磷脂酰丝氨酸标准溶液：准确称取磷脂酰丝氨酸标准品 100.0mg 至 10mL 容量瓶中，用氯仿-甲醇 (5.2.1) 溶液溶解并定容，即配制成含磷脂酰丝氨酸 10mg/mL 的储备液。 -20°C 下冷冻保存，有效期为 1 个月。

8.2 磷脂酰丝氨酸标准工作液：将磷脂酰丝氨酸标准溶液 (8.1) 用氯仿-甲醇 (5.2.1) 溶液稀释至浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ ，50 $\mu\text{g/mL}$ ，100 $\mu\text{g/mL}$ ，150 $\mu\text{g/mL}$ ，200 $\mu\text{g/mL}$ ，300 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作液，临用前现配。

9 仪器和设备

9.1 高效液相色谱仪：配备蒸发光散射检测器 (ELSD)。

- 9.2 分析天平：感量 0.001g 和 0.00001g。
- 9.3 超声波清洗仪：温度范围（10~80℃）。
- 9.4 涡旋混合器：最高转速不低于 500r/min。
- 9.5 离心机：最高转速不低于 10000r/min。
- 9.6 捣碎机。

10 分析步骤

10.1 试样的制备

- 10.1.1 饮料：固体饮料取代表性样品，用捣碎机捣至粉末状，样品袋密封，冷藏保存，备用；液体饮料直接取代表性样品混匀，密封保存，备用。
- 10.1.2 压片糖果：取代表性样品，用捣碎机捣至粉末状，样品袋密封，冷藏保存，备用。
- 10.1.3 凝胶糖果：取代表性样品，于-20℃冰箱冷冻（一般冷冻过夜）至坚硬后用捣碎机捣碎，样品袋密封，冷藏保存，备用。
- 10.1.4 胶囊：取代表性样品，去除外胶囊，内容物混匀，冷藏备用。
- 10.1.5 方便食品：取代表性样品，用捣碎机捣至粉末状，样品袋密封，冷藏保存，备用。
- 10.1.6 乳粉及乳制品：取代表性样品，混匀，冷藏保存，备用。

10.2 试样的提取

10.2.1 饮料、压片糖果、胶囊、方便食品等

称取0.1~1.0g试样（精确至0.001g）于50mL离心管中，加入10mL氯仿-甲醇溶液（5.2.1），涡旋分散试样，室温超声10min，于10000r/min离心2min，上清液过0.22 μm有机滤膜，待测。

10.2.2 凝胶糖果

称取0.5~1.0g试样于50mL离心管中，加入10mL 缓冲盐溶液（5.2.8），涡旋分散试样，室温超声10min，加10mL氯仿-甲醇溶液（5.2.1）涡旋1min混匀，于10000r/min离心2min，取下层氯仿层过0.22 μm有机滤膜，待测。

10.2.3 乳粉及乳制品

称取1.0g试样（精确至0.001g）于50mL离心管中，加入2mL水，涡旋分散试样，加入9mL甲醇（5.1.1），涡旋混匀1min，加入10mL氯仿（5.1.3），涡旋混匀1min，于10000r/min离心2min，上清液转移至另一50mL离心管，加入10mL饱和氯化钠溶液（5.2.7），涡旋2min，于10000r/min离心2min，去除上层水相，保留下层氯仿层，待净化。

10.2.4 净化

氨基固相萃取柱用5mL正己烷（5.1.4）活化后，取5mL待净化溶液（10.2.3）过柱，依次用5mL氯仿-甲醇溶液（5.2.1）5mL乙腈-正丙醇溶液（5.2.3）5mL甲醇（5.1.1）淋洗。加入6mL异丙醇-甲醇盐酸溶液（5.2.4）洗脱，抽干。收集洗脱液，于45℃水浴氮吹至干。用1~5mL氯仿-甲醇溶液（5.2.1）复溶，经0.22 μm有机滤膜过滤，待测。

11 色谱参考条件

- 11.1 色谱柱：Diol 柱（4.6mm×250mm，5μm），或具有同等性能的色谱柱。
- 11.2 柱温：45℃。
- 11.3 进样体积：20μL。
- 11.4 流速：1.0mL/min。
- 11.5 流动相 A：正己烷-异丙醇-乙酸-三乙胺（820:170:10:0.8，V/V）；流动相 B：异丙醇-水-乙酸-三乙胺（850:140:10:0.8，V/V）。
- 11.6 氮气压力：4.5bar。
- 11.7 蒸发温度：80℃。
- 11.8 洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间：min	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	95	5
8	60	40
17	40	60
17.01	0	100
20	0	100
20.1	95	5
22	95	5

12 标准曲线的制作

将磷脂酰丝氨酸标准工作液（8.2）按仪器参考条件进行测定，得到相应的标准系列工作溶液的色谱峰面积。以标准系列工作溶液质量浓度为横坐标，以峰面积响应值为纵坐标，绘制对数工作曲线。

13 测定

将试样溶液（10.2）注入高效液相色谱仪中，得到色谱峰面积响应值，在曲线范围内，用外标法校正，以保留时间定性，峰面积定量。

14 结果计算和表述

试样中磷脂酰丝氨酸的含量按式（1）计算。

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times F}{m \times 1000} \times 100 \quad (1)$$

式中：

X ——试样中磷脂酰丝氨酸的含量，单位为毫克每千克（mg/100g）；

C ——试样测定液中磷脂酰丝氨酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

C_0 ——由标准曲线查得空白试样进样溶液中磷脂酰丝氨酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——样品称样量，单位为克（g）；
 F ——试样稀释的倍数；
100、1000——换算系数；
结果保留三位有效数字。

15 精密度

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

16 方法检出限和定量限

取样量为1.0 g，定容体积为10 mL时，方法的检出限20 mg/100g，定量限为60 mg/100g。

附录 A
(资料性)
色谱图

A.1 标准溶液色谱图

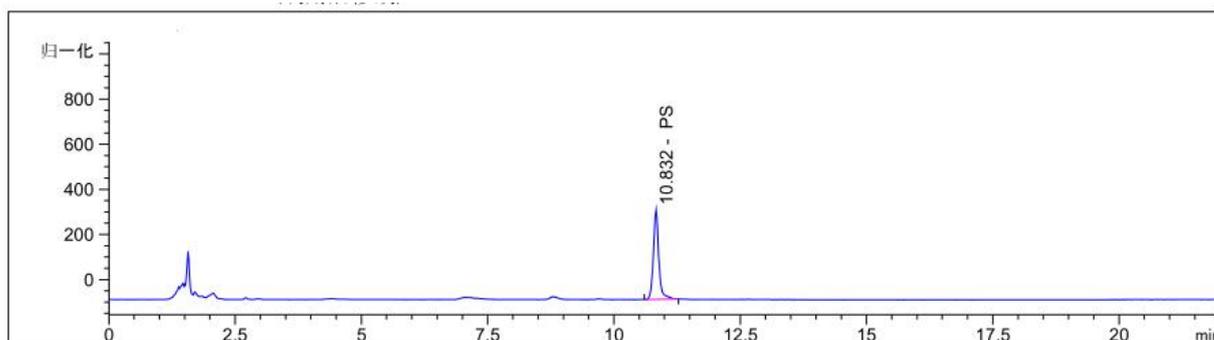


图 A.1 100 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液色谱图

A.2 试样色谱图

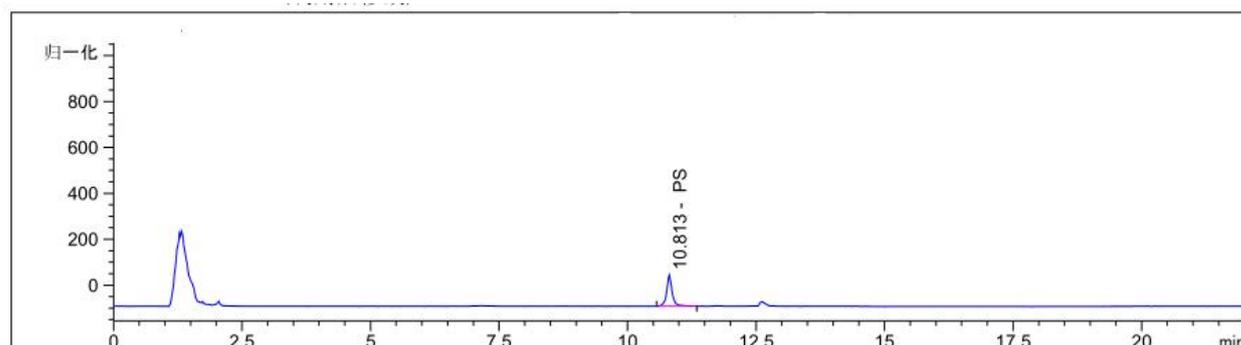


图 A.2 试样色谱图