



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—××××

食品中磷脂酰丝氨酸的测定

Determination of phosphatidylserine in food

×××××-××-××发布

×××××-××-××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。

本文件规定了食品质量相关技术要求，食品安全相关要求见有关法律法规、政策和食品安全标准等文件。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由全国食品工业标准化技术委员会(SAC/TC 64)提出并归口。

本文件起草单位：广东省食品工业研究所有限公司、广东省东莞市质量监督检测中心、国检测试控股集团(安徽)拓维检测服务有限公司、安利(中国)日用品有限公司、翁源广业清怡食品科技有限公司、江苏广海检测检验有限公司、中国科学院微生物研究所、仙乐健康科技股份有限公司、广东省科学院测试分析研究所(中国广州分析测试中心)、理星(宁波)生物科技有限公司、青岛谱尼测试有限公司、谱尼测试集团广西有限公司、青岛恒诺世佳品牌管理有限公司、沈阳天峰生物制药有限公司、河北迈金农业科技开发有限公司、广东广业清怡食品科技股份有限公司、东莞市南北检测认证技术有限公司、纽诺健康科学(中国)有限公司、山东佰安瑞生物药业有限公司、上海欧睿生物科技有限公司、河北远大九孚生物科技有限公司、广州白云山汉方现代药业有限公司、四川康联生物科技有限公司、上海统园食品技术有限公司、福建省工业产品生产许可证审查技术中心、山东悠乐滋生物科技有限公司、邦泰生物工程(深圳)有限公司、湖南国燕控股集团有限公司。

本文件主要起草人：庄俊钰、赖毅东、柯洋洋、刘春丽、王淑芝、林丹、何颖、许伟沂、王李平、袁永红、嵇春波、袁焕明、王桂森、张贵明、赵新庄、贝荣廷、何焜鹏、廖明慧、梁丽敏、杨静、车日晖、利通、张娜、陈秋霞、杜阳吉、陈秋森、何晓军、蔡振、朱培丰、王玉梅、朱程军、许文东、舒智、刘金双、罗春连、王志勇、舒尚科、康军。

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。

本文件适用于饮料、糖果(压片糖果、凝胶糖果)、方便食品、乳制品等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—2008 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提取净化后,采用正相液相色谱法分离,用蒸发光散射检测器(ELSD)测定,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。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇(CH_3OH):色谱纯。
- 5.1.2 乙腈(CH_3CN):色谱纯。
- 5.1.3 三氯甲烷(CHCl_3):色谱纯。
- 5.1.4 正己烷[$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$]:色谱纯。
- 5.1.5 异丙醇[$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$]:色谱纯。
- 5.1.6 正丙醇($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$):色谱纯。
- 5.1.7 三乙胺[$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$]。
- 5.1.8 乙酸(CH_3COOH)。
- 5.1.9 盐酸(HCl)。
- 5.1.10 磷酸(H_3PO_4)。
- 5.1.11 氯化钠(NaCl)。

5.1.12 二水合磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)。

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)。

5.1.15 水(H_2O):为 GB/T 6682—2008 规定的一级水。

5.2 试剂配制

5.2.1 三氯甲烷-甲醇溶液(90+10):取 900 mL 三氯甲烷(5.1.3)和 100 mL 甲醇,混匀备用。

5.2.2 甲醇-盐酸溶液(90+10):取 90 mL 甲醇(5.1.1)和 10 mL 盐酸(5.1.9),混匀备用。

5.2.3 乙腈-正丙醇溶液(60+30):取 60 mL 乙腈(5.1.2)和 30 mL 正丙醇(5.1.6),混匀备用。

5.2.4 异丙醇-甲醇盐酸溶液(80+20):取 80 mL 异丙醇(5.1.5)和 20 mL 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):取 820 mL 正己烷(5.1.4)、170 mL 异丙醇(5.1.5)、10 mL 乙酸(5.1.8)、0.8 mL 三乙胺(5.1.7),混匀备用。

5.2.6 异丙醇-水-乙酸-三乙胺溶液(850+140+10+0.8):取 850 mL 异丙醇(5.1.5)、140 mL 水、10 mL 乙酸(5.1.8)、0.8 mL 三乙胺(5.1.7),混匀备用。

5.2.7 饱和氯化钠溶液:称取 100 g 氯化钠(5.1.11),加入热水 200 mL,超声混匀,冷却至形成固液两相的饱和溶液。

5.2.8 氢氧化钠溶液(1 mol/L):称取 4.0 g 氢氧化钠(5.1.14)于烧杯中搅拌溶解,冷却至室温后转移至 100 mL 容量瓶中,用水定容至刻度并混匀。

5.2.9 磷酸盐缓冲溶液:称取 27.4 g 二水合磷酸二氢钠(5.1.12)及 8.80 g 十二水合磷酸氢二钠(5.1.13)于 1 000 mL 烧杯中,加入 800 mL 水溶解后,用 1 mol/L 氢氧化钠溶液(5.2.8)调节 pH 至 6.0,再转移至 1 000 mL 容量瓶中,用水定容至刻度并混匀。

5.3 材料

5.3.1 氨基固相萃取柱:500 mg/6 mL,或性能相当者。

5.3.2 滤膜:0.22 μm ,有机相。

5.4 标准品

磷脂酰丝氨酸($\text{C}_{42}\text{H}_{82}\text{NO}_{10}\text{P}$,CAS 号:51446-62-9):纯度 $\geq 97\%$,或经国家认证并授予标准样品/标准物质证书的标准样品/标准物质。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 磷脂酰丝氨酸标准储备液(10 mg/mL):准确称取磷脂酰丝氨酸标准品 100.0 mg(精确至 0.000 1 g),用适量三氯甲烷-甲醇溶液(5.2.1)溶解,移入 10 mL 容量瓶中,并用三氯甲烷-甲醇溶液(5.2.1)定容至刻度,混匀。—20 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻保存,有效期为 1 个月。

5.5.2 磷脂酰丝氨酸标准中间液(1 mg/mL):准确移取磷脂酰丝氨酸标准储备液(5.5.1)1 mL 至 10 mL 容量瓶中,用三氯甲烷-甲醇溶液(5.2.1)定容至刻度。临用现配。

5.5.3 磷脂酰丝氨酸标准工作液:分别吸取磷脂酰丝氨酸标准中间液(5.5.2)0.2 mL、0.5 mL、1 mL、1.5 mL、2 mL、3 mL 至 10 mL 容量瓶,用三氯甲烷-甲醇溶液(5.2.1)定容至刻度,混匀。磷脂酰丝氨酸标准系列溶液的质量浓度分别为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。临用现配。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪:配备蒸发光散射检测器(ELSD)。
- 6.2 分析天平:精确度 0.001 g 和 0.000 1 g。
- 6.3 超声波清洗仪:温度范围 10 ℃~80 ℃。
- 6.4 涡旋混合器:最高转速不低于 500 r/min。
- 6.5 离心机:最高转速不低于 10 000 r/min。
- 6.6 捣碎机。

7 分析步骤

7.1 试样的制备

7.1.1 固体试样

固体试样主要分为:

- 块状试样(压片糖果、方便食品等):取代表试样用捣碎机捣至粉末状,样品袋密封,冷藏备用;
- 粉末试样(乳粉、饮料等):取代表试样混匀,样品袋密封,冷藏备用;
- 凝胶糖果:取代表性样品,于-20 ℃冰箱冷冻至坚硬后用捣碎机捣碎,样品袋密封,冷藏备用;
- 软胶囊型凝胶糖果:取代表性样品,去除外软胶囊,内容物混匀,样品袋密封,冷藏备用。

7.1.2 液体试样

取代表性液体试样混匀,样品袋密封,冷藏备用。

7.2 试样的提取

7.2.1 饮料、压片糖果、软胶囊型凝胶糖果、方便食品等

称取 0.1 g~1.0 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 三氯甲烷-甲醇溶液(5.2.1),用涡旋混合器涡旋分散试样,用超声波清洗仪室温超声 10 min,于 10 000 r/min 离心 2 min,上清液过 0.22 μm 有机相滤膜,滤液待上机测定。

7.2.2 凝胶糖果

取 1.0 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 10 mL 磷酸盐缓冲溶液(5.2.9),用涡旋混合器涡旋振荡分散试样,加入 10 mL 三氯甲烷-甲醇溶液(5.2.1)涡旋 2 min,用超声波清洗仪室温超声 10 min,10 000 r/min 离心 2 min,若离心后三氯甲烷层出现乳化,三氯甲烷层转移至另一干净离心管中,加入 10 mL 饱和氯化钠溶液(5.2.7),涡旋 2 min,于 10 000 r/min 离心 2 min,取下层的三氯甲烷层过 0.22 μm 有机相滤膜,滤液待上机测定。

7.2.3 乳制品

称取 1.0 g 试样(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 2 mL 水,用涡旋混合器涡旋分散试样,加入 9 mL 甲醇(5.1.1),涡旋混匀 1 min,加入 10 mL 三氯甲烷(5.1.3),涡旋混匀 1 min,于 10 000 r/min 离心 2 min,上清液转移至另一 50 mL 离心管,加入 10 mL 饱和氯化钠溶液(5.2.7),涡旋 2 min,于 10 000 r/min 离心 2 min,去除上层水相,保留下层三氯甲烷层,待净化。

7.3 净化

氨基固相萃取柱用 5 mL 正己烷(5.1.4)活化后,取 5 mL 待净化溶液(7.2.3)过柱,依次用 5 mL 三氯甲烷-甲醇溶液(5.2.1)、5 mL 乙腈-正丙醇溶液(5.2.3)、5 mL 甲醇(5.1.1)淋洗。加入 6 mL 异丙醇-甲醇盐酸溶液(5.2.4)洗脱,收集洗脱液,于 45 °C 水浴氮吹挥去溶剂。用 1 mL~5 mL 三氯甲烷-甲醇溶液(5.2.1)复溶,过 0.22 μm 有机相滤膜,滤液待上机测定。

7.4 色谱测定

7.4.1 参考色谱条件

参考色谱条件如下:

- a) 色谱柱:Diol 二醇基柱(4.6 mm $\times$ 250 mm,5 μm),或具有同等性能的色谱柱;
- b) 柱温:45 °C;
- c) 进样体积:20 μL ;
- d) 流速:1.0 mL/min;
- e) 流动相 A:正己烷-异丙醇-乙酸-三乙胺溶液(5.2.5);
- f) 流动相 B:异丙醇-水-乙酸-三乙胺溶液(5.2.6);
- g) 载气压力:4.5 bar(4.5×10^5 Pa);
- h) 气体流量:2.0 L/min;
- i) 漂移管温度:80 °C;
- j) 雾化室温度:80 °C;
- k) 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
17.1	0	100
20	0	100
20.1	95	5
22	95	5

7.4.2 标准曲线的绘制

将磷脂酰丝氨酸标准工作液(5.5.3)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。

7.4.3 试样测定

将待测样液注入液相色谱仪中,得到待测溶液中磷脂酰丝氨酸的峰面积,根据标准曲线得到测定液中磷脂酰丝氨酸的质量浓度。待测样液中磷脂酰丝氨酸的响应值应在标准曲线的线性范围内,超过线

性范围则应稀释上机溶液,或调整取样量重新按样品分析步骤处理后再进样分析。磷脂酰丝氨酸的标准溶液色谱图及试样色谱图见附录 A。

7.4.4 空白试验

除不加试样外,按上述测定步骤进行。

8 结果计算与表示

试样中磷脂酰丝氨酸的含量按公式(1)计算。

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times F}{m \times 1\,000} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- X —— 试样中磷脂酰丝氨酸的含量,单位为毫克每一百克(mg/100 g);
 - C —— 试样测定液中磷脂酰丝氨酸的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 - C₀ —— 由标准曲线查得空白试样进样溶液中磷脂酰丝氨酸的质量浓度,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、1 000 —— 换算系数;
- 结果保留三位有效数字。

9 精密度

9.1 重复性

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%。

9.2 再现性

在再现性条件下,获得的不同实验室间独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的 10%。

9.3 其他

取样量为 1.0 g,定容体积为 10 mL 时,方法的检出限为 6 mg/100 g,定量限为 20 mg/100 g。

附录 A
(资料性)

磷脂酰丝氨酸标准溶液及试样液色谱图

磷脂酰丝氨酸标准溶液色谱图见图 A.1。试样液色谱图见图 A.2。

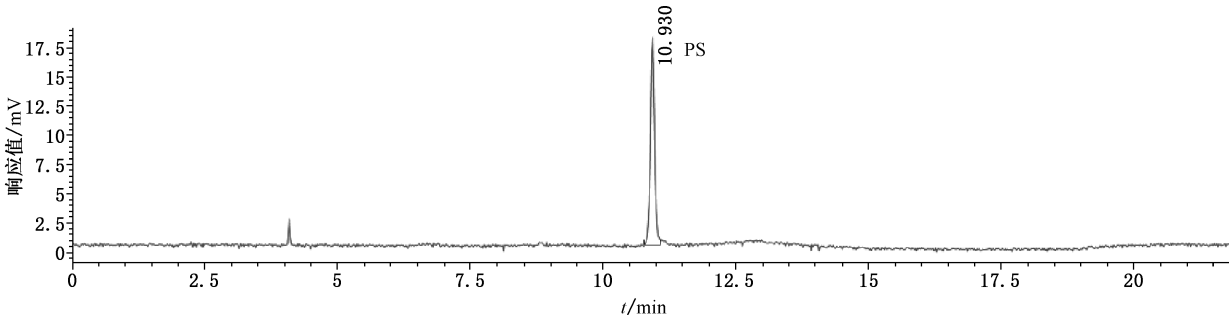


图 A.1 磷脂酰丝氨酸标准溶液(100 µg/mL)色谱图

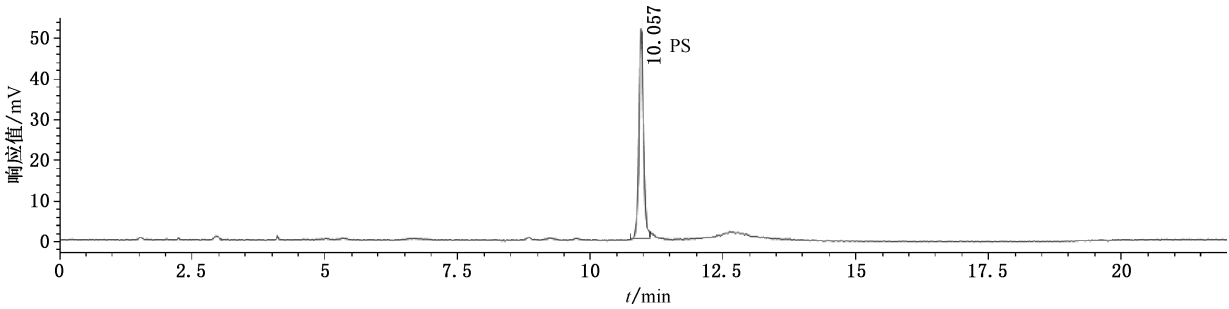


图 A.2 试样色谱图