

991CS 67.040
X 01

团 体 标 准

T/GDFPT 0014—2020

乳及乳制品中磷脂酰丝氨酸的测定

2020-03-20 发布

2020-04-20 实施

广东省食品生产技术协会 发布

目 次

前言.....	I
乳及乳制品中磷脂酰丝氨酸的测定.....	1
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 原理.....	1
4 试剂和材料.....	1
5 仪器和设备.....	1
6 分析步骤.....	2
7 分析结果的表述.....	3
8 精密度.....	3
9 其他.....	3
10 附录.....	4

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则第1部分：标准的结构和编写》的规则起草。

本标准由广东省食品生产协会提出并归口。

本标准负责起草单位：广东省食品工业研究所有限公司（广东省质量监督食品检验站）、翁源广业清怡食品科技有限公司、广东省食品生产协会。

本标准主要起草人：周芳梅、冯志强、陈晓嘉、李志龙、陈晓宁、黄韡、李令星、黄娜丽、徐静。

乳及乳制品中磷脂酰丝氨酸的测定

1 范围

本标准规定了乳及乳制品中磷脂酰丝氨酸的测定方法。

本标准适用于乳及乳制品中磷脂酰丝氨酸的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本标准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标准。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本标准。

GB/T 603 化学试剂试验方法中所有制剂及制品的制备

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样经酶解后,用氯仿-甲醇溶液萃取,经氨基固相萃取柱净化后,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。

4 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。

4.1 试剂

4.1.1 正己烷[$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$]:色谱纯。

4.1.2 异丙醇[$(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$]:色谱纯。

4.1.3 乙酸(CH_3COOH):优级纯。

4.1.4 三乙胺[$(\text{CH}_3\text{CH}_2)_3\text{N}$]:优级纯。

4.1.5 氯仿(CHCl_3):色谱纯。

4.1.6 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

4.1.7 乙腈($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}$):色谱纯。

4.1.8 正丙醇($\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$)。

4.1.9 盐酸(HCL)。

4.1.10 无水乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)。

4.2 材料

4.2.1 木瓜蛋白酶(CAS:9001-73-4, >2000U/mg)。

4.2.1 氨基固相萃取柱(6cc, 500mg)。

4.3 试剂配制

4.3.1 氯仿-甲醇溶液(900+100):取氯仿 900mL 和甲醇 100mL,混匀,备用。

T/GDFPT 0014—2020

4.3.2 正己烷-异丙醇-乙酸-三乙胺溶液（820+170+10+0.8）：取正己烷 820mL，异丙醇 170mL，乙酸 10mL，三乙胺 0.8mL，混匀，备用。

4.3.3 异丙醇-水-乙酸-三乙胺溶液（850+140+10+0.8）：取异丙醇 850mL，水 140mL，乙酸 10mL，三乙胺 0.8mL，混匀，备用。

4.3.4 甲醇-盐酸溶液（90+10）：取甲醇 90mL 和盐酸 10mL，混匀，备用。

4.3.5 乙腈-正丙醇溶液（60+30）：取乙腈 60mL 和正丙醇 30mL，混匀，备用。

4.3.6 异丙醇-甲醇盐酸溶液（80+20）：取异丙醇 80mL 和甲醇-盐酸溶液（4.2.4）20mL，混匀，备用。

4.4 标准品

4.4.1 磷脂酰丝氨酸（ $C_{42}H_{82}NO_{10}P$ ）：纯度 $\geq 90\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

4.5 标准溶液的配制

磷脂酰丝氨酸标准溶液：准确称取磷脂酰丝氨酸标准品 10mg（精确至 0.00001g），置于 10mL 容量瓶中，用氯仿-甲醇溶液（4.2.1）溶解并定容，混匀，该标准储备液的磷脂酰丝氨酸标准溶液浓度为 1mg/mL。分别准确吸取此标准储备液 0.1mL、0.2mL、0.4mL、0.8mL、1mL，并用氯仿-甲醇溶液定容至 10mL，配制的磷脂酰丝氨酸浓度分别为 10 μ g/mL、20 μ g/mL、40 μ g/mL、80 μ g/mL、100 μ g/mL。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱仪：带蒸发光散射检测器。

5.2 分析天平：感量分别为 0.1 mg 和 1 mg。

5.3 超声波水浴。

5.4 离心机。

5.5 旋转蒸发仪。

5.6 气体浓缩仪。

5.7 水浴恒温振荡器

5.8 旋涡混合器

6 分析步骤

6.1 试样制备及提取

准确称取试样 2g（精确至 0.0001 g），置于 150mL 具塞三角瓶中，加入 0.5g 木瓜蛋白酶，用 5mL 水充分溶解后再加入 20mL 无水乙醇，充分摇匀。于 37 $^{\circ}$ C 水浴恒温振荡器中酶解、振荡过夜。取出三角瓶后恢复至室温，将酶解后溶液转入 250mL 分液漏斗中，用 30mL 氯仿-甲醇溶液（4.2.1）萃取，重复 2 次，合并下层萃取液。将萃取液转移至 250mL 旋转蒸发瓶或氮气浓缩管中，并将其接在旋转蒸发仪或气体浓缩仪上，于 45 $^{\circ}$ C 中减压蒸馏或气流浓缩，待瓶中溶液蒸干，取下蒸发瓶，用氯仿-甲醇溶液（4.2.1）分次将蒸发瓶中残留物溶解并转移至 50mL 容量瓶中，定容至刻度，待净化。当样品含量较高时，可适当调整定容体积。

6.2 净化

氨基固相萃取柱用5mL正己烷活化后，取5mL待净化溶液过柱，依次用5mL氯仿-甲醇溶液（4.2.1）、5mL乙腈-正丙醇溶液（4.3.5）、5mL甲醇（4.1.6）淋洗，抽干。加入6mL异丙醇-甲醇盐酸溶液（4.3.6）洗脱，抽干。收集洗脱液，于45℃水浴氮吹至干。用5mL氯仿-甲醇溶液（4.2.1）溶解残余物，经0.22μm有机滤膜过滤，用于液相色谱分析。

6.3 仪器参考条件

6.3.1 色谱柱: Diol 柱（4.0mm*250mm， 5μm）或具同等性能的色谱柱；

6.3.2 流动相: 流动相A为正己烷-异丙醇-乙酸-三乙胺（820+170+10+0.8），见4.3.2；流动相B为异丙醇-水-乙酸-三乙胺（850+140+10+0.8），见4.3.3。

按表1进行梯度洗脱：

表1

时间 (min)	A(%)	B(%)
0	95	5
5	80	20
8.5	60	40
15	0	100
17.5	0	100
17.6	80	20
18	95	5
25	95	5

6.3.3 流速：1.0 mL /min；

6.3.4 柱温：45℃；

6.3.5 进样量：20.0 μL；

6.3.6 漂移管：100℃；

6.3.7 雾化室：80℃；

6.3.8 氮气：2.0 SLM。

6.4 标准曲线的制作

取磷脂酰丝氨酸标准溶液分别进样20.0μL，在给定的色谱条件下测定峰面积，然后作峰面积-磷脂酰丝氨酸浓度（μg/mL）标准曲线，曲线方程依蒸发光散射检测原理，见式（1）：

$$y = bx^a \dots\dots\dots (1)$$

式中：

y ——峰面积；

a 、 b ——与蒸发室温度、流动相性质等实验条件有关的常数；

x ——磷脂酰丝氨酸的浓度，单位为为微克每毫升（μg/mL）。

按仪器数据处理软件的处理方式不同，也可作对数方程，即 $lgy=b+algx$ 。

6.5 试样溶液的测定

在相同色谱条件下，将制备的空白溶液和试样溶液分别进样20.0μL，进行正相液相色谱分析。以保留时间定性，峰面积外标法定量。

7 分析结果的表述

试样中磷脂酰丝氨酸的含量按公式（2）计算：

$$X = \frac{(C - C_0) \times V \times F}{m \times 1000} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

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——由标准曲线查得试样进样溶液中磷脂酰丝氨酸的浓度，单位为为微克每毫升（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浓度，单位为为微克每毫升（μg/mL）；
 - V——试样定容体积，单位为毫升（mL）；
 - F——稀释倍数
 - m——试样质量，单位为克（g）；
 - 100、1000——换算系数；
- 结果保留三位有效数字。

8 精密度

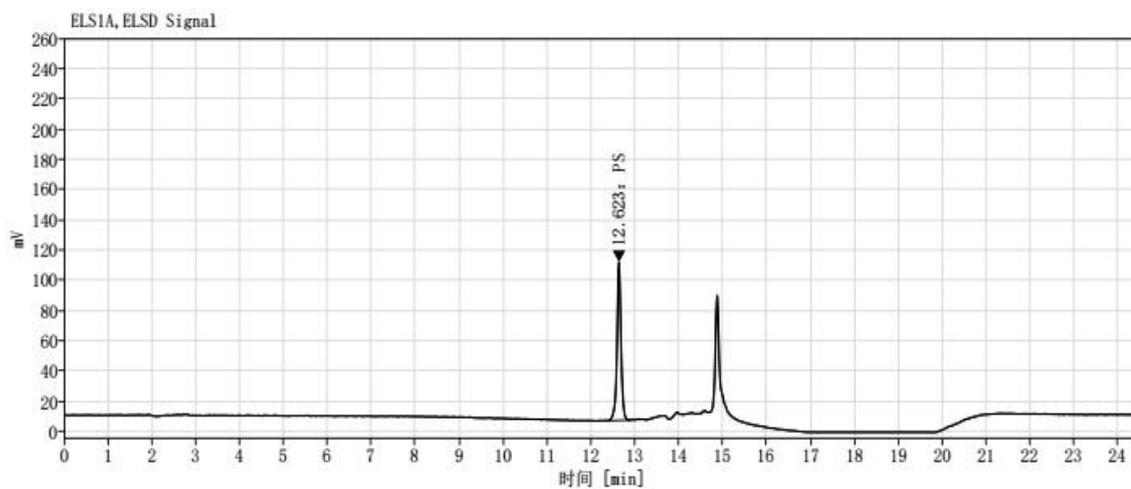
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

9 其他

液体试样方法检出限为3.0 mg/100g，定量限为10 mg/100g；固体试样的10 mg/100g，定量限为30 mg/100g。

附录 A

磷脂酰丝氨酸标准品的高效液相色谱图见图A. 1。



图A. 1磷脂酰丝氨酸标准品的高效液相色谱图