

中华人民共和国水产行业标准

SC/T 3057—2022

水产品及其制品中磷脂含量的测定 液相色谱法

Determination of phosphatide in fish and fishery products
—Liquid chromatography

2022-11-11 发布

2023-03-01 实施



中华人民共和国农业农村部 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。

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。

本文件由农业农村部渔业渔政管理局提出。

本文件由全国水产标准化技术委员会水产品加工分技术委员会(SAC/TC 156/SC 3)归口。

本文件起草单位：中国水产科学研究院黄海水产研究所、国家水产品质量检验检测中心、中国水产科学研究院黑龙江水产研究所。

本文件主要起草人：王联珠、彭吉星、孙言春、谭志军、郭莹莹、赵新楠、朱文嘉、文艺晓、吴海燕、郭萌萌、郑关超。

水产品及其制品中磷脂含量的测定 液相色谱法

1 范围

本文件描述了用液相色谱法测定水产品及其制品中磷脂含量的原理、试剂和材料、仪器和设备、试样制备与保存、测定步骤、结果计算、方法灵敏度和精密度。

本文件适用于鱼、贝、虾等水产品及其制品中磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、磷脂酰胆碱、鞘磷脂、溶血磷脂酰胆碱 5 种磷脂含量的测定。

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

GB/T 15687 动植物油脂 试样的制备

GB/T 30891—2014 水产品抽样规范

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样中磷脂经氯仿-甲醇溶液提取，固相萃取柱净化，液相色谱-蒸发光散射检测器检测，外标法定量。

5 试剂和材料

警示：应当严格遵循有毒物质的使用规程。采取有效措施保证组织和个人安全。

除另有说明，所有试剂均为色谱纯，试验用水应符合 GB/T 6682 一级水的要求。

5.1 试剂

5.1.1 正己烷(C_6H_{14})。

5.1.2 异丙醇(C_3H_8O)。

5.1.3 氯仿($CHCl_3$)。

5.1.4 甲醇(CH_3OH)。

5.1.5 乙酸(CH_3COOH)。

5.1.6 乙醚($C_4H_{10}O$)。

5.1.7 三乙胺($C_6H_{15}N$)。

5.1.8 盐酸(HCl):优级纯。

5.1.9 氯化钠(NaCl):优级纯。

5.1.10 无水硫酸钠(Na_2SO_4):优级纯,120℃烘干4h,干燥器内冷却至室温,储于密封瓶中备用。

5.1.11 正己烷-异丙醇溶液(2+3):量取40mL正己烷和60mL异丙醇,混匀。

5.1.12 氯仿-甲醇溶液(9+1):量取9mL氯仿和1mL甲醇,混匀。

5.1.13 氯仿-甲醇溶液(2+1):量取200mL氯仿和100mL甲醇,混匀。

5.1.14 0.9%氯化钠溶液:称取9g氯化钠,加1000mL水溶解。

- 5.1.15 氯仿-异丙醇溶液(2+1):量取 200 mL 氯仿和 100 mL 异丙醇,混匀。
- 5.1.16 乙酸-乙醚溶液(1+72):量取 4 mL 乙酸和 288 mL 乙醚,混匀。
- 5.1.17 2%盐酸溶液:量取 5.4 mL 盐酸,加水定容至 100 mL,混匀。
- 5.1.18 氯仿-甲醇-盐酸溶液(200+100+1):取 200mL 氯仿和 100 mL 甲醇,加入 1 mL 2%盐酸溶液,混匀。
- 5.1.19 0.04%三乙胺正己烷溶液:准确量取 0.4 mL 三乙胺,加正己烷定容至 1 000 mL,混匀。
- 5.1.20 13%乙酸溶液:准确量取 130 mL 乙酸,加水定容至 1 000 mL,混匀。

5.2 标准品

宜选择动物性来源标准品,5 种磷脂标准品详细信息见附录 A。

5.3 标准溶液配制

5.3.1 单一标准储备液

分别准确称取各磷脂标准品适量(精确至 0.1 mg),其中磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱、鞘磷脂和溶血磷脂酰胆碱用正己烷-异丙醇溶液(5.1.11)溶解,磷脂酰肌醇先用 0.5 mL 氯仿-甲醇溶液(5.1.12)溶解后再加入正己烷-异丙醇溶液(5.1.11)稀释并定容,配制成质量浓度分别为磷脂酰乙醇胺 1 000 mg/L、磷脂酰肌醇 1 000 mg/L、磷脂酰胆碱 3 000 mg/L、鞘磷脂 1 000 mg/L 和溶血磷脂酰胆碱 2 000 mg/L 的单一标准储备液,于-18℃下避光密封保存,有效期为 1 个月。

5.3.2 混合标准中间液

分别准确移取 1.8 mL 各磷脂单一标准储备液于同一 10 mL 棕色容量瓶中,用正己烷-异丙醇溶液(5.1.11)稀释并定容,配制成质量浓度分别为磷脂酰乙醇胺 180 mg/L、磷脂酰肌醇 180 mg/L、磷脂酰胆碱 540 mg/L、鞘磷脂 180 mg/L 和溶血磷脂酰胆碱 360 mg/L 的混合标准中间液,现用现配。

5.3.3 系列混合标准工作溶液

分别准确移取适量混合标准中间液于 10 mL 棕色容量瓶中,用正己烷-异丙醇溶液(5.1.11)稀释配制成质量浓度分别为磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇和鞘磷脂:10 mg/L、30 mg/L、45 mg/L、90 mg/L、180 mg/L,磷脂酰胆碱:30 mg/L、90 mg/L、135 mg/L、270 mg/L、540 mg/L;溶血磷脂酰胆碱:20 mg/L、60 mg/L、90 mg/L、180 mg/L、360 mg/L 的系列混合标准工作溶液,现用现配。

5.4 材料

氨基固相萃取柱:1 000 mg/6 mL,或性能相当者。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱仪:配蒸发光散射检测器。
- 6.2 天平:感量为 0.1 mg,0.001 g 和 0.01 g。
- 6.3 涡旋振荡器。
- 6.4 离心机:转速 \geq 4 000 r/min。
- 6.5 氮吹仪。
- 6.6 超声波清洗仪。
- 6.7 固相萃取装置。

7 试样制备与保存

7.1 试样制备

湿基试样制备按照 GB/T 30891—2014 中附录 B 的规定执行;干制品试样至少 200 g,粉碎后全部过 0.42 mm 孔径分析筛,充分混匀后装入洁净容器中密封备用;油脂试样参照 GB/T 15687 的规定执行,分取 50 g 装入洁净容器中密封备用。

7.2 试样保存

—18℃以下避光保存。

8 测定步骤

8.1 提取和净化

8.1.1 固体试样

8.1.1.1 提取

湿基试样称取 1 g~2 g(精确至 0.01 g),干制品试样称取 0.1 g~0.2 g(精确至 0.001 g),置于 50 mL 离心管中,加入 15 mL 氯仿-甲醇溶液(5.1.13),涡旋混合后超声提取 30 min,4 000 r/min 离心 5 min,收集上清液,残渣再加入 15 mL 氯仿-甲醇溶液(5.1.13)重复上述操作 2 次,合并上清液至分液漏斗中,加入 10 mL 氯化钠溶液(5.1.14),振荡摇匀后静置分层,收集下层提取液,加入适量无水硫酸钠(5.1.10)脱水过滤,30℃氮吹至近干,加入 2 mL 氯仿(5.1.3)溶解,待净化。

8.1.1.2 净化

氨基固相萃取柱先用 5 mL 氯仿活化,将待净化液移入氨基固相萃取柱(5.4),依次用 10 mL 氯仿-异丙醇溶液(5.1.15)和 10 mL 乙酸-乙醚溶液(5.1.16)淋洗小柱,再依次用 10 mL 甲醇和 10 mL 氯仿-甲醇-盐酸溶液(5.1.18)洗脱,收集全部洗脱液,于 30℃下氮吹至近干,加入正己烷-异丙醇溶液(5.1.11)溶解并定容至 10 mL,过 0.45 μm 尼龙滤膜后待测。

8.1.2 油脂试样

称取 0.2 g~0.5 g 油脂试样(精确至 0.001 g),加入氯仿(5.1.3)溶解并定容至 10 mL,准确移取 1 mL 按照 8.1.1.2 进行净化操作。

8.2 测定

8.2.1 色谱参考条件

- 色谱柱:硅胶整体柱(100 mm×4.6 mm),或性能相当者;
- 柱温:30℃;
- 进样量:20 μL;
- 流速:1.5 mL/min;
- 载气压力:50 PSI;
- 漂移管温度:65℃,喷雾器:加热模式 75%;
- 流动相:A 相 0.04% 三乙胺正己烷溶液(5.1.19),B 相 异丙醇(5.1.2),C 相 13% 乙酸溶液(5.1.20);梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

| 时间, min | 流动相, % | | |
|---------|--------|-----|-----|
| | A 相 | B 相 | C 相 |
| 0.0 | 40 | 57 | 3 |
| 8.0 | 40 | 50 | 10 |
| 15.0 | 40 | 50 | 10 |
| 15.1 | 40 | 57 | 3 |
| 20.0 | 40 | 57 | 3 |

8.2.2 标准曲线绘制

将系列混合标准工作液(5.3.3)分别注入液相色谱仪中,以系列标准溶液中各磷脂质量浓度的对数值为横坐标、以相应色谱峰峰面积的对数值为纵坐标,绘制标准曲线。5 种磷脂混合标准工作溶液的液相色谱图见附录 B。标准曲线方程依蒸发光散射检测原理,按公式(1)计算。

$$\lg y = b \lg x + \lg a \cdots \cdots (1)$$

式中:

- y —— 峰面积；
- x —— 磷脂标准溶液质量浓度的数值,单位为毫克每升(mg/L)；
- a、b —— 与蒸发温度、流动相性质等条件有关的常数。

8.2.3 试样溶液测定

取试样溶液注入液相色谱仪中,按 8.2.1 的色谱条件进行测定,记录色谱峰的保留时间和峰面积,外标法定量。试样溶液中各磷脂色谱峰保留时间与相应磷脂标准色谱峰保留时间的相对偏差不应大于 5.0%。试样溶液中各磷脂的响应值应在标准曲线范围内,超出范围的试样溶液可适当稀释后再进行测定。

8.3 空白试验

除不称取试样外,采用完全相同的测定步骤进行测定。

9 结果计算

试样中各磷脂的含量按公式(2)计算。

$$X_i = \frac{C_i \times V \times F}{m \times 1000} \quad (2)$$

式中:

- X_i —— 试样中各磷脂含量的数值,单位为毫克每克(mg/g)；
- C_i —— 从标准曲线得到的试样溶液中各磷脂质量浓度的数值,单位为毫克每升(mg/L)；
- V —— 试样溶液最终定容体积的数值,单位为毫升(mL)；
- F —— 稀释倍数；
- m —— 试样质量的数值,单位为克(g)；
- 1 000 —— 换算系数。

计算结果以重复性条件下 2 次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留至小数点后 2 位。

10 方法灵敏度和精密度

10.1 方法检出限和定量限

固体试样的方法检出限和定量限见表 2,油脂试样的方法检出限和定量限见表 3。

表 2 固体试样方法检出限和定量限

| 磷脂类化合物 | 检出限,mg/g | 定量限,mg/g |
|---------|----------|----------|
| 磷脂酰乙醇胺 | 0.10 | 0.20 |
| 磷脂酰肌醇 | 0.10 | 0.20 |
| 磷脂酰胆碱 | 0.30 | 0.60 |
| 鞘磷脂 | 0.10 | 0.20 |
| 溶血磷脂酰胆碱 | 0.20 | 0.40 |

表 3 油脂试样方法检出限和定量限

| 磷脂类化合物 | 检出限,mg/g | 定量限,mg/g |
|---------|----------|----------|
| 磷脂酰乙醇胺 | 2.00 | 4.00 |
| 磷脂酰肌醇 | 2.00 | 4.00 |
| 磷脂酰胆碱 | 6.00 | 12.00 |
| 鞘磷脂 | 2.00 | 4.00 |
| 溶血磷脂酰胆碱 | 4.00 | 8.00 |

10.2 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附录 A

(资料性)

5 种磷脂标准品详细信息

5 种磷脂标准品详细信息见表 A.1。

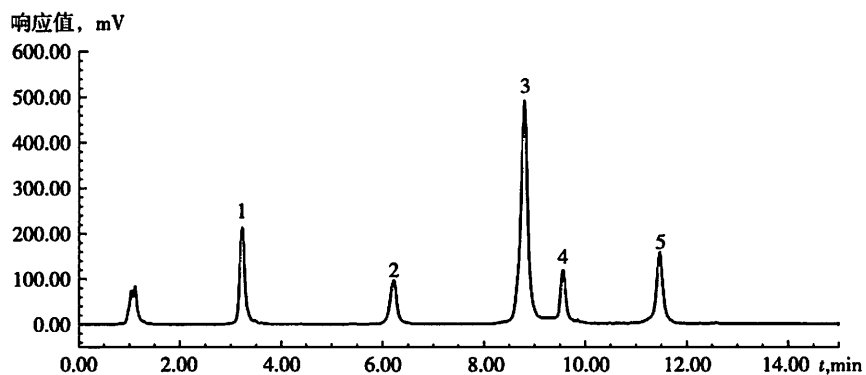
表 A.1 5 种磷脂标准品详细信息

| 序号 | 中文名称 | 英文名称 | 英文缩写 | CAS号 | 纯度,% | 生物来源 |
|----|---------|--------------------------|------|-------------|------|------|
| 1 | 磷脂酰乙醇胺 | Phosphatidylethanolamine | PE | 39382-08-6 | ≥97 | 鸡蛋黄 |
| 2 | 磷脂酰肌醇 | Phosphatidylinositol | PI | 383907-33-3 | ≥99 | 牛肝脏 |
| 3 | 磷脂酰胆碱 | Phosphatidylcholines | PC | 8002-43-5 | ≥99 | 鸡蛋黄 |
| 4 | 鞘磷脂 | Sphingomyelin | SM | 85187-10-6 | ≥98 | 鸡蛋黄 |
| 5 | 溶血磷脂酰胆碱 | Lysophosphatidylcholine | LPC | 9008-30-4 | ≥99 | 鸡蛋黄 |

附录 B
(资料性)

5 种磷脂混合标准溶液的液相色谱图

5 种磷脂混合标准溶液的液相色谱图见图 B.1。



标引序号说明:

1——磷脂酰乙醇胺(90 mg/L);

4——鞘磷脂(90 mg/L);

2——磷脂酰肌醇(90 mg/L);

5——溶血磷脂酰胆碱(180 mg/L)。

3——磷脂酰胆碱(270 mg/L);

图 B.1 5 种磷脂混合标准溶液的液相色谱图

中华人民共和国
水产行业标准
水产品及其制品中磷脂含量的测定 液相色谱法
SC/T 3057—2022

* * *

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北京印刷一厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2023 年 2 月第 1 版 2023 年 2 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·9252

定价: 24.00 元

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261



SC/T 3057—2022