



中华人民共和国国家标准

GB 31614.1—2023

食品安全国家标准 食品中唾液酸的测定

2023-09-06 发布

2024-03-06 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:

- 修改了标准名称;
- 修改了方法的适用范围,增加了液态乳、乳粉、糕点、饮料;
- 明确了燕窝及其制品中测定的目标物质为结合态唾液酸;
- 增加了液相色谱-荧光检测法和液相色谱-质谱/质谱法。

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。

本标准第一法液相色谱-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,释放出结合态唾液酸,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(CH_3CN):色谱纯。

3.1.2 磷酸(H_3PO_4):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 ,有机相型。

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 1 000 mL。

3.2.2 0.1%磷酸溶液:吸取 1 mL 磷酸,溶于水并稀释至 1 000 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 4:6 的体积比混合均匀。

3.3 标准品

唾液酸(*N*-乙酰神经氨酸, $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_9$,CAS 号 131-48-6):纯度 $\geq 96\%$,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(1 000 mg/L):准确称取适量唾液酸标准品(按纯度进行折算),用水溶解并

配制质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备溶液,于 4 °C 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(1 000 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,加入 0.1%磷酸溶液-乙腈(4+6)定容至刻度,混匀。唾液酸标准系列工作液的质量浓度分别为 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 10 000 r/min。

4.6 烘箱。

4.7 高速离心机。

4.8 筛网:筛网孔径 0.150 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 g 燕窝、固态燕窝制品在 101 °C~105 °C 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 0.150 mm)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

液态燕窝制品混匀后取 200 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,装入洁净容器,密闭避光,冷藏保存。

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 0.000 1 g)样品于 25 mL 具塞比色管中,加入 10 mL 盐酸溶液,盖上玻璃塞,涡旋混匀,置于 80 °C 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 0.1%磷酸溶液-乙腈(4+6)定容至刻度,混匀。移取 2 mL 于离心管中,15 000 r/min 离心 3 min,取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜后,待测。

游离态唾液酸含量的测定:称取 0.1 g(精确至 0.000 1 g)样品于 25 mL 具塞比色管中,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 0.1%磷酸溶液-乙腈(4+6)定容至刻度,混匀。移取 2 mL 于离心管中,15 000 r/min 离心

3 min,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

结合态唾液酸含量的测定:称取 10 g(精确至 0.01 g)样品置于透析袋中(试样体积不超过透析袋容积的 20%),扎紧透析袋两端,置于 1 000 mL 烧杯中在流动的自来水下透析 24 h。透析后,将此透析袋中的试液转移至 25 mL 具塞比色管中,加少量水冲洗透析袋,合并至比色管中,加入 104 μL 浓盐酸,加水定容至 25 mL,混匀,使水解液中盐酸的质量浓度为 0.05 mol/L。盖上玻璃塞,置于 80 °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 0.1%磷酸溶液-乙腈(4+6)定容至刻度,混匀。移取 2 mL 于离心管中,15 000 r/min 离心 3 min,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

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:SAX 强阴离子交换柱,250 mm×4.6 mm(内径),5 μm,或相当者。
- b) 柱温:30 °C。
- c) 检测波长:205 nm。
- d) 流动相:0.1%磷酸溶液-乙腈(40+60,体积比)。
- e) 流速:1.0 mL/min。
- f) 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质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。唾液酸标准溶液的色谱图参见附录 A 中图 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质量浓度。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

试样中结合态唾液酸的含量按式(1)计算。

$$X = \frac{\rho \times V}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(1)$$

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质量浓度,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);
- 1 000——换算系数。

计算结果需扣除空白值,保留 3 位有效数字。

对于燕窝和固态燕窝制品,分别测定唾液酸总量和游离态唾液酸含量,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

燕窝和固态燕窝制品,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(CH_3CN):色谱纯。

10.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

10.1.3 磷酸(H_3PO_4):色谱纯。

10.1.4 四氢呋喃($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$):色谱纯。

10.1.5 浓盐酸(HCl):12 mol/L。

10.1.6 邻苯二胺盐酸盐($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$)。

10.1.7 三氯甲烷(CHCl_3)。

10.1.8 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。

10.1.9 微孔滤膜:0.45 μm ,有机相型。

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 1 000 mL。

10.2.2 乙腈-水溶液(1+9):将乙腈和水按 1:9 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 0.2%磷酸溶液:吸取 2 mL 磷酸,溶于水并稀释至 1 000 mL。

10.3 标准品

唾液酸(*N*-乙酰神经氨酸, $C_{11}H_{19}NO_9$, CAS 号 131-48-6): 纯度 $\geq 96\%$, 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(1 000 mg/L): 准确称取适量唾液酸标准品(按纯度进行折算), 用水溶解并配制成质量浓度为 1 000 mg/L 的标准储备溶液, 于 4 °C 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(1 000 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(1+9)定容至刻度, 混匀。唾液酸标准系列工作液的质量浓度分别为 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 涡旋混合器。

11.4 分析天平: 感量为 0.1 mg 和 0.01 g。

11.5 匀浆机: 转速不低于 10 000 r/min。

11.6 高速离心机。

12 分析步骤

12.1 样品前处理

12.1.1 试样制备

液态试样摇匀; 基质均匀的半固态试样和粉状试样直接用于下一步试样提取; 其他试样需匀浆或粉碎均匀。

12.1.2 试样提取

称取 1 g(精确至 0.01 g)样品于 25 mL 具塞比色管中(固体样品先加入 3 mL 水, 涡旋振荡 30 s), 沿管壁缓慢加入 10 mL 盐酸溶液, 一边加一边振荡, 盖上玻璃塞, 涡旋混匀, 置于 80 °C 水浴中水解 40 min, 在水浴过程中每 5 min 振荡一次。取出比色管, 冷却至室温, 用乙腈-水溶液(1+9)定容至 25 mL, 混匀, 静置 5 min。取 10 mL 上层溶液放入离心管中, 加入 5 mL 三氯甲烷, 涡旋混匀后, 9 000 r/min 离心 5 min, 取上清液待净化。

12.1.3 试样净化

固相萃取柱依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化, 负压抽干, 样液以小于 1 mL/min 的流速通过固相萃取柱, 收集流出液, 过 0.45 μ m 微孔滤膜后, 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 邻苯二胺盐酸盐溶液, 盖上玻璃

塞,混匀,置于 80 °C 水浴中反应 35 min,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,衍生后标准系列工作溶液的质量浓度分别为 1.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、50.0 mg/L 和 100.0 mg/L。

12.2 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱:C₁₈柱,250 mm×4.6 mm(内径),5 μm,或相当者。
- b) 柱温:30 °C。
- c) 荧光检测器激发波长:235 nm,发射波长:414 nm。
- d) 流速:1.0 mL/min。
- e) 进样量:10 μL。
- f) 流动相:A相:950 mL 0.2%磷酸溶液+50 mL 四氢呋喃;B相:甲醇。梯度洗脱,见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A/%	B/%
0.0	90	10
11.0	90	10
12.0	10	90
15.0	10	90
16.0	90	10
20.0	90	10

12.3 标准曲线的制作

将衍生后的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质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。唾液酸标准溶液的色谱图参见附录 B 中图 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的质量浓度。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。

13 分析结果的表述

试样中唾液酸的含量按式(2)计算。

$$X = \frac{\rho \times V \times f}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots (2)$$

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质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);
- V —— 试样的定容体积,单位为毫升(mL);
- f —— 稀释倍数;

m ——试样的取样量,单位为克(g);
1 000——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(CH_3CN):色谱纯。

17.1.2 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

17.1.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。

17.1.4 浓盐酸(HCl):12 mol/L。

17.1.5 三氯甲烷(CHCl_3)。

17.1.6 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。

17.1.7 微孔滤膜:0.22 μm ,有机相型。

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1 000 mL。

17.2.2 乙腈-水溶液(1+9):将乙腈和水按1:9的体积比混合均匀。

17.2.3 0.1%甲酸溶液:吸取1 mL甲酸,溶于水并稀释至1 000 mL。

17.3 标准品

唾液酸(*N*-乙酰神经氨酸, $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_9$,CAS号131-48-6):纯度 $\geq 96\%$,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(1 000 mg/L):准确称取适量唾液酸标准品(按纯度进行折算),用水溶解并配制成质量浓度为1 000 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(1 000 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(1+9)定容至刻度,混匀。唾液酸标准系列工作液的质量浓度分别为0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L和2.0 mg/L,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 涡旋混合器。

18.4 分析天平:感量为0.1 mg和0.01 g。

18.5 匀浆机:转速不低于10 000 r/min。

18.6 高速离心机。

19 分析步骤

19.1 样品前处理

19.1.1 试样制备

液态试样摇匀,基质均匀的半固态试样和粉状试样直接用于下一步试样提取,其他试样需匀浆或粉碎均匀。

19.1.2 试样提取

称取1 g(精确至0.01 g)样品于25 mL具塞比色管中(固体样品先加入3 mL水,涡旋振荡30 s),沿管壁缓慢加入10 mL盐酸溶液,一边加一边振荡,盖上玻璃塞,涡旋混匀,置于80℃水浴中水解40 min,在水浴过程中每5 min振荡一次。取出比色管,冷却至室温,用乙腈-水溶液(1+9)定容至25 mL,混匀,静置5 min。取10 mL上层溶液放入离心管中,加入5 mL三氯甲烷,涡旋混匀后,9 000 r/min离心5 min,取上清液待净化。

19.1.3 试样净化

固相萃取柱依次用3 mL甲醇和3 mL水活化,负压抽干,样液以小于1 mL/min的流速通过固相萃取柱,收集流出液。准确吸取50 μL样液,加入950 μL乙腈-水溶液(1+9),混匀,过0.22 μm微孔滤膜后,待测。

19.2 液相色谱-质谱/质谱参考条件

19.2.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈柱, 3.0 mm×150 mm, 1.8 μm, 或相当者。
- b) 柱温: 30 °C。
- c) 流速: 0.3 mL/min。
- d) 进样量: 2 μL。
- e) 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	80	20
4.0	80	20
4.1	10	90
6.0	10	90
6.1	80	20
10.0	80	20

19.2.2 质谱/质谱参考条件

质谱/质谱参考条件如下:

- a) 电离方式: 电喷雾电离(ESI), 负离子模式。
- b) 扫描方式: 多反应监测(MRM)。
- c) 毛细管电压: 3 500 V。
- d) 裂解电压: 120 V。
- e) 干燥气温度: 300 °C。
- f) 干燥气流速: 8 L/min。
- g) 鞘气温度: 350 °C。
- h) 鞘气流速: 10 L/min。
- i) 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) 308/170.0(-13)	308/87.0(-17)

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质量浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。唾液酸标准溶液的特征离子色谱图参见附录 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，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)与质量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。

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质量浓度。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。

20 分析结果的表述

试样中唾液酸的含量按式(3)计算。

$$X = \frac{\rho \times V \times f}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(3)$$

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质量浓度，单位为毫克每升(mg/L)；
- V —— 试样的定容体积，单位为毫升(mL)；
- f —— 稀释倍数；
- m —— 试样的取样量，单位为克(g)；
- 1 000—— 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
唾液酸标准溶液液相色谱图

唾液酸标准溶液(10.0 mg/L)液相色谱图见图 A.1。

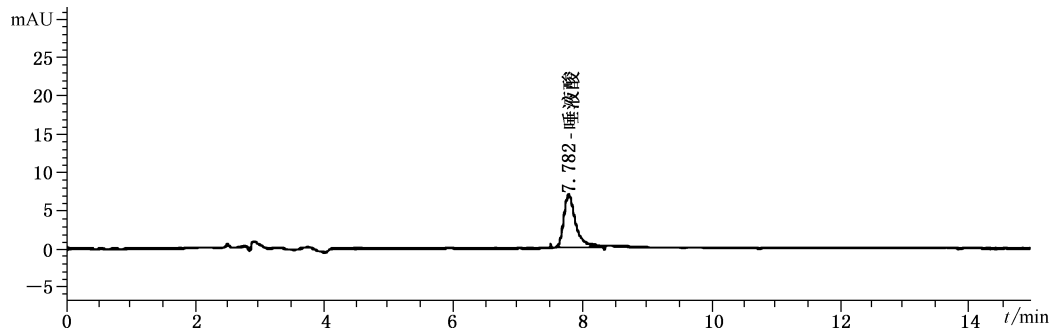


图 A.1 唾液酸标准溶液(10.0 mg/L)液相色谱图

附录 B
唾液酸标准溶液液相色谱图

唾液酸标准溶液(5.0 mg/L)液相色谱图见图 B.1。

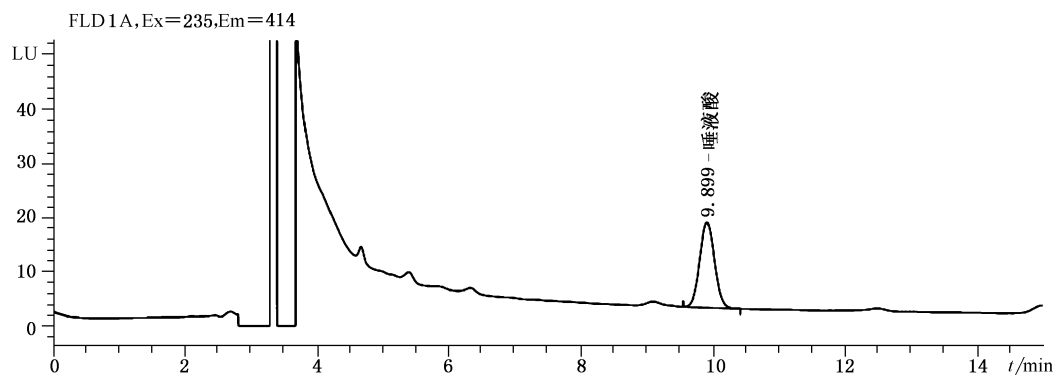


图 B.1 唾液酸标准溶液(5.0 mg/L)液相色谱图

附录 C

唾液酸标准溶液液相色谱-质谱/质谱特征离子色谱图

唾液酸标准溶液(0.1 mg/L)液相色谱-质谱/质谱特征离子色谱图见图 C.1。

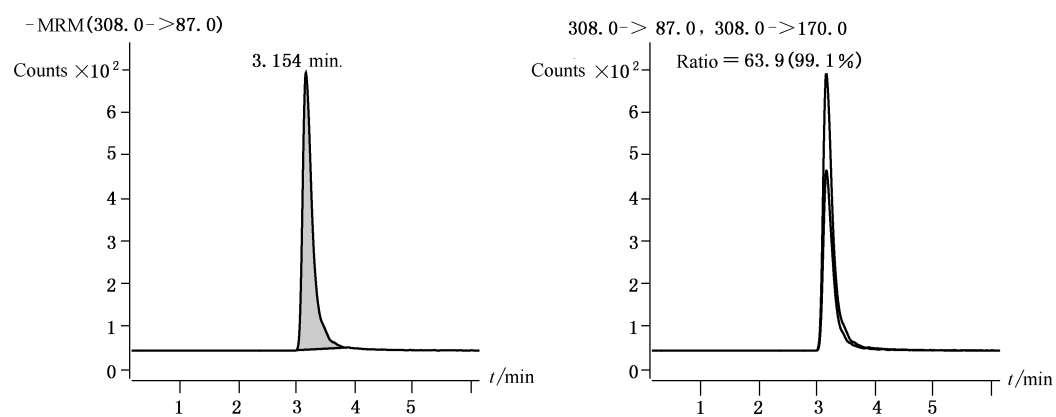


图 C.1 唾液酸标准溶液(0.1 mg/L)液相色谱-质谱/质谱特征离子色谱图