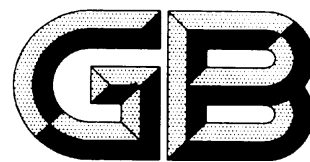


ICS

点击此处添加中国标准文献分类号



中华人民共和国国家标准

GB/T 2012—XXXX

蜂蜜中脯氨酸的测定-液相色谱法

Determination of proline in honey by liquid chromatography

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

(本稿完成日期:)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华全国供销合作总社提出并归口。

本标准起草单位：农业部蜂产品质量监督检验测试中心（北京）

本标准主要起草人：李熠、张金振、吴黎明、薛晓锋、赵静、陈兰珍、周金慧、陈芳、黄京平、王鹏

蜂蜜中脯氨酸的测定—液相色谱法

1 范围

本标准规定了蜂蜜中脯氨酸含量的液相色谱测定方法。

本标准适用于蜂蜜中脯氨酸含量的测定。

本方法的检出限和定量限分别为3.00 mg/kg和10.00 mg/kg。

2 规范性引用文件

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

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法（GB/T 6682-1992， neq ISO 3696:1987）

3 方法提要

试样中的脯氨酸用硼酸缓冲液提取后，经柱前衍生，液相色谱荧光检测器检测，外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 试剂

4.1.1 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

4.1.2 乙腈（C₂H₃N）：色谱纯。

4.1.3 四氢呋喃（C₄H₈O）：色谱纯

4.1.4 乙酸钠（C₂H₃O₂Na·3H₂O）：分析纯。

4.1.5 乙酸（C₂H₄O₂）：分析纯。

4.1.6 硼酸（H₃BO₃）：分析纯。

4.1.7 乙二胺四乙酸二钠（EDTA，C₁₀H₁₄N₂O₈Na₂·2H₂O）：分析纯。

4.1.8 氢氧化钠（NaOH）：分析纯。

4.1.9 磷酸（H₃PO₄）：分析纯。

4.1.10 盐酸（HCl）：优级纯。

4.2 试剂配制

4.2.1 NaOH溶液（0.1 mol/L）：称取2.00 g 氢氧化钠（4.1.8），溶于500 mL水中，摇匀，然后转移至聚乙烯容器中，密闭放置。

4.2.2 乙酸钠缓冲液（0.1 mol/L）：称取13.60 g 乙酸钠（4.1.4），溶解于1 L水中，用乙酸（4.1.5）调节pH至7.2，过0.45 μm滤膜，抽滤脱气。

4.2.3 硼酸缓冲液（0.1 mol /L）：称取EDTA（4.1.7）0.1862 g，硼酸（4.1.6）3.0915 g，溶解于500 mL水中，用NaOH溶液（4.2.1）调至pH 8.0。

4.2.4 盐酸溶液（0.1 mol /L）：取8.33 mL盐酸，定容至1 L。

4.3 标准品

4.3.1 脯氨酸标准品 (C₅H₉NO₂)：L-脯氨酸，纯度≥99%。

4.3.2 4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑 (NBD-F, C₆H₂FN₃O₃)：纯度≥99%。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 NBD-F 溶液 (100 mmol/L)：称取 NBD-F (4.3.2) 0.0183 g 于棕色液相进样瓶中，加入 1 mL 乙腈溶解，密封保存。

4.4.2 脯氨酸标准储备液 (1000 mg/L)：准确称取脯氨酸标准品 0.1000 g，用硼酸缓冲液 (4.2.3) 定容至 100 mL，配制成 1000 mg/L 的标准储备液。储备液贮存在 4 °C 冰箱中，有效期 3 个月。

4.5 膜：0.22 μm，水相。

5 主要仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪：配荧光检测器。

5.2 分析天平：感量 0.01 g；0.001 g；0.00001g。

5.3 涡旋混匀器。

5.4 pH 计：测量精度±0.02。

5.5 微量移液器。

5.6 恒温水浴锅。

5.7 注射器：1 mL。

6 试样的制备

将样品搅拌均匀，分出 0.5 kg 作为试样。制备好的试样置于样品瓶中，密封，并标明标记。将试样于 4 °C 下保存。

7 分析步骤

7.1 提取

准确称取 1 g±0.05 g，置于 100 mL 烧杯中，加入 20.0 mL 硼酸缓冲液 (4.2.3)，用玻璃棒轻轻搅拌均匀，使试样完全溶解，超声提取 10 min。将溶液转移至 50 mL 容量瓶中，用硼酸缓冲液 (4.2.3) 定容至刻度，充分混匀后，0.22 μm 滤膜过滤，滤液待衍生。

7.2 衍生

取 200 μL 标准溶液或样品溶液于棕色液相色谱进样瓶中，分别加入 70 μL 乙腈，30 μL NBD-F 溶液 (4.4.1)，盖好密封盖，涡旋混匀，置于 60 °C 恒温水浴锅中避光衍生 10 min，取出立即放入冰水中冷却，加入 100 μL 盐酸溶液 (4.2.4) 终止反应，混匀，在样品量无法满足仪器要求时，转移至内衬管中进样。

7.3 色谱测定

7.3.1 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：C18，5 μm，150 mm×4.6 mm (i.d)，或相当者；

- b) 流动相: A: 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液 (4.2.2) + 甲醇 + 四氢呋喃=900+95+5; B: 甲醇;
 c) 柱温: 30℃;
 d) 进样量: 20 μL;
 e) 荧光检测波长: 激发波长 470 nm, 发射波长 530 nm。

梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序 (VA+VB)

时间	A (%)	B (%)	流速 (mL/min)
0.00	100	0	1.0
0.50	75	25	1.0
7.00	75	25	1.0
8.00	0	100	1.0
10.00	0	100	1.0
12.00	100	0	1.0
15.00	100	0	1.0

7.3.2 液相色谱测定

用硼酸缓冲液 (4.2.3) 稀释标准储备液 (4.4.2), 依次配成 40.00 mg/L, 20.00 mg/L, 10.00 mg/L, 5.00 mg/L, 2.50 mg/L, 1.25 mg/L, 0.625 mg/L 的脯氨酸标准工作溶液。在上述色谱条件下, 测定七个浓度水平标准工作溶液的峰面积, 以峰面积对相应质量浓度绘制标准工作曲线, 然后测定未知样品, 用标准工作曲线对样品进行定量。样品溶液中脯氨酸的响应值应在仪器的线性范围内。脯氨酸的参考保留时间为 5.6 min, 脯氨酸标准溶液色谱图、空白溶液色谱图和蜂蜜样品色谱图参见附录 A 中图 A.1、图 A.2、图 A.3。

7.4 平行试验

按上述步骤, 对同一试样进行平行试验测定。

7.5 空白试验

按上述步骤, 对硼酸缓冲液 (4.2.3) 进行测定。

8 结果计算

结果用色谱数据处理软件或按式 (1) 计算:

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

式中:

X 一试样中脯氨酸的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg);

ρ 一从标准工作曲线上得到的被测组分溶液质量浓度, 单位为毫克每升 (mg/L);

V 一定容体积, 单位为毫升 (mL);

m 一样液所代表试样的质量，单位为克（g）。

9 准确度和精密度

9.1 准确度

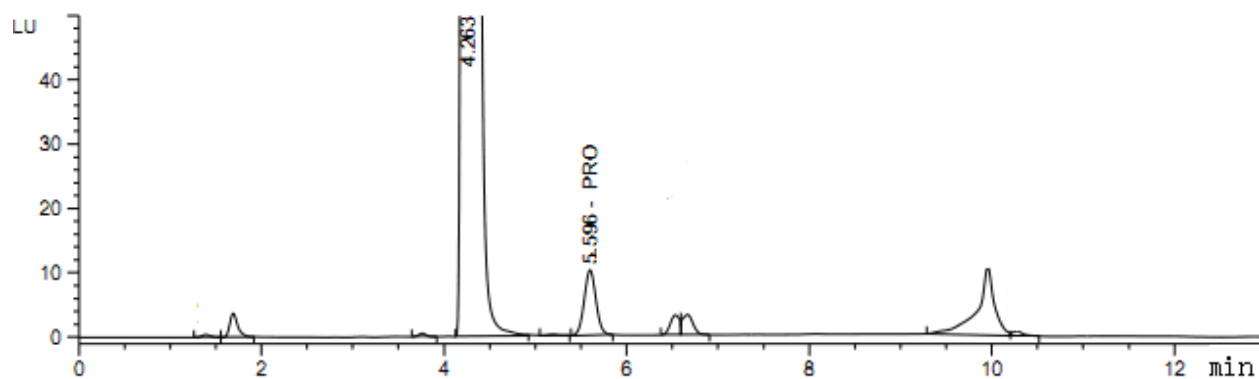
本方法中脯氨酸添加浓度及其回收率的试验数据为：添加量 125.00 mg/kg~500.00 mg/kg，回收率为 90.23%~90.70%。

9.2 精密度

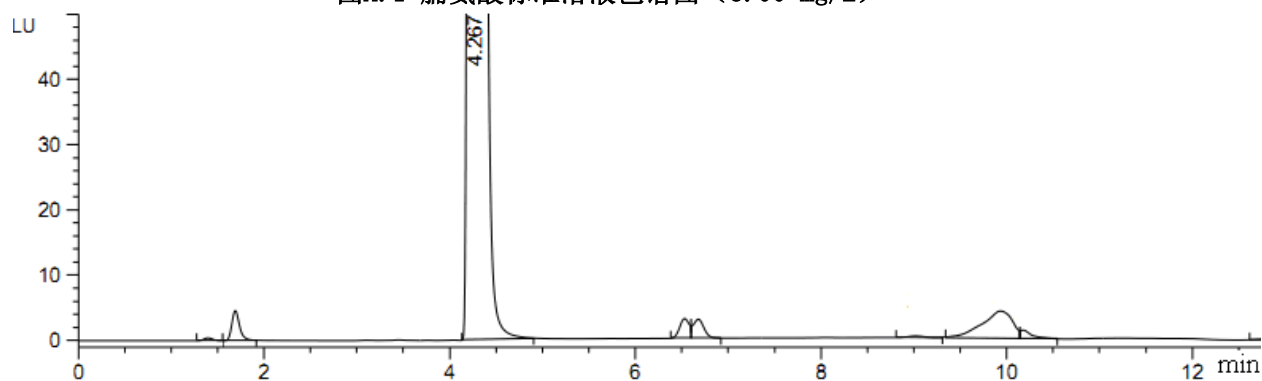
本部分的精密度数据按 GB/T 6379.2 的规定确定，在重复性条件和再现性条件下，获得的两次独立测试结果的标准差不超过重复性限 S_r 和再现性 S_R 。蜂蜜中脯氨酸含量为 370.47 mg/kg 时，测得的重复性限 $S_r=12.99$ ，再现性限 $S_R=15.93$ 。

附录 A
(资料性附录)
色谱图

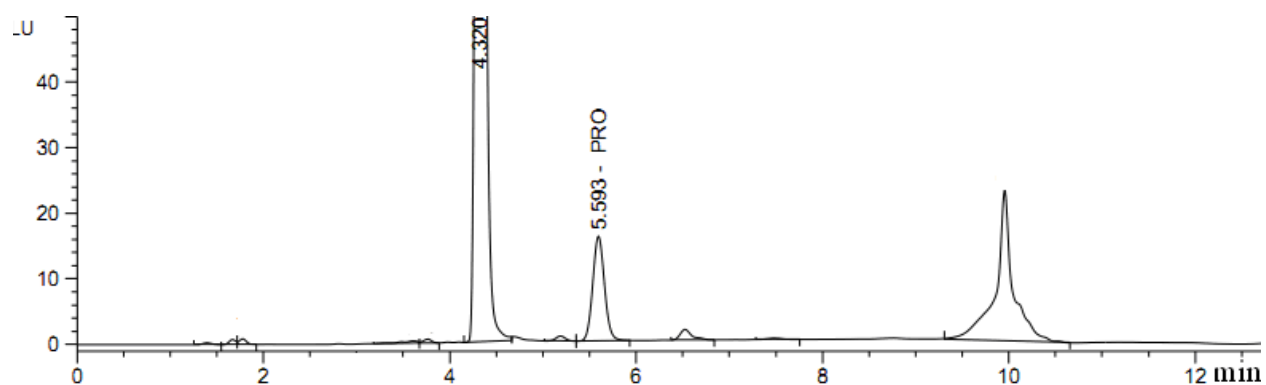
脯氨酸标准溶液色谱图 (A.1)、空白溶液色谱图 (A.2) 和蜂蜜样品色谱图 (A.3)



图A.1 脯氨酸标准溶液色谱图 (5.00 mg/L)



图A.2 空白溶液色谱图



图A.3 蜂蜜样品色谱图

