



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 32946—2016

## 蜂蜜中脯氨酸的测定 高效液相色谱法

Determination of proline in honey—High performance liquid chromatography

2016-08-29 发布

2017-03-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布  
中国国家标准化管理委员会



## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华全国供销合作总社提出。

本标准由全国蜂产品标准化工作组归口。

本标准起草单位：中国农业科学院蜜蜂研究所、农业部蜂产品质量监督检验测试中心（北京）、中国养蜂学会。

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

## 蜂蜜中脯氨酸的测定 高效液相色谱法

### 1 范围

本标准规定了蜂蜜中脯氨酸含量的高效液相色谱测定方法。  
本标准适用于蜂蜜中脯氨酸含量的测定。

### 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

### 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 除非另有说明,均使用分析试剂,水为 GB/T 6682 规定的一级水。
- 4.2 甲醇:色谱纯。
- 4.3 乙腈:色谱纯。
- 4.4 四氢呋喃:色谱纯。
- 4.5 乙酸钠。
- 4.6 乙酸。
- 4.7 硼酸。
- 4.8 乙二胺四乙酸二钠。
- 4.9 氢氧化钠。
- 4.10 磷酸。
- 4.11 盐酸。
- 4.12 L-脯氨酸标准品(CAS 号:147-85-3):纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.13 4-氟-7-硝基-2,1,3-苯并氧杂恶二唑(NBD-F,CAS 号:29270-56-2):纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.14 氢氧化钠溶液(0.1 mol/L):称取 2.00 g 氢氧化钠,溶于 500 mL 水中,混匀,转移至聚乙烯瓶中,密闭放置。
- 4.15 乙酸钠缓冲液(0.1 mol/L):称取 13.60 g 乙酸钠,溶解于 1 L 水中,用乙酸调节 pH 至 7.2,抽滤脱气。
- 4.16 硼酸缓冲液(0.1 mol/L):称取乙二胺四乙酸二钠 0.186 g、硼酸 3.09 g,溶解于 500 mL 水中,氢氧化钠溶液调 pH 至 8.0。
- 4.17 盐酸溶液(0.1 mol/L):取 8.33 mL 盐酸,定容至 1 L。
- 4.18 NBD-F 溶液(100 mmol/L):称取 NBD-F 0.018 3 g 于棕色液相进样瓶中,加入 1 mL 乙腈溶解,

密封保存。

4.19 脯氨酸标准储备液(1 000 mg/L):准确称取适量脯氨酸标准品,用硼酸缓冲液溶解后,贮存在4℃冰箱中。

4.20 0.22 μm 水系滤膜。

## 5 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,0.000 01 g。

5.3 涡旋混匀器。

5.4 pH 计:测量精度±0.02。

5.5 恒温水浴锅。

5.6 超声波清洗器。

## 6 试样的制备与保存

将样品搅拌均匀,分出 0.5 kg 试样置于样品瓶中,密封标记,于 4℃下保存。

## 7 分析步骤

### 7.1 提取

称取试样 1 g,精确至 0.001 g,置于 100 mL 烧杯中,加入 20.0 mL 硼酸缓冲液,用玻璃棒轻轻搅拌溶解,超声提取 10 min。将溶液转移至 50 mL 容量瓶中,用硼酸缓冲液定容至刻度,混匀,0.22 μm 滤膜过滤,滤液待衍生化。

### 7.2 衍生化

取 200 μL 样品溶液于棕色液相色谱进样瓶中,再分别加入 70 μL 乙腈、30 μL NBD-F 溶液,密封,涡旋混匀,置于 60℃恒温水浴避光衍生 10 min,取出立即放入冰水中冷却,加入 100 μL 盐酸溶液终止反应,混匀,待测。

### 7.3 液相色谱参考条件

液相色谱条件参考以下参数:

- a) 色谱柱: C<sub>18</sub>, 5 μm, 150 mm×4.6 mm(内径),或相当者;
- b) 流动相: A: 0.1 mol/L 乙酸钠缓冲液 - 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;
- f) 梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序(V<sub>A</sub>+V<sub>B</sub>)

| 时间/min | 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         |

7.4 液相色谱测定

用硼酸缓冲液稀释标准储备液，依次配成 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，按 7.2 步骤进行衍生。在上述色谱条件下，测定 6 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，用标准工作曲线对未知样品进行定量。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和蜂蜜样品色谱图参见附录 A 中图 A.1 和图 A.2。

7.5 平行试验

按上述步骤，对同一试样进行两次平行测定。

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 —— 试样中脯氨酸的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；
- ρ —— 从标准工作曲线上得到的被测组分溶液的质量浓度，单位为毫克每升(mg/L)；
- V —— 定容体积，单位为毫升(mL)；
- m —— 样液所代表试样的质量，单位为克(g)。

测定结果取其两次测定的算术平均值，计算结果保留小数点后一位。

9 定量下限

本方法的定量下限为 10.0 mg/kg。

附录 A  
(资料性附录)  
色谱图

A.1 脯氨酸标准溶液色谱图见图 A.1。

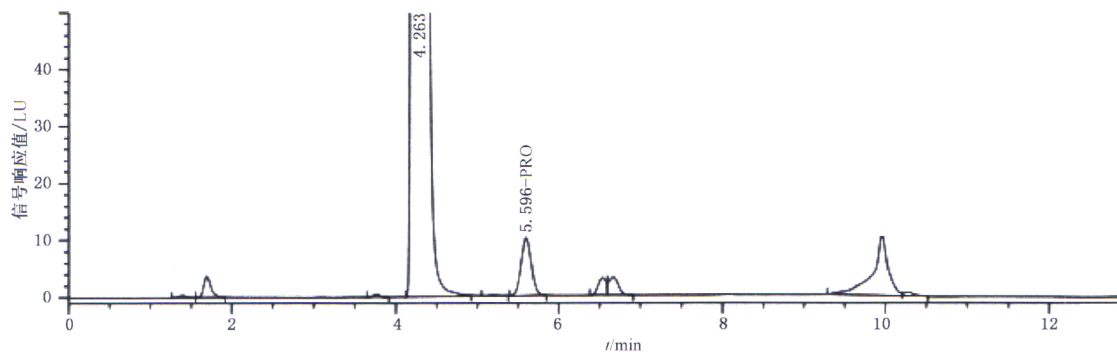


图 A.1 脯氨酸标准溶液色谱图(5.00 mg/L)

A.2 蜂蜜样品色谱图见图 A.2。

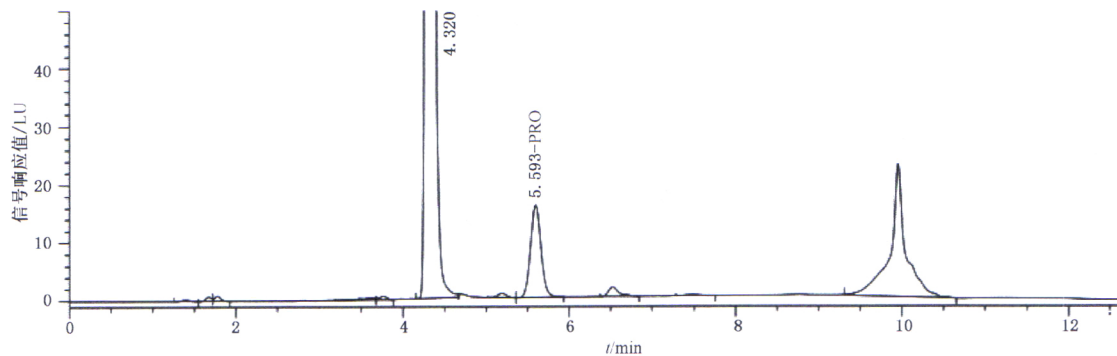


图 A.2 蜂蜜样品色谱图