

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4675.12—2016

出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法

Determination of lysozyme in wine for export—HPLC method

2016-12-12 发布

2017-07-01 实施



中 华 人 民 共 和 国
国家质量监督检验检疫总局 发 布

前 言

SN/T 4675《出口葡萄酒质量安全分析方法》共分为 30 个部分：

- SN/T 4675.1:出口葡萄酒中甘油的测定 酶法；
- SN/T 4675.2:出口葡萄酒中 2,3-丁二醇的测定 气相色谱法；
- SN/T 4675.3:出口葡萄酒中乙醇稳定碳同位素比值的测定；
- SN/T 4675.4:出口葡萄酒中乳酸的测定 酶法；
- SN/T 4675.5:出口葡萄酒中有机酸的测定 离子色谱法；
- SN/T 4675.6:出口葡萄酒中葡萄糖、果糖和蔗糖的测定；
- SN/T 4675.7:出口葡萄酒中乙醛的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.8:出口葡萄酒中 5-羟甲基糠醛的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.9:出口葡萄酒中二甘醇的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.10:出口葡萄酒中赭曲霉毒素 A 的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.11:出口葡萄酒中 7 种花色苷的测定 超高效液相色谱法；
- SN/T 4675.12:出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.13:出口葡萄酒中 2,4,6-三氯甲苯醚残留量的测定 气相色谱-质谱法；
- SN/T 4675.14:出口葡萄酒中纳他霉素的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.15:出口葡萄酒中水杨酸、脱氢乙酸和对氯苯甲酸的测定 液相色谱法；
- SN/T 4675.16:出口葡萄酒中富马酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.17:出口葡萄酒中丁基锡含量的测定 气相色谱-质谱/质谱法；
- SN/T 4675.18:出口葡萄酒中二硫代氨基甲酸酯残留量的测定 顶空气相色谱法；
- SN/T 4675.19:出口葡萄酒中钠、镁、钾、钙、铬、锰、铁、铜、锌、砷、硒、银、镉、铅的测定；
- SN/T 4675.20:出口葡萄酒中稀土元素的测定 电感耦合等离子体质谱法；
- SN/T 4675.21:出口葡萄酒中可溶性无机盐的测定 离子色谱法；
- SN/T 4675.22:出口葡萄酒中总二氧化硫的测定 比色法；
- SN/T 4675.23:出口葡萄酒及葡萄汁中氨氮的测定 连续流动分析仪法；
- SN/T 4675.24:出口葡萄酒福林-肖卡指数的测定 分光光度计法；
- SN/T 4675.25:出口葡萄酒颜色的测定 CIE 1976(L*a*b*)色空间法；
- SN/T 4675.26:出口葡萄酒浊度的测定 散射光法；
- SN/T 4675.27:出口葡萄酒碱性灰分的测定；
- SN/T 4675.28:出口葡萄酒细菌、霉菌及酵母的计数；
- SN/T 4675.29:出口葡萄酒中酒香酵母检验 实时荧光 PCR 法；
- SN/T 4675.30:出口葡萄酒中拜氏接合酵母检验 实时荧光 PCR 法。

本部分为 SN/T 4675 的第 12 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分修改采用国际葡萄与葡萄酒组织(OIV)的 OIV-MA-AS315-14《葡萄酒中溶菌酶的测定-液相色谱法》。本部分在技术内容上与方法一致,仅对 OIV 的方法 OIV-MA-AS315-14 的个别内容作了编辑性修改,修改的主要内容为:

- 色谱条件的优化。

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这些专利的责任。

本部分由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本部分起草单位：中华人民共和国广东出入境检验检疫局、中华人民共和国北京出入境检验检疫局。

本部分主要起草人：庞世琦、刘青、潘丙珍、梁瑞婷、陈秀明、刘朝霞、李志勇、韩深、田玲、宦萍。

出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法

1 范围

SN/T 4675 的本部分规定了葡萄酒中溶菌酶含量的高效液相色谱测定方法。

本部分适用于白葡萄酒和起泡葡萄酒中溶菌酶含量的测定。

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

本方法只检测葡萄酒中具有酶活性的溶菌酶的含量,但与蛋白质中酶真实的活性无关。

葡萄酒中的溶菌酶经反相苯基柱分离后,用高效液相色谱荧光检测器或紫外检测器测定,保留时间定性,外标法定量。

4 试剂和材料

除另有规定外,所用试剂均为分析纯,水采用 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 乙腈(C_2H_3N):色谱纯。

4.2 无水乙醇(C_2H_6O)。

4.3 盐酸(HCL)。

4.4 酒石酸($C_4H_6O_6$)。

4.5 三氟乙酸(TFA)。

4.6 5%盐酸溶液:量取 5 mL 盐酸,用水定容至 100 mL。

4.7 酒石酸溶液:称取 1.0 g 酒石酸(4.4),用 100 mL 无水乙醇溶解,用水定容至 1 000 mL。

4.8 溶菌酶标准物质(CAS:12650-88-3)。

4.9 溶菌酶标准储备液:准确称取适量的溶菌酶标准品(4.8),加适量酒石酸溶液(4.7)超声震荡使其充分溶解并定容至刻度,配制成浓度为 2 μ L 的标准储备液,保存在 0 $^{\circ}$ C~4 $^{\circ}$ C 的冰箱中。

4.10 溶菌酶标准工作溶液:分别准确量取溶菌酶标准储备溶液(4.9),用样品提取液稀释,配制成 5.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、25.0 mg/L、40.0 mg/L、50.0 mg/L、60.0 mg/L 的标准工作溶液,现配现用。

4.11 微孔滤膜:0.22 μ m,水系。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪:具有荧光检测器或紫外检测器。

SN/T 4675.12—2016

- 5.2 水平振荡器。
- 5.3 超声波水浴。
- 5.4 涡旋混合器。
- 5.5 分析天平;感量 0.1 mg。

6 测定步骤

6.1 提取

用移液管准确量取 10.0 mL 试样(起泡酒需预先脱气。将 100 mL 试样倒入带排气塞的瓶中,在室温下使用水平振荡器或超声波水浴脱气,直至无气泡逸出。)于 100 mL 容量瓶中,用 5% 盐酸(4.6)稀释至刻度并酸化 5 min,再经滤膜(4.11)过滤,收集滤液待测。

6.2 测定

6.2.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱:反相苯基柱,疏水层析凝胶反向色谱柱,7.5 cm×4.6 mm 或相当者;
- b) 柱温:30 ℃;
- c) 流动相:A:CH₃CN50%,TFA0.2%,H₂O49.8%;
B:CH₃CN 1%,TFA0.2%,H₂O98.8%;
- d) 流速:0.8 mL/min;
- e) 进样量:50 μL;
- f) 检测波长:紫外波长:280 μm;
荧光波长:激发波长(λ_{ex}):276 nm;
发射波长(λ_{em}):345 nm;
- g) 梯度洗脱程序见表 1:

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动 A/%	流动 B/%
0	0	100
3	0	100
10	30	70
15	40	60
20	50	50
25	100	0
34	100	0
36	0	100
40	0	100

6.2.2 液相色谱测定

按照上述色谱条件,分别对标准工作液和样品试液进样检测,以保留时间对样品进行定性,采用外标法定量。待测样液中溶菌酶的响应值应在仪器线性响应范围内,超过线性范围则应稀释后再进样分

析。溶菌酶的参考保留时间为 $24.5 \text{ min} \pm 0.6 \text{ min}$, 标准物质的色谱图参见附录 A。

6.3 空白试验

除不加样品试液外, 均按上述步骤进行。

7 结果计算和表述

试样中溶菌酶的含量由色谱数据处理软件或按式(1)计算获得, 计算结果应扣除空白值:

$$X = \frac{c \times V_1}{V} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X —— 试样中待测物的含量, 单位为毫克每升(mg/L);

c —— 标准溶液中待测物的浓度, 单位为毫克每升(mg/L);

V_1 —— 样液最终定容体积, 单位为毫升(mL);

V —— 试样的取样体积, 单位为毫升(mL)。

计算结果保留至小数点后一位。

8 方法的定量限和回收率

8.1 定量限

本方法的定量限: 50.0 mg/L 。

8.2 回收率

在四个添加浓度范围内, 白葡萄酒、起泡葡萄酒中溶菌酶的回收率数据参见附录 B。

9 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过其算术平均值的 5%。

SN/T 4675.12—2016

附录 A
(资料性附录)
色谱图

高效液相色谱法荧光检测器测定溶菌酶的典型色谱图见图 A.1。

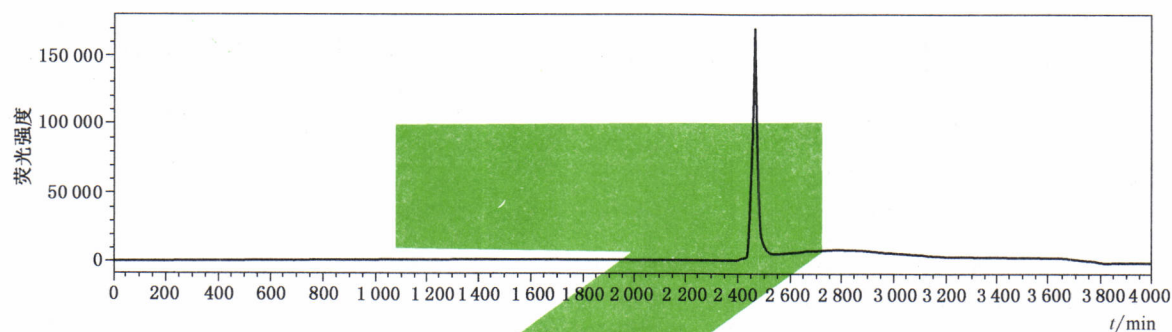


图 A.1 高效液相色谱法荧光检测器测定溶菌酶的典型色谱图(浓度为 100 mg/L)

高效液相色谱法紫外检测器测定溶菌酶的典型色谱图见图 A.2。

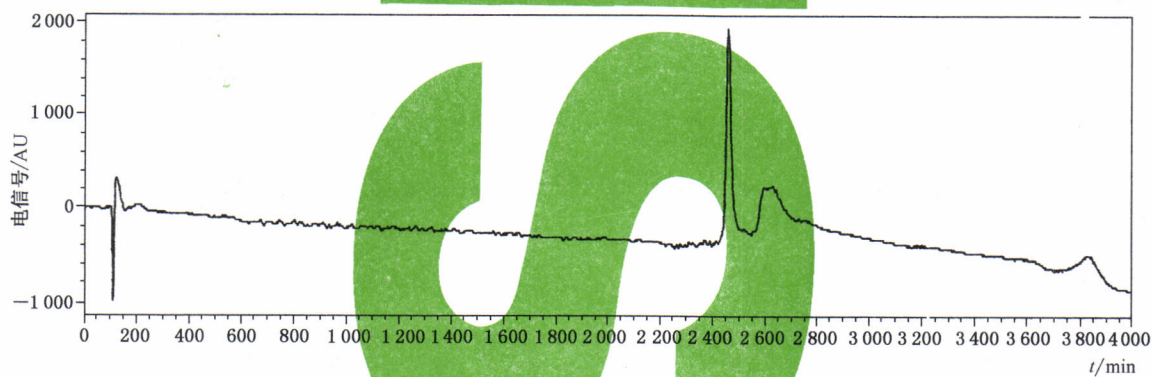


图 A.2 高效液相色谱法紫外检测器测定溶菌酶的典型色谱图(浓度为 100 mg/L)

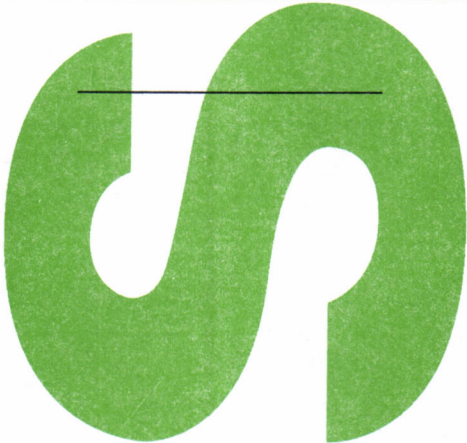
附 录 B
(资料性附录)

不同基质中溶菌酶不同添加水平回收率数据

不同基质中溶菌酶不同添加水平回收率数据见表 B.1。

表 B.1 不同基质中溶菌酶不同添加水平回收率数据

化合物	添加水平 mg/L	白葡萄酒 平均回收率 %	起泡酒 平均回收率 %
溶菌酶 (荧光检测器检测)	50.0	91.2~96.6	91.2~96.0
	200.0	90.9~94.6	92.4~94.8
	500.0	90.9~96.0	90.5~97.6
	750.0	91.8~96.0	90.6~96.6
溶菌酶 (紫外检测器检测)	50.0	90.8~94.8	90.6~98.6
	200.0	91.3~98.7	92.0~96.8
	500.0	90.7~99.2	90.0~97.2
	750.0	93.5~97.4	95.0~99.3



中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口葡萄酒中溶菌酶的测定 液相色谱法
SN/T 4675.12—2016

*

中国标准出版社出版
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
总编室:(010)68533533

网址 www.spc.net.cn

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2017年11月第一版 2017年11月第一次印刷
印数 1—500

*

书号: 155066·2-32301 定价 16.00 元



SN/T 4675.12-2016