

中华人民共和国供销合作行业标准

GH/T 1386—2022

果蔬食品中叶黄素、玉米黄质、隐黄质和胡 萝卜素的测定

Determination of lutein, zeaxanthin, cryptoxanthin and carotene in food from fruits
and vegetables

行业标准信息服务平台

2022 - 11 - 24 发布

2023 - 01 - 01 实施

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。

本文件由中华全国供销合作总社提出。

本文件由全国果品标准化技术委员会贮藏加工分技术委员会（SAC/TC 501/SC 1）归口。

本文件起草单位：江苏省农业科学院、中华全国供销合作总社南京野生植物综合利用研究所、兴化市联富食品有限公司、江苏艾兰得营养品有限公司、谱尼测试集团江苏有限公司、国家蔬菜加工技术研发专业分中心、江苏省脱水果蔬产业技术创新战略联盟、安徽省科学技术研究院、丹东市农业农村发展服务中心、江苏实朴检测服务有限公司。

本文件主要起草人：李大婧、王松均、戴竹青、张锋伦、施祖灏、张钟元、张兴、刘庆峥、何伟伟、肖亚冬、屠琦、张国栋、聂梅梅、姚正颖、张晓红、刘庆嵘、许舒雯、刘玉军、王晓东、马海霞。

行业标准信息平台

果蔬食品中叶黄素、玉米黄质、隐黄质和胡萝卜素的测定

1 范围

本文件规定了果蔬食品中叶黄素、玉米黄质、 α -隐黄质、 β -隐黄质、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素的
高效液相色谱测定方法。

本文件适用于含类胡萝卜素的果蔬原料及加工制品。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试验样品经正己烷-乙醇-丙酮-甲苯复合液提取，氢氧化钾-甲醇溶液皂化，使叶黄素、玉米黄质、 α -隐黄质、 β -隐黄质、 α -胡萝卜素和 β -胡萝卜素释放为游离态，用正己烷萃取并减压浓缩后，进行高效液相色谱法测定，外标法定量。

5 试剂材料和仪器设备

5.1 试剂

- 5.1.1 甲基叔丁基醚[CH₃OC(CH₃)₃, MTBE]: 色谱纯。
- 5.1.2 甲醇(CH₃O): 色谱纯。
- 5.1.3 二氯甲烷(CH₂Cl₂): 色谱纯。
- 5.1.4 正己烷(C₆H₁₄): 色谱纯。
- 5.1.5 双蒸水(H₂O): 一级水。
- 5.1.6 无水乙醇(C₂H₅O): 分析纯。
- 5.1.7 丙酮(C₃H₆O): 分析纯。
- 5.1.8 5.1.8 甲苯(C₇H₈): 分析纯。
- 5.1.9 无水硫酸钠(Na₂SO₄): 分析纯。
- 5.1.10 氢氧化钾(KOH): 分析纯。
- 5.1.11 抗坏血酸(C₆H₈O₆): 分析纯。
- 5.1.12 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(C₁₅H₂₄O, BHT): 分析纯。

5.2 标准品

- 5.2.1 叶黄素(C₄₀H₅₆O₂): 纯度大于等于 95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准样品。
- 5.2.2 玉米黄质(C₄₀H₅₆O₂): 纯度大于等于 95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准样品。
- 5.2.3 α -隐黄质(C₄₀H₅₆O): 纯度大于等于 95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准样品。
- 5.2.4 β -隐黄质(C₄₀H₅₆O): 纯度大于等于 95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准样品。
- 5.2.5 α -胡萝卜素(C₄₀H₅₆): 纯度大于等于 95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准样品。

准样品。

5.2.6 β -胡萝卜素 ($C_{40}H_{56}$)：纯度大于等于 95%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质或标准样品。

5.3 仪器和设备

5.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器/二极管阵列检测器。

5.3.2 分析天平：感量 0.001 g 和感量 0.00001 g。

5.3.3 超声波清洗器。

5.3.4 旋转蒸发器。

5.3.5 氮吹仪。

5.3.6 涡旋仪。

5.3.7 分光光度计。

5.3.8 恒温培养箱。

5.4 材料

微孔滤膜：0.45 μm ，有机系。

6 分析步骤

6.1 通用要求

所有分析操作均应室内避光进行。

6.2 试样制备

6.2.1 原料试样

水果、蔬菜原料类样品经研磨、打浆获得均质溶液，0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可保存1天。

6.2.2 固体试样

果蔬干制品、果蔬提取物制成的压片糖果、胶囊、粉剂等固体试样经粉碎、研磨、过筛（孔径小于 0.5 mm），获得固体粉末状试样，0 $^{\circ}\text{C}$ ~4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下可保存1周。

6.2.3 液体试样

果蔬汁等液体试样无需处理。

6.3 试剂配制

6.3.1 标准储备溶液（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：分别准确称取全反式叶黄素或玉米黄质或 α -隐黄质或 β -隐黄质或 α -胡萝卜素或 β -胡萝卜素标准品5 mg（精确至0.01 mg），加入25 mg BHT，转移至10 mL棕色容量瓶中，用二氯甲烷稀释并定容至刻度，配制成质量浓度为500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备溶液，置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，保存期3个月。标准储备溶液使用前应按附录A进行浓度校正。

6.3.1 标准中间溶液（100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）：准确移取上述标准储备溶液（6.3.1）1.0 mL于5 mL棕色容量瓶中，用二氯甲烷定容至刻度，摇匀，配制成质量浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准中间溶液，4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，保存期1周。标准中间溶液使用前应按附录A进行浓度校正。

6.3.2 标准系列溶液：分别移取上述标准中间溶液（6.3.2）0.0 mL、0.05 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.3 mL、0.4 mL、1.0 mL于10 mL棕色容量瓶中，用流动相稀释并定容配成浓度范围0.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准系列溶液。临用现配。

6.3.3 正己烷-乙醇-丙酮-甲苯提取液：分别准确移取正己烷10.0 mL、乙醇6.0 mL、丙酮7.0 mL、甲苯7.0 mL于棕色磨口瓶中，混合均匀获得体积比为10:6:7:7的正己烷-乙醇-丙酮-甲苯提取液。

6.3.4 氢氧化钾-甲醇溶液：称取氢氧化钾40 g于磨口瓶中，加入100 mL甲醇溶液，搅拌均匀获得40%的氢氧化钾-甲醇溶液。

6.4 提取和皂化

准确称取1 g~5 g (精确至0.001 g) 试样, 加入1.0 g抗坏血酸, 置于100 mL 磨口锥形瓶中, 加入30 mL正己烷-乙醇-丙酮-甲苯-提取液 (6.3.4), 盖上瓶塞, 振荡提取3 h~4 h, 避免沉降。提取结束加入2 mL 40% 氢氧化钾-甲醇溶液 (6.3.5), 摇匀, 置于避光处, 25 °C下皂化16 h得皂化液。

6.5 萃取

将皂化液转入250 mL分液漏斗, 加入30 mL正己烷, 盖好瓶塞, 室温下震荡1 min; 再加入38 mL 10% 硫酸钠溶液, 震荡摇匀, 静置分层, 收集有机层溶液; 将水相按上述方法进行第二次萃取, 合并有机相溶液。有机相于旋转蒸发器上40 °C减压浓缩至1 mL~2 mL, 随后用氮气吹干。准确加入6.0 mL甲醇溶液, 充分溶解, 经0.45 μm有机系膜过滤后收集至进样瓶中, 备用。

6.6 色谱测定

6.6.1 色谱条件

色谱条件如下:

- 色谱柱为C₃₀反向色谱柱, 柱长250 mm, 内径4.6 mm, 粒径5 μm; 或等效色谱柱;
- 流动相A相, 水、甲基叔丁基醚、甲醇体积比为5 : 25 : 70; 流动相B相, 水、甲基叔丁基醚、甲醇体积比为5 : 85 : 10;
- 洗脱梯度按表1进行;
- 流速为0.6 mL/min;
- 检测波长为450 nm;
- 柱温为25 °C;
- 进样体积为20 μL。

表1 洗脱梯度

时间/min	流动相比比例	
	A%	B%
0	95	5
4.5	80	20
12.5	50	50
18.0	25	75
24.0	5	95
30.0	5	95

6.6.2 标准曲线绘制

分别将叶黄素、玉米黄质、α-隐黄质、β-隐黄质、α-胡萝卜素、β-胡萝卜素标准系列溶液 (6.3.3) 注入高效液相色谱仪中, 得到峰面积, 以峰面积为纵坐标, 以标准系列溶液浓度为横坐标绘制标准曲线。

6.6.3 试样测定

将待测液 (6.5) 注入高效液相色谱仪中, 得到峰面积, 根据标准曲线得到待测液中叶黄素、玉米黄质、α-隐黄质、β-隐黄质、α-胡萝卜素、β-胡萝卜素浓度。以玉米汁为例的样品高效液相色谱图见附录B。

7 数据处理

试样中叶黄素、玉米黄质、α-隐黄质、β-隐黄质、α-胡萝卜素、β-胡萝卜素的含量以质量分数计, 按式(1)计算。计算结果以重复性条件下获得的三次独立测定结果的算术平均值表示, 保留三位有效数字。

$$= \frac{\times \times 1000}{\times 1000} \times \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——试样中叶黄素、玉米黄质、 α -隐黄质、 β -隐黄质、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C ——从标准曲线查得的试样溶液中叶黄素/玉米黄质/ α -隐黄质/ β -隐黄质/ α -胡萝卜素/ β -胡萝卜素的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——旋转蒸发后复溶溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

n ——超出线性范围后，需要进一步稀释的倍数。

8 精密度

在重复条件下获得的三次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

9 检出限

叶黄素、 α -胡萝卜素、 β -胡萝卜素检出限均为5 $\mu\text{g/kg}$ ；玉米黄质、 α -隐黄质、 β -隐黄质溶液检出限均为20 $\mu\text{g/kg}$ 。该方法在30 min内可分离检测出20余种胡萝卜色素，分离度大于1.4；加标回收率为95%~100%。

行业标准信息服务平台

附录 A
(规范性)
标准溶液浓度的校正

A.1 实验步骤

分别取叶黄素、β-隐黄质标准储备溶液（浓度约为 500 μg/mL）10 μL，注入含3.0 mL乙醇的比色皿中。以乙醇为空白，按表A.1中检测波长测定其吸光度值，平行测定3次，取均值。

取玉米黄质标准储备溶液（浓度约为 500 μg/mL）10 μL，注入含3.0 mL甲醇的比色皿中。以甲醇为空白，按表A.1中检测波长测定其吸光度值，平行测定3次，取均值。

分别取α-隐黄质、α-胡萝卜素、β-胡萝卜素标准储备溶液（浓度约为 500 μg/mL）10 μL，注入含3.0 mL正己烷的比色皿中。以正己烷为空白，按表A.1中检测波长测定其吸光度值，平行测定3次，取均值。

A.2 结果计算

标准溶液浓度按式（A.1）计算：

$$X = - \times \frac{3.01}{0.01} \dots \dots \dots (A.1)$$

式中：

X——标准储备溶液浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

A——标准储备溶液的紫外吸光均值；

E——各标准物质的比吸光系数（见表A.1）；

$\frac{3.01}{0.01}$ ——测定过程中稀释倍数的换算系数。

表 A.1 测定波长及比吸光系数

目标物	检测波长 (nm)	<i>E</i>	稀释溶剂
叶黄素	445	0.2550	乙醇
玉米黄质	449	0.2620	甲醇
α-隐黄质	445	0.2636	正己烷
β-隐黄质	445	0.2460	乙醇
α-胡萝卜素	444	0.2725	正己烷
β-胡萝卜素	450	0.2620	正己烷

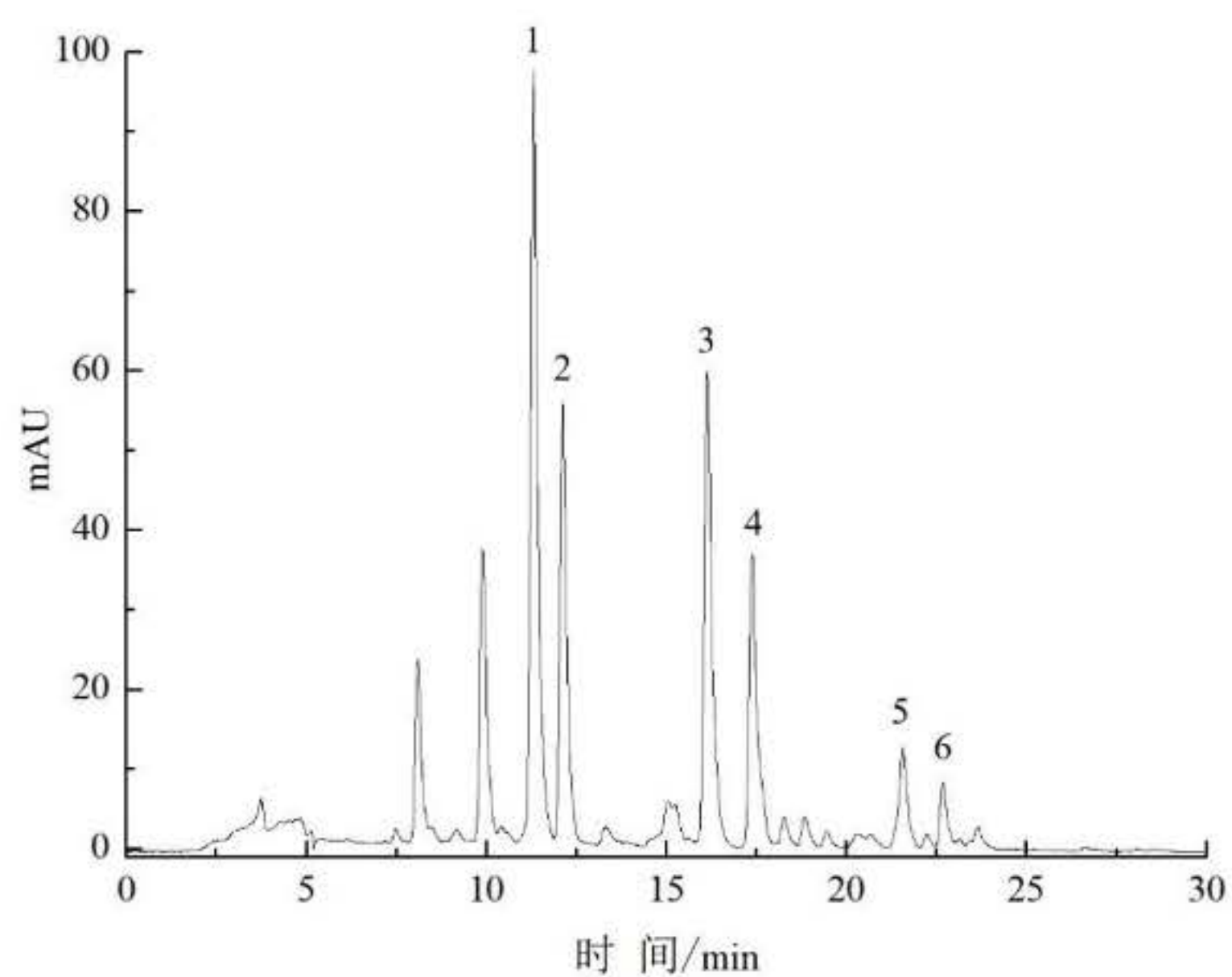
附录 B

(资料性)

玉米汁样品中类胡萝卜素高效液相色谱图

B.1 玉米汁样品中叶黄素、玉米黄质、隐黄质、胡萝卜素色谱图

采用本文件分析步骤获得的玉米汁样品中叶黄素、玉米黄质、隐黄质、胡萝卜素高效液相色谱图见图B.1。



标引序号说明：

- 1——叶黄素
- 2——玉米黄质
- 3—— α -隐黄质
- 4—— β -隐黄质
- 5—— α -胡萝卜素
- 6—— β -胡萝卜素

图 B.1 玉米汁样品中叶黄素、玉米黄质、隐黄质、胡萝卜素色谱图