

团 体 标 准

T/BPCTXXX—XXXX

凝胶糖果中叶黄素酯的测定

Determination of lutein esters in gummy candies

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

北京理化分析测试技术学会 发布

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。

本文件由北京理化分析测试技术学会归口。

本文件起草单位：略。

本文件主要起草人：略。

凝胶糖果中叶黄素酯的测定

1 范围

本文件规定了以明胶、果胶或其混合胶为基质的凝胶糖果中叶黄素酯的液相色谱测定方法。本标准适用于以明胶、果胶或其混合胶为基质的凝胶糖果中叶黄素酯的液相色谱测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法概要

凝胶糖果经粉碎、酶解后，通过有机溶剂提取样品中叶黄素酯，经皂化反应后转化为叶黄素，经C₃₀色谱柱分离，液相色谱-紫外检测器测定，通过保留时间定性、外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本文件中所用试剂应为分析纯，用水为 GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇（CH₃O）：色谱纯。
- 5.1.2 乙酸乙酯（C₄H₈O₂）：色谱纯。
- 5.1.3 无水乙醇（C₂H₆O）。
- 5.1.4 2,6-二叔丁基对甲酚（BHT，[(CH₃)₃C]₂C₆H₂(CH₃)OH）。
- 5.1.5 二氯甲烷（CH₂Cl₂）。
- 5.1.6 正己烷（C₆H₁₄）。
- 5.1.7 氯化钠（NaCl）。
- 5.1.8 氢氧化钾（KOH）。
- 5.1.9 碘（I₂）。
- 5.1.10 果胶酶：酶活力≥500 U/mg，生化试剂。
- 5.1.11 胰酶：生化试剂。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.4 g/mL 氢氧化钾-甲醇溶液：称取 4 g 氢氧化钾（5.1.8），加 10 mL 甲醇溶解（5.1.1），混匀。
- 5.2.2 0.1%BHT-乙醇溶液：称取 1 g 2,6-二叔丁基对甲酚(5.1.4)溶于 1000 mL 无水乙醇(5.1.3)中，混匀。
- 5.2.3 0.001 mg/mL 碘的乙醇溶液：称取 1 mg 碘（5.1.9），加无水乙醇(5.1.3)溶解稀释至 1 L。

5.3 标准品

- 5.3.1 叶黄素（CAS 号：127-40-2）。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备液：称取 2 mg（精确到 0.01 mg）叶黄素（5.3.1），用 0.1%BHT 乙醇溶液（5.2.2）溶解后，定容在 10 mL 棕色容量瓶中。该标准溶液充氮避光置于-20℃或以下的冰箱保存可保存 6 个月。

注1：避光操作和保存。

注2：叶黄素标准储备液使用前需校正，具体操作见附录A。

5.4.2 标准中间溶液：取适量校正后的标准储备液，以 0.1%BHT 乙醇溶液（5.2.2）为溶剂，制备质量浓度约为 10 µg/mL 的叶黄素标准中间液，现用现配。

注：避光操作和保存。

5.4.3 系列标准工作溶液：将标准中间溶液（5.4.2）用 0.1%BHT 乙醇溶液（5.2.2）稀释制备一系列标准溶液，标准溶液系列质量浓度约为 0.1 µg/mL、0.5 µg/mL、2 µg/mL、4 µg/mL、6 µg/mL 的叶黄素系列标准工作溶液，现用现配。

注：避光操作和保存。

5.5 材料

5.5.1 棕色容量瓶：10 mL、50 mL、100 mL。

5.5.2 移液器。

5.5.3 离心管：50 mL（螺旋盖）。

5.5.4 有机滤膜：0.45 µm。

6 仪器设备

6.1 液相色谱仪，带二极管阵列检测器或紫外检测器。

6.2 电子天平：感量 0.001 g 和 0.01 mg。

6.3 氮吹仪。

6.4 水浴振荡器。

6.5 离心机。

6.6 匀浆仪。

6.7 紫外可见分光光度计。

6.8 涡旋振荡器。

6.9 旋转蒸发器，配备真空泵系统。

6.10 水浴锅。

7 试验步骤

由于叶黄素对光敏感，除非另行说明，所有试验操作应在无 500 nm 以下紫外光的黄色光源或红色光源环境中进行。

7.1 提取

取不少于20粒样品（对于不同色泽或风味混装的样品，则按色泽或种类均匀取样），在含有液氮的低温容器中浸泡约10 min，取出后立即用匀浆仪粉碎，使之形成均匀的粉末或颗粒。称取适量（0.5~3 g）粉碎后的样品置于50 mL离心管中，加入0.35 g果胶酶(5.1.10)、0.35 g胰酶(5.1.11)和10 mL水，混匀，置于50℃恒温水浴振荡直至样品完全溶解。在溶解液中加入3 g氯化钠（5.1.7），混匀，加入15 mL无水乙醇（5.1.3），振荡3 min，加入15 mL正己烷（5.1.6），剧烈振荡1 min，离心（3500 r/min，1 min）或静置分层，转移上部正己烷层清液，重复提取3~5次至上清液近无色(第二次起加入正己烷的量可适当减少)，合并上层提取液，用氮吹仪吹干或40℃条件下旋蒸至近干。加入20 mL乙醇，涡旋或超声溶解残渣，混匀，加入0.4 g/mL氢氧化钾-甲醇溶液（5.2.1）2 mL，置于55℃水浴锅中水浴避光皂化30 min，取出冷却至室温，转移至50 mL棕色容量瓶中，用0.1%BHT乙醇溶液（5.2.2）定容至刻度。

注：50℃恒温水浴振荡期间，可将样品取出涡旋1-2次以加快样品溶解。

7.2 高效液相色谱测定参考条件

7.2.1 色谱柱：C₃₀柱 250 mm×4.6 mm，5.0 µm 或等效色谱柱。

7.2.2 流动相：甲醇：乙酸乙酯=80：20（体积比）。

- 7.2.3 流速：1.5 mL/min。
 7.2.4 检测波长：445 nm。
 7.2.5 进样体积：20 μL。
 7.2.6 柱温：30 °C。
 7.2.7 等度洗脱。

7.3 标准曲线的绘制

分别取标准系列工作液，按照7.2列出的条件分别进行液相测定，以标准溶液浓度为横坐标，对应的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。叶黄素标准溶液色谱图参见附录B中的图B.1。

7.4 测定

将标准工作液和试样溶液按照7.2列出的条件分别进行液相色谱分析测定，根据标准样品的保留时间定性，外标法定量。试样溶液中叶黄素的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围则应稀释或浓缩后再进行分析。

注：由于在样品提取过程中，温度、光照等原因可使部分反式结构的叶黄素发生异构化，可按以下步骤获得顺式叶黄素，用于确定异构化的叶黄素定性：以乙醇为溶剂，配制800 μg/L的叶黄素标准溶液50 mL，加入2 mL碘的乙醇溶液（5.2.3），摇匀，混合液在太阳光或日光灯下放置30 min，可获得顺式结构的叶黄素。经光碘异构化的反式叶黄素标准溶液色谱图参见图B.2。

8 结果计算与表示

试样中叶黄素酯含量（以叶黄素二棕榈酸酯计）的测定应按式（1）进行计算。

$$X = \frac{c \times V \times 1.84}{m \times 1000} \times \frac{1}{F_1} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X——试样中叶黄素酯的含量（以叶黄素二棕榈酸酯计），单位为毫克每克（mg/g）；

c——由标准曲线计算得到样品中反式叶黄素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——称样量，单位为克（g）；

V——样品最终定容体积，单位为毫升（mL）

1.84——叶黄素转换为叶黄素二棕榈酸酯的换算系数；

1000——单位换算系数；

F_1 ——校正系数，可通过以下方式获得：用液相色谱分析试样溶液，将顺式与反式叶黄素色谱峰面积加和作为总峰面积，其中反式叶黄素峰面积除以总峰面积所得值为校正系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，计算结果保留三位有效数字。

9 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15%。

10 其他

以称取样品量3 g，定容体积50 mL计，本方法的检测限为1 μg/g，定量限为3 μg/g。

附录 A

(规范性)

叶黄素标准储备溶液浓度校正方法

叶黄素标准储备溶液使用前需要校正。准确吸取1.0 mL标准储备液于100 mL棕色容量瓶中，用无水乙醇定容至刻度，摇匀。移取该溶液至1 cm 的石英比色皿中，以乙醇为空白，以分光光度计在445 nm 波长下测定吸光值A。按式（A.1）计算标准储备溶液浓度。

$$c_{\text{标}} = \frac{A \times 100}{255 \times 1} \times 1000 \times F_2 \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

$c_{\text{标}}$ ——标准储备溶液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

A——叶黄素稀释溶液在445 nm处吸光度值；

255——无水乙醇中叶黄素标准品在445 nm波长下的吸光系数，单位为 $\text{L/g} \cdot \text{cm}$ ；

100——稀释倍数；

1——比色皿厚度，单位厘米（cm）；

1000——单位换算系数；

F_2 ——校正系数，通过以下方式获得：用液相色谱分析校正后的标准溶液，将色谱图上溶剂峰以外的所有可见色谱峰面积加和作为总峰面积，其中反式叶黄素峰面积除以总峰面积所得值为校正系数。

附录 B

(资料性)

标准溶液液相色谱图

B.1 叶黄素（反式）标准溶液液相色谱图

叶黄素（反式）标准溶液液相色谱图见图B.1。

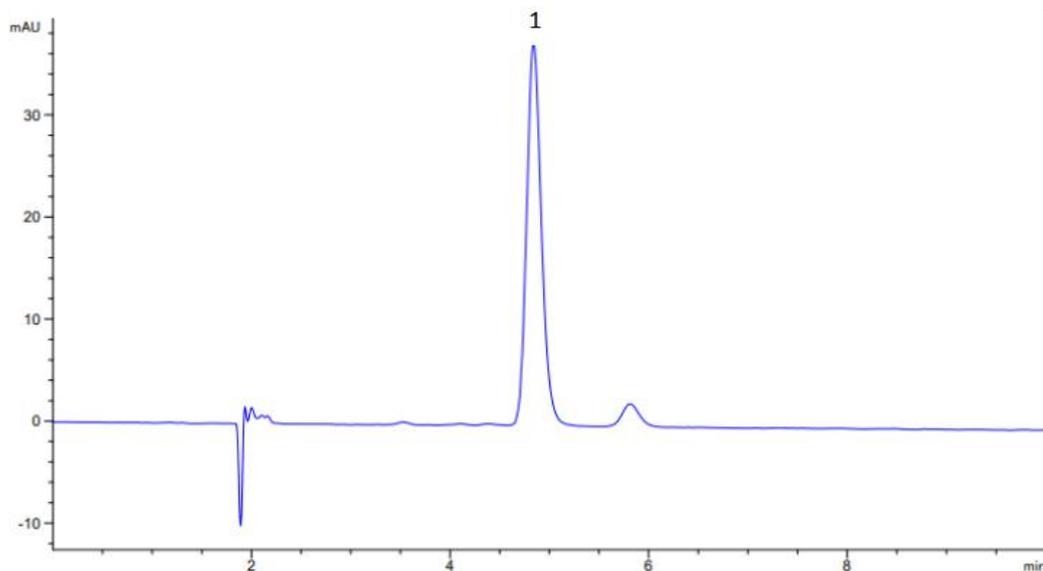


图 B.1 说明：1—反式结构的叶黄素

B.2 经光碘异构化的叶黄素（反式）标准溶液液相色谱图

经光碘异构化的叶黄素（反式）标准溶液液相色谱图见图B.2。

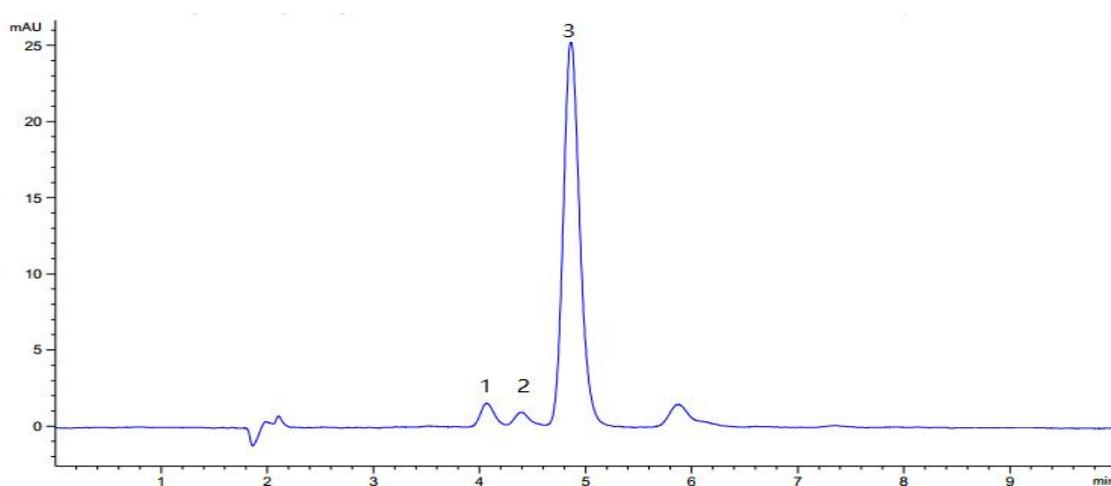


图 B.2 说明：1、2—顺式结构的叶黄素；3—反式结构的叶黄素