ICS
CCS

团　体　标　准

T/GDNB XXXX—2023

甘薯中 13 种类胡萝卜素单体物质含量的测定

Determination of 13 carotenoids in sweetpotato

（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

广东省农业标准化协会　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。

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。

本文件由广东省农业标准化协会提出并归口。

本文件起草单位：广东省农业科学院作物研究所

本文件主要起草人：王章英、张荣、唐朝臣、贾瑞雪、陈伊航

甘薯中13种类胡萝卜素单体物质含量的测定

1 范围

本文件规定了甘薯及其制品中13种类胡萝卜素单体物质含量测定原理、试剂和材料、仪器设备、样品制备、提取方法、检测条件、精密度、检出限和定量限。

本文件适用于甘薯、甘薯粉、甘薯干制品中13种类胡萝卜素单体物质（紫黄质，新黄质，环氧玉米黄质，叶黄素，玉米黄质，α-隐黄质，ε-胡萝卜素，β-隐黄质，α-胡萝卜素，β-胡萝卜素，δ-胡萝卜素，γ-胡萝卜素，番茄红素）含量检测。

2 规范性引用文件

本文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

试样冷冻干燥打粉之后，用乙醇-丙酮-正己烷混合液提取其中的13种类胡萝卜素，干燥后用甲基叔丁基醚溶液复溶，超高效液相色谱法测定，外标法定量。

5 试剂和材料(正文标题)

5.1 试剂

5.1.1 甲醇（CH_4O）：色谱纯。
5.1.2 乙腈（C_2H_3N）：色谱纯。
5.1.3 甲基叔丁基醚[$CH_3OC(CH_3)_3$，MTBE]：色谱纯。
5.1.4 2,6-二叔丁基对甲酚（$C_{15}H_{24}O$，BHT）：色谱纯。
5.1.5 甲酸（CH_2O_2）：色谱纯。
5.1.6 无水乙醇（C_2H_5OH）：分析纯。
5.1.7 丙酮（C_3H_6O）：分析纯
5.1.8 正己烷（C_6H_{14}）：色谱纯。

5.2 标准品

5.2.1 α-胡萝卜素（$C_{40}H_{56}$，CAS 号：7488-99-5）：纯度≥97%。
5.2.2 β-胡萝卜素（$C_{40}H_{56}$，CAS 号：7235-40-7）：纯度≥95%。
5.2.3 γ-胡萝卜素（$C_{40}H_{56}$，CAS 号：472-93-5）：纯度≥96%。
5.2.4 δ-胡萝卜素（$C_{40}H_{56}$，CAS 号：472-92-4）：纯度≥95%。
5.2.5 β-隐黄质（$C_{40}H_{56}O$，CAS 号：472-70-8）：纯度≥98%。
5.2.6 α-隐黄质（$C_{40}H_{56}O$，CAS 号：24480-38-4）：纯度≥98%。
5.2.7 叶黄素（$C_{40}H_{56}O_2$，CAS 号：172-40-2）：纯度≥96%。
5.2.8 番茄红素（$C_{40}H_{56}$，CAS 号：502-65-8）：纯度≥95%。
5.2.9 新黄质（$C_{40}H_{56}O_4$，CAS 号：14660-91-4）：纯度≥97%。
5.2.10 紫黄质（$C_{40}H_{56}O_4$，CAS 号：126-29-4）：纯度≥95%。

5.2.11　玉米黄质（$C_{40}H_{56}O_2$，CAS 号：144-68-3）：纯度≥97%。
5.2.12　ε-胡萝卜素（$C_{40}H_{56}O_4$，CAS 号：472-89-9）：纯度≥98%。
5.2.13　环氧玉米黄质（$C_{40}H_{56}O_3$，CAS 号：640-03-9）：纯度≥95%。

5.3　仪器与设备

5.3.1　超高效液相色谱：配有 DAD 二极管阵列检测器。
5.3.2　旋涡混合器。
5.3.3　离心机。
5.3.4　电子天平：感量 0.00001 g。
5.3.5　冷冻干燥机。
5.3.6　超声清洗仪。
5.3.7　粉碎机。
5.3.8　氮吹仪。

5.4　材料

微孔滤膜：0.22 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　样品制备

甘薯和甘薯干切碎，液氮速冻后冷冻干燥，并用粉碎机打粉，样品储存在-20℃暗光环境。甘薯粉试样无需处理。

6.3　试剂配制

6.3.1　标准储备溶液（200 μg/mL）

分别准确称取类胡萝卜素单体标准品 2g（精确至 0.01 mg），加入 1 mg BHT，转移至 10 mL 棕色容量瓶中，用甲基叔丁基醚稀释并定容至刻度，配制成质量浓度为 200 μg/mL 标准储备溶液，置于-20℃避光保存，保存期 3 个月。

6.3.2　标准中间溶液（100 μg/mL）

准确移取上述标准储备液（1.1）5.0 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲基叔丁基醚定容至刻度，摇匀，配制成质量浓度为 100 μg/mL 标准中间溶液，4℃避光保存，保存期 1 周。

6.3.3　标准系列溶液

分别移取上述标准中间溶液（1.2）0.00 mL，0.01 mL，0.05 mL，0.10 mL，0.50 mL，1.00 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲基叔丁基醚稀释并定容配成浓度范围 0.0 μg/mL~10.0 μg/mL 的标准系列溶液。临用现配。

6.3.4　正己烷-丙酮-乙醇提取液

分别准确移取正己烷 10.0 mL、丙酮 10.0 mL、乙醇 10.0 mL 于棕色磨口瓶中，混合均匀获得体积比为 1：1：1 的正己烷-丙酮-乙醇提取液。

6.4　试样提取

称取0.5 g已充分混匀的试样粉末至15 mL离心管中，加入5 mL含0.01% BHT(g mL^{-1})的乙醇-丙酮-正己烷提取液（6.3.4）进行提取，并于室温下充分震荡混匀。室温下漩涡振荡2 min，于4℃条件下，2500 g

离心5 min，然后将上清液转移至新的15 mL离心管中；重复以上提取步骤 2 次，将离心后上清液合并；用氮吹仪氮吹至干，得到类胡萝卜素。再用1 mL含有 0.01% BHT(g mL^{-1})的甲基叔丁基醚溶液复溶，超声震荡10 min 使其完全溶解，用0.22 μm 滤膜过滤后，保存在棕色进样瓶中，用于液相色谱分析。

6.5 色谱条件

超高效液相色谱（5.3.1）色谱条件如下：

a) 色谱柱：YMC Carotenoid C30 色谱柱，柱长250 mm，内径2 mm，粒径3 μm；
b) 流动相A相： 甲醇和乙腈(1∶3)，加入 0.01% BHT)(g mL^{-1})和 0.1%甲酸，流动相B相为甲基叔丁基醚加入0.01% BHT (g mL^{-1})，洗脱梯度按表1进行；
c) 流速为0.8 mL min^{-1}；
d) 检测波长为450 nm；
e) 柱温为23 ℃；
f) 进样体积为1 μL。

表 1 梯度洗脱条件

时间/min	流动相比例	
	A%	B%
0	85	15
1.0	80	20
2.0	70	30
3.0	55	45
4.0	40	60
5.0	25	75
5.10	85	15
8.0	85	15

6.6 标准曲线绘制

将13种类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，以类胡萝卜素标准品的浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制不同类胡萝卜素的标准曲线。

6.7 试样测定

将待测液（6.4）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13种类胡萝卜素单体浓度。以甘薯块根为例的样品高效液相色谱图见附录B。

7 数据处理

试样中13种类胡萝卜素单体的含量X_i的计算按式（1）进行：

$$X_i = \frac{\mathrm{CV}}{1000\mathrm{M}} \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中:

X_i——为甘薯块根中类胡萝卜素的含量，单位为微克每克（μg/g）；
C——为通过标准曲线计算的到的类胡萝卜素含量，单位为微克每毫升（μg/mL）；
V——为块根类胡萝卜素提取时复溶液的体积；
M——为块根类胡萝卜素提取时所使用到的样品重量。
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。

8 精密度

在重复性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 检出限和定量限

当取样量为0.5g、复溶体积为1mL，13种类胡萝卜素单体的检出限、定量限和加标回收率如表2所示：

表 2 13 种类胡萝卜素单体检出限、定量限和加标回收率

类胡萝卜素	检出限(μg mL^{-1})	定量限(μg mL^{-1})	加标回收率%
紫黄质	0.003	0.009	122.38
新黄质	0.004	0.015	85.80
环氧玉米黄质	0.004	0.015	108.02
叶黄素	0.003	0.012	108.41
玉米黄质	0.005	0.016	118.38
α-隐黄质	0.003	0.01	101.00
ε-胡萝卜素	0.003	0.011	103.45
β-隐黄质	0.004	0.012	96.47
α-胡萝卜素	0.003	0.01	98.44
β-胡萝卜素	0.004	0.012	84.61
δ-胡萝卜素	0.003	0.011	92.90
γ-胡萝卜素	0.005	0.016	98.67
番茄红素	0.018	0.06	93.13

附　录　A
（规范性）
标准溶液浓度的校正

A.1 试验步骤

使用前，应对叶黄素、玉米黄质、α-隐黄质、β-隐黄质、α-胡萝卜素、β-胡萝卜素、番茄红素的标准储备液的浓度进行校正，具体操作如下：

分别取叶黄素、β-隐黄质标准储备溶液（浓度约为200μg/ml）50μl,注入含10ml乙醇的1cm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，平行测定三次，取平均值。

取玉米黄质标准储备溶液（浓度约为200μg/ml）50μl，注入含10ml甲醇的1cm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，取平均值。

分别取α-隐黄质，α-胡萝卜素，β-胡萝卜素和番茄红素标准储备溶液（浓度约为200μg/ml）50μl，注入含10ml正己烷的1cm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，平行测定三次，取平均值。

表A.1 各类胡萝卜素测定波长及比吸光系数

目标物	检测波长（nm）	E	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	446	0.2725	正己烷
β-胡萝卜素	450	0.2620	正己烷
番茄红素	470	0.3450	正己烷

A.2 结果计算

按（A.1）计算标准溶液质量浓度：

$$X = \frac{A}{E} \times \frac{10.05}{0.05} \qquad \cdots\cdots(A.1)$$

式中：

X　——标准溶液质量浓度，单位为微克每毫升（μg/ml）；

A　——标准溶液吸光值；

E　——各物质的比吸光系数（见表A.1）；

$\frac{10.05}{0.05}$　——测定过程中稀释倍数的换算系数。

附　录　B
（资料性）
甘薯块根中 13 种类胡萝卜素单体超高效液相色谱图

B．1 甘薯块根中13种类胡萝卜素单体色谱图

采用本文件分析步骤获得的甘薯块根样品中13种类胡萝卜素超高效液相色谱图见图B.1。

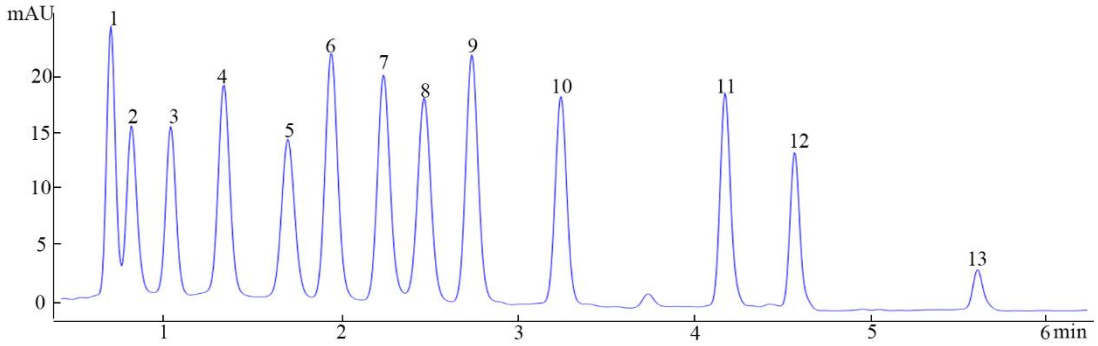

图 B．1 甘薯块根中13种类胡萝卜素单体色谱图

标引序号说明：
1——紫黄质
2——新黄质
3——环氧玉米黄质
4——叶黄素
5——玉米黄质
6——α-隐黄质
7——ε-胡萝卜素
8——β-隐黄质
9——α-胡萝卜素
10——β-胡萝卜素
11——δ-胡萝卜素
12——γ-胡萝卜素
13——番茄红素