

ICS 71.040.50

X 04

中国食品添加剂和配料协会团体标准

T/CFAA 0008—2024

辣椒红中辣椒素的测定 高效液相色谱法

Determination of capsaicinoids in paprika red—

High performance liquid chromatography

2024年7月12日发布

2024年7月12日实施

中国食品添加剂和配料协会 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。

本文件由中国食品添加剂和配料协会着色剂专业委员会提出。

本文件由中国食品添加剂和配料协会团体标准技术委员会归口。

本文件起草单位：晨光生物科技集团股份有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、新疆天椒弘安色素有限公司、邯郸市产品质量监督检验所、中国食品发酵工业研究院有限公司、中国食品添加剂和配料协会、中国轻工业国际交流中心。

本文件主要起草人：张晓芳、卢颖、石明革、王喜堂、焦利卫、刘捷、徐晨、杨清山、陈楠楠、李贞、袁瑞、田伏锦、耿晓东、薛然、朱振鹏。

辣椒红中辣椒素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了辣椒红中辣椒素含量的高效液相色谱测定方法。
本文件适用于辣椒红中辣椒素含量的测定。

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 601 化学试剂 标准滴定溶液的制备
- GB/T 602 化学试剂 杂质测定用标准溶液的制备
- GB/T 603 化学试剂 试验方法中所用制剂及制品的制备
- GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

辣椒素 capsaicinoids

在辣椒中产生辣味的*N*-香草基酰胺类生物碱物质的统称。

注1：其中辣椒碱、二氢辣椒碱和降二氢辣椒碱约占辣椒素总量的95%以上，是表征辣度的主要成分。

注2：本文件中辣椒素含量以辣椒碱、二氢辣椒碱和降二氢辣椒碱三种成分计。

4 原理

辣椒红样品用甲醇提取辣椒素，过滤后经C₁₈色谱柱分离，荧光检测器检测，以三种辣椒碱与合成辣椒碱标准品的相对保留时间定性，通过三种辣椒碱相对合成辣椒碱的校正因子，采用外标法进行定量。

5 试剂和溶液

本文件中所用试剂和水，在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂和符合GB/T 6682规定的一级水。试验中所用标准滴定溶液、杂质测定用标准溶液、制剂及制品，在没有注明其他要求时，均按GB/T 601、GB/T 602、GB/T 603的规定制备。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

5.1 甲醇：色谱纯。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 冰乙酸：色谱纯。

5.4 *N*-壬酸香草酰胺（合成辣椒碱）标准品（CAS号：2444-46-4）：纯度 $\geq 95\%$ 。

5.5 标准储备溶液：称取标准品约 10 mg（精确至 0.0001 g），用甲醇溶解并定容至 50 mL 容量瓶中，得到浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备溶液，置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期为 24 个月。

5.6 标准工作溶液：分别吸取标准储备溶液 0.0125 mL、0.025 mL、0.050 mL、0.125 mL、0.250 mL、1.25 mL 于 10 mL 容量瓶中，加甲醇稀释定容，得到浓度分别为 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准工作溶液，置于 2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存，有效期为 6 个月。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪：配备荧光检测器。

6.2 分析天平：感量为 0.01 mg 和 0.1 mg。

6.3 漩涡混合器。

6.4 高速离心机：转速大于 4500 r/min。

7 参考色谱条件

7.1 色谱柱： C_{18} 色谱柱（4.6 mm \times 150 mm，5 μm ），或同等性能的色谱柱。

7.2 流动相：1%冰乙酸溶液-乙腈，体积比为 60:40。

7.3 柱温：40 $^{\circ}\text{C}$ 。

7.4 激发波长：280 nm。

7.5 发射波长：325 nm。

7.6 流速：1.5 mL/min。

7.7 进样量：10 μL 。

8 分析步骤

8.1 样品溶液的制备

称取辣椒红样品约 0.5 g（精确至 0.0001 g）于 50 mL 离心管中，加入 20 mL 甲醇，涡旋混匀至少 1 min，在不小于 4000 r/min 条件下离心 5 min 以上，取上清液过 0.45 μm 微孔滤膜，作为样品溶液备用。

8.2 测定

8.2.1 标准曲线的绘制

在7参考色谱条件下，分别将标准工作溶液注入高效液相色谱仪中，记录各浓度溶液对应的峰面积值，以标准工作液的浓度为横坐标、峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

8.2.2 含量测定

将样品溶液注入高效液相色谱仪中，根据标准工作溶液中不同组分的相对保留时间（参见表1）定性样品溶液中各待测组分辣椒碱、二氢辣椒碱、降二氢辣椒碱的色谱峰，由峰面积按照标准曲线计算各组分的质量分数。待测辣椒红样品中辣椒素的响应值应在标准曲线的线性范围内，超过线性范围则应稀释后再重新进行分析。参考色谱图见附录A。

表1 标准溶液中不同组分相对合成辣椒碱的保留时间参考值

待测组分	相对保留时间
合成辣椒碱	1.00
辣椒碱	1.02
二氢辣椒碱	1.52
降二氢辣椒碱	0.92

9 结果计算

辣椒红样品中待测组分（辣椒碱、二氢辣椒碱、降二氢辣椒碱）的含量 w_i 按式（1）计算：

$$w_i = \frac{c_i \times V}{m \times R_i \times 1000000} \times 100\% \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

w_i ——辣椒红样品中待测组分的含量（ $i=1,2,3$ ，分别表示辣椒碱、二氢辣椒碱、降二氢辣椒碱），%；

c_i ——由标准曲线计算得到的样品溶液中辣椒碱、二氢辣椒碱或降二氢辣椒碱的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

R_i ——样品溶液中待测组分相对标准品的响应因子（参见表2）；

V ——样品加入甲醇的体积，单位为毫升（ mL ）；

1000000——单位换算系数；

m ——样品的质量，单位为克（ g ）。

表2 待测组分相对合成辣椒碱标准品的响应因子表

待测组分	响应因子
合成辣椒碱	1.00
辣椒碱	0.88
二氢辣椒碱	0.93
降二氢辣椒碱	0.92

辣椒红样品中辣椒素的含量 w 按式（2）计算：

$$w = w_1 + w_2 + w_3 \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

w ——辣椒红样品中辣椒素的含量，%。

w_1 ——辣椒红样品中辣椒碱的含量，%。

w_2 ——辣椒红样品中二氢辣椒碱的含量，%。

w_3 ——辣椒红样品中降二氢辣椒碱的含量，%。

计算结果保留两位有效数字。

10 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应不大于其算术平均值的 10%。

11 检出限和定量限

按取样量 0.5 g，用 20 mL 甲醇提取，本方法的检出限为 0.001%，定量限为 0.003%。

附录 A

(资料性)

外标法测定辣椒红中辣椒素含量的色谱图

外标法测定合成辣椒碱标准品的参考色谱图见图A.1。

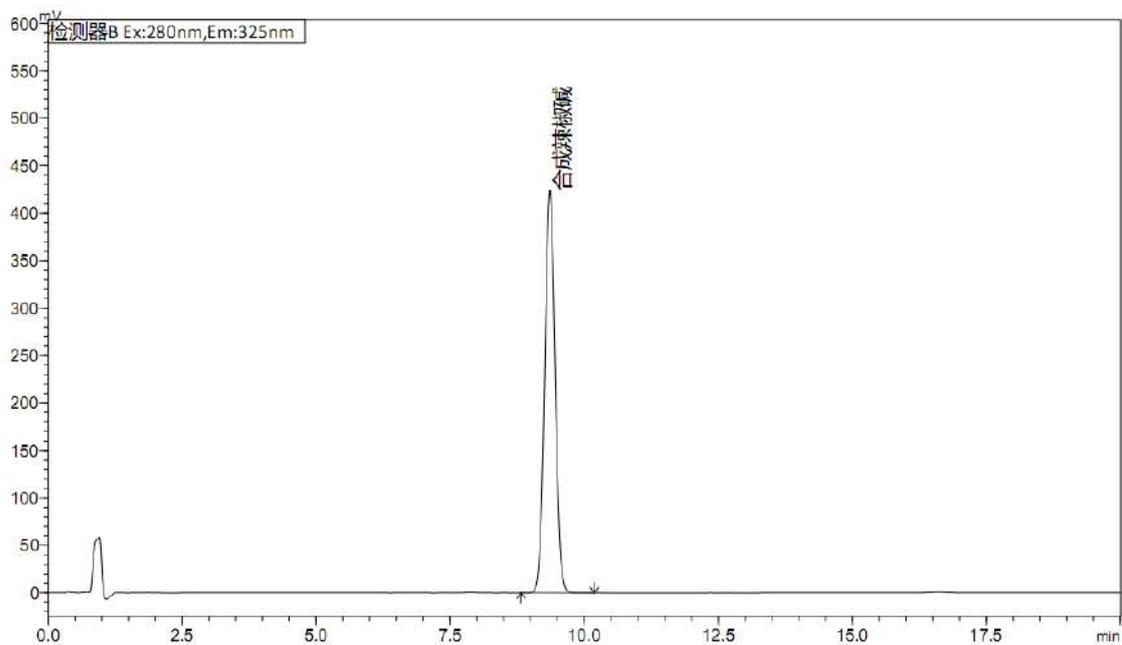


图 A.1 外标法测定合成辣椒碱标准溶液的色谱图

外标法测定天然辣椒碱标准品的参考色谱图见图A.2。

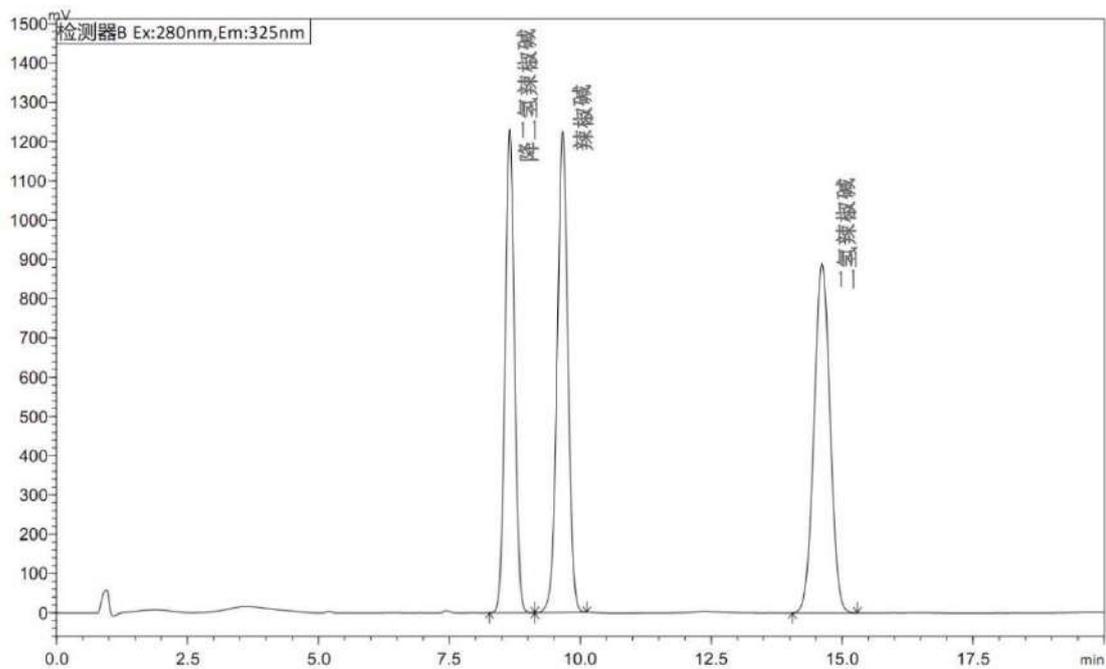


图 A.2 外标法测定天然辣椒碱标准溶液的色谱图

外标法测定辣椒红样品的参考色谱图见图A.3。

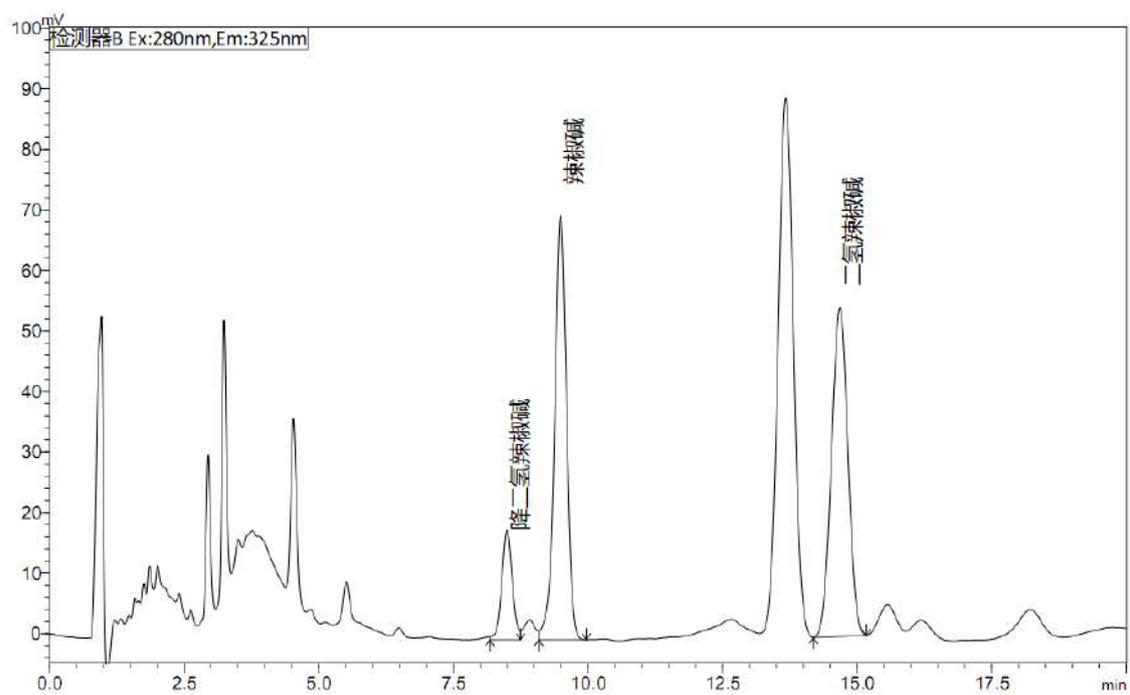


图 A.3 外标法测定辣椒红样品的色谱图