中国出入境检验检疫协会团体标准

《红棕榈油中胡萝卜素的测定》

（征求意见稿）

编制说明

标准起草组

二〇二三年十二月

《红棕榈油中胡萝卜素的测定》

团体标准编制说明

一、背景简况

《红棕榈油中胡萝卜素的测定》标准的制定，是依据中国出入境检验检疫协会2022年下达的计划任务进行的。该标准负责起草单位为中检集团中原农食产品检测（河南）有限公司、河南工业大学、大马棕榈油技术研发（上海）有限公司。标准负责起草人为张丽，负责组织标准的制定及验证工作，并负责编写标准文本及标准编制说明。

本标准制定的主要工作过程：

1. 标准起草制定工作组在对红棕榈油中胡萝卜素含量分析系统研究的基础上，查阅了有关国家的科技文献及相关标准资料，对搜集到的文献资料进行分析研究。

2. 对影响红棕榈油中多种胡萝卜素同分异构体分离的因素进行分析，探讨色谱柱种类、流动相种类及比例、洗脱模式、流速、柱温等方式对胡萝卜素同分异构体分离的影响，建立最优的色谱条件。

3. 采购红棕榈油样品，用建立的分离方法测定红棕榈油中胡萝卜素的含量。

4. 在上述工作基础上完成本标准的起草，同时完成本标准的编制说明。

二、编制原则

编写规则是按照 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》的要求进行编写的，根据胡萝卜素几种异构体的特点，参照有关标准，确定标准主要技术指标，确保标准具有科学性、先进性、针对性、适用性和可操作性，保护消费者利益，满足市场需求。

三、标准核心技术内容

《红棕榈油中胡萝卜素的检测》团体标准为推荐性标准，其主要内容包括：

1. 封面

按团体标准对封面的格式要求编写。

2. 前言

按照团体标准规定的格式编写。前言表明：（1）本标准的提出单位为中国出入境检验检疫协会；（2）本标准的起草单位为中检集团中原农食产品检测（河

南）有限公司、河南工业大学、大马棕榈油技术研发（上海）有限公司。

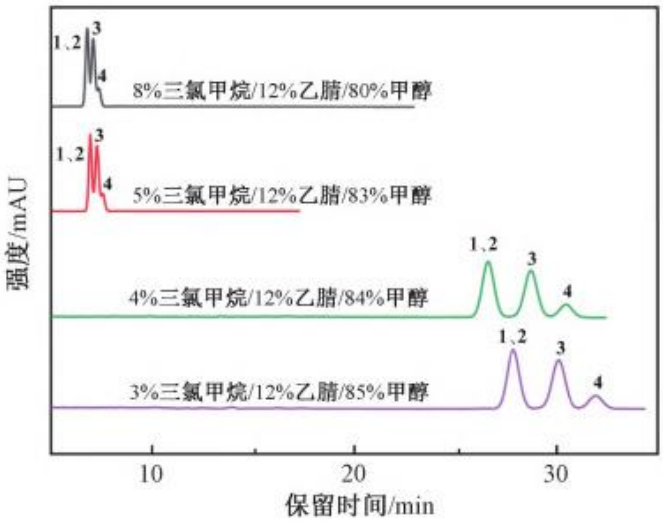
3. 标准主体内容：范围，规范性引用文件，术语和定义，原理、试剂和材料、仪器和设备、分析步骤、结果计算、精密度、定量限。

四、主要试验分析，技术经济论证，预期的经济效果

1.色谱条件的优化

1.1 InertSustain C_{18} 色谱柱

采用常规 InertSustain C_{18} 色谱柱，参照 GB 5009. 83-2016 色谱分离条件，采用 3%三氯甲烷/ 12%乙腈/ 85%甲醇，结果如图 1 所示。



注：峰 1 为 13-顺式-β-胡萝卜素；峰 2 为全反式 α-胡萝卜素；峰 3 为全反式 β-胡萝卜素；峰 4 为 9-顺式-β-胡萝卜素。 图 2—图 4 同。

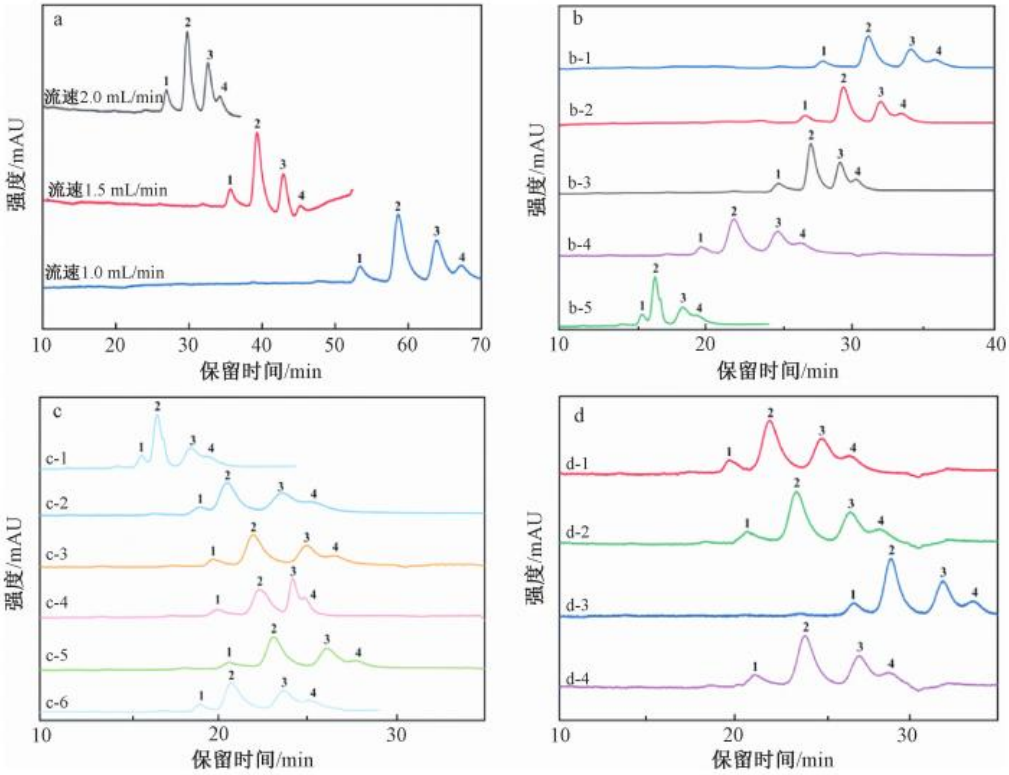
图 1 InertSustain C_{18} 色谱柱对 4 种胡萝卜素异构体色谱分离条件的优化

在流速 2. 0 mL/min、柱温 35℃、等度洗脱条件下，随着极性较弱的三氯甲烷含量的降低、极性较强的甲醇和乙腈含量的提高，色谱保留时间逐渐延长，分离度改善明显，但是仍然只有 3 个色谱峰，无法实现 4 种胡萝卜素的分离。考虑到胡萝卜素结构中含有多个双键，属于典型疏水性化合物，因此改用疏水性更强的 C_{30} 色谱柱。

1.2 Welch Ultimate XB-C_{30} 色谱柱

在 1.1 中较优色谱条件下，改用 Welch Ultimate XB-C_{30} 色谱柱，4 种胡萝卜素同分异构体分离效果显著改善，实现初步分离，但是全反式-β-胡萝卜素与 9-顺式-β-胡萝卜素之间的分离度有待进一步提高。首先尝试降低流速，结果如图

2a 所示，流速从 2.0 mL/min 降为 1.5 mL/min 或 1.0 mL/min，胡萝卜素的分离度明显改善，但是保留时间延长至 45~ 67 min，柱效明显降低，故而流速仍保持 2.0 mL/min。接着优化洗脱模式，尝试了一系列梯度洗脱程序(表 1) ，结果如图 2b 所示，全反式-β-胡萝卜素与 9-顺式- β-胡萝卜素色谱峰始终有部分重叠，无法实现完全分离。



注:a 为流动相 3%三氯甲烷/12%乙腈/ 85%甲醇，柱温 35 ℃；b、c、d 为流速 2. 0 mL/min，柱温 35 ℃，其他条件见表 1-表 3。

图 2 Welch Ultimate XB-C_{30} 色谱柱对 4 种胡萝卜素异构体色谱分离条件的优化

考虑到乙腈的极性介于三氯甲烷和甲醇之间，可以起到微调的作用，尝试改变流动相中乙腈用量。如图 2c—2d 所示，在相同梯度洗脱模式下，分别固定甲醇或三氯甲烷含量不变，同时改变乙腈/三氯甲烷(表 2)或乙腈/甲醇(表 3)的比例，胡萝卜素保留时间发生相应改变，但是分离效果改善不明显，需要继续微调流动相的极性。

一方面， 考虑到水的极性比甲醇和乙腈更大，尝试流动相中加入少量水以期改变微小极性实现目标物分离，结果表明保留时间相应延长，但分离效果未见明显改善，且当水的含量增大至 5% (0.5%三氯甲烷/ 20%乙腈/74. 5%甲醇/ 5%水，

等度洗脱，流速 2.0 mL / min，柱温 35 ℃) 时，流动相的极性明显增强，导致具有疏水性的胡萝卜素无法被洗脱。加水无法改善色谱分离效果，故后续试验流动相中不再添加水。另一方面，考虑到二氯甲烷的极性比三氯甲烷更弱，尝试用二氯甲烷替换流动相中的三氯甲烷，结果表明其对柱效及分离效果与三氯甲烷基本相同，而三氯甲烷毒性更大，故后续试验采用二氯甲烷作为流动相。综合考虑分析时间和 4 种胡萝卜素异构体的分离度，较优的色谱条件及色谱图分别见表 3d-4 和图 2d-4，但是，期望能在更短时间内对 4 种胡萝卜素异构体达到更好分离效果。

表 1 梯度洗脱程序

编号	流动相(A / B / C) 比例						
	0 min	10 min	18 min	20 min	22 min	25 min	40 min
b- 1	3 / 12 / 85	2 / 12. 5 / 85. 5	0 / 13. 5 / 86. 5	0 / 13. 5 / 86. 5	0 / 13. 5 / 86. 5	3 / 12 / 85	3 / 12 / 85
b- 2	3 / 12 / 85	2 / 12. 5 / 85. 5	0 / 13. 5 / 86. 5	0 / 13. 5 / 86. 5	0 / 13. 5 / 86. 5	3 / 12 / 85	3 / 12 / 85
b- 3	5 / 10 / 85	3 / 11 / 86	1 / 12 / 87	0 / 12. 5 / 87. 5	1 / 12 / 87	5 / 10 / 85	5 / 10 / 85

编号	流动相(A / B / C) 比例					
	0 min	15 min	18 min	19 min	20 min	30 min
b- 4	10 / 9 / 81	3 / 12 / 85	1 / 13 / 86	1 / 13 / 86	0 / 13 / 87	10 / 9 / 81

编号	流动相(A / B / C) 比例						
	0 min	15 min	18 min	19 min	20 min	30 min	35 min
b- 5	10 / 9 / 81	10 / 9 / 81	10 / 6 / 84	0 / 15 / 85	0 / 15 / 85	1 / 15 / 84	10 / 9 / 81

注：A、B、C 分别为三氯甲烷、乙腈、甲醇。 表 2 同。

表 2 改变乙腈 / 三氯甲烷比例时的梯度洗脱程序

编号	编号 流动相(A / B / C) 比例						
	0 min	15 min	18 min	19 min	20 min	30 min	35 min
c- 1	10 / 9 / 81	10 / 6 / 84	10 / 6 / 84	0 / 15 / 85	0 / 15 / 85	1 / 15 / 84	10 / 9 / 81
c- 2	10 / 9 / 81	4 / 12 / 84	4 / 12 / 84	0 / 15 / 85	0 / 15 / 85	1 / 15 / 84	10 / 9 / 81
c- 3	10 / 9 / 81	2 / 14 / 84	2 / 14 / 84	0 / 15 / 85	0 / 15 / 85	1 / 15 / 84	10 / 9 / 81
c- 4	10 / 9 / 81	1 / 15 / 84	1 / 15 / 84	0 / 15 / 85	0 / 15 / 85	1 / 15 / 84	10 / 9 / 81
c- 5	10 / 9 / 81	0 / 16 / 84	0 / 16 / 84	0 / 15 / 85	0 / 15 / 85	1 / 15 / 84	1 / 15 / 84
c- 6	10 / 9 / 81	3 / 13 / 84	3 / 13 / 84	0 / 15 / 85	0 / 15 / 85	1 / 15 / 84	1 / 15 / 84

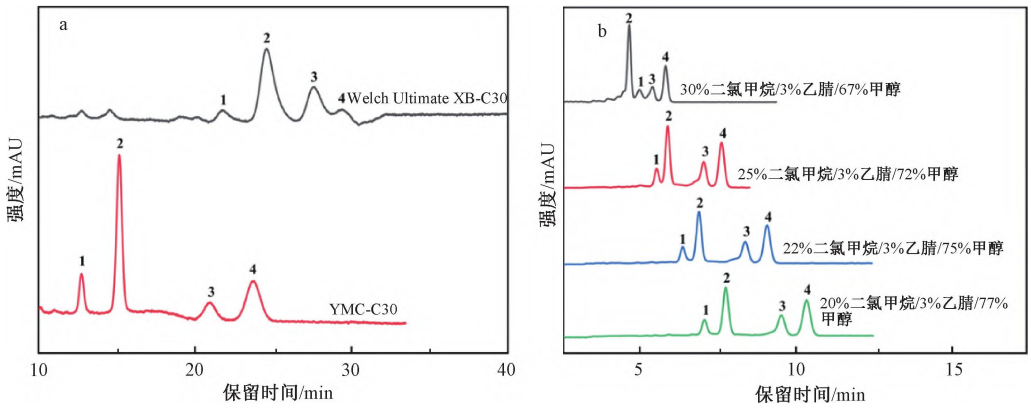


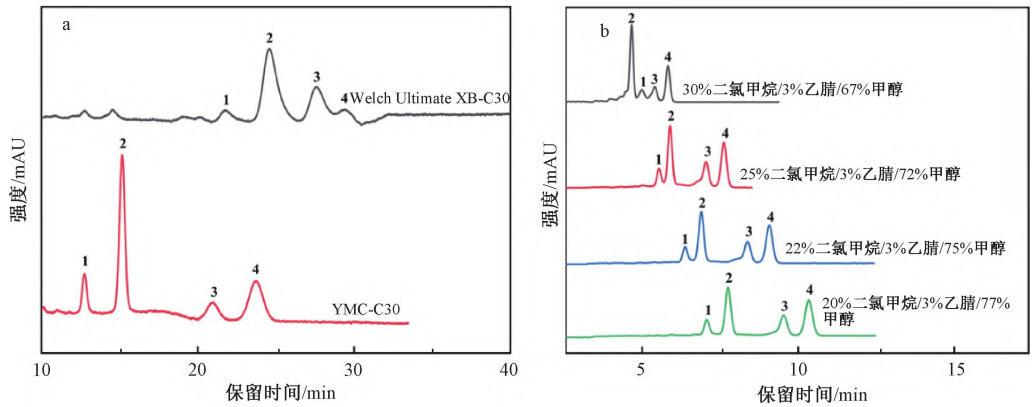
表 3 改变乙腈 / 甲醇比例时的梯度洗脱程序

编号	编号 流动相(A / B / C) 比例						
	0 min	15 min	18 min	19 min	28 min	30 min	35 min
d-1	10 / 7 / 83	3 / 10 / 87	3 / 10 / 87	0 / 11 / 89	0 / 11 / 89	10 / 7 / 83	10 / 7 / 83
d-2	10 / 5 / 85	3 / 8 / 89	3 / 8 / 89	0 / 9 / 91	0 / 9 / 91	10 / 5 / 85	10 / 5 / 85
d-3	10 / 2 / 88	3 / 5 / 92	3 / 5 / 92	0 / 6 / 94	0 / 6 / 94	10 / 2 / 88	10 / 2 / 88
d-4	10 / 3 / 87	3 / 6 / 91	3 / 6 / 91	0 / 7 / 93	0 / 7 / 93	10 / 3 / 87	10 / 3 / 87

注：A、B、C 分别为二氯甲烷、乙腈、甲醇。

1.3 YMC C_{30} 色谱柱

在 1.2 中较优色谱条件下，将 Welch Ultimate XB - C_{30} 色谱柱换作 YMC C_{30} 色谱柱，4 种胡萝卜素同分异构体能实现完全分离(图 3a)，且分析时间更短，说明 YMC C_{30} 色谱柱对胡萝卜素异构体有更高的分离选择性。但是分析时间还需近 25 min，柱效也较低，需进一步优化色谱条件，以缩短保留时间，提高柱效。



注：a 的梯度洗脱程序见表 3d-4，流速 2. 0mL / min,柱温 35℃；b 为等度洗脱，流速 2. 0mL /min，柱温 35℃。

图 3 YMC C_{30} 色谱柱对 4 种胡萝卜素异构体色谱分离条件的优化

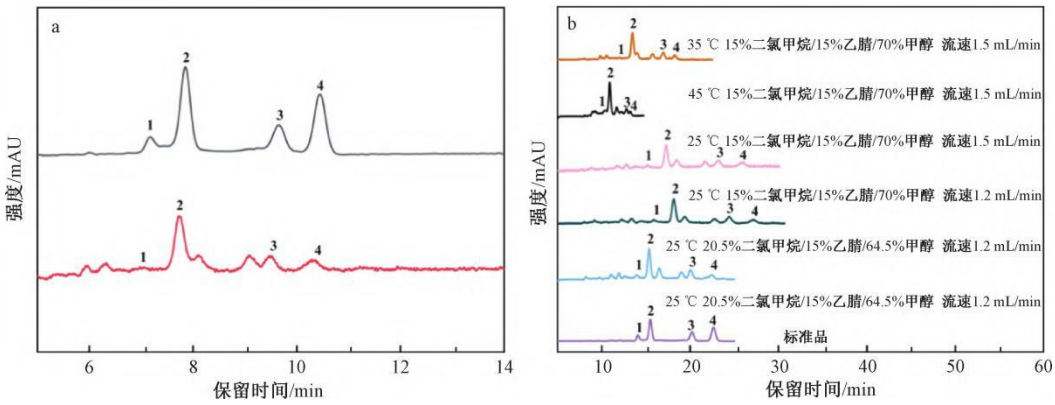
对二氯甲烷起始用量进行调整，结果如图 3b 所示，在固定乙腈含量不变的条件下，二氯甲烷含量由 20%增至 30%，保留时间显著减小，4 种胡萝卜素色

谱峰保留时间均小于 15 min，且流动相无须使用梯度程序，等度洗脱即可， 但分离度随二氯甲烷含量增加而下降，尤其是 13-顺式-β-胡萝卜素和全反式 α-胡萝卜素。

由图 3b 可知，4 种胡萝卜素同分异构体标准品的最佳色谱分离条件：YMC C_{30} 色谱柱，流动相 20%二氯甲烷/3%乙腈/ 77%甲醇(等度洗脱模式，流速 2. 0 mL/ min)，柱温 35℃。

1.4 实际样品的色谱条件优化

在 1.3 中最佳色谱分离条件下，对红棕榈油实际样品中的 4 种胡萝卜素进行色谱分离。结果如图 4a 所示，虽然实现了 4 种胡萝卜素标准品的完全分离，但由于红棕榈油实际样品基质的干扰，无法实现 4 种胡萝卜素的完全分离，需要进一步探索色谱分离条件。



注：a 为相同色谱条件(YMC C_{30} 色谱柱，流动相 20%二氯甲烷/ 3%乙腈/ 77%甲醇(等度洗脱，流速 2.0mL / min) ，柱温 35℃) 下，红棕榈油实际样品溶液与标准溶液色谱分离效果对比；b 为红棕榈油实际样品优化色谱条件过程。

图 4　红棕榈油实际样品中 4 种胡萝卜素异构体色谱分离条件的优化

调整流动相的种类以及比例，保留时间发生了改变，但胡萝卜素与基质间的分离效果未能得到明显改善。尝试调整柱温和流速以增大 4 种胡萝卜素的分离度，结果如图 4b 所示。在相同流动相条件下，随着柱温的升高，色谱峰的峰形及保留时间发生较大改变，说明柱温对红棕榈油实际样品的色谱分离影响显著，且柱温低有利于分离。

柱温 25 ℃条件(YMC C_{30} 色谱柱，流动相 15%二氯甲烷/ 15%乙腈/ 70%甲醇，等度洗脱模式)下，流速从 1.5 mL / min 降至 1.2 mL / min，实现了红棕榈油实际样品中 4 种胡萝卜素同分异构体的完全分离。 但是此条件下，色谱峰

展宽，柱效较低。通过增大疏水性较强的二氯甲烷含量，同时减小甲醇含量，达到了缩短保留时间、改善柱效的目的。

最终优化的红棕榈油中 4 种胡萝卜素的色谱分离条件: YMC C_{30} 色谱柱，流动相 20.5%二氯甲烷/ 15%乙腈/ 64.5%甲醇 (等度洗脱，流速 1.2 mL/ min) ，柱温 25℃。

2 方法性能评价

2.1 线性范围、相关系数、检出限和定量限

在最终优化色谱条件下，对方法的性能进行了考察，包括线性范围(LR)、相关系数(R^2) 和检出限(LOD，S/N = 3)，结果如表 4 所示。4 种胡萝卜素异构体在 0.2 ~ 3.0 μ g/mL 范围内具有良好线性关系，R^2 为 0.9996~0.9999，LOD 为 0. 1 mg/kg，LOQ 为 0.5 mg/kg。

表 4 方法性能评价及红棕榈油中 4 种胡萝卜素异构体的定量检测结果

分析物	线性方程	LR /(μg/mL)	R^2	LOD /(mg/kg)	LOQ/(mg/kg)	计算含量/ (mg/kg)	RSD(n = 3) /%
13 -顺式-β -胡萝卜素	y = 26346. 2x- 57. 3	0. 2 ~ 3. 0	0.9996	0.1	0.5	16. 9	5. 3
全反式-*α*-胡萝卜素	y = 76927. 5x+ 403. 0	0. 2 ~ 3. 0	0.9999	0.1	0.5	40. 2	0. 9
全反式-β -胡萝卜素	y = 24797. 9x- 394. 2	0. 2 ~ 3. 0	0.9997	0.1	0.5	42. 9	1. 6
9 -顺式-*β* -胡萝卜素	y = 72330. 0x- 369. 4	0. 2 ~ 3. 0	0.9999	0.1	0.5	5.1	4.2
总胡萝卜素						105. 1	

对红棕榈油样品中的待测胡萝卜素进行提取，采用最优色谱条件分离， 得到 4 种胡萝卜素同分异构体的色谱图，以保留时间定性，测定实际样品浓度，重复测定 3 次，结果如表 4 所示。红棕榈油实际样品中 13 -顺式- β -胡萝卜素、全反式- α -胡萝卜素、全反式- β -胡萝卜素和 9 -顺式- β - 胡萝卜素的含量分别为 16.9、40.2、42.9 和 5.1 mg/kg，红棕榈油实际样品中胡萝卜素总含量为 1mg/kg，测定的相对标准偏差(RSD)为 0.9%~5.3% (n =3)，表明该分析方法能成功用于 4 种胡萝卜素的分离检测。

2.2 回收率和精密度试验

对红棕榈油样品中的待测胡萝卜素进行提取，最优色谱条件下进行加标回收试验。选择 2 个浓度水平进行加标，结果如表 5 所示，4 种胡萝卜素的加标回收率为 91.0%~116.0%，RSDs 为 2.3%~8.5%(n=5)，重复性良好。

表 5　红棕榈油样品中 4 种胡萝卜素异构体的加标回收率

分析物	初始量 /(mg/kg)	加标量 /(mg/kg)	测定值 /(mg/kg)	加标回收率/%	RSD(n=5) /%
13-顺式-β-胡萝卜素	16. 9	6. 7	24. 6	114. 9	4. 0
		10. 0	28. 5	116. 0	3. 3
全反式-α-胡萝卜素	40. 2	10. 0	51. 7	115. 0	4. 4
		16. 6	55. 3	91. 0	2. 3
全反式-β-胡萝卜素	42. 9	10. 0	54. 0	111. 0	4. 7
		16. 6	61. 0	109. 0	3. 1
9-顺式-β-胡萝卜素	5.1	6. 7	12. 5	110. 4	3. 6
		10. 0	15. 6	105. 0	8. 5

3 结论

按照 GB 5009. 83—2016 中油样处理方法，将红棕榈油进行预处理、皂化和胡萝卜素萃取， 进行了 HPLC 色谱条件优化，考察了色谱柱、流动相种类、流动相比例、流速、柱温等影响因素，实现红棕榈油中 4 种胡萝卜素异构体(全反式-α-胡萝卜素、全反式-β- 胡萝卜素、13 -顺式-β- 胡萝卜素、9 -顺式-β-胡萝卜素)的完全分离。

在最优色谱条件(YMC C_{30} 色谱柱，流动相 20.5%二氯甲烷/ 15%乙腈/ 64. 5%甲醇(等度洗脱模式，流速 1.2 mL/min)，柱温 25℃)下，考察了 HPLC 方法的性能，并对红棕榈油实际样品中 4 种胡萝卜素异构体含量进行了测定。 4 种胡萝卜素在 0.2 ~ 3.0 μg/mL 范围内有良好的线性关系(R^2 = 0.9996~0.9999)，LODs 为 0.1mg/kg，加标回收率为 91.0%~116.0%，RSD 为 2.3 % ~8.5%(n=5)。

结果表明，优化的 HPLC 方法能成功用于红棕榈油中 4 种胡萝卜素同分异构体的分离检测，在红棕榈油品质分析中具有较大的应用潜力。但试验过程中存在胡萝卜素结构不稳定，受热、见光、遇氧气易降解以及实际油样基质复杂等干扰，在萃取、保存等过程中需高度关注。

五、是否填补标准空白

否。

六、采用国际标准的程度

参考美国药典中 Dietary Supplements 中胡萝卜素检测方法。

七、与有关的现行法律、法规的关系

本标准的制定，是对 GB 5009.83-2016 《食品安全国家标准 食品中胡萝卜

素的测定》的完善和补充。

八、技术要求不低于强制性国家标准相关要求的说明

无。

九、技术要求高于推荐性标准相关要求的情况

无。

十、其他应予说明的事项

无。