

团 体 标 准

T/BPCT002—2022

凝胶糖果中叶黄素酯的测定

Determination of lutein esters in gummy candies

2022-12-29 发布

2022-12-29 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。

本文件由北京理化分析测试技术学会归口。

本文件起草单位：杭州丁香健康管理有限公司、江苏艾兰得营养品有限公司、艾兰得营养品泰州有限公司、大连医诺生物股份有限公司、河北晨光检测技术服务有限公司、青岛藻蓝生物有限公司、晨光生物科技集团股份有限公司、中轻技术创新中心有限公司、天津科技大学、青岛市华测检测技术有限公司、通标标准技术服务（上海）有限公司、北京市产品质量监督检验研究院、北京市营养源研究所有限公司和杭州与众健康科技有限公司。

本文件主要起草人：钟其顶、武竹英、徐小明、张沛霞、任路道、杨清山、孙晓君、刘永梅、焦利卫、张翠英、陆心怡、李国辉、张婵、刘滨、孙娅娜、陈俊、盛洁、龚天理、谢文东、常俊、崔亚娟、岳红卫、孔祥武、张晓芳、高慧媛、谭栋灵、孔凡华。

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。
本文件适用于以明胶、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 原理

试样经粉碎、酶解后，以正己烷提取试样中的叶黄素酯，通过皂化反应转化为叶黄素，经 C_{30} 色谱柱分离，液相色谱-二极管阵列检测器或紫外检测器测定，通过保留时间定性、外标法定量，结果以叶黄素二棕榈酸酯计。

在提取与分析过程中，反式结构的叶黄素可能发生异构化，转化为顺式叶黄素，可通过保留时间定性、峰面积之和定量。

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 (CH_4O)：色谱纯。
- 5.1.2 乙酸乙酯 ($C_4H_8O_2$)：色谱纯。
- 5.1.3 无水乙醇 (C_2H_6O)。
- 5.1.4 2, 6-二叔丁基对甲酚 ($[(CH_3)_3C]_2C_6H_2(CH_3)OH$, BHT)。
- 5.1.5 正己烷 (C_6H_{14})。
- 5.1.6 氯化钠 ($NaCl$)。
- 5.1.7 氢氧化钾 (KOH)。
- 5.1.8 碘 (I_2)。
- 5.1.9 果胶酶：酶活力 ≥ 500 U/mg。
- 5.1.10 胰酶。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 氢氧化钾-甲醇溶液 (0.4 g/mL)：称取 4 g 氢氧化钾 (5.1.7)，加 10 mL 甲醇 (5.1.1) 溶解，混匀，室温保存待用。
- 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，室温保存待用。
- 5.2.3 碘-乙醇溶液 (0.001 mg/mL)：称取 1 mg 碘 (5.1.8)，加无水乙醇 (5.1.3) 溶解稀释至 1 L，室温保存待用。

5.3 标准品

叶黄素标准品（CAS号：127-40-2），纯度 $\geq 90\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 叶黄素标准储备液（0.2 mg/mL）：称取 2 mg（精确到 0.01 mg）叶黄素标准品（5.3），用 0.1%BHT-乙醇溶液（5.2.2）溶解并转移至 10 mL 棕色容量瓶中，稀释并定容至刻度，混匀。于-20℃或以下冰箱中充氮避光保存，可保存 6 个月；再次使用前应按照附录 A 校正。

5.4.2 叶黄素标准中间溶液（10 $\mu\text{g/mL}$ ）：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 $\mu\text{g/mL}$ 的叶黄素标准中间液，应避光操作，临用现配。

5.4.3 叶黄素系列标准工作溶液：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 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、4 $\mu\text{g/mL}$ 、6 $\mu\text{g/mL}$ 的叶黄素系列标准工作溶液，应避光操作，临用现配。

5.5 材料

5.5.1 棕色容量瓶：10 mL、50 mL、100 mL。

5.5.2 离心管：50 mL。

5.5.3 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 水浴振荡器：控温范围 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

6.4 离心机： ≥ 3500 r/min。

6.5 匀浆仪。

6.6 紫外可见分光光度计。

6.7 涡旋振荡器。

7 试验步骤

由于叶黄素和叶黄素酯对光敏感，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 粒试样（对于不同色泽或风味混装的试样，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 g~3 g）粉碎后的试样置于 50 mL 离心管中，加入 0.35 g 果胶酶（5.1.9）、0.35 g 胰酶（5.1.10）和 10 mL 水，混匀，置于 50 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡直至试样完全溶解。在溶解液中加入 3 g 氯化钠（5.1.6），混匀，加入 15 mL 无水乙醇（5.1.3），振荡 3 min，加入 15 mL 正己烷（5.1.5），剧烈振荡 1 min，离心（3500 r/min，1 min）或静置分层，转移上部正己烷层溶液，重复提取 3 次，合并上层提取液，用氮吹仪吹干或 40 $^\circ\text{C}$ 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，加入氢氧化钾-甲醇溶液（5.2.1）2 mL，置于 55 $^\circ\text{C}$ 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，过 0.45 μm 滤膜（5.5.3），供液相色谱测定。

注：50 $^\circ\text{C}$ 恒温水浴振荡期间，可将试样取出涡旋 1-2 次以加快溶解。

7.2 高效液相色谱测定参考条件

7.2.1 色谱柱：C₃₀ 柱 250 mm \times 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

分别取系列标准工作溶液，按照7.2列出的条件分别进行液相色谱测定，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 顺式叶黄素酯对照品的制备

由于在提取过程中，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-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。

7.5 测定

将系列标准工作溶液和试样溶液（7.1）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。

8 结果计算与表示

试样中叶黄素酯含量应按式（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之和作为总峰面积，其中反式叶黄素峰面积除以总峰面积所得值为校正系数。

以重复条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，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 mg/kg，定量限为3 mg/kg。

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（5.1.3）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。

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

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之和作为总峰面积，其中反式叶黄素峰面积除以总峰面积所得值为校正系数。

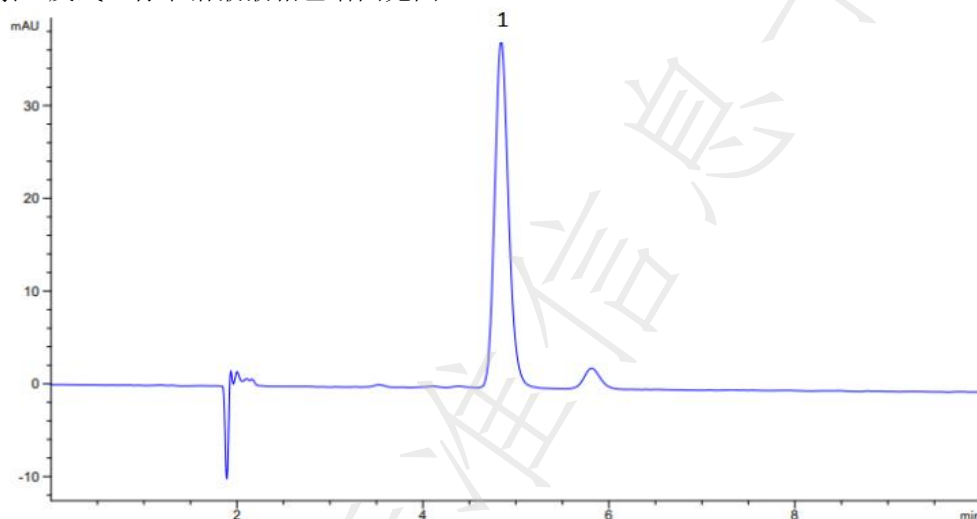
附录 B

(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。



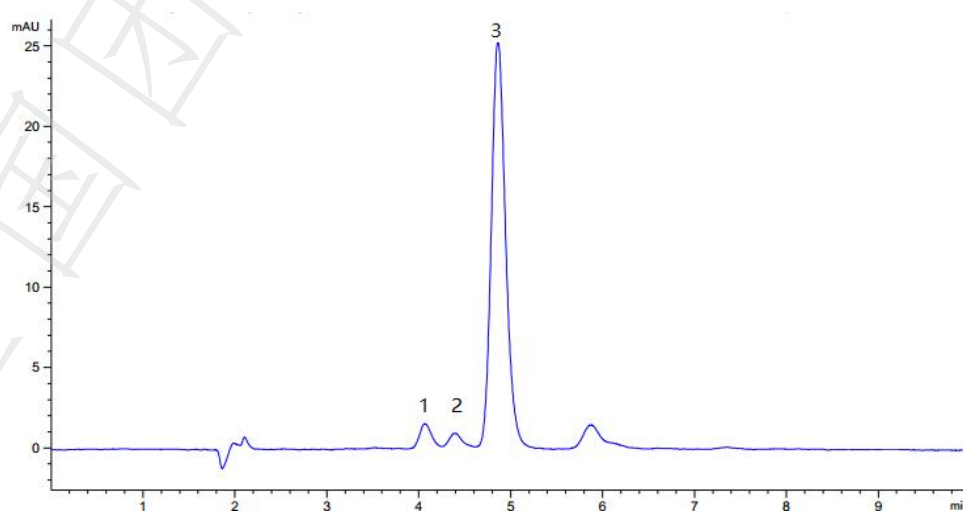
标引序号说明：

1——反式结构的叶黄素。

图 B.1 叶黄素（反式）标准溶液液相色谱图

B.2 经光碘异构化的叶黄素（反式）标准溶液液相色谱图

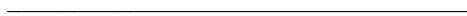
经光碘异构化的叶黄素（反式）标准溶液液相色谱图见图B.2。



标引序号说明：

- 1、2——顺式结构的叶黄素；
- 3——反式结构的叶黄素。

图 B.2 经光碘异构化的叶黄素（反式）标准溶液液相色谱图



全国团体标准信息平台