

T/HNSPGYX

河南省食品工业协会团体标准

T/HNSPGYXH 001-2022

小麦粉中 D-异抗坏血酸的测定

2022-09-13 发布

2022-09-16 实施

河南省食品工业协会 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。

本文件由河南省食品工业协会提出并归口。

本文件起草单位：河南省产品质量监督检验院、河南工业大学、华测检测认证集团股份有限公司。

本文件主要起草人：马军、郝莉花、马静、巩凡、张杰、李俊超、徐子婷、贾利平、金峻节、乔青青、曹硕、张国治、聂庆丽、黄强、徐小鸽。

小麦粉中 D-异抗坏血酸的测定

1 范围

本文件规定了小麦粉中 D-异抗坏血酸的液相色谱测定方法。

本文件适用于小麦粉中 D-异抗坏血酸的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件,凡是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 原理

试样中的 D-异抗坏血酸采用偏磷酸-乙酸溶液提取,经活性炭催化脱氢后,与邻苯二胺衍生成具有强荧光性的物质,用配有荧光检测器的高效液相色谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

4.1 材料

4.1.1 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

4.1.2 偏磷酸(HPO_3)。

4.1.3 冰乙酸(CH_3COOH)。

4.1.4 乙酸钠(CH_3COONa)。

4.1.5 邻苯二胺($\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2$)。

4.1.6 十二水合磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)。

4.1.7 磷酸(H_3PO_4)。

4.1.8 活性炭粉:200目。

4.2 试剂溶液配制

4.2.1 偏磷酸-乙酸溶液:称取 15 g 偏磷酸,加入 40 mL 冰乙酸及 250 mL 水,加温,搅拌,使之逐渐溶解,冷却后加水至 500 mL。放置 24 h 后使用。

4.2.2 乙酸钠缓冲溶液：称取 50 g 乙酸钠加水定容至 100 mL,备用。

4.2.3 邻苯二胺溶液：称取 20 mg 邻苯二胺，用水溶解并稀释至 100 mL，临用时配制。

4.2.4 20 mmol/L Na₂HPO₄ 溶液：称取 7.16 g Na₂HPO₄ • 12H₂O 溶解于 1 L 水中，用磷酸调节 pH 值至 7.0,备用。

4.3 标准品

D-异抗坏血酸标准品，纯度≥99%，CAS 号：89-65-6。

4.4 标准溶液配制

4.4.1 D-异抗坏血酸标准储备溶液（1000 μg/mL）：称取适量 D-异抗坏血酸标准品（精确至 0.1 mg），用偏磷酸-乙酸溶液（4.2.1）配制成 1000 μg/mL 的储备液，在 2℃~8℃避光条件下可保存一周。

4.4.2 D-异抗坏血酸标准中间溶液（100 μg/mL）：准确吸取 D-异抗坏血酸标准储备溶液 10 mL，用偏磷酸-乙酸溶液（4.2.1）稀释至 100 mL，临用时配制。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪：配荧光检测器(FLD)。

5.2 电子天平：感量分别为 0.1 mg 和 1 mg。

5.3 涡旋振荡器。

5.4 高速离心机：转速 8000 r/min。

5.5 针筒过滤器：有机相微孔滤膜，孔径 0.22 μm。

6 样品处理

6.1 试样制备

称取具代表性小麦粉样品约 200 g，混合均匀，混匀后样品置于密闭容器中，待称样处理，样品制备后应尽快完成实验。试样于 0℃~4℃密封保存；在制样的操作过程中及样品保存期间，应避免样品长时间与大量空气接触，防止样品中被测物质受到氧化导致被测物含量发生变化。

6.2 样品处理

6.2.1 试样提取

准确称取试样 2.5 g（精确至 0.001 g），置于 50mL 具塞离心管中，准确加入 20mL 偏磷酸-乙酸溶

液（4.2.1），涡旋振荡 20min，8000 r/min 离心 5 min，移取上层液体，再加入 20 mL 偏磷酸-乙酸溶液（4.2.1），经相同方法处理后，合并两次提取液，用偏磷酸-乙酸溶液（4.2.1）定容至 50mL，混匀后待衍生化。

6.2.2 试样衍生化

取上述提取液 25 mL，置于 250 mL 锥形瓶中，加入活性炭粉 1.0 g，剧烈摇动 5 min，用定性滤纸过滤，取滤液 1.00 mL 置于 10 mL 离心管中，加入乙酸钠缓冲（4.2.2）溶液 1.0 mL，再加入 2.5 mL 邻苯二胺（4.2.3）溶液，充分摇匀后，避光条件下放置 35 min 后，再加入 0.5 mL 偏磷酸-乙酸溶液（4.2.1），混匀后过微孔滤膜后，供高效液相色谱仪测定。

注意：样品衍生后应在 4 h 内检测。

6.3 仪器参考条件

6.3.1 色谱柱： C_{18} 反相柱，5 μ m，4.6 mm $\times$ 250 mm。

6.3.2 柱温：35 $^{\circ}$ C。

6.3.3 流动相：20 mmol/L Na_2HPO_4 （4.2.4）溶液+乙腈（90 + 10，体积比）。

6.3.4 流速：1.0 mL/min。

6.3.5 检测波长：激发波长 346 nm，发射波长 428 nm。

6.3.6 进样量：10 μ L。

6.4 标准曲线的制作

将标准中间溶液用偏磷酸-乙酸溶液（4.2.1）稀释至浓度为 0.25 μ g/mL、0.5 μ g/mL、1 μ g/mL、5 μ g/mL、10 μ g/mL、50 μ g/mL 的标准系列溶液，取各浓度标准液 25 mL，余下按 6.2.2 操作。衍生后标准使用液按浓度由低到高进样检测，以峰面积-浓度作图，绘制标准曲线。

6.5 试样溶液的测定

将待测液注入高效液相色谱仪中，得到对应的峰面积，根据标准曲线计算得到待测液中的物质浓度。物质浓度应在标准曲线之内，超出线性范围则应稀释试样后重新进行分析。

7 分析结果的表述

试样测定时，如果检出的色谱峰保留时间与标准品色谱峰保留时间相一致，偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内，则可认定样品中存在被测组分。

试样中被测组分的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V \times 1000}{m \times 1000} \quad (1)$$

式中：

X — 试样中 D-异抗坏血酸的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c — 由标准曲线计算得到的待测液中目标物的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V — 试样提取液体积，单位为毫升（mL）；

m — 试样质量，单位为克（g）；

1000 — 单位换算系数。

计算结果保留三位有效数字。

8 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算数平均值的 20%。

9 其他

当取样量为 2.5 g，提取溶液体积为 50 mL 时，小麦粉中 D-异抗坏血酸的检出限为 2 mg/kg，定量限为 5 mg/kg。

附录 A

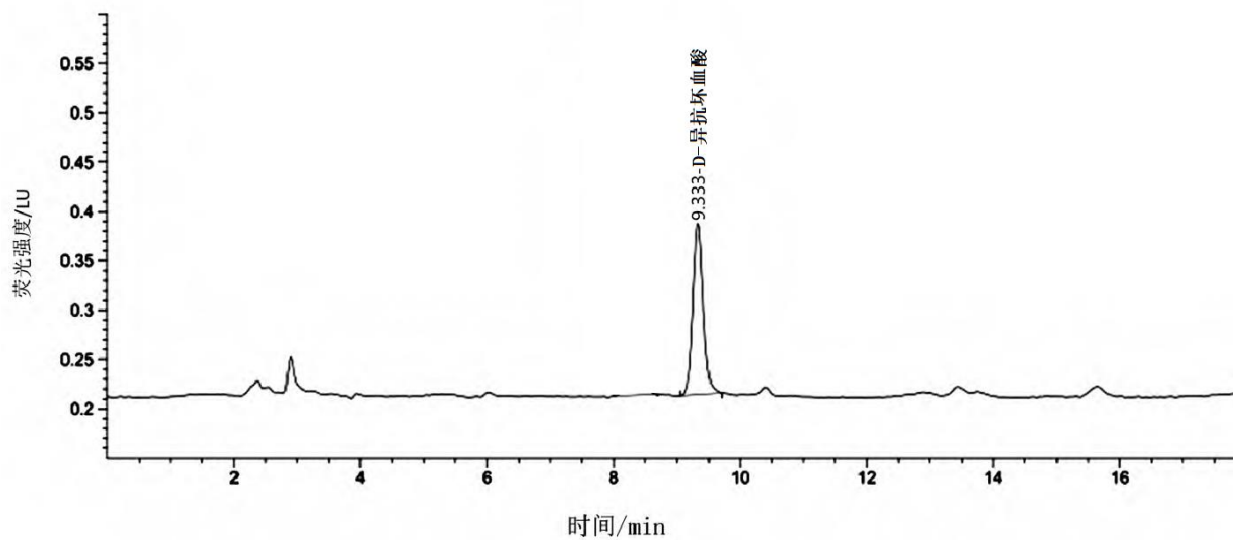


图 A.1 D-异抗坏血酸标准溶液液相色谱图