ICS 67.050
CCS X44

团　　体　　标　　准

T/HIFSA XXX-XXXX

斑兰叶及其制品中角鲨烯的测定

Determination method of squalene in pandan leaves and their products

（征求意见稿）

XXXX-XX-XX　发布　　XXXX-XX-XX　实施

海南省食品安全协会　　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。

本文件由海南省检验检测研究院产品质量监督检验所提出。

本文件由海南省食品安全协会归口。

本文件起草单位：海南省检验检测研究院产品质量监督检验所、海南省检验检测研究院食品检验检测中心、国家市场监管重点实验室（热带果蔬质量与安全）、海南永准质检技术服务有限公司、海南联越食品科技有限公司、海南热作高科技研究院有限公司、海南热作两院种业科技有限责任公司、海南云皓生物科技有限公司、海南新辰星食品有限公司、海南椰宇兰食品有限公司、海南省食品安全协会。

本文件主要起草人：吴毓炜、毛海梅、唐闻宁、陈慧玲、李敏芳、吴春晓、潘孝榆、黄昌政、潘芳妮、李备、黄勇平、魏静、王彬、张优云、欧阳欢、李贵雨、伍曾利、谢自壮、陈新荣、赵文阳。

斑兰叶及其制品中角鲨烯的测定

1 范围

本标准规定了斑兰叶及其制品中角鲨烯含量的三种测定方法：气相色谱法、气相色谱-质谱法和高效液相色谱法。

本标准适用于斑兰叶、斑兰粉、斑兰浆及斑兰制品中角鲨烯的测定。

当称取样品0.2g时，气相色谱法的定量限为50mg/kg，气相色谱-质谱法的定量限为2.5mg/kg，高效液相色谱法的定量限为30mg/kg。

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

NY/T 3673 植物油中角鲨烯

SN/T 4785 出口植物油中角鲨烯的测定

LS/T 6120 粮油检验 植物油中角鲨烯的测定 气相色谱法

T/GDWJ 001 食用斑兰叶（粉）

T/HIFSA 0004 斑兰粉

T/HIFSA 0005 斑兰浆

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

斑兰叶 pandan leaf

斑兰叶,学名香露兜叶，采自人工种植的露兜树科露兜树属植物香露兜（Pandanus amaryllifolius Roxb）的叶片，经挑选、清洗或挑选、清洗、干燥而成。

3.2

斑兰烘干粉 pandan leaf drying powder

以人工种植的斑兰叶为主要原料，经预处理、打浆、提取、离心或不离心、过滤或不过滤、烘干、粉碎、包装等工艺制成的粉末。

3.3

斑兰冻干粉 pandan leaf freeze-dried powder

以人工种植的斑兰叶为主要原料，经预处理、打浆、提取、离心或不离心、过滤或不过滤、低温真空干燥、粉碎、包装等工艺制成的粉末。

3.4

斑兰速溶粉 pandan leaf instant powder

以人工种植的斑兰叶为主要原料，经预处理、打浆、提取、离心或不离心、过滤或不过滤、真空干燥、粉碎、喷雾干燥、包装等工艺制成的粉末。

3.5

斑兰浆 pandan syrup

以人工种植的香露兜（Pandanus amaryllifolius Roxb）叶（斑兰叶）鲜叶为主要原料，经预处理、榨汁、过滤或不过滤，添加或不添加适量的添加剂，经杀菌或不杀菌、灌装、速冻等生产工艺制成的匀浆。

3.6

斑兰制品

以斑兰为辅料，经相应工艺加工制成的产品。

第一法 气相色谱法

4 原理

样品经过氢氧化钾-乙醇溶液皂化后，其中的角鲨烯用正己烷提取，采用气相色谱法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除另有说明，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 氢氧化钾。

5.1.2 无水乙醇。

5.1.3 正己烷：色谱纯。

5.2 试剂配制

氢氧化钾-乙醇溶液（约2mol/L）:准确称取（112±0.1）g氢氧化钾，加入200mL的无水乙醇（5.1.2），进行溶解，然后用无水乙醇（5.1.2）稀释定容至1000mL。

5.3 标准品

角鲨烯标准品：纯度≥98.0%。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 角鲨烯标准储备液（1.00mg/mL）:准确称取按其纯度折算为100%质量的角鲨烯标准品（5.3）100mg(精确至0.1 mg)，加正己烷溶解并置于100mL棕色容量瓶（6.7）中，定容至刻度，摇匀，得到浓度为1.00mg/mL的标准储备液。标准储备液可于4℃条件下避光保存3个月。

5.4.2 角鲨烯标准中间液（100μg/mL）:准确吸取1.00mL角鲨烯标准储备液（5.4.1）于10mL棕色容量瓶（6.7）中，用正己烷定容至刻度，混匀备用。

5.4.3 角鲨烯标准系列工作溶液：分别吸取适量角鲨烯标准中间液（5.4.2），用正己烷稀释，使标准工作溶液浓度分别为10μg/mL、20μg/mL、50μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、500μg/mL。

6 仪器和设备

6.1 气相色谱仪：配氢火焰离子检测器（FID）。

6.2 分析天平：精度0.0001g。

6.3 涡旋振荡器。

6.4　恒温水浴锅。

6.5　离心机。

6.6　氮吹仪。

6.7　棕色容量瓶：10mL。

6.8　微孔滤膜：0.22μm，有机系。

6.9　离心管：15mL。

6.10　玻璃试管:10mL。

6.11　组织捣碎机。

6.12　超声仪。

7　试样制备

7.1　斑兰叶和斑兰制品

取一定数量的具有代表性的样品，用组织捣碎机（6.11）粉碎，样品充分混合均匀后，备用。

7.2　斑兰粉和斑兰浆

取一定数量的具有代表性的样品，充分混合均匀后，备用。

8　分析步骤

8.1　称样

准确称取0.2g（精确至0.0001g）试样，置15mL离心管（6.9）中。

8.2　角鲨烯的提取

于装有试样的离心管中加入2mL氢氧化钾-乙醇溶液（5.2），置超声仪（6.12）超声皂化30min（在75℃条件下）后，取出离心管，冷却至室温；加入2mL水、1mL正己烷（5.1.3）提取，离心管至涡旋振荡器（6.3）混匀5min，充分提取；5000r/min离心5min，转移上清液至10mL玻璃试管（6.10）中。再用1mL正己烷（5.1.3）重复提取操作3次，并将4次提取的上清液合并至10mL玻璃试管（6.10）中，置于涡旋振荡器中混匀，用氮吹仪（6.6）吹干，立即加入1mL正己烷（5.1.3）复溶，振摇1min，过0.22μm滤膜上机。

8.3　气相色谱参考条件

8.3.1　色谱柱：HP-5 毛细管柱（30m×0.25mm×0.25μm）色谱柱，或等效色谱柱。

8.3.2　进样口温度：280℃。

8.3.3　升温程序：160℃保持 1min，以 15℃/min 速率升至 220℃保持 2min，以 5℃/min 速率升至 280℃保持 22min。

8.3.4　载气：高纯氮气（纯度 99.999%），流速 1.0mL/min，分流比 4:1。

8.3.5　FID 检测器温度：280℃，氢气流速 40mL/min，空气流速 300 mL/min，尾吹气（N_2）30 mL/min。

8.3.6　进样量：1μL。

8.3.7　标准曲线的制作

将角鲨烯标准系列工作溶液（5.4.3）依次按上述推荐色谱条件上机测定，记录色谱图峰面积，以标准工作溶液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

8.4　试样溶液的测定

在上述色谱条件下测得样品溶液中角鲨烯的保留时间，与标准溶液的保留时间比较定性，以色谱峰峰面积定量。

8.4.1　空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行操作。

9　结果计算

样品中角鲨烯含量按式（1）计算：

$$X = \frac{(c-c0)\times v\times f}{m} \quad (1)$$

式中：

X—试样中角鲨烯的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c—试样提取液中角鲨烯的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_0—空白溶液中角鲨烯的质量浓度，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—样品称样量，单位为克（g）；

f—稀释倍数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

10　精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

第二法 气相色谱-质谱法（GC/MS）

11　原理

样品经过氢氧化钾-乙醇溶液皂化后，其中的角鲨烯用正己烷提取，采用气相色谱-质谱仪测定，外标法定量。

12　试剂与材料

除另有说明，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

12.1.1　试剂

同5.1。

12.1.2　试剂配制

同5.2。

12.1.3　标准品

角鲨烯标准品：纯度≥98.0%。

12.1.4　标准溶液配制

12.1.5　角鲨烯标准储备液（1.00mg/mL）:准确称取按其纯度折算为 100%质量的角鲨烯标准品（12.3）100mg(精确至 0.1 mg)，加正己烷溶解并置于 100mL 棕色容量瓶（13.7）中，定容至刻度，摇匀，得到浓度为 1.00mg/mL 的标准储备液。标准储备液可于 4℃条件下避光保存 3 个月。

12.1.6　角鲨烯标准中间液（100μg/mL）:准确吸取 1.00mL 角鲨烯标准储备液（12.4.1）于 10mL 棕色

容量瓶（13.7）中，用正己烷定容至刻度，混匀备用。

12.1.7　角鲨烯标准系列工作溶液：分别吸取适量角鲨烯标准中间液（12.4.2），用正己烷稀释，使标准工作溶液浓度分别为 0.5μg/mL、1.0μg/mL、2.0μg/mL、5.0μg/mL、10μg/mL、20μg/mL。

13　仪器和设备

13.1　气相色谱-质谱仪：配有电子轰击电离源（EI）。

13.2　分析天平：精度 0.0001g。

13.3　涡旋振荡器。

13.4　恒温水浴锅。

13.5　离心机。

13.6　氮吹仪。

13.7　棕色容量瓶：10mL。

13.8　微孔滤膜：0.22μm，有机系。

13.9　离心管：15mL。

13.10　玻璃试管:10mL。

13.11　组织捣碎机。

13.12　超声仪。

14　试样制备

同第一法7。

15　分析步骤

15.1　称样

同第一法8.1。

15.2　角鲨烯的提取

同第一法8.2。

15.3　气相色谱参考条件

15.3.1　色谱柱：HP-5 MS（30m×0.25mm×0.25μm）色谱柱，或等效色谱柱。

15.3.2　进样口温度：280℃。

15.3.3　升温程序：180℃保持 1min，以 3℃/min 升至 280℃保持 15min。

15.3.4　载气：高纯氮气（纯度 99.999%），流速：1.0mL/min。

15.3.5　进样方式：分流，分流比 50:1。

15.3.6　进样量：1.0μL。

15.4　质谱参考条件

15.4.1　质谱仪：质谱检测器（配置电子轰击离子源）。

15.4.2　离子源：电子轰击离子源（EI）。

15.4.3　GC-MS 接口温度：280℃。

15.4.4　离子源温度：230℃。

15.4.5　进样口温度：280℃。

15.4.6　EI 离子源：70eV。

15.4.7　检测方式：选择离子监测（SIM）模式：定性离子为 m/z 69、81、95、137，定量离子为 m/z 69。

15.5　标准曲线的制作

将角鲨烯标准系列工作溶液（12.4.3）分别注入气相色谱-质谱联用仪中，测定相应的角鲨烯的色谱峰面积，以标准工作液的质量浓度为横坐标，以相应的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

15.6　试样溶液的测定

将试样溶液分别注入气相色谱-质谱联用仪中，得到相应的角鲨烯的峰面积，根据标准曲线得到待测液中角鲨烯的浓度。

15.7　定性测定

将角鲨烯标准系列工作溶液（12.4.3）和样品溶液依次按上述推荐气相色谱-质谱条件上机测定，在相同试验条件下，待测物在样品中的保留时间与标准工作液中的保留时间，并且色谱图中各组分定性例子对的相对丰度与浓度接近标准工作液中相应定性离子的相对丰度进行比较，在偏差范围内，则可判断为样品中存在对应的待测物。

角鲨烯的GC/MS色谱图和选择离子质谱图见附录A.1和A.2。

15.8　空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行操作。

15.9　结果计算

样品中角鲨烯含量按式（2）计算：

$$X = \frac{(c-c0)\times v\times f}{m} \cdots\cdots (1)$$

式中：

X—试样中角鲨烯的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c—试样提取液中角鲨烯的质量浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

c_0—空白溶液中角鲨烯的质量浓度，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—样品称样量，单位为克（g）；

f—稀释倍数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

15.10　精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

第三法 高效液相色谱法（HPLC）

16　原理

样品经过氢氧化钾-乙醇溶液皂化后，其中的角鲨烯用正己烷提取，采用高效液相色谱测定，外标法定量。

17　试剂与材料

除另有说明，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

17.1 试剂

17.1.1 氢氧化钾。

17.1.2 无水乙醇。

17.1.3 乙腈：色谱纯。

17.1.4 叔丁基甲醚：色谱纯。

17.1.5 正己烷：色谱纯。

17.2 试剂配制

氢氧化钾-乙醇溶液（约 2mol/L）:准确称取（112±0.1）g 氢氧化钾，加入 200mL 的无水乙醇（17.1.2），进行溶解，然后用无水乙醇（17.1.2）稀释定容至 1000mL。

17.3 标准品

角鲨烯标准品：纯度≥98.0%。

17.4 标准溶液配制

角鲨烯标准储备液（1.00mg/mL）:准确称取按其纯度折算为 100%质量的角鲨烯标准品（17.3）100mg(精确至 0.1 mg)，加正己烷溶解并置于 100mL 棕色容量瓶（18.7）中，定容至刻度，摇匀，得到浓度为 1.00mg/mL 的标准储备液。标准储备液可于 4℃条件下避光保存 3 个月。

17.4.1 角鲨烯标准中间液（100μg/mL）:准确吸取 1.00mL 角鲨烯标准储备液（17.4.1）于 10mL 棕色容量瓶（18.7）中，用正己烷定容至刻度，混匀备用。

17.4.2 角鲨烯标准系列工作溶液：分别吸取适量角鲨烯标准溶液（17.4.1）或角鲨烯标准中间液（17.4.2），用正己烷稀释，使标准工作溶液浓度分别为 10.0μg/mL、20.0μg/mL、50.0μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、400μg/mL。

17.4.3 角鲨烯标准系列工作溶液：分别吸取适量角鲨烯标准溶液（17.4.1）或角鲨烯标准中间液（17.4.2），用正己烷稀释，使标准工作溶液浓度分别为 10.0μg/mL、20.0μg/mL、50.0μg/mL、100μg/mL、200μg/mL、400μg/mL。

18 仪器和设备

18.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器。

18.2 分析天平：精度 0.0001g。

18.3 涡旋振荡器。

18.4 恒温水浴锅。

18.5 离心机。

18.6 氮吹仪。

18.7 棕色容量瓶：10mL。

18.8 微孔滤膜：0.22μm，有机系。

18.9 离心管：15mL。

18.10 玻璃试管:10mL。

18.11 组织捣碎机。

18.12 超声仪。

19 试样制备

同第一法7。

20 分析步骤

20.1 称样

同第一法8.1。

20.2 角鲨烯的提取

同第一法8.2。

20.3 液相色谱测定条件

20.3.1 色谱柱：C_{18}柱（250mm×4.6μm，5μm），或相当者；

20.3.2 流动相：乙腈/叔丁基甲醚（75+25，体积比）；

20.3.3 流速：1.0mL/min；

20.3.4 柱温：35℃；

20.3.5 检测波长：210nm；

20.3.6 进样量：10μL。

20.4 标准曲线的制作

将角鲨烯标准系列工作溶液（17.4.3）依次按上述推荐色谱条件上机测定，记录色谱图峰面积，以标准工作溶液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

20.5 试样溶液的测定

在上述色谱条件下测得样品溶液中角鲨烯的保留时间，与标准溶液的保留时间比较定性，以色谱峰峰面积定量。

21 结果计算

样品中角鲨烯含量按式（3）计算：

$$X = \frac{c \times v \times f}{m} \cdots\cdots (1)$$

式中：

X—试样中角鲨烯的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

c—试样提取液中角鲨烯的质量浓度，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—样品称样量，单位为克（g）；

f—稀释倍数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

22 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附 录 A

附 录 B （规范性）

附 录 C 色谱图和质谱图

A.1 角鲨烯标准品的GC/MS色谱图见图A.1。

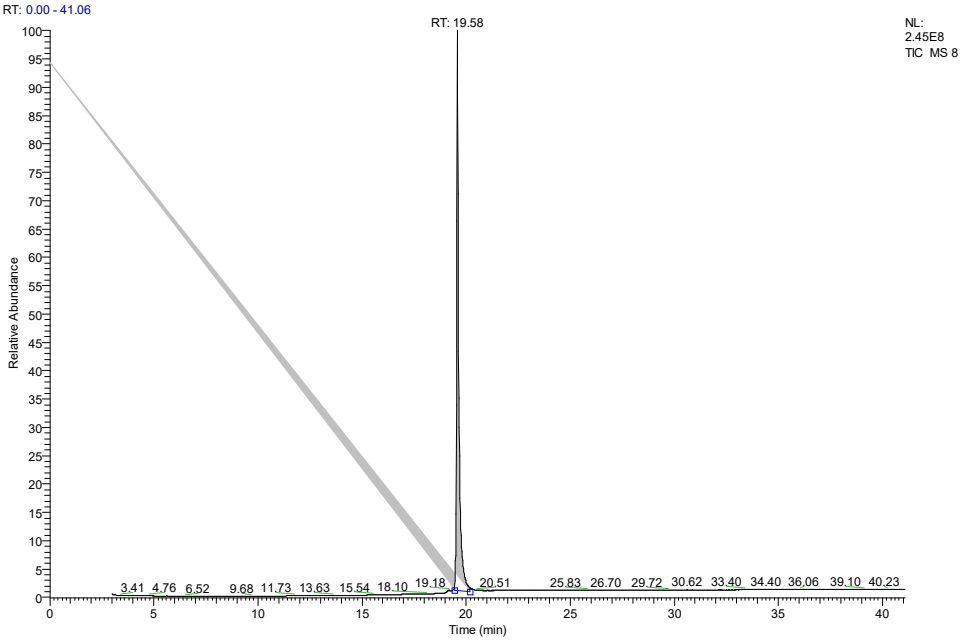

图 A.1 角鲨烯标准品的选择离子色谱图

A.2 角鲨烯标准品的选择离子质谱图见图A.2。

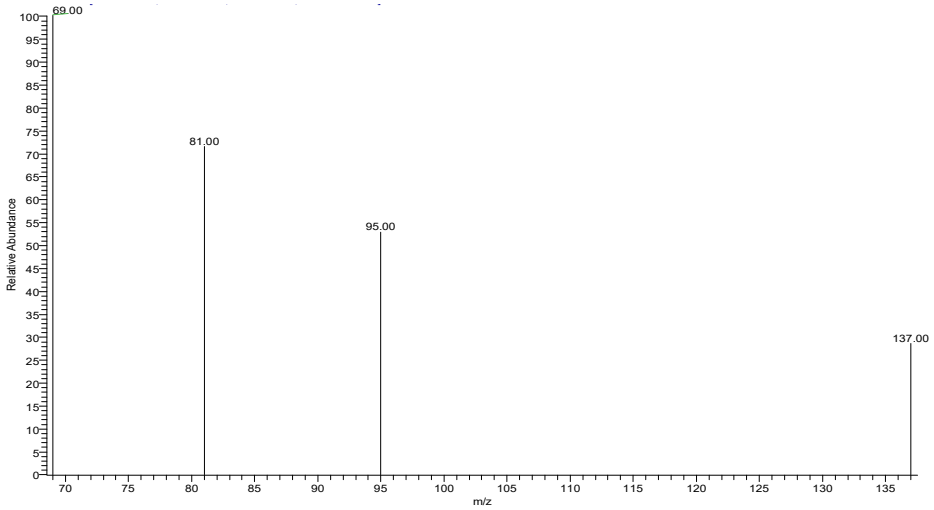

图 A.2 角鲨烯标准品的选择离子质谱图

A.3 角鲨烯标准品的高效液相色谱图见图A.3。

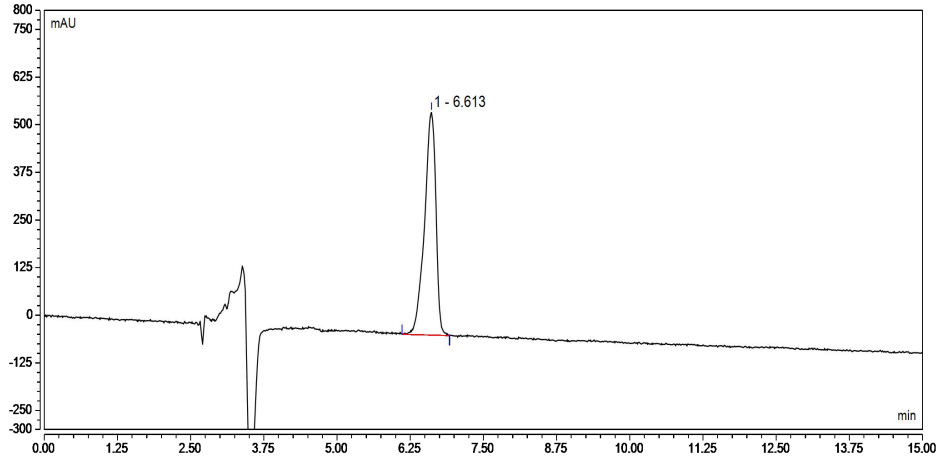

图 A.3 角鲨烯标准品的液相色谱图

A.4 角鲨烯标准品的气相色谱图见图A.4

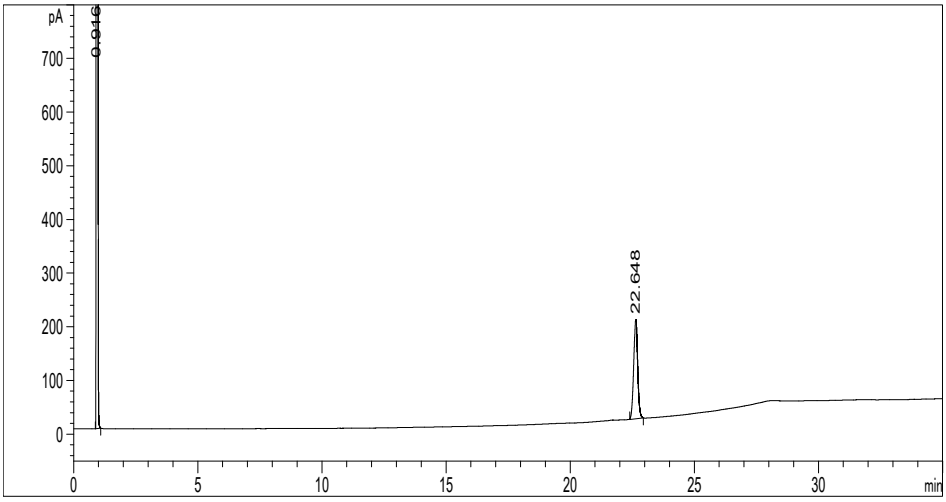

图 A.4 角鲨烯标准品的气相色谱图