

团体标准

T/ NAIA×××-××××

枸杞原浆中类胡萝卜素的测定 高效液相色谱法

Determination of carotenoids in Wolfberry Pulp
—High performance liquid chromatography

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本文件由宁夏回族自治区药品检验研究院提出。

本文件由宁夏化学分析测试协会归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区药品检验研究院（国家枸杞产品质量检验检测中心（宁夏）），中国科学院兰州化学物理研究所，宁夏回族自治区药品质量控制与评价重点实验室，宁夏农林科学研究院。

本文件主要起草人：陈欢、马玲、王宁丽、黄钰馨、姜文霞、臧娅妮、孙莹、刘淑瑛、马玉霞、平吉文、杨磊

本文件为首次发布。

枸杞原浆中类胡萝卜素的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了枸杞原浆中类胡萝卜素成分的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于枸杞原浆中类胡萝卜素成分：玉米黄质、 β -胡萝卜素、 β -隐黄素棕榈酸酯、玉米黄素双棕榈酸酯含量的测定，其他枸杞制品中类胡萝卜素含量的测定也可以参考本方法。

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

本文件没有需要规定的术语和定义。

4 原理

试样中类胡萝卜素成分采用二氯甲烷提取，用 0.1%BHT 无水乙醇溶液稀释并定容，微孔滤膜过滤，高效液相色谱法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T6682 规定的一级水。

5.1 无水乙醇（ C_2H_5OH ）：色谱纯。

5.2 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.3 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

5.4 二氯甲烷（ CH_2Cl_2 ）：色谱纯。

5.5 玉米黄质（zeaxanthin，CAS 号 144-68-3）； β -胡萝卜素（ β -carotene，CAS 号 7235-40-7）； β -隐黄素棕榈酸酯（ β -cryptoxanthin palmitate，CAS 号 6081-47-6）；玉米黄素双棕榈酸酯（zeaxanthin dipalmitate，CAS 号 144-67-2）。纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.6 0.1%BHT 无水乙醇溶液：称取 0.1 g 二丁基羟基甲苯（BHT），以 100 mL 无水乙醇溶解，混匀。

5.7 标准溶液配制

5.7.1 标准储备溶液

避光操作。分别准确称取适量的玉米黄质、β-胡萝卜素、β-隐黄素棕榈酸酯、玉米黄素双棕榈酸酯标准品（精确至 0.01 mg），用二氯甲烷溶解，分别配制成 300 μg/mL 的标准储备溶液，-20 °C 下保存。

5.7.2 标准工作溶液

避光操作。分别取类胡萝卜素物质的标准储备溶液，以 0.1%BHT 无水乙醇溶液（5.6）作为溶剂，稀释制成含玉米黄质 0.6 μg/mL、β-胡萝卜素 0.3 μg/mL、β-隐黄素棕榈酸酯 3 μg/mL、玉米黄素双棕榈酸酯 80 μg/mL 的混合溶液，作为标准工作溶液，-20 °C 下保存。

5.8 滤膜：0.45 μm，有机相。

5.9 离心管：50 mL，塑料。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪（配紫外检测器）。

6.2 分析天平，感量 0.00001 g。

6.3 超声波清洗器。

6.4 离心机：转速不低于 4000 r/min。

6.5 涡旋混合器。

6.6 超纯水机。

6.7 0.45 μm 滤膜，有机相。

7 分析步骤

7.1 试样提取

取枸杞原浆样品，摇匀，准确称取 5 g（精确至 0.0001 g），于 50 mL 离心管中，精密加入二氯甲烷 20 mL，以 3000 r/min 涡旋混匀 5 min，再以 4000 r/min 离心 10 min，取下层溶液，经 0.45 μm 滤膜过滤，取续滤液 2 mL，置 5 mL 量瓶中，用 0.1%BHT 无水乙醇（5.6）稀释至刻度，摇匀，待测定。

7.2 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：YMC C30 色谱柱 5 μm，4.6 mm×250 mm，或性能相当者；
- b) 柱温：25 °C；
- c) 流速：1.0 mL/min；
- d) 进样量：20 μL；
- e) 波长：450 nm
- e) 流动相：A 相为甲醇：乙腈：水（81:14:5），B 相为二氯甲烷，梯度洗脱条件见表 1；

表 1 梯度洗脱表

时间(min)	流 速(mL/ min)	$V_A(\%)$	$V_B(\%)$
0.00	1.0	70	30
20.00	1.0	50	50
48.00	1.0	50	50
50.00	1.0	70	30
55.00	1.0	70	30

7.3 测定

取标准工作溶液和试样溶液分别注入液相色谱仪，测定相应的峰面积，根据标准溶液色谱峰的保留时间和峰面积，对试样溶液的色谱峰根据保留时间进行定性，外标法定量。平行测定两次。

7.4 空白试验

除不加入试样外，其他过程与试样处理相同。

8 结果计算和表达

结果按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中被测组分含量，单位为微克每克（ $\mu\text{g/g}$ ）；

C —— 试样溶液中被测物的浓度，单位为毫克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V —— 试样提取体积，单位为毫升（ mL ）；

n —— 稀释倍数；

m —— 试样的质量，单位为克（ g ）。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，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超过算术平均值的 10%。

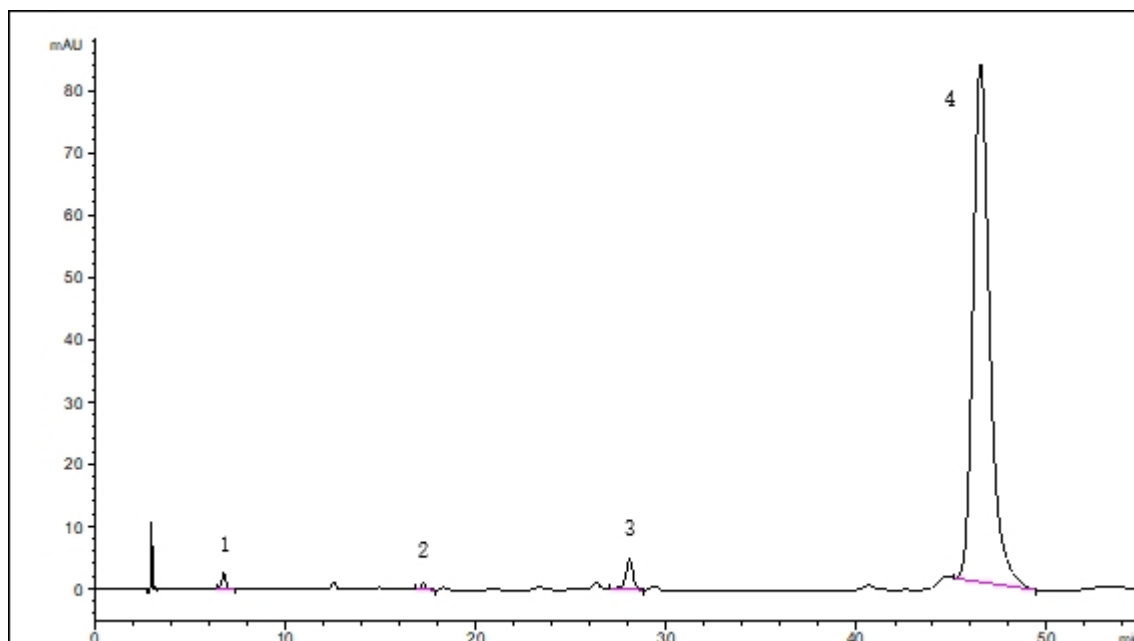
10 色谱图

色谱图见附录 A。

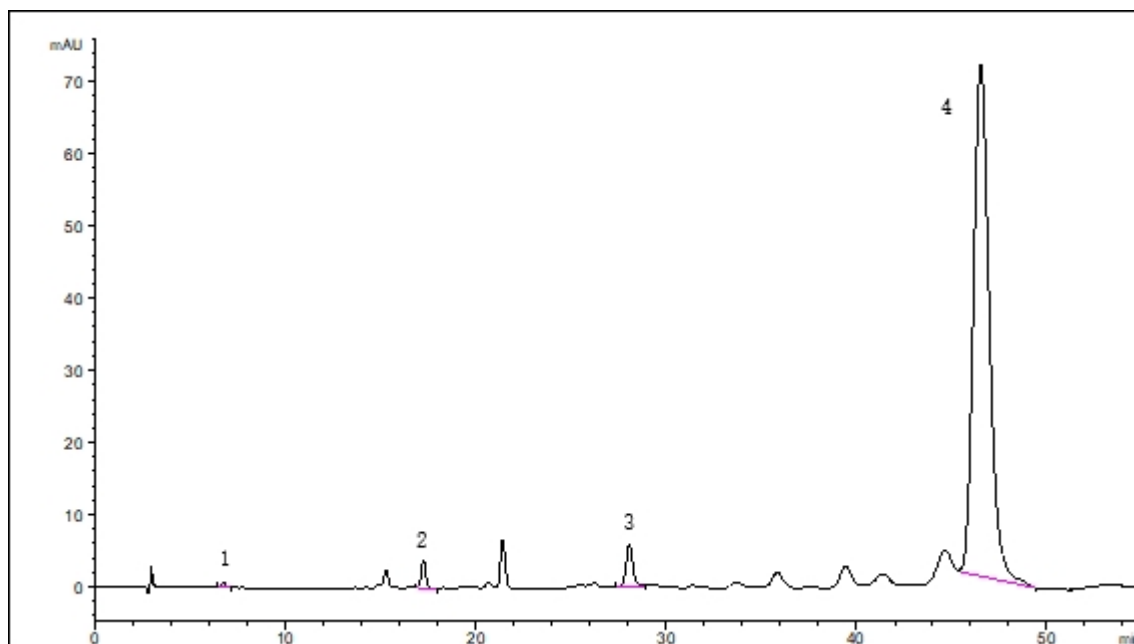
附录 A

(资料性)

玉米黄质、 β -胡萝卜素、 β -隐黄素棕榈酸酯、玉米黄素双棕榈酸酯混合标准溶液色谱图见图 A.1，试样溶液色谱图见图 A.2。



图A.1 玉米黄质、 β -胡萝卜素、 β -隐黄素棕榈酸酯、玉米黄素双棕榈酸酯混合标准溶液色谱图



图A.2 试样溶液色谱图

说明：1—玉米黄质，2— β -胡萝卜素，3— β -隐黄素棕榈酸酯，4—玉米黄素双棕榈酸酯