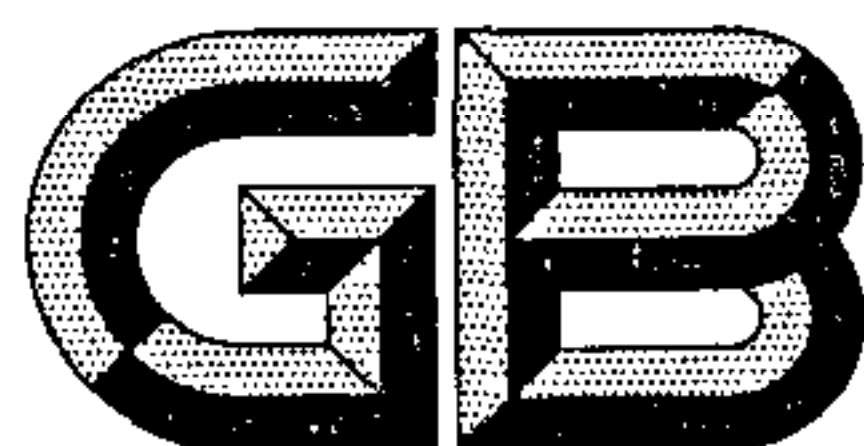


ICS 67.040
C 53



中华人民共和国国家标准

GB/T 5009.83—2003
代替 GB/T 12389—1990

食品中胡萝卜素的测定

Determination of carotene in foods

2003-08-11 发布

2004-01-01 实施

中华人民共和国卫生部
中国国家标准化管理委员会 发布

599

前 言

本标准代替 GB/T 12389—1990《食物中胡萝卜素的测定》。

本标准与 GB/T 12389—1990 相比主要修改如下：

——修改了标准的中文名称，标准中文名称改为《食品中胡萝卜素的测定》；

——增加了高效液相色谱法作为第一法；

——按 GB/T 20001.4—2001《标准编写规则 第4部分：化学分析方法》对原标准的结构进行了修改。

本标准由中华人民共和国卫生部提出并归口。

本标准第一法由卫生部食品卫生监督检验所负责起草，北京市卫生防疫站、中国预防医学科学院环境卫生监测所参加起草。

本标准第一法的主要起草人：杨祖英、李良学、张伟平、孙淳、姚孝元。

本标准第二法由中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所负责起草。

本标准第二法的主要起草人：赵忠林、王光亚、王竹、王国栋。

原标准于 1990 年首次发布，本次为第一次修订。

引 言

胡萝卜素是人体重要营养素,它是维生素 A 的前体,是保健食品的重要成分,6 μg β -胡萝卜素相当于 1 μg 维生素 A。我国于 1977 年批准 β -胡萝卜素作为着色剂加入奶油及膨化食品中,目前已允许加入饮料、黄油、冰淇淋等 14 种食品中。1993 年批准 β -胡萝卜素作为营养加强剂加入婴幼儿食品、乳制品中。由于 1990 年制定的食物中 β -胡萝卜素的测定方法(GB/T 12389—1990)操作烦琐,本次修订提出快速、简便、准确度、精密度较好的高效液相色谱法测定食品中 β -胡萝卜素,作为第一法。原食物中胡萝卜素的测定方法(GB/T 12389—1990)作为第二法。

食品中胡萝卜素的测定

1 范围

本标准规定了食品中胡萝卜素的测定方法——高效液相色谱法及纸层析法。

本标准适用于食品中胡萝卜素的测定。

本方法检出限:高效液相色谱法为 5.0 mg/kg(L),线性范围为 0 mg/L~100 mg/L;纸层析法为 0.11 μg ,线性范围 1 ng~20 ng。

第一法 高效液相色谱法

2 原理

试样中的 β -胡萝卜素,用石油醚+丙酮(80+20)混合液提取,经三氧化二铝柱纯化,然后以高效液相色谱法测定,以保留时间定性,峰高或峰面积定量。

3 试剂

3.1 石油醚:沸程 30 $^{\circ}\text{C}$ ~60 $^{\circ}\text{C}$ 。

3.2 甲醇:色谱纯。

3.3 丙醇。

3.4 己烷。

3.5 四氢呋喃。

3.6 三氯甲烷。

3.7 乙腈:色谱纯。

3.8 三氧化二铝:层析用,100目~200目,140 $^{\circ}\text{C}$ 活化 2 h,取出放入干燥器备用。

3.9 含碘异辛烷溶液:精确称取碘 1 mg,用异辛烷溶解并稀释至 25 mL,摇匀备用。

3.10 α -胡萝卜素标准溶液:精确称取 1 mg α -胡萝卜素,加入少量三氯甲烷溶解,然后用石油醚溶解并洗涤烧杯数次,溶液转入 25 mL 容量瓶中,用石油醚定容,浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$,于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

3.11 β -胡萝卜素标准溶液:精确称取 β -胡萝卜素 12.5 mg 于烧杯中,先用少量三氯甲烷溶解,再用石油醚溶解并洗涤烧杯数次,溶液转入 50 mL 容量瓶中,用石油醚定容,浓度为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, -18 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。两个月内稳定。根据所需浓度取一定量的 β -胡萝卜素标准液用移动相稀释成 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.12 β -胡萝卜素标准使用液:分别吸取 β -胡萝卜素标准溶液 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 mL 于 10 mL 容量瓶中,各加移动相至刻度,摇匀后,即得 β -胡萝卜素标准系列,分别含 β -胡萝卜素 5、10、20、30、40、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

3.13 β -胡萝卜素异构体:精确称取 1.5 mg β -胡萝卜素于 10 mL 容量瓶中,充入氮气,快速加入含碘异辛烷溶液 10 mL,盖上塞子,在距 20 W 的荧光灯 30 cm 处照射 5 min,然后在避光处用真空泵抽去溶剂,用少量三氯甲烷溶解结晶,再用石油醚溶解并定容至刻度,浓度为 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, -18 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

4 仪器

4.1 高效液相色谱仪。

4.2 离心机。

4.3 旋转蒸发器。

5 分析步骤

5.1 试样提取

5.1.1 淀粉类食品:称取 10.0 g 试样于 25 mL 带塞量筒中(如果试样中 β -胡萝卜素量少,取样量可以多些),用石油醚或石油醚+丙酮(80+20)混合液振摇提取,吸取上层黄色液体并转入蒸发器中,重复提取直至提取液无色。合并提取液,于旋转蒸发器上蒸发至干(水浴温度为 30℃)。

5.1.2 液体食品:吸取 10.0 mL 试样于 250 mL 分液漏斗中,加入石油醚+丙酮(80+20)20 mL 提取,然后静置分层,将下层水溶液放入另一分液漏斗中再提取,直至提取液无色为止。合并提取液,于旋转蒸发器上蒸发至干(水浴温度为 40℃)。

5.1.3 油类食品:称取 10.0 g 试样于 25 mL 带塞量筒中,加入石油醚+丙酮(80+20)提取。反复提取,直至上层提取液无色。合并提取液,于旋转蒸发器上蒸发至干。

5.2 纯化

将 5.1.1, 5.1.2, 5.1.3 的试样提取液残渣,用少量石油醚溶解,然后进行氧化铝层析。氧化铝柱为 1.5 cm(内径)×4 cm(高)。先用洗脱液丙酮+石油醚(5+95)洗氧化铝柱,然后再加入溶解试样提取液的溶液,用丙酮+石油醚(5+95)洗脱 β -胡萝卜素,控制流速为 20 滴/min,收集于 10 mL 容量瓶中,用洗脱液定容至刻度。用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,滤液作 HPLC 分析用。

5.3 测定

5.3.1 HPLC 参考条件:

色谱柱:Spherisorb C₁₈ 柱 4.6 mm×150 mm;

流动相:甲醇+乙腈(90+10);

流速:1.2 mL/min;

波长:448 nm。

5.3.2 试样测定:吸取 5.2 中已纯化的溶液 20 μ L 依法操作,从标准曲线查得或回归求得所含 β -胡萝卜素的量。

5.3.3 标准曲线:分别进标准使用液 20 μ L,进行 HPLC 分析,以峰面积对 β -胡萝卜素浓度作标准曲线。

6 结果计算

见式(1)。

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

式中:

X——试样中 β -胡萝卜素的含量,单位为克每千克(或克每升)[g/kg(或 g/L)];

V——定容后的体积,单位为毫升(mL);

c——试样中 β -胡萝卜素的浓度(在标准曲线上查得),单位为微克每毫升(μ g/mL);

m——试样的量,单位为克(或毫升)[g(mL)]。

计算结果保留两位有效数字。

7 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 10%。

第二法 纸层析法

8 原理

试样经过皂化后,用石油醚提取食品中的胡萝卜素及其他植物色素,以石油醚为展开剂进行纸层析,胡萝卜素极性最小,移动速度最快,从而与其他色素分离,剪下含胡萝卜素的区带,洗脱后于 450 nm 波长下定量测定。

9 试剂

9.1 石油醚(沸程 30℃~60℃):同时是展开剂。

9.2 氢氧化钾溶液(1+1):取 50 g 氢氧化钾溶于 50 mL 水。

9.3 无水乙醇:不得含有醛类物质。

9.3.1 检验方法:

9.3.1.1 银氨液:加浓氨水于 5% 硝酸银液中,直至氧化银沉淀溶解,加入 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液数滴,如发生沉淀,再加浓氨水使之溶解。

9.3.1.2 银镜反应:加 2 mL 银氨液于试管内,加入几滴乙醇摇匀,加入少许 2.5 mol/L 氢氧化钠溶液加热。如乙醇中无醛,则没有银沉淀,否则有银镜反应。

9.3.2 脱醛方法:取 2 g 硝酸银溶于少量水中,取 4 g 氢氧化钠溶于温乙醇中,将两者倾入 1 L 乙醇中,暗处放置两天(不时摇动,促进反应),过滤,滤液倾入蒸馏瓶中蒸馏,弃去初蒸的 50 mL。乙醇中含醛较多时,硝酸银用量适当增加。

9.4 无水硫酸钠。

9.5 β -胡萝卜素标准溶液

9.5.1 β -胡萝卜素标准贮备液:准确称取 50.0 mg β -胡萝卜素标准品,溶于 100.0 mL 三氯甲烷中,浓度约为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$,准确测其浓度。标定浓度的方法如下:

取标准贮备液 10.0 μL ,加正己烷 3.00 mL,混匀。测其吸光度值,比色杯厚度为 1 cm,以正己烷为空白,入射光波长 450 nm,平行测定三份,取均值。

按式(1)计算溶液浓度:

$$X = \frac{A}{E} \times \frac{3.01}{0.01} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X——胡萝卜素标准溶液浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

A——吸光度值;

E—— β -胡萝卜素在正己烷溶液中,入射光波长 450 nm,比色杯厚度 1 cm,溶液浓度为 1 mg/L 的吸光系数,为 0.263 8;

$\frac{3.01}{0.01}$ ——测定过程中稀释倍数的换算系数。

9.5.2 β -胡萝卜素标准使用液:将已标定的标准液用石油醚准确稀释 10 倍,使每毫升溶液相当于 50 μg ,避光保存于冰箱中。

警告:通常标准品不能全溶解于有机溶剂中,必要时应先将标准品皂化,再用有机溶剂提取,用蒸馏水洗涤至中性后,浓缩定容,再进行标定。由于胡萝卜素很容易分解。所以每次使用前,所用标准品均需标定,在测定试样时需带标准品同步操作。

10 仪器

10.1 实验室常用设备。

- 10.2 玻璃层析缸。
- 10.3 分光光度计。
- 10.4 旋转蒸发器:具配套 150 mL 球形瓶。
- 10.5 恒温水浴锅。
- 10.6 皂化回馏装置。
- 10.7 点样器或微量注射器。
- 10.8 滤纸:18 cm×30 cm。定性,快速或中速。

11 分析步骤

以下步骤需在避光条件下进行。

11.1 试样预处理

11.1.1 皂化

取适量试样,相当于原样 1 g~5 g(含胡萝卜素约 20 μg~80 μg)匀浆,粮食试样视其胡萝卜素含量而定,植物油和高脂肪试样取样量不超过 10 g。置 100 mL 带塞锥形瓶中,加脱醛乙醇 30 mL,再加 10 mL 氢氧化钾溶液(1+1),回流加热 30 min,然后用冰水使之迅速冷却。皂化后试样用石油醚提取,直至提取液无色为止,每次提取石油醚用量为 15 mL~25 mL。

11.1.2 洗涤

将皂化后试样提取液用水洗涤至中性。将提取液通过盛有 10 g 无水硫酸钠的小漏斗,漏入球形瓶,用少量石油醚分数次洗净分液漏斗和无水硫酸钠层内的色素,洗涤液并入球形瓶内。

11.1.3 浓缩与定容

将上述球形瓶内的提取液于旋转蒸发器上减压蒸发,水浴温度为 60℃,蒸发至约 1 mL 时,取下球形瓶,用氮气吹干,立即加入 2.00 mL 石油醚定容,备层析用。

11.2 纸层析

11.2.1 点样:在 18 cm×30 cm 滤纸下端距底边 4 cm 处作一基线,在基线上取 A、B、C、D 四点(见图 1),吸取 0.100 mL~0.400 mL 浓缩液(11.1.3)在 AB 和 CD 间迅速点样。

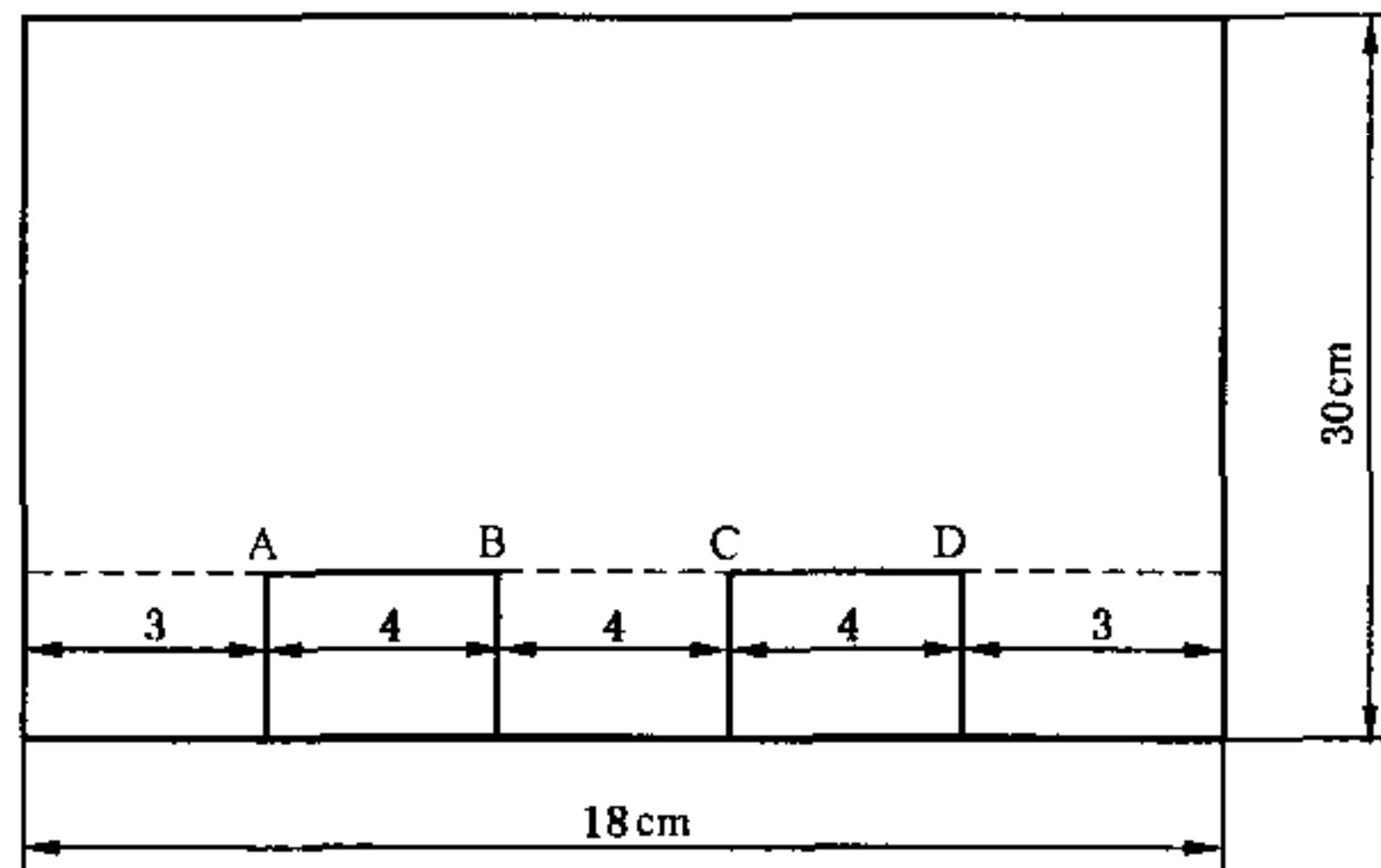


图 1

11.2.2 展开:待纸上所点样液自然挥发干后,将滤纸卷成圆筒状,置于预先用石油醚饱和的层析缸中,进行上行展开。

11.2.3 洗脱:待胡萝卜素与其他色素完全分开后,取出滤纸,自然挥发干石油醚,将位于展开剂前沿的胡萝卜素层析带剪下,立即放入盛有 5 mL 石油醚的具塞试管中,用力振摇,使胡萝卜素完全溶于试剂中。

11.3 测定

用 1 cm 比色杯,以石油醚调零点,于 450 nm 波长下,测吸光度值。以其值从标准曲线上查出 β-胡萝卜素的含量,供计算时使用。

11.4 标准工作曲线绘制

取β-胡萝卜素标准使用液(浓度为50 μg/mL)1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00 mL,分别置于100 mL具塞锥形瓶中,按试样分析步骤进行预处理和纸层析,点样体积为0.100 mL,标准曲线各点含量依次为2.5、5.0、7.5、10.0、15.0、20.0 μg。为测定低含量试样,可在0至2.5 μg间加做几点,以β-胡萝卜素含量为横坐标,以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

12 结果计算

试样中胡萝卜素含量按式(3)计算。

$$X = m_1 \times \frac{V_2}{V_1} \times \frac{100}{m} \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

X——试样中胡萝卜素的含量(以β-胡萝卜素计),单位为微克每百克(μg/100 g);

m_1 ——在标准曲线上查得的胡萝卜素质量,单位为微克(μg);

V_1 ——点样体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——试样提取液浓缩后的定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

13 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10%。