

中华人民共和国国家标准

GB 5413.35—2010

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中 β -胡萝卜素的测定

National food safety standard

Determination of β -carotene in foods for infants and young children,

milk and milk products

2010-03-26 发布

2010-06-01 实施

中华人民共和国卫生部 发布

前 言

本标准部分参考了国际分析家学会（AOAC）2005.7 β -Carotene in supplement and raw material的方法。

本标准附录A为规范性附录，附录B为资料性附录。

本标准系首次发布。

食品安全国家标准

婴幼儿食品和乳品中 β -胡萝卜素的测定

1 范围

本标准规定了婴幼儿食品和乳品中 β -胡萝卜素的测定方法。
本标准适用于婴幼儿食品和乳品中 β -胡萝卜素的测定。

2 规范性引用文件

本标准中引用的文件对于本标准的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本标准。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本标准。

3 原理

试样经皂化后，使 β -胡萝卜素完全变为游离态。用石油醚萃取后，反相色谱法分离，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 α -淀粉酶：酶活力 ≥ 1.5 U/mg。

4.2 无水硫酸钠（ Na_2SO_4 ）。

4.3 抗坏血酸（ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ）。

4.4 石油醚：沸程 $30\text{ }^\circ\text{C}\sim 60\text{ }^\circ\text{C}$ 。

4.5 甲醇（ CH_4O ）：色谱纯。

4.6 乙腈（ $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ）：色谱纯。

4.7 三氯甲烷（ CHCl_3 ）：色谱纯。

4.8 正己烷（ C_6H_{14} ）：色谱纯。

4.9 乙醇：体积分数为 95 %。

4.10 氢氧化钾溶液：称固体氢氧化钾 250 g，加入 200 mL 水溶解。临用前配制。

4.11 β -胡萝卜素标准品。

4.12 β -胡萝卜素标准溶液。

4.12.1 β -胡萝卜素标准储备液（ $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取 β -胡萝卜素标准品（4.11）50 mg（精确到 0.1 mg），用正己烷（4.8）定容至 100 mL 棕色容量瓶中。

注： β -胡萝卜素标准储备液需要 $-10\text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光储存，使用期限不超过3个月。标准储备液用前需校正，具体操作见

附录A。

4.12.2 β -胡萝卜素标准中间液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)：从 β -胡萝卜素标准储备液(4.12.1)中准确移取10.0 mL溶液于50 mL棕色容量瓶中，用正己烷(4.8)定容至刻度。

4.12.3 β -胡萝卜素标准工作液：从 β -胡萝卜素标准中间液(4.12.2)中分别准确移取0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 mL溶液转入5个100 mL棕色容量瓶中，用正己烷(4.8)定容至刻度，得到浓度为0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准工作液。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪，带紫外检测器。

5.2 旋转蒸发器。

5.3 恒温磁力搅拌器：20 $^{\circ}\text{C}$ ~80 $^{\circ}\text{C}$ 。

5.4 离心机：转速 \geq 5000 转/分钟。

5.5 分析天平：感量为0.1 mg。

5.6 氮吹仪。

5.7 培养箱：60 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 。

6 分析步骤

6.1 试样处理

6.1.1 淀粉类试样

称取混合均匀的固体试样约5 g或液体试样约50 g(均精确至0.0001 g)于250 mL三角瓶中，加入1.0 g抗坏血酸(4.3)，固体试样需用50 mL 45 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ 的水溶解并混合均匀。加入1 g α -淀粉酶(4.1)，向三角瓶中充氮后盖上瓶塞，置60 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱(5.7)内酶解30 min。

6.1.2 非淀粉类试样

称取混合均匀的固体试样约10 g或液体试样约50 g(均精确至0.0001 g)，置于250 mL三角瓶中，加入1.0 g抗坏血酸(4.3)，固体试样需用50 mL 45 $^{\circ}\text{C}$ ~50 $^{\circ}\text{C}$ 的水溶解并混合均匀。

6.2 待测液的制备

6.2.1 皂化：将100 mL 95%乙醇(4.9)加入到上述试样溶液中，混匀并加入25 mL氢氧化钾溶液(4.10)混匀，放入磁力棒，充入氮气排出空气，盖上胶塞。将1000 mL的烧杯中加入约300 mL的水，将烧杯放在恒温磁力搅拌器(5.3)上，当水温控制在53 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 时，将三角瓶放入烧杯中，磁力搅拌皂化约45 min后，取出立刻冷却到室温。

6.2.2 提取：将皂化液全部转入500 mL分液漏斗中，加入100 mL石油醚(4.4)，轻轻摇动，排气，盖好瓶塞，室温下振荡10 min后静置分层，将水相转入另一分液漏斗中按上述方法进行第二次提取。合并有机相，用水洗至近中性。有机相通过无水硫酸钠(4.2)过滤脱水。滤液收入500 mL烧瓶中，于旋转蒸发器(5.2)上在40 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 的充氮条件下蒸至近干(绝不允许蒸干)。用石油醚(4.4)溶解残渣并转移至10 mL容量瓶中定容。

从上述容量瓶中准确移取2.0 mL石油醚溶液于10 mL螺盖试管中，在40 $^{\circ}\text{C}$ \pm 2 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹仪(5.6)上吹干。向试管中加1.0 mL正己烷(4.8)，振荡溶解残渣。再将试管以不低于5000 转/分钟的速度离心(5.4)10 min，取出静置至室温后待测。

注：实验操作过程中应注意避光。

6.3 色谱测定

6.3.1 参考色谱条件

色谱柱：C₁₈柱，250 mm×4.6 mm，5 μm，或具同等性能的色谱柱。

流动相：三氯甲烷—腈—甲醇=3+12+85，将1 L的流动相中加入0.4 g的抗坏血酸，经0.45 μm膜过滤后备用。

流速：2.0 mL/min。

检测波长：450 nm。

柱温：35 °C±1 °C。

进样体积：20 μL。

6.3.2 标准曲线的绘制

分别将β-胡萝卜素标准工作液(4.12.3)注入液相色谱仪中（色谱图参见附录B），得到峰面积。以峰面积为纵坐标，以β-胡萝卜素标准工作液浓度为横坐标绘制标准曲线。

6.3.3 试样测定

将待测液(6.2.2)注入液相色谱仪中，得到峰面积，根据标准曲线得到待测液中β-胡萝卜素的浓度。

7 分析结果的表述

试样中β-胡萝卜素的含量按式(1)计算：

$$X = \frac{c \times 10 \times 100}{m \times 2} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中β-胡萝卜素的含量，单位为微克每百克（μg/100g）；

c——从标准曲线得到待测液中β-胡萝卜素的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）；

10——样液体积。

注：此计算结果为顺、反式β-胡萝卜素的总量。

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。

8 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%。

9 其他

本标准检出限为 2 μg/100g。

附录 A
(规范性附录)
标准溶液浓度校正方法

β-胡萝卜素标准储备液配制后需要校正，具体操作如下：

取β-胡萝卜素标准储备液（浓度为500 μg/mL）10 μL，注入含3.0 mL正己烷的比色皿中，混匀。测定其吸光值，比色杯厚度为1 cm，以正己烷为空白，入射光波长为450 nm，平行测定3次，取均值。

按（2）式计算溶液浓度：

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

式中：

X ——β-胡萝卜素溶液浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

A ——β-胡萝卜素的紫外吸光值；

E ——β-胡萝卜素在正己烷溶液中，入射光波长为450 nm，比色杯厚度为1 cm，溶液浓度为1 mg/L 的吸光系数为0.2638；

$\frac{3.01}{0.01}$ ——测定过程中稀释倍数的换算系数。

附录 B
(资料性附录)
标准品液相色谱图

B.1 β -胡萝卜素标准品液相色谱图

β -胡萝卜素标准品液相色谱图见图 B.1。

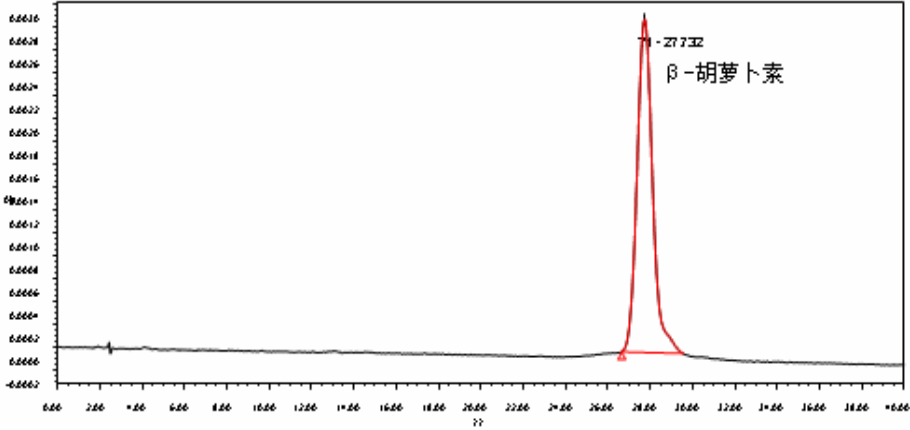


图 B.1 β -胡萝卜素标准品色谱图