

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4357—2023

## 植物源性食品中叶绿素的测定 高效液相色谱法

Determination of chlorophyll in foods of plant origin by high performance  
liquid chromatography

2023-04-11 发布

中华人民共和国农业农村部 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部农产品质量安全监管司提出。

本文件由农业农村部农产品营养标准专家委员会归口。

本文件起草单位：北京市营养源研究所有限公司、农业农村部食物与营养发展研究所、内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司、大连工业大学、北京工商大学、北京林业大学、北京市理化分析测试中心、北京市农林科学院农产品加工与食品营养研究所、北京东方倍力营养科技有限公司、安徽国泰众信检测技术有限公司、中国农业科学院农产品加工研究所。

本文件主要起草人：崔亚娟、朱大洲、孔凡华、张湔惟、赵祯、白沙沙、刘玉峰、许洪高、特日格乐、林立民、王佳、马利军、杜明、李赫、孟冬、杨清、贾丽、刘光敏、蒋峰、蒋彤、何涛、刘璇。





## 植物源性食品中叶绿素的测定 高效液相色谱法

### 1 范围

本文件规定了植物源性食品中叶绿素的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于植物源性食品中叶绿素的测定。

### 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

### 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

### 4 原理

试样中的叶绿素经甲醇提取、浓缩后,经反相液相色谱柱分离,用紫外检测器或二极管阵列检测器检测;根据色谱峰的保留时间定性,外标法定量。

### 5 试剂和材料

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

#### 5.1 试剂

5.1.1 无水硫酸钠( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )。

5.1.2 2,6-二叔丁基对甲酚( $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ ):简称 BHT。

5.1.3 甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ )。

5.1.4 甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ ):色谱纯。

#### 5.2 试剂配制

0.1% BHT 甲醇溶液:称取 0.1 g BHT(5.1.2)于烧杯中,用甲醇(5.1.3)溶解后,转移到 100 mL 容量瓶中,用甲醇(5.1.3)定容,混匀。

#### 5.3 标准品

5.3.1 叶绿素 a( $\text{C}_{55}\text{H}_{72}\text{MgN}_4\text{O}_5$ ,CAS 号:479-61-8),纯度 $\geq 95.0\%$ ,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3.2 叶绿素 b( $\text{C}_{55}\text{H}_{70}\text{MgN}_4\text{O}_6$ ,CAS 号:519-62-0),纯度 $\geq 95.0\%$ ,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

#### 5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备溶液(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):称取叶绿素 a 标准品、叶绿素 b 标准品各 5.00 mg(精确至 0.01 mg)分别置于烧杯中,用甲醇(5.1.4)溶解后,分别转移到 50 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(5.1.4)定容。标准储备溶液置于棕色样品瓶中,充氮密闭,  $-18\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱储存,有效期 3 个月。

5.4.2 混合标准工作溶液:分别移取叶绿素 a 标准储备溶液和叶绿素 b 标准储备溶液(5.4.1)0.10 mL、0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.00 mL、5.00 mL,混合于 10 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(5.1.4)定容,得到浓度为 1.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的系列混合

标准工作溶液,现用现配。

## 5.5 材料

5.5.1 有机系微孔滤膜:孔径为  $0.45\ \mu\text{m}$ 。

5.5.2 反向液相色谱柱: $\text{C}_{18}$ 柱,  $5\ \mu\text{m}$ ,  $150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$ (内径),或等效柱。

## 6 仪器与设备

6.1 天平:感量  $0.000\ 1\ \text{g}$  和  $0.000\ 01\ \text{g}$ 。

6.2 高效液相色谱仪:配有二极管阵列检测器或性能相当的检测器。

6.3 匀浆机。

6.4 高速粉碎机。

6.5 冷却水循环装置。

6.6 涡旋振荡器。

6.7 数控超声波清洗器。

6.8 高速离心机,转速 $\geq 6\ 000\ \text{r/min}$ 。

6.9 旋转蒸发仪。

6.10 氮吹仪。

## 7 分析步骤

### 7.1 试样制备

试样取可食部分经匀浆机匀浆或高速粉碎机粉碎均匀后,储存于样品瓶中,样品现用现制备。

### 7.2 试样处理

#### 7.2.1 提取

若样品为深绿色,则称取  $0.5\ \text{g} \sim 1.0\ \text{g}$ (样品精确至  $0.000\ 1\ \text{g}$ )置于  $50\ \text{mL}$  离心管中;若样品为绿色,称取  $1.0\ \text{g} \sim 2.0\ \text{g}$ (样品精确至  $0.000\ 01\ \text{g}$ )置于  $50\ \text{mL}$  离心管中;若样品为浅绿色,称取  $2.0\ \text{g} \sim 5.0\ \text{g}$ (样品精确至  $0.000\ 1\ \text{g}$ )置于  $50\ \text{mL}$  离心管中;其他样品则称取  $5.0\ \text{g} \sim 10.0\ \text{g}$ ,置于  $50\ \text{mL}$  离心管中。而后,若样品为液体,则加入无水硫酸钠(5.1.1)  $1\ \text{g}$ ,固体试样不需要加无水硫酸钠。然后,加入  $0.1\%$  BHT 甲醇溶液(5.2)  $15\ \text{mL}$ ,涡旋混匀,超声提取  $2\ \text{min}$ ,  $8\ 000\ \text{r/min}$  离心  $5\ \text{min}$ ,将上层溶液转移至  $150\ \text{mL}$  旋转蒸发瓶内,重复提取 3 次,合并提取液于蒸发瓶内。

#### 7.2.2 浓缩

将蒸发瓶接在旋转蒸发仪上,  $40\ ^\circ\text{C}$  水浴减压蒸馏,待瓶中萃取液剩下约  $2\ \text{mL}$  时,取下蒸发瓶,立即用氮气吹至近干。用  $0.1\%$  BHT 甲醇溶液(5.2)洗出蒸馏瓶中的组分,转移到  $5\ \text{mL}$  容量瓶中,用  $0.1\%$  BHT 甲醇溶液(5.2)定容。溶液过  $0.45\ \mu\text{m}$  有机系微孔滤膜后,采用高效液相色谱仪测定叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量,根据标准工作溶液中叶绿素 a 和叶绿素 b 的含量进行稀释。

不加试样,按同一操作方法做空白试验。

### 7.3 测定

#### 7.3.1 仪器参考条件

7.3.1.1 反向液向色谱柱: $\text{C}_{18}$ 柱,  $5\ \mu\text{m}$ ,  $150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$ (内径),或等效柱。

7.3.1.2 柱温: $30\ ^\circ\text{C}$ 。

7.3.1.3 流动相:甲醇。

7.3.1.4 流速: $1.0\ \text{mL/min}$ 。

7.3.1.5 检测波长:叶绿素 a 为  $665\ \text{nm}$ ,叶绿素 b 为  $468\ \text{nm}$ 。

7.3.1.6 进样量: $10\ \mu\text{L}$ 。

### 7.3.2 标准曲线的制作

将系列标准工作液分别注入液相色谱仪中,测定相应的峰面积;以标准工作液的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

### 7.3.3 样品的测定

试样溶液经高效液相色谱仪分析,测得峰面积;根据标准溶液色谱峰的保留时间,对试样溶液的色谱峰进行定性,外标法定量。叶绿素 a、叶绿素 b 标准溶液液相色谱图见附录 A。

## 8 结果计算

试样中叶绿素 a、叶绿素 b 的质量分数按公式(1)计算。

$$\omega_i = \frac{\rho_i \times V}{m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\omega_i$ ——试样中叶绿素 a 或叶绿素 b 质量分数的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

$\rho_i$ ——根据标准曲线计算得到的叶绿素 a 或叶绿素 b 质量浓度的数值,单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ );

$V$ ——试样溶液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

$m$ ——测试样品质量的数值,单位为克(g);

$f$ ——稀释倍数。

试样中总叶绿素的含量按公式(2)计算:

$$\omega = \omega_a + \omega_b \dots\dots\dots (2)$$

$\omega$ ——试样中总叶绿素含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

$\omega_a$ ——试样中叶绿素 a 含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

$\omega_b$ ——试样中叶绿素 b 含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

以 2 次测定结果的算术平均值表示,计算结果保留 3 位有效数字。

## 9 精密度

### 9.1 重复性

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

### 9.2 再现性

在再现性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

## 10 检出限和定量限

当样品取样量为 10.0 g、定容体积为 5 mL 时,叶绿素 a 的检出限为 0.06 mg/kg,叶绿素 b 的检出限为 0.03 mg/kg。

当样品取样量为 10.0 g、定容体积为 5 mL 时,叶绿素 a 的定量限为 0.2 mg/kg,叶绿素 b 的定量限为 0.1 mg/kg。

附 录 A

(资料性)

叶绿素 a 和叶绿素 b 混合标准工作溶液高效液相色谱图

叶绿素 a 和叶绿素 b(浓度均为 10  $\mu\text{g/mL}$ )混合标准工作溶液高效液相色谱图见图 A. 1。

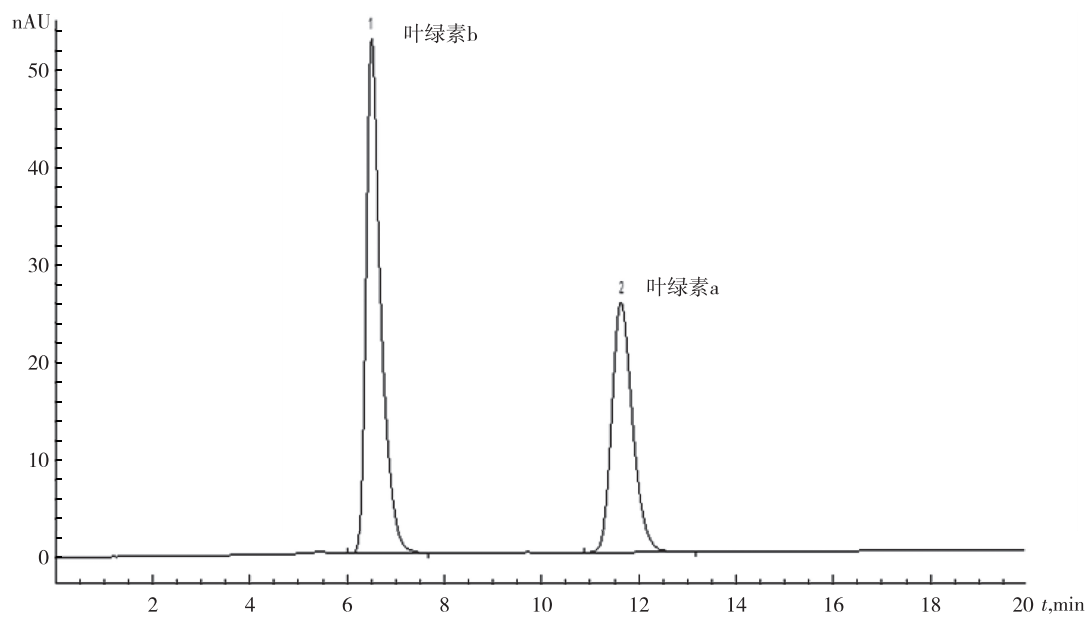


图 A. 1 叶绿素 a 和叶绿素 b 混合标准工作溶液高效液相色谱图