

β-胡萝卜素含量检测试剂盒说明书

高效液相色谱法

注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。

货号: AC10728

规格: 50T/48S

产品简介:

β-胡萝卜素是类胡萝卜素之一，是一种橘黄色脂溶性化合物，普遍存在于自然界中，也是最稳定的天然色素。许多天然食物中例如：绿色蔬菜、甘薯、胡萝卜、菠菜、木瓜、芒果等，皆存有丰富的β-胡萝卜素。

β-胡萝卜素在 450 nm 下有吸收峰，可以利用高效液相色谱法测定其含量。

试验中所需的仪器和试剂:

高效液相色谱仪（C18 柱（4.6×250 mm），紫外检测器（VWD））、台式离心机、可调式移液枪、研钵/匀浆器、EP 管、针头式过滤器（50 个，有机系，0.45 μm）、注射器、抽滤器、滤膜（有机系）、棕色进样瓶（50 个，1.5 mL）、甲醇（色谱纯）、超纯水、二氯甲烷（色谱纯）。

产品内容:

提取液：液体 60 mL×1 瓶，4℃ 保存。

标准品：粉剂×1 支，-20℃ 避光保存。临用前加入 1 mL 二氯甲烷配制成 2 mg/mL β-胡萝卜素标准溶液，-20℃ 密封保存，避免阳光直射。

实验前准备工作:

1. 将 500 mL 色谱纯甲醇（流动相 B）和 500 mL 二氯甲烷（流动相 A）用有机系滤膜抽滤，除去溶剂中杂质，以防堵塞色谱柱。
2. 将抽滤好的流动相 A、B 超声 20 min，备用。
3. 标准品的配制：将 2 mg/mL 的 β-胡萝卜素标准溶液用二氯甲烷稀释成 0.1 mg/mL、0.05 mg/mL、0.01 mg/mL、0.005 mg/mL、0.001 mg/mL 的 β-胡萝卜素标准溶液。（配制的标准品浓度仅供参考，可根据实际样品浓度进行调整）。-20℃ 保存（密封），测试前采用有机系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内，待测（测试前请提前放置至室温状态，以免对保留时间造成影响）。

操作步骤:

一、β-胡萝卜素的提取:

按质量（g）:提取液体积（mL）1:5~10 比例，建议称取 0.1 g 样本，若为叶片去主叶脉，充分碾碎，然后加入 1 mL 提取液，混合均匀，称重，研磨/匀浆，再次称重，补齐失重，密封，然后放入置于黑暗条件或者包上锡箔纸室温震荡浸取 4 h。室温条件下 10000 rpm 离心 10 min，取上清液（若上清液中仍有固体样本可再次离心），-20℃ 保存（密封），测试前采用有机系针头式过滤器过滤到棕色进样瓶内，待测（测试前放置至室温状态，若上清液颜色过深或者浓度过高，可稀释后再次过滤待测）。

二、测定步骤:

1. 开启电脑、打开液相色谱仪各模块开关按钮，安装上色谱柱，打开软件，在方法组中设置进样量

为 10 μ L，柱温：30 $^{\circ}$ C，流速为 0.8 mL/min，波长为 450 nm，走样时间 20 min，设置完毕保存方法组。

2. 采用相应的流动相清洗柱子，采用流动相 B：流动相 A = 75 : 25 比例的流动相平衡柱子，待基线稳定后开始加样。

3. 检测待测的标准品溶液，进样量为 10 μ L，在 20 min 内可分离 β -胡萝卜素， β -胡萝卜素的保留时间为 14.5 min 左右（体系、柱子、流动相 pH、温度等不同，保留时间有差异，仅作为参考）。

4. 检测待测的样品溶液，进样量为 10 μ L，在相应的保留时间处检测 β -胡萝卜素的峰面积。

三、 β -胡萝卜素含量计算

以标准品浓度（mg/mL）为横坐标，峰面积为纵坐标绘制 β -胡萝卜素的标准曲线，将样本的峰面积代入标准曲线，计算提取液中 β -胡萝卜素的浓度 x（mg/mL）。

$$\beta\text{-胡萝卜素的含量 (mg/g)} = x \times V_{\text{提取}} \div W = 10x$$

V 提取：提取液的体积，1 mL；W：样本质量，0.1 g；

稀释后测试的样本，需要乘以相应的稀释倍数，再进行计算。

注意事项

1. 测试完毕后，需要用高浓度的二氯甲烷冲洗色谱柱（约 20-30 个柱体积），以防阻塞色谱柱，再用高浓度的甲醇冲洗色谱柱，最后按柱子的种类规范冲洗，防止损伤色谱柱。

2. 标准品的稀释倍数要根据样品中 β -胡萝卜素的浓度确定，样品中 β -胡萝卜素的峰面积必须在不同浓度的标准品溶液的峰面积之内，该标准品的稀释倍数只是一个参考。若样本中 β -胡萝卜素浓度过高，建议可稀释后再测。

3. 若样本量过大，建议每天测试一次标准溶液（一个标准溶液即可），以确定相应的保留时间，所有待测溶液测试前须放置至室温状态。