|  |  |
| --- | --- |
| ICS  |   |
| CCS  | 点击此处添加CCS号 |

|  |
| --- |
|  43 |

湖南省地方标准

DB 43/T XXXX—2025

十字花科蔬菜中萝卜硫素的测定

高效液相色谱法

The test method for sulforaphane in cruciferous vegetables

High performance liquid chromatography

2025 - XX - XX发布

2025 - XX - XX实施

湖南省市场监督管理局  发布

目次

[前言 II](#_Toc200728097)

[1 范围 1](#_Toc200728098)

[2 规范性引用文件 1](#_Toc200728099)

[3 术语和定义 1](#_Toc200728100)

[4 试剂 1](#_Toc200728101)

[5 仪器与设备 1](#_Toc200728102)

[6 试样制备 1](#_Toc200728103)

[7 操作步骤 1](#_Toc200728104)

[7.1 称样 1](#_Toc200728105)

[7.2 萝卜硫素提取 2](#_Toc200728106)

[7.3 标准品制备 2](#_Toc200728107)

[7.4 色谱条件 2](#_Toc200728108)

[7.5 色谱测定 2](#_Toc200728109)

[8 结果计算 2](#_Toc200728110)

[8.1 标准曲线绘制 3](#_Toc200728111)

[8.2 鲜样中萝卜硫素含量计算 3](#_Toc200728112)

1. 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。

本文件由湖南省农业农村厅提出。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：湖南农业大学。

本文件主要起草人：黄科。

十字花科蔬菜中萝卜硫素的测定 高效液相色谱法

* 1. 范围

本文件规定了十字花科蔬菜中萝卜硫素含量测定的试剂、仪器与设备、试样制备、操作步骤、结果计算方法等要求。

本文件适用于十字花科蔬菜萝卜硫素含量的测定与分析。

* 1. 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 28728-2012 危险化学品实验室安全操作规程

GB/T 6682 实验室用水标准

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 试剂
1. 去离子水：符合GB／T 6682标准二级的规定；
2. 萝卜硫素标准品（苄基芥子油苷，Glucotropaeolin potassium salt，GC≥98%，PhytoLab）；
3. 分析纯二氯甲烷（国药）；
4. 无水硫酸钠（国药）；
5. 色谱级乙腈（[≥99.9% (GC), gradient grade, suitable for HPLC, Reag. Ph Eur, LiChrosolv](https://www.sigmaaldrich.cn/CN/zh/product/mm/100030)[®](https://www.sigmaaldrich.cn/CN/zh/product/mm/100030)）；
6. 流动相A：去离子水，超声波脱气30 s；流动相B：色谱级乙腈，超声波脱气30 s。
	1. 仪器与设备

实验室常用仪器设备：研钵或微型研磨机；旋转蒸发仪（中天科技，RE-2000B）；恒温水浴锅（荣华）；恒温摇床（上海苏坤，SKY-2102C）；色谱柱C18柱（Agilent），250 mm×4.6 mm，5 μm；高效液相色谱仪（Agilent）：DAD紫外检测器。

* 1. 试样制备

十字花科蔬菜不同组织部位（若需分部位检测，需单独取样，如：叶片、根部、花球、种子等）的鲜样或者保存于-80℃超低温冰箱的液氮速冻样品。

* 1. 操作步骤
		1. 称样

将样品经液氮速冻后研磨成粉状，分别称取2 g粉状待测试样至A、B、C三个50 mL玻璃锥形瓶中。

* + 1. 萝卜硫素提取

提取萝卜硫素时应：

* 1. 在锥形瓶中加入4 mL去离子水，将锥形瓶用封口膜封口，置于沸水浴中3-5分钟；（目的是使在样品匀浆中释放出的降解萝卜硫苷产生萝卜硫素的葡萄糖硫苷酶失活。）
	2. 之后将锥形瓶放入25 ℃恒温水浴锅中，静置水解4 h；
	3. 在锥形瓶中加入15 mL二氯甲烷于28 ℃恒温摇床中摇晃10 min，摇速200 rpm；
	4. 120 mm玻璃漏斗中放入滤纸，加5 g无水硫酸钠干燥，将混合溶剂进行过滤；
	5. 在锥形瓶中加入15 mL二氯甲烷，摇晃数次，将锥形瓶上的残留混合液洗净，将混合液再次过滤；
	6. 重复7.2.5；
	7. 滤液于38 ℃旋转蒸发仪（180rpm）上真空干燥；
	8. 干燥后的产物用2 mL乙腈浓缩，浓缩液用0.22 μm 有机滤膜过滤至进样瓶中，待上机检测。浓缩液在-20 ℃存放2周。
		1. 标准品制备

采用外标法对十字花科蔬菜萝卜硫素含量进行检测。将20 mg 萝卜硫素标准样品（GC≥98%）溶于1 mL乙腈，配成20 mg/mL萝卜硫素标准品母液。按照下表所示（见表1），进一步稀释标准品，经0.22 μm 有机滤膜过滤至进样瓶中，待上机检测。标准样品可在-20 ℃存放2周。

（标准样品的线性范围为12.5 - 800 μg；检测限 LOD≤0.5 μg/g, LOQ≤1.5 μg/g）。

1. 标准品母液配置表

| 序 号 | 标准品体积 | 乙腈体积（mL） | 浓度（μg/mL） |
| --- | --- | --- | --- |
| ① | 80 μL 20 mg/mL 标准品 | 1.92 | 800 |
| ② | 1 mL of ①（800 μg/mL） | 1 | 400 |
| ③ | 1 mL of ②（400 μg/mL） | 1 | 200 |
| ④ | 1 mL of ③（200 μg/mL） | 1 | 100 |
| ⑤ | 1 mL of ④（100 μg/mL） | 1 | 50 |
| ⑥ | 1 mL of ⑤（50 μg/mL） | 1 | 25 |
| ⑦ | 1 mL of ⑥（25 μg/mL） | 1 | 12.5 |

* + 1. 色谱条件

流动相A：80 %超纯水，流动相B：20 %乙腈，等度洗脱，检测波长：240 nm，柱温：30 ℃，流速：1 mL/min，检测时间20 min。

其中，精密度：6次重复测定RSD≤5%；准确度：3个水平加标回收率在85-110%之间。

* + 1. 色谱测定

使用自动进样器进样10μL，记录峰面积，重复三次。

* 1. 结果计算
		1. 标准曲线绘制

以标准溶液浓度为x轴，峰面积为y轴，绘制标准曲线，得到标准方程 y=kx+b，（R2≈1），将测定的峰面积带入方程得到浓缩液中萝卜硫素浓度x（μg/mL）。

* + 1. 鲜样中萝卜硫素含量计算

萝卜硫素含量按下列公式计算。

萝卜硫素含量 (μg/g 鲜重)=*X*×*V*÷*W*

式中：

*X* ----浓缩后萝卜硫素浓度（μg/mL）；

*V -*---浓缩后总体积，单位为（2 mL）；

*W ----*样本质量，单位为（g）。



附录A

A.1萝卜硫素标准样品标准曲线图



图 1：萝卜硫素标准样品标准曲线图

A.2萝卜硫素标准样品高效液相色谱图



图 2：萝卜硫素标准样品高效液相色谱图