|  |  |
| --- | --- |
| ICS | 65.020 |
| CCS | |  | | --- | | D:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T.pngD:\000000部门项目\09标准化插件开发\程序源代码\StandardEditor_ShanDongKeXieYuan\团标首页面字母T后面的反斜杠.pngGXAS |   B 30 |

团体标准

T/GXAS XXXX—XXXX

小米中叶酸的测定 高效液相色谱法

Determination of folic acid in millet—High performance liquid chromatography

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX实施

广西标准化协会  发布

1. 前言

本文件参照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。

本文件由广西粮食行业协会提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西壮族自治区农业科学院、广西标准化协会、广西壮族自治区产品质量检验研究院。

本文件主要起草人：覃国新、李惠玲、韦宇宁、何洁、吉日文、王海军、周其峰、陈泳锨、陆玮璠、劳水兵、罗丽红、梁志俭、闫飞燕、梁雪莲、王天顺、黄林华、何善廉、司露露、陈伟、蒋文艳、唐莉、王彦力、梁静、蒋才斌。

小米中叶酸的测定 高效液相色谱法

* 1. 范围

本文件描述了使用高效液相色谱法检测小米中叶酸的方法。

本文件适用于小米中叶酸的定量分析。

* 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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

* 1. 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

* 1. 原理

试样中叶酸用碳酸钠溶液提取，采用高效液相色谱仪分离，紫外检测，外标法定量。

* 1. 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，实验用水应符合GB/T 6682中一级水的要求。

* + 1. 试剂

甲醇：色谱纯。

碳酸钠。

磷酸二氢钾：优级纯。

氢氧化钾。

* + 1. 溶液配制

碳酸钠溶液（0.1moL/L）：称取碳酸钠（5.1.2）5.3g，用水溶解，定容至500mL，混匀。

氢氧化钾溶液（0.1moL/L）：称取氢氧化钾（5.1.4）2.81g，用水溶解，定容至500mL，混匀。

磷酸二氢钾溶液（0.05moL/L）：称取磷酸二氢钾（5.1.3）6.8g，用850mL水溶解，加入约70mL氢氧化钾溶液（5.2.2）,调节PH=6.3，水定容至10000mL，摇匀。

叶酸标准品（C19H19N7O6，CAS号：59-30-3）：纯度≥98.0%。

叶酸标准储备溶液：用感量0.0001g天平准确称取0.01g叶酸标准品，置于10mL棕色容量瓶中，加入碳酸钠溶液（5.2.1），溶解，定容至刻度，摇匀。该标准储备液叶酸含量为1000mg/L，2℃～8℃保存，有效期6个月。

叶酸标准工作溶液：吸取1.0mL标准储备液（5.2.5）于10mL容量瓶中，用碳酸钠溶液（5.2.1）定容至刻度，配得叶酸标准中间液（100mg/L）。分别吸取0.02mL、0.05mL、0.1mL、0.2mL、0.5mL、1.0mL、2.0mL和5.0mL标准中间溶液（100mg/L）于10mL容量瓶中，用碳酸钠溶液（5.2.1）定容至刻度，配得叶酸的质量浓度为0.2mg/L、0.5mg/L、1.0mg/L、2.0mg/L、5.0mg/L、10.0mg/L、20.0mg/L和50mg/L的标准工作液，可根据实际样品溶液的浓度适当调整标准工作液浓度。临用现配。

* + 1. 材料

容量瓶：10mL、20mL、500mL、1000mL。

微孔滤膜：孔径0.22μm，水相系。

40目筛网：孔径0.425mm。

* 1. 仪器设备

天平：感量0.0001g、感量0.001g。

移液枪：20μL、200μL、500μL、1000μL。

量筒：100mL、1000mL。

离心机：转速不低于6000r/min。

粉碎机。

高效液相色谱仪：配紫外可调波长检测器（或二极管矩阵检测器）。

* 1. 试验步骤
     1. 试样制备

随机取小米样品500g,经粉碎机粉碎后使其全部通过0.425mm的标准网筛，混匀，放入聚乙烯瓶或袋中，2℃～8℃避光保存。

* + 1. 试样提取

称取试样1.0～2.0g（精确至0.001g），置于20mL棕色容量瓶中，加入15mL碳酸钠溶液（5.2.1），浸提2h，期间摇动2～3次，用碳酸钠溶液（5.2.1）定容至刻度，摇匀。取少量提取液于离心机上5000r/min离心5min，取上清液过0.22m微孔滤膜，待测定。

* + 1. 参考色谱条件

如下：

1. 色谱柱；C18柱(250mm×4.6mm，5µm)，或性能相当；
2. 流动相：V[磷酸二氢钾溶液（5.2.3）]：V[甲醇（5.1.1）]=90：10（体积比）；
3. 流速：1.0mL/min；
4. 柱温：35℃；
5. 进样量：10μL；
6. 检测波长：285nm。
   * 1. 定量测定

将叶酸标准工作液和试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到相应色谱峰面积响应值，以标准工作液浓度为横坐标峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。根据标准曲线得到待测液中叶酸的浓度。

* + 1. 空白试验

除不加试样外，按7.2～7.4步骤测试。

* + 1. 色谱分析

分别将标准溶液和样品溶液，注入液相色谱仪中，以样品溶液峰面积与标准溶液峰面积比较定量，色谱图见附录A。

被测样品溶液中目标叶酸色谱峰的保留时间与相应标准溶液的色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在±2.5%之内。

* + 1. 结果计算

按公式（1）计算试样中叶酸的含量：

()

式中：

*X* ——试样中叶酸的含量，单位为毫克每百克（mg/100g）；

*P* ——根据标准曲线计算得到的试样中叶酸的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

*V* ——试样溶液的最终定容体积，单位为毫升（mL）；

*M* ——试样质量，单位为克（g）；

100 ——换算为100g样品中含量的换算系数；

1000 ——将浓度单位为g/mL换算为mg/mL的换算系数。

* 1. 精密度

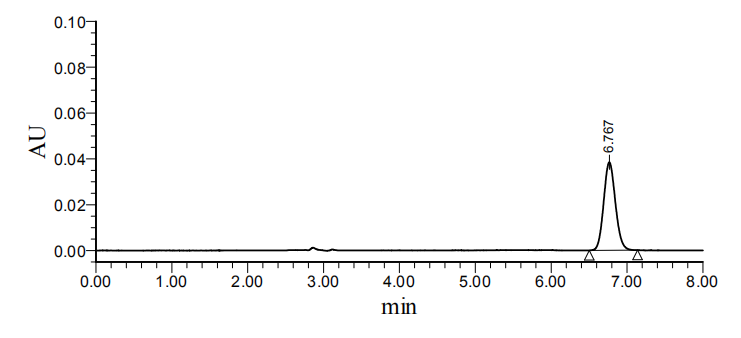
在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的10%。

* 1. 检出限与定量限

本方法检出限为0.07mg/100g，定量限为0.2mg/100g。

2. （资料性）  
   色谱图

色谱图见图A.1。



* 1. 叶酸标准溶液（10mg/L）的液相色谱图

