

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1582—2007

---

## 油菜籽中硫代葡萄糖苷的测定 高效液相色谱法

**Rapeseed—Determination of glucosinolates content  
—Method using high-performance liquid chromatography  
(ISO 9167-1:1992(E)—Part 1, IDT)**

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

---



中华人民共和国农业部 发布

## 前 言

本标准等同采用 ISO 9167 - 1:1992(E)——Part 1:油菜籽中硫甙含量测定 高效液相色谱法。  
为便于使用,本标准作了下列编辑性修改:

- a) “本国际标准”一词改为“本标准”;
- b) 用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”;
- c) 删除国际标准的前言。

本标准的附录 C 为规范性附录,附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位:农业部油料及制品质量监督检验测试中心。

本标准主要起草人:李培武、张文、汪雪芳、丁小霞、李光明、胡乐华。

## 油菜籽中硫代葡萄糖苷的测定 高效液相色谱法

### 1 范围

本标准规定了采用高效液相色谱法测定油菜籽中硫代葡萄糖苷含量的方法。

本标准适用于油菜种子及商品菜籽中硫代葡萄糖苷含量的测定,不适用于葡萄糖分子被取代的硫代葡萄糖苷样品分析。

### 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB 6682 实验室用水规定(GB 6682—1992,eqv ISO 3696—1987)

GB/T 14488.1 油料种子含油量测定法(GB/T 14488.1—1993,eqv ISO 659—1988)

GB/T 14489.1 油料水分及挥发物含量测定法(GB/T 14489.1—1993,eqv ISO 665—1977)

### 3 原理

用甲醇—水溶液(70+30),提取硫代葡萄糖苷,然后在阴离子交换树脂上纯化并酶解脱去硫酸根,反相  $C_{18}$  柱分离,紫外检测器检测硫代葡萄糖苷。

### 4 试剂

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.1 水:符合 GB/T 6682 标准二级的规定。

4.2 硫酸酯酶:*Helix pomatia* H1 型(EC3.1.6.1),每毫升硫酸酯酶活性单位不低于 0.5,硫酸酯酶溶液应即配即用。

4.3 葡聚糖凝胶悬浮液:称取 10 g DEAE Sephadex A25 葡聚糖凝胶,浸泡在过量的 2 mol/L 醋酸溶液中,静置沉淀,再加入 2 mol/L 醋酸溶液,直到液体体积是沉淀体积的 2 倍,于 4℃ 冰箱中存放,待用。

4.4 甲醇—水溶液(70+30):量取 70 mL 甲醇与 30 mL 水混合。

4.5 0.02 mol/L 醋酸钠溶液:称取 0.272 g 醋酸钠( $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ ),加入 800 mL 水溶解,用醋酸调节溶液的 pH 至 4.0,加水定容至 1 L。

4.6 6 mol/L 甲酸咪唑溶液:称取 204 g 咪唑,溶解于 113 mL 甲酸中,待溶液冷却后加水定容至 500 mL。

4.7 内标:用丙烯基硫代葡萄糖苷( $M_r=415.49$ )作内标,当样品中含有丙烯基硫代葡萄糖苷时,用苯甲基硫代葡萄糖苷( $M_r=447.52$ )作内标。当样品硫代葡萄糖苷含量低于  $20.0 \mu\text{mol/g}$  时,可将下述 4.7.1 至 4.7.3 中的内标物质浓度降低为 1 mmol/L 至 3 mmol/L。内标溶液在 4℃ 的冰箱中可存放 3 周,在 -18℃ 条件下可保存更长时间,内标溶液的纯度检定参照附录 A 执行。

4.7.1 5 mmol/L 丙烯基硫代葡萄糖苷溶液:称取 207.7 mg 丙烯基硫代葡萄糖苷溶解于 80 mL 水中,

加水定容至 100 mL。

4.7.2 20 mmol/L 丙烯基硫代葡萄糖苷溶液:称取 831.0 mg 丙烯基硫代葡萄糖苷溶解于 80 mL 水中,加水定容至 100 mL。

4.7.3 5 mmol/L 苯甲基硫代葡萄糖苷溶液:准确称取 223.7 mg 苯甲基硫代葡萄糖苷溶解于 80 mL 水中,加水定容至 100 mL。

4.7.4 20 mmol/L 苯甲基硫代葡萄糖苷溶液:准确称取 895.0 mg 苯甲基硫代葡萄糖苷溶解于 80 mL 水中,加水定容至 100 mL。

4.8 流动相 A:超声波脱气 30 s 的水。

4.9 流动相 B:取 200 mL 色谱级乙腈,加入 800 mL 水,混匀,超声波脱气 30 s。

## 5 仪器和设备

5.1 实验室常用仪器设备。

5.2 研钵或微型研磨机。

5.3 聚丙烯离子交换微柱,底部筛板为 100 目。

5.4 离心机:带有 10 mL 转头,并能获得  $5\,000\times g$  的相对离心力。

5.5  $0.45\ \mu\text{m}$  水溶性微孔滤膜。

5.6 色谱柱:填料颗粒小于或等于  $10\ \mu\text{m}$  的反相  $\text{C}_{18}$  或  $\text{C}_8$  柱,例如:Novapak  $\text{C}_{18}$  柱, $5\ \mu\text{m}$ ( $150\ \text{mm}\times 3.9\ \text{mm}$ );Lichrosorb Rp18 柱, $5\ \mu\text{m}$ ( $150\ \text{mm}\times 4.6\ \text{mm}$ );Spherisorb ODS2 柱, $5\ \mu\text{m}$ ( $250\ \text{mm}\times 4\ \text{mm}$ );Lichrospher Rp8 柱, $5\ \mu\text{m}$ ( $125\ \text{mm}\times 4\ \text{mm}$ )。

5.7 高效液相色谱仪:具备梯度洗脱,柱温可控制在  $30^\circ\text{C}$ ,带紫外检测器。

## 6 试样的制备

按照 GB 5491 的规定对试验材料进行缩分,将缩分后的试验材料分成三份。第一份按 GB/T 14489.1 的规定测定水分及挥发物含量,第二份按 GB/T 14488.1 的规定测定含油量,第三份为硫代葡萄糖苷待测试样。

如果试验材料中的水分及挥发物含量超过 10%,应在  $45^\circ\text{C}$  条件下通风干燥,将干燥后的待测试样在微型粉碎机中粉碎,过 40 目筛,然后立即连续完成 7.1 至 7.2 的全部过程。

## 7 操作步骤

### 7.1 称样

分别称取 200.0 mg 待测试样至 A、B 两支离心管中。

### 7.2 硫代葡萄糖苷的提取

7.2.1 将离心管  $75^\circ\text{C}$  水浴 1 min,加入 2 mL 沸甲醇—水溶液(70+30)后,立即加入  $200\ \mu\text{L}$  5 mmol/L 内标溶液至 A 管中, $200\ \mu\text{L}$  20 mmol/L 内标溶液至 B 管中。

7.2.2  $75^\circ\text{C}$  水浴 10 min,其间每隔 2 min 取出离心管在旋涡混合器上旋涡混合,然后取出离心管冷却至室温, $5\,000g$  离心 3 min,分别转移上清液至 10 mL 刻度试管 A'、B' 中。

7.2.3 分别向 A、B 管中再加入 2 mL 70% 沸甲醇—水溶液(70+30), $75^\circ\text{C}$  水浴约 30 s,旋涡混匀后, $75^\circ\text{C}$  水浴 10 min,其间每隔 2 min 取出旋涡混合,取出离心管冷却至室温, $5\,000g$  离心 3 min,分别转移上清液至原刻度试管 A'、B' 中。

7.2.4 用水调节 A'、B' 管中的提取液至 5 mL,混匀。此提取液在低于  $-18^\circ\text{C}$  的暗处可保存 2 周。

### 7.3 离子交换柱的制备

每一个试样的提取液准备一支聚丙烯离子交换柱,垂直置于试管架上。取 0.5 mL 充分混匀的葡聚糖凝胶悬浮液至每一离子交换柱中,注意不要使树脂黏附在柱壁。静置待液体排干后,取 2 mL 6 mol/L 甲酸咪唑溶液冲洗树脂,排干后,再用 1 mL 水冲洗树脂两次,每次均让水分排干。

#### 7.4 纯化、脱硫酸根

7.4.1 取 1 mL 提取液缓缓加入已准备好的离子交换微柱中,注意不能搅动树脂表面,待液体排干后,分别加入 1 mL 0.02 mol/L 醋酸钠溶液两次,每次加入后均让液体排干。

7.4.2 加入 100  $\mu$ L 硫酸酯酶溶液至离子交换微柱,35 $^{\circ}$ C 条件下反应 16 h。

7.4.3 分别用 1 mL 水冲洗离子交换微柱 2 次,洗脱液收集于试管中。

7.4.4 用水将洗脱液定容至 5 mL,充分混匀后,用 0.45  $\mu$ m 的微孔滤膜过滤,待进样。洗脱液在 -18 $^{\circ}$ C 暗处可存放 1 周。

#### 7.5 空白试验

用相同的样品进行相同的前处理,但不加内标物质,以检定样品中内标物质是否存在。

#### 7.6 色谱条件

7.6.1 仪器条件:流动相流速为 1.0 mL/min,柱温 30 $^{\circ}$ C,紫外检测器检测波长 229 nm。

#### 7.6.2 洗脱梯度

7.6.2.1 对 Spherisorb C<sub>18</sub> 柱,10  $\mu$ m(150 mm $\times$ 4 mm)和 Novapak C<sub>18</sub> 柱,5  $\mu$ m(150 mm $\times$ 3.9 mm),洗脱梯度见表 1。

表 1 Spherisorb C<sub>18</sub> 柱和 Novapak C<sub>18</sub> 柱洗脱梯度

时 间	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0 min	15	85
10 min	100	0
12 min	100	0
15 min	15	85
20 min	15	85

7.6.2.2 对 Lichrosorb R<sub>P</sub>18 柱,5  $\mu$ m(150 mm $\times$ 4.6 mm),洗脱梯度见表 2。

表 2 Lichrosorb R<sub>P</sub>18 柱洗脱梯度

时 间	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0 min	100	0
1 min	100	0
20 min	0	100
25 min	100	0
30 min	100	0

7.6.2.3 对 Lichrospher R<sub>P</sub>8 柱,5  $\mu$ m(125 mm $\times$ 4 mm),洗脱梯度见表 3。

表 3 Lichrospher R<sub>P</sub>8 柱洗脱梯度

时 间	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0 min	100	0
2.5 min	100	0
20 min	0	100
25 min	0	100
27 min	100	0
32 min	100	0

7.7 色谱测定

进样量 10 μL,记录峰面积。

8 结果表示

8.1 单组分硫代葡萄糖苷含量的计算

8.1.1 以每克干基脱脂油菜籽中所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示,按公式(1)计算,计算结果精确到小数点后两位。

$$D1 = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times Kg \times \frac{1}{1-w} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

D1——干基脱脂油菜籽中硫代葡萄糖苷含量的数值,单位为微摩尔每克(μmol/g);

Ag——脱硫硫代葡萄糖苷峰面积的数值;

As——内标峰面积的数值;

Kg——脱硫硫代葡萄糖苷相对校正系数,见附录 C;

m——试样质量的数值,单位为克(g);

n——试样中加入内标的量的数值,单位为微摩尔(μmol);

w——试样中水分、挥发物和含油量之和,以质量百分数表示(%)。

8.1.2 以每克脱脂油菜籽含标准水分及挥发物时所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示,按公式(2)计算,计算结果精确到小数点后两位。

$$D2 = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times Kg \times \frac{1}{1-w} \times (1-Ws) \dots\dots\dots (2)$$

式中:

Ag、As、n、m、Kg、w 同公式(1);

D2——脱脂油菜籽含标准水分及挥发物时硫代葡萄糖苷的含量的数值,单位为微摩尔每克(μmol/g);

Ws——标准水分及挥发物含量,以质量百分数表示,数值为 8.5%或 9%。

8.1.3 以每克干基油菜籽中所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示,按公式(3)计算,计算结果精确到小数点后两位。

$$D3 = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times Kg \times \frac{1}{1-wt} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

Ag、As、n、m、Kg 同公式(1);

D3——干基油菜籽中硫代葡萄糖苷含量的数值,单位为微摩尔每克(μmol/g)。

8.1.4 以每克油菜籽含标准水分及挥发物时所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示,按公式(4)计算,计算结果精确到小数点后两位。

$$D4 = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times Kg \times \frac{1}{1-wt} \times (1-Ws) \dots\dots\dots (4)$$

式中:

Ag、As、n、m、Kg、wt、Ws 同公式(1)、(2)和(3);

D4——油菜籽含标准水分及挥发物时硫代葡萄糖苷的含量的数值,单位为微摩尔每克(μmol/g)。

8.2 硫代葡萄糖苷含量的计算

硫代葡萄糖苷含量等于单组分硫代葡萄糖苷(单组分峰面积应大于峰面积总和的 1%)含量的总

和,以每克样品中所含硫代葡萄糖苷的微摩尔数表示。如果 A、B 两管硫代葡萄糖苷含量的测定值满足 9 中精密度的要求,硫代葡萄糖苷的含量为两测定值的算术平均值。计算结果精确到小数点后两位。

## 9 精密度

9.1 同一试样、同一方法、同一操作者、同一仪器、同一实验室短期内两次测定值:如果硫代葡萄糖苷含量低于  $20.00 \mu\text{mol/g}$ ,绝对差值不大于  $2.00 \mu\text{mol/g}$ ;如果硫代葡萄糖苷含量在  $20.00 \mu\text{mol/g} \sim 35.00 \mu\text{mol/g}$  范围内,绝对差值不大于  $4.00 \mu\text{mol/g}$ ;如果硫代葡萄糖苷含量大于  $35.00 \mu\text{mol/g}$ ,绝对差值不大于  $6.00 \mu\text{mol/g}$ 。

9.2 同一试样、同一方法、不同操作者、不同仪器、不同实验室两次测定值:如果硫代葡萄糖苷含量低于  $20.00 \mu\text{mol/g}$ ,绝对差值不大于  $4.00 \mu\text{mol/g}$ ;如果硫代葡萄糖苷含量在  $20.00 \mu\text{mol/g} \sim 35.00 \mu\text{mol/g}$  范围内,绝对差值不大于  $8.00 \mu\text{mol/g}$ ;如果硫代葡萄糖苷含量大于  $35.00 \mu\text{mol/g}$ ,绝对差值不大于  $12.00 \mu\text{mol/g}$ 。

附录 A  
(资料性附录)  
内标纯度的检定

A.1 检定方法

内标纯度的检定方法主要包括：

- 用本标准规定的方法进行高效液相色谱分析；
- 用高效液相色谱的离子对技术分析完整的内标(不脱硫酸根的内标)；
- 用气相色谱分析脱硫酸盐和硅烷化的内标；
- 用芥子酶(EC 3.2.3.2)水解内标,根据水解产物葡萄糖的浓度检定内标的纯度。

A.2 结果分析

如果用色谱方法检定内标纯度,当色谱图中主峰面积不小于总峰面积的 98%时,表明内标纯度符合本标准要求。

如果用酶水解方法检定内标纯度,当水解产物葡萄糖的摩尔浓度不小于内标摩尔浓度的 98%时,表明内标纯度符合本标准要求。



## 附录 B

## (资料性附录)

## 硫酸酯酶纯化及活性测试

**B.1 硫酸酯酶, *Helix pomatia* H1 型 (EC 3.1.6.1)**, 每毫升提纯过的硫酸酯酶溶液其活性单位大于 0.5。纯净度: 按照 B.2 到 B.4 所描述的方法对硫酸酯酶进行提纯、活性测试和稀释。

**B.2** 取聚丙烯离子交换微柱 5 根, 置于垂直状态, 对每一微柱加足够量的离子交换树脂, 使液体流干后, 可得 500  $\mu\text{L}$  树脂为宜。对每一微柱倾注 1 mL 6 mol/L 甲酸咪唑溶液, 再分别以 1 mL 冲洗两次。

**B.3 纯化**

称取 25.0 mg 硫酸酯酶, 溶于 2.5 mL 水中, 移取此液 500  $\mu\text{L}$  到 B.2 制备的微柱中 (每一微柱 500  $\mu\text{L}$  树脂), 用 1.5 mL 水冲洗微柱, 液体排干后加入 0.2 mol/L 醋酸钠溶液 1.5 mL, 并收集 5 个微柱的洗出液至一个小试管中。

浓缩洗脱液: 用 Milipore PTGC 11K25 浸入式滤纸过滤, 直到大约 100  $\mu\text{L}$  液体被保留 (大于 5 000 个分子团的硫酸酯酶没有被滤出), 再加 2.5 mL 水, 用过滤方式再次浓缩, 直到大约 100  $\mu\text{L}$  液体被保留, 然后用水稀释至 2.5 mL,  $-18^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存已纯化的硫酸酯酶, 待用。因使用时需要解冻, 可根据每次使用所需量以分装的方式冷藏。

**B.4 硫酸酯酶活性测试**

**B.4.1** 制备 0.15 mmol/L 丙烯基硫代葡萄糖苷溶液, 用缓冲液调 pH 至 5.8, 并配制下述三种溶液:

- a) 取 1 mL 醋酸至 500 mL 容量瓶中, 用水定容。
- b) 取 1 mL 乙烯肼至 500 mL 容量瓶中, 用水定容。
- c) 将 73 mL 溶液 a 与 40 mL 溶液 b 混合, 并以液 a 或液 b 调节该混合液 c 的 pH 至 5.8, 取 3 mL 5 mmol/L 丙烯基硫代葡萄糖苷溶液至 100 mL 容量瓶中, 以溶液 c 定容。

**B.4.2 活性测试**

用移液管吸取 2 mL 丙烯基硫代葡萄糖苷缓冲液 (B.4.1) 至分光光度计石英比色皿, 调节分光光度计波长至 229 nm, 比色皿温度调节至  $30^{\circ}\text{C}$ , 比色开始即  $t=0$  时, 加 50  $\mu\text{L}$  纯净的硫酸酯酶 (B.3) 至石英比色皿, 并立即观察记录仪, 当吸收值不再改变 ( $A_e$ ) 时停止记录仪, 绘制过  $t=0$  点的切线, 并计算  $\Delta A/\Delta t$  斜率。

硫酸酯酶活性 (即在  $30^{\circ}\text{C}$ 、pH 5.8 的条件下, 每分钟生成 1  $\mu\text{mol}$  脱硫丙烯基硫代葡萄糖苷的量) 就是每毫升硫酸酯酶溶液的活性单位, 用下式表示:

$$U = \frac{\Delta A}{\Delta t} \times \frac{V}{\Delta \epsilon} \times \frac{1\,000}{50} \times 10^6 \quad \text{..... (B.1)}$$

式中:

$U$ ——硫酸酯酶活性, 即每毫升硫酸酯酶溶液的活性单位;

$\Delta A/\Delta t$ ——过  $t=0$  点切线的斜率, 以每分钟的吸收值表示;

$V$ ——参与反应媒体体积, 单位为升, 即  $2.05 \times 10^{-3} \text{L}$ ;

$\Delta \epsilon$ ——[约 1 500 L/(mol · cm)] 在 229 nm 处每分子丙烯基硫代葡萄糖苷与脱硫丙烯基硫代葡萄糖苷消光系数转换值, 按式 B.2 计算。

$$\Delta\varepsilon = \frac{Ae}{Lc} \dots\dots\dots (B. 2)$$

式中:

$Ae$ ——脱硫丙烯基硫代葡萄糖苷在平衡点的吸收值与  $t=0$  时吸收值的变化值;

$L$ ——石英比色皿直径,以 cm 表示,即 1 cm;

$c$ ——脱硫丙烯基硫代葡萄糖苷在平衡点的浓度,以 mol/L 表示,按式 B. 3 计算。

$$c = \frac{0.15 \times 10^{-3} \times 0.95 \times 2}{2.05} = 1.39 \times 10^{-4} \text{ mol/L} \dots\dots\dots (B. 3)$$

式中:

0.95——丙烯基硫代葡萄糖苷在脱硫平衡点的产量。

硫酸酯酶的活性也可用式 B. 4 简化公式来计算:

$$U = \frac{\Delta A \times 5.7}{\Delta t A e} \dots\dots\dots (B. 4)$$

式中:

$\Delta A/\Delta t$ 、 $Ae$  同公式 B. 1 和公式 B. 2。

### B.5 稀释

用移液管吸取 1 mL 纯净的硫酸酯酶至 10 mL 容量瓶内,以水混匀定容。将此溶液分成小量,贮存在  $-18^{\circ}\text{C}$  的冰冻条件下。

附 录 C  
(规范性附录)  
相对校正系数

脱硫硫代葡萄糖苷的相对校正系数见表 C.1。

表 C.1 脱硫硫代葡萄糖苷的相对校正系数

序号	硫代葡萄糖苷名称		相对校正系数(Kg)
	中 文	英 文	
1	2-羟基-3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfoprogoitrin	1.09
2	反式2-羟基-3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfoepi-progoitrin	1.09
3	丙烯基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfosinigrin	1.00
4	4-甲亚砷丁基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfoglucoraphanin	1.07
5	2-羟基-4-戊烯基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfogluconapoleiferin	1.00
6	5-甲亚砷戊基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfoglucoalyssin	1.07
7	3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfogluconapin	1.11
8	4-羟基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfo-4-hydroxyglucobrassicin	0.28
9	4-戊烯基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfoglucobrassicinapin	1.15
10	苯甲基(苄基)脱硫硫代葡萄糖苷	desulfoglucotropaeolin	0.95
11	3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfoglucobrassicin	0.29
12	苯乙基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfogluconasturtiin	0.95
13	4-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfo-4-methoxyglucobrassicin	0.25
14	1-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	desulfoneoglucobrassicin	0.20
15	其他	other desulfoglucosinolates	1.00