

农业行业标准

《十字花科蔬菜及制品中硫代葡萄糖苷的测定
高效液相色谱法》

编制说明

（征求意见稿）

北京市农林科学院农产品加工与食品营养研究所
2026 年 10 月

起草单位：北京市农林科学院农产品加工与食品营养研究所、农业农村部食物与营养发展研究所、中国农业科学院蔬菜花卉研究所、江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所、北京市营养源研究所有限公司。

负责人：何洪巨

联系电话：010-81127318、13501083092

邮箱：hehongju@baafs.net.cn

一、工作简况

1.1 任务来源

根据农业农村部农产品质量安全监管司发布《关于下达 2020 年农业农村国家标准和行业标准制修订项目计划的通知》（农质标函〔2020〕128 号），由北京蔬菜学会主持承担“十字花科蔬菜及制品中硫代葡萄糖苷及其降解产物的测定”行业标准的制定工作（项目编号 HYB-20222）。

1.2 目的及意义

十字花科蔬菜（*Brassicaceae*）包括白菜、甘蓝、西兰花、花椰菜、萝卜、芝麻菜、油菜、芥菜等，是我国传统的食用蔬菜品种，在我国居民膳食结构中具有十分重要的地位。硫代葡萄糖苷（简称硫苷，glucosinolates）是十字花科植物中特有的一类含氮和硫的次生代谢产物，其核心结构是 β -D-葡萄糖连接一个磺酸盐醛基团和一个来源于氨基酸的侧链。根据侧链 R 基团的不同，可把硫苷分为三类：脂肪族、芳香族和吲哚族硫苷。目前已发现的硫苷有 130 多种，存在于十字花科蔬菜中的大约有 20 种。

在完整植物中，硫苷和它的水解酶黑芥子酶（myrosinase, EC 3.2.3.1）存在于不同的组织中；蔬菜在食用或受到机械破碎时，硫苷在内源黑芥子酶的作用下水解，产生异硫氰酸酯、硫氰酸酯和腈类等一系列降解产物，其中异硫氰酸苄乙酯（phenethyl-ITC）、吲哚-3-甲醇（indole-3-carbinol）、吲哚-3-乙腈（indole-3-acetonitrile）和萝卜硫素（sulforaphane）能调节机体关键的 Phase I 酶（P450 酶）和 Phase II 酶（如 Glutathione S-transferase, GST 酶）的活性，使机体的遗传物质免受损伤。特别值得注意的是，4-甲基亚磺酰丁基硫苷（glucoraphanin）的降解产物萝卜硫素，是参与致癌物解毒过程的 Phase II 酶（如苯醌还原酶和谷胱甘肽转移酶）的诱导剂，是目前发现的蔬菜中活性最强的天然抗癌成分。研究人员还发现 3-吲哚甲基硫苷

(glucobrassicin) 的降解产物吲哚-3-甲醇可以通过有效抑制 E3 泛素连接酶 (WWP1) 的功能来促进肿瘤细胞中 PTEN 的活化, 从而抑制肿瘤的发生和发展。此外, 硫苷的降解产物还是构成十字花科蔬菜特殊辛香风味的主要来源, 如白菜类的清鲜味、甘蓝类的苦味及萝卜的辛辣味等。

由于硫苷类物质在膳食中的广泛存在及其突出的生物活性和健康功能, 准确、快速、易行的定量分析方法对于筛选蔬菜种质资源、深入阐明硫苷生物活性和营养健康功效至关重要。硫苷的分析方法包括硫苷总量的分析 (分光光度法、近红外光谱法、X-射线法等) 和单一种类硫苷含量分析 (纸层析、薄层层析、高效液相色谱法、液相色谱-质谱联用法、核磁共振法等)。目前我国与硫苷检测方法相关的现行标准有: 《GB/T 23890-2009 油菜籽中芥酸及硫苷的测定 分光光度法》、《NY/T 792-2004 油菜籽芥酸硫苷的测定 光度法》、《NY/T 1103.3-2006 转基因植物及其产品食用安全检测 抗营养素第 3 部分 硫代葡萄糖苷的测定》、《NY/T 1582-2007 油菜籽中硫代葡萄糖苷的测定 高效液相色谱法》、《NY/T3295-2018 油菜籽中芥酸、硫代葡萄糖苷的测定 近红外光谱法》、《NY/T3296-2018 油菜籽中硫代葡萄糖苷的测定 液相色谱-串联质谱法》及《SN/T 1868-2007 进出口油菜籽及其饼粕中硫代葡萄糖苷总量的测定方法》。现行所有相关标准适用对象均为油菜籽及饼粕。国际上硫苷的测定主要依据是 “ISO9167-2019 Rapeseed and rapeseed meals-Determination of glucosinolates content – Method using high-performance liquid chromatography” 的方法, 还有 “ISO/TS 12788:2022 Rapeseed-Determination of glucosinolate content-Spectrometric method for total glucosinolates by glucose release” 作为测定总硫苷含量的补充方法, 仍然是以油菜籽及饼粕为适用对象。蔬菜中硫苷的组成和含量与油菜籽存在极大差异, 蔬菜基质 (较高水含量) 与油菜籽基质 (脂类物质占比高) 组成也存在很大不同, 适用于油菜籽的检测方法不能直接应用于十字花科蔬菜, 迫切需要制定针对蔬菜及制品的硫苷检测规范。

硫苷总量的测定方法不能明确硫苷的具体组分和确定单一硫苷的含量, 在蔬菜硫苷组成和含量测定实践中较少使用。液相色谱-串联质谱法具有较高的定性准确性和分析通量, 但同时存在较高的仪器成本和分析成本, 限制了其普及应用。高效液相色谱因其高灵敏度、良好的选择性和出色的重现性, 被公认为定量分析硫苷的最可靠和精确的技术。本标准拟制定十字花科蔬菜中硫代葡萄糖苷测定的高效液相色谱方法, 该方法具有检测准确、成本低、应用普遍等优点。该标准的建立, 对于筛选优质十字花科蔬菜种质资源、调控十字花科蔬菜活性物质硫苷合成代谢、提高十字花科蔬菜营养品质、指导高品质蔬菜育种和膳食营养健康具有重要意义。

1.3 主要起草单位

本标准主要起草单位为: 北京市农林科学院农产品加工与食品营养研究所、农业农村部食物与营养发展研究所、中国农业科学院蔬菜花卉研究所、江苏省农业科学院农产品质量安全与

营养研究所、北京市营养源研究所有限公司。

1.4 编写人员及其分工

何洪巨：项目负责人，负责制定实验方案、数据整理、标准文本和编制说明起草等工作。

王亚钦：负责文献调研、检测条件确定、数据整理、标准文本和编制说明起草工作。

刘光敏：负责文献调研、结果统计分析、标准文本和编制说明修改工作。

朱大洲：负责实验方案优化、标准文本和编制说明修改工作。

王娟：负责检测条件确定、方法验证、结果分析工作。

赵学志：负责检测条件确定、方法验证、结果分析工作。

徐东辉：负责标准文本修改、实验室间方法验证工作。

梁颖：负责检测条件确定、标准文本和编制说明修改工作。

许洪高：负责标准文本修改、实验室间方法验证工作。

崔亚娟：负责标准文本修改、实验室间方法验证工作。

1.5 主要工作过程（应包含起草、征求意见、送审等环节的时间及具体情况。）

项目组按照项目研究内容，分步实施并最终形成《十字花科蔬菜及制品中硫代葡萄糖苷的测定 高效液相色谱法》标准征求意见稿。具体工作内容和流程如下：

（1）2020年8月，标准正式立项。

（2）2020年9月，成立标准编写小组，明确任务分工。成立由项目负责人何洪巨研究员任组长的标准编写小组，制定工作计划，召开专项会议明确人员及任务分工。

（3）2020年10月，召开专家咨询会，确定编制原则。针对我国目前有关硫代葡萄糖苷检测方法标准及国际标准的现状，邀请业内专家召开专家咨询会，研究确定编制原则。

（4）2020年10月-2021年3月，文献调研、资料收集，初步确定主要技术参数。编制人员对国内外同类标准、学术论文、研究成果等文献资料进行收集整理，并根据我国十字花科蔬菜的种类与制品，明确其硫苷组成与含量。遵循 GB/T 20000.2-2001，初步拟订本标准的技术参数和内容。

（5）2021年4月-2021年12月，完成各类蔬菜样品的收集、前处理，进行检测条件和方法的优化，确定最终的检测技术参数。

（6）2022年1月-2022年12月，检测方法验证。实验室内部方法评价，验证硫苷检测方法的准确度、灵敏度、检出限、分离度、重复性等技术内容和参数。

（7）2023年1月-2023年6月，实验数据分析、整理，完成参数确定和方法验证。

（8）2023年7月-2025年2月，起草标准初稿。依据我国现行法律法规，根据查阅相关资

料及综合调研情况，并参照 GB/T 1.1-2000、GB/T 1.2-2002 的要求，起草完成标准征求意见稿和编制说明。

(9) 2025 年 3 月-8 月，形成标准文本初稿，邀请相关专家与加工企业技术人员、检测机构人员召开会议，针对标准初稿进行沟通 and 讨论。

(10) 2025 年 9 月-2026 年 5 月，检测方法外部实验室验证。联合农业农村部农产品质量检验测试中心（北京）、北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）、农业农村部农产品及加工品质量检验测试中心（北京）开展检测方法的实验室间验证比对试验。

(11) 2026 年 6 月-2026 年 10 月，形成标准文本征求意见稿，向相关生产经营、技术推广、科研教学、质量检测等部门专家广泛征求意见。

二、标准编制原则和主要技术内容

2.1 编制原则

本标准在编制过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章，严格遵循先进性、经济性和适用性原则，严格执行《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》（GB/T 20001.4-2015）、《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》（GB/T 1.1-2020）和《食品卫生检验方法 理化部分 总则》（GB/T 5009.1-2003）等有关标准的规定；力求技术内容叙述正确无误，文字表达准确、简明、易懂，标准构成严谨合理，内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。坚持科学性、先进性与实用性统一，确保制定出的标准既有良好的精密度、准确度和灵敏度，又经济、高效。形成征求意见稿后广泛征求科研、教学、推广、质检等相关部门专家意见。

2.2 主要技术内容

本标准起草阶段查阅了大量的国内外研究文献和相关标准，在参考国内标准有关规定的基礎上，结合已有研究和实践，对标准适用范围、规范性引用文件、原理、试剂和材料、仪器设备、样品制备与保存与试验步骤等进行了规定。

2.2.1 适用范围

本标准规定了十字花科蔬菜及制品中 20 种硫代葡萄糖苷的高效液相色谱测定方法，包括：丙烯基硫代葡萄糖苷（SIN）、苯甲基硫代葡萄糖苷（TRO）、3-丁烯基硫代葡萄糖苷(NAP)、4-戊烯基硫代葡萄糖苷(GBN)、2-羟基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷(PRO)、4-甲硫丁基硫代葡萄糖苷(ERU)、苯乙基硫代葡萄糖苷(NAS)、4-甲基亚磺酰丁烯基硫代葡萄糖苷(RAE)、4-甲基亚磺酰丁基硫代葡萄糖苷(RAA)、3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷(GBC)、5-甲亚磺戊基硫代葡萄糖苷(ALY)、4-甲氧基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷(4ME)、1-甲氧基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷(NEO)、4-羟基-

3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷(4OH)、3-甲基亚磺酰丙基硫代葡萄糖苷(GIB)、4-羟基苯甲基硫代葡萄糖苷(Sinalbin)、4-甲硫基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷(RSA)、5-甲硫基戊基硫代葡萄糖苷(GOB)、(2R)-2-羟基-2-苯乙基硫代葡萄糖苷(glucosibarin)、2-羟基-2-苯乙基硫代葡萄糖苷(glucobarbarin)。

本标准适用于十字花科蔬菜及制品中硫代葡萄糖苷含量的测定。

2.2.2 原理

用 50%乙醇水溶液提取硫代葡萄糖苷，然后在阴离子交换树脂上纯化并酶解脱去硫酸根，反相色谱柱分离，紫外检测器检测硫代葡萄糖苷。

2.2.3 试剂与材料

试剂包括：水为 GB/T 6682 规定的一级水；分析纯试剂乙醇、醋酸、三水合醋酸钠；色谱纯乙腈；硫酸酯酶溶液，*Helix pomatia* H1 型（EC 3.1.6.1），每毫升硫酸酯酶溶液的活性单位不低于 0.5；DEAE Sephadex A25 葡聚糖凝胶；丙烯基硫代葡萄糖苷（SIN）、苯甲基硫代葡萄糖苷（TRO）标准品，纯度 $\geq 98\%$ 。

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。

2 mol/L 醋酸溶液：量取 115 mL 冰醋酸，加水定容至 1 L。

0.02 mol/L 醋酸钠溶液：称取 0.272 g 三水合醋酸钠，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。

内标溶液：用丙烯基硫代葡萄糖苷作内标，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作内标。通过空白试验确定样品中是否含有内标物。

5 mmol/L 丙烯基硫代葡萄糖苷溶液：称取 207.7 mg 一水丙烯基硫代葡萄糖苷钾（ $M = 415.5$ g/mol）溶解于 80 mL 水中，加水定容至 100 mL。

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钾（ $M = 447.5$ g/mol）溶解于 80 mL 水中，加水定容至 100 mL。

2.2.4 仪器与设备

高效液相色谱仪、填料颗粒 $\leq 5 \mu\text{m}$ 的反相 C18 色谱柱、聚丙烯离子交换微柱、旋涡混合器、真空冷冻干燥机、离心机、恒温水浴锅、研钵或微型研磨机、电子天平、 $0.45 \mu\text{m}$ 水系微孔滤膜等。

2.2.5 试样的制备

采用四分法分取样品。缩分后的样品应用冷冻干燥机进行冻干处理，并将冻干后的样品粉碎，过 60-80 目筛，制得均匀的干粉样品。干粉样品可在低温下（-18℃）保存 6 个月。记录真空冷冻干燥前后样品的质量变化，用以计算样品失水量。

2.2.6 分析步骤

(1) 硫代葡萄糖苷的提取

称取 0.4 g (精确至 0.001 g) 待测干粉样品至 50 mL 离心管中, 将离心管在 75°C 水浴 1 min, 加入 10 mL 75°C 预热的 50% 乙醇溶液后, 迅速加入 200 μ L、5 mmol/L 的内标溶液, 75°C 下水浴 20 min, 其间每隔 2 min 取出离心管在旋涡混合器上旋涡混合一次。然后取出离心管冷却至室温, 5000 g 离心 5 min, 转移上清液至 10 mL 刻度试管中, 用水调节刻度试管中提取液至 10 mL, 混匀。此提取液在 -18°C 暗处可保存 2 周。

(2) 离子交换微柱的制备

每一个试样提取液准备一支聚丙烯离子交换微柱, 垂直置于试管架上, 加入玻璃棉, 塞紧。取 2 mL 充分混匀的葡聚糖凝胶悬浮液至每一个离子交换微柱中, 注意不要使悬浮液粘附在柱壁。静置待液体排干后, 用 1 mL 水冲洗树脂两次, 每次均让水排干。离子交换微柱应在制备后 12 小时内使用。

(3) 纯化和脱硫酸根

取 2 mL 样品提取液缓缓加入已制备好的离子交换微柱中, 注意不能搅动树脂表面, 待样品液不再滴下时, 分别加入 1 mL 0.02 mol/L 的醋酸钠溶液两次, 每次加入后均让液体排干。加入 75 μ L 硫酸酯酶溶液至离子交换微柱, 封口, 30°C 下反应 16 h。将离子交换微柱用水洗涤 3 次, 每次 0.5 mL, 洗脱液收集于试管中。将洗脱液充分混匀后, 用 0.45 μ m 的微孔滤膜过滤, 待进样。洗脱液在 -18°C 暗处可存放 1 周。

(4) 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。

2.2.7 色谱条件

Nova-Pak C18 色谱柱 (4 μ m, 150 mm $\times$ 3.9 mm) 或等效色谱柱, 柱温 30°C, 流动相 A 为水, 流动相 B 为 20% 乙腈水溶液 (取 200 mL 色谱纯乙腈, 加入 800 mL 水, 混匀), 洗脱梯度见表 1, 流动相流速为 1.0 mL/min, 检测波长 229 nm。进样量 10 μ L, 记录峰面积。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
1	100	0
21	0	100
26	100	0
31	100	0

2.2.8 结果计算

2.2.8.1 试样中单组分硫代葡萄糖苷的含量以每克冷冻干燥样品中的微摩尔数表示，按公式（1）计算：

$$Xg = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times \frac{Kg}{Ks} \quad \text{-----} \quad (1)$$

式中：

Xg ——干燥样品中硫代葡萄糖苷含量，单位为微摩尔每克（ $\mu\text{mol/g}$ ）；

Ag ——脱硫硫代葡萄糖苷峰面积；

As ——内标峰面积；

Kg ——脱硫硫代葡萄糖苷相对校正系数，按附录 A 的规定；

Ks ——内标脱硫硫代葡萄糖苷相对校正系数，按附录 A 的规定；

m ——试样质量，单位为克（g）；

n ——试样中加入内标的量，单位为微摩尔（ μmol ）。

计算结果表示到小数点后两位。

2.2.8.2 试样中单组分硫代葡萄糖苷的含量以每克鲜重样品中的微摩尔数表示，按公式（2）计算：

$$Cg = \frac{Ag}{As} \times \frac{n}{m} \times \frac{Kg}{Ks} \times (1-w) \quad \text{-----} \quad (2)$$

式中：

Ag 、 As 、 Kg 、 Ks 、 m 、 n 同式（1）；

Cg ——鲜样中硫代葡萄糖苷含量，单位为微摩尔每克（ $\mu\text{mol/g}$ ）；

w ——试样冷冻干燥后失重量，以质量百分数表示（%）。

计算结果表示到小数点后两位。

2.2.8.3 硫代葡萄糖苷总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。

2.3 标准名称变更

本标准原拟定名称为《十字花科蔬菜及制品中硫代葡萄糖苷及其降解产物的测定》。在标准编制过程中，编制组系统查阅了国内外大量相关文献及相关的国家标准和农业行业标准检测方法，结合硫代葡萄糖苷及其降解产物的理化特性与检测技术原理，对原拟定检测范围及标准名称进行了科学性、适用性调整，删除原定标准中降解产物测定部分的内容，申请将标准名称变更为《十字花科蔬菜及制品中硫代葡萄糖苷的测定 高效液相色谱法》，原因如下：

一是蔬菜中硫代葡萄糖苷的降解产物种类繁多，包括异硫氰酸酯、硫氰酸酯和腈类等一系

列结构、功能各异的化合物，一些降解产物对人体具有生物活性，而一些则具有生理毒性。按原定标准测定异硫氰酸酯类降解产物的总量，对于评价十字花科蔬菜及制品的食用安全性、营养品质与实际健康功效潜力缺乏明确的实际应用价值与行业指导意义。二是各类硫代葡萄糖苷降解产物理化特性差异大，统一检测方法不具备技术可行性。不同类型硫代葡萄糖苷降解产物的化学结构、极性、溶解性、稳定性等存在显著差异，需要进行不同的前处理和仪器分析条件，难以采用同一套检测体系实现多类降解产物的精准、稳定检测。综合考虑检测方法的科学性、适用性和实用价值，对原定标准中降解产物测定方法部分的内容进行删除，本标准仅规定硫代葡萄糖苷的检测方法，提升了标准的科学性和行业实用性。

三、主要试验参数确定与方法验证

3.1 主要试验参数的确定

3.1.1 提取溶剂的确定

植物组织中的硫代葡萄糖苷通常由水和甲醇、乙醇等极性有机溶剂提取，为保证蔬菜样品中硫苷的提取效率并综合考虑减少有机溶剂用量、减少有毒试剂使用，考察了以下提取溶剂对 3 种常见十字花科蔬菜西兰花、白菜、白萝卜中的硫苷的提取效率，结果如图 1 所示。纯水的提取效果最差，纯有机溶剂提取效果也不佳，而大部分硫苷在 50%-70%甲醇或 50%-70%乙醇溶液中提取效率最高。着重比较了 50%甲醇、70%甲醇、50%乙醇、70%乙醇四种溶剂下各类硫苷的响应情况：RAA、ALY、NAP 和 GBN 等脂肪族硫苷在 70%甲醇提取液中响应最高；与 50%甲醇相比，峰面积增加幅度小于 20%；相同体积分数下的乙醇溶液与甲醇情况类似，峰面积与甲醇溶液相比无显著差异或略低于甲醇溶液。4OH、GBC、4ME、NEO 等吲哚族硫苷在 50%甲醇或 50%乙醇提取条件下响应最高，乙醇与甲醇相比峰面积无显著差异或乙醇略低于甲醇。白萝卜中 RAE 和 RSA 两种特征硫苷在 100%甲醇中提取效率最高，在 50%-70%有机溶剂比例下仍有较高提取率。

综合以上实验结果考虑，在未大幅度降低提取效率的前提下，为减少有机溶剂用量，选择 50%有机溶剂来提取蔬菜中的硫苷。50%甲醇与 50%乙醇相比，大部分硫苷的响应差别不大，因甲醇毒性比乙醇大，从操作人员安全角度考虑，选择 50%乙醇作为提取溶剂。

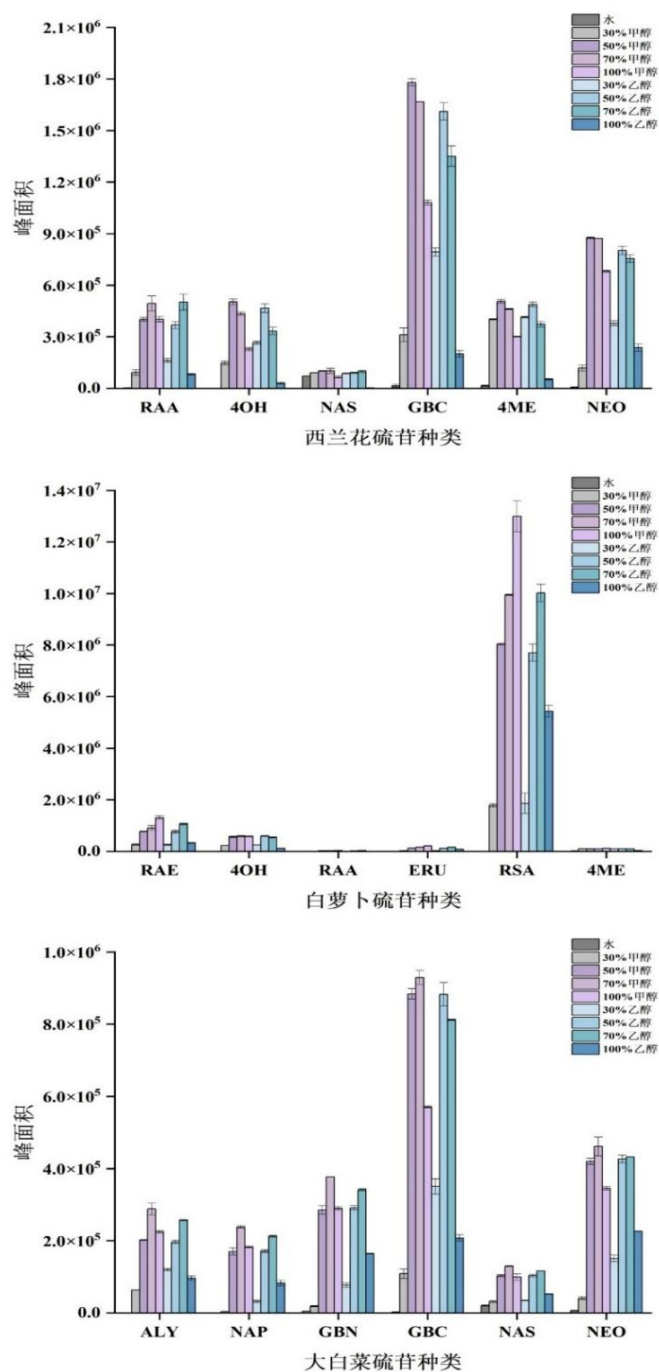


图 1 不同提取溶剂对三种十字花科蔬菜中主要硫苷的提取效率比较

3.1.2 提取料液比的确定

为保证样品中的硫苷提取完全，以 50%乙醇为提取溶剂，进行了料液比的优化实验，结果如图 2 所示。总的来说白萝卜中各类硫苷在 1:20 和 1:25 条件下提取效率较高，而西兰花中各类硫苷在 1:25 提取效率更高，综合比较后选择 1:25 为最佳提取料液比。

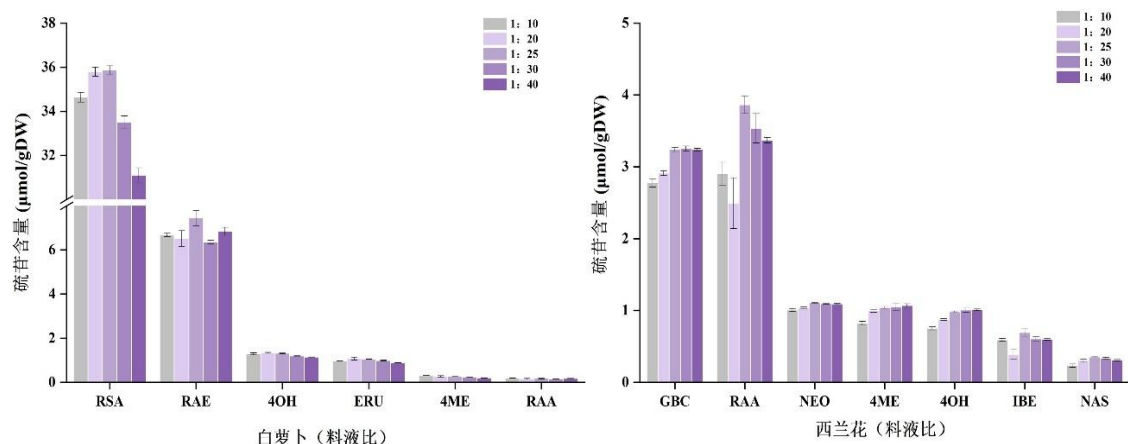


图 2 不同料液比对十字花科蔬菜中主要硫苷提取效率的影响

3.1.3 提取温度的确定

完整硫苷在植物组织被破坏后易在内源酶作用下水解，较低的提取温度不能迅速有效地将内源黑芥子酶灭活，而过高的提取温度可能会导致硫苷的热降解，因此需要选择适宜的提取温度。以 50%乙醇为提取溶剂，考察了不同提取温度对十字花科蔬菜中硫苷提取效率的影响，结果如图 3 所示。白萝卜和西兰花中各类硫苷均在 70-80℃ 的范围内提取效果较优，此温度范围可以作为硫苷提取的最佳温度。本标准选择 75℃ 作为提取温度。

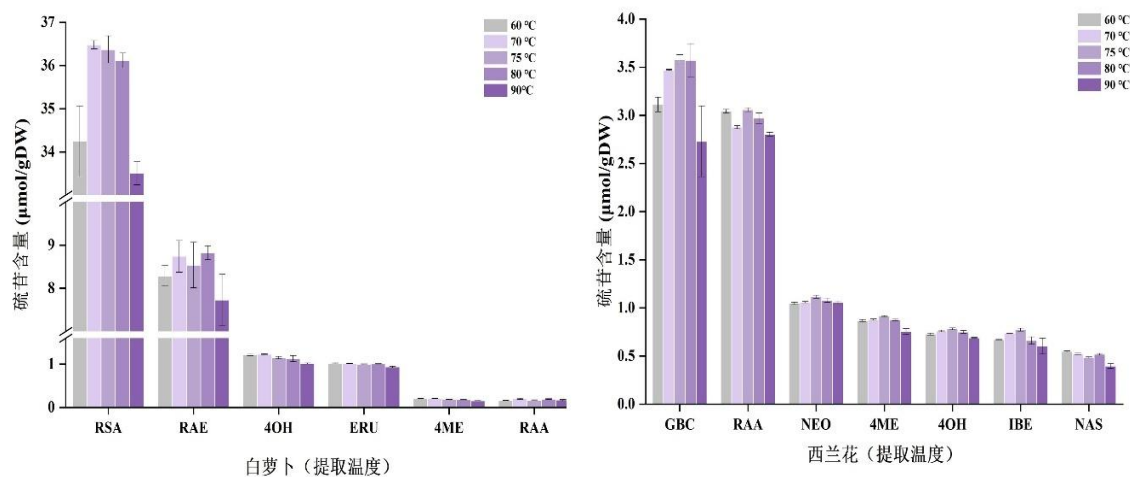


图 3 不同提取温度对十字花科蔬菜中主要硫苷提取效率的影响

3.1.4 提取时间和次数的确定

比较了不同提取时间对蔬菜中硫苷提取效率的影响，结果见图 4。白萝卜中除 RSA 外，其他硫苷的提取量随时间的延长变化不显著，而含量最高的硫苷 RSA 在提取时间超过 30 min 后提取量显著下降，而在提取时间为 5-20 min 无显著差异。西兰花中各类硫苷的提取量随时间

的变化趋势与白萝卜中 RSA 相似，大部分硫苷在提取时间为 5-20 min 无显著差异，而含量最为丰富的 GBC 在 20 min 提取效果最佳。综合各类硫苷提取效果，确定提取时间为 20 min。

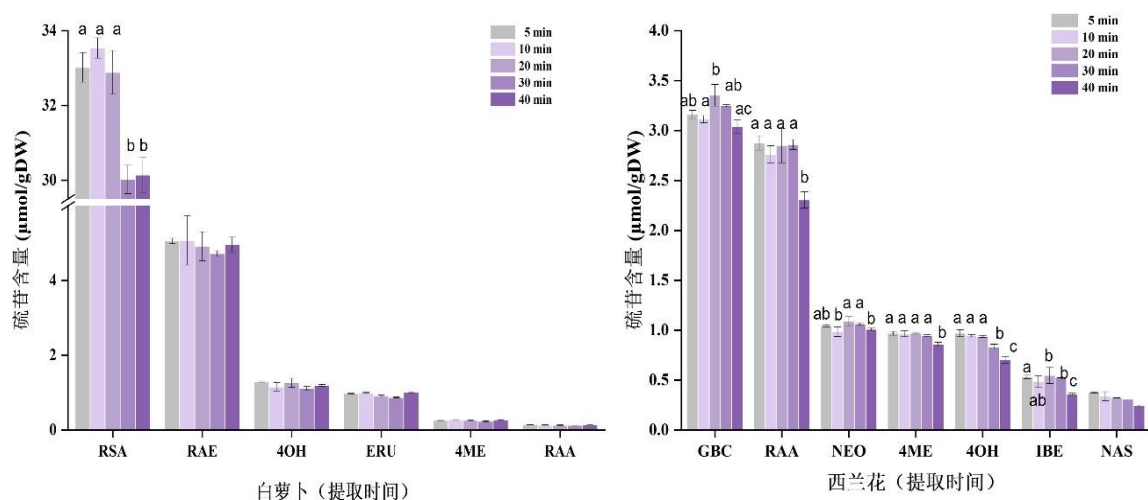


图 4 不同提取时间对十字花科蔬菜中主要硫苷提取效率的影响

(相同化合物标注不同字母表示差异显著, $p \leq 0.05$; 未标注字母表示不同提取条件下差异均不显著)

在确定提取时间后，比较了不同提取次数对白萝卜和西兰花中各类硫苷提取含量的影响(图 5)，发现提取次数的增加并不能显著增加硫苷的提取量，因此本标准选择 1 次提取即可。

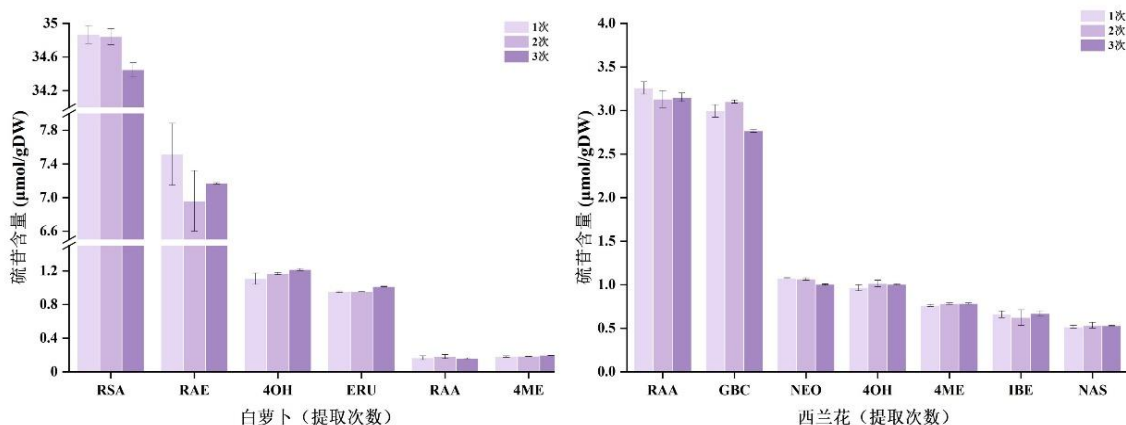


图 5 提取次数对蔬菜中主要硫苷提取效率的影响

3.1.5 离子交换柱制备

在制备离子交换柱时，加葡聚糖凝胶悬浮液至离子交换微柱后，部分参考文献和参考标准方法采用了 6 mol/L 甲酸咪唑溶液来冲洗树脂。我们比较了甲酸咪唑溶液与纯水冲洗制备的离子交换柱对蔬菜样品中硫苷的纯化和脱硫效果，如图 6 所示，二者色谱图几乎重合，没有明显差异。为降低所用试剂对操作人员的潜在毒性及简化操作步骤，本标准采用 2 mL 纯水冲洗离

子交换微柱。

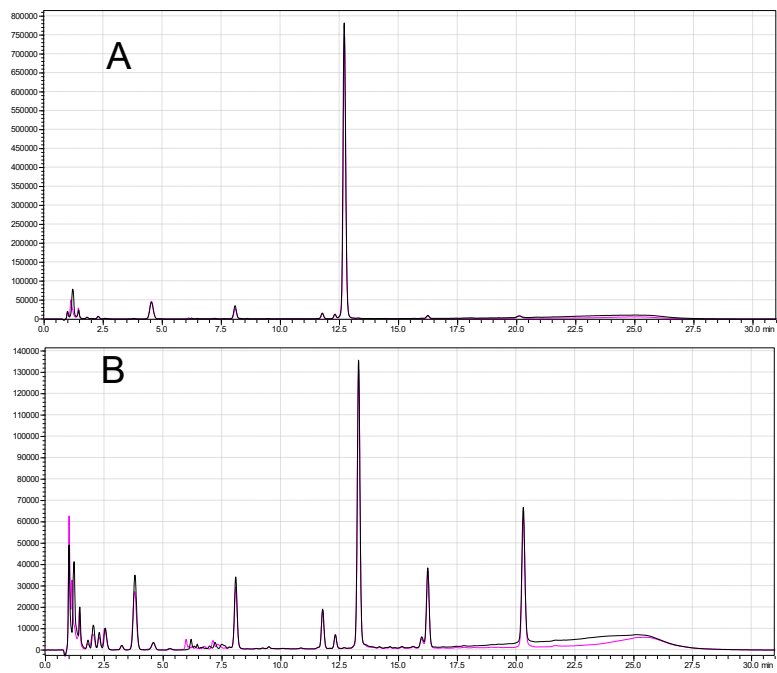


图 6 制备离子交换微柱条件优化

（黑色谱图为纯水冲洗，粉色为甲酸咪唑溶液冲洗；A 为白萝卜样品，B 为西兰花样品）

3.1.6 酶解时间、洗脱次数确定

对于硫酸酯酶进行脱硫反应的时间进行了比较（图 7），大部分硫苷的充分酶解需要超过 12 h，而延长至 20 h 及以上时硫苷含量无显著增加甚至降低，因此选择 16 h 为最佳酶解时间。

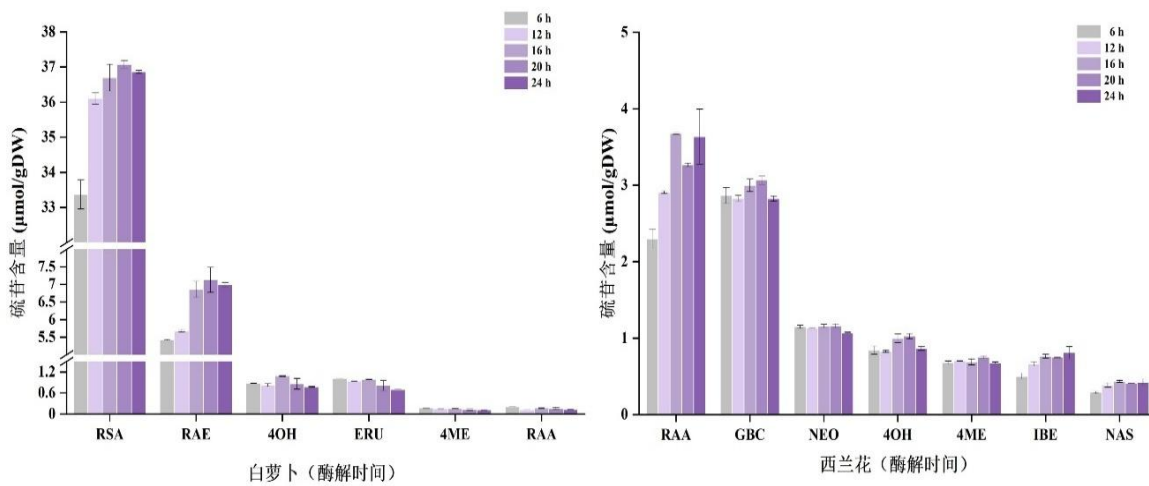


图 7 硫酸酯酶酶解反应时间优化

酶解反应结束后，需用水将脱硫硫苷从离子交换柱上洗脱下来，考察了洗脱次数（1-5 次）

对硫苷得率的影响，结果见图 8。前 3 次洗脱液中硫苷含量较高，第 4 次、第 5 次洗脱液中硫苷含量大幅减少。前 3 次洗脱后，超过 92% 含量的脂肪族硫苷 RAA、RAE、ERU、RSA 均已从柱上洗脱下来；与脂肪族硫苷相比，吡啶族硫苷与柱子结合更强，但在第 3 次洗脱后，超过 77% 的 GBC、79% 的 4ME 和 70% 的 4OH 从柱上洗脱下来。综上，本实验选择 3 次洗脱，可以收集到大部分的脱硫硫苷。

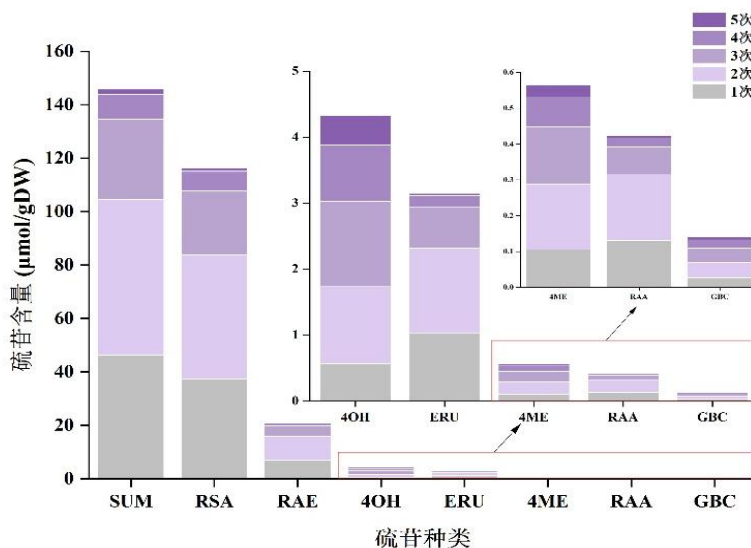


图 8 离子交换微柱不同洗脱次数下脱硫硫苷含量比较

3.1.7 色谱条件优化

本实验选取色谱柱填料颗粒小于或等于 $5\ \mu\text{m}$ 的反相 C_{18} 柱，如 Nova-Pak C_{18} $4\ \mu\text{m}$ ($150\ \text{mm} \times 3.9\ \text{mm}$)，Nova-Pak C_{18} $5\ \mu\text{m}$ ($150\ \text{mm} \times 3.9\ \text{mm}$)，Inertsil ODS-3 C_{18} $5\ \mu\text{m}$ ($150\ \text{mm} \times 4.6\ \text{mm}$) 等，参考现有硫苷检测标准方法和文献，对两种常用流动相组合对脱硫硫苷的洗脱分离效果进行了比较：（1）A 相：纯水，B 相：20%乙腈；（2）A 相：0.05%四甲基氯化铵（TMACl）水溶液，B 相：0.05%四甲基氯化铵+20%乙腈溶液。其他色谱条件相同情况下两种流动相洗脱效果比较如图 9 所示，二者色谱图无明显差异，各类硫苷均能得到很好的分离效果。因此，本实验选择 A 相为纯水、B 相为 20%乙腈的流动相组合，减少不挥发性盐的使用，可以延长色谱柱使用寿命。

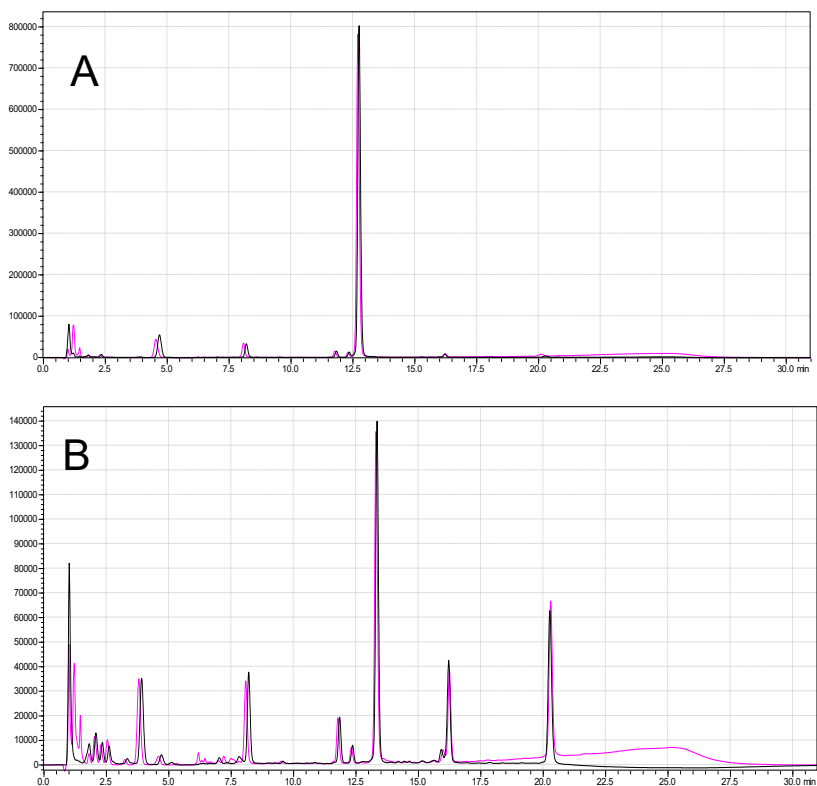


图 9 两种流动相相色谱图比较

(A 为白萝卜样品, B 为西兰花样品; 黑色谱图为纯水:20%乙腈, 粉色谱图为纯水: 20%乙腈, 分别加入 0.05% 四甲基氯化铵)

确定色谱柱和流动相组成后, 对洗脱程序和柱温进行调试, 蔬菜中常见的 20 种(脱硫)硫苷在本文 2.2.8 色谱条件下可以在 25 min 内实现较好的分离, 且峰形对称、半峰宽窄, 可应用于蔬菜样品中硫苷的测定。

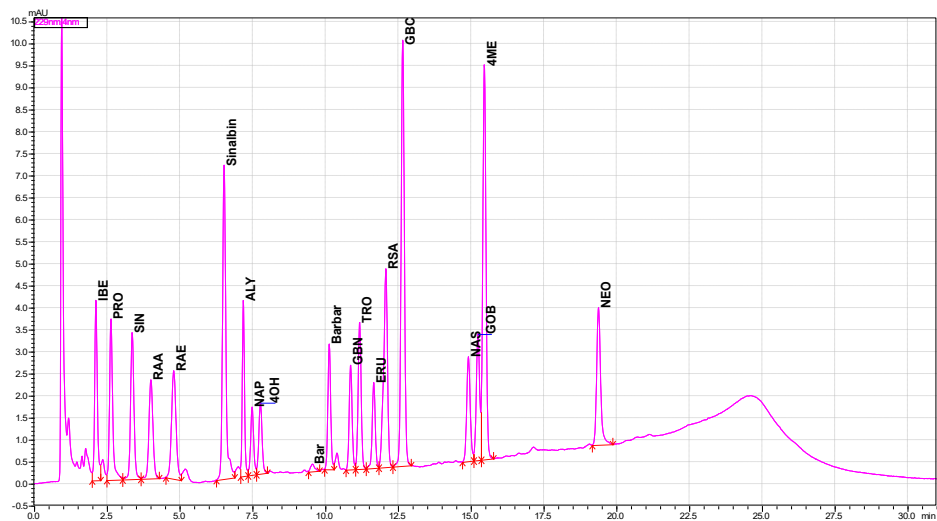


图 10 硫苷标准物质 HPLC 色谱图

3.1.8 定量相对校正系数确定

计算样品中硫苷含量时，以内标法相对校正系数定量，用丙烯基硫代葡萄糖苷作内标；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作内标。通过制作各类硫苷在蔬菜中通常含量范围内的标准曲线，根据不同硫苷标准曲线方程与内标物标准曲线方程，推算出不同硫苷的相对校正系数，见表 2。

表 2 各类脱硫硫苷相对校正系数

序号	中文名	缩写	摩尔质量 (g/mol)	相对校正系数(<i>K_i</i>)
1	3-甲基亚磺酰丙基脱硫硫代葡萄糖苷	GIB	422.03	1.07
2	2-羟基-3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	PRO	388.04	1.09
3	丙烯基脱硫硫代葡萄糖苷	SIN	358.03	1.00
4	4-甲基亚磺酰丁基脱硫硫代葡萄糖苷	RAA	436.04	1.07
5	4-甲基亚磺酰丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	RAE	434.03	1.13
6	4-羟基苯甲基脱硫硫代葡萄糖苷	Sinalbin	424.04	0.50
7	5-甲亚砷戊基脱硫硫代葡萄糖苷	ALY	450.06	1.07
8	3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	NAP	372.04	1.11
9	4-羟基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	4OH	463.05	0.28
10	(2R)-2-羟基-2-苯乙基脱硫硫代葡萄糖苷	Bar	438.05	1.09
11	2-羟基-2-苯乙基脱硫硫代葡萄糖苷	Barbar	438.05	1.09
12	4-戊烯基脱硫硫代葡萄糖苷	GBN	386.06	1.15
13	苯甲基（苄基）脱硫硫代葡萄糖苷	TRO	408.04	0.95
14	4-甲硫丁基脱硫硫代葡萄糖苷	ERU	420.05	1.15
15	4-甲硫基-3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	RSA	418.03	0.53
16	3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	GBC	447.05	0.29
17	苯乙基脱硫硫代葡萄糖苷	NAS	422.06	0.95
18	5-甲硫戊基脱硫硫代葡萄糖苷	GOB	434.06	1.00
19	4-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	4ME	477.06	0.25
20	1-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	NEO	477.06	0.20

3.2 方法学评价

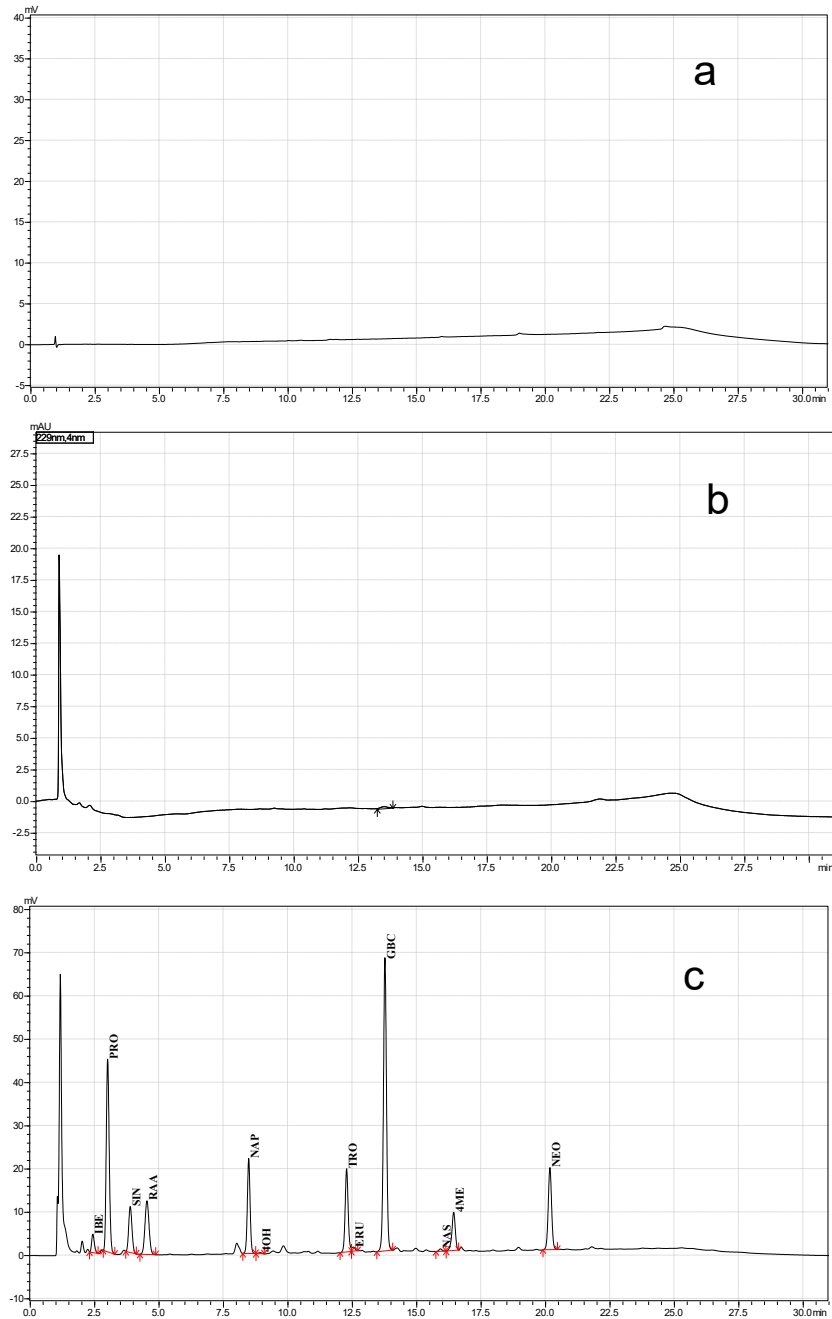
对建立的检测方法进行方法学评价，包括方法选择性、准确度、检出限（LOD）、定量限（LOQ）、测量范围、精密度（重复性和再现性）以及基质效应。

3.2.1 方法选择性和基质效应

经优化后的色谱条件下，标准物质溶液和样品提取液中 20 种硫苷均呈现很好的分离效果和响应（图 10），而在空白溶剂、空白样品（番茄）中均无硫苷响应信号（图 11），表明方法

具有选择性，蔬菜基质中存在的其他物质对目标物的干扰较小。

蔬菜中其他物质对硫苷检测的影响，通过计算基质效应评估，计算公式为：样品基质中添加已知含量的硫苷的响应值/纯溶剂（50%乙醇）中相同含量硫苷的响应值，比值越接近 1，表示基质效应越小。结果如图 12 所示，不同类型十字花科蔬菜基质效应在 0.8-1.2 之间，基质效应较弱，蔬菜中的基质成分没有显著增强或抑制硫苷的响应信号。



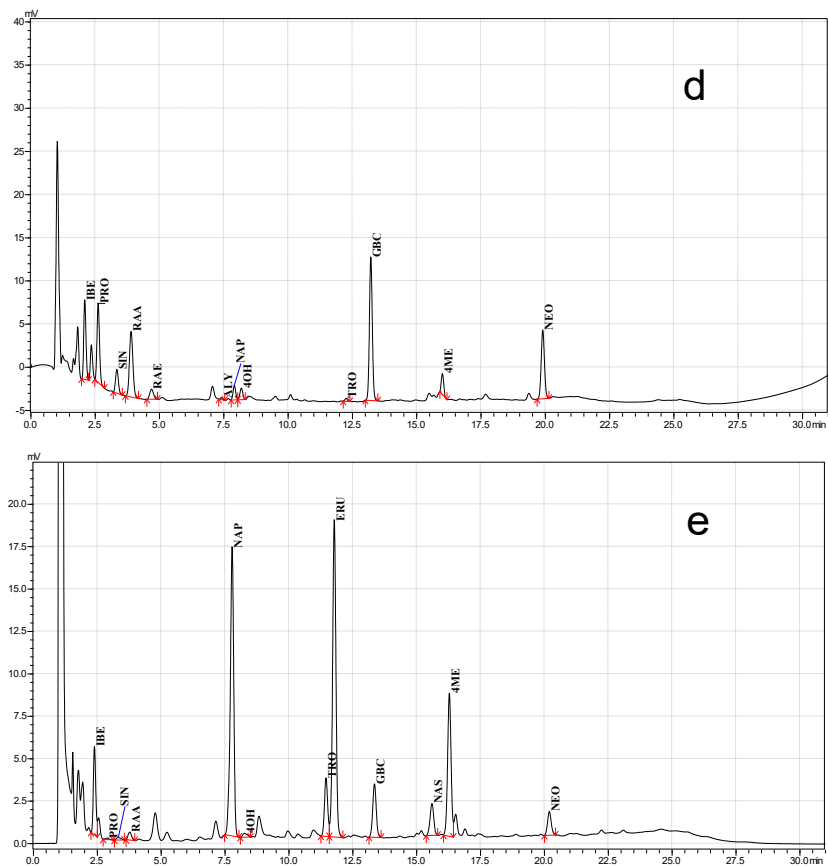


图 11 空白溶剂 (a)、空白样品 (b)、芥兰 (c)、羽衣甘蓝粉 (d)、油菜样品 (e)
中脱硫硫苷 HPLC 色谱图

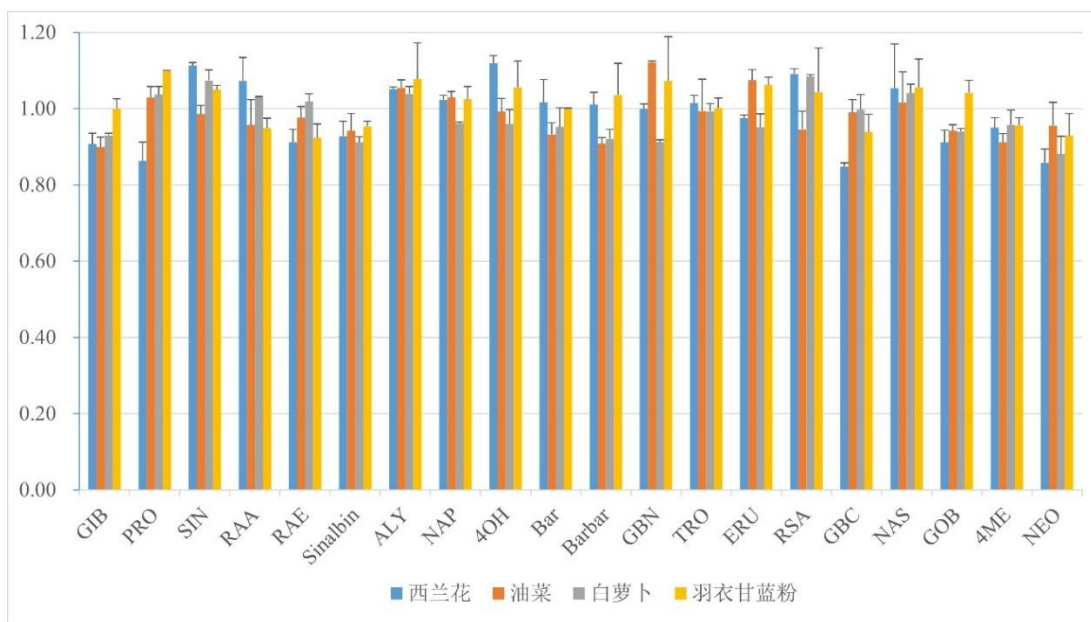


图 12 西兰花、油菜、白萝卜、羽衣甘蓝粉样品的基质效应评价

3.2.2 方法检出限和定量限

根据《GB/T 27417-2017 合格评定 化学分析方法确认和验证指南》的规定，通过信噪比法评价了方法的检出限（LOD），将一系列已知低浓度的硫代葡萄糖苷标准物质加入空白样品（番茄）中，以已知浓度的分析样品与空白样品中的各硫代葡萄糖苷测量信号相比较，确定 3:1 信噪比下的浓度为方法的检出限，以 3 倍的检出限确定定量限（LOQ），结果如表 3 所示。20 种硫苷的检出限和定量限分别为 0.02~0.08 $\mu\text{mol/g DW}$ 和 0.08~0.20 $\mu\text{mol/g DW}$ （DW:干重），可满足蔬菜及其制品中常见硫苷的含量检测需求。

表 3 方法检出限（LOD）和定量限（LOQ）

化合物	缩写	LOD ($\mu\text{mol/g DW}$)	LOQ ($\mu\text{mol/g DW}$)
3-甲基亚磺酰丙基脱硫硫代葡萄糖苷	GIB	0.05	0.20
2-羟基-3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	PRO	0.05	0.20
丙烯基脱硫硫代葡萄糖苷	SIN	0.05	0.20
4-甲基亚磺酰丁基脱硫硫代葡萄糖苷	RAA	0.04	0.20
4-甲基亚磺酰丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	RAE	0.05	0.20
4-羟基苯甲基脱硫硫代葡萄糖苷	Sinalbin	0.03	0.10
5-甲亚砷戊基脱硫硫代葡萄糖苷	ALY	0.06	0.20
3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	NAP	0.05	0.20
4-羟基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	4OH	0.05	0.20
(2R)-2-羟基-2-苯乙基脱硫硫代葡萄糖苷	Bar	0.03	0.10
2-羟基-2-苯乙基脱硫硫代葡萄糖苷	Barbar	0.03	0.10
4-戊烯基脱硫硫代葡萄糖苷	GBN	0.05	0.20
苯甲基脱硫硫代葡萄糖苷	TRO	0.05	0.20
4-甲硫丁基脱硫硫代葡萄糖苷	ERU	0.05	0.20
4-甲硫基-3-丁烯基脱硫硫代葡萄糖苷	RSA	0.05	0.20
3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	GBC	0.02	0.08
苯乙基脱硫硫代葡萄糖苷	NAS	0.04	0.20
5-甲硫戊基脱硫硫代葡萄糖苷	GOB	0.05	0.20
4-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	4ME	0.02	0.08
1-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫硫代葡萄糖苷	NEO	0.08	0.20

注：DW: 干重

3.2.3 方法准确度和重复性

分别向 3 种十字花科蔬菜及制品样品中（西兰花、白萝卜和羽衣甘蓝粉）添加准确量的硫苷标准溶液后进行提取、酶解和 HPLC 分析，计算方法的添加回收率。本试验设计了三个浓度水平的添加回收率实验，每个添加水平设置 6 次重复，添加浓度、回收率和测定值间的变异系数（CV，测量值标准偏差/平均值）见表 4-表 6。全部物质的添加回收率均在 80%-120% 范围之间，其中高浓度添加水平回收率在 95%-105% 之间，大部分物质在中等浓度和低浓度添加水平的回收率在 90%-110% 之间，重复测定 6 次结果的变异系数在 10% 以内，表明方法准确度高、重复性良好，可以满足蔬菜中硫苷含量定量的要求。

表 4 方法添加回收率和实验室内变异系数（白萝卜，n=6）

化合物	本底含量 ($\mu\text{mol/g DW}$)	添加量($\mu\text{mol/g DW}$)			回收率(%)					
		L1	L2	L3	L1	CV (%)	L2	CV (%)	L3	CV (%)
3-甲基亚磺酰丙基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.96	23.70	71.09	86.8	2.9	93.4	0.5	96.2	0.2
2-羟基-3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	3.22	25.77	77.31	88.6	1.1	93.5	0.3	97.1	0.0
丙烯基硫酸代葡萄糖苷	nd	3.49	27.93	83.79	92.5	0.3	96.6	0.9	99.4	0.6
4-甲基亚磺酰丁基脱硫酸代葡萄糖苷	1.34 $\pm$ 0.27	2.87	22.93	68.80	88.1	3.6	96.8	3.5	99.9	3.8
4-甲基亚磺酰丁基脱硫酸代葡萄糖苷	38.40 $\pm$ 0.27	2.88	23.04	69.12	85.0	1.8	91.3	0.4	99.6	0.9
4-羟基苯甲基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.95	23.58	70.75	91.6	1.5	96.6	0.7	97.7	0.8
5-甲亚砷戊基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.78	22.22	66.66	87.0	1.7	91.0	0.6	97.8	1.1
3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	3.36	26.88	80.64	84.2	1.3	87.7	1.4	95.5	2.0
4-羟基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	10.98 $\pm$ 0.51	2.70	21.60	64.79	95.2	2.3	102.8	3.4	105.3	2.1
(2R)-2-羟基-2-苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.85	22.83	68.48	94.0	1.0	98.9	1.7	101.2	2.2
2-羟基-2-苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.85	22.83	68.48	87.4	1.0	92.3	2.2	97.5	1.5
4-戊烯基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	3.24	25.90	77.71	89.0	0.8	95.5	2.8	97.8	2.0
苯甲基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	内标	内标	内标	-	-	-	-	-	-
4-甲硫丁基脱硫酸代葡萄糖苷	8.33 $\pm$ 0.01	2.98	23.81	71.42	86.5	0.4	92.9	4.0	96.3	0.9
4-甲硫基-3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	196.36 $\pm$ 1.41	2.99	23.92	71.77	95.8	0.2	96.9	1.1	102.1	0.4
3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.80	22.37	67.11	97.8	1.8	104.6	2.1	104.2	0.5
苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	1.78 $\pm$ 0.00	2.96	23.69	71.08	87.0	0.2	91.0	3.0	95.1	3.5
5-甲硫戊基脱硫酸代葡萄糖苷	1.73 $\pm$ 0.01	2.88	23.04	69.11	87.7	0.8	91.2	1.5	96.1	1.9
4-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	1.57 $\pm$ 0.00	2.62	20.96	62.88	100.1	2.1	106.9	1.8	104.5	0.2
1-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	4.37 $\pm$ 0.25	2.62	20.96	62.88	100.7	0.5	104.8	2.0	103.3	0.8

注：nd: 未检出；DW: 干重。

表 5 方法添加回收率和实验室内变异系数（西兰花，n=6）

化合物	本底含量 ($\mu\text{mol/g DW}$)	添加量($\mu\text{mol/g DW}$)			回收率(%)					
		L1	L2	L3	L1	CV (%)	L2	CV (%)	L3	CV (%)
3-甲基亚磺酰丙基脱硫酸代葡萄糖苷	5.92±0.01	2.96	23.70	71.09	89.2	0.7	91.6	2.1	96.0	0.3
2-羟基-3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	8.38±1.05	3.22	25.77	77.31	93.1	0.7	97.0	0.2	98.6	0.2
丙烯基硫酸代葡萄糖苷	2.09±0.01	3.49	27.93	83.79	96.0	0.8	99.9	0.3	101.5	0.1
4-甲基亚磺酰丁基脱硫酸代葡萄糖苷	65.93±2.04	2.87	22.93	68.80	93.2	0.2	95.7	2.3	99.1	0.3
4-甲基亚磺酰丁基脱硫酸代葡萄糖苷	1.73±0.00	2.88	23.04	69.12	82.8	1.6	96.7	1.4	95.7	0.2
4-羟基苯甲基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.95	23.58	70.75	93.5	0.3	93.6	1.3	97.3	0.4
5-甲亚砷戊基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.78	22.22	66.66	89.9	0.4	93.0	0.4	95.5	0.2
3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	2.69±0.01	3.36	26.88	80.64	82.8	0.6	88.6	0.6	99.2	0.6
4-羟基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	27.89±0.25	2.70	21.60	64.79	98.3	1.3	105.1	2.8	105.4	2.3
(2R)-2-羟基-2-苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.85	22.83	68.48	97.2	0.5	101.7	0.0	102.2	0.3
2-羟基-2-苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.85	22.83	68.48	92.7	0.7	98.0	0.1	99.2	0.7
4-戊烯基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	3.24	25.90	77.71	92.0	0.4	96.4	0.8	97.8	0.1
苯甲基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	内标	内标	内标	-	-	-	-	-	-
4-甲硫丁基脱硫酸代葡萄糖苷	11.31±0.05	2.98	23.81	71.42	85.3	0.7	90.7	0.5	96.8	0.4
4-甲硫基-3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.99	23.92	71.77	90.8	0.4	95.9	0.2	97.0	0.6
3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	53.68±0.04	2.80	22.37	67.11	99.1	1.1	101.8	1.7	102.0	1.5
苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	1.18±0.00	2.96	23.69	71.08	92.9	0.4	97.1	0.4	98.8	0.7
5-甲硫戊基脱硫酸代葡萄糖苷	3.46±0.01	2.88	23.04	69.11	99.3	1.2	108.0	1.0	103.9	0.4
4-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	13.1±0.01	2.62	20.96	62.88	104.6	1.5	106.3	1.4	101.9	0.8
1-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	42.8±0.25	2.62	20.96	62.88	100.3	0.7	105.4	0.5	104.6	2.1

注：nd: 未检出；DW: 干重。

表 6 方法添加回收率和实验室内变异系数（羽衣甘蓝粉，n=6）

化合物	本底含量 ($\mu\text{mol/g DW}$)	添加量($\mu\text{mol/g DW}$)			回收率(%)					
		L1	L2	L3	L1	CV (%)	L2	CV (%)	L3	CV (%)
3-甲基亚磺酰丙基脱硫酸代葡萄糖苷	28.04 $\pm$ 0.74	2.96	23.70	71.09	89.7	0.9	93.4	2.8	95.4	2.6
2-羟基-3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	83.54 $\pm$ 0.80	3.22	25.77	77.31	98.8	1.4	94.8	0.9	101.9	1.7
丙烯基硫酸代葡萄糖苷	24.21 $\pm$ 0.33	3.49	27.93	83.79	99.1	1.4	95.5	0.6	104.5	1.0
4-甲基亚磺酰丁基脱硫酸代葡萄糖苷	76.64 $\pm$ 0.97	2.87	22.93	68.80	91.9	1.3	94.8	0.2	98.7	2.6
4-甲基亚磺酰丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	13.63 $\pm$ 0.54	2.88	23.04	69.12	93.1	0.1	88.8	1.0	100.2	2.6
4-羟基苯甲基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.95	23.58	70.75	96.2	1.7	91.7	0.5	95.9	0.3
5-甲亚砷戊基脱硫酸代葡萄糖苷	1.11 $\pm$ 0.00	2.78	22.22	66.66	94.0	0.9	91.7	1.6	97.4	2.9
3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	43.45 $\pm$ 1.14	3.36	26.88	80.64	91.1	1.2	89.0	0.2	95.6	1.4
4-羟基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	9.18 $\pm$ 0.01	2.70	21.60	64.79	89.8	0.2	97.7	0.5	98.8	0.4
(2R)-2-羟基-2-苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.85	22.83	68.48	99.4	2.0	97.3	0.5	100.9	1.1
2-羟基-2-苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.85	22.83	68.48	100.6	1.0	95.3	0.3	103.9	1.5
4-戊烯基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	3.24	25.90	77.71	95.9	2.0	90.0	0.4	96.9	1.4
苯甲基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	内标	内标	内标	-	-	-	-	-	-
4-甲硫丁基脱硫酸代葡萄糖苷	3.57 $\pm$ 0.01	2.98	23.81	71.42	91.4	1.7	86.2	0.5	98.7	1.4
4-甲硫基-3-丁烯基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.99	23.92	71.77	97.1	2.2	91.6	0.8	97.7	1.0
3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	37.47 $\pm$ 0.46	2.80	22.37	67.11	100.2	2.4	97.5	0.6	100.5	0.6
苯乙基脱硫酸代葡萄糖苷	5.33 $\pm$ 0.01	2.96	23.69	71.08	105.2	1.7	99.7	0.9	105.3	0.9
5-甲硫戊基脱硫酸代葡萄糖苷	nd	2.88	23.04	69.11	106.6	2.0	99.4	0.3	102.6	1.6
4-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	6.81 $\pm$ 0.01	2.62	20.96	62.88	103.1	1.8	99.5	1.0	105.0	0.6
1-甲氧基-3-吡啶甲基脱硫酸代葡萄糖苷	49.08 $\pm$ 0.65	2.62	20.96	62.88	102.4	3.6	100.0	1.9	102.1	0.4

注：nd: 未检出；DW: 干重。

3.2.4 实验室间方法验证（方法再现性）

根据标准适用范围，选择油菜、白萝卜、西兰花、叶用芥菜及羽衣甘蓝粉五种常见的十字花科蔬菜和制品进行实验室间方法再现性考察，实验在北京市农林科学院农产品加工与食品营养研究所（本实验室，实验室 1）、农业农村部农产品质量检验检测中心（北京）（实验室 2）、北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）（实验室 3）、农业农村部农产品及加工品质量检验检测中心（北京）（实验室 4）共 4 家机构开展，各实验室测试结果见表 7-表 11 和附件《实验室间验证报告》。

由《实验室间验证报告》结果可见，各实验室内部同一样品重复测定 6 次，方法重复性变异系数小于 10%，大部分硫代葡萄糖苷测定结果的变异系数在 5%以内；方法的检出限和定量限均在 0.02~0.10 $\mu\text{mol/g DW}$ 和 0.08~0.20 $\mu\text{mol/g DW}$ 范围内。不同实验室间测定结果相比较，方法再现性变异系数小于 20%，实验室之间未出现统计离群值，表明所确定的方法在实验室之间有良好的重复性和再现性。由此，确定该方法在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%，在再现性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的 20%。

3.3 结论

本方法用 50%乙醇水溶液提取硫代葡萄糖苷，然后在阴离子交换树脂上纯化并酶解脱去硫酸根，反相 C18 色谱柱分离，紫外检测器检测脱硫酸硫代葡萄糖苷。经方法学考察，本方法具有较好的选择性和灵敏度，20 种硫苷的检出限和定量限分别为 0.02~0.08 $\mu\text{mol/g}$ 和 0.08~0.20 $\mu\text{mol/g}$ ，可满足蔬菜及其制品中常见硫苷的含量检测需求；全部物质的添加回收率均在 80%-120%范围之间，方法重复性变异系数小于 10%，方法再现性变异系数小于 20%，表明方法具有较高的准确度和精密度，可以满足蔬菜中硫苷含量定量的要求。

表 7 油菜中硫代葡萄糖苷含量实验室间比对试验数据统计

硫代葡萄糖苷	实验室 1 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 2 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 3 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 4 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 内重复 数	总平均值 ($\mu\text{mol/g DW}$)	标准 偏差	变异系 数%	实验室 1 Z 值	实验室 2 Z 值	实验室 3 Z 值	实验室 4 Z 值
2-羟基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷	2.06	2.02	2.20	2.18	6	2.12	0.09	4.28	0.67	1.11	0.89	0.67
丙烯基硫代葡萄糖苷	<0.20	0.23	<0.20	<0.20	6	<0.20	-	-	-	-	-	-
4-甲基亚磺酰丁基硫代葡萄糖苷	1.34	1.16	1.17	1.24	6	1.23	0.09	7.19	1.22	0.78	0.67	0.11
5-甲亚砷戊基硫代葡萄糖苷	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	6	<0.20	-	-	-	-	-	-
3-丁烯基硫代葡萄糖苷	5.08	5.40	5.21	5.32	6	5.25	0.15	2.84	1.13	1.00	0.27	0.47
4-甲硫丁基硫代葡萄糖苷	<0.20	nd	<0.20	nd	6	<0.20	-	-	-	-	-	-
3-吲哚甲基硫代葡萄糖苷	0.11	<0.20	0.10	<0.20	6	0.11	0.01	6.71	0.00	-	1.00	-
苯乙基硫代葡萄糖苷	<0.20	<0.20	<0.20	0.27	6	<0.20	-	-	-	-	-	-
4-甲氧基-3-吲哚甲基硫代葡萄糖苷	0.33	0.34	0.26	0.29	6	0.30	0.04	11.82	0.75	1.00	1.00	0.25
1-甲氧基-3-吲哚甲基硫代葡萄糖苷	0.28	0.29	0.27	0.29	6	0.28	0.02	6.14	0.00	0.50	0.50	0.50
总量	9.20	9.44	9.21	9.63	6	9.36	0.20	2.12	0.80	0.40	0.75	1.35

注：nd：未检出；<0.20：有检出但含量低于定量限。

表 8 芥菜中硫代葡萄糖苷含量实验室间比对试验数据统计

硫代葡萄糖苷	实验室 1 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 2 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 3 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 4 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 内重复 数	总平均值 ($\mu\text{mol/g DW}$)	标准 偏差	变异系 数%	实验室 1 Z 值	实验室 2 Z 值	实验室 3 Z 值	实验室 4 Z 值
丙烯基硫代葡萄糖苷	50.09	48.04	51.58	50.09	6	49.95	1.39	2.79	0.10	1.37	1.17	0.10
4-甲基亚磺酰丁基硫代葡萄糖苷	0.21	0.24	0.28	<0.20	6	0.24	0.04	15.60	0.75	0.00	1.00	-
3-丁烯基硫代葡萄糖苷	0.78	0.78	0.63	0.64	6	0.71	0.08	10.93	0.88	0.88	1.00	0.87
4-羟基-3-吲哚甲基硫代葡萄糖苷	0.71	0.93	0.87	0.69	6	0.80	0.11	13.96	0.82	1.18	0.64	1.00
3-吲哚甲基硫代葡萄糖苷	0.11	<0.20	0.10	<0.20	6	0.11	0.01	5.54	0.00	-	1.00	-
苯乙基硫代葡萄糖苷	0.25	0.20	<0.20	<0.20	6	0.24	0.02	10.25	0.50	2.00	-	-
4-甲氧基-3-吲哚甲基硫代葡萄糖苷	0.30	0.31	0.27	0.24	6	0.28	0.03	12.28	0.67	1.00	0.33	1.33
1-甲氧基-3-吲哚甲基硫代葡萄糖苷	0.20	<0.20	<0.20	0.27	6	0.24	0.03	13.90	1.33	-	-	1.00
总量	52.58	50.32	53.64	51.93	6	52.12	1.35	2.59	0.34	1.33	1.13	0.14

注：<0.20：有检出但含量低于定量限。

表 9 西兰花中硫代葡萄糖苷含量实验室间比对试验数据统计

硫代葡萄糖苷	实验室 1 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 2 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 3 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 4 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 内重复 数	总平均值 ($\mu\text{mol/g DW}$)	标准 偏差	变异系 数%	实验室 1 Z 值	实验室 2 Z 值	实验室 3 Z 值	实验室 4 Z 值
3-甲基亚磺酰丙基硫代葡萄糖苷	0.55	0.68	0.73	0.51	6	0.62	0.10	15.50	0.70	0.60	1.10	1.10
2-羟基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷	0.42	0.46	0.51	0.44	6	0.46	0.04	7.81	1.00	0.00	1.25	0.50
丙烯基硫代葡萄糖苷	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	6	<0.20	-	-	-	-	-	-
4-甲基亚磺酰丁基硫代葡萄糖苷	2.64	2.67	2.83	2.26	6	2.60	0.24	9.30	0.17	0.29	0.96	1.42
3-丁烯基硫代葡萄糖苷	<0.20	0.27	0.22	0.23	6	0.24	0.03	12.37	-	1.00	0.67	0.33
4-羟基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	0.75	0.91	0.85	0.67	6	0.79	0.09	11.89	0.44	1.33	0.67	1.33
4-甲硫丁基硫代葡萄糖苷	0.40	0.44	0.41	0.35	6	0.40	0.04	8.88	0.00	1.00	0.25	1.25
3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	2.75	3.22	2.53	2.42	6	2.73	0.31	11.32	0.06	1.58	0.65	1.00
苯乙基硫代葡萄糖苷	0.30	0.37	0.39	0.25	6	0.33	0.06	17.09	0.50	0.67	1.00	1.33
4-甲氧基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	0.68	0.75	0.54	0.54	6	0.63	0.09	14.92	0.56	1.33	1.00	1.00
1-甲氧基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	0.97	1.03	0.97	0.89	6	0.97	0.05	5.66	0.00	1.20	0.00	1.60
总量	9.48	10.79	9.98	8.56	6	9.70	0.83	8.56	0.27	1.31	0.34	1.37

注： <0.20：有检出但含量低于定量限。

表 10 白萝卜中硫代葡萄糖苷含量实验室间比对试验数据统计

硫代葡萄糖苷	实验室 1 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 2 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 3 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验室 4 ($\mu\text{mol/g DW}$)	实验 室内 重复 数	总平均值 ($\mu\text{mol/g DW}$)	标准 偏差	变异系 数%	实验室 1 Z 值	实验室 2 Z 值	实验室 3 Z 值	实验室 4 Z 值
4-甲基亚磺酰丁基硫代葡萄糖苷	<0.20	0.12	0.11	nd	6	0.11	0.01	9.07	-	1.00	0.00	-
4-甲基亚磺酰丁烯基硫代葡萄糖苷	5.45	5.48	5.14	5.92	6	5.50	0.32	5.86	0.16	0.06	1.13	1.31
4-羟基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	0.75	0.96	0.74	0.78	6	0.81	0.10	12.16	0.60	1.50	0.70	0.30
4-甲硫丁基硫代葡萄糖苷	0.77	0.83	0.82	0.75	6	0.79	0.04	4.60	0.50	1.00	0.75	1.00
4-甲硫基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷	27.21	28.69	29.71	28.40	6	28.50	0.91	3.20	1.42	0.21	1.33	0.11
4-甲氧基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	0.12	<0.20	<0.20	<0.20	6	0.12	0.01	4.35	0.00	-	-	-
总量	34.30	36.08	36.51	35.86	6	35.69	0.89	2.49	1.56	0.44	0.92	0.19

注： nd: 未检出； <0.20：有检出但含量低于定量限。

表 11 羽衣甘蓝粉中硫代葡萄糖苷含量实验室间比对试验数据统计

硫代葡萄糖苷	实验室 1 ($\mu\text{mol/g}$ DW)	实验室 2 ($\mu\text{mol/g}$ DW)	实验室 3 ($\mu\text{mol/g}$ DW)	实验室 4 ($\mu\text{mol/g}$ DW)	实验 室内 重复 数	总平均值 ($\mu\text{mol/g}$ DW)	标准 偏差	变异系 数%	实验室 1 Z 值	实验室 2 Z 值	实验室 3 Z 值	实验室 4 Z 值
3-甲基亚磺酰丙基硫代葡萄糖苷	0.62	0.55	0.70	0.59	6	0.62	0.06	10.02	0.00	1.17	1.33	0.50
2-羟基-3-丁烯基硫代葡萄糖苷	0.90	0.84	0.89	0.89	6	0.88	0.03	3.85	0.67	1.33	0.33	0.33
丙烯基硫代葡萄糖苷	0.26	0.28	0.26	0.31	6	0.28	0.02	8.91	1.00	0.00	1.00	1.50
4-甲基亚磺酰丁基硫代葡萄糖苷	0.73	0.80	0.81	0.73	6	0.76	0.04	5.70	0.75	1.00	1.25	0.75
3-丁烯基硫代葡萄糖苷	0.23	0.17	0.18	0.20	6	0.20	0.02	12.38	1.50	1.50	1.00	0.00
4-羟基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	<0.20	<0.20	<0.20	<0.20	6	<0.20	-	-	-	-	-	-
3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	0.37	0.42	0.34	0.33	6	0.37	0.04	10.10	0.00	1.25	0.75	1.00
4-甲氧基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	<0.08	<0.20	<0.20	<0.20	6	<0.20	-	-	-	-	-	-
1-甲氧基-3-吡啶甲基硫代葡萄糖苷	0.21	0.24	0.21	0.21	6	0.22	0.01	6.83	1.00	2.00	1.00	1.00
总量	3.31	3.29	3.40	3.24	6	3.31	0.09	2.81	0.00	0.22	1.00	0.78

注：<0.20：有检出但含量低于定量限。

四、采用国际标准和国外先进标准的程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况，或与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

无。

五、与有关的现行法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章，严格执行强制性国家标准和行业标准。与有关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调统一性的原则。本标准名称、内容及指标与现行国家标准之间不存在包含重复、交叉问题。

六、重大分歧意见的处理经过和依据

标准制定过程中技术路线和试验方案团队内部没有出现重大分歧意见。专家提出的意见和本标准征求意见稿文本内容无重大分歧。

七、标准作为强制性标准或推荐性标准的建议

本标准为化学分析方法标准，并不涉及有关国家安全、保护人体健康和人身财产安全、环境质量要求等有关强制性地方标准或强制性条文等的八项要求之一。因此，建议将本标准作为推荐性农业行业标准颁布实施。

八、贯彻标准的要求和措施建议

本标准为推荐性检测方法标准，不涉及强制内容，在农业行业正常颁布实施即可，标准归口单位可适时进行标准宣贯指导。

九、废止现行有关标准的建议

无。

十、其他应予说明的事项

无。