

团体标准

T/NAIA 0348-2024

黄芩中 7 种黄酮类物质含量的测定 高效液相色谱法

Determination of 7 flavanoids in astragalus High performance
liquid chromatography

2024-12-12 发布

2024-12-31 实施

宁夏化学分析测试协会 发布

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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所、宁夏食品检测研究院、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：刘霞、牛艳、杨静、王晓菁、石欣、吴燕、苟春林、张锋锋、李彩虹、杨春霞、王彩艳、陈翔、开建荣、张学玲、张小飞。

黄芩中 7 种黄酮类物质含量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了黄芩中黄酮类物质的液相色谱测定方法。

本文件适用于液相色谱法测定黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素、木犀草素、芹菜素、千层质素 A 的液相色谱法测定。

本文件的方法检出限：黄芩中黄芩苷、汉黄芩苷、黄芩素、汉黄芩素的方法检出限均为 0.075 mg/kg，木犀草素、芹菜素的方法检出限均为 0.15 mg/kg，千层质素 A 的方法检出限为 0.10 mg/kg。

2 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

3 术语和定义

本文件没有需要规定的术语和定义。

4 原理

试样中的黄酮类物质经 70% 甲醇超声提取，旋蒸近干，甲醇定容，微孔滤膜过滤，液相色谱仪检测和确证，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有规定外，所有试剂均为分析纯，水符合 GB/T 6682 中规定的一级水。

5.1 乙腈（ CH_3CN ）：色谱纯。

5.2 甲醇（ CH_3OH ）：色谱纯。

5.3 磷酸（ H_3PO_4 ）：分析纯。

5.4 黄芩苷（Baicalin, CAS 号 21967-41-9, 纯度 $\geq 98\%$ ）、木犀草素（Luteolin, CAS 号 491-70-3, 纯度 $\geq 98\%$ ）、汉黄芩苷（Wogonoside, CAS 号 51059-44-0, 纯度 $\geq 98\%$ ）、黄芩素（Baicalein, CAS 号 491-67-8, 纯度 $\geq 98\%$ ）、芹菜素（Apigenin, CAS 号 520-36-5, 纯度 $\geq 98\%$ ）、汉黄芩素（Wogonin, CAS 号 632-85-9, 纯度 $\geq 98\%$ ）和千层质素 A（Oroxylin A, CAS 号 480-11-5, 纯度 $\geq 98\%$ ）的液相色谱法测定。

5.5 标准储备溶液：分别准确称取黄芩苷、木犀草素、汉黄芩苷、黄芩素、芹菜素、汉黄芩素和千层质素 A 标准物质 10mg（精确至 0.0001g），用甲醇溶解并定容至 10.0mL，配制成 1000 mg/L 的标准储备液，0°C~4°C 贮存。

5.6 0.1%磷酸溶液（体积分数）：量取 1mL 磷酸，用水定容至 1000mL。

5.7 70%甲醇溶液（体积分数）：量取 700mL 甲醇，用水定容至 1000mL。

5.8 微孔滤膜：0.22 μm ，有机相。

5.9 离心管：50 mL。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱仪：配有紫外检测器。

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.0001 g。

6.3 高速万能粉碎机：10000 r/min。

6.4 超声波清洗机。

6.5 离心机：4000 r/min。

6.6 涡旋混合器。

6.7 旋转蒸发仪。

7 分析步骤

7.1 试样的制备

将试样去除杂质，60°C 烘箱中烘干 48h，用高速万能粉碎机粉碎，四分法分取，过 40 目筛，置于密封袋中备用。

7.2 试样的提取

平行做两份试样。称取试样 0.2 g（精确至 0.0001 g）于 50 mL 离心管，加入 40 mL 70% 甲醇溶液（5.7），充分振摇混匀，超声提取 30 min，放入离心机，4000 r/min 离心 3 min，过滤，再取残渣加入 40 mL 70% 甲醇溶液（5.7），重复提取一次，合并 2 次滤液，旋蒸后用甲醇（5.2）定容于 50mL 容量瓶中，经 0.22 μm 滤膜过滤，待测定。同试样进行空白试验，除不称取样品外，均按试样步骤进行。

7.3 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：C18 柱，250 mm \times 4.6 mm (i.d)，5 μm ，或性能相当者；

b) 柱温：40 °C；

c) 流速：0.8 mL/min；

d) 流动相：A 相为 0.1%磷酸溶液（5.6），B 相为乙腈，梯度洗脱条件见表 1；

e) 进样量：10.0 μL 。

f) 检测波长：280 nm。

表 1 流动相及其梯度条件 (V_A+V_B)

时间 (min)	流速 (mL/min)	V_A (%)	V_B (%)
0.00	0.8	90	10
15.00	0.8	75	25
25.00	0.8	65	35
45.00	0.8	45	55
53.00	0.8	25	75
60.00	0.8	90	10
65.00	0.8	90	10

7.4 标准曲线的绘制

用甲醇将7种黄酮标准储备溶液逐级稀释得到浓度为0mg/L、0.5mg/L、2.0mg/L、5.0mg/L、10mg/L、25mg/L、50mg/L、100mg/L的标准工作液。依次由低到高进行检测，以质量浓度为横坐标，以相应的峰面积为纵坐标进行线性回归，得到标准曲线方程。

7.5 测定

按照 7.3 给出的参考色谱条件，取标准工作溶液和样品定容液（7.2）依次上机进行检测，以色谱峰保留时间定性。

7.6 定量

采用外标-校准曲线法定量测定。保证所测样品中组分的响应值均在仪器的线性范围内。

8 结果计算

试样中黄芩苷、木犀草素、汉黄芩苷、黄芩素、芹菜素、汉黄芩素和千层质素A的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中被测物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

ρ —— 试样溶液中被测物的含量，单位为毫克每升（mg/L）；

V —— 试样定容溶液体积，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量的数值，单位为克（g）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 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超过算术平均值的 10%。

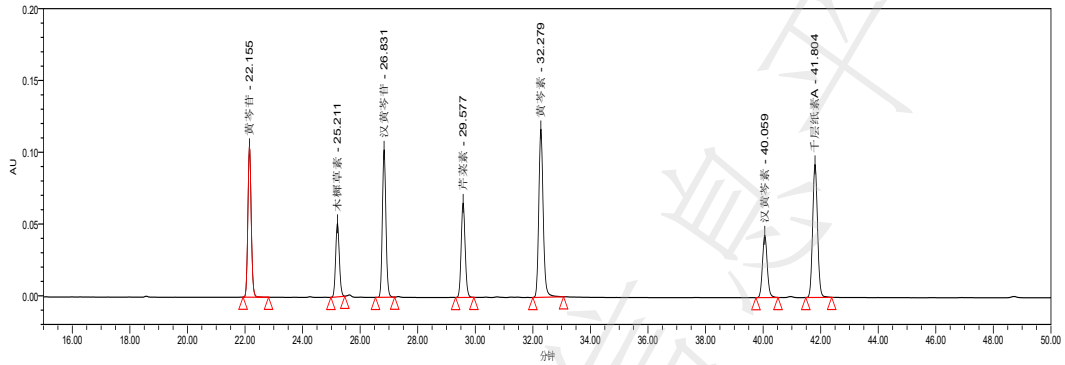
10 色谱图

标准溶液及样品中7种黄酮组分图谱见附录A。

附录 A
(资料性)

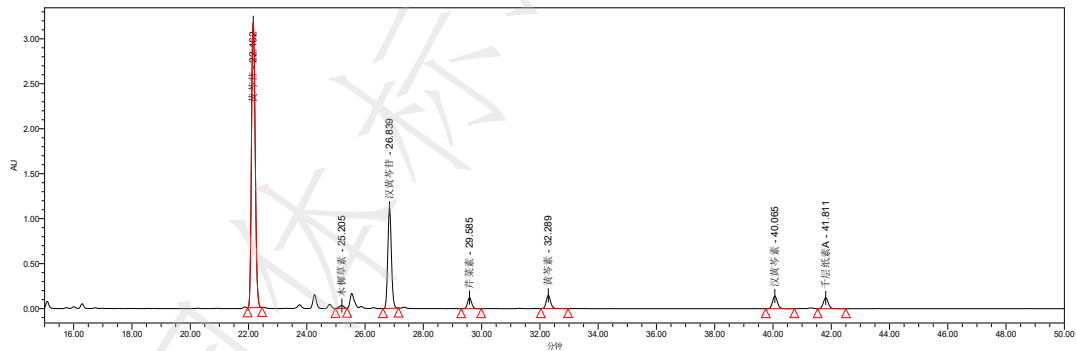
7种黄酮类物质的标准溶液色谱图和样品色谱图

A.1 7种黄酮类物质标准溶液20mg/L色谱图



图A.1 7种黄酮类物质标准溶液20mg/L色谱图

A.2 样品中7种黄酮类物质色谱图



图A.2 样品中7种黄酮类物质色谱图