

T/QAS

团 体 标 准

T/QAS 075—2022

黑果枸杞及其制品中花青素（花色苷）的含量测定 pH 示差法

2022 - 05 - 12 发布

2022 - 05 - 22 实施

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。

本文件由中国科学院西北高原生物研究所提出。

本文件由青海省标准化协会归口。

本文件起草单位：中国科学院西北高原生物研究所、青海省药品检验检测院、青海金麦杞生物科技有限公司。

本文件主要起草人：谭亮、李玉林、海平、陈涛、王环、杲秀珍、刘亚蓉、杨凤梅、云忠祥、冀恬、贺明珠、王硕、赵景阳、罗芳。

黑果枸杞及其制品中花青素（花色苷）的含量测定 pH 示差法

1 范围

本文件规定了黑果枸杞及其制品中花青素（花色苷）的含量测定——pH示差法的术语和定义、原理、试剂和材料、仪器和设备、分析步骤、数据处理、结果表示和精密度。

本文件适用于黑果枸杞鲜果、干果及其制品中花青素（花色苷）的测定，检出限和定量限如表1。

表1 黑果枸杞鲜果、干果及其制品中花青素（花色苷）测定的检出限和定量限

项目	检出限	定量限
黑果枸杞鲜果/（mg/100g）	7.04	21.3
黑果枸杞干果/（mg/100g）	28.2	85.3
黑果枸杞片/（mg/100g）	42.2	128.0
黑果枸杞提取物/（g/100g）	0.352	1.07
黑果枸杞冻干粉/（mg/100g）	70.4	213.3
黑果枸杞胶囊/（mg/100g）	42.2	128.0
黑果枸杞饮料/（mg/100mL）	0.633	1.92
黑果枸杞酒/（mg/100mL）	0.282	0.853

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实验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

黑果枸杞 *Lycium ruthenicum* Murr.

茄科（Solanaceae）枸杞属（*Lycium* L.）多棘刺灌木的球状或顶端稍有凹陷的紫黑色成熟果实。

3.2

花青素（花色苷） anthocyanins

花色素与糖以糖苷键结合而成的具有2-苯基苯并吡喃阳离子结构的类黄酮化合物。

4 原理

溶液pH不同,花青素的存在形式也不同。在 $\text{pH} \leq 3$ 时,其溶液呈现稳定的红色(花菁正离子),随着pH值增大,在 $\text{pH}=4 \sim 6$ 时,其溶液的颜色逐渐褪至无色(甲醇假碱和查尔酮),在 $\text{pH}=8 \sim 10$ 时变成紫色或蓝色(醌式(脱水)碱)。花青素发色团的结构转换是pH的函数,起干扰作用的褐色降解物的特性不随pH变化。根据朗伯-比耳定律,在两个不同的pH下,花青素溶液的吸光度差值与花青素的含量成正比。因此,通过两个pH,同一波长(以花青素最大可见吸收波长)下的吸光度差值以及在700 nm处测得的用于校正略微浑浊供试液的吸光度值可求得花青素含量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

5.1.1 试验用水应符合 GB/T 6682 规定的三级水。

5.1.2 氯化钾(KCl): 含量 $\geq 99.5\%$ 。

5.1.3 结晶乙酸钠($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$): 含量 $\geq 99.0\%$ 。

5.1.4 浓盐酸(HCl): 含量 $36.0\% \sim 38.0\%$ 。

5.1.5 无水乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$): 质量分数 $\geq 99.7\%$ 。

5.2 试剂配制

5.2.1 稀盐酸溶液(2 mol/L): 准确移取 16.6 mL 浓盐酸至 100 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。室温下保存,保存期 1 个月。

5.2.2 乙醇溶液(80%): 量取无水乙醇 800 mL 于 1 000 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。室温下保存,保存期 1 个月。

5.2.3 氯化钾缓冲溶液(0.025 mol/L, pH1.0): 称取 1.86 g 氯化钾固体(准确至 ± 1 mg)至 2 000 mL 烧杯中,加水约 980 mL 溶解,先加入浓盐酸 6 mL,然后用 2 mol/L 稀盐酸溶液调节溶液 pH 值至 1.0 ± 0.05 后,转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。室温下保存,保存期 3 个月。

5.2.4 乙酸钠缓冲溶液(0.4 mol/L, pH4.5): 称取 54.43 g 结晶乙酸钠固体(准确至 ± 1 mg)至 2 000 mL 烧杯中,加水约 960 mL 溶解,先加入浓盐酸 19 mL,然后用 2 mol/L 稀盐酸溶液调节溶液 pH 值至 4.5 ± 0.05 后,转移至 1 000 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。室温下保存,保存期 3 个月。

6 仪器和设备

6.1 分析天平: 感量 1 mg 和 0.1 mg。

6.2 紫外-可见分光光度仪: 配有 1 cm 比色皿。

6.3 pH 计: 精度 0.01。

6.4 超声波清洗机: 频率 40 KHz。

6.5 台式离心机: 转速 $\geq 8\ 000$ r/min。

6.6 食物粉碎机: 可将固体样品粉碎并通过 $425\ \mu\text{m}$ (40目)筛和 $250\ \mu\text{m}$ (60目)筛。

6.7 匀浆分散机: 转速 $\geq 15\ 000$ r/min。

7 分析步骤

7.1 试样制备

7.1.1 黑果枸杞鲜果

用四分法取适量或取全部，除去果、柄以外肉眼可见的黑果枸杞枝、叶、碎果、小石子、土颗粒等杂质后，用匀浆分散机以15 000 r/min转速匀浆分散20 s制成匀浆后，立即用于检测，如需加水应记录加水量。整个检测过程应在避光条件下进行，以下相同。

7.1.2 黑果枸杞干果

用四分法取适量或取全部，除去本文件7.1.1所述肉眼可见杂质后，取有代表性试样50 g~100 g，用食物粉碎机粉碎后，过40目筛，混匀后立即用于检测。

7.1.3 黑果枸杞片

用四分法取适量或取全部，取有代表性试样25 g~50 g，用食物粉碎机粉碎后，过60目筛，混匀后立即用于检测。

7.1.4 黑果枸杞提取物、冻干粉、胶囊

先将胶囊内容物倒出，然后将试样置于能容纳2~5倍试样体积的带盖容器中，通过反复振摇和颠倒容器使试样充分混匀均质后立即用于检测。

7.1.5 黑果枸杞饮料、酒等液体制品

通过反复振摇和颠倒盛装容器使试样充分混匀均质后立即用于检测。

7.2 供试品溶液制备

7.2.1 黑果枸杞固体、半固体试样溶液

7.2.1.1 称取一定量已处理试样（干果、冻干粉、片剂、胶囊内容物 0.5 g，鲜果匀浆 5.0 g，准确至 ± 1 mg；提取物 0.1 g，准确至 ± 0.1 mg），置于 150 mL 具塞磨口锥形瓶中，准确加入 50 mL 提取液（浓 HCl:80 %乙醇溶液 = 3:97, v/v），密塞，称定重量。

7.2.1.2 放入超声波清洗机中于 50 °C 超声提取 30 min，每隔 10 min 振摇 1 次，保持固相完全分散。

7.2.1.3 提取结束后冷却至室温，再次称定重量，用提取液补足减失的重量，混匀。取部分提取液以 8 000 r/min 离心 3 min，取上清液备用。

7.2.2 黑果枸杞液体试样溶液

7.2.2.1 准确移取已处理液体试样 1.0 mL~10 mL，置于 150 mL 具塞磨口锥形瓶中，准确加入 50 mL 提取液（浓盐酸:80 %乙醇溶液 = 3:97, v/v），密塞，称定重量。

7.2.2.2 放入超声波清洗机中于 50 °C 超声提取 10 min，每隔 3 min 振摇 1 次，保持液相完全分散。

7.2.2.3 按本文件 7.2.1.3 要求进行操作。

7.3 供试品检测溶液制备

7.3.1 黑果枸杞固体、半固体供试品检测溶液

7.3.1.1 按本文件 7.2.1 要求制备的供试品溶液先加入提取液（浓盐酸:80 %乙醇溶液 = 3:97, v/v）稀释 2~10 倍（含有 5 mg~60 mg 花青素），再用缓冲溶液稀释 5 倍，制备两份供试品检测溶液。

7.3.1.2 其中一份用氯化钾缓冲溶液（0.025 mol/L, pH1.0）稀释（1 mL 供试品溶液 + 4 mL 氯化钾缓冲溶液），另一份用乙酸钠缓冲溶液（0.4 mol/L, pH4.5）稀释（1 mL 供试品溶液 + 4 mL 醋酸钠缓冲溶液）。

7.3.2 黑果枸杞液体供试品检测溶液

按本文件7.2.2要求制备的供试品溶液先加入提取液（浓盐酸:80%乙醇溶液 = 3:97, v/v）稀释1~3倍（含有0.1 mg~0.3 mg花青素），再用缓冲溶液稀释5倍，制备2份供试品检测溶液。然后按本文件7.3.1.2要求进行操作。

7.4 测定

7.4.1 最大吸收波长

按本文件7.3要求制备的2份供试品检测溶液静置10 min后，在400 nm~600 nm波长之间进行部分可见波段扫描以确定最大吸收波长。

注：不同类别样品的花青素检测最大吸收波长参考值为 530 ± 2 nm。其中，黑果枸杞干果、饮料波长为528 nm，黑果枸杞鲜果波长为529 nm，黑果枸杞提取物、胶囊、酒波长为530 nm，黑果枸杞冻干粉波长为531 nm，黑果枸杞片波长为532 nm。

7.4.2 供试品检测溶液

分别在最大吸收波长和700 nm波长处分别测定用pH1.0缓冲溶液稀释的供试品检测溶液和用pH4.5缓冲溶液稀释的供试品检测溶液的吸光度值。

注：在700 nm处测定吸光度是用于校正略微浑浊的供试品检测溶液。但若供试品检测溶液混浊，则先通过离心或过滤使溶液澄清后再测定，以使微小的颗粒不会对花青素的测定造成影响。

8 数据处理

花青素（花色苷）的含量 X （以矮牵牛素类成分计），按公式（1）计算：

$$X = \frac{A \times MW \times DF \times V}{\epsilon \times l \times m \times 10} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X ——以矮牵牛素类成分计黑果枸杞及其制品中花青素（花色苷）的含量，单位为克每百克（g/100g）；

A ——pH1.0与pH4.5的供试品检测溶液的吸光度差值， $A = (A_{\max nm} - A_{700 nm})_{pH1.0} - (A_{\max nm} - A_{700 nm})_{pH4.5}$ ；

MW ——912.7，矮牵牛素类成分的平均摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）；

DF ——稀释因子；

V ——提取液总体积，单位为毫升（mL）；

ϵ ——29591，矮牵牛素类成分的平均摩尔消光系数，单位为升每摩尔厘米（L/（mol cm））；

l ——比色皿厚度，单位为厘米（cm）；

m ——称取试样的质量，单位为克（g）；

10——由g/kg换算为g/100g的转换因子。

9 结果表示

9.1 每个试样取两个平行样进行测定，以其算术平均值为测定结果。

9.2 花青素含量大于等于 1 g/100g 时，结果保留三位有效数字；花青素含量小于 1 g/100g 时，结果保留两位有效数字。

10 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10 %。

全国团体标准信息平台