

T B

团体标准

T/ NAIA×××- ××××

枸杞中 5 种黄酮类化合物的测定 液相色谱法

2022-× ×-× ×发布

2022-× ×-× ×实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前 言

本标准按照 GB/T1.1-2020 给出的规则起草。

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：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监管重点实验室（枸杞和葡萄酒质量安全））、宁夏回族自治区标准化研究院、宁夏化学分析测试协会、宁夏农产品质量标准与检测技术研究所。

本文件主要起草人：李瑞雪、王泽岚、朱捷、龚慧、路敏、王紫昕、刘继辉、王琛、陈盼盼、吴明、吕毅、马桂娟、葛谦、张小飞。本文件为首次发布。

枸杞中 5 种黄酮类化合物的测定 液相色谱法

1 范围

本文件规定了枸杞中 5 种黄酮类化合物含量的液相色谱法。

本文件适用于枸杞中杨梅素、二氢杨梅素、木犀草素、柚皮素、芸香柚皮素含量的测定和确证。

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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

样品经甲醇水溶液提取，超声离心，采用液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明，所用试剂均为分析纯，水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈(CH_3CN)：色谱纯。

5.1.2 甲醇(CH_3OH)：色谱纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 70%甲醇溶液：准确移取 700 mL 甲醇（5.1.2）至 1000 mL 容量瓶中，用水定容。

5.3 标准品

5.3.1 杨梅素（CAS 号：529-44-2）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.3.2 二氢杨梅素（CAS 号：27200-12-0）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.3.3 木犀草素（CAS 号：491-70-3）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.3.4 芸香柚皮素（CAS 号：14259-46-2）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.3.5 柚皮素（CAS 号：480-41-1）：纯度 $\geq 95\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准品。

5.4 标准溶液制备

5.4.1 标准储备液（10 mg/mL）：准确称取适量的标准物质（5.3），分别用甲醇（5.1.2）制备浓度为 10 mg/mL 的标准储备液。标准储备液在 -18°C 及以下避光保存。

5.4.2 混合标准中间液（1 mg/mL）：吸取上述标准储备液（5.4.1）各 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，摇匀，制备浓度为 1 mg/mL 混合标准中间液。

5.4.3 标准系列工作液：移取适量混合标准中间液（5.4.2），用 70 % 甲醇溶液（5.2.1）稀释成浓度为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作溶液。临用现配。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱仪：带紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平：感量为 0.00001 g 和 0.01 g。

6.3 高速离心机：15000 r/min。

6.4 涡旋混合器。

6.5 超声波振荡器。

6.6 0.45 μm 滤膜。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取约 200 g 样品于匀浆机中匀浆。制得样品在 -18°C 下保存。

7.2 试样的提取

称取 5 g（精确至 0.01 g）试样于 50 mL 塑料离心管中，加入 20 mL 70 % 甲醇溶液（5.2.1），涡旋混匀 1 min，超声提取 20 min。转入 25 mL 容量瓶中，用 70% 甲醇溶液（5.2.1）定容至刻度并充分混匀后，转入离心管，15000 r/min 离心 5 min，取上清液过 0.45 μm 滤膜，滤液待上机测定。

7.3 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：C8 色谱柱（250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μm ），或同等性能色谱柱；

b) 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ ；

c) 检测波长：290 nm（芸香柚皮素、柚皮素、二氢杨梅素），260 nm（杨梅素、木犀草素）；

d) 进样量：10 μL ；

e) 流速：1.0 mL/min；

f) 流动相 A：水，流动相 B：乙腈（5.1.1）。梯度洗脱条件见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	90	10
10.0	90	10
20.0	80	20
30.0	70	30
40.0	20	80
44.0	20	80
44.1	90	10
48.0	90	10

7.4 测定

7.4.1 标准曲线测定

将标准系列工作液分别注入液相色谱仪中，测定相应物质的峰面积，以标准系列工作液中该物质的浓度为横坐标，以该物质峰面积的响应值为纵坐标，绘制标准曲线。5 种标准物质溶液的液相色谱图参见附录 A。

7.4.2 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，得到对应的峰面积，根据标准曲线计算得到待测液中各物质的浓度。

8 分析结果的表述

试样中黄酮类化合物的含量按式（1）计算。

$$X = \frac{(C - C_0) \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —试样中黄酮类化合物的含量，单位为微克每千克（mg/kg）；

C —由标准曲线计算得到的待测液中黄酮类化合物浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V —样品测定液总体积，单位为毫升（mL）；

m —试样的质量，单位为克（g）；

计算结果保留 2 位有效数字。

9 定量限

本方法的检出限：二氢杨梅素、柚皮素、木犀草素、杨梅素为 1.5 mg/kg，柚皮素为 0.6 mg/kg。定量限：二氢杨梅素、柚皮素、木犀草素、杨梅素为 5.0 mg/kg，柚皮素为 2.0 mg/kg。

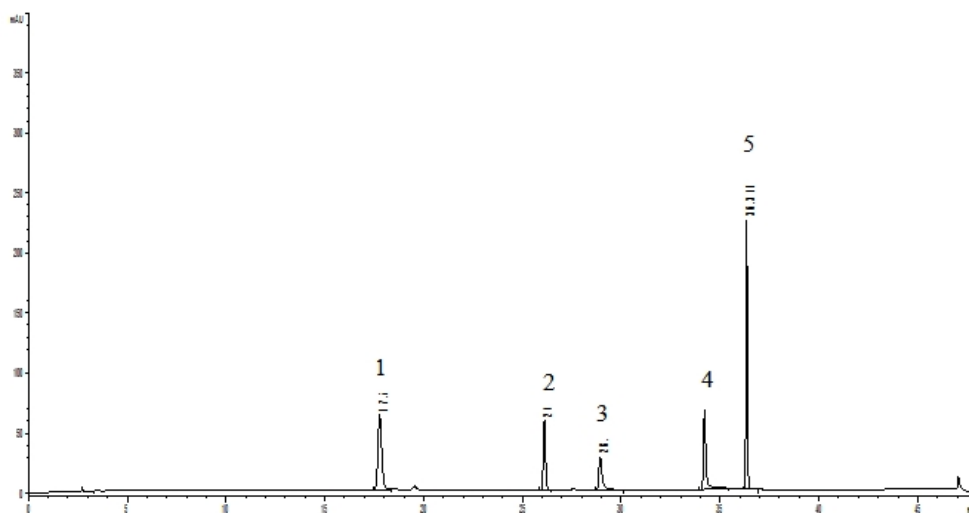
10 精密度

在重复性测定条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过其算术平均值的 10%。

附录 A
(资料性)

5 种黄酮类化合物标准溶液色谱图

5 种黄酮类化合物标准溶液 (100.0 $\mu\text{g/mL}$) 的液相色谱图见图 A.1。



标引序号说明:

- 1—二氢杨梅素;
- 2—芸香柚皮素;
- 3—杨梅素;
- 4—木犀草素;
- 5—柚皮素;

图 A.1 5 种黄酮类化合物标准溶液 (100.0 $\mu\text{g/mL}$) 液相色谱图