

ICS 67.060
CCS X 10

团 体 标 准

T/CCOA XXXX—XXXX

全谷物食品中多酚含量的测定 分光光度法

Determination of polyphenol content in whole grain foods
spectrophotometry

(征求意见稿)

20XX - XX - XX 发布

20XX - XX - XX 实施

中国粮油学会 发布

目 次

前 言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂和材料	1
5.1 试剂	1
5.2 标准品	1
5.3 试剂配制	2
5.4 没食子酸标准溶液配制	2
6 仪器和设备	2
7 分析步骤	2
7.1 试样处理	2
7.2 游离态多酚提取	2
7.3 结合态多酚提取	3
7.4 多酚含量测定	3
8 分析结果的表述	3
8.1 试样中游离态多酚含量和结合态多酚的计算	3
8.2 试样中总多酚含量的计算	3
9 精密度	4
10 检出限和定量限	4
11 其他	4
附录 A	5

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。

本文件由中国粮油学会提出并归口。

本文件起草单位：中南林业科技大学，湖南助农米业有限公司。

本文件主要起草人：徐友志、林亲录、黄庆明、廖娟、曾欣怡、胡剑、梁慧兰、黄睿博、薛云航、袁瑞博、易智豪、杨谷良、丁玉琴、李江涛、刘春、梁盈。

全谷物食品中多酚含量的测定 分光光度法

1 范围

本文件规定了全谷物食品中游离态多酚、结合态多酚以及总多酚的分光光度测定方法。。
本文件适用于全谷物食品中游离态多酚、结合态多酚以及总多酚含量的测定。

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

用乙醇水溶液超声提取试样中的游离态多酚和氢氧化钠溶液解离的结合态多酚，利用福林酚试剂将多酚中的羟基氧化生成蓝色复合物，在 760 nm 处产生最大吸收，通过分光光度计测定吸光度值，计算多酚的含量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的二级水。

5.1 试剂

- 5.1.1 石油醚（沸程 30–60 °C）。
- 5.1.2 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$ ）。
- 5.1.3 氢氧化钠（NaOH）。
- 5.1.4 浓盐酸（HCl，含量：36.0-38.0%）
- 5.1.5 无水碳酸钠（ Na_2CO_3 ）。
- 5.1.6 无水乙醇（ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ）。
- 5.1.7 甲醇（ CH_3OH ）。
- 5.1.8 福林酚试剂（Folin-Phenol, 1.0 mol/L）

5.2 标准品

没食子酸标准品（ $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5$ ，CAS 号为 149-91-7，纯度 $\geq 99\%$ ，或其他经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3 试剂配制

- 5.3.1 氢氧化钠溶液（0.5 mol/L）：称取 10.0 g 氢氧化钠（5.1.3），溶于水并稀释至 500 mL。
- 5.3.2 盐酸溶液（6.0 mol/L）：量取 25.00 mL 浓盐酸（5.1.4）置入 50 mL 容量瓶中，用水定容至刻度。
- 5.3.3 碳酸钠溶液（1.0 mol/L）：称取 10.600 g 无水碳酸钠（5.1.5），溶于水并稀释至 100 mL。
- 5.3.4 乙醇提取液（乙醇含量为 70%）：量取 70 mL 无水乙醇，加入 30 mL 水混匀。
- 5.3.5 萃取液：分别量取等体积的石油醚（5.1.1）和乙酸乙酯（5.1.2）混匀。

5.4 没食子酸标准溶液配制

5.4.1 没食子酸标准储备液（0.5 mg/mL）

准确称取 25.0 mg 没食子酸标准品（5.2）（精确至 0.0001 g），置入 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（5.1.7）溶解并定容至刻度，得到浓度为 0.5 mg/mL 的没食子酸标准储备液，4 °C 保存，有效期 1 个月。

5.4.2 没食子酸标准工作溶液

分别量取 0.00、1.00、2.00、3.00、4.00、6.00、8.00 和 10.00 mL 没食子酸标准储备液（5.4.1）置入 50 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（5.1.7）定容至刻度，震荡摇匀，即得 10~100.0 µg/mL 系列肽标准溶液。现用现配。

6 仪器和设备

- 6.1 分光光度计（190-1100 nm）。
- 6.2 离心机（≥6000 r/min）。
- 6.3 分析天平（感量 0.000 1 g，感量 0.001 g）。
- 6.4 数控超声波清洗器。
- 6.5 涡旋振荡器。
- 6.6 温控氮吹仪。
- 6.7 高速粉碎机。
- 6.8 不锈钢过滤筛（100 目）。

7 分析步骤

7.1 试样处理

取适量试样，置于高速粉碎机粉碎，过 100 目不锈钢过滤筛，混合均匀。准确称取 1.0 g 试样（精确至 0.0001 g）于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 乙醇提取液（5.2.4）放入超声波清洗器中超声提取 30 min，后 5000 r/min 离心 10 min，沉淀用 10 mL 乙醇提取液（5.2.4）重复提取 2 次，合并上清液，沉淀仍然留在 50 mL 离心管中，备用。

7.2 游离态多酚提取

将上清液（7.1）转移至 100 mL 分液漏斗中，加入 25 mL 萃取液（5.3.5），剧烈摇晃，静置，溶液分层后取上层液，下层液用萃取液（5.3.5）重复萃取 3 次。合并上层液，于 30-10 °C 下氮吹至干，用 10 mL 甲醇（5.1.7）复溶后得到游离态多酚待测液，4 °C 下冷藏备用。

7.3 结合态多酚提取

往装有沉淀的 50 mL 离心管 (7.1) 中加入 10 mL NaOH 溶液 (5.3.1), 用氮气通过试管口冲洗 25 s 后尽可能快速地将离心管盖紧, 于 40 °C 下避光碱解 6 h。用盐酸溶液 (5.3.2) 调节 pH 至 2.0, 5000 r/min 离心 30 min, 取上清液。沉淀加入 10 mL 乙醇提取液 (5.2.4) 放入超声波清洗器中超声提取 30 min, 5000 r/min 离心 10 min, 取上清液。重复提取 2 次, 合并上清液。将上清液转移至 100 mL 分液漏斗中, 加入 25 mL 萃取液 (5.3.5), 剧烈摇晃, 静置, 溶液分层后取上层液, 下层液用萃取液 (5.3.5) 重复萃取 3 次。合并上层液, 于 30-10 °C 下氮吹至干, 用 10 mL 甲醇 (5.1.7) 复溶后得到结合态多酚待测液, 4 °C 下冷藏备用。

7.4 多酚含量测定

7.4.1 标准曲线的绘制

分别量取没食子酸系列工作溶液 0.40 mL 置入 10 mL 具塞比色管中, 加入 2.40 mL 水, 0.40 mL Folin-Phenol 试剂 (5.1.8), 摇匀, 静置 6 min, 再各加入 1.60 mL 碳酸钠溶液, 摇匀, 静置 60 min, 再加入 5.20 mL 水, 摇匀, 移入 1 cm 比色皿中, 于 760 nm 波长处测定吸光度。以没食子酸标准溶液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线、计算线性方程和相关系数。

7.4.2 样品测定

吸取 0.40 mL 游离态多酚待测液 (7.2) 或结合态多酚待测液 (7.3) 置入 10 mL 具塞比色管中, 加入 2.40 mL 水, 0.40 mL Folin-Phenol 试剂 (5.1.8), 摇匀, 静置 6 min, 再加入 1.60 mL 碳酸钠溶液, 震荡摇匀, 于室温条件下静置 60 min, 再加入 5.20 mL 水, 摇匀, 移入 1 cm 比色皿中, 于 760 nm 波长处测定吸光度, 根据线性方程计算游离态多酚含量或结合态多酚含量。

8 分析结果的表述

8.1 试样中游离态多酚含量和结合态多酚含量的计算

试样中游离态多酚含量和结合态多酚含量按式 (1) 计算。

$$X = \frac{C \times V \times f}{m \times 1000} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中:

- X —— 多酚含量 (mg/100 g);
 C —— 标准曲线计算的多酚浓度 ($\mu\text{g/mL}$);
 V —— 试样最终定容体积;
 f —— 稀释倍数;
 m —— 试样质量 (g)。

计算结果保留三位有效数字。

8.2 试样中总多酚含量的计算

试样中总多酚含量按式 (2) 计算。

$$X_{\text{总}} = X_{\text{游}} + X_{\text{结}} \dots \dots \dots (2)$$

式中:

$X_{\text{总}}$ ——试样中总多酚含量 (mg/100 g) ;

$X_{\text{游}}$ ——试样中结合态多酚含量 (mg/100 g) ;

$X_{\text{结}}$ ——试样中游离态多酚含量 (mg/100 g) 。

计算结果保留三位有效数字。

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得超过算术平均值的 10%。

10 检出限和定量限

当取样量为 1.0 g 时, 本方法检出限为 1.4 mg/100 g, 定量限为 4.2 mg/100 g。

11 其他

没食子酸标准曲线参见附录A。

附录 A

标准曲线示例

以没食子酸标准品为例，标准曲线回归方程为： $A=0.0072\times C-0.0029$ ，相关系数 $R^2 = 0.9996$ （其中： A 为吸光度， C 为没食子酸标准溶液的浓度）。

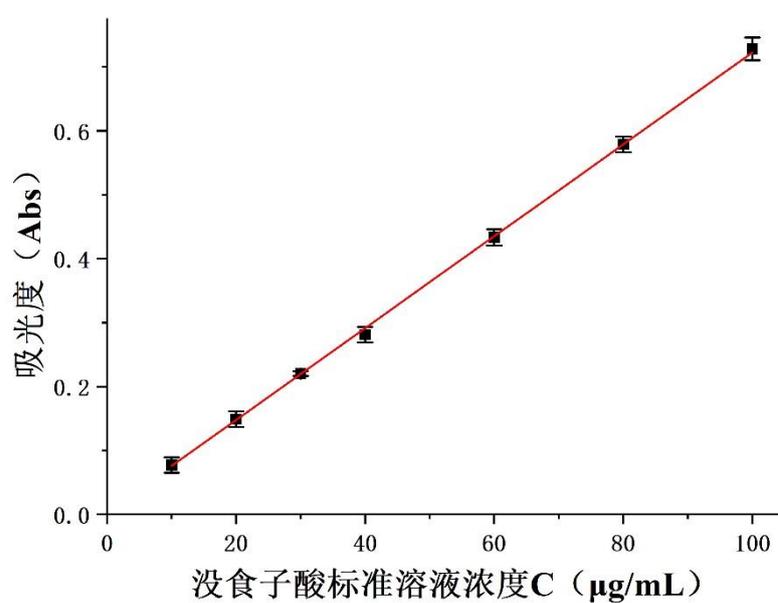


图 1 没食子酸标准曲线图。