

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2795—2015

苹果中主要酚类物质的测定 高效液相色谱法

**Determination of major phenolic compounds in apple—
High performance liquid chromatography**

2015-05-21 发布

2015-08-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部加工局提出并归口。

本标准起草单位：中国农业科学院农产品加工研究所、中国农业科学院果树研究所。

本标准主要起草人：刘璇、毕金峰、陈芹芹、吴昕烨、邓健康、聂继云、易建勇、周林燕、郑金铠、周沫、李静。

苹果中主要酚类物质的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了苹果中主要酚类物质的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于苹果中没食子酸、原儿茶酸、新绿原酸、原花青素 B1、儿茶素、绿原酸、原花青素 B2、咖啡酸、表儿茶素、p-香豆酸、芦丁、阿魏酸、槲皮苷、根皮苷、槲皮素和根皮素等单个或多个组分含量的测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 原理

苹果中的主要酚类物质经乙醇溶液提取，C₁₈固相萃取柱净化、定容，微孔滤膜过滤，高效液相色谱法测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，本标准所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 乙醇(CH₃CH₂OH, CAS号:64-7-5)。

4.1.2 乙腈(CH₃CN, CAS号:75-05-8)，色谱纯。

4.1.3 甲醇(CH₃OH, CAS号:67-56-1)，色谱纯。

4.1.4 甲酸(HCOOH, CAS号:64-18-6)，色谱纯。

4.2 试剂配制

4.2.1 乙醇溶液(8+2):取 80 mL 乙醇(4.1.1)加入 20 mL 水中，混匀。

4.2.2 甲酸溶液(2%，体积分数):取 2 mL 甲酸(4.1.4)，用水稀释至 100 mL。

4.2.3 甲酸—乙腈溶液(95+5):取 95 mL 甲酸溶液(4.2.2)，加入 5 mL 乙腈中，混匀。

4.3 标准品

4.3.1 没食子酸(C₇H₆O₅)，纯度≥98%。

4.3.2 原儿茶酸(C₇H₆O₄)，纯度≥99%。

4.3.3 新绿原酸(C₁₆H₁₈O₉)，纯度≥98%。

4.3.4 原花青素 B1(C₃₀H₂₆O₁₂)，纯度≥95%。

4.3.5 儿茶素(C₁₅H₁₄O₆)，纯度≥98%。

4.3.6 绿原酸(C₁₆H₁₈O₉)，纯度≥95%。

4.3.7 原花青素 B2(C₃₀H₂₆O₁₂)，纯度≥98%。

- 4.3.8 咖啡酸($C_9H_8O_4$),纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.3.9 表儿茶素($C_{15}H_{14}O_6$),纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.3.10 p-香豆酸($C_9H_8O_3$),纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.3.11 芦丁($C_{27}H_{30}O_{16}$),纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.3.12 阿魏酸($C_{10}H_{10}O_4$),纯度 $\geq 99\%$ 。
- 4.3.13 槲皮苷($C_{21}H_{20}O_{11}$),纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.3.14 根皮苷($C_{21}H_{28}O_{12}$),纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.3.15 槲皮素($C_{15}H_{14}O_9$),纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.3.16 根皮素($C_{15}H_{14}O_5$),纯度 $\geq 99\%$ 。

4.4 标准溶液配制

- 4.4.1 2 mg/mL 单一酚类物质标准储备溶液:分别准确称取酚类物质标准品(4.3)10 mg(精确到0.000 1 g),于5 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(4.1.3)溶解并稀释至刻度,配制成质量浓度为2 mg/mL 的单一酚类物质标准储备溶液。—20℃以下避光贮存,有效期一个月。
- 4.4.2 0.1 mg/mL 酚类物质混合标准中间溶液:分别准确吸取0.1 mL 单一酚类物质标准储备溶液(4.4.1)于2 mL 棕色容量瓶中,用甲醇(4.4)稀释至刻度,配置成质量浓度为0.1 mg/mL 酚类物质混合标准中间溶液。—20℃以下避光贮存,有效期一周。
- 4.4.3 酚类物质标准工作溶液:分别吸取酚类物质混合标准中间溶液(4.4.2)0.02 mL、0.1 mL、0.2 mL、0.4 mL、1.0 mL 至2 mL 棕色容量瓶中,用甲酸—乙腈溶液(4.2.3)定容至刻度,配制成质量浓度为1 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、20 mg/L 和 50 mg/L 的系列混合标准工作溶液。现配现用。

4.5 材料

- 4.5.1 C_{18} 固相萃取柱。
- 4.5.2 滤膜:0.45 μm ,有机相。

5 仪器

- 5.1 液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 5.2 分析天平:感量0.000 1 g、感量0.01 g。
- 5.3 研磨仪。
- 5.4 离心机:转速可达到10 000 r/min。
- 5.5 漩涡混合器。
- 5.6 旋转蒸发器。
- 5.7 超声波萃取仪:工作频率40 kHz,功率500 W。
- 5.8 固相萃取器。
- 5.9 圆底烧瓶:100 mL。
- 5.10 聚四氟乙烯离心管:50 mL。

6 试样制备与保存

将苹果样品,用干净纱布轻轻将样品表面擦净,按取样要求取200 g 样品采用对角线分割法,取对角部分,将其切碎,充分混均,再用四分法取样,用液氮冷冻后,于研磨仪中研磨成粉末,装入聚乙烯塑料瓶,—20℃以下保存,备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取试样 5 g(精确到 0.01 g)于 50 mL 聚四氟乙烯离心管中,加入 20 mL 乙醇溶液(4.2.1),用漩涡混合器充分混合,室温下超声提取 15 min,以 10 000 r/min 转速、4℃ 离心 10 min,上清液倒入 50 mL 棕色容量瓶中,重复提取 1 次,上清液合并转入 50 mL 棕色容量瓶中,用乙醇溶液(4.2.1)定容至 50 mL,备用。

7.2 浓缩

准确吸取 10 mL 样品提取液(7.1)于 100 mL 圆底烧瓶中,在旋转蒸发器上减压蒸发至除去乙醇,温度 $\leq 40^{\circ}\text{C}$,待净化。

7.3 净化

将 C_{18} 固相萃取柱放在固相萃取器上,依次用 5 mL 甲醇(4.1.3)和 5 mL 水活化,控制流速 1 mL/min。将待净化液(7.2)加入固相萃取柱中,用 5 mL 水清洗旋转蒸发后的圆底烧瓶,加入固相萃取柱中,用 3 mL 水淋洗,弃去;再用 5 mL 甲醇(4.1.3)分 2 次清洗圆底烧瓶,加入到固相萃取柱中,收集洗脱液至 10 mL 棕色容量瓶中并定容,过 0.45 μm 有机相微孔滤膜,供高效液相色谱测定。

7.4 液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 色谱柱,4.6 mm $\times$ 250 mm,粒径 5 μm ,或相当者;

流动相:A 为 2% 甲酸溶液,B 为乙腈,用前过 0.45 μm 滤膜,脱气,梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序(V_A+V_B)

时间 min	A	B
0	95	5
30	75	25
45	60	40
50	60	40
51	95	5
60	95	5

柱温: 40°C ;

流速:0.8 mL/min;

检测波长:280 nm,320 nm,360 nm;

进样量:10 μL 。

苹果中各主要酚类物质在其最佳定量波长下进行检测,各酚类物质的最佳定量波长见附录 A。

7.5 标准工作曲线

分别吸取 10 μL 标准工作液(4.13)注入高效液相色谱仪,按参考色谱条件测定。以测得峰面积为纵坐标,对应的标准溶液质量浓度(mg/L)为横坐标,绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

7.6 测定

做 3 份试料的平行测定,取 10 μL 试样溶液和相应的标准工作溶液在与标准相同的色谱条件下进行测定,以色谱峰保留时间定性,以色谱峰峰面积定量。标准工作溶液的高效液相色谱图参见附录 B。同时做空白试验,除不称取试料外,均按 7.1~7.3 操作步骤进行测定。

8 结果计算

苹果中被测酚类物质以质量分数计,单位以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算。

$$X = \frac{A \times \rho_s \times V_0 \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X ——试料中某一酚类物质的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ_s ——标准工作溶液中某一酚类物质组分的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);

A ——试样溶液中某一酚类物质组分的峰面积;

A_s ——标准溶液中某一酚类物质组分的峰面积;

V_0 ——试料中酚类物质提取液定容体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——过 C_{18} 固相萃取柱所用酚类物质提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 —— C_{18} 固相萃取柱净化后定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试料的质量,单位为克(g);

计算结果保留三位有效数字。

9 精密度

9.1 重复性

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 20%。

9.2 再现性

在再现性条件下,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 20%。

10 其他

本标准的定量测定范围:没食子酸、原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、p-香豆酸、芦丁、阿魏酸、槲皮苷、根皮苷和根皮素均为 0.25 mg/kg~100 mg/kg;

儿茶素和槲皮素均为 0.5 mg/kg~100 mg/kg;

原花青素 B1、原花青素 B2 和表儿茶素均为 1 mg/kg~100 mg/kg。

本标准方法的检出限:没食子酸、原儿茶酸、新绿原酸、绿原酸、咖啡酸、p-香豆酸、芦丁、阿魏酸、槲皮苷、根皮苷和根皮素为 0.12 mg/kg,儿茶素和槲皮素为 0.25 mg/kg,原花青素 B1、原花青素 B2 和表儿茶素为 0.5 mg/kg。

附 录 A
(规范性附录)
苹果多酚定量波长

苹果多酚定量波长见表 A.1。

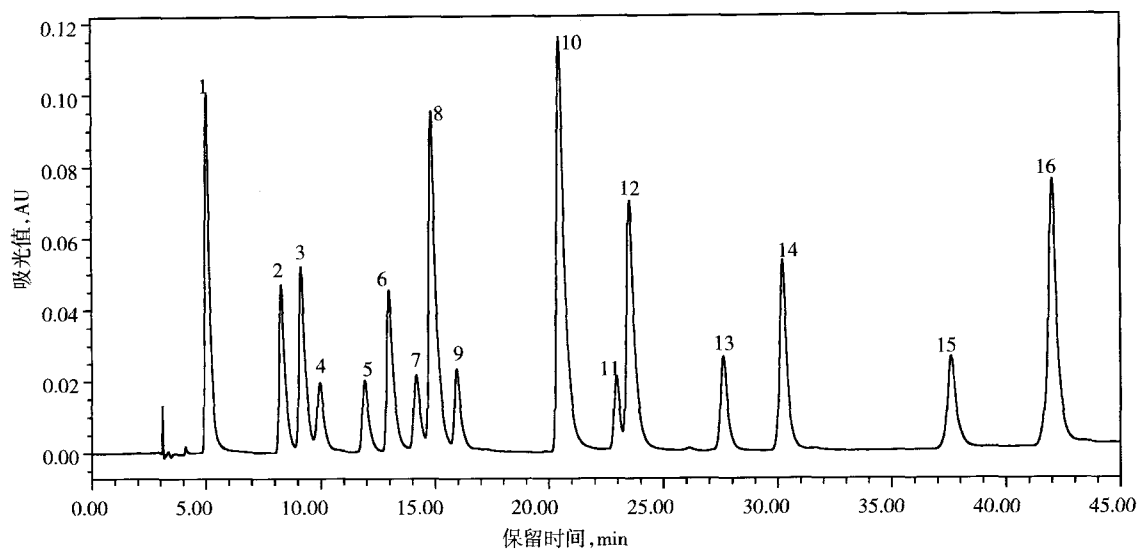
表 A.1 苹果多酚定量波长

序号	中文名	CAS 号	定量波长 nm
1	没食子酸	149-91-7	280
2	原儿茶酸	99-50-3	280
3	新绿原酸	906-33-2	320
4	原花青素 B1	20315-25-7	280
5	儿茶素	154-23-4	280
6	绿原酸	327-97-9	320
7	原花青素 B2	29106-49-8	280
8	咖啡酸	331-39-5	320
9	表儿茶素	490-46-0	280
10	p-香豆酸	501-98-4	320
11	芦丁	153-18-4	360
12	阿魏酸	537-98-4	320
13	槲皮苷 (槲皮素-鼠李糖苷)	522-12-3	360
14	根皮苷	7061-54-3	280
15	槲皮素	6151-25-3	360
16	根皮素	60-82-2	280

附录 B
(资料性附录)
标准溶液色谱图

B.1 50 mg/L 苹果酚类物质混合标准溶液色谱图(280 nm)

见图 B.1。



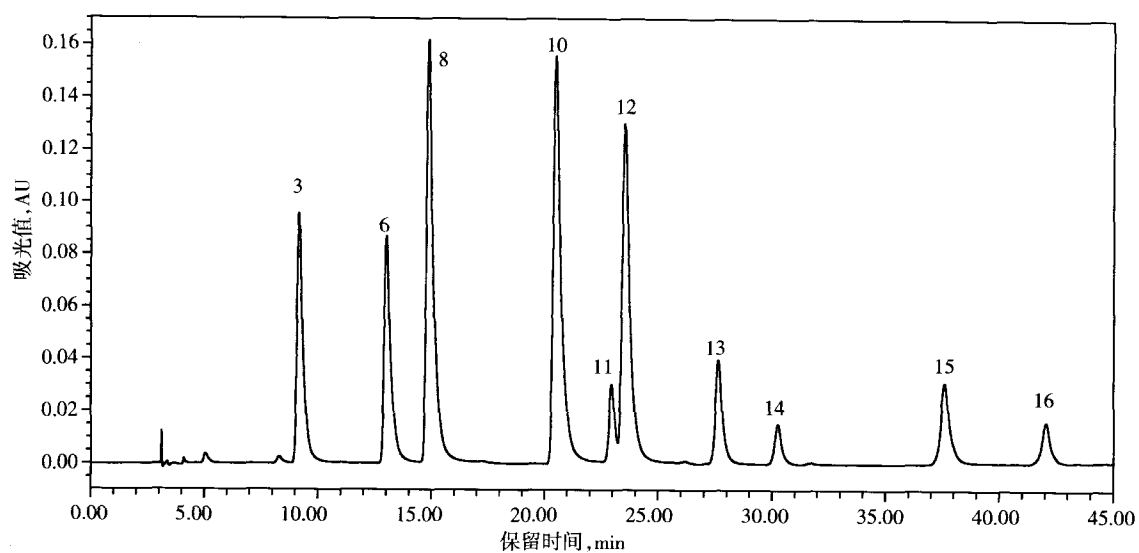
说明:

- | | |
|-------------|------------|
| 1——没食子酸; | 9——表儿茶素; |
| 2——原儿茶酸; | 10——p-香豆酸; |
| 3——新绿原酸; | 11——芦丁; |
| 4——原花青素 B1; | 12——阿魏酸; |
| 5——儿茶素; | 13——槲皮苷; |
| 6——绿原酸; | 14——根皮苷; |
| 7——原花青素 B2; | 15——槲皮素; |
| 8——咖啡酸; | 16——根皮素。 |

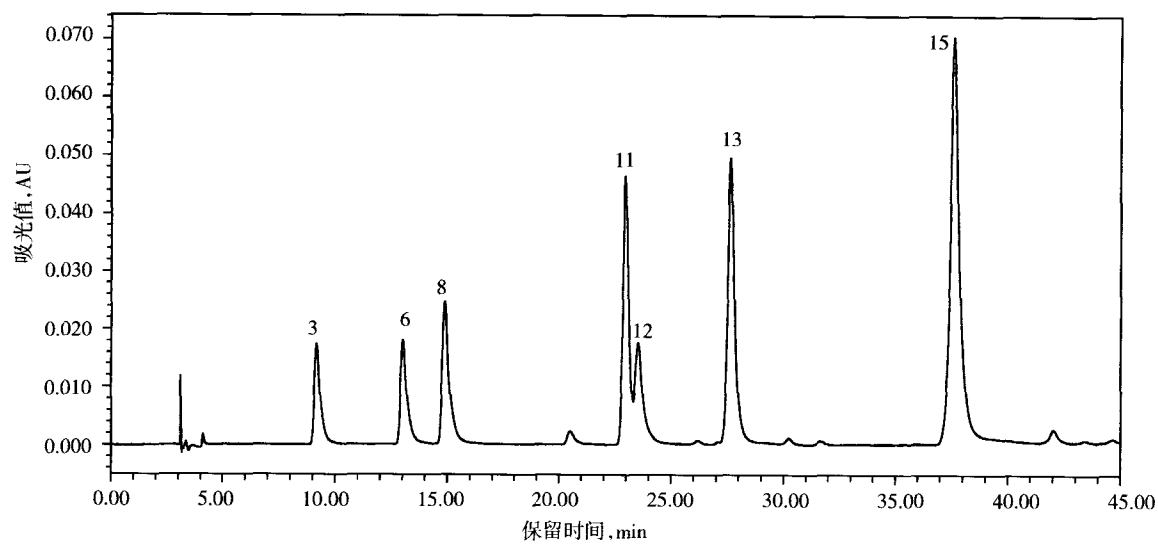
图 B.1 50 mg/L 苹果酚类物质混合标准溶液色谱图(280 nm)

B.2 50 mg/L 苹果酚类物质混合标准溶液色谱图(320 nm)

见图 B.2。

**图 B.2 50 mg/L 苹果酚类物质混合标准溶液色谱图(320 nm)****B.3 50 mg/L 苹果酚类物质混合标准溶液色谱图(360 nm)**

见图 B.3。

**图 B.3 50 mg/L 苹果酚类物质混合标准溶液色谱图(360 nm)**