

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2741—2015

仁果类水果中类黄酮的测定 液相色谱法

Determination of flavonoids in pome fruits—
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。

本标准由农业部种植业管理司提出。

本标准由全国果品标准化技术委员会(SAC/TC 510)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院果树研究所、农业部果品及苗木质量监督检验测试中心(兴城)。

本标准主要起草人:李静、聂继云、李志霞、李海飞、徐国锋、闫震、匡立学、毋永龙。

仁果类水果中类黄酮的测定 液相色谱法

1 范围

本标准规定了液相色谱法测定仁果类水果中类黄酮的方法。

本标准适用于仁果类水果(苹果、梨和山楂)中主要类黄酮含量的测定。

本标准的方法检出限和定量限见附录 A。

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

仁果类水果中的类黄酮物质经乙醇溶液超声提取后,经固相萃取小柱净化,在反相 C18 色谱柱上分离后,用紫外/二极管阵列检测器检测,外标法定量。

4 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 规定的一级水。

4.1 试剂

4.1.1 盐酸(HCl):优级纯。

4.1.2 甲酸(CH_2O_2):色谱纯。

4.1.3 甲醇(CH_4O):色谱纯。

4.1.4 乙醇($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)。

4.1.5 乙腈($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$):色谱纯。

4.1.6 80%乙醇溶液:取乙醇(4.1.4)800 mL,加入 200 mL 水,超声 2 min 混匀。

4.2 标准品

23 种类黄酮标准品:纯度 $\geq 98\%$,名称见附录 A。

4.3 标准溶液配制

4.3.1 单一组分标准溶液:准确称取类黄酮标准品各 5.0 mg,甲醇定容至 10.0 mL,配制成 500 mg/L 标准储备液, -18°C 以下贮存,备用。

4.3.2 混合标准溶液:混合标准溶液分为 3 组,其中组 I 和组 III 用于苹果和山楂果实中类黄酮的定量,组 II 和组 III 用于梨果实中类黄酮的定量。按照附录 A 中组别,根据各种黄酮类物质在仪器上的响应值,逐一吸取一定体积的单一组分标准溶液配制成混合标准溶液,再稀释成不同质量浓度的混合标准溶液,用于制作标准工作曲线,混合标准溶液现用现配。

4.4 材料

4.4.1 有机相微孔滤膜:0.22 μm 。

4.4.2 C18 固相萃取小柱:200 mg,6 mL。

5 仪器

- 5.1 液相色谱仪:配有二极管阵列检测器或紫外检测器。
- 5.2 电子天平:感量为 0.01 g 和 0.000 1 g。
- 5.3 离心机:可达 8 000 r/min 以上。
- 5.4 超低温冰箱:(-80±5)℃。
- 5.5 超声波清洗器:40 kHz。
- 5.6 旋转蒸发仪:带有温度控制。

6 试样的制备

果实洗净擦干,取可食部分切碎混匀,四分法取约 250 g,液氮冷冻,研成粉末,-80℃贮存备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 10 g 试样(精确到 0.01 g)于 50.0 mL 棕色离心管中,加入约 25 mL 80%乙醇溶液(4.1.6),混合,室温下超声 15 min,8 000 r/min 离心 5 min,上清液转入 50.0 mL 棕色容量瓶中,残渣再用约 15 mL 80%乙醇溶液按上述步骤重复提取 1 次,合并 2 次提取液,用 80%乙醇溶液定容至 50.0 mL,备用。

7.2 浓缩

准确吸取 10 mL 提取液(7.1)于 100 mL 旋转蒸发瓶中,35℃下减压蒸发除去乙醇,浓缩至约 3 mL。

7.3 净化

C18 固相萃取小柱(4.4.2)依次用约 5 mL 甲醇和约 5 mL 水预淋洗、活化后,将 7.2 浓缩液加至小柱中,旋转蒸发瓶用 5 mL 水清洗,清洗液转入小柱中,抽滤,弃除滤液。再用约 8 mL 甲醇分 2 次清洗旋转蒸发瓶,清洗液加入到小柱中,收集滤液,甲醇定容至 10.0 mL,过滤膜(4.4.1),待测定。

7.4 试剂空白试验

仅不加入样品,其他提取、浓缩和净化过程同样品相同。

7.5 测定

7.5.1 色谱参考条件

检测波长:280 nm、360 nm 和 520 nm,各组分定量波长见附录 A。

色谱柱:C18 色谱柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,颗粒度 5 μm,或性能类似的色谱柱。

柱温:40℃。

流速:0.8 mL/min。

流动相 A:20%甲酸;流动相 B:100%乙腈。

进样量:10 μL。

流动相梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 min	流动相 A	流动相 B
0	100	0
30	75	25
45	60	40
60	40	60
61	100	0
80	100	0

7.5.2 仪器测定

取标准工作溶液、样品待测液(7.3)及试剂空白(7.4)进样测定,以色谱峰保留时间定性,以标准工作液多点校准定量。试剂空白不能检出有对被测组分有干扰的物质。

8 结果计算

样品中类黄酮物质以质量分数 X 计,按式(1)计算。

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

式中:

- X ——样品中待测组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
 - ρ ——标准曲线计算出试样提取液中各组分的浓度,单位为毫克每升(mg/L);
 - V ——试样提取液定容体积,单位为毫升(mL);
 - m ——试样质量,单位为克(g)。
- 计算结果保留小数点后两位。

9 色谱图

类黄酮标准溶液色谱图参见附录 B。

10 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%。

附 录 A

(规范性附录)

类黄酮标准物质基本信息、最佳定量波长、检出限和定量限

类黄酮标准物质基本信息、最佳定量波长、检出限和定量限见表 A. 1。

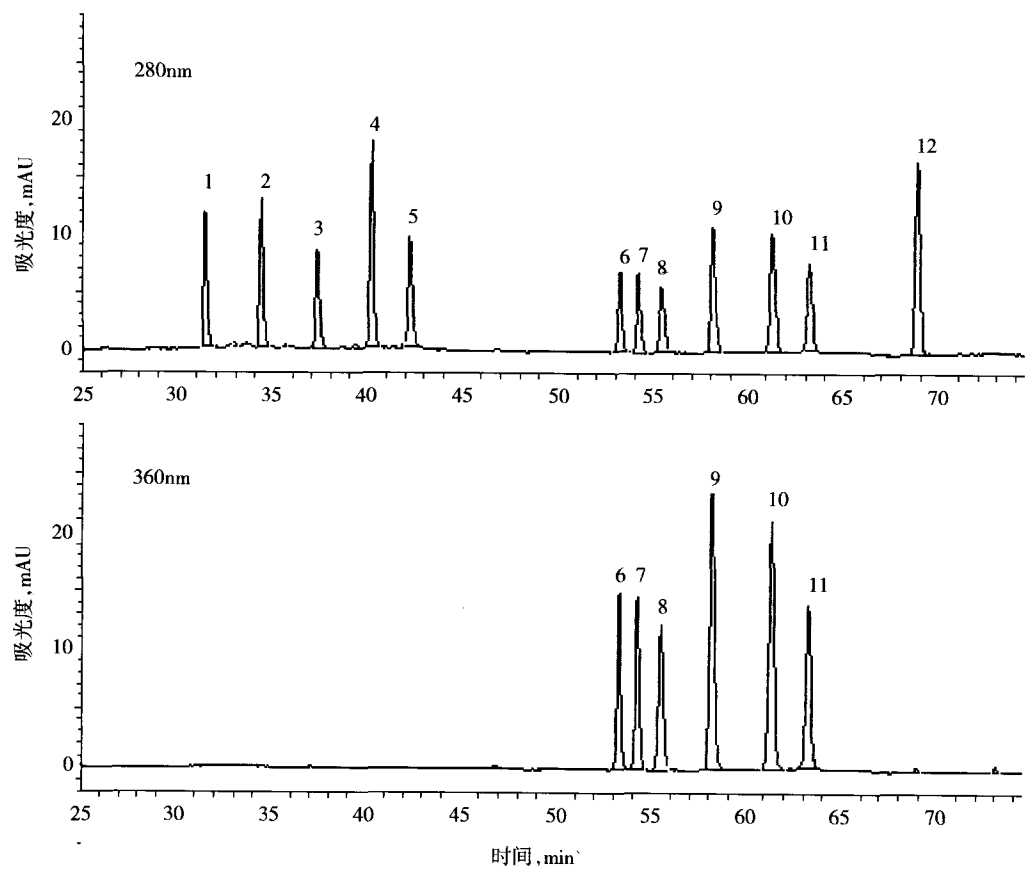
表 A. 1 类黄酮标准物质基本信息、最佳定量波长、检出限和定量限

序号	名 称	CAS 号	分子式	定量波长 nm	检出限 mg/kg	定量限 mg/kg	组别
1	原花青素 B1	20315 - 25 - 7	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	280	0.15	0.5	I 和 II
2	儿茶素	7295 - 85 - 4	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	280	0.15	0.5	I 和 II
3	原花青素 B2	29106 - 49 - 8	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	280	0.15	0.5	I 和 II
4	表儿茶素	490 - 46 - 0	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	280	0.15	0.5	I 和 II
5	原花青素 C1	37064 - 30 - 5	C ₄₅ H ₃₈ O ₁₈	280	0.15	0.5	I 和 II
6	芦丁	153 - 18 - 4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	360	0.075	0.25	I 和 II
7	槲皮素—半乳糖苷	482 - 36 - 0	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	360	0.075	0.25	I 和 II
8	槲皮素—葡萄糖苷	21637 - 25 - 2	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	360	0.075	0.25	I 和 II
9	槲皮素—木糖苷	549 - 32 - 6	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	360	0.075	0.25	I
10	槲皮素—阿拉伯糖苷	572 - 30 - 5	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	360	0.075	0.25	I
11	槲皮素—鼠李糖苷	522 - 12 - 3	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	360	0.075	0.25	I
12	根皮苷	7061 - 54 - 3	C ₂₁ H ₂₈ O ₁₂	280	0.06	0.2	I
13	熊果苷	497 - 76 - 7	C ₁₂ H ₁₆ O ₇	280	3.00	10.00	II
14	木樨草—葡萄糖苷	5373 - 11 - 5	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	360	0.075	0.25	II
15	山柰酚—芸香糖苷	17650 - 84 - 9	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	360	0.075	0.25	II
16	异鼠李—芸香糖苷	604 - 80 - 8	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	360	0.075	0.25	II
17	异鼠李—半乳糖苷	6743 - 92 - 6	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	360	0.06	0.20	II
18	异鼠李—葡萄糖苷	5041 - 82 - 7	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	360	0.075	0.25	II
19	矢车菊素—半乳糖苷	27661 - 36 - 5	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁	520	0.15	0.50	III
20	矢车菊素—葡萄糖苷	7084 - 24 - 4	C ₂₁ H ₂₁ ClO ₁₁	520	0.15	0.50	III
21	矢车菊素—阿拉伯糖苷	57186 - 11 - 5	C ₂₀ H ₁₉ ClO ₁₀	520	0.15	1.00	III
22	矢车菊素—木糖苷	29761 - 24 - 8	C ₂₀ H ₁₉ ClO ₁₀	520	0.15	0.50	III
23	氯化芍药—半乳糖苷	28148 - 89 - 2	C ₂₂ H ₂₃ ClO ₁₁	520	0.15	0.50	III

附录 B
(资料性附录)
类黄酮标准溶液色谱图

B.1 第 I 组类黄酮标准溶液色谱图

见图 B.1。



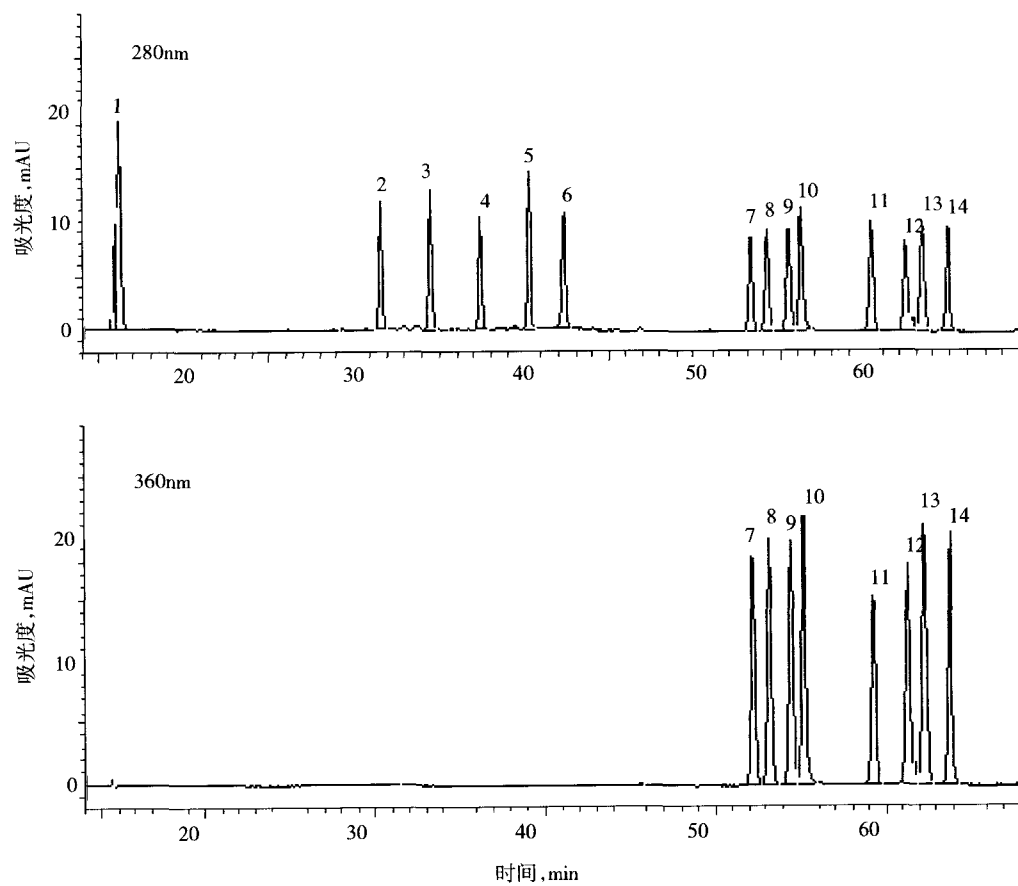
说明:

- | | |
|----------------------|-------------------------|
| 1——原花青素 B1(20 mg/L); | 7——槲皮素—半乳糖苷(10 mg/L); |
| 2——儿茶素(20 mg/L); | 8——槲皮素—葡萄糖苷(10 mg/L); |
| 3——原花青素 B2(20 mg/L); | 9——槲皮素—木糖苷(10 mg/L); |
| 4——表儿茶素(20 mg/L); | 10——槲皮素—阿拉伯糖苷(10 mg/L); |
| 5——原花青素 C1(20 mg/L); | 11——槲皮素—鼠李糖苷(10 mg/L); |
| 6——芦丁(10 mg/L); | 12——根皮苷(10 mg/L)。 |

图 B.1 第 I 组类黄酮标准溶液色谱图

B.2 第Ⅱ组类黄酮标准溶液色谱图

见图 B.2。



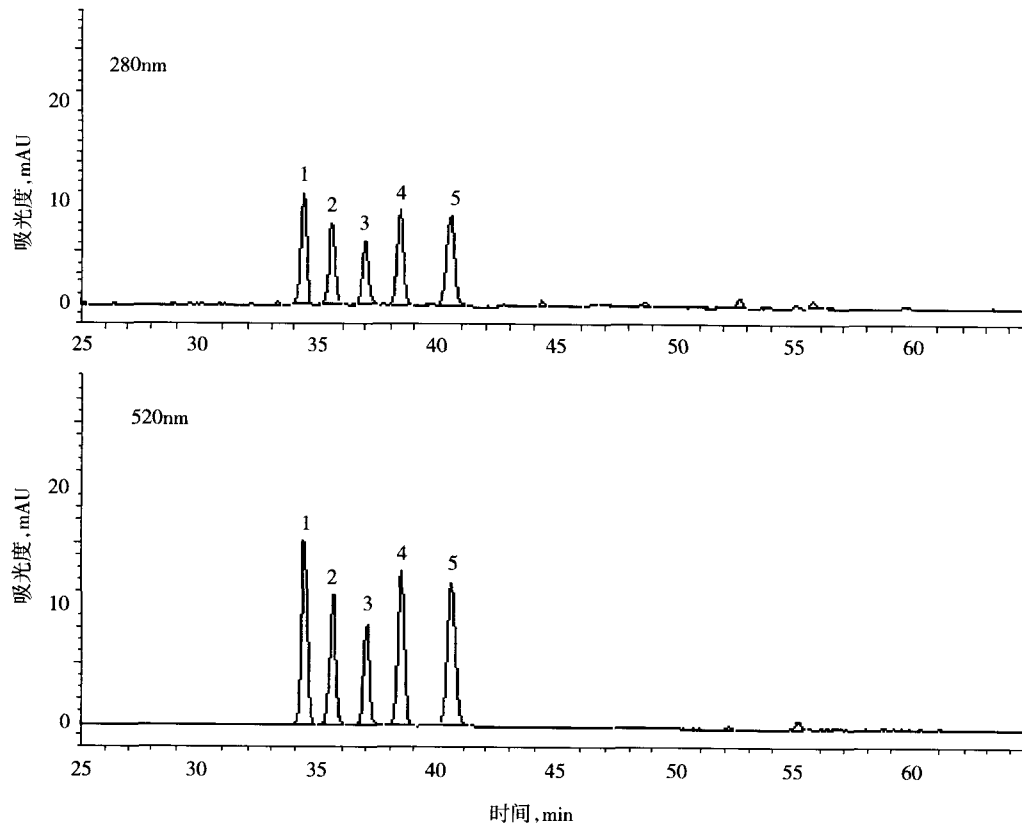
说明:

- | | |
|----------------------|------------------------|
| 1——熊果苷(75 mg/L); | 8——槲皮素—半乳糖苷(10 mg/L); |
| 2——原花青素 B1(20 mg/L); | 9——槲皮素—葡萄糖苷(10 mg/L); |
| 3——儿茶素(20 mg/L); | 10——木樨草—葡萄糖苷(10 mg/L); |
| 4——原花青素 B2(25 mg/L); | 11——山柰酚—芸香糖(10 mg/L); |
| 5——表儿茶素(15 mg/L); | 12——异鼠李—芸香糖苷(10 mg/L); |
| 6——原花青素 C1(20 mg/L); | 13——异鼠李—半乳糖苷(10 mg/L); |
| 7——芦丁(10 mg/L); | 14——异鼠李—葡萄糖苷(10 mg/L)。 |

图 B.2 第Ⅱ组类黄酮标准溶液色谱图

B.3 第Ⅲ组类黄酮标准溶液色谱图

见图 B.3。



说明:

1——矢车菊素—半乳糖苷(10 mg/L);

4——氯化芍药—半乳糖苷(10 mg/L);

2——矢车菊素—葡萄糖苷(20 mg/L);

5——矢车菊素—木糖苷(10 mg/L)。

3——矢车菊素—阿拉伯糖苷(10 mg/L);

图 B.3 第Ⅲ组类黄酮标准溶液色谱图