

# 中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2336—2013

---

## 柑橘及制品中多甲氧基黄酮含量的测定 高效液相色谱法

**Determination of polymethoxylated flavones in citrus and  
derived products—HPLC**

2013-05-20 发布

2013-08-01 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 501)归口。

本标准起草单位:中国农业科学院柑橘研究所、农业部柑橘及苗木质量监督检验测试中心、西南大学。

本标准主要起草人:焦必宁、赵其阳、苏学素、陈爱华、王成秋、张耀海、薛杨、陈卫军。

# 柑橘及制品中多甲氧基黄酮含量的测定

## 高效液相色谱法

### 1 范围

本标准规定了柑橘及其制品中多甲氧基黄酮(甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮)含量的液相色谱测定方法。

本标准适用于柑橘及其制品中多甲氧基黄酮(甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮)含量的测定。

本标准定量测定范围:甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮均为 0.02 mg/L~30 mg/L。

本标准方法定量限:甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮均为 0.02 mg/kg。

本标准方法检出限:甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮均为 0.01 mg/kg。

### 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

试料中的多甲氧基黄酮经甲醇超声提取、净化、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,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇(CH<sub>3</sub>OH),色谱纯。

4.2 乙酸溶液[ $\rho(\text{CH}_3\text{COOH})=0.5\%$ ]:量取 5 mL 乙酸,定容至 1 000 mL。

4.3 川皮苷标准品(纯度 $\geq 96.0\%$ )。

4.4 蜜橘黄酮标准品(纯度 $\geq 96.0\%$ )。

4.5 甜橙黄酮标准品(纯度 $\geq 96.0\%$ )。

4.6 多甲氧基黄酮标准储备溶液:分别称取 5.00 mg(精确到 0.01 mg)甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮标准品,溶于甲醇中,用甲醇定容至 50 mL,配制成质量浓度为 100 mg/L 的标准储备液。于-50℃冰箱中贮存,有效期 3 个月。

### 5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱仪:带紫外检测器(UV)。

5.2 分析天平:感量 0.001 g 和 0.000 01 g。

5.3 组织捣碎机。

5.4 超声波清洗器。

5.5 旋转蒸发器。

5.6 超低温冰箱。

5.7 离心机。

5.8 滤膜:0.45 μm,有机相。

## 6 分析步骤

### 6.1 试样制备

6.1.1 鲜果果实样品:果皮、果肉和种子分开处理。按四分法缩分后将其切碎,放入组织捣碎机中捣成匀浆后取样。

6.1.2 罐头样品:样品放入组织捣碎机中匀浆后取样。

6.1.3 果汁及饮料样品:充分混匀后直接取样。

### 6.2 提取

#### 6.2.1 鲜果果皮、种子

称取试样 1 g(精确到 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入甲醇 10.00 mL,50℃ 条件下超声处理 30 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液于容量瓶中,残渣以 10 mL 甲醇重复提取两次,合并上清液,用甲醇定容至 50 mL,0.45 μm 微孔滤膜过滤后待测。

#### 6.2.2 果肉、罐头、果汁及饮料

称取试样 5 g(精确到 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 10.00 mL 甲醇,超声处理 10 min,以 10 000 r/min 离心 10 min,收集上清液于容量瓶中,残渣以 10 mL 甲醇重复提取一次,合并上清液,用甲醇定容至 25 mL。取提取液 10 mL,在 50℃ 下减压旋转浓缩至近干,加入甲醇 2.00 mL,过 0.45 μm 微孔滤膜后待测。

### 6.3 仪器参考条件

色谱柱:C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm×250 mm,粒度 5 μm)或同等性能的色谱柱。

柱温:35℃。

进样量:10 μL。

检测波长:330 nm。

流动相:见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	A 相(乙酸溶液) %	B 相(甲醇) %
0	1.00	60	40
5	1.00	35	65
15	1.00	35	65
16	1.00	10	90
20	1.00	10	90
21	1.00	60	40
25	1.00	60	40

### 6.4 标准工作曲线

取标准储备溶液(4.6)用甲醇稀释配成质量浓度为 0.02 mg/L、0.10 mg/L、0.50 mg/L、2.5 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、30.0 mg/L 的标准工作溶液,按 6.3 进行测定。以甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮质量浓度为横坐标,相应的积分峰面积为纵坐标,绘制标准曲线或求线性回归方程。

### 6.5 测定

取 10 μL 相应的标准工作溶液和待测液顺序进样,以保留时间定性,以色谱峰面积积分值定量,试样溶液中甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮响应值均应在定量测定范围之内。色谱图参见附录 A。

### 6.6 空白试验

除不加试样外,其他步骤同试样操作步骤进行。

## 7 结果计算

试样中甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮的含量以质量分数  $\omega$  计,单位以毫克每千克(mg/kg)表示,按式(1)计算。

$$\omega = \frac{\rho \times V \times 1000}{m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

$\rho$ ——样液中甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮测定的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);

$V$ ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

$m$ ——试样质量,单位为克(g);

$n$ ——稀释倍数(鲜果果皮、种子为 1,果肉、罐头、果汁及饮料为 0.2)。

测定结果取两次平行测定结果的算术平均值,计算结果保留三位有效数字。

## 8 精密度

### 8.1 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 15%。

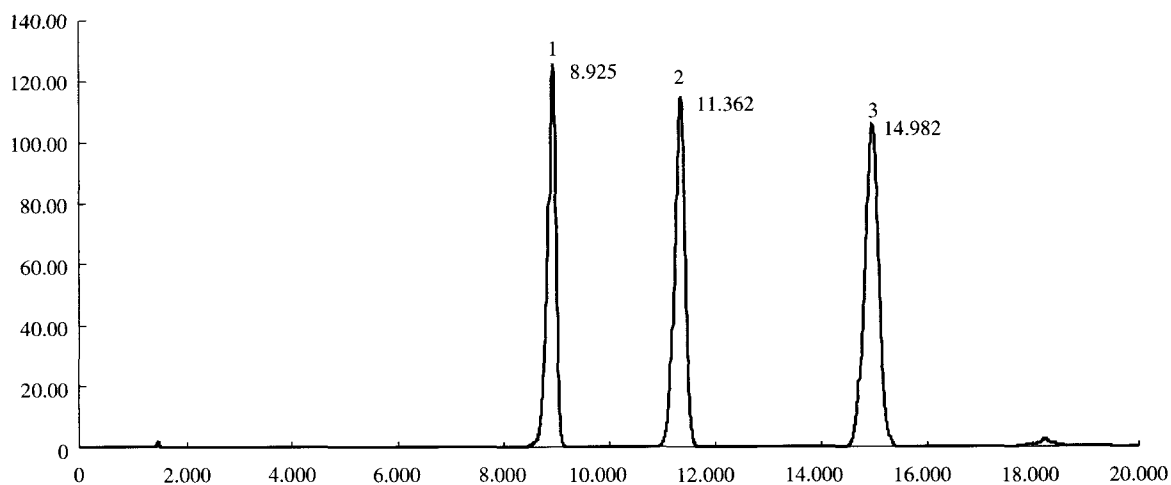
### 8.2 再现性

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 16%。

附录 A  
(资料性附录)

甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮混合标准溶液色谱图

甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮混合标准溶液色谱图见图 A. 1。



说明:

- 1——甜橙黄酮;
- 2——川皮苷;
- 3——蜜橘黄酮。

图 A. 1 5.00 mg/L 甜橙黄酮、川皮苷和蜜橘黄酮混合标准溶液色谱图