

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4352—2023

浆果类水果中花青苷的测定 高效液相色谱法

Determination of anthocyanins in berry fruits by high performance liquid chromatography

2023-04-11 发布

中华人民共和国农业农村部 发布



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。

本文件由农业农村部农产品质量安全监管司提出。

本文件由农业农村部农产品营养标准专家委员会归口。

本文件起草单位：青岛农业大学、农业农村部果品质量安全风险评估实验室（青岛）、青岛市农产品质量安全中心、江苏徐淮地区徐州农业科学研究所、山东农业工程学院、青岛市现代农业质量与安全工程重点实验室。

本文件主要起草人：聂继云、万浩亮、韩令喜、张佳、姜鹏、贾东杰、孟杰、原永兵、秦旭、刘晓丽、付红蕾、魏亦山。



浆果类水果中花青苷的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了浆果类水果中花青苷测定的高效液相色谱法。

本文件适用于浆果类水果中 16 种花青苷(附录 A)的测定。

本文件测定的 16 种花青苷中,矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷和芍药素-3-O-葡萄糖苷的线性范围为 0.5 mg/L~50 mg/L,其余 14 种花青苷的线性范围为 0.5 mg/L~100 mg/L;以试样称样量为 1 g、定容体积为 50 mL 计,16 种花青苷的检出限和定量限详见附录 A。

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

浆果类水果中的花青苷经盐酸甲醇溶液振荡提取,经反相色谱柱分离,紫外-可见光检测器或二极管阵列检测器检测,以保留时间定性,外标法定量。

5 试剂和材料

5.1 除非另有规定,本方法所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2 甲醇(CH_3OH)。

5.3 甲酸(HCOOH):色谱纯。

5.4 盐酸(HCl):36%~38%。

5.5 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.6 盐酸甲醇溶液:6 mL 盐酸(5.4)和 194 mL 甲醇(5.2)混匀。

5.7 提取剂:50 mL 盐酸甲醇溶液(5.6)和 450 mL 甲醇(5.2)混匀。

5.8 流动相 A:50 mL 甲酸(5.3),用超纯水定容至 1 000 mL。

5.9 流动相 B:1 000 mL 乙腈(5.5)。

5.10 标准品:纯度 $\geq 95\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质,相关信息见附录 A。

5.11 单标储备溶液:准确称取 5.0 mg,用提取剂(5.7)溶解并定容至 5 mL,即为 1 000 mg/L 的单标储备液,于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 储存于密闭棕色玻璃瓶中,有效期 6 个月。

5.12 混合标准工作液:将单标储备溶液混合后,用提取剂(5.7)作为溶剂,逐级稀释成 0.5 mg/L、5 mg/L、20 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、120 mg/L 的花青苷混合标准溶液,现用现配。根据浆果类水果种类,选择相应的单标储备溶液进行配制。

5.12 微孔滤膜:0.45 μm ,有机相。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪:配有紫外-可见光检测器或二极管阵列检测器。

6.2 分析天平:感量为 0.01g 和 0.000 1 g。

6.3 摇床:温度可控,转速 200 r/min。

6.4 离心机:转速不低于 5 000 r/min。

6.5 冷冻研磨机:转速 25 000 r/min。

7 试样的制备与保存

7.1 试样制备

果实洗净,擦干,取可食部分 200 g,切碎混匀,用冷冻研磨机研成粉末。

7.2 试样保存

试样装入样品瓶中,密封,置-80℃条件下冷冻保存。

8 测定步骤

8.1 提取

称取 1.00 g 试样于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 提取剂(5.7),混匀,置摇床上 30℃ 200 r/min 振荡提取 60 min,5 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入 50.0 mL 棕色容量瓶中,残渣再用 20 mL 提取剂(5.7)按上述步骤重复提取一次,合并上清液,用提取剂(5.7)定容至 50.0 mL,混匀,过微孔滤膜(5.13),待测。

8.2 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱:C₁₈柱,250 mm×4.6 mm(内径),粒径 5 μm,或相当者;
- b) 进样量:10 μL;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 柱温:40℃;
- e) 检测波长:520 nm;
- f) 梯度洗脱条件,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,%
0.0	94.0	6.0
30.0	92.0	8.0
31.0	91.0	9.0
60.0	88.0	12.0
61.0	0.0	100.0
70.0	0.0	100.0
71.0	94.0	6.0
75.0	94.0	6.0

8.3 标准曲线的绘制

将混合标准工作液(5.12)注入高效液相色谱仪中进行测定。以峰面积为纵坐标、标准溶液浓度为横坐标,绘制标准曲线,求回归方程和相关系数。

8.4 测定

将试样溶液(8.1)注入高效液相色谱仪中进行测定。以保留时间定性,按外标法以色谱峰面积定量。若样品溶液花青苷浓度超出了标准曲线的线性范围,应稀释后再行测定。

8.5 空白试验

除不加试样外,均按照 8.1~8.4 测定步骤操作。

9 结果计算

试样中各花青苷的含量按公式(1)计算。

$$\omega = \frac{(\rho - \rho_0) \times V \times f}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ω ——质量分数的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ ——从标准曲线上查得的试样提取液中待测组分浓度的数值,单位为毫克每升(mg/L);

ρ_0 ——从标准曲线上查得的空白试验提取液中待测组分浓度的数值,单位为毫克每升(mg/L);

V ——试样提取液定容体积的数值,单位为毫升(mL);

f ——试样提取液稀释倍数;

m ——试样质量的数值,单位为克(g)。

计算结果以 2 次测定结果的算术平均值表示,保留 3 位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 10%。

在再现性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值的 15%。

11 色谱图

标准溶液色谱图见附录 B。

附 录 A
(资料性)

16 种花青苷标准物质的基本信息、检出限和定量限

16 种花青苷标准物质的基本信息、检出限和定量限见表 A. 1。

表 A. 1 16 种花青苷标准物质的基本信息、检出限和定量限

序号	名称	CAS 号	分子式	检出限 mg/kg	定量限 mg/kg
1	飞燕草素-3-O-半乳糖苷	28500-00-7	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	0.15	0.50
2	飞燕草素-3-O-葡萄糖苷	6906-38-3	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂	0.10	0.30
3	飞燕草素-3-O-芸香糖苷	15674-58-5	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	0.15	0.50
4	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷	7084-24-4	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	0.05	0.15
5	矢车菊素-3-O-阿拉伯糖苷	27214-72-8	C ₂₀ H ₁₉ O ₁₀	0.15	0.50
6	矮牵牛素-3-O-葡萄糖苷	6988-81-4	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	0.10	0.30
7	矮牵牛素-3-O-半乳糖苷	28500-02-9	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₂	0.20	0.60
8	芍药素-3-O-葡萄糖苷	6906-39-4	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	0.15	0.50
9	锦葵色素-3-O-半乳糖苷	30113-37-2	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	0.10	0.30
10	芍药素-3-O-阿拉伯糖苷	27214-74-0	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	0.15	0.50
11	锦葵色素-3-O-葡萄糖苷	7228-78-6	C ₂₃ H ₂₅ O ₁₂	0.15	0.50
12	锦葵色素-3-O-阿拉伯糖苷	28500-04-1	C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁	0.10	0.30
13	飞燕草素-3-O-5-O-二葡萄糖苷	17670-06-3	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₇	0.15	0.50
14	矢车菊素-3-O-5-O-二葡萄糖苷	2611-67-8	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆	0.15	0.50
15	矢车菊素-3-O-半乳糖苷	27661-36-5	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁	0.10	0.30
16	天竺葵素-3-O-葡萄糖苷	18466-51-8	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀	0.15	0.50

附 录 B
(资料性)
标准溶液色谱图

见图 B.1,检测波长 520 nm,峰编号为对应的标准品编号,与表 A.1 中的序号一致。其中:(A)适用于蓝莓、葡萄和黑穗醋栗,从左至右各峰的标准溶液浓度依次为 30.0 mg/L、30.0 mg/L、30.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L、40.0 mg/L、20.0 mg/L、20.0 mg/L、50.0 mg/L、40.0 mg/L、50.0 mg/L 和 40.0 mg/L;(B)适用于石榴和猕猴桃,从左至右各峰的标准溶液浓度依次为 50.0 mg/L、50.0 mg/L、10.0 mg/L、10.0 mg/L、5.0 mg/L 和 8.0 mg/L。

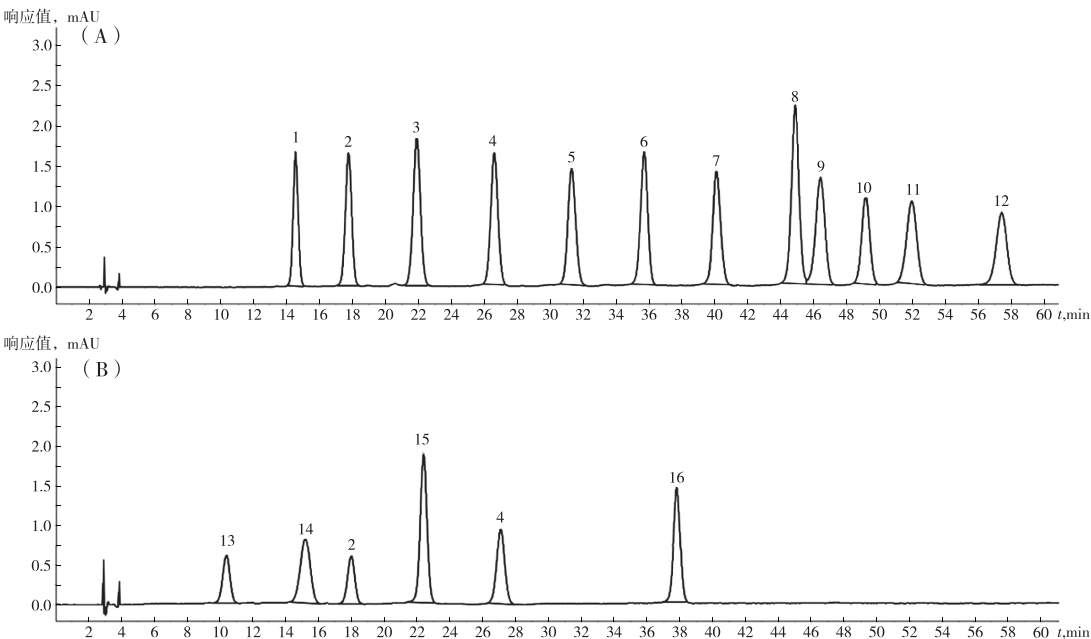


图 B.1 花青苷标准溶液色谱图