

---

# 《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色 谱法》国家标准编制说明

---

1 任务来源.....	1
2 起草的目的意义.....	1
2.1 企业产品开发和质量控制的需要.....	1
2.2 制定完善国家标准的需要.....	2
3 薄层色谱研究、应用与标准现状.....	3
3.1 薄层色谱研究.....	3
3.2 薄层色谱在植物提取物活性评价方面的应用.....	3
3.3 薄层色谱标准.....	3
4 主要起草过程.....	4
4.1 成立标准制定工作组.....	4
4.2 确定工作计划和标准制定原则.....	4
4.3 查询国内外相关标准和文献资料.....	4
4.4 研究建立标准方法和开展条件实验.....	5
4.5 方法验证.....	5
4.6 形成标准讨论稿和编制说明.....	5
4.7 形成标准草案.....	6
4.8 形成标准征求意见稿和编制说明.....	6
4.9 征求意见并形成标准送审稿和编制说明.....	6
5 本标准与国内外分析方法的关系.....	7
6 主要技术指标依据与说明.....	7
6.1 标准名称.....	7
6.2 前言.....	7
6.3 主体内容.....	7
6.4“范围”的界定.....	7
6.5 原理.....	7
6.6 试剂.....	8
6.7 仪器和设备.....	8
6.8 主要测定步骤.....	9
6.8.1 槐米提取液制备.....	9

---

6.8.2 色谱分离衍生和定量测定.....	9
6.8.3 标准曲线.....	13
6.8.4 检测限和定量限.....	13
6.8.5 精密度和准确度.....	13
6.8.6 抗氧化活性指数计算.....	14
6.8.7 小结.....	16
6.9 方法验证.....	16
6.9.1 参加验证的实验室.....	16
6.9.2 方法验证结果.....	17
6.9.3 验证结论.....	19
7 采用国际标准和国外先进标准程度，以及与国际、国外同类标准水平的 对比情况.....	20
8 与现行法律法规和强制性标准的关系.....	20
9 标准作为强制性或推荐性标准的意见.....	20
10 实施标准的建议.....	20
11 参考文献.....	20

---

## 1 任务来源

本国家标准的制定任务是根据国家标准化管理委员会下达的国家标准制定计划《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》项目(计划号: 20205075-T-424)起草。国家标准计划《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》由 424-cnls(中国标准化研究院)归口上报及执行,主管部门为国家市场监督管理总局(质检)。本标准由江南大学,南昌大学,国家食品安全风险评估中心,北京理化分析测试中心、中国标准化研究院、中国计量科学研究院等单位共同起草。本标准主要起草人:陈益胜、徐学明、金征宇、席兴军、兰韬、陶红、黄彩虹、舒蓝萍等。

## 2 起草的目的意义

### 2.1 企业产品开发和质量控制的需要

抗氧化是抗衰老、抗疲劳、抗炎等生物活性的重要基础。绝大部分以植物提取物为原料的功能食品都含有大量抗氧化活物质,例如芦丁、槲皮素、花青素、茶多酚等。目前,我国生产具有抗氧化功能产品(药品、食品和保健品等)的规模以上企业多达 2000 多家,已经形成了 2300 多亿元的产业规模。这些产品的原料大部分来自农业废弃物。

槐米是目前最具有抗氧化活性潜力的农业废弃物之一。槐米是槐树花蕾干燥后的产物,其中含有丰富的黄酮、皂苷和甾醇等生物活性物质。芦丁(Rutin),又称为维生素 P,是槐米中主要的黄酮类化合物,具有良好的抗氧化活性。不仅如此,芦丁还具有降血清胆固醇、降血压、降血脂、降血糖和提高免疫力等多种保健功效。例如,芦丁可以通过清除高血糖引发的过氧化物保护胰岛细胞免受损伤,从而降低 II 型糖尿病的发生风险。因此芦丁是一种极具开发前景的糖尿病药物治疗先导化合物。我国槐树资源丰富,但是槐米的综合利用度很低。因此,以槐米为资源开发以芦丁、槲皮素等为代表的抗氧化活性物质可以广泛地应用到食品、保健品和药品工业领域,形成高附加值产品,不仅具有巨大的经济价值,而且能够实现废弃资源利用。由此可见,因此,测定抗氧化活性的高低已经成为评价植物提取物产品开发和质量控制的一个关键环节。

---

## 2.2 制定完善国家标准的需要

目前,植物提取物中抗氧化活性评价方法主要根据受试对象分为体内和体外两大类。体内方法以丙二醛、超氧化物歧化酶、谷胱甘肽等为指标,测定其含量来评价体内抗氧化活性的高低。体外抗氧化评价体系则以自由基清除法、氧化还原法为主。体内方法的优势是更接近人体结果,但一般费时费力,且只能反映某一指标活性的高低。体外方法则很好地弥补了这一缺点。其中,1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法是应用最广泛的抗氧化测定方法。必须注意的是,常规的比色皿模式的 DPPH 测定法将 DPPH 溶液与样品直接混合,因此检测得到的是样品总的抗氧化活性。然而,植物提取物原料通常是多元抗氧化活性物质混合物。当这些物质混合在一起被 DPPH 法测定的时候,相互之间可能存在抗氧化拮抗或协同的效应,导致检测评估结果偏低或者偏高。此外,在很多评价任务中,仅仅测定混合物样品的总抗氧化性常规的抗氧化活性评价方法基于 DPPH 分子与自由基混合后体系的颜色变化,利用紫外-可见分光光度计监测其吸光度值变化可以实现对样品中总抗氧化活性的定量分析。但必须注意的是,这种抗氧化评价方法有一个固有的缺点:检测选择性差。更确切地说,当样品中含有两种或者两种以上的抗氧化活性物质的时候,分析结果无法区分每一种物质的抗氧化活性高低。而基于实验动物模型的抗氧化评价方法时间长、成本高且误差大,因此难以形成国家标准。

薄层色谱是近年来广泛应用到植物提取物分析的一项色谱分离技术。建立在薄层色谱和 DPPH 显色反应联用基础上的抗氧化分析方法兼备选择性高和通用性好的优点。更重要的是,薄层色谱是目前唯一能与生化反应直接联用的色谱工具。和传统的试管法测试不同,薄层色谱的色谱分离结果开放性和反应载体功能可以从根本上解决基于 DPPH 变色反应的抗氧化评估方法选择性差的问题。薄层分离使原本混在一起的不同抗氧化物质按分子结构的差异移动到薄层板上不同的位置形成物理隔离,因而可以有效避免各种物质之间可存在的协同或拮抗效应;随后,通过浸渍方式与薄层板耦合的 DPPH 溶液可以方便地实现对混合物中不同抗氧化组分的同时评估。因此,相对于传统的方法,建立在薄层色谱和 DPPH 显色反应基础上的抗氧化评价方法更加可靠,且更易形成标准。

---

### 3 薄层色谱研究、应用与标准现状

#### 3.1 薄层色谱研究

薄层色谱已发展具备一整套完整的仪器化操作平台，在点样、展开、浸渍衍生和扫描定量过程中均实现了半自动甚至全自动化，显著扩展了应用范围。其中，半自动薄层点样仪在高压氮气流的协助下，点样针内的液体样品以极细的液流形式被吹扫至色谱板上，点样体积通常在 1~10  $\mu\text{L}$  范围内。通过非接触吹扫法进行条带状点样，可以显著提高分离后相邻斑点的分辨率。薄层色谱分析过程中，所有步骤独立并配备相对应设备，可同时进行操作和分析，不仅提高了工作效率，也增加了仪器选择的灵活性。仪器化的操作平台在很大程度上提高了色谱分离的灵敏度及色谱展开图的分辨率，同时可视化成像后的光密度扫描提高了结果的准确性和重现性

#### 3.2 薄层色谱在植物提取物活性评价方面的应用

基于仪器化薄层色谱和生物传感反应的活性评价方法已经成为分析化学领域一个新的热点前沿。与柱色谱的闭环工作原理不同，薄层色谱是一个去中心化、开放的分析系统，分离过程结束后分离结果被保留在色谱板上而非废液瓶中。这一独特的优势使得薄层色谱的分离结果可以方便地与很多无法与传统柱色谱系统兼容的检测手段实现无障碍融合。因此，薄层色谱不仅是一种通量大、操作简便和灵活性高的色谱工具，而且还可以作为多种离线检测方法高效集成融合的分析平台，在分析通量、简便性、精密度和适用范围等方面达到了较为理想的平衡，因此在植物提取物活性评价方面有良好的应用前景。

不过，薄层色谱在食物提取物活性成分检测和功能评价方面的应用还处于起步阶段，虽然有一些文献报道，但还缺乏标准化的研究。

#### 3.3 薄层色谱标准

目前可查询到的关于薄层色谱技术的国家标准有两项：《配合饲料中 T-2 毒素的测定 薄层色谱法》和《蜂蜜中高果糖淀粉糖浆测定方法 薄层色谱法》。未查到将薄层色谱与生物传感联合用于植物提取物中功效成分活性评估的国家标准、行业标准和地方标准。这一缺失，使得企业在利用植物废弃物作为原料生产抗氧化功效产品及其质量控制缺乏技术支撑，无标准可用。

---

因此，有必要尽快制定《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》国家标准，以满足相关企业生产和品控的需要。

## 4 主要起草过程

### 4.1 成立标准制定工作组

国家重点研发项目立项后，2017 年 11 月 10 日在北京市西藏大厦召开了国家标准《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》第一次工作会。参加单位有江南大学、中国标准化研究院等。会议成立了由江南大学、中国标准化研究院等单位参加的标准工作组，主要由从事标准制修订、仪器分析、具有丰富技术经验的专业研究人员组成，工作组制定了初步的标准编制工作计划。

### 4.2 确定工作计划和标准制定原则

按照工作任务要求，工作组制定了标准起草工作计划和任务分工。

在充分研究与讨论的基础上，制定了标准制定原则：

- (1) 先进性：其可靠性、准确度、精密度和灵敏度达到较高水平。
- (2) 适用性：要适应我国植物提取物产业发展的要求。
- (3) 可操作性：符合我国目前检测仪器设备和试剂、材料的供应条件。

(4) 实用性：符合检测从业人员的技术水平，能被国内主要的环境分析实验室所使用并达到所规定的要求。要有利于槐米提取物及其制品质量，为企业生产和品控控制部门服务。

### 4.3 查询国内外相关标准和文献资料

2017 年，开始开展“植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法”方法研究。由于在现行国家标准、行业标准、地方标准、团体标准和企业标准中，均无相应的测定方法标准，所以我们查阅相关文献并开展研究工作。分析代表性抗氧化活性化合物的分子结构特点，优化色谱分离和 DPPH 显色等关键技术参数。该方法的要点有：(1) 以甲醇为溶剂提取槐米提取物中的抗氧化活性成分，(2) 通过超声进行辅助提取，(3) 采用硅胶薄层板为固定相，(4) 乙酸乙酯+乙酸+甲酸+水 10+1.1+1.1+2 mL 为流动相，(5) 浸渍 DPPH 溶液显色 15 分钟，(6) 荧光模式，D<sub>2</sub>&W 灯，激发光波长 530 nm，无滤光片，狭缝尺寸 3.00 × 0.30 mm (Micro)，扫描速度 100 mm/s，数据分辨率 100 μm/step。

---

中国知网、万方等中文数据库中查询到的公开发表文献中，关于植物提取物抗氧化活性的测定几乎都是依据或参考比色皿反应 DPPH 变色的方法，可靠性和实用性有限。通过 Science direct 和 America Chemistry Association 等国外科研数据局查询，可以查到少量以薄层色谱为平台，结合 DPPH 反应检测混合物中不同抗氧化物质功效活性的文献。

薄层色谱评价槐米提取物中抗氧化物质功效活性的方法具有选择性好、可靠性强、操作简单等优点，考虑到标准的适用性与可操作性，因此确定采用薄层色谱与 DPPH 反应显色相结合的方法评价植物提取物抗氧化活性。以槐米提取物为样品，经过初步试验，证明方法是可行的。而后对方法进行优化，对方法进行验证，结果表明方法的准确性、回收率、精密度等方面都能达到国家标准的要求，并且基本符合制定国家标准的条件，并于 2020 年向国家标准化管理委员会提出立项申请。

#### **4.4 研究建立标准方法和开展条件实验**

标准工作组按照计划任务书的要求，结合制定标准的要求，研究建立标准方法的实验方案，并进行方法前处理条件的选择、仪器条件的确定和方法精密度、准确度及检出限的测定等试验，并研究制定抗氧化活性指数的计算方法。

采集样品后，开始开展实验室验证工作，建立槐米提取物中抗氧化活性成分的薄层色谱分离和 DPPH 显色方法，包括流动相选择、光密度参数设定、线性范围、相关系数、加标回收率、准确度、精密度、检出限、定量限等；在光密度扫描检测数据的基础上，提出抗氧化指数的计算方法。

#### **4.5 方法验证**

2019 年 10~12 月，由 5 家单位对“植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法”进行验证，分别是南昌大学食品科学与技术国家重点实验室、浙江科技学院、农业部生物毒素检测重点实验室、甘肃省天然药物重点实验室和中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室，通过统计检验技术确认外部实验室试验结果的准确性。

#### **4.6 形成标准讨论稿和编制说明**

2019 年 7 月 5 日，起草工作组组织相关单位和专家，在山东青岛中国科学院兰州化学物理研究所召开第二次标准起草工作会。参会单位包括江南大学、



---

中国标准化研究院、中国科学院兰州化学物理研究所、北京化工大学、浙江大学等。

与会专家对《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》标准草案中的英文名称、范围、术语和定义、基本要求、主要技术指标、附录等章条提出了详细的意见，会后根据修改意见形成了《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》标准讨论稿及其编制说明。

#### **4.7 形成标准草案**

标准起草工作组查阅、收集和整理了国内外有关研究进展和专利、标准、法规等文献资料，掌握了相关标准的现状；对文献中抗氧化活性物质测定方法进行了对比和总结，为标准文本的编制奠定理论基础。在《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》国家标准第一次起草工作会议的基础上，起草工作组相关单位共同讨论起草形成了《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》国家标准的技术框架和主要内容，初步形成了《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》标准草案。

#### **4.8 形成标准征求意见稿和编制说明**

在前期工作的基础上，起草工作组组织相关单位和专家于 2019 年 10 月 22 日在北京中国标准化研究院召开第三次标准起草工作会。参会单位包括江南大学、中国标准化研究院、北京化工大学、浙江大学等。与会成员认真讨论《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》标准讨论稿后，根据讨论结果修改形成了《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》征求意见稿及编制说明。会议同时讨论了下一阶段征求意见的单位和专家名单。

#### **4.9 征求意见并形成标准送审稿和编制说明**

2020 年 月 日-2020 年 月 日，起草工作组根据讨论的专家和单位名单，分别向相关的行业主管部门、科研机构、检测部门和企业等 30 个单位和专家发出了标准征求意见稿，向相关单位和专家征求标准修改意见。截止到 2019 年月日，共收集到中科院过程所、...等 25 家科研机构、检测机构、管理部门、生产企业等单位提出的反馈意见 40 条。起草工作组对提出的意见经过反复研究、讨论和处理后，修改形成了《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》送审稿及编制说明。具体意见汇总和处理表见《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》征

## 5 本标准与国内外分析方法的关系

本标准研究旨在建立一项满足我国常见农业废弃物抗氧化活性的高效可靠评价方法。通过查阅国内外相关文献资料，制定条件优化方案，确保本方法前处理所采用的装置操作简便，能够满足国内实验室的条件要求。本标准拟采用仪器化薄层色谱和 DPPH 显色反应相结合测定定量评价槐米抗氧化活性。样品的前处理，即槐米提取物中抗氧化活性物质的提取采用超声法；选择合适的色谱分离和光谱检测条件。力求方法在稳定、可靠和实用的基础上，达到国际先进水平，以适应我国植物提取物抗氧化活性评价、质控与管理的需要。

## 6 主要技术指标依据与说明

### 6.1 标准名称

本标准主要解决植物提取物中抗氧化活性评价的技术问题，所以将本标准的名称定为：《植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法》，英文翻译为“Antioxidant capacity assessment of plant extract-Thin layer chromatography method”。

### 6.2 前言

明确了本标准的归口单位及主要起草单位、起草人。

### 6.3 主体内容

标准的主体内容包括：范围、规范性引用文件、原理、试剂、仪器和设备、测定步骤、空白试验、结果计算与表示、精密度和回收率、检出限、检验报告等。

### 6.4 “范围”的界定

本标准规定了薄层色谱联用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)显色反应评估植物提取物抗氧化能力的方法(以槐米提取物为例，芦丁为标准)。

本标准适用于同时评价植物性食品原料中多元抗氧化物质的抗氧化能力。

### 6.5 原理

用硅胶薄层色谱对槐米提取物的甲醇溶液进行展开，实现对其中多种抗氧化

---

物质的色谱分离，然后通过浸渍的方式将停留在硅胶薄层上的分离结果与 DPPH 显色反应相耦合，显色反应结果用光密度扫描仪定量检测，检测结果以芦丁为内标加权定量计算评估槐米样品综合抗氧化能力。

## 6.6 试剂

1) 除非另有说明，在分析中所使用试剂均为分析纯，用水为 GB/T 6682 规定的一级水

2) 芦丁标准品，分析纯

3) 甲醇，色谱纯

4) 乙酸乙酯，色谱纯

5) 乙酸，分析纯

6) DPPH，分析纯

7) 高压氮气，纯度 99.9%

8) 硅胶薄层板，分析型

9) 芦丁标准溶液

a) 标准储备液：精确称取  $10\text{ mg} \pm 0.1\text{ mg}$  芦丁标准品，溶于 10 mL 甲醇中。制得 1 mg/mL 标准储备液，置于棕色容量瓶中，在 4℃ 冰箱中恒温避光保藏，保质期 1 周

b) 标准工作液：准确吸取芦丁标准储备液 1.0 mL，与 9.0 mL 甲醇混合稀释，使该混合标准工作溶液浓度为 0.1 mg/mL。芦丁标准工作液测试当天新鲜配置

10) DPPH 衍生液

准确称取 25.0 mg DPPH(4.6)，溶于 75 mL 甲醇溶液中。DPPH 衍生液测试当天新鲜配置。

11) 槐米提取物

12) 滤膜：孔径 0.45  $\mu\text{m}$

13) 离心管：15~25 mL

## 6.7 仪器和设备

1) 实验室常用玻璃器皿

2) 分析天平：灵敏度 0.0001 g。

3) 涡旋混匀器

- 
- 4) 超声清洗仪：超声频率 40~80 kHz
  - 5) 离心机：转速 $\geq 4000$  rpm
  - 6) 双光束紫外-可见光分光光度计：检测范围 190-900 nm
  - 7) 薄层色谱工作站，包括：薄层点样仪、薄层展开仪、自动浸渍器、光密度扫描仪

## 6.8 主要测定步骤

### 6.8.1 槐米提取液制备

用电子天平(5.2)精确称取 50.0 mg 槐米提取物(4.11)粉末样品与 10 mL 甲醇混合。将混合物在涡旋混匀器(5.3)上震荡 1 min，然后置于超声清洗机(5.4)水浴 30 min。随后，将样品液在离心机(5.5)中以 3000 r/min 离心 10 min，取上清液 2 mL，用注射器过 0.45  $\mu\text{m}$  纤维素滤膜去除其中的固体微粒。过滤后，用 0.1 mg/mL 芦丁标准工作液作为参比，用双光束紫外-可见光分光光度计(5.6)测定滤液在 360 nm 波长的吸光度，以此为指导，用甲醇对滤液进行逐步稀释，使其吸光度在 0.7-1.0 之间。稀释后的滤液直接用于薄层点样分析。

### 6.8.2 色谱分离衍生和定量测定

a) 点样：以 0.5 kPa 氮气为载气，用薄层点样仪(5.7)将 5  $\mu\text{L}$  芦丁标准工作液(4.9b)和 5  $\mu\text{L}$  槐米提取液(6.1)以条带的形式吹扫到硅胶薄层板上。如图 1 所示，芦丁标准工作液和槐米提取液各点 3 个平行。具体参数为：条带高度 10 mm，条带宽度 6 mm，第一条带距板左边 15 mm，点样速度 150 ng/s，预留体积 0.2  $\mu\text{L}$ 。

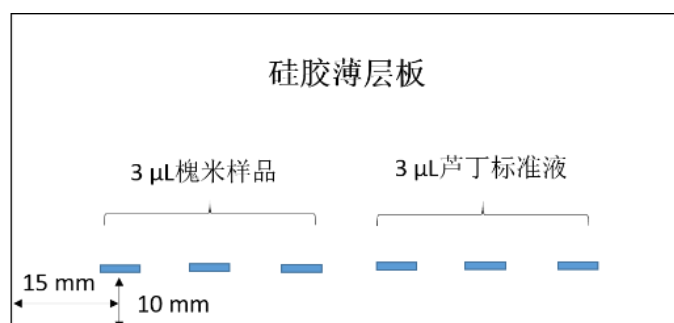


图 1 样品提取液和标准工作液的在硅胶薄层板上的点样布局

b) 展开：将点好后的硅胶薄层板用薄层自动展开仪(5.7)中色谱展开。

为了保证标准方法的规范性，本研究采用 CAMAG ADC-2 进行色谱展开，全自动化的预饱和硅胶板平衡有效避免了展开前沿变形的问题。在乙酸乙酯/

甲酸/乙酸/水体积比为 10/1.1/1.1/2 时，芦丁的比移值  $R_f$  为 0.45，槲皮素的比移值  $R_f$  为 0.65，同一轨道上的不同抗氧化活性成分实现良好的分离（图 2）。因此，可以确定本方法针对槐米提取物具有良好的选择性。

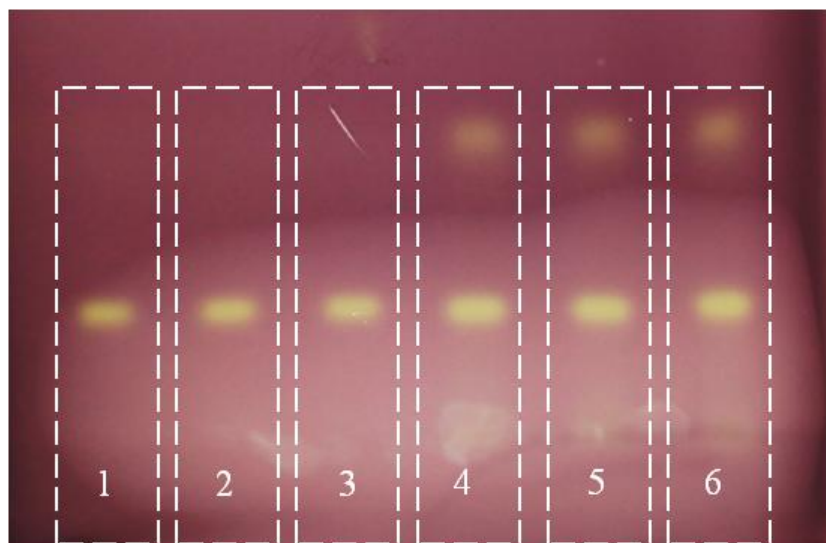


图 2 白光可视透射模式下的分离-显色结果：1-3. 芦丁标准品 100 ng/斑点（每个斑点含有 100 ng 芦丁标准品），4-6. 槐米样品 1-3

c) 浸渍衍生：用薄层自动浸渍仪(5.7)将展开干燥后的硅胶板浸入 DPPH 溶液(4.10)，浸渍速度 2 mm/s，停留时间 1 s。取出后将硅胶板避光静置待显色反应结束。

抗氧化代表物芦丁与 DPPH 作用显色是一个随时间变化的过程。因此，为了确定薄层板上 DPPH 显色反应的最佳反应时间，对浸渍衍生后的薄层板上目标斑点的信号强度进行了监测(每张照片时间间隔为 5 min)。如图 4 所示，在浸渍后的前 15 min 内，芦丁形成的抗氧化斑点信号强度均快速上升并达到最高值，此后呈缓慢下降趋势。因此可以确定薄层板上 DPPH 显色反应的最佳反应时间为 15 min。

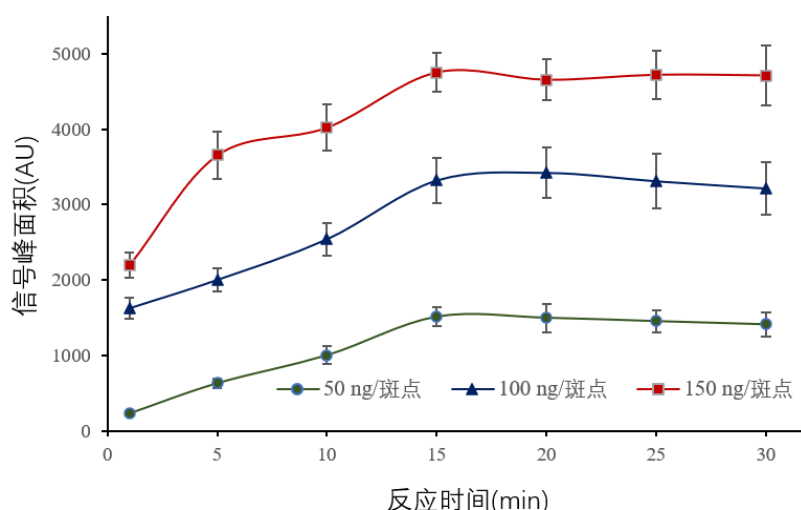


图 3 薄层板上不同浓度芦丁标准品抗氧化斑点信号强度随时间变化规律

d) 光密度扫描定量：用薄层光密度扫描仪(5.7)对已经显色的硅胶薄层板进行扫描检测。

由图 4 可知，硅胶板上芦丁的最大吸收在 530 nm。最初光密度扫描是采用吸收模式，扫描结果为反向吸收峰，数据无法分析，之后改用无滤光片的荧光模式重新扫描。在这一条件下，由于激发光被背景中没有消耗反应的 DPPH 分子吸收，形成低强度基线信号，而含有芦丁的目标物区域大部分 DPPH 被反应还原，能够反射大部分入射光，不使用滤光片就能避免反射光被截住而得不到检测信号。除了扫描模式，光源也是影响光密度扫描结果的重要因素。一般情况下，荧光模式下会选用扫描结果具有高信噪比的汞灯作为光源。但是本研究中使用汞灯无法得到色谱峰信号，所以改用 D2&W 灯作为激发光源，以得到具有良好信噪比的色谱峰信号（图 5）。狭缝尺寸、扫描速度和数据分辨率非关键参数，依照常规经验进行设置。因此，最终确定的光密度扫描定量分析的具体参数为：反射—荧光模式，D2&W 灯，激发光波长 530 nm，无滤光片，狭缝尺寸 3.00 mm×0.30 mm (Micro)，扫描速度 100 mm/s，数据分辨率 100 μm/s

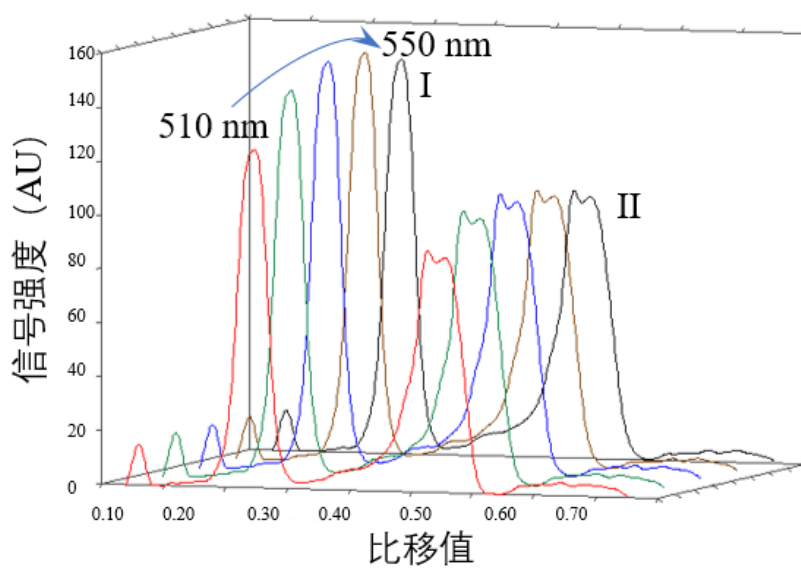


图 4 槐米提取物样品分离结果在不同波长下的光密度扫描结果：激发波长分别为 510, 520, 530, 540, 550 nm

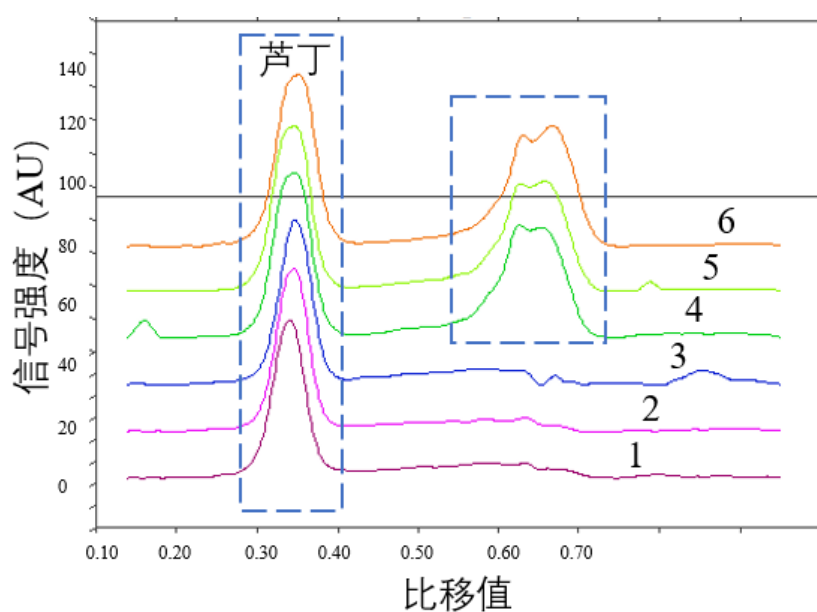


图 5 以波长 530 nm 为激发波长的光密度扫描结果：1-3. 芦丁标准品 100 ng/斑点（即轨道上每个斑点含有 100 ng 芦丁标准品），4-6. 槐米样品 1-3；虚线框内为抗氧化活性斑点

### 6.8.3 标准曲线

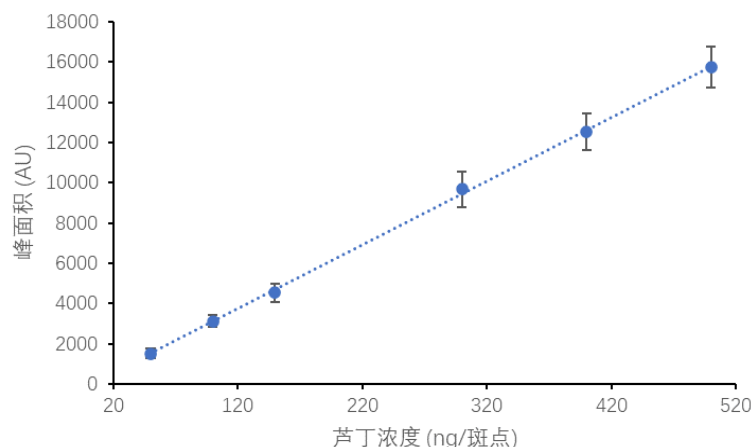


图 6 芦丁的标准曲线

以芦丁浓度为横坐标（x）相应的光密度扫描峰面积为纵坐标（y），做标准曲线。在芦丁浓度 50-500 ng/斑点范围内作图，得标准曲线回归方程标准曲线  $y=31.698x-65.953$ ，线性关系良好， $R^2=0.9995$ 。

### 6.8.4 检测限和定量限

使用合适浓度的芦丁标准溶液，逐渐减少点样量，进行薄层色谱-DPPH 显色反应，根据光密度扫描结果计算峰高与基线噪音高的比， $S/N=3$ （S 为对照品峰高，N 为基线噪音高）时的对照品浓度为检出限（LOD），得到芦丁的检测限 12 ng/斑点， $S/N=10$  时的浓度为定量限（LOQ），得到芦丁的定量限 39 ng/斑点。

### 6.8.5 精密度和准确度

通过测定槐米提取物中芦丁的添加回收率（分别进行了 3 个添加水平试验，50, 100, 150 mg/g，每个添加水平重复 3 次）对优化得到的分离-检测方法的精确度和准确度进行验证。表 1 所示，方法的添加回收率为 82%-97%，精密度  $RSD<10\%$ 。这表明本标准所使用的提取方法和分离检测手段具有良好的准确度和精密度。



表 1 检测方法的精度和准确度验证

样品	原有浓度 (mg/mL)	添加浓度 (mg/mL)	检测浓度 (mg/mL)	添加回收率 (%)
1	52	50	92±9	90±10
		100	132±8	87±6
		150	178±12	88±7
2	126	50	160±15	91±9
		100	201±17	89±8
		150	256±15	93±6
3	87	50	133±13	97±10
		100	154±10	82±6
		150	197±14	83±7

#### 6.8.6 抗氧化活性指数计算

按照公式(1)计算 3 个平行芦丁标准品斑点峰面积的平均值  $P_{\text{芦均}}$

$$P_{\text{芦均}} = \frac{(P_{\text{芦}1}) + (P_{\text{芦}2}) + (P_{\text{芦}3})}{3} \dots\dots(1)$$

按照公式(2)计算每个槐米提取液轨道斑点峰面积  $P_{\text{槐}}$ ，按式公式(1)计算：

$$P_{\text{槐}} = \sum_{i=1}^n P_i \dots\dots(2)$$

$i$ —抗氧化斑点编号

$n$ —抗氧化斑点数量

$P_i$ —第  $i$  个抗氧化斑点峰面积

按照公式(3)计算 3 个平行槐米样品平均斑点峰面积  $P_{\text{槐均}}$

$$P_{\text{槐均}} = \frac{(P_{\text{槐}1}) + (P_{\text{槐}2}) + (P_{\text{槐}3})}{3} \dots\dots(3)$$

按照公式(4)计算槐米样品的抗氧化指数  $A_i$

$$A_i = \frac{P_{\text{槐均}}}{P_{\text{芦均}}} \times \text{稀释倍数} \dots\dots(4)$$

---

提取物样品中往往不止一种抗氧化活性成分。而实现对提取物样品中所有抗氧化成分的综合活性评价，比精确定量测抗氧化活性物质含量可以更加客观地表征提取物作为药品和食品原料品质。因此，我们通过使用芦丁作为伴随外标，对所有样品分离得到的所有抗氧化峰信号面积进行归一化计算，得到抗氧化指数，可以对该样品的抗氧化活性进行整体评价。因此本方法更容易形成稳定可靠的国家标准。

---

### 6.8.7 小结

本实验以槐米提取物中芦丁为例，研究建立了薄层色谱与 DPPH 显色反应选择性定量评价植物提取物中抗氧化活性物质的方法。薄层板上芦丁与 DPPH 变色反应的浓度-信号关系标准曲线，结合硅胶板经光密度扫描、计算后得到的峰面积值，达到快速测定提取物中芦丁的含量的目的。实验结果显示，DPPH 在硅胶板上对芦丁的最优显色时间为 15 min；最佳提取溶剂为甲醇；通过使用乙酸乙酯/甲酸/乙酸/水(10/1.1/1.1/2，体积比)的混合物为流动相，可以实现提取物中不同抗氧化活性成分的完全分离；随后使用光密度扫描仪(反射—荧光模式，D2&W 灯，530 nm 激发波长，无滤光片)对色谱显色结果进行精确检测。该方法不仅简便可靠、抗干扰能力强，而且具有较好的定量能力。检测限和定量限分别为 12, 39 ng/斑点可以在 50-500 ng/斑点范围内获得良好的线性( $R^2=0.9995$ )。在此基础上，以芦丁作为外标，通过归一化计算方法，得到不同槐米提取物的抗氧化指数，有助于不同提取物样品的整体抗氧化活性评价比较，因此本方法更容易形成稳定可靠的国家标准。

综上所述，本标准方法能够满足植物提取物中抗氧化活性评价的要求。

## 6.9 方法验证

### 6.9.1 参加验证的实验室

选择 5 家具有资质的实验室参加方法的验证工作（表 2）。向验证单位提供方法草案、验证方案、标准溶液和验证报告格式。验证单位按照方法草案准备实验用品，在规定时间内完成验证实验并反馈验证结果报告。在方法验证前，参加验证的操作人员应熟悉和掌握方法原理、操作步骤及流程。方法验证过程中所用的试剂和材料、仪器和设备及分析步骤应符合方法相关要求。

表 2 验证单位与仪器型号

序号	定值单位	薄层色谱	色谱板
1	甘肃省天然药物实验室	CAMAG 薄层色谱工作站	德国默克硅胶板 F254(10×20cm)
2	南昌大学食品科学与技术国家重点实验室	CAMAG 薄层色谱工作站	德国默克硅胶板 F254(10×20cm)
3	农业部生物毒素检测重点实验室	CAMAG 薄层色谱工作站	德国默克硅胶板 F254(10×20cm)
4	浙江科技学院	CAMAG 薄层色谱工作站	德国默克硅胶板 F254(10×20cm)
5	中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室	CAMAG 薄层色谱工作站	德国默克硅胶板 F254(10×20cm)

### 6.9.2 方法验证结果

5 家实验室对三种槐米提取物样品的抗氧化指数进行检测计算，如表 3 所示。不同实验室之间的测定数据精密度如表 4 所示。

表 3 不同验证单位对槐米提取物抗氧化指数的测定计算结果

定值单位	样品序号	抗氧化指数测定值	RSD (%)
中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室	1	2.24	3.57
	2	2.37	2.95
	3	2.33	6.01
农业部生物毒素检测重点实验室	1	2.23	5.83
	2	2.28	7.02
	3	2.49	4.82
南昌大学食品科学与技术国家重点实验室	1	2.29	3.06
	2	2.41	3.73
	3	2.41	4.56
甘肃省天然药物实验室	1	2.41	6.22
	2	2.12	4.24
	3	2.28	4.39
浙江科技学院	1	2.18	5.04
	2	2.25	5.78
	3	2.37	7.17

表 4 不同验证单位之间检测数据精密度分析

定值单位	抗氧化指数测定值		
	样品 1	样品 2	样品 3
中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室	2.24	2.37	2.33
农业部生物毒素检测重点实验室	2.23	2.28	2.49
南昌大学食品科学与技术国家重点实验室	2.29	2.41	2.41
甘肃省天然药物实验室	2.41	2.12	2.28
浙江科技学院	2.18	2.25	2.37
平均值	2.27	2.286	2.376
RSD (%)	3.85	4.95	3.36

### 6.9.3 验证结论

5 家实验室对 3 个槐米提取物样品的抗氧化指数进行了检测计算（表 3），表 3 表明，针对单个样品的 RSD 值<7.17%。通过不同验证单位之间检测数据精密度分析得到，同一槐米提取物样品的 RSD 值<4.95%。上述分析结果表明，本标准提出的评价方法可以具有良好的可比性，可以在不同测试单位得到可靠的抗氧化定量评价结果

验证结论：本方法具有良好的可靠性和可比性，同时方法简单、耗时短，该方法用于实际样品中抗氧化活性的定量评价得到了满意的结果。

---

## 7 采用国际标准和国外先进标准程度，以及与国际、国外同类标准水平的对比情况

目前植物提取物抗氧化活性评价无国际标准和国外先进标准可参照。本标准在制订过程中对以槐米提取物抗氧化活性制品的质量、检测和市场进行了充分的调查研究，并广泛征求和采纳了国内相关领域专家的意见和建议，所制定的标准适合我国国情，具有先进性、科学性、实用性和可操作性，

## 8 与现行法律法规和强制性标准的关系

标准所确定的各项技术指标和内容符合我国现行的有关方针、政策，并与相关法律、法规、标准吻合。

本标准颁布实施后，填补我国企业生产抗氧化活性产品和质量控制方法的空白，更有利于行业应用；与现行的法律、法规及其他国家标准没有矛盾。

## 9 标准作为强制性或推荐性标准的意见

建议本标准作为推荐性国家标准发布。

## 10 实施标准的建议

如果本标准被批准并发布，为了贯彻好本标准，使其有效发挥作用，建议在标准发布后，在相关企业和检测机构进行宣传 and 贯彻，并组织有关部门和人员进行学习和培训。

## 11 参考文献

[1] M. Gutiérrez-Larraínzar, J. Rúa, D. de Arriaga, P.d. Valle, M.R. García-Armesto, In vitro assessment of synthetic phenolic antioxidants for inhibition of foodborne *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas fluorescens*, Food Control, 30 (2013) 393-399.

[2] M. Eskandani, H. Hamishehkar, J. Ezzati Nazhad Dolatabadi, Cytotoxicity and DNA damage properties of tert-butylhydroquinone (TBHQ) food additive, Food

---

Chem., 153 (2014) 315-320.

[3] G.M. Williams, M.J. Iatropoulos, J. Whysner, Safety Assessment of Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene as Antioxidant Food Additives, *Food and Chemical Toxicology*, 37 (1999) 1027-1038.

[4] L. Rashidi, Z. Gholami, S. Nanvazadeh, Z. Shabani, Rapid Method for Extracting and Quantifying Synthetic Antioxidants in All Edible Fats and Oils, *Food Analytical Methods*, 9 (2016) 2682-2690.

[5] M.A. Farajzadeh, M. Abbaspour, M.R.A. Mogaddam, H. Ghorbanpour, Determination of Some Synthetic Phenolic Antioxidants and Bisphenol A in Honey Using Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Followed by Gas Chromatography-Flame Ionization Detection, *Food Analytical Methods*, 8 (2015) 2035-2043.

[6] T.-X. Tang, X.-J. Xu, D.-M. Wang, Z.-M. Zhao, L.-P. Zhu, D.-P. Yang, A Rapid and Green Limit Test Method for Five Synthetic Colorants in Foods Using Polyamide Thin-layer Chromatography, *Food Analytical Methods*, 8 (2015) 459-466.

[7] Q. Li, X. Yu, Y. Yang, X. Liu, Simple Determination of Diacylglycerols Using Thin Layer Chromatography and Visible Spectrophotometry, *Food Analytical Methods*, 11 (2018) 236-242.

[8] P. Agrawal, K. Laddha, Development of validated high-performance thin layer chromatography for quantification of aristolochic acid in different species of the Aristolochiaceae family, *J. Food Drug Anal.*, 25 (2017) 425-429.

[9] D. De Lucia, S. Manfredini, T. Bernardi, S. Vertuani, High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC): a New Green Approach to Soluble Fiber Determination in Plant Matrices, *Food Analytical Methods*, 8 (2015) 32-39.

[10] D. Szikra, I.P. Nagy, Attenuated Total Reflectance as an Alternative of Diffuse Reflectance Infrared Detection in the Identification of Compounds Separated by Thin Layer Chromatography, *J. Liq. Chromatogr. Related Technol.*, 31 (2007) 161-168.

[11] L. Wang, X.-M. Xu, Y.-S. Chen, J. Ren, Y.-T. Liu, HPTLC-FLD-SERS as a



---

facile and reliable screening tool: Exemplarily shown with tyramine in cheese, *J. Food Drug Anal.*, (2017).

[12] Z. Xie, Y. Wang, Y. Chen, X. Xu, Z. Jin, Y. Ding, N. Yang, F. Wu, Tuneable surface enhanced Raman spectroscopy hyphenated to chemically derivatized thin-layer chromatography plates for screening histamine in fish, *Food Chem.*, 230 (2017) 547-552.

[13] L. Zhang, J. Shi, J. Tang, Z. Cheng, X. Lu, Y. Kong, T. Wu, Direct coupling of thin-layer chromatography-bioautography with electrostatic field induced spray ionization-mass spectrometry for separation and identification of lipase inhibitors in lotus leaves, *Anal. Chim. Acta*, 967 (2017) 52-58.

[14] Y. Chen, G.E. Morlock, Layer-Induced Sensitivity Enhancement in Planar Chromatography–Bioluminescence–Mass Spectrometry: Application to Alkaloids, *Chromatographia*, 79 (2016) 89-96.

[15] Y. Chen, W. Schwack, HPTLC-Bioautography/Mass Spectrometry: A Tailored Tool for Screening Veterinary Antibiotic Residues, *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 111 (2015) 125-128.

[16] Y. Chen, W. Schwack, High-performance thin-layer chromatography screening of multi class antibiotics in animal food by bioluminescent bioautography and electrospray ionization mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1356 (2014) 249-257.

[17] V. Baumgartner, C. Hohl, W. Schwack, Rolling—A new application technique for luminescent bacteria on high-performance thin-layer chromatography plates, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 2692-2699.

[18] I.M. Choma, E.M. Grzelak, Bioautography detection in thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 2684-2691.

[19] S. Buchinger, D. Spira, K. Bröder, M. Schlüsener, T. Ternes, G. Reifferscheid, Direct Coupling of Thin-Layer Chromatography with a Bioassay for the Detection of Estrogenic Compounds: Applications for Effect-Directed Analysis, *Anal. Chem.*, 85 (2013) 7248-7256.

[20] S. Agatonovic-Kustrin, D.W. Morton, P. Ristivojević, Assessment of

---

antioxidant activity in Victorian marine algal extracts using high performance thin-layer chromatography and multivariate analysis, *J. Chromatogr. A*, 1468 (2016) 228-235.

[21] L. Gu, T. Wu, Z. Wang, TLC bioautography-guided isolation of antioxidants from fruit of *Perilla frutescens* var. *acuta*, *LWT - Food Science and Technology*, 42 (2009) 131-136.

[22] L. Gu, S. Zheng, T. Wu, G. Chou, Z. Wang, High-Performance Thin-Layer Chromatographic-Bioautographic Method for the Simultaneous Determination of Magnolol and Honokiol in *Magnoliae officinalis* Cortex, *J. Planar Chromatogr.*, 27 (2014) 5-10.

[23] S.B. Kedare, R.P. Singh, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48 (2011) 412-422.

[24] M. Olech, Ł. Komsta, R. Nowak, Ł. Cieśla, M. Waksmundzka-Hajnos, Investigation of antiradical activity of plant material by thin-layer chromatography with image processing, *Food Chem.*, 132 (2012) 549-553.

[25] I.A. Sima, D. Casoni, C. Sâmbu, High sensitive and selective HPTLC method assisted by digital image processing for simultaneous determination of catecholamines and related drugs, *Talanta*, 114 (2013) 117-123.

[26] M.N. Safdar, T. Kausar, S. Jabbar, A. Mumtaz, K. Ahad, A.A. Saddozai, Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques, *J. Food Drug Anal.*, 25 (2017) 488-500.

[27] S.-N. Lou, Y.-S. Hsu, C.-T. Ho, Flavonoid compositions and antioxidant activity of calamondin extracts prepared using different solvents, *J. Food Drug Anal.*, 22 (2014) 290-295.

[28] C.C. Denardin, G.E. Hirsch, R.F. da Rocha, M. Vizzotto, A.T. Henriques, J.C.F. Moreira, F.T.C.R. Guma, T. Emanuelli, Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits, *J. Food Drug Anal.*, 23 (2015) 387-398.

[29] M.Ž. Muruzović, K.G. Mladenović, O.D. Stefanović, S.M. Vasić, L.R. Čomić, Extracts of *Agrimonia eupatoria* L. as sources of biologically active compounds and evaluation of their antioxidant, antimicrobial, and antibiofilm

---

activities, J. Food Drug Anal., 24 (2016) 539-547.

[30] H. Dehghan, Y. Sarrafi, P. Salehi, Antioxidant and antidiabetic activities of 11 herbal plants from Hyrcania region, Iran, J. Food Drug Anal., 24 (2016) 179-188.

[31] K.H. Musa, A. Abdullah, A. Al-Haiqi, Determination of DPPH free radical scavenging activity: Application of artificial neural networks, Food Chem., 194 (2016) 705-711.

[32] 王天楠, 张煌, 陈益胜等. HPTLC-DPPH 法定性定量分析保健品中芦丁 [J]. 食品与机械, 2019, 第 35 卷(1):92-96, 142.