

中华人民共和国国家标准

GB/TXXXXX—XXXX

木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液相色谱法

Determination of flavonol for cassava leaves —
High-performance liquid chromatography

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

(本草案完成时间：2022-2-25)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 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。

本文件由中国标准化研究院提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

木薯叶片中黄酮醇的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了高效液相色谱法测定木薯叶片中黄酮醇的测定方法的原理、试剂与材料、仪器与设备、试样制备、分析步骤、结果计算与表示、精密度的要求。

本文件适用于木薯新鲜叶片和木薯叶粉中4种黄酮醇类化合物含量的测定。

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

GB/T 32467 化学分析方法验证确认和内部质量控制术语及定义

3 术语和定义

GB/T 32467界定的术语和定义适用于本文件。

4 原理

试样中黄酮醇经50%乙醇溶液超声波辅助提取，提取液经离心，上清液混合后过滤，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

以下所用的试剂，除另有说明外均为分析纯试剂，水为符合GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 甲醇， CH_3OH ，色谱纯，CAS NO: 67-56-1。

5.2 无水乙醇， $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ，CAS NO: 64-17-5。

5.3 磷酸 H_3PO_4 ，CAS NO: 7664-38-2。

5.4 50%乙醇溶液：取 500 mL 无水乙醇，加入 500 mL 水，混匀。

5.5 0.2%磷酸溶液：取 2 mL 磷酸，置于 1000 mL 容量瓶中，用水定容至刻度(现配现用)。

5.6 4种黄酮醇标准样品：杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷，纯度 $\geq 98\%$ ，见附录A。

5.7 微孔滤膜：13 mm \times 0.22 μm 。

5.8 黄酮醇标准溶液配制

5.8.1 杨梅苷标准储备溶液：准确称取杨梅苷标准样品 10.0 mg，加甲醇溶解并定容至 10.0 mL，配成浓度为 1.0 mg/mL 标准储备液，在 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下密封保存，有效期 6 个月。

5.8.2 芦丁标准储备溶液：准确称取芦丁标准样品 60.0 mg，加甲醇溶解并定容至 10.0 mL，配成浓度为 6.0 mg/mL 标准储备液，在 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 下密封保存，有效期 6 个月。

- 5.8.3 烟花苷标准储备溶液：准确称取烟花苷标准样品 30.0 mg，加甲醇溶解并定容至 10.0 mL，配成浓度为 3.0 mg/mL 标准储备液，在-18 ℃下密封保存，有效期 6 个月。
- 5.8.4 水仙苷标准储备溶液：准确称取水仙苷标准样品 10.0 mg，加甲醇溶解并定容至 10.0 mL，配成浓度为 1.0 mg/mL 标准储备液，在-18 ℃下密封保存，有效期 6 个月。
- 5.8.5 标准中间工作溶液：分别移取 1.0 mL 的杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷标准储备溶液于 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇定容至 10.0 mL，获得杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷浓度分别为 100 μg/mL、600 μg/mL、300 μg/mL、100 μg/mL 标准中间工作溶液，在-18 ℃下密封保存，有效期 6 个月。
- 5.8.6 混合标准工作液：准确吸取一定体积的混合标准中间液，逐渐稀释，配制成芦丁浓度为 1.5 μg/mL，15 μg/mL，30 μg/mL，150 μg/mL，300 μg/mL 和 600 μg/mL，烟花苷浓度为 0.75 μg/mL，1.5 μg/mL，7.5 μg/mL，15 μg/mL，75 μg/mL，150 μg/mL 和 300 μg/mL，杨梅苷、水仙苷浓度分别为 0.25 μg/mL，2.5 μg/mL，5 μg/mL，25 μg/mL，50 μg/mL 和 100 μg/mL 的混合标准工作液。标准系列溶液于 4 ℃保存，有效期 7 d。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 6.2 分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01 g。
- 6.3 超声波清洗器：功率≥500 W。
- 6.4 离心机：带 15 mL 转子或适配器，转速≥5000 r/min。
- 6.5 植物组织研磨仪：带 0.2 mm 的筛。
- 6.6 烘箱：温度可调。

7 试样制备与保存

7.1 试样制备

7.1.1 木薯鲜叶

木薯新鲜叶片采集后，擦拭干净叶片表面尘土或水分，用液氮速冻后研磨至粉末，装入洁净的离心管中，密封保存。

7.2 木薯叶粉

木薯新鲜叶片采集后，放入 60 ℃烘箱连续烘干 24 h，取出后用植物组织研磨仪粉碎，过 0.2 mm 的筛，混匀，装入洁净的密封袋中，密封保存。

8 试样保存

木薯新鲜叶片试样保存于-40 ℃，木薯叶粉保存于 4 ℃以下。试样制备过程中，应防止样品污染或组分变化。

9 操作步骤

9.1 提取

9.1.1 木薯新鲜叶片

准确称取木薯鲜叶粉末 0.2 g (精确至 0.0001 g) 于 15.0 mL 离心管中, 加入 50% 的乙醇 5.0 mL, 旋涡振荡混匀, 超声提取 60 min (50 °C, 4 kHz), 待样品冷却后混匀, 样品离心 10 min (10000 r/min, 25 °C); 上清液转移至干净的 10 mL 容量瓶中, 残渣再加入 5.0 mL 50% 的乙醇溶液, 旋涡振荡混匀, 样品离心 5 min (10000 r/min, 25 °C), 合并两次离心的上清液, 加入 50% 的乙醇定容至 10.0 mL, 混匀即为待测液, 取 1 mL 混合的待测液, 通过 0.22 μm 微孔滤膜, 供高效液相色谱仪测定。

9.1.2 木薯叶粉

准确称取木薯叶粉末 0.2 g (精确至 0.0001 g) 于 15 mL 离心管中, 加入 50% 的乙醇 5.0 mL, 旋涡振荡混匀, 超声提取 60 min (50 °C, 4 kHz), 待样品冷却后, 样品离心 10 min (10000 r/min, 25 °C); 上清液转移至干净的 10 mL 容量瓶, 残渣再加入 5.0 mL 50% 的乙醇溶液, 旋涡振荡混匀, 样品离心 5 min (10000 r/min, 25 °C), 合并两次离心的上清液, 加入 50% 的乙醇定容至 10.0 mL, 混匀即为待测液, 取 1 mL 混合的待测液, 通过 0.22 μm 微孔滤膜, 供高效液相色谱仪测定。

9.2 色谱参考条件

- XDB C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 或性能相当的色谱柱;
- 流动相: 甲醇和 0.2% 磷酸水, 按表 1 的规定进行梯度洗脱;
- 流速: 0.8 mL/min;
- 检测波长: 360 nm;
- 进样量: 10 μL;
- 柱温: 40 °C。

表1 梯度洗脱表

时间/min	甲醇/%	0.2%磷酸水溶液/%
0	25	75
15	58	42
20	80	20
25	100	0
27	25	75
32	25	75

9.3 测定

参考上述色谱条件 (9.2) 调节高效液相色谱仪, 使木薯叶黄酮醇各组分的色谱峰完全分离。分别吸取 10 μL 适当浓度的木薯叶黄酮醇混合标准工作液和样液进行液相色谱测定, 分别得到木薯叶黄酮醇各组分的标准工作液峰面积 (A_{ii}) 和样液木薯叶各组分峰面积 (A_i)。如果样液中木薯叶黄酮醇某一组分峰面积与标准工作溶液中的该组分峰面积相差较大时, 稀释样液或调整标准工作液浓度后再行测定。

在上述色谱条件下, 样品中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷保留时间分别为 11.467 min、13.632 min、15.684 min、16.097 min, 标准样品的色谱图参见附录图 B.1。

9.4 空白试验

除不加试样外，按9.1~9.3操作步骤进行测定

10 结果计算与表示

10.1 木薯叶黄酮醇各组分含量

按式（1）计算试样中木薯叶黄酮醇各组分含量（mg/kg）。

$$X_i = \frac{A_i \times C_i \times V}{A_{ii} \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X_i ——试样中某一黄酮醇组分含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A_i ——试样提取液中某一黄酮醇组分的峰面积；

A_{ii} ——木薯叶黄酮醇混合标准工作液中某一组分的峰面积；

C_{ii} ——木薯叶黄酮醇混合标准液中某一组分的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样提取液最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）。

10.2 木薯黄酮醇总含量

试样木薯叶黄酮醇总含量为各组分之和，按式（2）计算：

$$X = \sum X_i \dots\dots\dots (2)$$

式中：

X ——试样中总黄酮醇含量，单位为毫克每千克（mg/kg）。

注：本标准4种黄酮醇已包括木薯叶黄酮醇的绝大部分组分，可认为是木薯叶黄酮醇的总含量。

10.3 结果表示

结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留1位有效数字。

11 精密度

11.1 重复性

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其算术平均值的10%。

11.2 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

12 检出限和定量限

木薯叶中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷检出限分别为：3.50 mg/kg、2.50 mg/kg、2.50 mg/kg、2.50 mg/kg，定量限分别为：10.00 mg/kg、7.50 mg/kg、7.50 mg/kg、7.50 mg/kg。

附录 A

(资料性)

4 种黄酮醇中英文名称、CAS 号、分子式

4 种黄酮醇中英文名称、CAS 号、分子式见表 A.1。

表 A.1 4 种黄酮醇中英文名称、CAS 号、分子式

序号	中文通用名	英文通用名	CAS No.	分子式
1	杨梅苷/杨梅素-3-0-芸香糖苷	Myricitrin, myricetin-3-0-rutinoside	41093-68-9	$C_{27}H_{30}O_{17}$
2	芦丁/槲皮素-3-0-芸香糖苷	Rutin, Quercetin 3-0-rutinoside	153-18-4	$C_{27}H_{30}O_{16}$
3	烟花苷/山柰酚-3-0-芸香糖苷	Nicotiflorin, Kaempferol-3-0-rutinoside	17650-84-9	$C_{27}H_{30}O_{15}$
4	水仙苷/异鼠李素-3-0-芸香糖苷	Narcissoside, Isorhamnetin-3-0-rutinoside	604-80-8	$C_{28}H_{32}O_{16}$

附录 B

(资料性)

4种黄酮醇混合标准溶液色谱图

4种黄酮醇混合标准溶液色谱图见图B.1。

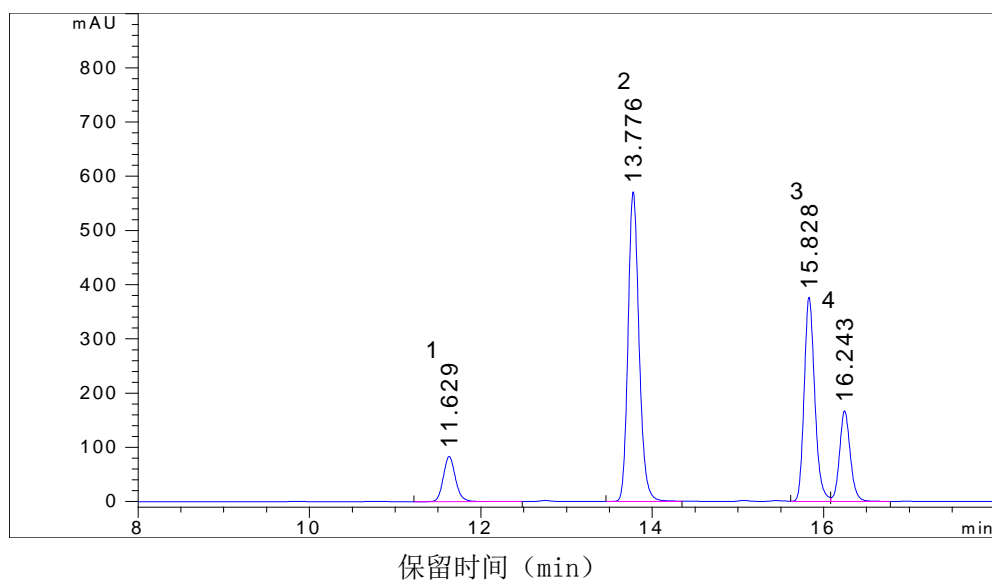


图 B.1 4种黄酮醇混合标准溶液高效液相色谱图

注：图B.1中编号1~4分别为：杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷，浓度分别为：50 mg/L、150 mg/L、50 mg/L、50 mg/L。