
《苹果中根皮苷的检测方法- 高效液相色谱法》国家标准编制说明

目录	
1 任务来源	3
2 起草的目的和意义	3
2.1 企业产品质量控制的需要	4
2.2 完善国家标准的需要	5
3 根皮苷研究/应用与标准现状	5
3.1 根皮苷研究	5
3.2 根皮苷开发应用	5
3.3 根皮苷标准	6
4.编制过程	7
4.1 成立标准制定工作组	7
4.2 确定工作计划和标准制定原则	8
4.3 查阅国内外相关标准和文献资料	8
4.4 研究建立标准方法，开展条件实验	9
4.5 方法验证	9
4.6 形成标准草案	9
4.7 形成标准讨论稿和编制说明	10
4.8 形成标准征求意见稿和编制说明	10
4.9 征求意见并形成标准送审稿和编制说明	10
5 本标准与国内外分析方法的关系	11
6 主要技术指标依据与说明	11
6.1 标准名称	11
6.2 前言	12
6.3 主体内容	12
6.4“范围”的界定	12
6.5 原理	12
6.6 试剂	12
6.7 仪器和设备	13
6.8 苹果样品制备	14
6.9 苹果粗品提取	14
6.10 根皮苷 HPLC 定量分析方法的建立	14
6.10.1 检测波长选择	14
6.10.2 色谱柱的选择	15
6.10.3 不同洗脱条件	17
6.10.4 根皮苷 HPLC 法检测优化后的色谱条件	22
6.10.5 标准曲线	22
6.10.6 检出限和定量限	23
6.10.7 精密度	23
6.10.8 标准溶液稳定性	24
6.10.9 重复性	24
6.10.10 稳定性	25
6.10.11 加标回收率试验	25
6.11 方法验证	26
6.11.1 参加验证的实验室	26

6.11.2 方法验证结果.....	错误！未定义书签。
6.12 实际样品检测.....	错误！未定义书签。
6.13 验证结论.....	错误！未定义书签。
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.....	26
8 与现行法律法规和强制性标准的关系.....	27
9 标准作为强制性或推荐性标准的意见.....	27
10 实施标准的建议.....	27
11 参考文献.....	27

1 任务来源

本国家标准的制定任务是根据国家标准化委员会下达的国家标准制定计划《苹果中根皮苷检测方法-高效液相色谱法》项目（计划号为 20205076-T-424）。由北京化工大学上报，中国标准化研究院归口及执行，主管部门为国家市场监督管理总局。本标准由北京化工大学，中国标准化研究院，中华全国供销合作总社济南果品研究院，中国农业大学、蓬莱昊林果蔬有限公司、河北冠卓检测科技股份有限公司等单位起草。本标准主要起草人：魏芸、路艳珍、席兴军、兰韬、郑晓冬、倪汉文、周文峰、鲁润华、刘媛媛、刘聪、仵云仲、于潇、王文娟。

2 起草的目的和意义

苹果系蔷薇科，苹果亚科苹果属植物，原产于中亚、欧洲东南部和我国的新疆西部^[1]，是一种很重要的经济作物。苹果的生态适应性强，果实的营养价值高、耐贮性好、供应周期长，是世界最重要的，也是我国农业部确定的一种优势农产品^[2]。新鲜的苹果中含有约 85% 的水分和 14% 的碳水化合物（主要是纤维和果糖），吃起来酸甜可口，此外苹果中还含有维生素（0.02-0.3%）、矿物质（0.1-0.3%）、有机酸（0.02-0.1%）和多酚（0.1-0.6%）等^[3-6]，营养价值较高，且易于人体吸收，具有较好的保健作用，被广泛用作膳食补充剂。

流行病学研究表明，通过食用苹果及相关产品可以降低一些疾病的发病率。如 Boyer 等^[7]研究发现苹果还可以降低 II 型糖尿病风险，Marchand 等^[8]发现日常食用大量的苹果、洋葱以及葡萄柚可以降低

40-50%的肺癌风险，Michels 等^[9]发现食用大量的苹果可以降低腺瘤风险，Jedrychowski 等^[10]发现每天吃一个以上的苹果可以降低约 50% 的大肠癌风险，Chai 和 Sesso 等^[11,12]发现食用苹果及苹果脆可降低 13-22% 的心血管疾病风险。苹果的这些功效与其组分的含量及抗氧化活性相关，Boyer 等^[7]报道苹果中的抗氧化活性成分的含量仅次于蔓越莓，位列水果中第二位，D'Angelo 等^[13]也发现 100 g 苹果表现出的抗氧化活性相当于 1.5 mg 维生素 C（VC）的抗氧化活性，但是苹果中含有的 VC 的量对总抗氧化活性的贡献值还不到 0.4%，大部分的抗氧化活性主要由其组成中的多酚体现，一般来说，多酚含量越高，抗氧化活性越强。因此，近年来，科研工作者投入了大量的时间和金钱在研究苹果的多酚组成及含量上。研究表明，苹果中的多酚组成主要有槲皮素类和根皮苷。

苹果中根皮苷的分离纯化及检测工艺目前没有相关国家标准，没有一定规模的应用，而且产业化目前还没形成。因此非常有必要制定相关标准。

2.1 企业产品质量控制的需要

我国的苹果主要种植在西北黄土高原和渤海湾两大区域，约占总栽培面积的 80%，其中陕西、山东、河南、山西、河北、甘肃、辽宁、新疆等地是主要产区，年产量均在百万吨以上，占苹果生产总量的 90%。苹果种植面积大、产量高，味道甜美，是我国最受欢迎的水果之一。同时，以苹果为原料生产苹果提取物，从而实现农副产品再利用，这越来越受到重视。但是根皮苷含量测定尚无国家标准，且根皮

苷原料的提取工艺不同，导致原料质量标准不统一，药品临床疗效不稳定。因此，本标准的制定是企业进行产品质量控制的需要。

2.2 完善国家标准的需要

是进一步完善和健全苹果产品质量标准的迫切需要。根皮苷含量作为是公认的苹果质量评价的关键性质量指标，作为一项苹果的品质评价指标具有重要的意义。但是目前针对苹果质量标准当中，由于缺乏苹果中根皮苷的检测方法，在目前已经发布实施的国家标准GB/T 10651-2008 《鲜苹果》没有设置根皮苷含量这一重要的质量评价指标，而是设置了最简单的可溶性固形物含量等这一较为常见的质量指标，不利于苹果行业的进一步健康发展。因此，这项通用基础性的检测方法标准的制定，将为今后所有苹果相关标准的制定奠定良好的基础。

3 根皮苷研究/应用与标准现状

3.1 根皮苷研究

国内外对根皮苷的研究十分广泛，可查询到大量的论文与专利，研究范围包括提取分离、纯品制备、分析检测、结构表征、药理活性、毒性、分子结构改性、产品加工等方面。

3.2 根皮苷开发应用

根皮苷是从苹果、苹果树皮及叶等中提取而得，它是苹果树体内的酚类物质。国内外的临床研究表明，根皮苷在治疗糖尿病方面有很好的疗效。根皮苷能激活蜂窝蛋白激酶，对细胞无序增生有抑制作用，可用于皮肤癌及其他肿瘤的辅助治疗。还具有降低血糖、改善记忆力、

抗氧化、抗炎、抗过敏等多种重要的生物活性，同时还可以抑制黑色素的形成,减淡茶褐色、灰色斑和雀斑的色泽，在食品、美容和保健品行业都有潜在的利用价值。

目前根皮苷已经批准成为食品添加剂，其糖基水解能够形成葡萄糖，加之含量高，所以被许多学者认为是碳水化合物的一种贮藏形式，是一种甜度非常高的天然非糖甜味剂，可以作为甜食爱好者的糖尿病人的糖类替代食品。它被多酚氧化酶氧化后生成的产物可以转化生成亮黄色的染料，这种染料的水溶性强，可用于食品加工业，替代人工染料，避免人工合成色素带来的毒害作用。由于这些良好的性能，其在新型药物和功能性食品的开发中具有广阔的前景。

3.3 根皮苷标准

已有大量文献及支撑材料证明，苹果及其皮和渣中含量较高的根皮苷，作为一种天然抗氧化剂，在食品化工、医疗保健、化妆品等领域发挥着重要的作用。根皮苷作为食品添加剂，抗氧化性效用广泛并且作用温和、无毒、绿色、健康的特点；根皮苷作为化妆品原料，抗氧化功能很强，具有显著美白、抗皱、保湿等作用，能清除皮肤内的自由基，对油脂的抗氧化浓度在 $(10\sim30)\times 10^{-6}$ 之间，能阻止糖类成分进入表皮细胞，从而抑制皮脂腺的过度分泌，治疗分泌旺盛型粉刺；能抑制黑素细胞活性，对各种皮肤色斑有淡化作用等。同时能吸收本身重量 4~5 倍的水，能促进配方中其它功能因子的吸收利用，使其发挥出更好的功效。因此从苹果皮渣提取出来的根皮苷，可应用于面膜、护肤膏霜、乳液和精华素中。而目前我国目前根皮苷的检测方法标准

为空白，导致根皮苷原料质量难以检测和控制，生产企业又缺乏技术力量研发检测方法，一定程度导致了市场上该原料的质量参差不齐，市场混乱。

截止 2020 年 7 月 24 日，国家药品监督管理局显示的持有化妆品生产许可证的企业有 5292 家，而我国化妆品注册备案的企业约 7 万多家，大约有九成以上的企业委托生产，市面上 60% 以上的产品声称具有美白、抗皱、保湿的产品。因此，这类化妆品当中的根皮苷含量测定，将极大满足这些生产企业质量控制和产品研发的需要。同时，也将为所有相关的检测机构如国家化妆品质量监督检验中心（广州））、国家化妆品质量监督检验中心（北京））、国家食品质量监督检验中心、国家食品质量监督检验中心（广东）、中国检科院综合检测中心、山东食品药品检验研究院、国家加工食品质量监督检验中心(济南)、北京市食品安全监控和风险评估中心、普宁华测、北京京畿检测技术有限公司、中国农科院质标所、浙江省农科院质量标准研究所、山东农科院质标所等市场监管系统检测机构、农业系统检测机构和第三方检测，在相关产品的检测抽查、质量监督和风险评估方面，提供一个权威急需的通用基础性检测方法标准。

4.编制过程

4.1 成立标准制定工作组

2019年11月10日在北京化工大学召开了国家标准《苹果中根皮苷检测方法-高效液相色谱法》第一次起草工作会议，成立了标准起草工作组，并进行了任务分工。起草工作组成员包括北京化工大学，中

国标准化研究院，中华全国供销合作总社济南果品研究院，中国农业大学等，相关的企业和行业蓬莱昊林果蔬有限公司、河北冠卓检测科技股份有限公司等单位参加了研讨会。按照工作任务要求，工作组进行了任务分解，制定了标准起草工作计划和任务分工表。

4.2 确定工作计划和标准制定原则

为保证标准的先进性和适用性，标准起草工作组在充分讨论和研究的基础上，明确了指标选择与确定的以下原则：

- （1）遵循国家有关方针、政策和法规，结合实验数据确定技术指标。
- （2）技术水平与生产实际相结合；密切结合我国国情，严格执行强制性国家标准，参考行业标准，同时也考虑到与其它相关标准相协调。
- （3）优先体现质量引导和规范作用，兼顾可操作性。

4.3 查阅国内外相关标准和文献资料

标准起草工作组首先收集、翻译和整理了国内外有关研究进展和先进国家的相关标准、法规等文献资料，掌握了有关标准现状；并对我国现有苹果相关标准中的术语、指标等技术内容进行了归纳和总结，为标准文本的编制奠定理论基础。

积极筹备标准制定前期工作。为了使本标准更具有先进性、科学性，广泛听取了行业内多家企业的意见；同时联合行业重点企业，从广西、北京、山东、辽宁等地区收集样品，收集国内苹果重点生产企业样品。

经查阅大量学术文献，制定了科学严谨的质量指标检测、评价实验方案和任务分工，确定根皮苷含量作为质量指标进行检测，建立高

效液相色谱检测苹果中根皮苷。

4.4 研究建立标准方法，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。

2019 年 11 月始，标准起草工作组赴陕西省、山东省等苹果主产地进行调研，获取了大量相关信息与数据，采集了多份样品。

第一批样品采集后，开始开展实验室研究及验证工作，建立根皮苷高效液相色谱分析方法，包括线性范围、相关系数、加标回收率、准确度、精密度、检出限、定量限等；苹果中根皮苷的粗提。

4.5 方法验证

2021 年 1 月 2 日~2021 年 2 月 26 日，由 5 家单位对“苹果中根皮苷的高效液相色谱检测方法”进行验证，分别是中国标准化研究院，中华全国供销合作总社济南果品研究院，中国农业大学、山东悟空仪器有限公司、北京市理化分析测试中心，通过统计检验确认外部实验室试验结果的准确性。

4.6 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；对文献中根皮苷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《苹果中根皮苷的高效液相色谱检测方法》国家标准第一次起草工作会议的基础上，起草小组按照 GB1.1-2009《标准化工作导则第 1 部

分：标准的结构和编写》的编写规定，共同讨论起草形成了《苹果中根皮苷的高效液相色谱检测方法》国家标准的技术框架和主要内容，初步形成了《苹果中根皮苷的高效液相色谱检测方法》标准草案。

4.7 形成标准讨论稿和编制说明

2020年2月底在北京召开了《苹果中根皮苷检测方法-高效液相色谱法》国家标准第二次起草视频工作会，在本次工作会上起草工作组及相关单位共同讨论了标准的技术框架和主要内容。

与会专家对《苹果中根皮苷检测方法-高效液相色谱法》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《苹果中根皮苷检测方法-高效液相色谱法》标准讨论稿及其编制说明。

4.8 形成标准征求意见稿和编制说明

2020年5月12日，起草工作组组织相关单位和专家召开了第三次标准起草工作视频会议。参加单位包括北京化工大学、中华全国供销合作总社济南果品研究院、中国标准化研究院、中国农业大学、中科院兰化所青岛分所等单位。与会专家及起草组成员对《苹果中根皮苷检测方法-高效液相色谱法》国家标准草案中的英文名称、范围、术语和定义、技术指标等条款内容提出了详细的意见，会后根据修改意见形成了《苹果中根皮苷检测方法-高效液相色谱法》国家标准征求意见稿及其编制说明。

4.9 征求意见并形成标准送审稿和编制说明

2021年3月1日-2021年5月1日，起草工作组根据讨论的专家

和单位名单，分别作为主持单位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，向相关单位和专家公开征求标准修改意见。截止到 2021 年 7 月 1 日，共收集到 XXX 等研究机构、检测机构、生产企业、销售企业等单位提出的反馈意见 XX 条。起草工作组对提出的意见经过反复研究、讨论和处理后，修改形成了送审稿及编制说明。具体意见汇总和处理表见标准征求意见汇总处理表。

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用水果苹果中根皮苷含量检测要求，在质量控制目标和技术手段上与国际接轨，适应我国大部分农副产品质控实验室仪器设备和技术能力的检测方法标准。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。本标准采用高效液相色谱法（HPLC）测定根皮苷。样品的前处理，即苹果中根皮苷的提取，检测方法参考文献资料，选择合适的色谱柱以及仪器条件。力求方法在稳定、可靠和实用的基础上，达到国际先进水平，以适应我国农副产品苹果中根皮苷含量检测、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

该标准名称按照国家标准立项计划确定，为促进行业发展和其他领域包括食品、保健品广泛使用，主要解决苹果中根皮苷测定的技术问题，所以将本标准的名称定为：《苹果中根皮苷检测方法-高效液

相色谱法》。翻译为“Determination of phlorizin in apples High performance liquid chromatography”。

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

本标准规定了用高效液相色谱法测定苹果中根皮苷含量的原理、材料、仪器与设备、测定步骤、结果计算与表示、精密度和回收率、检验报告。

本标准适用于苹果中根皮苷定性和含量测定。

6.5 原理

样品经提取等前处理后，将提取液过滤，经高效液相色谱分离测定，根据保留时间定性，外标峰面积定量。

6.6 试剂

6.6.1 乙腈：色谱纯。

6.6.2 根皮苷（CAS：60-18-1）标准品：纯度 $\geq 98.0\%$ 。

6.6.3 有机滤模：孔径 $0.45\mu\text{m}$ 。

6.6.4 流动相：A. 乙腈：B. 0.01% 三氟乙酸水溶液 = 25 : 75，流速：1.0 mL/min。

6.6.5 根皮苷标准储备溶液（1.0 mg/mL）：准确称取根皮苷标准品 25 mg（精确至 0.0001 g）于 25 mL 容量瓶中，用乙腈溶解并定容至刻度，配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液。放置于 4℃冰箱避光保存，有效期为一个月。

6.6.6 根皮苷标准中间液（500 μg/mL）：准确吸取 12.5 mL 根皮苷标准储备液（6.6.5）于 25 mL 容量瓶中，用乙腈定容。放置于 4℃冰箱避光保存，有效期为一个月。

6.6.7 根皮苷系列标准工作液：分别吸取根皮苷标准中间液（6.6.6）0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL、1.0 mL、2.0 mL、5.0 mL、10 mL 至 10 mL 容量瓶中，用乙腈定容。该标准系列浓度分别为 5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、25.0 μg/mL、50.0 μg/mL、100.0 μg/mL、250.0 μg/mL、500 μg/mL、1000 μg/mL。临用时配制。

6.6.8 除另外有规定外，所用试剂均为分析纯，水应复合 GB/T6682 中一级水的要求

6.7 仪器和设备

6.7.1 高效液相色谱仪，配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.7.2 天平：感量为 0.0001 g 和 0.001 g。

6.7.3 油浴锅。

6.7.4 超声波清洗器。

6.7.5 0.45 μm 微孔水相滤膜，0.45 μm 针筒式有机相过滤器。

6.7.6 旋转蒸发仪。

6.8 苹果样品制备

将苹果用干净纱布轻轻将样品表面擦净，将其切碎，混合均匀，保存待用。

6.9 苹果粗品提取

将苹果样品，用干净纱布轻轻将样品表面擦净，将其切碎，混合均匀，称取 20.00 g 样品(精确到 0.001g)加入 90%乙醇水溶液 100 mL，6000 r/min，匀浆 3 min，再加入 300 mL 90%乙醇水溶液转移至 1L 圆底烧瓶中，放入梭形转子，轻轻摇晃使样品和溶剂混合均匀，调节磁力搅拌器使转子能够带动溶液搅拌，80℃加热回流 1h 后（保证回流速度达到 1 滴/s，如果未到达，适当提高 1~2℃），冷却过滤，45℃旋蒸，旋蒸至 60 mL，转移至分液漏斗中，加 80 mL 乙酸乙酯萃取两次，（如有乳化现象，通过 4000 r/min，离心 2 min 进行破乳）合并两次的乙酸乙酯相于 250 mL 圆底烧瓶中，旋转蒸发至干，每次采用 1.0 mL 色谱甲醇清洗圆底烧瓶 3 次，全部转移至 5 mL 容量瓶中，加色谱甲醇定容至刻度，过 0.45 μm 针筒式有机相过滤器，即为试样液。

6.10 根皮苷 HPLC 定量分析方法的建立

6.10.1 检测波长选择

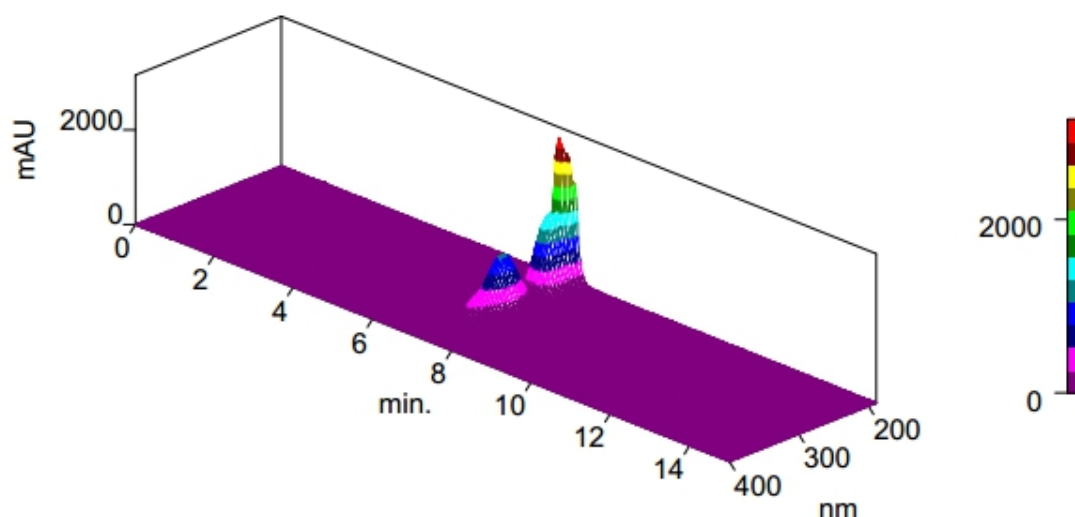


图 1 根皮苷标准样品的 3D 谱图

分析条件：液相色谱柱，ProdigyTM ODS-3 C18 (250×4.6 mm ID, 5 μm)；流动相，甲醇：水=51:49 (v/v)；流速，1.0 mL·min⁻¹；柱温，30℃；

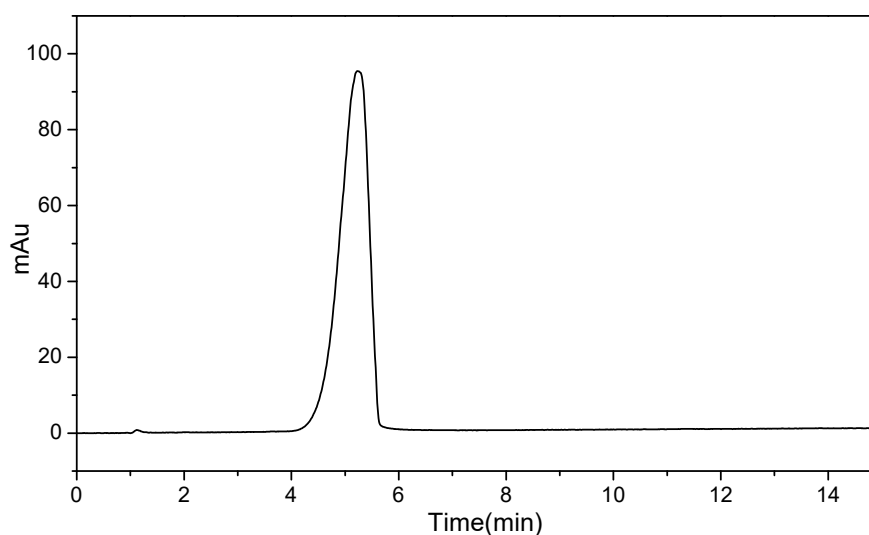
进样体积, 10 μL ; 运行时间, 15 min; 检测波长, 190-400 nm。除溶剂峰外, 其他波长下无杂峰出现。由于大多数杂质在 254nm 下有紫外响应, 因此选用 254 nm 作为检测波长。

6.10.2 色谱柱的选择

采用两根不同的 C_{18} 色谱柱, 测定根皮苷标准样品的纯度。

6.10.2.1 Apollo- C_{18} (150 \times 4.6 mm, 5 μm)柱

分析条件: 流动相, 甲醇:水=40:60 (v/v); 流速, 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 柱温, 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样体积, 10 μL ; 运行时间, 15 min; 检测波长, 254 nm。



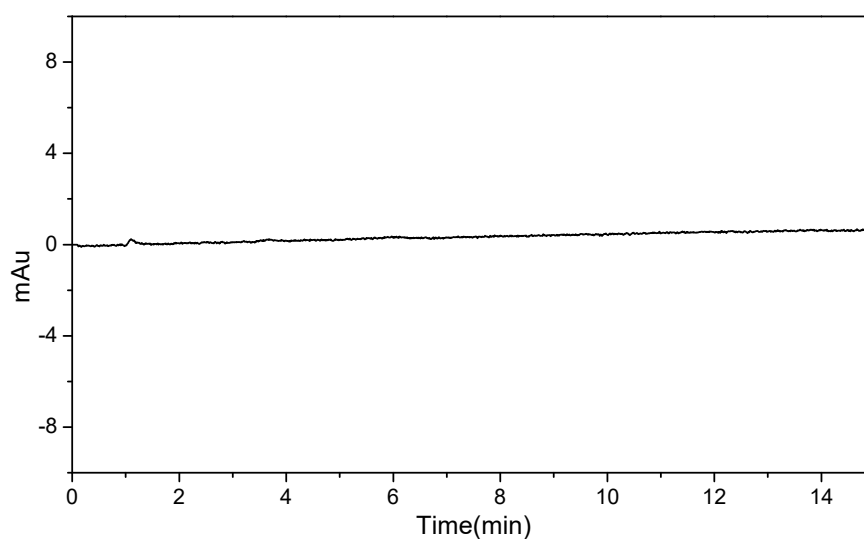
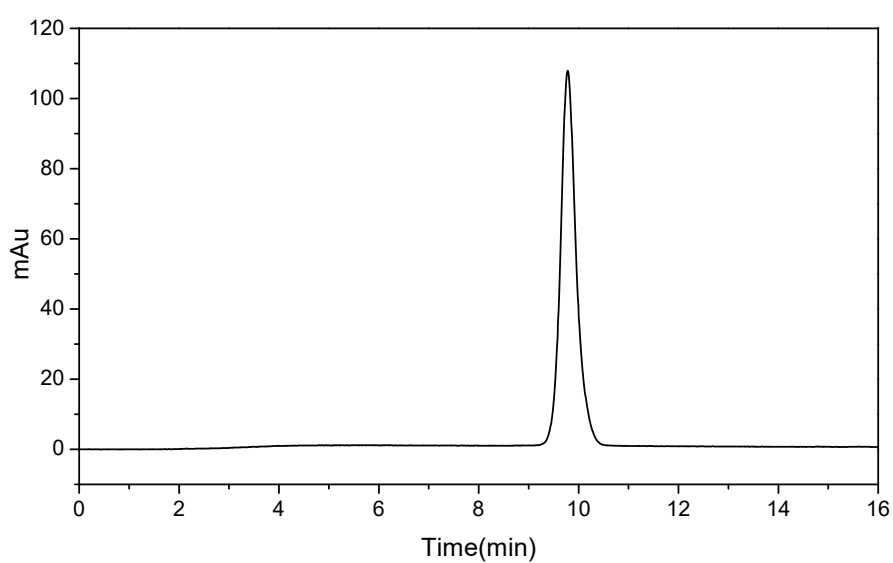


图 2 Apollo-C₁₈ 色谱柱根皮苷标准样品及空白 HPLC 图谱

扣除溶剂色谱峰后，对样品色谱峰进行面积归一化法定量，经积分，根皮苷纯度为 99.86%。

6.10.2.2 Interrial-ODS C₁₈ (250×4.6mm ID, 5μm)柱

分析条件：流动相，甲醇：水=50:50 (v/v)；流速，1.0 mL·min⁻¹；柱温，30℃；进样体积，10 μL；运行时间，16 min；检测波长，254 nm。



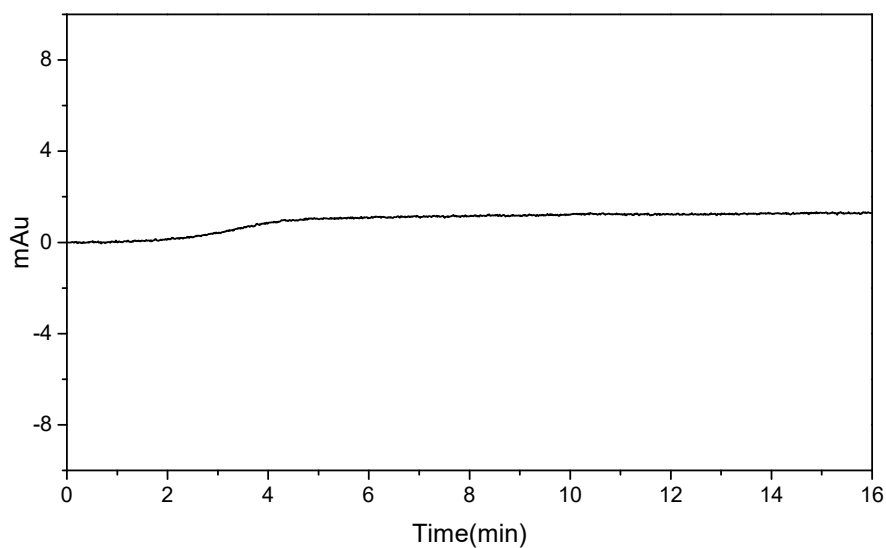


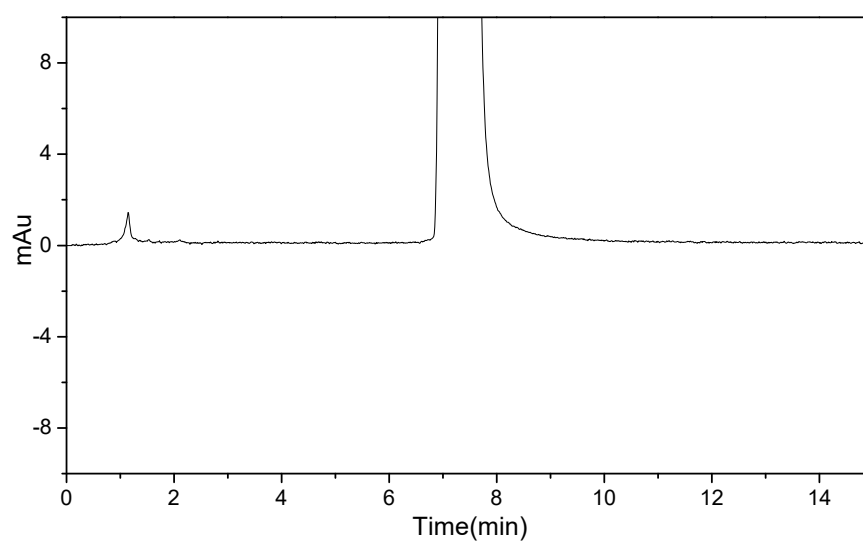
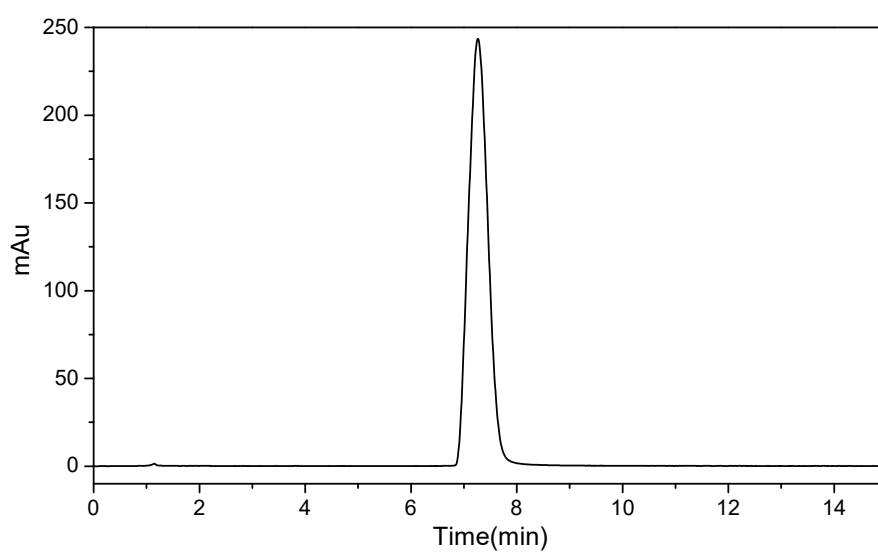
图 3 Interial-ODS C18 色谱柱根皮苷标准样品及空白 HPLC 图谱

扣除溶剂色谱峰后，对样品色谱峰进行面积归一化法定量，经积分，根皮苷纯度为 99.90%。

6.10.3 不同洗脱条件

6.10.3.1 等度洗脱

分析条件：液相色谱柱，ProdigyTM ODS-3 C18 (250×4.6 mm ID, 5 μm)；流动相，甲醇:水=51:49 (v/v)；流速，1.0 mL·min⁻¹；柱温，30℃；进样体积，10 μL；运行时间，15 min；检测波长，254 nm。



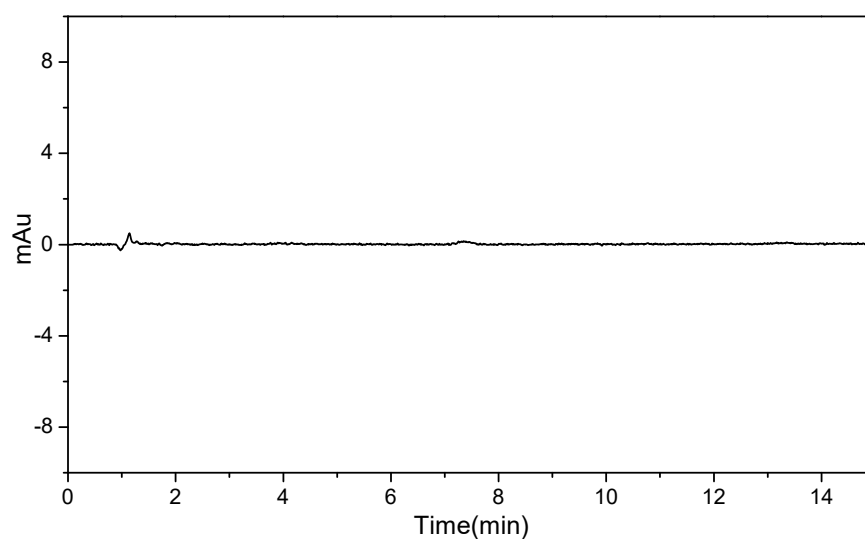
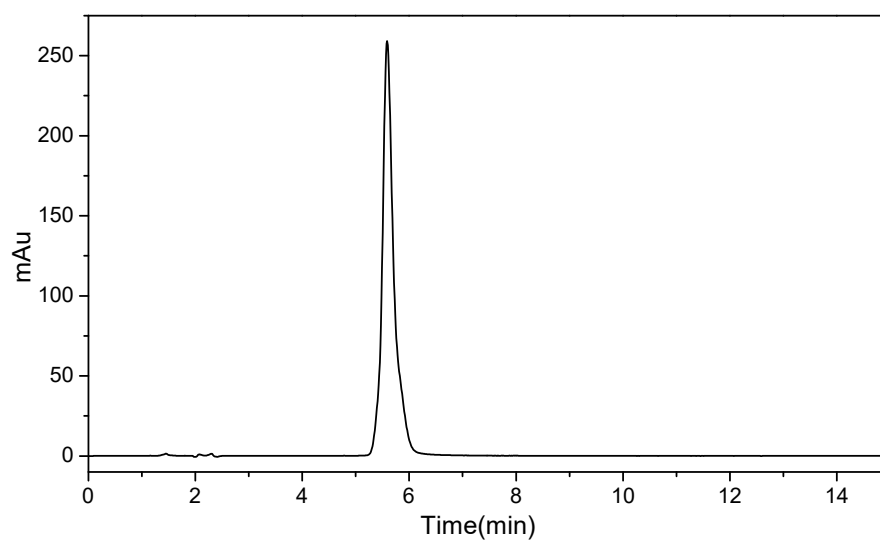


图 4 根皮苷标准样品及空白甲醇等度洗脱 HPLC 图谱

扣除溶剂色谱峰后，对样品色谱峰进行面积归一化法定量，经积分，根皮苷纯度为 99.87%。

分析条件：液相色谱柱，ProdigyTM ODS-3 C18 (250×4.6 mm ID, 5 μm)；流动相，乙腈:水=51:49 (v/v)；流速，1.0 mL·min⁻¹；柱温，30℃；进样体积，10 μL；运行时间，15 min；检测波长，254 nm。



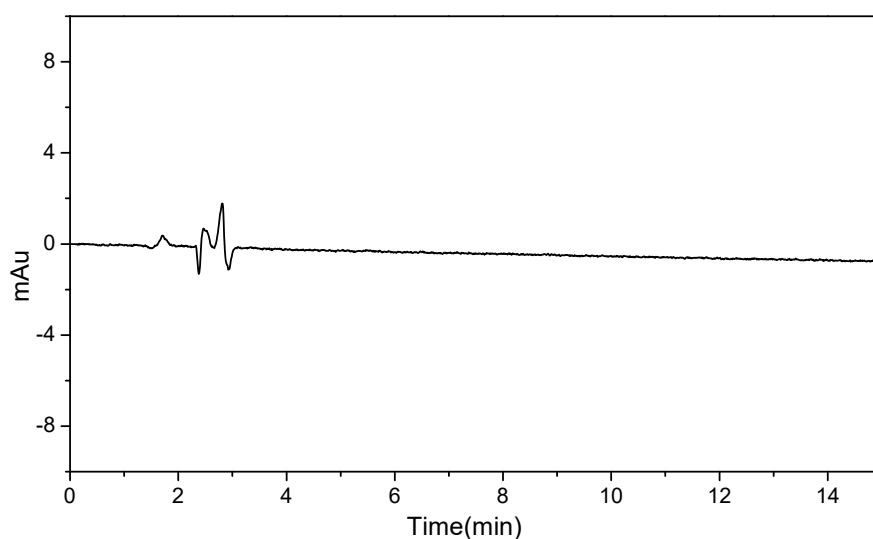


图 5 根皮苷标准样品及空白乙腈等度洗脱 HPLC 图谱

扣除溶剂色谱峰后,对样品色谱峰进行面积归一法定量,经积分,根皮苷纯度为 99.85%。

分析条件:液相色谱柱,Prodigy™ ODS-3 C18 (250×4.6 mm ID, 5 μm);流动相,乙腈:0.01%三氟乙酸水溶液=25:75 (v/v);流速,1.0 mL·min⁻¹;柱温,30℃;进样体积,10 μL;运行时间,30 min;检测波长,254 nm。

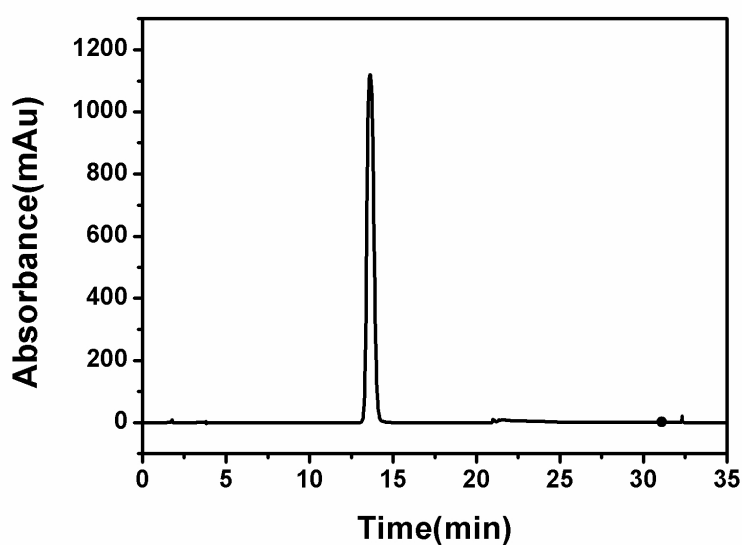


图 6 根皮苷标准样品及空白乙腈等度洗脱 HPLC 图谱

对样品色谱峰进行面积归一法定量，经积分，根皮苷纯度为 99.87%。

6.10.3.2 梯度洗脱

液相色谱柱，ProdigyTM ODS-3 C18 (250×4.6 mm ID, 5 μm)；流动相，A 为甲醇，B 为水，0-30 min 10%A-100%A 30-40 min 100%A；流速，1.0 mL·min⁻¹；柱温，30℃；进样体积，10 μL；运行时间：40 min；检测波长：254 nm。

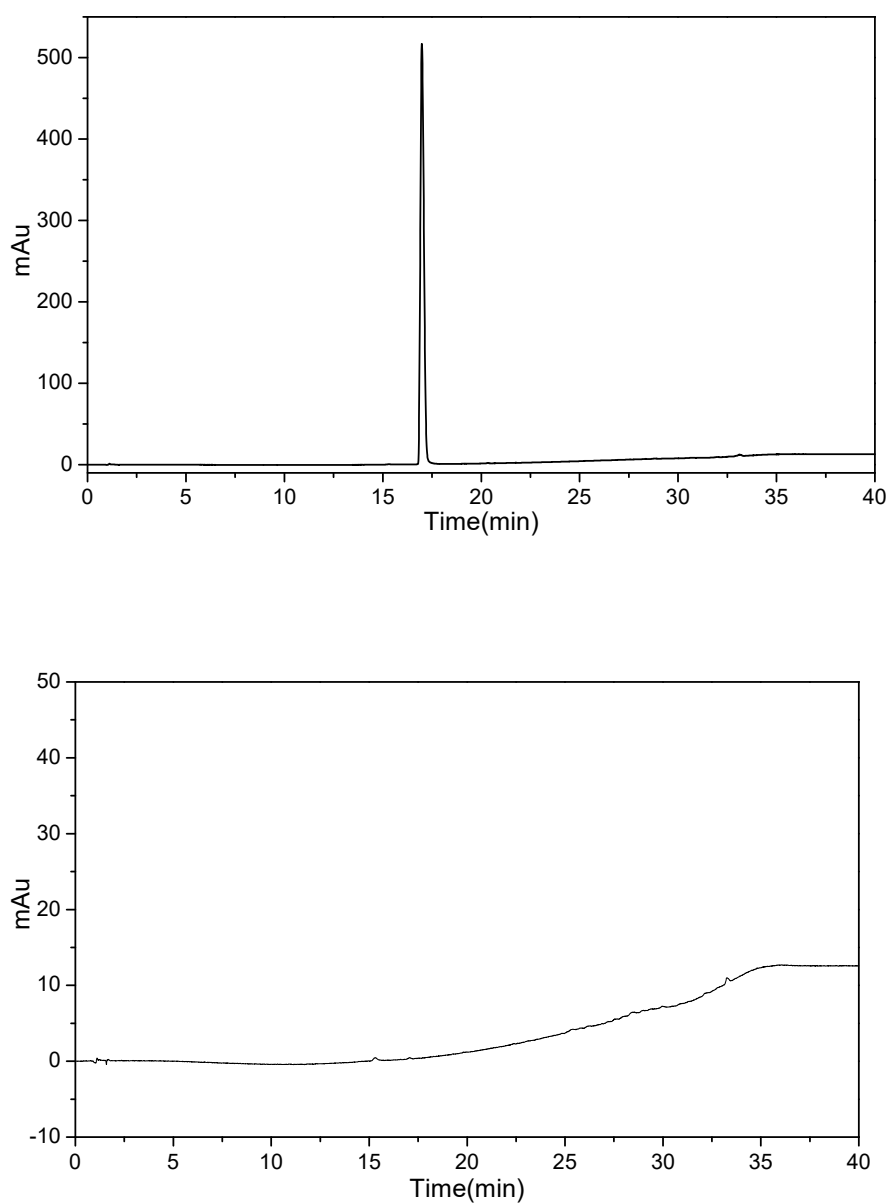


图 7 根皮苷标准样品及空白梯度洗脱 HPLC 图谱

扣除溶剂色谱峰后，对样品色谱峰进行面积归一化法定量，经积分，根皮苷纯度为 99.88%，未发现明显的杂质峰存在。

6.10.4 根皮苷 HPLC 法检测优化后的色谱条件

根皮苷 HPLC 检测优化后的色谱条件为

色谱柱：C₁₈ 液相色谱柱（250 mm×4.6 mm，5μm）或具有同等性能的色谱柱。

紫外检测波长：254 nm

流动相：乙腈：0.01%三氟乙酸水溶液 = 25:75。

流速：1.0 mL/min。

进样体积：10 μL

柱温：30℃。

6.10.5 标准曲线

按照“6.6.7 标准溶液配制”配制一系列浓度分别为 5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、25.0 μg/mL、50.0 μg/mL、100.0 μg/mL、250.0 μg/mL、500.0 μg/mL、1000.0 μg/mL 的根皮苷标准溶液，按照“6.10.4 根皮苷 HPLC 法检测优化后的色谱条件”进行 HPLC 分析，以根皮苷标准溶液浓度 X (μg/mL) 为横坐标、色谱峰面积 Y 为纵坐标进行线性拟合，拟合结果见表 1。

表 1. 根皮苷的标准曲线、线性范围、相关系数、检出限及定量限

目标物	标准曲线	线性范围 (μg/mL)	相关系数 (r ²)	检出限 (ng/mL)	定量限 (ng/mL)
根皮苷	Y=27.59X-18.89	5.0 - 1000.0	0.9991	6.85	22.83

6.10.6 检出限和定量限

6.10.6.1 仪器检出限和定量限

将对照品溶液逐步稀释，进行液相色谱分析，计算其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），得到根皮苷的检出限 ng/mL ； $S/N=10$ 时的浓度为定量限（LOQ），得到根皮苷的定量限为 ng/mL 。根皮苷的检出限（LOD）和定量限（LOQ）是根据国际纯粹与应用化学联合会（IUPAC）对LOD和LOQ的定义，经计算得到。计算公式为： $\text{LOD}=3\times S_B/b$ ， $\text{LOQ}=10\times S_B/b$ 式中， S_B 为10次空白试验得到的噪音信号平均值， b 为根皮苷标准曲线的斜率。由表1可知，该方法的检出限为 6.85 ng/mL 、定量限为 22.83 ng/mL 。

6.10.6.2 方法检出限和定量限

将实际样品溶液逐步稀释，进行液相色谱分析，计算其峰高与基线噪音高度的比， $S/N=3$ （ S 为样品溶液峰高， N 为基线噪音高）时的样品溶液浓度为检出限（LOD），得到苹果试样取样量为 20 g 时，检出限为 $0.83 \mu\text{g/mL}$ ，定量限为 $2.78 \mu\text{g/mL}$ 。

6.10.7 精密度

取苹果实际样品溶液，按照“6.10.4根皮苷HPLC法参考色谱条件”进行HPLC分析，重复进样6次，测得其保留时间和峰面积，计算其相对标准偏差（RSD），结果见表2。由结果表2可知，该方法的精密度良好。

表 2. 根皮苷的精密度试验结果 (n = 6)

序号	保留时间		峰面积	
	Time	RSD (%)	Area	RSD (%)
1	13.713	0.355	1436	0.222
2	13.760		1432	
3	13.771		1439	
4	13.717		1435	
5	13.707		1433	
6	13.696		1430	

6.10.8 标准溶液稳定性

取100 $\mu\text{g/mL}$ 的根皮苷标准样品溶液，分别在0、2、4、6、8、10 h时，按照“6.10.4根皮苷HPLC法参考色谱条件”进行HPLC分析，测得其保留时间和峰面积，计算其相对标准偏差（RSD），结果见表3。由结果表3可知，该方法的稳定性良好。

表 3. 根皮苷的稳定性试验结果 (n = 6)

检测时间 (h)	保留时间		峰面积	
	Time	RSD (%)	Area	RSD (%)
0	13.713	0.277	2872	0.773
2	13.792		2875	
4	13.760		2838	
6	13.696		2882	
8	13.771		2826	
10	13.717		2882	

6.10.9 重复性

准确称取20 g（精确至0.001 g）苹果样品6份，按照6.9处理样品进行根皮苷提取，制备得到样品溶液24份。按照“6.10.4根皮苷HPLC法参考色谱条件”进行HPLC分析，测得其保留时间和峰面积，计算其相对标准偏差（RSD），结果见表4。由结果表4可知，该方法的重复性良好。

表 4. 根皮苷的重复性试验结果 (n = 6)

序号	保留时间		峰面积	
	Time	RSD (%)	Area	RSD (%)
1	13.813	0.327	1436	0.150
2	13.760		1432	
3	13.771		1436	
4	13.717		1435	
5	13.707		1438	
6	13.696		1434	

6.10.10 稳定性

取苹果实际样品溶液，分别在0、2、4、6、8、10 h、24h时，按照“6.10.4根皮苷HPLC法参考色谱条件”进行HPLC分析，测得其峰面积，换算含量，计算其相对标准偏差（RSD），结果见表5。由结果表5可知，该方法的稳定性良好。

表 5 实际样品试样稳定性实验结果

检测时间 (h)	苹果样品中根皮苷浓度 (μg/mL)	RSD (%)
0	47.50	0.027
2	47.48	
4	47.51	
6	47.48	
8	47.49	
10	47.51	
24	47.50	

6.10.11 加标回收率试验

精密取苹果样品0.5 mL，按照“6.10.4根皮苷HPLC法参考色谱条件”进行HPLC分析，根据根皮苷的标准曲线计算出苹果样品溶液中根皮苷的浓度为2.375 μg/mL，换算成苹果中根皮苷的含量为0.475 mg/kg。另精密取该已知根皮苷含量的苹果样品9份，每3份分别精密加入浓度为100 μg/mL的根皮苷标准样品0.1mL、0.2 mL和0.3 mL，按

照6.9处理样品进行根皮苷提取，按照“6.10.4参考色谱条件”进行HPLC分析，计算其回收率，结果见表6。

表6. 根皮苷样品的加标回收率试验结果(苹果)

序号	样品含量 (μg)	添加量 (μg)	实测值 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	23.75	10	39.84	118.04	112.12	4.64
2			36.54	108.27		
3			37.14	110.04		
4		20	41.84	95.63	99.21	3.68
5			43.34	99.06		
6			45.03	102.93		
7		30	46.53	86.57	88.14	1.92
8			47.25	87.91		
9			48.34	89.93		

6.11 方法验证

6.11.1 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 10）。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。

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

目前根皮苷含量测定方法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根皮苷为活性成分的苹果的质量、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，填补我国苹果中根皮苷检测方法的空白，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] FORSLINE P L, ALDWINCKLE H S, DICKSON E E, et al. Collection, maintenance, characterization and utilization of wild apples of Central Asia[M]. Horticultural Reviews: wild apple and fruit trees of Central Asia, 2003, 29.
- [2] 冯涛, 张红, 陈学森, 等. 新疆野苹果果实形态与矿质元素含量多样性以及特异性状单株[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(3): 270-276.
- [3] JENSEN E N, BUCH-ANDERSEN T, RAVN-HARENG, et al. Mini-review: The effects of apples on plasma cholesterol levels and cardiovascular risk – a review of the evidence[J]. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2009, 84(6): 34-41.
- [4] HYUN T K, JANG K I. Apple as a source of dietary phytonutrients: an update on the potential health benefits of apple[J]. Excli Journal, 2016, 15: 565-569.
- [5] BHUSHAN S, KALIA K, SHARMA M, et al. Processing of Apple Pomace for Bioactive Molecules[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2008, 28(4): 285-296.
- [6] HE F J, MACGREGOR G A. Beneficial effects of potassium on human health[J]. Physiologia Plantarum, 2010, 133(4): 725-735.
- [7] BOYER J, LIU R H. Apple Phytochemicals and their health benefits[J]. Nutrition Journal, 2004, 3: 5-20.
- [8] MARCHAND L L, MURPHY S, HYANKIN J, et al. Intake of

flavonoids and lung cancer[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2000, 92(2): 154-160.

[9] MICHELS K B, GIOVANNUCCI E, CHAN A T, et al. Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the nurses' health study[J]. Cancer Research, 2006, 66(7): 3942-3953.

[10] JEDRYCHOWSKI W, MAUGERI U, POPIELA T, et al. Case-control study on beneficial effect of regular consumption of apples on colorectal cancer risk in a population with relatively low intake of fruits and vegetables[J]. European Journal of Cancer Prevention, 2010, 19(1): 42-47.

[11] CHAI S C, HOOSHMAND S, SAADAT R L, et al. Daily apple versus dried plum: Impact on cardiovascular disease risk factors in postmenopausal women[J]. Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics, 2012, 112(8): 1158-1168.

[12] SESSO H, GAZIANO J M, LIU S, et al. Flavonoid intake and risk of cardiovascular disease in women[J]. American Journal of Clinical Nutrition, 2003, 77(6): 1400-1408

[13] D'ANGELO S, LA PORTA R, NAPOLITANO M, et al. Effect of Annurca apple polyphenols on human HaCaT keratinocytes proliferation[J]. Journal of Medicinal Food, 2012, 15: 1024-1031.

附录 A

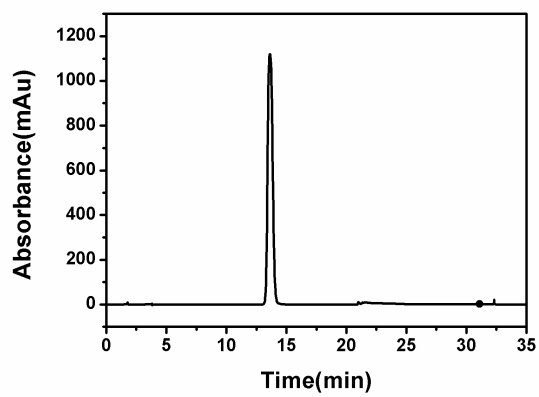


图 A.1 根皮苷标准溶液的色谱图。

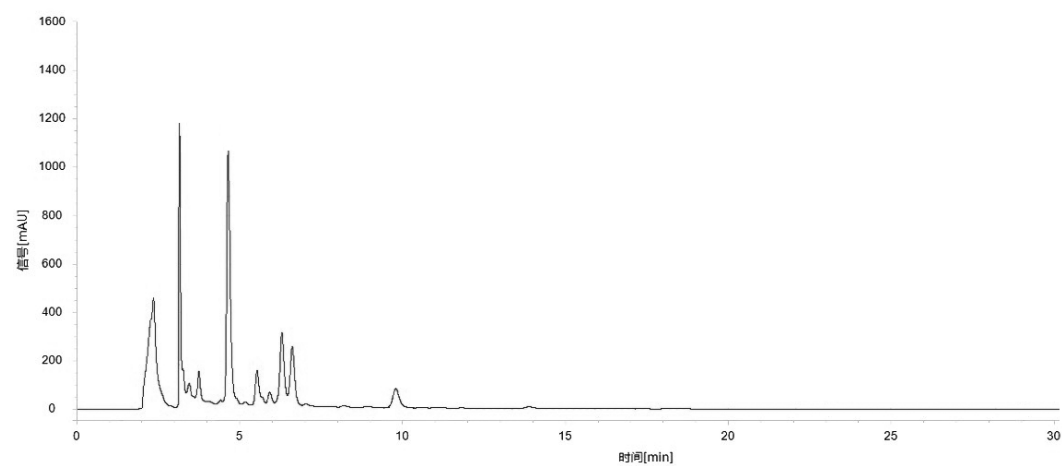


图 A.2 苹果 90%乙醇粗提物的色谱图。