中 华 人 民 共 和 国 国 家 标 准

GB/T XXXXX—XXXX

植物提取物抗氧化活性评价 薄层色谱法

Antioxidant capacity assessment of plant extract-Thin layer chromatography method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

文稿版次选择

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中华人民共和国标准化管理委员会　发 布

目　　次

前　　言 II
1 内容与适用范围 1
2 规范性引用文件 1
3 原理 1
4 试剂和材料 1
5 仪器与设备 2
6 测定步骤 2
7 结果计算 3
8 分析精度 3
附录 A 4

前　　言

本标准按照GB/T 1.1-2009给出的规则起草。
本标准由江南大学提出。
本标准由中国标准化研究院归口。
本标准起草单位：
本标准主要起草人：

植物提取物原料抗氧化活性评价 薄层色谱法

1 范围

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。

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，仅所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

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。

4 试剂和材料

4.1 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

4.2 芦丁标准品，分析纯

4.3 甲醇，色谱纯

4.4 乙酸乙酯，色谱纯

4.5 乙酸，分析纯

4.6 DPPH，分析纯

4.7 高压氮气，纯度 99.9%

4.8 硅胶薄层板，分析型

4.9 芦丁标准溶液

a) 标准储备液：精确称取 10 mg ±0.1 mg 芦丁标准品（4.2），溶于 10 mL 甲醇（4.3）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（4.10a）1.0 mL，与 9.0 mL 甲醇（4.3）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

4.10 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。

4.11 槐米提取物

4.12 滤膜：孔径 0.45 μm

4.13 离心管：15～25 mL

5 仪器与设备

5.1 实验室常用玻璃器皿

5.2 分析天平：灵敏度 0.0001 g。

5.3 涡旋混匀器

5.4 超声清洗仪：超声频率 40～80 kHz

5.5 离心机：转速≥4000 rpm

5.6 双光束紫外-可见光分光光度计：检测范围 190-900 nm

5.7 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 测定步骤

6.1 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 μm 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。

6.2 薄层色谱检测

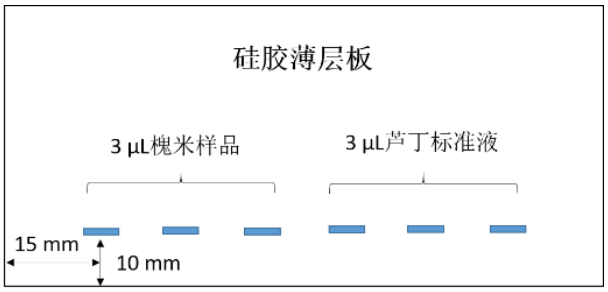


图 1 样品提取液和标准工作液的在硅胶薄层板上的点样布局

a) 点样：以 0.5 kPa 氮气为载气，用薄层点样仪(5.7)将 5 μL 芦丁标准工作液(4.9b)和 5 μL 槐米提取液(6.1)以条带的形式吹扫到硅胶薄层板(4.8)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 μL。

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，具体参数为：流动相乙酸乙酯+乙酸+甲酸+水 10+1.1+1.1+2 mL，预烘干 30 s，展开缸气氛饱和 5 min，预平衡 10 min，展开高度 50 mm，色谱展开后干燥 3 min。

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 20 min 待显色反应结束。

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。主要检测参数：荧光模式，D_2&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。

7 结果计算

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 $P_{芦均}$

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

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

$$P_{槐}=\sum_{i=1}^{n}Pi\ldots\ldots(2)$$

i—抗氧化斑点编号

n—抗氧化斑点数量

Pi—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 $P_{槐均}$

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

按照公式(4)计算槐米样品的抗氧化指数 *Ai*

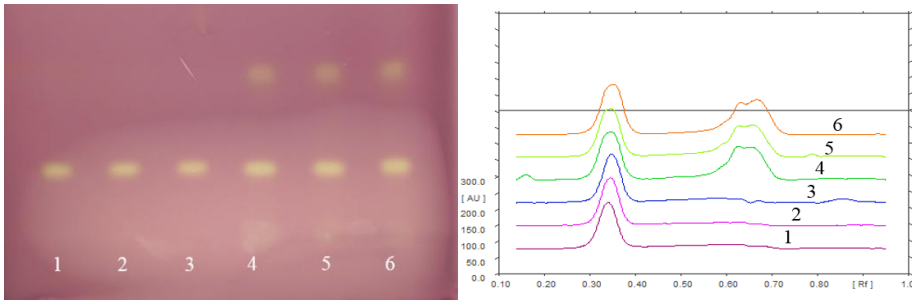
$$Ai=\frac{P_{槐均}}{P_{芦均}}\times 稀释倍数\ldots\ldots(4)$$

8 分析精度

同一操作者在同一块硅胶板上三次平行测定所得结果相对偏差≤10 %。

附　录　A
（资料性附录）

表 A.1 芦丁标准品和槐米提取物样品薄层色谱-DPPH 显色(左)和光密度扫描仪结果(右)



注：轨道1-3为芦丁标准样品；轨道4-6为槐米提取物样品