

TB

团体标准

T/ NAIA×××-××××

枸杞叶及枸杞茶中黄酮类化合物
的测定

Determination of flavonoids in barbary wolfberry leaves and barbary wolfberry tea

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 发布

前言

本文件按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本文件由宁夏回族自治区药品检验研究院（国家枸杞产品质量检验检测中心（宁夏））提出。

本文件由宁夏化学分析测试协会归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区药品检验研究院（国家枸杞产品质量检验检测中心（宁夏））、中国科学院兰州化学物理研究所、宁夏食品药品检验研究院。

本文件主要起草人：马玲、雷艳、王忠强、刘淑瑛、王宁丽、郑国保、马小荣、赵茜、吴少涛、马宗卫、王英华。

本文件为首次发布。

枸杞叶及枸杞茶中黄酮类化合物的测定

1 范围

本文件规定了枸杞叶及枸杞茶中总黄酮含量的分光光度计测定方法和枸杞叶及枸杞茶中黄酮类化合物含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于枸杞叶及枸杞茶中总黄酮及黄酮类化合物含量的测定。

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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

第一法 分光光度法测定枸杞中总黄酮的含量

4 原理

试样中的黄酮类化合物的分子结构上具有邻二酚羟基，可以在弱碱性条件下与铝盐络合，形成稳定的红色化合物，在可见光区域(510 nm)显色。在一定浓度范围内，该化合物的吸光度值与总黄酮含量成正比，符合郎伯-比尔定律。

5 试剂与材料

除另有说明外，本方法所用试剂均为分析纯和GB/T 6682 中规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 无水乙醇： $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ，CAS号：64-17-5

5.1.2 亚硝酸钠： NaNO_2 ，CAS号：7632-00-0

5.1.3 硝酸铝： $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ ，CAS号：7784-27-25.1.4 氢氧化钠： NaOH ，CAS号：1310-73-2

5.2 溶液的配制

5.2.1 60%乙醇溶液：量取60 mL无水乙醇加入到30 mL纯化水中，混匀备用。

5.2.2 70%乙醇溶液：量取70 mL无水乙醇加入到30 mL纯化水中，混匀备用。

5.2.3 5%亚硝酸钠溶液：准确称取5.00 g亚硝酸钠于100 mL容量瓶中，加适量水溶解，加水定容至刻

度，摇匀、备用。

5.2.4 10%硝酸铝溶液 准确称取10.00 g硝酸铝于100 mL容量瓶中，加适量水溶解，加水定容至刻度，摇匀、备用。

5.2.5 4%氢氧化钠溶液：准确称取8.00 g氢氧化钠于200 mL容量瓶中，加适量水溶解，用水定容至刻度，摇匀、备用。

5.3 标准品

芦丁标准品（ $C_{27}H_{30}O_{16}$ ，CAS号153-18-4）：纯度 $\geq 98.0\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

准确称芦丁标准品6.70mg（精确至0.0001g）至25 mL容量瓶中，加乙醇溶液（5.2.2）适量并超声使溶解，定容至刻度，摇匀，配制成0.268 mg/mL的芦丁标准储备液。

6 仪器与设备

6.1 紫外分光光度计。

6.2 分析天平，感量0.00001 g。

6.3 粉碎机。

6.4 超声波清洗器。

6.5 超纯水机。

6.6 水浴锅。

7 试样制备

取枸杞叶（枸杞茶）样品，粉碎，过3号筛，置干燥器中保存，待用。

取枸杞叶（枸杞茶）约1 g（精确至0.0001 g），置三角瓶中，加50 mL 70%的乙醇溶液（5.2.2）冷浸30 min，水浴回流提取1 h，滤过，分取滤液，药渣再加30 mL 70%的乙醇溶液（5.2.2），水浴回流提取1 h，过滤，合并滤液，用乙醇溶液（5.2.2）洗涤滤渣并定容至100 mL的量瓶中。摇匀，作为试液，待用。

8 分析步骤

8.1 标准曲线的绘制

精密吸取芦丁标准储备液（5.4）0mL、0.1mL、0.4mL、0.8mL、1.2mL、1.6mL、2.0mL置于10 mL容量瓶中，分别加水使成2.4 mL，各加5%亚硝酸钠溶液（5.2.3）0.4 mL，摇匀，放置6 min，加10%硝酸铝溶液（5.2.4）0.4 mL，摇匀，放置6 min，加4%氢氧化钠溶液（5.2.5）1 mL，加水至刻度，摇匀，放置15 min，以相应试剂作空白，在510 nm波长处测定吸光度值，以芦丁质量浓度 ρ (ug/mL)为横坐标，相应的吸光度值A为纵坐标，绘制标准曲线，得到标准曲线回归方程。

8.2 测定步骤

精密量取(7)待测液1.0mL,加5%亚硝酸钠溶液(5.2.3)0.4 mL,摇匀,放置6 min,加10%硝酸铝溶液(5.2.4)0.4 mL,摇匀,放置6 min,加4%氢氧化钠溶液(5.2.5)1 mL,加水至刻度,摇匀,放置15 min,试样于波长509 nm处测定,以测得吸光值由标准曲线查的试样待测液中总黄酮的含量,同时做空白实验。

9 结果计算和表达

试样中总黄酮含量以芦丁的含量以百分含量计,按公式(1)计算:

$$\omega = \frac{(\rho - \rho_0) \times V_1 \times V_3}{m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式(1)中:

ω ——试样中总黄酮含量的数值,单位为毫克每克(mg/g)

ρ ——从标准曲线上查得试样待测液中总黄酮的质量浓度的数值,单位为毫克每升(g/mL)

ρ_0 ——从标准曲线上查得空白待测液中总黄酮的质量浓度的数值,单位为毫克每升(g/mL)

V_1 ——试样中加入并定容的提取溶液体积的数值,单位为毫升(mL)

V_3 ——试样的最终定容体积的数值,单位为毫升(mL)

m ——试样的质量的数值,单位为克(g)

V_2 ——提取液的分取体积的数值,单位为毫升(mL)

测定结果保留三位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下,获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的10%。

第二法 高效液相色谱法测定黄酮类化合物的含量

11 原理

枸杞茶和枸杞叶中的芦丁经乙醇溶液提取后得到游离的黄酮类化合物,用C18柱分离,用紫外检测器在波长357 nm处测定,外标法定量。

12 试剂与材料

除另有说明外,本方法所用试剂均为分析纯和GB/T 6682 中规定的一级水。

12.1 试剂

12.1.1 无水乙醇: $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CAS号: 64-17-5。

12.1.2 甲醇: CH_3OH , CAS号: 67-56-1, 色谱纯。

12.1.3 冰醋酸：CH₃COOH，64-19-7，色谱纯。

12.2 溶液配制

12.2.1 70%乙醇溶液：量取70 mL无水乙醇加入到30 mL纯化水中，混匀备用。

12.2.2 1%冰醋酸溶液：量取1 mL冰醋酸于100 mL容量瓶中，加水定容至刻度，摇匀、备用。

12.3 标准品

芦丁标准品（C₂₇H₃₀O₁₆，CAS号153-18-4）：纯度≥98.0%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

12.4 材料

微孔滤膜：0.45μm，有机系。

12.4 标准溶液配制

同（5.4）。

13 仪器与设备

13.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

13.2 分析天平，感量0.00001 g。

13.3 粉碎机。

13.4 超声波清洗器。

13.5 超纯水机。

13.6 水浴锅。

14 试样制备

同（7）。

15 分析步骤

15.1 高效液相色谱参考条件

色谱柱：C18柱，长250 mm，内径4.6 mm，粒度5 μm，或相当者。

柱温：20 °C。

流动相：甲醇-1%冰醋酸（32：68）。

检测波长：357 nm。

流速：1.0 mL/min。

进样量：10 μL。

15.2 标准曲线的绘制

用乙醇溶液（5.2.2）分别将芦丁标准储备液稀释得到系列浓度为0 μg/mL、50 μg/mL、80 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、300 μg/mL、400 μg/mL的标准工作液，依次由低到高进样检测，以

芦丁质量浓度 ρ ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 相应的吸光度值 A 为纵坐标, 绘制标准曲线, 得到标准曲线回归方程。

15.3 定量测定

在相同的色谱条件下, 取等体积的试样待测液和相应浓度的标准工作溶液进行色谱分析, 以保留时间定性, 色谱峰面积外标法定量。试样待测液中黄酮类化合物的响应值均应在标准曲线范围内, 超过线性范围时应根据测定浓度进行适当倍数稀释后再进行分析。

16 结果计算和表达

试样中芦丁的含量按公式 (2) 计算:

$$\omega = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式 (2) 中:

ω ——试样中芦丁含量的数值, 单位为毫克每克 (mg/g);

ρ ——从标准曲线上查得试样待测液中芦丁的质量浓度的数值, 单位为毫克每升 (mg/L);

m ——试样的质量, 单位为克 (g);

V ——试样中加入并定容的提取溶液体积的数值, 单位为毫升 (mL);

测定结果保留三位有效数字。

17 精密度

在重复性条件下, 获得的两次独立测定结果的绝对差值不超过算术平均值的10%。

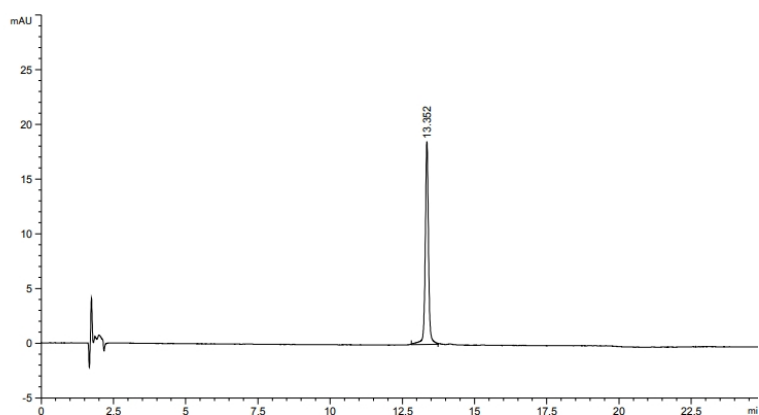
18 其他

本文件方法的检出限和定量限见附录B。芦丁标准溶液色谱图、试样色谱图见附录A。

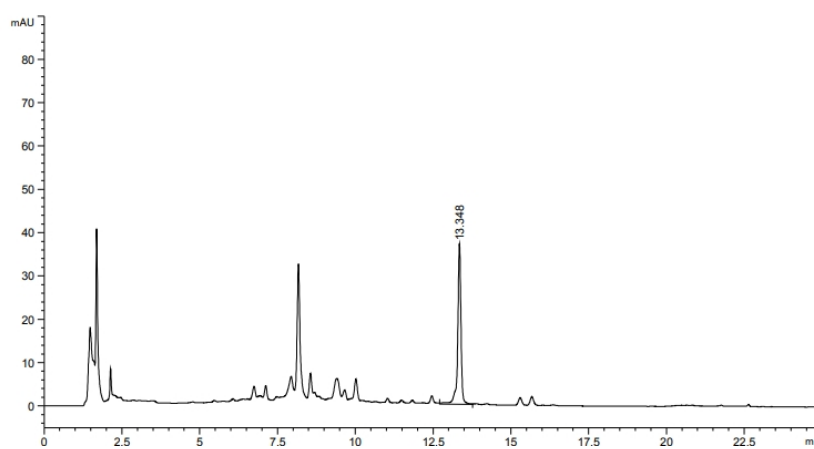
附录 A
(资料性附录)

芦丁标准品及枸杞叶、枸杞茶试样色谱图

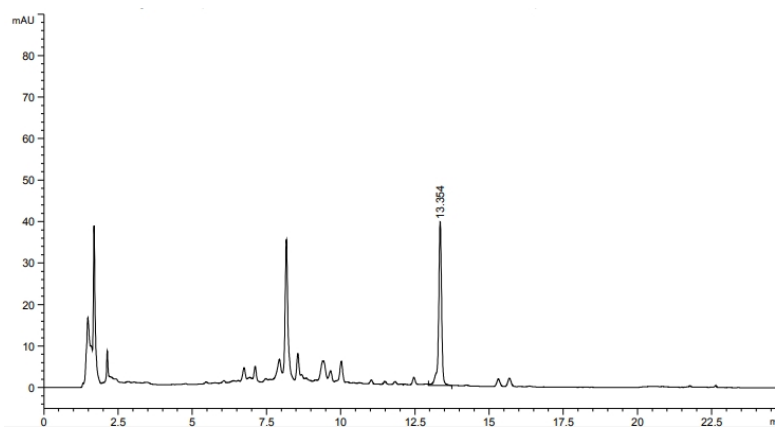
芦丁标准品及枸杞叶、枸杞茶试样溶液的HPLC色谱图见图A.1-A.3。



图A.1 芦丁标准品色谱图



图A.2 枸杞叶中芦丁组分色谱图



图A.3 枸杞茶中芦丁组分色谱图

附 录 B
(规范性附录)
方法的检测限和定量限

方法的检测限和定量限见表B.1。

表B.1 方法的检测限和定量限

名称	定量限 (μg/mL)	检测限 (μg/mL)
芦丁	0.101	0.030