

团体标准

T/ NAIA×××-××××

黄芪中 7 种黄酮类物质含量的测定 液相色谱法

Determination of 7 flavanoids in astragalus

High performance liquid chromatography

2024-××-××发布

2024-××-××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 《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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所、宁夏食品检测研究院、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：刘霞、牛艳、赵子丹、王晓菁、杨静、吴燕、杨春霞、苟春林、张锋锋、王彩艳、陈翔、开建荣、张学玲、张小飞。

本文件为首次发布。

黄芪中 7 种黄酮类物质含量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了黄芪中黄酮类物质的液相色谱测定方法。

本文件适用于黄芪中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、槲皮苷、木樨草苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、金丝桃苷、芒柄花苷和芒柄花黄素的液相色谱法测定。

本文件的方法检出限：毛蕊异黄酮葡萄糖苷、金丝桃苷、芒柄花黄素的方法检出限为 0.075 mg/kg，槲皮苷、木樨草苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、芒柄花苷的方法检出限为 0.15mg/kg。

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

3 术语和定义

本文件没有需要规定的术语和定义。

4 原理

试样中的黄酮类物质经甲醇超声提取，旋蒸近干，甲醇定容，微孔滤膜过滤，液相色谱仪检测和确证，外标法定量。

5 试剂与材料

除非另有规定外，所有试剂均为分析纯，水符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 乙腈（CH₃CN）：色谱纯。

5.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

5.3 甲酸（CH₂O₂）：色谱纯。

5.4 毛蕊异黄酮葡萄糖苷（Calycosin-7-glucoside，CAS 号 20633-67-4）、槲皮苷（quercitrin，CAS 号 522-12-3）、木樨草苷（cynaroside，CAS 号 5373-11-5）、山奈酚-3-O-芸香糖苷（kaempferol-3-O-rutinoside，CAS 号 17650-84-9）、金丝桃苷（Hyperoside，CAS 号 482-36-0）、芒柄花苷（Ononin，CAS 号 486-62-4）和芒柄花黄素（formononetin，CAS 号 485-72-3）的液相色谱法测定。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 标准储备溶液：分别准确称取适量的毛蕊异黄酮葡萄糖苷、槲皮苷、木樨草苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、金丝桃苷、芒柄花苷和芒柄花黄素（精确至 0.01 mg），用甲醇溶解，分别配制成 1000 mg/L 的标准储备溶液，-18 °C 下保存，有效期 1 年。

5.5.2 混合标准中间溶液：根据需要分别取黄酮类物质的标准储备液，用甲醇稀释成 10 mg/L 标准中间溶液，-18 °C 下保存，有效期 3 个月。

5.6 0.1%磷酸溶液（体积分数）：量取 1mL 磷酸，用水定容至 1000mL。

5.7 滤膜：0.22 μm，有机相。

5.8 离心管：50 mL，塑料。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱仪：配有紫外检测器。

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.0001 g。

6.3 高速万能粉碎机：10000 r/min。

6.4 超声波清洗机。

6.5 离心机：4000 r/min。

6.6 涡旋混合器。

7 分析步骤

7.1 试样的制备

将试样在 50°C 烘箱中干燥 24 h，用高速万能粉碎机粉碎，过 45 目筛，置于密封袋中备用。

7.2 试样的提取

平行做两份试样。称取试样 2 g（精确至 0.0001 g）于 50 mL 离心管，加入 20 mL 甲醇，充分振摇混匀，超声提取 30 min，放入离心机，4000 r/min 离心 3 min，上清液过 0.22 μm 滤膜，待测定。同试样进行空白试验，除不称取样品外，均按试样步骤进行。

7.3 液相色谱参考条件

a) 色谱柱：C18 柱，250 mm×4.6 mm (i.d)，5 μm，或性能相当者；

b) 柱温：40 °C；

c) 流速：0.3 mL/min；

d) 流动相：A 相为 0.1%磷酸溶液（5.6），B 相为乙腈，梯度洗脱条件见表 1；

e) 进样量：10.0 μL。

f) 检测波长：203 nm。

表 1 流动相及其梯度条件（ V_A+V_B ）

时间 (min)	流 速 (mL/ min)	$V_A(\%)$	$V_B(\%)$
0.00	0.8	90	10
15.00	0.8	75	25
25.00	0.8	65	35
45.00	0.8	45	55
53.00	0.8	25	75
60.00	0.8	90	10
65.00	0.8	90	10

7.4 标准曲线的绘制

用甲醇将混合标准储备溶液逐级稀释得到浓度为0.5mg/L、2.0mg/L、5.0mg/L、10mg/L、25mg/L、50mg/L、100mg/L的标准工作液。依次由低到高进行检测，以质量浓度X（mg/L）为横坐标，以相应的峰面积Y为纵坐标进行线性回归，得到标准曲线方程。

7.5 测定

按照 7.3 给出的参考色谱条件，取标准工作溶液和样品定容液（7.2）依次上机进行测定，以色谱峰保留时间定性。

7.6 定量

采用外标-校准曲线法定量测定。保证所测样品中组分的响应值均在仪器的线性范围内。

8 结果计算和表达

试样中毛蕊异黄酮葡萄糖苷、槲皮苷、木樨草苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、金丝桃苷、芒柄花苷和芒柄花黄素含量以质量分数 ω 计，数值以毫克每千克（mg/kg）计，按式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times v}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ω —— 试样中被测物残留量的数值，单位为毫克每千克（mg/kg）；

ρ —— 试样溶液中被测物的含量，单位为毫克每升（mg/L）；

V —— 试样定容溶液体积，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量的数值，单位为克（g）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 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%。

10 色谱图

标准溶液及样品中7种黄酮组分图谱见图A.1、图A.2。

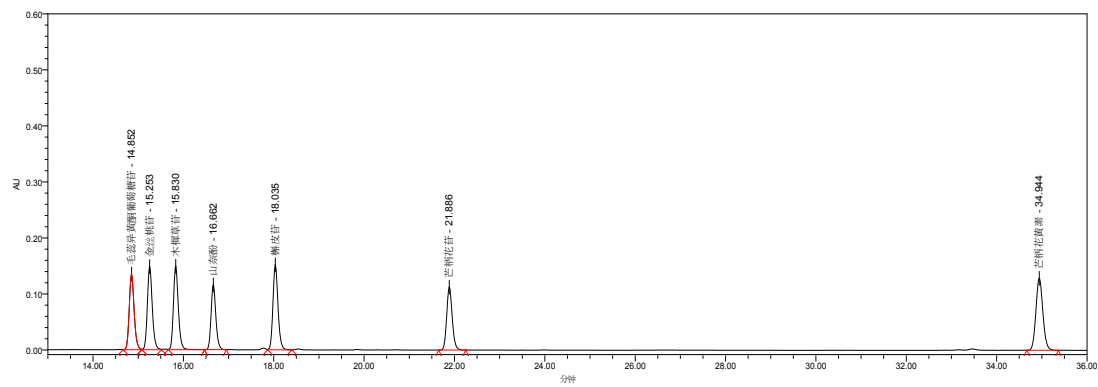
附录 A

(资料性)

7种黄酮类物质的标准溶液色谱图和样品色谱图

A.1 7种黄酮类物质标准溶液色谱图

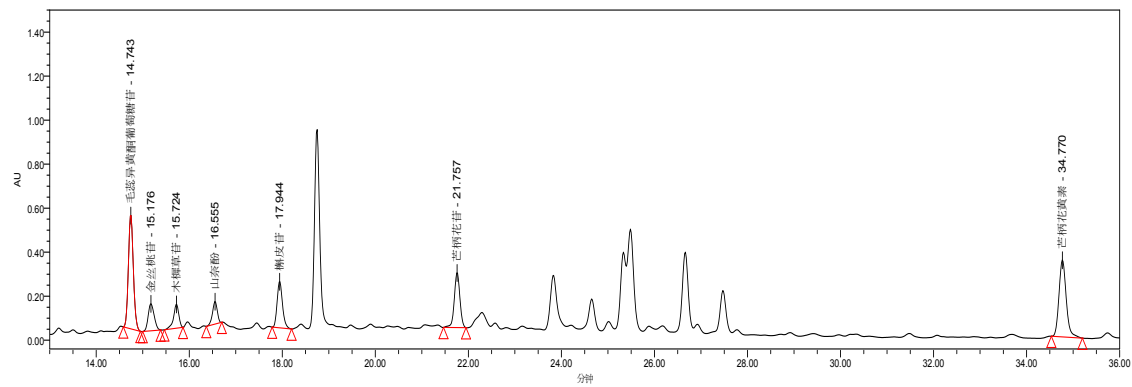
见图A. 1。



图A.1 7种黄酮类物质标准溶液色谱图

A.2 样品中7种黄酮类物质色谱图

见图A. 2。



图A.2 样品中7种黄酮类物质色谱图