

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2640—2014

**植物源性食品中花青素的测定
高效液相色谱法**

**Determination of anthocyanidins in plant origin products—
High performance liquid chromatography**

2014-10-17 发布

2015-01-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 和 GB/T 20001.4—2001 给出的规则起草。

本标准由农业部种植业管理司提出并归口。

本标准起草单位：四川省农业科学院分析测试中心、农业部食品质量监督检验测试中心（成都）、浙江省农业科学院农产品质量标准研究所。

本标准主要起草人：胡莉、雷绍荣、郭灵安、毛建霏、仲伶俐、杨晓凤、侯雪、郑蔚然。

植物源性食品中花青素的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了植物源性食品中的飞燕草色素、矢车菊色素、矮牵牛色素、天竺葵色素、芍药素和锦葵色素共6种花青素的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于植物源性食品中花青素含量的测定。

本标准的检出限:以称样量为1g,定容体积为50mL计,飞燕草色素、矢车菊色素、天竺葵色素、芍药素和锦葵色素5种花青素的检出限均为0.15mg/kg;矮牵牛色素的检出限为0.5mg/kg。同样条件下定量限:飞燕草色素、矢车菊色素、天竺葵色素、芍药素和锦葵色素5种花青素均为0.5mg/kg;矮牵牛色素为1.5mg/kg。

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 6379.1 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第1部分:总则与定义

GB/T 6379.2 测量方法与结果的准确度(正确度与精密度) 第2部分:确定标准测量方法重复性与再现性的基本方法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

植物源性食品中的花青素主要以花色苷的形式存在。试样经乙醇-水的强酸溶液超声提取花色苷后,经沸水浴将花色苷水解成花青素,用高效液相色谱法测定,以保留时间定性,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 无水乙醇(C_2H_5OH):色谱纯。

4.2 甲酸(CH_2O_2):色谱纯。

4.3 甲醇(CH_3OH):色谱纯。

4.4 盐酸(HCl):优级纯。

4.5 提取液:无水乙醇+水+盐酸=2+1+1(V+V+V),取200mL无水乙醇、100mL水和100mL盐酸混匀。

4.6 10%盐酸甲醇溶液(体积比):取10mL盐酸、90mL甲醇混匀。

4.7 飞燕草色素(Delphinidin):CAS号528-53-0,纯度 $\geq 96\%$ 。

4.8 矢车菊色素(Cyanidin):CAS号528-58-5,纯度 $\geq 98\%$ 。

4.9 矮牵牛色素(Petunidin chloride);CAS号1429-30-7,纯度 $\geq 96\%$ 。

4.10 天竺葵色素(Pelargonidin);CAS号134-04-3,纯度 $\geq 96\%$ 。

4.11 芍药素(Peonidin);CAS号134-01-0,纯度 $\geq 98\%$ 。

4.12 锦葵色素(Malvidin);CAS号643-84-5,纯度 $\geq 96\%$ 。

4.13 单标储备溶液

分别准确称取飞燕草色素(Delphinidin)、矢车菊色素(Cyanidin)、矮牵牛色素(Petunidin chloride)、天竺葵色素(Pelargonidin)、芍药素(Peonidin)和锦葵色素(Malvidin)共6种花青素标准品5.0 mg,用10%盐酸甲醇溶液(4.6)溶解并分别定容至10 mL容量瓶中,即为500 mg/L的单标储备液,于-18℃下,贮存于密闭的棕色玻璃瓶中,保存有效期为6个月。

4.14 混合标准使用液

在使用中将单一标准储备液进行混合后,用10%盐酸甲醇溶液(4.6)作为溶剂,并逐级稀释成0.5 mg/L、1.0 mg/L、5.0 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L或其他浓度的花青素混合标准使用液。在4℃条件下,有效期为6个月。

4.15 滤膜:0.45 μm,水相滤膜。

5 仪器与设备

5.1 高效液相色谱仪带

紫外或二极管阵列检测器。

5.2 天平:精度0.01 mg,0.01 g。

5.3 水浴锅:精度±2℃。

5.4 匀浆机。

5.5 超声波清洗机。

5.6 粉碎机。

6 分析步骤

6.1 试样制备

采用四分法分取样品,含水率高的样品,如葡萄、茄子等,取约200 g于匀浆机中匀浆;含水率低的样品,如黑米、黑豆等,用粉碎机进行粉碎,过250 μm的筛。所有样品在-18℃条件下保存。

6.2 提取

根据样品中花青素含量,称取样品1.00 g~10.00 g于50 mL具塞比色管中,加入提取液(4.5)定容至刻度,摇匀1 min后,超声提取30 min。

6.3 水解

超声提取后,于沸水浴中水解1 h,取出冷却后,用提取液(4.5)再次定容。静置,取上清液,用0.45 μm水相滤膜过滤,待测。样品制备好后,在4℃条件下,保存时间不超过3 d。

6.4 测定

6.4.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱:C₁₈柱,250 mm×4.6 mm×5 μm或性能相当者;
- b) 流动相A为含1%甲酸水溶液,流动相B为含1%甲酸乙腈溶液;
- c) 检测波长:530 nm;
- d) 柱温:35℃;
- e) 进样量:20 μL;
- f) 梯度洗脱条件,见表1。

表1 梯度洗脱表

| 时间, min | 流速, mL/min | 流动相 A, % | 流动相 B, % |
|---------|------------|----------|----------|
| 0.0 | 0.8 | 92.0 | 8.0 |
| 2.0 | 0.8 | 88.0 | 12.0 |

表 1 (续)

| 时间, min | 流速, mL/min | 流动相 A, % | 流动相 B, % |
|---------|------------|----------|----------|
| 5.0 | 0.8 | 82.0 | 18.0 |
| 10.0 | 0.8 | 80.0 | 20.0 |
| 12.0 | 0.8 | 75.0 | 25.0 |
| 15.0 | 0.8 | 70.0 | 30.0 |
| 18.0 | 0.8 | 55.0 | 45.0 |
| 20.0 | 0.8 | 20.0 | 80.0 |
| 22.0 | 0.8 | 92.0 | 8.0 |
| 30.0 | 0.8 | 92.0 | 8.0 |

6.4.2 色谱分析

分别将标准溶液和试样溶液,注入液相色谱仪中,以保留时间定性,以样品溶液峰面积与标准溶液峰面积比较定量。色谱图参见附录 A。

7 结果计算

样品中花青素含量为 6 种花青素含量之和。其含量以质量分数 w 计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$w = \frac{\rho \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ ——待测液中各花青素的质量浓度,单位为毫克每升(mg/L);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

m ——试样质量,单位为克(g)。

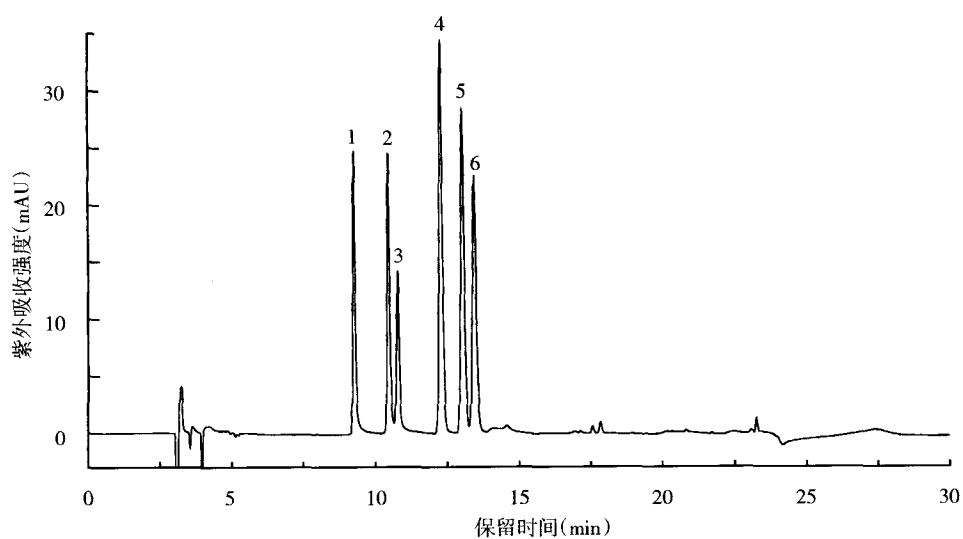
测定结果取两次测定的算术平均值,计算结果保留三位有效数字。

8 精密度

本标准精密度数据是按照 GB/T 6379.1 和 GB/T 6379.2 的规定确定的,获得重复性和再现性的值是以 95% 的置信度来计算。本标准方法的精密度数据参见附录 B。

附录 A
(资料性附录)
标准溶液色谱图

2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 花青素标准溶液色谱图见图 A.1。



说明:

1——飞燕草色素;
2——矢车菊色素;
3——矮牵牛色素;

4——天竺葵色素;
5——芍药素;
6——锦葵色素。

图 A.1 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 花青素标准溶液色谱图($\lambda 530 \text{ nm}$)

附录 B
(资料性附录)
方法精密度

方法精密度见表 B.1。

表 B.1 方法精密度

| 参数 | 含量 mg/kg | <i>r</i> | <i>R</i> | 参数 | 含量 mg/kg | <i>r</i> | <i>R</i> | 参数 | 含量 mg/kg | <i>r</i> | <i>R</i> |
|-----|-------------|----------|----------|-----|-------------|----------|----------|-----|-------------|----------|----------|
| 矮牵牛 | 2.5 | 0.74 | 0.84 | 矮牵牛 | 5.0 | 1.62 | 1.73 | 矮牵牛 | 10.0 | 1.77 | 2.25 |
| 矮牵牛 | 25.0 | 6.86 | 7.95 | 矮牵牛 | 50.0 | 9.03 | 14.44 | 矮牵牛 | 100.0 | 18.47 | 27.27 |
| 飞燕草 | 2.5 | 0.61 | 0.69 | 飞燕草 | 5.0 | 0.96 | 1.17 | 飞燕草 | 10.0 | 1.79 | 2.41 |
| 飞燕草 | 25.0 | 5.82 | 6.56 | 飞燕草 | 50.0 | 9.35 | 11.40 | 飞燕草 | 100.0 | 22.18 | 23.76 |
| 锦葵素 | 2.5 | 0.51 | 0.70 | 锦葵素 | 5.0 | 1.04 | 1.58 | 锦葵素 | 10.0 | 2.23 | 3.18 |
| 锦葵素 | 25.0 | 7.51 | 13.33 | 锦葵素 | 50.0 | 13.04 | 15.99 | 锦葵素 | 100.0 | 24.46 | 28.37 |
| 芍药素 | 2.5 | 0.47 | 0.53 | 芍药素 | 5.0 | 1.16 | 1.70 | 芍药素 | 10.0 | 1.4 | 2.60 |
| 芍药素 | 25.0 | 8.00 | 7.95 | 芍药素 | 50.0 | 14.65 | 19.97 | 芍药素 | 100.0 | 21.51 | 35.09 |
| 天竺葵 | 2.5 | 0.54 | 0.61 | 天竺葵 | 5.0 | 1.71 | 2.39 | 天竺葵 | 10.0 | 2.11 | 2.57 |
| 天竺葵 | 25.0 | 8.46 | 8.65 | 天竺葵 | 50.0 | 14.25 | 17.20 | 天竺葵 | 100.0 | 23.41 | 27.72 |
| 矢车菊 | 2.5 | 0.70 | 0.87 | 矢车菊 | 5.0 | 1.85 | 1.92 | 矢车菊 | 10.0 | 1.97 | 2.5 |
| 矢车菊 | 25.0 | 6.97 | 8.36 | 矢车菊 | 50.0 | 19.80 | 21.21 | 矢车菊 | 100.0 | 28.66 | 33.59 |

注：*r*为重复性限，*R*为再现性限。*R*是置信概率为95%时该方法的再现性。