

# DBS63

## 青海省地方标准

DBS63/0011-2021

### 食品安全地方标准 黑果枸杞中花青素含量的测定

2021年3月22日发布

2021年6月21日实施

青海省卫生健康委员会

发布

## 前 言

本文件遵循《中华人民共和国标准化法》、《中华人民共和国食品安全法》、《青海省食品安全地方标准管理办法》等法律法规规定，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。

本文件由青海省食品检验检测院提出。

本文件由青海省卫生健康委员会归口。

本文件起草单位：青海省食品检验检测院、青海大学、中国科学院西北高原生物研究所。

本文件主要起草人：王茜、王树林、董琦、束彤、马明芳、王平平、杨丽婧、谭亮、肖远灿、叶英、王启婷。

本文件于2021年3月22日首次发布。

## 食品安全地方标准

## 黑果枸杞中花青素含量的测定

## 1 范围

本文件规定了黑果枸杞花青素中矮牵牛素、锦葵素和飞燕草素的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于黑果枸杞花青素中矮牵牛素、锦葵素和飞燕草素的含量测定。

本方法锦葵素、飞燕草素检出限和定量限均为0.5 mg/kg和1.5 mg/kg，矮牵牛素检出限和定量限分别为1.5 mg/kg和4.0 mg/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 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。

## 4 原理

黑果枸杞花青素主要以花色苷的形式存在。试样经乙醇-水-盐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。

## 5 试剂与材料

除非另有规定，在分析中仅使用分析纯的试剂和GB/T 6682中规定的一级水。

## 5.1 试剂

5.1.1 无水乙醇（ $C_2H_5OH$ ）：色谱纯。

5.1.2 甲酸（ $CH_2O_2$ ）：色谱纯。

5.1.3 甲醇（ $CH_3OH$ ）：色谱纯。

5.1.4 乙腈（ $C_2H_3N$ ）：色谱纯。

5.1.5 盐酸（ $HCl$ ）：优级纯。

## 5.2 试剂配制

5.2.1 提取液：无水乙醇+水+盐酸=5+2+3（ $V+V+V$ ），量取250 mL无水乙醇，100 mL水和150 mL盐酸，混匀。

5.2.2 10% 盐酸甲醇溶液：按浓盐酸+甲醇=1+9（ $V+V$ ），分别量取10 mL浓盐酸和90 mL甲醇，混匀。

5.2.3 流动相A 1% 甲酸水溶液：准确吸取甲酸1 mL至1 L容量瓶中，水定容至刻度，摇匀。

5.2.4 流动相B 1% 甲酸乙腈溶液：准确吸取甲酸1 mL至1 L容量瓶中，乙腈定容至刻度，摇匀。

### 5.3 标准品

5.3.1 矮牵牛素 (Petunidin chloride) : CAS号1429-30-7, 纯度 $\geq 96\%$ 。

5.3.2 锦葵素 (Malvidin) : CAS号643-84-5, 纯度 $\geq 96\%$ 。

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

或购买经国家认证并授予标准物质证书的标准溶液。

### 5.4 标准溶液配制

#### 5.4.1 单标储备溶液

分别准确称取矮牵牛素、锦葵素和飞燕草素标准物质各5.0 mg, 用10% 盐酸甲醇溶解并定容至5 mL, 充分摇匀, 配制成1000 mg/L的标准储备液, 于 $-18^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存。在密闭棕色玻璃瓶中保存有效期为6个月。

#### 5.4.2 混合标准使用液

将单一标准储备液进行等比例混合后, 用10% 盐酸甲醇溶液作为溶剂, 并逐级稀释成矮牵牛素、锦葵素和飞燕草素浓度为0.5 mg/L、1.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L、100.0 mg/L, 该标准系列现用现配, 于 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

### 5.5 材料

5.5.1 滤膜:  $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜。

5.5.2 比色管: 50 mL带刻度具塞比色管。

## 6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪: 带紫外或二极管阵列检测器。

6.2 天平: 精度0.01 mg, 0.01 g。

6.3 水浴锅: 精度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

6.4 匀浆机。

6.5 超声清洗机。

## 7 分析步骤

### 7.1 试样制备

采用四分法分取样品, 取约200 g样品于匀浆机中匀浆。制得样品在 $-18^{\circ}\text{C}$ 下保存。

### 7.2 提取

称取5 g (精确至0.01g) 制备好的试样于50 mL具塞比色管中, 加入提取液 (5.2.1) 至刻度, 混匀1 min, 超声提取15 min。

### 7.3 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 (5.2.1) 定容至刻度, 摇匀, 静置。准确吸取上清液1.0 mL至10 mL容量瓶中, 用提取液 (5.2.1) 定容至刻度, 摇匀, 静置。取其上清液用 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 上机检测。制备好的样品可在 $4^{\circ}\text{C}$ 条件下保存不超过48 h。

## 7.4 空白试验

随同试样一起进行双份空白试验，除不加试样外，与试样制备过程一致。

## 7.5 测定

## 7.5.1 仪器参考条件

7.5.1.1 色谱柱：C<sub>18</sub>柱，150 mm×4.6 mm×5 μm或性能相当；

7.5.1.2 流动相A：1% 甲酸水溶液，流动相B：1% 甲酸乙腈溶液；

7.5.1.3 检测波长：530 nm；

7.5.1.4 柱温：35 ℃；

7.5.1.5 进样量：20 μL；

7.5.1.6 梯度洗脱条件，见表1。

表1 梯度洗脱条件表

时间(min)	流速(mL/min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	0.8	92	8
2.0	0.8	88	12
5.0	0.8	82	18
10.0	0.8	80	20
12.0	0.8	75	25
15.0	0.8	70	30
18.0	0.8	55	45
20.0	0.8	20	80
22.0	0.8	92	8
30.0	0.8	92	8

## 7.5.2 标准曲线的制作

将混合标准系列工作溶液分别注入液相色谱仪中，测定相应的峰面积，以混合标准系列工作溶液的质量浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

## 7.5.3 试样溶液的测定

将试样溶液注入液相色谱仪中，得到样品溶液峰面积，以保留时间定性，根据标准曲线得到试样中待测物的质量浓度。色谱图参见附录A。

## 8 结果计算

样品中花青素含量为矮牵牛素、飞燕草素和锦葵素之和。其含量以质量分数 $\omega$ 计，单位以克每百克(g/100g)计，按式(1)计算。

$$\omega = \frac{\rho \times V \times f}{m} \times 10^{-4} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

$\rho$ —待测液中花青素的质量浓度之和，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）。

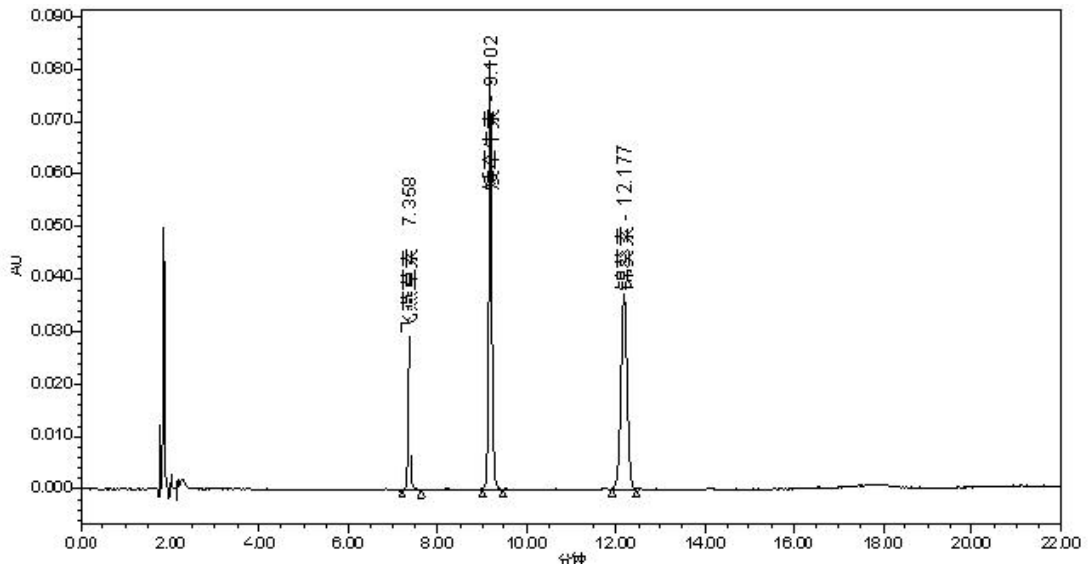
f—稀释倍数

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。

#### 9 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

附录 A  
(资料性附录)  
标准溶液色谱图



10mg/L 三种花青素标准溶液色谱图