

# 中华人民共和国国家标准

GB/T 42114—2022

## 木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液相色谱法

Determination of flavonol in cassava leaves—  
High-performance liquid chromatography

2022-12-30 发布

2023-07-01 实施

国家市场监督管理总局  
国家标准化管理委员会 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国标准化研究院提出并归口。

本文件起草单位：中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所、浙江省农业科学院、中国标准化研究院、浙江大学、中国热带农业科学院香料饮料研究所。

本文件主要起草人：王琴飞、张振文、陆柏益、杨丽、孙彩霞、张彦军、林立铭、余厚美、陆小静、韦卓文、李开绵。



# 木薯叶片中黄酮醇的测定 高效液相色谱法

## 1 范围

本文件描述了木薯(*Manihot esculenta* Crantz, Cassava)叶中 4 种黄酮醇化合物的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于木薯鲜叶和木薯干叶中杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷 4 种黄酮醇含量的测定。

## 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于本文件;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

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

木薯叶片试样中加入 50%乙醇水溶液,经超声波辅助提取,高效液相色谱仪分离,紫外检测器或二极管阵列检测器检测,根据保留时间定性和外标法定量。

## 5 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用分析纯试剂,以及符合 GB/T 6682 规定的一级水。

### 5.1 试剂

5.1.1 甲醇( $\text{CH}_3\text{OH}$ ,CAS 号:67-56-1):色谱纯。

5.1.2 无水乙醇( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ,CAS 号:64-17-5):色谱纯。

5.1.3 磷酸( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ,CAS 号:7664-38-2)。

### 5.2 试剂配制

5.2.1 50%乙醇水溶液(体积分数):取 500 mL 无水乙醇(5.1.2),加入 500 mL 水,混匀。

5.2.2 0.2%磷酸水溶液(体积分数):取 2.0 mL 磷酸(5.1.3),置于 1 000 mL 容量瓶中,用水定容至刻度,现配现用。

### 5.3 标准品

5.3.1 杨梅苷(myricetin-3-O-rutinoside, $\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{17}$ ,CAS 号:41093-68-9):纯度 $\geq 98.0\%$ 。

5.3.2 芦丁(querletin 3-*O*-rutinoside,  $C_{27}H_{30}O_{16}$ , CAS 号:153-18-4):纯度 $\geq 98.0\%$ 。

5.3.3 烟花苷(kaempferol-3-*O*-rutinoside,  $C_{27}H_{30}O_{15}$ , CAS 号:17650-84-9):纯度 $\geq 98.0\%$ 。

5.3.4 水仙苷(isorhamnetin-3-*O*-rutinoside,  $C_{28}H_{32}O_{16}$ , CAS 号:604-80-8):纯度 $\geq 98.0\%$ 。

## 5.4 标准溶液配制

### 5.4.1 标准储备溶液

称取杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷标准品分别为 100.0 mg、600.0 mg、300.0 mg 和 100.0 mg,加甲醇(5.1.1)溶解并定容至 100 mL,配成质量浓度分别为 1.0 mg/mL、6.0 mg/mL、3.0 mg/mL 和 1.0 mg/mL 标准储备液,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 密封避光保存。保存期 6 个月。

### 5.4.2 标准中间工作溶液

分别移取 1.0 mL 的杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷标准储备溶液(5.4.1)于 10 mL 棕色容量瓶中,用 50%乙醇水溶液(5.2.1)定容,获得 4 种黄酮醇标准品质量浓度分别为 100.0  $\mu\text{g/mL}$ 、600.0  $\mu\text{g/mL}$ 、300.0  $\mu\text{g/mL}$ 、100.0  $\mu\text{g/mL}$  标准中间工作溶液,现配现用。

### 5.4.3 系列混合标准工作液

准确移取一定体积的标准中间工作溶液(5.4.2),用 50%乙醇水溶液(5.2.1)逐级稀释,配制成杨梅苷质量浓度分别为 0.25  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、2.5  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、25.0  $\mu\text{g/mL}$ 、50.0  $\mu\text{g/mL}$ 、100.0  $\mu\text{g/mL}$ ,芦丁质量浓度分别为 0.15  $\mu\text{g/mL}$ 、3.0  $\mu\text{g/mL}$ 、15.0  $\mu\text{g/mL}$ 、30.0  $\mu\text{g/mL}$ 、150.0  $\mu\text{g/mL}$ 、300.0  $\mu\text{g/mL}$ 、600.0  $\mu\text{g/mL}$ ,烟花苷质量浓度分别为 0.15  $\mu\text{g/mL}$ 、1.5  $\mu\text{g/mL}$ 、7.5  $\mu\text{g/mL}$ 、15.0  $\mu\text{g/mL}$ 、75.0  $\mu\text{g/mL}$ 、150.0  $\mu\text{g/mL}$ 、300.0  $\mu\text{g/mL}$ ,水仙苷质量浓度分别为 0.15  $\mu\text{g/mL}$ 、0.5  $\mu\text{g/mL}$ 、2.5  $\mu\text{g/mL}$ 、5.0  $\mu\text{g/mL}$ 、25.0  $\mu\text{g/mL}$ 、50.0  $\mu\text{g/mL}$ 、100.0  $\mu\text{g/mL}$  的系列混合标准工作液,现配现用。

## 6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪:配备紫外检测器或二极管阵列检测器。

6.2 天平:感量 0.1 mg 和 0.01 g。

6.3 超声波清洗器:功率 $\geq 500\text{ W}$ 。

6.4 离心机:转速 $\geq 4\ 200\text{ r/min}$ ,配 15 mL 转子或适配器。

6.5 电热恒温干燥箱。

6.6 植物组织研磨仪。

6.7 旋涡混合器。

6.8 离心管:15 mL 和 50 mL。

6.9 容量瓶:10 mL 和 1 000 mL。

6.10 移液管:0.1 mL、0.2 mL、0.5 mL 和 1.0 mL。

6.11 PTFE 亲水微孔滤膜或相当性能的滤膜:孔径 0.22  $\mu\text{m}$ 。

## 7 试样制备与保存

### 7.1 木薯鲜叶

取适量木薯新鲜叶片(不带叶柄),擦拭干净表面尘土或水分,用液氮速冻后研磨至粉末,装入洁净的离心管中。试样制备后于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下密封避光保存。保存期 1 年。

7.2 木薯干叶

取适量的木薯干叶(不带叶柄),用植物组织研磨仪研磨至粉末,过 0.2 mm 的筛,混匀,装入洁净的密封袋中。试样制备后于 8 ℃ 以下密封避光保存。保存期 1 年。

8 测定步骤

8.1 提取

准确称取木薯鲜叶或木薯干叶粉末 0.2 g(±0.000 2 g)于 15 mL 离心管中,加入 50%乙醇水溶液(5.2.1)5.0 mL,旋涡振荡混匀,超声提取 60 min(50 ℃,500 W),离心 10 min(4 200 r/min,25 ℃),上清液转移至 10 mL 容量瓶中,残渣再加入 50%乙醇水溶液(5.2.1)5.0 mL,旋涡振荡混匀,离心 5 min(10 000 r/min, 25 ℃),合并两次离心的上清液,加入 50%乙醇水溶液(5.2.1)定容至 10 mL,旋涡振荡混匀,即待测样品溶液。取 1.0 mL 待测样品溶液,通过 0.22 μm 微孔滤膜(6.11),供高效液相色谱仪检测。

8.2 测定

8.2.1 色谱参考条件

- 高效液相色谱仪(6.1)的色谱参考条件如下:
- a) C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)或性能相当的色谱柱;
  - b) 流动相:甲醇和 0.2%磷酸水溶液,按表 1 的规定进行梯度洗脱;
  - c) 流速:0.8 mL/min;
  - d) 检测波长:360 nm;
  - e) 进样量:10 μL;
  - f) 柱温:40 ℃。

表 1 梯度洗脱表

时间 min	甲醇 %	0.2%磷酸水溶液 %
0	25	75
15	58	42
20	80	20
25	100	0
27	25	75
32	25	75

8.2.2 标准曲线的制作

取适量标准中间工作溶液(5.4.2),用 50%乙醇稀释成系列混合标准工作液(5.4.3),杨梅苷、芦丁、烟花苷和水仙苷质量浓度范围分别为:0.25 mg/L~100.0 mg/L、0.15 mg/L~600.0 mg/L、0.15 mg/L~300.0 mg/L 和 0.15 mg/L~100.0 mg/L。按照 8.2.1 规定的色谱条件测定,以标准溶液质量浓度为横坐标,对应的峰面积为纵坐标,建立标准工作曲线。4 种黄酮醇标准溶液色谱图见附录 A。

8.2.3 试样溶液的测定

按照 8.2.1 规定的色谱条件,将待测样品溶液(8.1)注入高效液相色谱仪(6.1)中进行测试,根据标准溶液色谱峰的保留时间进行定性。试样溶液中 4 种黄酮醇的响应值应在标准曲线线性范围内,超过线性范围应稀释后再进行分析,外标法定量。

9 结果计算与表述

9.1 木薯叶片中黄酮醇各组分含量

试样中木薯叶黄酮醇各组分含量,按式(1)计算。

$$X_i = \frac{\rho_i \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $X_i$  ——试样中某一黄酮醇组分含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- $\rho_i$  ——从标准工作曲线得到的试样溶液中各组分的质量浓度,单位为微克每毫升( $\mu\text{g/mL}$ );
- $V$  ——试样提取液定容体积,单位为毫升(mL);
- 1 000 ——单位换算系数;
- $m$  ——试样质量,单位为克(g);
- $f$  ——稀释倍数。

9.2 木薯叶黄酮醇总含量

试样中黄酮醇总含量为各组分之和,按式(2)计算。

$$X = \sum X_i \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- $X$  ——试样中黄酮醇总含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- $X_i$  ——试样中某一黄酮醇组分含量,单位为毫克每千克(mg/kg)。

注:本文件中 4 种黄酮醇已包括木薯叶片中黄酮醇的绝大部分含量,可视为木薯叶片中黄酮醇总含量。

9.3 结果表示

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示,结果保留至小数点后一位。

10 精密度

10.1 重复性

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

10.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过算术平均值的 15%。

11 检出限和定量限

本方法测定黄酮醇的检出限和定量限见表 2。

表 2 黄酮醇化合物检出限与定量限

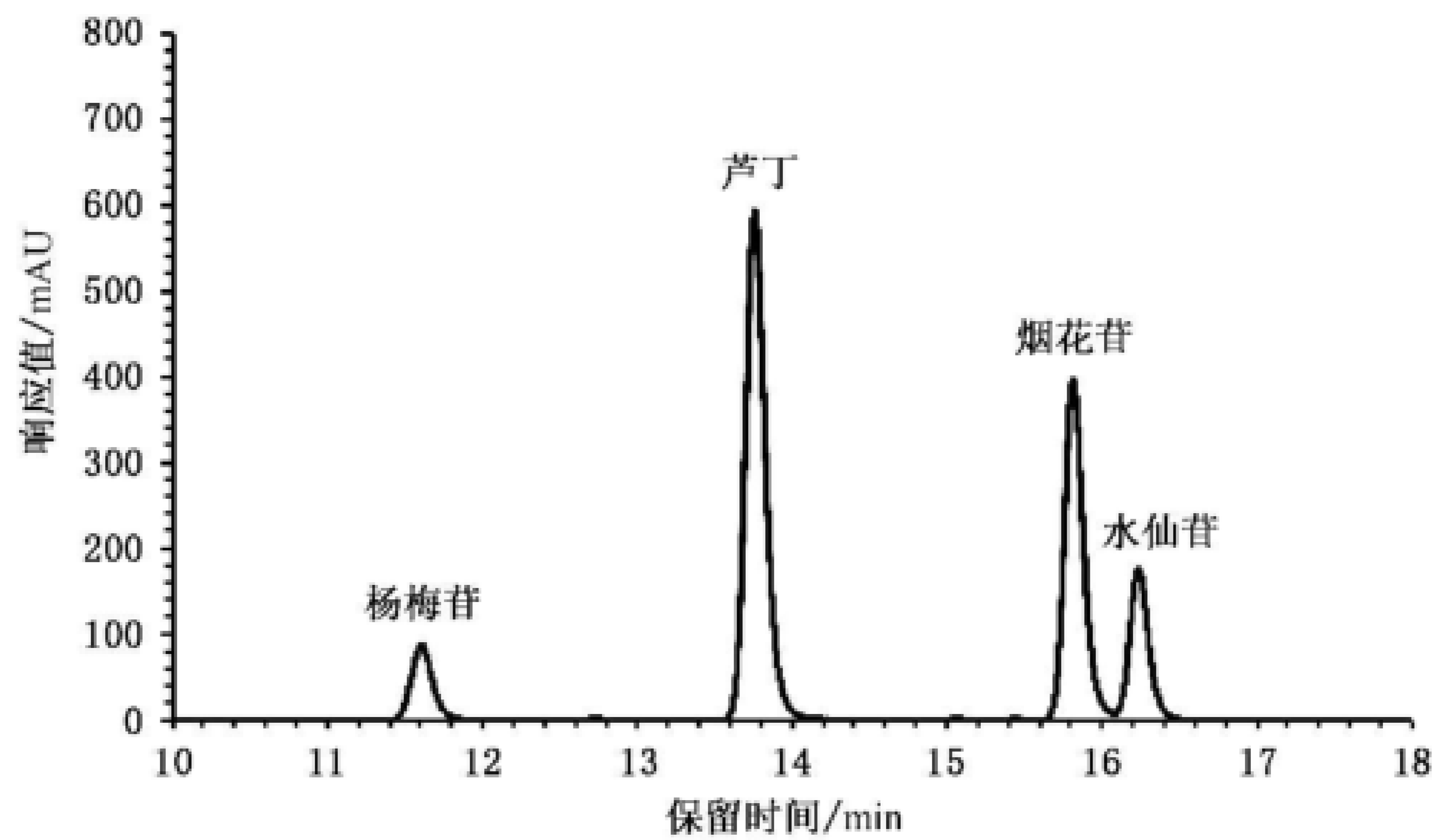
单位为毫克每千克

化合物名称	检出限	定量限
杨梅苷	10.0	32.0
芦丁	10.0	27.0
烟花苷	10.0	30.0
水仙苷	9.0	26.0

附 录 A  
(资料性)

4 种黄酮醇混合标准溶液色谱图

4 种黄酮醇混合标准溶液色谱图见图 A.1。



注：杨梅苷、芦丁、烟花苷、水仙苷质量浓度分别为：50.0 mg/L、300.0 mg/L、150.0 mg/L、50.0 mg/L。

图 A.1 4 种黄酮醇混合标准溶液高效液相色谱图



中 华 人 民 共 和 国  
国 家 标 准  
木薯叶片中黄酮醇的测定  
高效液相色谱法  
GB/T 42114—2022

\*

中国标准出版社出版发行  
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)  
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: [www.spc.org.cn](http://www.spc.org.cn)

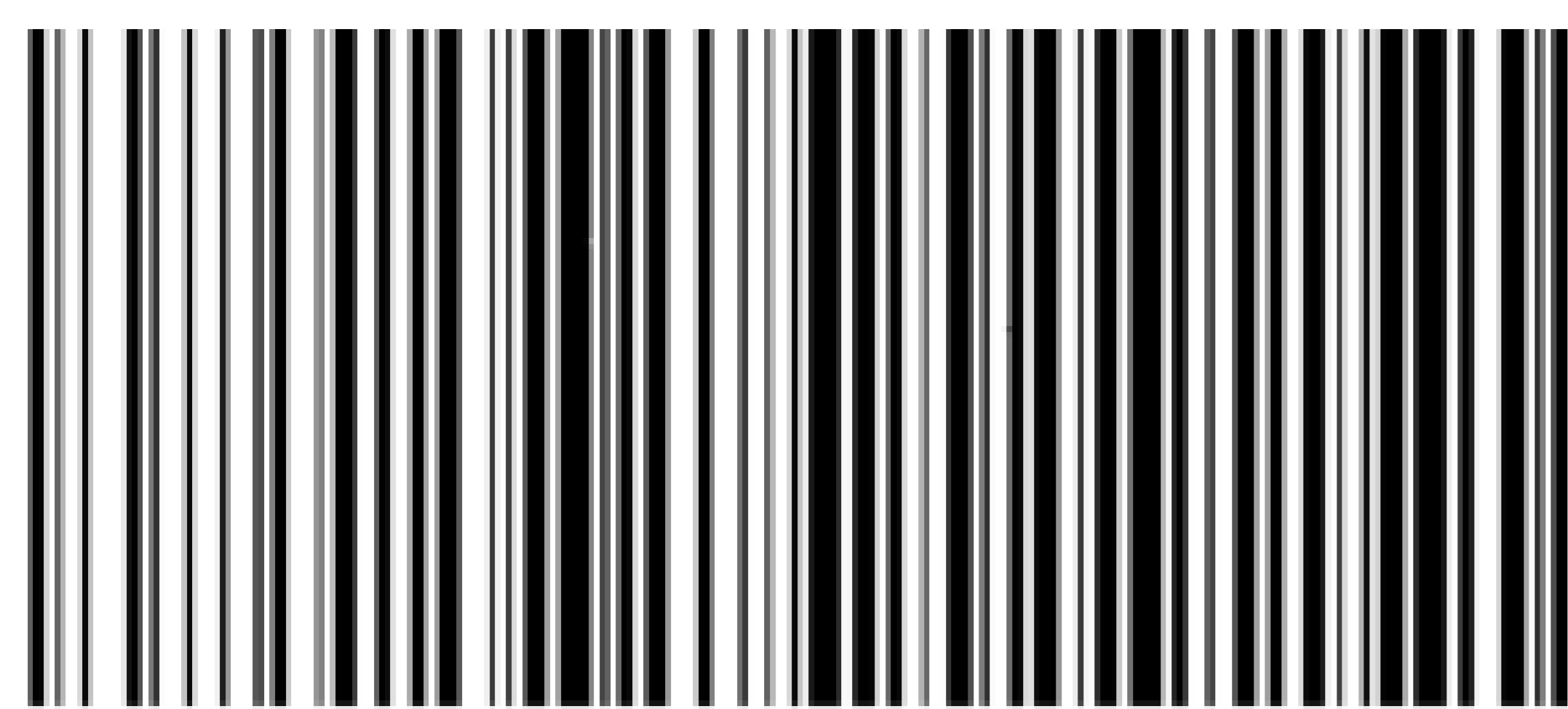
服务热线: 400-168-0010

2022年12月第一版

\*

书号: 155066 • 1-71576

版权专有 侵权必究



GB/T 42114-2022



码上扫一扫 正版服务到

[www.bzxz.net](http://www.bzxz.net)

免费标准下载网