

# 团 体 标 准

T/GDFDTAEC 05-2022

---

## 蜂胶类保健食品中总黄酮的测定-分光光度法

Determination of total flavonoids in propolis health food by

Spectrophotometry

2022 - 07 - 06 发布

2022 - 07 - 06 实施

---

广东省食品药品审评认证技术协会 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。

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。

本文件由广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、无限极(中国)有限公司提出。

本文件由广东省食品药品审评认证技术协会归口。

本文件起草单位：广东省科学院测试分析研究所（中国广州分析测试中心）、无限极(中国)有限公司、汤臣倍健股份有限公司、广东粤微食用菌技术有限公司、华测检测认证集团股份有限公司、广州金至检测技术有限公司、纽斯葆广赛（广东）生物科技股份有限公司、广州汇标检测技术中心、完美（广东）日用品有限公司、广东壹健康健康产业集团股份有限公司、东鹏饮料(集团)股份有限公司。

本文件主要起草人：王志强、孙红梅、张方圆、徐阳纯、杨田、刘惠俊、黄美山、李冰、李煜、陈晶、郁晓艺、魏鲜娥、刘光兰、朱桂芳、梁惠婷、梁文福、冼超森、潘淑贤、刘亚平、胡海娥、李学莉、罗功才、蒲长军、简伟明、李舜贤、关天竹、何春艳、许泽群、李栩欣。

本文件为首次发布。

# 蜂胶类保健食品中总黄酮的测定-分光光度法

## 1 范围

本文件规定了蜂胶类保健食品总黄酮含量的测定方法。

本文件适用于蜂胶类保健食品中总黄酮含量的测定，其中，固体样品和黏稠样品适用范围为0.13~12.7 g/100 g，液体样品适用范围为0.013~1.27 g/100 mL。

## 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

在酸性条件下，三价铝离子只与黄酮分子中的羰基于其邻位羟基之间发生显色反应产生络合物，在406 nm左右有最大吸收。在一定浓度范围内，其吸光度与黄酮类化合物含量呈正比，与标准曲线比较，可用于定量总黄酮。

## 5 试剂和材料

除非另有规定，本文件所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的三级水。

### 5.1 试剂

5.1.1 聚酰胺粉：100~200目。

5.1.2 乙醇：分析纯。

5.1.3 石油醚 I：分析纯。

5.1.4 无水甲醇：分析纯。

### 5.2 溶液配制

5.2.1 硝酸铝溶液：称取 17.60 g  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$ ，加水溶解后定容到 100 mL。

5.2.2 乙酸-乙酸钠溶液：称取 2.720 g 三水合乙酸钠，加水溶解后定容到 100 mL，用 2% 乙酸溶液调至 pH 为 5.6。

### 5.3 标准品

5.3.1 芦丁对照品：CAS：153-18-4、纯度 $\geq 90\%$ ，中国食品药品检定研究院或其他合格生产商。

## 5.4 标准溶液的配制

5.4.1 芦丁储备溶液：准确称取芦丁对照品 50 mg 置于容量瓶中，加无水乙醇溶解并定容至 50 mL，即得 1.0 g/L。

5.4.2 芦丁对照使用溶液：精密吸取芦丁储备溶液 10.0 mL 于 50 mL 容量瓶中，加无水乙醇溶解并定容至刻度，混匀。此溶液芦丁的质量浓度为 0.2 g/L。

## 6 仪器设备

6.1 紫外可见分光光度计。

6.2 离心机。

6.3 干燥箱。

6.4 高速粉碎机。

6.5 分析天平：精密度 0.0001 g 和 0.00001 g。

6.6 超声提取器：超声功率 $\geq$ 200 w。

6.7 小号层析柱：孔内径:1.5 cm,滤芯:G1。

6.8 大号层析柱：孔内径:2.1 cm,滤芯:G1。

6.9 数显恒温水浴锅。

## 7 试验步骤

### 7.1 标准曲线制备

吸取芦丁对照使用溶液0.00、0.25、0.50、1.00、1.50、2.00、2.50 mL（芦丁含量分别为0、50、100、200、300、400、500  $\mu$ g），分别置于25.0 mL容量瓶，再分别加入0.50 mL硝酸铝溶液（5.2.1）和0.50 mL乙酸-乙酸钠溶液（5.2.2），摇匀，用70%乙醇定容至刻度，摇匀静置显色反应30 min，再用1 cm石英比色皿，参比试剂空白，用紫外可见分光光度计在406 nm处测其吸光度值A。以吸光度A为纵坐标，以芦丁的质量( $\mu$ g)为横坐标，绘制标准曲线，求出直线回归方程并计算相关系数。

### 7.2 试样提取

固体样品：取 0.5~1.0 g 均匀试样<sup>注a</sup>，置于 50 mL 锥形瓶中，精密移取 25 mL 75%乙醇<sup>注b</sup>至锥形瓶中，称重，超声 30 min，提取冷却后补足重量；或置于 25 mL 容量瓶中，加入约 20 mL 75%乙醇<sup>注b</sup>进行提取，摇匀，超声 30 min，放冷至室温，加 75%乙醇定容至 25 mL。

黏稠样品：取 0.5~1.0 g 均匀试样<sup>注a</sup>，精密移取 25 mL 75%乙醇<sup>注b</sup>至锥形瓶中，称重，超声 30 min，提取冷却后补足重量。

液体样品：精密移取 5.0~10.0 mL<sup>注a</sup>到 25 mL 容量瓶中，加入 75%乙醇，摇匀后，超声提取 30 min，放冷至室温，定容至刻度。

样液经 4000 r/min 离心 5 min 后，于蒸发容器中加聚酰胺粉（5.1.1）<sup>注c</sup>，再吸取离心后上清液 1.0~5.0 mL 均匀地平铺、吸附于粉上，于 70℃ 挥去乙醇，然后转入层析柱<sup>注d</sup>洗脱。先用约 20 mL 石油醚 I 洗去杂质，吹尽醚液，弃去，接着用约 50 mL 无水甲醇洗脱黄酮，流速约 1 mL/min，合并洗脱液并定容至 50.0 mL 待用。

**注 a:** 颗粒较大的固体样品，称量前适当进行粉碎处理；胶囊样品取 20 粒，挤出内容物可使用研钵研成细粉或者玻璃棒进行混匀，称取内容物；试样取样量和供试液取样体积可根据试样中总黄酮的含量适当调整，以保证测定的吸光度值在 0.1~0.4 范围内。

**注 b:** 若遇到样品在溶剂中不易分散的，可增大提取乙醇的浓度。

**注 c:** 1 g 聚酰胺粉：吸附样液 1.0~2.0 mL，使用小号层析柱（6.7），填柱高约 4.5 cm；3 g 聚酰胺粉：吸附样液 3.0~5.0 mL，使用大号层析柱（6.8），填柱高约 4.5 cm。

**注 d:** 防止漏粉：可事先选择性在层析柱砂芯处垫上一层薄薄的脱脂棉。

### 7.3 试样溶液的测定

取洗脱液 10.0 mL 到 25.0 mL 容量瓶，加入 70%乙醇定容至刻度，摇匀作为样品空白。另准确移取 10.0 mL 洗脱液到 25.0 mL 容量瓶，再分别加入 0.50 mL 硝酸铝溶液（5.2.1）和 0.50 mL 乙酸-乙酸钠溶液（5.2.2），摇匀，用 70%乙醇定容至刻度，摇匀静置显色反应 30 min，再用 1 cm 石英比色皿，参比样品空白，在 406 nm 波长下测吸光值，通过标准曲线得出试样测定液绝对量。

## 8 结果计算

试样中总黄酮的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{m_2 \times V_1 \times 50}{m_1 \times V_2 \times 10 \times 1000000} \times 100 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中总黄酮的含量，以芦丁计，单位为克每一百克或克每一百毫升（g/100 g 或 g/100 mL）；

$m_1$ ——称取试样的质量，单位为克（g）；

$V_1$ ——超声提取后的定容体积，单位为毫升（mL）；

$m_2$ ——通过线性回归方程算得的测定用样液中总黄酮的质量，单位为微克（ $\mu\text{g}$ ）；

$V_2$ ——用于聚酰胺粉吸附时吸取的样液体积，单位为毫升（mL）。

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。总黄酮含量 $\geq 1$  g/100g时，结果保留三位有效数字，总黄酮含量 $< 1$  g/100g时，结果保留两位有效数字。

## 9 精密度

### 9.1 重复性

在重复性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

### 9.2 再现性

在再现性条件下获得的2次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的15%。

**注：**样品有颜色时，必须做样品空白，以消除样品颜色干扰。