

青海省食品安全地方标准

《黑果枸杞中花青素检测方法》

编制说明

一、工作简况

（一）任务来源与起草单位、主要起草人

本项目经青海省卫生健康委员会根据《青海省食品安全地方标准管理规定》批准立项（青卫食品[2020]4 号），由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所负责制订，由省内外 5 家检验机构进行样品检测及方法验证工作。主要起草人是：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。

表 1 标准起草人基本情况表

研制人员	姓名	性别	年龄	职称/职务	专业	单位	投入时间
项目负责人	王茜	女	52	高级工程师/副院长	食品检验与实验室管理	青海省食品检验检测院	6 个月
主要参加人员	王树林	男	50	教授	食品科学	青海大学	6 个月
	董琦	女	40	高级工程师	植物化学	中国科学院西北高原生物所	6 个月
	束彤	男	54	正高级工程师/院长	食品检验与实验室管理	青海省食品检验检测院	6 个月
	马明芳	女	39	高级工程师	食品检验	青海省食品检验检测院	6 个月
	王平平	女	32	工程师	食品检验	青海省食品检验检测院	3 个月
	杨丽婧	女	42	工程师	食品加工与安全	青海省食品检验检测院	3 个月
	谭亮	男	36	高级工程师	分析化学	中国科学院西北高原生物所	3 个月
	肖远灿	男	40	副研究员	植物化学	中国科学院西北高原生物所	3 个月

	叶英	女	36	副教授	食品科学	青海大学	3 个月
	王启婷	女	27	助理工程师	食品检验	青海省食品检验检测院	3 个月

（二） 简要起草过程

1.成立项目组

项目批复后，成立了由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所技术人员组成的项目组，牵头单位为青海省食品检验检测院。

2.制订工作方案

根据《青海省食品安全地方标准管理规定》，为确保年度内完成工作任务，项目组制订了工作方案，明确任务分工和时间节点，2020 年 5 月-8 月，收集整理相关的花青素含量分析检测方法，采用相关方法对黑果枸杞中花青素含量开展了反复检测和验证，确定采用液相色谱法测定黑果枸杞中矮牵牛素、飞燕草素和锦葵素作为黑果枸杞花青素检测指标，并在《青海日报》刊登公告，广泛面向社会征求意见；8 月-11 月购买样品进行检验及不同实验室间验证；11 月在实验基础上，组织专业技术人员对实验过程中出现的一系列问题进行了讨论，拟定初稿；12 月征求了相关单位及有关专家的意见和建议，形成标准送审稿。

3、项目实施

按照工作安排，5 月--8 月收集到相关花青素分析方法检验标准 4 项、查阅国内外文献、论文 6 篇，对实验参数进行了分析统计；

7 月采集黑果枸杞 4 批次（青海都兰县诺木洪、格尔木市大格勒、甘肃、新疆），青海省食品检验检测院检测花青素，9 月采集青海海西

黑果枸杞 15 批次；

11 月选择青海省食品检验检测院、西宁海关技术服务中心、甘肃中商食品质量检验检测有限公司、青海谱测检测有限公司、中国科学院西北高原生物研究所湖州高院生物资源产业化创新中心 5 家机构进行检验及不同实验室间验证，初步确定了该标准的检测范围、原理、试剂材料、仪器设备、分析步骤、结果计算等内容，随之拟定了初稿；

11 月底初稿完成后，征求了相关单位及有关专家的意见和建议，根据专家提出的意见建议，对标准进行修改、补充和完善，对采纳的意见在标准文本中进行逐条修改，不采纳的意见给出合理解释。由项目负责人进行汇总、审核，形成标准送审稿。

二、与我省有关法律法规和其他标准的关系

DBS63/***-2020《食品安全地方标准 黑果枸杞中花青素检测方法》地方标准经样品检测、方法研究探索并经不同检测机构检测数据分析比对确定。本标准符合现行法律、法规和强制性标准要求，不与之冲突。

三、国外国内有关法律法规和标准情况的说明

经查询，目前国内花青素、前花青素、原花青素等相关现行有效的相关测定标准有 4 项，分别是《植物性食品中花青素的测定 高校液相色谱法》（NY/T 2640-2014）、《保健食品中前花青素的测定（GB/T 22244-2008）》、《黑果枸杞中花青素含量的测定 高效液相色谱法》

（DB64/T 1578-2018）、《黑果枸杞原花青素含量的测定 液相色谱法》

（DB65/T 4039-2017）。其中国家标准有 1 项，行业标准有 1 项，地方标准有 2 项。《植物性食品中花青素的测定 高校液相色谱法》（NY/T

2640-2014) 标准是通过高效液相色谱仪测定植物源性食品中的飞燕草素、矢车菊色素、矮牵牛素、天竺葵色素、芍药素和锦葵素这 6 种花青素,测定结果为 6 种花青素之和。

《保健食品中前花青素的测定 (GB/T 22244-2008)》适用于以葡萄籽、葡萄皮、沙棘、玫瑰果、蓝浆果、法国松树皮提取物等为主要原料制造的保健食品中前花青素的测定。

《黑果枸杞中花青素含量的测定 高效液相色谱法》(DB64/T 1578-2018) 为宁夏回族自治区制定的地方标准,《黑果枸杞原花青素含量的测定 液相色谱法》(DB65/T 4039-2017) 为新疆维吾尔自治区制定的地方标准。

通过查阅文献、检测验证,数据显示黑果枸杞的花青素主要是矮牵牛素、锦葵素、飞燕草素,且 3 种花青素含量之和占黑果枸杞的花青素 85%以上,现有花青素检测的相关标准不能真实反应黑果枸杞中特征花色苷含量,因此,特制订《食品安全地方标准 黑果枸杞中花青素检测方法》标准。

通过制订《食品安全地方标准 黑果枸杞中花青素检测方法》标准,可为我省确定黑果枸杞花青素指标、统一检测方法,促进黑果枸杞产业发展,服务监管和企业生产销售提供依据。

四、标准的制订原则

标准的制订符合了以下主要原则: 1、符合国家有关法律、法规和标准; 2、体现了黑果枸杞的特点,符合青海省黑果枸杞产业发展和现况实际,可操作性、指导性强; 3、有利于促进我省黑果枸杞品质提质增效,

规范企业生产和经营，为监管提供依据，保障食品安全。

五、确定各项技术内容

2010 年以来，参加单位对黑果枸杞开展了一系列研究工作，相继主持完成了《柴达木黑果枸杞质量标准及新型加工技术研究》课题及《黑果枸杞花青素类型及结构分析》等项目研究，发表相关科研论文 20 余篇，申请国家发明专利 1 件，实用新型专利 3 件，完成黑果枸杞检验 500 余份，积累了较详实全面的一手数据和资料，为标准的制定奠定了基础。

（一）花青素特征检测指标的确定

范围制定遵循青海省黑果枸杞的花青素特性原则，通过检测数据显示青海黑果枸杞的花青素主要是矮牵牛素、锦葵素、飞燕草素，且 3 种花青素含量之和占黑果枸杞的花青素 85%以上。因此确定本文件规定黑果枸杞中花青素为矮牵牛素、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 3 种花青素的含量测定。

（二）分析方法确定

1.仪器与耗材

1.1 试剂

无水乙醇（ C_2H_5OH ）、甲酸（ CH_2O_2 ）、甲醇（ CH_3OH ）、乙腈（ C_2H_3N ）均为色谱纯；盐酸（ HCl ）：优级纯。除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T6682 中规定的一级水。

1.2 仪器

高效液相色谱仪：带紫外或二极管阵列检测器。

天平：精度 0.01mg，0.01g。

水浴锅：精度 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

匀浆机。

超声清洗机。

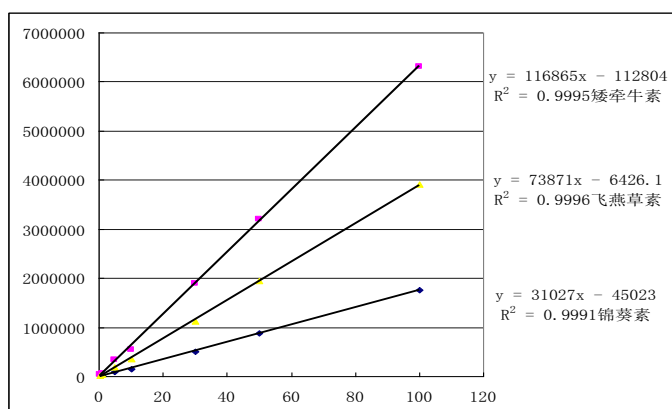
2.花青素标准溶液的配制与标准曲线的绘制

分别精密称取矮牵牛素、锦葵素和飞燕草素标准物质各 5.0 mg，分别用 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， -20°C 冷冻保存。在密闭棕色玻璃瓶中保存，有效期为 6 个月。

将单一标准储备液进行混合后，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均为 0.5 mg/L,1.0 mg/L, 5.0 mg/L, 10.0 mg/L, 25.0 mg/L, 50. 0mg/L, 100.0 mg/L 标准系列，该标准系列现用现配，于 4°C 条件下保存。

将混合标准系列工作溶液分别注入液相色谱仪，绘制标准曲线，如下图 1，标准物质色谱图见图 2，实测样品谱图见图 3。

图 1 混合标准溶液曲线图



由图 1 可知，在 0-100mg/L 范围内，矮牵牛素、锦葵素和飞燕草素

均呈线性、相关性良好。

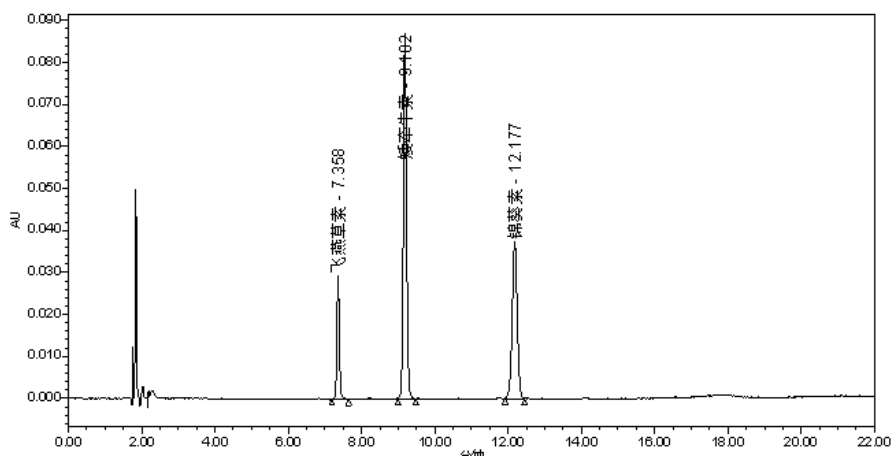


图2 混合标准物质谱图

该混合标准物质谱图基线平稳,飞燕草素、矮牵牛素和锦葵素均保留时间稳定,峰形左右对称,无前伸及拖尾情况,保留时间较短。

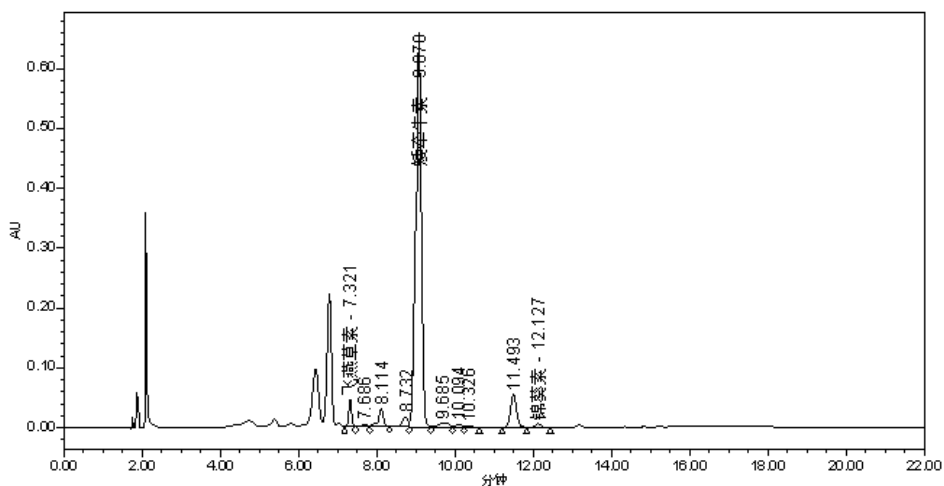


图3 样品实测图

由图3可知,该谱图基线平稳,样品中飞燕草素、矮牵牛素和锦葵素保留时间分别为7.321 min、9.070 min、12.127min,与对照品基本一致,目标峰能与杂峰完全分开,分离效果较好。

3.确定花青素最佳提取条件试验

对花青素提取条件中的乙醇体积分数、盐酸体积分数、超声时间、水浴温度采用 $L_9(3^4)$ 正交试验进行优化,进行了4因素3水平设计正交试

验，正交试验方案和结果见表 4，以锦葵素、矮牵牛素、飞燕草素之和为评价指标，对试验结果进行分析，确定最优提取条件。

表 1 正交试验因素水平表

水平	盐酸(%V/V)	乙醇(%V/V)	超声时间(min)	水解温度℃
1	20	40	15	60
2	25	50	30	80
3	30	60	45	沸水浴

表 2 正交实验因素、水平组合及结果分析表

试验号	因素				含量（mg/kg）		
	A	B	C	D	飞燕草素	矮牵牛素	锦葵素
	盐酸	乙醇	超声时间	水解温度			
1	1	1	1	1	0	531.2	51.8
2	1	2	2	2	0	302.5	220.7
3	1	3	3	3	0	397.8	235.3
4	2	1	2	3	87.7	980.2	66.3
5	2	2	3	1	0	450.1	83.6
6	2	3	1	2	23.4	554.4	214.5
7	3	1	3	2	33.2	606.7	132.1
8	3	2	1	3	99.9	1503.8	50.6
9	3	3	2	1	0	430.8	106.9
K1	1739.3	2489.2	3029.6	1654.4			
K2	2460.2	2711.2	2195.1	2087.5			
K3	2964	1963.1	1938.8	3421.6			
k1	579.8	829.7	1009.9	551.5			
k2	820.1	903.7	731.7	695.8			
k3	988.0	654.4	646.3	1140.5			
R	408.2	249.4	363.6	589.1			
优水平	A3	B2	C1	D3			
主次顺序	D>A>C>B						

由极差 R 确定各因素影响主次顺序为水解温度>盐酸体积分数>超声时间>乙醇体积分数；最佳提取条件为盐酸 30%、乙醇 50%、超声时间 15min、沸水浴。

4. 称样量考察

分别称取 3.00、3.50、4.00、4.50、5.00g(精确到 0.01g)粉碎的黑果枸杞样品按优化所得的前处理方法处理，供高效液相色谱仪测定，测得结果如表 3。

表 3 不同称样量测得花青素含量

称样量/g	3.00	3.50	4.00	4.50	5.00
飞燕草素 (g/100g)	0.0445	0.0421	0.0483	0.0441	0.0477
矮牵牛素 (g/100g)	0.7320	0.7157	0.7290	0.7502	0.7543
锦葵素 (g/100g)	0.0891	0.0902	0.0880	0.0911	0.0853
3 种 花 青 素 之 和 (g/100g)	0.8656	0.8480	0.8653	0.8854	0.8873

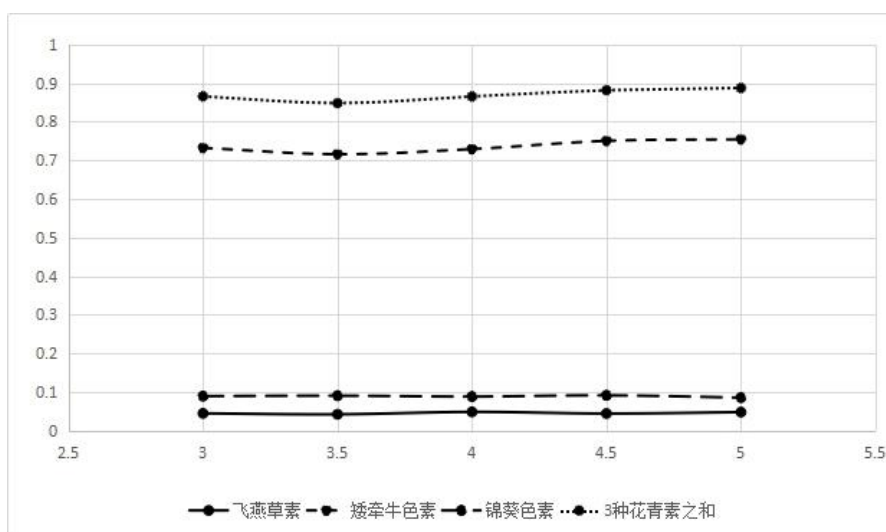


图 4 不同称样量时测定花青素含量的趋势图

由图 4 可知称样量在 3.00-5.00g 范围内时，测得实验结果数据无明显变化，所以为使样品更具有代表性，确定称样量为 5.00g。

5. 稳定性试验

按样品处理方法处理一份样品,分别在0h、2h、4h、6h、8h、10h、12h、16h、20h、24h、30h、36h、42h、48h时上机测定，计算测得结果RSD值，检测样品溶液的稳定性，结果见表4。

表 4 样品稳定性实验结果

时间/h	锦葵素 (g/100g)	矮牵牛素 (g/100g)	飞燕草素 (g/100g)
0 h	0.0853	0.726	0.0457
2 h	0.0922	0.764	0.0445
4 h	0.0915	0.764	0.0458
6 h	0.0905	0.770	0.0450
8 h	0.0891	0.768	0.0465
10 h	0.0921	0.754	0.0458
12 h	0.0919	0.748	0.0456
16 h	0.0904	0.741	0.0456
20 h	0.0852	0.742	0.0453
24 h	0.0892	0.730	0.0445
30 h	0.0870	0.737	0.0465
36 h	0.0871	0.721	0.0451
42 h	0.0896	0.710	0.0450
48 h	0.0872	0.716	0.0453
平均值	0.0891	0.742	0.0454
花青素含量相对标准偏差 RSD/%	4.25	2.82	1.36

上述结果表明样品提取液在48 h内溶液的稳定性良好。

6.重现性试验

按样品处理方法处理七份样品，上机测定，计算锦葵素、矮牵牛素、飞燕草素之和测得结果RSD值，检测方法的重现性，结果见表5。

表5 重现性试验结果 (n = 7)

序号	1	2	3	4	5	6	7	平均值	花青素含量 相对标准偏差 RSD/%
飞燕草素 g/100g	0.0448	0.0464	0.0446	0.0464	0.0461	0.0445	0.0444	0.0453	2.06
矮牵牛素 g/100g	0.726	0.726	0.727	0.728	0.727	0.727	0.726	0.726	0.104
锦葵素 g/100g	0.0853	0.0837	0.0840	0.0877	0.0908	0.0915	0.0824	0.0865	4.08
3种花青之和 g/100g	0.856	0.856	0.857	0.862	0.864	0.863	0.852	0.856	0.528

结果表明检测方法的重现性良好。锦葵素、矮牵牛素、飞燕草素之和测得相对标准偏差RSD为0.528%，参照国家食品药品监督管理局通告《食品补充检验方法研制指南》食品补充检验方法编制技术要求对实验室内重现性实验的相对标准偏差要求，重现性试验结论满足要求。

7.方法检出限和定量限测定试验

依据 GB/T27404-2008 检测方法确认的技术要求，测定低限根据一定量空白响应的标准偏差 (σ) 和被测物标准曲线的斜率 (S) 来计算定量限 ($QL = 10\sigma/S$) 和检出限 ($DL = 3\sigma/S$)。按“1.花青素标准溶液的配制与标准曲线的绘制”项下操作步骤绘制标准曲线以确定斜率 S，另移取 11 份 1.0 mL 空白试验样液，按样品检测过程进行检测，求出这 11 份空白样品响应值的标准偏差 σ 。根据计算公式求出检测限 ($DL = 3\sigma/S$) 和定量限 ($QL = 10\sigma/S$)，如下表：

表 6 测定方法的检出限与定量限

名称	锦葵素 mg/kg	飞燕草素 mg/kg	矮牵牛素 mg/kg
检出限 (MQL)	0.44	0.42	1.25
定量限 (MDL)	1.33	1.26	3.78

检测结果锦葵素和飞燕草素检出限及定量限均为 0.5mg/kg 和 1.5mg/kg，矮牵牛素检出限和定量限分别为 1.5mg/kg 和 4.0mg/kg。

8.回收率实验

选取同时含有花青素的三个样品，其中含量的测定值为 X_0 ，加入标准物质后的试样中各组分的测定值为 X_1 ，各物质回收率 P 按式(3)计算：

$$P = \frac{X_1 - X_0}{m} \times 100 \quad \text{----- (式 3)}$$

加标回收率结果见表 7:

表 7 3 种花青素回收率结果

花青素种类	加标水平 (μg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)
飞燕草素	2	89.5	91.2
	10	92.4	
	50	91.8	
锦葵素	2	85.6	88.7
	10	89.4	
	50	91.1	
矮牵牛素	2	90.9	91.3
	10	90.4	
	50	92.6	

三个不同添加水平试验，回收率在 88.7%~91.3%之间，参照国家食品药品监督管理局通告《食品补充检验方法研制指南》食品补充检验方

法编制技术要求对不同添加水平回收率实验的要求，回收率实验结果表明检测方法具有良好的准确性。

9.不同实验室间方法的再现性

为了取得准确可靠的试验数据，在国内选取了五家具有测试资格的、相同行业的实验室开展方法的验证工作，参与该方法的验证单位见下表：

序号	单位名称	统计表简写
1	青海谱测有限公司	谱测
2	西宁海关技术中心	西宁海关
3	甘肃中商食品质量检验检测有限公司	中商检
4	中国科学院西北高原生物所湖州高院生物资源产业化创新中心	湖州
5	青海省食品检验检测院	食检院

9.1 验证样品

分别在市场随机购买特优级、优级、合格品三种不同规格的黑果枸杞共 9 个样品给五家验证单位，给出了作业指导书，黑果枸杞样品中 3 种花青素之和和精密度验证结果结果见表 8。

表 8 5 家检测机构测得 3 种花青素之和（g/100g）

样品编号	D1	D2	D3	Z1	Z2	Z3	X1	X2	X3
谱 测	0.870	0.626	0.960	0.978	0.820	0.931	1.22	0.942	0.961
西宁海关	0.830	0.827	1.23	1.21	1.24	1.06	1.25	0.951	1.14
中商检	1.20	0.770	1.26	1.13	1.18	1.18	1.42	1.24	0.928
湖 州	0.935	0.654	0.951	0.843	0.932	0.922	0.971	0.832	0.764
食检院	0.904	0.630	1.13	1.14	1.04	0.941	1.18	0.943	0.912
平均值	0.907	0.701	1.10	1.06	1.04	0.998	1.19	0.910	0.941
相对标准偏差 RSD/%	15.43	13.05	13.20	13.98	16.59	9.71	13.38	14.86	14.29

参照国家食品药品监督管理局通告《食品补充检验方法研制指南》
食品补充检验方法编制技术要求关于实验室间再现性试验的相对标准偏

差要求，国内五家检测机构测得三种花青素含量之和满足相对标准偏差范围。

经验证：该检测方法在方法专属性、稳定性、重现性、回收率、定量限和检出限、精密度方面完全达到制定标准的要求，其方法简便、快捷，应在省内广泛使用。

六、重大意见分歧的处理依据和结果

项目组向6个检测机构及社会相关领域的权威人士进行了意见征询，收到反馈意见6份，征集到意见12条意见，见下表：

序号	章节编号	意见	提出单位/个人	处理结果
1	5 试剂与材料	对于其他试剂规定较为繁琐，可表述为除非另有规定，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和GB/T6682 中规定的一级水	胡凤祖 钱滢文	采纳
2	5.2试剂配制	配制过程中增加10%HCl甲醇溶液描述	胡凤祖	采纳
3	文本部分内容书写不全	标准物质称量中缺少一种标准物质，计算公式中增加稀释倍数，确认结果单位。	魏玉海 钱滢文	采纳
4	7.2 提取	提取过程中增加“精密称重”	魏玉海	不采纳
5	5.3 水解	提取液增加“补足减失重量”，样品制备好后，删除“可在4℃条件下保存不超过三天”的描述。	魏玉海	不采纳
6	标准名称《黑果枸杞中花青素含量的测定》	标准名称《黑果枸杞中花青素含量的测定》加入具体测定的项目。	魏玉海	不采纳
7	第二法	建议删除第二法（分光光度法）。	魏玉海	采纳

8	范围	范围中缺少标准适用范围。	钱滢文	采纳
9	5.3 标准品	建议增加一句“或购买经国家认证认可并授予标准物质证书的标准溶液物质”。	钱滢文	采纳
10	7.5.1 色谱参考条件	色谱柱增加“或性能相当”。	钱滢文	采纳
11	7.2 提取 7.3 水解	提取液后增加试剂的相应编号“（3.2）”。	钱滢文	采纳
12	液相色谱法	该方法对仪器条件，对照品要求高，价格昂贵，不经济。	中国科学院西北高原生物所分析测试中心	不采纳

采纳与否理由如下：

意见 1：对于其他试剂规定较为繁琐，可表述为除非另有规定，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T6682 中规定的一级水，本着科学态度，同意采纳。

意见 2：配制过程中增加 10%盐酸甲醇溶液描述。甲醇溶液配制的基体对结果的准确度影响较大，明确后便于操作，同意采纳。

意见 3：由于笔误原因，缺少了相应内容，同意采纳。

意见 4：提取过程中，精密加入提取液（5.2）称重。本实验在计量合格的具塞比色管中进行，仅定容至刻度即可，无需再写精密加入和称重，不同意采纳。

意见 5：“用提取液补足减失重量”，本实验前处理过程以体积计算，不以重量计算，不同意采纳。“样品制备好后，可在 4℃条件下保存不超过三天”建议删除意见，本实验做了稳定性研究，样品制备好后，可在 4℃条件下保存不超过 48 小时，其 48 小时之内 RSD%在 0.0615-1.85 之间，故不同意采纳。

意见 6：“标准名称《黑果枸杞中花青素含量的测定》加入具体测定的项目。”具体检验项目在标准适用范围中已明确，不同意采纳。

意见 7：建议删除第二法。紫外分光光度法测定结果是在某一波长下呈色物质的总和，而不是我们所要测定的黑果枸杞中主要花青素矮牵牛素、锦葵素、飞燕草素的含量，同意采纳。

意见 8：标准中缺少标准适用范围。依据 GB/T1.1-2020，标准适用范围是必备内容，同意采纳。

意见 9：5.3 标准品中建议增加一句或购买经国家认证认可并授予标准物质证书的标准溶液物质。根据试验，持有标准物质证书的标准物质均可当做标准物质使用，标准溶液物质，也可作为标准系列，同意采纳。

意见 10：色谱条件中色谱柱建议增加“或性能相当”；依据标准普遍性原则和适用性原则，同意采纳。

意见 11：提取液后增加试剂的相应编号“（3.2）”，为使本标准书写规范，便于操作，同意采纳。

意见 12：该方法对仪器条件，对照品要求高，价格昂贵，不经济。该标准方法主要用于检验机构统一检验方法，而不是作为企业出厂检验必备检验，不同意采纳。

七、 标准实施建议

1、本标准通过样品检测、资料查阅和不同检验机构方法验证，体现了青海黑果枸杞花青素的组成主要为锦葵素、飞燕草素、矮牵牛素 3 种，3 种色素含量之和占黑果枸杞花青素的 85%以上，因此，在地方标准《青海省食品安全地方标准 黑果枸杞》中，将理化指标花青素含量确定为锦

葵素、飞燕草素、矮牵牛素 3 种之和。

2、在黑果枸杞地方标准发布前，我省黑果枸杞生产加工企业相继制定了产品企业标准近百份，企标中对黑果枸杞特征指标要求不一，有原花青素、前花青素、总花青素等，检测方法也有液相色谱法、紫外分光光度法等。因此，建议把本方法作为青海省统一黑果枸杞花青素（锦葵素、飞燕草素、矮牵牛素）检测方法标准推行。

八、其他需要说明的事项

无。