

中华人民共和国国家标准

农业农村部 XXXX 号公告-X-XXXX

转基因植物及其产品食用安全检测 苜蓿皂苷含量的测定 分光光度法

Food safety detection of genetically modified organisms and derived products—
Determination of saponin in alfalfa by spectrophotometric method

(征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中华人民共和国农业农村部 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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国农业转基因生物安全管理标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、农业农村部科技发展中心、中国疾病预防控制中心营养与健康所、浙江大学。

本文件主要起草人：张宏福、张连华、陈亮、孟庆石、朱淑馨、宋贵文、焦悦、卓勤、王迪铭。

转基因植物及其产品食用安全检测

苜蓿皂苷含量的测定 分光光度法

1 范围

本文件规定了苜蓿中总皂苷含量的分光光度测定方法。

本文件适用于苜蓿中总皂苷含量的测定。

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

苜蓿皂苷为齐墩果烷型三萜皂苷，苷元与齐墩果酸同属齐墩果烷骨架。试样用70%乙醇溶液提取后，加入香草醛-冰醋酸溶液和高氯酸反应显色，在545 nm波长下测定吸光度，以齐墩果酸标准曲线比较定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，所用试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

5.1 甲醇（ CH_3OH ，CAS 号：67-56-1）。

5.2 乙醇（ $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ，CAS 号：64-17-5）。

5.3 冰醋酸（乙酸）（ $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ ，CAS 号：64-19-7）。

5.4 香草醛（ $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ，CAS 号：121-33-5）。

5.5 高氯酸（ HClO_4 ，CAS 号：7601-90-3）。

5.6 70%乙醇溶液：移取 70 mL 乙醇，加入到 100 mL 容量瓶中，加水定容，摇匀。

5.7 30%甲醇溶液：移取 30 mL 甲醇，加入到 100 mL 容量瓶中，加水定容，摇匀。

5.8 5%香草醛-冰醋酸溶液：准确称取 5 g 香草醛（精确至 0.1 g），加入到 100 mL 容量瓶中，用冰醋酸定容，摇匀。临用现配。

5.9 齐墩果酸标准储备溶液（1 mg/mL）：称取 10 mg 齐墩果酸标准品（CAS: 508-02-1，纯度≥98%）（精确至 0.1 mg）于 10 mL 容量瓶中，用甲醇溶解、定容，摇匀。临用现配。

5.10 齐墩果酸标准工作溶液：称取适量齐墩果酸标准储备溶液，用甲醇稀释定容，混匀，配制成浓度为 5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 标准系列溶液。临用现配。

6 仪器和设备

6.1 分光光度计：波长准确度±1 nm，可在 545 nm 处比色。

6.2 电子天平：精度为 0.1 g 和 0.1 mg。

6.3 超声波清洗仪：240 W。

6.4 离心机：相对离心力不小于 10000 g。

6.5 恒温水浴锅：控温精度 ±0.1℃。

6.6 涡旋混合器。

6.7 食品粉碎机。

6.8 氮吹仪。

7 试验步骤

7.1 标准曲线绘制

取 6 支具塞试管，对照管中加入 1 mL 甲醇，其余各管依次加入齐墩果酸标准工作溶液 1 mL。氮气吹干，加入 5%香草醛-冰醋酸溶液 200 μL，高氯酸 800 μL。70℃水浴 15 min，冰浴冷却后加入冰醋酸 5 mL，静置显色 20 min。以对照管中溶液做空白对照，用分光光度计在 545 nm 处测定各管中溶液的吸光度，以齐墩果酸浓度为横坐标，吸光度为纵坐标，绘制标准曲线，R² 达到 0.99 以上。

7.2 试样的制备及提取

7.2.1 取苜蓿干样（地上部分）150~200 g（精确至 0.1 g），粉碎过 50 目筛，混匀后装入洁净容器，放阴凉干燥处备用。

7.2.2 称取试样 1 g（精确至 0.01 g），加入 40 mL 70%乙醇溶液，涡旋振荡 3 min，超声提取 30 min，4℃过夜后再次超声提取 30 min，10000 g 离心 30 min。取 100 μL 上清液，氮气吹干，用水重悬后注入反相 C18 固相萃取微柱，分别用 5 mL 水和 5 mL 30% 甲醇淋洗后，再用 100% 甲醇洗脱 4 次，每次 1 mL/min。合并洗脱液置于 10 mL 具塞试管，氮气吹干，加入 5% 香草醛-冰醋酸溶液 200 μL，高氯酸 800 μL。70℃水浴 15 min，冰浴冷却后加入冰醋酸 5 mL，静置显色 20 min。

7.3 测定

以空白平行样作对照，用分光光度计在 545 nm 处测定上述待测试样的吸光度，并通过标准曲线计算出总皂苷含量。待测样液中目标组分的响应值应在标准曲线的线性范围之内，超过线性范围时应根据测定浓度进行适当倍数稀释后再进行测试。

8 试验数据处理

试样中总皂苷含量（以齐墩果酸计）按公式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ω ——试样中总皂苷含量，单位为毫克每克（mg/g）；

ρ ——标准曲线得到的试样溶液中待测组分的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样待测体积，单位为毫升（mL）；

f ——试样稀释倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1 000 ——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留 2 位有效数字。

9 精密度

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的绝对差值不应超过算术平均值的15%。

10 其他

总皂苷含量的检出限为0.3 mg/g，定量限为1.0 mg/g。