



中华人民共和国国家标准

GB/T 45538—2025



植物提取物抗氧化活性测定 薄层色谱法

Determination of plant extracts antioxidant activity—Thin layer
chromatography method

2025-04-25 发布

2025-11-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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：江南大学、深圳市标准技术研究院、中国标准化研究院、深圳市分析测试协会、山西农业大学、北京同仁堂健康药业股份有限公司、北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）、莱阳市检验检测中心、无限极（中国）有限公司、云南云科特色植物提取实验室有限公司、河北美业斯维生物技术有限公司、广东一方制药有限公司、南京中科药业有限公司、中国计量科学研究院、利和味道（青岛）食品产业股份有限公司、食药环检验研究院（山东）集团有限公司、英格尔检测认证（山东）有限公司。

本文件主要起草人：陈益胜、查圣华、詹松坤、张宏、王科、欧阳静、席兴军、卞瑞芳、师旭东、徐学明、王尉、陶红、陆智、王飞飞、刘锐、罗文汇、吕渭升、周亚杰、冯鹏、王珊珊、张永昌、刘名省、徐明玉、孙西丽、李艳红、徐宏、孟霞、王延伟、罗兵。



植物提取物抗氧化活性测定 薄层色谱法

1 范围

本文件描述了用薄层色谱法测定植物提取物抗氧化活性的方法。

本文件适用于洋甘菊、车前子、连翘、竹叶或槐米的提取物的抗氧化活性测定,其他植物提取物的抗氧化活性测定参照使用。

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

下列术语和定义适用于本文件。

3.1



抗氧化活性 antioxidant activity

植物提取物中抗氧化物质对自由基或氧化剂的清除能力。

注: 抗氧化活性常用 A_i (antioxidant index)表示。

4 原理

薄层色谱分离原理:由于色谱固定相对植物提取物中具有不同抗氧化活性的化合物(如酚类、黄酮类等)的吸附能力不同,在流动相流过固定相的过程中,会连续地产生吸附、解吸附、再吸附、再解吸附,从而实现不同抗氧化活性的化合物互相分离。

2,2-联苯基-1-苦基肼基(DPPH)浸渍显色原理:DPPH 外观呈深紫色,通过浸渍均匀涂布到薄层色谱固定相,固定相上存在的自由基清除剂与 DPPH 反应使其颜色显著变浅,形成深紫色背景下的浅黄色斑点。

通过薄层色谱分离将植物提取物中的具有不同抗氧化活性的化合物进行分离,结合 DPPH 浸渍显色反应(显色反应的结果通过薄层色谱扫描仪进行定量检测)。检测结果以芦丁的峰面积作为对照峰面积,植物提取物的总峰面积作为样品峰面积,通过样品峰和对照峰面积比值(A_i)表示植物提取物的综合抗氧化活性。

5 试剂与材料

除非另有说明,在分析中所使用试剂均为分析纯。

5.1 试剂

- 5.1.1 甲醇(CH_3OH , CAS 号 67-56-1)。
- 5.1.2 乙酸乙酯($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$, CAS 号 141-78-6)。
- 5.1.3 甲酸(CH_2O_2 , CAS 号 64-18-6)。
- 5.1.4 乙酸($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$, CAS 号 64-19-7)。
- 5.1.5 水至少达到 GB/T 6682 中规定的一级水要求。
- 5.1.6 2,2-联苯基-1-苦基肼基($\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_6$, CAS 号 1898-66-4), 纯度不低于 97%。
- 5.1.7 植物提取物, 市售。
- 5.1.8 芦丁($\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$, CAS 号 153-18-4), 纯度 $\geq 98\%$, 或标准物质/标准样品。

5.2 溶液制备

- 5.2.1 DPPH 衍生液: 称取 25.0 mg DPPH, 加入 75 mL 甲醇溶解, 混匀。现用现配。
- 5.2.2 流动相: 乙酸乙酯-乙酸-甲酸-水(10:1:1:2): 量取 100 mL 乙酸乙酯、10 mL 乙酸、10 mL 甲酸和 20 mL 水于烧杯中涡旋混匀。现用现配。
- 5.2.3 芦丁标准储备溶液(1 000 mg/L): 准确称取 10 mg (精确到 0.1 mg) 芦丁标准品于 10 mL 烧杯中, 用适量甲醇溶解并转移至 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 混匀。在 4 °C 冰箱中恒温避光保藏, 有效期为 7 d。
- 5.2.4 芦丁标准工作溶液(100 mg/L): 将 1 mL 芦丁标准储备溶液(5.2.3)转移至 10 mL 棕色容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 混匀。现用现配。

5.3 材料

- 5.3.1 高压氮气, 纯度 99.9%。
- 5.3.2 薄层色谱板, G60 F₂₅₄ 硅胶板, 硅胶层厚 0.2 mm, 规格 10 cm×10 cm。
- 5.3.3 纤维素滤膜, 孔径 0.45 μm 。
- 5.3.4 离心管, 规格分别为 15 mL、20 mL 和 25 mL。
- 5.3.5 一次性注射器, 带针头 5 mL。

6 仪器和设备

- 6.1 薄层色谱半自动点样仪。
- 6.2 薄层色谱全自动展开仪。
- 6.3 薄层色谱浸渍器。
- 6.4 薄层色谱扫描仪。
- 6.5 紫外可见分光光度计: 波长范围 200 nm~380 nm。
- 6.6 分析天平: 感量 0.1 mg。
- 6.7 涡旋混合器: 转速 2 800 r/min。
- 6.8 超声清洗仪: 超声频率 40 kHz~80 kHz。
- 6.9 离心机: 转速不低于 4 000 r/min。

7 分析步骤

7.1 样品处理

准确称取植物提取物 50 mg(精确至 0.1 mg)于 20 mL 具塞离心管中, 加入 10 mL 甲醇, 在涡旋混

合器上振荡 1 min,然后置于超声清洗仪中在 30 ℃水浴条件下超声 30 min。将提取液以 4 000 r/min 离心 10 min,用一次性注射器吸取 2 mL 上清液,过 0.45 μm 纤维素滤膜。过滤后,用紫外可见分光光度计测定样品滤液在 360 nm 处的吸光度。根据测定结果,用甲醇对样品滤液进行适当稀释,使其吸光度在 0.7~1.0 之间。稀释后的样品滤液直接用于后续测定。

7.2 薄层色谱分析步骤

7.2.1 点样

以 0.5 kPa 压力的高压氮气作为载气,用薄层色谱半自动点样仪将 3 μL 芦丁标准工作溶液(5.2.4)和 3 μL 样品滤液以斑点形式吹扫到薄层色谱板上。芦丁标准工作溶液和样品滤液各点 3 个平行通道。

7.2.2 展开

首先将点样完毕的薄层色谱板放入薄层色谱全自动展开仪中,然后将配制好的流动相(5.2.2)注入展开缸中,最后设置展开参数等待仪器自动展开完成色谱分离。展开参考参数:预烘干 30 s,气氛饱和 5 min,预平衡 15 min,展开高度 75 mm,色谱展开后干燥 3 min。

7.2.3 浸渍衍生

用薄层色谱浸渍器将干燥后的薄层色谱板浸入 DPPH 衍生液(5.2.1),浸渍速度 2 mm/s,停留时间 1 s。取出薄层色谱板,避光静置 15 min 待显色反应结束。

注:附录 A 给出了薄层色谱-DPPH 显色阳性试验结果示例。

7.2.4 光密度扫描定量

用薄层色谱扫描仪对已经显色的薄层色谱板进行扫描检测。检测参数:荧光模式,D2&W 灯,检测波长 530 nm,无滤光片。

8 结果计算

芦丁 3 个平行通道斑点峰面积的平均值 $\overline{P}_s$,按公式(1)计算:

$$\overline{P}_s = \frac{P_{s1} + P_{s2} + P_{s3}}{3} \dots\dots\dots (1)$$

式中:
 $\overline{P}_s$ —— 芦丁斑点峰面积的平均值;
 P_{s1} —— 芦丁 1 通道斑点峰面积;
 P_{s2} —— 芦丁 2 通道斑点峰面积;
 P_{s3} —— 芦丁 3 通道斑点峰面积。

植物提取物 1 个通道所有斑点总峰面积 P ,按照公式(2)计算:

$$P = \sum_{i=1}^n P_i \dots\dots\dots (2)$$

式中:
 P —— 植物提取物通道斑点总峰面积;
 i —— 斑点编号;
 n —— 斑点数量;

P_i ——第 i 个斑点峰面积。

植物提取物 3 个平行通道样品斑点总峰面积的平均值 $\overline{P}$, 按照公式(3)计算:

$$\overline{P} = \frac{P_1 + P_2 + P_3}{3} \dots\dots\dots (3)$$

式中:

$\overline{P}$ ——植物提取物样品斑点总峰面积的平均值;

P_1 ——植物提取物 1 通道斑点总峰面积;

P_2 ——植物提取物 2 通道斑点总峰面积;

P_3 ——植物提取物 3 通道斑点总峰面积。

植物提取物的抗氧化活性指数 A_i , 按照公式(4)计算:

$$A_i = \frac{\overline{P}}{P_s} \times f \dots\dots\dots (4)$$

式中:

A_i ——植物提取物样品的抗氧化指数;

$\overline{P}$ ——植物提取物样品斑点总峰面积的平均值;

P_s ——芦丁斑点峰面积的平均值;

f ——植物提取物样品溶液稀释倍数。

注: 稀释倍数 f 为稀释后与稀释前的体积之比。

9 精密度

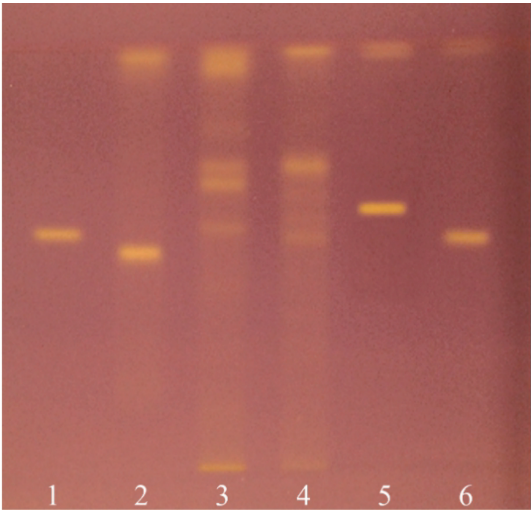
相同操作条件下在同一块薄层色谱板上 5 次平行测定芦丁所得结果, 相对标准偏差不大于 10%。



附 录 A
(资料性)

薄层色谱-DPPH 显色阳性试验结果示例

图 A.1 给出了薄层色谱-DPPH 显色阳性试验结果示例。



标引序号说明：

- | | |
|------------|-----------|
| 1——芦丁； | 4——连翘提取物； |
| 2——洋甘菊提取物； | 5——竹叶提取物； |
| 3——车前子提取物； | 6——槐米提取物。 |

图 A.1 芦丁及 5 种植物提取物薄层色谱-DPPH 显色阳性试验结果示例