



# 中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

## 蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛含量的测定 高效液相色谱法

Determination of hydroxymethyl furfural in royal jelly and royal jelly lyophilized powder—High performance liquid chromatography method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 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。

本文件由全国蜂产品标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

## 引 言

本文件的发布机构提请注意,声明符合本文件时,可能涉及到蜂王浆及其干粉中羟甲基糠醛含量的检测方法(专利号:ZL 2022 1 0477234.X)的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺,他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下,就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得:

专利持有人姓名:尹志红

地址:浙江省杭州市桐庐县经济开发区桑园路18号杭州碧于天保健品有限公司

请注意除上述专利外,本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

# 蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛的测定 高效液相色谱法

## 1 范围

本文件规定了蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛含量的高效液相色谱测定方法。  
本文件适用于蜂王浆及蜂王浆冻干粉中羟甲基糠醛含量的测定

## 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

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**羟甲基糠醛** Hydroxymethyl furfural

六碳糖在酸性条件下失去三分子水生成的具有呋喃环结构的化合物，CAS号：67-47-0。

## 4 原理

样品经氨水溶解，用乙酸乙酯提取羟甲基糠醛，离心，取上清液蒸干，用6%甲醇超声溶解，过0.22 $\mu$ m滤膜，用液相色谱仪紫外检测器（ $\lambda=285\text{nm}$ ）检测，绘制空白基质标准曲线，外标法定量。

## 5 试剂和材料

除非另有规定，所有试剂均为分析纯，试验用水应符合GB/T 6682中一级水的规定要求。

5.1 氨水（ $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ）：含氨（ $\text{NH}_3$ ）25~28%。

5.2 乙酸乙酯（ $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ）。

5.3 磷酸（ $\text{H}_3\text{PO}_4$ ）：优级纯，含量85%。

5.4 甲醇（ $\text{CH}_3\text{OH}$ ），液相色谱纯。

5.5 羟甲基糠醛（ $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$ ），CAS号：67-47-0，标准品，纯度 $\geq 99\%$ 。

5.6 羟甲基糠醛贮备液（1 mg/mL）：称取羟甲基糠醛（5.5）25 mg，精确到 $\pm 0.1$  mg，于25 mL容量瓶中，用甲醇溶解并定容。 $-18^\circ\text{C}$ 下保存期为24个月。

- 5.7 羟甲基糠醛中间液（100 mg/L）：取 1.0 mL 羟甲基糠醛贮备液(5.6),用甲醇稀释定容至 10 mL。-18℃下保存期为 12 个月。
- 5.8 羟甲基糠醛工作液 I（20 mg/L）：取 2.0 mL 羟甲基糠醛中间液(5.7),用水稀释定容至 10 mL。现配现用。
- 5.9 羟甲基糠醛工作液 II（2 mg/L）：取 1.0 mL 羟甲基糠醛工作液 I (5.8),用水稀释定容至 10 mL。现配现用。
- 5.10 羟甲基糠醛工作液 III(0.2 mg/L)：取 1.0 mL 羟甲基糠醛工作液 II (5.9),用水稀释定容至 10 mL。现配现用。
- 5.11 0.4%磷酸溶液：取 4 mL 磷酸（5.3），用水稀释定容至 1000 mL。
- 5.12 1.5%氨水溶液：取 1.5 mL 氨水（5.1），用水稀释定容至 100 mL。
- 5.13 6%甲醇溶液：取 6 mL 甲醇，用水稀释定容至 100 mL。
- 5.14 绘制标准曲线用样品：取绘制标准曲线用样品、添加 20 μg/kg 羟甲基糠醛的绘制标准曲线用样品，按本文件规定的方法进行测定，添加 20 μg/kg 羟甲基糠醛的绘制标准曲线用样品的羟甲基糠醛峰面积（S）与绘制标准曲线用样品羟甲基糠醛保留时间处的峰面积（N）的比值（S/N）应大于 10。密封，-18℃以下保存期 24 个月。

## 6 主要仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。
- 6.2 分析天平：感量为 0.1 mg 和 0.01g。
- 6.3 超声波清洗器。
- 6.4 离心机：转速≥4500 rpm。
- 6.5 滤膜：0.22 μm，有机相型。
- 6.6 单通道可调移液器：量程为 100~1000 μL，0.5~5 mL，1~10 mL。
- 6.7 容量瓶，10 mL, 25 mL
- 6.8 塑料离心管，50 mL。
- 6.9 量筒：100 mL，1000 mL。
- 6.10 玻璃容器：50 mL 鸡心瓶或者 20 mL 试管。

## 7 试样制备与保存

### 7.1 试样的制备

冷冻样品在0~8℃下16小时内解冻，取适量解冻后的试样，室温下搅拌均匀。  
未冷冻的试样直接取适量，室温下搅拌均匀。

蜂王浆冻干粉稀释样制备。称取3.00 g样品（精确到±0.01 g）于50 mL烧杯中，加入6.00 g（精确到±0.01 g）水，用玻璃棒每隔5 min搅拌一次，直至样品呈均匀的浆状，无颗粒，得蜂王浆冻干粉稀释样。

## 7.2 试样保存

将制备好的试样于0~8℃环境下保存，一月内进行测定。长久保存试样应在-18℃环境下。

## 8 操作步骤

### 8.1 试样溶液的制备

称取2.00 g蜂王浆样品或者蜂王浆冻干粉稀释样，精确到±0.01 g，于50 mL塑料离心管中，加入6.0 mL 1.5%氨水溶液（5.12），振荡，充分溶解1 min，立即加入20 mL乙酸乙酯，充分手动振荡提取1 min，4500转/min离心10 min。吸取10 mL上清液于玻璃容器中，氮气吹干或旋转蒸发至干，加入1.0 mL6%甲醇溶液（5.13），超声溶解，过0.22 μm滤膜，得到测试样液。

### 8.2 标准曲线工作溶液的制备

称取6份绘制标准曲线用样品（5.14）各2.00 g，精确至±0.01 g，于50 mL塑料离心管中，各加入0.2mg/L羟甲基糠醛工作液III（5.10）0 μL、200 μL、500 μL，2 mg/L羟甲基糠醛工作液II（5.9）200 μL、500 μL，20 mg/L羟甲基糠醛工作液I（5.8）200 μL，加入6.0 mL 1.5%氨水溶液（5.12），振荡，充分溶解1 min，立即加入20 mL乙酸乙酯，充分手动振荡提取1 min，4500转/min离心10 min。吸取10 mL上清液于玻璃容器中，氮气吹干或旋转蒸发至干，加入1.0 mL6%甲醇溶液（5.13），超声溶解，过0.22 μm滤膜，得到标准曲线工作溶液。标准溶液系列浓度为0 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、200 μg/L、500 μg/L、2000 μg/L。

### 8.3 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 填料色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；或等效色谱柱。

流动相：流动相 A，甲醇+0.4%磷酸溶液（5.10）=6+94；流动相 B，甲醇。梯度洗脱条件见附录 A。

流速：见附录 A。

柱温：35℃。

检测波长：285 nm。

进样量：20 μL。

### 8.4 测定

#### 8.4.1 液相色谱测定

用标准曲线工作溶液（8.2）、试样溶液（8.1）分别进样，以各标准曲线工作溶液浓度为横坐标，以各浓度标准曲线工作溶液的羟甲基糠醛峰面积为纵坐标，绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对样品进行定量。标准曲线工作溶液及试样溶液中羟甲基糠醛的响应值均应在仪器检测的线性范围之内。在上述色谱条件下，羟甲基糠醛的参考保留时间为12.0min，参考色谱图见附录 B。

#### 8.4.2 平行测定

按 8.1 和 8.4.1 步骤，对同一样品进行平行试验测定。

#### 8.4.3 空白试验

除不称取样品外，按 8.1 和 8.4.1 步骤进行测定。羟甲基糠醛浓度为 20 μg/L 的标准曲线工作样液 (8.2) 的羟甲基糠醛峰面积 (S) 与空白试验样液的羟甲基糠醛保留时间处的峰面积 (N) 的比值 (S/N) 应大于 10。

### 9 结果计算与表示

#### 9.1 结果计算

试样中羟甲基糠醛含量 (X) 以微克每千克 (μg/kg) 表示，按式 (1) 计算：

$$X = \frac{C_S \times V \times n \times 1000}{m \times \frac{10}{20} \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$C_S$ —从羟甲基糠醛标准工作曲线上计算得到的浓度，单位为微克每升 (μg/L)；

$V$ —样液最终稀释体积，单位为毫升 (mL)；

$m$ —样品质量，单位为克 (g)。

$n$ —测试样液稀释倍数。蜂王浆样品  $n=1$ ，蜂王浆冻干粉样品  $n=3$ 。

注：计算结果应扣除空白值

#### 9.2 结果表示

将符合重复性要求的两个独立测定值的算术平均值作为测定结果 (μg/kg)，保留三位有效数字。

### 10 测定方法灵敏度、准确度、精密度

#### 10.1 灵敏度

本方法蜂王浆检测限为 20 μg/kg，定量限 50 μg/kg；蜂王浆冻干粉检测限为 60 μg/kg，定量限 150 μg/kg。

#### 10.2 准确度

本方法在 50 μg/kg, 200 μg/kg, 500 μg/kg 添加浓度水平上，蜂王浆中的羟甲基糠醛回收率在 82.0%~110.0%之间。在 500μg/kg, 1000 μg/kg, 2000 μg/kg 添加浓度水平上，蜂王浆冻干粉中的羟甲基糠醛回收率在 87.0%~103.7%之间。

#### 10.3 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得超过算术平均值的15%。

附 录 A  
(规范性)  
流动相梯度洗脱参考条件

A.1 流动相梯度洗脱参考条件

流动相梯度洗脱条件参见表A.1。

表A.1 流动相梯度洗脱条件

时间/min	流动相A/%	流动相B/%	流速/(mL/min)
0.0	100	0	1.0
12.0	100	0	1.0
12.01	0	100	1.5
15.0	0	100	1.5
15.01	100	0	1.0
23.0	100	0	1.0

## 附录 B

(资料性)

空白蜂王浆样品和羟甲基糠醛浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的蜂王浆样品测定色谱图

## B.1 空白蜂王浆样品测定色谱图

空白蜂王浆样品测定色谱图参见图B.1。

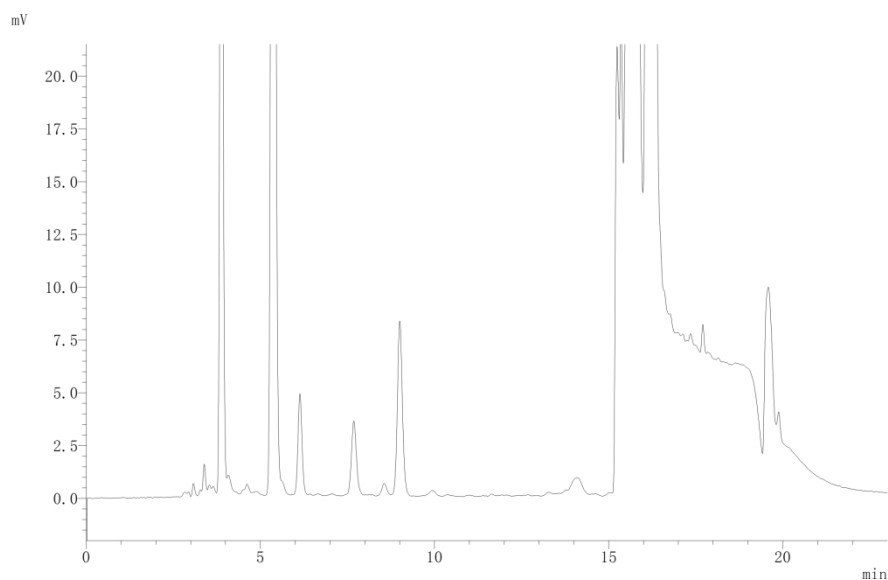
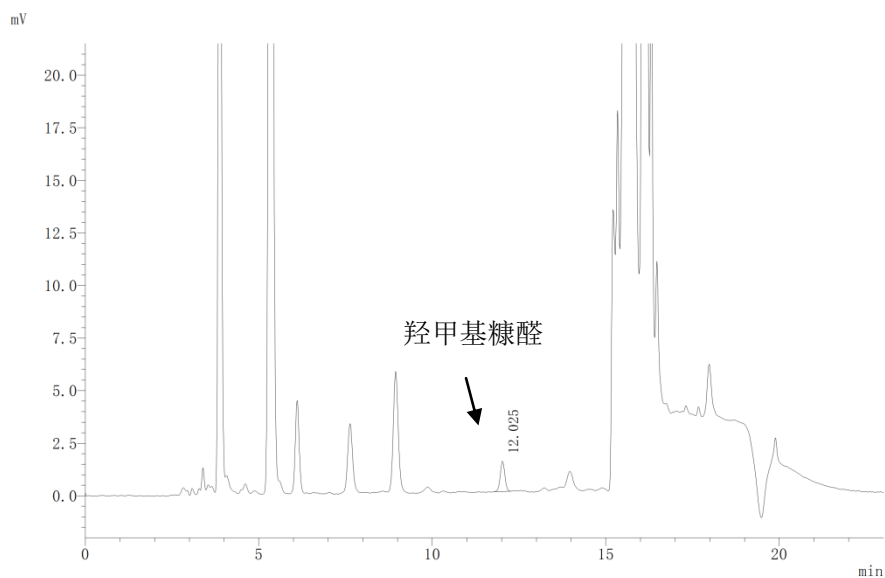


图 B.1 空白蜂王浆样品测定色谱图

B.2 羟甲基糠醛浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的蜂王浆样品测定色谱图羟甲基糠醛浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的蜂王浆样品测定色谱图参见图B.2。图 B.2 羟甲基糠醛浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  的蜂王浆样品测定色谱图