

团体标准

T/ NAIA×××-××××

枸杞中枸杞多糖含量的测定 高效液相色谱法

××××-××-××发布

××××-××-××实施

宁夏化学分析测试协会 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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区药品检验研究院、宁夏医科大学、宁夏沃福百瑞枸杞产业股份有限公司、宁夏医科大学药品质量检测中心负责起草

本文件主要起草人：马玲、马学琴、陈欢、杨玲玲、马宗卫、郭荣、梁建宁、苏晓娟、刘淑瑛、臧娅妮、王迎利、李艳婷、赵小军、赵茜、任如如、撒志明。

本文件为首次发布。

枸杞中枸杞多糖含量的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了枸杞中枸杞多糖含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于枸杞子及其制品中多糖类物质：甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖、岩藻糖含量的测定。

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

试样中的多糖类物质先用乙醚和80%的乙醇脱脂和脱色素，再用热水提取后用无水乙醇沉淀多糖，醇沉多糖再用水溶解后以4 moL/L三氟乙酸溶液水解为单糖，再加PMP衍生化，溶液用微孔滤膜过滤后，用高效液相色谱法测定，内标法定量。

5 试剂与材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 甲醇、乙腈：色谱纯，

5.2 标准品：D-甘露糖（SLBX3678V，Sigma，CAS号3458-28-4）；D-核糖（WXBB0660，99%，Sigma，CAS号50-69-1）；L-鼠李糖（BCBD1986V，≥99.0%，Sigma，CAS号10030-85-0）；D-葡萄糖醛酸（SLBH6139V，≥98.0%，Sigma，CAS号6556-12-3）；D-一水合半乳糖醛酸（BCBX5194，≥97.0%，Sigma，CAS号91510-62-2）；D-葡萄糖（LRAB8922，Sigma，CAS号50-99-7）；D-半乳糖（SLBM8792V，≥99.0%，Sigma，CAS号59-23-4）；D-木糖（SLBN4994V，≥99.0%，Sigma，CAS号58-86-6）；D-阿拉伯糖（BCBV0384，≥99.0%，Sigma，CAS号10323-20-3）；L-岩藻糖（SLBH8792V，≥99.0%，Sigma，CAS号2438-80-4）；2-脱氧-D-核糖（20200619，含量：98.0%，国药集团化学试剂有限公司，CAS号50-69-1）；D-阿洛糖（C10055777，98.0%，Macklin，CAS号2595-97-3）；2-氨基-2-脱氧-D-半乳糖盐酸盐（20150226，98.0%，国药集团化学试剂有限公司，CAS号

1772-03-8)；D-果糖（100231-201305，99.4%，中检院，CAS号57-48-7）；盐酸氨基葡萄糖（140649-201606，中检院；CAS号66-84-2）

5.3 内标使用溶液

精密称取2-脱氧-D-核糖适量，用水溶解并制成每mL含1.3 mg的溶液，作为内标使用溶液。

5.4 单标储备溶液

分别准确称取经真空干燥至恒重的甘露糖、岩藻糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、木糖、半乳糖醛酸、半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖适量，用水溶解并配置成质量浓度为10mg/mL的单标储备溶液，贮存于密闭容量瓶中避光于4℃下储存。

5.5 混合标准储备溶液

分别精密量取（5.4）项下的单标储备溶液适量，用水溶解并稀释制成每mL含甘露糖50 μg、岩藻糖30 μg、核糖20 μg，鼠李糖70 μg、葡萄糖醛酸70 μg、木糖140 μg、半乳糖醛酸440 μg、半乳糖400 μg、阿拉伯糖330 μg、葡萄糖500 μg的溶液，作为线性测定混合标准储备溶液。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪（配紫外检测器）。

6.2 分析天平

6.3 旋转蒸发器。

6.4 离心机。

6.5 超纯水机。

7 供试品溶液的制备

取-18℃冷冻冰箱中保存的枸杞子样品，粉碎，-18℃冷冻备用。准确称取枸杞细粉2g（精确至0.01mg）至锥形瓶中，加乙醚200 mL，加热回流2 h，静置，放冷，小心弃去乙醚液，残渣置水浴上挥尽乙醚，加入80%乙醇200 ml，加热回流2 h，趁热滤过，用80%热乙醇50 mL分次洗涤滤渣和滤器，滤渣连同滤纸置烧瓶中，加入水200 mL，加热回流3 h，趁热过滤，用少量热水洗涤滤器，合并滤液和洗液，置旋转蒸发器上浓缩至约5 mL，用水15 mL转移至离心瓶中，加无水乙醇80 mL充分混匀，4℃静置12 h，以4000 r/min离心10 min，弃去上清液，将残余物溶解在热水中并定量转移至10 mL容量瓶中，冷却至室温，用水稀释至刻度，并充分混合，转移至离心管中，以4000 r/min离心10 min。取上清液2.0 mL，置5 mL量瓶中，加入4 mol/L三氟乙酸溶液1.0 mL，100℃水解3 h，冷却至室温，加入4 mol/L氢氧化钠溶液1.0 mL，用水定容至刻度，摇匀。取溶液1.0 mL，置样品瓶中，加入内标使用溶液0.1 mL，加0.4 mol/L氢氧化钠溶液0.5 mL，加0.5 mol/L的PMP甲醇溶液1.0

mL，80 ℃加热60 min，冰水浴中放置10 min，加入0.4 moL/L盐酸溶液0.5 mL中和，混匀，转移至离心管中，加入甲苯4 mL，充分振摇后，4000 r/min离心10 min，取下层溶液，用0.45 μm的滤膜过滤，取续滤液即得。

8 高效液相色谱参考条件

色谱柱：Waters XTERRA C18 （3.5 μm，4.6 mm×250 mm）或性能相当者。
流动相：乙腈-pH6.5磷酸盐缓冲液（16:84）。
柱温：30 ℃。
检测波长：250 nm。
进样体积：20 μL。
流速：按表1进行洗脱。

表1 程序洗脱表

时间（min）	流速（mL/min）
0	1.0
13	1.0
18	0.7
80	0.7
85	1.0
130	1.0

9 标准曲线的制作

分别精密量取（5.5）项下的混合标准储备溶液0.05 mL、0.1 mL、0.3 mL、0.5 mL、0.6 mL、0.8 mL，置样品瓶中，分别加水使成1 mL，加入内标使用溶液0.1 mL，加0.4 moL/L氢氧化钠溶液0.5 mL，加0.5 moL/L的1-苯基-3-甲基-5-吡唑啉酮（PMP）甲醇溶液1.0 mL，80 ℃加热60 min后，冰水浴中放置10 min，加入0.4 moL/L盐酸溶液0.5 mL中和，混匀，转移至离心管中，加入甲苯4 mL，充分振摇后，4000 r/min离心10 min，取下层溶液，用0.45 μm的有机相滤膜过滤，即得系列线性测定混合标准使用溶液，取上述系列溶液按（8）项下的方法测定，记录峰面积，以对照品与内标物的峰面积比值X为横坐标，以对照品与内标物的质量比值Y为纵坐标，计算标准曲线或求线性回归方程。

10 测定

取平行两份的供试品溶液测定，待测液中各单糖的响应值应在标准曲线范围内。以相对保留时间确定待测定成分峰，以内标法计算待测成分含量。同时做空白试验。

11 结果计算

试样中甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖

、阿拉伯糖和岩藻糖的含量以质量分数 ω_i 计，数值以毫克每克（mg/g）计，按式（1）计算：

$$\omega_i = \frac{\rho \times n \times 25}{m} \quad (1)$$

式（1）中：

ρ —标准曲线计算出样液中甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖分别与内标2-脱氧-D-核糖的质量比；

n —内标的质量，单位为毫克（mg）；

m —试样的质量，单位为克（g）；

25—稀释倍数。

试样中枸杞多糖的含量是甘露糖、核糖、鼠李糖、葡萄糖醛酸、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、木糖、阿拉伯糖和岩藻糖的含量之和，以质量分数 ω 计，数值以毫克每克（mg/g）计，按式（2）计算：

$$\omega = \sum_{i=1}^{10} \omega_i \quad (2)$$

测定结果保留三位有效数字。

12 色谱图

多糖类混合标准品溶液及枸杞供试品色谱图参见附录A

13 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超过算术平均值的5%。

附录 A

(资料性)

多糖类标准混合溶液色谱图

图A.1 10种单糖混合标准使用溶液色谱图

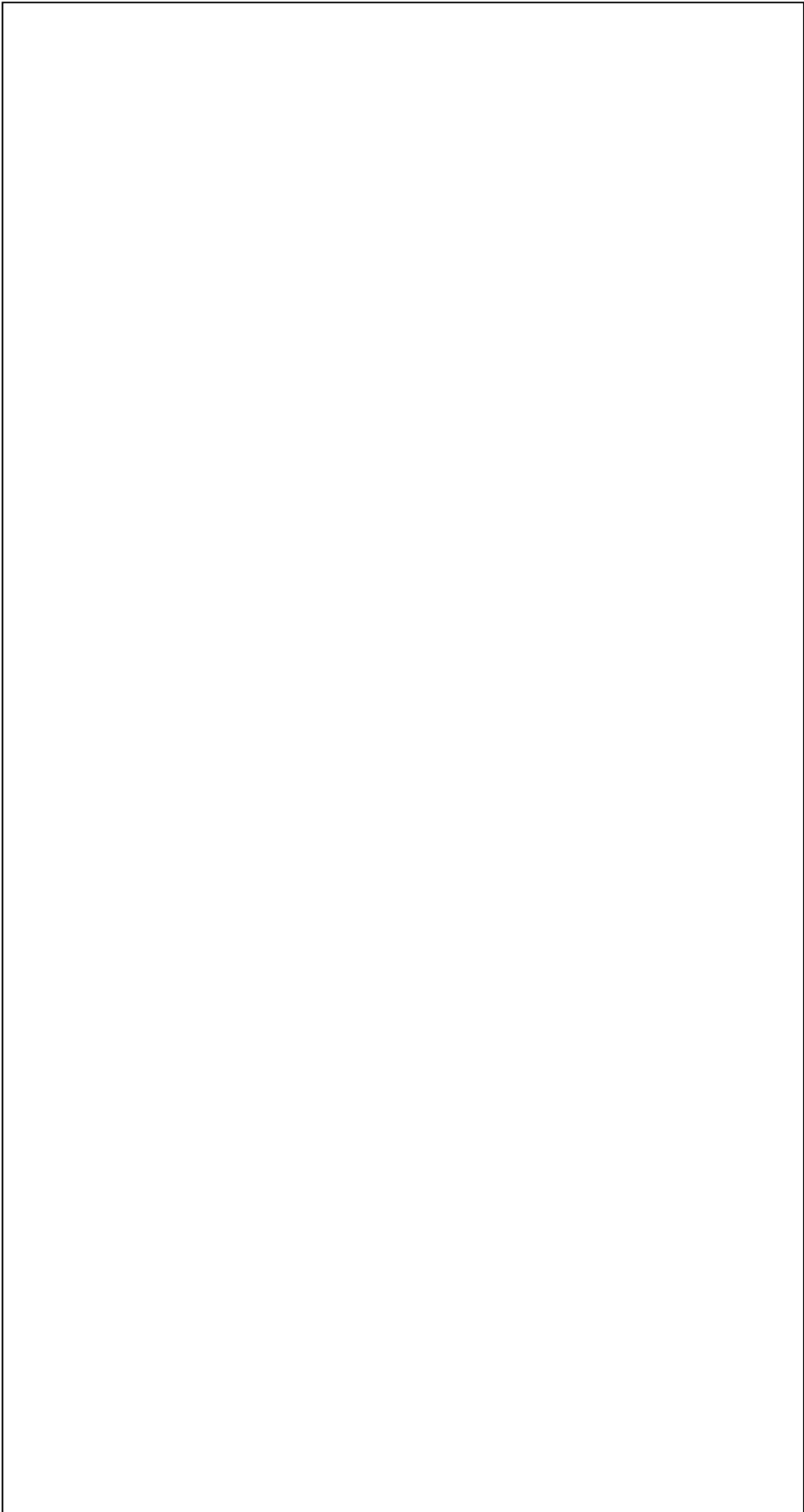


图2 枸杞供试品溶液色谱图

标引序号说明:

- 1-甘露糖;
- 2-核糖;
- 3-鼠李糖;
- 4-葡萄糖醛酸;
- 5-半乳糖醛酸;
- 6-葡萄糖;
- 7-半乳糖;
- 8-木糖;
- 9-阿拉伯糖;
- 10-岩藻糖;
- 11-2-脱氧-D-核糖 (内标)