

团体标准

T/ NAIA×××-××××

枸杞中维生素 C 和 2- α - β -D-葡萄糖基 -L-抗坏血酸的测定 高效液相色谱法

Determination of vitamin C and 2- α - β -d-glucosyl-l-ascorbic acid in Lycium barbarum.
—High performance liquid chromatography

××××-××-××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 给出的规则起草。

本文件由宁夏回族自治区药品检验研究院提出。

本文件由宁夏化学分析测试协会归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区药品检验研究院（国家枸杞产品质量检验检测中心（宁夏）），宁夏卫生健康职业技术学院，中国科学院兰州化学物理研究所，宁夏回族自治区药品质量控制与评价重点实验室，宁夏农林科学研究院。

本文件主要起草人：王宁、尚博扬、马玲、王宁霞、朱会琴、吴聪、武奕融、王英华。

本文件为首次发布。

枸杞中维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸 (AA-2βG) 的测定 高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了枸杞及枸杞原浆中维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于枸杞及枸杞原浆中维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸含量的测定；其他枸杞制品中维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸含量可参考本标准进行测定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

试样中的维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸经 2.0% 偏磷酸溶液在酸性条件下提取，用高效液相色谱法测定，外标法定量。

5 试剂与材料

除另有说明外，在分析中使用分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的一级水。

5.1 甲醇 (CH₃OH)：色谱纯。

5.2 磷酸(H₃PO₄)：优级纯，85%。

5.3 四丁基溴化铵(C₁₆H₃₆BrN)：分析纯。

5.4 偏磷酸(HO₃P)：分析纯。

5.5 20% 甲醇溶液：量取 200 mL 甲醇，用水定容至 1000 mL。

5.6 20 mmol/L 磷酸溶液 准确量取 1.4 mL 磷酸，加水稀释至 1000 mL 后，混匀，0.45 μm 滤膜过滤，备用。

5.7 5 mmol/L 四丁基溴化铵溶液 准确称取 1.61 g 四丁基溴化铵，用水溶解并定容至 1000 mL 容量瓶中，0.45 μm 滤膜过滤，备用。

5.8 2.0% 偏磷酸溶液：准确称取 2.0 g 偏磷酸，用水溶解并稀释至 100 mL，混匀，备用。

5.9 标准品 维生素 C(Vitamin C，CAS 号 50-81-7)、2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸

(2-o-β-D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid, CAS 号 562043-82-7), 纯度≥95.0%或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.10 标准品储备溶液

分别精密称取维生素 C、2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸标准品 10 mg (精确至 0.01 mg) 于 10 mL 容量瓶中, 加 2.0%偏磷酸溶液 (5.8) 溶解并定容, 分别配置成 1000 μg/mL 的标准品储备溶液, 贮存于密闭棕色容量瓶中, 于 4°C 下储存。

5.11 混合标准储备溶液

分别吸取维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸标准品储备溶液适量, 用 2.0%偏磷酸溶液 (5.8) 稀释成 400 μg/mL 的混合标准储备溶液, 贮存于密闭棕色容量瓶中, 于 4°C 下储存。

5.12 0.45 μm 滤膜, 有机相。

5.13 0.45 μm 滤膜, 水相。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱仪, 配有 DAD 检测器。

6.2 分析天平, 感量 0.00001 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 超纯水机。

6.5 粉碎机, 转速为 12000 r/min。

6.6 超声波清洗器。

7 试样制备

7.1 试样前处理

枸杞样品于 -18 °C 冷冻冰箱中保存。试验时将枸杞样品取出, 用高速万能粉碎机 (可加少量的液氮) 粉碎 (30 g 样品粉碎时间为 30 s), 分别置于样品瓶中, -18 °C 冷冻备用。

7.2 试样提取

准确称取试样 0.25 g (精确至 0.0001 g), 置具塞锥形瓶中, 精密加入 2.0%偏磷酸溶液 (5.8) 25 mL, 密塞, 称定重量, 充分振摇混匀, 超声提取 20 min, 放冷, 用 2.0%偏磷酸溶液 (5.8) 补足减失的重量, 摇匀, 用 0.45 μm 的滤膜 (5.13) 过滤, 取续滤液上机测定。

8 测定

8.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 色谱柱（5 μm，4.6 mm×250 mm），或性能相当者

流动相：20%甲醇：20 mmol/L 磷酸溶液：5 mmol/L 四丁基溴化铵溶液（20:40:40）

柱温：35 °C

检测波长：240 nm

流速：0.8 mL/min

进样量：5 μL

8.2 标准曲线的绘制

精密吸取（5.10）项下混合标准储备溶液 0.05 mL、0.1 mL、0.25 mL、1.0 mL、2.5 mL、5.0 mL、10.0 mL 分别置 10 mL 的容量瓶中，用 2.0%偏磷酸溶液（5.8）稀释至刻度，摇匀，即得浓度分别为 2.0、4.0、10.0、40.0、100.0、200.0、400.0 μg/mL 的系列混合标准使用溶液。取上述系列溶液按 8.1 项下的色谱条件进行测定，记录峰面积，以对照品溶液浓度（C）为横坐标，峰面积（A）准为纵坐标，绘制标准曲线。

8.3 试样测定

取平行两份试样溶液 5 μL，按 8.1 项下的色谱条件进行测定，以相对保留时间确定待测定成分峰，以外标法计算待测成分含量。试样中各组分的响应值应在标准曲线范围内，若超出曲线范围，应进行稀释。

9 结果计算和表达

试样中维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸的含量以质量分数 ω 计，单位为微克每克（μg/g），按式（1）计算：

$$\omega = \frac{c \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ω—— 维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸的含量，单位为微克每克（μg/g）；

c—— 由标准曲线得到的试样溶液中维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸，单位为毫克每升（μg/mL）；

V—— 试样溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m—— 试样的称样量，单位为克（g）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

10 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

(规范性附录)

中英文名称、分子式、CAS 号和纯度

2种成分的中英文名称、分子式、CAS号和纯度见表A.1。

表 A.1 中英文名称、分子式、CAS 号和纯度

序号	中文名称	英文名称	分子式	CAS 号	纯度
1	维生素 C	Vitamin C	$C_6H_8O_6$	50-81-7	$\geq 95.0\%$
2	2-o-β-D-葡萄糖基 -L-抗坏血酸	2-o-β-D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid	$C_{12}H_{18}O_{11}$	562043-82-7	$\geq 95.0\%$

附录 B

(资料性附录)

维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸标准品溶液及试样溶液色谱图

维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸标准品溶液及试样溶液色谱图见图 B.1-B.2。

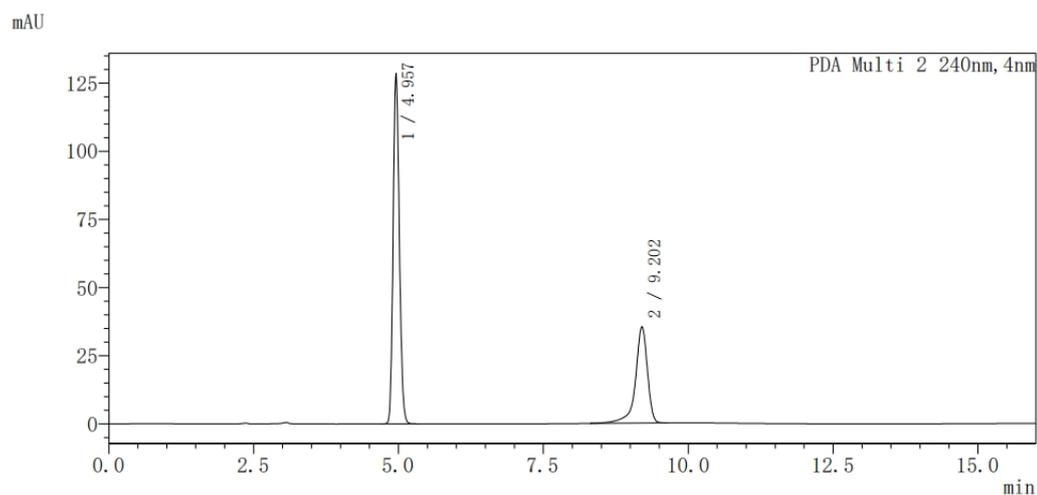


图 B.1 240 nm 下维生素 C 和 2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸标准溶液色谱

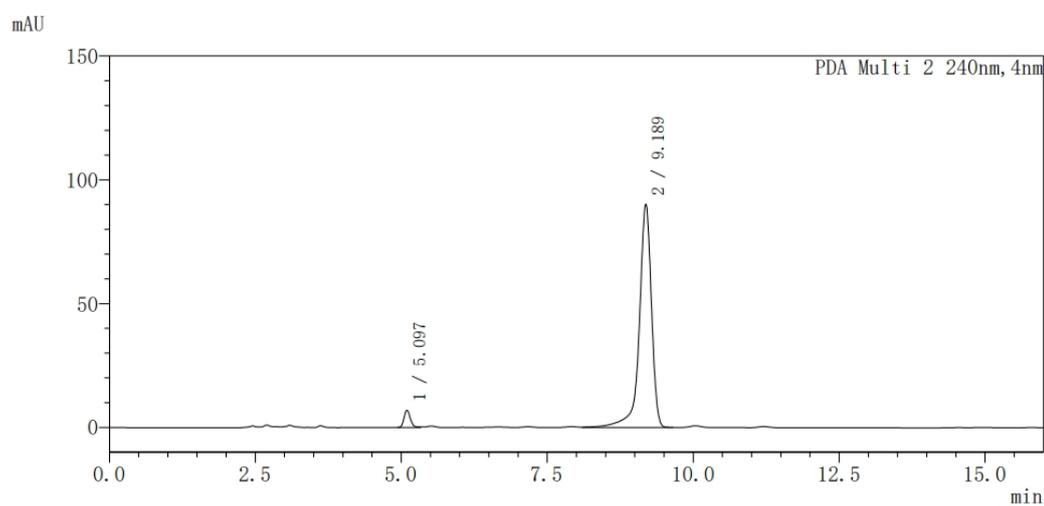


图 B.2 240 nm 下试样溶液色谱图

标引序号说明：1.维生素 C；2.2-o-β-D-葡萄糖基-L-抗坏血酸。

附录 C
(规范性附录)
方法的检测限和定量限

方法的检测限和定量限见表C.1。

表C.1 方法的检测限和定量限

分析物	检测限 $\mu\text{g/mL}$	定量限 $\mu\text{g/mL}$
维生素 C	0.210	0.630
2-o- β -D-葡萄糖基-L-抗坏血酸	0.422	1.266