

团 体 标 准

T/NAIAxxx-

xxx

液态枸杞产品中枸杞多糖的测定 离子色谱法

Determination of *Lycium barbarum* polysaccharides in liquid *Lycium barbarum* products -Ion Chromatography

XXXX-XX-XX发布

XXXX-XX-XX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(国家枸杞产品质量检验检测中心(宁夏))，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，宁夏医科大学、宁夏农林科学研究研究。

本文件主要起草人：臧娅妮、马玲、王宁丽、姜文霞、平吉文、王宁丽、姜文霞、撒志明、白长财、陈欢、黄钰馨、孙莹、王曼泽、马宗卫、邸多隆、刘建飞、牛艳、杨文静、马玉霞、马春燕、邸多隆

本文件为首次发布。

液态枸杞产品中枸杞多糖的测定

离子色谱法

1 范围

本文件规定了液态枸杞产品如枸杞原浆、黑枸杞原浆、枸杞青汁中枸杞多糖含量的离子色谱测定方法。

本文件适用于液态枸杞产品如枸杞原浆、枸杞全浆、黑枸杞原浆、枸杞青汁中枸杞多糖水解后的单糖组成为半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、木糖、甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸或单糖组成为以上各个单糖的任意组合的多糖含量的测定。

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

枸杞多糖 *Lycium barbarum polysaccharides*

是一种以半乳糖、阿拉伯糖、葡萄糖、鼠李糖、木糖、甘露糖、半乳糖醛酸、葡萄糖醛酸等为单糖单元的多糖，通过脱水缩合以糖苷键聚合而成的高分子化合物。

4 原理

样品经乙醇除杂、水回流提取得到枸杞多糖后，用三氟乙酸消解，产物经阴离子色谱柱分离，经离子色谱仪测定，外标法定量，以各单糖的峰面积为基准计算出样品中枸杞多糖的含量。

5 试剂与材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 氢氧化钠（NaOH，CAS NO.1310-73-2）：色谱纯。

5.1.2 无水乙酸钠（CH₃COONa，CAS NO.127-09-3）：色谱纯。

5.1.3 三氟乙酸（CF₃COOH，CAS NO.76-05-1）。

5.1.4 无水乙醇 ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$, CAS NO.64-17-5)。

5.2 溶液配制

5.2.1 氢氧化钠 (100 mmol/L) 和乙酸钠 (150 mmol/L) 混合溶液：准确称量 8.00 g 氢氧化钠 (5.1.1) 和 24.60 g 无水乙酸钠 (5.1.2) 到预先加入约 300 mL 水的 500 mL 烧杯中，待完全溶解且温度降到室温后，转移至 2000 mL 容量瓶中，再用预先脱气的水溶解定容。

5.2.2 三氟乙酸溶液 (2 mol/L)：准确移取 15 mL 三氟乙酸 (5.1.3)，加入到 100 mL 容量瓶中，用水定容，混匀。

5.2.3 乙醇溶液 (80%)：将 400 mL 无水乙醇 (5.1.4) 加入到 500 mL 容量瓶中，用水定容，混匀。

5.2.4 乙醇溶液 (60%)：将 300 mL 无水乙醇 (5.1.4) 加入到 500 mL 容量瓶中，用水定容，混匀。

5.3 标准品

标准品为经国家市场监督管理总局批准的标准物质或标准样品，见附录A表A.1。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 单糖标准储备溶液：精密称取半乳糖，LD-阿拉伯糖，D-葡萄糖，L-鼠李糖，D-木糖，D-甘露糖，D-半乳糖醛酸，D-葡萄糖醛酸对照品 16、38、26、10、26、4、100 和 4 mg，分别置于 20 mL 容量瓶中用水溶解并定容至刻度，混匀，4℃避光保存。

5.4.2 混合单糖标准中间溶液：精密量取 1 mL 各单糖标准储备溶液 (5.4.1)，加到 10 mL 容量瓶中，用水稀释至刻度，混匀，4℃避光保存，有效期 1 个月。

5.4.3 不同质量浓度的混合单糖标准系列工作溶液：分别移取混合单糖标准中间溶液 (5.4.2) 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7 mL 至 10 mL 容量瓶，用去离子水定容至刻度，混匀，配制成不同质量浓度的混合单糖标准系列工作溶液。

5.5 材料

5.5.1 反相净化小柱：RP 前处理小柱，C18 填料。

5.5.2 水系膜，0.22 μm 。

6 仪器

6.1 离子色谱仪，配脉冲安培检测器 (Au 为工作电极，Pd 为参比电极)。

6.2 微波消解仪，配有聚四氟乙烯消解管。

6.3 分析天平，感量 0.000001g、感量 0.00001g、感量 0.01 g。

6.4 旋转蒸发器/平行浓缩仪。

6.5 涡旋混合器。

7 样品

7.1 试样制备

取市售枸杞原浆、枸杞全浆、黑枸杞原浆、枸杞青汁等液态枸杞产品摇匀备用。

7.2 试样提取

精密称取样品 5.0 g (精确至 0.01 g)，置入 250 mL 圆底烧瓶中，加入 150 mL 乙醇溶液 (5.2.3)，加热回流 1 h，趁热用布氏漏斗抽真空滤过，弃去滤液，滤渣与滤器用约 50 mL 45℃~75℃ 热乙醇溶液 (5.2.3) 分 5 次过滤洗涤并弃去洗涤液；滤渣连同滤纸置烧瓶中，加 150 mL 乙醇溶液 (5.2.4)，加热回流提取 1 h，趁热用布氏漏斗抽真空滤过，弃去滤液，滤渣与滤器用约 50 mL 45℃~75℃ 热乙醇溶液

(5.2.4) 分5次过滤洗涤并弃去洗涤液；用150 mL乙醇溶液（5.2.4）重复提取1次后，滤渣连同滤纸置烧瓶中，将烧瓶置水浴锅（水浴温度80℃）上挥去残留的乙醇；加150 mL水，加热回流2 h，趁热过滤，用约50 mL 70℃~100℃热水过滤洗涤滤器，合并滤液与洗涤液，旋转蒸发浓缩（加热水浴温度70℃，真空度>0.09 MPa）至约10 mL，待冷却后转移至25 mL容量瓶中，并用水少量多次清洗旋蒸瓶，并将清洗液转移至容量瓶，定容，即得枸杞多糖提取液。

7.3 试样消解

准确移取4 mL枸杞多糖提取液于微波消解管中，加入4 mL三氟乙酸溶液（5.2.2），于120℃微波消解仪（升温参数：0~8 min，升温到120℃）中消解20 min后，冷却至室温；准确移取1 mL消解液至旋蒸瓶/平行浓缩管中，于45℃水浴浓缩至样品完全干燥。用水少量多次完全溶解上述干燥样品，并将溶液转移至5 mL容量瓶中，定容，混匀，得试样溶液。

8 测定步骤

8.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

- 色谱柱：基于聚苯乙烯-二乙烯基苯聚合物填料的阴离子交换色谱柱（4.0×250 mm，5 μm），或性能相当者；
- 进样量：20 μL；
- 流速：0.6 mL/min；
- 柱温：30℃；
- 流动相：以氢氧化钠和乙酸钠溶液梯度洗脱（A：水；B：100 mmol/L 氢氧化钠和 150 mmol/L 乙酸钠混合溶液）；
- 梯度洗脱程序见表 1；
- 检测器：脉冲安培检测器，Au 工作电极，Pd 参比电极，检测器电位波形程序见表 2。

表1 梯度洗脱程序（ V_A+V_B ）

时间 min	A	B
0.0	100	0
4.5	100	0
4.6	98	2
25.0	98	2
25.1	0	100
50.0	0	100
50.1	100	0
55.0	100	0

表2 检测器电位波形程序

时间 s	电位 V	积分
0.00	+0.05	—
0.20	+0.05	开始
0.30	+0.05	结束
0.30-0.35	+0.55	—
0.35-0.55	-0.10	—

8.2 标准曲线的绘制

将反相净化小柱（5.5.1）依次用5 mL甲醇、10 mL水活化，放置30 min后使用。吸取4 mL不同质量浓度的混合单糖标准系列工作溶液（5.4.3）过0.22 μm 水系滤膜（5.5.2）后，加载至反相净化小柱（5.5.1），弃去前2 mL~3 mL流出液，收集续滤液，待测。按照8.1设定的色谱条件，待仪器稳定后，依次测定不同浓度的混合单糖标准系列工作溶液的色谱峰面积。以各单糖质量浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

混合单糖标准工作溶液色谱图见附录B中的图B.1。

8.3 试样溶液的测定

吸取4 mL试样溶液（7.3），过0.22 μm水系滤膜（5.5.2）后，加载至反相净化小柱（5.5.1），弃去前2 mL~3 mL流出液，收集续滤液，待测。按照8.1设定的色谱条件，待仪器稳定后，依次测定试样的色谱峰面积。试样中各单糖的响应值均应在标准曲线线性范围之内，超过线性范围则应稀释后再进行分析。根据标准品的保留时间定性，外标法定量。

9 结果计算与表示

a) 样品中各单糖的质量按式（1）计算：

$$m_i = \frac{\rho_i \times D \times V_1}{V_2} \times V_3 \times 10^{-3} \dots \dots \dots (1.)$$

式中：

- m_i — 试样中各单糖的质量，单位为毫克（mg）；
- ρ_i — 由标准曲线计算所得试样中各单糖组分的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）；
- D — 稀释倍数；
- V_1 — 消解后总体积，单位为毫升（mL）；
- V_2 — 用于消解的枸杞多糖提取液的体积，单位为毫升（mL）；
- V_3 — 枸杞多糖提取液浓缩后定容的总体积，单位为毫升（mL）；
- 10^{-3} — 单位换算。

b) 样品中多糖的质量按式（2）计算：

$$m = \sum_{i=1}^n \left(m_i - \frac{m_i}{M_i} \times M_{(H_2O)} \right) \dots \dots \dots (2.)$$

式中：

- m — 试样中多糖的质量，单位为毫克（mg）；
- m_i — 试样中各单糖的质量，单位为毫克（mg）；

M_i — 试样中各单糖的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）；

$M_{(H_2O)}$ — 水的摩尔质量，单位为克每摩尔（g/mol）。

c) 样品中多糖的含量按式（3）计算：

$$w = \frac{m}{m_s} \times 10^{-5} \dots\dots\dots(3.)$$

式中：

w — 枸杞多糖含量，单位为毫克每千克（g/100g）；

m — 试样中多糖的质量，单位为毫克（mg）；

m_s — 试样的质量，单位为千克（kg）。

计算结果以两次测定结果的算术平均值表示，保留至小数点后两位有效数字。

10 检出限和精密度

10.1 检出限

本方法中各单糖检出限在 4.50×10^{-5} g/100g~ 3.57×10^{-4} g/100g之间，定量限在 1.35×10^{-4} g/100g~ 1.19×10^{-3} g/100g之间，见附录C。

10.2 精密度

10.2.1 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测定结果的相对标准偏差小于10%。

10.2.2 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测定结果的相对标准偏差小于15%。

附 录 A
(资料性)
标准品信息表

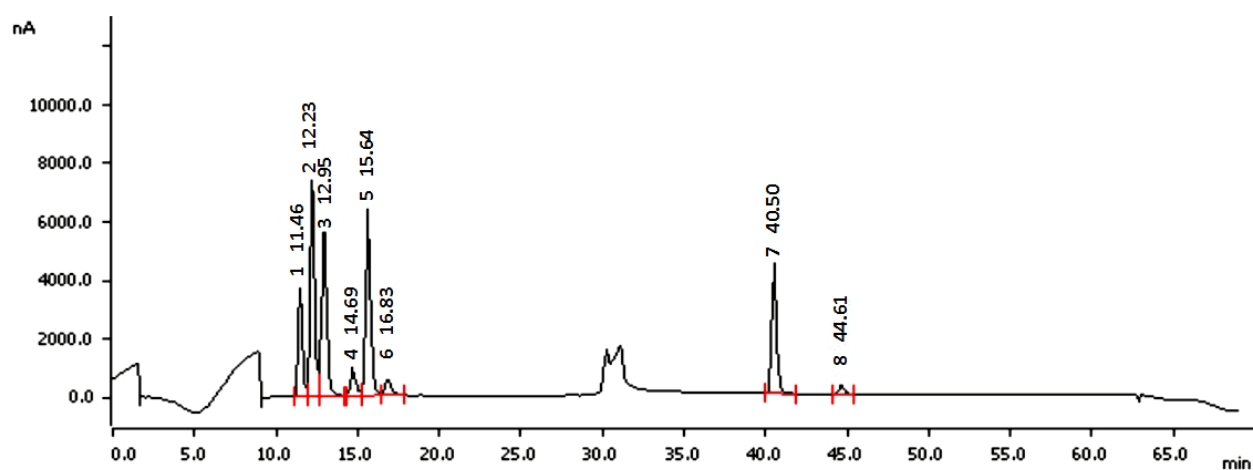
各单糖标准品信息见表A. 1。

表A. 1 标准品信息

标准品	分子式	CAS NO.	纯度，%
半乳糖	$C_6H_{12}O_6$	59-23-4	≥ 99.0
阿拉伯糖	$C_5H_{10}O_5$	10323-20-3	≥ 99.0
葡萄糖	$C_6H_{12}O_6$	50-99-7	≥ 99.0
鼠李糖	$C_6H_{12}O_5$	10030-85-0	≥ 99.0
木糖	$C_5H_{10}O_5$	58-86-6	≥ 99.0
甘露糖	$C_6H_{12}O_6$	3458-28-4	≥ 99.0
半乳糖醛酸	$C_6H_{10}O_7$	14982-50-4	≥ 95.0
葡萄糖醛酸	$C_6H_{10}O_7$	6556-12-3	≥ 99.0

附录 B
(资料性)
离子色谱图

混合单糖标准工作溶液见图B. 1。



标引序号说明：

- 1——半乳糖
- 2——阿拉伯糖
- 3——葡萄糖
- 4——鼠李糖
- 5——木糖
- 6——甘露糖
- 7——半乳糖醛酸
- 8——葡萄糖醛酸

图B. 1 混合单糖标准工作溶液色谱图

附 录 C

(资料性)

各单糖方法检出限和方法定量限

表C.1 各单糖方法检出限和方法定量限

目标物	检出限 (g/100g)	定量限 (g/100g)
半乳糖	6.86×10^{-5}	1.94×10^{-4}
阿拉伯糖	5.50×10^{-5}	1.60×10^{-4}
葡萄糖	4.50×10^{-5}	1.35×10^{-4}
鼠李糖	1.58×10^{-4}	4.56×10^{-4}
木糖	4.96×10^{-5}	1.49×10^{-4}
甘露糖	4.50×10^{-5}	3.77×10^{-4}
半乳糖醛酸	3.57×10^{-4}	1.19×10^{-3}
葡萄糖醛酸	1.30×10^{-4}	6.18×10^{-4}