

TB

# 团体标准

T/ NAIA×××-××××

## 枸杞中 3 种酚酸和 3 种黄酮化合物的测定 高效液相色谱法

Determination of three phenolic acids and three flavonoid compounds 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《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）），中国科学院兰州化学物理研究所，宁夏回族自治区食品检验研究院、宁夏回族自治区药品质量控制与评价重点实验室，。

本文件主要起草人：刘淑瑛、臧娅妮、马玲、撒志明、姜文霞、陈欢、黄钰馨、王宁丽、刘建飞、吕毅、孙莹、王曼泽、马宗卫、朱捷、邸多隆。

本文件为首次发布。

# 枸杞中 3 种酚酸和 3 种黄酮化合物的测定

## 高效液相色谱法

### 1. 范围

本文件规定了本文件适用于枸杞子及枸杞原浆中 1-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、4-香豆酸、芦丁、山奈酚、水仙苷的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于枸杞子及枸杞原浆中上述 3 种酚酸和 3 种黄酮化合物单个或多个成分含量的测定，其他枸杞制品中这 3 种酚酸和 3 种黄酮化合物的测定也可以参考本方法。

### 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

本文件没有需要界定的术语和定义。

### 4. 原理

试样中的酚酸类物质和黄酮类物质经 60%乙醇溶液提取，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 无水乙醇（ $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ ，CAS NO.64-17-5）。

5.1.2 甲醇（ $\text{CH}_3\text{OH}$ ，CAS NO.67-56-1）：色谱纯。

5.1.3 乙腈（ $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ，CAS NO.75-05-8）：色谱纯。

5.1.4 冰醋酸（ $\text{CH}_3\text{COOH}$ ，CAS NO.64-19-7）：色谱纯。

#### 5.2 溶液配制

5.2.1 60%乙醇溶液：将 300 mL 无水乙醇（5.1.1）加入到 500 mL 容量瓶中，用水定容，混匀。

5.2.2 0.5%醋酸溶液：将 0.5 mL 冰醋酸（5.1.4）加入到 100 mL 容量瓶中，用水定容，混匀脱气。

### 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 绿原酸、4-香豆酸、芦丁、山奈酚、水仙苷标准储备溶液①：精密称取绿原酸、4-香豆酸、芦丁、山奈酚、水仙苷标准品约 10 mg，分别置于 10 mL 容量瓶中，用 60%乙醇溶液溶解（5.2.1）并定容刻度，混匀。

5.4.2 绿原酸、4-香豆酸、芦丁、山奈酚、水仙苷标准储备溶液②：精密量取绿原酸、4-香豆酸、芦丁、山奈酚、水仙苷标准储备液①（5.4.1）1 mL、1 mL、4 mL、0.5 mL、1 mL，分别置 25 mL 的容量瓶中，用 60%乙醇溶液（5.2.1）定容至刻度，混匀。

5.4.3 1-咖啡酰奎宁酸标准储备溶液①：精密称取 1-咖啡酰奎宁酸标准品约 10 mg 置于 25 mL 容量瓶中，用 60%乙醇溶液（5.2.1）溶解并定容刻度，混匀。

5.4.4 1-咖啡酰奎宁酸标准储备溶液②：精密量取 1-咖啡酰奎宁酸标准储备溶液①（5.4.3）1.25 mL 置 25 mL 的容量瓶中，用 60%乙醇溶液（5.2.1）定容至刻度，混匀。

### 5.5 微孔滤膜

0.45  $\mu\text{m}$ ，有机相。

## 6. 仪器

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、感量 0.00001 g。

6.3 超纯水机。

6.4 高速粉碎机，460 w，24000 rpm。

6.5 超声波清洗仪。

## 7. 试样制备与保存

取-18℃冷冻的干燥枸杞子，去除果蒂、叶子等杂质，干法粉碎，混匀备用。

枸杞原浆、枸杞全浆摇匀备用。

## 8. 分析步骤

### 8.1 提取

取枸杞子粉末约 1.0 g，枸杞原浆、枸杞全浆约 7.0 g，精密称定（精确至 0.0001 g），置 25 mL 容量瓶中，加 60%乙醇溶液（5.2.1）20 mL，超声 20 min，放置至室温，用 60%乙醇溶液（5.2.1）定容至刻度，混匀，用 0.45  $\mu\text{m}$  的滤膜（5.5）过滤，取续滤液上机测定。

### 8.2 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 柱，长 150 mm，内径 4.6 mm，粒度 5  $\mu\text{m}$  (pH=1~11)或相当者。

流动相 A：乙腈；流动相 B：0.5%醋酸溶液（5.2.2）；梯度洗脱条件见表 1。

检测器：二极管阵列检测器（DAD）。

检测波长：320 nm。

进样体积：10  $\mu$ L。

柱温：25°C。

表 1 梯度洗脱程序表

时间 (min)	流速 (mL/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1.0	6	94
30	1.0	20	80
40	1.0	85	15
42	1.0	6	94
47	1.0	6	94

### 8.3 混合标准曲线的制备

按表 2 线性溶液配制表精密量取 1-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、4-香豆酸、芦丁、山奈酚、水仙苷各标准储备溶液②（5.4）分别至 10 mL 的容量瓶中，用 60%乙醇溶液（5.2.1）稀释至刻度，摇匀，即得系列线性测定混合标准使用溶液。取上述系列溶液按（8.2）项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）为纵坐标，绘制标准曲线或求线性回归方程，混合标准溶液的液相色谱图见附录 B 中的图 B.1。

表 2 线性溶液配制表

组分	量取体积(mL)					
	线性 1	线性 2	线性 3	线性 4	线性 5	线性 6
1-咖啡酰奎宁酸	0.13	0.25	0.50	0.75	1.00	2.00
绿原酸	0.06	0.13	0.20	0.25	0.50	1.00
4-香豆酸	0.06	0.13	0.25	0.50	0.75	1.00
芦丁	0.13	0.19	0.25	0.50	1.00	2.00
山奈酚	0.06	0.13	0.25	0.40	0.50	1.00
水仙苷	0.06	0.10	0.15	0.25	0.50	1.00

### 8.4 测定步骤

取平行两份的试样溶液测定，试样中各酚酸及黄酮类化合物的响应值应在标准曲线范围内。以外标法计算含量，试样溶液色谱图参见附录 B 中的图 B.2。

## 9. 结果计算

试样中 1-咖啡酰奎宁酸、绿原酸、4-香豆酸、芦丁、山奈酚、水仙苷的含量按干燥品的百分含量计，按式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式（1）中：

$\omega$ ——试样中各酚酸及黄酮类组分的含量，单位为毫克每克（mg/g）

$\rho$ ——由标准曲线计算所得试样中各酚酸及黄酮组分的质量浓度，单位为毫克每升（mg/L）

$m$ ——试样的质量，单位为克（g）；

$V$ ——试样中加入并定容的提取溶液的体积，单位为毫升（mL）

测定结果保留三位有效数字。

#### 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 10%。

## 附录 A

(规范性附录)

标准品信息

标准品中英文名称、分子式、CAS号和纯度见表A.1。

表A.1 标准品信息

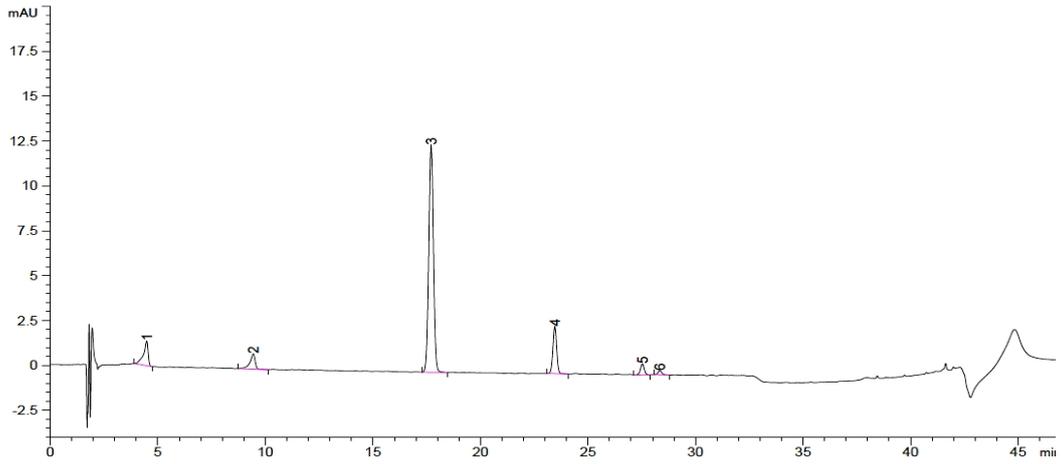
序号	中文名称	英文名称	分子式	CAS 号	纯度
1	1-咖啡酰奎宁酸	Cyclohexanecarboxylic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	1241-87-8	98.9%
2	绿原酸	Chlorogenic acid	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	327-97-9	96.3%
3	4-香豆酸	p-Coumaric acid	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	501-98-4	99.7%
4	芦丁	Rutin	C <sub>27</sub> H <sub>30</sub> O <sub>16</sub>	153-18-4	91.9%
5	山奈酚	Kaempferol	C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> O <sub>6</sub>	520-18-3	94.0%
6	水仙苷	Narcissoside	C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	604-80-8	93.1%

## 附录 B

(资料性附录)

### 标准品溶液及试样溶液色谱图

标准品溶液及试样溶液见图B.1-B.2。

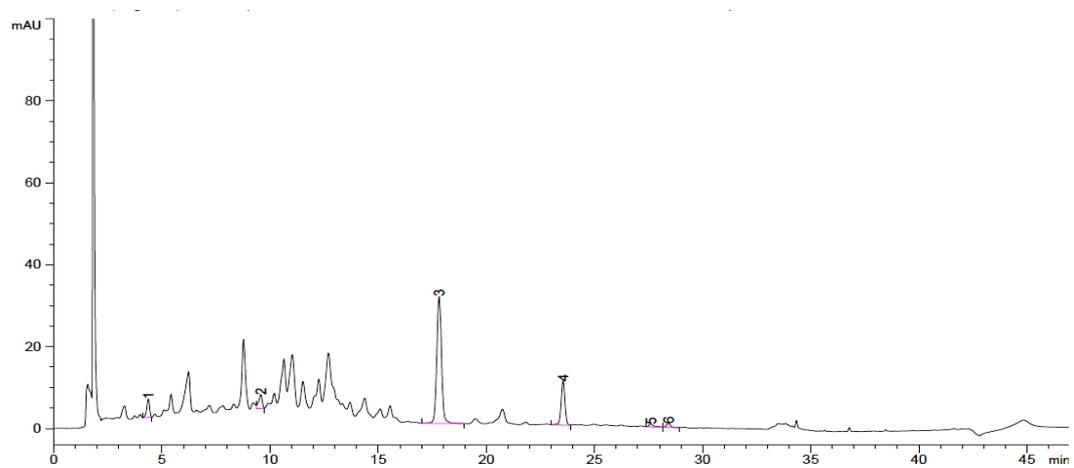


标引序号说明：

- 1——1-咖啡酰奎宁酸
- 2——绿原酸
- 3——香豆酸
- 4——芦丁
- 5——山奈酚
- 6——水仙苷

图 B. 1 标准品溶液色谱图

试样溶液色谱图见图B. 2。



标引序号说明：

1——1-咖啡酰奎宁酸

2——绿原酸

3——香豆酸

4——芦丁

5——山奈酚

6——水仙苷

图 B. 2 试样溶液色谱图