

TB

团 体 标 准

T/NAIA xxx-xxx

枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物含 量的测定 高效液相色谱法

Determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* L. leaves
—High performance liquid 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。

本文件由宁夏医科大学（宁夏医科大学枸杞研究中心）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：宁夏医科大学（宁夏医科大学枸杞研究中心）、宁夏回族自治区药品检验研究院、宁夏正山堂生物科技有限责任公司、百瑞源枸杞股份有限公司、中宁县吉利宝枸杞制品有限公司。

本文件主要起草人：马学琴、高涛、陈国宁、李嘉森、陈欢、杨玲玲、王玫、付雪艳、杨志刚、李琪、马金超、杨丽丽、李卫兵、韩璐。

本文件为首次发布。

枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物含量的测定

高效液相色谱法

1 范围

本文件规定了枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物含量的高效液相色谱测定方法。

本文件适用于枸杞叶及其制品中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷、对香豆酸、芦丁和山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷含量的测定。

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

试样中的酚酸类和黄酮类成分采用 80% 的乙醇超声提取，溶液用微孔滤膜过滤，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，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 无水乙醇 (C_2H_6O)

5.2 甲醇 (CH_4O)

5.3 磷酸 (H_3PO_4)

5.4 80%乙醇溶液：量取 80 mL 无水乙醇于 100 mL 量瓶中，加水定容至刻度，摇匀备用。

5.5 0.3%磷酸溶液：量取 3 mL 磷酸于 1000 mL 量瓶中，加水定容至刻度，摇匀备用。

5.6 标准品

绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷、对香豆酸、芦丁、山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷等标准品的英文名称、分子式、CAS 号及纯度见附录 A。

5.7 单标储备溶液

分别准确称取适量绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷、对香豆酸、芦丁和山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷标准品（精确到 0.00001 g），采用 80%乙醇溶液（5.4）溶解并制成质量浓度为 1 mg/mL 的单标储备溶液，贮存于密闭量瓶中备用。

5.8 混合标准储备溶液

精密量取各单标储备溶液（5.7），用 80%乙醇溶液（5.4）稀释至浓度均为 100 μg/mL 的混合标准储备溶液，贮存于密闭量瓶中备用。

5.9 微孔滤膜

0.45 μm，有机相。

6 仪器

6.1 高效液相色谱仪，配有 DAD 或 UV 检测器。

6.2 分析天平，感量 0.00001g。

6.3 超声波清洗仪。

6.4 粉碎机。

7 试样制备

取枸杞叶样品，粉碎过 40 目筛，混匀备用。

8 试样提取

取本品粉末（过 40 目筛）0.5 g，精密称定（精确到 0.0001 g），置具塞锥形瓶中，精密加入 80%乙醇溶液（5.4）20 mL，密塞，称定重量，超声 30 min，放冷，再称定重量，用 80%乙醇溶液补足减失的重量，均匀，用 0.45 μm 的滤膜（5.9）过滤，取续滤液上机测定。

8 分析步骤

8.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 色谱柱，长 250 mm，内径 4.6 mm，粒度 5 μm，或性能相当者。

柱温: 25 °C

流动相: A 为 0.3% 磷酸水, B 为甲醇; 梯度洗脱条件见表 1。

检测波长: 320 nm

流速: 0.8 mL/min

进样量: 20 μ L

表 1 梯度程序洗脱表

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	98	2
3	88	12
12	82	18
20	75	25
35	65	35
45	52	48
48	96	4
52	98	2

8.2 标准曲线的制作

精密吸取(5.8)项下混合标准储备溶液1mL、2mL、3mL、4mL、5mL、6mL至10mL量瓶中，用80%乙醇溶液(5.4)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(8.1)项的色谱条件进行测定，记录峰面积，以标准使用溶液浓度(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。

8.3 测定步骤

取平行两份的试样溶液测定，试样中各酚酸类和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。

混合标准储备溶液及试样溶液色谱图参见附录 B。

8.4 方法的检测限和定量限

本文件方法的检测限和定量限参见附录 C。

9 结果计算和表达

试样中新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷、对香豆酸、芦丁和山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷的含量按干燥品的百分含量计，按式（1）计算：

式(1)中:

A_x ——试样中各待测成分的峰面积。

C_R ——各标准品的浓度，单位为克每毫升 (g/mL)。

A_R ——各标准品的峰面积。

C_x ——试样溶液的浓度，单位为克每毫升 (g/mL)。

C_m ——试样水分含量 (%)。

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 5%。

附录 A

(规范性附录)

7 种酚酸类和黄酮类化合物中英文名称、分子式、CAS 号和纯度

7 种酚酸类和黄酮类化合物中英文名称、分子式、CAS 号和纯度见表 A.1

表 A.1 酚酸类和黄酮类化合物中英文名称、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	绿原酸	Chlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	327-97-9	≥98.0%
2	新绿原酸	Neochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	906-33-2	≥98.0%
3	隐绿原酸	Cryptochlorogenic acid	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	905-99-7	≥98.0%
4	槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷	Quercetin 3-O-rutinoside-7-O-glucoside	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	30311-61-6	≥98.0%
5	对香豆酸	p-Coumaric acid	C ₉ H ₈ O ₃	501-98-4	≥98.0%
6	芦丁	Rutin	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	153-18-4	≥98.0%
7	山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷	Ternatumoside II	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	1473419-87-2	≥98.0%

附录 B

(规范性附录)

混合标准储备溶液及试样溶液色谱图

混合标准储备溶液及试样溶液色谱图, 见图 B.1-B.2。

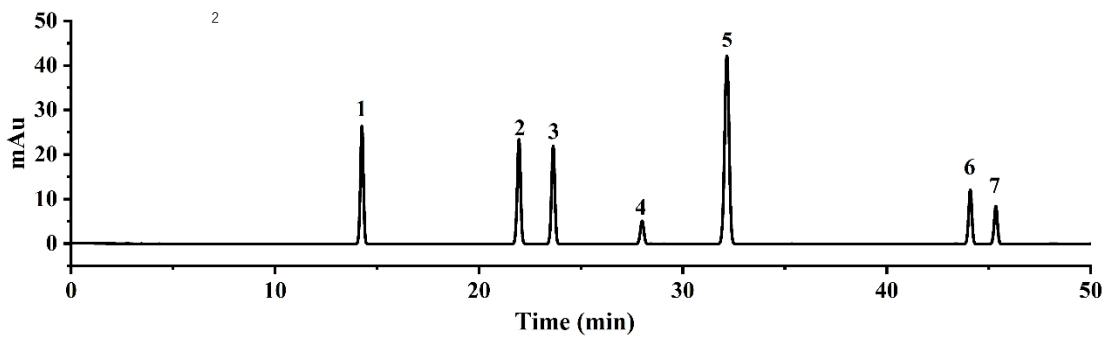


图 B.1 混合标准储备溶液色谱图

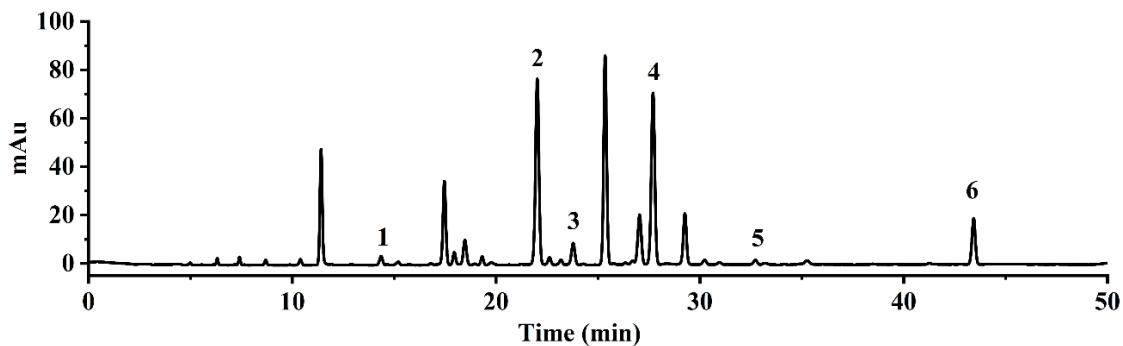


图 B.2 试样溶液色谱图

标引序号说明:

- 1.新绿原酸; 2.绿原酸; 3.隐绿原酸; 4.槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷; 5.对香豆酸; 6.芦丁; 7.山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷

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 $\mu\text{g/mL}$
绿原酸	0.038	0.116
隐绿原酸	0.042	0.126
新绿原酸	0.015	0.045
对香豆酸	0.023	0.069
山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷	0.053	0.161
芦丁	0.046	0.139
槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷	0.043	0.128