

# 《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》

## 标准编制说明

1 工作简况（包括任务来源、协作单位、主要工作过程、标准主要起草人及其所做的工作等）

### 1.1 任务来源

枸杞叶为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥叶，在化学成分研究方面，已有报道发现枸杞叶富含酚酸类、黄酮类、多糖类、甾体类、甜菜碱、精胺和亚精胺类等多种化学成分。现代研究表明，枸杞叶具有抗氧化、降血糖、调血脂、抗疲劳、神经保护、延缓衰老等多种生物活性。目前，枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的含量测定尚无国家或行业标准正式发布。宁夏化学分析测试协会 2023 年发布了 T/NAIA 0188-2023 《枸杞叶及枸杞茶中总黄酮含量的测定》，规定了枸杞叶和枸杞茶中总黄酮的含量测定方法。然而标准中采用的铝盐比色法，其专属性和准确度均较差，体现在并非所有黄酮类化合物均可与铝离子形成螯合物。同时有部分非黄酮类化合物可与铝盐形成螯合物显色，以上现象导致测定结果准确度不高、专属性不强。另外，标准不能明确其中具体的黄酮类化合物及其含量，而课题组发现的枸杞叶富含的绿原酸等酚酸类化合物的含量也未测定。

基于此，在宁夏化学分析测试协会的推动下，课题组于 2025 年 6 月提出了《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》的编制申请并获批，由申请单位宁夏医科大学组织实施，开展了团体标准的制定工作。本标准由宁夏医科大学（宁夏医科大学枸杞研究中心）提出，由宁夏化学分析测试协会归口，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负责起草。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。

### 1.2 主要工作过程

#### 1.2.1 成立标准制定工作组

接到标准起草任务后，项目负责人组织相关人员成立了标准编制小组，确定了本标准参与单位：宁夏医科大学（宁夏医科大学枸杞研究中心）、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。编制小组人员主要由从事药品检验、仪器分析、药物分析、标准制定等具有丰富技术经验的专业技术人员组成。

### 1.2.2 查阅相关国内外标准及文献

在制定枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物含量的测定方法之前，首先全面检索查阅了国内外关于枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的定性定量检测方法和研究进展，对已报道的酚酸类和黄酮类分析检测方法从使用仪器类型、样品前处理方法、定性方法和定量方法进行归纳总结，比较方法之间的优缺点，结合自治区实际情况，为本检测方法的制定奠定基础。本标准在制定过程中主要参考如下标准

(1) 宁夏中药材标准：枸杞茶。

(2) 宁夏团体标准 T/NAIA 0188—2023：枸杞叶及枸杞茶中总黄酮含量的测定。

(3) 宁夏食品安全地方标准 DBS64/684-2022：枸杞叶茶。

(4) 中华人民共和国国家标准 GB/T 20001.4-2015：标准编写规则 第4部分 试验方法标准。

(5) 中华人民共和国国家标准 GB/T 6379.4-2006：测量方法与结果的准确度(正确度与精密度)第4部分 确定标准测量方法正确度的基本方法。

(6) 中华人民共和国国家标准 GB/T 4883-2008：数据的统计处理和解释 正态样本离群值的判断和处理。

(7) 中华人民共和国国家标准 GB/T 10092-2009：数据的统计处理和解释 测试结果的多重比较。

### 1.2.3 确定试验方案

自《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》标准研究的任务下达后，工作小组确定了方法制定的原则，撰写了研究方法，制定了技术路线，对样品前处理和仪器检测条件进行筛选与优化。开展了方法专属性、定量限、检测限、准确度、精密度、线性和耐用性等验证技术内容的研究。本标准的制定参考了大量文献和标准方法，并分析归纳总结，拟定了试验方案，包括样品制备方法和仪器条件等试验具体方案。

#### 1.2.4 标准进度

在枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物新的检测方法确立后,经过几家单位反复的实验验证,目前形成宁夏化学分析测试协会《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》团体标准的征求意见稿,拟面向全国征求意见。后续根据反馈意见,再次经过大量的实验论证,最终形成送审稿。

### 2 标准编制原则和确定标准主要内容(如技术指标、参数、公式、性能要求、实验方法、检验规则)的依据

#### 2.1 标准的编制原则

依据 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》进行本标准的编制工作。在标准的制定过程中严格遵循国家有关方针、政策、法规和规章,严格执行强制性国家标准和行业标准。与同体系标准及相关的各种基础标准以及配套使用的取样、试剂规格等标准相衔接,遵循了政策和协调统一性原则。

在标准制定过程中力求做到:技术内容的叙述正确无误;文字表达准确、简明、易懂;标准的构成严谨合理;内容编排、层次划分等符合逻辑与规定。

#### 2.2 标准的研究背景

##### (1) 本标准起草的目的意义

宁夏枸杞叶已经作为地方特色药材和饮片分别被收载在《宁夏中药材标准》和《宁夏中药饮片炮制规范》中(命名为枸杞茶),为茄科植物宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L.的干燥叶,“甘,平。归肝、脾、肾经”,具有“滋补肝肾、养血益精”的功效,“用于肝肾阴虚、精血不足、失眠多梦……”;一般代茶饮适量。以上提示,枸杞叶具有“除烦益智,补五劳七伤”等传统功效,可用于改善“失眠多梦”等症状。尽管现代枸杞叶因蔬菜而闻名,菜用枸杞的栽培、开发利用已经日趋完善,展现出巨大的经济价值,但枸杞叶同枸杞子一样,亦具有药用价值,在保健和医药领域应用潜力巨大。随着大健康产业的快速发展,市场对药食同源枸杞子资源的需求量剧增。宁夏枸杞叶资源价值与枸杞子一起发展,双轮驱动,推动形成宁夏现代枸杞产业高质量发展格局。

在此背景下,工作小组就宁夏枸杞叶中的生物活性成分——枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物进行分析检测方法的研究,在深入研究、浅出标准原则的指引下,

制定枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的含量测定方法, 以期为宁夏枸杞叶的质量控制提供方法。

## (2) 枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物及其检测方法研究进展

枸杞叶富含酚酸类和黄酮类多类型资源性化学成分, 此类化合物具有抗高血糖和抗高脂血症的作用, 可通过抑制高血糖介导的肾脏氧化应激和炎症反应来改善糖尿病肾损伤。枸杞叶中的酚酸类化合物主要分为两大类, 一类是绿原酸类包括绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸等, 另一类是其他酚酸类包括咖啡酸、对香豆酸和阿魏酸等, 其中绿原酸含量最高。枸杞中的黄酮类化合物主要包括槲皮素、芦丁、槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷和山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷等, 其中芦丁的含量最高, 占总黄酮的 92%。

枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的含量测定方法是目前枸杞叶研究领域的热点之一, 也是难点之一, 具有广阔的开发应用前景。枸杞叶总黄酮含量测定虽常采用铝盐比色法, 但因其专属性和准确度不足, 难以真实反映枸杞叶中全部黄酮类化合物的含量。

因此, 本实验建立直接测定枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物成分含量的 HPLC 法, 为枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的质量控制提供依据。

## (3) 枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物含量测定现有标准

2023 年发布的《枸杞叶及枸杞茶中总黄酮含量的测定 T/NAIA 0188》标准中, 规定了枸杞叶和枸杞茶中总黄酮的含量测定方法。主要采用铝盐比色法, 其原理是具有邻二酚羟基或 3-羟基-4-羰基、5-羟基-4-羰基等结构的黄酮类化合物在弱碱性条件下可与铝盐生成螯合物, 加入氢氧化钠溶液后显色, 在波长 510 nm 处测定吸光度值, 在一定浓度范围内, 该螯合物的吸光度值与总黄酮含量成正比, 采用标准曲线定量。但其采用的铝盐比色法缺乏专属性且准确度不高, 样品中存在的其他非黄酮类化合物, 如酚酸、单宁/鞣质、花色苷等, 在含有邻二酚羟基等结构的前提下, 也能与铝离子发生显色反应, 从而导致测定结果偏高。同时, 并非所有的黄酮类化合物均具有邻二酚羟基或 3-羟基-4-羰基、5-羟基-4-羰基等基团而与铝离子有效螯合, 使得测定结果不能真实反映枸杞叶所有黄酮类化合物的含量。

基于以上枸杞叶国内外标准现状, 本项目拟建立针对枸杞叶中富含的绿原酸、

新绿原酸、隐绿原酸、芦丁、槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷、对香豆酸和山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷等多种成分的 HPLC 含量测定方法，解决现有标准中无枸杞叶指标性成分含量测定的现状，为枸杞叶的质量控制和研究提供了技术支撑。

## 2.3 标准的主要内容

### 2.3.1 适用范围

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。

### 2.3.2 标准的主要技术内容

本标准对适用范围、规范性引用文件、原理、试剂和材料、仪器和设备、分析方法及其验证、结果计算等技术内容进行了详细介绍。

### 2.3.3 方法研究报告

#### 2.3.3.1 仪器试剂及材料

Agilent 1260 II 高效液相色谱仪（配紫外检测器）；

梅特勒-托利多 XPE26 分析天平：感量为 0.00001g；

上海跃进医疗器械厂超声波清洗仪；

微孔滤膜：0.45 $\mu$ m（有机相）；

绿原酸（Chlorogenic acid，CAS 号 327-97-9）；新绿原酸（Neochlorogenic acid，CAS 号 906-33-2）；隐绿原酸（Cryptochlorogenic acid，CAS 号 905-99-7）；槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷（quercetin-3-O-rutinoside-7-O-glucoside，CAS 号 30311-61-6）；对香豆酸（p-Coumaric acid，CAS 号 501-98-4）；芦丁（Rutin，CAS 号 153-18-4）；山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷（Kaempferol-3-glucuronide，CAS 号 1473419-87-2）；纯度 $\geq$ 98.0%，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质；

甲醇：色谱纯（Fisher）；

无水乙醇：分析纯（天津大茂化学试剂厂）；

水：纯化水；

磷酸：色谱纯（天津大茂化学试剂厂）；

#### 2.3.3.2 80%乙醇溶液

量取 80 mL 无水乙醇至 100 mL 量瓶中，加水定容至刻度，摇匀备用。

#### 2.3.3.3 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。

#### 2.3.3.4 单标储备溶液

分别准确称取适量经真空干燥至恒重的绿原酸、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，贮存于密闭容量瓶中，4 °C 下储存。

#### 2.3.3.5 混合标准储备溶液

分别吸取适量绿原酸、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-葡萄糖鼠李糖苷单标储备溶液，用 80%乙醇溶液稀释至浓度均为 100 µg/mL 的混合标准储备溶液，贮存于密闭容量瓶中，4°C 下储存。

#### 2.3.3.6 供试品溶液

取枸杞叶样品，粉碎过 40 目筛，混匀备用。

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 10 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 的滤膜过滤，取续滤液上机测定。

#### 2.3.3.7 仪器条件的确定

##### （一）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，或相当者。

流动相：A 为 0.3%磷酸水，B 为甲醇；梯度洗脱条件见表 1。

柱温：25 °C

检测波长：320 nm

流速：0.8 mL/min

进样量：20  $\mu$ L

流速：按表 1 进行洗脱。

表 1 梯度程序洗脱表

时间 (min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	98.0	2.0
3	88.0	12.0
12	82.0	18.0
20	75.0	25.0
35	65.0	35.0
45	52.0	48.0
48	96.0	4.0
52	98.0	2.0

按上述色谱条件检测，混合标准储备溶液和试样溶液色谱图见图 1 和 2 所示。

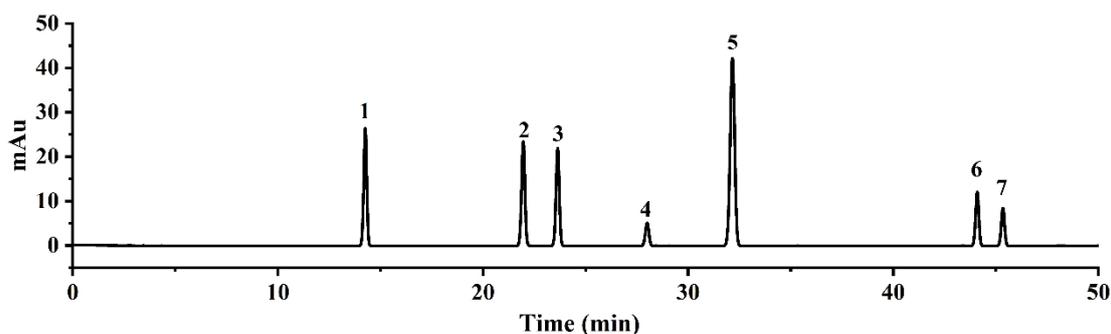


图 1 混合标准储备溶液色谱图

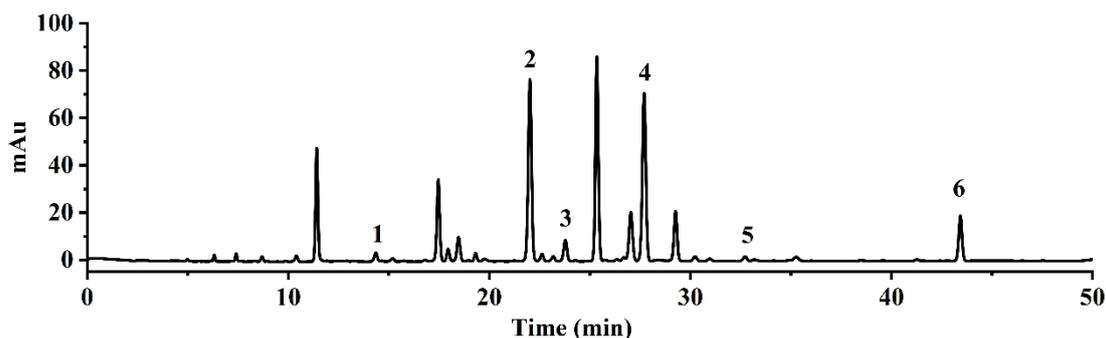


图 2 试样溶液色谱图

注：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

## (二) 前处理方法的选择

### (1) 提取溶剂的选择

本试验考察了3种不同浓度的乙醇溶液作为提取溶剂的提取效果,结果表明(见表2和图3),提取溶剂为80%乙醇溶液时效果最好。

表2 不同提取溶剂的选择(样品取样量为0.5 g时峰面积)

提取溶剂	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
40%乙醇	60.942	1515.649	157.963	668.026	34.852	159.779
60%乙醇	40.358	967.639	105.448	382.330	20.073	110.504
80%乙醇	82.441	2061.709	21.093	942.750	46.073	216.805

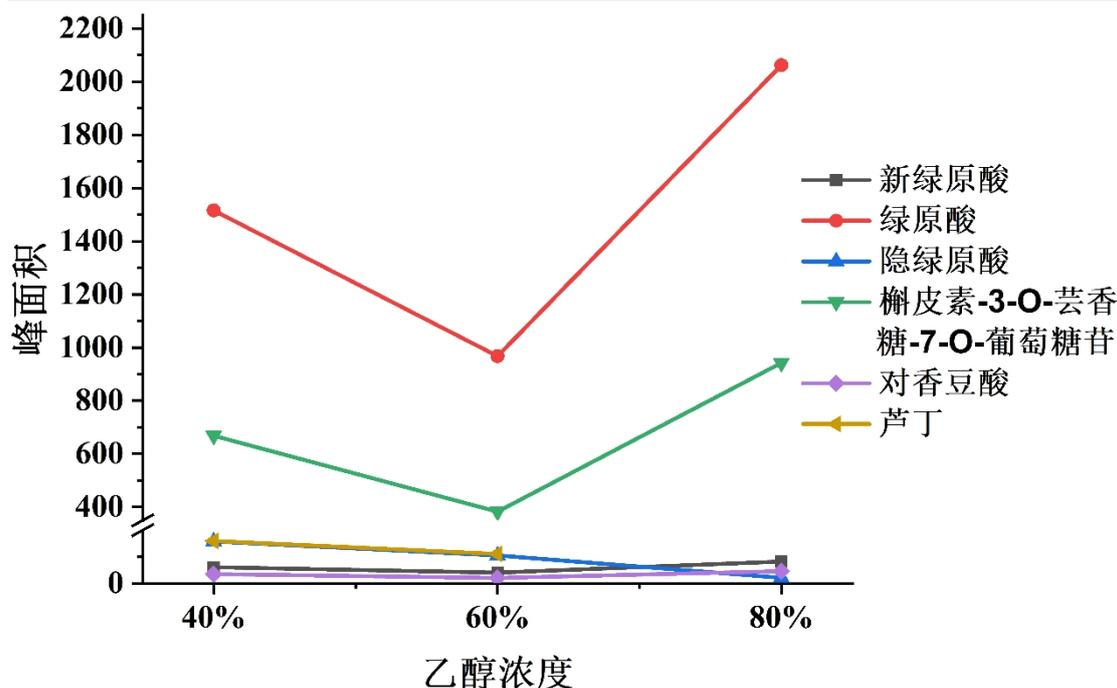


图3 不同提取溶剂的选择

## (2) 提取方法和时间的选择

本试验考察了不同超声时间对枸杞叶中酚酸类和黄酮类提取效果的影响。结果表明(见表3和图4),超声30 min结果较好,考虑到方法的简便快捷,本试验选择提取时间为超声30 min。

表3 不同提取方法和时间测定结果(样品取样量为0.5 g时峰面积)

超声时间	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
15 min	45.056	1117.915	124.635	433.243	15.517	133.416
30 min	78.938	1923.509	204.662	892.536	34.945	224.045
60 min	73.559	1805.12	190.215	430.773	43.625	133.198

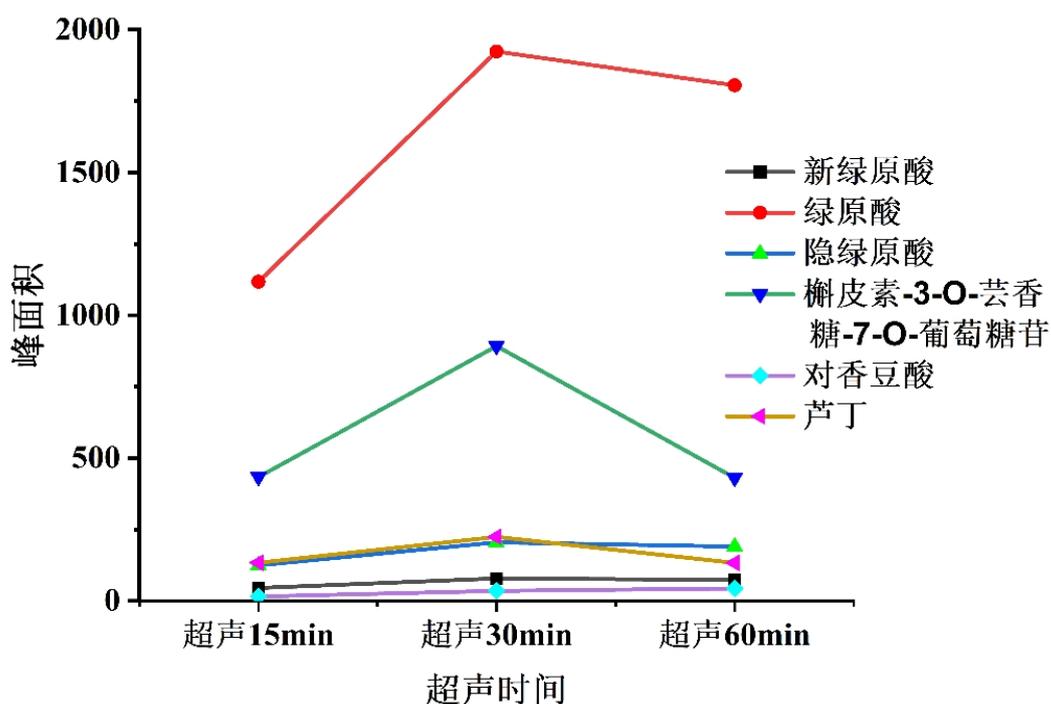


图4 不同超声时间的选择

### (3) 提取料液比的选择

本试验进行了 1:10、1:20、1:30 共计 3 种提取料液比的考察, 结果表明 (表 4, 图 5), 料液比为 1:20、1:30 时提取效果基本一致。考虑到经济实用, 本试验选择提取料液比为 1:20。

表 4 不同提取料液比的选择 (样品取样量为 0.5 g 时峰面积)

料液比	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
1: 10	64.236	1548.272	174.316	594.468	25.081	170.074
1: 20	61.193	1546.497	166.327	674.457	27.003	183.12
1: 30	61.575	1526.891	169.961	652.359	26.826	173.147

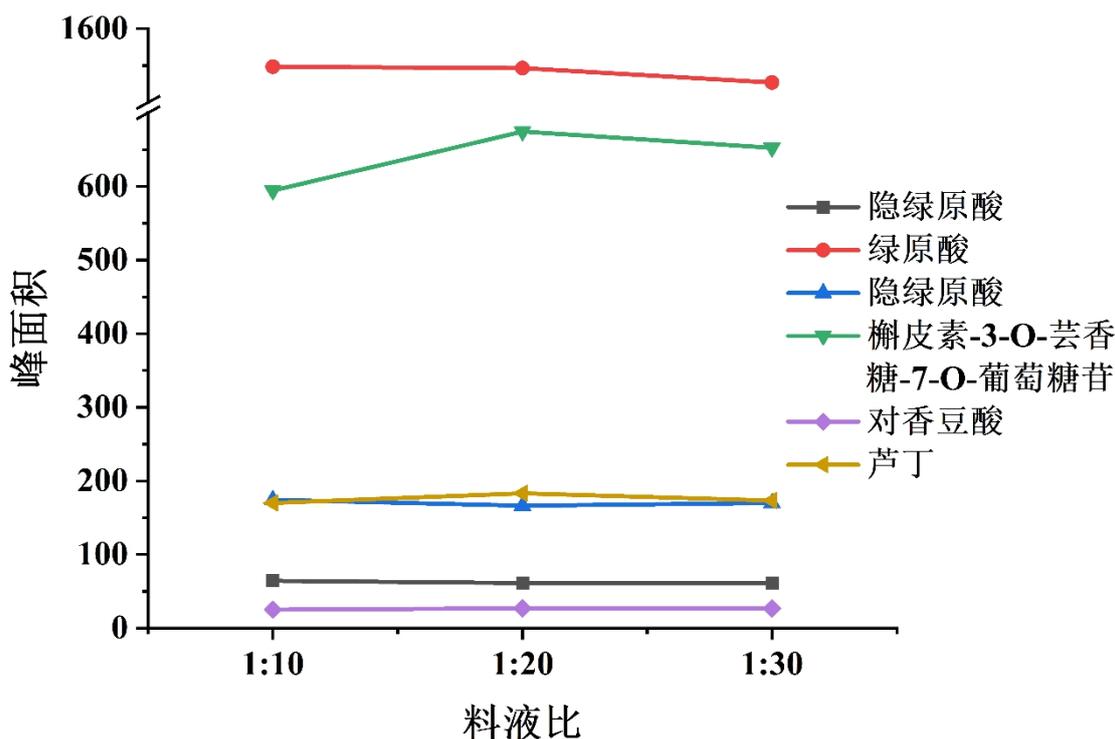


图 5 不同提取料液比的选择

### (三) 标准曲线及线性范围的确定

精密吸取一系列不同体积的混合标准储备液，分别置于适宜规格的量瓶中，用 80%乙醇溶液稀释至刻度，摇匀，即得一系列梯度浓度的混合标准使用溶液。取上述系列溶液按表 1 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。

绿原酸、隐绿原酸、新绿原酸、对香豆酸、山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷、芦丁及槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷的标准曲线线性方程、相关系数及线性范围见表 5 和图 6 所示。结果表明，酚酸类和黄酮类化合物对照品的标准曲线线性回归方程相关系数  $R^2$  值  $\geq 0.99$ ，显示出了良好的线性关系。

表 5 各酚酸类和黄酮类化合物线性方程

标样名称	线性方程	线性范围( $\mu\text{g/mL}$ )	相关系数( $R^2$ )
绿原酸	$Y=1.9131X-0.0687$	1.32~26.6	0.9995
隐绿原酸	$Y=2.1067X-0.3005$	1.1~21.8	0.9995
新绿原酸	$Y=1.982X-0.554$	1.2~24.3	0.9995
对香豆酸	$Y=4.0392X-1.6249$	1.4~25.6	0.9994
山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷	$Y=1.0694X-2.1332$	24.3~94.1	0.9938
芦丁	$Y=0.6928X-0.1402$	1.3~26.3	0.9994

槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷

$$Y=0.5958X+0.2343$$

1.1~22.2

0.9994

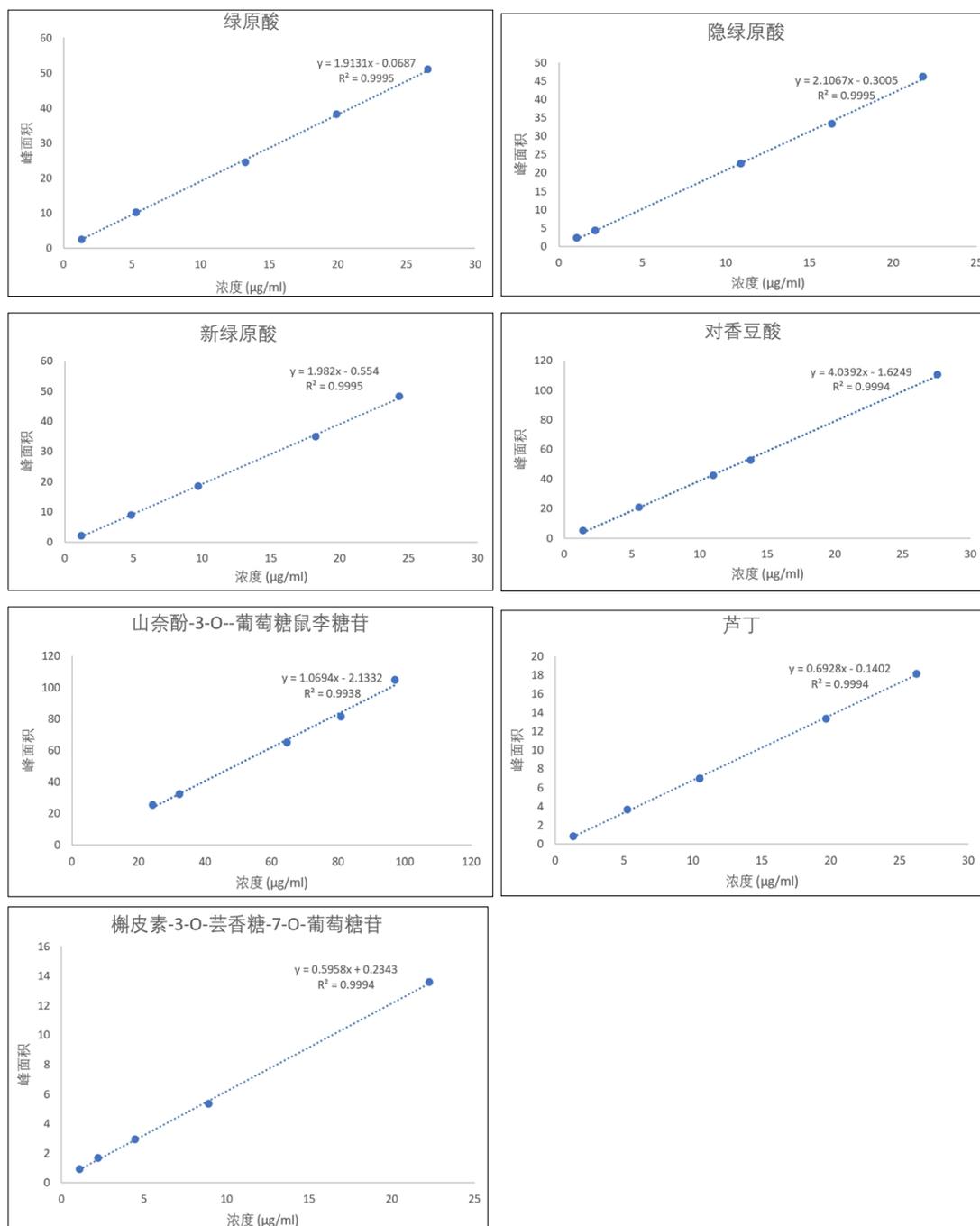


图 6 各酚酸类和黄酮类化合物线性关系图

#### (四) 仪器的精密度

取混合标准使用溶液，按照已确定的仪器方法连续进样 6 次，计算各对照品峰面积的相对标准偏差，确定仪器的精密度。结果表明（见表 6）：酚酸类和黄酮类化合物峰面积 RSD 为 0.5%~2.4%，说明该仪器方法精密度好，可以作为构

杞叶中酚酸类和黄酮类化合物及含量测定的仪器方法。

表 6 仪器的精密度 (n=6)

	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD (%)
绿原酸	397.82	407.67	418.18	413.85	419.40	412.38	411.54	2.1
隐绿原酸	339.44	362.15	352.39	349.31	355.80	357.58	352.78	2.3
新绿原酸	346.80	361.58	369.38	362.83	368.04	363.50	362.02	2.4
对香豆酸	861.49	875.76	887.81	891.75	915.14	903.74	889.28	2.2
山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷	139.09	138.25	137.69	136.90	137.91	138.13	138.00	0.5
芦丁	132.81	134.77	136.12	136.90	139.67	135.27	135.92	1.8
槲皮素-3-O-芸香-7-O-葡萄糖苷	58.16	59.29	60.14	60.28	61.33	60.38	59.92	1.9

### (五) 方法的重复性

精密称取枸杞叶供试品粉末 6 份,按照已确定的供试品溶液制备方法和仪器方法,测定枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的含量 ( $\mu\text{g/g}$ )。结果表明(见表 7):除山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷均未检测到外,其余 6 种成分含量的 RSD 为 0.3%~1.1%,说明方法重复性良好,可以作为枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物及含量测定的分析方法。

表 7 方法的重复性

	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD (%)
绿原酸	372.68	377.97	375.12	375.79	376.46	375.43	375.58	0.42
隐绿原酸	26.48	26.88	26.67	26.77	26.84	26.75	26.73	0.49
新绿原酸	6.28	6.28	6.22	6.16	6.27	6.19	6.23	0.74
对香豆酸	7.79	7.64	7.63	7.62	7.86	7.66	7.70	1.19
芦丁	115.34	115.82	115.97	115.88	116.50	116.11	115.94	0.30
槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷	951.87	956.86	960.80	956.84	960.30	957.22	957.31	0.30

### (六) 方法的准确度

绿原酸回收率:取枸杞叶样品 50 mg 9 份,精密称定(精确到 0.0001 g),精密加入绿原酸对照品储备液 0.4 mL、0.8 mL、1.2 mL 各三份,再加 80%乙醇溶液,补足 10 mL,密塞,按照供试品溶液制备方法(2.3.3.6)得绿原酸回收率测定使用溶液。

槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷回收率: 取枸杞叶样品 50 mg 9 份, 精密称定 (精确到 0.0001 g), 精密加入槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷对照品储备液 1.05 mL、2.1 mL、3.15 mL 各三份, 再加 80%乙醇溶液, 补足 10 mL, 密塞, 按照供试品溶液制备方法 (2.3.3.6) 得槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷回收率测定使用溶液。

隐绿原酸回收率: 取枸杞叶样品 1000 mg 9 份, 精密称定 (精确到 0.0001 g), 精密加入隐绿原酸对照品储备液 0.95 mL、1.90 mL、2.85 mL 各三份, 再加 80%乙醇溶液, 补足 10 mL, 密塞, 按照供试品溶液制备方法 (2.3.3.6) 得隐绿原酸回收率测定使用溶液。

新绿原酸回收率: 取枸杞叶样品 1000 mg 9 份, 精密称定 (精确到 0.0001 g), 精密加入新绿原酸对照品储备液 0.4 mL、0.8 mL、1.2 mL 各三份, 再加 80%乙醇溶液, 补足 10 mL, 密塞, 按照供试品溶液制备方法 (2.3.3.6) 得新绿原酸回收率测定使用溶液。

芦丁回收率: 取枸杞叶样品 100 mg 9 份, 精密称定 (精确到 0.0001 g), 精密加入芦丁对照品储备液 0.305 mL、0.610 mL、0.915 mL 各三份, 再加 80%乙醇溶液, 补足 10 mL, 密塞, 按照供试品溶液制备方法 (2.3.3.6) 得芦丁回收率测定使用溶液。

对香豆酸回收率: 取枸杞叶样品 1000 mg 9 份, 精密称定 (精确到 0.0001 g), 精密加入对香豆酸对照品储备液 100  $\mu$ L、200  $\mu$ L、300  $\mu$ L 各三份, 再加 80%乙醇溶液, 补足 10 mL, 密塞, 按照供试品溶液制备方法 (2.3.3.6) 得对香豆酸回收率测定使用溶液。

山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷回收率: 精密称定 (精确到 0.0001 g), 精密取枸杞叶样品 100 mg 9 份, 加入山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷对照品储备液 0.3 mL、0.6 mL、0.9 mL 各三份, 再加 80%乙醇溶液, 补足 10 mL, 密塞, 按照供试品溶液制备方法 (2.3.3.6) 得山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷回收率测定使用溶液。

取上述回收率测定使用溶液, 按照已确定的仪器方法测定, 以供试品各酚酸类和黄酮类化合物峰面积带入线性方程进行成分含量计算。结果表明 (见表 8): 枸杞叶中绿原酸、槲皮素-3-O-芸香糖-7-O-葡萄糖苷、隐绿原酸、新绿原酸、芦丁、对香豆酸、山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷的回收率平均值分别为 101.1%、

100.0%、102.1%、103.9%、99.1%、101.4%、100.4%，均在 95%~110%之间；RSD 值分别为 1.8%、1.9%、1.7%、1.4%、1.3%、1.4%、1.7%，均<5.0%，方法准确度较高。因此，本试验所建立的枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的高效液相色谱法完全能满足分析检测的要求。

表 8 方法的准确度 (n=9)

	取样量 (mg)	测得量 ( $\mu\text{g}$ )	样品中量 ( $\mu\text{g}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}$ )	回收率 (%)	平均 (%)	RSD (%)
绿原酸	50.8	1301.3	898.7	409.0	99.5	101.1	1.8
	49.3	1254.8	816.4	409.0	102.4		
	50.2	1288.9	839.3	409.0	103.3		
	48.9	1736.8	866.5	817.9	103.1		
	50.5	1647.3	797.6	817.9	102.0		
	51.3	1666.8	814.6	817.9	102.1		
	49.4	2044.8	834.9	1226.9	99.2		
	49.3	2050.0	856.7	1226.9	98.4		
	50.8	2021.0	786.5	1226.9	100.4		
槲皮素-3-O- 芸香糖-7-O- 葡萄糖苷	49.5	3536.9	2405.5	1052.7	102.3	100.0	1.9
	50.5	3500.3	2347.3	1052.7	102.9		
	49.3	3505.7	2388.7	1052.7	101.9		
	48.9	4494.6	2407.4	2105.5	99.6		
	51.0	4489.9	2458.5	2105.5	98.4		
	50.8	4480.8	2383.6	2105.5	99.8		
	48.9	5347.6	2293.7	3158.2	98.1		
	49.7	5365.0	2306.4	3158.2	98.2		
	49.2	5405.4	2327.5	3158.2	98.5		
隐绿原酸	993.7	290.1	189.6	948.1	102.0	102.1	1.7
	1003.8	299.4	192.4	948.1	104.3		
	984.5	297.8	203.5	948.1	99.8		
	1005.6	375.8	190.4	1896.2	98.9		
	997.6	377.2	180.9	1896.2	101.8		
	992.9	380.4	179.8	1896.2	103.0		
	1003.7	497.8	200.4	2844.3	102.7		
	989.3	471.1	174.0	2844.3	102.8		
	1003.7	498.3	197.3	2844.3	103.4		
新绿原酸	998.3	118.0	73.9	398.2	103.8	103.9	1.4
	1003.7	123.9	79.4	398.2	104.0		
	989.3	113.9	71.7	398.2	102.2		
	1007.3	159.3	78.3	796.4	100.9		
	997.8	168.2	81.0	796.4	104.7		
	993.4	167.3	78.4	796.4	105.9		
	989.3	208.3	80.5	1193.6	104.2		

	1003.8	202.0	74.9	1193.6	104.0		
	1008.3	204.6	75.8	1193.6	104.9		
芦丁	99.58	935.0	653.3	305.2	97.6		
	99.34	937.6	632.4	305.2	100.0		
	98.97	948.7	630.4	305.2	101.4		
	100.65	1253.9	654.3	610.4	99.1		
	99.73	1249.7	643.8	610.4	99.6	99.1	1.3
	98.83	1213.9	628.3	610.4	98.0		
	99.48	1512.8	633.7	915.6	97.6		
	100.24	1543.8	643.6	915.6	99.0		
	99.34	1533.4	623.2	915.6	99.6		
对香豆酸	998.9	305	203	99.0	100.8		
	994.8	304	195	99.0	103.3		
	1003.8	308	204	99.0	101.53		
	1012.7	405	212	199.0	98.6		
	1002.9	407	208	199.0	100.1	101.4	1.4
	996.2	401	199	199.0	100.8		
	1009.2	512	201	298.0	102.5		
	993.5	505	192	298.0	103.1		
	1006.8	506	199	298.0	101.8		
山奈酚-3-O-葡 萄糖鼠李糖苷	99.39	302.0	0.00	298.2	101.3		
	98.74	300.4	0.00	298.2	100.7		
	100.36	302.9	0.00	298.2	101.6		
	99.84	588.4	0.00	596.4	98.7		
	98.33	591.5	0.00	596.4	99.2	100.4	1.7
	99.22	579.5	0.00	596.4	97.2		
	100.30	908.6	0.00	894.6	101.6		
	99.36	903.5	0.00	894.6	101.0		
	100.38	916.3	0.00	894.6	102.4		

### (七) 方法的稳定性

取混合标准使用溶液和供试品溶液，按照已确定的仪器方法间隔 0 h、4 h、8 h、12 h、16 h 进样，记录各成分峰面积及 24 h 内各峰面积的 RSD。结果表明（见表 9）：混合标准使用溶液放置 24 h，7 种成分的 RSD 值为 0.2%~1.0%；供试品溶液放置 24 h，除山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷在各时间段均未检出外，其余 6 种成分的 RSD 值为 0.3%~2.8%，均<3%。表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

表 9 方法的稳定性

时间 (h)	新绿原 酸	绿原酸	隐绿原 酸	槲皮素-3-O-芸 香-7-O-葡萄糖 苷	对香 豆酸	芦丁	山奈酚-3-O- 葡萄糖鼠李 糖苷
混 0	278.0	313.8	273.4	45.6	691.8	104.2	139.1

合	4	274.8	314.5	267.3	45.5	684.6	104.2	138.3
标	8	273.8	313.3	267.1	45.4	682.9	103.7	137.7
准	12	274.6	313.2	267.5	45.4	687.2	104.0	136.9
使	16	274.4	313.1	266.8	45.3	687.8	103.9	137.9
用	24	272.9	311.3	265.5	45.3	685.2	103.6	138.13
溶	平均值	274.7	313.2	267.9	45.4	686.6	103.9	138.0
液	RSD (%)	0.6	0.3	1.0	0.3	0.5	0.2	0.4
供	0	84.8	1808.6	209.4	783.0	28.0	201.5	
试	4	80.3	1802.5	206.3	778.5	28.6	200.3	/
品	8	80.7	1806.8	207.0	782.4	27.3	202.3	/
溶	12	83.6	1793.2	204.9	774.8	28.0	199.6	/
液	16	82.7	1810.1	207.5	782.9	26.4	202.4	/
	24	80.7	1806.8	207.0	782.4	27.3	202.3	/
	平均值	82.1	1804.7	207.0	780.7	27.6	201.4	/
	RSD (%)	2.3	0.3	0.7	0.4	2.8	0.6	/

注：“/”表示未检出

#### (八) 方法的检测限和定量限

取各对照品储备溶液，逐级稀释后，按照确定的仪器方法进行样检测，分别以信噪比 3:1、10:1 确定为检测限和定量限。结果表明（见表 10）：7 种成分定量限最低为新绿原酸 0.045  $\mu\text{g/mL}$ ，最高为山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷 0.161  $\mu\text{g/mL}$ ；7 种成分检测限最低为新绿原酸 0.015  $\mu\text{g/mL}$ ，最高为山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷 0.053  $\mu\text{g/mL}$ 。以上数据表明该方法检测枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物具有较高的灵敏度。

表 10 检测限和定量限结果

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

#### (九) 耐用性

本试验对 2 种仪器、2 种色谱柱、3 种流速、3 种柱温进行了耐用性考察。

仪器I: Agilent 1260II 高效液相色谱仪

仪器II: Waters e2695 高效液相色谱仪

色谱柱I: COSMOSIL®C18 色谱柱 (5 μm, 4.6 mm×250 mm)

色谱柱II: XBridge®C18 色谱柱 (5 μm, 4.6 mm×250 mm)

柱温I: 38 °C

柱温II: 40 °C

柱温III: 42 °C

流速I: 0.9 mL/min

流速II: 1.0 mL/min

流速III: 1.1 mL/min

结果表明 (见表 11、12 和 13): 2 种仪器、2 种色谱柱、3 种流速、3 种柱温分离得到的供试品溶液色谱峰分离度良好, 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、芦丁峰面积的 RSD 均小于 5%, 说明本法耐用性良好。

表 11 色谱柱和色谱仪对峰面积耐用性

仪器	色谱柱	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	山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷
Agilent 1260	COSMOSIL®C18	78.0	1819.5	207.2	783.2	27.4	202.2	/
	XBridge®C18	84.8	1808.6	209.4	783.0	29.0	201.5	/
Waters e2695	COSMOSIL®C18	80.3	1802.5	206.3	778.5	28.6	200.3	/
	XBridge®C18	79.3	1822.0	205.2	778.8	28.5	199.3	/
平均		80.6	1813.1	207.0	780.9	28.4	200.9	
RSD %		3.2	0.4	0.7	0.3	2.1	0.5	

表 12 柱温对对峰面积耐用性

柱温 (°C)	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	山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷
38	80.3	1812.8	206.6	780.1	28.5	199.8	/
40	82.7	1810.1	207.5	782.9	26.4	202.4	/

42	79.0	1813.8	202.9	779.6	28.0	201.0	/
平均	80.7	1812.2	205.7	780.9	27.7	201.1	
RSD%	1.9	0.1	1.0	0.2	3.2	0.5	

表 13 流速对峰面积耐用性

流速 (mL/min)	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	山奈酚-3-O-葡萄糖鼠李糖苷
0.9	83.6	1793.2	204.9	774.8	29.0	199.6	/
1.0	82.7	1810.1	207.5	782.9	26.4	202.4	/
1.1	80.7	1806.8	207.0	782.4	27.3	202.3	/
平均	82.4	1803.4	206.5	780.0	27.6	201.4	
RSD%	1.5	0.4	0.6	0.5	3.9	0.7	

注：“/”表示未检出

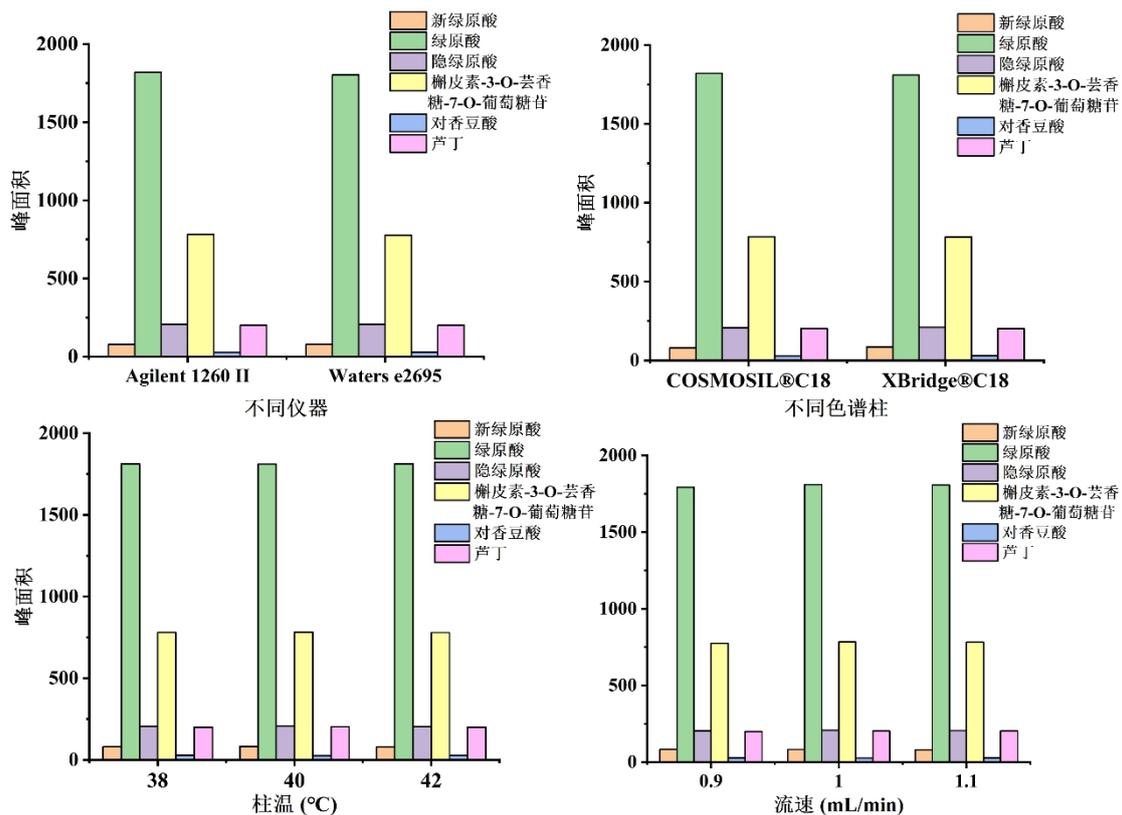


图 7 不同仪器、色谱柱、柱温和流速对酚酸类和黄酮类化合物含量测定的影响

### 3 结果计算

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：

$$\text{含量}\% = \frac{A_X \times C_R}{A_R \times C_X(1 - C_m)} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式 (1) 中：

$A_X$ ——试样中各待测成分的峰面积。

$C_R$ ——标准品溶液中各待测成分的浓度，单位为克每毫升 (g/mL)。

$A_R$ ——标准品溶液中各待测成分的峰面积。

$C_X$ ——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。

#### 4 与有关的现行法律、法规和国家标准、行业标准、地方标准的关系

在标准的制订过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章等，严格执行强制性国家标准和行业标准。与相关的各种基础标准相衔接，遵循了政策性和协调同一性的原则。本标准的顺利实施，有助于检测枸杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的含量。

#### 5 重大意见分歧的处理结果和依据

无。

#### 6 提出标准实施的建议

本团体标准建议为推荐性标准推广应用。通过实施本标准，将为杞叶中酚酸类和黄酮类化合物的分析提供技术支撑，为逐步完善检测方法体系奠定基础。

#### 7 其他应予说明的事项

无。