**TB**

**团 体 标 准**

 T/ NAIA XXX—XXXX

**枸杞中酚酸化合物含量的测定 高效液相色谱法**

Determination of phenolic acid compounds Content in *Lycium barbarum* L. by 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**

本标准按照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》的规定编写。

本标准由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本标准起草单位：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所、宁夏化学分析测试协会。

本标准主要起草人：杨春霞、张 艳、闫 玥、开建荣、牛 艳、王彩艳、王晓菁、李 冬、王晓静、张小飞。

枸杞中酚酸化合物含量的测定 高效液相色谱法

1. 范围

本标准规定了枸杞中9种酚酸化合物含量的高效液相色谱测定方法。

本标准适用于枸杞中没食子酸、咖啡酸、阿魏酸、原儿茶醛、儿茶素、绿原酸、丁香酸、香豆酸、表儿茶素含量的测定。

1. 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，仅所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

1. 原理

枸杞中的酚酸类化合物用30-40%乙醇回流提取，样液经酸化后用乙酸乙酯萃取，有机层浓缩复溶定容，微孔滤膜过滤，高效液相色谱法测定，外标法定量。

1. 试剂

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

* 1. 无水乙醇（CH3CH2OH）：优级纯。
	2. 乙腈（CH3CN）：色谱纯。
	3. 盐酸（HCl）：优级纯。
	4. 甲醇（CH3OH）：色谱纯。
	5. 氢氧化钠（NaOH）：优级纯。
	6. 磷酸溶液（H3PO4）：优级纯。
	7. 乙酸乙酯（CH3COOCH2CH3）：分析纯。
	8. 提取剂：乙醇+水=（30~40）+（70~60）（V+V），取30 mL或40mL乙醇、 70mL或60mL水混匀。
	9. 10%盐酸溶液：取381 mL超纯水，加入 37%盐酸119 mL，混匀。
	10. 没食子酸标准品（CAS 149-91-7，HPLC ≥ 98%）。
	11. 香豆酸标准品（CAS 500-05-0，HPLC ≥ 98%）。
	12. 原儿茶醛标准品（CAS 139-85-5，HPLC ≥98%）。
	13. 儿茶素标准品（CAS 154-23-4，HPLC ≥ 98%）。
	14. 绿原酸标准品（CAS 327-97-9，HPLC ≥ 98%）。
	15. 咖啡酸标准品（CAS 331-39-5，HPLC ≥ 98%）。
	16. 表儿茶素标准品（CAS 490-46-0，HPLC ≥98%）。
	17. 丁香酸标准品（CAS 530-57-4，HPLC ≥98%）。
	18. 阿魏酸标准品（HPLC98≥%）。
	19. 酚酸标准储备液：分别精密称取5.0 mg（精确到0.1 mg）没食子酸、香豆酸、原儿茶醛、儿茶素、绿原酸、咖啡酸、表儿茶素、丁香酸、阿魏酸标准品，用甲醇溶解到10 mL棕色容量瓶中， 配制成浓度为0.5 mg/mL，于-20 ℃冰箱中贮存。
1. 仪器和设备
	1. 高效液相色谱仪：配紫外检测器。
	2. 组织捣碎机。
	3. 分析天平：感量0.01 g和0.0001g。
	4. 振荡器：带有温度控制。
	5. 水浴锅：0-100 ℃。
	6. 球型冷凝回流管。
	7. 超纯水机。
	8. 旋转蒸发仪：带有温度控制。
	9. 0.45 µm有机相微孔滤膜。
2. 试样的制备

枸杞样品于-18 ℃冷冻冰箱中保存。试验时将样品取出，采用四分法，混合均匀后缩分至100 g，立即用高速万能粉碎机粉碎，置于样品瓶中，-18 ℃冷冻备用。

1. 试样的提取

取枸杞粉末以体积浓度为30-40 %的乙醇溶液按体积分数为样品总重量的10倍量进行提取，室温下振荡提取2h，振荡液于水浴中回流1.5-2 h，回流后的样液趁热过滤到浓缩瓶中过滤，残留物用乙醇洗涤2-3次，乙醇用量控制在2-3 mL，合并收集提取液，用提取剂定容至50 mL棕色容量瓶中。提取液一并于100 mL旋转蒸发瓶中，在40℃减压浓缩，蒸馏后用浓度为10 %的盐酸调节pH值为2.5-3.0。酸化液中加入20 mL乙酸乙酯萃取，分离有机溶剂层，然后经减压浓缩去除残留的乙酸乙酯，用 2 mL无水乙醇复溶后过0.45μm微孔滤膜，样液供上机测定。

1. 仪器参考条件
	1. 色谱柱：月旭Ultimate ®LP-C18型商品柱（25 cm×4 cm I.D.），或相当者；
	2. 流速：1.0 mL/min；
	3. 柱温：30.0 ℃。
	4. 检测波长：280 nm。
	5. 进样量：10 μL；
	6. 流动相：见表1。

 表1 流动相梯度洗脱程序

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 时间 / min | 流速mL/min | A相（0.1%磷酸水溶液）% | B相（乙腈）% |
| 0 | 1.0 | 95 | 5 |
| 5 | 1.0 | 95 | 5 |
| 65 | 1.0 | 70 | 30 |
| 66 | 1.0 | 95 | 5 |
| 80 | 1.0 | 95 | 5 |

1. 标准曲线的绘制

用甲醇将酚酸标准储备液（4.11）按不同倍数稀释，制备系列混合酚酸标准工作液，各酚酸浓度依次为0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、10.0、20.0 mg/L，以质量浓度*x*（mg/L）为横坐标，以相应的响应峰面积y为纵坐标绘制标准曲线（各酚酸标准色谱图见图A.1）。

1. 测定

将待测液上机测定，根据标准曲线得到待测液中各酚酸的浓度，以保留时间定性，色谱峰面积定量，试样溶液中酚酸响应值均应在标准曲线范围内。同时做空白试验。

1. 结果计算

枸杞样品中酚酸的含量以质量分数w计，数值以毫克每千克（mg/kg）计，按公式（1）计算：

 ……………………………………（1）

式中：

  *p* —样液中酚酸测定质量浓度，单位为毫克/升，mg/L；

V—样品最终定容体积，单位为毫升，mL;

*m*—称取样品的质量，单位为克，g；

*n*—稀释倍数

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

1. 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测试结果的绝对差值不得超过算术平均值的20%。

13其它

当枸杞样品为2.0 g 时，没食子酸、咖啡酸、原儿茶醛、绿原酸、丁香酸、香豆酸、表儿茶素定量限为1.0 mg/kg，儿茶素定量限为2.0 mg/kg，阿魏酸定量限为2.5 mg/kg。

14色谱图

酚酸标准溶液色谱图见附录A.1。

1. （资料性附录）
酚酸标准溶液色谱图

1、没食子酸；2、香豆酸；3、原儿茶醛；4、儿茶素；5、绿原酸；6、咖啡酸；7、丁香酸；8、表儿茶素；9、阿魏酸；