



中华人民共和国国家标准

GB/T ×××××—××××

植物中绿原酸类物质的测定 高效液相色谱法

Determination of chlorogenic acids in plants—
High-performance liquid chromatography

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会(SAC/TC 387)提出并归口。

本标准起草单位:深圳市计量质量检测研究院、深圳市农产品质量安全检验检测中心、上海市计量测试技术研究院、河南顺鑫检测科技有限公司、惠州市食品药品检验所、甘肃省商业科技研究所有限公司、深圳职业技术学院。

本标准主要起草人:张协光、杨俊、朱丽、肖伟敏、但琨、董珊、刘冬、邓梦雅、彭祖茂、杨雪、钱滢文、严虞虞、张彦军、黄秀丽、刘刚、王杰斌、黎海华、杨森、李兰英、杨国武。

植物中绿原酸类物质的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了植物中 6 种绿原酸类物质(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C)的测定方法——高效液相色谱法。

本标准适用于植物的根、茎、叶、花、果实、种子等样品中的 6 种绿原酸类物质(新绿原酸、绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C)的测定。

2 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

3 原理

样品经 50% 甲醇水溶液超声提取, C_{18} 反相色谱柱分离, 在波长 327 nm 处用高效液相色谱仪紫外检测器检测, 相对保留时间定性, 外标法定量。

4 试剂或材料

如无特别说明, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 甲醇(CH_3OH): 色谱纯。
- 4.2 乙腈(CH_3CN): 色谱纯。
- 4.3 甲酸($HCOOH$): 色谱纯。
- 4.4 新绿原酸($C_{16}H_{18}O_9$, CAS 号: 906-33-2), 纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.5 绿原酸($C_{16}H_{18}O_9$, CAS 号: 327-97-9), 纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.6 隐绿原酸($C_{16}H_{18}O_9$, CAS 号: 905-99-7), 纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.7 异绿原酸 A($C_{25}H_{24}O_{12}$, CAS 号: 2450-53-5), 纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.8 异绿原酸 B($C_{25}H_{24}O_{12}$, CAS 号: 14534-61-3), 纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.9 异绿原酸 C($C_{25}H_{24}O_{12}$, CAS 号: 32451-88-0), 纯度 $\geq 95\%$ 。
- 4.10 0.1% 甲酸水溶液: 准确吸取 1 mL 甲酸(4.3)于 1 L 容量瓶中, 用水溶解并定容至刻度, 混匀。
- 4.11 50% 甲醇水溶液: 准确量取 250 mL 甲醇(4.1)和 250 mL 水, 混匀, 作为提取溶剂。

4.12 标准储备液(2.50 mg/mL):分别准确称取绿原酸、新绿原酸、隐绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C 各 0.025 g(精确至 0.0001 g),用甲醇(4.1)溶解并定容至 10 mL。混匀后转入棕色玻璃容器中,4 °C 冰箱保存,保存期三个月。

4.13 标准中间液(100 μg/mL):分别准确吸取以上标准储备液(4.12)各 1.00 mL 于同一 25 mL 容量瓶中,用 50%甲醇水溶液稀释至刻度,混匀。临用前配制。

4.14 标准系列工作液:分别准确吸取标准中间液(4.13)0.500 mL、2.50 mL 于 100 mL 容量瓶中,用 50%甲醇水溶液(4.11)定容至 100 mL;再分别准确吸取标准中间液(4.13)1.00 mL、2.50 mL、5.00 mL 于 10 mL 容量瓶中,用 50%甲醇水溶液(4.11)定容至 10 mL。得到标准系列工作的浓度分别为 0.500 μg/mL、2.50 μg/mL、10.0 μg/mL、25.0 μg/mL、50.0 μg/mL。临用前配制。

4.15 微孔滤膜(NY): 0.45 μm。

5 仪器设备

5.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器。

5.2 电子天平:感量 0.1 g 和 0.1 mg。

5.3 涡旋振荡器。

5.4 超声波振荡器。

5.5 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

6 样品

6.1 样品的制备

6.1.1 含水量较低的固体样品:称取 100 g 样品,粉碎均匀,制得均匀一致的样品,冰箱中冷藏保存。

6.1.2 新鲜水果和蔬菜类:称取 500 g 样品,粉碎均质,制得均匀一致的匀浆,冰箱中冷冻保存。

6.2 样品的提取

准确称取 2 g(精确到 0.000 1 g)样品于 50.0 mL 离心管中,加入 30 mL 50%甲醇水溶液(4.11),超声提取 30 min,用 50%甲醇水溶液(4.11)定容至刻度,混匀,离心。经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后待测。

7 试验步骤

7.1 色谱参考条件

7.1.1 色谱柱:C₁₈柱,5 μm,4.6 mm×250 mm(或相当型号色谱柱)。

7.1.2 流动相:A:乙腈,B:0.1%甲酸-水溶液,淋洗梯度见表 1。

7.1.3 流速:1.0 mL/min。

7.1.4 柱温:30 °C。

7.1.5 检测波长:327 nm。

7.1.6 进样量:10 μL 。

表 1 高效液相色谱洗脱梯度参考条件

时间 min	流速 mL/min	流动相 A %	流动相 B %
0.0	1.0	10	90
5.0	1.0	10	90
18.0	1.0	40	60
18.5	1.0	80	20
20.0	1.0	80	20
21.0	1.0	10	90

7.2 标准曲线绘制

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中,测定相应的峰面积,以标准工作液的浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。标准品液相色谱图参见附录 A 的图 A.1。

7.3 样品测定

将样品溶液(6.2)注入高效液相色谱仪中,得到相应的峰面积,根据标准曲线得到待测液中绿原酸类各物质的浓度。样品液相色谱图可参考图 A.2 金银花样品中绿原酸类物质的液相色谱图。

注:必要时,对待测液进行稀释。

8 分析结果的表述

样品中 6 种绿原酸类物质的含量按式(1)计算:

$$X_i = \frac{c_i \times V \times f}{m_i} \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X_i ——样品中各组分的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c_i ——由标准曲线得到样品溶液中各组分的含量,单位为微克每毫升($\mu\text{g}/\text{mL}$);

V ——样品溶液定容体积,单位为毫升(mL);

f ——试液的稀释倍数;

m_i ——样品质量,单位为克(g)。

计算结果保留三位有效数字。

9 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得超过算术平均值的 10%。

10 其他

方法的检出限为 1.5 mg/kg,定量限为 5 mg/kg。

附录 A

(资料性附录)

6 种绿原酸类物质标准品及金银花样品的液相色谱图

A.1 6 种绿原酸类物质标准品的液相色谱图见图 A.1。

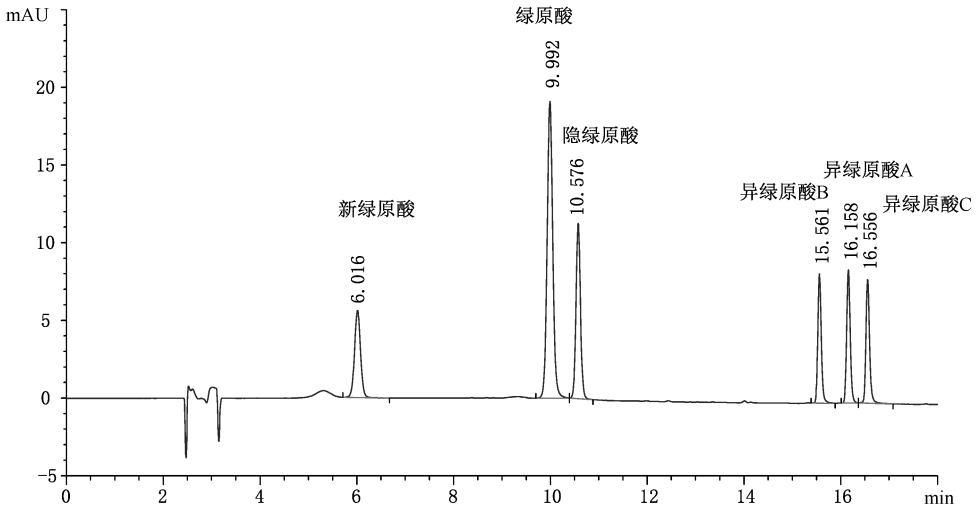


图 A.1 6 种绿原酸类物质标准品的液相色谱图

A.2 金银花样品中绿原酸类物质的液相色谱图见图 A.2。

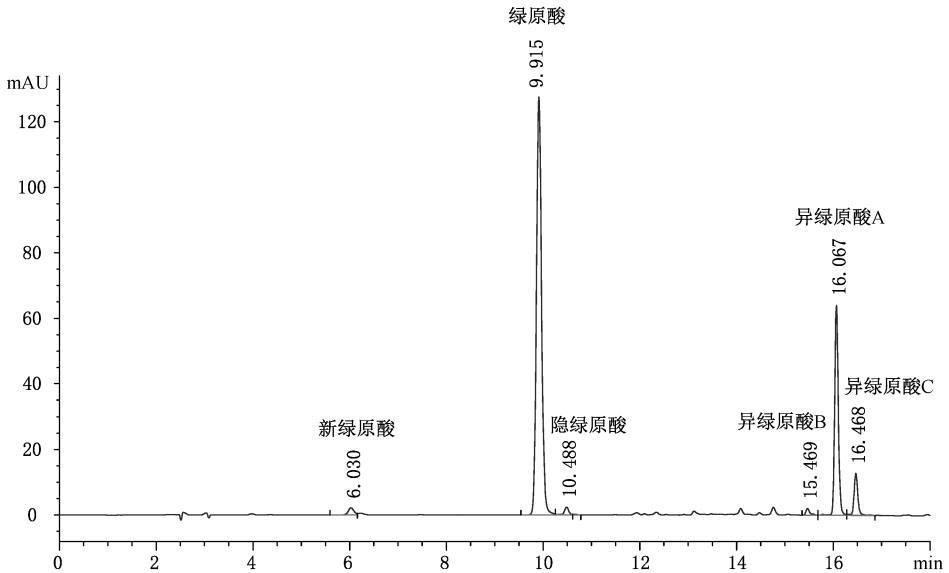


图 A.2 金银花样品中绿原酸类物质的液相色谱图