|  |  |
| --- | --- |
| ICS  | 65.080 |
| CCS  |

|  |
| --- |
|  |

G 21 |

团体标准

T/GXAF XXXX—XXXX

黄花蒿中青蒿素含量的测定

液相色谱-三重四级杆质谱法

Detection of Artemisinin in artemisia annua

Liquid chromatography - mass spectrometry

202X – XX - XX发布

202X - XX - XX实施

       发布

1. 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西大学提出。

本文件由广西肥料协会归口。

本文件起草单位：广西大学、广西西大检测有限公司、广西壮族自治区分析测试研究中心、广西壮族自治区产品质量检验研究院。

本文件主要起草人：范晓苏、裴根、韦婷彦、周权能、韦英亮、黄一帆、石梁稳、黄宏飞、覃雪、路丹、梁琼月、沈方科、王士伟、潘扬昌、陈桂鸾、梁鑫佳、唐小丽、王玉清、韦刚。

黄花蒿中青蒿素含量的测定 液相色谱-三重四级杆质谱法

* 1. 范围

本文件规定了黄花蒿中青蒿素含量的液相色谱-三重四级杆质谱测定方法。

本文件适用于黄花蒿中青蒿素含量的测定，其它植物可参照执行。

* 1. 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

* 1. 原理

用乙腈超声提取试样中的青蒿素，采用基质分散固相萃取剂净化，液相色谱-三重四级杆质谱进行测定，外标法定量。

* 1. 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

试剂

4.1.1 乙腈：色谱纯

4.1.2 甲酸：色谱纯

4.1.3 N-丙基乙二胺(PSA)填料：粒径 40~60μm

4.1.4 十八烷基硅烷键合相吸附剂(C18)：粒径 40~60μm

溶液配制

4.2.1 0.1%甲酸水溶液：准确吸取 1.0 mL 甲酸和于1L容量瓶中，用水溶解并稀释定容至1L。

标准品

4.3.1 青蒿素标准品（Artemisinin, C15H22O5,CAS: 63968-64-9）:纯度>99％。

标准溶液配制

4.4.1 青蒿素标准储备液：准确称取适量的青蒿素标准品，用乙腈溶解并稀释配制成 100 μg /mL 的标

准储备液，-20℃以下保存。

4.4.2 青蒿素标准中间液：根据需要，用乙腈稀释成适当浓度的标准中间液，4℃以下保存。

材料

4.5.1 微孔滤膜：0.22μm，有机相型。

* 1. 仪器和设备
	2. 液相色谱-三重四级杆质谱仪：配有电喷雾（ESI）离子源。
	3. 离心机：4000 r/min。
	4. 分析天平：感量 0.0001 g。
	5. 超声波。
	6. 烘箱。
	7. 试样的制备与保存

经烘箱40℃烘干、粉碎机粉碎，过60目分样筛，备用。

* 1. 分析步骤

7.1 提取

 称取样品0.1g（精确至0.001g）于50mL聚丙烯塑料离心管中,加入25mL乙腈，室温振荡3min， 30℃超声30min，4000r/min离心5min，取上清液。

7.2 净化

取1 mL上述上清液于预先称有20mg PSA和50mg C18的2mL聚丙烯塑料离心管中，振荡1 min，在4000 r/min离心5min。取上清液过0.22μm有机微孔滤膜。滤液供液相色谱-三重四级杆质谱测定。

7.3 测定

7.3.1 高效液相色谱参考条件

a） 色谱柱： BEH C18 2.1×100mm 粒度1.7μm，或性能相当者。

b） 流动相：A：0.1％甲酸水溶液，B：乙腈。

c） 流速：300μL/min，梯度洗脱程序见表1。

表 1 梯度洗脱程序表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 梯度时间/min | 流动相 A /% | 流动相 B/% |
| 0 | 80 | 20 |
| 4.5 | 5 | 95 |
| 6 | 5 | 95 |
| 6.1 | 80 | 20 |
| 8 | 80 | 20 |

d） 柱温：40℃。

e） 进样量：2μL。

7.3.2 质谱参考条件

参数条件见附录 A

7.3.2 标准曲线的配置

 将标准中间液用乙腈稀释至 5.0 ng/mL、10.0 ng/mL 、20.0ng/mL、30.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL做工作曲线，宜现用现配。

7.3.3 定量测定

 根据试样中被测物的含量情况，选取待测物的响应值在仪器线性响应范围内的浓度进行测定，如

超出仪器线性响应范围应进行稀释。并且保证标准工作液和待测液中的青蒿素响应值均应在仪器线性响应范围内。在上述色谱条件下青蒿素的参考保留时间为 3.8 min，标准溶液的多反应监测色谱图见附录B。

7.3.4 定性确证

 按照液相色谱－三重四级杆质谱条件测定样品和标准工作溶液，如果检测的质量色谱峰保留时间与标准品一致，定性离子对的相对丰度是用相对于最强离子丰度的强度百分比表示，应当与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致，相对丰度允许偏差不超过表2规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物。

表2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 相对丰度（基峰） | >50% | >20%至50% | >10%至20% | ≤10% |
| 允许的相对偏差 | ±20% | ±25% | ±30% | ±50% |

7.4 空白实验

 除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

* 1. 结果计算和表述

液相色谱-三重四级杆质谱法测定试样中青蒿素采用标准曲线法定量，标准曲线法定量结果按（1）式计算，计算结果应扣除空白值。

$ω=\frac{C×V}{m×1000}$ …………………………（1）

式中：

ω———试样中青蒿素的含量，单位为微克每克（μg/g）

C———样液上机得到的青蒿素浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）

V———样液最终定容体积，单位为毫升（mL）

m———试样称样量，单位为克（g）

1000——换算系数

* 1. 定量限和回收率
		1. 定量限

本方法定量限为 0.75μg/g

* + 1. 回收率

回收率的实验数据(在不同添加浓度范围内）见表3

表3 青蒿素在不同添加浓度下的回收率范围

|  |  |
| --- | --- |
| 添加浓度/（μg/g） | 回收率范围／％ |
| 12.5 | 86.8~108.7 |
| 37.5 | 96.2~111.5 |
| 75.0 | 106.5-109.8 |

附录A

（资料性附录）

青蒿素质谱分析参考条件

1. 扫描方式：正离子；
2. 离子源温度：105 ℃；

c) 电喷雾电压：4800 V；

d) 碰撞气流量：0.75 mL/min；

e) 去溶剂气流量：6 L/min；

f) 挡板电压：700V；

g) 去溶剂气温度：480 ℃;

h) 青蒿素定量离子对、定性离子对、锥孔电压、碰撞气能量见表A.1。

表 A.1 青蒿素定量离子对、定性离子对、锥孔电压、碰撞气能量

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 组分名称 | 离子对m/z | 锥孔电压V | 碰撞气能量eV |
| 青蒿素 | 定量离子对 | 283.05->265.05 | 45 | 7 |
| 定性离子对 | 283.05->247.05 | 45 | 7 |

非商业性声明：附录表A.1所列参数是在 EXPEC 5210 质谱仪完成的，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同厂家和型号的仪器。

附录B

（资料性附录）

青蒿素标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图





图B.1 青蒿素标准溶液的多反应监测色谱图