

ICS 67.050
B20

团体标准

T/ NAIA XXX—2023

枸杞中芦丁、山奈酚和异鼠李素的测定 高效液相色谱-质谱法

Determination of Rutinum, Kaempferol and Isorhamnetin in Lycium barbarum L.

by LC-MS/MS

2023-XX-XX 发布

2023-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》规定编写。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：宁夏回族自治区食品检测研究院（国家市场监管重点实验室（枸杞和葡萄酒质量安全））、宁夏工商职业技术学院、宁夏回族自治区食品质量监督检验二站、宁夏化学分析测试协会

本文件主要起草人：

本文件于 2023 年 XX 月 XX 日首次发布。

枸杞中芦丁、山奈酚和异鼠李素的测定 高效液相色谱-质谱法

1 范围

本文件规定了枸杞中芦丁、山奈酚和异鼠李素的高效液相色谱质谱检测方法。
本文件适用枸杞中芦丁、山奈酚和异鼠李素的测定和确证。

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实验方法

NY/T 3950 植物源性食品中 10 种黄酮类化合物的测定 高效液相色谱-串联质谱法

T/NAIA 050 枸杞及其制品中二氢槲皮素的测定 高效液相色谱法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法提要

试样经甲醇溶液超声提取后，经反相色谱柱分离，以保留时间定性，供高效液相色谱-质谱仪测定和确证，外标法定量。

5 试剂和材料

本方法所用的试剂，除另有规定外，均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。

5.1.2 甲醇：色谱纯。

5.1.3 甲酸：优级纯。

5.1.4 0.1%甲酸水溶液：1mL 甲酸用水定容到 1000mL。

5.1.5 80%甲醇溶液：将甲醇和水按 80+20 的体积比混合均匀。

5.2 标准品

5.2.1 标准品：芦丁（Rutinum，CAS 号 153-18-4， $C_{27}H_{30}O_{16}$ ）、山奈酚（Kaempferol，CAS 号 520-18-3， $C_{15}H_{10}O_6$ ）、异鼠李素（Isorhamnetin，CAS 号 480-19-3， $C_{16}H_{12}O_7$ ），纯度均 $\geq 98\%$ 。

5.2.2 标准储备液（1.0mg/mL）：分别准确称取芦丁、山奈酚、异鼠李素标准品 10mg（准确至 0.1mg），于 10mL 容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，4℃保存。

5.2.3 标准混合中间液（100 μ g/mL）：分别准确吸取芦丁、山奈酚、异鼠李素标准储备液各 1.00mL 于 10mL 容量瓶中，用初始流动相定容。

5.2.4 标准混合使用液：根据需要，用空白样品基质溶液配制适当浓度的标准混合工作液，临用现配。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平：感量 0.1mg 和 0.01g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 离心机：最大转速 10000r/min。

6.5 超声波发生器。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取代表性样品研磨均匀分装，密闭常温或冷藏保存。

7.2 试样的提取

称取试样 1.0g（精确到 0.01g）置于 50mL 离心管中，加入 80%甲醇溶液 10mL，超声提取 10min，8000r/min 离心 5min，上清液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤后，上机待测。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件

7.3.1.1 色谱柱：ZORBAX Eclipse Plus C18，2.1 mm×100 mm，粒径 3.5 μm 或性能相当者。

7.3.1.2 柱温：40℃。

7.3.1.3 流动相：A：0.1%甲酸水，B：乙腈；梯度洗脱见表 1。

7.3.1.4 流速：0.30mL/min。

7.3.1.5 进样量：10 μL。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流速/ (mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.30	90	10
2.00	0.30	90	10
4.00	0.30	70	30
6.00	0.30	50	50
8.00	0.30	20	80
10.00	0.30	20	80
10.10	0.30	90	10
12.00	0.30	90	10

7.3.2 质谱参考条件

7.3.2.1 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

7.3.2.2 扫描方式：负离子扫描。

7.3.2.3 检测方式：多反应监测（MRM）。

7.3.2.4 离子源温度：325℃。

7.3.2.5 气体流速：6L/min。

7.3.2.6 雾化器压力：45psi。

7.3.2.7 鞘气温度：350℃。

7.3.2.8 鞘气流速：11L/min。

7.3.2.9 毛细管电压：3500V。

7.3.2.10 喷嘴电压：500V。

7.3.2.11 定性离子对、定量离子对、碰撞能量等参数参见附录 A。

7.4 定量测定

根据样液中被测物含量情况，选定浓度相近的基质混合标准工作溶液，基质混合标准工作溶液和待测样液中被测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。基质混合标准工作溶液与样液等体积进样测定。标准溶液及样液均按 7.3.1 和 7.3.2 规定的条件进行测定，如果样液中与标准溶液相同的保留时间有峰出现，则对其进行确证，芦丁、山奈酚和异鼠李素的参考保留时间见表 2。芦丁、山奈酚和异鼠李素标准品的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 B，采用基质溶液标准曲线外标法定量。

表 2 参考保留时间

被测物名称	保留时间/（min）
芦丁	4.651
异鼠李素	6.745
山奈酚	7.842

7.5 定性测定

经确证分析被测物质量色谱峰保留时间与标准物质相一致，并且在扣除背景后的样品谱图中，所选择的离子均出现。同时所选择离子的丰度比与标准物质相关离子的相对丰度一致，相似度在允许偏差之内（见表 3），则可判定样品中存在对应的被测物。

表 3 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%至 50%	>10%至 20%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.6 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

8 分析结果的表述

试样中芦丁、山奈酚和异鼠李素含量按式（1）进行计算：

$$X = \frac{(c - c_0) \times v \times 1000}{m \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X ——样本中各种非食用着色剂含量，单位为毫克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C ——测定溶液浓度，单位为微克每毫升（ ng/mL ）；

C_0 ——空白基质溶液浓度，单位为微克每毫升（ ng/mL ）；

V ——样本溶液提取溶液体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样质量，单位为克（ g ）。

注：计算结果应扣除空白值，测定结果用平行测定的算数平均值表示，保留两位有效数字。

9 精密度

在重复性测定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 定量限

本方法的芦丁、山奈酚、异鼠李素定量限为 $0.02\text{mg}/\text{kg}$ 。

附录 A
(资料性附录)

表 A.1 芦丁、山奈酚和异鼠李素的质谱参数

被测物名称	母离子(m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)
芦丁	609.1	300.5*	120	25
		271.6	120	25
山奈酚	299.1	151.0*	80	25
		163.8	80	25
异鼠李素	315.2	300.2*	135	14
		151.0	135	14

附录 B
(资料性附录)

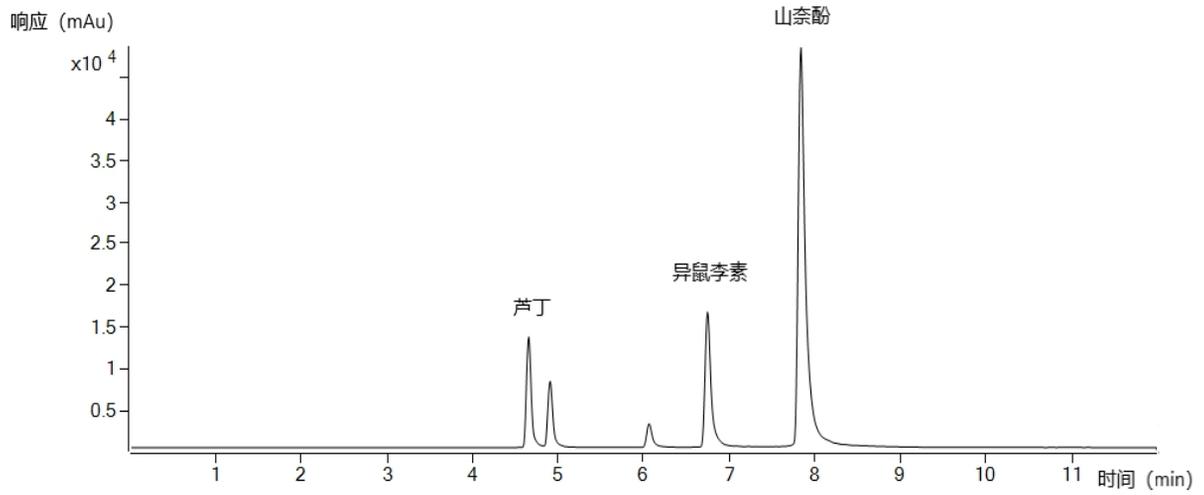
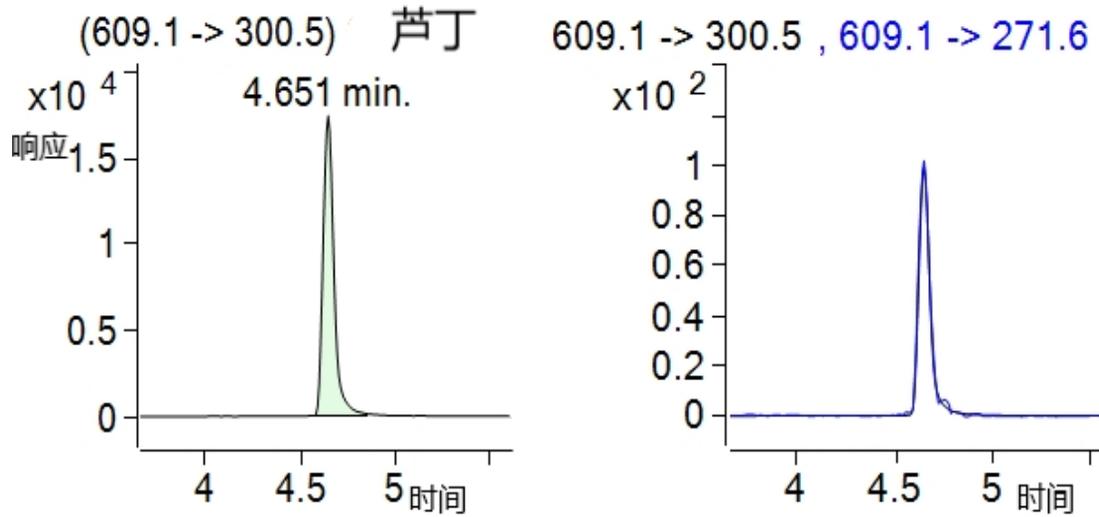


图 B.1 芦丁、山奈酚和异鼠李素的多反应监测 (MRM) 总离子流图



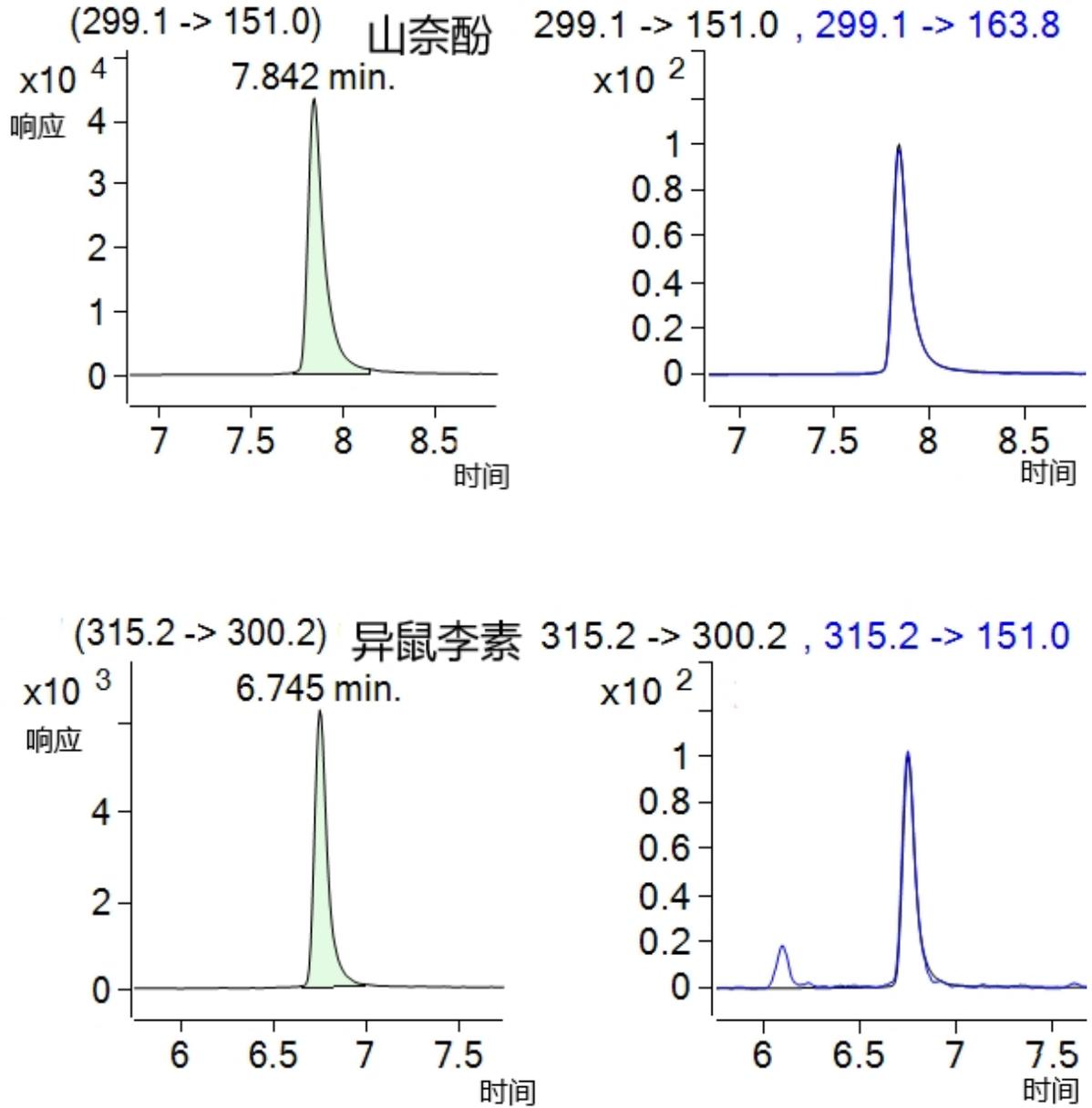


图 B.2 芦丁、山奈酚和异鼠李素的多反应监测 (MRM) 色谱图