

团体标准

T/GXAF 0012—2023

黄花蒿中青蒿素含量的测定 液相色谱-三重四级杆质谱法

Determination of Artemisinin in artemisia annua—Liquid chromatography—triple
quadrupole mass spectrometry

2023 - 04 - 10 发布

2023 - 05 - 01 实施

广西肥料协会 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》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、李泉、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、李妍。

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

本文件描述了液相色谱-三重四级杆质谱法测定黄花蒿中青蒿素含量的原理，规定了试剂和材料、仪器和设备、分析步骤、结果计算和表述、精密度等的要求。

本文件适用于黄花蒿中青蒿素含量的测定，检出限为 0.25 µg/g，测定下限为 0.75 µg/g。

2 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

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 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。

5 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。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。

5.1.2 甲酸：色谱纯。

5.2 溶液配制

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

5.3 标准品

青蒿素标准品（Artemisinin, C₁₅H₂₂O₅, CAS:63968-64-9）：纯度≥98%。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 青蒿素标准储备液：称取 1 mg（精确到 0.01 mg）的青蒿素标准品（5.3），用乙腈溶解并定容至 10 mL，配制成 100 µg/mL 的标准储备液，-20 °C 以下保存，有效期 3 个月。

5.4.2 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，-20 °C 以下保存。

5.5 材料

5.5.1 微孔滤膜：0.22 µm，有机相型。

5.5.2 N-丙基乙二胺（PSA）填料：粒径 40 µm~60 µm。

5.5.3 十八烷基硅烷键合相吸附剂（C18）：粒径 40 µm~60 µm。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-三重四级杆质谱仪：配有电喷雾（ESI）离子源。
- 6.2 离心机：4000 r/min。
- 6.3 涡旋振荡机。
- 6.4 分析天平：感量 0.0001 g和 0.01 mg。
- 6.5 超声波清洗仪。
- 6.6 烘箱。

7 试样的制备

样品经烘箱 40 °C烘干、粉碎机粉碎，过 60 目分样筛，备用。

8 分析步骤

8.1 提取

称取样品 0.1 g（精确至 0.0001 g）于 50 mL聚丙烯塑料离心管中，加入 25 mL乙腈，室温振荡 3 min，30 °C超声 30 min，4000 r/min离心 5 min，取上清液。

8.2 净化

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

8.3 测定

8.3.1 高效液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：BEH C18 2.1×100mm 粒度1.7 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：A：0.1%甲酸水溶液，B：乙腈；
- c) 流速：300 μL/min，梯度洗脱程序见表1；
- d) 柱温：40 °C；
- e) 进样量：2 μL。

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

8.3.2 质谱参考条件

- a) 扫描方式：正离子；
- b) 离子源温度：105 °C；
- 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：700 V；
- 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2。

表2 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 V
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

8.3.3 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、20.0 ng/mL、30.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100.0 ng/mL 做工作曲线，应现配现用。

8.3.4 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3规定的范围，则可判断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

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

8.3.5 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 3.65 min，标准溶液特征离子质量色谱图与典型样品特征离子质量色谱图见附录 A。

8.4 空白实验

除不加试样外，均按上述测定步骤进行。

9 结果计算和表述

青蒿素含量ω的计算按式（1）进行：

$$\omega = \frac{C \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

- 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。
- 计算结果应扣除空白值。

9.1 精密度

9.1.1 重复性

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%。

9.1.2 再现性

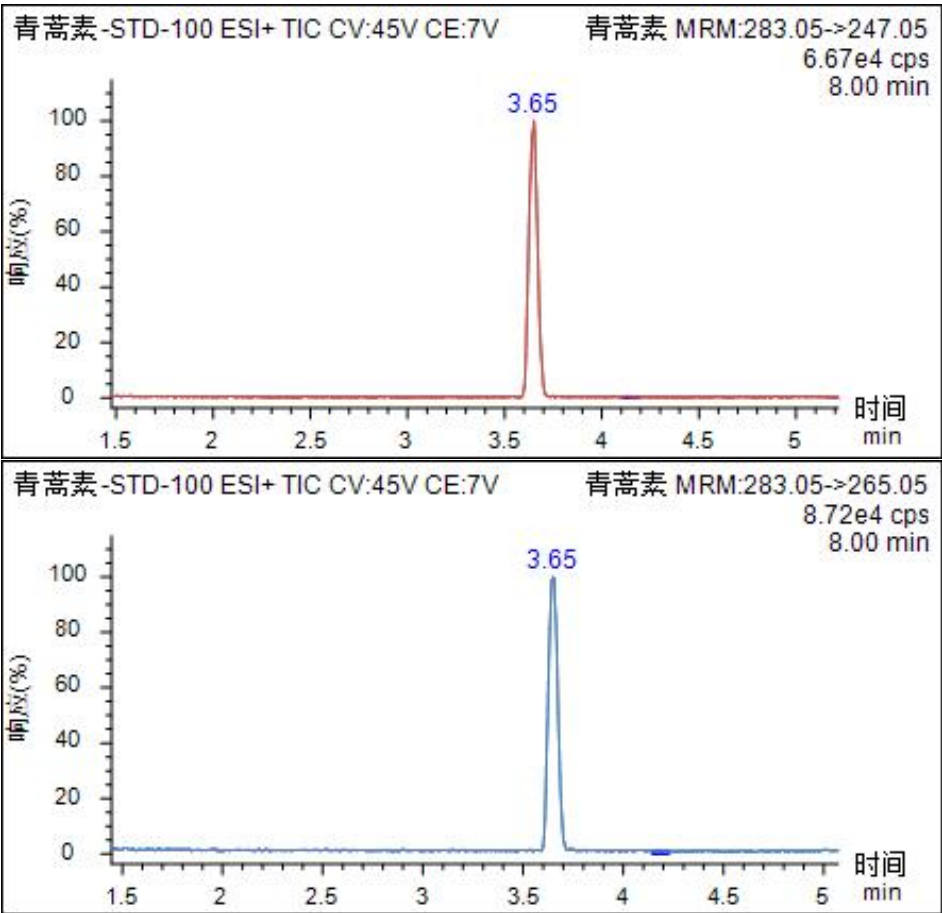
在再现性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

附录 A

(资料性附录)

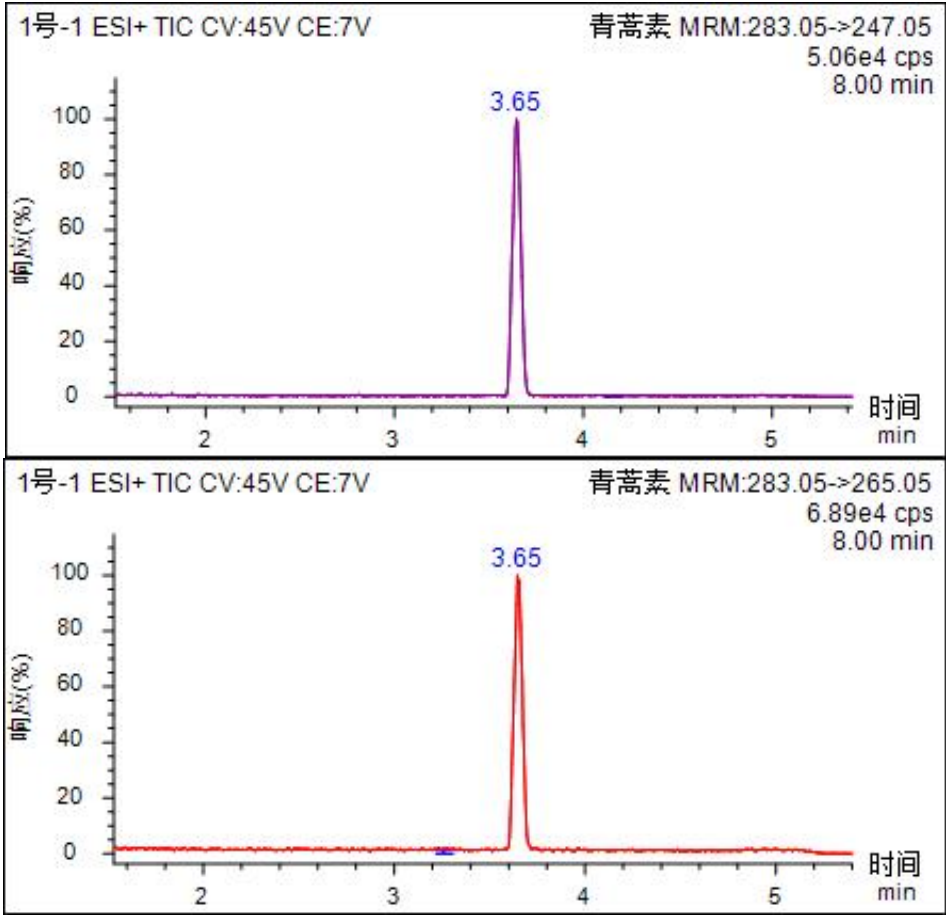
青蒿素标准溶液及典型样品特征离子质量色谱图

青蒿素标准溶液特征离子质量色谱图见A.1。



图A.1 青蒿素标准溶液特征离子质量色谱图 (100 µg/L)

典型样品特征离子质量色谱图见A.2。



图A.2 典型样品特征离子质量色谱图