

团体标准

T/ NAIA×××-××××

金银花中 12 种有效成分含量的测定 液相色谱-质谱联用法

Determination of 12 effective components
content in *Lonicerae Japonicae Flos*—

Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2024-××-××发布

2024-××-××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》的规定起草。

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：宁夏农产品质量标准与检测技术研究所，宁夏农林科学院林业与草地生态研究所，宁夏回族自治区食品检测研究院。

本文件主要起草人：赵子丹、刘华、刘霞、王晓静、李谦、李明、张艳、牛艳、吴燕、马斌、杨静、开建荣、陈翔、赵丹青、石欣。

本文件为首次发布。

金银花中 12 种有效成分含量的测定

液相色谱-质谱联用法

1 范围

本文件规定了金银花中 12 种有效成分含量的液相色谱-质谱联用测定方法。

本文件适用于金银花中 12 种有效成分（新绿原酸、绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 B、异绿原酸 C、木犀草苷、獐牙菜苷、忍冬苷、莫诺苷、当药醇苷、断氧化马钱子苷、断马钱子酸）的测定。

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

无。

4 原理

试样用甲醇溶液超声提取，上清液经离心后，液相色谱-质谱联用仪检测，外标法定量。

5 试剂与材料

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

5.1 试剂

5.1.1 甲醇(CH_3OH , CAS 号: 67-56-1): 色谱纯。

5.1.2 乙腈(CH_3CN , CAS 号: 75-05-8): 色谱纯。

5.1.3 甲酸(HCOOH , CAS 号: 64-18-6): 色谱纯。

5.2 溶液配制

5.2.1 70%甲醇溶液(70+30, 体积比): 量取 30 mL 水加入 70 mL 甲醇中，混匀。

5.2.2 0.1%甲酸水溶液: 量取 1.0 mL 甲酸于容量瓶中，用水定容至 1000 mL，摇匀。

5.3 标准品

新绿原酸标准品 (CAS 号 906-33-2)、绿原酸标准品 (CAS 号 327-97-9)、异绿原酸 A 标准品 (CAS 号 89919-62-0)、异绿原酸 B 标准品 (CAS 号 14534-61-3)、异绿原酸 C 标准品 (CAS 号 32451-88-0)、木犀草苷标准品 (CAS 号 5373-11-5)、獐牙菜

昔标准品（CAS 号 14215-86-2）、忍冬昔标准品（CAS 号 25694-72-8）、莫诺昔标准品（CAS 号 25406-64-8）、当药醇昔标准品（CAS 号 23445-00-3）、断氧化马钱子昔标准品（CAS 号 58822-47-2）、断马钱子酸标准品（CAS 号 60077-46-5），纯度均 $\geq 98\%$ 。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 标准储备溶液(1000 mg/L): 准确称取约 10 mg（精确至 0.1 mg）相应的标准品，用甲醇溶液(5.2.1)溶解并定容至 10 mL，避光-18℃及以下条件保存。

5.4.2 混合标准储备溶液(10 mg/L~100 mg/L): 吸取一定量的标准储备溶液于容量瓶中用甲醇溶液(5.2.1)定容至刻度，避光-18℃及以下条件保存。

5.5 材料

5.5.1 微孔滤膜(有机相): 13mm $\times$ 0.22 μ m，或相当者。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-三重四极杆质谱联用仪: 配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平: 感量 0.1 mg 和 0.01 g。

6.3 离心机: 4000 r/min。

6.4 高速粉碎机: 10000 r/min。

6.5 涡旋混合器。

7 分析步骤

7.1 试样制备

金银花样品随机取样 500 g，粉碎后充分混匀，放入聚乙烯袋中，于-18℃及以下条件保存。

7.2 样品提取

将试样充分混匀，称取 0.02 g，精确至 0.0001 g，置于 100 mL 容量瓶中，加入甲醇溶液(5.2.1)，定容至 100 mL，超声处理 30 min 后，4000 r/min 离心 5 min，过 0.22 μ m 滤膜，待测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱，2.1 mm（内径） $\times$ 100 mm，粒径 1.7 μ m，或相当者；
- b) 流动相: A 相为甲酸水溶液(5.2.2)，B 相为乙腈溶液(5.1.2)，流动相梯度条件见表 1；
- c) 流速: 0.3 mL/min；
- d) 柱温: 40℃；
- e) 进样量: 2 μ L。

表 1 流动相及其梯度条件（V_A+V_B）

时间 min	V_A %	V_B %
0.00	90	10
0.50	90	10
6.50	5	95
7.50	5	95
7.60	90	10
9.00	90	10

7.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源类型：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：负离子扫描；
- c) 电喷雾电压：负离子-4500V；
- d) 离子源温度：500 °C；
- e) 喷雾气流速：50 L/h；
- f) 气帘气流速：50 L/h；

g) 多反应监测：每种组分分别选择至少2个子离子。所有需要检测的子离子按照出峰顺序，分时段分别检测。每种组分的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数，参见附录A。

7.3.3 标准工作曲线

精确吸取一定量的混合标准溶液，逐级用空白基质溶液稀释成质量浓度为 0.01 mg/L、0.02 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.2 mg/L、0.5 mg/L、1.0 mg/L、3.0 mg/L 和 5.0 mg/L 的标准工作溶液，根据仪器性能和检测需要选择不少于 5 个浓度点，供液相色谱质谱联用仪测定。以每种组分定量用子离子的质量色谱图峰面积为纵坐标，相对应的标准工作溶液质量浓度为横坐标，绘制标准工作曲线。

7.3.4 定性及定量

7.3.4.1 保留时间

被测试样中目标物色谱峰的保留时间与相应标准色谱峰的保留时间相比较，相对误差应在±2.5%之内。

7.3.4.2 离子丰度比

按照上述条件进行样品测定，若检测样品的色谱峰保留时间与标准品一致，且与质量浓度相当的标准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目标被测物。

表 2 定性确证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%

本方法的标准物质 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图参见附录 B。

7.3.4.3 定量

外标法定量。

7.4 空白试验

除不加试样外，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

8 结果计算

试样中各组分含量以质量分数 X 计，单位为毫克每千克（mg/kg），按公式(1)计算。

$$X = \frac{\rho \times A \times V}{A_s \times m} \times \frac{1000}{1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X —— 试样中被测物残留量的数值，单位为毫克每千克（mg/kg）；

ρ —— 基质匹配标准工作溶液中被测物的质量浓度的数值，单位为毫克每升(mg/L)；

A —— 试样溶液中被测物的质量色谱图峰面积；

A_s —— 基质匹配标准工作溶液中被测物的质量色谱图峰面积；

V —— 提取液体积的数值，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量的数值，单位为克（g）。

计算结果以重复性条件下获得的 2 次独立测定结果的算术平均值表示，保留 2 位有效数字，含量超 1 mg/kg 时保留 3 位有效数字。

9 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与其算术平均值的比值（百分率），应符合附录 C 的要求。

10 定量限

本方法对 12 种有效成分的定量限为 0.01 mg/kg~0.1 mg/kg(见附录 D)。

附录 A
(资料性)

12种有效成分的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数

12种有效成分的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数，见表A.1。

表A.1 12种有效成分的保留时间、母离子、子离子及离子对质谱参数

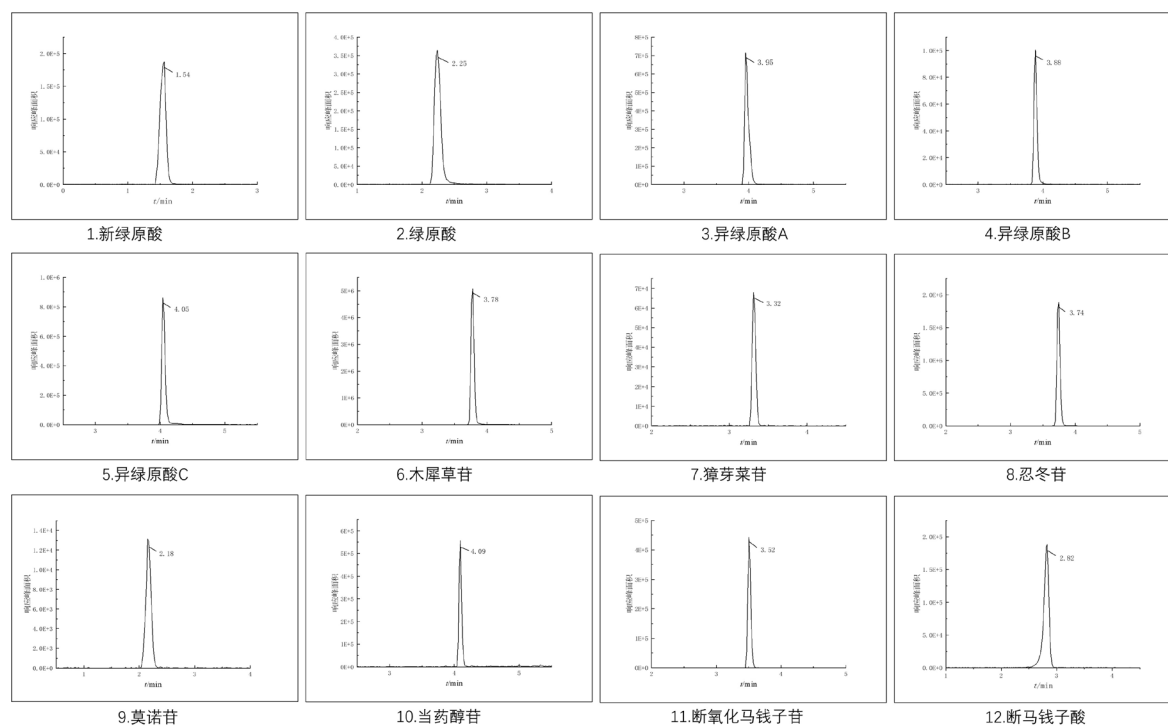
序号	中文名称	英文名称	保留时间 min	去簇电压 V	离子对 I	碰撞能 V	离子对 II	碰撞能 V
1	新绿原酸	neochlorogenic acid	1.54	-120	353.1/190.9	-26	353.1/134.9	-42
2	绿原酸	chlorogenic acid	2.25	-120	353.2/191.2	-23	353.2/84.9	-58
3	异绿原酸 A	isochlorogenic acid A	3.95	-120	515.2/353.1	-20	515.2/191.0	-40
4	异绿原酸 B	isochlorogenic acid B	3.88	-120	515.2/172.9	-25	515.2/335.9	-40
5	异绿原酸 C	isochlorogenic acid C	4.05	-120	515.3/353.1	-26	515.3/173.0	-40
6	木犀草苷	luteoloside	3.78	-120	447.1/285.1	-36	447.1/256.1	-60
7	獐牙菜苷	sweroside	3.32	-120	357.2/124.92	-25	357.2/196.0	-22
8	忍冬苷	lonicerin	3.74	-120	593.2/285.0	-52	593.2/447.2	-50
9	莫诺苷	morroniside	2.18	-120	405.3/242.8	-15	405.3/141.1	-30
10	当药醇苷	swertianolin	4.09	-120	435.2/271.9	-32	435.2/256.9	-56
11	断氧化马钱子苷	secoxyloganin	3.52	-120	403.2/371.1	-20	403.2/179.2	-20
12	断马钱子酸	secologanic acid	2.82	-120	373.0/59.0	-20	373.0/97.0	-60

附录 B

(资料性)

12种有效成分多反应监测（MRM）质量色谱图

12种有效成分多反应监测（MRM）质量色谱图，见图B.1。



图B.1 12种有效成分多反应监测（MRM）质量色谱图

附录 C
(规范性)
实验室内重复性要求

实验室内重复性要求，见表C.1。

表C.1 实验室内重复性要求

被测组分含量 mg/kg	精密度(RSD) %
$>0.001 \leq 0.01$	≤ 20
$>0.01 \leq 0.1$	≤ 15
>1	≤ 10

附录 D
(资料性)
12种有效成分中英文名称和方法定量限

12种有效成分中英文名称和方法定量限，见表D.1。

表D.1 12种有效成分中英文名称和方法定量限

序号	中文名	英文名	方法定量限, mg/kg
1	新绿原酸	neochlorogenic acid	0.05
2	绿原酸	chlorogenic acid	0.05
3	异绿原酸 A	isochlorogenic acid A	0.05
4	异绿原酸 B	isochlorogenic acid B	0.05
5	异绿原酸 C	isochlorogenic acid C	0.05
6	木犀草苷	luteoloside	0.01
7	獐牙菜苷	sweroside	0.05
8	忍冬苷	lonicerin	0.01
9	莫诺苷	morroniside	0.1
10	当药醇苷	swertianolin	0.05
11	断氧化马钱子苷	secoxyloganin	0.05
12	断马钱子酸	secologanic acid	0.1
