

BJS

食品补充检验方法

BJS 202108

蜂蜜中雷公藤甲素的测定

2021-07-28 发布

国家市场监督管理总局 发布

蜂蜜中雷公藤甲素的测定

1 范围

本方法规定了蜂蜜中雷公藤甲素的液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于蜂蜜中雷公藤甲素的定性和定量测定。

2 原理

试样中雷公藤甲素(雷公藤内酯醇)经乙酸乙酯提取, *N*-丙基乙二胺固相萃取柱净化, 用液相色谱-串联质谱测定, 外标法定量。

3 试剂与材料

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

3.1 试剂

3.1.1 甲醇(CH₃OH): 色谱纯。

3.1.2 乙酸乙酯(C₄H₈O₂)。

3.1.3 甲酸(HCOOH): 色谱纯。

3.2 溶液配制

3.2.1 甲醇溶液: 甲醇: 水(1+1, 体积比)。

3.2.2 0.1% 甲酸溶液: 1 mL 甲酸溶解于水中, 并定容至 1 L。

3.3 标准品

雷公藤甲素(Triptolide, C₂₀H₂₄O₆, CAS 号: 38748-32-2)标准品: 纯度 ≥ 98%。

3.4 标准溶液制备

3.4.1 雷公藤甲素标准储备液(1 mg/mL): 准确称取雷公藤甲素标准品 20.0 mg 于 10 mL 烧杯中, 用甲醇溶解后转移到 20 mL 容量瓶中, 并用甲醇定容。4 °C 避光保存, 有效期 1 个月。

3.4.2 雷公藤甲素标准中间液(1 μg/mL): 准确量取雷公藤甲素标准储备液(1 mg/mL)(3.4.1) 100 μL, 置于 100 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 1 μg/mL 的雷公藤甲素标准中间液。4 °C 避光保存, 有效期 1 个月。

3.5 材料

3.5.1 离心管: 50 mL。

3.5.2 *N*-丙基乙二胺固相萃取柱(500 mg/6 mL)或其他等效柱。

3.5.3 微孔滤膜: 0.22 μm, 有机系。

4 仪器和设备

- 4.1 液相色谱-串联质谱仪: 带电喷雾(ESI)离子源。
- 4.2 分析天平: 感量 0.000 1 g 和 0.001 g。
- 4.3 氮吹仪。
- 4.4 涡漩混合器。
- 4.5 固相萃取装置。
- 4.6 超声波清洗器。
- 4.7 离心机: 转速 $\geq 10\ 000$ r/min。
- 4.8 旋转蒸发器。
- 4.9 移液器: 100 μ L, 1 mL, 5 mL。

5 分析步骤

5.1 试样的制备与保存

对无结晶的蜂蜜样品将其搅拌均匀。对有结晶析出的蜂蜜样品,在密闭情况下,将样品瓶置于低于 60 $^{\circ}$ C 的水浴中温热,振荡,待样品全部融化后搅匀,迅速冷却至室温,在融化时应注意防止水分挥发。装入洁净容器,密封,标明标记。

5.2 试样的处理

5.2.1 提取

称取试样 2 g(精确至 0.001 g)置于 50 mL 离心管中,加入 4 mL 水与蜂蜜充分混匀,加入乙酸乙酯 15 mL,涡漩振荡 5 min,超声 10 min,以 10 000 r/min 离心 5 min,取上清液,沉淀再加入乙酸乙酯 15 mL,重复提取 1 次,合并上清液,旋转蒸发至干。

5.2.2 净化

残渣用 2 mL 乙酸乙酯溶解,过 *N*-丙基乙二胺固相萃取柱,用乙酸乙酯 5 mL 洗脱,收集洗脱液,氮气吹干。准确量取甲醇溶液 1 mL 溶解残余物,经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤,供液相色谱-串联质谱测定。

5.3 基质标准工作曲线的制备

准确量取雷公藤甲素标准中间液(1 μ g/mL)适量,用空白样品提取液溶解稀释,配制成雷公藤甲素质量浓度为 0 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、25 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 的系列基质标准工作溶液,或根据需要配制适当浓度的基质标准工作溶液;现配现用。以基质标准工作溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制基质标准工作曲线。

5.4 液相色谱-串联质谱测定

5.4.1 液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱, 75 mm \times 3.0 mm, 粒径 2.7 μ m, 或性能相当者。
- b) 流动相: A 为 0.1% 甲酸溶液, B 为甲醇。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	90	10
0.50	90	10
4.00	5	95
6.00	3	97
6.50	3	97
7.00	90	10
10.00	90	10

- c) 流速:0.3 mL/min。
d) 柱温:室温。
e) 进样量:5 μ L。

5.4.2 质谱参考条件如下:

- a) 离子源:电喷雾离子源(ESI)。
b) 检测方式:多反应模式(MRM)。
c) 扫描方式:正离子模式扫描(ESI+)。
d) 电喷雾电压(IS):5 500 V。
e) 气帘气(CUR):20 L/min。
f) 雾化气压力(GS₁):55 L/min。
g) 辅助气压力(GS₂):40 L/min。
h) 离子源温度(TEM):500 °C。
i) 定性离子对、定量离子对、去簇电压(DP)、碰撞能量(CE)、碰撞室入口电压(EP)、碰撞室出口电压(CXP)等参数见表 2。

表 2 雷公藤甲素定性离子对、定量离子对和质谱分析参数

名称	离子对 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 eV	入口电压 V	出口电压 V
雷公藤甲素	361.1/128.0 ^a	100	80	10	13
	361.1/141.2		80		
	361.1/104.9		60		

^a 定量离子对。

表 2 所列参数是在 SCIEX QTRAP 4500 质谱仪完成的,仅供参考。当采用不同质谱仪器时,仪器参数可能存在差异,测定前应将质谱参数优化到最佳。

5.5 定性测定

通过试样色谱图的保留时间与相应标准品的保留时间、色谱峰的特征离子与相应浓度标准色谱峰的特征离子相对照定性。试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 2.5%;试样特征离子的相对丰度与浓度相当标准溶液的相对丰度一致,允许的偏差见表 3。

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	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

雷公藤甲素的参考保留时间约为 4.81 min,质量色谱图参见附录 A 中图 A.1~图 A.3。

5.6 定量测定

按 5.4 设定仪器条件,以基质标准工作溶液浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制基质标准工作曲线,按外标法计算试样中雷公藤甲素的含量。样品中雷公藤甲素质量浓度应在标准工作曲线质量浓度范围内,超出标准工作曲线质量浓度上限的样品应稀释后进样。

5.7 空白试验

除不加试样外,均按试样同法操作。

6 结果计算

结果按式(1)计算:

$$X = \frac{\rho \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \times f \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

X —— 试样中各待测组分的含量,单位为微克每千克($\mu\text{g}/\text{kg}$);

ρ —— 从标准工作曲线得到的被测组分溶液质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V —— 试样溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);

f —— 试样制备过程中的稀释倍数;

m —— 试样质量,单位为克(g)。

计算结果需扣除空白值,测定结果用 2 次平行测定结果的算术平均值表示,结果保留 3 位有效数字。

7 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 20%。

8 其他

本方法检出限为 $1\ \mu\text{g}/\text{kg}$,定量限为 $3\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

本方法在 $3\ \mu\text{g}/\text{kg} \sim 30\ \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度范围内,回收率为 60%~120%。

附录 A
(资料性)
质量色谱图

质量色谱图见图 A.1~图 A.3。

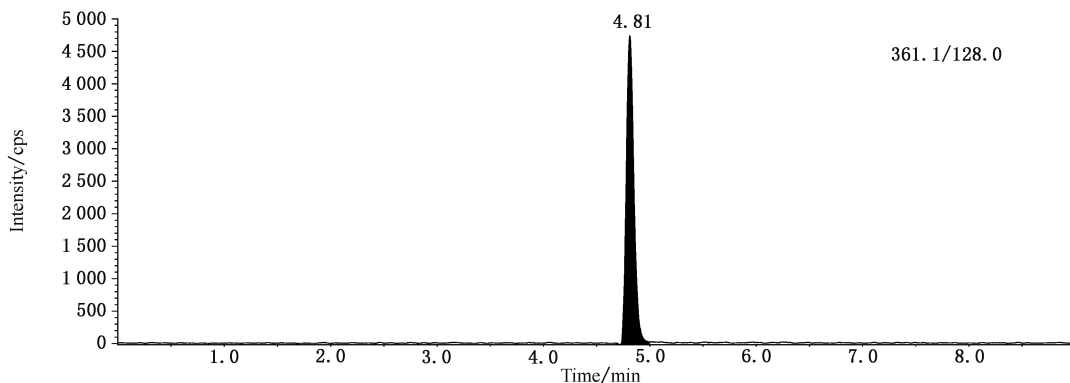


图 A.1 雷公藤甲素定量离子对质量色谱图(m/z 361.1/128.0)

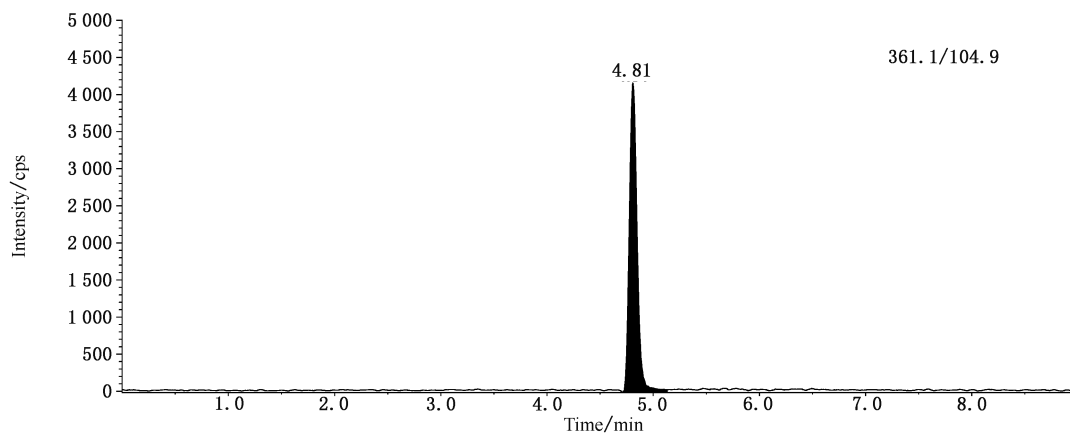


图 A.2 雷公藤甲素定性离子对质量色谱图(m/z 361.1/104.9)

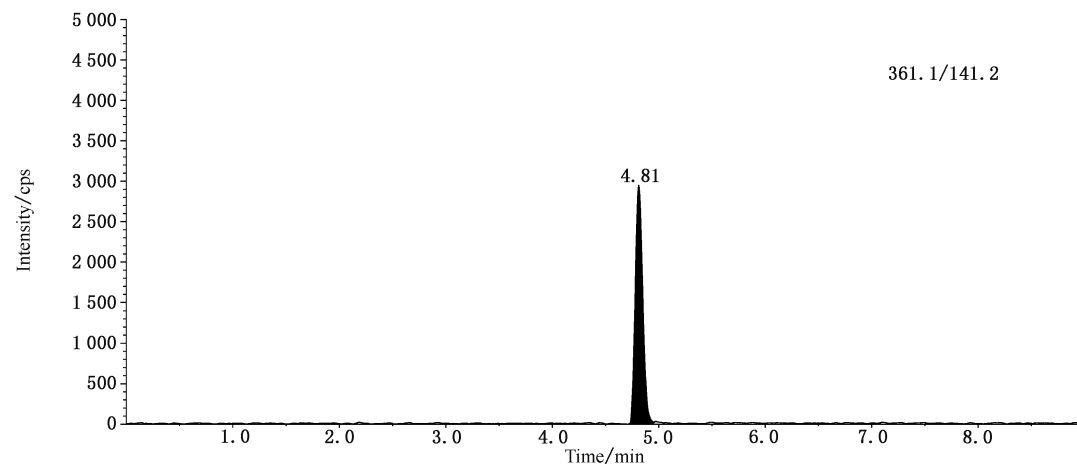


图 A.3 雷公藤甲素定性离子对质量色谱图(m/z 361.1/141.2)

本方法负责起草单位：四平市食品药品检验所。

本方法验证单位：湖北省食品质量安全监督检验研究院、黑龙江省食品药品检验检测所、辽宁省食品检验检测院、吉林省药品检验所、吉林省产品质量检验检测院。

本方法主要起草人：王丹彧、赵艳、刘丽、肖坤、李雅静、李正刚。