ICS 01.040.65
CCS B 04

TB

团 体 标 准

T/ NAIA×××-××××

枸杞中 6 种黄酮类物质含量的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of flavanoids in wolfberry

Liquid chromatography-mass spectrometry

2020-××-××发布 2021-××-××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、宁夏食品检测研究院、宁夏化学分析测试协会。

本文件主要起草人：杨静、王晓菁、张锋锋、牛艳、吴燕、苟春林、王彩艳、刘霞、陈翔、开建荣、张学玲、张小飞。

本文件为首次发布。

枸杞中 6 种黄酮类物质含量的测定

液相色谱-质谱/质谱法

1　范围

本文件规定了枸杞中黄酮类物质的液相色谱-质谱/质谱测定方法。

本文件适用于枸杞中芦丁、异槲皮苷、槲皮素-7-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、6-甲氧基山奈酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷的液相色谱-质谱/质谱法测定。

本文件的方法定量限：芦丁的方法定量限为 1.00 mg/kg，异槲皮苷和槲皮素-7-O-葡萄糖苷的方法定量限均为 0.010 mg/kg，山奈酚-3-O-芸香糖苷、6-甲氧基山奈酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷的方法定量限均为 0.050 mg/kg。

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

本文件没有需要规定的术语和定义。

4　原理

试样中的黄酮类物质用 70%甲醇溶液提取，涡旋超声，微孔滤膜过滤，用液相色谱-质谱/质谱仪检测和确证，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　乙腈（CH_3CN）：色谱纯。

5.2　甲醇（CH_3OH）：色谱纯。

5.3　甲酸（CH_2O_2）：色谱纯。

5.4　芦丁（rutin，CAS 号 153-18-4）、异槲皮苷（isoquercitrin，CAS 号 482-35-9）、槲皮素-7-O-葡萄糖苷（quercetin-7-O-glucoside，CAS 号 491-50-9）、山奈酚-3-O-芸香糖苷（kaempferol-3-O-rutinoside，CAS 号 17650-84-9）、6-甲氧基山奈酚-3-O-芸香糖苷

（6-methoxykaemphenol-3-O-rutinoside，CAS 号 403861-33-6）和水仙苷（narcissin，CAS 号 604-80-8）。

5.5 标准溶液配制

5.5.1 黄酮类物质标准储备溶液：分别准确称取适量的芦丁、异槲皮苷、槲皮素-7-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、6-甲氧基山奈酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷标准品（精确至 0.01 mg），用甲醇溶解，分别配制成 1000 mg/L 的标准储备溶液，-18 ℃下保存。

5.5.2 黄酮类物质混合标准中间溶液：根据需要分别取黄酮类物质的标准储备液，用甲醇稀释成 10 mg/L 标准中间溶液，-18 ℃下保存。

5.6 70%甲醇溶液（体积分数）：量取 70mL 甲醇，用水定容至 100mL。

5.7 0.1%甲酸溶液（体积分数）：量取 1mL 甲酸，用水定容至 1000mL。

5.8 滤膜：0.22 μm，有机相。

5.9 离心管：50 mL，塑料。

6 仪器与设备

6.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。

6.2 分析天平：感量 0.01 g 和 0.0001 g。

6.3 高速万能粉碎机：10000 r/min。

6.4 超声波清洗机。

6.5 离心机：4000 r/min。

6.6 涡旋混合器。

7 分析步骤

7.1 试样的制备

鲜、干枸杞样品于-18 ℃冷冻冰箱中保存。试验时将鲜、干枸杞样品取出，鲜样用高速组织捣碎机打浆，干样用高速万能粉碎机（可加少量的液氮）粉碎（30 g 样品粉碎时间为 30 s），分别置于样品瓶中，-18 ℃冷冻备用。

7.2 试样的提取

7.2.1 鲜果

称取试样 2.0000 g（精确至 0.0001 g）于 50.0mL 离心管，加入 20.0 mL70%甲醇溶液（5.6），充分振摇混匀，超声提取 60 min，放入离心机，4000 r/min 离心 5 min，上清液过 0.22 μm 滤膜，用液相色谱-质谱/质谱测定。

7.2.2 干果

称取试样 1.0000 g（精确至 0.0001 g）于 50.0 mL 离心管，加入 20.0 mL70%甲醇溶液（5.6），充分振摇混匀，超声提取 60 min，放入离心机，4000 r/min 离心 5 min，上清液过

0.22 μm 滤膜，用液相色谱-质谱/质谱测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱参考条件

a）色谱柱：C18 柱，150 mm×2.1 mm（i.d），1.8 μm，或性能相当者。

b）柱温：40 ℃。

c）流速：0.3 mL/min。

d）流动相：A 相为 0.1%甲酸溶液（5.7），B 相为乙腈，梯度洗脱条件见表 1。

e）进样量：2.0μL。

表 1 流动相及其梯度条件（V_A+V_B）

时间 (min)	流 速 (mL/ min)	V_A(%)	V_B(%)
0.00	0.3	90	10
1.00	0.3	90	10
14.00	0.3	10	90
16.00	0.3	10	90
18.00	0.3	90	10
20.00	0.3	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：选择离子监测模式；

c）电喷雾电压：3.5kV；

d）毛细管传输温度：300 ℃；

e）碰撞压力：1.5 mTorr；

f）鞘气：30 arb；

g）辅气：10 arb。

表2 黄酮类物质的选择离子监测分析参数

名称	保留时间/min	定性离子对/m/z	定量离子对/m/z	碰撞能量/eV
芦丁 rutin	4.73	609.14/271.071 609.14/300.042	609.14/300.042	-43.25 -26.61
异槲皮苷 isoquercitrin	4.90	462.98/301.042	462.98/301.042	-21.47 4.9
槲皮素-7-O-葡萄糖苷 quercetin-7-O-glucoside	4.90	463.21/151.071 463.21/301.113	463.21/301.113	-38.11 -22.78
山奈酚-3-O-芸香糖苷 kaempferol-3-O-rutinoside	5.17	593.27/255.042 593.27/285.042	593.27/285.042	-54.24 -29.85
6-甲氧基山奈酚-3-O-芸香糖苷	5.25	623.3/271.042	623.3/315.113	-53.82

6-methoxykaemphenol-3-O-rutinoside		623.3/315.113		-27.83
水仙苷 narcissin	5.25	623.21/300.042 623.21/315.042	623.21/315.042	-43.42 -43.42

7.3.3　定性测定

根据试样中被测物的含量情况，选取响应值适宜的标准工作液进行色谱分析。标准工作液和试样中被测物的响应值均应在仪器线性响应范围内。在上述仪器条件下，芦丁、异槲皮苷、槲皮素-7-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、6-甲氧基山奈酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷的保留时间分别约为 4.73、4.90、4.90、5.17、5.25、5.25min，选择离子监测色谱图参见附录 A。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 1 规定的范围，则可判断样品中存在对应的被测物。

表 1 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%

7.3.4　定量测定

采用外标-校准曲线法定量测定。保证所测样品中组分的响应值均在仪器的线性范围内。

7.4　空白试验

除不加入试样外，其他过程与试样处理相同。

8　结果计算和表达

试样中芦丁、异槲皮苷、槲皮素-7-O-葡萄糖苷、山奈酚-3-O-芸香糖苷、6-甲氧基山奈酚-3-O-芸香糖苷和水仙苷的含量以质量分数 ω 计，数值以毫克每千克（mg/kg）计，按式（1）计算：

$$\omega = \frac{\rho \times V}{m} \times \frac{1000}{1000} \quad \cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots\cdots（1）$$

式中：

ω —— 试样中被测物残留量的数值，单位为毫克每千克（mg/kg）；

V—— 试样中加入的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

m —— 试样质量的数值，单位为克（g）。

注：测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9　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超过算术平均值的 10%。

10　色谱图

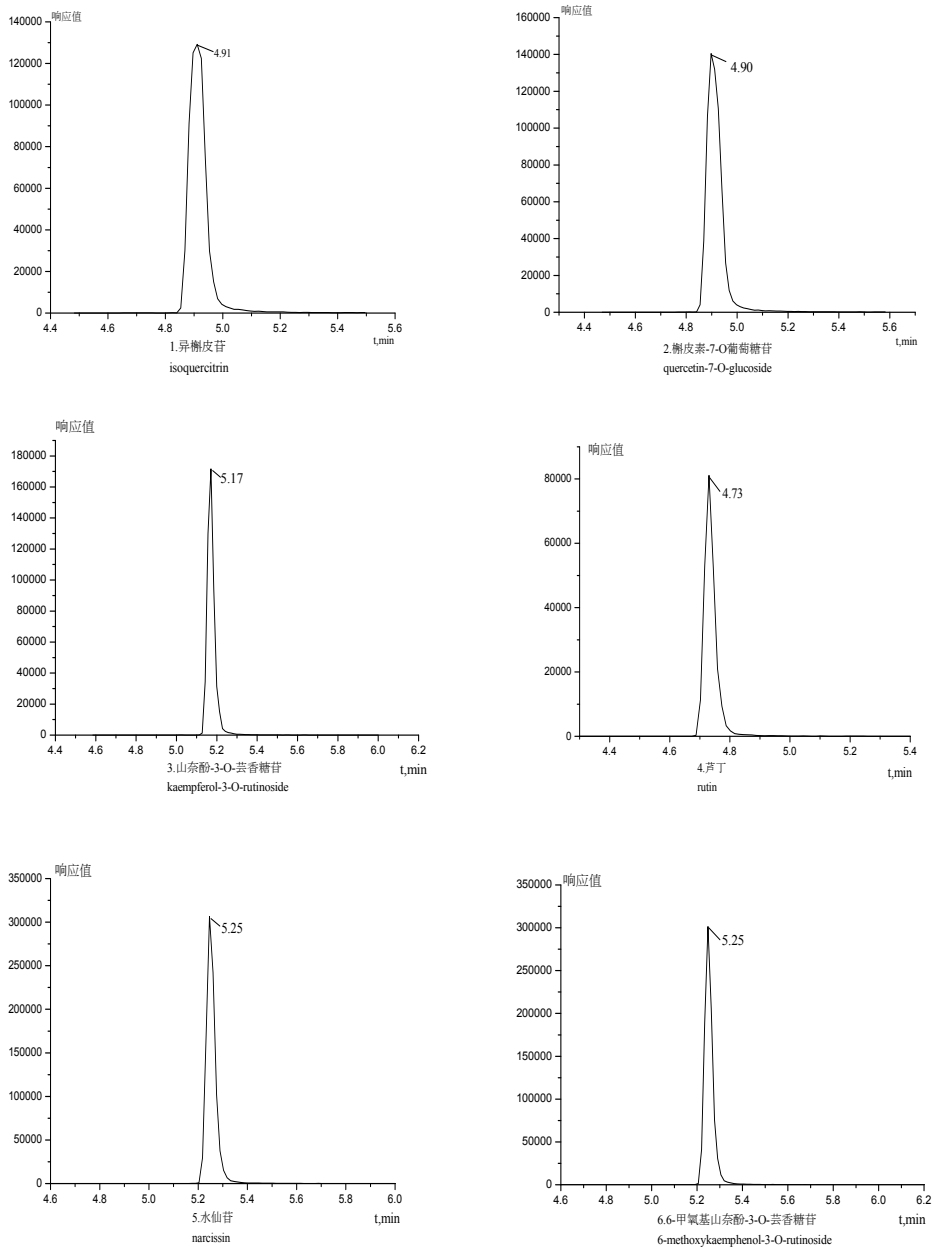
各目标化合物的选择离子监测（SRM）色谱图参见图 A.1。

附录 A

（资料性）

黄酮类物质的选择离子监测（SRM）质量色谱图

黄酮类物质的选择离子监测（SRM）质量色谱图见图A.1。



图A.1 黄酮类物质的选择离子监测（SRM）质量色谱图