

中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX
代替 GB/T 22247-2008

保健食品中淫羊藿苷的测定

Determination of icariin in health foods

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2024年1月)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX— 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

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。

本文件代替GB/T 22247-2008《保健食品中淫羊藿苷的测定》。

本文件与GB/T 22247-2008相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 修改了适用范围（见1）；
- 增加了试样制备（见7.1）；
- 修改了第一法 高效液相色谱法的前处理条件和色谱条件（见7.2和7.3）；
- 修改了第一法 高效液相色谱法的检出限和定量限（见10）；
- 增加了第二法 液相色谱—串联质谱法。

本文件由全国特殊食品标准化技术委员会提出并归口。

本文件起草单位：略。

本文件主要起草人：略。

保健食品中淫羊藿苷的测定

1 范围

本文件描述了保健食品中淫羊藿苷的测定方法

本文件适用于胶囊、软胶囊、片剂、颗粒、丸剂、口服液、酒类等剂型保健食品中淫羊藿苷的测定。

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。

第一法 高效液相色谱法

4 原理

试样中的淫羊藿苷采用乙醇—水溶液进行提取，对于含油试样则需用正己烷除脂，过滤后进高效液相色谱仪，经反相 C_{18} 色谱柱分离后，由紫外检测器检测，根据保留时间和峰面积进行定性和定量。

5 试剂和材料

除非另有说明，本方法所有试剂均为色谱纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙醇（ C_2H_5OH ）。

5.1.2 甲醇（ CH_3OH ）。

5.1.3 正己烷（ $CH_3(CH_2)_4CH_3$ ）：分析纯。

5.1.4 乙腈（ CH_3CN ）。

5.2 试剂配制

70%乙醇溶液（体积比）：量取700 mL乙醇（5.1.1）和300 mL水，混匀备用。

5.3 标准品

淫羊藿苷标准品：纯度 $\geq 98\%$ ，或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。标准物质中文名称、英文名称、CAS登录号、分子式、相对分子量、结构式详见附录A表A.1。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 淫羊藿苷标准储备液（200 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确称取 20 mg（精确至 0.1 mg）标准品至小烧杯中，加少量甲醇（5.1.2）溶解，溶液定量移入 100 mL 容量瓶中，用甲醇（5.1.2）稀释至刻度，摇匀。制成的标准储备液，在 2~8 $^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期 1 个月。

5.4.2 淫羊藿苷标准系列工作溶液：分别准确吸取标准储备液（5.4.1）50 μL 、100 μL 、250 μL 、1250 μL 、2500 μL 、5000 μL ，用甲醇（5.1.2）稀释并定容至 10 mL，配制成浓度分别为 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、25.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 、100.0 $\mu\text{g/mL}$ 的系列工作溶液。临用现配。

5.5 材料

5.5.1 通过式固相萃取柱：6 cc，200 mm，或性能相当者。

5.5.2 0.22 μm 有机滤膜。

6 仪器和设备

6.1 高效液相色谱仪，配有紫外检测器。

6.2 电子天平：感量分别为 0.0001 g 和 0.001 g。

6.3 离心机：转速 $\geq 9\ 000$ r/min。

6.4 超声波恒温水浴振荡器。

6.5 涡旋振荡器。

6.6 匀浆机。

6.7 粉碎机。

7 分析步骤

7.1 试样制备

硬胶囊、软胶囊样品：取不少于 20 粒，剪开，取出内容物，研细（必要时），混匀，内容物总量不低于 5 g，若 20 粒样品内容物低于 5 g 可增加取样量。片剂、丸剂样品：取不少于 20 粒或 10 g 样品，研细，混匀。粉剂、颗粒样品：取不少于 20 g 样品，研细（必要时），混匀。口服液：取 5 支独立包装样品，若内容物低于 10 g 可增加取样量，混合均匀。饮料类、酒类及其他剂型样品：取样品 20 g（或 mL）样品，混合均匀。

7.2 试样处理

7.2.1 硬胶囊、片剂、粉剂、颗粒、丸剂等固体试样：准确称取 1 g 试样（精确至 0.001 g）于 50 mL 刻度管中，准确加入 25 mL 70%乙醇溶液（5.2），涡旋振荡 1 min，超声提取 20 min，9 000 r/min 离心 5 min，吸取 3 mL 上清液过固相萃取柱（5.5.1）及 0.22 μm 有机滤膜（5.5.2），待测。

7.2.2 口服液、饮料类、酒类等液体试样：准确移取 1.0 mL 试样置于刻度管中，准确加入 10 mL 70%乙醇溶液（5.2），涡旋振荡 1 min，超声提取 20 min，9 000 r/min 离心 5 min，吸取 3 mL 上清液过固相萃取柱（5.5.1）及微孔滤膜（5.5.2），待测。

7.2.3 含油试样：准确称取 1 g 试样（精确至 0.001 g）于 50 mL 离心管中，加入 4 mL 正己烷（5.1.3），涡旋振荡 1 min，准确加入 10.0 mL 70%乙醇溶液（5.2），涡旋振荡 1 min，超声提取 20 min，9 000 r/min 离心 5 min，弃去上层正己烷，加入 5 mL 正己烷（5.1.3），涡旋振荡 1 min，9 000 r/min 离心 5 min，弃去上层正己烷，吸取 3 mL 下层清液，过固相萃取柱（5.5.1）及 0.22 μm 有机滤膜（5.5.2），待测。

7.3 色谱参考条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），或性能相当者。
- b) 检测器：检测波长 270 nm。
- c) 流动相 A：水；流动相 B：乙腈（5.1.4）；梯度洗脱程序见表 1。
- d) 柱温：35°C。
- e) 流速：1 mL/min。
- f) 进样量：10 μL。
- g) 梯度洗脱，见表 1。

表 1 梯度洗脱条件

时间 (min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0.00	76	24
25.0	74.3	25.7
25.1	30	70
34.0	30	70
34.1	76	24
46.0	76	24

7.4 标准曲线的制作

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱仪中，测定其峰面积（标准品色谱图见附录 B 图 B.1），以相应标准工作液的浓度为横坐标，以峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

7.5 试样溶液的测定

将试样溶液注入高效液相色谱仪中，得到相应峰面积（样品色谱图见附录 B 图 B.2），根据标准曲线，以外标法计算待测试样溶液中淫羊藿苷的浓度。

注：可根据试样中组分的含量，适当增加稀释倍数 f ，使其不超出标准曲线测定范围。

8 结果计算与表述

试样中淫羊藿苷的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V \times f}{m \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X ——试样中某种待测组分的含量，单位为克每千克或克每升（g/kg 或 g/L）；

c ——由标准工作曲线中得出的溶液中某种待测组分的浓度，单位为微克每毫升（μg/mL）；

V ——样液的提取体积，单位为毫升（mL）；

f ——试样制备过程中的稀释倍数；

m ——称样量，单位为克或毫升（g或mL）。

1000——单位换算系数；

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

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得超过算术平均值的10%。

10 其他

胶囊、片剂等固体试样，当试样量为 1.0 g 时，试样中淫羊藿苷的检出限为 0.0125 g/kg、定量限为 0.025 g/kg；酒类、口服液等液体试样，当试样量为 1 mL 时，试样中淫羊藿苷的检出限为 0.005 g/L、定量限为 0.01 g/L；软胶囊等含油试样，当试样量为 1.0 g 时，试样中淫羊藿苷的检出限为 0.005 g/kg、定量限为 0.01 g/kg。

第二法 液相色谱-串联质谱法

11 原理

试样中的淫羊藿苷采用乙醇-水溶液进行提取，对于含油试样则需用正己烷除脂，过滤后进高效液相色谱仪，经反相 C_{18} 色谱柱分离后，由质谱检测器检测，外标法定量。

12 试剂和材料

除非另有说明，本方法所用试剂均为色谱纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

12.1 试剂

甲酸（HCOOH）。

12.2 试剂配制

0.1%甲酸水溶液（体积比）：量取 1.0 mL 甲酸（12.1），加水稀释至 1000 mL，混匀备用。

12.3 标准品

同5.3。

12.4 标准溶液配制

12.4.1 淫羊藿苷标准储备液（1.0 mg/mL）：准确称取 10 mg（精确至 0.1 mg）标准品至小烧杯中，加少量甲醇（5.1.2）溶解，定量移入 10 mL 容量瓶中，用甲醇（5.1.2）稀释至刻度，摇匀，2~8℃保存，有效期 1 个月。

12.4.2 淫羊藿苷标准中间溶液（20 $\mu\text{g/mL}$ ）：分别准确量取 2.0 mL 淫羊藿苷标准储备液（12.4.1）置于 100 mL 容量瓶中，用甲醇（5.1.2）稀释至刻度，摇匀，2~8°C 保存，有效期 1 个月。

12.4.3 淫羊藿苷标准系列工作溶液：分别准确量取标准中间溶液（12.4.2）5 μL 、10 μL 、20 μL 、50 μL 、100 μL 、200 μL 、500 μL ，用甲醇（5.1.2）稀释并定容至 100 mL，配制成浓度分别为 1.0 ng/mL、2.0 ng/mL、4.0 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、40.0 ng/mL、100.0 ng/mL 的标准系列工作溶液，临用现配。

12.5 材料

同 5.5。

13 仪器和设备

液相色谱—串联质谱仪，配有电喷雾离子源（ESI 源）。

14 分析步骤

14.1 试样制备

同 7.1。

14.2 试样处理

同 7.2，根据实际浓度用 70%乙醇溶液（5.2）适当稀释至线性范围内，待测。

14.3 色谱参考条件

- 色谱柱：C₁₈ 柱（2.1 mm×100mm，2.5 μm ），或性能相当者。
- 流动相 A：乙腈，流动相 B：0.1%甲酸水溶液（12.2）；梯度洗脱程序见表 2。
- 流速：0.25 mL/min。
- 柱温：35°C。
- 进样量：2 μL 。

表 2 梯度洗脱程序

时间 (min)	A 相 (%)	B 相 (%)
0.0	20	80
1.0	20	80
4.0	90	10
5.0	90	10
5.01	20	80
6.0	20	80

14.4 质谱参考条件

- 离子源：电喷雾离子源（ESI 源）。
- 检测方式：多反应监测（MRM）。
- 离子喷雾电压（IS）：-4500 V。
- 雾化器压力（GS1）：55 psi。
- 辅助气压力（GS2）：60 psi。

- f) 气帘气 (CUR) : 30 psi。
 g) 碰撞气 (CAD) : 9 psi。
 h) 离子源温度 (TEM) : 500°C。
 i) 其他质谱参数见表 3。

表 3 主要参考质谱参数

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	离子化模式
淫羊藿苷	675.1	513.2*	-145	-17	-
	675.1	367.3	-145	-47	-

*定量离子对。

14.5 定性测定

在相同试验条件下测定标准工作溶液 (12.4.3) 和试样溶液 (14.2), 记录试样和标准工作溶液中淫羊藿苷的色谱保留时间, 若试样中检出与标准工作液中淫羊藿苷保留时间一致的色谱峰, 且其定性离子与浓度相当的标准溶液中相应的定性离子的相对丰度相比, 偏差不超过表4规定的范围, 则可以确定试样中检出淫羊藿苷。标准品特征离子色谱图参见附录C图C.1。

表 4 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

14.6 定量测定

将混合标准工作溶液 (12.4.3) 分别按仪器参考条件 (14.3和14.4) 进行测定, 得到相应的标准溶液的色谱峰面积。以混合标准工作溶液的质量浓度为横坐标, 以色谱峰的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

将试样溶液 (14.2) 按仪器参考条件 (14.3和14.4) 进行测定, 得到相应的样品溶液的色谱峰面积, 根据标准曲线得到待测液中组分的质量浓度。

注: 可根据试样中组分的含量, 适当增加稀释倍数f, 使其不超出标准曲线测定范围。

14.7 空白试验

除不加试样外, 均按上述步骤进行。

15 结果计算和表述

试样中淫羊藿苷的含量按式 (2) 计算:

$$X = \frac{(c - c_0) \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X——试样中某种待测组分的含量, 单位为微克每千克或微克每升 (μg/kg或μg/L);

c——由标准工作曲线中得出的溶液中待测组分的浓度, 单位为纳克每毫升 (ng/mL);

c_0 ——由标准曲线计算得到的过程空白样品中待测组分的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——样液的提取体积，单位为毫升（mL）；

f ——试样制备过程中的稀释倍数；

m ——称样量，单位为克或毫升（g或mL）；

1000/1000——单位换算系数。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

16 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15%。

17 其他

胶囊、片剂等固体试样，当称样量为 1.0 g 时，检出限为 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、定量限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ；酒类、口服液等液体试样，当称样量为 1 mL 时，检出限为 12 $\mu\text{g}/\text{L}$ 、定量限为 25 $\mu\text{g}/\text{L}$ ；软胶囊等含油试样，当称样量为 1.0 g 时，检出限为 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、定量限为 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

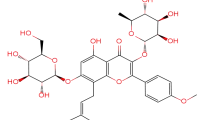
附录 A

(资料性)

标准物质的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量、结构式

标准物质的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量、结构式见表A.1。

表 A.1 标准物质的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量、结构式

中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子量	结构式
淫羊藿苷	Icariin	489-32-7	$C_{33}H_{40}O_{15}$	676.66	

附录 B

(资料性)

淫羊藿苷液相色谱图

淫羊藿苷液相色谱图见图B.1，样品中淫羊藿苷色谱图见图B.2。

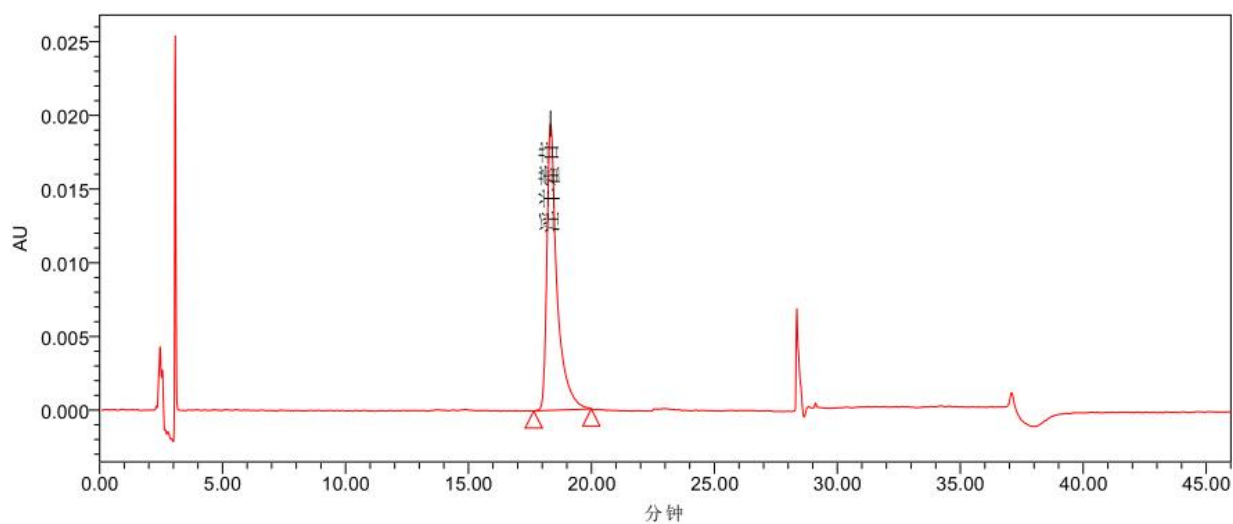


图 B.1 淫羊藿苷液相色谱图

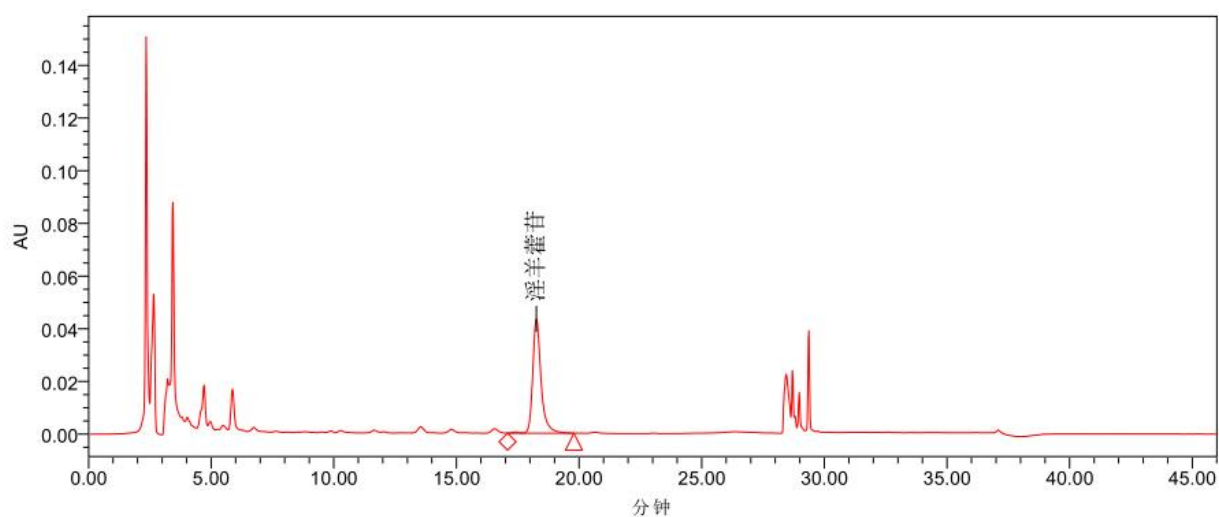


图 B.2 样品中淫羊藿苷液相色谱图

附录 C

(资料性)

淫羊藿苷特征离子色谱图

淫羊藿苷特征离子色谱图见图C.1。

图 C.1 淫羊藿苷特征离子色谱图

