

附件 2

食品中番泻苷 A、番泻苷 B 和大黄素甲醚的测定 BJS 201917

1 范围

本方法规定了食品（含保健食品）中番泻苷 A、番泻苷 B 和大黄素甲醚含量的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本方法适用于饮料、代用茶等食品及片剂、胶囊、颗粒剂、口服液等剂型的保健食品中番泻苷 A、番泻苷 B 和大黄素甲醚含量的测定。

2 原理

试样经甲醇-甲酸铵溶液（9:1）超声提取、离心、过滤后，滤液供高效液相色谱-质谱联用仪测定，外标法定量。

3 试剂和材料

注：水为 GB/T 6682 规定的一级水。

3.1 试剂

3.1.1 甲酸（HCOOH）：色谱纯。

3.1.2 甲醇（CH₃OH）：色谱纯。

3.1.3 甲酸铵（CH₅NO₂）：色谱纯。

3.2 试剂配制

3.2.1 甲酸溶液（0.1%）：取甲酸（3.1.1）1.0mL 用水稀释至 1000mL。

3.2.2 甲酸铵溶液(2mmol/L)：称取甲酸铵（3.1.3）0.13g（精确至 0.01g），溶于水并稀释至 1L。

3.2.3 甲醇-甲酸铵溶液（9:1）：取甲醇（3.1.2）900mL，加入 100mL 甲酸铵溶液（3.2.2），混匀。

3.3 标准物质

番泻苷 A、番泻苷 B 和大黄素甲醚的中文名称、英文名称、CAS 登录号、分子式、相对分子量见附录 A 表 A.1。番泻苷 B 和番泻苷 A 的纯度均 $\geq 95.0\%$ ，大黄素甲醚纯度 $\geq 99.0\%$ 。

3.4 标准溶液配制

3.4.1 番泻苷 A 标准储备液 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确称取番泻苷 A (3.3) 10.0mg(精确至 0.0001g), 置 250mL 量瓶中, 加入甲醇-甲酸铵溶液 (9:1) (3.2.3) 200mL, 超声 (40 $^{\circ}\text{C}$) 使溶解, 冷却至室温, 用甲醇-甲酸铵溶液定容至刻度, 摇匀, 制成浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 保存期 3 个月。

3.4.2 番泻苷 B 标准储备液 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确称取番泻苷 B (3.3) 10.0mg(精确至 0.0001g), 置 250mL 量瓶中, 加入甲醇-甲酸铵溶液 (9:1) (3.2.3) 200mL, 使其溶解, 用甲醇-甲酸铵溶液定容至刻度, 摇匀, 制成浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 保存期 3 个月。

3.4.3 大黄素甲醚标准储备液 (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 准确称取大黄素甲醚 (3.3) 10.0mg(精确至 0.0001g), 置 250mL 量瓶中, 加入甲醇 (3.1.2) 200mL, 超声 (40 $^{\circ}\text{C}$) 使溶解, 冷却至室温, 用甲醇定容至刻度, 摇匀, 制成浓度为 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 标准储备液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 保存期 3 个月。

3.4.4 混合标准中间液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$): 分别准确吸取番泻苷 A、番泻苷 B 和大黄素甲醚标准储备液(40 $\mu\text{g}/\text{mL}$)各 2.5mL, 用甲醇-甲酸铵溶液 (9:1) (3.2.3) 稀释至 10mL, 摇匀, 制成 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合标准中间液, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 保存期 1 个月。

3.4.5 混合标准系列工作液的制备: 分别准确吸取混合标准中间液 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (3.4.4) 适量, 用甲醇-甲酸铵溶液 (9:1) (3.2.3) 稀释, 摇匀, 作为系列混合标准工作溶液, 浓度依次为各化合物 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 临用新制或依仪器响应情况配制适当浓度的混合标准工作溶液。或根据需要采用空白基质提取液 (5.1.3), 配制适当浓度的基质混合标准工作溶液。

4 仪器和设备

4.1 高效液相色谱-质谱联用仪，配有电喷雾（ESI）离子源。

4.2 天平：感量分别为 0.00001g 和 0.0001g。

4.3 超声波清洗器。

4.4 涡旋混匀器。

4.5 离心机：转速 \geq 3000r/min。

5 分析步骤

5.1 试样制备

5.1.1 固态试样或半固态试样

取适量固态试样（代用茶及片剂、胶囊内容物、颗粒剂等保健食品）混匀，研细，或取适量半固态试样（软胶囊）内容物混匀，准确称取 1.0g（精确至 0.001g），置 100mL 量瓶中，加入甲醇-甲酸铵溶液（9:1）（3.2.3）80mL，涡旋混匀 1 min，超声（40℃）提取 60min，冷却至室温，用甲醇-甲酸铵溶液（9:1）定容至刻度，摇匀，以 3000r/min 离心 5min，取适量上清液过 0.22 μ m 有机滤膜，取续滤液，待测。

5.1.2 液态试样

取适量试样（饮料、口服液）混匀，准确量取 1.0mL，置 100mL 量瓶中，加入甲醇-甲酸铵溶液（9:1）（3.2.3）80mL，涡旋混匀 1min，超声（40℃）提取 60min，冷却至室温，定容至刻度，摇匀，以 3000r/min 离心 5min，取适量上清液过 0.22 μ m 有机滤膜，取续滤液，待测。

5.1.3 空白基质提取液

称取空白试样适量，与试样同法处理，制得空白基质提取液。

5.1.4 空白溶液

不加试样，与试样同法处理，制得空白溶液。

5.2 仪器参考条件

5.2.1 色谱参考条件

- a) 色谱柱: C₁₈ (2.1×50mm, 1.8μm), 或性能相当者。
- b) 流动相: A 相为甲醇 (3.1.2), B 相为 0.1%甲酸溶液 (3.2.1), 梯度洗脱程序见表 1。
- c) 流速: 0.2mL/min。
- d) 柱温: 40°C。
- e) 进样量: 2μL。

表 1 梯度洗脱程序表

梯度时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	25	75
10	25	75
15	60	40
18	90	10
25	90	10
26	25	75
28	25	75

5.2.2 质谱条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI 源)。
- b) 扫描方式: 负离子扫描 (ESI-)。
- c) 检测方式: 多反应离子监测 (MRM)。
- d) 干燥气、雾化气、加热气等均为高纯氮气, 使用前应调节相应参数使质谱灵敏度达到检测要求, 干燥气流速、加热气流速、雾化气流速、接口温度、脱溶剂管温度、加热器温度、碰撞能量等参数应优化至最佳灵敏度, 监测离子对和定量离子对等信息详见附录 B。

5.3 定性测定

按照超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱条件测定试样和标准工作溶液, 记录试样和标准溶液中各化合物的色谱保留时间, 当试样中检出与某标准品色谱峰保留时间一致的色谱峰 (变

化范围在±2.5%之内), 并且试样色谱图中所选择的监测离子对的相对丰度比与相当浓度标准溶液的离子相对丰度比(k)的偏差不得超过表2规定的范围, 可以确定试样中检出相应化合物。

表2 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 (%)	k > 50%	50% ≥ k > 20%	20% ≥ k > 10%	k ≤ 10%
允许的最大偏差 (%)	± 20	± 25	± 30	± 50

5.4 定量测定

5.4.1 标准曲线的制作

将混合标准工作溶液(3.4.5)分别按仪器参考条件(5.2)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浓度为横坐标, 以定量离子的色谱峰的峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

5.4.2 试样溶液的测定

将试样溶液(5.1.1-5.1.2)按仪器参考条件(5.2)进行测定, 得到样品溶液中对应组分的色谱峰面积。根据标准曲线得到待测液中组分的浓度, 平行测定次数不少于两次。

对照品色谱图参见附录C。

5.4.3 空白溶液的测定

空白溶液(5.1.4)同试样溶液测定步骤操作。

6 结果计算

将高效液相色谱-质谱联用仪测得浓度代入下式计算含量:

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

式中:

X — 试样中各待测物的含量, 单位为毫克每千克 (mg/kg 或 mg/L);

c — 从标准曲线中读出的各待测物的浓度, 单位为微克每毫升 (µg/mL);

V — 样液最终定容体积, 单位为毫升 (mL);

m — 试样的质量或体积，单位为克（g 或 mL）；

K — 稀释倍数。

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。

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

当称样量为 1g（精确至 0.001g）或 1mL，定容体积为 100mL 时，番泻苷 A 的检出限为 0.050mg/kg(mg/L)，定量限为 0.200mg/kg(mg/L)。番泻苷 B 的检出限为 0.050mg/kg(mg/L)，定量限为 0.15mg/kg(mg/L)。大黄素甲醚的检出限为 0.089mg/kg(mg/L)，定量限 0.356mg/kg(mg/L)。空白试验应无干扰。

附录A

化合物相关信息

表A.1 番泻苷A、番泻苷B、大黄素甲醚标准样品的中、英文名称、CAS登录号、

分子式、相对分子量

中文名称	英文名称	CAS 登录号	分子式	相对分子量
番泻苷 A	Sennoside A	81-27-6	$C_{42}H_{38}O_{20}$	862.75
番泻苷 B	Sennoside B	128-57-4	$C_{42}H_{38}O_{20}$	862.75
大黄素甲醚	Phycion	521-61-9	$C_{16}H_{12}O_5$	284.27

附录B

质谱参考条件

质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源(ESI)；
- b) 检测方式：多反应监测 (MRM)；
- c) 扫描方式：负离子扫描(ESI)；
- d) 雾化气流速：3.0L/min；
- e) 加热气流速：10.0L/min；
- f) 干燥气流速：10.0L/min；
- g) 喷雾电压：4.5kV；
- h) 接口温度：300°C；
- i) 脱溶剂管温度：250°C；
- j) 加热器温度：400°C；
- k) 其他质谱参数见表 B.1。

表 B.1 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

序号	化合物名称	电离方式	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能量 (V)	保留时间 (min)
1	番泻苷 B	ESI-	861.4	386.2* 699.2	42 29	14.74
2	番泻苷 A	ESI-	861.4	386.2* 699.2	42 29	15.87
3	大黄素甲醚	ESI-	283.3	240.1* 183.2	25 53	21.09

* 定量离子。

附录C

标准色谱图

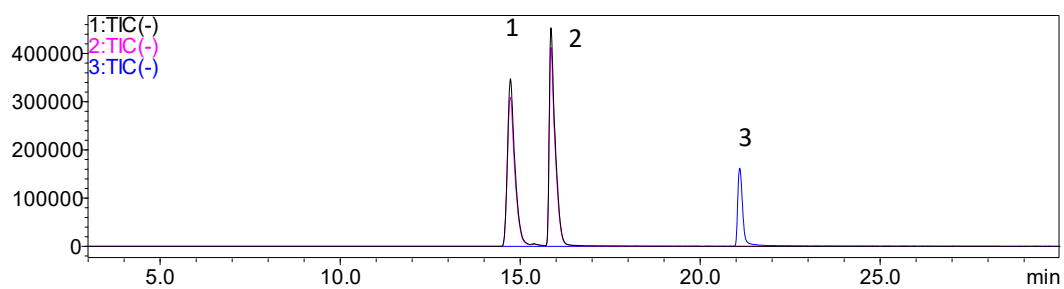


图 C.1 番泻苷 B、番泻苷 A、大黄素甲醚标准物质的总离子流色谱图

(1-番泻苷 B; 2-番泻苷 A; 3-大黄素甲醚, 以下同)

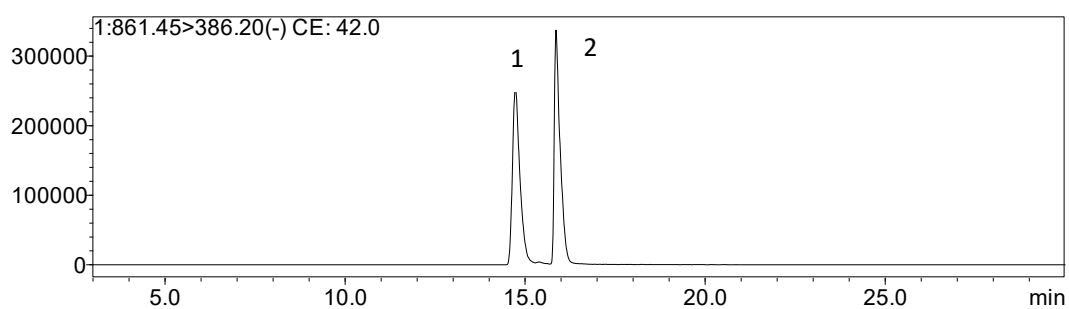


图 C.2 番泻苷 B、番泻苷 A 标准物质的提取定量离子色谱图

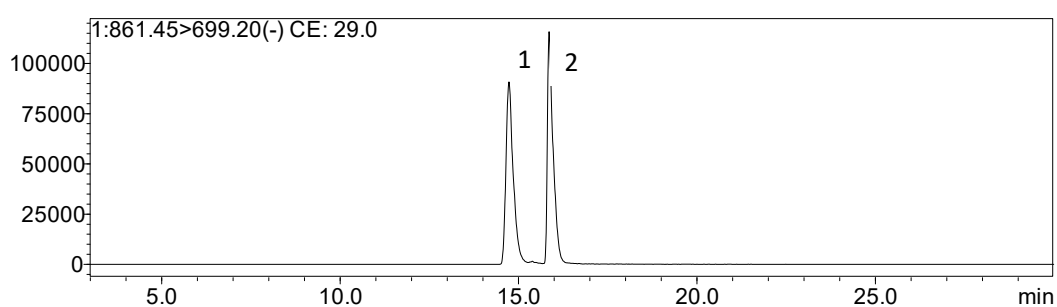


图 C.3 番泻苷 B、番泻苷 A 标准物质的提取定性离子色谱图

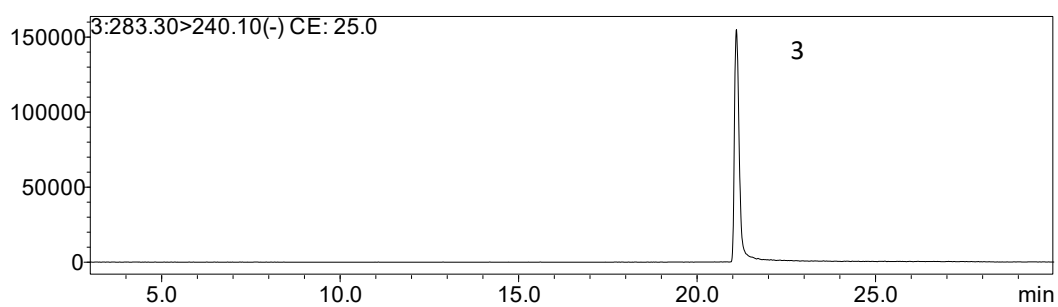


图 C.4 大黄素甲醚标准物质的提取定量离子色谱图

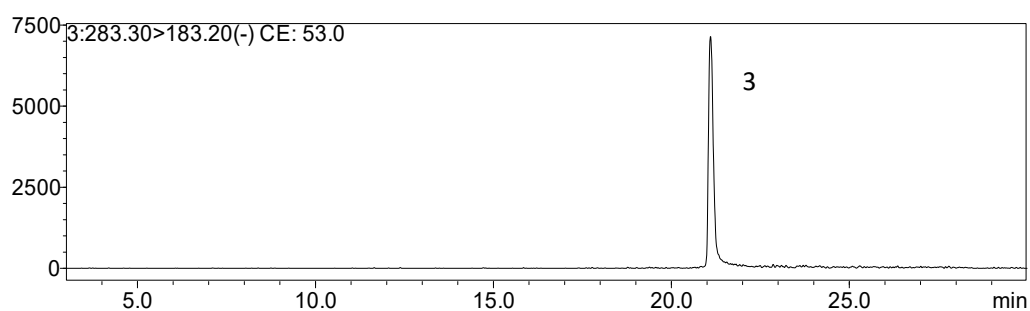


图 C.5 大黄素甲醚标准物质的提取定性离子色谱图

本方法负责起草单位：山东省食品药品检验研究院。

方法的参与单位：中国食品药品检定研究院、山西省食品药品检验所、福建省食品药品质量检验研究院、河北省药品检验研究院、辽宁省食品检验检测院。

主要起草人为：李启艳、刁飞燕、曹进、卢端萍、高广慧、董培智。