



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 2821—2015

蜂胶中咖啡酸苯乙酯的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of caffeic acid phenethyl ester in propolis—
Liquid chromatography tandem mass spectrometry

2015-10-09 发布

2015-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由农业部畜牧业司提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位:农业部农产品及转基因产品质量安全监督检验测试中心(杭州)、杭州蜂之语蜂业股份有限公司。

本标准主要起草人:钱鸣蓉、王强、章虎、周萍、吴俐勤、王祥云、汪建妹、章征天。

蜂胶中咖啡酸苯乙酯的测定 液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了蜂胶中咖啡酸苯乙酯的液相色谱—串联质谱测定方法。

本标准适用于蜂胶乙醇提取物及蜂胶胶囊中咖啡酸苯乙酯的测定。

本标准方法最低检出限为 3 mg/kg, 定量限为 10 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件, 仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 原理

用甲醇溶解, 超声波提取蜂胶中的咖啡酸苯乙酯, 液相色谱—串联质谱仪测定, 外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明, 均使用分析纯试剂, 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇: 色谱纯。

4.2 稀释液: 甲醇+水=80+20。

4.3 咖啡酸苯乙酯标准物质: 纯度 $\geq 97\%$ 。

4.4 咖啡酸苯乙酯标准储备溶液: 准确称取咖啡酸苯乙酯标准物质, 用甲醇配制质量浓度为 1 000 mg/L 的溶液, -18°C 冰箱中保存, 有效期为 12 个月。

4.5 咖啡酸苯乙酯标准中间溶液: 吸取适量咖啡酸苯乙酯标准储备溶液(4.4), 用甲醇稀释配制质量浓度为 1 mg/L 的溶液, $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 保存, 有效期为 1 个月。

4.6 咖啡酸苯乙酯标准工作溶液: 将标准中间溶液(4.5)用稀释液(4.2)稀释成 0.000 2 mg/L、0.001 mg/L、0.01 mg/L、0.05 mg/L、0.20 mg/L 和 0.50 mg/L 多个质量浓度的标准工作溶液, 绘制标准工作曲线。

4.7 滤膜: 有机, $0.22\ \mu\text{m}$ ($\phi 25\ \text{mm}$)。

4.8 聚丙烯离心管: 50 mL。

5 仪器

5.1 液相色谱—串联质谱仪: 配有电喷雾离子源。

5.2 粉碎机。

5.3 分析天平: 感量 0.000 1 g。

5.4 超声波清洗器。

5.5 高速离心机: 转速不低于 7 000 r/min。

6 分析步骤

6.1 试样的制备

6.1.1 蜂胶乙醇提取物的制备

从全部蜂胶样品中取出约 100 g 样品,装入洁净容器中分成 2 份,密封,并做标记。将试样于 -10°C 以下保存。样品测定前,取出冷冻贮存的试样 20 g~30 g,迅速粉碎。

6.1.2 蜂胶胶囊的制备

取装量差异项下胶囊内容物 20 g~30 g,混匀。

6.2 试样处理

准确称取 0.2 g(精确到 0.1 mg)蜂胶试样,置于 150 mL 的具塞锥形瓶中,加入 85 mL 甲醇,超声 15 min,冷却至室温,转移至 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇冲洗具塞锥形瓶并转移至容量瓶中,用甲醇定容,混匀。吸取 10 mL 溶液至 50 mL 离心管中,以 7 000 r/min 的转速离心 10 min,吸取 1 mL 上清液至 50 mL 棕色容量瓶中,用稀释液(4.2)定容,混匀后过滤膜待测。

6.3 测定条件

6.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱: C_{18} (150 mm $\times$ 2.1 mm, 3 μm)或相当者;
- 流动相:以含 0.5%甲酸的甲醇为流动相 A,以含 0.5%甲酸的 5 mmol/L 乙酸铵溶液为流动相 B,A 与 B 之间的比例为 8+2;
- 流速:0.2 mL/min;
- 进样量:5 μL ;
- 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$ 。

6.3.2 质谱参考条件

- 离子源:电喷雾离子源;
- 扫描方式:负离子扫描;
- 喷雾电压:3 000 V;
- 毛细管温度:350 $^{\circ}\text{C}$;
- 雾化气和帘气为氮气,碰撞气为氩气;
- 检测方式:多反应监测(MRM),多反应监测条件见表 1。

表 1 咖啡酸苯乙酯的保留时间和多反应监测条件

中文名称	保留时间 min	定量离子对 m/z	定性离子对 m/z	碰撞能量 eV
咖啡酸苯乙酯	3.5	283.1/135.0	283.1/135.0;283.1/179.0	29;21

6.4 定性测定

检出的色谱峰保留时间与咖啡酸苯乙酯标准物质保留时间相对标准偏差在 $\pm 2.5\%$ 以内,并且在扣除背景后所选择的兩对离子对的丰度比偏差不超过表 2 的规定,则可判断样品中存在咖啡酸苯乙酯。

表 2 定性测定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%	$\leq 10\%$
允许的相对偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

6.5 定量

本方法采用外标法定量,将标准工作溶液(4.6)分别进样,以标准工作溶液质量浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制标准工作曲线。用标准工作曲线对样品进行定量,试液中分析物的响应值应在仪器测定的线性范围内。如试样溶液中咖啡酸苯乙酯质量浓度值超出 0.50 mg/L,则用稀释液(4.2)稀释后测定。在上述条件下,标准溶液和蜂胶样品中咖啡酸苯乙酯的液相色谱—质谱/质谱多反应监测(MRM)色谱图参见附录 A。

7 结果计算

试样中咖啡酸苯乙酯的含量以质量分数计,数值以 ω 表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算。

$$\omega = \frac{\rho_s \times V \times f \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ρ_s ——由回归曲线计算得到的上机试样溶液中咖啡酸苯乙酯含量,单位为毫克每升(mg/L);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

f ——定容后稀释的倍数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

注:计算结果需扣除空白值,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。

8 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%。

附 录 A
(资料性附录)
多反应监测(MRM)色谱图

A. 1 咖啡酸苯乙酯标样多反应监测(MRM)色谱图

见图 A. 1。

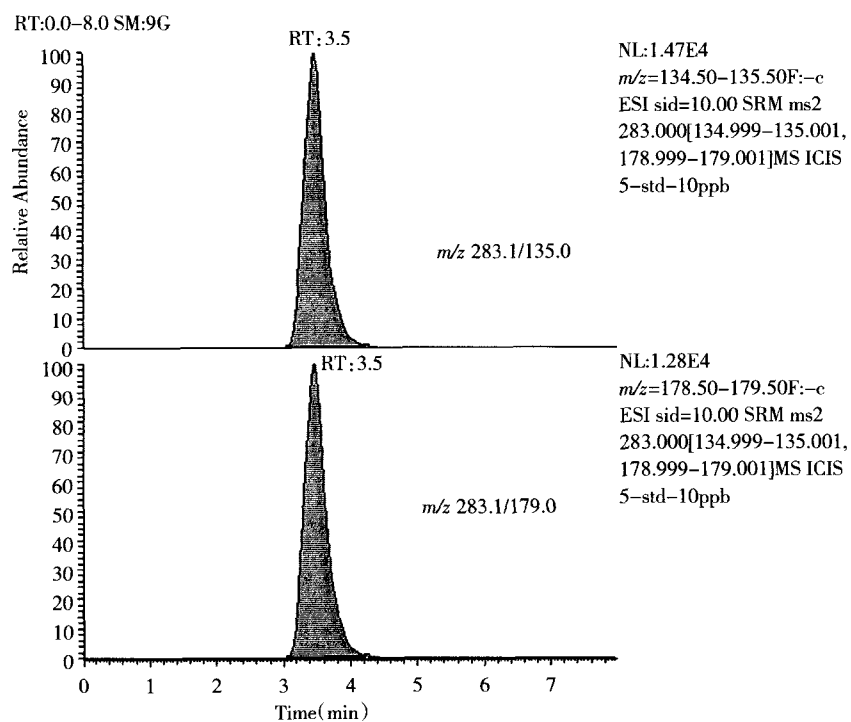


图 A. 1 质量浓度为 0.01 mg/L 咖啡酸苯乙酯标样多反应监测(MRM)色谱图

A. 2 蜂胶样品中咖啡酸苯乙酯的多反应监测(MRM)色谱图

见图 A. 2。

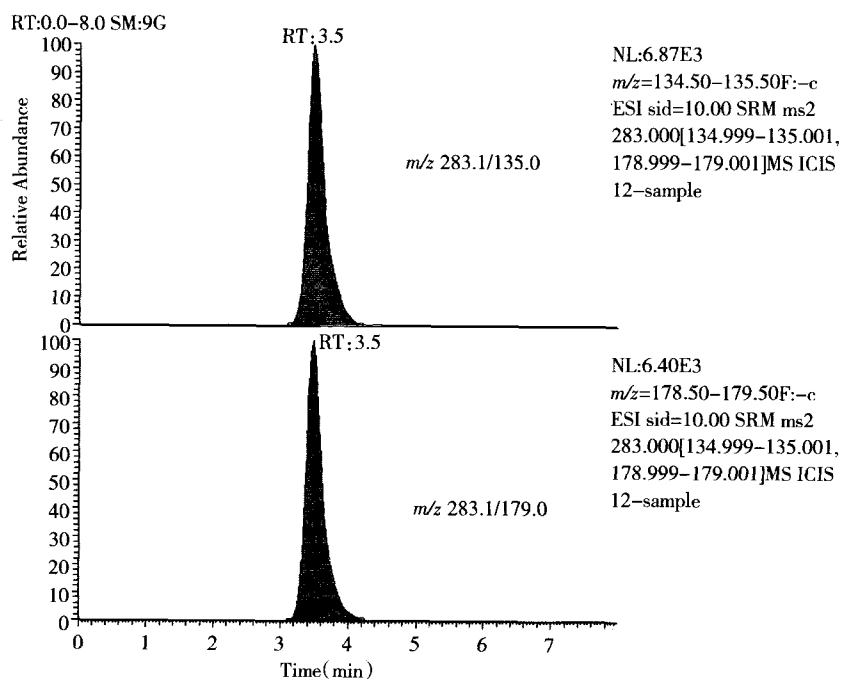


图 A. 2 蜂胶样品中咖啡酸苯乙酯的多反应监测(MRM)色谱图