

## 前 言

本标准的附录 A 和附录 B 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局提出。

本标准由中华全国供销合作总社归口。

本标准起草单位：中华人民共和国秦皇岛出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：庞国芳、李学民、张进杰、曹彦忠、范春林、贾光群。

本标准系首次发布的国家标准。

# 蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、 芹菜素、松属素、萜因、高良姜素含量的 测定方法 液相色谱-串联质谱检测法 和液相色谱-紫外检测法

## 1 范围

本标准规定了蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、萜因、高良姜素含量的液相色谱-串联质谱和液相色谱测定方法。

本标准适用于蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、萜因、高良姜素含量的测定。

本标准液相色谱-串联质谱法的检出限：芦丁为 0.15 g/kg；杨梅酮为 0.050 g/kg；槲皮素、高良姜素为 0.025 g/kg；茨菲醇、芹菜素、松属素、萜因为 0.006 0 g/kg。液相色谱法的检出限：杨梅酮、茨菲醇、芹菜素、萜因为 0.10 g/kg；芦丁、槲皮素、松属素、高良姜素为 0.20 g/kg。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6379 测试方法的精密度 通过实验室间试验确定标准测试方法的重现性和再现性(GB/T 6379—1986, neq ISO 5725:1981)

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法(GB/T 6682—1992, neq ISO 3696:1987)

## 3 原理

甲醇溶解试样，反相液相色谱柱分离黄酮化合物，八种黄酮化合物用液相色谱-串联质谱仪测定或用高效液相色谱紫外检测器测定，外标法定量。

## 4 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为优级纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 磷酸。

4.3 甲醇+水(1+1)：量取 50 mL 甲醇与 50 mL 水混合。

4.4 芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素标准物质：纯度 $\geq 99\%$ 。

4.5 芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素标准储备溶液：准确称取适量的每种标准物质(4.4)，用甲醇(4.1)配制浓度为 0.10 mg/mL 的混合标准储备溶液。

4.6 芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素标准工作溶液：根据需要用甲醇(4.1)和甲醇+水(4.3)将标准储备溶液(4.5)分别稀释成适当浓度的标准工作溶液。

## 5 仪器

5.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源。

5.2 高效液相色谱仪：配有紫外检测器。

5.3 温度可调超声波水浴。

5.4 注射过滤器:容积为 3 mL 或 5 mL,并带有 0.45  $\mu\text{m}$  过滤膜。

5.5 微量注射器:25  $\mu\text{L}$ 。

## 6 分析步骤

### 6.1 试样溶液的制备

称取 0.1 g~0.2 g 试样,精确到 0.001 g,置于 50 mL 容量瓶内,加入 40 mL 甲醇,在 60 $^{\circ}\text{C}$  的超声波水浴中,振荡 40 min,待样品完全溶解后,取出冷却至室温。然后用甲醇定容至 50 mL~100 mL,摇匀。用注射过滤器将试样溶液过滤至样品瓶内,摇匀后,供液相色谱仪测定。过滤的样液取 1 mL 与 1 mL 水混合后,供液相色谱-串联质谱仪测定。

### 6.2 测定

#### 6.2.1 液相色谱条件

##### 6.2.1.1 串联质谱法

- 色谱柱:Mightysil RP-18 3  $\mu\text{m}$  150 mm $\times$ 4.6 mm(内径)或相当者;
- 流动相:甲醇+水(65+35),用磷酸(4.2)调节流动相至 pH=3;
- 流速:0.3 mL/min;
- 进样量:20  $\mu\text{L}$ 。

##### 6.2.1.2 紫外检测法

- 色谱柱:Mightysil RP-18 3  $\mu\text{m}$  150 mm $\times$ 4.6 mm(内径)或相当者;
- 流动相:甲醇+水(58+42),用磷酸(4.2)调节流动相至 pH=3;
- 流速:0.7 mL/min;
- 检测波长:270 nm;
- 进样量:10  $\mu\text{L}$ 。

#### 6.2.2 质谱条件

- 扫描方式:正离子扫描;
- 检测方式:多反应检测;
- 电喷雾电压:4 000 V;
- 雾化气压力:0.055 MPa;
- 气帘气压力:0.069 MPa;
- 辅助气流速:6 L/min;
- 离子源温度:380 $^{\circ}\text{C}$ ;
- 去簇电压:100 V;
- 定性离子对、定量离子对和碰撞气能量,见表 1。

表 1 八种黄酮化合物的定性离子对、定量离子对、碰撞气能量和去簇电压

名称	定性离子对/(m/z)	定量离子对/(m/z)	碰撞气能量/V
芦丁	611/303 611/147	611/303	45
杨梅酮	319/153 319/137	319/153	45
槲皮素	303/229 303/152	303/229	40
苜蓿醇	287/153 237/134	287/153	45
芹菜素	271/153 271/118	271/153	45
松属素	257/153 257/131	257/153	35
荜因	255/153 255/128	255/153	45
高良姜素	271/153 271/118	271/153	45

### 6.2.3 测定

#### 6.2.3.1 液相色谱-串联质谱检测法测定

用芦丁、杨梅酮、槲皮素、荜非醇、芹菜素、松属素、奇因、高良姜素标准储备溶液配成的混合标准工作溶液(4.6)分别进样,以标准工作溶液浓度为横坐标,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,样品溶液中芦丁、杨梅酮、槲皮素、荜非醇、芹菜素、松属素、奇因、高良姜素的响应值均应在仪器测定的线性范围内。在上述色谱条件下,芦丁、杨梅酮、槲皮素、荜非醇、芹菜素、松属素、奇因、高良姜素的保留时间见表2。芦丁、杨梅酮、槲皮素、荜非醇、芹菜素、松属素、奇因、高良姜素的总离子流图参见附录A中的图A.1。

表2 八种黄酮化合物的参考保留时间

黄酮化合物名称	保留时间/min
芦丁	6.41
杨梅酮	7.66
槲皮素	10.09
荜非醇	14.18
芹菜素	15.25
松属素	24.56
奇因	29.92
高良姜素	36.19

#### 6.2.3.2 液相色谱紫外检测法测定

根据试样溶液中每种黄酮化合物含量情况,选定峰高相近的标准工作溶液。标准工作溶液和试样溶液中每种黄酮化合物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。对标准工作溶液和试样溶液等体积穿插进样测定。在上述色谱条件下,八种黄酮化合物出峰顺序和保留时间见表3。

表3 八种黄酮化合物的参考保留时间

黄酮化合物名称	保留时间/min
芦丁	3.326
杨梅酮	4.224
槲皮素	6.367
荜非醇	10.007
芹菜素	10.810
松属素	19.118
奇因	24.022
高良姜素	30.377

八种黄酮化合物标准物质的液相色谱图参见附录A中的图A.2。

本方法的添加回收率数据参见附录B中的表B.1。

### 6.3 平行试验

按上述步骤,对同一试样进行平行试验测定。

### 6.4 空白试验

除不称取试样外,均按上述分析步骤进行。

## 7 结果计算

## 7.1 液相色谱-串联质谱检测法

蜂胶中黄酮化合物含量利用数据处理系统计算或按式(1)计算:

$$X = c \times \frac{V}{m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000 \times 1\ 000} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

X——试样中黄酮化合物含量,单位为克每千克(g/kg);

c——从标准工作曲线得到的试样溶液中黄酮化合物的浓度,单位为微克每毫升( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

V——试样溶液定容体积,单位为毫升(mL);

m——最终试样溶液所代表的试样质量,单位为克(g)。

## 7.2 液相色谱紫外检测法

蜂胶中黄酮化合物含量利用数据处理系统计算或按式(2)计算:

$$X = \frac{h \times c_s \times V}{h_s \times m} \times \frac{1\ 000}{1\ 000 \times 1\ 000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

X——试样中黄酮化合物含量,单位为克每千克(g/kg);

h——试样溶液中黄酮化合物的峰高,单位为毫米(mm);

$h_s$ ——标准工作溶液中黄酮化合物的峰高,单位为毫米(mm);

$c_s$ ——标准工作溶液中黄酮化合物的浓度,单位为微克每毫升( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );

V——试样溶液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m——最终试样溶液所代表的试样质量,单位为克(g)。

注:计算结果需将空白值扣除。

## 8 精密度

本标准精密度数据是按照 GB/T 6379 的规定确定的,其重复性和再现性的值是以 95% 的可信度来计算。

## 8.1 液相色谱-串联质谱检测法

## 8.1.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限( $r$ ),蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、荜非醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素测定含量及重复性方程见表 4。

表 4 液相色谱-串联质谱检测法八种黄酮化合物含量范围及重复性和再现性方程

黄酮化合物名称	测定含量/(g/kg)	重复性限 $r$	再现性限 $R$
芦丁	1.313~1.401	$\lg r = -7.702\ 6 \lg m + 0.217\ 5$	$R = -0.733\ 1m + 1.258\ 2$
杨梅酮	0.736~0.645	$\lg r = -4.480\ 4 \lg m - 1.609\ 5$	$R = -1.009\ 3m - 0.849\ 5$
槲皮素	0.079~0.028	$\lg r = 0.876\ 2 \lg m - 1.226\ 3$	$\lg R = 0.706\ 2 \lg m - 1.179\ 0$
荜非醇	0.421~0.171	$\lg r = 1.080\ 7 \lg m - 0.702\ 6$	$\lg R = 0.930\ 5 \lg m - 0.737\ 5$
芹菜素	0.403~0.132	$\lg r = 0.691\ 6 \lg m - 1.123\ 3$	$\lg R = 0.724\ 9 \lg m - 0.963\ 9$
松属素	2.056~1.075	$\lg r = 1.112\ 0 \lg m - 0.903\ 8$	$\lg R = 1.066\ 2 \lg m - 0.726\ 3$
萜因	2.954~1.236	$\lg r = 0.820\ 0 \lg m - 0.890\ 3$	$\lg R = 0.475\ 9 \lg m - 0.687\ 1$
高良姜素	3.504~1.163	$\lg r = 0.474\ 7 \lg m - 0.800\ 4$	$\lg R = 0.989\ 5 \lg m - 0.676\ 1$

注:  $m$  为两次测定结果的算术平均值。

如果两次测定值的差值超过重复性限( $r$ ),应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

### 8.1.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限( $R$ ),蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨非醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素测定含量及再现性方程见表4。

## 8.2 液相色谱紫外检测法

### 8.2.1 重复性

在重复性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过重复性限( $r$ ),蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨非醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素含量范围及重复性方程见表5。

表5 液相色谱-紫外检测法八种黄酮化合物含量范围及重复性和再现性方程

黄酮化合物名称	含量范围/(g/kg)	重复性限 $r$	再现性限 $R$
芦丁	0.20~100	$\lg r = 0.8575 \lg m - 1.0353$	$\lg R = 0.8599 \lg m - 0.9893$
杨梅酮	0.10~50	$\lg r = 0.8667 \lg m - 1.1347$	$R = 0.0965m + 0.0098$
槲皮素	0.20~100	$\lg r = 0.8849 \lg m - 0.9541$	$\lg R = 0.9325 \lg m - 0.8442$
茨非醇	0.10~50	$r = 0.0548m - 0.0893$	$R = 0.0856m + 0.0017$
芹菜素	0.10~50	$r = 0.0339m + 0.0022$	$R = 0.0781m + 0.0034$
松属素	0.20~100	$r = 0.0815m - 0.0046$	$\lg R = 0.9664 \lg m - 1.0039$
萜因	0.10~50	$r = 0.0354m + 0.0019$	$R = 0.0675m + 0.0042$
高良姜素	0.20~100	$\lg r = 0.9578 \lg m - 1.1997$	$\lg R = 0.9082 \lg m - 0.8888$

注:  $m$  为两次测定结果的算术平均值。

如果两次测定值的差值超过重复性限( $r$ ),应舍弃试验结果并重新完成两次单个试验的测定。

### 8.2.2 再现性

在再现性条件下,获得的两次独立测试结果的绝对差值不超过再现性限( $R$ ),蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨非醇、芹菜素、松属素、萜因和高良姜素含量范围及再现性方程见表5。

## 附录 A

(资料性附录)

## 八种黄酮化合物标准物质的总离子流图和液相色谱图

A.1 八种黄酮化合物标准物质的总离子流图,见图 A.1。

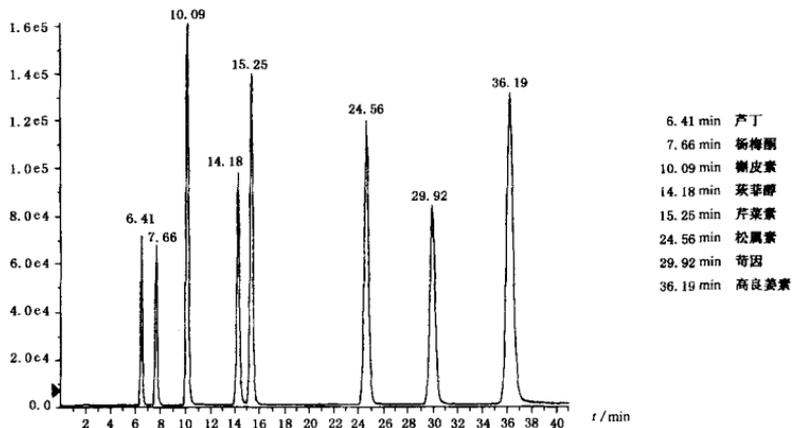


图 A.1

A.2 八种黄酮化合物标准物质的液相色谱图,见图 A.2。

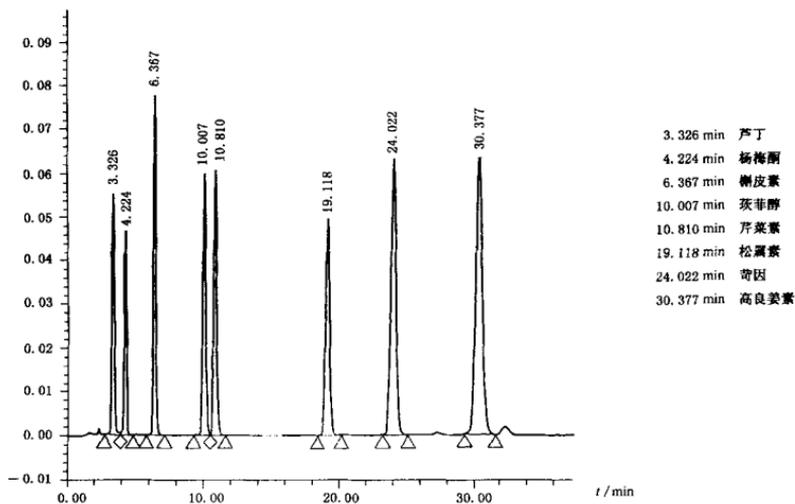


图 A.2

**附录 B**  
(资料性附录)  
**回收率**

本方法中液相色谱紫外检测法芦丁、杨梅酮、槲皮素、荜非醇、芹菜素、松属素、苛因、高良姜素添加浓度及平均回收率的试验数据,见表 B.1。

**表 B.1**

黄酮化合物名称	添加浓度/(g/kg)	回收率/(%)
芦丁	0.2	91.5
	50	92.5
	100	93.1
杨梅酮	0.1	93.2
	25	92.1
	50	91.8
槲皮素	0.2	93.5
	50	93.3
	100	92.4
荜非醇	0.1	93.4
	25	94.2
	50	92.3
芹菜素	0.1	93.0
	25	91.7
	50	92.6
松属素	0.2	92.7
	50	92.3
	100	92.1
苛因	0.1	95.8
	25	91.9
	50	92.7
高良姜素	0.2	91.3
	50	91.6
	100	92.0