

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4307—2023

葛根中黄酮类化合物的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of flavonoids in the root of kudzu vine—
High performance liquid chromatography-mass spectrometry (HPLC-MS)

2023-02-17 发布

2023-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部农产品质量安全监管司提出。

本文件由农业农村部农产品营养标准专家委员会归口。

本文件起草单位：北京工业大学、浙江省农业科学院、广西壮族自治区农业科学院。

本文件主要起草人：张芳、齐沛沛、王颖、王雨婷、智美丽、裴鹭羽、李宜珊、严华兵、尚小红。

葛根中黄酮类化合物的测定

高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了葛根中黄酮类化合物的高效液相色谱-串联质谱的定量检测方法。

本文件适用于野葛和粉葛中葛根素、3'-羟基葛根素、3'-甲氧基葛根素、大豆苷、大豆苷元、染料木素、染料木苷、刺芒柄花苷、刺芒柄花黄素、异甘草素和鹰嘴豆芽素 A 等 11 种黄酮类化合物含量的测定。

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。

4 原理

葛根样品中的黄酮类化合物用乙醇水溶液超声提取,采用高效液相色谱串联质谱仪测定,外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有规定,所有试剂均为分析纯。

5.1 试剂

5.1.1 水:GB/T 6682,一级。

5.1.2 甲醇(CH_4O):色谱纯。

5.1.3 甲酸(CH_2O_2):色谱纯。

5.1.4 乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$):分析纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 10%甲醇溶液:取 10 mL 甲醇(5.1.2),加水(5.1.1)定容至 100 mL,混匀。

5.2.2 30%乙醇溶液:取 30 mL 乙醇(5.1.4),加水(5.1.1)定容至 100 mL,混匀。

5.3 标准

黄酮类化合物标准品:相关信息见表 1,纯度不低于 98%。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 黄酮类化合物标准储备液:准确称取 11 种(表 1)待测物质的标准品,用甲醇(5.1.2)溶解后,加入 10%甲醇溶液(5.2.1)定量稀释,制成高浓度单标准品储备液。分别移取一定量的 11 种单标准品储备液于 25 mL 容量瓶,10%甲醇溶液(5.2.1)定容,制成 10 mg/L 的母液作为标准品储备液。避光-18℃以下保存,备用。

5.4.2 黄酮类化合物混合标准溶液:用 10%甲醇溶液(5.2.1)对 10 mg/L 的母液(5.4.1)稀释配成不同浓度的混合标准溶液用于绘制标准曲线。混合标准溶液应现用现配。

表 1 黄酮类化合物标准品基本信息表

序号	中文名称	英文名称	分子量	CAS 号
1	大豆苷元	Daidzein	254.24	486-66-8
2	异甘草素	Isoliquiritin	256.25	961-29-5
3	刺芒柄花黄素	Formononetin	268.26	485-72-3
4	染料木素	Genistein	270.24	446-72-0
5	鹰嘴豆芽素 A	Biochanin A	284.26	491-80-5
6	大豆苷	Daidzin	416.38	552-66-9
7	葛根素	Puerarin	416.38	3681-99-0
8	刺芒柄花苷	Ononin	430.40	486-62-4
9	3'-羟基葛根素	3'-hydroxypterarin	432.38	117060-54-5
10	染料木苷	Genistin	432.38	529-59-9
11	3'-甲氧基葛根素	3'-methoxypterarin	446.40	117047-07-1

6 仪器设备

- 6.1 超高效液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源(ESI)。
- 6.2 电热鼓风干燥箱:温度 50 °C~330 °C,功率 3.1 kW。
- 6.3 超声波清洗器:超声输入功率 200 W。
- 6.4 离心机:转速不低于 7 500 r/min。
- 6.5 超细水冷式粉碎机:细度 20 目~180 目(0.85 mm~0.09 mm),功率 2.5 kW。
- 6.6 天平:感量 0.001 g 和 0.000 1 g。

7 试样制备

7.1 试样制备

新鲜葛根经清洗去掉泥沙、去皮,用切片机切成 2 mm 薄片后,放置于托盘中,于 70 °C 烘箱中烘干至恒重。然后用分级超细水冷式粉碎机将葛根样品粉碎,全部装入洁净的容器中,立即检测。如果需要较长时间保存,将样品密封、标记后于-18 °C 以下保存。

7.2 试样提取

称取葛根粉末 0.5 g(精确至 0.000 1 g),置于 50 mL 离心管中,加入 25 mL 30%乙醇溶液(5.2.2),室温下超声提取 45 min。于 7 500 r/min 离心 5 min,将上清液转移至 50 mL 容量瓶中。沉淀物再用 30%乙醇溶液(5.2.2)洗涤 2 次,每次用量约 5 mL。在相同条件下离心 5 min,合并上清液,30%乙醇溶液(5.2.2)定容至 50 mL。上样前,采用 0.22 μm 有机相滤膜过滤(5.5)。

8 测定

8.1 超高效液相色谱参考条件

- 8.1.1 色谱柱:ACE Excel C₁₈柱(100 mm×2.1 mm×1.7 μm)或性能相当者。
- 8.1.2 流动相 A:甲醇(5.1.2)。
- 8.1.3 流动相 B:0.1%甲酸水溶液,取 0.1 mL 甲酸(5.1.3)加水(5.1.1)定容至 100 mL,混匀。
- 8.1.4 柱温:40 °C。
- 8.1.5 流速:0.3 mL/min。
- 8.1.6 进样量:10 μL。
- 8.1.7 流动相:梯度洗脱程序见表 2。

表2 梯度洗脱程序

t, min	A, %	B, %
0	5	95
1	40	60
3	80	20
5	95	5
7	95	5
7.1	5	95
9	5	95

8.2 质谱参考条件

8.2.1 扫描方式:正负离子扫描。

8.2.2 离子化电压:4 000 V。

8.2.3 毛细管温度:250 ℃。

8.2.4 碰撞气体:氩气(纯度为 99.99%),压力为 270 kPa。

8.2.5 雾化气:氮气(纯度为 97%以上),流速为 3.0 L/min。

8.2.6 辅助气:氮气(纯度为 97%以上),流速为 10.0 L/min。

8.2.7 检测方式:多反应监测(MRM)。

8.2.8 黄酮类化合物保留时间和监测离子对信息见附录 A。

8.3 供试样品的测定

在仪器的最佳条件下,分别取黄酮类化合物混合标准溶液(5.4.2)与葛根素等 11 种黄酮类化合物样品(7.2)上机测定。混合标准溶液中 11 种黄酮类化合物总离子色谱图和各组分离子色谱图见附录 A。

8.4 定性测量

在相同试验条件下测定试样和混合标准溶液,若样品溶液中检出色谱峰的保留时间与基质标准溶液中目标物色谱峰的保留时间一致(变化范围在±2.5%),且样品溶液的质谱离子对相对丰度与浓度相当基质标准溶液的质谱离子对相对丰度相比较,相对离子丰度的相对偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定样品中存在该组分。混合标准溶液中各黄酮类化合物离子色谱图见附录 B。

表3 定性时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分号

相对丰度(基峰)	50	20~50	10~20	≤10
允许的相对偏差	±20	±25	±30	±50

8.5 定量测量

以不同浓度混合标准溶液的浓度为横坐标,色谱峰面积(响应值)为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数应不低于 0.99。试样溶液与标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。如超出线性范围,应重新试验或将试样溶液和基质匹配混合标准系列溶液作相应稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与溶剂混合标准溶液的浓度相差不超过 30%。标准加入法则以添加的标准溶液浓度为横坐标、色谱峰面积(响应值)为纵坐标,绘制标准曲线,并外推至浓度坐标轴。

8.6 结果计算

用液相色谱-质谱数据处理软件或者按照公式计算试样中检测目标物量,按公式(1)计算。

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

式中:

ω ——试样中黄酮类化合物的含量的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

A ——样品中黄酮类化合物的峰面积;

ρ_s ——标准溶液浓度的数值,单位为毫克每升(mg/L);

V ——定容体积的数值,单位为毫升(mL);

f ——稀释倍数;

A_s ——标样中黄酮类化合物的峰面积;

m ——最终溶液所代表的试样质量的数值,单位为克(g)。

注:计算结果应扣除空白值,测定结果用平行测定的算术平均值表示,保留3位有效数字。

9 精密度

9.1 重复性

在重复性条件下获得的2次独立的测定结果的绝对差值不大于这2个测定值的算术平均值的15%。

9.2 再现性

在再现性条件下获得的2次独立的测试结果的绝对差值不大于2个测定值的算术平均值的15%。

10 检出限和定量限

葛根样品中大豆苷、葛根素、3-甲氧基葛根素和刺芒柄花黄酮的检出限为0.01 mg/kg,定量限为0.03 mg/kg;刺芒柄花苷、3-甲氧基葛根素和异甘草素的检出量为0.02 mg/kg,定量限为0.07 mg/kg;大豆苷元、染料木素、染料木苷和鹰嘴豆芽素A的检出限为0.03 mg/kg,定量限为0.1 mg/kg。



附录 A

(资料性)

黄酮类化合物保留时间、电离模式和监测离子对信息

黄酮类化合物保留时间、电离模式和监测离子对信息见表 A.1。

表 A.1 黄酮类化合物保留时间、电离模式和监测离子对信息

序号	中文名称	保留时间 min	前体离子 <i>m/z</i>	产物离子 <i>m/z</i>	Q1 偏差 V	碰撞电压 V	Q3 偏差 V	电离模式
1	葛根素	2.812	415.1	267.1 [*] ; 295.1	50;13	32;22	19;21	ESI ⁻
2	3'-甲氧基葛根素	2.847	445.2	282.1 [*] ; 325.2	9;25	37;24	21;25	ESI ⁻
3	大豆苷	3.030	417.1	255.1 [*] ; 137.0	-12; -30	-21; -48	-26; -26	ESI ⁺
4	3'-羟基葛根素	3.530	431.1	311.1 [*] ; 283.1	13;23	24;33	15;19	ESI ⁻
5	染料木苷	3.531	432.1	269.1 [*] ; 240.1	23;13	31;45	19;11	ESI ⁻
6	刺芒柄花苷	3.711	431.2	269.1 [*] ; 227.0	-22; -14	-21; -16	-18; -26	ESI ⁺
7	大豆苷元	3.860	253.1	224.0 [*] ; 208.1	29;13	26;30	15;21	ESI ⁻
8	染料木素	4.082	269.1	133.1 [*] ; 159.1	33;15	29;28	50;15	ESI ⁻
9	异甘草素	4.214	255.1	119.1 [*] ; 135.0	31;15	22;14	45;47	ESI ⁻
10	刺芒柄花黄素	4.398	267.1	252.1 [*] ; 223.1	15;31	19;30	17;23	ESI ⁻
11	鹰嘴豆芽素 A	4.693	283.1	268.1 [*] ; 239.1	33;9	21;31	19;11	ESI ⁻

* 为定量离子。

附录 B

(资料性)

11种黄酮类化合物总离子流图和各组分离子色谱图

B.1 混合标准溶液中 11 种黄酮类化合物总离子色谱图

见图 B.1。

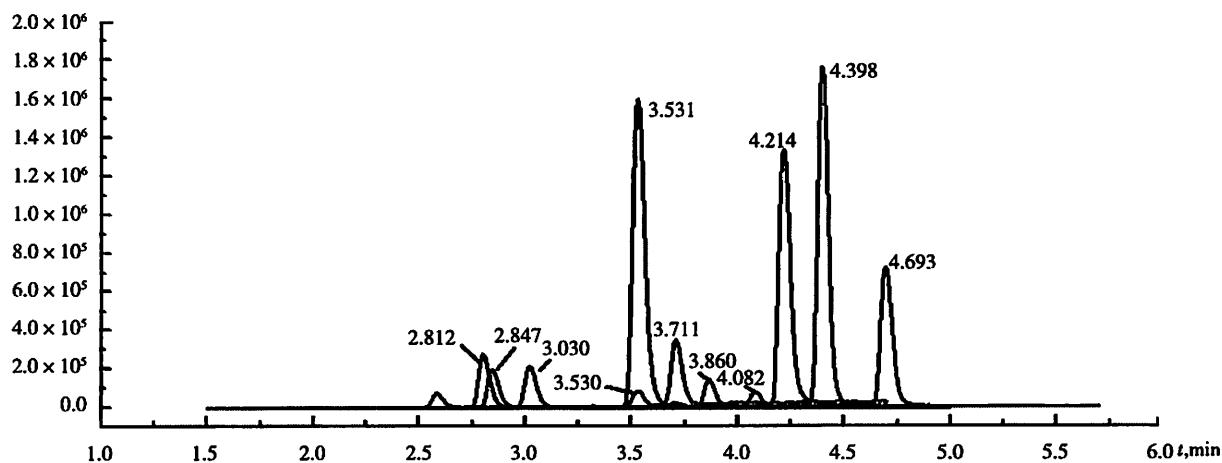


图 B.1 混合标准溶液中 11 种黄酮类化合物离子色谱图

B.2 混合标准溶液中 11 种黄酮类化合物各组分离子色谱图

见图 B.2。

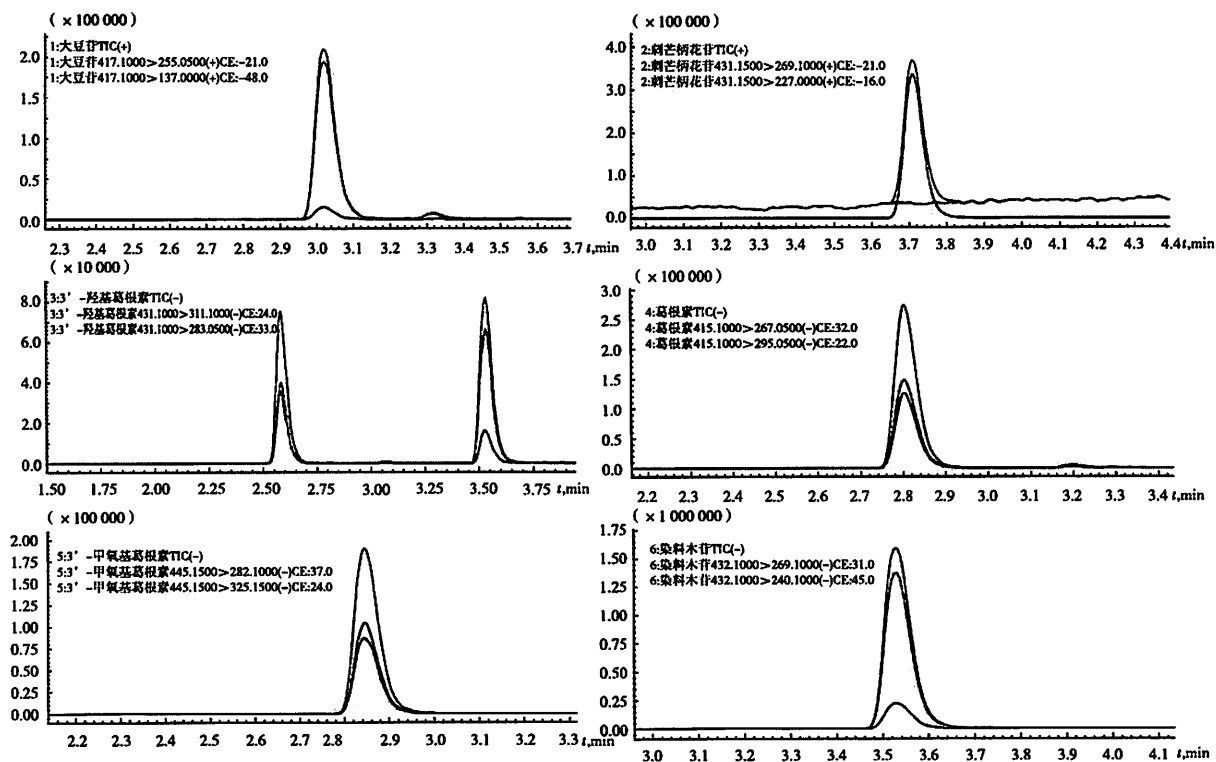


图 B.2 混合标准溶液中 11 种黄酮类化合物各组分离子色谱图

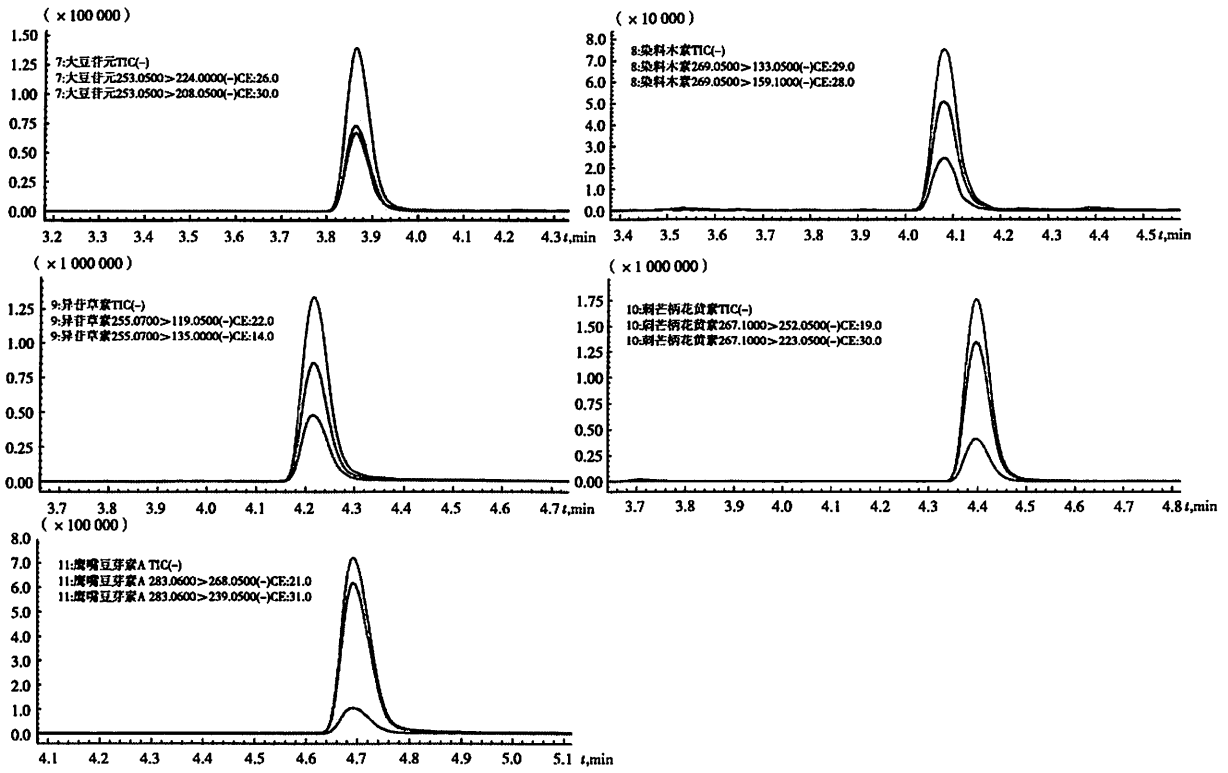


图 B.2 (续)

中华人民共和国
农业行业标准
葛根中黄酮类化合物的测定
高效液相色谱-串联质谱法

NY/T 4307—2023

* * *

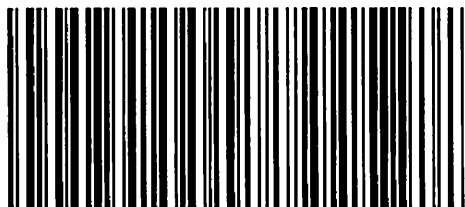
中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)
北京印刷一厂印刷
新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

* * *

开本 880mm×1230mm 1/16 印张 0.75 字数 15 千字
2023 年 4 月第 1 版 2023 年 4 月北京第 1 次印刷

书号: 16109·9369

定价: 24.00 元



NY/T 4307—2023

版权专有 侵权必究
举报电话: (010) 59194261