

中华人民共和国国家标准

GB/T 19427—2022

代替 GB/T 19427—2003

蜂胶中 12 种酚类化合物含量的测定 液相色谱-串联质谱法和液相色谱法

Determination of 12 phenolic compounds in propolis—
HPLC-MS/MS method and HPLC method

2022-03-09 发布

2022-10-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

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 19427—2003《蜂胶中芦丁、杨梅酮、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、苛因、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》，与 GB/T 19427—2003 相比，除结构调整和编辑性修改外，主要技术变化如下：

- a) 增加了咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、短叶松素 3-乙酸酯、绿原酸、阿替匹林 C 检测项目(见第 1 章、5.11、7.2)；
- b) 删除了芦丁、杨梅酮检测项目(见 2003 年版的第 1 章，4.4、4.5、4.6、6.2)；
- c) 更改了蜂胶样品提取条件(见 7.1，2003 年版的 6.1)。

本文件由中华全国供销合作总社提出。

本文件由全国蜂产品标准化工作组(SAC/SWG 2)归口。

本文件起草单位：秦皇岛海关技术中心、浙江大学、厦门思健生物科技有限公司。

本文件主要起草人：李学民、胡福良、崔宗岩、张翠平、李响、杨志伟、曹翠玲、刘晓茂、贾光群、张进杰、曹彦忠、颜鉴翔。

本文件所代替文件的历次版本发布情况为：

——GB/T 19427—2003。

蜂胶中 12 种酚类化合物含量的测定

液相色谱-串联质谱法和液相色谱法

1 范围

本文件描述了蜂胶中咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、柯因、高良姜素、短叶松素 3-乙酸酯、绿原酸、阿替匹林 C 含量测定的液相色谱-串联质谱法和液相色谱法。

本文件适用于蜂胶中咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、柯因、高良姜素、短叶松素 3-乙酸酯、绿原酸、阿替匹林 C 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

蜂胶试样用 85%乙醇水溶液提取，超声、离心、过滤和定容后，液相色谱-串联质谱仪测定或配有紫外检测器的液相色谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 乙醇：无水乙醇。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 甲酸：色谱纯。

5.4 乙酸：色谱纯。

5.5 乙醇水溶液(85+15)：准确移取 85 mL 乙醇(5.1)至 100 mL 容量瓶中，用水定容。

5.6 甲醇水溶液(80+20)：准确移取 80 mL 甲醇(5.2)至 100 mL 容量瓶中，用水定容。

5.7 甲醇-0.1%甲酸水溶液(50+50)：准确移取 50 mL 甲醇(5.2)以及 0.1 mL 甲酸(5.3)至 100 mL 容量瓶中，用水定容。

5.8 0.1%甲酸水溶液：准确移取 1.0 mL 甲酸(5.3)至 1 000 mL 容量瓶中，用水定容。

5.9 0.1%甲酸-甲醇溶液：准确移取 1.0 mL 甲酸(5.3)至 1 000 mL 容量瓶中，用甲醇(5.2)定容。

5.10 1.0%乙酸水溶液：准确移取 10 mL 乙酸(5.4)至 1 000 mL 容量瓶中，用水定容。

5.11 标准物质:绿原酸(CAS号:327-97-9)、咖啡酸(CAS号:331-39-5)、*p*-香豆酸(CAS号:501-98-4)、阿魏酸(CAS号:1135-24-6)、槲皮素(CAS号:117-39-5)、茨菲醇(CAS号:520-18-3)、芹菜素(CAS号:520-36-5)、松属素(CAS号:480-39-7)、短叶松素 3-乙酸酯(CAS号:52117-69-8)、柯因(CAS号:480-40-0)、高良姜素(CAS号:548-83-4)和阿替匹林 C(CAS号:72944-19-5),纯度均不低于 98%。

5.12 标准储备液:准确称取适量的标准物质(5.11),分别用甲醇(5.2)制备浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备液,该储备液在-18℃及以下温度可稳定保存 6 个月。

5.13 标准工作溶液:移取适量的标准储备液(5.12),用甲醇-0.1%甲酸水溶液(5.7)稀释成浓度为 0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL、1.0 μg/mL 的混合标准工作溶液,供液相色谱-串联质谱法检测使用;移取适量的标准储备液(5.12),用甲醇水溶液(5.6)分别稀释成浓度为 1.0 μg/mL、2.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL、20.0 μg/mL、50.0 μg/mL 的混合标准工作溶液,供液相色谱-紫外检测法检测使用。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。

6.2 液相色谱仪:配有紫外(或二极管阵列)检测器。

6.3 分析天平:感量 0.01 mg 和 0.001 g。

6.4 超声波清洗仪。

6.5 离心机:转速不低于 4 000 r/min。

6.6 微量可调移液器:量程分别为 10 μL~100 μL 和 0.1 mL~1 mL。

6.7 微孔滤膜:0.22 μm。

7 分析步骤

7.1 试样的制备与处理

7.1.1 试样的制备

取混合均匀的代表性蜂胶样品约 100 g,密封,并做标记。在样品测定前,将被测样品放入 10℃以下冰箱中保持 2 h 后,取出 20 g~30 g,迅速用粉碎机粉碎,过孔径约为 2 mm(10 目)的筛,冷藏保存于冰箱中作为待测试样。

7.1.2 试样的处理

称取 0.5 g(精确至 0.001 g)试样于 50 mL 塑料离心管中,加 15 mL 乙醇水溶液(5.5),在室温超声提取 20 min,在 4 000 r/min 下离心 10 min,上清液转入 50 mL 容量瓶中,按照上述步骤重复提取离心 2 次,合并上清液,用乙醇水溶液(5.5)定容至 50 mL,混匀。取上述样品溶液用甲醇水溶液(5.6)适当稀释并混匀后,取部分溶液过 0.22 μm 微孔滤膜(6.7)至样品瓶中,供液相色谱仪(6.2)测定;或取上述样品溶液用甲醇-0.1%甲酸水溶液(5.7)适当稀释后,过 0.22 μm 微孔滤膜(6.7)至样品瓶中,供液相色谱-串联质谱仪(6.1)测定。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱-串联质谱参考条件

液相色谱-串联质谱仪的液相色谱参考条件如下:

a) 色谱柱:C18,100 mm × 2.1 mm;1.7 μm 或相当者;



- b) 流动相 A:0.1%甲酸水溶液(5.8);
- c) 流动相 B:0.1%甲酸-甲醇溶液(5.9),梯度洗脱条件参见附录 A 的表 A.1;
- d) 流速:0.25 mL/min;
- e) 柱温:30 °C;
- f) 进样体积:2 μ L。

液相色谱-串联质谱仪的质谱参考条件如下:

- a) 扫描方式:正负离子扫描;
- b) 检测方式:多离子反应监测(MRM);
- c) 电喷雾电压:+5 500 V/−4 500 V;
- d) 雾化气体气压:0.345 MPa;
- e) 气帘气压:0.172 MPa;
- f) 离子源温度:500 °C;
- g) 去簇电压:+100 V/−100 V;
- h) 定量离子对、定性离子对和碰撞能量:参见表 1。

7.2.2 液相色谱参考条件



液相色谱仪(6.2)的参考条件如下:

- a) 色谱柱:C18,150 mm \times 4.6 mm;3.0 μ m 或相当者;
- b) 流动相 A:1.0%乙酸水溶液(5.10);
- c) 流动相 B:甲醇(5.2),梯度洗脱条件参见表 A.2;
- d) 流速:1.0 mL/min;
- e) 柱温:35 °C;
- f) 进样体积:5 μ L;
- g) 检测波长:12 种酚类化合物的定量检测波长参见表 1。

表 1 HPLC-MS/MS 离子化模式、定量离子对、定性离子对、碰撞能量及 HPLC-UV 检测波长

化合物	离子化模式	定量离子对 (m/z)	定性离子对 (m/z)	碰撞能量/V	HPLC-UV 检测波长/ nm
绿原酸	负离子(−)	352.9/190.9	352.9/85.0	20/52	310
咖啡酸	负离子(−)	178.8/134.9	178.8/133.9	20/32	310
<i>p</i> -香豆酸	负离子(−)	162.8/118.9	162.8/92.9	20/40	310
阿魏酸	负离子(−)	192.8/133.9	192.8/177.9	22/18	310
槲皮素	负离子(−)	300.8/150.9	300.8/178.8	28/24	350
菝葜醇	正离子(+)	287.0/153.0	287.0/68.9	41/79	350
芹菜素	负离子(−)	268.9/116.9	268.9/150.9	38/32	350
松属素	正离子(+)	257.0/153.0	257.0/131.0	35/40	280
短叶松素 3-乙酸酯	负离子(−)	312.7/253.0	312.7/271.0	28/26	280
柯因	正离子(+)	255.0/153.0	255.0/77.0	45/83	280
高良姜素	正离子(+)	271.0/153.0	271.0/77.0	41/73	280
阿替匹林 C	负离子(−)	299.0/255.0	299.0/200.0	24/28	315

7.2.3 定性与定量测定

7.2.3.1 液相色谱-串联质谱法

按 7.2.1 中液相色谱-串联质谱分析条件,分别测定样品溶液和混合标准工作溶液(5.13)。如果样品溶液与标准工作溶液在相同的保留时间有峰出现(保留时间偏差不超过±2.5%),且在扣除背景后的样品谱图中,所选择离子全部出现,其离子的丰度与标准物质对应的离子丰度一致,相对离子丰度偏差不超过表 2 的规定范围,可判定样品中存在被测物。以标准工作溶液浓度为横坐标,以 12 种酚类化合物定量离子峰面积为纵坐标绘制标准工作曲线。样品溶液中 12 种酚类化合物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。12 种酚类化合物的多反应监测(MRM)色谱图和保留时间参见附录 B 的图 B.1。

表 2 定性测定中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%
允许相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

7.2.3.2 液相色谱法

按 7.2.2 中液相色谱分析条件,分别测定样品溶液和混合标准工作溶液。如果样品溶液与混合标准工作溶液在相同的保留时间有峰出现(保留时间偏差不超过±2.5%),可判定样品中存在被测物。以标准工作溶液浓度为横坐标,以定量检测波长下 12 种酚类化合物峰面积为纵坐标绘制标准工作曲线。样品溶液中 12 种酚类化合物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。12 种酚类化合物标准物质的色谱图和保留时间参见图 B.2。

7.3 平行试验

同一样品应按照 7.1 和 7.2 进行平行测试。

7.4 空白试验

不称取试样,其余均按照 7.1 和 7.2 进行。

8 结果计算

某一种酚类化合物在试样中的含量用色谱数据处理系统或用式(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 ——试样中酚类化合物含量,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各目标物质量浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

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)。

计算结果保留三位有效数字。

9 定量限

本文件液相色谱-串联质谱法的定量限:绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、槲皮素、茨菲醇、芹菜

素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、柯因、高良姜素和阿替匹林 C 均为 $0.02 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；按照 1 : 10 000 稀释倍数计算，方法对于实际样品中绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、柯因、高良姜素、阿替匹林 C 定量限均为 $0.20 \text{ g}/\text{kg}$ 。

本文件液相色谱法的定量限：绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、柯因、高良姜素、阿替匹林 C 均为 $1.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ；按照 1 : 100 稀释倍数计算，方法对于实际样品中绿原酸、咖啡酸、*p*-香豆酸、阿魏酸、槲皮素、茨菲醇、芹菜素、松属素、短叶松素 3-乙酸酯、柯因、高良姜素、阿替匹林 C 定量限均为 $0.10 \text{ g}/\text{kg}$ 。

10 精密度

平行试验两次测定的绝对差值不超过其算术平均值的 10%。



附录 A

(资料性)

液相色谱-串联质谱法和液相色谱-紫外检测法梯度洗脱条件

液相色谱-串联质谱法和液相色谱-紫外检测法的梯度洗脱条件分别见表 A.1 和表 A.2。

表 A.1 液相色谱-串联质谱法梯度洗脱条件

时间/min	流动相 A:0.1%甲酸水溶液/ %	流动相 B:0.1%甲酸-甲醇溶液/ %
1.00	85	15
1.50	70	30
3.00	70	30
3.50	60	40
5.00	60	40
5.50	40	60
6.50	40	60
7.00	30	70
8.00	20	80
8.50	0	100
10.50	0	100
11.50	85	15
16.00	85	15

表 A.2 液相色谱法梯度洗脱条件

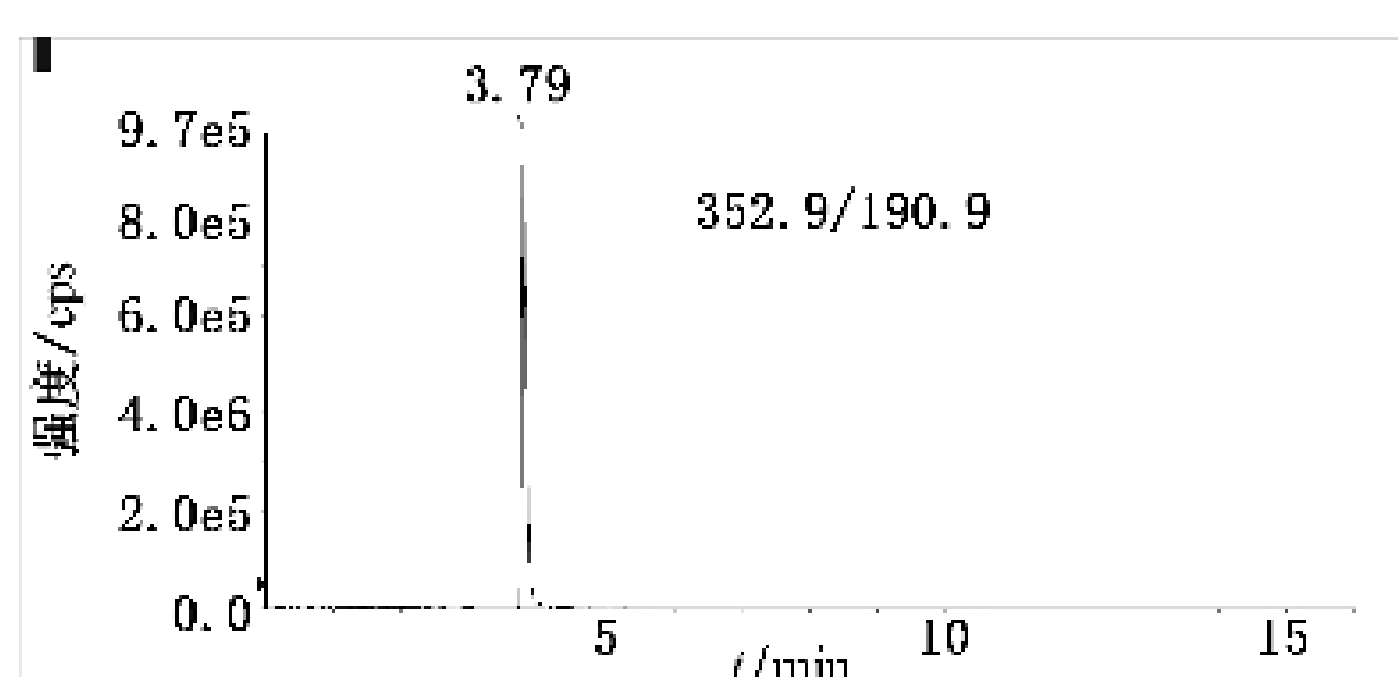
时间/min	流动相 A:1.0%乙酸水溶液/ %	流动相 B:甲醇/ %
8.00	70	30
12.00	50	50
20.00	50	50
25.00	40	60
35.00	25	75
45.00	0	100
50.00	70	30
60.00	70	30

附录 B

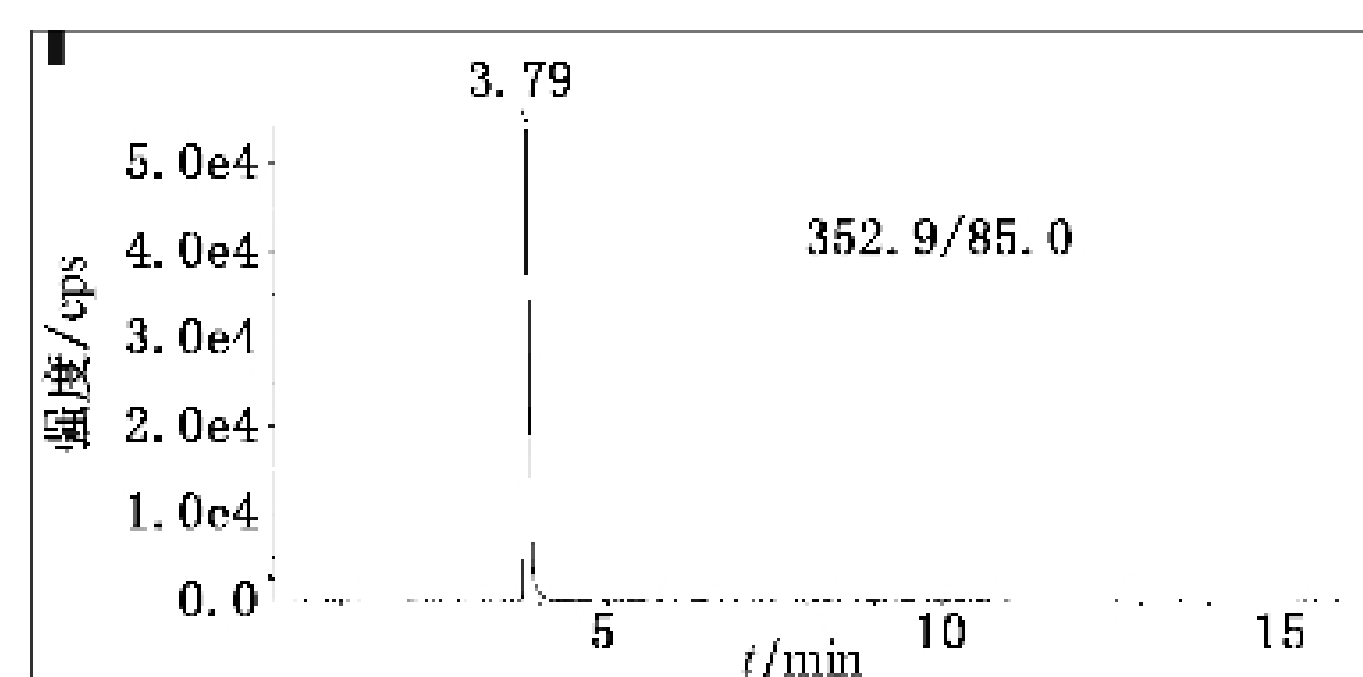
(资料性)

12 种酚类化合物标准的多离子反应监测(MRM)色谱图和 HPLV-UV 色谱图

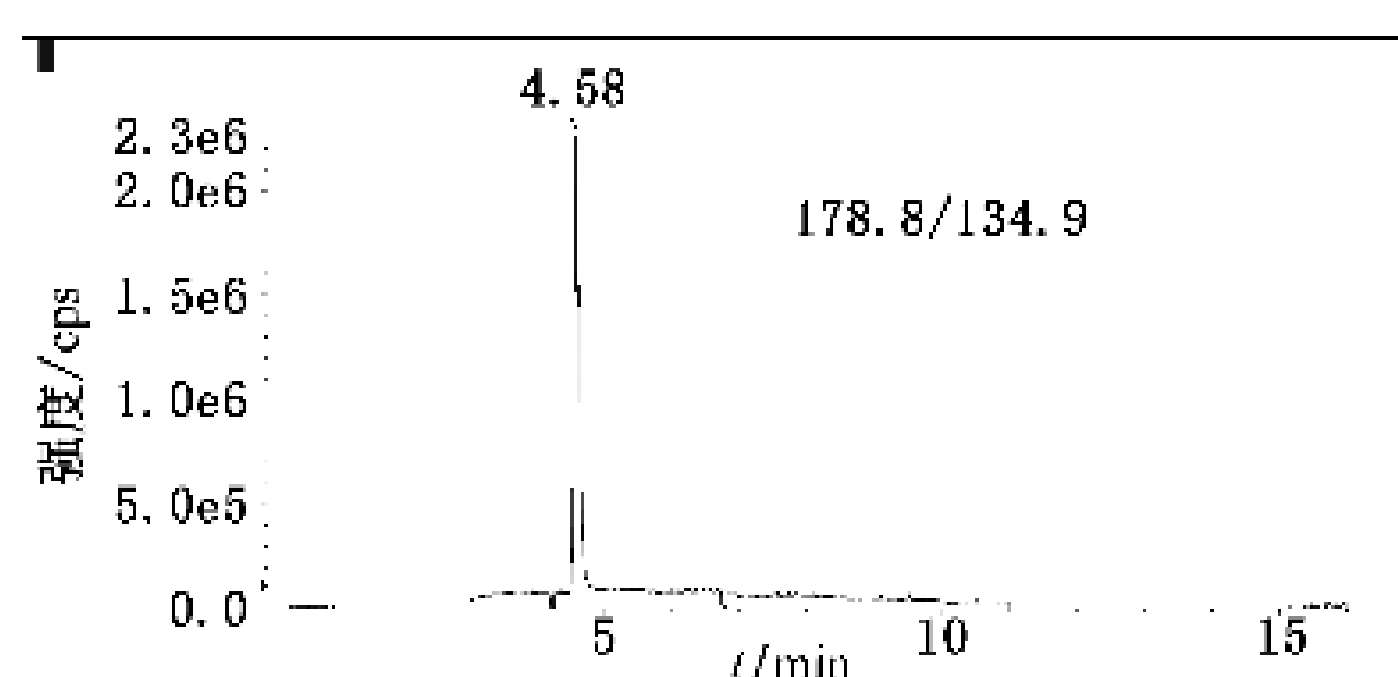
12 种酚类化合物标准的多离子反应监测(MRM)色谱图和 HPLV-UV 色谱图分别见图 B.1 和图 B.2。



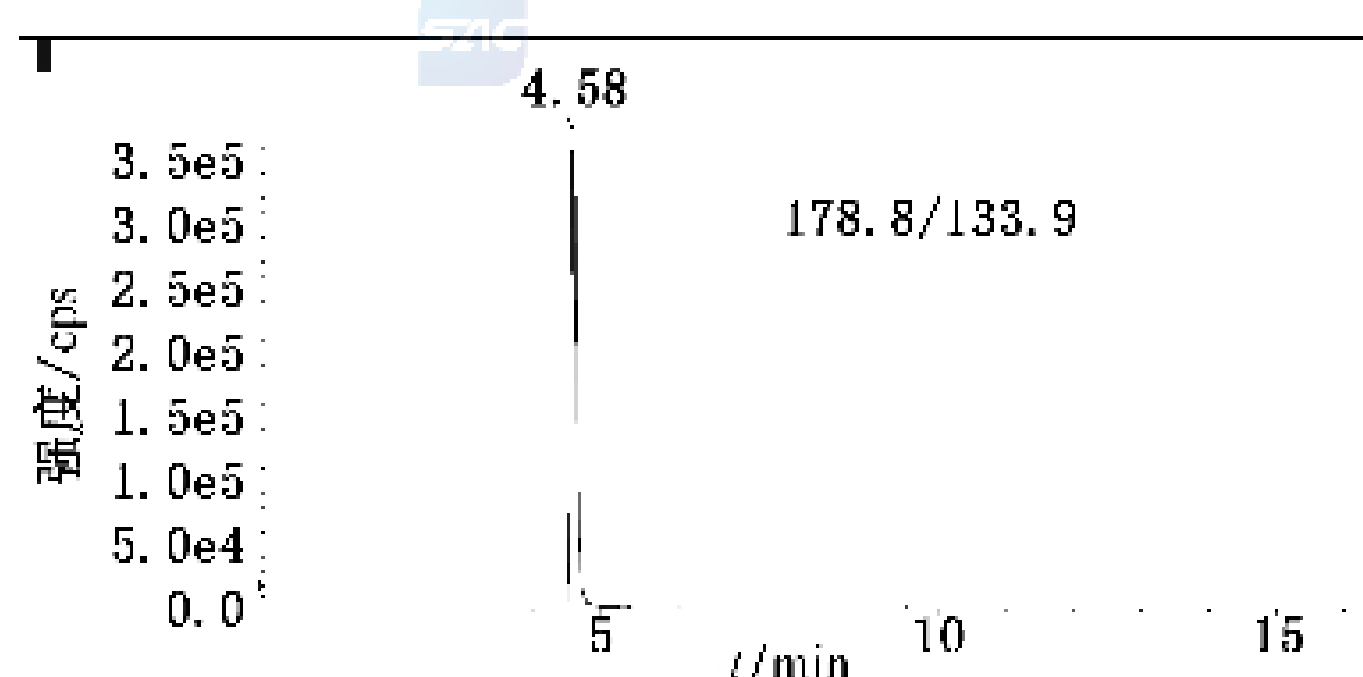
a) 绿原酸定量离子对色谱图



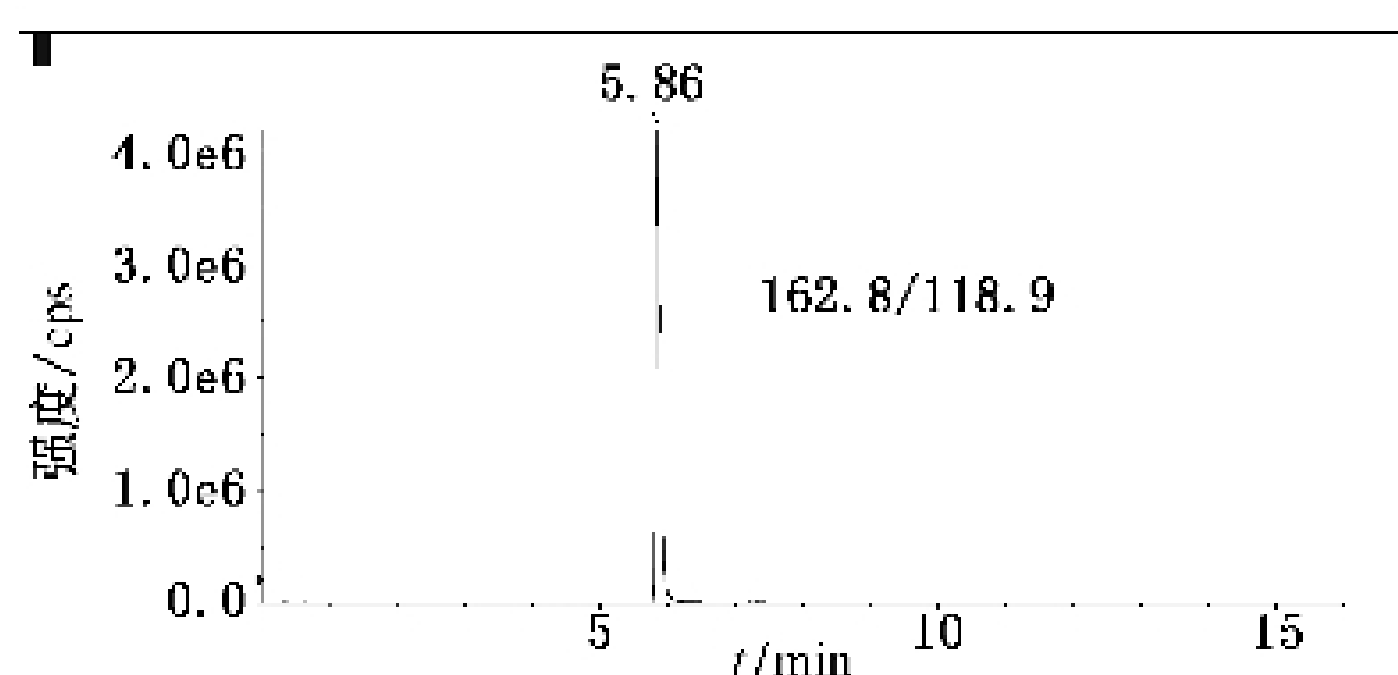
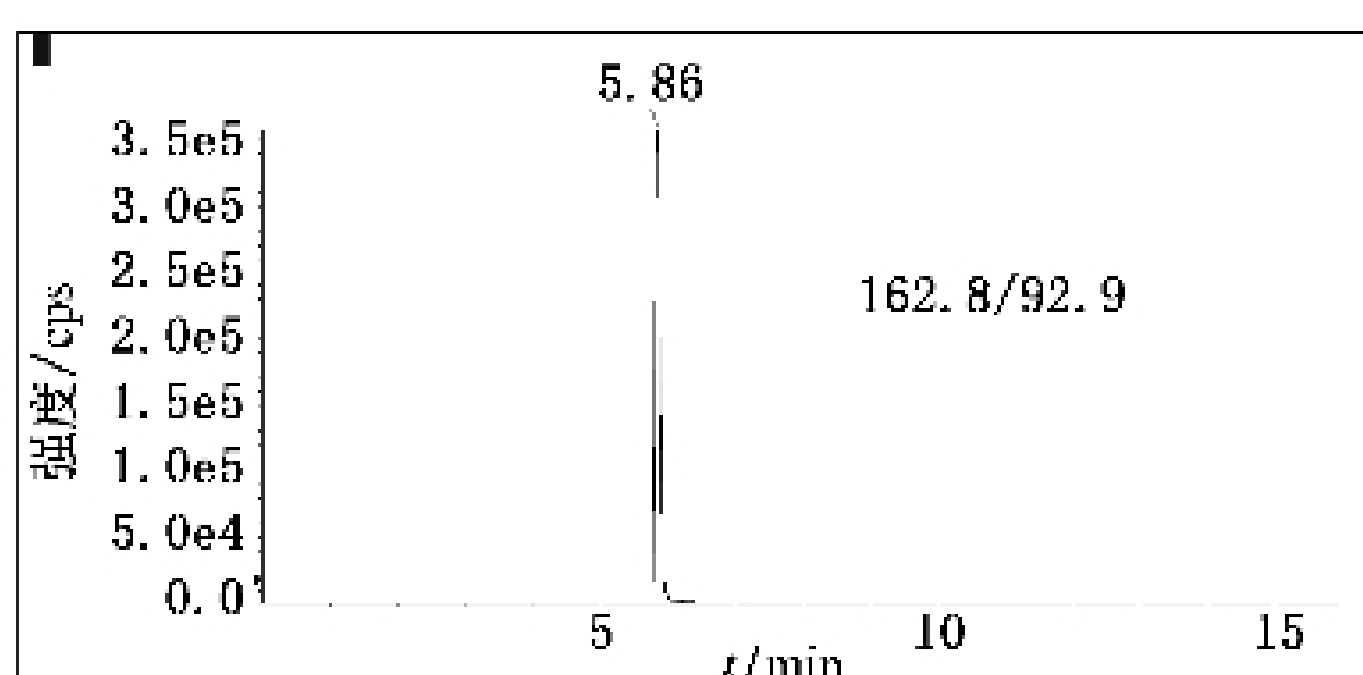
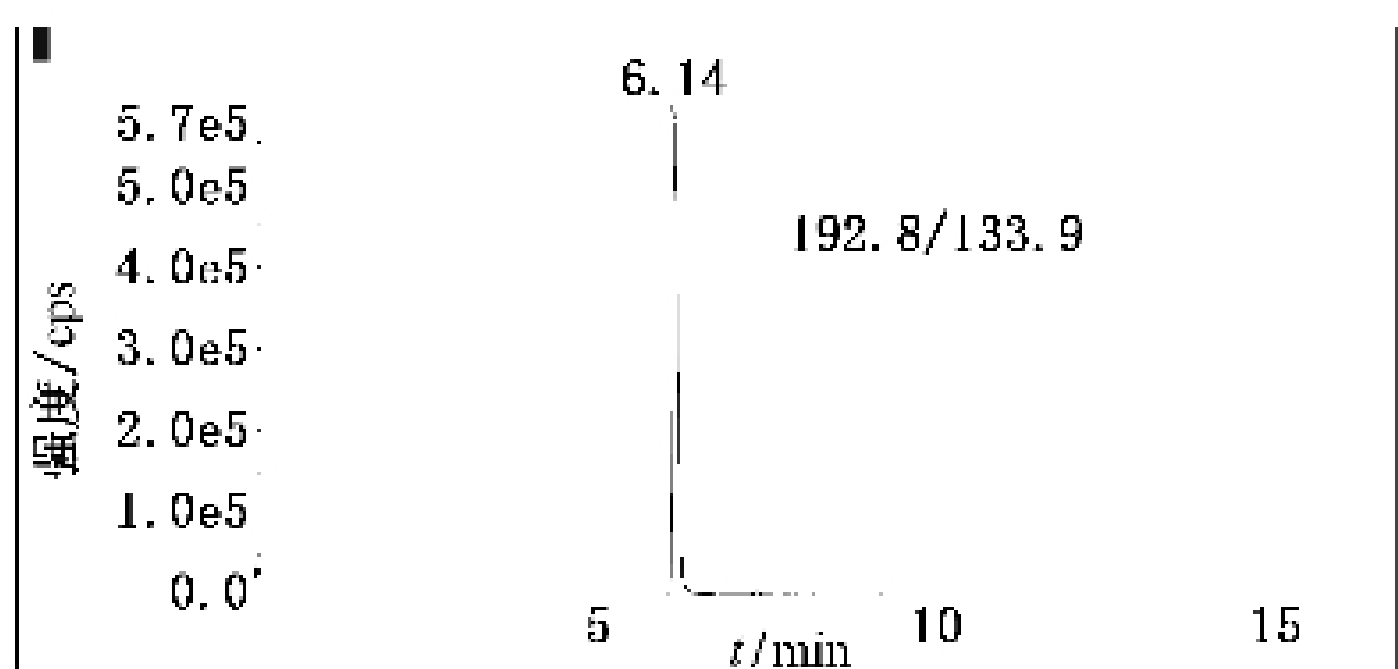
b) 绿原酸定性离子对色谱图



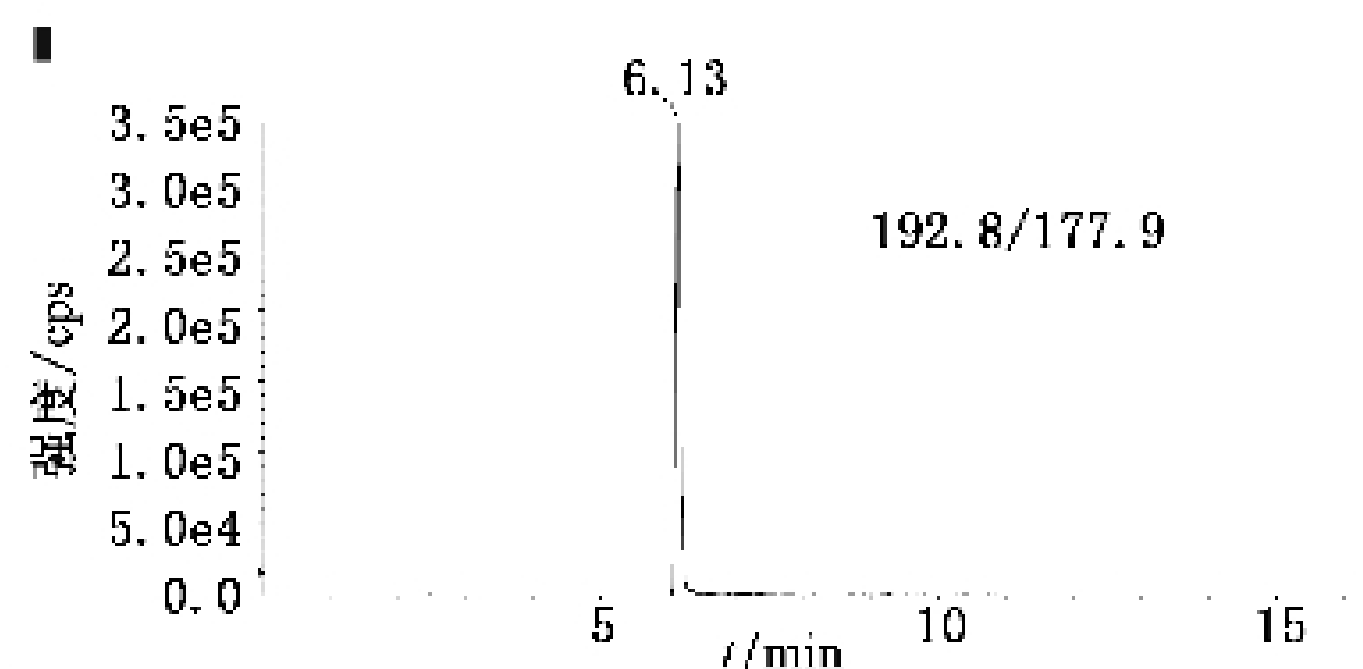
c) 咖啡酸定量离子对色谱图



d) 咖啡酸定性离子对色谱图

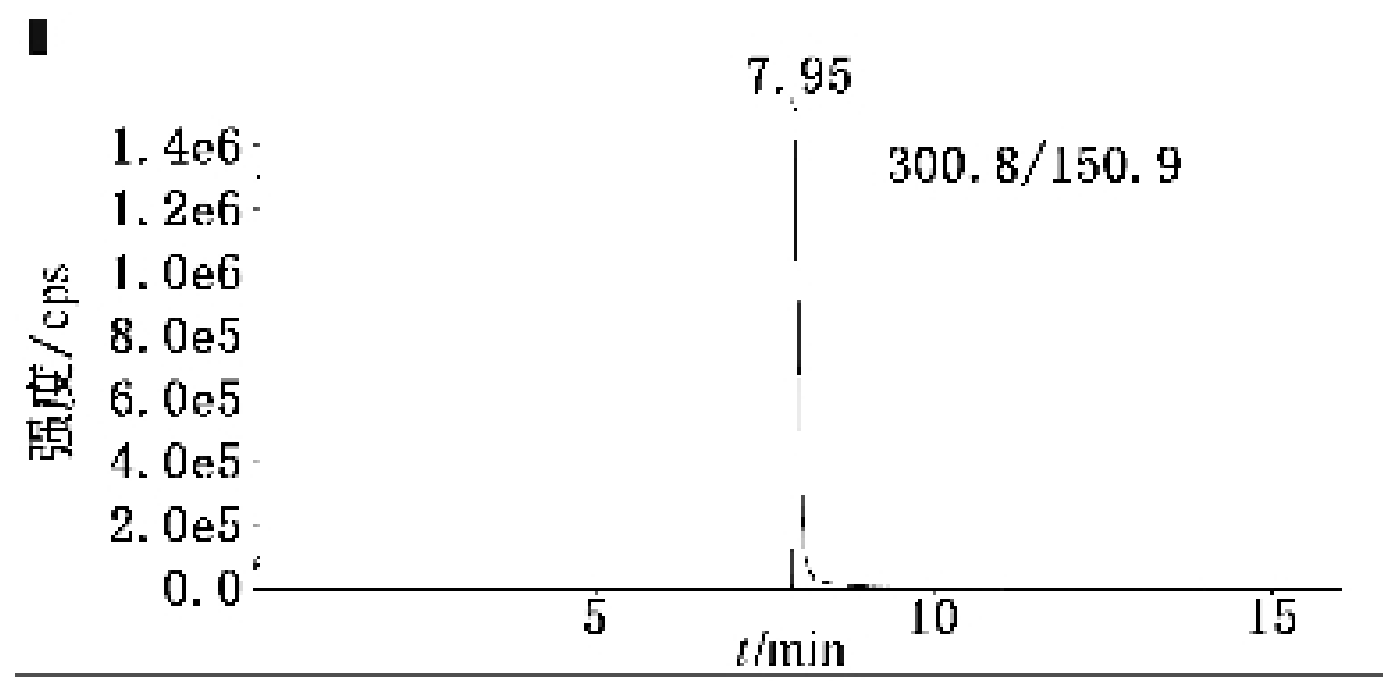
e) *p*-香豆酸定量离子对色谱图f) *p*-香豆酸定性离子对色谱图

g) 阿魏酸定量离子对色谱图

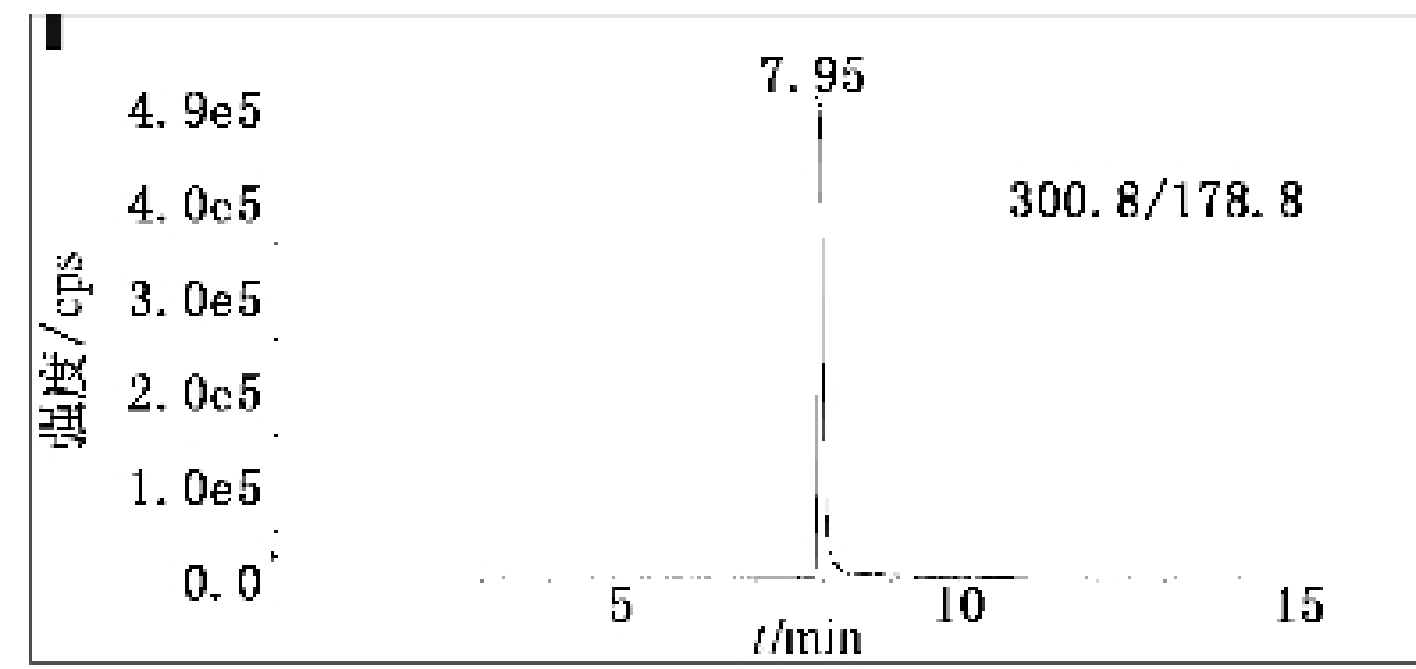


h) 阿魏酸定性离子对色谱图

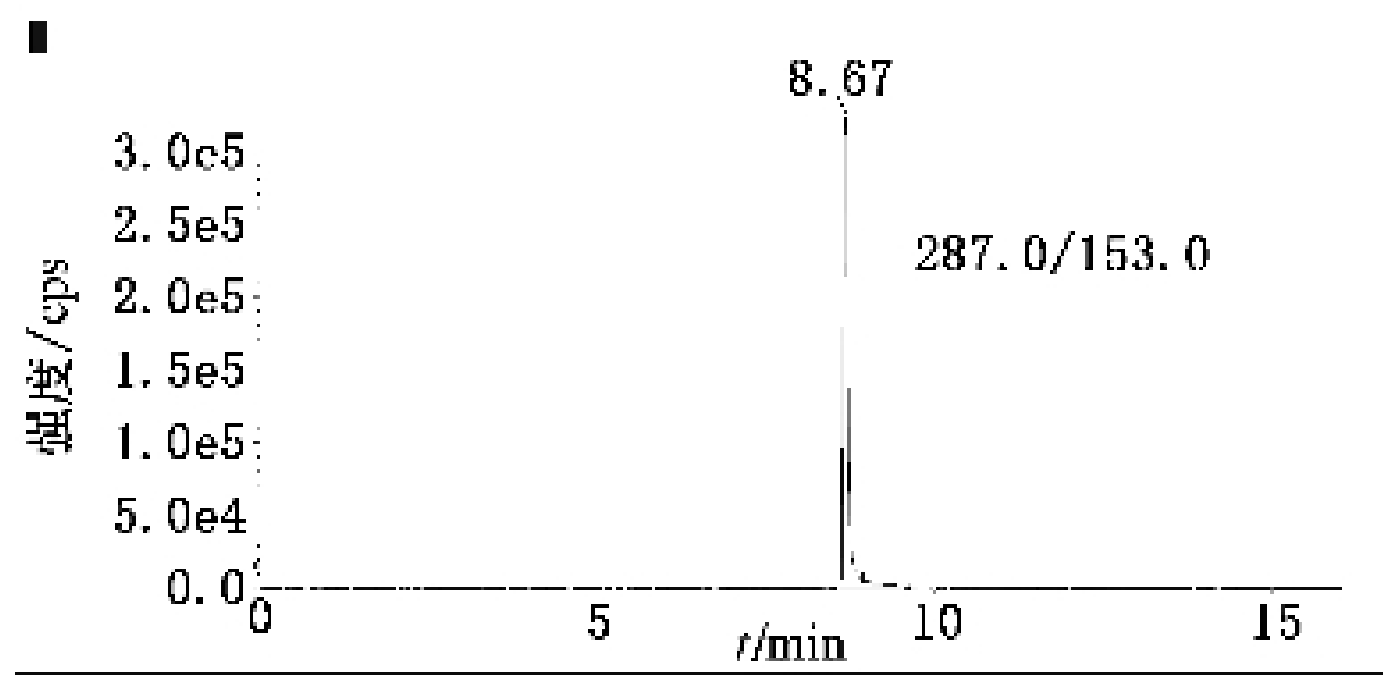
图 B.1 12 种酚类化合物的多离子反应监测色谱图



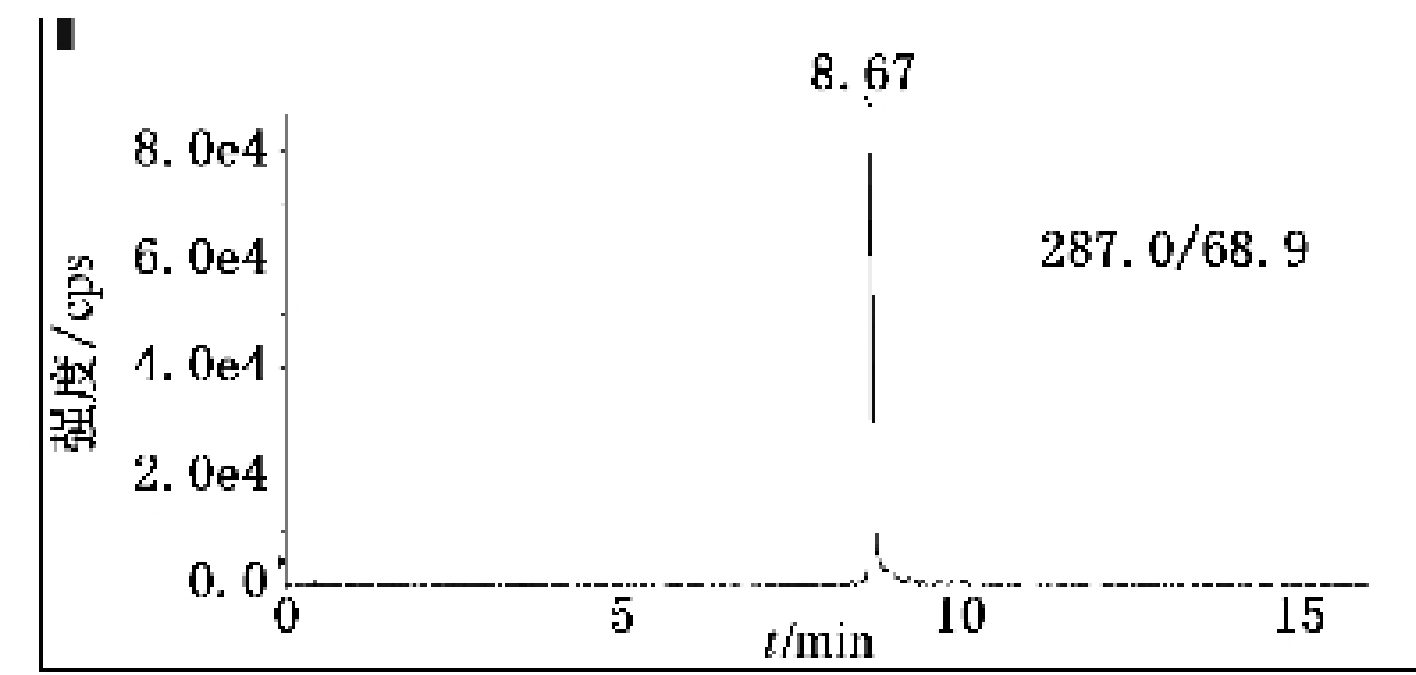
i) 槲皮素定量离子对色谱图



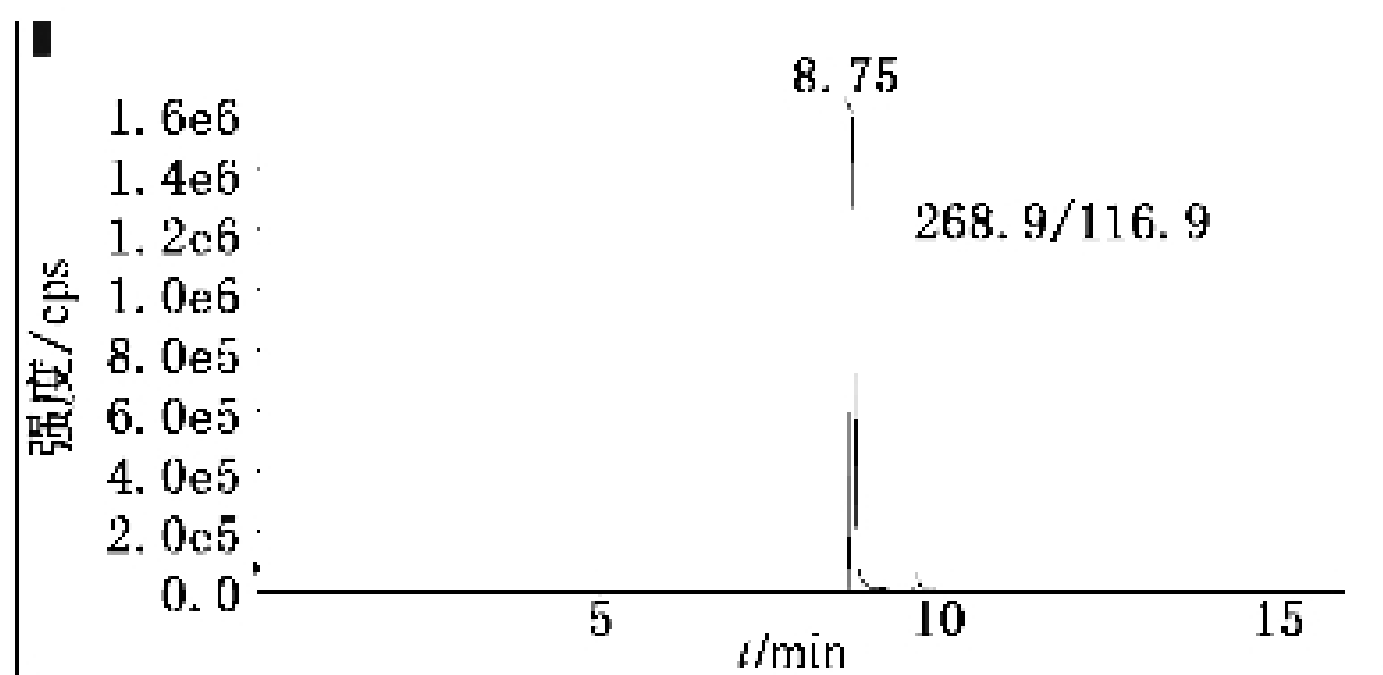
j) 槲皮素定性离子对色谱图



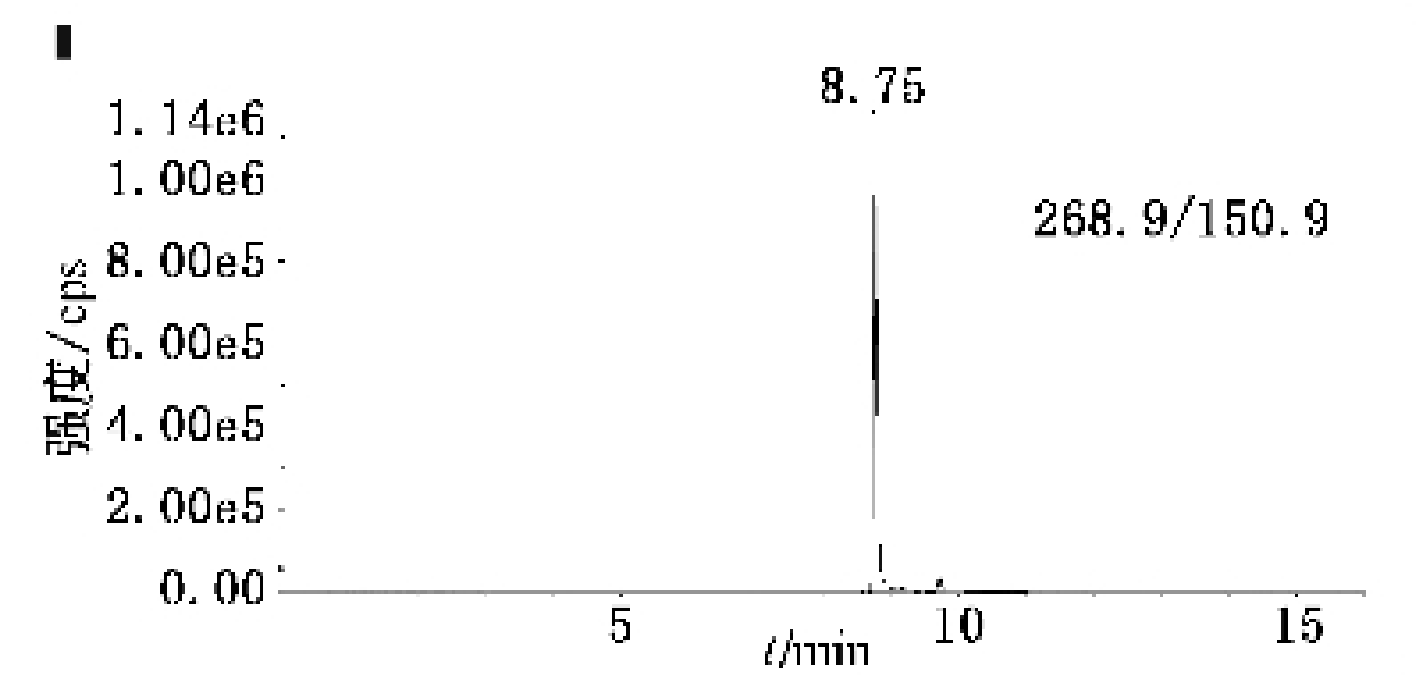
k) 茨菲醇定量离子对色谱图



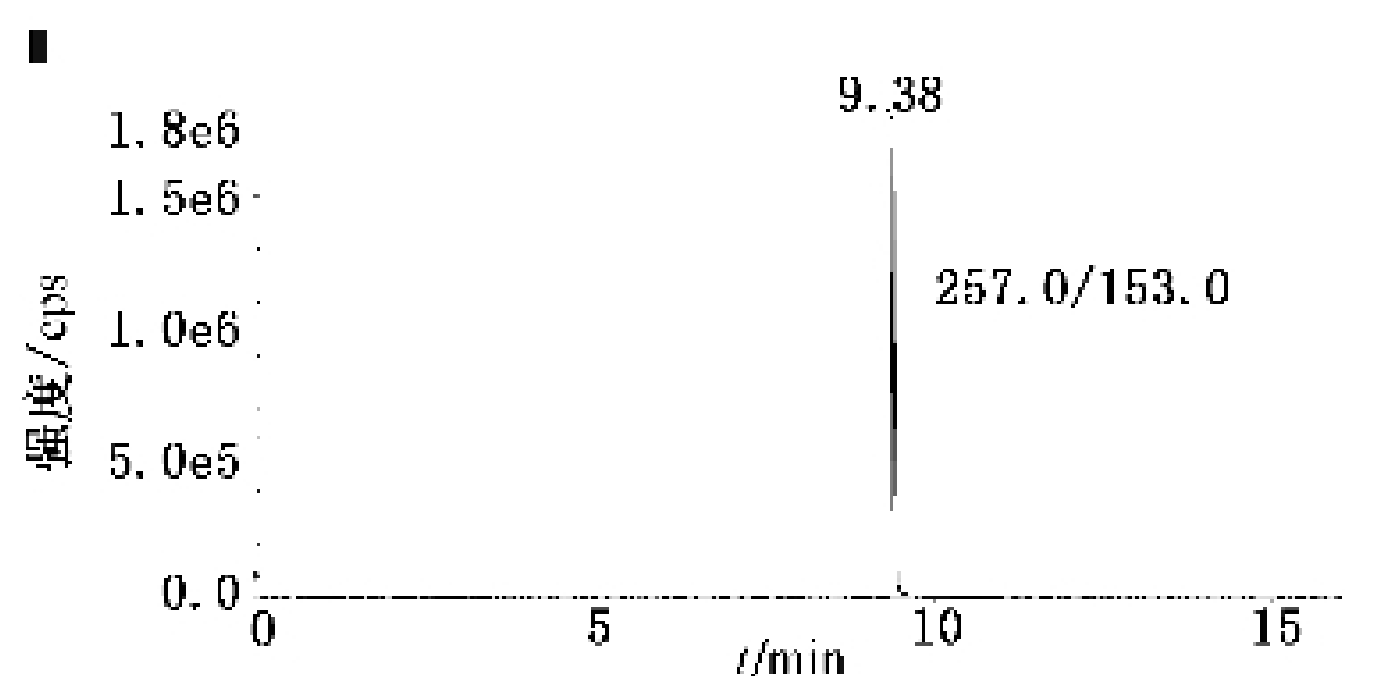
l) 茨菲醇定性离子对色谱图



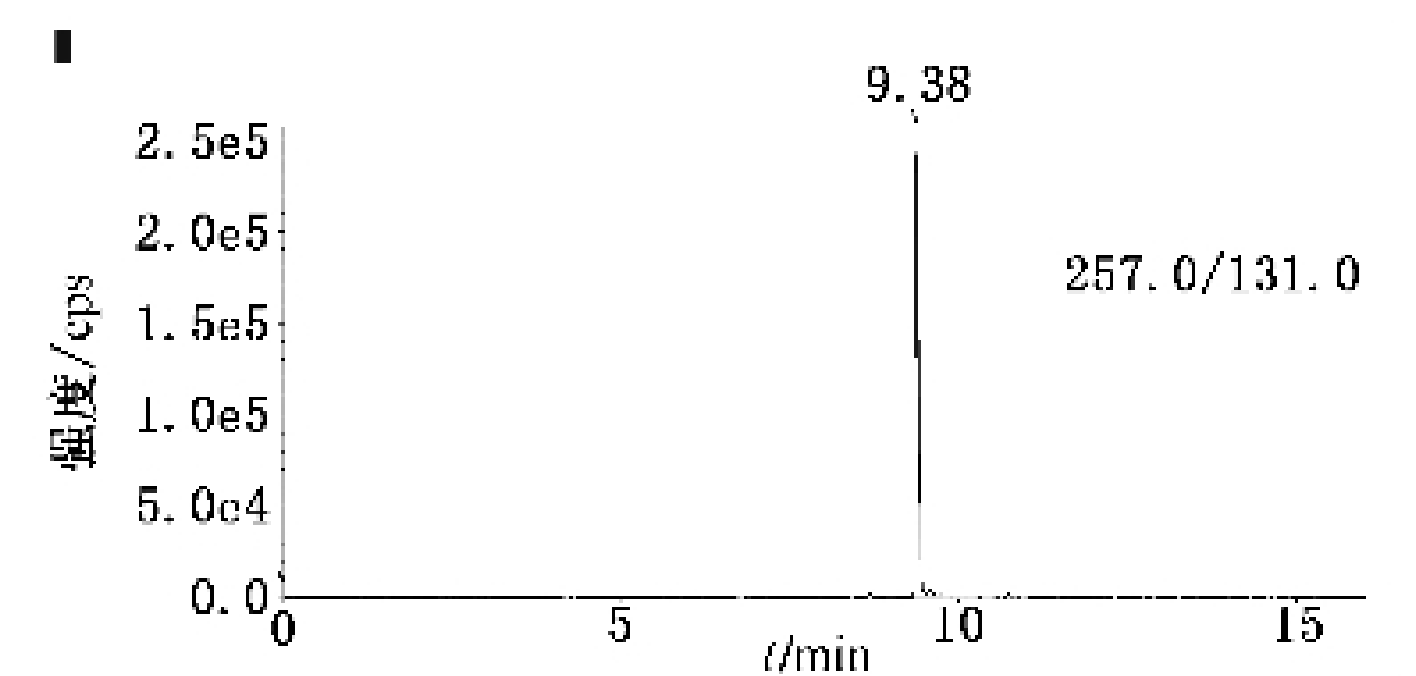
m) 芹菜素定量离子对色谱图



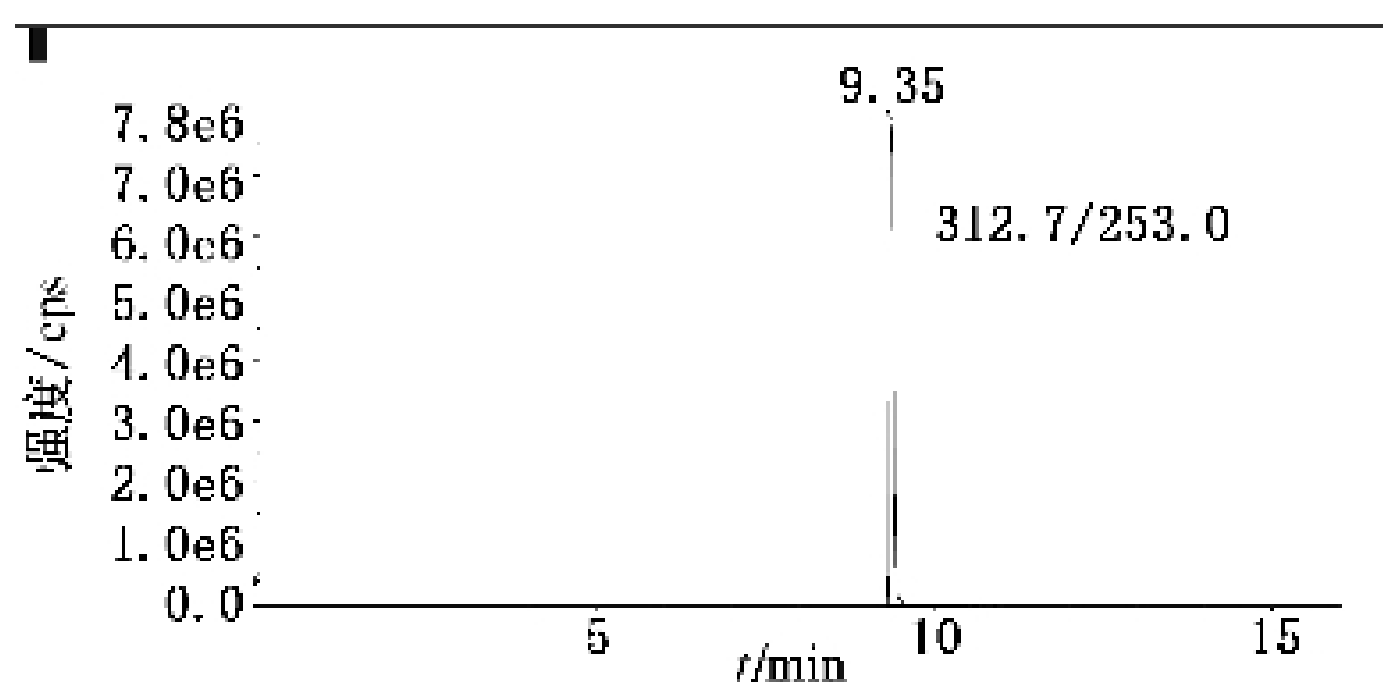
n) 芹菜素定性离子对色谱图



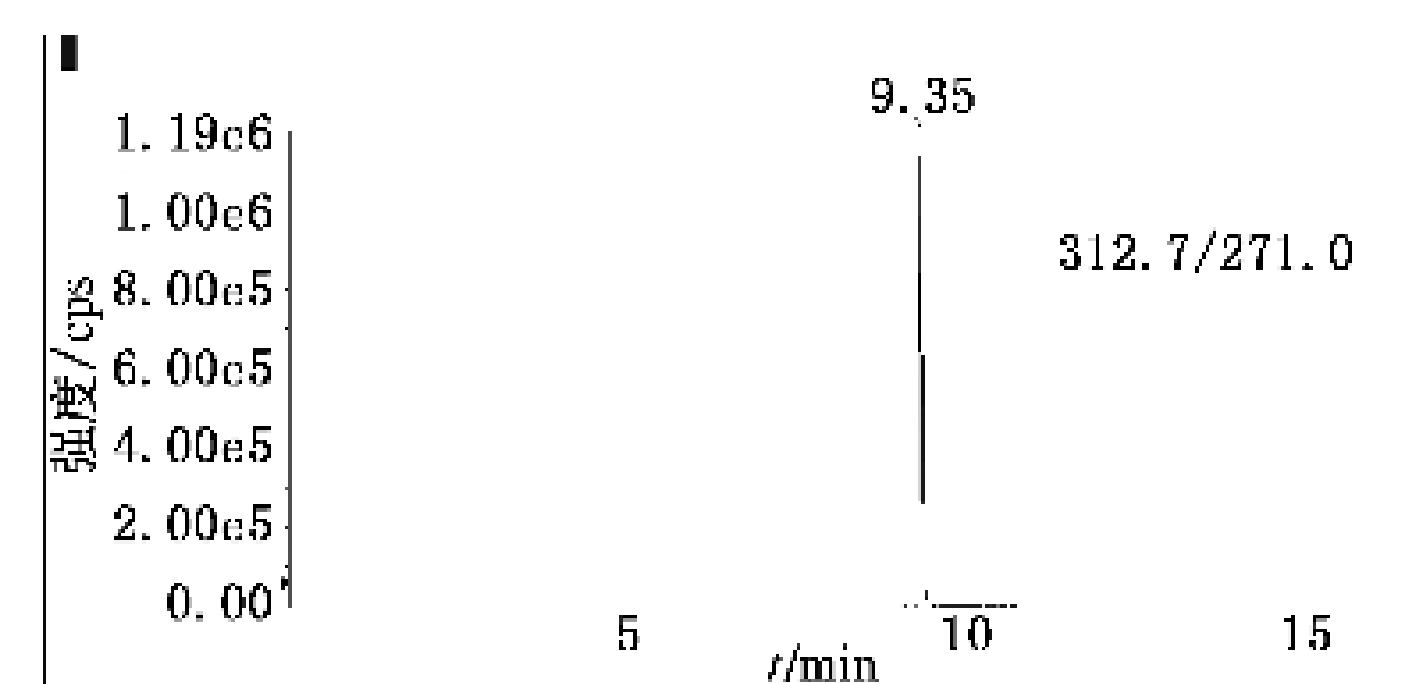
o) 松属素定量离子对色谱图



p) 松属素定性离子对色谱图

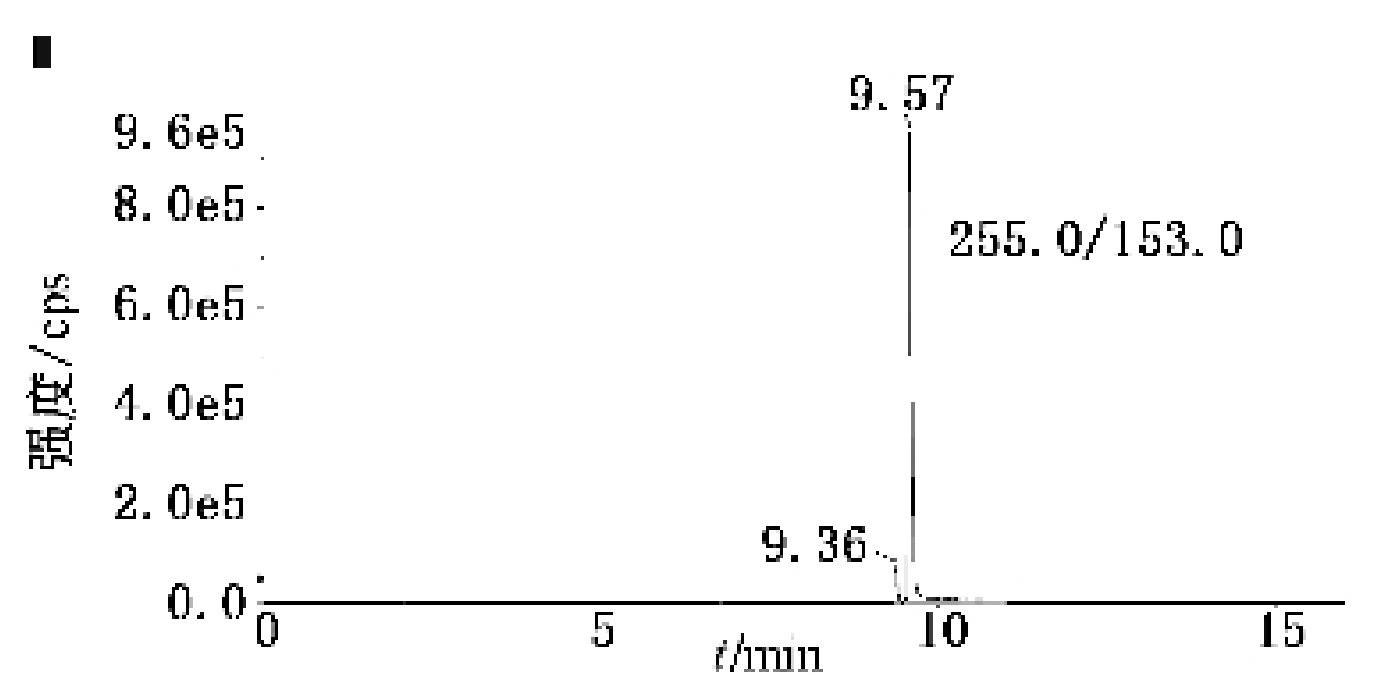


q) 短叶松素 3-乙酸酯定量离子对色谱图

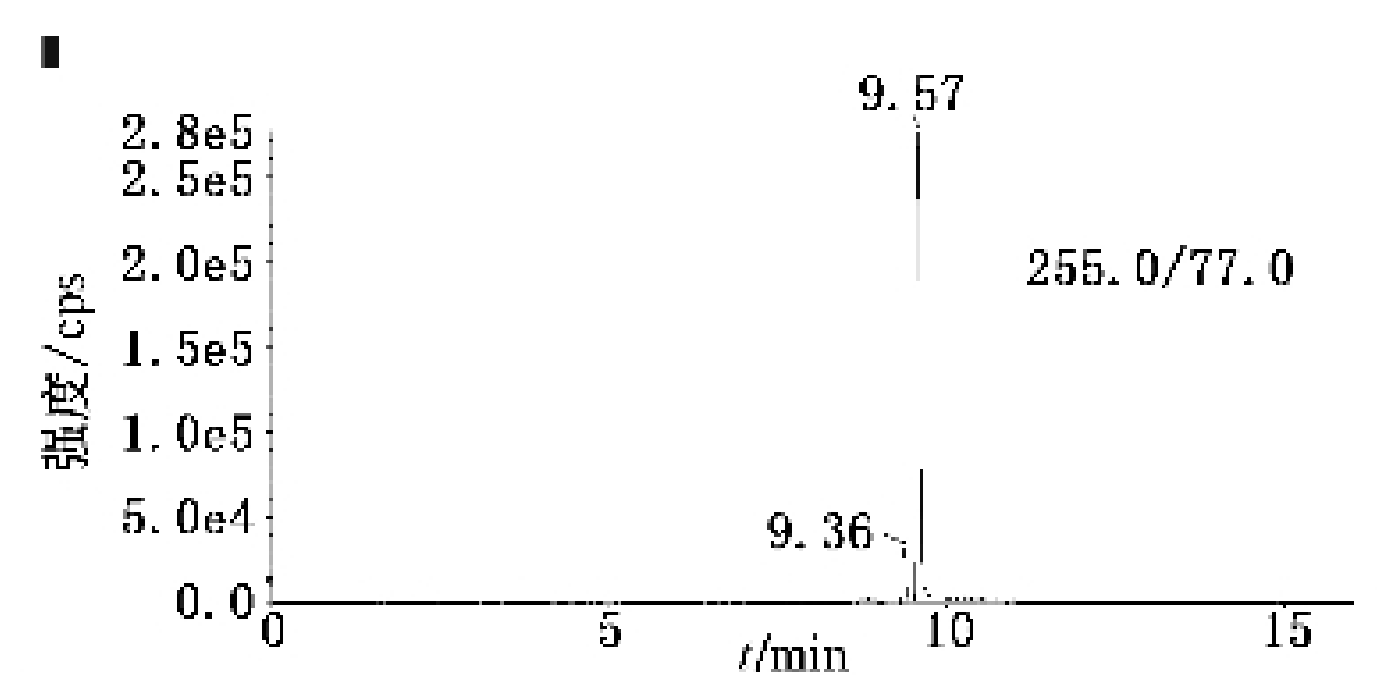


r) 短叶松素 3-乙酸酯定性离子对色谱图

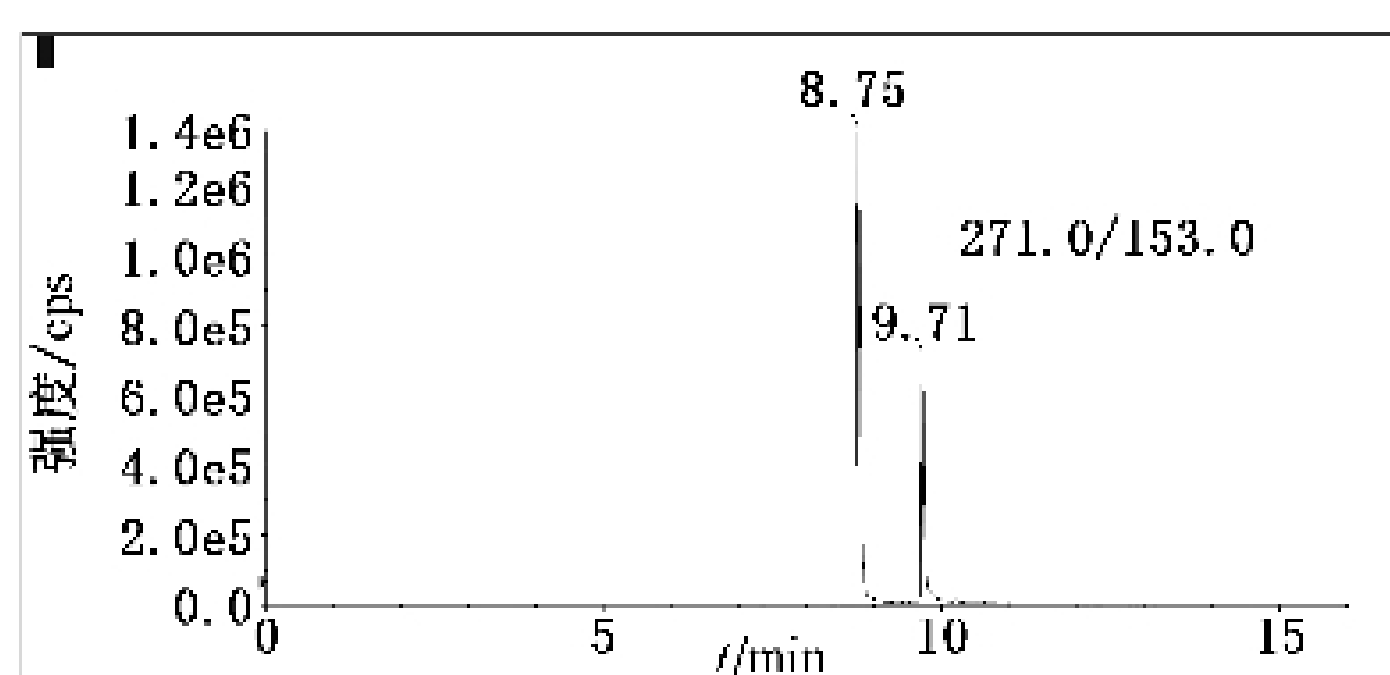
图 B.1 12 种酚类化合物的多离子反应监测色谱图 (续)



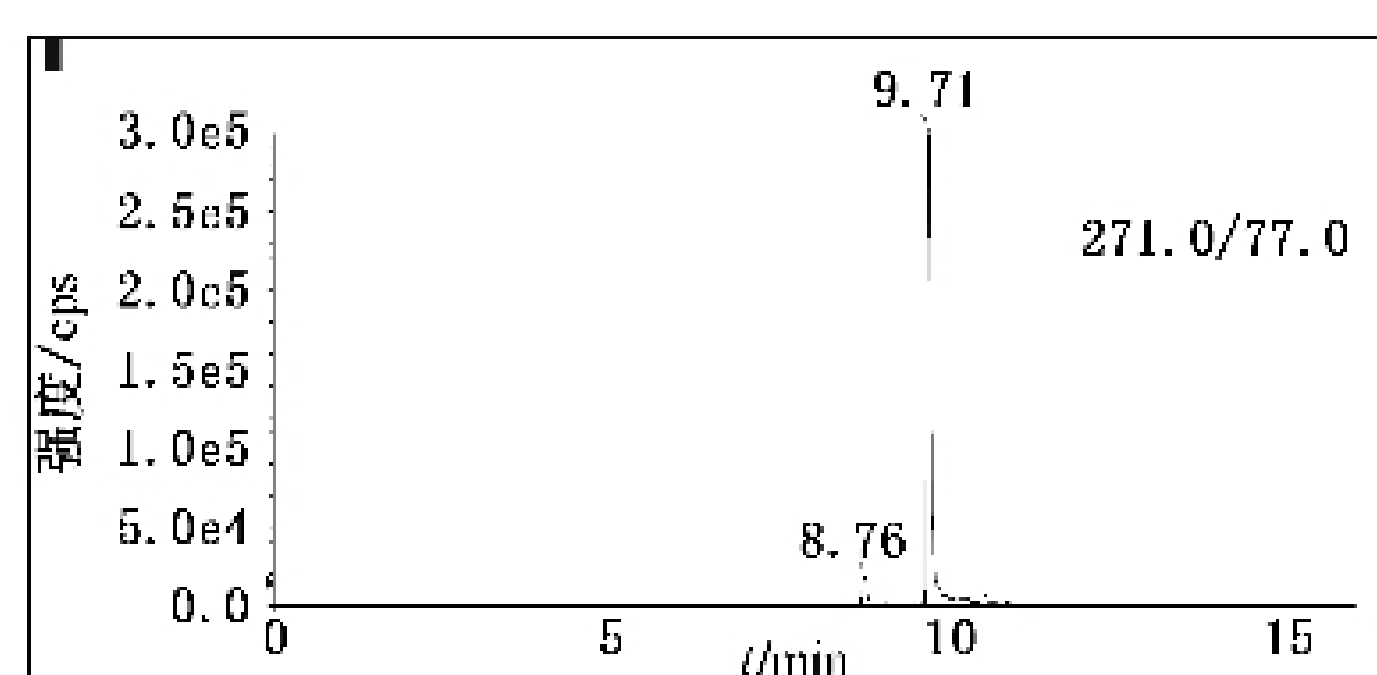
s) 柯因定量离子对色谱图



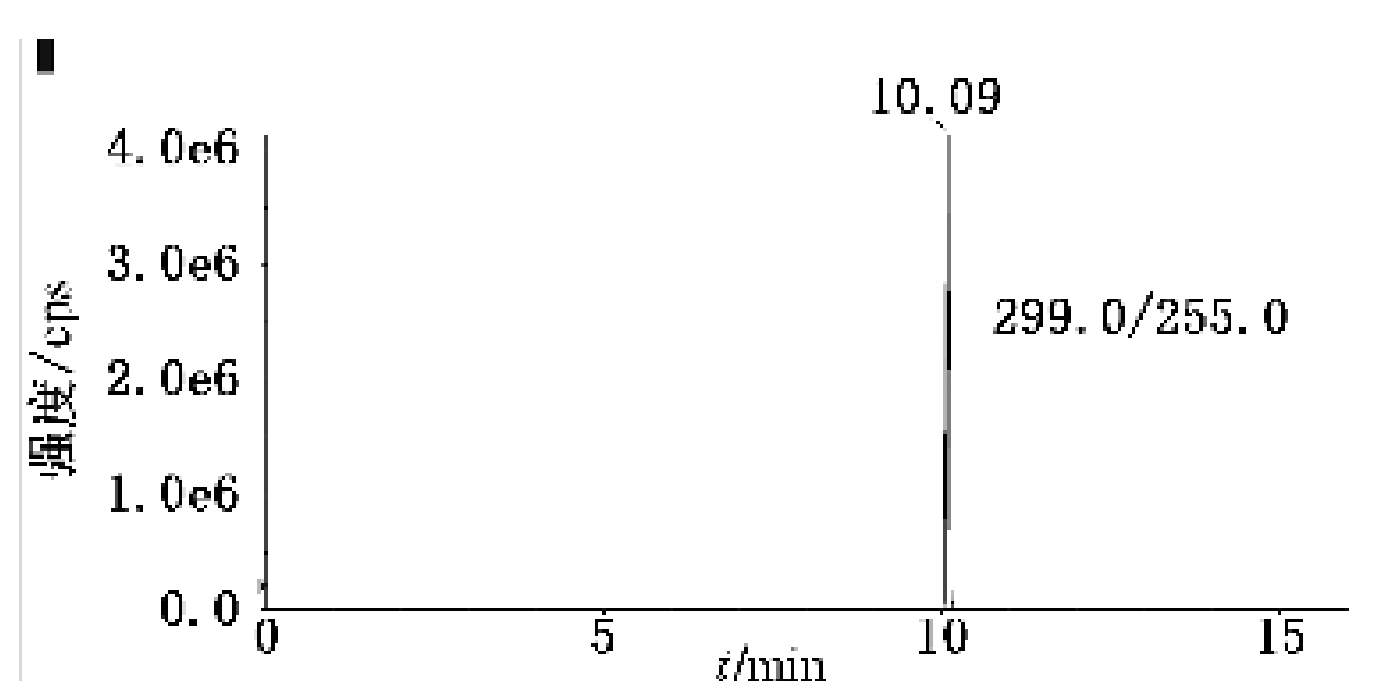
t) 柯因定性离子对色谱图



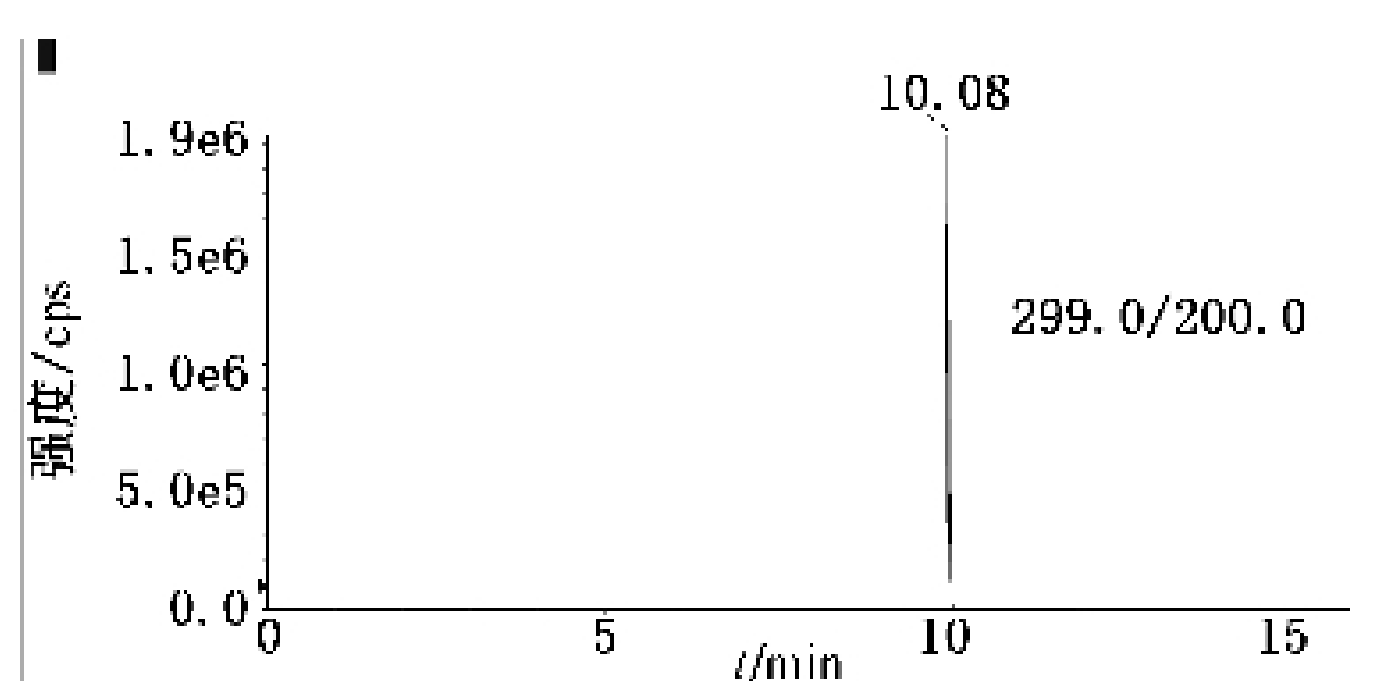
u) 高良姜素定量离子对色谱图



v) 高良姜素定性离子对色谱图



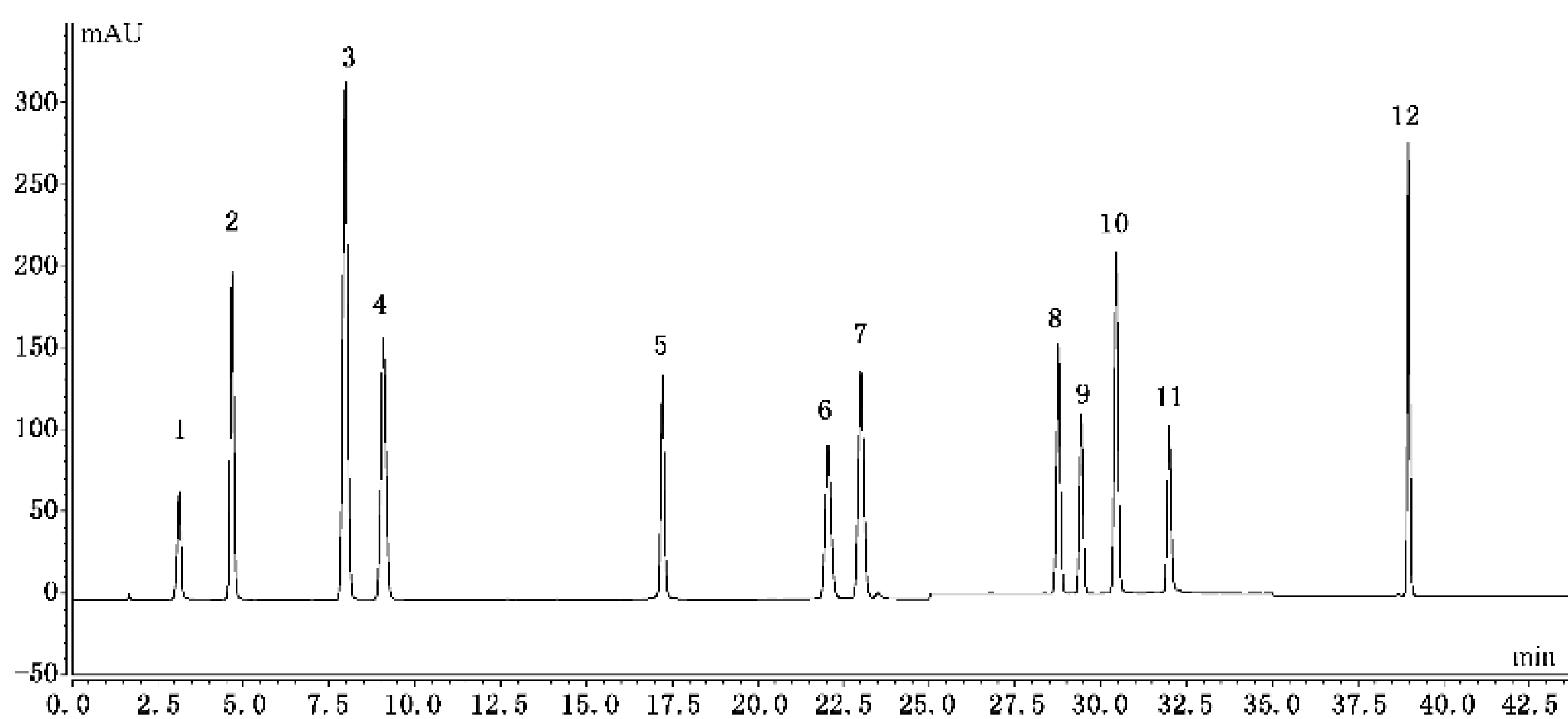
w) 阿替匹林 C 定量离子对色谱图



x) 阿替匹林 C 定性离子对色谱图

图 B.1 12 种酚类化合物的多离子反应监测色谱图 (续)

12 种酚类化合物标准的 HPLV-UV 色谱图如图 B.2。



标引序号说明：

- 1——绿原酸,3.14 min;
- 2——咖啡酸,4.67 min;
- 3——*p*-香豆酸,7.97 min;
- 4——阿魏酸,9.09 min;
- 5——槲皮素,17.22 min;
- 6——茨菲醇,22.05 min;
- 7——芹菜素,23.02 min;
- 8——松属素,28.76 min;
- 9——短叶松素 3-乙酸酯,29.44 min;
- 10——柯因,30.45 min;
- 11——高良姜素,32.00 min;
- 12——阿替匹林 C,38.97 min。

图 B.2 12 种酚类化合物的 HPLC-UV 色谱图