

SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 4052—2014

出口保健食品中荷叶碱的测定

Determination of nuciferine in health foods for export

2014-11-19 发布

2015-05-01 实施

中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由国家认证认可监督管理委员会提出并归口。

本标准起草单位：中华人民共和国湖南出入境检验检疫局、湖南省检验检疫科学技术研究院。

本标准主要起草人：焦艳娜、颜鸿飞、付善良、王美玲、李拥军、张莹、黄志强。

出口保健食品中荷叶碱的测定

1 范围

本标准规定了保健食品中荷叶碱的两种测定方法,即液相色谱-质谱/质谱法和高效液相色谱法。本标准适用于降脂胶囊、减肥咀嚼片和减肥茶中荷叶碱的定量测定和确证。

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

第一法 液相色谱-质谱/质谱法

3 原理

试样中的荷叶碱用甲醇超声提取,提取液经稀释后进样,高效液相色谱-质谱/质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除特殊注明外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

4.1 甲醇:液相色谱级。

4.2 乙腈:液相色谱级。

4.3 乙酸。

4.4 0.1%乙酸溶液:准确移取 1 mL 乙酸(4.3),用水稀释至 1 000 mL。

4.5 甲醇-水混合溶液(1+1,体积比):量取 100 mL 甲醇,加入 100 mL 水,混匀备用。

4.6 荷叶碱标准品(CAS号:475-83-2,分子式: $C_{19}H_{21}NO_2$):纯度 $\geq 99\%$ 。

4.7 荷叶碱标准贮备液:准确称取适量的荷叶碱标准品,用甲醇溶解,配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准贮备溶液,0℃~4℃下避光保存。

4.8 荷叶碱标准工作溶液:准确移取一定体积的标准储备溶液,根据需要用甲醇-水混合溶液(4.5)稀释成不同浓度系列的标准工作溶液。

5 仪器

5.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪:带电喷雾离子源(ESI)。

5.2 超声仪。

5.3 粉碎机。

5.4 分析天平:感量为 0.000 1 g 和 0.01 g。

5.5 离心机(最大转速 10 000 r/min)。

6 试样制备与保存

6.1 试样制备

取 20 粒片剂粉碎后,混匀,均分成两份,分别装入洁净容器内;取 20 粒胶囊试样连同胶囊壳一起粉碎,混匀,均分成两份,分别装入洁净容器内。减肥茶试样取 5 包~10 包充分混匀,粉碎后均分成两份,分别装入洁净容器内。

6.2 试样的保存

将试样于 0℃~4℃下保存。在取样、制样过程中,应防止样品受到污染或发生目标物含量的变化。

7 测定步骤

7.1 提取

称取 1 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 30 mL 甲醇超声提取 30 min。取出冷却至室温,将样品全部转移至 50 mL 容量瓶中,用 15 mL 甲醇分数次清洗锥形瓶,合并清洗液至容量瓶中并用甲醇定容至刻度,摇匀后,静置 5 min。移取 5 mL 提取液至 15 mL 离心管中,在 6 000 r/min 离心 5 min 后,取 0.5 mL 上清液,加入 0.5 mL 甲醇-水混合溶液(4.5),混匀后过 0.45 μm 有机微孔滤膜,供液相色谱-质谱/质谱仪分析。

7.2 测定

7.2.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下:

- a) 色谱柱: C₁₈ 柱(粒径 5 μm, 柱长 150 mm, 内径 4.6 mm)或相当者;
- b) 流动相: 梯度洗脱程序见表 1;
- c) 流速: 0.5 mL/min;
- d) 柱温: 30℃;
- e) 进样量: 10 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间 min	0.1%乙酸水溶液 %	乙腈 %
0	90	10
4	60	40
10	10	90
12	10	90
12.1	90	10
15	90	10

7.2.2 质谱条件

参见附录 A。

7.2.3 液相色谱-质谱检测及确证

7.2.3.1 定量测定

按照 7.2.1 色谱条件和 7.2.2 质谱条件测定样液和标准工作溶液,外标法定量。待测样液中荷叶碱的量应在标准曲线范围之内,如果超出标准曲线范围,应稀释到合适浓度后分析。在上述色谱条件下,荷叶碱的参考保留时间为 7.26 min。标准溶液的选择离子色谱图参见附录 B 中的图 B.1。

7.2.3.2 定性测定

在相同的实验条件下,样液中被测物的色谱峰保留时间与标准工作液相同,并且在扣除背景后的样液谱图中,所选择的离子对均出现,各定性离子的相对丰度与标准品离子的相对丰度相比,偏差不得超过表 2 规定的范围内,则可判断样品中存在对应的被测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 %	允许的相对偏差 %
>50	±20
>20~50	±25
>10~20	±30
≤10	±50

7.3 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

7.4 结果计算和表述

用色谱数据处理机或按照式(1)计算样品中待测物的残留量,计算结果应扣除空白:

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

式中:

X ——试样中荷叶碱含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——从标准工作曲线得到的荷叶碱浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——样液最终定容体积,单位为毫升(mL);

m ——最终样液代表的试样质量,单位为克(g)。

8 定量限和回收率

8.1 定量限

本方法的定量限为 0.01 mg/kg。

8.2 回收率

降脂胶囊、减肥咀嚼片、减肥茶中荷叶碱的添加水平及回收率数据见表3。

表3 降脂胶囊、减肥咀嚼片、减肥茶中荷叶碱的添加水平及回收率数据

添加水平 mg/kg	回收率范围 %		
	降脂胶囊	减肥咀嚼片	减肥茶
0.01	85.0~97.0	76.0~95.0	79.0~110.0
0.02	81.5~105.5	85.5~106.0	83.0~101.5
0.05	80.4~102.2	93.0~108.2	89.0~104.6
20 000	99.5~105.0	95.5~101.0	98.5~105.0

第二法 高效液相色谱法

9 原理

试样中的荷叶碱用甲醇超声提取,提取液经有机滤膜过滤后,用高效液相色谱仪测定,外标法定量。

10 试剂和材料

除特殊注明外,所有试剂均为分析纯,水为符合 GB/T 6682 规定的一级水。

10.1 甲醇:液相色谱级。

10.2 乙腈:液相色谱级。

10.3 三乙胺。

10.4 0.1%三乙胺溶液:准确移取 1 mL 三乙胺(10.3),用水稀释至 1 000 mL。

10.5 荷叶碱标准品(CAS号:475-83-2,分子式: $C_{19}H_{21}NO_2$):纯度 $\geq 99\%$ 。

10.6 荷叶碱标准储备液:准确称取适量的荷叶碱标准品,用甲醇溶解,配制成浓度为 1.0 mg/mL 的标准储备溶液,0℃~4℃下避光保存。

10.7 荷叶碱标准工作溶液:准确移取一定体积的标准储备液,根据需要用甲醇稀释成不同浓度系列的标准工作溶液。

11 仪器

11.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器或二极管阵列检测器。

11.2 超声波清洗器。

11.3 粉碎机。

11.4 分析天平:感量为 0.000 1 g 和 0.01 g。

12 试样制备与保存

同 6.1 和 6.2。

13 测定步骤

13.1 提取

称取 1 g(精确至 0.01 g)试样于 50 mL 具塞锥形瓶中,加入 30 mL 甲醇超声提取 30 min。取出冷却至室温,将样品全部转移至 50 mL 容量瓶中,用 15 mL 甲醇分数次清洗锥形瓶,合并清洗液至容量瓶中并用甲醇定容至刻度,摇匀后,静置 5 min。取上清液过 0.45 μm 有机微孔滤膜后,供液相色谱仪分析。

13.2 测定

13.2.1 液相色谱条件

液相色谱条件如下:

- a) 色谱柱: C_{18} 柱(粒径 5 μm ,柱长 250 mm,内径 4.6 mm)或相当者;
- b) 流动相:梯度洗脱程序见表 4;
- c) 流速:1.0 mL/min;
- d) 柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;
- e) 检测波长:270 nm;
- f) 进样量:10 μL 。

表 4 流动相梯度洗脱程序

时间 min	0.1%三乙胺溶液 %	乙腈 %
0	80	20
15	20	80
18	10	90
20	80	20
25	80	20

13.2.2 色谱测定

根据样液中荷叶碱含量情况,选定浓度相近的标准工作溶液。标准工作溶液和样液中荷叶碱响应值均应在仪器检测线性范围内。对标准工作溶液和样液等体积参插进样测定,在上述色谱条件下,荷叶碱保留时间约为 13.60 min。标准溶液的色谱图参见附录 C 中图 C.1。

13.3 空白试验

除不加试样外,按上述测定步骤进行。

13.4 结果的计算和表述

用色谱数据处理机或按照式(2)计算试样中荷叶碱的残留量,计算结果应扣除空白值:

$$X = \frac{c \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \dots\dots\dots(2)$$

式中:

X ——试样中荷叶碱的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c ——标准工作溶液中荷叶碱的浓度,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

m ——称样量,单位为克(g)。

14 定量限和回收率

14.1 定量限

本方法的定量限为 0.05 mg/g。

14.2 回收率

降脂胶囊、减肥咀嚼片、减肥茶中荷叶碱的添加水平及回收率数据见表 5。

表 5 降脂胶囊、减肥咀嚼片、减肥茶中荷叶碱的添加水平及回收率数据

添加水平 mg/g	回收率范围 %		
	降脂胶囊	减肥咀嚼片	减肥茶
0.05	95.2~103.2	84.6~104.0	92.4~101.2
0.1	92.9~108.0	92.5~99.2	91.4~98.5
0.5	87.6~102.2	95.2~103.6	91.4~99.6
20	97.7~100.1	96.5~99.5	97.3~101.1

附录 A
(资料性附录)
质谱测定参考条件¹⁾

参考质谱条件:

- a) 扫描方式:正离子扫描;
- b) 检测方式:多反应监测(MRM);
- c) 气帘气(CUR):137.9 kPa(20 psi);
- d) 雾化气(GS1):413.7 kPa(60 psi);
- e) 辅助加热气(GS2):448.2 kPa(65 psi);
- f) 碰撞气(CAD):48.3 kPa(7 psi);
- g) 电喷雾电压(IS):5 500 V;
- h) 离子源温度(TEM):550 °C;
- i) 定性离子对、定量离子对、碰撞能量、去簇电压、碰撞室出入口电压和碰撞室出口电压见表 A.1。

表 A.1 多反应监测条件

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	驻留时间 ms	去簇电 压(DP) V	碰撞能 量(CE) V	碰撞室入口 电压(EP) V	碰撞室出口 电压(CXP) V
荷叶碱	296.3	265.3*	200	80	24	10	15
		250.5	200	80	30	10	15
注:带“*”的离子为定量离子。							

1) 非商业性声明:附录 A 所列参数是在 API4000 质谱仪上完成的,此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考,并不涉及商业目的,鼓励标准使用者尝试采用不同厂家或型号的仪器。

附录 B

(资料性附录)

标准溶液的选择反应监测(SRM)色谱图

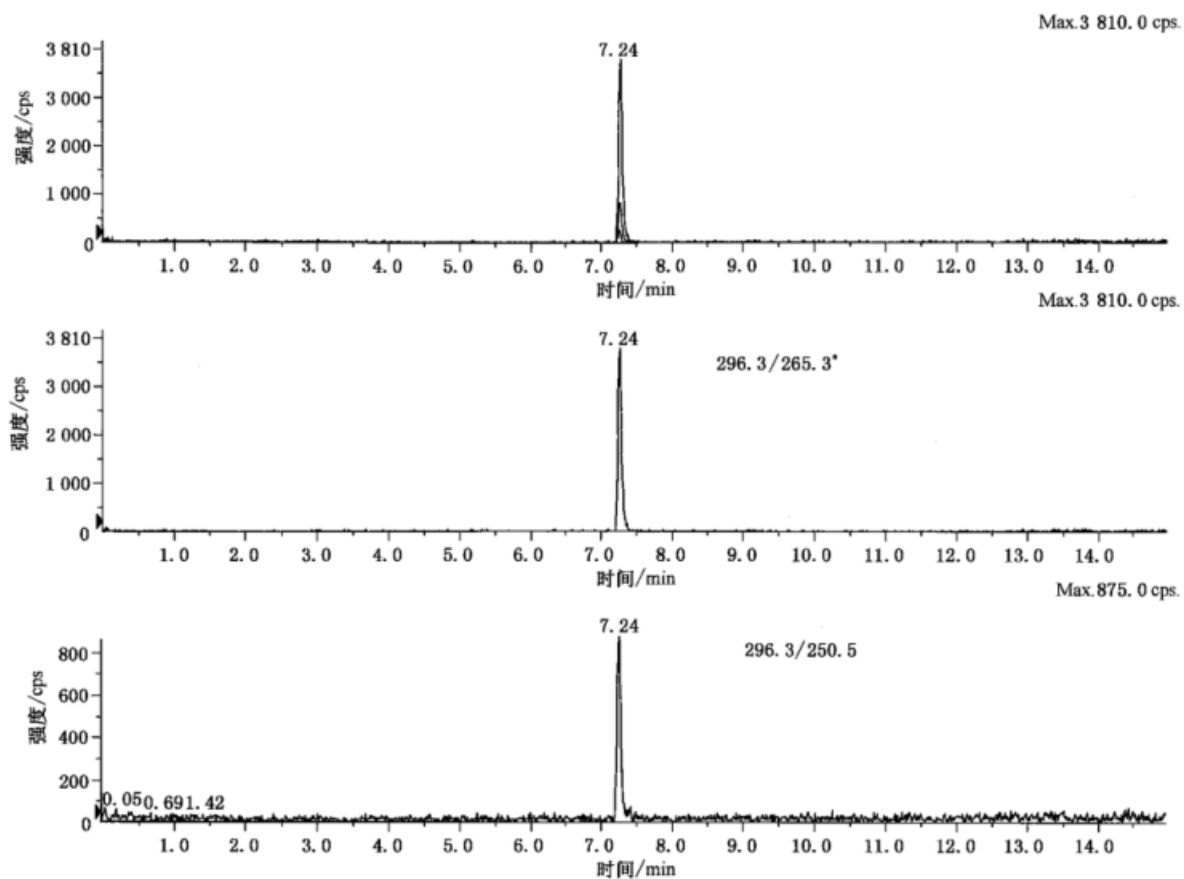


图 B.1 标准溶液的选择反应监测(SRM)色谱图

附录 C
(资料性附录)
标准溶液色谱图

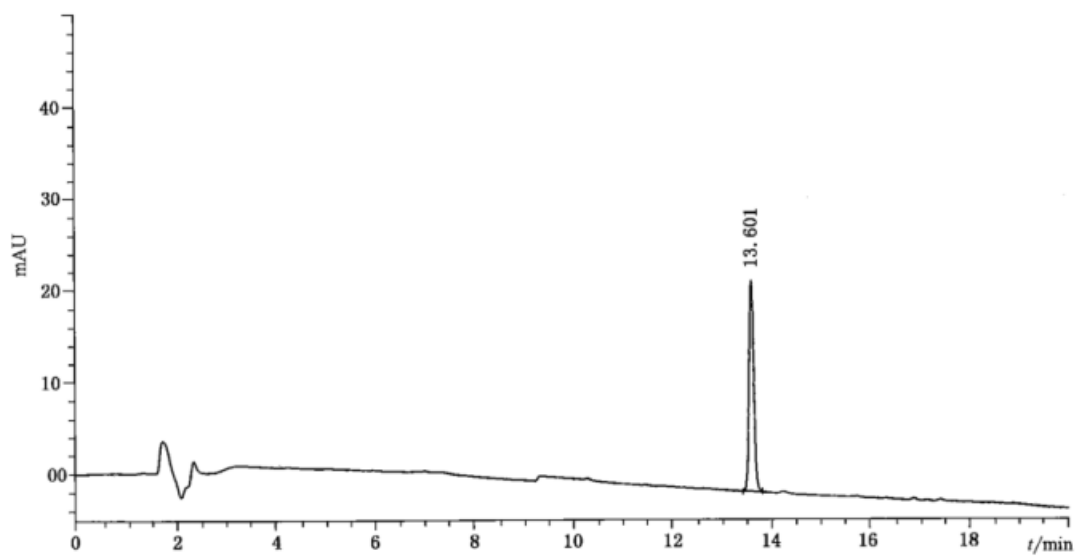


图 C.1 标准溶液色谱图