

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 3950—2021

植物源性食品中10种黄酮类化合物的 测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of 10 flavonoids in foods of plant origin by high performance
liquid chromatography-tandem mass spectrometry

2021-11-09 发布

2022-05-01 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：北京市营养源研究所、农业农村部食物与营养发展研究所、中国标准化研究院、内蒙古蒙牛乳业(集团)股份有限公司、中国合格评定国家认可委员会、国家食品行业生产力促进中心、北京市理化分析测试中心、国家蔬菜工程技术研究中心、中检集团中原农食产品检测(河南)有限公司。

本文件主要起草人：崔亚娟、朱大洲、白沙沙、孔凡华、许洪高、史波林、梁克红、陈雪、杨春雪、刘玉峰、罗欣、李东、宋晓东、杨志刚、马文丽、李宏、马杰、贾丽、刘光敏、宗珊盈。

植物源性食品中 10 种黄酮类化合物的测定

高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了植物源性食品中 10 种黄酮类化合物的高效液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于植物源性食品中表儿茶素、橙皮素、大豆苷元、槲皮素、黄豆黄素、木樨草素、芹菜素、杨梅素、异鼠李素和柚皮素 10 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

试样经乙醇溶液提取得到游离黄酮类化合物或经乙醇盐酸溶液提取得到游离与糖苷结合黄酮类化合物,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

5.1 试剂

5.1.1 水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.2 乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$):色谱纯。

5.1.3 乙醇($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$):优级纯。

5.1.4 盐酸(HCl):优级纯。

5.1.5 乙腈(CH_3CN):色谱纯。

5.2 试剂配制

5.2.1 75%乙醇溶液:取乙醇 75 mL(5.1.2),加水定容至 100 mL,混匀。

5.2.2 75%乙醇溶液:取乙醇 750 mL(5.1.3),加水定容至 1 L,混匀。

5.2.3 乙醇-盐酸溶液:取乙醇 750 mL(5.1.3),加入盐酸 100 mL(5.1.4),加水定容至 1 L,混匀。

5.3 标准品

10 种黄酮类化合物标准品:纯度 $\geq 98\%$,或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.4 标准溶液配制

5.4.1 黄酮类化合物标准储备液:分别称取标准品各 5 mg(精确至 0.01 mg),用 75%乙醇溶液(5.2.1)溶解并定容至 10 mL 即为 500 $\mu\text{g/mL}$ 的单标储备液,于 $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 储存于密闭棕色玻璃瓶中。

5.4.2 黄酮类化合物混合标准溶液:分别量取一定量的各黄酮类化合物标准储备液,用 75%乙醇溶液(5.2.1)稀释成 0.010 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.020 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.050 0 $\mu\text{g/mL}$ 、0.100 $\mu\text{g/mL}$ 、0.200 $\mu\text{g/mL}$ 、0.500 $\mu\text{g/mL}$ 、0.800 $\mu\text{g/mL}$ 、1.000 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准溶液或根据需要配制其他浓度,现用现配。

5.5 材料

有机相滤膜:0.22 μm 。

6 仪器与设备

- 6.1 高效液相色谱-串联质谱仪:配有电喷雾离子源。
- 6.2 天平:感量 0.01 mg、0.1 mg。
- 6.3 高速粉碎机。
- 6.4 匀浆机。
- 6.5 恒温水浴锅:带回流装置。
- 6.6 离心机:转速 6 000 r/min。

7 试样制备

试样取可食部进行制备。果汁、酒类等均匀的液体试样直接混匀;带悬浮物的液体试样、新鲜果蔬、半固体等试样采用匀浆机匀浆;固体试样采用高速粉碎机粉碎。试样制备后储存于样品瓶中备用,所有制备试样于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

8 分析步骤

8.1 游离黄酮类化合物的提取

称取试样 0.5 g~5 g(精确至 0.000 1 g)于 100 mL 具塞三角瓶中,加入乙醇溶液(5.2.2)80 mL,于 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 回流提取 90 min,冷却后转移至 100 mL 容量瓶中,75%乙醇溶液(5.2.2)定容至刻度,混匀后,6 000 r/min离心 10 min,上清液过 0.22 μm 滤膜备用。

8.2 游离与糖苷结合黄酮类化合物的提取

称取试样 0.5 g~5 g(精确至 0.000 1 g)于 100 mL 具塞三角瓶中,加入乙醇-盐酸溶液(5.2.3)80 mL,于 $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 回流提取 90 min,冷却后转移至 100 mL 容量瓶中,乙醇-盐酸溶液(5.2.3)定容至刻度,混匀后,6 000 r/min 离心 10 min,上清液过 0.22 μm 滤膜备用。

8.3 测定

8.3.1 仪器参考条件

- a) 色谱柱:HSS T3 色谱柱(柱长 100 mm,内径 2.1 mm,颗粒度 1.7 μm)或性能相当者;
- b) 流动相:A 为水(5.1.1),B 为乙腈(5.1.5),流速为 0.3 mL/min;
- c) 进样量:10 μL ;
- d) 柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- e) 梯度洗脱条件,见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间,min	流速,mL/min	A,%	B,%
0	0.3	90	10
0.5	0.3	70	30
1.0	0.3	60	40
4.0	0.3	40	60
4.1	0.3	90	10
5.0	0.3	90	10

- f) 扫描方式:离子源为电喷雾电离源负离子扫描方式(ESI);
- g) 去溶剂气和锥孔反吹气流速分别为 800 L/h 和 150 L/h,气体均为高纯氮气;
- h) 碰撞气流速为 0.15 mL/min,气体为氦气;
- i) 去溶剂辅助加热温度为 $400\text{ }^{\circ}\text{C}$;

- j) 离子源温度为 150 ℃；
- k) 监测离子对、碰撞气能量和源内破碎电压,见附录 B。

8.3.2 定性测定

在相同试验条件下,试样检出的色谱峰保留时间与标准品保留时间的偏差在±2.5%以内;并且试样溶液中黄酮类化合物定性离子的相对丰度与浓度接近的标准工作液中定性离子的相对丰度进行比较,若偏差不超过表 2 规定的范围,则可判定试样溶液中存在被测化合物。10 种黄酮类化合物的多反应监测色谱图,见附录 C。

表 2 质谱选择离子丰度允许偏差

单位为百分号

相对丰度	50	20~50	10~20	≤10
允许偏差	±20	±25	±30	±50

8.3.3 定量测定

将标准系列工作液分别注入高效液相色谱-串联质谱仪中,以各黄酮类化合物标准工作液的浓度为横坐标,以相应的峰面积为纵坐标,绘制标准曲线。

试样溶液注入高效液相色谱-串联质谱仪中,测得试样溶液中各黄酮类化合物的峰面积,根据标准曲线得到试样溶液各黄酮类化合物浓度。外标法定量。

8.4 分析结果的表述

试样中各游离黄酮类化合物或游离与糖苷结合黄酮类化合物的含量以质量分数表示,单位为毫克每千克,按公式(1)计算。

$$\omega_i = \rho_i \times \frac{V}{m} \times f \dots\dots\dots (1)$$

式中:

ω_i ——试样中各游离黄酮类化合物或游离与糖苷结合黄酮类化合物的质量分数的数值,单位为毫克每千克(mg/kg);

ρ_i ——从标准曲线上得到试样溶液中被测组分的质量浓度的数值,单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——试样溶液的定容体积的数值,单位为毫升(mL);

m ——试样称样量的数值,单位为克(g);

f ——试样溶液稀释倍数。

以 2 次测定结果的算术平均值表示,结果保留 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 次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值 15%。

9.2 再现性

在再现性条件下获得的 2 次独立测定结果的绝对差值不大于算术平均值 15%。

10 其他

当试样最大称样量 5 g,最小定容体积 25 mL,表儿茶素、大豆苷元、芹菜素、杨梅素、异鼠李素和柚皮素检出限为 0.03 mg/kg,定量限为 0.1 mg/kg;橙皮素、槲皮素和木樨草素检出限为 0.015 mg/kg,定量限为 0.05 mg/kg;黄豆黄素检出限为 0.1 mg/kg,定量限为 0.3 mg/kg。

附 录 A
(资料性)

10 种黄酮类化合物标准物质基本信息

10 种黄酮类化合物标准物质基本信息见表 A.1。

表 A.1 10 种黄酮类化合物标准物质基本信息

序号	名称	CAS 号	英文名称	分子式	相对分子质量
1	表儿茶素	490-46-0	L-Epicatechin	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	290.27
2	橙皮素	520-33-2	Hesperitin	C ₁₆ H ₁₄ O ₆	302.28
3	大豆苷元	486-66-8	Daidzein	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	254.24
4	槲皮素	117-33-5	Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302.24
5	黄豆黄素	40957-83-3	Glycitein	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	284.26
6	木樨草素	491-70-3	Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286.24
7	芹菜素	520-36-5	Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	270.24
8	杨梅素	529-44-2	Myricetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318.24
9	异鼠李素	480-19-3	Isorhamnetin	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316.26
10	柚皮素	480-41-1	Naringenin	C ₁₅ H ₁₄ O ₅	272.25

附 录 B
(资料性)

10 种黄酮类化合物的质谱分析参数

10 种黄酮类化合物的质谱分析参数见表 B. 1。

表 B. 1 10 种黄酮类化合物的质谱分析参数

序号	名称	保留时间,min	母离子, m/z	子离子, m/z	锥孔电压,V	碰撞能量,eV
1	表儿茶素	1.62	289.0	205.5,245.2*	40	15,12
2	橙皮素	3.09	301.0	164.0*,286.0	40	25,18
3	大豆苷元	2.36	253.2	209.0,224.2*	40	20,25
4	槲皮素	2.48	301.0	151.2*,179.2	45	20,20
5	黄豆黄素	2.41	283.2	240.5,268.5*	40	20,20
6	木樨草素	2.44	285.0	133.2*,151.2	40	30,30
7	芹菜素	2.88	269.2	107.2,117.2*	40	30,35
8	杨梅素	2.09	317.2	179.2*,192.2	40	20,20
9	异鼠李素	3.07	315.2	151.2,300.2*	40	25,20
10	柚皮素	2.93	271.2	107.2,119.2*	45	15,15

注:带* 为定量离子。

附录 C

(资料性)

10 种黄酮类化合物总离子流图和多反应监测色谱图

10 种黄酮类化合物总离子流图和多反应监测色谱图见图 C.1 和图 C.2。

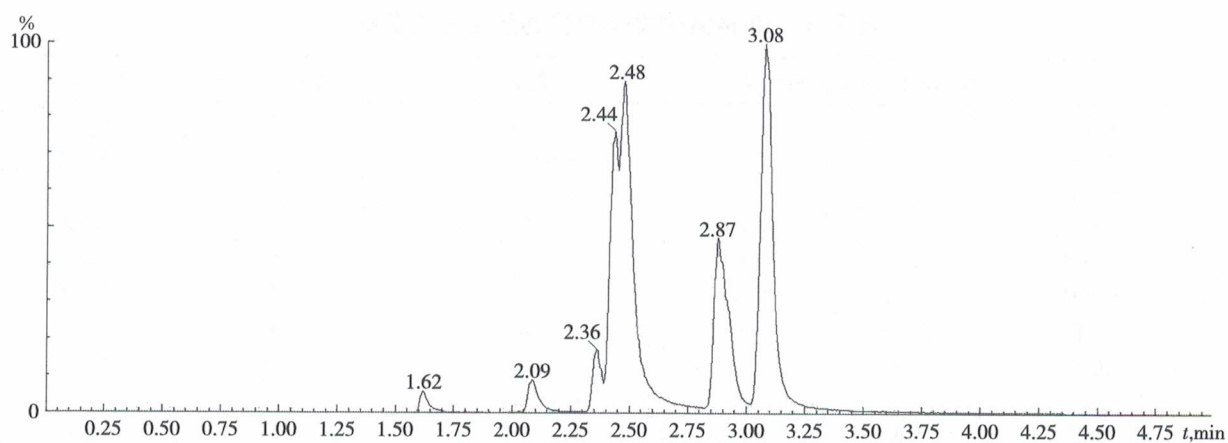


图 C.1 10 种黄酮类化合物总离子流图

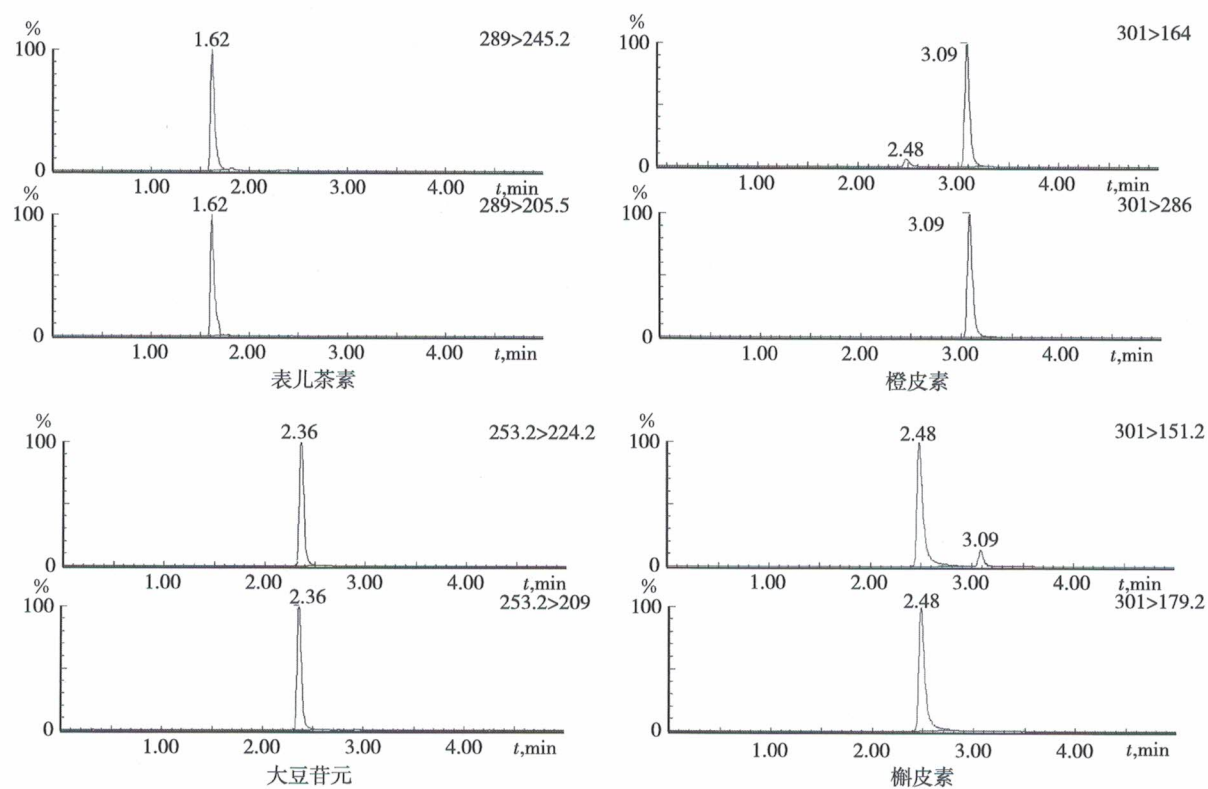


图 C.2 10 种黄酮类化合物多反应监测色谱图

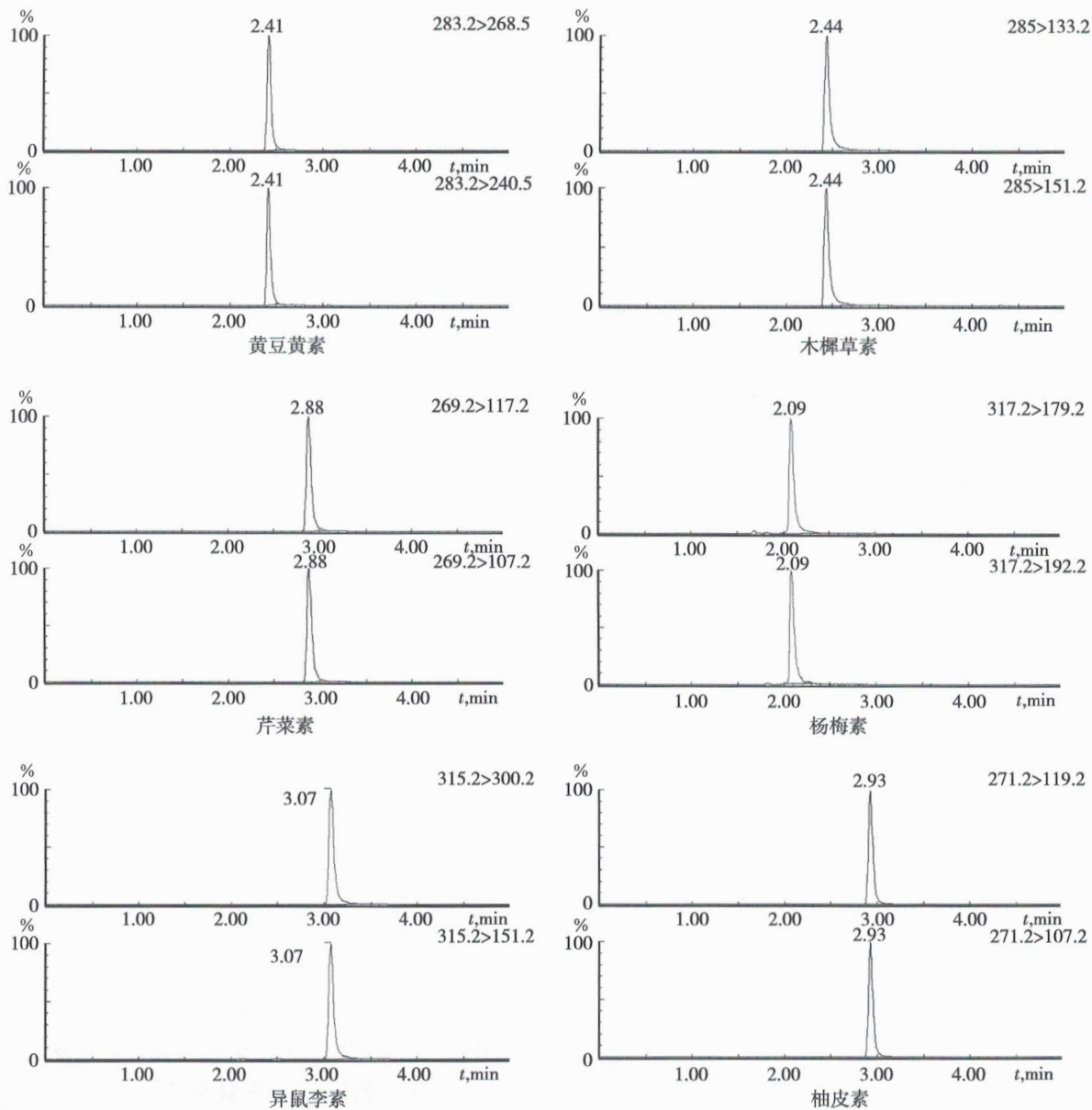


图 C. 2 (续)

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
植 物 源 性 食 品 中 10 种 黄 酮 类 化 合 物 的 测 定
高 效 液 相 色 谱 - 串 联 质 谱 法

NY/T 3950—2021

* * *

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

2022 年 2 月 第 1 版 2022 年 2 月 北 京 第 1 次 印 刷

书 号: 16109 • 8815

定 价: 24.00 元



NY/T 3950—2021

版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话: (010) 59194261