SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3865—2014

出口保健食品中番茄红素的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of lycopene in health foods for export—LC-MS/MS method

2014-01-13 发布　　2014-08-01 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：中国检验检疫科学研究院、中华人民共和国重庆出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：陈冬东、郗存显、王轶亮、李贤良、张雷、唐柏彬、王国民。

出口保健食品中番茄红素的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了保健食品中番茄红素的液相色谱-质谱/质谱检测方法。

本标准适用于番茄红素胶囊中番茄红素的液相色谱-质谱/质谱测定和确证。

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

3 方法提要

试样经氢氧化钾醇溶液皂化后用1%(质量浓度)2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)的石油醚提取，提取液经中性氧化铝层析柱净化后，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4 试剂材料

除非另有说明，所用试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 石油醚：高效液相色谱级。

4.2 二氯甲烷：高效液相色谱级。

4.3 叔丁基甲醚：高效液相色谱级。

4.4 乙腈：高效液相色谱级。

4.5 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)：优级纯。

4.6 氢氧化钾。

4.7 无水乙醇。

4.8 溶解液：称取1.0 g BHT，用二氯甲烷溶解并定容至100 mL。

4.9 提取液：称取10.0 g BHT，用石油醚溶解并定容至1 000 mL。

4.10 定容液：称取1.0 g BHT，用100 mL乙腈-石油醚(1+9，体积比)溶解并定容。

4.11 50%氢氧化钾溶液(质量浓度)：称取50.0 g氢氧化钾用水溶解并定容至100 mL。

4.12 番茄红素标准品：CAS:502-65-8，纯度≥99%，−70 ℃下贮存。

4.13 番茄红素标准储备液：称取适量番茄红素标准品(4.12)，用溶解液(4.8)溶解并定容至10 mL，番茄红素浓度为100 μg/mL，置于−18 ℃冰箱避光保存，有效期3个月。

4.14 番茄红素标准工作液：根据需要用空白样品提取液将标准储备液(4.13)稀释成0.01 μg/mL、0.05 μg/mL、0.10 μg/mL、1.0 μg/mL、5.0 μg/mL、10.0 μg/mL的标准工作溶液。

4.15 中性氧化铝(75 μm～150 μm)：105 ℃干燥2 h，于干燥器中冷至室温，每100 g中性氧化铝中加入2 mL水降活，混匀后密封，放置12 h后使用。

4.16 中性氧化铝层析柱：在层析柱管底部塞入一薄层脱脂棉，干法装入中性氧化铝(4.15)至 3 cm 高，轻敲实后加一薄层脱脂棉，用 10 mL 石油醚预淋洗，备用。

4.17 微孔滤膜：有机系，0.22 μm。

5 仪器与设备

5.1 液相色谱-质谱/质谱仪：配大气压化学电离源。

5.2 分析天平：感量为 0.01 g 和 0.01 mg。

5.3 旋转蒸发仪。

5.4 离心机：转速不低于 5 000 r/min。

5.5 旋涡混匀器。

5.6 超声清洗器。

5.7 氮吹仪。

5.8 恒温水浴锅。

6 试样制备与保存

6.1 试样制备

随机取同一批的供试品 50 粒，挤出内容物，用均质器搅拌试样，混匀，装入洁净容器中，密封，并标明标记。

6.2 试样保存

将试样于－70 ℃下存放。

7 分析步骤

7.1 提取

称取 0.5 g 样品(精确至 0.01 g)于 50 mL 离心管中，加入 5 mL 无水乙醇(4.7)和 3 mL 氢氧化钾溶液(4.11)后，旋涡混匀 2 min，超声 10 min，置于 80 ℃恒温水浴锅中皂化 2 h，每 10 min 振摇 1 次。冷却至室温后加入提取液(4.9)10 mL，振荡提取 5 min，以 5 000 r/min 离心 3 min，将上清液转移至旋蒸瓶中，再用提取液 10 mL 重复提取 2 次，合并提取液，于 40 ℃下旋蒸浓缩近干，用提取液 10 mL 溶解残渣，待净化。

7.2 净化

将待净化液全部转移至经过预淋洗的中性氧化铝层析柱(4.16)中，用 10 mL 石油醚淋洗，抽干后用 10 mL 溶解液(4.8)洗脱，收集洗脱液，于 40 ℃下氮气吹干，残渣用 1.0 mL 定容液(4.10)溶解，过 0.22 μm滤膜后，供 LC-MS/MS 测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱-质谱/质谱条件

液相色谱-质谱/质谱条件如下：

a) 色谱柱：C_{18}柱，150 mm×4.6 mm(内径)，粒径 3.5 μm，或相当者；

b) 流动相:乙腈∶叔丁基甲醚(50∶50),等度洗脱;
c) 流速:0.2 mL/min;
d) 柱温:40 ℃;
e) 进样量:30 μL;
f) 离子源:大气压化学源(APCI);
g) 扫描方式:正离子;
h) 监测方式:多反应监测(MRM);
i) 质谱条件:参见附录 A。

7.3.2 质谱测定

7.3.2.1 定性测定

被测组分选择 1 个母离子、3 个子离子,在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且样品谱图中被测组分监测离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液谱图中对应的监测离子的相对丰度进行比较,偏差不超过表 1 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 1 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>5	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

7.3.2.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下,对基质标准工作溶液进样,外标法定量。标准工作液和样液中待测物的响应值均应在仪器线性响应范围内。在上述色谱和质谱条件下番茄红素的保留时间约为 2.5 min,标准品多反应监测(MRM)色谱图参见附录 B 中图 B.1。

7.3.2.3 空白试验

除不加试样外,均按上述操作步骤进行。

8 结果计算和表达

结果用色谱数据处理机或按(1)式计算试样中番茄红素的含量,计算结果需扣除空白值:

$$x_i = \frac{c_i \times V \times 1\,000}{m \times 1\,000} \qquad \cdots\cdots(1)$$

式中:

x_i ——试样中番茄红素的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);

c_i ——从标准曲线上得到的待测物质的溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/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量,单位为克(g)。

9 测定低限和回收率

9.1 测定低限

本方法对保健食品中番茄红素的测定低限为 0.1 mg/kg。

9.2 回收率

采用本方法对不含番茄红素的保健食品基质进行添加回收试验，添加水平及回收率试验数据见表 2。

表 2 保健食品中番茄红素回收率数据表

添加浓度/(mg/kg)	回收率范围/%
0.10	80.6～120.4
0.20	85.9～115.7
0.50	87.3～109.7
1.0	79.4～96.4
5.0	85.2～108.5
10	95.2～113.4

附 录 A
（资料性附录）
质谱参考条件[1)]

质谱参考条件：

a) 气帘气(CUR)：30.0 psi(1 psi=6.895 kPa)；
b) 雾化气(GSl)：80.0 psi(1 psi=6.895 kPa)；
c) 放电电流(NC)：5.0 μA；
d) 去溶剂温度(TEM)：380.0 ℃；
e) 去簇电压(DP)：94.0 V；
f) 碰撞室入口电压(EP)：12.0 V；
g) 其他参数见表 A.1。

表 A.1 监测离子对、驻留时间、碰撞气能量、碰撞室出口电压等参数

化合物	监测离子对(m/z)	驻留时间/ms	碰撞气能量/V	碰撞室出口电压/V
番茄红素	537.8>467.6	400	26	36
	537.8>455.4*	400	29	13
	537.8>413.6	400	32	34
* 为定量离子对。				

1) 非商业性声明：表 A.1 所列参数是用 API4000 质谱仪完成的，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）
标准品多反应监测（MRM）色谱图

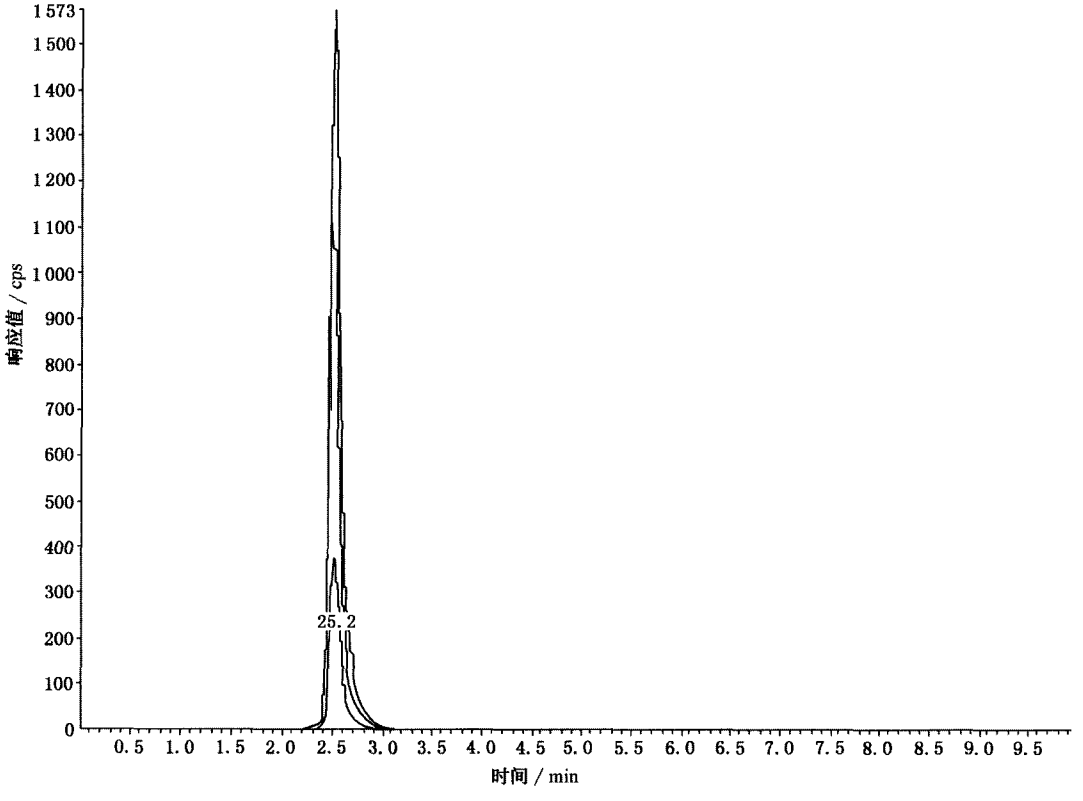


图 B.1 番茄红素标准品多反应监测（MRM）色谱图（0.05 μg/mL）