SN

中华人民共和国出入境检验检疫行业标准

SN/T 3866—2014

出口保健食品中酚酞和大黄素的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of phenolphthalein and emodin in health food 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

手机发送防伪码至13720082315
网站www.cnfw315.com
电话4006982315
刮涂层 查真伪

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、中华人民共和国黑龙江出入境检验检疫局。

本标准主要起草人：马微、彭涛、代汉慧、陈冬东、李晓娟、王海波、韩广源。

出口保健食品中酚酞和大黄素的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了出口保健食品中酚酞和大黄素的液相色谱串联质谱测定方法。

本标准适用于减肥片剂、减肥胶囊、减肥散剂、减肥饼干、减肥口服溶液、减肥咖啡和减肥茶中酚酞和大黄素的检测和确证。

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

将试样用甲醇超声提取，用甲醇-乙酸铵水溶液稀释；减肥口服溶液试样经甲醇-乙酸铵水溶液直接稀释，用配有电喷雾离子源的液相色谱-质谱/质谱进行测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

4.1 甲醇：色谱纯。

4.2 乙酸铵：优级纯。

4.3 10 mmol/L 乙酸铵溶液：精确称取0.771 g乙酸铵(4.2)，超纯水溶解，稀释至1 000 mL。

4.4 标准品：酚酞(phenolphthalein)，CAS号77-09-8，分子式 $C_{20}H_{14}O_4$，纯度大于等于97%；大黄素(emodin)，CAS号518-82-1，分子式 $C_{15}H_{10}O_5$，纯度大于等于97%。

4.5 标准储备溶液：分别称取0.01 g(精确至0.000 1 g)的标准品，大黄素先用少量丙酮溶解，用甲醇定容至100 mL，酚酞用甲醇溶解并定容至100 mL。该标准储备溶液置于−18 ℃保存，有效期3个月。

4.6 混合标准中间溶液：分别吸取适量的酚酞和大黄素标准储备液于100 mL容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配成大黄素和酚酞浓度分别为1 000 ng/mL和100 ng/mL的混合标准中间液。置于4 ℃保存，有效期1周。

4.7 混合标准工作溶液：根据需要用初始比例流动相[7.2.1b)]将混合标准中间溶液(4.6)逐级稀释成适当浓度的混合标准工作溶液，需现用现配。

4.8 有机相滤膜：孔径0.22 μm。

5 仪器和设备

5.1 高效液相色谱-质谱/质谱仪：配有电喷雾离子源。

5.2 分析天平：感度为 0.001 g 和 0.1 mg。
5.3 涡旋混合器。
5.4 超声波清洗器。
5.5 离心机：转速不低于 6 000 r/min。

6 试样制备与保存

6.1 试验制备

6.1.1 通则

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。

6.1.2 片剂

随机取同一批号的供试品 20 片，研细混匀，均分成两份，分别装入洁净容器中，密封并标明标记。

6.1.3 胶囊

随机取同一批号的供试品 20 粒，倾出所有内容物混匀，均分成两份，分别装入洁净容器中，密封并标明标记。

6.1.4 饼干

随机取同一批号的供试品 10 片，研细混匀，均分成两份，分别装入洁净容器中，密封并标明标记。

6.1.5 散剂

随机取同一批号的供试品 10 袋，混匀，均分成两份，分别装入洁净容器中，密封并标明标记。

6.1.6 咖啡

随机取同一批号的供试品 10 袋，混匀，均分成两份，分别装入洁净容器中，密封并标明标记。

6.1.7 茶叶

随机取同一批号的供试品 10 袋，混匀，均分成两份，分别装入洁净容器中，密封并标明标记。

6.1.8 口服溶液剂

随机抽取同一批号的供试品 10 支(瓶)，取等量体积溶液到同一洁净容器中混匀，均分成两份，密封并标明标记。

6.2 试样保存

将试样于－18 ℃保存。

7 分析步骤

7.1 提取

7.1.1 片剂、胶囊、饼干、咖啡、茶叶和散剂样品

称取 1.0 g 试样(精确至 0.01 g)于 50 mL 具塞锥形瓶中，加入 20.00 mL 甲醇，加盖混匀，置于超声

波清洗器中超声 20 min，萃取完毕后冷却至室温，添加甲醇定容为 20 mL，然后转置 50 mL 离心管中，6 000 r/min离心 5 min，取上清液 1.00 mL 于 5 mL 容量瓶中，用初始流动相定容至刻度，过0.22 μm滤膜，供液相色谱-质谱/质谱进行测定。

7.1.2 口服溶液剂

准确移取 1.00 mL 溶液剂试样于 10 mL 容量瓶中，用初始流动相定容至刻度，过 0.22 μm 滤膜，供液相色谱-质谱/质谱进行测定。

7.2 液相色谱-质谱/质谱测定

7.2.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3 柱，100 mm 长，内径 2.1 mm，粒度 1.8 μm，或相当者；

b) 流动相：甲醇-10 mmol/L 乙酸铵水溶液，梯度洗脱程序见表 1；

表 1 梯度洗脱程序

步骤	时间/min	10 mmol/L 乙酸铵水溶液/%	甲醇/%	流速/(mL/min)
1	0	90	10	0.45
2	3	5	95	0.45
3	4	5	95	0.45
4	5	90	10	0.45
5	6	90	10	0.45

c) 柱温：30 ℃；

d) 进样量：5 μL；

e) 样品室温度：20 ℃。

7.2.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

a) 离子源：电喷雾离子源；

b) 扫描方式：酚酞采用正离子扫描，大黄素采用负离子扫描；

c) 检测方式：多反应监测(MRM)；

d) 使用前应调节各参数使质谱灵敏度达到检测要求，参考条件参见附录 A。

7.2.3 定量测定

根据试样中被测物的含量情况，选取响应值相近的标准工作液一起进行色谱分析。混合标准工作液和待测液中酚酞和大黄素的响应值均应在仪器线性响应范围内。对混合标准工作液和样液等体积进行测定。在上述色谱条件下，酚酞的参考保留时间约为 2.73 min，大黄素的参考保留时间约为 3.60 min，标准溶液的选择性离子流图参见附录 B。

7.2.4 定性测定

按照液相色谱-质谱/质谱条件测定样品和标准工作溶液，如果检测的质量色谱峰保留时间与标准

品一致，定量测定时采用标准曲线法测定。定性时应当与浓度相当标准工作溶液的相对丰度一致，相对丰度允许偏差不超过表2规定的范围，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/%	>50	>20～50	>10～20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

7.2.5 空白试验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行。

8 结果计算和表述

8.1 固态样品结果计算和表述

用液相色谱-质谱/质谱数据处理机或按式(1)计算试样中酚酞和大黄素含量，计算结果需扣除空白值。

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

式中：

X ——试样中被测组分的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)；

c ——由标准工作曲线计算得到的试样中被测组分的浓度，单位为微克每升(μg/L)；

V ——样液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

m ——最终样液所代表的试样质量，单位为克(g)。

8.2 液态样品结果计算和表述

用液相色谱-质谱/质谱数据处理机或按式(2)计算试样中酚酞和大黄素含量，计算结果需扣除空白值：

$$X=\frac{c\times V_1}{V_2} \qquad \cdots\cdots(2)$$

式中：

X ——试样中被测组分的含量，单位为毫克每千克(mg/kg)或者微克每升(μg/L)；

c ——由标准工作曲线计算得到的试样中被测组分的浓度，单位为微克每升(μg/L)；

V_1——样液最终定容体积，单位为毫升(mL)；

V_2——最终样液所代表的试样体积，单位为毫升(mL)。

9 测定低限和回收率

9.1 测定低限

测定低限见表3。

表 3　不同样品中酚酞和大黄素的测定低限

化合物	片剂 LOQ/（mg/kg）	饼干 LOQ/（mg/kg）	散剂 LOQ/（mg/kg）	咖啡 LOQ/（mg/kg）	胶囊 LOQ/（mg/kg）	茶剂 LOQ/（mg/kg）	口服溶液剂 LOQ/（μg/L）
酚酞	2.0	2.0	2.0	5.0	5.0	5.0	2.0
大黄素	5.0	5.0	5.0	10	10	10	5.0

9.2　回收率

同收率见表 4、表 5。

表 4　片剂、饼干、散剂和口服溶液试样中酚酞和大黄素的回收率

化合物	添加浓度/（mg/kg）（片剂、散剂、饼干）（μg/L）（口服溶液）	片剂		散剂		饼干		口服溶液	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
酚酞	2.0	80.1～88.4	7.8	80.4～87.9	6.5	88.7～94.4	6.4	87.6～98.5	6.2
	4.0	85.1～90.2	5.6	82.3～88.1	4.8	89.3～97.1	5.8	88.6～99.7	4.6
	8.0	84.1～91.2	4.2	85.5～90.2	4.9	88.3～98.5	4.5	85.3～97.4	3.1
大黄素	5.0	79.8～83.2	7.9	80.7～96.1	7.5	81.2～90.7	6.4	89.2～95.7	5.3
	10	82.5～86.1	6.5	82.3～92.6	5.6	86.8～96.3	5.2	89.6～99.6	5.0
	20	86.9～89.2	5.3	86.2～92.3	4.4	81.3～95.8	4.7	87.6～98.7	4.8

表 5　茶叶、咖啡和胶囊试样中酚酞和大黄素的回收率

化合物	添加浓度/（mg/kg）	茶叶		咖啡		胶囊	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
酚酞	5.0	78.3～87.3	7.3	80.1～87.1	6.8	84.6～93.2	6.5
	10	80.3～89.1	6.2	81.3～87.9	6.1	89.6～97.5	5.9
	20	81.2～90.7	5.1	81.2～87.3	5.2	88.5～99.3	4.7
大黄素	10	79.1～84.5	6.3	80.1～87.5	6.4	87.3～99.5	6.9
	20	80.9～89.1	5.0	80.6～89.2	5.2	89.2～95.3	6.3
	40	82.0～90.2	4.2	81.3～89.1	3.7	85.3～97.5	4.7

附 录 A
（资料性附录）
质谱参考条件

质谱参考条件：

a） 毛细管电压：3.2 kV；

b） 射频透镜电压：0.5 V；

c） 离子源温度：150 ℃；

d） 去溶剂气温度：350 ℃；

e） 去溶剂气流量：800 L/h；

f） 锥孔气流量：50 L/h；

g） 光电倍增器电压：650 V；

h） 碰撞气体为氩气，碰撞气压 2.6×10^{-4} Pa；

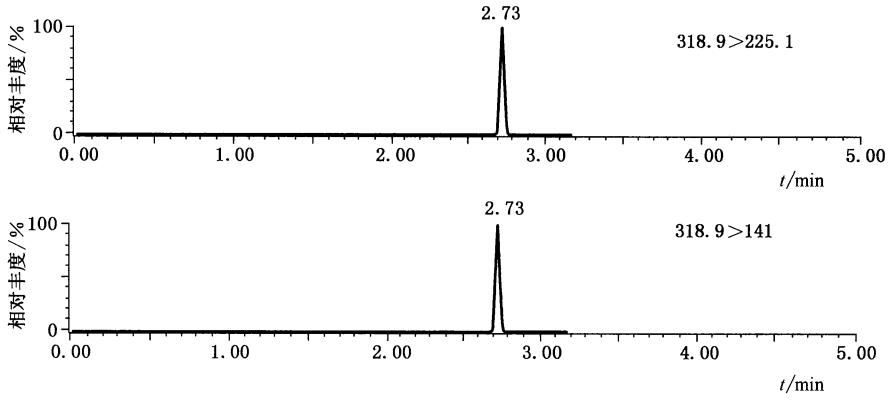
i） 多反应监测（MRM）模式检测；

j） 监测离子对、锥孔电压、碰撞能量见表 A.1。

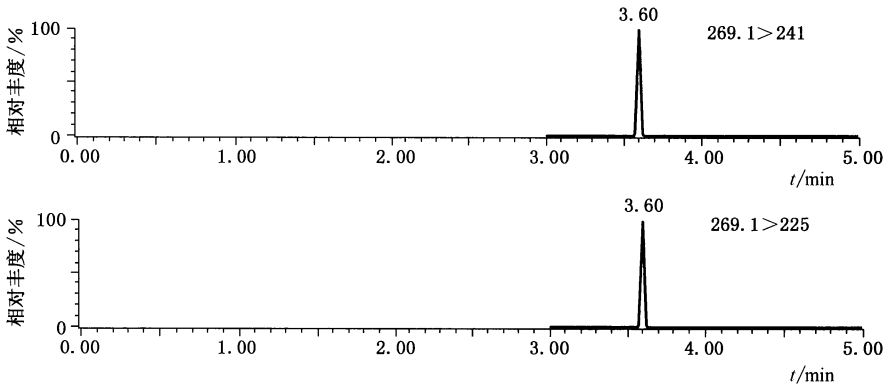
表 A.1 监测离子对、锥孔电压、碰撞能量

药品名称 (name)	电离模式 (ionization mode)	监测离子对 (monitoring ion paris) (m/z)	锥孔电压 (cone voltage)/ V	碰撞能量 (col.energy)/ eV
酚酞 (phenolphthalein)	ESI^+	318.9/225.1[a]	25	20
		318.9/141		30
大黄素 (emodin)	ESI^-	269.1/241.0	45	25
		269.1/225.0[a]		25
[a] 定量离子（the ion for quantification）。				

附 录 B
（资料性附录）
酚酞和大黄素标准溶液多反应监测色谱图



a） 酚酞



b） 大黄素

图 B.1 酚酞和大黄素标准溶液多反应监测色谱图

中华人民共和国出入境检验检疫
行 业 标 准
出口保健食品中酚酞和大黄素的测定
液相色谱-质谱/质谱法
SN/T 3866—2014
*
中 国 标 准 出 版 社 出 版
北京市朝阳区和平里西街甲 2 号(100029)
北京市西城区三里河北街 16 号(100045)
总编室:(010)68533533
网址 www.spc.net.cn
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
*
开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2014 年 11 月第一版 2014 年 11 月第一次印刷
印数 1—1 300
*
书号:155066·2-27395 定价 16.00 元

