

LC-MS/MS 测定蜂胶食品中 12 种酚类物质的含量

LCMSMS-793

摘要： 本文使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪建立了蜂胶食品中 12 种酚类物质同时测定的方法。实验结果表明，在 0.01-1 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围内，方法线性良好，各物质的线性相关系数均大于 0.999，曲线各浓度点准确度在 91.5%-109.1% 之间。0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的对照品溶液，连续进样 6 次，保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.09%-0.50% 和 1.73%-4.86% 之间。20、100 和 500 $\mu\text{g/g}$ 三个不同浓度加标的平均回收率在 85.4%-93.1%、81.4%-96.7%、83.6%-95.3% 之间，12 种酚类物质的 LOQ 为 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 。该方法简单，稳定，准确，可供相关实验人员参考使用。

关键词： 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪 蜂胶食品 酚类物质

技术特点：

- ❖ 该方法定量限值优于标准要求的定量限值。
- ❖ 应对 GB/T 19427—2022《蜂胶中 12 种酚类化合物含量的测定》。

蜂胶是植物树脂分泌物与蜂蜡、花粉等混合形成的粘性物质。蜂胶的功能与所含有的活性成分密切相关，酚类化合物就是其中最重要的活性成分。蜂胶因其含有多种活性成分，因此具有丰富的营养价值及医疗功效。酚类物质最早是在植物性食物中被发现的，因其具有潜在促进健康的作用，因此酚类物质也被科研学者广泛关注。酚类化合物是一类有益健康的化合物，其共同特性是分子中都含有酚类特征基团，因而具有较强的抗氧化功能。根据分子结构的不同，植物性食物中的酚类化合物可包含单酚、多酚、酚酸以及黄酮类物质。

在食品工业中，蜂胶因其具有很高的营养及医疗价值，因此随着蜂胶在食品和保健品中的广泛应用，国家市场监督管理总局对蜂胶中的功能性物质逐渐关注，2022 年 3 月 9 日，由国家市场监督管理总局与国家标准化管理委员会联合发布了 GB/T 19427—2022《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》的检测方法，2022 年 10 月 1 日正式实施。本文参照该标准，使用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了蜂胶产品中酚类物质的含量测定方法，可供相关实验人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	色谱工作站：	LabSolutions Ver. 6.108
质谱检测器：	LCMS-8045		

1.2 分析条件

液相色谱条件：

色谱柱：Shim-pack GISS C18 (50 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm)，P/N:227-30048-01，岛津（上海）实验器材有限公司

流动相：A 相 -0.1% 甲酸水溶液；B 相 -0.1% 甲酸甲醇溶液

流速：0.2 mL/min

进样体积：2 μL

柱温：30°C

洗脱方式：梯度洗脱

初始浓度：B 相初始浓度为 15%，时间程序见表 1

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	15
1.50	Pumps	Pump B Conc.	30
3.00	Pumps	Pump B Conc.	30
3.50	Pumps	Pump B Conc.	40
5.00	Pumps	Pump B Conc.	40
5.50	Pumps	Pump B Conc.	60
6.50	Pumps	Pump B Conc.	60
7.00	Pumps	Pump B Conc.	70
8.00	Pumps	Pump B Conc.	80
8.50	Pumps	Pump B Conc.	100
10.50	Pumps	Pump B Conc.	100
11.50	Pumps	Pump B Conc.	15
15.00	Controller	Stop	

质谱条件：

离子源：ESI (+/-)

DL 温度：250°C

接口电压：+4 kV/-3 kV

加热模块温度：400°C

雾化气流速：3.0 L/min

接口温度：300°C

加热气流速：10.0 L/min

干燥气流：10.0 L/min

扫描模式速：多反应监测 (MRM)

MRM 参数：见表 2

表 2 12 种酚类化合物 MRM 参数

序号	化合物名称	CAS 号	离子化模式	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
1	绿原酸	327-97-9	负	353.15	191.15*	18.0	16.0	20.0
					85.00	25.0	46.0	16.0
2	咖啡酸	331-39-5	负	179.20	135.10*	13.0	15.0	28.0
					134.10	12.0	22.0	26.0
3	p- 香豆酸	501-98-4	负	163.20	119.05*	18.0	15.0	23.0
					92.90	12.0	30.0	17.0
4	阿魏酸	1135-24-6	负	193.20	134.00*	14.0	16.0	14.0
					149.05	14.0	14.0	30.0
5	槲皮素	117-39-5	负	301.05	151.05*	16.0	22.0	15.0
					179.10	15.0	18.0	20.0
6	菝葜醇	520-18-3	正	287.00	152.95*	-20.0	-32.0	-26.0
					68.95	-14.0	-51.0	-28.0
7	芹菜素	520-36-5	负	269.10	117.05*	14.0	35.0	12.0
					151.05	20.0	24.0	30.0
8	松属素	480-39-7	正	257.05	153.05*	-18.0	-22.0	-27.0
					131.20	-18.0	-20.0	-23.0

9	短叶松素 3- 乙酸酯	52117-69-8	负	313.15	253.05*	16.0	20.0	18.0
					271.10	16.0	18.0	19.0
10	柯因	480-40-0	正	255.05	153.05*	-13.0	-30.0	-28.0
					103.10	-13.0	-34.0	-17.0
11	高良姜素	548-83-4	正	271.00	153.05*	-14.0	-30.0	-14.0
					91.20	-14.0	-43.0	-15.0
12	阿替匹琳 C	72944-19-5	负	299.20	255.20*	15.0	18.0	29.0
					200.20	15.0	23.0	14.0

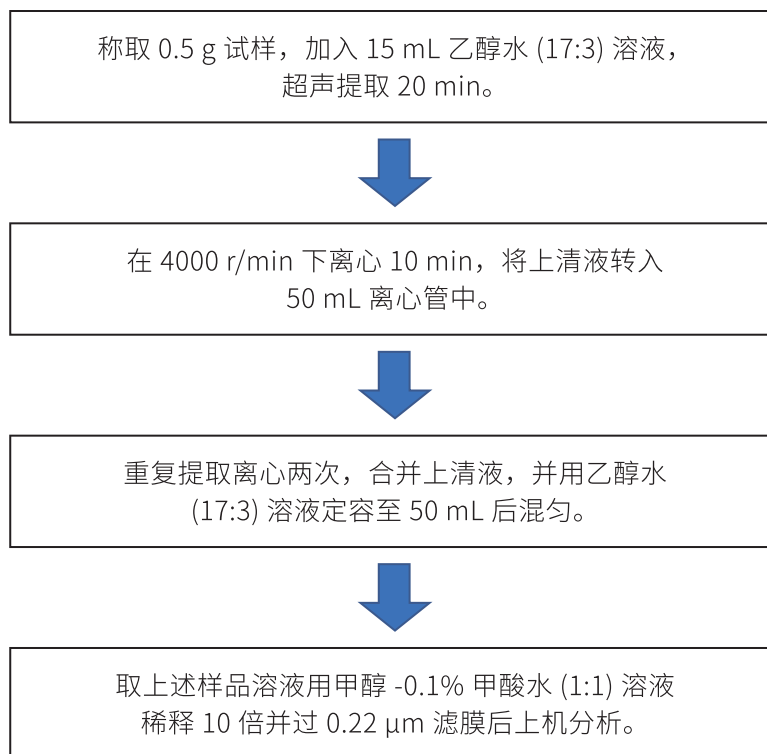
注：* 表示定量离子

1.3 标准品制备

混合标准储备液：准确称取各标准物质适量，用甲醇定容至 10 mL 容量瓶中，制得 1.0 mg/mL 标准储备液。-20℃避光保存。

标准工作溶液：准确量取适量混合标准储备液，用甲醇-0.1% 甲酸水 (1:1) 溶液稀释配制成 0.01、0.05、0.1、0.5、1 μg/mL 混合标准系列工作溶液。

1.4 样品前处理方法



■ 结果与讨论

2.1 色谱图

4:255.05>153.05(+)

4.42e5

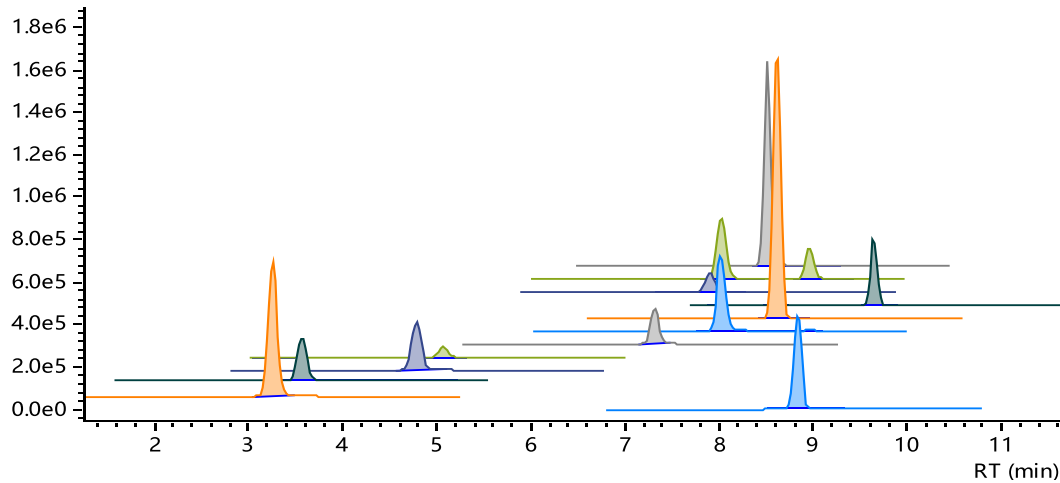


图1 12种酚类化合物的定量离子色谱图 (0.1 µg/mL)

2.2 校准曲线及其检出限

按照 1.3 制备 0.01、0.05、0.1、0.5、1 µg/mL 混合标准系列工作溶液，使用外标法拟合工作曲线，校准曲线见图 2。各浓度点线性回归的准确度及相关系数等结果见表 3。将最低浓度为 0.01 µg/mL 的 12 种酚类物质混合标准溶液，按 1.2 中的分析条件进行上机实测，12 种酚类物质的实测检出限和定量限情况见表 3。在上述实验条件下，12 种酚类物质的 LOQ 为 0.01 µg/mL，实测结果表明仪器灵敏度良好，能够满足 GB/T 19427—2022《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》标准方法中的测定低限要求。

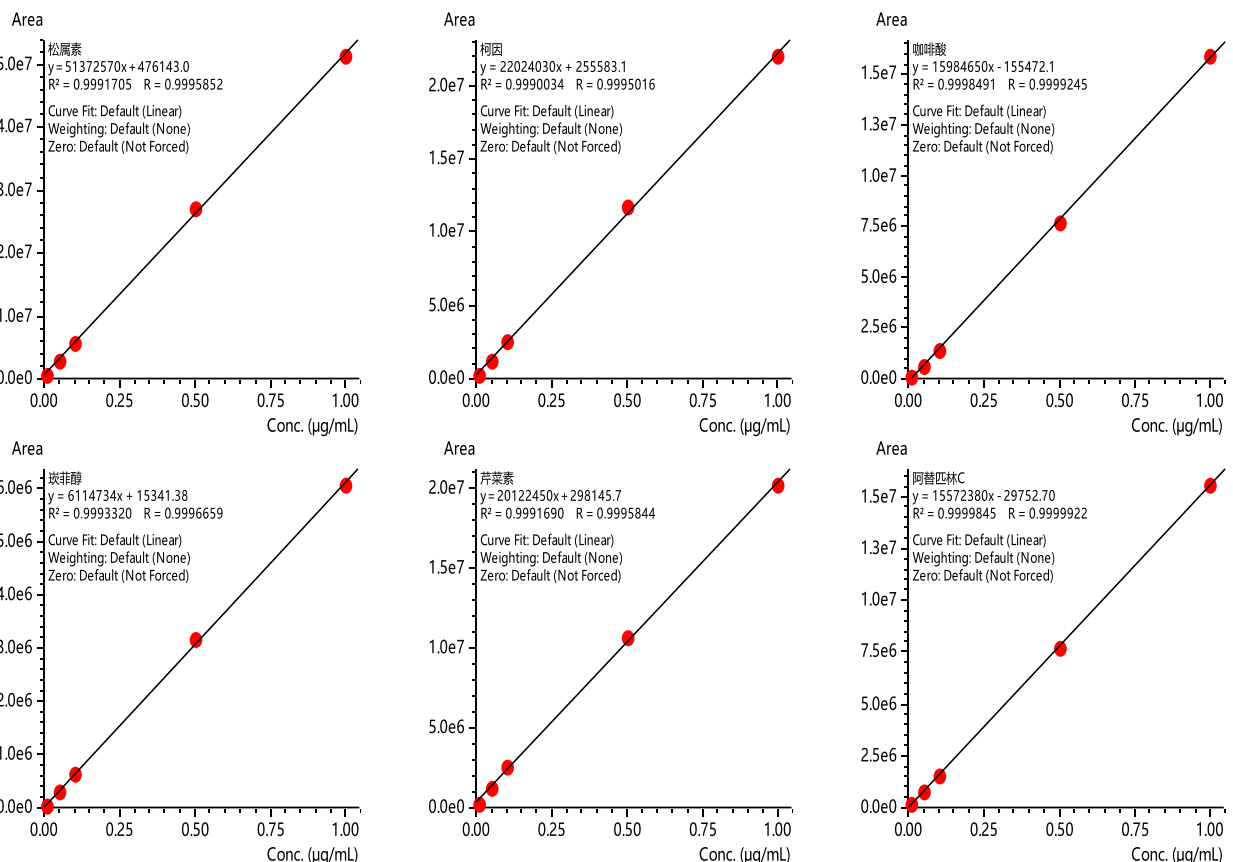


图2 部分酚类物质校准曲线

表 3 校准曲线情况及检出限、定量限结果

No.	化合物名称	线性范围 (µg/mL)	准确度 (%)	相关系数 R	定量限 (µg/mL)
1	绿原酸	0.01-1	93.8-102.9	0.9999	0.01
2	咖啡酸	0.01-1	94.1-101.4	0.9999	0.01
3	p- 香豆酸	0.01-1	93.5-100.3	0.9998	0.01
4	阿魏酸	0.01-1	92.4-99.1	0.9997	0.01
5	槲皮素	0.01-1	98.3-101.8	0.9991	0.01
6	苜蓿醇	0.01-1	93.7-107.7	0.9996	0.01
7	芹菜素	0.01-1	92.4-101.1	0.9997	0.01
8	松属素	0.01-1	91.5-102.6	0.9995	0.01
9	短叶松素 3- 乙酸酯	0.01-1	98.7-102.9	0.9998	0.01
10	柯因	0.01-1	95.5-104.4	0.9995	0.01
11	高良姜素	0.01-1	93.4-101.3	0.9991	0.01
12	阿替匹琳 C	0.01-1	95.3-109.1	0.9999	0.01

2.3 重复性考察

取低、中、高三个浓度的标准溶液，连续进样 6 次，仪器精密度实验考察结果见表 4。该结果表明，各物质保留时间的 RSD 在 0.09%-0.50% 的范围，峰面积的 RSD 在 1.73%-4.86% 的范围，以上数据表明仪器的精密度良好。

表 4 重复性结果 (n=6)

No.	化合物	RSD% (0.05 µg/mL)		RSD% (0.5 µg/mL)		RSD% (1 µg/mL)	
		保留时间	峰面积	保留时间	峰面积	保留时间	峰面积
1	绿原酸	0.50	3.72	0.41	4.38	0.47	4.64
2	咖啡酸	0.27	3.10	0.18	3.17	0.37	2.31
3	p- 香豆酸	0.32	1.73	0.45	4.86	0.43	2.02
4	阿魏酸	0.19	4.29	0.19	3.14	0.14	1.09
5	槲皮素	0.43	3.55	0.34	2.70	0.41	3.07
6	苜蓿醇	0.16	4.24	0.27	4.54	0.25	0.95
7	芹菜素	0.17	3.89	0.09	3.60	0.16	0.79
8	松属素	0.19	4.49	0.19	4.14	0.24	1.02
9	短叶松素 3- 乙酸酯	0.29	2.55	0.34	3.70	0.41	3.07
10	柯因	0.12	4.24	0.17	3.54	0.15	1.95
11	高良姜素	0.11	3.89	0.37	4.60	0.26	2.77
12	阿替匹琳 C	0.17	2.89	0.19	2.14	0.34	3.02

2.4 加标回收率考察

取含蜂胶的保健品样本一份，按照 1.4 的前处理方法，在 20、100 和 500 µg/g 三个加标浓度的水平下，进行回收率实验，结果见表 5。各样品平行测定 3 次，该测定结果显示，各物质在低中高三个浓度梯度的加标回收率分别为 85.4%-93.1%、81.4%-96.7%、83.6%-95.3% 之间，均满足该检测方法的条件要求。

4:255.05>153.05(+)

6.26e3

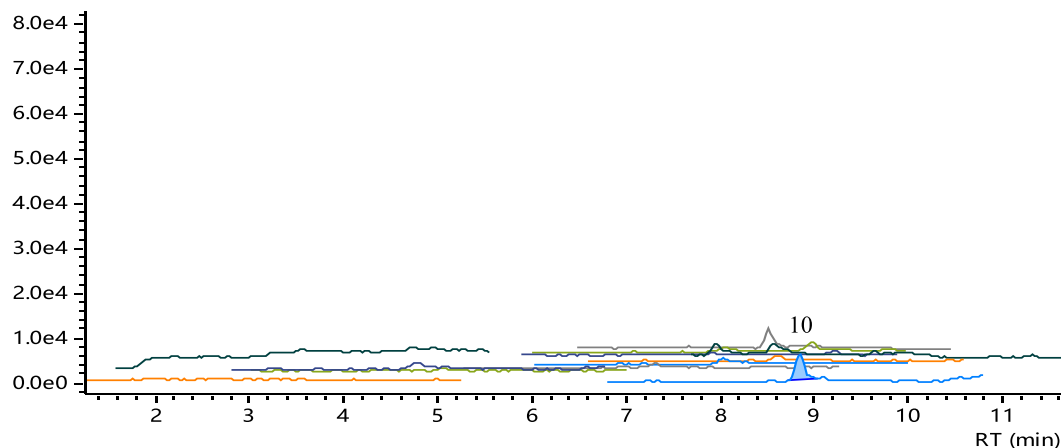


图3 保健品样本谱图

4:255.05>153.05(+)

9.14e4

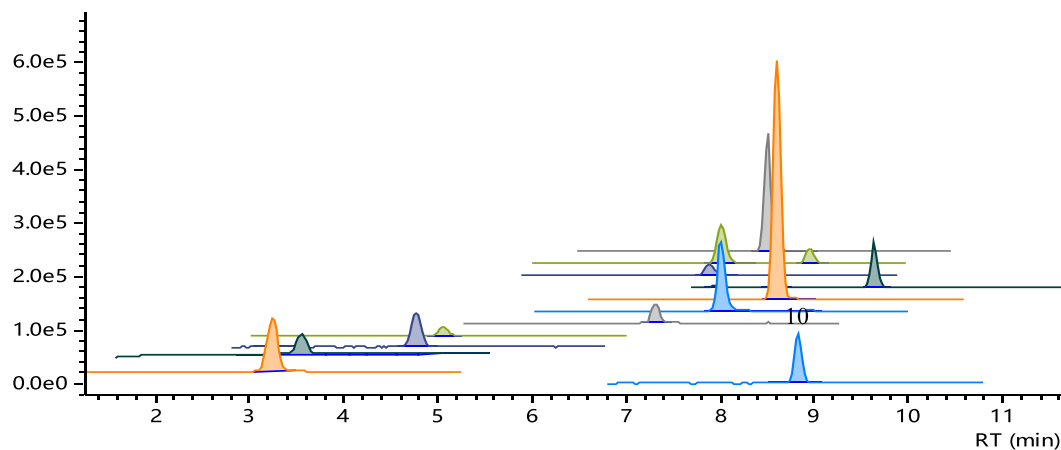


图4 保健品样本加标 (20 µg/g) 谱图

表5 回收率测定结果 (n=3)

No.	名称	样品	20 µg/g	100 µg/g	500 µg/g
		平均值 (µg/g)	平均回收率 (%)	平均回收率 (%)	平均回收率 (%)
1	绿原酸	N.D.	92.3	96.7	95.3
2	咖啡酸	N.D.	91.8	90.9	93.6
3	p- 香豆酸	N.D.	87.5	86.8	85.3
4	阿魏酸	N.D.	92.6	85.8	89.0
5	槲皮素	N.D.	85.4	86.2	91.5
6	茨菲醇	N.D.	86.6	81.4	86.2
7	芹菜素	N.D.	87.9	89.0	83.7
8	松属素	N.D.	93.1	91.8	92.7
9	短叶松素 3- 乙酸酯	N.D.	91.5	83.7	88.8
10	柯因	17.0	89.4	92.4	88.3
11	高良姜素	N.D.	85.8	89.5	83.6
12	阿替匹琳 C	N.D.	88.3	84.8	92.9

N.D.: 表示未检出。

■ 结论

本文使用岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用仪 LCMS-8045 建立了蜂胶食品中 12 种酚类物质同时测定的方法。实验结果表明, 在 0.01-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内线性关系良好, 各物质的线性相关系数均大于 0.999, 曲线各浓度点准确度在 91.5%-109.1% 之间。0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的对照品溶液, 连续进样 6 次, 保留时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD%) 分别在 0.09%-0.50% 和 1.73%-4.86% 之间。20、100 和 500 $\mu\text{g}/\text{g}$ 三个不同浓度加标平均回收率在 85.4%-93.1%、81.4%-96.7%、83.6%-95.3% 之间。12 种酚类物质的 LOQ 均为 0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 测试结果均优于标准要求的 0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的定量限值, 能够满足 GB/T 19427—2022《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》标准方法需求, 可适用于相关行业的质量控制及分析检验工作。

岛津应用云

