

人参中吲哚乙酸和吲哚丁酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of indole acetic acid and indole butyric acid in ginseng
——HPLC-MS/MS method

2016 - 12 - 22 发布

2017 - 04 - 01 实施

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2015给出的规则起草。

本标准由吉林出入境检验检疫局提出。

本标准由吉林省农业委员会归口。

本标准起草单位：吉林出入境检验检疫局检验检疫技术中心。

本标准主要起草人：田芳洁、康明芹、杨璐、曹海微、李荣荣、付瑶。

本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

人参中吲哚乙酸和吲哚丁酸的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了生晒参和鲜园参中吲哚乙酸(IAA)和吲哚丁酸(IBA)的液相色谱-质谱/质谱测定方法。本标准适用于生晒参和鲜园参中吲哚乙酸和吲哚丁酸的定性分析和定量测定。

本方法吲哚乙酸和吲哚丁酸的定量限均为 10.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

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,仅所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 原理

试料用甲醇提取,经固相萃取柱净化,液相色谱-质谱/质谱仪测定,外标法定量。

4 试剂或材料

除另有说明外,所用试剂均为分析纯,水为 GB/T 6682 规定的一级水。

- 4.1 吲哚乙酸标准物质 ($\text{C}_{10}\text{H}_9\text{NO}_2$): CAS 号 87-51-4, 纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.2 吲哚丁酸标准物质 ($\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_2$): CAS 号 133-32-4, 纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.3 乙腈 (CH_3CN): 色谱纯。
- 4.4 甲醇 (CH_3OH)。
- 4.5 甲酸 (HCOOH): 色谱纯, 纯度 $\geq 98\%$ 。
- 4.6 盐酸 (HCl)。
- 4.7 50 %甲醇溶液: 取等体积的甲醇和水混匀。
- 4.8 0.1 %甲酸溶液: 取 1.0 mL 甲酸 (4.5) 用 1 000 mL 水稀释并定容。
- 4.9 乙腈-0.1 % 甲酸溶液 (4+6): 量取 40 mL 乙腈与 60 mL 的 0.1 % 甲酸溶液 (4.8), 混匀。
- 4.10 吲哚乙酸、吲哚丁酸标准储备液: 100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。准确称取适量的吲哚乙酸、吲哚丁酸标准物质 (4.1、4.2), 分别用少量甲醇溶解并转移至 100 mL 容量瓶中, 分别用甲醇定容至刻度, 混匀, $-18\text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光保存 6 个月。
- 4.11 吲哚乙酸、吲哚丁酸混合标准工作溶液: 分别从标准储备溶液 (4.10) 准确移取上述吲哚乙酸、吲哚丁酸标准储备液 1.0 mL 至 100 mL 容量瓶中, 用甲醇定容至刻度, 混匀, 浓度为 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $0\sim 4\text{ }^\circ\text{C}$ 以下避光保存。使用时再根据需要用空白基质液 (4.12) 稀释配制成适当浓度的标准工作溶液。
- 4.12 空白基质液: 选择仅含内源性吲哚乙酸和吲哚丁酸的人参样品, 按照测定步骤 7.1 和 7.2 处理得到空白基质液。

4.13 HLB 固相萃取柱 (N-乙基吡咯烷酮-二乙烯基苯): 200 mg/6 mL, 使用前用 5 mL 甲醇和 5 mL 水预处理。

4.14 滤膜: 0.22 μm , 有机相。

5 仪器设备

5.1 液相色谱-质谱/质谱仪: 配备电喷雾离子源 (ESI)。

5.2 离心机: 10 000 r/min。

5.3 超声波清洗器: 40 kHz。

5.4 天平: 感量 0.0001 g 和 0.01 g。

5.5 涡旋混合器。

5.6 氮吹仪。

5.7 组织捣碎机。

5.8 中药粉碎机。

6 样品

取有代表性的样品 500 g, 按照 6.1 和 6.2 的方法进行制备, 装入干净的容器内混匀备用。在抽样及制样的操作过程中, 应防止样品受到污染或待测物发生含量的变化。

6.1 鲜园参

取整支人参切成碎块, 用组织捣碎机捣碎或其他认可的方法制成均匀的浆状。

6.2 生晒参

取整支人参切成碎块, 用中药粉碎机粉碎, 过 0.18 mm 孔径筛。

7 试验步骤

7.1 提取

7.1.1 鲜园参

称取 5 g 试样 (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 用入 50 mL 甲醇 (4.4) 分两次进行提取, 每次 25 mL, 涡旋混合 1 min, 超声提取 20 min 后, 以 10 000 r/min 速度离心 4 min, 合并上清液, 取 10 mL 上清液于 50 mL 离心管中, 再加入 20 mL 水, 涡旋混匀, 待净化。

7.1.2 生晒参

称取 2 g 试样 (精确至 0.01 g) 于 50 mL 离心管中, 加入 4 mL 水, 超声 10 min, 再加入 16 mL 甲醇 (4.4), 涡旋混合 1 min, 超声提取 20 min 后, 以 10 000 r/min 速度离心 4 min, 取 4 mL 上清液于 50 mL 离心管中, 再加入 8 mL 水, 涡旋混匀, 待净化。

7.2 净化

将 7.1 的上清液全部过柱, 待全部通过后, 依次以 50 % 甲醇 (4.7) 溶液和 5 mL 水洗涤, 流速不超过 2 d/s, 弃去淋洗液, 负压抽干, 用 5 mL 甲醇 (4.4) 洗脱, 收集洗脱液至试管中, 40 $^{\circ}\text{C}$ 以下

氮气浓缩至近干，用乙腈-0.1 % 甲酸溶液（4.9）溶解并定容至 1 mL，经滤膜（4.14）过滤，供 LC-MS/MS 测定。

7.3 空白试验

除不称取试料外，采取完全相同的分析步骤进行平行操作。

7.4 测定

7.4.1 色谱参考条件

色谱参考条件如下：

- 色谱柱：C18，2.1 mm×150 mm，3.5 μm ；
- 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 流速：0.20 mL/min；
- 进样量：10 μL ；
- 流动相：乙腈-0.1 % 甲酸混合溶液（4+6）。

7.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- 电离方式：电喷雾电离（ESI）；
- 扫描方式：正离子扫描；
- 检测方式：多反应监测（MRM）；
- 电离电压：5.5 kV；
- 气帘气：20 Psi；
- 雾化气：30 Psi；
- 辅助气：30 Psi；
- 碰撞气：6 Psi；
- 离子源温度：550 $^{\circ}\text{C}$ ；
- 定性离子对、定量离子对、去簇电压、碰撞能量见表 1。

表1 IAA-IBA 的监测离子对、去簇电压和碰撞能量

化合物名称	母离子 m/z	子离子 m/z	去簇电压 V	碰撞能量 V
IAA	176.1	130.2*	21	50
		103.3	43	50
		77.2	60	50
IBA	204.2	186.0*	17	60
		144.0	30	60
		130.0	30	60
*定量离子				

7.4.3 标准工作曲线

将浓度为 2.0 μg/L、4.0 μg/L、20.0 μg/L、50.0 μg/L、100.0 μg/L、200.0 μg/L、500.0 μg/L 的标准工作溶液（4.11），按参考色谱和质谱条件测定。以吡啶乙酸、吡啶丁酸的质量浓度为横坐标，相应的峰面积响应值为纵坐标，进行线性回归分析。

7.4.4 定性分析

在同一色谱/质谱条件下进行标准溶液和样品溶液的测定，如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准物质色谱峰的保留时间一致，所选择的两对子离子的质荷比也一致，而且样品定性离子的相对丰度与浓度相当标准工作溶液的定性离子的相对丰度相比较，相对标准偏差不超过表 2 规定的范围，则可判定样品中存在该物质。

表2 定性分析时相对离子丰度的最大允许偏差

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

7.4.5 定量测定

做两份试料的平行测定。根据试样中被测样液中被测组分的含量情况，选取响应值相近的标准工作液进行分析，对于高浓度样品须适当进行系列稀释。标准工作液和样液中被测组分的响应值均应在仪器线性响应范围内。在上述色谱条件下，吡啶乙酸和吡啶丁酸的参考保留时间为 3.08 min 和 4.96 min，外标法定量。标准溶液的多反应监测色谱图及提取离子流图参见附录 A。同时做空白试验。

8 试验数据处理

按（1）式计算试样中吡啶乙酸和吡啶丁酸含量。

$$X_i = \frac{c_i \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X_i —— 试样中被测组分含量，单位为微克每千克(μg/kg)；
- c_i —— 从标准曲线得到的被测组分溶液浓度，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 —— 样液所代表的试料的质量，单位为克(g)。

注：计算结果保留至小数点后一位。

9 精密度

9.1 重复性

在重复性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定结果的算术平均值的 15 %。

9.2 再现性

在再现性条件下，获得的两次独立测试结果的绝对差值不大于这两个测定结果的算术平均值的 20 %。

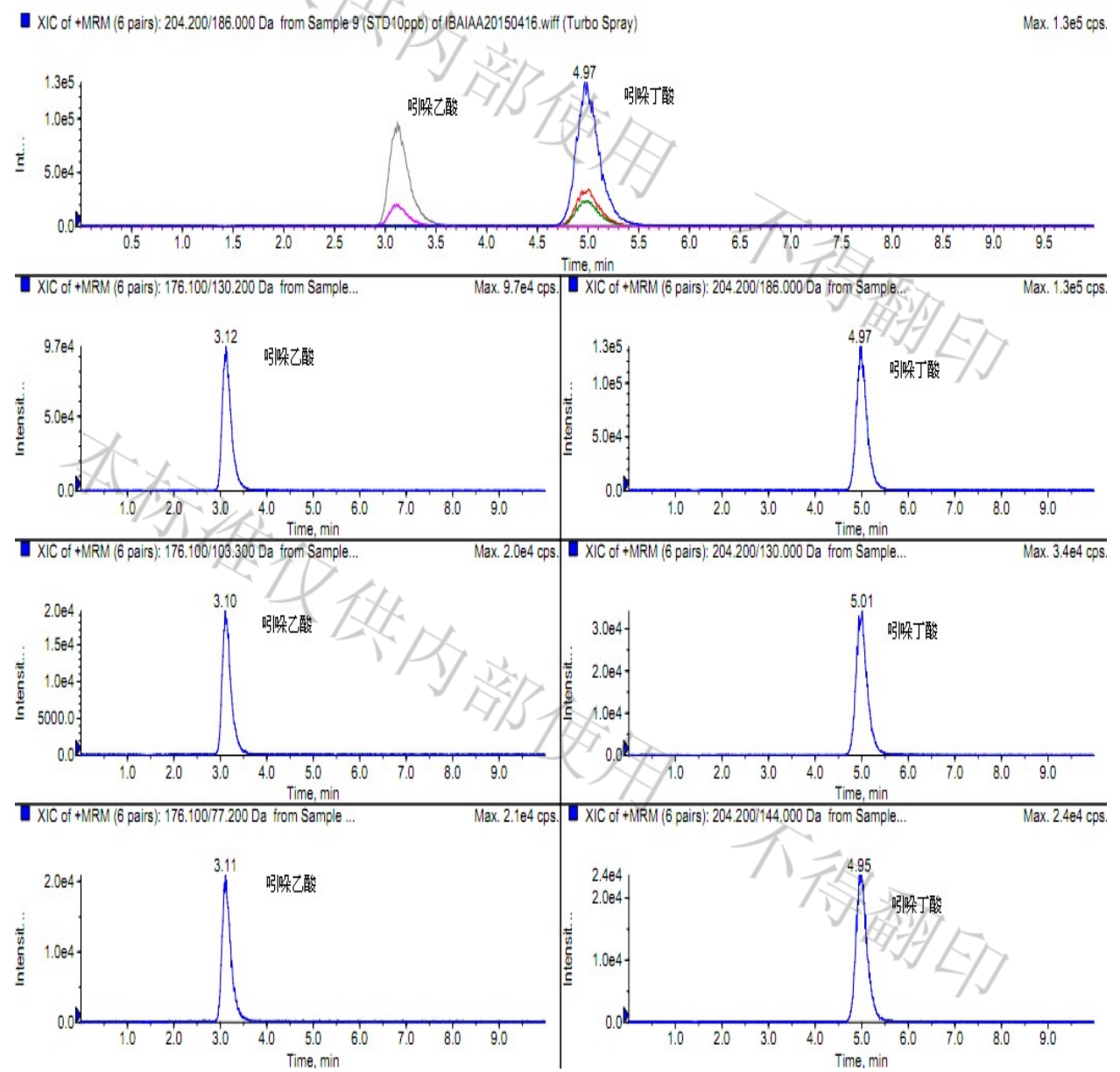
本标准仅供内部使用 不得翻印

本标准仅供内部使用 不得翻印

附 录 A
(资料性附录)

吲哚乙酸、吲哚丁酸标准品液相色谱-质谱/质谱图

吲哚乙酸、吲哚丁酸标准品液相色谱-质谱/质谱图见图A. 1。



图A. 1 吲哚乙酸、吲哚丁酸标准品液相色谱-质谱/质谱图 (10.0 $\mu\text{g/L}$)