

# DBS45

广西壮族自治区地方标准

DBS 45/067—2020

---

食品安全地方标准

甜茶中甜茶苷含量的测定

2021 - 05 - 30 发布

2021 - 06 - 30 实施

---

广西壮族自治区卫生健康委员会 发布

## 前 言

本文件按GB/T 1.1—2020的格式编写。

本文件由广西壮族自治区疾病预防控制中心、广西壮族自治区轻工产品质量检验站提出。

本文件代替DBS 45/060—2019《食品安全地方标准 甜茶》中的附录A。

本文件起草单位：广西壮族自治区疾病预防控制中心、广西壮族自治区轻工产品质量检验站。

本文件主要起草人：甘宾宾、白芸、李永芳、陆建梅、易永基、蒋志维、廖艳华、梁川、周能志、张瑞。

# 食品安全地方标准

## 甜茶中甜茶苷含量的测定

### 1 范围

本文件规定了甜茶[蔷薇科植物甜叶悬钩子[*Rubus chingii* var. *Suavissimus* (S. Lee)L. T. Lu]的干燥叶]中甜茶苷的测定方法。

本文件适用于高效液相色谱法测定甜茶中甜茶苷的含量。

### 2 原理

根据甜茶苷溶于甲醇水溶液的特性，试样采用70%甲醇溶液进行加热回流或超声提取，然后定容，试样过滤后直接利用高效液相色谱仪分离，紫外检测器检测，根据保留时间和峰面积进行定性和定量。对有需要确证的试样，可采用液相色谱-三重四极杆串联质谱仪进行定性确证。

### 3 试剂和材料

- 3.1 甲醇(CH<sub>3</sub>OH)：色谱纯。
- 3.2 水(H<sub>2</sub>O)：GB/T 6682规定的一级水。
- 3.3 磷酸(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)：分析纯。
- 3.4 0.1%磷酸溶液：用磷酸与水按0.1：100的比例配制。
- 3.5 甲酸(HCOOH)：优级纯。
- 3.6 0.1%甲酸溶液：用甲酸与水按0.1：100的比例配制。
- 3.7 70%甲醇溶液：用甲醇与水按70：30的比例配制。
- 3.8 甜茶苷标准品(C<sub>32</sub>H<sub>50</sub>O<sub>13</sub>,CAS号：64849-39-4)：纯度≥98%。
- 3.9 甜茶苷标准储备溶液(2.00mg/mL)：准确称取0.02g(精确至0.00001g)甜茶苷标准品于10mL容量瓶，用70%甲醇溶液溶解并定容至刻度。储备液置4℃±2℃冰箱中保存，保存期为3个月。
- 3.10 微孔滤膜：0.45μm。

### 4 仪器和设备

- 4.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器(或二极管阵列检测器)。
- 4.2 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪。
- 4.3 超声波清洗器：500W，40KHZ。
- 4.4 电子天平：0.001g和0.00001g。
- 4.5 粉碎机。
- 4.6 加热回流装置。

## 5 分析步骤

### 5.1 试样制备

取适量样品，用粉碎机将样品打成粉末状，过80目筛待测。

### 5.2 试样提取

试样的提取由实验室根据实际条件来选择5.2.1或5.2.2的方法进行。

#### 5.2.1 加热回流提取法

取甜茶样品（5.1）1g（精确至0.001g），置150mL的锥形瓶或圆底烧瓶中，加入70%甲醇溶液约70mL，置加热回流装置上，于80℃水浴提取60min（水浴温度达到80℃后开始计时），取出锥形瓶或圆底烧瓶立即冷水冷却至室温，提取液全部转移至100mL容量瓶，用70%甲醇溶液分多次重复冲洗锥形瓶或圆底烧瓶，洗液一并转移至容量瓶中，用70%甲醇溶液定容至刻度，摇匀，静置，取适量上清液过0.45μm滤膜，滤液供HPLC检测。

#### 5.2.2 超声提取法

取甜茶样品（5.1）1g（精确至0.001g），置150mL带磨口塞的锥形瓶中，加入70%甲醇溶液约70mL，盖上瓶塞，超声提取60min，取出锥形瓶冷却至室温，提取液全部转移至100mL容量瓶，用70%甲醇溶液分多次重复冲洗锥形瓶，洗液一并转移至容量瓶中，用70%甲醇溶液定容至刻度，摇匀，静置，取适量上清液过0.45μm滤膜，滤液供HPLC检测。

### 5.3 标准曲线的制备

分别吸取甜茶苷标准储备溶液（3.9）0.50mL、1.00mL、2.00mL、3.00mL、4.00mL于10mL容量瓶中，用70%甲醇溶液稀释并定容，配制成浓度为0.100mg/mL、0.200mg/mL、0.400mg/mL、0.600mg/mL、0.800mg/mL的标准系列工作液。

### 5.4 液相色谱参考条件

5.4.1 色谱柱：C<sub>18</sub>，250mm×4.6mm，5μm或等效色谱柱。

5.4.2 流动相：甲醇+0.1%磷酸溶液=70+30。

5.4.3 流速：1.0mL/min。

5.4.4 检测波长：210nm。

5.4.5 进样体积：10μL。

5.4.6 柱温：30℃。

### 5.5 色谱分析

在给定的仪器条件下进标准溶液系列和处理好的试样溶液进行高效液相色谱分析，以保留时间定性，以峰面积定量。

## 6 结果计算

试样中甜茶苷的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{C \times V}{m \times 1000} \times 100 \quad (1)$$

式中：

X—试样中甜茶苷的含量，单位为克每百克（g/100g）；

C—由标准曲线求得的进样液中甜茶苷的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

V—试样定容体积，单位为毫升（mL）；

m—试样的质量，单位为克（g）。

结果保留3位有效数字。

## 7 精密度

在重复条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的10%。

## 8 色谱图

在上述色谱条件下的色谱图见图1、图2

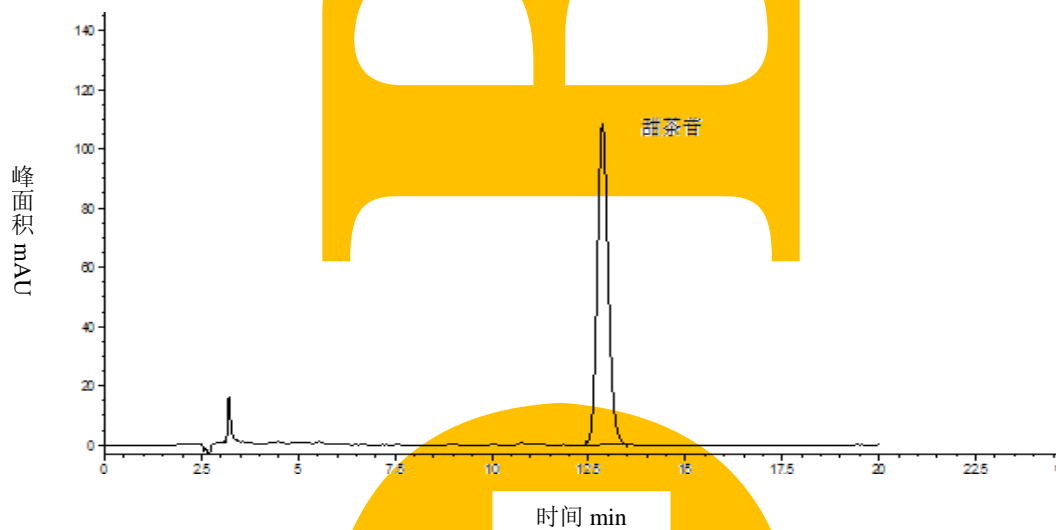


图1 甜茶苷标准溶液色谱图

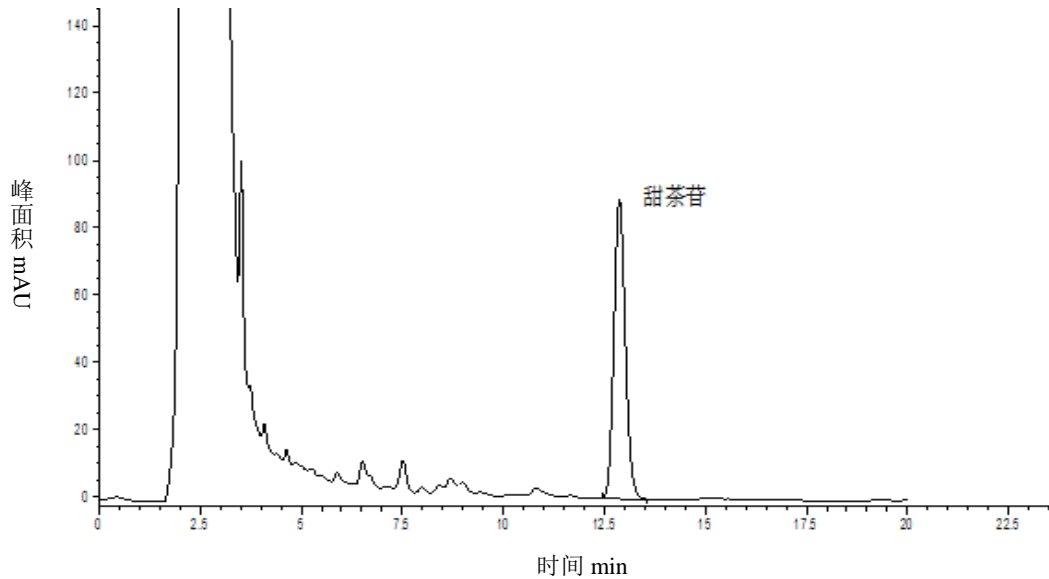


图2 甜茶样品中甜茶苷色谱图

## 9 检出限、定量限

当信噪比 $S/N=3$ ，取样量为1.0g,定容体积为100mL时，本方法的检出限（LOD）为0.016g/100g；当信噪比 $S/N=10$ ，取样量为1.0g，定容体积为100mL时，本方法的定量限（LOQ）为0.053g/100g。方法的线性范围为0.02mg/mL~2.2mg/mL。

## 10 定性确证实验

对于测定过程中需确证的样品，可用液相色谱-三重四极杆串联质谱仪定性确证。

### 10.1 液相色谱-三重四极杆串联质谱参考条件

色谱柱：AgilentZORBAX SB- $C_{18}$ ，或等效色谱柱。

流速：0.2mL/min。

柱温：35℃。

流动相：甲醇+0.1%甲酸溶液=70+30。

进样量：5 $\mu$ L。

离子源：电子喷雾离子源。

监测模式：多反应监测（MRM）。

离子源电压：3500V。

检测模式：正离子模式。

碰撞电压：45eV。

支簇电压：5eV。

### 10.2 质谱参考特征离子

表1 质谱参考特征离子

待测成分	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	子离子 (m/z)
甜茶苷	643	319	481

按照仪器参考条件（10.1）测定试样溶液和标准工作溶液，如果试样中的甜茶苷质量色谱峰保留时间与标准工作溶液一致（变化范围在 $\pm 2.5\%$ 之内；且试样中的甜茶苷两个子离子的相对丰度比（k）与浓度相当标准工作溶液的甜茶苷的两个子离子的相对丰度比相比，其允许偏差不超过表2规定的范围，则可判定为试样中存在甜茶苷。

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 (%)	$k > 50$	$50 \geq k > 20$	$20 \geq k > 10$	$k \leq 10$
允许的最大偏差 (%)	$\pm 20$	$\pm 25$	$\pm 30$	$\pm 50$

