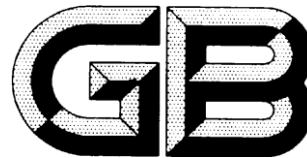


ICS

点击此处添加中国标准文献分类号



中华人民共和国国家标准

GB/T XXXXX—XXXX

植物源产品中辣椒素类物质的测定 液相色谱-质谱/质谱法

Determination of capsaicinoids in plant derived products ——

LC-MS/MS method

点击此处添加与国际标准一致性程度的标识

(征求意见稿)

(本稿完成日期：2020年05月26日)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试剂和材料	1
6 仪器与设备	2
7 分析步骤	2
8 结果分析	4
9 精密度	4
10 方法灵敏度	4
附录 A (资料性附录) 液相色谱-质谱/质谱参数参考条件 ^{D)}	5
附录 B (资料性附录) 多重反应监测 (MRM) 色谱图	6

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009 给出的规则起草。

本标准由全国生化检测标准化技术委员会（SAC/TC387）提出并归口。

本标准起草单位：××××××。

本标准主要起草人：××××××。

植物源产品中辣椒素类物质的测定 液相色谱-质谱/质谱法

1 范围

本标准规定了植物源产品中辣椒素类物质含量的液相色谱-质谱/质谱测定方法。
本标准适用于辣椒及其制品中辣椒素类物质含量的测定。

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 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 辣椒素类物质 capsaicinoid

在辣椒果实中产生辣味的N-香草基酰胺类生物碱物质的统称。

注：其中辣椒素、二氢辣椒素、降二氢辣椒素三种物质的含量约占辣椒素类物质总量的90%以上，是最辛辣、影响辣度最主要的活性成分。

4 原理

试样用甲醇超声提取，提取液经0.22 μm尼龙滤膜过滤后进样，反相色谱柱分离，液相色谱-质谱/质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明，本方法使用的试剂均为分析纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 甲醇：色谱纯。

5.2 合成辣椒素标准品：纯度≥98%；分子式：C₁₇H₂₇NO₃；CAS号：2444-46-4。

5.3 辣椒素标准品：纯度99%；分子式：C₁₈H₂₇NO₃；CAS号：404-86-4。

5.4 二氢辣椒素标准品：纯度≥98%；分子式：C₁₈H₂₉NO₃；CAS号：19408-84-5。

5.5 降二氢辣椒素标准品：纯度≥98%；分子式：C₁₇H₂₇NO₃；CAS号：28789-35-7。

5.6 辣椒素类物质标准储备液：分别准确称取辣椒素标准品、二氢辣椒素标准品、合成辣椒素标准品和降二氢辣椒素标准品各约 10 mg（精确至 0.01mg）于同一 10 mL 容量瓶中，加甲醇超声溶解并定容至刻度，混匀，配制成浓度均为 1.0 mg/mL 的辣椒素类物质混合标准储备溶液，于 4 °C 下避光保存备用，有效期为 2 个月。

5.7 辣椒素类物质标准工作溶液：准确移取适量的辣椒素类物质标准储备液，用甲醇逐级稀释配制成浓度为 1 ng/mL~5 μg/mL 的系列混合标准工作溶液，现配现用。

5.8 0.22 μm 尼龙滤膜。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-质谱/质谱仪：带电喷雾离子源（ESI 源）。

6.2 分析天平：感量为 0.01 mg 和 0.0001 g。

6.3 高速离心机（最大转速 15000 r/min）。

6.4 超声波清洗器（超声工作频率：40 kHz；温度可调：20 °C~80 °C）。

6.5 涡旋混匀器。

6.6 组织捣碎机。

6.7 电动粉碎机（粒度≤0.391 mm）。

7 分析步骤

7.1 样品制备

取新鲜辣椒或含水量较高的辣椒制品约 1 kg，用均质器制成匀浆，混匀，制备好的试样均分成两份，装入洁净的盛样容器内，密封并标识，现制现用。

取干辣椒、固态辣椒制品等有代表性样品约 1 kg，用电动粉碎机粉碎，制备好的试样均分成两份，装入洁净的盛样容器内，密封并标识，于 0 °C~4 °C 保存。

取辣椒油等有代表性油状样品约 1 kg，用均质器制成匀浆，制备好的试样均分成两份，装入洁净的盛样容器内，密封并标识，现制现用。

7.2 试样提取

7.2.1 鲜辣椒、含水量较高（水分含量>15%）的辣椒制品

取试样约 10 g（精确至 0.001g）于 50 mL 具塞离心管中，加入 3.0 g 无水硫酸钠和 30 mL 甲醇，超声（40 KHz，250 W，60 °C 水浴）提取 15 min，于 8000 r/min 下离心 5 min，上层清液转移至 100 mL 容量瓶中，再重复操作两次，合并三次提取液，用甲醇定容至刻度，混匀，精密量取 1 mL 于 10 mL 容量瓶中，加甲醇稀释定容，摇匀，过 0.22 μm 尼龙滤膜，待测。

7.2.2 辣椒粉、干辣椒及固态辣椒制品

取试样约 2 g（精确至 0.001g）于 50 mL 具塞离心管中，加入 30 mL 甲醇，以后同 7.1.1 “超声（40 KHz，250 W，60 °C 水浴）提取 15 min，……”操作。

7.2.3 辣椒油等油状样品

取试样约 2 g (精确至 0.001g) 于 50 mL 具塞离心管中, 加入 30 mL 甲醇, 以后同 7.1.1 “超声 (40 KHz, 250 W, 60 °C 水浴) 提取 15 min, ……” 操作。

7.3 样品测定

7.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱: RRHD SB-C₁₈ 色谱柱, 100 mm×2.1 mm, 粒度 1.8 μm 或相当者;
- b) 流动相: 流动相组成及梯度洗脱程序见表 1;
- c) 流速: 0.2 mL/min;
- d) 柱温: 40 °C;
- e) 进样量: 2 μL。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间 min	0.1%的甲酸水溶液 %	甲醇 %
0	45	55
3	45	55
8	40	60
13	30	70
18	20	80
23	0	100
28	0	100
28.1	45	55
40	45	55

7.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI 源);
- b) 扫描方式: 正离子模式;
- c) 检测方式: 多反应监测 (MRM);
- d) 干燥气、雾化气、碰撞气均为高纯氮气 (纯度 ≥ 99.999%); 使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求, 详细条件参加附录 A;
- e) 喷雾电压、碎裂电压、碰撞能量等参数应优化至最优灵敏度, 参考条件见附录 A.1。

7.3.3 液相色谱-质谱/质谱测定

7.2.3.1 定量测定

在仪器最佳工作条件下, 用辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒素和降二氢辣椒素混合标准工作溶液进样分析, 以峰面积为纵坐标, 溶液浓度为横坐标绘制标准工作曲线, 用标准工作曲线对样品进行定量, 应使样品溶液中四种辣椒素类物质的响应值在仪器测定的线性范围内, 如果含量超过标准工作曲线范围, 应稀释到合适浓度后分析。在上述色谱条件下辣椒素、二氢辣椒素、合成辣椒碱和降二氢辣椒素的参考保留时间分别为 13.46 min、17.14 min、13.42 min、9.08 min。4 种辣椒素类物质标准工作溶液的多反应监测色谱图参加附录 B 中图 B.1~图 B.4。

7.2.3.2 定性测定

在相同的实验条件下，样品溶液中被测物的色谱峰保留时间和标准工作溶液的相同（变化范围在±2.5%以内），并且在扣除背景后的样品溶液谱图中，所选择的离子均出现，各定性离子的相对丰度和标准品离子的相对丰度比，偏差不得超过表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

7.3.4 平行试验

按以上步骤对同一试样进行平行试验测定。

7.3.5 结果分析

按照式（1）计算样品中待测物的含量。

$$X = \frac{c \times V}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

X——试样中被测组分含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

C——从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V——样品稀释倍数；

M——样品溶液所代表最终试样的质量，单位为克（g）。

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留至小数点后两位。

7.3.6 精密度

在重复性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%。

7.3.7 方法灵敏度

本标准测定各辣椒素类物质检出限和定量限结果参见表3。

表3 4种辣椒素类物质的检出限和定量限

参数名称	辣椒粉、干辣椒以及固体辣椒制品检出限（mg/kg）	辣椒粉、干辣椒以及固体辣椒制品定量限（mg/kg）	辣椒油等油状样品检出限（mg/kg）	辣椒油等油状样品定量限（mg/kg）	鲜辣椒以及含水量高于15%辣椒制品检出限（mg/kg）	鲜辣椒以及含水量高于15%辣椒制品定量限（mg/kg）
降二氢辣椒碱	0.31	0.61	0.31	0.61	0.061	0.12
辣椒碱	0.31	0.61	0.31	0.61	0.061	0.12
合成辣椒碱	0.32	0.63	0.32	0.63	0.063	0.13
二氢辣椒碱	0.31	0.61	0.31	0.61	0.061	0.12

附 录 A
(资料性附录)

液相色谱-质谱/质谱参数参考条件¹⁾

参考质谱条件如下：

- a) 扫描方式：正离子模式；
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 干燥气（N₂）温度：350℃；
- d) 雾化气（N₂）压力：30 psi；
- e) 干燥气流速：9 L/min；
- f) 喷雾电压：4000 V；
- g) 定性离子对、定量离子对、碰撞能量、碎裂电压参见表 A.1。

表A.1 4种辣椒素类物质的MRM质谱分析参数

化合物名称	参考保留时间 min	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量(CE) V	碎裂电压(Frg.) V
辣椒素	13.46	306.1	137.1*	15	90
			122.2	50	
二氢辣椒素	17.14	308.2	137.1*	15	90
			308.2	50	
降二氢辣椒素	9.08	294.2	137.1*	15	85
			122	45	
合成辣椒素	13.42	294.2	137.1*	15	85
			122	45	

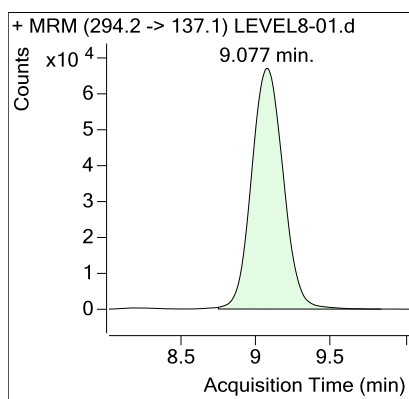
注：带“*”的离子为定量离子

1) 非商业性声明：附录A所列参数是在Agilent 6420质谱仪上完成的，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。

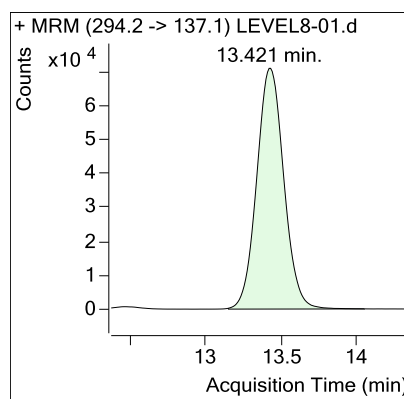
附录 B
(资料性附录)

标准工作溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图

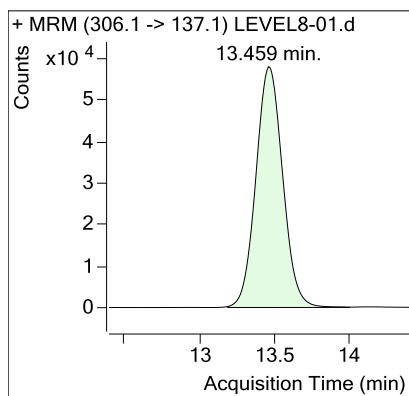
标准工作溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图, 见图B.1~图B.4。



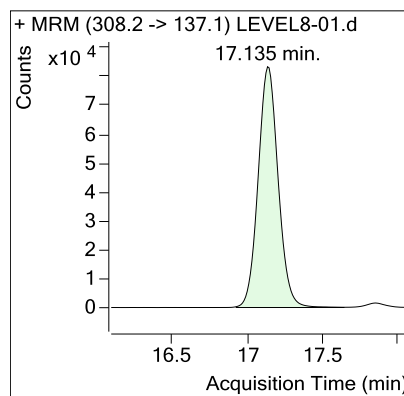
图B.1 降二氢辣椒素多反应监测 (MRM) 色谱图



图B.2 合成辣椒素多反应监测 (MRM) 色谱图



图B.3 辣椒素多反应监测 (MRM) 色谱图



图B.4 二氢辣椒素多反应监测 (MRM) 色谱图