

T/GDFCA

广东省食品流通协会团体标准

T/GDFCA 080—XXXX

中药材中单蒽核类蒽醌含量的测定 离子液体分散液-液微萃取-高效液相色谱法

Determination of mononuclear anthraquinone content in Chinese herbal medicine by
IL-DLLME-HPLC method

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

2022 – XX – XX 发布

2022 – XX – XX 实施

广东省食品流通协会 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 仪器和设备 2

7 测定步骤 2

8 结果计算 3

9 精密度 3

10 其他 3

附录 A（资料性） 高效液相色谱法测定单核蒽醌的典型色谱图 4

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件由广东省食品流通协会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

中药材中单蒽核类蒽醌含量的测定 离子液体分散液-液微萃取-高效液相色谱法

1 范围

本文件描述了离子液体分散液-液微萃取中药材(包括中药饮片)中的单蒽核类蒽醌, 高效液相色谱法测定其含量的要求和方法。

本文件适用于中药材、中药饮片单蒽核类蒽醌含量测定, 其他植物性食品可参照执行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 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

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经纯水煮沸提取, 提取液加入1-苄基-3-甲基咪唑双[(三氟甲基)磺酰基]亚胺盐和甲醇溶液进行离子液体-分散液-液微萃取, 萃取相中单蒽核类蒽醌经反相液相色谱柱分离后, 用紫外或二极管阵列检测器进行检测, 用保留时间进行定性, 外标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外, 所用试剂均为分析纯。水采用GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 甲醇(CH_3OH , CAS 号: 67-56-1): 色谱纯。

5.2 1-苄基-3-甲基咪唑双(三氟甲烷磺酰)亚胺盐($[\text{BeMim}][\text{Tf}_2\text{N}]$, CAS 号: 433337-24-7), 纯度 $\geq 98\%$ 。

5.3 磷酸(H_3PO_4 , CAS 号: 7664-38-2), GR: $\rho = 1.84\text{g/mL}$ 。

5.4 氢氧化钠(NaOH , CAS 号: 1310-73-2)

5.5 甲醇溶液($\varphi = 50\%$): 用甲醇(5.1)和水按 1:1 的体积比混合。

5.6 $[\text{BeMim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ 溶液: $50\mu\text{L}[\text{BeMim}][\text{Tf}_2\text{N}]$ (5.2)溶解于 0.7 mL 甲醇, 现配现用。

5.7 磷酸溶液(1+10): 将 10mL 磷酸(5.3)加入 100mL 水中。

5.8 氢氧化钠溶液(2mol/L): 准确称取 80g 氢氧化钠(5.4), 用水溶解并定容至 1L。

5.9 标准物质: 大黄素(Emodin, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, CAS 号: 518-82-1), 纯度 $\geq 98\%$; 芦荟大黄素(Aloe-emodin, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, CAS 号: 481-72-1), 纯度 $\geq 98\%$; 大黄酸(Rhein, $\text{C}_{15}\text{H}_8\text{O}_6$, CAS 号: 478-43-3), 纯度 $\geq 98\%$; 大黄酚(Chrysophanol, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_4$, CAS 号: 481-74-3), 纯度 $\geq 98\%$ 。

5.10 标准储备液: 分别准确称取适量标准品, 用 50%甲醇(5.5)溶解稀释定容配制成大黄素、芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚浓度分别为 $280\mu\text{g/mL}$ 、 $250\mu\text{g/mL}$ 、 $320\mu\text{g/mL}$ 、 $320\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液。 -18°C 冷冻避光保存, 有效期 6 个月。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱仪：配紫外检测器或二极管阵列检测器；
- 6.2 分析天平：感量 0.1 g 和感量 0.000 1 g；
- 6.3 超声波清洗器；
- 6.4 涡旋混合器；
- 6.5 离心机：转速不低于 4000r/min；
- 6.6 微孔滤膜：0.22 μm ，有机相型；
- 6.7 微量注射器：50 μL ；
- 6.8 其它实验室常用器皿：如锥形尖底试管等。

7 测定步骤

7.1 试样制备

取植物性样品 200g，粉碎后使其全部可通过 3 号标准网筛，放入聚乙烯瓶或袋中，密封，并标明标记，于常温下保存。

7.2 前处理

7.2.1 称取试样 10g（精确至 0.1g）于适用容器中，加入 500mL 蒸馏水加热至微沸，保持微沸 1h，待提取液冷却后，加入磷酸溶液（5.7）或氢氧化钠溶液（5.8）调节提取液 pH 值至 4.0 ± 0.2 ，定容至 500mL。

7.2.2 准确量取 5.0mL 提取液（7.2.1）放入 10mL 锥型尖底试管中，用微量注射器（或移液枪）将 300 μL [BeMim][Tf2N]溶液（5.6）快速注入提取液中，涡旋震荡 3min，然后于 20 $^{\circ}\text{C}$ 下超声辅助提取 6min。超声结束后立即冰浴 10min，取出后在 3500r/min 离心 10min，弃去上层水相，取出底部的 IL 相（通常为 150 μL ），供测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，250 mm $\times$ 4.6 mm，5 μm ，或性能相当者。
- b) 柱温：35 $^{\circ}\text{C}$ 。
- c) 流动相：0.1%磷酸水+甲醇=（20 + 80，体积比），等梯度洗脱。
- d) 检测波长：260 nm。
- e) 进样量：10 μL 。
- f) 流速：1.0 mL/min。

7.3.2 液相色谱测定

7.3.2.1 标准曲线的制作

分别准确移取经超声、涡旋溶解的大黄素、芦荟大黄素、大黄酸和大黄酚各单一标准储备液于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（5.1）逐级稀释配制成大黄素浓度分别为 1.09 $\mu\text{g/mL}$ 、2.19 $\mu\text{g/mL}$ 、4.38 $\mu\text{g/mL}$ 、8.75 $\mu\text{g/mL}$ 、17.50 $\mu\text{g/mL}$ 、35.00 $\mu\text{g/mL}$ ，芦荟大黄素浓度分别为 0.98 $\mu\text{g/mL}$ 、1.95 $\mu\text{g/mL}$ 、3.90 $\mu\text{g/mL}$ 、7.81 $\mu\text{g/mL}$ 、15.63 $\mu\text{g/mL}$ 、31.35 $\mu\text{g/mL}$ ，大黄酸和大黄酚浓度分别为 1.25 $\mu\text{g/mL}$ 、2.50 $\mu\text{g/mL}$ 、5.00 $\mu\text{g/mL}$ 、10.00 $\mu\text{g/mL}$ 、20.00 $\mu\text{g/mL}$ 、40.00 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准系列工作溶液供高效液相色谱测定。依次由低到高浓度进样检测，重复测定三次。以待测物峰面积为纵坐标，相应的标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。计算回归方程和相关系数。

7.3.2.2 试样溶液的测定

待测样液中的响应值应在标准曲线线性范围内，超过线性范围的则应稀释后重新进样分析。标准溶液的高效液相色谱图见附录 A 中的图 A.1。

7.4 空白试验

不称取试样，按 7.2-7.3 的步骤做空白实验，确认不含有干扰待测组分的物质。

8 结果计算

试样中芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚或大黄素的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{c \times V_2}{m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X——试样中待测组分含量（mg/kg）；
 - c——根据标准曲线或单点校准得到的待测组分溶液浓度（ng/mL）；
 - V₁——提取液定容体积（[BeMim][Tf2N]的体积），300μL；
 - V₂——试样溶液定容体积，500mL；
 - m——试样称样量（g）。
- 注：计算结果应扣除空白值，计算结果保留三位有效数字。

9 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数平均值的 10%；

10 其他

本方法芦荟大黄素、大黄酸、大黄素和大黄酚在1μg/L、5μg/L、10μg/L、20μg/L、50 μg/L的5个水平添加浓度的范围内的线性范围、重现性、检测限及定量限等参数见表1。

表 1 方法线性范围、重现性、检出限、定量限

分析物	线性回归方程	R ²	RSD(%)	检测限(μg/L)	定量限(μg/L)	回收率(%)
芦荟大黄素	Y=79053X-50	0.9993	3.40	7	3.4	85.2
大黄酸	Y=117597X+14638	0.9996	2.87	6	2.5	82.1
大黄素	Y=156086X+7539	0.9998	3.36	8	2.8	92.7
大黄酚	Y=199727X-9453	0.9999	4.51	4	1.6	90.2

附录 A

(资料性)

高效液相色谱法测定单核蒽醌的典型色谱图

A.1 单核蒽醌标准物质色谱图，见图 A.1。

芦荟大黄素、大黄酸、大黄酚或大黄素
