

ICS 67.050
X 04

DB37

山 东 省 地 方 标 准

DB37/T 4010—2020

含阿胶的食品中阿胶含量的测定方法

Method for determination of Ejiao content in Ejiao-containing food

2020 - 07 - 09 发布

2020 - 08 - 09 实施

山东省市场监督管理局 发布

前 言

本标准按照GB/T 1.1—2009给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由青岛海关提出、归口并组织实施。

本标准起草单位：青岛海关技术中心、东阿阿胶股份有限公司、中国检验检疫科学研究院。

本标准主要起草人：张鸿伟、周祥山、张晓梅、段小波、张峰、郭尚伟、田守生、艾连峰、梁成珠、徐云鹏。

本标准系首次发布。

含阿胶的食品中阿胶含量的测定方法

1 范围

本标准规定了含阿胶的食品中阿胶含量的液相色谱-质谱/质谱测定方法。
本标准适用于阿胶块、阿胶糕、阿胶粉中阿胶含量的测定。

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 原理

试样中的阿胶经三氯乙酸分离提取，胰蛋白酶酶解，液相色谱-质谱/质谱仪测定，外标法定量。

4 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

4.1

阿胶

马科动物驴*Equus asinus* L. 的干燥皮或鲜皮经煎煮、浓缩制成的固体胶。
[中华人民共和国药典2015版一部，第189页]

5 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682中规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。

5.1.2 甲酸：色谱纯。

5.1.3 碳酸氢铵：优级纯。

5.1.4 三氯乙酸：分析纯。

5.1.5 丙酮：分析纯。

5.1.6 胰蛋白酶：序列分析纯。

5.2 溶液配制

- 5.2.1 1%碳酸氢氨溶液：称取碳酸氢铵（5.1.3）10.0 g，溶于水并稀释至1 000 mL。
- 5.2.2 30%三氯乙酸溶液：准确称取三氯乙酸（5.1.4）214.3 g，溶于水并稀释至500 mL。
- 5.2.3 1 mg/mL 胰蛋白酶溶液：称取1 mg 胰蛋白酶（5.1.6），用1%碳酸氢铵溶液1 mL 溶解混匀，现用现配。
- 5.2.4 0.1%甲酸-水溶液：取甲酸（5.1.2）1 mL，用水稀释至1 000 mL。
- 5.2.5 0.1%甲酸-乙腈溶液：取甲酸（5.1.2）1 mL，用乙腈（5.1.1）稀释至1 000 mL。

5.3 标准品

阿胶（对照药材）。

5.4 标准储备溶液的配制

准确称取阿胶对照药材（5.3）0.10 g，用1%碳酸氢铵溶液（5.2.1）超声处理溶解，再用1%碳酸氢铵溶液定容至稀释至50 mL，配制成浓度为2.0 mg/mL的阿胶标准储备溶液。-20℃以下避光保存，有效期3个月。

5.5 材料

滤膜：0.22 μm。

6 仪器和设备

- 6.1 液相色谱-质谱/质谱分析仪：配有电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 分析天平：感量为0.01 g和0.000 01 g。
- 6.3 高速粉碎机。
- 6.4 超声波仪。
- 6.5 离心机。
- 6.6 涡旋混合器。
- 6.7 电热恒温水槽。

7 试样制备与保存

7.1 试样的制备

取出代表性样品，固体样品冷冻后经粉碎机粉碎，用四分法缩分出不少于5.0 g试样，粉状样品均分成两份，每份不少于5.0 g，装入清洁容器内，加封后作出标记，一份作试样，一份作留样。

7.2 试样的保存

按照样品产品标签规定的贮藏条件保存，未标明贮藏条件的，常温避光保存。

8 试验步骤

8.1 试样溶解

8.1.1 阿胶块、阿胶粉

准确称取0.1 g（精确到0.01 g）试样，用水超声溶解，再用水定容至25 mL。

8.1.2 阿胶糕

准确称取5.0 g（精确至0.01 g）试样，准确加入50 mL水，超声溶解，补足重量。

8.2 提取

精密移取2 mL样品溶液，缓缓加入等体积的30%三氯乙酸溶液，充分振荡混匀，4℃静置20 min，7 000×g离心5 min，弃上清，用2 mL冰浴丙酮洗涤沉淀，7 000×g离心5 min后弃丙酮清液；再用2 mL冰浴丙酮重复洗涤一次，并挥干丙酮，加入1%碳酸氢铵溶液10 mL~20 mL超声至溶解，制得样品阿胶提取液。

8.3 酶解

样品阿胶提取液0.22 μm滤膜过滤，取400 μL滤液，加入40 μL胰蛋白酶溶液，混匀，37℃恒温酶解16 h，待测。

8.4 标准工作曲线制备

取标准储备溶液2 mL，按8.2制得阿胶提取液2 mL，过0.22 μm滤膜，分别取滤液50、100、200、300、400 μL，用1%碳酸氢铵溶液补足至400 μL，即得阿胶含量分别为0.25 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL、1.5 mg/mL、2.0 mg/mL标准工作溶液，分别加入40 μL胰蛋白酶溶液，混匀，37℃恒温酶解16 h，用于制备标准工作曲线。

8.5 测定

8.5.1 色谱条件

色谱参考条件：

- a) 色谱柱： C_{18} 色谱柱（50×2.1 mm，13 μm）或相当者；
- b) 流动相：A：0.1%甲酸-水 B：0.1%甲酸-乙腈；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 进样量：5 μL；
- e) 柱温：30℃；
- f) 流动相梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	A相 %	B相 %
0.0	95	5
1.0	95	5
4.5	70	30
5.5	70	30
5.6	5	95
6.6	5	95
6.7	95	5
8.0	95	5

8.5.2 质谱条件

质谱参考条件:

- a) 电离方式: 电喷雾离子源;
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 检测方式: 多反应离子监测 (MRM);
- d) 喷雾电压、离子源温度等参数应优化至最优灵敏度;
- e) 脱溶剂气、碰撞气均为高纯氮气或其他合适气体;
- f) 监测离子对参数情况见表 2, 多反应监测 (MRM) 色谱图参见附录 A。

表 2 监测离子对参数

离子对	质荷比 m/z	透镜电压 V	碰撞能量 eV
定性离子对	591.8/556.3	128	22
定量离子对	591.8/910.5	128	22

8.5.3 定性测定

在同样测试条件下, 试样溶液中阿胶特征肽的保留时间与标准工作液中的保留时间偏差在±2.5%以内, 且离子对丰度比与浓度接近的标准溶液离子对相对丰度比偏差符合表3要求。

表 3 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

相对离子丰度 (%)	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大偏差 (%)	±20	±25	±30	±50

8.5.4 定量测定

以阿胶标准工作溶液浓度为横坐标, 以定量离子对的峰面积为纵坐标, 绘制标准工作曲线, 按外标法计算试样中阿胶的含量, 在上述色谱-质谱条件下, 阿胶标准工作溶液特征离子质量色谱图见附录。

8.6 空白试验

除不加试样外, 采用完全相同的测定步骤进行测定。

9 结果计算和表述

试样中阿胶的含量按式 (1) 计算:

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

式中:

X —— 试样中阿胶的含量, 单位为克每百克 (g/100g);

C —— 从标准曲线得到的试样测定液中阿胶的浓度, 单位为毫克每毫升 (mg/mL);

V —— 样品溶液的体积, 单位为毫升 (mL);

K —— 稀释倍数;

m ——称取试样的质量，单位为克（g）。

10 检测方法的定量限、回收率和精密度

10.1 定量限

本方法的定量限为0.02 mg/mL。

10.2 回收率

本方法在0.2 mg/mL~0.6 mg/mL添加阿胶浓度水平的回收率为95.0%~107.9%。

10.3 精密度

本方法批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对标准偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A
(资料性附录)
标准工作溶液的多反应监测 (MRM) 色谱图

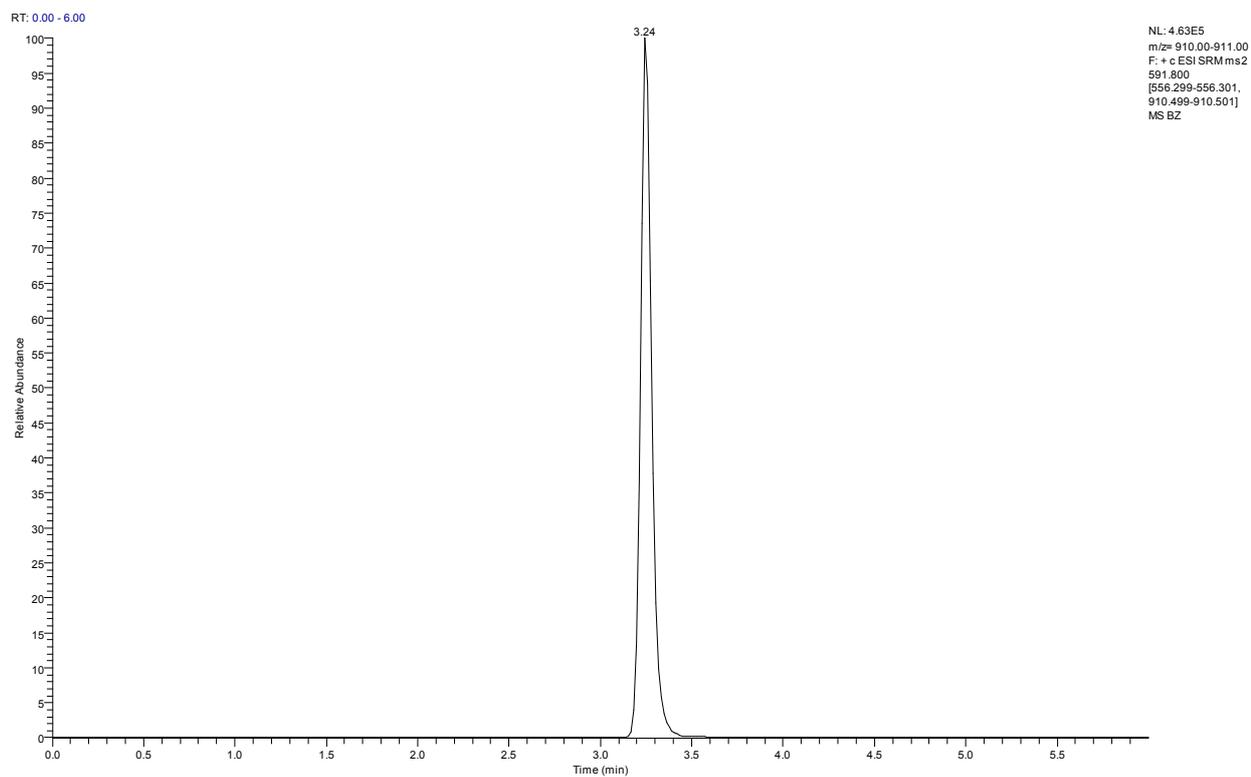


图 A.1 阿胶标准工作溶液的多反应监测特征离子 (591.8/910.5) 质量色谱图 (1.0 mg/mL)