

团 体 标 准

T/GDFCA 083—2024
代替T/GDFCA 083—2022

食品中吡咯里西啶类生物碱含量的测定 高 效液相色谱/串联质谱法

Determination of pyrrolizidine alkaloids content in foods by Liquid chromatography -
tandem mass spectrometry

(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。

2024 - 12 - XX 发布

2024 - 12 - 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	1
7 试样的制备	2
8 分析步骤	2
9 结果计算	5
10 灵敏度、准确度和精密度	5
附录 A (资料性) 22 种 PAAs 的名称及简称、CAS 号、结构式、分子式及相对分子量	6
附录 B (资料性) 22 种 PAAs 标准溶液 (20 µg/L) 多反应监测 (MRM) 色谱图	8

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。

本文件代替T/GDFCA 083—2022《食品中吡咯里西啶类生物碱含量的测定 高效液相色谱/串联质谱法》，与T/GDFCA 083—2022相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

a) “术语和定义”3.1中，删除了“一类天然的植物毒素，主要分布于菊科、豆科和紫草科等植物中。吡咯里西啶类生物碱本身不具有毒性，主要是其二级代谢产物代谢性吡咯对人体肝脏有毒害作用。”。

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专利的责任。

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：无限极（中国）有限公司，上海理工大学，广州华生检测技术服务有限公司，国家食品安全风险评估中心，江南大学，上海应用技术大学，华南理工大学，华南农业大学，华南协同创新研究院，通标标准技术服务有限公司，华测检测认证集团股份有限公司，佛山市沃特测试技术服务有限公司，广州金至检测技术有限公司，必维科技服务（西安）有限公司，欧陆分析测试技术服务（广州）有限公司，广东省科学院生物与医学工程研究所，花王酒业有限公司，南京中科药业有限公司，中国矿业大学，南通市中医院，广东省好杰宏生物医药科技有限公司，广东省食品流通协会。

本文件主要起草人：陆智，艾连中，权毓舒，李亚杰，武俊超，苏杰雄，周勇，罗珍，邓建军，孔秀莲，程琳琳，陈晓丹，寇秀颖，谭丽容，庞无瑕，黄良江，夏永军，梁春来，夏小乐，龙梦飞，田怀香，于海燕，唐语谦，汤钜源，杜冰，黎攀，杨继国，张欣，黄铨达，潘敏尧，杨潞芳，黄康惠，刘瑾玲，胡晓坤，罗诗泳，杨钰莹，黄玲珠，刘亚平，陈康康，何幼娟，梅璐，陈连梅，高裕锋，李家威，甄振鹏，黄敏兴，梁城伟，刘铭宇，杜卫群，刘建锋，李金燕，冯鹏，周亚杰，张一凡，朱可，曹刚，朱宏，刘宏健，文钰，刘丽梅，王涛，冯德悦，李志鹏，何蔚韬，李超宇，张国鸿，李延川，陈清平，叶映朵。

食品中吡咯里西啶类生物碱含量的测定 高效液相色谱/串联质谱法

1 范围

本文件描述了用高效液相色谱/串联质谱测定食品中22种吡咯里西啶类生物碱(PAs)含量的方法,包括方法的原理、试剂和材料、仪器和设备、试样的制备、分析步骤、结果计算、灵敏度、准确度和精密密度等要求。

本文件适用于食品中吡咯里西啶类生物碱(PAs)的测定,植物性中药材可参照执行。

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 分析实验室用水规则和试验方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

吡咯里西啶类生物碱 pyrrolizidine alkaloids, PAs

植物次代谢产物,二级代谢产物代谢性吡咯对人体肝脏有毒害作用,主要分布于菊科、豆科和紫草科等植物中。

4 原理

试样经提取液超声提取,离心后取部分提取液过固相萃取柱净化、氮吹浓缩、复溶,经微孔滤膜过滤,用高效液相色谱串联质谱仪测定,保留时间和特征离子对定性,外标法定量。

5 试剂和材料

除非另有规定,所用试剂均为分析纯,水为GB/T 6682规定的一级水。

- 5.1 甲醇(CH₃OH, CAS号: 67-56-1): 色谱纯。
- 5.2 10%甲醇水溶液: 取10 mL 甲醇(5.1),用水定容至100 mL。
- 5.3 95%甲醇水溶液: 95 mL 甲醇(5.1),5 mL 水,混匀备用。
- 5.4 氨水(NH₄OH, CAS号: 1336-21-6): 优级纯。
- 5.5 5%氨水甲醇溶液: 准确吸取5 mL 氨水(5.3),用甲醇(5.1),定容到100 mL。
- 5.6 甲酸(HCOOH, CAS号: 64-18-6): 色谱纯。
- 5.7 0.1%甲酸水溶液: 准确吸取0.5 mL 甲酸(5.6),用水定容至500 mL。
- 5.8 0.1%甲酸甲醇溶液: 准确吸取0.5 mL 甲酸(5.6),用甲醇(5.1)定容至500 mL。
- 5.9 PAs标准品: 22种PAs的中文名称、英文名称及简称、CAS号、结构式、分子式及相对分子量参见附录A的表A.1,均为有证标准物质,纯度≥95%。
- 5.10 0.1 mg/mL标准储备液: 准确称取每种PA标准物质10 mg(精确至0.1 mg),用甲醇(5.1)溶解配制成质量浓度为0.1 mg/mL的标准储备液,于-20℃密封保存,有效期3个月。
- 5.11 混合标准溶液: 分别准确吸取每种标准储备液(5.11)各1.00 mL于100 mL容量瓶中,用甲醇(5.1)稀释至刻度,配制成质量浓度为1.00 μg/mL混合标准溶液,现配现用。
- 5.12 微孔滤膜: 0.22 μm,有机相。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱-串联质谱仪，配电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 分析天平：感量为 0.000 1 g 和 0.01 g。
- 6.3 低温高速离心机：转速不低于 6 000 r/min。
- 6.4 超声波清洗器。
- 6.5 氮气吹干仪。
- 6.6 固相萃取装置。
- 6.7 混合型阳离子交换固相萃取柱（Oasis MCX 或同等柱效的萃取柱，6 mL/500 mg）。

7 试样的制备

7.1 固态试样

将植物性固体试样用四分法缩至 50 g~100 g，经粉碎机粉碎，全部通过 60 目标准筛，混匀，装入洁净容器，密封，并标明标记，于常温储存备用。

7.2 半固态试样或液态试样

将其充分搅拌均匀，分出 50 g~100 g 作为试样。制备好的试样装入洁净容器，密封，并标明标记，于常温储存备用。

8 分析步骤

8.1 样品提取

称取 2 g（精确至 0.01 g）试样于 250 mL 锥形瓶，加入 95% 甲醇水溶液 40 mL，在室温下超声提取 20 min，以 6 000 r/min 离心 10 min，移取上清液至 250 mL 烧杯，40 °C 水浴挥发至约 5 mL，为待净化液。

8.2 样品净化

8.2.1 活化：依次用 5 mL 甲醇（5.1）和 5 mL 超纯水（5.9）活化固相萃取柱，保证固相萃取柱柱头浸润。

8.2.2 淋洗：将待净化液（8.1）上样，依次用 5 mL 超纯水（5.9）和 5 mL 甲醇（5.1）淋洗两次，弃去淋洗液。

8.2.3 洗脱：用 4 mL 5% 氨水甲醇溶液（5.5），洗脱富集后的固相萃取柱，并用接收管接收洗脱液。

8.2.4 浓缩：将上述洗脱液在 40 °C 条件下氮吹浓缩至少于 0.5 mL，为待复溶样品。

8.3 样品复溶

待复溶样品用 10% 甲醇水溶液（5.2）溶解准确定容至 1.0 mL，过 0.22 μm 滤膜，待测定。

8.4 基质匹配标准曲线绘制

取空白试样，按上述方法处理制得其空白基质溶液，准确量取混合标准溶液适量，用空白基质溶液稀释成浓度为 0.1 μg/L、0.5 μg/L、1.0 μg/L、5.0 μg/L、10.0 μg/L 和 20.0 μg/L 的基质匹配混合标准工作溶液，临用现配。供液相色谱-串联质谱仪测定。以上述溶液中各 PA 的浓度为横坐标，相应的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。

8.5 仪器参考条件

8.5.1 液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：BEH C₁₈（2.1 mm×100 mm, 1.7 μm），或性能相当者；
- b) 流速：0.3 mL/min；
- c) 柱温：40 °C；
- d) 进样量：10 μL；
- e) 流动相及梯度洗脱程序见表 1。

表 1 流动相梯度洗脱程序

时间/min	A: 0.1%甲酸水溶液/%	B: 0.1%甲酸甲醇溶液/%
0.0	95	5
1.0	95	5
3.0	65.5	34.5
4.0	58.9	41.1
6.0	0	100
7.5	95	5
8.5	95	5

8.5.2 质谱参考条件如下:

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI);
- b) 扫描模式: 正离子扫描;
- c) 监测方式: 多反应监测 (MRM);
- d) 毛细管电压: +3 500 V;
- e) 源温度: 350 °C;
- f) 碰撞气: 氦气 0.15 mL/min;
- g) 雾化气压力: 40 psi;
- h) 锥孔气流速: 150 L/h;
- i) 质谱优化条件参数见表 2。

表 2 PA 的 UPLC-MS/MS 优化参数

化合物 (简称)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压/eV	碰撞能量/eV	保留时间 _{tr} /min
Em	398.2	220.3 ^a	140	17	4.986
		120.3		25	
Er	350.2	120.3 ^a	160	32	3.099
		138.1		32	
Eu	330.1	138.1 ^a	130	25	3.524
		156.2		36	
Hn	314.2	138.3 ^a	130	22	4.220
		156.3		32	
Im	300.1	138.3 ^a	130	20	3.535
		156.3		33	
Jb	352.1	120.1 ^a	150	35	3.459
		155.2		33	
LaN	316.1	138.1 ^a	160	32	3.886
		111.2		48	
Mc	326.2	120.0 ^a	150	41	2.786
		237.3		27	
ScN ^b	352.2	118.1 ^a	220	27	4.567
		136.3		32	
Sv ^c	336.2	120.1 ^a	160	34	4.508
		138.1		34	
SpN	350.2	118.2 ^a	240	36	4.260
		136.3		36	
EmN	414.2	254.1 ^a	160	35	4.951
		352.1		27	

表2 PA的UPLC-MS/MS优化参数 (续)

化合物 (简称)	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压/eV	碰撞能量/eV	保留时间 _{tr} /min
EuN	346.1	172.1 ^a	150	36	3.698
		111.2		53	
HnN	330.2	172.1 ^a	170	30	4.394
		138.2		30	
McN	342.1	137.4 ^a	160	34	3.399
		118.3		54	
JbN	368.1	296.1 ^a	250	28	3.624
		120.1		41	
ReN	368.2	118.2 ^a	170	35	4.037
		136.2		40	
Sk	366.2	168.2 ^a	160	34	5.137
		150.3		29	
SvN ^b	352.1	118.1 ^a	250	40	4.567
		120.1		41	
Sp	334.2	120.3 ^a	150	30	4.139
		138.4		30	
Re	352.2	138.3 ^a	160	34	3.968
		120.3		34	
Sc ^c	336.2	138.2 ^a	160	32	4.508
		120.2		33	

^a 定量离子。
^b ScN 和 SvN 是同分异构体, 定量时以异构体之和计算。
^c Sv 和 Sc 是同分异构体, 定量时以异构体之和计算。

8.6 高效液相色谱-串联质谱测定

8.6.1 定性测定

将基质匹配混合标准工作溶液和试样溶液注入高效液相色谱-串联质谱仪中, 记录基质匹配混合标准工作溶液和试样溶液中各化合物的保留时间, 在相同条件下, 如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准工作溶液中的某组分峰的保留时间一致 (变化范围在 $\pm 2.5\%$), 并且所选择的两对子离子的质荷比一致, 样品溶液中的定性离子相对丰度与浓度相当标准工作溶液中定性离子的相对丰度进行比较时, 相对偏差不得超过表3规定的范围, 则可判断样品中存在相应的被测物。

表3 定性确定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 %	$\leq 10\%$
允许的相对偏差	$\pm 20\%$	$\pm 25\%$	$\pm 30\%$	$\pm 50\%$

8.6.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下, 将基质匹配混合标准工作溶液和试样溶液注入高效液相色谱-串联质谱仪中, 拟合标准工作曲线, 外标法定量计算试样溶液中各待测组分浓度。试样溶液中各待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内, 超过线性范围则应稀释后 (或减少试样称样量) 再进样测定。22种PAs基质加标标准溶液的多反应检测 (MRM) 色谱图参见附录B。

8.6.3 空白试验

取空白试样, 采用完全相同的测定步骤进行测定。

9 结果计算

试样中每种PA含量按式（1）计算，计算结果应扣除空白值：

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

式中：

X ——试样中待测组分含量，单位为微克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

c ——根据标准曲线或单点校准得到的待测组分溶液浓度，单位为微克每升（ $\mu\text{g}/\text{L}$ ）；

V ——试样溶液定容体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样称样量，单位为克（ g ）。

计算结果保留三位有效数字。

10 灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

22种PAs在食品中的方法检出限均为0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法22种PAs在0.25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 、12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的范围内，其回收率要求70%~120%。

10.3 精密度

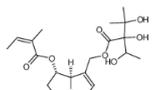
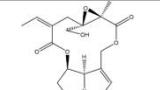
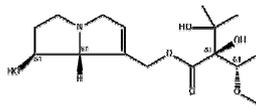
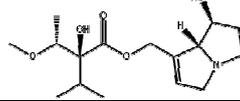
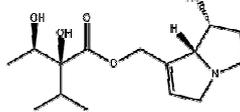
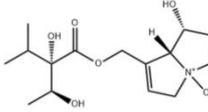
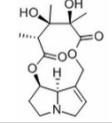
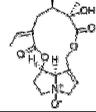
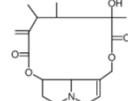
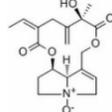
本方法在重复性下获得的两次独立测试结果的相对标准偏差不超过20%。

附录 A
(资料性)

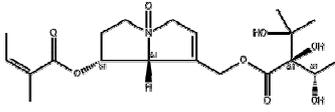
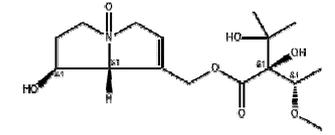
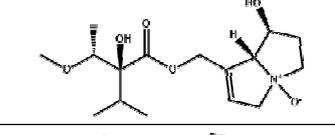
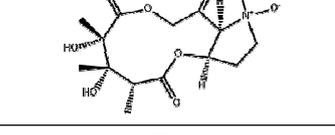
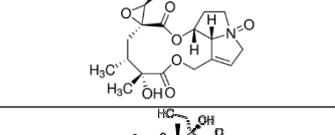
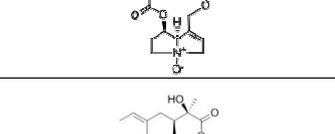
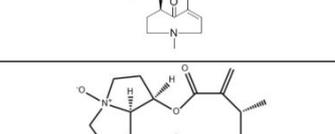
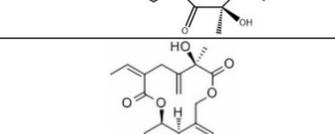
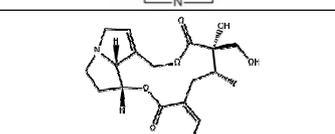
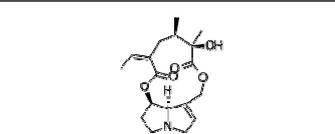
22 种 PAs 的名称及简称、CAS 号、结构式、分子式及相对分子量

22种PAs的中文名称、英文名称及简称、CAS号、结构式、分子式及相对分子量参见表A.1

表 A.1 22 种 PAs 的名称、简称、CAS 号、结构式、分子式及相对分子量

序号	名称	简称	CAS号	结构式	分子式/相对分子量
1	兰薊定; (+)-echimidine	Em	520-63-3		C ₂₀ H ₃₁ NO ₇ 397.46
2	芝麻菜叶千里光碱; erucifoline	Er	40158-95-0		C ₁₈ H ₂₃ NO ₆ 349.38
3	盐酸欧乃仁; europine hydrochloride	Eu	570-19-4		C ₁₆ H ₂₇ NO ₆ ·HCl 365.86
4	天芥菜碱; heliotrine	Hn	303-33-3		C ₁₆ H ₂₇ NO ₅ 313.39
5	促黑激素; intermedine	Im	10285-06-0		C ₁₅ H ₂₅ NO ₅ 299.36
6	千里光碱; jacobine	Jb	6870-67-3		C ₁₈ H ₂₅ NO ₆ 351.39
7	环磷酸胺N-氧化物, (+)-石松胺N-氧化物; (+)-lycopsamine N-oxide	LaN	95462-15-0		C ₁₅ H ₂₅ NO ₆ 315.36
8	野百合碱; monocrotaline	Mc	315-22-0		C ₁₆ H ₂₃ NO ₆ 325.36
9	千里光宁氧化物; senecionine N-oxide	ScN	13268-67-2		C ₁₈ H ₂₅ NO ₆ 351.39
10	春千里光里碱; senecivernine	Sv	72755-25-0		C ₁₈ H ₂₅ NO ₅ 335.39
11	千里光非林N-氧化物; seneciphylline N-oxide	SpN	38710-26-8		C ₁₈ H ₂₃ NO ₆ 349.38

表A.1 22种PAs的名称、简称、CAS号、结构式、分子式及相对分子量（续）

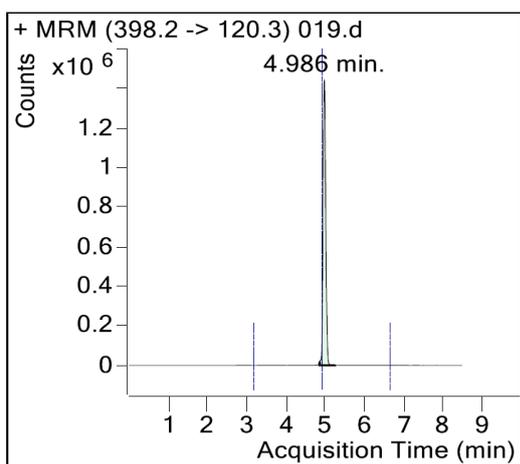
序号	名称	简称	CAS号	结构式	分子式/相对分子量
12	兰薊定N-氧化物; (+)-echimidine N-oxide	EmN	41093-89-4		C ₂₀ H ₃₁ NO ₈ 413.46
13	欧天芥菜碱N-氧化物; europine N-oxide	EuN	65582-53-8		C ₁₆ H ₂₇ NO ₇ 345.39
14	天芥菜碱N-氧化物; heliotrine N-oxide	HnN	6209-65-0		C ₁₆ H ₂₇ NO ₆ 329.39
15	野百合碱N-氧化物; monocrotaline N-oxide	McN	35337-98-5		C ₁₆ H ₂₃ NO ₇ 341.36
16	千里光碱N-氧化物; jacobine N-oxide	JbN	38710-25-7		C ₁₈ H ₂₅ NO ₇ 367.39
17	倒千里光碱N-氧化物; retrorsine N-oxide	ReN	15503-86-3		C ₁₈ H ₂₅ NO ₇ 367.39
18	克氏千里光碱; senkirkine	Sk	2318-18-5		C ₁₉ H ₂₇ NO ₆ 365.42
19	春千里光碱N-氧化物; senecivernine N-Oxide	SvN	101687-28-9		C ₁₈ H ₂₅ NO ₆ 351.39
20	千里光非灵; seneciphylline	Sp	480-81-9		C ₁₈ H ₂₃ NO ₅ 333.38
21	倒千里光碱; retrorsine	Re	480-54-6		C ₁₈ H ₂₅ NO ₆ 351.39
22	千里光宁; senecionine	Sc	130-01-8		C ₁₈ H ₂₅ NO ₅ 335.39

附录 B

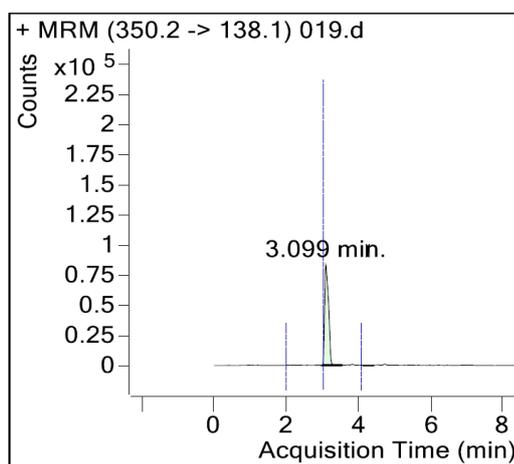
(资料性)

22种 PAs 标准溶液 (20 μg/L) 多反应监测 (MRM) 色谱图

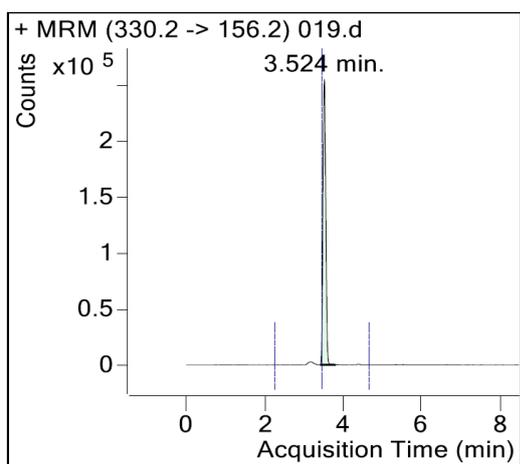
22种 PAs 标准溶液多反应监测 (MRM) 色谱图见图 B. 1。



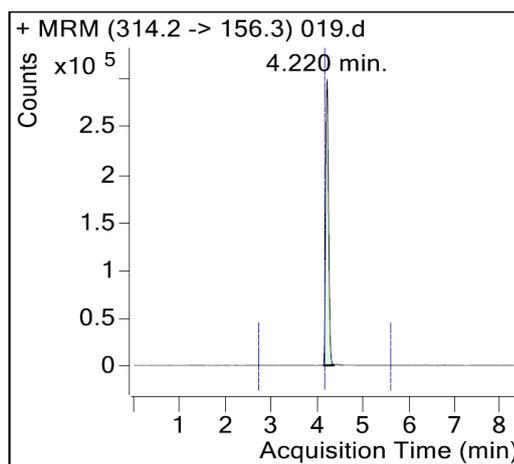
兰薊定 (+)-echinidine (Em)



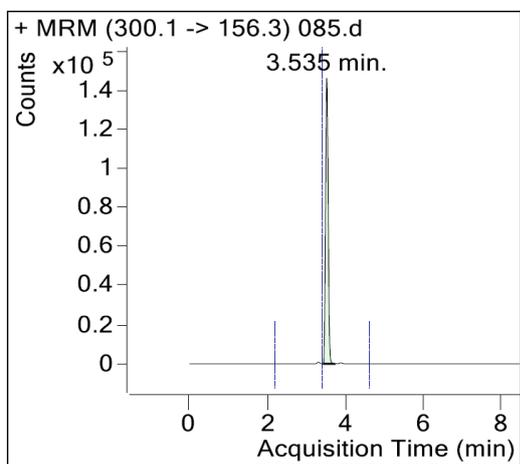
芝麻菜叶千里光碱 erucifoline (Er)



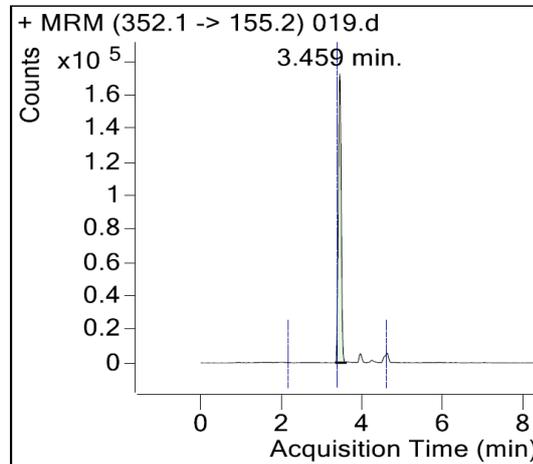
盐酸欧乃仁 europine hydrochloride (Eu)



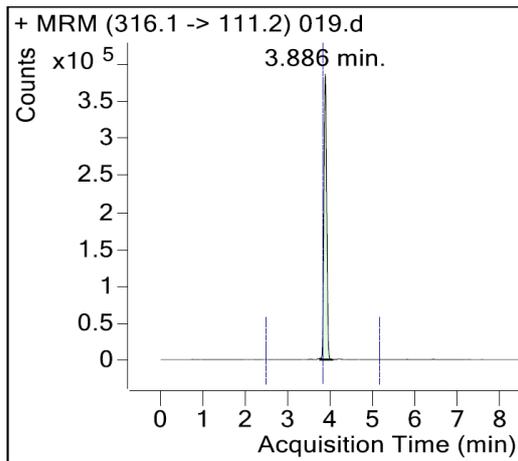
天芥菜碱 heliotrine (Hn)



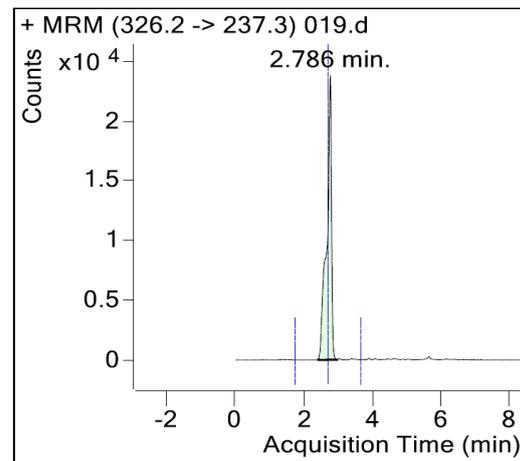
促黑激素 intermedine (Im)



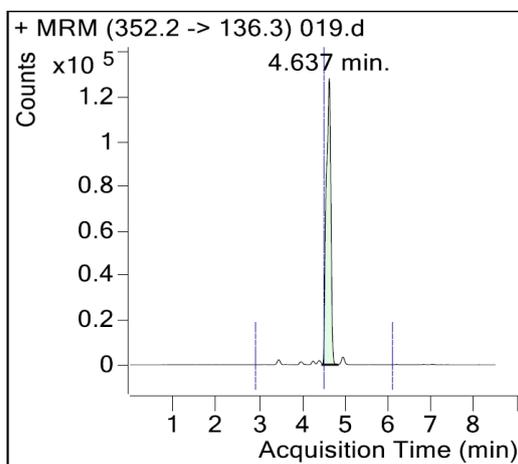
千里光碱 jacobine (Jb)



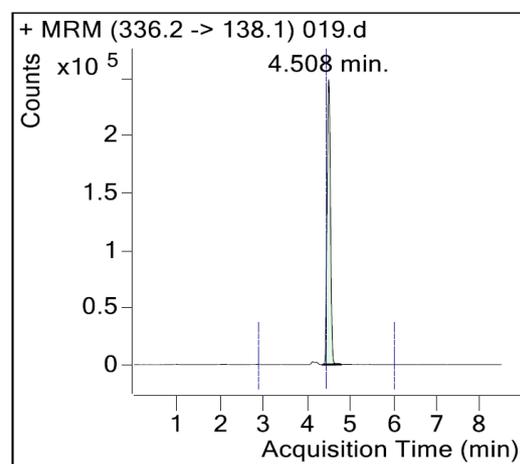
(+)-石松胺N-氧化物 (+)-lycopsamine N-oxide (LaN)



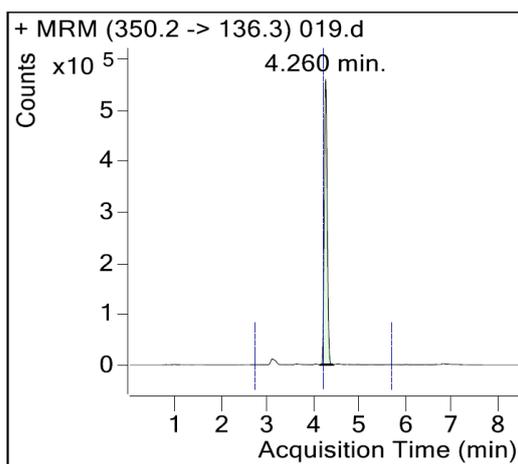
MC野百合碱 monocrotaline (Mc)



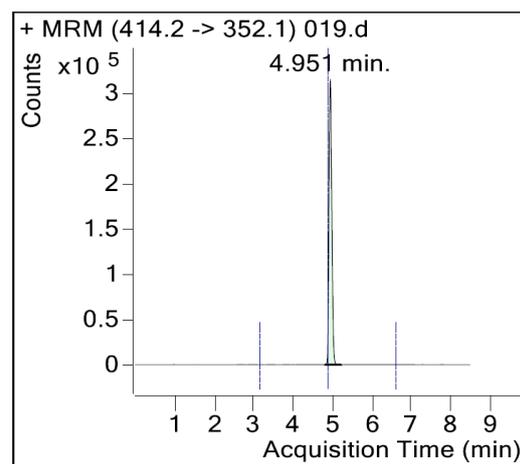
千里光宁氧化物 senecionine N-oxide (ScN)



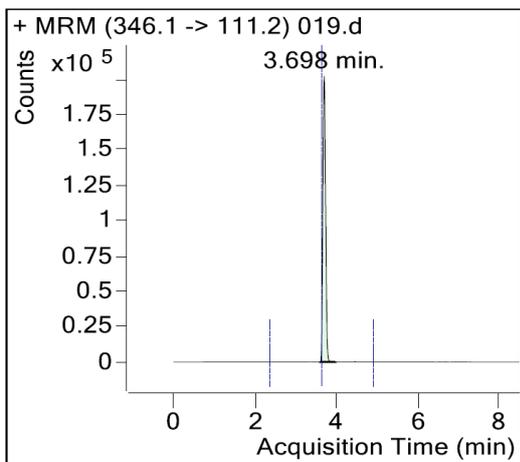
春千里碱 senecivernine (Sv)



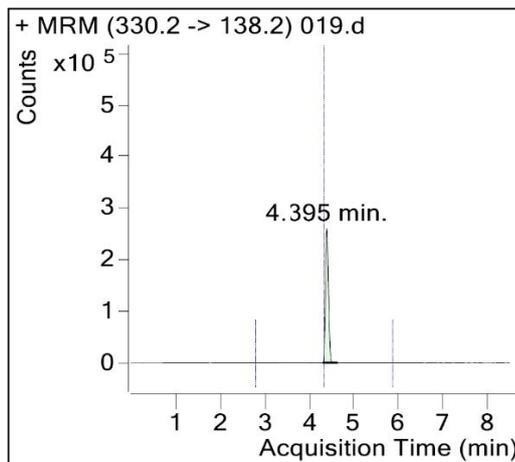
千里光非林 N-氧化物 Seneciphylline N-oxide (SpN)



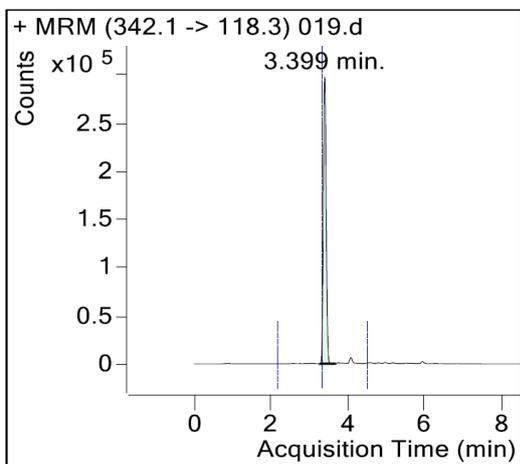
兰薊定N-氧化物 (+)-Echimidine N-Oxide (EmN)



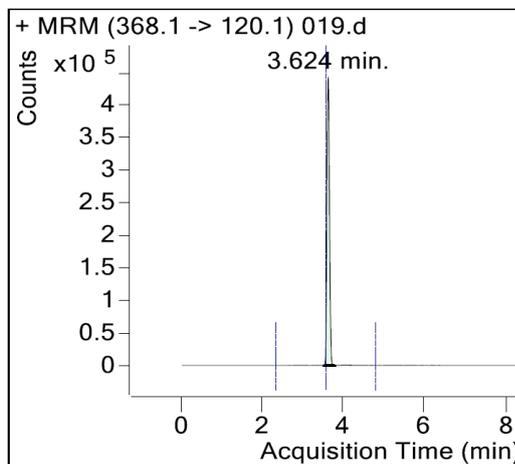
欧天芥菜碱N-氧化物 Europine N-oxide (EuN)



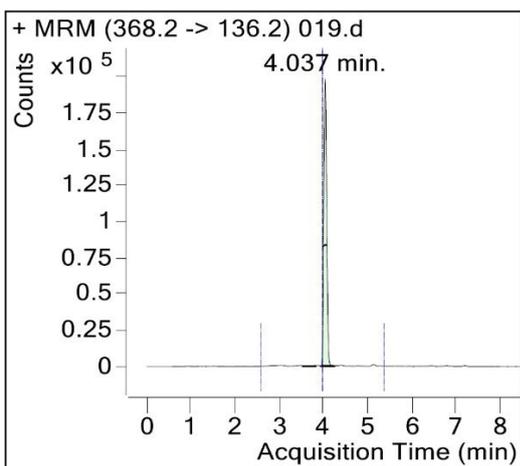
天芥菜碱N-氧化物 Heliotrine N-Oxide (HnN)



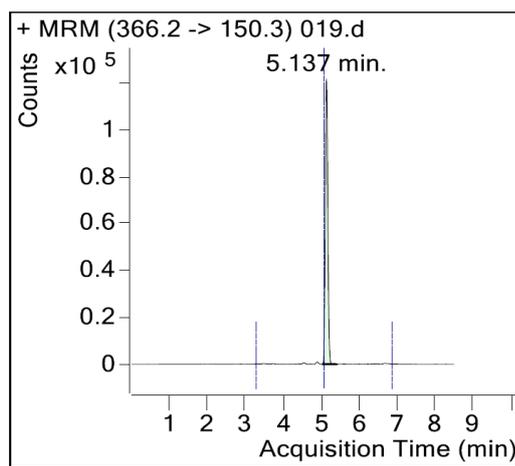
野百合碱N-氧化物 monocrotaline N-Oxide (McN)



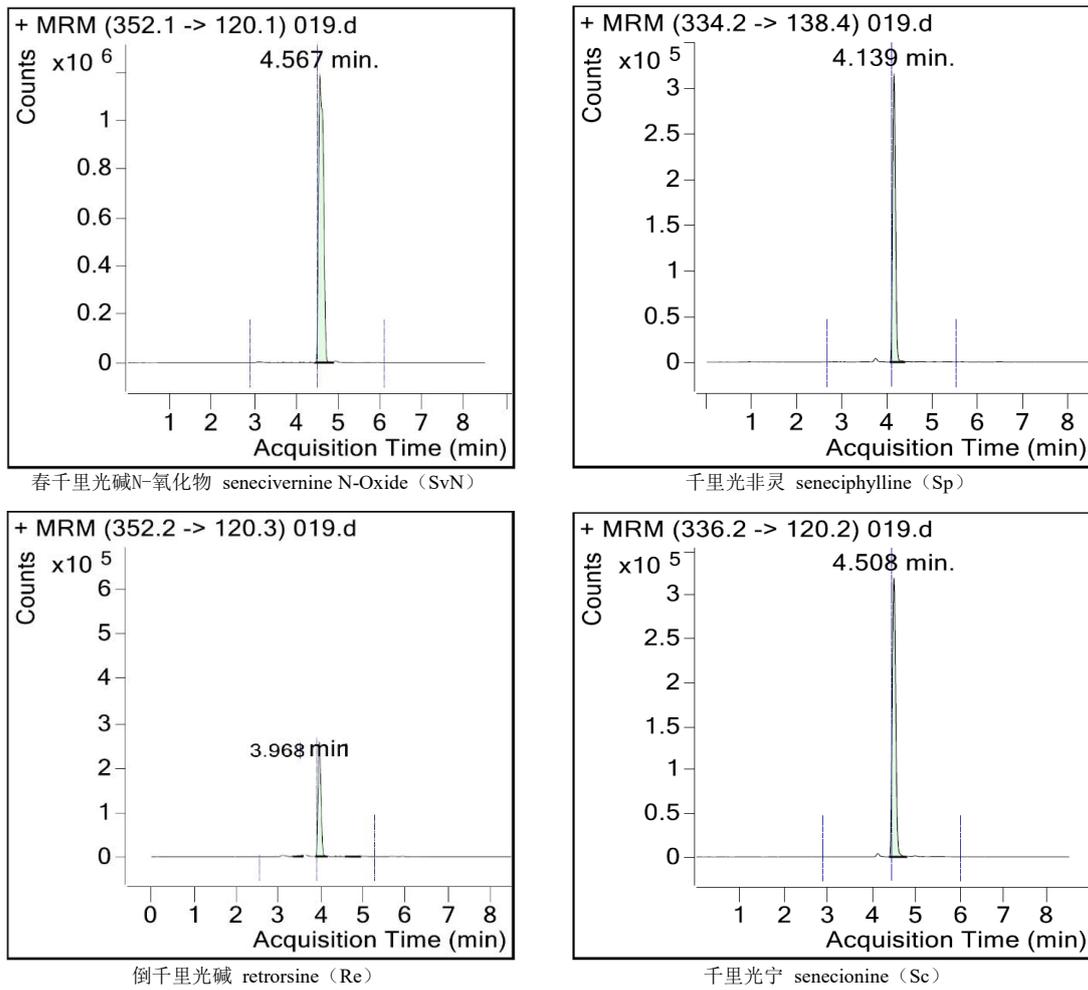
千里光碱N-氧化物 jacobine N-oxide (JbN)



倒千里光碱N-氧化物 retrorsine N-oxide (ReN)



克氏千里光碱 senkirine (Sk)

图 B.1 22 种 PAs 标准溶液 (20 $\mu\text{g/L}$) 多反应监测 (MRM) 色谱图