

T/GDFCA

广东省食品流通协会团体标准

T/GDFCA 083—XXXX

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 in food by Liquid chromatography - tandem
mass spectrometry

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2022-6-3）

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 试样的制备 2

8 分析步骤 2

9 结果计算（请无限极确认） 4

10 灵敏度、准确度和精密度 5

附 录 A （资料性） 22 种生物碱的名称及简称、CAS 号、结构式、分子式及相对分子量 6

附 录 B （资料性） 基质加标标准溶液（10μg/kg 上机浓度）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。

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：

本文件主要起草人：

本文件为首次发布。

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含量的方法，包括方法的原理、试剂、仪器和设备、试样制备、分析步骤、结果计算、精密度等要求。

本文件适用于植物性食品中吡咯里西啶类生物碱的测定，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

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。

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，色谱纯

5.2 10%甲醇水溶液：10mL 甲醇（5.1），90mL 水，混匀备用。

5.3 氨水，优级纯

5.4 5%氨水甲醇溶液：准确吸取 5mL 氨水（5.3）用甲醇（5.1）定容到 100mL。

5.5 甲酸，色谱纯

5.6 0.1%甲酸水溶液：准确吸取 0.5mL 甲酸（5.5）加入至 500mL 甲醇中。

5.7 0.1%甲酸甲醇溶液：准确吸取 0.5mL 甲酸（5.5）加入至 500mL 甲醇中。

5.8 超纯水（电阻率 $\geq 18.2 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$ ）

5.9 生物碱标准品：22 种生物碱中文名称、英文名称及其简称、结构式、分子式、相对分子质量参见附录 A 的表 A.1，均为有证标准物质，纯度 $\geq 95\%$ 。

5.10 0.1mg/mL 生物碱储备液：精密称取每种 PA 标准物质 10mg，用甲醇溶解配制成质量浓度为 0.1mg/mL 的标准品储备液，于 -20°C 密封保存，有效期 6 个月。（所有试剂溶液有效期请无限极确认）

5.11 混合标准溶液：分别准确吸取每种标准储备液（5.10）各 1.00mL 于 100mL 容量瓶中，用甲醇稀释至刻度，配制成质量浓度为 1.00 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准品溶液，于 4°C 避光保存，有效期 1 个月。

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，带电喷雾离子源（ESI）；
- 6.2 电子天平：感量为 0.000 1g 和 0.01g；
- 6.3 低温高速离心机：转速不低于 5000 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

7.1.1 固态试样

将植物性固体试样用四分法缩至 50g~100g，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。

7.1.2 半固态试样或液态试样

将其充分搅拌均匀，分出 50g~100g 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 2.00 g（精确至 0.01g）试样于 250 mL 锥形瓶，加入 95% 甲醇水溶液 40mL，在室温下超声提取 20 min，以 6000 r/min 离心 10 min，移取上清液至 250 mL 烧杯，40 °C 水浴挥发至 5 mL，为待净化液。

8.2 样品净化

- 8.2.1 活化：依次用 5 mL 甲醇和 5 mL 超纯水活化固相萃取柱，保证固相萃取柱柱头浸润。
- 8.2.2 淋洗：准确量取 1.00mL 待净化液（8.1）上样，依次用 5 mL 超纯水和 5 mL 甲醇淋洗两次，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 条件下氮吹浓缩至低于 0.5mL 近干，为待复溶样品。

8.3 样品复溶

待复溶样品用 10% 甲醇水溶液（5.3）溶解准确定容至 1.0mL，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。以上述溶液中各生物碱的浓度为横坐标，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 色谱参数

- 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 质谱条件

- 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：+3500 V；
e) 源温度：350 $^{\circ}\text{C}$ ；
f) 碰撞气：氦气 0.15 mL/min；
g) 雾化气压力：？；（请无限极确认）
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）	锥孔电压/eV	碰撞能量/eV	保留时间 t_R /min
Em	398.2	220.3 ^a 120.3	22	16	4.26
Er	350.2	120.3 ^a 138.1	78	24	2.47
Eu	330.1	138.1 ^a 156.2	36	26	2.60
Hn	314.2	138.3 ^a 156.3	48	18	3.48
Im	300.1	138.3 ^a 156.3	74	20	2.61
Jb	352.1	120.1 ^a 155.2	52	30	2.96
LaN	316.1	138.1 ^a 111.2	74	26	2.93
Mc	326.2	120.0 ^a 237.3	68	36	2.10
ScN	352.2	118.1 ^a 136.3	41	35	4.24
Sv	336.2	120.1 ^a 138.1	28	32	4.12
SpN	350.2	118.2 ^a 136.3	56	26	3.75
EmN	414.2	254.1 ^a 352.1	72	30	4.25

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）	锥孔电压/eV	碰撞能量/eV	保留时间t _R /min
EuN	346.1	172.1 ^a 111.2	76	28	2.71
HnN	330.2	172.1 ^a 138.2	38	28	3.61
McN	342.1	137.4 ^a 118.3	36	30	2.49
JbN	368.1	296.1 ^a 120.1	76	22	3.12
ReN	368.2	118.2 ^a 136.2	41	32	3.38
Sk	366.2	168.2 ^a 150.3	44	30	4.28
SvN	352.1	118.1 ^a 120.1	41	32	4.22
Sp	334.2	120.3 ^a 138.4	44	28	3.59
Re	352.2	138.3 ^a 120.3	48	26	3.31
Sc	336.2	138.2 ^a 120.2	74	30	4.10
^a 定量离子					

8.5.3 高效液相色谱-串联质谱测定

8.5.3.1 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±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%	≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

8.5.3.2 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，用标准曲线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种生物碱基质加标标准溶液的多反应检测（MRM）色谱图参见附录B。

8.5.3.3 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

试样中每种生物碱含量按式（1）计算：

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

式中：
 X ——试样中待测组分含量（ $\mu\text{g/kg}$ ）；
 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 ）；
 V ——试样溶液定容体积（ mL ）；
 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。

10 灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

22 种生物碱在植物性食品中的方法检出限均为 $0.1 \mu\text{g/kg}$ ，定量限为 $0.3 \mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

本方法22种生物碱在 $0.1 \mu\text{g/L}$ 、 $1.0 \mu\text{g/L}$ 、 $5.0 \mu\text{g/L}$ 添加浓度的范围内，其回收率范围为 $80\% - 110\%$ ，相应浓度基质加标标准工作曲线的相关系数见表4。

表 4 PAs 的线性关系

化合物	线性范围	回归方程	R^2
EmN	0.1~20 ng/mL	$y=30509x-6126.6$	$R^2=0.9979$
Em	0.1~20 ng/mL	$y=7544.4x-2085$	$R^2=0.9979$
ReN	0.1~20 ng/mL	$y=3861.7x-427.27$	$R^2=0.9998$
JbN	0.1~20 ng/mL	$y=27324x-1584.7$	$R^2=0.9995$
Sk	0.1~20 ng/mL	$y=31095x-696.6$	$R^2=0.9998$
SvN	0.1~20 ng/mL	$y=17213x-2759.4$	$R^2=0.9994$
Re	0.1~20 ng/mL	$y=9242.5x-1445.8$	$R^2=0.9978$
Jb	0.1~20 ng/mL	$y=19819x-3998.1$	$R^2=0.9986$
ScN	0.1~20 ng/mL	$y=16661x+787.06$	$R^2=0.9955$
SpN	0.1~20 ng/mL	$y=10012x-1473.3$	$R^2=0.9995$
Er	0.1~20 ng/mL	$y=20972x-3745.9$	$R^2=0.9995$
EuN	0.1~20 ng/mL	$y=40478x-1412.3$	$R^2=0.999$
McN	0.1~20 ng/mL	$y=10540x-1394.9$	$R^2=0.9967$
Sc&Sv	0.1~20 ng/mL	$y=49959x-18244$	$R^2=0.9969$
Sp	0.1~20 ng/mL	$y=12405x-2518.6$	$R^2=0.9994$
HnN	0.1~20 ng/mL	$y=141479x+20166$	$R^2=0.994$
Eu	0.1~20 ng/mL	$y=45236x-9374.1$	$R^2=0.999$
Mc	0.1~20 ng/mL	$y=16317x-5380.6$	$R^2=0.998$
LaN	0.1~20 ng/mL	$y=13972x+123.4$	$R^2=0.9982$
Hn	0.1~20 ng/mL	$y=55078x-13853$	$R^2=0.9992$
Im	0.1~20 ng/mL	$y=20885x-8803.5$	$R^2=0.995$

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)

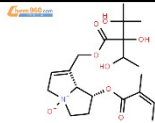
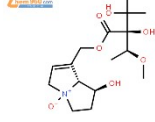
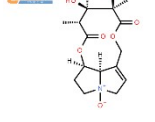
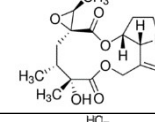
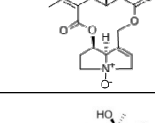
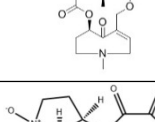
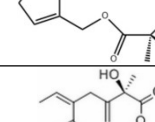
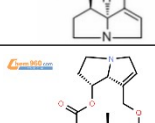
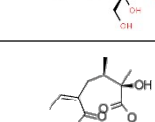
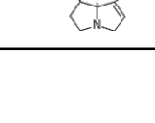
22 种生物碱的名称及简称、CAS 号、结构式、分子式及相对分子量

A.1 22 种生物碱的中文名称、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 种生物碱的名称及简称、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/分子量
1	兰茛定; (+)-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. 1525
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
6	千里光碱; Jacobine	Jb	6870-67-3		C ₁₈ H ₂₅ NO ₆ 351. 397
7	环磷酰胺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; Crotaline	Mc	315-22-0		C ₁₆ H ₂₃ NO ₆ 325. 361
9	千里光宁氧化物; senecionine N-oxide	ScN	13268-67-2		C ₁₈ H ₂₅ NO ₆ 351. 40
10	Senecivernine	Sv	72755-25-0		C ₁₈ H ₂₅ NO ₅ 335. 39500
11	千里光非林N-氧化物; Seneciophylline N-oxide	SpN	38710-26-8		C ₁₈ H ₂₃ NO ₆ 349. 383

表A.1 22种生物碱的名称及简称、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/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 ₇ 367.1631
17	倒千里光碱N-氧化物; retrorsine N-oxide	ReN	15503-86-3		C ₁₈ H ₂₅ NO ₇ 367.1631
18	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 ₅ 333.383
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)

基质加标标准溶液(10 μ g/kg 上机浓度) 色谱图

(请提供典型色谱图的上机浓度, 谱图待补充)
