

团 体 标 准

T/SATA 035—2022

蜂蜜中 21 种生物碱的测定 液相色谱—串联质谱法

Determination of 21 alkaloids in honey—Liquid
chromatography – tandem mass spectrometry

2022 - 03 - 24 发布

2022 - 04 - 24 实施

深圳市分析测试协会 发布

目 次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语与定义.....	2
4 原理.....	2
5 试剂和材料.....	2
6 仪器和设备.....	2
7 试样的制备与保存.....	3
8 测定方法.....	3
9 结果与计算.....	5
10 灵敏度、准确度和精密度.....	5
附录 A（资料性）基质加标标准溶液（10 μg/kg 上机浓度）色谱图.....	6
附录 B（资料性）21 种生物碱的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量.....	10

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。

本文件由深圳市分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：深圳市质量安全检验检测研究院、深圳市英思太检验检测有限公司。

本文件主要起草人：丁燕玲、陈彤、钟名琴、吴荣顺、黄婷、闫清华、陈丹华、叶夏声、黄永生、罗兰、何玉榆。

本文件为首次发布。

蜂蜜中 21 种生物碱的测定-液相色谱串联质谱法

1 范围

本标准规定了用液相色谱串联质谱仪器检测蜂蜜中多种生物碱的方法。

本标准适用于蜂蜜中毒芹碱、毛果芸香碱、毒扁豆碱、东莨菪碱、山莨菪碱、钩吻碱、千里光非灵、倒千里光碱、原阿片碱、马钱子碱、秋水仙碱、塔拉乌头胺、次乌头碱、中乌头碱、草乌甲素、乌头碱、藜芦次碱、 α -卡茄碱、雷公藤吉碱、雷公藤次碱和 α -茄碱的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可以使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规则和试验方法

GB/T 27404-2008 实验室质量控制规范 食品理化检测

GB/T 1.1-2020 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经乙腈超声提取，离心后取部分提取液氮吹浓缩、复溶，经微孔滤膜过滤，用液相色谱串联质谱仪测定，保留时间、离子相对丰度定性判断被测物，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 乙腈，色谱纯。

5.2 甲酸，色谱纯。

5.3 甲醇，色谱纯。

5.4 无水硫酸钠，分析纯。

5.5 乙酸铵，色谱纯。

T/SATA 035-2022

5.6 甲醇+水+甲酸(10+90+0.09)溶液配制:准确量取10.00 mL甲醇(5.3)、90.00 mL水、0.09 mL甲酸(5.2)溶液,混匀存放。

5.7 生物碱标准品:21种生物碱中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量详见附录B,均为有证标准物质。

5.8 标准储备溶液:1.00 mg/mL。准确称量每种标准物质,用甲醇配成1.00 mg/mL的标准储备液,-18°C冰箱中保存,有效期一年。

5.9 混合标准中间溶液:10.0 µg/mL。分别准确吸取每种标准储备溶液(5.8)1.00 mL于100 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,-18°C冰箱中保存,有效期3个月。移取一定量的10.0 µg/mL混合标准中间溶液,用甲醇配成不同浓度的混合标准工作溶液,2°C-4°C条件下贮存,有效期1个月。

6 仪器和设备

6.1 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0.1mg和0.01g。

6.3 高速离心机:转速不小于5000 r/min。

6.4 超声波清洗仪。

6.5 氮吹仪。

6.6 涡旋振荡器。

7 试样的制备与保存

对未结晶的样品将其搅拌均匀,对有结晶的样品可将样品瓶盖塞紧后,置于40°C的水浴中温热融化,混合均匀后取样品约500 g,装入洁净容器,密封,并标明标记,于常温下保存。

8 测定方法

8.1 提取

取1.00 g(精确至0.01 g)试样于50 mL离心管中,加入5.00 mL去离子水,涡旋混匀。加入10.00 mL乙腈,涡旋震荡5 min,超声辅助提取10 min。加入4.00 g无水硫酸钠,迅速振摇1 min,不低于5000 转/min离心6 min。

8.2 净化

于上述离心后提取液(8.1)中移取5.00 mL上清液至15 mL带刻度小管内,在45°C水浴中氮吹浓缩至少于0.5 mL。残留液用甲醇+水+甲酸(10+90+0.09)溶液准确定容至1.0 mL,过0.22µm滤膜,供液相色谱—串联质谱仪测定。

8.3 基质加标标准工作曲线的制备

准确移取21种生物碱的混合标准溶液适量,添加到1.00 g空白试样中,浓度为0.500µg/kg,1.00µg/kg,5.00µg/kg,10.0µg/kg,20.0µg/kg,50.0µg/kg的各系列空白添加试样,按8.1-8.2步骤操作,供液相色谱—串联质谱仪测定。

8.4 仪器参考条件

8.4.1 液相色谱条件

- a) 色谱柱: BEH C₁₈ (100×3.0mm, 1.7μm) ;
 b) 流动相: A相: 5 mmol/L乙酸铵 (加0.1%甲酸) 溶液; B相: 甲醇溶液;
 c) 梯度: 0.00-0.50min, 维持90%A; 0.50-4.00min, 90%A线性变化到70%A; 4.00min-6.50min, 70%A线性变化到10%A; 6.50min-9.00min, 维持10%A; 9.00min-10.00min, 10%A立即变化到90%A。
 d) 流速: 0.40 mL/min
 e) 柱温: 40°C
 f) 进样量: 5.00 μL

8.4.2 质谱条件

- a) 离子源: 电喷雾离子源
 b) 扫描方式: 正离子扫描
 c) 检测方式: 多反应监测
 d) 电离电压: 2.00 kV
 e) 源温: 150 °C
 f) 雾化温度: 500 °C
 g) 锥孔气流速: 150 L/h
 h) 雾化气流速: 1000 L/h
 i) 各种生物碱定性定量离子对及锥孔电压、碰撞能量见表1:

表1 21种生物碱定性定量离子对及去簇电压、碰撞电压

序号	名称	保留时间 /min	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Compound Name	Cone (v)	Collision (ev)
1	毒芹碱	4.70	128.1	41.1	coniine	30	21
			128.1	*69.0	coniine	30	15
2	毛果芸香碱	2.90	208.8	*96.2	Pilocarpine	20	26
			208.8	162.8	Pilocarpine	20	20
3	毒扁豆碱	5.42	276.2	*162.0	eserine	30	20
			276.2	219.1	eserine	30	11
4	东莨菪碱	5.00	304.2	*138.1	hyoscine	30	21
			304.2	156.2	hyoscine	30	16
5	山莨菪碱	4.96	306.2	122.1	anisodamine	30	28
			306.2	*140.1	anisodamine	30	24
6	钩吻碱	5.26	323.1	*195.1	gelsemine	30	36
			323.1	218.2	gelsemine	30	32
7	千里光非灵	5.80	334.2	*120.0	seneciphylline	30	26
			334.2	306.1	seneciphylline	30	24
8	倒千里光碱	5.46	352.2	120.1	retrorsine	30	27
			352.2	*324.1	retrorsine	30	26

9	原阿片碱	6.52	354.0	*149.0	Protopine	20	31
			354.0	188.0	Protopine	20	33
10	马钱子碱	5.83	395.2	244.1	brucine	30	33
			395.2	*324.1	brucine	30	29
11	秋水仙碱	7.13	400.2	326.1	colchicine	30	25
			400.2	*358.2	colchicine	30	21
12	塔拉乌头胺	5.87	422.3	58.1	talatisamine	30	44
			422.3	*390.3	talatisamine	30	29
13	次乌头碱	7.26	616.3	*524.2	hypaconitine	30	34
			616.3	556.3	hypaconitine	30	30
14	中乌头碱	7.19	632.4	354.3	Mesaconitine	30	32
			632.4	*572.3	Mesaconitine	30	32
15	草乌甲素	7.31	644.3	552.3	Bulleyaconitine A	30	37
			644.3	*584.4	Bulleyaconitine A	30	32
16	乌头碱	7.28	646.4	526.3	aconitine	30	37
			646.4	*586.3	aconitine	30	32
17	藜芦次碱	7.17	674.4	*456.3	veratridine	30	47
			674.4	474.4	veratridine	30	44
18	α -卡茄碱	7.06	852.6	*98.0	a-chaconine	30	90
			852.6	706.4	a-chaconine	30	67
19	雷公藤吉碱	7.86	858.5	*686.3	wilforgine	30	31
			858.5	840.3	wilforgine	30	26
20	雷公藤次碱	8.05	868.5	*178.0	Wilforine	50	54
			868.5	206.0	Wilforine	50	41
21	α -茄碱	7.08	868.5	*398.4	a-solanine	100	65
			868.5	722.4	a-solanine	100	65

注：带*为定量离子对。

8.4.3 液相色谱-串联质谱测定

8.4.3.1 定性测定

按照上述条件测定样品和基质加标标准溶液，如果样品的质量色谱峰保留时间与基质加标标准溶液一致；定性离子对的相对丰度与浓度相当的基质加标标准溶液的相对丰度一致，相对丰度偏差不超过表2的规定，则可判断样品中存在相应的被测物。

表2 定性时离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度	允许偏差 (%)
>50	±20
>20-50	±25
>10-20	±30
≤10	±50

8.4.3.2 定量测定

在仪器最佳工作条件下，对基质加标标准溶液进样，以峰面积为纵坐标，基质加标标准溶液浓度为横坐标，作单点或多点校准，样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。21种生物碱基质加标标准溶液的多反应监测(MRM)色谱图参见附录A。

8.4.3.3 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：

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

X :试样中待测组分含量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)；

c :从标准工作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：计算结果需扣除空白值。结果保留3位有效数字。

10 灵敏度、准确度和精密度

10.1 灵敏度

毒芹碱、毛果芸香碱、毒扁豆碱、东莨菪碱、山莨菪碱、钩吻碱、千里光非灵、倒千里光碱、原阿片碱、马钱子碱、秋水仙碱、塔拉乌头胺、次乌头碱、中乌头碱、草乌甲素、乌头碱、藜芦次碱、 α -卡茄碱、雷公藤吉碱、雷公藤次碱和 α -茄碱 21 种生物碱在蜂蜜中的方法检出限均为：0.500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。

10.2 准确度

本方法21种生物碱在0.500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -20.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度的范围内，其回收率范围为60%-120%，相应浓度基质加标标准工作曲线的相关系数应大于0.99。

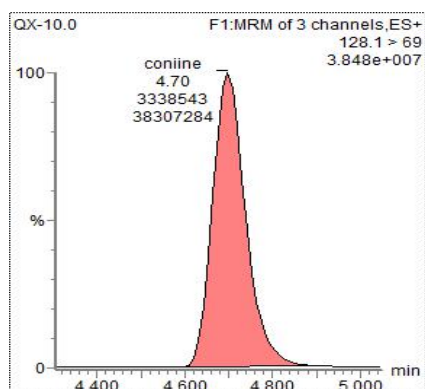
10.3 精密度：

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

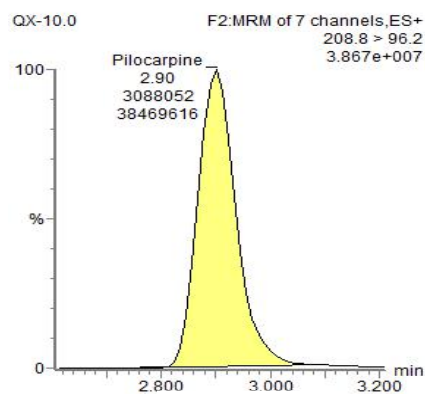
附录 A

(资料性)

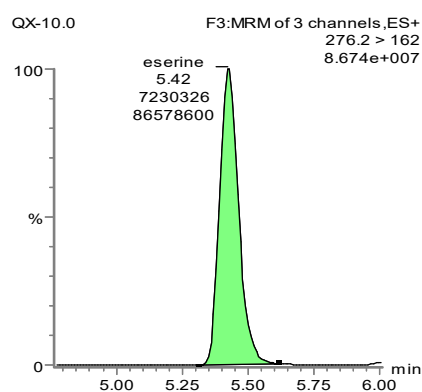
基质加标标准溶液 (10 μg/kg 上机浓度) 色谱图



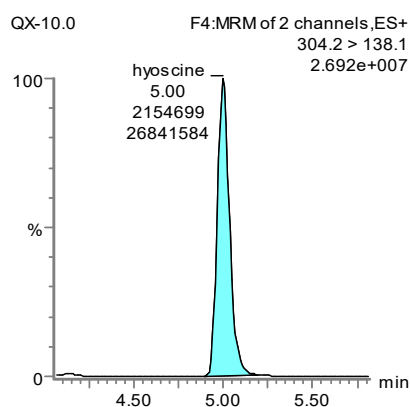
毒芹碱



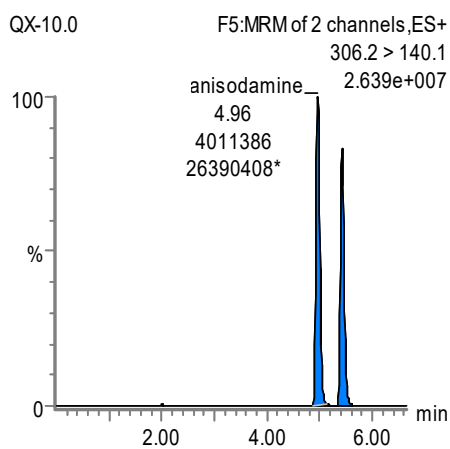
毛果芸香碱



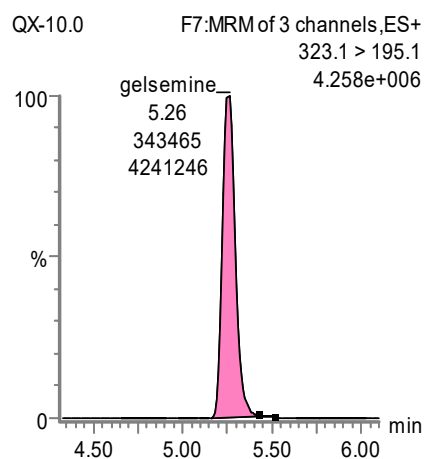
毒扁豆碱



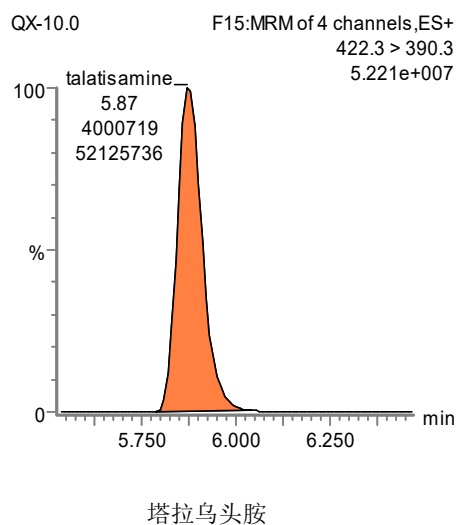
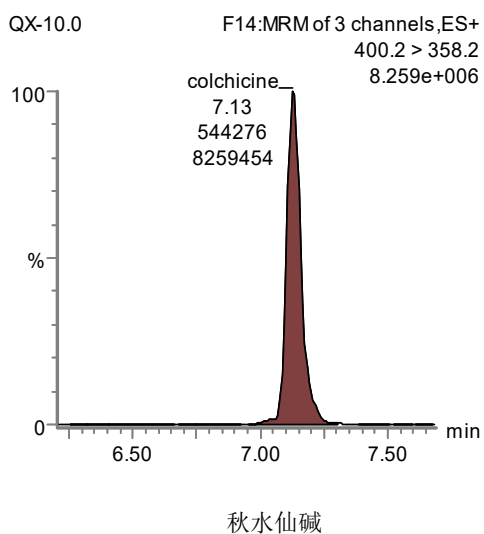
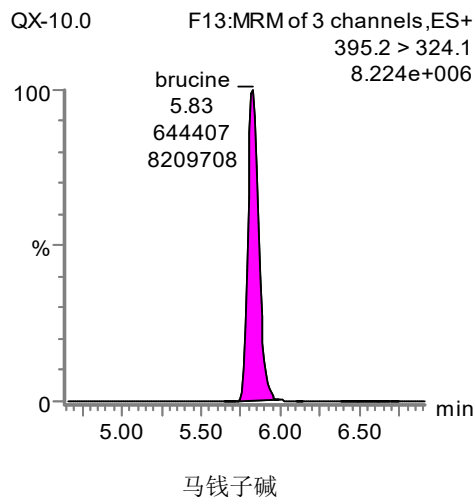
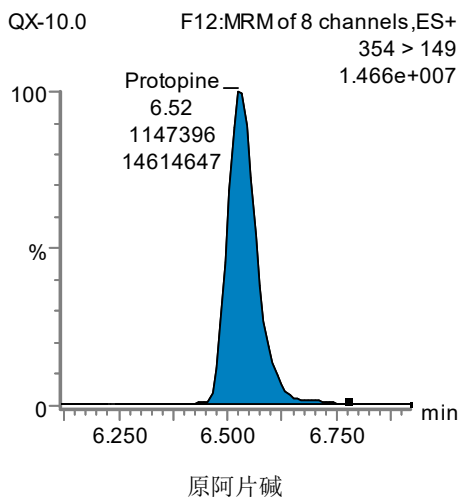
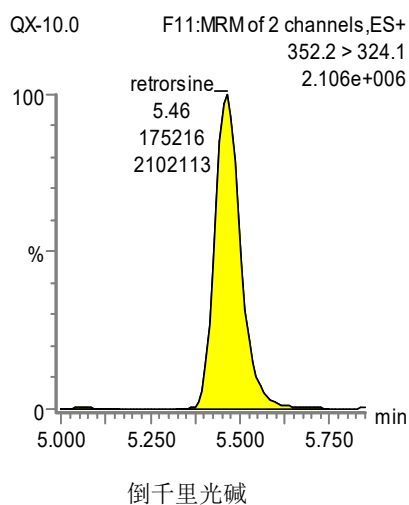
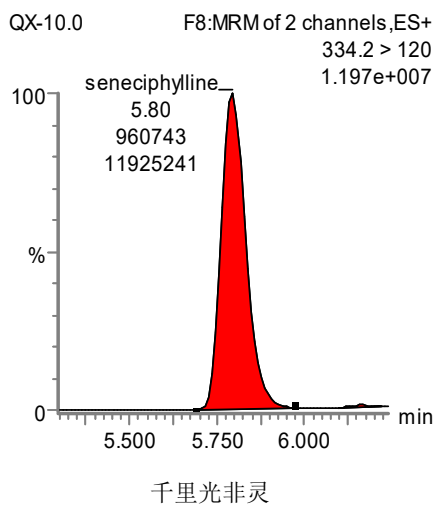
东莨菪碱



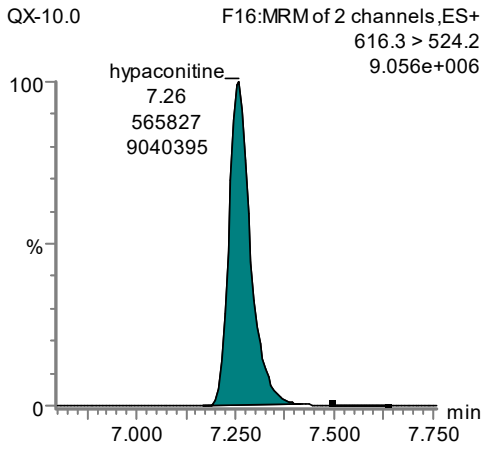
山莨菪碱



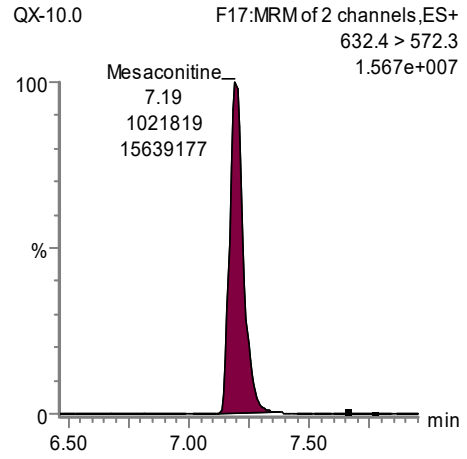
钩吻碱



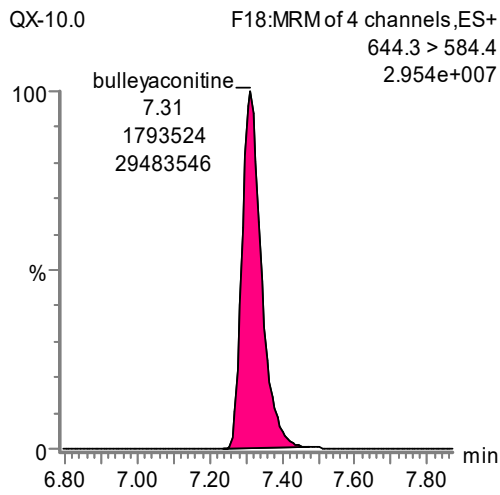
T/SATA 035-2022



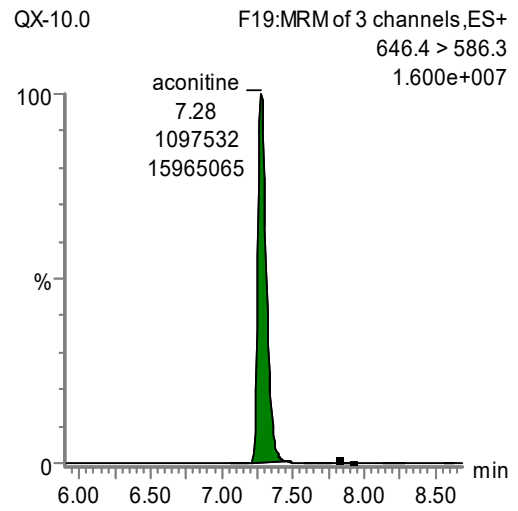
次乌头碱



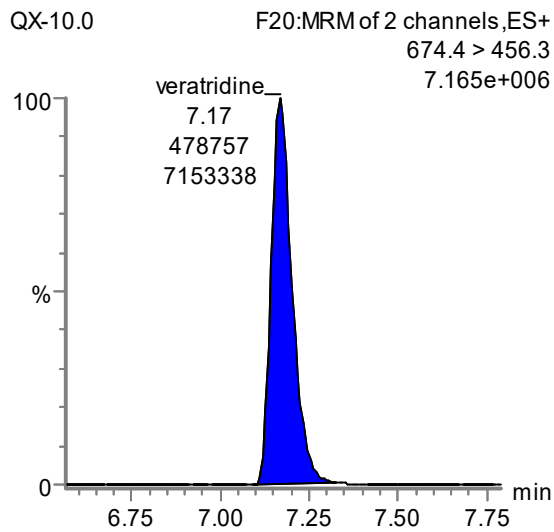
中乌头碱



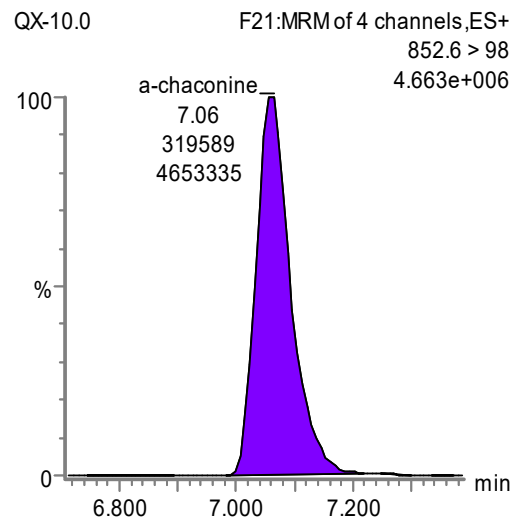
草乌甲素



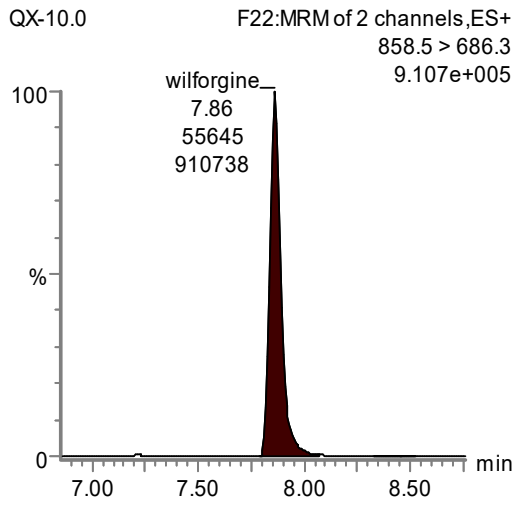
乌头碱



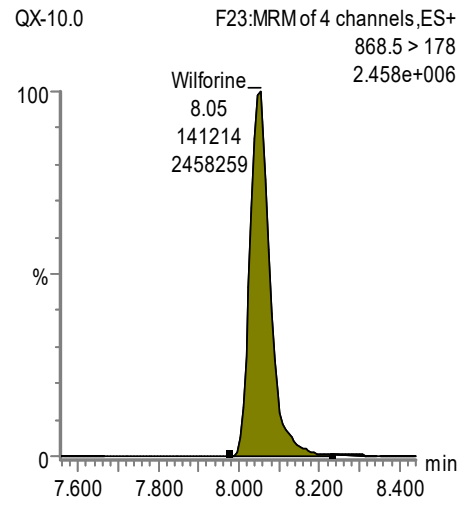
藜芦次碱



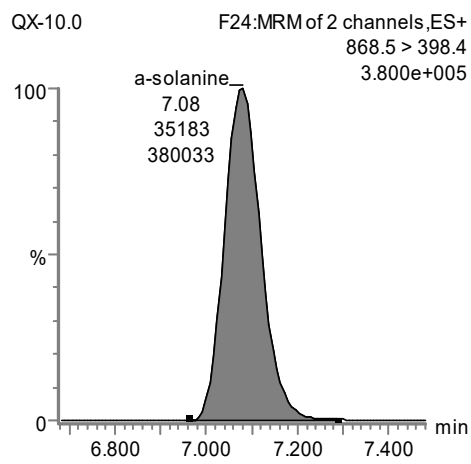
α-卡茄碱



雷公藤吉碱



雷公藤次碱



α -茄碱

附录 B

(规范性)

21 种生物碱的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量

序号	中文名称	英文名称	CAS 号	分子式	相对分子质量
1	毒芹碱	coniine	3238-60-6	C ₈ H ₁₇ N	127.23
2	毛果芸香碱	Pilocarpine	92-13-7	C ₁₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	208.26
3	毒扁豆碱	eserine	57-47-6	C ₁₅ H ₂₁ N ₃ O ₂	275.35
4	东莨菪碱	hyoscine	51-34-3	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303.35
5	山莨菪碱	anisodamine	17659-49-3	C ₁₇ H ₂₃ NO ₄	305.37
6	钩吻碱	gelsemine	509-15-9	C ₂₀ H ₂₂ N ₂ O ₂	322.4
7	千里光非灵	seneciophylline	480-81-9	C ₁₈ H ₂₃ NO ₅	333.38
8	倒千里光碱	retrorsine	480-54-6	C ₁₈ H ₂₅ NO ₆	351.39
9	原阿片碱	Protopine	130-86-9	C ₂₀ H ₁₉ NO ₅	353.37
10	马钱子碱	brucine	357-57-3	C ₂₃ H ₂₆ N ₂ O ₄	394.46
11	秋水仙碱	colchicine	64-86-8	C ₂₂ H ₂₅ NO ₆	399.44
12	塔拉乌头胺	talatisamine	20501-56-8	C ₂₄ H ₃₉ NO ₅	421.57
13	次乌头碱	hypaconitine	6900-87-4	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₀	615.71
14	中乌头碱	Mesaconitine	2752-64-9	C ₃₃ H ₄₅ NO ₁₁	631.71
15	草乌甲素	Bulleyaconitine A	107668-79-1	C ₃₅ H ₄₉ NO ₉	627.76
16	乌头碱	aconitine	302-27-2	C ₃₄ H ₄₇ NO ₁₁	645.74
17	藜芦次碱	veratridine	71-62-5	C ₃₆ H ₅₁ NO ₁₁	673.79
18	α-卡茄碱	a-chaconine	20562-03-2	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₄	852.06
19	雷公藤吉碱	wilforgine	37239-47-7	C ₄₁ H ₄₇ NO ₁₉	857.81
20	雷公藤次碱	Wilforine	11088-09-8	C ₄₃ H ₄₉ NO ₁₈	867.85
21	α-茄碱	a-solanine	20562-02-1	C ₄₅ H ₇₃ NO ₁₅	868.06