



# 中华人民共和国国家标准

GB/T 38571—2020

## 植物次生代谢物生物碱的检测 液相色谱-质谱法

Determination of alkaloids as plant secondary metabolites—  
Liquid chromatography-mass spectrometry

2020-03-31 发布

2020-03-31 实施

国家市场监督管理总局 发布  
国家标准化管理委员会

## 前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中国标准化研究院提出并归口。

本标准起草单位：中国测试技术研究院生物研究所、河北省食品检验研究院、中国标准化研究院、河北医科大学、中国计量大学。

本标准主要起草人：张岩、范素芳、马爱进、冯德建、马春玲、文迪、丛斌、王娟、吕品、叶子弘。



## 植物次生代谢物生物碱的检测 液相色谱-质谱法

### 1 范围

本标准规定了用液相色谱-串联质谱仪检测植物次生代谢产物生物碱的方法。

本标准适用于(-)-东莨菪碱、番木鳖碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、秋水仙碱、阿托品、土的宁、喜树碱、毛果芸香碱、鬼臼毒素的测定。

### 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

样品经提取液超声提取、离心后,用液相色谱-串联质谱仪测定,外标法定量。

### 4 试剂或材料

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。

#### 4.1 10%(体积分数)乙腈溶液

10 mL 乙腈+90 mL 去离子水,混匀。

#### 4.2 甲酸

色谱纯。

#### 4.3 0.1%(体积分数)甲酸水溶液

准确移取甲酸 1.0 mL 置于 1 L 容量瓶中,用水定容,混匀。

#### 4.4 1%(体积分数)甲酸-乙腈溶液

1 mL 甲酸+99 mL 乙腈,混匀。

#### 4.5 100 mmol/L 乙酸铵溶液

称取乙酸铵 3.854 g,用去离子水溶解,定容至 500 mL。

#### 4.6 乙酸铵-氨水缓冲液, pH 9

取 100 mL 100 mmol/L 乙酸铵溶液,用氨水调 pH 到  $9.0 \pm 0.5$ 。

GB/T 38571—2020

#### 4.7 生物碱

纯度均不小于 98%。

#### 4.8 1 mg/mL 生物碱储备液

准确称取 0.100 g 相应的生物碱分别置于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,配制成浓度为 1 mg/mL 的储备液,于 4 ℃ 避光保存,有效期 2 个月。

#### 4.9 10 mg/L 混合标准储备液

分别准确移取(-)-东莨菪碱、番木鳖碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、秋水仙碱、阿托品、土的宁、喜树碱、毛果芸香碱、鬼臼毒素标准储备溶液 1.0 mL 于 100 mL 容量瓶中,用甲醇定容,混匀,配制成(-)-东莨菪碱、番木鳖碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、秋水仙碱、阿托品、土的宁、喜树碱、毛果芸香碱、鬼臼毒素浓度为 10 mg/L 的混合标准储备溶液,于 4 ℃ 避光保存,可使用一周。

#### 4.10 微孔滤膜

0.22 μm,有机相。

### 5 仪器设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪(LC-MS/MS):配有电喷雾离子源(ESI)和四级杆质量分析器。

5.2 电子天平:感量为 0.000 1 g 和 0.001 g。

5.3 离心机:最高转速不低于 9 500 r/min。

5.4 超声波清洗仪。

5.5 氮吹仪。

5.6 涡旋混合器。

5.7 匀浆机。

5.8 离心管:10 mL、50 mL。

### 6 试样制备

#### 6.1 植物组织、动物组织

植物组织、动物组织等固体样品,绞碎并使其均质。



#### 6.2 体液

血液、尿液等液体样品,将取得的全部原始样品充分混匀后,待测。

### 7 试验步骤

#### 7.1 试样提取

##### 7.1.1 植物组织、动物组织

称取植物组织试样 1 g(精确至 0.001 g)于 50 mL 离心管中,加入 5 mL 去离子水,涡旋混合 2 min,加入 10 mL 乙腈,涡旋混合 1 min,超声辅助提取 10 min,加入 4 g 无水硫酸镁,迅速振摇 1 min,9 500 r/min



离心 5 min。取上清液 5.0 mL 在 45 ℃ 水浴中氮吹浓缩至干,用 1.0 mL 10% 乙腈溶液复溶,过微孔滤膜,待测定。

### 7.1.2 体液

#### 7.1.2.1 血液

取血液试样 0.5 mL 于 10 mL 离心管中,加入 1 mL 乙酸铵-氨水缓冲溶液,涡旋混合 1 min,加入 2.0 mL 甲醇,涡旋混合 2 min,超声辅助提取 10 min,9 500 r/min 离心 5 min,取上清液;残渣加入 2.0 mL 甲醇重复提取一次,合并上清液,45 ℃ 水浴中氮吹浓缩至干,用 1.0 mL 10% 乙腈溶液复溶,过微孔滤膜,待测定。

#### 7.1.2.2 尿液

取尿液试样 1.0 mL 于 10 mL 离心管中,准确加入 4.0 mL 含 1% 甲酸-乙腈溶液,涡旋混合 1 min 后,向离心管中加入 1.5 g 无水硫酸镁,迅速振摇 1 min,9 500 r/min 离心 5 min。取上清液 2.0 mL 在 45 ℃ 水浴中氮吹浓缩至干,用 1.0 mL 10% 乙腈溶液复溶,过微孔滤膜,待测定。

## 7.2 仪器参考条件

### 7.2.1 液相色谱参考条件如下:

- a) 色谱柱: C<sub>18</sub> 柱, 100 mm × 2.1 mm (内径), 2.5 μm, 或相当者。
- b) 流动相: 流动相 A——0.1% 甲酸水溶液; 流动相 B——乙腈。梯度洗脱, 梯度洗脱程序参见附录 A。
- c) 流速: 0.30 mL/min。
- d) 柱温: 30 ℃。
- e) 进样量: 2 μL。

### 7.2.2 质谱参考条件如下:

- a) 电离方式: 电喷雾电离, 正离子模式;
- b) 喷雾电压: 3.5 kV;
- c) 离子传输温度: 350 ℃
- d) 离子源温度: 320 ℃;
- e) 鞘气: 4.6 L/min;
- f) 辅助气: 8.8 L/min;
- g) 吹扫气: 1.5 L/min;
- h) 扫描模式: 多反应监测 (MRM) 模式, 11 种生物碱质谱参数参见附录 B。

## 7.3 混合标准工作溶液的制备

取相应的空白样品,按照 6.2 步骤进行处理,用得到的空白样品提取液将混合标准储备溶液逐级稀释得到(-)-东莨菪碱、番木鳖碱、乌头碱、次乌头碱、新乌头碱、秋水仙碱、阿托品、土的宁、喜树碱、毛果芸香碱、鬼臼毒素浓度为 5 μg/L、10 μg/L、20 μg/L、50 μg/L、100 μg/L 的系列混合标准工作溶液,浓度由低到高进行检测,以定量离子峰面积对质量浓度作图,做出标准曲线回归方程。

## 7.4 测定步骤

将试样溶液注入液相色谱-串联质谱仪中,得到 11 种生物碱的质谱响应值,根据标准曲线得到待测液中 11 种生物碱的浓度。样品溶液中各组分的响应值应在标准曲线的线性范围内,超过线性范围则应

GB/T 38571—2020

稀释后再进样测定。

7.5 定性判定

在相同条件测定样品溶液和标准溶液,如果样品溶液中检出的色谱峰的保留时间与标准溶液中的某种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 1 规定的范围,则可判断样品中存在该组分。

11 种生物碱标准物质的总离子流图参见附录 C。

表 1 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%

7.6 空白试验

除不加试样外,均按 7.1~7.5 测定条件和步骤进行。

7.7 方法的检出限、定量限

本标准的方法检出限、定量限见附录 D。

8 试验数据处理

8.1 植物组织、动物组织

植物组织、动物组织组分含量按式(1)计算:

$$X_i = \frac{\rho_i \times V \times K}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

- $X_i$  ——试样中待测组分含量,单位为微克每千克( $\mu\text{g/kg}$ );
- $\rho_i$  ——由标准曲线得出的测试液中某种组分的质量浓度,单位为微克每升( $\mu\text{g/L}$ );
- $V$  ——定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- $K$  ——稀释倍数;
- $m$  ——试样质量,单位为克( $\text{g}$ )。

计算结果保留三位有效数字。

8.2 体液

体液组分含量按式(2)计算:

$$X_i = \frac{\rho_i \times V_{\text{定容}} \times K}{V_{\text{试样}}} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

- $X_i$  ——试样中待测组分含量,单位为微克每升( $\mu\text{g/L}$ );
- $\rho_i$  ——由标准曲线得出的测试液中某种组分的质量浓度,单位为微克每升( $\mu\text{g/L}$ );
- $V_{\text{定容}}$  ——定容体积,单位为毫升( $\text{mL}$ );
- $K$  ——稀释倍数;

$V_{\text{试样}}$  ——试样体积,单位为毫升(mL)。  
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术平均值的 10%。



附 录 A  
(资料性附录)  
梯度洗脱程序

梯度洗脱程序见表 A.1。

表 A.1 梯度洗脱程序表

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0.0	90	10
2.0	90	10
6.0	75	25
19.0	75	25
19.01	90	10
22.0	90	10





附录 B  
(资料性附录)  
11 种生物碱质谱参数

11 种生物碱质谱参数见表 B.1。

表 B.1 11 种生物碱质谱参数表

序号	物质名称	母离子 <i>m/z</i>	透镜电压 V	子离子 <i>m/z</i>	碰撞能 V
1	(-)-东莨菪碱	304.2	86	138.1 <sup>a</sup>	19
				156.1	15
2	番木鳖碱	395.2	158	244.0	35
				324.1 <sup>a</sup>	29
3	乌头碱	646.4	249	586.3 <sup>a</sup>	31
				554.3	35
4	次乌头碱	616.4	147	556.3 <sup>a</sup>	30
				524.3	34
5	新乌头碱	632.4	249	572.3 <sup>a</sup>	31
				354.1	40
6	秋水仙碱	400.2	137	310.1	24
				358.2 <sup>a</sup>	20
7	阿托品	290.2	100	124.2 <sup>a</sup>	22
				93.2	29
8	土的宁	335.2	127	184.1 <sup>a</sup>	36
				156.1	44
9	喜树碱	349.3	131	305.1 <sup>a</sup>	21
				249.2	27
10	毛果芸香碱	209.1	113	95.1 <sup>a</sup>	29
				163.1	18
11	鬼臼毒素	415.0	82	247.0 <sup>a</sup>	15
				397.1	10
* 定量离子。					

# 附录 C (资料性附录)

## 11 种生物碱标准物质的提取离子质谱图

11 种生物碱标准物质的提取离子质谱图见图 C.1。

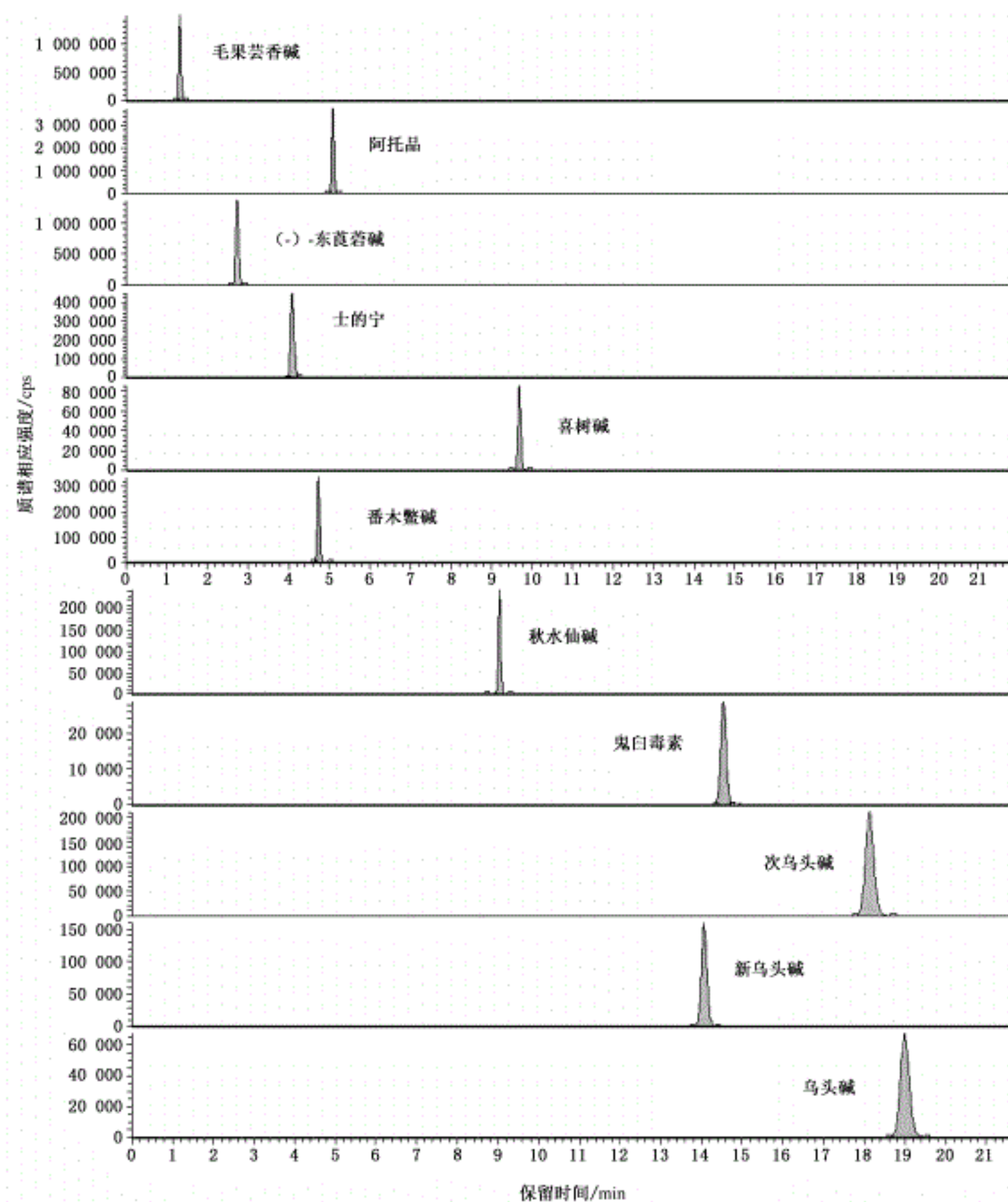


图 C.1 11 种生物碱标准物质的提取离子质谱图

附 录 D  
(规范性附录)  
方法检出限、定量限

方法检出限、定量限见表 D.1。

表 D.1 方法检出限、定量限

分析物	血液		尿液		动物组织		中药材		其他植物组织	
	检出限 μg/L	定量限 μg/L	检出限 μg/L	定量限 μg/L	检出限 μg/L	定量限 μg/L	检出限 μg/L	定量限 μg/L	检出限 μg/L	定量限 μg/L
毛果芸香碱	2	5	1	2	2	5	2	5	2	5
阿托品	0.5	1.0	0.2	0.5	0.5	1.0	0.5	1.0	0.5	1.0
(-)-东莨菪碱	2	4	1	2	2	4	2	4	2	4
喜树碱	3	10	2	5	3	10	3	10	3	10
番木鳖碱	2	4	1	2	2	4	2	4	2	4
新乌头碱	2	5	1	2	2	5	2	5	2	5
秋水仙碱	2	4	1	2	2	4	2	4	2	4
次乌头碱	2	4	1	2	2	4	2	4	2	4
乌头碱	3	10	2	5	3	10	3	10	3	10
土的宁	2	4	1	2	2	4	2	4	2	4
鬼臼毒素	3	10	2	5	3	10	3	10	3	10

