

ICS 67.100
CCS C 144

团体标准

T/NAIA XXX—2026

枸杞叶中 7 种生物碱的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of seven alkaloids in Lycium barbarum leaves by LC-MS/MS

2026-XX-XX 发布

2026-XX-XX 实施

宁夏化学分析测试协会 发布

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》规定编写。

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。

本文件由宁夏化学分析测试协会提出并归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

枸杞叶中 7 种生物碱的测定 高效液相色谱-质谱法

1 范围

本文件规定了枸杞叶中 7 种生物碱（胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和 N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺）的高效液相色谱-质谱检测方法。

本文件适用于枸杞叶中 7 种生物碱（胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和 N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺）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实验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

试样经乙酸甲醇超声提取后，经分散固相萃取净化，色谱柱分离，高效液相色谱-质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂和材料

本方法所用的试剂，除另有规定外，均为分析纯，水为 GB/T 6682 规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈：色谱纯。

5.1.2 甲醇：色谱纯。

5.1.3 甲酸：优级纯。

5.1.4 乙酸：优级纯。

5.1.5 分散固相萃取（QuEChERS）试剂：石墨化碳黑 GCB、十八烷基硅烷键合硅胶 C18，纯度均 \geq 98%。

5.1.6 0.05%甲酸水溶液：0.5 mL 甲酸用水定容到 1000 mL。

5.1.7 0.5%乙酸甲醇溶液：0.5 mL 乙酸用甲醇定容到 100 mL。

5.2 材料

5.2.1 有机微孔滤膜，孔径 0.22 μm ，或相当者。

5.2.2 离心管：50 mL。

5.3 标准品

5.3.1 标准品：胆碱（Choline，CAS号62-49-7， $C_5H_{15}NO$ ）、对羟基苯乙胺（2-(4-Hydroxyphenyl)ethylamine，CAS号51-67-2， $C_8H_{11}NO$ ）、咖啡酰腐胺（Caffeoylputrescine，CAS号29554-26-5， $C_{13}H_{18}N_2O_3$ ）、甜菜碱（Betaine，CAS号107-43-7， $C_5H_{11}NO_2$ ）、葫芦巴碱（Trigonelline，CAS号535-83-1， $C_7H_7NO_2$ ）、N-反式阿魏酰酪胺（N-Trans-Feruloyltyramine，CAS号66648-43-9， $C_{18}H_{19}NO_4$ ）和N-反式阿魏酰-3-甲基酪胺（N-trans-Feruloyl-3-methoxytyramine，CAS号78510-19-7， $C_{19}H_{21}NO_5$ ），纯度均 $\geq 98\%$ 。

5.3.2 标准储备液（1.0 mg/mL）：分别准确称取胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和N-反式阿魏酰-3-甲基酪胺标准品10 mg（准确至0.1 mg），于10 mL容量瓶中，用甲醇溶解并定容至刻度，4℃保存。

5.3.3 标准混合中间液（1 $\mu\text{g/mL}$ ）：分别准确吸取胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和N-反式阿魏酰-3-甲基酪胺标准储备液各100 μL 于100 mL容量瓶中，用甲醇定容，4℃保存。

5.3.4 标准混合系列工作液：分别准确吸取一定体积的1 $\mu\text{g/mL}$ 标准混合中间液，置于10 mL容量瓶中，用初始流动相定容至刻度，摇匀。标准混合系列工作液的浓度分别为5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL，临用现配。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪（LC-MS/MS）：配备电喷雾离子源(ESI)。

6.2 分析天平：感量0.1 mg和0.01 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 离心机：转速10000 r/min。

6.5 超声波发生器（500W）。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取枸杞叶干样研磨均匀分装，密封常温保存。

7.2 试样的提取

称取0.1 g枸杞叶样品（精确到0.01 g），加10 mL 0.5%乙酸甲醇（5.1.7），涡旋8 min，超声15 min，8000 r/min离心8 min，取上清液，待净化。

取上清液4 mL，加入至预先装有10 mg GCB和10 mg C18（5.1.5）的净化管中，涡旋5 min，8000 r/min离心5 min，准确移取1 mL上清液于45℃氮吹至近干，初始流动相复溶至1 mL，经0.22 μm 微孔滤膜过滤后，供LC-MS/MS分析。

7.3 仪器参考条件

7.3.1 液相色谱参考条件

7.3.1.1 色谱柱：PFP色谱柱（填料：表面多孔硅胶颗粒），4.6 mm \times 100 mm，2.7 μm ，性能相当者。

7.3.1.2 柱温：30℃。

7.3.1.3 流动相：A：0.05%甲酸水溶液，B：乙腈；梯度洗脱见表 1。

7.3.1.4 流速：0.30 mL/min。

7.3.1.5 进样量：5 μ L。

表 1 流动相及梯度洗脱条件

时间/min	流速/ (mL/min)	流动相 A/%	流动相 B/%
0.00	0.30	95	5
2.00	0.30	90	10
5.00	0.30	70	30
6.00	0.30	30	70
10.00	0.30	10	90
12.00	0.30	5	95
12.10	0.30	95	10

7.3.2 质谱参考条件

7.3.2.1 离子源：电喷雾离子源（ESI）。

7.3.2.2 扫描方式：正离子扫描。

7.3.2.3 检测方式：多反应监测（MRM）。

7.3.2.4 离子源温度：280 $^{\circ}$ C。

7.3.2.5 气体流速：7 L/min。

7.3.2.6 雾化气压力：45psi。

7.3.2.7 鞘气温度：325 $^{\circ}$ C。

7.3.2.8 鞘气流速：11 L/min。

7.3.2.9 毛细管电压：3500V。

7.3.2.10 喷嘴电压：500V。

7.3.2.11 定性离子对、定量离子对、碰撞能量等参数参见附录 A。

7.4 定性测定

在相同实验条件下进行样品测定时，如果检出的色谱峰的保留时间与标准样品相一致，并且目标化合物选择的子离子均出现，而且同一检测批次，对同一化合物，样品中目标化合物的离子丰度比与质量浓度相当的标准溶液相比，其允许偏差不超过表 3 规定的范围，则可判断样品中存在目标生物碱。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度	>50%	>20%至 50%	>10%至 20%	\leq 10%
允许的相对偏差	\pm 20%	\pm 25%	\pm 30%	\pm 50%

7.5 定量测定

根据样液中被测物含量情况，选定浓度相近的混合标准工作溶液，混合标准工作溶液和待测样液中被测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内。混合标准工作溶液与样液等体积进样测定。标准溶液及样液均按 7.3.1 和 7.3.2 规定的条件进行测定，如果样液中与标准溶液相同的保留时间有峰出现，则对其进行确证，胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和 N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺的参考保留时间见表 2。胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和 N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺标准品的多反应监测（MRM）色谱图参见附录 B，采用标准曲线外标法定量。

表3 参考保留时间

被测物名称	保留时间/ (min)
胆碱	2.703
对羟基苯乙胺	2.877
咖啡酰腐胺	3.464
甜菜碱	4.233
葫芦巴碱	4.249
N-反式阿魏酰酪胺	10.341
N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺	10.390

7.6 空白试验

除不加试样外，均按上述步骤进行。

8 分析结果的表述

试样中被测化合物的含量按式（1）计算：

$$X = \frac{(c - c_0) \times v \times 1000}{m \times 1000} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X ——样本中各种化合物含量，单位为毫克每千克（ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ）；

C ——测定溶液浓度，单位为微克每毫升（ ng/mL ）；

C_0 ——空白溶液浓度，单位为微克每毫升（ ng/mL ）；

V ——样本溶液提取溶液体积，单位为毫升（ mL ）；

m ——试样质量，单位为克（ g ）。

注：计算结果应扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留两位有效数字。

9 精密度

在重复性测定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%。

10 定量限

本方法的胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和 N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺定量限为 0.005 mg/kg 。

附录 A
(资料性附录)

表 A.1 胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和 N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺的质谱参数

被测物名称	母离子(m/z)	子离子 (m/z)	碎裂电压 (V)	碰撞能量 (eV)
胆碱	103.9	60*	80	5
		45	80	5
对羟基苯乙胺	138	121*	80	8
		103.1	80	20
咖啡酰腐胺	251.1	163*	80	16
		88.9	80	8
甜菜碱	118.1	58.1*	130	30
		59.1	130	10
葫芦巴碱	138	94.1*	80	5
		78.2	80	5
N-反式阿魏酰酪胺	314.1	177.1*	80	5
		121	80	5
N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺	344.2	177.1*	90	8
		145	90	28

注：*为定量离子对信息

附录 B
(资料性附录)

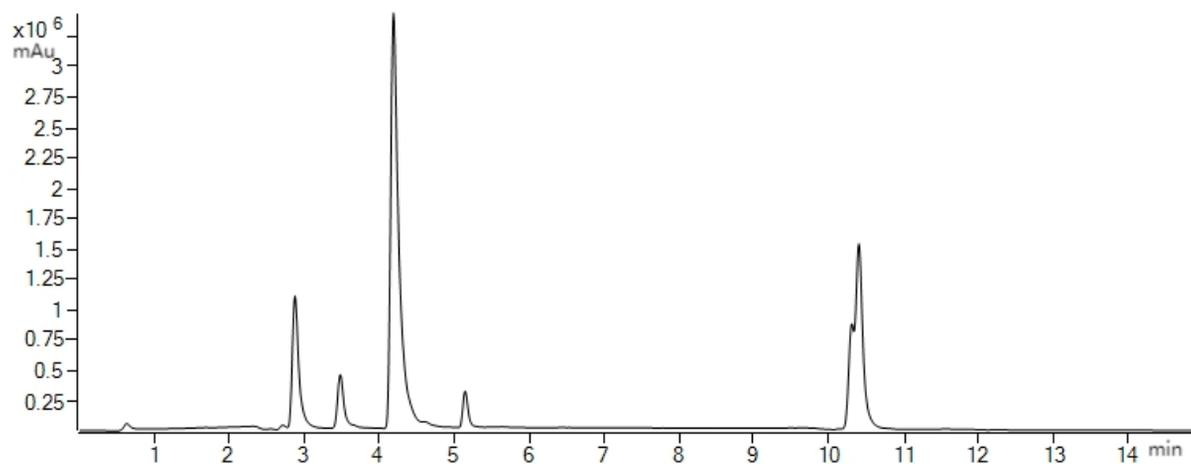


图 B.1 胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和 N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺的多反应监测 (MRM) 总离子流图

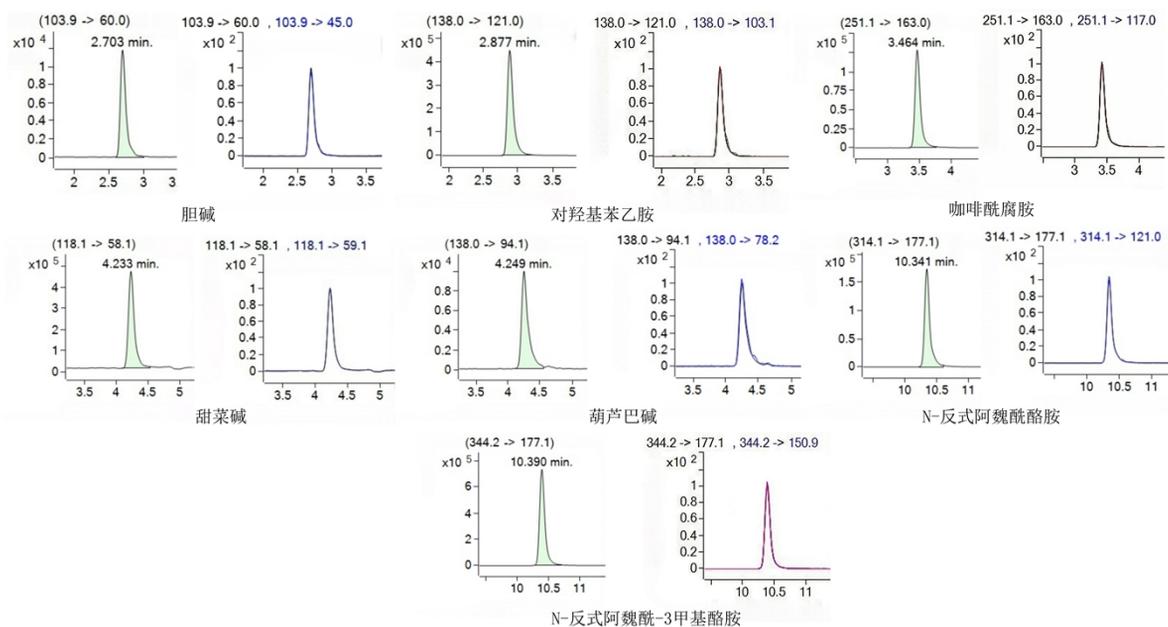


图 B.2 胆碱、对羟基苯乙胺、咖啡酰腐胺、甜菜碱、葫芦巴碱、N-反式阿魏酰酪胺和 N-反式阿魏酰-3 甲基酪胺的多反应监测 (MRM) 色谱图