

中华人民共和国供销合作行业标准

GH/T XXXX—XXXX

蜂蜜中葫芦巴碱含量的测定 液相色谱-串  
联质谱法

Determination of trigonelline in Honey—  
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华全国供销合作总社 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》的规定起草。

本文件由中华全国供销合作总社提出。

本文件由全国蜂产品标准化委员会（SAC/TC601）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

# 蜂蜜中葫芦巴碱含量的测定 液相色谱-串联质谱法

## 1 范围

本文件规定了蜂蜜中葫芦巴碱含量测定的液相色谱-串联质谱法。  
本文件适用于蜂蜜中葫芦巴碱含量的测定

## 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 分析实验室用水规格和试验方法

## 3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

## 4 原理

试样用 0.1%甲酸溶液溶解提取，经阳离子固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱仪测定，内标法定量。

## 5 试剂和材料

除另有规定外，所有试剂均为分析纯，水为符合GB/T 6682规定的一级水。

### 5.1 试剂

- 5.1.1 甲酸（ $\text{CH}_2\text{O}_2$ ）：色谱纯。
- 5.1.2 甲醇（ $\text{CH}_3\text{OH}$ ）：色谱纯。
- 5.1.3 氨水（ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ）。
- 5.1.4 乙腈（ $\text{CH}_3\text{CN}$ ）：色谱纯。
- 5.1.5 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）：色谱纯。

### 5.2 溶液配制

- 5.2.1 0.1%甲酸溶液：取 1 mL 甲酸（5.1.1）于 1000 mL 容量瓶中，用水稀释至 1 L，混匀。
- 5.2.2 2%氨水甲醇溶液：取 2 mL 氨水（5.1.3），用甲醇（5.1.2）稀释至 100 mL，混匀。
- 5.2.3 80%甲醇水溶液：取 80 mL 甲醇（5.1.2），用水稀释至 100 mL，混匀。

### 5.3 标准品

- 5.3.1 葫芦巴碱（Trigonelline,  $\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2$ , CAS 号：535-83-1, 纯度 $\geq 99\%$ ）。
- 5.3.2 葫芦巴碱-d3（Trigonelline-d3,  $\text{C}_7\text{H}_4\text{D}_3\text{NO}_2$ , 纯度 $\geq 98\%$ ）。

### 5.4 标准溶液配制

5.4.1 葫芦巴碱标准储备液(1 mg/mL): 准确称取葫芦巴碱(5.3.1)标准品 10 mg(精确至 0.01 mg), 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解、稀释并定容, 混匀, 配制成浓度均为 1 mg/mL 的葫芦巴碱标准储备液, 2~8 °C条件下保存。

5.4.2 葫芦巴碱-d3 标准储备液(1 mg/mL): 准确称取葫芦巴碱-d3(5.3.2)标准品 10 mg(精确至 0.01 mg), 置于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇溶解、稀释并定容, 混匀, 配制成浓度均为 1 mg/mL 的葫芦巴碱-d3 标准储备液, 2~8 °C条件下保存。

5.4.3 葫芦巴碱标准中间溶液: 准确移取葫芦巴碱标准储备液(5.4.1) 100 μL, 于 10 mL 容量瓶中, 用 80%甲醇水溶液(5.2.3)稀释并定容, 混匀后配制成浓度为 10 μg/mL 的葫芦巴碱标准中间溶液, 2~8 °C条件下保存。

5.4.4 葫芦巴碱-d3 标准中间溶液: 准确移取葫芦巴碱-d3 标准储备液(5.4.2) 100 μL, 于 10 mL 容量瓶中, 用 80%甲醇水溶液(5.2.3)稀释并定容, 混匀后配制成浓度为 10 μg/mL 的葫芦巴碱-d3 标准中间溶液, 2~8 °C条件下保存。

5.4.5 葫芦巴碱标准工作溶液: 分别移取葫芦巴碱标准中间溶液(5.4.3) 10 μL、20 μL、50 μL、100 μL、200 μL、500 μL 至 10 mL 容量瓶中, 并分别加入 10 μL 葫芦巴碱-d3 标准中间溶液(5.4.4), 用 80%甲醇水溶液(5.2.3)稀释至刻度, 分别配制成浓度为 0.01 μg/mL、0.02 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL、0.5 μg/mL 的葫芦巴碱标准工作溶液(葫芦巴碱-d3 浓度均为 0.1 μg/mL), 用于绘制标准工作曲线。标准工作溶液现用现配。

## 5.5 材料

5.5.1 强阳离子固相萃取柱(MCX): 60 mg/3 mL, 或相当者。

5.5.2 微孔滤膜: 有机系, 规格0.22 μm。

## 6 仪器和设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪: 配有电喷雾离子源。

6.2 分析天平: 感量 0.01 g 和 0.00001 g。

6.3 涡旋混合器。

6.4 固相萃取装置。

6.5 氮吹仪。

6.6 容量瓶: 10 mL、100 mL、1000 mL。

## 7 试样制备与保存

### 7.1 试样的制备

对无结晶的蜂蜜样品, 将其搅拌均匀。对有结晶的样品, 在密闭情况下, 置于不超过 60 °C的水浴中温热, 振荡, 待样品全部融化后搅匀, 冷却至室温。分出 200 g 作为试样。制备好的试样置于样品瓶中, 密封, 并做上标记。

### 7.2 试样的保存

试样于常温下保存。

## 8 测定步骤

### 8.1 提取

准确称取蜂蜜样品 2 g(精确至 0.01 g)至烧杯中, 加入适量 0.1%甲酸溶液溶解并转移至 50 mL 容

量瓶中，用 0.1%甲酸溶液冲洗烧杯并转移至容量瓶中，定容，混匀。然后取 1.0 mL 溶液加入 10  $\mu$ L 葫芦巴碱-d3 标准中间溶液（5.4.4）混匀后备用，待固相萃取净化。

## 8.2 净化

强阳离子固相萃取柱（5.5.1）依次用甲醇 3 mL 和水 3 mL 活化，加入内标的提取液经塞好脱脂棉的漏斗过滤后过固相萃取柱，依次用 3 mL 水和 3 mL 甲醇淋洗，抽干，用 3 mL 2%氨水甲醇溶液（5.2.2）洗脱。收集洗脱液，50  $^{\circ}$ C 条件下氮气吹干。加入 80%甲醇水溶液（5.2.3）1 mL，涡旋 1 min 溶解残余物，微孔滤膜（5.5.2）过滤，液相色谱-串联质谱仪测定。

## 8.3 测定

### 8.3.1 液相色谱参考条件

- 色谱柱：ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱（2.1 mm $\times$ 100 mm，1.7  $\mu$ m），或相当者；
- 流动相：乙腈+5 mmol/L 乙酸铵溶液（梯度洗脱，见表 1）；
- 流速：0.3 mL/min；
- 柱温：40  $^{\circ}$ C；
- 进样量：2  $\mu$ L。

表 1 梯度洗脱条件（A：乙腈；B：5 mmol/L 乙酸铵溶液）

时间（min）	流速（mL/min）	A(%)	B(%)
0.0	0.3	90	10
0.5	0.3	90	10
1.5	0.3	50	50
3.5	0.3	50	50
4.0	0.3	90	10
6.0	0.3	90	10

### 8.3.2 质谱参考条件

- 离子源：电喷雾离子源（ESI）；
- 扫描方式：正离子扫描；
- 检测方式：多反应监测（MRM）；
- 离子源温度：120  $^{\circ}$ C；
- 脱溶剂温度：350  $^{\circ}$ C；
- 脱溶剂气体流速：650 L/h；
- 锥孔气流速：50 L/h；
- 毛细管电压：3 kV；
- 葫芦巴碱及其同位素内标的 MRM 参数见表 2。

表 2 葫芦巴碱及葫芦巴碱-d3 的多反应监测（MRM）参数

化合物名称	定性离子对 ( <i>m/z</i> )	定量离子对 ( <i>m/z</i> )	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
葫芦巴碱	138.0/78.0	138.0/92.0	50	22
	138.0/92.0			20
葫芦巴碱-d3	141.0/97.1	141.0/95.1	50	20
	141.0/95.1			20

## 8.4 液相色谱-串联质谱测定

### 8.4.1 定性确证

每种被测组分选择一个母离子，2个以上子离子，在相同实验条件下，试样溶液中葫芦巴碱及其内标的保留时间与标准溶液中相应组分的保留时间一致，相对偏差在±2.5%之内，所有离子对都出现，且相对离子丰度与浓度相当的标准溶液相对离子丰度一致，其允许偏差应符合表3的要求。

表3 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%~50%	> 10%~20%	≤ 10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

### 8.4.2 定量测定

按照 8.3.1 和 8.3.2 设定仪器条件，以目标物的质量浓度为横坐标，以目标物峰面积与同位素内标峰面积比值为纵坐标，绘制标准工作曲线，按内标法计算试样中目标物的含量。标准溶液及试样溶液中的目标物响应值均应在仪器检测的线性范围内。

## 8.5 平行试验

按以上步骤，对同一试样进行平行试验测定。

## 8.6 空白试验

取空白试料，采用完全相同的测定步骤进行平行操作。

## 9 结果计算

结果按式（1）计算：

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

式中：

- $X$ —试样中被测组分含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；
- $\rho$ —从标准工作曲线上得到的被测组分溶液浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；
- $V$ —样品溶液定容体积，单位为毫升（mL）；
- $m$ —所称试样的质量，单位为克（g）。

注：计算结果应扣除空白值，结果保留2位有效数字或小数点后1位。

## 10 定量限

本文件中葫芦巴碱的定量限为0.25 mg/kg。

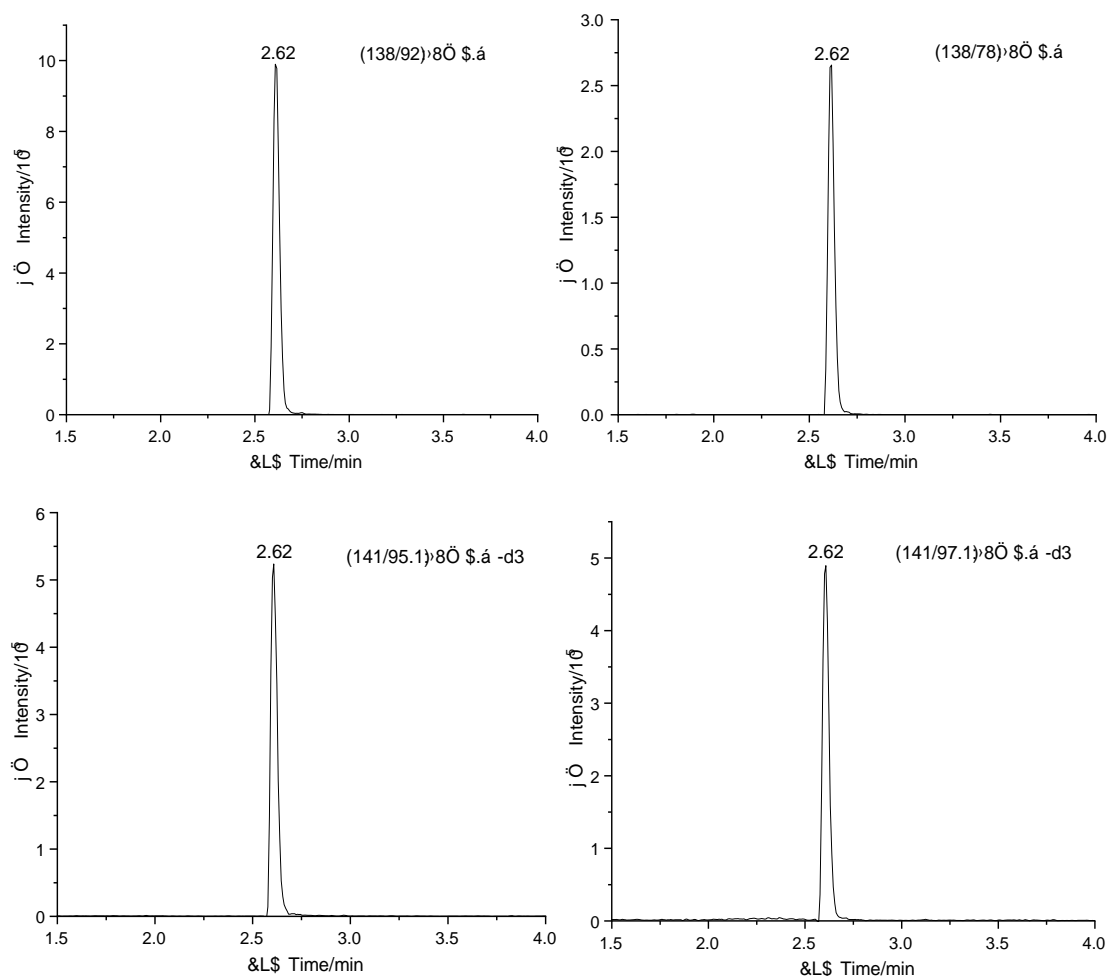
## 11 精密度

两次平行测定的绝对差值不超过其算术平均值的10%。

附录 A  
(资料性)

## 葫芦巴碱和葫芦巴碱-d3的多反应监测 (MRM) 色谱图

葫芦巴碱和葫芦巴碱-d3的多反应监测 (MRM) 色谱图见图A.1



图A.1 葫芦巴碱(500 ng/mL)和葫芦巴碱-d3(100 ng/mL)的多反应监测 (MRM) 色谱图

# 《蜂蜜中葫芦巴碱含量的测定 液相色谱-串联质谱法》编制说明

## （征求意见稿）

### 一、工作简况

#### 1.1 任务来源

本标准是根据中华全国供销合作总社办公厅文件：供销厅科社[2022]45号文件《中华全国供销合作总社办公厅关于下达2022年度供销合作社归口标准体系与行业品牌建设项目计划的通知》下达的任务，由秦皇岛海关技术中心作为主持单位，中国蜂产品协会等单位作为协作单位，开展该项标准研制工作，标准归口管理单位为全国蜂产品标准化委员会（原全国蜂产品标准化工作组），标准名称为《蜂蜜中葫芦巴碱含量的测定 液相色谱-串联质谱法》，其计划编号为2022GH-ZD-26。

#### 1.2 制定背景

蜂蜜是蜜蜂采集植物的花蜜、分泌物或蜜露，与自身分泌物混合后，经充分酿造而成的天然甜味物质。蜂蜜的种类繁多，按照蜜蜂所采集的蜜源植物品种可以分为单花蜜和百花蜜。已有研究表明，单花蜜的营养价值和口感均优于百花蜜。油菜蜜作为单花蜜的一种，是蜜蜂采集油菜花的花粉和花蜜酿制而成的蜂蜜，具有油菜花的香气，味道甜润，极易结晶，对血压调节和改善心肌功能有一定的作用，是我国产量最大、最稳定的的蜜种。目前，随着居民生活水平的不断提高，蜂蜜的需求量不断增加，一些不法商家为了获得更高的利润，将低价蜂蜜掺入高价蜂蜜中进行售卖，严重损害了消费者的利益。油菜蜜因其产量大、价格低的特点成为不法商家掺杂的首选，如将其掺入洋槐蜜、椴树蜜、荆条蜜等蜂蜜中来出售。因此，建立一种有效、快速的鉴别油菜蜜的方法是我们目前急需解决的问题。

近年来，通过检测特征标志物来进行蜜种鉴别已成为一种常用的方法。本研究团队在先前研究中发现葫芦巴碱在油菜蜜中的含量远高于其他蜜种，可作为油菜蜜的特征成分对其进行鉴别。葫芦巴碱（trigonelline）是从豆科植物葫芦巴的干燥种子中分离的一种水溶性的生物碱，具有抑制肥胖、调脂、抗氧化、抗炎和神经保护等多种生物学功效。目前，葫芦巴碱的测定方法主要有薄层色谱法（TLC）、高效液相色谱法（HPLC）、高效液相色谱-串联质谱法（HPLC-MS/MS）、毛细管电泳法（CE）和核磁共振法（NMR）等。其中，高效液相色谱法是最常用的检测方法，具有分离效率较高、操作简单，适合大批量样品检测的优点。



HPLC-MS/MS 采用多反应检测(MRM)模式进行测定,提高了目标物检测的灵敏度和特异性。本研究团队前期对蜂蜜样品进行溶解稀释后直接进行 HPLC-MS/MS,实现了蜂蜜中葫芦巴碱的快速测定,但该方法由于没有进行净化操作,导致仪器容易受到污染,且高倍数稀释降低了检测的灵敏度,同时基质效应也导致葫芦巴碱检测的准确度相对较差。

本研究团队对蜂蜜中葫芦巴碱测定的 HPLC-MS/MS 方法进行了进一步的改进和优化,通过固相萃取法对目标物进行富集和净化,采用同位素稀释法消除基质效应的影响,提高了方法的准确度,实现了蜂蜜中葫芦巴碱含量的快速和高灵敏检测,对该技术进行标准化,将会为油菜蜜的鉴别和品质评价、蜂蜜掺杂鉴别等提供有效技术支持。

### 1.3 主要起草过程

2022 年该标准获得立项之后,全国蜂产品标准化委员会(原全国蜂产品标准化工作组)启动了起草组征集工作,牵头单位秦皇岛海关技术中心与中国蜂产品协会等成立标准化工作小组,确定了与协作单位的任务分工,制定了标准的技术路线和完成进度计划,通过对检测方法的不断摸索和改进,进行了方法的灵敏度、回收率和精密度等方面的验证,并结合大量实际样品测定结果,逐步形成稳定可靠的检测方法,保证检测结果的可靠性,满足蜂蜜中葫芦巴碱含量的检测需求。

标准制定具体过程(含计划)如下:

2022.07-2022.12: 液相色谱-质谱/质谱法的进一步优化和完善,确定最优色谱、质谱条件和检测参数。

2023.01-2023.03: 样品前处理条件选择和优化,包括提取条件、净化条件等。

2023.04-2023.06: 方法室内验证,包括方法线性、定量限、实际样品添加回收率和精密度等;方法应用;形成标准征求意见稿。

2023.07- : 进行方法室间验证;标准征求意见;标准征求意见并汇总,形成标准送审稿;标准审查、修改与报批等。

## 二、标准编制原则、主要内容及其确定依据

### 2.1 编制原则

本标准的编制按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第 1 部分:标准的结构和编写规则》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分:试验方法标准》的要求进行编写制订。

## 2.2、主要内容说明及其确定依据

### 2.2.1 方法的技术参数选择与优化

#### 1) 前处理条件的选择和优化

①固相萃取柱: 选用固相萃取法净化样品, 常用的固相萃取柱为强阳离子类型, 如 MCX, 本研究选 MCX 柱进行净化。②提取溶剂和洗脱溶剂: 由于蜂蜜水溶液本身酸性特征, 不加甲酸即可实现目标物在 SPE 柱上的良好吸附, 考虑到加入一定量甲酸有利于提取体系稳定, 可以适用于不同酸度的蜂蜜样品, 因而, 选择 0.1% 的甲酸水溶液作为提取溶剂。氨水甲醇是 MCX 固相萃取柱的常用洗脱试剂, 本研究评估了不同浓度 (0.1%、0.5%、1.0%、2.0%、5.0%) 的氨水甲醇溶液对蜂蜜中葫芦巴碱的洗脱效果。结果表明, 采用 2% 氨水甲醇 (V/V) 作为洗脱溶剂效果很好。③淋洗条件和洗脱条件: 经过优化确定了淋洗条件为水 3 mL、甲醇 3 mL, 洗脱条件为 2% 氨水甲醇溶液 3 mL。

#### 2) 仪器条件的选择和优化

①色谱柱: 选用 ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱 (2.1mm×100 mm, 1.7 μm)。本研究发现葫芦巴碱在 HILIC 色谱柱上的峰形尖锐, 分离效果良好, 故以此作为分析柱。分离效果示意图见图 1。

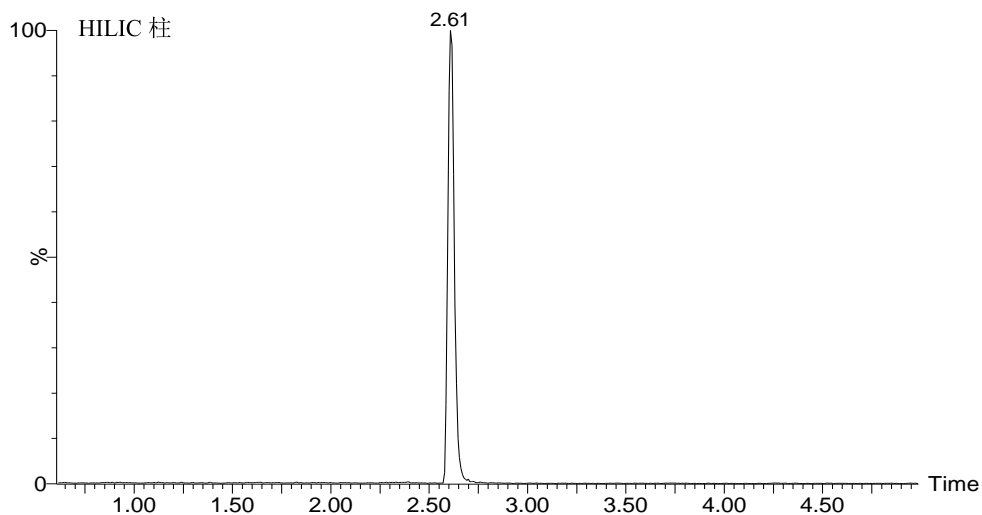


图 1 HILIC 柱葫芦巴碱分离效果图

②流动相: 对比了甲醇和乙腈做为流动相条件下葫芦巴碱的分离效果, 结果 (图 2) 表明, 在 HILIC 色谱柱上, 采用甲醇作为有机相时 (图 2a、b), 目标物均峰形展宽, 拖尾严重。而当乙腈作为有机相, 目标物的峰形和灵敏度均较好。进一步对比发现, 水相为 5 mmol/L 乙酸铵溶液 (图 2c) 时, 目标物响应明显高于 0.1% 甲酸水溶液 (图 2d), 故本研究采用乙

腈-5 mmol/L 乙酸铵溶液作为流动相。

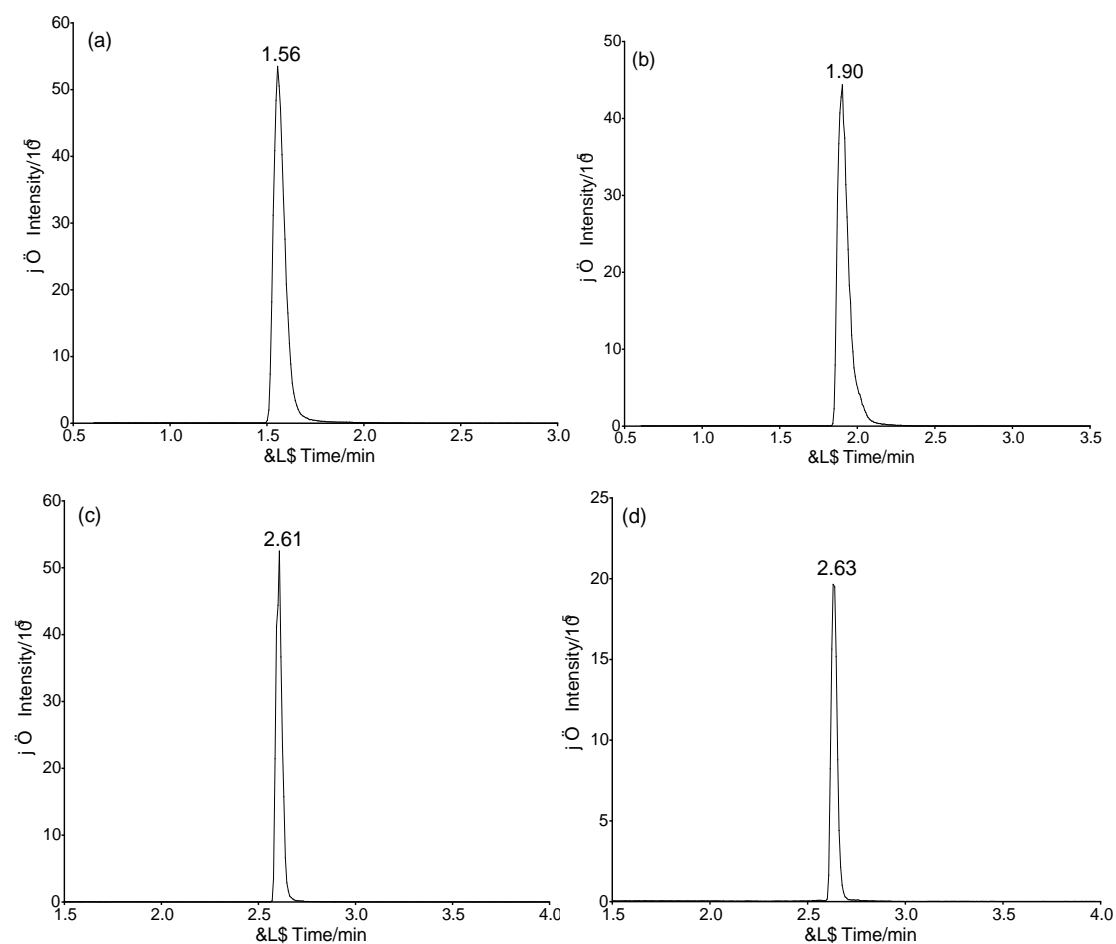


图 2 不同流动相条件下葫芦巴碱的峰形及响应

### 2.2.2 液相色谱-质谱条件

液相色谱参考条件：

- a) 色谱柱：ACQUITY UPLC BEH HILIC 柱（2.1 mm×100 mm，1.7 μm）或相当者；
- b) 流动相：乙腈+5 mmol/L 乙酸铵溶液（梯度洗脱，见表 1）；
- c) 流速：0.3 mL/min；
- d) 柱温：40 °C；
- e) 进样量：2 μL。

表 1 梯度洗脱条件（A，乙腈；B，5 mmol/L 乙酸铵溶液）

时间 (min)	流速 (mL/min)	A(%)	B(%)
0.0	0.3	90	10

时间 (min)	流速 (mL/min)	A(%)	B(%)
0.5	0.3	90	10
1.5	0.3	50	50
3.5	0.3	50	50
4.0	0.3	90	10
6.0	0.3	90	10

质谱参考条件:

- a) 离子源: 电喷雾离子源 (ESI);
- b) 扫描方式: 正离子扫描;
- c) 检测方式: 多反应监测 (MRM);
- d) 离子源温度: 120 °C;
- e) 脱溶剂温度: 350 °C;
- f) 脱溶剂气体流速: 650 L/hr;
- g) 锥孔气流速: 50 L/hr;
- h) 毛细管电压: 3 kV;
- i) 葫芦巴碱的 MRM 参数见表 2。

表 2 葫芦巴碱的多反应监测 (MRM) 参数

化合物名称	定性离子对 ( <i>m/z</i> )	定量离子对 ( <i>m/z</i> )	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
葫芦巴碱	138.0/78.0	138.0/92.0	50	22
	138.0/92.0			20
葫芦巴碱-d3	141.0/97.1	141.0/95.1	50	20
	141.0/95.1			20

### 2.2.3 定性检测

在上述液相及质谱条件下, 葫芦巴碱和葫芦巴碱-d3 的保留时间均为 2.61 min。

每种被测组分选择一个母离子, 2 个子离子, 在相同实验条件下, 试样溶液中葫芦巴碱和葫芦巴碱-d3 的保留时间与标准溶液中相应组分的保留时间一致, 相对偏差在±2.5%之内, 所有离子对都出现, 且相对离子丰度与浓度相当的标准溶液相对离子丰度一致, 其允许偏差应符合表 3 的要求。

表 3 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%~50%	> 10%~20%	≦ 10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

## 2.2.4 定量检测

针对复杂样品基质的检测，HPLC-MS/MS 常存在基质效应，采用同位素内标法定量可降低或消除基质效应，提高方法的准确性和精密度。本标准选用葫芦巴碱-d3 为同位素内标，其性质与目标物相似，在前处理过程中的损失和受基质影响程度相近，可以有效降低或消除基质效应，提高定量结果的准确性。

## 三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效益、社会效益和生态效益

### 3.1 方法室内验证及分析

对本标准方法的线性、灵敏度、添加回收率和精密度进行了考察，以保证方法准确可靠，具体验证结果如下：

#### 3.1.1 方法线性和检测限

以不低于 3 倍信噪比对应浓度为方法检出限，以不低于 10 倍信噪比对应浓度为方法定量限（测定低限），确定方法检出限为 0.075 mg/kg，定量限为 0.25 mg/kg。

以 80%甲醇-水溶液为溶剂配制葫芦巴碱浓度分别为 10、20、50、100、200、500 ng/mL 的系列标准工作液，同位素内标浓度为 100 ng/mL，HPLC-MS/MS 进行测定，以目标物的质量浓度为横坐标，以标准品与同位素内标物峰面积比值  $y$  为纵坐标，绘制葫芦巴碱的标准溶液工作曲线，得到化合物的线性范围、线性方程以及相关系数。结果表明，葫芦巴碱的线性相关系数 ( $R^2$ ) = 0.9993，表明目标物的线性关系良好。

葫芦巴碱标准溶液的多离子反应监测 (MRM) 色谱图见图 3，曲线方程和标准曲线见图 4。

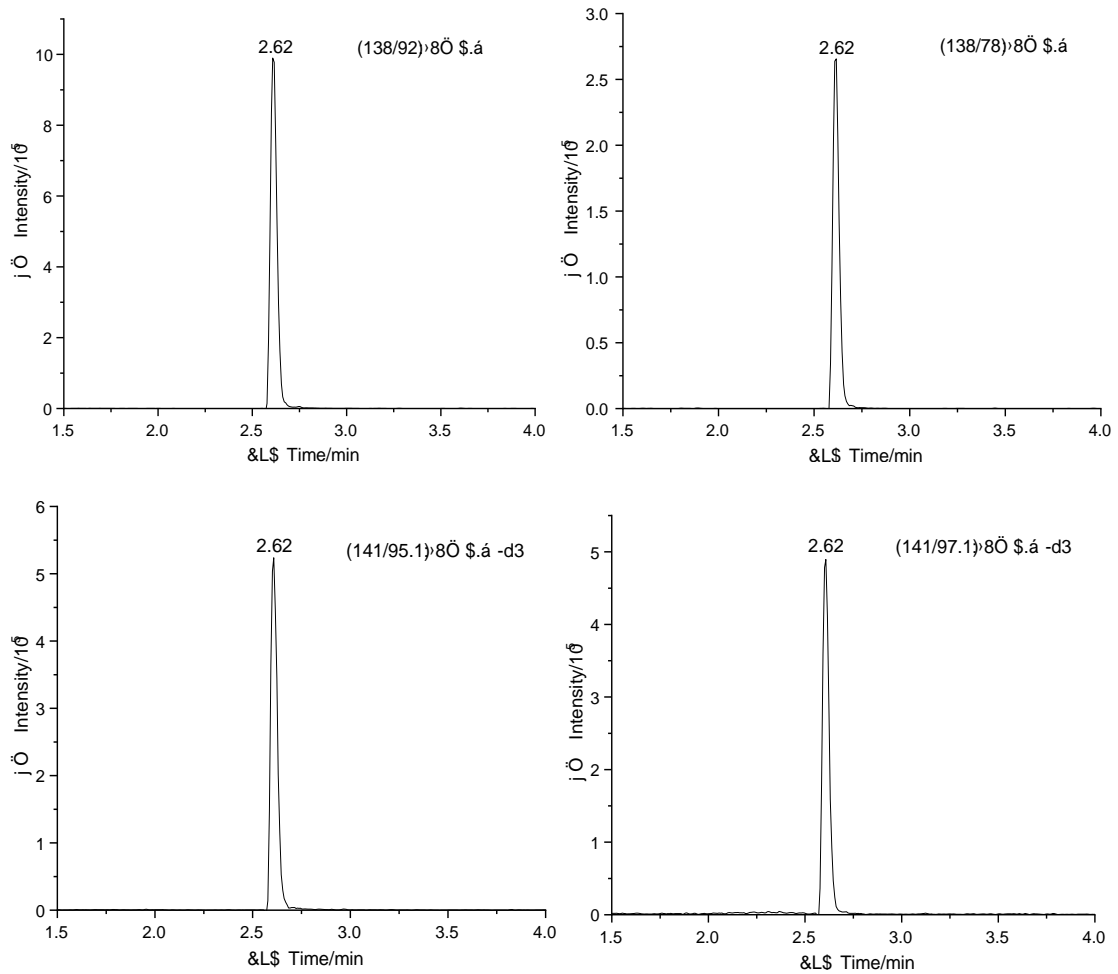


图 3 葫芦巴碱(500 ng/mL)和葫芦巴碱-d3(100 ng/mL)的多反应监测 (MRM) 色谱图

Compound name: Tri  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999664$ ,  $r^2 = 0.999328$   
 Calibration curve:  $0.370793 * x + 0.349459$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

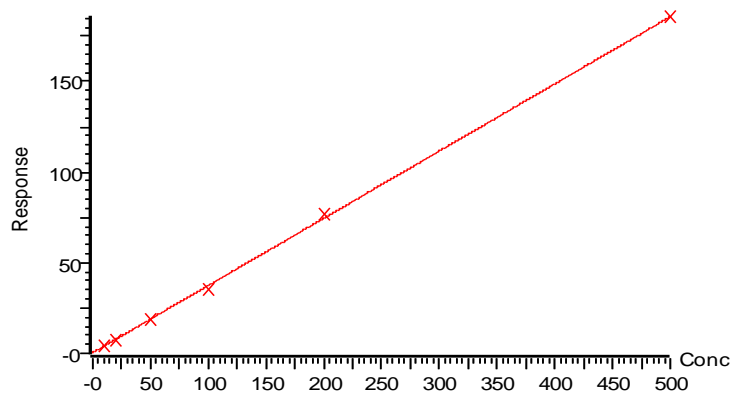


图 4 葫芦巴碱的线性及标准曲线

### 3.1.2 方法的回收率和精密度

采用添加回收实验对方法的准确度进行考察, 由于实际样品中均含有葫芦巴碱, 因此我们采用成分相近的果葡糖浆作为空白样品进行低、中、高水平的加标回收实验。此外, 进一步选择洋槐蜜、枣花蜜、椴树蜜、荆条蜜、百花蜜、咖啡蜜、油菜蜜 7 个蜜种的样品, 根据其本底含量, 进行适量浓度的添加实验。

对空白样品, 在 0.25、0.5、2.5 mg/kg 3 个添加浓度下, 每个浓度平行测定 6 次, 按上述方法进行前处理和仪器检测, 计算回收率与相对标准偏差。结果如表 4 所示, 方法的加标回收率在 97.8%~101.8%之间, 相对标准偏差 (RSD) 范围为 0.5%~4.3%。

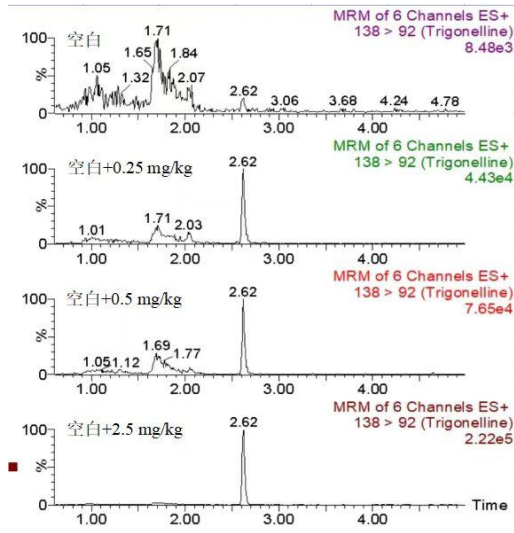
代表性蜂蜜样品按照上述方法进行处理和测定, 并依据其含量水平进行适量浓度添加, 每个添加浓度平行测定 4 次, 其回收率和相对标准偏差见表 5。结果表明实际样品中葫芦巴碱的平均回收率在 87.3%~106.3%, 相对标准偏差 (RSD) 范围为 0.9%~6.7%。说明本方法的回收率和精密度良好, 适用于蜂蜜中葫芦巴碱的测定。空白样品和代表性样品的不同浓度的添加样品以及定量离子色谱图见图 5。

表 4 空白样品中葫芦巴碱的添加回收率和精密度数据( $n=6$ )

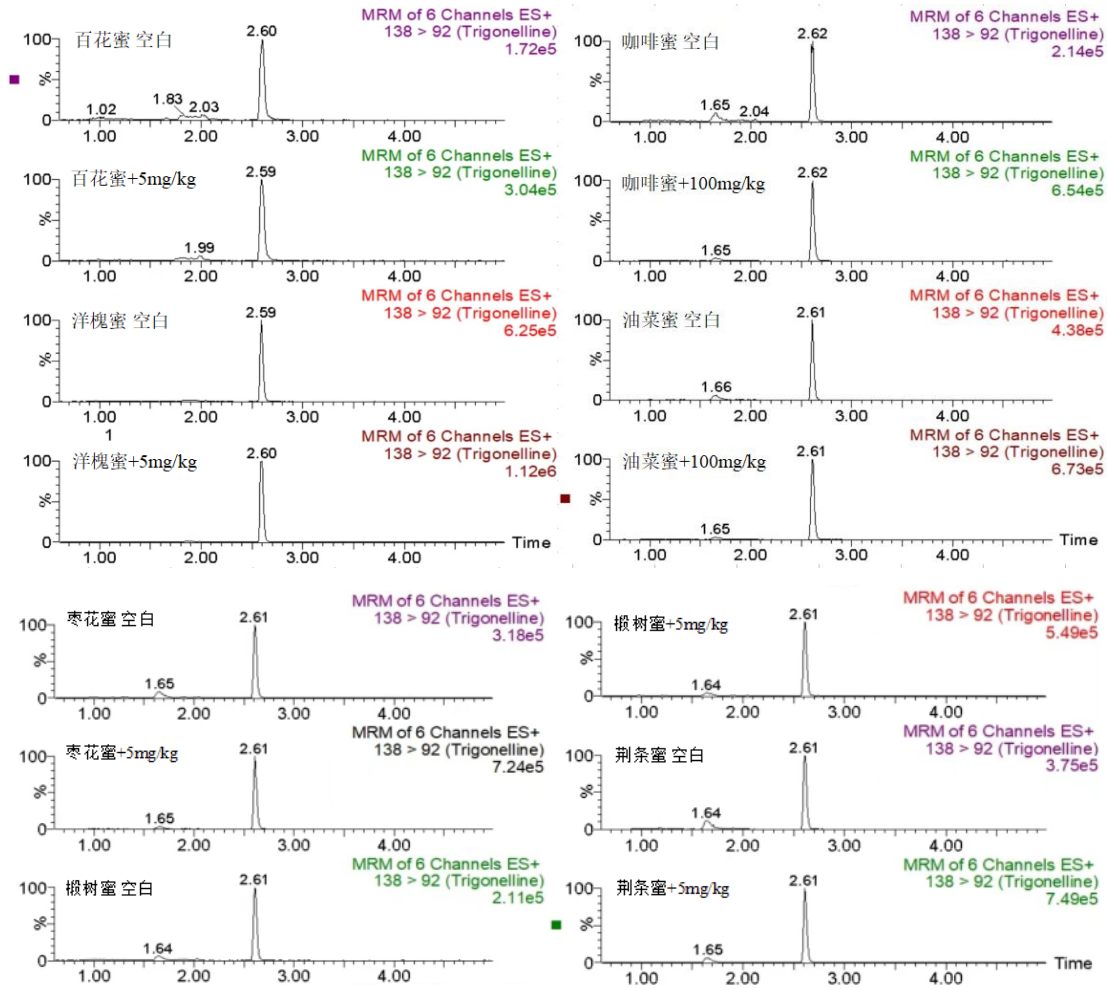
化合物 Compound	加标量 Spiked level/( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	平均回收率 Average Recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
葫芦巴碱 Trigonelline	0.25	101.8	4.3
	0.5	97.8	1
	2.5	101.1	0.5

表 5 代表性样品中葫芦巴碱的添加回收率和精密度数据( $n=4$ )

样品类型 Sample type	本底值 Content (mg/kg)	加标量 Spiked level (mg/kg)	平均回收率 Average Recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
洋槐蜜 Acacia honey	3.1	5	101.6	6.7
枣花蜜 Jujube honey	4.6	5	95.8	5.5
椴树蜜 Linden honey	2.7	5	95.7	0.9
荆条蜜 Vitex honey	5.1	5	93.3	0.9
百花蜜 Multifloral honey	5.7	5	87.3	1.8
咖啡蜜 Coffee honey	60.7	100	106.3	2.7
油菜蜜 Rape honey	103.5	100	101.3	2.5



(A)



(B)

图 5 空白及添加样品 (A) 和代表性单花种蜂蜜及添加样品 (B) 中葫芦巴碱的定量离子色谱图



### 3.2 方法室间验证及分析

进行中……

### 3.3 方法应用

采用本标准方法对 14 种不同蜜源植物共 274 批蜂蜜样品中的葫芦巴碱进行测定。包括油菜蜜 60 批，咖啡蜜 8 批，洋槐蜜 30 批，荆条蜜 30 批，椴树蜜 30 批，荔枝蜜 30 批，枣花蜜 30 批，百花蜜 8 批，荞麦蜜 8 批，葵花蜜 8 批，苕子蜜 8 批，紫云英蜜 8 批，橡胶蜜 8 批，龙眼蜜 8 批。结果表明，葫芦巴碱在所有蜂蜜样品中均有检出，且在油菜蜜和咖啡蜜中的含量远高于其他蜜种，平均含量分别为 77.8 mg/kg 和 55.5 mg/kg，最高含量分别为 91.7 mg/kg 和 58.3 mg/kg。而葫芦巴碱在洋槐蜜、荆条蜜、椴树蜜、枣花蜜等 12 种蜂蜜样品中的含量均低于 10 mg/kg；因此依据葫芦巴碱的含量可以实现油菜蜜或咖啡蜜与其他蜜种的区分。

本标准所述蜂蜜中葫芦巴碱含量测定的液相色谱-串联质谱法，灵敏度高、精密度好，能够满足蜂蜜中葫芦巴碱的检测要求。本标准方法和实际样品检测结果可以为油菜蜜鉴别和质量评价提供技术支撑，有利于促进蜂产品行业健康稳定和高质量发展。

### 3.4 预期的经济效益、社会效益和生态效益

本标准的实施，将为蜂蜜尤其是油菜蜜的鉴别和质量评价提供新的技术手段，有利于促进蜂业高质量发展。

## 四、与国际、国外同类标准技术内容的对比情况，或者与测试的国外样品、样机的有关数据对比情况

国外尚无相关标准。

## 五、以国际标准为基础的起草情况，以及是否合规引用或者采用国际国外标准，并说明未采用国际标准的原因

无。

## 六、与有关法律、行政法规及相关标准的关系

本标准属于蜂蜜标准体系中“检测方法”大类。

本标准方法的实施在一定程度上为强制性国家标准《GB 14963-2011 食品安全国家标准 蜂蜜》和推荐性行业标准《GH/T 18796-2012 蜂蜜》中蜂蜜的定义和质量评价提供技术方法支撑。

#### **七、重大分歧意见的处理经过和依据**

无。

#### **八、涉及专利的有关说明**

无。

#### **九、实施标准的要求，以及组织措施、技术措施、过渡期和实施日期的建议等措施建议**

建议本标准批准发布 3 个月后实施。

#### **十、其他应当说明的事项**

无。

### 主要参考文献:

- [1]. GB/T 14963-2011 食品安全国家标准 蜂蜜[S].
- [2]. Schanzmann H, Augustini A L R M, Sanders D, Dahlheimer M, Wigger M, Zech P, Sielemann S. Differentiation of Monofloral Honey Using Volatile Organic Compounds by HS-GCxIMS[J]. *Molecules*. 2022, 27(21): 7554.
- [3]. 乔江涛. 四种单花蜜中标志性成分鉴定及真实性评价[D]. 中国农业科学院, 2019
- [4]. 崔宗岩, 黄学者, 贾英杰, 母健, 贾光群, 李亮, 曹彦忠, 张进杰. 一种葫芦巴碱的检测方法及其在蜂蜜鉴别中的应用[P].2022-01-18
- [5]. 万子玉, 赖月月, 颜雨豪, 李巧, 李敏. 基于 HPLC-QQQ-MS 法测定分析熏硫半夏中葫芦巴碱的含量[J]. *中药与临床*. 2022, 13(03): 7-11
- [6]. 聂姗姗, 付凌燕, 孙立丽, 聂焱. 酒炒葫芦巴中葫芦巴碱的含量测定[J]. *智慧健康*. 2020, 6(14): 31-32
- [7]. 邱碧丽, 代丽玲, 刘超, 张绍龙, 杨艳. HPLC 法同时测定云南小粒咖啡中 4 种成分的含量[J]. *安徽农业科学*. 2018, 46(34): 173-175
- [8]. Perrone D, Donangelo C M, Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Food Chemistry*. 2008, 110(4): 1030-1035.
- [9]. Cangeloni L, Bonechi C, Leone G, Consumi M, Andreassi M, Magnani A, Rossi C, Tamasi G. Characterization of Extracts of Coffee Leaves (*Coffea arabica* L.) by Spectroscopic and Chromatographic/Spectrometric Techniques[J]. *Foods*. 2022, 11(16): 2495.
- [10]. 黄端华, 张银平, 刘薇, 张兰. 毛细管电泳法用于葫芦巴中活性物质的分离和测定[J]. *福州大学学报(自然科学版)*. 2013, 41(01): 109-114
- [11]. Elisabetta S, Claudia F, Stefano M. Preliminary Characterization of Monofloral *Coffea* spp. Honey: Correlation between Potential Biomarkers and Pollen Content[J]. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2015, 63(25): 5858-5863.
- [12]. Trinh N T N, Tuan N N, Thang T D, et al. Chemical Composition Analysis and Antioxidant Activity of *Coffea robusta* Monofloral Honeys from Vietnam[J]. *FOODS*, 2022, 11(3), 388.