ICS 67.220
CCS X 04

T/BPMA

北 京 预 防 医 学 会 团 体 标 准

T/BPMA 29—2024

火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of higenamine and tretoquinol in hotpot seasoning—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

2024－07－30 发布　　2024－07－30 实施

北京预防医学会　　发 布

全国团体标准信息平台

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。

本文件由北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）提出。

本文件由北京预防医学会归口。

本文件起草单位：北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）、北京市疾病预防控制中心、北京市延庆区疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：王建凤、冯月超、刘艳、郭巧珍、姚凯、张晶、林强。

全国团体标准信息平台

火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚的测定
液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚液相色谱-串联质谱的测定方法。

本文件适用于火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚的定性定量测定。

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 方法原理

火锅底料中的去甲乌药碱和曲托喹酚，用含5%甲酸的乙醇溶液提取，经十八烷基键合硅（C_{18}）、石墨化碳黑（GCB）以及加强基质脂类去除剂（EMR）组合填料净化后，采用液相色谱-串联质谱法测定，同位素内标法定量。

5 试剂和材料

5.1 试剂

除另有说明外，所用试剂均为色谱纯，水为GB/T 6682 规定的一级水。

5.1.1 甲醇（CH_3OH）。

5.1.2 乙醇（C_2H_5OH）。

5.1.3 甲酸（CH_3COOH）：纯度≥88%。

5.1.4 甲酸铵（$HCOONH_4$）。

5.1.5 乙腈（CH_3CN）。

5.1.6 去甲乌药碱（$C_{16}H_{17}NO_3$，CAS 号：5843-65-2）：纯度大于等于 99%。

5.1.7 去甲乌药碱-D_4（$C_{16}H_{13}D_4NO_3$，CAS 号：2249814-83-1）：纯度大于等于 99%。

5.1.8 曲托喹酚盐酸盐（$C_{19}H_{24}ClNO_5$，CAS 号：18559-59-6）：纯度大于等于 99%。

5.1.9 曲托喹酚盐酸盐-D_9（$C_{19}H_{15}D_9ClNO_5$，CAS 号：18559-63-2）：纯度大于等于 99%。

5.1.10 含 5%甲酸的乙醇溶液：移取 12.5 mL 甲酸（5.1.3），用乙醇（5.1.2）定容至 250 mL，混匀。

5.1.11 10 mmol/L 甲酸铵水溶液（含 0.1%甲酸）：称取 0.315 g 甲酸铵（5.1.4），用水溶解，向其中加入 0.5 mL 甲酸（5.1.3），定容至 500 mL，混匀。

5.1.12 复溶溶液：移取甲醇（5.1.1）和 10 mmol/L 甲酸铵水溶液（含 0.1%甲酸）（5.1.11）各 50.0 mL，混匀。

5.1.13 标准储备溶液：分别准确称取适量标准物质去甲乌药碱（5.1.6）、去甲乌药碱-D_4（5.1.7）、曲托喹酚盐酸盐（5.1.8）、曲托喹酚盐酸盐-D_9（5.1.9），用甲醇溶解并定容于 10 mL 容量瓶，按其纯度及有效成分折算，配制成 1000 μg/mL 标准储备溶液，-18 ℃或以下避光保存，有效期 3 个月。

5.1.14 混合标准储备溶液：分别准确移取去甲乌药碱和曲托喹酚两种标准储备液各 100 μL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成 10 μg/mL 的混合标准储备溶液，有效期 1 个月。

5.1.15 混合标准中间溶液：准确移取混合标准储备液（5.1.14）100 μL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，配制成 100 ng/mL 的混合标准中间溶液，现用现配。

5.1.16 混合内标标准储备溶液：准确移取去甲乌药碱-D_4和曲托喹酚-D_9标准储备液各 100 μL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，得到 10 μg/mL 混合内标标准储备溶液，有效期 1 个月。

5.1.17 混合内标标准工作溶液：准确移取 10 μg/mL 混合内标标准储备溶液（5.1.16）1.0 mL 于 10 mL 容量瓶中，用甲醇定容至刻度，得到 1 μg/mL 混合内标标准工作溶液，现用现配。

5.1.18 系列标准工作溶液：取适量混合标准中间液（5.1.15）和混合内标标准工作液（5.1.17），用复溶溶液（5.1.12）稀释配制成浓度为 0.1 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL 的系列标准工作溶液，其中内标浓度为 5 ng/mL，现用现配。

5.2 材料

5.2.1 石墨化碳黑（GCB，120 μm~400 μm）。

5.2.2 十八烷基键合硅胶（C_{18}，40 μm~60 μm）。

5.2.3 加强基质脂类去除剂（EMR）。

5.2.4 微孔滤膜：有机系，尼龙，0.22 μm。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱-三重四极杆串联质谱仪，配备有电喷雾电离源（ESI）。

6.2 离心机：转速不低于 8000 r/min。

6.3 氮气吹干仪。

6.4 振荡器。

6.5 涡旋混合器。

6.6 超声波清洗器。

6.7 分析天平：感量 0.000 01 g 和 0.01 g。

7 试样制备和保存

7.1 试样制备

取代表性样品 500 g，用搅碎机充分搅碎混匀（块状样品需先在 60 ℃水浴中融化后再用搅碎机充分

搅碎混匀）均分成两份作为试样，并标明标记。

7.2 试样保存

将试样于-18 ℃及以下保存。

8 测定步骤

8.1 样品的处理

8.1.1 提取

称取试样 2 g（精确到 0.01 g）于 50 mL 具塞螺旋盖聚丙烯离心管中，加入混合内标工作溶液（5.1.17）100 μL，加入 20 mL 含 5%甲酸的乙醇溶液（5.1.10），涡旋混匀，振荡提取 30 min，8000 r/min 离心 5 min，取上清液，待净化。

8.1.2 净化

移取 2.0 mL 8.1.1 中的待净化上清液于 10 mL 净化管中，加入 65 mg GCB（5.2.1）、65 mg C_{18}（5.2.2）和 65 mg EMR（5.2.3），涡旋混合，8000 r/min 离心 5 min，移取 1.0 mL 上清液，40 ℃氮气吹至近干，用复溶溶液（5.1.12）定容至 1.0 mL，涡旋混合 30 s，用微孔滤膜（5.2.4）过滤，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.2 空白试验

除不加试样外，其他步骤均按 8.1 进行。

8.3 仪器分析条件

8.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：高强度硅胶颗粒色谱柱（2.1 mm×100 mm, 1.8 μm）或性能相当者；

b) 柱温：30 ℃；

c) 进样量：5 μL；

d) 流速：0.3 mL/min；

e) 流动相：A 相为乙腈（5.1.5），B 相为 10 mmol/L 甲酸铵水溶液（含 0.1%甲酸）（5.1.11），梯度洗脱条件见表 1；

f) 被测物及内标物的参考保留时间见表 2。

表1 梯度洗脱条件

时间（min）	A（%）	B（%）
0.0	3	97
1.5	3	97
5.5	95	5
5.6	3	97
7.5	3	97

8.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

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：多重反应监测（MRM）；

d) 毛细管电压：3.0 kV；

e) 离子源温度：150 ℃；

f) 脱溶剂温度：500 ℃；

g) 脱溶剂气流量：800 L/h；

h) 锥孔气流量：50 L/h；

i) 碰撞气体：氩气；

j) 去甲乌药碱和曲托喹酚的其它质谱参数见表 2。

表2 去甲乌药碱和曲托喹酚及其内标的保留时间及质谱条件参考值

化合物	保留时间（min）	母离子（m/z）	子离子（m/z）	锥孔电压（V）	碰撞能量（eV）
去甲乌药碱	3.97	272.4	107.2*	40	20
			161.2		18
去甲乌药碱-D_4	3.97	276.5	108.3*	40	20
			164.3		18
曲托喹酚	4.44	346.5	164.2*	6	14
			149.1		5
曲托喹酚-D_9	4.43	355.6	164.1*	12	16
			137.1		46
注：加 * 的离子用于定量。					

8.4 定性判定

在相同试验条件下，试样溶液中待测物的保留时间应与系列标准溶液中待测物的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内；试样谱图中待测物监测离子对的相对离子丰度与浓度接近的系列标准溶液中对应的监测离子对的相对离子丰度，若最大允许偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定样品中存在对应的待测物。

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（含）	10~20（含）	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

8.5 定量测定

将试样溶液和系列标准工作溶液上机分析，以标准工作液中被测组分的浓度为横坐标，被测组分和对应内标的色谱峰面积之比为纵坐标，绘制标准工作曲线，用标准工作曲线对试样进行内标法定量。试样溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。去甲乌药碱、曲托喹酚以及内标标准溶液的特征离子质量色谱图见附录 A。

9 结果计算和表述

结果按式（1）计算：

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

式中:

X—— 试样中被测组分含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

m—— 试样的称样量，单位为克（g）；

c—— 从标准工作曲线得到的被测组分溶液浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V—— 提取液的体积，单位为毫升（mL）；

1000——换算系数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留一位小数。

10 方法准确度、精密度和灵敏度

10.1 方法检出限和定量限

去甲乌药碱和曲托喹酚的检出限均为 0.3 μg/kg，定量限均为 1.0 μg/kg。

10.2 准确度和精密度

本方法被测物在 1.0 μg/kg，2.0 μg/kg 和 10.0 μg/kg 添加浓度水平上的回收率和相对标准偏差见附录 B。

附录 A
（资料性）

去甲乌药碱和曲托喹酚以及内标标准品的特征离子质量色谱图

曲托喹酚、曲托喹酚-D_9、去甲乌药碱、去甲乌药碱-D_4的特征离子质量色谱图见 A.1~A.4。

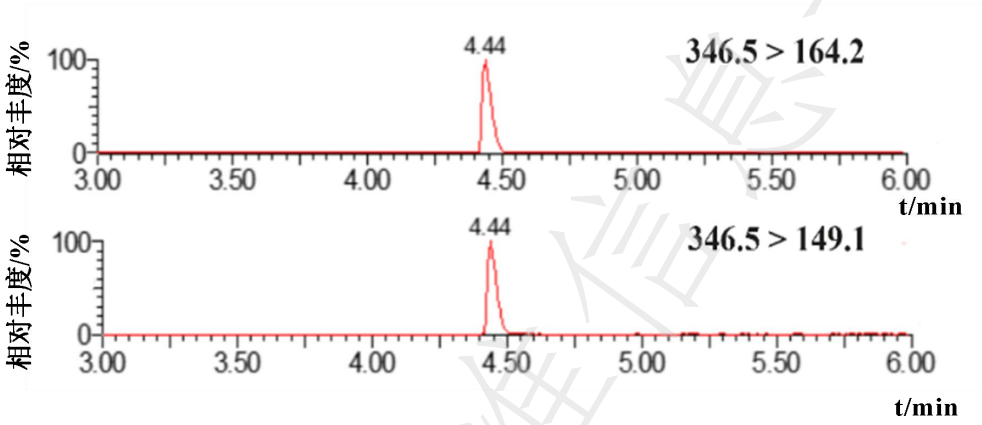

图 A.1 曲托喹酚的特征离子质量色谱图（10 ng/mL）

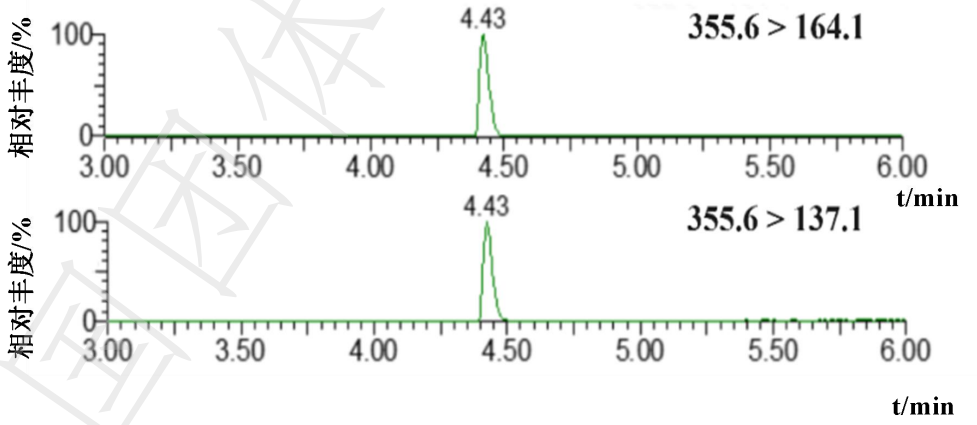

图 A.2 曲托喹酚-D_9的特征离子质量色谱图（5 ng/mL）

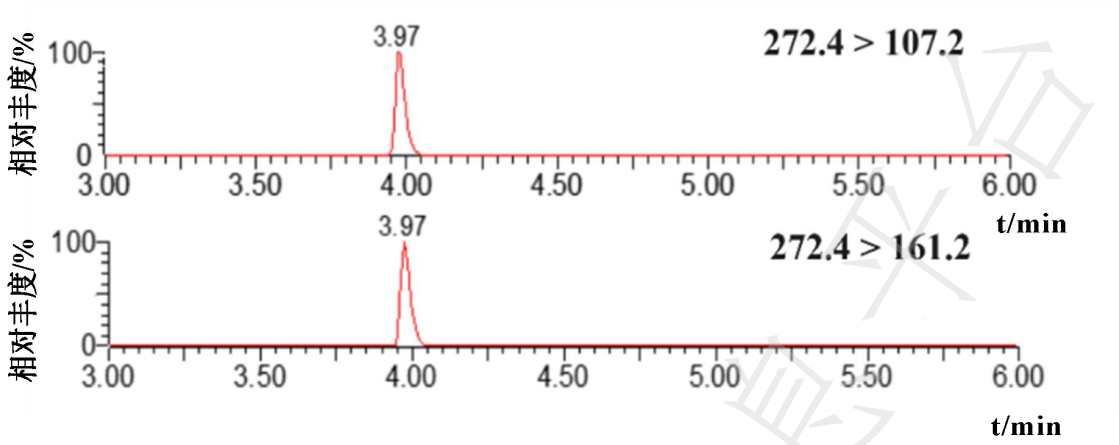

图 A.3 去甲乌药碱的特征离子质量色谱图（10 ng/mL）

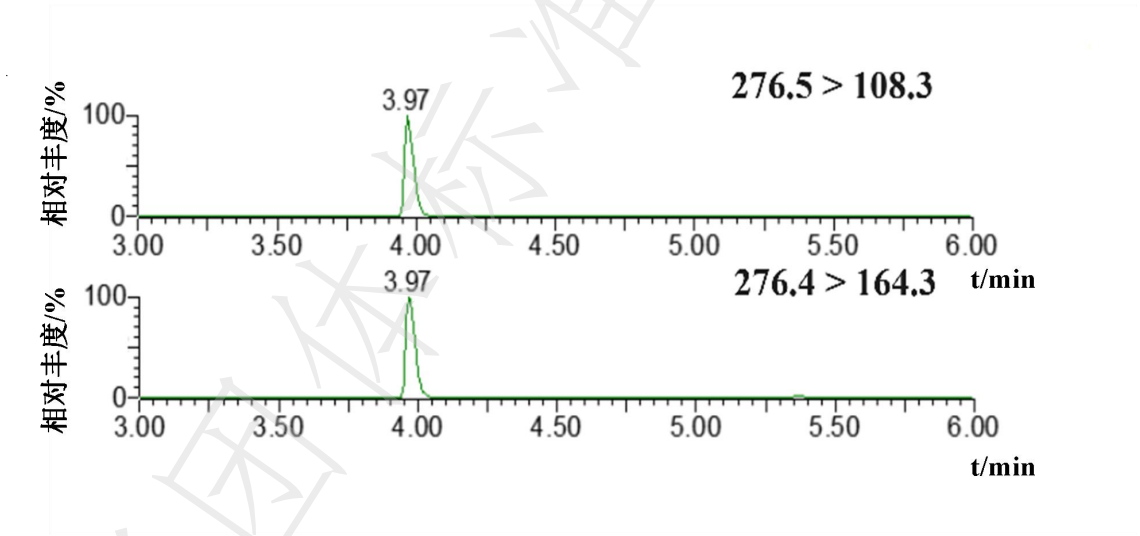

图 A.4 去甲乌药碱-D_4的特征离子质量色谱图（5 ng/mL）

附录 B
（资料性）
火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚的回收率和相对标准偏差

清汤、清油、牛油三种基质添加不同浓度水平时的加标平均回收率和相对标准偏差结果(RSD)见表 B.1。

表 B.1 火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚的回收率和相对标准偏差结果（*n*=6）

样品基质	曲托喹酚			去甲乌药碱		
	添加水平（μg/kg）	平均回收率（%）	RSD (%)	添加水平（μg/kg）	平均回收率（%）	RSD (%)
清汤	1.0	116	2.0	1.0	106	7.2
	2.0	101	4.2	2.0	102	8.1
	10.0	101	11.6	10.0	100	10.9
清油	1.0	117	1.9	1.0	113	3.8
	2.0	110	2.0	2.0	99.8	3.5
	10.0	106	7.1	10.0	96.0	6.7
牛油	1.0	111	4.4	1.0	104	4.4
	2.0	87.1	4.8	2.0	86.2	6.8
	10.0	91.0	3.7	10.0	88.2	5.6

全国团体标准信息平台