

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××-202×

饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相 色谱-串联质谱法

Determination of sanguinarine and chelerythrine in feeds—Liquid
chromatography-tandem mass spectrometry

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 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。

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。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：上海市质量监督检验技术研究院、上海市动物疫病预防控制中心。

本文件主要起草人：雷涛、张婧、郑国建、王博、葛宇、曹莹、陆志芸、吴剑平、卞华、严凤。

饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中血根碱、白屈菜红碱的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定。

本文件中血根碱、白屈菜红碱的检出限为0.002 mg/kg，定量限为0.005 mg/kg。

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

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4.1 原理

试样中的血根碱、白屈菜红碱经0.2%盐酸乙腈溶液提取，固相萃取柱净化后，用高效液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水：GB/T 6682，一级。

4.2.2 甲醇：色谱纯。

4.2.3 乙腈：色谱纯。

4.2.4 0.1%甲酸溶液（体积分数）：移取1 mL 甲酸，加水稀释至1 000 mL，混匀。

4.2.5 0.2%盐酸乙腈溶液（体积分数）：移取2 mL 盐酸，加乙腈稀释至1 000 mL，混匀。

4.2.6 标准储备溶液（0.5 mg/mL）：称取血根碱（ $C_{20}H_{14}NO_4$ ，CAS：2447-54-3，纯度 $\geq 98\%$ ）和白屈菜红碱（ $C_{21}H_{18}NO_4$ ，CAS：34316-15-9，纯度 $\geq 98\%$ ）标准品各50 mg（精确至0.1 mg），分别置于100 mL容量瓶中，用甲醇溶解并定容，混匀。-18℃及以下保存，有效期6个月。

4.2.7 标准中间溶液（1 μ g/mL）：分别准确移取0.2 mL标准储备溶液（4.2.6）于100 mL容量瓶中，用盐酸乙腈溶液（4.2.5）稀释并定容，混匀。临用现配。

4.2.8 标准系列溶液：分别准确移取适量标准中间溶液（4.2.7）于容量瓶中，用盐酸乙腈溶液（4.2.5）稀释并定容，混匀，配制成质量浓度分别为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 标准系列溶液。临用现配。

4.2.9 含极性基团的反相聚合物固相萃取柱：500 mg/6 mL，或者相当。

4.2.10 微孔滤膜：孔径为 0.22 μm，有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 液相色谱-串联质谱仪：配电喷雾（ESI）离子源。

4.3.2 分析天平：精度为 0.1 mg。

4.3.3 超声波清洗机。

4.3.4 离心机：转速不低于 9 000 r/min。

4.4 样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎使其全部通过0.425 mm的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g（精确至 0.1 mg），置于 50 mL 离心管中，加入 15 mL 盐酸乙腈溶液（4.2.5），涡旋，超声提取 20 min，9 000 r/min 离心 5 min，将上清液转移至 50 mL 容量瓶中。重复提取 2 次，合并上清液，用盐酸乙腈溶液（4.2.5）定容，混匀，备用。

4.5.2 净化

吸取备用液（4.5.1）约 3 mL 过固相萃取柱（4.2.9）及微孔滤膜（4.2.10），弃去约 1 mL 流出液，收集续滤液，待测。

4.5.3 测定

4.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：C₁₈柱，内径2.1 mm，柱长50 mm，粒径1.7 μm，或性能相当者；

b) 流速：0.3 mL/min；

c) 柱温：35 ℃；

d) 进样量：2 μL；

e) 流动相：A相为0.1%甲酸溶液（4.2.4），B相为乙腈（4.2.3），梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %
0.00	90	10
1.00	90	10

6.00	0	100
8.00	0	100
8.01	90	10
10.00	90	10

4.5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源模式：电喷雾电离，正离子模式（ESI⁺）；
- b) 监测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 电离电压：3.0 kV；
- d) 源温度：150 ℃；
- e) 雾化气：800 L/h；
- g) 雾化器温度：400 ℃；

血根碱、白屈菜红碱多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值见表2。

表2 血根碱、白屈菜红碱多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

待测物名称	监测离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
血根碱	332 > 274 ^a	30	33
	332 > 317	30	30
白屈菜红碱	348 > 332 ^a	30	30
	348 > 304	30	30
^a 为定量离子。			

4.5.3.3 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，分别取标准系列溶液（4.2.8）和试样溶液（4.5.2）上机测定。血根碱、白屈菜红碱标准溶液定量离子对色谱图见附录A。

4.5.3.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液与标准系列溶液（质量浓度相当）中血根碱、白屈菜红碱的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。根据表2选择的监测离子对，比较试样谱图中血根碱、白屈菜红碱监测离子对的相对离子丰度与质量浓度接近的标准系列溶液中监测离子对的相对离子丰度，若偏差不超过表3规定的范围，则可判定为样品中存在血根碱、白屈菜红碱。

表3 定性测定时相对离子丰度最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差	±20	±25	±30	±50

4.5.2.5 定量

以血根碱、白屈菜红碱的质量浓度为横坐标，定量离子对色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于0.99。用标准曲线法进行定量时，试样溶液中血根碱、白屈菜红碱的质量浓度应在标

准曲线的线性范围内。如超出范围,应将试样溶液用盐酸乙腈溶液(4.2.5)稀释后重新测定。单点校准定量时,试样溶液中血根碱、白屈菜红碱的质量浓度与标准溶液的质量浓度相差不超过30%。

4.6 试验数据处理

试样中血根碱、白屈菜红碱含量以质量分数 w_i 计,数值以毫克每千克(mg/kg)表示。多点校准按式(1)计算;单点校准按式(2)计算。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V}{m \times 1000} \times f \cdots \cdots (1)$$

式中:

ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中血根碱、白屈菜红碱的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样提取液定容体积,单位为毫升(mL);

f ——试样溶液中血根碱、白屈菜红碱的质量浓度超出标准曲线的线性范围后,进一步稀释的倍数;

m ——试样的质量,单位为克(g);

1 000——换算系数。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{si} \times V}{A_{si} \times m \times 1000} \times f \cdots \cdots (2)$$

式中:

A_i ——试样溶液中血根碱、白屈菜红碱的峰面积;

ρ_{si} ——标准工作溶液中血根碱、白屈菜红碱的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);

V ——试样提取液定容体积,单位为毫升(mL);

f ——试样溶液中血根碱、白屈菜红碱的质量浓度超出标准曲线的线性范围后,进一步稀释的倍数;

A_{si} ——标准工作溶液中被测组分的峰面积;

m ——试样的质量,单位为克(g);

1 000——换算系数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示,保留三位有效数字。

4.7 精密度

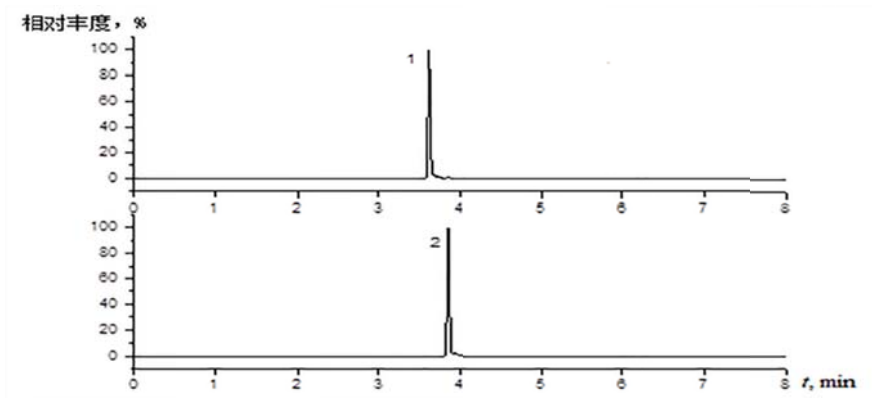
在重复性条件下,两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的20%。

附录 A

(资料性)

血根碱、白屈菜红碱标准溶液定量离子对色谱图

血根碱、白屈菜红碱标准溶液 (1 ng/mL) 的定量离子对色谱图见图A. 1。



标引序号说明:

- 1——血根碱 (定量离子对332>274) ;
- 2——白屈菜红碱 (定量离子对348>332) 。

图A. 1 血根碱、白屈菜红碱标准溶液 (1 ng/mL) 定量离子对色谱图