

---

中华人民共和国农业行业标准  
《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定  
液相色谱-串联质谱法》

编制说明

(公开征求意见稿)

上海市质量监督检验技术研究

上海市动物疫病预防控制中心

《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法》标准编

制组

二〇二三年六月

---

**项目名称：**《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》

**农业行业标准项目计划编号：**14202159

**承担单位：**上海市质量监督检验技术研究院、上海市兽药饲料检测所

**编制组主要成员：**雷涛、张婧、郑国建、王博、葛宇、曹莹、陆志芸、  
吴剑平、卞华、严凤

---

# 目录

一、工作概况.....	4
(一) 标准制定背景及任务来源.....	4
1. 标准制定背景.....	4
2. 任务来源.....	7
(二) 主要工作过程.....	7
1. 成立标准编制小组.....	7
2. 查询国内外相关标准和文献资料.....	7
3. 确定标准制定技术路线，制定原则.....	7
4. 进行论证实验，确定方法主要试验技术内容制定的合理性.....	7
5. 编写标准征求意见稿.....	8
6. 定向征求意见.....	8
7. 组织方法验证.....	8
8. 组织制定标准的预审，形成公开征求意见稿.....	9
8.1 组织预审查会.....	9
8.2 根据预审查会议的审查意见，完善标准文本及编制说明，形成公开征求意见稿.....	9
二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据.....	10
(一) 标准编制原则.....	10

---

2.1.1	规范性.....	10
2.1.2	适用性.....	11
2.1.3	客观性.....	11
2.1.4	协调性.....	11
2.1.5	易用性.....	11
(二)	主要技术内容确定的依据.....	11
2.2.1	与国内外相关标准的对比情况.....	11
2.2.2	方法主要试验技术制定与验证.....	11
三、	试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期经济效果.....	29
3.1	标准曲线定量方式的确定.....	29
3.2	方法的检出限和定量限.....	32
3.3	方法的准确度和精密度.....	37
3.4	方法特异性.....	47
3.5	标准储备溶液的稳定性试验.....	48
3.6	标准工作溶液的稳定性试验.....	48
3.7	试样溶液的稳定性试验.....	49
3.8	试样测定.....	50
3.9	验证单位试验结果.....	50
3.10	综述报告.....	51

---

3.11 技术经济论证 .....	51
3.12 预期经济效果 .....	51
四、采用国际标准 .....	51
五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准 .....	52
六、与有关现行法律、法规和强制性标准的关系 .....	52
七、重大分歧意见的处理经过和依据 .....	52
八、涉及专利的有关说明 .....	52
九、贯彻标准的要求，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 .....	52
十、其他应予说明的事项 .....	52
参考文献： .....	53
附件 .....	53
附件 1 验证报告 .....	55
附件 2 定向征求意见处理汇总表 .....	103
附件 3 预审专家签字表 .....	142
附件 4 农业行业标准《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法》( 预 审稿 ) 审查意见 .....	143

---

# 《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法》

## 农业行业标准制定的编制说明

### 一、工作概况

#### (一) 标准制定背景及任务来源

##### 1. 标准制定背景

博落回植物在我国分布广泛，民间作为杀虫农药以及使用博落回治疗疥癣，疗毒及杀虫灭蛆等在我国有悠久的历史<sup>[1]</sup>。

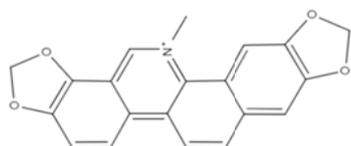
博落回(Macleayacordata(wild)R,B[Bocconiacordata])又名号筒杆，系罂粟科博落回属多年生植物，全株可入药。近代药理研究表明，博落回主要有效成分为血根碱和白屈菜红碱等<sup>[2]</sup>。血根碱具有抑制胆碱酯酶活性，通过调节色氨酸-5-羟色胺代谢途径，而增加饲养动物的采食量<sup>[3]</sup>，在 2003 年农业部第 318 号公告中公布为饲料添加剂品种<sup>[4]</sup>。

博落回散是由博落回提取物经加工制成的散剂，已成功地被开发为我国第一个二类新中兽药，并作为首个中兽药药物饲料添加剂批准使用，可视为后抗生素时代为解决饲用抗生素替代技术和产品<sup>[5]</sup>。2019 年 12 月 19 日，中华人民共和国农业农村部公告第 246 号收录了博落回散<sup>[6]</sup>。博落回散具有抗菌消炎、开胃、促生长的功能。用于促进猪、鸡、肉鸭，淡水鱼类、虾、蟹和龟、鳖生长。博落回散(100g:0.375g)在混饲时每 1 kg 饲料，猪饲料添加量为 200~500 mg；仔鸡饲料添加量为 300~500 mg；成年鸡饲料添加量为 200~300 mg；肉鸭饲料添加量为 200~300 mg；草鱼、青鱼、鲤鱼、鲫鱼、鳊鱼、鳙、泥鳅、虾、蟹、龟、鳖饲料添加量为 300~600 mg<sup>[6]</sup>。可长期添加使用<sup>[6]</sup>。

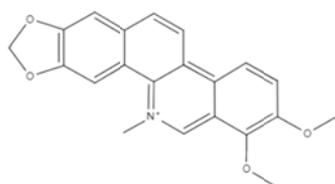
博落回作为兽药在《兽药质量标准》(2017 年版)中药卷中收载了博落回注射液<sup>[7]</sup>。在《兽药质量标准汇编》(2006-2011)中也有对博落回提取物的鉴别、有关物质等检查项<sup>[7]</sup>。但博落回作为饲料添加剂并未有相关的检测标准，博落回果

原料稀缺，制剂工艺相对复杂，为有效控制饲料添加剂产品质量，有必要制定相关的检测方法。

血根碱 (Sanguinarine), CAS 号: 2447-54-3, 分子式:  $C_{20}H_{14}NO_4$ , 分子量: 332.33, 其结构图见下图:



白屈菜红碱 (chelerythrine), CAS 号: 34316-15-9, 分子式:  $C_{21}H_{18}NO_4$ , 分子量: 348.37, 其结构图见下图:



2003 年农业部公告第 318 号《饲料添加剂品种目录》将血根碱公布为饲料添加剂品种, 作为调味剂、香料可用于养殖动物<sup>[4]</sup>; 在《兽药质量标准汇编》(2006-2011) 中也有对博落回提取物的鉴别、有关物质等检查项<sup>[7]</sup>。

2019 年, 按照农业农村部公告第 194 号<sup>[8]</sup>和第 246 号<sup>[6]</sup>规定, 博落回散批准文号由“兽药添字”转为“兽药字” (批准文号: 兽药字 180415250, 兽药字 180415329)。农业部公告第 2374 号<sup>[9]</sup>, 批准湖南美可达生物资源有限公司申报的博落回散变更注册, 增加含量规格和靶动物, 并发布修订后的产品质量标准、说明书和标签。变更注册: 含量规格在原 100g : 3.75g 基础上增加 100g : 0.375g、100g : 1.25g 两个规格; 靶动物在原猪、鸡基础上增加肉鸭、淡水鱼类、虾、蟹、龟、鳖。

以博落回散(100g:0.375g)为例, 在混饲时每 1 kg 饲料, 猪 200~500 mg; 仔鸡 300~500 mg, 成年鸡 200~300 mg; 肉鸭 200~300 mg; 草鱼、青鱼、鲤鱼、鲫鱼、鳊鱼、鳙、鳗、泥鳅、虾、蟹、龟、鳖 300~600mg, 可长期添加使用。博落回用量及使用范围见下表 1。

经液相色谱法测定, 博落回散(100g:0.375g)中血根碱含量在 1.3 mg/kg 左右, 白屈菜红碱含量在 0.65 mg/kg 左右, 因此可估算出饲料中血根碱和白屈菜红碱的

含量，见表 1。

表 1 博落回使用范围及用量

博落回散规格	动物	使用量 (mg/kg)	血根碱 (mg/kg)	白屈菜红碱 (mg/kg)
100g : 0.375g	猪	200~500	~0.26-0.65	~0.13-0.325
	仔鸡	300~500	~0.39-0.65	~0.195-0.325
	成年鸡	200~300	~0.26-0.39	~0.13-0.195
	肉鸭	200~300	~0.26-0.39	~0.13-0.195
	草鱼、青鱼、鲤鱼、鲫鱼、鳊鱼、鳙、鳊、泥鳅、虾、蟹、龟、鳖	300~600	~0.39-0.78	~0.195-0.39
100g : 1.25g	猪	60~150	~0.26-0.65	~0.13-0.325
	仔鸡	90~150	~0.39-0.65	~0.195-0.325
	成年鸡	60~90	~0.26-0.39	~0.13-0.195
	肉鸭	60~90	~0.26-0.39	~0.13-0.195
	草鱼、青鱼、鲤鱼、鲫鱼、鳊鱼、鳙、鳊、泥鳅、虾、蟹、龟、鳖	90~180	~0.39-0.78	~0.195-0.39
100g : 3.75g	猪	20~50	~0.26-0.65	~0.13-0.325
	仔鸡	30~50	~0.39-0.65	~0.195-0.325
	成年鸡	20~30	~0.26-0.39	~0.13-0.195
	肉鸭	20~30	~0.26-0.39	~0.13-0.195
	草鱼、青鱼、鲤鱼、鲫鱼、鳊鱼、鳙、鳊、泥鳅、虾、蟹、龟、鳖	30~60	~0.39-0.78	~0.195-0.39

---

## **2. 任务来源**

根据全国饲料工业标准化技术委员会下达的饲料工业国家标准、行业标准制定文件，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承担了《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》行业标准的制定工作，项目编号为14202159，该标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

## **(二) 主要工作过程**

### **1. 成立标准编制小组**

2020年8月，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接到《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》农业行业标准制定任务后，对该标准的具体工作进行了认真研究，确定了总体工作方案，并成立了标准制定工作组。

### **2. 查询国内外相关标准和文献资料**

2020年8月~10月，本标准编制组成员查询和收集了国内外相关标准和文献资料，确立了标准制定的指导思想，形成了开题报告和标准草案，并制定了初步的实验方案。

### **3. 确定标准制定技术路线，制定原则**

2020年11月，标准编制组召开了标准开题论证会。会上标准编制组介绍了对国内外相关分析方法的研究，标准制定的技术路线和技术难点，以及拟开展的主要工作等内容。

### **4. 进行论证实验，确定方法主要试验技术内容制定的合理性**

2020年12月~2021年2月，在查询、收集国内外相关标准、文献和技术资料的基础上，在参照国际和国外先进标准的基础上，结合目前的实际情况，初步

---

确定了标准的制定和相应的试验方法，形成了标准草案。

2021年3月~2021年6月，工作组对标准草案进行了多次讨论研究，同时对标准中采用的试验方法进行了研究与方法验证工作，积累了研究数据

## 5. 编写标准征求意见稿

2021年6月~2021年7月，对方法研究过程中出现的问题和困难，标准工作组进行了认真研究和分析，并得以解决。完善了方法的准确性和可靠性，在此基础上完成了标准文本及编制说明的征求意见稿。

## 6. 定向征求意见

2021年8月，根据有关专家意见基础上，对标准内容进行了修改完善，在此基础上，编写完成了《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准及编制说明定向征求意见稿。2022年2月，上海市质量监督检验技术研究院组织专家对负责起草的农业行业标准《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》（定向征求意见稿）进行了审查。主要意见及主要存在的问题包括以下几个方面：1. 格式、错字等不规范问题；2. 标准适用范围表述不清；3. 标准前后叙述不一致。工作组根据食品安全国家标准编写规则进行了修改。工作组对180条修改建议逐一进行了答复，其中173条采纳并修改，7条不予采纳并陈述了理由。意见和建议与定向征求意见稿无重大分歧。

## 7. 组织方法验证

2022年1月，方法经上海疾病预防控制中心、上海海关动植物食品中心和上海市农业科学院验证。验证结果表明，该标准方法设计合理，实用有效。液相色谱-串联质谱法的检出限、定量限、标准曲线范围、准确度与精确度均能满足配合饲料中血根碱和白屈菜红碱的测定要求。

---

## 8. 组织制定标准的预审，形成公开征求意见稿

### 8.1 组织预审查会

2023年4月，上海市兽药饲料检测所组织专家对农业行业标准《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》（定向征求意见稿）进行了预审，主要意见及主要存在的问题包括以下几个方面：1. 建议删除高效液相色谱法及其相关内容，标准名称修改为“饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法”；2. 建议采用固相萃取法净化，进一步优化样品提取和净化步骤，考察提高灵敏度的可行性；3. 编制说明按照《国家标准管理办法》相关要求进行修改完善，补充批间回收率及精密度数据、增加 0.1 mg/kg、1 mg/kg 的回收率测定数据，补充配合饲料、浓缩饲料和精料补充料样品提取方法的数据；4. 按照 GB/T 1.1 - 2020、GB/T 20001.4 - 2015 的要求规范标准文本及编制说明。与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

### 8.2 根据预审查会议的审查意见，完善标准文本及编制说明，形成公开征求意见稿

预审查意见处理情况：

**意见 1：**建议删除高效液相色谱法及其相关内容，标准名称修改为“饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法”。

**处理：**采纳。

按照农业部公告第 2374 号规定，血根碱在饲料中的使用量约为 0.26 mg/kg~0.78 mg/kg 之间，白屈菜红碱在饲料中的使用量约为 0.13 mg/kg~0.39 mg/kg 之间（表 1）。而在方法研制过程中，高效液相色谱法的定量限为 50 mg/kg，理论上还需浓缩 500 多倍才能勉强达到实际试样的检测需求，因此采纳专家组的意见，删除高效液相色谱法。

**意见 2：**建议采用固相萃取法净化，进一步优化样品提取和净化步骤，考察提高灵敏度的可行性。

---

**处理：**采纳。

在前处理优化过程中考察了强离子交换柱、混合型阳离子交换柱、QuEChERS 和 HLB 等净化效果（编制说明 2.2.3.2.4），并将方法定量限从 0.05 mg/kg 降到 0.005 mg/kg（编制说明 3.2）。

**意见 3：**编制说明按照《国家标准管理办法》相关要求进行修改完善，补充批间回收率及精密度数据、增加 0.1 mg/kg、1 mg/kg 的回收率测定数据，补充配合饲料、浓缩饲料和精料补充料样品提取方法的数据。

**处理：**采纳。

在编制说明中补充了批间回收率和精密度的数据，并增加了 0.1 mg/kg、1 mg/kg 的回收率测定数据（编制说明 3.3）；在前处理优化过程中，增加了配合饲料、浓缩饲料和精料补充料的提取方法优化数据（编制说明 2.2.3.2）。

**意见 4：**按照 GB/T 1.1 - 2020、GB/T 20001.4 - 2015 的要求规范标准文本及编制说明。

**处理：**采纳。

已按 GB/T1.1-2020、GB/T20001.4-2015 的要求及预审意见处理汇总表，对文件进行了相应的结构调整和编辑性改动，规范了文件，并对编制说明进行了完善。

## 二、标准编制原则和主要技术内容确定的依据

### （一）标准编制原则

#### 2.1.1 规范性

技术要素内容通过充分调研，科学评估、客观评价，以科学技术和实验数据为依据；依据依据 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》和 GB/T 20001.4-2015《标准编写规则 第 4 部分：试验方法标准》的规定起草编制。

---

### 2.1.2 适用性

根据我国农业部公告第 2374 号收载饲料添加剂产品的现状，提出高效液相色谱-串联质谱试验的合理通用方法。

### 2.1.3 客观性

广泛征求意见，合理采纳各相关方意见与建议。

### 2.1.4 协调性

制定的标准与现行有效的标准之间能相互协调，避免重复和不必要的差异。

### 2.1.5 易用性

标准编制工作组对相关的国内外标准、技术资料进行分析、研究，结合国内检测机构及饲料添加剂生产企业的质量控制及检验水平的实际情况制定了该标准。与此同时标准的内容便于检测机构和生产企业使用，并且易于被其他标准引用或剪裁使用。

## （二）主要技术内容确定的依据

本标准的主要技术内容（包括技术要求和试验方法）说明如下：

### 2.2.1 与国内外相关标准的对比情况

目前国内外尚无饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定标准。

### 2.2.2 方法主要试验技术制定与验证

#### 2.2.2.1 试剂或材料：

本标准所用试剂和水，在没有注明其他要求时，均指分析纯试剂和 GB/T 6682 中规定的一级水。试验中所用溶液在未注明用何种溶剂配制时，均指水溶液。

---

试样的制备均按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品，用四分法缩减取约 200 g，按照 GB/T 20195 制备样品，粉碎后过 0.425 mm 的试验筛，充分混匀，装入密闭容器中，备用。

2.2.2.1.1 水：GB/T 6682，一级。

2.2.2.1.2 甲醇：色谱纯。

2.2.2.1.3 乙腈：色谱纯。

2.2.2.1.4 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。

2.2.2.1.5 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。

2.2.2.1.6 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 °C 及以下保存，有效期 6 个月。

2.2.2.1.7 标准中间溶液(1  $\mu\text{g/mL}$ )：分别准确移取 0.2 mL 标准储备溶液于 100 mL 容量瓶中，用盐酸乙腈溶液稀释并定容，混匀。临用现配。

2.2.2.1.8 标准系列溶液：分别准确移取适量标准中间溶液于容量瓶中，用盐酸乙腈溶液稀释并定容，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。

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

2.2.2.1.10 微孔滤膜：孔径为 0.22  $\mu\text{m}$ ，有机系。

2.2.2.2 仪器设备：

2.2.2.2.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾(ESI)离子源。

2.2.2.2.2 分析天平：精度为 0.1 mg。

2.2.2.2.3 超声波清洗机。

2.2.2.2.4 离心机：转速不低于 9 000 r/min。

2.2.2.3 试验步骤

2.2.2.3.1 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，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，用盐酸乙腈溶液定容，混匀，备用。

#### 2.2.2.3.2 净化

吸取备用液约 3 mL 过固相萃取柱及微孔滤膜，弃去约 1 mL 流出液，收集续滤液，待测。

#### 2.2.2.3.3 测定

##### 2.2.2.3.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C<sub>18</sub>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，B相为乙腈，梯度洗脱程序见表2；

表 2 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

##### 2.2.2.3.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI<sup>+</sup>）；
- 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；
- f) 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3。

表3 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参考值

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
血根碱	332 > 274 <sup>a</sup>	30	33
	332 > 317	30	30
白屈菜红碱	348 > 332 <sup>a</sup>	30	30
	348 > 304	30	30

<sup>a</sup>为定量离子。

#### 2.2.2.4 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。

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

式中：

$\rho_i$ ——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。

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

式中：

$A_i$ ——试样溶液中血根碱、白屈菜红碱的峰面积；

$\rho_{si}$ ——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。

#### 2.2.2.5 精密度的确定

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%。

### 2.2.3 液相色谱-串联质谱法试验技术的建立

#### 2.2.3.1 液相色谱-串联质谱法仪器条件的确定

##### 2.2.3.1.1 色谱柱的确定

血根碱和白屈菜红碱为中等极性化合物，故选择采用 C18 色谱柱进行分离。以 0.1%甲酸溶液和乙腈为流动相，采用梯度洗脱。研究对比了 HSS T3-C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)、BEH-C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)、Tita-C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.9 μm)、EclipsePlus RRHD-C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)、Hypersil Gold-C<sub>18</sub> (2.1 mm×50mm, 1.9 μm)作为目标物的预选分离柱，图 1-图 5。实验表明，血根碱和白屈菜红碱在 C<sub>18</sub> 色谱柱上的洗脱效果差别不大，均能满足检测要求。实验室可根据具体情况择优选取色谱柱。本实验室研究选择色谱柱 BEH-C<sub>18</sub>(2.1×50 mm, 1.7 μm)进行下一步试验分析。

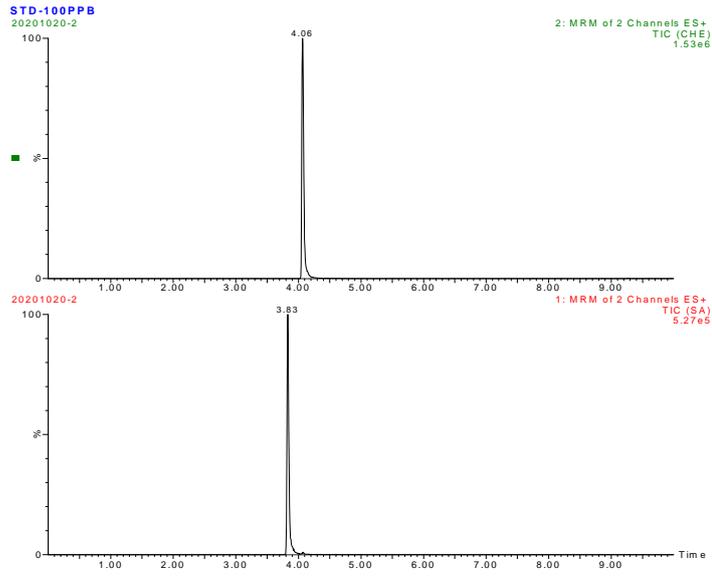


图 1 HSS T3-C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.8 μm)色谱图

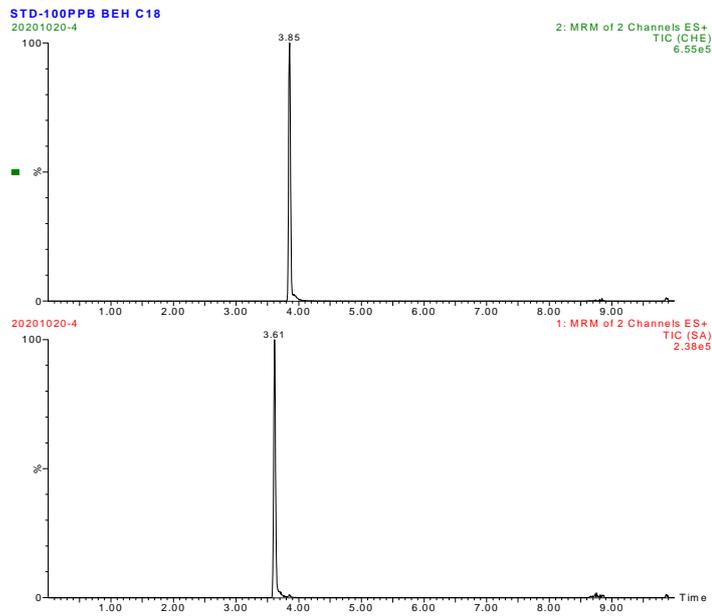


图 2 BEH-C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.7 μm)色谱图

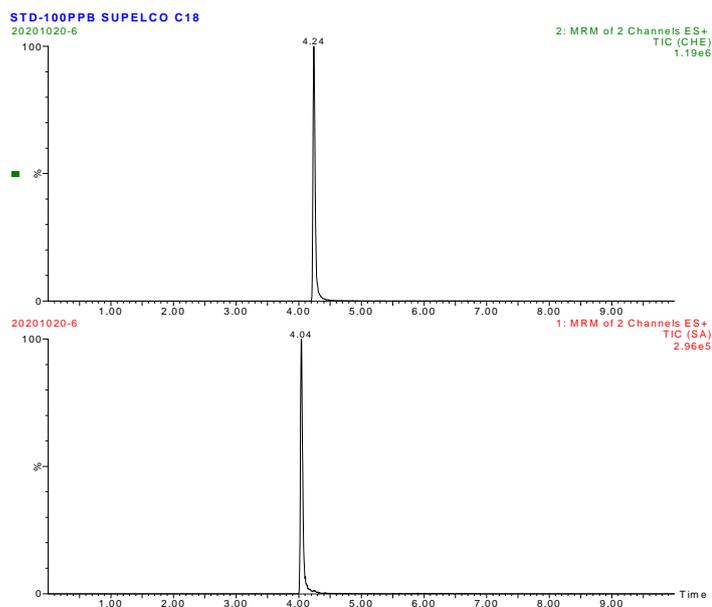


图 3 Tita-C<sub>18</sub>(2.1 mm×50 mm, 1.9 μm)色谱图

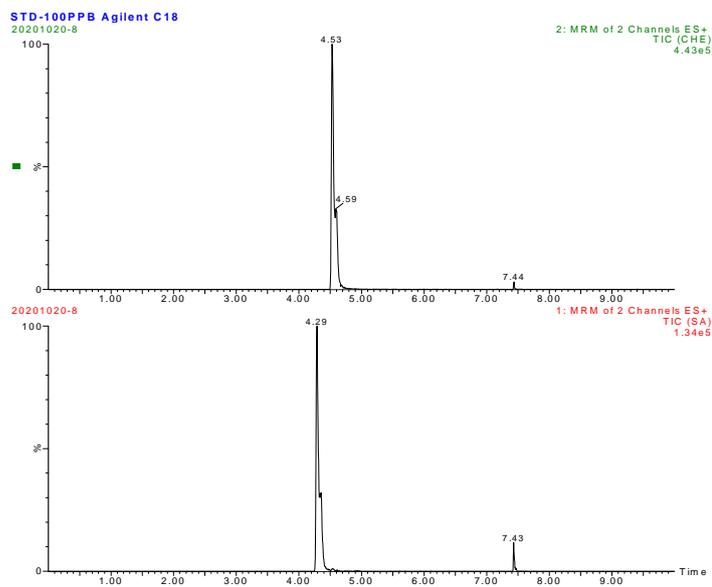


图 4 EclipsePlus RRHD-C<sub>18</sub>(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱图

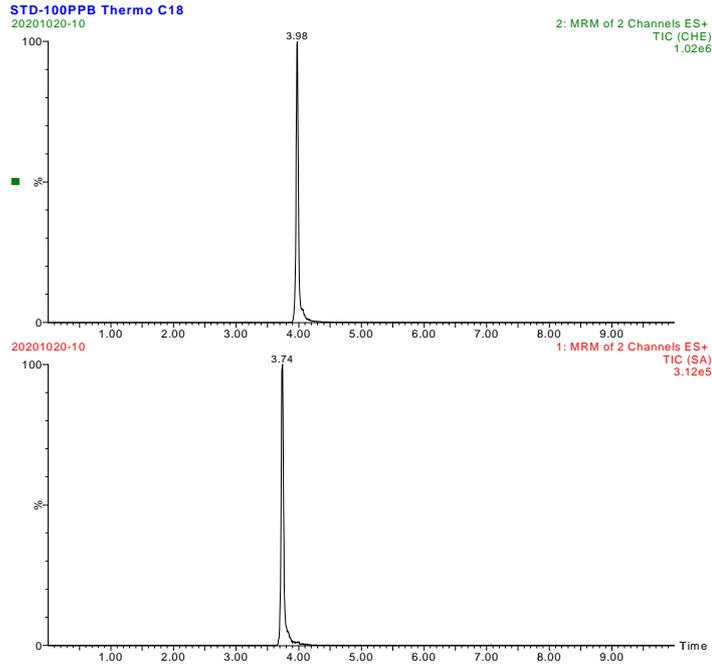


图 5 Hypersil Gold-C<sub>18</sub> (2.1 mm×50mm, 1.9 μm)色谱图

### 2.2.3.1.2 监测离子对的选择及质谱条件的确定

血根碱、白屈菜红碱含有带正电的氮原子,在质谱分析中可使用正离子模式。用浓度为 0.1 μg/mL 的血根碱、白屈菜红碱进行质谱扫描,得到血根碱和白屈菜红碱的质谱图,见图 6-图 7。从图 6 可知,血根碱的子离子扫描中质荷比为 274 和 317 的两个子离子响应较高;从图 7 可知,白屈菜红碱的子离子扫描中质荷比为 332 和 304 的两个子离子响应较高。和文献<sup>[10]</sup>报道一致。

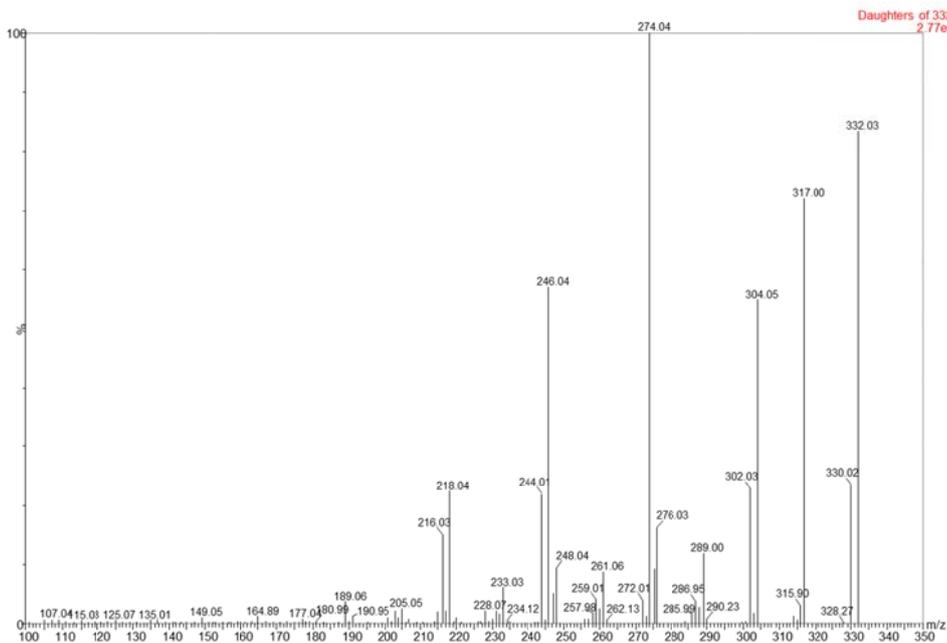


图 6 血根碱子离子扫描质谱图

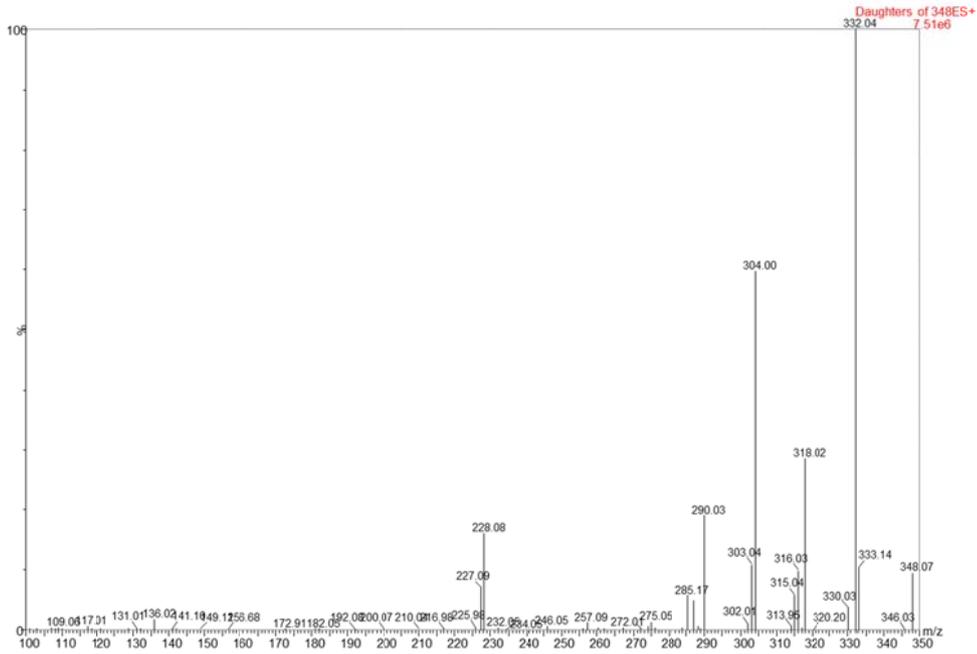


图 7 白屈菜红碱子离子扫描质谱图

用浓度为 0.1  $\mu\text{g/mL}$  的血根碱、白屈菜红碱标准溶液在正离子模式下进行条件优化，对 ESI 电喷雾电压、雾化气、反吹气、锥孔温度、碰撞能等质谱参数进行优化，使各碎片离子响应最强。多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 4。

通过对 Waters TQ-XS 质谱条件的优化，得到参考质谱条件：

- a) 离子源模式：电喷雾电离，正离子模式（ESI<sup>+</sup>）；
- 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  $^{\circ}\text{C}$ ；

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 4。

表 4 血根碱、白屈菜红碱多反应监测离子对、锥孔电压及碰撞能的参考值

化合物名称	母离子(m/z)	子离子 (m/z)	碰撞能 (eV)
血根碱	332	274*	33
		317	30

白屈菜红碱	348	332*	30
		304	30

\*定量离子

注：质谱条件仅供参考，当采用不同质谱仪器时，仪器参数可能存在差异，测定前应将质谱参数优化到最佳。

### 2.2.3.2 前处理方法的研究

#### 2.2.3.2.1 提取溶剂的选择

血根碱和白屈菜红碱易溶于甲醇、乙醇、乙腈等极性溶剂中，故在样品提取过程中首先选用实验室常用的甲醇、乙腈、乙醇作为提取溶剂。

研究以猪预混合饲料、猪浓缩饲料、猪配合饲料和猪精料补充料为代表基质，考察不同溶剂比例下的提取效率，加标浓度为 5 mg/kg。提取效果见表 5：

表 5 提取溶剂提取结果

提取溶剂	乙腈	乙醇	甲醇
血根碱		回收率%	
猪预混合饲料	74.4	59.6	72.4
猪浓缩饲料	78.0	61.2	74.7
猪配合饲料	71.5	58.1	72.9
猪精料补充料	77.5	57.1	72.0
白屈菜红碱		回收率%	
猪预混合饲料	74.9	9.25	30.6
猪浓缩饲料	72.4	9.64	30.5
猪配合饲料	76.4	9.14	29.1
猪精料补充料	76.4	9.18	29.9

结果发现，对于血根碱，乙腈和甲醇的提取效果较好；对于白屈菜红碱，只有乙腈的提取效果较好。但使用乙腈提取血根碱和白屈菜红碱时回收率也只有 75%左右。

查阅文献可知酸性溶液有助于血根碱和白屈菜红碱的提取，因此为了提高回收率，考察直接在乙腈中加入甲酸、乙酸和盐酸以提高提取效率，见表 6。

表 6 酸性提取溶剂提取结果

提取溶剂	乙腈	1%甲酸	1%乙酸	1%HCl
		乙腈	乙腈	乙腈
血根碱		回收率%		
猪预混合饲料	74.4	70.5	65.8	83.4
猪浓缩饲料	74.4	70.0	65.1	86.3
猪配合饲料	74.8	67.9	62.6	87.1
猪精料补充料	75.7	73.8	68.8	80.9
白屈菜红碱		回收率%		
猪预混合饲料	74.9	71.6	70.6	85.6
猪浓缩饲料	73.7	72.6	73.4	82.3
猪配合饲料	73.5	73.8	67.3	85.1
猪精料补充料	72.3	74.0	68.4	81.7

结果发现加盐酸对乙腈的提取效率有改进。因此继续考察盐酸浓度对提取效率的影响，见表 7。

表 7 不用盐酸浓度对提取效率的影响

提取溶剂	乙腈	0.1%HCl	0.2%HCl	0.4%HCl	0.5%HCl	0.6%HCl	1%HCl
		乙腈	乙腈	乙腈	乙腈	乙腈	乙腈
血根碱		回收率%					
猪预混合饲料	74.4	88.5	93.2	87.3	85.3	86.4	83.4
猪浓缩饲料	71.3	87.5	92.3	83.0	83.9	86.8	86.3
猪配合饲料	74.8	88.3	95.1	88.3	81.8	89.6	87.1
猪精料补充料	75.2	90.2	91.9	86.2	81.3	86.1	80.9

白屈菜 红碱	回收率%						
	猪预混合饲料	74.9	85.1	93.1	89.7	88.0	86.3
猪浓缩饲料	73.7	86.3	90.7	89.3	92.0	84.3	82.3
猪配合饲料	73.5	84.5	95.4	90.6	88.9	82.6	85.1
猪精料补充料	72.3	84.3	94.7	89.5	89.1	86.6	81.7

结果发现 0.2%盐酸乙腈溶液提取效果最佳，单次提取回收率在 90%以上。

#### 2.2.3.2.2 超声时间考察

一般情况下超声有助于提高提取效率，延长超声有助于提高目标化合物的回收率。考察了不同超声时间对回收率的影响，见表 8。

表 8 超声时间对提取效率的影响

超声时间	0 min	10 min	20 min	30 min
血根碱		回收率%		
猪预混合饲料	85.6	92.5	93.2	93.5
猪浓缩饲料	85.7	94.1	93.4	94.5
猪配合饲料	87.2	93.8	94.6	94.3
猪精料补充料	86.1	90.6	92.0	93.7
白屈菜红碱		回收率%		
猪预混合饲料	86.9	92.8	93.1	93.6
猪浓缩饲料	88.1	93.4	94.5	94.8
猪配合饲料	87.9	92.7	92.6	92.8
猪精料补充料	88.7	92.3	92.7	93.5

可见超声 10 min 基本能将血根碱和白屈菜红碱提取完全，为了保证提取效率，将超声时间设为 20 min。

### 2.2.3.2.3 提取次数考察

为了进一步提高提取效率，对提取次数进行考察，加标浓度为 5 mg/kg。

取 2 g 样品置于 50mL 离心管中，分别提取 1 次（每次 15 mL）、提取 2 次（每次 15 mL）、提取 3 次（每次 15 mL），超声时间为 20 min，以 9000 rpm 离心取上清，最终用 0.2%盐酸乙腈溶液定容至 50 mL。通过计算回收率比较不同提取次数下的差异，结果见表 9。

表 9 提取次数考察结果表

提取次数	1	2	3
血根碱	回收率%		
猪预混合饲料	93.2	96.1	96.8
猪浓缩饲料	92.3	95.7	97.6
猪配合饲料	95.1	97.0	96.8
猪精料补充料	91.9	95.4	95.9
白屈菜红碱	回收率%		
猪预混合饲料	93.1	97.0	96.6
猪浓缩饲料	90.7	95.4	96.1
猪配合饲料	95.4	96.6	97.3
猪精料补充料	94.7	95.6	96.5

由提取次数回收率考察数据看出，提取 1 次的回收率达到 90%以上，提取 2 次的回收率达到 95%以上，能提取完全。综合考虑工作效率等问题，确定提取次数为 2 次。

### 2.2.3.2.4 净化方法考察

为了保护色谱柱和质谱系统，需对提取液进行净化处理。

#### 2.2.3.2.4.1 阳离子交换柱

血根碱、白屈菜红碱含有带正电的氮原子，因此可以使用阳离子交换柱进行净化。

##### 2.2.3.2.4.1.1 强阳离子交换柱

选取 Agilent SCX（200 mg，6 mL）强阳离子交换柱进行实验。使用前先用

5 mL 甲醇和 5 mL 水进行活化,吸取 1 mL 提取液和 9 mL 水混合后上样,用 5 mL 水和 5 mL 甲醇进行淋洗, 负压抽干后, 用 6 mL 5%氨水甲醇溶液进行洗脱。进行分步收集, 每 1 mL 为一单位, 进行液相色谱-串联质谱检测。

对上样后的流出液和淋洗液进行了检测, 未检出血根碱和白屈菜红碱, 说明 SCX 能很好的吸附目标化合物。洗脱液的结果见表 10。

表 10 SCX 分步洗脱液中目标化合物浓度

洗脱液	1	2	3	4	5	6
<b>血根碱</b>	<b>ng/mL</b>					
猪预混合饲料	0.0779	114	33.2	17.3	8.60	5.44
猪浓缩饲料	0.0767	116	33.5	17.0	8.43	5.40
猪配合饲料	0.0788	113	33.5	17.2	8.77	5.37
猪精料补充料	0.0794	113	32.5	16.9	8.82	5.57
<b>白屈菜红碱</b>	<b>ng/mL</b>					
猪预混合饲料	0.0530	102	25.9	13.8	6.74	4.18
猪浓缩饲料	0.0534	101	25.6	13.8	6.81	4.15
猪配合饲料	0.0521	103	26.2	14.2	6.83	4.15
猪精料补充料	0.0531	104	25.4	14.1	6.78	4.15

可以发现 SCX 固相萃取柱对血根碱和白屈菜红碱的吸附能力较强, 5%氨水甲醇溶液无法将其完全洗脱。

#### 2.2.3.2.4.1.2 MCX 混合型阳离子交换柱

选取 Waters MCX (60 mg, 3 mL) 混合型阳离子交换柱继续进行实验。使用前先用 3 mL 甲醇和 3 mL 水进行活化, 吸取 1 mL 提取液和 9 mL 水混合后上样, 用 3 mL 水和 3 mL 甲醇进行淋洗, 负压抽干后, 用 5 mL 5%氨水甲醇溶液进行洗脱。进行分步收集, 每 1 mL 为一单位, 进行液相色谱-串联质谱检测。

对上样后的流出液和淋洗液进行了检测, 未检出血根碱和白屈菜红碱, 说明 MCX 也能很好的吸附目标化合物。洗脱液的结果见表 11。

表 11 MCX 分步洗脱液中目标化合物浓度

洗脱液	1	2	3	4	5
<b>血根碱</b>		<b>ng/mL</b>			
猪预混合饲料	164	18.9	11.0	8.32	2.13
猪浓缩饲料	164	18.9	10.8	8.23	2.19
猪配合饲料	164	18.8	11.2	8.19	2.12
猪精料补充料	161	18.6	10.9	8.46	2.19
<b>白屈菜红碱</b>		<b>ng/mL</b>			
猪预混合饲料	150	13.8	9.31	6.56	1.61
猪浓缩饲料	150	13.7	9.39	6.51	1.58
猪配合饲料	154	14.1	9.10	6.57	1.60
猪精料补充料	149	14.0	9.50	6.43	1.58

可以发现 MCX 固相萃取柱对血根碱和白屈菜红碱的吸附能力也较强，5% 氨水甲醇溶液无法将其完全洗脱。

为了增加洗脱强度，提高氨水浓度至 10%和 20%，结果见表 12-表 13

表 12 10%氨水甲醇洗脱液中目标化合物浓度

洗脱液	1	2	3	4	5
<b>血根碱</b>		<b>ng/mL</b>			
猪预混合饲料	127	13.5	7.18	3.12	3.72
猪浓缩饲料	130	13.4	7.25	3.11	3.73
猪配合饲料	129	13.5	7.33	3.16	3.63
猪精料补充料	129	13.5	7.31	3.19	3.65
<b>白屈菜红碱</b>		<b>ng/mL</b>			
猪预混合饲料	127	9.56	5.39	2.20	2.96
猪浓缩饲料	126	9.56	5.34	2.24	3.00
猪配合饲料	129	9.43	5.43	2.15	3.02
猪精料补充料	129	9.55	5.37	2.15	3.02

表 13 20%氨水甲醇洗脱液中目标化合物浓度

洗脱液	1	2	3	4	5
<b>血根碱</b>		<b>ng/mL</b>			
猪预混合饲料	134	24.2	8.3	3.23	2.21
猪浓缩饲料	135	23.8	8.2	3.21	2.23
猪配合饲料	135	24.6	8.4	3.18	2.26
猪精料补充料	137	23.9	8.2	3.19	2.17
<b>白屈菜红碱</b>		<b>ng/mL</b>			
猪预混合饲料	134	24.2	8.32	3.23	2.21
猪浓缩饲料	135	24.6	8.51	3.31	2.26
猪配合饲料	131	24.2	8.29	3.30	2.23
猪精料补充料	136	23.8	8.43	3.20	2.26

增大氨水浓度后的洗脱效果不如 5%氨水甲醇溶液的洗脱效果，说明 5%氨水甲醇溶液洗脱能力足够，可能是由于阳离子交换柱中的填料本体对血根碱和白屈菜红碱有较强的吸附，导致目标化合物洗脱不完全。

尝试使用 5%氨水乙腈作为洗脱溶液重复净化实验，分步收集 5 mL 洗脱液，结果见表 14。

表 14 5%氨水乙腈洗脱液中目标化合物浓度

洗脱液	1	2	3	4	5
<b>血根碱</b>		<b>ng/mL</b>			
猪预混合饲料	15.6	41.7	62.1	45.2	19.4
猪浓缩饲料	15.5	41.5	62.0	45.1	19.5
猪配合饲料	15.3	41.8	62.7	44.5	19.7
猪精料补充料	15.4	40.8	62.7	45.8	19.9
<b>白屈菜红碱</b>		<b>ng/mL</b>			
猪预混合饲料	7.31	27.4	43.2	31.9	17.9
猪浓缩饲料	7.32	27.5	43.5	32.2	17.9

猪配合饲料	7.23	27.5	43.6	31.6	18.3
猪精料补充料	7.29	27.6	43.6	31.3	17.6

可以发现 5%氨水乙腈溶液的洗脱能力弱于 5%氨水甲醇溶液。

### 2.2.3.2.4.1.3 QuEChERS 净化技术

QuEChERS 净化技术具有“quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe”等特点。试验了 3 种配方的 QuEChERS 净化包，分别为净化包 1（50 mg PSA, 100 mg C<sub>18</sub>, 100 mg MgSO<sub>4</sub>），净化包 2（50 mg PSA, 50 mg C<sub>18</sub>, 100 mg MgSO<sub>4</sub>），净化包 3（25 mg GCB, 50 mg PSA, 50 mg C<sub>18</sub>, 150 mg MgSO<sub>4</sub>）。吸取 1 mL 提取液加入到净化包中，涡旋 30 s 后 9000 rpm 下离心 2 分钟，取上清液过 0.22 μm 有机滤膜后进样分析，结果见表 15。

表 15 QuEChERS 净化效果

净化包	1	2	3
血根碱	回收率%		
猪预混合饲料	80.1	47.3	1.05
猪浓缩饲料	79.7	48.4	1.07
猪配合饲料	80.1	47.6	1.05
猪精料补充料	79.2	47.8	1.04
白屈菜红碱	回收率%		
猪预混合饲料	70.5	47.5	0.354
猪浓缩饲料	69.5	48.2	0.347
猪配合饲料	70.2	48.6	0.356
猪精料补充料	70.4	48.5	0.362

可见 GCB（石墨化碳黑）对血根碱和白屈菜红碱具有非常强的吸附能力，导致提取液经净化包 3 净化后回收率非常低。此外，含 PSA 和 C<sub>18</sub> 的净化包也会对目标化合物有吸附，回收率不理想。

### 2.2.3.2.4.1.4 多用途亲水-亲脂平衡反相吸附固相萃取柱

HLB（Hydrophile Lipophilic Balance）固相萃取柱是一种多用途亲水-亲脂平衡反相吸附固相萃取柱，适用于酸、碱和中性化合物的净化，可去除 95% 的常见

基质干扰物，例如蛋白质、盐类、磷脂等。

试验了 Waters HLB (500 mg, 6 mL) 和 Waters PRiME HLB (60 mg, 3 mL) 两个型号的固相萃取柱。取 6 mL 提取溶液，通过 HLB 固相萃取柱和 0.22  $\mu\text{m}$  有机微孔滤膜，分步收集 6 mL 通过液，结果见表 16-表 17。

表 16 HLB 通过液中目标化合物浓度

通过液	1	2	3	4	5	6
<b>血根碱</b>	<b>回收率%</b>					
猪预混合饲料	63.2	98.5	97.8	97.9	96.7	98.2
猪浓缩饲料	64.3	98.3	98.5	97.0	96.1	98.9
猪配合饲料	61.7	96.3	100.1	98.3	94.6	97.8
猪精料补充料	63.0	96.5	97.7	95.7	98.7	99.5
<b>白屈菜红碱</b>	<b>回收率%</b>					
猪预混合饲料	84.3	98.3	97.8	96.7	98.2	98.6
猪浓缩饲料	85.1	98.8	99.7	94.9	100.5	96.9
猪配合饲料	82.5	100.5	95.5	98.8	96.3	100.2
猪精料补充料	84.5	95.9	97.5	98.5	100.5	98.4

表 17 PRiME HLB 通过液中目标化合物浓度

通过液	1	2	3	4	5	6
<b>血根碱</b>	<b>回收率%</b>					
猪预混合饲料	67.3	90.3	95.7	97.0	98.2	98.1
猪浓缩饲料	68.5	92.4	96.9	98.7	96.0	96.7
猪配合饲料	66.7	91.9	95.2	98.5	98.5	98.5
猪精料补充料	67.7	90.9	96.9	95.7	97.9	95.9
<b>白屈菜红碱</b>	<b>回收率%</b>					
猪预混合饲料	67.3	90.3	95.7	97.0	98.7	98.2
猪浓缩饲料	68.8	92.4	95.4	98.5	96.5	96.6
猪配合饲料	66.9	91.1	95.0	99.4	97.3	100.7

猪精料补充料	68.0	90.6	93.6	95.0	96.4	98.6
--------	------	------	------	------	------	------

由表 16 可知，在使用 Waters HLB（500 mg，6 mL）净化时，只要弃去前面 1 mL，目标化合物就有较好的回收率，回收率在 95%以上；由表 17 可知，在使用 Waters PRiME HLB（60 mg，3 mL）时，弃去前面 4 mL，目标化合物也有较好的回收率，回收率在 95%以上。

因此选择 Waters HLB（500 mg，6 mL）进行后续实验。

### 三、试验验证的分析、综述报告，技术经济论证，预期经济效果

#### 3.1 标准曲线定量方式的确定

化学分析中，基质指的是样品中被分析物以外的组分，基质常常对分析物的分析过程有显著的干扰。质谱检测是基于化合物离子化并通过特定的核质比来检测和定量，因此任何干扰待测物离子化的物质都可能影响检测方法的灵敏度和选择性。

基质效应是指在样品测试过程中，由待测物以外的其他物质的存在，直接或间接影响待测物响应的现象。基质效应主要是由质谱检测器的离子化过程产生的，在电喷雾时，基质内的组分与目标化合物共同流出喷雾针，对电荷产生竞争，它们将产生的雾滴牢牢吸在一起，改变了带电雾滴的表面张力，影响目标物的雾化、挥发、分裂、化学反应以及带电过程，致使进入质谱的离子减少或增加，从而影响定量分析的可靠性和准确性。

基质效应可通过公式  $ME(\%) = \text{基质溶液中标准曲线斜率} / \text{纯溶剂中标准曲线斜率} \times 100\%$ ，来评价。ME 在 85%~115%之间一般认为不存在基质效应；当 ME 低于 85%时，则认为基质对目标化合物的响应产生抑制作用；当 ME 高于 115%时，则认为基质对目标化合物的响应存在增强作用。各代表基质效应考察结果见表 18，在 92.6%~103%之间。可见基质对血根碱和白屈菜红碱都无基质效应。但考虑到部分样品中血根碱和白屈菜红碱的含量超出标曲最高点，因此往往需进行 10 倍稀释后再进行测定。用提取溶液（0.2%盐酸乙腈溶剂）进行 10 倍稀释后进行基质效应的考察，结果见表 19。通过结果数据可以看出，稀释后个基质的基质效应在可接受范围内，在 92.7%~104%之间。

表 18 基质效应考察结果表

样品基质	血根碱基质效应	白屈菜红碱基质效应
猪预混料	98.7	101
猪浓缩料	99.6	99.6
猪配合饲料	98.6	101
鸡预混料	98.8	93.4
鸡浓缩料	99.7	96.4
鸡配合饲料	103	100
精料补充料	103	92.6
水产饲料	92.9	102

表 19 稀释 10 倍后基质效应考察结果表

样品基质	血根碱基质效应	白屈菜红碱基质效应
猪预混料	100	104
猪浓缩料	99.6	95.8
猪配合饲料	98.5	101
鸡预混料	93.9	92.9
鸡浓缩料	92.7	94.7
鸡配合饲料	95.4	99.9
精料补充料	95.8	101
水产饲料	95.8	95.7

对血根碱、白屈菜红碱标准工作溶液在 1 ng/mL~100 ng/mL 进行测定，以化合物浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，结果见表 20-表 21，图 8-图 9。

表 20 血根碱标准曲线测定结果表

浓度 (ng/mL)	峰面积			峰面积平均值
1	31758	33132	32589	32493
2	60262	61882	62443	61529

浓度 (ng/mL)	峰面积			峰面积平均值
5	151346	160893	148957	153732
10	281847	298303	296702	292284
20	593241	611775	601230	602082
50	1522151	1564841	1511969	1532987
100	2978530	3024223	3039171	3013975
标准曲线	$y=30208*x+1425.49$			r
				0.999812

表 21 白屈菜红碱标准曲线测定结果表

浓度 (ng/mL)	峰面积			峰面积平均值
1	63068	65225	66171	64821
2	125055	131207	125955	127406
5	302418	313400	302992	306270
10	571108	607267	610252	596209
20	1219447	1256050	1229439	1234979
50	3044055	3128856	3064703	3079205
100	6042078	6321341	6269965	6211128
标准曲线	$y=61758.4*x+1348.28$			r
				0.999756

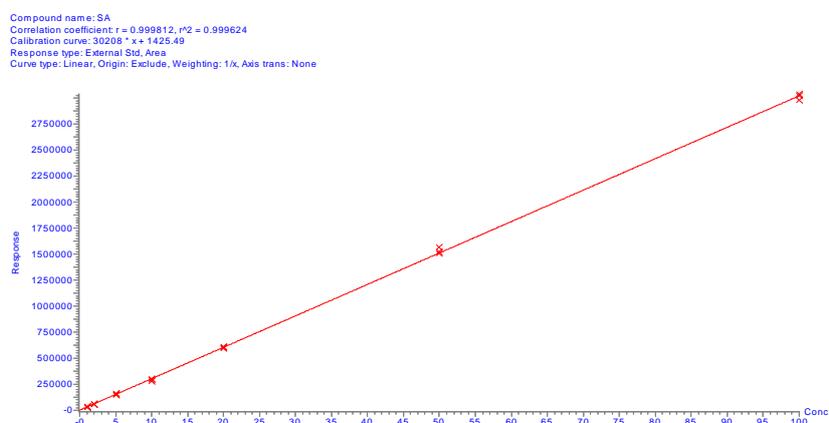


图 8 血根碱标准曲线

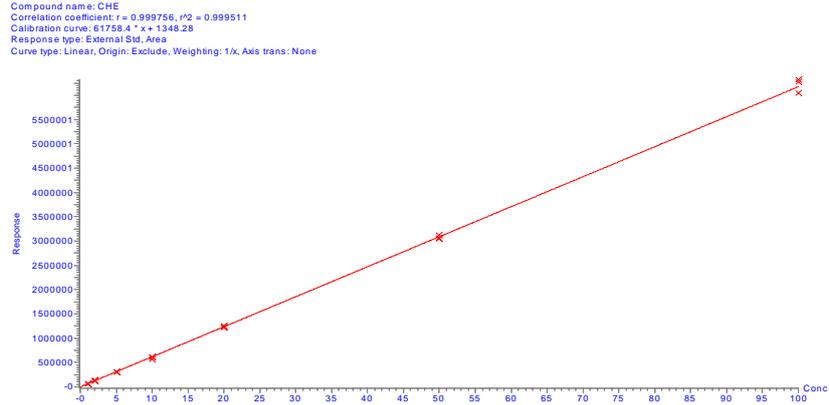


图 9 白屈菜红碱标准曲线

由图 8-图 9 可知，血根碱、白屈菜红碱在 1 ng/mL~100 ng/mL 浓度范围内线性良好， $r^2$  均可达到 0.999。实际应用过程中，各检测化合物在不同品牌和型号的质谱仪存在响应差异。因此，在实际样品测定中，可根据样品浓度或各化合物响应程度选择不同的线性范围对其进行准确定量，或将样品进行适当稀释后进样。

### 3.2 方法的检出限和定量限

为确定检出限、定量限水平，使用不同基质样品的基质溶液对血根碱和白屈菜红碱标准溶液进行稀释，直至目标化合物的信噪比为 10 左右作为方法的定量限。此时血根碱和白屈菜红碱的浓度为 0.2 ng/mL，图 10-图 17。按照前处理时的称样和稀释倍数折算，检出限为 0.002 mg/kg，定量限为 0.005 mg/kg。

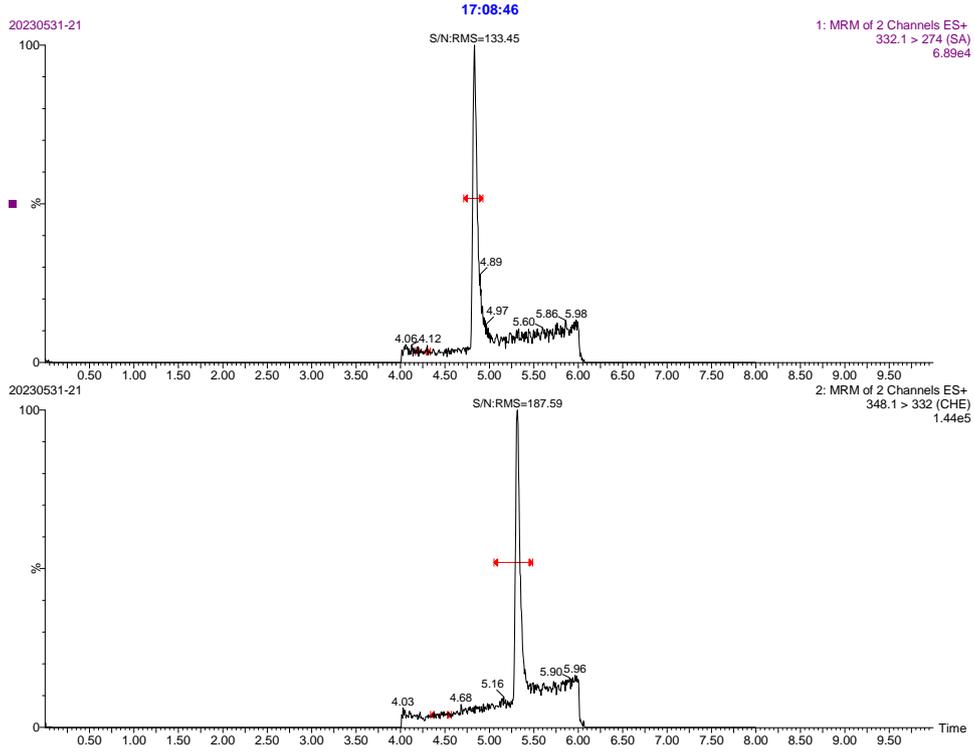


图 10 猪预混合饲料定量限附近色谱图

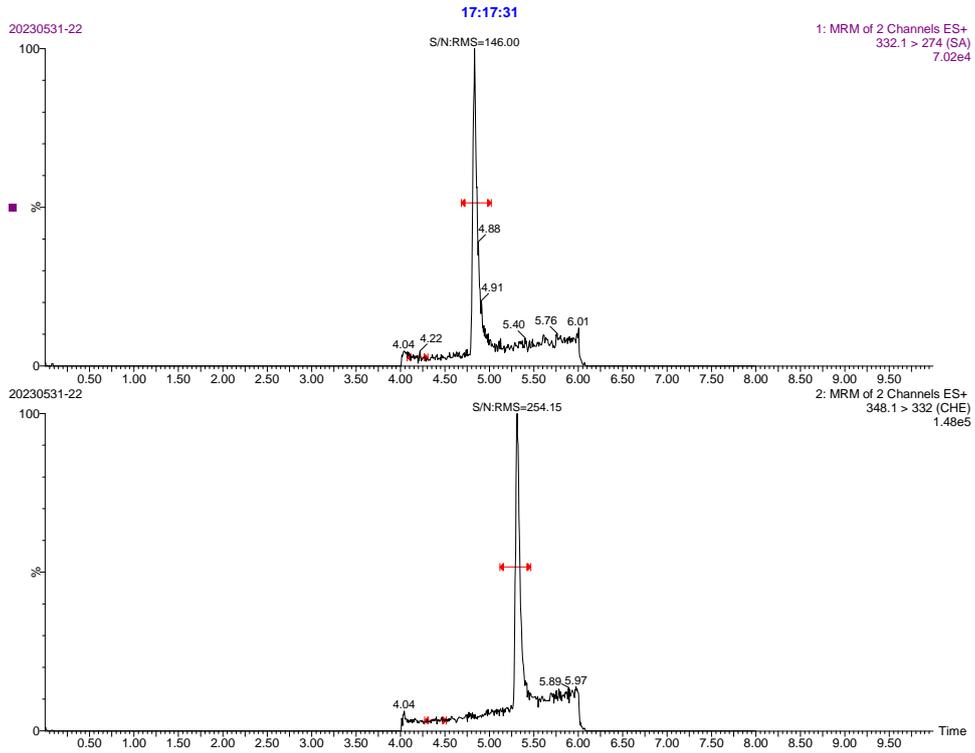


图 11 猪浓缩饲料定量限附近色谱图

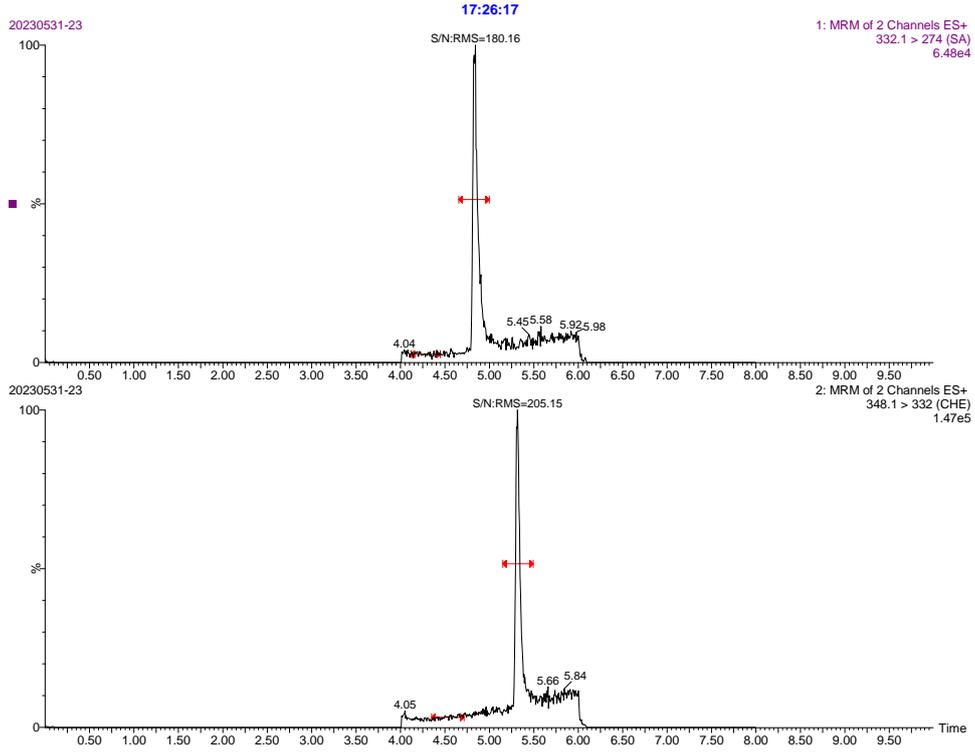


图 12 猪配合饲料定量限附近色谱图

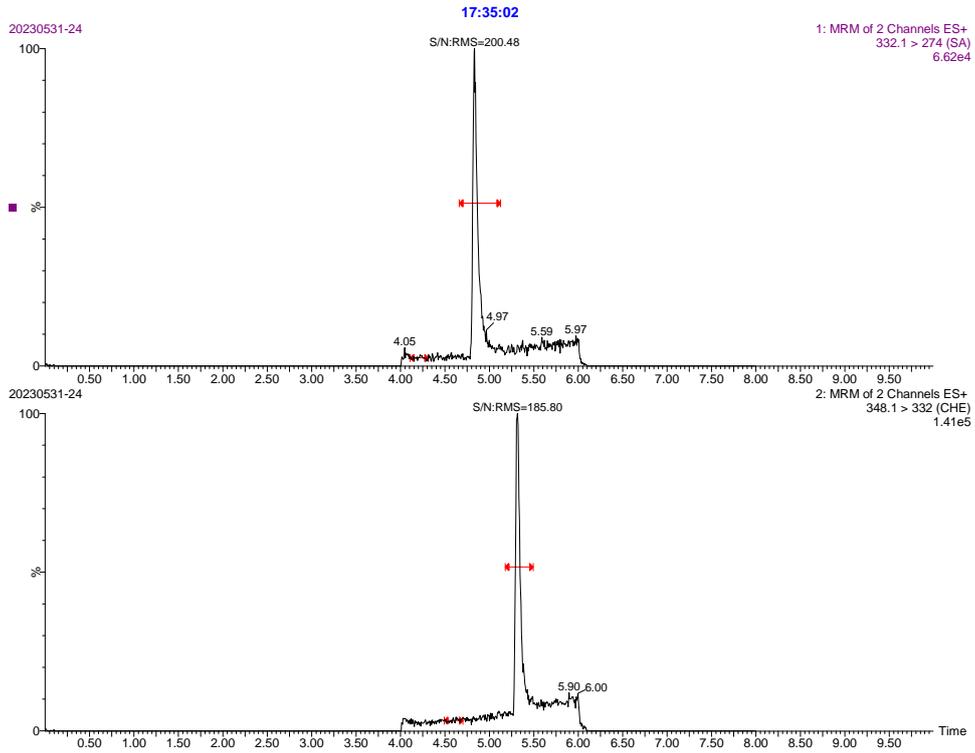


图 13 鸡预混合饲料定量限附近色谱图

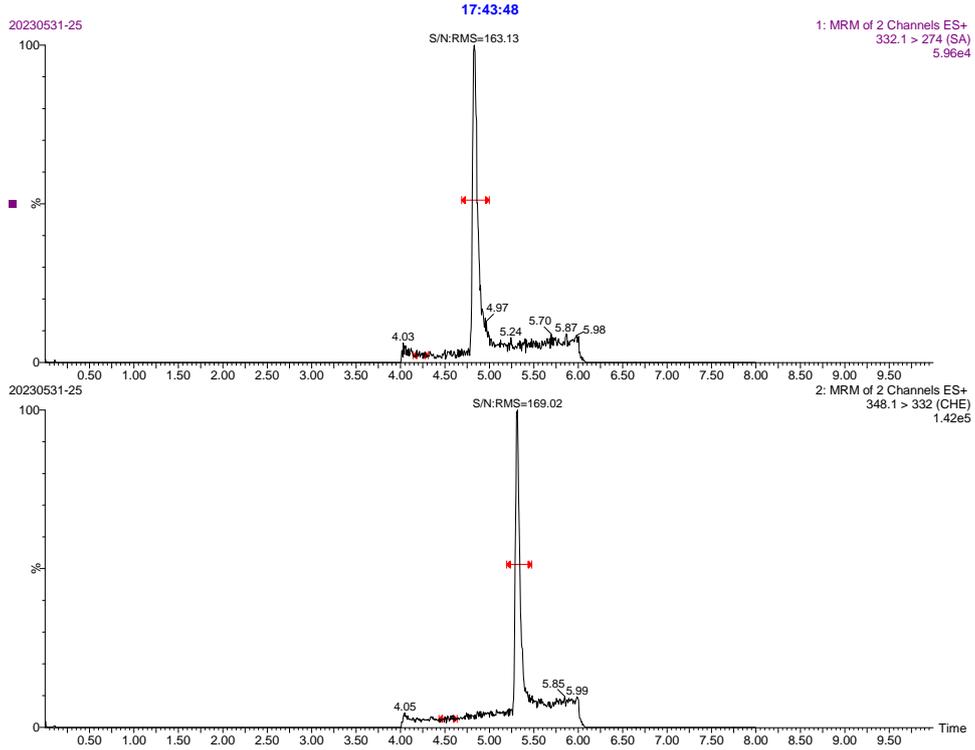


图 14 鸡浓缩饲料定量限附近色谱图

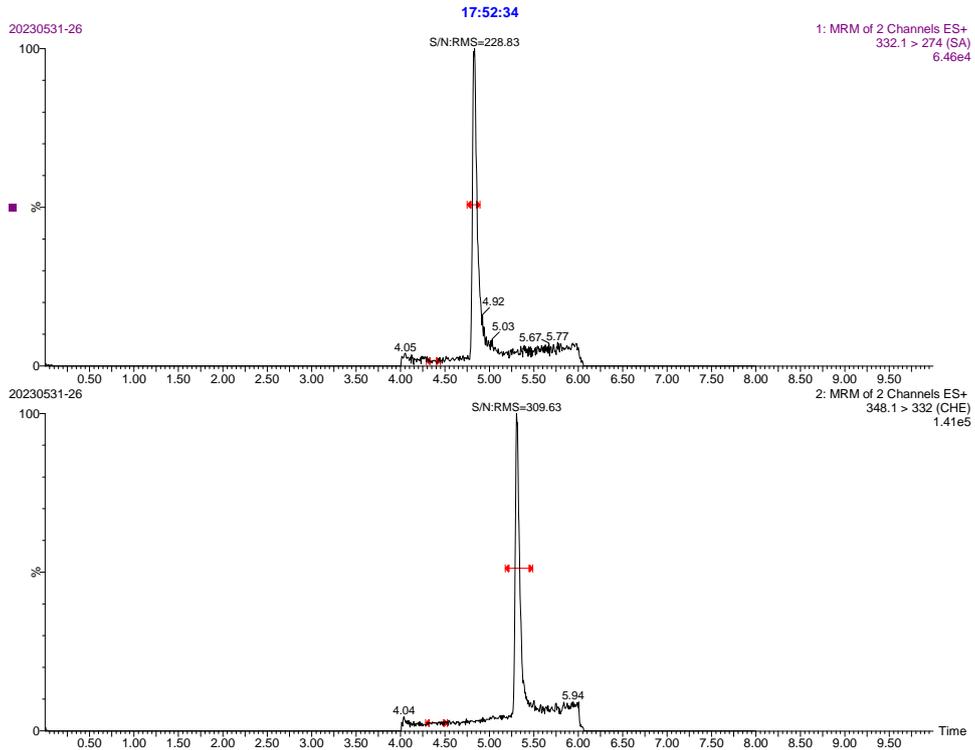


图 15 鸡配合饲料定量限附近色谱图

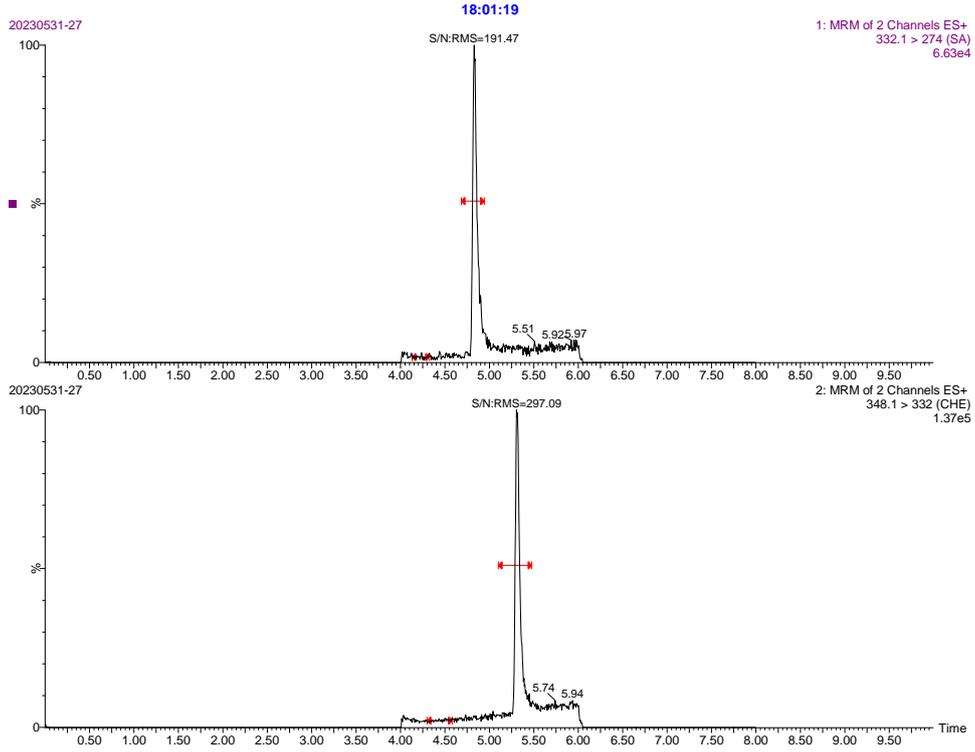


图 16 猪精料补充料定量限附近色谱图

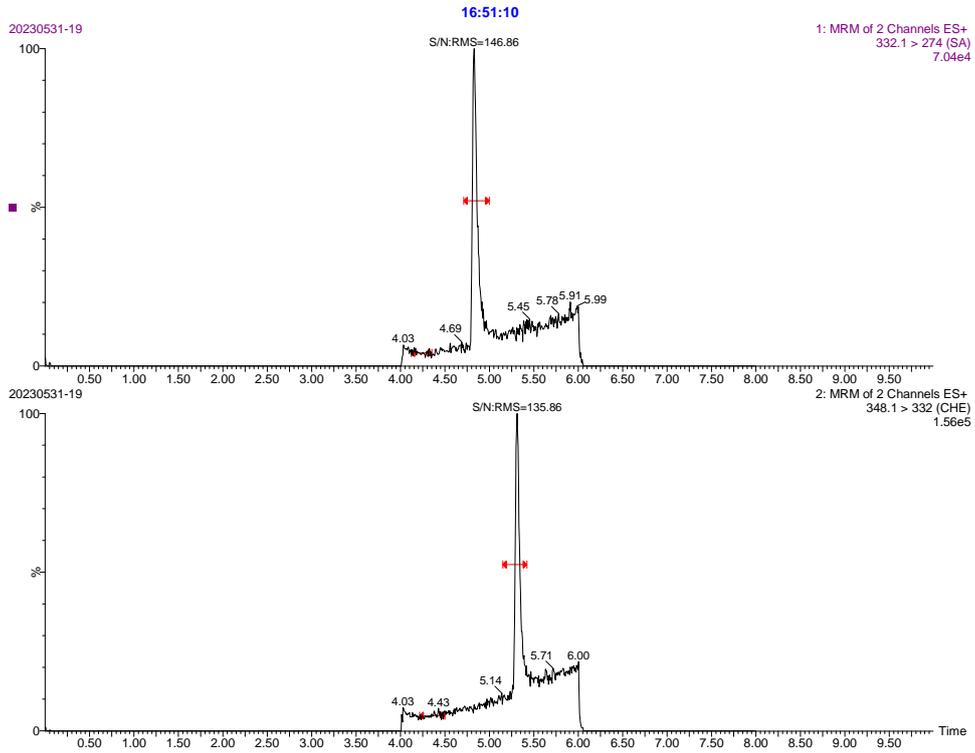


图 17 水产饲料定量限附近色谱图

### 3.3 方法的准确度和精密度

选取空白饲料基质进行 0.005 mg/kg、0.025 mg/kg、0.1 mg/kg、1 mg/kg、5 mg/kg 和 10 mg/kg 的添加，考查回收率及精密度。测定结果见表 22-表 37。

结果表明，血根碱在预混合饲料、浓缩料、配合饲料、精料补充料、水产饲料中的批内回收率在 91.9%~101%之间，RSD 在 3.30%~7.96%之间，批间回收率在 91.9%~101%之间，RSD 在 0.38%~8.00%之间；白屈菜红碱在预混合饲料、浓缩料、配合饲料、精料补充料、水产饲料中的批内回收率在 92.0%~101%之间，RSD 在 2.00%~8.10%之间，批间回收率在 92.0%~101%之间，RSD 在 0.16%~6.46%之间。方法的回收率及精密度均符合 GB/T 23182-2008《饲料中兽药及其他化学物质检测试验规程》要求。

表 22 方法准确度及精密度的试验结果-猪预混合饲料-血根碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00455	0.00501	0.00432	0.00428	0.00499	0.00442	0.00460	91.9	7.10
	0.025	0.0242	0.0224	0.0233	0.0247	0.0223	0.0251	0.0237	94.7	5.02
	0.1	0.1019	0.0923	0.0996	0.0889	0.0932	0.0955	0.0952	95.2	5.07
	1	0.921	1.029	0.889	0.929	1.048	1.046	0.977	97.7	7.33
	5	4.51	4.54	4.56	4.91	5.00	4.73	4.71	94.1	4.41
	10	10.28	9.21	9.64	9.36	9.65	9.13	9.55	95.5	4.39
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00478	0.00430	0.00470				0.00460	91.9	5.57
	0.025	0.0233	0.0240	0.0237				0.0237	94.7	1.58
	0.1	0.0971	0.0942	0.0943				0.0952	95.2	1.69
	1	0.975	0.909	1.047				0.977	97.7	7.06
	5	4.52	4.73	4.86				4.71	94.1	3.66
	10	9.75	9.50	9.39				9.55	95.5	1.93

表 23 方法准确度及精密度的试验结果-猪预混合饲料-白屈菜红碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00504	0.00509	0.00456	0.00500	0.00486	0.00437	0.00482	96.4	6.05
	0.025	0.0257	0.0242	0.0229	0.0232	0.0216	0.0239	0.0236	94.4	5.82
	0.1	0.0869	0.1043	0.0880	0.1007	0.1028	0.0983	0.0968	96.8	7.78
	1	0.937	0.884	0.971	1.047	0.889	1.068	0.966	96.6	8.10
	5	5.14	5.22	5.22	4.50	4.55	5.16	4.96	99.3	6.91
	10	9.18	10.40	10.09	9.51	10.20	9.34	9.78	97.8	5.19
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00507	0.00478	0.00462				0.00482	96.4	4.72
	0.025	0.0249	0.0231	0.0228				0.0236	94.4	5.00
	0.1	0.0956	0.0944	0.1006				0.0968	96.8	3.38
	1	0.910	1.009	0.979				0.966	96.6	5.22
	5	5.18	4.86	4.85				4.96	99.3	3.74
	10	9.79	9.80	9.77				9.78	97.8	0.16

表 24 方法准确度及精密度的试验结果-猪浓缩饲料-血根碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00458	0.00423	0.00498	0.00507	0.00431	0.00443	0.00460	92.0	7.61
	0.025	0.0222	0.0249	0.0243	0.0224	0.0237	0.0254	0.0238	95.2	5.52
	0.1	0.1048	0.0878	0.0940	0.0885	0.1025	0.0889	0.0944	94.4	7.96
	1	0.946	0.906	0.972	1.020	0.879	0.911	0.939	93.9	5.44
	5	5.00	4.66	4.79	5.10	5.04	4.54	4.85	97.1	4.73
	10	9.52	9.32	10.34	9.24	9.14	9.61	9.53	95.3	4.57
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						

	0.005	0.00441	0.00503	0.00437				0.00460	92.0	8.00
	0.025	0.0235	0.0233	0.0246				0.0238	95.2	2.77
	0.1	0.0963	0.0912	0.0957				0.0944	94.4	2.93
	1	0.926	0.996	0.895				0.939	93.9	5.47
	5	4.83	4.95	4.79				4.85	97.1	1.66
	10	9.42	9.79	9.37				9.53	95.3	2.41

表 25 方法准确度及精密度的试验结果-猪浓缩饲料-白屈菜红碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率/%	RSD/%
批内	0.005	0.00436	0.00502	0.00449	0.00466	0.00436	0.00470	0.00460	92.0	5.51
	0.025	0.0245	0.0228	0.0227	0.0244	0.0226	0.0221	0.0232	92.8	4.36
	0.1	0.1024	0.0873	0.0997	0.0882	0.0943	0.0885	0.0934	93.4	6.91
	1	1.048	1.043	1.040	0.900	1.019	0.959	1.002	100	5.96
	5	4.95	4.90	4.61	4.73	4.58	4.78	4.76	95.2	3.15
	10	9.29	9.95	10.02	9.45	9.63	9.34	9.61	96.1	3.25
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00469	0.00458	0.00453				0.00460	92.0	1.79
	0.025	0.0237	0.0236	0.0224				0.0232	92.8	3.09
	0.1	0.0949	0.0939	0.0914				0.0934	93.4	1.90
	1	1.045	0.970	0.989				1.002	100.2	3.91
	5	4.93	4.67	4.68				4.76	95.2	3.03
	10	9.62	9.74	9.48				9.61	96.1	1.32

表 26 方法准确度及精密度的试验结果-猪配合饲料-血根碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率/%	RSD/%
批内	0.005	0.00506	0.00474	0.00504	0.00428	0.00480	0.00431	0.00470	94.1	7.26
	0.025	0.0251	0.0224	0.0217	0.0241	0.0237	0.0224	0.0232	92.9	5.53

	0.1	0.0982	0.0994	0.0882	0.0963	0.0990	0.0926	0.0956	95.6	4.60
	1	0.964	0.953	0.992	0.896	0.979	1.046	0.972	97.2	5.07
	5	4.92	4.75	4.83	4.88	4.55	5.09	4.84	96.7	3.73
	10	9.47	9.36	9.20	9.08	10.02	10.16	9.55	95.5	4.65
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00490	0.00466	0.00455				0.00470	94.1	3.76
	0.025	0.0237	0.0229	0.0231				0.0232	92.9	1.92
	0.1	0.0988	0.0923	0.0958				0.0956	95.6	3.42
	1	0.958	0.944	1.013				0.972	97.2	3.71
	5	4.84	4.85	4.82				4.84	96.7	0.38
	10	9.41	9.14	10.09				9.55	95.5	5.14

表 27 方法准确度及精密度的试验结果-猪配合饲料-白屈菜红碱

牛预 混合 饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00442	0.00511	0.00446	0.00490	0.00430	0.00449	0.00462	92.3	6.88
	0.025	0.0234	0.0247	0.0258	0.0218	0.0238	0.0248	0.0241	96.2	5.86
	0.1	0.0949	0.1015	0.0971	0.0875	0.1006	0.0883	0.0950	95.0	6.30
	1	1.064	1.021	1.047	0.996	1.053	0.909	1.01	101	5.68
	5	4.97	4.69	4.66	4.60	4.57	4.81	4.72	94.3	3.15
	10	9.35	9.22	10.13	9.19	9.37	10.09	9.56	95.6	4.51
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00477	0.00468	0.00440				0.00462	92.3	4.19
	0.025	0.0241	0.0238	0.0243				0.0241	96.2	1.11
	0.1	0.0982	0.0923	0.0945				0.0950	95.0	3.13
	1	1.042	1.022	0.981				1.015	101.5	3.08
	5	4.83	4.63	4.69				4.72	94.3	2.14

	10	9.28	9.66	9.73				9.56	95.6	2.51
--	----	------	------	------	--	--	--	------	------	------

表 28 方法准确度及精密度的试验结果-鸡预混合饲料-血根碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00434	0.00442	0.00454	0.00495	0.00490	0.00468	0.00464	92.8	5.35
	0.025	0.0259	0.0232	0.0230	0.0239	0.0251	0.0251	0.0244	97.4	4.73
	0.1	0.0978	0.0965	0.0965	0.0884	0.0976	0.0880	0.0941	94.1	4.92
	1	0.944	1.036	0.958	0.895	0.955	0.934	0.954	95.4	4.87
	5	4.99	4.67	4.58	5.06	4.84	4.96	4.85	97.0	3.93
	10	10.39	9.28	10.50	10.50	9.68	9.95	10.05	100.5	4.99
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00438	0.00474	0.00479				0.00464	92.8	4.81
	0.025	0.0245	0.0235	0.0251				0.0244	97.4	3.38
	0.1	0.0971	0.0925	0.0928				0.0941	94.1	2.77
	1	0.990	0.927	0.944				0.954	95.4	3.43
	5	4.83	4.82	4.90				4.85	97.0	0.91
	10	9.84	10.50	9.82				10.05	100.5	3.87

表 29 方法准确度及精密度的试验结果-鸡预混合饲料-白屈菜红碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00427	0.00447	0.00489	0.00483	0.00472	0.00500	0.00470	93.9	5.86
	0.025	0.0257	0.0217	0.0233	0.0230	0.0228	0.0218	0.0230	92.1	6.27
	0.1	0.0964	0.1055	0.0960	0.0947	0.1056	0.0960	0.0990	99.0	5.15
	1	0.965	0.971	0.897	0.955	0.927	1.055	0.962	96.2	5.55
	5	4.78	4.70	4.66	4.58	4.70	4.52	4.66	93.1	2.00
	10	10.04	9.53	10.35	10.40	9.09	10.26	9.94	99.4	5.31
批间	添加量	第 1 天	第 2 天	第 3 天						

	(mg/kg)									
	0.005	0.00437	0.00486	0.00486				0.00470	93.9	5.99
	0.025	0.0237	0.0231	0.0223				0.0230	92.1	3.02
	0.1	0.1010	0.0953	0.1008				0.0990	99.0	3.24
	1	0.968	0.926	0.991				0.962	96.2	3.43
	5	4.74	4.62	4.61				4.66	93.1	1.60
	10	9.78	10.38	9.67				9.94	99.4	3.81

表 30 方法准确度及精密度的试验结果-鸡浓缩饲料-血根碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00504	0.00497	0.00460	0.00483	0.00465	0.00507	0.00486	97.2	4.12
	0.025	0.0248	0.0231	0.0216	0.0223	0.0252	0.0255	0.0237	95.0	6.97
	0.1	0.0869	0.0914	0.1010	0.1019	0.0920	0.0965	0.0949	94.9	6.20
	1	1.048	0.957	1.062	0.905	0.998	0.904	0.979	97.9	7.03
	5	4.51	4.54	4.56	4.91	5.00	4.73	4.71	94.1	4.41
	10	10.25	9.08	9.67	10.47	9.05	10.21	9.79	97.9	6.34
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00500	0.00472	0.00486				0.00486	97.2	2.96
	0.025	0.0240	0.0219	0.0253				0.0237	95.0	7.27
	0.1	0.0891	0.1014	0.0942				0.0949	94.9	6.51
	1	1.003	0.983	0.951				0.979	97.9	2.67
	5	4.52	4.73	4.86				4.71	94.1	3.66
	10	9.66	10.07	9.63				9.79	97.9	2.52

表 31 方法准确度及精密度的试验结果-鸡浓缩饲料-白屈菜红碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00473	0.00499	0.00432	0.00507	0.00459	0.00496	0.00478	95.5	5.97

	0.025	0.0226	0.0213	0.0250	0.0232	0.0235	0.0252	0.0235	93.9	6.32
	0.1	0.0955	0.1022	0.1005	0.1010	0.0911	0.0872	0.0962	96.2	6.32
	1	0.905	0.915	1.013	0.994	0.901	1.041	0.961	96.1	6.42
	5	4.98	4.55	5.12	5.04	4.94	4.69	4.88	97.7	4.51
	10	10.27	9.40	9.11	9.93	9.09	10.22	9.67	96.7	5.59
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00486	0.00470	0.00477				0.00478	95.5	1.72
	0.025	0.0219	0.0241	0.0244				0.0235	93.9	5.72
	0.1	0.0988	0.1008	0.0892				0.0962	96.2	6.46
	1	0.910	1.003	0.971				0.961	96.1	4.94
	5	4.76	5.08	4.81				4.88	97.7	3.49
	10	9.83	9.52	9.65				9.67	96.7	1.62

表 32 方法准确度及精密度的试验结果-鸡配合饲料-血根碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00499	0.00482	0.00449	0.00479	0.00492	0.00435	0.00472	94.5	5.38
	0.025	0.0213	0.0253	0.0252	0.0223	0.0252	0.0257	0.0242	96.7	7.73
	0.1	0.0874	0.0964	0.0978	0.0940	0.0876	0.0913	0.0924	92.4	4.74
	1	0.906	0.886	1.044	0.985	1.025	1.015	0.977	97.7	6.75
	5	4.98	4.54	4.79	4.81	4.99	4.64	4.79	95.8	3.77
	10	9.79	9.54	9.34	10.26	9.34	10.34	9.77	97.7	4.55
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00491	0.00464	0.00463				0.00472	94.5	3.34
	0.025	0.0233	0.0238	0.0254				0.0242	96.7	4.68
	0.1	0.0919	0.0959	0.0895				0.0924	92.4	3.51
	1	0.896	1.015	1.020				0.977	97.7	7.18

	5	4.76	4.80	4.82				4.79	95.8	0.61
	10	9.66	9.80	9.84				9.77	97.7	0.95

表 33 方法准确度及精密度的试验结果-鸡配合饲料-白屈菜红碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00502	0.00442	0.00442	0.00443	0.00496	0.00450	0.00463	92.5	6.11
	0.025	0.0254	0.0243	0.0233	0.0235	0.0232	0.0242	0.0240	95.9	3.45
	0.1	0.0871	0.0965	0.1036	0.0983	0.0903	0.1049	0.0968	96.8	7.32
	1	1.052	0.996	0.998	0.904	0.990	0.904	0.974	97.4	6.00
	5	5.11	4.66	4.53	4.92	5.10	4.55	4.81	96.2	5.54
	10	9.09	10.03	10.24	9.94	10.25	9.98	9.92	99.2	4.32
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00472	0.00443	0.00473				0.00463	92.5	3.70
	0.025	0.0249	0.0234	0.0237				0.0240	95.9	3.24
	0.1	0.0918	0.1009	0.0976				0.0968	96.8	4.77
	1	1.024	0.951	0.947				0.974	97.4	4.43
	5	4.88	4.72	4.83				4.81	96.2	1.70
	10	9.56	10.09	10.11				9.92	99.2	3.17

表 34 方法准确度及精密度的试验结果-猪精料补充料-血根碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00447	0.00496	0.00501	0.00485	0.00465	0.00453	0.00474	94.9	4.77
	0.025	0.0241	0.0246	0.0233	0.0222	0.0249	0.0238	95.2	4.15	0.0241
	0.1	0.1006	0.0926	0.1048	0.0987	0.1017	0.0929	0.0986	98.6	5.00
	1	1.019	0.885	0.931	0.935	1.019	0.981	0.962	96.2	5.60
	5	4.58	4.85	5.10	4.61	4.98	4.88	4.83	96.7	4.20

	10	9.74	9.11	9.22	9.76	9.09	10.45	9.56	95.6	5.57
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00471	0.00493	0.00459				0.00474	94.9	3.62
	0.025	0.0239	0.0239	0.0235				0.0238	95.2	0.95
	0.1	0.0966	0.1018	0.0973				0.0986	98.6	2.85
	1	0.952	0.933	1.000				0.962	96.2	3.60
	5	4.72	4.85	4.93				4.83	96.7	2.22
	10	9.43	9.49	9.77				9.56	95.6	1.93

表 35 方法准确度及精密度的试验结果-猪精料补充料-白屈菜红碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00491	0.00507	0.00434	0.00500	0.00439	0.00499	0.00478	95.7	6.90
	0.025	0.0224	0.0220	0.0239	0.0252	0.0252	0.0239	0.0238	95.1	5.72
	0.1	0.0972	0.0995	0.0913	0.1050	0.0925	0.0975	0.0972	97.2	5.12
	1	0.948	0.931	0.894	1.043	0.973	0.910	0.950	95.0	5.62
	5	4.67	5.22	5.05	5.08	4.97	5.20	5.03	101	4.01
	10	10.50	9.20	10.24	9.65	9.40	9.59	9.76	97.6	5.15
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00499	0.00467	0.00469				0.00478	95.7	3.72
	0.025	0.0222	0.0246	0.0246				0.0238	95.1	5.78
	0.1	0.0984	0.0982	0.0950				0.0972	97.2	1.94
	1	0.940	0.969	0.942				0.950	95.0	1.73
	5	4.95	5.07	5.08				5.03	100.6	1.49
	10	9.85	9.95	9.50				9.76	97.6	2.42

表 36 方法准确度及精密度的试验结果-水产饲料-血根碱

牛预混合	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
------	----------------	------	------	------	------	------	------	-----	-----------	-------

饲料										
批内	0.005	0.00498	0.00436	0.00470	0.00501	0.00493	0.00494	0.00482	96.4	5.18
	0.025	0.0225	0.0237	0.0250	0.0219	0.0252	0.0218	0.0234	93.5	6.49
	0.1	0.0987	0.0916	0.1015	0.0986	0.1028	0.0981	0.0986	98.6	3.94
	1	1.049	0.921	1.061	0.934	0.893	0.967	0.971	97.1	7.16
	5	4.50	4.86	4.92	4.64	4.83	4.75	4.75	95.0	3.30
	10	10.38	9.39	9.82	9.30	9.73	10.44	9.84	98.4	4.89
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00467	0.00486	0.00493				0.00482	96.4	2.82
	0.025	0.0231	0.0235	0.0235				0.0234	93.5	0.92
	0.1	0.0951	0.1000	0.1005				0.0986	98.6	3.01
	1	0.985	0.998	0.930				0.971	97.1	3.70
	5	4.68	4.78	4.79				4.75	95.0	1.33
	10	9.89	9.56	10.08				9.84	98.4	2.67

表 37 方法准确度及精密度的试验结果-水产饲料-白屈菜红碱

牛预混合饲料	添加量 (mg/kg)	数据 1	数据 2	数据 3	数据 4	数据 5	数据 6	平均值	回收率 /%	RSD/%
批内	0.005	0.00471	0.00509	0.00466	0.00501	0.00464	0.00422	0.00472	94.5	6.55
	0.025	0.0233	0.0255	0.0251	0.0216	0.0251	0.0222	0.0238	95.2	6.99
	0.1	0.1008	0.0961	0.1031	0.0992	0.0870	0.1041	0.0984	98.4	6.38
	1	1.060	0.914	0.959	1.044	1.037	1.060	1.01	101	6.02
	5	5.22	4.87	5.01	4.59	4.54	4.73	4.83	96.6	5.38
	10	10.01	9.33	10.22	9.32	9.06	9.88	9.64	96.4	4.81
批间	添加量 (mg/kg)	第 1 天	第 2 天	第 3 天						
	0.005	0.00490	0.00484	0.00443				0.00472	94.5	5.39
	0.025	0.0244	0.0234	0.0237				0.0238	95.2	2.17

	0.1	0.0985	0.1011	0.0955				0.0984	98.4	2.85
	1	0.987	1.001	1.048				1.012	101.2	3.17
	5	5.05	4.80	4.63				4.83	96.6	4.29
	10	9.67	9.77	9.47						

### 3.4 方法特异性

实验测定了 8 种不含血根碱和白屈菜红碱的饲料样品，按照优化后的前处理条件处理样品，在优化后的液相和质谱条件下进样，结果如图 18-图 19 所示。参照品未出现明显的目标峰，证明本方法具有良好的特异性。

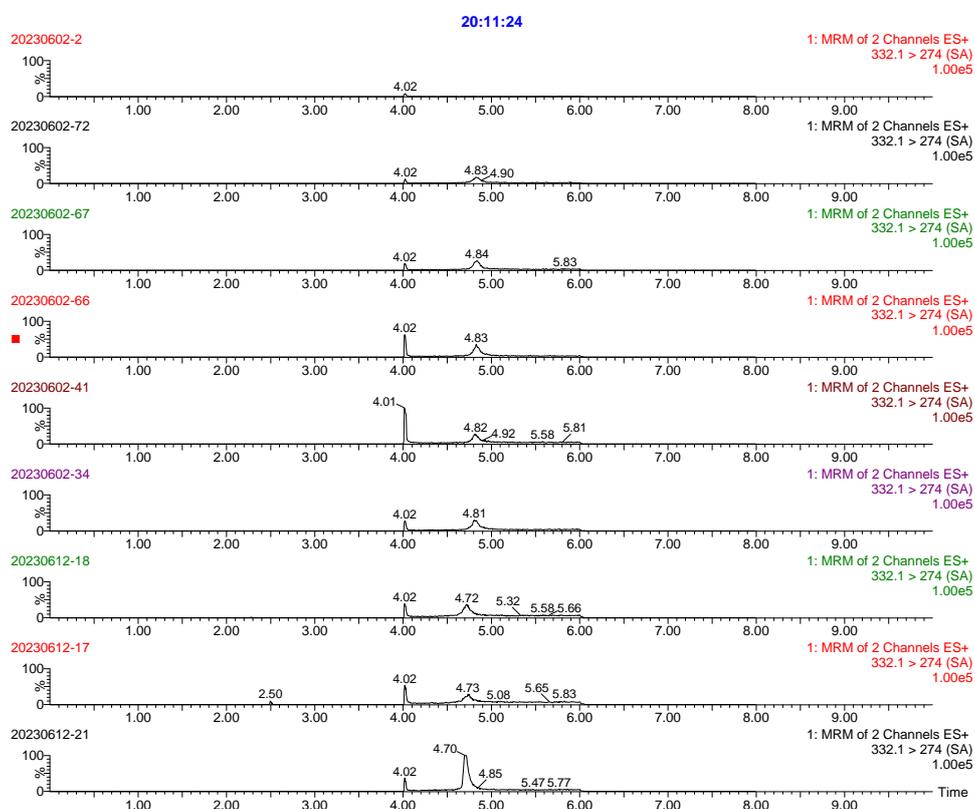


图 18 液相色谱-串联质谱体系中血根碱标准品 (0.2 ng/mL) 和 8 种空白基质的色谱图

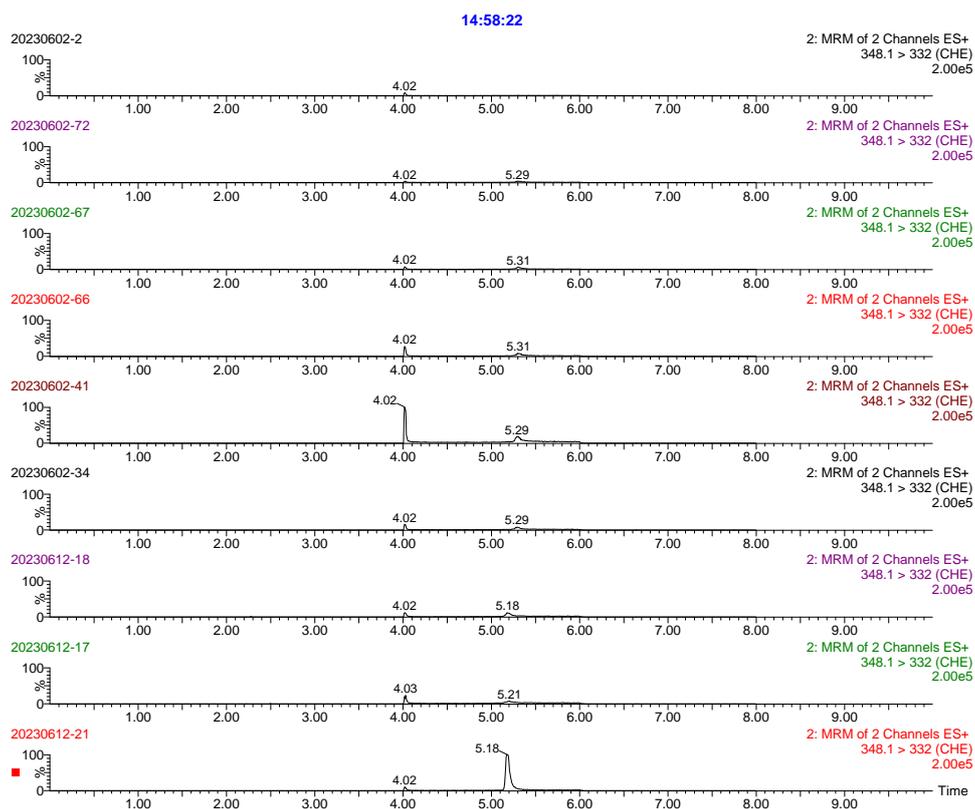


图 19 液相色谱-串联质谱体系中白屈菜红碱标准品（0.2 ng/mL）和 8 种空白基质的色谱图

### 3.5 标准储备溶液的稳定性试验

对标准储备溶液（0.5mg/mL）进行了为期 6 个月的稳定性试验。鉴于贮备液浓度较高，故每次试验时，临时稀释，配制成浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  的标准溶液，上机测定。试验结果表明，标准储备溶液在 $\leq -18^{\circ}\text{C}$ 下保存 6 个月是稳定的，见表 38。

表 38 标准储备溶液稳定性试验结果

化合物	峰面积（浓度 100 $\mu\text{g/mL}$ ）										平均值	RSD %
	0 天	7 天	14 天	21 天	1 月	2 月	3 月	4 月	5 月	6 月		
血根碱	3551	3504	3430	3445	3391	3420	3416	3487	3407	3475	3453	1.46
白屈菜红碱	3375	3447	3481	3395	3378	3450	3520	3546	3637	3551	3478	2.47

### 3.6 标准工作溶液的稳定性试验

将制备好的 10 ng/mL 标准溶液，在 24h 内连续进样测定，结果显示试液基

质中血根碱、白屈菜红碱的稳定较好。结果见表 39。

表 39 标准溶液的稳定性

化合物	峰面积							
	0 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	平均	RSD (%)
血根碱	281847	281026	290937	297527	300379	296819	291422	2.86
白屈菜红碱	571108	567969	585431	569758	582111	590547	577821	1.63

### 3.7 试样溶液的稳定性试验

将制备好的样品溶液（10 ng/mL），在 24h 内连续进样测定，结果显示试液基质中血根碱、白屈菜红碱的稳定较好，详见下表 40。

表 40 试样溶液稳定性结果表

基质	化合物	峰面积（上机测试浓度 10 ng/mL）							
		0 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	平均	RSD (%)
禽预混合 饲料	血根碱	289155	297665	297224	299314	305614	310276	299875	2.44
	白屈菜红碱	568244	563291	582515	567529	575059	558863	569250	1.48
禽浓缩 饲料	血根碱	273384	276477	268912	267540	259444	269297	269176	2.16
	白屈菜红碱	563006	569281	570095	557209	571770	589190	570092	1.90
禽配合 饲料	血根碱	287577	290094	296132	304079	314052	322968	302484	4.61
	白屈菜红碱	573174	585011	578795	586617	583850	586629	582346	0.92
畜预混合 饲料	血根碱	283878	274618	266416	267738	268596	262605	270642	2.79
	白屈菜红碱	573066	574548	578019	559753	579525	572822	572955	1.22
畜浓缩 饲料	血根碱	284378	290141	287467	277771	273479	266337	279929	3.24
	白屈菜红碱	558407	564779	557813	545283	536557	556312	553192	1.86
畜配合 饲料	血根碱	286955	288294	290080	289559	291330	282860	288179	1.04
	白屈菜红碱	556046	548018	566843	549544	536847	542442	549957	1.91
精料补充 料	血根碱	288303	289735	281728	273409	277114	272274	280427	2.65
	白屈菜红碱	563307	545373	541961	532926	535511	534544	542270	2.09
水产饲料	血根碱	275996	269338	259472	253845	248599	247924	259196	4.41

基质	化合物	峰面积（上机测试浓度 10 ng/mL）							RSD (%)
		0 h	2 h	4 h	8 h	16 h	24 h	平均	
	白屈菜红碱	570699	582549	596534	600485	590981	581941	587198	1.86

### 3.8 试样测定

在市面上购买到的畜预混合饲料、畜浓缩饲料、畜配合饲料各 1 批次作为本实验实际样品，用建立好的实验方法对其进行检测，测定结果如表 41 所示。饲料中血根碱、白屈菜红碱的浓度范围为 0.2 mg/kg ~10 mg/kg，其中预混合饲料样品图见图 20。

表 41 实际样品检测结果

样品	预混合饲料	浓缩饲料	配合饲料
血根碱 (mg/kg)	8.62	1.65	0.471
白屈菜红碱 (mg/kg)	4.84	0.973	0.263

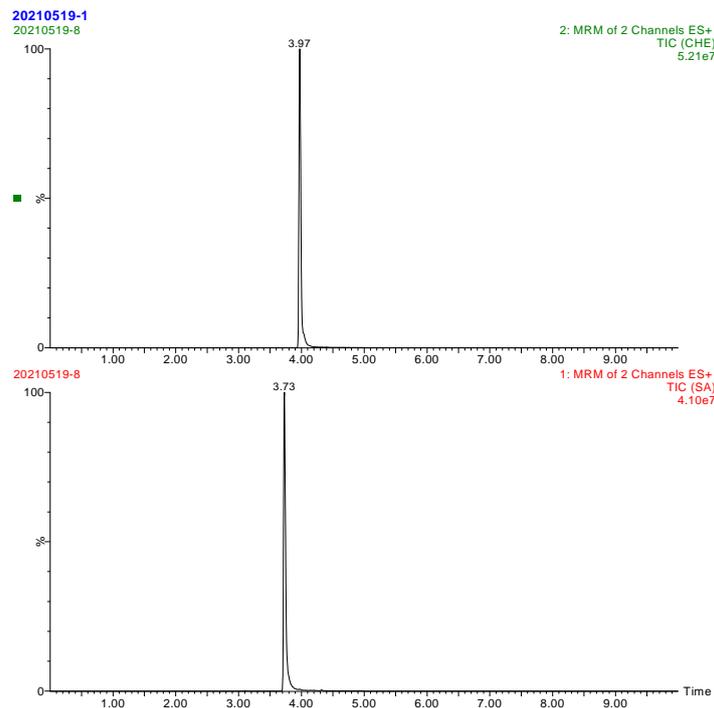


图 20 预混合饲料色谱图

### 3.9 验证单位试验结果

我单位委托上海海关动植物食品中心、上海市疾病预防控制中心、上海市农

---

业科学院农产品质量标准与检测技术研究所 3 家单位对标准方法的线性与范围、检出限与定量限、准确度与精密度进行验证确认，验证结果符合相关标准要求，表明方法可行。

### 3.10 综述报告

经上述方法学验证，高效液相色谱-串联质谱法的线性范围为 1 ng/mL~100 ng/mL，饲料中检出限为 0.002 mg/kg，定量限为 0.005 mg/kg。饲料中血根碱在预混合饲料、浓缩料、配合饲料、精料补充料、水产饲料中的批内回收率在 91.9%~101%之间，RSD 在 3.30%~7.96%之间，批间回收率在 91.9%~101%之间，RSD 在 0.38%~8.00%之间；白屈菜红碱在预混合饲料、浓缩料、配合饲料、精料补充料、水产饲料中的批内回收率在 92.0%~101%之间，RSD 在 2.00%~8.10%之间，批间回收率在 92.0%~101%之间，RSD 在 0.16%~6.46%之间。实验结果符合《GB/T23182-2008》相关标准要求。本方法适用于配合饲料、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。

### 3.11 技术经济论证

无。

### 3.12 预期经济效果

本标准制定有助于强化监管饲料中血根碱和白屈菜红碱的使用，直接保证了畜禽产品的安全，保障了人民的健康。同时，本标准制定还为饲料生产者提供技术服务，保障其生产饲料符合要求，避免因不达标遭受损失，提高生产者的经济效益。

## 四、采用国际标准

无。

---

## 五、采标情况，以及是否合规引用或采用国际国外标准

无。

## 六、与有关现行法律、法规和强制性标准的关系

在标准的制定过程中严格贯彻国家有关方针、政策、法律和规章。与相关的各种基础标准相衔接，遵循政策性和协调统一性的原则。

## 七、重大分歧意见的处理经过和依据

标准在制定过程中，标准编制组收集调研了国内外相关信息资料，组织主要生产企业技术专家对标准内容的制定，进行了详细研讨，并达成统一制定方案。无重大分歧意见。

## 八、涉及专利的有关说明

未涉及专利。

## 九、贯彻标准的要求，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

发布后、实施前应将信息在媒体上广为宣传，建议全国饲料工业标准化技术委员会秘书处及时组织标准宣贯、培训。

## 十、其他应予说明的事项

无。

---

## 参考文献:

- [1] 王瑾瑜, 任亚萍. 博落回属植物化学成分的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2009(15): 41-117
- [2] 曾建国, 刘华, 博落回主要功能成分及其在动物生产中的应用[J]. 饲料工业, 2019(40): 1-6.
- [3] 张灵梅, 朱晋佳, 杨玲媛, 等. 博落回在畜禽生产中的应用研究[J]. 激光生物学报, 2020(29): 113-119.
- [4] 中华人民共和国农业部公告第 318 号(2003 年 12 月) 饲料添加剂品种目录[J], 饲料广角, 2004(3): 4-5.
- [5] 欧阳龙, 盛利斌, 曾建国. 博落回散在健康养殖中的应用前景[J]. 湖南饲料, 2015(1): 28-29.
- [6] 中华人民共和国农业农村部公告第 246 号 .  
[http://www.moa.gov.cn/nybgb/2020/202003/202004/t20200419\\_6341878.htm](http://www.moa.gov.cn/nybgb/2020/202003/202004/t20200419_6341878.htm).
- [7] 张稳, 钱玺丞, 梁浩, 等. 博落回注射液中博落回生物碱的显色鉴别探讨[J]. 云南化工, 2021(8): 58-60.
- [8] 中华人民共和国农业农村部公告第 194 号 .  
[http://www.moa.gov.cn/nybgb/2019/201907/202001/t20200103\\_6334292.htm](http://www.moa.gov.cn/nybgb/2019/201907/202001/t20200103_6334292.htm).
- [9] 中华人民共和国农业部公告第 2374 号 .  
[http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg\\_1/gg/201603/t20160318\\_5059606.htm](http://www.moa.gov.cn/gk/tzgg_1/gg/201603/t20160318_5059606.htm).
- [10] 钟明, 黄可龙, 曾建国, 等. 采用 UPLC-ESI-MS 快速测定博落回各器官中主要生物碱的含量[J]. 中南大学学报(自然科学版),2011(7): 1899-1905.

## 附件

附件 1 验证报告

附件 2 定向征求意见处理汇总表

附件 3 预审专家签字表

---

附件 4 农业行业标准《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法》（预审稿）审查意见

---

附件 1 验证报告

上海海关动植物食品中心验证报告

中华人民共和国农业行业标准  
《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》

# 验证报告

委托单位：上海市质量监督检验技术研究院  
验证单位：上海海关动植物食品中心



验证时间：2022 年 1 月 20 日至 2022 年 1 月 30 日

# 验证报告

受上海市质量监督检验技术研究院委托，我单位根据其提供的《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿，对标准的技术指标进行了验证。

## 一、高效液相色谱法

### 1. 验证的方法及材料

#### 1.1 验证的方法

《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿及编制说明。

#### 1.2 验证的样品

混合饲料、配合饲料和浓缩饲料（猪、鸡）

#### 1.3 仪器设备品牌

高效液相色谱仪 Waters

#### 1.4 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 柱，250 mm×4.6 mm，粒径 5 μm，或性能相当者；

柱温：35℃；

进样量：5 μL；

流动相：A: 磷酸溶液；B: 乙腈,梯度洗脱程序见表 1；

流速：1.0 mL/min；

检测器：紫外检测器，检测波长 275 nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
5	85	15
22	50	50
22.1	20	80
25	20	80
25.1	85	15
30	85	15

## 2、验证的内容与结果

### 2.1 标准曲线

将血根碱、白屈菜红碱标准溶液用酸化乙腈逐级稀释成浓度为 1 μg/mL、2 μg/mL、

5 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL、50 µg/mL、100 µg/mL 的标准系列溶液，供液相色谱仪测定。标准曲线回归方程及相关系数见表 2-表 3。

表 2 血根碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(µg/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	22146	47898	115201	233759	461037	1153316	2264493
线性相关系数 r <sup>2</sup>	0.999919						
线性方程	$Y=2.267 \times 10^4 X+5.083 \times 10^3$						

表 3 白屈菜红碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(µg/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	20608	43600	105607	215002	421443	1054789	2073878
线性相关系数 r <sup>2</sup>	0.999930						
线性方程	$Y=3.076 \times 10^4 X+4.651 \times 10^3$						

从表 2-表 3 中可以看出：在 1µg/mL~100µg/mL 范围内，血根碱、白屈菜红碱标准溶液浓度与峰面积的响应值线性关系良好，相关系数≥0.9990，能够满足检测分析的要求。

## 2.2 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本，添加适量标准工作溶液于 1.0g 空白饲料中(即添加浓度为 50mg/kg)，经提取后测定，血根碱、白屈菜红碱的信噪比(S/N)均大于 10。因此，将血根碱、白屈菜红碱的检测限定为 20mg/kg，定量限定为 50mg/kg，可以满足日常测定的要求。色谱图见图 1~图 6。

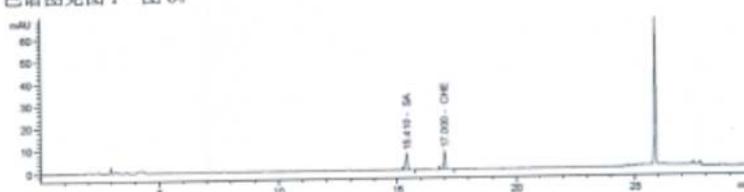


图1 鸡预混饲料定量限加标色谱图

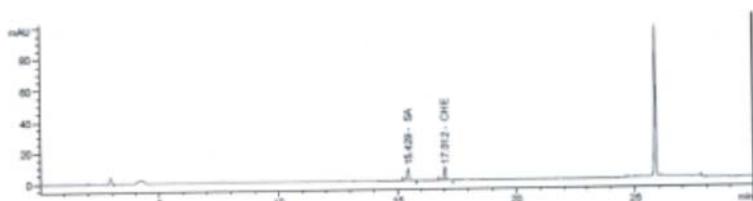


图2 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图

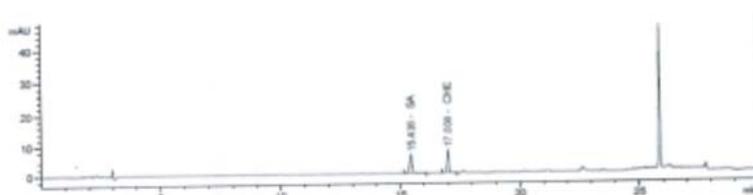


图3 鸡配合饲料定量限加标色谱图

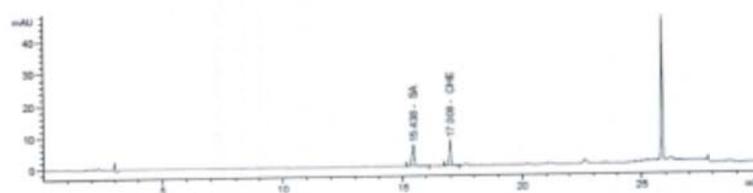


图4 猪预混饲料定量限加标色谱图



图5 猪浓缩饲料定量限加标色谱图

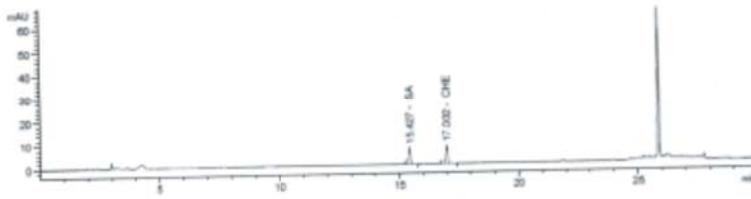


图6 猪配合饲料定量限加标色谱图

### 2.3 准确度（回收率）和精密度

以6个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度，每种饲料中添加3个浓度水平的血根碱、白屈菜红碱，每个浓度做6个平行，计算回收率和变异系数，结果见表4-表7。

表4 回收率实验结果（血根碱，n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						平均值
		测定计算值						
鸡预混饲料	50	103	104	94.2	105	96.3	103	101
	500	95.6	94.6	96.4	97.8	103	99.1	97.7
	1000	102	97.0	99.2	96.5	95.2	98.2	98.0
鸡浓缩饲料	50	96.8	101	96.4	99.8	92.8	95.3	97.0
	500	95.1	100	101	102	101	96.1	99.2
	1000	104	96.5	103	93.5	104	94.5	99.3
鸡配合饲料	50	95.9	93.7	96.5	102	96.7	97.1	97.1
	500	108	97.5	104	99.8	93.8	96.5	99.9
	1000	99.7	96.3	103	99.5	95.1	98.0	98.6
猪预混饲料	50	107	97.0	95.4	96.0	105	94.6	99.3
	500	101	96.4	104	97.0	107	98.1	101
	1000	96.4	96.9	98.3	98.2	100	103	98.9
猪浓缩饲料	50	109	100	99.3	97.5	94.3	97.7	99.7
	500	96.2	104	97.4	95.2	100.6	97.6	98.6
	1000	105	97.2	99.5	100	97.7	111	102
猪配合饲料	50	101	98.6	108	99.0	106.6	95.8	102

	500	95.6	102	103	104	96.5	99.1	100
	1000	100	98.9	105	106	102	92.1	101

表 5 回收率实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						
		测定计算值						平均值
鸡预混饲料	50	103	102	96.9	98.4	97.0	100	99.5
	500	94.7	94.1	95.7	96.8	103	98.4	97.0
	1000	102	96.9	99.4	96.4	95.3	98.2	98.0
鸡浓缩饲料	50	98.1	98.3	96.7	94.3	94.7	99.4	96.9
	500	94.2	99.3	99.5	101.2	100	95.4	98.3
	1000	102	98.6	103	93.8	104	94.2	99.3
鸡配合饲料	50	99.7	95.5	93.3	95.8	97.0	97.3	96.4
	500	107	96.4	103	98.0	93.4	95.4	98.9
	1000	99.5	96.1	103	99.1	95.1	97.7	98.4
猪预混饲料	50	95.7	95.6	95.1	93.9	93.2	95.4	94.8
	500	100	95.9	96.2	102.6	106	98.0	99.8
	1000	96.4	96.7	98.1	98.1	100	103	98.8
猪浓缩饲料	50	96.2	95.4	95.4	99.0	100	96.4	97.1
	500	95.5	103	96.3	94.6	99.8	96.0	97.6
	1000	105	97.3	101	98.1	97.8	111	102
猪配合饲料	50	95.2	104.9	97.4	95.6	97.8	96.7	97.9
	500	94.5	101.3	103	100	97.7	99.1	99.2
	1000	100	98.8	105	105	103	92.2	101

表 6 精密度实验结果 (血根碱, n=6)

样品类型	测定结果 (mg/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	51.6	52.1	47.1	52.6	48.1	51.7	50.5	4.56
	478	473	482	489	514	495	489	3.04
	1021	970	992	965	952	982	980	2.46
鸡浓缩饲料	48.4	50.4	48.2	49.9	46.4	47.6	48.5	3.06
	475	501	506	509	505	481	496	2.90

	1041	965	1032	935	1040	945	993	5.03
鸡配合饲料	48.0	46.8	48.2	51.2	48.4	48.6	48.5	3.01
	538	488	521	499	469	483	500	5.14
	997	963	1033	995	951	980	986	2.94
猪预混饲料	53.7	48.5	47.7	48.0	52.5	47.3	49.6	5.58
	503	482	520	485	537	491	503	4.29
	964	969	983	982	1003	1035	989	2.65
猪浓缩饲料	54.5	50.2	49.7	48.7	47.2	48.9	49.8	5.01
	481	521	487	476	503	488	493	3.37
	1054	972	995	1001	977	1111	1018	5.30
猪配合饲料	50.6	49.3	54.0	49.5	53.3	47.9	50.8	4.75
	478	510	516	518	483	495	500	3.47
	1002	989	1050	1059	1022	921	1007	4.96

表 7 精密度实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品类型	测定结果 (mg/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	51.4	50.8	48.4	49.2	48.5	50.2	49.8	2.48
	474	471	478	484	513	492	485	3.18
	1020	969	994	964	953	982	980	2.45
鸡浓缩饲料	49.0	49.1	48.4	47.2	47.3	49.7	48.5	2.12
	471	497	498	506	500	477	491	2.83
	1019	986	1035	938	1040	942	993	4.57
鸡配合饲料	49.9	47.7	46.7	47.9	48.5	48.7	48.2	2.22
	534	482	516	490	467	477	494	5.16
	995	961	1031	991	951	977	984	2.89
猪预混饲料	47.9	47.8	47.5	47.0	46.6	47.7	47.4	1.09
	500	479	481	513	532	490	499	4.08
	964	967	981	981	1002	1035	988	2.67
猪浓缩饲料	48.1	47.7	47.7	49.5	50.1	48.2	48.5	2.06
	478	517	482	473	499	480	488	3.41
	1049	973	1013	981	978	1112	1018	5.34
猪配合饲料	47.6	52.5	48.7	47.8	48.9	48.3	49.0	3.65
	472	506	513	502	489	495	496	2.90
	1000	988	1047	1048	1030	922	1006	4.75

结果表明: 在不同浓度添加水平下, 平均回收率大于 95%; 变异系数小于 10%, 方法的准确度和精密度均满足检测要求。

## 二、液相色谱-串联质谱法

### 1. 验证的方法及材料

#### 1.1 验证的方法

《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿及编制说明。

## 1.2 验证的样品

混合饲料、配合饲料和浓缩饲料（猪、鸡）

## 1.3 仪器设备品牌

高效液相色谱-串联质谱仪 Waters

## 1.4 液相色谱-串联质谱条件

### 1.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 柱，50 mm × 2.1 mm，粒径 1.7 μm，或性能相当者；

柱温：35℃；

进样量：2 μL；

流动相：A 相为 0.1% 甲酸溶液，B 相为乙腈，梯度洗脱程序见表 8；

流速：0.3 mL/min。

表 8 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
6.00	0	100
8.00	0	100
8.01	90	10
10.00	90	10

### 1.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI+）；

检测方式：多反应监测（MRM）；

鞘气：800 L/Hr；

反吹气：150 L/Hr；

雾化器温度：400℃；

电离电压：3.0 kV；

源温度：150℃。

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 9。

表 9 血根碱、白屈菜红碱的多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
血根碱	332 > 274*	30	33
	332 > 317	30	30
白屈菜红碱	348 > 332*	30	30
	348 > 304	30	30

\* 为定量离子。

## 二、验证的内容与结果

### 1. 标准曲线

将血根碱、白屈菜红碱标准溶液用酸化乙腈逐级稀释成浓度为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 的标准系列溶液，供液相色谱-串联质谱仪测定。标准曲线回归方程及相关系数见表 10-11。

表 10 血根碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	30721	58445	146325	292362	589019	1399568	2760265
线性相关系数 $r^2$	0.999522						
线性方程	$y=27906.3 \times x+4333.11$						

表 11 白屈菜红碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	62710	125341	296696	626858	1249778	3027400	6014801
线性相关系数 $r^2$	0.999775						
线性方程	$y=60519.6 \times x+3698.98$						

从表 10-11 中可以看出：在 1ng/mL~100ng/mL 范围内，血根碱、白屈菜红碱标准溶液浓度与峰面积的响应值线性关系良好，相关系数 $\geq 0.9990$ ，能够满足检测分析的要求。

### 2. 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本，添加适量标准工作溶液于 2.0g 空白饲料中(即添加浓度为 0.005mg/kg)，经提取后测定，血根碱、白屈菜红碱的信噪比(S/N)均大于 10，因此，将血根碱、白屈菜红碱的检测限定为 0.002mg/kg，定量限定为 0.005mg/kg，可以满足日常测定的要求。色谱图见图 7~图 18。

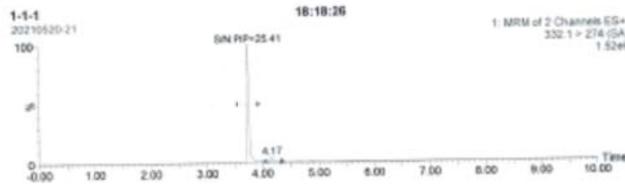


图7 鸡预混饲料定量限加标色谱图（血根碱）

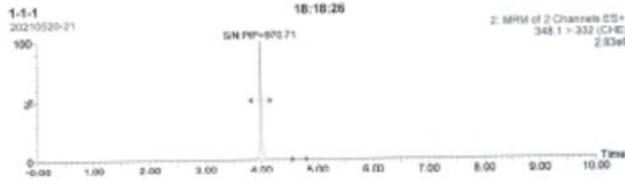


图8 鸡预混饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

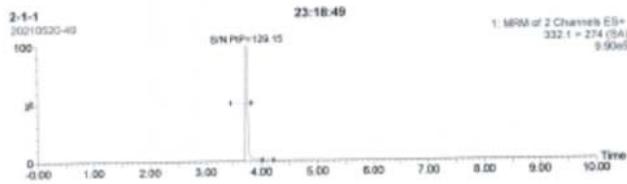


图9 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图（血根碱）

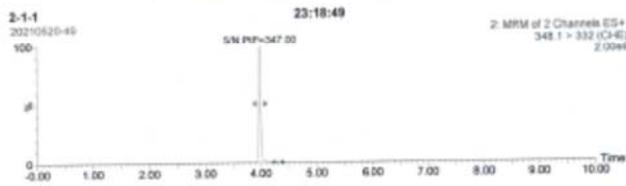


图10 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

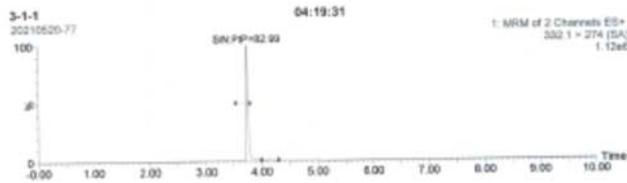


图 11 鸡配合饲料定量限加标色谱图（血根碱）

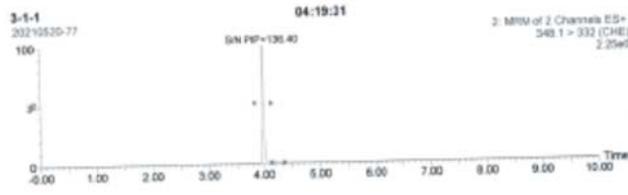


图 12 鸡配合饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

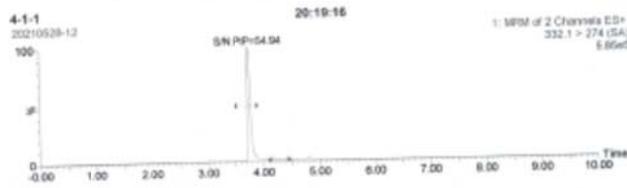


图 13 猪预混饲料定量限加标色谱图（血根碱）

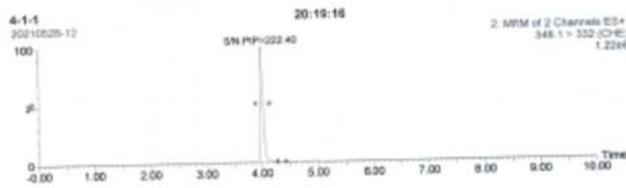


图 14 猪预混饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

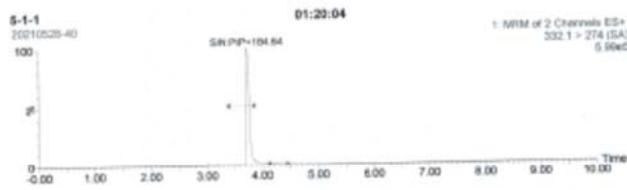


图 15 猪浓缩饲料定量限加标色谱图（血根碱）

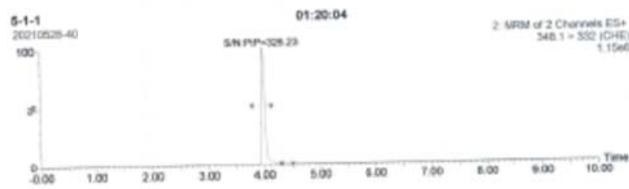


图 16 猪浓缩饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

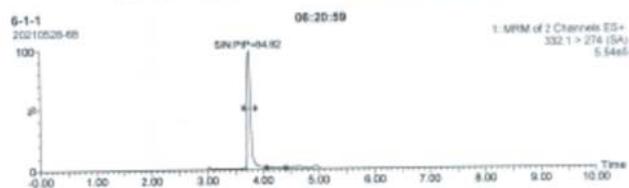


图 17 猪配合饲料定量限加标色谱图（血根碱）

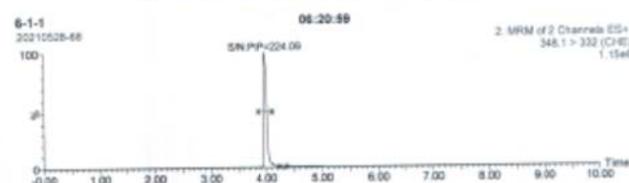


图 18 猪配合饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

### 3. 准确度（回收率）和精密度

以 6 个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。每种饲料中添加 3 个浓度水平的血根碱、白屈菜红碱，每个浓度做 6 个平行，计算回收率和变异系数，结果见表 12-表 15。

表 12 回收率实验结果（血根碱，n=6）

样品类型	添加浓度 $\mu\text{g}/\text{kg}$	回收率 (%)						平均值
		测定计算值						
鸡预混饲料	0.005	105	99.8	93.0	97.1	91.6	96.4	97.1
	5	97.9	93.8	98.2	98.5	97.3	99.9	97.6
	10	96.9	98.1	100.6	99.6	99.5	102	99.4
鸡浓缩饲料	0.005	91.5	98.9	92.9	101	94.2	94.1	95.4
	5	94.9	98.1	94.2	92.4	94.2	95.6	94.9
	10	95.0	96.6	97.5	97.6	99.3	101	97.9
鸡配合饲料	0.005	94.1	99.4	102.9	91.8	100.1	97.8	97.7
	5	102	103	98.2	96.1	97.0	95.1	98.5
	10	96.3	95.2	101	94.7	99.3	99.1	97.6

猪预混饲料	0.005	95.1	97.8	97.0	104	96.6	105	99.3
	5	95.2	97.8	97.4	99.7	95.8	95.7	96.9
	10	96.2	96.9	102	99.6	96.4	104	99.2
猪浓缩饲料	0.005	105	97.6	96.9	100	98.7	98.9	99.4
	5	91.2	103	107	106	103	103	102
	10	91.5	108	102	98.5	100	98.9	99.9
猪配合饲料	0.005	93.9	91.8	92.5	92.9	103	92.5	94.4
	5	94.6	97.8	96.9	95.4	101	97.1	97.1
	10	94.6	108	103	103	97.2	104	102

表 13 回收率实验结果（白屈菜红碱，n=6）

样品类型	添加浓度 μg/kg	回收率（%）						
		测定计算值						平均值
鸡预混饲料	0.005	104	95.2	96.7	97.5	95.0	96.1	97.4
	5	98.9	97.9	98.1	99.5	98.7	100	98.9
	10	92.2	97.9	99.6	100	100	101	98.5
鸡浓缩饲料	0.005	90.0	101	93.2	99.8	93.7	93.4	95.1
	5	95.3	99.3	94.4	92.4	94.6	95.9	95.3
	10	93.9	96.9	100	97.5	98.7	96.3	97.2
鸡配合饲料	0.005	93.7	98.8	103	94.2	99.1	98.5	97.8
	5	102	103	102	98.7	98.9	96.7	100
	10	94.8	92.5	97.5	96.0	97.4	97.4	95.9
猪预混饲料	0.005	91.9	100	99.2	99.4	96.9	101	98.1
	5	95.9	102	101	104	99.0	98.0	99.9
	10	94.4	96.9	96.7	97.5	96.5	99.7	96.9
猪浓缩饲料	0.005	96.5	96.7	100	102	101	106	100
	5	99.6	104	104	101	101	100	102
	10	91.9	108	101	95.0	96.0	96.5	98.0
猪配合饲料	0.005	98.0	95.8	90.1	97.0	109.5	96.6	97.8
	5	94.0	99.8	98.8	96.5	98.2	99.1	97.7

	10	92.0	108	98.7	101	96.6	102	99.8
--	----	------	-----	------	-----	------	-----	------

表 14 精密度实验结果(血標碱) (n=6)

样品 类型	测定结果 (mg/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混 饲料	0.00525	0.00499	0.00465	0.00485	0.00458	0.00482	0.00486	4.95
	4.90	4.69	4.91	4.93	4.87	5.00	4.88	2.10
	9.69	9.81	10.1	9.96	9.95	10.2	9.94	1.80
鸡浓缩 饲料	0.00457	0.00495	0.00465	0.00503	0.00471	0.00471	0.00477	3.76
	4.74	4.91	4.71	4.62	4.71	4.78	4.74	2.02
	9.50	9.66	9.75	9.76	9.93	10.14	9.79	2.26
鸡配合 饲料	0.00471	0.00497	0.00514	0.00459	0.00501	0.00489	0.00488	4.16
	5.10	5.14	4.91	4.80	4.85	4.75	4.93	3.21
	9.63	9.52	10.1	9.47	9.93	9.91	9.76	2.61
猪预混 饲料	0.00476	0.00489	0.00485	0.00518	0.00483	0.00527	0.00496	4.23
	4.76	4.89	4.87	4.98	4.79	4.79	4.85	1.74
	9.62	9.69	10.2	9.96	9.64	10.4	9.92	3.34
猪浓缩 饲料	0.00523	0.00488	0.00484	0.00501	0.00494	0.00494	0.00497	2.74
	4.56	5.13	5.35	5.29	5.16	5.17	5.11	5.53
	9.15	10.8	10.2	9.85	10.0	9.89	9.99	5.42
猪配合 饲料	0.00469	0.00459	0.00462	0.00464	0.00515	0.00462	0.00472	4.54
	4.73	4.89	4.84	4.77	5.04	4.86	4.86	2.23
	9.46	10.8	10.3	10.3	9.72	10.4	10.2	4.82

表 15 精密度实验结果(白屈菜紅碱) (n=6)

样品 类型	测定结果 (mg/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预 混饲 料	0.00519	0.00476	0.00484	0.00487	0.00475	0.00480	0.00487	3.33
	4.94	4.90	4.90	4.98	4.94	5.02	4.95	0.94
	9.22	9.79	9.96	10.03	10.0	10.1	9.85	3.30
鸡浓	0.00450	0.00504	0.00466	0.00499	0.00469	0.00467	0.00476	4.43

猪饲料	4.77	4.96	4.72	4.62	4.73	4.80	4.77	2.40
料	9.39	9.7	10.02	9.8	9.87	9.6	9.72	2.22
鸡配	0.00469	0.00494	0.00513	0.00471	0.00496	0.00493	0.00489	3.44
饲料	5.09	5.14	5.08	4.94	4.94	4.84	5.01	2.35
料	9.48	9.25	9.75	9.60	9.74	9.74	9.59	2.08
猪预	0.00459	0.00500	0.00496	0.00497	0.00484	0.00506	0.00491	3.44
混饲料	4.80	5.08	5.07	5.18	4.95	4.90	5.00	2.79
料	9.44	9.69	9.7	9.7	9.65	9.97	9.69	1.78
猪浓	0.00482	0.00483	0.00502	0.00511	0.00503	0.00530	0.00502	3.55
饲料	4.98	5.20	5.19	5.05	5.05	5.02	5.08	1.76
料	9.19	10.8	10.1	9.50	9.60	9.65	9.80	5.62
猪配	0.00490	0.00479	0.00450	0.00485	0.00547	0.00483	0.00489	6.50
饲料	4.70	4.99	4.94	4.83	4.91	4.95	4.89	2.20
料	9.20	10.8	9.87	10.1	9.66	10.2	9.98	5.43

结果表明：在不同浓度添加水平下，平均回收率大于 90%；变异系数小于 10%，方法的准确度和精密度均满足检测要求。

### 三、验证结论

“上海海关动植物食品中心”对上海市质量监督检验技术研究院建立的标准方法征求意见稿，从方法的线性、灵敏度、准确度和精密度等几个方面进行了考察，结果表明：检测方法原理合理，操作步骤有效，具有较好的可操作性，方法呈现良好的线性关系，检测限和定量限能够达到标准规定的要求，添加浓度的具体试验考察发现方法的平均回收率大于 85%；变异系数小于 5%，符合检测方法的要求。该方法可作为饲料中血根碱、白屈菜红碱的检测方法推广使用。

验证单位：上海海关动植物食品中心

验证人：



中华人民共和国农业行业标准  
《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》

验证报告

委托单位：上海市质量监督检验技术研究院

验证单位：上海市疾病预防控制中心

验证时间：2022年1月20日至2022年2月13日

# 验证报告

受上海市质量监督检验技术研究院委托，我单位根据其提供的《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿，对标准的技术指标进行了验证。

## 一、高效液相色谱法

### 1. 验证的方法及材料

#### 1.1 验证的方法

《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿及编制说明。

#### 1.2 验证的样品

混合饲料、配合饲料和浓缩饲料（猪、鸡）

#### 1.3 仪器设备品牌

高效液相色谱仪 Waters 2695

#### 1.4 液相色谱参考条件

色谱柱：Diamonsil C18 柱，250mm×4.6 mm，粒径 5 $\mu$ m；

柱温：35℃；

进样量：5  $\mu$ L；

流动相：A: 磷酸溶液；B: 乙腈,梯度洗脱程序见表 1；

流速：1.0 mL/min；

检测器：紫外检测器，检测波长 275nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
5	85	15
22	50	50
22.1	20	80
25	20	80
25.1	85	15
30	85	15

## 2、验证的内容与结果

### 2.1 标准曲线

将血根碱、白屈菜红碱标准溶液用酸化乙腈逐级稀释成浓度为 1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的标准系列溶液，供液相色谱仪测定。标准曲线回归方程及相关系数见表 2-表 3。

表 2 血根碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(μg/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	23210	46039	118032	241031	481525	1197188	2312692
线性相关系数 r <sup>2</sup>	0.999687						
线性方程	$Y=2.320 \times 10^4 X+8.242 \times 10^3$						

表 3 白屈菜红碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(μg/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	22031	42273	108242	222379	445614	1102483	2128692
线性相关系数 r <sup>2</sup>	0.999667						
线性方程	$Y=2.135 \times 10^4 X+8.168 \times 10^3$						

从表 2-表 3 中可以看出：在 1 μg/mL~100 μg/mL 范围内，血根碱、白屈菜红碱标准溶液浓度与峰面积的响应值线性关系良好，相关系数 ≥ 0.999，能够满足检测分析的要求。

## 2.2 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本，添加适量标准工作溶液于 1.0g 空白饲料中(即添加浓度为 50mg/kg)，经提取后测定，血根碱、白屈菜红碱的信噪比(S/N)均大于 10。因此，将血根碱、白屈菜红碱的检测限定为 20mg/kg，定量限定为 50mg/kg，可以满足日常测定的要求。色谱图见图 1~图 6，空白见图 7~图 12。

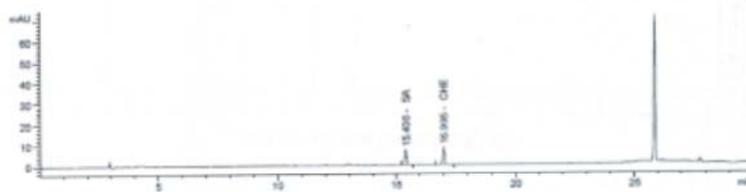


图1 鸡预混饲料定量限加标色谱图

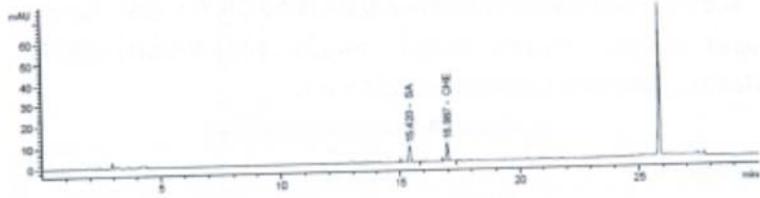


图2 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图

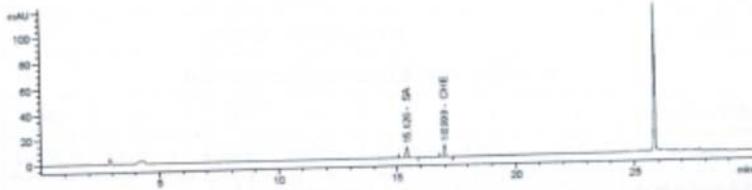


图3 鸡配合饲料定量限加标色谱图



图4 猪预混饲料定量限加标色谱图

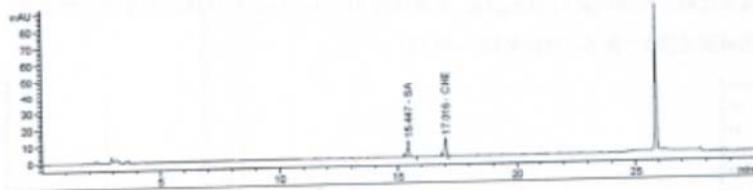


图5 猪浓缩饲料定量限加标色谱图

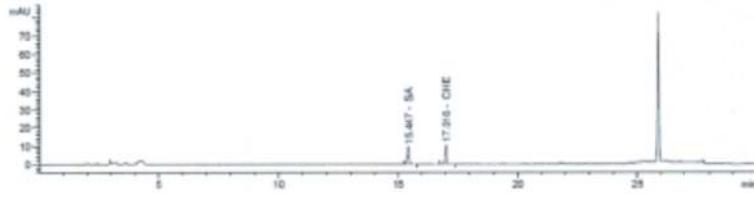


图6 猪配合饲料定量限加标色谱图

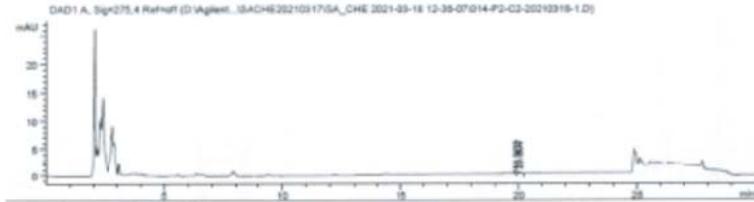


图7 鸡预混饲料空白色谱图

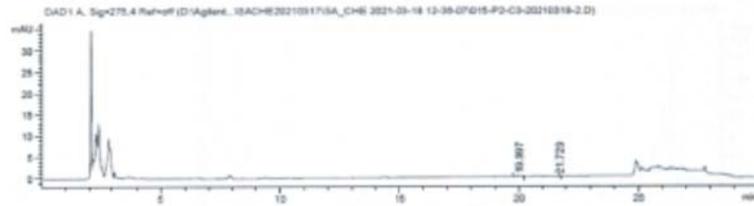


图8 鸡浓缩饲料空白色谱图

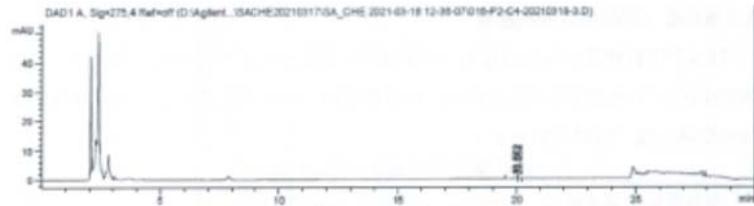


图9 鸡配合饲料空白色谱图

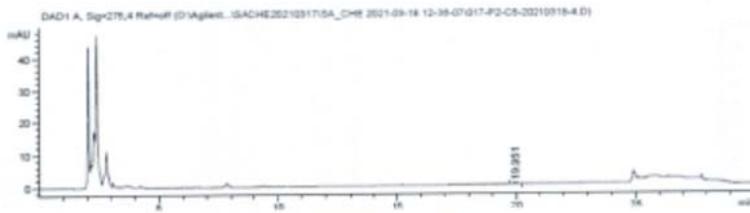


图11 猪预混饲料空白色谱图

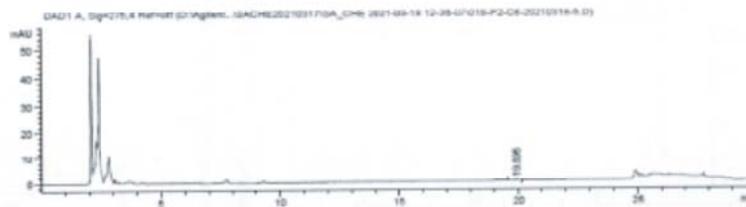


图11 猪浓缩饲料空白色谱图

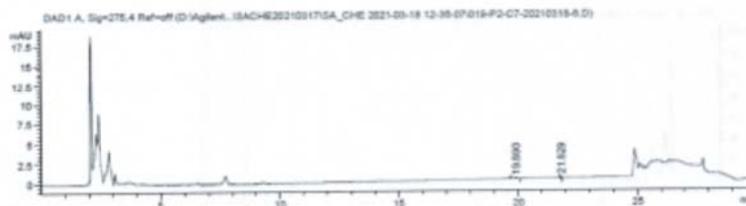


图12 猪配合饲料空白色谱图

### 2.3 准确度（回收率）和精密度

以6个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。每种饲料中添加3个浓度水平的血根碱、白屈菜红碱，每个浓度做6个平行，计算回收率和变异系数，结果见表4-表7。

表4 回收率实验结果（血根碱，n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						平均值
		测定计算值						
鸡预混饲料	50	103	91.6	94.6	89.0	91.9	91.4	93.6
	500	96.6	100	95.6	101	101	94.6	98.2
	1000	96.7	104	102	97.0	101	97.2	99.6
鸡浓缩饲料	50	96.6	90.7	93.5	92.2	92.4	97.2	93.8

	500	96.7	102	93.1	96.0	107	101	99.3
	1000	95.2	97.2	103	107	102	100	101
鸡配合饲料	50	97.8	91.2	94.8	94.5	96.7	95.5	95.1
	500	102	104	99.0	101	106	102	102
	1000	101	103	108	97.6	97.7	101	101
猪预混饲料	50	89.1	89.4	102	91.2	94.7	95.1	93.5
	500	100	103	98.0	100	106	94.3	100
	1000	107	103	102	110	107	106	106
猪浓缩饲料	50	96.0	91.6	95.3	96.1	95.6	97.0	95.3
	500	100	99.8	94.6	101	101	98.8	99.3
	1000	104	97.8	109	99.6	101	108	103
猪配合饲料	50	94.3	97.1	93.3	96.8	93.9	98.5	95.7
	500	102	96.8	100	108	105	101	102
	1000	104	101	105	102	102	102	103

表 5 回收率实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						
		测定计算值						平均值
鸡预混饲料	50	105	95.7	97.8	89.8	95.0	86.7	95.0
	500	92.9	99.2	95.0	99.1	100	95.7	97.0
	1000	95.9	104	102	95.9	101	96.7	99.2
鸡浓缩饲料	50	97.8	93.7	90.6	92.7	93.8	93.8	93.7
	500	97.5	101	96.3	96.3	103	96.6	98.6
	1000	94.9	100	96.3	108	98.5	98.2	99.3
鸡配合饲料	50	93.8	97.1	98.9	105	98.5	96.6	98.3
	500	100	103	97.6	99.9	105	99.5	101
	1000	100	103	107	97.3	97.2	101	101
猪预混饲料	50	91.3	86.5	94.7	90.1	92.4	101	92.7
	500	103	96.7	96.5	98.2	105	95.2	99.1
	1000	106	102	101	108	108	106	105

猪浓缩饲料	50	99.0	96.9	104	94.6	101	93.5	98.2
	500	99.2	99.4	92.6	98.8	101	97.7	98.0
	1000	108	97.1	104	99.4	100	107	103
猪配合饲料	50	93.1	95.2	90.5	90.9	94.5	106	95.0
	500	101	96.0	99.2	107	104	100	101
	1000	103	100	105	102	99.1	104	102

表 6 精密度实验结果 (血根碱, n=6)

样品类型	测定结果 (ng/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	51.6	45.8	47.3	44.5	46.0	45.7	46.8	5.34
	483	502	478	503	507	473	491	3.00
	967	1038	1022	970	1007	972	996	3.06
鸡浓缩饲料	48.3	45.3	46.8	46.1	46.2	48.6	46.9	2.79
	483	508	466	480	535	506	496	5.04
	952	972	1026	1066	1015	1001	1005	4.05
鸡配合饲料	48.9	45.6	47.4	47.2	48.3	47.7	47.5	2.38
	508	521	495	507	530	509	512	2.35
	1006	1032	1076	976	977	1013	1013	3.69
猪预混饲料	44.6	44.7	50.9	45.6	47.3	47.5	46.8	5.09
	502	513	490	501	528	472	501	3.87
	1066	1030	1019	1098	1069	1060	1057	2.70
猪浓缩饲料	48.0	45.8	47.7	48.0	47.8	48.5	47.6	1.96
	502	499	473	503	507	494	496	2.47
	1037	978	1092	996	1008	1076	1031	4.40
猪配合饲料	47.2	48.5	46.7	48.4	46.9	49.3	47.8	2.19
	511	484	501	541	525	506	511	3.85
	1038	1009	1055	1018	1016	1019	1026	1.68

表 7 精密度实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品类型	测定结果 (ng/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	52.6	47.9	48.9	44.9	47.5	43.3	47.5	6.84
	465	496	475	496	500	478	485	2.94
	959	1036	1022	959	1006	967	992	3.42
鸡浓缩饲料	48.9	46.9	45.3	46.3	46.9	46.9	46.9	2.49
	488	507	482	482	516	483	493	3.04
	949	1003	963	1077	985	982	993	4.55
鸡配合饲料	46.9	48.6	49.5	52.4	49.3	48.3	49.1	3.75
	502	514	488	500	523	498	504	2.45

	1001	1025	1069	973	972	1006	1008	3.61
猪混饲料	45.7	43.3	47.4	45.0	46.2	50.6	46.4	5.38
	516	484	483	491	523	476	495	3.91
	1058	1024	1011	1079	1080	1055	1051	2.69
猪浓缩饲料	49.5	48.4	52.1	47.3	50.4	46.7	49.1	4.11
	496	497	463	494	503	488	490	2.87
	1076	971	1045	994	1001	1069	1026	4.24
猪配合饲料	46.5	47.6	45.2	45.5	47.2	52.9	47.5	5.89
	506	480	496	533	522	500	506	3.72
	1031	1004	1049	1016	991	1036	1021	2.11

结果表明：在不同浓度添加水平下，平均回收率大于 90%；变异系数小于 10%，方法的准确度和精密度均满足检测要求。

## 二、液相色谱-串联质谱法

### 1. 验证的方法及材料

#### 1.1 验证的方法

《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿及编制说明。

#### 1.2 验证的样品

混合饲料、配合饲料和浓缩饲料（猪、鸡）

#### 1.3 仪器设备品牌

高效液相色谱-串联质谱仪 Waters TQ-XS

#### 1.4 液相色谱-串联质谱条件

##### 1.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱： Waters BEH C18 柱，50 mm×2.1 mm，粒径 1.7 μm；

柱温：35℃；

进样量：2μL；

流动相：A 相为 0.1% 甲酸溶液，B 相为乙腈，梯度洗脱程序见表 8；

流速：0.3 mL/min。

表 8 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
6.00	0	100
8.00	0	100

8.01	90	10
10.00	90	10

#### 1.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式（ESI+）；

检测方式：多反应监测（MRM）；

鞘气：800 L/Hr；

反吹气：150 L/Hr；

雾化器温度：400 ℃；

电离电压：3.0 kV；

源温度：150 ℃。

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 9。

表 9 血根碱、白屈菜红碱的多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
血根碱	332>274*	30	33
	332>317	30	30
白屈菜红碱	348 > 332*	30	30
	348 > 304	30	30

\* 为定量离子。

## 二、验证的内容与结果

### 1. 标准曲线

将血根碱、白屈菜红碱标准溶液用酸化乙腈逐级稀释成浓度为 1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 的标准系列溶液，供液相色谱-串联质谱仪测定。标准曲线回归方程及相关系数见表 10-11。

表 10 血根碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	31919	72974	150804	312176	629865	1626134	2900864
线性相关系数 r <sup>2</sup>	0.996846						
线性方程	y=30228.7x+5962.08						

表 11 白屈菜红碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	63983	133995	309312	641741	1299448	3405093	6175819

线性相关系数 $r^2$	0.997896
线性方程	$y=63895.4x+2437.61$

从表 10-11 中可以看出：在 1ng/mL~100ng/mL 范围内，血根碱、白屈菜红碱标准溶液浓度与峰面积响应值线性关系良好，相关系数 $\geq 0.99$ ，能够满足检测分析的要求。

## 2. 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本，添加适量标准工作溶液于 2.0g 空白饲料中(即添加浓度为 0.005mg/kg)，经提取后测定，血根碱、白屈菜红碱的信噪比(S/N)均大于 10。因此，将血根碱、白屈菜红碱的检测限定为 0.002mg/kg，定量限定为 0.005mg/kg，可以满足日常测定的要求。色谱图见图 13~图 24，空白谱图见图 25~30。

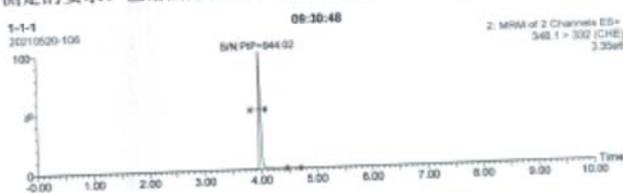


图 13 鸡预混饲料定量限加标色谱图(白屈菜红碱)

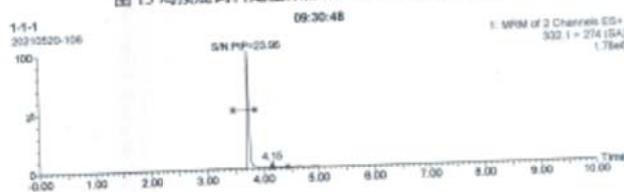


图 14 鸡预混饲料定量限加标色谱图(血根碱)

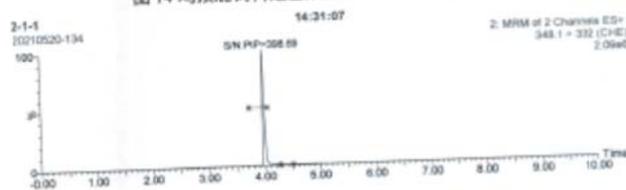


图 15 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图(白屈菜红碱)

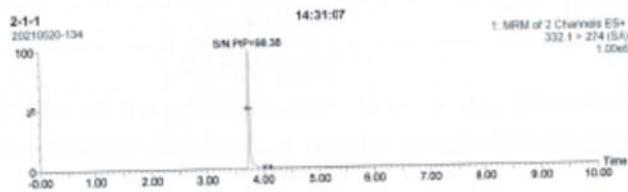


图 16 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图 (血根碱)

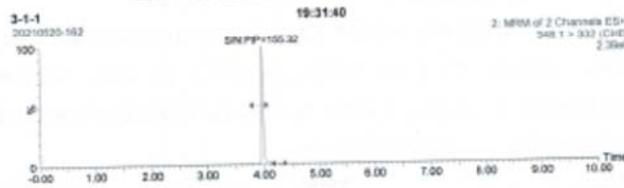


图 17 鸡配合饲料定量限加标色谱图 (白屈菜红碱)

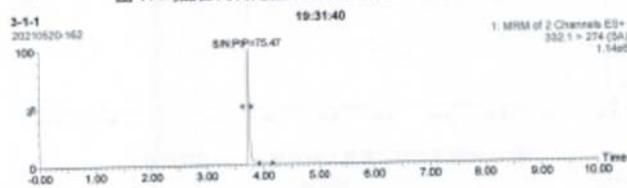


图 18 鸡配合饲料定量限加标色谱图 (血根碱)

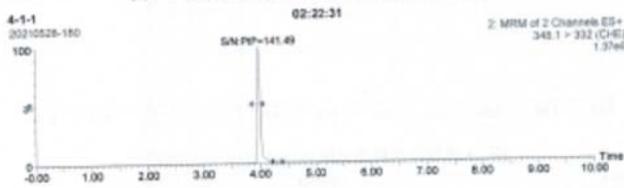


图 19 猪预混饲料定量限加标色谱图 (白屈菜红碱)

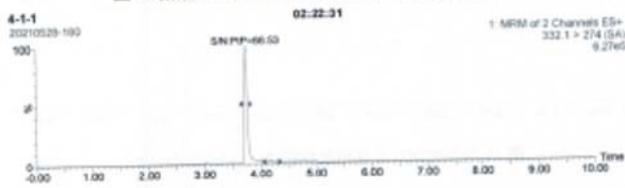


图 20 猪预混饲料定量限加标色谱图 (血根碱)

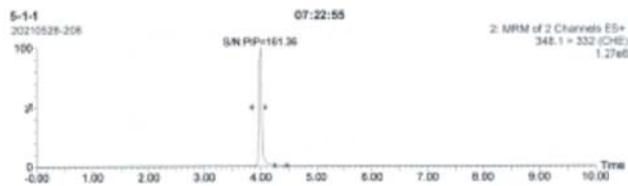


图 21 猪浓缩饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

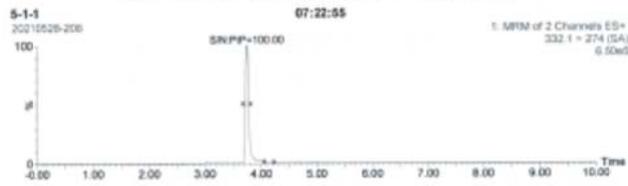


图 22 猪浓缩饲料定量限加标色谱图（血根碱）

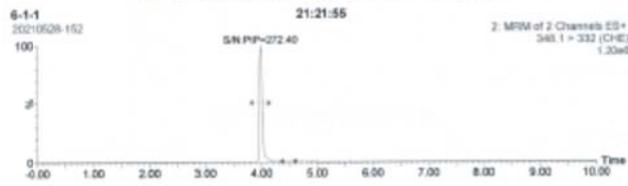


图 23 猪配合饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

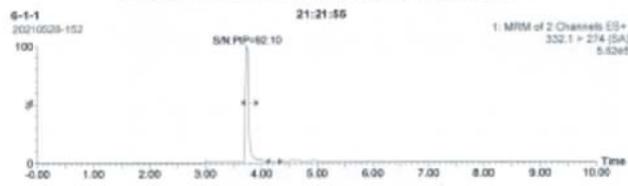


图 24 猪配合饲料定量限加标色谱图（血根碱）

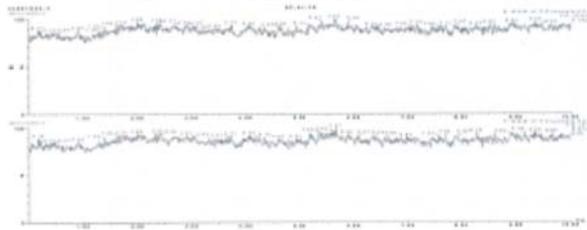


图 25 鸡预混饲料空白色谱图

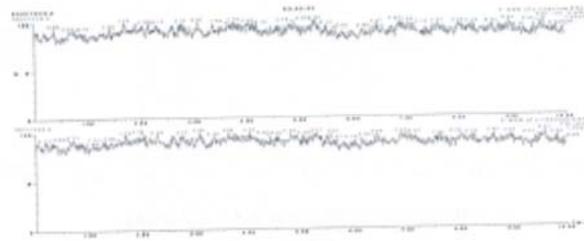


图 26 鸡浓缩饲料空白光谱图

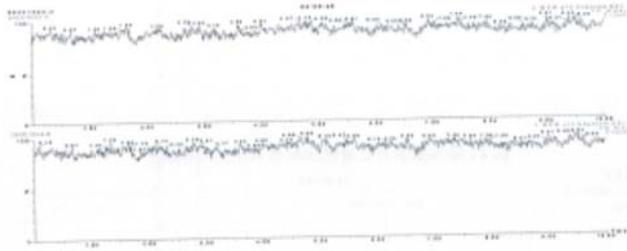


图 27 鸡配合饲料空白光谱图

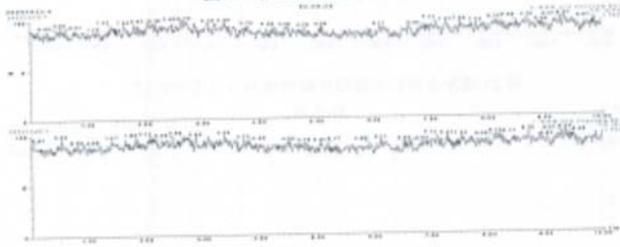


图 28 猪预混饲料空白光谱图

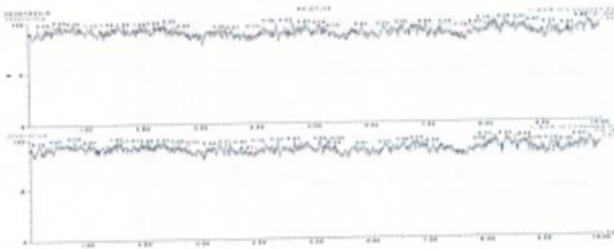


图 29 猪浓缩饲料空白光谱图

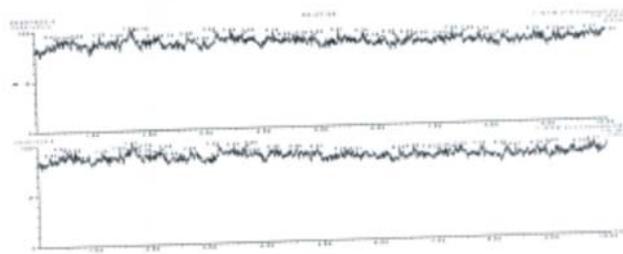


图 30 猪配合饲料定量添加标色谱图

### 3. 准确度（回收率）和精密度

以 6 个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。每种饲料中添加 3 个浓度水平的血根碱、白屈菜红碱，每个浓度做 6 个平行，计算回收率和变异系数，结果见表 12-表 15。

表 12 回收率实验结果（血根碱，n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						平均值
		测定计算值						
鸡预混饲料	0.005	91.8	105.2	96.3	106	99.2	102	100
	5	98.8	95.9	93.3	99.8	96.6	98.7	97.2
	10	94.0	97.2	95.5	97.1	98.9	99.9	97.1
鸡浓缩饲料	0.005	91.9	109	101	115	99.3	99.0	103
	5	101	106	104	98.7	99.7	103	102
	10	96.3	101	105	99.5	103	98.8	101
鸡配合饲料	0.005	99.0	102	115	96.7	105	104	104
	5	103	109	104	98.4	99.7	96.5	102
	10	92.9	95.1	97.4	94.2	95.1	95.2	95.0
猪预混饲料	0.005	97.6	90.2	96.5	91.7	89.9	95.6	93.6
	5	84.3	99.1	98.0	101	98.0	99.4	96.6
	10	85.0	98.2	96.0	97.4	99.6	100.6	96.1
猪浓缩饲料	0.005	93.1	107	90.4	100	94.5	100	97.7
	5	96.4	102	107	106	105	102	103
	10	82.7	97.0	104	97.9	103	97.6	97.0

猪配合饲料	0.005	90.3	103	106	106	100	107	102
	5	88.9	94.6	98.3	93.1	95.7	105	95.9
	10	97.9	107	101	99.2	94.4	106	101

表 13 回收率实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						
		测定计算值						平均值
鸡预混饲料	0.005	100	96.9	91.6	100	90.8	96.8	96.1
	5	102	101	98.3	103	98.4	103	101
	10	86.7	102	98.9	100	101	99.1	98.0
鸡浓缩饲料	0.005	93.8	106	98.6	109	94.2	93.2	99.0
	5	95.8	100	96.4	94.3	94.8	96.0	96.2
	10	87.6	95.9	98.2	94.4	97.5	92.4	94.3
鸡配合饲料	0.005	93.0	96.6	112	95.1	105	98.1	99.9
	5	102	107	103	94.1	96.7	91.1	99.0
	10	100	99.3	102	97.6	98.2	99.4	99.4
猪预混饲料	0.005	89.6	93.1	104	100	91.6	97.2	95.9
	5	88.5	98.0	102	104	102	103	99.5
	10	90.7	101	100	102	99.2	101	99.1
猪浓缩饲料	0.005	90.9	108	97.5	105	102	109	102
	5	92.8	103	109	108	105	105	104
	10	88.8	99.0	105	96.5	100	99.6	98.2
猪配合饲料	0.005	98.6	105	108	108	100	110	105
	5	95.5	96.1	99.0	94.5	96.5	103	97.4
	10	97.4	105	99.8	100	96.1	107	101

表 14 精密度实验结果 (血根碱, n=6)

样品类型	测定结果 (ng/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	0.00459	0.00526	0.00482	0.00531	0.00496	0.00510	0.00501	5.49
	4.94	4.80	4.66	4.99	4.83	4.93	4.86	2.46
	9.40	9.72	9.55	9.71	9.89	9.99	9.71	2.22
鸡浓缩饲料	0.00460	0.00547	0.00506	0.00573	0.00496	0.00495	0.00513	7.93

饲料	5.04	5.31	5.18	4.94	4.99	5.14	5.10	2.70
	9.63	10.1	10.5	9.95	10.3	9.88	10.1	3.09
鸡配合	0.00495	0.00509	0.00577	0.00484	0.00527	0.00522	0.00519	6.33
饲料	5.14	5.44	5.22	4.92	4.99	4.82	5.09	4.43
	9.29	9.51	9.74	9.42	9.51	9.52	9.50	1.55
猪预混	0.00488	0.00451	0.00483	0.00459	0.00450	0.00478	0.00468	3.61
饲料	4.21	4.96	4.90	5.05	4.90	4.97	4.83	6.37
	8.50	9.82	9.60	9.74	9.96	10.1	9.61	5.93
猪浓缩	0.00466	0.00537	0.00452	0.00502	0.00473	0.00501	0.00488	6.35
饲料	4.82	5.08	5.33	5.32	5.26	5.11	5.15	3.75
	8.27	9.70	10.4	9.79	10.3	9.76	9.70	7.87
猪配合	0.00451	0.00513	0.00528	0.00528	0.00500	0.00536	0.00509	6.09
饲料	4.44	4.73	4.92	4.65	4.79	5.24	4.79	5.57
	9.79	10.7	10.1	9.92	9.44	10.6	10.1	4.94

表 15 精密度实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品 类型	测定结果 (mg/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混	0.00501	0.00485	0.00458	0.00500	0.00454	0.00484	0.0480	4.20
	5.10	5.04	4.91	5.15	4.92	5.14	5.04	2.10
饲料	8.67	10.16	9.89	10.0	10.1	9.91	9.80	5.75
	0.00469	0.00528	0.00493	0.00544	0.00471	0.00466	0.0495	6.75
鸡浓缩	4.79	5.01	4.82	4.71	4.74	4.80	4.81	2.16
	8.76	9.59	9.82	9.44	9.75	9.24	9.43	4.15
鸡配合	0.00465	0.00483	0.00558	0.00476	0.00524	0.00491	0.00499	7.00
	5.09	5.34	5.16	4.71	4.83	4.56	4.95	6.05
饲料	10.0	9.93	10.2	9.76	9.82	9.94	9.94	1.56
	0.00448	0.00465	0.00518	0.00502	0.00458	0.00486	0.00480	5.65
猪预混	4.42	4.90	5.09	5.21	5.09	5.13	4.97	5.80
	9.07	10.1	10.0	10.2	9.92	10.1	9.91	4.23
猪浓缩	0.00454	0.00539	0.00488	0.00525	0.00508	0.00547	0.00510	6.81
	4.64	5.13	5.44	5.41	5.27	5.27	5.19	5.62
饲料	8.88	9.90	10.5	9.65	10.0	9.96	9.82	5.46
	0.00493	0.00523	0.00541	0.00541	0.00501	0.00549	0.00525	4.43
猪配合	4.77	4.80	4.95	4.73	4.82	5.13	4.87	3.08
	9.74	10.5	9.98	10.0	9.61	10.7	10.1	4.30

结果表明: 在不同浓度添加水平下, 平均回收率大于 90%; 变异系数小于 10%, 方法的准确度和精密度均满足检测要求。

### 三、验证结论

上海市疾病预防控制中心对上海市质量监督检验技术研究院建立的标准方法征求意见稿, 从方法的线性、灵敏度、准确度和精密度等几个方面进行了考察, 结果

表明：检测方法原理合理，操作步骤有效，具有较好的可操作性，方法呈现良好的线性关系，检测限和定量限能够达到标准规定的要求，添加浓度的具体试验考察发现方法的平均回收率大于 90%；变异系数小于 10%，符合检测方法的要求。该方法可作为饲料中血根碱、白屈菜红碱的检测方法推广使用。



验证单位：上海市疾病预防控制中心

验证人：蔡永玉

浓度 (μg/g)	峰面积	回收率 (%)	变异系数 (%)	检测限 (μg/g)	定量限 (μg/g)	线性方程	线性相关系数
0.1	1000	95.0	5.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
0.2	2000	92.0	6.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
0.5	5000	90.0	7.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
1.0	10000	88.0	8.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
2.0	20000	85.0	9.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
5.0	50000	82.0	10.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
10.0	100000	80.0	11.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
20.0	200000	78.0	12.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
50.0	500000	75.0	13.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999
100.0	1000000	72.0	14.0	0.05	0.1	$y = 10000x$	0.999

---

上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所

中华人民共和国农业行业标准  
《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》

# 验证报告

委托单位：上海市质量监督检验技术研究院

验证单位：上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所



验证时间：2022年1月20日至2022年1月30日

# 验证报告

受上海市质量监督检验技术研究院委托，我单位根据其提供的《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿，对标准的技术指标进行了验证。

## 一、高效液相色谱法

### 1. 验证的方法及材料

#### 1.1 验证的方法

《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿及编制说明。

#### 1.2 验证的样品

混合饲料、配合饲料和浓缩饲料（猪、鸡）

#### 1.3 仪器设备品牌

高效液相色谱仪 Waters

#### 1.4 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 柱，250 mm×4.5 mm，粒径 5 μm，或性能相当者；

柱温：35 °C；

进样量：5 μL；

流动相：A:磷酸溶液；B:乙腈,梯度洗脱程序见表 1；

流速：1.0 mL/min；

检测器：紫外检测器，检测波长 275 nm。

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	85	15
5	85	15
22	50	50
22.1	20	80
25	20	80
25.1	85	15
30	85	15

## 2、验证的内容与结果

### 2.1 标准曲线

将血根碱、白屈菜红碱标准溶液用酸化乙腈逐级稀释成浓度为 1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 的标准系列溶液，供液相色谱仪测定，标准曲线回归方程及相关系数见表 2-表 3。

表 2 血根碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(μg/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	22146	47898	115201	233759	461037	1153316	2264493
线性相关系数 $r^2$	0.999919						
线性方程	$Y=2267*10^4X+5.083*10^3$						

表 3 白屈菜红碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(μg/mL)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	20608	43600	105607	215002	421443	1054789	2073878
线性相关系数 $r^2$	0.999930						
线性方程	$Y=2.076^4X+4.651*10^3$						

从表 2-表 3 中可以看出：在 1 μg/mL~100 μg/mL 范围内，血根碱、白屈菜红碱标准溶液浓度与峰面积的响应值线性关系良好，相关系数  $\geq 0.9990$ ，能够满足检测分析的要求。

## 2.2 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本，添加适量标准工作溶液于 1.0g 空白饲料中(即添加浓度为 50mg/kg)，经提取后测定，血根碱、白屈菜红碱的信噪比(S/N)均大于 10。因此，将血根碱、白屈菜红碱的检测限定为 20mg/kg，定量限定为 50mg/kg，可以满足日常测定的要求。色谱图见图 1~图 6。

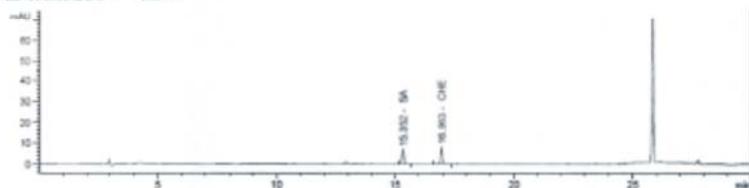


图1 鸡预混饲料定量限加标色谱图

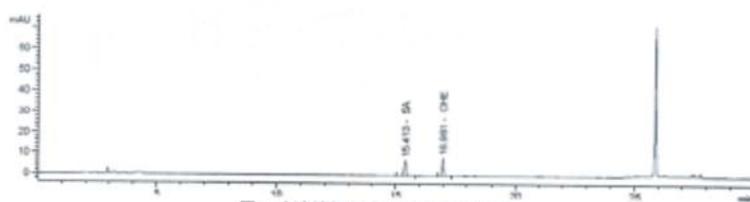


图2 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图

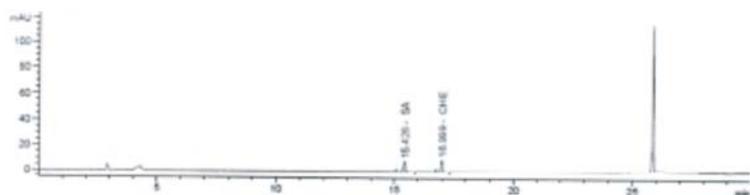


图3 鸡配合饲料定量限加标色谱图

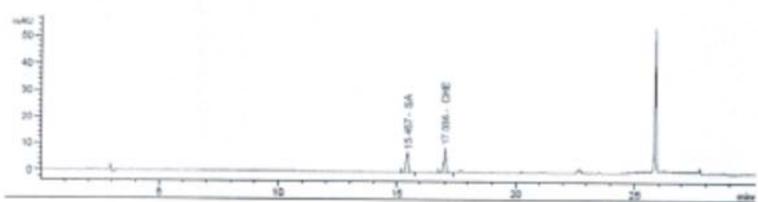


图4 猪预混饲料定量限加标色谱图

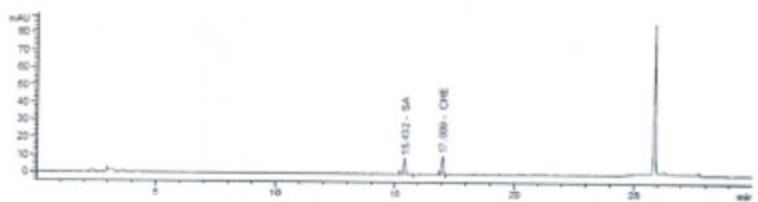


图5 猪浓缩饲料定量限加标色谱图

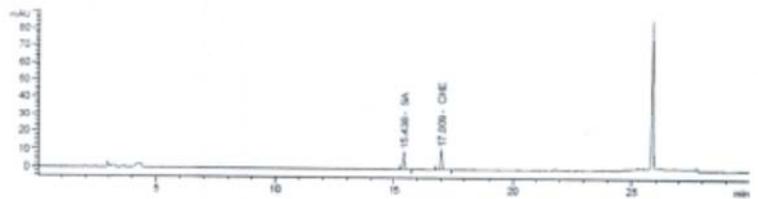


图6 猪配合饲料定量限加标色谱图

### 2.3 准确度（回收率）和精密度

以6个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。每种饲料中添加3个浓度水平的血根碱、白屈菜红碱，每个浓度做6个平行，计算回收率和变异系数，结果见表4-表7。

表4 回收率实验结果（血根碱，n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						
		测定计算值						平均值
鸡预混饲料	50	97.9	95.9	92.3	97.2	90.0	101	95.7
	500	95.6	98.8	97.7	96.8	103	96.1	98.0
	1000	97.0	101	99.3	95.9	95.3	95.4	97.4
鸡浓缩饲料	50	91.2	95.0	91.9	95.5	89.3	93.4	92.7
	500	100	99.8	94.9	96.6	97.7	98.2	97.9
	1000	102	95.9	95.9	98.3	100.5	94.8	98.0
鸡配合饲料	50	96.5	91.6	91.8	98.6	93.3	94.2	94.3
	500	98.6	106	106	96.2	94.9	97.0	99.7
	1000	100	96.2	98.1	100	103	103	100
猪预混饲料	50	102	92.9	95.5	91.3	102	88.4	95.4
	500	94.6	102	111	102	111	104	104
	1000	96.7	101	104	105	103	102	102
猪浓缩饲料	50	110	97.9	93.5	94.4	88.8	95.6	96.7
	500	102	103	104	101	103	94	101
	1000	105	104	95.6	98.7	101.4	105.4	102
猪配合饲料	50	96.8	92.1	99.7	97.0	97.2	91.3	95.7
	500	99.9	99.8	102	99.3	99.0	106	101
	1000	97.8	102	99.2	98.6	106	98.0	100

表5 回收率实验结果（白屈菜红碱，n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						
		测定计算值						平均值

鸡预混饲料	50	97.5	93.4	95.0	91.0	90.7	98.0	94.3
	500	94.7	98.3	96.9	95.8	103	95.5	97.3
	1000	97.0	101	99.6	95.9	95.3	95.4	97.4
鸡浓缩饲料	50	92.4	92.6	92.2	90.3	91.1	97.5	92.7
	500	99.5	99.0	93.4	96.0	96.8	97.6	97.0
	1000	100	98.0	96.2	98.7	101	94.5	98.0
鸡配合饲料	50	100	93.4	88.8	92.1	93.6	94.4	93.8
	500	97.9	105	105	94.5	94.5	95.9	98.6
	1000	100	96.0	97.9	99.6	103.5	103	100
猪预混饲料	50	91.2	91.6	95.2	89.3	90.6	89.1	91.2
	500	94.2	101	105	108	110	104	105
	1000	96.7	101	104	105	103	102	102
猪浓缩饲料	50	97.0	93.1	89.8	95.9	94.2	94.3	94.1
	500	101	103	103	100	102	92.9	100
	1000	104	104	97.3	96.7	101	95.9	99.9
猪配合饲料	50	91.1	98.1	89.8	93.7	89.2	92.1	92.3
	500	98.7	99.0	101	96.1	100	106	100
	1000	97.6	102	98.9	97.6	107	98.1	100

表 6 精密度实验结果 (血根碱, n=6)

样品类型	测定结果 (ng/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	49.0	47.9	46.1	48.6	45.0	50.4	47.8	4.10
	478	494	488	484	515	480	490	2.78
	970	1012	993	959	953	954	974	2.49
鸡浓缩饲料	45.6	47.5	45.9	47.8	44.6	46.7	46.4	2.58
	502	499	475	483	489	491	490	2.07
	1024	959	959	983	1005	948	980	3.03
鸡配合饲料	48.2	45.8	45.9	49.3	46.7	47.1	47.2	2.91
	493	529	528	481	474	485	498	4.82
	1004	962	981	1000	1035	1029	1002	2.79
猪预混饲料	51.2	46.4	47.7	45.7	51.1	44.2	47.7	6.04
	473	508	554	509	554	521	520	5.95
	967	1008	1038	1047	1028	1023	1019	2.80
猪浓缩饲料	55.0	49.0	46.8	47.2	44.4	47.8	48.3	7.38

	509	517	519	505	516	472	506	3.49
	1047	1037	956	987	1014	1054	1016	3.78
猪配合饲料	48.4	46.1	49.8	48.5	48.6	45.6	47.8	3.42
	499	499	508	497	495	528	504	2.44
	978	1021	992	986	1062	980	1003	3.28

表 7 精密度实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品类型	测定结果 (mg/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混饲料	48.8	46.7	47.5	45.5	45.4	49.0	47.1	3.33
	474	491	485	479	514	477	487	3.00
	970	1012	996	959	953	954	974	2.49
鸡浓缩饲料	46.2	46.3	46.1	45.1	45.6	48.7	46.3	2.70
	498	495	467	480	484	488	485	2.30
	1002	980	962	987	1005	945	980	2.38
鸡配合饲料	50.1	46.7	44.4	46.1	46.8	47.2	46.9	4.02
	490	523	523	472	472	479	493	4.82
	1002	960	979	996	1035	1027	1000	2.84
猪预混饲料	45.6	45.8	47.6	44.6	45.3	44.5	45.6	2.41
	471	505	513	539	549	520	516	5.35
	967	1007	1036	1047	1027	1023	1018	2.78
猪浓缩饲料	48.5	46.6	44.9	47.9	47.1	47.1	47.0	2.63
	505	513	513	501	511	464	501	3.73
	1043	1038	973	967	1015	959	999	3.74
猪配合饲料	45.5	49.0	44.9	46.8	44.6	46.0	46.2	3.52
	494	495	505	481	501	528	501	3.13
	976	1020	989	976	1070	981	1002	3.71

结果表明：在不同浓度添加水平下，平均回收率大于 95%；变异系数小于 10%，方法的准确度和精密度均满足检测要求。

## 二、液相色谱-串联质谱法

### 1. 验证的方法及材料

#### 1.1 验证的方法

《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》标准征求意见稿及编制说明。

#### 1.2 验证的样品

混合饲料、配合饲料和浓缩饲料 (猪、鸡)

#### 1.3 仪器设备品牌

高效液相色谱-串联质谱仪 Waters

#### 1.4 液相色谱-串联质谱条件

#### 1.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C18 柱，50 mm × 2.1 mm，粒径 1.7 μm，或性能相当者；

柱温：35℃；

进样量：2 μL；

流动相：A 相为 0.1% 甲酸溶液，B 相为乙腈，梯度洗脱程序见表 8；

流速：0.3 mL/min。

表 8 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.00	90	10
1.00	90	10
6.00	0	100
8.00	0	100
8.01	90	10
10.00	90	10

#### 1.4.2 质谱参考条件

电离方式：电喷雾电离，正离子模式 (ESI+)；

检测方式：多反应监测 (MRM)；

鞘气：800 L/Hr；

反吹气：150 L/Hr；

雾化器温度：400 °C；

电离电压：3.0 kV；

源温度：150 °C。

多反应监测 (MRM) 离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 9。

表 9 血根碱、白屈菜红碱的多反应监测 (MRM) 离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

被测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
血根碱	332 > 274 <sup>a</sup>	30	33
	332 > 317	30	30
白屈菜红碱	348 > 332 <sup>a</sup>	30	30
	348 > 304	30	30

<sup>a</sup>为定量离子。

## 二、验证的内容与结果

### 1. 标准曲线

将血根碱、白屈菜红碱标准溶液用酸化乙腈逐级稀释成浓度为1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL的标准系列溶液，供液相色谱-串联质谱仪测定。标准曲线回归方程及相关系数见表 10-11。

表 10 血根碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/ml)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	32072	60963	153171	306509	625641	1613463	2923362
线性相关系数 $r^2$	0.997847						
线性方程	$y=30312x+2362.16$						

表 11 白屈菜红碱标准曲线的线性范围及相关系数

浓度 C(ng/ml)	1	2	5	10	20	50	100
峰面积	67153	128844	314166	644935	1291066	3340018	6326984
线性相关系数 $r^2$	0.999356						
线性方程	$y=64374.2x+1545.98$						

从表 10-11 中可以看出：在 1ng/mL~1000g/mL 范围内，血根碱、白屈菜红碱标准溶液浓度与峰面积的响应值线性关系良好，相关系数 $\geq 0.9990$ ，能够满足检测分析的要求。

## 2. 方法检出限、定量限及色谱图

按标准文本，添加适量标准工作溶液于 2.0g 空白饲料中(即添加浓度为 0.005mg/kg)，经提取后测定，血根碱、白屈菜红碱的信噪比(S/N)均大于 10。因此，将血根碱、白屈菜红碱的检测限定为 0.002mg/kg，定量限定为 0.005mg/kg，可以满足日常测定的要求。色谱图见图 7~图 18。

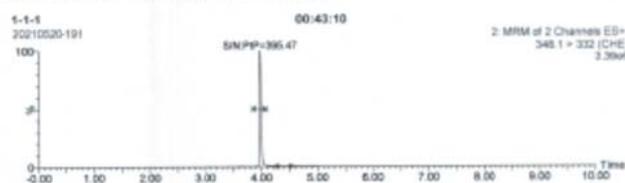


图 7 鸡预混饲料定量限加标色谱图（白屈菜红碱）

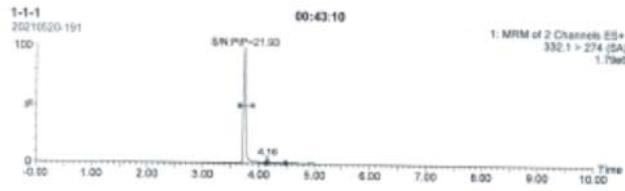


图 8 鸡预混饲料定量限加标色谱图 (血根碱)

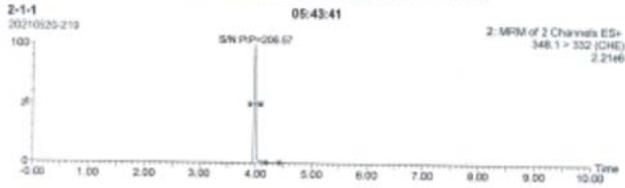


图 9 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图 (白屈菜红碱)

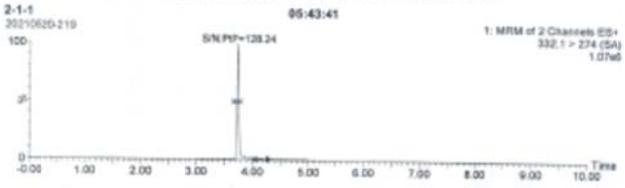


图 10 鸡浓缩饲料定量限加标色谱图 (血根碱)

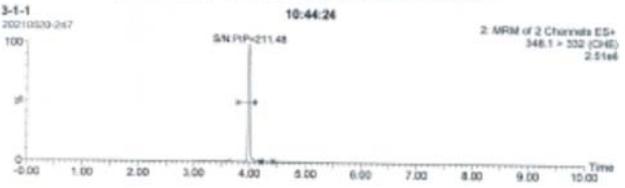


图 11 鸡配合饲料定量限加标色谱图 (白屈菜红碱)

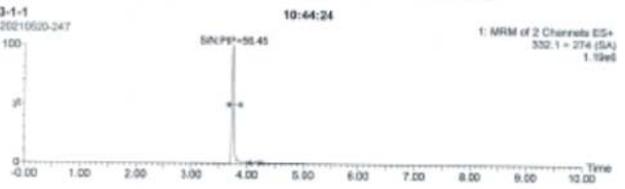


图 12 鸡配合饲料定量限加标色谱图 (血根碱)

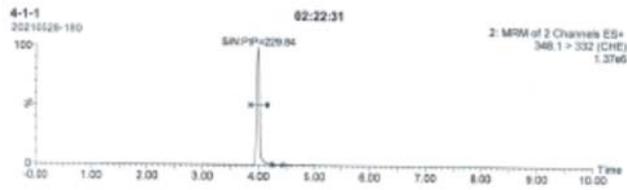


图 13 猪预混饲料定量限加标色谱图 (白屈菜红碱)

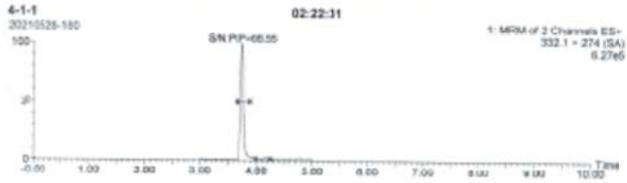


图 14 猪预混饲料定量限加标色谱图 (血根碱)

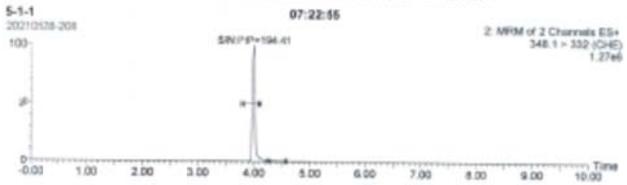


图 15 猪浓缩饲料定量限加标色谱图 (白屈菜红碱)

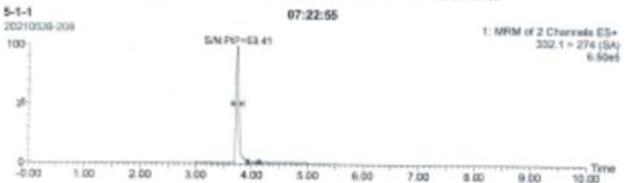


图 16 猪浓缩饲料定量限加标色谱图 (血根碱)

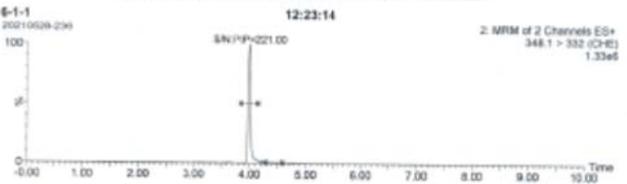


图 17 猪配合饲料定量限加标色谱图 (白屈菜红碱)

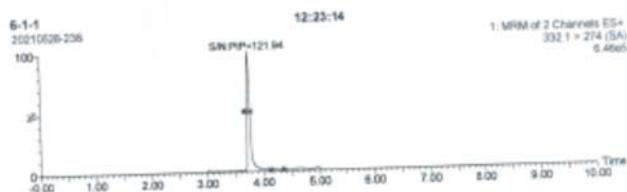


图 18 猪配合饲料定量限加标色谱图（血根碱）

### 3. 准确度（回收率）和精密度

以 6 个饲料样品为基础进行空白添加实验，验证该方法的准确度和精密度。每种饲料中添加 3 个浓度水平的血根碱、白屈菜红碱，每个浓度做 6 个平行，计算回收率和变异系数，结果见表 12-表 15。

表 12 回收率实验结果（血根碱，n=6）

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率（%）						平均值
		测定计算值						
鸡预混饲料	0.005	100	102	104	109	103	109	105
	5	99.2	96.0	94.4	101	93.6	100	97.4
	10	100	96.0	97.8	96.0	96.0	97.7	97.2
鸡浓缩饲料	0.005	98.6	102	94.1	107	91.3	89.7	97.2
	5	95.8	106	101	96.9	95.7	96.3	98.6
	10	94.2	96.0	99.2	97.4	101	95.1	97.1
鸡配合饲料	0.005	97.5	103	115	98.0	103	102	103
	5	103	109	104	97.6	98.4	97.6	102
	10	93.1	96.2	97.3	95.0	95.9	96.3	95.6
猪预混饲料	0.005	88.6	96.0	105	98.9	97.3	102	98.0
	5	92.6	93.4	96.9	100	95.7	101	96.7
	10	101	107	99.9	98.2	99.8	101	101
猪浓缩饲料	0.005	98.5	110	94.7	107	97.5	104	102
	5	92.4	97.5	109	110	98.4	94.6	100
	10	97.1	106	103	99.4	99.2	93.1	99.6
猪配合饲料	0.005	93.8	99.8	104	97.0	96.8	97.2	98.1

	5	93.3	95.9	103	94.9	99.0	103	98.1
	10	96.9	101	105	102	95.9	101	100

表 13 回收率实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品类型	添加浓度 mg/kg	回收率 (%)						平均值
		测定计算值						
鸡预混饲料	0.005	92.6	103	94.6	109	95.9	106	100
	5	104	100	98.4	104	97.2	105	101
	10	96.6	100	100	100	99.0	100	99.5
鸡浓缩饲料	0.005	91.0	100	90.9	109	86.3	90.9	94.7
	5	93.6	104	97.3	93.5	93.5	94.0	96.0
	10	98.1	98.0	98.5	96.7	98.1	97.8	97.9
鸡配合饲料	0.005	91.5	97.3	111	96.3	103	96.1	99.3
	5	99.5	104	100	90.9	92.9	99.7	97.9
	10	96.5	102	103	99.6	100	102	101
猪预混饲料	0.005	87.8	100	115	110	96.7	108	103
	5	92.7	94.1	98.6	103	95.2	102	97.7
	10	99.2	102	97.9	98.1	101	99.4	99.7
猪浓缩饲料	0.005	91.7	101	97.9	98.2	94.9	99.0	97.1
	5	99.9	98.5	104	104	98.1	96.2	100
	10	97.7	104	101	91.9	92.0	93.5	96.7
猪配合饲料	0.005	91.9	99.0	112	98.8	101	98.9	100
	5	91.9	96.4	104	95.4	98.8	104	98.4
	10	95.7	102	105	104	98.4	103	101

表 14 精密度实验结果 (血根碱, n=6)

样品类型	测定结果 (mg/kg)						平均值	CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6		
鸡预混饲料	0.00501	0.00508	0.00522	0.00543	0.00516	0.00545	0.00523	3.53
	4.96	4.80	4.72	5.03	4.68	5.02	4.87	3.21
	10.0	9.60	9.78	9.60	9.60	9.77	9.72	1.64
	0.00493	0.00511	0.00470	0.00535	0.00457	0.00449	0.00486	6.90

鸡浓缩饲料	4.79	5.31	5.03	4.84	4.78	4.81	4.93	4.22
	9.42	9.60	9.92	9.74	10.1	9.51	9.71	2.61
鸡配合饲料	0.00487	0.00513	0.00577	0.00490	0.00517	0.00511	0.00516	6.28
	5.15	5.45	5.18	4.88	4.92	4.88	5.08	4.46
	9.31	9.62	9.73	9.50	9.59	9.63	9.56	1.54
猪预混饲料	0.00443	0.00480	0.00527	0.00495	0.00487	0.00509	0.00490	5.81
	4.63	4.67	4.84	5.00	4.78	5.07	4.83	3.61
	10.1	10.7	9.99	9.82	9.98	10.1	10.1	3.02
猪浓缩饲料	0.00493	0.00550	0.00473	0.00537	0.00487	0.00520	0.00510	5.93
	4.62	4.88	5.45	5.48	4.92	4.73	5.01	7.32
	9.71	10.6	10.3	9.94	9.9	9.31	9.96	4.47
猪配合饲料	0.00469	0.00499	0.00521	0.00485	0.00484	0.00486	0.00491	3.60
	4.66	4.80	5.13	4.74	4.95	5.13	4.90	4.09
	9.69	10.1	10.5	10.2	9.59	10.1	10.0	3.37

表 15 精密度实验结果 (白屈菜红碱, n=6)

样品 类型	测定结果 (ng/kg)							CV 值 (%)
	1	2	3	4	5	6	平均值	
鸡预混 饲料	0.00463	0.00513	0.00473	0.00543	0.00480	0.00528	0.00500	6.52
	5.22	5.02	4.92	5.18	4.86	5.23	5.07	3.14
	9.66	10.0	10.0	10.0	9.90	10.0	9.95	1.57
鸡浓缩 饲料	0.00455	0.00502	0.00454	0.00544	0.00432	0.00455	0.00473	8.71
	4.68	5.21	4.87	4.67	4.67	4.70	4.80	4.45
	9.81	9.80	9.85	9.67	9.81	9.78	9.79	0.61
鸡配合 饲料	0.00458	0.00487	0.00557	0.00482	0.00515	0.00480	0.00496	7.03
	4.97	5.22	5.01	4.54	4.64	4.99	4.90	5.17
	9.65	10.2	10.3	9.96	10.0	10.2	10.1	2.34
猪预混 饲料	0.00439	0.00500	0.00574	0.00548	0.00483	0.00538	0.00514	9.55
	4.64	4.71	4.93	5.16	4.76	5.11	4.88	4.47
	9.92	10.2	9.79	9.81	10.1	9.94	9.97	1.81
猪浓缩 饲料	0.00459	0.00503	0.00490	0.00491	0.00474	0.00495	0.00485	3.31
	4.99	4.92	5.18	5.19	4.91	4.81	5.00	3.10
	9.77	10.4	10.1	9.19	9.20	9.35	9.67	5.27
猪配合 饲料	0.00460	0.00495	0.00558	0.00494	0.00507	0.00494	0.00501	6.39
	4.60	4.82	5.20	4.77	4.94	5.18	4.92	4.84
	9.57	10.2	10.5	10.4	9.84	10.3	10.1	3.52

结果表明：在不同浓度添加水平下，平均回收率大于 90%；变异系数小于 10%，方法的准确度和精密度均满足检测要求。

### 三、验证结论

“上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所”对上海市质量监督检验技术研究院建立的标准方法征求意见稿，从方法的线性、灵敏度、准确度和精密度等几个方面进行了考察，结果表明：检测方法原理合理，操作步骤有效，具有较好的可操作性，方法呈现良好的线性关系，检测限和定量限能够达到标准规定的要求，添加浓度的具体试验考察发现方法的平均回收率大于 85%；变异系数小于 10%，符合检测方法的要求。该方法可作为饲料中血根碱、白屈菜红碱的检测方法推广使用。

验证单位：上海市农业科学院农产品质量  
标准与检测技术研究所

验证人：

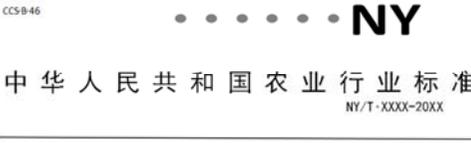


## 附件 2 定向征求意见处理汇总表

共收集到 180 条意见，其中采纳 173 条，不采纳 7 条。

序号	标准章条编号	意见内容	提出单位 (单位及专家)	处理意见及理由 (凡不采纳或部分采纳的意见需说明理由)
1	液相与液质法	建议从原理开始到精密度,液相色谱法和液质联用法分开写:原理、试剂、样品、提取等相同部分,可以在液质部分用“同1.1、1.2”等注明。	李祥明 山东省畜产品质量安全中心	采纳
2		建议删除高效液相色谱测定方法,针对同一试样,可采用不同方法,但检测灵敏度应该是统一的,否则无操作性。	向平 司法鉴定科学研究院	采纳
3	《标准文本》	对格式进行统一规范,注意部分笔误。	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳

4	标准文本	建议试验方法的描述按照全国饲料标委会模板进一步修改。	赵立军 农业农村部饲料质检中心 (成都)	采纳
5	标准文本	表 1、表 2、表 3、表 4 不应为三线图，请参照相关方法标准修改。	赵立军 农业农村部饲料质检中心 (成都)	采纳
6	标准文本和编制说明	建议按照 GB/T 1.1-2020 和 GB/T 20001.4-2015 进一步规范标准文本，完善编制说明	张凤枰 四川威尔检测技术股份有限公司	采纳
7	全文	按照 GB/T1.1 和 GB/T20001.4 的要求规范全文。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
8	表格	改为封闭表格。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
9	封面	专用美术字体： 	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳

10	封面	<p>参考：GB/T 1.1—2020中第51页调整封面格式，位置与间距都没有对。</p> 	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳
11	封面	<p>专用字体：</p> <p>中华人民共和国农业行业标准</p> <p>中华人民共和国农业农村部</p>	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳
12	封面	<p>GB/T 1.1—2020 第58页，附录F，表F.1中09规定英文译名用四号黑体。</p> <p>Determination of 10 Nitrofurans in feeds—</p> <p>Liquid chromatography-Mass spectrometry</p>	李芳 成都蜀星饲料有限公司	采纳
13	封面	<p>建议：征求意见稿修改为定向征求意见稿，文件英文译名字体修改为黑体。理由：GB/T 1.1-2020 附录 F 规定</p>	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	采纳
14	1 页眉页脚	<p>1、页眉框有一行空格；</p> <p>2、双数页页眉和页脚均应该在左侧；</p> <p>3、页码单数页和双数页格式需要调整。</p>	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳

15	0 前言	增加：本文件系首次发布。	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
16	0 前言	建议：在起草人后另起一行，增加“本文件首次发布。”理由：GB/T 1.1-2020 中 8.3 h ) 规定。	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	采纳
17	1	( 1 ) 建议修改为：本文件描述了饲料中血根碱、白屈菜红碱的高效液相色谱和液相色谱-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。本文件高效液相色谱法的检出限为 20 mg/kg、定量限为 50 mg/kg，液相色谱-串联质谱法检出限为 0.2 mg/kg，定量限为 0.5 mg/kg。( 2 ) 博落回散允许在猪、鸡、鸭、鱼使用，但不允许在反刍动物使用，建议方法适用范围增加精料补充料，并补充精料补充料试验数据	张凤枰 ( 四川威尔检测技术股份有限公司 )	采纳

18	1	“预混合饲料”改为“添加剂预混合饲料”。	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳
19	1	“预混合饲料”建议改为“添加剂预混合饲料”	柏雪 西南民族大学	采纳
20	1	建议修改为“添加剂预混合饲料”；并考虑是否增加“精料补充料”。	赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	采纳
21	1	适用范围包括预混合饲料是否合适，适用范围建议添加饲料添加剂。	张晓 山东晟华检测技术有限公司	采纳
22	1	靶动物涉及淡水鱼类、虾、蟹、龟、鳖，建议使用范围增加水产饲料。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
23	1	“本文件、描述了”等表述参见现有标准修改	向平 司法鉴定科学研究院	采纳
24	1	“本文件”建议改为“本标准”。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	不采纳 GB/T 1.1-2020 中要求

25	1	检出限，定量限建议放置正文最后部分。	向平 司法鉴定科学研究院	不采纳 GB/T 1.1-2020 中要求
26	1	建议改为：本文件规定了饲料中血根碱和白屈菜红碱的高效液相色谱测定方法与液相色谱-串联质谱测定方法。本文件适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中血根碱与白屈菜红碱的测定。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
27	1	1.因液相色谱法定量限为 50 mg/kg，建议删除液相色谱法或限制其使用范围，编制说明 2.2.3 中描述血根碱和白屈菜红碱在博落回散中含量在 500 mg/kg~1500 mg/kg，而编制说明（一）中描述博落回散在饲料中最高使用量为 500 mg/kg，经计算当 500 mg/kg 使用量时血根碱和白屈菜红碱在相应饲料中含量大约在 0.25 mg/kg~0.75 mg/kg。2.提高液相色谱串联	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)	采纳

		质谱法的灵敏度，至少应低于编制说明表 1 中最低使用量时的含量。		
28	2	建议文本结构按照高效液相色谱法、液相色谱-串联质谱法两个方法设立	张凤枰 (四川威尔检测技术股份有限公司)	采纳
29	2、5.1	GB/T 6682 应增加发布年份 2008。理由：正文明确指出是引用该标准的一级水要求，属涉及标准具体条文内容，应采用注日期引用。	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
30	2	建议：“该日期对应的版本适用于本文件；”修改为“仅该日期对应的版本适用于本文件；”理由：GB/T 1.1-2020 中 8.6.2 规定	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	采纳
31	4	试样中的血根碱、白屈菜红碱经 0.2%酸化乙腈提取后 建议	柏雪 西南民族大学	采纳

		改为：试样中的血根碱、白屈菜红碱经 0.2%盐酸乙腈提取		
32	4	建议改为：4 原理 试样中的血根碱和白屈菜红碱用酸化乙腈提取，用高效液相色谱仪或液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
33	5	悬置段建议按按 GB1.1-2020 中 7.4 关于段的章节规范编写。	耿士伟 江苏省畜产品质量检验测试中心	采纳
34	5	1) 删去 5.5 和 5.6，仅用于配制溶液的分析纯试剂不必单独列出，2) 5.11 应为混合标准储备溶液，5.12 为混合标准系列溶液，并将 HPLC 和 LC-MS/MS 所用的标准系列溶液分别列出，并给出具体的浓度点。	常碧影 中国农科院质标所	采纳
35	最新标准规定，试剂如果仅用于配制溶液，不需要单独列出，例如：盐酸、磷酸。	5.1□水：GB/T-6682，一级。 5.2□甲醇：色谱纯。 5.3□乙腈：色谱纯。 5.4□甲酸：色谱纯。 5.5□磷酸：85%。 5.6□盐酸：37%。 5.7□甲酸溶液：取 1 mL 甲酸，加水稀释至 1 000 mL，混匀。 5.8□磷酸空罐，取 0.8 mL 磷酸，加水稀释至 1 000 mL，混匀。	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳

36	5 和 5.1 之间	“除非另有规定，仅使用分析纯试剂。”——本句为悬置段，应改成条目。GB/T 1.1-2020 7.4 要求不能有悬置段	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
37	5.1	建议：“标准品”修改为“对照品”理由：标准品系指用于生物检定、抗生素或生物药品中量或效价测定的标准物质，以效价单位(U)表示。对照品系指用于鉴别、检查、含量测定和校正检仪器性能的标准物质。	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	采纳
38	5.2-5.6	补充各化合物的化学式	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
39	5.4、5.5、5.6	只用于配制溶液的试剂，不用单独列出。	宋荣 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
40	5.5	建议删除	田晓玲 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	采纳

41	5.5、5.6	删除	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
42	5.5、5.6	删除：85%、37%	曾勇 湖北省兽药监察所	采纳
43	5.5、5.6	删除：85%、37%	曾勇 湖北省兽药监察所	采纳
44	5.6	建议删除	田晓玲 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	采纳
45	5.7	“甲酸溶液”建议改为“0.1%甲酸溶液”。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	采纳
46	5.7、5.8	建议明确甲酸溶液和磷酸溶液浓度	柏雪 西南民族大学	采纳
47	5.7 和 5.8	建议补充浓度。	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)	采纳

48	5.8	“磷酸溶液”建议改为“0.08%磷酸溶液”。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	采纳
49	5.9	“取 2mL 盐酸加入到 800 mL 乙腈中，加乙腈稀释至 1 000 mL”，建议改为“取 2mL 盐酸，加乙腈稀释至 1000mL”，与上文的表示方法保持一致。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	采纳
50	5.9	建议改为：0.2%盐酸乙腈溶液：量取 800mL 乙腈，加入 2 mL 盐酸（5.6），用乙腈稀释、定容至 1 000 mL，混匀。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
51	5.10	补充各标准品的英文名和化学式	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
52	5.10	删除该条，相关内容合并至 5.11	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
53	5.10	建议改为：删除 5.10	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳

			站	
54	5.11	规范表达，修改细节见文本批注	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
55	5.11	建议改为：标准储备溶液 ( 0.5 mg/mL )：称取血根碱 ( CAS : 2447-54-3 , 纯度≥98% )、白屈菜红碱 ( CAS : 34316-15-9 , 纯度≥98% ) 各 50 mg ( 精确至 0.1 mg ) 分别于 100 mL 棕色容量瓶中，用甲醇溶解并定容，混匀。于-18 °C 以下保存，有效期为 6 个月。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
56	5.11、8.2.2.4	“≤”应为“≤”	吕伟军	采纳
57	5.12 标准系列溶液：	建议：根据下文，可知此处应该是配制两个组浓度梯度标准溶液，建议补充。 <small>5.12□标准系列溶液：分别准确移取标准储备溶液（5.11）适量于棕色容量瓶中，用0.2%盐酸乙醇溶液（5.9）稀释定容配成系列标准溶液，临用现配。</small>	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
58	5.12	“标准储备溶液（5.11）”括号内部分删除，并检查全文。	向平 司法鉴定科学研究院	采纳

59	5.12	标准系列溶液，未说明浓度。	曾勇 湖北省兽药监察所	采纳
60	5.12	补充标准系列溶液的浓度，可以分为标准系列溶液I，标准系列溶液II。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳
61	5.12	标准系列溶液，未说明浓度。	曾勇 湖北省兽药监察所	采纳
62	5.12	建议改为：标准系列溶液：准确移取适量的标准储备溶液（5.11）于50mL棕色容量瓶中，用0.2%盐酸乙腈溶液（5.9）稀释定容，混匀。配制成浓度为1 μg/mL、2 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL的标准系列溶液。临用现配。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
63	5.13	建议补充滤膜“有机系”的具体型号。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	不采纳 实验中常用的尼龙膜、聚四氟乙基膜都不会影响血根碱、白屈菜红碱的检测

64	6	建议增加“分析天平感量 0.01 mg”，并用于称量标准品。	赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	不采纳 标准品称样量为 50.0 mg，使用 0.1 mg 感量的天平已能满足要求。
65	6	1) 标题为：仪器设备。	常碧影 中国农科院质标所	采纳
66	6.1	高效液相色谱仪：配有紫外检测器/二极管阵列检测器。高效液相法定性检测需用到二极管阵列检测器，提供的紫外扫描图谱也是用到的二极管阵列检测器，建议删除紫外检测器	谭美英 湖南省兽药饲料监察所	采纳
67	6.3	分析天平：感量 0.1 mg 建议增加表述为：分析天平：感量 0.1 mg 和 0.01mg	柏雪 西南民族大学	不采纳 标准品称样量为 50.0 mg，使用 0.1 mg 感量的天平已能满足要求。
68	6.3	应配有感量为 0.01mg 的天平用于标准品的称量。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	不采纳 标准品称样量为 50.0 mg，使用 0.1

				mg 感量的天平已能满足要求。
69	6.3	“感量 0.1 mg”应修改为“感量 0.01 g 和 0.01 mg”。	岳秀英 四川省兽药监察所	不采纳 标准品称样量为 50.0 mg，使用 0.1 mg 感量的天平已能满足要求。
70	6.4	统一规范一下仪器名称“超声波仪”。	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳
71	6.4	建议“超声波仪”修改为“超声波清洗机”。	岳秀英 四川省兽药监察所	采纳
72	7	增加“制备”2 字	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
73	7	“粉碎使其粒径小于 0.42mm”考虑到实际操作人员的能力水平检验修改为“使其过 40 目筛”	张晓 山东晟华检测技术有限公司	采纳
74	7	“充分混匀，装入磨口瓶中”，目前饲料行业以样品袋封装为	吴仕辉 广东海大集团股份有	采纳

		主，如无特殊验证实验结果提示的必要性，建议表述为“密闭容器”即可，以免加重企业负担。	限公司	
75	8	8.2.1.1 和 8.2.2.1 中的色谱柱应分别表示为柱长、内径、粒径。	常碧影 中国农科院质标所	采纳
76	8.1 提取	建议：1、“在称取试验1g”前加一句“平行做两份试验”。 2、“再重复提取2次，合并上清于同一50 mL容量瓶中，用0.2%盐酸乙腈溶液（5.9）定容至刻度，”与编制说明中的结论不一致。  编制说明：“综合考虑，确定提取次数为3次。”	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
77	8.1	增加：平行做两份试验。	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
78	8.1	“准确至 0.0001 g”参照已有标准格式	向平 司法鉴定科学研究院	采纳
79	8.1	增加表述：平行做两份试样。“超声振荡提取 10 min”建议明确提取方式 “上清”建议改为“上清液”	柏雪 西南民族大学	采纳
80	8.1	超声振荡如何操作，是同步进行还是分步进行？“6 仪器和	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳

		设备”中应增加振荡器。		
81	8.1	建议改为 :8.1 提取 称取 1g( 精确至 0.0001 g )试样于 50 mL 离心管中 , 加入 10 mL 0.2%盐酸乙腈溶液 ( 5.9 ), 混匀 , 超声提取 10 min , 于 9000 r/min 离心 5 min , 取上清于 50 mL 容量瓶中。重复提取 2 次 , 合并上清液 , 过膜 ( 5.12 ) 过滤 , 待测。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
82	8.1	为提高灵敏度应适当增加相应净化浓缩步骤。	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心( 宁波 )	采纳
83	8.1	“准确至 0.0001 g”建议改为“精确至 0.0001 g”	杨海锋 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所	采纳

84	8.1	“滤膜 ( 5.12 )”改为“滤膜 ( 5.13 )”	杨海锋 上海市农业科学院 农产品质量标准与检测技术 研究所	采纳
85	8.1	“用 0.22 μm 滤膜 ( 5.12 ) 过滤”应修改为“... ( 5.13 )”。	岳秀英 四川省兽药监察所	采纳
86	8.2	删除“样品”2 字	潘葳 福建省农科院农业质量 标准与检测技术研究所	采纳
87	8.2	建议改为： 8.2 高效液相色谱参考条件	李宏 陕西省畜牧技术推广总 站	采纳
88	8.2.1.1	删除：“检测器：紫外检测器”，	潘葳 福建省农科院农业质量 标准与检测技术研究所	采纳
89	8.2.1.1	建议：“A.”修改为“A：”，“B.”修改为“B：”检测器部分增加二 极管阵列检测器波长条件。理由：GB/T 1.1-2020 中 9.4.1 规	高云峰 黑龙江省农产品和兽 药饲料技术鉴定站	采纳

		定。		
90	8.2.1.1	定性测定要求样品与对照品谱图紫外光谱图及最大吸收波长进行比较，因此检测器应明确为二极管阵列检测器	吕伟军	采纳
91	8.2.1.1	删去“检测器：紫外检测器”，上文 6.1 中已说明。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳
92	8.2.1.1	检测器：紫外检测器，检测波长 275 nm。建议修改为“二极管阵列检测器”	谭美英 湖南省兽药饲料监察所	采纳
93	8.2.1.2	建议统一标准系列溶液各浓度点的有效位数。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	采纳
94	8.2.1.2	是否应包含检出限对应的标准溶液浓度，或与 8.2.2.3 要求保持一致。	吕伟军	采纳
95	8.2.1.2	液相法的定量限为 50 mg/kg，理论上机浓度为 1 µg/mL，折合回收率后在线性范围外，建议调整标准曲线浓度范围。液	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳

		质方法同理。		
96	8.2.1.3 定性测定	“选择 275 nm 作为检测波长进行检测，在仪器最佳工作条件下……”，此段不够精练，建议提炼一下。	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
97	8.2.1.3	删除：且样品谱图中血根碱、白屈菜红碱的紫外光谱图及最大吸收波长应与对照品中血根碱、白屈菜红碱的紫外光谱图及最大吸收波长一致，则可判定为样品中存在血根碱、白屈菜红碱。血根碱、白屈菜红碱的紫外吸收光谱图见附录 A 的图 A.2。	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
98	8.2.1.3	删除“选择 275 nm 作为检测波长进行检测”。	曾勇 湖北省兽药监察所	采纳
99	8.2.1.3	建议删除“选择 275nm 作为检测波长进行检测”，已在 8.2.1.1 中明确。	田晓玲 辽宁省农产品及兽药饲料产品检验检测院	采纳
100	8.2.1.3	删除“选择 275 nm 作为检测波长进行检测”。	曾勇 湖北省兽药监察所	采纳

101	8.2.1.4	建议相关系数调整为 0.99	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
102	8.2.1.4、8.2.2.5	补充“单点校准定量时,试样溶液中待测物的浓度与标准溶液的浓度相差不超过 30%。”	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
103	8.2.1.5 试验数据 数据处理	“试样中血根碱、白屈菜红碱含量以质量分数 $\omega_1$ 计,数值以毫克每千克 ( mg/kg ) 表示,”与“ $\omega_1$ ——试样中被测组分含量的浓度 ( mg/kg );”表述不一致,请核实。	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
104	8.2.1.5 试验数据 数据处理	$\omega_1 = \frac{C \times V \times 1000}{m \times 1000} \times f \dots\dots\dots (1)$ 公式中分子分母都包含一个 1000,不清楚有何用意。	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
105	8.2.1.5 试验数据	“白屈菜红碱含量以质量分数 $\omega_1$ 计,” 建议:标红部分采用 Bell MT 字体	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳

	据处理			
106	8.2.1.5	1 “试验数据处理”改成：“结果计算和表述”2 删除“数值以毫克每千克 ( mg/kg ) 表示。”3 删除公式中的：1000/1000	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
107	8.2.1.5、8.2.2.6	建议补充单点校准公式	柏雪 西南民族大学	采纳
108	8.2.1.5、8.2.2.6	删除公式下面第一项 $\omega_1$ 、 $\omega_2$ 的说明。	宋荣 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
109	8.2.1.5、8.2.2.6	补充单点校准计算公式。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
110	8.2.1.5	“ $\omega_1$ ——试样中被测组分含量的浓度 ( mg/kg )”改为“ $\omega_1$ ——试样中被测组分含量的浓度，单位为毫克每千克 ( mg/kg )”，下同	杨海锋 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所	采纳
111	8.2.1.6 精密度	“高效液相色谱法的检出限为20 mg/kg，定量限为50 mg/kg;”与“在重复性条件下，当试样中血根碱、白屈菜红碱	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳

		<p>含量<math>\geq 20</math> mg/kg时，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10%；当试样中血根碱、白屈菜红碱含量<math>&lt; 20</math> mg/kg时，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15%。”</p> <p>后一段话存与前文存在矛盾，不应该是试样中血根碱……，应该是上机溶液中的血根碱。请核实。</p>		
112	8.2.1.6	液相色谱法的定量限为 50mg/kg，需重新确定精密度要求。	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
113	8.2.1.6	精密度表述中分为 $\geq 20$ mg/kg 和 $< 20$ mg/kg <sup>2</sup> 两种情况，与液相法的定量限为 50 mg/kg 冲突，请核准。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳
114	8.2.1.6，8.2.2.7	编制说明实验数据显示该方法精密度很好，建议将精密度要求改为 10%	杨海锋 上海市农业科学院农产品质量标准与检测技术研究所	采纳
115	8.2.2.1	建议：“A 相”、“B 相”修改为“A：”、“B：”理由：与 8.2.1.1	高云峰 黑龙江省农产品和兽	采纳

		表述方式一致。	药饲料技术鉴定站	
116	8.2.2.3	(1) 该条中的系列标准溶液是如何配制的, 保存条件是什么? 需在“试剂或材料”章中补充。(2) 该条中试样溶液用何种溶液稀释 10 倍? 需在 8.1 条中详细说明。(3) 液相色谱法与液质联用法的标准系列溶液是 1000 倍的关系, 而液质联用法的上机测定试样溶液与液相色谱法的仅为 10 倍关系, 是否合理, 建议进一步考察。	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
117	8.2.2.3	建议统一标准系列溶液各浓度点的有效位数。	金玉娥 上海市疾病预防控制中心	采纳
118	8.2.2.3	液质方法试样溶液需经 0.2% 盐酸乙腈溶液( 5.9 ) 稀释 10 倍, 建议移至 8.1 中表述。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳
119	8.2.2.6	“ $\omega_2$ ——试样中被测组分含量的浓度 ( mg/kg ) ”改为“ $\omega_2$ ——	杨海锋 上海市农业科学院	采纳

		试样中被测组分含量的浓度，单位为毫克每千克 ( mg/kg )”， 下同	农产品质量标准与检测技术 研究所	
120	8.2.2.7	建议补充批间精密度要求	吴仕辉 广东海大集团股份有 限公司	采纳
121	精密度	注意精密度的描述，四个标准之间要规范统一。	李祥明 山东省畜产品质量安 全中心	采纳
122	8.3	建议改为：8.3 测定	李宏 陕西省畜牧技术推广总 站	采纳
123	8.3.1	建议改为：8.3.1 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和试样溶液上机测定。血根 碱、白屈菜红碱标准溶液的高效液相色谱图参见附录 A 的 A.1。	李宏 陕西省畜牧技术推广总 站	采纳

124	8.3.2	<p>建议改为：8.3.2 定性 在仪器最佳工作条件下，试样溶液中血根碱、白屈菜红碱的保留时间应与标准系列溶液（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。</p>	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
125	8.3.3	<p>建议改为：8.3.3 定量 以血根碱、白屈菜红碱的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.999。试样溶液中待测物的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 0.2%盐酸乙腈溶液( 5.9 ) 稀释后，重新测定。</p>	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
126	8.4	<p>建议改为：8.4 试验数据处理 试样中血根碱和白屈菜红碱含量分数 <math>\omega_1</math> 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示，按公式  <math display="block">\omega_1 = \frac{C \times V}{m \times 1000} \times 100</math> 算：..... (1) 式 (1) 中：C ——由标准曲</p>	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳

		试样溶液中被测组分的浓度 ( mg/mL ); V ——试样中最终定容体积 ( mL ) m——试样的称样量 , 单位为克 ( g ); n——稀释因子 ; 结果保留三位有效数字。		
127	9	建议改为 : 9 精密度 建议列表述	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
128	9	结果计算的公式建议分单点和多点定量两个公式进行表述。	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心( 宁波 )	采纳
129	10	建议改为 : 10 液相色谱-串联质谱法	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
130	10.1	10.1 仪器参考条件	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳

131	10.1.1	10.1.1 液相色谱参考条件	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
132	10.1.2	10.1.2 质谱参考条件	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
133	10.2	10.2 测定	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
134	10.2.1	10.2.1 标准系列工作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和试样溶液上机测定。血根碱、白屈菜红碱标准溶液选择离子质量色谱图参见附录 B。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
135	10.2.2	10.2.2 定性 在相同试验条件下，试样溶液与标准系列溶液（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 3 选择的监测离子对，比较试	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳

		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浓度接近的标准系列工作溶液中监测离子对的相对离子丰度，若偏差不超过表 4 规定的范围，则可判定为样品中存在血根碱、白屈菜红碱。		
136	10.2.3	10.2.3 定量 以血根碱、白屈菜红碱的浓度为横坐标，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。试样溶液中待测物的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 0.2%盐酸乙腈溶液（5.9）稀释后，重新测定。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
137	11	11 试验数据处理 试样中血根碱、白屈菜红碱含量以质量分数 $\omega_2$ 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示，按公式（2）计算：.....（2）式中：C ——由标准曲线	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳

		得到的试样溶液中被测组分的浓度 ( ng/mL ) ; V —— 试样中最终定容体积 ( mL ) m —— 试样的称样量 , 单位为克 ( g ) ; n —— 稀释因子 ; n —— 稀释因子 ; 结果保留三位有效数字。		
138	附录	按照 GB/T 1.1-2020 对格式和表述进一步规范。	赵立军 农业农村部饲料质检中心 ( 成都 )	采纳
139	附录 A	“图 A.2 血根碱、白屈菜红碱标准溶液 ( 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的紫外扫描图”其中“扫描”改成“光谱”	潘葳 福建省农科院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
140	附录 A	删除图 A.2	李俊玲 山东省畜产品质量安全中心	采纳
141	附录 A	建议在“图 A.2”中将血根碱、白屈菜红碱的最大吸收波长标示出来。	赵立军 农业农村部饲料质检中心 ( 成都 )	采纳
142	附录 A	标题中增加“和紫外扫描图”。	宋荣 中国农业科学院农业质	采纳

			量标准与检测技术研究所	
143	附录 A	1) 在标题下, 应写: A.1 血根碱、白屈菜红碱标准溶液的液相色谱图见图 A.1; 2) 删去图 A.2。	常碧影 中国农科院质标所	采纳
144	图 A.2	紫外扫描图是否显示最大波长, 便于标准使用者参考。	吕伟军	采纳
145	附录 A、附录 B	补充引言, 如“血根碱、白屈菜红碱标准溶液 ( 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的液相色谱图见图 A.1, 紫外扫描图见图 A.2”。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳
146	附录 B	图 B.1 和图 B.2 建议合并描述	吴银良 农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心( 宁波 )	采纳
147	附录 B	在标题下, 应写: B.1 血根碱、白屈菜红碱标准溶液的选择离子质量色谱图见图 B.1。且只给出定量离子色谱图即可。	常碧影 中国农科院质标所	采纳
148	《编制说明》	对格式进行统一规范, 注意部分笔误。	李俊 中国农业科学院饲料研	采纳

			研究所	
149	<b>二、主要工作过程</b>	各阶段工作时间节点请梳理、核实。	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
150	<b>2.1.1 试剂或材料：</b> <b>2.1.2 仪器设备：</b>	<p>建议：这一部分直接用标准文本中的。</p> <p>2.1·高效液相色谱法试验技术制定</p> <p>2.1.1·试剂或材料：一级水；甲醇（色谱纯）；乙腈（色谱纯）；甲酸（色谱纯）；磷酸；盐酸。</p> <p>2.1.2·仪器设备：分析天平；感量 0.1mg；高效液相色谱仪，配紫外检测器/二极管阵列检测器；超声波仪；离心机。</p>	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
151	<b>2.1.3.1 试样的前处理</b>	“取上清于 50 mL 容量瓶中。再重复提取 2 次，” 请核实提取次数。	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
152	<b>2.1.5.1 结果计算</b>	计算公式与标准文本不一致，建议统一。	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳

		<p>结果按式(1)计算:</p> $W_1 = \frac{\rho_1 \times V_1 \times 1000 \times n}{m \times 1000} \dots \dots \dots (1)$ <p>式中:</p> <p><math>\rho_1</math>——从标准曲线查得的试样溶液血根碱、白屈菜红碱的质量浓度,单位为微克每毫升(<math>\mu\text{g/mL}</math>);</p> <p><math>V_1</math>——试样溶液的体积,单位为毫升(<math>\text{mL}</math>);</p> <p><math>m</math>——试样质量,单位为克(<math>\text{g}</math>);</p> <p><math>n</math>——试样溶液的稀释倍数。</p>		
153	2.2.2.2 提取次数 考察	<p>标准文本中“超声振荡提取 10 min”,编制说明中“2.2.2.2 提取次数考察</p> <p>每次提取时,涡旋 15 秒,超声时间为 20 min,以 9000 rpm 离心取上清,”</p>	李芳成都蜀星饲料有限公司	采纳
154	《编制说明》 2.4.11	<p>关于“由于未收集到血根碱和白屈菜红碱含量处于液相色谱法定量限之上的市售饲料样品”,按理是可以收集到这类样品的。</p>	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳
155	《编制说明》第 12 页	<p>“6 种空白样品”要具体标明具体畜禽种类,同时注意名称规范、统一。</p>	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳

156	《编制说明》第 13 页	“中药”改为“天然植物饲料原料”。	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳
157	《编制说明》三、标准编制原则和主要技术内容确定的依据	写中文全称：GB/T 1.1-2020《标准化工作导则》、GB/T 20001.4-2015《标准编写规则》。	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳
158	《编制说明》一、标准制定背景及任务来源	没有看懂“博落回散被列入修订的农业部公告第 2625 号《药物饲料添加剂品种目录及使用规范》”。	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳
159	《编制说明》一、标准制定背景及任务来源	“本身产品质量参差不齐”有数据支持吗？博落回及博落回散都不是饲料添加剂产品。	李俊 中国农业科学院饲料研究所	采纳

160	编制说明	饲料样品基质非常复杂，样品提取后不经过净化，是否对 HPLC 和 HPLC-MS/MS 分离分析造成影响 编制说明未说明，建议补充；个人建议加上净化步骤，保证分离分析准确可靠	张凤枰 (四川威尔检测技术股份有限公司)	采纳
161	编制说明	请按照《国家标准管理办法》规定的十个部分重新编写	张凤枰 (四川威尔检测技术股份有限公司)	采纳
162	编制说明	补充试样测定的数据。	高云峰 黑龙江省农产品和兽药饲料技术鉴定站	采纳
163	编制说明	“标准制定背景”中第三段中“2017 年 12 月 15 日，博落回散被列入修订的农业部公告第 2625 号《药物饲料添加剂品种目录及使用规范》，”应改为“2019 年 12 月 19 日，中华人民共和国农业农村部公告 第 246 号”	赵立军 农业农村部饲料质检中心(成都)	采纳

164	编制说明	建议在“提取溶剂的选择”和“提取次数考察”中给出试验时的加标回收浓度。	赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	采纳
165	编制说明	建议增加“参考文献”，并在文中适当位置标注。	赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	采纳
166	编制说明	请核实 2.2.10.2 中“ $\mu\text{g}/\text{kg}$ ”是否正确？	赵立军 农业农村部饲料质检中心（成都）	采纳
167	编制说明	检出限和定量限建议用添加回收方式代替空白基质稀释标样方式。	宋荣 中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所	采纳
168	编制说明 2.2.1.2	此段中文本描述了 6 种空白样品，但括号中仅给出了 5 种，请核实补充。	耿士伟 江苏省畜产品质量检测测试中心	采纳
169	编制说明 一、	博落回散样品中血根碱和白屈菜红碱的含量主要在 500 mg/kg~1500 mg/kg 之间，混饲使用量约为 200~600 mg/kg，	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳

		液相色谱法的定量限为 50 mg/kg，无法满足配合料的检测需求。2.4.11 也显示未收集到血根碱和白屈菜红碱含量处于液相色谱法定量限之上的市售饲料样品。		
170	编制说明 1	先确定波长，在确定流动相、再是提取方式和提取次数、检出限和定量限、抗干扰情况。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
171	编制说明 2	检出限和定量限的确定缺乏充分依据，请补充完善。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
172	编制说明 2.2.5	添加浓度最高为 1000 mg/kg，未覆盖博落回散样品中血根碱和白屈菜红碱大致含量范围。补充不同添加浓度 3 个批次的批间相对标准偏差数据。	吴宁鹏 河南省兽药饲料监察所	采纳
173	编制说明 2.4.5	建议提高加标浓度，以保证高浓度阳性样品测定结果的准确性。	彭丽 河南省兽药饲料监察所	采纳

174	编制说明 3	给出液相色谱法的抗干扰试验数据	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
175	编制说明 4	给出定性和定量离子的确定依据或引用的标准文献。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
176	编制说明 5	请说明化合物在不同饲料中不存在基质干扰的实验数据，用以证明使用单纯外标定量的依据。请补充方法适用范围中所有产品基质干扰的大小数据，来充分说明本标准使用基质匹配标准曲线的定性和定量的依据。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
177	编制说明 6	请补充标准适用范围中所有饲料产品自定量限起 5 个不同梯度添加样精密度回收率及批内和批间精密度数据。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
178	编制说明 7	请选择市场上的高含量和低含量实际样品来验证方法的可行性。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳

179	编制说明 8	请按照国标委要求的编制说明格式重新编排编制说明。	李宏 陕西省畜牧技术推广总站	采纳
180	试验数据处理	请仔细核对由过程、结果到该公式的全过程。参照已有标准，是否小标题更改为计算等词语。	向平 司法鉴定科学研究院	采纳

### 附件3 预审专家签字表

农业行业标准《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》

预审专家签字表

2023年4月20日

序号	姓名	职务/职称	所在单位	联系方式	签字
1	李俊玲	研究员	山东省畜产品质量安全中心	13805313306	李俊玲
2	杨秀玉	研究员	中国兽医药品监察所	13241400912	杨秀玉
3	程林丽	副教授	中国农业大学	13520870966	程林丽
4	李宏	研究员	陕西省畜牧技术推广总站	13572219615	李宏
5	吴银良	正高级工程师	农业农村部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)	13175177967	吴银良
6	张凤杆	教授级高工	四川威尔检测技术股份有限公司	18908078695	张凤杆
7	耿士伟	研究员	江苏省畜产品质量检验检测中心	13951886106	耿士伟
8	张育润	高工	国家标准技术审评中心	18610999798	张育润

附件4 农业行业标准《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法》（预审稿）审查意见

农业行业标准《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》  
（预审稿）审查意见

2023年4月20日，上海市兽药饲料检测所组织专家对上海市质量监督检验技术研究院、上海市兽药饲料检测所起草的农业行业标准《饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定》（预审稿）进行了认真审查。专家组由张凤桦、李俊玲、杨秀玉、程林丽、李宏、吴银良、耿士伟、张育润组成。在听取起草专家汇报的基础上，专家组审查了标准文本及编制说明，提出如下修改意见：

1. 建议删除高效液相色谱法及其相关内容，标准名称修改为“饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法”。

2. 建议采用固相萃取法净化，进一步优化样品提取和净化步骤，考察提高灵敏度的可行性。

3. 编制说明按照《国家标准管理办法》相关要求进行修改完善。补充批间回收率及精密度数据、增加0.1 mg/kg、1 mg/kg的回收率测定数据；补充配合饲料、浓缩饲料和精料补充料样品提取方法的数据。

4. 按照GB/T 1.1 - 2020、GB/T 20001.4 - 2015的要求规范标准文本及编制说明。

与会专家一致同意标准起草单位按照上述意见修改形成公开征求意见稿，报全国饲料工业标准化技术委员会秘书处。

组长：

2023年4月20日

### 预审意见处理汇总表

标准名称：饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定共 2 页

标准项目承担单位：上海市质量监督检验技术研究院、上海市兽药饲料检测所 2023 年 4 月 20 日填写

序号	文件章节编号	意见内容	提出单位	处理意见及理由	备注
1	标准文本	建议删除高效液相色谱法及其相关内容，标准名称修改为“饲料中血根碱、白屈菜红碱的测定 液相色谱-串联质谱法”。	专家组	采纳	
2	5.5.2.1	(1) 调整列项 b) 流动相至列项 c) 流动相； (2) 删除列项 f)。	专家组	采纳	
3	附录 B	图 A.1 用最低浓度标准溶液的色谱图	专家组	采纳	
4	编制说明	(1) 征求意见表意见处累加上统计信息； (2) 明确需配合饲料的品名； (2) 详细列出批间回收率及精密度数据； (3) 增加 0.1 mg/kg、1 mg/kg 的回收率测定数据；	专家组	采纳	

		<p>(4) 补充说明选择母离子、子离子的依据；</p> <p>(5) 根据博雅返回的添加量计算出饲料中血根碱和白屈红碱的含量范围；</p> <p>(6) 根据称样量优化超声时间和提取次数；</p> <p>(7) 图 37、图 38 单独给出空白基质图；</p> <p>(8) 建议使用固相萃取法净化，进一步优化样品提取和净化步骤，考虑提高灵敏度的可行性；</p> <p>(9) 补充配合饲料、浓缩饲料和精料补充料样品提取方法的数据；</p> <p>(10) 编制说明按照《国家标准管理办法》相关要求进一步修改完善。</p>		
5	标准文本及编制说明	按照 GB/T 1.1-2020、GB/T 20001.4-2015 的要求编制标准文本，完善编制说明。	专家组	采纳