

团 体 标 准

T/SATA 036—2022

植物药酒中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱含量的测定 高效液相色谱-串联质谱法

Determination of aconitine, hypaconitine and mesaconitine in botanical medicated wine—HPLC-MS/MS method

2022 - 03 -24 发布

2022 - 04- 24 实施

深圳市分析测试协会 发布

目次

前 言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 原理.....	1
5 试剂与材料.....	1
6 仪器和设备.....	2
7 分析步骤.....	2
8 结果计算.....	3
9 检测方法的灵敏度、精密度和专属性.....	3
附录 A（规范性）乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的相关信息.....	4
附录 B（资料性）质谱参考条件.....	5
附录 C（资料性）标准色谱图.....	6

前 言

本文件按照GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》给出的规则起草。

本文件由深圳市分析测试协会归口。

本文件起草单位：深圳市计量质量检测研究院、深圳市计量质量检测研究院（集团）有限责任公司。

本文件主要起草人：李芸、林爽、罗敏、程晓帆、柏文良、邹幼成、罗尔伦、区振豪、翁晓君、梁汉旺、张贵虹。

本文件为首次发布。

植物药酒中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱含量的测定

高效液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了植物药酒中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的高效液相色谱-串联质谱测定方法。
本文件适用于植物药酒中乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的定性定量测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

植物药酒：利用可食用或按照传统既是食品又是中药材（或符合相关规定）的植物及其制品，经再加工制成的、具有特定风格的饮料酒。

4 原理

试样经乙腈提取，过滤后，上清液供高效液相色谱-串联质谱测定，保留时间和相对离子丰度定性，外标法定量。

5 试剂与材料

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

5.1 甲醇：色谱纯。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 氨水：分析纯，含量为25%~28%。

5.4 0.1%氨水溶液：精密量取氨水（5.3）1.00 mL，用水稀释至1000 mL。

5.5 标准品：乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的中文名称、英文名称、CAS 号、分子式、相对分子质量详见附录 A，纯度≥99%。

5.6 标准储备液（1000 μg/mL）

精密称量适量乌头碱、次乌头碱、新乌头碱标准品（5.5），用乙腈溶解并制成浓度为1000 μg/mL 的混合标准储备液，于4℃下避光保存，有效期3个月。

5.7 标准中间液（10.0 μg/mL）

准确移取1.00 mL乌头碱、次乌头碱、新乌头碱混合标准储备液于100 mL容量瓶中，用乙腈定容至刻度，得到10.0 μg/mL的混合标准中间液，于4℃下避光保存，有效期1个月。

5.8 空白基质提取液

称取空白试样适量，与样品同法处理（7.1），作为空白基质提取液。

5.9 混合标准工作溶液

分别准确移取一定体积的混合标准中间液（5.7），用空白基质溶液配制成浓度为 0.500、1.00、2.00、5.00、10.0、20.0 μg/L 的混合标准工作液。

6 仪器和设备

- 6.1 高效液相色谱-串联质谱仪，配有电喷雾（ESI）离子源。
- 6.2 电子天平：感量为 0.0001 g。
- 6.3 超声波清洗器。
- 6.4 涡旋混匀器。
- 6.5 微孔滤膜：0.22 μm ，有机相型。

7 分析步骤

7.1 试样制备

取适量试样摇匀，吸取 1.00 mL 于 50 mL 离心管中，加入乙腈稀释至 10.0 mL，摇匀，振荡 20 min，用微孔滤膜（0.22 μm ，有机相）过滤，取续滤液，根据实际浓度适当稀释至线性范围内，待测。

7.2 仪器参考条件

7.2.1 色谱条件

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱（1.8 μm , 2.1×100 mm，耐受的 pH 值范围：pH>9），或性能相当者。
- b) 流动相：A 为 0.1% 氨水溶液，B 为甲醇，梯度洗脱程序见表 1。
- c) 流速：0.3 mL/min。
- d) 柱温：30 $^{\circ}\text{C}$ 。
- e) 进样量：2.0 μL

表 1 梯度洗脱程序表

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	70	30
0.2	70	30
3.5	10	90
5.5	10	90
6.5	70	30
7.0	70	30

7.2.2 质谱条件

- a) 离子源：电喷雾离子源（ESI 源）。
- b) 扫描方式：多反应监测（MRM）。
- c) 干燥气、雾化气、鞘气、碰撞气等均为高纯氮气或其他合适气体，使用前应调节相应参数使质谱灵敏度达到检测要求，毛细管电压、离子源温度、雾化气压力、辅助气体压力、气帘气压力、碰撞能量、去簇电压等参数应优化至最佳灵敏度，监测离子对和定量离子对等信息详见附录 B。

7.3 定性测定

按照高效液相色谱-串联质谱条件测定试样和标准工作溶液，记录试样和标准溶液中各化合物的色谱保留时间，以相对于最强离子丰度的百分比作为定性离子对的相对丰度，记录浓度相当的试样与标准工作溶液中相应成分的相对离子丰度。当试样中检出与标准品质量色谱峰保留时间一致的色谱峰（变化

范围在±2.5%之内)，并且相对离子丰度允许偏差不超过表2规定的范围，可以确定试样中检出相应化合物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	>20-50	>10-20	≤10
允许的相对偏差/%	±20	±25	±30	±50

7.4 定量测定

7.4.1 标准曲线的制作

将标准工作溶液（5.9）分别按仪器参考条件（7.2）进行测定，得到相应的标准溶液的色谱峰面积。以标准工作溶液的浓度为横坐标，以色谱峰的峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，在浓度范围 0.500~20.0 μg/L 内，相关系数不低于 0.99。

标准品提取离子色谱图参见附录 C。

7.4.2 试样溶液的测定

将试样溶液（7.1）按仪器参考条件（7.2）进行测定，得到相应的样品溶液的色谱峰面积，根据标准曲线得到待测液中组分的浓度。

7.5 空白试验

除不加试样外，均按上述操作步骤进行操作。

8 结果计算

将液相色谱-质谱测得浓度代入下式计算含量：

$$X = \frac{c \times V}{V_{\text{样}}} \times K \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- X — 试样中各待测物的含量，单位为微克每升（μg/L）；
- c — 从标准曲线中读出的供试品溶液中各待测物的浓度，单位为微克每升（μg/L）；
- V — 样液最终定容体积，单位为毫升（mL）；
- $V_{\text{#}}$ — 试样溶液所代表的体积，单位为毫升（mL）；
- K — 稀释倍数；

计算结果以重复性条件下获得的两次独立测定结果的算术平均值表示，结果保留三位有效数字。

9 检测方法的灵敏度、精密度和专属性

9.1 灵敏度

当取样量为 1.00 mL，定容体积为 10.0 mL 时，本方法的检出限为 5.00 μg/L，定量限为 10.0 μg/L。

9.2 精密度

在重复性条件下获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 15%。

9.3 选择性

取空白溶液(7.5)进样测定，应无干扰。

附录 A

(规范性)

乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的相关信息

表A.1乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的中文名称、英文名称、CAS号、分子式、相对分子质量

中文名称	英文名称	CAS号	分子式	相对分子质量
乌头碱	Aconitine	302-27-2	$C_{34}H_{47}NO_{11}$	645.74
次乌头碱	Hypaconitine	6900-87-4	$C_{33}H_{45}NO_{10}$	615.72
新乌头碱	Mesaconitine	2752-64-9	$C_{33}H_{45}NO_{11}$	631.72

附 录 B
(资料性)
质谱参考条件

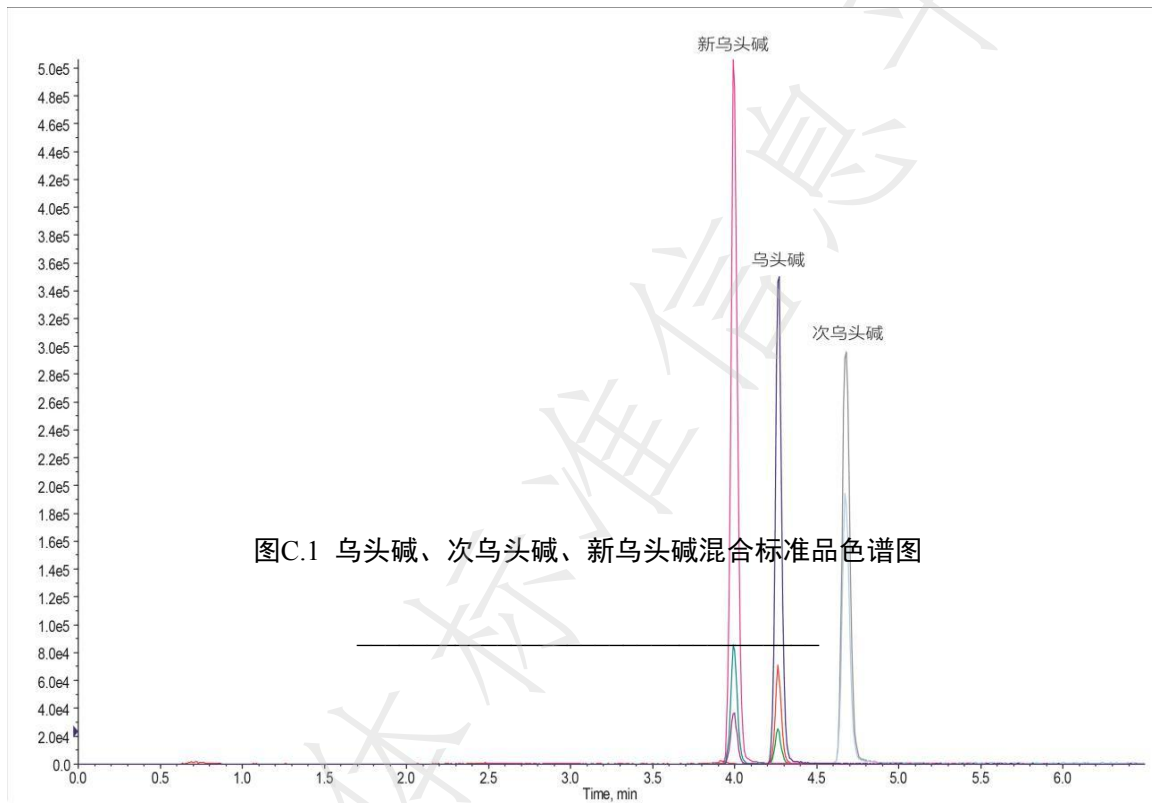
- a) 离子源：电喷雾离子源(ESI)；
b) 检测方式：多反应监测 (MRM)；
c) 扫描方式：正离子模式；
d) 毛细管电压：5500 V；
e) 离子源温度：500 °C ；
f) 雾化气压力：60 psi；
g) 辅助气体压力：60 psi；
h) 气帘气压力：30 psi；
i) 其他质谱参数见表B.1。

表B.1 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱的定性离子、定量离子和质谱分析参数参考值

化合物名称	电离方式	母离子(m/z)	子离子 (m/z)	去簇电压/V	碰撞能量(eV)
乌头碱	ESI ⁺	646.9	587.4*	60	46
			527.3	60	52
			368.2	60	57
次乌头碱	ESI ⁺	616.9	557.3*	60	45
			525.3	60	50
新乌头碱	ESI ⁺	633.1	573.3*	60	46
			541.2	60	51
			354.2	60	57

* 定量离子对。

附录 C
(资料性)
标准色谱图



图C.1 乌头碱、次乌头碱、新乌头碱混合标准品色谱图