方法验证报告

方法名称	液相色谱-串联质谱法测定火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚
制订单位	北京市科学技术研究院分析测试研究所（北京市理化分析测试中心）
验证单位	北京市延庆区疾病预防控制中心
样品前处理方法	**1.仪器和材料** Xevo TQ-S 超高效液相色谱仪串联三重四极杆质谱仪；GR22GIII高速冷冻离心机；N-EVAPTM 112 恒温水浴氮吹仪；MS200 多管涡旋混匀仪；Vortex-genie 2 涡旋混合器；KQ-500DE 数控超声波清洗器；色谱柱 Acquity UPLC HSS T3(100mm×2.1mm, 1.8μm)。 **2.试剂和材料** 试验室用水为一级水；甲醇、乙醇、甲酸、甲酸铵均为色谱纯；石墨化碳黑；十八烷基键合硅；EMR。 **3.标准储备溶液的配制** 取去甲乌药碱、曲托喹酚、去甲乌药碱-D_4和曲托喹酚盐酸盐-D_9标准品，用甲醇溶解，配制成储备液，再用甲醇+10mmol/L 甲酸铵水溶液(含 0.1%甲酸)（1+1）稀释配制成外标浓度分别为 0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、10ng/mL 的系列混合标准工作溶液，其中内标浓度均为 5 ng/mL。 **4.前处理方法** 称取试样2g(精确到0.01g)于50 mL的具塞螺旋盖聚丙烯离心管中，准确加入100 μL1 mg/L混合内标工作溶液，加入20 mL含5%甲酸的乙醇溶液，涡旋混匀，振荡提取3 0min，8000 r/min离心5 min。移取2.0 mL上清液于含有10 mL的净化管中，加入65 mg GCB、65 mg C_{18}和65 mg EMR，涡旋混合，8000 r/min离心5 min，移取1.0 mL上清液，氮气吹至近干，用1.0 mL甲醇+10mmol/L甲酸铵水溶液(含0.1%甲酸)（1+1）定容，涡旋30s，0.22 μm尼龙微孔滤膜过滤，供高效液相色谱串联质谱测定，同步进行空白试验。

仪器条件

1.仪器型号：

超高效液相色谱仪串联三重四极杆质谱仪（型号：Xevo TQ-S），美国WATERS 公司；色谱柱：ACQUITY UPLC HSS T3 2.1mm×100mm，1.8μm。

2.色谱分离条件：

流动相 A（甲醇）和 B（10mmol/L 甲酸铵水溶液(含 0.1%甲酸)）。柱温为30℃，进样量 5μL。洗脱程序见表 1。

表 1 UPLC 系统洗脱程序

时间（min）	流速（mL/min）	A	B
0.0	0.3	3	97
1.5	0.3	3	97
5.5	0.3	95	5
5.6	0.3	3	97
7.5	0.3	3	97

3.质谱条件：

电喷雾正离子模式 ES+；扫描方式为 MRM；毛细管电压 3.0kV；脱溶剂气温度 500℃；脱溶剂气流速为 800L/Hr；锥孔气流速 150L/Hr。其余各参数见表 2。

表2 去甲乌药碱和曲托喹酚的MRM参数

序号	被测物	定量离子对 (*m/z*)	CV/CE	定性离子对 (*m/z*)	CV/CE
1	去甲乌药碱	272.4>107.2	40/20	272.4>161.2	40/18
2	去甲乌药碱-D_4	276.5>108.3	40/20	276.5>164.3	40/18
3	曲托喹酚	346.5>164.2	6/14	346.5>149.1	6/5
4	曲托喹酚-D_9	355.6>164.1	12/16	355.6>137.1	12/46

4.实验结果：

采用溶剂标准曲线法内标法定量，去甲乌药碱和曲托喹酚在线性范围0.1-10 ng/mL 内线性相关系数良好，在 1 倍、2 倍和 10 倍定量限时回收率在76.3%~115%之间，相对标准偏差 RSD≤16.9%，结果见附表 1-3。

验证人 林强	验证单位签章
2023年 9月21日	2023年 9月21日

附表 1 清汤基质火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚的回收率（n=6）

	曲托喹酚					去甲乌药碱				
火锅底料种类	添加量（μg/kg）	测得值（μg/kg）	平均值（μg/kg）	平均回收率（%）	RSD (%)	添加量（μg/kg）	测得值（μg/kg）	平均值（μg/kg）	平均回收率（%）	RSD (%)
清汤基质	1.0	1.17	1.15	115	2.6	1.0	1.16	1.13	113	5.8
		1.18					1.13			
		1.13					1.18			
		1.15					1.00			
		1.16					1.15			
		1.10					1.16			
	2.0	2.23	2.14	107	4.6	2.0	2.26	2.17	108	2.3
		2.26					2.14			
		2.10					2.12			
		2.06					2.17			
		2.15					2.17			
		2.01					2.15			
	10	10.04	10.2	102	12.3	10	9.58	9.77	97.8	16.9
		10.30					9.71			
		8.90					7.66			
		8.74					8.39			
		11.52					11.81			
		11.72					11.52			

附表 2 清油基质火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚的回收率（n=6）

	曲托喹酚					去甲乌药碱				
火锅底料种类	添加量（μg/kg）	测得值（μg/kg）	平均值（μg/kg）	平均回收率（%）	RSD (%)	添加量（μg/kg）	测得值（μg/kg）	平均值（μg/kg）	平均回收率（%）	RSD (%)
清油基质	1.0	1.15	1.15	115	2.4	1.0	1.09	1.08	108	5.9
		1.13					1.02			
		1.20					1.07			
		1.12					1.18			
		1.15					1.01			
		1.16					1.12			
	2.0	2.20	2.26	113	2.2	2.0	2.04	1.96	98.1	3.8
		2.29					1.92			
		2.33					2.05			
		2.21					1.99			
		2.25					1.89			
		2.25					1.88			
	10	11.10	10.79	108	5.6	10	9.80	9.1	91.0	8.2
		10.80					9.02			
		11.28					9.43			
		11.44					9.91			
		9.95					8.19			
		10.19					8.27			

附表 3 牛油基质火锅底料中去甲乌药碱和曲托喹酚的回收率（n=6）

	曲托喹酚					去甲乌药碱				
火锅底料种类	添加量（μg/kg）	测得值（μg/kg）	平均值（μg/kg）	平均回收率（%）	RSD (%)	添加量（μg/kg）	测得值（μg/kg）	平均值（μg/kg）	平均回收率（%）	RSD (%)
牛油基质	1.0	1.12	1.12	112	3.2	1.0	0.92	0.89	89.0	6.8
		1.17					0.86			
		1.15					0.80			
		1.10					0.94			
		1.13					0.86			
		1.07					0.96			
	2.0	1.88	1.79	89.7	5.8	2.0	1.63	1.53	76.3	9.3
		1.83					1.65			
		1.63					1.34			
		1.70					1.36			
		1.88					1.55			
		1.84					1.63			
	10	9.73	9.81	98.1	5.6	10	7.84	7.88	78.8	6.3
		9.96					8.28			
		10.56					8.27			
		10.19					8.30			
		9.09					7.16			
		9.33					7.40			