

ICS 67.050

CCS X 04

T/GXAS

团 体 标 准

T/GXAS 834—2024

南宁老友粉中罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因的测定 离子交换净化-液相色谱串联质谱法

Determination of papaverine, noscapine, thebaine, morphine and codeine in Nanning Laoyou rice noodle by ion exchange purification-liquid chromatography tandem mass spectrometry

2024 - 09 - 29 发布

2024 - 10 - 05 实施

广西标准化协会 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 试剂和材料	1
6 仪器和设备	2
7 试样处理	3
8 测定	3
9 试验数据处理	3
10 精密度和正确度	4
11 检出限和定量限	4
附录 A (资料性) 液相色谱参考条件	5
附录 B (资料性) 质谱参考条件	6
附录 C (资料性) 5 种生物碱标准物质及内标多反应监测 (MRM) 参考色谱图	7

前 言

本文件参照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由南宁市食品药品检验所提出和宣贯。

本文件由广西标准化协会归口。

本文件起草单位：南宁市食品药品检验所、广西壮族自治区产品质量检验研究院、广电计量检测（南宁）有限公司、广西民生中检联检测有限公司、广西职业技术学院、广西复记食品科技有限公司、广西南宁市韩太食品有限责任公司。

本文件主要起草人：刘国石、覃弘毅、朱春红、陶汝青、黄薇臻、谢庆剑、黄利娟、范兴、苏萍、黄宇、徐铁纯、林跃华、董海龙、黄昊、李琬婧、何善廉、肖艳、罗行、陆兰娟、韦家荣、梁晓琳、李莹丽、梁卓妮、廖洁明、吴张静、陆鸣、李小金、唐成志。

南宁老友粉中罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因的测定 离子交换净化-液相色谱串联质谱法

1 范围

本文件描述了离子交换净化-液相色谱串联质谱法测定南宁老友粉中罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因等5种罂粟壳生物碱的方法。

本文件适用于现烹或预包装南宁老友粉中罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡和可待因等5种罂粟壳生物碱的测定。

2 规范性引用文件

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

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 原理

老友粉试样加水分散后，经正己烷脱脂、强阳离子交换作用净化，用液相色谱串联质谱测定。以保留时间、质谱特征离子对和离子对相对丰度比进行定性分析，以平行操作的空白样品、空白添加样品作为对照进行结果评价。罂粟碱、那可丁、蒂巴因采用外标法定量，吗啡、可待因采用内标法定量。

5 试剂和材料

除另有说明外，所用试剂均为色谱纯，水为GB/T 6682规定的一级水。

5.1 试剂

5.1.1 乙腈（ CH_3CN ）。

5.1.2 氨水（ $\text{NH}_3\cdot\text{H}_2\text{O}$ ），氨含量 $\geq 25\%$ 。

5.1.3 甲醇（ CH_3OH ）。

5.1.4 甲酸（ HCOOH ）。

5.1.5 乙酸铵（ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ）。

5.1.6 正己烷（ C_6H_{14} ）。

5.2 标准品

5.2.1 罂粟碱（ $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ ，CAS 号：58-74-2）：纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.2.2 吗啡（ $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$ ，CAS 号：57-27-2）：纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.2.3 那可丁（ $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}_7$ ，CAS 号：128-62-1）：纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.2.4 可待因（ $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ ，CAS 号：76-57-3）：纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.2.5 蒂巴因（ $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NO}_3$ ，CAS 号：115-37-7）：纯度 $\geq 99\%$ 。或经国家认证并授予标准物质证书的标

准物质。

5.2.6 吗啡 D₃ (C₁₇H₁₆D₃NO₃, CAS 号: 67293-88-3): 纯度≥99%。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.2.7 可待因 D₃ (C₁₈H₁₈D₃NO₃, CAS 号: 70420-71-2): 纯度≥99%。或经国家认证并授予标准物质证书的标准物质。

5.3 溶液配制

5.3.1 乙腈水溶液 (80+20, v/v): 量取 80 mL 乙腈 (5.1.1), 用水稀释至 100 mL, 摇匀备用。

5.3.2 氨水甲醇溶液 (5+95, v/v): 量取 5 mL 氨水 (5.1.2), 用甲醇 (5.1.3) 稀释至 100 mL, 摇匀备用。

5.3.3 甲酸乙腈溶液 (1+999, v/v): 量取 1 mL 甲酸 (5.1.4), 用乙腈 (5.1.1) 稀释至 1000 mL, 混匀, 过滤备用。

5.3.4 乙酸铵-甲酸水溶液 (2mmol/L): 准确称取 0.154 g 乙酸铵 (5.1.5) 溶解于适量水中, 再加入 1 mL 甲酸 (5.1.4), 用水稀释至 1000 mL, 混匀, 过滤备用。

5.3.5 标准储备液 (100 μg/mL): 准确称取适量罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡、可待因、吗啡 D₃ 和可待因 D₃ 标准品 (5.2), 用乙腈 (5.1.1) 配制成罂粟碱、那可丁、蒂巴因、吗啡、可待因、吗啡 D₃ 和可待因 D₃ 浓度均为 100 μg/mL 的标准储备液。-18 °C 避光保存, 有效期 6 个月。

5.3.6 混合标准工作溶液: 准确吸取罂粟碱、那可丁、蒂巴因标准储备液 (5.3.5) 各 100 μL 和吗啡、可待因储备液 (5.3.5) 各 1 mL 于 20 mL 容量瓶中, 用乙腈水溶液 (5.3.1) 定容至刻度, 摇匀, 即得含有罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 0.5 μg/mL 和吗啡、可待因浓度为 5 μg/mL 的混合标准工作溶液。4 °C 避光保存, 有效期 1 个月。

5.3.7 同位素内标工作溶液: 准确吸取吗啡 D₃、可待因 D₃ 标准储备液 (5.3.5) 各 200 μL 于 10 mL 容量瓶中, 用乙腈水溶液 (5.3.1) 定容至刻度, 摇匀, 得到含有吗啡 D₃、可待因 D₃ 浓度为 2 μg/mL 的同位素内标工作溶液。4 °C 避光保存, 有效期 1 个月。

5.3.8 标准工作溶液: 分别准确吸取适量混合标准工作溶液 (5.3.6) 和同位素内标工作溶液 (5.3.7), 用乙腈水溶液 (5.3.1) 稀释成罂粟碱、那可丁、蒂巴因浓度为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL, 吗啡、可待因浓度分别为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL, 吗啡 D₃、可待因 D₃ 浓度均为 100 ng/mL 的系列标准工作溶液, 临用新配。

5.4 材料

5.4.1 固相萃取柱: 混合型强阳离子交换柱 (以键合苯/苯磺酸基的有机聚合物为填料, 60 mg/3 mL) 或相当者。使用前依次用 3 mL 甲醇和 3 mL 水活化。

5.4.2 氮气: 纯度≥99.99%。

5.4.3 微孔滤膜: 孔径为 0.22 μm 的疏水性 PTFE 微孔滤膜。

6 仪器和设备

6.1 液相色谱串联质谱仪: 三重四极杆质谱, 配有电喷雾离子源 (ESI)。

6.2 电子天平: 感量为 0.001 g 和 0.01 mg。

6.3 离心机: 转速不小于 6 000 r/min。

6.4 固相萃取装置。

6.5 氮吹仪。

6.6 涡旋混合器。

6.7 粉碎机。

6.8 匀浆机。

7 试样处理

7.1 试样制备

取包含米粉、汤料、配料等所有原辅料的南宁老友粉待测试样 (>500 g)，粉碎匀浆混匀。混匀好的样品分成两份，分别作为试样和留样，装于洁净的瓶或袋中，密封并标记，于-18 ℃保存。

7.2 提取

称取试样1 g（精确至0.001 g）于15 mL离心管中，加入50 μL同位素内标工作溶液（5.3.7），混匀后加入2 mL水涡旋提取10 min，于6 000 r/min下离心5 min，将上清液移入另一15 mL离心管中，残渣加入2 mL水重复提取1次，合并上清液，加入2 mL正己烷（5.1.6），涡旋振荡1 min，待分层后弃去正己烷层，剩余清液待净化。

7.3 净化

将待净化清液全部移入已经活化好的固相萃取柱（5.4.1）中，控制流速在3 mL/min以下，依次用3 mL水、3 mL甲醇（5.1.3）淋洗，弃去淋洗液，抽干，用2 mL氨水甲醇溶液（5.3.2）洗脱，洗脱液于50 ℃下氮吹至干，准确加入1 mL乙腈水溶液（5.3.1），涡旋混匀1 min，经微孔滤膜（5.4.3）过滤后，滤液作为试样溶液，上机测定。

8 测定

8.1 定性测定

在同等试验条件下，使用液相色谱串联质谱仪测定试样溶液（7.3）和标准工作溶液（5.3.8），若检测的质量色谱峰保留时间与标准品保留时间相差不超过±2.5%，定性离子对的相对丰度（用相对于最强离子丰度的强度百分比表示）与浓度相当的标准工作溶液的相对丰度一致，相对丰度（k）允许偏差不超过表1规定的范围，则样品中存在对应的被测物。液相色谱串联质谱仪液相色谱参考条件见附录A，质谱参考条件见附录B。

表1 定性确定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	k > 50	50 ≥ k > 20	20 ≥ k > 10	k ≤ 10
允许的最大偏差/%	±20	±25	±30	±50

8.2 定量测定

取标准工作溶液（5.3.8）进样，以罂粟碱、那可丁和蒂巴因的色谱峰面积为纵坐标，罂粟碱、那可丁和蒂巴因的浓度为横坐标绘制标准工作曲线，外标法定量；以吗啡和可待因的峰面积与相应内标物峰面积的比值为纵坐标，吗啡和可待因的浓度为横坐标绘制标准工作曲线，内标法定量。在8.1的色谱和质谱条件下，5种罂粟壳生物碱标准物质提取离子参考色谱图见附录C。

8.3 空白试验

除不加试样外，按测定步骤进行平行操作。空白含量不应高于检出限。

9 试验数据处理

试样中被测物的含量按公式（1）计算。

$$X = \frac{c \times V}{m} \dots \dots \dots (1)$$

式中：

X——试样中被测物的含量，单位为微克每千克（μg/kg）；

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

V——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样取样质量，单位为克（g）。

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，计算结果保留三位有效数字。

10 精密度和正确度

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%，回收率范围在60%~120%之间。

11 检出限和定量限

当试样取样质量为1g，最终定容体积为1mL时，罂粟碱、那可丁和蒂巴因的检出限均为0.2 μg/kg，定量限均为0.5 μg/kg；吗啡和可待因的检出限均为2 μg/kg，定量限均为5 μg/kg。

附录 A
(资料性)
液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下,可根据不同仪器实际情况进行调整、优化:

- a) 色谱柱: Agilent HILIC plus, 规格为 100 mm×2.1 mm×1.8 μm, 或其他等效柱;
- b) 流速: 0.4 mL/min;
- c) 进样体积: 5.0 μL;
- d) 柱温: 35 °C±1 °C;
- e) 梯度洗脱程序见表 A.1。

表A.1 梯度洗脱程序

时间/min	乙酸铵-甲酸水溶液 (2 mmol/L) /%	甲酸乙腈溶液 (1+999, v/v) /%
0.0	5	95
0.3	5	95
0.8	15	85
1.5	15	85
2.0	25	75
2.7	25	75
2.8	5	95
5.0	5	95

GXAS
广西标准化协会

附录 B
(资料性)
质谱参考条件

质谱参考条件如下，可根据不同仪器实际情况进行调整、优化：

- a) 电离方式：电喷雾正离子模式（ESI⁺）；
- b) 检测方式：多反应离子监测（MRM）；
- c) 离子源温度：550 ℃；
- d) 电喷雾电压：5 500 V；
- e) 碰撞气（CAD）、气帘气（CUR）、雾化气（GS1）、辅助气（GS2）均为氮气，使用前调节各气流流量以使质谱灵敏度达到检测要求；
- f) 去簇电压（DP）、碰撞能量（CE）等电压值应优化至最佳灵敏度；
- g) 定性离子对、定量离子对、去簇电压和碰撞电压的优化条件参见表 B. 1。

表B.1 5种罂粟壳生物碱及内标化合物的定量离子对、定性离子对、去簇电压和碰撞电压

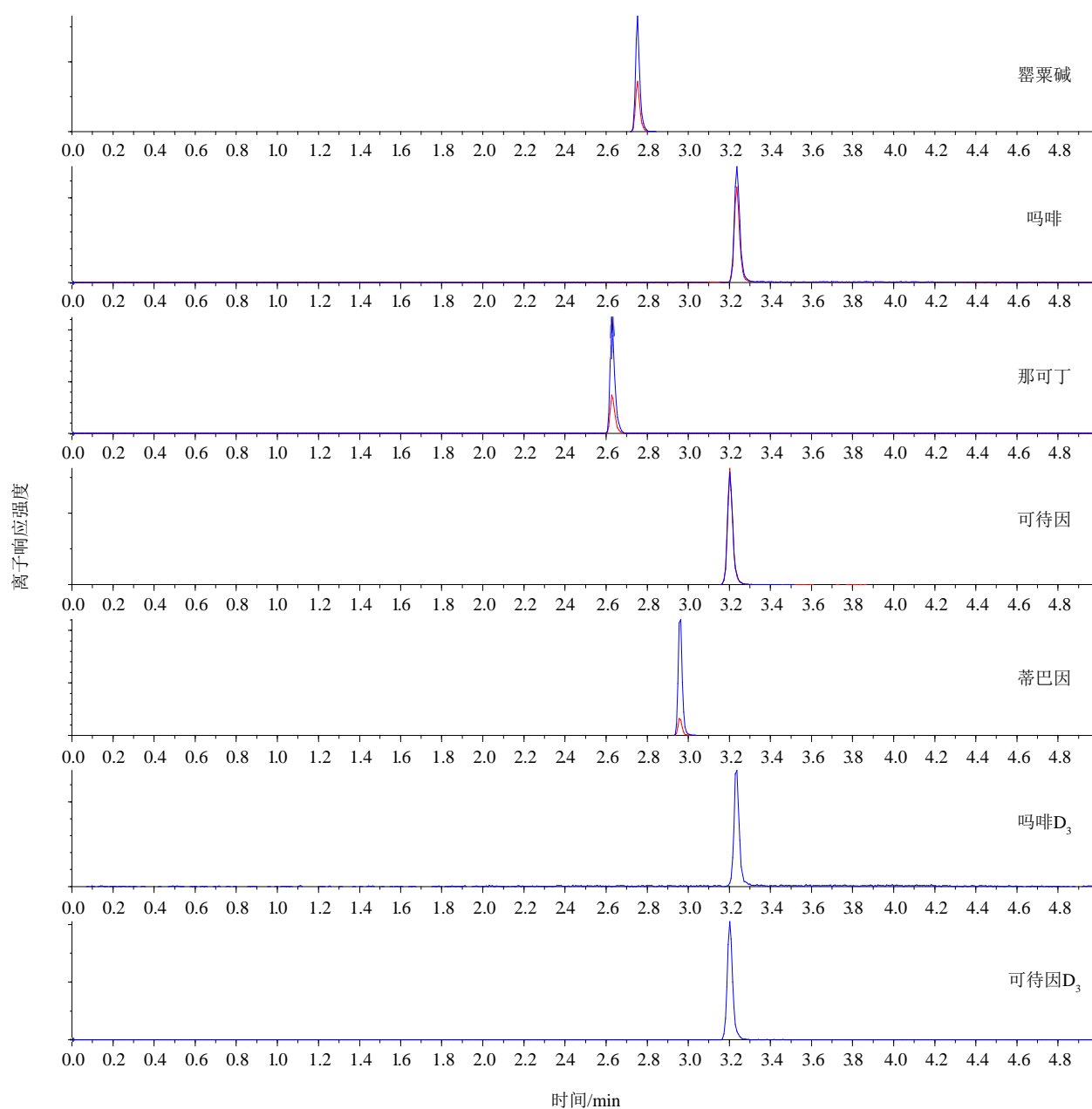
组分名称	定性离子对/m/z	定量离子对/m/z	去簇电压/V	碰撞电压/V
罂粟碱	340.1/202.1	340.1/202.1	60	35
	340.1/171.1		60	45
吗啡	286.1/201.1	286.1/201.1	90	34
	286.1/165.1		90	50
那可丁	414.1/220.1	414.1/220.1	90	30
	414.1/353.1		90	32
可待因	300.1/215.1	300.1/215.1	90	33
	300.1/165.1		90	50
蒂巴因	312.1/58.1	312.1/58.1	60	35
	312.1/251.1		60	35
吗啡D ₃	289.1/185.1	289.1/185.1	110	40
可待因D ₃	303.2/215.1	303.2/215.1	110	35

注：非商业性声明：表B所列质谱参考条件是在Sciex TripleQuad 4 500质谱仪上完成的，此处列出试验用仪器型号仅是为了提供参考，并不涉及商业目的，鼓励标准使用者尝试不同厂家和型号的仪器。

附录 C
(资料性)

5 种生物碱标准物质及内标多反应监测 (MRM) 参考色谱图

图C.1给出了5种生物碱标准物质及内标多反应监测 (MRM) 参考色谱图。



图C.1 5 种生物碱标准物质及内标多反应监测 (MRM) 参考色谱图

中华人民共和国团体标准
南宁老友粉中罂粟碱、那可丁、蒂巴因、
吗啡和可待因的测定 离子交换净化-液相色
谱串联质谱法
T/GXAS 834—2024
广西标准化协会统一印制
版权专有 侵权必究