

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×

禽蛋中叶酸总量测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of total folates in poultry eggs—
Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

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

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会（SAC/TC 274）归口。

本文件起草单位：XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX。

禽蛋中叶酸总量测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了禽蛋中叶酸总量的液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于禽蛋中叶酸总量（以叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基-四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和5,10-次甲基四氢叶酸总和计）的测定。

本文件的叶酸总量的检测限为20 ng/g,定量限为50 ng/g。

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

试样中叶酸、二氢叶酸、四氢叶酸、5-甲基-四氢叶酸、5,10-亚甲基四氢叶酸和5,10-次甲基四氢叶酸转化经甲醛和氰基硼氢化钠转化为5-甲基-10-甲基四氢叶酸。再经提取和液液萃取后，液相色谱-串联质谱仪测定，外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 乙腈：色谱纯。

5.3 甲醇：色谱纯。

5.4 甲醛溶液：≥36%。

5.5 甲酸：色谱纯。

5.6 二氯甲烷：色谱纯。

5.7 氰基硼氢化钠（NaBH₃CN）。

- 5.8 80%甲醇溶液：移取800 mL甲醇（5.3）于1000 mL容量瓶，加水（5.1）定容。
- 5.9 0.3 mol/L 氰基硼氢化钠溶液：称取 188.5mg 氰基硼氢化钠（5.7）溶于 5 mL 80%甲醇溶液中（5.8），溶解后转移至 10 mL 量瓶，加 80%甲醇溶液定容。
- 5.10 2%甲醛溶液：移取 0.55 mL 甲醛（5.4）于 10 mL 量瓶，加 80%甲醇溶液（5.8）定容。
- 5.11 10%甲酸溶液：移取 1 mL 甲酸（5.5）于 10 mL 量瓶，加 80%甲醇溶液（5.8）定容。
- 5.12 0.1%甲酸溶液：移取 1mL 甲酸（5.5）于 1 000 mL 量瓶，加水（5.1）定容。
- 5.13 0.1%甲酸乙腈溶液：移取 1mL 甲酸（5.5）于 1 000 mL 量瓶，加乙腈（5.2）定容。
- 5.14 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取 5-甲基四氢叶酸标准品（CAS：31690-09-2，纯度 $\geq$ 95%）10 mg（精确至 0.01 mg），用 5 mL 甲醇（5.3）溶解，移至 10 mL 棕色容量瓶中，用甲醇（5.3）定容。 -18°C 以下避光保存，有效期 6 个月。
- 5.15 标准中间溶液（100 $\mu\text{g/mL}$ ）：准确移取标准储备溶液（5.14）1 mL 于 10 mL 棕色容量瓶中，加甲醇（5.3）定容。 -18°C 以下避光保存，有效期 2 个月。
- 5.16 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液（5.15），用 80%甲醇溶液（5.8）配制成质量浓度为 20 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL 和 1 000 ng/mL 标准系列溶液。临用现配。
- 5.17 有机微孔滤膜：0.22 μm 。

6 仪器设备

- 6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾离子源（ESI）。
- 6.2 天平：精度为 0.1 mg 和 0.01 g。
- 6.3 旋涡混合器。
- 6.4 水浴锅：控温精度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 。
- 6.5 离心机：不低于 8 000 r/min。
- 6.6 真空冻干机。

7 样品

禽蛋去壳后置于烧杯中，玻璃棒充分搅拌均匀，称取蛋液 100g(M_1)，真空冻干机冷冻干燥，再次准确称量蛋粉质量 (M_2)，研磨，过 0.425 mm 孔径的分析筛，密封， -18°C 以下避光保存，待用。

8 试验步骤

8.1 试样的转化反应

平行做两份试验。准确称取试样 0.5 g (M_3 , 精确至 0.01 g) 于 10 mL 具塞离心管中，依次加入 0.3 mol/L 氰基硼氢化钠溶液（5.9）1 mL，2%甲醛溶液（5.10）1 mL，10%甲酸溶液（5.11）0.5 mL，80%甲醇溶液（5.8）2.5 mL，充分混合， 30°C 水浴锅中反应 60 min，得到试样转化溶液，待用。

8.2 提取

试样转化溶液（8.1）于 8 000 r/min 离心 10 min，全部上清液转移至 10 mL 容量瓶。离心管中加入 80%甲醇溶液（5.8）5 mL，充分混合后于 8 000 r/min 离心 10 min，移取上清液，合并两次上清液，混匀，用 80%甲醇溶液（5.8）定容至 10 mL（V₁），作为提取液，待用。

8.3 净化

准确移取 5 mL 提取液（8.2）（V₂）于 10 mL 具塞离心管中，依次加入水 2 mL 和二氯甲烷（5.6）1 mL，充分震荡后 5 000 r/min 离心 5 min，弃去下层二氯甲烷层，剩余水相加入二氯甲烷 1 mL 进行二次萃取，取上层水相至 10 mL 容量瓶，用 80%甲醇溶液（5.8）定容至 10 mL（V），过 0.22 μm 的微孔滤膜（5.17），待测。

8.4 系列标准溶液的转化反应

准确移取 0.5 mL 系列标准溶液（5.16）于 10 mL 离心管中，依次加入 0.3 mol/L 氰基硼氢化钠溶液（5.9）1 mL，2%甲醛（5.10）1 mL，10%甲酸（5.11）0.5 mL，加入 2 mL 80%甲醇溶液（5.8），充分混合后，置于 30 °C 水浴锅中反应 60 min。反应结束后用 80%甲醇溶液（5.8）定容 10 mL，待测。

8.5 测定

8.5.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈ 色谱柱，柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.7 μm，或性能相当者；
- b) 柱温：40 °C；
- c) 进样量：3 μL；
- d) 流速：0.4 mL/min；
- e) 流动相：A 相：0.1%甲酸溶液（5.12）；B 相：0.1%甲酸乙腈溶液（5.13），梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间（min）	A（%）	B（%）
0.0	98	2
1.0	98	2
4.5	50	50
5.5	5	95
6.0	5	95
6.1	98	2
8.0	98	2

8.5.2 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+）；
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 定性离子对、定量离子对及对应的碰撞能量见表 2；
- d) 干燥气温度：500 ℃；
- e) 气帘气压力：30 psi；
- f) 离子源电压：5 000 V。

表 2 定性离子对、定量离子对及对应的碰撞电压

化合物	定性离子对（m/z）	定量离子对（m/z）	碰撞能量（eV）
5-甲基-10-甲基四氢叶酸	474.2>327.1	474.2>327.1	20
	474.2>194.1		34

8.5.3 试样溶液测定

在仪器的最佳条件下，标准系列溶液（8.4）和试样溶液（8.3）分别上机测定。5-甲基-10-甲基四氢叶酸特征离子定量色谱图见附录 A。

8.5.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液（8.3）与标准工作溶液（8.4）中待测物质的保留时间的相对偏差应在±2.5%之内。根据表 3 选择的监测离子对，比较试样图谱中待测物定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对离子丰度，若偏差不超过表 3 规定的范围，则可判定为试样中存在对应的待测物。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

单位为百分比（%）

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

8.5.5 定量

以标准溶液的浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线。标准曲线的相关系数不低于0.99。试样溶液中待测物的响应值应在标准曲线线性范围内。超出线性范围，用80%甲醇溶液（5.8）稀释后重新测定。

9 试验数据处理

试样中总叶酸含量以 w_i 计，单位为微克每千克（ $\mu\text{g/kg}$ ）。按式（1）计算：

$$w_i = \frac{C_i \times V \times V_I}{M_3 \times V_2} \times \frac{M_2}{M_1} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中：

C_i ——由标准曲线得到的试样溶液中待测组分 i 的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；
 V ——上机前定容体积，单位为毫升（mL）；
 V_1 ——提取液定容体积，单位为毫升（mL）；
 V_2 ——萃取所使用提取液体积，单位为毫升（mL）；
 M_1 ——冻干前蛋液质量，单位为克（g）；
 M_2 ——冻干后蛋粉质量，单位为克（g）；
 M_3 ——试样的质量，单位为克（g）；
 n ——稀释倍数。

测定结果以平行测定的算术平均值表示，结果保留2位有效数字。

10 精密度

在重复性条件下，两次独立测试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%。

附录A

(资料性)

5-甲基四氢叶酸标准溶液定量离子色谱图

5-甲基四氢叶酸标准溶液定量离子色谱图见图 1。

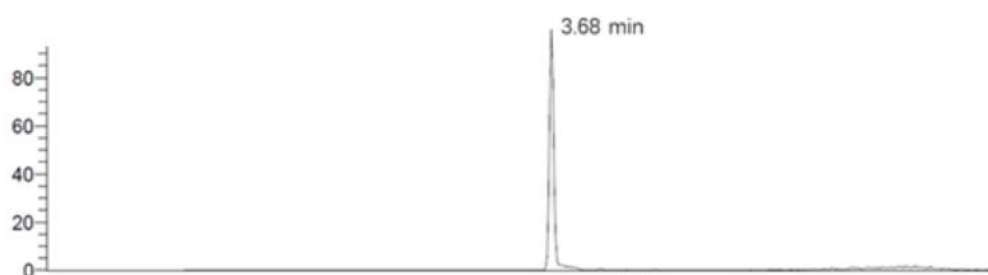


图1 5-甲基-10-甲基四氢叶酸标准溶液（50 ng/mL）定量离子色谱图