

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1458—2007

饲料中盐酸异丙嗪、盐酸氯丙嗪、地西泮、 盐酸硫利达嗪和奋乃静的同步测定 高效液相色谱法和液相色谱质谱联用法

Simultaneous determination of promethazine hydrochloride,
chlopromazine hydrochloride, diazepam, perphenazine and
thioridazine hydrochloride in Feeds by high performance liquid
chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准由农业部饲料效价与安全监督检验测试中心(北京)、中国农业大学负责起草。

本标准主要起草人:杨文军、张丽英、常碧影、王宗义、贺平丽。

饲料中盐酸异丙嗪、盐酸氯丙嗪、地西泮、 盐酸硫利达嗪和奋乃静的同步测定 高效液相色谱法和液相色谱质谱联用法

1 范围

本标准规定了以高效液相色谱法(HPLC)和液相色谱质谱联用法(LC-MS)同步测定饲料中盐酸异丙嗪、盐酸氯丙嗪、地西泮、盐酸硫利达嗪和奋乃静的方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料及添加剂预混合饲料的测定,每种药物最低检出浓度 HPLC 法为 1 mg/kg;LC-MS 确证法为 0.2 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

3 原理

用酸性乙腈提取试样中的 5 种药物。提取液经氮气吹干,用稀盐酸溶解后,通过固相萃取小柱(SPE)净化,在 HPLC 反相柱上分离,紫外检测器定量测定,质谱法确证。

4 试剂和溶液

除非另有说明,在色谱分析中仅使用确认为色谱纯的试剂,其他试剂选用分析纯即可。水为符合 GB/T 6682 一级用水的规定。

4.1 甲醇。

4.2 乙腈。

4.3 无水甲酸。

4.4 氨水。

4.5 盐酸。

4.6 0.1%的甲酸溶液:将 1 mL 无水甲酸(4.3)用水定容至 1 000 mL,通过 0.45 μ m 滤膜。

4.7 样品上柱稀释液和淋洗液 1: $c(\text{HCl})=0.02 \text{ mol/L}$ 的盐酸溶液。将 1.67 mL 盐酸(4.5)用水定容至 1 000 mL。

4.8 淋洗液 2: $c(\text{HCl})=0.1 \text{ mol/L}$ 的盐酸溶液。将 8.33 mL 盐酸(4.5)用水定容至 1 000 mL。

4.9 淋洗液 3:甲醇。

4.10 洗脱液:2%氨水的甲醇溶液。将 2 mL 氨水(4.4)用甲醇定容至 100 mL。

4.11 中性洗脱液:取洗脱液(4.10)97.5 mL,加入 2.5 mL 无水甲酸(4.3)混匀,现配现用。

4.12 提取液: $c(\text{HCl})=0.5 \text{ mol/L}$ 的盐酸溶液。将 4.17 mL 盐酸(4.5)用水定容至 100 mL 和乙腈(4.2),(1+9,v/v)。

4.13 标准溶液。

4.13.1 标准储备液：分别称取盐酸异丙嗪、盐酸氯丙嗪、地西泮、盐酸硫利达嗪和奋乃静的标准品 0.100 0 g(根据所购对照品纯度计算称样量)，分别置于 100 mL 容量瓶中，用甲醇(4.1)溶解并定容至刻度，其浓度各分别为 1 mg/mL。冰箱中冷藏，有效期为一周。

4.13.2 标准工作液：分别移取五种标准储备液(4.13.1)于同一棕色容量瓶，用中性洗脱液(4.11)依次稀释配制成标准工作液，浓度分别为 0.1 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL 和 10 μg/mL。现配现用。

5 仪器设备

5.1 分析天平：精度 0.1 mg。

5.2 超声波清洗器。

5.3 离心机。

5.4 往复式振荡器。

5.5 旋涡混合器。

5.6 高效液相色谱质谱联用仪：具有 C₁₈ 柱、紫外检测器和大气压电离源。

5.7 反相 C₁₈ 和阳离子混合型固相萃取纯化小柱(简称“SPE”)或类似小柱(1 mL, 30 mg)。

5.8 氮吹仪。

5.9 固相萃取仪。

6 试样制备

按 GB/T 14699.1—2005 规定的方法采样，选取有代表性的饲料样品 1 000 g，用四分法缩至 200 g 左右，粉碎并全部通过 0.45 mm 筛，混匀，装入磨口瓶中，低温避光保存备用。

7 测定步骤

7.1 提取

称取适量试样(表 1)，精确至 10 mg，置于 50 mL 具塞离心管中，准确加入提取液(4.12)40 mL，置于往复式振荡器以 120 r/min 振荡提取 25 min。然后，4 000 r/min 离心 8 min。将上清液转移至 100 mL 棕色容量瓶中。再分别用 40 mL 和 20 mL 提取液(4.12)，振荡提取 10 min，4 000 r/min 离心 8 min，合并上清液于棕色容量瓶中，用提取液(4.12)定容至刻度，摇匀，普通滤纸过滤。

表 1 试样称样量和滤液移取体积

项 目	配合饲料	浓缩料	预混料
称样量, g	5.00	2.00	1.00
取滤液体积, mL	2.0	1.0	0.5
滤液用氮气吹至, mL	0.5	0.5	0.5

7.2 吹干溶解

取配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混料滤液适量(表 1)，于 10 mL 离心管中，置于 60℃ 水浴氮气吹至 0.5 mL，分别加 2 mL 上柱稀释液(4.7)溶解，超声约 30 s，并旋涡混合数秒，备上固相萃取小柱净化使用。

7.3 净化

7.3.1 SPE 小柱活化：先用 1 mL 甲醇和 1 mL 水活化小柱，小柱内填料不得抽干。

7.3.2 上样淋洗：将稀释的滤液注入 SPE 小柱，依次分别用 2 mL 淋洗液 1(4.7)、2 mL 淋洗液 2(4.8)

和 2 mL 淋洗液 3(4.9)淋洗小柱。

7.3.3 洗脱:用 2 mL 洗脱液(4.10)洗脱小柱。洗脱下来的溶液加 50 μ L 甲酸(4.3)中和,混匀,作为试样液上机使用(试样液在冷藏冰箱中可保存 2 d)。

7.4 测定

7.4.1 高效液相色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 4.6 mm,粒度 5 μ m 或类似分析柱。

柱温:室温。

流动相:A:乙腈;B:0.1%的甲酸溶液(4.6),梯度洗脱程序见表 2。

流速:1.0 mL/min。

检测器:紫外检测器。

检测波长:251 nm。

进样量:20 μ L。

表 2 梯度洗脱程序

时间 min	乙腈,A %	0.1%甲酸溶液,B %	曲 线
0.00	28	72	1
2.00	28	72	1
8.00	39	61	6
9.00	80	20	6
13.00	80	20	6
14.00	28	72	11
19.00	28	72	2

7.4.2 液相色谱质谱条件:

质谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 2.1 mm,粒度 5 μ m 或类似分析柱。

流动相:同高效液相色谱法。

流速:0.25 mL/min。

进样量:10 μ L。

EI⁺源电压:3.0 kV。

源温度:110℃。

脱溶剂温度:350℃。

脱溶剂气流速:300 L/h。

反吹气流速:150 L/h。

7.5 定性和定量方法

7.5.1 液相色谱法

- a) 定性方法:除了用保留时间定性外,还可用二极管阵列检测器测定每种药物紫外光谱的匹配度,盐酸异丙嗪、盐酸氯丙嗪、地西泮、盐酸硫利达嗪和奋乃静三个吸收峰分别为:240 nm、250 nm 和 297 nm;235 nm、255 nm 和 306 nm;238 nm、285 nm 和 313 nm;238 nm、262 nm 和 308 nm;240 nm、255 nm 和 304 nm(色谱图参见附录 A)。
- b) 定量分析:向色谱仪分别注入标准溶液和试样液,积分得到峰面积,用单点或多点标准法定量。

7.5.2 液相色谱质谱方法

- a) 定性方法:试样与标准品四个特征离子需同时出现。试样与标准品保留时间的相对偏差不大于 0.5%。每种药物的 4 个特征离子基峰百分数与标准品允许差分别为:当基峰百分数>50%

时,允许差±20%;当基峰百分数为 20%~50%时,允许差±25%;当基峰百分数为 10%~20%时,允许差±30%;当基峰百分数≤10%时,允许差±50%。

b) 定量方法:根据每种药物的定量锥孔电压,提取准分子离子的色谱峰面积,单点或多点标准法定量(表 3)。

表 3 质谱定性定量及特征离子情况

名 称	锥孔电压,V	特征离子,m/z
盐酸异丙嗪	定量 15	准分子离子(M+1) ⁺ 285
	定性 17	m/z 86、240、285、286
盐酸氯丙嗪	定量 15	准分子离子(M+1) ⁺ 319
	定性 23	m/z 58、86、319、321
地西泮	定量 20	准分子离子(M+1) ⁺ 285
	定性 37	m/z 105、154、285、287
奋乃静	定量 20	准分子离子(M+1) ⁺ 404
	定性 37	m/z 143、171、404、406
盐酸硫利达嗪	定量 15	准分子离子(M+1) ⁺ 371
	定性 30	m/z 98、126、371、372

8 结果的计算与表述

试样中药物含量 ω,以质量分数(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$\omega = \frac{C_s \times A_i \times V_1 \times V_2}{A_s \times V_3 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

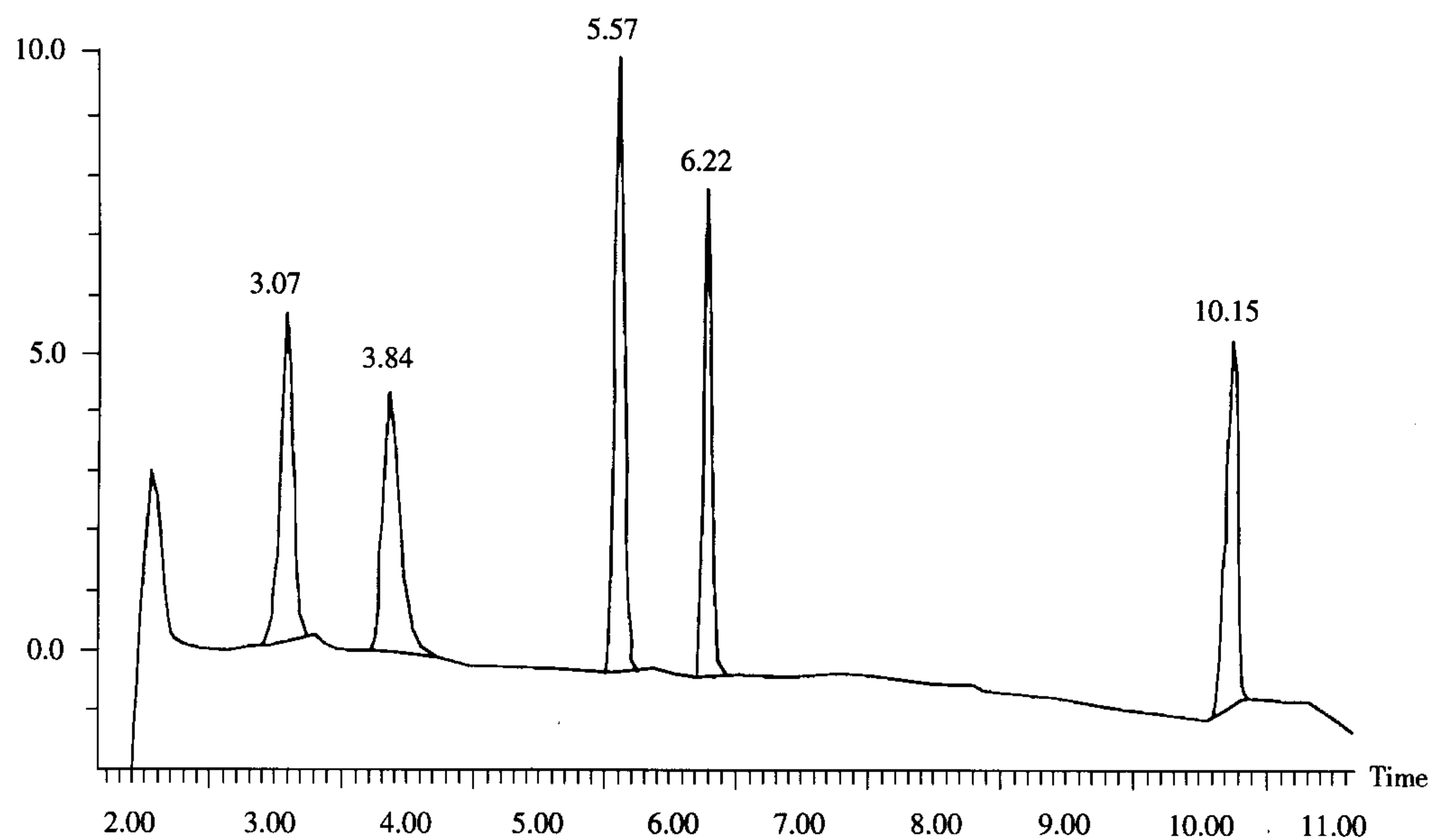
- ω ——待测试样中每种药物含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- C_s ——药物标准工作溶液浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
- A_i ——测得的色谱峰面积;
- A_s ——标准溶液色谱峰面积;
- m ——试样质量,单位为克(g);
- V₁ ——试样中加入提取液(4.13)的体积,单位为毫升(mL);
- V₂ ——净化过程 SPE 小柱洗脱液(4.11)的体积,单位为毫升(mL);
- V₃ ——提取液(4.13)加入 SPE 小柱的体积,单位为毫升(mL)。

9 允许差

在同一实验室由同一操作人员,使用同一台设备完成的两次平行检测结果,液相色谱测定方法相对偏差不大于 10%,质谱确证方法两次平行检测结果相对偏差不大于 20%。

附录 A
(资料性附录)

盐酸异丙嗪、盐酸氯丙嗪、地西洋、盐酸硫利达嗪和奋乃静标准图谱



图中以标准品色谱保留时间为 3.07 min、3.84 min、5.57 min、6.22 min 和 10.15 min 的出峰顺序，分别为盐酸异丙嗪、奋乃静、盐酸氯丙嗪、盐酸硫利达嗪和地西洋。