

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1757—2009

饲料中苯骈二氮杂革类药物的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of benzodiazepines in feeds
High performance liquid chromatography tandem mass spectrometry

2009-04-23 发布

2009-05-20 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。

本标准起草单位：农业部饲料质量监督检验测试中心(济南)。

本标准主要起草人：任爱丽、杨段玲、汤文利、赵金毅、梁萌、李斌、刘学江。

饲料中苯并二氮杂革类药物的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了测定饲料中氯氮革、硝西洋、奥沙西洋、氯硝西洋、劳拉西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑和地西洋等 9 种苯并二氮杂革类药物含量的液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料。

LC-MS/MS 法定量限为 0.03 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

GB/T 20195 动物饲料试样的制备

3 原理

在碱性条件下，用乙酸乙酯提取饲料中苯并二氮杂革类药物，蒸干提取液用正己烷溶解残渣，经过硅酸镁固相萃取小柱富集、净化，LC-MS/MS 分离测定。

4 试剂和材料

除非另有规定，仅使用确认为分析纯的试剂。

4.1 水，GB/T 6682，一级和三级。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 甲酸：优级纯。

4.5 正己烷。

4.6 氯化钠。

4.7 乙酸乙酯。

4.8 碳酸钠饱和溶液：称取 56 g 碳酸钠，加入 100 mL 水(三级，4.1)，搅拌、配制成饱和溶液。

4.9 0.05%甲酸溶液：准确移取 5.00 mL 甲酸(4.4)于 100 mL 容量瓶中，用水(一级)定容，用 0.20 μm 膜过滤后，再准确移取 10.00 mL 于 1 000 mL 容量瓶中，用水(一级)定容、摇匀。用前超声 5 min。

4.10 洗脱液 I：甲醇(4.2)+正己烷(4.5)+丙酮=45+45+10。

4.11 洗脱液 II：甲醇+水(一级)=70+30。

4.12 苯并二氮杂革类药物混合贮备溶液(100 μg/mL)：分别准确称取 9 种苯并二氮杂革类药物(氯氮革、硝西洋、奥沙西洋、氯硝西洋、劳拉西洋、艾司唑仑、阿普唑仑、三唑仑和地西洋)化学对照品(各种药物的纯度以 100%计)10.0 mg(精确到 0.1 mg)于 100 mL 容量瓶中，用甲醇溶解、定容，配制成浓度各为

100 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 的苯骈二氮杂革类药物混合贮备溶液。置于 $4^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存，有效期为 1 个月。

4. 13 苯骈二氮杂革类药物中间溶液($1.00 \mu\text{g} / \text{mL}$)：准确移取苯骈二氮杂革类药物混合贮备溶液(4. 12)1.00 mL 于 100 mL 容量瓶中，用甲醇稀释、定容。置于 $4^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存，有效期为 1 周。

4. 14 苯骈二氮杂革类药物工作溶液：分别准确移取苯骈二氮杂革类药物中间溶液(4. 13)50 μL 、100 μL 、200 μL 、300 μL 、500 μL 、750 μL ，用洗脱液 II(4. 11)稀释至 1 mL 配制成工作溶液，浓度分别为 0.05 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.30 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 、0.75 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 。现用现配。

4. 15 硅酸镁固相萃取小柱：500 mg / 6 mL。

5 仪器

5. 1 实验室用样品粉碎机。

5. 2 分析天平：感量 0.1 mg。

5. 3 带盖塑料离心管：100 mL。

5. 4 漩涡混合器。

5. 5 离心机。

5. 6 旋转蒸发仪：配备 150 mL 鸡心瓶。

5. 7 氮吹仪。

5. 8 固相萃取装置。

5. 9 超声波清洗器。

5. 10 液相色谱-串联质谱仪：配备电喷雾离子源。

6 采样

6. 1 采样步骤：按 GB / T 14699. 1 的规定执行。

6. 2 试样的制备：按 GB / T 20195 的规定制备试样，全部通过 0.45 mm 孔径的筛，混匀，装入密闭容器中避光保存备用。

7 分析步骤

7. 1 提取

称取约 5 g 试样(精确到 0.1 mg)于离心管(5. 3)中，加入 2 g 氯化钠(4. 6)，加入 20 mL 三级水，用碳酸钠饱和溶液(4. 8)调 pH 至 9~10。加入 30 mL 乙酸乙酯(4. 7)，加盖密封，漩涡(5. 4)混匀 1 min，置离心机(5. 6)4 360 g 离心 5 min，吸取上清液于 150 mL 鸡心瓶(5. 6)中。再加入 30 mL 乙酸乙酯，重复上述操作，合并 2 次提取液。

7. 2 净化

将提取液在 60°C 的旋转蒸发仪上蒸至近干，用 5 mL 正己烷溶解残渣，加载到已用 5 mL 正乙烷活化的硅酸镁固相萃取小柱(4. 15)，液体的过柱速度不要超过 1 mL / min；用 3 mL 正己烷清洗鸡心瓶，清洗液也加载到硅酸镁固相萃取小柱中；用 5 mL 洗脱液 I(4. 10)洗脱，收集洗脱液于 10 mL 具塞试管中，在 40°C 水浴中用氮气(5. 7)吹干；再准确移取 3.00 mL 洗脱液 II 洗脱，加压吹干硅酸镁固相萃取小柱，收集洗脱液于同一具塞试管中，溶解残渣，漩涡混匀，过 0.20 μm 有机滤膜，上机测定。如果上机溶液中各药物的浓度不在工作溶液范围内，用洗脱液 II 进行调整。

7. 3 测定

7. 3. 1 液相色谱测定参数的设定

色谱柱：C₁₈ 柱，柱长 100 mm，内径 3.0 mm，粒度 1.8 μm 或性能类似的分析柱。

柱温：50℃。

进样量：10 μL。

流动相：乙腈(4. 3)+0.05%甲酸溶液(4. 9)=35+65。

流速：0.6 mL / min。

7. 3. 2 质谱测定参数的设定

离子源：电喷雾离子源。

扫描方式：正离子模式。

检测方式：多反应监测。

碰撞电压：35 V。

气帘气、雾化气、辅助气、碰撞气均为高纯氮气及其他合适气体。使用前，应调节各气体流量，使质谱仪的灵敏度达到检测要求。

定性离子对、定量离子对以及相应的保留时间见表 1。

表 1 定性离子对、定量离子对以及相应保留时间的参考值

序号	名称	定性离子对,m/z	定量离子对,m/z	保留时间,min
1	氯氮草 (chlordiazepoxide)	300/227	300/227	0. 98
		300/282		
		300/241		
2	硝西泮 (nitrazepam)	282/207	282/207	2. 84
		282/236		
		282/180		
3	奥沙西泮 (oxazepam)	287/269	287/269	2. 74
		287/241		
		287/231		
4	氯硝西泮 (clonazepam)	316/270	316/270	3. 28
		316/241		
		316/214		
5	劳拉西泮 (lorazepam)	321/275	321/275	3. 06
		321/303		
		321/229		
6	艾司唑仑 (estazolam)	295/241	295/241	3. 18
		295/267		
		295/205		
7	阿普唑仑 (alprazolam)	309/274	309/274	4. 15
		309/281		
		309/241		
8	三唑仑 (triazolam)	343/308	343/308	4. 48
		343/239		
		343/279		
9	地西泮 (diazepam)	285/193	285/257	8. 12
		285/257		
		285/222		

7. 3. 3 定性测定

在相同试验条件下，利用保留时间和定性离子共同定性。样品中待测药物的保留时间与标准溶液中对应药物的保留时间偏差应在±5%之内；每种待测药物选择 1 个母离子和 3 个子离子，用样品中待测药物定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应药物定性离子的相对丰度进行比较。若偏差不超过表 2 规定的范围，则判定样品中存在对应的待测药物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的允许偏差

相对离子丰度, %	>50	>20~50	>10~20	≤10
偏差, %	±20	±25	±30	±50

7. 3. 4 定量测定

在上述仪器条件下, 分别注入工作溶液(4. 14)和试料溶液(7. 2)进行测定。用工作溶液做单点校准或多点校准, 以色谱峰的峰面积进行定量计算。

8 结果计算

试料中各种药物的含量 X_i 以质量分数表示, 单位为毫克每千克(mg / kg), 按式(1)计算:

$$X_i = \frac{A \times V}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

A ——试料溶液中药物峰面积的响应值对应的浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g} / \text{mL}$);

V ——洗脱液 II 的体积, 单位为毫升(mL);

m ——试料的质量, 单位为克(g)。

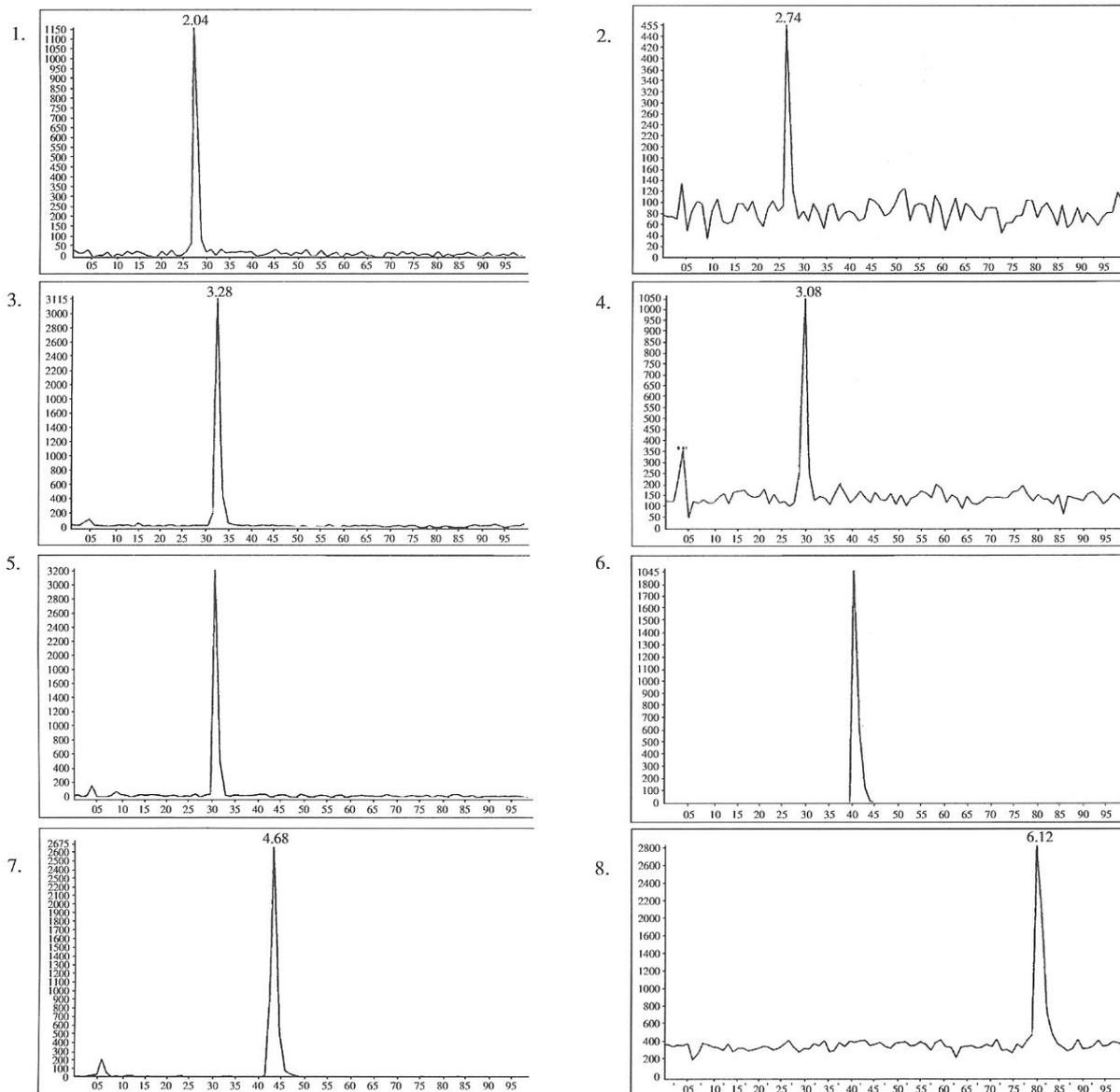
每个试样取两份试料进行平行测定, 以两次平行测定结果的算术平均值为测定结果, 结果保留 3 位有效数字。

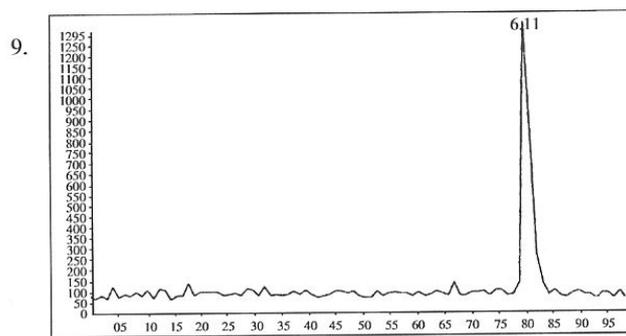
9 重复性

在重复性条件下完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于 20%。

附录 A
(资料性附录)
苯并二氮杂萘类药物液相色谱-质谱图

A.1 苯并二氮杂萘类药物标准溶液液相色谱-质谱图(MRM 色谱图)见图 A.1。





- 1. 氯氮草;
- 2. 硝西泮;
- 3. 奥沙西泮;
- 4. 氯硝西泮;
- 5. 劳拉西泮;

- 6. 艾司唑仑;
- 7. 阿普唑仑;
- 8. 三唑仑;
- 9. 地西泮。

图 A.1 苯并二氮杂革类药物标准溶液液相色谱-质谱图(10.0ng/mL,MRM 色谱图)