



中华人民共和国国家标准

GB/T 23741—2009

饲料中 4 种巴比妥类药物的测定

Determination of four kinds of barbiturates in feeds

2009-05-12 发布

2009-09-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)提出并归口。

本标准主要起草单位: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:李俊玲、李会荣、强莉、刘继明、门晓冬、李宏、杨志强。

饲料中 4 种巴比妥类药物的测定

1 范围

本标准规定了饲料中巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥和司可巴比妥的高效液相色谱测定方法和液相色谱-串联质谱测定法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中 4 种巴比妥类药物的测定。高效液相色谱测定方法定量限为 1 mg/kg,液相色谱-串联质谱方法定量限为 0.05 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 6682—2008,ISO 3696:1987,MOD)

GB/T 14699.1 饲料 采样(GB/T 14699.1—2005,ISO 6497:2002,IDT)

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备(GB/T 20195—2006,ISO 6498:1998,IDT)

3 方法原理

试样中的 4 种巴比妥类药物用三氯甲烷提取、过滤,滤液吹干后溶解过固相萃取小柱净化,洗脱液蒸干后用甲醇水溶解,在高效液相色谱仪上分离、测定,或在高效液相色谱-串联质谱仪上测定,外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明,在分析中仅使用确认为分析纯的试剂,实验室用水符合 GB/T 6682 一级水的规定。

4.1 甲醇:色谱纯。

4.2 乙腈:色谱纯。

4.3 三氯甲烷。

4.4 二氯甲烷。

4.5 2%甲醇水溶液:取 2 mL 甲醇与 98 mL 水混合。

4.6 甲醇水溶液:1+1。

4.7 乙腈水溶液:30+70。

4.8 磷酸盐缓冲液: $c(\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 0.1 \text{ mmol/L}$, $\text{pH} = 6.0$ 。称取 14.2 g 的无水磷酸氢二钠(Na_2HPO_4),加水定容至 1 000 mL,摇匀;另称取 15.6 g 的磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),加水定容至 1 000 mL,摇匀。取上述两种溶液按 123+877 的比例混匀即可。

4.9 流动相:甲醇+水=45+55。

4.10 巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥和司可巴比妥标准品:纯度 $\geq 99.0\%$ 。

4.11 标准贮备液:准确称取巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥和司可巴比妥标准品各 25 mg,分别用甲醇(4.1)溶解,定容至 25 mL,配成浓度为 1 mg/mL 的标准贮备液。2℃~8℃冷藏保存,有效期三个月。

4.12 混合标准中间液:准确移取巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥和司可巴比妥贮备液(4.11)各 5 mL,用甲醇(4.1)定容至 50 mL,该混合溶液中巴比妥、苯巴比妥、异戊巴比妥和司可巴比妥的浓度均为 100 $\mu\text{g/mL}$ 。2℃~8℃冷藏保存,有效期一个月。

- 4.13 固相萃取小柱:亲水亲脂平衡固相萃取柱,3 mL(60 mg)。
- 4.14 滤膜:0.22 μm 。
- 4.15 滤纸:快速,12.5 cm。

5 仪器和设备

- 5.1 高效液相色谱仪:配有紫外检测器或二极管阵列检测器。
- 5.2 液相色谱-串联质谱仪:配电喷雾离子源。
- 5.3 天平:感量为0.000 1 g。
- 5.4 氮吹仪。
- 5.5 涡旋振荡器。
- 5.6 固相萃取仪。

6 试样制备

按 GB/T 14699.1 采样。选取有代表性饲料样品至少 500 g,按 GB/T 20195 规定,制备通过 0.45 mm 实验筛的试样。

7 试样处理

7.1 提取

称取试料 2 g(精确至 0.000 1 g)于 100 mL 离心管中,准确加入 25 mL 三氯甲烷(4.3),涡旋振荡 2 min,过滤。准确移取滤液 15 mL 于具塞试管中,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至干,加入磷酸盐缓冲液(4.8)3 mL,涡旋溶解,备用。

7.2 净化

固相萃取小柱分别用 5 mL 甲醇(4.1)、5 mL 水、5 mL 磷酸盐缓冲液(4.8)活化。取上述提取液(7.1)过柱,再分别用 5 mL 磷酸盐缓冲液(4.8)、5 mL 甲醇水溶液(4.5)淋洗,空气抽干 30 min,用 10 mL 二氯甲烷(4.4)洗脱,收集洗脱液,40 $^{\circ}\text{C}$ 氮吹至干,准确移取 1 mL 甲醇水溶液(4.6)溶解残渣,过 0.22 μm 滤膜后待测。

8 液相色谱测定

8.1 液相色谱条件

色谱柱: C_8 柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm ,或其他效果等同的 C_8 柱。

柱温:室温。

进样量:20 μL 。

流动相:甲醇+水=45+55。

检测器:紫外检测器或二极管阵列检测器。

检测波长:215 nm。

流速:1.0 mL/min。

8.2 标准曲线的绘制

取混合标准中间液(4.12)适量逐步稀释,用甲醇(4.1)定容,配制成浓度分别为 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 、20.0 $\mu\text{g/mL}$ 、50.0 $\mu\text{g/mL}$ 的混合标准工作液,浓度由低到高进样,根据峰面积和浓度计算回归方程。4 种巴比妥类药物液相色谱条件下标准样品图谱参见图 A.1。

8.3 定量测定

试料溶液(7.2)上机测定,用单点或多点校准法进行定量。多点校准法定量,根据峰面积的响应值,从标准曲线中得到待测样中 4 种巴比妥类药物的浓度(c_{H});单点定量,根据样品峰面积的响应值与标准

溶液峰面积的响应值比值与标准溶液浓度的乘积得到待测样中 4 种巴比妥类药物的浓度(c_{i1})。

8.4 结果计算

试料中 4 种巴比妥类药物的含量 X_{i1} , 以质量分数计, 单位为毫克每千克(mg/kg), 按式(1)计算:

$$X_{i1} = \frac{c_{i1} \times V \times V_2 \times 1\,000}{m \times V_1 \times 1\,000} \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

c_{i1} ——试料中某种巴比妥类药物色谱峰面积对应的浓度, 单位为微克每毫升($\mu\text{g/mL}$);

V ——加入提取液的总体积, 单位为毫升(mL);

V_2 ——氮吹至干后溶解残渣用甲醇水溶液的体积, 单位为毫升(mL);

m ——试料的质量, 单位为克(g);

V_1 ——移取滤液的体积, 单位为毫升(mL)。

计算结果保留三位有效数字。

8.5 重复性

在同一实验室、由同一操作人员完成的两个平行测定结果, 相对偏差不大于 10%, 以两次平行测定结果的算术平均值为测定结果。

9 液相色谱-串联质谱法(仲裁法)

9.1 液相色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱长 100 mm, 内径 2.1 mm, 粒径 1.7 μm , 或其他效果等同的 C_{18} 柱;

柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$;

进样量: 5 μL ;

流动相: 乙腈+水, 梯度洗脱, 见表 1;

表 1 液相色谱-串联质谱流动相梯度洗脱表

时间/min	水/%	乙腈/%
0.0	70	30
0.5	70	30
1.0	50	50
4.0	20	80
4.01	70	30
10.0	70	30

流速: 0.4 mL/min。

9.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源;

扫描方式: 负离子扫描;

检测方式: 多反应监测(MRM);

毛细管电压: 4.0 kV;

干燥气温度: 350 $^{\circ}\text{C}$;

干燥气流速: 10 L/min;

雾化气压力: 0.241 MPa(35 psi);

定性离子、定量离子及对应的保留时间、毛细管出口端电压和碰撞能量见表 2。

表2 4种巴比妥类药物的定性、定量离子对及碰撞能量

被测物名称	定性离子对 (m/z)	定量离子对 (m/z)	保留时间/ min	毛细管出口端电压/ V	碰撞能量/ eV
巴比妥	183.2>84.9	183.2>140.1	0.933	80	20
	183.2>140.1				5
苯巴比妥	231.0>84.9	231.0>188.1	1.615	80	10
	231.0>188.1				5
异戊巴比妥	225.2>84.9	225.2>182.2	3.179	80	10
	225.2>182.2				10
司可巴比妥	237.2>84.9	237.2>194.2	3.750	80	20
	237.2>194.2				5

9.3 巴比妥类药物定性、定量离子对及碰撞能量

4种巴比妥类药物定性、定量离子对及碰撞能量见表2。

9.4 标准曲线的绘制

取混合标准中间液(4.12)适量逐步稀释,用乙腈水(4.7)稀释定容,配制成浓度分别为0.01 μg/mL、0.025 μg/mL、0.050 μg/mL、0.075 μg/mL、0.100 μg/mL、0.200 μg/mL的混合标准工作液,浓度由低到高进样,根据峰面积和浓度计算回归方程。4种巴比妥类药物液相色谱-串联质谱条件下标准样品图谱参见图A.2。

9.5 试液准备

取7.2项下的待测液,根据药物的浓度用乙腈水溶液(4.7)适当稀释。

9.6 定性测定

根据试样中各种化合物的保留时间和特征选择离子定性,试样中待测物质的保留时间与混合标准品工作液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且样品谱图中各组分定性离子的相对离子丰度与浓度接近的标准品工作液中对应的定性离子的相对离子丰度进行比较,若相差不超过表3规定的范围,则可判定为试样中存在对应的待测物。

表3 定性确证时相对离子丰度的最大相差

%

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的最大相差	±15	±20	±25	±30

9.7 定量测定

以定量离子的色谱峰面积进行单点或多点校正定量。多点校准法定量,根据峰面积的响应值,从标准曲线中得到待测样中4种巴比妥类药物的浓度(c_{i2});单点定量,根据样品峰面积的响应值与标准溶液峰面积的响应值比值与标准溶液浓度的乘积得到待测样中4种巴比妥类药物的浓度(c_{i2})。

9.8 结果计算

试料中4种巴比妥类药物的含量 X_{i2} ,以质量分数计,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(2)计算:

$$X_{i2} = \frac{c_{i2} \times V \times V_2 \times V_4 \times 1000}{m \times V_1 \times V_3 \times 1000} \quad \dots\dots\dots(2)$$

式中:

c_{i2} ——试料中某种巴比妥类药物色谱峰面积对应的浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);

V ——加入提取液的总体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——氮吹至干后溶解残渣用甲醇水溶液的体积,单位为毫升(mL);

V_4 ——吸取 7.2 项下试液的体积,单位为毫升(mL);

m ——试料的质量,单位为克(g);

V_1 ——移取滤液的体积,单位为毫升(mL);

V_3 ——吸取 7.2 项下试液定容的体积,单位为毫升(mL)。

计算结果保留三位有效数字。

9.9 重复性

在同一实验室、由同一操作人员完成的两个平行测定结果,相对偏差不大于 20%,以两次平行测定结果的算术平均值为测定结果。

附录 A (资料性附录)

4 种巴比妥类药物标准样品谱图

A.1 图 A.1 给出了 4 种巴比妥类药物液相色谱图。

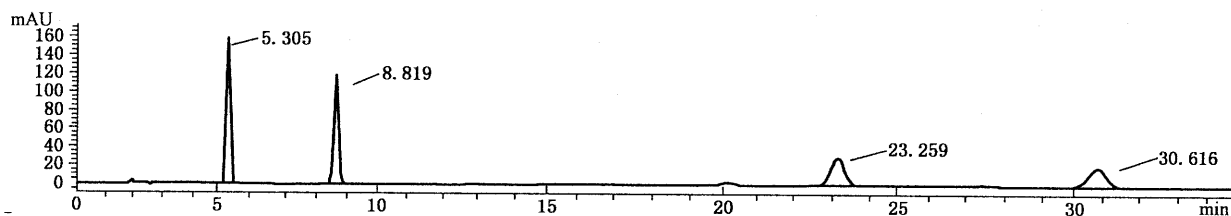
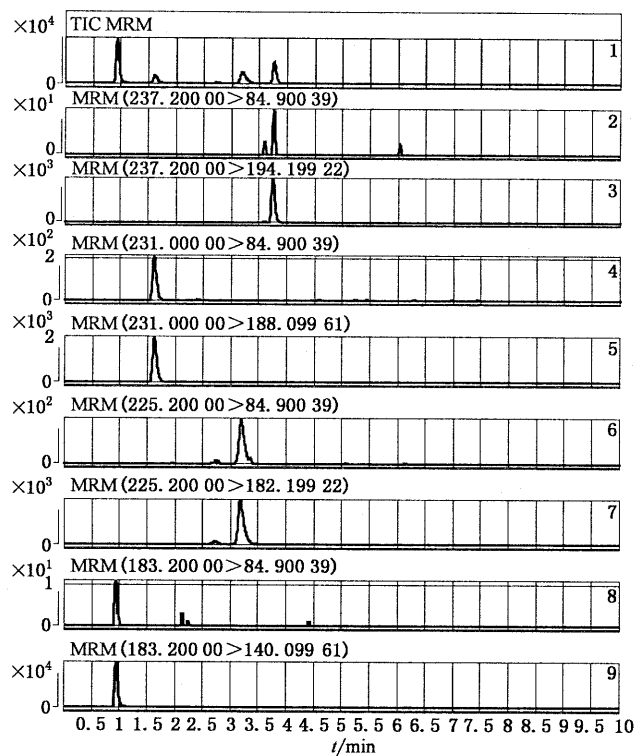


图 A.1 4 种巴比妥类药物液相色谱条件下标准样品图谱

A.2 图 A.2 给出了 4 种巴比妥类药物液相色谱-串联质谱图。



- 1——总离子流色谱图；
- 2——司可巴比妥定性离子；
- 3——司可巴比妥定量离子；
- 4——苯巴比妥定性离子；
- 5——苯巴比妥定量离子；
- 6——异戊巴比妥定性离子；
- 7——异戊巴比妥定量离子；
- 8——巴比妥定性离子；
- 9——巴比妥定量离子。

图 A.2 4 种巴比妥类药物液相色谱-串联质谱图(MRM 色谱图)(200 ng/mL)