

中华人民共和国国家标准

农业部 1862 号公告—2—2012

饲料中唑吡坦的测定 高效液相色谱法/液相色谱—串联质谱法

Determination of zolpidem in feeds—
High performance liquid chromatography/Liquid chromatography–tandem mass
spectrometry

2012-12-03 发布

2012-12-03 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1 给出的规则起草。

本标准由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(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:浙江省饲料监察所、浙江大学饲料研究所。

本标准主要起草人:应永飞、林仙军、韦敏珏、朱聪英、陆春波、鲁马媚、余东游、占秀安。

饲料中唑吡坦的测定

高效液相色谱法/液相色谱—串联质谱法

1 范围

本标准规定了饲料中唑吡坦的高效液相色谱和液相色谱—串联质谱测定方法,液相色谱—串联质谱法为确证方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中唑吡坦的测定。

本标准高效液相色谱法检测限为 0.4 mg/kg,定量限为 1.0 mg/kg;液相色谱—串联质谱法检测限为 0.02 mg/kg,定量限为 0.05 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注明日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 采样和试样制备

按 GB/T 14699.1 抽取有代表性的饲料样品,用四分法缩减取约 200 g。按照 GB/T 20195 制备样品,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入磨口瓶中,备用。

4 高效液相色谱法(HPLC)

4.1 原理

试样中的唑吡坦用三氯乙酸溶液提取,离心后经固相萃取柱净化,氮气吹干,流动相溶解,用高效液相色谱仪进行测定,外标法定量。

4.2 试剂和材料

除特殊注明外,本法所用试剂均为分析纯,水符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

4.2.1 乙腈:色谱纯。

4.2.2 甲醇。

4.2.3 甲酸。

4.2.4 氨水:浓度 28%。

4.2.5 三氯乙酸。

4.2.6 乙酸铵。

4.2.7 标准品:酒石酸唑吡坦,纯度 $\geq 97.0\%$,以唑吡坦计,乘以 0.8038 系数换算成唑吡坦的含量。

4.2.8 提取液:称取三氯乙酸 10 g,加水溶解后稀释至 1 000 mL,摇匀。

4.2.9 甲酸溶液(2.0%):量取甲酸 2.0 mL,加水溶解后稀释至 100 mL,摇匀。

4.2.10 氨水甲醇溶液(5.0%):量取氨水 5.0 mL,加甲醇至 100 mL,摇匀。

4.2.11 乙酸铵溶液(0.2%):称取乙酸铵 2.0 g,加水溶解后稀释至 1 000 mL,摇匀。加水至 1 000 mL,

溶解后摇匀。

4.2.12 流动相:取乙酸铵溶液 650 mL,加乙腈 350 mL,摇匀。

4.2.13 标准储备液:取酒石酸唑吡坦标准品 12.5 mg,精密称定,置于 100 mL 棕色容量瓶中,用甲醇配成唑吡坦浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的标准储备液,置 -20°C 保存。

4.2.14 标准系列工作溶液:分别吸取一定量的标准储备液,用流动相稀释成唑吡坦浓度为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1.0 $\mu\text{g/mL}$ 、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 的标准系列工作溶液,现用现配。

4.2.15 混合型阳离子交换固相萃取柱:MCX 柱,60 mg/3 mL;或相当者。

4.3 仪器和设备

除实验室常用仪器设备外,实验还需用如下装置:

- a) 高效液相色谱仪:配有紫外器。
- b) 离心机:最大转速 8 000 r/min 或以上。
- c) 固相萃取装置。
- d) 旋涡混合器。
- e) 分析天平:感量 0.000 01 g。
- f) 天平:感量 0.01 g。
- g) 氮吹仪。
- h) 超声波清洗器。

4.4 测定步骤

4.4.1 提取

称取适量试样(配合饲料 5 g,预混合饲料与浓缩饲料 2 g)精确至 0.01g,准确加入提取液 50.0 mL,超声提取 20 min,期间振摇 2 次~3 次。取出后静置 2 min,取上清液约 20 mL 置于 50 mL 离心管中,于 8 000 r/min 离心 5 min,上清液备用。

4.4.2 净化

4.4.2.1 依次用甲醇 3 mL、水 3 mL、甲酸溶液 3 mL 活化固相萃取柱,准确移取 5.0 mL 上清液上柱,控制过柱速度在 1 mL/min 以内。用甲酸溶液 3 mL 和甲醇 3 mL 淋洗,抽干 3 min,用氨水甲醇溶液 5 mL 洗脱,洗脱液在 50°C 下氮气吹干。

4.4.2.2 用 2.0 mL 流动相溶解残渣,涡旋 30 s,经 0.45 μm 滤膜过滤后上机测定。

4.4.3 色谱条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5.0 μm ;或其他等效色谱柱。

柱温: 30°C 。

进样量:20 μL 。

流动相流速:1.0 mL/min。

检测波长:243 nm。

4.4.4 测定

在仪器最佳工作条件下,标准工作液与试样交替进样。样品中待测物质保留时间的偏差小于或等于标准溶液保留时间的 $\pm 2.5\%$ 。采用外标法定量,样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内。当样品的上机液浓度超过线性范围时,需根据测定量浓度减少取样量进行重新测定,直至上机液浓度在标准曲线的线性范围内。上述液相色谱条件下,唑吡坦标准溶液的标准色谱图参见图 A.1。

4.5 结果计算与表示

4.5.1 结果计算

试样中唑吡坦的含量(X)以质量分数表示(mg/kg),用式(1)计算:

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C_s ——标准溶液中唑吡旦的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

A ——试样溶液中唑吡旦的峰面积;

A_s ——标准溶液中唑吡旦的峰面积;

m ——样品质量,单位为克(g);

V ——样品上机液定容体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——用于净化的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——提取液体积,单位为毫升(mL)。

4.5.2 结果表示

测定结果以平行测定结果的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

4.6 重复性

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%。

5 液相色谱—串联质谱法(LC-MS/MS)

5.1 原理

试样中的唑吡旦用三氯乙酸溶液提取,离心后经强阳离子固相萃取小柱净化,氮气吹干,流动相溶解,用液相色谱—串联质谱仪测定。采用色谱保留时间和质谱碎片离子丰度比定性,空白基质标准溶液校正,外标法定量。

5.2 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和符合 GB/T 6682 规定的一级水。

5.2.1 甲酸:色谱纯。

5.2.2 甲酸溶液(0.1%):量取甲酸 1.0 mL,加水至 1 000 mL,摇匀,即得。

5.2.3 流动相:取甲酸溶液 700 mL,加乙腈 300 mL,摇匀,即得。

5.2.4 空白样品洗脱液:取空白样品,按样品测定方法进行提取、净化,收集洗脱液。

5.2.5 基质匹配标准系列工作溶液:分别吸取一定量的标准储备液,添加空白样品洗脱液后与样品同法操作,使成浓度为 5.0 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、20 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$ 、100 $\mu\text{g/L}$ 、200 $\mu\text{g/L}$ 和 500 $\mu\text{g/L}$ 的基质匹配标准系列工作溶液,临用新配。

5.3 仪器和设备

5.3.1 液相色谱—串联质谱仪:配电喷雾离子源。

5.3.2 其他同 4.3。

5.4 测定步骤

5.4.1 提取

同 4.4.1。

5.4.2 净化

5.4.2.1 同 4.4.2.1。

5.4.2.2 用 2.0 mL 流动相溶解残渣,涡旋 30 s,经 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。

5.4.3 测定

5.4.3.1 色谱参考条件

a) 色谱柱: C_{18} 柱,柱长 150 mm,内径 2.1 mm,粒径 3.5 μm ;或相当者。

- b) 流动相:见 5.2.3。
- c) 流速:0.3 mL/min。
- d) 柱温:30℃。
- e) 进样量:20 μL。

5.4.3.2 质谱参考条件

- a) 电离方式:电喷雾正离子方式。
- b) 检测方式:多反应监测。
- c) 脱溶剂气、锥孔气、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,以使质谱灵敏度达到检测要求。
- d) 毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压优化至最佳灵敏度。
- e) 定性离子对、定量离子对、保留时间、锥孔电压和碰撞能量参考值见表 1。

表 1 唑吡坦定性、定量离子、锥孔电压和碰撞能量参考值

药物名称	保留时间 min	定性离子 m/z	定量离子 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
唑吡坦	2.0	307.9>91.8	307.9>235.1	47	51
		307.9>235.1			32

5.4.3.3 定性测定

在相同试验条件下,样品中待测物质的保留时间与标准溶液中对应的保留时间偏差在±2.5%之内,且样品中各组分定性离子的相对丰度与浓度接近的标准溶液中对应的定性离子的相对丰度进行比较,偏差不得超过表 2 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的待测物。

表 2 定性确证时相对离子丰度的最大允许偏差

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

5.4.3.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,标准工作液与试样交替进样,采用空白基质标准溶液校正,外标法定量。样品溶液中待测物的响应值均应在仪器测定的线性范围内,当样品的上机液浓度超过线性范围时,需根据测定浓度,稀释后进行重新测定。上述色谱和质谱条件下,唑吡坦标准溶液的多反应监测色谱图与质谱图见图 A.2、图 A.3。

5.5 结果计算和表示

5.5.1 结果计算

试样中唑吡坦的含量 X ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(2)计算:

$$X = \frac{A \times C_s \times V \times V_2}{A_s \times m \times V_1 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

C_s ——标准溶液中唑吡坦的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

A ——试样溶液中唑吡坦的峰面积;

A_s ——标准溶液中唑吡坦的峰面积;

m ——样品质量,单位为克(g);

V ——样品上机液定容体积,单位为毫升(mL);

V_1 ——用于净化的提取液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——提取液体积,单位为毫升(mL)。

5.5.2 结果表示

测定结果以平行测定结果的算术平均值表示,结果保留三位有效数字。

5.6 重复性

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%。

附录 A
(资料性附录)
唑吡坦的标准溶液色谱图

A.1 唑吡坦标准溶液(1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 HPLC 色谱图见图 A.1。

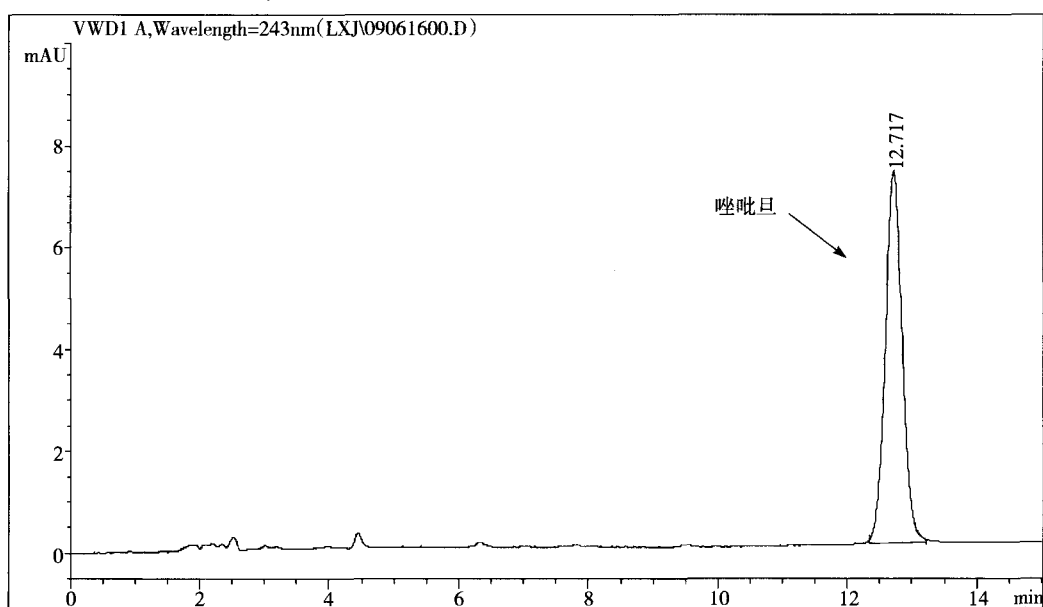


图 A.1 标准溶液(1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 HPLC 色谱图

A.2 基质匹配唑吡坦标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{L}$)的 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图见图 A.2。

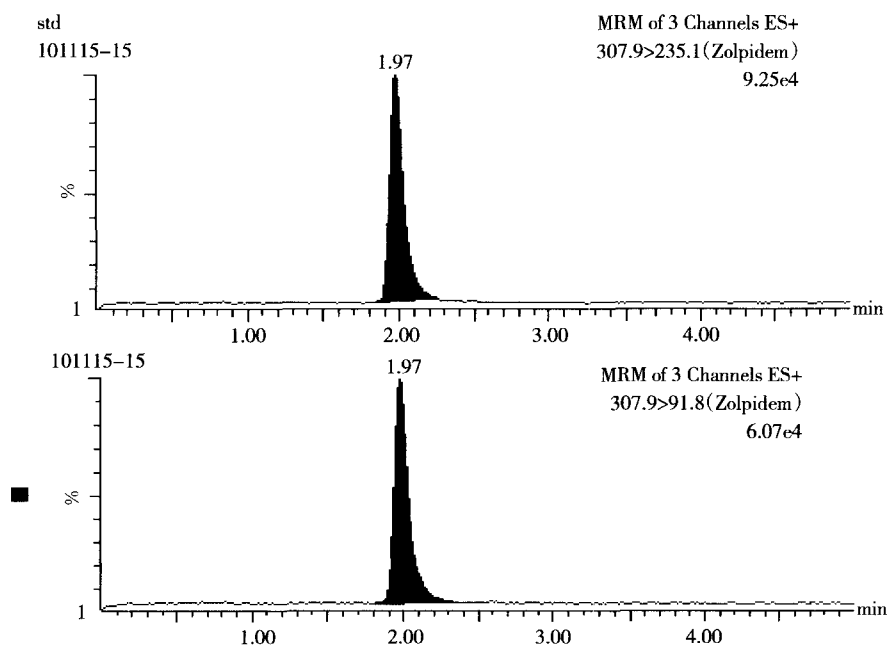


图 A.2 标准溶液(10 $\mu\text{g}/\text{L}$)的 LC-MS/MS 多反应监测质量色谱图

A. 3 唑吡旦标准溶液(200 $\mu\text{g/L}$)的母离子(m/z 307.9)二级子离子扫描质谱图见图 A. 3。

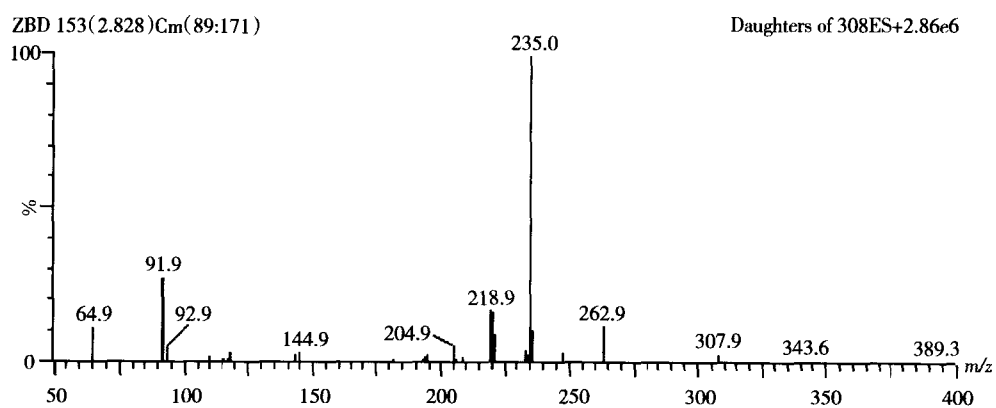


图 A. 3 标准溶液(200 $\mu\text{g/L}$)的母离子(m/z 307.9)二级子离子扫描质谱图