

中华人民共和国国家标准

农业部 1730 号公告—1—2012

饲料中 8 种苯并咪唑类药物的测定 液相色谱—串联质谱法和液相色谱法

Determination of eight benzimidazoles in feeds
by liquid chromatography–tandem mass spectrometry method and high
performance liquid chromatography method

2012-03-01 发布

2012-03-01 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—2009 给出的规则起草。

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(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:农业部农产品质量安全监督检验测试中心(宁波)、中国计量学院。

本标准主要起草人:吴银良、皇甫伟国、杨挺、叶子弘、陈国、王立君、赵健、朱勇。

饲料中 8 种苯并咪唑类药物的测定 液相色谱—串联质谱法和液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中 8 种苯并咪唑类药物(噻苯达唑、阿苯达唑、芬苯达唑、奥芬达唑、氟苯达唑、甲苯咪唑、氧苯达唑和三氯苯达唑)含量的液相色谱—串联质谱测定方法和液相色谱测定方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中苯并咪唑类药物的测定。

本标准的方法检出限和定量限:液相色谱串联质谱法的检出限为 0.20 mg/kg,定量限为 0.50 mg/kg;液相色谱法的检出限为 0.20 mg/kg,定量限为 0.50 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 20195 动物饲料 试样的制备

3 试样制备

饲料样品按 GB/T 20195 用四分法缩减至 500 g,粉碎后过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀后装入密闭容器。

4 液相色谱串联质谱法(仲裁法)

4.1 原理

试样中苯并咪唑类药物用甲酸乙腈溶液提取,提取液经甲酸水溶液稀释后用液相色谱—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,基质校准外标法定量。

4.2 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。

4.2.1 乙腈:色谱纯。

4.2.2 甲酸:色谱纯。

4.2.3 二甲亚砜:色谱纯。

4.2.4 甲醇:色谱纯。

4.2.5 噻苯达唑标准品:纯度 $\geq 99.0\%$ 。

4.2.6 阿苯达唑标准品:纯度 $\geq 97.0\%$ 。

4.2.7 芬苯达唑标准品:纯度 $\geq 99.0\%$ 。

4.2.8 奥芬达唑标准品:纯度 $\geq 99.0\%$ 。

4.2.9 氟苯达唑标准品:纯度 $\geq 98.0\%$ 。

4.2.10 甲苯咪唑标准品:纯度 $\geq 97.0\%$ 。

4.2.11 氧苯达唑标准品:纯度 $\geq 97.0\%$ 。

4.2.12 三氯苯达唑标准品:纯度 $\geq 99.0\%$ 。

4.2.13 二甲亚砜甲醇溶液:准确移取 400 mL 二甲亚砜(4.2.3)于 1 L 容量瓶中,加入 600 mL 甲醇(4.2.4),混匀后备用。

4.2.14 甲酸乙腈溶液(0.25%):准确移取 2.5 mL 甲酸(4.2.2)于 1 L 容量瓶中,加乙腈(4.2.1)定容至刻度,混匀后备用。

4.2.15 甲酸溶液(0.1%):准确移取 1 mL 甲酸(4.2.2)于 1 L 容量瓶中,用水定容至刻度,混匀后备用。

4.2.16 苯并咪唑类药物标准储备液:分别准确称取 10 mg 各苯并咪唑类药物标准品于 10 mL 容量瓶中,其中噻苯达唑、甲苯咪唑、氧苯达唑和阿苯达唑用二甲亚砜(4.2.3)溶解并定容至刻度,其余四种苯并咪唑类药物用二甲亚砜甲醇溶液(4.2.13)溶解并定容至刻度,配制成 1 000 mg/L 标准储备液, -18℃冰箱中保存,有效期 6 个月。

4.2.17 混合标准储备液(100 mg/L):移取各苯并咪唑类药物标准储备液(4.2.16)各 5 mL 于 50 mL 容量瓶中,用甲醇(4.2.4)定容至刻度, -18℃冰箱中保存,有效期 6 个月。

4.3 仪器和设备

4.3.1 液相色谱串联质谱仪:带电喷雾离子源。

4.3.2 离心机:最大转速 5 000 r/min 或以上。

4.3.3 分析天平:感量 0.01 mg。

4.3.4 天平:感量 0.01 g。

4.3.5 氮吹仪。

4.3.6 超声波清洗器。

4.3.7 涡旋混合器。

4.4 分析步骤

4.4.1 提取

称取 2 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,加入 20 mL 甲酸乙腈溶液(4.2.14),涡旋 1 min,然后超声提取 10 min,以 5 000 r/min 的速度离心 5 min 后吸取 1.0 mL 上清液于 5 mL 刻度试管中,加入 3 mL 甲酸溶液(4.2.15)于试管中,混匀后过 0.22 μ m 滤膜,进行液相色谱串联质谱分析。

4.4.2 基质校准标准曲线的制备

取 1.0 mL 混合标准储备液(4.2.17)于 5 mL 容量瓶中,用经甲酸溶液(4.2.15)稀释的空白样品提取液定容,得 20 mg/L 的基质混合标准工作液;移取适量该工作液,用经甲酸溶液(4.2.15)稀释的空白样品提取液逐级稀释配制浓度为 0.02 mg/L、0.08 mg/L、0.20 mg/L、1.0 mg/L、4.0 mg/L 和 10.0 mg/L 的系列基质校准工作溶液,过 0.22 μ m 滤膜后上机测定,以定量离子对峰面积为纵坐标,标准溶液浓度为横坐标,绘制基质校准标准曲线。

4.4.3 测定

4.4.3.1 色谱参考条件

- 色谱柱: C_{18} 柱, 150 mm $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m 或相当者。
- 流动相: A: 甲酸溶液(4.2.15); B: 乙腈(4.2.1)。
- 梯度洗脱: 洗脱程序见表 1。
- 进样量: 10 μ L。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	流速 mL/min	A	B
0	0.3	85	15
1.0	0.3	75	25
3.5	0.3	5	95
7.0	0.3	5	95
7.1	0.3	85	15
12.0	0.3	85	15

4.4.3.2 质谱参考条件

- 电离方式:电喷雾正离子方式;
- 检测方式:多反应监测;
- 脱溶剂气、锥孔气均为高纯氮气;碰撞气为高纯氩气或其他合适气体,使用前应调节各气体流量以使质谱灵敏度达到检测要求;
- 毛细管电压、锥孔电压、碰撞能量等电压优化至最佳灵敏度;
- 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 2。

表 2 苯并咪唑类药物定性、定量离子对、保留时间、锥孔电压和碰撞能量参考值

中文名称	保留时间 min	定性离子对 m/z	定量离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
噻苯达唑	2.17	202.2>131.0 202.2>175.1	202.2>131.0	40	30 25
奥芬达唑	5.76	316.3>191.2 316.3>284.2	316.3>191.2	35	22 18
氧苯达唑	6.05	250.4>176.2 250.4>218.3	250.4>218.3	35	26 18
甲苯咪唑	6.27	296.3>264.3 296.3>104.9	296.3>264.3	35	28 22
氟苯达唑	6.41	314.3>123.0 314.3>282.3	314.3>282.3	35	32 22
阿苯达唑	6.41	266.4>191.1 266.4>234.2	266.4>234.2	35	32 17
芬苯达唑	6.76	300.2>268.2 300.2>190.1	300.2>268.2	35	30 22
三氯苯达唑	7.57	359.1>344.1 359.1>198.2	359.1>344.1	30	30 25

4.4.3.3 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待测物质对应的保留时间偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内,且样品中各组分的两个子离子相对丰度与浓度接近的标准溶液的相对丰度一致,偏差不得超过表 3 规定的范围,则可判定为样品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

4.4.3.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下,混合标准工作液与试样交替进样,采用基质校准标准溶液校正,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,苯并咪唑类药物标准溶液的多反应监测色谱图参见图 A.1。

4.4.4 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

4.5 结果计算

试样中苯并咪唑类药物的含量 X ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(1)计算:

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

式中:

A ——试样溶液中苯并咪唑类药物的峰面积;

A_s ——标准工作液中苯并咪唑类药物的峰面积;

C_s ——标准工作液中苯并咪唑类药物的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

V ——定容体积,单位为毫升(mL);

m ——样品的质量,单位为克(g);

V_1 ——移取的上清液体积,单位为毫升(mL);

V_2 ——提取液体积,单位为毫升(mL)。

平行测定结果用算术平均值表示。

计算结果保留三位有效数字。

4.6 精密度

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 液相色谱法

5.1 原理

试样中的药物在碱性条件下用乙酸乙酯提取,阳离子固相萃取小柱净化,高效液相色谱仪分离,用紫外检测器或二极管矩阵检测器检测,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 乙酸乙酯。

5.2.2 辛烷磺酸钠。

5.2.3 磷酸。

5.2.4 正丙醇。

5.2.5 碳酸钠。

5.2.6 无水乙醇。

5.2.7 盐酸。

5.2.8 氨水。

5.2.9 碳酸钠溶液(1.0 mol/L):称取 10.6 g 碳酸钠(5.2.5)于 100 mL 容量瓶中,加水溶解后定容。

5.2.10 磷酸溶液(0.01 mol/L,含 0.01 mol/L 辛烷磺酸钠):准确移取 0.33 mL 磷酸(5.2.3)和称取 1.08 g 辛烷磺酸钠(5.2.2)于同一 500 mL 容量瓶中,加水溶解后定容。

5.2.11 盐酸溶液(0.1 mol/L):准确移取 2.12 mL 盐酸(5.2.7)于 250 mL 容量瓶中,加水稀释到刻度即成。

- 5.2.12 乙醇—盐酸溶液(2:1):移取 200 mL 无水乙醇(5.2.6)和 100 mL 盐酸溶液(5.2.11)混匀后备用。
- 5.2.13 乙腈—磷酸溶液(3:7):移取 30 mL 乙腈(4.2.1)和 70 mL 磷酸溶液(5.2.10)混匀后备用。
- 5.2.14 甲酸溶液(2.0%):移取 4 mL 甲酸(4.2.2)和 196 mL 水混匀后备用。
- 5.2.15 氨化甲醇(5.0%):移取 5 mL 氨水(5.2.8)和 95 mL 甲醇(4.2.4)混匀后备用。
- 5.2.16 混合标准工作液:取适量混合标准储备液(4.2.17)于 5 mL 容量瓶中,用乙腈—磷酸溶液(3:7)(5.2.13)定容,得含各苯并咪唑类药物浓度为 0.20 mg/L、0.50 mg/L、4.0 mg/L、10.0 mg/L、20.0 mg/L 和 50.0 mg/L 的混合标准工作液,4℃下可贮存 14 d。
- 5.2.17 阳离子交换固相萃取柱:60 mg,3 mL。使用前依次用 3 mL 甲醇(4.2.4)、3 mL 甲酸溶液(5.2.14)活化。
- 5.2.18 其他同液相色谱串质谱法中 4.2。

5.3 仪器和设备

- 5.3.1 液相色谱仪:配紫外或二极管矩阵检测器。
- 5.3.2 固相萃取装置。
- 5.3.3 其他同液相色谱串质谱法 4.3。

5.4 分析步骤

5.4.1 提取

称取 2 g 试样(精确到 0.01 g)于 50 mL 离心管中,依次加入 1.0 mL 碳酸钠溶液(5.2.9)和 20 mL 乙酸乙酯(5.2.1),涡旋 1 min,然后超声提取 10 min,以 5 000 r/min 的速度离心 2 min 后移取上清液至鸡心瓶中,离心管中再加入 20 mL 乙酸乙酯(5.2.1),同样步骤操作后合并上清液,加入 1.0 mL 正丙醇(5.2.4)后上清液于 40℃水浴中旋转浓缩至近干,用 6 mL 乙醇—盐酸溶液(5.2.12)分两次溶解残渣(第一次 4 mL,第二次 2 mL),合并溶解液,待净化。

5.4.2 净化

准确移取 5.4.1 全部提取液至固相萃取小柱(5.2.17)中。依次用 3 mL 甲酸溶液(5.2.14)、3 mL 甲醇(4.2.4)淋洗小柱,抽至近干后用 4 mL 氨化甲醇(5.2.15)洗脱。整个固相萃取过程流速控制在 1 mL/min~2 mL/min。洗脱液于 50℃下用氮气吹干,残留物用 2 mL 乙腈—磷酸溶液(5.2.13)超声溶解 2 min。过 0.45 μm 滤膜,进行液相色谱分析。

5.4.3 测定

5.4.3.1 HPLC 参考条件

- 色谱柱: C₁₈柱, 250 mm×4.6 mm, 5.0 μm 或相当者;
- 流动相: A:水; B:乙腈(4.2.1)。梯度洗脱程序见表 4;
- 柱温: 30℃;
- 进样量: 20 μL;
- 波长: 296 nm。

表 4 液相色谱法梯度洗脱程序

时 间 min	流 速 mL/min	A	B
0	1.0	70	30
2.0	1.0	70	30
15.0	1.0	15	85
20.0	1.0	15	85
20.5	1.0	70	30
28.0	1.0	70	30

5.4.3.2 标准曲线的绘制

取 5.2.16 中的混合标准工作液按浓度由低到高进样检测,以峰面积—浓度作图,得到标准曲线回归方程。标准溶液图谱参见图 A.2。

5.4.3.3 定量测定

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 5.4.2 中的定容液,然后重新测定。

5.4.4 空白实验

除不加试样外,均按上述测定步骤进行。

5.5 结果计算

试样中苯并咪唑类药物的含量 X ,以质量分数表示,单位为毫克每千克(mg/kg),按式(2)计算:

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

式中:

A ——试样溶液中苯并咪唑类药物的峰面积;

A_s ——标准工作液中苯并咪唑类药物的峰面积;

C_s ——标准工作液中苯并咪唑类药物的浓度,单位为毫克每升(mg/L);

V ——定容体积,2.0 mL;

m ——样品的质量,单位为克(g)。

平行测定结果用算术平均值表示。

计算结果保留三位有效数字。

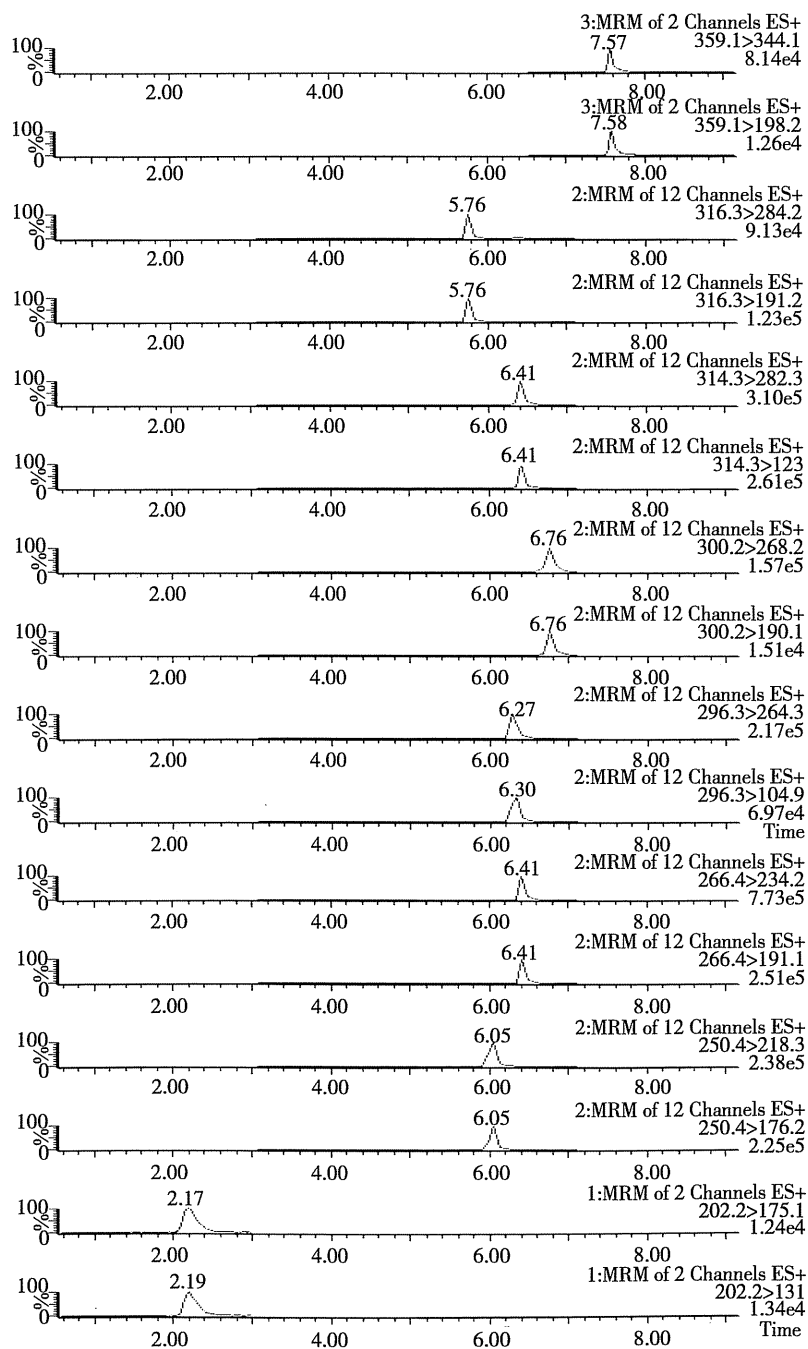
5.6 精密度

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)

苯并咪唑类药物液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图和液相色谱图

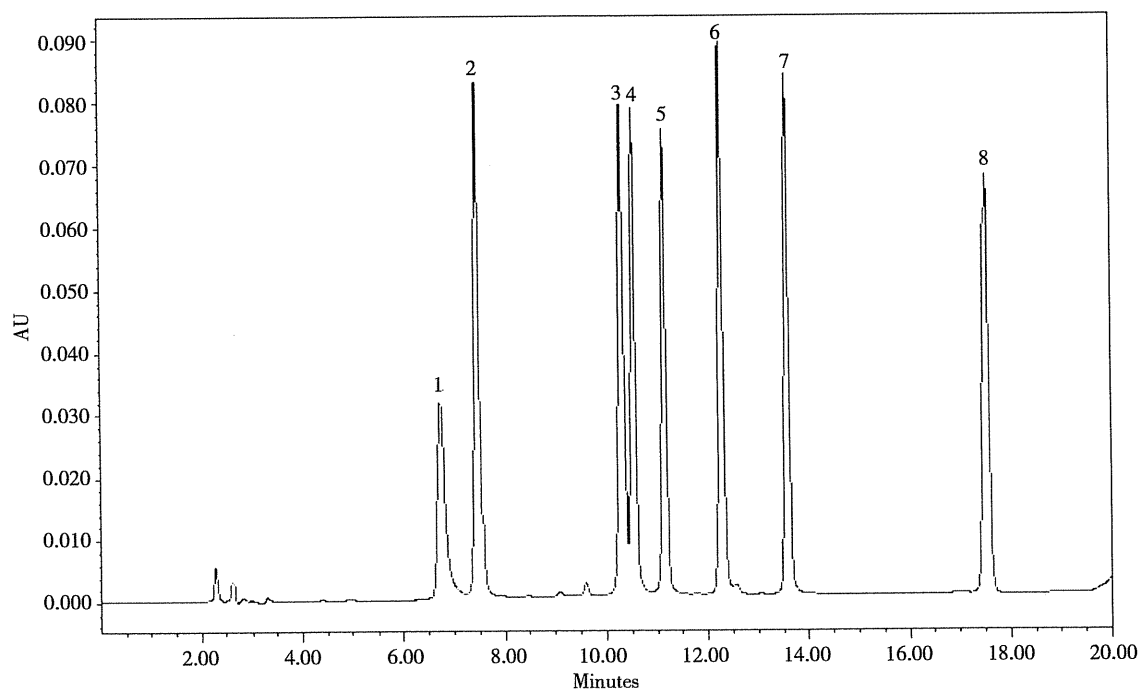
A. 1 苯并咪唑类药物液相色谱串联质谱多反应监测(MRM)色谱图见图 A. 1。



注:图中保留时间(min)2.17、5.76、6.05、6.27、6.41(母离子 266.4)、6.41(母离子 314.3)、6.76 和 7.57 分别为噻苯达唑、奥芬达唑、氧苯达唑、甲苯咪唑、阿苯达唑、氟苯达唑、芬苯达唑和三氯苯达唑。

图 A. 1 苯并咪唑类药物标准溶液(0.10 mg/L)MRM 色谱图

A.2 苯并咪唑类药物液相色谱图见图 A.2。



注：图中 1、2、3、4、5、6、7 和 8 分别为噻苯达唑、奥芬达唑、氧苯达唑、甲苯咪唑、阿苯达唑、氟苯达唑、芬苯达唑和三氯苯达唑。

图 A.2 苯并咪唑类药物标准溶液 (10.0 mg/L) 液相色谱图