

HNNY

湖南省农业技术规程

HNNY 483-2025

饲料中盐酸氯丙嗪、安眠酮和地西泮的 测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of chlopromazine hydrochloride, methaqualone and
diazepam in feeds by liquid chromatography-tandem mass
spectrometric method

2025-12-26 发布

2025-12-26 实施

湖南省农业农村厅发布

目 次

前言	1
1 范围	2
2 规范性引用文件	2
3 术语和定义	2
4 方法原理	2
5 试剂与材料	2
6 仪器与设备	3
7 试样制备与保存	4
8 试验步骤	4
9 结果计算	6
10 灵敏度、准确度精密度	7
附录 A 标准溶液多反应监测（MRM）色谱图	8

前 言

本文件按《湖南省农业技术规程制定与发布管理规范》相关规定起草。

本文件的某些内容可能涉及专利，本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由湖南省农业标准化技术委员会提出并技术归口。

本文件起草单位：长沙市农产品质量监测中心、长沙市农业科学院、湖南省兽药饲料监察所、
湖南省水产研究所。

本文件起草人：刘畅、徐丽君、范叶、丑亚琴、薛爽、杨博文、谭美英、隆雪明、易建希、
万译文、杨彦宁、冯晚霞、刘会峰、康洋、欧阳裕脂、崔新颖、罗扬、郑跃
莲、杨博、邓清林、邓均红、周玉洁、索纹纹、杨霄。

饲料中盐酸氯丙嗪、安眠酮和地西洋的 测定液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件规定了用液相色谱-串联质谱法测定饲料中盐酸氯丙嗪、安眠酮和地西洋的方法原理、试剂与材料、仪器与设备、试样制备与保存、试验步骤结果计算和灵敏度、准确度以及精密度。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料以及预混合饲料中盐酸氯丙嗪、安眠酮和地西洋的测定。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 方法原理

试样中的目标物经盐酸/乙腈溶液提取，混合型阳离子交换固相萃取柱净化，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

5 试剂与材料

5.1 乙腈：色谱纯。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 氨水：分析纯

5.4 甲酸：色谱纯。

5.5 盐酸：分析纯

5.6 2%甲酸水溶液：取甲酸 2 mL，加水定容至 100 mL。

5.7 0.1%甲酸溶液：取 0.5 mL 甲酸,用水溶解并定容至 500 mL。

5.8 5%氯化甲醇溶液：取氨水 5 mL，加甲醇定容至 100 mL。

5.9 0.5 mol/L 的盐酸溶液：将 4.17 mL 盐酸（5.5），用水定容至 100mL。

5.10 提取液：取 0.5 mol/L 的盐酸溶液（5.9）与乙腈（5.1）混合（1:9，v/v）。

5.11 标准物质：盐酸氯丙嗪、安眠酮、地西洋、氘代盐酸氯丙嗪-D₆、氘代安眠酮-D₇、氘代地西洋-D₅，纯度应大于 95.0%。

5.12 标准储备溶液（100 µg/mL）：准确称取适量的盐酸氯丙嗪、安眠酮、地西洋、氘代盐酸氯丙嗪-D₆、氘代安眠酮-D₇、氘代地西洋-D₅ 标准品，分别用甲醇配制成浓度为 100 µg/mL 的标准储备溶液，-18℃避光保存，有效期 6 个月。

5.13 混合标准溶液：准确移取适量氯丙嗪、安眠酮、地西洋标准储备溶液（5.11），用甲醇配制成 1.00 µg/mL（地西洋）和 100 ng/mL（氯丙嗪、安眠酮）的混合标准溶液，-18℃避光保存，现用现配。

5.14 混合内标标准溶液：准确移取适量氘代氯丙嗪-D₆、氘代安眠酮-D₇、氘代地西洋-D₅ 标准储备溶液（5.11），用甲醇配制成 1.00 µg/mL（氘代地西洋-D₅）和 100 ng/mL（氘代氯丙嗪-D₆、氘代安眠酮-D₇）混合内标标准溶液，-18℃避光保存，现用现配。

5.15 混合型阳离子交换固相萃取柱：60 mg/3mL,或相当者。

5.16 微孔滤膜：0.22 µm，有机系。

6 仪器与设备

6.1 液相色谱-串联质谱联用仪：配有电喷雾（ESI）离子源。

6.2 分析天平：感量 0.00001 g 和 0.01 g。

6.3 离心机：转速不低于 8000 r/min。

6.4 旋涡混匀器。

6.5 振荡器。

6.6 固相萃取装置

6.7 氮吹仪

6.8 微量注射器或移液器。

6.9 分子筛：孔径 0.42 mm。

7 试剂制备与保存

按GB/T 20195制备样品，至少200g，粉碎过0.42mm孔径的分子筛，充分混匀，避光密闭保存。

8 试验步骤

8.1 提取

称取适量样品2 g（精确到0.01 g），置于50mL离心管中，加入适量混合内标标准溶液，涡旋混合30 s，加入10 mL提取液，涡旋混匀后振荡15 min，8000 r/min离心5 min，移取上清液至另一50 mL离心管中，残渣重复提取一次，合并上清液，混匀，备用。

8.2 净化

混合型阳离子交换固相萃取柱依次用3mL甲醇、2%甲酸水活化，取2mL备用液过柱，用3 mL2%甲酸水溶液、3 mL甲醇淋洗，挤干，用3 mL5%氨化甲醇洗脱，收集洗脱液，于50℃氮吹至干，准确移取1.00 mL流动相溶解，混匀后经滤膜过滤后供液相色谱-串联质谱测定。

8.3 标准曲线的配制

分别精确移取混合标准溶液和混合内标标准溶液，用流动相溶液（乙腈+0.1%甲酸溶液，6:4，v/v）配制成药西泮的质量浓度为10.0 ng/mL、20.0 ng/mL、50.0 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL，氯丙嗪、安眠酮的质量浓度为1.00 ng/mL、2.00 ng/mL、5.00 ng/mL、10.0 ng/mL、20.0 ng/mL，氘代内标液适量的系列标准工作液，供液相色谱-串联质谱仪测定。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱：C18(50×2.1 mm,粒径1.7 μm)，或其它等效柱。

流动相：A相：乙腈；B相：0.1%甲酸溶液。流动相梯度洗脱条件参见表1。

进样量：4.0μL。

流速：0.20 mL/min。

柱温：35℃。

表 1 流动相梯度洗脱条件

时间（min）	A（%）	B（%）
0.00	60	40
4.00	60	40
4.10	90	10
5.00	90	10

5.10	60	40
7.00	60	40

8.4.2 质谱参考条件

离子源：电喷雾离子源。

扫描方式：正离子扫描。

检测方式：多反应监测（MRM）。

喷雾电压：3.5kV。

离子传输毛细管温度：350℃。

目标物与氘代内标物质谱参数见表2。

表 2 目标物与氘代内标物质谱参数

药物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (v)	碰撞能量 (ev)
氯丙嗪	319.2	214	36	22
		86.4*	36	36
氯丙嗪- D ₆	325.2	92.4	36	24
安眠酮	251	132.2*	38	31
		91.2	38	40
安眠酮- D ₇	258.2	139.1	38	32
地西洋	285	154*	20	30
		105	20	30
地西洋- D ₅	290.2	154.2	38	26
注：“*”表示定量离子。				

8.4.3 定性

样品中待测化合物色谱峰的保留时间与相应浓度标准校准溶液的色谱峰的保留时间应一致，偏差在±2.5%之内。在相同实验条件下，样品中待测化合物定性离子的相对丰度与浓度接近的标准物对应的定性离子的相对丰度比较，相对离子丰度的最大允许偏差参见表3。

表 3 相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度 K	K>50%	20%<K≤50%	10%<K≤20%	K≤10%
允许的相对偏差	±20%	±25%	±30%	±50%

8.4.4 定量

按8.4.1和8.4.2设置仪器条件，以待测药物特征离子色谱峰的峰面积与对应内标物特征离子色谱峰的峰面积比值为纵坐标，相应的标准溶液浓度比为横坐标，绘制标准工作曲线，求回归方程

和相关系数。试样溶液中待测药物的浓度应在标准系列工作溶液的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用流动相进一步稀释后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中待测物的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。氯丙嗪用氯丙嗪-D₆内标定量，安眠酮用安眠酮-D₇内标定量，地西洋用地西洋-D₅内标定量。氯丙嗪、安眠酮、地西洋及内标标准溶液的多反应监测（MRM）色谱图参见附录A。

9 结果计算

试样中待测物含量使用多点校准按公式（1）计算，单点校准按公式(2)计算，计算结果需扣除空白值，测定结果以平行测定的算术平均值表示，保留3位有效数字。

$$\omega = \frac{\rho \times V_1 \times V_3 \times 1000}{m \times V_2 \times 1000} \text{----- (1)}$$

式中：

ω ——试样中待测物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中待测物的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V_1 ——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——过固相萃取柱的提取液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——试样中提取液的总体积，单位为毫升（mL）；

m ——饲料质量，单位为克（g）。

$$\omega = \frac{A \times A_{si} \times \rho_s \times \rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1000}{A_s \times A_i \times \rho_{si} \times m \times V_2 \times 1000} \text{----- (2)}$$

式中：

ω ——样品中待测物的含量，单位为毫克每千克（mg/kg）；

A ——试样溶液中待测物的色谱峰面积；

A_{si} ——标准溶液中内标物的色谱峰面积；

ρ_s ——标准溶液中待测物的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

ρ_i ——试样溶液中内标物的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

A_s ——标准溶液中待测物的色谱峰面积；

A_i ——试样溶液中内标物的色谱峰面积；

ρ_{si} ——标准溶液中内标物的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V_1 ——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——过固相萃取柱的提取液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——试样中提取液的总体积，单位为毫升（mL）；

m ——饲料质量，单位为克（g）。

10 灵敏度、准确度与精密度

10.1 灵敏度

本方法氯丙嗪和安眠酮的检出限为5.00 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为10.0 $\mu\text{g/kg}$ ；地西洋的检出限为50.0 $\mu\text{g/kg}$ ，定量限为100 $\mu\text{g/kg}$ 。

10.2 准确度

本方法氯丙嗪和安眠酮在1.00 $\mu\text{g/kg}$ ~20.0 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的添加回收率为70%~120%；地西洋在10.0 $\mu\text{g/kg}$ ~200 $\mu\text{g/kg}$ 添加浓度水平上的添加回收率为70%~120%。

10.3 精密度

本方法的批内相对标准偏差 $\leq 15\%$ ，批间相对偏差 $\leq 20\%$ 。

附录 A

(资料性)

标准溶液多反应监测 (MRM) 色谱图

盐酸氯丙嗪、安眠酮、地西洋及内标标准溶液 (盐酸氯丙嗪、安眠酮为1.00ng/ml,地西洋为10.0ng/ml) 多反应监测 (MRM) 色谱图见图A.1。

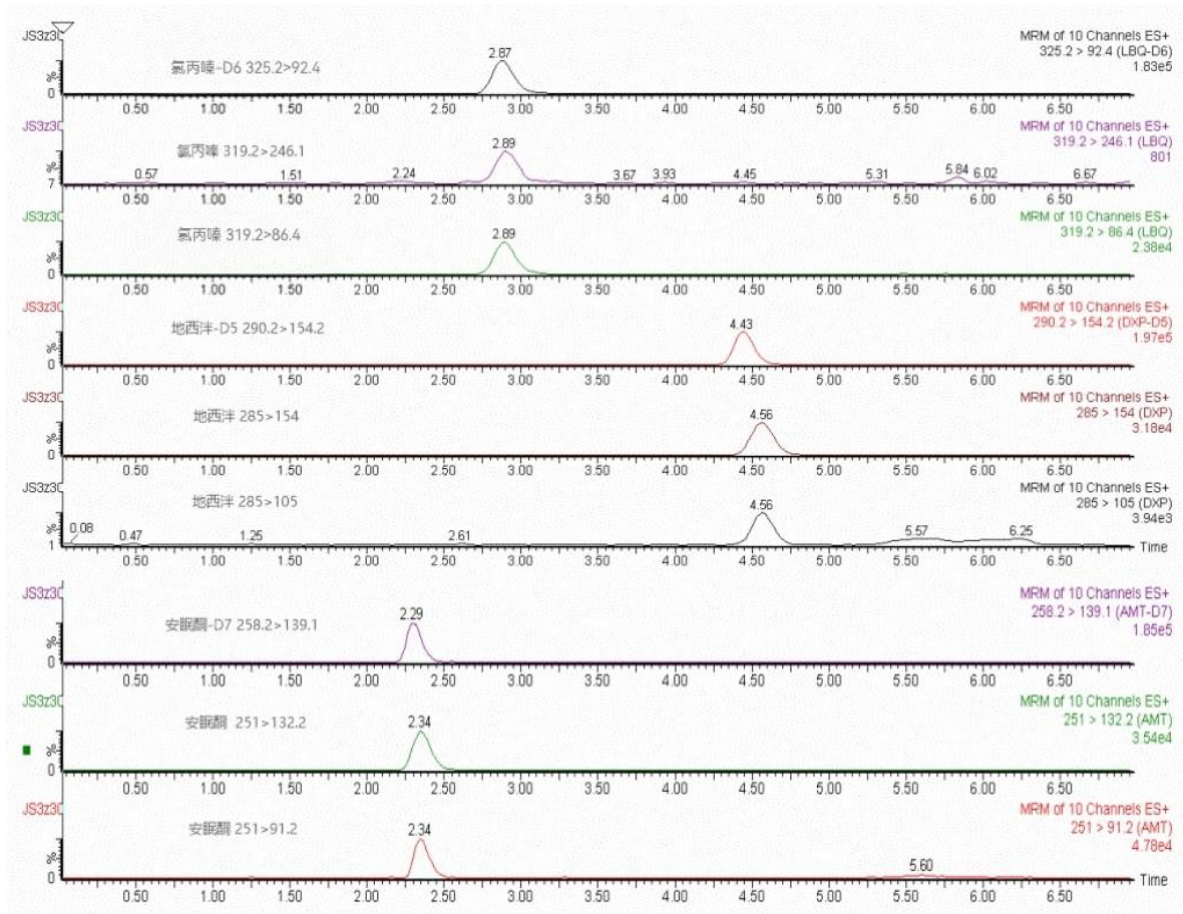


图 A.1 多反应监测 (MRM) 色谱图