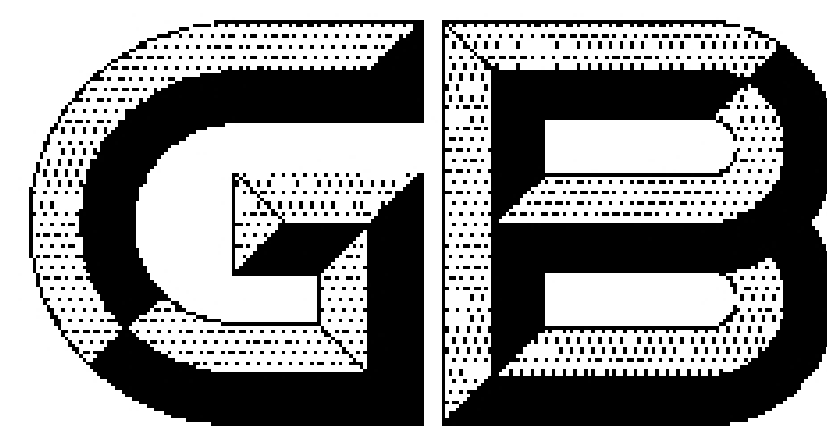




中华人民共和国国家标准

GB/T 19423—2020
代替 GB/T 19423—2003

饲料中尼卡巴嗪的测定

Determination of nicarbazin in feeds

2020-12-14 发布

2021-07-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 19423—2003《饲料中尼卡巴嗪的测定 高效液相色谱法》，与 GB/T 19423—2003 相比，除编辑性修改外，主要技术变化如下：

- 增加了液相色谱-串联质谱测定方法（见第 5 章）；
- 更改了高效液相色谱法的检出限，增加了定量限（见第 1 章，2003 年版的第 1 章）；
- 更改了高效液相色谱法的提取和净化方法（见 4.5.1、4.5.2，2003 年版的 7.1）；
- 更改了高效液相色谱法的试验数据处理（见 4.6，2003 年版的 7.4）。

请注意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专利的责任。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）提出并归口。

本文件起草单位：广东省农业科学院农产品公共监测中心、浙江省兽药饲料监察所、贵州省兽药饲料检测所。

本文件主要起草人：王威利、丁晨红、张志健、赵贵、万凯、王旭、李亚菲、苏秋权、林雪贤、章厉劼、侯轩、黄晓梅、殷秋妙、梁锐、崔泽锋、谢丽丽、王英。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- GB/T 19423—2003。

饲料中尼卡巴嗪的测定

1 范围

本文件描述了饲料中尼卡巴嗪的高效液相色谱和液相色谱-串联质谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中尼卡巴嗪的测定。

本文件高效液相色谱法中配合饲料、浓缩饲料的检出限为 0.5 mg/kg,定量限为 1 mg/kg,添加剂预混合饲料的检出限为 1 mg/kg,定量限为 2 mg/kg;液相色谱-串联质谱法的检出限为 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 高效液相色谱法

4.1 原理

试样中的尼卡巴嗪用甲醇-乙腈混合溶液提取,经 MAX 固相萃取小柱净化后,用高效液相色谱仪检测,外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

4.2.1 水:GB/T 6682,一级。

4.2.2 乙腈:色谱纯。

4.2.3 提取溶液:甲醇+乙腈=50+50。

4.2.4 80%乙腈溶液:准确量取 80 mL 乙腈(4.2.2),加水定容至 100 mL,混匀。

4.2.5 氢氧化钠溶液(0.2 mol/L):准确量取 0.8 g 氢氧化钠,用水稀释并定容至 100 mL,混匀。

4.2.6 4%甲酸乙腈溶液:准确量取 4 mL 甲酸,用乙腈(4.2.2)稀释并定容至 100 mL,混匀。

4.2.7 标准储备溶液(1 000 μg/mL):称取尼卡巴嗪(Nicarbazin, $C_{19}H_{18}N_6O_6$, CAS 号:330-95-0,含量不低于 99%)标准品 10 mg(精确至 0.01 mg)于 10 mL 容量瓶中,加入 2 mL 二甲基亚砜溶解,用乙腈(4.2.2)定容,摇匀,于-18℃以下保存,有效期为 3 个月。

4.2.8 标准中间溶液(100 μg/mL):准确量取标准储备溶液(4.2.7)1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用乙

腈(4.2.2)稀释至刻度,于 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期为3个月。

4.2.9 标准系列溶液:准确移取适量标准中间溶液(4.2.8)于10 mL容量瓶中,用80%乙腈溶液(4.2.4)稀释定容配成标准系列溶液,质量浓度分别为: $0.04\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $20\text{ }\mu\text{g/mL}$,临用现配。

4.2.10 MAX固相萃取小柱: $60\text{ mg}/3\text{ mL}$,或性能相当者。

4.2.11 微孔滤膜: $0.45\text{ }\mu\text{m}$,有机系。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪:配紫外检测器/二极管阵列检测器。

4.3.2 分析天平:感量 0.001 g 和 0.01 mg 。

4.3.3 涡漩混合器。

4.3.4 氮吹仪。

4.3.5 超声波清洗机。

4.3.6 冷冻离心机:转速不低于 $8\text{ }000\text{ r/min}$ 。

4.3.7 固相萃取装置。

4.4 样品

按GB/T 20195制备试样,至少 200 g ,粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中保存,备用。

4.5 试验步骤

4.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g (添加剂预混合饲料 $0.2\text{ g}\sim 1\text{ g}$,尼卡巴嗪含量小于 10 mg),精确至 0.001 g ,于50 mL离心管中,准确加入25 mL提取溶液(4.2.3),涡漩混匀1 min,置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴超声提取20 min,每隔5 min充分振荡一次。于 $8\text{ }000\text{ r/min}$ 离心5 min。取上清液于50 mL离心管中,残渣用25 mL提取溶液(4.2.3)重复提取一次,合并两次提取液,混匀。准确移取5 mL提取液于15 mL离心管中,加入 0.2 mL 氢氧化钠溶液(4.2.5),涡漩混匀后,得到试样待净化溶液,备用。

注:当添加剂预混合饲料中尼卡巴嗪含量大于1%时,建议适当减少称样量(试样中约相当于尼卡巴嗪含量 10 mg)进行测定。

4.5.2 净化

MAX固相萃取小柱(4.2.10)先用3 mL提取溶液(4.2.3)预淋洗。将4.5.1得到的试样待净化溶液全部过柱,抽干。用5 mL 4%甲酸乙腈溶液(4.2.6)洗脱,收集洗脱液,于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气吹至少于2 mL,用80%乙腈溶液(4.2.4)定容至5 mL,涡漩混匀后过 $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜,得到试样溶液,用高效液相色谱仪测定。

4.5.3 测定

4.5.3.1 高效液相色谱参考条件

色谱柱: C_{18} 柱,柱长 250 mm ,内径 4.6 mm ,粒径 $5.0\text{ }\mu\text{m}$;或性能相当者。

流动相:乙腈+水=50+50。

流速: 1.0 mL/min 。

柱温: $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

进样量:20 μL。
检测波长:350 nm。

4.5.3.2 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取标准系列溶液(4.2.9)和 4.5.2 得到的试样溶液上机测定。尼卡巴嗪标准溶液的高相液相色谱图见附录 A。

4.5.3.3 定性

以保留时间定性,试样溶液中尼卡巴嗪保留时间应与标准系列溶液中尼卡巴嗪的保留时间一致,其相对偏差在±2.5%之内。

4.5.3.4 定量

以尼卡巴嗪标准系列溶液中的浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数不应低于 0.99。试样溶液与标准溶液中尼卡巴嗪的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应将试样提取液用提取溶液(4.2.3)稀释(稀释倍数 n)至线性范围内,重新试验。单点校准定量时,试样溶液中尼卡巴嗪的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

4.6 试验数据处理

试样中尼卡巴嗪的含量以质量分数计。多点校准按公式(1)计算,单点校准按公式(2)计算:

$$w = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3 \times 1\,000}{m \times V_2 \times 1\,000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:
 w ——试样中尼卡巴嗪的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
 ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液中尼卡巴嗪的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 V_1 ——试样提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);
 V_3 ——试样定容的体积,单位为毫升(mL);
 V_2 ——用于净化的试样提取液的体积,单位为毫升(mL);
 m ——试样的质量,单位为克(g);
 n ——超出线性范围后,需要进一步稀释的倍数。

$$w = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times \rho \times 1\,000}{A_s \times V_2 \times m \times 1\,000} \times n \dots\dots\dots (2)$$

式中:
 w ——试样中尼卡巴嗪的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
 A ——试样溶液中尼卡巴嗪的峰面积;
 V_1 ——试样提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);
 V_3 ——试样定容的体积,单位为毫升(mL);
 ρ ——标准溶液中尼卡巴嗪的质量浓度,单位为微克每毫升(μg/mL);
 A_s ——标准溶液中尼卡巴嗪的峰面积;
 V_2 ——用于净化的试样提取液的体积,单位为毫升(mL);
 m ——试样的质量,单位为克(g);
 n ——超出线性范围后,需要进一步稀释的倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,计算结果保留三位有效数字。



4.7 精密度

在重复性条件下,两次独立测定结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 10%。

5 液相色谱-串联质谱法

5.1 原理

试样中的尼卡巴嗪用甲醇-乙腈混合溶液提取,经 MAX 固相萃取小柱净化后,用液相色谱-串联质谱仪检测,基质匹配外标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有规定,仅使用分析纯试剂。

5.2.1 水:GB/T 6682,一级。

5.2.2 乙腈:色谱纯。

5.2.3 提取溶液:甲醇+乙腈=50+50。

5.2.4 氢氧化钠溶液(0.2 mol/L):准确量取 0.8 g 氢氧化钠,用水稀释并定容至 100 mL,混匀。

5.2.5 4%甲酸乙腈溶液:准确量取 4 mL 甲酸,用乙腈(5.2.2)稀释并定容至 100 mL,混匀。

5.2.6 标准储备溶液(1 000 $\mu\text{g/mL}$):同 4.2.7。

5.2.7 标准中间溶液(10 $\mu\text{g/mL}$):准确量取标准储备溶液(5.2.6)0.1 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈(5.2.2)稀释至刻度,于-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期为 3 个月。

5.2.8 标准工作溶液(1 $\mu\text{g/mL}$):准确量取标准中间溶液(5.2.7)1.0 mL,置于 10 mL 容量瓶中,用乙腈(5.2.2)稀释至刻度,于-18 $^{\circ}\text{C}$ 以下保存,有效期为 1 个月。

5.2.9 MAX 固相萃取小柱:60 mg/3 mL,或性能相当者。

5.2.10 微孔滤膜:0.22 μm ,有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱:配有电喷雾离子源。

5.3.2 分析天平:感量 0.001 g 和 0.01 mg。

5.3.3 涡漩混合器。

5.3.4 超声波清洗机。

5.3.5 冷冻离心机:转速不低于 8 000 r/min。

5.3.6 固相萃取装置。

5.4 样品

按 GB/T 20195 制备样品,至少 200 g,粉碎使其全部通过 0.42 mm 孔径的分析筛,充分混匀,装入磨口瓶中保存,备用。选取与待测样品类型相同,均匀一致,且在待测物保留时间处仪器响应值小于方法定量限 30%的饲料样品,作为空白样品。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g(添加剂预混合饲料 1 g),精确至 0.001 g,于 50 mL 离心管中,准确加入 25 mL 提取溶液(5.2.3),涡漩混匀 1 min,置于 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴超声提取 20 min,每隔 5 min 充分振荡一

次。于 8 000 r/min 离心 5 min。取上清液于 100 mL 容量瓶中,残渣用 25 mL 提取溶液(5.2.3)重复提取一次,合并两次提取液,用提取溶液(5.2.3)定容至刻度,混匀。准确移取 2 mL 提取液于 15 mL 离心管中,加入 0.1 mL 氢氧化钠溶液(5.2.4),涡漩混匀后,得到试样待净化溶液,备用。

注:当添加剂预混合饲料中尼卡巴嗪含量大于 1%时,建议适当减少称样量(试样中约相当于尼卡巴嗪含量 10 mg)进行测定。

5.5.2 净化

MAX 固相萃取小柱(5.2.9)先用 3 mL 提取溶液(5.2.3)预淋洗。将 5.5.1 得到的试样待净化溶液全部过柱,抽干,准确加入 5 mL 4%甲酸乙腈溶液(5.2.5)洗脱,收集洗脱液,准确移取洗脱液 2 mL,用乙腈(5.2.2)定容至 10 mL,混匀后过 0.22 μm 微孔滤膜,得到试样溶液,用液相色谱-串联质谱仪测定。

5.5.3 基质匹配标准系列溶液的制备

称取基质空白试样,按照 5.5.1 和 5.5.2 处理得到空白试样溶液。取适量的标准工作溶液(5.2.8),以空白基质溶液进行稀释,配制成质量浓度分别为 0.04 ng/mL、0.1 ng/mL、0.2 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL 和 50 ng/mL 基质匹配标准系列溶液,待测,临用现配。

5.5.4 测定

5.5.4.1 液相色谱参考条件

色谱柱:C₁₈柱,柱长 100 mm,内径 2.1 mm,粒径 2.7 μm,或性能相当者。
柱温:30 ℃。
流速:0.3 mL/min。
进样量:5 μL。
流动相:A:水;B:乙腈。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A %	B %
0.0	60	40
1.0	60	40
2.0	20	80
4.5	20	80
4.6	60	40
8.0	60	40

5.5.4.2 质谱参考条件

电离方式:电喷雾电离,负离子模式(ESI⁻)。
检测方式:多反应监测(MRM)。
毛细管电压:4.5 kV。
离子源温度:400 ℃。
脱溶剂温度:526 ℃。

干燥气流量：氮气 600 L/h。
尼卡巴嗪的定性、定量离子对及其他参考质谱条件等见表 2。

表 2 尼卡巴嗪的定性、定量离子对及其他参考质谱条件

被测物名称	监测离子对 m/z	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
尼卡巴嗪	300.90>137.05 ^a	15	13
	300.90>107.05		37
^a 为定量离子。			

5.5.4.3 基质匹配标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下,分别取基质匹配标准系列溶液(5.5.3)和 5.5.2 得到的试样溶液上机测定。
尼卡巴嗪标准溶液定量离子质量色谱图见附录 B。

5.5.4.4 定性

在相同试验条件下,试样溶液与基质匹配标准系列溶液中尼卡巴嗪的保留时间相对偏差应在 ±2.5% 之内。根据表 2 选择的定性离子对,比较试样谱图中尼卡巴嗪定性离子的相对离子丰度与浓度接近的基质匹配标准系列溶液中对应的定性离子的相对离子丰度,若偏差不超过表 3 规定的范围,则可判定为样品中存在对应的尼卡巴嗪。

表 3 定性测定时相对离子丰度的最大允许偏差

相对离子丰度/%	>50	20~50(含)	10~20(含)	≤10
最大允许偏差/%	±20	±25	±30	±50

5.5.4.5 定量

以尼卡巴嗪基质匹配标准系列溶液的浓度为横坐标,色谱峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,标准曲线的相关系数不应低于 0.99。试样溶液与标准溶液中尼卡巴嗪的响应值均应在仪器检测的线性范围内,如超出线性范围,应重新试验或将试样溶液和基质匹配标准溶液用提取溶液(5.2.3)稀释(稀释倍数 *n*)至线性范围内,重新测定。单点校准定量时,试样溶液中尼卡巴嗪的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中尼卡巴嗪的含量以质量分数计。多点校准按公式(3)计算,单点校准按公式(4)计算:

$$w = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3}{m \times V_2 \times 1\,000} \times n \dots\dots\dots (3)$$

式中:
w ——试样中尼卡巴嗪的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
ρ_i ——从标准曲线查得的试样溶液中尼卡巴嗪的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
V₁ ——试样提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);
V₃ ——试样定容的体积,单位为毫升(mL);

- m ——试样的质量,单位为克(g);
- V_2 ——用于净化的试样提取液的体积,单位为毫升(mL);
- n ——超出线性范围后,需要进一步稀释的倍数。

$$w = \frac{A \times V_1 \times V_3 \times \rho}{A_s \times V_2 \times m \times 1\,000} \times n \dots\dots\dots (4)$$

式中:

- w ——试样中尼卡巴嗪的含量,单位为毫克每千克(mg/kg);
- A ——试样溶液中尼卡巴嗪的峰面积;
- V_1 ——试样提取溶液的总体积,单位为毫升(mL);
- V_3 ——试样定容的体积,单位为毫升(mL);
- ρ ——标准溶液中尼卡巴嗪的质量浓度,单位为纳克每毫升(ng/mL);
- A_s ——标准溶液中尼卡巴嗪的峰面积;
- V_2 ——用于净化的试样提取液的体积,单位为毫升(mL);
- m ——试样的质量,单位为克(g);
- n ——超出线性范围后,需要进一步稀释的倍数。

测定结果用平行测定的算术平均值表示,计算结果保留三位有效数字。

5.7 精密度

在重复性条件下,两次独立测试结果与其算术平均值的绝对差值不大于该算术平均值的 15%。

附录 A
(资料性)

尼卡巴嗪标准溶液的高效液相色谱图

尼卡巴嗪标准溶液的高效液相色谱图见图 A.1。

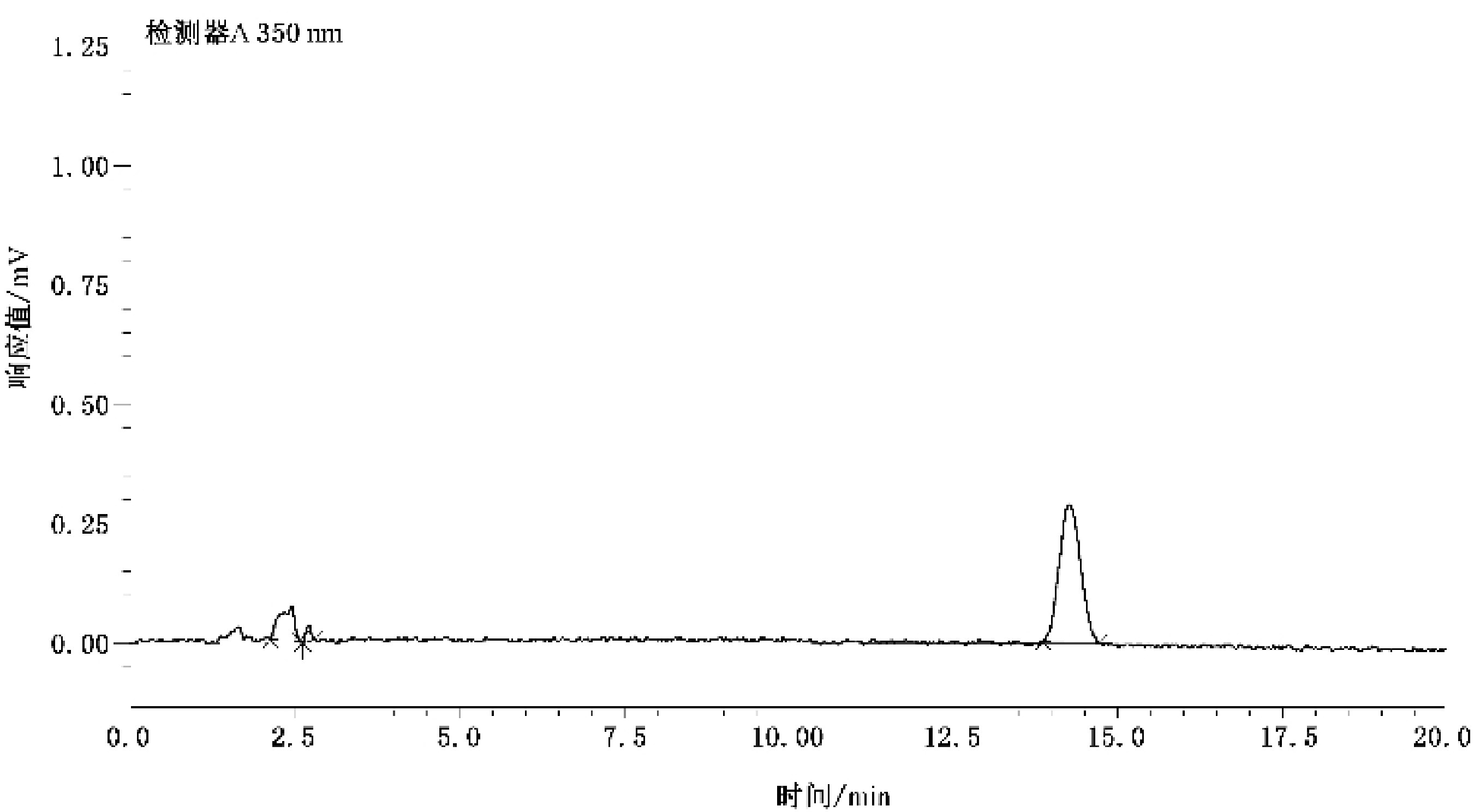


图 A.1 尼卡巴嗪标准溶液(0.1 μg/mL)的高效液相色谱图

附 录 B
(资料性)

尼卡巴嗪标准溶液的定量离子质量色谱图

尼卡巴嗪标准溶液的定量离子质量色谱图见图 B.1。

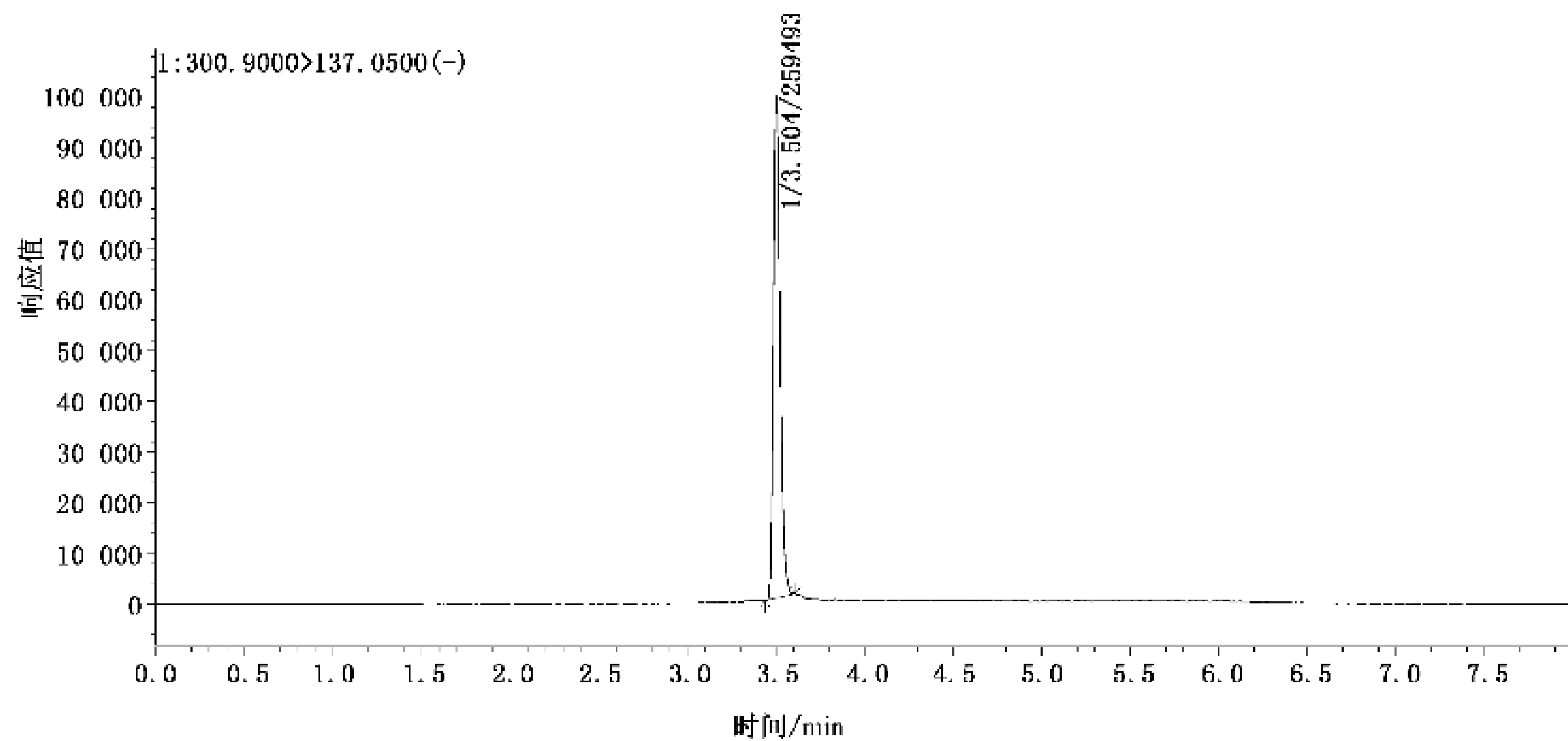


图 B.1 尼卡巴嗪标准溶液(2 ng/mL)的定量离子质量色谱图

