



中华人民共和国国家标准

GB/T 19423—2003

饲料中尼卡巴嗪的测定 高效液相色谱法

Determination of nicarbazin in feed—
High performance liquid chromatography

2003-12-11 发布

2002791

2004-06-01 实施



中华人民共和国
国家质量监督检验检疫总局 发布

前 言

本标准检测方法主要以美国食品药品监督管理局(FDA)编著的《动物组织及饲料中兽药分析手册》一书中“饲料中尼卡巴嗪的测定方法”为基础,经试验确定。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:浙江省饲料监察所。

本标准主要起草人:朱聪英、宣士荣、邵庆均、施杏芬、沈琴芳、张志健。

饲料中尼卡巴嗪的测定

高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了用高效液相色谱仪测定饲料中尼卡巴嗪含量的方法。
 本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和预混合饲料中尼卡巴嗪的测定。
 本方法的最低检测浓度为每千克饲料中尼卡巴嗪含量在 1 mg 以上。

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—1992 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

用二甲基甲酰胺(DMF)提取试样中的尼卡巴嗪,经碱性氧化铝层析柱过柱纯化,浓缩并用洗脱液溶解、定容,用高效液相色谱仪, C_{18} 反相柱,以甲醇溶液为流动相,用紫外检测器在波长 365 nm 条件下进行定量测定。

4 仪器设备

- 4.1 高效液相色谱仪,配有紫外检测器。
- 4.2 色谱柱: C_{18} 反相柱(粒度 $5\ \mu\text{m}$,柱长 10 cm,内径 4.6 mm)。
- 4.3 旋转蒸发器。
- 4.4 电动振荡器。
- 4.5 层析管:1 cm \times 30 cm。

5 试剂和溶液

以下所用的试剂和水,除特别注明者外均为分析纯试剂,水为符合 GB/T 6682—1992 中规定的三级水。

- 5.1 95%乙醇。
- 5.2 甲醇:色谱纯。
- 5.3 二甲基甲酰胺(DMF)。
- 5.4 碱性氧化铝:100 目~200 目,105 $^{\circ}\text{C}$ 条件下烘 2 h 后放干燥器中备用。
- 5.5 洗脱液:95%乙醇(5.1)-甲醇(5.2)为 95+5。
- 5.6 尼卡巴嗪贮备液:准确称取 100 mg 尼卡巴嗪标准品,用 DMF 定容至 100 mL(浓度为 1 mg/mL)。
- 5.7 尼卡巴嗪工作液:移取 1 mL 尼卡巴嗪贮备液(5.6),用 DMF 定量至 100 mL(浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。
- 5.8 流动相:80+20 的甲醇水溶液。

6 试样制备

选取有代表性的饲料样品,用四分法缩减至 500 g,粉碎至过 0.45 mm 孔径的分析筛,混匀,装入密

闭容器。

7 分析步骤

7.1 试液的制备

7.1.1 提取

准确称取试样 10 g 于具塞三角烧瓶中,加二甲基甲酰胺(DMF)50 mL,用电动振荡器振摇 30 min,用滤纸干过滤,弃取初滤液,收集滤液,备用。

7.1.2 柱层析纯化

7.1.2.1 柱的制备

在层析管中加入约 2/3 管高的二甲基甲酰胺(DMF),缓慢加入碱性氧化铝至高度为 6 cm(约 6 g),小心排除气泡,静止 15 min,打开活塞,放下液体,至液面达氧化铝表面,再加 25 mL DMF 洗柱,注意液面不能低于氧化铝表面。

7.1.2.2 纯化

准确移取 25 mL 滤液于层析柱中,放下液体,至液面达氧化铝表面,用 25 mL DMF 淋洗柱,弃去淋洗液,加 20 mL 洗脱液,立即洗脱尼卡巴嗪,弃去开始的 1 mL~3 mL 洗脱液,注意在以上过程中保持柱不干。收集其余洗脱液于旋转蒸发器烧瓶中,用旋转蒸发器在 60℃~70℃下蒸发至干,再用洗脱液定容,使其尼卡巴嗪最后浓度为 10 μg/mL 左右,备用。

如用其他口径层析管进行层析,则全部试剂按层析管内径平方比改变。

7.2 尼卡巴嗪标准溶液的制备

按 7.1.2.1 制备柱,准确移取 25 mL 尼卡巴嗪工作液,按 7.1.2.2 操作至“注意在以上过程中保持柱不干”。收集洗脱液于 25 mL 容量瓶中,用洗脱液定容至刻度。

7.3 测定

7.3.1 高效液相色谱条件

7.3.1.1 色谱柱: C₁₈ 反相柱(粒度 5 μm, 内径 4.6 mm, 柱长 10 cm)。

7.3.1.2 流动相: 甲醇+水(80+20)。

7.3.1.3 流速: 1 mL/min。

7.3.1.4 温度: 室温。

7.3.1.5 进样体积: 20 μL。

7.3.1.6 检测器: 紫外检测器, 波长 365 nm。

7.3.2 上机测定

尼卡巴嗪标准溶液和试液分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 按外标法以峰面积进行计算。

7.4 结果的计算与表述

7.4.1 计算公式

结果按(1)式计算:

$$C = \frac{P \times C_1 \times V \times 2}{P_1 \times m} \quad \dots\dots\dots(1)$$

式中:

C——试样中尼卡巴嗪含量, 单位为毫克每千克(mg/kg);

C₁——标准溶液中尼卡巴嗪含量, 单位为微克每毫升(μg/mL);

P——试液峰面积响应值;

P₁——标准溶液峰面积响应值;

V——试液定容体积, 单位为毫升(mL);

m——试样质量, 单位为克(g);

2——试液稀释倍数。

7.4.2 平行测定结果用算术平均值表示,保留三位有效数字。

8 允许差

同一分析者对同一试样同时两次测定(或重复测定)所得结果:尼卡巴嗪含量在 10 mg/kg(包括 10 mg/kg)以下的相对偏差不大于 20%;在 10 mg/kg 以上的相对偏差不大于 10%。
