



中华人民共和国国家标准

GB 29690—2013

食品安全国家标准

动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物残留量 的测定 液相色谱-串联质谱法

Determination of marker residues of Nicarbazin in animal derived food
by Liquid Chromatography- tandem Mass Spectrometric method

(电子版本仅供参考，以标准正式出版物为准)

2013-09-16 发布

2014-01-01 实施

中华人民共和国农业部

发布

中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会

目 次

目 次.....	I
前 言.....	II
动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物残留量的测定 液相色谱-串联质谱法.....	1
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 原理.....	1
4 试剂和材料.....	1
5 仪器和设备.....	2
6 样品的制备与保存.....	3
6.1 样品的制备.....	3
6.2 样品的保存.....	3
7 测定步骤.....	3
7.1 提取与净化.....	3
7.2 标准曲线的制备.....	3
7.3 测定.....	4
7.4 空白试验.....	5
8 结果计算和表述.....	5
9 检测方法灵敏度、准确度和精密度.....	6
9.1 灵敏度.....	6
9.2 准确度.....	6
9.3 精密度.....	6
附录 A.....	7

前 言

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准系国内首次发布的国家标准。

动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物残留量的测定

液相色谱-串联质谱法

1 范围

本标准规定了动物性食品中尼卡巴嗪残留标志物4,4-二硝基苯缩脲残留量检测的制样和液相色谱-串联质谱测定方法。

本标准适用于鸡的肌肉组织和鸡蛋中尼卡巴嗪残留标志物4,4'-二硝基均二苯脲残留量的检测。

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 1.1-2000 标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写规则

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

3 原理

试样中残留的4,4-二硝基苯缩脲，用乙腈提取，正己烷除脂，75%甲醇水溶液萃取，液相色谱-串联质谱法测定，内标法定量。

4 试剂和材料

以下所用的试剂，除特别注明者外均为分析纯试剂；水为符合GB/T 6682规定的一级水。

4.1 4,4'-二硝基均二苯脲对照品：含量 $\geq 98.0\%$ 。

4.2 4,4'-二硝基均二苯脲-D₈对照品：含量 $\geq 98.0\%$ 。

4.3 乙腈：色谱纯。

4.4 甲醇：色谱纯。

4.5 无水硫酸钠

4.6 正己烷

4.7 乙酸铵

4.8 二甲基甲酰胺

4.9 0.1 mol/L 乙酸铵溶液：取乙酸铵 1.93 g，用水溶解并稀释至 250 mL。

4.10 75%甲醇水溶液：取甲醇 75 mL，用水溶解并稀释至 100 ml。

4.11 75%甲醇水溶液饱和的正己烷 取75%甲醇水溶液100 mL，加正己烷100 mL，摇匀，静置分层，取上层液。

4.12 1 mg/mL 4,4'-二硝基均二苯胺标准贮备液 精密称取 4,4'-二硝基均二苯胺对照品 10 mg，于 10 mL 量瓶内，用二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 1 mg/mL 的 4,4'-二硝基均二苯胺标准贮备液。2~8℃保存，有效期 3 个月。

4.13 10 μg/mL 4,4'-二硝基均二苯胺标准工作液：精密量取 1 mg/mL 4,4'-二硝基均二苯胺标准贮备液 1.0 mL，于 100 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 10 μg/mL 的 4,4'-二硝基均二苯胺标准工作液。-18℃保存，有效期 3 个月。

4.14 1 mg/mL 4,4'-二硝基均二苯胺-D₈ 标准贮备液：精密称取 4,4'-二硝基均二苯胺-D₈ 对照品 10 mg，于 10 mL 量瓶内，用二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 1 mg/mL 的 4,4'-二硝基均二苯胺-D₈ 标准贮备液。2~8℃保存，有效期 3 个月。

4.15 10 μg/mL 4,4'-二硝基均二苯胺-D₈ 标准工作液：精密量取 1 mg/mL 4,4'-二硝基均二苯胺-D₈ 标准贮备液 1.0 mL，于 100 mL 量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，配制成浓度为 10 μg/mL 的 4,4'-二硝基均二苯胺-D₈ 标准工作液。-18℃保存，有效期 3 个月。

5 仪器和设备

5.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源。

5.2 分析天平：感量 0.000 01 g。

5.3 天平：感量 0.01 g。

5.4 涡旋振荡器

5.5 离心机

5.6 氮吹仪

5.7 离心管：50 mL。

5.8 滤膜：0.2 μm。

6 试料的制备与保存

6.1 试料的制备

6.1.1 鸡蛋

取适量新鲜或冷藏的空白或供试鸡蛋，去壳，并使均质。

——取均质后的供试样品，作为供试试料。

——取均质后的空白样品，作为空白试料。

——取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

6.1.2 鸡肌肉

取适量新鲜或冷冻的空白或供试组织，绞碎，并使均质。

——取均质后的供试样品，作为供试试料。

——取均质后的空白样品，作为空白试料。

——取均质后的空白样品，添加适宜浓度的标准工作液，作为空白添加试料。

6.2 试料的保存

-20℃以下保存。

7 测定步骤

7.1 提取与净化

称取试料(2±0.02) g，于50 mL离心管中，添加10 μg/mL 4, 4'-二硝基均二苯脲-D₈标准工作液适量，加无水硫酸钠2 g，乙腈8 mL，涡旋0.5 min，超声5 min，5 000 r/min离心10 min，取上清液，于40℃氮气吹干，加75%甲醇水溶液饱和的正己烷1 mL，涡旋10 s，再加75%甲醇水溶液1.0 mL，充分涡旋混合，于40℃水浴中静置5 min，2 000 r/min离心5 min，取下层清液，滤膜过滤，供液相色谱-串联质谱测定。

7.2 标准曲线的制备

精密量取10 μg/mL 4, 4'-二硝基均二苯脲标准工作液和10 μg/mL 4, 4'-二硝基均二苯脲-D₈标准工作液适量，用75%甲醇水溶液稀释，配制成4, 4'-二硝基均二苯脲-D₈浓度均为100 ng/mL 以及4, 4'-二硝基均二苯脲浓度为2、10、20、50、200和500 ng/mL系列对照溶液，供液相色谱-串联质谱法测定。以特征离子质量色谱峰面积为纵坐标，标准溶液浓度为横坐标，绘制标准曲线。求回归方程和相关系数。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

色谱柱: C₁₈ (150 mm×2.1 mm, 粒径5 μm), 或相当者;

流动相: 甲醇+0.1 mol/L 乙酸铵溶液 (75+25, v/v);

流速: 0.2 mL/min;

柱温: 30℃;

进样量: 20 μL。

7.3.2 质谱条件

离子源: 电喷雾离子源;

扫描方式: 负离子扫描;

检测方式: 多反应监测;

电离电压: 3.0 kV;

源温: 110℃;

雾化温度: 350℃。

锥孔气流速: 50 L/h;

雾化气流速: 450 L/h;

定性、定量离子对和锥孔电压及碰撞能量见表1。

表1 DNC和内标的定性、定量离子对及锥孔电压、碰撞能量

药物	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV
DNC	300.9>136.9	300.9>136.9	20	18
	300.9>106.9			32
DNC-D ₈	309.0>141.0	309.0>141.0	20	18

7.3.3 测定法

取试样溶液和对照溶液, 作单点或多点校准, 按内标法, 以峰面积比计算。试料溶液及对照溶液中4, 4'-二硝基均二苯胺及4, 4'-二硝基均二苯胺-D₈的峰面积比应在仪器检测的线性范围之内。试样溶液中的离子相对丰度与空白添加标准溶液中的离子相对丰度相比, 符合表2的要求。对照溶液和空白添加试样溶液中各特征离子质量色谱图见附录A。

表2 试料溶液中离子相对丰度的允许偏差范围

相对丰度 %	允许偏差 %
>50	±20
20~50	±25
10~20	±30
≤10	±50

7.4 空白试验

除不加试料外，采用完全相同的步骤进行平行操作。

8 结果计算和表述

单点校准:
$$C = \frac{AA'_{is}C_S C_{is}}{A_{is}A_S C'_{is}}$$

或标准曲线校准: 由
$$\frac{A_S}{A'_{is}} = a \frac{C_S}{C'_{is}} + b$$

求得 a 和 b , 则
$$C = \frac{C_{is}}{a} \left(\frac{A}{A_{is}} - b \right)$$

试料中DNC残留量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) : 按下式计算:

$$X = \frac{CV}{m}$$

式中:

X ——供试试料中4,4'-二硝基均二苯脲的残留量, $\mu\text{g}/\text{kg}$;

C ——试样溶液中4,4'-二硝基均二苯脲的浓度, ng/mL ;

C_{is} ——试样溶液中4,4'-二硝基均二苯脲- D_8 的浓度, ng/mL ;

C_S ——对照溶液中4,4'-二硝基均二苯脲的浓度, ng/mL ;

C'_{is} ——对照溶液中4,4'-二硝基均二苯脲- D_8 的浓度, ng/mL ;

A ——试样溶液中4,4'-二硝基均二苯脲的峰面积;

A_{is} ——试样溶液中4,4'-二硝基均二苯脲- D_8 的峰面积;

A_S ——对照溶液中4,4'-二硝基均二苯脲的峰面积;

A'_{is} ——对照溶液中4,4'-二硝基均二苯脲- D_8 的峰面积;

V ——溶解残余物所用75%甲醇水溶液的体积, mL ;

m ——供试试料质量，g。

注：计算结果需扣除空白值，测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留三位有效数字。

9 检测方法灵敏度、准确度和精密度

9.1 灵敏度

本方法的检测限为 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ，定量限为 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 。

9.2 准确度

本方法鸡蛋试料在 $1\sim 10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度、鸡肌肉试料在 $1\sim 300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 添加浓度水平上的回收率为 $80\%\sim 120\%$ 。

9.3 精密度

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

附录 A

(资料性附录)

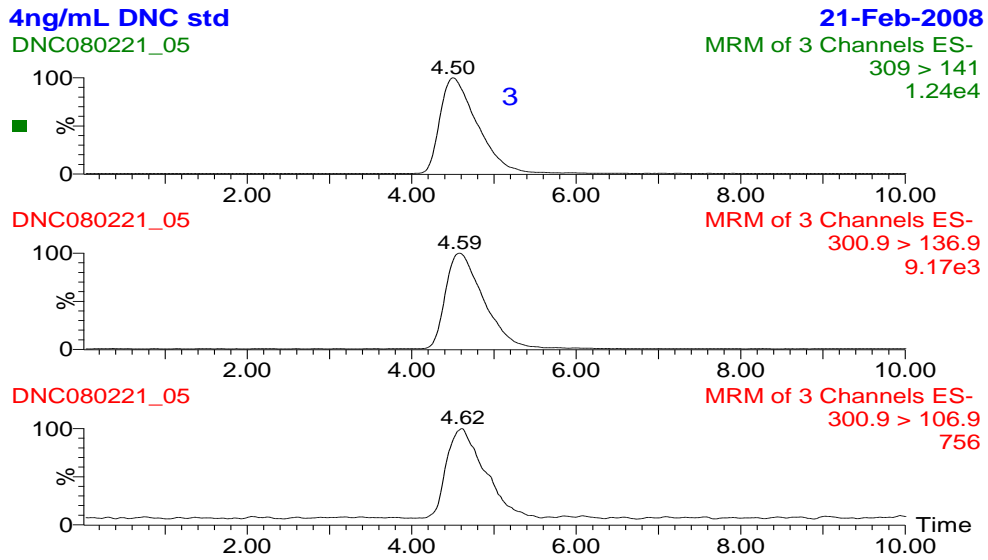


图 A1 4,4'-二硝基均二苯胺及内标物标准溶液特征离子质量色谱图 (4 ng/mL)

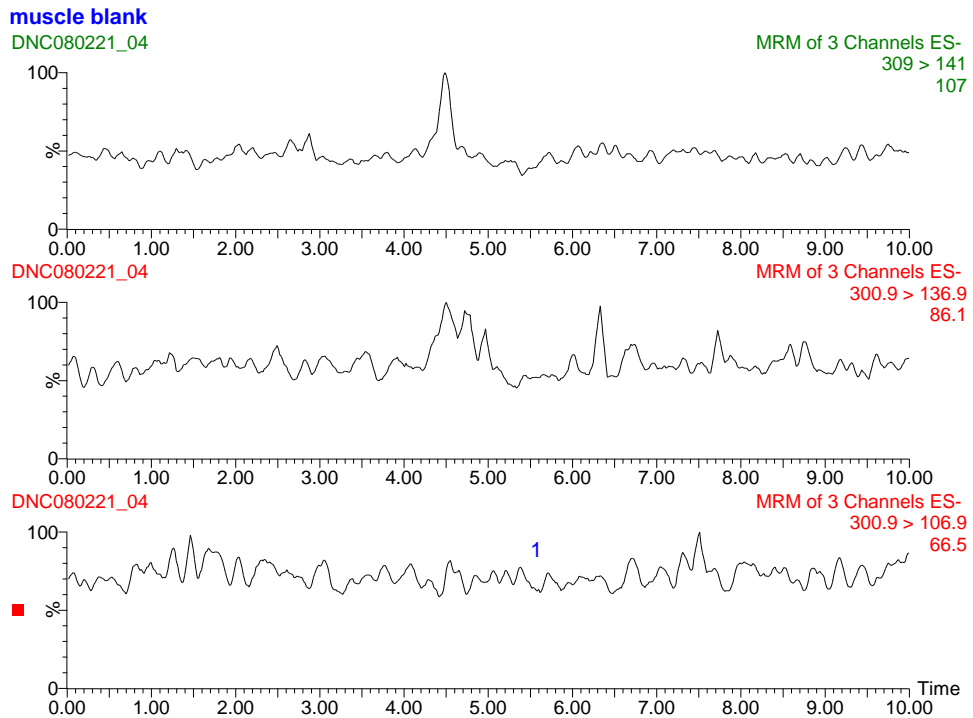


图 A2 鸡肌肉组织空白试样特征离子质量色谱图

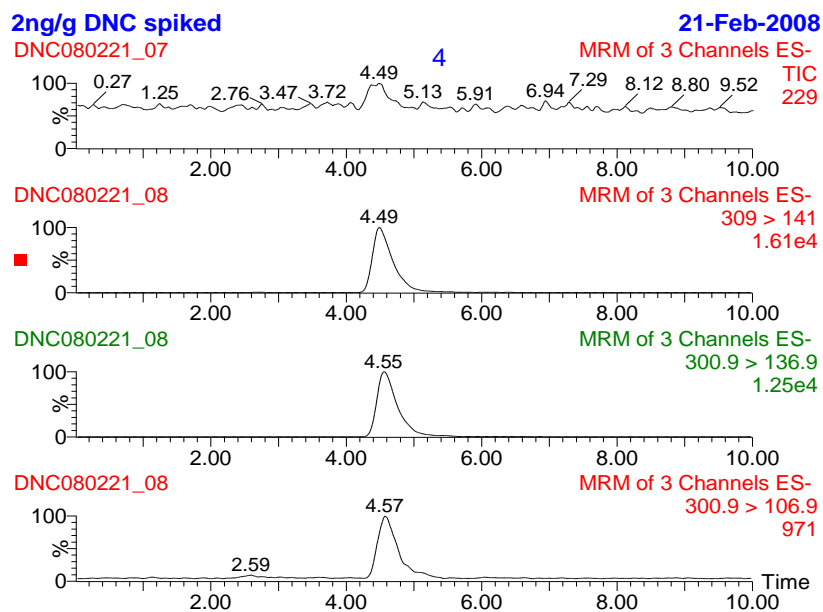


图 A3 鸡空白肌肉组织添加 4,4'-二硝基均二苯胺及内标物试样特征离子质量色谱图 (2 ng/g)

- 注：1—DNC 特征离子质量色谱图 (300.9>106.9);
 2—DNC 特征离子质量色谱图 (300.9>136.9);
 3—DNC-D₈ 特征离子质量色谱图 (309.0>141.0);
 4—空白组织总离子流色谱图 (TIC)。