

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××—202×
代替农业部783号公告—5—2006

饲料中二硝托胺的测定

Determination of dinitolmide in feeds

(公开征求意见稿)

202×-××-××发布

202×-××-××实施

中华人民共和国农业农村部 发布

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》的规则起草。

本文件代替农业部783号公告—5—2006《饲料中二硝托胺的测定 高效液相色谱法》，与农业部783号公告—5—2006相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了适用范围（见第1章，2006版的1）；
- 增加了高效液相色谱法检出限（见第1章）；
- 增加了液相色谱-串联质谱法（见第4章）；
- 更改了称样量和提取方法（见4.5.1和5.5.1，2006版的7.1）；
- 更改了净化方法（见4.5.2和5.5.2，2006版的7.2）；
- 更改了色谱参考条件（见4.5.3.1和5.5.3.1，2006版的7.3.1）。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部畜牧兽医局提出。

本文件由全国饲料工业标准化技术委员会（SAC/TC 76）归口。

本文件起草单位：宁波市农产品质量检测中心。

本文件主要起草人：王全胜、张亮、吴银良、凌淑萍、付岩、朱勇、赵健、章豪、陈国。

本文件所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2006年首次发布为农业部783号公告—5—2006；
- 本次为第一次修订。

饲料中二硝托胺的测定

1 范围

本文件描述了饲料中二硝托胺的液相色谱-串联质谱和高效液相色谱测定方法。

本文件适用于配合饲料、浓缩饲料、精料补充料和添加剂预混合饲料中二硝托胺的测定。

本文件液相色谱-串联质谱法的检出限为0.01 mg/kg、定量限为0.05 mg/kg，高效液相色谱法的检出限为0.3 mg/kg、定量限为1.0 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件中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 液相色谱-串联质谱法

4.1 原理

试样经氨化甲醇提取，中性氧化铝固相萃取净化，液相色谱-串联质谱仪检测，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 甲醇：色谱纯。

4.2.4 0.5%氨水甲醇溶液：取氨水 5 mL，用甲醇定容至 1000 mL，混匀。

4.2.5 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1000 mL，混匀。

4.2.6 甲酸-乙腈溶液：取 0.1%甲酸溶液（4.2.5）800 mL，用乙腈（4.2.2）稀释至 1 000 mL，混匀。

4.2.7 标准储备溶液（1000 mg/L）：称取二硝托胺标准品（CAS：148-01-6，纯度不低于 98%）10 mg（精确至 0.01 mg），置于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（4.2.2）溶解并定容，混匀。于-18℃以下保存，有效期 3 个月。

4.2.8 标准中间溶液（25 mg/L）：准确移取标准储备溶液（4.2.7）0.25 mL，于 10 mL 容量瓶中，用乙

腈（4.2.2）稀释、定容、混匀。于-18℃以下保存，有效期1个月。

4.2.9 标准系列中间溶液：准确移取适量标准中间溶液（4.2.8），用乙腈（4.2.2）稀释配制成浓度分别为0.010 μg/mL、0.025 μg/mL、0.10 μg/mL、0.25 μg/mL、1.0 μg/mL和2.5 μg/mL标准系列中间溶液。

4.2.10 标准系列溶液：准确移取标准系列中间溶液（4.2.9）各0.20 mL，分别用甲酸溶液（4.2.5）稀释、定容至1 mL，混匀，配制成浓度分别为2 ng/mL、5 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL和500 ng/mL的标准系列溶液。临用现配。

4.2.11 固相萃取柱：中性氧化铝柱，1 g/6 mL，或性能相当者。

4.2.12 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

4.3 仪器设备

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：转速不低于8 000 r/min。

4.3.3 分析天平：感量0.01 mg和0.01 g。

4.3.4 振荡器。

4.3.5 涡旋混合器。

4.3.6 固相萃取仪。

4.4 样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎使其全部通过0.425 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5 g（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为2 g），精确至0.01 g，置于50 mL塑料离心管中，准确加入20 mL（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为10 mL）氨水甲醇溶液（4.2.4），涡旋30 s，振荡提取40 min，于9 500 r/min离心3 min，移取上清液，残渣复提取1次，振荡20 min，离心后合并上清液。待净化。

4.5.2 净化

用5 mL甲醇（4.2.3）活化固相萃取小柱（4.2.11）。准确移取5 mL（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为2.5 mL）待净化溶液（4.5.1）过柱，用4 mL（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为2 mL）甲醇（4.2.3）洗脱，收集洗脱液，用甲醇（4.2.3）定容至10 mL（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为5 mL），混匀。准确移取1 mL于45℃下用氮气吹干，准确加入1 mL甲酸-乙腈溶液（4.2.6）溶解残渣，涡旋混匀，过微孔滤膜（4.2.12），备用。

4.5.3 测定

4.5.3.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

a) 色谱柱：C₁₈柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒度1.7 μm，或性能相当者；

b) 柱温：35℃；

- c) 进样量: 10 μL ;
d) 流动相: A: 0.1%甲酸溶液 (4.2.5); B: 乙腈 (4.2.2), 梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.2	80	20
0.5	0.2	80	20
3.0	0.2	20	80
3.5	0.2	20	80
3.6	0.2	80	20
5.0	0.2	80	20

4.5.3.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下:

- a) 电离方式: 电喷雾电离, 负离子模式 (ESI⁻);
b) 检测方式: 多反应监测 (MRM);
c) 毛细管电压: 2.5 kV;
d) 离子源温度: 150 $^{\circ}\text{C}$;
e) 脱溶剂温度: 500 $^{\circ}\text{C}$;
f) 脱溶剂气: 氮气 1000 L/h;
g) 多反应监测 (MRM) 离子对、锥孔电压及碰撞能量见表 2。

表2 待测物多反应监测 (MRM) 离子对、锥孔电压及碰撞能量的参考值

待测物名称	监测离子对 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)
二硝托胺	224.1>76.9	22	22
	224.1>181.1 ^a	22	10
^a 为定量离子对。			

4.5.3.3 标准系列溶液和试样溶液测定

在仪器的最佳条件下, 分别取二硝托胺标准系列溶液 (4.2.10) 和试样溶液 (4.5.2) 上机测定。标准溶液的定量离子对色谱图参见附录图A.1。

4.5.3.4 定性

在相同试验条件下, 试样溶液与标准系列溶液中二硝托胺的保留时间相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。根据表2选择的定性离子对, 比较试样谱图中二硝托胺定性离子对的相对离子丰度与浓度接近的标准系列溶液中对应的定性离子对的相对离子丰度, 若偏差不超过表3规定的范围, 则可判定为样品中存在二硝托胺。

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	>10~20	≤ 10
最大允许偏差/ (%)	± 20	± 25	± 30	± 50

4.5.3.5 定量

以二硝托胺标准溶液的浓度为横坐标，定量离子对的色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液与标准溶液中二硝托胺的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围时，应将试样溶液作相应稀释后重新测定。单点校准定量时，试样溶液中二硝托胺的浓度与标准溶液浓度相差不超过30%。

4.6 试验数据处理

试样中二硝托胺的含量以质量分数 w 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（1）计算；单点校准按公式（2）计算：

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2 \times V_4 \times 1000}{V_1 \times V_3 \times m} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中二硝托胺的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——净化后溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_4 ——氮吹后的最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——用于氮吹的净化溶液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

$$w = \frac{A \times \rho \times V \times V_2 \times V_4 \times 1000}{A_s \times V_1 \times V_3 \times m} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A ——试样溶液中二硝托胺的色谱峰面积；

ρ ——标准溶液中二硝托胺的浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——净化后溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_4 ——氮吹后的最终定容体积，单位为毫升（mL）；

A_s ——标准溶液中二硝托胺的峰面积；

V_1 ——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——用于氮吹的净化溶液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

1000——换算系数。

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。

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20%。

5 高效液相色谱法

5.1 原理

试样经氨化甲醇提取，中性氧化铝固相萃取净化后，用液相色谱仪检测，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 甲醇：色谱纯。

5.2.4 0.5%氨水甲醇溶液：取氨水 5 mL，用甲醇定容至 1 000 mL，混匀。

5.2.5 0.1%甲酸溶液：取甲酸 1 mL，用水稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.6 甲酸-乙腈溶液：取 0.1%甲酸溶液（5.2.5）800 mL，用乙腈（5.2.2）稀释至 1 000 mL，混匀。

5.2.7 标准储备溶液（1000 mg/L）：称取二硝托胺标准品（CAS：148-01-6，纯度不低于 98%）10 mg（精确至 0.01 mg），置于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（5.2.2）溶解并定容，混匀。于-18℃以下保存，有效期 3 个月。

5.2.8 标准中间溶液（25 mg/L）：准确移取标准储备溶液（5.2.7）0.25 mL，于 10 mL 容量瓶中，用乙腈（5.2.2）稀释、定容、混匀。于-18℃以下保存，有效期 1 个月。

5.2.9 标准系列溶液：准确移取适量标准中间溶液（5.2.8），用 0.1%甲酸溶液（5.2.5）和乙腈（5.2.2）稀释配制成浓度分别为 0.015 μg/mL、0.050 μg/mL、0.10 μg/mL、0.50 μg/mL、2.0 μg/mL 和 5.0 μg/mL 标准系列溶液。临用现配。

5.2.10 固相萃取柱：中性氧化铝柱，1 g/6 mL，或性能相当者。

5.2.11 微孔滤膜：0.22 μm，有机系。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱仪：配有紫外检测器/二极管阵列检测器。

5.3.2 离心机：转速不低于 8 000 r/min。

5.3.3 分析天平：感量 0.01 mg 和 0.01 g。

5.3.4 振荡器。

5.3.5 涡旋混合器。

5.3.6 固相萃取仪。

5.4 样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎使其全部通过0.425 mm孔径的分析筛，充分混匀，装入磨口瓶中，保存，备用。

5.5 试验步骤

5.5.1 提取

平行做两份试验。称取试样5 g（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为2 g），精确至0.01 g，置于50 mL塑料离心管中，准确加入20 mL（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为10 mL）氨水甲醇溶液（5.2.4），涡旋30 s，振荡提取40 min，于9 500 r/min离心3 min，移取上清液。残渣复提取1次，振荡20 min，离心后合并上清液。待净化。

5.5.2 净化

用5 mL甲醇（5.2.3）活化固相萃取小柱（5.2.10）。准确移取5 mL（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为2.5 mL）待净化溶液（5.5.1）过柱，用4 mL（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为2 mL）甲醇（5.2.3）洗脱，收集洗脱液，用甲醇（5.2.3）定容至10 mL（浓缩饲料和添加剂预混合饲料为5 mL），混合均匀。高效液相色谱仪分析时，取1 mL溶液过微孔滤膜（5.2.11）备用。超高效液相色谱仪分析时，准确移取1 mL溶液于45 °C下用氮气吹干，再准确加入1 mL甲酸-乙腈溶液（5.2.6）溶解残渣，涡旋混匀，过微孔滤膜（5.2.11），备用。

5.5.3 液相色谱参考条件

5.5.3.1 高效液相色谱参考条件

高效液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈柱，柱长250 mm，内径4.6 mm，粒度5 μm，或性能相当者。
- b) 柱温：35 °C。
- c) 检测波长：245 nm。
- d) 进样量：20 μL。
- e) 流动相：0.1%甲酸溶液（5.2.5）+乙腈（5.2.2）=80+20（V+V'）。

5.5.3.2 超高效液相色谱参考条件

超高效液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈柱，柱长100 mm，内径2.1 mm，粒度1.7 μm，或性能相当者。
- b) 柱温：35 °C。
- c) 检测波长：245 nm。
- d) 进样量：10 μL。
- e) 流动相：A：0.1%甲酸溶液（5.2.5）；B：乙腈（5.2.2），梯度洗脱程序见表4。

表4 超高效液相色谱法梯度洗脱程序

时间（min）	流速（mL/min）	A（%）	B（%）
0	0.2	80	20
0.5	0.2	80	20
4.0	0.2	65	35
5.5	0.2	30	70
6.0	0.2	30	70
6.1	0.2	80	20
8.0	0.2	80	20

5.5.4 测定

5.5.4.1 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（5.2.9）和试样溶液（5.5.2）上机测定。标准溶液的高效液相色谱图参见附录图A.2，超高效液相色谱图参见附录图A.3。

5.5.4.2 定性

以保留时间定性，试样溶液中二硝托胺保留时间应与标准系列溶液（浓度相当）中二硝托胺的保留时间一致，其相对偏差在±2.5%之内。

5.5.4.3 定量

以二硝托胺的浓度为横坐标，色谱峰面积（响应值）为纵坐标，绘制标准曲线，其相关系数应不低于 0.99。试样溶液中二硝托胺的浓度应在标准曲线的线性范围内。如超出范围，应将试样溶液用甲酸-乙腈溶液（5.2.6）稀释后，重新测定。单点校准定量时，试样溶液中二硝托胺的浓度与标准溶液浓度相差不超过 30%。

5.6 试验数据处理

试样中二硝托胺的含量以质量分数 w 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示。多点校准按公式（3）计算；单点校准按公式（4）计算：

$$w = \frac{\rho \times V \times V_2 \times V_4}{V_1 \times V_3 \times m} \dots\dots\dots (3)$$

式中：

ρ ——由标准曲线得到的试样溶液中二硝托胺的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——净化后溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_4 ——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

V_1 ——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——用于氮吹的净化溶液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

$$w = \frac{A \times \rho \times V \times V_2 \times V_4}{A_s \times V_1 \times V_3 \times m} \dots\dots\dots (4)$$

式中：

A ——试样溶液中二硝托胺的色谱峰面积；

ρ ——标准溶液中二硝托胺的质量浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V ——试样提取溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V_2 ——净化后溶液的定容体积，单位为毫升（mL）；

V_4 ——最终定容体积，单位为毫升（mL）；

A_s ——标准溶液中二硝托胺的峰面积；

V_1 ——用于净化的提取溶液体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——用于氮吹的净化溶液体积，单位为毫升（mL）；

m ——试样质量，单位为克（g）；

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。

5.7 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 20%。

附录 A

(资料性)

二硝托胺标准溶液定量离子色谱图和液相色谱图

二硝托胺标准溶液的定量离子色谱图见图A.1。

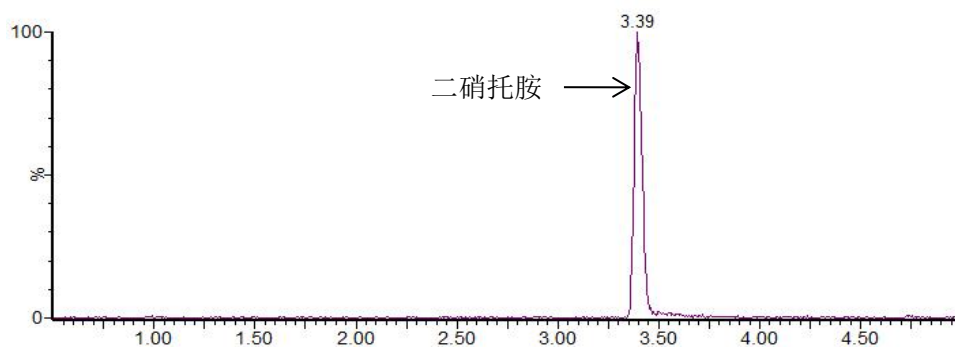


图 A.1 二硝托胺标准溶液 (0.002 mg/L) 液相色谱-串联质谱定量离子对色谱图

二硝托胺标准溶液的高效液相色谱图见图A.2。

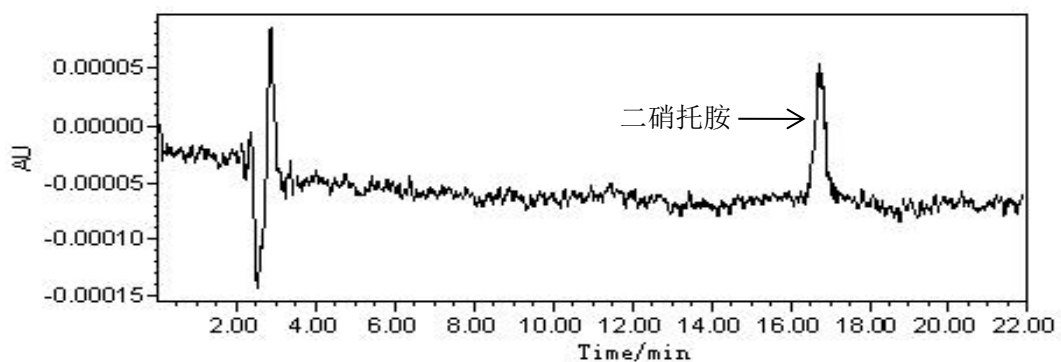


图 A.2 二硝托胺标准溶液 (0.015 mg/L) 高效液相色谱分析色谱图

二硝托胺标准溶液的超高效液相色谱图见图A.3。

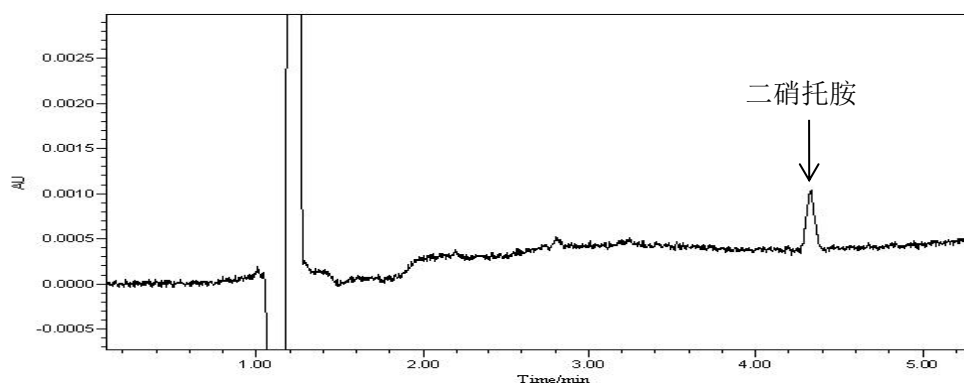


图 A.3 二硝托胺标准溶液 (0.015 mg/L) 超高效液相色谱分析色谱图