



中华人民共和国国家标准

GB/T 20363-202×

代替GB/T 20363-2006、GBT23741-2009

饲料中巴比妥类药物的测定

Determination of barbiturates in feeds

(公开征求意见稿)

20××-××-××发布

20××-××-××实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

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》的规定起草。

本文件代替 GB/T 20363—2006《饲料中苯巴比妥的测定》、GBT/23741—2009《饲料中四种巴比妥类药物的测定》，与 GB/T 20363—2006、GBT/23741—2009 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- a) 增加了液相色谱-串联质谱法（见第二法，2006年版）；
- b) 删除了 GC-MS 法（2006年版的4）；
- c) 适用范围中增加了精料补充料（见1，2006年版的1、2009年版的1）；
- d) 增加了检测药物种类为巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥（见1，2006年版的1、2009年版的1）；
- e) 更改了检出限和定量限：检出限为 0.025 mg/kg,定量限 0.05 mg/kg（见1，2006年版的1、2009年版的1）；
- f) 更改了 HPLC 法的原理（见 4.1，2006年版的 3.1、2009年版的 3）；
- g) 三氯甲烷提取改为乙腈提取（见 4.5.1 和 5.5.1，2006年版的 3.5.1、2009年版的 7.1）。
- h) 净化及浓缩改为固相萃取小柱净化（见 4.5.2 和 5.5.2，2006年版的 3.5.2）；
- i) 液相色谱-串联质谱法中，增加了同位素内标：苯巴比妥-d5 和异戊巴比妥-d5（5.2.5）
- j) 增加了附录 A（见附录 A）；
- k) 增加了附录 B（见附录 B）；
- l) 增加了附录 C（见附录 C）。

本文件及其所代替标准历次版本发布情况为：

——2006年首次发布为 GB/T 20363—2006；

——本次为第一次修订。

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这些专利的责任。

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：山东省畜产品质量安全中心、国粮武汉科学研究设计院有限公司[国家饲料质量检验检测中心（武汉）]、诺安实力可商品检验(青岛)有限公司。

本文件主要起草人：

饲料中巴比妥类药物的测定

1 范围

本文件描述了饲料中巴比妥、苯巴比妥、苯巴比妥钠、异戊巴比妥和司可巴比妥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、精料补充料、添加剂预混合饲料、混合型饲料添加剂以及植物提取物中巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥的测定。

本文件高效液相色谱法的检出限为0.5 mg/kg、定量限为1.0 mg/kg，液相色谱-串联质谱法的检出限为0.01 mg/kg、定量限为0.02 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

试样中的巴比妥类药物经乙腈提取，固相萃取柱净化，氮吹浓缩后，用高效液相色谱仪测定，外标法定量。

4.2 试剂或材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合GB/T 6682规定的一级水。

4.2.1 甲醇：色谱纯。

4.2.2 乙腈：色谱纯。

4.2.3 10 mmol/L 磷酸二氢钠溶液：准确称取 11.9 g 磷酸二氢钠，加水超声溶解，并定容至 1 L。

4.2.4 20%乙腈水溶液：乙腈+水=20+80。

4.2.5 巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥标准品：纯度≥99.0%。标准物质信息参见附录 C。

4.2.6 标准储备溶液：准确称取巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥标准品各 25 mg，分别用甲醇定容，定容至 25 mL，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液。2°C~8°C 保存，有效期三个月。

4.2.7 混合标准中间溶液：分别准确移取巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥贮备溶液 10 mL，用甲醇定容至 100 mL，配成浓度为 100 µg/mL 的标准中间液。2°C~8°C 冷藏保存，有效期 1 个月。

4.2.8 标准系列溶液：准确移取混合标准中间溶液适量，用 20%乙腈水溶液稀释定容，配制成浓度分别为 0.5 µg/mL、1 µg/mL、5 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL 和 50 µg/mL 的标准系列溶液。现用现配。

4.2.9 固相萃取小柱：CAPTIVA EMR-GPD 小柱，200 mg/6mL。或其它性能类似的小柱。

4.3 仪器设备

4.3.1 高效液相色谱仪：配有紫外检测器或二极管阵列检测器。

4.3.2 分析天平：精度 0.1 mg。

4.3.3 分析天平：精度 0.01 mg。

4.3.4 氮吹仪。

4.3.5 旋涡混合器。

4.3.6 固相萃取仪。

4.3.7 高速离心机：转速不低于 10 000 r/min。

4.3.8 微孔滤膜：0.22 µm，有机膜。

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

称取试样 2 g(精确至 0.0001 g)于 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 乙腈，涡旋 5 min，10 000 r/min 离心 5 min，上清液备用。

4.5.2 净化

加入 3 mL 水，涡旋 1 min。加入盐包，剧烈振荡 1 min，10 000 r/min 离心 5 min。取上清液 5 mL 过小柱(4.2.9)并挤干，收集滤液。将滤液在 40 °C氮吹至干，用 20%的乙腈水溶液 1 mL 复溶，涡旋 1 min，过膜，待测。

4.5.3 测定

4.5.3.1 高效液相色谱条件

a) 色谱柱：C18 柱长 150mm，内径 4.6 mm，粒径 2.7 µm。或其他效果等同的 C18 柱；

b) 柱温：30 °C；

c) 检测器：紫外检测器或二极管阵列检测器；

d) 检测波长：215 nm；

e) 流动相: A 相: 甲醇, B 相: 磷酸二氢钠溶液, 梯度洗脱程序见表 1;

f) 流速: 1.0 mL/min;

g) 进样量: 5 μ L。

表 1 梯度洗脱表

时间 (min)	A (甲醇)	B (磷酸二氢钠溶液)
0	15	85
3.0	15	85
4.5	25	75
22.0	27	73
22.5	80	20
26.5	80	20
27.0	15	85
30.0	15	85

4.5.3.2 定性

以保留时间定性, 试样溶液中巴比妥类药物的保留时间应与标准系列溶液中相对应的保留时间一致, 其相对偏差在 $\pm 2.5\%$ 之内。

4.5.3.3 定量

按照 4.6.1 给出的色谱参考条件, 分别上机测定标准系列溶液 (从低浓度到高浓度) 和试样溶液中待测化合物的响应值 (峰面积或峰高), 以标准工作液做单点或多点校准进行定量, 试样溶液中待测化合物的响应值应在标准工作曲线测定的线性范围内, 超出线性范围的则用 20% 的乙腈水溶液适当稀释后再进样分析。

4.1 试验数据处理

试样中巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥的含量以质量分数 ω_i 计, 数值以毫克每千克 (mg/kg) 表示, 按式(1)计算:

$$\omega_i = \frac{C \times V \times V_1 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \times n \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C——试样中巴比妥类药物色谱峰面积对应的浓度, 单位为微克每毫升 (μ g/mL);

V——加入提取液的体积, 单位为毫升 (mL);

V1——复溶液体积, 单位为毫升 (mL);

V2——过柱液体积, 单位为毫升 (mL);

m——试样的质量, 单位为克 (g);

n——上机测定的试样溶液超出线性范围后, 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 3 位有效数字。

4.2 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 10%。

5 液相色谱-串联质谱法

5.1 原理

试样中的巴比妥类药物经乙腈提取，固相萃取柱净化，液相色谱串联质谱仪测定，异戊巴比妥-d5和苯巴比妥-d5同位素内标法定量。

5.2 试剂或材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和符合GB/T 6682规定的一级水。

5.2.1 甲醇：色谱纯。

5.2.2 乙腈：色谱纯。

5.2.3 5 mmol/L 乙酸铵溶液：称取 0.1927g 乙酸铵，加水溶解，并定容至 500ml。

5.2.4 0.2%甲酸水溶液：取 0.2 mL 甲酸加入 100 mL 水中，混匀。

5.2.5 巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥标准品：纯度≥99.0%。标准物质信息参见附录 C。

5.2.6 同位素内标：苯巴比妥-d5 和异戊巴比妥-d5，纯度≥95.0%。

5.2.7 标准储备溶液：准确称取巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥标准品各 10 mg，分别用甲醇定容至 10 mL，配制成浓度为 1 mg/mL 的标准储备溶液。2°C~8°C冷藏保存，有效期三个月。

5.2.8 混合标准中间溶液 I：准确移取标准储备溶液 0.1 mL，用甲醇定容至 10 mL，配成浓度为 10 μg/mL 的标准中间液。2°C~8°C冷藏保存，有效期 1 个月。

5.2.9 混合标准中间溶液 II：准确移取标准储备溶液 0.1 mL，用甲醇定容至 10 mL，配成浓度为 100 ng/mL 的标准中间液。2°C~8°C冷藏保存，有效期 1 个月。

5.2.10 标准系列溶液：准确移取混合标准中间溶液 II 适量，用 0.2%甲酸水溶液稀释定容，配制成浓度分别为 0.01 μg/mL、0.05 μg/mL、0.1 μg/mL、0.2 μg/mL 和 0.5 μg/mL 的标准系列溶液。现用现配。

5.2.11 同位素内标储备溶液：准确称取苯巴比妥-d5 和异戊巴比妥-d5 内标各 10mg，用甲醇定容至 100 mL，配成浓度为 100 μg/mL 的内标储备溶液。2°C~8°C冷藏保存，有效期 1 个月。

5.2.12 同位素内标工作溶液：分别准确移取同位素内标储备溶液适量，用 0.2%甲酸水溶液稀释成 10 ng/mL 的内标工作溶液。现用现配。

5.2.13 固相萃取小柱：CAPTIVA EMR-GPD 小柱，200 mg/6mL。或其它性能类似的小柱。

5.3 仪器设备

5.3.1 液相色谱-串联质谱仪：带电喷雾离子源（ESI）。

5.3.2 分析天平：精度 0.1 mg。

5.3.3 分析天平：精度 0.01 mg。

5.3.4 氮吹仪。

5.3.5 旋涡混合器。

5.3.6 固相萃取仪。

5.3.7 高速离心机：转速不低于 10 000 r/min。

5.3.8 微孔滤膜：0.22 μm，有机膜。

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

称取试样 2 g(精确至 0.0001 g)于 50 mL 离心管中，准确加入 10 mL 乙腈，涡旋 5 min，10 000 r/min 离心 5 min，上清液备用。

5.5.2 净化

加入 3 mL 水，涡旋 1 min。加入盐包，剧烈振荡 1 min，10 000 r/min 离心 5 min。取上清液 5 mL 过小柱(5.2.13)并挤干，收集滤液。将滤液在 40 °C 氮吹至干，用 0.2% 的甲酸水溶液 1 mL 复溶，涡旋 1 min，过膜，待测。

5.5.3 测定

5.5.3.1 液相色谱参考条件

- a) 色谱柱：C18 柱长 100 mm，内径 2.1 mm，粒径 1.8 μm。或其他效果等同的 C18 柱；
- b) 柱温：40°C；
- c) 进样量：5 μL。
- d) 流速：0.2 mL/min；
- e) 流动相：A：5 mmol/L 乙酸铵溶液，B：乙腈，梯度洗脱程序见表 2。

表 2 梯度洗脱表

时间 (min)	A (乙酸铵溶液)	B (乙腈)
0.0	75	25
7.00	70	30
7.01	0	100
8.50	0	100
8.51	75	25
9.50	75	25

5.5.3.2 质谱参考条件

- a) 离子源：电喷雾离子源；
- b) 扫描方式：负离子扫描；
- c) 检测方式：多反应监测 (MRM)；
- d) 毛细管电压：3.5kV；
- e) 干燥气温度：350°C；
- g) 干燥气流速：8 L/min；
- h) 雾化气压力：40 psi；
- i) 监测离子对参数见表 3。

表3 4种苯巴比妥类药物监测离子参数

被测物名称	定性离子对 <i>m/z</i>	定量离子对 <i>m/z</i>	毛细管出口端电压 V	碰撞能量 eV
巴比妥	183.2>42.0	183.2>140.1	60	38
	183.2>140.0			17
苯巴比妥	231.0>42.1	231.0>85.1	60	42
	231.0>85.1			18
戊巴比妥	225.2>182.2	225.2>182.2	60	17
	225.2>42.1			42
异戊巴比妥	225.2>42.1	225.2>182.2	60	42
	225.2>182.2			17
司可巴比妥	237.1>42.1	237.2>194.2	60	44
	237.1>194.3			17
仲丁巴比妥	211.2>168.2	211.2>168.2	60	18
	211.2>42.1			38
苯巴比妥-d5	230.2>187.3	230.2>187.3	60	22
异戊巴比妥-d5	230.1>143.1	230.1>143.1	40	21

5.5.3.3 定性测定

在相同试验条件下，待测物在样品中的保留时间与标准工作液中的保留时间相对偏差在±2.5%之内，并且色谱图中定性离子对的相对丰度，与浓度接近的标准工作液中相应定性离子对的相对丰度进行比较，若相对偏差不超过表4规定的范围，则可判断为样品中存在对应的待测物。

表4 定性确证时相对离子丰度的最大允许误差

相对离子丰度 (%)	>50	>20~50	>10~20	≤10
允许的相对偏差 (%)	±20	±25	±30	±50

5.5.3.4 定量测定

在仪器最佳工作条件下，取标准系列溶液（从低浓度到高难度）和试样溶液分别上机测定，以待测化合物峰面积与苯巴比妥-d5和异戊巴比妥-d5峰面积的比值为纵坐标，待测化合物浓度为横坐标绘制标准工作曲线，对样品进行定量。试样溶液中待测化合物的响应值应在标准工作曲线测定的线性范围内。

5.6 试验数据处理

试样中巴比妥、苯巴比妥、戊巴比妥、异戊巴比妥、司可巴比妥和仲丁巴比妥的含量以质量分数 ω_i 计，数值以毫克每千克（mg/kg）表示，按式(2)计算：

$$\omega_i = \frac{C \times V \times V_1 \times 1000}{V_2 \times m \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

C——试样中待测化合物色谱峰面积与内标峰面积的比值对应的浓度，单位为微克每毫升（ $\mu\text{g/mL}$ ）；

V——加入提取液的体积，单位为毫升（mL）；

V1——氮吹至干后溶解残渣用 0.2%甲酸水溶液的体积，单位为毫升（mL）；

V2——过柱子溶液的体积，单位为毫升（mL）；

m——试样的质量，单位为克（g）。

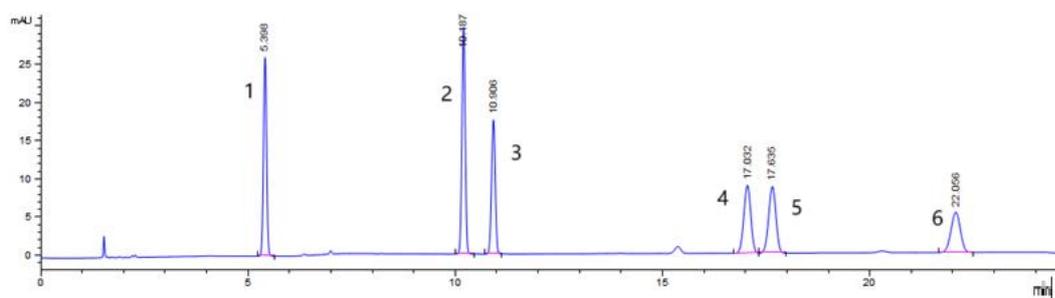
测定结果用平行测定的算术平均值表示，计算结果保留 3 位有效数字。

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 20%。

附录 A
(资料性)
巴比妥类药物标准溶液液相色谱图

巴比妥类药物标准溶液液相色谱图见图 A.1。



标引序号说明：

- 1—巴比妥；
- 2—苯巴比妥；
- 3—仲丁巴比妥；
- 4—戊巴比妥；
- 5—异戊巴比妥；
- 6—司可巴比妥。

图 A.1 巴比妥类药物标准溶液液相色谱图

附录 B
(资料性)
巴比妥类药物标准溶液 MRM 色谱图

巴比妥类药物标准溶液 MRM 色谱图见图 B.1。

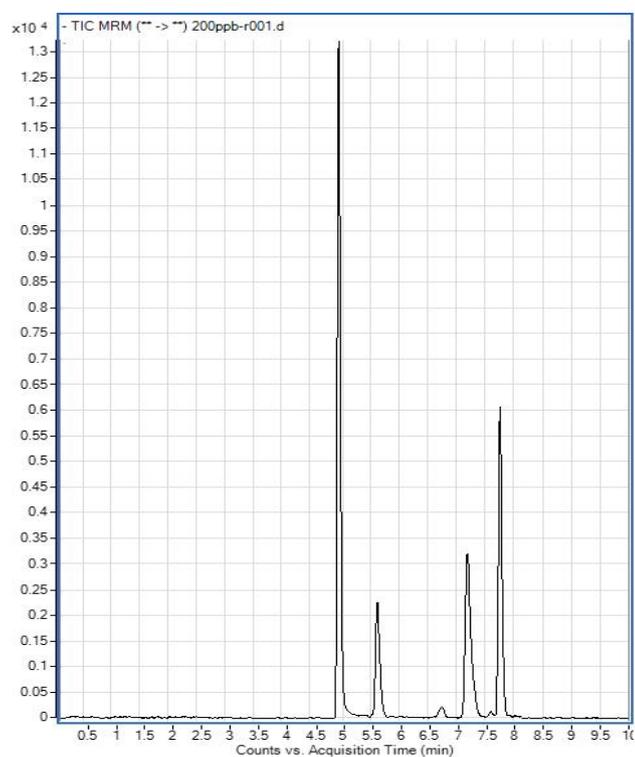
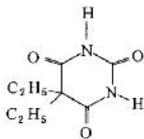
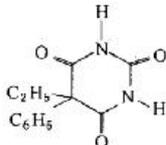
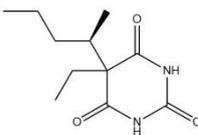
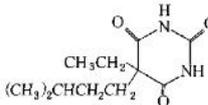
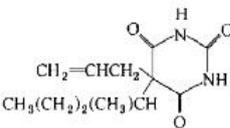
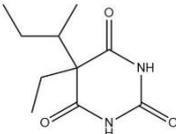
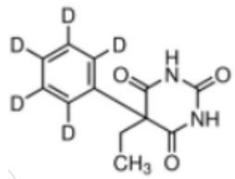
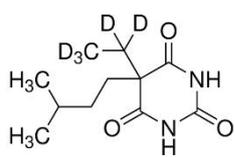


图 B.1 巴比妥类药物标准溶液 MRM 图

附录 C
(资料性)
标准物质基本信息

表 C.1 标准物质基本信息

英文名称	中文名称	CAS 号	结构式	分子式	相对分子量
Barbital	巴比妥	57-44-3		C ₈ H ₁₂ N ₂ O ₃	184.2
Phenobarbital	苯巴比妥	50-06-6		C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃	232.24
Pentobarbital	戊巴比妥	76-74-4		C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	226.27
Amobarbital	异戊巴比妥	57-43-2		C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃	226.27
Secobarbital	司可巴比妥	76-73-3		C ₁₂ H ₁₈ N ₂ O ₃	238.25
Butobarbital	仲丁巴比妥	125-40-6		C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃	212.25

Phenobarbital-d5	苯巴比妥-d5	73738-05-3		$C_{12}H_7D_5N_2O_3$	237.12
Amobarbital-d5	异戊巴比妥-d5	1190003-63-4		$C_{11}H_{13}D_3N_2O_3$	231.30