

中华人民共和国农业行业标准

NY/T ××××-202×

饲料中 10 种硝基呋喃类化合物的测定
液相色谱-串联质谱法

Determination of 10 nitrofurans in feeds — Liquid
chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

(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》的规定起草。

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：上海市质量监督检验技术研究院、上海市动物疫病预防控制中心（上海市兽药饲料检测所）。

本文件主要起草人：翁史昱、黄士新、秦宇、吴剑平、张斌骏、王承平、虞成华、王安琪、顾颖娟、王博、葛宇、曹莹、雷涛、严凤。

饲料中 10 种硝基呋喃类化合物的测定 液相色谱-串联质谱法

1 范围

本文件描述了饲料中10种硝基呋喃类化合物的液相色谱-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、添加剂预混合饲料和混合型饲料添加剂中硝呋醛肟、呋喃西林、呋喃唑酮、呋喃妥因、硝呋吡醇、硝呋齐特、呋喃苯烯酸钠、呋喃它酮、硝呋烯胺、硝呋索尔的测定。

本文件中硝呋醛肟、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃苯烯酸钠、硝呋烯胺、硝呋索尔的检出限为0.02 mg/kg，定量限为0.05 mg/kg；呋喃唑酮、硝呋吡醇、硝呋齐特、呋喃它酮的检出限为0.002 mg/kg，定量限为0.005 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 原理

试样中的硝基呋喃类化合物用乙腈提取，中性氧化铝粉末净化，液相色谱-串联质谱仪测定，基质匹配外标法定量。

5 试剂或材料

除非另有规定，仅使用分析纯试剂。

5.1 水：GB/T 6682，一级。

5.2 甲醇：色谱纯。

5.3 乙腈：色谱纯。

5.4 *N,N*-二甲基甲酰胺：色谱纯。

5.5 二甲亚砜：色谱纯。

5.6 乙腈溶液（50%，体积分数）：移取乙腈（5.3）50 mL 与水 50 mL（5.1），混匀。

5.7 标准品：10种硝基呋喃类标准品的纯度均不小于99%，具体分子式、分子量、CAS号和结构式见附录A。

5.8 标准储备溶液（1 mg/mL）：准确称取10种硝基呋喃类标准品各10 mg（精确至0.01 mg），分别置于10 mL棕色容量瓶中，其中硝呋醛肟、呋喃西林、呋喃唑酮、呋喃妥因、硝呋吡醇、硝呋齐特、硝呋索尔用乙腈（5.3）溶解并定容，呋喃它酮用甲醇（5.2）溶解并定容，硝呋烯腙用*N,N*-二甲基甲酰胺（5.4）溶解并定容，呋喃苯烯酸钠用二甲亚砜（5.5）溶解并定容，混匀。于-18℃下避光保存，有效期6个月。

5.9 混合标准工作溶液 I（10 mg/L）：分别准确移取呋喃唑酮、硝呋吡醇、硝呋齐特、呋喃它酮标准储备溶液（5.8）0.5 mL于50 mL棕色容量瓶中，用乙腈（5.3）稀释至刻度，混匀。于-18℃下避光保存，有效期6个月。

5.10 混合标准工作溶液 II（100 mg/L）：分别准确移取硝呋醛肟、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃苯烯酸钠、硝呋烯腙、硝呋索尔标准储备溶液（5.8）5 mL于50 mL棕色容量瓶中，用乙腈（5.3）稀释至刻度，混匀。于-18℃下避光保存，有效期6个月。

5.11 混合标准系列溶液：分别准确移取适量体积的混合标准工作液 I（5.9）和混合标准工作液 II（5.10）于棕色容量瓶中，用乙腈溶液（5.6）配置成呋喃唑酮、硝呋吡醇、硝呋齐特、呋喃它酮质量浓度分别为0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL，硝呋醛肟、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃苯烯酸钠、硝呋烯腙、硝呋索尔质量浓度分别为5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL的混合标准系列溶液。临用现配。

5.12 中性氧化铝粉末：粒径为40 μm~60 μm。

5.13 微孔滤膜：孔径为0.22 μm，有机系。

6 仪器设备

6.1 液相色谱-串联质谱仪：配有电喷雾（ESI）离子源。

6.2 分析天平：感量为0.01 g和0.01 mg。

6.3 离心机：转速不低于9 000 r/min。

6.4 涡旋混合器。

6.5 氮吹仪。

7 样品

按GB/T 20195制备样品，至少200 g，粉碎使其全部通过粒径为0.425 mm的分析筛，充分混匀，装入密闭容器中，避光保存，备用。选取类型相同，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。

8 试验步骤

注意：测定全过程，尽可能避光（或不在强光下）操作。

8.1 提取

平行做两份试验。称取试样 2 g（精确至 0.01 g），置于 50 mL 离心管中，加入 15 mL 乙腈（5.3）涡旋混匀。涡旋提取 20 min，9 000 r/min 离心 1 min，将上清液转移至 50 mL 棕色容量瓶中。重复提取两次，合并上清液，用乙腈（5.3）稀释并定容，涡旋混匀，备用。

8.2 净化

准确移取提取液（8.1）10 mL 于 15 mL 离心管中，加入 1.0 g 中性氧化铝粉末（5.12），涡旋 1 min，9 000 r/min 离心 1 min，准确移取上清液 5 mL 于 10 mL 刻度试管中，在室温下用氮气吹至小于 1 mL，用水定容至 2.0 mL，涡旋混匀，过微孔滤膜（5.12）滤液待测。

8.3 基质匹配标准系列溶液的制备

取空白试样，按 8.1 和 8.2 处理至氮气吹干，准确移取混合标准系列溶液（5.11）2.0 mL 溶解残余物，制得呋喃唑酮、硝呋吡醇、硝呋齐特、呋喃它酮质量浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL；硝呋醛肟、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃苯烯酸钠、硝呋烯踪、硝呋索尔质量浓度分别为 5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL 的基质匹配混合标准系列溶液。

8.4 测定

8.4.1 液相色谱参考条件

液相色谱参考条件如下：

- a) 色谱柱：C₁₈柱，内径 2.1 mm，柱长 100 mm，粒径 1.9 μm，或性能相当者；
- b) 流动相：A 相为水（5.1），B 相为乙腈（5.3），梯度洗脱程序见表 1；
- c) 流速：0.35 mL/min；
- d) 柱温：40 ℃；
- e) 进样量：2 μL。

表 1 梯度洗脱程序

时间 min	A 相 %	B 相 %
0.00	90	10
1.00	90	10
2.50	10	90
4.00	10	90
4.10	90	10
7.00	90	10

8.4.2 质谱参考条件

质谱参考条件如下：

- a) 离子源模式：电喷雾电离，正/负离子模式（ESI⁺/ESI⁻）；
- b) 检测方式：多反应监测（MRM）；
- c) 喷雾电压：3.0 kV；
- d) 离子源温度：150 ℃；
- e) 脱溶剂气流速：800 L/h；
- f) 锥孔气流速：150 L/h；
- g) 脱溶剂气温度：500 ℃。

多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压、碰撞能量的参考值及扫描模式见表2。

表 2 多反应监测（MRM）离子对、锥孔电压、碰撞能量的参考值及扫描模式

被测物名称	监测离子对 <i>m/z</i>	锥孔电压 V	碰撞能量 eV	扫描模式
硝呋醛肟	155.1 > 95.0 ^a	20	10	负离子
	155.1 > 81.1	20	10	
呋喃西林	199.3 > 182.1 ^a	40	10	正离子
	199.3 > 135.9	40	15	
呋喃唑酮	226.2 > 122.0 ^a	40	20	正离子
	226.2 > 139.0	40	15	
呋喃妥因	237.0 > 152.1 ^a	20	10	负离子
	237.0 > 193.9	20	15	
硝呋吡醇	247.2 > 154.1 ^a	40	15	正离子
	247.2 > 229.0	40	30	
硝呋齐特	276.1 > 121.1 ^a	40	20	正离子
	276.1 > 93.1	40	40	
呋喃苯烯酸钠	257.6 > 213.8 ^a	10	12	负离子
	257.6 > 184.0	10	18	
呋喃它酮	325.4 > 252.1 ^a	40	15	正离子
	325.4 > 281.0	40	25	
硝呋烯腙	361.4 > 180.0 ^a	40	20	正离子
	361.4 > 302.0	40	20	
硝呋索尔	366.0 > 210.9 ^a	40	20	正离子
	366.0 > 156.0	40	35	

^a为定量离子。

8.4.3 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（8.3）和试样溶液（8.2）上机测定。10种硝基呋喃类化合物基质匹配标准溶液的定量离子对色谱图见附录B。

8.4.4 定性

在相同试验条件下，试样溶液（8.2）与基质匹配标准溶液中待测物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，比较试样谱图中待测物定性离子的相对离子丰度与质量浓度接近的基质匹配标准系列溶液（8.3）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待测物。

表 3 定性测定时相对离子丰度最大允许偏差

单位为百分号

相对离子丰度	>50	>20~50	>10~20	≤10
最大允许偏差	±20	±25	±30	±50

8.4.5 定量

以基质匹配标准系列溶液质量浓度为横坐标，色谱峰面积为纵坐标，绘制标准曲线，标准曲线的相关系数应不低于0.99。试样溶液（8.2）与基质匹配标准溶液中待测物的响应值均应在仪器检测的线性范围内，如超出线性范围，应用空白基质溶液稀释（ f 倍）后重新测定分析。单点校准定量时，试样溶液（8.2）中待测物的质量浓度与基质匹配标准溶液的质量浓度相差不超过30%。

9 试验数据处理

试样中硝基呋喃类化合物含量 w_i 以质量分数计，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。

$$w_i = \frac{\rho_i \times V_1 \times V_3 \times f}{m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

ρ_i ——由标准曲线得到的试样溶液中硝基呋喃类化合物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_1 ——试样提取液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

f ——试样溶液中硝基呋喃类化合物的质量浓度超出标准曲线的线性范围后，进一步稀释的倍数；

m ——试样质量，单位为克（g）；

V_2 ——用于氮吹的试样提取液体积，单位为毫升（mL）；

1 000 ——换算系数。

$$w_i = \frac{A_i \times \rho_{is} \times V_1 \times V_3 \times f}{A_{is} \times m \times V_2 \times 1000} \dots\dots\dots (2)$$

式中：

A_i ——试样溶液中硝基呋喃类化合物的峰面积；

ρ_{is} ——标准工作溶液中硝基呋喃类化合物的质量浓度，单位为纳克每毫升（ng/mL）；

V_1 ——试样提取液定容体积，单位为毫升（mL）；

V_3 ——试样最终定容体积，单位为毫升（mL）；

f ——试样溶液中硝基呋喃类化合物的质量浓度超出标准溶液的质量浓度时，进一步稀释的倍数；

A_{is} ——标准工作溶液中硝基呋喃类化合物的峰面积；

m ——试样质量，单位为克（g）；

V_2 ——用于氮吹的试样提取液体积，单位为毫升（mL）；

1 000 ——换算系数。

10 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)

10 种硝基呋喃类化合物中文名、英文名、分子式、分子量、CAS 号和结构式

10 种硝基呋喃类化合物中文名、英文名、分子式、分子量、CAS 号和结构式见表 A.1。

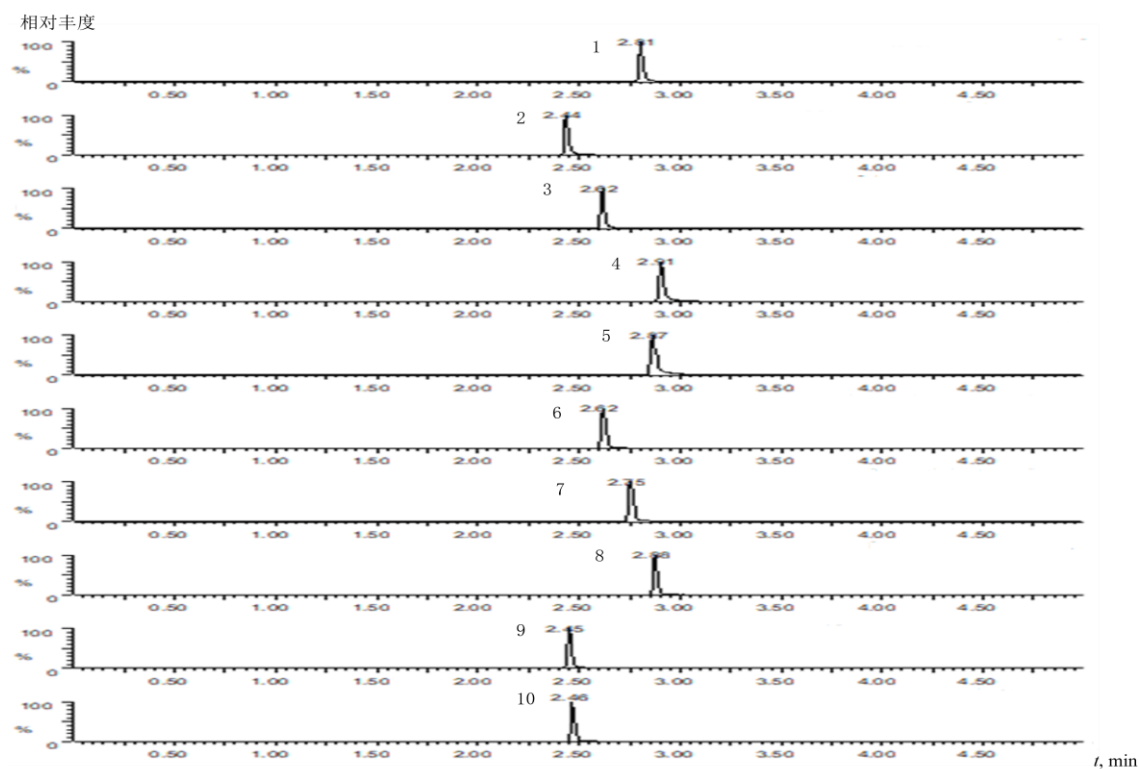
表 A.1 10 种硝基呋喃类化合物中文名、英文名、分子式、分子量、CAS 号和结构式

序号	中文名	英文名	分子式	分子量	CAS 号	结构式
1	硝呋醛肟	Nifuroxime	C ₈ H ₄ N ₂ O ₄	156.10	555-15-7	
2	呋喃西林	Nitrofurazone	C ₆ H ₆ N ₄ O ₄	198.14	59-87-0	
3	呋喃唑酮	Furazolidone	C ₈ H ₇ N ₃ O ₅	225.16	67-45-8	
4	呋喃妥因	Nitrofurantoin	C ₈ H ₆ N ₄ O ₅	238.16	67-20-9	
5	硝呋吡醇	Nifurpirinol	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O ₄	246.22	13411-16-0	
6	硝呋齐特	Nifuroxazide	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅	275.22	965-52-6	
7	呋喃苯烯酸钠	Nifurstylenate	C ₁₃ H ₁₀ NNaO ₅	283.21	54992-23-3	
8	呋喃它酮	Furaltadone	C ₁₃ H ₁₆ N ₄ O ₆	324.29	139-91-3	
9	硝呋烯腙	Nitrovin	C ₁₄ H ₁₂ N ₆ O ₆	360.28	804-36-4	
10	硝呋索尔	Nifursol	C ₁₂ H ₇ N ₅ O ₉	365.21	16915-70-1	

附录 B
(资料性)

10 种硝基呋喃类化合物混合标准溶液定量离子对色谱图

10 种硝基呋喃类化合物混合标准溶液定量离子对色谱图见图 B.1。



标引序号说明：

- 1——呋喃苯烯酸钠 (257.6>213.8)；
- 2——呋喃妥因 (237.0>152.1)；
- 3——硝呋醛肟 (155.1>95.0)；
- 4——硝呋索尔 (366.0>210.9)；
- 5——硝呋烯胺 (361.4>180.0)；
- 6——呋喃它酮 (325.4>252.1)；
- 7——硝呋齐特 (276.1>121.1)；
- 8——硝呋吡醇 (247.2>154.0)；
- 9——呋喃唑酮 (226.2>122.0)；
- 10——呋喃西林 (199.3>182.1)。

图B.1 10种硝基呋喃类化合物混合标准溶液定量离子对色谱图（硝呋醛肟、呋喃西林、呋喃妥因、呋喃苯烯酸钠、硝呋烯胺、硝呋索尔浓度为50 ng/mL，呋喃唑酮、硝呋吡醇、硝呋齐特、呋喃它酮浓度为5 ng/mL）。