

中华人民共和国国家标准

农业部 1486 号公告 —8— 2010

饲料中硝基呋喃类药物的测定 高效液相色谱法

Determination of nitrofurans in feeds—
High performance liquid chromatography

2010-11-16 发布

2010-11-16 实施



中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准遵照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国饲料工业标准化技术委员会(SAC/TC 76)归口。

本标准起草单位:中国农业大学动物医学院。

本标准起草人:沈建忠、张素霞、程林丽、江海洋、李建成、吴聪明、刘金凤。

饲料中硝基呋喃类药物的测定 高效液相色谱法

1 范围

本标准规定了饲料中 4 种硝基呋喃类药物含量的制样和高效液相色谱检测方法。

本标准适用于配合饲料、浓缩饲料和添加剂预混合饲料中呋喃西林、呋喃妥因、呋喃它酮和呋喃唑酮单个或多个药物含量的测定。

本标准的检测限：饲料中呋喃西林、呋喃妥因、呋喃它酮和呋喃唑酮均为 0.3 mg/kg。

本标准的定量限：饲料中呋喃西林、呋喃妥因、呋喃它酮和呋喃唑酮均为 1.0 mg/kg。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 分析实验室用水规则和试验方法

GB/T 14699.1 饲料 采样

GB/T 20195 动物饲料 试样的制备

3 方法原理

用乙腈提取试样中的硝基呋喃类药物，浓缩近干，用 2% 甲酸溶解，经混合型阳离子交换柱净化。高效液相色谱法测定，外标法定量。

4 试剂和材料

除非另有说明，在分析中仅使用确认为分析纯的试剂和 GB/T 6682 中规定的二级水。

4.1 乙腈：色谱纯。

4.2 甲醇：色谱纯。

4.3 甲酸：色谱纯。

4.4 氨水。

4.5 乙酸铵：色谱纯。

4.6 混合型阳离子交换柱：MCX 小柱或相当者，规格为 60 mg/3mL。

4.7 微孔滤膜：规格为 0.2 μm。

4.8 硝基呋喃类药物标准品：呋喃西林(Nitrofurazone)：纯度≥99%；呋喃妥因(Nitrofurantoin)：纯度≥99%；呋喃它酮(Furaltidone)：纯度≥99%；呋喃唑酮(Furazolidone)：纯度≥99%。

4.9 2% 甲酸：量取 2 mL 甲酸和 98 mL 水，混匀。

4.10 1% 氨水溶液：量取 1 mL 氨水和 99 mL 水，混匀。

4.11 固相萃取柱洗脱液：量取 1% 氨水溶液 30 mL 和甲醇 70 mL，混匀。

4.12 0.1 % 乙酸铵溶液：称取 1.0 g 乙酸铵，用水稀释定容至 1 L。

4.13 硝基呋喃类药物标准贮备液(200 μg/mL)：称取 4 种硝基呋喃类药物(4.8)各 0.02 g(精确到 0.000 1 g)于 4 个 100 mL 容量瓶中，加乙腈定容至刻度，超声溶解。4℃ 可以保存 6 个月。

4.14 硝基呋喃类药物混合标准贮备液(40 $\mu\text{g/mL}$):精密量取 200 $\mu\text{g/mL}$ 的 4 种硝基呋喃类药物标准贮备液(4.13)各 20 mL 于 100 mL 容量瓶中,用乙腈定容至刻度。4℃可以保存 6 个月。

4.15 混合标准工作液:分别移取适量 40 $\mu\text{g/mL}$ 混合标准贮备液(4.14)于 5 mL 容量瓶中,50℃氮气吹干,用 2%甲酸(4.9)定容至刻度,配制成 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、2 $\mu\text{g/mL}$ 、5 $\mu\text{g/mL}$ 和 20 $\mu\text{g/mL}$ 的系列标准工作液。4℃可以保存 1 周。

5 仪器和设备

- 5.1 实验室常用仪器、设备。
- 5.2 高效液相色谱仪,配二极管阵列检测器或紫外检测器。
- 5.3 天平:感量 0.01 g。
- 5.4 分析天平:感量 0.000 1 g。
- 5.5 涡旋混合器。
- 5.6 离心机。
- 5.7 旋转蒸发仪。
- 5.8 固相萃取装置。

6 采样与试样制备

按 GB/T 14699.1 的规定采集样品后,按 GB/T 20195 的规定取 1 kg 样品,四分法缩减取约 200 g,经粉碎,全部过 200 目孔筛,混匀装入磨口瓶中备用。

7 分析步骤

7.1 提取

称取配合饲料或浓缩饲料(2±0.02) g[或预混合饲料(1±0.01) g]于 100 mL 离心管中,加 50 mL 乙腈,涡动 1 min,65℃超声提取 15 min,每隔 5 min 手摇一次。3 800 r/min 离心 15 min。移取上清液 5 mL 于 100 mL 鸡心瓶中,50℃旋转蒸发至干。

7.2 净化

往鸡心瓶中加入 2%甲酸(4.12)5 mL,超声 2 min,接着涡动 1 min 使其充分溶解。将混合型阳离子交换柱安装于固相萃取装置上,依次用甲醇 3 mL、2%甲酸溶液 3 mL(4.12)活化。将样品液通过固相萃取柱,用水 3 mL 淋洗,抽真空 1 min。3 mL 固相萃取柱洗脱液(4.11)洗脱。上样溶液、淋洗液和洗脱液的流速均控制在不超过 1 mL/min。50℃氮气吹干,加 2%甲酸 1 mL 溶解残余物,过 0.2 μm 滤膜,供高效液相色谱测定。

7.3 测定

7.3.1 液相色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-3 色谱柱,长 250 mm,内径 4.6 mm,粒径 5 μm ,或相当者。

流动相:乙腈+0.05%乙酸铵,梯度洗脱;梯度洗脱条件见表 1。

表 1 液相色谱梯度洗脱条件

时间, min	0.05%乙酸铵, %	乙腈, %
0	85	15
15	65	35
17	85	15
20	85	15

流速:1.0 mL/min。

检测波长:365 nm。

柱温:室温。

进样量:20 μ L。

7.3.2 液相色谱测定

分别取适量试样溶液和相应浓度的标准工作液,作单点或多点校准,以色谱峰面积积分值定量。标准工作液及试样液中硝基呋喃类药物的响应值均应在仪器检测的线性范围之内,试样液进样测定过程中应参插标准工作液,以便准确定量。试样液浓度不在线性范围内时将样品稀释后进样。标准品液相色谱图参见附录 A。

8 结果计算

饲料中硝基呋喃类药物的含量 X_i ,以质量分数(mg/kg)表示,按式(1)计算:

$$X_i = \frac{C_i \times V \times n}{m} \dots\dots\dots (1)$$

式中:

C_i ——上机试样液中对应的硝基呋喃类药物的浓度,单位为微克每毫升(μ g/mL);

V ——上机试样液总体积,单位为毫升(mL);

n ——稀释倍数;

m ——试样质量,单位为克(g)。

测定结果用平行测定后的算术平均值表示,保留三位有效数字。

9 重复性

在重复性条件下完成的两个平行测定结果的相对偏差不大于 15%。

附 录 A
(资料性附录)
标准溶液色谱图

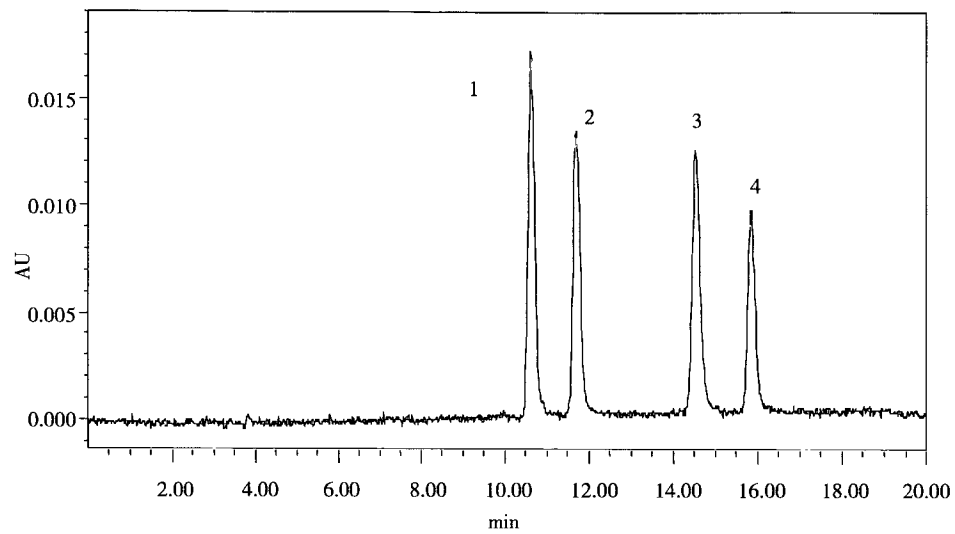


图 A.1 2 $\mu\text{g/mL}$ 硝基呋喃类药物标准溶液色谱图
(1 呋喃西林; 2 呋喃妥因; 3 呋喃唑酮; 4 呋喃它酮)